

بررسی اثرات آیوهگزول بر ترکیبات بیوشیمیایی اشک در نمونه حیوانی بزرگ

ابوتراب طباطبایی نائینی (Ph.D.) * محمدرضا حق شناس (Ph.D.) ** محمدرضا ضیائی درونکلایی (B.Sc.) ***
ناصر اوجی (Ph.D.) **** نوید ضیائی درونکلایی (D.V.M., Ph.D. Resident) +****

چکیده

سابقه و هدف: یکی از روش‌های تشخیصی کارآمد در بیماری‌های چشم و مجاری اشکی، استفاده از مواد حاجب و تصویربرداری از کیسه اشکی (Dacryocystography) می‌باشد. داکریوسیستوگرافی آسان، ارزان و تکنیک خاص پرتونگاری برای تعیین محل بیماری در دستگاه بینی-اشکی است. مواد حاجب گوناگونی برای داکریوسیستوگرافی استفاده می‌گردند. به طور کلی برای این عمل از مواد حاجب با اسمولاریتی پایین و نیز حداقل رقت آن‌ها استفاده می‌شود. تا کنون بر اساس بررسی‌های به عمل آمده، تأثیر مواد حاجب بر ترکیبات اشک دقیقاً ارزیابی نگردیده است؛ لذا در این تحقیق سعی بر آن بوده تا جزئیات اثر آیوهگزول بر ترکیبات اشک مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۰ رأس الاغ نر و ماده سه تا پنج ساله انتخاب گردیدند. آزمودنی‌ها تحت داکریوسیستوگرافی با آیوهگزول قرار گرفتند. میزان پروتئین تام، لیزوزیم، سدیم و پتاسیم و الکتروفورز پروتئین‌های اشک قبل از عمل و در فاصله‌های زمانی ۲ ساعت و ۲ هفته پس از داکریوسیستوگرافی اندازه‌گیری و مورد ارزیابی واقع شدند. برای تعیین پروتئین تام نمونه‌ها از روش لوری (Lowry) استفاده گردید.

فعالیت آنزیم لیزوزیم با روش شوگار (Shugar) ارزیابی شد. یکی از دقیق‌ترین روش‌های اندازه‌گیری عناصر در بافت‌ها و ترشحات بدن حیوانات استفاده از طیف سنجی جذب اتمی است. در این تحقیق از روش جذب اتمی با شعله برای اندازه‌گیری مقدار سدیم و پتاسیم نمونه‌های اشک و به منظور نزدیک تر شدن به اجزای موثر بر افزایش یا کاهش پروتئین تام که به روش لوری مورد ارزیابی قرار گرفت، از الکتروفورز ژل سدیم دو دسیل سولفات پلی‌اگرل (SDS-PAGE) در شیب غلظت ۲۰-۵ درصد استفاده شد. به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌های تحقیق حاضر از روش‌های توصیفی و اندازه‌گیری مکرر استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که میانگین و انحراف معیار مقدار پروتئین تام $2/15 \pm 5/88$ میلی گرم در میلی لیتر قبل از تجویز آیوهگزول، $0/96 \pm 4/10$ پس از دو ساعت و $3/68 \pm 7/36$ پس از دو هفته می‌باشد که دارای اختلاف معنی‌داری نمی‌باشد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار لیزوزیم اشک قبل از تجویز $170/88 \pm 858/39$ واحد در میلی گرم پروتئین اشک و پس از دو ساعت $178/67 \pm 1013/19$ و پس از دو هفته $360/50 \pm 702/54$ گردید که اختلاف معنی‌داری نداشتند. مقادیر سدیم اشک قبل از تجویز $725/44 \pm 3084/90$ و پس از دو ساعت $1372/52 \pm 3508/40$ و پس از دو هفته تجویز $2953/88 \pm 8026/20$ میکروگرم در میلی لیتر، و مقادیر پتاسیم اشک قبل از تجویز $52/55 \pm 863/37$ و پس از دو ساعت $46/81 \pm 753/84$ و پس از دو هفته $276/41 \pm 1564/20$ میکروگرم در میلی لیتر گردیدند که دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند. نتایج الکتروفورز پروتئین‌های اشک نشان داد، حداقل ۱۰ باند پروتئینی قابل تشخیص می‌باشد. از نظر تعداد باند الکتروفورزی موجود در نمونه‌های زمان‌های صفر، دو ساعت و دو هفته پس از عمل، تفاوتی مشاهده نگردید.

استنتاج: با توجه به نتایج و معنی دار نشدن تغییرات پارامترها در غالب موارد، به نظر می‌رسد احتمالاً آیوهگزول (مواد حاجب با پایه آبی) برای استفاده در داکریوسیستوگرافی منعی نداشته باشد و پرتونگار می‌تواند از آن برای تشخیص ضایعات مجرای اشکی و چشم استفاده نماید.

واژه‌های کلیدی: آیوهگزول، داکریوسیستوگرافی، پروتئین، الکتروفورز، لیزوزیم

⁺مؤلف مسئول: دکتر نوید ضیائی درونکلایی - دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، صندوق پستی ۷۱۳۴۵-۱۷۳۱ E-mail: ziaei.nd@gmail.com

* متخصص جراحی، استاد گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز ** متخصص وپروس شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی مازندران

*** کارشناس جهاد کشاورزی مازندران، بابلر **** دستیار بخش جراحی و رادیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: ۸۶/۱/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۶/۲/۹ تاریخ تصویب: ۸۷/۳/۸

مقدمه

پرتونگاری کیسه اشکی (Dacryocystography)، مشاهده مستقیم دستگاه بینی-اشکی با ماده حاجب است (۱). این روش تکنیک خاص پرتونگاری برای تشخیص و تعیین محل بیماری در این دستگاه است (۲). داکریوسیستوگرافی برای اولین بار در انسان در سال ۱۹۰۹ و در دامپزشکی در سال ۱۹۶۱ در سگ صورت پذیرفته است (۱). داکریوسیستوگرافی برای تعیین محل انسداد، تمایز انسدادهای ناقص و کامل، اتساع یافتگی، انحرافات، تنگی‌ها، عدم رشد و تعیین محل نمونه‌برداری انجام می‌گیرد. داکریوسیستوگرافی آسان، ارزان و تکنیک خاص پرتونگاری برای تعیین محل بیماری در دستگاه بینی-اشکی می‌باشد (۲،۱).

روزمزگی استفاده از تکنیک‌های نوین تشخیص، گه‌گاه غبار کم رنگی بر برخی انواع دیرینه‌تر آن‌ها پوشانده است؛ در حالی که بعضاً ممکن است هنوز اختصاصی‌ترین روش یا روش‌های تشخیصی باشند. پرتونگاری، دستاورد علمی صده اخیر علوم، از زمره روش‌های مقدم تشخیصی است که گه‌گاه در این گروه جای می‌گیرد؛ از سوی دیگر، دیرینگی استفاده از چنین ابزارهای تشخیصی ممکن است گاهی سبب پوشیده ماندن یا بی‌توجهی نسبت به عوارض ناخواسته ناشی از آن‌ها نیز گردد که از آن جمله می‌توان به عوارض محتمل بر اثرات ناخواسته مواد حاجب رادیوگرافی بر برخی از اندام‌ها مثل دستگاه اشکی را نام برد (۳). مواد حاجب گوناگونی برای داکریوسیستوگرافی استفاده می‌گردند.

آیوهگزول ماده حاجب محلول درآبی است که به طور گسترده در پرتونگاری تشخیصی استفاده می‌شود (۴،۵). به طور کلی از مواد حاجب با اسمولاریتی پایین و نیز از حداقل رقت آن‌ها برای داکریوسیستوگرافی استفاده می‌شود، چون تحریک و تخریب غده‌ای کم‌تری

نسبت به سایر مواد حاجب معمول مورد استفاده در پرتونگاری انسان ایجاد می‌کند. با توجه به این‌که آیوهگزول ماده حاجبی مناسب برای مطالعات فوق، معرفی شده است و در داکریوسیستوگرافی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (اگرچه گزارش شده است ماده حاجب روغنی که چسبندگی بالا دارد، تضاد (Contrast) بهتری ایجاد می‌نماید) تا کنون بر اساس بررسی‌های به عمل آمده، تأثیر این دارو بر ترکیبات اشک دقیقاً ارزیابی نگردیده است؛ لذا در این تحقیق تأثیر این دارو بر ترکیبات اشک مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای انجام مطالعه تعداد ده رأس الاغ از جنس نر و ماده و محدوده سنی ۳ تا ۵ سال انتخاب گردیدند. پس از تأیید سلامتی الاغ‌ها از نظر بالینی و پاراکلینیکی، چشم‌ها دقیقاً معاینه گشتند و کاملاً سالم تشخیص داده شدند. برای معاینه چشم‌ها، رفلکس پلکی، رفلکس مینس و معاینه چشم با افتالمسکوپ انجام گردید. سپس آزمودنی‌ها با استفاده از آیوهگزول تحت عمل داکریوسیستوگرافی قرار گرفتند. در مطالعه حاضر داکریوسیستورینوگرافی آزمودنی‌ها با استفاده از آیوهگزول ۲۴۰ (جدول شماره ۱) و بررسی عوارض جانبی احتمالی این ترکیب انجام گردید. به دلیل تنگی منافذ اشکی بالایی و پایینی در الاغ، داکریوسیستوگرافی از عقب (retrograde) انجام گردید. داکریوسیستوگرافی رتروگرید از منفذ پایینی مجرای اشکی با کاتتر فرنچ ۵ انجام شد. در اجرای داکریوسیستورینوگرافی الاغ ۶-۴/۵ میلی‌لیتر ماده حاجب آیوهگزول استفاده شد؛ در انتخاب حجم تجویزهای فوق به گونه‌ای عمل شده است تا چشم آزمودنی‌ها با ۲ میلی‌لیتر از ماده حاجب آغشته شود. دستگاه پرتوشناسی منتخب برای اجرای کار، فلیپس مدل سوپر ام-۱۰۰ ثابت

جدول شماره ۱: ماده حاجب مورد استفاده در داکروسیستوگرافی

نوع ماده حاجب (بر اساس پایه)	نام تجاری	ترکیبات	غلظت ترکیبات (mg/ml)	غلظت ید (mg/ml)	کارخانه سازنده
آبی	آمینپک (آیوهگزول)	آیوهگزول	۵۱۸		نیکومد ایمپجینگ
		ترومتامول	۱/۲	۲۴۰	ای اس،
		اداتات سدیم کلسیم	۰/۱		اسلو
					نروژ

ساخت کشور آلمان بوده است. فاصله لوله تا هدف (سر
الاغ) ۵۵-۶۰ سانتی متر در نظر گرفته شد. پرتو بر اساس
جدول شماره ۲ تابانده شد:

جدول شماره ۲: مشخصات پرتو تابانده شده برای داکروسیستوگرافی

هدف	مشخصات پرتو		
	Sec	mAs	KV
سرالغ	۰/۱۶	۲۰	۸۰

پ- تزریق ماده حاجب به وسیله سرنگ و همان
کاتتر
ت- اخذ نماهای پرتونگاری فوق (در برخی موارد
مورب)

پس از تهیه رادیوگراف‌ها، تشریح پرتونگاری
قسمت‌های مختلف مجرا استخراج گردید.

نمونه‌های اشک قبل از عمل به عنوان شاهد، دو
ساعت پس از داکروسیستورینوگرافی برای ارزیابی
تأثیر کوتاه مدت دارو و دو هفته پس از عمل برای
ارزیابی تأثیر بلند مدت دارو تهیه شدند.
رهگیری کلی اثرات مواد حاجب پرتونگاری و
امکان تحریک آن‌ها، با اندازه‌گیری تغییرات محتمل
وارد بر پروتئین تام، مورد آزمایش و بررسی قرار
گرفت. برای تعیین پروتئین تام نمونه‌ها از روش لوری
(Lowry's, 1951) استفاده گردید. در این روش ایجاد
کمپلکس رنگی و شدت رنگ ایجاد شده بستگی به
غلظت پروتئینی موجود در نمونه دارد (۷).

در تحقیق حاضر فعالیت آنزیم لیزوزیم با روش
شوگار (Shugar's, 1952) ارزیابی و مقایسه گردید (۸).
از خاصیت باکتریولیتیک لیزوزیم (۹) بر روی باکتری
میکروکوکوس لیزودیکتیکوس که ماده مناسبی برای
آن می‌باشد، جهت ارزیابی فعالیت آن آنزیم استفاده
شده است. در این روش سوسپانسیونی از باکتری کشته
یا زنده تهیه می‌شود و تغییرات جذب نور پس از اضافه

از کاست و فیلم (Agfa, USA) 30×40 سانتی
متری و داروی ظهور و ثبوت تولید داخلی (فرهان-
ایران) برای ظاهرسازی رادیوگراف‌ها استفاده گردید. به
طور خلاصه داکروسیستورینوگرافی در الاغ طی مراحل
ذیل انجام می‌گردید:

۱- آماده سازی حیوان برای داکروسیستورینوگرافی

الف- آرام بخشی

ب- بی‌هوشی

۲- اخذ رادیوگراف ساده

الف- نمای جانبی

ب- نمای پشتی- شکمی

ج- نمای مورب جانبی پشتی- شکمی

۳- داکروسیستورینوگرافی

الف- ارسال کاتتر از عقب (retrograde)

ب- شست و شوی مجرا با سالین استریل به وسیله

سرنگ و همان کاتتر

کردن آنزیم به این سوسپانسیون، فعالیت یا عدم فعالیت آنزیم انسان می‌دهد. یک واحد لیوزیم برابر کاهش کدورت ۰/۰۰۱ در دقیقه در ۴۵۰ نانومتر در pH برابر ۷/۰ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط خاص می‌باشد (۸).

برای اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم اشك از طیف‌سنجی جذب اتمی با شعله استفاده شده است. در روش کار اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم اشك مانند اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم پلاسما عمل می‌گردد. در ابتدا استانداردهای سدیم و پتاسیم با توجه به مقدار طبیعی آن‌ها در اشك انسان تهیه گردید. برای صفر کردن دستگاه از بلانک آب دو تقطیره استفاده شد. طول موج‌های استفاده شده برای سدیم ۵۸۹/۰ و پتاسیم ۷۶۶/۵ نانومتر می‌باشند. پس از رسم نمودار استاندارد توسط دستگاه با استفاده از رقت‌های استاندارد (درخصوص هر عنصر به طور جداگانه) اقدام به اندازه‌گیری میزان سدیم و پتاسیم شد. البته از نمونه‌های طرح، بر اساس غلظت پیش فرض این عناصر در اشك انسان، رقت تهیه گردید. رقت‌ها با آب دو تقطیره در لوله‌های آزمایش شسته شده با اسید تهیه شدند (۱۰).

در مطالعه حاضر به منظور نزدیک‌تر شدن به اجزای موثر بر افزایش یا کاهش پروتئین تام (۱۱) که به روش لوری مورد ارزیابی قرار گرفت، از الکتروفورز SDS-PAGE در شیب غلظت ۲۰-۵ درصد و رنگ آمیزی کوماسی بلو استفاده گردید. اصول انجام SDS-PAGE در ژل دارای شیب، مشابه انجام این روش در ژل با غلظت ثابت می‌باشد و تنها تفاوت آن‌ها در نحوه آماده سازی ژل است. از نظر عملی شیب غلظت پلی‌اکریل آمید در دامنه ۳-۳۰ درصد قابل تهیه است. با این حال انتخاب محدوده این شیب متأثر محدوده وزنی مخلوط پروتئینی مورد مطالعه و یا اجزای مورد نظر در این مخلوط می‌باشد. به منظور انجام الکتروفورز

اشك در شیب غلظت، شیب ۲۰-۵ برای انجام پروژه انتخاب گردید. برای تهیه ژل دارای شیب غلظت، ابتدا بایستی دو محلول اکریل آمید با غلظت مختلف (در این تحقیق با غلظت‌های ۵ درصد و ۲۰ درصد) آماده نمود. سپس با استفاده از ظرف شیب‌ساز (دو ظرف مرتبط)، یکی از این دو محلول به تدریج در دیگری حل و توسط پمپ پرستالتیک یا نیروی ثقل (در این تحقیق) وارد قاب شیشه‌ای گردد.

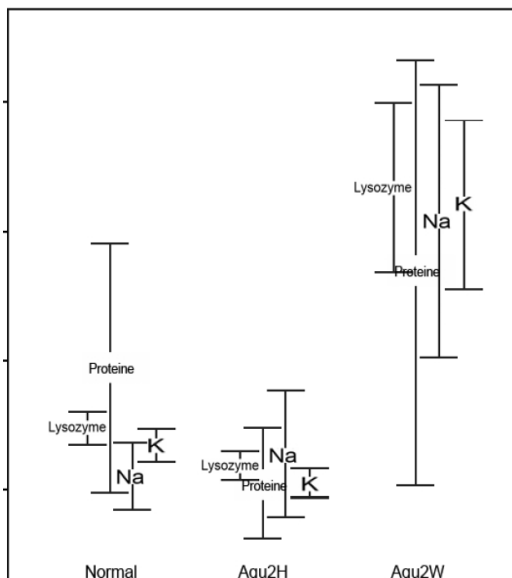
به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌های تحقیق حاضر از روش‌های توصیفی و اندازه‌گیری مکرر استفاده شد. در اجرای روش‌های آماری فوق از نرم‌افزار رایانه‌ای علوم اجتماعی (SPSS, ver 12) استفاده گردید.

یافته ها

نمونه‌های اشك قبل از داکریوسیستوگرافی، دو ساعت و دو هفته پس از عمل، تهیه و مقادیر پروتئین تام، لیوزیم، سدیم و پتاسیم و الگوی الکتروفورز پروتئین‌های اشك اندازه‌گیری و مقایسه گردیدند. مقدار پروتئین اشك الاغ ایرانی به روش لوری برای بالاترین و پایین‌ترین سطح پروتئین به ترتیب ۸/۱ و ۳/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با میانگین $\pm 2/15$ انحراف معیار $5/88$ به دست آمد. میانگین و انحراف معیار مقدار پروتئین اشك پس از زمان‌های ۲ ساعت و ۲ هفته بعد از عمل به ترتیب $0/96 \pm 4/10$ و $3/68 \pm 7/36$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اشك شدند که اختلاف معنی‌داری با قبل از عمل وجود نداشت ($P > 0/05$).

براساس اندازه‌گیری انجام شده بر روی میزان سدیم اشك به روش طیف سنجی جذب اتمی با شعله مقادیر $3845/50$ و $2142/00$ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب برای بالاترین و پایین‌ترین سطح سدیم اشك در الاغ ایرانی، با میانگین $\pm$ انحراف معیار $3084/90 \pm 725/44$ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد.

اشک در زمان‌های صفر، ۲ ساعت و ۲ هفته پس از داکریوسیستوگرافی از نظر تعداد باند حاضر تفاوتی مشاهده نشد.



نمودار شماره ۱: نمودار Error-bar تلفیقی پروتئین، لیوزیم، سدیم و پتاسیم اشک در تیمار ماده حاجب آیوهگزل (Normal = مقادیر طبیعی قبل از چکاندن ماده حاجب، Aqu2H = بعد از گذشت ۲ ساعت و Aqu2W = بعد از گذشت ۲ هفته)

جدول شماره ۳: گزارش وضعیت باندهای مشاهده شده حاصل از الکتروفورز نمونه های اشک به روش SDS-PAGE

ردیف	وزن مولکولی باندهای به دست آمده (Kilo-Dalton)
۱	۱۰
۲	~ ۱۵
۳	~ ۱۸
۴	~ ۲۰
۵	~ ۳۰-۳۵
۶	۴۰
۷	۵۰
۸	~ ۶۰-۷۰
۹	~ ۱۰۰-۱۲۰
۱۰	۱۵۰

میانگین $\pm$ انحراف معیار سطح سدیم اشک پس از زمان‌های ۲ ساعت و ۲ هفته بعد از عمل به ترتیب $۳۵۰۸۴/۴۰ \pm ۱۳۷۲/۵۲$ و $۸۰۲۶/۲۰ \pm ۲۹۵۳/۸۸$ میکروگرم در میلی‌لیتر شدند که افزایش معنی‌داری را نشان داده است ($P < ۰/۰۵$).

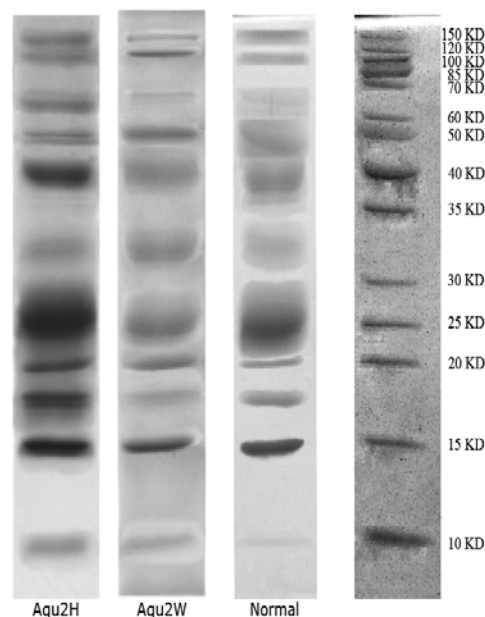
میزان پتاسیم اشک به روش طیف سنجی جذب اتمی، مقادیر $۹۳۶/۹$ و $۸۰۵/۹۵$ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب برای بالاترین و پایین‌ترین سطح پتاسیم اشک در الاغ ایرانی با میانگین $\pm$ انحراف معیار $۸۳۶/۳۷ \pm ۵۲/۵۵$ به دست آمد. میانگین $\pm$ انحراف معیار مقدار پتاسیم اشک پس از زمان‌های ۲ ساعت و ۲ هفته پس از عمل به ترتیب $۷۵۳/۸۴ \pm ۴۶/۸۱$ و $۱۵۶۴/۲۰ \pm ۲۷۶/۴۱$ میکروگرم در میلی‌لیتر گردیدند که واجد اختلاف معنی‌داری با مقادیر قبل از تجویز دارو می‌باشند ($P < ۰/۰۵$).

در خصوص فعالیت ویژه آنزیم لیوزیم اشک به روش آنزیمی، مقادیر ۱۰۰۰ و $۶۴۷/۰۵$ واحد در میلی‌گرم پروتئین اشک به ترتیب مربوط به بالاترین و پایین‌ترین سطح آنزیم در اشک الاغ ایرانی با میانگین $\pm$ انحراف معیار $۱۷۰/۸۸ \pm ۸۵۸/۳۹$ واحد در میلی‌گرم پروتئین اشک به دست آمد. میانگین $\pm$ انحراف معیار فعالیت آنزیم لیوزیم اشک پس از زمان‌های ۲ ساعت و ۲ هفته بعد از عمل داکریوسیستوگرافی به ترتیب $۱۷۸/۶۷ \pm ۱۰۱۳/۱۹$ و $۷۰۲/۵۴ \pm ۳۶۰/۵۰$ واحد در میلی‌گرم پروتئین اشک گردید که اختلاف معنی‌داری با قبل از داکریوسیستوگرافی نداشته است ($P > ۰/۰۵$).

در الکتروفورز نمونه‌های اشک با روش SDS-PAGE پس از رنگ‌آمیزی با کوماسی آبی حداقل ۱۰ باند پروتئینی قابل تشخیص بود که در جدول و تصویر شماره ۱ نشان داده شده‌اند. حداقل وزن مولکولی پروتئین‌های قابل تشخیصی بر روی ژل حدود ۱۰ کیلو دالتون و حداکثر آن تقریباً ۱۵۰ کیلو دالتون بود. بین الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های نمونه‌های

پروتئین‌های متعددی می‌باشد که به میزان بسیار جزئی، یک درصد، از طریق پالایش (Filtration) از سرم و ما بقی، در حدود ۹۹ درصد، توسط غدد اشکی تولید می‌گردند (۱۴).

سلول‌های ترشحی غده اشکی فرآورده بسیار پیچیده‌ای از آب، یون‌ها و پروتئین‌ها تولید می‌کنند (۱۵). غلظت پروتئین اشک تحت تأثیر اعصاب حسی و خودکار می‌باشد. صدمات بسیار کوچک (Microtrauma) و آزرده‌گی‌های سطح چشم باعث افزایش نشت ترکیبات پلاسمایی و محتویات سلول بافتی به داخل اشک می‌گردند (۱۶). در این تحقیق نشان داده شده که آپوهگزول با غلظت به کار برده شده هیچ‌گونه تأثیری بر روی مقدار پروتئین اشک در کوتاه مدت و بلند مدت نداشته است. انسان و حیوانات اهلی در ترکیبات اشک خود دارای لیوزیم می‌باشند. لیوزیم، یک پروتئین باکتریولیتیک در اشک است که توسط غدد اشکی ترشح می‌گردد و با افزایش سن، میزان آن در موجودات زنده کاهش می‌یابد؛ و میزان آن در جنس نر و ماده تفاوت معنی‌داری ندارد (۱۷). میزان لیوزیم اشک در بیماری‌هایی نظیر التهاب ملتحمه و کراتیت در حد طبیعی است ولی در کراتیت هرپسی کاهش نشان می‌دهد (۱۸). در بیمارانی که دارای انسداد کامل یا ناقص مجرای بینی - اشکی هستند میزان لیوزیم اشک افزایش می‌یابد (۱۹). در این میان برخی گونه‌ها مانند شتربی‌کوهان (Lama)، بز و گوسفند دارای غلظت‌های بالای لیوزیم و گاو دارای غلظت پایین‌تر می‌باشند (۲۰، ۲۱). از آنجایی که غلظت لیوزیم در شرایط التهاب (۲۱) و عفونت (۲۲) چشم افزایش می‌یابد، چنین به نظر می‌رسد، ارزیابی سطح آن در اشک به شناخت وضعیت طبیعی و یا غیرطبیعی در چشم کمک‌کننده باشد. Gionfriddo و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که به دلیل مقادیر بالای لیوزیم در اشک شتربی‌کوهان (Lama)، این حیوان



تصویر شماره ۱: وضعیت باندهای مشاهده شده حاصل از الکتروفورز

SDS-PAGE اشک به روش

(اولین ستون سمت راست = مارکر،

Normal = الکتروفورز قبل از چکاندن ماده حاجب،

Aqu2H = الکتروفورز بعد از گذشت ۲ ساعت از چکاندن ماده حاجب با پایه آبی،

Aqu2H = الکتروفورز بعد از گذشت ۲ هفته از چکاندن ماده حاجب با پایه آبی.

بحث

استفاده از داروی مطمئن در انجام عمل داکریوسیستوگرافی، یکی از اصول اولیه این روش تشخیص می‌باشد. آپوهگزول دارویی است که به طور گسترده در مطالعات پرتونگاری و برش نگاری رایانه‌ای استفاده می‌شود ولی در منابع، تا کنون از تأثیر این دارو بر ترکیبات اشک مستنداتی یافت نگردید. به طور کیفی در مورد تأثیر این دارو بر میزان راحتی و دید بیماران پس از داکریوسیستوگرافی، مطالعاتی انجام گردیده که تأثیرات سویی از جنبه‌های فوق نداشته است (۱۲). لذا در این مطالعه تأثیر این دارو بر ترکیبات مهم اشک مورد بررسی قرار گرفت. ترکیب پروتئین اشک ممکن است طی بیماری چشمی تغییر کند (۱۱) و افزایش آن در بیماری چشم خشک نشان داده شده است (۱۳). اشک دارای

برخلاف گاو به بیماری چشم صورتی مبتلا نمی‌گردد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که مقادیر لیزوزیم اشک لاما، گوسفند و گاو (۲۱) به مراتب کم‌تر از لیزوزیم الاغ در حالت طبیعی می‌باشد.

یکی از فرآورده‌های اصلی غده اشکی، آب است. آب از فضای بینابینی غده به سمت مجرای آن حرکت می‌کند و در آنجا با دیگر فرآورده‌های ترشحات مخلوط می‌شود. این جابه‌جایی آب تحت تاثیر پدیده اسمز انجام می‌شود که خود به یون‌هایی که از سلول‌های آسینی به داخل مجرا سرازیر می‌شوند، وابسته است. از این رو غالب مطالعاتی که به حرکت آب می‌پردازند در واقع به مطالعه کانال‌های غشایی که در تبادلات یونی سلول‌های آسینی نقش دارد، معطوف می‌شوند و لذا به طور غیرمستقیم حرکت آب را مورد بحث قرار می‌دهند (۱۵).

طی ۲ ساعت اول، با مکانیسم‌های پیش‌تر یاد شده، هجوم پلاسما و اجزای آن، رقت یونی حادث شده را تحت تاثیر و پوشش قرار می‌دهد. این فرضیه با توجه به مقایسه غلظت یون‌ها در پلاسما و اشک از قوت بالاتری برخوردار می‌گردد و افت اولیه پتاسیم و افزایش مقدار سدیم نیز به خوبی توجیه می‌گردد. اسمولاریتی مایع اشکی حدود 300 mosM و حاوی Na^+ ($128/7 \text{ mM}$)، K^+ (17 mM)، Cl^- ($141/3 \text{ mM}$) و بیکربنات ($12/4 \text{ mM}$)؛ HCO_3^- است. این مایع اسمولاریتی مشابه با پلاسما دارد، ولی Na^+ (پلاسما 140 mM) کمتر، K^+ (پلاسما 4 mM) بیش‌تر و به میزان بسیار بالاتری Cl^- (پلاسما 100 mM) در آن یافت می‌شود. مقادیر بالاتر Na^+ ، K^+ و Cl^- بازتاب مسیری است که به موجب آن آب از اپی‌تلیوم حرکت می‌کند و وارد مجرای غده می‌گردد (۱۵). افزایش معنی‌دار مقادیر سدیم و پتاسیم در نمونه‌برداری ۲ هفته بعد، به نظر می‌رسد ناشی از اثر شیمیایی آیوهگزول باشد؛ زیرا طی ۲ هفته بعد از

نمونه‌برداری، اثر تحریک حاصل از اخذ نمونه به احتمال زیاد برطرف شده است. بنابراین با توجه به افزایش معنی‌دار مقادیر سدیم و پتاسیم در نمونه‌برداری ۲ هفته بعد، احتمالاً بتوان چنین نتیجه گرفت که ماده حاجب آیوهگزول دارای اثرات بلند مدت (دست کم ناچیز) روی ساختارهای اشکی باشد.

از میان تکنیک‌های گوناگون استفاده شده برای تحقیق درخصوص ترکیب پروتئینی اشک انسان، الکتروفورز ژل سدیم دو سیل سولفات پلی‌اکریل (SDS-PAGE) از روش‌های ممتاز محسوب می‌گردد (۱۱). از مزایای آنالیز الکتروفورزی اشک، غیر تهاجمی بودن آن به منظور استفاده در تشخیص برخی بیماری‌های است (۱۳). در تحقیق حاضر از ژل گرادینت ۲۰-۵ درصد استفاده شده است. نظر به جدا شدن باندهای واضح متعدد در مطالعه حاضر، احتمالاً شیب غلظت انتخاب شده برای جداسازی اجزای پروتئین اشک مناسب بوده باشد. میزان غلظت ترکیبات مختلف موجود در اشک مانند IgG در شرایط التهابی چشم در اشک افزایش می‌یابد (۲۳). با توجه به مشاهده باندهای پروتئینی به دست آمده در زمان‌های قبل، ۲ ساعت و ۲ هفته بعد از داکریوسیستوگرافی، هیچ‌گونه تفاوتی در الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های اشک مشاهده نگردید.

با توجه به نتایج مقادیر پروتئین تام، میزان لیزوزیم، میزان الکترولیت‌های اشک (سدیم و پتاسیم) و الکتروفورز پروتئین‌های اشک، به نظر می‌رسد، آیوهگزول با توجه به تغییرات بسیار محدود و عمدتاً غیر معنی‌داری که در زمان‌های کوتاه مدت و بلندمدت بر روی اشک داشته، دارای تأثیر ناچیزی بر ساختار چشم بوده است و با اطمینان از سلامت دارو می‌توان آن را برای مطالعات داکریوسیستوگرافی به کار برد.

سپاسگزاری

محترم پژوهشی دانشگاه شیراز به خاطر حمایت از این طرح، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

نویسندگان مقاله از آقای دکتر محمود امین لاری استاد محترم بخش بیوشیمی برای همکاری و شورای

Reference

1. Gelatt KN, Cure T, Guffy M, Jessen C. Dacryocystorhinography in Dog and Cat. *J Small Anim Pract* 1972; 13: 381-397.
2. Johnston GR, Feeney DA. Radiology in ophthalmic diagnosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 1980; 10(2): 317-337.
3. Auer J A. *Equine Surgery*, 2nd ed. W.B. Saunders Co; 1999.
4. Kealy JK. *Diagnostic Radiology of the Dog and Cat*, W.B. Saunders Co; 1979.
5. Dennis R, Herrtage ME. Low osmolar contrast media: A Review. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 1989; 30(1): 2-7.
6. Gleeson TG, Bulugahapitiya S. Contrast-Induced Nephropathy. *AJR* 2004; 183: 1673-1687.
7. Tsai I-C, Lee T, Tsai W-L, Chen M-C, Wu M-J, Lee W-L, Ting H-J. Contrast Enhancement in Cardiac MDCT: Comparison of Iodixanol 320 versus Iohexol 350. *AJR* 2008; 190:W47-W53 (DOI:10.2214/AJR.07.2541)
8. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagents. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
9. Shugar D. Measurement of lysozyme activity and the ultraviolet inactivation of lysozyme. *Biochem Biophys Acta* 1952; 8: 302-309.
10. Meyer K, Palmer JW, Thompson R, Khorazo D. On the Mechanism of Lysozyme Action. *J Biol Chem* 1936; 1: 479-486.
11. Cantle JE. *Atomic Absorption Spectrophotometry*. The Netherlands: Elsevier Scientific Publishing Company; 1982.
12. Kuizenga AB, van Haeringen NJ, Meijer F, Kijlstra A. Identification of lectin binding proteins in human tears. *Invest Ophthalm Vis Sci* 1991; 32(13): 3277-3284.
13. Munk PL, Burhenne LW, Buffan FV, Nugent RA, Lin DT. Dacryocystography: Comparison of water soluble and oil-based contrast agents. *Radiology* 1989; 173: 827-830.
14. Grus FH, Sabuncuo P, Dick HB, Augustin AJ, Pfeiffer N. Changes in the tear proteins of diabetic patients. *BMC Ophthalmology* 2002; 2(4): 1471-2415.
15. Cullen CL, Lim C, Sykes J. Tear film breakup times in young healthy cats before and after anesthesia. *Vet Ophthalmology* 2005; 8(3): 159-164.

16. Walcott B. The lacrimal gland and its veil of tears. *New Phys Sci* 1998; 13: 97-103.
17. Salvatore MF, Pedroza L, Beuerman RW. Denervation of rabbit lacrimal gland increases levels of transferrin and unidentified tear proteins of 44 and 36 kDa. *Curr Eye Res* 1999; 18(6): 455-466.
18. Aine E, Morsky P. Lysozyme concentration in tears, assessment of reference values in normal subject. *Acta Ophthalmol* 1983; 62: 932-938.
19. Chao CW, Stuebben AM, Butala SM. Characterization of ocular mucus extract by croosed immunoelectrophoretic techniques. *Invest Ophth Vis Sci* 1990; 31: 1127-1135.
20. Lew H, Yun Y-S, Lee S-Y. Electrolytes and electrophoretic studies of tear proteins in tears of patients with nasolacrimal duct obstruction. *Ophthalmolog* 2005; 219(3): 142-146.
21. Gionfriddo JR, Melgarejo T, Morrison EA, Alinovi CA, Asem LK, Krohne SG. Comparison of tear proteins of llamas and cattle. *Am J Veter Res* 2000; 61(10): 1289-1293.
22. Gionfriddo JR, Davidson H, Asem EK, Krohne SG. Detection of lysozyme in llama, sheep, and cattle tears. *Am J Veter Res* 2000; 61(10): 1294-1297.
23. Pinard CL, Weiss ML, Brightman AH, Fenwick BW, Davidson HJ. Evaluation of lysozyme and lactoferrin in lacrimal and other ocular glands of bison and cattle and in tears of bison. *Am J Veter Res* 2003; 64(1): 104-108.
24. Davidson HJ, Kuonen VJ. The tear film and ocular mucins: REVIEW. *Vet Ophthalmol* 2004; 7(2): 71-77.

Archive of SID