

**SİRKADİYEN RİTME BAĞLI OLARAK MELATONİN SEVİYESİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN ERİTROSİTLERDE LİPİD PEROKSİDASYONU ÜZERİNE ETKİSİ\***

**Effects of Circadian Rhythm-Related Physiological Melatonin Level Alterations on Lipid Peroxidation in Erythrocytes**

**M.Betül YERER<sup>1</sup>, Sami AYDOĞAN<sup>2</sup>**

**Özet:** Melatonin pineal bez tarafından salgılanan ve gece-gündüz ritmini düzenlemekle görevli olan bir hormon olup, 1993 yılında antioksidan etkilerinin varlığı gösterilmiştir. Eritrositlerde oksidatif hasarın belirtilerinden biri de membran yapısındaki lipidlerin peroksidasyona uğramasıdır. Bu çalışmanın amacı, sirkadiyen ritim değişikliklerinde eritrosit membranındaki lipidlerin oksidatif hasara uğrayıp uğramadığının araştırılmasıdır. Çalışma, Erciyes Üniversitesi Deneysel Klinik Araştırma Merkezi'nden sağlanan Swiss Albino, 90-120 günlük, ortalama 200-250 gr ağırlığında, 50 erkek sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Sıçanlar özel olarak hazırlanmış kafeslerde, sırasıyla, kontrol grubu olarak 12/12 saat(s) ve karşılaştırma grupları olarak 0/24s, 24/0s, 8/16s ve 16/8s aydınlık/karanlık (A/K) döngüsüne maruz bırakıldı. Alınan kan örneklerinin plazmaları ayrıldıktan sonra 3 kez fosfat tamponu ile yıkanarak hazırlanan eritrosit paketinde spektrofotometrik yöntemle lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçüldü. Ayrıca plazma melatonin düzeyleri de ELISA kiti ile değerlendirildi.

Plazma melatonin düzeyleri, 0/24s A/K döngüsü uygulanan grupta anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Diğer gruplarda ise ışığa maruziyet arttıkça buna paralel olarak plazma melatonin düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı belirlendi ( $p<0.05$ ). Eritrositlerde zardaki lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA değerleri belirlendiğinde gruplar arası farkın istatistiksel açıdan önemli olmadığı bulunmuştur.

Sonuç olarak, sirkadiyen ritimlerdeki, dolayısıyla da plazma melatonin düzeyindeki değişikliklerin eritrosit membran lipid peroksidasyonuna neden olduğu, bu etkilerin istatistiksel açıdan önemli olmamasının denek sayısının azlığından kaynaklanıyor olabileceği nedeniyle ışık döngüsü değişikliğinin eritrosit membranında MDA düzeylerini ve oksidatif hasar gelişimini etkileyebileceği düşünülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Sirkadiyen ritim, melatonin, eritrosit, lipid peroksidasyonu, sıçan

**Summary:** Melatonin is an endojen hormone, which regulates the light-dark cycle and is first shown to have antioxidant effects on 1993, is secreted from the pineal gland. One of the markers of oxidative stress in erythrocytes is the peroxidation of lipids in the membrane. The aim of this study is to investigate whether the erythrocyte membrane lipids are exposed to oxidative damage via circadian rhythm alterations. 90-120 days old, 200-250 gr, 50 male Swiss Albino rats, supplied from the University of Erciyes Experimental Clinical Research Centre, were used. The rats were exposed to 12/12 hours(h), 0/24h, 24/0h, 8/16h ve 16/8h Light/Dark (L/D) cycle respectively, in special cages. After separating the plasma, the erythrocytes were washed 3 times by phosphate buffer and malondialdehit (MDA) level which is an index of lipid peroxidation is measured spectrophotometrically in erythrocyte suspension. Furthermore, the plasma melatonin levels were evaluated by ELISA.

Plasma melatonin levels were significantly higher in 0/24 h L/D ( $p<0.05$ ) group whereas the levels decreased dramatically with the increase in exposure to light ( $p<0.05$ ). MDA levels in group of 24/0 h L/D reduced, but the difference was not statistically significant.

As a result, plasma melatonin levels due to circadian rhythm alterations caused lipid peroxidation in erythrocyte membrane. However, these changes were not statistically different probably due to the number of the subject. For this reason, we suggested that circadian rhythm changes could affect MDA levels and oxidative damage in erythrocyte membrane.

**Key words:** Circadian rhythm, melatonin, erythrocyte, lipid peroxidation, rat

<sup>1</sup> Bilim Doktoru.Erciyes Ün.Sağ.Bil.Ens.Fizyoloji AD, Kayseri

<sup>2</sup> Prof.Dr.Erciyes Ün.Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD, Kayseri

\* Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından SBY-05-02 nolu proje ile desteklenmiştir.

Kronobiyoloji alanındaki son gelişmeler, biyolojik saatlerin vücuttaki fizyolojik mekanizmalar üzerinde zannedilenden çok daha fazla ve çok yönlü etkilerinin olduğunu göstermiştir. Memelilerde biyolojik saatlerin en önemlilerinden biri gece-gündüz ritmini sağlayan sirkadiyen ritimdir. Bu canlılarda sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde başlıca pineal bez ve suprakiazmatik nükleus (SCN) görev alır (1). Melatonin ise pineal bez tarafından salgılanan ve ritmi düzenlemekle görevli olan bir hormon olup, 1950'li yılların sonuna doğru varlığı tanımlanmıştır. Pineal bez memelilerde fotik bilgiyi nöroendokrin sinyallere dönüştürmektedir. Antioksidan özelliği 1991 yılında ilk kez gösterilen melatonin, lipofilik özelliğinden dolayı organizmada çok geniş alanda etki gösterebilmektedir (2). Organizmalar, serbest radikallerin yol açtığı oksidatif hasara karşı kendilerini koruyabilmek için, birçok savunma mekanizmasına sahiptirler. Bu mekanizmaların başında da süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri gelmektedir. Eritrositlerde oksidatif stres oluşumu membran yapısında bulunan lipidlerin peroksidasyona uğraması, membran bütünlüğünün bozulması eritrositlerin parçalanma riskinin artmasına neden olur (3,4). Eritrositlerde membran lipidlerinin peroksidasyona uğraması sonucunda ikincil ürün olarak oluşan önemli oksidasyon ürünlerinden birisi de MDA'dır (5). Bu nedenle çalışmada eritrositlerde oksidatif hasarın göstergesi olarak MDA düzeyleri değerlendirilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, farklı aydınlık/karanlık döngüsü uygulamalarında vücutta fizyolojik olarak sentezlenen melatonin düzeylerindeki değişiklikler, eritrosit membranı lipid peroksidasyonunda oluşan değişikliklerin arasında bir ilişkinin olup olmadığının araştırılmasıdır. Böylelikle farklı ışık döngüsüne maruz kalınması durumunda eritrositlerde oksidatif hasar gelişip gelişmeyeceği konusuna açıklık getirilmek istenmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda; Erciyes Üniversitesi Deneysel Klinik Araştırma Merkezi'nden sağlanan Swiss Albino 90-120 günlük, ortalama 200-250 gr ağırlığında, 50 adet erkek sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Deneş süresince, normal oda sıcaklığı ve neminde tutulan sıçanlar, standart pellet yem ve musluk suyu ile beslendi. Sıçanlar 10'arlı 5 gruba ayrılarak havalandırması ve ışıklandırması ayarlanabilen sirkadiyen ritim çalışmaları için özel olarak tasarlanmış olan kafeslerde bir hafta süreyle farklı aydınlık-karanlık (A-K) döngülerine tabi tutuldu. Gruplara uygulanan aydınlık/karanlık döngüleri:

- 1. Kontrol:** 12/12 saat A/K döngüsü uygulanan grup
- 2. Grup :** 0/24 saat A/K döngüsü uygulanan grup
- 3. Grup :** 8/16 saat A/K döngüsü uygulanan grup
- 4. Grup :** 16/8 saat A/K döngüsü uygulanan grup
- 5. Grup :** 24/0 saat A/K döngüsü uygulanan grup

Gruplardaki bütün sıçanlar bir haftalık sürenin sonunda içinde buldukları sirkadiyen ritmin gerektirdiği ışık ortamında her sabah saat 10:00'da ketamin ile anestezi edildikten sonra abdominal aortadan bütün kanlarının heparinli enjektöre çekilmesi suretiyle öldürüldü. Sıçanlardan alınan heparinli tam kan örnekleri; 3 kez fosfat tamponu ile yıkandı, santrifüj edilerek, eritrosit paketi ve plazma olmak üzere ayrılıp plazma melatonin düzeyi ölçümleri için (-) 20°C'de derin dondurucuda saklandı.

Plazma Melatonin düzeyi Melatonin ELISA kiti (IBL, Turkey) ile ölçüldü. Testin prensibi, biotinlenmiş ve biotinlenmemiş antijenlerin belli miktarda antikor bağlanma bölgesine kompetatif bağlanma derecelerinin ölçülmesi esasına dayanır. Biotinlenmiş antijen bağlanması örnekteki analit konsantrasyonu ile ters orantılıdır.

Plazma örneklerinden melatoninin ekstraksiyonu özel olarak hazırlanmış ekstraksiyon kolonları (Waters) ile gerçekleştirildi. Sistem dengeye geldiğinde, serbest biotinlenmiş antijenler ortamdan uzaklaştırılarak p-nitrofenil fosfat substratı varlığında antikorlara bağlı olan biotinlenmiş antijenlerin miktarı anti-biotin alkalin fosfataz belirteci ile belirlenirken, miktar tayini ise konsantrasyonu bilinen standartlarla aynı şekilde çalışılarak çizilen standart eğriden hesaplandı ve pg/ml cinsinden ifade edildi (6,7).

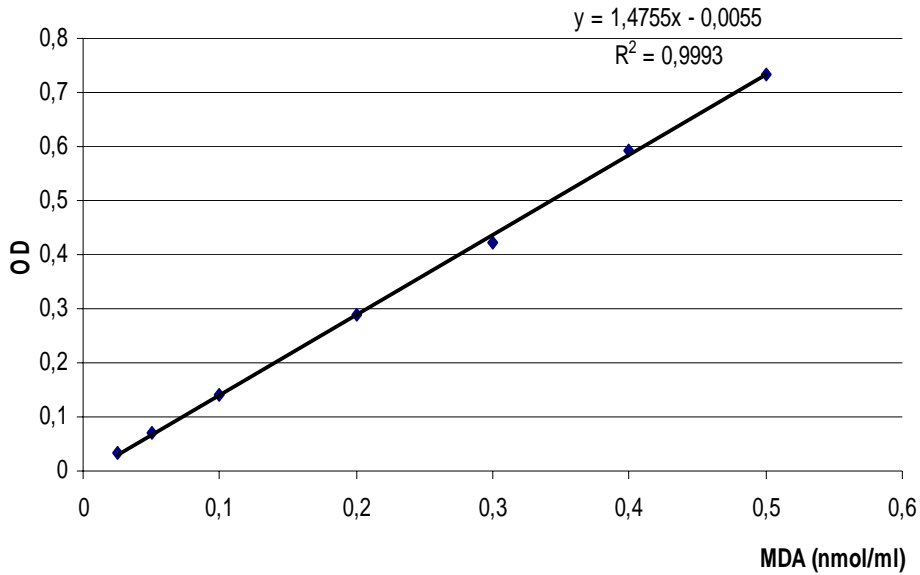
Eritrosit MDA tayininde, Stocks ve Dormandy tarafından geliştirilen metod kullanıldı (8). Metoda göre, malondialdehit (MDA) oluşumu, lipid peroksidasyonunun bir indeksi olarak kabul edildi. Metodun temel prensibi; lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asitle reaksiyona girmesi sonucunda oluşan pembe renkli kompleksin absorbansının 532 nm'de okunmasıdır. MDA değerlendirmesi ise; konsantrasyonu bilinen

standartlar kullanılarak çizilen standart eğri üzerinden yapıldı.

Stok MDA (5.848 M) çözeltisinden, 100 nmol/ml konsantrasyonda hazırlanan ara stok standarttan 0.025: 0.05: 0.1: 0.2: 0.3: 0.4: 0.5 nmol MDA/ml konsantrasyonlarında standart seri hazırlandı ve her konsantrasyon için iki kez çalışılarak MDA konsantrasyonlarına karşılık gelen optik dansite (OD) değerleriyle standart eğri çizildi (Şekil 1).

Standart eğriden bulunan eritrosit MDA seviyeleri (nmol/ml), aynı eritrosit süspansiyonlarında tayin edilen, Hb (g/ml) başına verildi (nmol MDA/g Hb).

Çalışma gruplarından elde edilen örneklerden ölçülen parametreler, SPSS for Windows 13.0 paket bilgisayar programı kullanılarak, gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi ile gerçekleştirildi. Çoklu karşılaştırma prosedürlerinden ise Dunn's testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak kabul edildi.



Şekil 1. Malondialdehit standart eğrisi

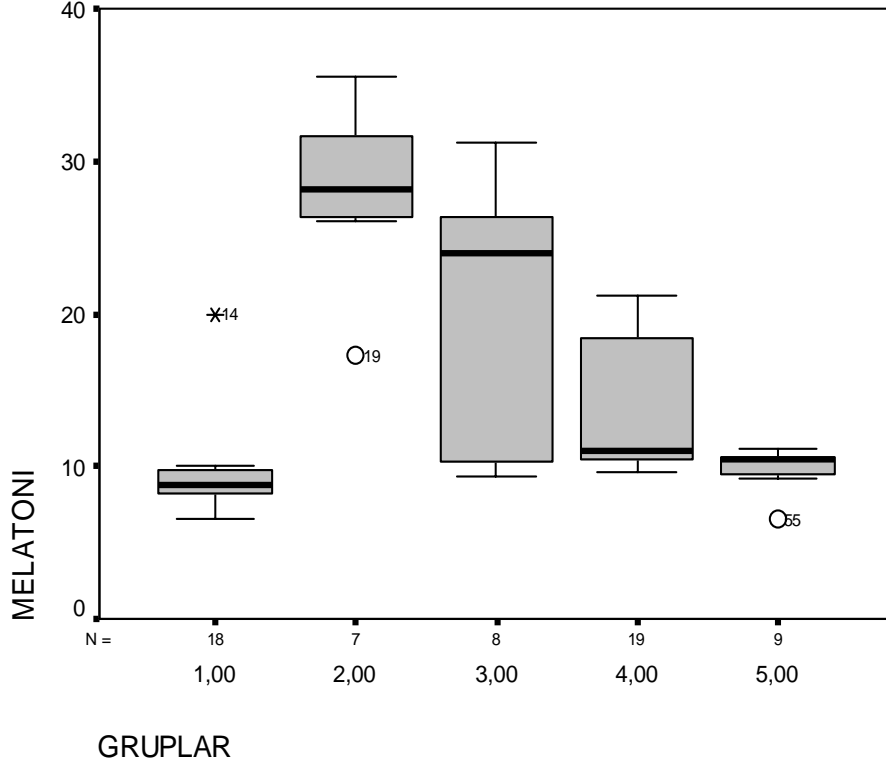
## BULGULAR

Plazma melatonin düzeyleri, 0/24 s A/K döngüsü uygulanan, diğer bir deyişle sırf karanlığa maruz bırakılan grupta anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p<0.001$ ). Diğer gruplarda ise ışığa maruziyet arttıkça buna paralel olarak plazma melatonin düzeyleri de anlamlı olarak azalmış ve sırf aydınlığa maruz kalan grupta plazma melatonin düzeyi kontrol grubuna yakın değerde bulunmuştur (Tablo I, Şekil 2).

Eritrositlerde zardaki lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondelaldehit düzeyleri değerlendirildiğinde, en yüksek MDA düzeyinin 8/16 s A/K döngüsü uygulanan grupta olduğu görülmüştür. Bu grupta MDA düzeyinin kontrol grubuna göre ve diğer gruplara göre farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo I, Şekil 3).

**Tablo I.** Farklı bileşenlerde A/K uygulaması yapılan sıçanlarda plazma melatonin düzeyleri ve eritrosit MDA düzeyleri

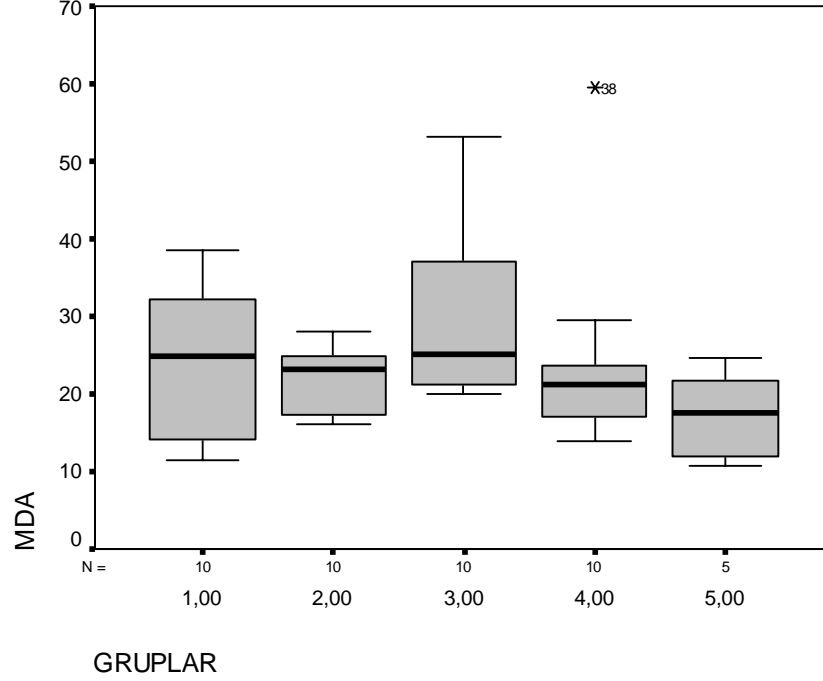
Gruplar	Plazma Melatonin (pg/ml) Median (Minimum-Maksimum)	Eritrosit MDA (nmol/gHb) Median (Minimum-Maksimum)
12/12 sa A/K (Kontrol)	8,8 6,5-20,0	24,92 11,49-38,61
0/24 sa A/K	26,805 16,09-35,52 *	23,05 16,17-27,97
8/16 sa A/K	23,98 9,350-31,15*	25,186 19,97-53,12
16/8 sa A/K	11,0 9,67-21,14 *	21,117 14,0-59,42
24/0 sa A/K	10,420 6,49-11,20 #	17,66 10,81-24,64
p değerleri	$p<0.001$	$p= 0.22$



**Şekil 2.** Farklı bileşenlerde A/K uygulaması yapılan sıçanlarda plazma melatonin düzeyleri.

Grup 1: 12/12 s A/K, Grup 2: 0/24 s A/K, Grup 3: 8/16 s A/K,  
Grup 4: 16/8 s A/K, Grup 5: 24/0 s A/K

\*: Kontrol grubuna göre  $p < 0.05$ , #: 0/24 s A/K grubuna göre  $p < 0.05$



Şekil 3. Farklı bileşenlerde A/K uygulaması yapılan sıçanların eritrositlerde MDA düzeyleri

Grup 1: 12/12 s A/K, Grup 2: 0/24 s A/K, Grup 3: 8/16 s A/K,  
Grup 4: 16/8 s A/K, Grup 5: 24/0 s A/K

## TARTIŞMA

Canlılarda biyolojik saatler, hücrel ve sistemsel fonksiyonların yürütülmesinde oldukça önemli roller üstlenmişlerdir. Bu biyolojik saatlerin en önemlilerinden biri de dünyanın güneş etrafındaki dönüşü ile ilgili olan ritimlerdir. Sirkadiyen ritim olarak adlandırılan bu gece-gündüz ritimleri birçok hormonal iletinin temelini oluşturur ve bu hormonlardan en önemlisi nokturnal salım gösteren melatonin hormonudur. Melatoninin biyolojik sistemler üzerinde; gece-gündüz döngüsünün düzenlenmesinin ötesinde; kan basıncı, vücut ısısı ve mevsimsel üreme fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi etkileri vardır. Kanser, Alzheimer gibi hastalıklarda rolü olduğu ve antioksidan etkilerinin bulunduğu bilinmektedir (9,10).

Melatoninin daha önce gösterilmiş bir diğer etkisi ise zarları stabilize edici özelliğidir. Bu konuda daha önce yaptığımız çalışmalarda (11,12), melatoninin sepsiste artan oksidatif hasarda eritrosit zarında koruyucu etkileri gösterilmiş ve *in vivo* ortamda melatoninin farmakolojik dozlarının eritrosit zarını lipid peroksidasyonundan ve oksidatif hasardan koruduğu ve antioksidan savunma sistemindeki enzimlerin aktivitelerini artırdığı bulunmuştur. Ayrıca *in vitro* ortamda da melatoninin eritrositlerin zarında sodyum nitroprussid uygulamasına bağılı olarak artan nitrik oksit (NO) düzeylerinin oksidatif etkisini önleyici yönde etkilerinin olduğu bulunmuştur. Ancak bu çalışmada melatoninin fizyolojik düzeylerinde pikogram (pg) düzeyindeki değişiklikler eritrosit membranında lipidlerin peroksidasyonu açısından önemli bir değişikliğe neden olmamıştır.

Aynı zamanda *in vivo* ve *in vitro* deneylerde, birçok hastalığın patojenezinde ve fizyolojik doku perfüzyonunda oldukça önemli olan eritrositlerin deformabilite özelliklerindeki bozuklukların da melatonin uygulaması ile antioksidan etkisine bağlı olarak düzeltildiği öne sürülmüştür (11,12). Melatoninin hücre zarlarını stabilize edici özelliğinin yanı sıra mitokondrial zarları da stabilize edici özelliklerinin olduğu gösterilmiştir. Lipofilik özellikte olması nedeniyle özellikle de mitokondrial iç zarı stabilize ederek elektron transport zincirinin fonksiyonunu gerektiği gibi yapabilmesine yardımcı olmaktadır (13).

Melatoninin zarlar üzerindeki etkileri dikkate alınarak, bu çalışmada da farklı sirkadiyen ritimlere tabi tutulmuş sıçanların fizyolojik melatonin düzeyindeki değişikliklerin eritrositlerde lipid peroksidasyonunu nasıl etkilediği değerlendirilmiştir. Farklı A/K döngülerine tabi tutulan sıçanların plazma melatonin düzeyleri değerlendirildiğinde tamamen karanlık uygulanan grupta en yüksek bulunurken aydınlıkta kalma süresinin artması ile melatonin düzeyleri azalmıştır. Plazma melatonin düzeyleri ile eritrosit membranında lipid peroksidasyonu arasındaki ilişki incelendiğinde ise, tam bir korelasyon bulunmamakla birlikte, 8/16 s A/K uygulanan grupta MDA düzeylerinin en yüksek olduğu görülmüştür. Bu grupta MDA düzeyinin kontrol grubuna göre ve diğer gruplara göre farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ancak özellikle de 8/16 saat A/K döngüsü uygulanan grupta bu değişikliklerin belirgin olması bu ışık döngüsünün eritrositlerdeki oksidatif hasar açısından kritik bir düzenleme olabileceğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak, sirkadiyen ritimlerdeki, dolayısıyla da plazma melatonin düzeyindeki değişikliklerin eritrosit membran lipid peroksidasyonuna neden olduğu, bu etkilerin istatistiksel açıdan önemli olmamasının denek sayısının azlığından kaynaklanıyor olabilmesi nedeniyle ışık döngüsü değişikliğinin eritrosit membranında MDA düzeylerini ve oksidatif hasar gelişimini etkileyebileceği düşünülmüştür.

## KAYNAKLAR

1. Cassone MV. *The clocks tell the time. Nature Neuroscience* 2005, 8: 3.
2. Ianas O, Olivescu R, Badescu I. *Melatonin involvement in oxidative process. Rom J Endocrin* 1991, 29: 117-123.
3. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. *Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in human. Acta Biochimica Polonica* 2003, 50: 1129-1146.
4. Reiter RJ. *Melatonin: clinical relevance. Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003, 17: 273-285.
5. Benzie IF. *Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. Int J Food Sci Nutr* 1996, 47: 233-261.
6. Kunz D, Bes F. *Melatonin as a therapy in REM sleep behavior disorder patients: an open-labeled pilot study on the possible influence of melatonin on REM-sleep regulation. Movement Disorders* 1999, 14: 507-511.
7. Sharman EH, Sharman KG, Ge YW, Lahiri DK, Bondy SC. *Age-related changes in murine CNS mRNA gene expression are modulated by dietary melatonin. J Pineal Res* 2004, 36: 165-170.
8. Stocks J, Dormandy TL. *The autooxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. Br J Haematol* 1971, 20: 95-11.
9. Korf HW, Von Gall C, Stehle J. *The circadian system and melatonin: lessons from rats and mice. Chronobiol Intern* 2003, 20: 697-710.
10. Schibler Ueli. *The daily rhythms of gens, cells and organs. EMBO Reports* 2005, 6: 9-13

11. Yerer MB, Yapislar H, Aydogan S, Yalcin O, Baskurt O. Lipid peroxidation and deformability of red blood cells in experimental sepsis in rats: The protective effects of melatonin. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004, 30: 77-82.
12. Aydogan S, Yerer MB, Yapislar H. In vitro effects of melatonin on the filtrability of erythrocytes in SNP-induced oxidative stress. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004, 30: 317-22.
13. Fosslien E. Mitochondrial medicine--molecular pathology of defective oxidative phosphorylation. *Ann Clin Lab Sci* 2001, 31: 25-67.



