

ÖZGÜN ARAŞTIRMA Original Article

Correspondence address

Yazışma adresi

Semin GEDİKLİ

Atatürk Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji AD,
Erzurum, Türkiye

semin.gedikli@atauni.edu.tr

Geliş tarihi / Received : 10 Şubat 2023

Kabul Tarihi / Accepted : 03 Aralık 2023

E-Yayın Tarihi / E-Published : 01 Mayıs 2024

Cite this article as

Bu makalede yapılacak atıf

Gedikli S, Şahin E, Özbek A, Tatar A,

Kara A, Hacımüftüoğlu A.

Melatoninin MCF-7 Hücre Kültüründeki Apoptoz Aktivasyonunun ve Sitotoksitesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), MTT Hücre Canlılık Testi ve İmmünohistokimya Yöntemleriyle Araştırılması

Akd Tıp D 2024;10(2): 265-275

Semin GEDİKLİ

Atatürk Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji AD,
Erzurum, Türkiye

ORCID ID: 0000-0001-8238-7226

Elvan ŞAHİN

Sakarya Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji AD,
Sakarya, Türkiye

ORCID ID: 0000-0001-8585-9903

Ahmet ÖZBEK

Altınbaş Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji AD,
İstanbul, Türkiye

ORCID ID: 0000-0001-8938-6533

Abdulgani TATAR

Atatürk Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Tıbbi Genetik AD,
Erzurum, Türkiye

ORCID ID: 0000-0001-7273-1679

Adem KARA

Erzurum Teknik Üniversitesi,
Fen Fakültesi,
Genetik AD,
Erzurum, Türkiye

ORCID ID: 0000-0002-5766-6116

Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU

Atatürk Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Tıbbi Farmakoloji AD,
Erzurum, Türkiye

ORCID ID: 0000-0002-9658-3313

Melatoninin MCF-7 Hücre Kültüründeki Apoptoz Aktivasyonunun ve Sitotoksitesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), MTT Hücre Canlılık Testi ve İmmünohistokimya Yöntemleriyle Araştırılması

The Investigation of Apoptosis Activation and Cytotoxicity of Melatonin in MCF-7 Cell Culture Through Polymerase Chain Reaction (PCR), MTT Cell Viability Assay and Immunocytochemical Methods

ÖZ

Amaç:

Dünyada ve Türkiye’de en sık görülen kanser türlerinden biri olan meme kanseri, kanser nedeni ölüm oranları arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Bu nedenle bu hastalığın tedavisine yönelik yeni araştırmalar yapılmaktadır. Bu çalışmada, güçlü bir antioksidan olan melatoninin kanserle olan ilişkisinin ve kanser hastalığının tedavisi yönündeki katkısının araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler:

Çalışmamızda, melatoninin sitotoksik dozlarını ve IC50 değerini belirleyebilmek için MCF-7 hücre hattına 10 nM–100.000 nM aralığında melatoninin konsantrasyonları uygulandı. Melatonin uygulamasının ardından hücre canlılığı analizi yapıldı ve melatonin için etkin dozlar belirlendi. MCF-7 hücreleri, 5 konsantrasyon (10, 100, 1000, 10.000 ve 100.000 nM) melatoninin dozu ile 24 saat inkübasyon işlemine tabi tutuldu. Tüm gruplarda melatoninin sitotoksitesisi, toplam antioksidan kapasite ve toplam oksidan düzeyi, apoptotik aktivite (Bax ve p53 immünopozitifliği) ve p53 gen ekspresyon düzeyleri incelendi.

Bulgular:

Yirmi dört saatlik inkübasyon sonunda MCF-7 hücrelerine uygulanan melatoninin hücre proliferasyonunu inhibe ederek sitotoksik etki yaptığı ($p<0.05$), p53 gen ekspresyonunu ve Bax protein sentezini artırdığı tespit edildi. İmmünohistokimyasal boyamada Bax ve p53 immünopozitifliğinin arttığı belirlendi. Ayrıca melatoninin tedavisi TAS’ı artırıp TOS’u azalttı.

Sonuç:

Bu etkiler, melatoninin p53 gen ekspresyonu ve Bax proteinindeki artışa bağlı olarak apoptoz aktivasyonunu indüklediğini ve dolayısıyla kanser tedavisinde kullanılabilecek yardımcı bir ajan olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler:

Apoptoz, Bax, Meme Kanseri, Melatonin, p53

DOI: 10.53394/akd.1249740

ABSTRACT**Objective:**

Breast cancer, one of the most common cancer types in the world and in Turkey, ranks first among cancer-related deaths. For this reason, new researches are carried out for the treatment of this disease. We aimed to investigate the relationship of melatonin, a powerful antioxidant, with cancer and its contribution to the solution of cancer.

Material and Methods:

In our study, melatonin concentrations in the range of 10 nM–100,000 nM were applied to the MCF-7 cell line to determine the cytotoxic doses and IC50 value of melatonin. Cell viability analysis was performed after melatonin administration and effective doses were determined for melatonin. MCF-7 cells were incubated for 24 hours with 5 concentrations (10, 100, 1000, 10,000 and 100,000 nM) doses of melatonin. Cytotoxicity of melatonin, total antioxidant capacity and total oxidant level, apoptotic activity (Bax and p53 immunopositivity) and p53 gene expression levels were examined in all groups.

Results:

At the end of the 24-hour incubation, it was determined that melatonin administered to MCF-7 cells inhibited cell proliferation and had a cytotoxic effect, increasing p53 gene expression and Bax protein synthesis. It was determined that Bax and p53 immunopositivity increased in immunocytochemical staining. In addition, melatonin treatment increased TAS and decreased TOS.

Conclusion:

These effects show that melatonin induces apoptosis activation due to the increase in p53 gene expression and Bax protein, and thus may be an adjunctive agent that can be used in cancer treatment.

Key Words:

Apoptosis, Bax, Breast cancer, Melatonin, p53

GİRİŞ

Kanser, vücudun herhangi bir yerinde meydana gelen kontrolsüz hücre bölünmesi şeklinde karşımıza çıkan, yüksek morbidite ve mortalite oranlarıyla da önemi giderek artan bir hastalık tablosudur (1-3). Kadınlar arasında görülme sıklığı ve insidansı giderek artan meme kanseri tüm kanser türleri arasında ikinci sırada yer almaktadır (4, 5). GLOBOCAN (The Global Cancer Observatory)'dan elde edilen verilere göre 2018 yılında ülkemiz genelinde 22.345 kadın (tüm kanserlerin %10,6'sı) meme kanseri tanısı almıştır. Bu sonuçlara göre de meme kanseri yeni kanser tanısı almış olan vakalar içinde dünya genelinde ikinci sırada yer almaktadır (4).

Meme kanseri, oldukça karmaşık ve tehlikeli bir hastalıktır (6). Çoklu ilaç direncinin meydana gelmesi, anti-tümör ajanların spesifik olmayan sistemik dağılımı, tümör bölgesine ulaşmayan ilaç konsantrasyonları ve sitotoksitesite gibi durumlar nedeniyle tedavisi giderek daha da zor bir hal almıştır (6, 7). Henüz, meme kanserini önleyici kesin bir yöntem bulun-

mamakla birlikte, kemoterapötik tedavilere ek olarak uygulanabilecek alternatif tedaviler hem kemoterapinin zararlı etkisini en aza indirmek için hem de tedavi seçeneklerinin artması açısından oldukça önemlidir (8). Tümör baskılayıcı genler arasında yer alan p53 geni, normalde inaktif olarak bulunur (9). DNA sentez ve tamirinde, hücre farklılaşmasında ve programlanmış hücre ölümünde (apoptoz) görev almaktadır (10). Kanser hastalarında en fazla oranda mutant olan p53 geni, kanser türlerinin yaklaşık %50-55'inde mutasyona uğramakta, hatta bu mutasyon bazı kanser türlerinde her iki allelde de meydana gelmektedir (11). Apoptoz, organizmada var olan homeostazi koruyan bir olaydır (12). Kanserle ilişkili olan apoptozda kaspazlar aktive olmakta ve hücreleri apoptozdan koruyan protein ailesini inaktive etmekte ya da ortadan kaldırmaktadır. Kaspazlar, ayrıca apoptozu inhibisyona uğratan negatif düzenleyicileri baskılayarak hücre ölümünü tetiklemektedir (13, 14). Bcl-2 ailesi apoptozu düzenleyen antiapoptotik ve proapoptotik üyelerden oluşan bir onkoprotein grubudur (14, 15). Bir hücrede, proapoptotik proteinlerden Bax proteini fazla olduğu zaman hücre apoptoza girmekte, antiapoptotik proteinlerden Bcl-2 fazla olduğu zaman ise apoptoz inhibe edilmektedir (16). Onkostatik bir etkiye sahip olan melatonin hormonunun, pek çok kanser türünün semptomlarını hafiflettiğini, proliferasyonunu, anjiogenezini ve metastazını engellediğini gösteren pek çok çalışma mevcuttur (17-22).

MCF-7 hücre hattı, ilk olarak 1970 yılında altmış dokuz yaşında bir hastanın metastatik dokusundan elde edilmiş olan epitel hücreleridir. Bu hücreler adherent özelliklere sahiptir ve transfeksiyonlar için uygundur. MCF-7 hücreleri östrojen reseptör pozitif özellik gösterdiğinden dolayı meme kanseri araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (23).

Biz de çalışmamızda, melatoninin farklı konsantrasyonlarının (10, 100, 1000, 10.000, 100.000 nM), MCF-7 hücre proliferasyonu üzerindeki olası sitotoksik ve apoptotik etkilerini p53 geni ekspresyonu aracılığıyla araştırmayı hedefledik. Bu çalışma, Semin GEDİKLİ'nin "Melatoninin MCF-7 Hücre Kültüründeki Apoptoz Aktivasyonunun ve Sitotoksitesitesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), MTT Hücre Canlılık Testi ve İmmünotokimya Yöntemleriyle Araştırılması" başlıklı doktora tezinden üretilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEMLER**Hücre kültürü**

Çalışmamızda, Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı Şap Enstitüsünden (Ankara) temin edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattı (4. pasaj) kullanıldı. Çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için gereken etik kurul onayı Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu'ndan (Karar No: 2012.5.1/9) alınmıştır. Çalışma, araştırma ve yayın etiği ilkelerine ve Helsinki kriterlerine uygun olarak yürütülmüştür. Hücreler %5 CO₂ içeren, 37 °C sıcaklıkta nemli atmosfere sahip inkübatörde (Nuair), hazır amniyon kültür hücresi medyum (BIO-AMF-1) ile 25 cm²'lik flasklar içerisinde steril şartlarda inkübe edildi. Hücreler flask içerisinde %80-90 doygunluğa (confluent) ulaşıncaya pasajlanarak 37°C'de %5 CO₂ ortamında büyütülmeye devam edildi.

Melatonin dozunun belirlenmesi

Melatonin dozunun belirlenebilmesi amacıyla 96'lık plate içerisine her kuyucuğa eşit sayıda (5000 hücre) hücre ekildi. Ardından 10, 25, 50, 100, 1000, 10000, 50000 ve 100000 nM konsantrasyonlardaki melatonin hücre medyumlarına eklendi. Ekilen hücreler 24 saat inkübasyon işlemine tabi tutulduktan sonra hücre canlılığını tespit edebilmek için MTT analizi (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) uygulandı.

MTT analizi

Bir tetrazolyum tuzu olan MTT, canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrogenaz enzimine spesifik bir ajandır. MTT analiz yönteminde, canlı olan hücrelerin mitokondrisinde bulunan süksinat - dehidrogenaz enzimi, MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalamak suretiyle menekşe renginde suda çözünmeyen formazan tuzlarını oluşturur. Analiz sonucunda spektrofotometrik açıdan elde edilen ölçüm değerleri ortamda var olan hücrelerin metabolik aktivitelerini gösterir ve ortaya çıkan bu değer canlı hücre sayısı ile ilişkilidir. Proliferasyon oranındaki artış formazan tuzu oluşumunda yükselmeye, dolayısıyla absorpsiyon değerinin artmasına neden olmaktadır (24).

Melatoninin MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi için 96 kuyucuklu plakların her bir kuyucuğuna 5000 hücre ekildi. Yirmi dört saatlik inkübasyonun ardından seri dilüsyonlar şeklinde hazırlanan melatonin hücrelerin üzerine eklendi. Kontrol gruplarına sadece medyum eklendi. Melatonin uygulanan gruplara ise 24 saatlik sürenin ardından MTT analizi (Sigma Aldrich, USA) yapıldı. Bunun için kuyucuklardaki medyumun üzerine 10 µL MTT solüsyonu eklendi, üç saat süre ile 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyon gerçekleştirildi. Üç saatlik inkübasyondan sonra MTT ile oluşan formazan kristallerini çözmek için 100 µL DMSO eklendi ve plaklar 20 dakika inkübatörde bekletildi. İnkübasyonun ardından spektrofotometre cihazı ile (µ-Quant, BioTek Instruments, USA) gerçekleştirilen ölçümler 570 nm absorpsiyon değerinde ve üç tekrar şeklinde gerçekleştirildi. Microsoft Excel programı yardımıyla uygulanan ilaç dozu-hücre viabilite eğrisi (% olarak) oluşturularak melatoninin %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC50) değeri logaritmik eğim grafiği ile hesaplandı.

Total antioksidan kapasitesi ve total oksidan seviyesi analizleri

Total antioksidan kapasitesinin ve total oksidan seviyesinin belirlenebilmesi için altı kuyucuklu plakların her bir kuyucuğuna 5x10⁵ hücre ekimi yapıldı. Kırk sekiz saat sonra gerçekleştirilen tripsinizasyon işleminin ardından hücrelerden bir lizat hazırlandı. Bahsi geçen ölçümlerin yapılabilmesi için elimizde var olan Total Antioxidant Status Assay Kiti (TAS) ve Total Oxidant Status Assay Kiti (TOS) (Rel Assay Diagnostic Türkiye) kullanıldı. Üretici firmanın belirttiği prosedür doğrultusunda hazırlanan hücre lizatlarından µ-Quant mikropak cihazı ile ölçüm yapılarak TAS ve TOS değerleri mmol Trolox eşdeğer/L cinsinden belirlenmiştir.

Hücrelerin lamda üretilmesi

Flaskta çoğaltılan hücrelerden, polilizin kaplı lamaların yüzeyine eşit miktarda olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Ortalama 24 saat sonra yani hücrelerin lam yüzeyine yapışması sağlandıktan sonra melatonin uygulanacak olan gruplara belirlenen konsantrasyonlarda melatonin eklenirken, kontrol gruplarına aynı miktarda medyum eklendi. Yirmi dört saatlik sürenin sonunda lamalar PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkandı ve -20 °C'de soğutulmuş metanol içerisinde 10 dakika fikse edildiler. PBS ile yıkanan lamalar immünperoksidaz boyama işlemleri gerçekleştirilinceye kadar -20 °C'de saklandılar.

İmmünperoksidaz boyama tekniği

Bu işlem için -20 °C'den çıkarılan lamalar oda ısısına gelene kadar bekletildi ve PBS ile yıkandı. Lamalar %3'lük H₂O₂ solüsyonunda 10 dk. beklendikten sonra 3x5 dk PBS'le yıkama yapıldı. Permeabilizasyon işlemi için 10 dk. süreyle %0,1 Triton X-100 PBS solüsyonunda bekletilen lamalar 3x5 dk. PBS ile yıkandı. Ardından %1'lik BSA solüsyonunda 30 dk. süreyle bekletilen lamalara primer antikorlar (p53 mouse monoclonal antibody, ab1101; Bax mouse monoclonal antibody, ab5714) damlatıldı ve 37 °C'de 1 saat nemlendiricili kabinde bekletildi. Ardından PBS ile 3x5 dk. yıkama işlemi ve sekonder antikor damlatılarak 1 saat boyunca inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. PBS ile 3x5 dk. yıkama işleminin ardından lamaların üzerine Horseradish peroksidaz konjugeli streptavidin biotin (HRP) damlatılarak yarım saat bekletildi. PBS ile 3x5 dk. yıkama işleminden sonra Harris Hematoksilende 5 dk. bekletilen lamalar dereceli alkol ve ksilol solüsyonlarından geçirildikten sonra entellan ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal değerlendirme

İmmünohistokimyasal boyama sonuçları "Stereolojik Fractionator Frame" metodu ile değerlendirildi. Bu metotla elde edilen sonuçlar sayesinde gruplar arasında karşılaştırmaları yapılabildi. Yapılan tüm bu analizler stereoloji workstation sistemi (BioPrecision MAC 5000 controller system) ve stereoloji software (Stereo Investigator version 9.0, Microbrightfield, Colchester, VT) ataçmanlı ışık mikroskop (Leica DM4000 B, Tokyo, Japan) ile yapıldı (25, 26).

MCF-7 hücre hatları üzerindeki p53 ve Bax immünpozitifliğini tespit edebilmek için "Unbiased Counting Frame and Fractionator" metodu kullanıldı (25, 27). Tüm gruplara ait olan her bir lamda 1000 hücre sayıldı ve pozitif boyanmış olan hücreler bu program sayesinde işaretlendi. Sayım sonrası elde edilen 1000 hücre içerisindeki pozitif hücre yoğunluğu Şekil 2 ve Şekil 4'te gösterilmiştir.

qRT-PCR analizi

qRT-PCR analizi için öncelikle RNA izolasyon kiti (High Pure RNA Isolation Kiti-Roche, Almanya) kullanılarak MCF-7 hücre hattından RNA izolasyonu yapıldı. Analiz sonucunda hücrelerden elde edilen RNA miktarı ve saflık dereceleri NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, İngiltere) cihazında spektrofotometrik (260/280 nm) açıdan ölçüldü ve qRT-PCR analizlerinde kullanılmaya kadar -80°C'de saklandı. Hedef genlere ait mRNA ifade düzeylerinin belirlenmesi amacıyla

la, hücre hatlarından elde edilmiş olan RNA örneklerinden 1 µg RNA, Random heksamer primerleri ve cDNA sentez kiti (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche, Almanya) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. p53 ve aktin proteinlerini kodlayan mRNA düzeylerinin kantitatif olarak ölçülebilmesi için "QuantiTec® Primer Assay, Qiagen kits for SYBR® Green-based real-time PCR" kitleri kullanıldı. p53 proteini için QT00060235, internal kontrol ve sanal standart eğim hesaplamasının yapılabilmesi için kullanılan aktin protein için de QT01680476 katalog numaralı ürünler kullanıldı. PCR amplifikasyonu için üretici firmanın belirttiği protokol doğrultusunda "Rotor Gene Q" PCR cihazı kullanılarak gerekli işlemler yapıldı.

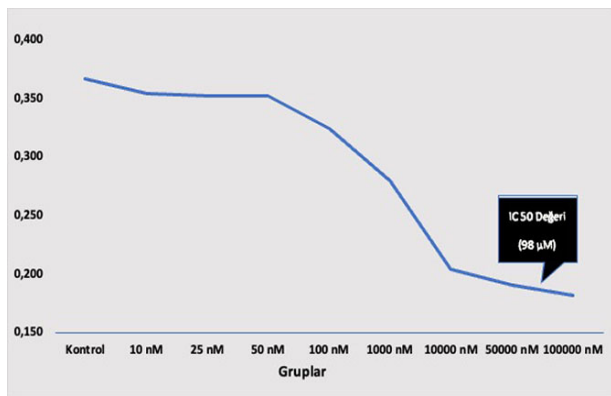
İstatistiksel analiz

Çalışmanın sonunda elde edilen veriler SPSS 20.00 istatistik veri programı ile değerlendirildi. Elde edilen veriler ortalama±SD şeklinde ifade edildi. İstatistiksel analiz sonuçları düzenli dağılım gösterdiği için parametrik testler olan One-Way Anova ve Post Hoc Duncan Testi kullanıldı. İstatistiksel önem $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

Melatoninin anti-proliferatif etkisinin MTT yöntemiyle belirlenmesi

MCF-7 hücrelerinin 24 saat süreyle melatoninin farklı konsantrasyonları ile (10, 100, 1000, 10.000 ve 100000 nM) inkübasyonunun ardından MTT analizi ile hücre canlılık oranlarında meydana gelen değişimler belirlendi. Yapılan MTT analizinden elde edilen veriler ışığında melatoninin hücre yoğunluğu üzerine olan etkisi mikropalak okuyucuyla okutularak logaritmik eğim çizgisi oluşturuldu. Logaritmik eğim çizgisine göre melatoninin IC50 değeri 98 µM olarak belirlendi (Şekil 1).



Şekil 1. MCF-7 hücre kültürüne uygulanan melatoninin 24 saatlik inkübasyon süreci sonucunda elde edilen baskılayıcı konsantrasyon 50 (IC50) değeri.

Total oksidan seviyesi ve total antioksidan kapasitesi değerlendirme sonuçları

Biyokimyasal analiz sonuçlarına göre, total oksidan seviyesinin en yüksek olduğu grubun 100 nM konsantrasyonda melatonin uygulanan grup olduğu, en düşük seviyenin ise 100.000 nM konsantrasyonda melatonin uygulanan grup olduğu be-

lirildi. 100 nM konsantrasyonda melatonin verilen grupla diğer gruplar arasında elde edilen farkın total oksidan seviyesi bakımından istatistiksel açıdan anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). Total antioksidan kapasitesinin en yüksek olduğu grubun 100 nM konsantrasyonda melatonin uygulanan grup, en düşük değer ise 100.000 nM konsantrasyonda melatonin uygulanan grup olduğu en yüksek antioksidan kapasitesinin ise 100 nM konsantrasyonda melatonin uygulanan grupta olduğu görüldü. Elde edilen farklar bakımından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Tablo I).

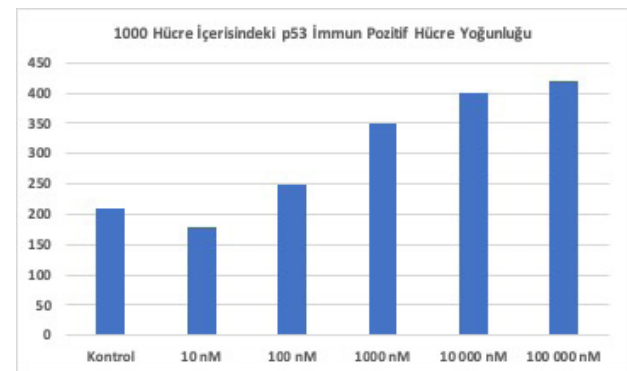
Tablo I. Total oksidan ve antioksidan değerleri analiz sonuçları

Grup	TOS değeri (µmol H ₂ O ₂ Equv/L)	TAS değeri (µmol H ₂ O ₂ Equv/L)
Kontrol	4,1503± 0,2899 ^a	0,1395± 0,0318 ^a
10 nM	4,3313± 0,9410 ^a	0,2929± 0,0763 ^b
100 nM	4,8039± 0,6612 ^b	0,3148± 0,1188 ^b
1000 nM	4,1830± 0,2135 ^a	0,2896± 0,0790 ^b
10 000 nM	4,0196± 0,4319 ^a	0,2843± 0,0791 ^b
100 000 nM	3,6275± 0,5882 ^a	0,1925± 0,0946 ^{ab}

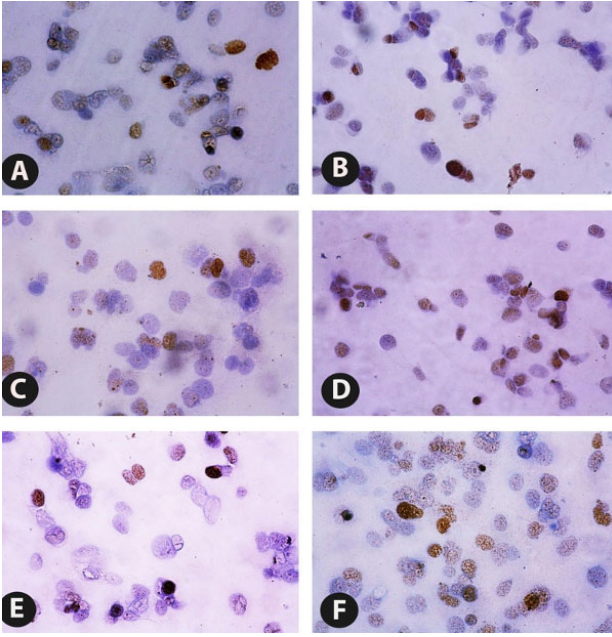
Tüm veriler ortalama ± SD olarak belirtildi. İstatistiksel analizler One-Way Anova, Post Hoc. Duncan Testi ile değerlendirildi. İstatistiksel önem $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

İmmünitokimyasal sonuçlar

İmmünitokimyasal boyama için p53 ve Bax antikoru kullanıldı. MCF-7 hücre hatları üzerinde gerçekleştirilen p53 antikoru ile boyama işlemlerinin ardından immünpozitifliğin en yoğun olduğu grubun 100.000 nM konsantrasyonda melatonin uygulanan grup olduğu tespit edildi. Ayrıca p53 immünpozitifliğinin değerlendirilmesi için MCF-7 hücrelerinde stereolojik metotla saydığımız 1000 hücre içerisinde p53-pozitif hücre sayısının en az olduğu grubun 10 nM grubu olduğu immünpozitifliğin melatonin dozundaki artışa paralel olarak arttığı belirlendi (Şekil 2, 3).

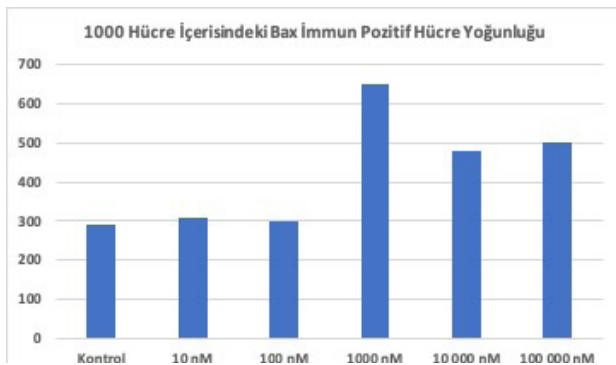


Şekil 2. 1000 hücre başına düşen p53 immün pozitif hücre sayısının stereolojik analiz sonuçları.

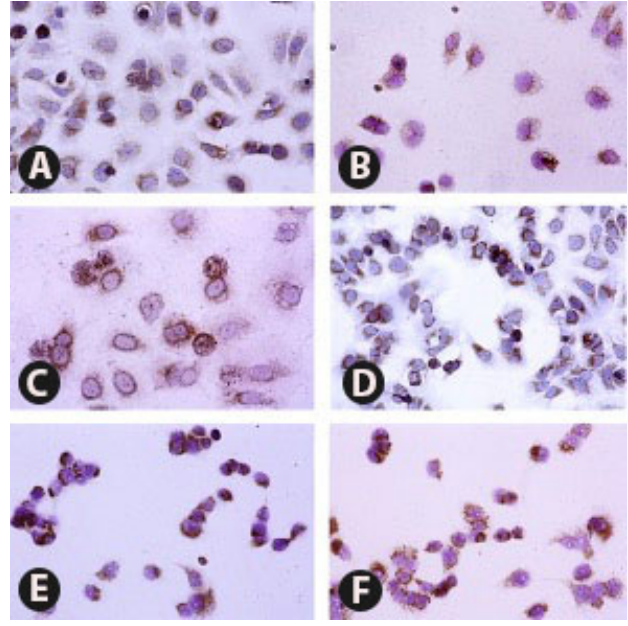


Şekil 3. MCF-7 hücre hattının p53 primer antikorunu kullanarak indirekt immünotokimyasal yöntemle değerlendirilmesi. A: Kontrol, B: 10 nM melatonin uygulanan grup, C: 100 nM melatonin uygulanan grup, D: 1000 nM melatonin uygulanan grup, E: 10 000 nM melatonin uygulanan grup, F: 100 000 nM melatonin uygulanan grup. X400.

MCF-7 hücre hatları üzerinde gerçekleştirilen Bax antikorunu ile boyama işlemlerinin ardından immüno pozitifliğin en yoğun olduğu grubun 1000 nM melatonin uygulanan grup olduğu tespit edildi. Ayrıca Bax immüno pozitifliğinin değerlendirilmesi için MCF-7 hücrelerinde stereolojik metotla saydığımız 1000 hücre içerisinde Bax-pozitif hücre sayısının kontrol ve 100 nM'lık melatonin uygulanan gruplarda en düşük değere sahip olduğu, immüno pozitifliğin en yüksek olduğu grubun ise 1000 nM melatonin uygulanan grup belirlendi (Şekil 4, 5).



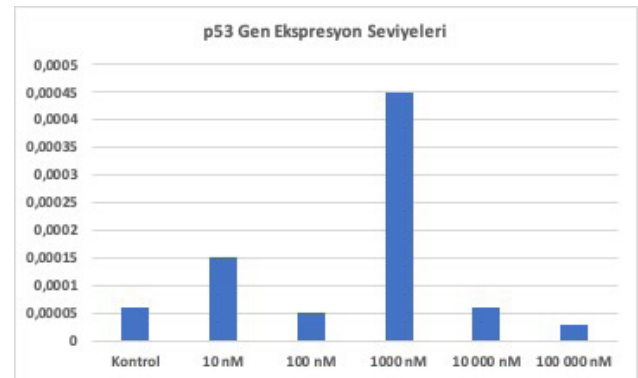
Şekil 4. 1000 hücre başına düşen Bax immün pozitif hücre sayısının stereolojik analiz sonuçları.



Şekil 5. MCF-7 hücre hattının Bax primer antikorunu kullanarak indirekt immünotokimyasal yöntemle değerlendirilmesi. A: Kontrol, B: 10 nM melatonin uygulanan grup, C: 100 nM melatonin uygulanan grup, D: 1000 nM melatonin uygulanan grup, E: 10 000 nM melatonin uygulanan grup, F: 100 000 nM melatonin uygulanan grup. X400.

qRT-PCR sonuçları

Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile değerlendirilen p53 gen ekspresyon düzeyinin, 1000 nM melatonin uygulanan grupta en yüksek oranda olduğu tespit edildi (Şekil 6).



Şekil 6. Melatonin uygulanan meme kanseri hücrelerinde tespit edilen p53 ve aktin (iç kontrol) konsantrasyonu (IU/ml) değerleri. Gen ekspresyon düzeyi, "örnek konsantrasyonu (IU/ml) / internal kontrol konsantrasyonu" formülü ile hesaplandı.

TARTIŞMA

Kadınlar arasında dünya genelinde en yaygın olarak görülen bir kanser türü olan meme kanserinin 2008 yılı itibariyle kadınlarda görülme sıklığının %23, kanser nedenli ölüm oranının ise %14 olduğu tespit edilmiştir (28, 29). Hastalığın teşhis ve tedavisinde pek çok gelişme kaydedilmesine rağmen son 20 yıl içerisinde bu hastalık kaynaklı ölüm oranları artış göstermiştir (30, 31).

Hastalığın tedavisi için kemoterapötik ilaçların ve endokrin tedavinin ayrı olarak ya da birlikte uygulanması durumunda bile süreç ölümlerle sonuçlanabilmektedir (32). Meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere yeni geliştirilen (dosetaksel, vinorelbin, letrozol, ve paklitaksel v.b. ya da halihazırda var olan anti-tümör ilaçları ile pek çok kanser türü üzerinde olumlu sonuçlar elde edilmiş olsa da sağlıklı hücre ve dokular üzerinde istenmeyen yan etkileri de olabilmektedir (33). Bazen de vücut, uygulanan ilaca karşı direnç geliştirmekte bu nedenle de etkin bir tedavi uygulanamamaktadır. Aslında, hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceği tamamen verilen ilaca karşı göstermiş olduğu dirençle ya da hassasiyetle ilgili bir durumdur (34, 35). Kemoterapötik ilaçların neden olduğu yan etkilerden kan hücreleri, gastrointestinal sistem hücreleri, sperm hücreleri, mesane, böbrek, sinir sistemi organları, akciğerler ve kalp gibi hayati önemi olan organlar etkilenmektedir (36). Kemoterapötik ilaçlar reaktif oksijen türevlerinin (ROS) artmasına, GSH, GSH-Px, sitokrom C ve katalaz gibi antioksidan sistemlerinin azalmasına neden olmaktadır (37). Bu nedenle kanser tedavisinde uygulanan kemoterapötiklere ek olarak bazı antioksidan maddeler de verilerek reaktif oksijen türevleri azaltılmaya ve kanser ilaçlarının sebep olduğu yan etkiler tamamen önlenemese de azaltılmaya çalışılmaktadır (36).

Kanser, apoptoz süreçlerinde meydana gelen aksaklıklardan kaynaklanmaktadır. Melatoninin ise kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini, apoptoz sürecini artırdığını dolayısıyla kanser gelişimini önlediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (38-42). Ayrıca çeşitli hastalık türlerinde bireylere uygulanan melatoninin ciddi yan etkileri olduğunu gösteren bir araştırma bulunmadığı gibi aksine melatoninin kanser hastalarının yaşam kalitesini artırdığı yönünde bulgular mevcuttur. Elde edilen veriler melatoninin çok yönlü ve güçlü bir antioksidan aday olduğunu, serbest radikal türevlerini ortadan kaldırmada da oldukça etkili bir hormon olduğunu kanıtlamaktadır (43). Yaptığımız çalışma ile güçlü bir antioksidan ve antikanserojenik bir ajan olan melatoninin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini in vitro olarak göstermeyi hedefledik. Yaptığımız deneysel işlemlerin ardından MCF-7 hücre yoğunluğunun en fazla olduğu grubun melatonin uygulanmayan grup olduğunu, canlı hücre yoğunluğunun uygulanan melatonin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak azaldığını tespit ettik. Yaptığımız literatür taramalarında melatoninin %50 baskılayıcı değerinin (IC50) 35 µM-426 µM aralığında oldukça geniş bir yelpazeye sahip olduğunu gördük (44-46). IC50 değeri için tespit ettiğimiz bu farkın vücut hücrelerindeki muhtemel farklılıktan kaynaklanıyor olabileceği sonucuna vardık ve 24 saatlik inkübasyon

işleminin ardından melatoninin IC50 değerini 98 µM olarak belirledik. Hücre canlılığının tespitinde kullanılan, oldukça elverişli bir yöntem olan MTT analizi sonucunda elde edilen renk yoğunluğunun canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterdiği bilinmektedir (47-50). Yaptığımız MTT analizi sonucunda melatoninle inkübe ettiğimiz hücre hatlarında hücre yoğunluğunun kontrol grubuna kıyasla azaldığını tespit ettik. Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda melatoninin sahip olduğu antiproliferatif, kemopreventif ve tümör inhibe edici etkileri gösterilmiştir (51). Bizim de MTT analizi sonucu ile tespit ettiğimiz hücre yoğunluğundaki azalmayı, Cos ve ark., melatoninin hücre siklusunun G1-S fazına geçişini engellemesine ve S evresinde olan hücrelerde DNA sentezini azaltmasına bağlamışlardır (52).

Canlı hücrelerdeki bütün moleküllerle reaksiyona giren ve hücrelere zarar veren serbest radikaller, bu etkileri sonucunda nörodejenerasyon, otoimmün hastalıklar ve kanser gibi pek çok hastalığın gelişmesine neden olurlar (53, 54). Organizmalarda var olan savunma sistemleri ise serbest radikallerin neden olduğu hasarlara karşı hücreleri korumak amacıyla hemen antioksidan sistemlerini devreye sokarak hücreleri korumaya çalışırlar (55). Melatoninin de serbest radikal temizleme aktivitesine sahip güçlü bir antioksidan olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (56-58). Yapılan bir çalışma ile gece boyunca artan melatonin salgısına plazmadaki total antioksidan seviyesindeki artışın eşlik ettiği, gece boyunca ışığa maruz bırakılan civcivlerde ise melatonin salgılanmasının baskılanmasından dolayı total antioksidan seviyesinde azalmanın meydana geldiği gösterilmiştir (59). Viral enfeksiyonların iyileşme sürecinde gelişen inflamatuvar yanıt ile oksidatif stresin azaltılmasının bir göstergesi olan antioksidan seviyesindeki artış doğru orantılıdır (60). Biz de yaptığımız deney sonucunda total antioksidan seviyesinin, kontrol grubuna oranla melatonin uygulanan gruplarda doz artışına bağlı olarak arttığını tespit ettik. Total oksidan seviyesinin en düşük olduğu grubun ise kontrol grubuna kıyasla 100.000 nM konsantrasyonda melatonin uygulanan grup olduğunu gördük.

Kadınlarda en sık görülen kanser türü olan meme kanseri, erken menarş görme, geç menopoz veya östrojen gibi dışı hormonlarına uzun süre maruz kalma gibi nedenlerle oluşmaktadır (61, 62). Melatonin, var olan anti-tümöral etkisini nöroendokrin aksla etkileşime girerek gonadal östrojen başta olmak üzere kanser gelişimine neden olan başka hormonların da sekresyonunu baskılamak yoluyla göstermektedir (20, 63). Ayrıca melatoninin östrojen reseptör α -pozitif (ER α -positive) meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu durdurduğu da gösterilmiştir (64). Ancak ER α -negatif hücreler üzerinde proliferasyonu inhibe ettiğini veya etmediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (64, 65). Melatoninin anti-proliferatif etkisi sadece meme kanseri hücreleri üzerinde değil endometriyal kanser, prostat kanseri, karaciğer kanseri ve osteosarkoma gibi farklı kanser türleri üzerinde de gösterilmiştir (65). Hücre siklusu kinetiklerinin düzenlenmesi süreçlerinde melatonin ve östradiol arasında bir etkileşim söz konusudur. Östradiol hücresel döngünün G1/S fazında durmasını sağla-

maktadır. Meme kanseri tedavisinde kullanılan tamoxifen gibi östrojen-reseptör antagonistleri kanser hücrelerinin G1 fazından S fazına geçişini durdurmakta ve böylece kanser hücre proliferasyonunu önlemektedir (66). Melatonin de tamoxifen gibi S fazına geçen hücre oranında %50 azalmaya sebep olmaktadır (52).

Hücre siklusunun düzenlenmesinde pozitif veya negatif yönde hareket eden birtakım etkenler vardır. Negatif yönde etki gösteren düzenleyiciler arasında ilk sırayı p53 geni almaktadır (67). p53 tümör supresör geni, kanser türlerinin yarısından fazlasında mutasyona uğrayan, durdurulan ya da yeniden düzenlenen dolayısıyla kanser etiyojisinde oldukça önemli role sahip olan bir genidir. DNA hasarına yanıt olarak p53 geni hücreyi ya apoptoza götürür ya da hücre siklusunu kontrol eder. Bahsi geçen özelliklerinden dolayı da moleküler bir “genom gardiyanı” olarak adlandırılır (68). p53 geninin mutasyona uğraması ya da inaktive olması durumunda ise kanser hastalığı ortaya çıkmaktadır (67, 69). Normal koşullarda inaktif halde bulunan p53 geni DNA hasarıyla aktif hale gelir ve miktarında bir artış meydana gelir (70). p53 geninin en önemli hedefleri arasında, hücre siklusunu düzenleyen siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21WAF1 geni, Fas GADD45, Bax, IGF-BP3 ve siklin G1 gibi genler gelmektedir (68, 71).

Rodentler üzerinde yapılan bir çalışmada melatonin uygulamasının meme kanseri insidansında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (72). Yapılan in vitro bir çalışmada ise melatonin hormonunun MCF-7 hücrelerinde hem p53 hem de p21WAF1 proteinlerinin ekspresyonunu artırarak hücrelerde p53 bağımlı yol üzerinden apoptozun başlatılma olasılığını kuvvetlendirdiği tespit edilmiştir (72, 73). Ayrıca p53 geni eksik olan hücrelerin genetik açıdan kararsız olduğu ve kanserleşmeye daha yatkın hücreler oldukları belirlenmiştir (72). Melatoninin sadece meme kanseri üzerinde değil endometriyal kanser, ovaryum kanseri, Lewis akciğer kanseri, prostat kanseri ve intestinal kanserler gibi çeşitli kanser türleri üzerinde de proliferasyonu önleyici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (74-78). Melatoninin MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptoz aktivitesini doza bağımlı olarak göstermeyi hedeflediğimiz bu çalışma sonucunda p53 gen ekspresyon düzeyinin 24 saatlik melatonin inkübasyonunun ardından 1000 nM doz verilen grupta en yüksek değeri aldığı qRT-PCR ile tespit ettik. Tümör gelişiminin en önemli sebeplerinden birinin p53 geninde meydana gelen mutasyon olduğu daha önce belirtilmişti. Protein stabilizasyonundan dolayı biriken mutant p53 immünotokimyasal tekniklerle de saptanabilmektedir. İmmünotokimyasal teknikler p53 proteininin hücrel lokalizasyonunun intrasellüler dağılımının tespitinde oldukça önemlidir ve kanser hücrelerinde p53 aktivasyonunun tespiti için son zamanlarda oldukça tercih edilen bir yol olmuştur (79, 80). Yaptığımız immünotokimyasal p53 boyaması sonucunda, melatonin uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla immünotokimyasal pozitif hücre sayısında artış olduğunu tespit ettik. Bu sonuç doğrultusunda melatoninin p53 aktivasyonunu artırdığını ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde apoptozu uyardığını düşünmekteyiz.

Kanser türlerinin birçoğunda Bcl-2 protein ailesine ait olan unsurlar apoptozu inhibe etmektedir. Bu protein ailesinden Bad, Bak, Bcl-Xs ve Bax proteinleri apoptozu artırırken, Bcl-2, Bcl-XL ve Mcl-1 proteinleri apoptozu inhibe etmektedir (81, 82). Yapılan bir çalışmada pankreas kanseri üzerine uygulanan düşük konsantrasyondaki melatoninin bu hücrelerde kaspaz-9 aktivasyonunu ve Bax proteininin seviyesini artırdığı ve dolayısıyla proapoptotik süreci tetiklediği gösterilmiştir (83). Başka bir çalışmada, prostat kanseri üzerine uygulanan melatonin, Bax proteininde ve sitokrom c düzeyinde artışa, Bcl-2 proteininde ise azalmaya neden olmuştur (84). Benzer şekilde tümör hücreleri üzerinde melatoninin var olan onkostatik etkisini Bax ekspresyonundaki artış ve Bcl-2 üretimindeki azalma yoluyla gerçekleştirdiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (85, 86). Biz de yaptığımız deney sonucunda uyguladığımız melatoninin, Bax proteinindeki aktivasyonu kontrol grubuna kıyasla artırdığını immünotokimyasal çalışmalar sonucunda gördük.

SONUÇ

Sonuç olarak, östrojen pozitif meme kanseri hücrelerinde farklı dozlarda uygulanan melatonin, kanser hücrelerinde total antioksidan madde miktarında artışa, total oksidan madde miktarında ise azalmaya neden olduğunu tespit ettik. p53 gen ekspresyonundaki artış, hem qRT-PCR analizi ile hem de immünotokimyasal boyamalar ile teyit edilmiştir. Ayrıca pro-apoptotik bir protein olan Bax proteininin aktivasyonunun da melatonin uygulaması ile arttığı belirlendi. Melatonin uygulamasının meme kanseri hücreleri üzerindeki bu olumlu etkileri daha detaylı çalışmalarda farklı yönleriyle ele alınmalıdır.

Etik Komite Onayı:

Bu araştırma, ilgili tüm ulusal düzenlemelere, kurumsal politikalara ve Helsinki Bildirgesinin ilkelerine uygundur ve Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Onay Numarası: 2012 / 2012.5.1/9).

Yazar Katkıları:

Fikir – E.Ş., S.G.; Tasarım – E.Ş., S.G.; A.K.; Denetleme – E.Ş., A.K., A.Ö.; Kaynaklar – E.Ş., S.G., A.K.; Malzemeler – E.Ş., A.H., A.T., A.K., A.Ö.; Veri Toplanması ve/veya İşlenmesi – S.G., A.K., E.Ş.; Analiz ve/veya Yorum – E.Ş., S.G., A.Ö., A.K.; Literatür Taraması – S.G., E.Ş., A.K.; Yazıyı Yazan – S.G., E.Ş.; Eleştirel İnceleme – E.Ş., A.Ö., A.T., A.K.

Çıkar Çatışması:

Yazarların beyan edecek çıkar çatışması yoktur.

Finansal Destek:

Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

1. Kutlu R, Demirbaş N, Börüban MC, Güler T. Sigara içmeye atfedilebilen kanser türleri ve sosyodemografik özellikleri. *Türk Onkol Derg* 2014; 29(3): 81-8.
2. Yokuş B, Çakır DÜ. Kanser biyokimyası. *Dicle Univ Vet Fak Derg* 2012; 1: 7-18.
3. Alıcı S, İzmirli M, Doğan E. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'na başvuran kanser hastalarının epidemiyolojik değerlendirilmesi. *Türk Onkol Derg* 2006; 21:87-97.
4. The Global Cancer Observatory (GCO). <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf> (Erişim tarihi: 20.05.2022)
5. Yazıcı O, Özdemir N. Meme kanserinde epidemiyolojik veriler, risk faktörleri, risk azaltıcı yaklaşımlar. *T Klin Tıbbi Onkoloji-Özel Konular* 2018; 11(1): 1-7.
6. 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.
7. Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discov Today* 2010; 15(19-20): 842-50.
8. Şimşek F, Sevinç İ, Müftüoğlu S, Özbilgin K, Vatanserver S, Tuğlu İ. Meme kanseri hücre hatlarında propranolol ve paklitakselin anjiyogenez üzerine etkisi. *Cukurova Med J* 2019; 44(1): 144-53.
9. Karaman A. Mide kanserinde p53 tümör supresör geninin rolü. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2003; 23: 67-73.
10. Özgür MA, Şamlı H, Özgöz A, Solak M, Dilek H. Meme karsinomlarında polimeraz zincir reaksiyonu ve enzim kesimi ile p53 gen mutasyonlarının araştırılması ve dokuda immunohistokimyasal olarak p53 proteininin gösterilmesi. *Kocatepe Tıp Derg* 2006; 7(1):17-22.
11. Yılmaz E, Altunok V. Kanser ve p53 geni. *AVKAE Derg* 2011; 1: 19-23.
12. Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Ars Kay Tar Derg* 2011; 20: 145-58.
13. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-16.
14. Yerlikaya A, Dokudur H. Protein yıkımının önemi. *Uludağ Üniv Tıp Fak Derg* 2009; 35: 93-9.
15. Altunkaynak BZ, Özbek E. Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir? *Tıp Arast Derg* 2008; 6: 93-104.
16. Bircan S, Çandır Ö, Kapucuoğlu N, Başpınar Ş. p53, BCL-2, Bax expression in basal cell carcinomas and nontumoral surrounding skin. *Turk J Path* 2005; 21(3-4): 44-8.
17. Ravindra T, Lakshmi NK, Ahuja YR. Melatonin in pathogenesis and therapy of cancer. *IJMS* 2006; 60: 523-35.
18. Lissoni P, Rovelli F, Malugani F, Bucovec R, Conti A, Maestroni GJ. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuroendocrinol Lett* 2001; 22: 45-7.
19. Fernández R, Güézmés A, Sánchez-Barceló EJ. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58: 4383-90.
20. Cos S, González A, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso- González C, Sánchez-Barceló EJ. Estrogen-signaling pathway: A link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. *Cancer Detect Prev* 2006; 30: 118-28.
21. Cos S, Sánchez-Barceló EJ. Melatonin and mammary pathological growth. *Front Neuroendocrin* 2000; 21: 133-70.
22. Sánchez-Barceló EJ, Cos S, Fernández R, Mediavilla MD. Melatonin and mammary cancer: a short review. *Endocr-Relat Cancer* 2003; 10: 153-9.
23. Karabekir G, Demircan G, Özdaş Ş. Resveratrolün MCF-7 hücre soyunda apoptotik etkinin araştırılması. *FNG & Bilim Tıp Dergisi* 2017; 3(1): 27-34.
24. Mossman, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
25. Kalkan Y, Kapakin KAT, Kara A, Atabay T, Karadeniz A, Simsek N, Karakuş E, Can İ, Yıldırım S, Özkanlar S, Şengül E. Protective effect of Panax ginseng against serum biochemical changes and apoptosis in kidney of rats treated with gentamicin sulphate. *J Mol Histol* 2012; 43: 603-13.

26. Akman S, Canakci V, Kara A, Tozoglu U, Arabaci T, Dagsuyu İM. Therapeutic effects of alpha lipoic acid and vitamin C on alveolar bone resorption after experimental periodontitis in rats: a biochemical, histochemical, and stereologic study. *J Periodontol* 2013; 84: 666-74.
27. Huang HL, Hsing HW, Lai TC, Chen YW, Lee TR, Chan HT, Lyu PC, Wu CL, Lu YC, Lin ST, Lin CW, Lai CH, Chang HT, Chou HC, Chan HL. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J Biomed Sci* 2010; 17:36.
28. Duijts SFA, Faber MM, Oldenburg HSA, Beurden M, Aaronson NK. Effectiveness of behavioral techniques and physical exercise on psychosocial functioning and health-related quality of life in breast cancer patients and survivors-a meta-analysis. *Psycho-Oncol* 2011; 20: 115-26.
29. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.
30. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *PNAS* 2003; 100: 3983-8.
31. Andre F, Broglio K, Pusztai L, Berrada N, Mackey JR, Nabholz JM, Chan S, Hortobagyi GN. Estrogen receptor expression and docetaxel efficacy in patients with metastatic breast cancer: A pooled analysis of four randomized trials. *Oncologist* 2010; 15: 476-83.
32. Muss HB, Case LD, Richards F, White DR, Cooper MR, Cruz JM, Powell BL, Spurr CL, Capizzi RL. Interrupted versus continuous chemotherapy in patients with metastatic breast cancer. *NEJM* 1991; 325: 1342-8.
33. Andre F, Slimane K, Bachelot T, Dunant A, Namer M, Barrelier A, Kabbaj O, JP Spano, Marsiglia H, Rouzier R, Delaloge S, Spielmann M. Breast cancer with synchronous metastases: trends in survival during a 14-year period. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3302-8.
34. Tsuruo T, Naito M, Tomida A, Fujita N, Mashima T, Sakamoto H, Haga N. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sci* 2003; 94: 15-21.
35. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000; 256: 42-9.
36. Türk G. Kemoterapötiklerin erkek üreme sistemi üzerindeki yan etkileri ve koruyucu stratejiler. *Marmara Pharm J* 2013; 17: 73-92.
37. Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev* 2008; 1: 15-24.
38. Sainz RM, Mayo JC, Rodriguez C, Tan DX, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 1407-26.
39. Wenzel U, Nickel A, Daniel H. Melatonin potentiates flavone-induced apoptosis in human colon cancer cells by increasing the level of glycolytic end products. *IJC* 2005; 116: 236-42.
40. Eck-Enriquez K, Kiefer TL, Spriggs LL, Hill SM. Pathways through which a regimen of melatonin and retinoic acid induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 61: 229-39.
41. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
42. Winczyk K, Pawlikowski M, Lawnicka H, Kunert-Radek J, Spadoni G, Tarzia G, Karasek M. Effects of melatonin and melatonin receptors ligand N-[(4-methoxy-1H-indol-2-yl) methyl]propanamide on murine Colon 38 cancer growth in vitro and in vivo. *Neuro Endocrinol. Lett* 2002; 23: 50-54.
43. Vijayalaxmi B, Thomas CR, Reiter RJ, Herman TS. Melatonin: From basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2575-2601.
44. Brömme HJ, Mörke W, Peschke E, Ebel H, Peschke D. Scavenging effect of melatonin on hydroxyl radicals generated by alloxan. *J Pineal Res* 2000; 29: 201-8.
45. Ebel H, Peschke D, Brömme HJ, Mörke W, Blume R, Peschke E. Influence of melatonin on free radical-induced changes in rat pancreatic beta-cells in vitro. *J Pineal Res* 2000; 28: 65-72.
46. Gitto E, Tan DX, Reiter RJ, Karbownik M, Manchester LC, Cuzzocrea S, Fulia F, Barberi I. Individual and synergistic antioxidative actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferrioxamine (desferoxamine) in rat liver homogenates. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53: 1393-1401.

47. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
48. Alley MC, Scudiere DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 1988; 48: 589-601.
49. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 1987; 47: 936-42.
50. Abe K, Matsuki N. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neurosci Res* 2000; 38: 325-9.
51. Jung-Hynes B, Schmit TL, Reagan-Shaw SR, Siddiqui IA, Mukhtar H, Ahmad N. Melatonin, a novel Sirt1 inhibitor, imparts antiproliferative effects against prostate cancer in vitro in culture and in vivo in TRAMP model. *J Pineal Res* 2011; 50: 140-9.
52. Cos S, Blask DE, Lemus-Wilson A, Hill AB. Effects of melatonin on the cell cycle kinetics and "estrogen-rescue" of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Pineal Res* 1991; 10: 36-42.
53. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004; 36: 1-9.
54. Karbownik M, Lewinski A, Reiter RJ. Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 735-53.
55. Matès JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000; 153: 83-104.
56. Reiter RJ. Aging and oxygen toxicity: relation to changes in melatonin. *Age* 1997; 20: 201-13.
57. Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998; 56: 359-84.
58. Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC, Karbownik M, Calvo JR. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol Signals Recept* 2000; 9: 160-71.
59. Albarrán MT, López-Burillo S, Pablos MI, Reiter RJ, Agapito MT. Endogenous rhythms of melatonin, total antioxidant status and superoxide dismutase activity in several tissues of chick and their inhibition by light. *J Pineal Res* 2001; 30: 227-33.
60. Sırmatel F, Duygu F, Çelik H, Selek Ş, Sırmatel Ö, Gürsoy B, Eriş FN. Kronik viral hepatit olgularında total oksidatif seviye ve total antioksidan kapasitenin değerlendirilmesi. *Klinik Derg* 2009; 22: 92-6.
61. Russo IH, Russo J. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998; 3: 49-61.
62. Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *NEJM* 2001; 344: 276-85.
63. Sánchez-Barceló EJ, Cos S, Mediavilla D, Martínez-Campa C, González A, Alonso-González C. Melatonin-estrogen interactions in breast cancer. *J Pineal Res* 2005; 38(4): 217-22.
64. Kiefer T, Ram PT, Yuan L, Hill SM. Melatonin inhibits estrogen receptor transactivation and cAMP levels in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 71: 37-45.
65. Hill SM, Frasch T, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, Mao L. Molecular mechanisms of melatonin anticancer effects. *Integr Cancer Ther* 2009; 8: 337-46.
66. Osborne CK, Hobbs K, Clark GM. Effect of estrogens and antiestrogens on growth of human breast cancer cells in athymic nude mice. *Cancer Res* 1985; 45: 584-90.
67. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-6.
68. Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *PNAS* 1995; 92: 8493-7.

69. Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, Wen SF, Wang L, Kirschmeier P, Bishop WR, Nielsen LL, Pickett CB, Liu S. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 2002; 21: 2613-22.
70. Janusa F, Albrechtsena N, Dornreitera I, Wisemüller L, Grosseb F, Depperta W. The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 12-27.
71. Asker C, Wiman KG, Selivanova G. p53-Induced apoptosis as a safeguard against cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265: 1-6.
72. Schernhammer ES, Schulmeister K. Melatonin and cancer risk: does light at night compromise physiologic cancer protection by lowering serum melatonin levels? *Br J Cancer* 2004; 90: 941-3.
73. Dillon DC, Easley SE, Asch BB, Cheney RT, Brydon L, Jockers R, Winston JS, Brooks JS, Hurd T, Asch HL. Differential expression of high-affinity melatonin receptors (MT1) in normal and malignant human breast tissue. *Am J Clin Pathol* 2002; 118: 451-8.
74. Kanishi Y, Kobayashi Y, Noda S, Ishizuka B, Saito K. Differential growth inhibitory effect of melatonin on two endometrial cancer cell lines. *J Pineal Res* 2000; 28: 227-33.
75. Petranka J, Baldwin W, Biermann J, Jayadev S, Barrett JC, Murphy E. The oncostatic action of melatonin in an ovarian carcinoma cell line. *J Pineal Res* 1999; 26: 129-36.
76. Mocchegiani E, Perissin L, Santarelli L, Tibaldi A, Zorzet S, Rapozzi V, Giacconi R, Bulian D, Giraldi T. Melatonin administration in tumor-bearing mice (intact and pinealectomized) in relation to stress, zinc, thymulin and IL-2. *Int J Immunopharmacol* 1999; 21: 27-46.
77. Gilad E, Laufer M, Matzkin H, Zisapel N. Melatonin receptors in PC3 human prostate tumor cells. *J Pineal Res* 1999; 26: 211-20.
78. Anisimov VN, Popovich IG, Shtylik AV, Zabezhinski MA, Ben-Huh H, Gurevich P, Berman V, Tandler Y, Zusman I. Melatonin and colon carcinogenesis III. Effect of melatonin on proliferative activity and apoptosis in colon mucosa and colon tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2000; 52: 71-6.
79. van Gijssel HE, van Gijlswijk RP, de Haas RR, Stark C, Mulder GJ, Meerman JH. Immunohistochemical visualization of wild-type p53 protein in paraffin-embedded rat liver using tyramide amplification: Zonal hepatic distribution of p53 protein after N-hydroxy-2-acetylaminofluorene administration. *Carcinogenesis* 1998; 19: 219-22.
80. Ogawara Y, Kishishita S, Obata T, Isazawa Y, Suzuki T, Tanaka K, Masuyama N, Gotoh Y. Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J Biol Chem* 2002; 277: 21843-50.
81. Hishikawa K, Oemar BS, Tanner FC, Nakaki T, Lüscher TF, Fujii T. Connective tissue growth factor induces apoptosis in human breast cancer cell line MCF-7. *J Biol Chem* 1999; 274: 37461-6.
82. Naumovski L, Clean ML. Bcl-2 Inhibits apoptosis associated with terminal differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells. *Blood* 1994; 83: 2261-7.
83. Leja-Szpak A, Jaworek J, Pierzchalski P, Reiter RJ. Melatonin induces pro-apoptotic signaling pathway in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1). *J Pineal Res* 2010; 49: 248-55.
84. Joo SS, Yoo YM. Melatonin induces apoptotic death in LNCaP cells via p38 and JNK pathways: therapeutic implications for prostate cancer. *J Pineal Res* 2009; 47: 8-14.
85. Jang SS, Kim WD, Park WY. Melatonin exerts differential actions on X-ray radiation-induced apoptosis in normal mice splenocytes and Jurkat leukemia cells. *J Pineal Res* 2009; 47: 147-55.
86. Cucina A, Proietti S, D'Anselmi F, Coluccia P, Dinicola S, Frati L, Bizzarri M. Evidence for a biphasic apoptotic pathway induced by melatonin in MCF-7 breast cancer cells. *J Pineal Res* 2009; 46: 172-80.