

Deneyisel *Toxoplasma gondii* infeksiyonlarında serum çinko düzeyleri ve çinko takviyesinin hücresel bağışıklıktaki etkisi

Dr. Abdülkerim K.BALTACI*, Dr.Neyhan ERGENE**, Dr.Ali ATEŞ***, Dr.Cem Ş.BEDİZ**,
Uzm.Recep ÖZMERDİVENLİ**, Dr.Selçuk DUMAN****

Bu araştırmada, deneysel olarak oluşturulmuş Toxoplasma gondii infeksiyonunda, serum çinko düzeylerinin belirlenmesinin yanısıra, çinko takviyesinin hücresel bağışıklık üzerine olan etki derecesinin ortaya konulması amaçlandı. Çalışmada 50 adet Wistar-Albino erkek ratların 20'si çinko takviyeli diyetle beslenen infeksiyonlu deney grubunu (İD), 20'si normal diyetle beslenen infeksiyonlu kontrol grubunu (İK) ve 10 tanesi normal diyetle beslenen infeksiyonsuz kontrol grubunu (K) oluşturdu. Grupların serum çinko düzeyleri ve immünolojik parametreleri değerlendirildi. Total ve T8 lenfositler İD ve İK gruplarında yüksek olarak gözlenirken, T4 lenfositler K grubunda yüksek bulundu (P < 0.001). Serum çinko seviyeleri arasında anlamlı farklılık tesbit edilmedi. Her iki kontrol grubunda T4-T8 lenfositleri arasında, İD grubunda T8-lenfositleriyle serum çinko seviyeleri arasında korelasyon görülürken, diğer parametreler anlamsız bulundu. Çinko takviyesinin T.gondii infeksiyonunda T8-lenfosit yapımını artırarak hücresel bağışıklık sistemini uyardığı, dolayısıyla parazitik infeksiyonlarda yürütülen tedavi yanında çinko takviyesinin yararlı olabileceği sonucuna varıldı. [Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi 2(2):130-134,1995]

Anahtar Kelimeler : *T.gondii, çinko, hücresel bağışıklık.*

Serum zinc levels and the effect of zinc supplementation on cellular immunity in experimentally induced *Toxoplasma gondii* infections

Fifty Wistar-Albino male rats were divided into three groups each containing 10, 20 and 20 rats to represent the control (C), infected with zinc supplemented diet (ID) and infected without zinc supplemented diet (IK) groups, respectively, in order to determine the serum zinc levels and the effect of zinc supplement on the cellular immunity in experimentally induced T.gondii infection. Serum zinc levels and some immunologic parameters of rats were determined. Total and T8 lymphocytes were high in ID and IK groups while T4 lymphocyte was high in K group (P < 0.001). No difference was observed between the serum zinc levels of all groups. In the correlation coefficient calculations a positive relation was found between T4 and T8 lymphocytes in both K and IK groups, though there was not any relation in the other parameters and, also a positive relation was observed between the T8 lymphocytes and serum zinc levels in the supplemented infected group. It was observed in this study that zinc supplementation stimulates the immune system by increasing the T8 lymphocyte production and it may be concluded that zinc supplementation might be useful besides the therapeutic treatments for parasitic infections. [Journal of Turgut Özal Medical Center 2(2):130-134,1995]

Key Words : *Toxoplasma gondii, zinc, cellular immunity.*

Çinkonun büyüme, gelişme ve enzim aktiviteleri için gerekli olduğu 1930'larda ortaya konmuş, eksikliği üzerine olan çalışmalar ise 1960'lardan sonra yapılmıştır^{1,2}. Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre çinko ile immün sistem arasında önemli ilişkiler bulunmakta, yetersizliğinde daha çok hücresel

* : Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı - Elazığ

** : Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı - Konya

*** : Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü - Konya

**** : Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Anabilim Dalı - Konya

(Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiş ve 8.Ulusal Parazitoloji Kongresinde (7-10 Eylül 1993-Trabzon) bildiri olarak sunulmuştur.)

immünite etkilenmekte ve çeşitli immün bozukluklar ortaya çıkmaktadır³⁻⁵. Bu değişiklikler diyetle çinko ilavesiyle düzeltilebilmektedir⁶⁻⁸. İn vitro sistemlerde de çinkonun lenfositlerin sayılarını artırdığı ve etkilerini aktive ettiği çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir⁹⁻¹². Bugün çinko doğal bir T-lenfosit mitojeni olarak kabul edilmektedir¹³⁻¹⁵. Çinkonun bu fonksiyonu, enzimler yoluyla DNA, RNA ve protein sentezini stimüle etmesiyle oluşmaktadır^{16,17}. Farelerde yapılan farklı deneylerde, yalnızca çinko yönünden eksik diyetin lenfoit organlarda ve özellikle timusta belirgin atrofiye neden olduğu gösterilmiştir. Bu sebeple hücresel immünite içinde yardımcı T-lenfosit (T₄) fonksiyonlarındaki azalmaya bağlı olarak antikor cevabının da etkilendiği ortaya konmuş, diyetle çinko ilavesiyle immün cevaplar normale dönmüştür^{11,18}.

T.gondii enfeksiyonunda hücresel immünite belli başlı kontrol mekanizmasıdır^{19,20}. Son yıllarda yapılan çalışmalarda *T.gondii*'ye karşı immünitede T-supresör (T₈) hücre fonksiyonlarının önemi ortaya konmuştur^{21,22}.

Daha önceki çalışmalardan çinko eksikliğinde primer olarak T₄-hücrelerinin etkilendiğinin bilinmesine karşılık, bu çalışmada parazitik enfeksiyonlarda efektör/regülatör rol oynayan T₈ hücrelerinin²³, çinko takviyesi yapıldığında *T.gondii* enfeksiyonunda nasıl etkileneceği araştırılmak istenmiştir.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışma 1992 Mayıs-Ekim ayları arasında S.Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi. Çalışmada 350-400 gr ağırlığında 4-6 aylık Wistar-Albino erkek ratlar kullanılırken, kullanılan ratların 20 adedi çinko takviyeli diyetle beslenen enfeksiyonlu deney grubunu (İD), 20 tanesi normal diyetle beslenen enfeksiyonlu kontrol grubunu (İK), 10 adedi de normal diyetle beslenen enfeksiyonsuz kontrol grubunu (K) oluşturdu. Normal ve çinko takviyeli diyetler (çinko miktarları sırasıyla 96.95 mg/kg-286.80 mg/kg) Yem Sanayii T.A.Ş. Konya Yem Fabrikasında hazırlanıp analizi yapıldıktan sonra kullanıldı. Deney hayvanları 15 günlük diyetten sonra *T.gondii* ile mikroskopik sahada 10-12 parazit görülür şekilde 0.5 ml serum fizyolojik içinde, eter anestezi altında intraperitoneal enjeksiyonla infekte edildi.

Total lenfosit sayımları Wright boyası ile hazırlanan yayma preparatları ile ışık mikroskobu altında yapıldı. T₄ ve T₈ lenfositlerinin anti-T₄ ve

anti-T₈ monoklonal antikorları ile (Behringer-Mannheim, Almanya) immün floresans yöntemi kullanılarak yüzde oranları belirlendi.

Serum çinko seviyeleri GATA Farmasötik-Toksikoloji Anabilim Dalında Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi (Varian 30-40 PSC-56) kullanılarak tesbit edildi.

İstatistiksel değerlendirmelerde, gruplar arasındaki farklılıkların tesbiti için Varyans analizi, burada önemli bulunanlar arasındaki farkı tesbit etmek için Duncan metodu kullanıldı ve parametreler arasındaki ilişkilerin önemi için korelasyon katsayıları hesaplandı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan grupların bireysel parametreleri Tablo I, II ve III'de istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo IV'de sunulmuştur. Serum çinko seviyeleri gruplar arasında anlamlı farklılıklar göstermezken, T₄ lenfosit değerleri İK grubunda diğerlerine göre yüksek, T₈ ve total lenfosit değerleriyse İD grupta daha belirgin olmak üzere enfeksiyonlu gruplarda yüksek bulunmuştur. Sonuçlar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak P<0.001 seviyesinde anlamlı bulunmuştur. Ayrıca korelasyon hesaplarına göre İK ve K gruplarında T₄-T₈ lenfosit değerleri arasında pozitif bir ilişki gözlenirken (r=0.61 ve 0.76 P<0.05), İD grubunda serum çinko seviyeleri ile T₈ lenfosit değerleri arasındaki ilişki anlamlı (r=0.55, P<0.05) bulunmuştur. Korelasyon hesaplarına ilişkin bulgular Şekil 1, 2 ve 3'de sunulmuştur.

Tablo I. Çinko takviyeli enfeksiyonlu grup

ID	T ₄ -lenfosit (%)	T ₈ -lenfosit (%)	Total lenfosit (%)	Serum çinkosu (µg/dl)
1	36	45	72	112
2	34	44	68	119
3	39	46	86	128
4	31	42	74	74
5	33	41	78	81
6	32	38	66	90
7	30	41	70	144
8	41	36	89	100
9	36	38	68	98
10	30	37	75	115
11	34	40	78	76
12	40	44	69	148
13	30	36	84	90
14	30	34	67	96
15	34	37	78	79
16	36	33	72	68
17	36	40	69	112
18	-	-	84	85
19	-	-	84	119
20	-	-	77	98

Baltacı ve ark.

Deneyel Toksoplasma gondii enfeksiyonlarında serum çinko düzeyleri ve hücresel bağışıklıktaki etkisi

Tablo II. Normal diyetli enfeksiyonlu grup

İK	T ₄ -lenfosit (%)	T ₈ -lenfosit (%)	Total lenfosit (%)	Serum çinkosu (µg/dl)
1	29	28	58	114
2	32	34	58	58
3	30	33	63	114
4	32	34	66	57
5	29	34	58	67
6	29	37	67	52
7	30	28	60	122
8	32	30	63	92
9	36	38	70	79
10	36	39	59	86
11	28	30	65	100
12	32	40	68	84
13	34	38	71	99
14	30	33	59	100
15	30	34	71	91
16	29	34	58	125
17	-	-	64	114
18	-	-	70	120
19	-	-	59	132
20	-	-	59	58

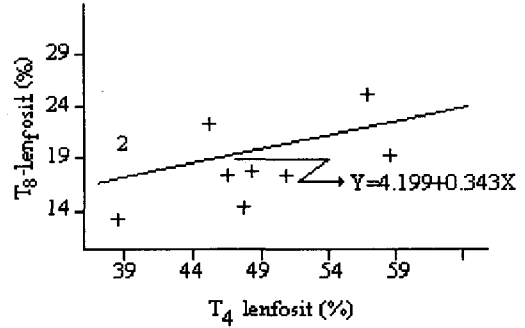
Tablo III. İnfeksiyonsuz kontrol grubu

K	T ₄ -lenfosit (%)	T ₈ -lenfosit (%)	Total lenfosit (%)	Serum çinkosu (µg/dl)
1	59	22	53	118
2	45	22	55	85
3	45	19	48	100
4	58	28	59	68
5	40	15	68	110
6	39	19	57	56
7	39	19	48	79
8	46	18	49	89
9	48	20	51	57
10	47	20	58	59

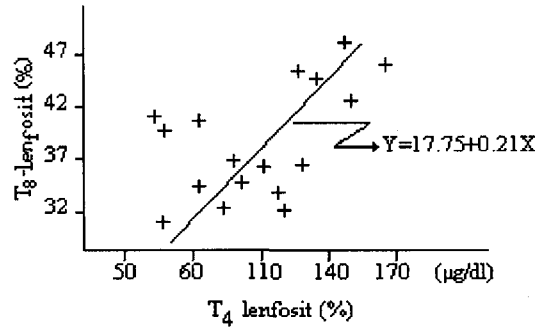
Tablo IV. Çalışma gruplarının istatistiksel değerlendirme sonuçları*

Gruplar	T ₄ -lenfosit (%)	T ₈ -lenfosit (%)	Total lenfosit (%)	Serum çinkosu (µg/dl)
K	46.60±2.34a	20.20±1.07a	53.60±1.97a	82.10±7.06
İK	31.13±0.61b	34.00±0.93b	63.30±1.09b	93.20±5.62
İD	34.24±0.86b	39.53±0.93c	75.40±1.57c	101.60±5.06

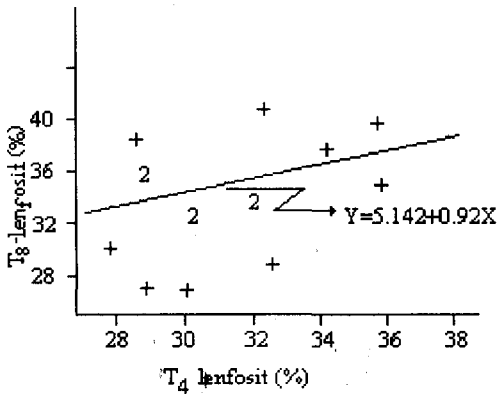
*: Aynı sütunda değişik harf taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (P<0.001).



Şekil 2. İK grubunda T₄ ve T₈ lenfositleri arasındaki ilişki (r=0.76, P<0.05)



Şekil 3. İD grubunda serum çinko düzeyleri ile T₈ lenfositleri arasındaki ilişki (r=0.55, P<0.05)



Şekil 1. K grubunda T₄ ve T₈ lenfositleri arasındaki ilişki (r=0.61, P<0.05)

TARTIŞMA

İmmün yetmezliğin sık rastlanan nutrisyonel nedenleri arasında çinko eksikliği en önemlisidir. Güçlü bir immün tepki, doku ve hücrelerde yeterli miktarda çinko bulunmasıyla yakından ilgilidir ve eksikliği halinde enfeksiyonlar daha sık görülmektedir^{18,24,25}. Bir çalışmada²⁶, *Trypanosoma cruzi* ile infekte edilen farelerde 22. günde çinko eksik diyetle beslenenlerin %85'i sınırlı diyetle beslenenlerin %10'u, normal diyetle beslenenlerin

hiçbirisinin ölmediğinin bildirilmesi de çinkonun konak savunmasındaki rolünü göstermektedir. Ayrıca çinko eksikliğinin timus atrofisine neden olması^{11,18} T-lenfosit organizasyonunu da bozacaktır. Buna karşılık parazitik enfeksiyonlarda hücrel immünite savunmada en önemli mekanizmadır^{19,20} ve özellikle T₈ lenfositler daha önemli görevler almaktadır. T₄ lenfositler ise daha çok enfeksiyonun başlangıç döneminde immün regülasyon sırasında rol oynamaktadır²². Bunun yanında T₄-lenfositlerin bir alt grubu olan Th₂'lerin sentezlediği IL-10'nun IFN-gama sentezini inhibe ettiği ve buna bağlı olarak intrasellüler *T.gondii*'ye karşı makrofaj aktivasyonunu önlediği de bildirilmiştir²⁷. Suzuki ve Remington²⁸ da IFN-gama'nın *T.gondii* enfeksiyonuna karşı dirençte rol oynayan en önemli aracı olduğunu ileri sürmüşlerdir. T₈-lenfositlerin ise IFN-gama ve IL-2'yi yüksek oranda sentezledikleri bilinmektedir²⁹.

Khan ve ark²⁹, *T.gondii* enfeksiyonlarında spesifik antikorlar ile T₈-lenfositlerinin bloke edilmesi halinde koruyucu immünite transferinin başarılı olmadığını, buna karşılık T₄ lenfositlerin blokajının immünite transferine olumsuz etki yapmadığını göstermişlerdir. Brown ve Mc Lead³⁰ ise enfeksiyondan sonra *T.gondii* yayılmasını önlemede T₈-lenfositlerinin ilk ve önemli olan bir rol üstlendiklerini bildirmişlerdir. Bütün bu bulgular T₈-lenfositlerin etki mekanizmalarının aydınlatılmasına katkıda bulunmuştur. Bu çalışmada ise parazitik enfeksiyonlarda çinko takviyesinin hücrel immüniteyi nasıl etkileyeceği araştırılmış ve enfeksiyonlu deney grubunda T₈-lenfositlerin önemli oranda arttığı gözlenmiş, buna paralel olarak serum çinko seviyesi ile önemli korelasyon tesbit edilmiştir.

Gerçekleştirilen çalışmada elde edilen bulgulara göre, çinko takviyesinin *T.gondii* enfeksiyonunda T₈-lenfosit yapımını artırarak hücrel bağışıklık sistemini uyardığı, dolayısıyla parazitik enfeksiyonlarda yürütülen tedavi yanında çinko takviyesinin de yararlı olabileceği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

1. Beisel WB. Single nutrients and immunity (B.Zinc). Am J Clin Nutr 1982;35:449-55.
2. Ercan M, Ceylan A, Köylü H. Sağlıkta ve hastalıkta çinkonun rolü ve önemi. Fizyoloji Bülteni 1988;5:256-60.
3. Duchateau J, Delepese G, Vrijens R, Collet H. Beneficial effects of oral zinc supplementation on the immune response of old people. Am J Med 1981;70:1001-4.
4. Everett G, Appor J. Effect of zinc deficiency on prostoglandin levels in pregnant rats. Nutr Res 1985;1:335-7.
5. Fernandes G, Nair M, Onoe K, Tanaka T, Floyd R, Good RA. Impairment of cell-mediated immunity functions by dietary zinc deficiency in mice. Proc Natl Acad Sci 1979;76:457-61.
6. Chandra RK. Cell-mediated immunity in nutritional imbalance. Fed Proc 1980;39:3088-92.
7. Chandra RK. Excessive intake of zinc impairs immune responses. JAMA 1984;252:1443-6.
8. Chandra S, Vyas D, Chandra RK. Trace elements immunity and susceptibility to infection. Nutr Res 1985;1:693-9.
9. Carlomagno MA, McMurrey DN. Chronic zinc deficiency in rats: Its influence on some parameters of humoral and cell-mediated immunity. Nutr Res 1983;3:69-78.
10. Flynn A. In vitro levels of copper magnesium and zinc required for mitogen stimulated T-lymphocyte proliferation. Nutr Res 1985;5:487-95.
11. Luecke RW, Simonel CE, Fraker PJ. The effect of restricted dietary on the antibody mediated response of the zinc deficient A/J mouse. J Nutr 1978;108:881-7.
12. McClain CJ, Kasarskis EJ, Allen JJ. Functional consequences of zinc deficiency. Prog Nutr Sci 1985; 9: 195-226.
13. Bert LV, Alphonse G. The metallobiochemistry of zinc enzymes. Adv Enzymol 1984; 56:283-430.
14. Flynn A, Loftus MA, Finke JH. Production of interleukin-1 and interleukin-2 in allogeneic mixed lymphocyte cultures under copper magnesium and zinc deficient conditions. Nutr Res 1984;4:673-9.
15. Formby B, Formby FS, Grodsky GM. Relations between insulin release and zinc⁶⁵ efflux from rat pancreatic islets maintained in tissue culture. Diabetes 1984; 33:229-34.
16. Chvapil M. Effect of zinc and biomembranes. Med Clin North Am 1976;60:799-812.
17. Cunnane SC. Role of zinc fatty acid metabolism in lipid membranes. Prog Food Nutr Sci 1988; 12:51-88.
18. Fraker PJ, Jardiu P, Cook J. Zinc deficiency and immune function. Arch Dermatol 1987;123:1699-701.
19. Hakim FT, Gazzinelli RT, Denkers E, Hiény S, Shearer GM, Sher A. CD8+ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite infected or antigen pulsed

- host cells. J Immunol 1991;147:2310-6.
20. Hughes HAP, Connely CA, Strangeways JEM, Hudson L. Antigen specific lymphocyte transformation induced by secreted antigens from *Toxoplasma gondii*. Clin Exp Immunol 1984;58:539-47.
 21. Kasper LH, Khan IA, Ely KH, Buelow R, Boothroyd JC. Antigen-specific (p30) mouse CD8+ T-cells are cytotoxic against *Toxoplasma gondii* infected peritoneal macrophages. J Immunol 1991;148(5):1493-8.
 22. Subauste CS, Koniaris AH, Remington JS. Murine CD8+ cytotoxic T-lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii* infected cells. J Immunol 1991;147(11):3955-9.
 23. Sher A, Coffman RL. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. Ann Rev Immunol 1992;10:385-409.
 24. Bogden JD, Oleske JM, Lavenhar AM, Munves EM, Kemp FW, Bruening KS. Zinc and immunocompetence in elderly people: effects of zinc supplementation for 3 months. Am J Clin Nutr 1988;48:655-63.
 25. Fischer PWF, Giroux A, L'Abbe M. Effect of zinc supplementation on copper status in adult man. Am J Clin Nutr 1984;40:743-6.
 26. Fraker PJ, Caruso R, Kierszenbaum F. Alteration in the immune and nutritional status of mice by synergy between zinc deficiency and infection with *Trypanosoma cruzi*. J Nutr 1982;112:1224-9.
 27. Gazzinelli RT, Oswald JP, Jones SL, Sher A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma activated macrophages. J Immunol 1992;148:1792-6.
 28. Suzuki Y, Remington JS. The effect of anti-IFN antibody on the protective effect of Lyt-2+ immune T-cells against *Toxoplasmosis* in mice. J Immunol 1990;144:1954-6.
 29. Khan IA, Ely KH, Kasper LH. A purified parasite (p30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. J Immunol 1991;147:3501-6.
 30. Brown CR, McLead R. Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. J Immunol 1990;145(10):3438-41.

Yazışma Adresi : Yrd.Doç.Dr. Abdülkerim K. BALTACI
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji ABD
ELAZIĞ