

# بررسی اثر ملاتونین بر زخم معده ناشی از استرس در موش صحرایی

دکتر مرتضی ثمنی، دکتر احمدرضا دهپور، الهام بابازاده خامنه

گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

## چکیده

**مقدمه:** یکی از اعمال سودمند منسوب به ملاتونین، حفاظت در برابر اکسیدکننده‌های آندوژن است. هدف این مطالعه بررسی اثر محافظتی ملاتونین در برابر رادیکال‌های آزاد، در زخم معده ناشی از استرس میباشد.

**مواد و روشها:** در این مطالعه برای ایجاد زخم معده ناشی از استرس در موش صحرایی، از روش فیزیکی غوطه‌ور کردن حیوان در آب سرد استفاده شده است. حیوانات به مدت یک ساعت در آب ۱۸ تا ۲۱ درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور شده و پس از ۴ ساعت زخم‌های ایجاد شده در مخاط معده آنها به روش ماکروسکوپی شمارش و با امتد  $J. Score$  اندازه‌گیری شده است.

**یافته‌ها، نتیجه گیری:** نتایج ما نشان داد که:

- ۱- پیش مداوای حیوانات با ملاتونین بطور وابسته به دوز ایجاد زخم معده توسط استرس را کاهش می‌دهد.
- ۲- آنزیم نیتریک اکساید سینتاز با  $L-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME)$  باعث تشدید زخم معده ناشی از استرس می‌شود.
- ۳- ملاتونین ایجاد زخم معده ناشی از استرس و  $L-NAME$  را نیز کم می‌کند. به این ترتیب به نظر می‌رسد عملکرد حفاظتی ملاتونین از طریق افزایش تولید نیتریک اکساید می‌باشد.

## مقدمه

از عوامل مهم دخیل در ایجاد زخم معده می‌توان به افزایش ترشح اسید و پپسین، کاهش جریان خون مخاطی، کاهش سنتز پروستاگلاندین‌ها، کاهش تولید اکسید نیتریک و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اشاره کرد که روش‌های فیزیکی ایجاد زخم معده از جمله استرس با تأثیر بر بعضی از این عوامل عمل می‌کنند. داروهای مختلفی که بتوانند به نحوی اثر عوامل ایجاد کننده زخم معده را خنثی کنند اثر ضد زخم معده خواهند داشت (۱،۲).

ملاتونین هورمونی است که در اپی‌فیز و بعضی بافت‌های دیگر از جمله دستگاه گوارش از سروتونین سنتز می‌شود و مسئول تنظیم سیکل خواب و بیداری است و نیز اثرات دیگری مثل حفاظت در برابر اکسید کننده‌های آندوژن (۳،۴)، جلوگیری از پیری و مؤثر بودن در درمان افسردگی و عفونت با HIV و انواع سرطان به آن نسبت داده شده است. از عوامل مهم و شناخته شده دفاعی در مخاط دستگاه گوارش می‌توان به موکوس (ماده مخاطی گلیکوپروتئینی)، بی‌کربنات سدیم، جریان خون دستگاه گوارش، پروستاگلاندین‌ها و اکسید نیتریک اشاره نمود. بعضی از این عوامل اثر خود را با خاصیت جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد اعمال می‌کنند. رادیکال‌های آزاد، الکترون جفت نشده دارند و چون تمایل به گرفتن الکترون برای جفت کردن الکترون‌های خود دارند اکسید کننده می‌باشند و به پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA حمله می‌کنند و به آن‌ها آسیب می‌زنند. از مهمترین رادیکال‌های آزاد می‌توان به رادیکال آزاد سوپراکسید و رادیکال آزاد هیدروکسیل اشاره نمود. از عوامل ضد رادیکال آزاد بدن می‌توان ویتامین E، ویتامین C، ملاتونین، سلنیوم، گلوتاتیون پراکسیداز، سوپر اکساید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز را برشمرد که سلول‌ها را در مقابل غلظت بالا و خطرناک رادیکال‌های آزاد محافظت می‌نمایند. با توجه به اینکه رادیکال‌های آزاد در ایجاد زخم معده دخالت دارند، تحقیقات برای پیدا کردن ترکیباتی که بعنوان آنتی‌اکسیدان عمل کرده، اثر ضد زخم داشته باشند ادامه دارد. در این مطالعه اثر ملاتونین روی زخم معده ناشی از استرس در موش صحرایی مورد

مطالعه قرار گرفته است. این ماده از عوامل حفاظتی بدن در مقابل رادیکال‌های آزاد شناخته شده است و در ضمن تولید گلوتاتیون پراکسیداز را افزایش می‌دهد. اثر دیگر ملاتونین القاء تولید نیتریک اکساید است. نیتریک اکساید از راه‌های مختلف روی غشاء دستگاه گوارش ایجاد نقش حفاظتی اعمال می‌کند.

## مواد و روشها

این مطالعه بر روی موش‌های صحرایی نر از نوع albino به وزن ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم انجام گرفته است. حیوانات از ۴۸ ساعت قبل از مطالعه از دسترسی به غذا محروم می‌شدند ولی به آب آشامیدنی دسترسی داشتند. حیوانات در قفس‌هایی نگهداری می‌شدند که امکان دسترسی به مدفوع خود را نیز نداشته باشند. اصول اخلاقی برای بررسی حیوانات (۵) مورد ملاحظه قرار می‌گرفت. حیوانات با ضربه به سر به صورت آبی کشته شده و در حالت بی‌دردی کامل، شکم آنها باز می‌شد.

برای تهیه محلول‌های دارویی، ملاتونین را در نرمال‌سالین و L-NAME را در آب مقطر حل کردیم. حیوانات به پنج گروه تقسیم شدند:

۱- گروه نرمال‌سالین: حیوانات این گروه دو بار، هر بار یک میلی‌لیتر نرمال‌سالین از راه داخل صفاقی دریافت می‌کردند (جدول ۱).

۲- گروه استرس شاهد: حیوانات این گروه پس از تزریق نرمال‌سالین (مثل گروه ۱) از طریق غوطه‌ور کردن در آب ۱۸ تا ۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت در معرض استرس قرار می‌گرفتند.

۳- گروه ملاتونین: در این گروه به ۶ زیر گروه دوزهای ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن حیوانات ملاتونین از راه داخل صفاقی تزریق کرده و نیم ساعت بعد مانند گروه استرس به آنها به مدت یک ساعت استرس داده می‌شد.

برای محاسبات آماری از نرم افزار SPSS و روش آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد و  $P < 0.05$  را اختلاف معنی دار در نظر گرفتیم.

## یافته ها

استرس ایجاد شده از طریق غوطه‌وری حیوانات در آب در همه حیوانات ایجاد زخم کرد در حالیکه در حیوانات گروه کنترل زخمی در معده ملاحظه نشد. ملاتونین بصورت وابسته به دوز در مقابل زخم ایجاد شده توسط استرس ایجاد اثر حفاظتی نمود (جدول ۱) و با دوز ۱۰ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن Score J. را از  $30.67 \pm 1.28$  به  $7.0 \pm 0.43$  کاهش داد. تزریق داخل صفاقی L-NAME قبل از استرس باعث تشدید اثر زخم‌زایی استرس شد و Score J. را به  $60.67 \pm 1.88$  افزایش داد، ولی تزریق ملاتونین در حیواناتی که همزمان تحت استرس و درمان با L-NAME بوده باعث کاهش Score J. به  $21.81 \pm 0.72$  گردید (جدول ۱).

۴- گروه L-NAME: در حیوانات این گروه به هر حیوان ۱۰ mg برای هر کیلوگرم وزن بدن L-NAME از راه داخل صفاقی تزریق کرده و نیم ساعت بعد، مثل گروه استرس به آنها به مدت یک ساعت استرس داده می‌شد.

۵- گروه L-NAME و ملاتونین: در این گروه ابتدا به حیوانات ۱۰ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن L-NAME تزریق شد. نیم ساعت بعد ۱۰ mg/kg ملاتونین تزریق شد و ۳۰ دقیقه بعد به مدت یک ساعت به آنها استرس وارد شد.

حیوانات گروه نرمال‌سالین ۲/۵ ساعت پس از دومین تزریق نرمال‌سالین و تمام گروه‌ها ۲/۵ ساعت پس از اتمام زمان استرس، کشته شده و بلافاصله بعد از ایجاد شکاف در ناحیه شکم، معده را از بدن خارج کرده و از ناحیه انحنای کوچک شکافته و پس از شستشوی آن با نرمال‌سالین، آسیب‌های مخاطی ایجاد شده را بصورت ماکروسکوپی بررسی کرده و عدد Score J. را بدست آوردیم (۶). تعداد زخم کوچک‌تر از یک میلی‌متر را a، تعداد زخم‌های بین ۱ تا ۲ میلی‌متر را b و زخم‌های بزرگتر از ۲ میلی‌متر را c نامیده و J را از رابطه زیر حساب کردیم:

$$J = a + 2b + 3c$$

جدول شماره ۱- اثر ملاتونین، L-NAME و ملاتونین همراه L-NAME بر زخم معده ناشی از استرس

P	J. Score Mean ± sem (n=6)	زمان (ساعت)				گروه مورد آزمایش
		۴	۲/۵	۱	۰/۵	
—	—	کشته شدن	استراحت	نرمال‌سالین	—	گروه نرمال‌سالین
—	$30.67 \pm 1.28$	کشته شدن	استراحت	استرس	نرمال‌سالین	گروه استرس شاهد
$P < 0.05$	$26.8 \pm 0.37$	کشته شدن	استراحت	استرس	ملاتونین (۰/۲۵)	گروه ملاتونین (۱)
$P < 0.001$	$21.00 \pm 0.71$	کشته شدن	استراحت	استرس	ملاتونین (۰/۵)	گروه ملاتونین (۲)
$P < 0.001$	$15.82 \pm 0.75$	کشته شدن	استراحت	استرس	ملاتونین (۱)	گروه ملاتونین (۳)
$P < 0.001$	$10.00 \pm 0.77$	کشته شدن	استراحت	استرس	ملاتونین (۲/۵)	گروه ملاتونین (۴)
$P < 0.001$	$8.17 \pm 0.75$	کشته شدن	استراحت	استرس	ملاتونین (۵)	گروه ملاتونین (۵)
$P < 0.001$	$7.00 \pm 0.43$	کشته شدن	استراحت	استرس	ملاتونین (۱۰)	گروه ملاتونین (۶)
$P < 0.001$	$60.67 \pm 1.88$	کشته شدن	استراحت	استرس	—	گروه L-NAME (۱۰)
$P < 0.001$	$21.81 \pm 0.72$	کشته شدن	استراحت	استرس	ملاتونین (۱۰)	گروه L-NAME و ملاتونین (۱۰)

## بحث

نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن می‌باشد. در ضمن نشان داده شده که نیتریک اکساید (NO) اثر حفاظتی روی سلول‌های مخاط معده دارد (۹). چون در مطالعات ما مهار تولید NO باعث تشدید اثر زخم‌زایی استرس شده و ملاتونین شدت زخم‌زایی استرس و L-NAME بطور همزمان را کاهش داده، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که ملاتونین احتمالاً به نحوی باعث تقویت مسیر تولید نیتریک‌اکساید شده و از این طریق سهمی در اثر ضد زخم معده این دارو ایفا می‌کند.

نتایج ما نشان داد که اثر زخم‌زایی استرس توسط ملاتونین خنثی ولی توسط L-NAME تشدید می‌شود و جلو اثر زخم‌زایی استرس همزمان با L-NAME نیز توسط ملاتونین گرفته می‌شود. چون استرس از طریق افزایش تولید رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند (۲،۷) و ملاتونین آنتی‌اکسیدان بوده و باعث کاهش رادیکال‌های آزاد در ضمن استرس می‌شود (۴،۸). می‌توان گفت احتمالاً اثر حفاظتی ملاتونین روی مخاط معده

## منابع

1. Yashikawa T, et al. Pathogenesis of stress-induced lesions, *J Clin Biochem* 1987; 2: 163-170.
2. Das D, et al. Hydroxy radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration, *Free radical Biol Med* 1997; 23(1): 8-18.
3. Martindale 2000; 1599-1600.
4. Lagneux C, et al. Protective effects of melatonin against ischemia reperfusion injury in isolated rat heart. *Life Sci* 2000; 66(6): 503-509.

5. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals 1983; 16: 106-110.
6. Morley JE, et al. Endogenous opioids and stress ulceration. *Life Sci* 1982; 31: 683-699.
7. Kato K, et al. Melatonin gastroprotective and antistress roles involve both central and peripheral effects. *J Gastroenterol* 2001; 36(2): 91-95.
8. Eliss A, et al. Melatonin increases the efficacy of ranitidine and omeprazole in reducing gastric damage. *J Pineal Res* 2002; 33(1): 1-7.
9. Kontunet JU, et al. Endogenous nitric oxide in the regulation of gastric secretory and motor activity in humans. *Aliment Pharmacol* 1990; 13(12): 1683-1691.