

Melatonin Kanser Hücrelerini Öldürür Mü?

İçindekiler

Özet.....	2
1. Giriş.....	2
1.1. Melatonin Nedir?.....	2
1.2. Melatonin ve Kanser.....	3
1.3. Hipotez.....	4
2. Materyaller ve Yöntemler.....	5
2.1. Materyaller.....	5
2.2. Yöntemler.....	7
2.2.1. Hücre Kültürü Yöntemi.....	7
2.2.2. Propidiyum İyodür Boyaması Yöntemi.....	8
2.2.3. Presto Mavisi Yöntemi.....	8
2.2.4. Verilerin Analizi.....	9
3. Bulgular.....	10
3.1. PI Boyama Bulguları.....	10
3.2. Presto Mavisi Bulguları.....	12
4. Sonuç ve Tartışma.....	13
5. Öneriler.....	14
6. Kaynakça.....	15

Özet

Melatonin, epifiz bezi tarafından salgılanan ve uyku-uyanıklık döngüsünü düzenleyen bir hormondur. Melatonin, doğrudan radikal süpürücü olarak ve dolaylı olarak antioksidan enzimlerin düzenlenmesi yoluyla antioksidan etki gösterir ve kansere karşı koruyuculuğu meme kanseri gibi kanser tiplerinde gösterilmiştir.

Erken yaştan itibaren körlük yaşayan hastalarda kanser hastalığının daha az görüldüğü ve bunun da artan melatonin salgısına bağlı olabileceği bilimsel çalışmalar ile araştırılan bir konudur. Bu durum daha çok meme kanseri üzerinde çalışılmıştır.

Bizim çalışmamızda, melatoninin koruyucu etkisinin farklı tip kanserde de etkili olabileceği önerilmektedir. Bunun için, projemizde insan beyin kanseri hücreleri üzerinde 6 saat boyunca uygulanan 3 farklı dozda melatoninin hücre canlılığına ve hücre ölümüne etkisi araştırılmıştır.

1. Giriş:

Maria Feychting, Bill Österlund ve Anders Ahlbom tarafından yazılan ve sonrasında birçok makalede desteklenen sonuçlara göre görme engelli insanlarda kanser riski daha düşüktür. Makalelere göre de bunun nedeni epifiz (pineal) bezinden salgılanan melatonin isimli hormondur [1-4].

Melatonin seviyesi gün boyunca azalır ve geceleri yükselir. Uyuduğumuz ortam ne kadar karanlıksa, melatonin salgımız da o kadar sağlıklı olur. Araştırmalar göstermiştir ki gece boyu salgılanan melatonin, vücudun hücrelerine ve organlarına homeostazı sağlamak ve biyolojik saat ve vücudumuzun biyoritmini düzenlemek gibi metabolik ritimlerin düzenlenmesi için sinyaller göndermektedir. Bununla beraber bağışıklık sistemi üzerinde de etkileri bulunur [5].

1. Melatonin Nedir?

Melatonin uzun zamandan beri bilinen pineal bez hormonudur. Temel olarak immün modülatör, gün içi ve mevsimsel ritmi ayarlayıcı, uyku düzenleyici etkileri vardır. Tüm vücutta yaygın melatonin reseptörleri bulunmaktadır. Uyku bozukluğuna karşı ve antidepresan olarak da kullanılan melatonin birçok hastalığın tedavisinde denenmektedir [6].

Pineal bez (epifiz bezi) M.Ö 300. yılda iskenderiyeli Herophilus (325-280 M.Ö.) tarafından tanımlanmıştır. Bergamalı Galen, pineal bez için, çam kozalağına benzemesi nedeni ile konareion (Latince conarium) adını kullanmıştır. Vesalius (1514-1564) pineal bezin topografyasını ve

yapısını tanımlamış, yine orta çağın ünlü filozof, hekim ve matematikçisi Rene Descartes (1596-1650) “ruhun yerleştiği yer” olarak tanımlayarak bellek işlevlerindeki önemini vurgulamıştır [7]. 1850’de Kolliker, memelilerin pineal bezinde sinir liflerinin varlığını gözlemlemiştir [7]. Cajal, fare pineal bezinde demet yapan sinir liflerini bulmuş ve sempatik orijinli olduğunu iddia etmiştir [7].

En önemli gelişme Lerner ve arkadaşlarının pineal ekstrelerde bulunan, amfibienlere verildiğinde cilt renginin açılmasına neden olan potansiyel pineal hormonu izole etmeleridir. Ancak bu hormonun memelilerde pigment üzerine etkisinin olmadığı anlaşılmıştır. Lerner bu maddeyi Yunanca’da siyah anlamına gelen “melas” ve iş anlamına gelen “tosos” kelimelerini birleştirilerek “melatonin” olarak adlandırmıştır [6,9].

2. Melatonin ve Kanser

Bergmann ve Engel’in 1935-1952 yılları arasında yaptıkları çalışmalarda pineal bez ekstrelerinin deney hayvanlarında büyümeyi geciktirdiğinin ortaya konması, bunun kanser büyümesini de geciktirebileceği fikrini doğurmuştur. Yazarlar, prostat kanserli hastalarda kanserin kontrol altına alınmasının yanı sıra hastaların ağrılarının da azaldığını ve genel durumlarının iyileştiğini gözlemlemişlerdir [10].

Günümüzde ise melatonin ve kanser çalışmalarının büyük çoğunluğu meme kanseri modelleri üzerinde yapılmaktadır. Yapılan çalışmalar melatoninin gece uygulamalarının kanserde daha başarılı sonuçlar verdiğini ortaya koymuştur. Kanser gelişiminde melatoninin gece salgısının bozulmasının önemli olduğunu düşündüren veriler elde edilmiştir. Özellikle gece ışık altında çalışan kadınlarda kanser insidansının arttığı ortaya konmuştur. Hatta ışık yoğunluğunun derecesiyle tümör büyüme hızı arasında doğru orantının varlığını gösteren çalışmalar bildirilmiştir [11-13].

Mevsimlerin kanser gelişmesi üzerindeki etkisi melatoninle orantılıdır. Gecelerin uzun sürdüğü kış aylarında melatonin üretimi fazladır ve bu dönemde tümör gelişmesi yavaşlar [14].

Kanser tedavisinde melatonin, IL-2 ile birlikte kullanılmaktadır. Yan etkisi çok olan IL-2’nin melatonin ile kombinasyonunda, melatonin IL-2’nin istenilen etkisini artırır ve böylece etkin IL-2 dozunun azaltılması sağlanmış olur [15].

Melatonin, kanser hücresi büyüme faktörlerinden olan linoleik asitin kanser hücresine girişini sağlayan reseptörlerini azaltmaktadır. Melatoninin Ca^{2+} aktiveli kalmoduline yüksek afinite ile bağlandığı tespit edilmiştir. Böylece melatonin kalmodulini kalsiyumdan uzaklaştırarak hücre siklusunu yavaşlatarak tümörün büyümesini engelleyeceği ileri sürülmüştür. Melatonin sağlıklı hücrelerde apoptozis oluşumunu engelleyici özelliğe de sahiptir [13].

Kanser oluşumunda protoonkogenler ve tümör supresör genler (TSG) arasındaki denge önemlidir. Bu dengenin devamlılığı için hücrelerdeki melatonin genlerinin hassas ve dengeli bir şekilde ekspresyonu gerekir. Bu dengeyi bozan etmenler hücrelerin kansere olan eğilimini artırır [17].

Melatoninin hasarlı DNA'nın onarımını teşvik ettiği de bildirilmiştir. Bilindiği gibi kanser hücrelerinin gelişimi, bölünmesi ve çoğalması için bir enerji kaynağı ve büyüme faktörü olan linoleik asit, vücutta üretilmemekte ve bundan dolayı dışarıdan besinlerle alınmak zorundadır. Bu aşamada melatonin linoleik asitin kanserli hücreye girmesini engellemekte ve metabolize edilmesini baskılamaktadır [18]. Melatonin adezyon moleküllerinin ve proinflatuvar sitokinlerin sentezini azaltır [19].

Melatoninin güçlü antioksidan etkisinin yanı sıra nöral dokularda glutatyon peroksidaz aktivitesini (GPA) artırmak gibi bir fonksiyonu daha vardır. Beyin GPA'sının gece daha yüksek olması yüksek melatonin düzeyi ile yakından ilgilidir. Glutatyon peroksidaz, beyinde peroksitleri ortadan kaldıran başlıca enzim olarak bilinmektedir [20].

Literatürdeki çalışmaların gösterdiği üzere melatonin antioksidan enzimleri uyarır, lipit peroksidasyonunu engeller ve beyin dokusunu oksijen kaynaklı serbest radikallerinden korur.

3. Hipotez

Bundan yola çıkarak, bu çalışmada melatoninin beyin kanseri hücrelerinde de etkili olacağı ve kanser hücrelerini öldüreceği hipoteze edilmiştir.

2. Materyaller ve Yöntemler

Yöntemin belirlenmesi sürecine literatür araştırması ile başlandı .Araştırmada bir çok yayın tarandı .Belirlenen yöntemin **İzmir Biyotıp ve Genom Merkezinde** görevli **Prof.Dr. Şermin Genç** ile uygunluğu tartışıldı .Uygunluğunun onayının ardından **Prof. Dr. Şermin GENÇ** ile çalışmalara başlandı. 3-4 ay süren çalışmalar için önce hücre kültürü eğitimi alındı ve öncül literatür araştırmaları tamamlandı.

2.1.Materyaller

U87mg hücreleri: Ticari olarak satılan bu hücreler, insandan elde edilmiş beyin kanseri (nöroblastoma) hücreleridir. Yüzeye yapışarak tutunurlar. Bu hücreler biyoteknolojik yöntemler ile immortalize (ölümsüz) edilmiş hücrelerdir. Bu sayede istenilen süre kadar yaşatılabilir, deney yapılmayacağı zaman sıvı azot içerisinde dondurulabilir ve tekrar çözülerek deney yapılabilir.



Hücre besi ortamı: Hücrelerin sağlıklı büyümesi için gereken besinleri içerir. Hücrelerin hücre kültüründe büyütülmesi için en temel ihtiyaçtır. Her hücre tipinin besi ortamı ihtiyacı farklıdır. Temel hücre besi ortamında amino asitler, vitaminler, inorganik tuzlar, glikoz ve serum olması gerekmektedir. Besin sağlamanın yanı sıra bir besi ortamı pH ve ozmolalite olarak da uygun olmalıdır. Çalışmamızdaki U87mg hücreleri için Gibco Marka 4.5 g/L D-glucose ve L-glutamine içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kullanılmıştır. D-glucose, hücreler için besindir. L-glutamine ise, bir esansiyel aminoasittir.



Fetal sığır serumu ve Penisilin/streptomisin: Hücrelerin büyümesi için temel besi ortamına ortam hacminin %10'u kadar fetal sığır serumu ve %1'i kadar penisilin/streptomisin antibiyotikleri eklenmiştir. Serum, büyümeyi desteklerken, antibiyotik karışımı da hücre kültüründeki bulaşılara karşı koruyuculuk sağlar.



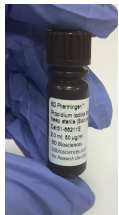
Tripsin: Hücre kültüründe büyütülen hücreler bizim hücrelerimiz gibi yüzeye tutunan hücreler ise, tripsin kimyasalı kullanılarak yüzeyden kaldırılır. Bu kimyasal, hücrelerin yüzeye tutunmasını sağlayan yüzey proteinlerinin yüzeyden koparılmasını sağlar. Tripsin ile kaldırılıp toplanan hücreler santrifüj makinesi ile uygun süre ve hızda çöktürülerek bir pellet (topak) haline getirilir. Bu pellet hücreler mikroskop altında sayılarak çalışmaya uygun yoğunlukta yeni kaplara ekilir.



Melatonin: Çalışmamızda kullanılan melatonin maddesi, 3 farklı dozda hücre besi ortamına karıştırılarak hücrelere verilmiştir.



Propididyum iyodür boyası: Kısaca PI olarak geçen bu boya, ölü hücrelerde ulaşılabilir duruma gelen DNA'yı boyayarak floresan mikroskop altında kırmızı renk verir. Bu sayede Hücre kabı içinde kaç tane ölü hücre olduğunu görebiliriz.



Presto mavisi: Bu boya, canlı hücrelerin metabolik aktivitesinden faydalanarak hücrelerimizin canlılığı hakkında bir veri verir. Bu boya, resazurin maddesidir. Bu madde canlı hücreler tarafından metabolize edilir ve resorufine çevrilerek hücre dışına salınır. Böylece hücre ortamı maviden pembe renge döner.

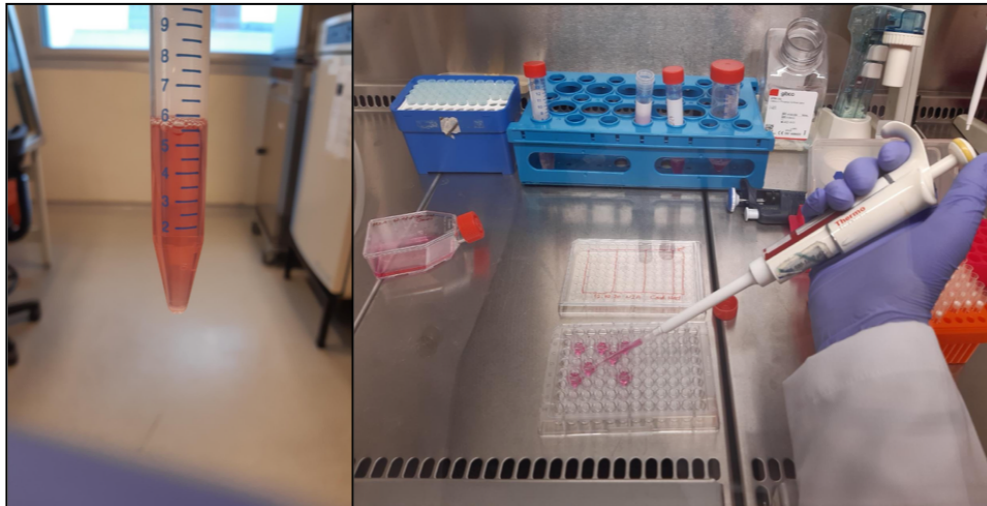
2.2. Yöntemler

2.2.1. Hücre Kültürü Yöntemi

Hücre kültürü, dokulardan elde edilen veya ticari olarak satılan hücre hatlarının araştırmalarda kullanılabilmesi için gerekli şartların sağlanarak büyütülmesini mümkün kılar. Hücre kültüründe her hücre tipi farklı koşullara ihtiyaç duyabilir. Genel minimum koşullar kontrollü sıcaklık, hücrelerin büyüebileceği steril hücre kültür kapları, hücrelerin tutunması için bir yüzey (adheran-yüzeye tutunan hücreler için), büyüme için en uygun olan besi ortamı ve uygun pH ve ozmolaliteyi sağlayan bir inkübatördür.

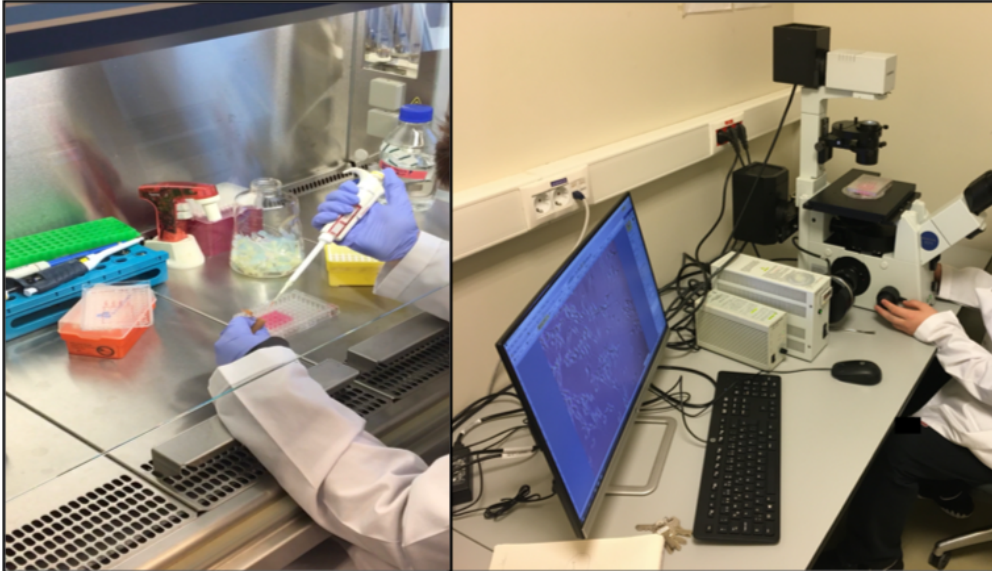
Hücreler, uygun ortam şartlarında büyütüldükten bir süre sonra, bölünerek çoğaldıklarından hücre kültür kabının tamamını doldurur. Bu aşamada hücrelerin yeni bir kültür kabına aktarılmaları gerekir. Deney çalışmaları için de hücreler deneye uygun büyüklükte kültür kaplarına aktarılmalıdır.

Bizim çalışmamızda, U87mg hücreleri normal hücre kültür kabından kaldırılarak 96-kuyulu hücre kaplarına 50000/ml yoğunlukta olacak şekilde ekilmiştir. Bu kaplar için 200 µl besi ortamı hacmi kullanılmıştır. Ekilen hücreler, 24 saat 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren inkübatörde tutulmuştur. 24 saat sonra melatonin gruplarına 100-500-1000 µM olacak konsantrasyonda eklenmiştir. Melatonin hücre ortamında 6 saat bekletildikten sonra sonuçları almak üzere diğer yöntemlere geçilmiştir.



2.2.2. Propidiyum İyodür (PI) Boyaması Yöntemi

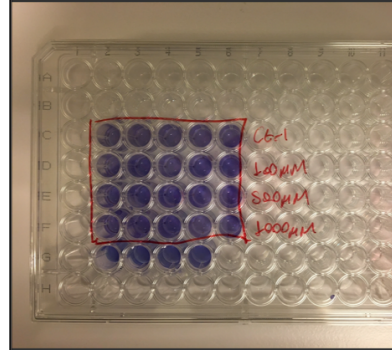
PI boyası, ölü hücrelerin DNA'larını boyayarak floresan mikroskop altında kırmızı renk verir. Bu yöntem için PI boyası hücre ortam hacminin 1/20'si olacak şekilde (5 µl) hücre kuyularına eklenmiştir. Daha sonra hücreler 15 dakika inkübatörde bekletilmiştir. 15 dakikanın sonunda hücrelerin floresan mikroskobu ile resimleri çekilmiştir. 20X objektif kullanılmıştır.



2.2.3. Presto Mavisi Yöntemi

PI boyaması ile çekilen resimlerin ardından, hücre ortamları boşaltılmış ve presto mavisi boyası yeni hücre besiy ortamı içine 1/10 seyrelcek şekilde (20 µl) eklenmiştir. Hücreler yine

inkübatörde 15 dakika bekletildikten sonra Thermo marka Varioskan Flash isimli multiplak okuyucu cihazında 560 ve 590 nm dalgaboylarında okutulmuş ve çıkan değerler analiz edilmiştir.



2.2.4. Verilerin Analizi

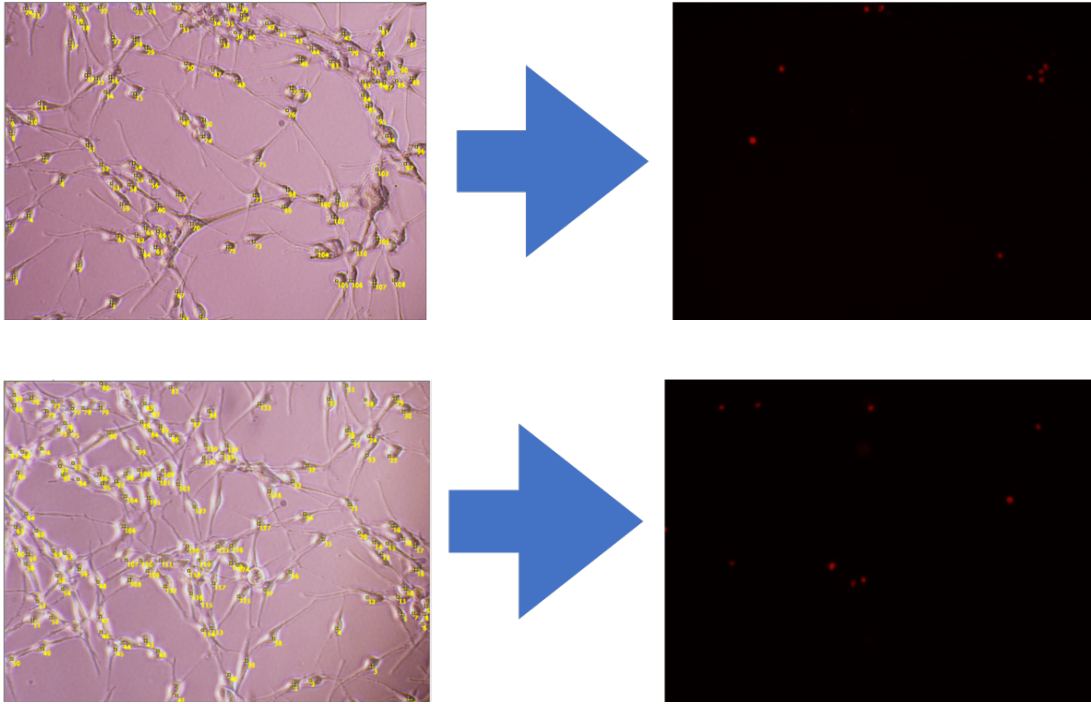
Çalışmamızda her grupta 5 örnek ile çalıştık. Bu 5 örneğe dair elde edilen veriler ImageJ ve Graphpad programları ,PI boyama fotoğraflarındaki hücreler ImageJ programı kullanılarak sayıldı.

PI boyamasından ve Presto mavisini boyamasından elde edilen veriler istatistiksel yöntemler ile, Graphpad programı kullanılarak analiz edildi. Analizde 2'li grup karşılaştırması için parametrik olmayan Mann-Whitney U testi kullanıldı. Bu test, bizim hipotezimizin doğruluğunu değerlendirirken, elde ettiğimiz sonuçların rasgele ortaya çıkıp çıkmadığını değerlendirmiştir. Bu testte belirlenen güvenlik aralığımız %95'tir. Yani, eğer test bize anlamlı bir sonuç veriyorsa, bu sonuç %95 oranında güvenilir bir sonuçtur ve %5 olasılıkla rasgele elde edilmiştir anlamına gelir. Böylece biz, iki grubu karşılaştırdığımızda, %95 olasılıkla bu gruplar birbirlerinden farklıdır ve bu fark bizim uygulamamız sonucu ortaya çıkmıştır diyebiliriz. Bu da anlamlı farklılık olarak isimlendirilir ve ($p>0.05$) şeklinde ifade edilir. Gruplardaki sayıların grup ortalamasından uzaklığı, ortalamanın standart hatası olarak isimlendirilir. Bu da Graphpad programında hesaplanarak, grafiklerdeki hata çubukları ile belirtilmiştir.

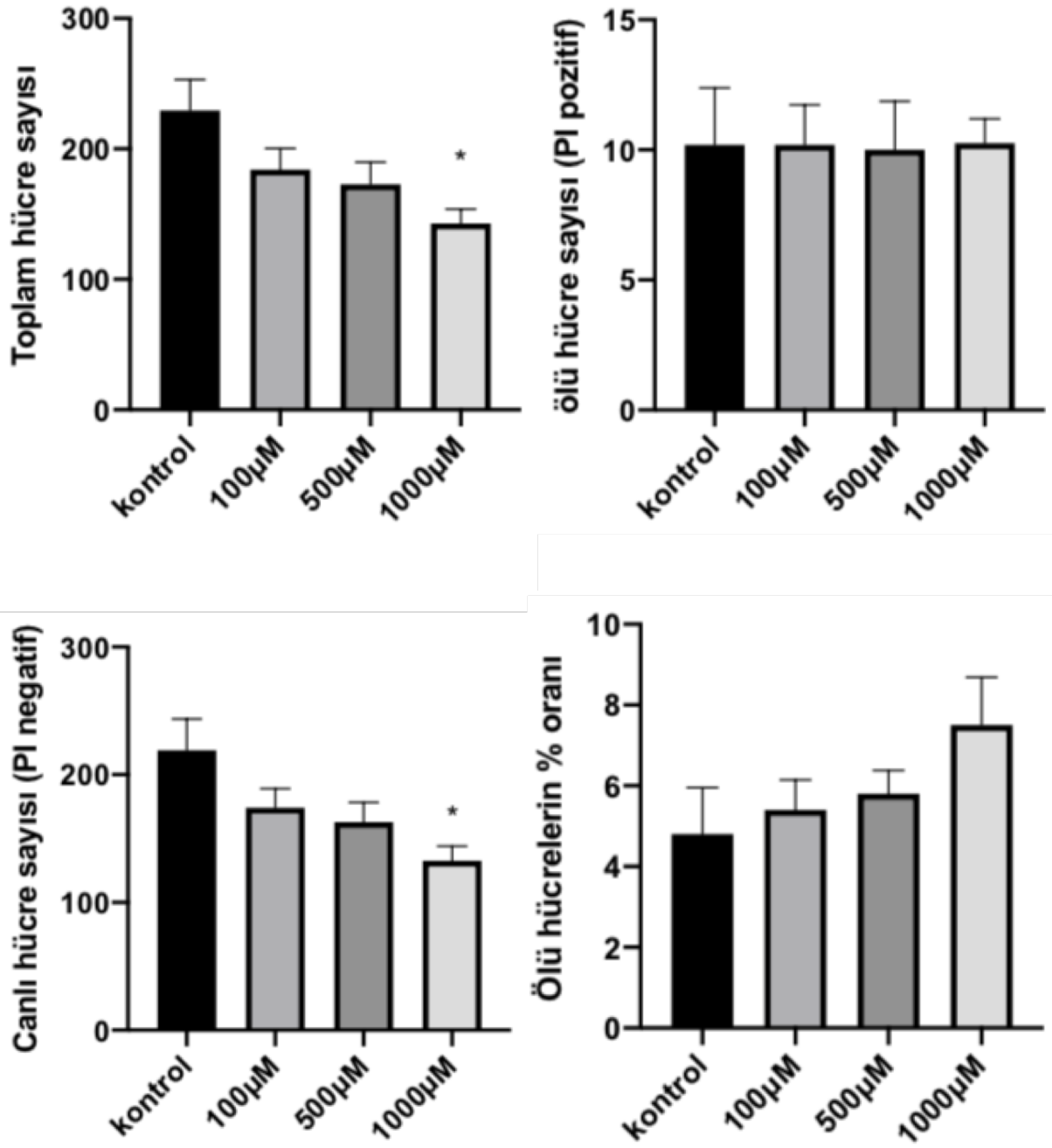
3. Bulgular

3.1. PI Boyama Bulguları

PI boyama sonucunda, elde edilen resimlerden toplam hücre ve ölü hücre sayıları Image J programı kullanılarak sayıldı. Toplam hücre sayısından ölü hücre sayısının çıkarılması ile canlı hücre sayısı elde edildi.



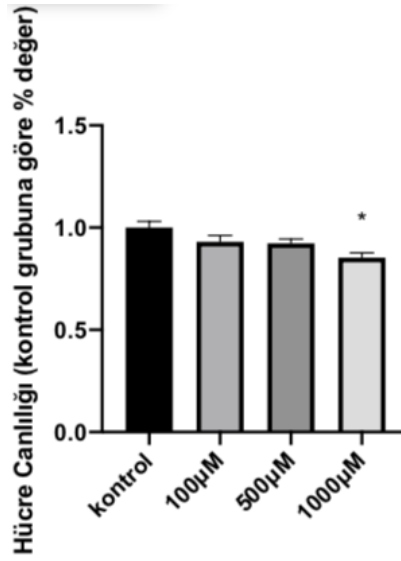
Bu sayılar gruplar arası karşılaştırma ile analiz edildi. Daha sonra, ölü hücre sayıları, toplam hücre sayısına oranlanarak ölüm yüzdesi elde edildi ve bunlar da gruplar arası karşılaştırıldı. Bu analizler sonucu elde edilen grafikler şöyledir:



Bu analizlere göre, 1000 µM dozunda melatoninin canlı hücre sayısını ve toplam hücre sayısını anlamlı derecede azaltmaktadır ($p>0.05$). Diğer dozlar için bu etki gözlenmemiştir. Ölü hücre sayısı ve ölü hücrelerin yüzde oranında da benzer şekilde etki gözlenmemiştir. Grafiklerde de gördüğümüz şekli ile, artan doz ile azalan bir canlı hücre sayısı ve toplam hücre sayısı vardır. Ölü hücre sayısı değişmese de ölü hücrelerin yüzde oranı artan doz ile beraber artmaktadır.

3.2.Presto Mavisi Bulguları

Presto mavisi analizinde, 590 nm dalgaboyu, kontrol dalgaboyudur ve 560nm dalgaboyundaki ölçümlerden çıkarılarak veriler elde edilir. Daha sonra melatonin grubu değerleri kontrol grubu değerine oranlanarak normalize edilmiştir. Bunun sonucunda kontrol grubu değerini 1 olarak görürüz ve diğer grupları da bu sayıya oranlamış oluruz. Daha sonra yine gruplar arası karşılaştırma analizi ile bu ölçümün sonuçları analiz edilmiştir. Elde edilen grafik şöyledir:



Bu grafiğe göre de, 1000µM dozunda anlamlı bir düşüş vardır. Diğer dozlarda melatonin hücre canlılığını etkilememiştir.

4. Sonuç ve Tartışma

Çalışmamız, erken yaştan itibaren körlük yaşayan insanlarda azalan kanser insidansının sebeplerini araştıran çalışmalardan ilham alınarak yapıldı. Melatoninin bu konudaki koruyuculuğu daha çok meme kanseri çalışmalarında denenişorsa da farklı kanser hücreleri üzerinde de etkili olabileceğini düşündük. Bu sebeple nöroblastoma (insan beyin kanseri) hücrelerini kullanarak 3 farklı dozda melatonin ile hücre ölümü ve hücre canlılığı üzerinde etkileri inceledik. Sonuçlarımıza göre yalnızca 1000uM dozunda melatonin, çalışmamıza göre, beyin kanseri hücreleri üzerinde negatif bir etki gösterdi ve canlı hücre sayısını düşürdü. Bu da bizim hipotezimizin doğruluğunu destekleyen bir sonuçtur. Ayrıca daha önce diğer kanser tipleri ile yapılan çalışmaların da sonuçlarına uyumludur. Diğer dozlar ise bizim çalışmamızda etkili olmamış. Çalışma daha fazla örnek sayısı ile tekrarlanarak, farklı süreler dahil edilerek ve farklı hücre aktiviteleri ve ölüm tipleri de dahil edilerek zenginleştirilebilir.

Ölü hücre sayısı ve ölü hücre yüzdesinde anlamlı bir fark bulamadık. PI boyası, apoptotik ölümü belirleyen bir boyadır, bu hücreler apoptozdan farklı şekillerde ölüyor olabilirler. Bunu daha iyi açıklamak için hücrenin farklı ölüm tiplerine ve farklı hücre aktivitelerine bakmak iyi olabilir. Ya da uygulama süresi boyunca ölmüş, parçalanmış ve uygulamanın sonunda artık orada olmayabilirler, dolayısıyla boyanmamışlardır. Farklı sürelerde de deney yapılarak da bir çalışma yapılabilir (time course).

5. Öneriler

Çalışmamızın sonuçlarına göre önerilebilecek gelecek çalışmaları şöyle sıralayabiliriz:

1. Çalışmamızda melatonin'in U87 Glioblastoma hücrelerinde yüksek dozda hücre ölümüne yol açtığı bulunmuştur. Melatonin uygulaması tek bir zaman noktasında gerçekleştirilmiştir. Daha uzun süreli uygulama düşük dozlarda da etkili olabilir.
2. Melatonin çalışmamızda tek başına kullanılmıştır. Glioblastoma tedavisinde kullanılan ilaçlarla birlikte kullanımı denenmelidir.
3. Melatonin yüksek dozları normal hücreler için zararlı olabilir. Normal hücrelerde zararlı olup olmadığı belirlenmelidir.
4. Çalışmamızda melatoninin etkisi tek bir hücre tipinde incelenmiştir. Başka hücre hatlarında veya insandan alınan tümör hücrelerinde denenmelidir.
5. Melatonin tümöre etkisi hayvan çalışmalarında denenmelidir.

Kaynakça

1. Coleman, M. P. and R. J. Reiter (1992). "Breast cancer, blindness and melatonin." *Eur J Cancer* 28(2-3): 501-503.
2. Feychting, M., et al. (1998). "Reduced cancer incidence among the blind." *Epidemiology* 9(5): 490-494.
3. Flynn-Evans, E. E., et al. (2009). "Total visual blindness is protective against breast cancer." *Cancer Causes Control* 20(9): 1753-1756.
4. Kliukiene, J., et al. (2001). "Risk of breast cancer among Norwegian women with visual impairment." *Br J Cancer* 84(3): 397-399.
5. Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; 351:152-166.
6. Grant SG, Melan MA, Latimer JJ, Witt-Enderby PA. Melatonin and breast cancer: Cellular mechanisms, clinical studies and future perspectives. *Expert Rev Mol Med*. 2009; 11:e5.

7. Palaoğlu ÖS, Beşkonaklı E. Pineal bez ve yaşlanma. Geriatri Turkish Journal of Geriatrics 1998;1:13-8.
8. Çam A, Erdoğan MF. Melatonin. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi. Mecmuası 2003; 56:103-12.
9. Lerner AB. Hormones and Skin color. Scientific American 1961 (July) 456-60.
10. Bergmann, W. and Engel, P. Über den Einfluss von Zirbelextrakten auf Tumoren bei weissen Mäusen und bei Menschen. Wien. klin. Wschr 1950;62:79–82.
11. Hotchkiss AK, Nelson RJ. Melatonin and immune function: hyper hypothesis? Crit Rev Immunol 2002;22:351-71
12. Çetin E. Melatonin ve bağışıklık sistemi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2005;2:119-23.
13. Reiter RJ, Tan DX, Erren TC, Fuentes-Broto L, Paredes SD. Light-mediated perturbations of circadian timing and cancer risk: a mechanistic analysis. Integr Cancer Ther 2009;8:354-60
14. Choi, D. (2013). "Potency of melatonin in living beings." Dev Reprod 17(3): 149-177.
15. Lissoni P, Barni S, Tancini G, Mainini E, Piglia F, Maestroni GJ, et al. Immunoendocrine therapy with low-dose subcutaneous interleukin-2 plus melatonin of locally advanced or metastatic endocrine tumors. Oncology 1995;52:163-6.
16. Maestroni GJ. The photoperiod transducer melatonin and the immune-hematopoietic system. J Photochem Photobiol B 1998;43:186-92.
17. Turgut T, Şükrü Ö, Ahmet K. Melatonin ve kanserle ilişkisi. Genel Tıp Dergisi 2009;19:137-43.
18. Kerman M, Cırak B, Ozguner MF, Dagtekin A, Sutcu R, Altuntas I, et al. Does melatonin protect or treat brain damage from traumatic oxidative stress? Exp Brain Res 2005;163:406-10.

19. Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2003;17:273-85.
20. Kuş D, Sarsılmaz M. Pineal bezin morfolojik yapısı ve fonksiyonları. T Klin J Med Sci 2002;22:221-6.