

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA DMBA İLE OLUŞTURULMUŞ MEME
KANSERİNDE ÇİNKO İLE MELATONİN UYGULAMASININ
BAĞIŞIKLIK PARAMETRELERİNE ETKİSİ**

Saltuk Buğra BALTACI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ

KONYA-2017

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA DMBA İLE OLUŞTURULMUŞ MEME
KANSERİNDE ÇİNKO İLE MELATONİN UYGULAMASININ
BAĞIŞIKLIK PARAMETRELERİNE ETKİSİ**

Saltuk Buğra BALTACI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 16202034 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2017

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Saltuk Buğra BALTACI tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Fiziyojji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

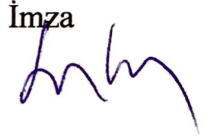
Jüri Başkanı (Danışman): Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ
Selçuk Üniversitesi

İmza


Üye: Prof. Dr. Nilsel OKUDAN
Selçuk Üniversitesi

İmza


Üye: Yrd. Doç. Dr. Leyla AYDIN
Başkent Üniversitesi

İmza


ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ender Erdoğan
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bir çok besinsel, hormonal ve çevresel faktör kemirgenlerde oluşturulan tümörlerin büyümesini ve karsinogenezi etkiler. Serbest radikal süpürücü etkisine ilave olarak melatoninin kanser büyümesinin bir inhibitörü olabileceği ileri sürülmektedir. Melatoninin günlük uygulamasının özellikle meme kanserinde tümör gelişimini engelleyici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Deney hayvanlarında pineal bezin cerrahi olarak çıkarılması metastatik yayılmaya ilave olarak primer tümör büyümesini uyarır, oysa melatonin uygulaması tümöral büyümeyi inhibe eder.

Kanser olgularında diyetteki çinko eksikliğinin bağışıklık fonksiyonlarını bozarak azalmış T-lenfosit popülasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Bu nedenle de tümöral olaylarda çinko uygulamasının tümör gelişimini önleyici etkisine dikkat çekilmektedir.

Dünyada kadınlarda en sık görülen kanser türünün meme kanseri olduğu bilinmektedir. Tümör gelişiminin önemli inhibitörleri olabileceğine dikkat çekilen melatonin ve çinkonun kombine ve ayrı ayrı uygulamalarının DMBA ile oluşturulmuş sıçan meme kanserindeki bağışıklık parametrelerine olan etkilerinin ortaya konulması konuyla ilgili orijinal bilgilere ulaşmamızı sağlayabilir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET.....	vi
SUMMARY	vii
1.GİRİŞ	1
1.1. Melatonin	2
1.1.1. Melatonin Hormonunun Etkileri.....	2
1.1.2. Melatoninin Biyosentezi, Katabolizması ve Düzenlenmesi	4
1.1.3. Melatoninin Serbest Radikal Yok Etme Özelliği	6
1.1.4. Melatoninin Nükleer DNA'yı Koruduğuna İlişkin Kanıtlar	7
1.1.5. Onkostatik Madde Olarak Melatonin	8
1.1.6. Melatoninin İmmünomodülatör Fonksiyonu	10
1.1.7. Hipnotik Olarak Melatonin	11
1.1.8. Kronobiyotik Molekül Olarak Melatonin	12
1.1.9. Depresyonda Melatonin	14
1.2. Çinko.....	14
1.2.1. Çinkonun Bağ Doku ve Kıl Gelişimi Üzerindeki Etkisi.....	17
1.2.2. Çinkonun Sinir Sistemi, Öğrenme ve Depresyon Üzerine Etkisi	18
1.2.3. Çinkonun Oksidatif Stres Üzerine Etkisi.....	21
1.2.4. Çinkonun Apoptozis Üzerindeki Etkisi.....	22
1.2.5. Çinkonun Bağışıklık Sistemi Üzerindeki Etkisi	23
1.2.6. Bağışıklık Sisteminde Çinko Yetersizliği	23
1.2.7. Bağışıklık Gelişimi Üzerine Fetal Çinko Yetersizliğinin Etkileri	24
1.2.8. Bağışıklık Sisteminin Özel Hücreleri Üzerine Çinkonun Etkileri	25
1.2.9. Çinko Taşıma Proteinleri	27
1.2.10. Metallotiyoninler	28
2.GEREÇ ve YÖNTEM	32
2.1. Hayvan Materyali.....	32
2.1.1. Deney Hayvanları ve Beslenmeleri.....	33

2.2. Deneysel Uygulamalar.....	33
2.2.1. Meme kanseri oluşturulması.....	33
2.2.2. Çinko uygulaması	33
2.2.3. Melatonin Uygulaması	34
2.3. Kan Örneklerinin Elde Edilmesi.....	34
2.3.1. Akım Sitometri ile T, B, NK Hücre Analizi Prosedürü.....	34
2.4. İstatistik.....	35
3.BULGULAR	36
4.TARTIŞMA.....	38
4.1. Lenfosit Yüzdelerinin Tartışılması.....	38
4.2. Yardımcı T Lenfosit (CD4(+)) Yüzdelerinin Tartışılması.....	40
4.3. Sitotoksik T Lenfosit (CD8 (+)) Yüzdelerinin Tartışılması	42
4.4. B Lenfosit (CD45RA(+)) Yüzdelerinin Tartışılması.....	43
4.5. NK ve NKT Yüzdelerinin Tartışılması.....	43
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	46
6. KAYNAKLAR.....	47
7. EKLER.....	61
8. ÖZGEÇMİŞ.....	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA-NAT	Aralkilamin N-asetiltransferaz
aMT6S	6-Sülfatoksimeletonin
CD	Başkalaşım Kümesi(Cluster of Differentiation)
CRSD	Sirkadiyen Ritim Uyku Bozukluğu
DMBA	7,12-Dimetilbenz[a]antrasen
DNA	Deoksiribonükleik Asit
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü(Human Immunodeficiency Virus)
INF- γ	Gama İnterferon
LOOH	Lipit Hidroperoksitleri
NK	Doğal Öldürücü Hücreler(Natural Killer)
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
OH ⁻	Hidroksil İyonu
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asidi
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SCN	Suprakiazmik Nükleus
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tümör Nekroz Faktör
ZIP	Zrt ve Irt-Benzeri Proteinler

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sıçanlarda DMBA ile Oluşturulmuş Meme Kanserinde Çinko ile Melatonin Uygulamasının Bağışıklık Parametrelerine Etkisi

Saltuk Buğra BALTACI

Fizyoloji (Tıp) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2017

Bu çalışmanın amacı dişi sıçanlarda güçlü bir immünsupresör ve kanserojen madde olan DMBA (7,12-dimetilbenz[a]antrasen) ile oluşturulmuş meme kanserinde çinko ile melatonin uygulamasının bağışıklık parametrelerine olan etkilerinin araştırılmasıdır.

Çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen Wistar cinsi sütün yeni kesilmiş dişi sıçanlar üzerinde aynı merkezde gerçekleştirildi. Çalışma protokolü aynı merkezin Deneysel Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylandı. Toplam 42 adet sıçan kullanılan çalışmada hayvanlar 5 gruba ayrıldı:

Grup 1 (n:6) Kontrol, Grup 2 (n:6) DMBA Kontrol, Grup 3 (n:10) DMBA+Çinko Grubu, Grup 4 (n:10) DMBA+Melatonin Grubu, Grup 5 (n:10) DMBA+Melatonin ve Çinko Grubu.

Grup 1 dışındaki hayvanlara meme kanseri oluşturmak için kolza yağı (kanola) içinde 80 mg/kg dozunda 7,12-dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) gavaj yoluyla verildi. Çinko ve melatonin uygulanan gruplara 5 mg/kg/gün dozunda çinko, melatonin ve çinko+melatonin 4 hafta boyunca verildi.

Deneysel uygulamaları takiben anestezi altında hayvanlardan EDTA'lı tüplere alınan taze kan örneklerinde; lenfosit oranları, T-Lenfosit alt tipleri, B lenfositler ile doğal öldürücü hücreler olan NK ve NKT hücre yüzdeleri tayin edildi.

Uygulama yapılan gruplarda bağışıklık parametreleriyle ilgili hücre tiplerinde, özellikle DMBA ile meme kanseri oluşturulmuş kontrol grubuna oranla önemli artış ortaya çıktı ($p<0.05$). Lenfosit, total T-lenfosit ve CD4 lenfosit oranlarındaki en yüksek artış çinko ve melatoninin kombine uygulandığı grupta elde edildi ($p<0.05$). Çinko uygulanan grup en yüksek NKT hücre yüzdelerine sahipti ($p<0.05$).

Çalışmanın bulguları DMBA ile oluşturulan meme kanserinde çinko ve melatonin uygulamasının bağışıklık parametrelerinde artışa yol açtığını göstermektedir. Bağışıklık parametrelerindeki artış çinko+melatoninin kombine uygulamasında daha güçlü şekilde ortaya çıkmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Bağışıklık; Çinko; DMBA; Kanser; Melatonin

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

The Effects of Zinc and Melatonin Supplements on the Immunity Parameters of Rats with DMBA Induced Breast Cancer

Saltuk Buğra BALTACI

Department of Physiology (Medicine)

MASTER THESIS / KONYA-2017

The aim of the study was to determine the effects of zinc and melatonin supplements on the immunity parameters of female rats with induced breast cancer. The breast cancer was induced by the potent immuno-suppressor and carcinogenic substance 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA).

The study was performed on recently weaned female Wistar rats obtained from Selcuk University Experimental Medicine Research and Application Centre (SUEMRAC). The study was also conducted at SUEMRAC. The study protocol was approved by SUEMRAC's Experiment Animals Ethics Committee. There were a total of 42 rats studied, divided into 5 groups as follows:

Group 1 (n=6) Control, Group 2 (n=6) DMBA Control, Group 3 (n=10) DMBA + Zinc, Group 4 (n=10) DMBA + Melatonin, Group 5 (n=10) DMBA + Zinc & Melatonin.

With the exception of Group 1, the rats' breast cancer was induced by receiving a canola-oil-mixed 7,12-dimethylbenz[a]anthracene DMBA 80 mg/kg dose via gavage.

Throughout four weeks, Groups 3, 4 & 5 received daily 5 mg/kg doses of zinc, melatonin, and zinc+melatonin respectively.

Following the experimental application, the rats were anaesthetized and blood samples were taken into tubes enhanced with EDTA. The fresh blood samples' lymphocyte rates, T-lymphocyte subgroups, B-lymphocyte and natural killer cells NK and NKT were evaluated.

It was found that a notable increase occurred in the cell types related to the immunity parameters in the supplemented groups; especially compared to the Control Group 2 in which breast cancer was induced via DMBA ($p < 0.05$).

The most significant increase in lymphocyte, T-lymphocyte and CD4 lymphocyte rates was found in Group 5 -Zinc & Melatonin ($p < 0.05$). The highest NKT cell rates were found in Group 3 -Zinc ($p < 0.05$).

The study's findings show that zinc and melatonin supplements have led to an increase in the immunity parameters of rats with DMBA induced breast cancer. The most significant increase in immunity parameters have occurred in the rats who received the combined supplements of zinc & melatonin.

Key Words: Cancer; DMBA; Immunity; Melatonin; Zinc

1.GİRİŞ

Hemen her enzim sınıfında bulunan tek metal olan çinko bağışıklık sisteminde de kritik rol oynar (Baltacı ve Mogulkoc 2012). İmmün sistemde çinko en fazla CD4 işaretli T-lenfositler üzerinde etkilidir. T4-lenfositleri Th-1 ve Th-2 olarak ikiye ayrılmaktadır. Th-1 IL-2 ve INF- γ üretimini sağlarken; Th-2 humoral immüneyi düzenlemektedir. Hatta Th-2'nin ürettiği bir sitokin olan IL-10 hem T-hücrelerini hem de NK hücrelerinin INF- γ sentezini inhibe ederek hücrel immüneyi olumsuz etkilemektedir. Bu olaylarda çinkonun etkisi hem Th-1 lenfositler hem de NK hücreleri üzerinedir (Baltacı ve Mogulkoc 2012). Çinko gibi melatonin hormonu da bağışıklık fonksiyonları üzerine direkt etkilidir (Baltacı ve Mogulkoc 2012). Melatonin T hücrelerinin aracılık ettiği sitokin ekspresyonunu artırır. Melatonin verilmesi Th-1 hücreleri üzerinden IFN- γ , IL-2 ve TNF- α salınımını uyarır. İnsan monositlerinde de benzer şekilde bahsedilen sitokinlerin üretimi melatonin tarafından artırılır (Pandey ve ark 2015, Csaba 2016). Birçok besinsel, hormonal ve çevresel faktör kemirgenlerde oluşturulan tümörlerin büyümesini ve karsinogenezi etkiler. Serbest radikal süpürücü etkisine ilave olarak melatonin kanser büyümesinin bir inhibitörü olabileceği ileri sürülmektedir (Ma ve ark 2016). Melatoninin günlük uygulamasının özellikle meme kanserinde tümör gelişimini engelleyici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Vriend ve Reiter 2015). Deney hayvanlarında pineal bezin cerrahi olarak çıkarılması metastatik yayılmaya ilave olarak primer tümör büyümesini uyarır, oysa melatonin uygulaması tümöral büyümeyi inhibe eder (Vriend ve Reiter 2015). Kanser olgularında diyetdeki çinko eksikliğinin bağışıklık fonksiyonlarını bozarak azalmış T-lenfosit popülasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Sangthawan ve ark 2015). Bu nedenle tümöral olaylarda çinko uygulamasının tümör gelişimini önleyici etkisine dikkat çekilmektedir (Sun ve ark 2016). Dünyada kadınlarda en sık görülen kanser türünün meme kanseri olduğu bilinmektedir (Hao ve ark 2016). Güçlü bir immünespresör ve kanserojen madde olan DMBA (7,12-dimetilbenz[a]antrasen)'nin sıçanlarda gavaj yoluyla uygulanması meme kanseri modeli olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Bobrowska-Korczak ve ark 2015, Skrajnowska ve ark 2015). Bu çalışmanın amacı da dişi sıçanlarda güçlü bir immünespresör ve kanserojen madde olan DMBA (7,12-

dimetilbenz[a]antrasen) ile oluşturulmuş meme kanserinde çinko ile melatonin uygulamasının bağışıklık parametrelerine olan etkilerinin araştırılmasıdır.

1.1. Melatonin

M.Ö. 3. yüzyıl civarında Herophilus tarafından tanımlanan Pineal bezin yapısı Vesalius (1514-1564) tarafından ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir. Fransız Filozof Descartes ise (1596-1650) pineal bezi ruhun merkezi olarak düşünmüştür. Hint felsefesine göre pineal bez daha gerçekçi ve derinlemesine görebilen bir üçüncü göz olarak kabul edilmiştir. Bununla beraber pineal bezden salgılanan temel hormon olan melatoninin biyosentezi ve kimyasal yapısı 1958’de Lerner tarafından ortaya konulmuştur. Nöroendokrin bir organ olan pineal bezden salgılanan melatonin hormonunun etkilerinin başlangıçta düşünüldüğünden çok daha yaygın olduğu anlaşılmıştır. Kırk yılı aşkın bir süre önce, melatoninin gece üretim düzeninin değişmesinin fotoperiyodik türlerin yıllık çoğalma döngülerine işaret eden bir sinyal olduğu bulunmuştu. O zamandan beri, melatoninin etkileri, günlük ritimler, bağışıklık fonksiyonu, uyku, retinal fizyoloji ve genel endokrin işlevleri ile de ilişkilendirilmiştir. Ancak, son yıllarda, “indol”ün etkin bir serbest radikal yok edicisi ve antioksidan olduğu bulunduktan sonra, melatoninin etki alanı daha da genişlemiş ve tümöral olayların engellenmesinde de potansiyel bir değeri olabileceği düşünülmüştür. En yaygın bilimsel tarama motoru olan PubMed taramasında melatonin anahtar kelimesiyle 21854 adet yayına ulaşılması melatonin hormonunun araştırılmasına olan ilginin yaygın bir şekilde devam ettiğini gösterir.

1.1.1. Melatonin Hormonunun Etkileri

İnsan-dışı memeli canlılarda melatoninin (N-asetil-5-metoksi-triptamin) mevsimsel üreme psikolojisi (Bartness ve ark 1993, Goldman ve Nelson 1993, Reiter 1993), 24 saatlik döngüde meydana gelen ritimsel değişiklikler (Armstrong 1989, Redman ve ark 1993) ve bağışıklık fonksiyonları üzerindeki (Maestroni 1993) etkileri en iyi bilinirken; insanlarda en çok “jet lag”ın belirtilerini azaltmada ki (Arendt ve ark 1986), 24 saatlik ritmisiteyi düzenlemedeki (Armstrong 1989) yetkinliği ve uyku zamanını belirleme ile uykunun verimini artırıcı (Dawson ve

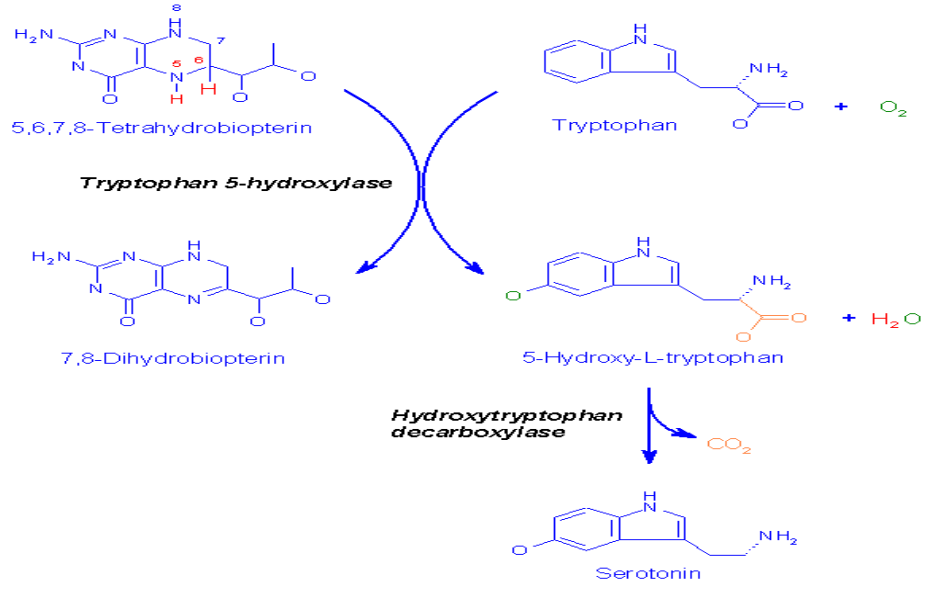
Encel 1993) etkileriyle ön plana çıkmıştır. Bu etkilerin yanında, melatonin serbest radikalleri yok etme yeteneğine sahiptir. Bir serbest radikal ile bir yok edici arasındaki etkileşim, bir “reseptör”ün yararı olmaksızın gerçekleşir. “İndol” her hücreye ve görünüşte tüm alt hücrel bölmelere kolayca girebildiğinden, melatoninin çok yeni keşfedilen bu etkisi, organizmadaki her hücrede melatoninin bir işlevi olduğuna delalet eder (Reiter ve ark 1995, Reiter 1997).

Melatonin etki mekanizmasında bir “membran reseptörler” ailesi klonlanmış ve dağılımları oldukça geniş ve türe özgü (Williams ve ark 1995, Shin ve ark 1996) iken, bu reseptörlerin sinirsel konumları da en çok araştırılmak istenen konu olmuştur. Melatoninin organizmalardaki en temel işlevlerinin bir bölümü çok muhtemelen membran reseptörleriyle etkileşimi sonucu yerine gelecektir ve bunlardan hangilerinin melatoninin etkilerinin çeşitli yönleri üzerinde belirleyici olduğu da araştırılmaktadır. İyi bir şekilde belgelenen melatonin membran reseptörlerinin dışında, bir grup hücrenin daha, çekirdeklerinde melatonin için bağlanma bölgelerine sahip olabilecekleri yönünde kanıtlar gösterilmiştir (Acufla-Castroviejo ve ark 1994, Carlberg ve Weisenberg 1995). Eğer durum bu şekilde ise, melatoninin olası potansiyel genomik etkilerinin bir bölümüne bu nükleer bölgeler aracılık etse bile, melatoninin etkisinin moleküler mekanizmasındaki bilinmezlikler sonuç olarak devam edecektir (Carlberg ve Weisenberg 1995).

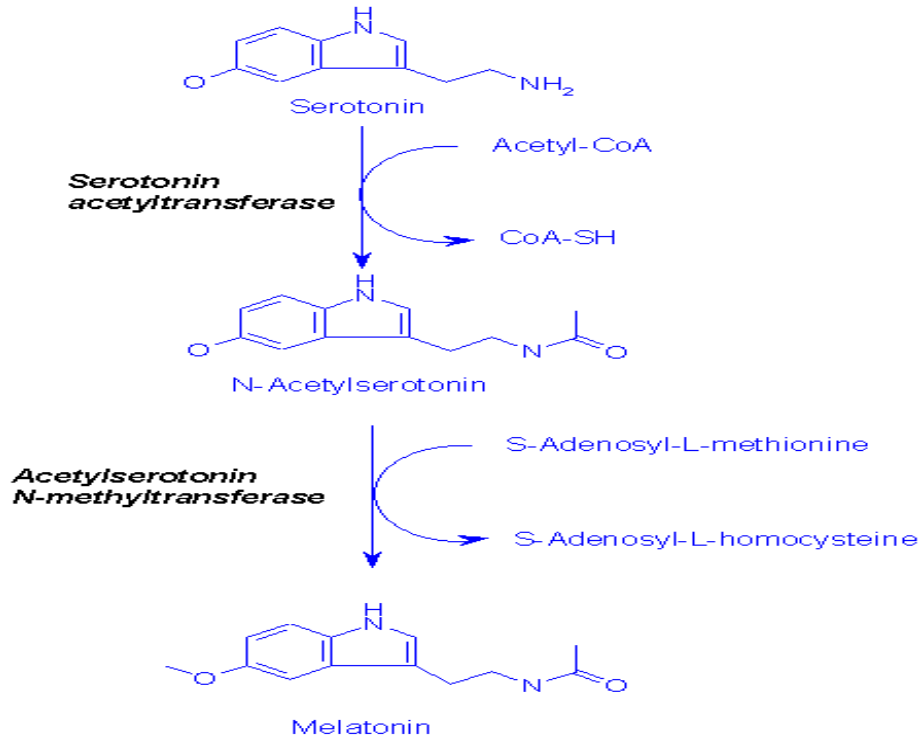
Melatoninin, reseptörlerle yaptığı etkileşime dayandığına şüphe duyulmayan işlevleri bulunmakta ise de, ilginç olarak bu molekülün reseptörden bağımsız etkileri de olabileceğine dair güncel kanıtlar mevcuttur. Örneğin, hücre içi melatoninin kalmoduline bağlandığı ileri sürülmektedir (Huerto-Delgado ve ark 1994). Bu hücre içi molekülün önemi dikkate alındığında, melatoninin bu moleküle bağlanmasının kalmodulin bağımlı “nitrik oksit sentaz” (NOS) aktivitesinde azalma gibi etkilere yol açması - gerçekten de yaptığı rapor edildiği üzere (Pozo ve ark 1994, Bettahi ve ark 1996) - beklenebilir. Dahası, civcivde, henüz kesin bir nedensel ilişki gösterilememiş olmakla beraber, melatoninin gece düzeylerindeki artışla sinirsel NOS aktivitesi azalımı arasındaki güçlü bir ilişki vardır (Reiter ve ark 1997).

1.1.2. Melatoninin Biyosentezi, Katabolizması ve Düzenlenmesi

Pinealositlerdeki melatonin biyosentezindeki enzimatik mekanizma ilk olarak Axelrod (1974) tarafından tespit edilmiştir. Pineal bezden salgılanan başlıca hormon olan melatonin bir indol türevidir. Melatonin sentezi için öncelikle triptofan amino asidinin dolaşımdan hücre içine alınması gerekmektedir. Melatonin öncüsü olan triptofan, kanda 5-hidroksitriptofan aracılığıyla serotonine dönüştürülür. Serotonin sonra, çoğu durumda simgelenirilmiş hız sınırlayıcı enzim olan arylakylamine N-asetiltransferaz (AA-NAT) tarafından N-asetilserotonin formuna asetillendirilir. N-asetilserotonin hidroksiindol-O-metiltransferaz tarafından melatonine dönüştürülür (Şekil 1-2). Melatonin yapımı, adrenerjik kontrol altındadır. Karanlıkta, pineal bezde melatonin sentezinin artması bez içindeki postgangliyonik sinir uçlarından noradrenalin salgılanması ile mümkün olmaktadır. Noradrenalin, pinealosit membranında başlıca β_1 reseptörleri üzerine etki ederek cAMP yapımını artırmak suretiyle N-asetiltransferaz (NAT) ve dolayısıyla melatonin sentezini hızlandırmaktadır (Pandi-Perumal ve ark 2006). Pineal melatonin üretimi, gündüz boyunca düşük seviyelerde ve gece boyunca yüksek seviyelerle birlikte sirkadiyen ritmi oluşturur. Bu sirkadiyen ritim, organizmaların gündüz veya gece boyunca aktif olduğuna bakılmaksızın çoğu omurgalıda devam eder (Claustrat ve Brun 2005). Gözlerdeki melatonin sentezi, benzer bir sirkadiyen periyodu gösterir. Memelilerde pineal melatonin biyosentezinin düzenlenmesine majör sirkadiyen osilatör için, retinadaki suprakiazmatik çekirdekte (SCN) tasarlanarak, retinohipotalamik sistem aracılık etmektedir (Pandi-Perumal ve ark 2006). Son zamanlarda melatonin biyosentez enzimleri, insan lenfositlerinde tespit edilmiştir ve yakınlarına sentezlenen melatonin muhtemelen immün sistemin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Carrillo-Vico ve ark 2005). Diğer çeşitli ekstrapineal bölgeler arasındaki melatonin sentezi özellikle gastrointestinal sistemde önem taşımaktadır. Gastrointestinal melatonin, özellikle yüksek diyet triptofan seviyeleri etkisi altında, dolaşıma serbest bırakılabilir (Pandi-Perumal ve ark 2006).



Şekil 1.1. Melatonin Sentez Basamakları



Şekil 1.2. Melatonin Sentez Basamakları

1.1.3. Melatoninin Serbest Radikal Yok Etme Özelliği

Ianas ve arkadaşları (1991), melatoninin antioksidan potansiyelini ilk keşfedenlerdi. Raporlarında melatoninin, test tüpündeki konsantrasyonuna bağlı olarak, antioksidan veya prooksidan aktiviteye sahip olabildiğini ileri sürmüşlerdi. Melatoninin antioksidan etkileri defeatle teyit edilmiş olmakla birlikte (Reiter ve ark 1995a, 1995b, Reiter 1997), “indol” ün herhangi bir prooksidan etkisiyle ilgili çok daha az bilgi mevcuttur. Antioksidan olduğu düşünölen maddelerin, belli koşullar altında, serbest radikal üretimini fiilen teşvik edebilmeleri olağandışı bir durum değildir. Bu tür moleküllere iyi bir örnek C vitaminidir (askorbik asit) (Reiter ve ark 1997).

Ianas ve arkadaşlarının raporundan (1991) 2 yıl sonra, Tan ve arkadaşları (1993), benzer bir test tüpü içindeki hücre içermeyen sistemde, melatoninin hidroksil radikalini (OH^-) nötralize etme yeteneğini sınadılar. OH^- (normalde organizmalarda üretilen en zehirli radikal olduğu genel kabul görmektedir) çok yüksek reaktivitesi dolayısıyla melatonin tarafından yok edilmek üzere spesifik hedef olarak denemeye tabi tutulmuştu. Tan ve arkadaşları (1993) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda, melatoninin OH^- radikalini içten büyüme ile sentezlenen antioksidan olan indirgenmiş glutatyondan daha etkin ve bitkilerde bulunan bir antioksidan olan “mannitol”den daha iyi nötralize ettiği bulundu. OH^- radikali yüksek reaktivitesi yüzünden birçok molekül tarafından şu yada bu ölçüde yok edilmesine karşı, melatonin, Tan ve arkadaşlarının çalışmaları uyarınca (1993) önemli bir OH^- radikali yok edicisi olarak göröndüğünden, esas yeteneği olan serbest radikal hasarına karşı koruma sağlama özelliğinin anlaşılması için insan ve hayvan çalışmalarındaki doku hasarının fiilen saptandığı çalışmalar gerçekleştirildi. Bu çalışmaların yayınlanmış raporları, melatoninin çeşitli dokuları indüklenen serbest radikal hasarından (Poeggeler ve ark 1993, Hardeland ve ark 1995, Reiter ve ark 1995, Reiter 1997), muhtemeldir ki kısmen de olsa OH^- radikalini yok ederek koruduğunu göstermiştir.

OH^- radikalinin doğrudan yok edilmesinin yanında, “çoklu doymamış yağ asitlerin” (PUFA) oksidasyonu sırasında üretilen “peroksil” radikalinin (LOO^-) de melatonin tarafından, E vitamininden daha yüksek bir etkinlikte yok edildiği rapor

edilmiştir (Pieri ve ark 1994). Bu bulgu, E vitamini (α -tocopherol) genellikle ilk akla gelen lipid (yağ) antioksidanı olduğundan, çok fazla ilgi toplamıştır. Nitekim, eğer melatonin, LOO^- ve lipid peroksidasyonu ile mücadelede gerçekten α -tocopherol'den daha etkinse, bu özellik melatoninin önemli bir antioksidatif ajan olma işlevini kesinlikle destekleyecektir. Buna karşın, başka araştırmacıların raporları melatoninin peroksil radikali yok edicisi olarak E vitamininden daha iyi olduğunu göstermiş değildir. Nitekim, bu çalışmaları baz alındığında, Scaiano (1995) melatonin ve E vitamininin LOO^- yok etmede eşit derecede etkin olabileceğini belirtirken, Marshall ve ark (1996) melatoninin E vitamininden daha az etkin olduğunu iddia etmişlerdir. Son tahlilde, bu konuda sağladığı fayda hakkında karar vermeden önce, melatoninin doğrudan LOO^- 'ni yok etme yeteneğine ilişkin ilave çalışmalara gerek bulunmaktadır; öte yandan, melatoninin, bir lipid antioksidanı olarak çok etkin olduğu, çalışmaların çoğunda kanıtlanmıştır (Reiter 1995, Reiter ve ark 1995).

“Singlet” oksijen ($*O_2$) (çiftlenmemiş elektronu hiç yoktur), bir serbest radikal olmamasına karşın, hücrelerde zehirli etki yaratan reaktif bir oksijen türüdür. Ön bulgular, melatoninin, $*O_2$ indüklemek için ışığa maruz bırakılan, kültürü yapılmış “cerebellar” sıçan nöronlarında meydana gelen hasarı azaltmada etkin olduğunu göstermektedir. İki laboratuardan elde edilen kanıtlar (Chan ve Tang 1996, Marshall ve ark 1996), melatoninin, hypochlorous asidini de nötralize ettiğini göstermekte olup, bu etki, birkaç indolaminler tarafından ortaklaşa yaratılmış olabilir. “Hypochlorous” asidi, normalde, aktive olan lenfositlerde ve “makrofajlar”da üretilir. Bütün bu bulgular, toplu halde, omurgalı epifiz bezinin asli salgısı olan, melatoninin doğrudan serbest radikal yok etme etkisine işaret etmektedir.

1.1.4. Melatoninin Nükleer DNA'yı Koruduğuna İlişkin Kanıtlar

Tan ve arkadaşları (1993, 1994), melatoninin bir OH^- radikali yok edicisi olduğunu bildirmelerinden kısa bir süre sonra, dışarıdan verilen melatoninin karaciğer nükleer DNA'sındaki -kimyasal bir kansorejen olan “safrole” enjeksiyonundan sonra oluşan- hasarı azaltıp azaltmayacağını araştırmak üzere bazı insan çalışmaları tasarladılar. Genellikle serbest radikal içerdiği kabul edilen

mekanizmalar aracılığıyla DNA hasarına yol açtığı için, bu çalışmalarda “safrole” kullanılmıştı. Organizmada üretilen tüm radikaller içinde, DNA’yı kolaylıkla ve belki de örneğin, O₂’e (Jaeschke 1995) oranla daha etkin bir şekilde tahrip eden elbette OH⁻ radikalidir. Tan ve arkadaşları (1993) melatoninin “safrole” ile birlikte verilmesinin sıçan karaciğerinde ölçülen DNA hasarını önemli ölçüde azalttığını buldular. Melatoninin DNA’ya sağladığı koruma kayda değerdi; hangi mekanizma aracılığıyla sağlandığı kanıtlanamadığından, bu koruyucu etkinin içinde melatoninin serbest radikal yoketme aktivitesinin rolü bulunduğu varsayıldı. Bu çalışmalar, melatoninin safrole-indüklemeli hasarı mı önlediği veya daha ziyade DNA onarımını mı indüklediği konusunda bir ayırım sağlayacak bir sonuç vermemiştir.

Vijayalaxmi ve arkadaşları (1995a, 1995b, 1996), melatoninin serbest radikal-indüklemeli DNA hasarına karşı potansiyel koruyucu etkisini araştırmak üzere, daha iyi anlaşılmiş bir model kullandılar. Çok yüksek frekanslı, yüksek enerjili radyasyonun DNA’nın moleküler bütünlüğünü tahrip etmesini sağlayan mekanizmaların, diğer süreçlerin arasında, H₂O’nun hemolitik bölünmesini ve sırası geldiğinde, DNA tahribatına yol açan OH⁻ radikal üretimini içerdiği bilinmektedir. Söz konusu DNA hasarının hesaplanmasına yönelik birden çok yöntem mevcuttur. Vijayalaxmi ve arkadaşları (1995, 1995, 1996), insan kanı lenfositlerinde bulunan DNA parçalarının sadece 150 cG iyonize edici radyasyona veya radyasyona ve çeşitli melatonin konsantrasyonlarına maruz bırakılmasına olanak veren, çok sayıda “sitogenetik” prosedürler kullandılar. Yazarlar bu çalışmalarında melatoninin iyonize edici radyasyon ışınlanmasının bir sonucu olan DNA anomalilerinin sayısını, doza bağlı olacak şekilde, azalttığı sonucuna vardılar. Bulgularının ayrıca, hayvanın hayatta kalma süresi bağlamında, radyokoruyucu etkilerle uyumlu olduğuna da dikkat çektiler.

1.1.5. Onkostatik Madde Olarak Melatonin

Kan veya ekstrasellüler sıvıdaki melatoninin, gece sırasında fizyolojik dalgalanmasının tümör başlatma ve/veya ilerlemesini kısıtlayacağına dair kanıtlar bulunmaktadır. Çok sayıdaki deneysel çalışma melatoninin genel onkostatik etkisi için çok büyük destek sağlamıştır (Blask ve ark 2005). Fizyolojik ve farmakolojik

konsantrasyonlarının uygulanmasıyla melatonin, insan meme kanseri hücre hatlarında MCF, östrojen-pozitif üzerinde artan bir inhibitör etki göstermiştir. Hücre üretim çalışmaları bu konuda melatoninin etkilerinin, artan glutatyon seviyeleriyle ilişkili olduğunu göstermiştir (Blask ve ark 2005). Melatonin aynı zamanda hücrenin östrojen sinyal yolağını düzenleyerek östrojen duyarlı meme kanseri büyümesini engeller (Hill ve ark 1999). Melatonin hücre büyümesi üzerine etkisini; meme kanser hücrelerindeki östradiol reseptörünün transkripsiyonel aktivitesiyle gösterebilir (Kiefer ve ark 2002). Melatoninin bir diğer antitümör etkisi, yağ asidi alımının özellikle linoleik asidin MT1/MT2 bağımlı inhibisyonu sonucu görülen hepatomlarda, onun mitojenik metaboliti olan 13-hidroksidekodonik asit oluşumunu engelleyerek antitümör etkisi göstermiştir (Blask ve ark 2005). Çeşitli çalışmalarda melatonin, over kanseri hücre hatları (Petranka ve ark 1999), endometrium kanseri (Kanishi ve ark 2000), insan uveal melanom hücreleri (Hu ve Roberts, 1997, Hu ve ark 1998), prostat tümör hücreleri (Gilad, 1999) ve intestinal tümörleri içine alan çeşitli tümör hücrelerine karşı (Anisimov ve ark 1997, Anisimov ve ark 2000) onkostatik etkileri olduğu gösterilmiştir. Melatonin ve sisplatin etoposid birlikte uygulanması metastik nonsmal hücreli akciğer kanseri olan hastalarda, hem yaşam süresini hem de kalitesini artırmıştır (Lissoni ve ark 2003). Melatoninin kanser ilerlemesiyle ilgili objektif yararlarının dışında miyelotoksisite ve antitümör tedavileriyle ilişkili lenfositopeniyi düzelterek subjektif yararlar da sağlar ve böylece hastaların yaşam kalitesini artırır (Vijayalaxmi Thomas ve ark 2002). Melatonin çoğunlukla in vivo ve in vitro çalışmalarda anti-karsinojenik ve tümör gelişimini önleyici etkileri olmasına rağmen bazı çalışmalarda tümör gelişimini artırabildiği görülmüştür (Anisimov 2003).

Oksidatif stres karsinogenezisin başlaması, artması ve ilerlemesinden sorumlu tutulmaktadır (Klaunig ve ark 1998). Melatoninin anti-karsinojenik aktivitesi, temel olarak antioksidan ve serbest radikal temizleme özelliğinden dolayı mutagenezi azaltır (Karbownik ve ark 2001). Melatonin salgılanması çeşitli tipteki kanser hastalarında bozulmuştur (Grin ve Grunberger 1998, Bartsch ve Bartsch 1999). Kanser hastalarındaki melatonin konsantrasyonlarının kapsamlı değişimleri, hastalığın artmasıyla ilişkili olan nedenlerin tanımlanması gerekmektedir. Gece

vardiyasında çalışan hemşirelerde kolorektal kanser veya meme kanseri insidansının artmasının nedeni, bu kişilerde geceleri ışığa maruz kalma sonucu melatonin salgısının azalmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Schernhammer ve Schulmeister 2004). Bu hipotez en son yapılan deneysel çalışmayla desteklenmiştir (Blask ve ark 2005). Her 12 saatlik karanlık fazda, artan yoğunluklardaki beyaz floresan ışığına maruz kalan hepatomlu ratlarda veya meme kanseri olan kişilerde, gece melatonin kan seviyeleri ve tümör büyüme stimülasyonu doza-bağımlı olarak baskılandığı gösterilmiştir (Blask ve ark 2005). Blask ve arkadaşları (2005) bahsedilen çalışmalarında 12 sağlıklı premenopozlu denekden 3 farklı zaman diliminde kan örnekleri almışlardır. Denekler; gündüz boyunca, güneş batmasından sonraki 2 saat boyunca ve gece 23:00 sonrasında izleyen 90 dakika boyunca parlak floresan ışığa maruz bırakıldılar. Alınan kan örnekleri daha sonra gelişen tümörlere doğru direkt olarak pompalanmıştır. Tümör büyümesinin en yavaş olduğu karanlık dönemde gönüllülerden toplanan melatonin seviyelerinin yüksek olduğu kan örneklerindeki sonuçlar oldukça ilgi çekicidir. Zira gece salgı düzeyi artan melatonin meme kanserindeki tümör büyümesini engellerken, yine gece parlak floresan ışığa maruz kalan deneklerde melatonin hormonunun tümör engelleyici etkisi inhibe edilmiştir. Bu sonuçlar gece tümör büyümesindeki azalmanın melatonin hormonunun salgı düzeyiyle yakın ilişkili olduğunu gösterir (Blask ve ark 2005).

1.1.6. Melatoninin İmmünomodülatör Fonksiyonu

Son yıllarda yapılan çalışmalar melatoninin, immünomodülatör role sahip olduğunu göstermiştir. Maestroni ve arkadaşları, melatonin sentezinin inhibisyonu sonucu farelerde humoral ve hücrel yanıtın azaldığını göstermiştir (Maestroni ve ark 1986). Eksojen melatonin alımı stres olayları veya ilaç tedavisinde, fareleri ölümcül ensefalotik virüslerden koruyarak immün yetmezlikleri önlediği gösterilmiştir (Maestroni 2001). Melatonin ayrıca kanser kemoterapötik ajanların toksik etkisinden, hematopoetik prekürsör hücreleri koruduğu gösterilmiştir (Maestroni ve ark 1994). Sitokin yanıtlarıyla ilgili melatoninin insan periferik kan mononükleer hücrelerinde IL2 ve IL6 üretimini artırdığı (Garcia-Maurino ve ark 1997), aynı zamanda insan monositlerini aktive ederek IL12 ve IL-2 üretimini teşvik

ettiği rapor edilmiştir (Garcia-Maurino ve ark 1999). Lenfoid hücrelerdeki spesifik melatonin reseptörlerinin varlığı, immün sistemin düzenlenmesinde melatoninin doğrudan bir etkisi olduğuna kanıttır (Gonzalez-Haba ve ark 1995, Carrillo-Vico ve ark 2003). Melatoninin bağışıklık artırıcı etkisi yalnızca onun sitokin üretimini artırıcı özelliğine bağlı değildir, ayrıca onun antioksidan ve anti-apoptotik etkilerine de bağlıdır (Srinivasan ve ark 2005). Melatonin insanlarda, lenfosit hücrelerindeki IL-2 üretimini stimüle ederek otokrin veya parakrin yollardan sentezlenir (Carrillo-Vico ve ark 2004). Gece melatonin seviyeleri T-helper hücrelerinin ritmiyle korelasyon göstermiştir ki, melatonin tedavisi ratlarda CD4+ hücre sayısını artırmıştır (Castrillon ve ark 2000). 77 HIV-1 enfekteli bireylerde yapılan kohort çalışmasında, serum melatonin seviyeleri ve IL-12 arasında korelasyon görülmüştür (Nunnari ve ark 2003), HIV-1 enfekteli bireylerde bulunan azalmış serum melatonin seviyeleri T-helper 1 immün cevabın bozulmasına neden olabilir (Castrillon ve ark 2000). Melatonin hücre içi glutatyon üretimini stimüle eder, onun bağışıklık artırıcı etkisi glutatyon seviyelerindeki etkisinin sonucu olabilir (Urata ve ark 1999).

Melatoninin immün artırıcı etkileri çeşitli hayvan türlerinde ve insanlarda gösterilmiştir (Carrillo-Vico ve ark 2005, Pandi-Perumal ve ark 2006). Melatonin otoimmün hastalıkların patogenezinde rol oynayabilir, özellikle romatoid artiritli hastalarda gece melatonin serum seviyelerinin sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Maestroni ve ark 2004). Kışın yüksek enlemlerde oto-immün hastalıkların artmış prevelansı, uzun gecelerde melatoninin artmış bağışıklık uyarıcı etkisine bağlı olabilir (Esquifino ve ark 2004). Melatoninin, bağışıklık sistemine zaman-bağımlı sinyal sağladığı ileri sürülmüştür. Son yapılan bir çalışmada, in vivo koşullar altında (yani alüminyum hidroksit sonrasında antikor titrelerin artması) melatonin eklenmesi, tanımlanmış T-helper 2-tabanlı immün cevabı artırdığı bulunmuş ve böylece melatonin yeni bir adjuvant immünomodülatör ajan potansiyel özelliği olduğunu göstermiştir (Regodon ve ark 2005).

1.1.7. Hipnotik Olarak Melatonin

Melatonin, sağlıklı insanlar dahil diurnal hayvanlarda uykuyu iyileştirir (Zhdanova 2005). İnsanlardaki endojen melatoninin gece sırasında artması ve uyku

süresi arasındaki yakın ilişki, melatoninin uykunun fizyolojik düzenlenmesinde rolü olduğunu göstermektedir (Dijk ve Cajochen 1997, Zhdanova ve Tucci 2003, Pandi-Perumal ve ark 2005). Gece endojen melatonin artışı ve 'uyku kapısının açılması' arasındaki zamansal ilişki, birçok araştırmacıyı melatoninin uykuyu kolaylaştırdığını göstermek için harekete geçirdi (Lavie 1997, Sack ve ark 1997). SCN'deki MT1 reseptörler, muhtemelen bu etkiye aracılık eder.

Gün içerisinde melatoninin (0,1–3 mg) oral alımı sağlıklı insan deneklerinde, gece boyunca gözlenen dolaşımdaki melatonin seviyelerinin artmasıyla uykuya neden olduğu bulunmuştur (Dollins ve ark 1994). İnsomniyalı hastalara 6 ay boyunca (3mg oral alımı) melatonin verilmesi uyku kalitesini, süresini artırarak ve uykuya geç başlamayı azaltarak hipnotik tedaviye katkı sağlar (Siegrist ve ark 2001).

Endojen melatonin üretimindeki azalma, uyku hastalıklarının efektif eksojen melatonin tedavi için bir ön koşul olarak görülür. Son zamanlarda uyku bozukluklarında eksojen melatonin desteğiyle ilgili gerçekleştirilen klinik çalışmada, çeşitli yaş gruplarında melatoninin uyku kalitesi, verimliliği veya geç uyumayı tedavi edici etkileri başarısız olmuştur (Buscemi ve ark 2006). Buna karşın, Brzezinski ve arkadaşları tarafından, çoğu yaşlı olan 284 denek üzerinde 17 farklı yöntem kullanılarak gerçekleştirilen araştırmada, melatoninin uyku verimliliğini artırmada ve uykuya başlangıç zamanını azaltmada etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Brzezinski ve ark 2005). Bu meta-analizlere dayanarak, uyku bozukluğu tedavisinde eksojen melatonin kullanımı, melatonin eksikliği olan yaşlı bireylerde önerilir.

1.1.8. Kronobiyotik Molekül Olarak Melatonin

Melatonin, hem vücut ritmini stabilize eden hem de güçlendiren bir endojen düzenleyici olarak davranır (Dawson ve Armstrong 1996). Bu yüzden, vücudun biyolojik saatini ayarlayan bir 'kronobiyotik' olarak adlandırılır. Buna ilk kanıt olarak 2 mg eksojen melatoninin, endojen sirkadiyen ritmi regüle ettiği, erken uyumayı sağlayıcı ve/veya uykunun verimini artırıcı etkisini gösteren rapor örnek olarak verilebilir (Arendt ve ark 1985). Lewy ve arkadaşları (1992) oral melatonin

takviyesinden sonraki dört gün içinde, loş ışık altında melatoninin gece salgı düzeyinde görülen artışın daha erken ortaya çıktığını göstermişlerdir. Lewy ve arkadaşları (1992)'nin bu raporundan sonra, eksojen melatonin alımının, uyku, vücut ısısı, endojen melatonin ve kortizol dahil olmak üzere vücut ritminin zamanlamasını da değiştirdiği gösterilmiştir (Arendt ve Skene 2005). Sirkadiyan ritm bozukluğu olan veya gece vardiyasında çalışan insanlarda 5mg melatonin desteğinin, biyolojik saat ritmini ilerlettiği bildirilmiştir (Deacon ve Arendt 1995). Yine benzer araştırmalardan birinde, 1.5 mg eksojen melatoninin uyuma süresini değiştirmeden, uyku saatini düzenlediğinin (Rajaratnam ve ark 2004), ortaya konulması, melatoninin uyumayı sağlayıcı etkisinden daha çok, uyku zamanının belirlenmesinde etkili olduğunu gösterir.

Melatoninin faz değiştirme etkisi, onun uygulanma zamanına bağlıdır. Melatoninin akşam ve gecenin ilk yarısında alınması sirkadiyen ritmi ilerletirken, gecenin ikinci yarısında ve sabahın ilk saatlerinde alınması fazın gecikmesine neden olur. Bu etkileri oluşturan melatonin dozu 0,5 ile 10 mg/gün arasındadır (Lewy ve ark 1992). Faz ilerlemesinin ve gecikmesinin büyüklüğü alınan doza bağlıdır (Deacon ve Arendt 1995). Melatonin, plasentayı geçtiği anda fetusun biyolojik saatinin düzenlenmesinde de aktif rol oynayabilir (Claustrat ve ark 2005).

Melatonin desteğinin sirkadiyan ritmi değiştirici etkisi, SCN'de MT2 reseptörlerinin bulunmasıyla ilişkilendirilir (Liu ve ark 1997). Zaten melatoninin kronobiyotik etkisinin SCN'deki elektriksel ve metabolik aktivitesinden kaynaklandığı hem in vivo, hem de in vitro olarak gösterilmiştir (Pevet ve ark 2002). SCN'ye direkt olarak melatonin uygulanması, melatonin piklerinin sıklığını önemli derecede artırır, dolayısıyla melatoninin biyolojik saati ilerletici etkisine ek olarak salınım sıklığı da direkt olarak etkilenir (Pevet ve ark 2002). Buna rağmen amplitüd modülasyonu, SCN'deki saat gen ekspresyonuyla ilgisiz gibi görünüyor (Poirel ve ark 2003).

1.1.9. Depresyonda Melatonin

Birçok çalışma, depresyonlu hastalarda melatonin seviyelerinin değiştiğini göstermiştir. Ruhsal bozukluğu olan hastalarla ilgili melatonin çalışmaları, birçok araştırmada konu edilmiştir (Srinivasan ve ark 2006). Bu araştırmaların çoğunda major depresif bozukluğu olan hastalarda melatonin artışlarının olmasına rağmen, melatonin seviyelerinin düşük olduğu görülmüştür (Rubin ve ark 1992, Crasson ve ark 2004). Melatonin faz-değişimi major depresif bozukluğunda önemli bir özelliktir ve düşük melatonin seviyesi depresyon için 'trait marker' olarak tanımlanmıştır (Beck-Friis ve ark 1985). Bir grup bipolar depresif hastalarda iyileşme süreci boyunca, melatonin salgısının düşük seviyede olduğu bulunmuştur (Souetre ve ark 1989). Aslında, melatonin salgısının büyüklüğü bipolar hastalarda 'duruma bağımlı' olduğu belirlenmiştir (Mayeda ve ark 1998). Antidepresan kullanan majör depresif bozukluğu olan hastaların tedavisinde, klinik durumunun ilerlemesiyle birlikte plazma melatonin seviyeleri ve üriner aMT6S (6-Sülfatoksimelatonin) atılımının arttığını göstermiştir (Venkoba Rao ve ark 1983, Thompson ve ark 1985, Golden ve ark 1988). Melatonin, ruhsal bozukluklar tedavisinde terapötik ajan olduğu için CRSD (Sirkadiyen Ritim Uyku Bozukluğu) tedavisinde başarılı olmuştur (Matsubara ve ark 2003). 3mg melatonin tedavisi, uykuyu önemli ölçüde iyileştirir fakat depresif bozuklukların klinik durumunu iyileştirmemiştir (Dolberg ve ark 1998). Bu çalışmalardan, agomelatine yeni bir melatoninerjik antidepresan olarak ortaya çıkmış ve depresyon tedavisinde kullanılabilceği kanıtlanmıştır (Den Boer ve ark 2006). Agomelatin, MT1/MT2 melatonin agonist ve seçici antagonist olan 5-HT_{2c} reseptörü, depresyonlu birçok hayvan modellerinde aktif olduğu kanıtlanmıştır (Den Boer ve ark 2006).

1.2. Çinko

Çinko demirden sonra vücutta en çok bulunan ve vücuttaki proteinlerin %10'unun bağlandığı bir mikro besin elementidir. Çinko serbest halde Zn⁺² olarak bulunmakla birlikte, birçok yapıyla bağ kurarak, bu yapılara görevlerini yapabilecekleri özellikler kazandırmaktadır. DNA polimeraz ve RNA polimeraz gibi 7200 enzim (Mason 2016); TFIIIA, GATA 6 ve DM gibi birçok parmak proteini

(Laity ve ark 2001); insan prolaktin (hPRL) ve büyüme hormonu (hGH) gibi birçok hormon (Voorhees ve ark 2011) çinkoyu bağlayarak görevlerini yapabilecekleri özellikler kazanırlar.

Çinko kemik, kas ve kıkırdak dokunun gelişimi için gereklidir. Çinko kemik hücrelerinden osteoblastların aktivitesini artırmakta, osteoklastların aktivitesini ise inhibe etmektedir (Hie ve Tsukamoto 2011). Çinko osteoblastik hücrelerde hücresel proliferasyonu, alkalen fosfataz aktivitesini ve kollojen sentezini uyararak osteogenik etkiyi geliştirebilir (Seo ve ark 2010). Çinkonun eksikliği durumunda ise bu dokularda önemli bozukluklar ortaya çıkmakta ve gelişimleri sekteye uğramaktadır. Miyotonik distrofi tip II (Raheem ve ark 2010) ve Ehlers-Danlos sendromu (Fukada ve ark 2008) gibi bağ dokuyula ilişkili hastalıklar çinkoyla da ilişkilendirilmektedir.

Çinko bir nöromodülatör ve nörotransmitter olarak görev almaktadır. Çinko sinir hücrelerinde presinaptik alandan salınmakta ve postsinaptik alanda etki göstermektedir (L1 ve ark 2001). Çinko bu nedenle öğrenme ve hafızayla ilişkilendirilmektedir (Tamano ve ark 2016). Çinkonun eksikliği ise sinir sistemiyle ilgili olarak öğrenme güçlüğü, hafıza kaybı ve depresyona neden olmaktadır (Tassabehji ve ark 2008, Adlard ve ark 2010).

Bağışıklık sistemiyle ilgili olarak çinko önemli etkilere sahiptir. Çinko eksikliği T hücrelerinin yüzdesinin ve NK hücrelerinin litik aktivitesinin azalmasına neden olur (Daaboul ve ark 2012). ZIP 14 KO (ZIP 14 geni baskılanmış) farelerinde ise IL-6 seviyesi ciddi şekilde azaldığı rapor edilmiştir (Aydemir ve ark 2012).

Çinkonun apoptozis üzerindeki etkisi tartışılmaya devam edilmektedir. Çinkonun apoptozisi uyardığını ifade eden çalışmalar olmakla beraber, apoptozisi inhibe ettiğini ifade eden çalışmalar da bulunmaktadır. Çinkonun apoptozisi önlediğine dair çalışmalar bunu daha çok üretimi inhibe edilen kaspaz 3 ve kaspaz 8'e bağlamaktadır (Smith ve ark 2012, Pourhassanali ve ark 2016). Çinkonun apoptozisi uyardığına dair çalışmalar ise bunu daha çok ERK (Ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz)'nin inaktivasyonuna ve mitokondri üzerinden gerçekleşen sitokrom c üretimine dayandırmaktadır (Pang ve ark 2013).

ZİP ve ZnT olmak üzere iki çinko taşıyıcı protein ailesi bulunmaktadır. ZİP protein ailesi ekstrasellüler alandan ve hücre içi kompartmanlardan sitozole çinko taşır. ZnT ise sitozolden hücre içi kompartmanlara ve ekstrasellüler alana çinkoyu taşır (Kimura ve Kambe 2016). Bu proteinlerle ilgili herhangi bir doğal mutasyon veya bu protein genlerinin laboratuvar ortamında baskılanması çinkonun vücuttaki işleviyle ilgili olarak önemli bilgiler sağlamaktadır. Aynı şekilde bu taşıyıcı protein genlerinin mutasyonu bir çok hastalığın patogenezinde rol oynar.

Çinko canlı için bir mikro besin elementidir ve hücre için hayati faaliyete katılmaktadır. Çinko canlı için önemli olmasının yanında hücrede gereğinden fazla bulunduğunda toksik etkilere yol açmaktadır (Kao ve Rusyniak 2016). Bu toksik etkilerin oluşmasını engellemek için, çinko ya hücre dışına atılmakta ya hücrede çeşitli veziküllerde depo edilmekte veya bazı protein ve bileşiklerle birleştirilerek toksik etkileri ortadan kaldırılmaktadır (Beyersmann ve Haase 2001). Çinkonun toksik etkilerinin ortadan kaldırılması ve onunla birleştirilmesi için üretilen proteinlere metallothioneinler denir (Nakashima ve Dyck 2009).

Çinko hücrede tek başına ve doğrudan etkilere sahip olmakla birlikte, başka besin elementleri ve hormonları da etkilemekte ve komplike etkiler ortaya çıkarmaktadır. Çinkonun emilimi Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} ve Cd^{+2} gibi iki yüklü iyonlar tarafından inhibe edilmekte, Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi iyonlardan ise etkilenmemektedir (Colvin ve ark 2003). Overektomili ratlara çinkonun sağlanması, azalan kalsiyum ve fosfatı restore etmektedir, borun sağlanması ise çinkonun oranını yükseltmektedir (Yazıcı ve ark 2011, Baltacı ve ark 2014). Çinko eksikliği olan ratlarda önemli oranda melatonin eksikliği olduğu, çinko sağlanan gruplarda ise melatonin oranının önemli oranda yüksek olduğu gözlenmiştir (Bediz ve ark 2003). Melatonin sağlamanın ise diyabetten sonra düşen karaciğer çinko düzeyini önemli oranda iyileştirdiği bulunmuştur (Bicer ve ark 2015). Dört hafta gibi uzun bir süre 3mg/kg/gün melatonine maruz kalma ise testis gibi dokulara zarar vermekte, çinkonun sağlanması ise bu tahribatın önüne geçmektedir (Tuncer ve ark 2011).

1.2.1. Çinkonun Bağ Doku ve Kıl Gelişimi Üzerindeki Etkisi

Kemik, kırık ve yağ doku bağ dokunun alt tiplerini oluşturmaktadır (Kierszenbaum ve Tres 2015). Bağ dokunun en önemli yapı taşı kollojenlerdir. Prokollojenler düz endoplazmik retikulum içinde prolin ve hidroksprolin hidrosilasyonuna uğrayarak kararlı bir hale gelirler (Merrett ve ark 2012). Vücutta en çok kemik ve kasta bulunan çinko, kollojenin parçalanmasını inhibe etmektedir (Nakashima ve Dyck 2009, Osorio ve ark 2011). Kollojenler aynı zamanda gelişim süresince çinko bağımlı endoproteinler olan kollejenazlar tarafından da yeniden düzenlenir (Lovejoy ve ark 1994, Kierszenbaum ve Tres 2015).

Fibroblastlar cilt, tendon ve ligamentlerin matriksini üreten hücrelerdir. Fibroblastlar bu matriks elemanlarından proteoglikanları, glikoproteinleri ve kollojen ve elastinin öncü maddelerini sentezlemektedir (Kierszenbaum ve Tres 2015). Çinko aspartat 16 μM 'lık konsantrasyonda hücre kültürü ortamında insan fibroblast proliferasyonunu artırır (Tyszka-Czochara ve ark 2014).

İskelet kası kök hücreleri stres, zorlanım ve aşırı yüklenme gibi çeşitli uyarılara cevap olarak aktive edilir ve birçok miyojenik progenitör hücreleri üretmek için hücre siklusuna girer ve çoğalırlar. Bu hücreler daha sonra miyofibrilleri oluşturmak için farklılaşır ve kaynaşırlar. Çinkonun C2C12 miyoblastlarında proliferasyonu desteklediği, fakat miyojenik ekspresyonu ve miyotüb oluşumunu azaltmakla birlikte farklılaşmayı inhibe ettiği gösterilmiştir (Ohashi ve ark 2015).

12 haftalık bir uygulama süresinden sonra, çinko içeren trikalsiyum fosfat kemikleşmeyi artırdı ve çinko içermeyen trikalsiyum fosfat ise kemik oluşumuna herhangi bir etkide bulunamadı (Luo ve ark 2014). Post menopozal kadınlarda çinkonun kalsiyumla beraber aynı oranda sağlanması kemik kaybını önleyebilir (Sunar ve ark 2008). Çinkonun kemikleşmeyi artırması osteoblastik hücre proliferasyonunu ve alkalen fosfataz aktivitesini artırmasıyla ilişkilidir (Seo ve ark 2010). Çinko aynı zamanda osteoklastik kemik oluşumunu inhibe etmekte, osteoblastik kemik oluşumunu ise uyarmaktadır (Baltaci ve ark 2014). Mezenkimal kök hücreleri Osteoblast benzeri hücrelere dönüşürken hem çinko emilimi hem de

Çinko taşıyıcı Zip 1 proteininin ekspresyonu arttı. Buradan osteoblastların kök hücrelerine göre daha fazla çinko kullanımına gereksinim duyduğu sonucunu çıkarabiliriz (Tang ve ark 2006).

Çinko taşıyıcı proteinlerle ilgili mutasyonlar çinkonun görevleriyle ilgili önemli bilgiler sağlamakta ve kas ve bağ doku problemlerini de kapsayan önemli hastalıklara ışık tutmaktadır. Ehlers-Danlos sendromu postnatal büyümede gecikme, iskelet ve bağ doku anomalileri, parmakların eğri olması, ekstremitelerin aşırı esnek olması, göz akının mavimsi olması ve azalan hidroksi kollojen düzeyi ile karakterizedir. Golgi organelinden sitoplazmaya çinko taşıyan ZIP 13 geni mutasyonu Ehler-Danlos sendromuna neden olmaktadır (Kimura ve Kambe 2016). ZIP 13 geni baskılanmış fareler kemik, diş ve bağ doku yönünden bu sendroma benzeyen semptomlar sergilemiş, osteoblast, kondrosit, odontoblast ve fibroblastın olgunlaşmasında eksiklikler ortaya çıkmış, kemik morfogenetik protein (BMP) ve TGF-β sinyalinde yetersizlikler kaydedilmiştir. Bu alışmayla ZIP 13 ve çinkonun bağ dokuyla ilişkisi ise bir kez daha rapor edilmiştir. Miyotonik distrofi yetişkinlerde en genel kas hastalıklarından biridir ve yine bu hastalığın temelinde de çinko parmak proteini 9 (ZNF 9)'un olduğu belirtilmektedir (Raheem ve ark 2010).

Kıl gelişimi telogen, anagen, katagen ve ekzogen evrelerinden oluşmaktadır. Bu evrelerden telogen dinlenme evresi, anagen ise büyüme evresi olarak bilinmektedir (Paller ve Mancini 2011). Çinko eksikliği durumunda telogen ve anagen evreleri bölünmekte ve kellik ortaya çıkmaktadır. Kıl gelişimi için aynı zamanda kemik morfogenetik protein önemli bir sitokindir (Randall ve Botchkareva 2008). Çinko taşıyıcısı ZIP 13 eksikliği bu proteini azalmaktadır (Fukada ve ark 2008). Sonuç olarak çinko ile ilgili bazı aksaklıkların görülmesi durumunda ise kelliğin ortaya çıkma ihtimali artmaktadır.

1.2.2. Çinkonun Sinir Sistemi, ğrenme ve Depresyon zerine Etkisi

Çinko içeren akson terminalleri bütün telensefalonda bulunur. Beyindeki inko konsantrasyonu 10nM-10μM arasında ve özellikle neokorteks, hipokampüs, stratum ve amigdalada yoğun bir şekilde bulunmaktadır (Paoletti ve ark 2009,

Takeda 2014, Mlyniec ve ark 2015). Hipokampus ve amigdala işbirliği halinde çalışır ve duygusal belleğin oluşmasında görev alırlar (Barrett ve ark 2010).

Çinko presinaptik alandaki veziküllerin içine, ZnT 3 vesilesiyle taşınır (Chi ve ark 2008) ve gelen uyarıya bağlı olarak sinaptik alana boşaltılır. Boşaltılan çinkonun miktarı uyarının derecesine ve sıklığına bağlıdır. Çinkonun serbestlenmesi, sodyuma bağlı bir aksiyon potansiyeli ve ekstrasellüler kalsiyum gerektirir (Li ve ark 2001, Besser ve ark 2009).

Sinaptik olarak serbestlenen çinko hipokampusün CA3 bölgesinde seçici bir şekilde postsinaptik alandaki çinkoya duyarlı reseptörleri aktive etmektedir. Çinkoya duyarlı reseptörlerin aktivasyonu, ekstrasellüler düzenleyici kinazın ve kalsiyum/kalmodulin kinaz II'nin fosforilasyonunun yanında, kalsiyumun intrasellüler olarak serbestlenmesini uyarmaktadır (Besser ve ark 2009). Çinko postsinaptik nöronlarda NMDA reseptörleri, kalsiyumu geçirebilen AMPA/kainat reseptörleri ve voltaja-bağlı kalsiyum kanalları vesilesiyle taşınabilir (Li ve ark 2001).

Veziküler çinko içeren nöronlar, glutamaterjik, glisinerjik veya γ -aminobütirik asit (GABA)-erjiktir. Veziküler çinkolu GABAerjik nöronlar spinal kord ve serebellumda bulunurken, glisinerjik nöronlarla beraber bulunan veziküler çinko önemli oranda spinal kordda bulunmaktadır (Nakashima ve Dyck 2009). Veziküler çinko içeren glutamaterjik nöronlar, zincerik nöronlar olarak da ifade edilmektedir (Takeda ve ark 2014). Talamus, beyin sapı veya spinal kordun sinir innervasyonları zincerik değil iken, kortikokortikal, kortikolimbikal veya limbo-kortikal olarak uzanan nöronlar önemli oranda zinceriktir (Nakashima ve Dyck 2009). Bilinçle ilgili olarak çinkonun etki mekanizması iki şekilde betimlenmektedir: Zincerik nöronlarda çinko ve glutamat beraber presinaptik alandaki veziküllerden sinaptik alana boşaltılır, glutamat postsinaptik sinirdeki kanalın açılmasını sağlarken, çinko açılan kanaldan postsinaptik alana girerek bilincin oluşmasında görev alır. Zincerik olmayan nöronlar da ise glutamat tek başına veziküllerin içinden sinapsa boşaltılır ve glutamat post sinaptik alana giderek kanalların açılmasını sağlar. Çinko ise daha önceden bulunduğu sinaptik aralıktan postsinaptik alana girerek bilincin oluşmasını sağlar (Tamano ve ark 2016).

ZnT3 presinaptik alanda çinkonun veziküllerin içinde toplanmasında görev alır (Chi ve ark 2008). ZnT3 geni bastırılmış farelerde sosyal davranışlarda ve nesneleri fark etmeyle ilgili olarak hafıza da eksiklikler ortaya çıkar (Martel ve ark 2011). Bu değişiklikler öğrenme ve hafızayla ilgili olarak hipokampüsün anahtar proteinlerindeki önemli değişikliklerle ilgilidir. Bu değişiklikler presinaptik protein SNAP25 (-46%; $p<0.01$); postsinaptik protein PSD95 (-37%; $p<0.01$); glutamat reseptörleri AMPAR (-34%; $p<0.01$), NMDAR2a (-64%; $p<0.001$) ve NMDAR2b (-49%; $p<0.05$)`nin azalan düzeyiyle ilişkilidir (Adlard ve ark 2010).

GPR39 reseptörü anti-depresan faaliyetlerde görev alan bir reseptördür. GPR39`un antidepresyon faaliyetinde görev aldığı, escitalopram(4 mg/kg), reboxetine(10 mg/kg) ve bupropion (15 mg/kg) gibi antidepresan ilaç uygulamalarında sırasıyla %290, %816 ve %272 oranında artmasıyla ortaya çıkmıştır (Mlyniec ve Nowak 2013). Aynı şekilde çinko ve antidepresanlardan fluoxetine (5 mg/kg), paroxetine (0.1 mg/kg), desipramine (0.1 mg/kg), imipramine (0.1 mg/kg) ve bupropion(1 mg/kg)`un kombinasyonları tek başına uygulamalarla karşılaştırıldığında kuyruk gerim testinde hareketsiz kalma süresini önemli oranda azaltmıştır (Cunha ve ark 2008). Üç hafta çinko eksik diyetle (1 ppm) beslenen erkek fareler, depresyonla ilişkili anksiyete benzeri davranışlar sergilemiştir (Tassabehji ve ark 2008). Çinkonun eksikliği, GPR39 Zn^{+2} duyarlı reseptörün down regülasyonu ile ilişkili olarak depresif davranışlara yol açmakla birlikte, çinkonun sağlanması antidepresif etkiler ortaya çıkarmaktadır. Çinko GPR39`a bağlanır ve anti depresif faaliyetlerde önemli roller oynar. Çinkonun GPR39`a bağlanması beyin kaynaklı nörotrofik faktör gibi proteinlerde bir artışa yol açan, sinyalleri tetiklemektedir (Mlyniec ve ark 2015). Çinko, dopaminerjik nöronlar tarafından eksprese edilen, bir membran proteini olan, dopamin taşıyıcısını da düzenler. Çinkonun düşük oranda bulunması HEK293 hücrelerinde dopamin emilimini azaltmıştır (Piffl ve ark 2009). Dopaminerjik sistemin bozulması ise depresyona neden olmaktadır (Hori ve Kunugi 2013).

1.2.3. Çinkonun Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

Çinko oksidanların üretiminde ve metallerin uyardığı oksidatif hasarın düzenlenmesinde görev alır. Proteinlerin sistein kısmında çinkonun sülfürle ilişkisi önemlidir. Çünkü, metaller, nitrik oksit, peroksitler, oksitlenmiş glutasyon ve diğer tiyol oksidan türleri tarafından çinko proteinlerin bu kısımlarından koparılır ve bu proteinler işlevsiz hale getirilir (Oteiza 2012). Çinkonun yapısına katıldığı moleküllerden bir tanesi de NOS (Nitrik oksit sentaz)'dir. NOS'nin yapısındaki çinko, sepsis, inflamasyon, iskemi-reperfüzyon ve arterosklerosis süresince üretilen peroksinitrit (ONOO⁻) tarafından serbest hale getirilir ve bu süper oksit anyonlarının (O₂⁻) artışına neden olur (Zou ve ark 2002). Çinko eksikliği ve overektomiyle beraber kemik ve eritrositlerde glutasyon düzeyi de azalmaktadır (Baltacı ve ark 2004). Glutasyon düzeyinin azalması ise oksidatif strese neden olmaktadır (Sekhar ve ark 2011). Çinko uygulaması yüzme egzersiziyle beraber glutasyon düzeyini artırır ve oksidatif stresi önler (Bicer ve ark 2012).

Ekstrasellüler çinkodaki azalma, kalsiyum emilimine ve protein kinaz C/ NADPH oksidaz ve NOS'nin kalsiyuma bağlı aktivasyonuna yol açan, NMDA reseptörünün aktivasyonu aracılığıyla nöronal oksidanlarda bir artışa yol açar (Aimo ve ark 2010, Eide 2011). Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve nörotropin (NT)-4/5 NADPH oksidasyon düzeyini artırır. NADPH oksidaz inhibitörü, 4-(2-aminoetil) benzen sülfonid florid (AEBSF) ise serbest oksijen radikallerindeki artışı azaltmaktadır (Hwang ve ark 2002). Sonuç olarak NADPH oksidaz meydana gelen serbest oksijen türlerinin artışına aracılık etmektedir. Çinkonun sağlanması ise reaktif oksijen türlerinin üretilmesini baskılamakta (Hie ve Tsukamoto 2011) ve anti oksidan sistemleri aktive ederek artan oksidatif stresi inhibe etmektedir (Baltacı ve ark 2014).

Sadece çinkonun azalması değil çinkonun aşırı artması da yine reaktif oksijen türlerinin artmasına neden olur. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve intrasellüler çinko birbiriyle ilişkilidir. ROS, çinko bağlayan proteinlerin oksidasyonunu sağlar ve sitoplazmik kompartmanlardaki çinkonun serbestlenmesine neden olurken (McCord ve Aizenman 2014), çinkonun sitoplazmada fazla artması da ROS'un artmasına neden olur (Sensi ve Jeng 2004).

1.2.4. Çinkonun Apoptozis Üzerindeki Etkisi

Çinko eksik diyetle beslenen farelerin hipokampusunda, fas, fasligand (FasL), apoptozis uyarıcı faktör ve kaspaz 3 gibi apoptozis proteinleri aktive olur (Gao ve ark 2009). Çinkonun ekstrasellüler alanda azalması NMDA reseptörlerinin aktivasyonuna (Hie ve Tsukamoto 2011), bu da kaspaz 3'ün aktivasyonuna ve apoptozise neden olur (Dittmer ve ark 2008). İnsan nöronal öncü hücrelerde (NT-2) ise çinko eksikliğinde, p53'ün üzerinden gerçekleşen bir sinyal zinciriyle, reaktif oksijen türleri artar, apoptozis uyarıcı faktör mitokondrinin dışına atılarak mitokondrinin bütünlüğü bozulur, mitokondriyal membran potansiyeli %24 azalır ve apoptozise yol açacak pro-apoptotik mitokondriyal protein BAX artar (Seth ve ark 2015).

Çinko eksikliği birçok hücrede apoptozisi uyarırken, çinkonun sağlanması apoptozisi baskılamaktadır. Kültüre edilmiş sertoli hücrelerinde, 8µM'lık çinko uygulaması kaspaz 3 ekspresyonunu azaltarak apoptozisi baskılar (Pourhassanali ve ark 2016). Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerine yönelik 10 µMol/L'lik çinko uygulaması hücrel apoptozisi azaltmış, hücrel canlılığı geliştirmiş, vasküler kaynaklı endotelial büyüme faktörünü artırmış ve Akt aktivasyonunu up regüle etmiştir (Zhang ve ark 2011). ZnO eozinofillerde kaspazları inhibe ederek apoptozisi geciktirmiş (Silva ve Girard 2016), HCT-116 kolon epitelyal hücrelerinde ise çinko uygulaması, deksolatın neden olduğu apoptozisi ve reaktif oksijen türlerinin üretilmesini bloke etmiştir (Smith ve ark 2012).

Çinkonun apoptozisi baskıladığına dair çalışmalar olmakla beraber, çinkonun apoptozisi uyardığına dair çalışmalarda vardır. Burada önemli olan, uygulanan çinkonun konsantrasyonu, uygulama süresi, hücre çeşidi, çinkodan önce uygulanan madde ve uygulama şeklidir. Çinko oksit nanopartikülleri PI3K/Akt/kaspaz-3/7 aracılığıyla apoptozisi, LOX'un aracılık ettiği ROS üretimiyle nekrozisi uyarmıştır (Kim ve ark 2015). İnsan prostat kanser hücrelerinde çinkoya maruz kalma, intrasellüler çinkoda artmaya ve apoptozise uğrayan hücrelerin çoğalmasına neden olmuştur. Bunun Bax'ın artan düzeyi veya azalan Bcl-2 ve sürvinin ekspresyonundan kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (Ku ve ark 2012). Çünkü, sürvinin kaspazları

direk olarak inhibe eder ve apoptozisi önler, sürvivinin baskılanması ise apoptozisi uyarır (LaCasse ve ark 1998).

1.2.5. Çinkonun Bağışıklık Sistemi Üzerindeki Etkisi

Çinkonun sağlık için gerekliliğini gösteren ilk bilgiler 1930'da ki hayvan çalışmalarında büyüme için önemli olduğunu gösteren rapordur(Todd ve ark 1934). Ancak 1960'lara kadar insan popülasyonunda çinkonun önemi anlaşılamadı (Prasad ve ark 1961). 1960'ların başında Mısır ve İran'da ergenlik dönemindeki gençlerde büyümede gerilik ve hipogonadizmle karakterize fonksiyon bozukluklarından çinko eksikliğinin sorumlu olduğu anlaşıldı. Bu hastalık tablosu bunu ortaya koyan araştırmacının ismiyle "Prasad sendromu" olarak adlandırıldı (Prasad ve ark 1963). Daha sonraki yıllarda paranteral beslenme üzerinde çinkonun tedavide etkili olabileceği açıkça gösterildi (Prasad ve ark 2004). Son 40 yılda bağışıklık hücreleri ve onların fonksiyonları üzerinde çinko eksikliğinin ve besinsel çinko takviyesinin etki mekanizmalarına ait bilgiler hızlı bir gelişme gösterdi. Bu günkü bilgilerimize göre çinkonun besinsel olarak yetersizliği dünyada 2 milyar insanı etkilemektedir (Prasad ve ark 2004).

1.2.6. Bağışıklık Sisteminde Çinko Yetersizliği

Marjinal çinko yetersizliğinin klinik belirtileri arasında bağışıklık, tat ve koku duyusunun bozulması, gece körlüğünün başlaması, hafızanın bozulması ve erkeklerde spermatogenezin azalması öncelikle sayılabilir (Walsh ve ark 1994, Zalewski 1996). İnsanlarda aşırı çinko yetersizliği, ileri derecede bozulmuş bağışıklık fonksiyonları, enfeksiyonlara eğilimde artış, ishal, kellik ve mental bozukluklarla karakterize edilmektedir (Kay ve Tasman-Jones 1975, Walsh ve ark 1994). Benzer belirtiler çinko yetersizliği olan laboratuvar hayvanlarında da ortaya çıkmaktadır (Prasad ve ark 2004).

Çoğu insan ve hayvan araştırmaları çinko yetersizliğinin bulaşıcı hastalıklara direnci azalttığını gösterir (Prasad ve ark 2004). Bu nedenle çinko desteği enfeksiyon esnasında uygulandığında yararlı etkilere sahiptir. Çinko pastillerinin yaygın soğuk algınlığının süresini azalttığı gösterildi ve okul öncesi çocuklardaki çalışmalar, çinko

takviyesinin bir ishal vakası esnasında %30'un üzerinde hastalık oranını azalttığını gösterdi (Sazawal ve ark 1996). HIV virüslü hastalarda çinko yetersizliği sıklıkla görülür ve hastalığın ilerlemesine serum çinko konsantrasyonlarının azalması ve phytohemagglutinin (PHA)'in mitojenik yanıtlarının baskılanması eşlik eder (Pifer ve ark 1987, Bogden ve ark 1990). Bu değişiklikler çinko takviyesiyle kısmen tersine çevrilebilir (Wang ve ark 1994). Yine, AIDS'in fare modelinde, dalağında içeren tüm dokularda çinko konsantrasyonlarındaki baskılanma ilginçtir (Wang ve ark 1994). Ancak çinko takviyesinin AIDS hastalarının ilerlemiş evrelerinde yararlı olduğu gösterilememiştir (Tang ve ark 1996). Ancak şurası kesindir ki; canlı organizmada çinko enfeksiyona direncin kuvvetli bir aracıdır (Prasad ve ark 2004).

Lenfopeni insanlarda ve hayvanlarda çinko yetersizliği durumunda yaygındır, merkezi ve periferik lenfoid dokuların her ikisinde de meydana gelir (Fraker ve ark 1986). İki haftalık süreyle çinko yetersizliği olan diyetlerle beslenen yetişkin farelerde periferik kan ve dalak dokusundaki T ve B lenfositin sayıları azaldığı gösterilmiştir (Prasad ve ark 1988, Moulder ve Steward 1989). Çinko yetersizliği yalnızca lenfosit konsantrasyonlarını azaltmakla sonuçlanmaz T ve B lenfosit fonksiyonlarını bastırır (Prasad ve ark 1988, Moulder ve Steward 1989).

1.2.7. Bağışıklık Gelişimi Üzerine Fetal Çinko Yetersizliğinin Etkileri

Fare ve insan olmayan primatlarda gebeliğe ait çinko yetersizliği fetus üzerine kısa ve uzun dönemde sağlık için zararlı etkilere sahiptir (Beach ve ark 1982, 1983). Önemli derecede azalmalar marjinal çinko eksikliği olan farelerin doğan yavrularının lenfoid organ büyüklüğü ve gama globülin konsantrasyonlarında görülür (Beach ve ark 1982, Beach ve ark 1983). Maymunlarda çinko yetersizliği hipogamaglobulinemi, periferik kan lenfosit mitojenlerinde ve nötrofil fonksiyon azalmaya yol açar (Keller ve Fraker 1986, Vruwink ve ark 1988). Maternal çinko eksikliğine bağlı olan intrauterin büyüme yavaşlaması yıllarca devam edebilen hücresel bağışıklığın baskılanmasıyla sonuçlanır (Keller ve Fraker 1986, Vruwink ve ark 1988). Ayrıca 1 yaşın üzerinde oluşan besinsel yetersizlikler timus büyüklüğünde sürekli azalmalarla sonuçlanmaktadır (Vruwink ve ark 1988).

Çinko durumu aynı zamanda gebeliğin son dönemi esnasında anneden fetusa antikorların plasental transportunu etkileyebilir. Çünkü çinko normal plasental gelişim için önemlidir, yetersizlik durumunda çocuk tarafından maternal antikorların kazanımı rahimdeki azalma ile sonuçlanabilir (Herzenberg ve ark 1992).

Orak hücre anemili hastalarda periferik T lenfosit sayıları baskılanmış, CD4⁺, CD8⁺ T lenfosit oranları, doğal öldürücü hücre aktivitesi ve IL-2 düzeyleri azalmış, bir timik hormon olan timulinin aktivitesi engellenmiştir (Tapazoglou ve ark 1985, Prasad ve ark 1989). Çinko takviyesi bozulan bu immünolojik indeksleri geri çevirmiştir (Abdallah ve ark 1988).

Yaşlı insanlarda bağışıklık fonksiyonlarındaki azalma çinko yetersizliğinden kaynaklanabilir, zira yaşlı insanlara çinko takviyesi enfeksiyonla bağışıklık cevabını artırırken, yara iyileşmesindeki gecikmeyi de tersine çevirmiştir (Garfinkel 1986, Prasad ve ark 1993).

1.2.8. Bağışıklık Sisteminin Özel Hücreleri Üzerine Çinkonun Etkileri

T lenfositlerin gelişimi

İnek, domuz ve sıçanlar ile şiddetli çinko eksikliği olan çocuklar da çinko yetersizliği T lenfosit gelişimi için merkezi bir organ olan timusun büyüklüğündeki önemli azalmaları tanımlar (Miller ve ark 1968, Shanklin ve ark 1968, Julius ve ark 1973, Haas ve ark 1976)

Çinko eksik diyetle beslenen farelerde 4 hafta sonra timusun orijinal büyüklüğünün %75'ini kaybettiği, 6 hafta sonra ise yalnızca birkaç timositin timik kapsülde kaldığının rapor edilmesi çinko-timus ilişkisine çarpıcı bir örnektir (Fernandes ve ark 1979). Çinko eksikliği görülen akrodermatitis enteropatikalı çocuklarda lenfositlerin sayısının azaldığı, özellikle de kan ve periferik lenfoid dokulardaki T lenfositlerin oranının azaldığı bildirilmiştir (Julius ve ark 1973). Deneysel insan modelindeki son çalışmalar CD8⁺ CD73⁺ T lenfositlerin prekürsörlerinin ve sitotoksik T lenfositlere oranının çinko yetersizliğinde azaldığını da göstermiştir (Golden ve ark 1977).

Gecikmiş aşırı duyarlılık ve sitotoksik aktivite gibi T lenfosit tepkileri, çinko eksikliği esnasında baskılanırken, çinko takviyesiyle tersine dönüştürülür (Sazawal ve ark 1997). Yetersiz beslenen çocuklarda baskı altına alınmış gecikmiş aşırı duyarlılık tepkileri çinko takviyesinden sonra düzeltilmiştir (Sazawal ve ark 1997). İn vitro çalışmalar IL-2 aktivitesi ve T lenfosit hücre çoğalması için çinkonun gerekli olduğunu göstermiştir (Tanaka ve ark 1990).

Yardımcı T4-lenfositleri sitokin salgılarına göre Th1 ve Th2 olarak ikiye ayrılmıştır. Th1, IFN- γ , IL-2 ve TNF- α üretimini sağlarken; Th2, IL-4, IL-6 ve IL-10 üretimini sağlamaktadır. Hatta Th2'nin ürettiği bir sitokin olan IL-6 ve IL-10 T-hücrelerinin IFN- γ sentezini inhibe ederek hücrel immüniteyi olumsuz etkilemektedir (Baltaci ve ark 2003, 2005). Çinko özellikle Th1 lenfositlerin aktivasyonunu artırır (Baltaci ve ark 2003, 2004).

B lenfositlerin gelişimi

Kemik iliğindeki B lenfositlerin gelişimi çinko yetersizliği tarafından negatif bir şekilde etkilenir (DePasquale-Jardieu ve Fraker 1984). Fareler 30 gün için marjinal çinko yetersizliği olan bir diyetle beslendiğinde, toplam B lenfosit ve onların prekürsörleri yaklaşık olarak %75 oranında azaltıldı. Kayıplar sırasıyla %50 ve %25 azalmalarla pre-B ve olgunlaşmamış B lenfositlerde hakim olmuştur (DePasquale-Jardieu ve Fraker 1984). Olgun B lenfositler daha az etkilenmiştir. Bu bulgu, T ve B lenfosit olgunlaşmasının tipik işaretleriyle çinko yetersizliğinde kalan farelerin dalak hücrelerinin fonksiyonel olarak normal görülmesiyle ilgili önceki çalışmalarla tutarlıdır. Böylece çinko yetersizliği dalakta daha az B lenfosit neden olarak ilikteki B lenfositlerin gelişimini engeller. Ayrıca B lenfosit antikor tepkilerinin de çinko eksikliği tarafından baskılandığı rapor edilmiştir (DePasquale-Jardieu ve Fraker 1984).

Çinko eksikliğinde bağışıklık sistemi bozuklukları ortaya çıkar. Dağılmış bir çinko homeostazisi lenfositlerin yetersiz bir şekilde oluşmasına, aktivasyonuna ve olgunlaşmasına, artan inflamasyon riskine ve hatta ölüme neden olur (Maares ve Haase 2016). Çinko eksikliği overektomili ratlarda böbrek doku hasarını artırmakta,

çinkonun sağlanması ise bu koşulları önleyebilmektedir (Baltacı ve ark 2004). Çinko bir anti oksidandır ve anti inflamatuvar etkilere sahiptir. İnflamatuvar sitokinlerinin ve reaktif oksijen türlerinin üretilmesi arterosklerozis, yaşlanma, kanser ve diğer kronik hastalıklarla ilişkilidir. Çinko uygulamasının meydana getirdiği etkiler hücrelere özgüdür. Çinko uygulanan HL-60 hücreleri, çinko eksik hücrelerle karşılaştırıldığında A20 ve A20 TNF reseptörüyle ilişkili faktör 1 kompleksini artırır, IKK-a/NF-κB sinyal yolunu, oksidatif stres markırlarını, inflamatuvar sitokinleri ve malondialdehit'i azaltır. Bir sitoplazmik çinko parmak proteini olan A20, nükleer faktör (NF-κB) aktivitesini ve tümör nekrozis faktörün (TNF) aracılık ettiği programlı hücre ölümünü inhibe eder (Lee ve ark 2000, Baltacı ve ark 2012). A20, TNF-α ve IL-1β'nin down regülasyonuna katkı sağlamaktadır (Prasad ve ark 2011). A20, TNF-α'nın uyardığı apoptozisi baskılamak için cIAP1/2'e ihtiyaç duyar. A20'nin, cIAP1/2'e bağlanması için ise yedinci çinko parmak proteinini gerektirir (Yamaguchi ve Yamaguchi 2015).

Yüksek çinko konsantrasyonu(100 μM) interlökin-1 (IL-1)'in uyardığı IL-1 reseptör kinaz (IRAK) aktivasyonunu inhibe ederken, çinko düzeyindeki azalma ise T hücre fonksiyonunun bozulmasına yol açar (Daaboul ve ark 2012). HUT-78 (T helper O (Th₀) hücre hattı) hücrelerinde, çinko eksikliği durumunda, nükleer faktör κB (NF-κB) 'nin azalan aktivasyonundan dolayı IL-2 ve interlökin 2 reseptör α'nın gen ekspresyonunda bir azalma meydana gelmiştir. Çinko eksikliğinden dolayı HUT-78 hücrelerinde azalan NF-κB (Aktif B hücrelerinin nükleer faktör kappa-hafif zincir değiştiricisi), DNA'ya azalan NF-κB bağlantısından, azalan NF-κB mRNA'larından, azalmış κB inhibitör protein fosforilasyonundan ve azalmış IκK'dan dolaydır (Prasad 2008).

1.2.9. Çinko Taşıma Proteinleri

Zrt- ve Irt-benzeri proteinler (ZIP) ve Zn taşıyıcıları (ZnT) hücre de çinko taşınmasında görev alırlar (Kimura ve Kambe 2016). ZIP proteinleri sitoplazmadaki çinkoyu hücrenin içindeki vezikül ve organellere ve hücrenin dışına taşır (Kimura ve Kambe 2016). ZnT proteinleri ise hücrenin vezikül ve organellerindeki çinkoyu ve hücrenin dışındaki çinkoyu sitoplazmaya taşır (Wang ve ark 2009). Çinko hücreye

taşıdıktan sonra %50 oranında sitoplazmada, %30-40 çekirdekte, %10 hücre zarında bulunur. Hücrede çinko fazla miktarda bulunursa metallothiyoninlerle birleştirilir ve çinko toksisitesine karşı hücre korunmuş olur (Wang ve ark 2009).

1.2.10. Metallothiyoninler

Metallothiyonin (MT) sisteince zengin düşük moleköl ağırlıklı bir peptittir. MT ağır metallerin neden olduğu toksisiteye karşı bir detoksidan olarak faaliyet gösterir. Metallothiyoninlerin uyarılması ve ekspresyonu DNA hasarı, oksidatif stres ve apoptozise karşı korumayla ilişkilendirilmiştir (Ostrakhovitch ve ark 2016). MT1 ve MT2 ekspresyonu en çok pankreas, prostat, spinal korddadır, en zayıf olarak timositlerde ve T hücrelerinde vardır. Fare MT3 ve MT4 ekspresyonu çok daha sınırlı ve dokuya özgüdür. MT3 ve MT4 önemli oranda beyin ve keratinize epitel dokuda eksprese edilmektedir. Beyaz yağ doku ve osteoblastlarda MT3 ekspresyonu belirlenmemiştir. MT4'ün ekspresyonu epidermis ve midededir (Hidalgo ve ark 2001, Swindell 2011). MT-4'ün transkripsiyonu glikoporin A⁺ ve CD71⁺ hücrelerinde de belirlenmiştir (Rahman ve Ley 2001). Genel olarak metallothiyonin immünoreaktivitesi ise normal ciltte bazal hücrelerin hem sitoplazma hem de nükleusunda gerçekleşmiştir (Romanucci ve ark 2011). Memeli metallothiyoninleri yedi tane +2 yüklü çinko iyonunu kendi sistein gruplarına bağlar. Yedi tane çinko bağlanmış metallothiyonin, bir bağlantıyla birbirinden ayrılmış, iki farklı kümeye doğru tetrahidrat olarak beraber koordine olur; N terminal β domaini [(Zn₃Cys9)³⁻] ve C terminal α domaini [(Zn₄Cys11)³⁻]. β domaini zayıf affiniteye sahip bir çinko bağlanma bölgesi oluştururken, α domaini yüksek affiniteye sahip bir çinko bağlanma bölgesi oluşturur (Pinter ve Stillman 2015).

Çinkonun sağlanması lökositlerdeki MT mRNA bolluğunu iki kat artırır (Aydemir ve ark 2006). Metallothiyonin (MT) 1 ve metallothiyonin 2 yönünden normal normal MT ^{+/+} kardiyomiyositlerinde, ZnCl₂, MT düzeyini artırmıştır ve Dox (Doxorubicin)'un kardiyotoksitesini inhibe etmiştir. Bu laktat dehidrogenaz sızmasını, kardiyomiyosit apoptozisini, DNA zararını, ROS toplanmasını engelleyebilir ve Dox tarafından uyarılan anti oksidan enzimlerinin aktivitesindeki azalmayı inhibe edebilir. Bunun yanında, ZnCl₂, Prx-2, -3, -5 ve -6'nın

ekspresyonunu artırmıştır. $ZnCl_2$, Dox tarafından uyarılan MT $+/+$ kardiyomiyositlerinde Prxs`nin azalan ekspresyonlarını inhibe edebilir, fakat metallothiyonin 1 ve 2 geni çıkarılmış MT $-/-$ farelerinde hiçbir etki ortaya çıkarmamaktadır (Jing ve ark 2016). Çinko sınırlaması MT $+/+$ farelerinde kemik büyümesini etkilememiştir. Buna rağmen, plazma ve uzun kemiklerde düşük çinko konsantrasyonuna sahip, MT $-/-$ farelerinde, daha düşük vücut yüksekliği, daha kısa ve daha küçük tibia ve femur, daha düşük kondrosit proliferasyonu ile gösterildiği gibi, büyüme durmuştur, fakat süngerimsi kemik üzerindeki osteoklastik yoğunluk artmıştır (Fong ve ark 2009). Çinko eksikliği LX-2 hücrelerinin MT ekspresyonunun inhibisyonuna yol açar. MT ekspresyonunun inhibisyonu çinko eksikliğiyle artar ve artan reaktif oksijen içeriğiyle, yetersiz mitokondriyal fonksiyonla ve sitokrom C oksidaz aktivitesinin inhibisyonuyla sonuçlanır (Kang ve ark 2015).

Metallotiyonin 1 ve 2`nin kimyasal karsinogenlere karşı koruyucu etkileri olduğu da kanıtlanmıştır. 14 haftalık 7,12-dimetilbenz[a]antresen uygulamasından sonra cilt tümörleri MT $-/-$ farelerinde gelişmiş, fakat MT $+/+$ farelerinde gelişmemiştir. Bu MT`lerin DMBA`nın uyardığı cilt tümörlerine karşı endojenik savunma faktörü olarak faaliyet gösterebileceği gösterilmiştir (Zhang ve ark 1998). Prostat kanseri hücrelerinde (PC-3), çinko MT-1 izotipleri MT-1J ve MT-1M`nin ekspresyonunu önemli oranda up regüle etmiştir(Lin ve ark 2009). Meme kanseri tümörü hücrelerindeki MT ekspresyonu tümörün agresifliğiyle ilişkili bulunmuştur (Douglas-Jones ve ark 1995). PLC/PRF/5, H460 ve HepG2 ($r = -0.991$) insan tümör hücrelerinde bazal metallothiyonin düzeyi ve etoposide`nin uyardığı apoptozis arasında ters bir orantı ortaya çıkarılmıştır. HepG2 hücrelerinde, 24 saatlik bir kadmiyum uygulamasından sonra, etoposide`nin uyardığı apoptozis azalmış ve MT düzeyi artmıştır. Çinko uygulamasında aynı şekilde etoposide`nin uyardığı apoptozisi azaltmış ve MT sentezini artırmıştır (Shimoda ve ark 2003). Tümöral hücrelerde metallothiyonin ve tümör baskılayıcı gen olan P53`ün beraber ekspresyonu ve kompleks oluşturması apoptozisin düzenlenmesiyle ilgili olabilir (Ostrakhovitch ve ark 2006). Karaciğer tümörlerinde MT sentezinin down regülasyonu p53 tümör represör geni gibi diğer genlerin mutasyonu ve MT promoterlerinin hiper metilasyonu ile ilişkili olabilir. İnsan kanser hücrelerini kullanan in vitro çalışmalar

epitelyel neoplastik hücrelerde MT'nin ekspresyonu ve uyarısı üzerine p53 ve östrojen reseptörleri için olası bir rolü önermektedir (Cherian 2003). P53⁺ ve östrojen reseptörüne sahip MCF7 hücreleri, 24 saat 10 µM CdCl₂ ile muamele edildiğinde 10.79±1.36 katlık metalotiyonin sentez uyarısı sergilerken, P53⁻ ve östrojen reseptörü bulunmayan hücreler 1.40±0.10 ve 3.65±0.30 arasında değişen az bir uyarı sergilenmiştir (Fan ve Cherian 2002). MT1 ve 2 meme, böbrek, akciğer, ovaryum, prostat, salgı bezi, mesane, servikal, endometriyal, cilt kanseri, melanoma, akut lenfoblastik lösemi gibi durumlarda artmıştır. Bu durumlarda MT 1 ve 2 ekspresyonu tümörün derecesi/evresi ve kemoterapi/radyasyon uygulamasıyla doğru orantılıdır. Karaciğer, gastrik, kolorektal, merkezi sinir sistemi ve tiroid kanserinde ise MT1 ve MT2 down regüle olmuştur (Pedersen ve ark 2009).

Metallotiyoninler yaşlanmayla ilişkilendirilmiştir. Metallotiyoninler yaşlanma ve kronik inflamasyonda artar (Vasto ve ark 2007). Veziküler çinko da aynı şekilde artan yaşla beraber hipokampus ve diğer ön beyin bölgelerinde artar. Çinko bağlı MT1 ve MT2 yaşlanmanın potansiyel bir markırı olabilir ve gelişen beyin bölgelerinde çinko metabolizmasında görev alabilir (Penkowa ve ark 1999, Mocchegiani ve ark 2001). Yaşlanmayla beraber, intrasellüler çinko homeostazisi değişir, çünkü yüksek orandaki MT düzeyi çinkoyu serbestleyemez ve çinko emiliminde görev alan çinko taşıyıcıları (ZIP ailesi) bozulabilir. Bu bağışıklık sistemi için düşük intrasellüler çinko içeriğine yol açar. Çinkonun sağlanması fonksiyonları geliştirebilir (Mocchegiani ve ark 2010). Yaşlı bireylerde metallotiyoninler timuline göre daha yüksek çinko bağlama affinitesine sahip olduğundan dolayı, çinkoyu bağlayarak azalan timik verimliliğe ve yetersiz karaciğer ekstratimik T hücre yoluna neden olabilir. Bu durumun tam tersi, metallotiyoninlerin timulin için bir çinko donörü olabileceğini ifade eden çalışmalar da vardır (Coto ve ark 1992, Mocchegiani ve ark 1998). Yaralanmış bir beyinde, MT-1 ve 2, makrofajların, T lenfositlerin, interlökinlerin, TNF-α'nın, matriks metalloproteinazların ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu inhibe eder (Penkowa ve ark 2002, Penkowa 2006). MT1 ve 2 nöronal hasar ve yıkıma karşı koruma özelliği sağlar (Stankovic ve ark 2007).

NO aynı zamandan NOS (Nitrik oksit sentetaz)'den çinkonun serbestlenmesine neden olur. Bu NOS'nin uyarılmasını ve aktivitesini baskılar (Khatai ve ark 2004). NO donörleri tarafından ekzojenik olarak uygulanan NO, nitrosative stresine neden olur ve çinkoyu depolayan metallothiyonin gibi proteinlerden çinkonun serbestlenmesine neden olur. NO donörleri tarafından ekzojenik olarak uygulanan nitrosative stresi intrasellüler çinko serbestlenmesi aracılığıyla MT mRNA ekspresyonunu artırır (Spahl ve ark 2003). Oksidatif stres ve reaktif oksijen türleri MT1 ve MT2'artırır. Metallothiyoninler çinkoyu serbestledikten sonra süper oksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri, nitrik oksit ve peroksinitrit gibi sayısız ROS'la etkileşir (Bell ve Vallee 2009). MT lizozomları kararlı hale getirerek ve apoptozisi azaltarak oksidatif strese karşı hücreleri korur (Baird ve ark 2006).

2.GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Gerçekleştirilen çalışmanın protokolü Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deneysel Hayvanları Etik Kurulu (2016-31) tarafından onaylandı. Araştırma Wistar cinsi süttten yeni kesilmiş (40 günlük) dişi sıçanlar üzerinde gerçekleştirildi. Toplam 42 dişi sıçan kullanılan araştırmada çalışma grupları şu şekilde oluşturuldu.

Grup 1, (n:6) Kontrol Grubu: Hiçbir uygulamanın yapılmadığı normal diyetle beslenen grup.

Grup 2, (n:6) DMBA Kontrol Grubu: Bu grubu oluşturan hayvanlara tümör oluşturmak amacıyla kolza yağı (kanola) içinde 80 mg/kg dozunda 7,12-dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) gavaj yoluyla verildi ve bu hayvanlar normal diyetle beslendi.

Grup 3, (n:10) DMBA+Çinko Grubu: Bu grubu oluşturan hayvanlara tümör oluşturmak amacıyla kolza yağı (kanola) içinde 80 mg/kg dozunda 7,12-dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) gavaj yoluyla verilirken, ayrıca hayvanlara standart diyetle ilave olarak 4 hafta süreyle 5 mg/kg/gün dozunda çinko intraperitoneal (ip) yolla verildi.

Grup 4, (n:10) DMBA+Melatonin Grubu: Bu grubu oluşturan hayvanlara tümör oluşturmak amacıyla kolza yağı (kanola) içinde 80 mg/kg dozunda 7,12-dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) gavaj yoluyla verilirken, ayrıca hayvanlara standart diyetle ilave olarak 4 hafta süreyle 5 mg/kg/gün dozunda melatonin ip yolla verildi.

Grup 5, (n:10)DMBA+Melatonin ve Çinko Grubu: Bu grubu oluşturan hayvanlara tümör oluşturmak amacıyla kolza yağı (kanola) içinde 80 mg/kg dozunda 7,12-dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) gavaj yoluyla verilirken, ayrıca hayvanlara standart diyetle ilave olarak 4 hafta süreyle 5 mg/kg/gün dozunda melatonin ve çinko kombinasyonu ip yolla uygulandı.

2.1.1. Deneysel Hayvanları ve Beslenmeleri

Deneysel hayvanları çalışmanın tamamlandığı zamana kadar Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinde diğer hayvanlardan ayrı bir odada tutuldu. Deneysel hayvanları çalışma süresince standart sıcaklık ve ışık ortamında (21 ± 1 °C, 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık) barındırıldılar. Hayvanlar Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen sıçan yem ve normal çeşme suyuyla beslendiler. Hayvanlar günlük temizlenen özel kafeslerde tutuldu. Hayvanların yem tüketimi yaklaşık 100 gram ağırlık başına 10 gram yem şeklinde gerçekleşti.

2.2. Deneysel Uygulamalar

2.2.1. Meme kanseri oluşturulması

Meme kanseri oluşturmak için Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, USA) firmasından temin edilen 7,12-dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) kullanıldı. Bu amaçla hayvanlara tümör oluşturmak amacıyla kolza yağı (kanola) içinde 80 mg/kg dozunda 7,12-dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) gavaj yoluyla tek doz olarak verildi. Hayvanların uygulamadan bir hafta sonra meme dokuları palpe edilerek meme dokusunun büyümesi kontrol edilmeye başlandı. Meme dokusundaki büyümeler belirgin olarak tespit edildikten sonra DMBA uygulaması yapılan 36 sıçan arasından randomize olarak seçilen 6 sıçandan genel anestezi altında bir meme dokusu alındı. Işık mikroskobu altında patolojik olarak tümör varlığı tespit edildikten sonra çinko ve melatonin uygulamalarına başlandı (Bobrowska-Korczak ve ark 2015, Skrajnowska ve ark 2015). Tümör oluşumu DMBA uygulamasından sonraki 9. hafta içerisinde patolojik olarak tespit edildi.

2.2.2. Çinko uygulaması

Çinko uygulaması çinko-sülfat şeklinde distile suda çözüldükten sonra 0.5 ml serum fizyolojik içerisinde 5 mg/kg/gün olarak ip enjeksiyonla gerçekleştirildi. Çinko sülfat uygulaması dört hafta boyunca sabah saat 9.00-10.00 saatleri arasında gerçekleştirildi.

2.2.3. Melatonin Uygulaması

Melatonin (Sigma M-5250) saf etanolde çözüldükten sonra karanlıkta ve kapalı olarak kullanılma zamanına kadar 4°C bekletildi. Stok solüsyondan 5 mg/kg/gün dozunda melatonin 0.5 ml serum fizyolojik içerisinde sıçanlara ip olarak enjekte edildi. Melatonin uygulaması çinko uygulaması gibi 4 hafta süreyle aynı saatlerde gerçekleştirildi.

2.3. Kan Örneklerinin Elde Edilmesi

Dört hafta süren deneysel uygulamaları takiben sıçanlardan genel anestezi altında EDTA'lı tüplere alınan 2 mililitrelik kan örnekleri oda sıcaklığında muhafaza edilerek, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü Çocuk İmmünolojisi ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalında bulunan (bağışıklık parametreleriyle ilgili hücre analizlerinin gerçekleştirilmesi için) immünoloji laboratuvarına götürüldü.

2.3.1. Akım Sitometri ile T, B, NK Hücre Analizi Prosedürü

Akım sitometride T, B ve NK hücre oranlarını belirlemek amacıyla Anti-Rat CD3, CD4, CD8a, CD45RA, CD161a monoklonal antikorları (BD Bioscience) kullanılarak hücre yüzey boyaması yapıldı (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. T, B ve NK hücrelerinin akım sitometrik analizinde kullanılan monoklonal antikorlar.

Hücre Tipi	T Hücreleri			B Hücreleri	NK Hücreleri
	Total T Hücre	Yardımcı T Hücre	Sitotoksik T Hücre		
Monoklonal Antikor	CD3 (APC)	CD4 (PE)	CD8 (FITC)	CD45RA (FITC)	CD161a (PE)

Kontrol, CD3(APC)/CD4(PE)/CD8(FITC) ve CD3(APC)/CD45RA(FITC)/CD161a(PE) tüpleri olmak üzere üç tüp hazırlandı. Her tüpe 100 µL rat perifer kanı eklendi. Kontrol tüpü dışındaki tüplere kitlerin prosedüründe yazan miktarda monoklonal antikorlar eklendi, vortekslendi. 20 dakika oda sıcaklığında karanlıkta

inkübe edildi. Kırmızı kan hücrelerini parçalayarak uzaklaştırmak amacıyla 1/10 oranında distile su ile sulandırılmış 10X'lik Lysing solüsyonundan (BD Bioscience) 2mL tüplere eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 1500 rpmde 5 dakika santrifüj edilerek beyaz kan hücrelerinin çökmesi sağlandı, süpernatant boşaltıldı. Tüplere 2mL PBS eklenerek 1500 rpmde 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet kısmı 500 µL PBS ile süspanse edildi. Tüpler FACS Aria III akım sitometri (BD Bioscience) cihazında okutuldu. Analizler FACS Diva Version 6.1.3 software kullanılarak yapıldı. Dot blot grafikleriyle yapılan analizlerde hücreler CD3(+) Total T hücre, CD3(+)CD4(+) Yardımcı T Hücre, CD3(+)CD8(+) sitotoksik T hücre, CD45RA(+) B hücre ve CD161a(+) NK hücreler olarak sınıflandırılarak oranları belirlendi.

2.4. İstatistik

Bulguların istatistiksel açıdan yorumlanması SPSS 21.0 bilgisayar paket programı ile yapılmış, bütün parametrelerin aritmetik ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Verilerin homojenliğinin belirlenmesi amacıyla “Shapiro-Wilk” testi yapıldı ve verilerin normal dağılım gösterdiği belirlendi. Gruplar arasındaki farkın tespitinde “Tek yönlü varyans analizi (ANOVA)” testi, farklılıklarının hangi gruptan kaynaklandığının belirlenmesi için ise çoklu karşılaştırma testlerinden olan “Duncan” testi kullanıldı. $P < 0,05$ düzeyindeki farklılıklar anlamlı olarak kabul edildi.

3.BULGULAR

Çalışma Gruplarının Lenfosit, Total T lenfosit ile CD4(+) Yardımcı T Lenfosit Yüzdelerinin Karşılaştırılması

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada en yüksek lenfosit oranları melatonin ve çinkonun kombine uygulandığı grup 5’te elde edildi ($p<0.05$). Melatonin uygulanan grup 4’ün lenfosit oranları, grup 1,2 ve 3’ten yüksek ($p<0.05$), Çinko uygulanan grup 3’ün lenfosit oranları da grup 1 ve 2’den daha yüksekti ($p<0.05$). En düşük lenfosit oranları hiçbir uygulamanın yapılmadığı genel kontrol grubunda (grup 1) elde edildi ($p<0.05$, Çizelge 3.1.). Melatonin ve çinkonun kombine uygulandığı grup 5’in Total T lenfosit yüzdeleri diğer grupların tamamından daha yüksekti ($p<0.05$). Grup 1,2,3 ve 4’ün total T lenfosit yüzdeleri birbirinden farklı değildi (Çizelge 3.1.). Çalışmamızda en yüksek CD4(+) yüzde oranları melatonin ve çinkonun kombine uygulandığı grup 5’te elde edildi ($p<0.05$). Grup 1, 2, 3, 4’ün CD4(+) yüzde oranları birbirinden farklı değildi (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Çalışmaya Katılan Grupların Lenfosit Oranı (%), CD3(+)Total T (%), CD3(+) CD4(+) Yardımcı T (%), CD4(+) (%) Yüzdeleri

Gruplar	Lenfosit Oranı (%)	CD3(+) Total T (%)	CD3(+) CD4(+) Yardımcı T (%)	CD4(+) (%)
Kontrol	13,30±2,73 ^e	55,70±4,6 ^b	45,55±2,71 ^b	47,91±4,26
DMBA Kontrol	19,40±4,61 ^d	54,88±1,9 ^b	44,13±3,39 ^b	47,26±3,44
Çinko	26,55±3,26 ^c	54,02±4,1 ^b	45,55±2,71 ^b	47,38±2,61
Melatonin	33,84±5,24 ^b	54,01±2,4 ^b	44,13±3,39 ^b	46,82±3,12
Çinko+ Melatonin	43,29±4,34 ^a	58,34±3,1 ^a	48,18±2,18 ^a	48,76±1,79

a,b,c,d,e: Aynı sütunda değişik harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0,05$).

Çalışma Gruplarının CD3(+)CD8(+) Sitotoksik T, CD8(+), CD45RA(+) B, CD161a(+) NK, CD3(+)CD161a(+) NKT Yüzdelerinin Karşılaştırılması

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada en düşük CD8 (+) yüzde oranları DMBA ile meme kanseri oluşturulmuş kontrol grubu olan grup 2’de elde edildi ($p<0.05$). Grup 1, 3, 4 ve 5’in CD8 (+) yüzde oranları birbirinden farklı değildi (Çizelge 3.2.). Çalışmamızda hiçbir uygulamanın yapılmadığı genel kontrol grubu olan grup 1’in B lenfosit yüzdeleri diğer grupların tamamından önemli şekilde düşük bulundu ($p<0.05$). Grup 2, 3, 4 ve 5’in B lenfosit yüzdeleri birbirinden farklı değildi (Çizelge 3.2.). NK hücre yüzdeleri yönünden gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Çinko uygulanan grup 3’ün doğal öldürücü T hücre (NKT) yüzde oranları diğer grupların tamamından daha yüksekti ($p<0.05$). Grup 1, 2, 4 ve 5’in NKT yüzde oranları birbirinden farklı değildi (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Çalışma Gruplarının CD3(+)CD8(+) Sitotoksik T (%), CD8(+) (%), CD45RA(+) B (%), CD161a(+) NK (%), CD3(+)CD161a(+) NKT(%) Düzeylerinin Karşılaştırılması

Gruplar	CD3(+)CD8(+) Sitotoksik T	CD8(+)	CD45RA(+) B	CD161a(+) NK	CD3(+)CD161a(+) NKT
Kontrol	17,38±1,67 ^a	20,00±1,26 ^a	22,11±3,11 ^b	6,30±1,64	1,86±0,3 ^b
DMBA Kontrol	13,48±2,62 ^b	15,41±1,42 ^b	27,36±1,72 ^a	6,51±1,77	1,85±0,5 ^b
Çinko	17,11±1,34 ^a	18,92±1,53 ^a	28,10±2,81 ^a	6,39±1,35	2,41±0,2 ^a
Melatonin	16,22±1,60 ^a	18,31±2,06 ^a	26,91±2,76 ^a	6,53±1,02	1,87±0,2 ^b
Çinko+ Melatonin	17,54±1,82 ^a	19,71±1,93 ^a	26,22±1,93 ^a	6,33±1,60	1,82±0,4 ^b

a,b,: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0,05$).

4.TARTIŞMA

Deneyisel çalışmalarda, bir polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) olan 7,12-Dimetilbenz[a]antrasen (DMBA), bir kanserojen model olarak kapsamlı bir şekilde kullanılmaktadır (Kim ve ark 2014). DMBA, bağışıklık baskılayıcı ve kanserojen olarak çoğunlukla ciltte ve meme bezinde bir tümör başlatıcı olarak görev yapar (Kim ve ark 2014). Bu nedenle, kemirgenler üzerinde DMBA kaynaklı kanser modellerinde tümöral gelişimi önlemeye yönelik ve bağışıklığı uyarıcı çeşitli maddelerin kullanımında artan bir ilgi söz konusudur (Kim ve ark 2014, Hou ve ark 2015). Bu nedenle gerçekleştirdiğimiz çalışmada deney hayvanlarında kanser oluşturmak amacıyla DMBA kullanılmıştır.

4.1. Lenfosit Yüzdelerinin Tartışılması

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada en yüksek lenfosit oranları melatonin ve çinkonun kombine uygulandığı grup 5'te elde edildi. Melatonin uygulanan grup 4'ün lenfosit oranları, grup 1, 2 ve 3'ten yüksek, Çinko uygulanan grup 3'ün lenfosit oranları da grup 1 ve 2'den daha yüksekti. En düşük lenfosit oranları hiçbir uygulamanın yapılmadığı genel kontrol grubunda (grup 1) elde edildi.

İmmünomodülatör bir hormon olan melatonin hormonunun lenfositleri X-ışınlarının yol açtığı hücre hasarından koruduğu (Rostami ve ark 2016), ayrıca bağışıklığı baskılanmış bireylerde immünolojik parametreleri aktive ederek lenfosit düzeylerinde artışa yol açtığı rapor edilmiştir (Yoo ve ark 2016). Benzer şekilde Vishwas ve Halder (2014)'da hamsterlarda eksojen melatonin tedavisinin serum kültür ortamında lenfositer parametreleri artırdığını göstermişlerdir. Lenfoid hücrelerdeki spesifik melatonin bağlayıcı reseptörlerin varlığı, immün sistemin düzenlenmesinde melatoninin doğrudan bir etkisi olduğuna kanıttır (Gonzalez-Haba ve ark 1995, Carrillo-Vico ve ark 2003). Melatoninin bağışıklık artırıcı etkisi yalnızca onun sitokin üretimini artırıcı özelliğine bağlı değildir, ayrıca onun antioksidan ve anti-apoptotik etkilerine de bağlıdır (Srinivasan ve ark 2005). Melatonin insanlarda, lenfosit hücrelerindeki IL-2 üretimini stimüle ederek otokrin

veya parakrin yollardan sentezlenir (Carrillo-Vico ve ark 2004). Zaten melatonin lenfositler üzerindeki uyarıcı etkisiyle ilgili zıt bir rapor bulunmamaktadır.

Lenfopeni insanlarda ve hayvanlarda çinko yetersizliği durumunda yaygındır, merkezi ve periferik lenfoid dokuların her ikisinde de meydana gelir (Fraker ve ark 1986). İki haftalık süreyle çinko yetersizliği olan diyetlerle beslenen yetişkin farelerde periferik kan ve dalak dokusundaki T ve B lenfositin sayıları azaldığı gösterilmiştir (Prasad ve ark 1988, Moulder ve Steward 1989). Çinko yetersizliği yalnızca lenfosit konsantrasyonlarını azaltmakla sonuçlanmaz T ve B lenfosit fonksiyonlarını bastırır (Prasad ve ark 1988, Moulder ve Steward 1989). Sonuçta bağışıklık yanıtında anahtar bir rol oynayan çinko lenfositlerin olgunlaşmasında ve aktivitesinde kritik bir rol oynar (Rosenkranz ve ark 2016). Çinko desteğine bağlı olarak serum çinko konsantrasyonundaki artış, esas olarak lenfosit hücrelerinin sayısındaki bir artış nedeniyle T hücre fonksiyonunun zenginleştirilmesi ile de ilişkilidir (Barnett ve ark 2016). Baş-boyun radyasyon tedavisi sırasında çinko sülfat takviyesi dolaşımdaki T lenfositleri ile T lenfosit alt popülasyonları üzerinde önemli hiçbir artış göstermediğinin (Sangthawan ve ark 2015) bildirilmesi çinkonun kanser immüno tedavisinde kullanımındaki zaman, doz-süre ilişkisini düşündürür. Ancak şurası kesindir ki; canlı organizmada çinko enfeksiyona direncin kuvvetli bir aracıdır ve çinkonun bu etkisindeki hedef hücreleri de lenfositlerdir (Prasad ve ark 2004).

Biz gerçekleştirdiğimiz çalışmada DMBA ile meme kanseri oluşturulmuş sıçanlarda en yüksek lenfosit oranlarını melatonin ve çinkonun kombine uygulandığı grupta (grup 5) elde ettik. Elde ettiğimiz yüksek lenfosit oranları yukarıda raporları sunulan araştırmacıların bulgularıyla uyumludur. Ayrıca çalışmamızda Melatonin uygulanan grup 4'ün lenfosit oranlarını, grup 1,2 ve 3'ten, çinko uygulanan grup 3'ün lenfosit oranlarını da grup 1 ve 2'den daha yüksek olarak tespit ettik.

Burada açıklanması gereken melatoninin tek başına uygulamasının, çinko uygulamasından daha yüksek seviyede lenfosit oranlarında artışa yol açmasıdır. Çinko bağışıklık cevaplarında özellikle de hücresel bağışıklık reaksiyonlarının ve lenfositlerin olgunlaşmasında önemli bir etkiye sahiptir (Rosenkranz ve ark 2016).

Çinkonun günler içerisindeki yetersizliği bile insan ve hayvanlarda immünolojik parametrelerde baskılanmayla sonuçlanır (Prasad ve ark 2004). Bu nedenle çalışmamızda çinko uygulamasıyla elde ettiğimiz lenfosit düzeylerindeki artışın hem melatonin, hem de melatonin+çinko kombinasyonunda ki artışlardan daha düşük olması ilginçtir. Bu olayda DMBA'nın bağışıklık sistemini baskılayıcı etkisinin çinko tarafından daha güçlü bir şekilde durdurulmasında 4 haftalık çinko uygulamasının yeterli olmamasından kaynaklanabileceği söylenebilir. Ancak sonuçta çinko uygulaması DMBA ile kanser oluşturulmuş kontrol hayvanlarıyla mukayese edildiğinde lenfosit oranlarında önemli şekilde artışa yol açmıştır.

4.2. Yardımcı T Lenfosit (CD4(+)) Yüzdelerinin Tartışılması

Melatonin ve çinkonun kombine uygulandığı grup 5'in CD4 (+) yüzdeleri diğer grupların tamamından daha yüksekti. Grup 1,2,3 ve 4'ün CD4 (+) yüzdeleri ise birbirinden farklı değildi.

Yaşlanma, artan kanser insidansı ile birlikte bulaşıcı ve dejeneratif hastalıklarla ilişkili bir durum olan immün fonksiyonlarda zayıflamaya yol açar. Doğal, hücrel ve humoral bağışıklık, yaşla birlikte artan bozulma sergiler. Dolaşımdaki melatonin yaşla birlikte azalmaktadır ve melatoninin immün modülatör etkisi üzerine yoğun ilgi vardır. Melatonin, granülositler ve makrofajlar için öncül hücrelerin üretimini uyarır. Ayrıca doğal öldürücü hücrelerin ve CD4+ hücrelerinin üretimini uyarır. Doğal öldürücü hücrelerden ve T yardımcı lenfositlerden çeşitli sitokinlerin üretimi ve salınması melatonin ile artırılır. Sonuç olarak melatonin, yaşlı bireylerde bağışıklık fonksiyonunu güçlendirmek için potansiyel bir terapötik değere sahiptir (Cardinali ve ark 2008). Fizyolojik olarak, melatonin T yardımcı lenfositler ve onların ürünleri olan sitokinlerle ilişkilidir. Hem normal hem de lösemik farelerde, melatonin uygulaması, kanserli hücelere karşı savunmaya aracılık eden doğal öldürücü (NK) hücrelerin fonksiyonel olarak zenginleşmesine neden olur (Miller ve ark 2006). Melatonin, hem kemik iliği hem de dokularda konakçı savunmasında yer alan hemen hemen tüm hematopoetik ve bağışıklık hücrelerinin proliferatif ve maturasyonel aşamaları da dahil olmak üzere hücre dinamiklerini düzenlemektedir (sadece NK hücrelerinde değil, aynı zamanda T ve B lenfositleri, granülositler ve

monositler). Özellikle melatonin, normal granülositlerin ve B lenfositlerin hayatta kalmasını sağlayan güçlü bir antiapoptotik sinyaldir (Miller ve ark 2006). Melatonin antitümör işlevleri olan önemli bir immün modülatördür ve artmış CD4 (+) CD25 (+) düzenleyici T hücreleri hastaların tümör dokularında ve mide kanseri ile birlikte hayvan modellerinde gözlenmiştir (Liu ve ark 2011). Yukarıda raporları sunulan araştırmacıların bulguları antikanserojenik bir hormon olan melatoninin T-lenfosit hücreleri, özellikle de yardımcı T-lenfosit hücreleri üzerine pozitif etkilerine dikkat çeker. Nitekim pinealektomide azalan T-lenfosit yüzdelerinin melatonin uygulamasıyla önemli ölçüde artış gösterdiği Chen ve ark (2016) tarafından rapor edilmiştir. Benzer şekilde glukokortikoidler tarafından indüklenen immün sistemi baskılanmış hayvanlarda melatoninin IL-2 üretimini, timus ve dalaktaki lenfosit hücrelerini çoğaltarak yardımcı T-lenfositlerle ilişkili immün cevapları artırdığı gösterilmiştir (Gupta ve Haldar 2013).

Çinko doğal bir T-lenfosit uyarıcısıdır. Orak hücre anemili hastalarda periferik T lenfosit sayıları baskılanmış, CD4⁺, CD8⁺ T lenfosit oranları, doğal öldürücü hücre aktivitesi ve interlökin (IL)-2 düzeyleri azalmış, timik bir hormon olan timulinin aktivitesi engellenmiştir (Tapazoglou ve ark 1985, Prasad ve ark 1989). Çinko takviyesi bozulan bu immünolojik indeksleri geri çevirmiştir (Abdallah ve ark 1988). Çinko farelerde T_h1 hücreleri üzerinde pozitif etkilere sahiptir (Matsumura ve ark 2010). Çinko eksikliği olan çocuklara 20 mg/gün çinkonun 5 hafta süreyle uygulanması hem CD4(+), hem de CD8(+) hücre yüzdelerinde artışla sonuçlanmıştır (Sandstead ve ark 2008). Kırksekiz gün boyunca çinko desteği alan yaşlı bireylerde yardımcı T-lenfosit hücre oranlarında önemli artış olduğu rapor edilmiştir (Putics ve ark 2008). Yardımcı T- lenfositler olan CD4(+) hücrelerin hem melatonin, hem de çinko uygulamasından pozitif olarak etkilendiği yukarıda raporları sunulan araştırmacıların bulgularının ortak sonucudur. Biz çalışmamızda melatonin ve çinko kombinasyonu uygulanan meme kanseri oluşturulmuş grup 5 hayvanlarında diğer grupların tamamından daha yüksek oranda CD4(+) hücre seviyesi tespit ettik.

Çalışmamızda elde ettiğimiz yüksek CD4(+) hücre oranları yukarıdaki araştırmacıların bulgularıyla uyumludur. Ancak bizim grup 5'te elde ettiğimiz artmış

CD4(+) hücre yüzdelerini daha benzer şekilde karşılaştırabileceğimiz çalışma Brazão ve ark (2015)'nin raporlarıdır. Bahsedilen araştırmacılar çalışmalarında Trypanosoma cruzi enfeksiyonunda melatonin ve çinko terapilerinin, CD4 (+) T lenfositlerin yüzdesini arttırdığını, hayvanlarda çinko ve melatonin tedavisinin bağışıklık sisteminin modülasyonunu, sitokin üretimini ve kronik Trypanosoma cruzi enfeksiyonu sırasında inflamatuvar süreci etkilediğini ortaya koymuşlardır (Brazão ve ark 2015). Brazão ve ark (2015)'nin bulguları çalışmamızda grup 5'te elde ettiğimiz yüksek CD4(+) hücre oranlarını kuvvetle destekler. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada çinko+melatonin kombine uygulaması sonucu CD4(+) hücre yüzdelerinde artış tespit ederken, çinko ve melatoninin ayrı ayrı uygulandığı gruplarda artış tespit edemedik. Çinko (grup 3) ve melatonin (grup 4) gruplarının CD4(+) yüzde oranları genel kontrol (grup 1) grubundan farklı değildi. Muhtemelen çinko ile melatoninin DMBA uygulaması ile kanser oluşturulmuş hayvanlarda CD4(+) hücreleri üzerindeki etkilerinin ortaya çıkması daha uzun süreli uygulamayı gerektirmektedir.

4.3. Sitotoksik T Lenfosit (CD8 (+)) Yüzdelerinin Tartışılması

Çalışmamızda en düşük CD8 (+) yüzde oranları DMBA ile meme kanseri oluşturan grup 2'de elde edildi. Diğer grupların CD8 (+) yüzde oranları birbirinden farklı değildi. Meme bezinde tümör oluşumunu uyarıcı etki yapan DMBA aynı zamanda bağışıklık sisteminin de güçlü bir inhibitörüdür (Kim ve ark 2014). Grup 2'de elde ettiğimiz azalmış CD8 (+) yüzde oranları bu yönüyle beklenen bir sonuçtur. Ancak çalışmamızda 4 haftalık çinko (grup 3), melatonin (grup 4) ve çinko+melatonin (grup 5) gruplarında CD8 (+) yüzde oranlarında bir farklılık tespit edemedik. Muhtemelen çinko ile melatoninin ayrı ayrı ve kombine verilmesinin DMBA uygulaması ile kanser oluşturulmuş hayvanlarda CD8(+) hücreleri üzerindeki etkilerinin ortaya çıkması daha uzun süreli uygulamayı gerektirmektedir. En azından grup 2'de ortaya çıkan baskılanmış sitotoksik T lenfosit düzeylerinin çinko, melatonin ve çinko-melatonin kombine uygulamasıyla önlendiğini sonuç olarak söyleyebiliriz.

4.4. B Lenfosit (CD45RA(+)) Yüzdelerinin Tartışılması

B lenfosit oranları yönüyle uygulama grupları arasında (grup 2, 3, 4 ve 5) arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Ancak hiçbir uygulamanın yapılmadığı genel kontrol grubunun (grup 1) B Lenfosit yüzdeleri uygulama gruplarından daha düşük seviyede idi. Elde ettiğimiz bu bulgu grup 2, 3, 4 ve 5'te çinko ve melatonininden bağımsız ancak DMBA ile uyarılan meme kanserine bağlı olarak B Lenfosit yüzdelerinde artış ortaya çıktığını göstermektedir.

4.5. NK ve NKT Yüzdelerinin Tartışılması

NK oranları yönüyle gruplar (grup 1, 2, 3, 4 ve 5) arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Elde ettiğimiz bu bulgu uygulama süresi ve/veya dozuyla ilişkili olabilir. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada en yüksek NKT (%) oranlarını çinko uygulanan grupta (grup 3) elde ettik. Grup 1, 2, 4 ve 5'in NKT (%) oranları birbirinden farklı değildi.

Timik epitel hücreleri (TEC'ler) tarafından sentezlenen çinkoya bağlı timik hormon olan timulin, NK hücre sitotoksitesinde ve T_h1 sitokin üretiminde (IL-2 ve IFN-gama) yer alır ve bu da NKT ve klasik NK dalak hücre sitotoksitesini etkiler (Santarelli ve ark 2006). Doğal öldürücü hücreler olan NKT hücreleri timus dışında yoğun olarak sağlıklı farelerin karaciğer mikrovasküler sisteminde bulunurlar. Ancak bu NKT hücrelerinin dolaşım düzeni ve intravasküler davranış mekanizmaları aydınlatılamamıştır. NKT hücreleri CD4(+) T hücrelerinde, promiyelositik lösemi çinko parmak proteininin (PLZF) tek ekspresyonuyla spesifik olarak eksprese edilen bir transkripsiyon faktörü tarafından uyarılabilir (Thomas ve ark 2011). Transkripsiyonel regülatör promiyelositik lösemi çinko parmak proteini (PLZF), doğal öldürücü T (NKT) hücrelerinin farklılaşması sırasında yüksek derecede eksprese edilir ve efektör/bellek doğuştan-benzeri fenotipin kazanılması için gereklidir (Pereira ve Boucontet 2012). Bu yönüyle NKT hücrelerinin oluşumunda çinko oldukça kritik bir rol oynar.

NKT hücreleri timüs, karaciğer, dalak ve kemikte bulunur. Atimik çıplak farelerde gösterildiği gibi karaciğerde bulunan timustan bağımsız bir farklılaşma

yolunun varlığına rağmen, timus NKT gelişimi için bir alandır (Emoto ve Kaufmann 2003). Yaşlanma sırasında timus atrofiktir. Bu nedenle, yaşlanma sırasında timik başarısızlığı telafi etmek için karaciğerin ekstratimik fonksiyonu ortaya çıkar (Abo ve ark 200). IL-12 uyarımı altında, "klasik" NKT hücreleri sitotoksiktir ve Th1 (IFN- γ) ve Th2 (IL-4) sitokinlerinin üretimi yoluyla önemli bir immün düzenleyici rol oynarlar (Emoto ve Kaufmann 2003). Klasik NKT hücreleri tarafından IL-4 üretiminde bir bozukluk, kronik bir inflamasyon ve otoimmün hastalıklar sırasında ortaya çıktığı için patolojiye yol açar (Araujo ve ark 2004). Bununla birlikte, klasik NKT hücrelerinin başlıca görevi, antitümör sitotoksik yanıtta önemli bir rol oynayan IFN- γ üretmektir (Cui ve ark 1997). Sitotoksik bir aktiviteye sahip NKT hücreleri, hedef hücrelerin direkt olarak öldürülmesinin yanı sıra, adaptif bağışıklık tepkisini yönlendirmek için gerekli sinyaller sağlamada çok önemli bir rol oynamaktadır (DelaRosa ve ark 2006). Bu nedenle de, çinko ve metalotiyoninlerin (MT) oynadığı rol aşağıdaki nedenlerden dolayı kritik olabilir:

Birincisi, çinko, doğal ve uyarlanabilir immün yanıtın verimliliği için vazgeçilmez olan bir eser elementtir (Mocchegiani ve ark 2009). Yaşlılıkta MT'nin çinko salınımı sınırlıdır, strese benzer kronik bir etki oluşturan bu durum hücre içi çinkonun düşük biyoyararlanımıyla sonuçlanır (Mocchegiani ve ark 2006). Üçüncü olarak, stres ve inflamasyon sırasında, MT'nin gen ekspresyonu, pro-inflamatuar sitokinler IL-1, IL-6 ve TNF- α tarafından uyarılır (Davis ve Cousins 2000). Yüksek MT düzeyleri de yaşlanmada zararlı etkilere yol açar (Sansoni ve ark 2008). Buna ek olarak, IL-6, karaciğerdeki çinko taşıyıcı Zip14'ü düzenler ve artmış MT mRNA indüksiyonu ile birleştirilmiş akut faz yanıtının hipozincemisine katkıda bulunur (Liuzzi ve ark 2003). Bu nedenle, bu sitokinlerin, özellikle IL-6'nın yaşlanmadaki artışı (Franceschi ve ark 1995), düşük hücre içi çinko iyonu biyoyararlanımı ve bozulmuş bağışıklık yanıt ile ilişkili MT'nin anormal bir şekilde artmasına yol açar (Mocchegiani ve ark 2000). Bu bulgularla uyumlu olarak çinko ve MT homeostazı, çinko iyonu biyoyararlanımı sağladığı için uzun yaşamı sağlayabilir (Mocchegiani ve ark 2004). Çinko uygulamasıyla elde ettiğimiz yüksek NKT (%) oranları oldukça önemli bir bulgu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu bulgu iki yönüyle çok önemlidir: Birincisi sitotoksik bir aktiviteye sahip NKT hücreleri, hedef hücrelerin direkt olarak

öldürülmesini sağladığı için DMBA ile uyarılmış meme kanserinde tümör engelleyici bir koruma sağlayabilir. İkincisi, fizyolojik doz olarak kabul edilebilecek (5 mg/kg) çinko uygulamasın 4 haftalık zaman diliminde NKT (%) hücre oranlarını önemli şekilde artırması yaşlanmada ortaya çıkabilecek bağışıklık fonksiyon bozukluklarının önlenmesinde umut verici olabilir.

Çalışmanın bulguları DMBA ile oluşturulan meme kanserinde çinko ve melatoninin kombine uygulamasının bağışıklık parametrelerinde artışa yol açtığını göstermektedir. Çalışmamızın vurgulanması gereken bir başka sonucu yalnızca çinko uygulaması DMBA ile oluşturulan meme kanserinde sitotoksik aktiviteye sahip NKT hücre yüzdelerini bütün çalışma gruplarına oranla güçlü bir şekilde artırmıştır. Sitotoksik aktiviteye sahip NKT hücreleri, hedef hücrelerin direkt olarak öldürülmesini sağladığı için DMBA ile uyarılmış meme kanserinde tümör engelleyici bir koruma sağlayabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada;

1. DMBA ile uyarılmış meme kanserinde en yüksek lenfosit oranları melatonin ve çinkonun kombine uygulandığı grup 5'te elde edildi.
2. Melatonin uygulanan grup 4'ün lenfosit oranları, grup 1, 2 ve 3'den yüksek, Çinko uygulanan grup 3'ün lenfosit oranları da grup 1 ve 2'den daha yüksekti.
3. En düşük lenfosit oranları hiçbir uygulamanın yapılmadığı genel kontrol grubunda (grup 1) elde edildi.
4. Melatonin ve çinkonun kombine uygulandığı grup 5'in CD4 (+) yüzdesi diğer grupların tamamından daha yüksekti.
5. Çalışmamızın vurgulanması gereken bir başka sonucu yalnızca çinko uygulaması DMBA ile oluşturulan meme kanserinde sitotoksik aktiviteye sahip NKT hücre yüzdelerini bütün çalışma gruplarına oranla güçlü bir şekilde artırmıştır.
6. Sitotoksik aktiviteye sahip NKT hücreleri, hedef hücrelerin direkt olarak öldürülmesini sağladığı için DMBA ile uyarılmış meme kanserinde tümör engelleyici bir koruma sağlayabilir.
7. Daha sonra gerçekleştirilecek çalışmalarda DMBA ile uyarılmış meme kanserinde çinko ile melatoninin birlikte ve ayrı ayrı uygulamalarının daha uzun süreli yapılması kanser immünoterapisinde önemli bilgilere ulaşmamızı sağlayabilir.

6. KAYNAKLAR

- Abdallah JM, Kukuruga M, Nakeff A, Prasad AS, 1988. Cell cycle distribution defect in PHA-stimulated T lymphocytes of sickle cell disease patients. *Am J Hematol*, 28, 279-81.
- Abo T, Kawamura T, Watanabe H, 2000. Physiological responses of extrathymic T cells in the liver. *Immunol Rev*, 174, 135-49.
- Acufla-Castroviejo D, Reiter RJ, Menendez-Pelae A, Pablos MI, Burgos A, 1994. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res*, 16, 100-12.
- Adlard PA, Parncutt JM, Finkelstein DI, Bush AI, 2010. Cognitive loss in zinc transporter-3 knock-out mice: a phenocopy for the synaptic and memory deficits of Alzheimer's disease? *J Neurosci*, 30, 1631-6.
- Aimo L, Cherr GN, Oteiza PI, 2010. Low extracellular zinc increases neuronal oxidant production through naphthol oxidase and nitric oxide synthase activation. *Free Radic Biol Med*, 48, 1577-87.
- Anisimov VN, 2003. Effects of exogenous melatonin – a review. *Toxicol Pathol*, 31, 589-603.
- Anisimov VN, Popovich IG, Shtylik AV, Zabezhinski MA, Ben Huh H, Gurevich P, Berman V, Tendler Y, Zusman I, 2000. Melatonin and colon carcinogenesis. III. Effect of melatonin on proliferative activity and apoptosis in colon mucosa and colon tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Exp Toxicol Pathol*, 52, 71-6.
- Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA, 1997. Melatonin and colon carcinogenesis. I. Inhibitory effect of melatonin on development of intestinal tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Carcinogenesis*, 18, 1549-53.
- Araujo LM, Lefort J, Nahori MA, Diem S, Zhu R, Dy M, 2004. Exacerbated Th2-mediated airway inflammation and hyperresponsiveness in autoimmune diabetes-prone NOD mice: a critical role for CD1d-dependent NKT cells. *Eur J Immunol*, 34, 327-35.
- Arendt J, Aldhous M, Marks V 1986. Alleviation of jet lag by melatonin: Preliminary results of controlled double blind trial. *Brit Med J*, 292, 1170.
- Arendt J, Bojkowski C, Folkard S, Franey C, Marks V, Minors D, Waterhouse J, Wever RA, Wildgruber C, Wright J, 1985. Some effects of melatonin and the control of its secretion in humans. *Ciba Found Symp*, 117, 266-83.
- Arendt J, Skene DJ, 2005. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rev*, 9, 25-39.
- Armstrong S, 1989. Melatonin: The internal Zeitgeber of mammals? *Pineal Res Rev*, 7, 158-202.
- Axelrod J, 1974. The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science*, 184, 1341-8.
- Aydemir TB, Blanchard RK, Cousins RJ, 2006. Zinc supplementation of young men alters metallothionein, zinc transporter, and cytokine gene expression in leukocyte populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 1699-704.
- Aydemir TB, Chang SM, Guthrie GJ, Maki AB, Ryu MS, Karabiyik A, Cousins RJ, 2012. Zinc transporter ZIP14 functions in hepatic zinc, iron and glucose homeostasis during the innate immune response (endotoxemia). *PLoS One*, 7, 48679.
- Baird SK, Kurz T, Brunk UT, 2006. Metallothionein protects against oxidative stress-induced lysosomal destabilization. *Biochem J*, 394, 275-83.
- Baltacı AK, Sunar F, Moğulkoç R, Öztekin E, 2004. Effect of zinc deficiency and supplementation on lipid peroxidation of renal tissue in ovariectomized rats. *Biol Trace Elem Res*, 101, 231-9.
- Baltacı AK, Bediz CS, Moğulkoç R, Kurtoglu E, Pekel A, 2003. The effect of zinc and melatonin supplementation on cellular immunity in rats with toxoplasmosis. *Biol Trace Elem Res*, 96, 237-46.
- Baltacı AK, Moğulkoç R, 2012. Leptin and zinc relation: Inregulation of food intake and immunity. *Indian J Endocrinol Metab*, 16, 611-6.
- Baltacı AK, Moğulkoç R, Ayyıldız M, Kafalı E, Koyuncuoglu T, 2014. Lipid peroxidation in kidney and testis tissues in experimental hypothyroidism: the role of zinc. *Bratislava Medical Journal*, 115, 498-501.
- Baltacı AK, Moğulkoç R, Bediz CS, Pekel A, 2005. Effects of zinc deficiency and pinealectomy on cellular immunity in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Biol Trace Elem Res*, 101, 47-56.

- Baltaci AK, Mogulkoc R, Salbacak A, Celik I, Sivrikaya A, 2012. The role of zinc supplementation in the inhibition of tissue damage caused by exposure to electromagnetic field in rat lung and liver tissues. *Bratislava Medical Journal*, 113, 400-3.
- Baltaci AK, Sunar F, Mogulkoc R, Acar M, Toy H, 2014. The effect of zinc deficiency and zinc supplementation on element levels in the bone tissue of ovariectomized rats: histopathologic changes. *Arch Physiol Biochem*, 120,80-5.
- Baltaci AK, Sunar F, Mogulkoc R, Oztekin E, 2004. The effects of zinc deficiency and supplementation on lipid peroxidation in bone tissue of ovariectomized rats. *Toxicology*, 203,77-82.
- Barnett JB, Dao MC, Hamer DH, Kandel R, Brandeis G, Wu D, Dallal GE, Jacques PF, Schreiber R, Kong E, Meydani SN, 2016. Effect of zinc supplementation on serum zinc concentration and T cell proliferation in nursing home elderly: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr.*, 103, 942-51.
- Barrett K, Brooks H, Boitono S, Barman S, 2010. Ganong's review of medical physiology, s. 241-260.
- Bartness TJ, Powers JB, Hastings MH, Bittman EL, Goldman BD, 1993. The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *J Pineal Res*, 15, 161-90.
- Bartsch C, Bartsch H, 1999. Melatonin in cancer patients and in tumor-bearing animals. *Adv Exp Med Biol*, 467, 247-64.
- Beach RS, Gershwin ME, Hurley LS, 1982. Reversibility of developmental retardation following murine fetal zinc deprivation. *J Nutr*, 112, 1169-81.
- Beach RS, Gershwin ME, Hurley LS, 1983. Persistent immunological consequences of gestational zinc deprivation. *Am J Clin Nutr*, 38, 579-90.
- Beck-Friis J, Kjellman BF, Aperia B, Uden F, von Rosen D, Ljunggren JG, Wetterberg L, 1985. Serum melatonin in relation to clinical variables in patients with major depressive disorder and a hypothesis of a low melatonin syndrome. *Acta Psychiatr Scand*, 71, 319-30.
- Bediz CS, Baltaci AK, Mogulkoc R, 2003. Both zinc deficiency and supplementation affect plasma melatonin levels in rats. *Acta physiologica Hungarica*, 90,335-9.
- Bell SG, Vallee BL, 2009. The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link. *Chembiochem*, 10,55-62.
- Besser L, Chorin E, Sekler I, Silverman WF, Atkin S, Russell JT, Hershinkel M, 2009. Synaptically released zinc triggers metabotropic signaling via a zinc-sensing receptor in the hippocampus. *J Neurosci*, 29,2890-901.
- Bettahi I, Pozo D, Osuna C, R. J. Reiter RJ, AcunTh-Castroviejo D, J. M. Guerrero JM, 1996. Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J Pineal Res*, 20, 205-10.
- Beyersmann D, Haase H, 2001. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals*, 14,331-41.
- Bicer M, Akil M, Baltaci AK, Mogulkoc R, Sivrikaya A, Akkus H, 2015. Effect of melatonin on element distribution in the liver tissue of diabetic rats subjected to forced exercise. *Bratislava Medical Journal*, 116,119-23.
- Bicer M, Gunay M, Baltaci AK, Uney K, Mogulkoc R, Akil M, 2012. Effect of zinc supplementation on lipid peroxidation and lactate levels in rats with diabetes induced by streptozotocin and subjected to acute swimming exercise. *Bratislava Medical Journal*, 113,199-205.
- Blask DE, Brainard GC, Dauchy RT, Hanifin JP, Davidson LK, Krause JA, Sauer LA, Rivera-Bermudez MA, Dubocovich ML, Jasser SA, 2005. Melatonin-depleted blood from premenopausal women exposed to light at night stimulates growth of human breast cancer xenografts in nude rats. *Cancer Res*, 65, 11174-84
- Blask DE, Dauchy RT, Sauer LA, 2005. Putting cancer to sleep at night: the neuroendocrine/circadian melatonin signal. *Endocrine*, 27, 179-88.
- Bobrowska-Korcza B, Skrajnowska D, Tokarz A, Bialek S, Jezierska E, 2015. Effect of zinc and polyphenols supplementation on antioxidative defense mechanisms and the frequency of micro

- satellite in stability in chemically-induced mammary carcinogenesis in therat. *Cancer Biomark*, 15, 133-42.
- Bogden JD, Baker H, Frank O, 1990. Micronutrient status and human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann N Y Acad Sci*, 587, 189–95.
- Brazão V, Santello FH, Filipin Mdel V, Azevedo AP, Toldo MP, de Moraes FR, do Prado JC Jr, 2015. Immunoregulatory actions of melatonin and zinc during chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *J Pineal Res*, 58, 210-8.
- Brzezinski A, Vangel MG, Wurtman RJ, Norrie G, Zhdanova I, Ben Shushan A, Ford I, 2005. Effects of exogenous melatonin on sleep: a meta-analysis. *Sleep Med Rev*, 9, 41–50.
- Buscemi N, Vandermeer B, Hooton N, Pandya R, Tjosvold L, Hartling L, Vohra S, Klassen TP, Baker G, 2006. Efficacy and safety of exogenous melatonin for secondary sleep disorders and sleep disorders accompanying sleep restriction: meta-analysis. *BMJ*, 332, 385-93.
- Cardinali DP, Esquifino AI, Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, 2008. Melatonin and the immune system in aging. *Neuroimmunomodulation*, 15, 272-8.
- Carlberg C, Weisenberg I, 1995. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: An unexpected relationship. *J Pineal Res*, 18, 171-8.
- Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, Garcia-Maurino S, Reiter RJ, Guerrero JM, 2004. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J*, 18, 537-9.
- Carrillo-Vico A, Garcia-Perganeda A, Najji L, Calvo JR, Romero MP, Guerrero JM, 2003. Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. *Cell Mol Life Sci*, 60, 2272-8.
- Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ, 2005. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*, 27, 189-200.
- Castrillon PO, Esquifino AI, Varas A, Zapata A, Cutrera RA, Cardinali DP, 2000. Effect of melatonin treatment on 24-h variations in responses to mitogens and lymphocyte subset populations in rat submaxillary lymph nodes. *J Neuroendocrinol*, 12, 758-65.
- Chan TY, Tang PL, 1996. Characterization of the antioxidant effects of melatonin and related indoleamines in vitro. *J Pineal Res*, 20, 187-91.
- Chen F, Reheman A, Cao J, Wang Z, Dong Y, Zhang Y, Chen Y, 2016. Effect of melatonin on monochromatic light-induced T-lymphocyte proliferation in the thymus of chickens. *J Photochem Photobiol B*, 161, 9-16
- Cherian M, 2003. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 533,201-9.
- Chi ZH, Wang X, Cai JQ, Stoltenberg M, Danscher G, Wang ZY, 2008. Zinc transporter 3 immunohistochemical tracing of sprouting mossy fibres. *Neurochem Int*, 52,1305-9.
- Claustrat B, Brun J, Chazot G, 2005. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev*, 9, 11-24.
- Colvin RA, Fontaine CP, Laskowski M, Thomas D, 2003. Zn²⁺ transporters and Zn²⁺ homeostasis in neurons. *European Journal of Pharmacology*, 479,171-85.
- Coto JA, Hadden EM, Sauro M, Zorn N, Hadden HW, 1992. Interleukin 1 regulates secretion of zinc-thymulin by human thymic epithelial cells and its action on T-lymphocyte proliferation and nuclear protein kinase C. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 89, 7752-6.
- Crasson M, Kjiri S, Colin A, Kjiri K, L'Hermite-Baleriaux M, Ansseau M, Legros JJ, 2004. Serum melatonin and urinary 6-sulfatoxymelatonin in major depression. *Psychoneuroendocrinology*, 29, 1-12.
- Csaba G, 2016. The Immunoendocrine Thymus as a Pacemaker of Lifespan. *Acta Microbiol Immunol Hung.*, 63, 139-58.
- Cui J, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Toura I, 1997. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science*, 278, 1623-6.

- Cunha MP, Machado DG, Bettio LE, Capra JC, Rodrigues AL, 2008. Interaction of zinc with antidepressants in the tail suspension test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32,1913-20.
- Daaboul D, Rosenkranz E, Uciechowski P, Rink L, 2012. Repletion of zinc in zinc-deficient cells strongly up-regulates IL-1beta-induced IL-2 production in T-cells. *Metallomics*, 4,1088-97.
- Davis SR, Cousins RJ, 2000. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J Nutr*, 130, 1085-8.
- Dawson D, Armstrong SM, 1996. Chronobiotics – drugs that shift rhythms. *Pharmacol Ther*, 69, 15-36.
- Dawson D, Encel N, 1993. Melatonin and sleep in humans. *J Pineal Res*, 15, 1-12.
- Deacon S, Arendt J, 1995. Melatonin-induced temperature suppression and its acute phase-shifting effects correlate in a dose-dependent manner in humans. *Brain Res*, 688, 77-85.
- DelaRosa O, Pawelec G, Peralbo E, Wikby A, Mariani E, Mocchegiani E, 2006. Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity. *Biogerontology*, 7, 471-81.
- Den Boer JA, Bosker FJ, Meesters Y, 2006. Clinical efficacy of agomelatine in depression: the evidence. *Int Clin Psychopharmacol*, 21, 21-4.
- DePasquale-Jardieu P, Fraker PJ, 1984. Interference in the development of a secondary immune response in mice by zinc deprivation: persistence of effects. *J Nutr*, 114, 1762-9.
- Dijk DJ, Cajochen C, 1997. Melatonin and the circadian regulation of sleep initiation, consolidation, structure, and the sleep EEG. *J Biol Rhythms*, 12, 627-35.
- Dittmer S, Sahin M, Pantlen A, Saxena A, Toutzaris D, Pina AL, Geerts A, Golz S, Methner A, 2008. The constitutively active orphan G-protein-coupled receptor GPR39 protects from cell death by increasing secretion of pigment epithelium-derived growth factor. *J Biol Chem*, 283,7074-81.
- Dolberg OT, Hirschmann S, Grunhaus L, 1998. Melatonin for the treatment of sleep disturbances in major depressive disorder. *Am J Psychiatry*, 155, 1119-21.
- Dollins AB, Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ, Deng MH, 1994. Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 1824-8.
- Douglas-Jones AG, Schmid KW, Bier B, Horgan K, Lyons K, Dallimore ND, Moneypenny IJ, Jasani B, 1995. Metallothionein expression in duct carcinoma in situ of the breast. *Human pathology*, 26,217-22.
- Eide DJ, 2011. The oxidative stress of zinc deficiency. *Metallomics*, 3,1124-9.
- Emoto M, Kaufmann SH, 2003. Liver NKT cells: an account of heterogeneity. *Trends Immunol*, 24, 364-9.
- Esquifino AI, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP, 2004. Circadian organization of the immune response: a role for melatonin. *Clin Appl Immunol Rev*, 4, 423-33.
- Falutz J, Tsoukas C, Gold P, 1988. Zinc as a cofactor in human immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *JAMA*, 259, 2850-1.
- Fan LZ, Cherian MG, 2002. Potential role of p53 on metallothionein induction in human epithelial breast cancer cells. *Br J Cancer*, 87,1019-26.
- Fernandes G, Nair M, Onoe K, Tanaka T, Floyd R, Good RA, 1979. Impairment of cell mediated immune functions by dietary Zn deficiency in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 457-61.
- Fong L, Tan K, Tran C, Cool J, Scherer MA, Elovarris R, Coyle P, Foster BK, Rofe AM, Xian CJ, 2009. Interaction of dietary zinc and intracellular binding protein metallothionein in postnatal bone growth. *Bone*, 44, 1151-62.
- Fraker PJ, Gershwin ME, Good RA, Prasad A, 1986. Interrelationships between zinc and immune function. *Fed Proc*, 45, 1474-9.
- Franceschi C, Monti D, Sansoni P, Cossarizza A, 1995. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunol Today*, 16, 12-6.

- Fukada T, Civic N, Furuichi T, Shimoda S, Mishima K, Higashiyama H, Idaira Y, Asada Y, Kitamura H, Yamasaki S, Hojyo S, Nakayama M, Ohara O, Koseki H, Dos Santos HG, Bonafe L, Ha-Vinh R, Zankl A, Unger S, Kraenzlin ME, Beckmann JS, Saito I, Rivolta C, Ikegawa S, Superti-Furga A, Hirano T, 2008. The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways. *PLoS One*, 3, 3642.
- Gao HL, Zheng W, Xin N, Chi ZH, Wang ZY, Chen J, Wang ZY, 2009. Zinc deficiency reduces neurogenesis accompanied by neuronal apoptosis through caspase-dependent and -independent signaling pathways. *Neurotox Res*, 16, 416-25.
- Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Raffi-el-Idrissi M, Sanchez-Margalet V, Goberna R, Guerrero JM, 1997. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol*, 159, 574-81.
- Garcia-Maurino S, Pozo D, Carrillo-Vico A, Calvo JR, Guerrero JM, 1999. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci*, 65, 2143-50.
- Garfinkel D, 1986. Is aging inevitable? The intracellular zinc deficiency hypothesis of aging. *Med Hypotheses*, 19, 117-37.
- Gilad E, Laufer M, Matzkin H, Zisapel N, 1999. Melatonin receptors in PC3 human prostate tumor cells. *J Pineal Res*, 26, 211-20.
- Golden MHN, Jackson AA, Golden BE, 1977. Effect of zinc on thymus of recently malnourished children. *Lancet*, 2, 1057-9.
- Golden RN, Markey SP, Risby ED, Rudorfer MV, Cowdry RW, Potter WZ, 1988. Antidepressants reduce whole-body norepinephrine turnover while enhancing 6 hydroxymelatonin output. *Arch Gen Psychiatry*, 45, 150-4.
- Goldman B, Nelson RJ, 1993. Melatonin and seasonality in mammals. In: Yu HS, Reiter RJ (ed). *Melatonin*. CRC Press, Boca Raton (1993)
- Gonzalez-Haba MG, Garcia-Maurino S, Calvo JR, Goberna R, Guerrero JM, 1995. High-affinity binding of melatonin by human circulating T lymphocytes (CD4+). *FASEB J*, 9, 1331-5.
- Grin W, Grunberger W, 1998. A significant correlation between melatonin deficiency and endometrial cancer. *Gynecol Obstet Invest*, 45, 62-5.
- Gupta S, Haldar C, 2013. Physiological crosstalk between melatonin and glucocorticoid receptor modulates T-cell mediated immune responses in a wild tropical rodent, *Funambulus pennanti*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 134, 23-36.
- Haas SM, Fraker PJ, Luecke RW, 1976. The effect of zinc deficiency on the immune response of A/J mice. *Fed Proc*, 35, 659.
- Hao Y, Wolfram V, Cook J, 2016. A structured review of health utility measures and elicitation in advanced/metastatic breast cancer. *Clinicoecon Outcomes Res*, 8, 293-303.
- Hardeland R, Balzer I, Poeggeler B, Fuhrberg B, Uria H, Behrmann C, R. Wolf R, Meyer TJ, Reiter RJ, 1995. On the primary functions of melatonin in evolution: Mediation of photoperiodic signals in a unicell, photoxidation, and scavenging of free radicals. *J Pineal Res*, 18, 104-11.
- Herzenberg LA, Kantor AB, Herzenberg L, 1992. Layered evolution in the immune system. A model for the ontogeny and development of multiple lymphocyte lineages. *Ann N Y Acad Sci*, 651, 1-9.
- Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vasak M, 2001. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Research Bulletin*, 55, 133-45.
- Hie M, Tsukamoto I, 2011. Administration of zinc inhibits osteoclastogenesis through the suppression of RANK expression in bone. *Eur J Pharmacol*, 668, 140-6.
- Hill SM, Teplitzky S, Ram PT, Kiefer T, Blask DE, Spriggs LL, Eck KM, 1999. Melatonin synergizes with retinoic acid in the prevention and regression of breast cancer. *Adv Exp Med Biol*, 460, 345-62.
- Hori H, Kunugi H, 2013. Dopamine agonist-responsive depression. *Psychogeriatrics*, 13, 189-95.
- Hou X, Du Y, Deng Y, Wu J, Cao G, 2015. Sleeping Beauty transposon system for genetic etiological research and gene therapy of cancers. *Cancer Biol Ther*, 16, 8-16.

- Hu DN, Roberts JE, 1997. Melatonin inhibits growth of cultured human uveal melanoma cells. *Melanoma Res*, 7, 27-31.
- Hu DN, McCormick SA, Roberts JE, 1998. Effects of melatonin, its precursors and derivatives on the growth of cultured human uveal melanoma cells. *Melanoma Res*, 8, 205-10.
- Huerto-Delgadillo L, Anton-Tay F, Benitz-King G, 1994. Effects of melatonin on microtubule assembly depends on hormone concentration: Role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J Pineal Res*, 17, 55-62.
- Hwang J, Choi S, Koh J, 2002. The role of NADPH oxidase, neuronal nitric oxide synthase and poly(ADP ribose) polymerase in oxidative neuronal death induced in cortical cultures by brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5. *Journal of Neurochemistry*, 82, 894-902.
- Ianas O, Olnescu R, Badescu I, 1991. Melatonin involvement in oxidative stress. *Rom J Endocrinol*, 29, 147-53.
- Jaeschke H, 1995. Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Proc Soc Exp Biol Med*, 209, 104-11.
- Jing L, Li L, Zhao J, Zhao J, Sun Z, Peng S, 2016. Zinc-induced metallothionein overexpression prevents doxorubicin toxicity in cardiomyocytes by regulating the peroxiredoxins. *Xenobiotica*, 46, 715-25.
- Julius R, Schilkind M, Sprinkle T, Rennert O, 1973. Acrodermatitis enteropathica with immune deficiency. *J Pediatr*, 83, 1007-11.
- Kang X, Chen R, Zhang J, Li G, Dai P-G, Chen C, Wang H-J, 2015. Expression Profile Analysis of Zinc Transporters (ZIP4, ZIP9, ZIP11, ZnT9) in Gliomas and their Correlation with IDH1 Mutation Status. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16, 3355-60.
- Kanishi Y, Kobayashi Y, Noda S, Ishizuka B, Saito K, 2000. Differential growth inhibitory effect of melatonin on two endometrial cancer cell lines. *J Pineal Res*, 28, 227-33.
- Kao LW, Rusyniak DE, 2016. Chronic Poisoning: Trace Metals and Others. In: *Goldman-cecil medicine*. Eds: Goldman L, Schafer AI, 91-8.
- Karbownik M, Lewinski A, Reiter RJ, 2001. Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. *Int J Biochem Cell Biol*, 33, 735-53.
- Kay RG, Tasman-Jones C, 1975. Acute zinc deficiency in man during intravenous alimentation. *Aust N Z J Surg*, 45, 325-30.
- Keller PR, Fraker PJ, 1986. Gestational zinc requirement of the A/J mouse: effects of a marginal zinc deficiency on in utero B cell development. *Nutr Res*, 6, 41-50.
- Khatai L, Goessler W, Lorencova H, Zangger K, 2004. Modulation of nitric oxide-mediated metal release from metallothionein by the redox state of glutathione in vitro. *Eur J Biochem*, 271, 2408-16.
- Kiefer T, Ram PT, Yuan L, Hill SM, 2002. Melatonin inhibits estrogen receptor transactivation and cAMP levels in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 71, 37-45.
- Kierszenbaum AL, Tres L, 2015. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*, s. 111-49.
- Kim JH, Jeong MS, Kim DY, Her S, Wie MB, 2015. Zinc oxide nanoparticles induce lipoxygenase-mediated apoptosis and necrosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochem Int*, 90, 204-14.
- Kim SH, Kim CW, Jeon SY, Go RE, Hwang KA, Choi KC, 2014. Chemopreventive and chemotherapeutic effects of genistein, a soy isoflavone, upon cancer development and progression in preclinical animal models. *Lab Anim Res*, 30, 143-50.
- Kimura T, Kambe T, 2016. The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: An Overview and Perspective. *Int J Mol Sci*, 17, 336.
- Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, Stevenson DE, Walborg EF Jr., 1998. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, 106, 289-95.
- Ku JH, Seo SY, Kwak C, Kim HH, 2012. The role of survivin and Bcl-2 in zinc-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Urol Oncol*, 30, 562-8.

- LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE, 1998. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*, 17, 3247-59.
- Laity JHL, M. B, Wright PE, 2001. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology*, 11, 39-46.
- Lavie P, 1997. Melatonin: role in gating nocturnal rise in sleep propensity. *J Biol Rhythms*, 12, 657-65.
- Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP, Ma A, 2000. Failure to regulate TNF-induced NF- κ B and cell death responses in A20-deficient mice. *Science*, 289, 2350-4.
- Lewy AJ, Ahmed S, Jackson JM, Sack RL, 1992. Melatonin shifts human circadian rhythms according to a phase-response curve. *Chronobiol Int*, 9, 380-92.
- Li Y, Hough CJ, Suh SW, Sarvey JM, Frederickson CJ, 2001. Rapid translocation of Zn²⁺ From presynaptic terminals Into postsynaptic hippocampal neurons after physiological stimulation. *J Neurophysiol*, 86, 2597-604.
- Lin SF, Wei H, Maeder D, Franklin RB, Feng P, 2009. Profiling of zinc-altered gene expression in human prostate normal vs. cancer cells: a time course study. *J Nutr Biochem*, 20,1000-12.
- Lissoni P, Chilelli M, Villa S, Cerizza L, Tancini G, 2003. Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: a randomized trial. *J Pineal Res*, 35, 12-5.
- Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, Reppert SM, 1997. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*, 19, 91-102.
- Liu H, Xu L, Wei JE, Xie MR, Wang SE, Zhou RX, 2011. Role of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in melatonin-mediated inhibition of murine gastric cancer cell growth in vivo and in vitro. *Anat Rec (Hoboken)*, 294, 781-8.
- Liuzzi JP, Lichten LA, Rivera S, Blanchard RK, Aydemir TB, Knutson MD, 2005. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 6843-8.
- Lovejoy B, Cleasby A, Hassell AM, Longley K, Luther MA, Weigl D, McGeehan G, McElroy AB, Drewry D, Lambert MH, 1994. Structure of the catalytic domain of fibroblast collagenase complexed with an inhibitor. *Science*, 263, 375-7.
- Luo X, Barbieri D, Davison N, Yan Y, de Bruijn JD, Yuan H, 2014. Zinc in calcium phosphate mediates bone induction: in vitro and in vivo model. *Acta Biomater*, 10, 477-85.
- Ma Z, Yang Y, Fan C, Han J, Wang D, Di S, Hu W, Liu D, Li X, Reiter RJ, Yan X, 2016. Melatonin as a potential anticarcinogen for non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*, 19, 46768-84.
- Maares M, Haase H, 2016. Zinc and immunity: An essential interrelation. *Arch Biochem Biophys*, 1, 58-65.
- Maestroni GJ, 2001. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert Opin Invest Drugs*, 10, 467-76.
- Maestroni GJ, Conti A, Lissoni P, 1994. Colony-stimulating activity and hematopoietic rescue from cancer chemotherapy compounds are induced by melatonin via endogenous interleukin 4. *Cancer Res*, 54, 4740-3.
- Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W, 1986. Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J Neuroimmunol*, 13, 19-30.
- Maestroni GJM, 1993. The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J Pineal Res*, 14, 1-10.
- Maestroni GJM, Cardinali DP, Esquifino AI, Pandi-Perumal SR, 2004. Does melatonin play a Maestroni disease-promoting role in rheumatoid arthritis? *J Neuroimmunol*, 158, 106-11.
- Marshall KA, Reiter RJ, Poeggeler B, Aruoma OI, Halliwell B, 1996. Evaluation of the antioxidative activity of melatonin in vitro. *Free Radic Biol Med*, 21, 307-15.
- Martel G, Hevi C, Kane-Goldsmith N, Shumyatsky GP, 2011. Zinc transporter ZnT3 is involved in memory dependent on the hippocampus and perirhinal cortex. *Behav Brain Res*, 223, 233-8.

- Mason JB, 2016. Vitamins, trace minerals, and other micronutrients. In: Cecil medicine., Eds: Goldman LaS, Andrew. I., 24, s. 1445-55.
- Matsubara E, Bryant-Thomas T, Pacheco QJ, Henry TL, Poeggeler B, Herbert D, Cruz-Sanchez F, Chyan YJ, Smith MA, Perry G, 2003. Melatonin increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 85, 1101-08.
- Matsumura M, Nagata M, Nakamura K, Kawai M, Baba T, Yamaki K, Yoshino S, 2010. Adjuvant effect of zinc oxide on Th2 but not Th1 immune responses in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 32, 56-62.
- Mayeda A, Mannon S, Hofstetter J, Adkins M, Baker R, Hu K, Nurnberger JJ, 1998. Effects of indirect light and propranolol on melatonin levels in normal human subjects. *Psychiatry Res*, 81, 9-17.
- McCord MC, Aizenman E, 2014. The role of intracellular zinc release in aging, oxidative stress, and Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*, 6, 77.
- Merrett K, Ljunggren MK, Mondal D, Griffith M, Rafat M, 2012. Biomaterials properties production and devices type I collagen biological functions synthesis and medicinal applications In: Type I collagen: Biological functions, synthesis and medicinal applications. Eds: Henriques ME, Pinto M, s. 1-13.
- Miller ER, Leucke RW, Ullrey DE, Baltzer BV, Bradley BL, Hofer JA, 1968. Biochemical, skeletal and allometric changes due to zinc deficiency in the baby pig. *J Nutr*, 95, 278-86.
- Miller SC, Pandi-Perumal SR, Esquifino AI, Cardinali DP, Maestroni GJ, 2006. The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer. *Int J Exp Pathol*, 87, 81-7.
- Mlyniec K, Nowak G, 2013. GPR39 up-regulation after selective antidepressants. *Neurochem Int*, 62,936-9.
- Mlyniec K, Singewald N, Holst B, Nowak G, 2015. GPR39 Zn(2+)-sensing receptor: a new target in antidepressant development? *J Affect Disord*, 174, 89-100.
- Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi R, Cipriano C, Muti E, Malavolta M, 2006. Zinc-binding proteins (metallothionein and alpha-2 macroglobulin) and immunosenescence. *Exp Gerontol*, 41, 1094-107.
- Mocchegiani E, Giacconi R, Cipriano C, Malavolta M, 2009. NK and NKT cells in aging and longevity: role of zinc and metallothioneins. *J Clin Immunol*, 29, 416-25.
- Mocchegiani E, Giacconi R, Cipriano C, Muzzioli M, Fattoretti P, Bertoni-Freddari C, Isani G, Zambenedetti P, Zatta P, 2001. Zinc-bound metallothioneins as potential biological markers of ageing. *Brain Res Bull*, 55,147-53.
- Mocchegiani E, Giacconi R, Muti E, Rogo C, Bracci M, Muzzioli M, 2004. Zinc, immune plasticity, aging, and successful aging: role of metallothionein. *Ann NY Acad Sci U S A*, 1019, 127-34.
- Mocchegiani E, Malavolta M, Costarelli L, Giacconi R, Cipriano C, Piacenza F, Tesi S, Basso A, Pierpaoli S, Lattanzio F, 2010. Zinc, metallothioneins and immunosenescence. *Proc Nutr Soc*, 69,290-9.
- Mocchegiani E, Muzzioli M, Cipriano C, Cipriano C, 1998. Zinc, T-cell pathways, aging: role of metallothioneins. *Mechanisms of Ageing and Development*, 106, 183-204.
- Mocchegiani E, Muzzioli M, Giacconi R, 2000. Zinc and immunoresistance to infection in aging: new biological tools. *Trends Pharmacol Sci*, 21, 205-8.
- Moulder K, Steward MW, 1989. Experimental zinc deficiency: effects on cellular responses and the affinity of humoral antibody. *Clin Exp Immunol*, 77, 269-74.
- Nakashima AS, Dyck RH, 2009. Zinc and cortical plasticity. *Brain Res Rev*, 59, 347-73.
- Nunnari G, Nigro L, Palermo F, Leto D, Pomerantz RJ, Cacopardo B, 2003. Reduction of serum melatonin levels in HIV-1-infected individuals' parallel disease progression: correlation with serum interleukin-12 levels. *Infection*, 31, 379-82.
- Ohashi K, Nagata Y, Wada E, Zammit PS, Shiozuka M, Matsuda R, 2015. Zinc promotes proliferation and activation of myogenic cells via the PI3K/Akt and ERK signaling cascade. *Exp Cell Res*, 333,228-37.

- Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley DH, Tay FR, Toledano M, 2011. Zinc reduces collagen degradation in demineralized human dentin explants. *J Dent*, 39, 148-53.
- Ostrakhovitch EA, Olsson PE, Jiang S, Cherian MG, 2006. Interaction of metallothionein with tumor suppressor p53 protein. *FEBS Lett*, 580, 1235-8.
- Ostrakhovitch EA, Song YP, Cherian MG, 2016. Basal and copper-induced expression of metallothionein isoform 1,2 and 3 genes in epithelial cancer cells: The role of tumor suppressor p53. *J Trace Elem Med Biol*, 35, 18-29.
- Oteiza PI, 2012. Zinc and the modulation of redox homeostasis. *Free Radic Biol Med*, 53, 1748-59.
- Paller AS, Mancini AJ, 2011. Disorders of Hair and Nails. 130-66.
- Pandey SK, Haldar C, Vishwas DK, Maiti P, 2015. Synthesis and in vitro evaluation of melatonin entrapped PLAnanoparticles: an oxidativestress and T-cell responseusing golden hamster. *J Biomed Mater Res A*, 103, 3034-44.
- Pandi-Perumal SR, Esquifino AI, Cardinali DP, Miller SC, Maestroni GJM, 2006. The role of melatonin in immunoenhancement: Potential application in cancer. *Int J Exp Pathol*, 87, 81-7.
- Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R, 2006. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J*, 273, 2813-38.
- Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R.
- Pandi-Perumal SR, Zisapel N, Srinivasan V, Cardinali DP, 2005. Melatonin and sleep in aging population. *Exp Gerontol*, 40, 911-25.
- Pang W, Leng X, Lu H, Yang H, Song N, Tan L, Jiang Y, Guo C, 2013. Depletion of intracellular zinc induces apoptosis of cultured hippocampal neurons through suppression of ERK signaling pathway and activation of caspase-3. *Neurosci Lett*, 552, 140-5.
- Paoletti P, Vergnano AM, Barbour B, Casado M, 2009. Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience*, 158, 126-36.
- Pedersen MO, Larsen A, Stoltenberg M, Penkowa M, 2009. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *Prog Histochem Cytochem*, 44, 29-64.
- Penkowa M, 2006. Metallothioneins are multipurpose neuroprotectants during brain pathology. *FEBS J*, 273, 1857-70.
- Penkowa M, Giralt M, Camats J, Hidalgo J, 2002. Metallothionein 1+2 protect the CNS during neuroglial degeneration induced by 6-aminonicotinamide. *J Comp Neurol*, 444, 174-89.
- Penkowa M, Nielsen H, Hidalgo J, Bernth N, Moos T, 1999. Distribution of metallothionein I + II and vesicular zinc in the developing central nervous system: correlative study in the rat. *J Comp Neurol*, 412, 303-18.
- Pereira P, Boucontet L, 2012. Innate NKT $\gamma\delta$ and NKT $\alpha\beta$ cells exert similar functions and compete for a thymic niche. *Eur J Immunol*, 42, 1272-81.
- Petranka J, Baldwin W, Biermann J, Jayadev S, Barr-ett JC, Murphy E, 1999. The oncostatic action of melatonin in an ovarian carcinoma cell line. *J Pineal Res*, 26, 129-36.
- Pevet P, Bothorel B, Slotten H, Saboureaux M, 2002. The chronobiotic properties of melatonin. *Cell Tissue Res*, 309, 183-91.
- Pieri C, Marra M, Monari R, Recchioni R, Marchselli F. Melatonin, 1994: A peroxy radical scavenger more potent than vitamin E. *Life Sci*, 55, 271-6.
- Pifer LL, Wang YF, Chiang TM, Ahokas R, Woods DR, Joyner RE, 1987. Borderline immunodeficiency in male homosexuals: is life-style contributory? *South Med J*, 80, 687-91, 697.
- Pifl C, Wolf A, Rebernik P, Reither H, Berger ML, 2009. Zinc regulates the dopamine transporter in a membrane potential and chloride dependent manner. *Neuropharmacology*, 56, 531-40.
- Pinter TB, Stillman MJ, 2015. Putting the pieces into place: Properties of intact zinc metallothionein 1A determined from interaction of its isolated domains with carbonic anhydrase. *Biochem J*, 471, 347-56.
- Poeggeler B, Reiter RJ, Tan PX, Chen LD, Manchester LC, 1993. Melatonin, hydroxyl-mediated oxidative damage, and aging. *J Pineal Res*, 14, 151-68.

- Poirel VJ, Boggio V, Dardente H, Pevet P, Masson- Pevet M, Gauer F, 2003. Contrary to other non-photic cues, acute melatonin injection does not induce immediate changes of clock gene mrna expression in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience*, 120, 745-55.
- Pourhassanali N, Roshan-Milani S, Kheradmand F, Motazakker M, Bagheri M, Saboory E, 2016. Zinc attenuates ethanol-induced Sertoli cell toxicity and apoptosis through caspase-3 mediated pathways. *Reprod Toxicol*, 61, 97-103.
- Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM, 1994. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci*, 55, 455-60.
- Prasad AS, 2008. Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. *Mol Med*, 14, 353-7.
- Prasad AS, Bao B, Beck FW, Sarkar FH, 2011. Zinc-suppressed inflammatory cytokines by induction of A20-mediated inhibition of nuclear factor-kappaB. *Nutrition*, 27, 816-23.
- Prasad AS, Fitzgerald JT, Hess JW, Kaplan J, Pelen F, Dardenne M, 1993. Zinc deficiency in elderly patients. *Nutrition*, 9, 218-24.
- Prasad AS, Halsted JA, Nadimi M, 1961. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. *Am J Med*, 31, 532-46.
- Prasad AS, Kaplan J, Brewer GJ, Dardenne M, 1989. Immunological effects of zinc deficiency in sickle cell anemia (SCA). *Prog Clin Biol Res*, 319, 629-49.
- Prasad AS, Meftah S, Abdallah J, Kaplan J, Brewer GJ, Bach JF, Dardenne M, 1988. Serum thymulin in human zinc deficiency. *J Clin Invest*, 82, 1202-10.
- Prasad AS, Mialr Jr, Farid Z, Sandstead HH, Schuler AR, 1963. Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism. *J Lab Clin Med*, 61, 537-49.
- Prasad AS, Bao B, Beck FW, Kucuk O, Sarkar FH, 2004. Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radic Biol Med*, 37, 1182-90.
- Putics A, Vödrös D, Malavolta M, Mocchegiani E, Csermely P, Soti C, 2008. Zinc supplementation boosts the stress response in the elderly: Hsp70 status is linked to zinc availability in peripheral lymphocytes. *Exp Gerontol*, 43, 452-61.
- Raheem O, Olufemi SE, Bachinski LL, Vihola A, Sirito M, Holmlund-Hampf J, Haapasalo H, Li YP, Udd B, Krahe R, 2010. Mutant (CCTG)_n expansion causes abnormal expression of zinc finger protein 9 (ZNF9) in myotonic dystrophy type 2. *Am J Pathol*, 177, 3025-36.
- Rahman MT, Ley MD, 2001. Metallothionein isogene transcription in red blood cell precursors from human cord blood. *Eur. J. Biochem.*, 268, 849-56.
- Rajaratnam SM, Middleton B, Stone BM, Arendt J, Dijk DJ, 2004. Melatonin advances the circadian timing of EEG sleep and directly facilitates sleep without altering its duration in extended sleep opportunities in humans. *J Physiol*, 561, 339-51.
- Randall VA, Botchkareva NV, 2008. The biology of hair growth. In: *Cosmetics applications of laser and light-based systems*. Eds: Ahluwalia GS, 1, s. 26-35.
- Redman J, Armstrong S, Ng KT, 1983. Free-running activity rhythms in the rat: Entrainment by melatonin. *Science*, 219, 1089-91.
- Regodon S, Martin-Palomino P, Fernandez-Montesinos R, Herrera JL, Carrascosa-Salmoral MP, Piriz S, Vadillo S, Guerrero JM, Pozo D, 2005. The use of melatonin as a vaccine agent. *Vaccine*, 23, 5321-7.
- Reiter RJ, 1993. The melatonin rhythm: Both a clock and a calendar. *Experientia*, 49, 654-64.
- Reiter RJ, 1995. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEBJ*, 9, 526-33.
- Reiter RJ, 1997. Antioxidant actions of melatonin. *Adv Pharmacol*, 38, 103-17.
- Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden LR, Chuang JI, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D, 1995. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res*, 18, 1-11.
- Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Saarela S, 1994. Melatonin as a free radical scavenger: Implications for aging and age-related diseases. *Ann NY Acad Sci*, 719, 1-12.

- Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS, 1997. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res*, 29, 363-72.
- Romanucci M, Bongiovanni L, Russo A, Capuccini S, Mechelli L, Ordeix L, Della Salda L, 2011. Oxidative stress in the pathogenesis of canine zinc-responsive dermatosis. *Vet Dermatol*, 22, 31-8.
- Rosenkranz E, Maywald M, Hilgers RD, Brieger A, Clarner T, Kipp M, Plümäkers B, Meyer S, Schwerdtle T, Rink L, 2016. Induction of regulatory T cells in Th1-/Th17-driven experimental autoimmune encephalomyelitis by zinc administration. *J Nutr Biochem.*, 29, 116-23.
- Rostami A, Moosavi SA, Dianat Moghadam H, Bolookat ER, 2016. Micronuclei Assessment of The Radioprotective Effects of Melatonin and Vitamin C in Human Lymphocytes. *Cell J.*, 18, 46-51.
- Rubin RT, Heist EK, McGeoy SS, Hanada K, Lesser IM, 1992. Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression. XI. Serum melatonin measures in patients and matched control subjects. *Arch Gen Psychiatry*, 49, 558-67.
- Sack RL, Hughes RJ, Edgar DM, Lewy AJ, 1997. Sleep-promoting effects of melatonin: at what dose, in whom, under what conditions, and by what mechanisms? *Sleep*, 20, 908-15.
- Sandstead HH, Prasad AS, Penland JG, Beck FW, Kaplan J, Egger NG, Alcock NW, Carroll RM, Ramanujam VM, Dayal HH, Rocco CD, Plotkin RA, Zavaleta AN, 2008. Zinc deficiency in Mexican American children: influence of zinc and other micronutrients on T cells, cytokines, and antiinflammatory plasma proteins. *Am J Clin Nutr*, 88, 1067-73.
- Sangthawan D, Phungrassami T, Sinkitjarurnchai W, 2015. Effects of zinc sulfate supplementation on cell-mediated immuneresponse in head and neck cancer patientst reated withr adiationtherapy. *Nutr Cancer*, 67, 449-56.
- Sangthawan D, Phungrassami T, Sinkitjarurnchai W, 2015. Effects of zinc sulfate supplementation on cell-mediated immune response in head and neck cancer patients treated with radiation therapy. *Nutr Cancer*, 67, 449-56.
- Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni F, Biasini C, Zanni F, Zanlari L, 2008. The immune system in extreme longevity. *Exp Gerontol*, 43, 61-5
- Santarelli L, Bracci M, Mocchegiani E, 2006. In vitro and in vivo effects of mercuric chloride on thymic endocrine activity, NK and NKT cell cytotoxicity, cytokine profiles (IL-2, IFN-gamma, IL-6): role of the nitric oxide-L-arginine pathway. *Int Immunopharmacol*, 6, 376-89.
- Sazawal S, Black RE, Bhan MK, Jalla S, Bhandari N, Sinha A, Majumdar S, 1996. Zinc supplementation reduces the incidence of persistent diarrhea and dysentery among low socio-economic children in India. *J Nutr*, 126, 443-50.
- Sazawal S, Jalla S, Mazumder S, Sinha A, Black RE, Bhan MK, 1997. Effect of zinc supplementation on cell-mediated immunity and lymphocyte subsets in preschool children. *Indian Pediatr*, 34, 589-97.
- Scaiano JC, 1995. Exploratory laser flash photolysis study of free radical reactions and magnetic field effects in melatonin chemistry. *J Pineal Res*, 19, 189-95.
- Schernhammer ES, Schulmeister K, 2004. Melatonin and cancer risk: does light at night compromise physiologic cancer protection by lowering serum melatonin levels? *Br J Cancer*, 90, 941-3.
- Sekhar RV, Patel SG, Guthikonda AP, Reid M, Balasubramanyam A, Taffet GE, Jahoor F, 2011. Deficient synthesis of glutathione underlies oxidative stress in aging and can be corrected by dietary cysteine and glycine supplementation. *Am J Clin Nutr*, 94, 847-53.
- Sensi SL, Jeng JM, 2004. Rethinking the excitotoxic ionic milieu: The emerging role of Zn²⁺ in ischemic neuronal injury. *Current molecular medicine*, 4, 83-107.
- Seo HJ, Cho YE, Kim T, Shin HI, Kwun IS, 2010. Zinc may increase bone formation through stimulating cell proliferation, alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Nutr Res Pract*, 4, 356-61.
- Seth R, Corniola RS, Gower-Winter SD, Morgan TJ, Jr., Bishop B, Levenson CW, 2015. Zinc deficiency induces apoptosis via mitochondrial p53- and caspase-dependent pathways in human neuronal precursor cells. *J Trace Elem Med Biol*, 30, 59-65.
- Shanklin SH, Miller ER, Ullrey DE, Hoefler JA, Leucke RW, 1968. Zinc requirement of baby pigs on casein diets. *J Nutr*, 96, 101-8.


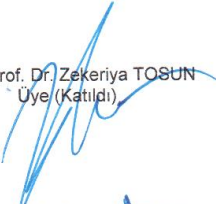



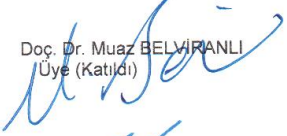

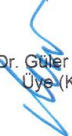
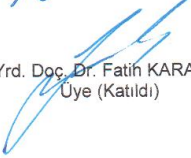
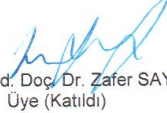



- Shimoda R, Achanzar WE, Qu W, Nagamine T, Takagi H, Mori M, Waalkes MP, 2003. Metallothionein is a potential negative regulator of apoptosis. *Toxicol Sci*, 73, 294-300.
- Shin SYW, Ng N, Pang SF, 1996. A molecular perspective of the genetic relationships of G protein coupled melatonin receptor subtypes. *J Pineal Res*, 20, 198-204.
- Siegrist C, Benedetti C, Orlando A, Beltran JM, Tuchscher L, Nosedà CM, Brusco LI, Cardinali DP, 2001. Lack of changes in serum prolactin, FSH, TSH, and estradiol after melatonin treatment in doses that improve sleep and reduce benzodiazepine consumption in sleep-disturbed, middle-aged, and elderly patients. *J Pineal Res*, 30, 34-42.
- Silva LR, Girard D, 2016. Human eosinophils are direct targets to nanoparticles: Zinc oxide nanoparticles (ZnO) delay apoptosis and increase the production of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-8. *Toxicol Lett*, 259, 11-20.
- Skrajnowska D, Korczak BB, Tokarz A, Kazimierzczuk A, Klepacz M, Makowska J, Gadzinski B, 2015. The effect of zinc and phytoestrogen supplementation on the changes in mineral content of the femur of rats with chemically induced mammary carcinogenesis. *J Trace Elem Med Biol*, 32, 79-85.
- Smith AF, Longpre J, Loo G, 2012. Inhibition by zinc of deoxycholate-induced apoptosis in HCT-116 cells. *J Cell Biochem*, 113, 650-7.
- Souetre E, Salvati E, Belugou JL, Pringuey D, Candito M, Krebs B, Ardisson JL, Darcourt G, 1989. Circadian rhythms in depression and recovery: evidence for blunted amplitude as the main chronobiological abnormality. *Psychiatry Res*, 28, 263-78.
- Spahl DU, Berendji-Grün D, Suschek CV, Kolb-Bachofen V, Kröncke K, 2003. Regulation of zinc homeostasis by inducible NO synthase-derived NO: Nuclear metallothionein translocation and intranuclear Zn²⁺ release. *Pnas*, 100, 13952-7.
- Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Maestroni GJ, Esquifino AI, Hardeland R, Cardinali DP, 2005. Role of melatonin in neurodegenerative diseases. *Neurotox Res*, 7, 293-318.
- Srinivasan V, Smits M, Spence W, Lowe AD, Kayumov L, Pandi-Perumal SR, Parry B, Cardinali DP, 2006. Melatonin in mood disorders. *World J Biol Psychiatry*, 7, 138-51.
- Stankovic RK, Chung RS, Penkowa M, 2007. Metallothioneins I and II: Neuroprotective significance during CNS pathology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 484-9.
- Sun J, Shen R, Schrock MS, Liu J, Pan X, Quimby D, Zanesi N, Druck T, Fong LY, Huebner K, 2016. Reduction in squamous cell carcinomas in mouse skin by dietary zinc supplementation. *Cancer Med*, 5, 2032-42.
- Sunar F, Gormus ZI, Baltaci AK, Mogulkoc R, 2008. The effect of low dose zinc supplementation to serum estrogen and progesterone levels in post-menopausal women. *Biol Trace Elem Res*, 126, 11-4.
- Swindell WR, 2011. Metallothionein and the biology of aging. *Ageing Res Rev*, 10, 132-45.
- Takeda A, 2014. Zinc signal in brain functions. In: *Zinc Signals in Cellular Functions and Disorders*. Eds: Fukada T, Kambe T, s. 161-75.
- Takeda A, Fujii H, Minamino T, Tamano H, 2014. Intracellular Zn(2+) signaling in cognition. *J Neurosci Res*, 92, 819-24.
- Tamano H, Koike Y, Nakada H, Shakushi Y, Takeda A, 2016. Significance of synaptic Zn²⁺ signaling in zincergic and non-zincergic synapses in the hippocampus in cognition. *J Trace Elem Med Biol*, 38, 93-8.
- Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ, 1993. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J*, 1, 57-60.
- Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, Barlow-Walden LR, 1993. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett*, 70, 65-71.
- Tan DX, Reiter RJ, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Barlow-Walden LR, 1994. Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by the carcinogen safrole. *Carcinogenesis*, 15, 615-8.

- Tanaka Y, Shiozawa S, Morimoto I, Fujita T, 1990. Role of zinc in interleukin 2 (IL 2) mediated T-cell activation. *Scand J Immunol*, 31, 547-52.
- Tang AM, Graham NM, Saah AJ, 1996. Effects of micronutrient intake on survival in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Am J Epidemiol*, 143, 1244-56.
- Tang Z, Sahu SN, Khadeer MA, Bai G, Franklin RB, Gupta A, 2006. Overexpression of the ZIP1 zinc transporter induces an osteogenic phenotype in mesenchymal stem cells. *Bone*, 38, 181-98.
- Tapazoglou E, Prasad AS, Hill G, Brewer GJ, Kaplan J, 1985. Decreased natural killer cell activity in zinc deficient subjects with sickle cell disease. *J Lab Clin Med*, 105, 19-22.
- Tassabehji NM, Corniola RS, Alshingiti A, Levenson CW, 2008. Zinc deficiency induces depression-like symptoms in adult rats. *Physiol Behav*, 95, 365-9.
- Thomas SY, Scanlon ST, Griewank KG, Constantinides MG, Savage AK, Barr KA, Meng F, Luster AD, Bendelac A, 2011. PLZF induces an intravascular surveillance program mediated by long-lived LFA-1-ICAM-1 interactions. *J Exp Med*, 208, 1179-88.
- Thompson C, Mezey G, Corn T, Franey C, English J, Arendt J, Checkley SA, 1985. The effect of desipramine upon melatonin and cortisol secretion in depressed and normal subjects. *Br J Psychiatry*, 147, 389-93.
- Todd WR, Elvejheim CA, Hart EB, 1934. Zinc in the nutrition of the rat. *Am J Physiol*, 107, 146-56.
- Tuncer I, Sunar F, Toy H, Baltaci AK, Mogulkoc R, 2011. Histological effects of zinc and melatonin on rat testes. *Bratisl Lek Listy*, 112, 425-7.
- Tyszka-Czochara M, Pasko P, Reczynski W, Szlosarczyk M, Bystrowska B, Opoka W, 2014. Zinc and propolis reduces cytotoxicity and proliferation in skin fibroblast cell culture: total polyphenol content and antioxidant capacity of propolis. *Biol Trace Elem Res*, 160,123-31.
- Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, Honma K, Kondo T. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1999;27:838–847.
- Vasto S, Mocchegiani E, Malavolta M, Cuppari I, Listi F, Nuzzo D, Ditta V, Candore G, Caruso C, 2007. Zinc and inflammatory/immune response in aging. *Ann N Y Acad Sci*, 1100, 111-22.
- Venkoba rao A, Parvathi Devi S, Srinivasan V. Urinary melatonin in depression. *Indian J Psychiatry* 1983;25:167–172.
- Vijayalaxmi R, Reiter RJ, Herman TS, Meltz ML. Melatonin and radioprotection from genetic damage: In vivo/in vitro studies in human volunteers. *Radiat Res* 1996;371:221 -228.
- Vijayalaxmi R, Reiter RJ, Meltz ML. Melatonin protects human blood lymphocytes from radiation induced chromosome damage. *Mutat Res* 1995;346: 23—31.
- Vijayalaxmi R, Reiter RJ, Sewerynek E, Poeggeler B, Leal BZ, Meltz ML. Marked reduction of radiation-induced micronuclei in human blood lymphocytes pretreated with melatonin. *Radiat Res* 1995;143: 102—106.
- Vijayalaxmi Thomas CR Jr, Reiter RJ, Herman TS. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol* 2002;20:2575–2601.
- Vishwas DK, Haldar C, 2014. MT1 receptor expression and AA-NAT activity in lymphatic tissue following melatonin administration in male golden hamster. *Int Immunopharmacol*, 22, 258-65.
- Voorhees JL, Rao GV, Gordon TJ, Brooks CL, 2011. Zinc binding to human lactogenic hormones and the human prolactin receptor. *FEBS Lett*, 585, 12, 1783-8.
- Vriend J, Reiter RJ. Breastcancer cells: Modulation by melatonin and the ubiquitin-proteasomesystem--a review. *Mol Cell Endocrinol* 2015;5:417:1-9.
- Vruwink KG, Hurley LS, Gershwin ME, Keen CL. Gestational zinc deficiency amplifies the regulation of metallothionein induction in adult mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 1988;188:30–4.
- Walsh CT, Sandstead HH, Prasad AS, Newberne PM, Fraker PJ. Zinc health effects and research priorities for the 1990's. *Environ Health Perspect* 1994;102:5–46.
- Wang X, Wu Y, Zhou B, 2009. Dietary zinc absorption is mediated by ZnT1 in *Drosophila melanogaster*. *FASEB J*, 23, 8, 2650-61.

- Wang Y, Liang B, Watson RR. The effect of alcohol consumption on nutritional status during murine AIDS. *Alcohol* 1994;11:273–8.
- Williams LM, Hannah LT, Hastings MH, Maywood ES. Melatonin receptors in the rat brain and pituitary. *J Pineal Res* 1995;19:173—177.
- Yamaguchi N, Yamaguchi N, 2015. The seventh zinc finger motif of A20 is required for the suppression of TNF-alpha-induced apoptosis. *FEBS Lett*, 589, 12, 1369-75.
- Yazıcı Z, Baltacı AK, Moğulkoç R, Halifeoğlu I, Kaya Y, 2011. Effect of boron supplementation on plasma element distribution in ovariectomized rats subjected to acute swimming exercise. *Neuro Endocrinol Lett*, 29, 173-7.
- Yoo YM, Jang SK, Kim GH, Park JY, Joo SS, 2016. Pharmacological advantages of melatonin in immunosenescence by improving activity of T lymphocytes. *J Biomed Res*, 30, 314-21
- Zalewski PD. Zinc and immunity: implications for growth, survival and function of lymphoid cells. *J Nutr Immunol* 1996;4:39–80.
- Zhang B, Satoh M, Nishimura N, Suzuki JS, Sone H, Aoki Y, Tohyama C, 1998. Metallothionein deficiency promotes mouse skin carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Cancer research*, 58, 18, 4044-6.
- Zhang D, Li Y, Zhu T, Zhang F, Yang Z, Miao D, 2011. Zinc supplementation results in improved therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in a mouse ischemic limb model. *Cytotherapy*, 13, 2, 156-64.
- Zhdanova IV, Tucci V. Melatonin, circadian rhythms, and sleep. *Curr Treat Options Neurol* 2003;5:225–229.
- Zhdanova IV. Melatonin as a hypnotic: *Pro. Sleep Med Rev* 2005;9:51–65.
- Zou M-H, Shi C, Cohen RA, 2002. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *Journal of Clinical Investigation*, 109, 6, 817-26.

7. EKLER

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ DENEYSEL TIP UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

Karar Sayısı: 2016-31	Toplantı Tarihi: 19.07.2016	
<p>Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Rasim Moğulkoç ve Prof. Dr. Abdulkerim Kasım BALTACI, Saltuk Buğra Baltacı tarafından sunulan "Sıçanlarda DMBA ile oluşturulmuş meme kanserinde çinko ile melatonin uygulamasının bağışıklık parametrelerine etkisi" başlıklı Yüksek Lisans tezi projesi kurul tarafından değerlendirildi.</p> <p>Projede belirtilen anesteziik maddenin (ketamine 60 mg/kg xylazine5 mg/kg) kullanılması uygun görülmüştür. Projede belirtilen ve istatistiksel olarak en güvenilir sonuç elde edilebilecek asgari sayıda kullanılacak olan (50 adet sıçan) hayvan sayısı uygun görülmüştür.</p> <p>Projenin hayvan deneylerine ilişkin yönlerinin Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesinde belirtilen "Etik Kurallar" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.</p> <p>Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesinde yer alan kurallar ve belirtilen "Hayvan Deneyleri İle İlgili Etik İlkeler" saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında "Etik Kurul Yönergesi İlkelerine Uyulduğuna", çalışmanın deneysel kısmını yapacak çalışmacının "Deney Hayvanları Kullanım Sertifikasına" sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından "uygun" olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.</p>		
Prof. Dr. Nilnel OKUDAN Başkan (Katıldı)		
		
Prof. Dr. Zekeriya TOSUN Üye (Katıldı)	Doç. Dr. Yaserin ÖZNUURLU Başkan V. (Katıldı)	Prof. Dr. Ercan DURMUŞ Üye (Katılmadı)
		
Prof. Dr. Banu BOZKURT Üye (Katıldı)	Doç. Dr. Muaz BELVIRANLI Üye (Katıldı)	Doç. Dr. Kamil ÜNEY Üye (Katıldı)
		
Doç. Dr. Güler YAVAŞ Üye (Katıldı)	Yrd. Doç. Dr. Fatih KARA Üye (Katıldı)	Yrd. Doç. Dr. Zafer SAYIN Üye (Katıldı)
		
Vet. Hekim S. Metin GÖKYAPRAK Üye (Katıldı)	Burhan YILMAZ Üye (Katıldı)	Murat SABAN Üye (Katıldı)
		

8. ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Konya'da doğdu. İlköğretimini Özel Diltaş İlköğretim Okulu, lise eğitimini Özel Diltaş Anadolu Lisesinde tamamladı. Mevlana Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Yüksek Okulu Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümünden 2015 yılında mezun oldu. 2015 yılında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji (Tıp) Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı.