Archive of SID

مقاله تحقیقی

تغییرات مورفولوژیک غده اشکی و اپی‌تلیوم قرنیه چشم پس از تزریق ملاتونین در موش‌های سوری

فرشته مهرآیین .Ph.D*، فریدون نگهدار .M.Sc*

* بخش علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ دریافت: اسفند ماه ۸۹ تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۹۰

چکیده

هدف: تأثیر ملاتونین بر غده اشکی واپی‌تلیوم قرنیه چشم

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۲۰ موش سوری نر ۱۱ماهه با وزن ۲۳-۲۰ گرم به طور تصادفی به دو گروه مساوی کنترل و تجربی تقسیم شدند؛ به گروه تجربی ملاتونین به صورت تک دوز روزانه ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم حل شده در سالین به مدت چهارده روز به صورت داخل صفاقی تزریق شد و موش‌های کنترل فقط سالین دریافت کردند. پس از اتمام تزریق‌ها موش‌ها با اتر کشته و غده اشکی و چشم آن‌ها خارج شد و برای مطالعه با میکروسکوپ نوری آماده شد و اندازه‌گیری‌های مورفومتری برای تعیین ضخامت قرنیه صورت گرفت. سپس داده‌ها در نرم‌افزار SPSS و آزمون t تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: ضخامت اپی‌تلیوم قرنیه در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافته بود ($P<0.001$) و در لومن آسینی‌های غدد اشکی انکلوزیون‌های با اندازه مختلف مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: ملاتونین بر غده اشکی واپی‌تلیوم قرنیه چشم آثار متفاوتی داشت.

کلید واژه‌ها: ملاتونین، غده اشکی، قرنیه

مقدمه

ملاتونین هورمون غده اپی‌فیز در سال ۱۹۵۸ توسط لرنر (Lerner) و همکارانش کشف شد [۱] و یک سال بعد ساختار شیمیایی آن به‌عنوان Nاستیل ۵ متوکسی تریپتامین مشخص شد [۲]. این کشف باعث تحقیقات بعدی روی این هورمون شد و در چند دهه اخیر اطلاعات قابل توجهی در زمینه عملکرد این هورمون به‌دست آمده است. پیئنالوسیت‌های غده اپی فیز، اسیدآمینه Lتریپتوفان را از خون گرفته و آنرا به ۵هیدروکسی تریپتوفان تبدیل کرده و سپس این محصول دکربوکسیله شده و به سروتونین تبدیل می‌شود. در مرحله بعد سروتونین استیله شده و بعد از متیله شدن به ملاتونین تبدیل می‌شود [۳]. ملاتونین پس از تشکیل در غده ذخیره نشده و بلافاصله به خون آزاد می‌شود. ملاتونین در کبد هیدروکسیله و سپس با سولفات یا گلوکورونید کنژوگه شده و دفع می‌شود [۳].

ملاتونین به‌عنوان خنثی کننده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند. رادیکال‌های آزاد مولکول‌هایی با یک الکترون آزاد

آدرس مکاتبه: تهران، بزرگراه همت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، بخش علوم تشریح، صندوق پستی ۱٤٤۹٦۱٤٥۲٥

Email: femehra@yahoo.com

www.SID.ir

هستند و محصول فرایند فسفوریلاسیون اکسیداتیو واکسیداسیون اسیدهای چرب در سلول‌ها هستند [۳، ٤و٥]. ملاتونین به‌عنوان آنتی اکسیدانت عمل کرده و به بقای سلول کمک می‌کند [٦و٧].

مطالعات اندکی در مورد تأثیر ملاتونین بر چشم انجام گرفته و تأثیر آن بیشتر به‌عنوان آنتی اکسیدانت بیان شده است. ملاتونین از طریق رسپتورهای M1 و M2 بر سلول‌های چشم تأثیر می‌گذارد [۸] به‌طوری‌که فوجیدا (Fujieda) و همکارانش در سال ۲۰۰۰ رسپتورهای ملاتونین (M1) در شبکیه چشم خوکچه هندی را با روش‌های ایمونو سیتو شیمیایی شناسایی کردند و این رسپتورها را بر سلول‌های گانگلیونی و آماکرین شبکیه مطالعه نمودند و نتیجه گرفتند که ملاتونین از طریق رسپتورهای مذکور می‌تواند اثر مستقیم بر این سلول‌ها داشته باشد [۹]. همچنین ویچمن (Wiechmann) و همکاران در سال ۲۰۰۳ چشم زنوپوس را با روش‌های ایمونوسیتوشیمی و میکروسکوپ هم کانون بررسی کردند و وجود رسپتورهای M1c و M1a را درلایه فیبروزه چشم و قرنیه گزارش دادند و این بیانگر نقش ملاتونین درفیزیولوژی سلولی این بخش از چشم است [۱۰]. اپی‌تلیوم سطحی قرنیه یک اپی‌تلیوم منحصر به‌فرد بوده و سدی در برابر ورود عفونت‌ها به چشم ایجاد می‌کند، از سوی دیگر؛ شفافیت و هموستاز قرنیه را حفظ می‌نماید که موجب حفظ دید طبیعی می‌شود. تعادل روزانه بین بلوغ اپی‌تلیوم سطحی و ریزش سلول‌ها عامل مهمی در حفظ تمامیت این سد است. با ریزش سلول‌ها، سلول‌های عمقی‌تر اپی‌تلیوم تکثیر می‌شود و جایگزین سلول‌های از دست رفته می‌شوند [۱۰]. هدف از این بررسی درک تأثیر ملاتونین بر ضخامت قرنیه بوده است تا بتوان به‌عنوان دارویی برای درمان آسیب‌های اپی‌تلیوم قرنیه و سلول‌های از دست رفته آن استفاده کرد. همچنین بتوان به‌وسیله آن کند شدن تکثیر سلولی که در روند افزایش سن بروز می‌کند را جبران کرد. برخلاف آثار سودمند این هورمون، عوارض آن بر غده

Archive of SID

اشکی چشم نیز در این تحقیق مطالعه شده است.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۰ موش سفید سوری نر ۱۱ماهه با وزن ۲۳-۲۰ گرم که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بود، به مدت یک‌ماه در شرایط استاندارد و مطابق دستورالعمل مرکز تحقیقات علوم پزشکی تهران تغذیه و نگهداری شدند تا با شرایط حیوانخانه سازگار گردند. سپس حیوانات به طور تصادفی به دو گروه مساوی کنترل و تجربی تقسیم شدند. به گروه تجربی ملاتونین ساخت شرکت سیگمای آمریکا به طور روزانه و با تک دوز ۱۰mg/kg حل شده در سالین به مدت چهارده روز به صورت داخل صفاقی تزریق شد [۱۱و۱۲]. موش‌های گروه کنترل به‌جای ملاتونین دوز مشابهی از سالین دریافت کردند. بعد از آخرین تزریق تمام موش‌ها با اتر کشته شدند و غده اشکی و چشم آنها خارج و در فرمالین ۱۰درصد تثبیت شد و در الکل‌های ۵۰ تا ۱۰۰ آبگیری و با گزیلل شفاف‌سازی و در پارافین اینفیلتره و سپس در پارافین قالب‌گیری شد. پس از آن توسط میکروتوم برش‌های ۵ میکرونی از قالب‌ها تهیه و با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شد. در هر گروه ۲۰ مقطع به طور تصادفی انتخاب و اندازه‌گیری ضخامت قرنیه به‌وسیله image (DMLB) analyzer leica و نرم افزار Qwin leica و عدسی ٤٠x میکروسکوپ نوری انجام شد [۱۳]. سپس آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون t برای مقایسه تغییرات در دو گروه کنترل و تجربی انجام شد.

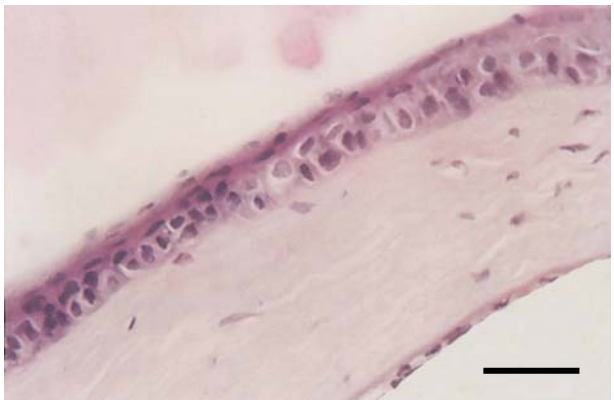
یافته‌ها

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود قرنیه گروه کنترل دارای اپی‌تلیوم مطبق سنگفرشی و استروما است که حاوی فیبروبلاست‌ها و رشته‌های کلاژن است. در شکل(۲) قرنیه در گروه تجربی شامل اپی‌تلیوم مطبق سنگفرشی است

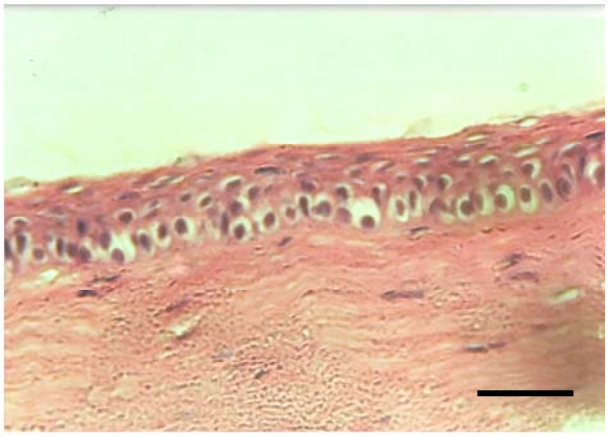
www.SID.ir

60 Archive of SID

که مطالعات کمّی در مورد ضخامت آن، افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل را نشان داد ($p<0.001$) (جدول۱).



شکل۱. فتومیکروگراف قرنیه در گروه کنترل که در آن اپی‌تلیوم مطبق سنگفرشی مشاهده می‌شود. رنگ‌آمیزی: هماتوکسیلین- ائوزین، بار: ۷۵میکرون



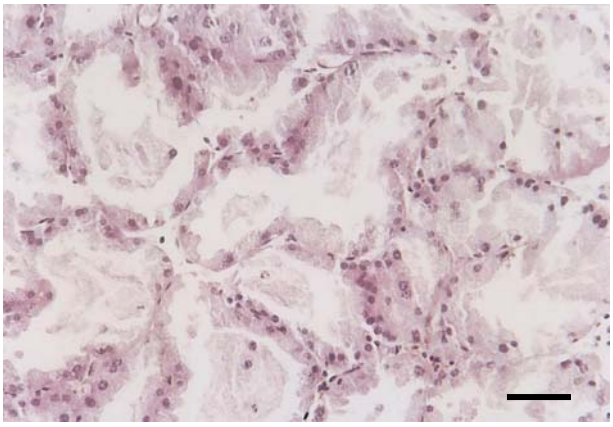
شکل۲. فتومیکروگراف قرنیه در گروه تجربی که در آن ضخامت اپی‌تلیوم مطبق سنگفرشی قابل مشاهده است. رنگ‌آمیزی: هماتوکسیلین-ائوزین، بار: ۷۵میکرون

جدول۱. میانگین و انحراف معیار ضخامت اپی‌تلیوم **قرنیه** در گروه‌های کنترل و تجربی

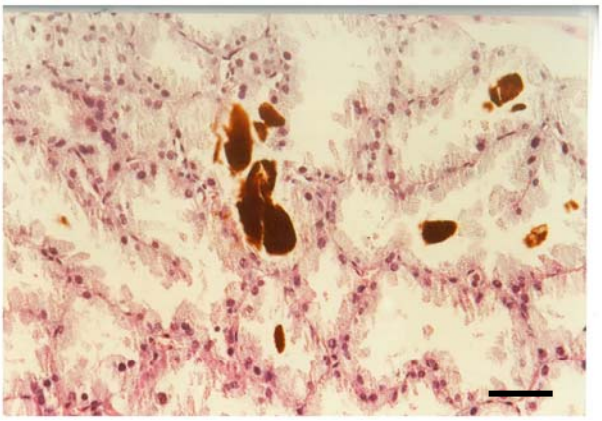
گروه‌ها	کنترل	تجربی
ضخامت اپی تلیوم قرنیه	۵/۲۲ ± ۴۱/۵ (µ)	۶/۰۵ ± ۴۵/۴۹ (µ)*

* :$p<0.001$ معنی دار در نظر گرفته شد

غده اشکی در گروه کنترل (شکل۳) دارای آسینوس‌هایی با اپی‌تلیوم مکعبی بود. در لومن آن‌ها مقداری از ترشحات و سلول‌های ریخته شده اپی‌تلیال مشاهده شد؛ در حالی‌که آسینوس‌های غده در گروه تجربی (شکل٤) دارای انکلوزیون‌هایی با اندازه‌های مختلف بود.



شکل۳. فتومیکروگراف غده اشکی در گروه کنترل، درون آسینوس‌ها مقداری ترشح و سلول‌های ریخته شده از اپی‌تلیوم دیده می‌شود، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، بار: ۵۰ میکرون



شکل٤. فتومیکروگراف غده اشکی در گروه تجربی، درون آسینوس‌ها انکلوزیون‌های با اندازه‌های مختلف وجود دارد. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، بار: ۵۰ میکرون

بحث

در این تحقیق اثر ملاتونین بر غده اشکی و اپی‌تلیوم قرنیه چشم موش‌های سوری مطالعه شده است. نتایج این تحقیق نشان داد که ضخامت اپی‌تلیوم در گروه تجربی به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته ($p<0.001$) که

www.SID.ir

Archive of SID

نشان‌دهنده اثر ملاتونین بر تکثیر سلول‌های اپی‌تلیوم قرنیه است که از طریق رسپتورهای موجود بر سلول‌های اپی‌تلیال انجام می‌شود و مطالعات هیستوشیمی بافت چشم در حیوانات مختلف مانند جوجه، موش و انسان مشخص کرده که قرنیه و صلبیه دارای رسپتورهای ملاتونین هستند [۱۴و۱۵]. رسپتورهایMT2 و MT1 در قرنیه و صلبیه شناخته شده است، بنابراین ملاتونین با اتصال به این رسپتورها بر رشد و تکامل بافت‌های چشم تأثیر می‌گذارد. این رسپتورها در زنوپوس با روش‌های ایمونوهیستوشیمی و میکروسکوپ هم کانون در اپی‌تلیوم قرنیه شناسایی شده‌اند. بیان رسپتورهای ملاتونین در قرنیه بیانگر نقش تنظیم کنندگی رشد آن است [۱۰]. زواید سلولی و فیبروبلاست‌های قرنیه هر دو رسپتور را بیان می‌کنند که اثر ملاتونین بر فیزیولوژی و فعالیت سلول‌های قرنیه را آشکار می‌سازد [۱۰]. مکان این رسپتورها در نواحی اتصالات محکم است که این بیانگر قدرت ملاتونین در اثرگذاری بر تشکیل یا تخریب اتصالات محکم است و با تغییر نور و بیان رسپتورهای ملاتونین تغییر می‌کند؛ به همین دلیل این فرضیه وجود دارد که ملاتونین با ریتم روزانه بر اپی‌تلیوم سطحی قرنیه اثر می‌گذارد [۱۶]. همگامی بین ریتم ملاتونین و ریتم فعالیت میتوزی قرنیه پیشنهاد کننده نقش ملاتونین بر رشد و ترمیم قرنیه است و بازسازی اپی‌تلیوم قرنیه و فعالیت میتوزی سلول‌های اپی‌تلیال قرنیه تحت تأثیر ریتم شبانه روزی است که در شب به حداکثر می‌رسد و در روز کاهش می‌یابد [۱۷و۱۸]. این تغییر ریتم شبانه روزی بر میزان ترمیم زخم‌های قرنیه و بر عملکرد داروهایی که برای اپی‌تلیوم قرنیه مورد استفاده قرار می‌گیرد، اثر می‌گذارد [۱۶]. به‌علاوه تزریق ملاتونین باعث پیشرفت تکثیر سلول‌های قرنیه می‌شود [۱۹]. رسپتورهای ملاتونین در نواحی مختلف پراکنده است [۲۰]. شواهد نشان می‌دهد که شبکیه دارای رسپتورهای ملاتونین است. تولید رادیکال‌های آزاد عاملی برای بروز بیماری‌های مختلف چشمی است. خاصیت آنتی اکسیدانتی ملاتونین در چشم توسط مطالعات زیادی تأیید شده است [۱۹]. افزایش اکسیداتیو استرس‌ها یکی از دلایل دژنره شدن ماکولاست که در آن فتورسپتورهای شبکیه دژنره می‌شوند [۲۱و۲۲].

اطلاعات درباره نقش عملکردی رسپتورهای ملاتونین در کنترل رشد و ترمیم چشم کم است. تغییر در رسپتورهای ملاتونین می‌تواند در ترمیم زخم‌های قرنیه دخالت کرده و بهبود آن‌ها را به تعویق بیندازد. این نتایج می‌تواند عاملی برای مطالعات بعدی باشد که نقش مولکولی ملاتونین را در ترمیم قرینه آشکار سازد. در کنار اثراتی که ملاتونین بر روند تکثیری اپی‌تلیوم قرینه می‌گذارد تشکیل انکلوزیون‌هایی با اندازه‌های مختلف درون آسینوس‌های غده اشکی قابل توجه بود که این اولین تحقیق درباره آثار ملاتونین بر غده اشکی است. ترشح اشک به‌وسیله غده اشکی تأمین می‌شود که سطح قرنیه را مرطوب می‌کند. هرگونه اختلال در عملکرد این غده می‌تواند باعث التهاب شود و در شرایط التهاب آزاد شدن سیتوکین‌ها می‌تواند باعث کاهش ترشح اشک شود که در نهایت آسیب قرنیه را به‌دنبال دارد [۹و۱۰و۲۳و۲۴]. بروز این انکلوزیون‌ها نشان‌دهنده تحریک‌پذیری سلول‌های آسینوس‌ها و وجود رسپتورهای ملاتونین در سلول‌های این غده است؛ به‌طوری‌که Fujieda مکانیسم تأثیر ملاتونین را به‌واسطه رسپتورهایM1 وM2 مرتبط با G پروتئن‌ها می‌داند [۹] و Rich تحریک کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ در سلول‌های اپی تلیال را مؤثر می‌داند [۲۵].

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که ملاتونین بر اپی‌تلیوم قرنیه و غده اشکی آثار متفاوتی دارد به طوری‌که در قرنیه چشم باعث افزایش ضخامت اپی‌تلیوم می‌شود و در غده اشکی موش‌ها تولید انکلوزیون‌های داخل آسینی‌ها را پیش می‌برد.

www.SID.ir

References

1. **lerner AB, Case JD, Takashi Y, Lee TH, Mori N**. Isolation of melatonin, pineal factor that lightens melanocytes. J Am Chem Soc1958; 80: 2587-9.
2. **lerner AB, Case JD, Heinzelman RU**. Structure of melatonin. J Am Chem Soc 1959; 81: 6084-5.
3. **Boutin JA, Audinot V, Ferry G, Delagrang P.** Molecular tools to study melatonin pathway and actions. Trends Pharmacol Sci 2005; 26(8) 412-9.
4. **Arendt J.** Melatonin and the mammalian pineal gland. London. Chapman & Hall, 1995.
5. **Reiter RJ**. Melatonin: clinical relevance. Best Pract Res Clin Endocrinol Metub 2003: 17: 273-85.
6. **Harman D.** Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol 1956; 11: 298-300.
7. **Harman D.** Free radical theory of aging. Mutat Res 1992; 266-275.
8. **Machiafava PL, Longoni B.** Melatonin as an antioxidant in retinal photoreceptor. J Pineal Res 1999; 26: 184-9.
9. **Fujieda H, Scher J, Hamadanizadeh SA.** Dopaminergic and GABAergic amacrine cells and direct targets of melatonin: immunocytochemical study of MT1 melatonin receptor in guinea pig retina. Vis Neurosci 2000; 17: 63-70.
10. **Wiechmann AF, Roda JA.** Melatonin receptor expression in the cornea and sclera. Exp Eye Res 2003; 77: 219-23.
11. **Chen ST, Chung JI, Hong MH , Li EI.** Melatonin attenuates MPP induced neurodegeneration and glutathione impairment in the nigrostriatal dopamine pathway. J Pineal Res 2002; 32: 262-9.
12. **Singh S, Ahmed R, Sagar RK, Kirshana B.** Neuroprotection of the nigrostriatal neurons by melatonin in hemiparkinsonium rat. Indian J Med Res 2006; 124(4): 419-26.
13. **Inuwa IM, Williams MA.** A morphometric study on the endometrium of rat uterus in hypothyroid and thyroxin treated hypothyroid rats. UPSALA J Med Sci 2006; 111(2): 215-26.
14. **Fujieda M, Hamasanizadeh SA, Wankiewiez E, Pang SF, Brown GM.** Expression of MT1 melatonin receptor in rat retina: evidence for multiple cell targets for melatonin. Neuroscience 1999;93:703-99.
15. **Dubocovich ML, Takahashi JS.** Use of 2[I 125] indomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. Proc Nat Acad Sci USA 1984; 84: 3916-20.
16. **Burns ER, scheving LE**. Isoproterenol induced phase shifts in circadian rhythm of mitosis in murine corneal epithelium. J Cell Biol 1973; 56: 605-8.
17. **Doughty MJ.** Morphometric analysis of the surface cells of rabbit corneal epithelium by scanning electron microscopy. Am J Anat 1990; 189: 316-28.
18. **Gange AM, Danilenko KV, RosolemSG, Hebert M.** Impact of oral melatonin on the electroretinogram cone response. J circadian Rhytms 2009; 7: 14: 1-7.
19. **landmark PO, Pandi- perumal SR, Srinivasan V, Cardinali DP.** Role of melatonin in the eye and ocular dysfunctions.Vis Neurosci 2006; 23(6): 853-62.
20. **Danielczyk K, Dziegiel P.** The expression of MT1 melatonin receptor and Ki-67 antigen in melanoma malignum. Anticancer Res 2009; 29: 3887-95.
21. **Cai J, Nelson KC, Wu M Sternberg P Jr, Jones DP.** Oxidative damage and protection of the RPE. Prog Retin Eye Res 2000; 19: 205-21.
22. **Changxian YI, Xiaoyan P, Hong Y, Mengxiang G, Pierpaoli W.** Effects of melatonin in age related macular degeneration. Ann NY Acad Sci 2005; 1057: 384-92.
23. **Stem ME, Gao J, Schwalb TA,Ngo M, Tieu DD, Chan CC, et al**. Conjunctival T cell subpopulations in Sjogren's and non Sjogren's patients with dry eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 2002; 43: 2609-14.
24. **Tsubota K, Fujita H, Tsuzaka K ,Takeuchi T.** Quantitative analysis of lacrimal gland function, apoptotic figures, fas and fas ligand expression of lacrimal gland in dry eye patients. Exp Eye Res 2003; 76: 233-40.
25. **Rich A, Farrugia G, Rae JL.** Effects of melatonin on ionic currents in cultured ocular tissues. Am J Physiol Cell Physiol 1999; 276: 923-9.

www.SID.ir