

اندازه‌گیری غلظت ویتامین‌های A و C در نمونه‌های اشک و سرم مصدومین شیمیایی آلوده با گاز خردل

نوشین میرخشتی^{۱*}، فاطمه قسامی^{۲*}، خسرو جدیدی^{۳*}، M.D. سیدعلی علوی^{۴*} و فاطمه هادی‌زاده^{۵*} M.D.

آدرس مکاتبه: *شرکت تحقیقاتی حکیمان شرق - شهرک علمی- تحقیقاتی- اصفهان- ایران

**دانشگاه علوم پزشکی بقیه... «عج» - دانشکده پزشکی - گروه چشم پزشکی و مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی - تهران- ایران

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸۳/۱۱/۲۱ تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۴/۸/۱ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸۴/۱۱/۱۸

خلاصه

مقدمه: عوارض چشمی یکی از شایع‌ترین عوارض دیررس مسمومیت با گاز خردل است که شامل خشکی چشم و گروهی از آسیب‌های قرنیه‌ای می‌باشد که به نابینائی بیمار ختم می‌شود. تاکنون در مورد فیزیوپاتولوژی این بیماری تحقیقی انجام نشده است. به دلیل دخالت سیستم اکسیدان/آنتی اکسیدان در انواع بیماری‌های چشمی و اختصاصاً خشکی چشم و بیماری‌های قرنیه‌ای، در این مطالعه به ارزیابی ویتامین‌های A و C به‌عنوان ویتامین‌های آنتی اکسیدان، در این مصدومین پرداخته شده است.

مواد و روش کار: ویتامین C به‌روش Roe در نمونه اشک و سرم و ویتامین A به روش Bayfield در نمونه اشک مصدومین شیمیایی نسبت به گروه شاهد سنجیده شد.

نتایج: تفاوت معنی‌دار بین دو گروه مصدومین و شاهد در مقادیر ویتامین C در اشک (P value=۰/۰۱۷) و نیز مقادیر آن در سرم مشاهده شد (P value=۰/۰۲۲)، ولی در مورد ویتامین A تفاوت معنی‌دار نبود.

بحث: با توجه به نقش ویژه ویتامین C در دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن بالاخص در چشم، کاهش آن به معنی آسیب‌پذیری چشم در مقابل عوامل داخلی و محیطی مولد رادیکال‌های آزاد می‌باشد. به این دلیل استفاده از اشکال موضعی ویتامین C برای این مصدومین می‌تواند مثر ثمر باشد.

واژه‌های کلیدی: گاز خردل، چشم، ویتامین C، ویتامین A

مقدمه

۲/۵ درصد از تلفات جنگ شد، در سال‌های بعد هم در جنگ‌های مختلفی مورد استفاده قرار گرفت. بزرگترین آسیب اخیر مرتبط به آن، در جنگ عراق با ایران گزارش شده است [۱].

در سال‌های اخیر سلاح‌های شیمیایی و از جمله سولفورموستارد یا گاز خردل به موضوع مهم بحث‌های جهانی تبدیل شده است. این ماده که اولین کاربرد جنگی آن در جنگ جهانی اول موجب به‌وجود آوردن

۱- پزشک عمومی- شرکت تحقیقاتی حکیمان شرق- نویسنده مسئول
۲- پزشک عمومی- شرکت تحقیقات حکیمان شرق
۳- پزشک عمومی- شرکت تحقیقات حکیمان شرق

۴- پزشک عمومی- شرکت تحقیقاتی حکیمان شرق- نویسنده مسئول
۵- پزشک عمومی- شرکت تحقیقاتی حکیمان شرق

اسید اسکوربیک از آنتی‌اکسیدان‌های مطرح در چشم می‌باشد. اسکوربات در بافت‌های چشمی گونه‌های حیوانی با غلظتی چندین برابر غلظت پلاسمایی تجمع می‌یابد [۱۷].

کمبود ویتامین A منجر به اشکال در تمایز اپی‌تلیوم قرنیه و ملتحمه و خشکی چشم می‌گردد که با تجویز ویتامین A این اختلالات تا حدودی برگشت می‌کند.

همان‌گونه که گفته شد، یکی از عوارض مزمن مصدومین شیمیایی گاز خردل خشکی چشم است. بر اساس مطالعه Augustin و همکاران، لیپیدپراکسیداسیون به‌طور معنی‌داری در بیماران دچار خشکی چشم بیشتر از گروه شاهد بوده است [۱۸]. در مقابل آن استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها منجر به افزایش ثبات اشک و ارتقای سلامتی ملتحمه شده است [۱۹] که می‌تواند مطرح‌کننده اهمیت آسیب‌اکسیداتیو (برهم خوردن تعادل سیستم‌اکسیدان/آنتی‌اکسیدان) در بروز خشکی چشم باشد.

ویتامین C از آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب و رتینول‌ها از آنتی‌اکسیدان‌های محلول در چربی موجود در چشم می‌باشد [۲۰]. مطالعات انجام شده در مورد نقش رادیکال‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها در بیماری‌های چشمی بر روی نمونه‌های گوناگونی انجام پذیرفته است که سرم بیماران [۲۱]، بافت [۲۳ و ۲۲]، اشک [۲۴ و ۲۵]، کشت سلول‌های پوششی قرنیه و عدسی [۲۶] و لکوسیت‌های خون را شامل می‌شود.

همان‌طور که در مطالعات قبلی نیز استفاده شده است، اشک نمونه مناسبی برای بررسی سیستم‌اکسیدان/آنتی‌اکسیدان در بیماری‌های چشمی می‌باشد. بیوشیمی اشک در آسیب‌های دیس‌تروفیک قرنیه اهمیت دارد [۲۷]. براساس مطالعه Vin'kova نتایج آنالیز شاخص‌های پراکسیداسیون لیپیدی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان اشک با زمان گذشتن از حادثه، شدت و مرحله یووئیت متعاقب تروما مطابقت دارد [۲۸].

براین اساس و با توجه به امکان اثر سیستم‌های اکسیدان/آنتی‌اکسیدان در پاتوژنز آسیب ناشی از موستارد، در این مطالعه برآن شدیم تا به بررسی غلظت ویتامین C در اشک و سرم و ویتامین A در اشک مصدومین مبتلا به عوارض دیررس چشمی گاز خردل در مقایسه با افراد سالم بپردازیم.

آثار مسمومیت با گاز خردل ممکن است موضعی، سیستمیک و یا هر دو را شامل شود که به شرایط محیطی، ارگان‌های تماس یافته مدت و مقدار تماس بستگی دارد. تئوری‌های جدید در رابطه با مکانیسم سمیت گاز خردل که شامل تئوری پلی‌ADP ریوپولیمراز، تئوری تیول کلسیم و تئوری پراکسیداسیون لیپیدها می‌باشند، همگی در نقص تعادل مواد اکسیدان، تشکیل رادیکال‌های آزاد و واکنش‌های متعاقب آن مشترکند [۳ و ۲]. ارگان‌هایی که بلافاصله بعد از تماس با موستارد آسیب می‌بینند عبارتند از: پوست، چشم‌ها و ریه‌ها. بسته به مدت زمان تماس با موستارد مصدومین به‌طور گذرا و یا دائمی دچار ناتوانی می‌شوند [۴].

سوزش شدید، فتوفوبی و بلفارواسپاسم، کونژکتیویت شدید، ادم قرنیه، واسکولاریزاسیون قرنیه و نقصان در بینایی در فاز حاد مسمومیت می‌توانند ایجاد شود [۵]. در گروهی از بیماران که تماس بیشتری با سم داشته‌اند، پس از یک دوره نهفته ۱۰ تا ۲۵ ساله، درگیری قرنیه به‌شکل زخم‌های قرنیه مکرر و مقاوم ایجاد می‌شود. به‌دنبال این کراتوپاتی، کونژکتیویت مزمن و کدر شدن قرنیه نیز ایجاد می‌گردد [۶ و ۷]. مشکل بسیار شایع چشمی دیگر در مصدومین گاز خردل خشکی چشم است که به‌صورت یک بیماری مزمن چشمی در بیماران دیده می‌شود [۸]. در مورد مکانیسم ایجاد عوارض دیررس و درمان آن‌ها اطلاعی در دست نیست. با توجه به فرم التهابی مزمن این عوارض از یک سو و نقش اثبات شده رادیکال‌های آزاد در پاتوژنز التهاب مزمن بافتی [۹] از سوی دیگر، یک فرضیه محتمل نقش رادیکال‌ها در عوارض دیررس چشمی گاز خردل می‌باشد. به‌ویژه این‌که اثر حفاظتی آنتی‌اکسیدان‌ها در مقابل کراتیت و زخم قرنیه [۱۰ و ۱۱] و خشکی چشم [۱۳ و ۱۲] در آزمایشات متعددی تایید شده است و اشکال در مهار رادیکال‌های آزاد نیز در پاتوژنز بیماری‌های قرنیه موثر دانسته شده است که از این میان می‌توان به اثر اشکال در مهار رادیکال‌های هیدروکسیل و افت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و سطح اسید اسکوربیک در آسیب‌قرنیه‌ای ناشی از هرپس سیمپلکس [۱۴]، کاهش ویتامین C لکوسیت‌های بیماران مبتلا به زخم عفونی قرنیه [۱۵] و نقش کاهش ویتامین A در خشکی چشم و کراتوکونژکتیویت و اشکال در تمایز سلول‌های پوششی قرنیه [۱۶] اشاره نمود.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری: با در نظر گرفتن ضریب اطمینان ۹۵ درصد، طی نمونه‌گیری در سه نوبت زمانی از مصدومین شیمیائی گاز خردل با محدوده سنی 40 ± 5 سال که مطابق پرونده پزشکی خود در سال‌های ۱۳۶۷-۱۳۶۱ دچار مصدومیت چشمی با گاز خردل شده و در حال حاضر مبتلا به عوارض چشمی می‌باشند، در مجموع ۵۳ نمونه خون و ۵۰ نمونه اشک تهیه گردید. این مصدومین بر اساس تشخیص چشم پزشکی مبتلا به خشکی چشم بوده‌اند و به همین دلیل از اشک مصنوعی در طول سال‌های مصدومیت استفاده می‌کرده‌اند، البته در روز نمونه‌گیری این افراد از هیچ دارویی استفاده نکرده بودند. از تمام این افراد برای نمونه‌گیری اشک، از فشار جریان ازت بر روی قرنیه چشم مصدومین استفاده شد [۲۹]. نمونه‌های اشک بلافاصله داخل آمپول‌های شیشه‌ای ریخته و درب آن‌ها توسط شعله مسدود و در ظرف یخ تا رسیدن به تانک ازت نگهداری شد. نمونه‌های خون نیز با دور 1500 rpm به مدت ده دقیقه سانتریفوژ و سرم آن جدا و درون آمپول‌های شیشه‌ای منجمد شد. نمونه‌های شاهد به همان تعداد، از میان دانشجویان پزشکی داوطلب تهیه گردید. شرایط ورود به مطالعه، مصرف نکردن دارو، حداقل یک هفته قبل از نمونه‌گیری، عدم مصرف سیگار و برخوردار نبودن از لنز چشمی بود. این افراد به بیماری عمومی دیگری نیز مبتلا نبودند (غیر از عوارض گاز خردل در گروه مصدومین). در مورد کلیه مصدومین مطابق پرونده پزشکی، سابقه مسمومیت با گاز خردل مورد تأیید قرار گرفت. کلیه این افراد عوارض جلدی گاز خردل را در زمان شیمیائی شدن داشتند و در حال حاضر دچار مشکل چشمی بودند (منظور از مشکل چشمی عیوب انکساری نمی‌باشد).

آزمون‌های بیوشیمیائی: برای اندازه‌گیری ویتامین C، از روش Roe [۳۰] و برای اندازه‌گیری ویتامین A، از روش Bayfield [۳۱] استفاده شد که توضیح هر یک از این روش‌ها در زیر آورده می‌شود:

اندازه‌گیری ویتامین C: مواد مورد نیاز عبارتند از: تری کلرواستیک اسید ۵ و ۱۰ درصد در آب مقطر، محلول DTC شامل: 0.4 g تیواورا، سولفات مس 0.5 g و ۲ و ۴

دی‌نیتروفلن هیدرازین $3/0 \text{ g}$ که با اسید سولفوریک 9 N به حجم صدمیلی لیتر رسانده شود و اسید سولفوریک ۶۵ درصد. $50 \mu\text{L}$ از نمونه به $50 \mu\text{L}$ از تری کلرواستیک اسید 10 درصد افزوده و به شدت ورتکس شد و به مدت ۲۰ دقیقه در 3500 rpm سانتریفوژ گردید. $50 \mu\text{L}$ از مایع رویی با $10 \mu\text{L}$ از محلول DTC مخلوط و برای ۳ ساعت در 37°C نگهداری شد. $37 \mu\text{L}$ از اسید سولفوریک ۶۵ درصد افزوده و ورتکس گردید. پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق توسط اسپکتروفتومتر Coleman 6/20، جذب نوری در 520 nm قرائت شد.

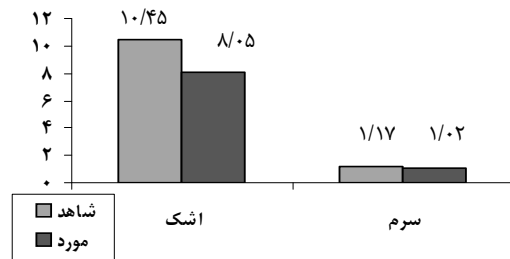
اندازه‌گیری ویتامین A: مواد مورد نیاز: اتانول، متانول، هگزان، کلروفرم، تری کلرو استیک اسید.

به $25 \mu\text{L}$ از نمونه، داخل یک میکروتیوب $1/5$ میلی‌لیتری اپندورف پوشانده شده توسط کاغذ آلومینیوم، $200 \mu\text{L}$ اتانول و $200 \mu\text{L}$ متانول اضافه شد. پس از ۱۰ ثانیه ورتکس، $250 \mu\text{L}$ هگزان به آن اضافه و مجدداً به مدت ۶۰ ثانیه به شدت ورتکس شد. برای جدا شدن فاز رویی، به مدت ۵ دقیقه با 1500 rpm سانتریفوژ شد. فاز هگزان رویی جدا و مجدداً $500 \mu\text{L}$ هگزان اضافه و مجدداً به مدت ۶۰ ثانیه ورتکس گردید. مشابه مرحله قبل، سانتریفوژ و فاز رویی جدا شد. سپس مجموع هگزان جمع‌آوری شده، در دمای $45^\circ\text{C} - 50^\circ\text{C}$ توسط گاز نیتروژن تبخیر شد. به نمونه $40 \mu\text{L}$ کلروفرم اضافه گردید. در نهایت به سرعت $80 \mu\text{L}$ تری کلرواستیک اسید با آن مخلوط و بلافاصله جذب نوری توسط اسپکتروفتومتر Coleman 6/20 در 620 nm خوانده شد.

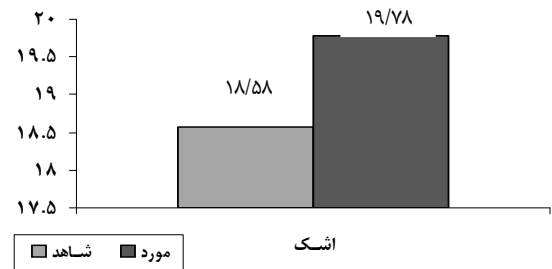
تجزیه و تحلیل داده‌ها: پس از ورود داده‌ها به نرم افزار آماری SPSS، میانگین و انحراف معیار هریک از شاخص‌های بیوشیمیائی در اشک گروه‌های مورد و شاهد محاسبه و نتایج مربوطه توسط آزمون student t-test مقایسه گردید. همچنین میانگین و انحراف معیار هریک از شاخص‌های بیوشیمیائی در سرم گروه‌های مورد و شاهد نیز محاسبه و نتایج مربوطه توسط آزمون student t-test مقایسه شد.

نتایج

نتایج بررسی فاکتورهای مختلف در سرم و اشک گروه مورد و شاهد در نمودارهای ۱ و ۲ آمده است. ویتامین C سرم بیماران 0.35 ± 0.10 g/dl و ویتامین C سرم افراد سالم 0.24 ± 0.10 mg/dl بود ($P \text{ value} = 0.022$). این مقادیر در اشک بیماران 3.62 ± 0.08 mg/dl و در اشک گروه سالم 3.45 ± 0.10 mg/dl گزارش شد ($P \text{ value} = 0.017$). مقدار ویتامین A اشک در گروه مورد 4.08 ± 19.78 ng/ml و در گروه شاهد 4.76 ± 18.58 ng/ml به دست آمد ($P \text{ value} = 0.171$).



شکل ۱: مقادیر ویتامین C اشک و سرم مطابق با روش Roe (mg/ml)



شکل ۲: مقادیر ویتامین A اشک مطابق با روش Byfield (ng/ml)

بحث

مشکلات چشمی دیررس مصدومین گاز خردل شامل خشکی چشم با شیوع بالا و عوارض قرنیه‌ای اعم از کراتیت، زخم قرنیه، نئوواسکولاریزاسیون و کدورت قرنیه می‌باشد [۳۲] از میان دو عامل آنتی‌اکسیدانی که در این مطالعه بررسی شده‌اند، به نظر می‌رسد ویتامین C اهمیت بیشتری داشته باشد چون بر هر سه گونه فعال اکسیژن‌دار مطرح در بیماری‌های چشمی [۳۳]، یعنی رادیکال

هیدروکسیل [۳۴]، پراکسید هیدروژن [۳۵] و رادیکال سوپراکسید موثر شناخته شده است. این درحالی است که پیش از این اثر گونه‌های فعال اکسیژن‌دار بر بیماری‌های قرنیه‌ای اعم از کدورت قرنیه [۳۶]، زخم قرنیه و خشکی چشم در مواردی با اتیولوژی متفاوت ثابت شده است. کارایی آنتی‌اکسیدان‌ها در جلوگیری از این عوارض نیز تایید کننده این اثر است. از این میان می‌توان به اثر بخشی درمان آنتی‌اکسیدانی برای خشکی چشم و خصوصا ویتامین C برای جلوگیری از زخم قرنیه [۳۷] اشاره نمود. بنابراین کاهش ویتامین C در اشک مصدومین مورد مطالعه نیز می‌تواند توجیه کننده نقش گونه‌های فعال اکسیژن‌دار در این بیماری باشد. در مورد علت کاهش اسکوربیک اسید در سرم بیماران، فیزیوپاتولوژی در سایر نقاط بدن نظیر ریه، می‌تواند توجیه کننده باشد. براین اساس پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی از فرآورده‌های دارویی موضعی ویتامین C در درمان این مصدومین استفاده شود.

ویتامین A در چشم نقش‌های گوناگونی ایفا می‌کند. به گونه‌ای که کاهش این ویتامین منجر به اختلال در تمایز سلول‌های اپیتلیال قرنیه می‌گردد. علاوه بر این، این ویتامین در بسیاری از بیماری‌های چشمی از قبیل خشکی چشم، تخریب عدسی و رتین [۳۸]، کراتوکنژکتیویت و SLK (superiorlimbic keratoconjunctivitis) [۳۹] دیده می‌شود. علاوه بر این ثابت شده است که کمبود ویتامین A با مکانیسم‌های گوناگونی قرنیه را مستعد عفونت با سودوموناس آئروژینوزا می‌گرداند که این مکانیسم‌ها عبارتند از: کمبود اشک برای رفع آلودگی باکتریال، نقصان در مهاجرت نوتروفیل‌ها، کراتینیزاسیون اپی‌تلیوم و تداخل در بهبودی زخم قرنیه و اشکال عملکرد پلی‌مورفونوکلترها [۴۰]. در بیماری‌هایی نظیر بیماری‌های کبدی و اختلال در هضم چربی‌ها کاهش این ویتامین علت اصلی بیماری‌های چشمی محسوب می‌گردد که می‌تواند منجر به کوری بیمار شود [۴۱].

در مطالعه ما تفاوت معنی‌داری بین غلظت ویتامین A در اشک دو گروه مورد و شاهد مشاهده نشد که این عدم تفاوت می‌تواند حاکی از عدم دخالت ویتامین A در ایجاد عوارض چشمی مصدومین گاز خردل باشد.

در ارتباط با نقاط ضعف این طرح باید گفت علیرغم ناشتا بودن افراد مورد مطالعه در روز نمونه‌گیری که تاثیر تغذیه بر مقدار ویتامین C سرم را از بین می‌برد، ولی به دلیل تجمع آن در اشک و همچنین تجمع ویتامین A در بدن تغذیه به‌عنوان یک متغیر مزاحم در این مطالعه مطرح است.

در خاتمه با توجه به همسن نبودن گروه‌های شاهد و بیمار به دلیل محدودیت‌های تحقیق، نیاز به بررسی‌های تکمیلی در این قسمت توصیه می‌شود.

یک دلیل احتمالی برای این مورد می‌تواند غیرمؤثر بودن سطح طبیعی ویتامین A اشک در محافظت قرنیه و ملتحمه باشد. چون تمام مقالات مربوط به عوارض کاهش ویتامین A، مربوط به سطح بافتی این ویتامین می‌باشند. گرچه این نتایج امکان اثر بخشی استفاده موضعی از ویتامین A را برای پیشگیری از وقوع کراتیت و کدورت قرنیه در چشم بیماران که به دلیل عوارض چشمی گاز خردل دچار حمله حاد کراتیت شده‌اند، رد نمی‌کند.

منابع

- 1- Somani S M. Toxicokinetics and toxicodynamics of mustard. In: Chemical warfare agents. San Diego, California: Academic Press 1992; p.15.
- 2- Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J* 1987;1:358-364.
- 3- Papirmeister B, Gross CL, Meier HL, Petrali JP, Johnson JB. Molecular basis for mustard-induced vesication. *Fund Appl Toxicol* 1985;5:5134-5149.
- 4- Somani SM. Toxicokinetics and toxicodynamics of mustard. In: Chemical warfare agents. San Diego, California: Academic Press; 1992. p.14.
- 5- Hugh WF. Mustard gas injury to the eyes. *Arch Ophthalmol* 1942;27:582.
- 6- Blodi FC. Mustard gas keratopathy. *Int Ophthalmol Clin*. 1971; 2: 1.
- 7- Duke-Elder WS, MacFaul PA. Chemical injuries, in *System of Ophthalmology*, Vol 14: Injuries, Part 2: Non-Mechanical Injuries. St. Louis cr Mosby co; 1972;.
- 8- جدیدی خسرو، عین‌الهی بهرام. بررسی عوارض چشمی گاز خردل در مجروحین شیمیایی جنگ تحمیلی. *مجله کوثر* ۱۳۷۸؛ شماره ۴: صفحات ۷-۲۸۵.
- 9- Mitchell RN, Cotran RC. Cell injury, adaptation and death. In: Kumar V, Cotran R, Robbins SL. *Robbins Basic pathology*. 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders company 2003; P.9-11.
- 10- Toczolowski J, Wolski T, Klamut-Sory K. Effect of drugs inhibiting the formation of hydroxide radicals on healing of experimental corneal ulcer. *Klin Oczna* 1992;94(4):83-5.
- 11- Sieradzki E, Olejarz E, Strauss K, Marzec A, Mieszkowska M, Kaluzny J. The effect of selenium and vitamin E on the healing process of experimental corneal lesions in the eye of the rabbit. *Klin Oczna* 1998;100(2):85-8.
- 12- Kobayashi TK, Tsubota K, Takamura E, Sawa M, Ohashi Y, Usui M. Effect of retinol palmitate as a treatment for dry eye: a cytological evaluation. *Ophthalmologica* 1997;211(6):358-61.
- 13- Tseng SC, Farazdaghi M. Reversal of conjunctival transdifferentiation by topical retinoic acid. *Cornea* 1988;7(4):273-9.
- 14- Terekhina NA, Petrovich IuA, Batueva RA, Sosnin DIu, Vesna VA. [Lacrimal and salivary antioxidants in viral infection] *Klin Lab Diagn* 1998;(1):13-5.
- 15- Trope GE, Lee WR, Moseley H, Hainsworth IR. Low leucocyte ascorbic acid levels and corneal ulceration. *Trans Ophthalmol Soc U K*. 1979;99(4):495-6.
- 16- Tseng SC, Farazdaghi M, Rider AA. Conjunctival transdifferentiation induced by systemic vitamin A deficiency in vascularized rabbit corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28(9):1497-504.
- 17- Reiss GR, Wemess PG, Zollman PE, Brubaker RF. Ascorbic acid levels in the aqueous humor of nocturnal and diurnal mammals. *Arch Ophthalmol* 1986;104:753-755.
- 18- Augustin AJ, Spitznas M, Kaviani N, Meller D, Koch FH, Grus F, Gobbels MJ. Oxidative reactions in the tear fluid of patients suffering from dry eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1995;233(11):694-8.
- 19- Blades KJ, Patel S, Aidoo KE. Oral antioxidant therapy for marginal dry eye. *Eur J Clin Nutr* 2001;55(7):589-97.
- 20- Berman ER. *Biochemistry of the Eye*. New York: Plenum Press 1991; p.1-476.
- 21- Ihara Y, Nobukuni K, Namba R, Kamisaka K, Kibata M, Kajinami K. A family of familial hypercholesterolemia with cerebral infarction and without coronary heart disease. An unusual case with corneal opacity, polyneuropathy and carpal tunnel syndrome in the family: therapy with probucol and tocopherol nicotinate. *J Neurol Sci* 1991;106(1):10-8.
- 22- Ciuffi M, Pisanello M, Pagliai G, Raimondi L, Franchi-Micheli S, Cantore M. Antioxidant protection in cultured corneal cells and whole corneas submitted to UV-B exposure. *J Photochem Photobiol B* 2003;71(1-3):59-68.
- 23- Cejkova J, Ardan T, Filipec M, Midelfart A. Xanthine oxidoreductase and xanthine oxidase in human cornea. *Histol Histopathol* 2002;17(3):755-60.
- 24- Arkhipova LT, Dolgova IG. Prognostic significance of local and systemic indicators of lipid peroxidation and antioxidant system in perforating wounds of the eyes and their time course during local antioxidant treatment. *Vestn Oftalmol* 2001;117 (5):37-40.
- 25- Smirenaia E, Kourenkov V, Chesnokova NB, Kuznetsova TR. Antioxidant activity of tear fluid and antioxidant therapy in myopic patients after laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg* 2002;18(3):364-5.

- 26- Lym HS, Suh Y, Park CK. Effects of hyaluronic acid on the polymorphonuclear leukocyte (PMN) release of active oxygen and protection of bovine corneal endothelial cells from activated PMNs. *Korean J Ophthalmol* 2004;18(1):23-8.
- 27- Gorskova EN, Sevost'ianov EN, Teplova SN, Korobeinikova EN. Changes in oxidative processes in the anterior segment of the eye in patients with keratoconus. *Vestn Oftalmol* 2002;118(3):30-2
- 28- Kuizenga AB, Nicolaas J, Haeringen V, Kijlstra A. SDS- minigel electrophoresis of human tears. *Inv Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:381-386.
- 29- Vin'kova GA. Metabolic state of the other eye in post-traumatic uveitis. *Vestn Oftalmol* 2000;116(4):19-22.
- 30- Roe JH, Kuether CA. The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *J Biol Chem* 1943;147:399-407.
- 31- Bayfield RK, Cole ER: Colorimetric estimation of vitamin A with trichloroacetic acid. *Methods Enzy- mol.* 1980;67:189-195.
- 32- Solberg Y, Alcalay M, Belkin M. Ocular injury by mustard gas. *Surv Ophthalmol* 1997;41(6):461-6.
- 33- Kuizenga A, Haeringen JV, Kijlstra A. Inhibition of hydroxyl radical formation by human tears. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:305-313.
- 34- Shimmura S, Masumizu T, Nakai Y, Urayama K, Shimazaki J, Bissen-Miyajima H, Kohno M, Tsubota K. Excimer laser-induced hydroxyl radical formation and keratocyte death in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(6):1245-9.
- 35- Shang F, Lu M, Dudek E, Reddan J, Taylor A. Vitamin C and vitamin E restore the resistance of GSH-depleted lens cells to H₂O₂. *Free Radic Biol Med* 2003;34(5):521-30.
- 36- Pfister RR, Paterson CA, Spiers JW, Hayes SA. The efficacy of ascorbate treatment after severe experimental alkali burns depends upon the route of administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980;19(12):1526-9.
- 37- Carubelli R, Nordquist RE, Rowsey JJ. Role of active oxygen species in corneal ulceration. Effect of hydrogen peroxide generated in situ. *Cornea* 1990;9(2):161-9.
- 38- Brown NA, Bron AJ, Harding JJ, Dewar HM. Nutrition supplements and the eye. *Eye* 1998;12:127-33.
- 39- Kabat AG. Lacrimal occlusion therapy for the treatment of superior limbic keratoconjunctivitis. *Optom Vis Sci* 1998;75(10):714-8.
- 40- Kozlov SA, Khyshiktuev BS, Logunov NA. [Effects of complex therapy with emoxipin on the course of diabetic retinopathy] *Vestn Oftalmol* 2003;119(2):28-30.
- 41- Sommer A. Effect of vitamin A deficiency on the ocular surface. *Ophlm* 1983;90(6):592-600.