مقاله پژوهشی

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۳ شماره ۱ فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۰ صفحات ۱۷-۱۳

سطح سرمی هموسیستئین، لیپوپروتئین با دانسیته پایین و فعالیت آنزیم پاراکسوناز در بیماران مبتلا به دژنرسانس وابسته به سن ماکولای مرطوب

علیرضا جواد زاده: گروه چشم پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
امیر قربانی حق جو: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط
E-mail:ghorbaniamir@hotmail.com
نادره رشتچی زاده: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
الهام بحرینی: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
سمیرا علیزاده: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۸/۴/۳۱ ، پذیرش: ۸۹/۱۱/۲۱

چکیده

زمینه و اهداف: فاکتورهای متعددی در بروز بیماری دژنرسانس وابسته به سن ماکولای مرطوب دخالت دارند؛ عدم تعادل در وضعیت اکسیداسیون و احیای بدن یکی از این عوامل می باشد. هدف مطالعه حاضر ارزیابی احتمال وجود هایپرهموسیستئینمی و کاهش فعالیت پاراکسوناز در بیماران مبتلا به دژنرسانس وابسته به سن ماکولای مرطوب بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تحلیلی روی ٤٥ بیمار مبتلا به دژنرسانس وابسته به سن ماکولای مرطوب مراجعه کننده به مرکز آموزشی-درمانی نیکوکاری تبریز و ٤٥ فرد سالم بعنوان شاهد انجام شد. فعالیت پاراکسوناز، هموسیستئین و LDL-C اکسیدشده با روش های اسپکتروفتومتری و ELISA مورد سنجش قرار گرفتند.

یافته ها: کاهش معنی داری در سطح فعالیت پاراکسوناز در گروه بیمار نسبت به گروه شاهد وجود داشت (P <۰/۰۵). اختلاف معنی داری در سطوح هموسیستئین (P <۰/۰۵) و LDL-C اکسیدشده بین دو گروه مشاهده گردید (P <۰/۰۵).

نتیجه گیری: سطوح افزایش یافته LDL-C اکسیدشده بعنوان شاخص استرس اکسیداتیو در بیماران دژنرسانس وابسته به سن ماکولای مرطوب، ممکن است یکی از علل غلظت بالای هموسیستئین در این بیماران باشد. همینطور فعالیت پاراکسوناز برای پیشگیری از آسیب اکسیداتیو در این افراد کافی بنظر نمی رسد چرا که عوامل متعددی در بروز بیماری دژنرسانس وابسته به سن ماکولای مرطوب دخالت دارند.

کلید واژه ها: بیماری دژنرسانس وابسته به سن ماکولای مرطوب، هموسیستئین، پاراکسوناز، LDL-C اکسیدشده

مقدمه

بیماری دژنرسانس وابسته به سن ماکولا (Age related macular degeneration; 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 می شود. ARMD بر دونوع است: نوع خشک و نوع مرطوب (۱). هر چند نوع خشک شیوع بیشتری دارد اما نوع مرطوب عامل بیش از ۸۰٪ نابینایی در بین این جمعیت از بیماران می باشد (۲). مشخصه نوع مرطوب یا نئوواسکولر رشد غیرطبیعی عروق مشیمیه ای جدید همراه با خونریزی و نشت سروز 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، استرس اکسیداتیو، ایسکمی، پیری اپیتلیوم پیگمانته شبکیه و التهاب ریسک فاکتورهای اصلی در بروز و پیدایش ARMD مرطوب هستند. با توجه به وابسته به سن بودن بیماری ARMD

مرطوب و مطالعات قبلی مبنی بر افزایش تولید رادیکال های آزاد و فراورده های حاصل از اکسیداسیون با افزایش سن، اهمیت بررسی استرس اکسیداتیو و تأثیر آن در تغیر ساختار ناحیه ماکولا اجتناب ناپذیر است (۴،۵). هر چند تعداد فاکتورهای اکسیدان و آنتی اکسیدان داخلی زیاد و عموما مرتبط با همدیگر می‌باشد، اما در مطالعه حاضر نقش هموسیستئین را بعنوان یک اکسیدان و آنزیم پاراکسوناز را بعنوان یک آنتی اکسیدان داخلی در بروز بیماری ARMD مرطوب مورد ارزیابی قرار دادیم؛ دو عاملی که امروزه در بروز بیماریهای عروقی بسیار مورد توجه قرار گرفته اند (۹–۵).

هموسیستئین اسید آمینه‌ای واسط در تبدیل متیونین به آرژینین است. هرگونه نقص در متابولیسم هموسیستئین خواه به دلیل نقص آنزیمی یا کمبود ویتامین های لازم، منجر به هیپرهموسیستئینمی می‌شود (٦). افزایش غلظت هموسیستئین خون باعث افزایش انواع اکسیژن فعال بدلیل افزایش اتواکسیداسیون آن و نیز بالا رفتن یکی از متابولیت‌های آن یعنی هموسیستئین تیولاکتون می‌شود. هموسیستئین تیولاکتون با هموسیستئینیله کردن، پروتئین‌ها را مستعد اکسیداسیون و تخریب می نماید(۷).

پاراکسوناز متصل به HDL-C با هیدرولیز لیپیدهای پراکسیده بویژه در LDL–C و آترومها، و نیز با فعالیت هموسیستئین تیولاکتونازی در جلوگیری از هموسیستئینیله شدن پروتئین‌ها اثرات آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال می‌کند. پاراکسوناز دارای پلی مورفیسم های متعددی است که فعالیت متفاوتی نسبت به بعضی از سوبستراهای سنتزی مثل پاراکسون نشان می‌دهند؛ اما فعالیت آریل استرازی پاراکسوناز نسبت به سوبسترای فنیل استات متأثر از پلی مورفیسمهای آن نمی‌باشد. بنابراین اندازه‌گیری فعالیت آریل استرازی می‌تواند تخمینی از وضعیت کمی آنزیم در بدن می باشد (۹). استرس اکسیداتیو بدلیل افزایش تولید پرواکسیدانها یا سطوح ناکافی آنتی اکسیدانها، نقش مهم و علت و معلولی در بروز انواع بیماریهای چشمی بویژه ARMD مرطوب دارد. ناحیه ماکولا بدلیل مقادیر بالای اسیدهای چرب غیر اشباع در غشای سلولی، موقعیت مستقیم آن در برابر نور و مصرف بالای اکسیژن بسیار مستعد استرس اکسیداتیو می باشد؛ بویژه زمانی که تولید عوامل اکسیدکننده بالا و عملکرد سیستم آنتی اکسیدان داخلی ناکافی باشد.

هدف مطالعه حاضر ارزیابی سطوح پلاسمایی هموسیستئین و فعالیت سرمی پاراکسوناز و ارزیابی استرس اکسیداتیو با سنجش LDL-C اکسیدشده در بیماران مبتلا به ARMD مرطوب در مقایسه با افراد سالم می باشد.

مواد و روش ها

مطالعه تحلیلی 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 تا۸۰ سال انتخاب شدند. گروههای مورد مطالعه شامل ۴۵ بیمار مبتلا به ARMD مرطوب و ۴۵ فرد سالم به عنوان شاهد بودند که بصورت تصادفی انتخاب شده بودند. از ورود افراد با سابقه دیابت، سکته، نارسایی کلیوی و یا کبدی، فشار خون کنترل نشده و سیگاریها و نیز افرادی که سابقه مصرف فراورده های 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 تجارتی استاندارد (پارس آزمون) اندازه‌گیری شد. مقادیر LDL-C با معادله Friedewald سنجیده شد (۱۰). جهت انجام آزمایشات بعدی، باقیمانده نمونه ها در دمای $-۷۰^{\circ}C$ نگهداری شدند. فعالیت آنزیم پاراکسوناز با روش Eckerson و سوبسترای پاراکسون اندازه گیری شد (۱۱). در این روش فعالیت پاراکسوناز با افزودن ۲۰ میکرولیتر سرم به ۷۰۰ میکرولیتر بافر اولیه [حاوی ۲ mM پاراکسون، ۲ mM CaCl2 در ۱ mM بافر Tris-HCl (PH=۸)]، سپس سنجش میزان تولید پارا–نیتروفنیل بعنوان محصول با اسپکتروفتومتر در ثانیه‌های ٦۰ و ۱۲۰، در دمای $۲۵^{\circ}C$ و در طول موج ٤۱۲ nm اندازه‌گیری شد و مقادیر برحسب IU/mL گزارش گردید. فعالیت آریل استرازی نیز با استفاده از سوبسترای فنیل استات با افزودن ۱۰ میکرولیتر سرم به ۳ میلی لیتر بافر اولیه [حاوی ۲ mM فنیل استات، ۲ mM CaCl2 در ۱ mM بافر Tris-HCl (PH=۸)] سپس سنجش میزان تولید فنیل بعنوان محصول با اسپکتروفتومتر در ثانیه های ٦۰ و ۱۲۰، در دمای $۲۵^{\circ}C$ و در طول موج ۲۷۰ nm اندازه گیری شد و مقادیر برحسب واحدU/l گزارش شد. میزان هموسیستئین تام پلاسما با استفاده از کیت شرکت AXIS و بروش ایمنواسی آنزیمی اندازه گیری گردید. LDL-C اکسیدشده با استفاده از کیت Mercodia و بروش ایمونواسی انجام شد.

داده بدست آمده از مطالعه بوسیله روشهای آماری توصیفی (میانگین±انحراف معیار) و آزمون تی مستقل یا ازمون ناپارامتری یومان و تینی و با استفاده از نرم افزار آماری SPSS.16 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در این مطالعه مقدار P کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار تلقی گردید.

یافته ها

بطور تصادفی ۲۸ زن و ۱۷ مرد در هر یک از دو گروه مورد مطالعه قرار گرفتند. ویژگیهای بالینی افراد شرکت کننده در هر گروه در جدول ۱ آمده است. تفاوت معنی داری در توزیع سن و جنس بین گروه بیمار (متوسط سنی ۷±۷۱ سال) و گروه شاهد. (متوسط سنی ٦۹±۵ سال)؛ ($P > ۰/۰۵$) وجود نداشت. به استثنای میانگین‌های LDL-C (۴۰±۱۳۲ mg/dl در مقابل ۳۵±۱۰۵ mg/dl،

(P = ۰/۰۰۱) و کلسترول (۳۹ mg/dl ± ۲۰۴ در مقابل mg/dl ۳۶±۱۸۱، P=۰/۰۰۵)، و نیز BCVA (Best corrected visual acuity) (P = ۰/۰۰۱)، در مورد سایر پارامترهای بالینی و پایه اختلاف آماری معنی‌داری بین دو گروه مورد مطالعه مشاهده نگردید (P >۰/۰۵).

مطابق جدول ۲ میانگین فعالیت سرمی آنزیم پاراکسوناز در گروه بیمار (۵۰U/ml±۷/۷۳) به طور معنی داری از گروه شاهد (۱۰۲/۳±۶۶U/ml) پایین‌تر بود (P =۰/۰۲)؛ ولی اختلاف معنی‌داری در فعالیت آریل استرازی بین گروه بیمار و کنترل (به ترتیب ۱۶U/l±۷۰/۸ و ۲۰U/l±۷/۷۴) مشاهده نشد (P=۰/۳). همچنین این جدول نشان می‌دهد که میانگین غلظت پلاسمایی هموسیستئین بیماران تقریبا ۳۸/۱٪ بالاتراز گروه شاهد بود (۱۵/۴±۷/۲µM در مقابل ۱۰/۷±۷/۳µM، P = ۰/۰۰۱). علاوه براین میانگین سطوح پلاسمایی LDL-C اکسید شده نیز در بیماران تقریبا ٪۴۳/۹ بالاتر از گروه شاهد بود (۱۴U/l±۵۲/۲ در مقابل ۱۱U/l±۳۷/۸، P = ۰/۰۰۱).

بحث

در مطالعه حاضر سطوح پلاسمایی هموسیستئین در بیماران مبتلا به ARMD مرطوب مورد ارزیابی قرار گرفت. این مطالعه همانند نتایج بدست آمده از تحقیق K. Coral و همکاران بر روی بیماران ARMD مرطوب (۱۲)، افزایش معنی داری را در سطوح هموسیستئین در بیماران ماکولای مرطوب نشان داد. همچنین در تحقیقی بر روی جامعه ایرانیان غلظت هموسیستئین در بیماران قلبی در مقایسه با افراد سالم مورد ارزیابی قرار گرفت. میانگین هموسیستئین بدست آمده از تحقیق ما در دو گروه بیمارARMD مرطوب وسالم با محدوده‌های تعیین شده برای میانگین هموسیستئن در جمعیت بیماران قلبی و سالم مطالعه ذکر شده (15.56±6.77 در مقابل 11.51±4.63) قابل مقایسه است (۱۳).

جدول ۱: اطلاعات بالینی بیماران دژنرسانس وابسته به سن ماکولای مرطوب و گروه شاهد

متغیرها	بیمار	شاهد	P-value*
سن	۷۱±۷	۶۹±۵	۰/۱
BCVA	۰/۱±۰/۰۷	۱/۱۸±۰/۳۶	۰/۰۰۱**
Pesudophacia	۳۴	۲۹	-
اندیکس توده بدن (g/m^2)	۲۵/۳±۴	۲۷/۳±۶	۰/۱
فشار سیستولیک (mmHg)	۱۲۹/۸±۲۰	۱۲۴/۴±۷	۰/۱
فشار دیاستولیک (mmHg)	۷۷/۵±۱۰	۸۲/۵±۸	۰/۱
گلوکز (mg/dl)	۸۸±۱۳	۸۵/۲±۱۵	۰/۵
اوره (mg/dl)	۳۲/۳±۷	۳۴/۳±۶	۰/۱
کراتینین (mg/dl)	۱/۰±۰/۲	۱/۰۸±۰/۲	۰/۱
تری گلیسرید (mg/dl)	۱۴۴/۵±۶۴	۱۵۴±۴۹	۰/۱
کلســـــترول (mg/dl)	۲۰۴±۳۹	۱۸۱±۳۶	۰/۰۰۵
HDL-C (mg/dl)	۴۳/۱±۵	۴۴/۲±۶	۰/۳
LDL-C (mg/dl)	۱۳۲±۴۰	۱۰۵±۳۵	۰/۰۰۱

اعدادبصورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده اند.
BCVA = Best corrected visual acuity
Independent-samples T-test*
Mann-Whitney U test**

جدول ۲: متغیرهای اکسیدان وآنتی اکسیدان در بیماران دژنرسانس وابسته به سن ماکولای مرطوب و گروه شاهد

متغیرها	بیمار	شاهد	P-value*
پاراکسوناز (U/ml)	۷۳/۷±۵۰	۱۰۲/۳±۶۶	۰/۰۲
آریل استراز (U/l)	۷۰/۸±۱۶	۷۴/۷±۲۰	۰/۳
LDL-Cاکسیدشده (U/l)	۵۲/۲±۱۴	۳۷/۸±۱۱	۰/۰۰۱
هموسیستئین(µM)	۱۵/۴±۷/۲	۱۰/۷±۳/۷	۰/۰۰۱

اعداد بصورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده اند.
*Independent-samples T test

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که حتی افزایش ملایم در هموسیستئین خون بعنوان یک عامل اکسیداتیو عمل می‌کند و با خطر بیماریهای عروقی همراه است (۱۴،۱۵). این مطالعات نتیجه مطالعه ما را مبنی بر وجود هیپرهموسیستئینمی در بیماران ARMD مرطوب تأیید می‌کنند. برای ارزیابی شدت آسیب اکسیداتیو و پیامد حاصل از افزایش غلظت هموسیستئین، سطوح پلاسمایی LDL-Cاکسیدشده اندازه‌گیری شد. نتایج حاصله حاکی از افزایش غلظت این ماده در پلاسمای بیماران ARMD مرطوب نسبت به افراد شاهد بود. طبق مطالعات انجام شده، هموسیستئین بدلیل قابلیت اتواکسیداسیون، در غلظتهای بالا موجب افزایش تولید انواع اکسیژن فعال (ROS) از قبیل آنیون سوپر اکسید ($O^{\bullet}$) و رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\bullet}$) می‌شود (۱۶). عوامل ROS با اکسیداسیون ماکرومولکولها بویژه پارتیکل‌های لیپیدی و تجمع فراورده های ناشی از استرس اکسیداتیو مثل LDL-C اکسیدشده، موجب آسیب عروق و آترواسکلروز می‌شود. همچنین تحقیقات نشان داده‌اند، هموسیستئین تیولاکتون با اتصال به آپولیپوپروتئین B-100 و هموسیستئینیله کردن آن، LDL را بسیار مستعد اکسیداسیون می کند(۱۷). LDL هموسیستئینیله توسط رسپتور scavenger ماکروفاژها در جدار عروق برداشت و موجب تجمع کلسترول در داخل این سلولها و تشکیل فوم سل ها می شود که هسته های اولیه آترواسکلروز می باشند. در مطالعه فوق فعالیت آنزیم پاراکسوناز در بیماران ماکولای مرطوب نسبت به گروه کنترل پایین تر بود. مطالعه انجام شده توسط Baskol و همکاران (۱۸) بر روی بیماران مبتلا به دژنرسانس وابسته به سن ماکولا این یافته مارا تأیید می کند. اگرچه مکانیسم این کاهش فعالیت در بیماران ماکولای مرطوب مشخص نیست، اما افزایش سطح LDL-C اکسیدشده ناشی از افزایش ROS، می‌تواند کاهش فعالیت سرمی پاراکسوناز را توضیح دهد. چرا که مصرف پاراکسوناز برای جلوگیری از اکسیداسیون معمولا منجر به تغییر در فعالیت سرمی پاراکسوناز می‌شود (۲۰–۱۹). گزارش شده است که بدنبال هیدرولیز لیپیدهای پراکسیده، گروههای سولفیدریل پاراکسوناز با لیپیدهای اکسیده واکنش داده و آنزیم غیرفعال می‌شود (۲۰). احتمال دیگر برای کاهش فعالیت پاراکسوناز، هموسیستئینیله شدن این آنزیم یا دیگر پروتئینهای HDL مثل آپولیپو پروتئین A1 توسط هموسیستئن تیولاکتون می‌باشد(۲۱). بنابر این افزایش انواع اکسیژن فعال و نیز هموسیستئینیله شدن پروتئین‌ها منجر به کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی پاراکسوناز و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش سطح LDL-C اکسید شده می‌شود.

نتایج مطالعات انجام شده در سال ۲۰۰۰ نشان داد که پاراکسوناز می‌تواند لاکتونهای آروماتیک و آلیفاتیک متعددی را از جمله هموسیستئین تیولاکتون هیدرولیز کند. هرچند ارتباط بین فعالیت پاراکسونازی و هموسیستئین تیولاکتونازی این آنزیم دقیقا مشخص نیست اما مشخص شده که اثرات آن روی پاراکسون بسیار مشابه هموسیستئن تیولاکتون است و با تخمین فعالیت پاراکسوناز هیدرولازی سرم به خوبی می‌توان فعالیت هموسیستئین تیولاکتون هیدرولازی را اندازه‌گیری کرد (۲۲). میزان اتصال هموسیستئین تیولاکتون به پروتئین ها ارتباط معکوسی با فعالیت پاراکسونازی داشته و سنجش میزان فعالیت پاراکسونازی در ارزیابی میزان هموسیستئینیلاسیون پروتئین‌ها اهمیت دارد (۲۳).

بیماری دژنرسانس وابسته به سن ماکولای مرطوب یک بیماری چند عاملی است و وجود طیف گسترده‌ای از عوامل احتمالی در ایجاد بیماری سبب شده است که مکانیسم دقیقی از تغییرات فیزیولوژیکی این بیماری در اختیار ما قرار نگیرد (۲۴). طبق نتایج تحقیقات سال‌های اخیر، سطوح بالای سرمی کاروتنوئیدها، ویتامین های C، E، بتا کاروتن و فلز روی با کاهش خطرات بیماری ماکولای مرطوب همراه است (۲۵،۲۶). علاوه بر این با توجه به اهمیت هموسیستئین تیولاکتون در آسیبهای حاصل از هیپرهموسیستئینمی و نقش پاراکسوناز در خنثی سازی این ماده، بهتر است در مطالعه دیگری ارتباط بین هموسیستئین تیولاکتون و پاراکسوناز را با سنجش فعالیت هموسیستئن تیولاکتونازی در جهت کاهش هموسیستئین تیولاکتون مورد ارزیابی قرار داد.

نتیجه گیری

بیماران دژنرسانس وابسته به سن ماکولای مرطوب در مقایسه با افراد شاهد، بدلیل غلظت بالای هموسیستئین با افزایش تولید ROS مواجه هستند و بخاطر کاهش برداشت این عوامل ناشی از کاهش فعالیت پاراکسوناز بسیار مستعد استرس اکسیداتیو می باشند. هر چند به نظر می آید که استفاده از آنتی اکسیدانها می تواند در پیشگیری یا کاهش اثرات مخرب عوامل اکسیداتیو مؤثر باشد، اما مطالعات بیشتری لازم است تا نقش عوامل تغییر دهنده این فاکتورها را در پیشگیری و حتی درمان بیماری دژنرسانس وابسته به سن ماکولای مرطوب نشان دهد.

References:

1. De Jong PT. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006; **355**(14): 1474-1485.
2. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ* 2004; **82**(11): 844-851.
3. Bourla DH, Young TA. Age-related macular degeneration: a practical approach to a challenging disease. *J Am Geriatr Soc* 2006; **54**(7): 1130-1135.

4. MacDonald IM. Genetic aspects of age-related macular degeneration. *Can J Ophthalmology* 2005; **40**(3): 288-292.
5. Judge S, Jang 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. Jakubowski H. Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J* 1999; **13**(5): 2277–2283.
7. Jakubowski H, Goldman E. Synthesis of homocysteine thiolactone by methionyl-TRNA synthetase in cultured mammalian cells. *FEBS Lett* 1993; **317**(3): 237–240.
8. Jarvik GP, Hatsukami TS, Carlson C, Richter RJ, Jampsa R. Paraoxonase activity, but not haplotype utilizing the linkage disequilibrium structure, predicts vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23**(10): 1465–1471.
9. Nevin DN, Zambon A, Furlong CE, Richter RJ, Humbert R. Paraoxonase genotypes, lipoprotein lipase activity, and HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; **16**(10): 1243-1249.
10. Fujimoto WY. Friedewald's LDL-cholesterol estimation formula in a Japanese American population. *Jpn Circ J* 1988; **52**(7): 604-606.
11. 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): 214-227.
12. Coral K, Raman R, Rathi S, Rajesh M, Sulochana KN. Plasma homocysteine and total thiol content in patients with exudative agerelated macular egeneration. Eye 2006; **20**(2): 203–207.
13. Ghaedi M, Haji Zeinali AM, Boroumand MA, Abbasi SH. Homocysteine level in CAD patients of Iranian population. *Iranian Cardiovascular Research Journal* 2007; **1**(2): 92-97.
14. Ray JG. Review: elevated homocysteine levels are modestly associated with increased ischemic heart disease and stroke risk. *ACP J Club* 2003; **138**(4): 78-84.
15. Homocysteine studies collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke. *JAMA* 2002; **20**(16): 15–22.
16. Ciaccio M, Bivona G, Bellia C. Therapeutically approach to plasma homocysteine and cardiovascular risk reduction. *Ther Clin Risk Manag* 2008; **4**(1): 219-224.
17. Heuberger RA, Fisher AI, Jacques PF**,** Klein R**,** Klein B. Relation of blood homocysteine and its nutritional determinants to age-related maculopathy in the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr* 2002; **76**(4): 897-902.
18. Baskol G, Karakucuk S, Oner AO, Baskol M, Kocer D. Serum paraoxonase 1 activity and lipid peroxidation levels in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmologica* 2006; **220**(1): 12-16.
19. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Erogul J, Sorenson R. Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999; **26**(7-8): 892–904.
20. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; **101**(8): 1581–1590.
21. Jakubowski H. Protein homocysteinylation: a new mechanism of atherogenesis. *Postepy Hig ed Dosw* 2005; **59**(1): 392-404.
22. Jakubowski H, Ambrosius WT, Pratt JH. Genetic determinants of homocysteine thiolactonase activity in humans: implications for atherosclerosis. *FEBS Lett* 2001; **491**(11): 35–39.
23. Chwatko G, Jakubowski H. The determination of homocysteine-thiolactone in human plasma. *Anal Biochem* 2005; **337**(2): 271–277.
24. Smith W, Assink J, Klein R, Mitchell P, Klaver CC. Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. Ophthalmology 2001; **108**(4): 697-704.
25. De32Smith W, Mitchell P, Leeder SR. Dietary fat and fish intake and age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol* 2000; **118**(5): 401-404.
26. Chong W, Wong T, Kreis A, Simpson J, Guymer R. Dietary antioxidants and primary prevention of age related macular degeneration: systematic review and meta-analysis 2007; **335**(7623): 755-763.