

## Çinko ve Melatonin Eksikliğinin Rat Testisleri Üzerine Histolojik Etkileri

Ahmet Öztürk<sup>1</sup>, Abdülkerim Kasım Baltacı<sup>2</sup>, Cem Şeref Bediz<sup>3</sup>, Salim Güngör<sup>4</sup>, Ali Ateş<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Yrd.Doç.Dr. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı-Konya

<sup>2</sup>Yrd.Doç.Dr. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı- Konya

<sup>3</sup>Doç.Dr. 9 Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı-İzmir

<sup>4</sup>Prof.Dr. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı- Konya

<sup>5</sup>Doç.Dr. Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü- Konya

### Özet

Bu çalışmada melatonin ve çinko eksikliğinin birlikte ve ayrı ayrı rat testisleri üzerindeki histolojik etkileri araştırıldı. Çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinde yapıldı. Yirmi dört adet yetişkin erkek Sprague Dawley rat dört gruba ayrıldı. I. gruba çinko eksik diyet verildi (n=6). II. gruba pinealektomi uygulandı (n=6). III. gruba hem pinealektomi uygulandı, hem de çinko eksik diyet verildi (n=6). IV. grup kontrol olarak kullanıldı (n=6).

3 haftanın sonunda hayvanlardan dekapitasyonla alınan kan örneklerinde plazma çinko ve melatonin düzeyleri tayin edildi. Testis doku kesitleri hematoksilin eozin ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi. Spermatogenez skorlaması ile spermatogenetik faaliyetler değerlendirildi.

II. grupta plazma çinko seviyeleri kontrol grubundan anlamlı olarak daha düşüktü (p<0.01). I. ve III. grupta plazma çinko seviyeleri hem kontrol, hem de II. gruptan anlamlı şekilde daha düşüktü (p<0.01). Grup I, II ve III'deki melatonin seviyeleri kontrol grubuna göre daha düşük bulundu (p<0.01). Pinealektomize grupların (Grup II ve III) melatonin düzeyleri grup I'den de anlamlı derecede düşüktü (p<0.01). Spermatogenetik değerlendirmede grup II ile kontrol grubu arasında önemli bir fark görülmedi. Grup I ve III'de spermatogenetik aktivitede bir baskılanma gözlemlendi (p<0.01). Grup I'deki baskılanma grup III'deki baskılanmadan daha yüksekti. Grup I'de tübüler dejenerasyon ve nekroz, tübül lümenlerinde tıkanma, bazı tübüllerde hyalinizasyon gözlemlendi. III. grupta bazal membran kalınlaşması, lenfositik infiltrasyon ve bazı germ hücrelerinde nekroz gözlemlendi. Grup II ve kontrol grubunda histopatolojik değişiklik belirlenmedi.

Bu çalışmanın bulguları literatür bilgilerine uygun olarak çinko eksikliğinin testiküler harabiyete yol açtığını göstermektedir. Melatonin eksikliği, 3 haftalık çinko eksikliğinin yol açtığı testiküler hasarı azaltabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Çinko eksikliği, pinealektomi, rat testisi

### Histological Effects of Zinc or Melatonin Deficiency on Testes of the Rats

#### Abstract

The present study was designed to investigate the histological effects of zinc and/or melatonin deficiency on rat testes. A total of 24 adult male Sprague Dawley rats were used in the study. The experiments were done in Selçuk University Experimental Medicine Research and Application Center. The rats were divided into 4 groups. Group I got zinc deficient diet (n=6). Pinealectomy was applied to the Group II (n=6). Group III consisted of pinealectomized (Px) and zinc deficient rats (n=6). Group IV members were intact control rats (n=6).

At the end of the 3 weeks all animals were decapitated and plasma zinc and melatonin levels were determined. Testicular tissues were stained by hematoxyline eosine and investigated under the light microscope. The seminiferous tubules and spermatogenetic activation was observed and spermatogenesis was scored.

The plasma zinc levels in Px group (Group II) were significantly lower than those of control (p<0.01). In the Group I and Group III plasma zinc levels were significantly lower than those of not only control but also Group II (p<0.01 for all). The melatonin levels in Group I, II and III were significantly lower than control (p<0.01). In spermatogenetic evaluation, there was no significant difference between control and Group II. A significant suppression was observed in the spermatogenetic activity of the zinc deficient groups (Group I and Group III, p<0.01). The suppression was higher in the Group I than Group III.

In the seminifer tubules of the Group I, degeneration, necrosis, obstruction and some hyalinisation were observed. In Group III an increase in the basal membrane thickness, lymphocytic infiltration and

necrosis in some germ cells were observed. No significant histological changes were obtained in the Group II compared with the control.

The findings of this study support the previous studies that zinc deficiency causes testicular damage. These results also suggest that melatonin deficiency may reduce the testicular damage caused by zinc deficiency.

**Key Words:** Zinc deficiency, pinealectomy, testes of rat

Melatonin başlıca pineal bezden sentezlenen ve sekrete edilen bir nörohormondur. Pineal bezin dışında vücutta başka doku ve hücrelerden de salgılanarak birlikte pinealektomize ratlarda plazma melatonin düzeyi oldukça azalmakta ancak tamamen yok olmamaktadır (1,2). Melatoninin en iyi bilinen etkileri üreme fizyolojisi ile ilgili olanlardır. Öyle ki hipotalamus-hipofiz-gonadlar sistemi üzerinde inhibitör bir etkiye sahiptir. Ayrıca Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) salgısını azaltan opioid peptidlerin sekresyonunu da artırmaktadır (3).

Melatonin aynı zamanda önemli bir iz element olan çinkonun (Zn) sindirim sisteminden emilimini artırmaktadır. Pinealektomize (Px) farelerde plazma melatonin düzeylerindeki azalmaya paralel olarak plazma Zn düzeylerinde de önemli azalmaların meydana gelmesi, melatonin-Zn arasındaki ilişkinin önemli bir göstergesidir (4).

İmmün fonksiyonlarda temel bir rolü olduğu bilinen Zn (5) büyüme ve cinsel fonksiyonlar üzerinde de önemli bir etkiye sahip bulunmakta, kronik olarak eksikliğinde ise hipogonadizme neden olmaktadır (6). Çinkonun testislerde ve aksesuar seks glandlarında yüksek konsantrasyonda bulunması üreme fizyolojisinde önemli rolleri olduğunu göstermektedir (7). Çinkonun sperm membran bütünlüğünü sağladığı, sperm motilitesini artırdığı, sperm kuyruğunun helezonik hareketini düzenlediği bilinmektedir (8). Erişkin erkek testisinde Zn konsantrasyonu yüksek oranda bulunmakta ve ejakulattaki spermatozoanın yaşam süresini çinkonun uzattığı düşünülmektedir (9,10). Ancak çinkonun gonadal fonksiyonlarla ilişkisi oldukça karmaşık bir görünüm arz etmekte ve konu ile ilgili başka araştırmaların yapılmasını gerekli kılmaktadır.

Melatoninin bahsedilen etkilerinin yanı sıra çinkonun üreme fizyolojisindeki bilinen etkileri birlikte düşünüldüğünde bu iki maddenin rat testisleri üzerindeki etkilerinin histopatolojik araştırılması konu ile ilgili bilgilerimize katkı sağlayacaktır.

#### Materyal ve Metod

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezinden elde edilen

Sprague Dawley cinsi, 24 adet erişkin erkek rat üzerinde, üç haftalık deney süresi sonunda aynı merkezde gerçekleştirildi. Hayvanlar dört gruba ayrıldı. I. grup (n=6); çinko eksik deney grubu olarak isimlendirilen ve çinko eksik (0.650 ppm/gr Zn) diyetle beslenen hayvanlardan, II. Grup (n=6); melatonin eksik deney grubu olup normal diyetle beslenen ve pinealektomi (Px) yaparak melatonin eksikliği geliştirdiğimiz hayvanlardan, III. Grup (n=6), çinko eksik+Px deney grubu olup; pinealektomi sayesinde melatonin eksikliği geliştirilen ve çinko eksik (0.650ppm/gr Zn) diyetle beslenen hayvanlardan oluşuyordu. IV. Grup (n=6) ise hiçbir cerrahi müdahalenin yapılmadığı, normal rat yemi ile beslenen hayvanlardan oluşturuldu. Hayvanların barındığı özel çelik kafesler her gün yıkanarak Zn kontaminasyonu minimuma indirildi. Zn eksik ve Zn eksik+Px deney gruplarına içme suyu olarak bi-distile su verilirken, diğer gruplara normal içme suyu verildi. Yemler; normal ve Zn eksik diyet şeklinde Aytekinler Yem Katkı Sanayii'nden (Konya) temin edildi. Pinealektomi, Kuszack ve Rodin'in tanımladığı şekilde (11) ve genel anestezi (ketalar hidroklorid 60mg/kg., Xylazine 5 mg/kg.) altında usulüne uygun olarak gerçekleştirildi. Deney süresi sonunda hayvanlardan biyokimyasal analizler için dekapitasyonla numune kan örnekleri alındıktan sonra, ratların testisleri çıkarılarak % 10'luk formaldehid solüsyonunda tespit edildiler.

#### Biyokimyasal Metod

**Plazma Zn Tayinleri:** Dekapitasyonla alınan 2 cc kan örnekleri santrifüje edilip plazmaları alınarak plastik kapaklı tüplerde -20°C'de muhafaza edildiler. Plazma Zn düzeyleri, Elazığ Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında bulunan Shimatsu ASC-600 model Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresinde alevli atomizasyon tekniği ile ikişer kez ölçüldü. Sonuçlar µgr/dl cinsinden tayin edildi.

**Serum Melatonin Tayinleri:** Melatonin tayininde kullanılmak üzere hazırlanan heparin'li tüplere ikişer cc alınan kan örnekleri +4°C'de, 2500 devirde ve 10 dakika süre ile santrifüje edildikten sonra Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında melatonin kiti (Melatonin 1-125 RIA DDV

BIOCHEMIE GmbH D 35037 Marburg Schwanelle 44) kullanılarak RIA yöntemiyle pg/ml düzeyinde tayin edildi.

**Histopatolojik Metod:** Deney ve kontrol gruplarını oluşturan hayvanların testislerinden ikişer blok oluşturuldu. Her bloktan 5 µ kalınlığında iki adet kesit alındı. Her kesit hematoksilin eozin boyası ile boyandı. Hazırlanan kesitlerde ışık mikroskopunda, beş değişik sahada, 20'şer testis tübülleri ve spermatogenetik faaliyeti incelendi. Belirlenen bulgular modifiye Johnson kriterlerine göre değerlendirmeye tabii tutuldu. Bu spermatogenez skorlamasında maksimum skor 7 olarak belirlendi. Buna göre:

Skor1-Hücre yok

Skor2-Hiç germ hücresi yok, sadece sertoli hücresi var

Skor3-Spermatogonium var

Skor4-Spermatosit var

Skor5-Spermatid var

Skor6-Spermatozoa var

Skor7-Normal spermatogenez (Tüm hücrelerden yeterince var).

Elde edilen verilerin varyans analizinin ön şartlarına uygunluğu kontrol edilmiş, veriler varyans analizinin ön şartlarını sağlamadıkları için, varyans analizi yapabilmek amacıyla karekök transformasyonuna tabi tutulmuştur. Transformasyon sonucu elde edilen değerlere varyans analizi uygulanmıştır. Farklı grupların belirlenmesi amacıyla da Duncan testi yapılmıştır.

## Bulgular

Histopatolojik olarak; kontrol grubunun ve Px grubun ışık mikroskopik incelemesinde, testis tübüllerinde dejenerasyon ve nekroz hiçbir seride gözlenmedi. Kontrol grubunda tüm hücrelerden yeterince gözlenirken (Skor 7), Px grubunda normal spermatozoalar gözleniyordu (Skor 6). Çinko eksik grupta ise tubulus lümeninde tıkanma, tubuler dejenerasyon ve nekroz yaygındı. Bazı tubüllerde ise hyalinizasyon bulguları gözlemlendi. Germ hücreleri ileri düzeyde azalmıştı ve spermatogenetik arrest mevcuttu (Skor 2-3). Çinko eksik + Px grubunda ise bazal membranda kalınlaşma, tubuler dejenerasyon, lenfositik infiltrasyon ve yer yer germ hücrelerinde nekroz gözlenirken spermatogonium düzeyinde de spermatogenetik arrest (Skor 3) yaygındı (Şekil 1-4). Grupların spermatogenez skorlaması Tablo 1'de sunuldu. Histopatolojik değerlendirmede en az iki grup ortalaması arasındaki farkın, istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edildi ( $p<0.01$ ). Buna göre Px grubun ortalamasıyla kontrol grubunun ortalaması arasında önemli bir fark gözlenmezken ( $p>0.05$ ), diğer iki grubun ortalamalarının kontrol ve Px gruplarının ortalamalarından düşük olduğu görüldü ( $p<0.01$ ).

Grupların plazma çinko ve melatonin düzeyleri Tablo 2'de verildi. Çalışmada, plazma çinko ve melatonin düzeyleri arasında önemli bir ilişki olup olmadığını belirleyebilmek için korelasyon katsayıları hesaplandı. Sonuçta çinko ve melatonin arasında  $p<0.01$  düzeyinde pozitif korelasyon belirlendi.

**Tablo 1.** Grupların spermatogenez skorlamasının istatistiksel değerlendirme sonuçları:

Gruplar	Denek Sayısı (n)	Spermatogenez Skoru+SD	Anlamlılık düzeyi*
Grup 1 (Zn eksik)	6	2.83 ± 0.40	C
Grup 2 (Px)	6	6.16 ± 0.40	A
Grup 3 (Zn eksik+Px)	6	3.66 ± 0.52	B
Grup 4 (Kontrol)	6	6.5 ± 0.55	A

\*Aynı sütunda değişik harf taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0.01$ ).

**Tablo 2.** Grupların plazma çinko ve melatonin düzeylerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları

Gruplar	Çinko (µgr/dl)	Anlamlılık düzeyi*	Melatonin (pg/ml)	Anlamlılık düzeyi*
Grup 1 (Zn eksik)	45.45 ± 25.40	C	10.28 ± 3.40	B
Grup 2 (Px)	70.55 ± 7.90	B	3.95 ± 1.64	C
Grup 3 (Zn eksik+Px)	45.88 ± 8.25	C	2.85 ± 1.78	C
Grup 4 (Kontrol)	120.55 ± 10.78	A	16.50 ± 7.24	A

\*Aynı sütunda değişik harf taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0.01$ ).



Şekil 1. Çinko eksik grup: Bazal membranda kalınlaşma, germ hücrelerinde nekroz, tübüllerde dejenerasyon ve tıkanma, Spermatogenez Skor 2-3 düzeyinde. (H.E. x288)



Şekil 3. Çinko ve Melatonin Eksik Grup: Spermatogenez Skor 3 düzeyinde, tüplerde dejenerasyon ve nekroz, lümende tıkanma gözleniyor. (H.E. x253)



Şekil 2. Melatonin Eksik Grup: Spermatogenez Skor 5 düzeyinde, tübül çapları normal, normal histolojik görünüm. (H.E. x184)



Şekil 4. Kontrol Grubu: Normal spermatogenez, tüm hücreler normal görünümde. (H.E. x288)

### Tartışma

Organizmanın önemli iz elementlerinden biri olan Zn'nun büyüme ve üreme fizyolojisi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir (6,7,12,13). Yapılan çalışmalar, Çinkonun sindirim sisteminden emiliminin melatoninle arttığını göstermektedir (14). Bu durumda melatonin eksikliğinde doğal olarak vücut sıvılarında Çinkonun da azalması gerekmektedir. Nitekim çalışmamızda da plazma Zn ve melatonin düzeyleri arasında, benzer şekilde  $p < 0.01$  mesafesinde pozitif korelasyon belirlenmiştir. Çalışmamızda dikkat çekici bir bulgu da, Çinko eksik grubun plazma melatonin düzeyinin kontrol grubunun plazma melatonin düzeyine göre anlamlı olarak düşük olmasıdır. Bu durumda Zn ve melatonin arasında tek yönlü değil bilakis iki yönlü bir etkileşimin olduğu ortaya çıkmaktadır. Literatür taramasında pineal bezin, Zn eksikliğinden etkilendiğini gösterir bir bilgiye rastlayamadık. Ancak diğer birçok endokrin bezin, sınırda ya da ileri düzeyde Zn eksikliğinden etkilendiğine dair çok sayıda çalışma mevcuttur (5). Bu nedenle Zn eksikliği ve pineal bez etkileşiminin araştırmaya açık bir konu olduğunu düşünüyoruz.

Follis ve arkadaşlarının çalışmalarında, Zn yetmezlikli ratların testislerinde, çok sayıda atrofik seminifer tübüllerde sadece spermatogonilerin bulunduğu ifade edilmektedir (15). Yapılan diğer histolojik çalışmalarda; Hamdi ve arkadaşları (16) Zn eksikliğine bağlı olarak testis dokusunda seminifer tubulus çaplarında önemli daralmalar olduğunu, spermatogenezin değişik dönemlerinde olgunluk arrestinin gözlendiğini bildirdiler. Hafiez ve arkadaşları (17) da benzer histolojik bulgulara ek olarak kronik zaafiyette görülen dev hücrelerden bahsetmektedirler. Prasad ve arkadaşları ise bu bulguların Zn ilavesiyle düzeldiğini ve çinkonun esas etkisinin germinal epitelyumda olduğunu ifade etmektedirler (13). Çalışmamızda Zn eksik ratlarda gözlediğimiz seminifer tubullerdeki dejenerasyon, tubuler nekroz, tubulus çapında daralma ve tıkanma ile hiç germ hücrelerinin bulunmayıp sadece sertoli hücrelerinin varlığı, literatür bilgilerimizi desteklemektedir.

Melatonin, epifizden salınan ve sirkadiyan ritme sahip bir nörohormondur. Bu nedenle yapılan deneysel çalışmalarda hayvanlar; kontrollü, kısa ya da uzun fotoperiyotta deneylere tabii tutulmaktadırlar. Vaughan ve arkadaşları (18) kısa ve uzun fotoperiyoda maruz kalan ratlara 15 mm. silastik testosteron pelletleri implante ederek, kısa fotoperiyoda tabii tutulan ratlarda testiküler ağırlıktaki azalmanın, uzun fotoperiyoda tabii olanlara

göre daha fazla olduğunu gösterdiler. Bu çalışmanın devamında uzun fotoperiyoda tabii tutulan ve testosteron pelleti implante edilen ratlara melatonin enjekte edildiğinde, testosteronun tek başına testislerde yaptığı etkiyi şiddetlendirdiğini ve sonuçta melatonin enjeksiyonlarının reproduktif organlarda gonadal atrofiye yol açtığını gösterdiler. Jarrige ve arkadaşları da (19) pinealektomize anneden doğan ratların testislerinde mutlak atrofiyle birlikte testiküler dihidrotosteron muhtevasında değişiklik olmazken, plazma dihidrotosteron düzeylerinde azalma meydana geldiğini gösterdiler. Çalışmamızda melatonin eksikliğine bağlı olarak pinealektomize ratların testislerinde histolojik değişiklikler gözlemedik. Ancak spermatogenez skorlamasında, istatistiksel olarak önemsiz düşmeler belirledik. Bu durumun büyük olasılıkla, çalışmamızın üç hafta ile sınırlı olmasından kaynaklandığını düşünüyoruz.

Çalışmamızda Zn eksik gruptaki yaygın testiküler harabiyet, Zn eksik + Pnx grubundaki bulgulara göre daha ağırdı. Literatür bilgilerine göre; melatonin varlığının testis dokusundaki olumsuz etkileri düşünüldüğünde (20), melatonin eksikliğinin Zn eksikliğinin etkilerini (istatistiksel olarak önemsiz de olsa) hafifletmesi beklenen bir durumdur. Ayrıca plazma melatonin eksikliği nedeniyle barsaklardan Zn emiliminin azalmasına bağlı olarak, plazma Zn düzeyi de anlamlı olarak azalır (14). Nitekim bizim çalışmamızda da melatonin eksik gruptaki plazma Zn düzeyinin kontrole göre anlamlı düşük olması literatür bilgilerini desteklemektedir.

### Sonuç olarak;

"1-Çinko ile melatonin arasında (hem varlıkları, hem de eksiklikleri açısından) iki yönlü bir etkileşim var gibi görünmektedir ve özellikle araştırılması gereken bir konudur."

"2-Zn eksikliği, literatür bilgilerimize uygun olarak testis dokusunda harabiyete yol açmaktadır ve spermatogenez üzerinde olumsuz etkileri vardır."

"3-Melatonin eksikliği, Zn eksikliğinin üreme fizyolojisi üzerindeki olumsuz etkilerini yavaşlatmaktadır."

### Yazışma Adresi:

Yrd.Doç.Dr. Ahmet Öztürk  
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Üroloji Anabilim Dalı  
42080-KONYA  
Tel: 0332-3232600/1634  
E-mail: ahoz\_06@altavista.com

**Kaynaklar**

- 1-Keleştimur H. İnsanda pineal bezin fonksiyonları. F.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi. 1996;10(1):141-7.
- 2-Li Li, Wong JTY, Pang SF, Shiu SYW. Melatonin-Induced Stimulation of Rat Corpus Epididymal Epithelial Cell Proliferation. Life Sciences 1999;65 (10):1067-76.
- 3-Chazot G, Claustrat B, Brun J, Olivier M. Rapid antidepressant activity of desypramine: correlation with urinary melatonin. Biol Psychiatry. 1985;20(9):1026-30.
- 4-Maestroni GJM. The immunoneuroendocrine role of melatonin. J Pineal Res 1993;14:1-10.
- 5-Bediz CŞ, Baltacı AK, Tiftik AM, Vatansev H ve Gökçen M. Ratlarda Çinko Eksikliğinin Bazı Hormonlar Üzerine Etkisi. S.Ü.Tıp Fak. Derg. 1999;15:59-63.
- 6-Nishi Y. Zinc and Growth. J Am Coll Nutr 1996;15:340-44.
- 7-Liu Y, Franklin RB, Costello LC. Prolactin and Testosterone Regulation of Mitochondrial Zinc in Prostate Epithelial Cells. Prostate 1997;30:26-32
- 8-Perk H, Şahin A, Bedük Y, Durak İ. İnfertil hastalarda çinko sülfat tedavisi ve sonuçlarının değerlendirilmesi. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Araştırma Dergisi.1990;8(6): 549-51.
- 9-Bedwal RS, Bahuguna A. Zinc, copper and selenium in reproduction. Experientia. 1994;50(7):626-40.
- 10-Suzuki T, Suzuki K, Nakajima K, Otaki N, Yamanaka H. Metallothionein in human seminal plasma. Int J Urol 1994;1(4):345-48.
- 11-Kuszek J, Rodin MA. New technique of pinealectomy for adult rats. Pro Experimentis 1977;33(2):283-4.
- 12-Pekary AE, Lukaski CH, Mena I, Smith SM, Bhasin S, Hersman JM. Testosterone increases TRH biosynthesis in epididymis but not heart of zinc-deficient rats. Peptides 1993;14:315-24.
- 13-Prasad SA, Mantzoros CS, Beck FWJ, Hess JW, Brewer GJ. Zinc status and serum testosterone levels of healthy adults. Nutrition 1996;12(5):344-8.
- 14-Mocchegiani E, Bulian D, Santarelli L, Tibaldi A, Muzzioli M, Lesnikov V et al. The zinc pool is involved in the immune-reconstituting effect of melatonin in pinealectomized mice. J Pet 1996;277: 1200-8.
- 15-Follis RH, Day HG, McCollum EV. J Nutrit 1941;95:526-30.
- 16-Hamdi SA, Nassif OI, Ardawi MS. Effect of marginal or severe dietary zinc deficiency on testicular development and functions of the rat. Arch Androl 1997; 38(3):243-53.
- 17-Hafiez AA, El-Kirdassy ZHM, El-Malkh NM, El-Zayat EM. Role of zinc in regulating the testicular function. Part 3. Histopathological changes induced by dietary zinc deficiency in testes of male albino rats. Die Nahrung 1990;34:65-73.
- 18-Vaughan MK, Oaknin S, Cozzi B, Li K, Rieter RJ. Influence of melatonin on the testicular regression induced by subcutaneous testosterone pellets in male rats kept in long or short photoperiod. J Reprod Fert 1988;82:277-84.
- 19-Jarrige JF, Boucher D. Influence de la glande pineale maternelle sur la fonction testiculaire du rat. Annales d'Endocrinologie 1992;53:67-70.
- 20-Gunduz B, Stetson MH. Effects of photoperiod, pinealectomy and melatonin implants on testicular development in juvenal Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). Biol Reprod 1994;51(6):1181-7.