

## **Evaluation of Serum malondialdehyde concentrations and enzymatic activity of paraoxonase and arile esterase in women with a recurrent spontaneous abortion**

Sanjadi M, Nayeri H\*

Department of Biochemistry, Islamic Azad University of Falavarjan Branch, Isfahan, I. R. Iran.

Received: 2018/11/25 | Accepted: 2019/07/30

### **Abstract:**

**Background:** Recurrent spontaneous abortion (RSA) is considered as a harmful event for couples, and can lead to serious problems such as anxiety and depression in couples. Malondialdehyde (MDA) is involved in a variety of disorders including spontaneous abortion (RSA). Paraoxonase and Ariel Esterase are antioxidant enzymes with various protective effects. This study aimed to investigate the relationship between serum MDA level and enzymatic activity of paraoxonase and arile esterase enzymes with RSA risk.

**Materials and Methods:** In this case-control study, 53 RSA patients and 47 healthy age- and sex-matched subjects as the control group were enrolled in the study. Level of MDA were determined in serum sample by using a calorimetrically method with thiobarbituric acid (TBA). The activity of enzymes Paraoxonase and arylesterase were measured by spectrophotometry.

**Result:** The mean serum level of MDA was significantly increased in RSA patients compared to a healthy control group ( $5.85 \pm 1.00$  vs.  $5.47 \pm 0.77$ ,  $P < 0.05$ ). We did not observe any significant difference between two groups in mean activity of enzymes Paraoxonase and arylesterase. We found a positive statistical correlation between the serum levels of MDA and anti-paternal cytotoxic antibody (APCA) ( $r = +0.20$ ,  $P = 0.04$ ).

**Conclusion:** The present study reveals that oxidative stress and lipid peroxidation in women with a history of spontaneous abortion may increase and subsequently may play a role in non-pregnant women with a history of RSA. Therefore, the increase of oxidative stress in women with a history of RSA is not related solely to pregnancy.

**Keywords:** Recurrent abortion, Oxidative stress, Malondialdehyde, Paraoxonase, Arylesterase

**\*Corresponding Author:**

**Email:** Hashem.nayeri@yahoo.com

**Tel:** 0098 933 600 5705

**Fax:** 0098 513 841 6015

Conflict of Interests: *No*

\_\_\_\_\_ *Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, December, 2019; Vol. 23, No 5, Pages 535-542*

*Please cite this article as:* Sanjadi M, Nayeri H. Evaluation of Serum malondialdehyde concentrations and enzymatic activity of paraoxonase and arile esterase in women with a recurrent spontaneous abortion. *Feyz* 2019; 23(5): 535-42.

# بررسی میزان غلظت سرمی مالون‌دی‌آلدهید و فعالیت آنزیمی آنزیم‌های پاراکسوناز و آریل‌استراز در زنان با سابقه سقط مکرر خودبه‌خودی

مریم سنجدی<sup>۱</sup>، هاشم نیری<sup>۲\*</sup>

## خلاصه:

**سابقه و هدف:** سقط مکرر به‌عنوان یک رویداد آسیب‌زا برای زوج‌ها مطرح است و منجر به بروز علائمی همچون اضطراب و افسردگی در زوجین می‌شود. مالون‌دی‌آلدهید (MDA) در بیماری‌های گوناگونی از جمله سقط مکرر خودبه‌خودی (RSA) نقش دارد. پاراکسوناز و آریل‌استراز، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با اثرات محافظتی گوناگون می‌باشند. هدف از مطالعه حاضر، بررسی ارتباط سطح سرمی MDA و فعالیت آنزیمی آنزیم‌های پاراکسوناز و آریل‌استراز در زنان با سقط مکرر خودبه‌خودی می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مورد-شاهدی، تعداد ۵۳ زن غیرباردار با سابقه سقط مکرر خودبه‌خودی به‌عنوان گروه بیماران و ۴۷ زن غیرباردار به‌عنوان گروه کنترل وارد مطالعه شدند. سطح سرمی مالون‌دی‌آلدهید در نمونه‌های سرم با یک روش رنگ‌سنجی با تیوباریتوریک اسید تعیین شد. فعالیت آنزیم پاراکسوناز و آریل‌استراز توسط روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. **نتایج:** میانگین سطح سرمی مالون‌دی‌آلدهید در گروه بیماران سقط مکرر خودبه‌خودی در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معناداری افزایش یافته بود ( $P=0.03$ ،  $5/47 \pm 0/77$  vs.  $7/55 \pm 1/00$ ). اختلاف معناداری در فعالیت آنزیم‌های پاراکسوناز و آریل‌استراز در دو گروه مشاهده نشد. **نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر نشان داد که در زنان با سابقه سقط مکرر خودبه‌خودی، استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدها افزایش می‌یابد و متعاقباً ممکن است نقش‌هایی در زنان غیرباردار با سابقه RSA داشته‌باشد. بنابراین افزایش استرس اکسیداتیو در زنان با سابقه RSA تنها مربوط به دوران بارداری نمی‌باشد.

**واژگان کلیدی:** سقط مکرر، استرس اکسیداتیو، مالون‌دی‌آلدهید، پاراکسوناز، آریل‌استراز

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و سوم، شماره ۵، آذر و دی ۹۸، صفحات ۵۴۲-۵۳۵

## مقدمه

Agarwal و همکاران در سال ۲۰۰۵، بیان داشتند که استرس اکسیداتیو یک عامل مهم برای از دست رفتن حاملگی است که این به دلیل عدم تعادل اکسیدان-آنتی‌اکسیدان در هنگام بارداری می‌باشد [۴]. Gulum و همکاران در سال ۲۰۱۶، وضعیت آنتی‌اکسیدانی و شاخص‌های استرس اکسیداتیو، میزان پاراکسوناز و آریل‌استراز را در خون و پلاسمای مایع منی مردان نابارور بررسی نمودند و نتایج نشان داد که استرس اکسیداتیو نقش مهمی را در ناباروری مردان ایفا می‌کند که منجر به عدم کارایی اسپرم می‌شود. رادیکال‌های آزاد، باعث شروع پراکسیداسیون لیپید در غشا می‌شوند و نتیجه نهایی پراکسیداسیون لیپید، تولید مواد مضر است که مهم‌ترین آن‌ها آلدهیدها هستند [۵]. یکی از مهم‌ترین آلدهیدها مالون‌دی‌آلدهید (MDA) است که یک شاخص برای اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپید می‌باشد. اگرچه سطح مالون‌دی‌آلدهید در زنان با سابقه سقط مکرر مورد بررسی قرار نگرفته است، اما بررسی سطح آن در مطالعه‌ای که بر روی موارد خودبه‌خودی و تکی سقط صورت گرفته‌است، نشان می‌دهد که بدون توجه به نوع سقط، سطح این مارکر به‌طور معناداری قبل از بروز سقط نسبت به زمان بعد از سقط افزایش یافته‌است [۵]. از طرف دیگر پاراکسوناز ۱ (PON) به‌عنوان آنزیمی آنتی‌اکسیدانی است که پراکسیدهای لیپیدی موجود در لیپوپروتئین‌های اکسیدشده را

بر طبق تعریف، سقط مکرر به از دست دادن سه یا تعداد بیشتری حاملگی، پشت‌سرهم قبل از هفته بیستم بارداری گفته می‌شود [۱]. دلایل متعددی برای وقوع سقط‌های مکرر خودبه‌خودی وجود دارد. عوامل ایمنولوژیکی، آناتومیکی، اندوکرینی و ژنتیکی مهم‌ترین عوامل در این زمینه محسوب می‌شوند [۲]. عوامل دیگری از جمله: وجود ناهنجاری‌های کروموزومی، هیپوتیروئیدی درمان‌نشده، سندرم آنتی‌فسفولیپید، عفونت‌ها و عوامل محیطی نیز در این زمینه می‌توانند دخالت داشته باشند [۳]. اخیراً عدم تعادل بین سیستم اکسیدان-آنتی‌اکسیدان به‌عنوان یکی از عوامل مهم در وقوع سقط‌های مکرر خودبه‌خودی مطرح شده‌است. استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پاتوژنز سقط مکرر در سه‌ماهه‌های مختلف بیماری دارد [۴].

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
  ۲. استادیار، گروه بیوشیمی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
- \* نشانی نویسنده مسئول:  
فلاورجان، اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، گروه بیوشیمی  
تلفن: ۰۹۳۳۶۰۰۵۷۰۵  
دوره‌نویس: ۰۵۱۳۸۴۱۶۰۱۵  
پست الکترونیک: Hashem.nayeri@yahoo.com  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۴  
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۵/۸

گروه کنترل سالم وارد مطالعه شدند. اطلاعات دموگرافیک و کلینیکی بیماران با استفاده از چک لیست تعبیه شده توسط دو کارشناس آزمایشگاه پیش از نمونه گیری خون جمع آوری شد. از افراد شرکت کننده در این مطالعه، فرم رضایت نامه کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان دریافت شد.

متغیرهای مطالعه:

در این مطالعه ۶ متغیر اصلی به کار گرفته شده بود که شامل موارد ذیل بود:

سقط مکرر خودبه خودی: کیفی - مستقل

سن: کمی - مستقل

جنس: کیفی - مستقل

پاراکسوناز: کمی - وابسته

آریل استراز: کمی - وابسته

مالون دی آلدھید: کمی - وابسته

معیارهای ورود به مطالعه:

۵۳ بیمار مبتلا به سقط مکرر خودبه خودی که طبق معیارهای

تشخیصی RSA، تشخیص سقط مکرر خودبه خودی توسط پزشک

معالج برای آنها قطعی است، وارد مطالعه خواهند شد.

سقط بیش از سه مورد

سقط قبل از هفته ۲۰ ام بارداری باشد.

حداقل باید یک سال از آخرین سقطشان گذشته باشد.

معیارهای خروج از مطالعه:

وجود بیماری های زمینه ای و مزمن

بیماری های اتوایمن

عدم رضایت بیمار

جمع آوری نمونه

میزان ۵ میلی لیتر خون وریدی محیطی از بیماران و گروه

کنترل توسط دو کارشناس آزمایشگاه جمع آوری و در لوله های

آزمایشگاهی بدون ماده ضد انعقاد ذخیره شد. نمونه ها سانتریفیوژ

شده، پلاسمای آنها جداسازی شد و سپس در فریزر و در دمای

۸۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایش های سنجش سطح

سرمی و میزان فعالیت آنزیمی نگهداری شدند.

اندازه گیری غلظت MDA سرمی

میزان سطح سرمی مالون دی آلدھید به روش آنالیز

تیوباریتوریک اسید و به صورت اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد.

محلول استاندارد حاوی مالون دی آلدھید از مخلوط حاوی سرم به-

همراه محلول تری کلریک اسید ۲۰ درصد و سدیم دو دسیل

سولفات ۸/۱ درصد و محلول تیوباریتوریک اسید ۰/۸ درصد

استخراج شد. سپس این محلول استخراج شده به مدت یک ساعت

هیدرولیز می کند [۵]. مطالعات زیادی رابطه معکوس فعالیت این

آنزیم با شرایط استرس اکسیداتیو را نشان داده است. کاهش فعالیت

پاراکسوناز در چندین بیماری تحت تأثیر استرس اکسیداتیو، مانند:

دیابت، استنوز آرتری، آترواسکلروز و بیماری قلبی-عروقی ثابت

شده است [۶]. پاراکسوناز دارای سه دسته آنزیمی شناخته شده

است؛ از جمله: پاراکسوناز، آریل استراز (ARE) و دیازوکوناز [۷].

هر دو PON و ARE برای تشکیل یک جزء مهم سیستم آنتی-

اکسیداتیو آنزیمی پلازما تعامل می کنند [۷]. با توجه به پروسه

پراکسیداسیون لیپید و نیز اهمیت مکانیسم های استرس اکسیداتیو

که منجر به تولید گونه های واکنش پذیر اکسیژن می شوند و به دلیل

نقش این مکانیسم ها در سقط مکرر و نظر به این که تاکنون

مطالعه ای مشابهی به بررسی مارکرهای مهم استرس اکسیداتیو در

بیماران مبتلا به سقط مکرر نپرداخته است، بررسی مالون دی آلدھید

به عنوان یکی از مهم ترین مارکرهای پراکسیداسیون لیپید و استرس

اکسیداتیو در این بیماران از اهمیت بسزایی برخوردار می باشد.

اگرچه ممکن است میزان استرس اکسیداتیو و تولید مارکرهای آن

نظیر مالون دی آلدھید که نشانی از میزان فعالیت این مکانیسم ها در

بدن می باشد، در بیماران مبتلا به سقط مکرر افزایش یافته باشد، اما

بررسی آنزیم های تجزیه کننده ای این ترکیبات نیز از اهمیت زیادی

برخوردار می باشد؛ چراکه ممکن است این افزایش در ترکیبات

حاصل از استرس اکسیداتیو ناشی از نقص در آنزیم های

تجزیه کننده ای آنها باشد. علاوه بر نقص های ذکر شده، تاکنون

مطالعه ای به بررسی مارکرهای استرس اکسیداتیو و نیز میزان

فعالیت آنزیم های تجزیه کننده ای این ترکیبات در زنان مبتلا به سقط

مکرر نپرداخته است، بنابراین بررسی سطح مالون دی آلدھید و نیز

میزان فعالیت آنزیم های پاروکسوناز و آریل استراز در این بیماران

از اهمیت بسزایی برخوردار بوده، می تواند کمک شایانی به شناسایی

بخشی از مکانیسم های اتیولوژیک و پاتوژنز این بیماری بکند.

## مواد و روش ها

### جمعیت های مورد مطالعه

این مطالعه در سال ۱۳۹۶ در شهر اصفهان انجام شد.

نمونه های بیماران از آزمایشگاه های اریترن، جم و پاستور

جمع آوری شد. در این مطالعه مورد-شاهدی تعداد ۵۳ بیمار با

سابقه سقط مکرر که تشخیص این بیماری برای آنها توسط

متخصص زنان و زایمان صورت گرفته بود، به روش تصادفی ساده

با استفاده از جدول اعداد تصادفی انتخاب شدند. همچنین تعداد ۴۷

زن بدون سابقه سقط مکرر که از نظر سن، جنس و شاخص توده

بدنی (BMI) با گروه بیمار تفاوت معناداری نداشتند، نیز به عنوان

جوشانده و سپس خنک و به آن ان-بوتانول اضافه شد. لایه ارگانیک اسید بعد از سانتریفیوژ به مدت ده دقیقه با دور ۴۰۰۰rpm جدا و با طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانش شد. برای تهیه معرف‌ها از آب مقطر خالص استفاده شد. قبل از شروع آزمایش دمای معرف‌ها به دمای اتاق رسانده شد. برای تهیه معرف ۵/۲ گرم معرف ۲ با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر به حجم رسید. برای تهیه محلول استاندارد MDA با غلظت ۱۰ mM، ابتدا ۳۳ میکرولیتر از معرف ۳ با ۲۰ از معرف ۴ به حجم رسانده شد و محلول به مدت دو ساعت در تاریکی و دمای اتاق قرار گرفت و برای تهیه استوک ۱۰ mM، ۱۰ میکرولیتر از محلول استاندارد MDA با غلظت ۱۰ mM با آب مقطر به حجم نهایی ۱۰ ml رسانده شد. پس از آن یک-سری رقت ۶ تایی با غلظت ۱۰-۰ میکرومولار تهیه شد.

لوله آزمایش شماره ۱: حاوی یک میلی‌لیتر آب مقطر (نمونه شاهد)  
 لوله آزمایش شماره ۲: حاوی یک میلی‌لیتر از محلول استاندارد MDA + ۴ میلی‌لیتر آب مقطر  
 لوله آزمایش شماره ۳: حاوی یک میلی‌لیتر محلول استاندارد MDA + ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر  
 لوله آزمایش شماره ۴: حاوی ۱/۵ میلی‌لیتر محلول استاندارد MDA + ۱ میلی‌لیتر آب مقطر  
 لوله آزمایش شماره ۵: حاوی ۲ میلی‌لیتر محلول استاندارد MDA + ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر  
 لوله آزمایش شماره ۶: حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول استاندارد MDA

سنجش فعالیت پاراکسوناز

پاراکسوناز یک آنزیم مرتبط با HDL است. این آنزیم عمدتاً در کبد تولید شده، به جریان خون می‌ریزد. پاراکسوناز، هیدرولیز ترکیبات بسیار سمی مانند آفت‌کش‌ها و ... را بر عهده دارد. با استفاده از کیت سنجش، فعالیت آنزیم پاراکسوناز (PONI) اندازه‌گیری شد. این سنجش به‌عنوان شاخص ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و نشانگر بیماری‌های قلبی-عروقی و کبدی است. کیت حاوی بافر Tris-Hcl و  $CaCl_2$  و پاراکسون می‌باشد. در این روش پاراکسوناز، سوپسترای پاراکسون را کاتالیز کرده، پارانیتروفلن حاصل می‌شود. ابتدا از نمونه‌های موجود در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، ۹۰۰ میکرولیتر از محلول‌های حاوی سوپسترا را با ۱۰۰ میکرولیتر سرم مخلوط نموده، به درون کووت‌های دستگاه اسپکتوفتومتر انتقال دادیم و در طول موج ۴۱۲ نانومتر میزان تولید پارانیتروفلن را پس از ۲ دقیقه اندازه‌گیری کرده، OD را ثبت نمودیم.

سنجش فعالیت آریل استراز

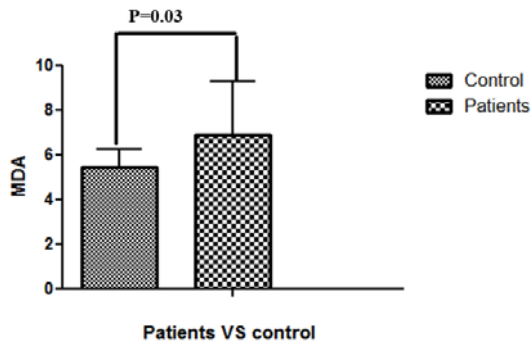
آریل استراز یکی از فعالیت‌های آنزیم پاراکسوناز، در سم-زدایی فرآیند پراکسیداسیون لیپیدها نقش دارد. فعالیت آریل استرازی در التهاب، استرس اکسیداتیو، بیماری‌های قلبی-عروقی و سرطان‌ها کاهش می‌یابد. با استفاده از این روش کار سنجش آنزیم اندازه‌گیری شد. آنزیم PONI، فنیل استات را کاتالیز می‌کند و فنل و استیک اسید حاصل می‌شود. میزان تولید فنل در طول موج ۲۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. کیت حاوی بافر tris-hcl و  $CaCl_2$  و فنل استات به‌عنوان سوپسترا و پایدارکننده می‌باشد. ۹۰۰ میکرولیتر از محلول آماده‌شده را با ۱۰۰ میکرولیتر از سرم‌ها و سپس با سمپلر مخلوط می‌کنیم. بعد در دستگاه اسپکتوفتومتر جذب محلول در طول موج ۴۱۲ پس از ۲ دقیقه قرائت شد. این مراحل برای سایر سرم‌ها تکرار شد. Mackness و همکاران نشان دادند که آنزیم پاراکسوناز دارای دو نوع فعالیت پاراکسونازی (قابل اندازه‌گیری در برابر پاراکسون) و آریل استرازی (قابل اندازه-گیری در برابر فنیل استات) می‌باشد [۸]. به نظر می‌رسد این آنزیم احتمالاً دو شکل آنزیمی متداول با خصوصیات کیفی منحصر به فرد دارد. گزارش شده‌است که فعالیت این آنزیم در برابر پاراکسون دارای تغییرپذیری بیشتری است؛ درحالی‌که فعالیت آریل استرازی از ثبات بیشتری برخوردار است و معیار بهتری از غلظت آنزیمی می‌باشد.

آنالیز آماری

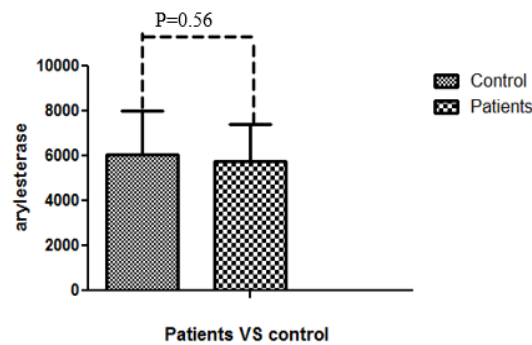
تجزیه و تحلیل آماری در دو سطح توصیفی و استنباطی انجام شد. در سطح توصیفی از شاخص‌های میانگین و انحراف معیار استفاده شد. در سطح استنباطی پس از انجام آزمون کولموگروف اسمیرنوف به‌منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها، در صورت برقراری فرض نرمال بودن برای مقایسه متغیرهای کمی بین دو گروه از آزمون تی مستقل و در غیر این صورت از آزمون من-ویننی استفاده شد. از آزمون کای دو به‌منظور مقایسه متغیرهای کیفی بین دو نمونه استفاده شد. از مدل رگرسیون لجستیک به‌منظور بررسی هم‌زمان اثر متغیرهای مورد مطالعه بر وجود یا عدم وجود سابقه‌ی سقط استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۲ انجام گرفت.

### نتایج

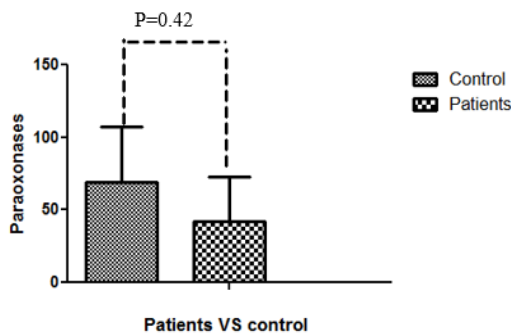
۱- میانگین سن و BMI در گروه بیماران به‌ترتیب برابر با  $31/66 \pm 5/03$  و  $26/46 \pm 4/28$  و در گروه کنترل برابر با  $32/14 \pm 5/19$  و  $27/52 \pm 4/45$  بود و تفاوت معناداری در سن و BMI دو گروه مشاهده نشد ( $P=0/63$ ،  $P=0/22$ ). سایر اطلاعات



شکل شماره ۱- مقایسه میانگین غلظت سرمی مالون دی آلدهید که تفاوت معناداری را در دو گروه نشان می‌دهد.



شکل شماره ۲- مقایسه میانگین غلظت سرمی آریل استراز که تفاوت معناداری را در دو گروه نشان نمی‌دهد.



شکل شماره ۳- مقایسه میانگین غلظت سرمی پاراکسوناز که تفاوت معناداری را در دو گروه نشان نمی‌دهد.

دموگرافیک گروه بیماران و گروه کنترل در جدول شماره ۱ نشان داده شده است (آزمون t).

۲- میزان سطح سرمی مالون دی آلدهید به روش آنالیز تیوباریتوریک اسید و به صورت اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. میانگین سطح سرمی مالون دی آلدهید در گروه بیماران به طور معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود ( $P=0.03$ ,  $5.47 \pm 0.77$  vs  $1.00 \pm 0.75$ )، (شکل شماره ۱) (آزمون t).

۳- میزان فعالیت پاراکسوناز به روش اسپکتروفتومتری بررسی شد که در آن از پاراکسون به عنوان سوبسترا استفاده شده است. تفاوت معناداری بین افراد سالم و بیماران سقط مکرر خودبه‌خودی در میانگین فعالیت آنزیم‌های آریل استراز و پاراکسوناز مشاهده نشد ( $P=0.56$ ,  $P=0.42$ ). (شکل‌های شماره ۲ و ۳) آزمون t. همچنین یک ارتباط معنادار بین میانگین سطح سرمی مالون دی آلدهید و تست APCA مشاهده شد. به این صورت که با افزایش سطح آنزیم مالون دی آلدهید مقدار آنتی‌بادی APCA نیز افزایش پیدا می‌کرد ( $r=0.2$ ,  $P=0.04$ ). آزمون ضریب همبستگی Pearson. (جدول شماره ۲).

۴- طبق نتایج جدول شماره ۳ و براساس مدل رگرسیون لجستیک، از بین کلیه متغیرهای تأثیرگذار بر روی سقط مکرر مورد بررسی در این تحقیق، تنها اثر متغیر MDA در سطح خطای ۵ درصد معنادار مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). مقدار نسبت شانس برای MDA ۱۰ برابر ۱/۴۷ بود، بدان معنا که به ازای هر ۰/۱ واحد افزایش در مقدار MDA (۱ واحد افزایش MD ۱۰) شانس ابتلا به سقط مکرر ۱/۵ برابر خواهد شد. بنابراین افزایش MDA به عنوان یک عامل خطر در سقط مکرر می‌باشد.

جدول شماره ۱- اطلاعات دموگرافیک بیماران و افراد کنترل

مشخصات دموگرافیک	گروه بیماران	گروه کنترل	مقادیر P
تعداد افراد	۵۳	۴۷	-
سن (سال)	$31/66 \pm 5/03$	$32/14 \pm 5/19$	۰/۶۳
شاخص توده بدنی (کیلوگرم/مترمربع)	$26/46 \pm 4/28$	$27/52 \pm 4/45$	۰/۲۲
تعداد سقط	$3/49 \pm 0/82$	-	-
آزمایش APCA	۵	۰	۰/۲۲

جدول شماره ۲- بررسی رابطه APCA ratio با سقط مکرر

سطح معناداری	گروه		APCA ratio
	آزمایش	کنترل	
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	
۰/۰۳۸	(۹۰/۶)۴۸	(۱۰۰)۴۷	منفی (<۰/۱۲۳)
	(۹/۴)۵	۰	مثبت (>۰/۱۲۳)
	(۱۰۰)۵۳	(۱۰۰) ۴۷	کل

جدول شماره ۳- برآورد ضرایب رگرسیون لجستیک و نسبت بخت‌ها برای متغیرهای تأثیرگذار بر سقط مکرر

متغیر	آماره والد	درجه آزادی	سطح معناداری	مقدار ضریب	(فاصله اطمینان ۹۵٪) نسبت بخت
مقدار ثابت	۸/۸۲۴	۱	۰/۰۰۳	-۱۰/۱۱	---
سن	۱/۸۰۹	۱	۰/۱۷۹	-۰/۰۷۰	۰/۹۳(۰/۸-۱)
شاخص توده‌ی بدنی	۰/۵۶	۱	۰/۸۱۳	-۰/۰۱۴	۰/۴۸(۰/۷-۱/۲)
اریل‌استراز	۱/۰۴۸	۱	۰/۳۰۶	۰/۰	۱/۱(۰/۸۵-۱/۴)
10MDA	۱۵/۵۵	۱	۰/۰۰۱ <sup>o</sup>	۰/۳۸۶	۱/۴۷(۱/۲-۱/۸)
پاراسکوناز	۰/۳۴۵	۱	۰/۵۵۷	-۰/۰۰۴	۰/۶۸(۰/۸۳-۱/۳)
100apca_ratio	۳/۳۲	۱	۰/۰۶۸	-۰/۲۶۳	۱/۳(۱-۱/۷)

## بحث

اساسی در پاتوفیزیولوژی سقط مکرر ایفا می‌کنند. همچنین مشخص شده‌است که مارکرهای بیوشیمیایی آسیب‌گشایی ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن مانند محصولات پراکسیداسیون چربی، قبل از بروز سقط مکرر به بیشترین میزان خود در خون این بیماران می‌رسند [۱۹]. در مطالعه حاضر میزان مالون‌دی‌آلدهید در نمونه خون بیمارانی که دچار سقط مکرر بودند، اندازه‌گیری شد و میانگین میزان مالون‌دی‌آلدهید افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه سالم نشان داد که با مطالعات ذکر شده هم‌راستا است. در مطالعه حاضر فعالیت آریل‌استراز و پاراسکوناز در دو گروه مورد مطالعه تغییر معنی‌داری نداشت. افزایش مالون‌دی‌آلدهید در بیماران به‌عنوان مارکر افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد. همچنین، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پراکسیداسیون لیپیدی را مهار می‌کند و بنابراین باعث کاهش مالون‌دی‌آلدهید می‌شود که در مطالعه حاضر هم‌زمان با افزایش مالون‌دی‌آلدهید در بیماران تغییری در میزان فعالیت آنزیم‌های آریل‌استراز و پاراسکوناز مشاهده نکردیم که عدم معنی‌دار بودن فعالیت پاراسکوناز و آریل‌استراز در مطالعه حاضر احتمالاً به دلیل تعداد محدود نمونه‌های مورد آزمایش، عدم ثابت بودن فاکتورهای مؤثر بر روی فعالیت این آنزیم همچون تغذیه، فعالیت بدنی، داروهای مورد مصرف بیمار و عوامل محیطی برون‌زاد و درون‌زاد هر فرد بیمار باشد [۱۰]. Dirican و همکاران در سال ۲۰۰۴، همبستگی منفی بین فعالیت پاراسکوناز و مالون‌دی‌آلدهید را که ناشی از تخریب اکسیداتیو وسیع پاراسکوناز می‌باشد، نشان دادند؛ در واقع اتصال پاراسکوناز به HDL وابسته

در این مطالعه سطح سرمی مالون‌دی‌آلدهید در گروه بیماران سقط مکرر خودبه‌خودی در مقایسه با گروه افراد سالم به‌طور معناداری افزایش یافته بود. همچنین یک ارتباط آماری مثبت بین سطح سرمی مالون‌دی‌آلدهید و آنتی‌بادی سیتوتوکسیک ضد پدیری (APCA) مشاهده کردیم. با این وجود اختلاف معناداری در فعالیت آنزیم‌های پاراسکوناز و آریل‌استراز در دو گروه مشاهده نشد. یکی از مهم‌ترین محصولات که طی فرآیند پراکسیداسیون ناشی از گونه‌های واکنش‌پذیر در بدن تولید می‌شود، مالون‌دی‌آلدهید است. در مطالعات گذشته به‌طور شایع اندازه‌گیری سطح مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان مارکر پراکسیداسیون لیپیدها انجام شده‌است. براساس مطالعات Korpacka و همکاران در سال ۲۰۰۸، مالون‌دی‌آلدهید یکی از محصولات نهایی پراکسیداسیون لیپیدها است که میزان آن در شرایط استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد و با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد و افزایش استرس اکسیداتیو در سقط مکرر را ثابت می‌کند. علاوه بر این، مالون‌دی‌آلدهید در سنتز ترومبوکسان و سیکلواکسیژناز که دو مسیر مهم التهابی هستند، نیز نقش دارد. در نتیجه، اندازه‌گیری آن می‌تواند علاوه بر این‌که نشانی از وضعیت اکسیداسیون در بدن باشد تا حدودی میزان التهاب در بدن را نیز نشان دهد [۹]. استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی سقط و نیز بروز سقط مکرر دارد. استرس اکسیداتیو باعث آسیب اندوتلیوم جفت، رگ‌زایی ناقص جفتی و اختلال سیستم ایمنی می‌شود که این‌ها خود به‌طور مستقیم نقشی

مطالعه و بررسی شدند. براساس این مطالعه فعالیت پاراکسونازی در افراد بیمار به طور معنی داری کمتر از افراد سالم بود که نشان-دهنده افزایش استرس اکسیداتیو در این بیماری و تضعیف قدرت آنتی اکسیدانی و بدتر شدن وضعیت اکسیداتیو بدن است [۲۲]. به-طور کلی وجود مغایرت در نتایج مطالعه حاضر با بعضی از مطالعات ممکن است به متفاوت بودن ساختار ژنتیکی جوامع مختلف و تفاوت های نژادی مربوط باشد [۱۶]. شرایطی مانند دیابت، بیماری های تیروئید، سندرم متابولیک، نارسایی کلیوی و افزایش سن در ارتباط با فعالیت کاهش یافته پاراکسونازها می باشد [۱۷، ۱۸]. این مطالعه اولین مطالعه ای است که به افزایش مالون دی آلدھید و نقش بالقوه استرس اکسیداتیو در زنان با سقط مکرر اشاره می کند. با این وجود دارای محدودیت هایی نیز می باشد: در مطالعه حاضر همزمان با افزایش MDA در بیماران، تغییرات فعالیت آریل استرازی و پاراکسونازی مشاهده نکردیم که عدم معنی دار بودن فعالیت پاراکسونازی و آریل استرازی در مطالعه حاضر احتمالاً به دلیل تعداد محدود نمونه های مورد آزمایش، عدم ثابت بودن فاکتورهای مؤثر بر روی فعالیت این آنزیم همچون تغذیه، فعالیت بدنی، داروهای مورد مصرف بیمار و عوامل محیطی برونزاد و درونزاد هر فرد بیمار باشد. یکی دیگر از محدودیت-های مهم این پژوهش مربوط به این موضوع است که در توازن اکسیدان-آنتی اکسیدان مؤلفه های متعددی دخیل هستند که در این پژوهش فقط سه عامل آن PON و MDA و ARE ارزیابی شدند و بنابراین تعمیم نتایج به کل توازن اکسیدان-آنتی اکسیدان بدون توجه به سایر مؤلفه ها ممکن است اشتباهاتی به دنبال داشته باشد.

#### نتیجه گیری

به طور کلی در این مطالعه افزایش مالون دی آلدھید که یک شاخص برای اندازه گیری پراکسیداسیون لیپیدی است، بیانگر این است که در زنان مبتلا به سقط مکرر خودبه خودی، میزان استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدها افزایش می یابد که دلالت بر عدم وجود تعادل بین سیستم اکسیدان-آنتی اکسیدان دارد که در نهایت باعث تشدید استرس اکسیداتیو می شود. اگرچه افزایش استرس اکسیداتیو در زنان با سابقه سقط مکرر خودبه خودی تنها مربوط به دوران بارداری نیست. در پایان چند پیشنهاد جهت مطالعات آینده ارائه می شود: انجام مطالعات جامع تر با حجم نمونه ی بیشتر، در بیماران مبتلا به سقط مکرر خودبه خودی، مقدار بیان آنزیم های دخیل در سیستم اکسیدان و آنتی اکسیدان در سطح ژنی اندازه گیری شود، بررسی ارتباط وجود تیروئیدیت خودایمن با بیماران سقط مکرر خودبه خودی و در نهایت بررسی ارتباط بین

بودن این آنزیم را به HDL تأیید می کند [۱۱]. در همین راستا Durrington و همکاران در سال ۲۰۰۱، گزارش نمودند که به-دلیل جایگاه پاراکسوناز روی HDL و ارتباط نزدیک پاراکسوناز با نقش آنتی اکسیدانی HDL، میزان این لیپوپروتئین در بیماران بر روی فعالیت آنزیم بسیار حائز اهمیت است [۱۲]. نتایج حاصل از اندازه گیری میزان سطح سرمی فاکتورهای مانند لیپوپراکسیداز، گلوکوناتیون پراکسیداز، بتاکاروتن، ویتامین A و ویتامین E بر روی ۴۰ زن با سابقه سقط نشان داده است که سطح فاکتورهای آنتی-اکسیدان به طور معناداری نسبت به گروه کنترل پایین تر است. در مطالعه ای دیگر میزان پاراکسوناز، آریل استراز و مالون دی آلدھید در افرادی که در معرض تشعشعات یونیزان هستند، اندازه گیری شد و محققان به این نتیجه رسیدند که ارتباط معکوس معنی دار بین پاراکسوناز و آریل استراز و مالون دی آلدھید وجود ندارد که با مطالعه حاضر هم خوانی دارد [۱۳]. به نظر می رسد همبستگی منفی بین فعالیت پاراکسوناز و مالون دی آلدھید، ناشی از تخریب اکسیداتیو وسیع پاراکسوناز می باشد و اتصال پاراکسوناز به HDL وابسته بودن این آنزیم را به لیپید تأیید می کند [۲۰]. در واقع برای فعالیت پاراکسوناز، محیط آب گریز HDL ضروری است. فسفولیپیدها و مخصوصاً آن هایی که زنجیر اسید چرب بلندی دارند، آنزیم پاراکسوناز را پایدار می کنند و برای اتصال آن در سطح لیپوپروتئین ضروری هستند. فعالیت پایین پاراکسوناز در HDL همچنین می تواند به خاطر حضور مهارکننده های گردشی مثل محصولات پراکسیداسیون لیپیدها باشد [۱۱]. از طرفی عدم تغییر فعالیت پاراکسوناز صرفاً نتیجه تغییرات HDL نبوده، بلکه ناشی از غیرفعال شدن اکسیداتیو آنزیم می باشد که طی این مکانیسم گروه سولفیدریل آزاد آنزیم PON-1 با لیپیدهای اکسیده خاص، واکنش می دهد و در نهایت PON-1 غیرفعال می شود [۱۰] احتمالاً حمله رادیکال های آزاد به آنزیم، باعث غیرفعال شدن آن می شود [۱۴]. یک مکانیسم دیگر در رابطه با عدم فعالیت آنزیم PON-1 می تواند از سرکوب شدن سنتز آنزیم به خاطر نقص ژنتیکی منشأ بگیرد [۱۰] و یا احتمالاً برخاسته از تنظیم کاهش رونویسی آن در کبد باشد [۱۵]. عفونت به عنوان یکی از عوامل اصلی در سقط مکرر زنان مطرح می باشد. در همین راستا Ayar و همکاران در سال ۲۰۱۷ اثر آنزیم های پاراکسوناز و آریل استراز را در نوزادان مبتلا به عفونت دوره جنینی بررسی و مشاهده نمودند که سطح آنزیم آریل استراز نشانه قوی برای سپسیس در بیماران می باشد [۲۱]. در مطالعه ای دیگری فعالیت پاراکسونازی و آریل استرازی سرم در بیماران مبتلا به سرطان معده بررسی شد. در این مطالعه ۲۰ بیمار مبتلا به سرطان معده با ۳۰ فرد سالم به صورت مقایسه ای

اسلامی واحد فلورجان و سرکار خانم دکتر شاکری متخصص زنان و زایمان که در انجام این مطالعه کمک‌های فراوانی کردند. تشکر به عمل می‌آورند.

آنتی‌بادی ضدپراکسیداز (Anti-TPO) و سطح مالون‌دی‌آلدهید در این بیماران.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان از حمایت‌های دانشگاه آزاد

### References:

- [1] Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol* 2009; 2(2): 76.
- [2] Nunes DP, Spegiorin LC, Mattos CC, Oliani AH, Vaz-Oliani DC, Mattos LC. The ADA\* 2 allele of the adenosine deaminase gene (20q13. 11) and recurrent spontaneous abortions: an age-dependent association. *Clin* 2011; 66(11): 1929-33.
- [3] El Hachem H, Crepau V, May-Panloup P, Descamps P, Legendre G, Bouet PE. Recurrent pregnancy loss: current perspectives. *Int J Womens Health* 2017; 9: 331.
- [4] Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3(1): 28.
- [5] Gulum M, Gumus K, Yeni E, Dogantekin E, Ciftci H, Akin Y, et al. Blood and semen paraoxonase—arylesterase activities in normozoospermic and azoospermic men. *Androl* 2017; 49(9): e12752.
- [6] Gil-Villa AM, Cardona-Maya W, Agarwal A, Sharma R, Cadavid Á. Role of male factor in early recurrent embryo loss: do antioxidants have any effect?. *Fertil Steril* 2009; 92(2): 565-71.
- [7] Kim DS, Marsillach J, Furlong CE, Jarvik GP. Pharmacogenetics of paraoxonase activity: elucidating the role of high-density lipoprotein in disease. *Pharmacogenomics* 2013; 14(12): 1495-515.
- [8] Mackness M, Mackness B. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *Gene* 2015; 567(1): 12-21.
- [9] Krzystek-Korpacka M, Boehm D, Matusiewicz M, Diakowska D, Grabowski K, Gamian A. Paraoxonase 1 (PON1) status in gastroesophageal malignancies and associated paraneoplastic syndromes—connection with inflammation. *Clin Biochem*. 2008; 41(10-11): 804-11.
- [10] Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. The role of paraoxonase 1 activity in cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Drugs* 2004; 4(4): 211-7.
- [11] Dirican M, Akça R, Sarandol E, Dilek K. Serum paraoxonase activity in uremic predialysis and hemodialysis patients. *J Nephrol* 2004; 17(6): 813-8.
- [12] Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(4): 473-80.
- [13] Serhatlioglu S, Gursu MF, Gulcu F, Canatan H, Godekmerdan A. Levels of paraoxonase and arylesterase activities and malondialdehyde in workers exposed to ionizing radiation. *Cell Biochem Funct* 2003; 21(4): 371-5.
- [14] Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Erogul J, Sorenson R, Bisgaier CL, 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.
- [15] Camuzcuoglu H, Arioiz DT, Toy H, Kurt S, Celik H, Erel O. Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2009; 112(3): 481-5.
- [16] Jarvik GP, Tsai NT, McKinstry LA, Wani R, Brophy VH, Richter RJ, et al. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 1; 22(8): 1329-33.
- [17] Précourt R, Amre D, Denis MC, Lavoie JC, Delvin E, Seidman E, et al., The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. *Atheroscler* 2011; 214(1): 20-36.
- [18] Solati M, Raiszadeh F, Azizi FE. Lipids, apolipoproteins, lipid oxidation and paraoxonase enzyme activity In diabetic and non-diabetic end stage renal disease patients. *Int J Endocrinol Metab* 2008; 4: 175-82.
- [19] Modaresi A, Nafar M, Sahraei Z. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Iran J Kidney Dis* 2015; 9(3): 165.
- [20] Kural BV, Örem C, Uydu HA, Alver A, Örem A. The effects of lipid-lowering therapy on paraoxonase activities and their relationships with the oxidant-antioxidant system in patients with dyslipidemia. *Coron Artery Dis* 2004; 15(5): 277-83.
- [21] Ayar G, Atmaca YM, Alışık M, Erel Ö. Effects of paraoxonase, arylesterase, ceruloplasmin, catalase, and myeloperoxidase activities on prognosis in pediatric patients with sepsis. *Clin Biochem* 2017; 50(7-8): 414-7.
- [22] Gałczyński K, Bełtowski J, Nowakowski Ł, Vasilevska D, Rechberger T, Semczuk A. Serum paraoxonase 1 activity and protein N-homocysteinylolation in primary human endometrial cancer. *Tumour Biol* 2018; 40(9): 1010428318797869.