مجله دانشکده پزشکی اصفهان **مقاله پژوهشی**
سال بیست و نهم/شماره ۱۳۲/هفته چهارم اردیبهشت ماه ۱۳۹۰
تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۱۹ **تاریخ پذیرش:** ۹۰/۱/۲۸

نقش آپوپتوزیس در جدا شدن شیار پلک نوزاد رت با روش هماتوکسیلین- ائوزین

دکتر بهمن رشیدی[۱]، دکتر جعفر سلیمانی راد[۲]

خلاصه

مقدمه: آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول فرایندی است که طی آن سلول‌های ناخواسته به دنبال فعالیت هماهنگ و برنامه‌ریزی شده‌ی مجموعه‌ی دقیقی از ژن‌ها از بین می‌روند. آپوپتوز در تکامل رویان، پاتوژنز سرطان و پاسخ‌های ایمنی هومورال نیز مورد توجه است. با توجه به نقش آپوپتوز در تکامل جنین در این مطالعه نقش آن در جدا شدن پلک‌های رت نوزاد مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول فرایندی است که طی آن سلول‌های ناخواسته به دنبال فعالیت هماهنگ و برنامه‌ریزی شده‌ی مجموعه‌ی دقیقی از ژن‌ها از بین می‌روند. آپوپتوز در تکامل رویان، پاتوژنز سرطان و پاسخ‌های ایمنی هومورال نیز مورد توجه است. با توجه به نقش آپوپتوز در تکامل جنین در این مطالعه نقش آن در جدا شدن پلک‌های رت نوزاد مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بررسی میکروسکوپیک محل باز شدن پلک‌ها نشان داد که پیدایش شیار پلکی به صورت فرورفتگی از سطح خارجی و داخلی شروع و پس از به هم رسیدن این فرورفتگی‌ها، پلک‌ها از هم جدا می‌گردند. تغییراتی که ضمن پیشرفت فرورفتگی‌ها ملاحظه می‌گردند عبارتند از ظهور سلول‌های وزیکوله با مشخصات مورفولوژیک سلول‌های آپوپتوتیک شامل پیکنوز هسته، چروکیدگی سلول، ائوزینوفیلی سیتوپلاسم و پیدایش حلقه‌ی روشن و خالی در اطراف سلول‌ها. این سلول‌ها به تعداد فراوان و به صورت گروهی از روز ششم تا دوازدهم در عمل پیدایش شیار و از روز دوازدهم به بعد به صورت پراکنده در بین سلول‌های خاردار طبقه‌ی اپی‌درم پلک‌های در حال تشکیل مشاهده شدند. تغییر دیگری که ضمن پیدایش شیار پلکی ملاحظه می‌گردد، گسترش اپی‌درم شاخی سطح خارجی و سنگفرشی مطبق غیرشاخی سطح داخلی پلک در محل فرورفتگی‌ها است که با پیدایش لایه‌های مختلف اپی‌درم شامل طبقات بازال، خاردار، گرانولر و شاخی همراه می‌باشد.

نتیجه‌گیری: نقش آپوپتوز در پدیده‌ی تکامل چه قبل از Implantation و چه بعد از آن و نیز در تنظیم جمعیت سلولی ارگان‌های افراد بالغ مشخص شده است. مشاهده‌ی سلول‌هایی با مشخصات مورفولوژیک سلول‌های آپوپتوتیک در محل جدا شدن پلک چشم نوزادان رت بیان‌گر نقش آپوپتوز در پیدایش شیار پلک چشم نوزادان رت می‌باشد. با توجه به سهولت دستیابی به سلول‌های آپوپتوتیک در محل پیدایش شیار پلکی، محل جدا شدن پلک چشم رت می‌تواند به عنوان مدل بسیار مناسبی برای بررسی مهار کننده‌ها و القاء کننده‌های آپوپتوز مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: پلک چشم، آپوپتوز، سلول‌های آپوپتوتیک، پیگنوز.

مقدمه

آپوپتوز، اولین بار در سال۱۹۷۳میلادی شناخته شد و به خاطر نمای مورفولوژیک خاص خود آپوپتوز نام گرفت که در زبان یونانی به معنای ریختن و افتادن است (۲-۱). آپوپتوز شکل مشخصی از مرگ سلولی است که طی نمو اغلب بافت‌ها، تعداد سلول‌ها را کنترل می‌کند و هم‌چنین در انواع گسترده‌ای از شرایط پاتولوژیک و فیزیولوژیک بروز می‌نماید (۳). برای آپوپتوز، اصطلاحات دیگری مانند مرگ سلولی کنترل شده، مرگ سلولی فیزیولوژیک، مرگ سلولی بیولوژیک و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده به کار می‌رود.

طی آپوپتوز سلول‌های ناخواسته به دنبال یک سلسله وقایع و فعالیت‌های هماهنگ و برنامه‌ریزی

[۱] استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۲] استاد، گروه علوم تشریحی و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر بهمن رشیدی
Email: b_rashidi@med.mui.ac.ir

www.mui.ac.ir

شده، که توسط مجموعه‌ی دقیقی از ژن‌ها کنترل می‌شوند، از بین می‌روند. آپوپتوز در فرایندهایی چون تکامل، مکانیزم هوموستاتیک برای حفظ جمعیت سلولی در بافت‌ها، ساز و کاری دفاعی در واکنش‌های ایمنی، پیری و بسیاری از موارد دیگر کاربرد دارد. آپوپتوز مسؤول بسیاری از وقایع فیزیولوژیک تطابقی و پاتولوژیک از قبیل تخریب برنامه‌ریزی شده‌ی سلول‌ها در هنگام تکامل رویان (Embryogenesis)، جایگزینی تخم (Implantation)، تکامل اعضا (Organogenesis)، تحلیل تکاملی (Development Involation)، متامورفوز (Metamorphosis) و کاهش حجم ارگان‌ها پس از اتمام فعالیت، عمل می‌نماید. به طور مثال نمونه‌هایی از بروز آپوپتوز در پستانداران طی دوره‌ی تکاملی و تطبیق ارگان‌ها با شرایط جدید شامل: از بین بردن سلول‌های غیرطبیعی در مرحله‌ی مورولا و بلاستوسیست (۴)، تکامل گوش داخلی (از قبیل چین خوردن ناحیه‌ی بین یوتریکول و مجرای اندولنفاتیک، چین خوردن ناحیه‌ی وستیبولار و تشکیل مجاری نیم‌دایره، عصب‌دهی مجرای حلزونی و اپی‌تلیوم وستیبولار) (۵)، کاهش تعداد سلول‌های ژرمینال در مرد و زن (۶)، تکامل استخوان‌های کالواریا و سوچورهای بین استخوان‌ها فونتانل‌ها و منتژ (۷) است. برخی محرک‌های آسیب‌رسان به سلول که در مقادیر معمول قادر به ایجاد نکروز و مرگ سلولی هستند (حرارت و پرتوتابی، داروهای ضد سرطان سیتوتوکسیک و هیپوکسی) در مقادیر اندک باشند باعث آپوپتوز می‌شوند (۱).

در بررسی بافت‌شناسی بافت‌هایی که با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ شده‌اند، نشان داده شده که آپوپتوز سلول‌ها را به طور انفرادی یا در دستجات کوچک درگیر می‌کند (۱). سلول‌های آپوپتوتیک به صورت توده‌های گرد یا بیضی، متشکل از سیتوپلاسم ائوزینوفیلیک متراکم به همراه قطعات کروماتین فشرده، دیده می‌شوند. از آن جا که چروکیدگی سلول و ایجاد اجسام آپوپتوتیک بسیار سریع روی می‌دهد و قطعات مزبور به سرعت فاگوسیته و تخریب شده و یا به داخل مجرا می‌ریزند، قبل از این که تغییرات بافت در برش بافتی قابل مشاهده گردد، ممکن است آپوپتوز قابل ملاحظه‌ای در بافت رخ داده باشد. علاوه بر این، آپوپتوز برخلاف نکروز، باعث برانگیختن آماس نمی‌شود، بنابراین یافتن آن مشکل‌تر است (۱).

ساده‌ترین و دقیق‌ترین روش برای بررسی آپوپتوز در سلول‌های استخوانی و در محیط‌های کشت استفاده از میکروسک.پ الکترونی (Light microscope یا LM) است. از معایب این روش آن است که چون "مورفولوژی" اساس و معیار تشخیص آپوپتوز است بنابراین افراد باید تحت آموزش وسیعی قرار گیرند. در عوض روشی بسیار ارزان است، چون با رنگ‌آمیزی روتین و استاندارد هماتوکسیلین و ائوزین (Hematoxylin and eosin یا H & E) انجام می‌شود و در آن نیازی به استفاده از آنتی‌بادی‌ها و نوکلئوتیدهای نشان‌دار و معرف‌های گران قیمت نیست (۸). در ضمن از رنگ Thionin blue (۹)، PAS و آلسین‌بلو نیز می‌توان استفاده کرد.

در بررسی بافت‌شناسی بافت‌هایی که با H & E رنگ‌آمیزی شده‌اند، آپوپتوز سلول‌ها را به طور انفرادی یا دستجات کوچک درگیر می‌کند. مورفولوژی سلول‌های آپوپتوزی در LM به صورت چروکیدگی

www.mui.ac.ir

سلول و سیتوپلاسم و هسته‌ای فشرده و رنگ‌پذیری زیاد نسبت به سلول‌های زنده‌ی اطراف خود مشخص می‌گردد. به این دلیل که سلول‌های آپوپتوزی اتصال خود را با سلول‌های مجاور از دست می‌دهند، در پیرامون آن‌ها فضایی روشن بوجود می‌آید که آن‌ها را بیشتر مشخص می‌نماید (۸).

گاهی ممکن است سلول‌های در حال میتوز با سلول‌های آپوپتوزی اشتباه گردند که با توجه به نمای دوکی شکل و اندازه بزرگ‌تر در سلول در حال میتوز می‌توان آن‌ها را از هم‌دیگر تفکیک کرد. در ضمن سلول‌های در حال آپوپتوز دارای حاشیه‌ای تیز و خاردار هستند (۱۰).

ولی در مجموع به سه دلیل مشاهده سلول‌های آپوپتوزی مشکل است: الف- هر مقطع از هسته‌ی یک سلول زنده اغلب ۵ تا ۱۰ میکرون قطر دارد و به راحتی قابل دید است اما در سلول‌های آپوپتوزی به دلیل چروکیدگی و متراکم شدن، اندازه‌ی فوق کاهش یافته بنابراین مشاهده‌ی آن مشکل است (۸)، ب- در آماده‌سازی مقطع احتمال عبور برش از سلول‌های آپوپتوزی بسیار کمتر از سلول‌های زنده است (۸) و ج- اجسام آپوپتوزی که از شکسته شدن هسته در مراحل آخر آپوپتوز به دست می‌آیند، قطر کمی در حدود ۲ تا ۳ میکرون دارند و چون اکثر آن‌ها دارای سیتوپلاسم متراکم هستند و مارکرهای سیتوپلاسمی واضحی ندارند غیرقابل مشاهده می‌باشند. به علاوه اجسام آپوپتوتیک خیلی سریع توسط سلول‌های اطراف خود فاگوسیته می‌شوند (۸). با توجه به مطالب گفته شده، یکی از فرایندهایی که طی مراحل تکاملی جنینی با از بین رفتن سلول‌های تشکیل شده باعث مورفوژنز می‌شود فرایند آپوپتوز می‌باشد. چگونگی شروع آپوپتوز به طور دقیق مشخص نشده است و تحقیقات پایه‌ای در این زمینه ادامه دارد. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی احتمال دخالت آپوپتوز در باز شدن پلک چشم رت نوزاد با روش روتین، ساده و کم هزینه ولی استاندارد H & E بود. با توجه به این که پلک بسته شده چشم رت در مرحله‌ی پس از تولد و در حدود روز شانزدهم پس از تولد پاره شده و باعث باز شدن چشم می‌گردد، در صورتی که نشان داده شود آپوپتوز در جدا شدن پلک‌های چشم نوزاد نقش دارد جدا شدن پلک رت نوزاد می‌تواند به عنوان مدلی بسیار مناسب برای بررسی مهار کننده‌ها و القاء کننده‌های آپوپتوز مورد استفاده قرار گیرد.

روش‌ها

برای انجام این تحقیق، تعداد ۱۲ رت ماده و ۶ رت نر از نژاد استرالیایی Wistar، تا سنین ۴ ماهگی در محل آزمایشگاه بافت شناسی و رویان شناسی دانشکده‌ی پزشکی نگهداری شدند. رت‌های استرالیایی در قفس‌هایی با سقف مشبک فلزی به صورت دسته جمعی یا جفت نگه داشته شدند و از خاک اره برای بستر آن‌ها استفاده شد. علاوه بر این، در دوران بارداری و شیردهی در هر قفس مقداری پنبه هم قرار داده شد که رت‌های ماده از آن به همراه خاک اره برای ساخت آشیانه‌ای برای زایمان و پرورش نوزادان استفاده کردند. قسمتی از سقف هر قفس به وسیله صفحات چوبی با مقوا پوشانده شد، زیرا تجربه نشان داده است که رت‌ها به ویژه در مواقع بارداری و شیردهی ترجیح می‌دهند در دید مستقیم نباشند. موش‌های بالغ به طور متوسط روزانه احتیاج به ۱۵ کالری انرژی دارند. بنابراین، روزانه یک بار صبح‌ها به

www.mui.ac.ir

آن‌ها غذا داده شد. رژیم غذایی آن‌ها از غذای فشرده و آماده شده‌ی کارخانه خوراک دام پارس بود. غذا در فرورفتگی تعبیه شده برای همین منظور در سقف مشبک قفس‌ها ریخته شد. از ظروف شیشه‌ای نیز به عنوان ظرف آب استفاده شد تا رت‌ها با مکیدن، آب مورد نیاز خود را تأمین کنند.

قفس‌ها به طور هفتگی مورد نظافت و شستشو قرار می‌گرفتند و سپس خاک اره و پنبه لازم برای بستر رت‌ها تجدید می‌گردید. برای شستشوی قفس‌ها از آب فراوان و پودر لباسشویی استفاده می‌گردید. برای پرورش صحیح حیوان بایستی به دو عامل فیزیولوژیک و روانی توجه نمود. لذا بایستی سعی کرد کلیه‌ی شرایط طبیعی و رفاه حیوان از نظر تغذیه، جایگاه و شرایط طبیعی برآورده شود. موش‌ها به خصوص نوزادان آن‌ها به دلیل کوچکی و وسعت زیاد سطح بدن نسبت به جثه به حرارت و گرمی زیادی احتیاج دارند. با توجه به این شرایط طبیعی است که موش‌های صحرایی احتیاج به غذای بیشتری داشته و مدام در حال خوردن و جویدن باشند.

سپس رت‌ها جهت جفت‌گیری ۲ ماده و ۱ نر کنار هم قرار داده شدند و پس از یک شبانه روز و اثبات جفت‌گیری از طریق تهیه اسمیر واژینال، رت‌های نر از ماده‌ها جدا شدند. با توجه به اینکه هدف آزمایش حاضر بررسی نقش آپوپتوز در روند طبیعی باز شدن پلک‌ها بود و نیازی به تقسیم‌بندی گروه شاهد و آزمایش نبود تمام نمونه‌ها در شرایط یکسان پرورش یافتند. دوره‌ی حاملگی بعد از اثبات جفت‌گیری ۲۱ روز طول کشید و از هر رت حامله به طور متوسط ۷ تا ۸ نوزاد متولد گردید و شرایط نگهداری آن‌ها به صورت فوق الذکر انجام شد.

از روز ششم تا شانزدهم هر روز ۵ نوزاد به صورت اتفاقی برای نمونه‌برداری انتخاب شدند و نمونه‌برداری از هر دو پلک به همراه کره‌ی چشم انجام گردید. نمونه‌برداری بدین صورت انجام گرفت که ابتدا نوزادان توسط سرما (در فریزر یخچال) بیهوش شدند. چون احتمال می‌رفت که مواد بیهوش‌کننده با روش‌های دیگر بر روی مورفولوژی سلولی اثر بگذارد از سرما برای بیهوش کردن نوزادان رت استفاده گردید. سپس با استفاده از اسکارپل از ناحیه‌ی شیار پلک همراه با محتویات کره چشم با دقت زیاد نمونه‌برداری گردید و سپس نمونه‌ها در داخل سبدهای فلزی کوچک قرار داده شدند و پس از شماره‌گذاری و درج سن نوزادان برای فیکساسیون از محلول فرمل نمکی ۱۰ درصد استفاده شد. نمونه‌ها پس از ثابت‌سازی در فرمالین ۱۰ درصد بافر شده و مراحل پاساژ بافتی با الکل‌های صعودی و شفاف‌سازی در گزیلل انجام شدو در نهایت در پارافین قالب‌گیری شدند. نمونه‌ها براساس روش روتین H&E رنگ‌آمیزی شدند. تصاویر تهیه شده از میان ۵۵۰ اسلاید بافتی تهیه شده، انتخاب شدند و برای عکس گرفتن از LM مدل Olympus BH-2 و فیلم فوجی ASO 100 استفاده گردید.

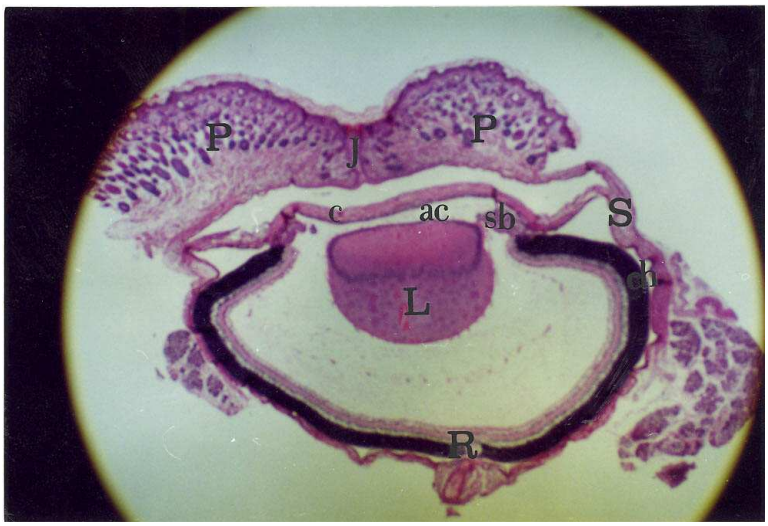
یافته‌ها

نتایج به دست آمده حاکی از آغاز پیدایش شیار پلک به صورت دو فرورفتگی از سطح خارجی و سطح ملتحمه‌ای پلک به هم پیوسته بود. فرورفتگی‌ها بهم نزدیک می‌شدند و در نهایت با پیشرفت سریع‌تر

www.mui.ac.ir

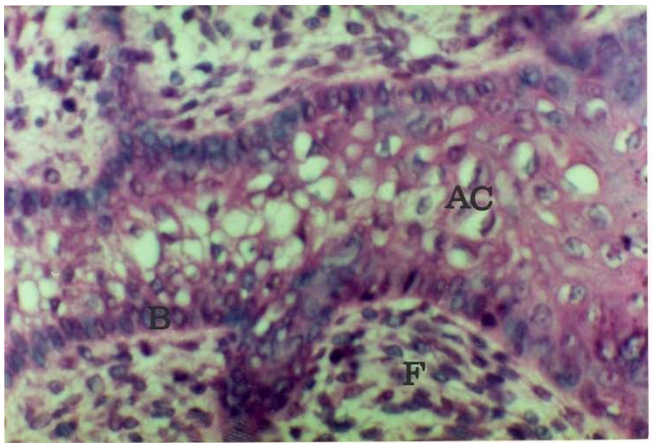
فرورفتگی سطح خارجی در مجاورت سطح ملتحمه‌ای پلک‌ها از هم جدا می‌شد. ضمن عمیق‌تر شدن فرورفتگی و تشکیل شیار، سلول‌ها در محل جدا شدگی مشخصات سلول‌های اپی‌درمی را به خود گرفتند؛ به طوری که لبه‌ی پلک‌های در حال تشکیل همه‌ی لایه‌های اپی‌درمی را دارا بودند. ضمن تغییرات فوق، سلول‌های موجود در قسمت جدا نشده از نوع سلول‌های وزیکولر با مشخصات سلول‌های آپوپتوتیک بود که از روز دوازدهم به بعد این نوع سلول‌ها به طور پراکنده فقط در بین سلول‌های طبقه‌ی خاردار اپی‌درم در حال تشکیل ملاحظه شد.

شکل شماره‌ی ۱ نمایی از مقطع چشم نوزاد رت شش روزه را نشان می‌دهد. پلک‌ها در این مرحله بهم پیوسته هستند و محل شیاری که پلک‌ها را از هم جدا می‌کند به خوبی مشخص است. در شکل شماره‌ی ۲ محل جدا شدن پلک‌ها (روز ششم) و قسمت باریکی از محور پلک‌ها در طرفین آن نشان داده شده است. سلول‌های زمینه در طرفین محل جدا شدن پلک‌ها حاوی فیبروبلاست‌ها با سیتوپلاسم و هسته‌ای روشن هستند. در نوار محل جداشدگی، سلول‌های بازال در طرفین نوار به صورت ردیف منظم و از نوع سلول‌های استوانه‌ای دارای هسته‌های میله‌ای کوتاه دیده می‌شوند. در محور محل جدا شدن پلک‌ها هسته‌ی سلول‌ها به صورت متراکم و به تعداد زیاد و فضایی روشن در اطراف و سیتوپلاسم متراکم و اسیدوفیل می‌باشد با درشت‌نمایی بالا (شکل شماره‌ی ۳)، سلول‌های محور محل جداشدگی همه‌ی خصوصیات سلول‌های آپوپتوتیک را نشان می‌دهند (روز ششم). بدین معنی که هسته‌ی سلول‌ها متراکم و در بعضی موارد دندانه‌دار دیده می‌شوند و فضای روشنی در زیر هسته مشاهده می‌شود که در برخی موارد هلالی شکل می‌باشد. فشردگی و اسیدوفیل بودن سیتوپلاسم به خوبی قابل تشخیص می‌باشد. شکل شماره‌ی ۴ نمایی از مقطع پلک چشم نوزاد رت نه روزه را نشان می‌دهد. پیوستگی پلک‌ها و محل جدا شدن آن‌ها به صورت نواری مشخص دیده می‌شود. در این تصویر فقط پلک‌ها دیده می‌شوند. سطح خارجی پلک‌ها اپی‌تلیوم.

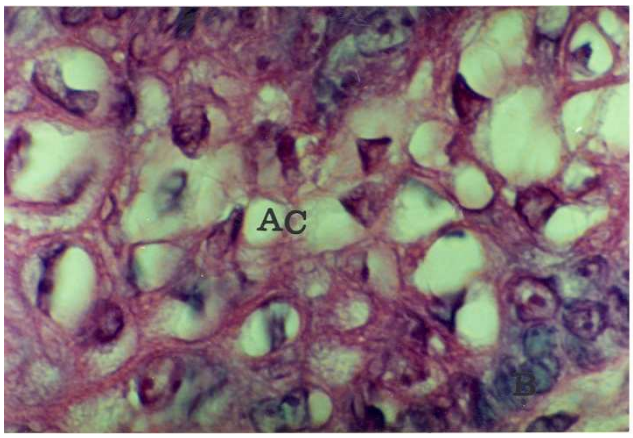


شکل ۱. مقطعی از کره‌ی چشم نوزاد رت شش روزه (رنگ‌آمیزی H & E درشت‌نمایی ۳۳ برابر)
(P): پلک به هم پیوسته، (J): محل جدا شدن پلک‌ها، (C): قرنیه
(SB): جسم مژگانی، (AC): اطاقک قدامی، (L): عدسی
(R): شبکیه، (ch): کوروئید، (S): صلبیه

www.mui.ac.ir



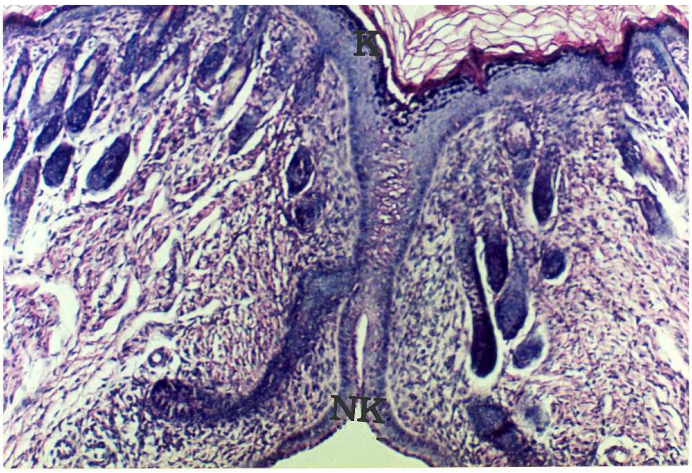
شکل ۲. تصویری از مقطع اتصال در شکل ۱ با درشت‌نمایی بزرگ‌تر که محل جدا شدن پلک‌ها را نشان می‌دهد (رنگ‌آمیزی H & E، درشت‌نمایی ۶۶۰ برابر)
(B): سلول‌های لایه‌ی بازال
(AC = Apoptotic cell): سلول‌های آپوپتوتیک در محل جدا شدن پلک که دارای هسته‌های فشرده و متراکم به همراه حفرات روشن در اطراف هسته‌ها و سیتوپلاسم متراکم و ائوزینوفیل می‌باشند.
(F): زمینه‌ی اطراف در طرفین نوار محل‌جدا شدن، که دارای سلول‌های فیبروبلاست می‌باشد.



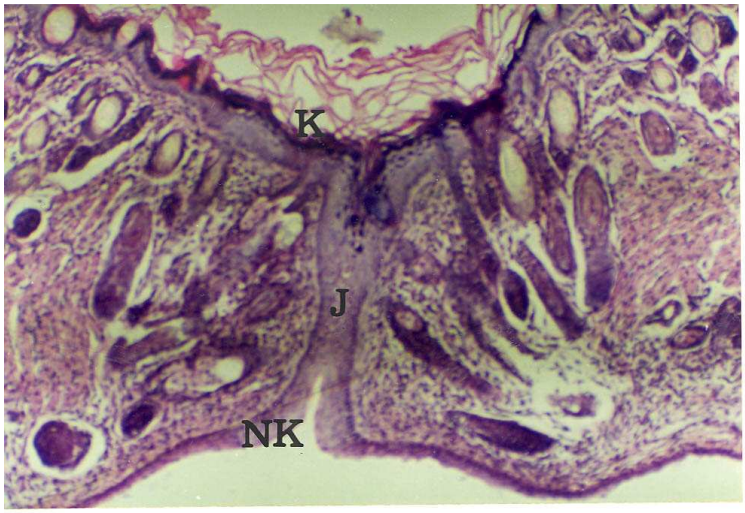
شکل ۳. درشت‌نمایی بزرگ‌تر از شکل شماره‌ی ۲ که سلول‌های محل جدا شدن پلک‌ها را نشان می‌دهد. سلول‌های آپوپتوتیک (AC) که دارای هسته‌ی پیکنوز شده و فشرده به همراه فضای روشن در اطراف هسته می‌باشند و گاهی هسته‌ی سلول‌ها به صورت دندانه‌دار دیده می‌شوند. سیتوپلاسم سلول‌های آپوپتوتیک فشرده و ائوزینوفیل دیده می‌شود. هتروکروماتین در بعضی از سلول‌های آپوپتوتیک در زیر غشای هسته به صورت هلالی شکل دیده می‌شود. (B): سلول‌های لایه بازال. (رنگ‌آمیزی H & E، درشت‌نمایی ۱۶۵۰ برابر)

سنگفرشی مطبق شاخی شده و سطح داخلی آن‌ها سنگفرشی مطبق غیرشاخی می‌باشد. در طرفین محل جدا شدن پلک‌ها سلول‌های طبقه بازال به صورت خط تیره دیده می‌شوند. فرورفتگی سطح داخلی و خارجی پلک‌ها نسبت به روزهای قبل عمیق‌تر شده است. نوار محل جدا شدن پلک‌ها حاوی سلول‌های روشن و وزیکول مانند می‌باشد. شکل شماره‌ی ۵ نمایی از مقطع پلک چشم نوزاد رت دوازده روزه را نشان می‌دهد. پلک‌ها به هم چسبیده هستند. در سطح خارجی پلک‌ها لایه شاخی اپی‌تلیوم سنگفرشی مطبق شاخی شده به صورت لایه‌های شبکه مانند دیده می‌شود. سطح داخلی پلک‌ها لایه‌ی شاخی از نوع اپی‌تلیوم سنگفرشی مطبق غیرشاخی می‌باشد. شیار محل جدا شدن هم از سطح داخلی و هم از سطح خارجی عمیق‌تر شده است. نفوذ سلول‌های

www.mui.ac.ir



شکل ۴. مقطعی‌از پلک چشم نوزاد رت نه روزه در محل جدا شدن پلک‌ها. به اپی‌تلیوم سنگفرشی مطبق شاخی شده در سطح خارجی پلک (K) و غیرشاخی در سطح داخلی آن (NK) توجه نمایید. محل‌جداشدن پلک به صورت نواری مشخص و حاوی سلول‌های دارای حفرات روشن در بین دو پلک قابل مشاهده است (رنگ‌آمیزی H & E، درشت‌نمایی ۱۶۵ برابر).

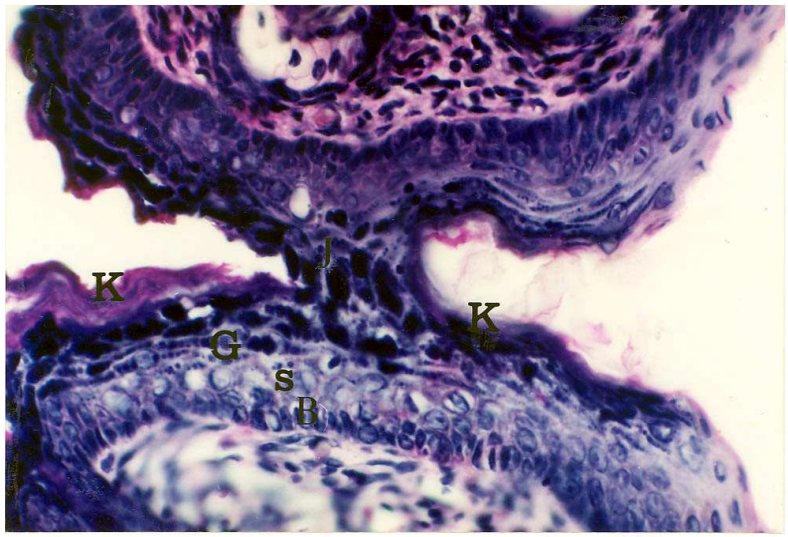


شکل ۵. مقطعی از پلک چشم نوزاد رت دوازده روزه در محل جدا شدن پلک‌ها. به اپی‌تلیوم سنگفرشی مطبق شاخی شده در سطح خارجی پلک (K) و غیرشاخی در سطح داخلی آن (NK) توجه نمایید. محل جدا شدن پلک به صورت نواری مشخص و حاوی سلول‌های دارای حفرات روشن در بین دو پلک قابل مشاهده است (J) (رنگ‌آمیزی H&E ، درشت‌نمایی ۱۶۵ برابر).

گرانولوزا در سطح خارجی به لایه‌های پایین‌تر در محل جدا شدن مشهود است. سلول‌های وزیکول مانند در میان دو خط تیره که سلول‌های لایه بازال می‌باشند مشاهده می‌شوند در شکل شماره‌ی ۶ با درشت‌نمایی بالا، محل جدا شدن پلک‌ها به همراه قسمتی از زمینه‌ی پلک‌ها در طرفین آن مشاهده می‌شود (روز سیزدهم). فیبروبلاست‌های زمینه‌ای اطراف دارای سیتوپلاسم و هسته روشن می‌باشند. در محل جدا شدن پلک‌ها اپی‌تلیوم پلک‌ها به طور کامل تشکیل شده است و لایه‌های اپی‌درمی به خوبی مشخص می‌باشند. در اپی‌تلیوم پلک‌های در حال تشکیل سلول‌های وزیکول مانند به طور پراکنده قابل مشاهده هستند. سلول‌ها در محل نوار چسبندگی دیگر وزیکول مانند دیده نمی‌شوند و بیشتر از نوع

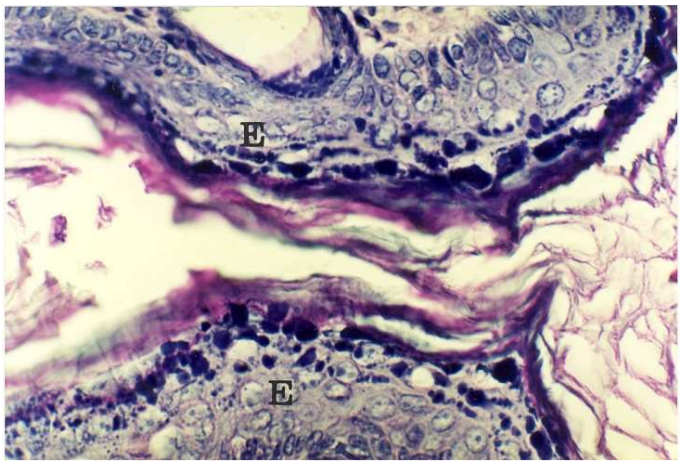
www.mui.ac.ir

سلول‌های گرانولوزایی هستند که بیانگر تکامل این ناحیه به سمت اپی‌تلیوم سنگفرشی مطبق شاخی می‌باشند. سلول‌های اپی‌تلیوم سطح داخلی و خارجی پلک‌ها از لایه‌ی بازال به سطح در حال بلوغ هستند و تمام لایه‌های اپی‌تلیوم شاخی شامل لایه‌ی بازال، لایه‌ی خاردار، لایه‌ی دانه‌دار، لایه‌ی شفاف و لایه‌ی شاخی به خوبی قابل تشخیص می‌باشند. قابل ذکر است که اپی‌تلیوم سطح خارجی پلک‌ها از نظر تکاملی نسبت به اپی‌تلیوم داخلی پلک‌ها متکامل‌تر مشاهده می‌شود . شکل شماره‌ی ۷ با درشت‌نمایی بالا، لبه‌ی پلک‌ها را در محل جدا شدن دو پلک نشان می‌دهد (روز پانزدهم). زمینه‌ی اطراف به علت تکامل اپی‌تلیوم در دو طرف محل جدا شدن و ضخامت قابل ملاحظه‌ی آن قابل مشاهده با این درشت‌نمایی نیست. سلول‌های گرانولر به صورت دو لایه‌ی تیره رنگ در دو طرف محل جدا شدن دیده می‌شوند و بقیه‌ی لایه‌های اپی‌درم به صورت منظم در طرف محل جدا شدن از عمق به سطح قابل مشاهده می‌باشند. هیچ‌گونه سلولی در محل جدا شدن دیده نمی‌شود فقط لایه‌های کراتینی هستند که چسبندگی مختصر محل جدا شدن را حفظ کرده‌اند. شکل ۸ با درشت‌نمایی بالا، قسمتی از پلک‌های جدا شده نشان داده شده است(روز شانزدهم). پلک‌ها کاملاً از یکدیگر مجزا می‌باشند و در این تصویر قرنیه، عنبیه، لنز و قسمتی از جسم مژگانی مشاهده می‌شود .شکل ۹ با درشت‌نمایی بالا، فقط یک طرف از لبه‌ی پلک‌ها در محل جدا شدن را نشان داده است (روز شانزدهم). اپی‌درم این ناحیه متشکل از لایه بازال با سلول‌های منظم از نوع استوانه‌ای کوتاه بر روی غشای پایه، کراتینوسیت‌ها (لایه‌ی خاردار) در دو تا سه ردیف که بر روی طبقه‌ی بازال قرار گرفته‌اند سلول‌های لایه‌ی دانه‌دار و طبقه‌ی شفاف و خارجی‌ترین لایه‌ی طبقه‌ی شاخی و پوسته پوسته می‌باشد که مبیّن بلوغ کراتینوسیت‌ها از عمق به سطح می‌باشد.

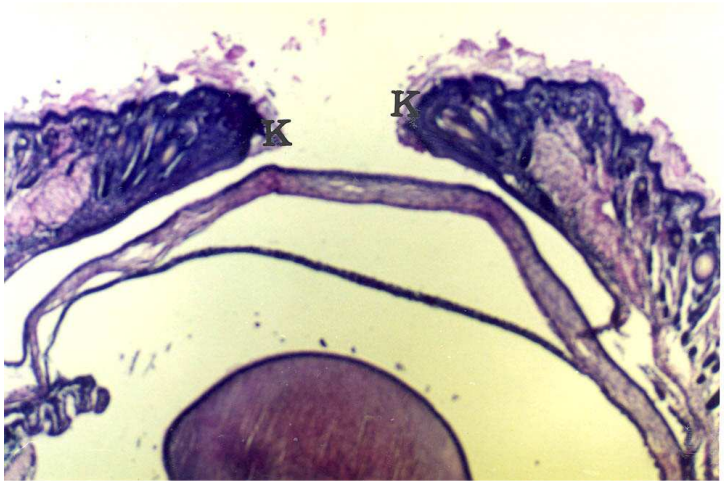


شکل ۶. تصویری که محل جدا شدن پلک‌ها را نشان می‌دهد (روز سیزدهم). به سلول‌های لایه‌ی بازال (B) به همراه سلول‌های لایه‌ی خاردار (S) و لایه‌ی دانه‌دار (G) در دو طرف محل جدا شدن توجه نمایید. محلی که هنوز چسبندگی بین دو پلک را نشان می‌دهد از ۲ تا ۳ ردیف سلول گرانولوزا تشکیل شده است (J). لایه‌های شاخی شده را در دو طرف محل چسبندگی یعنی در سطح داخلی و خارجی پلک می‌توان رؤیت کرد (K). توجه نمایید که در محل چسبندگی، مانند اشکال قبل حالت حفرات روشن اطراف هسته دیده نمی‌شود (رنگ‌آمیزی H & E، درشت‌نمایی ۶۶۰ برابر).

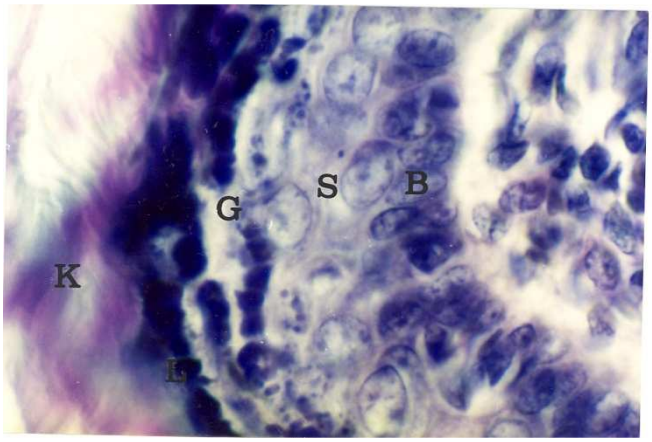
www.mui.ac.ir



شکل ۷. تصویری که محل جدا شدن پلک‌ها را نشان می‌دهد (روز پانزدهم). دقت نمایید در دو طرف محل جدا شدن پلک‌ها اپی‌تلیوم از نوع سنگفرشی مطبق شاخی می‌باشد و تمام لایه‌های اپی‌درم را می‌توان مشاهده کرد (E). در محل جدا شدن پلک‌ها فقط شبکه‌ای از لایه‌ی کراتینی به چشم می‌خورد ولی هنوز جدا شدگی کامل پلک‌ها اتفاق نیفتاده است (رنگ‌آمیزی H & E، درشت‌نمایی ۶۶۰ برابر)



شکل ۸. تصویری که محل جدا شدن پلک‌ها را نشان می‌دهد (روز شانزدهم). لبه‌ی محل جدا شدن، سطح خارجی و قسمتی از سطح داخلی پلک‌ها اپی‌تلیوم سنگفرشی مطبق شاخی دارد (K). در این تصویر جداشدگی دو پلک به وضوح مشخص می‌باشد (رنگ‌آمیزی H & E، درشت‌نمایی ۶۶ برابر).



شکل ۹. تصویری با درشت‌نمایی بزرگ‌تر از لبه‌ی پلک در محل جدا شدن پلک‌ها در روز شانزدهم. بافت همبند در زیر اپی‌تلیوم لایه‌ی بازال (B)، لایه‌ی خاردار (S)، لایه‌ی دانه‌دار (G)، لایه‌ی شفاف (L) و لایه‌ی کراتینی (K) (رنگ‌آمیزی H & E، درشت‌نمایی ۱۶۵۰ برابر).

www.mui.ac.ir

بحث

نقش آپوپتوز در فرایند تکاملی ارگان‌های مختلف جنینی مطلب شناخته شده‌ای است (۱۱-۱۰). امروز مشخص شده است که علاوه بر تکامل، آپوپتوز به عنوان عامل کنترل‌کننده‌ی جمعیت سلولی در رشد ارگان‌های افراد بالغ نیز نقش دارد (۱۲، ۱). از آن جا که سلول‌های توموری نیز از این قاعده مستثنی نیستند (۱۵-۱۳ ۱)، بنابراین به دست آوردن اطلاعات در زمینه‌ی آپوپتوز اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. امروزه عوامل مختلفی که باعث القا یا مهار آپوپتوز می‌گردند مورد شناسایی قرار گرفته است (۸). بررسی چگونگی عملکرد این عوامل و هم‌چنین مطالعه عوامل جدیدی که چنین نقشی را ایفا می‌کنند برای کنترل تکثیر سلول‌های توموری اهمیت به سزایی دارد. بنابراین داشتن ابزاری مناسب برای بررسی جنبه‌های مختلف آپوپتوز می‌تواند در تحقیقات مربوط به آپوپتوز نقش حیاتی داشته باشد.

با توجه به این که آپوپتوز در اکثر فرایندهای تکاملی نقش دارد، احتمال این که در جدا شدن پلک چشم‌ها پس از پیدایش و به هم چسبیدن آن‌ها نیز نقش داشته باشد بسیار زیاد است. با این وجود، بررسی این مسأله در جنین انسان مشکل و ناممکن و در سایر پستانداران با توجه به این که جدا شدن پلک چشم‌ها در مراحل نهایی تکامل جنینی رخ می‌دهد، بسیار مشکل است. در رت به عنوان یک پستاندار باز شدن پلک‌های به هم چسبیده در حدود شانزدهمین روز پس از تولد صورت می‌گیرد. بنابراین، چگونگی تکامل پلک چشم رت بهترین فرصت را به دست می‌دهد تا مراحل مختلف باز شدن پلک‌ها و نقش آپوپتوز در آن مورد بررسی قرار گیرد. بر اساس یافته‌های بررسی حاضر حضور سلول‌هایی با مشخصات مورفولوژیک سلول‌های آپوپتوتیک در محل تشکیل شیار پلکی آینده، دلیل بر بروز آپوپتوز در این ناحیه می‌باشد. مشخصات مورفولوژیکی که در سلول‌های محل جدا شدن پلک‌ها در مقاطع مختلف پلکی از روز ششم تا دوازدهم مشاهده گردیدند و دلیل اصلی ما مبنی بر بروز پدیده‌ی آپوپتوز در جدا شدن پلک‌ها می‌باشند عبارتند از این که مطالعات میکروسکوپیک به خصوص با درشت‌نمایی بالا نشان دادند که اگر چه پلک‌ها در روز شانزدهم و به بعد باز می‌گردند ولی تغییرات سلولی در بین اپی‌تلیوم خارجی و داخلی محل جدا شدن پلک‌ها از قبیل پیکنوز (Cell yknosis) و چروک سلول (Shrinkage) و هسته از روز ششم به وضوح قابل مشاهده بود. به علاوه رنگ‌پذیری این سلول‌ها با هماتوکسیلین بیشتر شده و هسته‌ی این سلول‌ها به صورت نامنظم و خاردار دیده می‌شوند و مچاله شدن هسته‌ها به طور کامل به چشم می‌خورد. در اکثر سلول‌های ناحیه‌ی محل جدا شدن به جز اپی‌تلیوم خارجی و داخلی، حلقه‌ای روشن که خالی به نظر می‌رسید در اطراف سلول قابل مشاهده بود. در ضمن سلول‌هایی که بعد از آن، لایه‌ی بازال طبقه‌ی اپی‌درم پوست ناحیه محل جدا شدن را تشکیل می‌دهند از ابتدای روز ششم تا روز جدا شدن (روز ۱۶) هیچ‌گونه تغییری نشان ندادند و به صورت استوانه‌ای و دارای رنگ‌پذیری نرمال بودند که تفاوت رفتار سلول‌های اطراف را با محل جدا شدن به وضوح نشان می‌داد.

تکامل لایه‌ی اپی‌درم و قرارگیری سلول‌ها از لایه‌ی بازال به سمت لایه‌ی کراتینیزه که از ابتدا در لایه‌ی خارجی مشاهده می‌گردد به سمت عمق یعنی اپی‌تلیوم داخلی حرکت می‌کند و سلول‌های خاردار و گرانولوزا را می‌توان در این اپی‌درم مشاهده کرد. تا روز دوازدهم

www.mui.ac.ir

سلول‌های با نمای چروکیدگی سیتوپلاسم و هسته، پلی‌مورف بودن هسته‌ها و گاهی هلالی شدن هتروکروماتین در زیر غشای هسته را می‌توان در ناحیه محل جدا شدن پلک چشم مشاهده کرد. با این وجود، در روزهای سیزدهم، چهاردهم، پانزدهم و شانزدهم دیگر سلولی با نمای گفته شده دیده نمی‌شود و سلول‌های این ناحیه در حال بلوغ به سمت سلول‌های اپی‌درم می‌باشند. این امر بیانگر کامل شدن پیدایش شیار و اتمام پدیده‌ی آپوپتوز می‌باشد که نشان‌دهنده‌ی عملکرد سلول‌های متعهد شده بوده و نویددهنده‌ی تشکیل اپی‌درم پلک می‌باشد. در عوض در روزهای فوق سلول‌هایی با مشخصات سلول‌های آپوپتوتیک در بین سلول‌های خاردار اپی‌درم پلک‌های در حال تشکیل مشاهده گردید که بیانگر بروز آپوپتوز در این لایه می‌باشد. این امر در شرایط نرمال، در اپی‌درم سایر نواحی نیز گزارش گردیده بود (۲۳-۱۶). با توجه به نمای سلول‌های ناحیه‌ی جدا شدن و تغییرات مورفولوژیکی آن‌ها که با رنگ‌آمیزی H & E به صورت هاله‌ی روشن (Clear halo)، چروکیدگی (Shrinkage)، پیکنوز، هلالی شدن (Crescent) و متراکم شدن کروماتین، دیده می‌شدند بیانگر حضور سلول‌های آپوپتوتیک و به عبارت دیگر نقش آپوپتوز در جدا شدن و تشکیل شیار پلک چشم می‌باشد.

طی مطالعه‌ی دیگری که Smith و همکاران در سال ۱۹۹۷ بر روی افزایش آپوپتوز در جفت در اختلال رشد داخل رحمی (Intrauterine growth retardation) با LM و رنگ‌آمیزی H&E که استفاده از Fixative فرمالین انجام دادند، به این نتیجه دست یافتند که سلول‌های تحت آپوپتوز تغییراتی شامل چروکیدگی، به هم فشرده شدن هتروکروماتین، نمای هلالی شکل در زیر غشای هسته و نمای چرخ دنده‌ای پیدا می‌کنند. تعداد سلول‌های مشاهده شده در این مطالعه بین ۵ تا ۷ هزار بود (۲۴). مطالعه‌ی دیگر این محققین بر روی فرایند آپوپتوز در جفت مربوط به حاملگی نرمال، نشان می‌دهد که مورفولوژی سلول‌های آپوپتوزی همانند مطالعه‌ی بالا می‌باشد (۲۵). Aihara و همکاران در سال ۱۹۹۵ سلول‌های آپوپتوزی در نمونه‌های آدنوکارسینومای پروستات را، پس از آماده سازی و قالب‌گیری با پارافین توسط LM و رنگ‌آمیزی H & E مورد مطالعه قرار دادند و ملاحظه کردند که در سلول‌های آپوپتوتیک کروماتین هسته متراکم و بازوفیل می‌باشد که این پدیده با ائوزینوفیلی شدید سیتوپلاسم همراه می‌باشد. در ضمن بیان کرده‌اند که اطراف سلول در حال آپوپتوز به صورت یک هاله‌ی روشن (Clear halo) دیده می‌شود (۱۳). مشاهده‌ی سلول‌های آپوپتوزی توسط Staunton و همکاران در تومورها بیانگر مشخصات مورفولوژیکی نظیر متراکم شدن هسته، چروکیدگی سلولی، هلالی شدن کروماتین یا دانه تسبیحی شدن کروماتین هسته (Ring like)، ائوزینوفیل شدن شدید سیتوپلاسم و هاله‌ی روشن اطراف سلول در سلول‌های آپوپتوزی می‌باشد که با مطالعات قبلی انجام شده با این روش هم‌خوانی دارد (۱۴).

تحقیق دیگری که Lin و همکاران در سال ۱۹۹۷ بر روی ایجاد هیپواسپرماتوژنز با افزایش فرایند آپوپتوز در سلول‌های اسپرماتوژنیک و سرتولی انجام دادند، ساختمان سلول‌های آپوپتوزی را به صورت متراکم شدن کروماتین و سیتوپلاسم، ائوزینوفیل شدن شدید سیتوپلاسم و پیکنوز در کروماتین هسته به همراه هاله‌ی روشن اطراف سلول با رنگ‌آمیزی H & E نشان دادند که نمای مورفولوژیکی این سلول‌ها در مطالعات مختلف یکسان و مشابه بود (۲۶).

مطالعه‌ی دیگری که Aihara و همکاران در سال

www.mui.ac.ir

۱۹۹۴ بر روی سلول‌های آپوپتوزی در سرطان‌های پروستات با رنگ‌آمیزی H & E و LM انجام دادند نشان داد که سلول‌های آپوپتوزی به صورت توده‌ای تنها و گرد و هموژن با کروماتین متراکم و سیتوپلاسم به شدت ائوزینوفیل که اطراف این توده متراکم را فرا گرفته است با بازوفیلی شدید کروماتین به هم فشرده‌ی هسته ظاهر می‌شوند (۱۵). دو مطالعه‌ی دیگر که یکی را Kim و همکاران بر روی سلول‌های کندروسیت در آرتریت روماتوئید در سال ۱۹۹۹ و دیگری را بر روی همین سلول‌ها در استئوآرتریت در سال ۲۰۰۰ انجام دادند مشخص کردند که در رت سلول‌های آپوپتوتیک شکل و خصوصیات مشابهی مثل چروکیدگی هسته و سیتوپلاسم، پیکنوز هسته، متراکم شدن سلول و ائوزینوفیلی شدید سیتوپلاسم ظاهر می‌شوند که این مطالعات نیز با استفاده از LM و رنگ‌آمیزی H&E انجام گرفت (۲۸-۲۷).

در سال ۲۰۰۰، Fujikawa و همکاران در مورد بروز پدیده‌ی آپوپتوز در نورون‌ها بعد از حملات تشنج و صرع تحقیق کرده و با رنگ‌آمیزی H&E و LM توانستند نشان دهند که سلول‌های آپوپتوتیک عصبی از نظر نمای مورفولوژیکی شامل پیکنوز، چروکیدگی و ائوزینوفیل شدن سیتوپلاسم شبیه بقیه‌ی سلول‌ها می‌باشند (۲۹). هم‌چنین در سال ۱۹۹۹ Hotchkiss و همکاران سلول‌های آپوپتوزی را در ارگان‌های مختلف بعد از سپسیس (Sepsis) و شوک بررسی کردند و ضمن مشاهده این سلول‌ها در ارگان‌های مختلف مثل طحال، کبد، ریه و ... نمای مورفولوژیکی سلول‌های آپوپتوزی به صورت متراکم شدن و قطعه قطعه شدن هسته و چروکیده شدن سیتوپلاسم را نشان دادند. مطالعه‌ی فوق نیز با استفاده از رنگ‌آمیزی H & E و LM بوده است (۳۰). مطالعه‌ی دیگری که Kashihara در سال ۱۹۹۸ بر روی پدیده‌ی آپوپتوز در پولیپ‌های گاستریک و آدنوکارسینومای معده انجام دادند و تنها از روش H&E و LM استفاده کردند، تغییرات سلول‌های آپوپتوزی را به صورت چروکیدگی سلول، فشردگی هتروکروماتین هسته، هلالی شدن یا حلقه‌ای شدن یا دانه تسبیحی شدن کروماتین هسته، افزایش ائوزینوفیلی سیتوپلاسم و هم‌چنین پیدایش هاله‌ی روشن در اطراف سلول و سست شدن ارتباطات سلولی بیان کردند (۳۱). همچنین تنها تحقیق انجام شده در راستای تحقیق ما در سال ۲۰۰۳ انجام شد که از روش‌های متفاوتی برای بررسی روند آپوپتوزیس در محل اتصال دو پلک در رت‌ها استفاده شد و توسط روش LM و ایمونوهیستوشیمی نتیجه گرفتند که آپوپتوزیس در محل اتصال دو پلک نقش مهمی‌دارد که با داده‌های ما مطابقت دارد (۳۲). هر چند هدف ما در این مطالعه روشی آسان و کم هزینه برای اثبات فرایند آپوپتوزیس بوده است که به این مهم دست پیدا کردیم. با توجه به مطالب فوق و عنایت به نمای مورفولوژیک سلول‌های آپوپتوتیک با روش H & E چنین به نظر می‌رسد که چه در حالت فیزیولوژیک و چه در حالت پاتولوژیک، مختصات سلول در حال آپوپتوز در بافت‌های مختلف مشابه و یکسان می‌باشد. اگر در مجموع این تغییرات را با LM دسته‌بندی کنیم شامل این موارد هستند: چروکیدگی هسته (Cell shrinkage)، هسته‌ی متراکم هیپوکروماتیک (Condensed Hyperchromatic nuclear)، هلالی شدن یا دانه تسبیحی شدن کروماتین هسته (Ring like or beaded nuclear chromatin, crescent)، کاهش ارتباط سلول با سلول (Loss of cell to cell contact)، افزایش ائوزینوفیلی سیتوپلاسم (Deeply eosinophilic

www.mui.ac.ir

cytoplasm)، پیکنوز سلول و هسته (Cell and nuclear pyknosis) و سلول آپوپتوتیک که اغلب با هاله‌ی روشن احاطه شده است (Apoptotic cell were often surrounded by a clear halo).

در نهایت می‌توان گفت از آن جا که آپوپتوز در مورفوژنز، پدیده‌ی ایزوفورم، تکامل اندام‌ها و ارگان‌های مختلف نقش دارد و نقش آن در تکامل پلک چشم نیز غیر قابل انتظار نمی‌باشد و نیز با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر در نشان دادن نقش اساسی آپوپتوز در جدا شدن پلک چشم رت طی دوره نوزادی و با در نظر گرفتن این نکته که سلول‌های محل جدا شدن پلک چشم بایستی به طور دسته جمعی از بین بروند تا پلک‌های به هم چسبیده از هم جدا گردند (منبعی از توده‌ی سلولی در حال آپوپتوز)، نقش آپوپتوز در این مسئله شرایط استثنایی را برای بررسی عوامل دخیل در مهار و القای آپوپتوز فراهم می‌نماید.

References

1. Cotran RS, Kumar V, Colliens T. Robbins Pathologic Basis of Disease. 6th ed. Philadelphia: Saunders; 1999. p. 18-25, 289-92.
2. Jonathan CF, Vickas V, Patel. Apoptosis and the Cardiovascular System. ACC Current J Review 1998; 13-5.
3. Kerr JF, Harmon B, Searle J. An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibers. J Cell Sci 1974; 14(3): 571-85.
4. Hardy K. Apoptosis in the human embryo. Rev Reprod 1999; 4(3): 125-34.
5. Nishikori T, Hatta T, Kawauchi H, Otani H. Apoptosis during inner ear development in human and mouse embryos: an analysis by computer-assisted three-dimensional reconstruction. Anat Embryol (Berl) 1999; 200(1): 19-26.
6. Reyes FA, Chavarria Olarte ME. [The participation of apoptosis in the development and function of the male gonad]. Ginecol Obstet Mex 1999; 67: 330-40.
7. Rice DP, Kim HJ, Thesleff I. Apoptosis in murine calvarial bone and suture development. Eur J Oral Sci 1999; 107(4): 265-75.
8. Hewitson TD, Darby IA. In situ localization of apoptosis using TUNEL. Methods Mol Biol 2010; 611: 161-70
9. Studzinski GP. Apoptosis: A Practical Approach. Oxford: Oxford University Press; 1999. P.1-39.
10. Abdelwahid E, Pelliniemi LJ, Niinikoski H, Simell O, Tuominen J, Rahkonen O, et al. Apoptosis in the pattern formation of the ventricular wall during mouse heart organogenesis. Anat Rec 1999; 256(2): 208-17.
11. Georges P, Madigan MC, Provis JM. Apoptosis during development of the human retina: relationship to foveal development and retinal synaptogenesis. J Comp Neurol 1999; 413(2): 198-208.
12. Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Gasbarrini G, Corazza GR. Apoptosis and gastrointestinal tract. Ital J Gastroenterol Hepatol 1999; 31(2): 162-72.
13. Aihara M, Scardino PT, Truong LD, Wheeler TM, Goad JR, Yang G, et al. The frequency of apoptosis correlates with the prognosis of Gleason Grade 3 adenocarcinoma of the prostate. Cancer 1995; 75(2): 522-9.
14. Staunton MJ, Gaffney EF. Tumor type is a determinant of susceptibility to apoptosis. Am J Clin Pathol 1995; 103(3): 300-7.
15. Aihara M, Truong LD, Dunn JK, Wheeler TM, Scardino PT, Thompson TC. Frequency of apoptotic bodies positively correlates with Gleason grade in prostate cancer. Hum Pathol 1994; 25(8): 797-801.
16. Taylor JK, Zhang QQ, Monia BP, Marcusson EG, Dean NM. Inhibition of Bcl-xL expression sensitizes normal human keratinocytes and epithelial cells to apoptotic stimuli. Oncogene 1999; 18(31): 4495-504.
17. Li G, Bush JA, Ho VC. Effect of retinoic acid on apoptosis and DNA repair in human keratinocytes after UVB irradiation. J Cutan Med Surg 2000; 4(1): 2-7.
18. Nishizaki K, Anniko M, Orita Y, Masuda Y, Yoshino T, Kanda S, et al. Programmed cell death in the development of the mouse external auditory canal. Anat Rec 1998; 252(3): 378-82.
19. Magerl M, Tobin DJ, Muller-Rover S, Hagen E, Lindner G, McKay IA, et al. Patterns of proliferation and apoptosis during murine hair follicle morphogenesis. J Invest Dermatol 2001; 116(6): 947-55.
20. Ouhtit A, Gorny A, Muller HK, Hill LL, Owen-Schaub L, Ananthaswamy HN. Loss of Fas-ligand expression in mouse keratinocytes during

www.mui.ac.ir

UV carcinogenesis. Am J Pathol 2000; 157(6): 1975-81.
21. Nguyen VT, Ndoye A, Hall LL, Zia S, Arredondo J, Chernyavsky AI, et al. Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectant upon secretagogue action of acetylcholine. J Cell Sci 2001; 114(Pt 6): 1189-204.
22. Chaturvedi V, Qin JZ, Denning MF, Choubey D, Diaz MO, Nickoloff BJ. Apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes. J Biol Chem 1999; 274(33): 23358-67.
23. Breuhahn K, Mann A, Muller G, Wilhelmi A, Schirmacher P, Enk A, et al. Epidermal overexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces both keratinocyte proliferation and apoptosis. Cell Growth Differ 2000; 11(2): 111-21.
24. Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. Am J Obstet Gynecol 1997; 177(6): 1395-401.
25. Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. Am J Obstet Gynecol 1997; 177(1): 57-65.
26. Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Abrams J, Lipshultz LI, Kim ED. Apoptotic frequency is increased in spermatogenic maturation arrest and hypospermatogenic states. J Urol 1997; 158(5): 1791-3.
27. Kim HA, Song YW. Apoptotic chondrocyte death in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1999; 42(7): 1528-37.
28. Kim HA, Lee YJ, Seong SC, Choe KW, Song YW. Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis. J Rheumatol 2000; 27(2): 455-62.
29. Fujikawa DG, Shinmei SS, Cai B. Seizure-induced neuronal necrosis: implications for programmed cell death mechanisms. Epilepsia 2000; 41 Suppl 6: S9-13.
30. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. Crit Care Med 1999; 27(7): 1230-51.
31. Kashihara K. Detection of apoptosis using hematoxylin-eosin. Arch Pathol Lab Med 1998; 122(6): 493.
32. Mohamed YH, Gong H, Amemiya T. Role of apoptosis in eyelid development. Exp Eye Res 2003; 76(1): 115-23.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 29. No 132. 4th week. Mav 2011 Received: 8.2.2011 Accepted: 17.4.2011

Role of Apoptosis in Separation of Eyelid in Newborn Rat with Method of Hemathoxylin and Eosin

Bahman Rashidi PhD[1], Jafar Soleimani Rad PhD[2]

Abstract

Background: Apoptosis or programmed cell death is a process in which the unwanted cells die after a coordinated and planned activities of an accurate collection of genes. Apoptosis are considered in embryo development, cancer pathogenesis and humoral immune responses. Considering the role of apoptosis in fetal development, this study was done to investigate its role in separating eyelids in neonatal rats.

Methods: For this purpose the unopened eyelids of 6-16 days old Wister newborn rats were removed after anesthesia and fixed in 10% formolin. After preparation and paraffin embedding, 5 micron thick sections stained with hemathoxylin and eosin, and studied with light microscope.

Findings: Microscopic assessment of opening place of eyelids showed that the eyelid groove formation starts with external and internal surface troughs. After reaching the troughs together, the eyelids are separated.The main changes that occurred during eyelid formation are appearance of vesicular cells with morphologic characteristics of apoptotic cells includes: nuclear pyknosis, cell shrinkage, deeply eosinophilic cytoplasm surrounded by, and clear halo. These cells were abundant form 6th to 16th day. After 12th day these cells were seen among the cells of spinosum layer. The other change that we could see during eyelid formation was development of keratinized epidermis of external surface and nonkeratinized stratified squamous epithelium of the internal surface of eyelid.

Conclusion: Role of apoptosis in developing embryo, before and after implantation, is well known. Presence of cells with characteristics of apoptotic cells in the site of eyelid development in rat showed the role of apoptosis in eyelid formation. Easy to access of apoptotic cells in eyelid formation in newborn rats can serve rat as a very suitable model for evaluating the inhibitors and inductors of apoptosis.

Keywords: Pyknosis, Apoptotic cell, Apoptosis, Eyelid.

[1] Assistant Professor, Department of Anatomy and Histology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

[2] Professor, Department of Anatomy and Histology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Corresponding Author: Bahman Rashidi PhD, Email: b_rashidi@med.mui.ac.ir