

**GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EHRİCH SOLİD TÜMÖRLÜ  
FARELERDE MELATONİN VE GECE  
IŞIK UYGULAMASININ  
KARŞILAŞTIRMALI ETKİSİ**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ZELİHA YILDIRIM  
AĞUSTOS 2011**

**Ehrlich Solid Tümörlü Farelerde Üzerinde  
Melatonin Ve Gece Işık Uygulamasının  
Karşılaştırmalı Etkisi**

**Gaziantep Üniversitesi  
Biyoloji Bölümü  
Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman  
Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN**

**Zeliha YILDIRIM  
AĞUSTOS 2011**

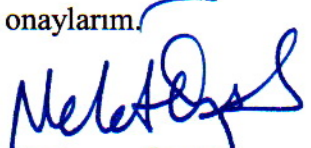
T.C.  
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tezin Adı: Ehrlich Solid Tümörlü Fareler Üzerinde Melatonin ve Gece Işık  
Uygulamasının Karşılaştırmalı Etkisi  
Öğrencinin, Adı Soyadı: Zeliha YILDIRIM  
Tez Savunma Tarihi: 01.08.2011

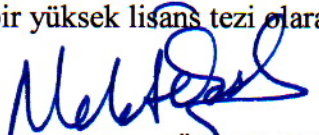
Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

  
Prof. Dr. Ramazan KOÇ  
FBE Müdürü

Bu tezin yüksek lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylıyorum.

  
Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN  
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN  
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

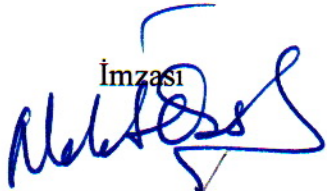
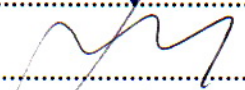
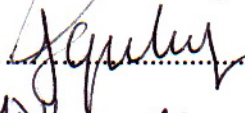
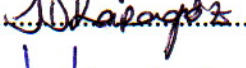
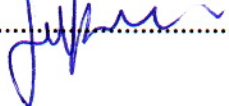
Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Prof. Dr. İbrahim SARI

Doç. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER

Yrd. Doç. Dr. I. Didem KARAGÖZ

Yrd. Doç. Dr. İ.Halil KILIÇ

İmzası  
  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....

## ÖZET

### EHRLICH SOLİD TÜMÖRLÜ FARELER ÜZERİNDE MELATONİN VE GECE IŞIK UYGULAMASININ KARŞILAŞTIRMALI ETKİSİ

YILDIRIM, Zeliha  
Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü  
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN  
Ağustos 2011, 71 sayfa

Bu çalışmada melatoninin *Swiss albino* türü farelerde oluşturulan Ehrlich solid tümör üzerine olan antitümöral etkisi araştırılmıştır. Çalışmada 80 adet *Swiss albino* türü erkek fareden oluşan beşi aydınlık ve beşi karanlık olmak üzere 10 grup oluşturulmuştur. (+) Kontrol grubu hariç tüm hayvanlara 0.2 ml NaCl çözeltisi içinde 1/1 hacimde hazırlanarak  $1 \times 10^6$  EAT i.p. olarak enjekte edilerek EST oluşturulmuştur. Deney gruplarına 1ml 8 mg/kg/gün, 12 mg/kg/gün, 16 mg/kg/gün melatonin i.p. yolla her gün enjekte edilmiştir. Melatonin uygulamaya başlama zamanından 2 gün sonra EAT inoküle edilerek EST oluşturulmuş ve uygulamaya 14 gün devam edilmiştir. Melatonin uygulaması akşam 18:00-20:00 saatleri arasında yapılmıştır. Ayrıca gece 02:00-04:00 saatleri arasında bazı gruplar 580  $\mu$ W floresan ışığa maruz bırakılmıştır. Deney süresince tüm grupların kilo değişimleri kaydedilmiştir. Deneklerde biyokimyasal parametrelerden MDA ve GSH' a, patolojik olarak ise nekroz alanı ve tümör çapına bakılmıştır. Aydınlık ve karanlık grupların MDA-GSH değerlerinde istatistiksel olarak önemli bir değişim olmazken ( $p > 0,05$ ), karanlık grupların tümör çapı ve nekroz alanlarında artış gözlenmiştir. Grup K2, K3, K4'te tümör oluşumundan dolayı kilo artışı tesbit edilmiştir. 15.günde tüm hayvanlar sakrifiye edilerek doku örnekleri alınmış ve Hematoksilen-eozin boyamasını takiben patolojik incelemeleri yapılmıştır. Patolojik değerlendirmeler neticesinde de melatoninin EST oluşumunu tetikleyici etkisi olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Melatonin, Ehrlich, antitümöral, *Swiss albino*.

## ABSTRACT

### THE COMPARISON EFFECT OF MELATONIN AND NIGHT LIGHT APPLICATION IN MICE WITH EHRLICH SOLID TUMORS

YILDIRIM, Zeliha

M.Sc. in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

August 2011, 71 pages

In this study, antitumoral activity of melatonin was investigated in Swiss albino mice with Ehrlich solid tumor. 80 male Swiss albino mice were divided into ten groups: five of them were light groups and the rest were dark groups (n=8). Except (+) control group, all the groups were injected with  $1 \times 10^6$  EAC intraperitoneally to develop ascites tumor. Experimental groups were injected i.p 8 mg/kg/day, 12 mg/kg/day, 16 mg/kg/day melatonin daily. After 2 days beginning of melatonin application, EAT was inoculated to develop EST. Then melatonin was given for fourteen days. Melatonin was applied between the hours of 18:00-20:00 at night. In addition to, some groups were exposed to fluorescent light 580 uW between the hours 2:00-04:00 at night. Animals' body weight changes were recorded in all groups during the experiment. At the result of study, MDA and GSH were measured from blood samples and necrosis area and tumor size from tumor tissue. Although changes between MDA and GSH parameters of light and dark groups were not different ( $p > 0,05$ ) tumor size and necrosis area of dark groups were different from light group ( $p < 0,05$ ). Body weight gains of group K2, K3 and K4 were related with tumor burden. On the fifteenth day, all animals were sacrificed and tumor tissues were discarded and stained with haematoxylin-eosin for pathological studies. In conclusion, melatonin has trigger effect against to Ehrlich solid tumor.

**Key Words:** Melatonin, Ehrlich, antitümöral, *Swiss albino*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen sevgili hocam ve danışmanım Sayın Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN'a,

Çalışmalarında maddi ve manevi desteğini gördüğüm her türlü konuda bilgilerini ve deneyimlerini benden esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ ve Yrd. Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ' a,

Çalışmamın patolojik değerlendirmelerini gerçekleştiren ve yorumlarıyla ufkumu açan Prof. Dr. Suna ERKILIÇ' a,

Çalışmamın biyokimyasal değerlendirmelerini gerçekleştiren ve desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen Doç. Dr. Seyithan TAYSI' ye,

İstatiksel analizlerde bana yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Alihan ÇOKKIZGIN' a,

Ayrıca, Biyolog İzzettin GÜLER ve Ahmet ÇAKMAK 'a,

Varlıklarından güç aldığım sevgili annem, babam ve kardeşlerime, ayrıca maddi ve manevi her zaman yanımda olan sevgili ablam Aydan TÜRKMENOĞLU' na,

En içten şükranlarımı sunuyorum.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa no</b>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iv
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	vi
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	ix
<b>BÖLÜM 1 : GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Deneysel Kanser Modellerinin Tarihçesi.....	3
1.2. Ehrlich Asit Tümörü (EAT).....	4
1.3. Kemoterapi.....	6
1.4. Dünyada Kanser İstatistikleri.....	8
1.5. Melatonin Hakkında Genel Bilgi .....	9
1.5.1. Tanımı ve Yapısı .....	9
1.5.1.1. Melatonin Tarihçesi.....	11
1.5.1.2 Sentezi.....	13
1.5.1.3. Etki Mekanizması.....	14
1.5.1.4. Serbest radikallere karşı savunmada melatoninin rolü.....	15
1.5.2. Melatoninin Etkileri .....	17
1.5.2.1. Melatonin sentezinde aydınlık-karanlık kontrolü ve fotoperiyodizm .....	17
1.5.2.2. Melatoninin Merkezi Sinir Sistemi Üzerine Etkileri .....	18
1.5.2.3. Melatoninin İmmün Sistem Üzerine Etkileri .....	19
1.5.2.3.1. Melatoninin Bağışıklık Sistemine Etkisi.....	20
1.5.2.3.2. Lenfoid Dokulara Etkisi.....	21
1.5.2.3.3. Humoral Bağışıklığa Etkisi.....	21
1.5.2.3.4. Hücresel Bağışıklığa Etkisi.....	22
1.5.2.4. Yaşlanma ve Melatonin .....	23
1.5.2.5. Melatoninin Anti-apoptotik Etkileri.....	23

1.5.3.Melatonin ve Kanser .....	24
<b>BÖLÜM 2 : LİTERATÜR ÖZETLERİ.....</b>	<b>26</b>
<b>BÖLÜM 3 :MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>32</b>
3.1.Araç ve Gereçler .....	32
3.1.1. Kimyasal Maddeler.....	32
3.1.2.Cihazlar ve Diğer Gereçler.....	32
3.1.3. Araştırmada Kullanılan Deney Hayvanları.....	33
3.2.Yöntemler .....	33
3.2.1. <i>Swiss albino</i> Türü Farelerde Ehrlich Solid Tümörünün (EST) Oluşturulması.....	33
3.2.2. Melatonin Hazırlanışı.....	34
3.2.3.Melatoninin Ehrlich Solid Tümör Modellemesi Üzerine Etkisi	34
3.2.4. Oluşturulan Gruplar ve Yapılan İşlemler.....	34
3.2.4.1. Aydınlık Gruplar.....	34
3.2.4.2. Karanlık Gruplar.....	35
3.3. Tümör Gelişiminin Takip Edilmesi .....	36
3.4. Biyokimyasal Analizler.....	36
3.4.1.Malondialdehit (MDA) Ölçümü.....	36
3.4.2.Total Glutasyon (TGSH) Ölçümü .....	38
3.5. Histo-Patolojik Değerlendirme.....	39
3.6. İstatiksel Analizler	39
<b>BÖLÜM 4 :ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>40</b>
4.1. Deneklerin Ağırlık Değişiminin Takipi İle İlgili Bulguları.....	40
4.2.Biyokimyasal Bulgular.....	41
4.3.İmmünohistopatolojik Bulgular.....	43
<b>BÖLÜM 5 : TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>50</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>55</b>



## ŞEKİLLER LİSTESİ

	<b>Sayfa no</b>
<b>Şekil 2.1.</b> Pineal Bez	15
<b>Şekil 2.2.</b> Pineal gland'da melatonin sentezinin kontrolü.....	17
<b>Şekil 2.3.</b> Melatonin Hormonunun Sirkadiyen Ritmi .....	22
<b>Şekil 4.1.</b> Işık verilen gruplar ile karanlık grupların kanlarındaki GSH miktarları.....	46
<b>Şekil 4.2.</b> Işık verilen gruplar ile karanlık grupların kanlarındaki MDA miktarları .....	47
<b>Şekil 4.3.</b> I.Gruba Ait Tümör Hücreleri Tarafından İnvaze Olmuş Doku Kesiti .....	49
<b>Şekil 4.4.</b> II.Gruba Ait Tümör Hücreleri Tarafından İnvaze Olmuş Doku Kesiti.....	50
<b>Şekil 4.5.</b> III.Gruba Ait Tümör Hücreleri Tarafından İnvaze Olmuş Doku Kesiti.....	50
<b>Şekil 4.6.</b> IV.Gruba Ait Tümör Hücreleri Tarafından İnvaze Olmuş Doku Kesiti.....	51
<b>Şekil 4.7.</b> V.Gruba Ait Tümör Hücreleri Tarafından İnvaze Olmuş Doku Kesiti .....	52
<b>Şekil 4.8.</b> VI.Gruba Ait Tümör Hücreleri Tarafından İnvaze Olmuş Doku Kesiti .....	52
<b>Şekil 4.9.</b> VII.Gruba Ait Tümör Hücreleri Tarafından İnvaze Olmuş Doku Kesiti .....	53
<b>Şekil 4.10.</b> VIII.Gruba Ait Tümör Hücreleri Tarafından İnvaze Olmuş Doku Kesiti .....	54

## TABLolar LİSTESİ

	<b>Sayfa no</b>
<b>Tablo 3.1.</b> DeneY Hayvanlarına Verilen Yemin Bileşimi .....	33
<b>Tablo 4.1.</b> Değişik Dozlarda Melatonin Uygulaması ile <i>Swiss albino</i> Türü Farelerde Gözlenen Ağırlık Değişimleri .....	40
<b>Tablo 4.2.</b> Deneklerde görülen tümör çapları .....	43
<b>Tablo 4.3.</b> Deneklerin nekrozların alan ölçümleri .....	44

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ALL	: Allopurinol
BCG	: Bakteriyel Orjinli Klasik Adjuvant
BP	: Benzapirone
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
CAT	: Katalaz
C-AMP	: Siklik Adenozine Monofosfat
CBA	: Sitometrik Boncuk Dizisi
CCL-4	: Karbon Tetra Klorid
CEL	: Seleksoksib
COX-2	: Yüksek Protein
DCHF – Da	: 2',7'-diklorflorosken-diasetat
DMBA	: Dimetilbenzanthracene
DPI	: Dipenilyodinyum
DTNB	: 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
EAT	: Ehrlich Ascites Tümör
EACF	: Ehrlich Ascites Karsinoma Faktörü
EST	: Ehrlich Solid Tümör
ER	: Östrojen Reseptörü
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GOS	: Reaktif oksijen türleri
<sup>3</sup> H	: Timidine
4- HDA	: 4- Hidroksilalken
HIOMT	: Hidroksi İndol O- Metil Transferaz
6- HMS	: 6- Hidroksimelatoninsülfat
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi
H- TERT	: Human Telomerase Reverse Transcriptase
L-BSO	: L- Buthionine - Sulfoksimik

LL	: Sürekli ışık
LPO	: Lipoperoksidasyon
MCF -7	: Meme Tümörü Hücresi
MDA	: Malondialdehit
MEL	: Melatonin
MMP-9	: Metallaproteinaz-9
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	: Sodyum Karbonat
NAC	: N-Asetil Sistein
NACl	: Sodyum Klorür
NAT	: N - Asetiltrensferaz
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
β – NADPH	: Nikotinamide-Adenin Dinükleotide Fosfat
PARP	: Poli ADP Ribose Polimeraz
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCSS	: Perikriptal Kolonik Stroma
PDTC	: Pirulodin Dithiokarbamat
PKA	: Protein Kinaz A
PKC	: Protein Kinaz C
4P – PDOT	: 4 Fenil- 2- Propionamidotetralin
p – 38 MAPK	: Aktif Mitojen Protein Kinaz
ROS	: Reaktif Oksijen
SCGE	: Tek Hücre Jel Electroforezi
SCN	: Süprakiyazmatik Nükleus
SF	: Serum Fizyolojik
SHR	: Sabit Hibrid Yayılımı
SK-MEL-1	: İnsan Melanoma Hücresi
SKN	: Sirkadiyen Ritim
SOD	: Süper Oksit Dismutaz
SSCP	: Tek Sarmal Konformasyon Polimorfizmi
ROS	: Reaktif Oksijen
TSTA	: Tümör Spesifik Tranplantasyon Antijeni

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Kanser, hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına yol açan metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdikleri, çok basamaklı bir süreçtir. Bu değişiklikler hücre çoğalmasını ve ömrünü, komşu hücrelerle ilişkileri ve immün sistemden kaçma kapasitesini kontrol eden modifikasyonlar sonucu ortaya çıkar. Kanser üzerine yapılan araştırmalar oldukça uzun bir geçmişe dayanmaktadır. Bu konu ile ilgili çalışmalar, 14. yy'dan bu yana devam etmektedir. Söz konusu zaman zarfında araştırmalar için çeşitli kimyasal bileşiklerden yararlanarak model oluşturmanın yanında onkolojik bakımdan anlamlı ilerleme kaydedebilmek için kemoterapötik açıdan somut sonuçlara ulaşmak gerekmiştir. İşte bu noktada, deneysel çalışmaların mutlak gerekliliği karşımıza çıkar. Bu konuda önemli olabilecek ilk kayıtlar, 1889 yılında yapılan tümör çalışmalarından elde edilmektedir (Sugiura, 1962). Onkoloji çalışmalarında kullanılan spontan veya indüklenen tümör modelleri için çok sayıda hayvan ve fazla miktarda maddi olanak ile uzun zaman gerektiğinden, birçok araştırmacı tarafından daha az tercih edilmişlerdir. Bunun yanında transplante edilebilen tümörler, söz konusu dezavantajları avantaja çevirdiği için daha çok kullanılır olmuşlardır. Dolayısıyla özellikle 1950'li yıllardan sonra transplante edilebilen tümörlerin oluşturduğu modellerin tercih edildiği kanser araştırmaları ön plana çıkmaktadır (Zeybek, 1996).

Bu çalışmada kullandığımız tümör modeli EST (Ehrlich Ascites Tumor, Ehrlich Asit Tümörü), transplante edilebilir bir tümör modelidir ve farelere özgü olmasından (Kaleoğlu ve İşli, 1997) dolayı EST'nin çalışılması tümör değerlendirmesi ve izlenmesi açısından kolaylık sağlar. Çalışmamızda, çok agresif bir tümör olan EAT'nin solid formu kullanılmıştır. Klinik durumlarda, asit oluşumu genellikle yumurtalık kanseri gibi ilerlemiş kanserli hastalarda sıklıkla gözlenir (Mycek vd., 1998). İntraperitoneal dağılım gösteren asit birikimi bir kez oluştuğu zaman prognoz kötüdür. Abdominal parasentez hastanın semptomlarını azaltmak için geliştirilir.

Dünyanın birçok bölgesinde halen ilk üç ölüm sebebi arasında yer alan kansere çözüm bulabilmek bir yana, hastalığın seyrini düzeltmek ve yaşam süresini biraz olsun uzatmak bile önemli görülmektedir. Kanser, hücrenin normal yaşam döngüsünü kontrol altında tutan gen dengesinin bozulması sonucu düzensiz ve ölümsüz yaşam döngüsüne geçerek homeostazise zarar verir hale gelmesi olarak özetlenebilir.

Birçok bilim adamı kansere karşı çözüm planları geliştirebilmek üzere çalışmalarına devam etmektedir. Bu gibi planlar arasında gündeme gelen alternatiflerden birisi de melatonindir. O tarihlerden günümüze azımsanmayacak sayıda çalışma yapılmış olup melatoninin bir yandan doğrudan anti-kanser etkinlik gösterebileceği bilgisi yanında, kronobiyolojik düzenleyici, antioksidan ve bağışıklık sistemini destekleyici özelliklerinin de kanserle ilişkili olabileceği değerlendirilmiştir. Günümüz insanının hayat tarzı ve beslenmesindeki değişiklikler ve endüstrileşme çeşitli hastalıkların yoğun bir şekilde artışına neden olmuştur. Gece vardiyası dünya genelinde 100 milyondan fazla insanı etkileyen ilave bir sağlık riski olarak ortaya çıkmıştır. Çalışmalar, uyku bozuklukları, halsizlik, kardiyovasküler hastalıklar ve belirli kanser türlerinin gece vardiyası çalışanlarında gündüz çalışanlarına göre daha sık görüldüğünü ortaya çıkarmıştır. Bu hastalıkların insidansları normalde yaşla beraber arttığı için, gece vardiyası hızlandırılmış insan yaşlanması modeli olarak kabul edilebilir. Gece vardiyası ile ilişkili hastalıkların patofizyolojik mekanizmalarından birisi bozulmuş nörolojik ve hormonal düzenlemelerdir, bunlardan en önemlisi de otonomik sinir sisteminin ve pineal bezden melatonin salınımının bozulmasıdır (Korkmaz ve Tamura, 2008).

Araştırmalarda melatoninin birçok kanser türü üzerindeki etkinliğinin ortaya konmasının yanı sıra klasik kanser tedavileriyle beraber kullanımının genel durumu düzelttiği, klinik cevabı ve yaşam süresini artırdığı ortaya konmuştur. Bu veriler, elde edilmesi kolay ve ucuz bir molekül olan melatoninin, genel olarak hiçbir ciddi yan etkisine rastlanmamış olması ve toksik doz güvenlik sınırlarının da yüksek olması nedeniyle, kanser hastalarında destekleyici olarak kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir. (Topal vd., 2009)

Bu çalışmanın amacı melatonin kullanımını daha iyi anlamaktır. Bu nedenle çalışmada melatonin anti-tümöral etkilerini *Swiss albino türü erkek* farelerde oluşturulan ehrlich solid tümörü (EST) üzerinde in vivo da test etmek amaçlanmıştır.

Yapılan literatür taramalarında melatonin gece karşılaştırmalı etkisinin deneysel bir tümör modeli üzerine in vivoda anti-tümöral etkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, çalışmada *Swiss albino* türü erkek farelerde oluşturulan solid tümör dokusunda melatonin anti-tümöral etkisi gözlemlenmiştir.

### **1.1.Deneysel Kanser Modellerinin Tarihçesi**

Erken dönem tıbbi kayıtlar incelendiğinde kanserin bir hastalık olarak tanımlanması tıp tarihi kadar eskidir. Kanserin açıklanmaya çalışıldığı yaklaşık 7 adet papirus incelendiğinde, bu konuda bir dereceye kadar bilgi edinilebilmektedir. Kanser çalışmalarıyla ilgili ilk yazılı kaynaklar olan bu papiruslar ancak 19.yy'da aydınlatılabilmektedir. Yedi adet papirus içinde önemli yer tutan Edwin Smith ve Georgem Ebers papiruslarından anlaşıldığı üzere M.Ö. 2500'lü yıllarda ilk kanser araştırmaları başlamış, M.Ö.1600 civarında ise bu araştırmalar yazılı dökümanlar halinde toplanmıştır.

M.Ö.400'lü yıllara gelindiğinde özellikle Yunanistan ve Roma'da Hipokrat ve Galen gibi büyük hekimlerin içinde bulunduğu araştırmacı doktorların kanser tanımlaması ve tedavisinde önemli gelişmeler kaydettikleri göze çarpmakta, kanserin tehlikeli olan veya olmayan formları bulunduğu bahsedilmektedir.

Bu dönemde Hipokrat tümörü bir yengece benzettiği için kansere; Yunanca'da yengeç anlamına gelen "karkinoma" (karsinoma) adını vermiştir. Hipokrat'a göre tümörün bir merkezi yapısı (gövdesi) bulunmakta ve bu yapıdan çıkan kolları ile tümör etkisini vücudun çeşitli bölgelerine ulaştırmaktadır.

Hipokrat ve Galen'in hızlı ilerleme gösteren çalışmalarından etkilenen İstanbul, Kahire, İskenderiye ve Atina'daki diğer hekimler araştırmalarını kanser üzerine yoğunlaştırmışlardır. M.S.1000'li yılların başlarında Türk alimi İbn-i Sina'nın kısaca "Kanun" diye adlandırılan ve 12.yy'da Latinceye de çevrilen eserinde tedavi ve farmakolojik açıdan kansere yaklaşımı göze çarpmaktadır.

Beyaz arsenik ve arap zatkından oluşan bir merhem ile 16.yy'a gelindiğinde kanserli derinin tedavisinde uygulamalar yapılmıştır (Marsden' in merhemi). Canlı organizmaların yapı, fonksiyon ve kimyasının aydınlatılmasıyla birlikte kimyasal karsinojenler, hücre kültürü, tanı teknikleri, kemoterapi ve genetik manipölasyonlar gibi alanlarda 20.yy'ın erken dönemlerinden itibaren "günümüzde dahil" kanser araştırmaları hız kazanmıştır.

Diğer yandan 19.yy' la beraber, özellikle kimyasal karsinojenlerin kullanıldığı, ilk kayıtlı, deneysel kanser çalışmaları göze çarpmaktadır. Edinburgh Üniversitesi bünyesinde tavşanlarda meme kanseriyle ilgili araştırmalar 1874-1878 yılları arasında yapılmış, 1910-1915 yıllarında ise; Jensen, Murray, Ehrlich, Little gibi bilim adamlarının geliştirdiği deneysel kanser modelleri (spontan veya indüklenmiş tümör modelleri) kullanılmaya başlanmıştır..

Ehrlich, 1907 yılında, albino bir farenin meme bezinden çıkartılan Ehrlich Mouse Carcinoma'dan türetilen EAT modelini ortaya koymuştur. Tokyo Üniversitesi'nden 1911 yılında tavuklarda viral kaynaklı kanser modeli uygulamaları olmuştur. Tokyo Üniversitesi'nde 1915 yılında tavşan derisine ilk defa kimyasal karsinojen (kömür katranı) uygulanmıştır. Jensen'in 1910-1915 yıllarında "Jensen Rat Sarcoma'yı deneysel kanser çalışmalarına kazandırdığı görölmektedir. Wilm'in, transplante edilebilen sıçan renal tümörünü kullanmaya başlamasıyla 1950'li yıllardan sonra transplante tümör modelleri ön plana çıkmıştır. Bununla birlikte ortaya konan değişik tümör modellerinin gelişimi ile birlikte çeşitli anti-karsinojen ajanların denenmesinde hızlı bir artış gözlenmiştir. Gilman'ın lenfomaya karşı alkillenmiş ajanlarla yaptığı sistemik kanser tedavisi ilk önemli ilaç etkilerini 1940'lı yılların ortalarında ortaya koymuştur (Zeybek, 2003).

## **1.2. Ehrlich Asit Tümörü (EAT)**

Günümüzde de tedavide başarılı olmak ve kansere karşı yeni yöntemler geliştirmek üzere yapılan çalışmalar deney hayvanlarında oluşturulan bu deneysel hayvan tümörleri üzerinde sürdürölmektedir. Elde edilişinden bu yana pek çok araştırmaya konu olan deneysel hayvan tümörlerinden biri olan EAT, ilk olarak dişi bir farede spontan meme adenokarsinoması olarak ortaya çıkmış ve Ehrlich & Apolant (1905) tarafından tümör parçaları fareden fareye deri altına transplante edilerek deneysel



tümör haline getirilmiştir. Loewenthal ve Jahn (1932) bu tümörün farelerin peritonunda sıvı halde büyüyen formunu elde etmeyi başarmışlar ve peritonda hücrelerin yanı sıra asit sıvısı da olduğu için tümör Ehrlich Ascites Tümörü adını almıştır. Lettre vd. (1972) yaptığı çalışmalarla 2. Dünya savaşı sırasında hem bu tümörün devamını sağlamış hem de tümörü kalitatif ve kantitatif bakımdan kanser araştırmaları için uygun bir test sistemi haline getirmiştir. EAT hücreleri 1948 yılından sonra araştırmalarda kullanılmak üzere hızla dünyadaki araştırma enstitülerine yayılmıştır. EAT diferansiye olmamış bir tümördür. Transplante edilebilme oranı yüksek olan, regresyon göstermeyen, hızlı proliferasyona, kısa yaşama süresine sahip, %100 ölüme götüren ve immünolojik açıdan tümör spesifik transplantasyon antijenleri (TSTA)' ne sahip olmayan (Kaleoğlu ve İşli, 1977) bu tümörün orijinali hiperdiploiddir. Haucscka 1953'te (Lettre vd., 1972), kromozom sayısı tetraploid olan bir alt soy elde etmiştir.

EAT'nin sıvı formunun elde edilmesiyle birlikte, çalışmalarda yoğun bir şekilde sıvı tümör kullanılmıştır. Kullanımdaki yoğunluğun nedeni, sıvı formun serbest tümör hücrelerini içeren süspansiyon şeklinde olması ve bunun sonucunda istenilen sayıdaki hücrenin bir başka hayvana transplante edilebilmesidir (Klein,1951). EAT amaca göre asit form veya solid form olarak kullanılmaktadır. Eğer tümör hücresi içeren asit sıvısı deney hayvanına i.p. yolla enjekte edilirse asit form, s.c. yolla enjekte edilirse solid form elde edilir. EAT hücreleri, farelerin peritoneal boşluğunda süspansiyon halinde çoğalırlar ve in vitroda yapay yüzeylere yapışmazlar (Aktaş, 1996). Pasajdan 4-6 gün sonra asit oluşmaya başladığı anlaşılabilir ve toplam 5-12 cc asit teşekkül eder (Gümüşhan, 2002).

EAT hücrelerinin sayıları çoğalma periyodu boyunca hızlı hücre bölünmeleri ile artar ve periton boşluğunu doldururlar. Tümör hücrelerindeki bu çoğalmaya paralel olarak asit sıvısının birikimi de meydana gelir. Belli bir zaman sonra da konak hayvan hem tümör hacminin oluşturduğu basınç hem de tümörün organizmaya verdiği hasar sonucunda ölür. Çoğalma fazından plato fazına geçişleri boyunca EAT hücrelerinin canlılık oranlarında önemli bir azalma ortaya çıkmamaktadır (Schmidt vd., 1991).

### 1.3.Kemoterapi

Modern tıpta kanser tedavisi için kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi gibi birkaç metot oluşturulmuştur. Kemoterapi günümüzde kanser tedavisinin en etkili metodu olarak düşünülmektedir (Ajith ve Janardhanan, 2003).

Her yıl 1 milyon yeni kanser hastası teşhis edilmektedir. Bu hastaların %25'inden azı tek başına cerrahi ve/veya radyoterapi ile tedavi edilebilmektedir. Geriye kalan hastaların büyük bir bölümüne hastalığın herhangi bir evresinde kemoterapi uygulanmaktadır. Kanser hastalarının küçük bir bölümünde (yaklaşık %10) kanserin tipi nedeniyle kemoterapi ile tam şifa veya uzun bir iyileşme dönemi (remisyon) sağlanabilmektedir. Kanser hastalarının ortalama 5 yıl yaşama şansları yaklaşık %40 kadardır ve kardiyovasküler sisteme ait hastalıklardan sonra kanser, ölümlerin en sık ikinci nedenidir (Mycek vd., 1998). Kanser ilaçla tedavisi anlamına gelen kemoterapinin ana ilkesi tümör hücrelerine, hastanın normal hücrelerinden daha fazla etki ederek normal hücrelere zarar vermeden veya minimum düzeyde etki ederek tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak veya onları yok etmektir (Kayaalp, 1996). Dolayısıyla amaç, kullanılan ilaçlarla tümörün büyümesini engelleyecek letal toksik etki sağlamaktır. Genellikle hücre replikasyonunu sağlayan metabolik olayların engellenmesi amaçlanır. İdeal olarak bu ilaçların sadece malign hücreleri etkilemesi amaçlanır. Ancak kullanımda olan ilaçlar kanser hücrelerine spesifik etki gösterememekte ve proliferen olan tüm normal ve anormal hücreleri etkilemektedirler. Bu nedenle kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçların hepsinin toksik ve tedavi edici etkilerinin doz yanıt eğrileri diktir. Kemoterapinin amacı tam şifa sağlanmasıdır. Bunun anlamı uzun dönemde hastalığın tekrarlanmamasıdır. Şifa için tüm neoplastik hücrelerin vücuttan temizlenmesi gerekir. Eğer şifa sağlanamazsa tedavi palyatiftir yani hastalığa bağlı şikayetlerin giderilmesine ve yaşamı tehdit eden toksisiteden korunmasına yöneliktir. Bu sayede hastanın mümkün olduğu kadar normale yakın yaşaması sağlanmaya çalışılır. Bu yüzden, eğer tümör yayılmış ve cerrahi olarak tedavi edilmesi mümkün değilse kemoterapi uygulanır. Aynı zamanda, mikro-metastazların önlenmesi için cerrahi veya radyasyon tedavisinden sonra uygulanmaktadır. Kemoterapiye en duyarlı olan tümörler iyi diferansiye olmamış ve hızlı büyüyen tümörlerdir (Mycek vd., 1998). Bununla birlikte, birçok kanser kemoterapötikleri hastanın normal hücrelerini ciddi şekilde etkiler (Mascarenhas,

1994). Örneğin; günümüzde kanser tedavisinde sitostatikler intraselüler hedeflere odaklanmıştır ve etki mekanizmaları doğal hücre hasarına dayanmaktadır. Fakat bu ilaçlara bazı tümör türlerinin dirençli olması ve yine bu ilaçların normal hücrelerde de ciddi hasarlar oluşturması (hepatotoksik, nefrotoksik, kardiyotoksik v.b. etkiler) kanser tedavisinde yeni seçenekler arama zorunluluğu getirmiştir (Solni vd., 1998). Bilim adamları kanserle ilgili çalışmalarda ideal ilacı, yani normal hücreye en az düzeyde etki yapan ilacı bulmak odağında yoğunlaşmışlardır (Gümüşhan, 2002). Bu yüzden, günümüzde doğal ürünlerin kullanımının kanser kontrolü ve yok edilme programında çok değerli olduğu düşünülmektedir. Kanser kemoterapisi henüz yarım yüzyıllık bir klinik geçmişe sahip olmasına rağmen, bu amaçla kullanılmak üzere binlerce kimyasal madde incelenmiştir. Ancak çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılan bu kimyasal maddelerden bugün sadece çok azı kanser kemoterapisinde ilaç olarak kullanılmaktadır. Kemoterapinin başlıca eksiklerinden biri immün sistemin baskılanmasıdır. Geniş çeşitlilikteki bileşikler, immün cevapları etkinleştirme kabiliyetindedirler. BCG gibi bakteriyel orijinli klasik adjuvantların kanser tedavisinde terapötik etki oluşturduğu gösterilmiştir. Fakat etki, yüksek dozda BCG verildiğinde tümör gelişiminin artışı, hepatik granuloma indüksiyonu, karaciğer disfonksiyonu gibi hastada çok sayıda istenmeyen yan etkiye bağlı olarak sınırlıdır (Ribi vd., 1981). Levamizol ve interferonlar gibi kimyasal ajanlar 1970'lerin ortalarında ve 1980'lerin başlarında kanser tedavisi için geniş kullanım alanı bulmuştur (Gomi vd.,1983). İmmünolojik etkilere rağmen yardımcı olarak levamizol (Stevenson vd., 1991), sadece levamizol tedavisi yada interferonlu kombinasyonu (Kirkwood ve Ernstaff, 1990) hiçbir önemli klinik yarar göstermemiştir. Sitokinler hem humoral hem de hücre aracılı immün cevapların etkili fonksiyonları ve indüksiyonunda kritik rol oynarlar. Kanser hastalarının tedavisinde IL-2, IL-4, IL-7'nin immün modülatör özelliği, kullanımlarını arttırır. Fakat KVS toksisitesi, pulmoner toksisite, hematolojik toksisite gibi tek ve farklı yan etkileri kullanımlarını sınırlar (Rosenberg vd., 1994). Uzun periyotta yan etkisiz yada az yan etkili kullanılabilen immün modülatörler kanser tedavisinde takdir edilir kullanımdadırlar. Bazı medikal bitkilerin farklı yollarla immüniteyi tetiklediği gösterilmiştir. Spesifik hücrel ve humoral immün cevabı arttırdıkları gösterilmiştir (Duke, 1985). Düşük toksisite ve yüksek medikal etkilerinden dolayı bitkisel ilaçları kabul etmek için büyüyen bir akım vardır. Bitkilerin medikal öneme sahip oldukları bir çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Quasney vd., 2001).

#### **1.4. Dünyada Kanser İstatistikleri**

Dünyada kanser hastaları ile ilgili sayım yapma ve veri toplama isteği 1728 yılında Londra'da genel nüfus sayım idaresince yapılan bir çalışma ile başlamış ve bu tarihten itibaren farklı ülkelerdeki çalışmalar ile devam etmiştir.

Danimarka'da 1943, Macaristan'da 1952, Finlandiya ve Almanya'da 1953 yıllarında toplum tabanlı kanser kayıt sistemleri veri toplamaya başlamışlardır.

Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan standardizasyon çalışmaları ve 1948 yılında yayınlanan ICD (International Classification of Diseases) 'nin 6. Baskısı sonrasında kodlama sisteminin çeşitli ülkelerde benimsenmesi ile 1992 yılı itibariyle 52 ülkede 266 adet toplum tabanlı kanser kayıt sistemi oluşmuştur. Bu ülkelerdeki çalışmalar düzenli olarak "5 Kıtada Kanser İnsidansı" (Cancer Incidence in Five Continents) isimli Dünya Sağlık Örgütü yayınında özetlenmektedir. En son olarak 50 ülkeden 150 toplum tabanlı kanser kayıt sisteminin verileri 1997'de yayınlanmıştır.

Parkin vd., (1990), yılında dünyada 8.1 milyon yeni kanser hastası (non-melanoma deri kanserleri hariç) olduğunu tahmin etmiştir. En sık görülen kanser olan akciğer kanseri bütün dünyadaki erkeklerde görülen kanserlerin %18'ini, gelişmiş ülkelerdeki erkeklerde görülen kanserlerin ise %21'ini oluştururken, ikinci sırada tüm yeni vakaların yaklaşık %10'u olan mide kanseri, üçüncü sırada da kadınlarda %21 ile en sık görülen kanser olan meme kanseri gelmiştir. Bunları gelişmiş ülkelerde kolorektal kanser ve prostat kanseri, gelişmekte olan ülkelerde ise serviks ve ösefagus kanseri takip eder.

Pisani vd., (1990), yılında tüm dünyada 5.2 milyon kanserden ölümün %55'inin (2.8 milyon) gelişmekte olan ülkelerde meydana geldiğini hesaplamaktadırlar. Mortalitede 1.33 olan Erkek/Kadın oranı, Erkek/Kadın oranı 1.13 olan insidanstan daha yüksektir ve kadınların lehine prognoz ortaya koymaktadır. Akciğer kanseri yıllık 900,000 ölüm vakası ile en çok öldüren sebep olurken onu ikinci sırada yıllık 600,000 ölüm ile mide kanseri ve herbiri en az 400,000 ölümden sorumlu olan kolorektal ve karaciğer 5 kanseri izlemektedir. Erkeklerde karaciğer kanseri 3. sıradaki ölüm nedeni olarak yer alırken; kadınlarda 300,000'in üzerinde ölüm meme kanserine atfedilmekte ve onu 230'ar bin yıllık ölüm ile mide ve akciğer kanserleri takip etmektedir. Erkeklerde kanserden ölme riski yüzbinde 205 yaşa göre

standardize edilmiş hız ile doğu Avrupa'da en yüksektir. Diğer gelişmiş bölgelerdeki mortalite hızı yaklaşık yüzbinde 180'dir. Kadınlar için en riskli bölge yüz binde 125.4 yaşa göre standardize ölüm hızı ile kuzey Avrupa'dır.

Bray ve arkadaşları, Dünya Sağlık Örgütü mortalite verilerini ve ulusal kanser kayıtlarından elde edilen insidans hesaplarını kullanarak 38 Avrupa ülkesi için 1995 yılı tahminlerini yayınlamıştır. Yeni kanser vakası sayısı 2.6 milyon olarak tahmin edilen, dünya kanser yükünün dörtte birinin üzerindedir. Kanserden ölüm sayısı ise yaklaşık 1.6 milyondur. Erkeklerde en yüksek insidans hızı, yüzbinde 420.9 ile Avusturya dışında batı Avrupa ülkelerinde, en düşük hız ise kuzey Avrupa ülkelerinde, yüzbinde 356.6 ile İsveç'te, 377.8 ile İngiltere'de görülmektedir. Erkeklerdeki duruma zıt olarak kadınlarda en yüksek insidans hızı kuzey Avrupa ülkelerinde (315.9), özellikle Danimarka'da (396.2) görülmektedir. Mortalite hızları ise doğu Avrupa ülkeleri, özellikle Macaristan'da en yüksektir. Akciğer kanseri Avrupa'da 1995 yılında en sık görülen kanser türüdür (377,000 vaka). Erkeklerde en sık görülen kanser türleri akciğer (%22), kolorektal (%12) ve prostat (%11); kadınlarda ise meme (%26), kolorektal (%14) ve midedir (%7). Erkeklerde akciğer kanseri (%29); kadınlarda ise meme kanseri (%17) ölüm sebepleri arasında 1. sıradadır. Parkin, 2000 yılı için 10 milyon yeni kanser vakası, 6 milyon kanserden ölüm ve 22 milyon kanserli hasta hesaplamıştır. En sık görülen kanserler akciğer (1.2 milyon), meme (1.05 milyon), kolorektal (945,000), mide (876,000) ve karaciğer (564,000) kanserleridir. Meme ve prostat kanserinin tüm dünyadaki insidans hızı artarken, mideninki düşmüştür. Akciğer, kolorektal ve servikal kanser insidansı bölgeye göre farklı seyirler göstermektedir.

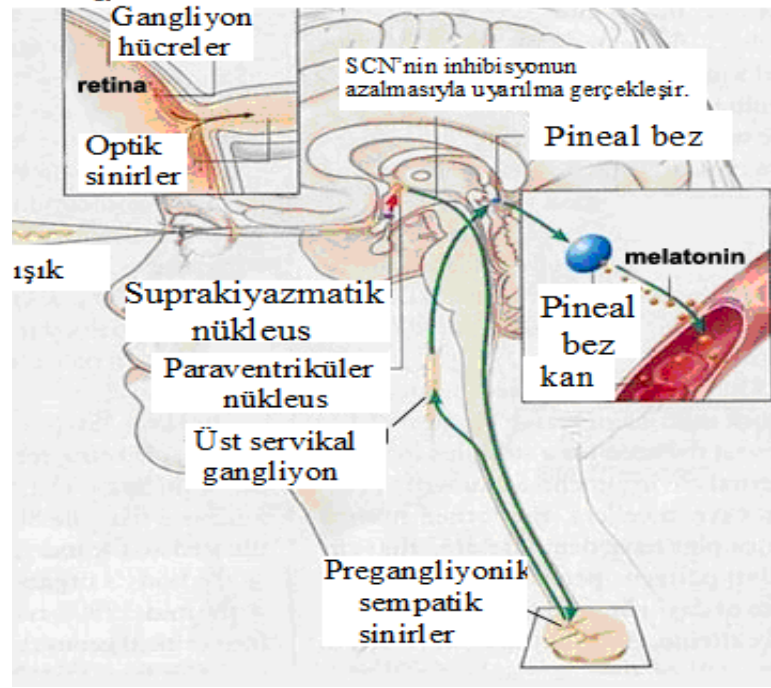
## **1.5. Melatonin Hakkında Genel Bilgi**

### **1.5.1.Tanımı ve Yapısı**

Pineal bezde sentezlenen bir nörohormon olan melatonin yapıca N-asetil 5 metoksi triptamindir. Melatonin, karanlıkta pineal bezden salgılanan, uyku, üreme, sirkadiyen ritim ve immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur. Pineal bez, yaklaşık üç yüz yıl önce Fransız filozof Descartes tarafından "ruhun tahtı" olarak tanımlanmış, ancak MEL'in varlığı 1958 yılında dermatolog Lerner tarafından belirlenmiştir. Sığır pineal bez ekstrelerinin, kurbağa

deri rengini açtığı gözleyen Lerner, melanin granüllerinin agregasyona uğradığını belirlemiş ve ekstrelerden izole ettiği bu maddeye melatonin adını vermiştir (Brzezinski, 1997; Lerner vd., 1958). İnsanlarda üçüncü ventrikülün arkasında yer alan pineal bez (epifiz bezi), böbrekten sonra vücudun en çok kan akımına sahip ikinci organdır. Memelilerde fotik informasyonları nöroendokrin melatoninin kandaki yarılanma ömrü 10-40 dakika civarındadır. İnsanda ortalama 28.4 dakika olduğu bildirilmiştir. Hormonun % 90'ı karaciğerde hidrosillenir, kan ile tüm vücut sıvılarına nakledilir (Reiter, 1991). Atılımı ise 6-hidroksimelatonin ve kinürenaminlerin glikuronid ve sülfat bileşikleri şeklinde %20 feçesle, %70 idrarla olur. Serbest melatonin halinde %'1'i ve 5 metoksiindolasetik asit olarak % 0.5'i geçmemek üzere idrarda bulunabilir (Touitou vd., 1998). Melatonin karanlık periyotta sentezlenir ve salınır, ayrıca karanlığın süresi hakkındaki bilginin değerlendirilmesine aracılık eder. Doğumdan itibaren 3 aya kadar çok az olan MEL salınımı, giderek artmakta ve sirkadien doğasını kazanmaktadır. Normal genç erişkinlerde gündüze göre, gece 3-10 kat daha yüksek olan serum MEL konsantrasyonu, 02:00-04:00 saatleri arasında doruk düzeye ulaşmakta ve daha sonra giderek azalmaktadır (Reiter, 1993). Yaşlanma ile birlikte MEL sentezinin azaldığı gösterilmiştir (Poeggeler, vd., 1993). Sentezini takiben, pineal bezden doğrudan dolaşıma verilen MEL, lipofilik özelliğine rağmen, membran reseptörleri aracılığıyla hedef hücrelerine ulaşır. Otoradyografik çalışmalarla, beynin çeşitli bölgelerinde, bağırsak, ovaryumlar, kan damarları (Brzezinski, 1997) ve karaciğerde (Acuna vd., 1996), MEL reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir. MEL reseptörlerinin sensitivitesi ve ekspresyonu, günlük ışık ritmi ile ilişkilidir (Forsling, 2001). Lipofilik özelliği nedeniyle, hücrenin tüm fraksiyonlarına kolaylıkla girebilen MEL için (Reiter, 1993), sitozolik ve nükleer bağlanma yerleri de tanımlanmıştır (Brzezinski, 1997). MEL'in inaktivasyonu, başlıca karaciğerde gerçekleşir. İndol halkasının 6. konumundan hidrosile olan MEL, daha sonra sülfat veya glukuronik asitle konjuge edilerek idrarla atılır. MEL'in idrardaki başlıca metaboliti olan 6-sülfatoksi melatonin düzeyleri, MEL'in plazma düzeyleri kadar, sentez ve yıkımı için de iyi bir göstergedir (Hardeland vd., 1993) Melatonin sirkadiyan ritmi, gençlerde oldukça düzenlidir, yaşlılıkta sıklıkla siklus bozulma gösterir ve hipomelatoninemi sendromu olarak belirtilen psikiyatrik depresyon gibi bazı hastalıklarda melatonin sirkadiyan ritmi tamamen bozulur. Melatonin oldukça güçlü ve etkili bir endojen serbest radikal toplayıcısıdır. Oldukça toksik olan hidrosil radikali melatonin tarafından ortadan

kaldırılır ve hücrelerdeki biyomoleküler üzerine olan oksidatif hasarın önlenmesinde çok önemli rol oynar. Serbest radikaller kanser ve kardiyovasküler hastalıkların etiolojisinde rol oynayabilmektedir. Yaşlılıkta melatonin yetersizliği ortaya çıkmaktadır. Böylece kanser ve aterosklerotik kalp hastalıkları ile birlikte görülebilen oksidatif hasarlara karşı insanlar daha hassas olabilmektedir.



Şekil 1.1.Pineal bez

### 1.5.1.1.Melatonin Tarihiçesi

Pineal bezin varlığı eski zamanlardan beri bilinmektedir. Pineal bez, M.Ö. üçüncü yüzyılda Herophilus tarafından tanımlanmıştır. Bundan 450 yıl sonra Galen, pineal bezin beyin dokusunda farklı bir yapıda olduğunu fark etmiş, lenf bezlerine benzer bir görevi olabileceğini söylemiştir (Emre, 1993). Pineal bezle ilgili gelişmeler üç büyük döneme ayrılabilir. Birinci dönem; İ.Ö. 3. yüzyıl civarında Herophilus tarafından pineal bezin bulunmasıyla başlar. Gallen insan pineal glandını çam ağacının tepesine benzettiği Latince kökenli “conarium” kelimesini kullanmıştır. Bu kelime pineal sinirleri tanımlamak için “nervi conarii” olarak kullanılmıştır. Pineal kelimesi Latince’de çam ağacı kozalağı anlamına gelen “pinea” kelimesinden gelmiştir. Vesalius (1514-1564) pineal bezin topografik yapısını dikkatlice incelemiştir. Descartes (1596-1650) pineal bezin “ruhun oturduğu yer” olduğuna

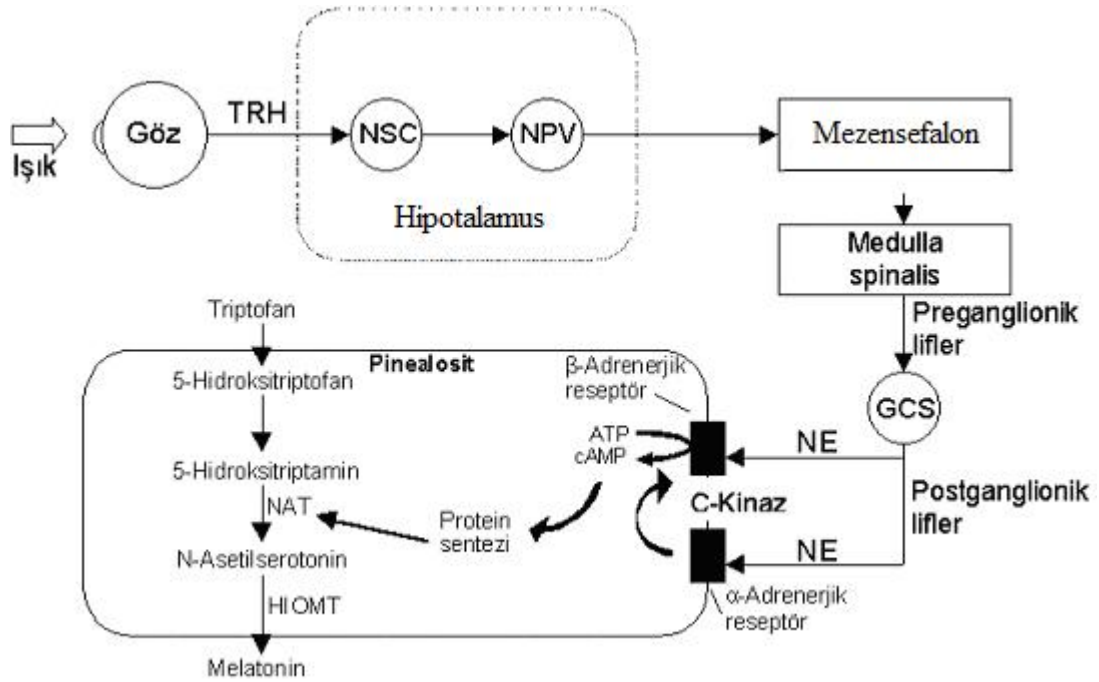
inaniyordu. İkinci dönem; Kolliker, memelilerin pineal bezinde sinir liflerinin varlığını gözlemlemiştir (1850). Cajal, fare pineal bezinde demet yapan sinir liflerini bulmuş ve sempatik orjinli olduğunu iddia etmiştir (1904). Üçüncü dönem ise son 50 yılı kapsar. En önemli gelişme Lerner ve arkadaşlarının pineal ekstrelerde bulunan, amfibienlere verildiğinde cilt renginin açılmasına neden olan potansiyel pineal hormonu izole etmeleridir. Lerner bu maddeyi Yunanca'da siyah anlamına gelen "melas" ve iş anlamına gelen "tosos" kelimelerini birleştirerek "melatonin" olarak isimlendirmiştir. Lerner ve arkadaşları 1958 yılında pineal bezden elde ettikleri doku özlerini amfibialara verdiklerinde, amfibiaların deri renginin açıldığını görmüşler ve bu hormonu melatonin olarak adlandırmışlardır. Bundan on yıl sonra pineal bezin işlevlerinde aydınlık ve karanlığın rolü bildirilmiştir. Pineal bez beynin orta hattında, üçüncü ventrikulün tavanında yer alır. Piamater ile sarıdır. Pinealositler ve glial hücrelerden oluşur. Vücut büyüklüğüne oranla çok küçük olmasına karşın, böbreklerden sonra en fazla kanlanan ikinci organdır. Pineal bezin uyarılmasında sempatik sistem baskındır ve superior sempatik gangliondan kaynaklanan sinir lifleri nervii conarii aracılığı ile beze ulaşır. Sempatik innervasyondan başka, az oranda parasempatik ve serotoninerjik sinir lifleri ile de innerve edilir. Pineal bezde birçok peptit yapıda hormon sentezlenmesine rağmen, ana hormon melatoninidir (Palaoğlu ve Beşkonaklı, 1998).

### **1.5.1.2 Sentezi**

Sentezin başlangıç basamağını, sistemik dolaşımdan triptofanın pinealosite aktif geçişi oluşturur. Triptofan, önce triptofan hidroksilaz ile orto pozisyonundan hidroksillenerek 5-hidroksitriptofana dönüşür. Bunu aromatik aminoasit dekarboksilazların kataliz ettiği dekarboksilasyon reaksiyonu izler. Oluşan ürün önemli bir biyolojik amin olan 5-hidroksitriptamin (serotonin) dir. Serotonin, N-asetiltransferaz (NAT) ve hidroksiindol O-metil transferaz (HIOMT) 'ın birbirini takip eden aktiviteleri ile melatonine dönüşür. Pineal bezde melatonin sentezi sirkadyen bir ritim gösterir ve karanlık faz boyunca maksimum noktasına ulaşır. Bu ritim suprakiazmatik nukleuslar tarafından algılanan aydınlık-karanlık dönüşümü ile sağlanır. Karanlığın başlamasıyla sinir uçlarından nöradrenalin salgılanır, bu da pinealositlerdeki  $\beta$ -adrenerjik reseptörleri uyarır. Adenilat siklaz aktivitesinin artmasıyla oluşan cAMP, NAT sentezini uyarır. NAT'ın enzimatik aktivitesinin gece



boyunca artışı serotonin düzeylerini düşürür, buna bağlı olarak N-asetilserotonin ve melatonin düzeylerini artırır. Melatonin sentezini uyaran diğer bir mekanizma, fosfoinozitol sistemiyle bağlantılı  $\alpha$ -1 adrenoreseptörler olup burada  $Ca^{+2}$ -fosfolipid bağımlı protein kinaz C yoluyla cAMP uyarılması gerçekleşir (Stehle, vd., 1993). Melatonin, epifiz bezinde triptofandan sentezlenir ve plazmada proteinlere bağlıdır. Karaciğerde metabolize olur ve başlıca metaboliti 6-Hidroksimelatonin-sülfat (6-HMS) 'dır. İnsanlarda ekzojen melatoninin kısa bir metabolik yarı ömrü (20-60 dk.), büyük bir hepatik geçiş etkisi vardır (Petzinger ve Ziegler, 2000). Bir çalışmada deneklere i.v. melatonin verilerek serum ve tükürükteki melatonin düzeyleri ile idrardaki 6-HMS düzeyi ölçülmüş; puberte öncesi çağıdaki çocukların melatoninini yetişkinlere göre daha hızlı metabolize ettikleri saptanmıştır. Tüm çalışma genelinde serum ve tükürük melatonin değerleri arasındaki oranın denekler arasında 55 kata varan değişiklikler sergilediği gözlemlenmiştir (Rasonyi vd., 1999). Bu farklı oranlar farmakokinetik çalışmalarda melatonin kullanırken dikkat edilmesi gerektiğini göstermektedir.



**Şekil 1.2:** Pineal gland'da melatonin sentezinin kontrolü. TRH: Tractus Retinohipotalamus, NSC: Nukleus suprakiazmatik, NPV: Nükleus paraventrikularis, GSC: Gangliyon servikal superior, NE: Norepinefrin, NAT: 5-Hidroksitriptamin-N asetiltransferaz, HIOMT: Hidroksiindol-O metiltransferaz

### 1.5.1.3. Etki Mekanizması

Melatonin, lipitte çözünebildiğinden hücre membranını kolaylıkla geçer ve tüm hücre organellerine girebilir. Fizyolojik etkilerini, hem reseptör aracılığı ile hem de reseptörden bağımsız olarak gösterebildiği bildirilmiştir. Melatoninin etkileri genel olarak, organizmalarda baştan başa lokalize olan hücrelerin membranlarındaki reseptörlerle ilişkilidir. Pineal hormon için membran reseptörleri beyinde SCN (suprakiazmatik nukleus)'yi de içeren değişik alanlarda tanımlanmıştır (Reiter, 1996). Başlangıçta, melatonin için nüklear bağlanma bölgeleri, hepatik hücrelerin çekirdeklerinde tanımlanmasına rağmen, sonraki araştırmalar, onların santral sinir sistemi ve periferik yapıların her ikisinde de yaygın olduklarını göstermiştir. Melatonin, çok sayıda olduğu görülen reseptör aracılı etkilerinin yanı sıra, reseptör bağımsız etkilere de sahiptir. Melatonin, yüksek difüzyon kapasitesi ile hücrelerin içine kolayca girer ve kalmoduline bağlanır, bundan dolayı kalsiyuma bağlı çok sayıda hücre içi olayı etkiler. Yapılan bir çalışmada melatoninin, yüksek oranda etkili serbest radikal süpürücü olduğu gösterildi. Melatoninin yüksek oranda toksik serbest radikalleri süpürme yeteneği, reseptör - bağımsız fonksiyondur (Bettahi vd., 1996). Periferik immün hücrelerde melatonine ait membran reseptörlerinin varlığı saptanmıştır. Bunlar ikinci haberci olarak cAMP' i kullanır. Melatoninin nukleusta bağlandığı bölgeler hem merkez sinir sisteminde hemde periferik dokuda mevcuttur ve klonlanmıştır. Melatoninin reseptörden bağımsız etkileri de vardır. Bu etkilerinde aracı olarak kalmodulin kullanılır ve Ca<sup>2+</sup> ile ilişkili olan hücre içi olaylar değişikliğe uğrar. Bunun sonucunda kalmodulin bağımlı nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesi azalır (Reiter, 1996). Özellikle karanlık ile ilgili impulslar pineal bezde ulaşınca norepinefrinin pinealosit membranında adrenerjik reseptörlere bağlanmasıyla bir seri reaksiyon başlar. Membranda adenil siklaz aktivasyonu yoluyla hücre içi c-AMP yapımı ve N-asetiltransferaz artışı olur. Melatonin sentez ve salınımı artar. (Seegers,1994) Melatonin üretildikten sonra depolanmaz, hem lipofilik hem de hidrofilik özelliğinden dolayı kana, beyin omurilik sıvısı da (BOS) dahil olmak üzere tüm vücut sıvılarına hızlı bir şekilde dağılır. Pineal bezde melatonin oluşumu ile bu hormonun plazma seviyeleri arasında güçlü bir ilişki vardır. (Szczec vd., 1973) Plazma melatoninin konsantrasyonu gece saatlerinde gündüze göre 3-10 kat fazladır. Melatonin salgılanması akşam saat 21:00-22:00 saatlerinde başlar, 02:00-04:00 saatleri arasında maksimum seviyelerine ulaşır, sabah 07.00-09.00

saatleri arasında azalmaya başlar. Melatonin plazma konsantrasyonu gündüz 0-20 pg/dl iken gece 50-200 pg/dl düzeyine yükselmektedir. Bir günde 30 mg melatonin üretilmektedir ve bunun % 80'ni gece sentez edilmektedir (Singh, 1990). Melatonin seviyesini ışığın yanında birçok çevresel faktörler (ısı, gel-git vb.) ve çeşitli ilaçlar örneğin  $\beta$ -blokörler etkiler. (Holmberg vd., 1988). B blokörlerin,  $\beta$ 1-adrenerjik reseptörler aracılığı ile melatonin salınımını azalttığı gösterilmiştir. (Huff ve Hamilton, 1979). B blokörlerin, nokturnal melatonin seviyelerini azaltması sonucunda uyku düzensizlikleri meydana gelir. Klinik çalışmalarda bu yan etkinin oral melatonin kullanımı ile önlenebileceği belirtilmektedir. (Reich, 1998)

#### **1.5.1.4. Serbest radikallere karşı savunmada melatoninin rolü**

Melatonin kuvvetli bir antioksidan özelliğe sahiptir. Serbest radikalleri tutarak nötralize eder ve antioksidan savunma enzimlerinin sentezini uyarır. Melatoninin serbest radikalleri tutma yeteneği reseptörden bağımsızdır. Ancak antioksidan enzimlerin indol halkası tarafından uyarılması, melatoninin nükleustaki reseptörlere bağlanmasından sonra gerçekleşmektedir. Melatoninin bu etkilerini inceleyen çalışmalarda çoğunlukla farmakolojik dozlar kullanılmıştır (Bettahi vd., 1996). Serbest radikallerin oluşumunu sınırlamak veya oluştuklarında nötralize etmek için bir dizi reaksiyon gerçekleşir. Bu süreç toplu olarak “antioksidatif savunma sistemi” olarak adlandırılır. Toksik molekülleri inaktif maddelere metabolize eden çeşitli enzimler ve bunun yanında radikalleri nötralize eden veya süpüren moleküller vardır, bunlar sırasıyla, antioksidatif enzimler ve antioksidanlar olarak belirtilir. Antioksidatif enzimler, süperoksit anyon radikalini hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) katalitik olarak dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD) ve  $H_2O_2$ 'i suya metabolize eden iki enzim olan katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidazı (GSH-Px) içerir. Eğer, aşırı aktiviteyle CAT ve GSH-Px in yeterli derecede metabolize edemeyeceği miktarlarda  $H_2O_2$  oluşursa, artmış SOD aktivitesi, daha yüksek derecede toksik radikal üretimine yol açabilir. Serbest radikaller üretildiklerinde, bunları süpüren değişik moleküller vardır. Redükte glutatyon (GSH) gibi bir kısmı hücre içinde sentezlenirken, E ve C vitaminleri ve  $\beta$ -karoten gibi diğerleri besinlerle alınır. GSH ve C vitamini primer olarak sitozolde bulunur ve E vitamini, şartlara göre  $\beta$ -karoten hücrelerin membranlarında bulunmaktadır. Tan ve arkadaşları, melatoninin oksijen kökenli radikallerden en toksik olan hidroksil radikali nötralize etme yeteneğini test

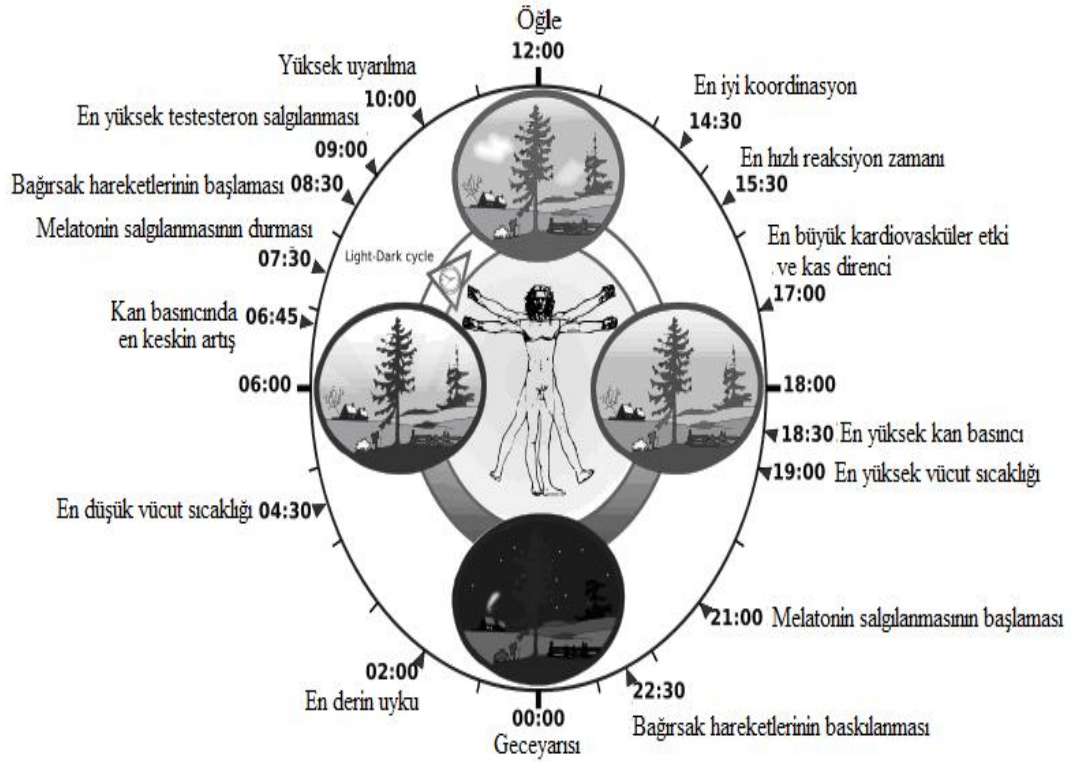
etmişlerdir. Melatoninin, etkili bir hidroksil radikali süpürücüsü olmasının yanında, aynı zamanda bu toksik ajanları nötralize etme etkinliğinin endojen antioksidan GSH' tan 5 kat daha büyük olduğu ve ekzojen süpürücü mannitolden yaklaşık 15 kat daha iyi olduğu kanıtlanmıştır. Pieri ve arkadaşları, melatoninin yüksek lipitte çözünebilirliği karşısında, in vivo şartlarda E vitaminine eşit veya daha iyi bir antioksidan olduğunu kanıtlamışlardır. Melatoninin, hidroksil ve peroksil radikallerini süpürme yeteneğinin yanı sıra, diğer süpürücülerle etkileşime girerek etkinliklerini arttırdığı yönünde araştırmalar yapılmıştır. Melatoninin etkinliğinin, C vitamini, GSH ve trolox gibi zincir kırıcı antioksidanların varlığında daha iyi olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular gösteriyor ki, melatonin umulandan daha düşük konsantrasyonlarda da etkin bir serbest radikalsüpürücüsüdür (Bettahı vd., 1996). Karbon tetraklorid (CCl<sub>4</sub>), yaygın olarak kullanılan bir serbest solvent, temizleyici ajan ve herbisittir. Sindirim yolu ile alındığında özellikle hepatik dokuları tahrip eder. CCl<sub>4</sub> toksisitesinden kaynaklanan hasar, genellikle serbest radikal orijinli olarak kabul edilir. Karaciğer homojenatları veya mikrozomları, CCl<sub>4</sub> ile inkübe edildiğinde, artmış lipit peroksidasyonun göstergeleri olan MDA+4HDA (4-hidroksilalken) düzeylerinde önemli artışlar ölçülmüştür. Melatoninin, bu artışları doza bağlı olarak indirgediği tespit edilmiştir. Oksijenin aktive olmamış formu örneğin singlet oksijen (1O<sub>2</sub>), çeşitli makromolekülleri hasara uğratan toksik bir ajandır. Melatoninin singlet oksijeni baskıladığı Poeggeler ve arkadaşları tarafından daha önceden bildirilse de ilk deneysel deliller Cagnoli tarafından ortaya konmuştur. Bazı enzimler antioksidatif savunmada çok önemlidir çünkü bu enzimler, serbest radikaller veya reaktif oksijenin, non-radikal ürünlere metabolize edilmesine aracılık eder. Bu enzim ailesinden en iyi bilinenlerden bazıları, superoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon reduktazdır. Melatoninin farmakolojik seviyelerinin, beyinde GSH-Px aktivitesini uyardığı bildirilmiştir (Reiter vd., 1997).

## **1.5.2.Melatoninin Etkileri**

### **1.5.2.1.Melatonin sentezinde aydınlık-karanlık kontrolü ve fotoperiyodizm**

Mevsimsel fonksiyonların günün uzunluğu ile ilişkilendirilmesine fotoperiyodizm denir. Fotoperiyodik memelilerde fotoperiyodik değişimin algılanması için sağlam bir epifiz bezine ihtiyaç olduğu artık iyi bilinmektedir. Melatonin tüm türlerde gece sentezlenir ve salgılanır. Sirkadian bir ritme uyar. Memelilerde bu ritmi SKN belirler. SKN lezyonlarında, melatoninin salgısının sirkadian ritmi kaybolur. Sirkadian ritim temelde aydınlık-karanlık siklusunu izler (Cassone, 1990). Birçok türde melatonin sekresyonu gecenin uzunluğu ile ilişkilidir. Gece ne kadar uzarsa melatonin salgılanması o kadar uzun sürer (Arendt, 1995). Işık, karanlık fazın başında ve/veya sonunda sekresyonu baskılar ve ritmi düzenler. Melatoninin salgılanması mevsimlik farklılık da gösterir. Yazın daha geç salınırken, kışın salınım daha erken başlar. Uzun süreli melatonin sekresyonu kısa günlerde, kısa süreli melatonin sekresyonu uzun günlerde görülür. Gün uzunluğu ve sinyalin yorumu söz konusu olan canlı türünün fizyolojisine bağlıdır. Hayvanlarda kısa gün melatonin sinyalinden önce bir uzun günler sürecinin olması üreme siklusunu geliştirir. Kısa süreli ama yeterli miktarda ışık maruziyeti melatonin salgısını baskılar. İnsanlarda geceleri melatonin salgısını baskılayacak doz 2500 lux.'tür ve en etkilisi yeşil ışıktır (Cassone 1990).

**Işık uygulama ile salgıdaki değişim:** İlk çalışmalar sadece parlak ışığın (gün ışığı) insanda melatonin düzeyini baskıladığını bildirirken son bulgular yapay ışığın (karanlık periyottaki aydınlatma sistemi) da benzer etkiyi gösterdiği ileri sürülmüştür. Körlerde ışık algılaması "0" olan kişilerde melatonin sekresyonu 24 saat içinde serbest olarak dağılım göstermektedir. (Reiter, 1991). Gece oluşturulan yapay aydınlık melatonin sentez ve salgılanmasını akut olarak baskılayarak, akşam karanlığın başlamasıyla birlikte uygulanan ışık gece 02.00-04.00 arası görülen plazma melatonin konsantrasyon pikinde kaymaya buna karşılık sabah henüz hava ağarmadan ışık uygulama ise bu konsantrasyon pikinin erken belirmesine neden olur. Sabah ve akşam saatleri maruz kalınan aydınlık ise fazda daralmaya neden olur (Claustrat vd., 1998).



**Şekil 1.3.**Melatonin Hormonunun Sirkadiyen Ritmi

### 1.5.2.2.Melatoninin Merkezi Sinir Sistemi Üzerine Etkileri

Melatonin beyin fonksiyonları üzerinde de rol oynamaktadır. Pineal bez ve melatonin olasılıkla beyin kan akımı üzerinde de rol oynamakta olup, depresyonlu hastalarda melatonin seviyeleri düşük bulunmaktadır. Ayrıca sürekli analjezik kullanan hastalarda melatonin verilmesi opioid reseptörleri aracılığı ile analjezik kullanımını azaltmaktadır. Hayvanlarda yapılan bir çalışmada, deneysel kafa travması sonrası melatonin verildiğinde antioksidan enzimlerin aktivitesinin arttığı saptanmıştır. Sonuçta melatoninin antioksidan enzimleri uyarıcı ve lipit peroksidasyonunu azaltıcı özellikleri beyin dokusunu oksidatif değişikliklerden koruyucu etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

### 1.5.2.3. Melatoninin İmmün Sistem Üzerine Etkileri

Melatoninin immünolojik rolüne ait ilk bulgu Maestroni ve arkadaşlarına aittir (1987). Farelerin devamlı ışığa maruz kalması veya gece  $\beta$ -adrenerjik reseptör blokörlerinin uygulanımı gibi melatonin oluşumunun inhibe edildiği şartlarda immün fonksiyonların baskılandığı görülmüştür. Sonraki çalışmalardan alınan sonuçlar

melatoninin humoral ve hücrel immun yanıtı artırdığını desteklemiştir. Melatoninin bu etkisi normal şartlarda belirgin değildir. Yaşlanma, viral hastalıklar, kortikosteroid kullanımı veya akut stress gibi immun sistemin baskılandığı durumlarda etki belirgin hale gelmektedir (Reiter vd., 2000). Wichmann ve arkadaşları farelerde yumuşak doku travması ve hemorajik şok sonucu immun fonksiyonlardaki baskılanmanın melatonin ile geri çevrildiği, ayrıca kronik melatonin tedavisinin insanda lökosit naturel killer aktivitesini artırdığını bildirmişlerdir (Wichmann vd., 1996). Melatoninin immunosupresyona karşı olan etkileri yada immun fonksiyonları artırıcı etkileri yardımcı T lenfositlerdeki spesifik reseptörlere bağlanması ile ilişkilidir. Melatoninin bu reseptörlere bağlanması, gamma-interferon, IL-2 veya opioid peptidlerin salgılanmasını artırmaktadır. Melatonin indüklü opioidler melatoninin hemotopoietik etkisine aracılık etmektedirler. Tümörlü farelerde melatonin uygulaması, kan hücrelerini kemoterapötik ilaçların toksik etkilerinden korumuştur (Maestroni, 1995). Melatonin seviyesindeki artışın timik proliferasyona yol açarak immün hücrelerde apoptozisi engellediği düşünülmektedir (Macchi ve Bruce, 2004) Memeli hayvanlarda pinealektominin immün cevabı azalttığı bilinmektedir. Ratlarda pinealektomi yapılması humoral immün cevabı azaltmış ve immüitenin diurnal ritmini bozulmuştur. Japon bildiricilerinde yapılan bir çalışmanın sonuçları da pinealektominin humoral ve hücrel immün cevabı azalttığını göstermektedir. Melatonin sekresyonuna gözün az da olsa katkısı vardır, fakat pinealektomi yapılan kuşlarda oküler melatonin sekresyonu normal immün cevabı sağlamak için gerekli melatonin düzeyini sağlayamamaktadır.

#### **1.5.2.3.1. Melatoninin Bağışıklık Sistemine Etkisi**

Yapılan laboratuvar ve saha çalışmalarında fotoperiyodun bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri incelenmesine rağmen, melatoninin bağışıklık sistemine ait doku ve hücrelere doğrudan etkileri konusunda az sayıda çalışma yapılmıştır (Hotchkiss ve Nelson, 2002). Fotoperiyodun bağışıklık üzerindeki etkilerinin incelendiği laboratuvar çalışmalarında kısa günlerdeki immun fonksiyonun uzun günlerdekine göre daha etkili olduğu belirtilmekte ve bu durum kısa günlerde melatonin üretiminin daha fazla olmasına bağlanmaktadır (Demas ve Nelson, 1998). Pineal bezin çıkarılması ya da deneysel olarak melatonin sentezinin engellenmesiyle bağışıklık

sistemi baskılanır. Bu durumda dışardan melatonin verilmesi baskılanmış olan bağışıklık sistemini yeniden aktive eder (Esquifino vd., 2004). Stres, viral hastalıklar, bakteriyel hastalıklar, kortikosteroid kullanımı ya da ilaç tedavisi sırasında ikincil olarak gelişen immun yetersizlikler melatonin ile önlenabilir (Maestroni, 2001). Travma ya da hemorajik şoktan sonra baskılanan bağışıklık fonksiyonları da melatonin ile düzeltilebilir (Wichmann, 1996.). Melatoninin özellikle yaşlanmaya bağlı gelişen immun yetersizliklerde, immun yanıtı artırıcı etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Palaoğlu ve Beşkonaklı,1998). Bıldırcın, hindi, tavuk gibi kanatlı türlerinde yapılan çalışmalarda melatoninin hücrel ve humoral bağışıklık yanıtını geliştirdiği gözlenmiştir (Brennan vd., 2002; Siopes, 2002; Moore ve Siopes, 2003). Melatonin immun sistem hücrelerini ya doğrudan melatonin reseptörleri aracılığıyla ya da dolaylı yoldan steroid hormonlardaki değişikliklere bağlı olarak aktive eder (Hotchkiss ve Nelson, 2002.).

#### **1.5.2.3.2. Lenfoid Dokulara Etkisi**

Melatonin memeli hayvanların timus, dalak ve immun fonksiyonla doğrudan ilişkili diğer dokuların boyutlarında genişleme yapar. Deneysel olarak pineal bezi çıkarılmış ya da pineal fonksiyonu inhibe edici ilaç kullanılmış hayvanlarda timus bezinin atrofiye olduğu görülmüş, bu hayvanlara dışarıdan melatonin verildiğinde bezde hiperplazi izlenmiştir (Maestroni, 1987). Buna karşılık kuşlarda yapılan çalışmalarda melatoninin dalak ve bursa Fabricius'un kütlesini azalttığı gözlenmiştir. Bu farklılık memeli timus hormonlarının kanatlılardakinden farklı olmasına bağlanabilmektedir (Skwarlo, 2000). Farelerde pineal bezin çıkarılmasından sonra doğal öldürücü hücre aktivitesinin azaldığı bildirilmektedir (Del Gobbo vd., 1989). Öte yandan farelerde yapılan bir başka çalışmada yeme melatonin ilave edilmesinden 7 ve 14 gün sonra doğal öldürücü hücre ve monosit sayısının arttığı gözlenmiştir (Currier, 2000). Melatonin reseptörleri bazı monosit ve makrofaj hücreleri üzerinde tanımlanmıştır. Melatoninin bu reseptörlere bağlanmasıyla granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör üretiminde artış görülür ve makrofaj üretimi ile fonksiyonu artar (Maestroni vd., 1994; Maestroni vd., 2002).



### **1.5.2.3.3. Humoral Bağışıklığa Etkisi**

Birçok kemirgen türünde fotoperiyot ve melatonin, lenfosit proliferasyonunu kolaylaştırmaktadır. Aydınlik dönemin kısa olduğu günlerde farelerde lenfosit proliferasyonu artar. Farelere dışardan melatonin uygulaması da aynı etkiyi gösterir (Demas vd.,1996). Hamsterlerin kullanıldığı bir çalışmada melatoninin immun hücre fonksiyonunu doğrudan lenfositler üzerinden etkilediği gösterilmiştir. Melatonin bu etkisini MT2 reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirmektedir (Prendergast vd., 2001) Fare kemik iliğinde B lenfositlerin oluşması sırasında melatoninin apoptozisi engellediği bildirilmektedir (Yu vd., 2000). Antikor üretimi de melatonin uygulamasından etkilenmektedir. Luzindol (MT2 reseptör antagonisti) uygulanan fareler, bu maddenin uygulanmadığı farelere göre daha düşük düzeyde IgG üretmişlerdir (Drazen vd., 2000). Farelerde melatoninin farmakolojik olarak inhibe edilmesi, koyun alyuvarlarına karşı oluşan antikor yanıtını azaltmıştır (Persengiev vd., 1991). Sağlıklı genç insanlar üzerinde yapılan çalışmada günlük 10 mg dozundaki melatoninin 10 gün süreyle ağızdan verilmesiyle tükürükteki IgA seviyesinin önemli derecede yükseldiği belirtilmektedir. Üst solunum yolu enfeksiyonlarında tükürükteki IgA'nın etkisi düşünüldüğünde bu bulgu oldukça önemlidir (Maestroni, 1993). Tarla faresi ve hamsterlerin kullanıldığı çalışmalarda ise melatonin uygulamasının antikor üretimini etkilemediği kaydedilmiştir (Drazen vd., 2002).

### **1.5.2.3.4. Hücresel Bağışıklığa Etkisi**

Melatonin reseptörleri dalak hücreleri üzerinde de tanımlanmıştır (Drazen., 2001). Dışardan melatonin uygulamalarının fare, tarla faresi, hamster gibi kemirgen türlerinde dalak hücrelerinin proliferasyonunu artırdığı (Prendergast vd., 2001), melatoninin bu uyarıcı etkisinde MT2 reseptörlerinin önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Reppert, 1997). Ayrıca melatonin tedavisi T hücre proliferasyonunu artırmaktadır (Konakchieva vd., 1995). Diğer taraftan melatonin büyük doku uyuşum kompleksi sınıf II moleküllerinin ifadesini artırır (Pioli vd., 1993). Bu durumda makrofajların T hücrelere antijen sunma yeteneği kolaylaşır (Çetin, 2005). Melatonin doğrudan T lenfositlerle etkileşime girerek hücresel bağışıklığı etkiler. Fare yardımcı T lenfositleri üzerinde yüksek duyarlılığa sahip bağlanma bölgeleri tespit edilmiştir (Maestroni,1995). Bağışıklık sistemi baskılanmış farelerde melatonin

zayıflamış olan yardımcı T hücre aktivitesini artırırken, melatoninin T lenfositleri uyarmasıyla yardımcı T lenfositler tarafından salınan endojen opioidlerde artış görülmüştür. Bu endojen opioidlerin immun fonksiyonu uyarıcı yönde etkisi vardır. Farelerde yardımcı T lenfositlerden kaynaklanan endojen opioidler antikör sentezini artırır (Maestroni vd., 1988). Yaşlı farelere melatonin verildiğinde timus bezinin işlevi ve T hücrelerin aracılık ettiği immun fonksiyonlar genç farelerdeki düzeye ulaşır (Mocchiegani vd., 1996). Melatonin, T hücrelerin apoptozisini azaltır ve T hücre aracılı sitokin ifadesini artırır (Maestroni,1998). Melatonin yardımcı T lenfositleri IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-12 ve dolaylı olarak IL-4 ile IL-10 üretmesi için uyarır (Garcia vd., 1997 ; Maestroni, 2001, Raghavendra, 2001). Melatonin uygulamalarıyla insan monositlerinden IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-1 ve IL12'nin salınımı artırılır. Bu sitokinler strese bağlı immun baskılanmayı ya da ikincil olarak gelişen immun yetersizlikleri önleyebilir (Çetin, 2005).

#### **1.5.2.4. Yaşlanma ve Melatonin**

Melatoninin sirkadiyen ritmi yeni doğanda yoktur, 3-4 aylık olana kadar da gözlenmez, 1 yaş civarında gelişir ve 1-3 yaş arasında en yüksek seviyesine ulaşır; daha sonra yavaş yavaş düşmeye başlar. İlerleyen yaş ile birlikte pineal bezin ritmi bozulur ve gece pik değerleri olmasına rağmen melatonin seviyesi azalmaya başlar. (Shigeta vd., 2001). Yaşlanma ile ilgili kabul gören bir teoriye göre, yaşlanma esnasında organlarda oluşan anatomik ve fonksiyonel dejenerasyon serbest radikallerin oluşturduğu hasara bağlanmaktadır. Nörodejeneratif bozuklukların birçoğunda serbest radikal hasarı kesin olarak gösterilmiştir. Melatonin güçlü bir hidroksil radikal toplayıcısı olduğundan, melatonin kaybı beynin oksidatif atakla ileri derecede hasarına neden olur. Böylece yaşlanma, endojen melatonin seviyesindeki belirgin azalmayla ilişkili olup, yaşlanma sürecinde sinir dokusu tahrip edici serbest radikallere daha fazla maruz kalır. Teorik olarak, melatonin uygulaması bu durumların oluşumunu geciktirebilir. Birçok organda olduğu gibi pineal bez fonksiyonu da yaşlanma ile birlikte azalır. Yaşlanma sürecinde, geceleri melatonin seviyesinde görülen artışların kademeli olarak azalması bu dejenerasyonun oldukça açık göstergesidir. Pineal melatonin sentezinin yaşlanma ile azalmasını açıklayan en sık önerilen görüş, pinealosit membranı üzerinde bulunan  $\beta$ -adrenerjik reseptör sayısındaki azalmadır. Gece  $\beta$ -adrenerjik reseptörler, pineal bez içine sempatik

nöronlardan norepinefrin salgılanmasına aracılık etmekte ve melatonin üretiminin artmasına neden olan bir dizi olayı başlatmaktadır. (Mollaoğlu ve Özgüner, 2005)

### **1.5.2.5. Melatoninin anti-apoptotik etkileri**

Melatoninin apoptozun regülasyonundaki ilk bulgusu 1994 (Maestroni vd.,1994) yılında verilmiştir. Bunu takiben pek çok deneysel çalışmada apoptoz üzerine melatoninin etkileri incelenmiş ve sonuçlar 3 başlık olarak özetlenmiştir;

1. İmmün hücrelerdeki apoptozun inhibisyonu (antiapoptotik etki);
2. Nöronal hücrelerdeki hücre ölümünün önlenmesi (antiapoptotik etki);
3. Kanser hücrelerinde apoptozun hızlandırılması (proapoptotik etki).

Bu başlıklar altında yapılan tüm çalışmalar sonuç olarak melatoninin apoptozdaki etkilerinin mekanizmasını, apoptozda oksidatif stresin önemini ve melatoninin antioksidan etkilerinin apoptozdaki rolünü de ortaya çıkarmıştır. Günümüzde serbest radikallerin kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar başta olmak üzere çeşitli patolojilerde ve yaşlanmadaki rollerinin gösterilmesi antioksidan kullanımını gündeme getirmiş ve bu konuda çalışmalar giderek bir ivme kazanmıştır. Melatonin diğer pek çok antioksidan ile kıyaslandığında gerek güçlü radikal süpürücü etkisi gerek antioksidan enzim aktivitelerini artırıcı özelliği ile güncelliğini korumaktadır. Ancak melatoninin klinikte kullanıma girmesi için çalışmalar halen sürmektedir.

### **1.5.3. Melatonin ve Kanser**

Dünyanın birçok bölgesinde halen ilk üç ölüm sebebi arasında yer alan kansere çözüm bulabilmek bir yana, hastalığın seyrini düzeltmek ve yaşam süresini biraz olsun uzatmak bile önemli görülmektedir. Kanser, hücrenin normal yaşam döngüsünü kontrol altında tutan gen dengesinin bozulması sonucu düzensiz ve ölümsüz yaşam döngüsüne geçerek homeostazise zarar verir hale gelmesi olarak özetlenebilir. Birçok bilim adamı kansere karşı çözüm planları geliştirebilmek üzere çalışmalarına devam etmektedir. Bu gibi planlar arasında gündeme gelen alternatiflerden birisi de melatonindir. Binlerce yıldır tanınan ve biyolojik önemi bilinen pineal bez ve bu bölgeden salınan melatoninin kanser üzerine olası etkileri ilk kez 20. yy başlarından itibaren sistematik olarak ele alınmaya başlanmıştır. O

tarihlerden günümüze azımsanmayacak sayıda çalışma yapılmış olup melatoninin bir yandan doğrudan anti-kanser etkinlik gösterebileceği bilgisi yanında, kronobiyolojik düzenleyici, antioksidan ve bağışıklık sistemini destekleyici özelliklerinin de kanserle ilişkili olabileceği değerlendirilmiştir. Araştırmalarda melatoninin birçok kanser türü üzerindeki etkinliğinin ortaya konmasının yanı sıra klasik kanser tedavileriyle beraber kullanımının genel durumu düzelttiği, klinik cevabı ve yaşam süresini artırdığı ortaya konmuştur. Bu veriler, elde edilmesi kolay ve ucuz bir molekül olan melatoninin, genel olarak hiçbir ciddi yan etkisine rastlanmamış olması ve toksik doz güvenlik sınırlarının da yüksek olması nedeniyle, kanser hastalarında destekleyici olarak kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir. Tümör büyümesini ve metastaz sayısını azaltmaktadır. İncelemelerde prostat ve meme kanseri olan hastalarda melatonin seviyeleri düşük bulunmuştur. Hayvanlardaki deneysel çalışmalarda tümör oluşumunu pinealektominin artırıp, melatoninin azalttığı bildirilmiştir. İncelemelerde prostat ve meme kanseri olan hastalarda melatonin seviyeleri düşük bulunmuştur (Macchi ve Bruce, 2004). Melatonin kanser gelişmesini durdurucu yönde etki gösterir. Mevsimlerin kanser gelişmesi üzerindeki etkisi melatoninle ilişki içindedir. Gecelerin uzun sürdüğü kış aylarında melatonin üretimi fazladır ve bu dönemde tümör gelişmesi yavaşlar. İlkbahar ve yaz aylarında geceler kısa, melatonin üretimi daha azdır ve meme kanseri riski de artmaktadır (Nelson ve Blorn, 1994). Kanser bağışıklık reaksiyonlarını baskılar. Melatoninin bağışıklık fonksiyonunu hangi mekanizmalarla değiştirerek kanser gelişmesini engellediği net olarak ortaya konulmamıştır (Hotchkiss ve Nelson, 2002). Kanser tedavisinde melatonin, IL-2 ile birlikte kullanılmaktadır. İnterlokin 2'nin antikanserojenik etkisi çok yüksek dozlarda ortaya çıkar ve tek başına kullanıldığında ciddi toksik etkileri bulunur. Melatonin ve IL-2 kombinasyonunda, melatoninin IL-2'nin istenilen etkisini artırdığı gözlenmiş ve etkin IL-2 dozunun azaltılması sağlanmıştır. Bu kombinasyon metastatik böbrek kanseri, metastatik akciğer kanseri, metastatik kolorektal karsinom, metastatik hepatom, metastatik gastrik karsinom, metastatik endokrin tümörler, pankreatik tümörler ve meme kanserinde uygulanmış ve başarılı bulunmuştur (Lissoni vd.,1995). Melatonin sağlıklı hücrelerde apoptozis oluşumunu engelleyici özelliğe de sahiptir (Maestroni, 1998).

## BÖLÜM 2

### LİTERATÜR ÖZETLERİ

Anisimov vd., (1997), ratlarda ilk kez kolon kanserine karşı melatoninin etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak ileum ve jejunum tümörlerinin sıklığında bir artış; duodenumda tümör çeşitliliğinde bir azalış gözlemişlerdir ve ratlarda DMH' in sebep olduğu kolon kanserlerinde melatoninin inhibitör etkisi olduğunu rapor etmişlerdir.

Blask vd., (1997), çalışmalarında insan meme tümörü hücresi MCF-7 pozitif östrojen reseptörü (ER) kullanmışlardır. Glutomylistein sentetazın bir inhibitörü olan buthionine-[S,R] sulfoximine (L-BSO), melatoninin inkübasyonu sonucu onkostotik olayları engellediğini ve melatonin faaliyetleri için glutatyonun gerekli olduğunu gözlemlemişlerdir. MCF-7 hücrelerinin 5 gün inkübasyonu sonucunda intraselüler glutatyonun sabit olarak azaldığını gözlemlemişlerdir.

Anisimov vd., (2000), dişi farelere triethyleneglycol'de 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) intravaginal olarak aşlamışlardır. Sonuç olarak, pineal indole hormonu olan melatonin DMBA'nın farelerde neden olduğu servikal ve vajinal karsinojenleri inhibe ettiğini bildirmişlerdir. İn vitro şartlarda antimitojenik ve antiklastojenik etki bulmuşlardır.

Palabıyık (2003) tarafından endokrin tümörleri üzerine yapılan çalışma iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada over CA ve kontrol grubundan gece boyunca kanları alınıp serum melatonin düzeylerine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar anlamlı derecede farklı bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları çalışmaya alınan hasta ve kontrol grupları için tümörün melatonin salınım ritmini etkilediği görüşünü desteklemiştir. Sonuç olarak over CA (%15) ve meme CA (%7) tümörlerinin DNA örneklerinde Gi2 $\alpha$  mutasyonları bulunmuştur.

Bizzari vd., (2003), rat meme kanser hücresi RM4'ün proliferasyonunda melatonin ve düşük dozda D<sub>3</sub>[1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>'ün birleşiminin RM4'ün proliferasyonunda etkisini değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak; meme kanserinin tedavisinde MEL ve

[1,25- (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] in bileşiminin yararlarını ve en azından TGF-β<sub>1</sub> sekresyonunda tümör büyümesini engellediğini rapor etmişlerdir.

Sanchez-Barcelo' vd., (2003), hayvan modellerinde in vivo koşullarda kimyasal olarak oluşturulmuş memeli tümörlerinde pineloktami genellikle ters etki yaparken, melatonin uygulananlarda gizilliğin uzaması, vakaların azalması ve tümörlerdeki büyüme oranı, deneysel manipülasyonlarda pineal bezlerin aktivasyonunu değerlendirmişlerdir. Melatonin onkostatik etkisinin özelliği tümör biyolojisinin farklı özelliğinin yanı sıra bu etkiyi yapabilmesi için fizyolojik dozlarında meme tümörü üzerinde önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Lenoir vd., (2005), Dişi *Sprague Dawley* türü ratlarda DMBA' nin sebep olduğu kanser üzerine melatonin etkisini araştırmışlardır. Sonuçlar, melatonin DMBA'nın memeli kanserinde hem tedavi edici hem de önleyici etkisinin hemen hemen aynı düzeyde olduğunu gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak melatonin DMBA' nın yol açtığı DNA hasarını belirgin bir şekilde azaltıp, kanser oluşumunu önemli ölçüde engellediği belirlenmiştir.

Blask vd., (2005), gece çalışan kadınlarda melatonin baskılanması sonucu meme kanserinin görülme oranının arttığını gözlemlemişlerdir.. Karaciğer tümörlü sıçanların veya meme kanserli insanların gece boyunca beyaz florasan ışığına maruz bırakılması sonucu melatonin baskılanmasından dolayı tümör büyümesinde ve mitojenik molekül 13 hidroksidesadionik asit metabolizmasında artış olduğunu rapor etmişlerdir. İnsan meme kanserinde ve rat karaciğer tümörlerinde gece süresince melatonince zengin kanlar, gündüz melatonince fakir olan kanlar toplanıp in situ yayılmış ve tümörler karşılaştırılmış, melatonince zengin olanlarda belirgin bir şekilde proliferatif aktivite ve linolenik asit metabolizmasının baskılandığını gözlemlemişlerdir. Gece okuler ışığa maruz kalan yani melatonince fakir olan bireylerin tümörlerinde yüksek tümör proliferatif aktivite gözlenmiştir. Sonuç olarak gece boyunca ışığa maruz kalanlarda tümör büyümesinin tepkisine bağlı şiddetini ve insan nokturnal, sirkadiyen melatonin sinyali sadece insan meme kanserini engellemekle beraber bu etki gece beyaz ışığa ve kısa süreli okuler ışığa maruz kalanlarda melatonin inhibe edici etkisi olduğunu bildirmişlerdir.

Kanno vd., (2005) farelerde in vivo ve in vitro ortamlarda toksiteye neden olan asetemionphene karşı melatonin koruyucu etkisini araştırmışlardır. MTT analizi ve H-timidin birleşme analizi kullanılmasıyla farelerde hepatosit primer kültüründe canlı hücrelerin kaybına neden olan AA'da MLT' nin önemli koruyucu etkisinin olduğunu ve reaktif oksijen türünün (ROS) üretimine neden olan AA 6 saatte en yüksek seviyeye ulaştığını ve hepotisitte 12 saatte lipid peroksidasyonda artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak, MLT' nin toksiteye neden olan AA'yı önlemek için potansiyel olarak yararlı olduğunu ama AA'nın neden olduğu antinosiseption ve antipiretik etkisi olmadığını rapor etmişlerdir.

Vesnushkin vd., (2006), benzapirone (BP) üzerinde melatonin etkilerini araştırmışlardır. Sonuçlarda, kansere neden olan BP' nin melatonin uygulanmasıyla inhibe olduğu bildirilmiştir. Böylece, ilk kez bu çalışmada melatoninin mezenşimal orjinli malignanlarda (kötü huylu) inhibitör etkisi olduğunu tespit etmişlerdir. Melatoninin düşük dozlarda lipid peroksidasyonunda ve tümör oluşumunun inhibisyonunda daha etkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Tam vd., (2007), hormon tedavisine cevap vermeyen 22Rv1 insan prostat kanser hücrelerinin antiproliferasyonunda, melatonin uyarıcı mekanizmasının, farmakolojik açıdan kullanımını belirlemişlerdir. Sonuç olarak önemli ölçüde melatonin antiproliferatif etkileri MT<sub>1</sub> reseptörü kullanılarak p27Kip<sub>1</sub> geninde ve protein fazla ekspresyonunda protein kinaz C (PKC) ve paralelinde PKA'nın beraber yeni sinyal mekanizmasına aracılık ettiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak moleküler prostat kanser mekanizmasında ve bağımsız androjene geçişte prostat kanserinin primer ve sekonder gelişim sürecinin önlenmesinde melatoninin güçlü desteği olduğunu rapor etmişlerdir.

Venushkin vd., (2007), SHR farelerine aseton ve benzapiren uygulaması ile deri kanserine neden olmuşlardır. Lipid peroksidasyon, malonik dialdehid (MDA) seviyesinin temeline dayanarak ve tümör dokularındaki ve kan serumlarındaki katalaz seviyesini değerlendirmişlerdir. Kontrol grubundaki tümör sıklığı % 69.4 olarak bildirmişlerdir. Melatonin uygulaması ve latent period (gizil dönem) arasında bir korelasyon bulamamışlardır. Tümör gelişiminden sonra melatonin uygulaması tümörün büyümesini azalttığını gözlemlemişlerdir. Melatonin

uygulamasını kan serumlarındaki MDA'yı ve katalaz seviyesini baskıladığını fakat tümör dokularını etkilemediğini rapor etmişlerdir.

Kavak (2008), Bu çalışmada melatoninin CaCo-2 adenokanser hücrelerinde NO, MDA ve MMP-9 yapımına etkilerini araştırmışlardır. Melatoninin CaCo-2 hücrelerinde apoptoz üzerine etkisi izlenmemiştir. Melatonin (1 mM) uygulamasında üçüncü günün sonunda NO düzeylerinde kontrol grubuna göre azalma izlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Melatonin uygulaması MDA düzeylerinde değişikliğe yol açmadığını tespit etmişlerdir. Üç günlük melatonin uygulaması sonucu 1 mM, 0,01 mM ve 0,01 mM dozlarda aktif MMP-9 düzeylerinde kontrol grubuna göre artış olduğunu gözlemlemişlerdir ( $p < 0,05$ ). Kolorektal kanserlerde MMP-9 düzeyleri tümör gelişiminde ve metastaz oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Melatonin uygulamasının NO düzeyleri üzerine etkileri melatoninin antitümöral etkiye sahip olabileceğini düşündürürken MMP-9 düzeyleri üzerine etkisi şaşırtıcıdır. Melatoninin adenokanser hücreleri üzerine dual etkili olması olası olup KKK'deki etki mekanizmalarına yönelik daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Martinez-Campa vd., (2008) meme kanseri hücrelerinde melatonin (mel) 'nin baskıladığı hTERT ekspresyonunu kadmiyum veya 17 $\beta$ -estradiol'ün indükleyip indüklediğini değerlendirmişlerdir. MEL'nin MCF-7'ye transfer edilen hTERT-Luc'ta E2 ve Cd'un hTERT transkripsiyonu indüklemesini engellediğini bulmuşlardır. Mel'nin transfer edilen HeLa hücrelerinde ER $\alpha$  tarafından E<sub>2</sub> ve Cd'un aracılığıyla hTERT transaktivasyonun tetiklemesini önemli derecede azaltmış olduğunu ve Mel'nin MCF-7 hücrelerinde hTERT ekspresyonunu E<sub>2</sub> veya Cd tarafından indüklenmesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Melatoninin ksenöstrojenlere maruz kalan mesleki veya çevresel karsinojen veya östrojene bağlı tümörlerin tedavisinde telomeraz aktivitesinin inhibisyonunu destekleyici bir rolü olduğunu rapor etmişlerdir.

Cucina vd., (2009), melatonin MCF-7 hücrelerinde büyümeyi inhibe edici olarak uygulamışlardır. Sonuç olarak; MCF-7 hücrelerinde melatonin iki farklı apoptotik süreci tetiklediğini bildirmişlerdir: kaspaz-7'yi aktifleyen geç apoptotik TGF $\beta$ <sub>1</sub> bağımlı süreç ve TGF $\beta$  ve kaspaz bağımsız tepki muhtemelen terminal efektör olabileceğini rapor etmişlerdir.



Winczyk vd., (2009), kolon 38 hücrelerinde MT<sub>1</sub> reseptörlerinin antogonistinin MLT' nin antiproleratif etkisini azaltmadığını bulmuşlar fakat MT<sub>2</sub> reseptörlerinin katkısında sorumlu olduğu öne sürmüşlerdir. Sonuç olarak MLT'nin membran reseptörleri MLT' nin onkostatik aktivitesinde gerekli olmadığını gözlemlemişlerdir ve böylece diğer nükleer sinyal ve reseptöre bağlı olmayan mekanizmaları kapsadığını bildirmişlerdir.

Francisco vd., (2010) pankreatik kanserli hayvanların yaşam süresi ve tümör nodüllerinin sayısı, oksidatif stresin parametrelerinin ölçümünü, ya tümör sürecinin ilerleme fazını ya da indüksiyon süresince melatoninin (MEL) ve selesoksib (CEL) 'in sinerjik etkisini ve kıyaslamalarını değerlendirmişlerdir. Pankreatik ve splenik alanlardaki tümör nodüllerinin varlığı makroskopik olarak gözlenmiştir ve pankreatik dokulardaki lipoperoksidasyonun (LPO) seviyesi, glutatyon (GSH) indirgenmesi, süperosit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ölçülmüştür. MEL'nin uygulaması deneysel BOP uygulaması yapılan hayvanların ölümü ve oksidatif stres ve tümör nodüllerindeki indirgenmede CEL uygulanan hayvanlara göre daha kuvvetli yararlı etki yapmıştır. Sonuç olarak kombine uygulamanın sadece indüksiyon fazı süresince uygulandığında sinerjik yararlı bir etki bıraktığını ve melatoninin hamsterlerin yaşam süresini düzeltmek için önemli ve yararlı etkisi olduğunu bulmuşlardır.

Ruiz-Rabelo vd., (2010), çalışmalarında Suriye hamsteri kullanarak pankreas kanserine melatonin ve kapesitabinin etkisini değerlendirmişlerdir. Pankreatik dokularda oksidatif stres markırları ve patolojik tümör gelişiminin değerlendirilmesi yapılmıştır. BOP uygulanan bütün hayvanların hasta veya pankreatik dokularındaki antioksidan seviyesi azalmıştır ve lipoperoksidasyon seviyesinin artmasıyla ilgili olarak adenokarsinomalarında az çok farklılaşma olduğu bildirilmiştir. Pankreas kanserini kapesitabin uygulanan hayvanların sadece % 66'sında ve melatonin uygulanan grubun % 33' ünde gözlemlemişlerdir. Melatonin ve kapesitabine birlikte uygulanan gruplardaki hayvanların % 10 'unda pankreas kanseri gözlenildiği bildirmişlerdir. Pankreas dokusunun antioksidasyon seviyesinde artışın olmasına ve lipid peroksidasyon seviyesinde azalma olmasına neden olduğu rapor edilmiştir.

Cabrera vd., (2010). Çalışmalarında melatoninin insan melanoma hücresi SK-MEL-1'in büyümesini azalttığını bulmuşlardır. Antiproleratif etki hücrel döngü fazının ilerleme sürecinde ve hem de regülatör enziminin anahtarı olan tirosinaz aktivitesinin artışında rol aldığını belirlemişlerdir. Melatonin membran reseptörlerinin antogonisti (4-P-PDOT) ve G reseptör inhibitörünün, hücre büyümesini durdurmasını engel olamadığını ancak bunun aksine p-38 aktif mitojen protein-kinaz (p38 MAPK) sinyalinin melatonin hücre büyümesinin inhibisyonunda önemli bir oynadığını tespit etmişlerdir. p38 MAPK'ın fosforilasyonuna neden olan indolamin ve hücre proliferasyonunda etkisi olan özel bir inhibitör SB203580 ortamdan uzaklaştırılmıştır. Ayrıca, antioksidanlarla ilgili kıyaslamalı çalışmalarda örneğin N-asetil-L-sistein ve trolox belirtilmiştir ve SK-MEL-1 hücrelerinin gelişmesi olayı antioksidanlara karşı oldukça hassas olduğunu gözlemlemişlerdir.

Kannen vd., (2011), 14 gün boyunca sürekli ışığa (LL) maruz bırakılan, melatonin (MLT) ve DMH uygulanan hayvanların kolon dokularında preneoplastik örneklerin analizini gerçekleştirmişlerdir. Böylece MLT'nin LL'nin sebep olduğu preneoplastik örneklerin kontrolünde önemli bir rolü olduğunu rapor etmişlerdir.

## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Araç ve Gereçler

##### 3.1.1. Kimyasal Maddeler

Ksantin oksidaz (Sigma-Aldrich, Germany), Nitroblue tetrazolyum (Roche, Switzerland), Ksantine (Merck, Germany), Etanol (Grup Delta), Asetik Asit (Merck), Hidrojen peroksit, Sodyum klorid (Merck), Etilendiamine-tetraasetik asit (EDTA) (Sigma-Aldrich, Germany), Sülfirik asit (Merck, Germany), Formaldehit (Riedel-de Haenen), Sodyum asit, Diyominobenzidin, Aseton, Melatonin (Sigma-Aldrich, Germany), Kloroform, Hemotoksilen, Nikotinamid-Adenin Dinükleotit Fosfat ( $\beta$ -NADPH) (İndirgenmiş form), Glutasyon (Okside,% 98), Glutasyon redüktaz, Bovin serum albumin, Sodyum Karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Carlo Erba, Italy), Hekzadesiltrimetil, Amonyum Bromit, 4-aminoantipirin, Fenol, Butillendirilmiş hidrositolyen (BHT), Sülfirik asit (Merck, Germany), Sodyum klorid (Riedel-de Haën, Germany), Ksenol orange tetrasodyum (Merck, Germany), o-dianisidin dihidroklorol, Glycerol (Carlo Erba), Amonyum-Fer (II) sülfate heksahidrat (Merck, Germany), 2-Tiyobarbuturik asit (Sigma-Aldrich,Germany), 1,1,3,3,-Tetraethxy Propan (Sigma-Aldrich, Germany), Tris Hidrokloride (Ambresco), Tris Base (Ambresco) (Merck, Germany), Etilen Glikol (Fluka, Germany), 5,5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Sigma-Aldrich, Germany), Parafin, PCNA.

##### 3.1.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler

Floresan lamba (580 uW), Hassas terazi (Precisa 160M), Mikrotom (MicroTec Cut 4060), Fotoğraf Makinesi (Fujifilm Fine Pix 600S zoom), Etüv (Nüve EN 500), Doku Takip Cihazı (Lecia asp 300), Işık Mikroskobu (Micros MC300A), Motic Plus 2.0 Yazılım Programı ve Kamera (Motic).

### 3.1.3. Araştırmada Kullanılan Deney Hayvanları

Araştırmada kullanılan deney hayvanları *Swiss albino* türü (25-30 gr, 10-12 haftalık) erkek fareler olup Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (TIPDAM) 'dan temin edilmiştir. Hayvanlar oda ısısının 22±2 °C' ye sabitlendiği 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ışık periyodunda polipropilen kafesler içinde laboratuvar ortamımızda bulundurulmuştur. Deneme için seçilen hayvanların hiçbiri göz yada kulak enfeksiyonu taşıyor, yamalı tüy yada açık yara barındırmıyordu. Deney hayvanlarının beslenmesi için standart pellet yem kullanılmıştır ve çeşme suyu *ad libitum* olarak verilmiştir. Hayvanların beslenmelerinde kullanılan yem Gaziantep Yem Fabrikasından getirilmiştir. Kullanılan yemin bileşimi Tablo 3.1 'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Deney Hayvanlarına Verilen Yemin Bileşimi

Kuru Madde (%)	93,69
Ham Protein (%)	34,15
Kalsiyum (%)	3,36
Magnezyum (%)	0,50
Sodyum (%)	1,09
Çinko (mg/kg)	286,80
Ham Yağ	3,00
Bakır (mg/kg)	29,33
Metabolik Enerji (kcal/kg)	2095
Ham Maddeler	Balık unu, mısır, buğday, ayçiçeği küspesi, çavdar ve mineral maddeler

## 3.2.Yöntemler

### 3.2.1. *Swiss albino* Türü Farelerde Ehrlich Solid Tümörünün (EST) Oluşturulması

Çalışmamızda solid tümör oluşturulmasında İstanbul Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden temin edilen ve peritonunda sıvı EAT taşıyan stok fare (ağırlığı 30 gr, 3 aylık) kullanılmıştır. Bu fareden parasentezle alınan 1x10<sup>6</sup> Ehrlich asit sıvısı (EAT) Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma

ve Uygulama Merkezinden temin edilen ağırlıkları 25-30 gr arasında değişen 10-12 haftalık *Swiss albino* türü farelere intramuscular (i.m.) olarak enjekte edilmiştir (Ozaslan, 2007). Bu sıvı, izotonik NaCl çözeltisi içinde 1/1 hacimde hazırlanarak 0.2 ml olarak farelerin skapulasından quadriceps içerisine (i.m.) yolla inokule edilmiştir (Zumrutdal, 2008).

### **3.2.2. Melatoninin Hazırlanışı**

Melatonin (Merck, Germany) ticari olarak satın alınmış ve % 30'luk etil alkol içerisinde 1:50 oranında çözülmüştür. Deneme gruplarına göre 8 mg/kg/gün, 12 mg/kg/gün, 16 mg/kg/gün olmak üzere 3 farklı dozda melatonin uygulanmıştır.

### **3.2.3. Ehrlich Solid Tümör Modellemesi ve Melatonin Uygulaması**

Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen 25-30 gr ağırlığında 10-12 haftalık 80 adet erkek *Swiss albino* ırkı fare 10 gruba ayrılmıştır (n=8). (+) Kontrol grubu hariç tüm hayvanlara 0.2 ml NaCl çözeltisi içinde 1/1 hacimde hazırlanarak  $1 \times 10^6$  EAT intramuscular (i.m.) olarak enjekte edilerek EST oluşturulmuştur. Deney gruplarına 1ml hacimde 8 mg/kg/gün, 12 mg/kg/gün, 16 mg/kg/gün melatonin i.m. yolla her gün enjekte edilmiştir. Melatonin uygulamaya başlama zamanından 2 gün sonra EAT inokule edilerek EST oluşturulmuş ve uygulamaya 14 gün devam edilmiştir. Melatonin uygulaması akşam 18:00-20:00 saatleri arasında yapılmıştır. Ayrıca gece 02:00-04:00 saatleri arasında bazı gruplar 580  $\mu$ W floresan ışığa maruz bırakılmıştır.

### **3.2.4. Oluşturulan Gruplar ve Yapılan İşlemler**

Deneme gruplarımız ışık verilen ve karanlık gruplar olmak üzere iki farklı uygulama yapılmıştır.

#### **3.2.4.1. Aydınlık Gruplar**

Grup A1 (n=8): Denemenin 1. gününden itibaren her gece 02:00-04:00 saatleri arasında 580  $\mu$ W/cm<sup>2</sup> ışık uygulanmıştır. Denemenin 2.gününde 0.2 ml  $1 \times 10^6$  EAT hücreleri i.m. olarak enjekte edilmiştir.

Grup A2 (n=8): Denemenin 1.gününden itibaren her gece 02:00-04:00 saatleri arasında  $580 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  ışık uygulanmış ve ayrıca 18:00-20:00 saatleri arasında 8 mg/kg melatonin i.p. enjeksiyon yoluyla her gün verilmiştir. Denemenin 2.gününde 0.2 ml  $1 \times 10^6$  EAT hücresi i.m. olarak enjekte edilmiştir.

Grup A3 (n=8): Denemenin 1.gününden itibaren her gece 02:00-04:00 saatleri arasında  $580 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  ışık uygulanmış ve ayrıca 18:00-20:00 saatleri arasında 12 mg/kg melatonin i.p. enjeksiyon yoluyla her gün verilmiştir. Denemenin 2.gününde 0.2 ml  $1 \times 10^6$  EAT hücresi i.m. olarak enjekte edilmiştir.

Grup A4 (n=8): Denemenin 1.gününden itibaren her gece 02:00-04:00 saatleri arasında  $580 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  ışık uygulanmış ve ayrıca 18:00-20:00 saatleri arasında 16 mg/kg melatonin i.p. enjeksiyon yoluyla her gün verilmiştir. Denemenin 2.gününde 0.2 ml  $1 \times 10^6$  EAT hücresi i.m. olarak enjekte edilmiştir.

Grup A5 (n=8) Bu gruba sadece gece 02:00-04:00 saatleri arasında  $580 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  ışık uygulanmıştır. Melatonin uygulaması ve kanser oluşumu gerçekleştirilmemiştir.

#### **3.2.4.2. Karanlık Gruplar**

Grup K1 (n=8): Denemenin 2.gününde 0.2 ml  $1 \times 10^6$  EAT hücresi i.m. olarak enjekte edilmiştir. Işık ve melatonin uygulanmamıştır.

Grup K2 (n=8): Denemenin 1. gününden başlamak suretiyle 8 mg/kg melatonin 18:00-20:00 saatleri arasında i.p enjeksiyon yoluyla her gün uygulanmış ve 2.gün 0.2 ml  $1 \times 10^6$  EAT hücresi i.m. olarak enjekte edilmiştir.

Grup K3 (n=8): Denemenin 1. gününden başlamak suretiyle 12 mg/kg melatonin 18:00-20:00 saatleri arasında i.p enjeksiyon yoluyla her gün uygulanmış ve 2.gün 0.2 ml  $1 \times 10^6$  EAT hücresi i.m. olarak enjekte edilmiştir.

Grup K4 (n=8): Denemenin 1. gününden başlamak suretiyle 16 mg/kg melatonin 18:00 - 20:00 saatleri arasında i.p enjeksiyon yoluyla her gün uygulanmış ve 2.gün 0.2 ml  $1 \times 10^6$  EAT hücresi i.m. olarak enjekte edilmiştir.

Grup K5 (n=8):Denemenin 1.gününden başlanarak 8 mg/kg melatonin 18:00 - 20:00 saatleri arasında i.p enjeksiyon yoluyla her gün uygulanmıştır.

Tüm hayvanlardan denemenin 15. gününde heparinize edilmiş enjektörler vasıtasıyla kardiyak kanlar toplanmış ve ardından tüm hayvanlar eter anestezi altında sakrifiye edilmiştir.

### **3.3. Tümör Gelişiminin Takip Edilmesi**

Tüm hayvanların günlük besin ve su tüketimi, ağırlık artışları takip edilmiş ve kayıt altına alınmıştır.

### **3.4. Biyokimyasal Analizler**

Tüm hayvanlardan toplanan kardiyak kanlardan eritrosit paketleri hazırlanarak -70 °C’de saklanmıştır. Daha sonra bu numunelerden GSH ve MDA parametreleri belirtilen prosedürlere uygun olarak çalışılmıştır (Taysi, 2003).

#### **3.4.1.Malondialdehit (MDA) Ölçümü**

Uchiyama ve Mihara’ nın MDA çalışma yöntemi esas alınarak uygulanmıştır (Uchiyama ve Mihara 1977). Bu yöntem lipit peroksidasyon ürünlerinden malondialdehitin tiobarbitürik asit ile oluşturduğu kompleksin spektrofotometrik olarak 520 ve 535 nm’ de tespiti esasına dayanan bir yöntemdir.

#### Reaktifler

- \_ Homojenizasyon çözeltisi: % 1,15 KCl çözeltisi
- \_ Tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi: % 0,6 (w/v)
- \_ % 1’ lik fosforik asit çözeltisi
- \_ n-Butanol
- \_ Standart: Tetraetoksipropan

#### **Prensibi:**

Yağ asidi peroksidasyonu son ürünü olan MDA TBA ile reaksiyona girerek 532 nm de maksimum absorban veren pembe renkli bir kompleks oluşturur.

### **Hazırlanacak çözeltiler:**

- 1- Fosfat tamponu ile tamponlanmış serum fizyolojik: 8.1 g NaCl, 5.79 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O ve 0.252 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O tartılıp bir miktar suda çözülür ve son hacim 1 litreye tamamlanarak pH 7.4 e ayarlanır.
- 2- BHT çözeltisi (%0.88): 88 mg BHT tartılıp, 10 ml mutlak alkol içinde çözülür. Günlük hazırlanır.
- 3- Triklor asetik asit (TCA,%30): 30 g TCA tartılıp bir miktar distile suda çözülür ve son hacim 100 ml ye tamamlanır.
- 4- EDTA çözeltisi (0.1 M): 34.899 g EDTA-Na<sub>2</sub> tartılıp distile su ile 1 litreye tamamlanır. Çözünmesi için pH baz ilavesi ile 8.0 getirilmelidir.
- 5- TBA çözeltisi (%1'lik): 1 g TBA tartılıp, 100 ml 0.05 N NaOH içinde çözülür. Taze hazırlanmalıdır.
- 6- NaOH çözeltisi (0.05 N): 2 g NaOH tartılıp bir miktar distile suda çözülür ve hacim 1 litreye tamamlanır.

### **Deneyin yapılışı:**

0.2 ml kandan alınan numune üzerine 0.8 ml fosfat tamponu, 0.025 ml BHT ve 0.5 %30'luk TCA eklenir. Tüpler vortekste karıştırılır ve iki saat buzda bekletilir. Daha sonra 2000 devir/dak. da 15 dakika santrifüj edilir. Süpernatandan bir ml alınarak başka bir tüpe aktarılır. Üzerine 0.075 ml 0.1 M'lık EDTA ve 0.25 ml %1'lik TBA eklenir. Tüpler karıştırılır ve kaynar su banyosunda 15 dk. Bekletilir. Oda ısısına soğutulduktan sonra spektrofotometrede 532 nm de absorbansları okunur. (Ohkawa vd.,1978)

### **Hesaplama:**

MDA-TBA kompleksinin 532 nm deki ekstinksiyon katsayısından ( $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) yararlanılarak nanomol/ml cinsinden MDA değerleri bulunur. Sonuçlar aşağıdaki şekilde hesaplanır.



$$A = a \times b \times c$$

a: absorbans

b: ışık yolu

c: konsantrasyon

### 3.4.2.Total Glutasyon (TGSH) Ölçümü

GSH-Px aktivitesinin ölçümü Paglia ve Valentina (1967) methoduna göre yapılmıştır. GSH-PX tert-butil hidroperoksit (tBH) varlığında glutasyon oksidasyonunu katalizler. Okside glutasyon  $NADP^{+}$  yi  $NADPH$ ' e yükseltirken, glutasyon redüktaz ve  $NADPH$  varlığında indirgenmiş forma dönüştürür.  $NADPH$ ' in absorbansındaki azalma 340 nm' de ölçülmüştür. Ayrıca dakikada bir absorbans değişimi ölçüldü. GSH-Px aktivitesi birim olarak nmol/ ml olarak ifade edilmiştir.

Eritrositlerin hemen hemen tüm non-protein sülfidril grupları redükte glutasyon formundadır. 5,5' Ditiobis (2- nitrobenzoik asit) (DTNB) sarı bir bileşiğe dönüşen sülfidril gruplarıyla kolayca redükte edilebilen bir disülfid kromojendir. Redükte kromojenin absorbansı 412 nm'de ölçülecek ve direkt GSH konsantrasyonu ile orantılıdır.

#### Reaktifler

\_Metafosforik asit: 0,5 M

\_Fosfat tamponu: 1M, pH: 8,0

\_Ellman reaktifi: DTNB: 160  $\mu$ M ve  $KHCO_3$ : 319  $\mu$ M, pH: 8,0 olacak

şekilde KOH ile ayarlanmıştır.

#### Deneyin Yapılışı

Kan örnekleri, 1/5 ağırlık/hacim (w/v) olacak şekilde metafosforik asitle seyreltilip, homojenize edilmiştir. Homojenatlar, 3500 rpm' de, 10 dakika santrifüj edilmiştir. Her bir numune tüpüne, 0,2 ml süpernatant, 0,1 ml distile su, 0,3 ml fosfat tamponu, 2,4 ml Elman reaktifi konularak karıştırılmıştır, 410 nm'de kör tüpüne karşı, absorbans ölçülmüştür. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi ANOVA + Dunnett multiple comparisons test yöntemine göre yapılmıştır.

Hesaplama:

$\Delta A = \sum x \Delta c \times l$  eşitliğinde, p-nitro fenolat için  $\sum = 13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  değeri ve Lowry yöntemi ile bulunan mg protein değeri kullanılarak, glutatyon miktarı  $\mu\text{mol GSH/mg}$  protein olarak hesaplanmıştır.

### **3.5. Histopatolojik Değerlendirme**

Tüm hayvanların tümör dokuları ambulok çıkarılmış ve 24 saat %10'luk tamponlu formaldehit içerisine alınmıştır. Daha sonra değişik derişikliklerdeki alkoller ve ksilollerden geçirilerek 24 saat içerisinde tespit edilmiştir. Böylece parafin blokları hazırlanan doku örneklerinden 4 mikron kalınlığında doku kesitleri alınmıştır ve deparafinizasyon işlemi uygulanmıştır. Hematoksilen ile boyanan örnekler ksilolde şeffaflaştırıldıktan sonra Nikon marka ışık mikroskobunda değerlendirilmiştir.

### **3.6. İstatiksel Analizler**

Araştırma sonunda elde edilen verilere ait varyans analizi, SAS paket programı kullanılarak yapılmış (Anonymous, 1997), ortalamaların karşılaştırılmasında, Duncan Çoklu Karşılaştırma testinden yararlanılmıştır (Düzgüneş ve ark., 1987).

## BÖLÜM 4

### ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 4.1. Deneklerin Ağırlık Değişiminin Takibi İle İlgili Bulgular

Hayvanlar denemenin başlangıç gününden itibaren her gün hassas terazide tartılmış ve tartım sonuçları kayıt altına alınmıştır. Her bir gruba ait ağırlık değişimi deneklerin 15 g ün sonundaki ağırlıklarından başlangıçtaki ağırlıkları çıkarılarak hesaplanmıştır. (Tablo 4.1)

**Tablo 4.1.** Değişik Dozlarda Melatonin Uygulaması ile *Swiss albino* Türü Farelerde Gözlenen Ağırlık Değişimleri.

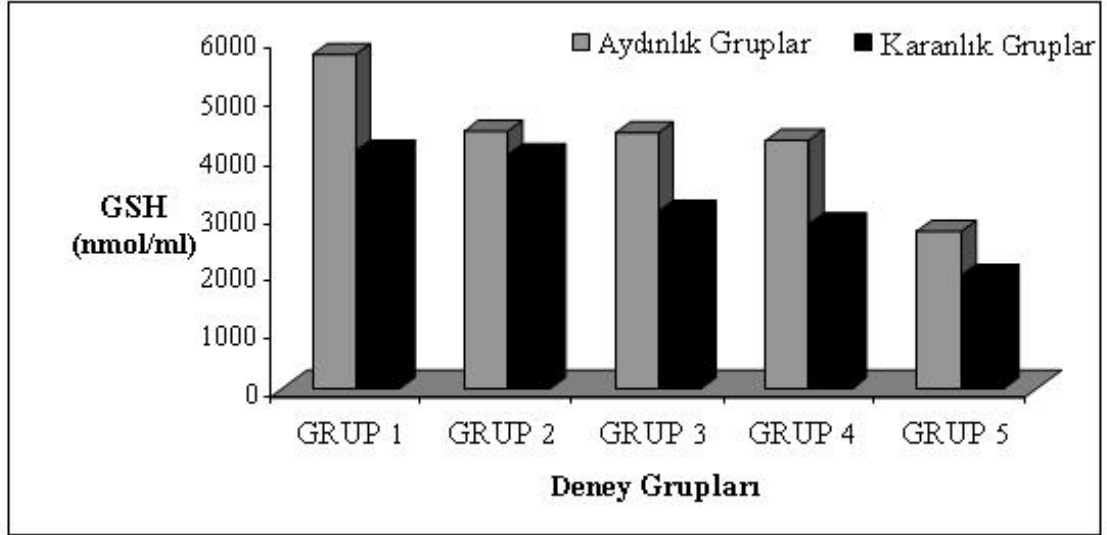
Denek no	Deneklerin ağırlık değişimleri									
	Aydınlık gruplar					Karanlık gruplar				
	1.GRUP	2.GRUP	3.GRUP	4.GRUP	5. GRUP	1.GRUP	2.GRUP	3.GRUP	4.GRUP	5. GRUP
1.	0,7	-2,8	0,9	11	-3,9	-6	3	7	-	-3,9
2.	-7	-3,9	1,4	3,1	0,2	-2,2	2,8	3,6	5,5	-5,9
3.	-1,8	-0,9	-2	-11,1	1	9,2	2,1	-	-2,7	-0,2
4.	4,4	-8,2	-	10,3	-3,2	-14,5	2,6	2,4	1,4	-2,5
5.	-2,1	-0,6	1,2	1,3	-3,6	-2,6	2,8	-	1,6	-4,2
6.	1,7	0,7	2,7	9,6	-0,6	2	1,5	2,5	0,8	-7,2
7.	-0,4	-1,7	-2,9	3,5	-3,6	4	0,1	6,3	1,4	-2,4
8.	4,2	-0,2	-1,3	-7,1	-0,7	10,3	3	7,4	2,2	-3,3

Değerler 15. gün sonundaki denek ağırlıkları ile deney başlangıcındaki ağırlıklardan çıkartılarak hesaplanmıştır. (- : ölüm)

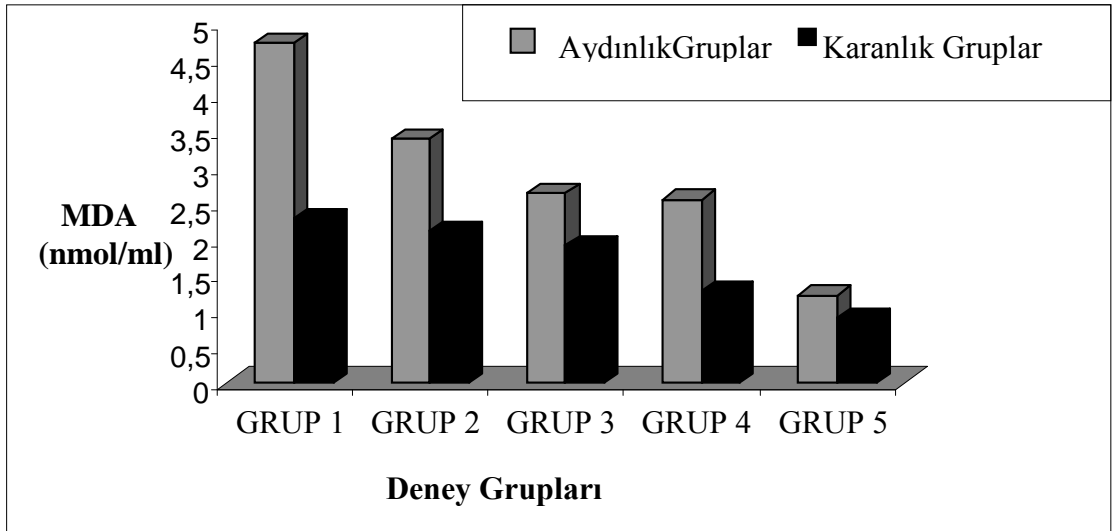
Deney hayvanlarının hem aydınlık hem de karanlık gruplarındaki ağırlık değişimleri istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2.Biyokimyasal Bulgular

Deney havanlarına ait MDA ve GSH parametre değerleri Şekil 4.1 ve 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Aydınlik gruplar ile karanlık grupların kanlarındaki GSH miktarları



Şekil 4.2. Aydınlik gruplar ile karanlık grupların kanlarındaki MDA miktarları

Aydınlik deneme gruplarındaki en yüksek GSH değeri Grup A1’de (5758 nmol/ml) saptanırken, en düşük GSH değeri ise Grup A5’te (1949 nmol/ml) elde edilmiştir.

Aydınlık deneme gruplarına ait GSH değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak ( $p>0,05$ ) önemli olmadığı tespit edilmiştir.

Aydınlık grupların GSH değerleri incelendiğinde tüm grupların GSH miktarlarında azalmaların olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubuna (Grup A1) kıyasla Grup A2, Grup A3, Grup A4 ve Grup A5'in GSH miktarları sırasıyla % 25.6, % 28.9, % 22.8 ve % 33.9 düzeylerinde azalma göstermiştir.

Karanlık deneme gruplarındaki en yüksek GSH değeri Grup K1'de (4411 nmol/ml) saptanırken, en düşük GSH değeri ise Grup K3'te (2707 nmol/ml) elde edilmiştir. Karanlık deneme gruplarına ait GSH değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak ( $p>0,05$ ) önemli olmadığı tespit edilmiştir.

Karanlık grupların GSH değerleri incelendiğinde tüm grupların GSH miktarlarında azalmaların olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubuna (Grup K1) kıyasla Grup K2, Grup K3, Grup K4 ve Grup K5'in GSH miktarları sırasıyla % 30.3, % 35.2, % 38.6 ve % 8.4 düzeylerinde azalma göstermiştir.

Aydınlık deneme gruplarındaki en yüksek MDA değeri Grup A1'de (4,735 nmol/ml) saptanırken, en düşük MDA değeri ise Grup A5'te (1,284 nmol/ml) elde edilmiştir. Aydınlık deneme gruplarına ait MDA değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak ( $p>0,05$ ) önemli olmadığı belirlenmiştir.

Aydınlık grupların MDA değerleri incelendiğinde tüm grupların MDA miktarlarında azalmaların olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubuna (Grup A1) kıyasla Grup A2, Grup A3, Grup A4 ve Grup A5'in MDA miktarları sırasıyla % 51.6, % 44,3, % 28.2 ve % 73 düzeylerinde azalma göstermiştir.

Karanlık deneme gruplarındaki en yüksek MDA değeri Grup K1'de (1,903 nmol/ml) saptanırken, en düşük MDA değeri ise Grup K3'te (0,897 nmol/ml) elde edilmiştir. Karanlık deneme gruplarına ait MDA değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak ( $p>0,05$ ) önemli olmadığı belirlenmiştir.

Karanlık grupların kontrolü ile diğer karanlık gruplar karşılaştırıldığında MDA miktarlarında azalma ve artmalar belirlenmiştir. Kontrol grubuna (Grup 1) oranla

Grup 2 ve Grup 5'te sırasıyla % 34 ve % 10 artış olduğu ve Grup 3 ve Grup 4'te ise sırasıyla % 52,8 ve % 36 azalma olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca aydınlık ve karanlık deneme gruplarının MDA ve GSH değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ).

### 4.3. İmmünohistopatolojik Bulgular

Deney hayvanlarından ambulok olarak çıkarılan solid tümör dokularının histopatolojik incelenmeleri sonucunda tümör inokülasyonu yapılan tüm gruplarda tümör tutulumunun olduğu belirlenmiştir.

Denek hayvanlarından çıkarılan tümör dokularının çapları ölçülmüştür (**Tablo 4.2**)

**Tablo 4.2** Deneklerde görülen tümör çapları

Denek no	Tümör çapları (cm)									
	Aydınlık gruplar					Karanlık gruplar				
	1.GRUP	2.GRUP	3.GRUP	4.GRUP	5. GRUP	1.GRUP	2.GRUP	3.GRUP	4.GRUP	5. GRUP
1.	1,2	1	0,6	0,9	T.Y.	0,6	1,2	1,6	-	T.Y.
2.	1	1,2	1,2	1,3		0,9	1,5	1,6	1,6	
3.	0,8	1	1	0,7		1,2	1	-	1,4	
4.	1	0,6	-	1,1		0,6	1,4	1,4	1,2	
5.	0,7	1	0,8	0,7		0,8	1,4	-	1,1	
6.	0,5	0,6	1	0,8		1	1,2	1	1,8	
7.	1	1,3	0,8	1,3		0,9	1,7	1,4	1,5	
8.	0,7	1	0,8	0,9		0,5	1,4	1,4	1,5	

T.Y: Tümör yok - : ölüm

Aydınlık grupların kontrolünün (Grup A1) tümör çapları ile diğer aydınlık grupların tümör çapları arasında istatistiksel olarak önemli bir değişim olmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ).

Karanlık grupların kontrolü (Grup K1) ile Grup K2' nin tümör çapları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiş iken ( $p>0,05$ ), Grup K3 ve Grup K4' ün deneklerinin tümör çapındaki artış ise istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Deneklerden çıkarılan tümörlerin dokularında görülen nekroz alanlarının hesaplanması Tablo 4.3’ te verilmiştir. Çalışmamızda tüm hayvanların nekroz alanları ise (+,-) skora sistemine belirlenmiştir.

**Tablo4.3.** Deneklerde görülen nekrozların alan ölçümleri

Denek no	Nekroz alanları									
	Aydınlık gruplar					Karanlık gruplar				
	1.GRUP	2.GRUP	3.GRUP	4.GRUP	5. GRUP	1.GRUP	2.GRUP	3.GRUP	4.GRUP	5. GRUP
1.	++	++	+	++	N.Y.	+	++	++	-	N.Y.
2.	++	++	+++	+++		++	+++	+++	+++	
3.	++	++	++	+		++	++	-	++	
4.	+	++	-	+++		++	++	+++	+++	
5.	+	++	++	+		++	+++	-	+++	
6.	+	+	+++	++		++	+++	+++	+++	
7.	+++	+++	++	+++		++	+++	+++	+++	
8.	+	+++	+++	++		+	++	+++	+++	

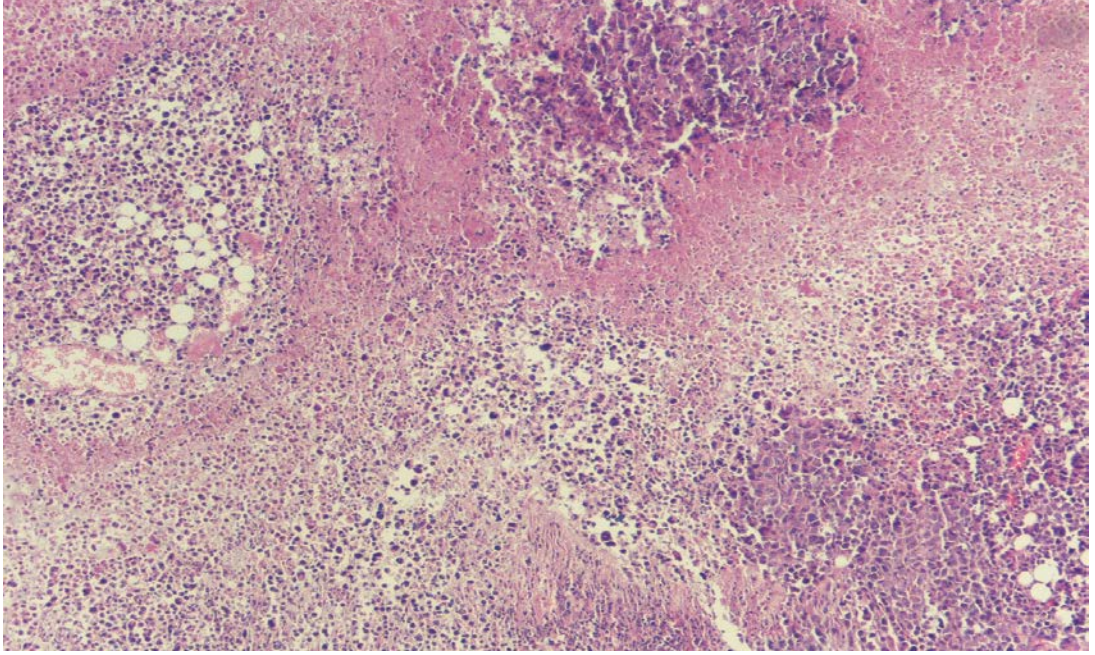
+ : çok az nekrozlu, +: az nekrozlu, ++ : orta düzeyde nekrozlu, ++: çok nekrozlu, +++ : çok fazla nekrozlu N.Y.: Nekroz yok - : ölüm

Aydınlık grupların kontrolü (Grup A1) ile diğer aydınlık grupların nekroz alanları arasındaki değişim istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ).

Ancak karanlık grupların kontrolü (Grup K2) ile diğer karanlık grupların nekroz alanları karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ).

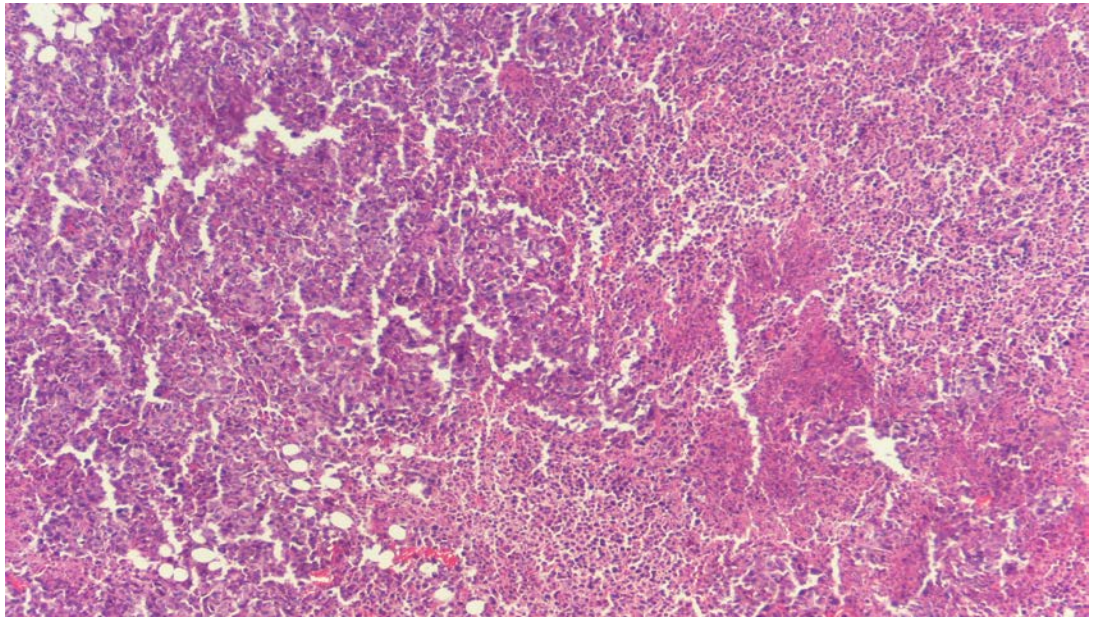
Aydınlık ve karanlık grupların tümör çapı ve nekroz alanları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir ( $p>0,05$ ).

Tümör inokülasyonunu takiben sadece ışık uygulamasına tabi tutulan hayvanlardan oluşan Grup A1’e ait histopatolojik değerlendirmeler sonucunda nekroz alanı % 62,5 olduğu belirlenmiştir. Tümör çapı ortalaması ise 0,7 cm olarak hesaplanmıştır. (**Şekil 4.3.**)



**Şekil 4.3.** Grup A1'e Ait Tümör Hücreleri Tarafından İnvaze Olmuş Doku Kesiti

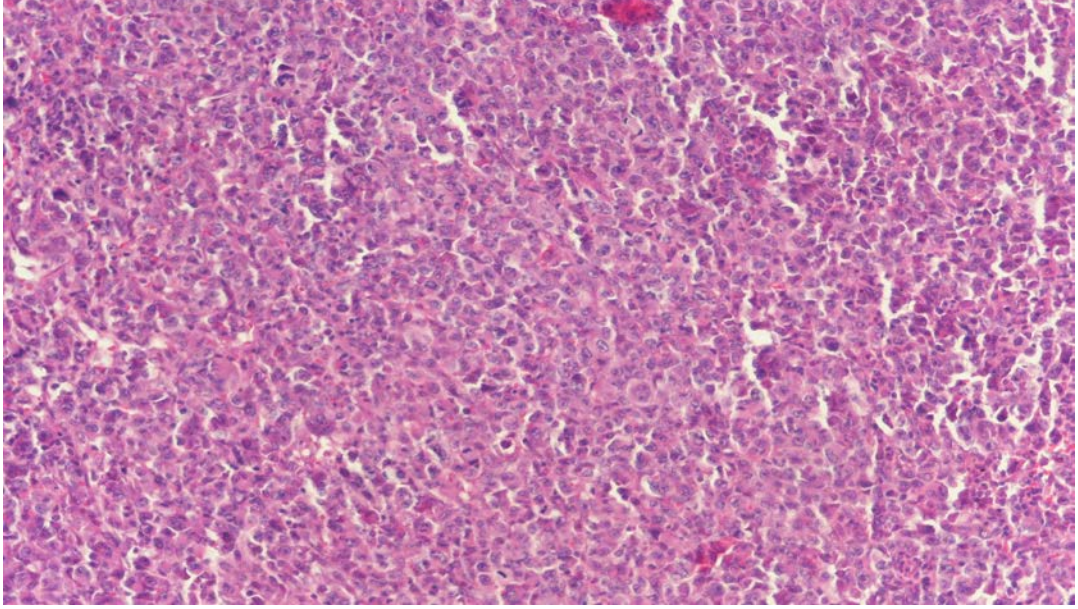
Tümör inokülasyonunu takiben 8 mg/kg melatonin (MLT) verilen ve ışık uygulanan Grup A2'ye ait histopatolojik değerlendirmeler nekroz alanlarının % 77,5 olduğu belirlenmiştir. Tümör çapı ise 0,96 olarak hesaplanmıştır. (**Şekil 4.4.**)



**Şekil 4.4.** Grup A2'ye Ait Tümör Hücreleri Tarafından İnvaze Olmuş Doku Kesiti

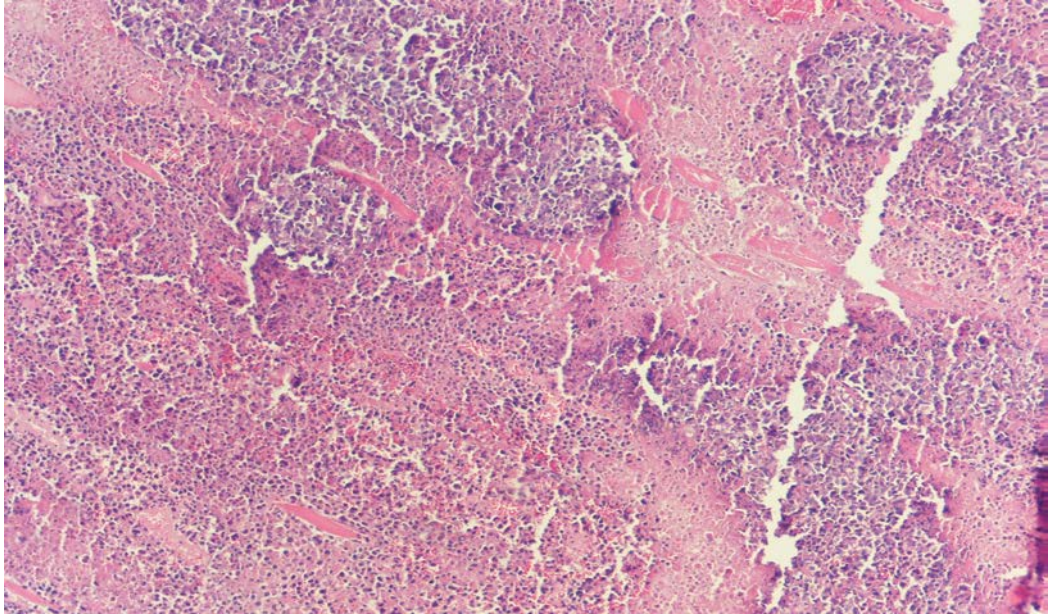


Tümörlü hayvanlara 12 mg/kg MLT'nin ve ışık uygulanan Grup A3'e ait histopatolojik değerlendirmeler sonucunda nekroz alanlarının % 77 tümör çapının ise 0,8 cm olduğu belirlenmiştir. (Şekil 4.5)



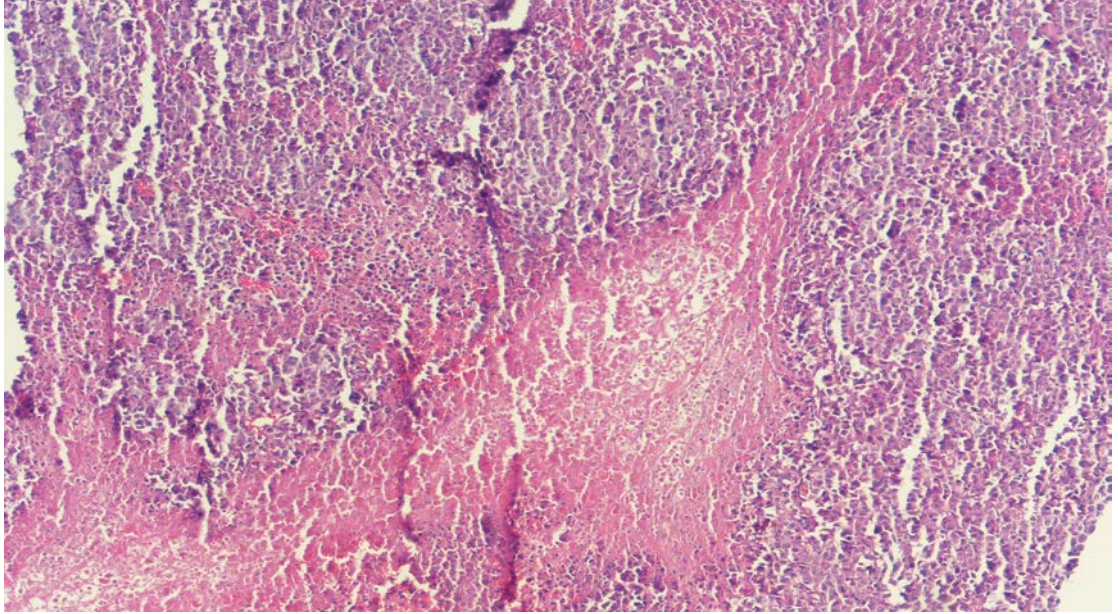
**Şekil 4.5.** Grup A3' e Ait Tümör Hücreleri Tarafından İnvaze Olmuş Doku Kesiti

Tümörlü hayvanlara 16 mg/kg MLT'nin ve ışık uygulanan Grup A4'e ait histopatolojik değerlendirmeler sonucunda nekroz alanlarının % 75 tümör çapının ise 0,96 cm olduğu belirlenmiştir. (Şekil 4.6)



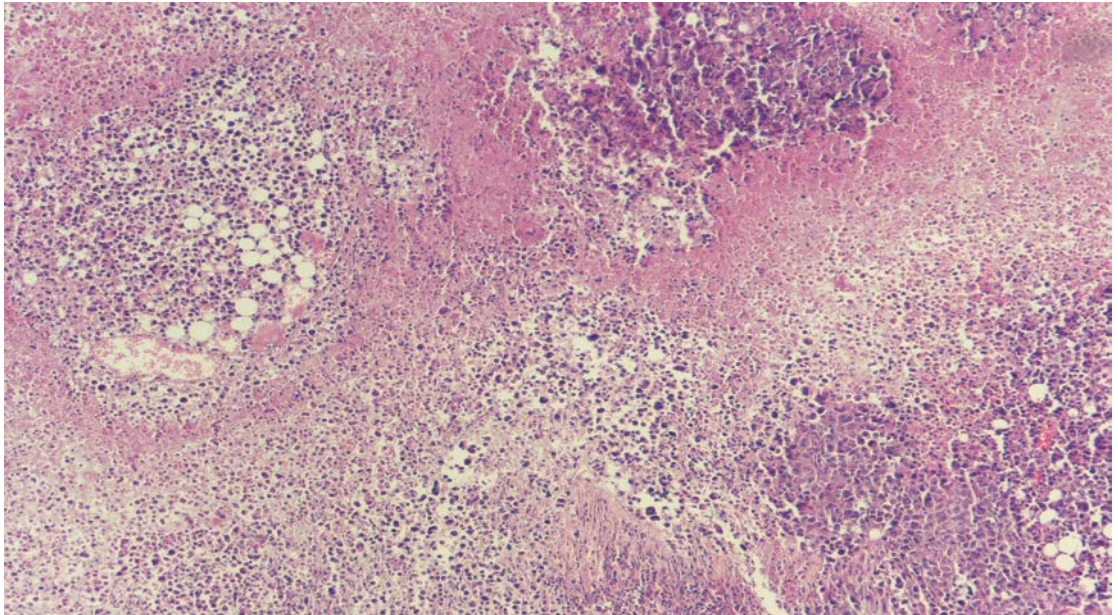
**Şekil 4.6.** Grup A4'e Ait Tümör Hücreleri Tarafından İnvaze Olmuş Doku Kesiti

Tümörlü hayvanlara sadece karanlık uygulaması yapılan Grup K1'e ait histopatolojik değerlendirmeler sonucunda nekroz alanlarının % 65, tümör çapının ise 0,85 cm olduğu belirlenmiştir. (Şekil 4.7.)



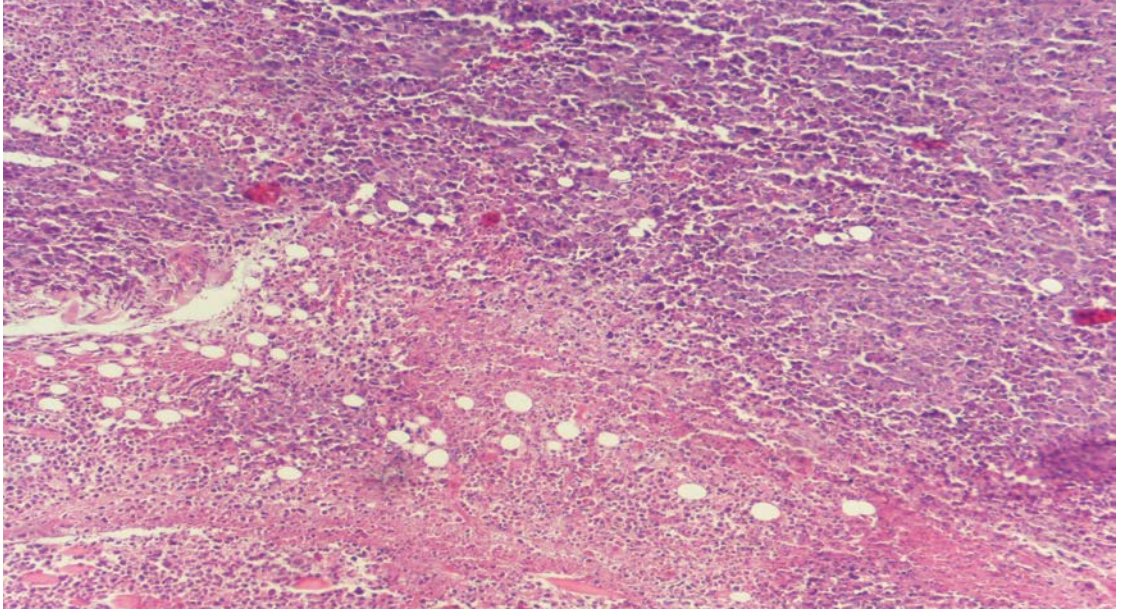
**Şekil 4.7.** Grup K1'e Ait Tümör Hücreleri Tarafından İnvaze Olmuş Doku Kesiti

Tümörlü hayvanlara 8 mg/kg MLT'nin ve karanlık uygulaması yapılan Grup K2'ye ait histopatolojik değerlendirmeler sonucunda nekroz alanlarının ise % 100 tümör çapının ise 1,14 cm olduğu belirlenmiştir. (Şekil 4.8.)



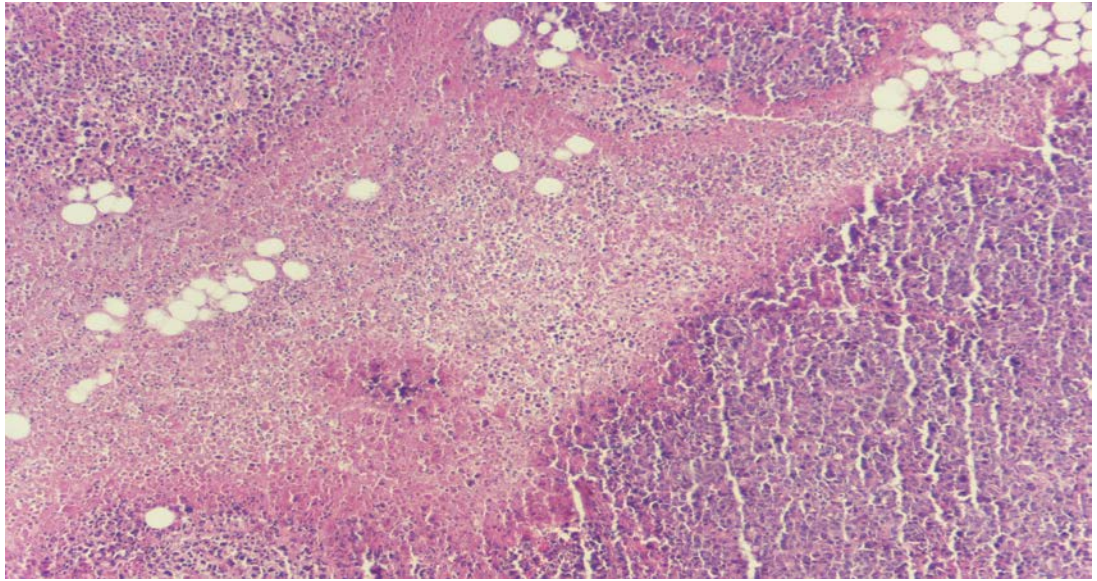
**Şekil 4.8.** Grup K2' ye Ait Tümör Hücreleri Tarafından İnvaze Olmuş Doku Kesiti

Tümörlü hayvanlara 12 mg/kg MLT'nin ve karanlık uygulaması yapılan Grup K3'e ait histopatolojik değerlendirmeler sonucunda nekroz alanlarının %100 tümör çapının ise 1,4 cm olduğu belirlenmiştir. (Şekil 4.9.)



**Şekil 4.9.** Grup K3'e Ait Tümör Hücreleri Tarafından İnvaze Olmuş Doku Kesiti

Tümörlü hayvanlara 16mg/kg MLT'nin ve karanlık uygulaması yapılan Grup K4'e ait histopatolojik değerlendirmeler sonucunda nekroz alanlarının % 100 tümör çapının ise 1.44 cm olduğu belirlenmiştir. (Şekil 4.10.)



**Şekil 4.10.** Grup K4'e Ait Tümör Hücreleri Tarafından İnvaze Olmuş Doku Kesiti

Ayrıca aydınlık ve karanlık grupların nekroz alanı, tümör çapı, ağırlık değişimi ve MDA ve GSH değerleri birbirleriyle karşılaştırılığında (A1-K1, A2-K2, A3-K3, ..... ) istatistiksel olarak önemli bir değişim olmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ).

## BÖLÜM 5

### TARTIŞMA VE SONUÇ

Binlerce yıldır tanınan ve biyolojik önemi bilinen pineal bez ve bu bölgeden salınan melatoninin kanser üzerine olası etkileri ilk kez 20. yy başlarından itibaren sistematik olarak ele alınmaya başlanmıştır. O tarihlerden günümüze kadar çok sayıda çalışma yapılmıştır. Melatoninin bir yandan doğrudan anti-kanser etkinlik gösterebileceği bilgisinin yanı sıra, kronobiyolojik düzenleyici olduğu, antioksidan ve bağışıklık sistemini destekleyici özelliklerinin de kanserle ilişkili olabileceğine yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Reiter, 2003 ; Jung ve Ahmad, 2006). Melatoninin çeşitli kanser türleri üzerindeki etkinliğinin ortaya konulmasının yanı sıra klasik kanser tedavileriyle beraber kullanımının genel durumu düzelttiği, klinik cevabı ve yaşam süresini artırdığı bildirilmektedir (Topal vd., 2009).

Çalışmamızda elde edilen verilere göre tümör inokülasyonuna bağlı olarak deney hayvanlarının hem aydınlık hem de karanlık gruplarında kilo artış ve azalışlarının beraber görülmesi kilo artışlarının anlamsız olduğu sonucunu doğurmuştur. Sonuç olarak melatoninin uygulamasıyla gerek aydınlık gerekse karanlık gruplarda kilo değişimine bağlı bir bulgu elde edilememiştir.

Bazı araştırmacılar kanserli hastalarda plazmada ve kanserli dokularda artan lipid peroksit düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir. (Gerber ve Segela., 2000, Sadakani ve Nadkarni., 1996, Otamiri ve Sdojahl., 1989). Kanser hastalarında anormal olarak çoğalan hücrelerde lipid peroksidasyonunun artmasıyla serum lipid peroksitlerinde yükselmenin olduğunu Szatrowski ve Nathan (1991) araştırmalarında rapor etmişlerdir.

Serbest radikal aracılı doku hasarının göstergesi olarak daha çok oksidatif hasar sonucu oluşan ürünlerin ölçülmesi yoluna gidilmektedir. Bu amaçla lipid peroksidasyonunun yıkım ürünlerinden biri olan MDA, oksidatif hasarın *in vivo* göstergesi olarak en sık ölçülen parametredir.

Skrzydewska ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada kolorektal kanser hastalarında plazma ve doku MDA konsantrasyonlarını arttığını göstermişlerdir (Skrzydewska vd., 2005). Erata ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada kolorektal kanserli hastaların normal dokuları ile malign dokuları arasındaki MDA düzeylerini karşılaştırmışlar ve malign dokuda MDA düzeylerinin %111 daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (Özdemirler vd., 2005). Bayraktar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kolon kanserli hastalarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum MDA düzeylerinde anlamlı bir artış görülmektedir (Bayraktar ve Harputluoğlu., 2007). Otamiri ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kolorektal kanser hastalarında normal doku ile karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde anlamlı bir yükselme bulmuşlardır (Otamiri ve Sjudahl.,1989).

Ancak kanser vakalarında MDA seviyesinin yükseldiğini gösteren çalışmaların yanı sıra MDA seviyesinde düşüşlerin gözlemlendiği ve bu sonuçların istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı çalışmalar da mevcuttur. Özellikle melatonin uygulanan çalışmalarda MDA seviyesindeki değişikliklerin önemsiz olduğu vurgulanmaktadır. Mei ve arkadaşları (2005) yaptıkları bir çalışmada kolitli ratlardan aldıkları inflamasyonlu kolonu lipopolisakkaritle uyararak *in vivo* ve *in vitro* üzerine etkilerini incelemişlerdir. *In vitro* deneylerde lipopolisakkaritle uyarılan hücrelerde 1mM dozda melatonin uygulamasının NO melatoninin MDA ve NO<sup>•</sup> düzeyinde anlamlı bir düşüşe sebep olduğunu, 10 µM ve 100 µM dozlarda ise NO<sup>•</sup> düzeylerinde bir azalma olduğunu fakat bu azalmanın anlamlı olmadığını göstermişlerdir. Yerer ve arkadaşları (2005) yaptıkları çalışmada plazma melatonin seviyelerindeki değişikliklerin eritrosit MDA düzeylerinde değişikliklere sebep olduğunu fakat bu değişikliklerin istatistiksel bir anlamlılık taşımadığını göstermişlerdir. Kavak ve arkadaşları da (2008) yaptıkları bir çalışmada kolorektal tümörlerde matriks metalloproteinaz-9 üzerine melatonin etkisinin doku MDA düzeylerinde anlamlı bir fark olmadığını bulmuşlardır.

Bizim çalışmamızda, karanlık ve aydınlık ortamlarda EST inoküle edilen *Swiss albino* türü farelerde melatoninin uygulamasının MDA düzeyleri üzerindeki artış ve azalmalara etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p>0,05$ ) saptanmıştır. MDA seviyesi ile ilgili sonuçlarımız hem Kavak hem de Mei ve arkadaşlarının yaptıkları

araştırmalarının sonuçlarıyla paralellik gösterirken, Skrzydlewska, Erata, Bayraktar, Otamiri ve arkadaşlarının araştırma sonuçlarıyla uyumlu değildir.

GSH, hücrelerde en çok bulunan enzimatik olmayan antioksidandır ki hücre yaralanmasının neden olduğu oksidatif strese karşı savunmada kritik bir rol oynar. GSH seviyesinin azalması, hastalık gelişimine etki edebilir (Brittebo vd., 1993). Dinçer ve arkadaşları (2008) yaptıkları bir çalışmada deneysel akut pankreatit üzerine melatonin enjeksiyonunun ve pinelaktominin etkilerini araştırmışlardır. Kontrol grubu akut pankreatitli deneklerde belli bir düzeye çıkan MDA değerlerinin işleme pinealektominin ilave edilmesiyle istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yükseldiğini, buna karşılık GSH ve SOD düzeylerinin düştüğü saptamışlardır. Kuş ve arkadaşları (2004), sıçan perifrontal korteksinde formaldehit maruziyetiyle oluşan oksidatif hasara karşı melatonin hormonunun koruyucu etkisini araştırmışlardır. Formaldehit maruziyetiyle birlikte melatonin enjekte edilen sıçanlarda SOD ve GSH-Px'te enzim aktivitelerinde bir artış olduğunu MDA değerlerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğunu bulmuşlardır. Baydaş ve arkadaşları (2002) pinealektomize edilen ratların dokularında lipid peroksidasyon düzeyleri, glutatyon peroksidaz aktivitesi ve okside glutatyon gibi antioksidan enzimlerin günlük değişimlerini incelemişler ve hem ekzojen hem de endojen melatoninin antioksidan enzim aktivitesini artırdığını saptamışlardır. Bu enzimlerin bir kısmının melatoninin sirkadiyan ritmi ile paralellik gösterdiği ve pinealektomize ratlarda bu ritmin etkilendiği belirtilmiştir. Yüce ve Aksakal (2006) yaptıkları bir çalışmada ratlarda homosisteinin oksidan-antioksidan sistem ve koroner damarlarda oluşturduğu değişiklikler üzerine melatoninin etkisini araştırmışlardır. Homosistein uygulanan erkek ratların hem plazma hem de doku GSH düzeylerinde kontrol grubuna göre azalma tespit edilirken, melatonin uygulamasının ise homosistein grubunda görülen bu azalmaları derinleştirdiğini görmüşlerdir. Ancak dişilerde homosistein uygulaması sadece doku GSH düzeylerinde bir azalmaya neden olmuştur.

Biz de çalışmamızda; kullandığımız melatonin uyguladığımız EST taşıyan farelerin MDA ve GSH düzeylerindeki plazma değişiminin anlamlı bir fark yaratmadığını bulduk. Bu sonuç melatonin antioksidan etkinliğinin lipid peroksidasyonu üzerine etkisi olmadığını düşündürmektedir.

Antioksidan ve immün sistemi destekleyici özellik sergileyebileceği yönünde pek çok makale bulunan melatoninin antikarsinojenik etkileri ile ilgili çalışmalar da rapor edilmiştir. Melatoninin, tümör büyüme faktörü (TGF: tumor growth factor) üretimini inhibe ederek IL-2'nin antitümör aktivitesini yükseltebileceğine dair çalışmalar mevcuttur (Webb ve Puig-Domingo, 1995). Melatonin onkostatik ajan olarak etki göstermektedir (Cos ve Blask, 1994). Epifiz bezi alınan hayvanlarda primer tümörün stimüle olduğu, metastazların arttığı gözlenmiştir (Hughes, 1994). Melatoninin hayvan deneylerinde melanom ve meme kanserleri gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Wilson vd., 1992; Blask vd., 1992). Diğer yandan, lösemi gibi hormon salgılamayan tümörlerde ise melatoninin olumsuz etkileri olduğu belirtilmektedir (Rohr ve Herold, 2002). Venhuskin ve arkadaşları (2007) melatonin mezenşimal orjinli malignanlarda inhibitör etkisini ilk kez göstermişlerdir. Başka bir araştırmada insan prostat kanseri hücrelerinde melatoninin uyarıcı etkileri araştırılmış ve sonuç olarak melatoninin prostat ve sekonder gelişim sürecinin önlenmesinde güçlü desteği olduğu bildirilmiştir (Tam vd., 2007). Rat meme kanseri hücresinde melatoninin tümör büyümesini engellediği rapor edilmiştir (Bizzari vd., 2003). Farriol ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada düşük ( $10^{-7}$  M- $10^{-10}$  M) ve yüksek dozlarda ( $1,2$  ve  $3 \times 10^{-3}$  M) melatoninin CT-26 sıçan hücrelerinde DNA sentezi üzerine olan etkilerini 5-bromo-2-deoksiüridin düzeylerine bakarak incelemişler, yüksek doz melatonin konsantrasyonları ile DNA sentezi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş bulmuşlardır (Farriol vd., 2000). Pek çok faktör pineal bezde melatonin sentez ve salınımını dolayısı ile plazma melatonin düzeyini etkiler (Noyan, 1993; Waldhauser vd., 1984). Bu faktörlerden en iyi bilineni ve en etkilisi, ortamın ışık durumu yani aydınlık ya da karanlık olmasıdır. Meme kanseri gelişiminde, gelişmiş ülkelerde ışığa yoğun maruziyet ve dolayısıyla melatonin azlığı hipotezi ortaya konulmaktadır (Rohr ve Herold, 2002). Anna ve arkadaşları (2008), Singapur' daki Çinli bayanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada 9 saat uyuyan bayanların 6 saat uyuyan bayanlara göre meme kanserine yakalanma riskinin daha az olduğunu tespit etmişlerdir.

Plazma melatoninin konsantrasyonu gece saatlerinde gündüze göre 3-10 kat fazladır. Melatonin salgılanması akşam saat 21:00-22:00 saatlerinde başlar, 02:00-04:00 saatleri arasında maksimum seviyelerine ulaşır, sabah 07:00-09:00 saatleri arasında azalmaya başlar. Melatonin hormonunun sirkadiyen bir ritimde çalışmasından dolayı biz de aydınlık ve karanlık gruplarımızdan oluşan çalışmamızda melatonin gece en



fazla pik yaptığı 02:00-04:00 saatleri arasında deneklerimize ışık uygulaması yaparak vücutta fizyolojik olarak salgılanan melatoninin inhibe edilmesi sağlanmıştır. İki farklı deney grubumuzun tümör gelişimi histopatolojik olarak değerlendirildiğinde diğer yapılan bazı çalışmaların aksine karanlık grubumuzda ki tümör çapları ve nekroz alanları aydınlık grubumuza göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Bizim çalışmamıza paralel olarak melatoninin kanser üzerinde etkisinin olmadığını belirten çalışmalarda mevcuttur: Farelerde deri kanserine melatonin etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada melatoninin MDA' yı baskıladığı fakat tümör dokularını etkilemediğini bildirmişlerdir (Venhuskin vd., 2007). Melatoninin adenokanser hücrelerinde apoptoz üzerine etkisi izlenmemiştir (Kavak, 2008). Melatonin MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır ve melatonin iki farklı apoptotik süreci tetiklediğini bildirmişlerdir.

Fakat literatür taramaları sonucu kanser çalışmalarında gece ışık uygulamasıyla melatonin salgılanmasının inhibe edildiği, ilave melatonin uygulanarak bu etkinin bertaraf edilmeye çalışıldığı ve melatoninin antioksidan ve antikarsinojen özelliğinin değerlendirildiği in vivo hayvan modellemelerine rastlanmamıştır. Çalışmamızda melatonin uygulamasının doza ve karanlık/aydınlık döngüsüne bağlı olarak karanlık gruptaki deneklerde agresif bir tümör olan EST tümörünü tetikleyici etkisini saptadık. Aydınlık gruptaki deneklerde tümör çapları ve nekroz alanları karanlık gruptaki deneklere nazaran daha küçük ve az olduğunu tespit ettik.

Sonuç olarak melatoninin deneysel EST üzerine karanlık ve aydınlık ortamda etkilerini araştıran bu çalışmamızda, MDA ve GSH düzeylerine herhangi bir olumlu etki göstermediği ortaya konmuştur. Tümör çapı ve nekroz alanları üzerine melatoninin karanlıkta tetikleyici etkisi olduğu saptanmıştır. Bu durum Ehrlich solid tümörünün fareler üzerinde çabuk ve hızlı ilerleyen agresif bir tümör olması nedeniyle melatoninin bu tümörü inhibe edemediğini düşündürmektedir. Literatürde melatoninin inhibe edici özelliği olduğunu saptayan çalışmalar bulunmasına rağmen, tümör tetikleyici olduğunu gösteren çalışmalar bulunmamaktadır. Şuana kadar literatürde melatoninin gece tümörü tetiklediğine yönelik bir sonuca rastlanılmamış olması çalışmamızın dikkat çekici bir sonucudur.

Ancak melatoninin tümör üzerine etkilerini kanıtlayabilecek daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Melatoninin sadece EST' ne değil diğer kanser türleri üzerine de etkilerinin araştırılması sonucu kesin yargıya varılabileceğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

- Acuna, C.D., Reiter, R.J., Menendez, P.A., Pablos, M.I., Burgos, A. (1994). Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *Journal of Pineal Research*, **16**, 100-112.
- Adams, J., Lauterburg, B.H., Mitchell, J.R. (1983). Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat: regulation and response to oxidative stress. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **227**, 749-745.
- Akkuş, İ. (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları Konya.
- Aktaş, E. (1996). Ehrlich Asit Sıvısının L-Hücrelerinin Çoğalma Hızına Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İstanbul.
- Anisimov, V.N., Zabezhinski, M.A., Popovich, I.G., Zaripova, E.A., Musatov, S.A., Andre, V., Vigreux, C., Godard, T. ve Sichel, F. (2000). Inhibitory effect of melatonin on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced carcinogenesis of the uterine cervix and vagina in mice and mutagenesis in vitro. *Cancer Letters*, **156**, 199-205.
- Arain, S.R., Ruehlow, R.M., Uhrich, T.D. (2004). The efficacy of dexmedetomidine versus morphine for postoperative analgesia after major inpatient surgery. *Anesthesia Analgesia*, **98**, 153-8.
- Arendt, J. (1995). The Pineal Gland: Basic Physiology and Clinical Implications. *Endocrinology*, **72**, 433-42.
- Arendt, J. (1998). Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of Reproduction*, **3**, 13-22.

- Baydaş, G., Gürsu, M.F., Yılmaz, S., et al. (2002). Daily rhythm of glutathione peroxidase activity, lipid peroxidation and glutathione levels in tissues of pinealectomized rats. *Neuroscience Letters*, **323**, 195-198.
- Bayraktar, M., Harputluoğlu, M., (2007). Kolon kanserli hastaların serum C-reaktif protein ve malondialdehit düzeylerinin incelenmesi. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Science*, **27**, 13-15.
- Belleville, J.W., Ward, D.S., Byron C., Bloor M. (1992). Effects of intravenous dexmedetomidine in humans I. Sedation, ventilation, and metabolic rate; *Anesthesiology*, **77**, 1125-1133.
- Bettahi I., Pozo D., Osuna C., Reiter R.J., Acuna-Castroviejo D., Guerrero J.M. (1996). Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *Journal Pineal Research*, **20**, 205-210.
- Bichel, P. (1970). Tumor Growth Inhibiting Effect of JB-1 Ascitis Fluid-1, An In Vivo Investigation, *European Journal of Cancer*, **6**, 291.
- Bizzarri, M., Cucina, A., Valente, M.G., Tagliaferri, F., Borrelli, V., Stipa, F. and Cavallaro, A. (2003). Melatonin and Vitamin D3 Increase TGF- $\beta$ 1 Release and Induce Growth Inhibition in Breast Cancer Cell Cultures. *Journal of Surgical Research*, **110**, 332-337.
- Blask, D.E., Lemus-Wilson, A.M., Wilson, S.T. (1992). Breast cancer: A model system for studying the neuroendocrine role of pineal melatonin in oncology. *Biochemical Social Transactions*, **20**, 309-11.
- Blask, D.E., Wilson, S.T., Fred, Z. (1997). Physiological melatonin inhibition of human breast cancer cell growth in vitro: evidence for a glutathione-mediated Pathway. *Cancer Research*; **57**, 1909-1914, May 15.
- Blask, D.E., Brainard, G.C., Dauchy, R.T., Hanifin, J.P., Davidson, L.K., Krause, J.A., Sauer, L.A., Rivera-Bermudez, M.A., Dubocovich, M.A., Jasser, S.A., Lynch, D.T., Rollag, M.D., Zalatan, F., (2005). Melatonin-Depleted Blood

- from Premenopausal Women Exposed to Light at Night Stimulates Growth of Human Breast Cancer Xenografts in Nude Rats. *Cancer Research*, **65**.
- Boutin, J.A., Aedinot, V., Ferry, G., Delagrangé, P. (2005). Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends in Pharmacological Sciences*, **26**, 412-419.
- Brittebo., E.B., Darnerud, P.O., Eriksson., C., Brandt., I. (1993). Nephrotoxicity and covalent binding of 1,1-dichloroethylene in buthionine sulphoximinetreated mice. *Archives of Toxicology*, **67**, 605–12.
- Bulian, Daniele., Pierpaoli, Walter. (2000). The pineal gland and cancer I. Pinealectomy corrects congenital hormonal dysfunctions and prolongs life of cancer-prone C3H/He mice. *Journal of Neuroimmunology*, **108**, 131–135
- Brennan, C.P., Hendricks, G.L., El-Sheikh, T.M., Mashaly, M.M., 2002. Melatonin and the enhancement of immune responses in immature male chickens. *Poultry Science.*, **81**, 371- 375
- Bourne, R.S., Mills, G.H. (1995). Melatonin: possible implications for the postoperative and critically ill patient., **32**, 371-379.
- Cabrera, J., Negrin, G., Este´vez, F., Loro, J., Reiter, R.J., Quintana, J. (2010). Melatonin decreases cell proliferation and induces melanogenesis in human melanoma SK-MEL-1 cells. *Journal Pineal Research*, **49**, 45–54
- Cardinalli, D.P., Pevet, P. (1998). Basic aspects of melatonin action. *Sleep Medicine Reviews*, **2**, 175-190. 59
- Cassone, W.M. (1990). Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends in Neuroscience.*, **13**, 457-63.
- Claustrat, B., Brun, J., Geoffriau, M., Chazot, G. (1998). Melatonin: from the hormone to the drug? *Restor Neurology Neuroscience*, **12**, 151-157.
- Claustrat, B., Brun, J., Chazot, G. (2005). The basic phylyology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Medicine Reviews*, **9**, 11-24.

- Cucina, A., Proietti, S., Anselmi, F.D., Coluccia, P., Dinicola, S., Frati, L., Bizzarri, M. (2009). Evidence for a biphasic apoptotic pathway induced by melatonin in MCF-7 breast cancer cells. *Journal Pineal Research*, **46**, 172–180.
- Currier, N.L., Sun, L.Z., Miller, S.C., (2000). Exogenous melatonin: quantitative enhancement in vivo of cells mediating non specific immunity. *Journal Neuroimmunology*, **104**, 101-108.
- Çam, A., Erdoğan, M.F. (2003). Melatonin. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, **56**, 103-112
- Çetin, E. (2005). Sıçanlarda ultraviyole radyasyonunun bazı bağışıklık değerleri üzerine etkisi. Doktora Tezi. A.U. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Programı. Ankara.
- Del, Gobbo, V., Libri, V., Villani, N., Calio, R., Nistico, G., 1989. Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. *International Journal Immunopharmacology*, **11**, 567-573.
- Demas, G.E., Klein, S.L., Nelson, R.J. (1996). Reproductive and immune responses to photoperiod and melatonin are linked in *Peromyscus* subspecies. *Journal of Comparative Physiology A*, **179**, 819-825.
- Dinler, K., (2008). İntra-peritoneal melatonin enjeksiyonu ve pinealektomi'nin deneysel akut pankreatit modelinde etkinliğinin araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi.
- Drazen, D.L., Bilu, D., Biblo, S.D., Nelson, R.J., (2001). Melatonin enhancement of splenocyte proliferation is attenuated by luzindole, a melatonin receptor antagonist. *American Journal of Physiology Regulation Integrative and Comparative Physiology*, **280**, R1476-1482.
- Drazen, D.L., Jasnow, A.M., Nelson, R.J., Demas, G.E. (2002). Exposure to short days, but not short term melatonin, enhances humoral immunity of male Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Journal of Pineal Research*, **33**, 118-124.

- Duke, J.A. (1985). *CRC Handbook of Medicinal Herbs*. CRC Pres International Inc., **13**, 229 (4718).
- Düzgüneş, O., Kesici, T., Kavuncu, O., Gürbüz, F., 1987. Araştırma ve Deneme Metotları (İstatistik Metotları-II). Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları: 1021, Ders Kitabı: 295. Ankara, 381s.
- Emre, B., (1993). Pineal bez ve melatonin. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi., **40**, 336-345.
- Esquifino, A.I., Perumal, S.R.P., Cardinali, D.P., (2004). Circadian organization of the immune response: A role for melatonin. *Clinical Applied Immunology Reviews.*, **4**, 423-433.
- Esterbauer, H., Cheeseman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hidroksynonenal. *Methods Enzymology*, **186**, 407-421.
- Forsling, M.L. (2001). Melatonin. *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes*, **8**, 147-153.
- Garcia, M.S., Gonzalez, H.M.G., Calvo, J.R., Rafii, I.M., Sanchez, M.V., Goberna, R. ve Guerrero, J.M. (1997). Melatonin enhances IL-2, IL-6 and IFN $\gamma$  production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *Journal of Immunology*, **159**, 574-581.
- Gerber, M., Segala, C., (1992). Aging and cancer: plasma antioxidants and lipid peroxidation in young and aged breast cancer patients. *Groupe d'Epidémiologie métabolique*. **62**, 235-46.
- Gomi, K., Morinto, M., Nomoto, K. (1983). Influence of Surgical Removal and Effect of Levamisole on Cytotoxic T-Cell Mediated Antitumour Immunity in Mice. *Cancer Research* **43**, 5120.

- Grounds, M. (1999). Dexmedetomidine: phase III results. Proceedings from the 19th international symposium on intensive care and emergency medicine. *Journal of medicine*, **121**, 16-19.
- Gümüşhan, H. (2002). İ.P., İ.V., S.C., Yollarla Uygulanan Adriamycin'in Ehrlich Asit Tümörü (EAT) Taşıyan Farelere Etkileri Üzerine Bir Çalışma, Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa.
- Hardeland, R., Reiter, R.J., Poeggeler, B., Tan, D-X. (1993). The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*. **17**:347-357.
- Holmberg T., Thuvander A., Hult K. (1988). Ochratoxin A as a supressor of mitogeninduced blastogenesis of porcine blood lymphocytes. *Acta Veterinia Scandinavia*, **29**, 219-223.
- Hotchkiss, A.K., Nelson, R.J., (2002). Melatonin and immune function: Hype or hypothesis? *Critical Revival Immunology*, **22**, 351-371.
- Huff, W., Hamilton, P.B., (1979).Mycotoxins their biosynthesis in fungi ochratoxins: metobolites of combined pathways. *Journal Food Protection*, **42** (10), 815-850.
- Hughes, J.T.(1994). Teratogenesis. *Carcinogenesis and mutagenesis*, **14**, 213-7.
- Jung, B., Ahmad, N. (2006). Melatonin in cancer management: Progress and Promise. *Cancer Research*, **66**, 9789-93
- Kaleoğlu, Ö., İşli, N. (1977). Ehrlich-Lettre Asit Tümörü, *Tıp Fakültesi Mecmuası* **40**,978-984.
- Kannen, V., Marini, T., Zanette, D.L., Frajacomo, F.T., Silva, G.E.B., Silva Jr., W.A. ve Garcia, S.B. (2011). The melatonin action on stromal stem cells within pericryptal area in colon cancer model under constant light. *Biochemical and Biophyscial Research and Communications*. **405**(4),593-8.



- Kanno, S.İ., Tomızava, A., Hiura, T., Osanaı, Y., Kakuta, M., Kıtajıma, Y., Koıwai, K., Ohtake, K., Ujıbe, M. ve Ishıkawa, M. (2006). Melatonin Protects on Toxicity by Acetaminophen But Not on Pharmacological Effects in Mice. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. **29** (3) 472—476.
- Karkela, J., Vakkuri, O., Kaukinen, S., Haung, W.Q., Pasanen, M. (2002). The influence of anaesthesia and surgery on the circadyen rythhm of melatonin. *Acta Anasthesiol Scand*, 46, 30-36.
- Kavak., T. (2008). Kolorektal tümörlerde matriks metalloproteinaz-9, nitrik oksit ve malondialdehid konsantrasyonları üzerine melatonin etkisi. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Uzmanlık tezi, 09100-Aydın.
- Kaya, G., Memiş, D., Turan, A. (2004). Rokuronyum enjeksiyon ağrısının önlenmesinde deksmedetomidin ile lidokainin karşılaştırılması *Türk Anestezi ve Rean Cem Mecmuası*, **32**, 344-348.
- Kayaalp, O. (1996). Hacettepe Taş Kitapçılık. *Tıbbi Farmakoloji*. **975**, 7731-234, 79-322, Ankara.
- Kerman, M., Cirak, B., Özgüner, M.F., Dağtekin, A. (2005). Does melatonin protect or treat brain damage from traumatic oxidative stres? *Experimental Brain Research*, **163** 406-410.
- Kın, T. (1971). The Effects of Carcinostatic Agents on the Cell Cycle of Ehrlich Ascites Carcinoma Cells. *Nagoya Journal of Medicine Science*, **33**, 307-314.
- Killer, Lineage. Cells by Tumour-Bearing Host Macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, **44**, 185-190.
- Kirkwood, J.M., Ernstaff, M.S. (1990). Role of İnterferons in the Therapy of Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology* **95**, 1805.

- Klein, G. (1951). Comparative Studies of Mouse Tumors with Respect to Their Capacity for Growth as ‘‘Ascites Tumors’’ and Their Average Nucleic Acid Content Per Cell. *Experimental Cell Research*, **2**, 518-573.
- Konakchieva, R., Kyurkchiev, S., Kehayov, I., Taushanova, P. ve Kanchev, L. (1995). Selective effect of methoxyindoles on the lymphocyte proliferation and melatonin binding to activated human lymphoid cells. *Journal of Neuroimmunology*, **63**, 125-132.
- Korkmaz, A., Tamura, H. (2008). Night-Shift, Risk of Chronic Diseases and Melatonin Rhythm. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, **7**, 529-534.
- Kuş, I., Sarsılmaz, M. (2002). The morphological structure and functions of the pineal gland. *Journal Medical Science*, **22**, 221-226
- Lenoir, V., Jonage-Canonico, M.B.Y., Perrin, M.H., Martin, A., Scholler, R., Kerdelhué B., (2005). *Breast Cancer Research*, **7**, R470-R476
- Lissoni, P., Barni, S., Tancini, G., Mainini, E., Piglia, F., Maestroni, G.J., Lewinski, A., (1995). Immunoendocrine therapy with low dose subcutaneous interleukin-2 plus melatonin of locally advanced or metastatic endocrine tumors. *Oncology*, **52**, 163-166.
- M, Farriol., Y., Venereo., X., Orta., J., M., Castellanos, T., Segovia-Silvestre (2000). In vitro effects of melatonin on cell proliferation in a colon adenocarcinoma line. *Journal of Applied Toxicology*, **20**, 21–24.
- Macchi, M.M., Bruce, J.N. (2004). Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinology*. Sep-Dec, **25** (3-4), 177-195.
- Maestroni, G.J., Conti, A., Pierpaoli, W., (1987). The pineal gland and circadian, opiateergic, immunoregulatory role of melatonin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **496**, 67-77.

- Maestroni, G.J., Conti, A., Pierpaoli, W. (1988). Role of the pineal gland in immunity. III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiate receptor mechanism. *Immunology*, **63**, 465-469.
- Maestroni, G.J., Covacci, V., Conti, A., (1994). Hematopoietic rescue via T cell dependent, endogenous granulocyte-macrophage colony stimulating factor induced by the pineal neurohormone melatonin in tumor bearing mice. *Cancer Research*, **54**, 2429-2432.
- Maestroni, G.J.M. (1995a). The immunoendocrine role of melatonin. *Journal Pineal Research*, **19**, 149-165.
- Maestroni, G.J. (1995b). T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *Journal of Pineal Research*, **18**, 84-89.
- Maestroni, G.J., Sulli, A., Pizzorni, C., Villaggio, B., Cutolo, M., (2002). Melatonin in rheumatoid arthritis: synovial macrophages show melatonin receptors. *Annals of New York Academy Science*, **966**, 271-275.
- Maksimovich, A.A. (2002). Structure and Function of the Vertebrate Pineal Gland. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, **38**, 1-15.
- Moore, C.B., Siopes, T.D., (2003). Melatonin enhances cellular and humoral immune responses in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) via an opiate receptor mechanism. *General and Comparative Endocrinology*, **131**, 258-263.
- Martinez-Campa, C.M., Alonso-Gonzalez, C., Mediavilla, M.D., Cos, M., Gonzalez, A., Sanchez-Barcelo E.J. (2008). Melatonin down-regulates hTERT expression induced by either natural estrogens (17 $\beta$ -estradiol) or metalloestrogens (cadmium) in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Letters*, **268**, 272-277.
- Mascarenhas, M. (1994). Structure-Activity Characterization, a Quick Method to Screen Mushrooms for the Presence of Antitumor Glucans. *Mushroom Research* **3**, 77-80.

- Mei, Q., Xu, J-M., Xiang, L., Hu, Y-M., Hu, X-P., ve Xu, Z-W., (2005). Change of nitric oxide in experimental colitis and its inhibition by melatonin in vivo and in vitro. *Postgrad Medical of Journal*, **81**, 667–672.
- Mocchegiani, E., Bulian, D., Santarelli, L., Tibaldi, A., Muzzioli, M., Lesnikov, V., Pierpaoli, W., Fabris, N. (1996). The zinc pool is involved in the immune reconstituting effect of melatonin in pinealectomized mice. *Journal Pharmacol Experimental Therapy*, **277**, 1200-1208.
- Moğulkaç, R., Baltacı, A.K. (2002). Hipertiroidi oluşturulan ratlarda intraperitoneal melatonin uygulamasının tiroid hormonları ve testosteron salınmasına etkisi. *Genel Tıp Dergisi*, **12**, 129-132.
- Mollaoglu, H., Özgüner, M.F. (2005). Yaşlanma sürecinde melatoninin rolü. *S.D.Ü. Tıp Fak. Dergisi*, **12**, 52-56.
- Moore, C.B., Siopes, T.D., Steele, C.T., Underwood, H. (2002). Pineal melatonin secretion, but not ocular melatonin secretion, is sufficient to maintain normal immune responses in Japanese quail. *General and Comparative Endocrinology*, **126**: 352-358.
- Moore, C.B., Siopes, T.D., (2003). Effect of melatonin supplementation on the ontogeny of immunity in the Large White turkey poult. *Poultry Science*, **81**: 1898-1903.
- Mycek, M.J., Harvey, R.A., Champe, P.C. (1998). *Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden; Farmakoloji*.
- Nelson, R.J., Blorn, J.M., (1994). Photoperiodic effects on tumor development and immune function. *Journal of Biology Rhythms*, **9**, 233-249.
- Noyan, A., (1993). Fiziyoloji ders kitabı. Ankara: Metaksan Matbaası, 1095-9.
- Nowak, J.Z., Zawilska, J.B. (1998). Melatonin and its physiological and therapeutic properties. *Pharmacy World and science*, **20**, 18-27.
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. (1978). Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbituric acid. *The Journal of Lipid Research*. **19**: 1053-1057.

- Otamiri, T., Sjobahl, R., (1989). Increased lipid peroxidation in malignant tissues of patients with colorectal cancer. *Cancer*; **64**: 422-5.
- Özdemirler, Erata, G., Kanbağlı, O., Durlanik, O., Bulut, T., Toker, G., Uysal, M. (2005). Induced oxidative stress and decreased expression of inducible heat shock protein 70 (ihsp 70) in patients with colorectal adenocarcinomas. *Japanase Journal of Clinical Oncology*, **35** (2), 74-78.
- Padillo, F.J., Ruiz-Rabelo, J.F., Cruz, A., Perea, M.D., Tasset, I., Montilla, P., Tunez, I., Muntane´ J. (2010). Melatonin and celecoxib improve the outcomes in hamsters with experimental pancreatic cancer. *Journal Pineal Research*, **49**, 264–270.
- Paglia, D.E., Valentine, W.N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal Lab Clinical Medical*, **70**, 158-169.
- Palabıyık, O. (2003). Farklı türde kanserli hastalarda melatonin salınım ritmi ve G protein mutasyonları. *Yüksek lisans tezi*. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Syf: 65
- Palaoğlu, S., Beşkonaklı, E. (1998). Pineal bez ve yaşlanma. *Turkish Journal of Geriatrics*; **1**: 13-18.
- Persengiev, S., Patchev, V., Velev, B., (1991). Melatonin effects on thymus steroid receptors in the course of primary antibody responses: significance of circulating glucocorticoid levels. *International Journal Biochemical.*, **23**, 1487-1489.
- Petzinger, E., Ziegler, K. (2000). Ochratoxin A from a toxicological perspective. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapy*, **23**, 91-98.
- Pioli, C., Caroleo, M.C., Nistico, G., Doria, G. (1993). Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T cell proliferation. *International Journal Immunopharmacology*, **15**, 463-468.
- Prendergast, B.J., Yellon, S.M., Tran, L.T., Nelson, R.J., (2001). Photoperiod modulates the inhibitory effect of in vitro melatonin on l ymhocyte

- proliferation in female Siberian hamsters. *Journal Biology Rhythms.*, **16**, 224-233.
- Quasney, M.E., Carter, L.C., Oxford, C., Watkins, S.M., Gershwin, M.E., German, J.B. (2001). Inhibition of Proliferation and Induction of Apoptosis in SNU-I Human Gastric Cancer Cells by the Plant Sulfolipid, Ulfoquinovosyldiacylglycerol. *Journal of Nutrition Biochemical* **12**, 310-315.
- Raghavendra, V., Singh, V., Kulkarni, S.K., Agrewala, J.N. (2001). Melatonin enhances Th2 cell mediated immune responses: lack of sensitivity to reversal by naltrexone or benzodiazepine receptor antagonists. *Molecular and Celular Biochemical*, **221**, 57-62.
- Rasonyi, T., Schlatter, J., Dietrich, D.R. (1999). The role of  $\alpha$ -2u- globulin in ochratoxin A induced renal toxicity and tumors in F 344 rats. *Toxicology Letters*, **11**,104(1-2):83-92.
- Reich, K. (1998). Feldstudie zum Vorkommen von Ochratoxin A und Zearalenon in Futtermitteln und im Blut von Zucht- und Mastschweinen mit besonderer Berücksichtigung der Futterherkunft und -lagerung. Doktora Tezi, Freien Üniversitesi Veteriner Fakültesi Berlin. Journal-Nr. 2188.
- Reiter, R., Tang, Lei., Garcia, J.J., Munoz-Hoyos, A. (1997). Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sciences*, **60** (25): 2255-2271.
- Reiter, R.J. (1991a). Neuroendocrine effects of light. *International Journal of Biometeorology*, **35**, 169-175.
- Reiter, R.J., (1991b). Melatonin. The chemical expression of darkness. *Molecular and Celular Endocrinology*, **79**, 153-158.
- Reiter, R.J. (1993). Interactions of the pineal hormonemelatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Brazilian Journal Medical Biology Research*, **26**, 1141-1155.

- Reiter, R.J. (1996) Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *European Journal of Endocrinology*, **134**, 412-20.
- Reiter, R.J., Calvo, J.R., Karbownik, M., QI, W., Tan, D.X. (2000). Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Annals of the New York Academy of Science*, **917**, 376-386.
- Reiter, R.J. (2003). Melatonin: Clinical relevance. *Best Practical Research Clinical Endocrinology Metabolism*, **17**, 273–85.
- Ribi, E., Canterall, J., Schwartzman, S., et al. (1981). BCG Cell Wall Skeleton, P3, MDP and Other Microbial Components Structure Activity Studies in Animal Studies. *Raven Press*, New York, p. 15.
- Rohr, U.D., Herold, J. (2002). Melatonin deficiencies in women. *Maturitas*, **41**, S85-S104.
- Ruiz-Rabelo, J., Vázquez, R., Arjona, A., Perea, D., Montilla, P., Túnez, I., Muntané, J., Padillo, J. (2010). Improvement of Capecitabine Antitumoral Activity by Melatonin in Pancreatic Cancer, **98**, 234-312.
- Russel, R. (2003) Melatonin: Clinical relevance. *Best Practice and research Clinical Endocrinology and Metabolism*, **17**, 273-285.
- Sa'nchez-Barcelo', Cos, S., Ferná'ndez, R., Mediavilla, M.D. (2003). International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer Melatonin and mammary cancer: a short review. *Endocrine-Related Cancer*, **10**, 153–159.
- Sadani, G.R., Nadkarni, G.D., (1996). Role of tissue antioxidant defence in thyroid cancers. *Cancer Letters*, **109**, 231-5.
- Scheer, F., Czeisler, C.A. (2005). Melatonin, sleep, and circadian rhythms. *Sleep Medicine Reviews*, **9**, 5-9.

- Scheinin, B., Lindgren, L., Randell, T. (1992). Dexmedetomidine attenuates sympathoadrenal responses to tracheal intubation and reduces the need for thiopentone and perioperative fentanyl. *British of Journal Anaesthesia*, **68**, 126-131.
- Seegers, J.C., Lottering, M-L., Garlinski, P.J. (1994). The mycotoxin Ochratoxin A causes apoptosis-associated DNA degeneration in human lymphocytes. *Medical Science Research*, **22**, 417-419.
- Shigeta H, Yasui A, Nimura Y, Machida N, Kageyama M, Miur M, Menjo M, Ikeda K. (2001). Postoperative delirium and melatonin levels in elderly patients. *The American Journal of Surgery*, **182** 449-454.
- Singh, G.S.P., Chauhan, H.V.S., J.H.A., G.J., Singh, K.K. (1990). Immunosuppression due to chronic Ochratoxicosis in broiler chicks. *The Journal of Comparative Pathology*, **103**, 399-410.
- Skrzydowska, E., Sulkowski, S., M. Koda., B., Zalewski, L., K-Koda., M. Sulkowska. (2005). Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, **11** (3), 403-406.
- Skwarlo SK, 2002. Melatonin in immunity: comparative aspects. *Neuroendocrinol Letters*, **23** (Suppl 1), 61-66.
- Stehle, J.H., Failkes, N.S., Maolina, C.A., Simonneaux, V., Pevet, P., Sassone-Corsi, P. (1993). Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature*, **365**, 314-318.
- Stevenson, H.C., Gren, I., Hamilton, J.M., et al. (1991). Levamisole Known Effects on the Immune System. Clinical Results and Future Applications to the Treatment of Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **9**, 2052.
- Stoschitzky, K., Sakotnik, A., Lercher, P., Zweiker, R., Maier, R., Liebmann P, Linder W. (1999). Influence of beta-blockers on melatonin release. *European Journal of Clinical Pharmacology*, **55**, 111-115.



- Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemical*, **34**, 497-500.
- Szatrowski, T.P., Nathan, C.F. (1991). Production of large amounts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by human tumor cells. *Cancer Research*, **51**, 794-8.
- Szczzech, G.M., Carlton, W.W., Tuite, J. (1973). Ochratoxicosis in beagle dogs. 2. Pathology. *Vet. Pathol.* a; **10**, 219-231.
- Tam, C.W., Mo, C.W., Yao, K.M., Shiu, S.Y. W. (2007). Signaling mechanisms of melatonin in antiproliferation of hormone-refractory 22Rv1 human prostate cancer cells: implications for prostate cancer chemoprevention. *Journal Pineal Research*, **42**, 191-202
- Taysi, S., Koc, M., Büyükokuroğlu, M.E., Altınkaynak, K., Şahin, Y.N., (2003). Melatonin reduces lipid peroxidation and nitric oxide during irradiation-induced oxidative injury in rat liver. *Journal Pineal Research*, **34**, 173-177
- Tokumitsu, H., Hiratsuka, J., Sakurai, Y., Kobayashi, T., Ichikawa, H., Fukumori Y., (2000). Gadolinium neutron-capture therapy using novel gadopentetic acid chitosan complex nanoparticles: in vivo growth suppression of experimental melanoma solid tumor. *Cancer Letters*, **150**; 177-182
- Touitou, Y., Bogdan A., Auzeby A., Selmaoui B. (1998). Melatonine et vieillissement. *Therapie*, **53**, 473-478.
- Tsuzuki, K., Okamoto-Miunu, K., Mizuno, K. (2004). Effects of humid heat exposure on sleep, thermoregulation, melatonin and microclimate. *Journal of thermal Biology*, **29**: 31-34.
- Uchiyama, M., Mihara, M. (1977). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, **86**, 271-8.
- Ünlügenç H., Gündüz M., Güler T. (2005). The effect of pre-anaesthetic administration of intravenous dexmedetomidine on postoperative pain in patients receiving patient-controlled morphine. *European Journal of Anaesthesiol*, **22**, 386-391.

- Vesnushkin, G.M., Plotnikova, N.A., Anisimov, V.N. (2007) Melatonin suppresses benz (a) pyrene-induced carcinogenesis in mice. *Voprosy Onkology*, **53** (1): 60-5
- Vesnushkin, G.M., Plotnikova, N.A., Semenchenko, A.L., Anisimov, V.N (2006) Dose-dependent inhibitory effect of melatonin on carcinogenesis induced by benzo[a]pyrene in mice. *Journal Experiment Clinical Cancer Research*. Dec **25** (4), 507-13
- Waldhauser, F., Weiszenbacher, G., Frisch, H., Zeitlhuber, U. (1984). Fall in Nocturnal Serum Melatonin During Prepuberty and Pubescence. *The Lancet*, 362-364.
- Webb, S.M., Puig-Domingo, M. (1995). Role of melatonin in health and disease. *Clinical Endocrinology*, **42**, 221-34.
- Wichmann, M.W., Zelleneger, R., DeMaso, C.M., Ayala, A., Chaudry, I.H. (1996). Melatonin administration attenuates depressed immune functions after trauma-hemorrhage. *Journal Surgical Research*, **63**, 256-262.
- Wilson, S.T., Blask, D.E., Lemus-Wilson, A.M. (1992). Melatonin augments the sensitivity of MCF-7 human breast cancer cells to tamoxifen in vitro. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, **75**, 669-70.
- Winczy, K., Fuss-Chmielewska, J., Lawnicka, H., Pawlikowski, M., Karasek, M. (2009). Luzindole but not 4-phenyl-2- propionamidotetralin (4P-PDOT) diminishes the inhibitory effect of melatonin on murine Colon 38 cancer growth in vitro. *Neuroendocrinology Letters*, **30** (5), 657-62.
- Yaprak, M., Altun, A., Vardar, A., Aktoz, M., Ciftçi, S., Ozbay, G. (2003). Decreased nocturnal synthesis of melatonin in patients with coronary artery disease. *International Journal of Cardiology*, **89**, 103-107.
- Yerer, M.B., Aydoğan, S., (2006). Sirkadiyen ritme bağlı olarak melatonin seviyesindeki değişikliklerin eritrositlerde lipid peroksidasyonu üzerine

etkisi. Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences), **15** (3), 153-160.

Yu, Q., Miller, S.C., Osmond, D.G., (2000). Melatonin inhibits apoptosis during early B cell development in mouse bone marrow. *Journal of Pineal Research*, **29**, 86-93.

Yücel, A., Aksakal, M., (2006). Ratlarda homosisteinin oksidan-antioksidan sistem ve koroner damarlarda oluşturduğu değişiklikler üzerine melatoninin etkisi. Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Dergisi, **20** (1), 51-59.

Zumrutdal, M.E., Ozaslan, M., Tuzcu M., Kalender, M.E., Daglıoğlu, K., Akova, A., Karagoz, I.D., Kilic, I.H., Colak, O., Koksall, F. (2008). Effect of *Lawsonia inermis* treatment on mice with sarcoma. *African Journal of Biotechnology*, **7** (16), 2781-2786.