

Pinealektomi veya Melatonin Uygulamasının Ratlarda Plazma Çinko Düzeylerine Etkisi¹

EFFECT OF PINEALECTOMY OR MELATONIN ADMINISTRATION ON PLASMA ZINC LEVELS OF RATS*

Cem Şeref BEDİZ*, A. Kasım BALTACI**, Rasim MOĞULKOÇ**, Ali ATEŞ***

* Doç.Dr., Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD, İZMİR

** Yrd.Doç.Dr., Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD,

*** Dr., Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, KONYA

Özet

Amaç: Pineal bezden salgılanan melatoninin, immün fonksiyonlar için temel bir eser element olan çinko seviyelerini düzenlediği ileri sürülmektedir. Pinealektomize farelerde gösterilen çinko düzeylerindeki azalmalar bahsedilen ilişkiyi desteklemektedir. Gerçekleştirilen çalışmada ratlarda pinealektomi veya melatonin uygulamasının plazma çinko düzeylerini nasıl etkilediği araştırıldı.

Materyal ve Metod: Araştırma; Kontrol Grubu (n=8), Pinealektomize (Px) Deneysel Grubu (n=8) ve Melatonin Uygulanan (3mg/kg/gün deri altı melatonin uygulaması yapılmış grup) Deneysel Grubu (n=8) olmak üzere toplam 3 çalışma grubunu oluşturan 24 adet Sprague Dawley cinsi erişkin erkek ratlar üzerinde Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinde gerçekleştirildi. Çalışmanın deneysel kısmının bitiminde deney hayvanlarından dekapitasyonla alınan kan örneklerinde plazma çinko (atomik absorpsiyon spektrofotometresi) ve plazma melatonin (RIA yöntemiyle) düzeyleri tayin edildi.

Bulgular: Plazma çinko düzeyleri melatonin takviyeli grupta, kontrol ve pinealektomize gruplara oranla daha yüksekti (P<0.01). Px-deneysel grubunun aynı değerleri ise hem kontrol, hem de melatonin uygulaması yapılan gruplardan önemli ölçüde düşük bulundu (P<0.01). Plazma melatonin düzeyleri melatonin uygulanan grupta kontrol ve pinealektomize gruplara göre daha yüksek seviyede (P<0.01), Px-deneysel grubunun plazma melatonin düzeyleri hem kontrol grubu, hem de melatonin uygulanan gruptan önemli ölçüde düşüktü (P<0.01).

Sonuç: Çalışmanın sonucunda elde edilen bulgular ratlarda pinealektominin plazma çinko düzeylerini önemli ölçüde baskıladığını, melatonin uygulamasının ise plazma çinko konsantrasyonlarında anlamlı bir yükselmeye yol açtığını ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Pinealektomi, Melatonin uygulaması, Çinko

T Klin Tıp Bilimleri 2002, 22:101-104

Summary

Objective: It was suggested that pineal neurohormon melatonin modulates the plasma zinc levels. Plasma zinc level decrease in pinealectomized mice showed by previous studies supports the significant relations between zinc and melatonin. In this study, the effects of melatonin deficiency and supplementation on plasma zinc levels were investigated.

Materials and Methods: The study was done in Selçuk University Experimental Medicine Research and Application Center. Twenty-four adult male rats divided into 3 groups. Pinelectomy (Px) was applied to 8 rats. Melatonin was administered (3mg/kg/day sc.) to eight intact rats. Intact 8 rats were used as controls. Three weeks later, the rats were decapitated and plasma zinc and melatonin levels were determined.

Results: The plasma zinc level was higher in melatonin administered rats than both control and pinealectomized groups (P<0.01). Similar parameters of Px experimental group were significantly lower than both melatonin administered and control groups (P<0.01). While plasma melatonin levels were higher in melatonin administered group in comparison to control and pinealectomized groups (P<0.01), plasma melatonin levels of Px experimental group were significantly lower than both control and melatonin administered groups (P<0.01).

Conclusion: The results of this study suggest that while pinealectomy suppresses plasma zinc levels significantly, melatonin supplementation augments the plasma zinc levels significantly in rats.

Key Words: Pinelectomy, Melatonin administration, Zinc

T Klin J Med Sci 2002, 22:101-104

Melatonin başlıca pineal bezden sentezlenen ve sekrete edilen bir nörohormondur. Pineal bezin dışında vücutta başka doku ve hücrelerden de salınmakla birlikte pinealektomize farelerde plazma düzeyi azalmakta ancak tamamen yok olmamaktadır (1). Melatoninin en iyi bilinen etkileri üreme fizyolojisi ile ilgili olmakla beraber, bu

hormonun immün sistemi özellikle hücresel bağışıklığı hem direkt hem de indirekt yollarla etkilediği ileri sürülmektedir (2, 3). Timustan salgılanan, "timulin" diye adlandırılan, hücresel immün fonksiyonların gelişimi ve devamı için gerekli olan çinkoya bağımlı bir hormonun, pineal bezi çıkarılmış farelerin kanlarında daha düşük

Tablo 1. Çalışma Gruplarının Ağırlık Ortalama ve Değişimleri

Gruplar	Çalışma Öncesi Ağırlık (g)	Çalışma Sonrası Ağırlık (g)	Ağırlık Değişimleri (g)
Kontrol Grubu (n=8)	260.50±30.65	265.40±45.48	-6.00±3.16 b
Pinealektomize Grup (n=8)	265.73±30.70	261.46±29.78	4.09±4.90 a
Melatonin Uygulanan Grup (n=8)	257.45±35.25	261.25±40.24	-2.69±3.88 b

*Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (P<0.01)

Tablo 2. Çalışma Gruplarının Plazma Çinko Ve Melatonin Düzeyleri

Gruplar	Çinko (µg/dl)	Melatonin (pg/ml)
Kontrol Grubu (n=8)	120.55±10.75 b	19.25±7.00 b
Pinealektomize Grup (n=8)	70.25±6.10 c	3.40±1.20 c
Melatonin Uygulanan Grup (n=8)	190.50±19.25 a	95.85±11.30 a

*Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (P<0.01)

seviyede bulunması melatoninin hücrel immünite ile ilişkisine çarpıcı bir örnek olarak verilebilir (3). Pinealektomize farelerde sirkülasyondaki İnterlökin-2 (IL-2) düzeyinde, Timik Epitelial Hücre sayısında (TEC) ve CD₄ işaretli T-hücre sayısındaki anlamlı azalmalar (4), çinko eksikliğindeki bulgulara benzemektedir (5,6). Melatoninin immün sistem üzerinde bahsedilen bütün etkilerinde “çinko” temel bir aracı gibi görülmektedir. Melatonin eksikliğinin aynı zamanda çinko eksikliği ile sonuçlanması (3) bu bulguları desteklemektedir. Melatonin eksikliğinin çinko düzeylerini azalttığı ileri sürülmesine karşın (3,4), melatonin takviyesinin çinko düzeylerini nasıl etkilediğinin de araştırılması, melatoninin hem hücrel immünite, hem de çinko ile ilişkisinin ortaya konulması açısından önemli olabilecektir.

Materyal ve Metot

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen ratlar üzerinde aynı merkezde ve bu merkezin etik kurulunun onayı ile gerçekleştirildi. Sprague – Dawley cinsi 6 aylık toplam 24 adet erişkin erkek ratlar kullanılan araştırmada, gruplar şu şekilde oluşturuldu:

Grup 1 (n:8) Kontrol Grubu: Hiçbir uygulamanın yapılmadığı normal diyetle beslenen grup.

Grup 2 (n: 8) Pinealektomize Deney Grubu: Kuszack ve Rodin'in (7) tanımladığı şekilde, ketamin (60 mg/kg) ve rompun (5 mg/kg) kombinasyonu ile anestezi edildikten sonra, pinealektomi yapılarak normal diyetle beslenen grup.

Grup 3 (n:8) Melatonin Takviyeli Grup: Normal diyetle ek olarak 15 gün boyunca her akşam saat 21.00' de intraperitoneal melatonin (3mg/kg/gün) uygulaması yapılmış grup.

30 mg melatonin (Melatonin, Sigma M-250) 3 ml saf etanolde çözdürülerek hazırlanan stok solüsyon, ışığa maruz bırakılmadan, enjeksiyon zamanına kadar buzlukta muhafaza edildi. Hazırlanan stok solüsyondan her rat için 0.1 ml alınarak üzerine 0.9 ml NaCl solüsyonu eklenerek uygulamalar gerçekleştirildi.

Üç hafta süren çalışmanın deneysel bölümünün bitiminde, melatoninin günlük ritmi de göz önüne alınarak deney hayvanlarının tamamından gece saat 21.00'de dekapitasyonla heparinli tüplere gerekli analizlerde kullanılmak üzere kan örnekleri alındı.

Plazma çinko düzeylerinin tayini Elazığ Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında bulunan Shimatsu ASC – 600 model Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresinde gerçekleştirildi. Ölçümler alevli atomizasyon tekniği kullanılarak 213.9 nm dalga boyundaki ışık ile her numune için iki defa yapıldı. Çinko seviyeleri µg/dl olarak tayin edildi (8).

Plazma melatonin tayinleri melatonin kiti kullanılarak (Melatonin 1-25 RIA DDV BIOCHEMIE GmbH D 35037 Marburg Schwanellee 44) S. Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında Radio İmmüno Assay (RIA) yöntemiyle pg/ml olarak tayin edildi (9).

Çalışmada elde edilen bulguların aritmetik ortalamaları ve standart hataları hesaplandı. Gruplar arasındaki farklılıkların tespiti için varyans analizi uygulandı. Grup ortalamaları arasındaki fark Asgari Önemli Fark Testi (Least Significant Difference “LSD”) ile kontrol edildi (10).

Bulgular

Araştırma gruplarının çalışma öncesi ve sonrası ağırlık ortalamaları yönünden mukayeselerinde herhangi bir farklılık ortaya konulamazken, pinealektomize deney

grubunda çalışma sonrası öncesine nazaran gözlenen ağırlık kaybı kontrol ve melatonin uygulanan gruplara oranla fazlaydı ($P<0.01$), (Tablo 1).

Plazma melatonin düzeyleri, melatonin uygulanan grupta, kontrol ve pinealektomize gruplardan diğer daha yüksekti ($P<0.01$). Pinealektomize deney grubunun aynı değerleri kontrol grubundan önemli ölçüde düşük bulundu ($P<0.01$). Plazma çinko düzeyleri melatonin uygulanan grupta kontrol ve pinealektomize gruplardan daha yüksek seviyede (yeni) ($P<0.01$), pinealektomize grubun plazma çinko düzeyleri kontrol grubuna oranla önemli ölçüde düşüktü ($P<0.01$), (Tablo 2).

Tartışma

Gerçekleştirilen çalışmada, ağırlık ortalamaları yönünden çalışma öncesi ve sonrasında gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktu. Ancak; ağırlık değişimleri yönünden çalışma öncesiyle karşılaştırıldığında pinealektomili grupta meydana gelen ağırlık kaybının diğer gruplara oranla daha fazla olduğu gözlemlendi. Elde ettiğimiz bu bulgu başka araştırmacıların bulgularıyla çelişkili gibi görülmektedir. Zira, pinealektominin farelerde ağırlık kaybına yol açmamasına karşın, plazma çinko düzeylerinde önemli azalmalara yol açtığı bildirilmektedir (3, 4). Ratlarda çinko eksikliğinin ağırlık kaybına neden olduğu bir çok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (11, 12). Melatonin eksikliğinin aynı zamanda çinko eksikliğiyle sonuçlanması (13) çalışmamızda pinealektomize ratlarda gözlenen ağırlık kaybının bir nedeni olarak düşünülebilir.

Pinealektomize grupta plazma melatonin düzeyinde azalma gözlenirken, buna paralel olarak aynı grubun plazma çinko düzeyleri de diğer gruplardan önemli ölçüde düşüktü. Buna karşın melatonin uygulaması yapılan deney grubunun plazma çinko düzeyleri ise diğer gruplardan anlamlı şekilde yüksekti. Epifiz bezi olarak da bilinen pineal bez vücudun biyolojik saati gibi fonksiyon görür (1). En iyi bilinen etkileri salgıladığı melatonin hormonu aracılığıyla uyku-uyanıklık periyodunu düzenlemesi ve üreme fizyolojisi üzerine olanlarıdır (1, 14). Bunun yanı sıra pineal bez ve melatoninin antioksidan etkisi ve immün fonksiyonlarla ilişkisi de yoğun araştırmaların konusunu teşkil etmektedir (15, 16). Melatonin immün sistemi özellikle de hücrel immüniteyi hem direk, hem de indirek yollarla etkileyen bir hormondur (17). Yaşlı farelerde melatonin takviyesinin timik fonksiyonları iyileştirmesi bu hormonun immün sistem üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir (4). İlginç olan melatoninin immün sistem üzerindeki bu etkilerine çinkonun aracılık etmesidir (4). Pinealektomize farelerde gözlenen negatif çinko balansı, çinko bağımlı bir hormon olan plazma timulin seviyesindeki azalmalar ile CD_4 ve CD_8 lenfosit hücre sayılarındaki azalmalar bu ilişkinin delili olarak

söylenbilir (3). Melatoninin immün sistem üzerindeki bu etkilerini timustaki spesifik melatonin reseptörleriyle direkt olarak göstermesi de muhtemeldir (18). Büyüme, gelişme ve enzim aktiviteleri için önemli bir eser element olan çinkonun (6), yaşlanma ve immünitede temel bir rol oynadığı bilinmektedir (5, 19, 20). Öyle ki çinko bu gün doğal bir T-lenfosit mitojeni olarak kabul edilmektedir (5, 21).

Pineal bezden sentezlenen ve sekrete edilen başlıca nörohormon olan melatoninin önemli bir eser element olan çinkonun sindirim sisteminden emilimini arttırdığı ileri sürülmektedir (3). Bağırsaklarda melatonin için spesifik bağlama bölgelerinin bulunması da, bu hormonun çinkonun sindirim sisteminden emilimini arttırmasında temel bir mekanizma gibi görülmektedir (4). Literatürlerde melatonin ile çinko ilişkisini konu alan çalışmaların çoğunlukla bu iki maddenin hücrel immünite üzerindeki etkileri üzerinde yoğunlaştığı gözlenmektedir (3,4,13,15-18). Çalışmamızda pinealektomize ratlarda plazma melatonin düzeylerindeki azalmaya paralel olarak plazma çinko düzeylerinde de önemli azalmaların meydana gelmesi, buna karşın melatonin takviyesi yapılan deney hayvanlarında plazma çinko düzeylerinde anlamlı artışların oluşması melatonin ile çinko arasındaki ilişkinin önemli bir göstergesi olarak düşünülebilir. Tarafımızdan gerçekleştirilen bir başka çalışmada (22), ratlarda çinko eksikliğinin plazma melatonin düzeylerinde önemli bir azalmaya, çinko uygulamasının ise plazma melatonin düzeylerinde anlamlı bir artışa yol açabileceği şeklinde elde edilen bulgular, çinko ile melatonin arasındaki ilişkiye bir delil olarak söylenebilir. Ancak, bu ilişkide başka faktörlerin de rol alıp almadığının belirlenebilmesi için, melatonin ile çinko ilişkisinde ayrıntılı çalışmaların yapılması bir öneri olarak ileri sürülebilir.

Sonuç olarak araştırmamızda elde edilen bulgular; pinealektominin ratlarda plazma çinko düzeylerinde bir baskılanmaya neden olduğunu, melatonin takviyesinin ise plazma çinko düzeylerinde önemli bir artışa yol açabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Keleştimur H. İnsanda pineal bezin fonksiyonları. FÜ Sağlık Bil Derg 1996; 10 (1):141-7.
2. Pierpaoli W. Pineal grafting and melatonin induce immunocompetence in nude (a thymic) mice. InternJ Neuroscience 1993; 68: 123-31.
3. Mocchegiani E, Bulian D, Santarelli L, Tibaldi A, Muzzioli M, Lesnikov V, Pierpaoli W, Fabris N. The zinc pool is involved in the immune - Reconstituting effect of melatonin in pinealectomized mice. JPET 1996; 277:1200-8.
4. Mocchegiani E, Bulian D, Santarelli L, Tibaldi A, Muzzioli M, Lesnikov V, Pierpaoli W, Fabris N. The immuno-reconstituting effect of melatonin or pineal grafting and its relation to zinc pool in aging mice. J Neuroimmunol 1994; 53:189-201.
5. Prasad AS. Zinc and immunity. Mol Cell Biochem 1998; 188 (1-2): 63-9.

6. Baltacı AK, Ergene N, Uysal H. Çinkonun insan sağlığındaki rolü. SÜ Tıp Fak Derg 1990; 6 (4): 444-8.
7. Kuszack J, Rodin MA. New technique of pinealectomy for adult rats. Pro Experimentis 1977; 33 (2): 283-4.
8. Bonilla E. Flameless atomic absorption spectrophotometric determination of manganese in rat brain and other tissues. Clin Chem 1978; 24: 471 - 474.
9. Tiefenauer LX, Anders RY. Prevention of bridge binding effects in haptenic immunoassay system exemplified by an iodinated radioimmunoassay for melatonin. J Immunol Methods 1984; 74: 293-8.
10. Düzgüneş O, Kesici T, Gürbüz F. İstatistik Metotları – 1, Ankara, A. Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, 1984.
11. Fraker PJ, Jardieu P, Cook J. Zinc deficiency and immune function. Arch Dermatol 1987; 123: 1699-701.
12. Prasad AS. Clinical manifestations of zinc deficiency. Ann Rev Nutr 1985; 5: 341-63.
13. Öztürk A, Baltacı AK, Bediz CŞ, Güngör S, Ateş A. Çinko ve melatonin eksikliğinin rat testisleri üzerine histolojik etkileri. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 26. Kongresi (Uluslararası Katılımlı) Bildiri Özetleri Kitabı; 4-8 Eylül 2000; Eskişehir, Türkiye. p.105.
14. Sonta KS. Functional connections between the pineal gland and immune system. Acta Neurobiol Exp 1996; 56: 341-57.
15. Üstündağ B, Canatan H. Melatonin: Güçlü bir antioksidan ve serbest radikal giderici. Fırat Tıp Derg 1999; 1(7): 502-12.
16. Maestroni GJM. The immunoneuroendocrine role of melatonin. J Pineal Res 1993; 14: 1-10.
17. Pierpaoli W, Changxian Y. The involvement of pineal gland and melatonin in immunity and aging. J Neuroimmunol 1990; 27: 99-109.
18. Fabris N, Mocchegiani E, Provinciali M. Plasticity of neuroendocrine-thymus interactions during aging. Cell Mol Biol 1997; 43 (4): 529-41.
19. Baltacı AK, Ergene N, Ateş A, Bediz CŞ, Özmerdivenli R, Duman S. Deneysel Toxoplazma gondii infeksiyonlarında serum çinko düzeyleri ve çinko takviyesinin hücresel bağışıklıktaki etkisi. Turgut Özal Tıp Merkezi Derg 1995; 2(2):130-4.
20. Baltacı AK, Moğulkoç R, Sapmaz E, Bediz CŞ, Çelik H, Kumru S. Gebe kadınlarda vulvovajinal kandidiazis ile serum çinko düzeyleri arasında ilişki. SÜ Tıp Fak Derg 1998; 14 (3): 117-9.
21. Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. Am Physiol Rew 1993; 73: 79-110.
22. Bediz CŞ, Baltacı AK, Moğulkoç R, Ateş A. Ratlarda çinko eksikliği ve takviyesinin plazma melatonin düzeylerine etkisi. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 26. Kongresi (Uluslararası Katılımlı) Bildiri Özetleri Kitabı; 4-8 Eylül 2000; Eskişehir, Türkiye. p.106.

Geliş Tarihi: 05.02.2001

Yazışma Adresi: Dr.A. Kasım BALTACI
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD,
42080 KONYA

³Bu çalışma Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 26. Kongresinde (Uluslararası Katılımlı) Poster Olarak Sunulmuştur.