

## بررسی ارتباط برخی از ترکیبات آنتی اکسیدانی در افراد با آب سیاه (گلوکوم)



آمنه یارنظری<sup>۱</sup>، مرتضی نوروزی یگانه<sup>۱</sup>، عادلہ پورصالح کچومتقالی<sup>۱</sup>، رضا زارعی<sup>۲</sup>، محمد نجفی<sup>۱</sup>، گلناز اسفندیاری<sup>۱\*</sup>

(۱) گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، تهران، ایران.

(۲) گروه چشم پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۱۹

تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۲۴

## چکیده

**مقدمه:** آب سیاه نوعی نروپاتی دژنره کننده بینایی مزمن است که در این بیماری افراد دید محیطی خود را از دست می دهند و در صورتی که درمان نشوند ممکن است دید کامل خود را از دست بدهند. عوامل مختلفی در پاتوژنز این بیماری نقش دارند که هدف این مطالعه، بررسی ارتباط سلنیوم سرم و مایع زلالیه، گلوکاتیون سرمی و گلوکاتیون پراکسیداز ۱ همولیزات مایع زلالیه با آب سیاه زاویه باز اولیه می باشد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه ۴۵ بیمار با آب سیاه زاویه باز و ۴۵ نمونه کنترل به صورت رندوم و با تشخیص پزشک متخصص چشم انتخاب شدند. اندازه گیری آنزیم گلوکاتیون پراکسیداز ۱ گلبول قرمز برحسب هموگلوبین انجام شد. هموگلوبین همولیزات با استفاده از کیت اندازه گیری هموگلوبین و جذب گلوکاتیون به روش کالریتری انجام شد. اندازه گیری سلنیوم در نمونه سرم و مایع زلالیه با استفاده از روش اسپکتروفتومتری جذب اتمی کوره گرافیتی انجام شد. محاسبات آماری به کمک SPSS vol.18 انجام شد.

**یافته های پژوهش:** مقایسه آنتی اکسیدانی تام دو گروه بیمار و کنترل نشان داد که اختلاف معناداری در مایع زلالیه وجود ندارد ( $P=0.84$ ). اما مقایسه مقادیر سلنیوم مایع زلالیه دو گروه نشان می دهد سلنیوم مایع زلالیه بیماران به میزان معناداری بیشتر از افراد کنترل می باشد ( $P=0.02$ ). هم چنین مشاهده شد که افزایش سلنیوم سرم به طور معناداری ( $P=0.0001$ ) موجب افزایش سلنیوم مایع زلالیه می شود. هم چنین مشخص شد که افزایش سلنیوم مایع زلالیه تاثیر چندانی در افزایش فشار داخل چشم ندارد ( $P=0.045$ ).

**بحث و نتیجه گیری:** به نظر می رسد که سلنیوم در مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با پاتوژنز بیماری نقش چشمگیری داشته باشد.

واژه های کلیدی: سلنیوم، گلوکاتیون پراکسیداز، آنتی اکسیدان ها

\*نویسنده مسئول: گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

Email: golnazesfandiari@yahoo.com

## مقدمه

آب سیاه نوعی نروپاتی دژنره کننده بینایی مزمن است. یکی از موارد نادر در این زمینه نروپاتی بینایی ایسکمی شریان پیشین است. بیماران مبتلا به این نوع خاص از آب سیاه، دید محیطی خود را از دست می دهند و در صورتی که درمان نشوند، ممکن است دید کامل خود را از دست بدهند (۱). انواع آب سیاه عبارتند از: زاویه باز، زاویه بسته و انواع پیشرفته که خود این ها نیز به انواع اولیه و ثانویه تقسیم بندی می شوند. از مشخصات کلینیکی عمده آب سیاه زاویه باز اولیه، فنجانی شکل شدن سر عصب نوری توام با از بین رفتن میدان دید است. علی رغم آن که فشار داخل چشمی بالا راه نمی توان جزء ویژگی های کلینیکی این بیماری دانست اما شواهدی وجود دارد مبنی بر این که نژاد سیاه، سنین بالا، فشار داخل چشمی بالا، سابقه خانوادگی ابتلاء به آب سیاه زاویه باز اولیه، نزدیک بینی و فشار دیاستولیک پایین، فاکتورهای مخاطره آمیز برای گلوکوم زاویه باز اولیه می باشند (۲). سلنوپروتئین P دومین سلنوپروتئین مهم است که به فرم گلیکوزیله به پلاسما ترشح می شود (۳،۴). مهم ترین نقش سلنوپروتئین p، شرکت در انتقال سلنیوم به بافت ها است (۵،۶). می توان گفت که سلنوپروتئین p به عنوان یک شلاتور فلزی نیز عمل می کند (۷). و علاوه بر آن نیز سلنوپروتئین p یک آنتی اکسیدان است (۸). ROS ها در سلول های بیولوژیک غلظت پایینی دارند که این غلظت از طریق تعادل بین میزان کلیرانس و تولید آن ها که توسط آنتی اکسیدان های مختلف تعیین می گردد حاصل می شود. آنتی اکسیدان ها موادی هستند که زمانی که دارای مقادیر کمتری نسبت به یک ماده قابل اکسید شدن می باشند، به طور قابل ملاحظه ای مانع اکسیداسیون آن ماده شده یا اکسیداسیون آن را به تاخیر می اندازند. آنتی اکسیدان ها ممکن است داخل یا خارج سلولی باشند. یک دسته از آنتی اکسیدان هایی که در گروه آنتی اکسیدان های آنزیمی قرار دارند، شامل: آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز ، کاتالاز ، پراکسیداز ، گلوکوتیون پراکسیداز، تیول-دیسولفید اکسید و ردوکتاز، پراکسی ردوکسین ها (۹) و دسته دیگر آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی هستند که شامل: فلزات،

ویتامین های C، E و A و نیز اسید اوریک، بیلی روبین و کوآنزیم Q<sub>10</sub> می باشد. سلنیوم به شکل سلنوسیستئین به کار رفته است. هفت ایزوفرم گلوکوتیون پراکسیداز در انسان ها شناخته شده است که پنج تای آن ها سلنوپروتئین است و دوتای دیگر واجد سیستئین به جای سلنوسیستئین می باشند. مهم ترین خاصیت سلنیوم فعالیت آنتی اکسیدانی آن بوده و خواص دیگری از قبیل خاصیت ضد التهابی و خواص ضد ویروسی داشته و به شکل اسید آمینه سلنوسیستئین (SeC) در ساختمان حداقل ۲۵ نوع پروتئین (سلنوپروتئین) شرکت دارد. سلنوپروتئوم در انسان متشکل از ۱۷ سلنوپروتئین است که برخی از آن ها دارای ژن های متعدد با عملکردهای یکسان هستند. اثرات سلنیوم بر روی موجودات وابسته به غلظت است. این ترکیب در غلظت های نانومولار و میکرومولار خاصیت آنتی اکسیدانی داشته و ضروری است و در غلظت های بیشتر از آن چه که برای سنتز سلنوپروتئین ها لازم است، خاصیت پرواکسیدانی دارد و در غلظت های بیشتر از این مقدار، ترکیبات سلنیوم تجمع پیدا می کنند و این امر منجر به بروز استرس اکسیداتیو و آسیب به اجزاء سلولی شود. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط سلنیوم سرم و مایع زلالیه و نیز گلوکوتیون سرمی، گلوکوتیون پراکسیداز ۱، همولیزات و آنتی اکسیدان تام مایع زلالیه با آب سیاه زاویه باز اولیه می باشد. هدف ویژه از این طرح شامل: تعیین میزان سلنیوم در مایع زلالیه بیماران مبتلا به گلوکوم زاویه باز اولیه و افراد کنترل و مقایسه میزان سلنیوم در مایع زلالیه بیماران مبتلا به گلوکوم زاویه باز اولیه با افراد کنترل هم چنین تعیین میزان سلنیوم در سرم بیماران مبتلا به گلوکوم زاویه باز اولیه و افراد کنترل علاوه بر آن مقایسه میزان سلنیوم در سرم بیماران مبتلا به گلوکوم زاویه باز اولیه با افراد کنترل و تعیین میزان آنتی اکسیدان کل در مایع زلالیه بیماران مبتلا به گلوکوم زاویه باز اولیه و افراد کنترل و نیز مقایسه میزان آنتی اکسیدان کل در مایع زلالیه بیماران مبتلا به گلوکوم زاویه باز اولیه با افراد کنترل و تعیین میزان گلوکوتیون در سرم بیماران مبتلا به گلوکوم زاویه باز اولیه و افراد کنترل و مقایسه میزان گلوکوتیون در سرم

طولانی مدت همولیزات در این دما تغییری در فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز ایجاد نمی کند (۱۲). در تمام مدت آزمایش نمونه ها و محلول ها در ظروف محتوی یخ نگه داشته شدند. در روز انجام آزمایش همولیزات ها از انجماد خارج شده و به نسبت ۱:۴ با آب مقطر دیونیزه و سپس به نسبت ۱:۲ با بافر فسفات حاوی EDTA و DTT (بافر فسفات ۱۰۰ میلی مول در لیتر، ۱ میلی مول در لیتر EDTA=، pH=۷/۴، ۲ میلی مول در لیتر DTT) رقیق شد. سپس نمونه ها با استفاده از محلول درابکین موجود در کیت اندازه گیری هموگلوبین به میزان ۱۰ برابر رقیق شدند. در مرحله بعد محلول واکنش گر اصلی تهیه شد. کلیه محلول ها در روز انجام آزمایش و به صورت تازه تهیه شدند ۴۰۰ میکرولیتر از محلول واکنش گر در داخل کووت ریخته شد و از همین محلول به عنوان بلانک استفاده شد. در مرحله بعد ۲۰ میکرولیتر TBHP به آن اضافه شد و سپس طی یک بازه زمانی اجازه دادیم تا جذب ثابت شود. در مرحله بعد ۲۵ میکرولیتر از نمونه رقیق شده را به آن اضافه کرده و بعد از یک دقیقه، تغییرات جذب را ۳۰ ثانیه به ۳۰ ثانیه یادداشت می نماییم. در مرحله بعد میانگین اختلاف جذب ها را در دقیقه حساب کرده و با توجه به ضریب جذب مولی (NADPH)  $1 \text{ mol L}^{-1}$   $6/22 \times 10^3 \text{ cm}$  فعالیت را محاسبه می کنیم (میکرو مول NADPH اکسید شده در دقیقه) در مرحله بعد با تقسیم کردن فعالیت آنزیم در هر نمونه بر مقدار هموگلوبین تام آن نمونه بر حسب گرم، فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز ۱ (بر حسب U/gr Hb) برای هر نمونه محاسبه شد.

*اندازه گیری سلیوم در نمونه سرم: روش های مورد استفاده برای اندازه گیری سلیوم عبارتند از: روش فعال سازی نوترونی، اسپکتروفلوریمتری HPLC2، روش اسپکتروفتومتری جذب اتمی کوره گرافیتی و روش اسپکتروفتومتری جذب اتمی مجهز به دستگاه تولید هیدرید، حد تشخیص جذب اتمی شعله برای برخی از عناصر نظیر آرسنیک و سلیوم در حد ۱ ppm است. عناصری نظیر آرسنیک، سلیوم، آنتیموان، بیسموت، قلع و سرب تشکیل هیدرید در محلول های اسیدی با*

بیماران مبتلا به گلوکوم زاویه باز اولیه با افراد کنترل و در آخر تعیین میزان فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز در سرم بیماران مبتلا به گلوکوم زاویه باز اولیه و افراد کنترل می باشد.

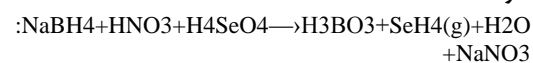
### مواد و روش ها

*مشخصات گروه های بیمار و کنترل: در این مطالعه ۴۵ نفر بیمار مبتلا به آب سیاه زاویه باز اولیه (POAG) و ۴۵ نفر کنترل مبتلا به آب مروارید بر اساس معیارهای مطالعه و زیر نظر چشم پزشک فوق تخصص آب سیاه مورد مطالعه قرار گرفتند.*

*اندازه گیری هموگلوبین در نمونه همولیزات: در این روش با استفاده از کیت آماده اندازه گیری هموگلوبین، گلبول های قرمز در نمونه لیز شده و هموگلوبین آزاد می شود که توسط فری سیانید به مت هموگلوبین تبدیل و در ادامه فرآیند توسط KCN تبدیل به سیان مت هموگلوبین شده است، که ترکیب با دوامی است. جذب آن در ۴۵۹ نانومتر اندازه گیری می شود، که شدت آن متناسب با مقدار هموگلوبین در نمونه است. از غلظت استاندارد هموگلوبین برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و غلظت سایر نمونه ها بر مبنای آن تعیین گردید.*

*اندازه گیری فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز بر حسب هموگلوبین در گلبوله ای قرمز: اندازه گیری گلوکاتایون پراکسیداز بر اساس آنزیم کوپل و از طریق روش Paglia و Valentine که توسط اندرسون و همکاران تغییراتی در آن ایجاد شده است، انجام شد (۱۰،۱۱). در این روش سرعت اکسیداسیون گلوکاتایون توسط TBHP (جایگزین H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) که به وسیله گلوکاتایون پراکسیداز موجود در گلبول های قرمز کاتالیز شده، سنجیده می شود. گلوکاتایون اکسید شده حاصل، تحت تاثیر آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز مجدداً احیاء می شود و در این حین یک مولکول NADPH به NADP تبدیل می گردد. با توجه به کاهش جذب در ۳۴۰ نانومتر می توان سرعت تولید گلوکاتایون اکسید را اندازه گیری کرد. برای انجام این آزمایش همولیزات فریز شده در -۸۰ درجه سانتی گراد مورد استفاده قرار گرفت. بررسی ها حاکی از این است که نگهداری*

NaBH<sub>4</sub> می دهند. واکنش بورهیدرید با سلنیوم IV، در حضور اسید نیتریک غلیظ منجر به واکنش زیر می شود:



H<sub>4</sub> تولید شده توسط گاز آرگون به درون سل کوارتز که روی شعله قرار گرفته، هدایت شده و در آن جا توسط گرما به سلنیوم اتمی تبدیل می شود. با عبور نور از میان این سل، گونه های اتمی تولید شده نور را جذب کرده و کاهش نور رسیده به آشکارساز دستگاه اتمی ثبت می شود. برای به دست آوردن غلظت سلنیوم، ابتدا استانداردهایی با غلظت های مشخص تهیه شده و به دستگاه داده می شود تا سیگنال حاصله اندازه گیری شود. سپس با رسم منحنی کالیبراسیون که در آن محور x غلظت و محور y سیگنال حاصله می باشد، خط مستقیمی به دست می آید. حال نمونه مجهول به دستگاه داده می شود و سیگنال آن اندازه گیری می گردد. با داشتن سیگنال و معادل های منحنی کالیبراسیون می توان غلظت مجهول را به دست آورد.

*اندازه گیری سطح آنتی اکسیدان کل در مایع زلالیه:* برای اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی تام از متدولوژی Ozcan Erel استفاده شد (۲۳). بر اساس این روش مولکول ABTS احیاء با استفاده از پراکسید هیدروژن (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) در محیط اسیدی (بافر استات ۳۰ میلی مولار با pH=۳/۶) به ABTS اکسید شده که رنگ سبز پر رنگی دارد تبدیل می گردد. مخلوط شدن این ماده با بافر استات ۰/۴ مولار pH=۵/۸ به کم رنگ شدن آن کمک می نماید. آنتی اکسیدان های نمونه به تسریع این رنگ پریدگی کمک نموده به طوری که غلظت آن ها با میزان رنگ پریدگی ABTS متناسب است. با خوانش میزان کاهش رنگ با اسپکتروفتومتر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل مشخص می گردد که با میزان کاهش رنگ رابطه مستقیم دارد. اندازه گیری با استفاده از اسپکتروفتومتر 3000 pharmacia biotech England, Ultrospec انجام گرفت.

*اندازه گیری سلنیوم در نمونه مایع زلالیه:* اندازه گیری سلنیوم در نمونه های مایع زلالیه با روش اتمیک

بزرگترین مجهز به کوره گرافیتی انجام شد (نمودار شماره ۱). در روش کوره گرافیتی حرارت مورد نیاز برای متمایز کردن عناصر از طریق الکتریکی به وجود می آید که نسبت به نوع شعله ها استفاده وسیع تری دارد. انواع مختلفی حرارت دهنده برای این نوع دستگاه طراحی شده است که موفق ترین آن ها شامل یک لوله کوچک گرافیتی است که از طریق عبور جریان بالایی (بالتر از ۵۰۰ A) در ولتاژ پایین باعث ایجاد حرارت می شود. قطر داخلی لوله گرافیتی در حدود ۴-۸ میلی متر می باشد و در حدود ۲ تا ۴ سانتی متر طول دارد و یک روزنه کوچک در سطح بالایی آن تعبیه شده است که نمونه از طریق این منفذ توسط میکروپمپ یا اتوسمپلر وارد آن می شود. دو سر این لوله به یک اختلاف پتانسیل خارجی متصل می گردد، و به علت مقاومت گرافیت در مقابل عبور جریان الکتریسیته، لوله گرافیتی به تدریج گرم شده و قادر خواهد بود تا نمونه را به حالت اتمی تبدیل نماید. سطح داخلی لوله گرافیتی از یک کربن سخت و نفوذناپذیر به نام گرافیت پیرولیتیک پوشیده شده است. خود لوله گرافیتی، کوره گرافیتی نامیده می شود. در طی اتمی شدن، جریانی از گاز آرگون از داخل و خارج لوله گرافیتی عبور می نماید تا از اکسید شدن و سوختن کوره جلوگیری نماید. فقط در حدود ۲ تا ۹ ثانیه جریان گاز قطع شده و اندازه گیری جذب انجام می شود. دمای اتمایزر گرافیتی که برای اتمی کردن نمونه مایع استفاده می شود در چهار مرحله مختلف برنامه ریزی شده است:

*الف-تبخیر حلال:* در این مرحله که حدود ۲۰ تا ۵۰ ثانیه طول می کشد، دمای کوره کمی بیشتر از دمای جوش حلال (تا ۳۰۰ درجه سانتی گراد) تثبیت می شود.

*ب-خاکستر کردن:* در این مرحله که حدود ۲۰ تا ۵۰ ثانیه طول می کشد، دما را تا ۱۷۰۰ درجه سانتی گراد افزایش می دهند تا تمام ترکیبات آلی از بین رفته و فقط مواد معدنی باقی می ماند.

*ج-اتمى شدن:* در این مرحله که ۲ تا ۳ ثانیه طول می کشد، بر حسب نوع عنصر و ماده معدنی مورد نظر دما را افزایش می دهند تا خاکستر بر جای مانده تبدیل

کمی به وسیله آنالیز رگرسیون دوگانه ارزیابی شد. لازم به ذکر است که تفاوت‌ها زمانی از لحاظ آماری معنادار در نظر گرفته می‌شدند که ارزش P کمتر از ۰/۰۵ باشد.

### یافته‌های پژوهش

مشخصات گروه‌های بیمار و کنترل: اطلاعات دموگرافیک و مشخصات کلینیکی گروه‌های مبتلا به آب سیاه زاویه باز اولیه و کنترل مبتلا به آب مروارید در جدول شماره ۱ خلاصه شده است.

نتایج حاصل از مقایسه جنسیت، سن افراد و BMI آن‌ها نمایانگر همگن بودن دو گروه بوده، چرا که ارزش P در موارد فوق به ترتیب برابر با ۰/۱۸، ۰/۲۰ و ۰/۹۵ می‌باشد، که اختلاف معناداری را نشان نمی‌دهد. در ضمن متغیرهایی از قبیل فشارخون سیستولیک ( $P=0.76$ )، فشارخون دیاستولیک ( $P=0.59$ )، استعمال سیگار ( $P=0.82$ ) و ابتلاء به دیابت ( $P=0.384$ ) بین دو گروه، مورد ارزیابی واقع شد که در هیچ یک اختلاف معناداری بین دو گروه مشاهده نشد. مقادیر ارزش P هر دو پارامتر C/D ratio، فشار داخل چشم IOP کمتر از ۰/۰۰۰۱ بوده که نمایانگر اختلاف معنادار بین دو گروه مورد مطالعه می‌باشند، و به عبارتی مقادیر پارامترهای فوق در بیماران آب سیاه زاویه باز اولیه POAG افزایش معناداری داشته اند (جدول شماره ۱).

نتایج حاصل از مقایسه آنتی‌اکسیدان تام و سلنیوم در مایع زلالیه دو گروه نشان می‌دهد، اختلاف معناداری بین مقادیر آنتی‌اکسیدان تام در مایع زلالیه وجود نداشته ( $P=0.84$ ) اما مقایسه مقادیر سلنیوم مایع زلالیه دو گروه با ( $P=0.02$ ) نشان می‌دهد سلنیوم مایع زلالیه بیماران به میزان معناداری بیشتر از افراد کنترل می‌باشد به علاوه آنالیز داده‌ها نشان داد که در کل جمعیت، افزایش سلنیوم سرم به طور معناداری ( $P=0.0001$ ) می‌باشد (جدول شماره ۲) (نمودار شماره ۲).

نمودار شماره ۱ نشان دهنده نسبت سلنیوم سرم به مایع زلالیه در بین دو گروه بیمار و کنترل می‌باشد. نمودار شماره ۲ نشان می‌دهد که آنالیز داده‌ها در کل جمعیت، افزایش سلنیوم سرم به طور

به بخار اتمی می‌شود. این دما ممکن است بالاتر از ۳۰۰۰ درجه سانتی‌گراد باشد. در این مرحله گاز آرگون قطع شده تا یک ابر اتمی غلیظ از نمونه باقی بماند و حساسیت چند برابر شود.

د-تمیزشدن کوره: این مرحله حدود ۳-۱ ثانیه طول می‌کشد و دمای کوره به بالاترین حد ممکن (۳۰۰۰ درجه کلوین) رسیده تا تمامی مواد بر جای مانده از کوره حذف شوند.

لازم به ذکر است که فاصله‌های زمانی ذکر شده و سه مرحله دمایی برحسب نوع عنصر مورد آنالیز به صورت برنامه‌های منظم به دستگاه داده می‌شود.

دمای معمول به دست آمده از کوره گرافیتی ۱۳۰۰-۱۲۰۰ درجه سانتی‌گراد است. نمونه وارد شده در داخل کوره گرافیتی می‌تواند در جداره لوله اتمی شود، ولی این نمونه اتمی به هنگام حرکت به مرکز لوله که سردتر است، می‌تواند دچار پدیده خودجذبی شود. به عبارت دیگر نمونه تهییج شده در جداره، با نمونه تهییج نشده در مرکز لوله برخورد کرده و بدون نشر نور، به حالت پایه بر می‌گردد. برای از بین بردن خودجذبی، از یک صفحه گرافیتی در مرکز استفاده می‌شود تا دمای جداره با مرکز کوره برابر شود. در روز انجام آزمایش نمونه‌های مایع زلالیه از فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد خارج شد، و پس از ذوب تا لحظه انجام آزمایش در ظرف حاوی یخ نگهداری شدند. استانداردهای مورد نظر با غلظت‌های ۱۱۰، ۳۵، ۵۰، ۶۵، ۸۰، ۹۵ نانوگرم در میلی‌لیتر تهیه شدند. تزریق نمونه‌ها و استانداردها به کوره توسط سرنگ هامیلتون و به صورت مستقیم (بدون رقیق‌سازی) صورت گرفت. حجم تزریق شده به کوره ۱۰ میکرولیتر بود.

محاسبات آماری به کمک SPSS vol.18 صورت گرفت. بیان مطالعات کمی به صورت  $Mean \pm SD$  بوده است. آنالیز آماری مورد استفاده برای بررسی وجود توزیع نرمال، آزمون کولموگروف-اسمیرنوف و برای قیاس متغیرهای کلینیکی بین گروه‌های بیمار و کنترلی که توزیع نرمال داشتند و آزمون t-test برای سایر متغیرها آزمون من-ویتنی بود. بررسی همگون بودن گروه‌ها از نظر عوامل فردی به کمک آزمون کای اسکوئر صورت پذیرفت. همبستگی متغیرهای

نمودار شماره ۴ نشان می دهد که ارتباط بین افزایش سن بیماران مبتلا به آب سیاه زاویه باز اولیه و افزایش فشار داخل چشم ارتباط معناداری وجود دارد ( $P=0.725$ ). نمودار شماره ۵ نشان می دهد که آنالیز داده ها بین افزایش در میزان سلنیوم سرم با افزایش سن در بیماران مبتلا به آب سیاه زاویه باز اولیه ارتباط معناداری وجود ندارد ( $P=0.628$ ).

معناداری ( $P=0.0001$ ) موجب افزایش سلنیوم مایع زلالیه می شود.

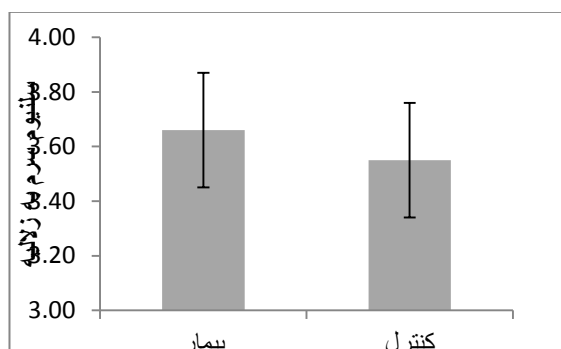
نمودار شماره ۳ ارتباط بین میزان سلنیوم مایع زلالیه و افزایش در فشار داخل چشم را نشان می دهد. آنالیز نتایج به دست آمده بیان می کند، که افزایش سلنیوم مایع زلالیه تاثیر چندانی در افزایش فشار داخل چشم ندارد ( $P=0.045$ ).

جدول شماره ۱. ویژگی های دموگرافیک و پاراکلینیک گروه های بیمار و کنترل

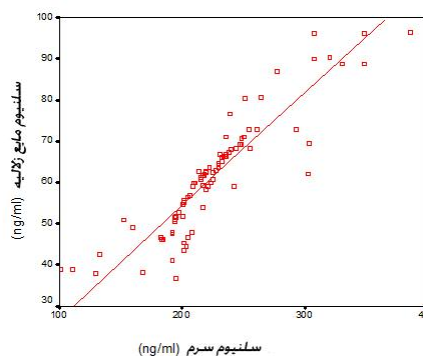
ارزش P	گروه بیمار	گروه کنترل Mean±SD(n)	پارامتر
۰/۱۸	۳۲/۱۳	۲۶/۱۹	جنس (زن/مرد)
۰/۲۰	۱۰/۱۹±۸۰/۹۴	۱۰/۰۱±۶۸/۲۰	سن (سال)
۰/۶۷	۱۴/۳۶±۱۲۹/۹۶	۱۵/۶۰±۱۲۹/۰۰	فشارخون سیستولیک (میلی متر جیوه)
۰/۵۹	۸/۶۸±۸۸/۲۴	۸/۹۰±۸۸/۲۴	فشارخون دیاستولیک (میلی متر جیوه)
<۰/۰۰۰۱	۶/۶۸±۲۵/۹۵	۴/۹۱±۱۶/۵۸	فشار داخل چشم (میلی متر جیوه)
<۰/۰۰۰۱	۲۴۰/۹۰±۴۳۰/۸۰	۱۲۸/۱۰±۲۴۸/۶۰	ضخامت قرنیه (میکرون)

جدول شماره ۲. پارامترهای بیوشیمیایی مایع زلالیه

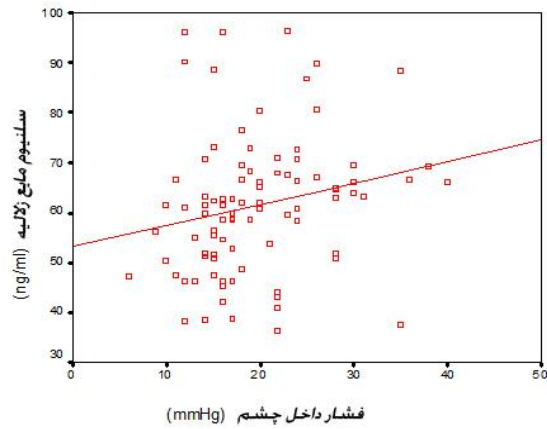
ارزش P	بیمار (۴۵ نفر)	کنترل (۴۵ نفر)	پارامتر
۰/۸۴	۲۸۵/۵۲±۱۱۳/۳۴	۳۲۹/۳±۷۹/۸	ظرفیت تام آنتی اکسیدانی (Trolox equivalent $\mu\text{M/l}$ )
۰/۰۲	۶۵/۶۹±۱۵/۰۹	۶۰/۳۵±۱۵/۸۰	سلنیوم (نانوگرم در میلی لیتر)



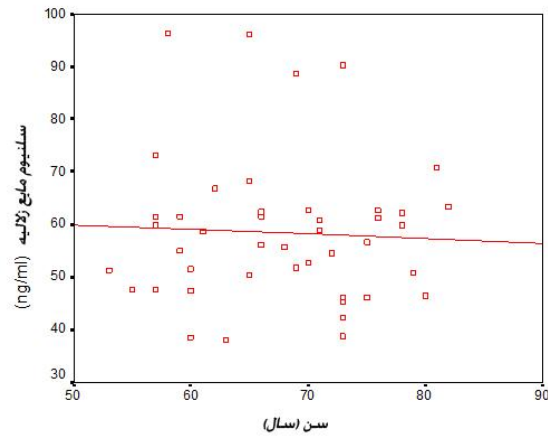
نمودار شماره ۱. نسبت سلنیوم سرم به سلنیوم مایع زلالیه در گروه بیمار و کنترل



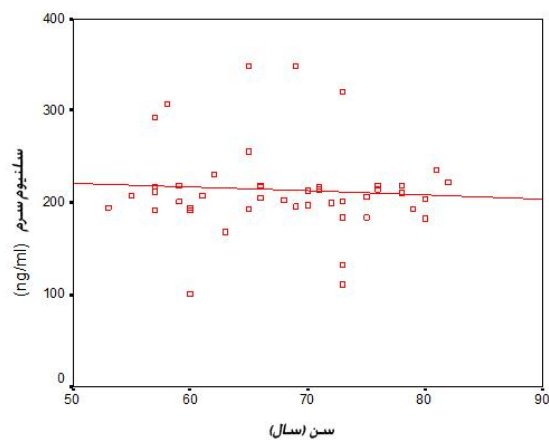
نمودار شماره ۲. رگرسیون خطی سلنیوم سرم و سلنیوم مایع زلالیه ( $r=0.9$ ,  $P=0.0001$ )



نمودار شماره ۳. رگرسیون خطی فشار داخل چشم و سلنیوم مایع زلالیه ( $r=0.212, P=0.045$ )



نمودار شماره ۴. رگرسیون خطی سن بیمار و فشار داخل چشم ( $r=0.291, P=0.725$ )



نمودار شماره ۵. رگرسیون خطی سن بیماران و سلنیوم سرم ( $r=0.054, P=0.628$ )

## بحث و نتیجه گیری

آب سیاه نوعی نروپاتی دژنره کننده بینایی مزمن است، که می توان بر اساس ویژگی های عصب بینایی آن را از دیگر فرم های اکتسابی نروپاتی بینایی متمایز کرد. یکی از عوامل موثر در بروز و پیشرفت این بیماری استرس اکسیداتیو است. گونه های فعال اکسیژن به عنوان فاکتور اصلی دخیل در بروز استرس اکسیداتیو از طریق ایجاد اختلال در عملکرد میتوکندری، تشکیل محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته AGEs، اعمال شرایط هیپوکسی کاذب و تغییر در عملکرد فاکتور رشد یا بروز دیس لیپوپروتئینمی، موجب بروز اختلالات عروقی در افراد مبتلا به آب سیاه می شود، و سطوح پایین آنتی اکسیدان ها نیز در بروز این بیماری و پاتوژنز آن نقش دارد (۱۳). یک ارزیابی مقایسه ای بین میزان سلنیوم، گلووتاتیون، گلووتاتیون پراکسیداز ۱ و سطح آنتی اکسیدان تام در نمونه سرم و مایع زلالیه در بیماران مبتلا به آب سیاه زاویه باز اولیه، با میزان این پارامترها در افراد کنترل انجام شد. مقصود از این مطالعه بررسی تاثیر فاکتورهای مرتبط با استرس اکسیداتیو در پاتوژنز آب سیاه زاویه باز اولیه بود، و بر همین اساس مقادیر مربوط به این فاکتورها در دو گروه بیمار و کنترل با یکدیگر مقایسه شد. نتایج حاصل از مطالعه ما حاکی از این است که میزان فشار داخل چشم در بین دو گروه بیمار و کنترل، اختلاف معناداری دارد؛ به عبارتی دیگر مقادیر مربوط به فشار داخل چشم در گروه بیمار نسبت به کنترل خیلی بیشتر بود (نمودار شماره ۳). گلووتاتیون پراکسیداز ۱ یکی از اعضای آنتی اکسیدان های آنزیمی است. در بررسی های انجام شده توسط قائم و همکاران مشخص شده است، که فعالیت آنزیم های گلووتاتیون پراکسیداز در بیماران مبتلا به آب سیاه زاویه باز اولیه نسبت به افراد کنترل اختلاف معناداری دارد (۱۴). مطالعه انجام شده توسط مچسترک و همکاران نشان داد که در افراد واجد پلی مورفیسم Pro198Leu ژن گلووتاتیون پراکسیداز ۱، حساسیت به اثرات مضر ناشی از پراکسید هیدروژن بیشتر است و این امر ریسک ابتلاء به POAG را افزایش می دهد. گروه دیگری از مطالعات فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان موجود در مایع زلالیه را نیز مورد ارزیابی قرار

داده اند. در مایع زلالیه چندین عامل اکسیدکننده از قبیل پراکسید هیدروژن و آنیون سوپراکسید وجود دارد (۱۵). بر همین اساس حضور آنزیم های آنتی اکسیدان از قبیل گلووتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیس موتاز برای حذف این عوامل ضروری است. یکی از اهداف این ترکیبات اکسیدکننده شبکه ترایکولار TM است و استرس اکسیداتیو مزمن منجر به آسیب این شبکه می شود. حضور مزمن اکسیدان ها در مایع زلالیه به خاطر نقص سیستم آنتی اکسیدان آنزیمی، در پاتوژنز POAG دخیل است (۱۶). نتایج حاصل از مطالعه ما نشان داد که فعالیت این آنزیم در گروه بیمار و کنترل اختلاف معناداری با یکدیگر ندارد. گلووتاتیون به عنوان یک ترکیب حاوی گروه تیول نقش مهمی در خنثی کردن رادیکال های فعال دارد، و یکی از راه های ارائه این نقش، استفاده از این مولکول به عنوان دهنده الکترون در واکنشی است که توسط گلووتاتیون پراکسیداز انجام می شود. نتیجه حاصل از بررسی میزان این مولکول در مطالعه ما به نتیجه حاصل از مقایسه فعالیت گلووتاتیون پراکسیداز ۱ تقریباً همسو می باشد. به این صورت که مقایسه بین میزان گلووتاتیون سرم در دو گروه بیمار و کنترل از نظر آماری تقریباً بی معنی است. سلنیوم نقش متابولیکی خود را از طریق حضور در ساختمان ریشه های سلنوسیستین در یکسری سلنوپروتئین ها مثل گلووتاتیون پراکسیداز بازی می کند (۱۷). بر همین اساس انتظار می رود که بین مقدار سلنیوم و فعالیت این آنزیم ها ارتباط همسویی وجود داشته باشد. در مطالعه انجام شده توسط اکسون و همکاران مشخص شد که در گروه های مورد مطالعه با وضعیت سلنیوم مشابه، بین مقدار سلنیوم سرم و فعالیت گلووتاتیون پراکسیداز ارتباط معناداری وجود دارد. سلنیومی که از طریق غذا وارد می شود، بر غلظت سلنیوم موجود در بدن و هم بر فعالیت گلووتاتیون موثر است، با این وجود تاثیر سلنیوم موجود در مواد غذایی بر غلظت سلنیوم پلاسما، نسبت به تاثیر بر فعالیت گلووتاتیون پراکسیداز بیشتر است. در مطالعات دیگر نیز مشخص شده است که سلنیوم سرم در خانم ها بیشتر از آقایان است، در حالی که در آقایان مقدار گلووتاتیون پراکسیداز سرم بیشتر است (۱۸). ما انتظار داریم که



TM می شود. افزایش سطح سلیوم سلولی در داخل این سلول ها به بیش از مقادیر طبیعی آن منجر به تغییر در توازن اکسیداتیو این سلول ها شده و می تواند پیام آپوپتوز را القاء کند. از آن جایی که ظرفیت آنتی اکسیدانی تام مایع زلالیه، بین افراد کنترل و بیمار تفاوتی با یکدیگر ندارند، بنا بر این ما نتیجه می گیریم که نقش سلیوم در مسیرهای بیولوژیکی سلولی چشمگیرتر از وضعیت اکسیدانی است. گلوکوتایون پراکسیداز ۱ یک سلنواگزیم است که ظرفیت آنتی اکسیدانی تام را افزایش می دهد. برعکس سلیوم که با POAG ارتباط داشت، در مطالعه ما بین فعالیت گلوکوتایون پراکسیداز ۱ و بیماری ارتباطی مشاهده نشد. مطالعه ما نشان داد که میزان سلیوم سرم در هر دو گروه مورد مطالعه بیش از ۲۱۹ نانوگرم در میلی لیتر است. در مطالعه ما هم چنین سطح گلوکوتایون سرم مورد ارزیابی واقع شد و نتایج حاصل، حاکی از آن است که گلوکوتایون پراکسیداز ۱ نمی تواند غلظت محصول این آنزیم را در بیماران خیلی تغییر دهد. ما دریافتیم که سطح سلیوم مایع زلالیه با غلظت سلیوم سرم ارتباط دارد. به علاوه بررسی های ما نشان داد که بین سلیوم و فشار داخل چشم ارتباط وجود دارد و فشار داخل چشم فاکتور حساس تری در تشخیص POAG در بیماران مورد مطالعه بود.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از کارمندان و کارکنان گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی ایران تقدیر و تشکر می شود.

میزان سلیوم در مایع زلالیه بیماران نسبت به افراد کنترل بیشتر باشد. در این مطالعه مقدار سلیوم موجود در سرم و هم چنین سلیوم موجود در مایع زلالیه مورد ارزیابی قرار داده شد. نتیجه مطالعه ما به این ترتیب بود که مقادیر سلیوم مایع زلالیه، در بین دو گروه بیمار و کنترل اختلاف معناداری داشتند، به این معنا که میزان سلیوم مایع زلالیه در گروه بیماران نسبت به کنترل به میزان قابل توجهی بیشتر بود. با این وجود برخلاف مطالعات قبلی، نتایج حاصل از مطالعه ما نشان داد که افزایش سلیوم مایع زلالیه تاثیر چندانی در افزایش فشار داخل چشم ندارد. علاوه بر آن در مطالعه ما مشخص شد که میزان سلیوم موجود در سرم بیماران به میزان قابل توجهی بیشتر از افراد کنترل است. آنتی اکسیدان تام برآیند کلی آنتی اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی می باشد، در مطالعه انجام شده توسط مچسترک و همکاران مشخص شد که میزان آنتی اکسیدان تام در بیماران مبتلا به آب سیاه، نسبت به افراد کنترل کمتر است (۱۹). در مطالعه انجام شده توسط کیا و همکاران مشخص شد که میزان آنتی اکسیدان تام در بیماران مبتلا به آب سیاه نسبت به کنترل کمتر است (۲۰). در مطالعه ما برخلاف دیگر مطالعات مشخص شد که میزان آنتی اکسیدان تام موجود در مایع زلالیه بین دو گروه کنترل و بیمار تفاوت معناداری با یکدیگر ندارد. در مطالعه ما نیز مشخص شد که سلیوم یکی از عوامل مسبب POAG است. انتشار مداوم سلیوم سرم به داخل مایع زلالیه منجر به انباشته شدن سلیوم در داخل سلول های

### References

1. Hayreh SS, Jonas JB, Optic disc morphology after arteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Ophthalmology* 2001; 108: 1586-94
2. Allingham RR, Damji KF, et al. Clinical epidemiology of glaucoma, textbook of glaucoma. 5<sup>th</sup> ed. 2003; P.125-56
3. Read R, Bellew T, et al. Selenium and amino acid composition of selenoprotein P, the major selenoprotein in rat serum. *J BiolChem* 1990;265: 17899-905.
4. Akesson B, Bellew T, et al. Purification of selenoprotein P from human plasma. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1204: 243-9.
5. Burk RF, and Hill KE, Selenoprotein P: A selenium rich extracellular glycoprotein. *J Nutr* 1994;124: 1891-7.
6. Peters MM, Hill KE, et al. Altered hippocampus synaptic function in selenoprotein P deficient Mice. *Mol Neurodegener* 2006;1: 12.
7. Hill KE, Zhou J, et al. Deletion of selenoprotein P alters distribution of

- selenium in the mouse, *J BiolChem* 2003; 278:13640-6.
8. Sasakura C, Suzuki KT. Biological interaction between transition metals (Ag, Cd and Hg), selenide/sulfide and selenoprotein P. *J InorgBiochem* 1998; 71: 159-62.
9. Takebe G, Yarimizu J. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J BiolChem* 2002;277: 41254-8.
10. Zadák Z, Hyspler R. Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiol Res*2009;581: 13-7.
11. Atkinson JB, Hill KE. Centrilobular endothelial cell injury by diquat in the selenium deficient Rat liver. *Lab Invest* 2001; 81:193-200.
12. Steinbrenner H, Bilgic E. Selenoprotein P protects endothelial cells from oxidative damage by stimulation of glutathione peroxidase expression and activity. *Free Rad Res* 2006;40: 936-43.
13. Agapova OA, Ricard CS. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human optic nerve head astrocytes. *Glia* 2001;33:205-16.
14. AlwardWL, a new ganglion ocular development. *Science* 2003;299: 1527-8.
15. Ghanem AA, Rafa LF. Oxidative stress markers in patients with primary open angle glaucoma. *Curr Eye Res* 2010;35: 295-301.
16. Combs GF. Status of selenium in prostate cancer prevention. *Br J Cancer* 2004;91:195-9.
17. Spallholz JE1, Boylan LM, Larsen HS. Advances in understanding selenium's role in the immune system. *Ann N Y Acad Sci*1990;587:123-39...
18. Bjornstedt M, Xue J. The thioredoxin and glutaredoxin system are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1994;269: 29382-4.
19. Shannon M, Conley M. Seleniums Effects on MMP-2 and TIMP-1 Secretion by Human Trabecul Mesh Cell1996;34: 123-31.
20. Ireneuszmajsterek A, Katarzynamalinowska A. Evaluation of oxidative stress markers in pathogenesis of primary open angle glaucoma. *Exp Mol Pathol* 2011; 90:231-7.



## The Study of Relationships between Some Antioxidants in Patients with Glaucoma

Yarnazai A<sup>1</sup>, Nouroziyeganeh M<sup>1</sup>, Poursaleh kachoumesghali A<sup>1</sup>, Zarei R<sup>2</sup>, Najafi M<sup>1</sup>, Esfandiari G<sup>1\*</sup>

(Received: July 9, 2016

Accepted: October 15, 2016)

### Abstract

**Introduction:** Glaucoma is a chronic optic degenerative neuropathy in which people may lose their peripheral vision. Since various factors are involved in the pathogenesis of this disease the aim of this study was to investigate the relationships between serum and aqueous humor selenium levels, serum glutathione and hemolysate and aqueous humor glutathione peroxidase 1 values with primary open angle glaucoma.

**Materials & methods:** In this study, 45 patients with open-angle glaucoma and 45 controls were randomly selected and diagnosed by specialists. Measurement of erythrocyte glutathione peroxidase 1 was normalized by hemoglobin. Hemoglobin and glutathione measurements were performed by colorimetric method. Serum and aqueous humor selenium values were measured using graphite furnace atomic absorption spectrophotometry and atomic absorption spectroscopy with hydride

generator. Statistical analysis was performed using SPSS ver.18.

**Findings:** Total aqueous humor antioxidant value showed no significant difference between patient and control groups ( $p=0.84$ ). However, both groups showed comparable levels of aqueous humor selenium so that in patients was significantly higher than controls ( $p=0.02$ ). It was also observed that serum selenium increased significantly in comparison with aqueous humor selenium ( $p=0.0001$ ). It was also found that aqueous humor selenium was not correlated to intraocular pressure ( $p=0.045$ ).

**Discussion & conclusions:** It seems that selenium has an important role in biological pathways associated with pathogenesis of disease.

**Keywords:** Selenium, Glutathione peroxidase1, Antioxidants

1. Dept of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Dept of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran,

\* Correspondin author Email: golnazesfandiari@yahoo.com