

## بررسی آسیب مخاط معده و سطح ملاتونین بدنبال محرومیت از خواب نسبی در رت

خسرو صادق نیت حقیقی<sup>۱\*</sup>، ارشاد نوری<sup>۲</sup>، غلامرضا حسین زاده<sup>۳</sup>، احمدرضا دهپور<sup>۴</sup>

۱. متخصص طب کار، دانشیار و عضو مرکز تحقیقات بیماریهای شغلی و طب کار، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲. دستیار گروه طب کار، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳. دانشیار گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴. استاد گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ پذیرش: ۹۰/۰۳/۱۲

تاریخ دریافت: ۸۹/۰۹/۲۶

### چکیده:

**مقدمه:** زندگی امروزی کار کردن با ساعات طولانی و شیفت کاری را اجتناب ناپذیر کرده است که با عوارض گوناگون جسمی و روانی همراه می‌باشد و یکی از عوارض شایع جسمی، شکایات گوارشی است. مطالعات نقش محافظتی ملاتونین در دستگاه گوارش را نشان داده اند. در این مطالعه قصد داریم آسیب مخاط معده ناشی از محرومیت از خواب نسبی در رت و نقش احتمالی ملاتونین را در آن بررسی کنیم.

**روش بررسی:** ۲۴ رت نر را در دو گروه ۱۲ تایی کنترل که خواب طبیعی داشتند و گروه محرومیت از خواب نسبی تقسیم کردیم. برای ایجاد محرومیت از خواب نسبی از یک قفس استوانه‌ای ویژه که به آرامی، ۲۳ ساعت در روز، به مدت ۱۴ روز می‌چرخید استفاده کردیم. در ۲۴ ساعت نهایی حیوانات از غذا محروم بودند. نهایتاً معده حیوانات تحت بررسی ماکروسکوپیکی و میکروسکوپیکی قرار گرفت و نمونه سرم نیز جهت بررسی میزان ملاتونین بروش ELISA گرفته شد.

**یافته‌ها:** آسیب مخاطی کم و بیش در هر دو گروه مشاهده شد. شدت آسیب در گروه محرومیت از خواب نسبی بطور معنی‌داری از گروه کنترل بیشتر ( $P < 0/001$ ) و سطح ملاتونین در گروه محرومیت از خواب نسبی بطور معنی‌داری از گروه کنترل کمتر بود ( $P < 0/001$ ).

**بحث و نتیجه‌گیری:** می‌توان گفت که محرومیت از خواب نسبی در رت‌ها می‌تواند منجر به آسیب مخاط معده و افزایش استعداد به بروز آن شود. از طرف دیگر ملاتونین سرم در گروه محرومیت از خواب نسبی بطور معنی‌داری از گروه کنترل کمتر بود. می‌رسد کاهش ملاتونین سرم در ایجاد این آسیب نقش داشته باشند.

**کلید واژه‌ها:** آسیب مخاط معده، محرومیت از خواب نسبی، ملاتونین

\* نویسنده مسؤول: آدرس پستی: تهران، میدان راه آهن، بیمارستان بهارلو، دفتر ریاست. تلفن: ۰۲۱-۶۶۵۵۹۳۰۰

## مقدمه

امروزه نیازهای اجتماعی و عوامل اقتصادی بسیاری از مردم را به سمت شیفت کاری و ساعات کاری طولانی سوق می دهند. اختلالات جسمی و روانی بسیاری را به این نوع زمان بندی کاری نسبت داده اند. در میان این اختلالات، مشکلات گوارشی شیوع قابل توجهی دارند (۱). مطالعات چندی نشان داده اند که شکایات گوارشی در افرادی که ساعات کاری طولانی دارند شایع تر است (۲ و ۳) و مطالعات زیادی ارتباط معنی داری میان شیفت کاری و اختلالات گوارشی نشان داده اند (۶-۴)، برخی از این مطالعات ذکر کرده اند که شیفت کاری می تواند ریسک فاکتوری برای بیماری زخم پپتیک باشد (۷ و ۸). نظریه های متعددی جهت توضیح ارتباط میان مشکلات گوارشی و این دو نوع زمان بندی کاری مطرح شده است مثل تغییر عادات غذایی، چه از نظر نوع غذا و چه از نظر زمان مصرف غذا، تغییر ریتم سیرکادین و همچنین پاسخ استرسی ناشی از محرومیت از خواب که منجر به تغییراتی در سیستم های دفاعی بدن می شود. دیگر عواملی که می تواند منجر به ایجاد مشکلات گوارشی در این افراد شود افزایش مصرف سیگار و قهوه در میان شیفت کاران است (۱).

مطالعات حیوانی مختلفی بروز آسیب مخاط معده را در رت های محروم از خواب حاد (۹) و مزمن (۱۰ و ۱۱) نشان داده اند. برخی از این مطالعات این ضایعات را ناشی از استرس دانسته اند (۱۱). اخیراً مطالعات زیادی شواهدی مبنی بر نقش ملاتونین در محافظت از بافتها در دستگاه گوارش در مدل های مختلف از جمله استرس، مطرح کرده اند (۱۴ و ۱۲).

در این مطالعه ما قصد داریم تا اثر محرومیت از خواب نسبی را بر مخاط معده در رت ها بررسی کنیم، همچنین قصد داریم نقش احتمالی ملاتونین در آسیب ایجاد شده را بررسی نماییم تا بتوانیم فرضیه ای راجع مکانیسم ایجاد مشکلات معده ای در افراد دچار محرومیت از خواب نسبی، همچون شیفت کاران و افرادی که ساعات

کاری طولانی دارند، مطرح کنیم. هدف دیگر ما از انجام این مطالعه راه اندازی یک مدل *experimental* محرومیت از خواب می باشد که بتوانیم از طریق آن با ایجاد مداخلات مختلف بر ساعات خواب و بیداری حیوانات به بررسی اثرات و مکانیسم آنها بپردازیم.

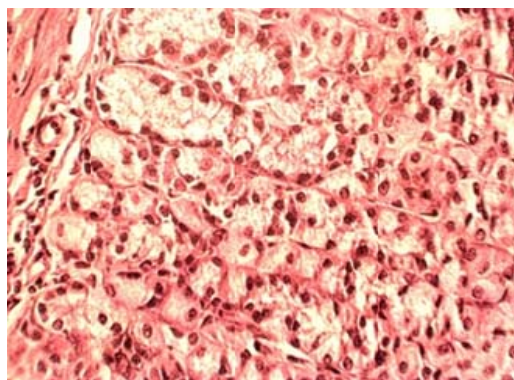
## روش بررسی

این مطالعه از نوع مطالعات کارآزمایی بالینی *experimental* می باشد. گروه کنترل و گروه مداخله هر کدام شامل ۱۲ عدد رت نر بودند. ۲۴ رت نر رابه طور تصادفی در دو گروه ۱۲ تایی کنترل با خواب طبیعی و کنترل با محرومیت از خواب نسبی تقسیم کردیم. رت های نر ۲۰۰ تا ۲۸۰ گرمی در دمای  $22 \pm 1$  درجه سانتیگراد، رطوبت ۶۵-۷۰ درصد و شرایط روز و شب مصنوعی (۱۲ ساعت روز و ۱۲ ساعت شب) نگهداری و توسط غذای استاندارد حیوانات و آب لوله کشی تغذیه می شدند. برای القاء محرومیت از خواب نسبی قفس هایی را به شکل استوانه افقی که توسط موتور هر دو دقیقه یک دور می چرخید طراحی کردیم (۱۱ و ۱۵). در قاعده این قفس استوانه ای محفظه ای جهت غذای حیوانات قرار دادیم و آب نیز از یک ورودی از قاعده ای دیگر قفس توسط یک لوله وارد قفس میشد تا حیوانات بتوانند بطور ۲۴ ساعته به آب و غذا دسترسی داشته باشند. موتورها را طوری برنامه ریزی کردیم که هر روز بین ساعت ۳ و ۴ بعد از ظهر خاموش شوند تا رت ها بتوانند یک ساعت در روز خواب بدون اختلال داشته باشند. محرومیت از خواب نسبی به مدت ۱۴ روز ادامه داده شد. گروه کنترل را نیز در همین قفس ها در حالیکه موتورشان خاموش بود نگهداری می کردیم. هر دو گروه محرومیت از خواب نسبی و کنترل را در ۲۴ ساعت پایانی روز چهاردهم مطالعه از غذا محروم کردیم. پس از تمام مدت مطالعه جهت القای بی هوشی در رت ها به منظور خارج کردن معده و خونگیری از آنها

اندکس اولسر بدست آمده برای هر رت متغیری کمی می‌باشد که آنرا از مجموع حاصلضرب تعداد ضایعات موجود در هر دسته در ضریب آن بدست می‌آوردیم. داده‌ها به صورت  $SD \pm Mean$  نشان داده می‌شوند و آنالیز آماری توسط آزمون independent samples T-test صورت گرفت. ( $P < 0/05$ ) را به عنوان سطح معنی‌داری مد نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

اندکس ضایعات در گروه کنترل  $0/75 \pm 0/35$  بود، در حالی که اندکس ضایعات در گروه محرومیت از خواب نسبی به  $2/36 \pm 7/3$  رسیده بود که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری را نشان می‌داد ( $P < 0/001$ ). این یافته با یافته‌های حاصل از ارزیابی میکروسکوپیک نمونه‌های بافتی همسان بود. در گروه کنترل غدد معدی ظاهری نرمال داشتند، تراکم سلول‌های chief و partial نیز نرمال بود (شکل شماره ۱).



شکل ۱: ارزیابی میکروسکوپیک نمونه‌های بافتی در گروه کنترل

ولی در گروه محرومیت از خواب نسبی تجمع خون، انفیلتراسیون سلول‌های چند هسته‌ای و پرولیفراسیون سلول‌های chief در قاعده‌ی غدد معدی مشاهده می‌شد. هسته‌های دراز و متراکم در میان غدد معدی و لامیناپروپریا بیانگر عدم عملکرد این سلول‌ها و سیر مرگ در آنها بود (شکل شماره ۲).

از تزریق داخل صفاقی داروی pentobarbital شرکت سیگما به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استفاده کردیم. پس از خارج کردن معده و پس از کلامپ کردن دو انتهای آن، ۱۰ سی‌سی محلول ۲ درصد فورمالدئید داخل هر معده تزریق کردیم و پس از گذشت ۱۰ دقیقه معده را از قوس بزرگتر آن بردیم و با سالیسین خنک شستشو دادیم. اندازه ضایعات ایجاد شده را زیر یک ذره بین با بزرگنمایی ۳ برابر بررسی کردیم. زخم‌ها را بر اساس یک سیستم قراردادی امتیازبندی کردیم. به اینصورت با توجه به طول ضایعات به سه دسته تقسیم شدند و به هر دسته یک ضریب نسبت داده شد (ضایعات کوچکتر یا مساوی یک میلی‌متر، ضریب یک؛ ضایعات بین ۲ تا ۴ میلی‌متر، ضریب ۲؛ و ضایعات بزرگتر از ۴ میلی‌متر ضریب ۳) در نهایت اندکس ضایعات در هر معده را از مجموع حاصل ضرب تعداد ضایعات موجود در هر دسته در ضریب آن بدست آورده شد (۱۶ و ۱۷).

همچنین نمونه‌های بافت معده را در محلول فرمالدئید ۱۰ درصد جهت ارزیابی هیستولوژیک توسط یک پاتولوژیست که از مداخلات صورت گرفته آگاهی نداشت، فیکس شد.

### سنجش سطح ملاتونین:

خونگیری را از بطن راست رت‌ها بین ۲ تا ۵ ساعت پس از شروع روز انجام دادیم. نمونه‌های خون را به مدت یک ساعت در دمای اتاق در لوله‌های آزمایش نگهداری کردیم و سپس آنها را در سانتریفوژ در ۳۶۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۴ درجه سانتیگراد، به مدت ۱۵ دقیقه قرار دادیم. بعد از این مرحله سرم را از نمونه‌ها جدا و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد تا زمان انجام آزمایش الایزا نگهداری کردیم. آزمون الایزا توسط کیت اختصاصی سنجش ملاتونین رت، ساخت شرکت USCN Life Science انجام دادیم. حداقل دوز ملاتونین رت که توسط این کیت قابل شناسایی بود ۵/۹ پیکوگرم در میلی‌لیتر بود.

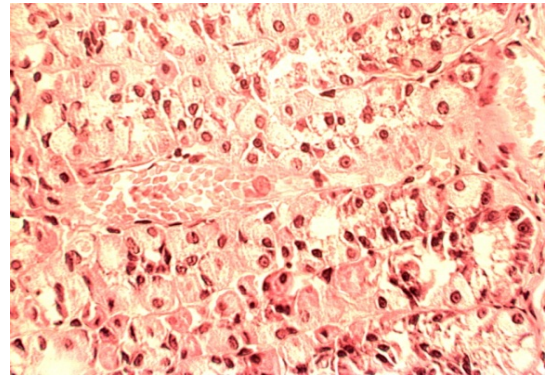
نسبی مزمن به مدت یک هفته و دو هفته منجر به ایجاد زخم معده در رت‌ها می‌شود(۱۱).

مطالعات متعددی اثرات محافظتی و همچنین اثر بهبودی بخش ملاتونین را بر زخم‌های معده در مدل‌های مختلف نشان داده‌اند(۱۳ و ۱۲ و ۱۸). در مطالعه ما نیز در گروه محرومیت از خواب نسبی که با ضایعات بیشتری در مخاط معده همراه بودند سطح ملاتونین کاهش قابل توجهی را نسبت به گروه کنترل که خواب نرمال داشتند، نشان داد.

### نتیجه‌گیری

در پایان با توجه به یکسان بودن تمامی شرایط محیطی در هر دو گروه کنترل و مداخله به جز در مورد محرومیت از خواب نسبی، می‌توان گفت که محرومیت از خواب نسبی در رت‌ها می‌تواند منجر به آسیب مخاط معده و افزایش استعداد به بروز آن شود که با توجه به پایین‌تر بودن سطح ملاتونین در رت‌های گروه محرومیت از خواب نسبی نسبت به گروه کنترل بخشی از این خاصیت را می‌توان به پایین بودن ملاتونین در این گروه نسبت داد. هرچند برای یافتن ارتباط علیتی نیاز به انجام مطالعات دیگری با استفاده از آگونیست‌ها یا آنتاگونیست‌های ملاتونین می‌باشد.

همچنین در این مطالعه ما سعی کردیم با اضافه کردن بررسی میکروسکوپیک بافت مخاط معده در کنار بررسی ماکروسکوپیک آن، شواهد عینی بیشتری را در مورد ضایعات مخاط معده جمع‌آوری کنیم، ولی با این وجود با توجه به وابستگی این بررسی‌ها به اپراتور آن، استفاده از روش‌های عینی‌تر مانند ایمونوهیستوکیستمی برای تعیین میزان آسیب مخاطی پیشنهاد می‌شود.



شکل ۲: ارزیابی میکروسکوپیک نمونه‌های بافتی در گروه محرومیت از خواب نسبی

سطح ملاتونین سرم در گروه کنترل  $59/40 \pm 407/76$  پیکوگرم در میلی‌لیتر بود. سطح ملاتونین سرم در گروه محرومیت از خواب نسبی به  $26/00 \pm 87/02$  پیکوگرم در میلی‌لیتر کاهش یافته بود، که بیانگر تفاوت معنی‌دار از لحاظ آماری میان سطح ملاتونین سرم در این دو گروه بود ( $P < 0/001$ ).

### بحث

در این مطالعه اثر محرومیت از خواب نسبی را بر مخاط معده رت مورد بررسی قرار گرفته شد. با توجه به یافته‌های این مطالعه اندکس ضایعات در گروه محرومیت از خواب نسبی به صورت معنی‌داری از گروه کنترل بیشتر بود. Murison و همکارانش هم نشان داده بودند که محرومیت از خواب به صورت حاد به مدت ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه کنترل که محرومیت از خواب نداشتند، می‌تواند منجر به بروز زخم معده در رت‌های محروم از غذا به مدت ۴۰ ساعت بشود(۹). همچنین Guo و همکارانش نشان دادند که محرومیت از خواب

1. Caruso C. Shift work and long working hours, in environmental and occupational medicine. N.R. William, Editor 2007: Lippincott Williams & Wilkins: 1359-63.
2. Celik S, Veren F, Ocakci A. Gastrointestinal complaints related to eating and drinking habits and work life of intensive care nurses in Zonguldak, Turkey. *Dimens Crit Care Nurs*, 2008; 27(4): 173-179.
3. Rosta J, Gerber A. Excessive working hours and health complaints among hospital physicians: a study based on a national sample of hospital physicians in Germany. *Ger Med Sci*, 2007. 5: Doc09. Published online 2007 Norember 29.
4. Knutsson A. Health disorders of shift workers. *Occup Med (Lond)*, 2003. 53(2): 103-8.
5. Muecke S Effects of rotating night shifts: literature review. *J Adv Nurs*, 2005. 50(4): 433-439.
6. Segawa K, Nakazawa S, Tsukamoto Y, Kurita Y, Goto H, Fukui A, et al. Peptic ulcer is prevalent among shift workers. *Dig Dis Sci*, 1987. 32(5): 449-453.
7. Pietroiusti A, Forlini A, Magrini A, Galante A, Coppeta L, Gemma G, et al, Shift work increases the frequency of duodenal ulcer in H pylori infected workers. *Occup Environ Med*, 2006; (11) 63 : 773-5.
8. Van Mark A, Spallek M, Groneberg DA, Kessel R, Weiler SW. Correlates shift work with increased risk of gastrointestinal complaints or frequency of gastritis or peptic ulcer in H. pylori-infected shift workers? *Int Arch Occup Environ Health*, 2010. 83(4): 423-431.
9. Murison R, Ursin R, Coover GD, Lien W, ursin H. Sleep deprivation procedure produces stomach lesions in rats. *Physiol Behav*, 1982. 29(4): 693-4.
10. Guo JS, Cho CH, Koo MW. Worsening effect of partial sleep deprivation on indomethacin-induced gastric mucosal damage. *Pharmacol Biochem Behav*, 2005; 82(3): 515-521.
11. Guo JS, chau FL, Cho CH, Koo MW. Partial sleep deprivation compromises gastric mucosal integrity in rats. *Life Sci*, 2005; 77(2): 220-9.
12. Brzozowska I, Ptak\_Belowska A, Pawlik M, Pajdo R, Drozdowicz D, Konturek SJ, et al. Mucosal strengthening activity of central and peripheral melatonin the mechanism of gastric defense. *J Physiol Pharmacol*, 2009. 60 Suppl 7: 47-56.
13. Kato K, Murai I, Asai S, Takahashi Y, Nagata T, Komuro S, et al. Circadian rhythm of melatonin and prostaglandin in modulation of stress-induced gastric mucosal lesions in rats. *Aliment Pharmacol Ther*, 2002; 16 Suppl 2: 29-34.
14. Konturek PC, konturek SJ, Brzozowski T, Dembinski A, Zembala M, Mytar B, et al. Gastroprotective activity of melatonin and its precursor, L-tryptophan, against stress-induced and ischaemia-induced lesions is mediated by scavenge of oxygen radicals. *Scand J Gastroenterol*, 1997; 32(5): 33-48
15. Shen XZ, Chow JF, Koo MW, Cho CH. Gene expression profiles in gastric mucosa of sleep deprivation rats. *World J Gastroenterol*, 2000; 6(5): 754-8.
16. Peskar BM, Ehrlich K, Peskar BA. Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002; 301(3): 969-974.
17. Stroff T, Plate S, Ebrahim JS, Ehrlich KH, Respondek M, Peskar BM. Tachykinin-induced increase in gastric mucosal resistance: role of primary afferent neurons, CGRP, and NO. *Am J Physiol*, 1996; 271(6 Pt 1): G1017-1027.
18. Konturek PC, Konturek SJ, Majka J, Zembala M, Hahn EG. Melatonin affords protection against gastric lesions induced by ischemia-reperfusion possibly due to its antioxidant and mucosal microcirculatory effects. *Eur J Pharmacol*, 1997; 322(1): 73-7.