

Navorsings- en oorsigartikels

Renale opruiming van melatonien

M.E. Steyn en M. Viljoen*

Departement Fisiologie, Universiteit van Pretoria, Posbus 2034, Pretoria, 0001

Ontvang 5 September 1995; aanvaar 2 November 1995

UITTREKSEL

Slegs twee publikasies bestaan waarin die omvang van die renale opruiming van melatonien in mense beskryf word. Die melatonienopruimingswaardes is egter verkry na óf orale toediening van melatonien óf deur verskillende tegnieke te gebruik vir die bepaling van melatonien in die plasma en urien onderskeidelik. In hierdie studie is melatonienopruiming bepaal oor 'n tyd van die dag wanneer die plasmavlakke relatief konstant bly, en is die melatonienvlakke in plasma en urien elk onderskeidelik met die Fraser-, NID- en WHB-metodes bepaal. Die resultate toon dat melatonienopruiming onder 2 ml/min is en dat hoër waardes verkry word wanneer van metodes gebruik gemaak word wat die ekstraksieproedures omseil.

ABSTRACT

Renal clearance of melatonin

Only two publications exist in which actual values for the renal clearance of intact melatonin in man is described. The melatonin clearance values were, however, obtained either after the oral intake of melatonin, or by applying different techniques for the determination of melatonin in urine and plasma. In this study, renal clearance of melatonin was determined during the hours where melatonin concentrations are relatively constant. Melatonin levels in plasma and urine respectively were each determined by three analytical techniques, i.e. the Fraser, NID and WHB methods. The results show renal clearance of melatonin to be under 2 ml/min and that higher values are obtained with analytical techniques which bypass the extraction process.

INLEIDING

Die eerste gedokumenteerde bespreking van die funksies van die pineaalklier is reeds deur Galen (130 - 200 v.C.) gedoen. Ten spyte hiervan het die eerste studies oor die chemiese identiteit en biosintese van die pineaal se belangrikste hormoon, melatonien, eers in die 1950's begin.¹ Daar bestaan egter nog onsekerheid oor talle aspekte van melatonien-funksie, sowel wat betref die produksie van melatonien in ekstrapineale weefsel as die gevolge van die verwydering van melatonien uit die sirkulasie.

Opruiming van melatonien uit die sirkulasie berus grootliks op hepatiese en renale afbraak na 6-hidroksimelatonien, waarvan 70-80% aan sulfaat gekoppel word om die belangrikste metabooliet in die urien, 6-sulfatoksimeleatonien, te vorm, en ongeveer 5% van die 6-hidroksimelatonien aan glukuronsuur gebind word.²⁻⁵ Dit is egter bekend dat melatonien ook in 'n mindere mate in sy onveranderde vorm deur die niere verwyder kan word.⁶ Daar is egter nog onsekerheid oor die omvang van die renale opruiming van melatonien. Hierdie onsekerheid is moontlik te wyte aan die sirkadiese ritme van melatoniensekresie en -ekskresie; met ander woorde, onsekerheid kan die gevolg wees van die fluktuierende plasma- en urienvlakke van melatonien en die metodes wat gebruik word vir die ontleding van melatonien in plasma en urien.

Die doel van hierdie studie is om renale melatonienopruiming te bepaal oor 'n tyd van die dag wanneer die plasmavlakke relatief konstant is, en om opruimingswaardes, soos verkry met verskillende analitiese metodes, te vergelyk.

MATERIAAL EN METODEDES

Twee eksperimentele groepe, van wie geskrewe ingeligte toestemming verkry is, is vir die ondersoek gebruik, naamlik 'n jong groep (ouderdom = $23,1 \pm 2,2$ jaar, $n = 10$; vrouens: $21,3 \pm 1,2$ jaar, $n = 3$; mans: $23,9 \pm 2,1$ jaar, $n = 7$) en 'n bejaarde groep (ouderdom = $73,6 \pm 8,1$ jaar, $n = 12$; vrouens: $73,4 \pm 5,5$ jaar, $n = 8$; mans: $74,0 \pm 11,8$ jaar, $n = 4$).

Urienmonsters is oor 'n tydperk van 6 uur versamel, vanaf 09:00 tot 15:00. Die totale urienvolume is gemeet en 'n monster van die urien by -20°C gestoor. Bloedmonsters is om 12:00 geneem en die gehepariniseerde bloed is direk na versameling op ys gehou, binne 2 uur vir 15 minute gesentrifugeer by 4°C en die plasmamonsters by -20°C gestoor tot met ontleding.

Kreatinienvlakke is bepaal met die Jaffe-reaksietydmetode met geringe wysigings van die reagentse;⁷ en melatonienvlakke is deur middel van drie verskillende radio-immunometodes bepaal, naamlik die Frasermetode,⁸ die WHB-metode⁹ en die NID-metode.¹⁰

Die Fraser radio-immunometode vir die bepaling van melatonien is oorspronklik ontwikkel om die ekstraksiestap uit te skakel. Die reagentse vir die metode is die volgende: N-Tris(hidroksimetiel)metielglisien (Trisien), dekstraan, geaktiveerde koolstof (Norit A), melatonien (verkry van Sigma Chemical Company deur Amersham) ³H-melatonien (verkry van New England Nuclear, Boston deur Amersham), etanol, NaCl, gelatien en sintilliasie vloeistof (Ready Pro-tein van Beckman). Die antiliggzaam (Guildhay Antisera) is

* Outeur aan wie korrespondensie gerig kan word

verkry van die Biochemie Departement, Universiteit van Surrey, Engeland. Dit word in konyne teen melatonien opgewek, met tiroglobulien of beesserumalbumien as die proteïendraer en gekonjugeer met karbodiimid.

Melatonien-vrye plasma, wat verkry is deur plasma van vrywilligers oornag met geaktiveerde dekstraanbedekte koolstof te roer, is vir die opmaak van standaard gebruik. Vir die opmaak van die tritium-gemerkte melatonien (^3H -melatonien), antiliggaam en suspensie van geaktiveerde koolstof is gebruik gemaak van 0,1 M trisienbuffer (pH = 7), wat 9 g NaCl en 1 g gelatien per liter bevat. Die oplossings is daaglik vars opgemaak. By 0,5 ml monster of standaard (verkry met afverduining van 500 pg tot 2 pg per 0,5 ml) is 0,2 ml antiliggaam (1 tot 2000 verdunning in trisienbuffer) gevoeg en vir 30 minute by kamertemperatuur in die donker geïnkubeer. Na byvoeging van 0,1 ml tritium-gemerkte melatonien, is die monsters vir 18 uur by 4 °C geïnkubeer. Die gebonde melatonien is van die vry fraksie geskei deur byvoeging van 0,5 ml dekstraanbedekte koolstofoplossing, vir 15 minute by 4 °C geïnkubeer en vir 15 minute teen 3 000 rpm gesentrifugeer. 'n Volume van 0,7 ml van die supernatant is toe by 4,3 ml sintillasievloei-stof in 'n telhouertjie gevoeg, vir een uur in die donker by kamertemperatuur geskud, waarna die beta-emissies in 'n betasintillasieteller getel is. Die tellings van die standaardreeks, sowel as van die monsters, is na aftrekking van die niespesifieke bindingskontrolle as 'n persentasie van die totale binding bereken. Hierdie waardes (persentasiebinding) van die standaardreeks is teenoor die melatonienkonsentrasie op semilogaritmiese grafiekpapier uiteengesit, en 'n S-vormige kurwe is verkry. Die monsterwaardes word van hierdie kurwe afgelees en met twee vermenigvuldig om die melatonienkonsentrasie per milliliter plasma te verkry.

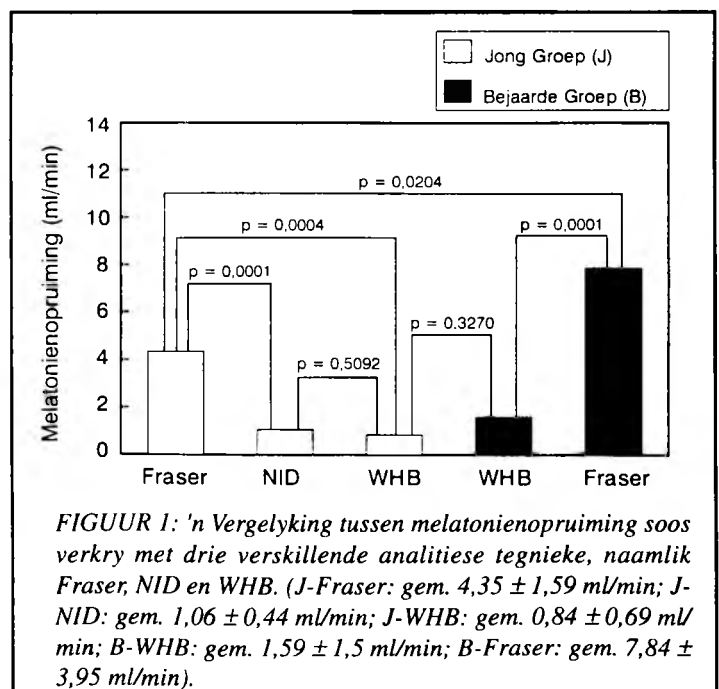
Die WHB-metode⁹ is 'n kommersiële RIA-KIT-metode wat in Bromma, Swede, ontwikkel is. Die beginsel van die metode berus daarop dat melatonien, geëkstraheer in metileenchloried, bepaal word deur middel van 'n RIA-metode, wat tritium-gemerkte melatonien gebruik. Die antigeen-antiliggaam-kompleks word gepresipiteer met versadigde ammoniumsulfaat, die presipitaat opgelos en die tritiuminhoud in 'n sintillasieteller gemeet. Die reagent sluit in: 'n melatonienstandaard, en melatonienantiserum, opgewek in skape, wat in die KIT ingesluit is, tritium-gemerkte melatonien en Biofluor-sintillasievloei-stof (beide verkry van New England Nuclear), fosfaatbuffers (pH = 7 en pH = 7,5), metileenchloried, ammoniumsulfaat en natriumhidroksied.

Na 'n ekstraksieprosedure waartydens die melatonien in metileenchloried geëkstraheer word, word die metileenchloried deur 'n lugstroom in 'n 37 °C waterbad afgedryf en die droë residu in 0,5 ml fosfaatbuffer opgelos. Vir die radio-immunobepaling (RIA) van die melatonien word by 0,2 ml van die ekstrak 0,1 ml tritium-gemerkte melatonien en 0,1 ml antiliggaam gevoeg, die buisies met parafilm bedek en vir een uur by 37 °C geïnkubeer. Na afkoeling van die buise in 'n ysbad, word 0,4 ml versadigde ammoniumsulfaat-oplossing bygevoeg om die antigeen-antiliggaam-kompleks te presipiteer en die buise vir een uur in 'n ysbad geïnkubeer. Na sentrifugering vir 30 minute by 4 °C word die supernatant verwyder, die neerslag in 0,2 ml 0,1 mol/l natriumhidroksied opgelos en die buise dan vir 10 minute by 37 °C gelaat, waarna 0,3 ml gedistilleerde water bygevoeg word. Die 0,5 ml opgeloste presipitaat word na telflessies oorgeplaas en

10 ml Biofluor-oplossing word bygevoeg. Die oplossing word geskud en die radioaktiwiteit in 'n betasintillasieteller gemeet. Die persentasie binding van die monsters en standaard word bereken en melatonienkonsentrasies van die monsters word afgelees van 'n standaardkurwe van persentasiebinding teenoor melatonienkonsentrasie in pg/ml op semilogaritmiese grafiekpapier.

Die NID-metode¹⁰ is deur die Nichols Institute Diagnostics ontwikkel en is ook in KIT-vorm beskikbaar. Melatonien word in diëtleter geëkstraheer. Die RIA-metode gebruik ^{125}I -gemerkte melatonien en 'n poliklonale antiliggaam. Die gebonde en vry melatonien word deur 'n tweede antiliggaam en daaropvolgende sentrifugering van mekaar geskei. Die reagent sluit in: 'n melatonienstandaard, melatonienantiliggaam opgewek in konyne, ^{125}I -gemerkte melatonien, PBS-gelatien-buffer (pH 7,4), 'n kontroleserum, 'n skeidingsreagens ('n tweede antiliggaam, antikonyngammaglobulien, opgewek in donkies) en diëtleter, waarvan alles behalwe laasgenoemde in die KIT ingesluit is. Na ekstraksie van melatonien in diëtleter, wat na skeiding van die waterfase deur bevriesing na 'n tweede ekstraheerbuis gedekanteer en onder stikstofgas afgedamp word, word die droë ekstrak in 0,5 ml PBS-buffer opgelos. Vir die RIA-metode word by 0,2 ml standaard- of monsterekstrak 0,1 ml antiserum gevoeg, vir een uur by 37 °C geïnkubeer, waarna 0,1 ml ^{125}I -gemerkte melatonienoplossing bygevoeg word en die buise vir 18 uur by 4 °C geïnkubeer word. Na byvoeging van die skeidingsreagens (tweede antiliggaam) word die buise vir 30 minute by kamertemperatuur geïnkubeer, 1 ml gedistilleerde water word bygevoeg en die buise vir 15 minute by 2 000 rpm gesentrifugeer. Die supernatant word verwyder en die radioaktiwiteit van die neerslag vir twee minute in 'n gammasingtillasieteller getel. Die standaardkurwe word opgestel deur die persentasiebinding teenoor melatonienkonsentrasie (pg/ml) op semilogaritmiese grafiekpapier uiteen te sit. Melatonienkonsentrasies van die monsters word van die standaardkurwe afgelees.

Opruiming is bereken met behulp van die formule UV/P , waar U die uriënkonsentrasie van melatonien voorstel, P die plasmakonsentrasie en V die uriënvloei per minuut.



FIGUUR 1: 'n Vergelyking tussen melatonienopruiming soos verkry met drie verskillende analitiese tegnieke, naamlik Fraser, NID en WHB. (J-Fraser: gem. 4,35 ± 1,59 ml/min; J-NID: gem. 1,06 ± 0,44 ml/min; J-WHB: gem. 0,84 ± 0,69 ml/min; B-WHB: gem. 1,59 ± 1,5 ml/min; B-Fraser: gem. 7,84 ± 3,95 ml/min).

RESULTATE

Melatonienopruiming het gewissel afhange van die metode wat gebruik is om die melatonienkonsentrasies in die plasma en urien te bepaal (figuur 1). In die jong groep was dit $1,06 \pm 0,44$ ml/min met die NID-metode, $0,84 \pm 0,69$ ml/min met die WHB-metode, en $4,35 \pm 1,59$ ml/min met die Fraser-metode. In die bejaarde groep was dit $1,59 \pm 1,47$ ml/min met die WHB-metode en $7,84 \pm 3,95$ ml/min met die Fraser-metode. Melatonienopruiming in die jong groep, soos bepaal met die Frasermetode, was betekenisvol hoër as die opruiming soos bepaal met óf die NID-metode ($p = 0,0001$) óf die WHB-metode ($p = 0,0004$), terwyl die opruiming soos verkry met die NID- en WHB-metodes nie betekenisvol van mekaar verskil het nie ($p = 0,5092$). Die opruiming in die bejaarde groep was, afhange van die metode wat vir ontleding gebruik is, dieselfde (WHB) of hoër (Fraser) as dié van die jong groep. Die p -waarde vir die verskil tussen die jong groep en die bejaarde groep was $0,3270$ in geval van die WHB-metode, en $0,0204$ in geval van die Fraser-metode.

Die enigste statisties betekenisvolle korrelasie tussen melatonienopruiming en kreatinienopruiming is gevind in die bejaarde groep, naamlik 'n direkte korrelasie ($r = 0,6088$; $p = 0,0184$) tussen die opruiming van melatonien ($x = 1,45$ ml/min $\pm 1,35$; $n = 16$), bepaal met die WHB-metode, en die opruiming van kreatinien, ($x = 77,22$ ml/min $\pm 36,84$; $n = 16$).

BESPREKING

Die opruiming van melatonien, die hoof idoolamien afkomstig vanaf die pineaalklier, uit die sirkulasie, berus grootliks op hepatiese en renale degradering, met uitskeiding van, hoofsaaklik, 6-sulfatoksimeletonien in die urien. Minder belangrike metaboliese bane waarin ander melatonien-afkomstige metaboliete gevorm word, is egter ook beskryf.¹¹ Voorbeelde hiervan sluit onder andere in die de-asetilering van melatonien na 5-metoksitriptamien, asook die omskakeling van melatonien na N-asetiel-5-metoksikinurenamien. Die belangrikste pad is egter waarskynlik steeds dié van melatonien na N-asetiel-5-metoksi-6-hidroksitriptamien (6-hidroksimeletonien), wat dan óf gekonjugeer word met sulfaat óf met glukuronied.

Dat nierfunksie beïnvloed word deur melatonien, maar dat die niere ook 'n invloed het op die sirkulerende melatonienvlakke, is duidelik uit talle publikasies.¹²⁻¹⁵ Bo en behalwe die rol van die niere in melatonienafbraak en die uitskeiding van melatonienafbraakprodukte, word 'n klein hoeveelheid melatonien ook in die intakte vorm deur die niere uitgeskei. Die rede vir die oënskynlike lae renale uitskeiding van melatonien in sy intakte vorm is waarskynlik te wyte aan die feit dat 60% daarvan aan albumien in die plasma gebind is.¹⁶ Daar is egter nog min gedoen om die werklike renale opruimingswaarde van melatonien te bepaal. 'n Studie deur Vakkuri, et al.¹⁷ toon 'n melatonienopruimingswaarde van 1,1 ml/min. Opruimingswaardes in hierdie studie is egter gedoen na orale melatonientoediening en verskillende metodes is gebruik vir die bepaling van melatonien in urien en plasma onderskeidelik. Uit 'n studie van Fernandez, et al.,¹⁸ waar die WHB-metode gebruik is, wil dit voorkom asof melatonienopruiming in vrouens wissel tussen 0,3 ml/min en ongeveer 2 ml/min, met die hoër waardes verkry in die ouer individue.¹⁸ Niks is egter bekend omtrent die versamingsperiodes en -prosedures van urien en plasma vir hulle studie nie.

In die resultate van hierdie studie is, met behulp van die ontledingstegnieke wat ekstraksiestappe insluit, opruimingswaardes verkry wat ooreenstem met dié van Vakkuri¹⁷ en Fernandez.¹⁸ Opruimingswaardes soos verkry met die Fraser-metode - 'n tegniek wat ontwikkel is om langdradige ekstraksieprosesse uit te skakel - is egter betekenisvol hoër as die opruimingswaardes wat verkry is met die twee metodes waarin ekstraksieprosesse voorkom. Ten spyte van die voordele verbonde aan metodes soos dié van Fraser⁸ en Webley¹⁹ wil dit dus voorkom asof 'n ekstraksieproses wel nodig is vir die bepaling van melatonien in die urien, aangesien metaboliete van melatonien waarskynlik ook gemeet word by die uitsluiting van 'n ekstraksieproses.

Samevattend kan gesê word dat renale opruiming van melatonien in sy onveranderde vorm minder as 2 ml/min is, en dat hoër waardes verkry word wanneer melatonienvlakke in die urien bepaal word met behulp van metodes waarin die ekstraksieproses omseil word.

SUMMARY

The clearance of melatonin from the circulation largely depends on hepatic and renal degradation to 6-hydroxymelatonin. 70-80% of the 6-hydroxymelatonin is then conjugated to sulphate to form 6-sulphatoxy-melatonin, which constitutes the major melatonin metabolite in urine. Another 5% of the 6-hydroxymelatonin conjugates to glucuronic acid.²⁻⁵ Melatonin does, however, also appear in its intact form in urine,⁶ albeit to a minor extent. The extent of renal melatonin clearance is still not quite clear. Only two publications exist in which actual values for the renal clearance of intact melatonin in man is described. The melatonin clearance values of the two existing publications were, however, obtained either after the oral intake of melatonin, or by applying different techniques for the determination of melatonin levels in urine and plasma.

In this study, renal clearance of melatonin was determined during the hours when melatonin concentrations are relatively constant. Melatonin levels in plasma and urine respectively were each determined by three different analytical techniques, i.e. the Fraser,⁸ WHB⁹ and NID¹⁰ methods. In the NID method a RIA is performed by using ¹²⁵I-labelled melatonin after extraction of melatonin with diethyl-ether. In the WHB method ³H-labelled melatonin is used for the RIA, after extraction with methylene chloride. In the Fraser method, the RIA also employs ³H-labelled melatonin, but with the exclusion of an extraction process.

Melatonin clearance varied according to the analytical method used for the determination of melatonin concentration in plasma and urine (figure 1). In the young group it was $1,06 \pm 0,44$ ml/min by using the NID method, $0,84 \pm 0,68$ ml/min by using the WHB method and $4,35 \pm 1,59$ ml/min by using the Fraser method. In the elderly group it was $1,59 \pm 1,47$ ml/min when using the WHB method and $7,84 \pm 3,95$ ml/min when using the Fraser method. Clearance of melatonin in the young group, as determined by means of the Fraser method, was significantly higher than that obtained by either the NID method ($p=0,0001$) or the WHB method ($p=0,004$), while clearance as estimated with the NID and WHB methods were comparable ($p=0,5092$). Depending on the method used, melatonin clearance in the elderly group was the same as (WHB), or higher than (Fraser), that of the young group. The p -value for the difference between the young group and the elderly group was $0,3270$ in the case of

the WHB method and 0,0204 in the case of the Fraser method. The only statistically significant correlation between clearance of melatonin and clearance of creatinine was found in the elderly group, namely a direct correlation ($r=0,6088$; $p=0,0184$) between the clearance of melatonin ($x=1,45$ ml/min $\pm 1,35$; $n=16$) estimated with the WHB method and the clearance of creatinine ($x=77,22$ ml/min $\pm 36,84$; $n=16$). The higher clearance values of the Fraser method probably result from the higher urinary melatonin levels obtained by omission of the extraction process, since metabolites of melatonin are probably also measured.

The results showed the renal clearance of melatonin to be under 2 ml/min and demonstrated that higher values are obtained with analytical techniques which bypass the extraction process.

BEDANKING

Ons bedank graag die personeel van die voorkliniese biblioteek van die Universiteit van Pretoria.

LITERATUURVERWYSINGS

- Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H. & Mori, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes, *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 25-87.
- Arendt, J. (1988). Melatonin, *Clin. Endocrinol.*, 29, 205-299.
- Kveder, S. & McIsaac, W.M. (1961). The metabolism of melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) and 5-methoxytryptamine, *J. Biol. Chem.*, 236, 3214-3220.
- Kopin, I.J., Pare, C.M.B., Axelrod, J. & Weissbach, H. (1961). The fate of melatonin in animals, *J. Biol. Chem.*, 236, 3072-3075.
- Fellenberg, A.J., Phillipou, G. & Seemark, R.F. (1981). Urinary 6-sulphatoxymelatonin excretion and melatonin production rate: studies in sheep and man. In *Pineal Function*, Matthews, C.D. & Seemark, R.F. eds. (Elsevier, Amsterdam) p. 143-149.
- Reiter, R.J. (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions, *Endocrine Reviews*, 12(2), 151-180.
- Fabiny, D.L. & Ertingshausen, G. (1971). Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the CentrifChem, *Clin. Chem.*, 17(8), 696-700.
- Fraser, S., Cowen, P. & Franklin, M. (1983). Direct radioimmunoassay for melatonin in plasma, *Clin. Chem.*, 29(2), 396-397.
- Fernandez, B., Malde, J.L., Montero, A. & Acuna, D. (1990). Relationship between adenohipophyseal and steroid hormones and variations in serum and urinary melatonin levels during the ovarian cycle, perimenopause and menopause in healthy women, *J. steroid. Biochem.*, 35(2), 257-262.
- Vakkuri, O., Leppaluoto, J. & Vuolteenabo, O. (1984). Development and validation of a melatonin radioimmunoassay using radioiodinated melatonin as tracer, *Acta endocrinol.*, 106, 152-157.
- Yu, H.S., Tsin, A.T.C. & Reiter, R.J. (1993). In *MELATONIN Biosynthesis, Physiological Effects, and Clinical Applications*, Yu, H.S. & Reiter, R.J. eds. (CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo) p. 7.
- Song, Y., Ayre, E.A. & Pang S.F. (1992). The identification and characterization of 125I-labelled iodomelatonin-binding sites in the duck kidney, *J. Endocrinol.*, 135, 353-359.
- Song, Y., Poon, A.M.S., Lee, P.P.N. & Pang, S.F. (1993). Putative melatonin receptors in the male guinea pig kidney, *Journal of Pineal Research*, 15, 153-160.
- Valtonen, M., Laitinen, J.T. & Eriksson, L. (1993). Renal melatonin excretion in sheep is enhanced by water diuresis, *Journal of Endocrinology*, 138, 445-450.
- Richardson, B.A., Studier, E.H., Stallone, J.N. & Kennedy, C.M. (1992). Effects of melatonin on water metabolism and renal function in male Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*), *J. Pineal Res.*, 13, 49-59.
- Cardinali, D.P., Lynch, H.J. & Wurtman, R.J. (1972). Binding of melatonin to human and rat plasma proteins, *Endocrinology*, 91, 1213-1218.
- Vakkuri, O., Leppaluoto, J. & Kauppila, A. (1985). Oral administration and distribution of melatonin in human serum, saliva and urine, *Life Sciences*, 37, 489-495.
- Fernandez, B., Malde, J.L., Montero, A. & Acuna, D. (1988). Pineal gland and gonadotropins: renal clearance rate of FSH, LH and melatonin in the fertile period and in peri- and postmenopausal women, *Med. Sci. Res.*, 16, 849-850.
- Webley, G.E., Mehl, H. & Willey, K.P. (1985). Validation of a sensitive direct assay for melatonin for investigation of circadian rhythms in different species, *J. Endocrinol.*, 106, 387.