

## نقش محافظتی ملاتونین بر روی ضایعات بافت نخاع پس از تابش اشعه گاما

باقر مینایی زنگی<sup>۱\*</sup>، سارا آقای زاده<sup>۲</sup> و مهناز آذرنیا<sup>۳</sup>

۱- گروه بافت شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (عهده دار مکاتبات) [minaebz@sina.tums.ac.ir](mailto:minaebz@sina.tums.ac.ir)

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

۳- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران

### چکیده

تابش (Radiation) باعث آسیب‌های جدی در نخاع می‌شود. تا به حال عوامل مختلفی تحت عنوان رادیوپروتکتور شناخته شده‌اند. در این مطالعه، ما بر تأثیر ملاتونین بعنوان نورورادیوپروتکتور بر نخاع ناحیه گردنی توجه کرده‌ایم. ۲۴ رت نر بالغ از نژاد ویستار آلبینو در محدود وزنی ۲۵۰g-۲۰۰ انتخاب شدند. آنها را به ۴ گروه شش تایی تقسیم کردیم:

۱- گروه شاهد

۲- گروه ملاتونین که روزانه  $30 \frac{mg}{kg}$  ملاتونین دریافت می‌کردند

۳- گروه اشعه که تنها ۱۰Gy اشعه گاما دریافت نمودند.

۴- گروه ملاتونین + اشعه که علاوه بر در معرض اشعه گاما قرار گرفتن به همان میزان، روزانه ملاتونین نیز دریافت نمودند. پس از ۷۲ ساعت، تمام رت‌ها قربانی شده و مطالعات هیستوپاتولوژیک و آنالیز بیوشیمیایی از نظر میزان مالون دی آلدئید، گلوتاتیون و پروتئین بافتی انجام شد. میزان مالون دی آلدئید، گلوتاتیون و پروتئین بافتی در گروه ۴ یعنی گروهی که تحت تأثیر اشعه قرار داشت، پس از تیمار توسط ملاتونین کاهش یافت در حالیکه میزان گلوتاتیون افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد ( $P < 0.005$ ). تغییرات هیستوپاتولوژیک نیز پس از تیمار با ملاتونین در مقایسه با گروه اشعه، به میزان قابل توجهی کاهش یافت. در نتیجه، ملاتونین ممکن است در حفاظت از نخاع در مقابل سمیت حاصل از اشعه مفید باشد. این ویژگی، ناشی از توانایی آن در از بین بردن رادیکال آزاد اکسیژن می‌باشد.

واژه های کلیدی: ملاتونین، رادیکال آزاد، حفاظت در برابر تابش، مالون دی آلدئید (MDA) و گلوتاتیون (GSH)

### مقدمه

میزان دوز و فرکانس اشعه و اندازه سطحی دارد که در معرض اشعه قرار می‌گیرد [۱، ۲]. بیشترین آسیب‌های تهدید کننده و جدی در بافت نخاع که تحت تأثیر تابش قرار داشته است، نکروز، گلیوز و تغییرات مربوط به ماده سفید نخاع می‌باشد.

در بسیاری از شرایط زیان آور و خطرناک پاتولوژیک، سیستم عصبی مرکزی در معرض تابش قرار می‌گیرد و تأثیرات زیان آور اشعه گاما در بافتهای عصبی و نگهدارنده معمول می‌باشد. میزان این تأثیرات جانبی بستگی به

مورفولوژیکی به صورت بصری انجام شد. آسیب‌های هیستوپاتولوژیک نیز با ارزش گذاری ۳-۰ مشخص شد. (۰ هیج، ۱ خفیف، ۲ متوسط، ۳ شدید).

#### نتایج:

تفاوت‌های میزان متوسط GSH در گروه‌های شاهد، اشعه و اشعه به علاوه ملاتونین از نظر آماری معنی دار و قابل توجه بودند ( $P < 0.05$ ). آنالیز مشابه آن برای MDA نیز تفاوت‌های قابل توجهی را نشان می‌دهد ( $P < 0.05$ ) و برای تغییرات میزان غلظت پروتئین نیز قابل ملاحظه بودند ( $P < 0.05$ ) (شکل ۱)

از نظر هیستوپاتولوژیک، میزان متوسط و مجموع تغییرات کمی (تأثیر کلی) در تغییراتی مثل التهاب، ارتشاح سلولهای تک هسته‌ای، نکروز، وزیکوله شدن، دمیلینه شدن ترومبوس و گرفتگی خون در جدول (۱) نشان داده شده‌اند. از نظر آماری تفاوت قابل ملاحظه ای بین گروه‌های شاهد و اشعه دیده شد ( $P < 0.05$ ). تفاوت‌های بین گروه‌های شاهد و اشعه به علاوه ملاتونین برای التهاب، ارتشاح سلولهای تک هسته‌ای، گرفتگی و احتقان خون، نکروز، وزیکوله شدن و دمیلینه شدن قابل توجه بود ( $P < 0.05$ ). تفاوت‌های آماری برای التهاب و ارتشاح سلولهای تک هسته‌ای بین گروه اشعه و اشعه به علاوه ملاتونین معنی دار نبودند ( $P > 0.05$ ) با این حال نتایج تست "t" اختلاف قابل توجه را در مورد نکروز و دمیلینه شدن نشان دادند.

تابش به شدت موجب ایجاد شرایط التهابی شامل گشادی عروق، افزایش دانسیته عروق و نکروز شامل انحطاط نورونی و تشکیل سلولهای gitter می‌شود (شکل ۲). مشخص شد که ملاتونین نقش محافظتی مؤثر در تمام شرایط پاتولوژیک به جز وزیکوله شدن را دارد. (جدول ۱).

#### بحث

رادیوپروتکتورها، نیاز مهمی در رادیوتراپی می‌باشند. بعضی مواد اگرچه مستقیماً بر حساسیت تابشی سلولها تأثیر نمی‌گذارند، با این حال ممکن است از کل بدن جانوران محافظت کنند زیرا آنها موجب تنگ شدن رگ‌ها می‌شوند و یا به شکلی بر پروسه معمول متابولیسم تأثیر گذاشته و آن را به صورتی تغییر می‌دهند که موجب

اشعه گاما بیشتر با تولید رادیکالهای آزاد موجب آسیب‌های بافتی می‌شود. مطالعات نشان می‌دهند که رادیکالهای آزاد اکسیژن ممکن است باعث پراکسیداسیون لیپید و فشار اکسیداتیو شوند. ملاتونین، بعنوان مهمترین محصول ترشحي غده پینه آل در مغز، به عنوان یک عامل محافظتی در تنظیم پروسه‌های فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی شناخته شده است [۳].

نشان داده شده است که ملاتونین توانایی از بین بردن رادیکالهای هیدروکسیل و پیروکسیل، آنیونهای پروکسی نیتريت، نیتريك اكساید، اكسیژن واحد و رادیکالهای لیپید پروکسیل را دارد و به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل می‌کند [۲، ۳، ۴]. همچنین مشخص شده است که ملاتونین آنزیم‌هایی را فعال می‌کند که در نقش میانجی و واسطه در متابولیسم اکسیژن واکنش گر را دارند [۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷].

در این مطالعه، آسیب‌های نخاع پس از تابش اشعه گاما بر تمام قسمت‌های بدن، در رت‌ها بررسی شد علاوه بر آن میزان پاسخ GSH, MDA و پروتئین بافتی نیز در چنین آسیب‌هایی مورد توجه قرار گرفت.

#### مواد و روشها

آزمایش بر ۲۴ رت نر، بالغ ویستار آلبینو در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ gr انجام شد. رت‌ها به طور تصادفی به ۴ گروه شش تایی تقسیم شدند. گروه I گروه شاهد، گروه II گروه اشعه که تنها در معرض اشعه گاما به میزان ۱۰ Gy قرار داشتند. گروه III گروه ملاتونین که روزانه به میزان  $30 \frac{gr}{kg}$  ملاتونین دریافت می‌کردند و گروه IV که علاوه بر همین میزان ملاتونین در معرض اشعه گاما نیز قرار داشتند. رت‌های توسط کبالت -۶۰ واحد تله تراپی اشعه دریافت کردند و پس از ۷۲ ساعت با کتامین اتوپسی شده و با کلروپرومازین قربانی شدند.

#### بررسی‌های هیستوپاتولوژیک

نمونه‌های بافتی پس از طی پروسه‌های معمول در موم پارافین قرار داده شدند. برشهای به ضخامت  $4 \mu m$  تهیه شده و با اتوزین و هماتوکسیلین (E & H) برای ارزیابی با میکروسکوپ نوری رنگ آمیزی شدند. بررسی تغییرات

نتایج حاصل از بررسی‌های ما نشان می‌دهد که سطح GSH به دنبال تابش کاهش می‌یابد اما در حضور ملاتونین، در مقایسه با گروه شاهد، افزایش را در میزان GSH مشاهده می‌کنیم. می‌دانیم که GSH یک عامل مهم محافظتی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو است و با شرکت در سیستم دفاعی سلول از آن در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند [۱۳]. گزارش شده است که GSH توانایی از بین بردن  $O_2$  را دارد و از گروه پروتئین‌های تیول در برابر اکسیداسیون محافظت می‌کند. نقش مشابه نقش آنتی‌اکسیدامی گلوکوتاتیون در مورد ویتامین E و اسید آسکوربیک نیز صادق است. [۱۴]. همچنین گزارش شده است که میزان GSH بافت و فعالیت گلوکوتاتیون ردوکتاز و گلوکوتاتیون پراکسیداز به طور قابل ملاحظه‌ای تحت تأثیر فشار اکسیداتیو کم می‌شود به همین دلیل ما پیشنهاد می‌کنیم که مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان منجر به کاهش آسیب‌های بافتی ناشی از رادیکالهای آزاد می‌شود [۱۵]. در این آزمایش، کاهش در میزان غلظت GSH نخاع بعد از تابش را می‌توان با بر هم کنش بین این آنزیم و رادیکالهای آزاد حاصل از تابش توضیح داد.

سطح مالون دی‌آلدهید (MDA) بافتی شاخص میزان پراکسیداسیون لیپید است [۱۵]. اخیراً نشان داده شده است که دریافت ملاتونین پیش از در معرض اشعه قرار گرفتن میزان MDA را در کبد رت کاهش می‌دهد [۱۶]. تیمار با ملاتونین نیز ممکن است جلوی تغییرات مورفومتریک بافت‌ها را بگیرد. همانطور که در مورد لوله‌های منی ساز و سلولهای لایدیگ رت‌ها پیشتر گزارش شده است. [۱۷]. مطالعه اخیر نشان می‌دهد که افزایش MDA پس از تابش را می‌توان با تیمار توسط ملاتونین به طور قابل ملاحظه‌ای کنترل کرد. تغییرات MDA نشان می‌دهد که ارتباط مستقیمی بین آن و تأثیرات هیستوپاتولوژیک حاصل از تابش وجود دارد.

غلظت پروتئین بافتی نیز پس از دریافت ملاتونین در موشهایی که تحت تأثیر اشعه گاما قرار داشتند در مقایسه با گروه اشعه کاهش یافته است. توزیع ترکیبات سیستم ایمنی برای دفاع از سلولهای درمقابل فشار اکسیداتیو مستقیم نیست [۴]. از طرف دیگر کارایی سیستم ایمنی باعث فعال شدن دیگر سیستم‌ها در بافتهای سالم می‌شود

کاهش تراکم اکسیژن در حد بحرانی در اندام‌ها می‌شوند. گروه دیگری از رادیوپروتکتورها وجود دارند مثل Amifastine که رادیکالهای آزاد ایجاد شده توسط تابش‌های یونیزه را از بین می‌برند [۸]. کاهش میزان صدمه حاصل از اشعه یکی از مشکلات مهم در رادیوتراپی بیماران می‌باشد و مطالعات اخیر تأثیرات وابسته به میزان دوز و زمان تابش را نشان می‌دهند. تغییرات مخرب در ساختار ماده سفید نخاع از جنبه هیستوپاتولوژیک قابل ملاحظه هستند [۹، ۱۰]. آسیب رادیکالهای آزاد، بخصوص مشتقات اکسیژن فعال شده، در آسیب سلولی قابل توجه است. ادم سلول و نکروز سلول توسط رادیکالهای آزاد اکسیژن ایجاد می‌شود. [۱۱، ۱۲].

ملاتونین، که توسط غده پینه‌ال سنتز می‌شود، نقش مهمی را در تنظیم بسیاری از عملکردهای فیزیولوژیک ایفا می‌کند [۱۳] این ترکیب تأثیر آنتی‌اکسیدانی خود را با از بین بردن رادیکالهای هیدروکسیل و پروکسیل و آنیونهای پروکسی نیتريت اعمال می‌کند [۱۴]. مطالعات *in vitro* انجام شده توسط Tan et al 1993 اولین گزارشات مثبت در مورد تأثیرات محافظتی ملاتونین است که با از بین بردن رادیکالهای OH همراه بود. این رادیکالها زمانی تولید می‌شوند که هیدروژن پراکسید در معرض اشعه ماوراء بنفش قرار بگیرد. [۱۵].

مطالعات انجام شده بر روی لنفوسیت‌های خون نیز کاهش را در ایجاد سلولهای غیر عادی با آسیب‌های ژنتیکی نشان داد. لنفوسیت‌هایی که در معرض اشعه قرار داشتند، پس از تیمار با ملاتونین، کاهش قابل توجهی را در ناهنجاریهای کروموزومی و ایجاد Micronuclei به میزان ۶۵-۶۰٪ نشان دادند [۱۶]. نتایج رضایت بخش در مطالعات *in vitro* ما را به سوی مطالعات بیشتر در شرایط *in vivo* هدایت کرد [۱۷]. اطلاعاتی که توسط Mehnet et al 2003 منتشر شد پیشنهاد می‌کنند که پیش درمان با ملاتونین به میزان قابل توجهی میزان آسیب‌های ایجاد شده اکسیداتیو حاصل از سطوح بالای مالون دی‌آلدهید را کاهش می‌دهد، همچنانکه فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و گلوکوتاتیون پراکسیداز را در بافت کبد رت‌هایی که تمام بدنشان به میزان ۶Gy اشعه دیده است تحت تأثیر قرار می‌دهد [۱۸].

آن وجود دارد که میزان سمیت ناشی از تابش را در نخاع ناحیه گردنی رت کم کرد. علاوه بر این نشان داده شده است که ملاتونین میزان MDA بافت را پس از تابش کم کرده و غلظت GSH را تنظیم می‌کند. همچنین نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که درمان با ملاتونین می‌تواند یک عامل تسهیل کننده بالقوه برای کاهش تأثیرات تابش باشد که این تأثیرات همان تخریب بافت نخاع توسط رادیکالهای آزاد می‌باشد.

### تشکر

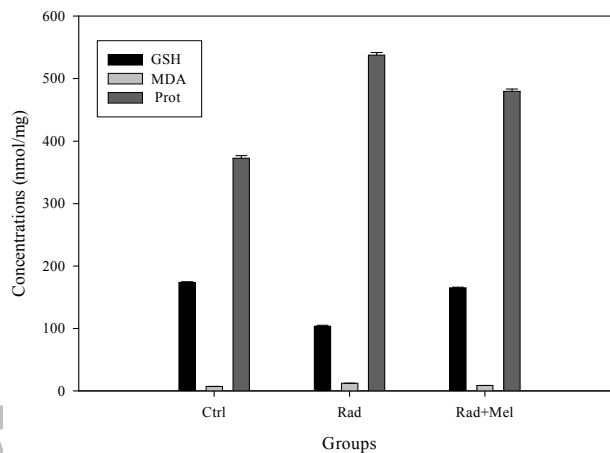
با تشکر از گروه فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران، بخصوص آقای دکتر قاضی خوانساری و با سپاس از زحمات خانم غزاله قبادی به خاطر کمک‌های بی دریغ شان.

و ارتباط بین عوامل آنتی اکسیدان و سیستم ایمنی سلول مشخص می‌باشد. در ارتباط مستقیمی بین توانایی آنتی اکسیدانی ملاتونین در نمونه‌های تابش دیده نشان داده شده است. بنابراین اضافه کردن ملاتونین به بافتهای تابش دیده می‌تواند برای کاهش آسیب‌های جدی بخصوص در مورد بیماری‌هایی که تحت درمان با رادیوتراپی هستند، مفید باشد. در مقایسه با رادیوتراپی به تنهایی، اضافه کردن ملاتونین به درمان با اشعه برای Glioblastoma غیر قابل تیمار، افزایش رت‌های زنده را با کاهش میزان سمیت حاصل از تابش نشان داد.

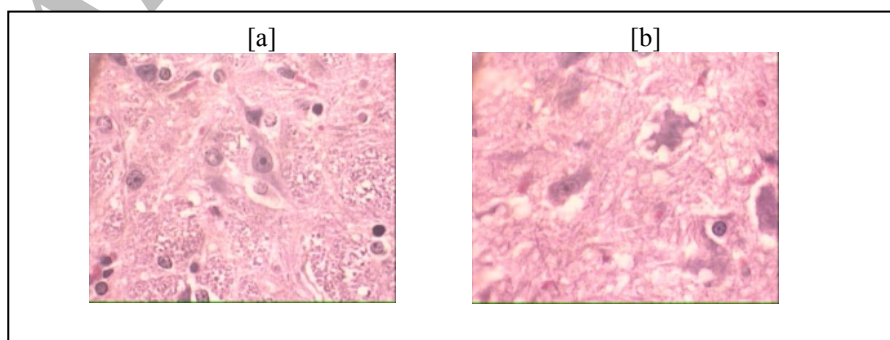
### نتیجه

با توجه به توانایی‌های آنتی اکسیدانی و قابلیت از بین بردن رادیکالهای آزاد که در ملاتونین وجود دارد، امکان

## Figures and Tables



شکل ۱ - مقایسه متوسط GSH, MDA و غلظت پروتئین بافتی بین گروه‌ها و گروه شاهد



شکل ۲ - بعضی از تغییرات ماده سفید نشان داده شده است (a) سلولهای عصبی نکروتیک کروماتولیسسیس، دمیلینه شدن و تغییرات عروقی در گروه تابش دیده نشان داده شده است (H&E, \*۱۰۰) (b) تغییرات در سلول عصبی و تعداد عروق در گروه تیمار با ملاتونین نشان داده شده است. (\*۱۰۰) (H&E,

جدول ۱ - کمیت‌های هیستوپاتولوژیک در تمام گروه‌ها

Groups	Histopathological values: mean±standard error (95% confidence interval)							Total effect
	Inflammation	Mononuclear infiltration	Congestion	Necrosis	Vesiculation	Demyelination	Thrombosis	
Control	0.33±0.21 (0.54)	0.33±0.21 (0.54)	0.00±0.00 (0.00)	0.00±0.00 (0.00)	0.00±0.00 (0.00)	0.00±0.00 (0.00)	0.00±0.00 (0.00)	0.66±.21
Radiation	2.50±0.22 (0.57)	2.67±0.21 (0.54)	1.67±0.21 (0.54)	2.17±0.17 (0.43)	1.34±0.21 (0.54)	3.00±0.00 (0.00)	0.83±0.17 (0.43)	13.35±.22
Melatonin	0.00±0.00 (0.00)	0.00±0.00 (0.00)	0.00±0.00 (0.00)	0.00±0.00 (0.00)	0.00±0.00 (0.00)	0.00±0.00 (0.00)	0.00±0.00 (0.00)	0.00±.00
Radiation + Melatonin	1.83±0.17 (0.43)	1.67±0.34 (0.85)	1.00±0.00 (0.00)	0.17±0.17 (0.43)	2.00±0.00 (0.00)	1.33±0.21 (0.54)	0.00±0.00 (0.00)	8.00±.34

جدول ۲ - نسبت هماهنگی بین تغییرات هیستوپاتولوژیک و آنزیمی بعد از تابش

Enzyme	Total pathologic effect	
	Correlation coefficients (R's)	P-values
GSH	-0.94	0.83
MDA	0.94	0.057
Protein	0.94	0.057

## References

1. Erol FS, Topsakal C, Ozveren MF, Kaplan M, Iihnan N, Zercan IH and Yildiz OG, 2004. Protective effect of melatonin and vitamin E in brain damage due to gamma radiation. *Neurosurg Rev.*, 27:65-69.
2. Vijayalaxmi, Reiter RJ, Herman TS and et al, 1998. Melatonin reduces gamma radiation-induced primary DNA damage in human blood lymphocytes. *Mutat. Res.*, 397: 203-208.
3. Vijiylaxmi, Reiter RJ, Meltz ML and Herman TS, 1998. Melatonin: possible mechanisms involved in its "radioprotective" effect. *Mutat. Res.*, 404:187-189.
4. Şener G, Jahoviv N, Tosun O, Atasoy BM, and Yegen BC, 2003. Melatonin ionizing radiation-induced oxidative organ damage in rats. *Life Sciences*, 74: 563-572.
5. Okatani Y, Wakatsuki A, Shinohara K, Kaneda Ch and Fukaya T, 2001. Melatonin stimulates glutathion peroxidase activity in human chorion. *J.Pineal Res.*, 30:199-205.
6. Vijayalaxmi, Meltz ML, Reiter RJ, Herman TS and Kumar SK, 1998. Melatonin and protection from whole-body irradiation: survival studies in mice. *Mutat. Res.*, 425:21-27.
7. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C and et al, 2000. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J. Biomed. Sci.* 29:444-458.
8. Hall EJ, 2000. *Radiobiology for the radiologist*. Lippincott Williams and Willkins Press, p: 136- 139.
9. Shirazi A, Mahdavi SR and Trott KR, 2004. Radiation myelopathy: a radiobiological review. *Rep. Pract. Oncol. Radiother.*, 9:119-27.
10. Shirazi A, Mahdavi SR, Minaee B and et al, 2005. Short term changes in prostacyclin secretory profile of radiation induced myelopathy in rat cervical spinal cord. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 72:373-378.
11. Liang BC, 1999. Radiation-associated neurotoxicity. *Hospital Physician*, April 54-58.
12. Leibel SA, Sheline GE, 1987. Radiation therapy for neoplasms of the brain. *J. Neurosurgery*, 66: 1-22.
13. Reiter RJ, 1980. The pineal gland and its hormone in the control of reproduction in mammals. *Endocrine Rev.*, 1: 109-131.
14. Stascia P, Ulanski P and Rosiak JM, 1998. Melatonin as a hydroxyl radical scavenger. *J. Pineal Research*, 25: 65-66.
15. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B and et al, 1993. Melatnin: A potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J.*, 1: 57-60.
16. Vijayalaxmi, Reiter RJ, Herman TS and et al, 1998. Melatonin reduces gamma radiation-induced primary DNA damage in human blood lymphocytes. *Mutat. Res.*, 397: 203-208.
17. Vijayalaxmi, Reiter RJ, Tan D-U and et al, 2004. Melatonin as a radioprotective agent: A review. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 59: 639-653.
18. Mehmet KOC, Seyithan T, Mehmet E and et al, 2003. Melatonin protects rat liver against irradiation induced oxidative damage. *Mutat. Res.*, 27: 65-69.
19. Conti A and Maestroni GJM, 1995. The clinical neuroimmunotherapeutic role of melatonin in oncology. *J. Pineal Res.*, 19: 103-110.