

DMBA ile meme kanseri oluşturulmuş sıçanlarda artan uterus doku hasarı çinko ve melatonin desteğiyle önlenir*

Zinc and melatonin supplementation ameliorates uterus tissue damage in dmbs-induced breast cancer in rats*

Elif Gülbahçe Mutlu¹, Saltuk Buğra Baltacı²

¹Karatay Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Konya

²Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Konya

Elif Gülbahçe Mutlu orcid.org/0000-0003-2391-2152

Saltuk Buğra Baltacı orcid.org/0000-0002-9752-7508

Öz

Amaç: Bu çalışmanın amacı dişi sıçanlarda DMBA ile oluşturulmuş meme kanserinde çinko ile melatonin uygulamasının uterus dokusundaki lipid peroksidasyonu üzerine olan etkilerinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Wistar cinsi süten yeni kesilmiş toplam 42 adet dişi sıçan kullanılan araştırmada hayvanlar 5 gruba ayrıldı: Grup 1 Kontrol, Grup 2 DMBA Kontrol, Grup 3 DMBA+Çinko, Grup 4 DMBA+Melatonin, Grup 5 DMBA+Melatonin ve Çinko. Grup 1 dışındaki hayvanlara meme kanseri oluşturmak için kolza yağı (kanola) içinde 80 mg/kg dozunda DMBA gavaj yoluyla verildi. Çinko ve melatonin uygulanan gruplara 5 mg/kg/gün dozunda ip çinko, melatonin ve çinko+melatonin 4 hafta boyunca verildi. Hayvanlardan alınan uterus doku örneklerinde MDA (malondialdehid) ve GSH (glutatyon) düzeylerispektrofotometrik yöntemle tayin edildi.

Bulgular: En yüksek uterus MDA seviyeleri DMBA ile meme kanseri oluşturulmuş kontrol (G2) grubunda elde edildi ($p<0.05$). Melatonin ve çinkonun kombine uygulandığı DMBA grubunun (G5) uterus MDA seviyeleri diğer grupların tamamından daha düşüktü ($p<0.05$). DMBA ile meme kanseri oluşturulmuş kontrol (G2) grubu en düşük GSH düzeylerine sahipti ($p<0.05$). Melatonin ve çinkonun kombine uygulandığı DMBA grubunun (G5) GSH değerleri diğer grupların tamamından daha yüksekti ($p<0.05$).

Sonuç: Çalışmanın bulguları DMBA ile oluşturulan meme kanserinde artan uterus doku hasarının çinko, melatonin ve çinko+melatonin desteğiyle baskılandığını göstermektedir. Özellikle çinko + melatoninin kombine uygulanması tümoral olaylarda ortaya çıkan doku hasarının önlenmesinde katkı sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: DMBA, meme kanseri, beyin dokusu, MDA, GSH, çinko, melatonin

Abstract

Objective: This study aims to investigate the effects of zinc and melatonin supplementation on lipid peroxidation in the uterus in DMBA-induced breast cancer in female rats.

Material and Methods: A total of 42 recently weaned Wistar rats were divided into 5 groups as follows: Control (Group 1), DMBA Control (Group 2), DMBA + Zinc (Group 3), DMBA + Melatonin (Group 4), DMBA + Melatonin & Zinc (Group 5). 80 mg/kg of DMBA was given in canola oil through gavage to animals except for group 1 to induce breast cancer. 5 mg/kg of zinc and/or melatonin were given daily for 4 weeks intraperitoneally to related groups. Malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels in uterus tissue samples were determined via spectrophotometric methods.

Results: The highest uterus tissue MDA levels were in the DMBA-treated group (Group 2) ($p<0.05$). Uterus MDA levels of DMBA group (G5), in which melatonin and zinc were applied in combination, were lower than all other groups ($p<0.05$). Breast cancer-induced control (G2) group with DMBA had the lowest GSH levels ($p<0.05$). The GSH values of the DMBA group (G5), in which melatonin and zinc were applied in combination, were higher than all other groups ($p<0.05$).

Conclusion: The results show that the increased uterus tissue damage in DMBA-induced breast cancer is alleviated by zinc or/and melatonin treatment. Especially combined zinc and melatonin treatment may contribute to the prevention of tissue damage caused by tumoral events.

Key words: DMBA, breast cancer, brain tissue, MDA, GSH, zinc, melatonin

Giriş

İnsan meme kanseri son derece karmaşık ve tehlikeli bir hastalıktır (1). Çoklu ilaç direncinin yaygınlığı ve ortaya çıkışı, anti-tümör ajanlarının spesifik olmayan sistemik dağılımı, tümör bölgesine ulaşan yetersiz ilaç konsantrasyonları, sitotoksitesite ve terapötik yanıtları izleme yeteneğinin sınırlı olması ile kanser tedavisi giderek daha zorlayıcı ve tedavi edilemez bir hastalık haline gelmiştir (1,2). Bu sorunun üstesinden gelmek için, kanser tedavisi veya yürütülen tedaviye yardımcı olabilecek yeni stratejiler üzerinde çalışılmaktadır. İnsan meme kanserine benzerliği dolayısıyla, sıçanlarda oluşturulan deneysel meme kanser modeli oldukça tercih edilen bir yöntemdir (3). Dişi sıçanlarda DMBA (7,12-Dimethylbenz(a)anthracene) kaynaklı meme kansinomları, meme kansinogenezinin standart laboratuvar modeli haline gelmiştir (4). DMBA; sıçanlarda DMBA aracılı biyokimyasal, moleküler, genetik ve histopatolojik değişiklikler insan kanserlerinde gözlenenlere benzer olduğu için mutasyon ve kanser araştırmalarında prototip ajan olarak yaygın olarak kullanılan sentetik bir polisiklik aromatik hidrokarbondur (5).

Çalışmalar eser elementlerin antikanserojen mekanizmalardaki rolünü göstermiştir (6). Çinko, özellikle, metalotinoninler, bakır/çinko süperoksit dismutaz gibi antioksidan savunma sisteminde yer alanlar da dahil olmak üzere 300'den fazla enzimin bir katalitik bileşeni olarak antikanserojen olaylarda oldukça ilgi çeken bir eser elementtir (6). Çinko ayrıca memenin patogenezinde yer alan matris metaloproteinazlara (MMP'ler) yanıtları kontrol eden proteinlerin kofaktörü olarak işlev görür (7). Çinko konsantrasyonlarındaki değişiklikler, bu hastalığın gelişimi ve ilerlemesi de dahil olmak üzere hücre fonksiyon bozukluğu ve proliferasyonunda önemli bir rol oynayabilir (8).

Pineal bez tarafından üretilen ve salgılanan melatoninin bir anti-kanserojen ajanı rolü son birkaç on yıldır yoğun bir şekilde araştırılmıştır (9). Melatonin, özellikle meme kansinomu olmak üzere çeşitli kanser türlerinde değerlendirilmiştir (10). Melatonin, hücre çoğalmasını azaltarak

tümör oluşumunu inhibe ederken, ayrıca; anti-metastatik, pro-apoptotik, anti-anjiyojenik, anti-oksidan/anti-mutajenik ve immüno-arttırıcı etkilere sahiptir (9,10). Melatoninin bu etkileri, onu insanlarda kansinojeniz sürecinin riskini azaltmak için mükemmel bir ajan yapar (9,10).

Meme kanseri hastalarının yüzde altısında metastaz vardır ve yaklaşık% 30'unda kesin tedaviyi takiben metastaz gelişir (11). Her ne kadar meme kanseri metastazı, akciğer / plevra, karaciğer, kemik ve beynin en yaygın bölgeleri duktal ve lobüler kansinomda benzer olsa da, lobüler kansinomun gastrointestinal sistem ile jinekolojik organlara, metastaz yapma olasılığı daha yüksektir (12). Meme kanseri nadiren rahme metastaz yapar (11) Ekstra genital kanser bölgelerinden genital organlara metastazlar oldukça nadirdir (11, 12). Mevcut olduğunda, yumurtalık peritoneal yayılmaya bağlı en yaygın metastaz bölgesidir ve metastazların genital organlara% 75.8'ini oluşturur (12).

Bu çalışmanın amacı da dişi sıçanlarda DMBA ile oluşturulmuş meme kanserinde çinko ile melatonin uygulamasının uterus dokusundaki lipid peroksidasyonu üzerine olan etkilerinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem

Hayvan Materyali ve gruplar

Araştırma Wistar cinsi sütten yeni kesilmiş (40 günlük) dişi sıçanlar üzerinde gerçekleştirildi. Çalışma protokolü Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deneysel Hayvanları Etik Kurulu (2016-32) tarafından onaylandı. Toplam 42 dişi sıçan kullanılan çalışmada 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 di-

DMBA ile meme kanseri oluşturulmuş sıçanlarda artan uterus doku hasarı çinko ve melatonin desteğiyle önlenir - Gülbahçe Mutlu E. ve Baltacı SB.

yetle 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.

Deney Hayvanları ve Beslenmeleri

Deney hayvanları çalışmanın tamamlandığı zamana kadar Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinde diğer hayvanlardan ayrı bir odada tutuldu. Deney hayvanları çalışma süresince standart sıcaklık ve ışık ortamında (21±1 oC, 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık) barındırıldılar.

Deneysel Uygulamalar

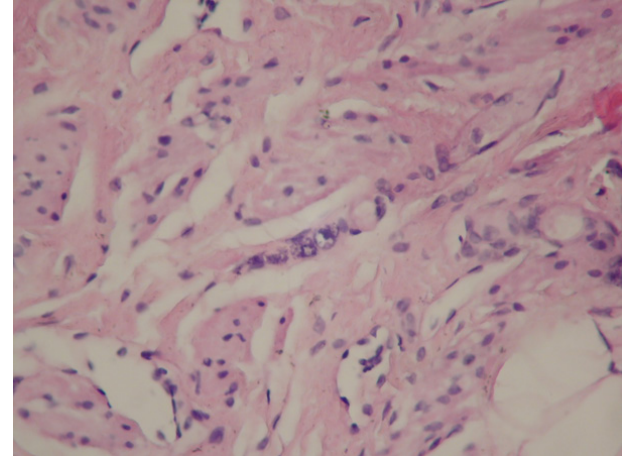
Meme kanseri oluşturulması

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 (Resim 1). Tümör oluşumu DMBA uygulamasından sonraki 10. hafta içerisinde patolojik olarak tespit edildi.

Çinko uygulaması

Çinko (Merck, 7446-20-0) uygulaması çinko-sülfat şeklinde distile suda çözüldükten sonra 0.5 ml serum fizyolojik içerisinde kg vücut ağırlığı başına 5 mg/gün olarak ip enjeksiyonla gerçekleştirildi. Çinko sülfat uygulaması dört hafta boyunca sabah saat 9.00-10.00 saatleri arasında gerçekleştirildi.



Resim 1.Meme dokusunda tümöral değişiklikler belirlendi (HE: X40).

Melatonin Uygulaması

Melatonin (Sigma M-5250) saf etanolde çözüldükten sonra karanlıkta ve kapalı olarak kullanılmaya 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.

Örneklerin Elde Edilmesi

Dört hafta süren deneysel uygulamaları takiben genel anestezi altında sakrifiye edilen hayvanlardan lipit peroksidasyonu analizleri için uterus doku örnekleri de alındı.

Biyokimyasal Analizler

Doku Malondialdehid(MDA) Düzeylerinin Belirlenmesi

Uters dokusundaki MDA düzeyleri Mihara ve Uchiyama

(12) yöntemi kullanılarak SPECTROstar (BMG Labtech, Germany) cihazında gerçekleştirildi ve sonuçlar nmol/gr doku olarak tanımlandı.

Doku Glutasyon (GSH) Analizi

Uterus dokusundaki GSH düzeyleri Ellmann's metodu kullanılarak SPECTROstar (BMG Labtech, Germany) cihazında ölçüldü ve elde edilen veriler mg/gr doku olarak sunuldu (14).

İstatistiksel Değerlendirmeler

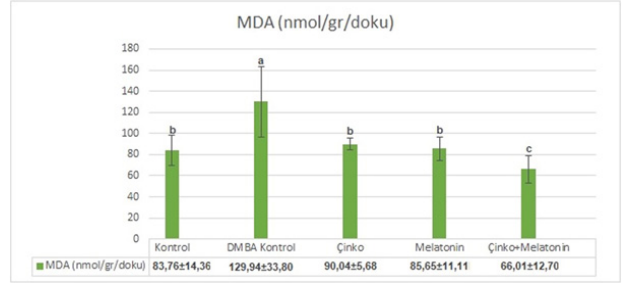
Bulguların istatistiksel açıdan yorumlanması SPSS 21.0 bilgisayar paket programı ile yapılmış, bütün parametrelerin aritmetik ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Verilerin homojenliğinin belirlenmesi amacıyla "Shapiro-Wilk" testi yapıldı ve verilerin normal dağılım gösterdiği belirlendi. 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.

Bulgular

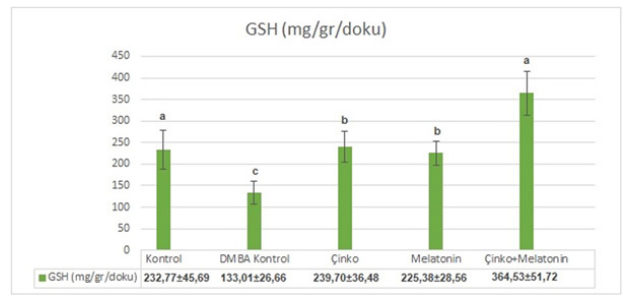
En yüksek uterus doku MDA seviyeleri DMBA ile meme kanseri oluşturulmuş kontrol (G2) grubunda elde edildi ($p < 0,05$). DMBA+Çinko (G3) ile DMBA+Melatonin (G4) gruplarının uterus doku MDA seviyeleri Grup 2'den düşük, Melatonin ve çinkonun kombine uygulandığı DMBA grubundan (G5) daha yüksekti ($p < 0,05$). Melatonin ve çinkonun kombine uygulandığı DMBA grubu (G5) en düşük MDA seviyelerine sahipti (Grafik 1, $p < 0,05$).

Melatonin ve çinkonun kombine uygulandığı DMBA grubunun (G5) uterus doku GSH düzeyleri diğer grupların tamamından önemli şekilde yüksekti ($p < 0,05$). DMBA+Çinko (G3) ile DMBA+Melatonin (G4) gruplarının uterus doku GSH seviyeleri Grup 2'den yüksek, melatonin ve çinkonun kombine uygulandığı DMBA grubundan (G5) daha düşüktü ($p < 0,05$). En düşük uterus GSH seviyeleri DMBA ile meme kanseri oluşturulmuş kontrol grubunda elde edildi (Grafik 2, $p < 0,05$).

Grafik 1. Çalışma Gruplarının Uterus MDA Düzeyleri.



Grafik 2. Çalışma Gruplarının Uterus GSH Düzeyleri.



Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, DMBA ile meme kanseri oluşturulmuş dişi sıçanlara çinko ve melatonin uygulamasının uterus dokusundaki lipit peroksidasyonu üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

Oksidatif stres ve doku hasarının bir göstergesi olarak en sık kullanılan parametrelerden bir tanesi MDA seviyelerinin belirlenmesidir. Bu nedenle çalışmamızda oksidan stresin göstergesi olarak doku MDA düzeyleri belirlenmiştir. Çalışmamızdaki en yüksek uterus doku MDA düzeyleri DMBA (G2) grubunda elde edildi. DMBA ile kanser oluşturulmuş bir çok deneysel çalışmada oksidatif stres parametrelerinde artış görüldüğü rapor edilmiştir (15-17). Mevcut çalışmada DMBA ile kanser oluşturulmuş sıçanların uterus dokusundaki MDA düzeyleri diğer gruplarla mukayese edildiğinde önemli şekilde yüksekti. Karsinogenez, normal bir hücrenin bir kanser hücresine dönüşümünü destekleyen bir dizi hücrel ve moleküler olayı içeren karmaşık bir süreçtir. Karsinogenez sürecinin tüm aşamalarında yer alan temel moleküler mekanizmalarla reaktif oksijen türlerinin ilişkili olabileceğine dikkat çekilmektedir (18). Zaten reaktif oksijen türlerinin artı-

şının ve oksidatif stresin, meme kanserinin ilerlemesine metastazına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (19). Burada kritik olan, tümoral olaylarda artan oksidatif stresin, antioksidan sistemin aktivasyonunu sağlayan çeşitli faktörlerle önlenebilirliğinin araştırılmasıdır (19). Çinko antioksidan etkiye sahip önemli bir elementtir. Meme kanseri olan kadınlarda çinko metabolizmasında değişiklikler olduğu bilinir. Bu değişiklikler hastalığın kötü prognozu ve kanserojen süreçteki artışla yakından ilişkilidir (20). Çinko tümoral olaylarda ortaya çıkan doku hasarının önlenmesinde etkili bir aday olarak önerilmektedir (21). Başlıca pineal bezden salgılanan melatonin hormonu güçlü bir antioksidandır. Özellikle meme kanseri insidansı ile melatonin üretimi arasında ters bir ilişki vardır (22). Melatonin tedavisi de bu nedenle tümoral olaylardaki doku hasarının önlenmesinde güçlü bir aday olarak kabul edilir (22). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada, hem çinko uygulaması yapılan DMBA grubunun (G3), hem de melatonin uygulaması yapılan DMA grubunun (G4), uterus dokusundaki MDA düzeyleri, DMBA (G2) grubunun aynı değerlerinden önemli şekilde düşük bulundu. Elde ettiğimiz bu bulgu, çinko ve melatoninin tümoral olaylarda ortaya çıkan doku hasarını önleyebileceğini göstermektedir. Hem çinkonun (21), hem de melatoninin (22) tümoral olaylarda ortaya çıkan doku hasarının önlenmesinde etkili bir aday olabileceğini öneren araştırmacıların raporları, çalışmamızda meme kanserinde çinko ve melatonin desteğiyle elde ettiğimiz azalmış uterus MDA düzeyleri uyumludur. Biz, gerçekleştirdiğimiz çalışmada en düşük uterus MDA değerlerini çinko ve melatoninin kombine uygulandığı DMBA grubunda (G5) elde ettik. Çinko ve melatoninin kombine uygulamasının meme kanserindeki doku hasarını nasıl etkilediğini konu alan bir çalışmaya rastlayamadık. Ancak Baltacı ve ark (8)'nin gerçekleştirdiği çalışmada çinko ve melatoninin kombine uygulamasının meme kanseri oluşturulmuş sıçanlarda bağışıklık parametrelerini aktive ettiğini bildirmeleri, çalışmamızdaki çinko ve melatoninin kombine uygulamasıyla elde ettiğimiz azalmış uterus MDA değerlerini dolaylı olarak da olsa destekleyen bir rapordur.

Çalışmamızdaki en düşük uterus GSH düzeyleri DMBA (G2) grubunda elde edildi. Meme kanserinde GSH başta olmak üzere antioksidan yolların baskılandığı bilinmektedir (24, 25). Bu nedenle elde ettiğimiz bulgu meme kanserinde antioksidan aktivitenin baskılandığını bildiren

raporlarla uyumludur. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada çinko (G3) ve melatonin (G4) uygulanan DMBA gruplarının uterus GSH düzeyleri DMBA (G2) grubundan yüksekti. Meme ve prostat kanserinde metal taşıyıcı bir protein olan metalotiyoninin çinko ile birlikte GSH düzeylerini yükselterek antioksidan aktiviteyi artırdığı ve sonuç olarak da meme ve prostat kanserinde oksidatif hasarı önlediği gösterilmiştir (26). Zaten çinkonun meme karsinogeneziyle ilişkili anahtar süreçlerde yer aldığı, çinko eksikliğinde meme kanseri görülme sıklığının arttığı rapor edilmiştir (27). Antioksidan bir element olarak bilinen çinkonun (28) takviyesinin DMBA ile meme kanseri oluşturduğumuz sıçanlarda uterus GSH düzeylerini artırması yukarıda bulguları sunulan araştırmacıların raporlarıyla uyumludur. Epidemiyolojik çalışmalar, farklı tümör tipleri üzerinde melatoninin olası bir onkostatik özelliğini göstermiştir (29). Zaten Melatonin hormonu da bugün meme kanseri inhibitörü olarak tanımlanmaktadır (30). Melatonin hormonunun kanser önleyici etkisinin altında yatan mekanizmalardan bir tanesi de, antioksidan aktiviteyi artırarak doku hasarını önlemesidir (29). Çalışmamızda DMBA ile meme kanseri oluşturulmuş sıçanlarda melatonin desteğinin uterus dokusundaki GSH düzeylerini artırması, yukarıdaki raporlarla birlikte düşünüldüğünde beklenen bir sonuç olarak düşünülebilir. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada en yüksek uterus GSH düzeyleri çinko ve melatoninin kombine uygulandığı DMBA (G5) grubunda elde edildi. Meme kanseri oluşturulmuş sıçanlarda çinko ile melatonin hormonunun kombine halde uygulamasının antioksidan aktiviteyi nasıl etkilediğiyle ilgili bir rapora rastlayamadık. Antioksidan olarak bilinen çinko (28) ve melatoninin (29) kombine uygulaması, gerçekleştirdiğimiz çalışmada DMBA ile meme kanseri oluşturulmuş grupla mukayese edildiğinde uterus GSH düzeylerini önemli şekilde artırmıştır. Elde ettiğimiz bu bulgu, tümoral olaylarda ortaya çıkan doku hasarının önlenmesinde çinko ve melatoninin kombine uygulamasının önemli olabileceğini gösterir.

Çalışmamızın sonuçları bir bütün olarak değerlendirildiğinde;

1. Çalışmamızda elde edilen bulgulara dayanarak, çinko ve melatoninin kombine desteğinin DMBA ile oluşturulan meme kanserinde artan uterus doku hasarının önlenmesinde yararlı olabileceği sonuç olarak söylenebilir.

DMBA ile meme kanseri oluşturulmuş sıçanlarda artan uterus doku hasarı çinko ve melatonin desteğiyle önlenir - Gülbahçe Mutlu E. ve Baltacı SB.

2. Mevcut çalışma; melatonin ile çinko kombinasyonunun meme kanserinde artan uterus doku hasarını güçlü bir şekilde baskıladığını gösteren ilk çalışmadır.

Kaynaklar

1. Sofi MS, Sateesh MK, Bashir M, Ganie MA, Nabi S. Chemopreventive and anti-breast cancer activity of compounds isolated from leaves of *Abrus precatorius* L. *3 Biotech* 2018;8(8):371.
2. Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discov Today* 2010;15(19-20):842-50.
3. Samy RP, Gopalakrishnakone P, Ignacimuthu S. Anti-tumor promoting potential of luteolin against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in rats. *Chem Biol Interact* 2006;164(1-2):1-14.
4. Russo J, Russo IH. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res Treat.* 1996;39(1):7-20.
5. Izzotti A, Camoirano A, Cartiglia C, Grubbs CJ, Lubet RA, Kelloff GJ, Flora SD. Patterns of DNA adduct formation in liver and mammary epithelial cells of rats treated with 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene, and selective effects of chemopreventive agents. *Can Res* 1999;59:4285-90.
6. Kumar R, Razab S, Prabhu K, Ray S, Prakash B. Serum butyrylcholinesterase and zinc in breast cancer. *J Cancer Res Ther* 2017;13(2):367-70.
7. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2017;147:1-73.
8. da Cruz RS, Andrade FO, Carioni VMO, Rosim MP, Miranda MLP, Fontelles CC, de Oliveira PV, Barbisan LF, Castro IA, Ong TP. Dietary zinc deficiency or supplementation during gestation increases breast cancer susceptibility in adult female mice offspring following a J-shaped pattern and through distinct mechanisms. *Food Chem Toxicol* 2019;134:110813.
9. Ferreira LC, Orso F, Dettori D, Lacerda JZ, Borin TF, Taverna D, Zuccari DAPC. The role of melatonin on miRNAs modulation in triple-negative breast cancer cells. *PLoS One* 2020;15(2):e0228062.
10. Kubatka P, Zubor P, Busselberg D, Kwon TK, Adamek M, Petrovic D, Opatrilova R, Gazdikova K, Caprnda M, Rodrigo L, Danko J, Kruzliak P. Melatonin and breast cancer: Evidences from preclinical and human studies. *Crit Rev Oncol Hematol* 2018;122:133-43.
11. Akhtar A, Ratra A, Puckett Y, Sheikh AB, Ronaghan CA. Synchronous Uterine Metastases from Breast Cancer: Case Study and Literature Review. *Cureus* 2017;9(11):e1840.
12. Çift T, Aslan B, Bulut B, İlvan Ş. Unusual uterine metastasis of invasive ductal carcinoma: A case report. *Turk J Obstet Gynecol* 2016;13(3):164-6.
13. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978;86(1):271-8.
14. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968;25(1):192-205.
15. Gan H, Zhang Y, Zhou Q, Zheng L, Xie X, Veeraraghavan VP, Mohan SK. Zingerone induced caspase-dependent apoptosis in MCF-7 cells and prevents 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in experimental rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2019 ;33(10):e22387.
16. Rajendran J, Pachaiappan P, Subramaniyan S. Dose-dependent chemopreventive effects of citronellol in DMBA-induced breast cancer among rats. *Drug Dev Res* 2019;80(6):867-76.
17. Zeweil MM, Sadek KM, Taha NM, El-Sayed Y, Menshawy S. Graviola attenuates DMBA-induced breast cancer possibly through augmenting apoptosis and antioxidant pathway and downregulating estrogen receptors. *Environ Sci Pollut Res Int* 2019;26(15):15209-17.
18. Hecht F, Pessoa CF, Gentile LB, Rosenthal D, Carvalho DP, Fortunato RS. The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *Tumour Biol* 2016;37(4):4281-91.
19. Gurer-Orhan H, Ince E, Konyar D, Saso L, Suzen S. The Role of Oxidative Stress Modulators in Breast Cancer. *Curr Med Chem* 2018;25(33):4084-101.
20. Borges de Araújo CG, Oliveira do Nascimento Holanda A, de Souza Rocha CV, Soares do Nascimento AP, Simplício Revoredo CM, Borges da Silva B, do Nascimento Nogueira N, do Nascimento Marreiro D. Relationship between zincemia, superoxide dismutase activity and marker of oxidative stress in women with breast cancer. *Nutr Hosp* 2015;32(2):785-91.
21. Famurewa AC, Ekeleme-Egedigwe CA, David EE, Eleazu CO, Folawiyo AM, Obasi NA. Zinc abrogates anticancer drug tamoxifen-induced hepatotoxicity by suppressing redox imbalance, NO/iNOS/NF-κB signaling, and caspase-3-dependent apoptosis in female rats. *Toxicol Mech Methods* 2020;30(2):115-23.
22. Amin AH1, El-Missiry MA, Othman AI, Ali DA, Gouida MS, Ismail AH. Ameliorative effects of melatonin against solid Ehrlich carcinoma progression in female mice. *J Pineal Res* 2019;67(2):e12585.
23. Baltacı SB, Mogulkoc R, Baltacı AK, Emsen A, Artac H. The effect of zinc and melatonin supplementation on immunity parameters in breast cancer induced by DMBA in rats. *Arch Physiol Biochem* 2018;124(3):247-52.
24. Luo M, Shang L, Brooks MD, Jagge E, Zhu Y, Buschhaus JM, Conley S, Fath MA, Davis A, Gheordunescu E, Wang Y, Harouaka R, Lozier A, Triner D, McDermott S, Merajver SD, Luker GD, Spitz DR, Wicha MS. Targeting Breast Cancer Stem Cell State Equilibrium through Modulation of Redox Signaling. *Cell Metab* 2018;28(1):69-86.e6.
25. Didžiapetrienė J, Kazbarienė B, Tikuišis R, Dulskas A, Dabkevičienė D, Lukosevičienė V, Kontrimavičiūtė E, Sužiedėlis K, Ostapenko V. Oxidant/Antioxidant Status of Breast Cancer Patients in Pre- and Post-Operative Periods. *Medicina (Kaunas)* 2020;56(2). pii: E70.
26. Gumulec J, Masarik M, Krizkova S, Adam V, Hubalek J,

Hrabeta J, Eckschlager T, Stiborova M, Kizek R. Insight to physiology and pathology of zinc(II) ions and their actions in breast and prostate carcinoma. *Curr Med Chem* 2011;18(33):5041-51.

27. Al-Saran N, Subash-Babu P, Al-Nouri DM, Alfawaz HA, Alshatwi AA. Zinc enhances CDKN2A, pRb1 expression and regulates functional apoptosis via upregulation of p53 and p21 expression in human breast cancer MCF-7 cell. *Environ Toxicol Pharmacol* 2016;47:19-27.
28. Jarosz M, Olbert M, Wyszogrodzka G, Młyniec K, Librowski T. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- κ B signaling. *Inflammopharmacology* 2017;25(1):11-24.
29. Li Y, Li S, Zhou Y, Meng X, Zhang JJ, Xu DP, Li HB. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. *Oncotarget* 2017;8(24):39896-921.
30. Hill SM, Belancio VP, Dauchy RT, Xiang S, Brimer S, Mao L, Hauch A, Lundberg PW, Summers W, Yuan L, Frasch T, Blask DE. Melatonin: an inhibitor of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2015;22(3):R183-204.