T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

FARELERDE GÜN IŞIĞININ MELATONİN HORMONU, KİSSPEPTİN PROTEİNİ SENTEZİ, CİLT KANSERİ OLUŞUMU VE METASTAZA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Perçin PAZARCI

TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Davut ALPTEKİN

ADANA-2017

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

FARELERDE GÜN IŞIĞININ MELATONİN HORMONU, KİSSPEPTİN PROTEİNİ SENTEZİ, CİLT KANSERİ OLUŞUMU VE METASTAZA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Perçin PAZARCI

TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Davut ALPTEKİN

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
TDK-2015-2966 Nolu proje ile desteklenmiştir.

ADANA-2017

KABUL VE ONAY

Tıbbi Biyoloji Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan

"Farelerde Gün Işığının Melatonin Hormonu, Kisspeptin Proteini Sentezi, Cilt Kanseri Oluşumu ve Metastaza Etkisinin İncelenmesi"

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 06 / 09 / 2017

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Davut Alptekin
Çukurova Üniversitesi
Başkan

Prof. Dr. H. Ümit Lüleyap
Çukurova Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Ergin Şingirik
Çukurova Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Fuat Dilmeç
Harran Üniversitesi
Üye

Yard. Doç. Dr. M. Ertan Ay
Mersin Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI

ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. ...../……./20….

Perçin Pazarcı

Kayıtlı olunan Program : Tıbbi Biyoloji
Tezin Konusu : Farelerde Gün Işığının Melatonin Hormonu, Kisspeptin Proteini Sentezi, Cilt Kanseri Oluşumu ve Metastaza Etkisinin İncelenmesi

Tezin Türü : Yüksek Lisans : ☐ Doktora: ☐

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof. Dr. Davut Alptekin
Danışmanın İletişim Bilgileri
Telefon : 0322 3386060*3498
E-Posta : alptekin@cu.edu.tr

Öğrencinin İletişim Bilgileri
Telefon : 05055934246
E-Posta : percinpazarci@gmail.com
Adresi : Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

TEŞEKKÜR

Öncelikle Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda çalışmalara başladığımdan beri beni doğru bir şekilde yönlendiren, yol gösteren, fikir veren, çıkan sorunların çözülmesinde yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Davut ALPTEKİN'e ve Prof. Dr. Halil KASAP'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamın tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. M. Bertan YILMAZ'a teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim. Ayrıca Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimim sırasında desteklerini ve bilgi birikimlerini esirgemeyen anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri, Prof. Dr. H. Ümit LÜLEYAP, Prof. Dr. Osman DEMİRHAN, Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI, Prof. Dr. Mülkiye KASAP'a teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmamızın hayvan deneyleri ve laboratuvar çalışmaları sırasında sorunların çözülmesinde fikir ve yardımlarını esirgemeyen Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. H. Mahir KAPLAN'a, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürü Dr. Y. Kenan DAĞLIOĞLU'na ve anabilim dalımız Yüksek Lisans Öğrencisi Hale ÖKSÜZ'e ayrıca teşekkür ederim.

Ayrıca manevi yönden bana her zaman destek olan başta eşim Seda PAZARCI olmak üzere anneme, babama, kardeşime ve çalışmanın çeşitli aşamalarında yardımı dokunan anabilim dalımız personeline sevgilerimi iletiyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY **Error! Bookmark not defined.**

ETİK BEYANI iii

TEŞEKKÜR iv

İÇİNDEKİLER v

ŞEKİLLER DİZİNİ vii

ÇİZELGELER DİZİNİ viii

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ix

ÖZET x

ABSTRACT xii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Melatonin Hormonu 3

2.2. Kisspeptin Proteini 6

2.3. Melanoma 9

3. GEREÇ VE YÖNTEM 12

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler 12

3.2. Kullanılan Aygıtlar 14

3.3. Kullanılan Bilgisayar Yazılımları 14

3.4. Farelerin Gruplandırılması, Yetiştirilmesi ve Deney Akışı 14

3.5. Melanoma Hücre Hatlarının Hazırlanması ve Enjeksiyonu 17

3.6. Tümör Boylarının Ölçülmesi ve Hacimlerinin Hesaplanması 18

3.7. Melatonin ELISA Deneyi 18

3.7.1. ELISA Platelerin Hazırlanması ve Absorbance Ölçümü 19

3.7.2. Melatonin Hormonu Konsantrasyonlarının Belirlenmesi 19

3.8. Kisspeptin ELISA Deneyi 20

3.8.1. Doku Homojenizasyonu 20

3.8.2. Bradford Protein Assay 20

3.8.3. ELISA Platelerin Hazırlanması ve Absorbance Ölçümü 21

3.8.4. Kisspeptin Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi 21

3.9. Real Time qPCR Deneyi 22

3.9.1. RNA İzolasyonu 22
3.9.2. cDNA Sentezi 23
3.9.3. Real Time qPCR 24
3.9.4. Real Time qPCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi 25
3.10. İstatistiksel Analiz 25
4. BULGULAR 26
4.1. Melatonin Hormonu, Kisspeptin Proteini, *KISS1* Ekspresyon Miktarları ve İlgili İstatistiksel Analizler 26
4.2. Tümör Büyüklükleri ve İlgili İstatistiksel Analizler 33
5. TARTIŞMA 38
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 43
7. KAYNAKLAR 45
8. EKLER 54
ÖZGEÇMİŞ 54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Melatonin 3
Şekil 2.2 Melatonin biyosentezi 4
Şekil 2.3 Melatoninin antikanser özellikleri 6
Şekil 2.4 İnsanda aktif kisspeptinlerin sentezi 7
Şekil 2.5 İnsanda kisspeptinin etki mekanizması 8
Şekil 2.6 Suriye hamsterlarında gün uzunluğu, melatonin, kisspeptin arasındaki ilişki 9
Şekil 2.7 Melanoma oluşumunda etkin olan gen mutasyonları ve yolaklar 11
Şekil 3.1 Deney akışı özeti 17
Şekil 4.1 Tümör oluşan farelerden örnekler 26
Şekil 4.2 Dişi ve erkek farelerin kisspeptin değerlerinin karşılaştırılması 31
Şekil 4.3 Gün ışığı grubu ve kör gruptaki farelerin melatonin ve *KISS1* değerlerinin karşılaştırılması 32
Şekil 4.4 Sağlıklı ve tümör oluşumu gözlenen farelerin melatonin ve *KISS1* değerlerinin karşılaştırılması 33
Şekil 4.5 Tümör hacimlerinin haftalara göre değişimi 34
Şekil 4.6 Deney sonundaki tümör hacimleriyle melatonin ve *KISS1* değerleri arasındaki ilişki 35
Şekil 4.7 Gün ışığı grubundaki ve kör gruptaki farelerin deney sonundaki tümör hacimlerinin karşılaştırılması 35
Şekil 4.8 Gün ışığı grubundaki ve kör gruptaki farelerin tümör hacimlerinin haftalar içerisindeki değişiminin karşılaştırılması 37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Fare deney grupları 15
Çizelge 3.2 2X RT master mix bileşenleri ve miktarları 23
Çizelge 3.3 cDNA eldesi için Thermal Cycler'da kullanılan program 24
Çizelge 3.4 Real Time qPCR reaksiyonunun bileşenleri ve miktarları 24
Çizelge 3.5 Applied Biosystems 7500 Real Time qPCR için kullanılan program 24
Çizelge 4.1 Melatonin, Kisspeptin ve *KISS1* miktarları 27
Çizelge 4.2 11. ve 17. hafta sonunda kesilen sağlıklı farelerin değerlerinin karşılaştırılması 30
Çizelge 4.3 Dişi ve erkek farelerin değerlerinin karşılaştırılması 30
Çizelge 4.4 Gün ışığı grubu ve kör gruptaki farelerin değerlerinin karşılaştırılması 31
Çizelge 4.5 Sağlıklı ve tümör oluşumu gözlenen farelerin değerlerinin karşılaştırılma 32
Çizelge 4.6 Tümör hacimlerinin (mm^3) haftalara göre değişimi 33
Çizelge 4.7 Deney sonundaki tümör hacimleriyle melatonin, kisspeptin ve *KISS1* değerlerinin karşılaştırılması 34
Çizelge 4.8 Gün ışığı grubundaki ve kör gruptaki farelerin deney sonundaki tümör hacimlerinin karşılaştırılması 35
Çizelge 4.9 Gün ışığı grubundaki ve kör gruptaki farelerin tümör hacimlerinin haftalar içerisindeki değişim oranlarının karşılaştırılması 36

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ARC	Arcuate Çekirdek
BSA	Bovine Serum Albumin
Ct	Threshold Cycle
DEPC	Dietilpyrokarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GME	Gün Işığı-Melanoma-Erkek
GMD	Gün Işığı-Melanoma-Dişi
GnRH	gonadotropik release hormon
GSE	Gün Işığı-Sağlıklı-Erkek
GSD	Gün Işığı-Sağlıklı-Dişi
KME	Kör-Melanoma-Erkek
KMD	Kör-Melanoma-Dişi
KSE	Kör-Sağlıklı-Erkek
KSD	Kör-Sağlıklı-Dişi
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PMSF	Fenylmetansulfonilflorid
Real Time qPCR	Real Time Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RPM	Dakikadaki Rotor Sayısı
SCN	Suprachiasmatic nükleus

ÖZET

Farelerde Gün Işığının Melatonin Hormonu, Kisspeptin Proteini Sentezi, Cilt Kanseri Oluşumu Ve Metastaza Etkisinin İncelenmesi

Melatonin hormonu, hayvanlarda kandaki miktarı gün döngüsü içerisinde ışık miktarıyla ters orantılı olarak değişen bir hormondur. Melatonin miktarındaki sürekli fazlalığın (körlük veya az gün ışığı alan bölgelerde yaşama gibi) cilt kanseri ve meme kanseri gibi bazı kanser tipleriyle ilişkisi bilinmektedir. Kisspeptin proteininin hücre içindeki miktarı kandaki melatonin miktarına bağlı olarak değişmekle birlikte yoğun olarak beynin hipotalamus bölgesindeki hücrelerde üretilmektedir. Kisspeptin melanomalarda ve meme kanserlerinde metastaz süpresörü olarak çalışmaktadır. Yapılan bu çalışmayla, farelerde gün ışığı alım miktarının kandaki melatonin miktarını nasıl etkilediğinin, beynin hipotalamus bölgesindeki hücrelerde bulunan kisspeptin miktarının gün ışığı alım miktarına ve kandaki melatonin miktarına bağlı olarak nasıl değiştiğinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Ek olarak, farelerde cilt kanseri oluşturulmuş ve kanser oluşumu, metastaz oranı, gün ışığı alımı, melatonin hormonunun düzeyi ve kisspeptin proteininin düzeyi arasındaki ilişkiler ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, yeni doğmuş fareler kör grup ve gün ışığı grubu olarak ayrılmış, kör gruptaki fareler karanlık ortamda ve gün ışığı grubundaki fareler 12 saat gündüz 12 saat gece ortamında 17 hafta boyunca yetiştirilmiştir. 11. hafta sonunda farelere melanoma hücre hattı aşılaması yapılmış ve tümör hacimlerinin değişimleri 6 hafta boyunca takip edilmiştir. Deney sonunda farelerin kanlarından melatonin ölçümü ve hipotalamus dokularından Kisspeptin ölçümü yapılmıştır. Ayrıca farelerin hipotalamuslarında *KISS1* geninin transkripsiyon hızı tespit edilmiştir. Çalışmalar sonucunda, kör gruptaki farelerin gün ışığı grubundaki farelere göre melatonin seviyelerinin yüksek, *KISS1* seviyelerinin ise düşük olduğu, tümör oluşumu gözlenen farelerin sağlıklı farelere göre melatonin seviyelerinin düşük, *KISS1* seviyelerinin ise yüksek olduğu, tümör hacimleriyle melatonin seviyeleri arasında ters ve *KISS1* seviyeleri arasında doğru orantılı bir ilişki olduğu ve tümör büyüme hızlarının kör gruptaki farelerde gün ışığı grubundaki farelere göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında, melatoninin ve kisspeptinin kanser oluşumunda önemli birer tümör süpresör olduğu, bu iki önemli elemanın gün ışığı alımından yüksek derecede etkilendiği sonucuna varılmıştır. Bu iki önemli elemanın ayrıca birbirlerinin miktarlarından etkilendiği sonucuna varılmış ancak bu etkinin tek yönlü doğrusal bir etki olmaktan çok, daha komplike ve başka faktörlere göre de değişebilen bir etki olduğu yorumu yapılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Gün ışığı, Kisspeptin, *KISS1*, Melatonin, Melanoma

ABSTRACT

Examination of Effects of Daylight on Melatonin Hormone, Kisspeptin Protein, Skin Cancer Formation and Metastasis in Mice

Melatonin is a hormone whose blood level changes inversely proportional to daylight during day cycle. Relationship of skin and breast cancer with constant redundancy of melatonin (i.e. blindness, living in territories that constantly take less sunlight) is already known. Kisspeptin's cellular level is inversely proportional with melatonin level in blood and it is mostly synthesized by the hypothalamus cells of the brain. Kisspeptin functions as a metastasis suppressor in melanomas and breast cancers. With this study, it is aimed to determine the relationship between daylight and melatonin level in blood, relationship between daylight, blood melatonin level and kisspeptin level in cells which are located at the hypothalamus region of brain. In addition, skin cancer is formed on mice to examine the relationship between cancer formation, metastasis, daylight, melatonin levels and kisspeptin levels. For this purpose, new born mice are separated as blind group and daylight group such that blind group is raised in dark and daylight group is raised in 12 hours light/12 hours dark for 17 weeks. At the end of 11th week, melanoma cell lines are inoculated to mice and tumor growth is observed for 6 weeks. At the end of the experiment, melatonin levels are measured from blood serum and kisspeptin levels are measured from hypothalamus. In addition, transcription levels of *KISS1* gene in hypothalamus tissue is also detected. At the end of this study, blind group is found have higher melatonin levels and lower *KISS1* expression levels with respect to daylight group. Also, melatonin levels are found to be inversely proportional and *KISS1* levels are found to be directly proportional with tumor volumes. Moreover, tumor growth speed is found to be lower in blind group than in daylight group. In the light of these results, melatonin and kisspeptin are shown to be important tumor suppressors and these two important elements are highly affected by daylight. In addition, these two tumor suppressors are also found to be affected by the levels of each other, however, this relationship is speculated to be complicated and affected by other factors too instead of being simple and direct.

Key Words: Daylight, Kisspeptin, *KISS1*, Melatonin, Melanoma

1. GİRİŞ

Melatonin hormonu, epifiz bezi tarafından üretilen, hayvanlarda kandaki miktarı gün döngüsü içerisinde ışık miktarıyla ters orantılı olarak değişen endokrin bir hormondur[1-6]. Melatoninin kandaki miktarının bu değişiklikleri vücuttaki birçok fonksiyonun sirkadyan ritminin düzenlenmesini sağlamaktadır[7,8]. Melatonin hormonunun vücutta metabolizmasını düzenlediği proteinlerden bir tanesi de Kisspeptin proteinidir[9,10]. Kisspeptin proteini *KISS1* geni tarafından sentezlenmektedir ve bu proteinin hücre içindeki miktarı kandaki melatonin miktarına bağlı olarak değişmekle birlikte yoğun olarak beyinin hipotalamus bölgesindeki hücrelerde üretilmektedir [11].

Melatoninin tümör süpresör özellikleri son yıllarda araştırmalara sıklıkla konu olmaktadır. Melatonin hormonunun antioksidan özellikleri, çekirdek DNA'sı ve mitokondriyal DNA'yı koruyucu özellikleri çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir[12-15]. Yapılan farklı hücre kültürü ve hayvan çalışmalarında, melatoninin birçok farklı tümör tipinde süpresör olabileceği vurgulanmıştır[16-18]. Örneğin, vücuttaki melatonin miktarı normal bireylere göre sürekli fazla olan körlerde, diğer bireylere göre meme, mide, cilt gibi birçok kanser tipine yakalanma insidansının daha düşük olduğu yapılan çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir[19-21].

Gün ışığı alımının vücutta sentezlenen melatonin ve kisspeptin miktarını etkilediği bilinmektedir[22]. Vücutta sentezlenen melatonin miktarı aynı zamanda sentezlenen kisspeptin miktarını da değiştirmektedir. Örneğin, günün uzadığı mevsimlerde üreyen fare gibi memelilerde melatonin miktarı azalırken, hipotalamusta bulunan hücrelerde sentezlenen kisspeptin miktarı belirgin şekilde artmaktadır[9,23,24]. Kisspeptinin birincil görevi üreme sezonunun kontrolü olmakla birlikte, etki mekanizması tam olarak bilinmese de antimetastatik bir protein olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir[25-27]. Yapılan çeşitli hücre kültürü ve hayvan deneyi çalışmalarında harici olarak verilen kisspeptinin metastaz miktarını azalttığı belirtilmiştir[28-30].

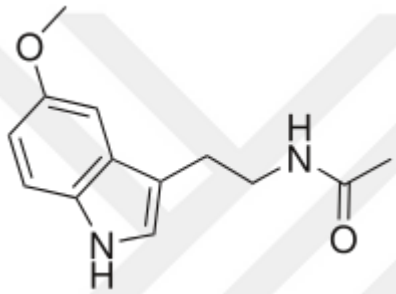
Farklı çalışmalarda, gün ışığı-melatonin, gün ışığı-kisspeptin, metastaz-kisspeptin, kisspeptin-melatonin ilişkileri araştırılmıştır ancak, tüm bunların birbirine bağlı olarak nasıl değişim gösterdiği ile ilgili detaylı bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan bu çalışmayla, farelerde gün ışığı alım miktarının kandaki melatonin miktarını

nasıl etkilediği, beynin hipotalamus bölgesindeki hücrelerde bulunan kisspeptin miktarının gün ışığı alım miktarına ve kandaki melatonin miktarına bağlı olarak nasıl değiştiğinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada buna ek olarak, bir grup farede melanoma hücre hattı kullanılarak cilt kanseri oluşturulmuş, cilt kanseri oluşumunun ve kanser oluşan deneklerdeki metastaz oranının gün ışığı alımı, melatonin hormonunun düzeyi ve kisspeptin proteininin düzeyi ile ilişkisi ortaya konulmaya çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Melatonin Hormonu

Melatonin, kimyasal ismi N-asetil-5-methoksitriptamin olan (Şekil 2.1), ilk olarak hayvanlarda epifiz bezinde keşfedilen bir hormon olmakla birlikte, bitkilerde, mantarlarda ve bakterilerde de bulunabilen bir maddedir[31,32]. Melatonin hayvanlarda uyku zamanının düzenlenmesi, kan basıncının düzenlenmesi, üreme mevsiminin düzenlenmesi gibi sirkadyan ritimlerinin düzenlenmesine ek olarak, bağışıklık sisteminin uyarılması ve hücrenin korunması gibi işlevlere de sahiptir[7,32].

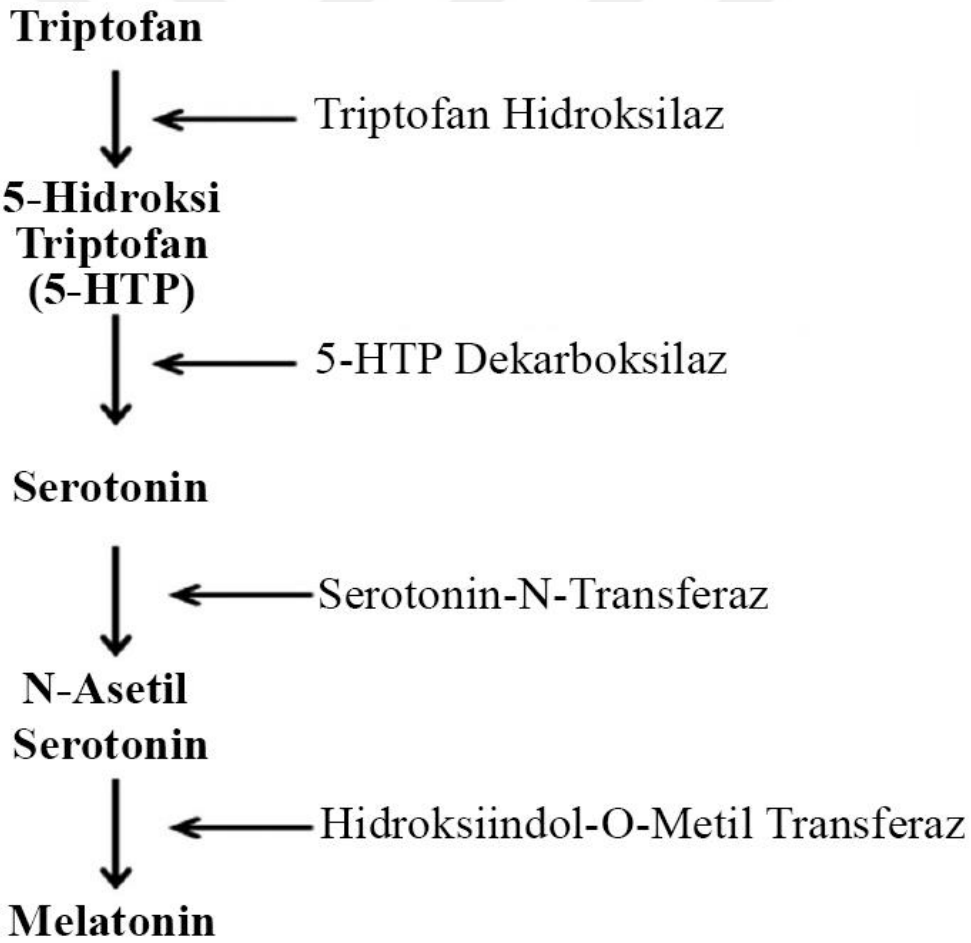


Şekil 2.1 Melatonin (N-asetil-5-methoksitriptamin)

Melatonin hormonu etkilerinden birçoğunu melatonin reseptörlerine bağlanıp onları aktive ederek gösterir[33]. Bu reseptörler başta retina ve beyin olmak üzere kalp, bağırsak, karaciğer ve lenfositlerde bulunabilen M1 ve M2 tipi G Protein-Coupled reseptörlerdir[34]. Diğer etkileri ise antioksidan özelliklerinden kaynaklıdır ve nükleer ve mitokondriyal DNA'nın korunmasında önemli role sahiptir[35].

Melatoninin vücutta sentezlenmesi triptofan amino asidinin hidroksilasyonu ve dekarboksilasyonu yoluyla gerçekleştirilir (Şekil 2.2)[36]. Monoamin kökenli, aminoasitten türetilen bir hormondur. Yapı itibarıyla melatonin amfifilik bir moleküldür ve bu sayede tüm hücrelere rahatça girebilir. Serotoninin serotonin-N-transferaz tarafından N-asetillenmesi sentez hızını belirleyen basamaktır ve bu enzim vücutta hipotalamusta bulunan Suprachiasmatic nükleus (SCN) tarafından kontrol edilir[37]. SCN retinadan sinirler vasıtasıyla sinyal alabilen çekirdeklerden biridir ve geceleyin norepinefrin vasıtasıyla melatonin sentezini kontrol eder. Norepinefrin beta-adrenerjik reseptörler vasıtasıyla hücre içi cAMP seviyelerini artırır ve bu sayede cAMP bağımlı protein kinaz A aktive olur. Aktive olan protein kinaz A, N-asetil transferaz enzimini aktive eder ve

böylece melatonin sentezi artar[37,38]. Gün ışığı alımıyla birlikte beta-adrenerjik reseptörlerin uyarılması durur ve melatonin seviyeleri düşer. Geceleyin kanda melatonin seviyesi artar, sabaha karşı maksimum seviyesine ulaşır ve gün ışığının alınmasıyla birlikte yıkılmaya başlayarak tekrar bazal seviyesine döner[39]. Kandaki bazal melatonin seviyesi yıl içerisinde mevsime göre ve bireylerde yaşa göre değişiklik göstermektedir[40]. Gün ışığının daha çok alındığı mevsimlerde bazal melatonin seviyesi azalırken gün ışığının daha az alındığı mevsimler bazal melatonin seviyesi artmaktadır[41]. Buna ek olarak yaşlanma ile beraber vücuttaki bazal melatonin seviyesinin düştüğü ve buna bağlı olarak yaşlı bireylerde uyku bozukluklarının daha sık görüldüğü bildirilmiştir[42,43]. Ayrıca yaşlı bireylerde melatonin takviyesinin uyku bozuklukları, Parkinson ve Alzheimer hastalıkları üzerinde olumlu etki gösterdiği de çeşitli çalışmalarda tartışılmıştır[44,45].



Şekil 2.2 Melatonin biyosentezi[36]

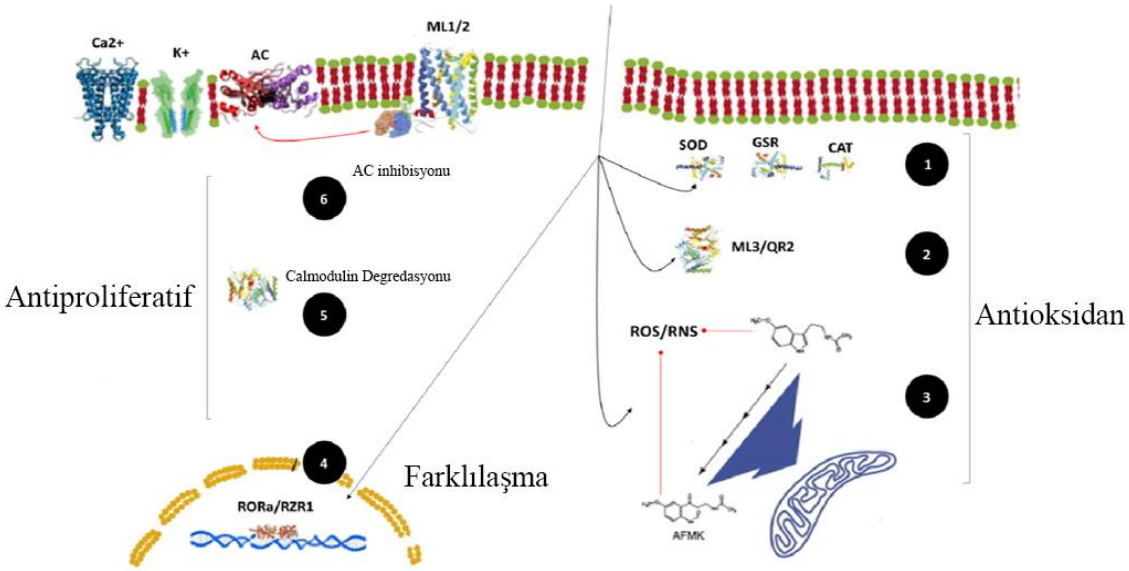
Hangi dalga boyunda ve hangi şiddette ışığın melatonin sentezini azalttığı araştırmacıların ilgisini çeken bir diğer konu olmuştur. Yapılan çalışmalar neticesinde 446–483 nm dalga boyunda mavi ışığın melatonin sentezini en fazla inhibe eden ışık olduğu tespit edilmiştir[46]. Melatonin sentezinin inhibisyonu ile ışık şiddeti arasındaki ilişki daha komplike olmakla birlikte genel kanı ışık şiddeti arttıkça melatonin sentezinin inhibisyonu için gereken sürenin azaldığı yönündedir[47].

Melatonin sirkadyan ritmi düzenlemekte önemli rol aldığından dolayı psikiyatrik hastalıklarda da önemli bir faktördür. Melatoninin sentez ritminin değişmesi, azalması veya artması birçok farklı psikiyatrik probleme yol açabilmektedir. Melatonin seviyelerindeki kronik veya akut değişikliğin mevsimsel depresyon, bipolar bozukluk, unipolar bozukluk, blumia, anoraksi, şizofreni, obsesif kompulsif bozukluk gibi birçok hastalığa yol açtığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir[48-51].

Psikiyatrik etkilerine ek olarak, etki mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte melatoninin radyasyonun etkilerinden koruma, migrene bağlı baş ağrılarını azaltma, safra kesesi taşlarına karşı koruyucu olma gibi birçok farklı özelliği tespit edilmiştir[52-54]. Melatoninin bağışıklık sistemi elemanlarını da olumlu etkilediği bilinmektedir. Fazla melatoninin timüs ağırlığını, dalak ağırlığını, kemik iliğindeki NK ve monositlerin sayılarını ve T hücrelerinin aktivitelerini artırdığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir[55-57].

Sirkadyan ritmin düzenlenmesinin yanında melatoninin en önemli fonksiyonu güçlü bir serbest radikal avcısı olması ve antioksidatif etkisidir[58]. Melatonin serbestçe hücre zarını ve kan-beyin bariyerini geçebilir ve OH^-, O_2^- ve NO^- gibi birçok zararlı serbest radikali yok edebilir[59,60]. Ek olarak, melatonin diğer antioksidanlarla birlikte çalışarak onların etkisini artırır ve melatoninin metabolitleri de antioksidan etki göstererek bir cascade başlatır ve böylece melatoninin antioksidan etkisi yüksek miktarda artar[61,62]. Antioksidatif etkilerinin yanında melatonin aynı zamanda önemli bir pro-apoptotik ajandır ve mitokondrideki kaspaz yolaklarını uyararak neoplastik hücrelerin apoptozunu sağlar[63,64]. Buna ek olarak, melatoninin hücre döngüsünü inhibe ettiği ve bunun sonucunda onkostatik etkilerinin de olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir[65-67]. Ayrıca bazı çalışmalarda melatoninin anjiogenezi engellediği ve kanser hücrelerinde görülen hızlı hücre farklılaşmasını yavaşlattığı/durduğu belirtilmiştir[68-71]. Tüm bu özellikleri göz önüne alındığında melatonin güçlü bir anti-kanser ajanıdır. Kanser üzerine

direkt etkilerinin yanında aynı zamanda bağışıklık sisteminin regülasyonu, antioksidatif etkiler, miyeloprotektif etkiler gibi ikincil etkileriyle de kanserin önlenmesinde önemli bir yere sahiptir[72]. Melatoninin anti-kanser özellikleri Şekil 2.3'de gösterilmiştir.

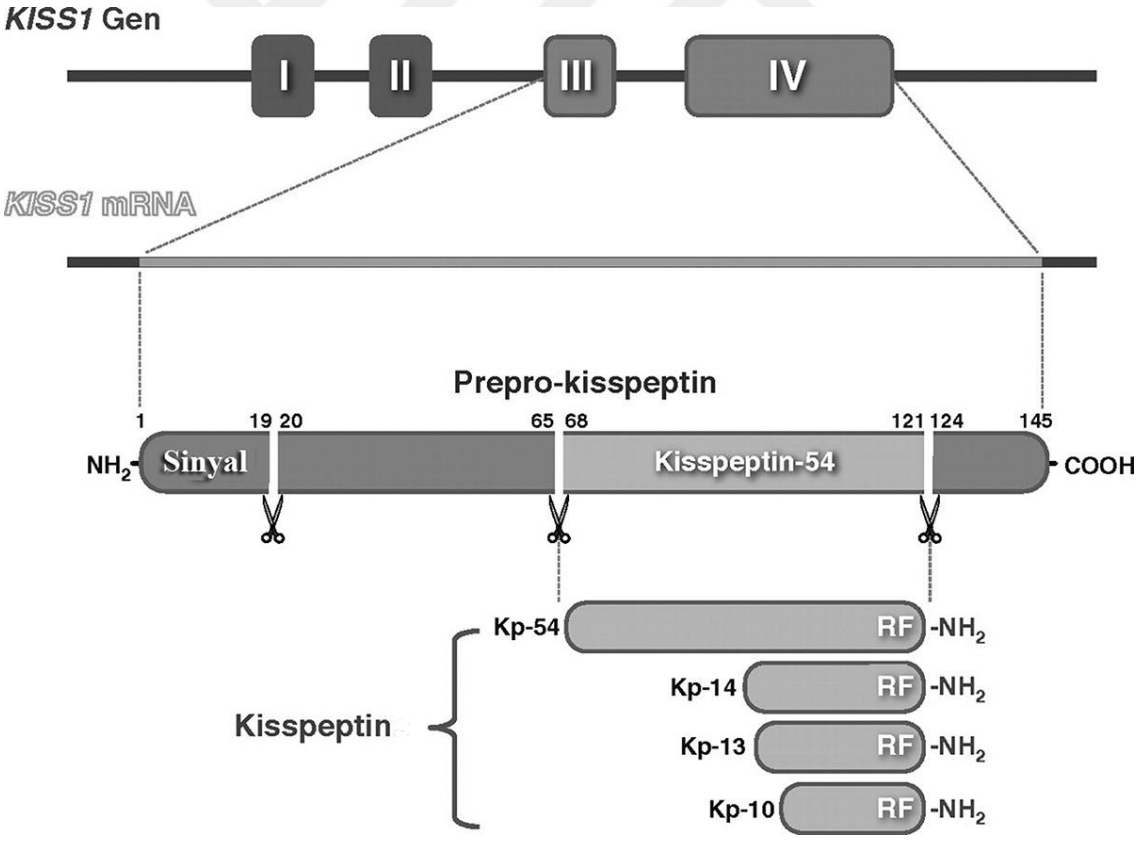


Şekil 2.3 Melatoninin antikanser özellikleri[72]. (1) Anti-oksidant enzim aktivasyonu; (2) ML3 reseptörlerine bağlanma; (3) Direkt antioksidan etki; (4) Gen ekspresyonunun regülasyonu; (5) Calmodulin degredasyonu; (6) AC inhibisyonu. ML1/2: melatonin type reseptör 1-2; SOD: süper oksit dismutaz; GRS: glutatione redüktaz; CAT: katalaz; ML3/QR3: melatonin type reseptör 3/quinone redüktaz 2; AC: adenilat siklaz; ROS: reaktif oksijen türleri; RNS: reaktif nitrojen türleri; AFMK: N(1)-asetil-N(2)-formil-5-methoxykynuramine.

2.2. Kisspeptin Proteini

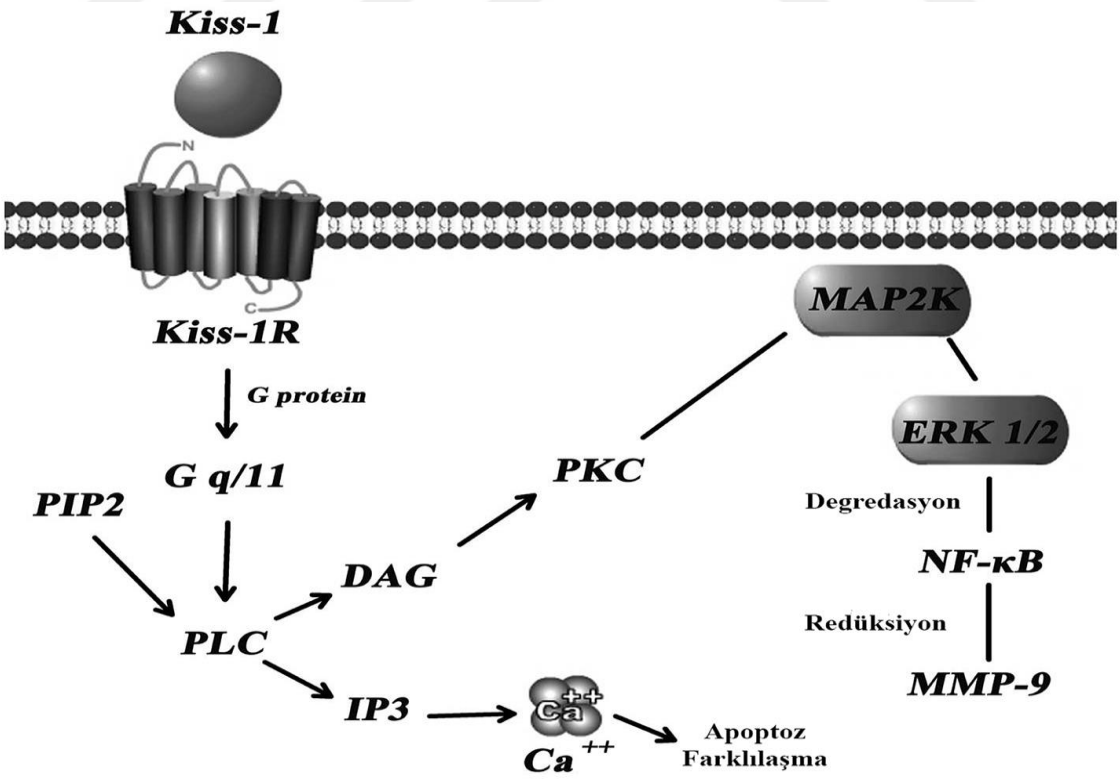
Kisspeptin ilk kez 1996 yılında Lee et al.[26] tarafından insan melanoma hücre hatlarında metastaz inhibitörü olarak keşfedilmiş ve metastin olarak adlandırılmıştır. Lee et al.[26] tarafından yapılan çalışmada insan metastatik melanoma hücre hatlarına sağlam 6. kromozomun eklenmesi sonucu metastazın yüksek oranda azaldığı tespit edilmiş, bu azalmaya neden olduğu düşünülen gen bölgesinin cDNA'sı klonlanmış ve daha sonra metastatik hücre hatlarına kopyalanarak doğruluğu onaylanmıştır. Esasında kopyalanan 6. kromozomun kisspeptinin regülasyonunda görevli genleri içerdiği ise daha sonradan anlaşılmıştır. Kisspeptin ilerleyen yıllarda da antimetastatik özelliklerinden dolayı birçok çalışmaya konu olmuştur.

Kisspeptin proteini *KISS1* geni tarafından sentezlenir. Bu gen insanda 1. kromozom üzerinde (1q32) bulunur ve 4 ekzona sahiptir[73]. Vücutta beyinde ve böbrek üstü bezlerde sentezlenmekle birlikte kisspeptin sentezinin en büyük bölümü hipotalamusta arcuate çekirdek (ARC) ve anteroventral periventriküler çekirdek tarafından yapılır[74,75]. Kisspeptin RF-amid peptidleri kategorinde bir nöropeptiddir ve N-ucunda Arg-Phe-NH_2 motifi görülür[76]. Diğer nöropeptidler gibi öncelikle büyük bir precursor protein olan prepro-kisspeptin (145 amino asit) şeklinde sentezlenir ve daha sonra küçük parçalara kesilerek fonksiyonel hale gelir[77]. Vücutta en çok bulunan ve aktif protein olan en büyük parça kisspeptin-54 olmakla birlikte kisspeptin-54'ün C-ucundan kesilmesiyle oluşan kisspeptin-14, kisspeptin-13, kisspeptin-10 gibi çok sayıda daha küçük kisspeptinlerde vardır ve bu aktif kisspeptinler hücrelerde G-protein coupled reseptörler olan GPR54 reseptörlerine bağlanarak çalışır[28]. Şekil 2.4'de aktif kisspeptinlerin sentezi gösterilmiştir.



Şekil 2.4 İnsanda aktif kisspeptinlerin sentezi[76]

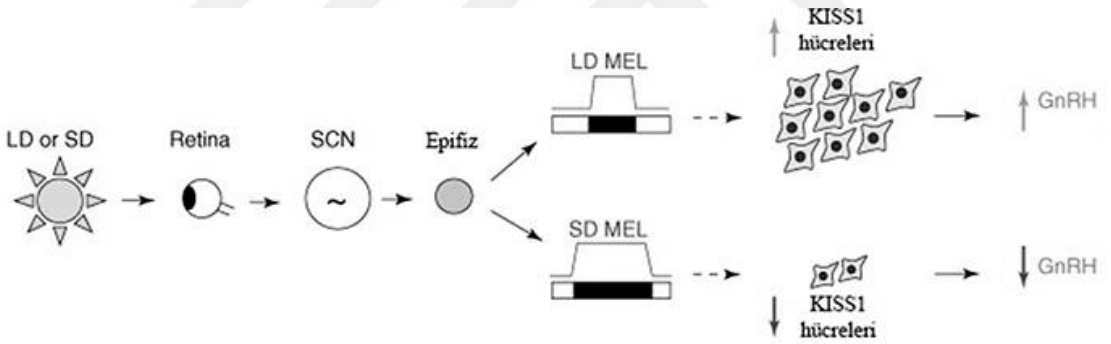
Metastaz bilindiği üzere tek bir olay olmayıp neoplastik hücrelerde hücre-hücre adezyonun azalması, çevre dokuları işgal, anjiogenez, lenfoid veya vasküler sistemde kanser hücrelerinin taşınması, endotelin geçilmesi, yeni bölgeye yerleşme gibi birçok olayı içeren karmaşık bir süreçtir[78]. Kanserin kontrol altına alınması ve tedavisinde metastazın önemli bir yeri vardır. Bu sebeple metastaz süpresör genler ilgi çeken bir araştırma konusu olmaktadır. Günümüzde insanda 20 kadar metastaz süpresör gen tanımlanmış bulunmaktadır ancak bu genlerden sadece *KISS1* geni G-protein coupled reseptörlere bağlanarak etki göstermektedir[79]. Hücrelerin primer tümörden ayrılmasını engelleyerek etki gösteren *Nm23*, *KAI1* gibi metastaz süpresör genlerin aksine, *KISS1* geninin metastaz kaskadında daha geç devreye girerek metastaz bölgesine yerleşen tümörün oluşmasını ve büyümesini engelleyerek etki gösterdiği düşünülmektedir[80-82]. *KISS1* geninin etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, kisspeptinle aktive olan GPR54 reseptörlerinin fosfatidil inositol 4,5 bisfostat hidrolizini, kalsiyum mobilizasyonunu ve *ERK1/2 MAPK* fosforilasyonunu uyardığı ve bu yolla kanser hücrelerinin mobilitesini, çoğalmasını ve bölgeye yerleşmesini inhibe ettiği tahmin edilmektedir (Şekil 2.5)[83,84].



Şekil 2.5 İnsanda kisspeptinin etki mekanizması[84]

Kisspeptinin bir diğer önemli görevi ise ergenliğe giriş, seks hormonlarının düzenlenmesi ve özellikle üreme döngüsünün kontrolüdür. Kisspeptin nöronları beyinde gonadotropik release hormon (GnRH) nöronlarıyla birbirlerine çok yakın şekilde bulunurlar ve GnRH nöronlarında yüksek miktarda kisspeptin reseptörleri bulunur ve busayede kisspeptin GnRH salınımını artırır[85,86]. Bu sebeple kisspeptin hipothalamus-hipofiz-gonad döngüsünde önemli bir elemandır.

Mevsimsel üreyen canlılarda kisspeptin, melatonin ile beraber cinsel aktiviteyi ve üremeyi kontrol eder[87]. Farelerde ve Suriye hamsterlarında yapılan çalışmalarda günlerin uzaması ve gün ışığı alımının artmasıyla beraber melatonin seviyesinin azaldığı, kisspeptin seviyesinin arttığı ve buna bağlı olarak cinsel aktivitenin ve üremenin arttığı gösterilmiştir[88,89]. Aralarındaki ilişki mekanizması tam olarak bilinmemekle melatonin miktarıyla kisspeptin sentezi arasında ters bir ilişki olduğu düşünülmektedir ancak bunun sebepleri tartışmaya açıktır. Şekil 2.6'da gün uzunluğu, melatonin ve kisspeptin arasındaki ilişkinin nasıl olduğu gösterilmiştir.



Şekil 2.6 Suriye hamsterlarında gün uzunluğu, melatonin, kisspeptin arasındaki ilişki[90]. LD: uzun gün; SD: kısa gün; MEL: melatonin; SCN: Suprachiasmatic nükleus.

2.3. Melanoma

Melanoma, vücudu zararlı ultraviyole ışınlardan koruyan melanin pigmentini üreten dendritik hücreler olan melanositlerden köken alan kötü huylu tümörlere verilen isimdir. Melanositlerin bir araya gelmesiyle oluşan yapılara nevus (ben) adı verilir bu yapılar iyi huyludur ancak bu yapıların kötü huylu yapılara transforme olmaları sonucu melanoma ortaya çıkar. Hastalığın ortaya çıkması çevresel faktörlerle birlikte genetik faktörlere de bağlıdır.

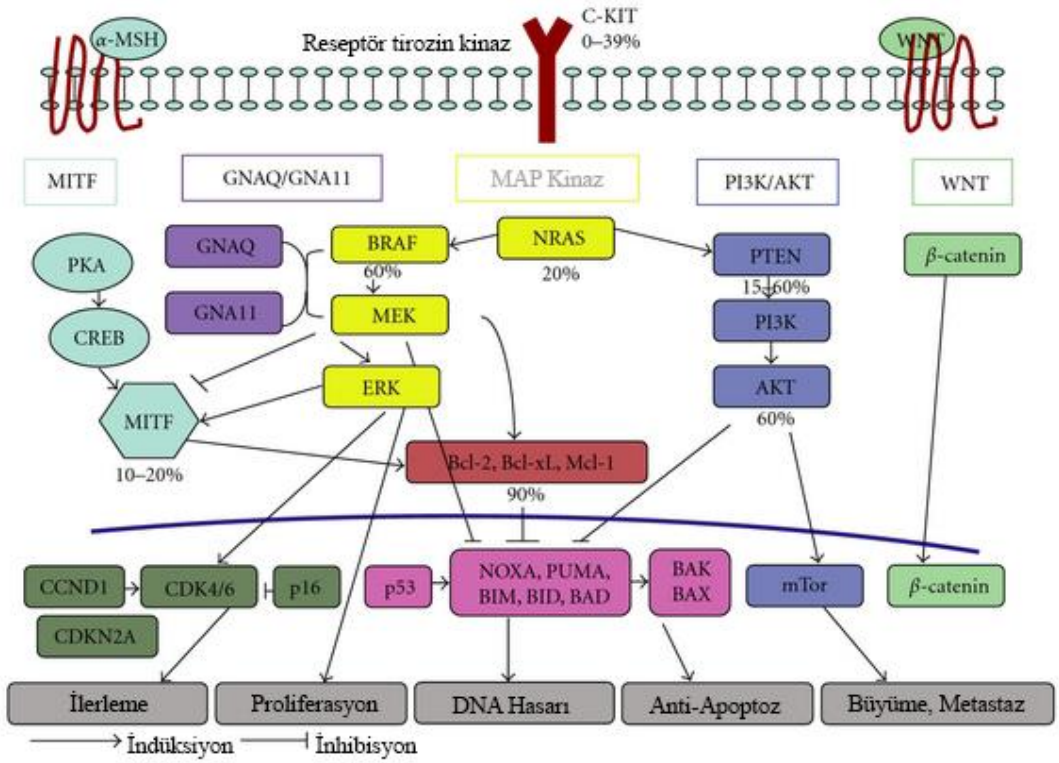
Melanoma tüm cilt kanserleri içerisinde %5 oranla en düşük paya sahip olmasına karşın ölüm oranı en yüksek cilt kanseridir ve cilt kanseri kaynaklı ölümlerin %75'inden sorumludur[91-93]. Melanoma, erken teşhis edilmesi durumda tedavi edilebilmekle birlikte, metastatik melanoma tedavi açısından hala sıkıntılı bir hastalıktır[94].

Melanoma insidansı dünyada ülkeler ve ırklar arasında büyük farklılıklar göstermekle birlikte rastlanma sıklığının en çok arttığı ülkeler Avustralya, Yeni Zelanda ve Kuzey Amerika'dır (%3-7)[92,95,96]. Diğer birçok kanser tipinin aksine melanoma tüm yaştan insanları etkilemektedir. Ortalama melanoma diagnoz yaşı ülkelere göre farklılık göstermekle birlikte 55'in üzerinde olmasına karşın 20-45 yaşları arasında pik yapar ve çocukluk çağı melanomaları ise %2 civarındadır[93,97,98]. Melanomanın erkeklerle kadınlar arasındaki görülme sıklığı hemen hemen eşit olmasına karşın erkekler daha fazla risk altındadır[99].

Melanomanın etiyolojisi henüz tam olarak anlaşılmamasına karşın birçok iç ve dış etken faktörler bilinmektedir. Renkli göz, sarı veya kızıl saç sahibi olmak, açık ten rengi, sık güneşlenmek, ailede daha önce melanoma görülüp görülmediği gibi birçok risk faktörü belirlenmiştir[100]. Çevresel faktörler ise yaşanılan ülke, güneş ışığına maruz kalma süresi, tatil alışkanları gibi çok çeşitlidir[101].

Az görülen bazı genetik mutasyonlar melanoma riskini yüksek oranda artırmaktadır. Bunlardan en bilineni *CDKN2A* geni mutasyonlarıdır. Bu gende meydana gelen mutasyonlarla alternatif bir okuma çerçevesi oluşması p53'ün stabilitesini azaltmakta ve melanoma riskini artırmaktadır[102]. Bu gende meydana gelen mutasyonlar aynı zamanda sentezlenen CDK4 inhibitörünün fonksiyonunu yitirmesine neden olmakta ve hücre bölünmesinin kontrolünü zorlaştırarak melanoma riskini artırmaktadır[103]. Ek olarak, nükleotid çıkarma tamiri mekanizmasında görev alan enzimlerin mutasyonu sonucu ortaya çıkan Xeroderma pigmentosum hastalığına neden olan mutasyonlarda UV radyasyonunun verdiği zararın önlenmesinde rol alan mekanizmaları etkilediğinden melanoma riskini yüksek oranda artırmaktadır[104]. Melanoma riskini yüksek oranda artıran ve nadir görülen bu mutasyonların yanında, popülasyonda daha sık rastlanan ancak melanoma riskini yüksek oranda olmasa da artıran bazı genlerde bilinmektedir. Örnek olarak kızıl saçlı tüm bireylerde bulunan mutant *MC1R* geni melanoma riskini 2-4 kat arası artırmaktadır[105]. Bu genlere ek olarak melanomanın oluşumunun çeşitli evrelerinde mutasyona uğrayan ve etkili olan *BRAF, Bcl-2, NRAS, HRAS, ALK, ROS1,*

NTRK1 gibi çok sayıda gen tanımlanmıştır ve etki mekanizmaları araştırılmaktadır ancak bu genlerin direk melanoma ile mi ilişkili oldukları yoksa genel kanser yolaklarından kaynaklı mutasyonların melanoma potansiyeli taşıyan melanositleri etkilemesi sonucumu melanomaya yol açtıkları tartışmalıdır[106]. Şekil 2.7'de melanoma hastalarında tespit edilen gen mutasyonlarından başlıcaları ve mutasyonların etkilediği yolaklar özetlenmiştir[107].



Şekil 2.7 Melanoma oluşumunda etkin olan gen mutasyonları ve yolaklar[107] (Yüzdelik sayılar melanoma hastalarında bu genlerde mutasyona rastlanma sıklığını göstermektedir)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Yaptığımız çalışmada gün ışığı alım miktarının vücutta sentezlenen melatonin ve kisspeptin miktarını nasıl değiştirdiği, bunun melanoma hücre hattı verilen farelerde kanser oluşumuna nasıl etki ettiği ve son olarak kanser gözlenen farelerde metastaz oranının melatonin ve kisspeptin miktarıyla nasıl bir ilişki gösterdiği ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu amaca uygun olarak, melatonin ve kisspeptin miktarlarının bulunması için Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) metodu, *KISS1* geninin ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için ise Real Time kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time qPCR) metodu kullanılmıştır. Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden etik kurul izni alınarak yapılmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Çalışmamızda kullanılan kimyasal malzemeler, kitler ve kitlerin içerikleri aşağıda belirtilmiştir.

a) Fare Melatonin ELISA Kit (SunredBio)

- Standart Protein Solüsyonu (240 ng/L)
- Standart Seyreltici
- Mikro ELISA Plate
- Str-HRP-Conjugate
- Yıkama Solüsyonu
- Biyotin-(MT)-Ab
- Chromogen A Solüsyonu
- Chromogen B Solüsyonu
- Stop Solüsyonu

b) Fare *KISS1* ELISA Kit (SunredBio)

- Standart Protein Solüsyonu (3200 pg/mL)
- Standart Seyreltici
- Mikro ELISA Plate
- Str-HRP-Conjugate
- Yıkama Solüsyonu
- Biyotin-(*KISS1*)-Ab

- Chromogen A Solüsyonu
- Chromogen B Solüsyonu
- Stop Solüsyonu

c) Saf Su

d) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Life Tech)

e) Phosphate-buffered saline (PBS) (Life Tech)

f) Trizol (Invitrogen)

g) Kloroform (Merck)

h) İzopropanol (Merck)

i) Etil Alkol (Merck)

j) High-Capacity cDNA Reverse Transkripsiyon Kiti (Applied Biosystems)

- 10X Reverse Transkriptaz Tamponu
- 25X Deoksiribonükleotit trifosfat (dNTP)
- 10X Reverse Transkriptaz Random Primer
- MultiScribe™ Reverse Transkriptaz

k) *KISS1* TaqMan® Gen Ekspresyon Assay (Applied Biosystems)

- 20X TaqMan Gene Expression Assay

l) TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

- AmpliTaq Gold® DNA Polimeraz
- Uracil-N glikosilaz
- dNTP ve dUTP
- ROX™ Referans
- Tampon Çözelti

m) Dietilpyrokarbonat (DEPC) ile muamele edilmiş su (Merck)

n) Bovine Serum Albumin (BSA)

o) Radio-Immunoprecipitation Assay (RIPA) Buffer

p) Fenylmetansulfonilflorid (PMSF)

q) Sodyum Vanadat

r) Proteaz İnhibütörü

s) Bradford Solüsyonu

3.2. Kullanılan Aygıtlar

Çalışmamızda kullanılan aygıtlar, araçlar ve gereçler aşağıda belirtilmiştir.

a) Steril Enjektörler (1 ml'lik) (Beybi)

b) T75 Hücre Kültürü Flaskı (Sigma)

c) Fare Kafes Seti (Radon)

d) Vacutainer Kan Toplama Tüpleri (Becton Dickinson)

e) Steril PCR Tüpleri (Axygen)

f) Steril Tüpler (1.5 mL) (Eppendorf)

g) Mikro pipet (Gilson)

h) Mikro pipet Ucu (Expell Plus)

i) Hassas Tartı (Sartorius)

j) Santrifüj Cihazı (Nüve)

k) Etüv (Nüve)

l) Thermal Cycler (Eppendorf)

m) ELISA Mikro Plate Okuyucu (Rayto)

n) ELISA Mikro Plate Yıkayıcı (Rayto)

o) Işık Ölçer (Sekonik)

p) Ultrasonik Sonikasyon Cihazı (Bandelin)

q) 7500 Real Time qPCR cihazı (Applied Biosystems)

r) Laminar Flow Kabini

s) Milimetrik Kaliper

3.3. Kullanılan Bilgisayar Yazılımları

Çalışmamızda veri analizi ve istatistiksel analiz için kullanılan bilgisayar yazılımları aşağıda belirtilmiştir.

SPSS 20.0[108] (IBM Corp.)

Excel 2016 (Microsoft)

3.4. Farelerin Gruplandırılması, Yetiştirilmesi ve Deney Akışı

Deneylerde Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden sağlanan balb/c albino türü fareler kullanıldı. Çalışmaya dahil edilen fareler yaş ve cinsiyet kriterlerini sağlayan fareler içerisinden rastgele şekilde

seçildi. Yaş ve cinsiyet dışında farelerin çalışmada kullanılması için herhangi bir dahil edilme veya dışlama kriteri kullanılmadı.

a) Eşit sayıda dişi ve erkek fareden (her grup için 24 erkek, 24 dişi fare) 2 ayrı grup (toplamda 96 fare) oluşturuldu. Bu gruplardan birincisi "Kör Grup" olarak adlandırdığımız, hiç ışık almadan (0 lüks ışık) büyümeleri sağlanan grup oldu. Diğeri ise "Gün Işığı Grubu" olarak adlandırdığımız, normal gün ışığı alan (4000 lüks) (12 saat gündüz, 12 saat gece) grup oldu (Çizelge 3.1).

b) Kör Grup ve Gün Işığı Grubu yine eşit sayıda dişi ve erkek farelerden oluşan 2'şer ayrı gruba bölündü. Bu gruplardan birincisi "Melanoma Grubu" olarak adlandırdığımız ve melanoma hücre hatlarının deri altlarına aşılanacağı grup (18 erkek, 18 dişi fare), diğeri ise "Sağlıklı Grup" olarak adlandırdığımız ve melanoma aşılaması yapılmayacak grup oldu (6 erkek, 6 dişi fare). Oluşturulacak gruplar ve adlandırılmaları Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Fare deney grupları

Yeni Doğmuş Fareler (48 erkek, 48 dişi)							
Kör Grup (24 erkek, 24 dişi)				Gün Işığı Grubu (24 erkek, 24 dişi)			
Melanoma Grubu		Sağlıklı Grup		Melanoma Grubu		Sağlıklı Grup	
18 erkek	18 dişi	6 erkek	6 dişi	18 erkek	18 dişi	6 erkek	6 dişi
Kısaltma **KME**	Kısaltma **KMD**	Kısaltma **KSE**	Kısaltma **KSD**	Kısaltma **GME**	Kısaltma **GMD**	Kısaltma **GSE**	Kısaltma **GSD**

c) Oluşturulan gruplarda kullanılan farelerden kör gruba dahil olanlar doğumlarından sonra 1. hafta sonunda, henüz görme becerileri gelişmeden, karanlık odaya alındı. Tüm fareler 3. hafta sonunda (emzirmenin bittiği dönem) annelerinden ayrılarak ve ilgili gruplara ait kafeslere konuldu ve çalışma başlatıldı. Farelerde görme, doğumdan sonra 10-14'üncü günler arası başladığından bu sayede kör grupta doğuştan meydana gelen körlük taklit edilmiş oldu[109].

d) Oluşturulan gruplarda dişi ve erkek fareler her zaman ayrı kafeslerde muhafaza edilerek çiftleşmeleri engellendi. Farelerin kafes ortamındaki kalabalıktan etkilenmemeleri için deney süresince bir kafeste en fazla 6 fare muhafaza edildi.

e) Gruplar oluşturulduktan ve annelerinden ayrıldıktan sonra, fareler uygun yetişme şartlarında (oda sıcaklığı, yiyecek, su, havalandırma) kendilerine ayrılan kafeslerinde 8 hafta süresince (11 haftalık olana kadar) yetiştirildi.

f) 8 hafta sonra (11 haftalık farelerden) her iki sağlıklı grupta bulunan farelerin yarısı alınarak (her sağlıklı grup için 3 erkek 3 dişi) bu farelerden Vacutainer tüplere kan örneği alındı (KSE-1-2-3, KSD-1-2-3, GSE-1-2-3 ve GSD-1-2-3). Kan örnekleri +4 ^{0}C sıcaklıkta 1500 g'de santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve bu serumlar kandaki melatonin hormonunun miktarları ölçülmek üzere -80 ^{0}C'de muhafaza edildi. Daha sonra bu fareler dekapitasyon uygulanarak öldürüldü, diseksiyon mikroskobu altında hipotalamusları çıkarıldı ve çıkarılan dokular ikiye bölünerek kisspeptin proteini miktarları ve ekspresyon düzeyleri ölçülmek üzere -80 ^{0}C'de muhafaza edildi. Bu sayede 8 hafta sonunda gün ışığı alımının melatonin ve kisspeptin miktarlarını nasıl etkilediğinin bulunması amaçlandı.

g) 8 hafta sonunda (fareler 11 haftalık iken) hem gün ışığı grubu hem de kör grupta bulunan melanoma alt gruplarındaki farelere B16F10 melanoma hücre hattı deri altlarına enjekte edilerek bu gruplarda deri kanseri oluşumu sağlanması amaçlandı.

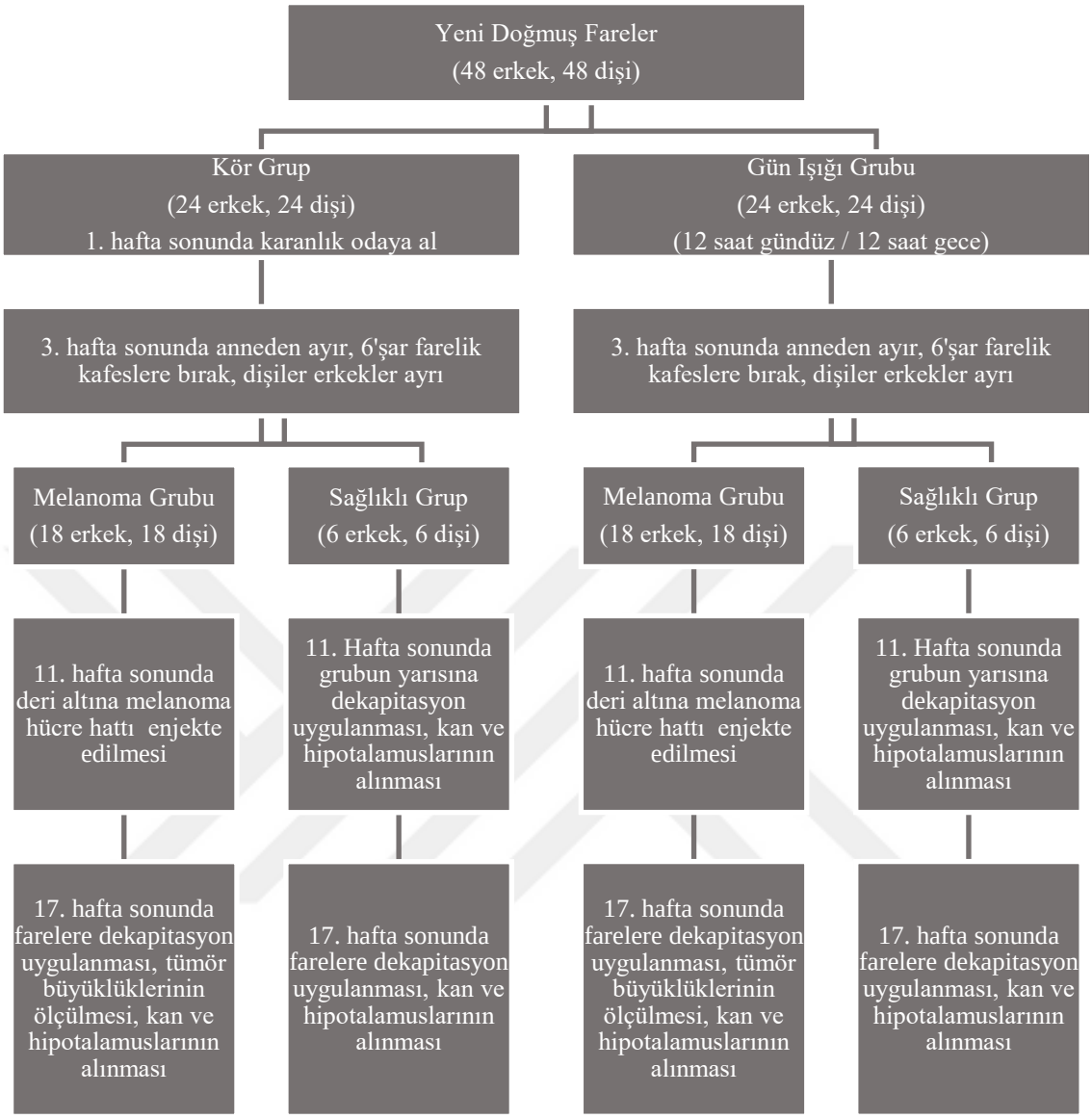
h) Melanoma hücre hattı enjeksiyonunun ardından fareler yine belirtilen koşullarda 6 hafta süreyle (fareler 17 haftalık olana kadar) yetiştirilmeye devam edildi. Bu sırada tümör oluşan farelerde tümör boyutları haftalık olarak kaliper yardımıyla ölçüldü.

i) 6 hafta sonunda (fareler 17 haftalık iken) melanoma hücre hattı enjekte edilen farelerin derilerindeki tümör büyüklükleri incelendi ve oluşan tümörlerin büyüklükleri orthogonal olarak hesaplandı.

j) 6 hafta sonunda (fareler 17 haftalık iken) kalan tüm farelerden Vacutainer tüplere kan örneği alındı. Kan örnekleri +4 ^{0}C sıcaklıkta 1500 g'de santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve bu serumlar kandaki melatonin hormonunun miktarları ölçülmek üzere -80 ^{0}C'de muhafaza edildi. Daha sonra bu fareler dekapitasyon uygulanarak öldürüldü, diseksiyon mikroskobu altında hipotalamusları çıkarıldı ve çıkarılan dokular ikiye bölünerek kisspeptin proteini miktarları ve ekspresyon düzeyleri ölçülmek üzere -80 ^{0}C'de muhafaza edildi. Buna ek olarak farelerin iç organları yine diseksiyon mikroskobunda incelendi ve kanserin metastaz yapıp yapmadığı tespit edilmeye çalışıldı.

k) Son olarak elde edilen veriler objektif bir şekilde analiz edilerek ve uygun istatistik yöntemlerle değerlendirildi.

l) Deney akışı Şekil 3.1'de özetlenmeye çalışılmıştır.



Şekil 3.1 Deney akışı özeti

3.5. Melanoma Hücre Hatlarının Hazırlanması ve Enjeksiyonu

Hücre hatlarının hazırlanması ve enjeksiyonunda Overwijk ve Restifo[110] tarafından hazırlanan protokol ihtiyaçlarımızı karşılayacak şekilde değiştirilerek kullanılmıştır. Farelerde melanoma oluşturmak için hızlı gelişen ve metastatik bir tip olan B16F10 melanoma hücre hattı tercih edilmiştir.

a) B16F10 melanoma hücre hattının, T75 flask içerisindeki DMEM besi yeri üzerine ekimi yapıldı.

b) İkinci gün besi yeri uzaklaştırıldı, sonrasında PBS ile yıkama yapıldı ve besi yeri değiştirildi.

c) İlerleyen günlerde hücrelerin takibi yapıldı ve hücreler flask yüzeyini %60-70 kapladığı durumda pasaj yapıldı. Pasaj yapılırken besi yeri yapışkan hücrelerin üzerinden hücrelere zarar vermeden uzaklaştırıldı.

d) 14'üncü günde flasklardan besi yeri uzaklaştırılıp PBS ile yıkama yapıldı ve flaskların üzerine 5 ml Tripsin eklendi ve hücreler yüzeyden yaklaşık 1,5 dk sonra söküldü.

e) Hücrelerin üzerine tekrar DMEM besi yeri eklendi ve 3 dk 1000 RPM'de santrifüj edildi.

f) Elde edilen hücreler, hücre sayımı yapılarak 10^6 hücre/mL olacak şekilde DMEM ile seyreltildi.

g) Enjeksiyonlar farelerin karın bölgelerine, deri altı (subkutan) olarak uygulandı.

h) Enjeksiyon yapılacak bölge az miktarda etil alkolle ıslatılarak hem tüylerin yapışıp derinin daha kolay görünmesi sağlandı hem de enjeksiyondan sonra farelerin bölgeyi ağızlarıyla tahriş ederek enjekte edilen sıvıyı dışarı çıkmaya zorlamaları önlenmeye çalışıldı.

i) Hazırlanan melanoma hücre solüsyonu insülin enjektörüyle her fareye 100 µL (10^5 hücre) olacak şekilde enjekte edildi.

3.6. Tümör Boylarının Ölçülmesi ve Hacimlerinin Hesaplanması

Tümör boyları, tümör oluşan farelerde tümörün oluşmasının ardından her hafta düzenli olarak ölçüldü. Ölçüm en uzun enine (genişlik) ve boyuna (uzunluk) kesit arasında yapıldı. Bu iki kesit arasından kısa olan kesit genişlik, uzun olan kesit ise uzunluk olarak alındı. Tümör hacimlerinin hesaplanması için aşağıda belirtilen elipsoit formül kullanıldı[111,112].

Tümör Hacmi = (genişlik x genişlik x uzunluk) / 2

3.7. Melatonin ELISA Deneyi

Farelerin kanlarında bulunan melatonin miktarının tayini için SunredBio markalı ELISA kiti kullanıldı ve kit içerisinden çıkan protokol uygulandı. ELISA protokolü kullanılarak elde edilen absorbance verilerinden Excel programı yardımıyla örneklerdeki melatonin miktarı hesaplandı.

3.7.1. ELISA Platelerin Hazırlanması ve Absorbance Ölçümü

a) -80 ^{0}C'den çıkarılan serumlar eriyene kadar beklendi.

b) Kit içerisinden çıkan standart protein solüsyonu (240 ng/L) ve standart seyreltici kullanılarak Standart 1 (7.5 ng/L), Standart 2 (15 ng/L), Standart 3 (30 ng/L), Standart 4 (60 ng/L) ve Standart 5 (120 ng/L) solüsyonları Eppendorf tüpler içerisine hazırlandı.

c) ELISA plate üzerindeki boş (Blank) kuyucuğu boş bırakıldı. Standart 1-2-3-4-5 kuyucuklarından her birine 50 µL aynı numaralı standart solüsyonu ve 50 µL Streptavidin-HRP eklendi.

d) ELISA plate üzerindeki örnek kuyucuklarından her birine, 40 µL serum örneği, 10 µL Biotin-(MT)Ab ve 50 µL Streptavidin-HRP eklendi.

e) ELISA plate üzeri membranla kapatılıp hafifçe çalkalandıktan sonra 37 ^{0}C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.

f) İnkübasyon süresinin ardından ELISA plate üzerindeki membran çıkarıldı ve ELISA plate yıkama cihazı içerisine alındı. Kit içerisinde bulunan yıkama tamponu kullanılarak cihaz içerisinde ELISA plate 3 kez yıkandı.

g) Yıkama işleminin ardından tüm kuyucuklara (blank ve standart kuyucuklarıda dahil) 50 µL Chromogen A solüsyonu ve 50 µL Chromogen B solüsyonu eklendi.

h) ELISA plate üzeri membranla kapatılıp hafifçe çalkalandıktan sonra 37 ^{0}C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

i) İnkübasyon süresinin ardından tüm kuyucuklara (blank ve standart kuyucuklarıda dahil) 50 µL Stop solüsyonu eklendi.

j) ELISA plate daha sonra kuyucukların Absorbance miktarları ölçülmek üzere mikro plate okuyucu cihazında 450 nm dalga boyunda yürütüldü.

3.7.2. Melatonin Hormonu Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

a) Tüm kuyucukların absorbance değerlerinden boş (blank) kuyucuğunun absorbance değeri çıkarıldı.

b) Daha sonra, standart kuyucukların absorbance değerlerinin ve bilinen konsantrasyonlarının doğal logaritması (ln) alındı. Elde edilen değerler kullanılarak Microsoft Excel programında lineer regresyon grafiği çizildi ve grafiğin denklemi elde edildi [ln(konsantrasyon) = 1,3514 x ln(absorbance) + 3,6779] (R^2 = 0,99).

c) Konsantrasyonu bilinmeyen örnek kuyucuklarının elde edilen absorbance değerlerinin doğal logaritması alınarak denklemde yerine koyuldu ve ln(konsantrasyon) değerleri hesaplandı.

d) Son olarak ln(konsantrasyon) değerleri ve sabit "e" sayısı kullanılarak melatonin konsantrasyon değerleri elde edildi.

3.8. Kisspeptin ELISA Deneyi

Farelerin hipotalamuslarında bulunan kisspeptin miktarının tayini için SunredBio markalı ELISA kiti kullanıldı ve kit içerisinden çıkan protokol uygulandı. Dokular homojenize edildikten sonra homojenatlarda bulunan total protein tayini için Bradford protein assay metodu uygulandı[113]. ELISA protokolü kullanılarak elde edilen absorbance verilerinden Excel programı yardımıyla örneklerdeki kisspeptin miktarı hesaplandı. Elde edilen protein konsantrasyonları Bradford protein assay kullanılarak elde edilen total protein miktarlarına göre standardize edildi.

3.8.1. Doku Homojenizasyonu

a) 20 mL RIPA, 200 µL PMSF, 200 µL sodyum vanadat ve 200 µL proteaz inhibitörü bir tüpte karıştırılarak homojenizasyon sıvısı hazırlandı.

b) -80 ^{0}C'den çıkarılan dokuların üzerine 200'er µL hazırlanan homojenizasyon sıvısından eklendi.

c) Dokular sonifikasyonla buz üzerinde parçalandı ve homojenatlar elde edildi.

d) Homojenatlar 10000 RPM'de 10 dakika santrifüj edildi.

e) Santrifüj sonunda pelletler atıldı ve süpernatantlar yeni tüplere alındı.

3.8.2. Bradford Protein Assay

a) BSA protein solüsyonu saf su kullanılarak seyreltildi ve Standart 1 (0,03125 µg/mL), Standart 2 (3,125 µg/mL), Standart 3 (6,25 µg/mL), Standart 4 (12,5 µg/mL) ve Standart 5 (25 µg/mL) solüsyonları Eppendorf tüpler içerisine hazırlandı.

b) Hazırlanan her bir homojenat örneğinden 10 µl alınarak ilgili kuyucuklara eklendi.

c) Boş plate üzerindeki boş (Blank) kuyucuğu boş bırakıldı. Standart 1-2-3-4-5 kuyucuklarından her birine 10 µL aynı numaralı standart solüsyonu eklendi.

d) Tüm kuyucukların üzerine 100 µL Bradford solüsyonu eklendi.

e) Plate daha sonra kuyucukların absorbance miktarları ölçülmek üzere mikro plate okuyucu cihazında 595 nm dalga boyunda yürütüldü.

3.8.3. ELISA Platelerin Hazırlanması ve Absorbance Ölçümü

a) Kit içerisinden çıkan standart protein solüsyonu (3200 pg/mL) ve standart seyreltici kullanılarak Standart 1 (100 pg/mL), Standart 2 (200 pg/mL), Standart 3 (400 pg/mL), Standart 4 (800 pg/mL) ve Standart 5 (1600 pg/mL) solüsyonları Eppendorf tüpler içerisine hazırlandı.

b) ELISA plate üzerindeki boş (Blank) kuyucuğu boş bırakıldı. Standart 1-2-3-4-5 kuyucuklarından her birine 50 µL aynı numaralı standart solüsyonu ve 50 µL Streptavidin-HRP eklendi.

c) ELISA plate üzerindeki örnek kuyucuklarından her birine, 40 µL homojenat örneği, 10 µL Biotin-(*KISS1*)Ab ve 50 µL Streptavidin-HRP eklendi.

d) ELISA plate üzeri membranla kapatılıp hafifçe çalkalandıktan sonra 37 ^{0}C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.

e) İnkübasyon süresinin ardından ELISA plate üzerindeki membran çıkarıldı ve ELISA plate yıkama cihazı içerisine alındı. Kit içerisinde bulunan yıkama tamponu kullanılarak cihaz içerisinde ELISA plate 3 kez yıkandı.

f) Yıkama işleminin ardından tüm kuyucuklara (blank ve standart kuyucuklarıda dahil) 50 µL Chromogen A solüsyonu ve 50 µL Chromogen B solüsyonu eklendi.

g) ELISA plate üzeri membranla kapatılıp hafifçe çalkalandıktan sonra 37 ^{0}C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

h) İnkübasyon süresinin ardından tüm kuyucuklara (blank ve standart kuyucuklarıda dahil) 50 µL Stop solüsyonu eklendi.

i) ELISA plate daha sonra kuyucukların Absorbance miktarları ölçülmek üzere mikro plate okuyucu cihazında 450 nm dalga boyunda yürütüldü.

3.8.4. Kisspeptin Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

a) Öncelikle Bradford protein assay ve kisspeptin ELISA deneyleri için tüm kuyucukların absorbance değerlerinden boş (Blank) kuyucuklarının absorbance değeri çıkarıldı.

b) Daha sonra, her iki deney içinde standart kuyucukların absorbance değerlerinin ve bilinen konsantrasyonlarının doğal logaritması (ln) alındı. Elde edilen değerler

kullanılarak Microsoft Excel programında lineer regresyon grafikleri çizildi ve grafiklerin denklemleri elde edildi.

Bradford protein assay için: ln(konsantrasyon) = 2,255 x ln(absorbance) + 3,4276 (R^2= 0,97)

Kisspeptin ELISA için: ln(konsantrasyon) = 1,6053 x ln(absorbance) + 7,0011 (R^2= 0,99)

c) Konsantrasyonu bilinmeyen örnek kuyucuklarının elde edilen absorbance değerlerinin doğal logaritması alınarak denklemde yerine koyuldu ve ln(konsantrasyon) değerleri hesaplandı.

d) Son olarak ln(konsantrasyon) değerleri ve sabit "e" sayısı kullanılarak örneklerdeki total protein ve kisspeptin proteini konsantrasyon değerleri elde edildi.

e) Bradford protein assay ile bulunan tüm total protein konsantrasyonları, bu assay ile tespit edilen en küçük konsantrasyon değerine bölünerek çarpan sayıları elde edildi.

İlgili örneğin ELISA yöntemi ile bulunan Kisspeptin protein konsantrasyonu, bu çarpan değerlerine bölünerek sonuçlar standardize edildi ve Kisspeptin protein konsantrasyonları belirlendi.

3.9. Real Time qPCR Deneyi

Çalışmamızda *KISS1* geni için tasarlanan FAM boyalı prob içeren TaqMan Gen Ekspresyon Assayi kullanılarak Real Time qPCR gerçekleştirildi ve bu sayede örneklerden alınan hipotalamuslardaki *KISS1* geninin ekspresyon düzeyleri ölçüldü. RNA izolasyonu için Trizol metodu kullanıldı[114]. cDNA sentezi için Applied Biosystems marka High-Capacity cDNA Reverse Transkripsiyon Kiti kullanıldı ve kit içerisinden çıkan protokol uygulandı.

3.9.1. RNA İzolasyonu

a) -80 ^{0}C'den çıkarılan dokuların üzerine 500'er µL Trizol eklendi.

b) Örnekler daha sonra homojenizasyon ve hücrelerin parçalanması için sonifikasyona tabi tutuldu.

c) Homojenize edilen örnekler -20 ^{0}C'de bir gece bekletildi.

d) Ertesi gün -20 ^{0}C'den çıkarılan örnekler buz üzerinde çözüldükten sonra 15 saniye vortekslendi ve +4 ^{0}C'de 12000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Pelletler atıldı ve süpernatantlar yeni bir tüpe aktarıldı.

e) Yeni tüpe aktarılan süpernatantlar üzerine 100'er µL kloroform eklendi, 15 saniye vortekslendi ve 5 dakika buz üzerinde bekletildi.

f) Örnekler +4 ^{0}C'de 12000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından örneklerde 3 ayrı faz gözlendi. En altta DNA'nın bulunduğu kırmızı (fenol-kloroform) faz, ortada proteinlerin bulunduğu beyaz faz ve en üstte RNA'nın bulunduğu saydam faz.

g) Örneklerde bulunan saydam fazlar yeni tüplere aktarıldı, üzerlerine 250'şer µL izopropanol eklendi, 15 saniye vortekslendi ve 5 dakika buz üzerinde bekletildi.

h) Örnekler +4 ^{0}C'de 12000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu sayede RNA'lar çöktürülmüş oldu.

i) Süpernatantlar atıldı ve pelletlerin üzerlerine %75'lik (DEPC ile seyreltilmiş) -20 ^{0}C'de tutulan 500'er µL etil alkol eklendikten sonra pipetaj yapılarak pellet çözüldü. Bu sayede RNA'lar yıkanmış oldu.

j) Örnekler +4 ^{0}C'de 7500 g'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkanmış RNA'lar çöktürüldü. Süpernatantlar atıldıktan sonra tüpler buz üzerinde ağzı açık şekilde kalan etil alkol buharlaşana kadar bekletildi.

k) Pelletlerin üzerine 20'şer µL DEPC eklenerek RNA'lar çözüldü ve örnekler -80 ^{0}C'de saklandı.

3.9.2. cDNA Sentezi

a) Kit bileşenleri ve RNA'lar buz üzerinde çözülmeye bırakıldı.

b) Çözülme tamamlandıktan sonra 2X RT master miks her örnek için Çizelge 3.2'de belirtilen miktarlarda olacak şekilde 100 örnek için hazırlandı.

c) Her PCR tüpüne 10 µL 2X RT master miks ve 10 µL RNA eklendi. PCR tüpleri thermal cycler cihazına yerleştirildi ve Çizelge 3.3'de belirtilen program çalıştırıldı.

d) Program sonunda elde edilen cDNA'lar -80 ^{0}C'de saklandı.

Çizelge 3.2 2X RT master mix bileşenleri ve miktarları

2x RT Master Mix Bileşenleri	**Kullanılan miktar**
10X RT Buffer	2.0 µL
25X dNTP karışımı	0.8 µL
10X RT Random Primer	2.0 µL
MultiScribeTM Reverse Transcriptase	1.0 µL

Çizelge 3.2 (Devamı)

Nükleaz içermeyen Su	4.2 µL
1 reaksiyon için toplam hacim	10 µL

Çizelge 3.3 cDNA eldesi için Thermal Cycler'da kullanılan program

	1.Aşama	2.Aşama	3.Aşama	4.Aşama
Sıcaklık	25 ºC	37 ºC	85 ºC	4 ºC
Zaman	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

3.9.3. Real Time qPCR

a) Kit bileşenleri ve RNA'lar buz üzerinde çözülmeye bırakıldı.

b) Çözülme tamamlandıktan sonra Real Time qPCR karışımı her örnek için Çizelge 3.4'de belirtilen miktarlarda hazırlandı.

c) Hazırlanan PCR karışımları 96'lık plate içerisine aktarıldı.

d) Plate'in üstü şeffaf filmle kapatıldı ve üzerine koruyucu örtü yerleştirildi.

e) Plate Applied Biosystems 7500 Real Time qPCR cihazına yüklendi. Cihazın programı Çizelge 3.5'deki gibi ayarlandı ve çalıştırıldı.

Çizelge 3.4 Real Time qPCR reaksiyonunun bileşenleri ve miktarları

Real Time qPCR bileşenleri	**Kullanılan miktar**
20X TaqMan Gene Expression Assay	1.0 µL
2X TaqMan Universal PCR Master Mix	10.0 µL
cDNA örneği	4.0 µL
RNAaz içermeyen su	5.0 µL
Her reaksiyon için toplam hacim	20 µL

Çizelge 3.5 Applied Biosystems 7500 Real Time qPCR için kullanılan program

Isı Döngüsü Koşulları		
Aşama	Sıcaklık (ºC)	Zaman(dd:ss)
Hold	50	2:00
Hold	95	10:00

Çizelge 3.5 (Devamı)

Döngü	95	0:15
(40 Döngü)	60	1:00

3.9.4. Real Time qPCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Ekspresyon düzeylerini belirlemek için threshold cycle (Ct) değerleri arasındaki farklılıklar ölçülür[115]. Ct değeri bize üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. Ct sistem başladığı andan itibaren, logaritmik oranda ürün oluşması sonucu logaritmik lineer faza geçiş noktasıdır[116]. *KISS1* geninin ekspresyon düzeyini belirlemek için ΔCt yöntemi kullanıldı[117]. Sonuçlar aşağıdaki formül kullanılarak değerlendirildi;

ΔCt= Ct hedef gen - Ct referans gen

ΔΔCt= ΔCt örnek - ΔCt kontrol

Oran = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

3.10. İstatistiksel Analiz

Tüm örnekler için tümör hacimleri, melatonin konsantrasyonları, kisspeptin konsantrasyonları ve *KISS1* ekspresyon seviyeleri tespit edildikten sonra bu veriler bağımsız t-testi, two-way ANOVA ve Pearson korelasyon analizi kullanılarak karşılaştırıldı. Analiz için SPSS 20.0[108] programı kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışmaya Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden sağlanan 96 adet balb/c albino türü fare ile başlandı. Deney sonunda bu farelerden 87 tanesi hayatta kaldı. 9 tane fare (1 adet sağlıklı ve 8 adet enjeksiyon yapılan fare) bilinmeyen sebeplerden öldü ve çalışma dışı bırakıldı. Çalışma sonunda 12 tane farede melanoma oluşumu gözlendi. Tümör oluşan farelerden örnekler Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Çalışma başlangıcında tümör oluşan farelerdeki metastaz durumunun görsel olarak tespit edilmesi amaçlanmıştı ancak tümör oluşan farelerin akciğer, karaciğer ve böbreklerinde herhangi bir metastaz görsel olarak gözlemlenemedi.



Şekil 4.1 Tümör oluşan farelerden örnekler

4.1. Melatonin Hormonu, Kisspeptin Proteini, *KISS1* Ekspresyon Miktarları ve İlgili İstatistiksel Analizler

Serumda tespit edilen melatonin miktarları, alınan hipotalamus dokularında tespit edilen kisspeptin proteini miktarları ve *KISS1* ekspresyon düzeyleri (mRNA) Çizelge 4.1'de belirtilmiştir. Melatonin miktarları serumdan ölçüldüğü için herhangi bir standardizasyon yapılmamıştır. Kisspeptin proteininin miktarları ise Bradford assay ile metot bölümünde belirtildiği gibi standardize edilmiştir. *KISS1* (mRNA) ekspresyon düzeyleri tespit edilirken ΔCt metodu kullanılmış ve ekspresyon düzeyleri göreceli olarak tespit edilmiştir. GSD-1 nolu örnek hesaplamalarda kontrol olarak kabul edilmiş ve standart alınarak (1 birim) göreceli ekspresyon düzeyleri bu örneğe göre belirlenmiştir.

Çizelge 4.1 Melatonin, Kisspeptin ve *KISS1* miktarları

Örnek No	**Melatonin (ng/L)**	**Kisspeptin (pg/mL)**	***KISS1***
KSD-1	8,519	48,290	0,529
KSD-2	7,915	23,301	0,376
KSD-3	22,058	31,669	0,269
KSD-4	14,261	2,853	0,399
KSD-5	27,693	26,228	1,396
KSD-6	30,406	16,431	1,107
KSE-1	15,547	25,452	0,250
KSE-2	21,372	21,416	0,166
KSE-3	15,171	14,732	0,261
KSE-4	20,963	7,401	16,737
KSE-5	13,125	15,068	0,422
KSE-6	19,793	23,596	0,022
KMD-1	9,947	10,857	0,115
KMD-2	9,649	35,974	0,102
KMD-3	2,992	10,191	33,862
KMD-4	5,946	26,388	23,572
KMD-5	20,827	60,474	1,291
KMD-6	25,047	26,107	0,365
KMD-7	17,941	4,391	0,316
KMD-8	10,701	4,436	0,374
KMD-9	14,385	12,413	3,879
KMD-10	16,434	6,356	1,358
KMD-11	17,767	25,772	6,081
KMD-12	19,793	41,957	1,187
KMD-13	9,909	6,389	5,089
KMD-14	18,246	8,734	1,795
KMD-15	13,569	41,283	4,496
KMD-16	10,171	62,606	1,250
KME-1	26,916	18,551	16,195

Çizelge 4.1 (Devamı)

KME-2	27,839	20,512	12,974
KME-3	9,872	14,174	5,515
KME-4	25,475	13,299	15,520
KME-5	19,259	7,352	0,291
KME-6	25,810	8,835	20,471
KME-7	26,819	5,362	10,435
KME-8	24,196	21,220	9,026
KME-9	24,196	5,021	15,368
KME-10	16,733	24,130	2,057
KME-11	17,076	8,445	12,411
KME-12	19,214	9,381	4,378
KME-13	16,392	22,027	25,124
KME-14	16,095	24,954	2,536
KME-15	15,088	6,081	1,220
KME-16	13,528	5,979	0,405
KME-17	12,093	17,907	3,862
GSD-1	7,565	21,219	1,000
GSD-2	19,614	23,816	0,502
GSD-3	18,071	14,952	0,560
GSD-4	14,180	21,430	1,913
GSD-5	18,641	46,338	1,818
GSE-1	8,304	5,884	0,356
GSE-2	10,209	20,511	20,314
GSE-3	17,162	47,479	9,359
GSE-4	11,546	6,515	9,248
GSE-5	13,853	14,800	1,630
GSE-6	14,180	10,920	2,152
GMD-1	8,735	33,434	16,786
GMD-2	13,934	16,820	95,049
GMD-3	10,587	14,325	1,431

Çizelge 4.1 (Devamı)

GMD-4	11,858	17,672	25,787
GMD-5	22,242	23,370	11,659
GMD-6	13,206	18,894	2,641
GMD-7	13,934	6,905	2,409
GMD-8	14,839	13,028	9,494
GMD-9	13,569	13,707	19,591
GMD-10	12,329	33,043	0,905
GMD-11	10,511	10,220	0,458
GMD-12	19,793	7,474	2,264
GMD-13	10,511	12,784	1,302
GMD-14	8,699	12,124	1,890
GMD-15	11,275	39,041	1,024
GMD-16	7,117	17,861	17,145
GMD-17	14,714	17,587	29,569
GME-1	9,098	10,154	20,605
GME-2	13,488	16,596	25,422
GME-3	11,469	19,303	0,572
GME-4	12,329	15,447	0,802
GME-5	10,815	11,746	11,578
GME-6	13,650	18,032	12,275
GME-7	9,649	15,192	11,695
GME-8	12,527	18,753	32,620
GME-9	12,805	17,033	7,950
GME-10	10,815	34,975	4,604
GME-11	15,757	17,713	0,846
GME-12	11,198	12,243	25,725
GME-13	11,391	27,044	71,057
GME-14	10,059	17,723	31,980

11. hafta sonunda kesilen ve 17. hafta sonunda kesilen sağlıklı farelerin melatonin, kisspeptin ve *KISS1* değerleri t-testi kullanılarak karşılaştırılmış ve ortalama

değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Çizelge 4.2). 11. hafta sonunda kesilen fareler de bu sebeple diğer analizlerde 17. hafta sonunda kesilen sağlıklı farelerle beraber değerlendirilmiştir.

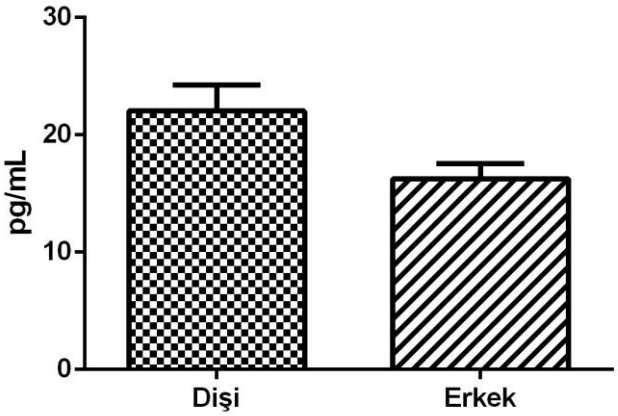
Çizelge 4.2 11. ve 17. hafta sonunda kesilen sağlıklı farelerin değerlerinin karşılaştırılması

	Kör Grup				**Gün Işığı Grubu**			
	Kesim Tarihi	n	Ortalama	p	Kesim Tarihi	n	Ortalama	p
Melatonin (ng/L)	11. hafta	6	15,097	0,145	11. hafta	6	13,488	0,700
	17. hafta	6	21,040		17. hafta	5	14,480	
Kisspeptin (pg/mL)	11. hafta	6	27,476	0,069	11. hafta	6	22,310	0,801
	17. hafta	6	15,263		17. hafta	5	20,000	
KISS1	11. hafta	6	0,309	0,309	11. hafta	6	5,349	0,621
	17. hafta	6	3,347		17. hafta	5	3,352	

Dişi ve erkek farelerin melatonin, kisspeptin ve *KISS1* değerleri t-testi kullanılarak karşılaştırılmış ve ortalama değerler arasındaki fark kisspeptin için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.3). Dişi farelerde kisspeptin miktarı erkek fareler göre daha yüksektir ($p<0,05$). Dişi ve erkek farelerdeki kisspeptin değerleri arasındaki farkın grafiği Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 Dişi ve erkek farelerin değerlerinin karşılaştırılması

	Cinsiyet	**n**	**Ortalama**	**p**
Melatonin (ng/L)	Dişi	44	14,320	0,203
	Erkek	43	15,881	
Kisspeptin (pg/mL)	Dişi	44	22,026	**0,027**
	Erkek	43	16,255	
KISS1	Dişi	44	7,600	0,273
	Erkek	43	11,080	

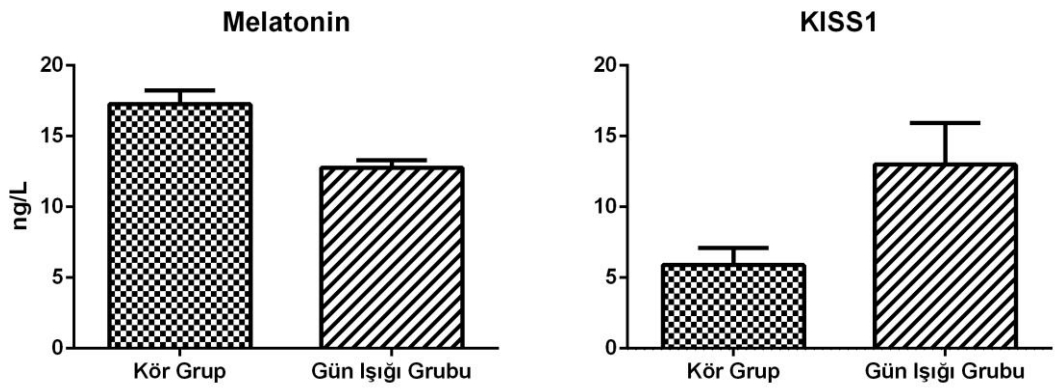


Şekil 4.2 Dişi ve erkek farelerin kisspeptin değerlerinin karşılaştırılması (ortalama+S.E.M., $p<0,05$)

Gün ışığı grubundaki ve kör gruptaki farelerin melatonin, kisspeptin ve *KISS1* değerleri t-testi kullanılarak karşılaştırılmış ve ortalama değerler arasındaki fark melatonin ve *KISS1* için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.4). Kör gruptaki farelerde melatonin miktarı gün ışığı grubundaki farelere göre daha yüksekken *KISS1* miktarı gün ışığı grubundaki farelere göre daha düşüktür ($p<0,05$). Gün ışığı grubundaki ve kör gruptaki farelerin melatonin ve *KISS1* değerleri arasındaki farkın grafiği Şekil 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4 Gün ışığı grubu ve kör gruptaki farelerin değerlerinin karşılaştırılması

	Grup	**n**	**Ortalama**	**p**
Melatonin (ng/L)	Kör Grup	45	17,261	**0,000**
	Gün Işığı Grubu	42	12,767	
Kisspeptin (pg/mL)	Kör Grup	45	19,422	0,844
	Gün Işığı Grubu	42	18,907	
KISS1	Kör Grup	45	5,886	**0,028**
	Gün Işığı Grubu	42	13,000	

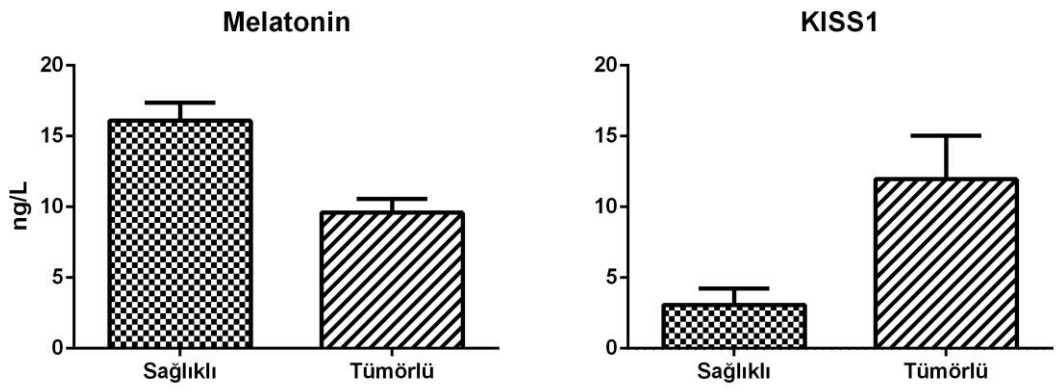


Şekil 4.3 Gün ışığı grubu ve kör gruptaki farelerin melatonin ve *KISS1* değerlerinin karşılaştırılması (ortalama+S.E.M., $p<0,05$)

Melanoma hücre hattı enjeksiyonu yapılmayan sağlıklı fareler ile tümör oluşumu gözlenen farelerin melatonin, kisspeptin ve *KISS1* değerleri t-testi kullanılarak karşılaştırılmış ve ortalama değerler arasındaki fark melatonin ve *KISS1* için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.5). Sağlıklı farelerde melatonin miktarı tümör oluşumu gözlenen farelere göre daha yüksekken *KISS1* miktarı tümör oluşumu gözlenen farelere göre daha düşüktür ($p<0,05$). Sağlıklı farelerin ve tümör oluşumu gözlenen farelerin melatonin ve *KISS1* değerleri arasındaki farkın grafiği Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5 Sağlıklı ve tümör oluşumu gözlenen farelerin değerlerinin karşılaştırılması

	Grup	**n**	**Ortalama**	**p**
Melatonin (ng/L)	Sağlıklı	23	16,093	**0,000**
	Tümörlü	12	9,588	
Kisspeptin (pg/mL)	Sağlıklı	23	21,317	0,373
	Tümörlü	12	17,540	
KISS1	Sağlıklı	23	3,078	**0,017**
	Tümörlü	12	11,964	



Şekil 4.4 Sağlıklı ve tümör oluşumu gözlenen farelerin melatonin ve *KISS1* değerlerinin karşılaştırılması (ortalama+S.E.M., $p<0,05$)

4.2. Tümör Büyüklükleri ve İlgili İstatistiksel Analizler

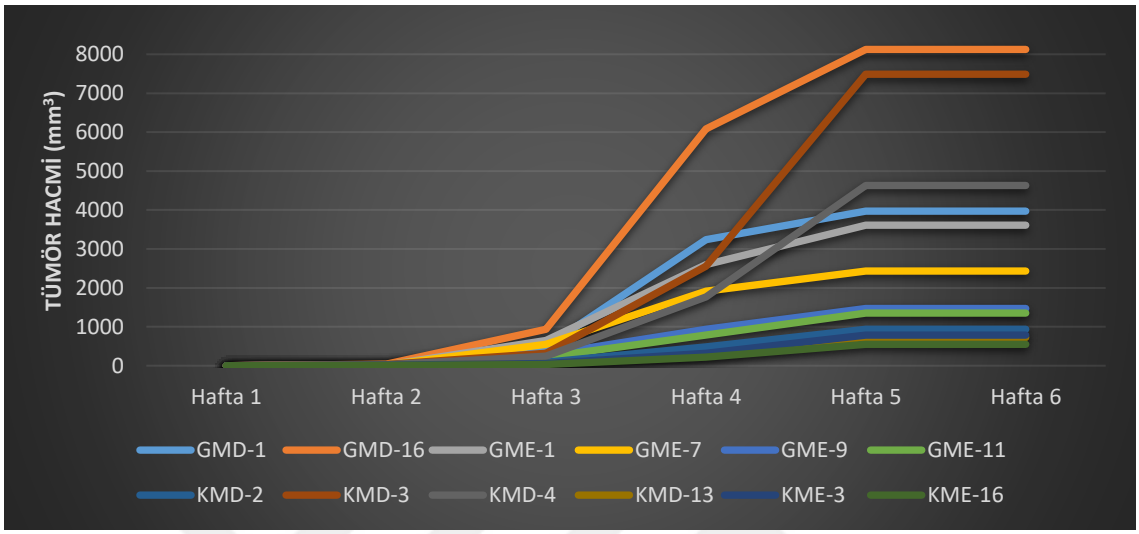
Melanoma hücre hattı enjeksiyonu yapılan 72 fareden 8 tanesi öldü ve 12 tane farede tümör oluşumu gözlendi. Tümör oluşumu gözlenen farelerin 6'sının erkek 6'sının dişi, 6'sının gün ışığı grubunda ve 6'sının kör grupta olduğu tespit edildi. Gruplar ve cinsiyetler arasında tümör oluşan fareler bakımından herhangi bir sayısal farka rastlanmadı. Tümör oluşumu gözlenen farelerde enjeksiyondan kesime kadar tümör hacimlerinin haftalara göre değişimi Çizelge 4.6 ve Şekil 4.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.6 Tümör hacimlerinin (mm^3) haftalara göre değişimi

Örnek No	Hafta 1	Hafta 2	Hafta 3	Hafta 4	Hafta 5	Hafta 6
KMD-2	-	18,00	87,50	486,00	936	936
KMD-3	-	32,00	320,00	2560,00	7488	7488
KMD-4	-	22,50	245,00	1764,00	4630,5	4630,5
KMD-13	-	6,00	56,00	288,00	726	726
KME-3	-	13,50	56,00	320,00	786,5	786,5
KME-16	-	6,00	31,50	220,50	550	550
GMD-1	-	32,00	486,00	3240,00	3971	3971
GMD-16	-	40,00	936,00	6083,50	8125	8125
GME-1	-	18,00	650,00	2601,00	3610	3610
GME-7	-	13,50	550,00	1912,50	2432	2432

Çizelge 4.6 (Devamı)

GME-9	-	13,50	288,00	936,00	1470	1470
GME-11	-	6,00	220,50	786,50	1352	1352

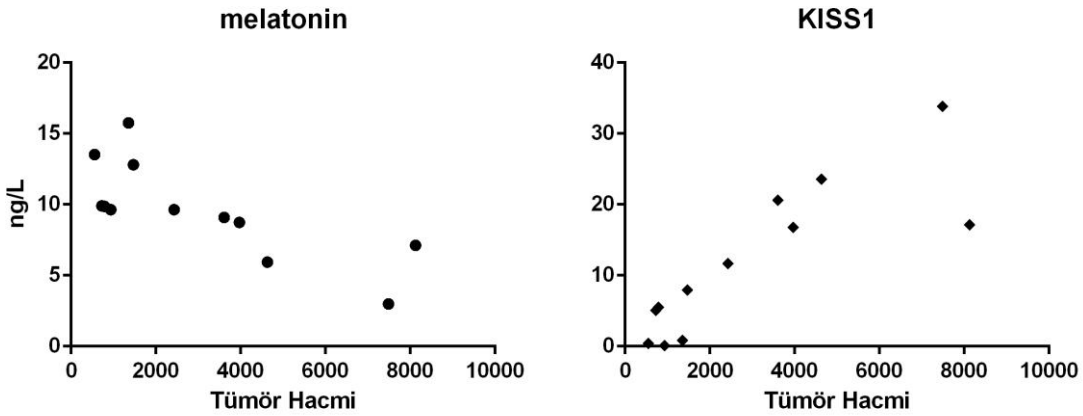


Şekil 4.5 Tümör hacimlerinin haftalara göre değişimi

Tümör oluşumu gözlenen farelerin melatonin, kisspeptin ve *KISS1* değerleri Pearson korelasyon analizi kullanılarak deney sonundaki tümör hacimleri ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda melatonin ve *KISS1* değerlerinin deney sonundaki tümör hacimleriyle ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.7). Deney sonundaki tümör hacimleriyle melatonin değerleri arasında ters orantılı (korelasyon değeri = -0,766, $p<0,05$) güçlü bir ilişki bulunurken, deney sonundaki tümör hacimleriyle *KISS1* değerleri arasında doğru orantılı (korelasyon değeri = 0,849, $p<0,05$) güçlü bir ilişki bulunduğu tespit edilmiştir. Deney sonundaki tümör hacimleriyle melatonin ve *KISS1* (mRNA) değerleri arasındaki ilişki Şekil 4.6'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7 Deney sonundaki tümör hacimleriyle melatonin, kisspeptin ve *KISS1* değerlerinin karşılaştırılması

	Tümör Hacmi		
	n	Korelasyon Değeri	p
Melatonin	12	-0,766	**0,004**
Kisspeptin	12	0,067	0,837
KISS1	12	0,849	**0,000**

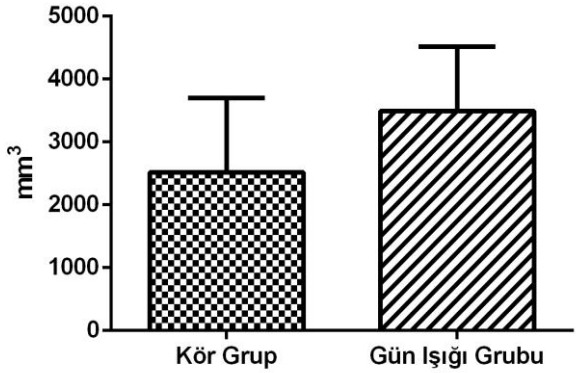


Şekil 4.6 Deney sonundaki tümör hacimleriyle melatonin ve *KISS1* değerleri arasındaki ilişki

Tümör oluşumu gözlenen farelerden gün ışığı grubundaki ve kör gruptaki farelerin deney sonundaki tümör hacimleri t-testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Gün ışığı grubundaki farelerin deney sonundaki ortalama tümör hacmi kör gruptaki farelerden yüksek olmasına karşın bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 4.8). Gün ışığı grubu ve kör gruptaki farelerin deney sonundaki tümör hacimleri arasındaki farkın grafiği Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8 Gün ışığı grubundaki ve kör gruptaki farelerin deney sonundaki tümör hacimlerinin karşılaştırılması

Grup	**n**	**Tümör Hacmi Ortalaması (mm^3)**	**p**
Kör Grup	6	2519,500	0,547
Gün Işığı Grubu	6	3493,333	

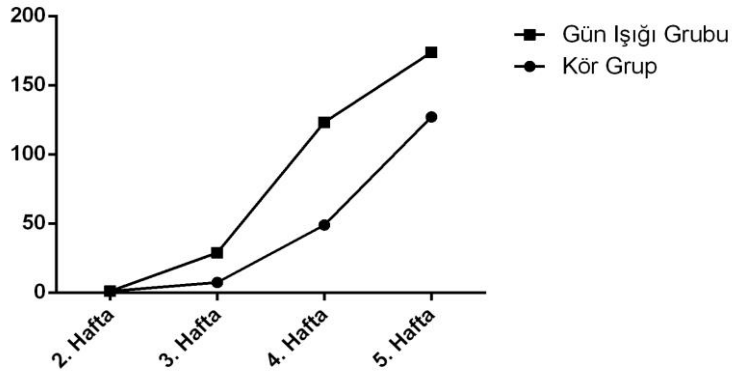


Şekil 4.7 Gün ışığı grubundaki ve kör gruptaki farelerin deney sonundaki tümör hacimlerinin karşılaştırılması (ortalama+S.E.M., $p>0,05$)

Gün ışığı grubundaki ve kör gruptaki farelerin tümör hacimlerinin haftalar içerisindeki değişim hızları two-way ANOVA analizi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma için Çizelge 4.6'da verilen haftalara göre tümör hacimleri tümörlerin ilk görüldüğü hafta olan 2. haftadaki değerlere bölünmüş ve tümörlerin oluştuktan sonra her hafta kaç kat büyüdükleri tespit edilmiştir. Bunun sonucunda, gün ışığı grubundaki farelerin tümör hacimlerinin kör gruptaki farelerin tümör hacimlerinden hızlı büyüdükleri tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.9). Gün ışığı grubu ve kör gruptaki farelerin tümör hacimlerinin artış hızları arasındaki farkın grafiği Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.9 Gün ışığı grubundaki ve kör gruptaki farelerin tümör hacimlerinin haftalar içerisindeki değişim oranlarının karşılaştırılması

		Hafta 2	**Hafta 3**	**Hafta 4**	**Hafta 5**	**p**
Kör Grup	KMD-2	1	4,861111	27	52	**0,026**
	KMD-3	1	10	80	234	
	KMD-4	1	10,88889	78,4	205,8	
	KMD-13	1	9,333333	48	121	
	KME-3	1	4,148148	23,7037	58,25926	
	KME-16	1	5,25	36,75	91,66667	
Gün Işığı Grubu	GMD-1	1	15,1875	101,25	124,0938	
	GMD-16	1	23,4	152,0875	203,125	
	GME-1	1	36,11111	144,5	200,5556	
	GME-7	1	40,74074	141,6667	180,1481	
	GME-9	1	21,33333	69,33333	108,8889	
	GME-11	1	36,75	131,0833	225,3333	



Şekil 4.8 Gün ışığı grubundaki ve kör gruptaki farelerin tümör hacimlerinin haftalar içerisindeki değişiminin karşılaştırılması (ortalama+S.E.M., p>0,05)

5. TARTIŞMA

Yaptığımız çalışmada gün ışığı alım miktarının vücutta sentezlenen melatonin ve kisspeptin miktarını nasıl değiştirdiği, bunun melanoma hücre hattı verilen farelerde kanser oluşumuna nasıl etki ettiği ve metastazın melatonin ve kisspeptin miktarıyla nasıl bir ilişki gösterdiği araştırılmıştır. Bu amaçla, melatonin ve kisspeptin miktarlarının belirlenmesi için uygulaması daha hızlı, hata yapma olasılığı daha az ve güçlü sonuçlar üreten ELISA metodu tercih edilmiştir[118-120]. *KISS1* geninin ekspresyonunun (mRNA) belirlenmesi için ise Real-Time qPCR metodu kullanılmıştır.

Çalışmamızda öncelikle dişi ve erkek fareler arasındaki melatonin, kisspeptin ve *KISS1* değerleri karşılaştırılmıştır. Melatonin ve *KISS1* değerlerinin bu iki grup arasında benzer olduğu tespit edilirken kisspeptin değerinin dişi farelerde (22,026 pg/mL) erkek farelere (16,255 pg/mL) göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Nathan et al.[121] ve Wetterberg et al.[122] daha önce yaptıkları çalışmalarda cinsiyetin melatonin üzerindeki etkisini araştırmışlar ancak erkek ve dişi bireyler arasında herhangi bir farka rastlamamışlardır. Buna karşın, Touitou et al.[123] araştırmasında yaşlı insanlardaki (yaş ort. 80,9) melatonin seviyelerini karşılaştırmış ve yaşlı kadınlardaki melatonin seviyesinin erkeklere göre daha yüksek olduğunu tespit etmiştir fakat bu farklılığın sebebini açıklayamamıştır. Çalışmamızda kullanılan farelerin genç fareler olduğu düşünüldüğünde dişi ve erkekler arasında melatonin seviyeleri arasında herhangi bir fark bulunmaması daha önceki bulgularla benzerlik göstermektedir. Erkek ve dişi fareler arasında *KISS1* (mRNA) ve kisspeptin miktarları karşılaştırıldığında ise *KISS1* miktarları arasında herhangi bir fark gözlenmezken kisspeptin miktarları dişi farelerde daha yüksek tespit edilmiştir. Clarke et al.[76] bunun sebebini kisspeptin sentezinin büyük çoğunluğunu yapan AVPV nöronlarının cinsiyete bağlı olarak dimorfik olmasına ve dişilerde erkeklere oranla daha çok miktarda bu nöronlardan bulunmasına bağlamıştır. Buna dayanarak, bulgularımıza göre sentez hızı (*KISS1* mRNA miktarı) dişi ve erkek farelerde farklılık göstermezken kisspeptin miktarının dişi bireylerde daha fazla gözlenmesi AVPV nöronlarının dişi bireylerde daha fazla miktarda olmasıyla ilişkilendirilebilir. AVPV nöronlarının dişi bireylerde neden daha fazla bulunduğuyla ilgili ise kesin bir görüş olmamakla birlikte sebebinin dişi bireylerde menstural döngünün kontrolünde de kisspeptinin rol alması olduğu düşünülmektedir[76].

Birçok çeşitli çalışmada gösterildiği üzere vücuttaki melatonin döngüsünü düzenleyen en önemli olaylardan birisi retinadaki sinirlerin ışık ile uyarılmasıdır[37-39]. Lockley et al.[124] yaptığı çalışmada çeşitli görme bozukluklarına sahip bireylerin melatonin döngülerini incelemiş ve kısmi görme bozuklukları olan ancak ışığı algılayabilen bireylerde melatonin döngüsünün normalden ufak sapmalar gösterdiğini buna karşın ışığı algılayamayan tam görme bozukluğu olan bireylerde melatonin döngüsünün anormal olduğunu gün içerisinde sürekli değiştiğini belirtmiştir. Ek olarak, Skene ve Arendt[125] yaptıkları çalışmada iki gözü de bulunmayan retinadan ışık alamayan bireylerin sirkadyan ritimlerinin senkronizasyonlarının bozuk olduğunu ve melatonin döngüsünün spontane olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda gün ışığı grubu ile kör grup melatonin seviyeleri bakımından karşılaştırılmış ve grupların ortalama melatonin seviyeleri tespit edilmiştir. Kör gruptaki farelerde ortalama melatonin seviyesi 17,261 ng/L olarak tespit edilirken, gün ışığı grubundaki ortalama melatonin seviyesi 12,767 ng/L olarak tespit edilmiştir. Daha öncede belirtildiği gibi kandaki melatonin miktarı gün ışığından etkilenmektedir. Çalışmamızda tespit edilen ortalama melatonin seviyeleri arasındaki bu farkın kör gruptaki farelerin melatonin seviyelerindeki düzensiz değişiklikten kaynaklandığı düşünülmektedir. Gün ışığı ve kör gruptaki farelerin kesim işlemi gün ışığı alınan saate denk gelecek şekilde planlanmıştır ve bu sayede kandaki bazal melatonin seviyelerinin ortalama değerlerinin tespit edilmesi düşünülmüştür. Normal döngüye sahip gün ışığı grubunda melatonin miktarı gün içerisinde bazal seviyedeyken kör gruptaki farelerin melatonin değişimleri düzensiz olduğundan ortalamaları daha yüksek bulunmuştur. Skene ve Arendt[125] , Lockley et al.[124] gibi araştırmacıların daha önce belirttiği üzere kör bireylerde melatonin döngüsünün düzensizliği kandaki melatonin miktarının sürekli değişken olmasına ve dolayısıyla vücudun gün içerisinde daha çok melatonine maruz kalmasına neden olmaktadır. *KISS1* (mRNA) ve kisspeptin seviyelerine bakıldığında ise gün ışığı ve kör gruptaki farelerin kisspeptin miktarları arasında bir fark bulunamazken *KISS1* miktarının gün ışığı grubunda (13,000) kör gruba göre (5,886) önemli derecede daha fazla olduğu tespit edilmiştir (p=0,028). Kauffman et al.[90] 'a göre gün uzunluğuyla (gün ışığına maruz kalma süresi) kisspeptin sentezi arasındaki ilişki doğru orantılıdır ve gün ışığına maruz kalma arttıkça kisspeptin sentezi artmaktadır. Ek olarak, Smith et al.[126] , Revel et al.[89] , Salehi et al.[88] çalışmalarında melatonin ile kisspeptin arasındaki ilişkiyi incelemişler ve

melatoninin arttığı durumlarda kisspeptin sentezinin azaldığını bulgulamışlardır. Morgan ve Hazlerigg[127] 'e göre ise bunun sebebi kisspeptinin üreme kontrolünde önemli rolü olması ve üremenin uzun gün döngülerinde artmasıdır. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular bu görüşlerle benzerlik göstermektedir. Gün ışığı grubunda kör gruba göre *KISS1* sentezi yüksek iken kisspeptin miktarları arasında fark olmamasının ise üretilen kisspeptinin kan yoluyla farklı dokulara aktarılmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Gün ışığı grubunda fazla miktarda sentezlenen kisspeptinin üreme döngüsünün aktif olması için üreme organlarına ve diğer dokulara taşınmış olabileceği, kör grupta ise üreme döngüsü pasif durumda olduğundan üretilen kisspeptinin yine hipotalamusta bulunduğu ve diğer dokulara taşınmasının az miktarda olduğu yorumu yapılabilir.

Melatonin miktarlarının tümör oluşumu gözlenen farelerde (9,588 ng/L) sağlıklı farelere göre (16,093 ng/L) çok düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Grinevich ve Labunetz[128] çalışmalarında melanomalı bireylerle sağlıklı bireyler arasındaki melatonin seviyelerindeki farkı incelemiş ve melanoma hastalarında melatonin düzeylerinin sağlıklı bireylere göre çok düşük düzeyde olduğunu tespit etmişlerdir. Melanoma oluşumu gözlenen deneklerde melatonin düzeylerinin sağlıklı deneklere göre düşük düzeylerde olması hastalığın sirkadyan ritmi ve vücutta bulunan bilinmeyen birçok mekanizmayı aksatmasıyla bağlantılı olabilir. Bir diğer ihtimal ise melatonin seviyesi düşük olan farelerin yapılan hücre hattı aşılaması sonrası melanomaya yakalanması ancak aşılama yapılan ve melatonin seviyesi daha yüksek olan farelerin kendilerini bundan koruyabilmesi şeklinde düşünülebilir. Ancak, hücre hattı aşılamasının direkt olması, normal hayattaki gibi kanser oluşumunun zamana yayılmaması ve gün ışığı grubuyla kör grup arasında melatonin miktarları arasında fark olmasına karşın kansere yakalanan fare sayısı bakımından herhangi bir fark olmaması bu ihtimali zayıflatmaktadır. Tümör oluşumu gözlenen ve sağlıklı farelerin *KISS1* ve kisspeptin değerleri karşılaştırıldığında ise kisspeptin miktarları arasında herhangi bir fark tespit edilmezken, *KISS1* miktarının tümör oluşumu gözlenen farelerde (11,964) sağlıklı farelere göre (3,078) çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgulara göre, kisspeptinin antimetastatik ve antikanser özellikleri düşünüldüğünde tümör oluşumundan kaynaklı olarak kisspeptinin hipotalamustaki sentezinin arttığı ve kan yoluyla tümörlü dokulara taşındığı yorumlanabilir. Murphy[129] çalışmasına bu duruma değinmiştir. Buna karşın, Shirasaki et

al.[130] metastaz yapan melanomalarda *KISS1*'in sentezinin (mRNA) azaldığını belirtmiştir. Çalışmamızda *KISS1*'in artışı bu sonuçlarla çelişiyor görünse de, farelerde herhangi bir metastazla karşılaşılmadığından dolayı bu normal karşılanabilir. Kanserin daha ileri evreye kadar beklenmesi durumunda örneklerimizde metastaz gerçekleşip gerçekleşmeyeceği, bunun *KISS1* sentezini nasıl etkileyeceği bilinmediğinden dolayı ise bu durum yoruma açıktır. Ek olarak, tümör oluşumu gözlenen farelerdeki tümör hacmi ile melatonin ve *KISS1* miktarları arasındaki korelasyon karşılaştırıldığında melatoninin tümör hacmi ile güçlü ters bir korelasyon içerisinde olduğu, *KISS1*'in ise güçlü doğru bir korelasyon içerisinde olduğu görülmektedir. Bununda yukarıda belirttiğimiz yorumları doğrular nitelikte olduğu düşünülmektedir. Melatonin miktarı düştükçe tümör hacimleri artmıştır ve buna bağlı olarak melatoninin melanoma oluşumu üzerindeki koruyucu etkisinden bahsedilebilir. Birçok çalışmada da bu ilişki gösterilmiştir[18,131,132]. Tümör hacimleri arttıkça ise *KISS1* sentezi artmıştır ve buna bağlı olarak deneklerde hiç metastaza rastlanmadığı da düşünüldüğünde *KISS1* sentezinin artmasının metastazın engellenmesi ile ilgili olduğu akla getirilebilir. Ancak bu yorumun doğrulanması için oluşan tümörlerden alınan dokularda bulunan kisspeptin miktarının ölçülmesi faydalı olacaktır.

Kör grup ve gün ışığı grubunda son tümör hacimleri karşılaştırıldığında kör gruptaki tümörlerin son tümör hacimlerinin ortalamasının daha düşük olduğu görülmekle birlikte bu istatistiksel olarak ispatlanamamıştır. Sonuçların istatistiksel olarak anlamsız olmasının tümör oluşumu gözlenen fare sayısının (n=12) az olmasından kaynaklandığı ve daha fazla farede tümör oluşumu sağlanması durumunda anlamlı hale gelebileceği düşünülmektedir. Ek olarak, tümör hacimlerinin haftalar içerisinde büyüme hızları karşılaştırıldığında ise gün ışığı grubundaki farelerde tümörlerin kör gruptaki farelere göre daha hızlı büyüdüğü tespit edilmiştir. Yukarıda daha önce bahsettiğimiz bilgiler ışığında kör gruptaki yüksek miktardaki melatoninin tümör oluşumunu yavaşlattığı düşünülmektedir. Melatoninin tümör süpresör özellikleri göz önüne alındığında bu sonuç anlamlıdır. Kör gruptaki farelerde *KISS1* sentezinin (mRNA) düşük olduğu göz önüne alındığında bu farelerde metastaz oranının daha fazla olması gerektiği düşünülmekte ancak deneklerde herhangi bir metastazla karşılaşılmadığından bu hipotezimiz doğrulanamamaktadır. Kanser oluşumu hücre hattı enjeksiyonuyla gerçekleştirildiğinden farelerde tümör oluşumu normal çevre koşullarına göre hızlı gerçekleşmiş ve ilerlemiştir.

Bilindiği üzere metastaz kanserin ileri evrelerinde görülen bir durumdur[133]. Bunun sonucunda, farelerde metastaz oluşmasını beklemek farelerde oluşan tümörlerin aşırı büyümesine ve hayati fonksiyonların sekteye uğramasına neden olabileceğinden çalışmanın süresi kısa tutulmuştur. Bu sebeple metastaz oluşumu gözlemlenememiştir. Sonraki çalışmalarda kanserojen maddelerle farelerde kanser oluşturmak alternatif bir yol olabilir. Ancak kanserojen madde uygulamasında da kanserojen ajanların *KISS1* sentezini etkileyip etkilemediğinin bilinmemesi, oluşacak metastazların *KISS1* senteziyle ilişkisinin gösterilmesinde soru işaretleri yaratabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmaya Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden sağlanan 96 adet balb/c albino türü fare ile yaptığımız çalışmada gün ışığı alım miktarının vücutta sentezlenen melatonin ve kisspeptin miktarını nasıl değiştirdiği, bunun melanoma hücre hattı verilen farelerde kanser oluşumuna nasıl etki ettiği ve son olarak kanser gözlenen farelerde metastaz oranının melatonin ve kisspeptin miktarıyla nasıl bir ilişki gösterdiği araştırılmıştır ve aşağıda belirtilen sonuçlar elde edilmiştir:

1. 96 fareyle başlayan çalışma deney sonunda 87 fareyle tamamlandı. 9 tane fare (1 adet sağlıklı ve 8 adet enjeksiyon yapılan fare) bilinmeyen sebeplerden öldü ve çalışma dışı bırakıldı. Çalışma sonunda 12 tane farede melanoma oluşumu gözlendi.
2. Dişi ve erkek fareler arasında yapılan karşılaştırmada melatonin ve *KISS1* (mRNA) seviyeleri açısından cinsiyete bağlı bir farklılığa rastlanmamıştır. Kisspeptin seviyelerinin ise dişi farelerde erkek farelere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.
3. Gün ışığı grubu ve kör gruptaki fareler arasında yapılan karşılaştırmada, kör gruptaki farelerin gün ışığı grubundaki farelere göre melatonin seviyelerinin yüksek, *KISS1* seviyelerinin ise düşük olduğu tespit edilmiştir. Gün ışığı grubu ve kör gruptaki fareler arasında yapılan karşılaştırmada kisspeptin seviyelerinde ise herhangi bir farklılığa rastlanmamıştır.
4. Sağlıklı ve tümör oluşumu gözlenen fareler arasında yapılan karşılaştırmada, tümör oluşumu gözlenen farelerin sağlıklı farelere göre melatonin seviyelerinin düşük, *KISS1* seviyelerinin ise yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sağlıklı ve tümör oluşumu gözlenen fareler arasında yapılan karşılaştırmada kisspeptin seviyelerinde ise herhangi bir farklılığa rastlanmamıştır.
5. Tümör oluşumu gözlenen farelerde, tümör hacimleriyle melatonin seviyeleri arasında ters orantılı bir ilişki, tümör hacimleriyle *KISS1* seviyeleri arasında doğru orantılı bir ilişki tespit edilmiş olup tümör hacimleriyle kisspeptin arasında herhangi bir ilişki tespit edilememiştir.
6. Tümör oluşumu gözlenen farelerde tümör hacimlerinin haftalara göre artış hızları tespit edilmiştir. Tümör oluşumu gözlenen gün ışığı grubu ve kör gruptaki fareler arasında

yapılan karşılaştırmada, tümör büyüme hızlarının kör gruptaki farelerde gün ışığı grubundaki farelere göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir.
7. Tümör oluşumu gözlenen gün ışığı grubu ve kör gruptaki fareler arasında yapılan karşılaştırmada, son tümör hacimlerinin kör gruptaki farelerde gün ışığı grubundaki farelere göre daha düşük olduğu tespit edilmiş ancak bu istatistiksel olarak ispatlanamamıştır.

Bu sonuçlar ışığında, melatoninin ve kisspeptinin kanser oluşumunda önemli birer tümör süpresör olduğu, bu iki önemli elemanın gün ışığı alımından yüksek derecede etkilendiği sonucuna varılmıştır. Bu iki önemli elemanın ayrıca birbirlerinin miktarlarından etkilendiği sonucuna varılmış ancak bu etkinin tek yönlü doğrusal bir etki olmaktan çok, daha komplike ve başka faktörlere göre de değişebilen bir etki olduğu yorumu yapılmıştır. İleriki yapılacak çalışmalarda tümör oluşan dokularda yapılacak melatonin, kisspeptin ve *KISS1* miktar analizleri bu çalışmadaki boşlukları doldurabilir ve daha net bir tablo ortaya konmasına ve daha net yargılara varılmasına yardımcı olabilir. Ayrıca, daha yavaş ilerleyen bir kanser seyri için farelerde farklı kanser oluşturma metotlarının kullanılmasının elde edilen sonuçları nasıl değiştireceği araştırılması gereken önemli bir noktadır.

7. KAYNAKLAR

1. **Claustrat B, Brun J, Chazot G**. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep medicine reviews*, **2005**;9(1):11-24.

2. **Bernard M, Guerlotte J, Greve P, Grechez-Cassiau A, Iuvone MP, Zatz M, Chong NW, Klein DC, Voisin P**. Melatonin synthesis pathway: circadian regulation of the genes encoding the key enzymes in the chicken pineal gland and retina. *Reproduction, nutrition, development*, **1999**;39(3):325-334.

3. **Claustrat B, Brun J, Garry P, Roussel B, Sassolas G**. A once-repeated study of nocturnal plasma melatonin patterns and sleep recordings in six normal young men. *Journal of pineal research*, **1986**;3(4):301-310.

4. **Follenius M, Weibel L, Brandenberger G**. Distinct modes of melatonin secretion in normal men. *Journal of pineal research*, **1995**;18(3):135-140.

5. **Lewy AJ, Wehr TA, Goodwin FK, Newsome DA, Markey SP**. Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science*, **1980**;210(4475):1267-1269.

6. **Bojkowski CJ, Aldhous ME, English J, Franey C, Poulton AL, Skene DJ, Arendt J**. Suppression of nocturnal plasma melatonin and 6-sulphatoxymelatonin by bright and dim light in man. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*, **1987**;19(9):437-440.

7. **Altun A, Ugur-Altun B**. Melatonin: therapeutic and clinical utilization. *International journal of clinical practice*, **2007**;61(5):835-845.

8. **Scheer FA, Czeisler CA**. Melatonin, sleep, and circadian rhythms. *Sleep medicine reviews*, **2005**;9(1):5-9.

9. **Revel FG, Ansel L, Klosen P, Saboureau M, Pevet P, Mikkelsen JD, Simonneaux V**. Kisspeptin: A key link to seasonal breeding. *Rev Endocr Metab Dis*, **2007**;8(1):57-65.

10. **Clarke IJ, Caraty A**. Kisspeptin and seasonality of reproduction. *Advances in experimental medicine and biology*, **2013**;784:411-430.

11. **Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M**. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiological reviews*, **2012**;92(3):1235-1316.

12. **Manev H, Uz T, Kharlamov A, Cagnoli CM, Franceschini D, Giusti P**. In vivo protection against kainate-induced apoptosis by the pineal hormone melatonin: effect of exogenous melatonin and circadian rhythm. *Restorative neurology and neuroscience*, **1996**;9(4):251-256.

13. **Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S**. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2001**;939:200-215.

14. **Herrera J, Nava M, Romero F, Rodriguez-Iturbe B**. Melatonin prevents oxidative stress resulting from iron and erythropoietin administration. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, **2001**;37(4):750-757.

15. **Guerrero JM, Reiter RJ**. Melatonin-immune system relationships. *Current topics in medicinal chemistry*, **2002**;2(2):167-179.

16. **Park SY, Jang WJ, Yi EY, Jang JY, Jung Y, Jeong JW, Kim YJ**. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1alpha stabilization under hypoxia. *Journal of pineal research*, **2010**;48(2):178-184.

17. **Blask DE, Dauchy RT, Sauer LA, Krause JA, Brainard GC**. Light during darkness, melatonin suppression and cancer progression. *Neuro Endocrinol Lett*, **2002**;23 Suppl 2:52-56.

18. **Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT, Holowachuk EW, Ruhoff MS, Kopff HS**. Melatonin inhibition of cancer growth in vivo involves suppression of tumor fatty acid metabolism via melatonin receptor-mediated signal transduction events. *Cancer research*, **1999**;59(18):4693-4701.

19. **Coleman MP, Reiter RJ**. Breast cancer, blindness and melatonin. *Eur J Cancer*, **1992**;28(2-3):501-503.

20. **Hahn RA**. Profound bilateral blindness and the incidence of breast cancer. *Epidemiology*, **1991**;2(3):208-210.

21. **Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Erren TC, Piekarski C, Tamura H, Manchester LC**. Light at night, chronodisruption, melatonin suppression, and cancer risk: a review. *Crit Rev Oncog*, **2007**;13(4):303-328.

22. **Walton JC, Weil ZM, Nelson RJ**. Influence of photoperiod on hormones, behavior, and immune function. *Front Neuroendocrinol*, **2011**;32(3):303-319.

23. **Greives TJ, Mason AO, Scotti MA, Levine J, Ketterson ED, Kriegsfeld LJ, Demas GE**. Environmental control of kisspeptin: implications for seasonal reproduction. *Endocrinology*, **2007**;148(3):1158-1166.

24. **Prendergast BJ, Kriegsfeld LJ, Nelson RJ**. Photoperiodic polyphenisms in rodents: Neuroendocrine mechanisms, costs, and functions. *Q Rev Biol*, **2001**;76(3):293-325.

25. **Dungan HM, Clifton DK, Steiner RA**. Minireview: Kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, **2006**;147(3):1154-1158.

26. **Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR**. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of the National Cancer Institute*, **1996**;88(23):1731-1737.

27. **Smith JT, Clifton DK, Steiner RA**. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction*, **2006**;131(4):623-630.

28. **Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M**. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *The Journal of biological chemistry*, **2001**;276(37):34631-34636.

29. **Navenot JM, Fujii N, Peiper SC**. Activation of Rho and Rho-associated kinase by GPR54 and KiSS1 metastasis suppressor gene product induces changes of cell morphology and contributes to apoptosis. *Molecular pharmacology*, **2009**;75(6):1300-1306.

30. **Navenot JM, Fujii N, Peiper SC**. KiSS1 metastasis suppressor gene product induces suppression of tyrosine kinase receptor signaling to Akt, tumor necrosis factor family ligand expression, and apoptosis. *Molecular pharmacology*, **2009**;75(5):1074-1083.

31. **Nassar E, Mulligan C, Taylor L, Kerksick C, Galbreath M, Greenwood M, Kreider R, Willoughby DS**. Effects of a single dose of N-Acetyl-5-methoxytryptamine (Melatonin) and resistance exercise on the growth hormone/IGF-1 axis in young males and females. *J Int Soc Sports Nutr*, **2007**;4:14.

32. **Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP**. Melatonin. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **2006**;38(3):313-316.

33. **Boutin JA, Audinot V, Ferry G, Delagrange P**. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends in pharmacological sciences*, **2005**;26(8):412-419.

34. **Reppert SM, Weaver DR, Rivkees SA, Stopa EG**. Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science*, **1988**;242(4875):78-81.

35. **Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z**. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol*, **2003**;50(4):1129-1146.

36. **Kumar A, Rinwa P, Kaur G, Machawal L**. Stress: Neurobiology, consequences and management. *J Pharm Bioallied Sci*, **2013**;5(2):91-97.

37. **Schomerus C, Korf HW**. Mechanisms regulating melatonin synthesis in the mammalian pineal organ. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2005**;1057:372-383.

38. **Brainard GC, Hanifin JP, Greeson JM, Byrne B, Glickman G, Gerner E, Rollag MD**. Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **2001**;21(16):6405-6412.

39. **Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ**. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*, **2005**;27(2):189-200.

40. **Bubenik GA, Konturek SJ**. Melatonin and aging: prospects for human treatment. *J Physiol Pharmacol*, **2011**;62(1):13-19.

41. **Wehr TA, Duncan WC, Jr., Sher L, Aeschbach D, Schwartz PJ, Turner EH, Postolache TT, Rosenthal NE**. A circadian signal of change of season in patients with seasonal affective disorder. *Arch Gen Psychiatry*, **2001**;58(12):1108-1114.

42. **Karasek M**. Melatonin, human aging, and age-related diseases. *Exp Gerontol*, **2004**;39(11-12):1723-1729.

43. **Scholtens RM, van Munster BC, van Kempen MF, de Rooij SE**. Physiological melatonin levels in healthy older people: A systematic review. *J Psychosom Res*, **2016**;86:20-27.

44. **Srinivasan V, Cardinali DP, Srinivasan US, Kaur C, Brown GM, Spence DW, Hardeland R, Pandi-Perumal SR**. Therapeutic potential of melatonin and its analogs in Parkinson's disease: focus on sleep and neuroprotection. *Ther Adv Neurol Disord*, **2011**;4(5):297-317.

45. **Lin L, Huang QX, Yang SS, Chu J, Wang JZ, Tian Q**. Melatonin in Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci*, **2013**;14(7):14575-14593.

46. **Komada Y, Aoki K, Gohshi S, Ichioka H, Shibata S**. Effects of television luminance and wavelength at habitual bedtime on melatonin and cortisol secretion in humans. *Sleep Biol Rhythms*, **2015**;13(4):316-322.

47. **McIntyre IM, Norman TR, Burrows GD, Armstrong SM**. Human melatonin suppression by light is intensity dependent. *Journal of pineal research*, **1989**;6(2):149-156.

48. **Nair NP, Hariharasubramanian N, Pilapil C**. Circadian rhythm of plasma melatonin in endogenous depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **1984**;8(4-6):715-718.

49. **Oren DA**. Retinal melatonin and dopamine in seasonal affective disorder. *J Neural Transm Gen Sect*, **1991**;83(1-2):85-95.

50. **Monteleone P, Natale M, La Rocca A, Maj M**. Decreased nocturnal secretion of melatonin in drug-free schizophrenics: no change after subchronic treatment with antipsychotics. *Neuropsychobiology*, **1997**;36(4):159-163.

51. **Mortola JF, Laughlin GA, Yen SS**. Melatonin rhythms in women with anorexia nervosa and bulimia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*, **1993**;77(6):1540-1544.

52. **Peres MF, Masruha MR, Zukerman E, Moreira-Filho CA, Cavalheiro EA**. Potential therapeutic use of melatonin in migraine and other headache disorders. *Expert Opin Investig Drugs*, **2006**;15(4):367-375.

53. **Koppisetti S, Jenigiri B, Terron MP, Tengattini S, Tamura H, Flores LJ, Tan DX, Reiter RJ**. Reactive oxygen species and the hypomotility of the gall bladder as targets for the treatment of gallstones with melatonin: a review. *Dig Dis Sci*, **2008**;53(10):2592-2603.

54. **Vijayalaxmi, Reiter RJ, Herman TS, Meltz ML**. Melatonin and radioprotection from genetic damage: in vivo/in vitro studies with human volunteers. *Mutation research*, **1996**;371(3-4):221-228.

55. **Vaughan MK, Vaughan GM, Reiter RJ**. Effect of ovariectomy and constant dark on the weight of reproductive and certain other organs in the female vole, Microtus montanus. *J Reprod Fertil*, **1973**;32(1):9-14.

56. **Pertsov SS**. Effect of melatonin on the thymus, adrenal glands, and spleen in rats during acute stress. *Bull Exp Biol Med*, **2006**;141(3):292-295.

57. **Miller SC, Pandi-Perumal SR, Esquifino AI, Cardinali DP, Maestroni GJ**. The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer. *Int J Exp Pathol*, **2006**;87(2):81-87.

58. **Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC, Barlow-Walden LR**. Melatonin--a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1994**;738:419-420.

59. **Pohanka M**. Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders: implication and counteracting of melatonin. *J Appl Biomed*, **2011**;9(4):185-196.

60. **Reiter RJ, Manchester LC, Tan DX**. Neurotoxins: free radical mechanisms and melatonin protection. *Current neuropharmacology*, **2010**;8(3):194-210.

61. **Arnao MB, Hernandez-Ruiz J**. The physiological function of melatonin in plants. *Plant Signal Behav*, **2006**;1(3):89-95.

62. **Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ**. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *Journal of pineal research*, **2007**;42(1):28-42.

63. **Fischer TW, Zmijewski MA, Wortsman J, Slominski A**. Melatonin maintains mitochondrial membrane potential and attenuates activation of initiator (casp-9) and effector caspases (casp-3/casp-7) and PARP in UVR-exposed HaCaT keratinocytes. *Journal of pineal research*, **2008**;44(4):397-407.

64. **Ferreira Cda S, Maganhin CC, Simoes Rdos S, Girao MJ, Baracat EC, Soares-Jr JM**. [Melatonin: cell death modulator]. *Rev Assoc Med Bras*, **2010**;56(6):715-718.

65. **Pizarro JG, Yeste-Velasco M, Esparza JL, Verdaguer E, Pallas M, Camins A, Folch J**. The antiproliferative activity of melatonin in B65 rat dopaminergic neuroblastoma cells is related to the downregulation of cell cycle-related genes. *Journal of pineal research*, **2008**;45(1):8-16.

66. **Sanchez-Sanchez AM, Martin V, Garcia-Santos G, Rodriguez-Blanco J, Casado-Zapico S, Suarez-Garnacho S, Antolin I, Rodriguez C**. Intracellular redox state as determinant for melatonin antiproliferative vs cytotoxic effects in cancer cells. *Free Radical Res*, **2011**;45(11-12):1333-1341.

67. **Tam CW, Chan KW, Liu VWS, Pang B, Yao KM, Shiu SYW**. Melatonin as a negative mitogenic hormonal regulator of human prostate epithelial cell growth: potential mechanisms and clinical significance. *Journal of pineal research*, **2008**;45(4):403-412.

68. **Luchetti F, Betti M, Canonico B, Arcangeletti M, Ferri P, Galli F, Papa S**. ERK MAPK activation mediates the antiapoptotic signaling of melatonin in UVB-stressed U937 cells. *Free Radical Bio Med*, **2009**;46(3):339-351.

69. **Soybir G, Topuzlu C, Odabas O, Dolay K, Bilir A, Koksoy F**. The effects of melatonin on angiogenesis and wound healing. *Surg Today*, **2003**;33(12):896-901.

70. **Mediavilla MD, Guezmez A, Ramos S, Kothari L, Garijo F, Barcelo EJS**. Effects of melatonin on mammary gland lesions in transgenic mice overexpressing N-ras proto-oncogene. *Journal of pineal research*, **1997**;22(2):86-94.

71. **Lissoni P, Rovelli F, Malugani F, Bucovec R, Conti A, Maestroni GJM**. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuroendocrinol Lett*, **2001**;22(1):45-47.

72. **Di Bella G, Mascia F, Gualano L, Di Bella L**. Melatonin Anticancer Effects: Review. *Int J Mol Sci*, **2013**;14(2):2410-2430.

73. **West A, Vojta PJ, Welch DR, Weissman BE**. Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics*, **1998**;54(1):145-148.

74. **Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA**. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*, **2004**;80(4):264-272.

75. **Kanda S, Oka Y**. Structure, synthesis, and phylogeny of kisspeptin and its receptor. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **2013**;784:9-26.

76. **Clarke H, Dhillo WS, Jayasena CN**. Comprehensive Review on Kisspeptin and Its Role in Reproductive Disorders. *Endocrinol Metab (Seoul)*, **2015**;30(2):124-141.

77. **Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M**. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, **2001**;411(6837):613-617.

78. **Hanahan D, Weinberg RA**. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **2011**;144(5):646-674.

79. **Prabhu VV, Sakthivel KM, Guruvayoorappan C**. Kisspeptins (KiSS-1): essential players in suppressing tumor metastasis. *Asian Pac J Cancer Prev*, **2013**;14(11):6215-6220.

80. **Prabhu VV, Siddikuzzaman, Grace VM, Guruvayoorappan C**. Targeting tumor metastasis by regulating Nm23 gene expression. *Asian Pac J Cancer Prev*, **2012**;13(8):3539-3548.

81. **Bari R, Zhang YH, Zhang F, Wang NX, Stipp CS, Zheng JJ, Zhang XA**. Transmembrane interactions are needed for KAI1/CD82-mediated suppression of cancer invasion and metastasis. *Am J Pathol*, **2009**;174(2):647-660.

82. **Savvidis C, Papaoiconomou E, Petraki C, Msaouel P, Koutsilieris M**. The role of KISS1/KISS1R system in tumor growth and invasion of differentiated thyroid cancer. *Anticancer Res*, **2015**;35(2):819-826.

83. **Babwah AV, Pampillo M, Min L, Kaiser UB, Bhattacharya M**. Single-cell analyses reveal that KISS1R-expressing cells undergo sustained kisspeptin-induced signaling that is dependent upon an influx of extracellular Ca2+. *Endocrinology*, **2012**;153(12):5875-5887.

84. **Ji K, Ye L, Mason MD, Jiang WG**. The Kiss-1/Kiss-1R complex as a negative regulator of cell motility and cancer metastasis (Review). *Int J Mol Med*, **2013**;32(4):747-754.

85. **Clarkson J, Herbison AE**. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, **2006**;147(12):5817-5825.

86. **Herbison AE, de Tassigny X, Doran J, Colledge WH**. Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, **2010**;151(1):312-321.

87. **Dardente H, Lomet D, Robert V, Decourt C, Beltramo M, Pellicer-Rubio MT**. Seasonal breeding in mammals: From basic science to applications and back. *Theriogenology*, **2016**;86(1):324-332.

88. **Salehi S, Adeshina I, Chen H, Zirkin BR, Hussain MA, Wondisford F, Wolfe A, Radovick S**. Developmental and endocrine regulation of kisspeptin expression in mouse Leydig cells. *Endocrinology*, **2015**;156(4):1514-1522.

89. **Revel FG, Saboureau M, Masson-Pevet M, Pevet P, Mikkelsen JD, Simonneaux V**. Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr Biol*, **2006**;16(17):1730-1735.

90. **Kauffman AS, Clifton DK, Steiner RA**. Emerging ideas about kisspeptin- GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Trends Neurosci*, **2007**;30(10):504-511.

91. **McCourt C, Dolan O, Gormley G**. Malignant melanoma: a pictorial review. *Ulster Med J*, **2014**;83(2):103-110.

92. **Marks R**. Epidemiology of melanoma. *Clin Exp Dermatol*, **2000**;25(6):459-463.

93. **Giblin AV, Thomas JM**. Incidence, mortality and survival in cutaneous melanoma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, **2007**;60(1):32-40.

94. **Bishop JN, Bataille V, Gavin A, Lens M, Marsden J, Mathews T, Wheelhouse C**. The prevention, diagnosis, referral and management of melanoma of the skin: concise guidelines. *Clin Med*, **2007**;7(3):283-290.

95. **Armstrong BK, Kricker A**. Cutaneous melanoma. *Cancer Surv*, **1994**;19-20:219-240.

96. **Perera E, Gnaneswaran N, Perera M, Sinclair R**. Validating the use of Medicare Australia billing data to examine trends in skin cancer. *F1000Res*, **2015**;4:1341.

97. **DiPiro JT**. *Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach*. 8th Ed., New York: McGraw-Hill Medical, **2011**.

98. **Diepgen TL, Mahler V**. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol*, **2002**;146 Suppl 61:1-6.

99. **Coleman MP, Rachet B, Woods LM, Mitry E, Riga M, Cooper N, Quinn MJ, Brenner H, Esteve J**. Trends and socioeconomic inequalities in cancer survival in England and Wales up to 2001. *Brit J Cancer*, **2004**;90(7):1367-1373.

100. **Goldstein AM, Tucker MA**. Genetic epidemiology of cutaneous melanoma: a global perspective. *Arch Dermatol*, **2001**;137(11):1493-1496.

101. **Autier P, Dore JF, EPIMEL, Grp EMC**. Influence of sun exposures during childhood and during adulthood on melanoma risk. *International Journal of Cancer*, **1998**;77(4):533-537.

102. **Begg CB, Orlow I, Hummer AJ, Armstrong BK, Kricker A, Marrett LD, Millikan RC, Gruber SB, Anton-Culver H, Zanetti R, Gallagher RP, Dwyer T, Rebbeck TR, Mitra N, Busam K, From L, Berwick M, Genes E, Melanoma Study G**. Lifetime risk of melanoma in CDKN2A mutation carriers in a population-based sample. *Journal of the National Cancer Institute*, **2005**;97(20):1507-1515.

103. **Della Torre G, Pasini B, Frigerio S, Donghi R, Rovini D, Delia D, Peters G, Huot TJ, Bianchi-Scarra G, Lantieri F, Rodolfo M, Parmiani G, Pierotti MA**. CDKN2A and CDK4 mutation analysis in Italian melanoma-prone families: functional characterization of a novel CDKN2A germ line mutation. *Br J Cancer*, **2001**;85(6):836-844.

104. **Paszkowska-Szczur K, Scott RJ, Serrano-Fernandez P, Mirecka A, Gapska P, Gorski B, Cybulski C, Maleszka R, Sulikowski M, Nagay L, Lubinski J, Debniak T**. Xeroderma pigmentosum genes and melanoma risk. *International journal of cancer Journal international du cancer*, **2013**;133(5):1094-1100.

105. **Goldstein AM, Landi MT, Tsang S, Fraser MC, Munroe DJ, Tucker MA**. Association of MC1R variants and risk of melanoma in melanoma-prone families with CDKN2A mutations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **2005**;14(9):2208-2212.

106. **Bastian BC**. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol*, **2014**;9:239-271.

107. **Goppner D, Leverkus M**. Prognostic parameters for the primary care of melanoma patients: what is really risky in melanoma? *J Skin Cancer*, **2011**;2011:521947.

108. **IBM Corp**. IBM SPSS Statistics for Windows. Version 20.0, Armonk, NY: IBM Corp., 2010.

109. **Aerts J, Nys J, Arckens L**. A highly reproducible and straightforward method to perform in vivo ocular enucleation in the mouse after eye opening. *J Vis Exp*, **2014**(92):e51936.

110. **Overwijk WW, Restifo NP**. B16 as a mouse model for human melanoma. *Curr Protoc Immunol*, **2001**;Chapter 20:Unit 20 21.

111. **Jensen MM, Jorgensen JT, Binderup T, Kjaer A**. Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper. *BMC Med Imaging*, **2008**;8:16.

112. **Tomayko MM, Reynolds CP**. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol*, **1989**;24(3):148-154.

113. **Bradford MM**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **1976**;72:248-254.

114. **Rio DC, Ares M, Jr., Hannon GJ, Nilsen TW**. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc*, **2010**;2010(6):pdb prot5439.

115. **Vaerman JL, Saussoy P, Ingargiola I**. Evaluation of real-time PCR data. *J Biol Regul Homeost Agents*, **2004**;18(2):212-214.

116. **Kontanis EJ, Reed FA**. Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors. *J Forensic Sci*, **2006**;51(4):795-804.

117. **Pfaffl MW**. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, **2001**;29(9):e45.

118. **Revelen R, D'Arbonneau F, Guillevin L, Bordron A, Youinou P, Dueymes M**. Comparison of cell-ELISA, flow cytometry and Western blotting for the detection of antiendothelial cell antibodies. *Clin Exp Rheumatol*, **2002**;20(1):19-26.

119. **Suchankova A, Ritterova L, Krcmar M, Krchnak V, Vagner J, Jochmus I, Gissmann L, Kanka J, Vonka V**. Comparison of ELISA and western blotting for human papillomavirus type 16 E7 antibody determination. *J Gen Virol*, **1991**;72 (Pt 10):2577-2581.

120. **Dittadi R, Catozzi L, Gion M, Brazzale A, Capitanio G, Gelli MC, Menegon A, Gardini G, Malagutti R, Piffanelli A**. Comparison between western blotting, immunohistochemical and ELISA assay for p185neu quantitation in breast cancer specimens. *Anticancer Res*, **1993**;13(5C):1821-1824.

121. **Nathan PJ, Wyndham EL, Burrows GD, Norman TR**. The effect of gender on the melatonin suppression by light: a dose response relationship. *J Neural Transm (Vienna)*, **2000**;107(3):271-279.

122. **Wetterberg L, Bratlid T, von Knorring L, Eherhard G, Yuwiler A**. A multinational study of the relationships between nighttime urinary melatonin production, age, gender, body size, and latitude. *Eur Arch Psy Clin N*, **1999**;249(5):256-262.

123. **Touitou Y, Fevremontange M, Proust J, Klinger E, Nakache JP**. Age-Associated and Sex-Associated Modification of Plasma Melatonin Concentrations in Man - Relationship to Pathology, Malignant or Not, and Autopsy Findings. *Acta Endocrinol-Cop*, **1985**;108(1):135-144.

124. **Lockley SW, Skene DJ, Arendt J, Tabandeh H, Bird AC, Defrance R**. Relationship between melatonin rhythms and visual loss in the blind. *J Clin Endocrinol Metab*, **1997**;82(11):3763-3770.

125. **Skene DJ, Arendt J**. Circadian rhythm sleep disorders in the blind and their treatment with melatonin. *Sleep Med*, **2007**;8(6):651-655.

126. **Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, Sari IP, Jaafarzadehshirazi MR, Maltby M, Bateman K, Goodman RL, Tilbrook AJ, Ubuka T, Bentley GE, Clarke IJ, Lehman MN**. Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology*, **2008**;149(11):5770-5782.

127. **Morgan PJ, Hazlerigg DG**. Photoperiodic signalling through the melatonin receptor turns full circle. *J Neuroendocrinol*, **2008**;20(6):820-826.

128. **Grinevich YA, Labunetz IF**. Melatonin, thymic serum factor, and cortisol levels in healthy subjects of different age and patients with skin melanoma. *Journal of pineal research*, **1986**;3(3):263-275.

129. **Murphy KG**. Kisspeptins: Regulators of metastasis and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol*, **2005**;17(8):519-525.

130. **Shirasaki F, Takata M, Hatta N, Takehara K**. Loss of expression of the metastasis suppressor gene KiSS1 during melanoma progression and its association with LOH of chromosome 6q16.3-q23. *Cancer research*, **2001**;61(20):7422-7425.

131. **Blask DE, Wilson ST, Zalatan F**. Physiological melatonin inhibition of human breast cancer cell growth in vitro: Evidence for a glutathione-mediated pathway. *Cancer research*, **1997**;57(10):1909-1914.

132. **Ying SW, Niles LP, Crocker C**. Human-Malignant Melanoma-Cells Express High-Affinity Receptors for Melatonin - Antiproliferative Effects of Melatonin and 6-Chloromelatonin. *Eur J Pharm-Molec Ph*, **1993**;246(2):89-96.

133. **Yoshida BA, Sokoloff MM, Welch DR, Rinker-Schaeffer CW**. Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field. *Journal of the National Cancer Institute*, **2000**;92(21):1717-1730.

8. EKLER

EK 1. Etik kurul onayı

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Toplantı Sayısı	Toplantı Tarihi	Toplantı Yeri	Oturum Başkanı
4	23.06.2014	Ç.Ü.T.F.-DETAUM	Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK

KARAR NO 1– Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'ndan Öğretim Üyesi Prof.Dr.Halil KASAP'ın sorumlu araştırmacı olarak yürütmesi öngörülen, **"Farelerde Gün Işığının Melatonin Hormonu, Kisspeptin Proteini Sentezi, Cilt Kanseri Oluşumu ve Metastaza Etkisinin İncelenmesi"** başlıklı proje, araştırma etiği yönünden değerlendirildi; toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

BAŞKAN
Prof. Dr . Ergin ŞİNGİRİK
Araştırmacı Uzman Üye
Farmakoloji A.B.D. Öğretim Üyesi

ÜYELER
Doç. Dr. Yusuf Kenan DAĞLIOĞLU
Veteriner Hekim
ÇÜTF-DETAUM Müdürü

Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Araştırmacı Uzman Üye
Mikrobiyoloji A.B.D. Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Mustafa EMRE
Araştırmacı Uzman Üye
Biyofizik A.B.D. Öğretim Üyesi

Prof .Dr.Gülşah SEYDAOĞLU
Araştırmacı Uzman Üye
Biyoistatistik A.B.D. Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Selim KADIOĞLU
Tıp Etiği Uzmanı Üye
Deontoloji ve Tıp Tarihi A.B.D. Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Bertan YILMAZ
Araştırmacı Uzman Üye
Tıbbi Biyoloji A.B.D. Öğretim Üyesi

Av. Mehmet Ali AKGÜL
Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi
[Meslek Dışı ve Kurum Dışı Üye]
Katılamadı

Sezgin KERTMEN
Sivil Üye
[Meslek Dışı ve Kurum Dışı Üye]
Katılamadı

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Adana'da doğdu. İlköğrenimini Ankara’da ortaöğrenimini Adana’da tamamladı. 2000’de Adana Fen Lisesinden mezun olup 2000’de Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünü kazandı ve 2008 yılında mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans programını kazandı. 2009 yılında aynı Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2011 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı ve aynı anabilim dalında doktora eğitimine başladı.