

## مقایسه هورمون ملاتونین سرم افراد سالم و مبتلایان به میگرن

دکتر کورش فولادساز (استادیار)\*، دکتر محمد انصاری (استادیار)\*\*، دکتر محمدجواد رسایی (استاد)\*\*\*

\* دانشگاه علوم پزشکی زنجان

\*\* دانشگاه علوم پزشکی تهران

\*\*\* دانشگاه تربیت مدرس تهران

### چکیده

**مقدمه:** میگرن نوعی سردرد راجعه مزمن ارثی می‌باشد. در حال حاضر میلیون‌ها نفر در جهان از این بیماری باستانی رنج می‌برند. و بار اقتصادی عظیمی را بر جامعه تحمیل می‌نماید. علت اصلی انجام مطالعه این است که بر طبق شواهد و مقالات موجود هورمون ملاتونین به عنوان مهمترین محصول ترشحی غده پینه‌آل، قادر است در پیشگیری از بروز حملات میگرن مؤثر باشد.

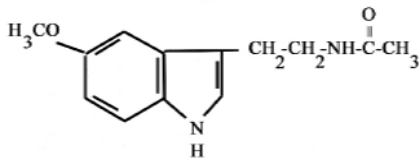
**مواد و روشها:** در این پژوهش غلظت ملاتونین شب هنگام سرم بیماران مبتلا به میگرن و افراد شاهد توسط کیت الیزا (ELISA) مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. ۵۰ بیمار میگرنی (اکثراً خانم‌ها و در محدوده سنی ۲۰-۴۰ سال) که بر طبق معیارهای IHS مورد تأیید متخصص مغز و اعصاب بودند با گروه شاهد (اکثراً آقایان و در محدوده سنی ۱۸-۴۴ سال) مورد مقایسه قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** آنالیز آماری نشان می‌دهد که غلظت ملاتونین شب هنگام افراد میگرنی ( $28/4 \pm 32/9$ ) نسبت به افراد شاهد ( $56/8 \pm 75/6$ ) کمتر است و از مقایسه غلظتهای ملاتونین سرم افراد شاهد و مبتلایان به میگرن با استفاده از t-test به روش کیت ELISA با  $P = 0/0064$  اختلاف معنی داری را نشان می‌دهد.

**نتیجه گیری و توصیه ها:** با توجه به نتایج فوق به نظر می‌رسد که ترشحات غده پینه‌آل نقش مهمی در همزمان نمودن موجود با شرایط محیطی و سردردهای میگرنی دارد.

مقدار غیر قابل آشکار تا ۲۰ پیکوگرم در میلی لیتر و تیر شبانه

## مقدمه



تا ۳۰۰ پیکوگرم در میلی لیتر هم می‌رسد. فاکتورهای مؤثر در غلظت ملاتونین شامل سیکل تاریکی - روشنایی، سیکل خواب- بیداری، جنس و سن، سیکل قاعدگی، داروهای مختلف و فصول می‌باشند. ملاتونین اثرات متفاوتی روی رادیکالهای آزاد، غدد آندوکروینی بدن، دستگاه گوارش، سیستم ایمنی جوندگان، تقسیمات لنفوسیت‌های خون داشته و بعنوان هورمون ضدپیری و ضد استرس شناخته شده است (۵،۶،۷). طبق گزارشات موجود ارتباطاتی میان ملاتونین و بسیاری از اختلالات نظیر سرطانها، ناهنجاریهای روانی، سیروز کبدی، پارکینسون، میگرن و غیره وجود دارد (۸،۹،۱۰). در مورد ارتباط میان میگرن و هورمون ملاتونین مطالعات قبلی متعددی انجام شده است که در آنها محققینی نظیر Silberstein Brun و Peres به اثرات هورمون ملاتونین در پیشگیری از بروز سردرد میگرن اشاره نموده‌اند (۱۱،۱۲،۱۳). هدف اصلی از انجام این پژوهش بررسی مقایسه‌ای غلظت ملاتونین شب هنگام افراد طبیعی و بیماران مبتلا به میگرن می‌باشد و اینکه غده پینه‌آل قادر است در همزمان نمودن موجود با شرایط محیطی و سردردهای میگرنی نقش مهمی داشته باشد و از اندازه‌گیری ملاتونین سرم می‌توان به عنوان شاخص تأیید بیماری میگرن استفاده نمود.

## مواد و روش‌ها

کیت ELISA ساخت شرکت IBL آلمان و نمونه‌های سرم شبانه افراد سالم و افراد مبتلا به میگرن (سنتز ملاتونین با برقراری تاریکی افزایش می‌یابد). روش انجام پژوهش به صورت مورد شاهدی (Case - Control) بوده که با استفاده از آزمون t-test انجام شده است و متغیرهای مداخله‌گر حذف گردیدند.

غده پینه‌آل یا صنوبری یک ارگان نورآندوکروینی است که نقش مهمی در حفظ تعادل وضعیت هموستاز در ارتباط با تغییرات شرایط محیطی دارد و ترشحات این غده در تنظیم تعداد زیادی از سازوکارهای عصبی و نورآندوکروینی شرکت می‌کند که شامل کنترل خواب، تخمک‌گذاری، رهاسازی گونادوتروپین‌های مختلف و ریتمهای بیولوژیک می‌باشد که مهمترین محصول ترشحی این غده، ملاتونین (۵-متوکسی-N-استیل تریپتامین) می‌باشد (۱،۲).

ملاتونین یا ۵-متوکسی-N-استیل تریپتامین حدوداً ۴۰ سال پیش ساختمانش روشن شد و توسط Lerner et al مشخص شد که از خانواده متوکسی اندولها می‌باشد و به صورت زیر است (۳).

### ساختمان شیمیایی ملاتونین

این هورمون با وزن مولکولی کم (۲۳۲/۲) توسط غده پینه‌آل مهره‌داران از اسیدآمینه تریپتوفان سنتز می‌شود و سنتز آن توسط رهاسازی نورآدرنالین از نورون‌های سمپاتیکی فراوان پینه‌آل، تسریع می‌شود (۳).

نیمه عمر ملاتونین پلاسما ۵۰-۲۰ دقیقه می‌باشد. ملاتونین ملکولی شدیداً لیپوفیل بوده و اغلب به پروتئین‌های حامل از جمله آلبومین بطور برگشت پذیر متصل می‌شود و به راحتی از سد خونی مغزی (BBB) عبور می‌کند (۴).

مسیرهای متابولیکی ملاتونین از گونه به گونه متفاوت می‌باشد. محل اصلی متابولیسم هورمون در کبد و مغز می‌باشد. در مورد ملاتونین مطالعات زیادی روی انسان و حیوانات انجام شده است که این هورمون را بعنوان یک ساعت بیولوژیک آندوژن در تنظیم بیوریتیم‌های شبانه روزی مطرح می‌سازد. در انسان نقش‌های ملاتونین در دست تحقیقات است که پدیده‌هایی مانند دپرسیون، شیزوفرنی، خواب و بیداری، ناهنجاریهای مربوط به خواب، پیری، بلوغ جنسی و تنظیم ایمنی همگی در ارتباط با ملاتونین هستند (۱،۲،۳).

غلظت ملاتونین پلاسما و مایع مغزی نخاعی و بزاق دارای تغییرات شبانه‌روزی می‌باشد. تیر روزانه پلاسمایی ملاتونین از

۶- پس از تبخیر حلال در ۳۷ درجه سانتیگراد، باقیمانده در ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر حل شده و آماده سنجش می‌باشد.

### روش سنجش ملاتونین توسط کیت الیزا (IBL):

- ۱- از هر کدام از استانداردها و سرم‌ها که استخراج شده‌اند ۵۰ میکرولیتر در چاهک‌ها ریخته شد.
- ۲- ۵۰ میکرولیتر کونژوگه ملاتونین - بیوتین و ۵۰ میکرولیتر آنتی سرم اضافه شد.
- ۳- به مدت ۲۰-۱۴ ساعت در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.
- ۴- توسط بافر سنجش ۳ مرتبه شستشو شده و با کوبیدن روی کاغذ صافی کاملاً خشک شد.
- ۵- ۱۵۰ میکرولیتر کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه شد.
- ۶- به مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای اتاق (در روی شیکر) قرار داده شد.
- ۷- مرحله ۴ تکرار شد.
- ۸- ۲۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا (PNPP) به هر چاهک اضافه شد.
- ۹- به مدت ۴۰-۲۰ دقیقه در حرارت اتاق در روی شیکر با دور زیاد قرار گرفت.
- ۱۰- ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده واکنش به هر چاهک اضافه شد.
- ۱۱- سپس در طول موج ۴۰۵ نانومتر جذب نوری قرائت شد.

## یافته‌ها

در این مطالعه ۳۰ نمونه سرم نرمال و ۵۰ نمونه افراد مبتلا به میگرن برای سنجش ملاتونین با کیت ELISA مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت با استفاده از رسم منحنی استاندارد مربوطه، غلظت نمونه‌های سرمی افراد نرمال و افراد مبتلا به میگرن محاسبه شد (شکل ۱).

طبق گزارشات مقالات، مقدار سرمی ملاتونین با افزایش سن به شدت کاهش یافته ولی میزان ملاتونین وابسته به جنس نمی‌باشد، از افراد سالم که از نظر سلامت و عدم ابتلا به بیماری مورد تأیید پزشک بودند به تعداد ۳۰ نفر از آنها خونگیری در ساعت ۱۱/۵ شب و زیر نور کم به عمل آمد. داوطلبین اکثراً آقایان (۴ زن و ۲۶ مرد) و در محدوده سنی ۱۸ تا ۴۴ سالگی (میانگین ۳۰ سال) بودند. توسط سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سرم‌ها جدا گردیده و تا زمان آزمایش در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و دنا توراسیون حرارتی و استخراج قبل از سنجش انجام شد. از ۵۰ نفر میگرنی (اکثراً خانم‌ها) که با بررسی وجود نشانه‌های میگرن طبق معیارهای IHS (International Headache Society) مورد تأیید متخصص و جراح مغز و اعصاب بودند در ساعت ۱۱/۵ شب با هماهنگی خود بیماران و در محل مسکونی آنها در زیر نور کم چراغ خونگیری به عمل آمد. پس از خونگیری، توسط سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سرم‌ها جدا گردیده و تا زمان آزمایش در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند بیماران یک هفته به زمان خونگیری تا زمان خونگیری به غیر از مسکن از دارویی دیگر استفاده نکردند. بیماران اکثراً خانم‌ها بودند و در محدوده سنی ۴۰-۲۰ سال (میانگین ۲۷ سال) قرار داشتند.

### روش اندازه‌گیری کیت ELISA (ساخت شرکت IBL

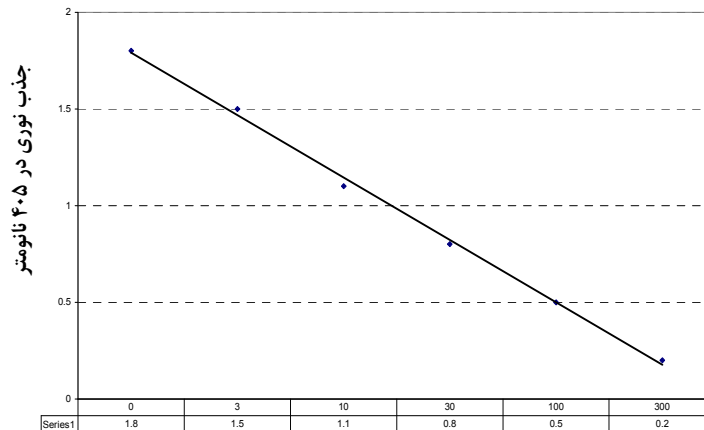
آلمان):

روش استخراج فاز جامد (Solid phase extraction)

سرم و استانداردها:

- ۱- ستون آماده Sep-pak توسط متانول مطلق دو مرتبه شستشو شد.
- ۲- سپس توسط آب مقطر دو مرتبه شستشو شد.
- ۳- ۰/۵ میلی لیتر از سرم یا استانداردهای روی ستون ریخته شد.
- ۴- سپس توسط متانول ۱۰٪ یک مرتبه شسته شد.
- ۵- در پایان با استفاده از متانول مطلق، محلول خروجی جمع‌آوری شد.

Standard curve of IBL kit (ELISA)



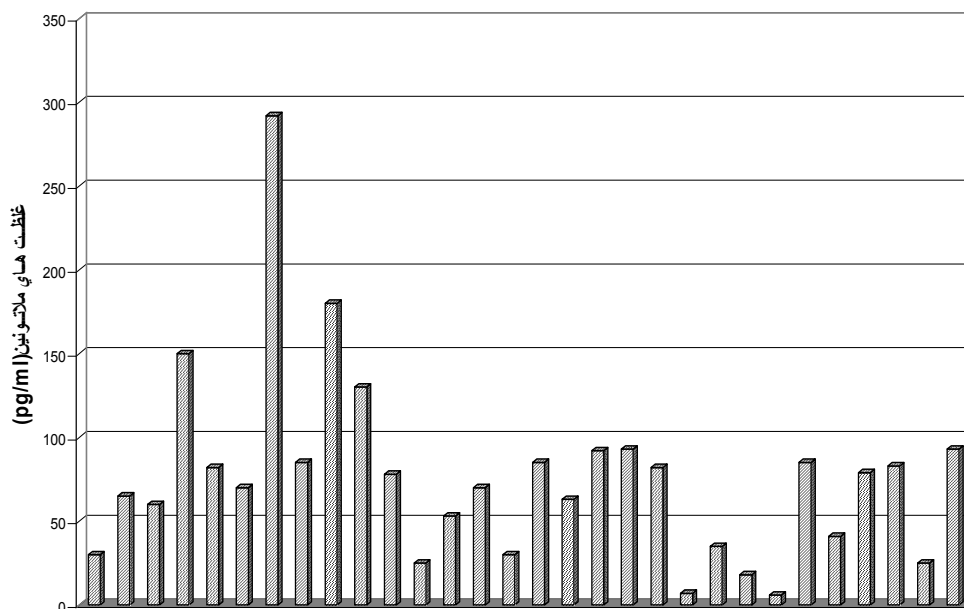
ملاتونین (Pg/ml)

شکل شماره ۱-

این مقادیر توسط کیت ELISA به ترتیب  $۵۶/۸ \pm ۷۵/۶$  و  $۳۲/۹ \pm ۲۸/۴$  می‌باشند.

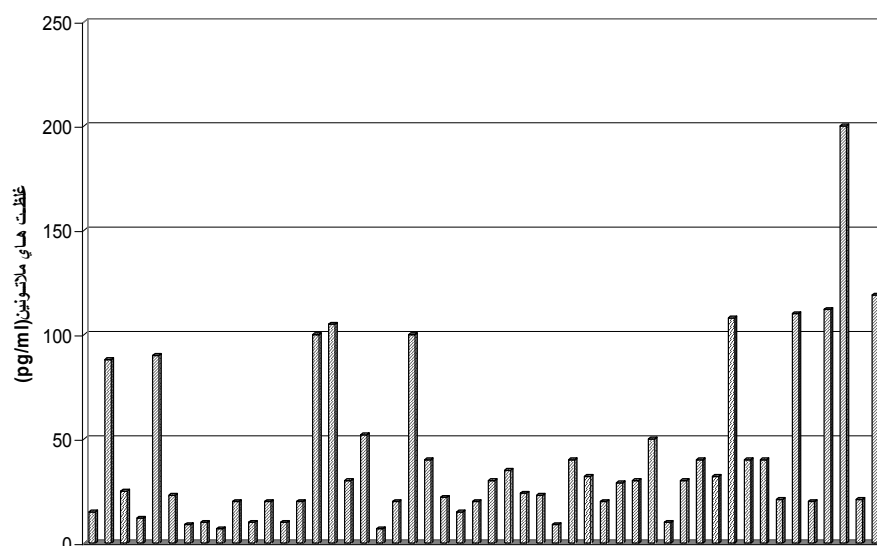
شکل‌های (۲ و ۳) منحنی‌های هیستوگرام مربوط به غلظت‌های ملاتونین نمونه سرم افراد نرمال و افراد میگرنی می‌باشند.

بر طبق مطالعه Claustrat و همکاران (۱۴) مقادیرهای متوسط ملاتونین را در ۴۶ نمونه نرمال (نمونه‌های ۱۱/۵ شب) در محدوده  $۳۲/۲ \pm ۵۲/۱$  و در مورد ۳۸ نمونه میگرنی در محدوده  $۱۳/۴ \pm ۱۹/۱$  گزارش نمودند که در تحقیق کنونی



تعداد نمونه‌ها

شکل ۲- منحنی هیستوگرام مربوط به غلظت‌های ملاتونین نمونه‌های سرم افراد نرمال به روش کیت الایزا



تعداد نمونه‌ها

شکل ۳- منحنی هیستوگرام مربوط به غلظت‌های مالتونین نمونه‌های سرم افراد میگرنی به روش کیت الیزا

## بحث

علائم، انسان‌های ما قبل تاریخ نیز به میگرن مبتلا می‌شده‌اند. شیوع میگرن با سن تغییر می‌کند و تا سن ۴۰ سال افزایش یافته و بعد از آن کاهش می‌یابد. میگرن به صورت حملات (دوره‌ای) راجعه سردرد بروز می‌کند و شدت و مدت آن به طور وسیعی متغیر بوده و معمولاً حملات یک طرفه هستند.

در بیماران میگرنی، غالباً کاهش مالتونین پلاسما و ادرار مشاهده می‌شود و این کمبود در بروز میگرن نقش احتمالی دارد. بطوریکه تغییرات مالتونین را در پاتوژنز میگرن موثر می‌دانند. در مورد ارتباط مالتونین و میگرن دلایلی وجود دارد:

۱) عملکرد غیرطبیعی غده پینه‌آل می‌تواند به حملات میگرنی منجر شود. این بیماری ناهنجاری دوره‌ای بوده و غده پینه‌آل به عنوان ارگانی تطابقگر، از طریق مالتونین با تنظیم دقیق ریتمهای بیولوژیکی، هموستاز مغزی را تنظیم و حفظ می‌نماید.

۲) در بروز حملات میگرن، تغییرات فصلی و روزانه وجود داشته که در ارتباط با تغییرات دوره‌ای ترشح مالتونین است.

سردرد یکی از شایع‌ترین شکایاتی است که پزشک با آن مواجه می‌شود. امروزه این عارضه گریبانگیر اغلب افراد نوع بشر است. در مورد مکانیسم درد مجموعه‌ای میتوان گفت که اتساع سرخرگهای داخل یا خارج جمجمه‌ای (و احتمالاً حساس شدن این رگها) به هر علتی که باشد، تولید درد می‌کند. میگرن، نوعی سردرد مزمن ارثی و بیماری مهم قرن حاضر می‌باشد که در بروز آن زندگی ماشینی، سروصدای ناشی از کارخانجات، مشکلات زندگی، فشارهای عصبی، روانی و اجتماعی نقش مهمی دارند. در جهان میلیون‌ها نفر از میگرن رنج می‌برند و مشکل اقتصادی عظیمی بر جامعه تحمیل می‌نماید به طوریکه عوامل انسانی و مدرن‌ترین ابزار و امکانات طبی برای درمان آن بسیج شده‌اند. معمولاً زنها (۲۹-۸٪) بیشتر از مردها (۱۹-۱٪) به سرردهای میگرنی مبتلا می‌شوند. میگرن یک بیماری باستانی است و با توجه به دلایل باستان‌شناسی و کشف آثار و

مبتلا به میگرن طبق معیار IHS مورد سنجش و مقایسه قرار گرفت. داوطلبین سالم اکثراً آقایان و در محدوده سنی ۱۸ الی ۴۵ سالگی بودند و بیماران میگرنی اکثراً خانم و در محدوده سنی ۲۰ الی ۴۰ سال قرار داشتند که بر اساس گزارش مقالات موجود مقدار ملاتونین با افزایش سن کاهش یافته ولی میزان ملاتونین وابسته به جنس نمی‌باشد.

برای اندازه‌گیری ملاتونین روشهای متفاوتی نظیر روش‌های بیولوژیکی، فلورومتری، انواع کروماتوگرافی و سنجش‌های ایمنی وجود دارد که از میان سنجش ایمنی می‌توان روش ELISA را نام برد که روشی مناسب و بی‌خطر می‌باشد.

در این پژوهش با استفاده از کیت ELISA ساخت شرکت IBL آلمان غلظت ملاتونین سرم اندازه‌گیری شد. روش کیت، سیستم بیوتین - آویدین می‌باشد و از آنزیم آلکالین فسفاتاز استفاده شده است که در ۴۰۵ نانومتر جذب نوری ماکزیمم دارد و همچنین از متانول مطلق به عنوان حلال استخراج کننده استفاده شده است و سیستم طراحی شده توسط کیت Solid phase extraction می‌باشد.

اندازه‌گیری ملاتونین در ۳۰ فرد نرمال و در ۵۰ فرد مبتلا به میگرن نشان می‌دهد که غلظت ملاتونین شب هنگام در افراد میگرنی نسبت به افراد نرمال کمتر است طبق گزارش Claustrat (۱۴) با مقایسه غلظت‌های ملاتونین سرم افراد نرمال و مبتلایان به میگرن  $P < 0/001$  اختلاف معنی‌دار بوده که از مقایسه غلظت‌های ملاتونین سرم افراد نرمال و مبتلایان به میگرن با استفاده از t-test به روش کیت الیزا  $P = 0/0064$  و اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهند و این نتایج با گزارشات منتشر شده توسط مقالات کاملاً مطابقت دارد. لازم به توضیح است که این پژوهش برای نخستین بار در کشور انجام شده است و در سطح بین‌المللی نیز تعداد مقالات موجود بسیار نادر می‌باشند.

نتیجه بسیار مهمی که از پژوهش حاضر حاصل می‌گردد بدین صورت است که می‌توان از اندازه‌گیری ملاتونین سرم در تشخیص افتراقی سردرد ناشی از میگرن از سایر سردردها استفاده نمود.

۳) حالت‌های دپرسیون که با کاهش ترشح ملاتونین و قطع ریتمهای شبانه روزی ملاتونین همراه است، بروز حملات میگرن را افزایش داده و در واقع این ناهنجاری‌ها مکانیزم بیماریزایی مشترکی دارند.

۴) ملاتونین در تنظیم متابولیسم کلسیم نقش داشته و با تجویز آن، غلظت کلسیم مایع مغزی نخاعی (CSF) افزایش یافته و با توجه به نقش کلسیم در تنظیم خاصیت ارتجاعی عروق مغزی، ملاتونین سبب تسهیل انقباض عروق مغزی می‌گردد.

۵) عوامل مهار کننده بتا - آدرنرژیک مانند پروپرانولول ترشح ملاتونین را مهار نموده و در پروفیلاکسی میگرن مؤثر هستند.

۶) تجویز کلونیدین با مهار ترشح ملاتونین، عامل پروفیلاکتیک میگرن است.

۷) با توجه به نقش ملاتونین در آزادسازی و تنظیم فعالیت‌های پپتیدهای اپیوئیدی، تغییرات غلظت هورمون در احساس درد طی حمله حاد میگرن مؤثر است. (۱۱،۱۲،۱۳)

۸) معمولاً سن شروع میگرن هنگام بلوغ یا کمی بعد از آن بوده که با تغییرات نوروآندوکرینی نظیر ملاتونین در ارتباط است و کاهش شدید ملاتونین پلازما در دوره قبل از بلوغ مشاهده می‌شود.

۹) فاکتورهای محرک خارجی نظیر نور شدید، صداها و بوها در بروز حملات میگرنی مؤثر می‌باشند و طبق گزارشات موجود، حداقل پنج نوع سلول پینه‌آلی حساس به نور، صدا و بو وجود دارد.

۱۰) قطع سنتز ملاتونین پینه آلی توسط تجویز رزپرین ( داروی ایجاد کننده سردرد میگرنی ) در موش‌ها دیده شده است.

۱۱) ملاتونین نقش کنترلی در میگرن داشته بطوریکه با تزریق ۲۰ میکوگرم ملاتونین تأخیر فاز نمودار ملاتونین پلاسمایی شبانه به تقدم فاز تبدیل می‌شود.

۱۲) ملاتونین سنتز پروستاگلاندین‌ها بخصوص  $TXB_2$  و  $PGE_2$  نیز سنتز NO را مهار می‌کند.

در این پژوهش که خود می‌تواند مقدمه‌ای بر سایر پژوهش‌ها باشد، غلظت‌های ملاتونین افراد سالم و بیماران

## منابع

1. Forsling ML. (2001). Melatonin; Current Opinion in Endocrinology and Diabetes. 8 (3) : 147-153.
2. Blaicher W, Speck E, Im hof MH. et al(2000). Melatonin in postmenopausal females. Arch. Gynecol. Obstet. 263: 116-118.
3. Lerner AB, Case JD.,Takaha Y.Lee TH and Mori N. (1958). Isolation of melatonin, pineal factor that lightens melanocytes. J.Am. Chem.Soc.80: 2587-2592.
4. Cardinali DP, Lynch HJ. and Wurtman RJ.(1972) Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. Endocrinology. 91 : 1213-1218.
5. Zeitzer JM., Daniels JE, Dufy JF. et al.(1999). Do plasma melatonin concentration decline with age ? Am. J. Med. 107: 432-436.
6. Maharaj DS, Anoopkumar S, Glass BD , Lack B. et al. (2002). The identification of the UV degradants of melatonin and their ability to scavenge free radicals. J. Pineal. Res. 32(4) : 257-263.
7. Munoz HA, Fernandez – Garcia JM, Molina – carballo A. et al (2000). Effect of clonidine on plasma ACTH, cortisol and melatonin in children. J. Pineal. Res. 29: 48-53.
8. Garfinkel D. and Zisapel N.(1996). Liver cirrhosis and circadian rhythm Ann. Intern. Med. 125(2): 154-156.
9. Vijayalaxmi T, Charles R, Reiter R. (2002). Melatonin: From basic research to cancer treatment clinics. J. Clin. Oncol. 20:2575-2603.
10. Seabra M., Tufik S , Abucham J. et. Al. (2001). Hypothalamic involvement in chronic migraine.J. Neurol Neurosurg. Psychiat. 71(6):747-751.
11. Brun J, Claustrat B, saddier P and Ghazot G (1995). Nocturnal melatonin excretion is decreased in patients with migraine without aura attacks associated with menses. Cephalalgia. 15:136-139.
12. Silberstein SD.(1995). The association between hormones and migraine Cephalalgia. 15(2):78-79.
13. Peres MFP.,Rozen TD.(2001). Melatonin in the preventive treatment of chronic headache. Cephalalgia. 21(10): 993-995.
14. Claustrat B, Brun J., Geoffriau M. et al.(1997). Nocturnal plasma melatonin profile and melatonin kinetics during infusion in status migrainosus. Cephalalgia. 17(4):511-517.