

5. årsoppgaven stadium IV
Høsten 2005
Medisinstudiet ved Universitetet i Tromsø

**Melatonin-nivået hos unge friske
personer i Nord-Norge og Sør-Norge**

**Er det forskjeller i melatonin-nivået mellom
nord og sør i den lyse og mørke årstiden?**

Forfattere:

Med.stud Morten L. Steen kull -00

Med.stud. Svein Olav Syverstad kull -00

Veileder:

Professor Bjarne Østerud

Innholdfortegnelse

Sammen drag.....	side 2
Innledning.....	side 2-3
Materiale og metode.....	side 4
Resultater.....	side 5-7
Diskusjon.....	side 8-10
Konklusjon.....	side 10
Litteratur.....	side 11

Sammendrag

Bakgrunn. Vårt prosjekt har som mål å undersøke om det er ulikheter i melatonin-nivået hos unge friske personer i Sør-Norge sammenlignet med Nord-Norge i den mørke og lyse årstiden. Det er vel kjent at melatonin er et søvnhormon som produseres når lysmengden avtar på retina (1, 2). Det er gjort mye forskning på dette feltet, men det er fremdeles uenighet om hvorvidt det er forskjeller i melatonin-nivå i befolkningen i nord hvor det er mørketid sammenlignet hvor det ikke er mørketid.

Material og metode. Vi har testet to grupper i juni og to grupper i desember, i Sør-Norge og Nord-Norge. Hver gruppe bestod av 40 personer med en stor overvekt av menn. Disse ble rekruttert fra militærleirene på Sætermoen og Kongens Garde på Røa. Alle prøvene ble tatt på morgenen mellom kl. 0800 og 0900 på sommeren og mellom kl. 0900 og 1000 på vinteren. Prøvene ble analysert med The Buhlmann Melatonin enzym linked immunosorbent assay (ELISA) på Biokjemisk avd. ved Universitetet i Tromsø.

Resultater. Våre resultater viser signifikante forskjeller mellom unge friske personer i Sør-Norge sammenlignet med Nord-Norge i den mørke årstiden, p-verdi viser $0,005 > P > 0,002$. På sommeren er det også forskjeller mellom Sør-Norge og Nord-Norge, men disse er ikke signifikant høyere, p-verdi viser $0,1 > P > 0,05$. Videre er det signifikant høyere melatonin nivå på sommeren i sør enn på vinteren i sør, p-verdi $0,02 > P > 0,05$. Sammenligning mellom sommeren og vinteren i nord viser ingen signifikante verdier, p-verdi $P > 0,5$.

Innledning

Søvnhormonet melatonin syntetiseres hovedsakelig i epifysen. I tillegg er det holdepunkter for syntese i retina, linsen, ovarier og en rekke blodelementer, deriblant mononukleære leukocytter. Hormonet er et N-acetyl-5-metoxy-tryptamin, og ble først oppdaget i 1958. Forløperen er den essensielle aminosyren tryptofan, hvor inntaket av denne er med på å regulere produksjonen av melatonin. Tryptofan omdannes via serotonin til melatonin. I løpet av de tre første månedene av livet er det en liten melatonin produksjon. Etter dette starter syntesen, hvor nivået er på sitt høyeste rundt ett til tre års alderen og varer frem til voksen alder. Senere avtar syntesen gradvis i alderdommen (4, 5).

Melatonin produksjonen har en 24-timer syklus. Den styres av lysmengden, hvor en har lave konsentrasjoner om dagen og høye konsentrasjoner om natten. Lyset overføres fra retina via "tractus retinohypothalamic to suprachiasmatic nucleus (SCN)" som er et senter for døgnrytmereguleringen. Melatonin virker på egne reseptorer som er lokalisert blant annet på SCN, cerebellum, retina, nyrer, ovarier og blodårer. Det er til nå påvist tre melatonin reseptorer med flere subtyper, hvor MT1- og MT2 reseptorene er G-proteinbundet. Reseptor tettheten og sensitiviteten varierer gjennom døgnet, hvor lysmengden og melatonin selv er viktige modulerende faktorer. I tillegg finnes det andre faktorer som enda ikke er identifisert og som kan innvirke på reseptorenes egenskaper, og som vil være viktig i behandlingen av melatonin relaterte sykdommer (6, 7).

Nyere studier har vist at melatonin har en anti-inflammatorisk effekt i mikrosirkulasjonen. En har målt en nedregulering av inflammatoriske mediatorer, deriblant leukotrien B₄, IL-8, TNF- α (4). Videre er det vel kjent at hormonet har en kraftig antioksidativ effekt som følge av sin hydroksyl gruppe og kan dermed nøytralisere to OH⁻ grupper. Lipopolysakkarid (LPS) fra Gram-negative bakterier kan generere frie radikaler, hvor melatonin kan ha en beskyttende effekt mot LPS induert inflammasjon (4). Siden dette hormonet har vært kjent lenge, er det fremdeles mye som ikke er besvart, spesielt sammenligninger mellom nord og sør.

I denne oppgaven skal vi belyse om hvorvidt det er forskjeller i melatonin nivået hos unge friske personer i Sør-Norge sammenlignet med Nord-Norge i den mørke og lyse årstiden. Frem til nå er det ikke publisert artikler som kan vise denne forskjellen mellom nord og sør i landet. Det er derimot gjennomført et studie i Tromsø hvor det er gjort en rekke målinger av melatonin gjennom hele året. Studiet viser at det er forskjeller i verdiene mellom sommer og vinter i byen (3). Videre er det mange andre studier som beskriver melatonin og dets potensielle egenskaper.

Material og metode

Vi rekrutterte totalt 160 personer fra militærleierne på Sætermoen i Troms og Røa i Oslo. Det deltok 40 soldater i hver gruppe som deltok i prosjektet. Inklusjonskriterium for denne deltakelsen var at de var friske og hadde vært stasjonert i leiren i minst tre måneder. Det ble ikke gjort noen selektiv utvalg, hvor soldatene frivillig kunne delta på studiet. Studiet tok ikke hensyn til om noen hadde vært på permisjon eller gjort spesielle aktiviteter som kunne innvirke på resultatet.

Det ble i forkant gitt muntlig og skriftlig informasjon om hva studiet innebar. Soldatene gjorde et skriftelig samtykke til deltakelse. Undersøkelsen ble vurdert av etisk komite 2003. Hovedvekten av deltakerne var menn som skulle avtjene sin verneplikt.

Selve prøvetakningen ble gjort i juni og desember måned i 2003. Vi startet på sommeren i Nord-Norge og gjorde det samme i Sør-Norge noen dager senere. Samme prosedyre ble gjentatt i desember. Det ble ikke registrert hvor mange av disse personene som var med på den første målingen i juni. Alle blodprøvene ble tatt innenfor en time, hvor en på sommeren startet kl 0800 og på vinteren kl 0900. Prøvene ble tatt på EDTA glass og sentrifugert. Videre pipeterte vi ut 0,5ml plasma som vi så lagret ved -70°C .

Melatonin ble ekstrahert fra plasma med hjelp av C_{18} -kolonner og direkte påvisning med ELISA. Vi startet med å sette åtte C_{18} -kolonner på vakuumsug. Neste trinn var kondisjonering, hvor en tilførte 2x1ml metanol og 2x1ml destillert vann. Tilsatte 0,2ml plasma pr kolonne og vasket C_{18} -kolonnene med 2x1ml 10% metanol og 1ml heksan. Til slutt tilsatte vi 1ml metanol og vasket ut melatonin. Produktet ble så evaporert til det ble tørt, før vi tilsatte 0,25 ml buffer. Prøvene ble på nytt frosset ned. Brukte deretter The Buhlman Melatonin enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for direkte kvantitativ påvisning av melatonin. Sensitivitet og spesifisitet er ikke opplyst i ELISA brosjyren fra forhandler.

I vår fremstilling av det innsamlede datamaterialet har vi brukt to utvalgs t-test med små utvalg.

Resultater

Vi tok 40 blodprøver i Nord-Norge og 40 blodprøver i Sør-Norge i juni 2003. Dette gjentok vi i desember samme år. I to av blodprøvene som ble tatt i desember i Nord-Norge var ikke melatoninnet målbart med ELISA. Vi satt da igjen med 158 melatonin-verdier fra Nord-Norge og Sør-Norge, sommer og vinter.

Tabell 1 viser en oversikt på ulike statistiske data for de ulike årstidene i Nord-Norge og Sør Norge. Resultatene viser at melatonin verdiene i plasma i desember er signifikant høyere i Nord-Norge enn de er i Sør Norge, men forskjellen om sommeren er ikke signifikant selv om verdien er 40 % høyere i Nord Norge enn i Sør-Norge. Fig 1. viser resultatene for prøvene tatt på vinterstid i Nord-Norge og i Sør-Norge. Fig 2. viser resultatene for prøvene tatt på sommeren i Nord-Norge og i Sør-Norge. Fig 3. viser resultatene for prøvene tatt i Sør-Norge på vinter- og sommertid. Fig 4. viser resultatene for prøvene tatt i Nord-Norge på vinter- og sommertid.

Tabell 1

STAT	SN	SS	VN	VS
Snitt	20,3	14,5	18,1	8,2
Median	14,2	14,5	13,8	4,2
Varians	291,1	72,1	272,6	163,7
St-avvik	16,9	8,4	16,3	12,6
P-verdi	Ikke signifikant, men 40% høyere i nord enn i sør, med $0,1 > P > 0,05$.		Signifikant høyere i nord enn i sør, med $0,005 > P > 0,002$.	

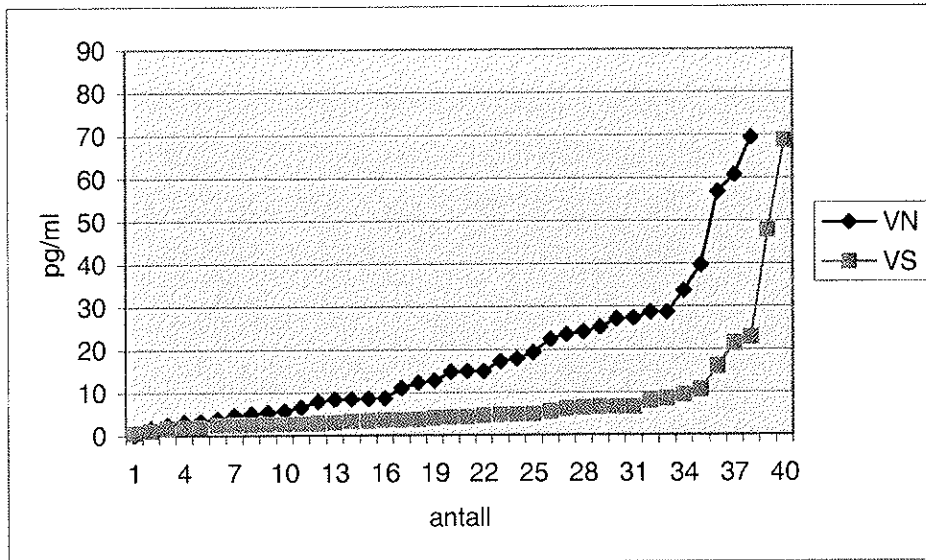
Statistiske data på melatonin-nivåer i Nord-Norge og i Sør-Norge, sommer og vinter.

SN=sommer Nord-Norge, SS=sommer Sør-Norge,

VN=vinter Nord-Norge, VS=vinter Sør-Norge.

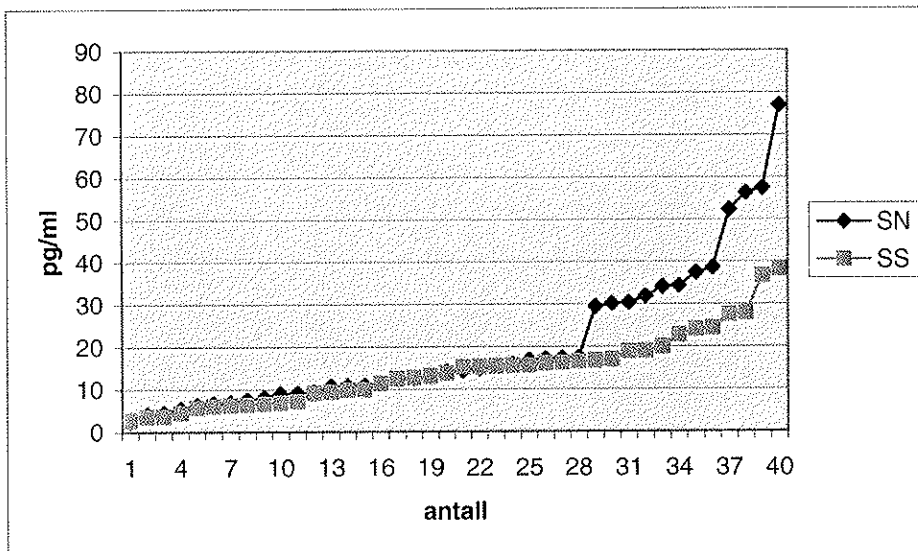
Alle verdiene, bortsett fra P-verdier, er oppgitt i pg/ml i plasma.

Figur 1



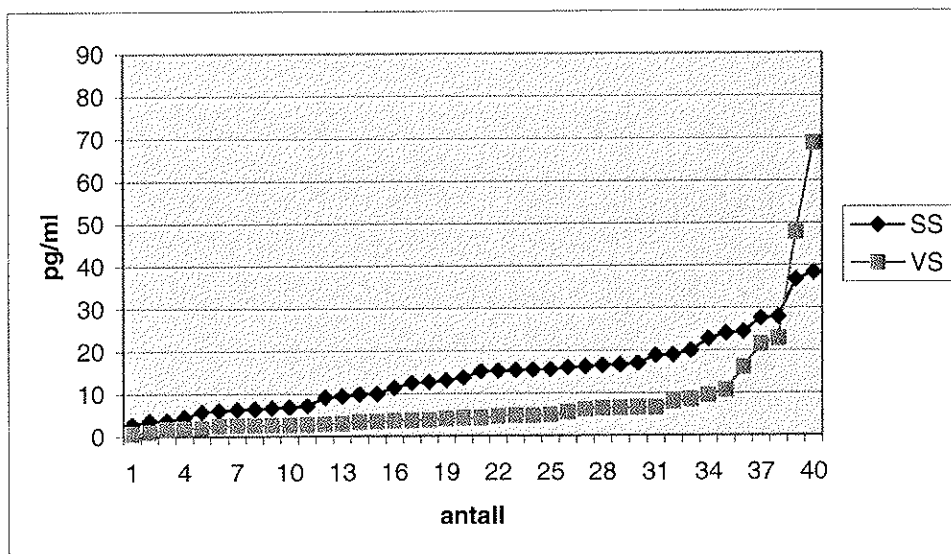
Melatonin verdier målt i pg/ml av de vernepliktige, vinter Nord-Norge og vinter Sør-Norge. Melatonin nivået er signifikant høyere i Nord-Norge i forhold til i Sør-Norge med $0,002 > P > 0,005$. VN=vinter Nord-Norge, VS=vinter Sør-Norge.

Figur 2



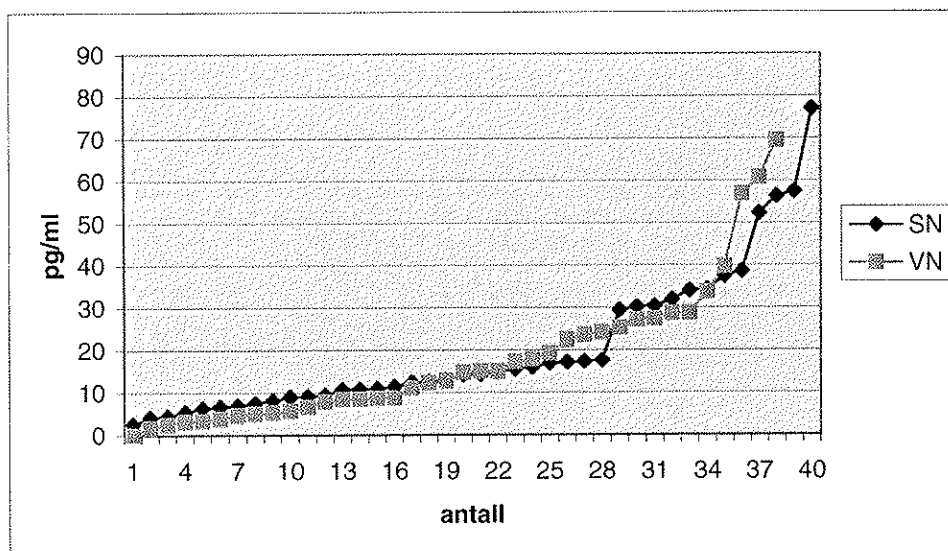
Melatonin verdier målt i pg/ml av de vernepliktige, sommer Nord-Norge og sommer Sør-Norge. Melatonin nivået er høyere i Nord-Norge enn i Sør-Norge, men ikke signifikant høyere, $0,1 > P > 0,05$. SN=sommer Nord-Norge, SS=sommer Sør-Norge.

Figur 3



Melatonin verdier målt i pg/ml av de vernepliktige, vinter Sør-Norge og sommer Sør Norge. Melatonin nivået er signifikant høyere på sommeren enn på vinteren med $0,02 > P > 0,05$. SS=sommer Sør-Norge, VS=vinter Sør-Norge.

Figur 4



Melatonin verdier målt i pg/ml av de vernepliktige, vinter Nord-Norge og Sommer Nord-Norge. Melatonin nivået er høyere på sommeren enn på vinteren, men ikke signifikant høyere med $P > 0,5$. SN=sommer Nord-Norge, VN=vinter Nord-Norge.

Diskusjon

Vår studie viser at melatonin nivået er høyere på de nordlige breddegrader sammenlignet med sørligere breddegrader. Dette er ikke overraskende med hensyn til målingene i desember da det er mørketid i Nord-Norge, mens det fortsatt er betydelig sollys i Sør-Norge. Siden melatonin nivået reguleres av lyset på øynene, er det imidlertid overraskende at nivået av melatonin også er høyere i Nord-Norge enn i Sør-Norge om sommeren. Videre er det oppsiktsvekkende at både i Sør-Norge og i Nord-Norge er verdiene høyere om sommeren enn om vinteren.

Dette siste fenomenet kan forklares ved at blodprøvene til melatonin analysene ble foretatt mellom kl. 0800 og 0900 på sommertid, mens de ble utført mellom kl. 0900-1000 i desember. Det innebærer at nivået av melatonin har fått anledning til å bli redusert mer i soldatene der prøvene ble tatt mellom kl 0900-1000 på vinteren. Melatonin nivået er kjent for å være høyest sent på natten for så å synke raskt tidlig på morgenen/formiddagen. Dette kan antagelig delvis forklare det høyere melatonin nivået i desember sammenlignet med juli måned. En annen forklaring på de høyere verdiene om sommeren sammenlignet med vinterverdiene er at biorytmen til folk blir forskjøvet om sommeren som følge av lys lenge på kvelden og natten. Dette er antagelig mer utbredt langt nord sammenlignet med for eksempel Sør-Norge. Denne forandringen i biorytme ble observert av Stokkan (3), hvor melatonin nivået ble målt i spytt til forskjellige tider på døgnet og gjennom de forskjellige årstider. I en annen studie på 20 studenter hvor melatonin nivået ble målt kl 0800 i desember, mars, juni og september ble det vist at melatonin nivået var høyest i desember, svært mye lavere og ganske likt i mars og september (vår- og høst- jamndøgn), mens nivået i juni (St.hans) var en mellomting mellom desember og mars/september (Fjærli og Østerud, upubliserte data). Dette er blitt tolket dit hen at i juni er biorytmen så sterkt forskjøvet at melatonin nivået kl 0800 om morgenen fortsatt er svært høyt, og egentlig skulle man fremdeles vært i seng og sovet. Intervju med studentene bekreftet at i juni følte de seg svært trøtte om morgenen, noe som ganske sikkert har sammenheng med melatonin nivået.

I laboratoriet til Østerud har det i mange år blitt utført studier på effektene av å innta marine oljer hos mange hundre mennesker. I den forbindelse er blodcellenes aktivitet blitt testet ved å stimulere dem med lipopolysakkarider (LPS). Her ble det funnet at aktiviteten på blodcellene går opp om våren, mens den går ned utover høsten mot juletider (Østerud, upublisert). Siden

melatonin i fysiologiske mengder (ned mot 10 pg/ml) ble påvist å ha nedregulerende effekter på LPS-stimulerte blodceller, er det fremsatt hypotese om at årstidsvariasjonene i melatonin i blodet er årsaken til de forandringer vi ser vår og høst på blodcelleaktiviteter (8).

Melatonin målingene bekrefter også at det er store individuelle variasjoner. For eksempel ser vi i fig. 2 at svært mange av soldatene i Sør-Norge og Nord-Norge har omtrent samme melatonin nivå om sommeren, men at det spesielt i Nord-Norge er noen som har betydelig høyere nivå enn de i Sør-Norge. Mest sannsynlig kan noe av dette tilskrives forandringene i biorytmen, men det kan også skyldes klare individuelle variasjoner. I studien på de 20 studentene ble det vist at noen av disse hadde svært lave nivåer av melatonin hele året, mens andre hadde svært høye nivåer. For å få et helhetlig bilde av melatonin nivåene skulle man utført melatonin målinger for eksempel annen hver time hele døgnet i både juli og desember.

Feilkilder er en faktor som nesten er umulig å unngå i en slik oppgave. Vi har prøvd å minimere disse ved at vi har brukt en gruppe som har tilnærmet samme alder, er i samme miljø og har tilnærmet samme døgnrytme. Fordelene med å bruke soldater i et slikt studie er at de står opp til samme tid om morgenen. Selv om det er overvekt av menn, så viser tidligere studier at det ikke er noen nivåforskjeller av melatonin mellom kjønnene (9). Det vi tror kan påvirke mest er geografisk tilholdsted og alder (10, 11).

Selve laboratorie testen er valid, men det kan være små pipeteringsfeil og ulik hastighet på gjennomkjøringen av de ulike kolonnene, selv om vi holdt oss innenfor en kolonnefart på maks 2 ml/min.

Som allerede omtalt, ble blodprøvene utført mellom kl. 0800 og 0900 på sommeren og mellom kl. 0900 og 1000 på vinteren. Det var helt nødvendig å utføre prøvene på samme tid i Nord-Norge og i Sør-Norge for i det hele tatt å kunne sammenligne resultatene. Selv om resultatet mellom Nord-Norge og Sør-Norge er relativt likt, er det ganske åpenbart at blodprøvetakningen med en times forskyvning, sommer og vinter, har påvirket resultatene.

Som også omtalt ovenfor, er det enkelte personer som har vesentlig høyere konsentrasjoner av melatonin enn gjennomsnittet. Dette kan en se både i den lyse og mørke årstiden. Flere årsaker kan ligge bak dette. Det kan bl.a. skyldes at enkelte individer bruker lengre tid før melatonin nivået er kommet ned til et akseptabelt nivå eller at de har en høyere produksjon av

melatonin enn andre (12). Siden vi ikke kjenner hver enkelts bakgrunn, kan en ikke avgjøre hva dette skyldes i vår undersøkelse. Det som vil være av stor interesse i fremtiden er å se hvordan høye/lave melatonin-nivåer kan være assosiert med ulike sykdommer.

Konklusjon

Gjennom vårt arbeid har vi avdekket at melatonin nivået om morgenen i Nord-Norge er signifikant høyere enn Sør-Norge på vinterstid, p-verdi viser $0,005 > P > 0,002$. På sommertid er det også forskjeller på 40 %, men de er ikke signifikant høyere, p-verdi viser $0,1 > P > 0,05$. Videre er det signifikante høyere melatonin nivå på sommeren i Sør-Norge enn på vinteren i Sør-Norge, p-verdi $0,02 > P > 0,05$. Vår siste sammenligning mellom sommeren og vinteren i Nord-Norge viser ingen signifikante verdier, p-verdi $P > 0,5$.

Dette viser at mørketiden i Nord-Norge gir et høyere melatonin-nivå enn i Sør-Norge, hvor det fortsatt er sollys. De høye verdiene på sommeren i Sør-Norge sammenlignet med vinterstid i Nord-Norge kan forklares med at biorytmen er forskjøvet om sommeren som følge av lengre lys på kvelden og natten, samt at blodprøvene på vinterstid ble tatt en time senere enn på sommertid.

Litteratur

1. P. Pevet. Melatonin: From Seasonal to Circadian Signal. *J. Neuroendocrinology*. 2003; 15: 422-426.
2. Paula A. Witt-Enderby, Jennifer Bennett, Michael J. Jarzynka, Steven Firestine and Melissa A. Melan. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Science direct - Life Sciences*. 2003; 72: 2183-2198.
3. Stokkan KA, Reiter RJ. Melatonin rhythms in Artic urban residents. *J Pineal Res*. 1994 ; 16: 33-6.
4. Paul D. Johe and Bjarne Østerud The in vivo effect of melatonin on cellular activation processes in human blood during strenuous physical exercise. *J Pineal Res*. 2005; 39: 324-330.
5. Pål-Didrik Hoff Roland. Melatonin – bruk og misbruk. *Tidsskr. Nor. Lægeforening*. 2001; 121: 1498-9.
6. Otfried M. Debus, Alexsander Lerchl, Hans W. Bothe, Janbernd Bremer, Barbara Fiedler, Meike Franssen, Jessica Koehring, Michaela Steils and Gerhard Kurlemann. Spontaneous central melatonin secretion and resorption kinetics of exogenous melatonin: a ventricular CSF study. *Journal of Pineal Research*. 2002; 33: Page 213.
7. Jiri Vanecek. Cellular Mechanisms of Melatonin Action. *Physiological Rewies*. 1998; 78: 687-721.
8. Fjærli O, Lund T, Østerud B. The effect of melatonin on cellular activation processes in human blood. *J Pineal Res*. 1999; 26: 50-55.
9. P. J. Nathan, E. L Wyndham, G. D. Burrows and T. R. Norman. The effect of gender on the melatonin suppression by light: a dose response relationship. *J. of Neural Transmission* 2000; 107: 271-279.
10. Erren TC, Piekarski C. Does winter darkness in the Artic protect against cancer? The melatonin hypothesis revisited. *Med Hypothesis*. 1999; 53: 1-5.
11. Sack RL, Lewy AJ, Erb DL, Vollmer WM, Singer CM. Human melatonin production decreases with age. *J Pineal Res*. 1986; 3: 379-88.
12. Bratlid T, Wahlund B. Alterations in serum melatonin and sleep in individuals in a sub-artic region from winter to spring. *Int J Circumpolar Health*. 2003; 62: 242-54.