Effects of Aromatherapy with Ginger Essential Oil on Tonic Immobility Reactions and some Blood Metabolites of Caponized and Intact Cockerels

MJ. Eskandari[1], **F. Samadian[2]**, R .Naghiha[3], M.Ghaderi-Zefrehei[4]
1.MSc Graduated, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran
2.Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran.
farhad.samadian@gmail.com
3.Assistant Professor &Vet, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran.
4.Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran.
Received:2019.18. 11 **Accepted: 2019.22.12**

Abstract

Inroduction & Objective: Aromatherapy with essential oils (EO) in rats has been reported to alter some of the serum variables and reduce anxiety. Therefore, the purpose of this study was to investigate the effect of aromatherapy with ginger EO on serum metabolites and fear related responses in capons and intact cockerels.

Materials and Methods: In this study, 10 caponized and 10 sham-operatedcockerelswere used. Half of the poultries in each group (capons=5 andsham-operated cockerels=5) were treated by aromatic EO in a chamber, and the rest of experimental poultries were exposed to water vapor in the same chamber. Eachbird after removal from the chamber was held by both legs and swung into an inverted position for 30 s and thereaftertonic immobility (TI)test was performed on it.Two weeks after this test, the aromatherapy process was repeated in all birds and blood plasma metabolites were measured before and after aromatherapy.

Results: Aromatherapy in the caponized group resulted in a decrease in the tonic immobility duration, indicating a decrease in fearfulness induced by harvesting process.Moreover, aromatherapy significantly increased plasmalevels of glucose, protein and total urea in cockerels.

Conclusion: Aromatherapy is probably by activating the sympathetic system and increase blood pressure, lead to increased levels of glucose, protein and serum urea and reduce the number of inductions required to attain the TI response. Therefore, ginger EOexposure during manual harvesting maybe advisable to reduce fearful responses in cockerels.

Key word: Ginger Essential Oil, Plasma Biochemistry Parameters, Tonic Immobility Test, Manual Harvesting of Poultry.

.

فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۸، جلد ۱۳، شماره ۱، زمستان۹۸، صفحه-۱۳ تا ۲۳
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

بررسی تغییرات متابولیتی و آنزیمی اشک زنان در دوره قاعدگی

وهب جعفریان[۱]، زهرا بیانی[۲]
۱- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان ایران.V.jafarian@znu.ac.ir
۲-دانشجوی دکتری رشته علوم قرآن و حدیث، دانشگاه آزاد اسلامی زنجان، زنجان. ایران.

تاریخ دریافت:۹۸/۷/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۱

چکیده

زمینه و هدف: اشک انسان ترکیب پیچیده‌ای از پروتئین‌ها، آنزیم‌ها، چربی‌ها، متابولیت‌ها و الکترولیت‌ها است که افزون بر تمیز و شفاف نگه داشتن سطح چشم، در تغذیه چشم نقش دارد. هدف از این پژوهش بررسی تغییرات متابولیتی و آنزیمی اشک در زنان در دوره قاعدگی است

روش کار: دامنه سنی زنان مورد آزمایش ۱۸ تا ۲٤ سال بود و از سلامت جسمی و بینایی کامل و رژیم غذایی مشابهی در دوره یک ماهه پیش از نمونه‌گیری برخوردار بودند. نمونه‌های اشک زنان به عنوان تیمار در روز سوم قاعدگی و نمونه های شاهد سه روز پس از اتمام قاعدگی تهیه گردید. برخی از پروتئین‌های اشک نیز تحت آنالیز توسط FPLC و RP-HPLC قرار گرفتند. در این پژوهش، تغییرات بیوشیمیایی از قبیل تغییر در آنزیم‌های لیزوزیم، پراکسیداز، آلفا آمیلاز، تیروزیناز، و تغییر در متابولیت‌هایی مانند گلوکز، فسفر و کلسیم موجود در اشک زنان در طول دوران قاعدگی و حالت طبیعی بررسی و مقایسه شد.

یافته ها: نتایج بیوشیمیایی نشان داد که میزان غلظت پروتئین‌ها(کمّی و کیفی (SDS-PAGE)) و آنزیم‌های لیزوزیم، پراکسیداز، تیروزیناز در زنان قاعده نسبت به حالت‌های طبیعی آن‌ها افزایش یافت، ولی میزان آلفاآمیلاز، گلوکز، فسفر، و کلسیم در اشک در دوره قاعدگی کمتر بود.

نتیجه‌گیری: بنابر این پژوهش، کاهش گلوکز، فسفر و کلسیم موجود در اشک را می‌توان به عنوان شاخصی در مطالعات مقایسه‌ای و تشخیص طبی در زنان در شرایط قاعدگی در نظر گرفت.

واژه های کلیدی: اشک، آنزیم، متابولیت، قاعدگی، HPLC

مقدمه

چشم انسان به وسیله یک پوشش نازک مایع(لایه‌ی اشک) پوشیده شده است. لایه‌ی اشک چندین نقش - اساسی در سیستم بینایی دارد که شامل شستشوی چشم و فراهم‌کردن مواد غذایی و فاکتورهای رشد برای اپی‌تلیوم می‌شود و هم‌چنین به عنوان سدی در برابر عفونت‌های میکروبی محیط چشم به کار می‌رود. اشک دارای سه لایه شامل لیپیدی، آبی و موسینی است که هر کدام از این لایه‌ها ترکیبات گوناگونی دارند و نقش‌های مختلفی را در چشم انجام می‌دهند(۸).نقش‌های اصلی اشک شامل نگهداری سطحی صاف و هموار برای انعکاس نور، روان کردن پلک چشم، روان کردن پرده ملتحمه و قرنیه، تأمین مواد غذایی قرنیه، حذف مواد خارجی از قرنیه و پرده ملتحمه چشم، و دفاع سطح چشمی از پاتوژن‌ها از طریق مواد ضد باکتریایی ویژه و غیر ویژه می‌باشد(۱۷). اشک‌ها از ۹۸ تا ۹۹٪ آب همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر پروتئین تشکیل شده است. مایع اشکی شامل نمک‌ها، پروتئین‌ها و لیزوزیم بوده و یکی از نقش-های آن نگهداری تونیسیته لایه اشک می‌باشد(۱۱). مایع ترشح شده توسط غدد لاکریمال در چشم محلول پیچیده‌ای از یون‌ها و پروتئین‌ها است. پروتئین‌های ویژه غده لاکریمال در غلظت‌های بالا در اشک وجود دارند و شامل لاکتوفرین، لیپوکالین و لیزوزیم می‌باشند. پروتئین-های آمیلاز، پراکسیداز، فعال کننده پلاسمینوژن، پرولاکتین، فاکتور رشد اپیدرمی و رتینول به میزان

کمتری در اشک چشم وجود دارند(۱۷). اشک را بر اساس سیستم تحریک به سه نوع: اشکی تحریکی، اشک پایه‌ای(بدون تحریک) و اشک احساسی(اشک ناشی از ناراحتی، خوشحالی، ترس و غیره) تقسیم‌بندی می‌شود. ترکیب لیپیدهای موجود در اشک به طور قابل ملاحظه‌ای در افراد مختلف متفاوت است(۱۰). بیش از ۶۰ ترکیب مختلف از پروتئین‌های اشک انسان شناسایی شده است. چنین گزارش شده است که مقادیر نسبی پروتئین‌های موجود در اشک یک شخص بسته به روش جمع‌آوری متفاوت می‌باشد. برخی از متابولیت‌های اشک شامل گلوکز، پیرووات، لاکتات و اوره اشک شناسایی شده است(۱۶). در اشک نیز الکترولیت‌هایی مانند سدیم، کلر و پتاسیم وجود دارد. هم‌چنین اشک انسان متأثر از حالات مختلف بدن قرار می‌گیرد. داروهای سیستمیک بر سرعت جریان اشک و بر روی ترکیبات آن اثر می‌گذارند(۲۱). قاعدگی در زنان همراه با تغییر در میزان هورمون‌های استروژن و پروژسترون رخ می‌دهد. سطح هورمون استروژن در طی تخمک‌گذاری و مرحله لوتئال افزایش می‌یابد، در حالی که میزان هورمون پروژسترون کمی پیش از تخمک‌گذاری افزایش و بلافاصله در مرحله لوتئال به سرعت کاهش می‌یابد. در این دوران نیز زنان از لحاظ روحی در وضعیت نامتعادلی قرار دارند(۷). تغییر در لایه اشک و فراسنجه‌های مربوط به قرنیه از جمله انحنای قرنیه و ضخامت قرنیه نیز تحت تأثیر تغییرات هورمونی در طی دوره قاعدگی در زنان در چندین پژوهش گزارش شده است(۲۱، ۱۳، ۱۰). افزون بر این، هورمون استروژن می‌تواند باعث تغییر در عملکردهای فیزیولوژیک قرنیه چشم توسط بازجذب سدیم، جلوگیری از آب و در نتیجه ورم بافت مربوطه شود(۶). تاکنون گزارشی بر روی برخی تغییرات بیوشیمیایی موجود در اشک در دوره قاعدگی نشده است. هدف از این پژوهش بررسی تغییرات بیوشیمیایی اشک شامل پروتئین‌ها، متابولیت‌ها و الکترولیت‌های آن در زنان در دوره عادت ماهیانه و مقایسه آن با حالت طبیعی است تا بتوان در تشخیص‌های طبی از نشانگرهای این تغییرات استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از اشک

در این پژوهش، ۳۰ نفر از دانشجویان دختر به طور تصادفی با دامنه سنی ۱۸ تا ۲۴ سال ساکن خوابگاه نرگس دانشگاه گیلان که از رژیم غذایی تقریباً یکسانی استفاده می‌نمودند و سابقه بیماری خاصی نیز در مورد چشم‌هایشان وجود نداشت، انتخاب شدند. نمونه‌گیری در روزهای سوم دوره قاعدگی و سه روز بعد از دوره انجام شد. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری به میکروتیوب‌های ۲۰۰ میکرولیتری منتقل و تا زمان انجام آزمایش در یخچال با دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

سنجش‌های بیوشیمیایی

روش‌های الکتروفورزی

برای بررسی میزان کیفی و کمّی پروتئین‌های موجود در اشک زنان در دوره قاعدگی و حالت طبیعی از الکتروفورز SDS-PAGE، طبق روش لاملی(۱۴) استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل‌ها با استفاده از کوماسی بریلینت بلو(G-۲۵۰) انجام گرفت. زایموگرام آنزیم آلفا آمیلاز با استفاده از الکتروفورز به روش PAGE انجام شد.

تعیین غلظت پروتئین کل

غلظت پروتئین کل با استفاده از روش برادفورد(۵) و رسم منحنی استاندارد در حضور آلبومین سرم گاوی محاسبه شد.

اندازه‌گیری الکترولیت‌ها و گلوکز اشک

اندازه‌گیری فسفر بر اساس روش اسپکتروفتومتری انجام و جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت شد و میزان فسفر به روش زیر به دست آمد:

$$\text{فسفر(میلی گرم در صد)} = \frac{\text{جذب آزمایش}}{\text{جذب استاندارد}} \times ۵$$

اندازه‌گیری میزان کلسیم اشک بر اساس روش های اسپکتروفتومتری صورت گرفت و جذب نمونه‌ها در ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و میزان کلسیم بر طبق رابطه مقابل به دست آمد.

$$\text{کلسیم (mg/dl)} = \frac{\text{جذب آزمایش}}{\text{جذب استاندارد}} \times ۱۰$$

برای اندازه‌گیری گلوکز با استفاده از روش اسپکتوفتومتری در طول موج ۵۴۶ نانومتر انجام گرفت و غلظت نمونه‌ها از طریق معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{Glucose} = \frac{\Delta A\ Sample}{\Delta A\ STD} \times Conc.Std\,(mg/dl)$$

تعیین فعالیت آنزیم‌ها

برای اندازه‌گیری میزان فعالت آنزیم آمیلاز از روش جونگ استفاده و جذب نمونه ها در طول موج ۵۴۰ نانومتردر حضور نمونه شاهد تعیین شد(۱۲). فعالیت آنزیم پراکسیداز بنابر روش سریری و همکاران اندازه-گیری و سرعت واکنش آنزیمی به‌صورت تغییرات جذب علیه زمان (ΔA / min) در طول موج ۵۱۰ نانومتر(مربوط به ماکزیمم جذب کروموژن - ضمیمه) ثبت گردید(۱۸). جهت تعیین فعالیت آنزیمی، تغییرات جذب علیه زمان (ΔA /min یا OD) به عدد ثابت ۶/۵۸ تقسیم می‌شود. برای سنجش فعالیت آنزیم تیروزیناز از سوبسترای دوپامین هیدروکلراید استفاده و تغییرات جذب بر زمان در طول موج ۵۱۰ نانومتر محاسبه و با ضرب عدد حاصل در عدد ثابت ۰/۰۱۷ فعالیت آنزیمی به دست آمد(۹).

کروماتوگرافی

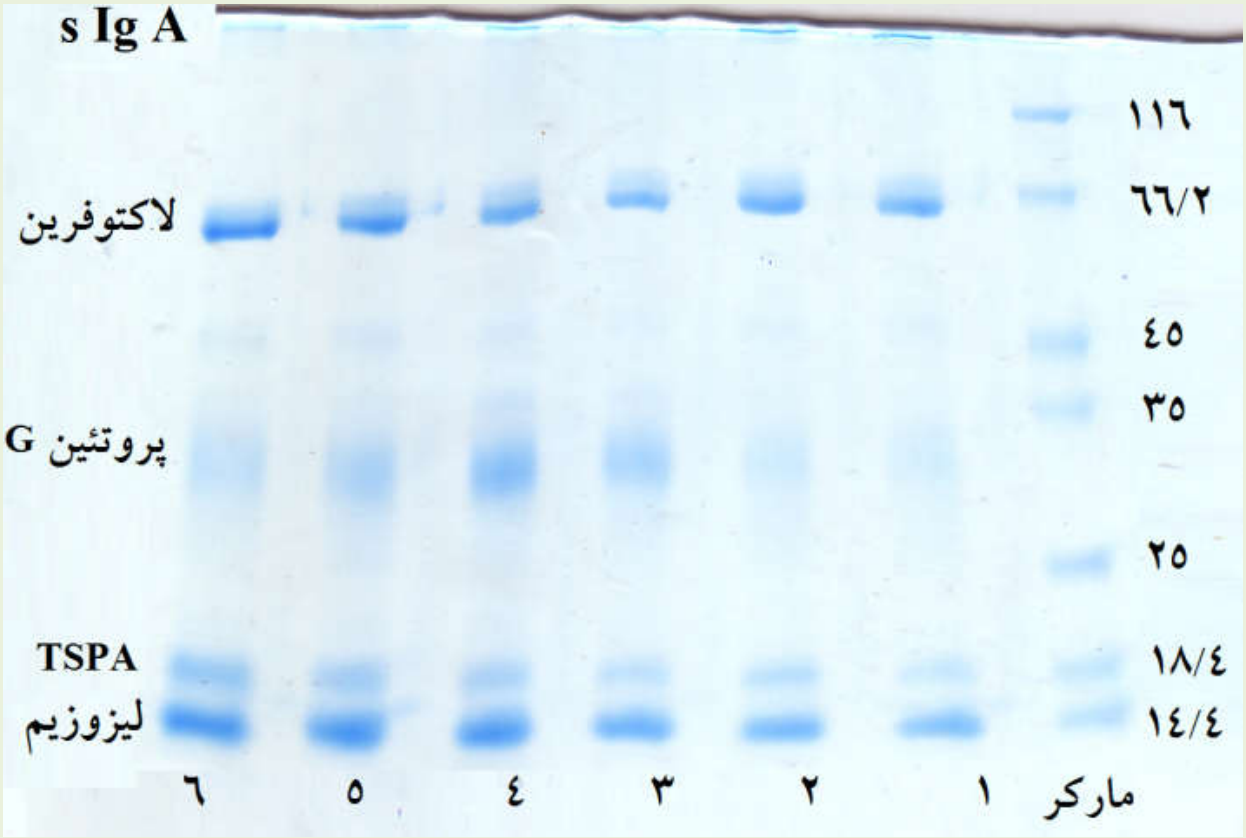
برای آنالیز پروتئین‌های موجود در نمونه‌های اشک در دو حالت قاعدگی و طبیعی، از دستگاه HPLC(Waters Co. USA) استفاده شد. جهت انجام از دستگاه HPLC بعد از تعیین غلظت نمونه ها، ۲۵ میکروگرم پروتئین را به ستون C18 با سرعت ۷۰۰ میکرولیتر بردقیقه با حلال‌های مورد استفاده شامل آب(۸۰٪)، متانول(۱۰٪)، استونیتریل(۵٪) و n-هگزان(۵٪) با شیب غلظتی برای مدت ۶۰ دقیقه بارگذاری شده و با توجه به توانایی نرم‌افزار GhromGate، از ۴ طول موج ۲۸۰، ۲۵۴، ۲۲۰ و ۲۱۴ نانومتر برای تشخیص پروتئین‌ها استفاده شد. از آن‌جا که استاندارد هیچ کدام از پروتئین‌های موجود در اشک در اختیار نبود، بعد از به دست آوردن پیک‌ها برای آن‌که مشخص شود هر پیکی متعلق به کدام پروتئین است، از الکتروفورز استفاده شد. به طوری که در بخش Waste دستگاه HPLC تک تک پیک‌ها جمع‌آوری، و جهت افزایش غلظت ترکیب در نمونه‌های جمع شده این کار ده‌ها مرتبه انجام شد، تا پروتئین‌ها در الکتروفورز قابل مشاهده باشند. از آن جایی که هیچ استانداردی مربوط به پروتئین لیزوزیم اشک وجود نداشت، بنابراین جهت تهیه نمونه استاندارد از FPLC استفاده شد. پس از انجام کروماتوگرافی، فعالیت آنزیم لیزوزیم در فرکشن‌های هر پیک سنجیده و فرکشن‌هایی که حاوی آنزیم لیزوزیم بودند به عنوان استاندارد در HPLC جهت تعیین محل دقیق پیک لیزوزیم مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

نتایج بررسی کیفی پروتئین اشک

نتایج آزمون ژل الکتروفورز SDS-PAGE پروتئین-های موجود در اشک زنان در دوران قاعدگی و در حالت طبیعی در شکل ۱ نشان داده شده است. در بررسی‌های انجام شده با استفاده از الکتروفورز مشاهده شد که در هنگام قاعدگی میزان پروتئین‌های اشک افزایش یافت. هم‌چنین باندهای الکتروفورزی با استفاده از نرم افزار Total Lab مورد بررسی قرار گرفت(شکل ۲). نتایج مربوط به آنالیز پروتئین‌های اشک نمونه‌های شاهد(پس از قاعدگی یا حالت طبیعی) و تیمار(دوره قاعدگی) با استفاده از دستگاه HPLC در شکل۳ نشان

داده شده است. همان‌گونه که در این مشخص شده است، پروتئین لاکتوفرین، لیزوزیم، و لیپوکالین در نمونه‌های اشک موجود در زنان در دوره قاعدگی نسبت به حالت طبیعی افزایش یافت. نتایج الگوهای الکتروفورزی آلفا آمیلاز اشک نشان‌دهنده وجود سه باند بود که در شکل۴ مشخص می‌باشد. مقایسه این باندها نیز با استفاده از نرم افزار Total Lab صورت گرفت. در تمامی نمونه‌های مورد آزمایش، مقدار این آنزیم در اشک زنان در دوره قاعدگی کاهش یافت.



شکل۱- نمونه ژل الکتروفورز پروتئین‌های موجود در اشک زنان در دوران قاعدگی و در حالت طبیعی با استفاده از بافر نمونه غیر احیایی و رنگ آمیزی با کوماسی بلو. مارکر پروتئینی SM0431 مورد استفاده قرار گرفت. شماره‌های ۲، ٤ و ٦ مربوط به نمونه‌های اشک در دوره قاعدگی و شماره های ۱، ۳ و ٥ مربوط به نمونه‌های اشک در حالت طبیعی هستند.

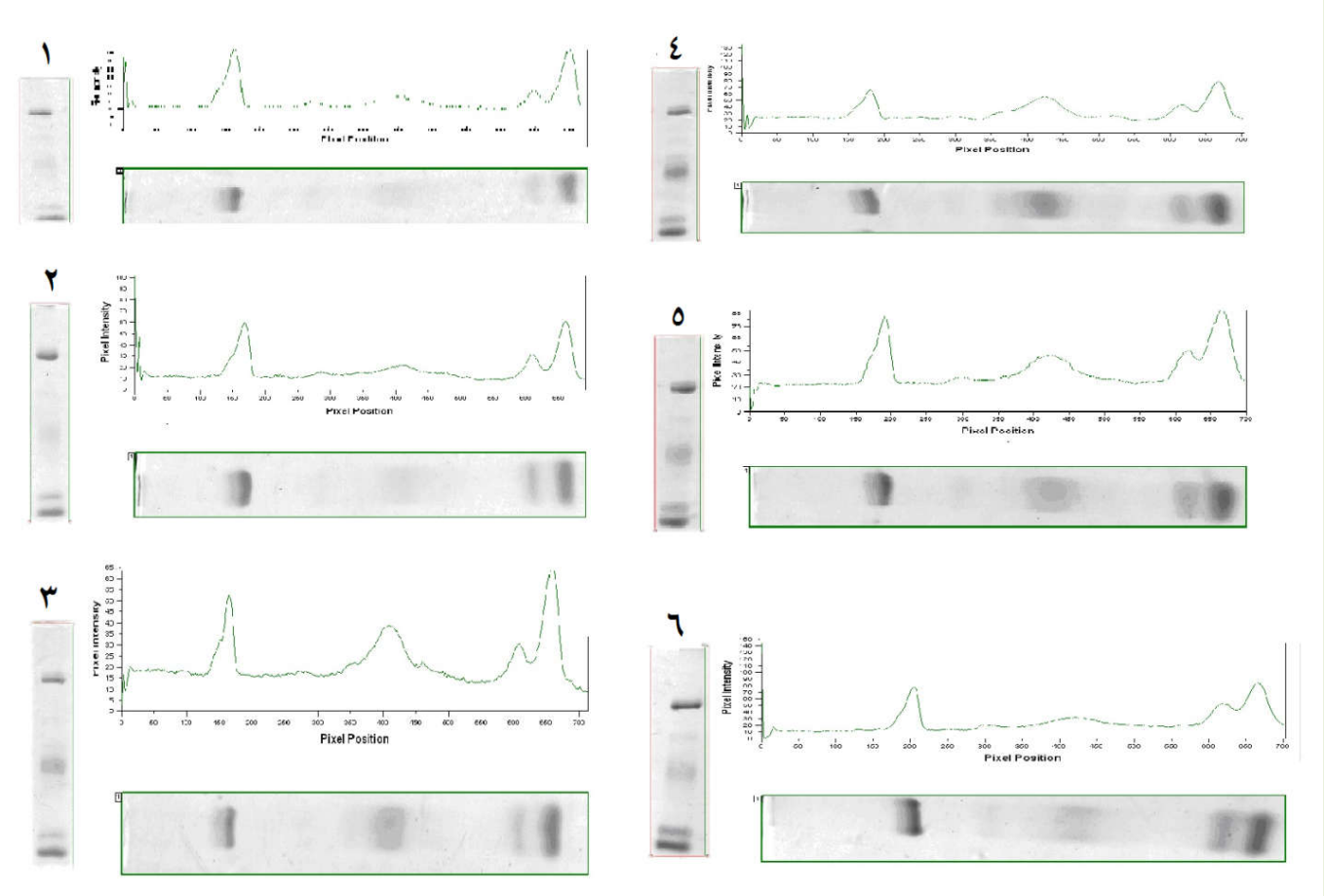
بررسی تغییرات غلظت پروتئین تام، متابولیت‌ها و الکترولیت‌ها

نتایج آزمایش‌های انجام گرفته در مورد میانگین غلظت کل پروتئین در جدول ۱ آورده شده است. با استفاده از منحنی استاندارد، BSA و معادله خط، غلظت پروتئین کل(تام) در نمونه‌های اشک در زنان در دوره قاعدگی و حالت طبیعی بررسی گردید. نتایج حاکی ازافزایش غلظت پروتئین تام در دوره قاعدگی می باشد. نتایج به دست‌آمده نشان داد که غلظت گلوکز، فسفر و کلسیم در اشک زنان در دوره قاعدگی به طور چشم-گیری نسبت به نمونه‌های مشابه در دوره پس از قاعدگی(حالت طبیعی) کاهش یافت، ولی غلظت پروتئین کل در دوره قاعدگی بیشتر از حالت طبیعی بود(جدول ۱).

اندازه گیری فعالیت آنزیم‌های اشک

در بررسی‌های انجام شده میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، تیروزینار و لیزوزیم در نمونه‌های موجود در

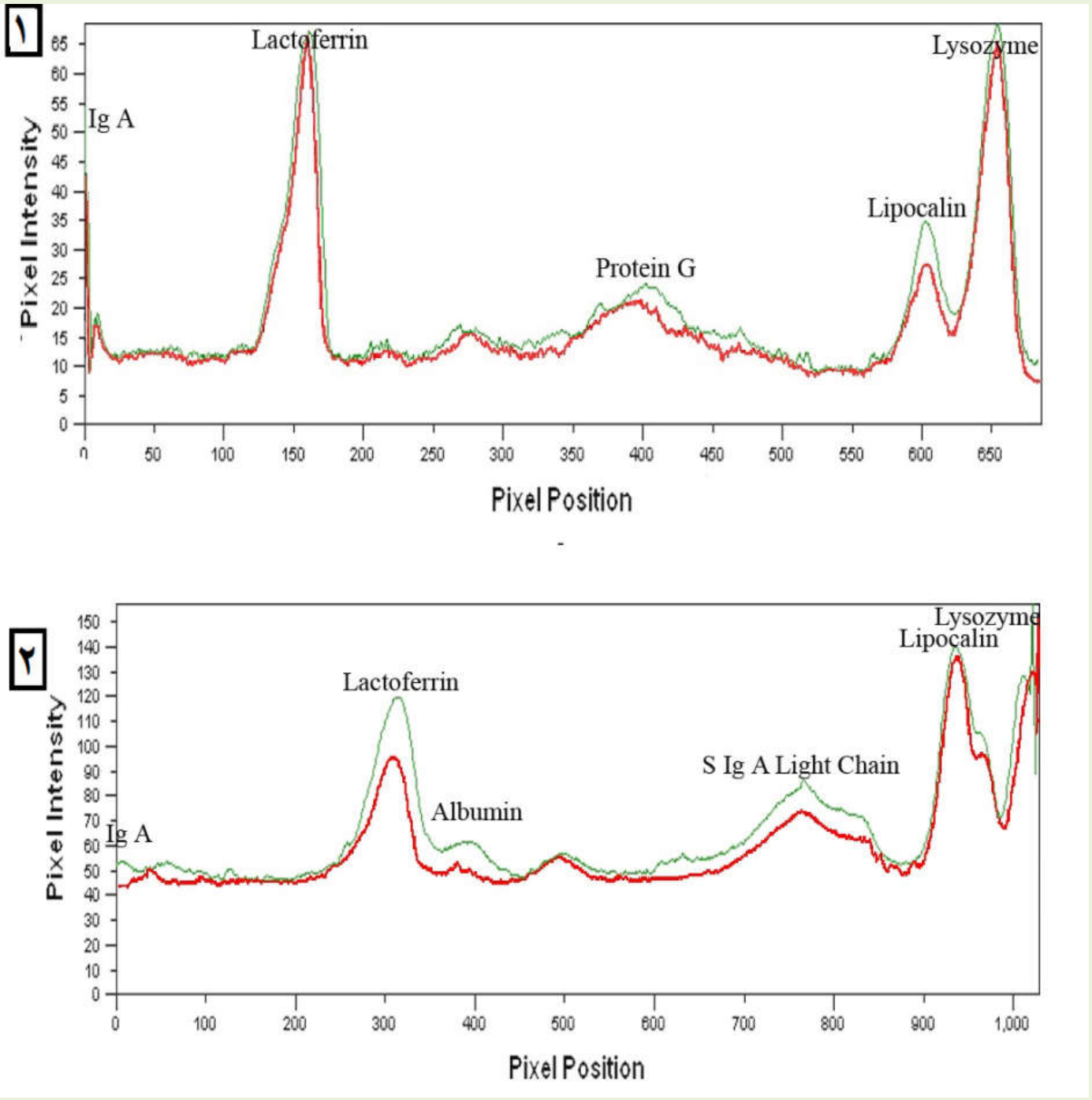
اشک زنان در دوره قاعدگی نسبت به حالت طبیعی افزایش یافت(جدول ۲).



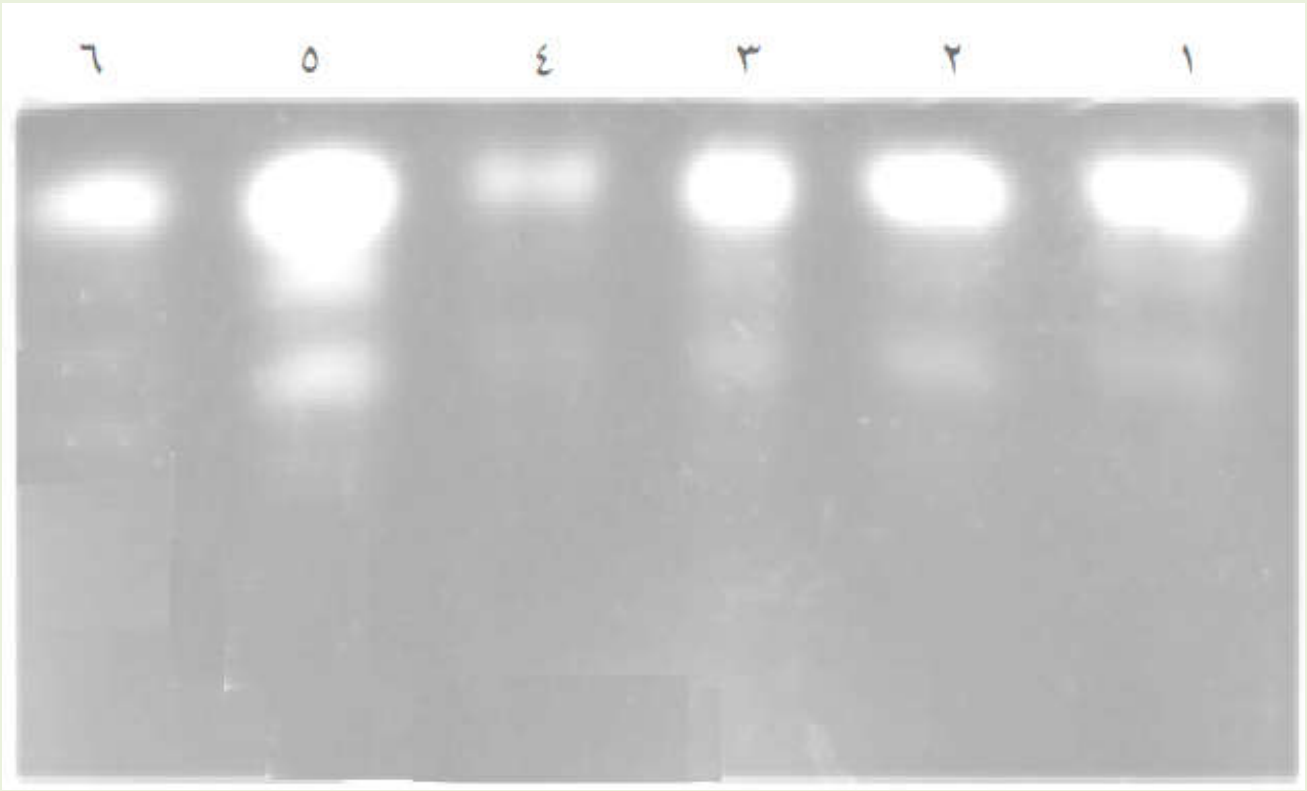
شکل۲- نتایج الکتروگرام نمونه ۱ تا ٦ ژل الکتروفورز. شماره‌های ۲، ٤ و ٦ مربوط به نمونه‌های اشک در دوره قاعدگی و شماره های ۱، ۳ و ٥ مربوط به نمونه‌های اشک در حالت طبیعی هستند.

کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا(HPLC)

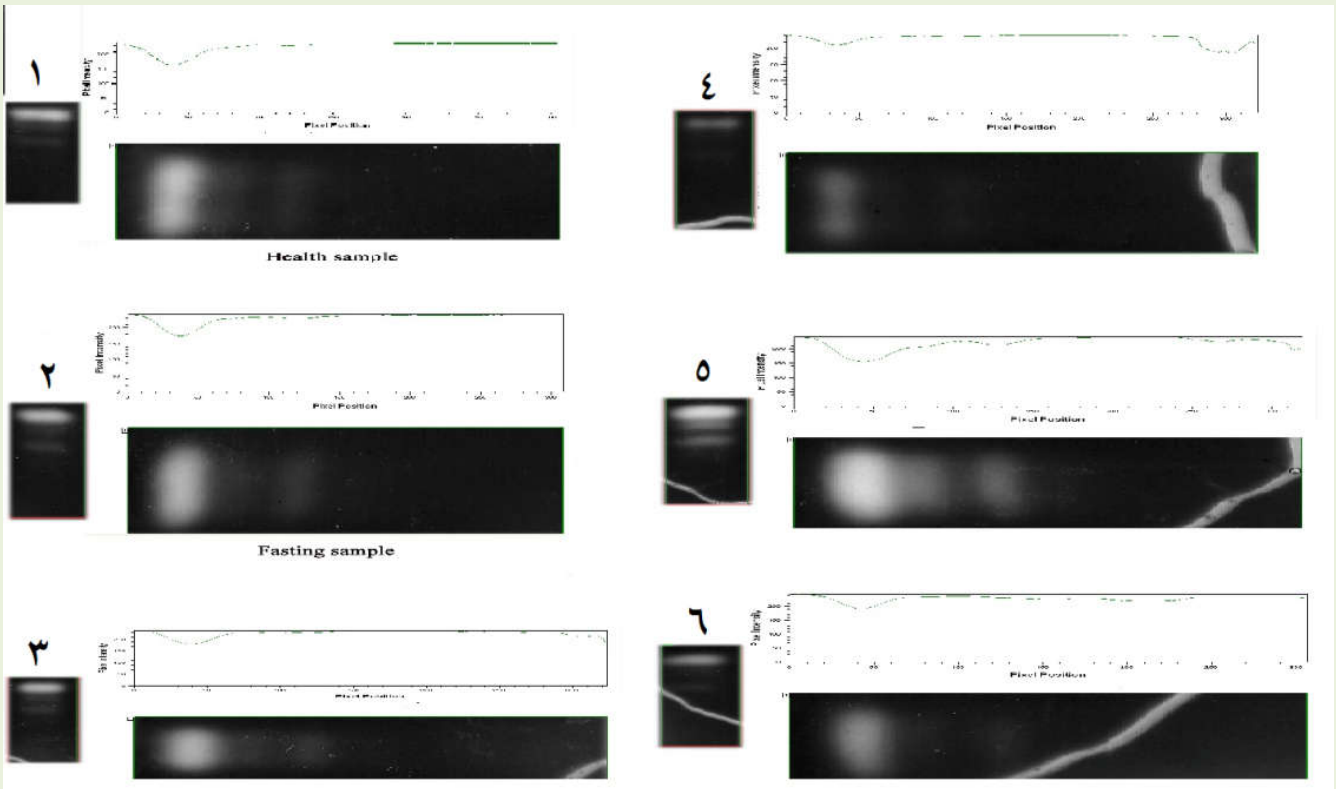
بررسی بیوشیمیایی پروتئین‌های اشک با استفاده از دستگاه HPLC نشان داد که همانند روش برادفورد، غلظت پروتئین کل در اشک زنان در دوره قاعدگی نسبت به دوره پس از قاعدگی(حالت طبیعی) افزایش یافت. پس از به دست آوردن پیک‌های کروماتوگرام، شناسایی پیک‌ها، با تزریق نمونه و جمع‌آوری آن‌ها و تغلیظ نمونه‌های مورد نظر، الکتروفورز نمونه‌های فوق انجام گرفت. در نهایت دو پیک، یعنی پیک‌های مربوط به لیزوزیم و لاکتوفرین تشخیص داده شدند. در این پژوهش، لیزوزیم انسانی از طریق FPLC نیز تخلیص و به عنوان استاندارد در HPLC مورد استفاده قرار گرفت



شکل۳- مقایسه الکتروگرام(۱) نمونه اول و دوم، (۲) نمونه سوم و چهارم. نمونه پروتئین موجود در اشک زنان در دوره قاعدگی با خط سبز و در دوره پس از قاعدگی(حالت طبیعی) با خط قرمز رنگ نشان داده شده است.



شکل٤- زایموگرام آنزیم آلفاآمیلاز اشک در زنان در دو دوره قاعدگی و پس از قاعدگی(حالت طبیعی). شماره‌های ۲، ٤ و ٦ مربوط به نمونه‌های اشک در دوره قاعدگی و شماره های ۱، ۳ و ٥ مربوط به نمونه‌های اشک در دوره پس از قاعدگی هستند.



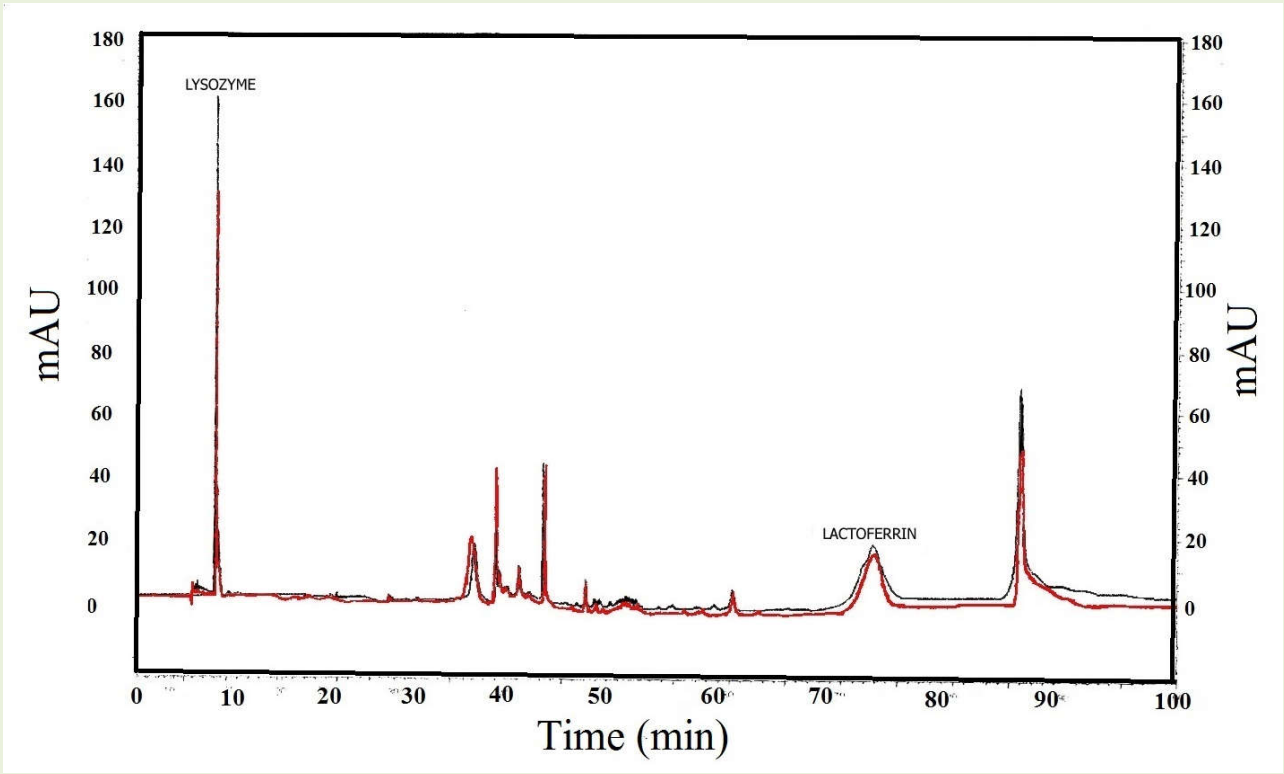
شکل٥- الکتروگرام نمونه ۱ تا ٦ ژل مربوط به آنزیم آلفا آمیلاز(نگاره ٤). شماره‌های ۲، ٤ و ٦ مربوط به نمونه‌های اشک در دوره قاعدگی و شماره های ۱، ۳ و ٥ مربوط به نمونه‌های اشک در حالت طبیعی هستند.

جدول ۱- میزان پروتئین کل و برخی عناصر موجود در اشک زنان در دوره قاعدگی و پس از قاعدگی(حالت طبیعی)

مراحل نمونه‌گیری	پروتئین کل (mg/mL)	گلوکز (mg/dl)	کلسیم (mg/dl)	فسفر (mg%)
دوره قاعدگی	۶/۳۱	۷//۶۲	۱/۱	۱/۷۸
حالت طبیعی	۵/۷۴	۱۷/۳۷	۲/۳۶	۲/۵

جدول ۲- میزان برخی آنزیم‌های موجود در اشک زنان در دوره قاعدگی و پس از قاعدگی(حالت طبیعی)

مراحل نمونه‌گیری	پراکسیداز (µmol/min)	تیروزیناز (µmol/min)	لیزوزیم (µmol/min)
دوره قاعدگی	۰/۰۰۰۹۶	۰/۰۰۲۱	۰/۰۰۱۱
حالت طبیعی	۰/۰۰۰۳۸	۰/۰۰۱۱	۰/۰۰۰۸۲



شکل٦- بررسی بیوشیمیایی پروتئین‌های اشک با استفاده از دستگاه HPLC. (مشکی) نمودار مربوط نمونه اشک زنان در دوره قاعدگی و (قرمز) مربوط به دوره پس از قاعدگی (حالت طبیعی).

بحث و نتیجه گیری

لیزوزیم اشک دارای توانایی تجزیه کردن دیواره‌های باکتریایی از طریق هضم آنزیمی مونوپلی ساکاریدهای بافتی آن می باشد. غلظت لیزوزیم در اشک به اندازه کافی بالااست تا برای فعالیت ضد باکتریایی مفید باشد. لیزوزیم بین ۲۰ تا ۴۰ ٪ محتوای پروتئینی اشک را تشکیل داده و در اشک فراوان‌تر از دیگر مایعات بدنی مانند بزاق، سرم و ادرار می باشد. هم‌چنین این پروتئین قلیایی‌ترین پروتئین اشک می باشد(۸). بنابر پژوهش‌های پیشین، تغییرات هورمونی در طی دوره قاعدگی در زنان موجب تغییر در لایه اشک و انحنا و ضخامت قرنیه می-

شود(۲۱، ۱۰). افزون بر این، هورمون مرتبط با دوره قاعدگی مانند استروژن بر عملکردهای فیزیولوژیک قرنیه چشم اثر می‌گذارد و باعث تغییر بازجذب سدیم می‌شود(۶). بنابر تحقیقات انجام‌شده، پایدارای و کیفیت لایه اشک نقش مهمی در کیفیت نوری چشم دارد(۱۶). در طی چرخه قاعدگی محتوای برخی از متابولیت‌های خون از جمله گلوکز افزایش می‌یابد(۳). نتیجه مهم دیگر مطالعه حاضر این بود که پروتئین هایی مانند لاکتوفرین، لیپوکالین و لیزوزیم در ترکیب اشک در هنگام قاعدگی افزایش می‌یابند. یکی از وظایف اصلی اشک حفاظت چشم در برابر میکرب‌ها می‌باشد. لایه میانی اشک شامل بسیاری از پروتئین‌های ضد میکربی است که از مهم‌ترین آن‌ها ایمونوگلوبولین‌ها(پادتن‌ها)، سایتوکاین‌ها، لیپوکالین، لاکتوفرین، لیزوزیم و دفنسین‌ها می‌باشند که توسط غدد موجود در چشم تولید می‌شوند(اما این‌که این پروتئین‌ها از خون سرچشمه می‌گیرند مورد سوال است(۱۹).این پروتئین‌ها از جمله پروتئین‌های سیستم ایمنی ذاتی محسوب می‌شوند که از سلول‌های ایمنی ذاتی تولید و نقش ضد میکربی ایفا می‌نمایند(۱۵). مستندات و مشاهدات بسیاری وجود دارند که نشان می‌دهند قاعدگی یک فرآیند التهابی است که با تغییرات اساسی در ساختار اندومتریال رحم به واسطه عملکرد لوکوسیت‌های متفاوت درگیر است(۲). تقریباً ۴۰ درصد از سلول‌های استرومال در فاز ترشحی چرخه قاعدگی(مرحله قبل از قاعدگی) را لوکوسیت‌ها تشکیل می‌دهند. افت هورمون‌های استروژن و پروژسترون در نبود حاملگی و رخ دادن قاعدگی سبب تحریک فراخوانی و گسترش لوکوسیت‌ها در اندومتر رحم می‌شود(۲). پاسخ‌های ایمنی ایجاد شده توسط این لوکوسیت‌ها که در مرحله قبل از قاعدگی رخ داده و شرایط را برای شروع قاعدگی فراهم می‌کنند، اغلب ذاتی هستند و با افزایش چشمگیر ماکروفازها و نوتروفیل‌ها و ماست سل‌ها مشخص می‌شوند. ماکروفازها و نوتروفیل‌ها منع غنی پروتئین‌های ضد میکربی مانند لاکتوفرین، لیزوزیم و دفنسین‌ها می‌باشند که حضورشان در طول قاعدگی که سد اپی‌تلیالی اندومتر رحم تخریب می‌شود، به دفاع علیه حمله میکربی کمک خواهد کرد. ماست سل‌ها نیز با ترشح پروتئین‌های تجزیه کننده به تخریب ماتریکس خارج سلولی سلول‌های اپی‌تلیالی رحم کمک می‌کنند(۱۵). در زمان قاعدگی افزون بر ایمنی ذاتی، ایمنی اکتسابی نیز فعال می‌شود که یکی از مشخصه‌های آن افزایش تولید پادتن‌هایی مانند IgA و IgGمی‌باشد که توسط سلول‌هایی با نام B سل تولید می‌شوند(۱). با وجود این‌که مقدار پروتئین کل خون در طی قاعدگی و حالت طبیعی تقریباً یکسان است اما مطالعات نشان داده‌اند که مقدار این پادتن‌ها در خون و در طول قاعدگی نسبت به مرحله تخمک‌گذاری بسیار افزایش می‌یابند(۱). سلول‌های ترشح‌کننده پادتن در مرحله قبل از تخمک‌گذاری حدوداً چهار برابر هستند(۱،۱۹). با در کنار هم گذاشتن این اطلاعات می‌توان به این نتیجه رسید که در زمان قاعدگی، تغییرات فاکتورهای ایمنی موجود در خون و اشک می‌توانند هم‌سو باشند زیرا از طرفی ترکیبات خون و همین‌طور اشک هر دو تحت تاثیر هورمون های استروژن و پروژسترون قرار می‌گیرند(۴،۲۰) و از سوی دیگر پروتئین‌های اشک می‌توانند از خون سرچشمه بگیرند(۱۹). روی هم رفته، بنابر پژوهش حاضر میزان مواد بیوشیمیایی محتوای اشک تحت تأثیر دوره قاعدگی در زنان قرار می‌گیرد. به طوری‌که میزان غلظت پروتئین‌ها(کمّی و کیفی) و آنزیم‌های لیزوزیم، پراکسیداز و تیروزینار در زنان قاعده نسبت به حالت‌های طبیعی آن‌ها افزایش می‌یابد. از سوی دیگر، میزان آلفاآمیلاز، گلوکز، فسفر، و کلسیم در اشک در دوره قاعدگی کمتر می‌شود. بر اساس یافته‌های این پژوهش، کاهش گلوکز، فسفر و کلسیم موجود در

اشک را می‌توان به عنوان شاخصی در مطالعات مقایسه‌ای و تشخیص طبی در زنان در شرایط قاعدگی در نظر گرفت.

منابع

1.Beagley, KW., Gockel, CM. (2003). Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 38(1); 13-22.

2.Berbic, M., Fraser, IS. (2013). Immunology of normal and abnormal menstruation. Women's Health, 9(4); 387-395.

3.Bennal, AS., Kerure, SB. (2013). Glucose handling during menstrual cycle. International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology, 2(3); 284-287.

4.Bhatia, A., Sekhon, HK., Kaur, G. (2014). Sex hormones and immune dimorphism. The Scientific World Journal, 2014; 150-159.

5.Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Journal of Analytical Biochemistry, 72; 248-254.

6.Bowman, WC., Rand, MJ. (1980). Textbook of pharmacology(No. 2nd ed.). Blackwell Scientific Publications.

7.Cavdar, E., Ozkaya, A., Alkin, Z., Ozkaya, HM., Babayigit, MA. (2014). Changes in tear film, corneal topography and refractive status in premenopausal women during menstrual cycle. Contact Lens and Anterior Eye, 37(3); 209-212.

8.Herbaut, A., Liang, H., Denoyer, A., Baudouin, C., Labbé, A. (2019). Tear film analysis and evaluation of optical quality: A review of the literature. Journal francais d'ophtalmologie, 42(2); 21-35.

9.Gutteridge, JM., Paterson, SK., Segal, AW., Halliwell, B. (1981). Inhibition of lipid peroxidation by the iron-binding protein lactoferrin. Biochemical Journal, 199(1); 259-261.

10. Giuffre, G., Di Rosa, L., Fiorino, F., Bubella, DM., Lodato, G. (2007). Variations in central corneal thickness during the menstrual cycle in women. Cornea, 26(2); 144-146.

11. Inada, K., Baba, H., Okamura, R. (1982). Studies of human tear proteins--1. Analysis of tears from normal subjects by crossed immunoelectrophoresis. Japanese Journal of Ophthalmology, 26(3); 314-325.

12. Jung, D.H. (1980). Preparation and application of procion yellow starch for amylase assay. Clinica Chimica Acta, 100(1); 7-11.

13. Kiely, PM., Carney, LG., Smith, G. (1983). Menstrual cycle variations of corneal topography and thickness. American Journal of Optometry and Physiological Optics, 60(10); 822-829.

14. Laemmli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227; 680–685.

15. King, A.E., Critchley, H.O., Kelly, R.W. (2003). Innate immune defences in the human endometrium. Reproductive Biology and Endocrinology, 1(1); 116.

16. Montes-Mico, R., Cervino, A., Ferrer-Blasco, T., Garcia-Lazaro, S., Madrid-Costa, D. (2010). The tear film and the optical quality of the eye. Ocul. Surf, 8;185-192.

17. Paulsen, FP., Berry, MS. (2006). Mucins and TFF peptides of the tear film and lacrimal apparatus. Progress in histochemistry and cytochemistry, 41(1); 1-53.

18. Sariri, R., Sajedi, RH., Jafarian, V. (2006). Inhibition of horseradish peroxidase activity by thiol type inhibitors. Journal of molecular liquids, 123(1); 20-23.

19. Schnetler, R., Gillan, WDH., Koorsen, G. (2012). Immunological and antimicrobial molecules in human tears: a review and preliminary report. African Vision and Eye Health, 71(3); 123-132.

20. Sharma, A., Porwal, S., Tyagi, M. (2018). Effect of oral contraceptives on tear film in reproductive age group women. International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology, 7(3); 861.

21. Versura, P., Fresina, M., Campos, EC. (2007). Ocular surface changes over the menstrual cycle in women with and without dry eye. Gynecological endocrinology, 23(7); 385-390.

Evaluation of Metabolic and Enzymatic Changes in Tears in Women During Menstrual Period

V.Jafarian[1], Z. Baiani[2]

1. Associate Professor of Biology Department, Faculty of Science, University of Zanjan, Zanjan, Iran.**V.jafarian@znu.ac.ir**

2. PhD Student of Quran& Hadith Sciences, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

Received:2019.7. 10 **Accepted: 2019.22.12**

Abstract

Inroduction & Objective: Human tears are a complex combination of proteins, enzymes, fats, metabolites, and electrolytes that in spite of keeping the eye surface clean and transparent, play an important role in nourishing the eye.

Material and Method: The age of the women tested was ranging from 18 to 24 years old and had complete physical and visual health with similar diet during one month before sampling. Tear samples of women were prepared as treatment on the third day of menstruation and control samples three days after menstruation. Some tear proteins were also analyzed by FPLC and RP-HPLC. In the present study, some biochemical alterations such as changes in lysozyme, peroxidase, alpha-amylase, tyrosinase, and changes in metabolites such as glucose, phosphorus, and calcium were measured and compared in tears of women during menstruation and normal conditions.

Results: Biochemical results showed that the concentration of proteins (quantitative and qualitative (SDS-PAGE)) and lysozyme, peroxidase and tyrosinase enzymes increased in menstrual women as compared to their normal state, while alpha-amylase, glucose, phosphorus, and calcium were lower in tears during menstruation.

Conclusion: According to our study, the reduction of glucose, phosphorus and calcium in tears can be considered as an indicator in comparative studies and medical diagnosis in women under menstruation.

Keywords: Enzyme, HPLC, Menstruation, Metabolite,Tear.