

ارزیابی سطوح پروفایل لیپیدی و LDL اکسید شده در فنوتیپ‌های مختلف آنزیم پاراکسوناز در بیماران مبتلا به دژنراسانس وابسته به سن ماکولای مرطوب

امیر قربانی حق جو: استاد، مرکز تحقیقات دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

علیرضا جواد زاده: استاد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

*الهام بحرینی: استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (*نویسنده مسئول). bahreini.e@iums.ac.ir

محمد برجی: دانشجوی دکتری، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

زهرا حصاری: دانشجوی دکتری، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۹

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: عدم تعادل بین عوامل اکسیداتیو و آنتی اکسیدان‌ها یکی از پیش زمینه‌های مهم در بروز بیماری دژنراسانس وابسته به سن ماکولای مرطوب (ARMD مرطوب) است. هدف این مطالعه تعیین فنوتیپ‌های پاراکسوناز و بررسی سطوح پروفایل‌های لیپیدی در فنوتیپ‌های مختلف است. **روش کار:** از مجموع ۹۰ بیمار، ۴۵ بیمار مبتلا به ARMD مرطوب و ۴۵ فرد سالم تحت نظر پزشک متخصص انتخاب شدند. فعالیت پاراکسوناز در مقابل سوبسترهای پاراکسون و فنیل استات سنجش شد. پروفایل لیپیدی و LDL اکسید شده به ترتیب با روش‌های رنگ سنجی و الایزا اندازه‌گیری شد. **یافته‌ها:** سه فنوتیپ AA با فعالیت آنزیمی پایین، AB با فعالیت آنزیمی متوسط و BB با آنزیمی بالا مشخص شد. اختلاف معناداری در توزیع فنوتیپ‌های پاراکسوناز بین بیماران ARMD مرطوب در مقایسه با افراد سالم وجود داشت ($\chi^2=6/17, P=0/01$). میانگین سطوح OX-LDL در سه فنوتیپ پاراکسوناز ($P < 0/05$) و نسبت OX-LDL/HDL در فنوتیپ‌های AA و AB در بیماران نسبت به افراد سالم بالاتر بود (به ترتیب $P=0/001$ و $P=0/01$). تفاوت معناداری در سطوح OX-LDL بین فنوتیپ‌های پاراکسوناز بیماران ($P=0/7$) دیده نشد. **نتیجه‌گیری:** با توجه به مولتی فاکتوره بودن ARMD مرطوب، سطوح افزایش یافته OX-LDL و OX-LDL/HDL بعنوان بیومارکرهای استرس اکسیداتیو و فنوتیپ‌های ضعیف و متوسط PON1 به پیشرفت بیماری کمک می‌کند. با توجه به وجود فنوتیپ قوی PON1 در جمعیت کمی از این بیماران، نقش اکسیداتیو عوامل موثر دیگر نیز در این بیماری قابل بررسی است.

کلیدواژه‌ها: پروفایل لیپیدی، LDL اکسید شده، در فنوتیپ، پاراکسوناز، دژنراسانس وابسته به سن ماکولای مرطوب

مقدمه

استرس اکسیداتیو، ایسکمی، پیری اپیتلیوم پیگمانته شبکیه و التهاب ریسک فاکتورهای اصلی در بروز و پیدایش ARMD مرطوب هستند (۴، ۵). با توجه به وابسته به سن بودن بیماری ARMD مرطوب و نتایج مطالعات قبلی مبنی بر افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و فرآورده‌های حاصل از اکسیداسیون با افزایش سن، اهمیت بررسی تأثیر استرس اکسیداتیو در تغییر ساختار ناحیه ماکولا اجتناب‌ناپذیر است. فاکتورهای اکسیدان و آنتی‌اکسیدان متعدد و مرتبطی در بدن وجود دارد که ممکن است همراه با عوامل ژنتیک در پیشبرد بیماری نقش داشته باشند (۶).

بیش از ۵۰ سال قبل متوجه شدند که سرم انسان قادر به هیدرولیز پاراکسون، ترکیبات ارگانو فسفات‌ها موجود در حشره‌کش‌ها می‌باشد. آنزیم کاتالیز کننده این

بیماری دژنراسانس وابسته به سن ماکولا (ARMD) یکی از علل شایع نابینایی در بین سالمندان بالای ۵۰ سال است. در این بیماری ناحیه ماکولای شبکیه دچار تحلیل، آتروفی و در مواردی خونریزی می‌شود. ARMD بر دو نوع است: نوع خشک و نوع مرطوب (۱). هرچند نوع خشک شیوع بیشتری دارد اما نوع مرطوب (ARMD مرطوب) عامل بیش از ۸۰٪ نابینایی در بین جمعیت این بیماران می‌باشد (۲). مشخصه نوع مرطوب یا نئوواز کولار رشد غیرطبیعی عروق مشیمیه‌ای جدید همراه با خونریزی و نشت سرروز است. زخم ناشی از این عروق خونی باعث آسیب غیرقابل برگشت فتورسپتورها و در صورت عدم درمان، از دست رفتن سریع بینایی می‌شود (۳). عوامل ژنتیکی،

foam cells مرحله ای کلیدی در شروع آترواسکلروزیس است. PON1 با ممانعت از تغییرات اکسیداتیو LDL و با تخریب لیپیدهای اکسید شده آن، از تحریک پاسخهای التهابی در سلولهای دیواره آرتیوولی جلوگیری می کند. بنابراین فعالیت پایین PON1 پلاسما ارتباط مستقیمی با بیماریهای قلبی-عروقی دارد (۱۴، ۱۵). بسیاری از تحقیقات این فرایند را ناشی از اثر استیل هیدرولازی PON1 دانسته اند. شرایط پاتوفیزیولوژیکی مرتبط با افزایش استرس های اکسیداتیو و فاکتورهای محیطی فعالیت پاراکسونازی سرم را کاهش می دهد. مطالعه حاضر نقش آنزیم پاراکسوناز و فنوتیپهای آن را بعنوان یک آنتی اکسیدان داخلی و تغییرات سطوح لیپیدی در بیماری ARMD مرطوب مورد ارزیابی قرار می دهد؛ عواملی که در بروز بیماریهای عروقی بسیار مطرح هستند.

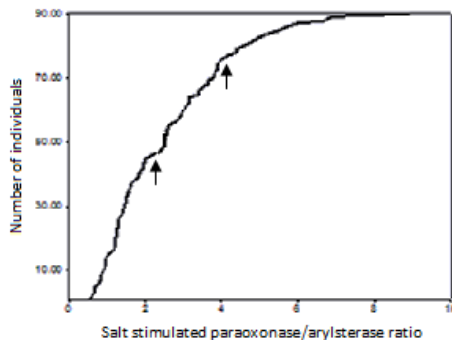
روش کار

مطالعه مورد - شاهدهی حاضر در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تبریز انجام شد. افراد مورد مطالعه، از بین مراجعه کنندگان به کلینیک چشم پزشکی نیکوکاری تبریز و در محدوده سنی ۵۰ تا ۸۰ سال انتخاب شدند. گروههای مورد مطالعه شامل ۴۵ بیمار مبتلا به ARMD مرطوب و ۴۵ فرد سالم به عنوان شاهد بودند. از ورود افراد با سابقه دیابت، سکت، نارسایی کلیوی و یا کبدی، فشار خون کنترل نشده و سیگارپها و نیز افرادی که سابقه مصرف فرآوردههای آنتی اکسیدان را داشتند به مطالعه حاضر جلوگیری شد.

پس از تحمل ناشتایی شبانه، از تمامی افراد واجد شرایط ۱۰ میلی لیتر خون اخذ شد و پس از سانتریفوژ در دور پایین و جداسازی سریع سرم و پلاسما، آزمایشات اولیه از قبیل سنجش قند، اوره، کراتینین و فعالیت آمینوترانسفرازها (جهت اطمینان از عدم ورود افراد دیابتی و مبتلایان به نارسایی کلیه و یا کبدی به مطالعه حاضر) و همچنین سطح سرمی تری گلیسرید، کلسترول و HDL-C با استفاده از اتوآنالایزر و استفاده از کیت های تجارتي استاندارد (پارس آزمون) اندازه گیری شد. مقادیر LDL-C با معادله Friedewald سنجیده شد (۱۶). جهت انجام آزمایشات بعدی، باقیمانده نمونه ها در دمای 70°C - نگهداری شدند. سنجش فعالیت آنزیم های پاراکسوناز و آریل استراز:

واکنش را پاراکسوناز (PON) نامیدند و تحت عنوان پاراکسوناز ۱ (PON1) معروف شد (۷). گلیکوپروتئین و نوعی آروماتیک استراز سرمی است متشکل از ۳۵۴ اسید آمینه با وزن ملکولی ۴۳kDa و در کبد سنتز می شود. در جایگاه فعال این آنزیم، دو یون کلسیم به صورت فوقانی (Ca1) و تحتانی (Ca2)، یک یون فسفات و یک ملکول آب وجود دارد. Ca1 نقش کاتالیتیک و Ca2 نقش ساختمانی دارد و جدا کردن آن باعث دناتوره شدن آنزیم می شود. گلیکوزیله بودن ضرورتی برای فعالیت های هیدرولیتیک آن ندارد، بلکه در افزایش حلالیت و ثبات، و نیز ممانعت در اتصال غیر اختصاصی به غشاهای پلاسمایی نقش دارد. این آنزیم از انتهای آمین خود به apoA-I متصل و همراه با HDL در پلاسما حمل می شود و با غلظتی بسیار کمتر از پلاسما در سایر بافت ها نیز وجود دارد (۸، ۹). مطالعات *in vitro* سوبستراهای متنوعی از جمله پاراکسون و فنیل استات برای این آنزیم مشخص شده است. پلی مورفیسم های متعددی برای PON1 تعیین شده است (۸). طبق مطالعات قبلی، پلی مورفیسم ها نسبت به سوبسترای پاراکسون تنوع فعالیت PON1 نشان می دهند، اما نسبت به سوبسترای فنیل استات کارایی یکسانی نشان می دهند و آنزیم پلی مورفیسمی در این ارتباط نشان نمی دهد. بنابراین فعالیت آنزیم را با سرعت هیدرولیز سوبسترای پاراکسون (پاراکسونازی)، و غلظت آن را با سرعت هیدرولیز فنیل استات (آریل استرازی) می سنجند. تعیین این فعالیت نشان داده است که سطح سرمی پاراکسوناز از فردی به فرد دیگر فرق می کند اما در هر فردی نسبتاً ثابت است (۱۰، ۱۱).

نقش های فیزیولوژیکی متنوعی را به PON1 نسبت داده اند از قبیل فعالیت فسفولیپازی A2 در هیدرولیز فاکتور فعال کننده پلاکتی (PUFA) و فسفولیپیدهای اکسید شده که نتیجه آن حفظ لیپوپروتئینها و غشاهای پلاسمایی از آسیب انواع اکسیژن فعال (ROS) می باشد (۱۲، ۱۳). فعالیت آنتی آترواسکلروزی PON1 وابسته به HDL است. HDL دو نقش مهم دارد: واسطه خروج کلسترول بویژه از فوم سلهای ماکروفاژی در آسبیه های آترواسکلروزی و کاهش اکسیداسیون لیپیدی در LDL. بنابراین PON1 مسئول اثرات ضد آترومی HDL است. اکسیداسیون LDL و برداشت OX-LDL توسط رسپتورهای scavenger و تشکیل



شکل ۱- توزیع نسبت فعالیت پاراکسونازی تحریک شده با NaCl به فعالیت آریل استرازای در کل افراد مورد مطالعه

apolipoprotein B antibody نشاندار اضافه می‌شود. بعد از آنکو باسیون و شستشوی مجدد کنژوگه موجود در میکروپلیت با اضافه کردن 3,3,5,5-tetramethylbenzidine (TMB) مشخص شده و با اضافه کردن اسید واکنش متوقف می‌شود. در طول موج 450nm جذب نمونه‌ها اندازه گیری می‌شود.

روش اندازه گیری HDL: HDL با کیت پارس آزمون به روش آنزیمی اندازه گیری شد. در این روش پس از افزودن محلول رسوب دهنده به سرم، مخلوط فوق سانتریفوژ می‌شود. محلول رویی را جدا و با اتوانالایزر غلظت HDL در طول موج 520nm اندازه گیری می‌شود.

روش اندازه گیری Apo A1: با استفاده از کیت پارس آزمون، به روش ایمنوتوربیدومتری توسط Anti-human apolipoprotein A1 antibody و استفاده از دستگاه اتوانالایزر در طول موج 340nm و دمای 37°C اندازه گیری شد.

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: تحلیل آماری مطالعه فوق با استفاده از نرم افزار آماری SPSS انجام شد. اطلاعات بدست آمده از گروه‌های مورد مطالعه با آزمون آماری Student's t test و Mann-Whitney U test مورد آنالیز قرار گرفتند. فراوانی فنوتیپ‌های PON1 در بیماران و گروه مورد مطالعه با chi-square test سنجیده شد. P-value < 0/05 از نظر آماری معنی دار تلقی گردید و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد.

یافته‌ها

مقایسه ویژگی‌های بالینی افراد شرکت کننده: جدول

فعالیت پاراکسونازی PON1 با روش اصلاح شده Eckerson با استفاده پاراکسون (Diethyl p-nitrophenylphosphate, Sigma Chemical Co.) بعنوان سوبسترا سنجیده شد (۱۷). سرعت هیدرولیز پاراکسون با آزاد سازی p-nitrophenol در طول موج 405nm با دستگاه اسپکتروفوتومتر و در دمای 37°C، در دو مرحله، به صورت فعالیت پایه (بدون NaCl) و فعالیت تحریک شده با NaCl یک مولار اندازه گیری شد. فعالیت PON1 بر اساس واحد بین المللی U/ml عبارتست از یک واحد از آنزیم که ۱ پاراکسون را در یک دقیقه هیدرولیز کند.

فعالیت آریل استرازای PON1 با استفاده از فنیل استات (Merck-Schuchardt, Munich, Germany) بعنوان سوبسترا سنجیده شد. چون فنیل استات یک آریل استر است به روشی که از فنیل استات برای سنجش فعالیت PON1 استفاده شد Arylesterase assay می گویند. سرعت هیدرولیز این سوبسترا به فنیل و استات و سنجش غلظت فنیل با اسپکتروفوتومتر در طول موج 270 nm و 37°C تعیین شد. فعالیت آریل استرازای در مورد فنوتیپ های مختلف یکسان است. یک واحد فعالیت آریل استرازای معادل هیدرولیز یک میکرومول فنیل استات در دقیقه می‌باشد و برحسب U/L سرم بیان می‌شود.

تعیین فنوتیپ: PON1 با روش دو سوبسترای انجام شد. برای این منظور فعالیت پاراکسونازی تحریک شده با NaCl را بر فعالیت آریل استرازای تقسیم می‌شود. نموداری برحسب افزایش این نسبت در افراد رسم می‌شود. این نمودار دارای دو نقطه عطف می‌باشد. درمرز این نقاط فنوتیپها از هم جدا و در سه محدوده قرار می گیرند؛ به ترتیب AA (با فعالیت پایین)، AB (با فعالیت متوسط) و BB (با فعالیت بالا)

روش اندازه گیری OX-LDL: برای اندازه گیری OX-LDL از کیت Mercodia Oxidized LDL Two-site enzyme و روش ELISA immunoassay استفاده شد. در این تکنیک از دو آنتی بادی مونوکلونال، علیه شاخصهای آنتی ژنی آپولیپوپروتئین B اکسیدشده روی LDL استفاده می‌شود. پس از کوپل شدن OX-LDL موجود در نمونه با آنتی بادی های کوت شده در کف چاهک و خارج کردن ترکیبات اضافه با شستشو، anti-human

PON1، اختلاف معنی‌داری بین دو گروه مورد مطالعه وجود داشت، ($P = 0.01$, chi-square=). طبق جدول ۲، فنوتیپ AA در بین بیماران ماکولای مرطوب نسبت به گروه کنترل فراوانی بیشتری داشت، (%۶۲/۲ در مقابل %۳۵/۶)، در حالی‌که فنوتیپ‌های AB و BB در گروه کنترل فراوانتر از گروه بیمار بودند: به ترتیب (%۴۶/۷ در مقابل %۲۸/۹ و %۱۷/۸ در مقابل %۸/۹).

همانطور که جدول ۳ نشان می‌دهد، فعالیت PON1 نسبت به پاراکسون به ترتیب در فنوتیپ‌های $AA < AB < BB$ افزایش می‌یابد. در حضور NaCl، فعالیت PON1 بطور قابل توجهی افزایش یافت. در حالی‌که در بین فنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌داری در فعالیت آریل استرازی PON1 نسبت به سوبسترای فیل استات مشاهده نشد ($P > 0.05$). در داخل هر فنوتیپی تفاوت معنی‌داری در فعالیت PON1 (پاراکسونازی و آریل استرازی) بین دو گروه بیمار و کنترل وجود نداشت ($P > 0.05$).

۱ ویژگی‌های بالینی افراد شرکت کننده را نشان می‌دهد. تفاوت معنی‌داری در توزیع سن و جنس بین گروه بیمار (۲۸ زن و ۱۷ مرد با متوسط سنی 71 ± 7 سال) و گروه کنترل (۲۸ زن و ۱۷ مرد با متوسط سنی 69 ± 5) وجود نداشت. به استثنای LDL و کلسترل ($P < 0.05$) و نیز (Best corrected BCVA ($P < 0.05$) و visual acuity ($P = 0.01$))، در مورد سایر پارامترهای بالینی و پایه اختلاف آماری معنی‌داری بین دو گروه مورد مطالعه مشاهده نشد ($P > 0.05$).

مقایسه فنوتیپ‌های PON1 بین دو گروه بیمار و کنترل: مطابق شکل ۱، نسبت بدست آمده از تقسیم فعالیت تحریک شده PON1 با NaCl بر فعالیت آریل استرازی، توزیع سه گانه‌ای را در جمعیت مورد مطالعه نشان می‌دهد. افراد با نسبت کمتر از ۰/۰۲ بعنوان فنوتیپ AA ($n=44$) فعالیت ضعیف، با نسبت ۲/۰۱ - ۴/۲ بعنوان فنوتیپ AB ($n=34$) فعالیت متوسط و بیشتر از ۴/۲۱ بعنوان فنوتیپ BB ($n=16$) فعالیت قوی در نظر گرفته شدند. در توزیع سه فنوتیپ

جدول ۱- اطلاعات دموگرافیک گروه بیماران و گروه کنترل

Parameters	Patients (mean \pm SD)	Controls (mean \pm SD)	p*
Number /Sex	45/(18M, 27 F)	45/(18M, 27 F)	-
Age (year)	71 \pm 7	69 \pm 5	> 0.1
BCVA	1.18 \pm 0.36	0.10 \pm 0.07	< 0.001
Pseudophacia	34	29	-
BMI (g/m ²)	25.3 \pm 3.8	27.3 \pm 5.6	> 0.1
Systolic pressure (mmHg)	129.8 \pm 20	124.4 \pm 7.2	> 0.1
Diastolic pressure (mmHg)	77.5 \pm 10	82.5 \pm 8.1	> 0.1
Glucose (mg/dl)	88.0 \pm 13	85.2 \pm 14.9	> 0.5
Urea (mg/dl)	32.3 \pm 7.2	34.3 \pm 6.1	> 0.1
Creatinine (mg/dl)	1.0 \pm 0.2	1.08 \pm 0.18	> 0.1
Triglycerides (mg/dl)	144.5 \pm 63.8	153.7 \pm 49.5	> 0.4
Cholesterol (mg/dl)	204.0 \pm 39.5	181.1 \pm 36.3	< 0.005
HDL (mg/dl)	43.1 \pm 5.0	44.2 \pm 6.3	> 0.3
LDL (mg/dl)	131.6 \pm 40.2	105.1 \pm 35.3	< 0.001

BCVA = Best corrected visual acuity, BMI = Body Mass Index HDL = High-Density Lipoprotein, LDL = Low-density lipoprotein, OX-LDL = oxidized LDL, *Independent-sample T test

جدول ۲- توزیع فنوتیپ‌ها بین گروه بیمار و گروه کنترل

	AA N(%)	AB N(%)	BB N(%)
Patients	28 (62.2%)	13 (28.9%)	4 (8.9%)
Controls	16 (35.6%)	21 (46.7%)	8 (17.8%)

AA = low-activity phenotype, AB = intermediate-activity phenotype, BB = high-activity phenotype
N: number of individuals

جدول ۳- مقایسه فعالیت‌های پاراکسونازی و آریل استرازی بین دو گروه بیمار و کنترل

Enzymes	Phenotypes	Patients	Controls	p*
		(Mean ± SD)	(Mean ± SD)	
Paraoxonase (U/ml)	AA	40.91 ± 17.8	43.14 ± 18.0	0.7
	AB	113.41 ± 28.2	110.50 ± 29.6	0.4
	BB	174.18 ± 15.4	201.18 ± 70.6	0.6
Paraoxonase + NaCl (U/ml)	AA	84.25 ± 34.4	96.08 ± 41.5	0.3
	AB	260.15 ± 75.6	230.37 ± 71.2	0.2
	BB	384.88 ± 42.2	479.91 ± 127.9	0.1
Arylesterase (kU/l)	AA	66.73 ± 16.2	72.56 ± 17.7	0.2
	AB	77.90 ± 15.9	73.80 ± 21.4	0.5
	BB	76.44 ± 4.7	81.57 ± 21.3	0.3

*Mann-Whitney U test

جدول ۴- پروفایل لیپیدی سرم بیماران و کنترل در فنوتیپ‌های PON1

Parameters	Phenotypes	Patients	Controls	p*
		(Mean ± SD)	(Mean ± SD)	
HDL (mg/dl)	AA	42.29 ± 4.6	41.38 ± 4.9	0.5
	AB	44.77 ± 5.0	44.52 ± 4.4	0.9
	BB	43.00 ± 8.0	49.12 ± 9.9	0.4
Apolipoprotein A1 (mg/dl)	AA	137.18 ± 18.7	139.94 ± 5.2	0.9
	AB	145.08 ± 21.8	138.76 ± 14.1	0.4
	BB	134.75 ± 14.0	142.12 ± 15.5	0.9
Cholesterol (mg/dl)	AA	201.86 ± 40.9	179.56 ± 31.1	0.04
	AB	211.54 ± 39.8	180.29 ± 42.7	0.04
	BB	208.75 ± 23.9	184.75 ± 24.8	0.5
Triglyceride (mg/dl)	AA	139.25 ± 55.3	164.56 ± 45.7	0.06
	AB	168.69 ± 81.0	153.57 ± 49.2	0.7
	BB	102.50 ± 28.7	132.12 ± 56.7	0.3
LDL (mg/dl)	AA	131.72 ± 40.1	105.28 ± 29.4	0.02
	AB	133.00 ± 46.1	105.05 ± 44.6	0.06
	BB	131.50 ± 22.2	109.20 ± 22.2	0.1
OX-LDL (mU/l)	AA	53.16 ± 14.2	37.79 ± 11.3	0.001
	AB	52.04 ± 15.2	39.22 ± 11.2	0.01
	BB	46.02 ± 1.1	35.07 ± 9.1	0.02
OX-LDL/HDL	AA	1.28 ± 0.42	0.93 ± 0.33	0.001
	AB	1.18 ± 0.38	0.89 ± 0.30	0.01
	BB	1.05 ± 0.21	0.76 ± 0.31	0.1

*Mann-Whitney U test

توتال کلسترول ($P = 0.04$ ، در هر دو مورد) و میانگین سطوح LDL (به ترتیب، $P = 0.02$ و $P = 0.06$) در بیماران بالاتر از گروه کنترل بود؛ اما در فنوتیپ BB، تفاوت معنی داری بین بیمار و کنترل در میانگین سطوح توتال کلسترول و LDL وجود نداشت (به ترتیب، $P = 0.01$ و $P = 0.05$). در هر سه فنوتیپ میانگین سطوح پلاسمایی OX-LDL در بیماران بطور معنی داری بالاتر از گروه کنترل بود، در حالیکه

مقایسه سطح سرمی پروفایل‌های لیپیدی در فنوتیپ‌های پاراکسوناز در گروه بیمار با گروه کنترل: جدول ۴ سطوح پروفایل لیپیدی را در فنوتیپ‌های PON1 بین گروه‌های بیمار و کنترل مقایسه می‌کند. در فنوتیپ‌های مشابه، تفاوت معنی داری در میانگین سطوح Apo A1، HDL و تری گلیسرید بین گروه‌های بیمار و کنترل وجود ندارد (در هر سه مورد، $P > 0.05$). در فنوتیپ‌های AA و AB، میانگین سطوح

این روش فنوتایپینگ، معیار کمی برای اثرات عملکردی PON1 در ارتباط با سوبسترهای مختلف می‌باشد و اطلاعات بیشتری نسبت به ژنوتیپ در ارتباط با فعالیت PON1 و احتمال بروز بیماری یا پاسخ به عوامل محیطی فراهم می‌کند (۲۲).

در مطالعه حاضر تغییرات وضعیت استرس اکسیداتیو براساس تغییرات سطوح OX-LDL و OX- LDL/HDL نسبت به تغییرات فعالیت PON1 در فنوتیپ‌های آن مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین احتمالاتی بررسی شد: اول اینکه آیا تفاوتی در توزیع فنوتیپ‌های PON1 بین بیماران E-ARMD و افراد سالم وجود دارد؟ آیا سطوح OX-LDL بعنوان عامل اکسیداتیو و نسبت OX-LDL/HDL بعنوان اندکس آنروژنیک (۲۳) ممکن است از جمله شاخص‌های اصلی آسیب اکسیداتیو در ناحیه ماکولا باشند؟ همچنین آیا تغییرات فعالیت PON1 ارتباط مستقیمی با سطوح OX-LDL و نسبت OX-LDL/HDL در این دسته از بیماران دارد؟

یافته اصلی این مطالعه توزیع متفاوت سه فنوتیپ PON1، یعنی AA، AB و BB، در بین بیماران نسبت به گروه کنترل بود. در گروه بیماران فنوتیپ AA با فعالیت ضعیف پاراکسونازی فراوانی بیشتری نسبت به گروه کنترل داشت، در حالیکه فراوانی فنوتیپ‌های AB و BB با فعالیت پاراکسونازی متوسط تا قوی در بین افراد سالم بیشتر از افراد بیمار بود. همچنین میزان بالای OX-LDL و OX-LDL/HDL در هر سه فنوتیپ PON1 بیماران نسبت به افراد کنترل، حاکی از وجود استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی بعنوان یک مکانیسم آسیب بافتی در بیماران ARMD مرطوب می‌باشد. AnandBabu و همکاران با بررسی دو پلی مورفیسم Q192R و L55M، ضمن عدم وجود تفاوت معنادار در توزیع این دو فنوتیپ بین بیماران ARMD، سطوح فعالیت پاراکسونازی بالاتری را برای ژنوتیپ هموزیگوتی Q192R گزارش کردند. همچنین در یافته‌های آنها سطوح Ox-LDL بطور معناداری در بیماران ARMD مرطوب افزایش یافته بود (۲۴).

یافته مهم دیگر، عدم وجود تفاوت معنی دار در سطوح OX-LDL و نسبت OX-LDL/HDL در بین فنوتیپ‌های AA، AB و BB بیماران بود. Ikeda و

میانگین نسبت OX-LDL/HDL بطور معنی داری در فنوتیپ‌های AA و AB بیماران (به ترتیب، $P=0/001$ و $P=0/01$) بالاتر از افراد کنترل بود، و اما در فنوتیپ BB این ارتباط بی معنی بود ($P=0/1$).

مقایسه غلظت پلاسمایی OX-LDL بین سه فنوتیپ PON1 در جمعیت بیمار: در بین سه فنوتیپ PON1 مشخص شده در بیماران (AA، AB و BB) اختلاف معنی داری در سطوح OX-LDL ($P=0/073$ AB و AA؛ $P=0/49$ ، BB و AA؛ $P=0/95$ ، BB و AB) مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری

استرس اکسیداتیو بدلیل افزایش تولید پرواکسیدانها و یا سطوح ناکافی آنتی‌اکسیدانها، نقش مهم و علت و معلولی در بروز انواع بیماریهای چشمی بویژه دژنراسیون وابسته به سن ماکولای مرطوب دارد (۴). ناحیه ماکولا، بدلیل مقادیر بالای اسیدهای چرب غیر اشباعی (PUFAs) در غشای سلولی، موقعیت مستقیم آن در برابر نور و مصرف بالای اکسیژن بسیار مستعد استرس اکسیداتیو می‌باشد (۱۸). علاوه براین بدلیل فراوانی تعداد میتوکندری و پراکسیزومها در اپیتلیوم رنگی شبکیه، بازگردش اکسیژن در این ناحیه بسیار بالا است. بنابراین ناحیه ماکولا بسیار در معرض انواع اکسیژن فعال (ROS) و بسیار مستعد استرس اکسیداتیو است؛ بویژه زمانی که عملکرد سیستم آنتی‌اکسیدانتی داخلی ناکافی و تولید عوامل اکسید کننده بالا باشد (۱۹، ۲۰). آنزیم PON1 یکی از این سیستم‌های آنتی‌اکسیدان داخلی و OX-LDL یکی از محصولات حاصل از استرس اکسیداتیو می‌باشد.

پلی مورفیسم‌های متعددی برای پاراکسوناز گزارش شده است. اکثر آنها فعالیت‌های متنوعی نسبت به اغلب سوبسترهای سنتزی مثل پاراکسون نشان می‌دهند اما اغلب فعالیت آریل استرازی مشابهی نسبت به فنیل استات دارند (۲۱). با توجه به این تنوع تعیین فنوتیپ اطلاعات دقیق تری نسبت به ژنوتیپ می‌دهد. در این مطالعه با روش تعیین فنوتیپ ذکر شده بر اساس نسبت پاراکسونازی تحریک شده با نمک به فعالیت آریل استرازی، بدون نیاز به ژنوتایپینگ حالات هموزیگوتی با فعالیت پایین (AA)، هتروزیگوتی با فعالیت متوسط (AB) و هموزیگوتی با فعالیت بالا (BB) تعیین شد.

Hyman و همکاران در مطالعه خود از اهمیت آنتی‌اکسیدان درمانی را در پیشگیری از پیشرفت بیماری ARMD مرطوب گزارش دادند (۳۳). چون PON1 یک آنتی‌اکسیدان می‌باشد، آنتی‌اکسیدان تراپی مؤثر می‌تواند از پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری کند و بررسی عوامل مؤثر در افزایش فعالیت PON1 می‌تواند یک راه انتخابی در درمان ARMD مرطوب باشد.

بیماران ARMD مرطوب در مقایسه با افراد شاهد، با افزایش تولید ROS مواجه هستند و بخاطر کاهش برداشت این عوامل ناشی از کاهش فعالیت پاراکسوناز بسیار مستعد استرس اکسیداتیو می‌باشند. هرچند به نظر می‌آید که استفاده از آنتی‌اکسیدانها می‌تواند در پیشگیری یا کاهش اثرات مخرب عوامل اکسیداتیو مؤثر باشند، اما مطالعات بیشتری لازم است تا نقش عوامل تغییر دهنده این فاکتورها را در پیشگیری و حتی درمان بیماری دژنراسانس وابسته به سن ماکولای مرطوب نشان دهد.

تقدیر و تشکر

از همکاران محترمی که در پیشبرد این مطالعه همکاری داشته‌اند، قدردانی می‌گردد.

منابع

1. De Jong PT. Age-related macular degeneration. *New Eng J Med*; 2006. 355(14): 1474-1485.
2. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP, et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organiz*; 2004. 82(11): 844-51.
3. Bourla DH, Young TA. Age-related macular degeneration: A practical approach to a Challenging Disease. *J Am Geriat Soc*; 2006. 54(7): 1130-1135.
4. MacDonald IM. Genetic aspects of age-related macular degeneration. *Canad J Ophthalmol*; 2005. 40(3): 288-292.
5. Judge S, ang YM, Smith A, Hagen T, Leeuwenburgh C. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *FASEB J*; 2005. 19(3): 419-421.
6. Zarbin MA. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*; 2004. 122(4): 598-614.
7. Kuo CL, La Du BN. Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases: structural stability

همکاران بیان داشتند که پلی مورفیسم‌های پاراکسوناز، ریسک فاکتورهای احتمالی بروز ARMD مرطوب هستند و بالا بودن سطح LDL اکسیدشده در پاتوژنز این بیماری نقش دارد (۲۵). Baskol و همکاران و نیز Ates و همکاران در مطالعه جداگانه ای بر روی بیماران مبتلا به دژنراسانس وابسته به سن ماکولا سطوح پایین فعالیت آنزیم PON1 را گزارش کردند (۲۶). اگرچه مکانیسم این کاهش فعالیت در بیماران ماکولای مرطوب مشخص نیست، اما افزایش سطح LDL اکسیدشده ناشی از افزایش ROS، می‌تواند کاهش فعالیت سرمی پاراکسوناز را توضیح دهد. چرا که مداخله پاراکسوناز برای جلوگیری از اکسیداسیون معمولاً منجر به تغییر در فعالیت سرمی آن می‌شود (۱۴)، (۲۷). در مطالعه حاضر تفاوتی در سطوح سرمی HDL بین بیمار و کنترل و نیز در بین فنوتیپها مشاهده نشد این نتایج با مطالعه Pert در بیماران ARMD تقویت می‌شود (۲۸).

مطالعه فوق نشان می‌دهد که بیماران ARMD مرطوب بخاطر سطوح بالای OX-LDL و عمدتاً فعالیت پاراکسونازی ضعیف و تا حدی متوسط در معرض استرس اکسیداتیو هستند. نسبت بالای OX-LDL/HDL در بیماران مورد مطالعه می‌تواند با خطر آترواسکلروز شدید و بیماری عروقی ناپایدار مرتبط باشد. مقایسه فنوتیپها بین بیمار و کنترل با فعالیت پاراکسونازی مشابه، بیماران نسبت به افراد سالم درجه اکسیداتیو بالاتری را نشان دادند، هرچند این تفاوت در فنوتیپ BB ملایم تر بود. این پدیده را می‌توان به تولید بالای ROS مثل آنیون سوپراکسید (O_2^-) و رادیکال هیدروکسیل (OH°) بعنوان فرآورده‌های اتواکسیداسیون و آغاز کننده اکسیداسیون LDL نسبت داد (۲۹، ۳۰). Shaw و همکاران در مطالعه خود استرس اکسیداتیو، التهاب و رگزایی را از عوامل بروز استرس اکسیداتیو گزارش کردند.

بیماری دژنراسانس وابسته به سن ماکولای مرطوب یک بیماری چند فاکتوره است و وجود طیف گسترده ای از عوامل احتمالی در ایجاد بیماری سبب شده است که مکانیسم دقیقی از تغییرات فیزیولوژیکی این بیماری در اختیار ما قرار نگیرد. مطالعات اخیر از این تئوری حمایت کرده اند که مصرف ویتامین C، E، بتا کاروتن و روی با کاهش خطر ARMD و دید همراه است (۳۱، ۳۲).

20. Tribble DL. Lipoprotein oxidation in dyslipidemia: insights into general mechanisms affecting lipoprotein oxidative behavior. *Curr Opin Lipidol*; 1995. 6(4): 196-208.
21. Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet*; 1993. 3(1): 73.
22. Eckerson HW, Romson J, Wyte C, La Du BN. The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. *Am J Hum Genet*; 1983. 35(2): 214.
23. Lynch SM, Campione AL, Moore MK. Plasma thiols inhibit hemin-dependent oxidation of human low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta*; 2000. 1485(1): 11-22.
24. AnandBabu K, Bharathidevi SR, Sripriya S, Sen P, Prakash VJ, Bindu A, et al. Serum Paraoxonase activity in relation to lipid profile in Age-related Macular Degeneration patients. *Experim Eye Res*; 2016. 152: 100-112.
25. Ikeda T, Obayashi H, Hsegava G, Nakamura N, Yoshikiwa T, Imamura Y, et al. Paraoxonase gene polymorphisms and plasma oxidized low-density lipoprotein level as possible risk factors for exudative age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*; 2001. 132(2): 191-195.
26. Baskol G, Karakucuk S, Oner AO, Baskol M, Kocer D, Mirza E, Saraymen R, et al. Serum paraoxonase 1 activity and lipid peroxidation levels in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmologica*; 2006. 220(1): 12-16.
27. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Eroglu J, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS, et al. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med*; 1999. 26(7-8): 892-904.
28. Pertl L, Kern S, Weger M, Hausberger S, Trieb M, Gasser-Steiner V, Haas A, et al. High-Density Lipoprotein Function in Exudative Age-Related Macular Degeneration. *PloS One*; 2016. 11(5): e0154397.
29. Johnston N, Jernberg T, Lagerqvist B, Seigbahn A, Wallentin L. Improved identification of patients with coronary artery disease by the use of new lipid and lipoprotein biomarkers. *Am J Cardiol*; 2006. 97(5): 640-645.
30. Drobek-Słowik M, Karczewicz D, Safranow K. The potential role of oxidative stress in the pathogenesis of the age-related macular degeneration (AMD). *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalne J*; 2007. 61: 28-37.
31. Smith W, Mitchell P, Leeder SR. Dietary fat and fish intake and age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol*; 2000. 118(3): 401-404.
32. Chong EW, Wong TY, Kreis AJ, Simpson JA, Guymer RH. Dietary antioxidants and primary prevention of age related macular degeneration: and enzymatic activity. *Drug metabol Dispos*; 1998. 26(7): 653-660.
8. Dahabreh IJ, Kitsios GD, Kent DM, Trikalinos TA. Paraoxonase 1 polymorphisms and ischemic stroke risk: A systematic review and meta-analysis. *Gene Med*; 2010. 12(10): p. 606.
9. Ferretti G, Bacchetti T, Sahebkar A. Effect of statin therapy on paraoxonase-1 status: a systematic review and meta-analysis of 25 clinical trials. *Prog Lipid Res*; 2015. 67: 0:50-
10. Jarvik GP, Hatsukami TS, Carlson C, Richter RJ, Jampsa R, Brophy VH, et al. Paraoxonase activity, but not haplotype utilizing the linkage disequilibrium structure, predicts vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 2003. 23(8): 1465-1471.
11. Wheeler JG, Keavney BD, Watkins H, Collins R, Danesh J. Four paraoxonase gene polymorphisms in 11 212 cases of coronary heart disease and 12 786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet*; 2004. 363(9410): 689-695.
12. Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J*; 2001. 354(Pt 1): 1.
13. Rozenberg O, Shih DM, Aviram M. Human serum paraoxonase 1 decreases macrophage cholesterol biosynthesis: possible role for its phospholipase-A2-like activity and lysophosphatidylcholine formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 2003. 23(3): 461-467.
14. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Investigat*; 1998. 101(8): 1581-1590.
15. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atheroscler*; 1993. 104(1-2): 129-135.
16. Fujimoto WY. Friedewald's Ldl-Cholesterol Estimation Formulain A Japanese American Population. *Japan Circulat J*; 1988. 52(7): 604-606.
17. Eckerson HW, Wyte CM, La Du B. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Human Genet*; 1983. 35(6): 1126.
18. DeAngelis MM, Lane AM, Shah CP, Ott J, Dryja TP, Miller JW. Extremely Discordant Sib-Pair Study Design to Determine Risk Factors for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Arch Ophthalmol*; 2004. 122(4): 575-80.
19. Bailey TA, Kanuga N, Romero IA, Greenwood J, Luthert PJ, Cheetham ME. Oxidative stress affects the junctional integrity of retinal pigment epithelial cells. *Investig Ophthalmol Visu Sci*; 2004. 45(2): 675-684.

systematic review and meta-analysis. *BMJ*; 2007. 335(7623): 755.

33.Hyman L, Neborsky R. Risk factors for age-related macular degeneration: an update. *Curr Opin Ophthalmol*;2002. 13(3): 171-175.

Evaluation of lipid profile and oxidized LDL levels among different paraoxonase phenotypes in exudative age-related macular degeneration patients

Amir Ghorbani Haghjo, PhD, Professor, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Alireza Javadzadeh, MD, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

***Elham Bahreini**, PHD, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (*Corresponding author). bahreini.e@iums.ac.ir

Mohammad Borji, PhD, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Zahra Hesari, PHD, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background: Disequilibrium between oxidative stress and antioxidant levels has been proposed as an important case of exudative age-related macular degeneration (ARMD). The aim of the present study was to investigate lipid profile and oxidized low-density lipoprotein (OX-LDL) levels within paraoxonase 1 (PON1) phenotypes together in the patients with exudative ARMD.

Methods: Of 90 patients, 45 exudative ARMD patients and 45 healthy controls were selected by an ophthalmologist. PON1 activity was measured in serum using paraoxon and phenylacetate as substrates. The PON1 phenotype was determined using double-substrate method. Cholesterol, triglyceride and HDL were assayed by colorimetric method. OX-LDL levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay method.

Results: Three phenotypes were determined: AA (low activity), AB (intermediate activity) and BB (high activity). The distribution of PON1 phenotypes was significantly different between the patients with exudative ARMD and control subjects (chi-square = 6.17, P= 0.01). The mean OX-LDL levels in all three phenotypes (P< 0.05), and OX-LDL/HDL ratio in AA and AB phenotypes (P= 0.001, P= 0.1, respectively) were significantly higher in the patients than controls. No significant differences were detected in OX-LDL levels among three PON1 phenotypes in both control (P= 0.7 for OX-LDL) and patients (P= 0.6 for OX-LDL).

Conclusion: Increased plasma OX-LDL levels and ratios of OX-LDL/ HDL, as biomarkers of lipoprotein oxidative stress and more common low or intermediate PON1 activity in patients with exudative ARMD, indicate that PON1 activity is insufficient to explain the increased oxidative stress observed in exudative ARMD.

Keywords: Lipid profile, Oxidized LDL, Paraoxonase, Phenotype, Exudative Age-related macular degeneration