

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOĞİ VE EMBRİYOLOĞİ ANABİLİM DALI

**MEME KANSERİ MODELİNDE MELATONİNİN KORUYUCU  
ETKİSİNİN PRİMER TÜMÖR VE METASTAZ AÇISINDAN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Asiye Kübra KARADAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2019-ANTALYA

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MEME KANSERİ MODELİNDE MELATONİNİN KORUYUCU  
ETKİSİNİN PRİMER TÜMÖR VE METASTAZ AÇISINDAN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Asiye Kübra KARADAŞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2017-2417 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

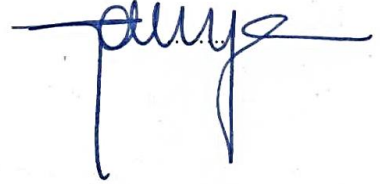
2019-ANTALYA

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 28 Mayıs 2019

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER  
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Necdet DEMİR  
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU  
Ege Üniversitesi



Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Narin DERİN**

**Enstitü Müdürü**

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmamın kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrenci

Asiye Kübra KARADAŞ

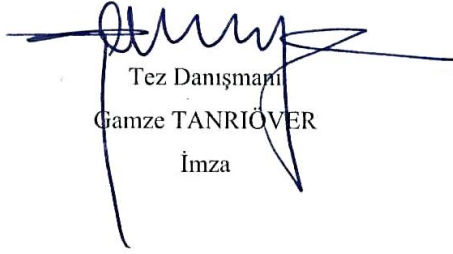
İmza



Tez Danışmanı

Gamze TANRIÖVER

İmza



## TEŐEKKÜR

Tezimin bu aŐamaya gelmesinde;

Sayın danışman hocam Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER'e tez aŐamasında göstermiŐ olduğu sabır, tevazu ve sevgisinden dolayı,

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında bulunan tüm sevgili hocalarıma hem hayat dersi olsun hem de bilgi anlamında vermiş oldukları donanımdan dolayı,

Ekip arkadaşlarım Sayra DİLMAÇ, Sendegül YILDIRIM ve Melike UÇAK'a her zorlandığımda yardıma koŐtuklarından dolayı,

Sevgili Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına her soruma sıklımadan cevap verdiklerinden dolayı,

Sevgili aile üyelerim babam Musa GÖKSU, annem Aliye GÖKSU ve kardeŐim Medine Rüveyda GÖKSU'ya bu zorlu süreçte gösterdikleri sevgi, sabır ve sağladıkları maddi imkanlardan dolayı,

Ve sevgili eŐim Yılmaz KARADAŞ'a gösterdiği desteği ve anlayıŐından dolayı sonsuz teŐekkürlerimi sunuyorum.

## ÖZET

Meme kanseri dünyada kadınlarda en çok görülen kanser tipidir. Ölüme sebebiyet veren, hastalarda bulunan primer tümörlerden ziyade tümör hücrelerinin yapmış olduğu metastazlardır. Melatonin, kan, tükürük ve idrar gibi birçok sıvıda bulunan, pineal bezden suprakiazmatik nükleus aracılı olarak salgılanan indol türevli bir bileşiktir. Melatoninin tümörle ilgili çalışmalarda anti-proliferatif, anti-inflamatuvar ve anti-karsinogenik etkisiyle onkostatik özelliğe sahip olduğu söylenmektedir. Bu projede; melatonin uygulamasının primer tümör ve metastazlar üzerine etkisinin, metastatik meme kanseri hücreleri kullanılarak oluşturulan modelde değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

Çalışmamızda 4 haftalık Balb-C dişi fareler kullanılıp, 6 gruba ayrıldı. Melatonin, 4TLM (4T1 karaciğer metastaz hücreleri) hücrelerinin meme dokusuna enjekte edilmesinden önce (M1) ya da (M2) sonra verildi. Melatonin gruplarının kontrolü olarak; melatoninin içinde çözündüğü %6 EtOH çözücü olarak verildi. M1 enjeksiyonu tümör inokülasyonundan bir ay önce başlayıp ve 4TLM hücrelerinin enjeksiyonundan sonra yaklaşık 4 hafta devam etti. M2, 4TLM hücrelerinin enjeksiyonundan 1 gün sonra başladı. Nekropsi, 4TLM hücre enjeksiyonundan 27 gün sonra yapıldı. Primer tümör, karaciğer ve akciğer dokuları çıkarıldı. Tümör taşıyan farelerin periferik kan yaymalarında immün hücrelerin fenotiplerinin sayımı gerçekleştirildi. Ayrıca akciğer metastazı ve primer tümör büyümesinde değişiklikler değerlendirildi. Anjiyogenezi göstermek için; primer tümörler anjiyogenik proteinler açısından immünohistokimya ve western blot yöntemi ile değerlendirildi. Karaciğer dokularına metastaz analizi yapıldı.

Primer tümör ve karaciğer dokularında melatonin tedavi gruplarında MKSH belirteçlerinin immunreaksiyonlarının melatonin almayan TM grubuna göre azaldığı görüldü. Melatonin uygulanan gruplarda; anjiyogenik belirteçlerin ekspresyonlarının immünohistokimya ve western blot yöntemleriyle anlamlı olarak azaldığı gösterildi.

Sonuç olarak; melatonin uygulamasının fare meme kanseri modelinde, primer tümör ve mikroçevrede tümör gelişimi ve metastatik yanıtlarını azalttığı gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Meme kanseri, melatonin, anjiyogenez, immünohistokimya, western blot

## ABSTRACT

Breast cancer is the most common type of cancer in women in the world. It is the metastases performed by tumor cells rather than the primary tumors present in patients. Melatonin is an indole-derived compound, which is secreted by the suprachiasmatic nucleus through the pineal gland, found in many fluids such as blood, saliva and urine. Melatonin has been indicated as a possible oncostatic effects in a different type of cancers, it's anti-proliferative, anti-inflammatory and anti-carcinogenic roles being demonstrated in tumor-related studies. The aim of this study is to evaluate the effect of melatonin administration on primary tumors and metastases by using metastatic breast cancer cells.

4-week-old Balb-C female mice were separated 6 groups. Melatonin treatments were either given before (M1) or after (M2) the injection of 4TLM (4T1 liver metastasis) cells into the mammary pad. Vehicle which was %6 EtOH were also given to control group in compliance with the pre or post melatonin treatment group (M1 and corresponding vehicle group). M1 started a month from the inoculation (M1 and V groups) and continued for approximately 4 weeks after the injection of 4TLM cells. M2 started 1 day after injection of 4TLM cells. Necropsies were performed 27 days after injection of 4TLM. Primary tumors and lung tissues were removed. We performed phenotypes of immune cells in peripheral blood smears obtained tumor-bearing mice. For angiogenesis; primary tumors were evaluated by immunohistochemistry and western blot analysis in terms of angiogenic proteins. Metastasis analysis was performed on liver tissues.

In primary tumor and liver tissues, MDSC markers immunoreactivity decreased in melatonin treatment groups compared to TM group. Melatonin treated groups; a significant decrease in the expression of angiogenic markers was demonstrated by both immunohistochemistry and western blot methods.

As a result; melatonin treatment decreases tumor development and metastatic response both in primary tumors and tumor microenvironment in the mouse breast cancer model.

**Anahtar Kelimeler:** Breast cancer, melatonin, angiogenesis, immunohistochemistry, western blot

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TABLolar DİZİNİ .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR .....	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Kanser .....	3
2.1.1. İnvazyon ve Metastaz .....	3
2.1.2. Meme Kanseri .....	4
2.2. Melatonin .....	5
2.3 Meme Kanseri Ve Melatonin .....	7
2.3.1. Melatonin ve Antioksidan Etkisi .....	8
2.3.2. Melatonin ve İnflamasyon .....	8
2.3.3 Melatonin ve MKSH'ler .....	9
2.3.4 Melatonin ve Anjiyogenez .....	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	17
3.1 Hayvanlar .....	17
3.2 Hücre Kültürü .....	17
3.3 Deney Modeli .....	17
3.4 Primer Tümörlerin Proliferasyon Hızındaki Değişimlerin Değerlendirilmesi .....	19
3.5 Hayvanların Ağırlıklarının Tartılması .....	19
3.7 Doku Takibi ve Kesit Alma .....	19
3.7.1 Doku Takibi Protokolü .....	19
3.8 Metastaz Analizi .....	20
3.8.1 Makro Metastaz Analizleri .....	20
3.8.2 Mikro Metastaz Analizleri .....	20
3.9 Periferik Yayma Analizi .....	21



3.10 İmmünohistokimyasal Analizler .....	21
Kullanılan Solüsyonlar .....	21
3.10.1 Image–J Analizi.....	22
3.10.2 İstatistiksel Analiz .....	23
3.11 Western Blot Yöntemi .....	23
3.11.1 Dokulardan Lizat Hazırlanması.....	23
3.11.2 Western Blot Protokolü .....	24
4.BULGULAR .....	26
4.1.1 İstatistiksel Analiz .....	28
4.2 Primer Tümörlerin Proliferasyon Hızındaki Değişimlerin Değerlendirilmesi .....	28
4.3 Hayvan Ağırlıklarının Ölçümü .....	29
4.4 Primer Tümör Ağırlık Ölçümü .....	30
4.4.1 İstatistiksel Analiz .....	31
4.5 Mikro ve Makro Metastaz Analizleri .....	31
4.5.1 Akciğer Makro Metastaz Analizi .....	31
4.5.2 Akciğer Mikro Metastaz Analizi .....	32
4.5.3 Karaciğer Mikrometastaz Analizi.....	34
4.6 Primer Tümör Dokularının İmmünohistokimyasal Analizlerle Değerlendirilmesi.....	36
4.7 Karaciğer Dokularının İmmünohistokimyasal Analizlerle Değerlendirilmesi.....	43
4.8 Primer Tümör Dokularının Western Blot Analiziyle Değerlendirilmesi .....	50
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	57
KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ .....	69

## TABLolar DİZİNİ

**Tablo 2.3.1:** Anjiyogenezi pozitif ve negatif yönde uyaran moleküller gösterilmektedir. 11

**Tablo 4.1.1:** Gruplardan alınan kan örneklerinden hazırlanan periferik kan yayma preparatlarının incelenmesi ve analizleri tabloda kıyaslanmaktadır.

28

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b>	Malign bir tümörün metastaz aşamaları görülmektedir.	3
<b>Şekil 2.2.</b>	Sirkadiyen olarak salınan melatoninin gün içinde salındığı saatler görülmektedir	5
<b>Şekil 2.3.</b>	Melatonin salınım mekanizması görülmektedir.	7
<b>Şekil 2.4.</b>	Tümör mikroçevresinde MKSH'lerin yerleşimi görülmektedir.	10
<b>Şekil 2.5.</b>	Tümörögenizde anjiyogenik süreç görülmektedir.	12
<b>Şekil 4.1.</b>	Grafik periferik kan yayma analizi sonucunda monosit hücre miktarının gruplara göre dağılımını göstermektedir.	26
<b>Şekil 4.2.</b>	Grafik periferik kan yayma analizi sonucunda lenfosit hücre miktarının gruplara göre dağılımını göstermektedir.	27
<b>Şekil 4.3.</b>	Grafik periferik kan yayma analizi sonucunda nötrofil hücre miktarının gruplara göre dağılımını göstermektedir.	27
<b>Şekil 4.4.</b>	Primer tümör büyüme hızlarının günlere göre değişim grafiği görülmektedir.	29
<b>Şekil 4.5.</b>	Gruplar arası hayvan ağırlıklarının değerlendirildiği grafik gösterilmektedir.	30
<b>Şekil 4.6.</b>	Tümör ağırlıklarının gruplar arası değerlendirildiği grafik gösterilmektedir.	31
<b>Şekil 4.7.</b>	Akciğer dokularında makrometastaz analizlerinin grafiği gösterilmektedir.	32
<b>Şekil 4.8.</b>	Akciğerdeki metastatik alanların gruplar arası resmedilmesi gösterilmektedir.	33
<b>Şekil 4.9.</b>	Akciğer dokularında mikrometastaz analizlerin grafiği gösterilmektedir	33
<b>Şekil 4.10.</b>	Karaciğerdeki metastatik alanların gruplar arası resmedilmesi gösterilmektedir.	35
<b>Şekil 4.11.</b>	Karaciğer dokusundaki metastatik alanların ölçümlerini gösteren grafik gösterilmektedir.	35
<b>Şekil 4.12.</b>	CD11b, GR1 ve CD33 antikorlarının primer	

	tümör dokusunda immünohistokimyasal olarak boyanması gösterilmektedir.	37
<b>Şekil 4.13.</b>	İmmünohistokimyasal olarak boyanan CD11b'nin ekspresyon grafiği gösterilmektedir.	38
<b>Şekil 4.14.</b>	CD33 antikorunun immünohistokimyasal olarak ekspresyon grafiği gösterilmektedir.	39
<b>Şekil 4.15.</b>	Gruplar arası GR1 ekspresyonunun grafiği gösterilmektedir.	39
<b>Şekil 4.16.</b>	Primer tümör dokularında anjiyogenik belirteçlerin ekspresyonu gösterilmektedir.	41
<b>Şekil 4.17.</b>	VEGF-A antikorunun gruplar arası ekspresyon analizi görülmektedir.	42
<b>Şekil 4.18.</b>	VEGFR-1 antikorunun gruplar arası ekspresyon analizi görülmektedir.	42
<b>Şekil 4.19.</b>	VEGFR-2 antikorunun gruplar arası ekspresyon analizi görülmektedir.	43
<b>Şekil 4.20.</b>	Karaciğer dokusunda CD11b, CD33 ve GR1 ekspresyonları gösterilmektedir.	44
<b>Şekil 4.21.</b>	Karaciğerde CD11b ekspresyonunun gruplar arası farklılıkları gösterilmektedir.	45
<b>Şekil 4.22.</b>	Karaciğerde GR1 ekspresyonunun gruplar arası farklılıkları gösterilmektedir.	45
<b>Şekil 4.23.</b>	Karaciğerde CD33 ekspresyonunun gruplar arası farklılıkları gösterilmektedir.	46
<b>Şekil 4.24.</b>	Anjiyogenik belirteçlerin karaciğer dokusunda immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi gösterilmektedir.	47
<b>Şekil 4.25</b>	VEGF-A molekülünün immünohistokimyasal analizini göstermektedir.	48
<b>Şekil 4.26.</b>	VEGFR-1 molekülünün immünohistokimyasal analizini göstermektedir.	49
<b>Şekil 4.27.</b>	VEGFR-2 molekülünün immünohistokimyasal analizini göstermektedir.	49

<b>Şekil 4.28.</b>	Anjiyogenik moleküllerin primer tümör dokusunda western blot yöntemiyle elde edilen bantlar gösterilmektedir.	50
<b>Şekil 4.29.</b>	Anjiyogenik moleküllerden VEGF-A'nın primer tümör dokusunda western blot yöntemiyle elde edilen bantlarının analizi grafikte gösterilmektedir.	51
<b>Şekil 4.30.</b>	Anjiyogenik moleküllerden VEGFR-1'in primer tümör dokusunda western blot yöntemiyle elde edilen bantlarının analizi grafikte gösterilmektedir.	51
<b>Şekil 4.31.</b>	Anjiyogenik moleküllerden VEGFR-2'nin primer tümör dokusunda western blot yöntemiyle elde edilen bantlarının analizi grafikte gösterilmektedir.	52

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>13-HODE</b>	:	13-hidroksiododekadienoik asit
<b>4T1</b>	:	Metastatik 4T1 meme tümörü hücre hattı
<b>4TLM</b>	:	Karaciğere metastaz yapmış ve buradan elde edilmiş tümör hücreleri
<b>cAMP</b>	:	Siklik adenzin monofosfat
<b>CBP</b>	:	CREB bağlayıcı protein
<b>CREB</b>	:	cAMP cevap elemanı bağlayıcı protein
<b>DMEM-F12</b>	:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DNA</b>	:	Deoksiribonükleik asit
<b>EGF</b>	:	Epidermal büyüme faktörü
<b>e-Kaderin</b>	:	Epitelial kaderin
<b>FBS</b>	:	Fetal sığır serumu
<b>FGF</b>	:	Fibroblast büyüme faktörü
<b>FLT-3</b>	:	FMS ilişkili tirozin kinaz-3
<b>G-CSF</b>	:	Granülosit koloni uyarıcı faktör
<b>GM-CSF</b>	:	Granülosit/makrofaj koloni uyarıcı faktör
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	:	Hidrojen peroksit
<b>HBSS</b>	:	Hanks' Balanced Salt Solution
<b>HDM</b>	:	Hücre dışı matriks
<b>HGF</b>	:	Hepatosit büyüme faktörü
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	:	Hipoksiyle indüklenbilir faktör -1 $\alpha$
<b>HIOMT</b>	:	Hidroksi indol-O-metil transferaz
<b>HKH</b>	:	Hemapoietik kök hücre
<b>IL</b>	:	İnterlökin
<b>KHF</b>	:	Kök hücre faktörü
<b>LA</b>	:	Linoleik asit
<b>M-CSF</b>	:	Makrofaj koloni uyarıcı faktör
<b>MEK</b>	:	Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz
<b>MKSH</b>	:	Myeloid kökenli süpresör hücre

<b>MLT</b>	:	Melatonin
<b>MMP</b>	:	Matriks metalloproteinaz
<b>NaCl</b>	:	Sodyum klorür
<b>NAT</b>	:	N- asetil transferaz
<b>NF-κB</b>	:	Nükleer faktör kappa
<b>OMÖ</b>	:	Ortak myeloid öncülü
<b>PANC-1</b>	:	Pankreatik karsinom hücre hattı
<b>PBS</b>	:	Fosfat buffered salin (Tuzlu Fosfat Tamponu)
<b>PDGF</b>	:	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
<b>PGF</b>	:	Plasental büyüme faktörü
<b>PIK</b>	:	Proteaz inhibitör kokteyl
<b>PVN</b>	:	Paraventriküler Nükleus
<b>ROT</b>	:	Reaktif oksijen türleri
<b>RNT</b>	:	Reaktif nitrojen türleri
<b>SDS</b>	:	Sodyum dodesil sülfat
<b>SKN</b>	:	Suprakiazmatik nükleus
<b>SSG</b>	:	Süperiyor servikal gangliyon
<b>TBS</b>	:	Tris buffered salin (Tuzlu Tris Tamponu)
<b>TBS-T</b>	:	Tris buffered salin (Tuzlu Tris Tamponu)– twin20 karışımı
<b>TM</b>	:	Tümör
<b>TNF</b>	:	Tümör nekroz faktör
<b>VEGF</b>	:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
<b>VEGFR</b>	:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Meme kanseri dünyada kadınlarda en sık görülen kanser türlerinden biridir. Meme kanseri normal epitel hücrelerin malignant transformasyonuna neden olan kompleks genetik ve epigenetik olaylar sonucu ortaya çıkmaktadır (Lo & Sukumar, 2008). Meme kanserinden ölümlerin en yaygın sebebi primer tümör kaynaklı etkinin yanı sıra, tümörün yarattığı metastazlardır.

Melatonin; son yıllarda antioksidan, anti-inflamatuvar ve anti-tümör aktivitesi gösterdiği ve karsinojen ajanlara karşı serbest radikal temizleyicisi gibi çalışarak etki ettiği bilinen ve pineal bezden kana kolaylıkla salınan indol türevli bir bileşiktir. Melatoninin epitelyal-mezenkimal dönüşüm faktörlerini etkileyerek metastazı inhibe etmek üzere bazı yanıtları tetikleyebildiği ve tümör hücrelerinin invazyon kapasitesini sınırlayarak etki gösterdiği de son yıllarda bildirilmiştir (Alvarez-Garcia, Gonzalez, Alonso-Gonzalez, Martinez-Campa, & Cos, 2012). Ayrıca, akut stres ya da immünsüpresif bazı farmakolojik uygulamalar sonucunda ortaya çıkan immün yetmezlik durumlarında uygulandığında belirgin bir immün aktivasyona sebep olduğu gösterilmiştir. Ancak konuyla ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır (Maestroni, 1993). Diğer yandan, tümör mikroçevresinin kontrolünde rol oynadığının öne sürülmesi melatoninin malign hücre çevresindeki etkisini araştırmaya değer kılmış ve özellikle bu alanda *in vitro* çalışmalara konu olmuştur (Alvarez-Garcia ve ark., 2012).

*In vitro* çalışmaların yanında *in vivo* araştırmalar bu molekülün gerçek etkisinin ya da etkilerinin anlaşılmasına olanak sağlayacağından; bu projede özellikle *in vivo* deneysel araştırma modeli ön plana çıkarılmış ve primer tümöre ek olarak metastazdaki etkilerinin vurgulanması hedeflenmiştir. Projenin amacı, melatoninin primer tümör ve organ metastazlarındaki etkisinin anjiyogenik mekanizmalar üzerinden olabileceği hipotezinin aydınlatılmaya çalışılmasıdır. Bu mekanizmaların açıklanmasıyla, anti-anjiyogenik ve immün yanıt oluşumuna dayalı etkiler üzerinden; primer tümörün oluşumu ve metastazında melatoninin etkisi ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Melatoninin tümör oluşmadan önce kullanımı ve sonrasında da tümör ile birlikte destekleyici tedavi seçeneği olarak kullanılmaya devam edilmesini içeren bir çalışma literatürde yer almamaktadır. Bu çalışmayla koruyucu amaçlı kullanılacak olan melatoninin tümör oluşumu



ve metastatik yanıtlar üzerine etkisi de değeriendirilecek ve bununla ilgili ayrıntılar da literatüre ilk defa kazandırılacaktır.

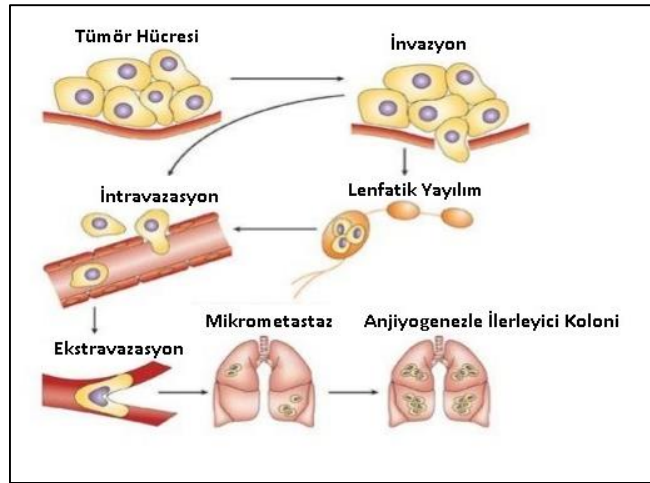
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

Kanser, çeşitli genetik ve hücrel değişiklikler sonrası tümör süpresör genleri inaktif ve onkogenleri aktif hale getiren karmaşık bir hastalıktır (Sundberg ve ark., 1998). Kanser günümüzde kardiyovasküler hastalıklardan sonra en fazla ölüme sebebiyet veren hastalıktır (Koene, Prizment, Blaes, & Konety, 2016).

#### 2.1.1. İnvazyon ve Metastaz

Metastaz, kanser hücrelerinin birincil bir bölgeden vücuttaki diğer organlara yayıldığı karmaşık bir süreçtir. Birkaç adımdan oluşan bu süreçte, hücre dışı matriksin (HDM) değişimi ve sitoskelet yapısının yeniden oluşumu bu adımlardan en önemlileridir. Bu süreçte malign hücreler ana tümör kitlesinden ayrılır, ayrılan hücreler HDM ile olan dinamiğin bozulmasına rağmen bağlarını yeniden düzenlerler. Hücre dışı matriksle ilişkili çevre dokuları istila etmeye başlayan tümör hücreleri kan damarları içine girerek tüm vücuda bu yolla yayılmaya başlarlar (Şekil 2.1.) (Gkretsi & Stylianopoulos, 2018). İnvazyon ve metastaz kanser hastalarında hastalığın en tehlikeli ve ölümcül aşamalarıdır. Bir tümör invazyon yeteneğini kazandığında vücuda kolayca yayılabilir ve yeni odaklar oluşturabilmektedir (Kohn & Liotta, 1995).



**Şekil 2. 1** Malign bir tümörün metastaz aşamaları görülmektedir. Tümör hücreleri buldukları ortamdan invazyon ile ayrılıp; lenfatik yol aracılı intravazasyonla damar içine ve sonrasında da ekstravazasyonla damar dışına çıkarak dokuya yönelirler. Anjiyogeneze doku içinde yeni odaklar oluşturduktan sonra hızla aktive olmaktadır (Steege, 2003).

İnvazif özellikleri olan primer tümörlerde, hücre-hücre etkileşimlerinde etken rol oynayan E-kaderin (Epitelial kaderin) adezyon molekülünün kaybı, hücreler arası bağlantıların kopmasına sebep olur. Bu adezyon molekülünün sitoplazmik kuyruğu,  $\alpha$ -katenin ve  $\beta$ -katenin yoluyla aktin hücre iskeletine bağlanarak sıkı bir etkileşim sağlamaktadır (Fletcher & Mullins, 2010). Hücreler arası etkileşim özellikle tümör hücrelerinin birbirlerine tutunarak daha kompakt bir yapı kazanmalarına ve sayılarını daha da arttırarak ikincil metastaz alanlarına yönelmelerine destek olmaktadır. Pankreas kanserinde yapılan bir çalışmada, E-kaderin bağlantılarının bozulması; tümörün erken invazyon yeteneği kazanmasına ve beraberinde de metastazı tetiklemesine yol açmıştır (Chiang & Massague, 2008).

### **2.1.2. Meme Kanseri**

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser olup, kadınlarda görülen kötü huylu tümörlerin neredeyse üçte birini içermektedir. Kansere bağlı ölümlerin nedeni olarak akciğer kanserinden sonra ikinci sırada olup, 40-55 yaş arasındaki Amerikalı kadınlarda önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Metastatik meme kanseri olan kadınların %25-30'unun tümörün yarattığı metastazlar nedeniyle hayatlarını kaybettikleri bildirilmiştir (Burstein, Polyak, Wong, Lester, & Kaelin, 2004).

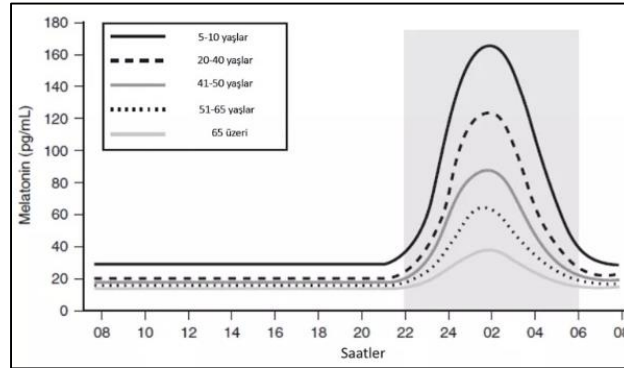
Meme kanseri farklı prognostik özelliklere sahip, klinik, patolojik ve moleküler açıdan farklı belirteçleri içeren, farklı biyolojik alt tiplerden oluşan heterojen bir tümör çeşididir (Choccalingam, Rao, & Rao, 2012). Meme kanseri, dokunun da yapısı gereği; ya süt üreten salgı bezleri olan lobül hücrelerinde veya lobüllerden memeye süt aktaran kanallar arasında görülmektedir. Memenin stromal kısmında kanserin ortaya çıkması daha az rastlanan bir durumdur. Zamanla proliferen olan tümör hücreleri sağlıklı meme dokusunu istila edebilir ve yakınlarındaki lenf nodlarına geçebilirler. Bu aşamadan sonra tümör hücrelerinin vücuda yayılmaları çok daha kolay ve hızlı gerçekleşmektedir.

Meme kanseri, 20 yaş altında nadiren görülür ve artan yaşla görülme sıklığının arttığı hatta 55 yaşından sonra daha sık rastlandığı bildirilmiştir. Meme kanserine yakalananların %30'unda risk faktörleri arasında erken menstruasyon, geç menapoz, çocuk doğurmamış olma, ileri yaşta ilk canlı doğum, ailede meme kanseri öyküsü, ileri yaş ve obezite sayılabilmektedir (Anders, Johnson, Litton, Phillips, & Bleyer, 2009).

## 2.2. Melatonin

Melatoninin salgılandığı temel organlar pineal bez ve retinadır (Wiechmann, 1986). Pineal bezde bulunan pinealositler ve retinadaki retinal fotoreseptörlerin, serotoninini melatonine dönüştürmek için kullandığı yolların benzerliği pineal bezin fotoreseptif bir organdan geliştiği fikrini desteklemektedir (Lynch, Wurtman, Moskowitz, Archer, & Ho, 1975; Wiechmann, 1986). Melatonin, sirkadiyen ritimle düzenlenen bir sekresyon mekanizmasına sahip olup, ritmi hipotalamusun suprakiazmatik nükleusunda (SKN) bulunan bir biyolojik saat tarafından ayarlanmaktadır. SKN, günlük aydınlık/karanlık siklusu ile 24 saatlik bir periyoda ayarlanmıştır. Bu senkronizasyon, ışık sinyalinin retinal yollarla SKN'ye iletilmesi ile başlamaktadır. SKN'de bulunan saat, multisinaptik nöronal yollarla sirkadiyen sinyalleri pineal beze gönderir ve ritmik melatonin üretimini yönetir.

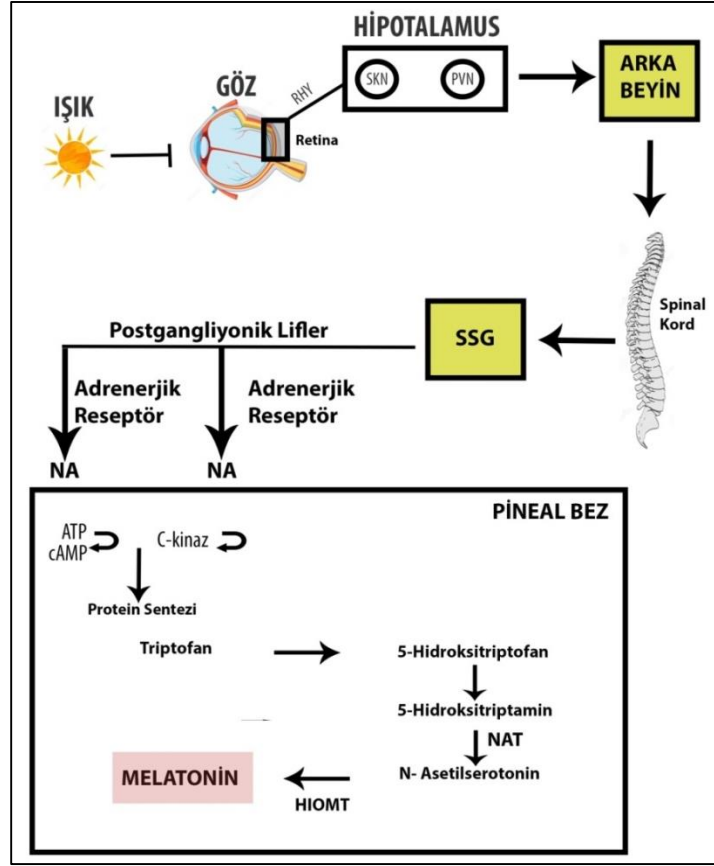
Melatonin hormonunun salınması pinealosit hücrelerinin ışığa duyarlı olmasıyla direkt ilişkilidir. Bu duyarlılık sayesinde ışıkla ortaya çıkan engellenme, karanlıkta ortadan kalkar ve pinealositlerin melatonin salgılaması tetiklenir. Özellikle gece saat 23:00–05:00 sıralarında melatonin salgılanması zirve yapar ve kandaki konsantrasyonu 3-10 kat artır (Perreau-Lenz ve ark., 2003). Akşam 21.00-22.00 saatlerinde kandaki melatonin miktarı artmaya başlar, 02.00-04.00 saatlerinde en üst seviyeye ulaşır (Şekil 2.2.) ve sabah 05.00-07.00'de azalmaya geçer ve 07.00'den sonra bazal seviyelere iner. Melatoninin kandaki konsantrasyonu gündüz saatlerinde yaklaşık 0-20 pg/dl düzeylerinde iken, gece saatlerinde 50-200 pg/dl düzeylerine yükselir. Gece boyunca ortalama 30 mg melatonin sentezlenir.



**Şekil 2. 2** Sirkadiyen olarak salınan melatoninin gün içinde salındığı saatler gösterilmektedir. Melatoninin salınmaya başladıktan sonra gece 2.00 ve 4.00 saatleri arasında pik değerine ulaşır ve yaklaşık 2 saat boyunca maksimum seviyede kalır (Grivas & Savvidou, 2007).

Işığın inaktivasyonu ile, gözde retina tabakasında başlayan uyarı retinohipotalamik yol ile hipotalamusta bulunan çekirdeklerden önce suprakiazmatik çekirdeğe ardından da paraventriküler çekirdeğe ulaşmaktadır. Arka beyin ve spinal kord yolunu izleyerek superior servikal gangliyonuna gelen uyarım, norepinefrin salınımına sebep olur (Perreau-Lenz ve ark., 2003). Norepinefrin pineal bezdeki en önemli nörotransmitterdir. Norepinefrin, pinealosit membranının içerdiği postgangliyonik reseptörlere ( $\beta 1$  ve  $\alpha 1$  adrenerjik reseptörler) bağlanarak işlev görür.  $\beta 1$  reseptörlerinin uyarılmasıyla melatonin sentezinin yaklaşık %85'i,  $\alpha 1$  reseptörlerinin uyarılmasıyla ise sentezin yaklaşık %15'i gerçekleşmektedir (Wagner, Brandstatter, & Hermann, 2000).

Işığın inaktivasyonu ile oluşan karanlık uyarısı pineal beze ulaştığı zaman, norepinefrin hormonu pinealosit membranında bulunan adrenerjik reseptörlere bağlanır. Böylece bir dizi reaksiyon başlar. Pinealosit hücre membranlarında adenil siklaz aktivasyonunu sağlar, bu da hücre içindeki c-AMP ve NAT (N-asetiltransferaz) enziminin artışına neden olur. Sonuçta melatonin sentezi ve salınımı başlar (Şekil 2.3.) (Schomerus & Korf, 2005). Kan plazmasında bulunan triptofan pinealositlere geçiş yaptıktan sonra, önce serotonine ardından NAT (N-asetiltransferaz) enzimi vasıtasıyla melatonine dönüştürülür. Üretilen bu melatonin herhangi bir dokuda depolanamaz. Amfoterik bir bileşik olduğundan hem lipofilik hem de hidrofilik özelliğe sahiptir.



**Şekil 2.3.** Sirkadiyen olarak salınan melatoninin salınım mekanizması gösterilmektedir. Ortamda ışığın olmaması gözdeki fotoreseptör hücrelerin uyarı oluşturmaya ve retinohipotalamik yol ile hipotalamusta bulunan iki büyük çekirdeğe ardından süperiyor servikal ganglion ve buradan da postgangliyonik liflerle pineal beze ulaşmasına sebep olur. Böylelikle melatonin salınım süreci başlar (Emet ve ark., 2016).

### 2.3 Meme Kanseri Ve Melatonin

Pineal bezin kanser gelişimi üzerinde role sahip olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Blask, 2009). Bu çalışmalarda, pinealektomi sonrası pineal bezin fonksiyonel inhibisyonu sağlanmış ve denekler ışığa maruz bırakılarak melatonin hormonu da baskılanmıştır. Oluşturulan meme kanseri modellerinde, tümör hücrelerinin stimüle olduğu eksojen melatonin uygulamasının da *in vitro* çalışmalarda karsinogenez yanıtlarını geriletmediği görülmüştür. Bu çalışmada melatoninin karsinogenez üzerine etkisiyle sirkadiyen ritm değişimleri ya da bozulmalarının karsinogenik yanıtları etkileyebileceği vurgulanmaktadır (Anisimov, 2003).

Meme kanseri olan hastalar, sirkadiyen ritminin bozulmasına bağlı olabilecek düşük melatonin seviyeleri ile karşımıza çıkmaktadır. Meme kanseri hastalarında melatonin tedavisinin meme

kanserinin ilerlemesini yavaşlatabildiği ve hastaların yaşam kalitesini yükseltebildiği öne sürülmüştür (Li ve ark., 2017).

### **2.3.1. Melatonin ve Antioksidan Etkisi**

Reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNT) yararlı ve zararlı her iki role sahip olduğu bilinen hücrel metabolizma ürünleridir (Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic, & Mazur, 2006; Wu, Kosten, & Zhang, 2013). Bu reaktif türlerin fazla üretimi, DNA ve protein gibi canlı hücre yapılarına ciddi zarar veren oksidatif strese neden olmakta ve bu stres yanıtları da kanser ve birçok hastalıkta artmaktadır (Bonfont-Rousselot & Collin, 2010; Fernandez, Bonilla, Phillips, & Perl, 2006; Guglielmotto, Tamagno, & Danni, 2009; Militante & Lombardini, 2004; Poeggeler ve ark., 1999; Valko ve ark., 2006; Yamashita, Sakamoto, Yamanishi, Totani, & Yamamoto, 2013). Melatoninin hem antioksidan özelliği hem de serbest radikal süpürücü olarak işlev görmesi; mitokondride oksidan-antioksidan dengesinin sağlanmasında önemli bir role sahip olup, bu dengenin de özellikle karsinogenezde etkili olabileceği literatürde vurgulanmaktadır (Allegra ve ark., 2003; Mallo ve ark., 1990; Militante & Lombardini, 2004; Reiter ve ark., 1999; Rasmeyer ve ark., 2003; Vakkuri, Leppaluoto, & Kauppila, 1985).

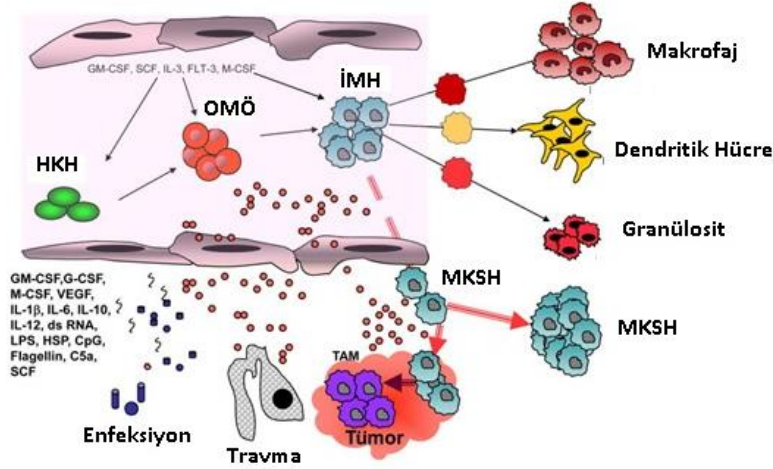
### **2.3.2. Melatonin ve İnflamasyon**

Melatonin, nöroimmüno-endokrin sistemin düzenlenmesinde etkin bir molekül olup; inflamasyon ve inflamasyon ile ilişkili organ hasarına karşı koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir (Shim ve ark., 2015). Melatoninin, endotelin-1, VEGF, NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , IL-6, STAT3, TNF- $\alpha$  gibi inflamasyon oluşumundan sorumlu yolları etkilediği literatürde özellikle *in vitro* çalışmalarla ortaya konmuştur (Sanchez, Calpena, & Clares, 2015). Melatonin organizmanın immün yanıtını, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-22, TNF- $\alpha$  gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltarak ve aynı zamanda anti-inflamatuvar sitokin olan IL-10'un da artışını sağlayarak düzenlemektedir (Cutando, Montero, Gomez-de Diego, Ferrera, & Lopez-Valverde, 2015; Maldonado, Garcia-Moreno, Gonzalez-Yanes, & Calvo, 2016). NF- $\kappa$ B yolağında özellikle proliferasyon ve inflamatuvar yanıtta rol alan p65, sitoplazmada p50 ile birleşerek nükleusa geçmekte ve birlikte inflamatuvar yanıtları tetiklemektedir. TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 gibi sitokinlerin üretilmesi yoluyla NF- $\kappa$ B'nin tümörlerde yeni damar oluşumunda (anjiyogenez) önemli bir rol oynadığı da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu sitokinler anjiogenezin primer düzenleyicisi olan VEGF ekspresyonunu da stimüle edebilmektedirler (Xie, Xia, Zhang, Gong, & Huang, 2010).

### 2.3.3 Melatonin ve MKSH'ler

İmmatur miyeloid hücreler (IMH), miyelopoezin normal basamaklarında yer alan kemik iliğinde yerleşen hücrelerdir. IMH'ler periferel organlara göç edip, gittikleri yerlerde dendritik hücrelere, makrofajlara ve/veya granüositlere farklılaşma özelliğindedirler. Ancak, özellikle tümör mikroçevresinde ya da akut/kronik enfeksiyon alanlarında, bu alanlardan gelen çekici sinyallerin etkisiyle IMH'ler miyeloid kökenli supressor hücrelere (MDSC; MKSH) dönüşmektedirler. Tümör mikroçevresine MKSH; bu alanda yer alan immun hücrelerin baskılanmasını sağlayarak, tümör büyümesi ve invazyonuna destek olurlar (Şekil 2.4.) (Gabrilovich & Nagaraj, 2009). MKSH'ler; ilk kez tümör verilen hayvanlarda yapılan çalışmalarla tanımlanmış ve bu hayvanların tümör dokusu ile lenf nodlarında varlığı gösterilmiştir (Wei ve ark., 2016). MKSH'lerin, meme kanserinde yapılan çalışmalarda tümör büyümesini ve metastazını arttırdığı, beraberinde de immün sistemi baskılayarak ortamı tümör lehine çevirdiği öne sürülmüştür (Diaz-Montero ve ark., 2009). Tümör mikroçevresinde CD11b<sup>+</sup> ve GR1<sup>+</sup> kemik iliği kökenli hücreler dominant protümörojenik faktörlerin kaynağı olarak değerlendirilmekte ve MKSH'leri olarak kabul edilmektedirler (Park ve ark., 2013; Yan ve ark., 2010). Yan ve ark.'nın literatüre kazandırdıkları çalışmalarında, 4T1 hücreleri ile oluşturdukları meme kanseri modelinde, akciğere infiltre olan metastatik hücrelerin GR1 ve CD11b ekspresyon ettikleri gösterilmiştir (Yan ve ark., 2010). Bu hücrelerin tümör gelişimi ve metastazı tetikleyen MKSH'ler olduğu ve uygun koşullarda tümörün immün süpresif etkilerle büyümesini ve metastazını desteklediği belirtilmektedir. MKSH'lerin primer tümörden uzakta metastaz alanlarında, pre-metastatik niş koşullarının oluşturulmasına ve lokal anjiyogenezin sağlanmasına katıldıkları da düşünülmektedir. Özellikle metastatik mikroçevrede MKSH'lerin CD33<sup>++</sup> ekspresyon ettikleri de vurgulanmaktadır (Yu ve ark., 2013).





**Şekil 2.4.** Tümör mikroçevresinde MKSH'lerin yerleşimi görülmektedir (Gabrilovich & Nagaraj, 2009). Kemik iliğinde yer alan immatür miyeloid hücreler (İMİH) miyelopoiezin normal basamaklarında bulunur ve granülosit/makrofaq koloni-sitimüle edici faktör (GM-CSF), kök-hücre faktörü (KHF), interlökin-3 (IL-3), FMS-ilişkili tirozin kinaz 3 (FLT-3), makrofaq koloni stimüle edici faktör (M-CSF) gibi birçok faktörün de kontrolü altındadır. Hematopoietik kök hücreler (HKH), miyeloid progenitör hücrelere (ortak miyeloid öncülü, OMÖ) ve sonrasında da İMİH'lere farklılırlar. İMİH'ler farklı çevre koşullarında ve organlarda yeni ulaştıkları yerlerde yeniden farklılanabilirler. Ancak tümör mikroçevresinde, bu alandan gelen sinyallere de bağlı olarak farklılanmaz ve MKSH olarak kalırlar. Ancak, aktivasyonları devam ederek immun baskılayıcı fonksiyonlar sergilerler.

### 2.3.4 Melatonin ve Anjiyogenez

Anjiyogenez terimi ilk olarak 1787 yılında İngiliz cerrah John Hunter tarafından kullanılmış ve daha sonra 1935 yılında Hertig tarafından ilk olarak plasentada bulunan kan damarlarının gelişimini tanımlamak için ortaya atılmıştır (Folkman & Klagsbrun, 1987). Kan damarları, vaskülogenez ve anjiyogenez olmak üzere iki farklı mekanizma aracılığıyla oluşmaktadır. Vaskülogenez, immatür mezenşimal hücrelerden kan damarlarının gelişmesine bağlı olup embriyonun erken dönemleriyle sınırlı olduğu bilinmektedir. Anjiyogenez ise, daha önce mevcut olan kan damarlarından yeni damarların oluşması olarak tanımlanmaktadır. Bu olay, insan vücudunda doğal fizyolojik bir olay olabildiği gibi patolojik de olabilen bir olaydır. Anjiyogenez, kadın üreme siklusunda fizyolojik olarak meydana gelebilirken, tümör gelişim süreci ve inflamasyonda patolojik olarak meydana gelmektedir (Martinez, 2006). Primer damarsal sistemin gelişimi 'vaskülogenez' olarak tanımlanır ve ilkel damarsal ağı oluşturmak üzere endotelial progenitor hücrelerin hem embriyonik hem de embriyodan bağımsız mezoderm içinde farklılaşmasını içerir. Damarsal ağlarının uzanması ve değişimi için oluşan damar ağının yeniden düzenlenerek küçük ve büyük damarları oluşturması gereklidir (Folkman & Shing, 1992).

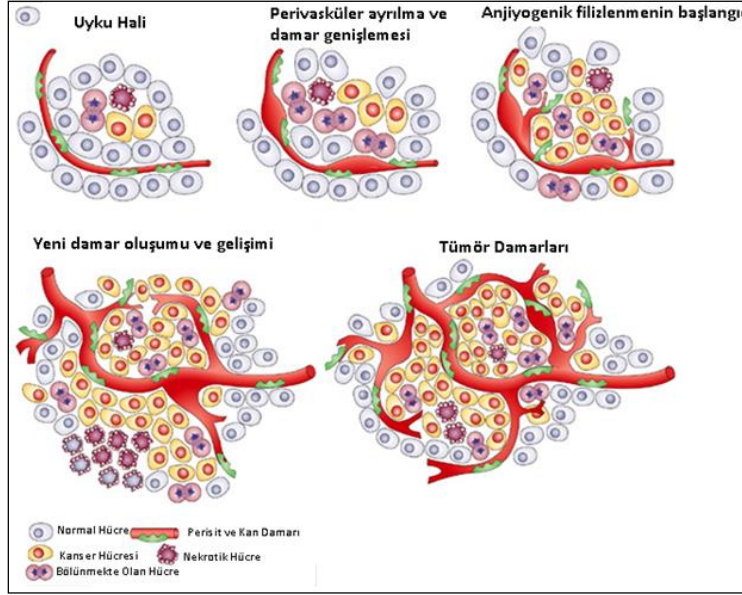
Anjiyogenez evreleri pek çok büyüme faktörünün ve düzenleyici proteinin kontrolü altında gerçekleşmektedir (Tablo 2.1.) (Distler, Neidhart, Gay, & Gay, 2002).

**Tablo 2.1.** Anjiyogenezi pozitif ve negatif yönde uyaran moleküller görülmektedir. Anjiyogenezi uyaran ve inhibe eden bazı moleküller tabloda yer almaktadır (Bergers & Benjamin, 2003).

Anjiyogenik Faktörler	Anjiyogenezi Önleyen Faktörler
VEGF (Vasküler endotelial büyüme faktör)	Trombospondin- 1
PGF (Plasental büyüme faktör)	Anjiostatin
FGF (Asidik, bazik fibroblast büyüme faktör)	Endostatin
FGF-3 (Fibroblast büyüme faktör-3)	Vazostatin
FGF-4 (Fibroblast büyüme faktör-4)	Vasküler endotelial büyüme faktörü inhibitörü
TGF- $\alpha$ (Transforme edici büyüme faktör- $\alpha$ )	Trombosit faktör-4 fragmanı
TGF- $\beta$ (Transforme edici büyüme faktör- $\beta$ )	Prolaktin derivesi
EGF (Epidermal büyüme faktör)	Restin
HGF (Hepatosit büyüme faktör)	Proliferinle ilgili protein
TNF- $\alpha$ (Tümör nekroz faktör- $\alpha$ )	İnterferon- $\alpha$ - $\beta$
PDGF (Trombosit kaynaklı büyüme faktör)	Anjiopoetin-2
GCSF (Granülosit koloni uyaran faktör)	Antitrombin-3 fragmanı
IL- 8 (İnterlökin-8)	İnterferon ile indüklenebilen protein- 10
Anjiogenin	
Proliferin	

Embriyonik damarsal sistemin gelişmesi esnasında meydana gelen olaylar ve embriyonun oksijen ve besin ihtiyacı, erişkin bir organizmada anjiyogenez oluşumunda, özellikle hipoksinin aktive ettiği metabolik cevaplarla benzerlik içermektedir (Folkman, 1997; Intaglietta, Johnson, & Winslow, 1996). Anjiyogenez oldukça karmaşık olaylar dizisidir ve çok sayıda birbirini takip eden mekanizmayla gerçekleşmektedir. Hücre dışı matriks (HDM) ve matriksi çevreleyen hücrelerin salgıladığı birçok büyüme faktörü, sitokinler ve bunların sahip olduğu reseptörler anjiyogenezde önemli rollere sahiptirler (Clauss, 2000). Tümör hücrelerinin büyümesi için gerekli olan besinlerin alınabilmesi için tümör hücreleri tarafından salgılanan maddeler de anjiyogenezi tetiklemektedir. Tetiklenen anjiyogenik yanıtlarla ortaya çıkan yeni damarlar (Şekil 2.5.), tümör dokusunun büyümesi, invazyonu ve metastazı için gerekli olan oksijen, besin maddeleri ve büyüme faktörlerinin ortama gelmesini sağlamaktadırlar. Devamlı büyüyen tümörlerde, tümör kitlesi 1-2 mm<sup>3</sup>'lük hacime eriştiğinde besin ve oksijene daha fazla ihtiyaç duyduğu için anjiyogenezi de aktive etmektedir. Yeni damar oluşumu gerçekleşmediğinde çevre dokudan difüzyon ile beslenen tümör dokusunun, en fazla 0.5-1cm<sup>3</sup>'lük hacime kadar

büyüebildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Daha fazla büyüebilmeleri ve metastaz yapabilmeleri için anjiyogenezin gerekli olduğu bilinmektedir (Folkman, 1971).



**Şekil 2.5.** Tümorengenezde anjiyogenik süreç görülmektedir. Uyku halinde bulunan tümör hücrelerinin uyarımıyla dokuda perivasküler ayrılmalar ve damar genişleme gözlenmektedir. Bu olay anjiyogenik sürecin başlangıcıdır ve tümör hücrelerinin ihtiyacı olan tüm desteği sağlamaktadır (Loizzi ve ark., 2017).

Anjiyogenez, genel olarak tanımlanan 3 basamaklı bir süreçte gerçekleşmektedir:

**1. Bazal Membranın Proteolitik Enzimler Tarafından Yıkımı:** Bazal membran ve HDM'nin proteolitik enzimlerle yıkılması; anjiyogenik faktörler, matriks metalloproteinazlar (MMP) ve plazminojen aktivatör (PA) enzimlerini aktive ederler. Bu enzimler bazal membranı ve HDM'yi yıkarak; endotel hücrelerinin uyarılması ve kapiller filizlenmenin gerçekleşmesini sağlamaktadır (Ausprunk & Folkman, 1977).

**2. Endotel Hücrelerinin Aktivasyonu, Proliferasyonu ve Göçü:** Anjiyogenik faktörler endotel hücrelerindeki reseptörlerine bağlanarak hücrelerin aktivasyonunu sağlamaktadırlar. Bu aktivasyon, endotelin HDM'in yıkımını sağlamasıyla devam eder ve beraberinde de hücrelerin bu alana göçünü tetikler. Hücreler hızla çoğalmaya başlayarak, bu süreçte en etkin rol oynayan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'nin salgılanmasını aktive ederek hızla yeni dallar oluşturulmasını sağlarlar (Carmeliet, 2003).

**3. Tübül Oluşumu ve Olgunlaşma, Damar Stabilizasyonu ve Hücre Dışı Matriksin Yeniden Düzenlenmesi:** Endotel hücre çoğalmasından sonra HDM bileşenlerinin depolanması ve bir araya getirilmesi için hücre dışı proteoliz mutlaka bulunduğu yere göre inhibe edilmelidir. Damar olgun hale geldikten ve uygun anjiyogenez durumu oluştuktan sonra, anjiyogenik faktörlerde azalma görülür, anjiyogenez inhibitörlerinde de artış gözlenir. Bu sayede endotel hücreleri sessiz bir hale gelir ve damarlar kan akımını başlatmaya hazır hale gelmiş olur (Pepper, Montesano, Mandriota, Orci, & Vassalli, 1996).

### **Anjiyogeneizde Görevli Bazı Anjiyogenik Faktörler**

Tümörün büyümesi esnasında mikrodamarlar, tümöre besin, oksijen ve büyüme faktörleri sağlamak için sayılarını büyük oranda arttırmaları. Tümör anjiyogenezinin meydana gelmesi normal fizyolojik anjiyogeneze göre bazı farklılıklar içermektedir. Uyarıcılar ve inhibe ediciler arasındaki dinamik bozulur. Tümör ve endotel hücreleri bu dinamiğin bozulmasında temel bir role sahiptir. Birçok anjiyogenik büyüme faktörü fazla ekspre olmadığında, tümör büyümesinin de olamayacağı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Ziyad & Iruela-Arispe, 2011).

### **Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)**

Anjiyogeneizde görevli faktörler içerisinde en önemlisi, vasküler endotelyal büyüme faktörüdür (VEGF). İlk keşfedildiğinde vasküler endotelyal permeabilite faktörü (VEPF) olarak isimlendirilen bu faktör şu anda VEGF-A olarak adlandırılmaktadır (Clauss, 2000). VEGF ailesinin VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF ve svVEGFs olmak üzere toplam yedi üyesi bulunmaktadır. Bunlardan VEGF-E ve svVEGF dışında diğer VEGF üyeleri memeli genomu tarafından kodlanıp, anjiyogenez ve lenf-anjiyogeneizde rol almaktadırlar. VEGF ailesinin, yüksek afiniteye sahip, tirozin kinaz sınıfından olan VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (insanda; KDR ve farede, Flk-1) ve VEGFR3 (Flt-4) olmak üzere 3 tane reseptörü bulunmaktadır (Heldin & Westermarck, 1999).

VEGF'in reseptörü olan vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörü 1 (VEGFR-1) ile ilişkili tümör hücrelerinde özellikle proliferasyon, migrasyon ve yaşamsal aktivitelerin devamı ile ilgili basamaklar aktive olmaktadır (Yao ve ark., 2011). VEGF'in VEGFR-2 ile ilişkisi ise genel olarak endotelyal hücre mitogenezi ve vasküler permeabilitede aracı olup anjiyogenez basamaklarının ilerlemesine yardımcı olmaktadır. VEGFR-2 sinyalinde çok sayıda tirozin kinaz molekülü bulunur ve bunların aktivitesine göre VEGFR-2; proliferasyon, hücrenin sağkalımı, migrasyon ve

vasküler permeabilitede rol oynayan moleküler mekanizmaların çalışmasını başlatabilir (Ferrara & Adamis, 2016).

Stockmann ve ark. miyeloid kökenli hücrelerde, VEGF-A delesyonu olan bir *in vivo* modelde ortaya çıkan delesyonun; yüksek yoğunluklu damar ağı oluşumunu zayıflattığını göstermişlerdir. VEGF-A yokluğunda; VEGFR-2 fosforilasyonunun da azaldığı aynı çalışmada belirtilmektedir. Miyeloid kökenli hücrelerin ürettiği VEGF-A'dan yoksun primer tümörlerde, perisit miktarı ve damarsal yapının azaldığı; anjiyogenik geçişin engellendiği, tümörögenезin gerilediği ve hücrelerin apoptoza giderek tümör kitlelerinde nekrotik alanları arttırdığı da belirtilmektedir (Stockmann ve ark., 2008).

Alvarez-Garcia ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, melatoninin tümöral dokuda anti-anjiyogenik aktiviteye neden olduğunu ve VEGF'in, düzenlenmesinde rol oynadığını belirtmişlerdir. Endotelyal hücrelerin çevresindeki VEGF düzeyinin azalması, bu faktörün malign epitelyal hücreler ve proksimal endotelyal hücreler arasındaki parakrin ilişkiye dayandığını göstermektedir. Melatoninin, VEGF ve sitokinler üzerine etkisinin tümör mikroçevresinin düzenlenmesinde etkin rol oynaması bu molekülün anti-anjiyogenik etkilerinin yanında savunmada görevli hücreler üzerinde de rol oynayabileceğini göstermektedir (Alvarez-Garcia, Gonzalez, Alonso-Gonzalez, Martinez-Campa, & Cos, 2013). Endojen VEGF ekspresyonunun melatonin tarafından baskılandığı bildirilmiş (Lv, Cui, Yao, Xu, & Yang, 2012) ve MCF-7 ile MDA-MB 231 hücre hatlarında yapılan *in vitro* çalışmada da bu etkinin varlığı gösterilmiştir (Jardim-Perassi ve ark., 2016). Yapılan bir diğer *in vitro* çalışmada ise, PANC-1 (pankreatik karsinoma hücre hattı) hücre hattına verilen melatoninin tümör hücrelerinin proliferasyonunu etkilediği ve beraberinde de VEGF-A ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Lv ve ark., 2012).

### **Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)**

Polipeptit yapıda olduğu bilinen EGF birçok dokuda bulunur ve trombosit degranülasyonu sırasında sentezlenir. Epitel hücreler, endotel ve fibroblastlar için kemotaktiktir. Anjiyogenezi ve kollajenaz aktivitesini uyardığı bildirilmiştir (Herbst, 2004).

Melatoninin tümör oluşumunu inhibe ettiği birçok çalışmada gösterilmiştir. Blask ve ark.'ları yaptıkları çalışmada melatoninin kanser hücrelerinin büyümesini sınırlama yeteneğini açıklayan bir mekanizma tanımlamıştır. Melatoninin, hepatoma hücrelerinde membran reseptör aracılı süreçler yoluyla, linoleik asit (LA) ve mitojenik sinyalleme molekülü 13-hidroksiododekadienoik aside (13-HODE) dönüşümünü içeren yağ asitlerinin alımını ve metabolizmasını inhibe ettiğini göstermiştir. Çoklu doymamış esansiyel yağ asidi olan LA, Batı diyetinde yüksek seviyelerde tüketilmekte olup, deneysel sıçan ve insan tümör büyümesinin güçlü bir indükleyicisidir. 13-HODE, epidermal büyüme faktörünü (EGF)-EGF reseptörü otofosforilasyonu ve mitojen ile aktive edilmiş protein kinazlar olan MEK ve ERK 1/2 de dahil olmak üzere birçok sinyal molekülünün fosforilasyonu ile mitojenez başlatıldığı gösterilmiştir (Reiter, 2004).

### **Fibroblast Büyüme Faktörü-2 (FGF)**

FGF-2, hücre dışı matriks bileşenleri olan ve kan damarlarının olgunlaşmasında görevli olan kaderin ve integrinlerin düzenlenmesine de katkıda bulunmaktadır (Presta ve ark., 2005).

### **Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)**

Yapılan çalışmalarda PDGF'in 2 tane (A ve B) geni olduğu, bu iki gen kombinasyonu ile üç tip (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-AB) PDGF varlığı öne sürülmüştür.

Melatonin, kanser hücrelerinin besin ve oksijen tedarikini engelleyen çeşitli mekanizmalar kullanmaktadır. Transkripsiyonel düzeyde, hipoksiyle indüklebilen faktör-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) ve VEGF, anjiyogenezin inhibisyonu için melatoninin ana hedefleridirler. Melatonin, HIF-1 $\alpha$ 'nın çekirdeğe translokasyonunu önleyerek, VEGF ekspresyonunu engellemektedir. Ayrıca, anjiyogenez ile ilişkili genlerin ekspresyonuna dahil olan HIF-1 $\alpha$ , fosfo-STAT3 ve CBP/p300 kompleksinin oluşumunu da baskılamaktadır. Melatoninin anjiyostatik özellikleri de, VEGFR-2'nin aktivasyonunu ve ekspresyonunu inhibe etme yeteneğinden kaynaklanabilir. Melatoninin diğer anjiyostatik mekanizmaları arasında endotel hücre göçü, invazyon ve tüp oluşumunun inhibisyonu da yer almaktadır.

Literatürde yer alan bilgiler ışığında, “melatonin uygulanması; meme kanserinin oluşumunda, gelişiminde ve ilerleyen evrelerinde ortaya çıkacak metastaz yanıtlarında; anti-anjiyogenik, anti-inflamatuvar ve immun supresif yanıtları etkiler” hipotezini kurduk. Bu hipotezimiz

doğrultusunda, önerilen projede; primer tümör oluşumundan önce ve tümör enjeksiyonuyla birlikte melatonin uygulanmasının; tümör oluşumu, büyümesi ve metastazları üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Hayvanlar

Bu tez çalışması Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından 20/12/2016 tarihli B.30.2.AKD.0.05.07.00/110 sayı numaralı onayı ile gerçekleştirildi.

Yaptığımız çalışmada 4 haftalık Balb-C ırkı dişi fareler kullanıldı ve deney grupları 4T1 meme kanseri hücre hattının karaciğere metastazından elde edilip üretilmiş 4TLM (4TLM; **4T- Liver Metastatic cell line**) hücre hattının kullanılması ile oluşturuldu.

#### 3.2 Hücre Kültürü

-196°C'de bulunan 4TLM hücre hattı L-Glutamin, esansiyel olmayan aminoasitler, sodyum pirüvat ve %5'lik Fetal Sığır Serum (FBS) eklenmiş besiyerine DMEM F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) alındı ve %5 O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı. %80-90 konfluensiye ulaştıktan sonra hücreler sayıldı 1x10<sup>5</sup> sayıda olacak şekilde farelerin meme dokusuna ortotopik olarak enjekte edildi.

#### 3.3 Deney Modeli

Çalışmamızda 60 tane Balb-c ırkı 4 haftalık dişi fareler kullanıldı. Projede ilk 2 deney grubu olarak belirttiğimiz 1 ay öncesinden melatonin uygulanmaya başlayacak hayvanlarla ilk olarak deneye başlandı. Bunun için hayvan grupları hem melatonin verdiğimiz hem de melatoninini içinde çözdiğimiz %6'lık EtOH grubu çözücü grubu olacak şekilde dizayn edildi ve gruplar aşağıdaki gibi oluşturuldu.

1. MLT (10 mg/kg doz) + TM + MLT (30 mg/kg doz)
2. Çözücü + TM + Çözücü
3. TM + MLT (30 mg/kg doz)
4. TM + Çözücü
5. TM (Sadece tümör enjekte edilen grup)
6. Kontrol (Hiçbir enjeksiyona maruz kalmamış grup)

Her grupta 10 adet hayvan olacak şekilde gruplar organize edildi. Öncelikli olarak ilk 2 grup için deneye başlandı ve 10mg/kg doz melatonin (M1) ve çözücü olarak da %6'lık EtOH enjeksiyonu sabah ve akşam olmak üzere günde 2 defa uygulandı. 10mg/kg ve 30mg/kg doz her ikisi de



çalışmalarda fizyolojik olarak kullanılan dozlardır (Ding ve ark., 2019). 10mg/kg literatürde meme kanseri çalışması için önerilen doz ile aynı olup melatonin etki mekanizması değerlendirildiğinde her gün karanlık periyoduna girmeden önce verilmesi de etkinliğine katkıda bulunacaktır (Barrett & Bolborea, 2012). 30mg/kg doz, literatürde meme kanseri çalışmalarında sıklıkla önerilen bir dozdur. Melatoninin günde iki defa verilmesinin sebebi, ilk doz için; aydınlık dönemde de kanda etkinliğini göstermesi ve immün yanıtları tetikleyebilecek bir kapasiteye sahip olabilmesi içindir. İkinci dozun uygulanmasının sebebi; karanlık dönemde de etkinliğini normal salgılanan doz ile birlikte artarak göstermesi içindir (Barrett & Bolborea, 2012).

Enjeksiyon, her gün sabah 09.<sup>00</sup>-10.<sup>00</sup> ve akşam 16.<sup>00</sup>-17.<sup>00</sup> arasında 1cc olacak şekilde intraperitoneal olarak yapıldı. 1. ayın sonunda kontrol grubu hariç tüm gruplara tümör enjeksiyonu yapıldı. 4TLM hücreleri 1ml'de  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde HBSS'de (Hank's Balanced Salt Solution Thermo Fisher #14185052) çözüldü. Hücrelerin kültür tabağında %80 konfluensiye ulaşması için beklendi ve sonrasında tripsin ile kaldırılarak thoma lamında sayıldı. Her hayvana 0,1 ml içinde  $1 \times 10^5$  hücre olacak şekilde sağ meme dokusuna ortotopik olarak enjekte edildi. Tümör hücrelerinin hayvanlara enjeksiyonundan 1 gün sonra melatonin enjeksiyonuna günlük 30mg/kg doz olmak üzere (M2), günde iki kez sabah ve akşam olmak üzere devam edildi. 30mg/kg doz melatonin (M2) ve çözücü olarak da %6'lık EtOH enjeksiyonu sabah ve akşam olmak üzere günde 2 defa uygulandı. Sabah enjeksiyonları saat 09.<sup>00</sup>- 10.<sup>00</sup> arası, akşam enjeksiyonları saat 16.<sup>00</sup>-17.<sup>00</sup> olmak üzere 27 gün boyunca hayvanlar sakrifiye edilene kadar yapıldı. Bu enjeksiyon şeklindeki amaç, farenin vücudunda melatoninin daha uzun süre kalmasını sağlayarak; tümörün yarattığı inflamatuvar yanıtı ve metastaz alanlarında yer aldığı bilinen MKSH'leri etkileyip etkilemediğini görmeye çalışmaktır (Barrett & Bolborea, 2012; Pardridge & Mietus, 1980). 27. gün sonunda hayvanlar eterle bayıltıldı ve ilk olarak gözlerinden mikro hematokrit tüpü yardımıyla kanları alınıp periferik yayma için preparatlar hazırlandı. Hayvanların kanları alındıktan sonra servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilip tez için gerekli dokuları olan karaciğer, akciğer ve primer tümörleri çıkartıldı.

Alınan dokuların bir kısmı parafin takip için %10'luk formalin içine alınırken, bir kısmı da Western Blot yöntemi için endorflara alınarak -80°C'de saklandı. Formaline alınan dokular doku takip protokolüne tabii tutuldu.

### **3.4 Primer Tümörlerin Proliferasyon Hızındaki Değişimlerin Değerlendirilmesi**

Primer tümör enjeksiyonundan 1 hafta sonra başlanan ve 3 günde bir yapılan tümör ölçümleri sonucunda her hayvanın tümör büyüme hızları değerlendirildi. Enjeksiyondan sonra ilk 7 gün tümörler elle palpe edilebilir büyüklüğe ulaşmadıklarından ölçüm işlemine 7. günden sonra başlandı. Hayvanlara tümör enjeksiyonu yapıldıktan 1 hafta sonra 2 gün arayla kumpas aleti yardımıyla hayvanların tümör büyüklükleri milimetre cinsinden ölçüldü. Tümör boyutları X ve Y ekseninde ölçüldü. Ölçümler sonucunda tümör hacmi hesaplandı. Her ölçüm için ortalama alınarak yapılan toplam 5 tümör ölçümü ile tümör hacim ilerleme grafiği elde edildi. Ayrıca sakrifikasyon sonrasında çıkarılan tümörlerin ağırlıkları tartıldı ve elde edilen sonuçlar grafiğe aktarıldı.

### **3.5 Hayvanların Ağırlıklarının Tartılması**

Meme kanseri modeli oluşturulan fareler zaman içerisinde tümörün metastaz potansiyeline de bağlı olarak, normal ağırlıklarını kaybetmeye başlarken, tümörlerinin büyümesine bağlı olarak da belli bir ağırlık kazanırlar. Bu nedenle tümör kitleleri uzaklaştırıldıktan sonra hayvan ağırlıklarının değerlendirilmesine karar verildi. Melatonin uygulamasının tümör enjeksiyonundan önce kullanılması, özellikle melatoninin olası etkilerini değerlendirmemizi sağlarken, hayvan ağırlıkları üzerine de bir etkisinin olup olmadığını da anlamamıza olanak tanımıştır. Tümörler çıkartıldıktan sonra da gruplar arasındaki hayvan ağırlıkları farkı değerlendirildi.

### **3.7 Doku Takibi ve Kesit Alma**

#### **3.7.1 Doku Takibi Protokolü**

- 1- %10'luk formaline alınan dokular gece boyu fiksatifte bekletildi.
- 2- Ertesi gün fiksatif uzaklaştırmak için 4 saat akar suda dokular yıkandı.
- 3- Suyu uzaklaştırmak için artan alkol serilerinde (%70, %80, %90) 1'er gün olmak üzere bekletildi.
- 4- %100'lük alkolde 3 saat bekletilen dokular daha sonra şeffaflaşma aşaması için ksilol serilerinden geçirildi.
- 5- Ardından sıvı parafin serilerinden geçirilip en son da parafine gömüldü.

Hazırlanan parafin bloklardan metastaz analizi ve immünohistokimya deneyleri için superfrost lamlara örnekler alındı.

### **3.8 Metastaz Analizi**

Ortotopik olarak oluşturduğumuz meme kanseri modelinde 27. günün sonunda alınan akciğer ve karaciğer dokularında oluşan metastazların analizleri yapıldı. Sakrifikasyon sırasında ve sonrasında akciğer dokularında yoğun ve gözle görülür metastazlar gözlemlendi. Bu nedenle, akciğer ve karaciğer dokuları için makro ve mikro metastaz analizleri yapıldı.

#### **3.8.1 Makro Metastaz Analizleri**

Sakrifikasyon sonrasında alınan akciğer dokuları, total olarak Bouin's fiksatifine alındı. 1 gün Bouin's fiksatifinde bekletildikten sonra dokularda gözle görülebilen metastatik nodüller sayıldı. Daha sonra dokular %70 alkole alındı ve fiksatif tamamen uzaklaşana kadar yıkandı. Sonrasında normal doku takip protokolü izlenerek sırasıyla %70, %80, %90 ve %100'lük alkollerden geçirildi. Ksilol ile şeffaflaştırma yapıldı ve takibe devam edilerek parafine gömme işlemi uygulandı.

#### **3.8.2 Mikro Metastaz Analizleri**

27. günün sonunda sakrifiye edilen Balb-c ırkı dişi farelerin akciğer dokularına ek olarak karaciğer dokuları da alındı. Ancak karaciğer dokularında yüzeysel metastazlar net olarak seçilemediği için, doku içerisindeki metastazları değerlendirebilmek amacıyla mikro metastaz analizleri yapıldı.

Bu analiz için; karaciğer ve akciğer dokuları parafin takibe alındı. Total karaciğer ve akciğer dokuları birkaç parçaya ayrıldı (trimleme işlemi) ve aynı blok içerisinde gömüldü. Poly-L-lizini elektrostatik lamlara 5 µm'lik kesitler alınarak tüm karaciğer ve akciğer dokuları seri kesit olacak şekilde kesit atlamadan alındı. 10 slayt arayla seçilen her kesit hematoksilin-eozin ile boyandı. Boyanan slaytların 10 farklı alanında fotoğraflar çekildi ve bu fotoğraflarda Spot Advanced 4.6 (SPOT Imaging, a division of Diagnostic Instruments, USA) programı kullanılarak metastaz alanları mikrometre kare (µm<sup>2</sup>) cinsinden ölçülerek değerlendirildi. Metastatik alanlar total doku alanına oranlanarak metastatik kitlenin alan oranı hesaplandı. Tüm gruplar için bu değerlendirilme yapıldı.

### 3.9 Periferik Yayma Analizi

İnflamatuvar yanıtları değerlendirmek için yapılan analizlerde her hayvandan alınan kandan periferik yayma yapıp hematoksilen-eozin ile boyandıktan sonra monosit, lenfosit ve nötrofil miktarları sayıldı. Sayma işlemi her hayvandan 2 slaytın 10 farklı alanının fotoğraflandırılmasıyla gerçekleştirildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

### 3.10 İmmünohistokimyasal Analizler

#### Kullanılan Solüsyonlar

- Sitrik asit (pH:6,0; 900 ml distile suda 2,1 gr sitrik asit)
- PBS (Phosphate Buffered Saline, pH: 7,2-7,4; 2000 ml suda 16 gr Sodyum Klorür (Merck # 1.06404.1000) 2,85 gr Disodyum Hidrojen Fosfat (Merck # 1.06580.1000), 0,8 gr Potasyum Dihidrojen Fosfat (Merck # 1.04873.1000))
- %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Alkol serileri
- Ksilol
- Entellan

Primer tümör ve metastaz analizleri için kullanılan karaciğer dokularında, MKSH belirteçleri CD11b, Ly6G (GR1), CD33 ile anjiyogenik belirteçler olan; VEGF-A, VEGFR-1 ve VEGFR-2 ekspresyonları immunohistokimyasal olarak değerlendirildi. 5 mikrometre kalınlığındaki kesitler superfrost lamlar üzerine alındı ve gece boyunca 60°C'lik etüvde bekletildi. Parafinden kurtarılmak için, kesitler 2 defa 10'ar dakika ksilolden geçirildi. Kesitler daha sonra alkol serilerinden sırasıyla (%100, %90, %80, %70) 5'er dakika geçirildi. Distile su ile yıkama işlemi takiben; dokulardaki antijenik epitoplarnın belirginleşmesi için kesitler, sitrik asit tamponu (pH:6,0; 900 ml distile suda 2,1 gr sitrik asit) içine alındı. 750 watta 7 dakika olacak şekilde mikrodalgada kaynatma işlemi yapıldı. Mikrodalgada kaynatma işleminden sonra kesitler sitrik asit içerisinde 20 dakika boyunca oda ısısında soğumaya bırakıldı. Kesitler yıkama solüsyonu olan fosfat tamponuna (PBS) alınıp 3 kere 5'er dakika yıkandı ve dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini yok etmek için metanolla karıştırılan %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda (63ml metanol+7ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 15 dakika bekletildi. Daha sonra, kesitler 5'er

dakikadan 3 defa PBS'te yıkandı. Dokuların çevresi antikorun dağılmasını engellemek için hidrofobik kalemle (Patolab, #PEN-01 hydrophobic pappen) çizildi. Spesifik olmayan antikor bağlanmasını önlemek için, bloklama solüsyonu (Ultra V Block, LabVision Corporation, #TA-125UB) kullanılarak 7 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bloklama solüsyonu kesitler üzerinden uzaklaştırıldı ve primer antikorlar olan CD11b (abcam, #ab133357), Ly6G (GR1) (abcam, #ab25377), CD33 (abcam, #ab203032), VEGF-A (abcam, #ab51745), VEGFR-1 (abcam, #ab32152) ve VEGFR-2 (abcam, #ab45010) ile +4°C'de gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün, tekrar PBS ile 5 dakika 3 kez yıkayıp, biyotinli sekonder antikorda (Vector Lab. #BA-1000) oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. İnkübasyonun ardından 3 defa 5 dakika PBS ile yıkandı. Streptavidin-peroksidaz (Scytek sensitek #SHP125) ile 40 dakika inkübe edilen slaytlar; inkübasyondan sonra PBS ile yıkama işlemine tabi tutuldu. Sonrasında da kromojen olarak DAB (3,3'-Diaminobenzidine) (Sigmafast™, #D4168-50SET) substratı damlatılarak enzim substrat ilişkisi sonucunda reaksiyon bölgelerinin kahverengi olması için 3dk. beklendi. DAB reaksiyonu slaytları suya alarak durduruldu. Kesitlere Mayer'in hematoksileniyle (DDK Italia, #09-168) zıt boyama yapıp entellan (Merck #107961.0500) ile kapatıldı. Işık mikroskobu düzeyinde meme primer tümörü ve karaciğer dokularında CD11b, Ly6G (GR1), CD33, VEGF-A, VEGFR-1 ve VEGFR-2 proteinlerinin dağılımları ve immünoreaktivite dereceleri tespit edilip fotoğrafları çekildi.

İmmunohistokimyasal ekspresyonları değerlendirmek için ve aynı zamanda ayrı ayrı tüm antikorların ekspresyon seviyelerini gruplar arasında kıyaslayarak nitel bir değer belirlemek için; ekspresyon seviyeleri tüm dokularda Image-J (Image Processing and Analysis in Java–NIH) analizleri yapılarak değerlendirildi.

### **3.10.1 Image–J Analizi**

Slaytların rastgele 10 alanından fotoğraflar çekildi ve ekspresyon miktarları Image-J programı kullanılarak değerlendirildi. Ardından bütün dokunun alanı hesaplanarak total alan ölçümü ile ekspresyon görülen alanlar birbirine oranlandı. İmmünohistokimyasal ekspresyonların tamamı Image-J programı yardımıyla değerlendirildi ve gruplara arasındaki fark kıyaslandı.

### **3.10.2 İstatistiksel Analiz**

Yapılan analizlerin sonuçları Image J programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Analizlerde SigmaStat 3.5- Systat Software paket programı kullanıldı ve  $p < 0,005$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler normal dağılıma uyduğunda Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way ANOVA) yapıldı. İmünohistokimyasal ve western blot analizinden elde edilen değerler One-way ANOVA ile analiz edilmiştir ve post-hoc test olarak Student- Newman testi kullanılmıştır.

### **3.11 Western Blot Yöntemi**

Hayvanlardan aldığımız primer tümör dokularında aradığımız VEGF-A, VEGFR-1 ve VEGFR-2 proteinlerinin varlığını belirlemek için Western Blot yöntemini ile proteinlerin ekspresyon seviyeleri değerlendirildi.

#### **3.11.1 Dokulardan Lizat Hazırlanması**

##### **Kullanılan Solüsyonlar**

###### Lizis Tamponu:

- 10ml 0,1M Tris (pH 7.4), (Bio-Rad, #161-0719)
- 90ml distile su, 1ml 100X Na-orthovanadate (Sigma, #S650)
- 1gr SDS (Sigma, # L4390)
- Proteaz inhibitör kokteyli (PIK) (Protease inhibitor cocktail tablet, Roche, #1169749800120)

Sakrifikasyon esnasında alınan ve sıvı nitrojende  $-196^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan dokulardan lizatlar hazırlandı. Primer tümör doku örnekleri, bistüri ile parçalanıp ezildi ve ependorf tüplerine alınarak ağırlıkları tartıldı. 0,2 gr doku başına 600 mikrolitre lizis tamponu ve 25 mikrolitre PIK olacak şekilde hesaplama yapılarak ependorflara lizis tamponu ve proteaz inhibitör kokteyli eklendi. Örnekler lizis tamponu ile iyice karıştırıldı. 20 dakika buz üzerinde bekletildi. Daha sonra sonikasyon ile ses dalgaları yardımıyla mekanik parçalanmaları ve homojenize olmaları sağlandı. 30 dakika daha buz üzerinde bekletilerek toplam 50 dakika lizis tamponu ile muamele edildi. Örnekler  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 15.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar alınıp yeni ependorf tüplere konuldu, pelet kısmı atıldı ve lizatlar hazırlanmış oldu. Hazırlanan lizatlar  $-20^{\circ}\text{C}$  de saklandı.

### 3.11.2 Western Blot Protokolü

#### Kullanılan Solüsyonlar

##### 5X Yürütme Tamponu:

- 9 gr Tris (Bio-Rad, #161-0719)
- 43.2 gr Glisin (Bio-Rad, #161-0718)
- 3gr SDS (Sigma, # L4390)
- 600 ml Distile Su
- Distile su ile 1X şeklinde dilüe edilerek kullanıldı.

##### Transfer Tamponu:

- 14.3 gr Glisin (Bio-Rad, #161-0718)
- 3 gr Tris (Bio-Rad, #161-0719)

Karışım 700 ml distile su içerisinde çözüldü. Solüsyona 200 ml Metanol (Merck, #1.06.008.2500) eklendi ve toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

##### Bloklama Solüsyonu (%5'lik süt tozu):

5gr süt tozu (Bio-Rad ##1706404) 100 ml TBS-T içerisinde çözüldü ve +4°C'de 24 saat kalacak şekilde muhafaza edildi.

##### 10X TBS Tamponu:

- 60.55 gr Tris (Bio-Rad, #161-0719)
- 87.66 gr NaCl (Merck #1.06404.1000)
- 800 ml distile suda çözdürüldü. pH'ı 7,4'e ayarlandı. pH ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

##### TBS-T Solüsyonu:

Hazırlanan 10X TBS'ten alınan 100ml solüsyon distile su ile 1 litreye tamamlandı ve böylece 1X TBS elde edilmiş oldu. Elde edilen 1 litre 1X TBS içerisine 1000µl Tween-20 (Sigma, #P9416) eklendi ve oda ısısında saklandı.

- Thick Blot Paper (Bio-Rad,#165-0921)

- Blotting-Grade Blocker nonfat dry milk (Süt tozu) (Bio-Rad, #170-6404)
- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, #34080)
- PVDF Transfer Membranı (Thermo Scientific, #88520)
- PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, #26619)
- CL- Xposure film 18x24 cm (Thermo Scientific, #34089)
- PQ Universal Developer 5L (ILFORD, #1757314)
- Hypam Fixer 5L (ILFORD, #1758285)

Çalışılacak proteinlerin ağırlıkları (kDa) göz önüne alınarak uygun jeller hazırlandı (%10'luk bis-akrilamid jel). Her kuyucuğa 20 µl örnek yüklendi ve proteinler yüklemeye başlamadan önce leammlili ile muamele edildi ve lineer hale gelmeleri sağlandı. Protein-Leammlili karışımı önce 15 dakika 80V'da, daha sonra 2 saat 100V'da elektroforez yapıldı. Blot aşamasına geçmeden önce proteinlerin aktarılacağı PVDF membranlar metanol ile 5 dk çalkalayıcı inkübatör üzerinde muamele edildi. Elektroforez aşamasından sonra blotlama işlemi yapılarak (gece boyu +4°C'de) jeldeki proteinlerin membranlara aktarılması sağlandı. Proteinlerin aktarıldığı PVDF membranlarda spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için TBS-T ile hazırlanmış %5'lik süt tozu karışımı ile 1 saat süreyle bloklandı. Daha sonra bloklanmış olan membranlar herhangi bir yıkama işlemi yapılmadan uygun sıcaklık ve koşullarda (+4°C'de gece boyu) primer antikorlarla karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Primer antikorlarla inkübasyondan sonra membranlar 3 kez 10 dakika süre ile TBS-T solüsyonu ile yıkandı. Yıkama aşamasından sonra sekonder antikor ile uygun sıcaklık ve koşullarda (oda ısısında, 1 saat) inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tekrar 3 kez 10 dakika TBS-T solüsyonu ile yıkandı. Membranlar kemilüminesan ile uygun sürede inkübe edilip, membrandaki protein bantları karanlık odada filme aktarıldı.



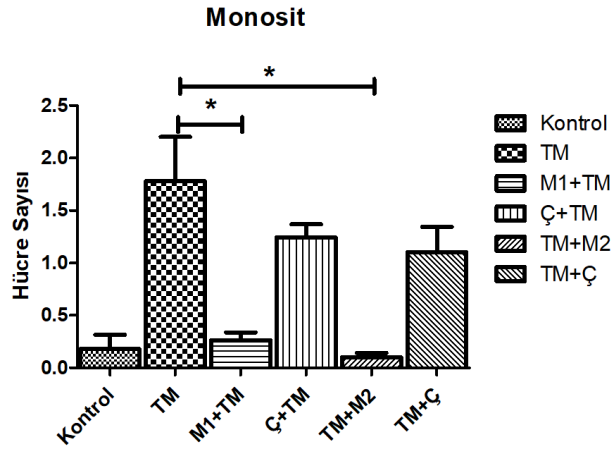
## 4.BULGULAR

### 4.1. İnflamatuvar Yanıtların Değerlendirmesi

Vücuda giren bir patojen sonucu hayvanın lökosit miktarlarında bazı değişimler meydana gelir. Hayvanın vermiş olduğu bu tepki inflamatuvar yanıt sonucudur. Tümör de inflamatuvar yanıtı eşlik eder ve bu yanıtı değerlendirmek için sakrifikasyon sırasında hayvanlardan kan alındı. Bu kanlarda periferik yayma preparatları hazırlanıp immün hücreler sayıldı.

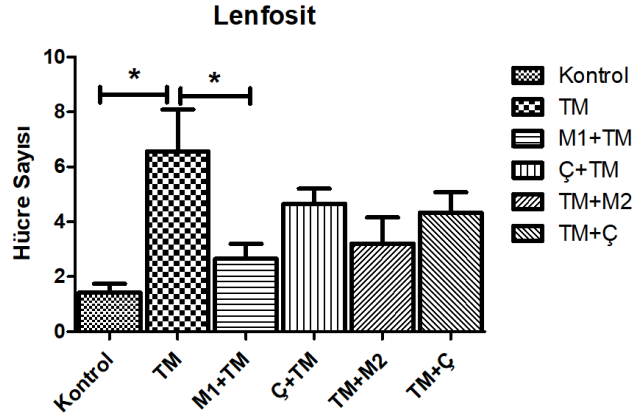
### Periferik Yayma Analizi

Yapılan analizler monosit sayısı açısından değerlendirildiğinde; analizler sonucunda sadece tümör enjekte edilmiş grup olan TM'ye göre M1+TM ve TM+M2 grubunda monosit miktarında anlamlı bir azalma gözlemlendi (Şekil 4.1.) (\* $p<0,05$ ).



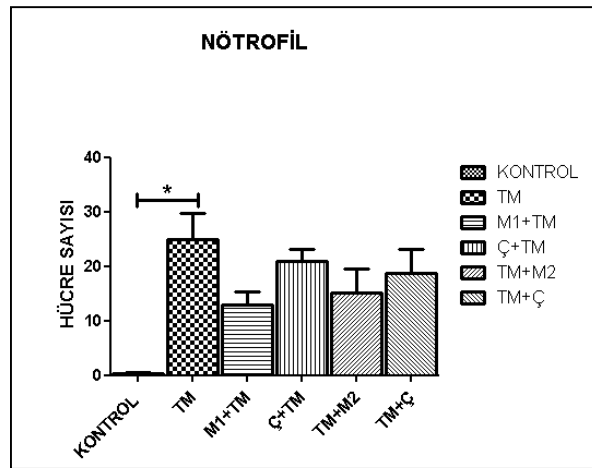
**Şekil 4.1.** Periferik kan yayma analizi sonucunda monosit hücre miktarının gruplara göre dağılımı gösterilmektedir. Melatonin ile tedavi edilen gruplarda monosit miktarının anlamlı olarak düştüğü dikkati çekmektedir. (\* $p<0,05$  değerinde anlamlılık ifade etmektedir).

Lenfosit açısından değerlendirildiğinde; kontrol grubuna kıyasla tümürlü hayvanlarda artan lenfosit sayısı dikkati çekmektedir. Buna karşın; TM grubundaki artışın M1+TM grubunda anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.2.) (\* $p<0,05$ ).



**Şekil 4.2.** Periferik kan yayma analizi sonucunda lenfosit hücre miktarının gruplara göre dağılımı gösterilmektedir. Yapılan analizlerde lenfosit miktarının sadece tümör enjekte edilen grupta (TM) yüksek olduğu melatonin ve çözücü uygulanan gruplarda da düşük olduğu görüldü (\* $p < 0,05$  değerinde anlamlılık ifade etmektedir.)

Yapılan analizlere göre; sadece tümör enjeksiyonu yapılan ve hiç tedavi almamış TM tümör gruplarında kontrol hayvanlarına kıyasla nötrofil sayısında artış gözlenmiştir. Buna göre, inflamatuvar yanıtın tümöre bağlı olarak arttığı görülmektedir. TM grubuna kıyasla melatonin uygulanan gruplarda nötrofil sayısının azaldığı fakat bu azalmanın anlamlı olmadığı gözlemlendi. Ayrıca hem melatonin hem de çözücü grupları birbirleriyle kıyaslandıklarında da anlamlı bir fark bulunamadı. Her grup kontrol ile kıyaslandığında ise; tümör enjeksiyonu yapılmış, melatonin ve çözücü uygulanmış hayvanlarda nötrofil sayısının anlamlı olarak arttığı gözlemlendi( Tablo 4.3.).



**Şekil 4.3.** Periferik kan yayma analizi sonucunda nötrofil miktarının gruplara göre dağılımı görülmektedir. Analiz sonucunda nötrofil sayısının, tümör enjekte edilmiş tüm gruplarda tümör enjekte edilmeyen kontrol hayvanlarına göre arttığı, melatonin uygulanan gruplarda da azalmanın olduğu ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı dikkati çekmekteydi. (\* $p < 0,05$  değerinde anlamlılık ifade etmektedir.)

**Tablo 4.1.** Gruplardan alınan kan örneklerinden hazırlanan periferik yayma preparatlarının incelenmesi ve analizleri tabloda kıyaslanmaktadır.

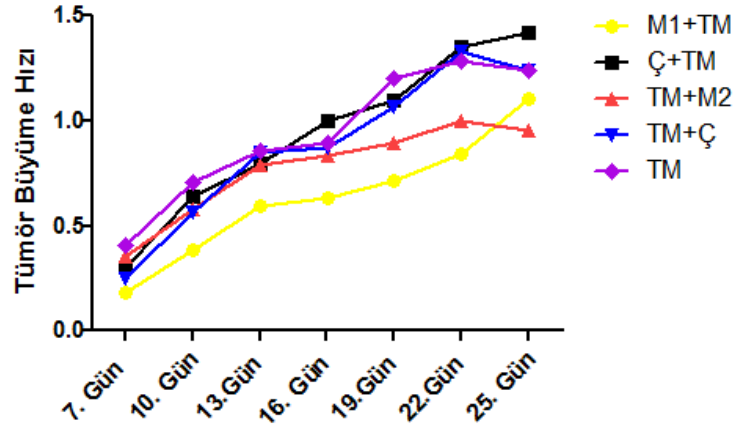
	<b>LENFOSİT (hücre)</b>	<b>MONOSİT (hücre)</b>	<b>NÖTROFİL (hücre)</b>
<b>KONTROL</b>	1,42	0,18	0,42
<b>TM</b>	6,56	1,78	25,01
<b>M1+ TM</b>	2,65	0,263	12,9
<b>Ç + TM</b>	4,657	1,243	20,843
<b>TM + M2</b>	3,214	0,1	15,071
<b>TM + Ç</b>	4,333	1,1	18,689

#### **4.1.1 İstatistiksel Analiz**

Periferik yayma analizinde, SigmaStat 3.5- Systat Software paket programı kullanıldı ve  $p < 0,005$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Normal dağılım olduğu durumda Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way ANOVA) yapıldı. Post-hoc test olarak Student- Newman testi kullanıldı.

#### **4.2 Primer Tümörlerin Proliferasyon Hızındaki Değişimlerin Değerlendirilmesi**

Primer tümör enjeksiyonundan 1 hafta sonra başlanan ve 3 günde bir yapılan tümör ölçümleri sonucunda her hayvanın tümör büyüme hızları değerlendirildi. Yapılan analizler sonucunda primer tümörlerin büyüme hızındaki değişim değerlendirilmiş ve önceden melatonin enjeksiyonu yapılarak deneye dahil edilen hayvanların tümör büyüme hızlarının (M1+TM) diğer gruplara göre daha yavaş olmasına rağmen en düşük büyüme hızının tümörden sonra melatonin uygulamasına ait olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 4.4.).

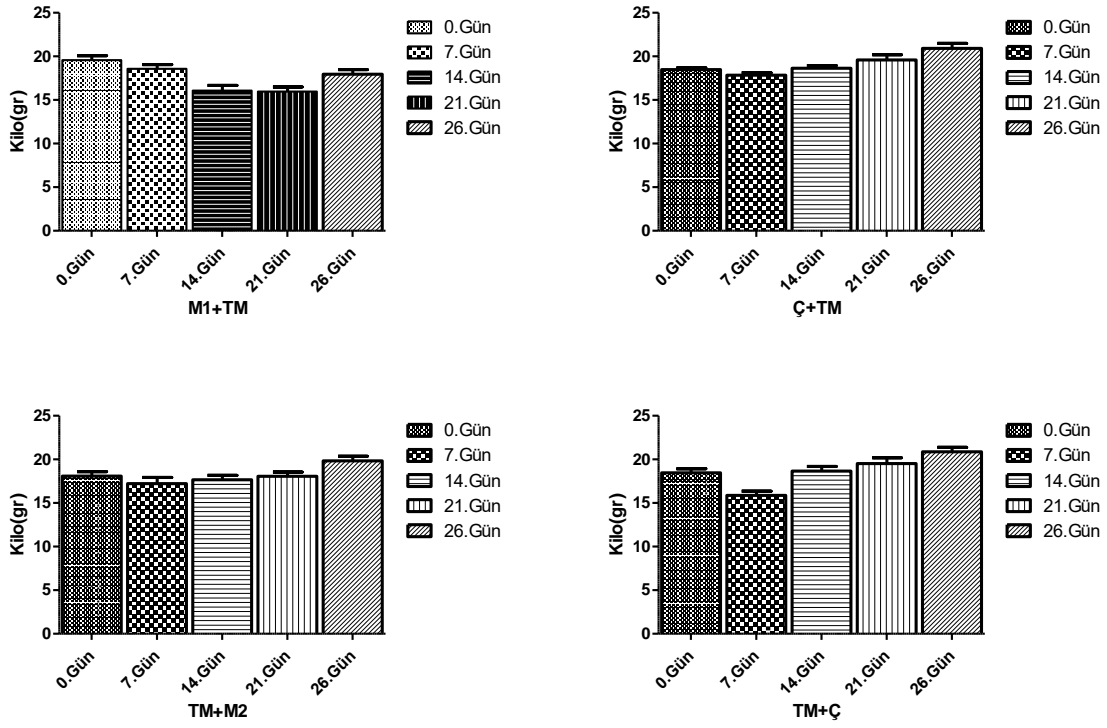


**Şekil 4.4.** Primer tümör büyüme hızlarının günlere göre değişim grafiği görülmektedir. Üçer gün arayla yapılan tümör büyüme ölçümlerinde; tümör büyümesinin melatonin verilen gruplarda sadece tümör enjeksiyonu almış gruba göre daha yavaş seyrettiği görüldü.

### 4.3 Hayvan Ağırlıklarının Ölçümü

Meme kanseri modeli oluşturulan fareler zaman içerisinde tümörün metastaz potansiyeline de bağlı olarak, normal ağırlıklarını kaybetmeye başlarken, tümörlerinin büyümesine bağlı olarak da belli bir kitle kazanırlar. Bu nedenle tümör kitleleri uzaklaştırıldıktan sonra hayvan ağırlıklarını değerlendirdik. Melatoninin tümörden önce de kullanılmaya başlanması, olası etkilerini değerlendirmemizi sağlarken, hayvan ağırlıklarını da etkileyip etkilemediğinin incelenmesi, farelerin yeme potansiyeli ile de yakından ilişkili olduğundan gruplar arasındaki hayvan ağırlıkları farkı değerlendirildi (Şekil 4.5.).

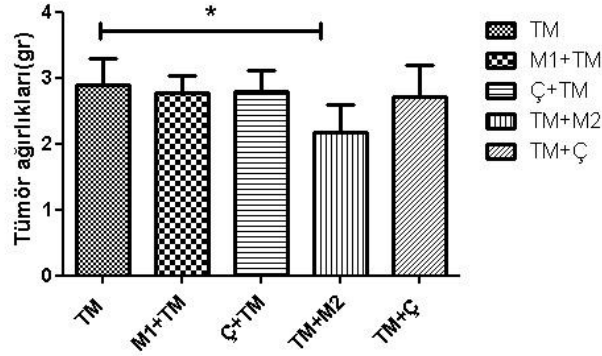
Buna göre tümör enjeksiyonu yapılan gün ölçülen hayvan ağırlıkları, kurban edildikten ve tümör uzaklaştırıldıktan sonra yapılan ağırlıklarla kıyaslanarak sonuçlar değerlendirildi.



**Şekil 4.5.** Hayvan ağırlıklarının gruplara göre değerlendirilmesi grafikte gösterilmektedir. Buna göre; tümör büyümesine bağlı olarak gruplar arası hayvan ağırlıkları arasında yapılan analizler sonucunda hayvanların ağırlıklarında anlamlı bir değişimin olmadığı uygulanan melatoninin de hayvan ağırlıkları üzerinde ciddi bir etki yaratmadığı görülmektedir.

#### 4.4 Primer Tümör Ağırlık Ölçümü

Hayvanların sakrifikasyon sırasında alınan primer tümör dokuları hassas terazi ile tartıldı ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. Buna göre; tümör sonrası melatonin (TM+M2) verilen grupta, sadece tümör enjeksiyonu yapılan (TM) ve tümör ve çözücü (TM+Ç) uygulanan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlılık görülmektedir (Şekil 4.6.). Tümör ağırlıklarında M1+TM grubunda ise çözücü gruplarına göre herhangi bir anlamlılık görülmemektedir.



**Şekil 4.6.** Tümör ağırlıklarının gruplar arası değerlendirildiği grafik gösterilmektedir. Yapılan ölçümlerde tümör ağırlıklarının melatonin verilen grupta (TM+M2) sadece tümör enjeksiyonu almış gruba göre anlamlı olarak azaldığı görüldü. (\* $p < 0,05$  değerinde anlamlılık ifade etmektedir).

#### 4.4.1 İstatistiksel Analiz

Tümör ağırlıklarının ve hayvan ağırlıklarının analizinde, SigmaStat 3.5- Systat Software paket programı kullanıldı ve  $p < 0,005$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Normal dağılım olduğu durumda Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way ANOVA) yapıldı. Post-hoc test olarak Tukey testi kullanıldı.

#### 4.5 Mikro ve Makro Metastaz Analizleri

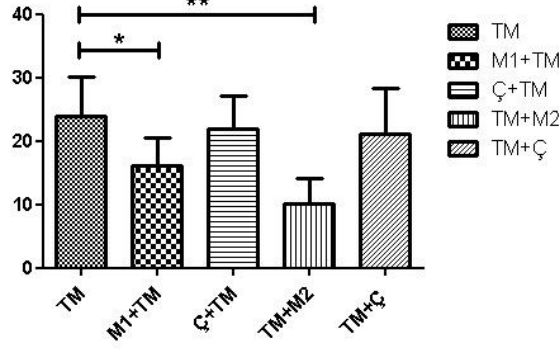
Tümör hücreleri ilk olarak oluştukları ortamdan, mikroçevrenin ve anjiyogenik faktörlerin etkisiyle bir süre sonra farklı organlara veya alanlara taşınırlar. Metastaz olarak bilinen bu durumda; tümör hücreleri sonradan ulaştıkları ikincil alanlarda veya dokularda primer karakterlerinden farklı bir karaktere sahip olurlar. Ortamın da indüktif etkisiyle giderek kitle boyutunu arttırır ve yeni metastatik odaklar arayabilirler. Çalışmamızda da metastaz analizlerinin yapılması; tümör hücrelerinin oluşturdukları ikincil göç alanlarının oranını göstermek amacıyla planlandı.

##### 4.5.1 Akciğer Makro Metastaz Analizi

Yapılan analizler sonucunda akciğerlerin tamamı değerlendirilerek göz ile görülebilen metastatik nodüller sayıldı ve gruplar arasında değerlendirme yapıldı. Makro metastatik alanlar gruplar arasında değerlendirildiğinde melatonin uygulanan gruplarda (M1+TM ve TM+M2) sadece

tümörün verildiği TM grubuna göre anlamlı bir azalma gözlemlendi. (Şekil 4.7.) (\*/\*\* için;  $p<0.005$ ).

#### AKCİĞER MAKRO METASTAZ ANALİZİ



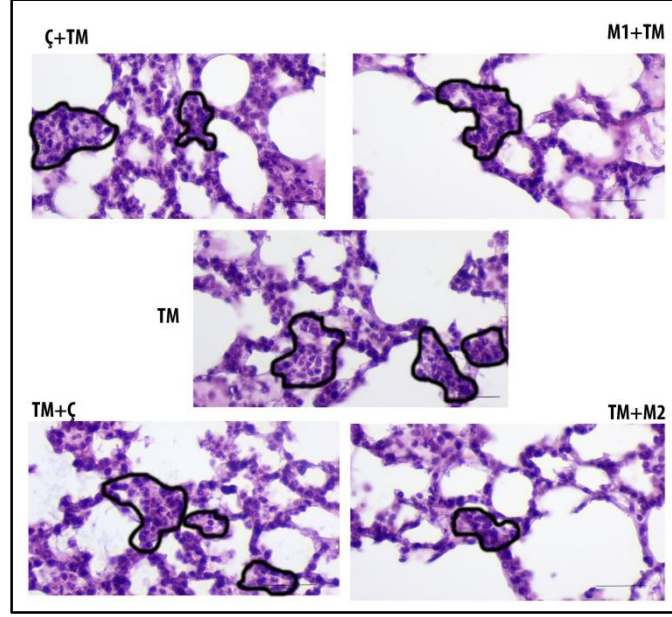
**Şekil 4.7.** Akciğer dokularında makrometastaz analizlerinin grafiği görülmektedir. Analiz sonucunda; melatonin verilen tedavi gruplarında (M1+TM, TM+M2) metastatik nodüllerin sadece tümör enjekte edilen gruba (TM) göre anlamlı olarak azaldığı görüldü (\*/\*\* için;  $p<0.005$ ).

#### 4.5.1.1 İstatistiksel Analiz

Tümör ağırlıklarının ve hayvan ağırlıklarının analizinde, SigmaStat 3.5-Systat Software paket programı kullanıldı ve  $p<0,005$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Normal dağılım olduğu durumda Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way ANOVA) yapıldı. Post-hoc test olarak Student-Newman testi kullanılmıştır.

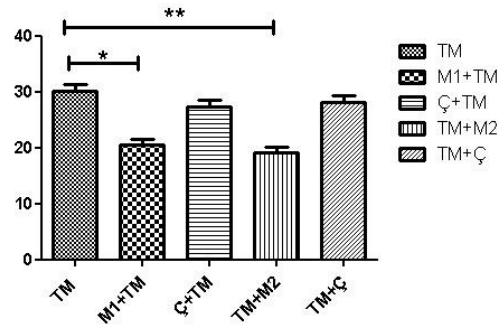
#### 4.5.2 Akciğer Mikro Metastaz Analizi

Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra akciğer dokuları çıkartıldı ve mikrometastaz analizleri yapıldı. Her hayvanın akciğer dokuları Bouin takibine alınıp sonrasında seri kesit alma işlemi gerçekleştirildi. Kesitler poly-L-lizinli lamlara alınıp, aralarından rastgele seçilen 20 slayt hematoksilen-eozinle boyandı. Her slayttan 10 farklı alan fotoğraflanarak bu alanlarda metastatik alanların işaretlenmesiyle sonuçlar metastatik kitlenin büyüklüğünün total alana oranlanmasıyla değerlendirildi (Şekil 4.8.). Yapılan analiz sonucunda; akciğerdeki metastatik alanların melatonin verilen gruplarda, sadece tümör enjekte edilen gruba göre anlamlı olarak azaldığı görüldü (Şekil 4.9).



**Şekil 4.8.** Akciğerdeki metastatik alanların gruplar arasındaki farkları resimlerde görülmektedir. Yapılan analizlerde; metastatik alanların, melatonin uygulanan gruplarda sadece tümör enjekte edilmiş gruplara göre azaldığı görüldü.

**AKCİĞER MİKRO METASTAZ ANALİZİ**



**Şekil 4.9.** Akciğer dokularında mikrometastaz analizlerinin grafiği gösterilmektedir. Analiz sonucuna göre; melatonin verilen tedavi gruplarında (M1+TM, TM+M2) metastatik alanların sadece tümör enjekte edilen gruba (TM) göre anlamlı olarak azaldığı görüldü (\*/\*\* için;  $p < 0.005$ ).

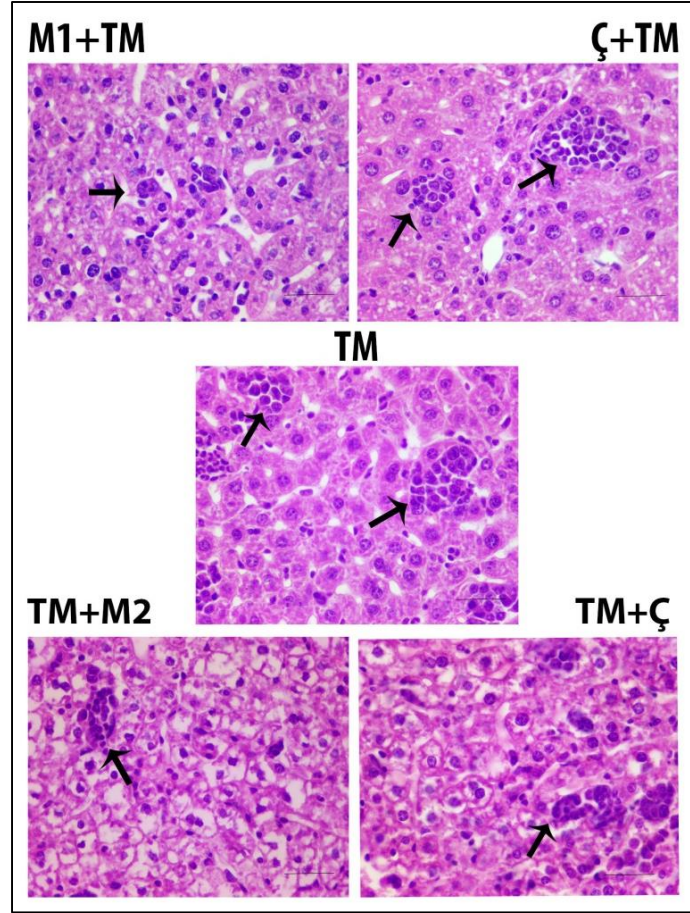
#### 4.5.2.1 İstatistiksel Analiz

Tümör ağırlıklarının ve hayvan ağırlıklarının analizinde, SigmaStat 3.5- Systat Software paket programı kullanıldı ve  $p < 0,005$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Normal dağılım olduğu durumda Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way ANOVA) yapıldı. Post-hoc test olarak Student-Newman testi kullanılmıştır.



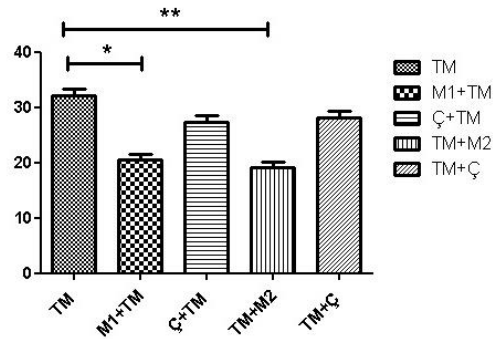
### 4.5.3 Karaciğer Mikrometastaz Analizi

Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra karaciğer dokuları çıkartıldı ve mikrometastaz analizleri yapıldı. Bunun için; her hayvanın karaciğer dokuları parafin takibe alınıp sonrasında seri kesitler poly-L-lizinli lamlara aktarıldıktan sonra, aralarından rastgele seçilecek 20 slaytın hematoxilen eozinle boyanması sağlandı. Her slayttan 10 farklı alan fotoğraflanarak bu alanlarda metastatik alanların işaretlenmesiyle sonuçlar metastatik kitlenin büyüklüğünün total alana oranlanmasıyla değerlendirildi (Şekil 4.10.). Ölçümler  $\mu\text{m}^2$  olarak hesaplandı. Sadece tümör verilen grup olan TM ve çözücü gruplarının (Ç+TM ve TM+Ç) karaciğer dokularında görülen metastatik alanların toplam alana oranı, melatonin verilen gruplara (M1+TM ve TM+M2) göre oldukça fazlaydı. M1+TM ve TM+M2 gruplarının metastatik alanlarındaki azalış da istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.11.) (\*\*/\* $p<0,05$ ).



**Şekil 4.10.** Karaciğerdeki metastatik alanların gruplar arası değişimi gösterilmektedir. Metastatik alanların boyutlarının değerlendirildiğinde, melatonin uygulanan her iki grupta da bu alanların sadece tümör enjekte edilen gruplara göre anlamlı olarak azaldığı görüldü.

#### KARACİĞER MİKRO METASTAZ ANALİZİ



**Şekil 4.11.** Karaciğer dokularında mikrometastaz analizlerinin grafiği gösterilmektedir. Analiz sonucuna göre; melatonin verilen tedavi gruplarında (M1+TM, TM+M2) metastatik alanların sadece tümör enjekte edilen gruba (TM) göre anlamlı olarak azaldığı görüldü (\*/\*\* için;  $p < 0.005$ ).

#### **4.5.3.1 İstatistiksel Analiz**

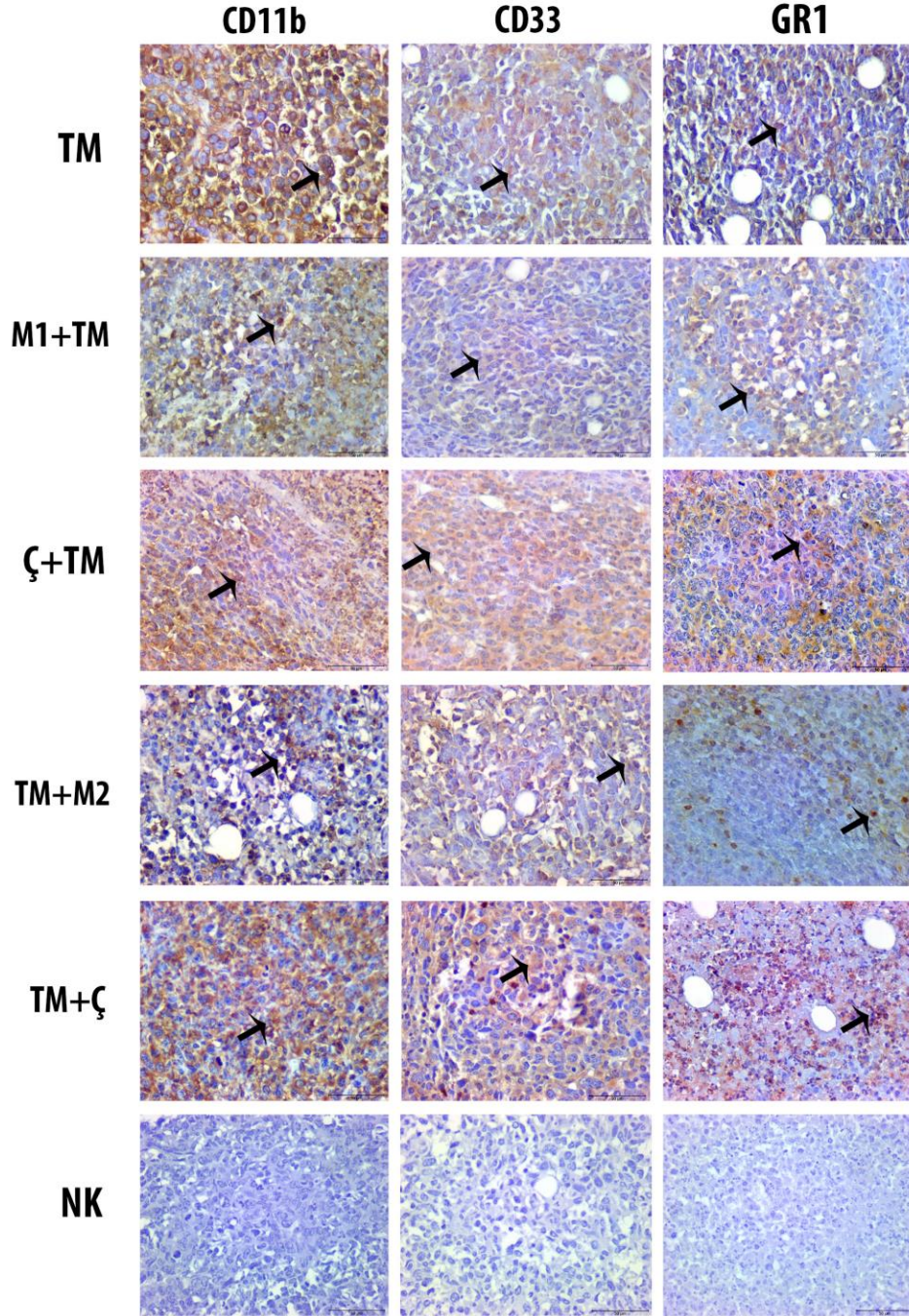
Tümör ağırlıklarının ve hayvan ağırlıklarının analizinde, SigmaStat 3.5-Systat Software paket programı kullanıldı ve  $p < 0,005$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Normal dağılım olduğu durumda Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way ANOVA) yapıldı. Post-hoc test olarak Student-Newman testi kullanıldı.

#### **4.6 Primer Tümör Dokularının İmmünohistokimyasal Analizlerle Değerlendirilmesi**

Primer tümörlerde yapılan immünohistokimyasal analizler için önemli MKSH belirteçlerinden olan CD11b, GR1 ve CD33 antikörlerinin ekspresyonları değerlendirildi. CD11b<sup>+</sup> ve Gr1 tümör mikroçevresinde yer alan, kemik iliği kökenli hücreler dominant tümör faktörlerinin kaynağı olarak bilinen MKSH belirteci olarak kabul edilmektedir. CD33 de; CD33 myeloid seriye ait sitoplazmik myeloperoksidazlardır.

Tümörün gelişimini destekleyen MKSH'lerin ifadesi göz önüne alındığında, CD11b<sup>+</sup>, GR1 ve CD33 belirteçleri bunun için önemli belirteçlerdir. Melatonin uygulanan gruplarda bu proteinlerin ekspresyonlarının çözücü ve sadece tümör uygulanan gruba göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi.

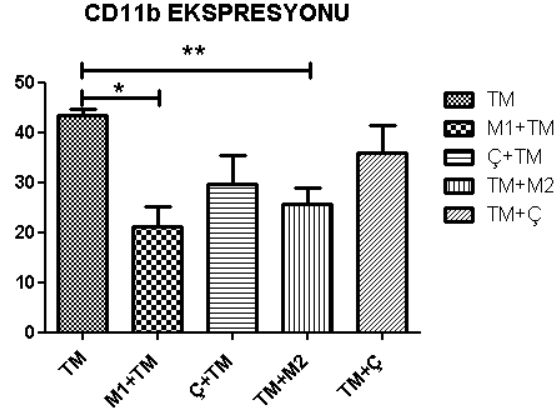
Yapılan deneylerde CD33, CD11b<sup>+</sup> ve GR1 ekspresyonunun gruplar arasında sadece tümör enjekte edilmiş TM grubuna göre, tümör enjekte edilmeden önce melatonin başlanan gruplarda (M1+TM) ve tümör enjekte edildikten sonra melatonin verilmeye başlanan gruplarda (TM+M2) da anlamlı derecede bir düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.12.) (\*\*/\*\*\*  $p < 0,05$ ).



**Şekil 4.12.** CD11b, GR1 ve CD33 antikorlarının primer tümör dokusunda immünohistokimyasal ekspresyonları gösterilmektedir. Yapılan analizlerde MKSH belirteçlerinin melatonin uygulanan gruplarda (M1+TM, TM+M2) gözle görülür bir şekilde düştüğü görüldü. Sadece tümör enjekte edilen grupta ise bu ekspresyonlar oldukça yoğundu. (NK: Negatif Kontrol, oklar: tümör hücresindeki CD11b, CD33 ve GR1'i göstermektedir. Ekspresyonlar CD11b, CD33 için; sitoplazmik iken, GR1 için nükleerdir). Skala bar: 50µm

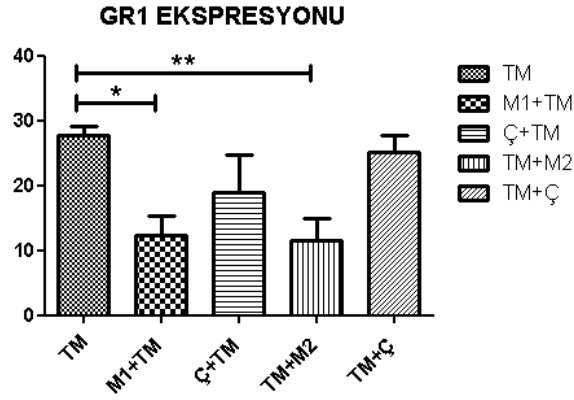
Yapılan image J analizleri sonucunda, MKSH belirteçleri olan CD11b, CD33 ve GR1 için gruplar arası farklılıklar değerlendirildiğinde; melatonin uygulanan M1+TM ve TM+M2 gruplarında

yalnız tümör enjekte edilmiş TM grubuna göre CD11b ekspresyonlarında gözle görülür bir azalma gözlemlendi. Bu değişim image j analizi ile istatistiksel olarak doğrulandı (Şekil 4.13.).



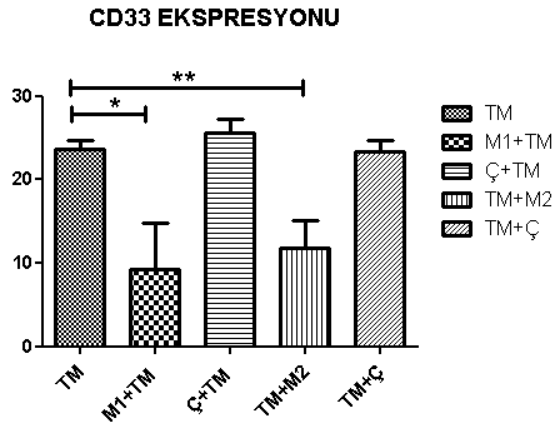
**Şekil 4.13.** MKSH belirteci olan CD11b'nin ekspresyon grafiği gösterilmektedir. Analiz sonucunda, CD11b ekspresyonu melatonin tedavi gruplarında sadece tümör enjekte edilmiş gruba göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi (\*\* için;  $p < 0,005$ ).

MKSH belirteci olan GR1'in tümör varlığında oranlarının arttığı bilinmektedir. Yaptığımız deneyde sadece tümör verilen gruba göre melatonin verilen gruplarda anlamlı bir azalma gözlemlendi (Şekil 4.14) (\*\* için;  $p < 0,05$ ).



**Şekil 4.14.** Gruplar arası GR1 ekspresyonunun grafiği gösterilmektedir. Yapılan analizlerde; GR1 ekspresyonunun melatonin uygulanmış gruplarda sadece tümör enjekte edilmiş gruba göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi (\*/\*\* için;  $p < 0,005$ )

Yaptığımız deneylerde sadece tümör enjekte ettiğimiz grup olan TM’de CD33 ekspresyonu fazlayken, melatonin uyguladığımız gruplarda (M1+TM ve TM+M2) bu ekspresyonun azaldığı görüldü (Şekil 4.15.) (\*/\*\*  $p < 0,05$ ).



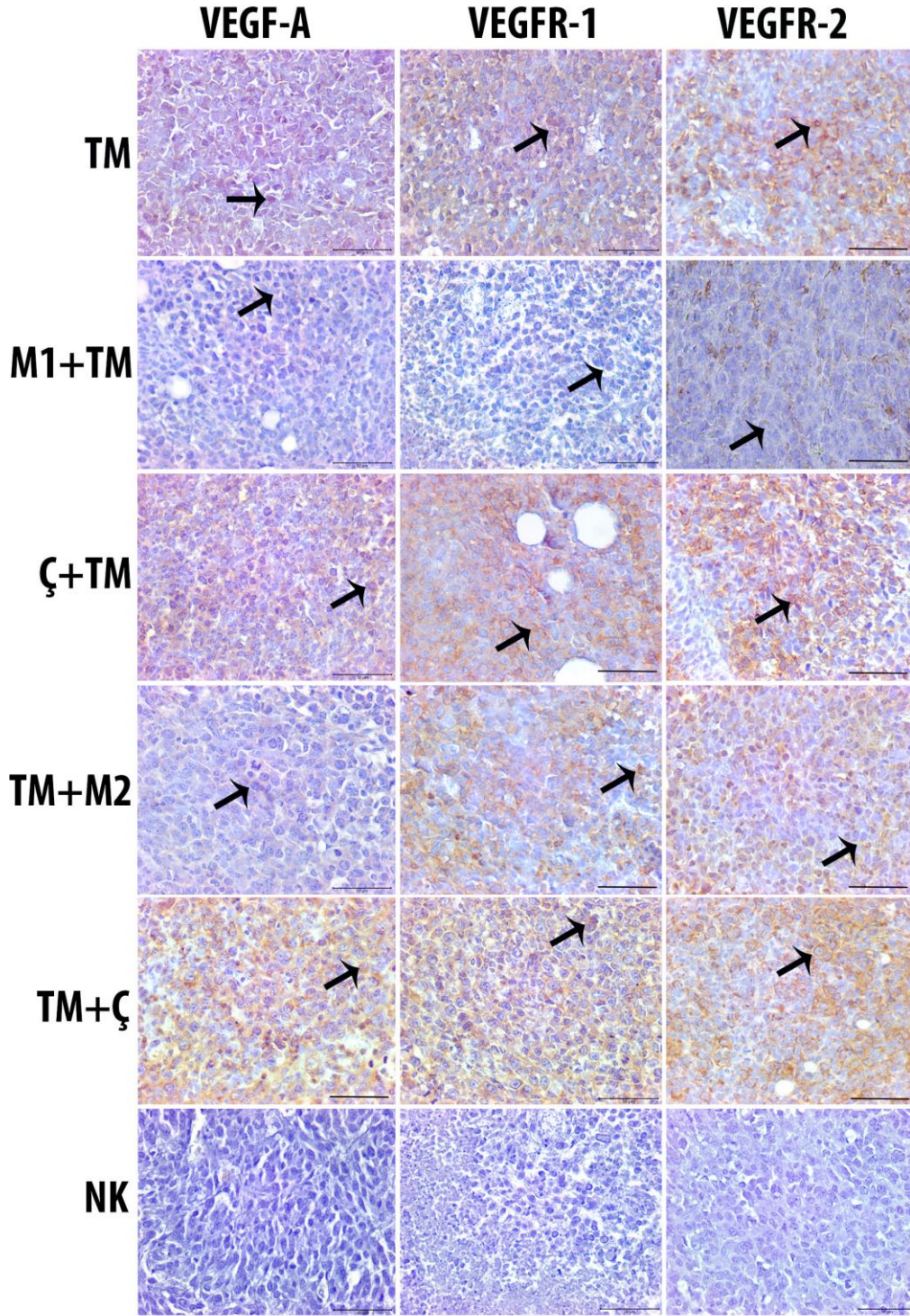
**Şekil 4.15.** MKSH belirteci olan CD33’ün ekspresyon grafiği gösterilmektedir. Yapılan analizlerde; CD33 ekspresyonunun; melatonin verilen gruplarda sadece tümör enjekte edilmiş gruba göre anlamlı olarak azaldığı görüldü (\*/\*\* için;  $p < 0,005$ ).

#### 4.6.1 İstatistiksel Analiz

MKSH belirteçlerinin immünohistokimyasal analizinde, SigmaStat 3.5-Systat Software paket programı kullanıldı ve  $p < 0,005$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Normal dağılım olduğu

durumda Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way ANOVA) yapıldı. Post-hoc test olarak Student-Newman testi kullanıldı.

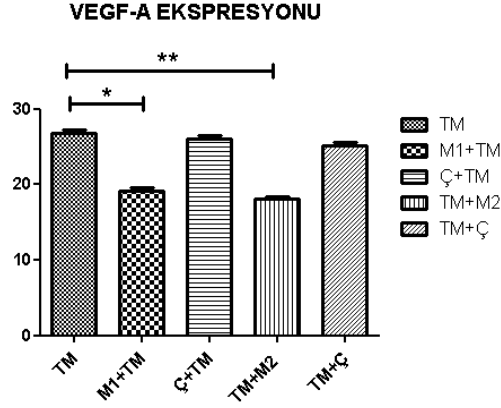
Primer tümörlerde anjiyogenez belirteçlerinden olan VEGF-A, VEGFR-1 ve VEGFR-2 ile yapılan immünohistokimyasal analizlerde, melatonin uygulanan gruplarda VEGF-A, VEGFR-1 ve VEGFR-2 proteinlerinin miktarlarında melatonin uygulanmamış gruba göre anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.16.) (\*\*/\*\*\*  $p < 0,005$ ).



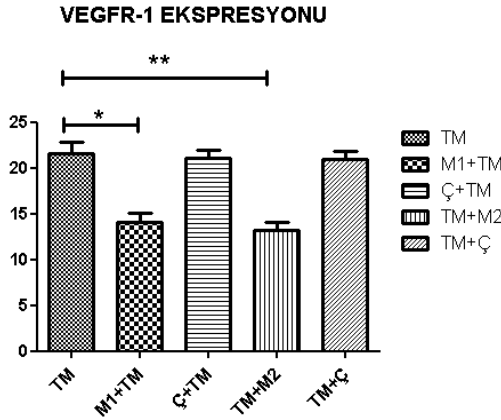
**Şekil 4.16.** Primer tümör dokusunda anjiyogenez belirteçlerinin ekspresyonu gösterilmektedir. Yapılan deneyler sonucunda anjiyogenik moleküllerin ekspresyonu melatonin verilen M1+TM ve TM+M2 gruplarında, sadece tümör enjekte edilmiş olan TM grubuna göre gözle görülür bir şekilde azaldı. Oklar; tümör hücrelerindeki ekspresyonları göstermektedir. (NK: Negatif Kontrol, Skala bar: 50µm).



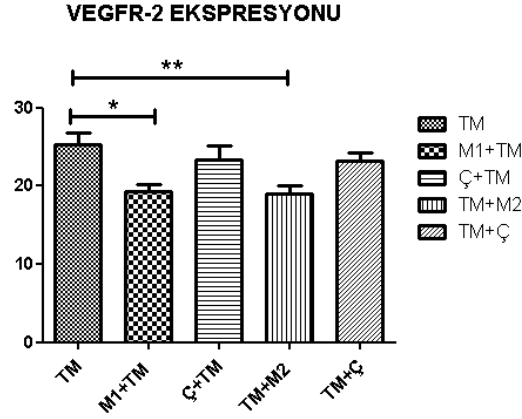
Yapılan immunohistokimyasal analizlerde, VEGF-A (Şekil 4.17.), VEGFR1 (Şekil 4.18.) ve VEGFR2 (Şekil 4.19.) ekspresyonları gruplar arasında değerlendirildiğinde, bu moleküllerin melatonin verilen M1+TM ve TM+M2 gruplarında ekspresyonun sadece tümör verilmiş TM grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görüldü. Bu ekspresyon farkları da image J analizi ile doğrulandı.



**Şekil 4.17.** VEGF-A antikorunun gruplar arası ekspresyon analizini gösteren grafik gösterilmektedir. Yapılan analizlerde VEGF-A ekspresyonu melatonin verilen gruplarda anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü (\*/\*\* için;  $p < 0,005$ ).



**Şekil 4.18.** VEGFR-1 antikorunun gruplar arası ekspresyon analizini gösteren grafik görülmektedir. Yapılan analizlerde VEGFR-1 ekspresyonu melatonin verilen gruplarda anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü (\*/\*\* için;  $p < 0,005$ ).



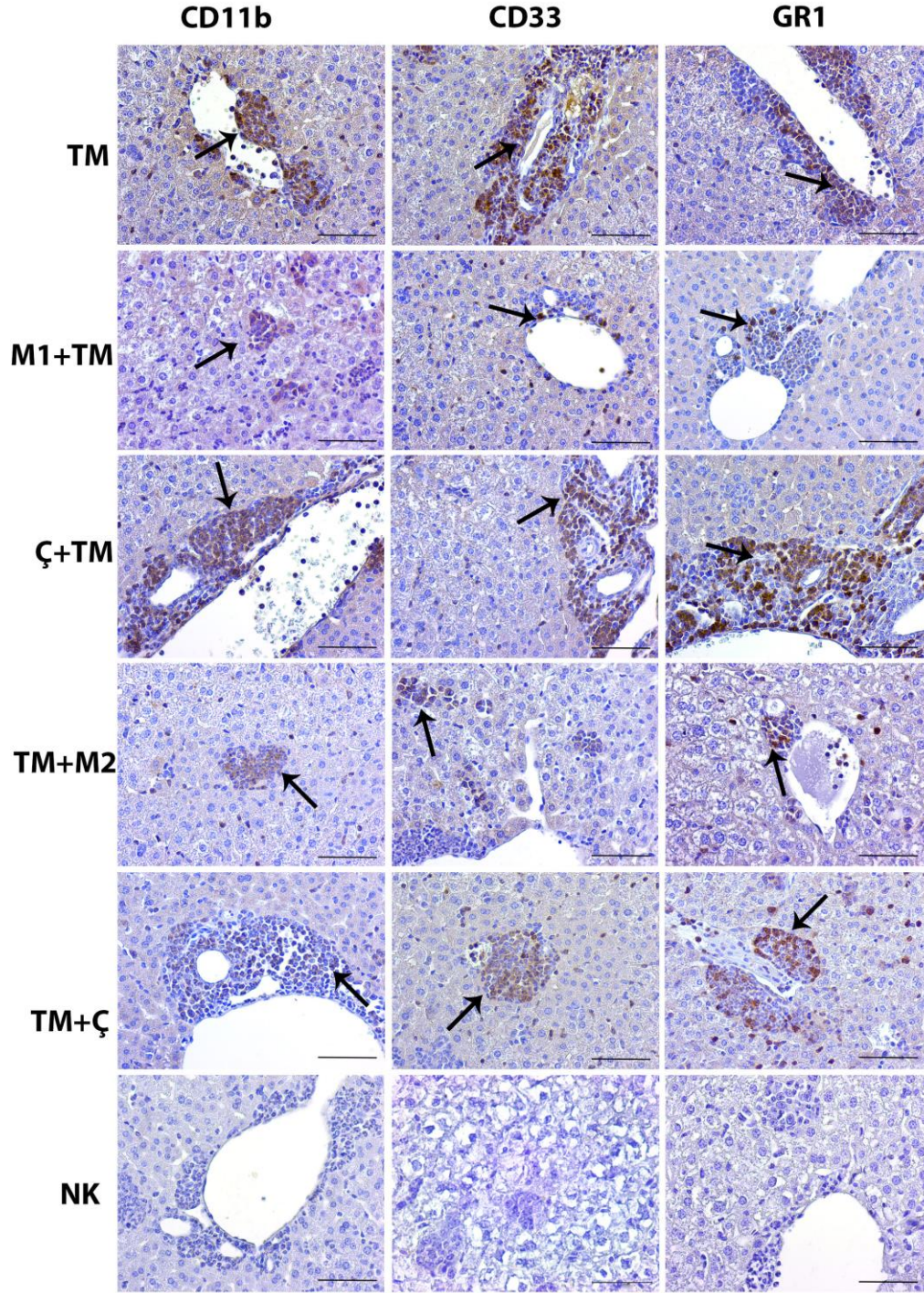
**Şekil 4.19.** VEGFR-2 antikorunun gruplar arası ekspresyon analizini gösteren grafik görülmektedir. Yapılan image J analizlerinde; VEGFR-2 ekspresyonu melatonin uygulanan gruplarda anlamlı bir şekilde azaldığı dikkati çekmekteydi (\*/\*\* için;  $p < 0,005$ ).

#### 4.6.2 İstatistiksel Analiz

Anjiyogenez belirteçlerinin immünohistokimyasal analizinde, SigmaStat 3.5-Systat Software paket programı kullanıldı ve  $p < 0,005$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Normal dağılım olduğu durumda Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way ANOVA) yapıldı. Post-hoc test olarak Student- Newman testi kullanılmıştır.

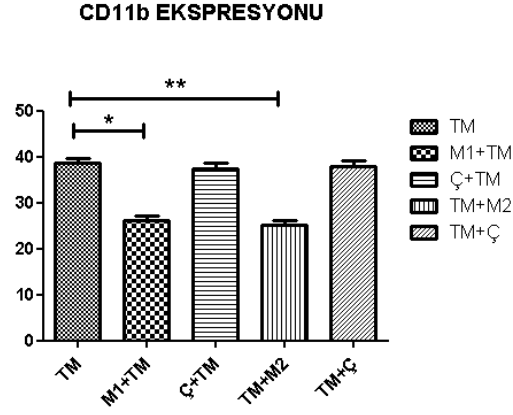
#### 4.7 Karaciğer Dokularının İmmünohistokimyasal Analizlerle Değerlendirilmesi

Karaciğer dokularında yapılan immünohistokimya analizleri sonucunda MKSH belirteçlerinin gruplar arası değerlendirmesi yapıldı. Sonuçlara göre, melatonin uygulanan gruplarda CD11b, CD33 ve GR1 proteinlerinin ekspresyonlarının sadece tümör enjeksiyonu yapılmış gruba göre anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.20.).



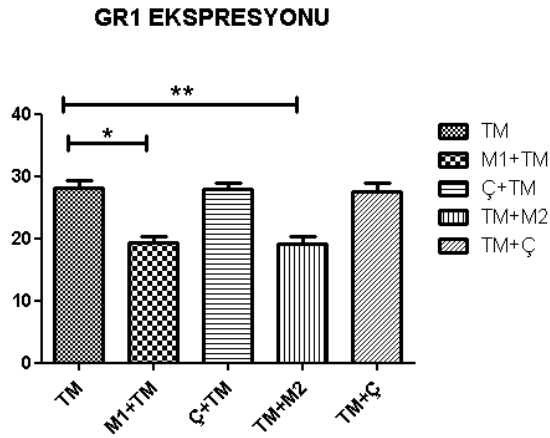
**Şekil 4.20.** Karaciğer dokusunda CD11b, CD33 ve GR1 ekspresyonları görülmektedir. Yapılan analizlerde; melatonin uygulanan gruplarda (M1+TM, TM+M2), sadece tümör enjekte edilmiş gruba göre MKSH belirteçlerinin ekspresyonlarının daha az olduğu görüldü. Oklar metastatik alanlarda bulunan tümör hücrelerindeki ekspresyonları göstermektedir. (NK: Negatif Kontrol). (Skala bar: 50µm).

Yapılan analizler sonucunda; melatonin uygulanan gruplarda (M1+TM, TM+M2), sadece tümör enjekte edilmiş gruba göre CD11b belirtecinin ekspresyonunun daha az olduğu görüldü (Şekil 4.21.).



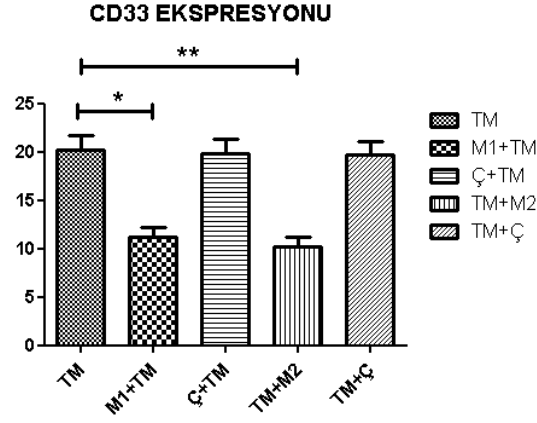
**Şekil 4.21.** Karaciğerde CD11b ekspresyonunun gruplar arası farklılıkları gösterilmektedir. Analizlerde CD11b ekspresyonunun melatonin uygulanan gruplarda anlamlı olarak az olduğu gözlemlendi (\*/\*\*  $p < 0,05$ ).

Melatonin uygulanan gruplarda (M1+TM, TM+M2), sadece tümör enjekte edilmiş gruba göre GR1 belirtecinin ekspresyonunun da daha az olduğu görüldü (Şekil 4.22.).



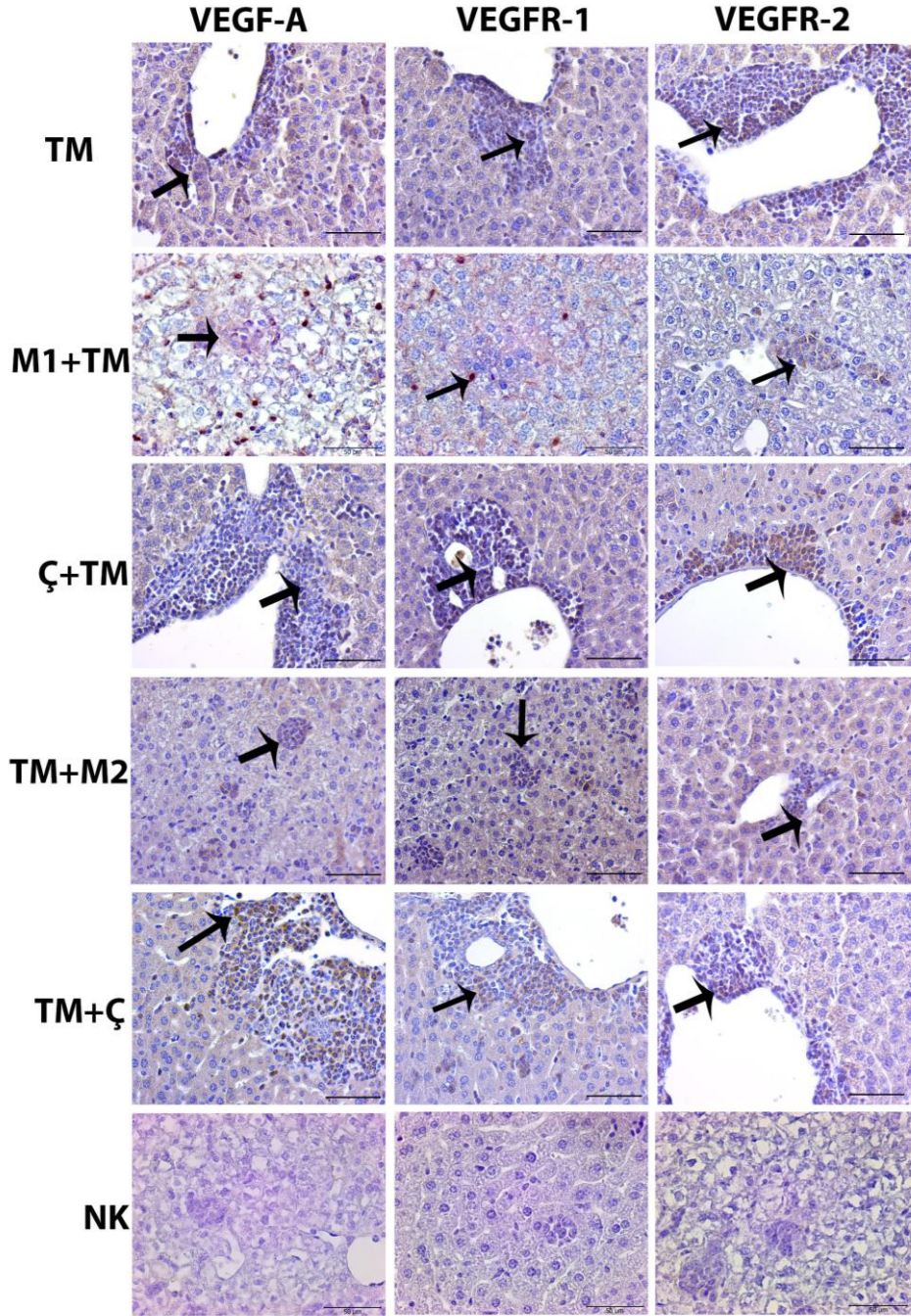
**Şekil 4.22.** Karaciğerde GR1 ekspresyonunun gruplar arası farklılıkları gösterilmektedir. Analizlerde GR1 ekspresyonunun melatonin uygulanan gruplarda anlamlı olarak az olduğu gözlemlendi (\*/\*\*  $p < 0,05$ ).

CD33 ekspresyonunun da melatonin uygulanan gruplarda (M1+TM, TM+M2), sadece tümör enjekte edilmiş gruba göre daha düşük olduğu görüldü (Şekil 4.23.).



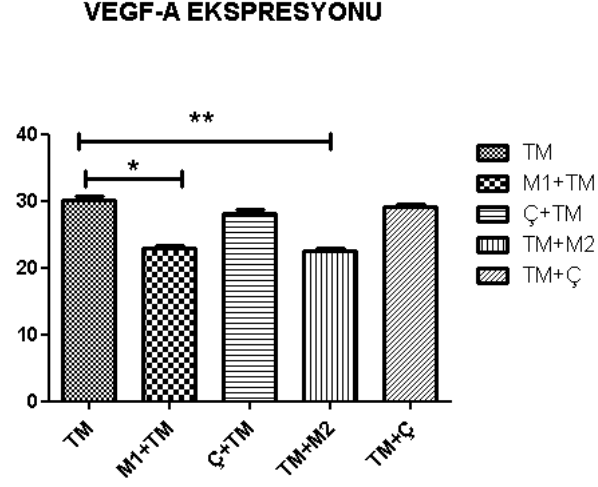
**Şekil 4.23.** Karaciğerde CD33 ekspresyonunun gruplar arası farklılıkları gösterilmektedir. Analizlerde CD33 ekspresyonunun melatonin uygulanan gruplarda anlamlı olarak az olduğu gözlemlendi (\*/\*\*  $p < 0,05$ ).

Anjiyogenez belirteçlerinden olan VEGF-A, VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin karaciğer dokusundaki ekspresyonları da immunohistokimyasal olarak değerlendirildi. Melatoninle uygulanan M1+TM ve TM+M2 gruplarında anjiyogenezde kilit rol oynayan moleküller VEGF-A, VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin ekspresyonları sadece tümör enjeksiyonu yapılmış TM grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu (Şekil 4.24.).



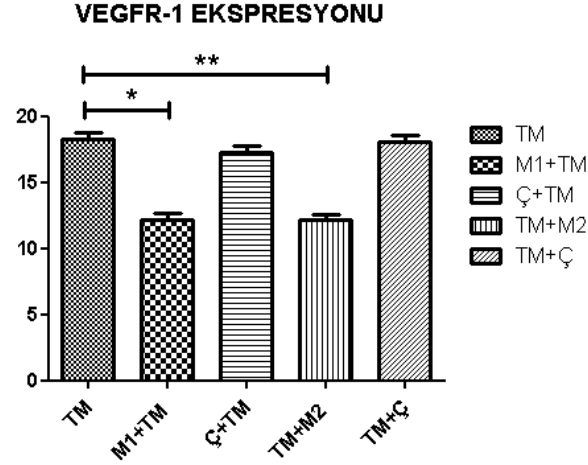
**Şekil 4.24.** Anjiyogenik belirteçlerin karaciğer dokusunda immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi görülmektedir. VEGF-A, VEGFR-1 ve VEGFR-2 moleküllerinin melatonin uygulanan gruplarda düşük, sadece tümör uygulanan grupta ise yüksek olduğu görüldü. Oklar, metastatik alanlarda tümör hücrelerinde bulunan ekspresyonları göstermektedir. (Skala bar: 50µm, NK: Negatif kontrol)

Yapılan analizler sonucunda; anjiyogenik belirteçler olan VEGF-A, VEGFR-2 ve VEGFR-1 değerlendirildiğinde VEGF-A ekspresyonunun melatonin uygulanan M1+TM ve TM+M2 gruplarında sadece tümör verilen TM grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.25.).



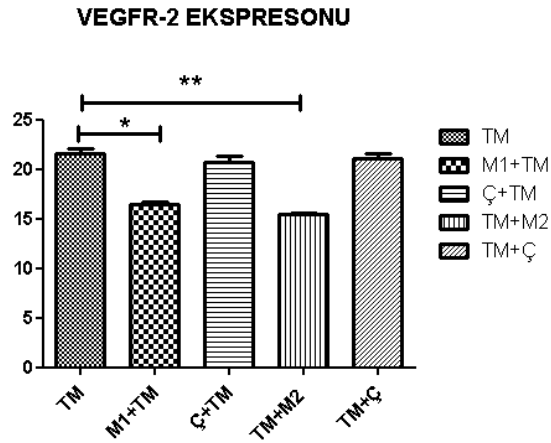
**Şekil 4.25.** VEGF-A molekülünün ekspresyonu immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiş ve image J analizi ile gruplar arasındaki değişim istatistiksel olarak yorumlanmıştır. Grafik gruplar arası VEGF-A ekspresyonunun değişimini göstermektedir. Analizlerde VEGF-A ekspresyonunun melatonin uygulanan gruplarda anlamlı olarak azaldığı görülmektedir (\*/\*\*  $p < 0,05$ ).

VEGFR-1 ekspresyonunun da melatonin uygulanan M1+TM ve TM+M2 gruplarında sadece tümör verilen TM grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.26.).



**Şekil 4.26.** VEGFR-1 molekülünün ekspresyonu immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiş ve image J analizi ile gruplar arasındaki değişim istatistiksel olarak yorumlanmıştır. Grafik, gruplar arası VEGFR-1 ekspresyonunun değişimini göstermektedir. Analizlerde VEGFR-1 ekspresyonunun melatonin uygulanan gruplarda anlamlı olarak azaldığı görülmektedir (\*/\*\*  $p < 0,05$ ).

Yine aynı şekilde VEGFR-2 ekspresyonunun da melatonin uygulanan M1+TM ve TM+M2 gruplarında sadece tümör verilen TM grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.27.).



**Şekil 4.27.** VEGFR-2 molekülünün immünohistokimyasal analizini göstermektedir. Analizlerde VEGFR-2 ekspresyonunun melatonin uygulanan gruplarda anlamlı olarak azaldığı görüldü (\*/\*\*  $p < 0,05$ ).

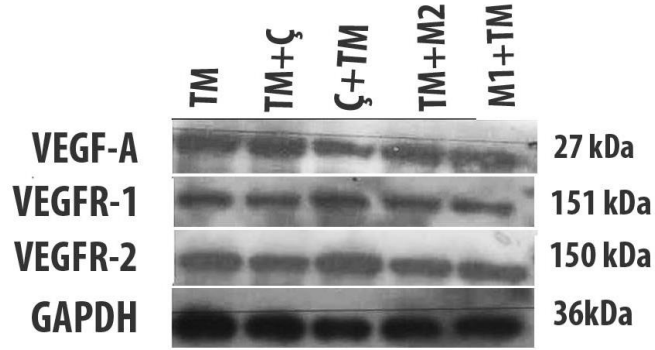


#### 4.7.1 İstatistiksel Analiz

Anjiyogenez belirteçlerinin immünohistokimyasal analizinde, SigmaStat 3.5-Systat Software paket programı kullanıldı ve  $p < 0,005$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Normal dağılım olduğu durumda Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way ANOVA) yapıldı. Post-hoc test olarak Student- Newman testi kullanılmıştır.

#### 4.8 Primer Tümör Dokularının Western Blot Analiziyle Değerlendirilmesi

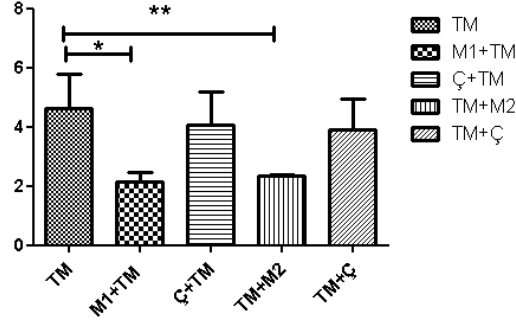
Yapılan Western blot deneyleri sonucunda anjiyogenik moleküller olan VEGF-A, VEGFR-1 ve VEGFR-2 ekspresyonları değerlendirildiğinde bu proteinlerin ekspresyonlarının melatonin uygulanan gruplarda anlamlı olarak azaldığı, çözücü ve tümör gruplarında ise daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.28.). Bu bulgular immunohistokimyasal ekspresyonlarımız ile uyumluydu.



**Şekil 4.28.** Anjiyogenik moleküllerin primer tümör dokusunda western blot yöntemiyle elde edilen bantları görülmektedir. Western blot analizi sonucunda; anjiyogenik moleküllerin antikorlarından elde edilen bantlarda, melatonin uygulanan gruplarında anlamlı bir azalmanın olduğu dikkati çekmekteydi.

VEGF-A, VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin varlıkları western blot yöntemiyle gruplar arasında incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Analiz sonucuna göre, VEGF-A ekspresyonu, melatonin uygulanan M1+TM ve TM+M2 gruplarında sadece tümör verilen TM grubuna göre anlamlı bir düşüş görüldü (Şekil 4.29.).

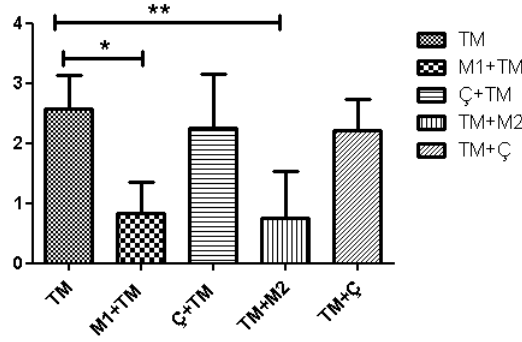
#### VEGF-A WESTERN BLOT ANALİZİ



**Şekil 4.29.** Anjiyogenik moleküllerden VEGF-A'nın primer tümör dokusunda western blot yöntemiyle elde edilen bantlarının GAPDH molekülünün miktarına oranlanmasıyla elde edilen analiz grafikte gösterilmektedir. Analizlerde, melatonin uygulanan gruplarda anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi (\*/\*\* için;  $p < 0,005$ ).

VEGFR-1 ekspresyonunda ise, melatonin uygulanan M1+TM ve TM+M2 gruplarında sadece tümör verilen TM grubuna göre anlamlı bir düşüş izlendi (Şekil 4.30.).

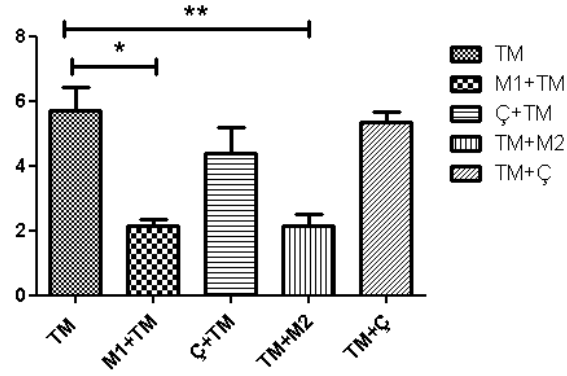
#### VEGFR-1 WESTERN BLOT ANALİZİ



**Şekil 4.30.** Anjiyogenik moleküllerden VEGFR-1'in primer tümör dokusunda western blot yöntemiyle elde edilen bantlarının GAPDH molekülünün miktarına oranlanmasıyla elde edilen analiz grafikte gösterilmektedir. Analizlerde, VEGFR-1 ekspresyonunda melatonin uygulanan gruplarda anlamlı bir azalma gözlemlendi (\*/\*\* için;  $p < 0,005$ ).

VEGFR-2 ekspresyonunda da, melatonin uygulanan M1+TM ve TM+M2 gruplarında sadece tümör verilen TM grubuna göre anlamlı bir azalma gözlemlendi (Şekil 4.31.).

### VEGFR-2 WESTERN BLOT ANALİZİ



**Şekil 4.31.** Anjiyogenik moleküllerden VEGFR-2'nin primer tümör dokusunda western blot yöntemiyle elde edilen bantlarının GAPDH molekülünün miktarına oranlanmasıyla elde edilen analiz grafikte gösterilmektedir. Analizlerde, VEGFR-1 ekspresyonunda melatonin uygulanan gruplarda anlamlı bir azalma gözlemlendi (\*/\*\* için;  $p < 0,005$ ).

#### 4.8.1 İstatistiksel Analiz

Anjiyogenez belirteçlerinin western blot analizinde, SigmaStat 3.5-Systat Software paket programı kullanıldı ve  $p < 0,005$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Normal dağılım olduğu durumda Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way ANOVA) yapıldı. Post-hoc test olarak Student-Newman testi kullanılmıştır.

## 5. TARTIŞMA

Meme kanserinde, primer tümörün büyümesi, proliferasyonu, invazyonu ve metastazını tetikleyen pek çok faktör bulunmaktadır. Melatoninin, insan kanserlerinde potansiyel kemoterapötik bir etkiye sahip olduğu, hücrenin hayatta kalma, proliferasyon ve apoptoz ile ilişkili çeşitli sinyal yollarını etkileyebildiği literatürde yer almaktadır (Dai ve ark., 2008; Um, Park, & Kwon, 2011). Ancak, çalışmamız melatoninin tümör büyümesi ve proliferasyonu üzerine önleyici ve koruyucu etkinliğinin olup olmadığını yorumlamamızı sağlayacak ilk *in vivo* çalışmadır. Ayrıca oluşturduğumuz meme kanseri modelinde melatoninin primer tümöre ek olarak metastazlara olan olası etkilerini de yorumlamamızı sağlayacaktır.

Metastatik meme kanseri hastaları arasında sağ kalım sürelerinin farklılıkları, patolojik alt tipleri (Kennecke ve ark., 2010), tümör hacimleri (Marinelli ve ark., 2016), nodal durum (X. X. Wang, Jiang, Li, Song, & Shao, 2016) ve benzeri çeşitli klinik göstergelerle büyük ölçüde ilişkilidir. Colombo J ve ark. yaptıkları çalışmada ksenograft fare modelinde inflamasyon ilişkili molekül olan NfκB üzerinden melatoninin inflamasyona ve proliferasyona olan etkilerini incelemişler ve sonuç olarak melatoninin hayvanların tümör boyutlarında bir azalmaya sebep olduğunu göstermişlerdir (Colombo ve ark., 2018). Başka bir çalışmada, MCF-7 ve T47D hücrelerinin proliferasyonu üzerine melatoninin olası etkileri incelendiğinde, bisfenol A (BPA)'nın etkisiyle ortaya çıkan proliferasyonun melatoninle azaldığı gösterilmektedir (T. Wang ve ark., 2018). Çalışmamız da melatoninin, tümör büyümesi ve proliferasyonuna etkinliğini değerlendirmek üzerine kurulmuş ve melatonin uygulanan gruplarda tümör büyüklüğü ve büyüme hızının belirlenmesine dayandırılmıştır. Bu durum Wang ve ark.'nın çalışmalarını destekler nitelikte olup; melatoninin proliferasyonu önleyici bir etkisinin olup olmadığı fikrini akıllara getirmektedir.

Melatonin uygulamasıyla yapılan çalışmalarda, bu antioksidan ajanın hayvan ağırlıkları üzerine etkisi hiç değerlendirilmemiştir. Oysa ki inflamatuvar yanıtla tetiklenen birçok hastalık ve kanserde vücut ağırlığının ciddi oranda azaldığını bilmekteyiz (Chen ve ark., 2018). Bu durum hem kanserin yarattığı immun direncin azalmasına hem de klinikte kullanılan kemoterapötiklere bağlı olarak gerçekleşmektedir. Çalışmamızda, tümöre eşlik eden inflamatuvar yanıt da bağlı olarak hayvan ağırlıklarının değişmediği görülmüştür. Bu durum, melatoninin belirgin oranda vücut ağırlığı üzerinde etkin olmadığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda, metastatik ve agresif hücre hattı ile oluşturulmuş fare meme kanseri modelinde, melatoninin tümör oluşumuna karşı olası koruyucu ve tümör oluşturduktan sonra da hem primer tümörün hem de metastatik odakların gerilemesine yönelik tedaviye katkı sağlayıcı etkinliği araştırıldı. Çalışmamızda 4TLM (4T1-Liver Metastasis) hücre hattının agresif ve metastaz kapasitesinin yüksek olduğu önceki çalışmalarımızdan bilinmektedir (Erin ve ark., 2013). 4TLM hücre hattının, inflamatuvar yanıt ortaya çıkarttığı beraberinde de bu yanıtın tümörün agresivitesine eşlik ettiği bilinmektedir. Bu nedenle; projemizde inflamatuvar yanıtları değerlendirebilmek için; periferik yayma analizleri yapıldı. Sadece tümör enjeksiyonu yapılan gruplara göre melatonin gruplarında nötrofil sayılarının anlamlı olarak azaldığını gördük. Bu bulgular daha önce aynı hücre hattı kullanılarak yapılan çalışmadaki periferik yayma analizleri ile benzerlik göstermektedir (Tanriover, Eyinc, Aliyev, Dilmac, & Erin, 2018). Fakat literatürde 4TLM hücre hattı verilen ve melatonin uygulanmış bir fare meme kanseri modeli bulunmamaktadır. Sonuçlarımızda; melatonin gruplarında nötrofil miktarının azaldığını göstermekte olup; uygulanan melatoninin tümör hücresi verilen hayvanlardaki lökosit sayısını azalttığı görülmektedir.

Maryam Akbarzade ve ark.'nın ovaryum kanser hücreleri SKOV3'den izole edilen kanser kök hücreleri (KHK) üzerine melatoninin etkilerini araştırdıkları çalışmada, melatoninin metastazın önemli basamaklarından biri olan invazyonu önlediğini göstermişlerdir (Akbarzadeh ve ark., 2017). Melatoninin metastazlar üzerine etkilerini göstermek istediğimiz çalışmamızda; *in vivo* karaciğer ve akciğer metastaz analizlerimiz, literatürde yer alan *in vitro* tümör invazyonundan elde edilen verilerle uyumludur. Metastatik analizlerde tümör hücrelerinin hayvanların karaciğer ve akciğerine yapmış olduğu metastazlar makro ve mikro olarak değerlendirildiğinde; melatonin uygulanan gruplarda bu metastatik alanların miktarında düşüş olduğu yani bu sebeple; anti-metastatik bir molekül olarak kullanabileceği görülmüş ve sonuçlar literatürle de uyumlu bulunmuştur (Akbarzadeh ve ark., 2017).

Tümör hücrelerinin metastaz, yayılma ve uzak bölgede yeni bir tümör oluşturabilmeleri için kendilerine has özel bir mikroçevreye ihtiyaçları vardır. Tümör çevresinde inflamasyon nedeniyle pek çok doğal bağışıklık sistemi elemanı yer almaktadır. Bunlar; makrofajlar, nötrofiller, mast hücreleri, MKSH'ler, dendritik hücreler ve doğal öldürücü (NK) hücrelerdir. Bilindiği üzere miyelooid hücreler, inflamasyon ve tümör sözkonusu olduğunda farklanmadan, tümör ve

inflamasyon mikroçevresine göç eder ve burada (Kamran, Chandran, Lowenstein, & Castro, 2018), immünsüpresif fonksiyona sahip MKSH'leri oluştururlar (Gabrilovich & Nagaraj, 2009). MKSH'lerin en iyi belirteci CD11b<sup>+</sup> ve GR1<sup>+</sup> proteinleridir. (Jaffe, Arai, & Nabel, 1996). Literatürde, CD11b<sup>+</sup> miyeloid hücre serisinde, Gr1 antijeninin iki farklı epitopunu tanıyan antikorlar olan Ly6G (granülositik) ve Ly6C (monositik) ekspresyonlarına göre MKSH'lerin morfolojik farklılıkları detaylı olarak belirlenmiştir (Youn, Nagaraj, Collazo, & Gabrilovich, 2008). CD33'de benzer şekilde birçok çalışmada MKSH belirteci olarak kullanılmış ve CD33<sup>+</sup> ile HLA-DR<sup>-</sup> popülasyonlarının tümör mikroçevresinde artması metastaz yanıtlarıyla ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda, tümör mikroçevresinde yer alan immunsupressif karakterli MKSH'leri belirlemek amacıyla yaptığımız immünohistokimyasal boyanmalarda; melatonin verilen gruplarda CD11b, GR1 ve CD33 ekspresyonlarının azaldığını gördük. Bu durum melatoninin MKSH'leri etkileyerek immün süpressif yanıtı ortadan kaldırmaya çalıştığını düşündürmektedir. Diaz-Montero ve ark., dolaşımdaki MKSH düzeylerinin meme kanseri ve metastatik tümör mikroçevresi ile korele olduğunu göstermiştir (Diaz-Montero ve ark., 2009) . Yan ve ark. yaptıkları çalışmada 4T1 hücreleri enjekte edilen fare deneylerinde tümör hücrelerinin metastazından önce Gr-1+/CD11b<sup>+</sup> hücrelerinin akciğere infiltre olduğunu göstermişlerdir. Bu hücreler uygun koşullarda tümörün proliferatif, immün süpressif ve inflamatuvar etkilerle büyümesini ve metastazını desteklemektedirler(Yan ve ark., 2010). Bizim bulgularımız da 4T1 hücre hattının karaciğere yapmış olduğu metastatik alanlardan alınan hücrelerle yapılan bir çalışma olduğundan literatürü desteklemektedir.

Anjiyogenez, tümör gelişimiyle ilişkili önemli bir süreçtir (Plate, Breier, & Risau, 1994). Tümör kitlesel olarak büyüdükçe daha çok oksijene ihtiyaç duyacağından ortaya çıkacak hipoksiye engel olmak için damar sayısını anjiyogenik aktiviteyle artırma eğilimindedir. Hipoksi ile tetiklenen anjiyogenezin anahtar düzenleyicisi, hipoksiyle indüklenebilir faktörü 1-alfa'dır (HIF-1 $\alpha$ ). HIF-1 $\alpha$ , hipoksi ile indüklenmiş reaktif oksijen türleri (ROS) yardımı ile stabilize edilir ve hipoksik genlerin ortaya çıkmasına ve anjiyogenezde önemli bir molekül olan VEGF'in uyarılmasına sebep olur. Tümör damarlarının organize olma özelliği yoktur ve bu damarlar sızıntı yaparak, tümör dokusunda VEGF-A'nın hipoksiye bağlı ekspresyonu ile işlevsel olan damarlarda bozulmaya ve anjiyogenezin daha fazla uyarılmasına neden olur. Yani VEGF-A tümör oluşumunda kilit moleküldür (Carmeliet, 2005). VEGF molekülü 1, 2 ve 3 olmak üzere üç ana VEGFR reseptörüne bağlanabilmektedir (Fujita ve ark., 2008). VEGF-A, VEGFR-1 (Flt-1) ve

VEGFR-2'ye (KDR / Flk-1) bağlanır. VEGFR-2, VEGF etkisiyle bilinen hücrel olaylarının hemen hemen hepsine aracılık ettiği bilinmektedir (Holmes, Roberts, Thomas, & Cross, 2007). VEGFR-2'nin VEGF-A'ya bağlanma afinitesi daha yüksektir ve bu ikili de tümör anjiyogenezinde kilit rol oynamaktadır (Goel & Mercurio, 2013). Melatonin anti-anjiyogenik etkisi ve onkogen ekspresyonlarının düzenlenmesiyle, proliferasyonu sınırlayıcı bir etkiye sahip olmasıyla, dolaylı olarak onkostatik bir aktiviteye sahiptir (Di Bella, Mascia, & Colori, 2013). MDA-MB-231 üçlü meme kanseri hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada melatoninin anjiyogenez etkilerini araştıran ekip, sonuç olarak VEGF ve VEGFR-2 ekspresyonlarının azaldığını ve melatoninin anjiyogenezini inhibe edebileceğini gösterdiler. Sonuçlarımızda da melatoninin anjiyogenezini sınırlandırarak onkostatik etki ettiğini VEGFR-1 ve VEGFR-2 ekspresyonlarıyla gösterdik. Sonuç olarak; melatonin ile tedavi edilen gruplarda anjiyogenik moleküllerin miktarı sadece tümörle muamele edilmiş hayvanlara göre anlamlı derecede azaldı. Bu sonuç bize melatoninin hipoksiye bağlı olarak bozulan tümörün büyümesiyle ilişkili olan VEGF-A, VEGFR-1 ve VEGFR-2 ekspresyonlarının düşük olmasıyla önemli bir ajan olabileceğini göstermiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda, melatonin; tümör büyüme hızı ve tümör ağırlıklarında yarattığı gerilemeyle; anti-proliferatif bir etkiye sahip olabileceği, periferik yayma analizleri sonucunda lökosit miktarında düşüşe sebep olmasıyla periferik immün hücre yanıtlarını geriletebileceği görüldü. Metastatik dokularda yapılan analizlerde de melatoninin; metastaz ve MKSH yanıtlarını azaltarak anti-metastatik; anjiyogenik belirteçlerin ekspresyonunu etkileyerek de anti-anjiyogenik bir etkiye sahip olabileceği görüldü.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu Yüksek Lisans tez çalışmasında, 4T1 meme kanseri hücre hattının karaciğere metastaz yapmış hücrelerinin toplanması ve yeniden üretilmesiyle elde edilen; invazyon ve metastaz yetenekleri yüksek olduğu bilinen 4TLM hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücrelerin primer tümör olarak meme dokusuna ortotopik enjeksiyonu yapılmış ve oluşturulan *in vivo* modelde, primer tümör ve uzak metastatik organlar olarak da akciğer ve karaciğerin değerlendirmeleri yapılmıştır. Bu meme kanseri modelinde, *in vivo* primer tümör ve organ metastazlarında melatoninin tümör enjeksiyonundan önce kullanılması ilk defa yapılmış, literatürde var olan *in vitro* çalışmaları da doğrulamıştır. Metastatik organlardaki immün yanıt ve anjiyogenez moleküllerinin ekspresyon sonuçları da literatüre ilk defa kazandırılmış bir bilgi olduğundan sonuçların yorumlanması ile yeni proje ve kliniğe yansıyabilecek yeni çalışmalara ışık tutabileceği kanaatindeyiz.

- 1- Oluşturulan fare meme kanseri modelinde tümör enjeksiyonuyla seyreden immün yanıtlara da paralel olarak; periferik yayma analizleri yapıldı. Melatonin uygulamasının periferik yayma yanıtlarını azalttığı görüldü.
- 2- Tümörden önce ve tümörle birlikte uygulanan melatoninin, primer tümör üzerine etkilerini değerlendirmek için; tümör büyüme hızları, tümör ağırlıkları ve hayvan ağırlıkları takip edildi. Melatonin uygulamasının, önce yada tümörle olması ciddi bir fark yaratmaksızın; tümör büyüme hızları ve ağırlıklarının düşük olduğu görüldü. Hayvan ağırlıkları üzerine bir etkinin olmadığı da belirlendi.
- 3- Primer tümördeki MKSH ve anjiyogenik belirteçler üzerine yanıtlar hem immunohistokimyasal hem de western blot yöntemiyle değerlendirildi. Tümörün büyümesine ve metastazına eşlik eden MKSH'lerin belirteçleri olan CD11b, GR1 ve CD33 ekspresyonlarının melatonin uygulanan gruplarda sadece tümör enjeksiyonuna maruz kalmış hayvanlara göre daha az ekspre olduğu görüldü. VEGF-A, VEGFR-1 ve VEGFR-2 gibi anjiyogenik belirteçlerin de; melatonin uygulanan gruplarda sadece tümör enjeksiyonuna maruz kalmış hayvanlara göre ekspresyonunun daha az olduğu görüldü. Tüm immunohistokimyasal veriler de western blot analizleri ile doğrulandı.
- 4- Metastatik organlar olarak seçtiğimiz karaciğer ve akciğer dokularında yapılan metastaz analizlerinde; melatonin uygulanan gruplarda metastatik odakların daha küçük olduğu dikkati çekti.



5- Karaciğer dokularında özellikle metastaz alanlarında yapılan immunohistokimyasal analizlerde; metastatik mikroçevrede yer alan MKSH belirteçlerinin ve metastatik alanlarda anjiyogenik belirteçlerin de melatonin uygulanan gruplarda ekspresyonlarının azaldığı görüldü.

## KAYNAKLAR

Akbarzadeh, M., Movassaghpour, A. A., Ghanbari, H., Kheirandish, M., Fathi Maroufi, N., Rahbarghazi, R., . . . Samadi, N. (2017). The potential therapeutic effect of melatonin on human ovarian cancer by inhibition of invasion and migration of cancer stem cells. *Sci Rep*, 7(1), 17062. doi:10.1038/s41598-017-16940-y

Allegra, M., Reiter, R. J., Tan, D. X., Gentile, C., Tesoriere, L., & Livrea, M. A. (2003). The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res*, 34(1), 1-10.

Alvarez-Garcia, V., Gonzalez, A., Alonso-Gonzalez, C., Martinez-Campa, C., & Cos, S. (2012). Melatonin interferes in the desmoplastic reaction in breast cancer by regulating cytokine production. *J Pineal Res*, 52(3), 282-290. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00940.x

Alvarez-Garcia, V., Gonzalez, A., Alonso-Gonzalez, C., Martinez-Campa, C., & Cos, S. (2013). Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. *J Pineal Res*, 54(4), 373-380. doi:10.1111/jpi.12007

Anders, C. K., Johnson, R., Litton, J., Phillips, M., & Bleyer, A. (2009). Breast cancer before age 40 years. *Semin Oncol*, 36(3), 237-249. doi:10.1053/j.seminoncol.2009.03.001

Anisimov, V. N. (2003). The role of pineal gland in breast cancer development. *Crit Rev Oncol Hematol*, 46(3), 221-234.

Ausprunk, D. H., & Folkman, J. (1977). Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res*, 14(1), 53-65.

Barrett, P., & Bolborea, M. (2012). Molecular pathways involved in seasonal body weight and reproductive responses governed by melatonin. *J Pineal Res*, 52(4), 376-388. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00963.x

Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, 3(6), 401-410. doi:10.1038/nrc1093

Blask, D. E. (2009). Melatonin, sleep disturbance and cancer risk. *Sleep Med Rev*, 13(4), 257-264. doi:10.1016/j.smr.2008.07.007

Bonnefont-Rousselot, D., & Collin, F. (2010). Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology*, 278(1), 55-67. doi:10.1016/j.tox.2010.04.008

Burstein, H. J., Polyak, K., Wong, J. S., Lester, S. C., & Kaelin, C. M. (2004). Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med*, 350(14), 1430-1441. doi:10.1056/NEJMra031301

Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 9(6), 653-660. doi:10.1038/nm0603-653

Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, 69 Suppl 3, 4-10. doi:10.1159/000088478

Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., . . . Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204-7218. doi:10.18632/oncotarget.23208

Chiang, A. C., & Massague, J. (2008). Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med*, 359(26), 2814-2823. doi:10.1056/NEJMra0805239

Choccalingam, C., Rao, L., & Rao, S. (2012). Clinico-Pathological Characteristics of Triple Negative and Non Triple Negative High Grade Breast Carcinomas with and Without Basal Marker (CK5/6 and EGFR) Expression at a Rural Tertiary Hospital in India. *Breast Cancer (Auckl)*, 6, 21-29. doi:10.4137/BCBCR.S8611

Clauss, M. (2000). Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost*, 26(5), 561-569. doi:10.1055/s-2000-13213

Colombo, J., Jardim-Perassi, B. V., Ferreira, J. P. S., Braga, C. Z., Sonehara, N. M., Junior, R. P., . . . Zuccari, D. (2018). Melatonin Differentially Modulates NF- $\kappa$ B Expression in Breast and Liver Cancer Cells. *Anticancer Agents Med Chem*, 18(12), 1688-1694. doi:10.2174/1871520618666180131112304

- Cutando, A., Montero, J., Gomez-de Diego, R., Ferrera, M. J., & Lopez-Valverde, A. (2015). Effect of topical application of melatonin on serum levels of C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in patients with type 1 or type 2 diabetes and periodontal disease. *J Clin Exp Dent*, 7(5), e628-633. doi:10.4317/jced.52604
- Dai, M., Cui, P., Yu, M., Han, J., Li, H., & Xiu, R. (2008). Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1 alpha induced by CoCl<sub>2</sub> in cultured cancer cells. *J Pineal Res*, 44(2), 121-126. doi:10.1111/j.1600-079X.2007.00498.x
- Di Bella, G., Mascia, F., & Colori, B. (2013). The Di Bella Method (DBM) in the treatment of prostate cancer: a preliminary retrospective study of 16 patients and a review of the literature. *Neuro Endocrinol Lett*, 34(6), 523-528.
- Diaz-Montero, C. M., Salem, M. L., Nishimura, M. I., Garrett-Mayer, E., Cole, D. J., & Montero, A. J. (2009). Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 58(1), 49-59. doi:10.1007/s00262-008-0523-4
- Ding, S., Lin, N., Sheng, X., Zhao, Y., Su, Y., Xu, L., . . . Pu, J. (2019). Melatonin Stabilizes Rupture-Prone Vulnerable Plaques via Regulating Macrophage Polarization in a Nuclear Circadian Receptor RORalpha-Dependent Manner. *J Pineal Res*, e12581. doi:10.1111/jpi.12581
- Distler, O., Neidhart, M., Gay, R. E., & Gay, S. (2002). The molecular control of angiogenesis. *Int Rev Immunol*, 21(1), 33-49.
- Emet, M., Ozcan, H., Ozel, L., Yayla, M., Halici, Z., & Hacimuftuoglu, A. (2016). A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs. *Eurasian J Med*, 48(2), 135-141. doi:10.5152/eurasianjmed.2015.0267
- Erin, N., Kale, S., Tanriover, G., Koksoy, S., Duymus, O., & Korcum, A. F. (2013). Differential characteristics of heart, liver, and brain metastatic subsets of murine breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, 139(3), 677-689. doi:10.1007/s10549-013-2584-0

- Fernandez, D., Bonilla, E., Phillips, P., & Perl, A. (2006). Signaling abnormalities in systemic lupus erythematosus as potential drug targets. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 6(4), 305-311.
- Ferrara, N., & Adamis, A. P. (2016). Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 15(6), 385-403. doi:10.1038/nrd.2015.17
- Fletcher, D. A., & Mullins, R. D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280), 485-492. doi:10.1038/nature08908
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285(21), 1182-1186. doi:10.1056/NEJM197111182852108
- Folkman, J. (1997). Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. *EXS*, 79, 1-8.
- Folkman, J., & Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors. *Science*, 235(4787), 442-447.
- Folkman, J., & Shing, Y. (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem*, 267(16), 10931-10934.
- Fujita, N., Imai, J., Suzuki, T., Yamada, M., Ninomiya, K., Miyamoto, K., . . . Miyamoto, T. (2008). Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for nucleus pulposus cells in the intervertebral disc. *Biochem Biophys Res Commun*, 372(2), 367-372. doi:10.1016/j.bbrc.2008.05.044
- Gabrilovich, D. I., & Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 9(3), 162-174. doi:10.1038/nri2506
- Gkretsi, V., & Stylianopoulos, T. (2018). Cell Adhesion and Matrix Stiffness: Coordinating Cancer Cell Invasion and Metastasis. *Front Oncol*, 8, 145. doi:10.3389/fonc.2018.00145
- Goel, H. L., & Mercurio, A. M. (2013). VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer*, 13(12), 871-882. doi:10.1038/nrc3627
- Grivas, T. B., & Savvidou, O. D. (2007). Melatonin the "light of night" in human biology and adolescent idiopathic scoliosis. *Scoliosis*, 2, 6. doi:10.1186/1748-7161-2-6

Guglielmotto, M., Tamagno, E., & Danni, O. (2009). Oxidative stress and hypoxia contribute to Alzheimer's disease pathogenesis: two sides of the same coin. *ScientificWorldJournal*, 9, 781-791. doi:10.1100/tsw.2009.93

Heldin, C. H., & Westermark, B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*, 79(4), 1283-1316.

Herbst, R. S. (2004). Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 59(2 Suppl), 21-26. doi:10.1016/j.ijrobp.2003.11.041

Holmes, K., Roberts, O. L., Thomas, A. M., & Cross, M. J. (2007). Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal*, 19(10), 2003-2012. doi:10.1016/j.cellsig.2007.05.013

Intaglietta, M., Johnson, P. C., & Winslow, R. M. (1996). Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovasc Res*, 32(4), 632-643.

Jaffe, M. L., Arai, H., & Nabel, G. J. (1996). Mechanisms of tumor-induced immunosuppression: evidence for contact-dependent T cell suppression by monocytes. *Mol Med*, 2(6), 692-701.

Jardim-Perassi, B. V., Lourenco, M. R., Doho, G. M., Grigolo, I. H., Gelaleti, G. B., Ferreira, L. C., . . . Pires de Campos Zuccari, D. A. (2016). Melatonin Regulates Angiogenic Factors under Hypoxia in Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer Agents Med Chem*, 16(3), 347-358.

Kamran, N., Chandran, M., Lowenstein, P. R., & Castro, M. G. (2018). Immature myeloid cells in the tumor microenvironment: Implications for immunotherapy. *Clin Immunol*, 189, 34-42. doi:10.1016/j.clim.2016.10.008

Kennecke, H., Yerushalmi, R., Woods, R., Cheang, M. C., Voduc, D., Speers, C. H., . . . Gelmon, K. (2010). Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*, 28(20), 3271-3277. doi:10.1200/JCO.2009.25.9820

Koene, R. J., Prizment, A. E., Blaes, A., & Konety, S. H. (2016). Shared Risk Factors in Cardiovascular Disease and Cancer. *Circulation*, 133(11), 1104-1114. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020406

Kohn, E. C., & Liotta, L. A. (1995). Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. *Cancer Res*, *55*(9), 1856-1862.

Li, Y., Li, S., Zhou, Y., Meng, X., Zhang, J. J., Xu, D. P., & Li, H. B. (2017). Melatonin for the prevention and treatment of cancer. *Oncotarget*, *8*(24), 39896-39921. doi:10.18632/oncotarget.16379

Lo, P. K., & Sukumar, S. (2008). Epigenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics*, *9*(12), 1879-1902. doi:10.2217/14622416.9.12.1879

Loizzi, V., Del Vecchio, V., Gargano, G., De Liso, M., Kardashi, A., Naglieri, E., . . . Cormio, G. (2017). Biological Pathways Involved in Tumor Angiogenesis and Bevacizumab Based Anti-Angiogenic Therapy with Special References to Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci*, *18*(9). doi:10.3390/ijms18091967

Lv, D., Cui, P. L., Yao, S. W., Xu, Y. Q., & Yang, Z. X. (2012). Melatonin inhibits the expression of vascular endothelial growth factor in pancreatic cancer cells. *Chin J Cancer Res*, *24*(4), 310-316. doi:10.3978/j.issn.1000-9604.2012.09.03

Lynch, H. J., Wurtman, R. J., Moskowitz, M. A., Archer, M. C., & Ho, M. H. (1975). Daily rhythm in human urinary melatonin. *Science*, *187*(4172), 169-171.

Maestroni, G. J. (1993). The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J Pineal Res*, *14*(1), 1-10.

Maldonado, M. D., Garcia-Moreno, H., Gonzalez-Yanes, C., & Calvo, J. R. (2016). Possible Involvement of the Inhibition of NF-kappaB Factor in Anti-Inflammatory Actions That Melatonin Exerts on Mast Cells. *J Cell Biochem*, *117*(8), 1926-1933. doi:10.1002/jcb.25491

Mallo, C., Zaidan, R., Galy, G., Vermeulen, E., Brun, J., Chazot, G., & Claustrat, B. (1990). Pharmacokinetics of melatonin in man after intravenous infusion and bolus injection. *Eur J Clin Pharmacol*, *38*(3), 297-301.

Marinelli, B., Espinet-Col, C., Ulaner, G. A., McArthur, H. L., Gonen, M., Jochelson, M., & Weber, W. A. (2016). Prognostic value of FDG PET/CT-based metabolic tumor volumes in metastatic triple negative breast cancer patients. *Am J Nucl Med Mol Imaging*, *6*(2), 120-127.

Martinez, A. (2006). A new family of angiogenic factors. *Cancer Lett*, 236(2), 157-163. doi:10.1016/j.canlet.2005.04.008

Militante, J., & Lombardini, J. B. (2004). Age-related retinal degeneration in animal models of aging: possible involvement of taurine deficiency and oxidative stress. *Neurochem Res*, 29(1), 151-160.

Pardridge, W. M., & Mietus, L. J. (1980). Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. *J Neurochem*, 34(6), 1761-1763.

Park, S. I., Lee, C., Sadler, W. D., Koh, A. J., Jones, J., Seo, J. W., . . . McCauley, L. K. (2013). Parathyroid hormone-related protein drives a CD11b+Gr1+ cell-mediated positive feedback loop to support prostate cancer growth. *Cancer Res*, 73(22), 6574-6583. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4692

Pepper, M. S., Montesano, R., Mandriota, S. J., Orci, L., & Vassalli, J. D. (1996). Angiogenesis: a paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. *Enzyme Protein*, 49(1-3), 138-162.

Perreau-Lenz, S., Kalsbeek, A., Garidou, M. L., Wortel, J., van der Vliet, J., van Heijningen, C., . . . Buijs, R. M. (2003). Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur J Neurosci*, 17(2), 221-228.

Plate, K. H., Breier, G., & Risau, W. (1994). Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis. *Brain Pathol*, 4(3), 207-218.

Poeggeler, B., Pappolla, M. A., Hardeland, R., Rassoulpour, A., Hodgkins, P. S., Guidetti, P., & Schwarcz, R. (1999). Indole-3-propionate: a potent hydroxyl radical scavenger in rat brain. *Brain Res*, 815(2), 382-388.

Presta, M., Dell'Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., & Rusnati, M. (2005). Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16(2), 159-178. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.01.004



Reiter, R. J. (2004). Mechanisms of cancer inhibition by melatonin. *J Pineal Res*, 37(3), 213-214. doi:10.1111/j.1600-079X.2004.00165.x

Reiter, R. J., Tan, D. X., Cabrera, J., D'Arpa, D., Sainz, R. M., Mayo, J. C., & Ramos, S. (1999). The oxidant/antioxidant network: role of melatonin. *Biol Signals Recept*, 8(1-2), 56-63. doi:14569

Ressmeyer, A. R., Mayo, J. C., Zelosko, V., Sainz, R. M., Tan, D. X., Poeggeler, B., . . . Hardeland, R. (2003). Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox Rep*, 8(4), 205-213. doi:10.1179/135100003225002709

Sanchez, A., Calpena, A. C., & Clares, B. (2015). Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin. *Int J Mol Sci*, 16(8), 16981-17004. doi:10.3390/ijms160816981

Schomerus, C., & Korf, H. W. (2005). Mechanisms regulating melatonin synthesis in the mammalian pineal organ. *Ann N Y Acad Sci*, 1057, 372-383. doi:10.1196/annals.1356.028

Shim, D. W., Shin, H. J., Han, J. W., Ji, Y. E., Jang, C. H., Koppula, S., . . . Lee, K. H. (2015). A novel synthetic derivative of melatonin, 5-hydroxy-2'-isobutyl-streptochlorin (HIS), inhibits inflammatory responses via regulation of TRIF-dependent signaling and inflammasome activation. *Toxicol Appl Pharmacol*, 284(2), 227-235. doi:10.1016/j.taap.2015.02.006

Steeg, P. S. (2003). Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer*, 3(1), 55-63. doi:10.1038/nrc967

Stockmann, C., Doedens, A., Weidemann, A., Zhang, N., Takeda, N., Greenberg, J. I., . . . Johnson, R. S. (2008). Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature*, 456(7223), 814-818. doi:10.1038/nature07445

Sundberg, K., Johansson, A. S., Stenberg, G., Widersten, M., Seidel, A., Mannervik, B., & Jernstrom, B. (1998). Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis*, 19(3), 433-436.

Tanriover, G., Eyinc, M. B., Aliyev, E., Dilmac, S., & Erin, N. (2018). Presence of S100A8/Gr1-Positive Myeloid-Derived Suppressor Cells in Primary Tumors and Visceral Organs Invaded by Breast Carcinoma Cells. *Clin Breast Cancer*, 18(5), e1067-e1076. doi:10.1016/j.clbc.2018.03.013

Um, H. J., Park, J. W., & Kwon, T. K. (2011). Melatonin sensitizes Caki renal cancer cells to kahweol-induced apoptosis through CHOP-mediated up-regulation of PUMA. *J Pineal Res*, 50(4), 359-366. doi:10.1111/j.1600-079X.2010.00851.x

Vakkuri, O., Leppaluoto, J., & Kauppila, A. (1985). Oral administration and distribution of melatonin in human serum, saliva and urine. *Life Sci*, 37(5), 489-495.

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160(1), 1-40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009

Wagner, G., Brandstatter, R., & Hermann, A. (2000). Adrenergic and cholinergic regulation of in vitro melatonin release during ontogeny in the pineal gland of Long Evans rats. *Neuroendocrinology*, 72(3), 154-161. doi:10.1159/000054582

Wang, T., Liu, B., Guan, Y., Gong, M., Zhang, W., Pan, J., . . . Ye, L. (2018). Melatonin inhibits the proliferation of breast cancer cells induced by bisphenol A via targeting estrogen receptor-related pathways. *Thorac Cancer*, 9(3), 368-375. doi:10.1111/1759-7714.12587

Wang, X. X., Jiang, Y. Z., Li, J. J., Song, C. G., & Shao, Z. M. (2016). Effect of nodal status on clinical outcomes of triple-negative breast cancer: a population-based study using the SEER 18 database. *Oncotarget*, 7(29), 46636-46645. doi:10.18632/oncotarget.9432

Wei, W. C., Lin, S. Y., Lan, C. W., Huang, Y. C., Lin, C. Y., Hsiao, P. W., . . . Yang, N. S. (2016). Inhibiting MDSC differentiation from bone marrow with phytochemical polyacetylenes drastically impairs tumor metastasis. *Sci Rep*, 6, 36663. doi:10.1038/srep36663

Wiechmann, A. F. (1986). Melatonin: parallels in pineal gland and retina. *Exp Eye Res*, 42(6), 507-527.

Wu, J. Q., Kosten, T. R., & Zhang, X. Y. (2013). Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 46, 200-206. doi:10.1016/j.pnpbp.2013.02.015

Xie, T. X., Xia, Z., Zhang, N., Gong, W., & Huang, S. (2010). Constitutive NF-kappaB activity regulates the expression of VEGF and IL-8 and tumor angiogenesis of human glioblastoma. *Oncol Rep*, 23(3), 725-732.

Yamashita, T., Sakamoto, K., Yamanishi, H., Totani, N., & Yamamoto, J. (2013). Effect of a free radical scavenger on nitric oxide release in microvessels. *Vascul Pharmacol*, 58(1-2), 134-139. doi:10.1016/j.vph.2012.10.006

Yan, H. H., Pickup, M., Pang, Y., Gorska, A. E., Li, Z., Chytil, A., . . . Yang, L. (2010). Gr-1+CD11b+ myeloid cells tip the balance of immune protection to tumor promotion in the premetastatic lung. *Cancer Res*, 70(15), 6139-6149. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0706

Yao, J., Wu, X., Zhuang, G., Kasman, I. M., Vogt, T., Phan, V., . . . Bais, C. (2011). Expression of a functional VEGFR-1 in tumor cells is a major determinant of anti-PlGF antibodies efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(28), 11590-11595. doi:10.1073/pnas.1109029108

Youn, J. I., Nagaraj, S., Collazo, M., & Gabrilovich, D. I. (2008). Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*, 181(8), 5791-5802.

Yu, J., Du, W., Yan, F., Wang, Y., Li, H., Cao, S., . . . Ren, X. (2013). Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J Immunol*, 190(7), 3783-3797. doi:10.4049/jimmunol.1201449

Ziyad, S., & Iruela-Arispe, M. L. (2011). Molecular mechanisms of tumor angiogenesis. *Genes Cancer*, 2(12), 1085-1096. doi:10.1177/1947601911432334

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	<b>Asiye Kübra</b>	<b>Uyruğu</b>	<b>T.C</b>
<b>Soyadı</b>	<b>KARADAŞ</b>	<b>Tel no</b>	<b>05462271268</b>
<b>Doğum tarihi</b>	<b>02/03/1990</b>	<b>e-posta</b>	<b>asiyegksu@gmail.com</b>

### Eğitim Bilgileri

	<b>Mezun olduğu kurum</b>	<b>Mezuniyet yılı</b>
<b>Lise</b>	<b>Hacı Mehmet Sabancı Lisesi/ Sivas</b>	<b>2007</b>
<b>Lisans</b>	<b>Karadeniz Teknik Üniversitesi/ Fen Fakültesi/ Biyoloji</b>	<b>2013</b>
<b>Yüksek Lisans</b>	<b>Akdeniz Üniversitesi/ Sağlık Bilimleri Enstitüsü/ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı</b>	<b>-</b>
<b>Doktora</b>	<b>-</b>	

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (yıl-yıl)</b>

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Sınav türü</b>	<b>Puanı</b>
<b>İngilizce</b>	<b>YÖKDİL</b>	<b>54</b>

## Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Fare meme kanseri modelinde karsinogenik yanıtla karşı ortaya çıkacak anksiyete ve depresyonun düzenlenmesinde melatoninin etkisi	BAP	2019-2020

## Yayımlar ve Bildiriler:

Acar B ve ark. Diabetes mellitus accelerates fatty degeneration of the supraspinatus muscle after tendon tear: An experimental study in rats. Eklem Hastalık Cerrahisi. 2018 Dec;29(3):176-83. doi: 10.5606/ehc.2018.62388.

13. uluslararası Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 2016, Çeşme ' Koroid Pleksusda Aquaporin-1 (AQP1), Aquaporin-2 (AQP2) ve Aquaporin-4(AQP4) Ekspresyonları: Cinsiyet ve Siklus Bağımlı Farklılıklar', Poster Sunumu.

15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (IHC 2017) in May, 18-21, 2017, Antalya, Turkey ' Enhancing Potential Territories Of The Lateral Thoracic Artery Based Perforator Flap Via Injections Of Adipose-Derived Stem Cells', Poster Presentation

14. Ulusal Histoloji Ve Embriyoloji Kongresi, 2018, Antalya 'Düzenli Melatonin Kullanımı Meme Kanseri Gelişimi Ve Metastazlarını Etkiler Mi?' Sözlü Sunumu

1.Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi 2018, Edirne, 'Melatonin Decreases Growth Of Primary Tumor And Lung Metastasis In A Mice Model Of Breast Cancer' Poster Sunumu

XXVI International Symposium on Morphological Sciences 2018, Prague, 'Preventive and Therapeutic Administration of Melatonin Increases c-Fos Immunoreactivity in Motor Cortex in Mice Breast Cancer Model' Poster Presentation

17. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2019, Trabzon 'Kuprizon İle İndüklenmiş Demiyelinizasyon Fare Modelinde Glial Hücrelerde Toll Like Reseptör-4 (Tlr4) Ekspresyonu' Poster Sunumu

24. Ulusal Elektron Mikroskop Kongresi 2019, Edirne, 'Melatonin meme kanserinde epitelyal-mezenkimal geçişi önleyerek metastaz sürecine etki edebilir mi?' Poster Sunumu