

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Tammam SİPAHİ

138060

FARKLI TÜRDE KANSERLİ HASTALARDA
MELATONİN SALINIM RİTMİ VE G PROTEİN
MUTASYONLARI

Orkide PALABIYIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Y.Ö. YÜKSEK LİSANS TEZİ
DOKÜMANTASYON BİRİMİ

138060

EDİRNE-2003

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Tammam SİPAHİ

FARKLI TÜRDE KANSERLİ HASTALARDA
MELATONİN SALINIM RİTMİ VE G PROTEİN
MUTASYONLARI

Orkide PALABIYIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Destekleyen Kurum: Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri TÜBAP: 451

Tez no: 77

EDİRNE-2003

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyofizik Anabilim Dalının Yüksek Lisans programı çerçevesinde hazırlanmış olan bu çalışma Enstitü Yönetim kurulunun 01.07.2003 tarih ve 51 sayılı toplantısının 6 nolu kararı ile belirlenen aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18.07.2003

Prof.Dr. Serap ŞENER
BAŞKAN

Prof.Dr. Müberra UYGUN
ÜYE



Yrd.Doç.Dr. Tammam SİPAHI
ÜYE

Prof.Dr. Müberra UYGUN
Enstitü Müdürü





TEŐEKKÜR

Tezimin her aŐamasında bilgi birikimini benimle paylaŐan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Tammam SİPAHI'ye, çalışma hayatımın her döneminde desteğini hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Seralp ŞENER'e, hasta serum ve dokularını toplamamda bana bölümlerinin imkanlarını sunan Trakya Üniversitesi Tıp Fakóltesi Cerrahi Anabilim Dalı'na, Trakya Üniversitesi Tıp Fakóltesi Kadın Hastalıkları Anabilim Dalı'na, Trakya Üniversitesi Tıp Fakóltesi Patoloji Anabilim Dalı'na, moral desteğim sevgili eŐim Onur PALABIYIK'a, aileme, arkadaşlarıma ve projemizi maddi olarak destekleyen Trakya Üniversitesi Araştırma Fonuna çok teŐekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Yüksek Canlılardaki Hücrelerin İletişimi	4
2.1.1. Kimyasal Haberciler	4
2.1.2. Kimyasal Habercileri Salgılayan Bezler	5
2.2. Pineal Bez	5
2.3. Melatonin	6
2.3.1. Melatonin Sentezi	7
2.3.2. Melatonin Salınımı	8
2.3.3. Melatonin Metabolitleri	11
2.3.4. Melatonin Reseptörleri	11
2.3.5. Melatoninin Fizyolojik Etkileri	12
2.4. Kimyasal Habercilerin Etkilediği Reseptörler	12
2.5. Sinyal İletim Mekanizmasının Birincil ve ikincil Habercileri	13
2.6. GTP-Bağlayan Proteinler Süper Ailesinin Üyeleri	13
2.7. G Proteinlerinin Yapısı	15
2.7.1. G Proteinin α -Alt Birimlerinin Yapısı	18
2.7.2. G Proteinlerinin α -Alt Birimlerinin Çeşitleri	18
2.7.3. G Proteini ve İnsan Hastalıkları	19
2.7.4. G proteinin Onkogenik Roller	20
2.8. Over Kanseri	20
2.9. Meme Kanseri	22
2.9.1. Meme Kanseri ve Risk Faktörleri	22
2.9.2. Hormonal Risk Faktörleri	22
2.9.3. Hormonal Olmayan Risk Faktörleri	23
2.10. Tümör Belirteçleri	23
2.10.1. Karsinoembriyonik Antijen (CEA)	23

2.10.2. CA 125	24
2.10.3. CA 15-3	24
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	25
3.1. Hasta ve Denekler	25
3.2. Kimyasal Maddeler	25
3.3. Elektroforetik Analizde Kullanılan Standartlar	26
3.4. Kitler	27
3.4.1. CEA, CA 125, CA 153 Kitleri	27
3.4.2. Melatonin Kiti	27
3.5. Kullanılan Yöntem	27
3.5.1. Serum Tümör Belirteçlerinin Düzeylerinin Ölçülmesi	27
3.5.2. Serum Melatonin Düzeyinin Ölçülmesi	29
3.6. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	30
3.7. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	31
3.7.1. DNA'nın Elde Edilmesinde Kullanılan Çözeltiler	31
3.7.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Çözeltiler	32
3.7.3. Agaroz Gel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler	32
3.7.4. SSCP Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	33
3.7.5. Gümüş Nitrat Boyamada Kullanılan Çözeltiler	34
3.8. Dokularda Genomik DNA İzolasyonu	34
3.9. Genomik DNA'nın Derişimleri ve Saflığı	35
3.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	35
3.10.1. Kullanılan Primerlerin Dizileri	36
3.10.2. PZR Koşulları	36
3.10.3. Agaroz Gel Elektroforezi	37
3.11. SSCP (Tek Sarmal Konformasyon Polimorfizmi)	37
3.12. İstatistik	37
4. BULGULAR	38
4.1. Tümörlü Hastaların Melatonin Salınım Ritminin İncelenmesi	38
4.2. Tümör Dokularından Genomik DNA İzolasyonu	44
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	44
4.3.1. G _{12α} 'nın 179. Kodonunu İçeren Bölgenin Çoğaltılması	44
4.3.2. G _{12α} 'nın 205. Kodonunu İçeren Bölgenin Çoğaltılması	45

4.3.3. $G_{12\alpha}$ 'nın 179. ve 205. Kodonları İçeren Bölgenin oğaltılması	46
4.4. SSCP (Tek Sarmal Konformasyon Polimorfizmi) Yöntemiyle Mutasyonların İncelenmesi	47
4.4.1. $G_{12\alpha}$ Genindeki gip Mutasyonların SSCP Yöntemiyle İncelenmesi	47
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ	56
7. ÖZET	57
8. SUMMARY	58
9. KAYNAKLAR	59
10. RESİMLEMELER LİSTESİ	64
10.1 Şekiller	65
10.2. Tablolar	66
11. ÖZGEÇMİŞ	67
12 EK	68

SİMGE VE KISALTMALAR

cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
CEA	Karsinoembriyonik Antijen
DAG	Diaçilgliserol
EtBr	Etüdyum Bromür
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GDP	Guanin Difosfat
GTP	Guanin Trifosfat
IP3	İnositoltrifosfat
Mel1a	Melatonin Reseptörü 1'in alt tipi 1
Mel1b	Melatonin Reseptörü 1'in alt tipi 2
MT1	Melatonin Reseptörü 1
MT2	Melatonin Reseptörü 2
MT3	Melatonin Reseptörü 3
Pi	İnorganik Fosfat
PIP ₂	Fosfotidil inositol Difosfat
RIA	Radyoimmun Assay
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SSCP	Tek Sarmal Konformasyon Polimorfizmi
TSH	Troid Uyarıcı Hormon
UV	Ultraviyole

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Pineal bez ve salgıladığı en önemli madde olarak bilinen melatonin son yıllarda gittikçe artan sayıda bilimsel araştırmaya konu olmuş ve olmaya devam edeceği düşünülmektedir. Melatonin ile yapılan çalışmalar, bu hormonun plazmadaki değişen düzeyinin birçok fizyolojik süreçte ve çeşitli hastalıkların fizyopatolojisinde önemli roller üstlendiğini göstermiştir. Pek çok faktör pineal bezde melatonin sentez ve salınımını dolayısı ile plazma melatonin düzeyini etkiler. ^{1,2} Bu faktörlerden en iyi bilineni ve en etkilisi, ortamın ışık durumu yani aydınlık ya da karanlık olmasıdır. Sentez ve salınım, karanlıkta superiyor servikal gangliyonlardan gelen sinyallerin pinealositleri uyarıcı etkisi ile artarken, aydınlıkta azalmaktadır. Plazma melatonin düzeyi ilk önce saat 22⁰⁰-24⁰⁰ arasında bir yükselme gösterir, 01⁰⁰-04⁰⁰ arasında pik yapar ve 06⁰⁰-10⁰⁰ arasında tekrar gündüz seviyelerine düşer. ³

Yapılan araştırmaların sonucu melatoninin hücre membranında üç reseptör tipi tarafından işlev görebildiğini göstermiştir. Bu reseptörler MT1 (yüksek afinite [pikomolar]), MT2 (düşük afinite [nanomolar]) ve yakın zamanda bulunan (guanin redüktaz ailesine ait olan) MT3 reseptörleridir. ⁴⁻⁹ MT1 reseptörlerinin aktivasyonu Gi proteinleri aracılığı ile adenilat siklaz inhibisyonu sonucu siklik adenozin monofosfat (cAMP) düzeyinde düşmeye neden olur. MT1 reseptörleri olasılıkla renal fonksiyon, uyku, sirkadyen ritim ve üreme işlevine katılmaktadır. ¹⁰⁻¹³ MT1 reseptörünün Mel1a (hipofizer pars tüberalisdekiler üreme ile ilgili, suprakiazmatik nükleusdakiler sirkadyen etki ile ilgili) ve Mel1b (retina ve beyinde) olmak üzere iki alt tipi vardır. MT2 düşük afiniteli, fosfoinositol hidrolizi ile etki gösterir ancak dokulardaki dağılımı henüz tam olarak bilinmemektedir. ^{14,15} Son zamanlarda MT2 reseptörüne benzer bağlayıcı profil gösteren bir protein Suriye kobayı (Hamster) böbreğinden elde edilmiş ve MT3 olarak adlandırılmıştır. Araştırmalar bu proteinin detoksifikasyonda yer alan bir enzim olan insan guanin redüktaz 2'ye %95 benzerlik gösterdiğini saptamıştır. Ancak bu proteinle ilgili pek fazla bilgi bulunmamaktadır. ¹⁶⁻²⁰

Sinyal ileti sistemlerinde görev alan ve melatonin reseptörlerinden aldıkları sinyalleri hücre içine aktaran moleküller ise heterotrimerik G proteinleridir. G

proteinlerinin üç alt birimden (α , β ve γ) oluştuğu saptanmıştır. α -alt birimi guanin nükleotitleri bağlayan diğer proteinlerle yapısal ve işlevsel benzerlikler gösterir ve birincil yapısı G proteinini tanımlar. ²¹ β ve γ -alt birimleri birbirlerine sıkıca bağlıdır ve ancak çok güçlü denatürantlarla işlem görürlerse ayrılırlar. ²² Her G proteininde $\beta\gamma$ kompleksi bulunmasına rağmen, G proteinleri α -alt birimlerine göre sınıflandırılırlar. ²¹

G-proteinleri aracılığıyla gerçekleşen sinyal ileti sistemlerinin bileşenlerinin yapı ve işlevlerine ait son yıllarda biriken bilgi, bu bileşenlerdeki bozuklukların hastalıklara yol açabileceğine işaret etmektedir. ²³⁻²⁵ Tümör gelişimi ile pineal bezin salgıladığı ürünler arasında da olası ilişkilerin olduğu çok çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. ²⁶⁻²⁹ Pineal fonksiyonun baskılanması, meme, over, prostat ve malign melanoma gibi çeşitli kanser türlerinin etiyolojisinde rol aldığı saptanmıştır. ²⁷⁻²⁹ Kanserli hastalarda pineal ve immün fonksiyon bozuklukları konusunda çok sayıda çalışma yapılmış ve serum melatonin düzeyinin azalışı malignansi için ipucu olabileceği ileri sürülmüştür. ²⁸⁻³⁰

Bu çalışmanın amacı, meme CA'lı ve over CA'lı hastaların tümörlerinin oluşmasında melatonin salınım ritminin incelenmesi, ayrıca G proteinin olası rolüne açıklık kazandırmak üzere $G_{i2\alpha}$ 'nın (gip) mutasyonlarını inceleyerek G proteinin mutasyonlarının hastalık mekanizmasındaki potansiyelini araştırmaktır.

Çeşitli tetkiklerle birlikte ve Kemiluminescent İmmunassay tekniği ile desteklenerek tanısı konmuş, meme CA'lı ve over CA'lı hasta gruplarından gece boyunca saat 22⁰⁰, 24⁰⁰, 02⁰⁰, 04⁰⁰ ve 06⁰⁰ da olmak üzere 5 kez kanları alınıp serum melatonin seviyeleri Radyoimmünassay (RIA) yöntemiyle belirlendi. Sağlıklı deneklerden oluşan kontrol grubundan da eş zamanlı olarak kanlar toplandı ve serum melatonin seviyeleri aynı yöntemle belirlendi. Kanserli hastaların melatonin düzeyleri ile sağlıklı deneklerin melatonin düzeyleri karşılaştırılarak da kanser ve melatonin düzeyi ilişkisi saptandı.

Ayrıca tümörlerin oluşmasında G proteinlerin rolüne açıklık kazandırmak için aynı hasta gruplarının tümörlü dokularından parça alındı ve $G_{i2\alpha}$ proteinlerinin α -alt birimlerindeki mutasyonları incelemek için doku örneklerinden DNA elde edildi. DNA elde edildikten sonra $G_{i2\alpha}$ 'nın 179 ve 205 numaralı kodonlarının ikisini içeren bölge ile 179 ve 205 kodonlarını ayrı ayrı içeren bölgeler özgün primerler kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemiyle çoğaltıldı. PZR ürünleri agaroz

jellerinde yürütüldü ve Etüdyum bromür (EtBr) ile boyanarak Ultraviyole (UV) altında görüntülendi. Üzerindeki mutasyonlar Tek Sarmal Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) yöntemi kullanılarak belirlendi ve G proteininin mutasyonlarının hastalık mekanizmasındaki potansiyeli araştırıldı.

Çalışmanın hastalığın erken teşhis ve tanısının konmasında izlenecek sağlık politikalarına yardımcı bilgiler vermesi beklenmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yüksek Canlılardaki Hücrelerin İletişimi

Yüksek canlıların hücreleri arasındaki iletişim kimyasal haberciler aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. Bu haberciler farklı dokuların metabolik etkinliklerini düzenlemekte, organizmanın çevresel değişimlere uyum sağlamasına yardımcı olmakta ve organizmayı çoğalma sürecine göre hazırlamaktadır. Tüm kimyasal haberciler, habercinin varlığını saptayan ve reseptör adı verilen proteinler aracılığıyla işlev görürler. Kimyasal habercilerin özgün reseptörlere bağlanmasıyla bir dizi kimyasal tepkime sonucu hücre içi yanıt oluşur.³¹

2.1.1. Kimyasal Haberciler

Kimyasal haberciler çok çeşitlidirler ve değişik gruplar içinde sınıflandırılırlar:

a-) Sinir sisteminde görev alan asetilkolin, melatonin, norepinefrin, serotonin ve dopamin gibi haberciler içeren nörotransmitterler.³²

b-) Glikoprotein yapısında olan ve viral infeksiyonlara karşı korunum mekanizmasını tetikleyen interferonlar.³³

c-) Bir canlı türünden başka bir canlı türüne geçebilen feromonlar.³⁴

d-) Büyüme faktörleri gibi hormon benzeri peptidler.

e-) Bir hücre yada hücre grupları tarafından vücut sıvılarına salgılanarak vücudun diğer hücrelerinde fizyolojik kontrol görevini yapan hormonlar.

Kimyasal habercilerin bazıları vücuttaki bütün dokuları etkilerken, (örneğin hipofiz ön bezinden salgılandıktan sonra kan yolu ile tüm vücuda dağılan ve vücut bölümlerinin çoğunda büyümeye neden olan büyüme hormonu), diğerleri ise hedef dokuyu seçip sadece onu etkiler.(örneğin pineal bezinden salgılandıktan sonra hedef doku olarak gonadal bezini uyurarak fonksiyonlarını baskılayan melatonin).

2.1.2. Kimyasal Habercileri Salgılayan Bezler

Büyüme hormonu, adrenokortikotropin, tiroid uyarıcı hormon (TSH), folikül uyarıcı hormon (FSH), lüteinizan hormon, prolaktin, antidiüretik hormon (vasopressin) ve oksitosin hormonları salgılayan hipofiz bezi, kortizol ve aldosteron salgılayan böbrek üstü bezi korteksi, tiroksin, triiodotironin ve kalsitonin hormonları salgılayan tiroid bezi, insülin ve glukagon hormonları salgılayan pankreasın langerhans adacıkları, östrojen ve progesteron hormonları salgılayan overler, testesteron hormonu salgılayan testisler, parathormon hormonu salgılayan paratiroid bezi, melatonin, serotonin hormonlarını salgılayan pineal bez ve insan korionik gonadotropini, östrojen, progesteron ve insan somatomammotropini hormonları salgılayan plasenta en önemli endokrin salgı bezleri olarak sayılabilir.³⁵

2.2. Pineal Bez

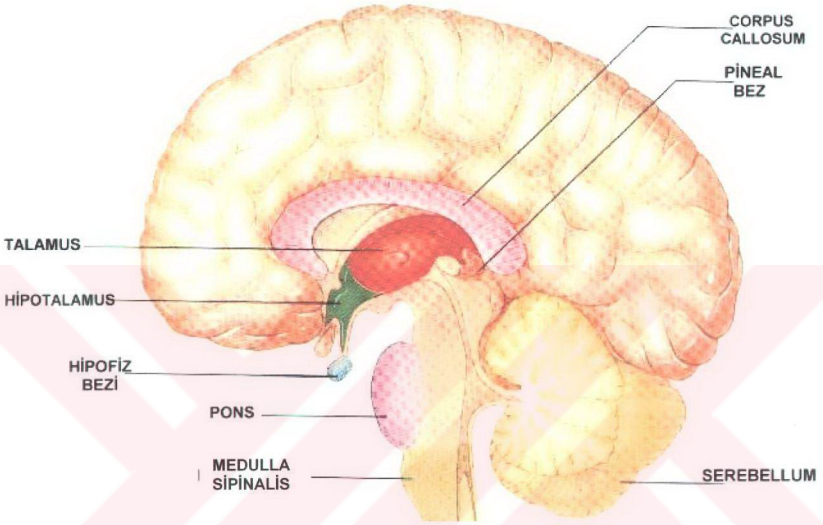
Pineal bez, adını çam kozalağına benzemesine borçludur. İnsan vücudundaki en küçük endokrin bezdir. Ortalama 100-150 mg ağırlığında, 5-10 mm boyunda ve 3-5 mm genişliğinde konik bir bezdir. Ağırlığında ve boyutlarında ergenlik çağına kadar artış, ergenlik çağından sonra ise azalış görülür.^{36,37}

Embriyonal gelişimin 7. Haftasında diensefalonun tavanının arka bölümünden çıkan ektodermal bir divertikülden gelişir. Pia mater orijinli konnektif doku pineal bezi çepeçevre sarar. Damarlar ve miyelinsiz sinir lifleri içeren bağ doku, septumlar şeklinde pineal bezin parankimi içine doğru uzanır (şekil 2.1).³⁸

Memelilerde pineal bez elektriksel uyarıları hormonal uyarılara dönüştüren bir nörendokrin transduser işlevi görür. Pineal bez her iki kollikulus superiorun arasındaki çukurlukta ve orta hatta yer alan bir yapıdır. Yukarıda corpus callosumun splenium kısmından üçüncü ventrikülün tela choroidea'sı ile ayrılır. Pineal bezin öne doğru uzanan sap kısmı üst ve alt olmak üzere iki laminaya ayrılır. Bu iki lamina arasında, üçüncü ventrikülün arka-üst kısmında bulunan recessus pinealis yer alır.³⁹ Pineal bezde diğer sirkumventrikuler organlarda olduğu gibi kan beyin bariyeri bulunmamaktadır. Bu özellikli durum bez sekresyonlarının direkt beyin omurilik sıvısına veya kana karışmasını sağlar.⁴⁰

Pineal bezin parankimi pinealositler ve glia hücrelerinden oluşur. Nöroepitelial hücreler olan pinealositler, hafif bazofilik sitoplazmalı hücrelerdir; belirgin nükleoluslar

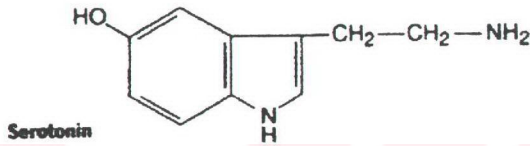
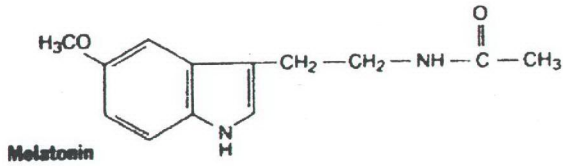
içeren çekirdekleri büyük, düzensiz veya birkaç lopludur. Sitoplazmik uzantılı hücreler olan pinealositler, granüllü ve granülsüz endoplazmik retikulum, mikrotübüller, lipid damlacıkları, mitokondriler ve çok sayıda golgi kompleksi içerirler.⁴¹



Şekil 2.1. İnsan Beyni (Sobbotta İnsan Anatomi Atlası)

2.3. Melatonin

Pineal bezin en önemli ve en iyi bilinen ürünü melatonindir. Pineal bez melatoninini sentezlerken ara ürün olarak serotoninini de sentezleyip salgılar (şekil 2.2).



Şekil 2.2. Melatonin ve Serotonin

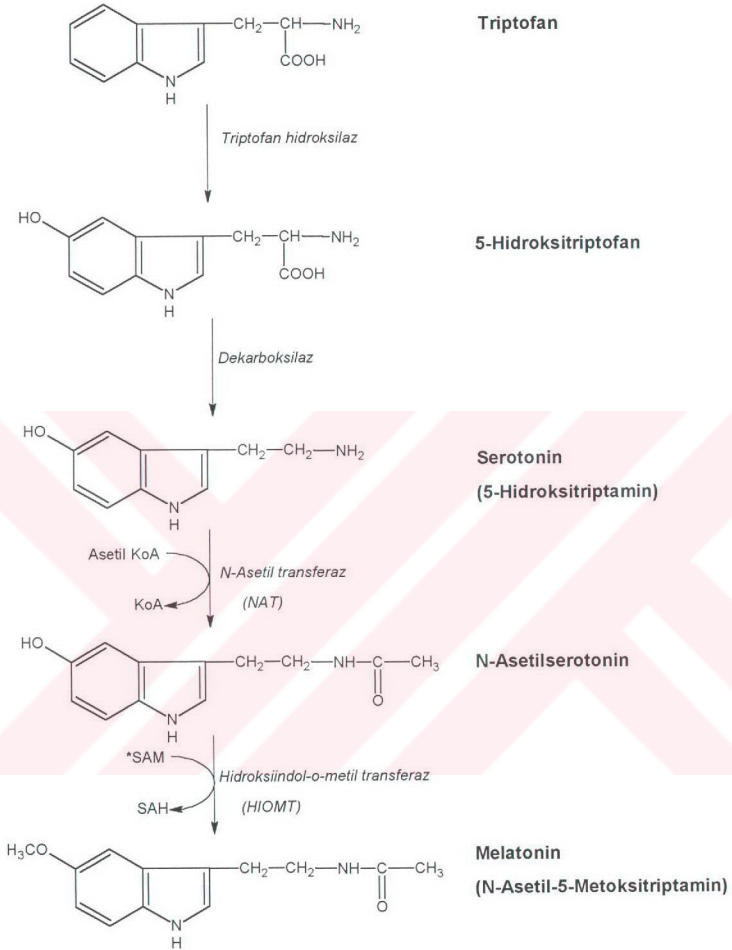
Pineal bezin salgıladığı başlıca ürünler Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Pineal bezin salgıladığı başlıca ürünler

1- Melatonin
2- 5-Metoksitriptamin
3- Hidroksiindol asetikasit
4- Metoksitriptofol
5- Hidrositriptofol
6- Metoksiindol asetikasit

2.3.1 Melatonin Sentezi

Melatonin triptofan aminoasitinden sentezlenir. Sentez basamakları sırasında oluşan ara maddelerden biri de serotonindir. Melatonin sentez evreleri Şekil 2.3'de gösterilmiştir.⁴²



Şekil 2.3. Melatonin sentez evreleri ³⁰

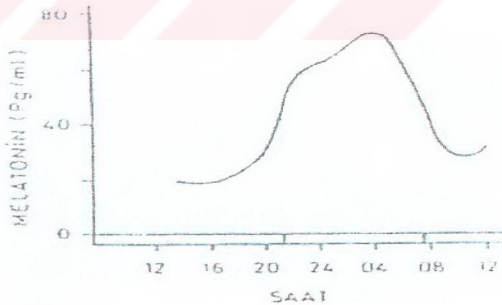
2.3.2. Melatonin Salınımı

Pek çok faktör pineal bezde melatonin sentez ve salınımını dolayısı ile plazma melatonin düzeyini etkiler (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Melatonin sentezini ve salınımını etkileyen başlıca faktörler

1- Ortamın ışık durumu
2- Kişinin yaşı
3- Mevsim
4- Ortam sıcaklığı
5- Hormonlar
6- Manyetik alanlar

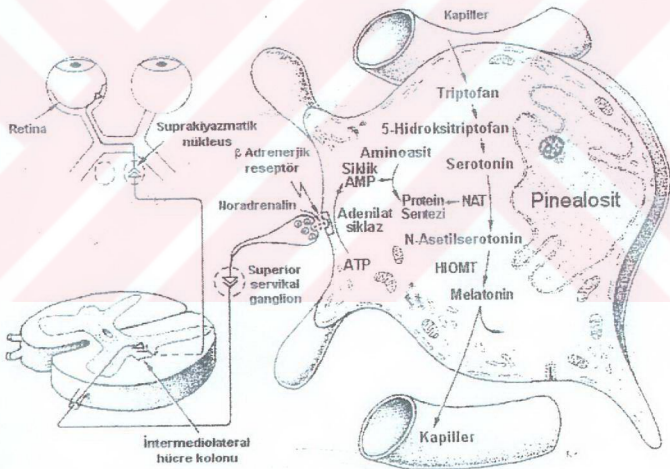
Bu faktörlerden en iyi bilineni ve en etkili, ortamın ışık durumudur. Sentez ve salınım, karanlıkta superiyor servikal gangliyonlardan gelen sinyallerin pinealositleri uyurucu etkisi ile artarken aydınlıkta azalmaktadır. Superiyor servikal gangliyonlardaki aksonları pineal beze giden sempatik postganglioner nöronların deşarj frekansları ortamın aydınlık derecesi ile ters orantılıdır. Bu nöronların deşarj frekansları gündüz azalır, gece artar. Dolayısıyla melatonin sentez ve salınımı konsantrasyonu gündüz azalır, gece artar. Bu nedenle melatonin yapımı ve serum konsantrasyonu konusunda sirkadyen bir ritim söz konusudur (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Sirkadyen serum melatonin ritmi

Pineal bezin inervasyonunu superiyor sempatik gangliyonlardan gelen sempatik postganglioner lifler sağlar. Pineal bezin inervasyonunda ışık ve görme yolları da

önemlidir. Işık enerjisi retinadaki fotoreseptörlerce elektrik enerjisine dönüştürülür ve aksiyon potansiyelleri şeklinde görme merkezine iletilir. Görme reseptörlerinde oluşan bilgiyi taşıyan lifler suprakiazmatik nukleustaki nöronlarla sinaps yapar. Bu nukleustaki nöronların aksonları ise görme merkezine gider, ancak bazı lifler, aşağı doğru inerek torakal omurilikteki sempatik preganglioner nöronlarda sonlanırlar. Söz konusu sempatik preganglioner nöronların aksonları superiyor servikal gangliondaki belirli nöronlarda, superiyor servikal ganglionlardaki ilgili nöronların aksonları ise pineal bezde sonlanırlar (Şekil 2.5) ¹¹.



Şekil 2.5. Gözlerle pineal bez arasındaki sinirsel bağlantı ve pineal bezde melatonin biyosentezi.

Pineal bezde sonlanan sempatik postganglioner liflerden noradrenalin salınır. Pinealositlerde bulunan β_1 reseptörleri ile noradrenalinin etkileşmesi sonucunda membrandaki adenilat siklaz aktive olur ve sitoplazmada cAMP artar. cAMP artışı ilgili enzimlerin aktivasyonu ile melatonin sentezinin artmasına neden olur. Melatonin

sentezinin yaklaşık % 85'inden β_1 reseptörlerinin uyarılması, yaklaşık % 15'inden ise α_1 reseptörlerinin uyarılması sorumludur. α_1 reseptörlerinin uyarılması kalsiyum kanallarının açılmasına ve inositoltrifosfat (IP₃) oluşumuna yol açar. ^{43,44}

Bir çok endokrin bez oluşturdukları hormonları depolarlar. Pineal bez için bu geçerli değildir. Çünkü pineal bezde melatonin oluşumu yükseldiği anda kandaki titreleri de yükselmektedir. Melatonin oluşur oluşmaz hemen kana serbestlenir, böylece pineal bezde melatonin oluşumu ile plazmadaki seviyeleri arasında güçlü bir ilişki vardır. ⁴⁵

Melatonin kanda daha çok plazma proteinlerine bağlı olarak bulunur. Melatoninin albümine bağlı bulunması idrarla atılımını sınırlar. İdrarda melatoninin ancak % 1 kadarı formu değişmemiş olarak bulunur.

2.3.3. Melatonin Metabolitleri

İnsanda melatoninin metabolize olduğu primer yer karaciğerdir. En önemli metaboliti hidroksilasyonla oluşan 6-hidroksimelatoninidir. Sülfürik asit ve daha az olarak glukuronik asitle konjuge olur ve bu da idrarla atılır. Melatonin oluşumunda prekürsör olan N-asetilserotonin de insanlarda melatonin metaboliti olduğu bulunmuştur. Böylece melatonin metabolizmasında, 6-hidroksilasyon gibi demetilasyon da spesifik bir yoldur. Melatoninin kendi prekürsörüne dönüşmesi melatonin sentezinin kompleks bir feed back mekanizma ile kontrol edildiğini göstermektedir. Metabolize olmayan melatonin ve metabolitleri idrarla atılır. İdrardaki metaboliti olan 6-sulfatoksimeleatonin serum melatonin konsantrasyonu ile yakın ilişkilidir.

2.3.4. Melatonin Reseptörleri

Melatonin reseptörlerinin 3 grubu tanımlanmıştır. MT1, yüksek afiniteli, guanozin trifosfat (GTP) bağlama proteinleri ailesinin bir üyesidir. MT1 reseptörlerinin aktivasyonu hedef hücrelerde adenilat siklaz aktivitesinin baskılanmasına neden olur. Bu reseptörler olasılıkla retina işlevine, sirkadyen ritme ve üreme işlevine katılmaktadır. ⁵⁻⁹

MT1 reseptörlerinin Mel-1a (hipofizer pars tüberalisdekiler üreme ile ilgili, supraliazmatik nukleusdakiler sirkadyen etki ile ilgili) ve Mel-1b (retina ve beyinde) olmak üzere 2 alt tipi vardır. ¹⁴

MT2 ve MT3 reseptörleri ise düşük afiniteli, fosfoinositol hidrolizi ile etki gösterir ancak dağılımları henüz tam olarak belirlenmemiştir. ^{15,16}

İnsan beyninin çeşitli bölgelerinde, bağırsakta, overlerde ve kan damarlarında melatonin reseptörleri bulunur.

2.3.5. Melatoninin Fizyolojik Etkileri

Melatoninin fizyolojik etkileri son yıllarda önemli bir ilgi alanını oluşturmaktadır. Bu nedenle melatoninin çeşitli süreçlerdeki etkileri konusunda yoğun bilgi birikimi söz konusudur. Melatoninin etkili olabileceği bazı süreçler Tablo 2.3'de verilmiştir. ²⁹

Tablo 2 3. İnsanlarda melatoninin etkili olabileceği bazı olaylar

Reprodüktif olaylar	Nöropsikiyatri	Diğer
Menstruel siklus	Uyku ve bozuklukları	Bağıışıklık
Spermatogenez	Anoreksiya nervoza	Kanser
Hipotalamik amenore	PMD	Yaşlanma
Premenstuel sendrom	Epilepsi	Termogülaston
Puberte prekoks	Şizofreni	Antioksidan etki
Puberte tarda	Mevsimlik affektif bozukluk	Tiroid ve adrenal bozuklukları
Kontrasepsiyon	Otizm	Jet - lag

2.4. Kimyasal Habercilerin Etkilediği Reseptörler

Kimyasal habercilerin bir kısmı sadece hücre içindeki reseptörlerle etkileşime girerken bir kısmı da hücre membranının dış yüzeyinde bulunan reseptörlerle etkileşime girer. Hücre membranının dış yüzeyinde bulunan reseptörler 3 sınıftan oluşur:

- a) G-proteinleriyle kenetli reseptörler. ⁴⁶
- b) İyon kanalı kenetli reseptörler.

c) Enzim kenetli reseptörler.

G-proteinleriyle kenetli reseptörler hayvanlarda tanımlanmış yüzden fazla üyesi ile en geniş hücre-yüzey reseptörleri ailesini oluşturur. Bu reseptör ailesi membranı 7 kez kat eden proteinler süper ailesindedir. ⁴⁷

2.5. Sinyal İletim Mekanizmasının Birincil ve İkincil Habercileri

Hücre membranının dış yüzeyinde bulunan reseptörün kimyasal haberciyle etkileşimi sonucu ikincil haberci adı verilen bir aracı molekül etkinleşir. Kimyasal habercinin kendisi ise birincil habercidir. cAMP ve fosfatidil inositol difosfat (PIP₂) en yaygın iki ikincil habercilerdir. cAMP; adenilat siklaz yolunda görev alır ve protein kinazların etkinleşmesini sağlar. PIP₂ ise fosfoinositit tepkime şelalesinde görev alır ve hidrolizlenerek inositol trifosfat (IP₃) ve diaçilgliserol (DAG) adlı iki hücre içi ulağa dönüşür. IP₃ kalsiyumun endoplazmik retikülünden stoplazmaya salınımını gerçekleştirerek bu yoldaki sinyal mekanizmasını tetiklerken, DAG protein kinazları etkinleştirir. ⁴⁸

2.6. GTP-Bağlayan Proteinler Süperailisinin Üyeleri

GTP-bağlayan proteinler süper ailesi aşağıdaki üyelerden oluşmaktadır:

a) Protein sentez faktörleri.

b) Membran-geçişli sinyal süreçlerinde yer alan heterotrimerik GTP-bağlayan proteinler (kısaca G proteini).

c) Protoonkogenik ras proteinleri.

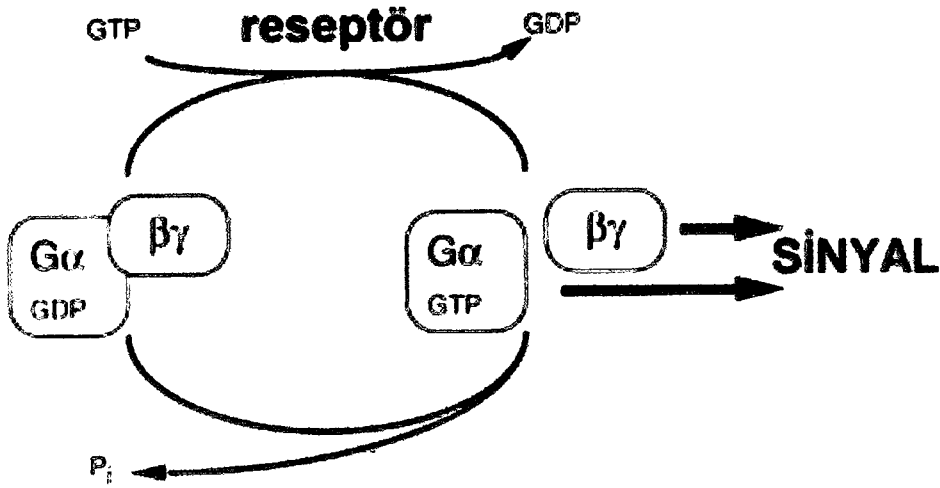
d) Rab, rap, rho, rac, smg21, smg25, YPT, SEC4, ARF genlerinin ürünleri olan düşük molekül ağırlıklı GTP-bağlayan proteinler

e) Tübülinler

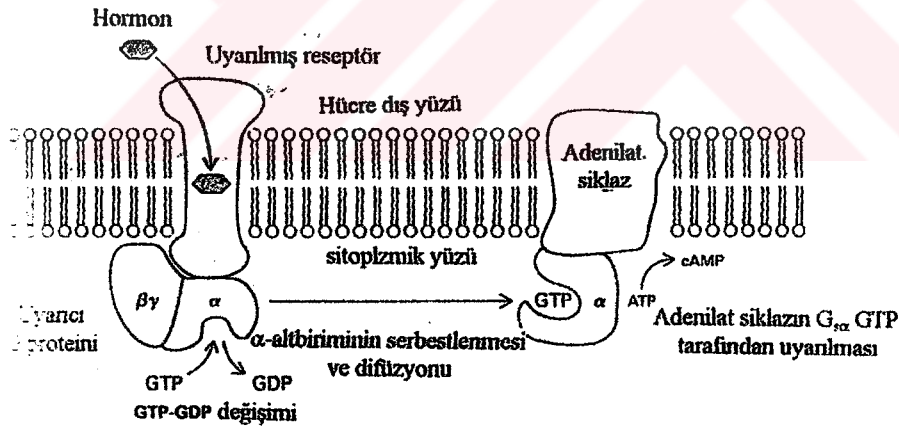
Sinyal iletiminde rol alan bütün GTP-bağlayan proteinler GTP bağlar ve hidrolizler. Bu özellik proteinin çok sayıdaki farklı hücresel süreçte moleküler bir anahtar olarak işlev görmesi açısından çok önemlidir. GTP-bağlayan proteinler, ligandın fosfat potansiyeline bağlı olarak iki form arasında gidip gelirler (Şekil 2.6)

GTP-bağlı form aktif yapıdır. Bu formda protein hedef molekülü tanıyıp onunla etkileşime girer (Şekil 2.7). Bağlı GTP'nin GDP ve inorganik fosfata (Pi) hidrolizlenmesiyle, yapı GDP-bağlı forma yani inaktif forma kayar. GDP-bağlı formun

değiştirmesi sonucu gerçekleşir. Bu basamak dışarıdaki enerjinin GTP formuyla girdiği basamaktır. ⁴⁹



şekil 2.6. G proteinlerinin GTPaz dōngüsü⁴⁹



şekil 2.7. Adenilat siklazın Gs tarafından uyarılması.⁴⁸

2.7. G Proteinlerinin Yapısı

Çok sayıda hormonal ve duysal sinyal iletiminde gōrev alan heterotrimerik G proteinleri α , β ve γ alt birimlerinden oluşmaktadır. ⁵⁰ Bu alt birimlere ilişkin

özellikler Tablo 2.4 ve Tablo 2.5'de gösterilmiştir. α -alt birimi guanin nükleotitleri bağlayan diğer proteinlerle yapısal ve işlevsel benzerlikler gösterir ve birincil yapısı G proteinini tanımlar. ²¹ β ve γ -alt birimleri birbirlerine sıkıca bağlıdırlar. ²² Her G proteininde $\beta\gamma$ kompleksi bulunmasına rağmen, G proteinleri α -alt birimlerine göre sınıflandırılır. ²¹

α -alt birimi guanin nükleotitlerinin (GDP veya GTP) bağlandığı yüksek ilginlikli tek bağlanma bölgesine sahiptir. α -alt biriminin GTP bağlı formu $\beta\gamma$ kompleksinden ayrılır, membran iç yüzeyinde difüzlenerak efektör moleküllerle etkileşime girer ve hücreyel yanıtı oluşturacak olan zincirleme tepkimeyi başlatır. ^{51,52} Son yıllarda α -alt birimi gibi $\beta\gamma$ kompleksinin de bazı efektör moleküllerle etkileşime girebildiği ve bu moleküllerin etkinliğini değiştirebildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. ⁵³

Tablo 2.4. Memeli G proteini α -alt birimleri ⁵¹

AİLE	ALT TİP	EKSPRESYON	EFEKTÖRLER
$G\alpha_s$	$G\alpha_{sS}$ (2form) ^a	Her yer	Adenilat siklaz (tüm tipler)
	$G\alpha_{sL}$ (2form) ^a	Her yer	Ca^{2+} kanalı(L tipi)↑
	$G\alpha_{olf}$	Koku epiteli	Adenilat siklaz ↑
$G\alpha_{i/o}$	$G\alpha_{gust}$	Tat hücreleri	?
	$G\alpha_{t-r}$	Retinal çubuk, tat hücreleri	cGMP fosfodiesteraz ↑
	$G\alpha_{t-c}$	Retinal koni	cGMP fosfodiesteraz ↑
	$G\alpha_{i1}$	yaygın	
	$G\alpha_{i2}$	heryer	Adenilat siklaz (tipI,V,VI) ↓
	$G\alpha_{i3}$	yaygın	
	$G\alpha_{o1}$ ^a	Nöron, nöroendokrin hücre	Ca^{2+} kanalı (L-/N-tipi) ↓
$G\alpha_{o2}$ ^a	Nöron, nöroendokrin hücre	Ca^{2+} kanalı (L-/N-tipi) ↓	
	$G\alpha_z$	Nöron, trombosit	?
$G\alpha_q$	$G\alpha_q$	her yer	

Tablo 2.4 (devam). Memeli G proteini α -alt birimleri⁵¹

$G\alpha_{11}$	her yer	Fosfolipaz C β \uparrow
$G\alpha_{14}$	Böbrek, akciğer, dalak	($\beta_3 \geq \beta_2 > \beta_4$)
$G\alpha_{15/16}^b$	Hemopoietik hücre	
$G\alpha_{12}$	her yer	?
$G\alpha_{13}$	her yer	?

^a ekli varyantlar

^b tür varyantları ($G\alpha_{15}$, fare, $G\alpha_{16}$, insan)

G proteinleri GDP-bağlı dinlenme durumunda iken heterotrimerik ($\alpha\beta\gamma$) yapıdadır ve reseptör yada efektörle etkileşim halinde değildir. Ligandın reseptörle bağlanması ile reseptörde yapısal bir değişim gerçekleşir ve GDP-bağlı heterotrimerik formdaki G proteinine bağlanması için yüksek ilginliğe sahip reseptör bölgesi açığa çıkar. ⁵⁴ G proteini ile ligand tarafından uyarılmış reseptör arasındaki etkileşimin çok sayıda bölge üzerinden olduğu ve G proteinin reseptör tarafından uyarılması ile $G\alpha$ 'da GDP'nin GTP ile yer değiştirdiği düşünülmektedir. ⁵⁵ GTP'nin bağlanması ile, α -alt biriminin reseptöre ve $\beta\gamma$ kompleksine ilgisi azalır, $G\alpha$ -GTP, $\beta\gamma$ -alt biriminden ayrılarak etkinleşir ve bir efektör molekülü ile etkileşime girer. GTPaz aktivitesi ortaya çıkmasıyla GTP'yi GDP'ye hidrolizler ve G proteinini aktif olmayan dinlenme durumuna döndürür. ($G\alpha$ -GDP) efektörden ayrılarak, $\beta\gamma$ -alt birimi ile bir araya gelir. ^{51,54}

Tablo 2.5. Memeli G proteini β ve γ Alt Birimleri⁵¹

ALT TİP	EKSPRESYON	EFEKTÖR VE ETKİNLEŞTİĞİ PROTEİN
β_1	Yaygın, retinal çubuk	
β_2	Yaygın dağılım	
β_3	Yaygın, retinal koni	Adenilat siklaz tip I \downarrow
β_4	Yaygın dağılım	Adenilat siklaz tip II, IV \uparrow
β_5	Çoğunlukla beyin	Fosfolipaz C β ($\beta_3 > \beta_2 > \beta_1$) \uparrow

Tablo 2.5 (devam). Memeli G proteini β ve γ Alt Birimleri⁵¹

γ_1	Retinal çubuk	Fosfolipaz A ₂ ↑
γ_2	Çoğunlukla beyin	Reseptör kinaz (GRK 2 ve 3) ↑
γ_3	Çoğunlukla beyin	Fosfoinositid 3 kinaz γ ↑
γ_4	Çoğunlukla beyin	Raf ?
γ_5	Yaygın dağılım	fosdusin
γ_7	Yaygın dağılım	
γ_8	Retinal koni	
γ_9	Koku epiteli	
γ_{10}	Yaygın dağılım	
γ_{11}	Yaygın (beyin hariç)	

^a Düzenleme veya etkileşim $\beta\gamma$ kompleksi üzerinden gerçekleşmektedir.

Çeşitli G proteinlerinin birincil yapıları arasında benzerliklerin araştırılması sonucu yüksek derecede benzerliğe sahip birkaç bölge ortaya çıkarılmıştır. ⁵³

a) P Bölgesi: Hidrolitik süreçlerde görev aldığı sanılmaktadır. Bu bölgenin bağlı GDP'nin α ve β fosforil gruplarına yakın olması ve Ha-ras p21 proteininin 12 no'lu kodonundaki Gly→Val mutasyonunun GTPaz aktivitesinin kaybolmasına neden olması bu varsayımı güçlendirmektedir.

b) E Bölgesi: Efektör molekülü ile etkileşime girmesi nedeniyle E bölgesi olarak adlandırılmaktadır. Ras p21 proteinin E bölgesindeki mutasyonlar, GTP bağlama özelliğini etkilememeksizin transformasyon etkinliğinin yok olmasına neden olmaktadır. Bu bölgenin dizisi aile fertleri arasında güçlü olarak korunmaktadır.

c) G Bölgesi: Bütün GTP-bağlayan proteinlerde korunan ve bu bölge, GTP'nin guanin halkası ile doğrudan etkileşime girmektedir.

d) G' Bölgesi: Birçok GTP-bağlayan proteinde yüksek oranda korunmuştur. Bu bölgenin GDP veya GTP bağlı durumlar arasındaki yapısal değişimde görev aldığı sanılmaktadır.

e) G'' Bölgesi: GTP' nin guanin halkasına yakın bir bölgesidir. ⁵⁷

2.7.1. G Proteinin α -Alt Birimlerinin Yapısı

Tüm α -alt birimleri kendi başlarına birer enzimidirler. Bu proteinler içsel GTPaz etkinliğine sahiptirler ve bağlı GTP'nin son fosfatını hidrolizleyerek bağlı GDP ve serbest P_i oluşmasını sağlarlar. Günümüze değin 20 farklı G protein α -alt birimi tanımlanmıştır. ⁵⁶⁻⁵⁸ α -alt birimleri 39-52 kDa molekül ağırlığında bir protein ailesidir. Amino asit dizilişi olarak aralarında % 45-80 oranında benzerlik vardır. Birincil yapılarının farklılığı yanında üç boyutlu yapıları da farklıdır. ²⁵

Son yıllarda G proteinlerinin yapı işlev bağlantısını açıklamak için değişik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ayrıca G_{α} - $G_{\beta\gamma}$ etkileşimi ve GTP-hidrolizini belirleyen etmenler gibi birçok soruya yanıt aranmıştır. Bu çalışmalar α -alt biriminin GTPaz bölgesi ve α -heliks bölgesi olmak üzere iki bölgeden oluştuğunu ortaya koymuştur. ⁵⁸ GTPaz bölgesi, GTPaz ailesine üye tüm proteinlerde ortak ve altı uzun β -şeridi çevreleyen beş α -heliks'ten oluşmuştur. Heterotrimerik G proteinlerine özgün α -heliks bölgesi ise tümüyle α -heliks yapıdadır. ⁵⁹ GTPaz bölgesi, reseptör, efektör ve $\beta\gamma$ -alt birimleri bağlama bölgesi içerir. α -heliks bölgesinin işlevi ise henüz açıklığa kavuşmamıştır. ⁵⁵

2.7.2. G Proteinlerinin α -Alt birimlerinin Çeşitleri

α -alt birimlerine göre G proteinleri Tablo 4'de görüldüğü gibi G_{α_s} , $G_{\alpha_{i/o}}$, G_{α_q} , $G_{\alpha_{12}}$ olmak üzere dört aileye ayrılır.

G_s proteini adenilat siklaz etkinliğini artırarak görev yapar. Adenilat siklaz etkinliğinin artmasıyla cAMP sentezi artar ve cAMP ikincil haberci olarak hücre içi yanıtı başlatır. Hücre içi yanıtının sonlanması GTP'nin hidrolizlenmesiyle gerçekleşir. Ancak bazı patolojik durumlarda bu mekanizma aksayabilir.

G_i proteini adenilat siklaz aktivitesini baskılayarak cAMP seviyesini düşürür. ⁶⁰ Burada da bazı patolojik durumlarda bu mekanizmanın aksaması olasıdır.

G_q proteini fosfolipaz C enzimini etkinleştirir. Bu enzim ise PIP_2 parçalayarak IP_3 ve DAG oluşmasını sağlar. ⁶¹ DAG protein kinazları uyarırken, IP_3 ise iyon kanallarını etkinleştirir. Bu gruba dahil olan G_{16} proteini hemopoietik hücrelerin sadece belli bir alt grubunda bulunmasına rağmen işlevsel olarak farklı birçok reseptör tarafından etkinleştirilebilmektedir.

G_{12} hakkında ise henüz pek fazla bir şey bilinmemektedir.

$G_{\alpha'}$ 'nin reseptörlerle etkileşiminin üç bölgede gerçekleştiği ileri sürülmektedir. Reseptörün etkinleşmesi sonucu $\beta\gamma$ kompleksinden ayrılan α -alt biriminin birçok ikincil haberci ile etkileşime girdiği ve onları düzenlediği bilinmektedir. Efektör-G protein etkileşiminin $G_{\alpha'}$ 'nin arka yüzünde ki bölgede olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar, adenilat siklazı uyaran bölgenin $G_{\alpha s}$ 'in karboksil ucunda 235-356 bölgesinde bulunduğunu göstermiştir.⁶² Bu bölgedeki kalıntılara ilişkin mutasyonlar adenilat siklazı uyarma yeteneğinde azalmaya neden olmaktadır.⁶³

α -alt biriminin amino ucunun $\beta\gamma$ -alt birimi ile etkileşime giren bölge olduğu düşünülmektedir.⁸¹ α -alt biriminin amino ucundan 2 kDa'luk bir parçanın tripsinle uzaklaştırılmasından sonra α -alt biriminin $\beta\gamma$ -alt birimi ile birleşme özelliği yok olmaktadır. Özellikle 7-10 amino asitlerin birleşme için önemli olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar, 50-60 kalıntılar civarındaki bir bölgenin de etkileşimler açısından önemli olduğunu düşündürmektedir.

2.7.3. G Proteini ve İnsan Hastalıkları

Sinyal iletim yollarında oldukça kritik bir konuma sahip olmaları nedeniyle, G proteinlerinin yapı ve işlevlerindeki bozukluklar önemli hastalıklara neden olmaktadır. G proteinine bağlı sinyal iletiminin insan organizmasındaki çeşitliliği nedeniyle körlük, hormon direnci, erken ergenlik ve neoplazi gibi birbirinden çok farklı klinik tabloları olan hastalıklar ortaya çıkabilmektedir.

Efektör, G proteini ve reseptörlerdeki mutasyonlara ilişkin çalışmalar sinyal iletimini önemli ölçüde değiştirebilecek potansiyel değişimler açığa çıkarılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda insan hastalıklarında rol alan sinyal iletim yolları bileşenlerine ait mutasyonların bulunabileceği bölgeler da hakkında fikir edinilmiştir.

Birçok hücre sel yanıt farklı G proteinleriyle kenetli yollar tarafından pozitif veya negatif olarak düzenlenmektedir. Örneğin birçok endokrin salgı bezinde hem hormon salınımı hem de hücre bölünmesi G_q veya G_s eşlikli yollarla uyarılmakta ve G_j / G_o Eşlikli yollarla baskılanmaktadır. Hücre sel yanıtın bu şekilde düzenlenmesi sonucunda uyarıcı yolların sürekli etkinliği veya baskılayıcı yolların işlev kaybı, hedef organda aynı anormal yanıtın oluşmasını sağlamaktadır.

2.7.4. G proteinin Onkogenik Roller

Gerek G proteinlerinin sinyal iletimindeki kritik konumları gerekse α alt birimlerini kodlayan genlerin bir kısmının daha önceden onkogen olarak bilinmesi G proteinlerinin onkogen potansiyellerinin oldukça fazla olduğunu göstermektedir. $G\alpha_s$ 'e ilişkin onkogen gsp, $G\alpha_{12}$ 'ye ilişkin onkogen gip olarak adlandırılmaktadır. Tümör oluşumundaki rolü çok açık olmamakla birlikte $G\alpha_{12}$ 'ye ilişkin mutasyon da gep olarak bilinmektedir.

İnsan endokrin tümörlerinde içsel GTPaz etkinliğini baskılayarak $G\alpha_s$ ve $G\alpha_{12}$ 'yi sürekli aktifleyen mutasyonlar bulunmuştur. gsp onkogeni çoğunlukla hipofiz ve tiroid tümörlerinde bulunmuştur. Bu onkogen nedeniyle siklaz-cAMP yolu sürekli aktif kalmaktadır. Hipofiz ve tiroid hücrelerinde bu sinyal anormal çoğalmaya neden olmakta ve farklılaşmış işlevlerin yerine getirilmesini engellemektedir.

Over ve adrenal korteks tümörlerinde de gip onkogeni tanımlanmıştır. Gip onkogeninin tümör oluşumundaki rolü çok açık değilse de belirli hücre tiplerini transforme edebileceği sanılmaktadır. $\beta\gamma$ alt birimlerinin MAP kinazlarla olan etkileşimine rağmen insan tümörlerinde bunlara ilişkin mutasyonlara rastlanmamıştır.

2.8. Over Kanseri

Over insan dişi üreme sisteminin temel organlarından biridir. Her dişi insanda iki adet over bulunmaktadır. Üreme overlerindeki yumurtanın gelişmesiyle başlar. Her aylık seksüel çevrimin ortasında tek bir yumurta over foliküllerinden dışarı atılır. Bu yumurtanın fallop tüplerin birinden geçerek uterusu ulaşır. Eğer bir sperm tarafından döllenirse uterusu implante olarak fetus, plasenta ve fetal membranlara dönüşür.

Over tümörlerinin çok sayıda histolojik tür ve şekli bulunmaktadır (Tablo 2.6). Bunun nedeni normal overin üç tür hücre çeşidinden oluşmasıdır: multipotent yüzey epiteli, totipotent germ hücreleri ve multipotent seks kord-stromal hücreleri. Tümörlerin sınıflandırılması histolojik olarak yapılmasına rağmen bu tümörler

granulosa hücrelerinin özelliklerini sergilemektedir; diğer bir deyişle FSH bağlamakta, FSH'ya yanıt vermekte ve peptid hormon inhibin ve Mullerian inhibe edici madde salgılamaktalar. Bu tümörler tarafından inhibin salgılanması plazma FSH düzeyini baskılamakta ve tümörlerin FSH'dan bağımsız olarak büyüdüklerini düşündürmektedir.

Tablo.2.6. Over tümör tipleri

TÜMÖR TİPİ	İNSİDANS (%)	YAŞ GRUBU
I. Epitel Hücreleri	65 - 70	20 +
Seröz		
Müköz		
Endometroid		
Mezaneftroid		
Brenner		
Sistadenofibroma		
II. Germ Hücreleri	15 - 20	0 - 25 +
Teratoma		
Disgerminoma		
Endodermal sinüs		
Koriokarsinoma		
III. Seks Kort - Stromal	5 - 10	Tüm yaşlar
Fibroma		
Granulosa		
Teka		
Sertoli-Leydig		
IV. Metastazlar	5	Değişken

2.9. Meme Kanseri

Ciddi bir toplumsal sağlık sorunu olan meme kanserine genetik ve çevresel etkenlerin etkisi ortaya çıkarıldıkça önlenmesine yönelik gelişmeler artmaktadır. Meme kanseri multifaktöriyel ve bundan dolayıda karmaşık bir hastalıktır. Günümüzde Birleşik Devletlerde her yıl yaklaşık olarak 180 bin kişiye meme kanseri teşhisi konmaktadır.⁶⁴

Meme kanseri meme dokusundaki kontrolsüz yada düzensiz hücre bölünmesi sonucu yakındaki doku ya da organlara saldıran ve zarar veren bir hastalık türüdür. Ayrıca hücreler orijinal tümör dokusundan ayrılıp kan yolu ile yada lenfatik sistemle yayılıp vücudun diğer bölümlerinde ikincil tümörler meydana getirebilmektedirler (metastaz). Meme tümörleri en çok meme dokusundaki lobüllerden yada duktuslardan köken almaktadır.⁶⁶

2.9.1. Meme kanseri ve risk faktörleri

Kalıtsal meme kanserinin gelişmesinde kabul edilen en önemli risk faktörü aile hikayesidir. Eğer bir aile hikayesi var ise bu ailedeki kadınlar için normal popülasyona göre daha da artmıştır. Bununla birlikte pek çok genetik olmayan risk faktörleri hastalığın etiyolojisine katkıda bulunmaktadır. Bu risk faktörleri genel olarak hormonal olan ve hormonal olmayan risk faktörleri olmak üzere iki alt gruba ayrılabilir.

2.9.2. Hormonal risk faktörleri

alışmalar, östrojen hormonuna maruz kalma meme kanseri gelişmesi için bir risk faktörü olduğunu göstermiştir. Diğer arttırıcı faktörler menstural döngünün artması, erken menarş yaşı ve geç menapoz olarak bildirilmiştir. Ayrıca ovulasyon döngüsünün düşürülmesi ve uzamış emzirme süreleri meme kanseri riskini azaltıcı faktörlerdir. Menapoz sonrası hormon tedavisinin de meme kanseri riskini arttırıcı bir etki yaptığına dair çalışmalar da bildirilmiştir.

2.9.3. Hormonal olmayan risk faktörleri

Hormonal olmayan risk faktörleri de kanserin gelişmesinde etkilidirler. Diğer bir risk faktörü de çevreden alınan iyonize radyasyondur. 2. Dünya Savaşı sırasında Japonya'ya atılan atom bombasından sonra açığa çıkan radyasyonun somatik mutasyonlara sebep olmasından dolayı sağ kalan kadınlarda hem meme kanseri görülme sıklığı artmış hem de ortaya çıkma yaşı erken döneme kaymıştır.

Diğer bir hormonal olmayan faktör ise aşırı alkol kullanımıdır. Aşırı alkol tüketimi östrodiolün serumdaki seviyesini ve dolaylı olarak östrojenin miktarını artırarak meme kanserinin gelişmesine katkıda bulunmaktadır.

Bulunan bazı genler ve onların mutasyona uğramış türleri de meme kanseri gelişiminde etkili faktörlerden biridir. Bu genlerden en önemlileri BRCA1 ve BRCA2 genleridir. Meme kanseri genetik faktörler ile çevresel faktörlerin birlikte etkimesi sonucunda ortaya çıkan bir kanser türüdür.⁶⁷

2.10. Tümör Belirteçleri

Daha erken tanıyı sağlıya bilmek umuduyla, vücut sıvılarında tümörler için spesifik olabilecek bazı maddeler arayışı öteden beri vardır. Tümörün varlığını belirten böyle maddeler 'tümör belirteci' denir. Bu maddeler tümörün kendi ürünü olabilir; bunları tümör hücreleri yapar ve kana verir. Yada bu maddeler hastanın tümöre karşı reaksiyonu sonucu da ortaya çıkabilir.

2.10.1. Karsinoembriyonik Antijen (CEA)

Kompleks bir glikoprotein olan bu antijen 1965'te, kolon adenokarsinoması olan hastalarda bulundu. Yazık ki CEA sadece kolonkarsinomasında değil, bir çok selim ve habis durumlarda da yükselebiliyor. Selim olanlar: Sigara içenler, bronşit, amfizem, gastrit, gastrik ülser, karaciğer hastalıkları, pankreatit v.b. yalnız bu durumlarda CEA yükselmeleri genellikle geçicidir ve ml de 10 ng geçtiği çok seyrek görülür.

Kolon ve rektum karsinomalarından başka epitelyel kanserler de CEA yükselbiliyor. Bunlarda bazıları: Pankreas, akciğer, meme, mide, tiroit, kadın genital organ karsinomaları. Pankreas karsinomalarının %65-90'ında, akciğer karsinomalarının %52-77'sinde, diğerlerinin de yarısında yüksek bulunur.

2.10.2. CA 125

Over kanserlerinde yararlıdır. Serumda normal seviyeleri 35 U/ml'nin altındadır. Nonmüsinöz epitelyel over karsinomasında, hastaların %80'inde yükselir. Bu yükseliş tümörün büyüklüğü ile orantılıdır. Nükseden over karsinomasında, başka belirtiler ortaya çıkmadan önce bunun yükseldiği görülür.

2.10.3. CA 15-3

Meme kanseri için bir belirteçtir. Sütte vardır. Serumda normal seviyesi 13 U/ml'dir. Meme kanseri ilerledikçe bu belirtecin yüksek bulunduğu hasta oranı artar.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Hasta ve Denekler

Çalışmamız Over CA (Grup 1), Meme CA (Grup 2) ve Kontrol (Grup 3) gruplarının oluşturduğu 3 grup ile gerçekleştirildi. Grup 1; Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları Kliniğine başvuran Over CA'lı 13 kadın hastadan, Grup 2; Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Kliniğine başvuran Meme CA'lı 13 kadın hastadan ve Kontrol Grubu da yaş ve cinsiyet açısından uyumlu sağlıklı 13 kişiden oluşturuldu.

Hastalardan ve deneklerden gece boyunca saat 22⁰⁰, 24⁰⁰, 02⁰⁰, 04⁰⁰ ve 06⁰⁰'da kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri santrifüj edildi ve elde edilen serumlar derin dondurucuda -70°C'de saklandı. Daha sonra bu örneklerle Melatonin düzeyleri çalışıldı.

Ayrıca tümörlerin oluşmasında G proteinlerin olası rolüne açıklık kazandırmak için aynı hasta gruplarının tümörlü dokularından parça alındı ve G_{12α} proteinlerinin α-alt birimlerindeki mutasyonları incelemek için doku örneklerinden DNA elde edildi ve çalışıncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.2. Kimyasal Maddeler

Agaroz (Sigma)

Akrilamit (Serva)

Amonyumpersülfat (Riedel-de Haen)

Asetik Asit (Carlo Erba)

Borik Asit (Riedel-de Haen)

Bromofenol Mavisı (Merck)

Etanol (Grup Deltalar)

Etidyum Bromür (Sigma)

Etilenediamintetraasetikasit (EDTA) (Kimetsan)

dATP (MBI)
dCTP (MBI)
dGTP (MBI)
dTTP (MBI)
Fenol (Merck)
Formamit (Merck)
Formaldehit (Riedel-de Haen)
Gliserol (Riedel-de Haen)
Gümüş Nitrat (Merck)
Hidroklorik asit (Carlo Erba)
Ksilen Siyanol F F (Sigma)
Klorofom (Birpa)
Potasyum Asetat (Merck)
Potasyum Klorür (Merck)
Sodyumdodesilsülfat (Merck)
Sodyum Hidroksit (Riedel-de Haen)
Soyum Karbonat (Carlo Erba)
Soyum Klorür (Merck)
Sukroz (Sigma)
Taq DNA polimeraz (MBI)
N,N'-Metilen Bisakrilamit (Serva)
N,N,N',N'-Tetrametiletilediamin (TEMED) (Sigma)
Tris (Merck)
667 Polaroid film (Polaroid)

3.3. Elektroforetik Analizde Kullanılan Standart

Standart (Promega)

50 bç DNA Lader Markeri

Molekül Ağırlığı

(50-1031) baz çifti (bç)

3.4. Kitler

3.4.1. CEA, CA 125, CA 153 Kitleri

Serum, CEA, CA125, CA153 tümör belirteçlerinin ölçümü için Bio-DPC şirketinin ürettiği Kemiluminescent Immunassay tekniğin de kullanılan CEA (Kod no: LKCE50154), CA125 (Kod no: LKOP50156), CA153 (Kod no: LKBR5252A) kitleri kullanıldı.

3.4.2. Melatonin Kiti

Serum melatonin düzeyi ölçümü için DDV Biochemie GmbH firmasının MEL-180 125-IOD Melatonin RIA kiti kullanıldı.

Melatonin RIA Kitinin İçeriği: Kitin içeriğinin tamamı in vitro kullanım içindir ve 2-8°C arasında saklanmalıdır. ⁶⁸ Kit içeriği;

I-125 Tracer

Assay buffer

Antiserum

Precipitating reagent

Plazma standartları

Plazma ve serum için 1. ve 2. Kontroller

Enzim

Enzim buffer'dan oluşmaktadır.

3.5. Kullanılan Yöntem

3.5.1. Serum Tümör Belirteçlerinin Düzeylerinin Ölçülmesi

Serum tümör belirteci düzeyleri Biyofizik Laboratuvarında Otomatik Kemiluminescent yöntemi kullanılarak belirlendi (Tablo 3.1). Bu sistem İmmulite enzim immunometrik assay DPC solit faz yöntemi ile çalışır. İmmulite otomatik analizör kullanır. Serumdaki antijenin kantitatif tayini için hazırlanmıştır. Barkod ile tanımlanan kitler, test ünitesi, konjugant (reagent) ve standart (adjuster) içerir. Solit faz bir immulite test ünitesi polistren bir boncuktur. Polistren boncuk spesifik

monoklonal bir antikorla kaplanmıştır. Hasta örneği test tüpüne pipetlenir, 37°C sıcaklıkta ve 70 dakika inkübe edilir. Bu sırada içindeki antijen, spesifik monoklonal antikorla bağlanır. Bağlanmış antijen ve antikor daha sonra satrifüjle adamentin dioksetan ile reaksiyona girer. Yıkama sistemi ile katı faz beş defa yıkanır. Luminimetre her örnek için oniki okuma yapar. Bağlanmış kompleks lumunimetrede ölçülerek foton akışı ile örnekteki antijen konsantrasyonunu gösterir.

Tablo 3.1. Hastalara ait serum Tümör Belirteçlerinin Sonuçları

Hasta Adı	Tümör Marker sonuçları	
1- Z.Ç	CEA: 4,9	CA12-5: 30,3
2- S.İ	CEA: 5,1	CA12-5: 25,8
3- N.M	CEA: 3,9	CA12-5: 24,7
4- H.Ş.	CEA: 2,3	CA12-5: 73,8
5- G.Ö.	CEA: 24,0	CA12-5: 500,0
6- V.Ö.	CEA: 10,8	CA12-5: 318,0
7- L.K.	CEA: 6,2	CA12-5: 34,6
8- F.S.	CEA: 1,5	CA12-5: 103,0
9- A.T.	CEA: 4,4	CA12-5: 24,2
10- F.D.	CEA: 5,4	CA12-5: 21,7
11- G.C.	CEA: 2,2	CA12-5: 4,06
12- N.M.	CEA: 6,3	CA12-5: 32,4
13- R.Ç.	CEA: 1,9	CA12-5: 24,6
14- F.D.	CEA: 2,9	CA153: 61,1
15- Ş.T.	CEA: 1,2	CA153: 42,5
16- A.K.	CEA: 4,1	CA153: 70,4
17- Z.G.	CEA: 5,7	CA153: 59,2
18- N.K.	CEA: 0,9	CA153: 24,2
19- S.Ç.	CEA: 4,1	CA153: 55,7
20- N.T.	CEA: 4,3	CA153: 60,3
21- M.Ü.	CEA: 0,5	CA153: 12,9
22- N.T.	CEA: 0,9	CA153: 14,0
23- N.Ç.	CEA: 1,1	CA153: 40,6
24- H.A.	CEA: 2,8	CA153: 65,5
25- K.Y.	CEA: 1,7	CA153: 19,1
26- N.Ü.	CEA: 0,4	CA153: 83,0

3.5.2. Serum Melatonin Düzeyinin Ölçülmesi

Serum melatonin düzeyleri RIA yöntemi kullanılarak ölçüldü. Bu yöntem ile çalışma yapabilmek için antijen, antikor ve radyoaktif madde ile işaretli antijen gereklidir.

Reaksiyon sırasında işaretli ve işaretsiz moleküller, antikor üzerindeki serbest bağlayıcı bölgeler için rekabet eder. Bu süreç içinde antijen-antikor kompleksi oluşur. Bağlı antijen miktarı, işaretlenmemiş antijen ile ters orantılıdır. Hormon miktarı fazla ise daha az radyoaktivite sayılır.

Katı faz olarak mikropartiküller ve katı yüzey kullanılır. Mikropartiküller olarak selüloz, poliakrilamid, politren, sefadeks, sefaron, cam parçacıkları kullanılır. Antikorlar partiküllere süspansiyon olarak ilave edilmiştir.

Katı yüzey faz olarak da tüp duvarlarına, disklere, tek boncuklara bağlı antikorlar kullanılır. Radyoaktivite gamma sayacı yardımı ile ölçülür.

Polysteren RIA tüpleri şu şekilde isimlendirildi:

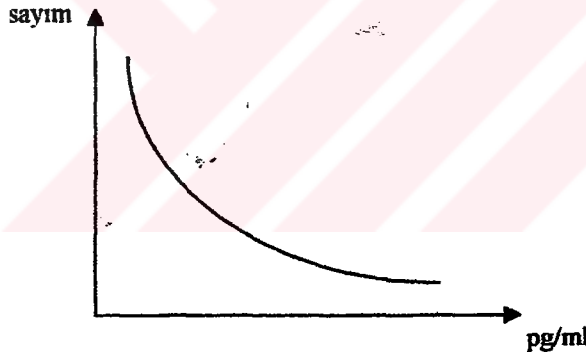
Total Count	TC
Non-specific binding	NSB
Standart A	0 pg/ml
Standart B	3 pg/ml
Standart C	10 pg/ml
Standart D	30 pg/ml
Standart E	100 pg/ml
Standart F	300 pg/ml

Kit içeriği kullanıma hazır hale getirildikten sonra standartlar ve hasta örnekleri aşağıdaki şekilde çalışıldı.

1. NSB tüplerine 100µl Standart A eklendi.
2. 100 µl standart ve kontrol çözeltileri ilgili tüplere eklendi
3. TC dışındaki tüplere 25 µl enzim solüsyonu eklenerek 1 dakika santrifüj edildi.
4. Bütün tüpler oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

5. TC dışındaki bütün tüplere 50 µl Assay buffer eklendi ve 1 dakika vortekslendi.
6. Bütün tüpler 50 µl I-125 Tracer eklendi.
7. TC ve NSB hariç bütün tüplere 50 µl antiserum eklendi.
8. Bütün tüpler 1 dakika santrifüj edildi.
9. Bütün tüpler oda sıcaklığında 18-20 saat inkübe edildi.
10. TC dışındaki bütün tüplere 500 µl precipitating reagent eklendi.
11. Bütün tüpler soğutmalı santrifüjde 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi.
12. Tüplerin içeriği dökülerek kurutma kağıdının üzerinde kısa bir süre bekletildi.
13. Bütün tüplerdeki radyoaktivite gamma sayacında 1 dakika süreyle sayıldı.

Sayımın değerlendirilmesi için semi-logaritmik grafik kağıdı kullanıldı. Bağlı fraksiyon sayımları Y ekseninde, standart konsantrasyonları X ekseninde gösterildi. Bu eğri yardımıyla örnek konsantrasyonu belirlendi (şekil-8)⁶⁸. Ayrıca bu çalışmada ölçüm sonuçları bilgisayar programları yardımı ile değerlendirilmiştir.



Şekil 3.1. Sayım Değerlendirilmesi.

3.6. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Agaroz Elektroforez Tankı	(Bio-Rad)
Poliakrilamit Elektroforez Sistemi	(CBS Scientific co.)
Etüv	(Heracus)
Güç Kaynağı	(EC 105)
Manyetik Karıştırıcı	(Hanna)
PH Metre	(Elektromag)

Santrifüj	(Hettich 30 RF)
Soğutmalı Santrifüj	(Shimadzu)
Spektrofotometre	(LKB)
Su Banyosu	(Nüve ST 402)
Vortex	(Janke& Kunkel)
Terazi	(Sartorius)
Derin Dondurucu	(Arçelik)
Buzdolabı	(Arçelik)
UV Kaynağı	(Vilber Lourmat)
Otomatik Mikro pipetler	(Gilson)
Otoklav	(All Amerikan)
Polysteren RIA tüpleri	(1265)
Gamma Sayacı	(Bio-DPC)

3.7. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

3.7.1. DNA'nın Elde Edilmesinde Kullanılan Çözeltiler

Homojenleştirme Tamponu

0.1 M	NaCl
0.2 M	Sukroz
0.01M	EDTA pH 7.0
0.3 M	Tris-HCl

TE Çözeltisi

10 mM	Tris-HCl	pH 7.4
1 mM	EDTA-NaOH	pH 8.0

3.7.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Çözeltiler

PZR Tomponu (10X), pH 8.3

Tris-HCl	750 mM	pH 8.8
(NH ₄) ₂ SO ₄	200 mM	
% 0.1	Tween 20	

Nükleotit Karışımı (dNTP)

Her nükleotit derişimi 100 mM olan ana stoklardan, dört nükleotidi içeren ve herbirinin son derişimi 1.25 mM olan çalışma karışımı hazırlandı.

Primer stok Çözeltisi

Çalışma için MBI firmasında sentezletilen primerlerin 260 nm' daki OD değerleri ve $15.3 \times A + 11.8 \times G + 9.3 \times T + 7.4 \times C$ denklemiyle hazırlanan sönüm katsayısı değerlerinden yararlanılarak primerlerin ana stok derişimleri hesaplandı. Çalışma stoku ise her primer derişimi 10 pmol/μl olacak şekilde hazırlandı.

Polimeraz zincir tepkimesinde kullanılan bütün stoklar -20°C de saklandı.

3.7.3. Agaroz Gel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler

Elektrofrez Yürütme Tamponunun Ana Stoğu (10XTEB)

108 gr	Tris
7.44 gr	EDTA
55 gr	Borik Asit
1 lt Distile su içinde çözündürülür.	

% 2 Agaroz Gel Elektrofrez

0.8 gr	Agaroz
2 μl	Etidyum Bromür (10 mg/ml ana stoktan)

Agaroz 40 ml 0.5XTEB çözeltisi içinde kaynatıldı, 60°C'ye soğutulduktan sonra EtBr eklendi.

(6X) DNA Yürütme Boyası

% 0.09	Bromfenol Mavisi
% 0.09	Ksilen Siyanol FF
% 60	Gliserol
60 mM	EDTA

3.7.4. SSCP Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

Gliserollü PAGE Ayrışım Geli (%6)

7.5 ml	1.5 M Tris-HCl pH 8.8
6.0 ml	Akrilamit/Bisakrilamit (30:0.8)
1.5 ml	Gliserol
100 µl	% 10 (w/v) Amonyumpersülfat
7.5 µl	TEMED
15 ml	Distile Su

PAGE Üst Geli (%4.5)

1.25 ml	1 M Tris pH 6.8
1.5 ml	Akrilamit/ Bisakrilamit (30:08)
100 µl	% 10 (w/v) Amonyumpersülfat
5 µl	TEMED
7.15 ml	Distile Su

SSCP İçin Örnek Denatüre Edici Tampon

% 95 (v/v)	Formamit
10 mM	NaOH

% 0.05 (w/v)	Bromfenol Mavisi
% 0.05 (w/v)	Ksilen Siyanol

3.7.5. Gümüş Nitrat Boyamada Kullanılan Çözeltiler

% 10 (v/v)	Etanol
% 5 (v/v)	Asetik asit
% 0.1 (w/v)	Gümüş Nitrat
%1.5 (w/v)	Sodyum Hidroksit
% 0.15 (v/v)	Formaldehit
%0.75 (w/v)	Sodyum Karbonat

3.8. Dokularda Genomik DNA izolasyonu

Doku örnekleri 0.1 M NaCl, 0.2 M Sukroz, 0.01 M EDTA ve 0.3 M Tris-HCl (pH 8.0) içeren homojenlendirme tamponunda (100gr/ml) teflon uçlu cam homojenizatör kullanılarak 4°C'de homojenize edildi ve derişimi % 0.5 olacak şekilde SDS eklenip vorteksledikten sonra 65°C'de 30 dakika inkübe edildi. Örnek üzerine derişimi 1M olacak şekilde potasyum asetat eklenip vorteksledikten sonra 1 saat süreyle 0°C'de bekletildi. Örnekler 5000 x g'de 10 dakika santrifüjlendi ve DNA içeren üst sıvı steril bir tüpe aktarılarak, 1 hacim kloroform/fenol (1:1) karışımı ile yıkandıktan sonra 1 hacim kloroform ile tekrar yıkandı ve son olarak 5 hacim soğuk etanol ile çöktürüldü. Elde edilen DNA çökeleği 350 µl TE tamponu içinde çalkalamalı olarak oda sıcaklığında iki saat süreyle inkübe edilerek DNA'nın çözünmesi sağlandı.

3.9. Genomik DNA'nın Derişimleri ve Saflığı

DNA örneklerinin derişimleri ve saflık dereceleri 260 ve 280 nm'deki absorpsiyonları okunarak belirlendi (Tablo.3.2).

Tablo 3.2. Safılaştırılmış DNA'ların Derişimleri

HASTALAR	260	280	260/280 ORANI	DNA Miktarı ng/ μ l
1- Z.Ç.	0,57	0,32	1,83	2850
2- S.İ.	0,173	0,096	1,79	865
3- N.M.	0,168	0,097	1,73	840
4- H.ř.	0,027	0,016	1,68	1350
5- G.Ö.	0,054	0,034	1,55	2700
6- V.Ö.	0,22	0,127	1,73	1100
7- L.K.	0,224	0,136	1,65	1200
8- F.S.	0,144	0,102	1,41	720
9- A.T.	0,258	0,138	1,86	1290
10- F.D.	0,063	0,038	1,66	315
11- G.Ç.	0,085	0,055	1,54	425
12- N.M.	0,02	0,014	1,42	100
13- R.Ç.	0,027	0,018	1,5	135
14- F.D.	0,01	0,006	1,66	50
15- ř.T.	0,009	0,006	1,66	45
16- A.K.	0,012	0,009	1,33	60
17- Z.G.	0,03	0,017	1,76	150
18- N.K.	0,258	0,133	1,93	1290
19- S.Ç.	0,125	0,083	1,5	625
20- N.T.	0,018	0,012	1,38	900
21- M.Ü.	0,034	0,023	1,48	170
22- N.T.	0,123	0,081	1,52	615
23- N.Ç.	0,011	0,006	1,83	55
24- H.A.	0,042	0,025	1,68	210
25- K.Y.	0,374	0,196	1,9	1870
26- N.Ü.	0,038	0,023	1,65	190

3.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

$G_{i2\alpha}$ 'nın ekson 5 ve 6 bölgeleri (aradaki intron bölgesini de kapsayacak şekilde 604 bç), ekson 5 bölgesi (165 bç) ve ekson 6 bölgesi (175bç), 50 μ l reaksiyon hacminde , 10 pmol oligonükleotit primerler, 0.2 mM dNTP, 200ng genomik DNA ve 2.5 U Taq DNA polimeraz enzimi ve $G_{i2\alpha}$ 'nın ekson 5 bölgesi ile ekson 6 bölgeleri için 2 mM, $G_{i2\alpha}$ 'nın aradaki entron bölgesini dahil eden ekson 5 ve ekson 6 bölgesi için 1.5 mM Mg Cl₂ kullanılarak çoğaltıldı.

3.10.1. Kullanılan Primerlerin Dizileri

Gi2 α

Ekson5 ve 6 için

GC2: 5' ATT GCA.CAG AGT GAC TAC ATC CCC 3'

GD2: 5' GGC GCT CAA GGC TAC GCA GAA 3'

Ekson 5 (kodon 179) için

GC3: 5' CCC AGC TAC CTG AAC GAC CTG G 3'

GD3: 5' CTC GCT CAC TTG AAG TGT AGG TC 3'

Ekson 6 (kodon 205) için

GC4: 5'CAT CTG CAG GAT GTT TAG TGT GG 3'

GD4: 5' CAT CCT CTC ACC ATC TCC TCG 3'

3.10.2. PZR Koşulları

G_{l2 α} 'nin ekson 5 ve 6 (604 bç) bölgeleri için:

94°C	1 dak.	
58°C	2 dak.	30 döngü
72°C	3dak	

G_{l2 α} 'nin ekson 5 (165 bç) ve G_{l2 α} 'nin ekson 6 (175 bç) için:

94°C	30 sn	
61°C	45 sn	30 döngü
72°C	45 sn	

Bütün programların sonu, örnekleri 4°C'de saklıyacak programla bağlanmıştır.

3.10.3. Agaroz Gel Elektroforezi

PZR ile çoğaltılan DNA örnekleri % 2'lik agaroz gelinde 100 V' ta (yaklaşık 60 mA) 1 saat kadar yürütülerek ve EtBr ile boyanarak UV altında incelendi.

3.11. SSCP (Tek Sarmal Konformasyon Polimorfizmi)

PZR ürünleri % 95 formamid, 10 mM NaOH, % 0.05 Bromfenol mavisi ve % 0.05 ksilen siyanol içeren denatüre edici tamponla 95°C'de 5 dakika süreyle işlem gördükten sonra buzda saklandı. Örnekler gliserollü olarak % 6 denatüre edici olmayan poliakrilamid jellerinde 250 V'ta 2-5 saat 0.6XTEB tamponu kullanılarak elektroforeze tabi tutuldu. Jeller % 10 etanol ve % 5 asetik asit ile sabitleştirilip, % 0.1 gümüş nitrat ile boyandı, bantlar % 1.5 NaOH / % 0.15 formaldehid ile ortaya çıkarıldıktan sonra tepkime % 0.75 sodyum karbonatla durduruldu.

3. 12. İstatistik

İstatistik değerlendirme için SPSS 10.00 (Statistical Package for Social Sciences) İstatistik Programı kullanılmıştır. Denek sayıları ve kullanılan teknikler nedeniyle veriler Kruskal-Wallis, Friedman ve Mann-Whitney U testleri ile değerlendirilmiştir.

Çalışma için Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurulundan (Ek-1) onay alınmıştır.

4.BULGULAR

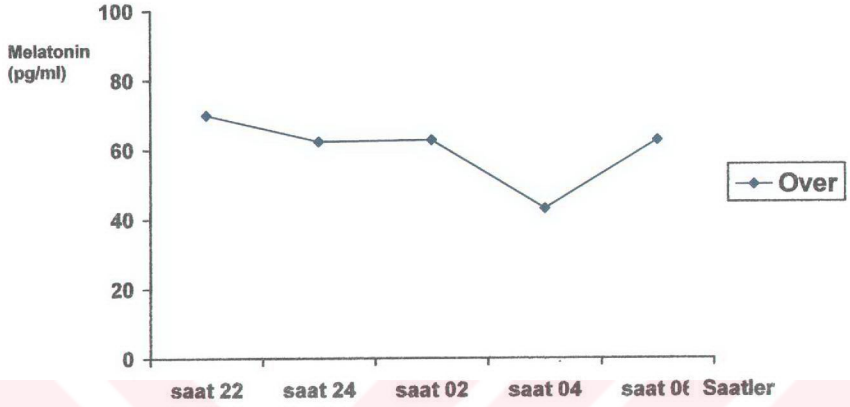
4.1. Tümörlü Hastaların Melatonin Salınım Ritminin incelenmesi

Çalışmaya alınan Grup1 hastalarının yaş ortalamaları 58.85 ± 9.23 (min= 39, max = 71), Grup 2 hastalarının yaş ortalamaları 48.77 ± 9.32 (min = 34, max = 70) ve Grup 3'ün yaş ortalamaları ise 43.08 ± 11.74 'dir (min=24, max=58).

Çalışmaya aldığımız Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'ün ortalama melatonin değerleri aşağıda (Tablo 4.1-3) ve (Şekil 4.1-3) verilmiştir.

Tablo 4.1. Grup 1'in Ortalama Melatonin Değerleri.

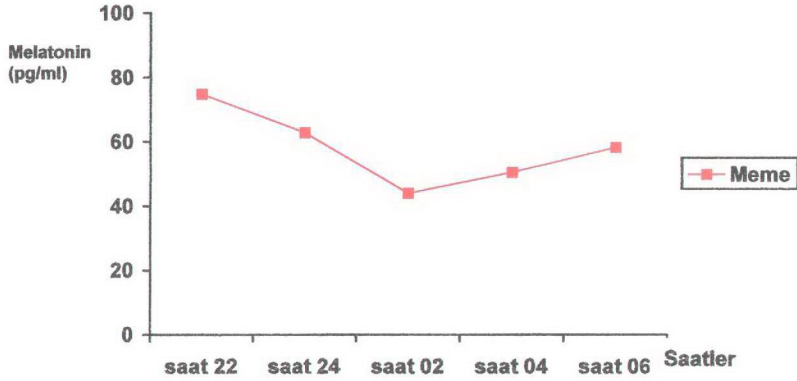
Grup 1	Yaş	saat 22 ⁰⁰	saat 24 ⁰⁰	saat 02 ⁰⁰	saat 04 ⁰⁰	saat 06 ⁰⁰
Over	52	33.42	43.77	214.01	64.57	72.95
Over	70	27.92	26.31	64.31	51.82	161.61
Over	61	99.65	79.46	51.22	35.47	79.63
Over	48	268.81	232.99	122.89	67.82	199.05
Over	65	209.42	82.97	179.12	176.43	97.89
Over	71	220.20	129.31	47.55	19.18	9.55
Over	53	4.98	26.21	10.44	14.20	27.02
Over	58	7.09	41.09	20.23	16.21	91.10
Over	60	8.21	17.97	28.26	51.22	22.34
Over	56	7.45	63.2	25.55	8.43	25.15
Over	39	6.71	8.48	33.59	19.76	8.17
Over	67	6.55	52.16	11.07	24.68	10.39
Over	65	9.49	6.56	7.06	9.20	8.19
Ortalama	58.85	69.99	62.34	62.71	42.99	62.54
Std Sapma	9.23	97.09	61.78	67.17	45.10	62.33



Şekil 4.1. Grup 1'in Saatlere Göre Ortalama Melatonin Değerleri.

Tablo 4.2. Grup 2'nin Ortalama Melatonin Değerleri.

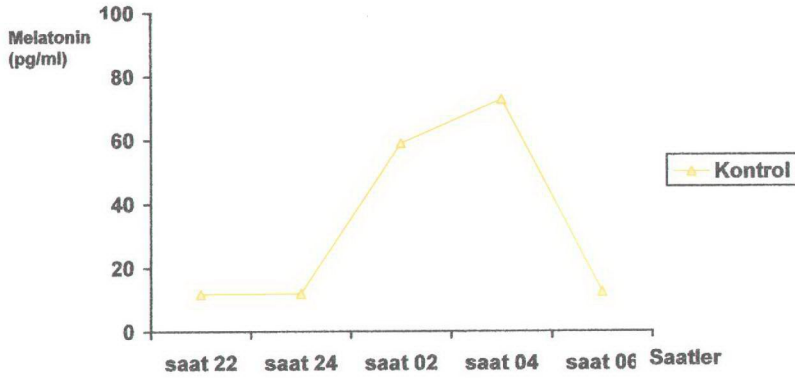
Grup 2	Yaş	saat 22 ⁰⁰	saat 24 ⁰⁰	saat 02 ⁰⁰	saat 04 ⁰⁰	saat 06 ⁰⁰
Meme	54	82.28	228.28	19.78	43.60	10.28
Meme	34	47.88	58.92	50.96	53.53	48.39
Meme	52	4.68	8.57	7.62	61.66	26.10
Meme	40	104.71	50.96	8.44	16.07	27.05
Meme	46	8.84	192.25	9.39	59.77	54.98
Meme	50	4.82	9.28	100.67	14.63	18.28
Meme	54	22.73	56.61	33.33	60.05	78.34
Meme	42	16.44	31.44	41.46	23.55	12.52
Meme	37	75.09	29.78	48.06	22.31	24.15
Meme	54	8.14	20.28	7.36	40.52	66.96
Meme	49	6.32	6.51	7.82	8.02	8.04
Meme	52	298.31	70.13	29.68	248.48	285.85
Meme	70	294.27	54.90	207.48	4.05	95.20
Ortalama	48.77	74.96	62.92	44.00	50.48	58.16
Std Sapma	9.23	103.77	69.11	55.79	62.99	73.84



Şekil 4.2. Grup 2'nin Saatlere Göre Ortalama Melatonin Değerleri

Tablo 4.3. Grup 3'nin Ortalama Melatonin Değerleri.

Grup 3	Yaş	saat 22 ⁰⁰	saat 24 ⁰⁰	saat 02 ⁰⁰	saat 04 ⁰⁰	saat 06 ⁰⁰
Kontrol	33	16.49	28.18	48.65	134.34	28.31
Kontrol	37	8.36	8.26	26.63	11.31	6.53
Kontrol	57	39.84	11.34	32.31	21.89	4.65
Kontrol	49	8.48	6.42	148.48	176.76	20.76
Kontrol	58	19.49	18.68	20.28	29.86	5.69
Kontrol	30	3.04	6.26	6.72	11.86	8.26
Kontrol	49	8.26	10.07	35.22	70.04	6.53
Kontrol	29	2.40	2.64	58.92	25.23	8.45
Kontrol	52	13.31	29.55	46.17	193.26	17.26
Kontrol	24	23.04	10.04	30.00	23.04	26.99
Kontrol	37	3.17	7.72	6.44	109.42	5.32
Kontrol	52	2.57	13.60	233.67	13.23	8.35
Kontrol	53	6.16	3.40	72.35	124.24	13.71
Ortalama	43.08	11.89	12.01	58.91	72.65	12.37
Std Sapma	11.74	10.75	8.58	63.98	66.66	8.34



Şekil 4.3. Grup 3'ün Ortalama Melatonin Değerleri.

Her grubun saatlere göre ortalama melatonin değerleri Tablo 4.4'de gösterilmiştir.

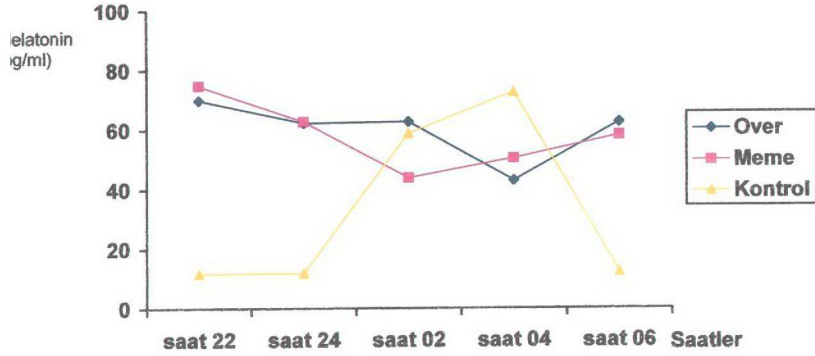
Tablo 4.4. Gruplara Göre Melatonin Ortalama Değerleri

Grup	Saatlere göre Melatonin Ortalama Değerleri				
	saat 22 ⁰⁰	saat 24 ⁰⁰	saat 02 ⁰⁰	saat 04 ⁰⁰	saat 06 ⁰⁰
Grup 1	66.99	62.35	62.72	42.99	62.54
Grup 2	74.96	62.92	44.00	50.58	58.16
Grup 3	11.89	12.01	58.91	72.65	12.37

Gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığını anlayabilmek için Non-Parametrik testlerden Bağımsız gruplarda 2'den fazla ortalama arasındaki farkın anlamlılık testi olan Kruskal-Wallis uygulanmıştır. Üç grup karşılaştırıldığında saat 24 ve 06'da melatonin değerleri arasında önemli derecede fark olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.5) ve (Şekil 4.4) ($\chi^2 = 13.019$, $p=0.001$ ve $\chi^2 = 11.136$, $p=0.004$).

Tablo 4.5. Saatlere Göre İstatiksel Değerler

Saatler	İstatistiksel Değerler	
	χ^2	p
Saat 22 ⁰⁰	4.222	0.121
Saat 24 ⁰⁰	13.019	0.001
Saat 02 ⁰⁰	1.088	0.581
Saat 04 ⁰⁰	1.193	0.551
Saat 06 ⁰⁰	11.136	0.004

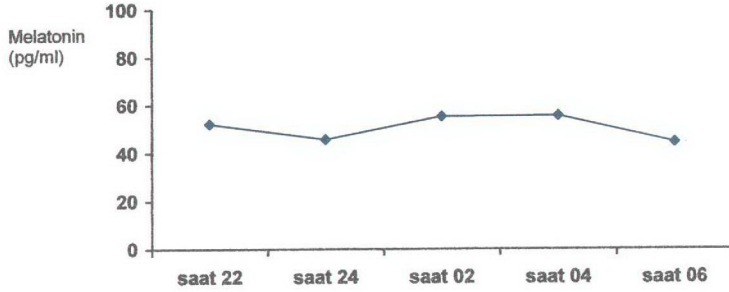


Şekil 4.4. Saatlere göre ortalama Melatonin Değerleri.

Çalışmaya alınan hastaların ortalama melatonin değerlerinin saatlere göre (saat 22⁰⁰, 24⁰⁰, 02⁰⁰, 04⁰⁰ ve 06⁰⁰) anlamlı değişim gösterip göstermediğindedir bakılmıştır (Tablo 4.6-4.7)(Şekil 4.5). Bunun için Non-Parametrik testlerden Friedman test kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre fark anlamlı bulunmuştur. (KiKare=11.89.sd=4, p=0021)

Tablo 4.6: Saatlere Göre Ortalama Melatonin Değerleri

Grup	N	Ortalama	Std. Sapma
Saat 22 ⁰⁰	39	52.28	85.17
Saat 24 ⁰⁰	39	45.75	57.63
Saat 02 ⁰⁰	39	55.21	61.38
Saat 04 ⁰⁰	39	55.37	58.83
Saat 06 ⁰⁰	39	44.35	59.15



Şekil 4.5. Saatlere Göre Ortalama Melatonin Değerleri

Tablo 4.7. Saatlere Göre İstatistiksel Değer

Saatler	N	Mean Rank
Saat 22 ⁰⁰	39	52.28
Saat 24 ⁰⁰	39	45.75
Saat 02 ⁰⁰	39	55.21
Saat 04 ⁰⁰	39	55.37
Saat 06 ⁰⁰	39	44.35
İstatistiksel Değerler		
KiKare=11.589		p=0.021

Gruplar arasında farkın hangi grup/gruplardan kaynaklandığını anlayabilmek için Non-Parametrik testlerden "Bağımsız gruplarda iki ortalama arasındaki farkın anlamlılık testi" olan Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Grup 1 ve Grup 2'deki hastaların saatlere göre melatonin değerleri karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Grup 1 ve Grup 3 karşılaştırıldığında saat 24 ve saat 06 arasında melatonin değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($z=-3.154$, $p=0.002$ ve $z=-2.744$, $p=0.006$). Grup 2 ve Grup 3 karşılaştırıldığında saat 24 ve saat 06'da melatonin değerleri arasında önemli bir fark tespit edilmiştir ($z=-3.051$, $p=0.002$ ve $z=-3.001$, $p=0.003$)(Tablo 4.8)

Tablo 4.8. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'ün 2'li karşılaştırmalarındaki istatistiksel Değerler.

Gruplar	İstatistiksel Değerler		Gruplar	İstatistiksel Değerler		Gruplar	İstatistiksel Değerler	
	z	p		z	p		z	p
Over-Meme			Over-Kontrol			Meme-Kontrol		
saat 22	-0.231	0.817	saat 22	-1.462	0.144	saat 22	-2.026	0.043
saat 24	0.179	0.858	saat 24	-3.154	0.002*	saat 24	-3.051	0.002*
saat 02	-1.000	0.317	saat 02	-0.077	0.939	saat 02	-0.795	0.427
saat 04	-0.128	0.898	saat 04	-1.103	0.270	saat 04	-0.744	0.457
saat 06	-0.179	0.858	saat 06	-2.744	0.006*	saat 06	-3.001	0.003*

* Saat 24 ve 06'da anlamlı bir fark saptanmıştır

4.2. Tümör Dokularından Genomik DNA İzolasyonu

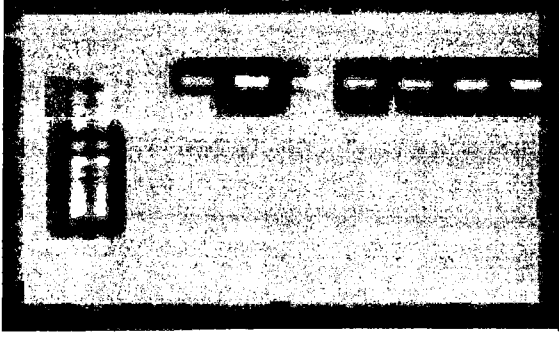
Bütün hastaların doku örnekleri taze dokulardan elde edildi. 1 – 13 no'lu hastaların doku örnekleri over tümörlerine, 13 – 26 no'lu hastaların doku örnekleri meme tümörlerine aittir. Taze doku örnekleri homojenize edildikten sonra DNA'lar izole edildi. İzole edilen DNA'ların derişimleri spektrofotometrik ölçümler sonucu belirlendi (Tablo 3.2). 260 nm'de okunan OD değerleri kullanılarak DNA derişimleri ve saflığı belirlendi.

4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

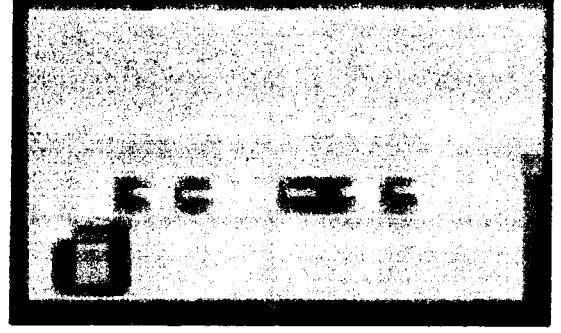
G proteinini kodlayan genin incelenmeye tabi tutulan DNA bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı. $G_{12\alpha}$ 'ya ilişkin gip mutasyonlarını belirlemek için 3 ayrı bölge çoğaltıldı.

4.3.1. $G_{12\alpha}$ 'nın 179. Kodonunu İçeren Bölgenin Çoğaltılması

179 no'lu kodonu içeren 165 baz çifti uzunluğundaki bölge GC3 ve GD3 primerleri kullanılarak Gereç ve Yöntemler'de belirtilen koşullarda çoğaltıldı. (Şekil 4.6-9)



M (-) 1 2 3 4 5 6 7

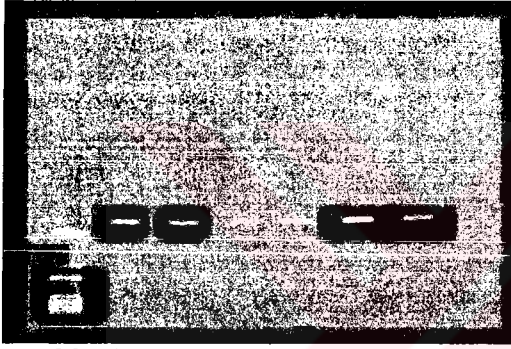


M 8 9 10 11 12 13 (-)

Şekil 4.6.

Şekil 4.7.

*Şekil 4.6-7. $G_{12\alpha}$ 'nın 179 nolu kodonunu içeren bölgenin PZR yöntemiyle çoğaltılması (-); DNA içermeyen kontrol, M; 50 bp'lik DNA Marker ve (1-13) Over CA hasta DNA ürünleri



M 14 15 16 17 18 19 (-)



M 20 21 22 23 24 25 26 (-)

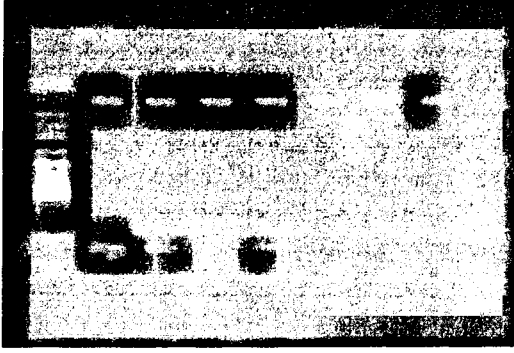
Şekil 4.8.

Şekil 4.9.

*Şekil 4.8-9. $G_{12\alpha}$ 'nın 179 nolu kodonunu içeren bölgenin PZR yöntemiyle çoğaltılması (-); DNA içermeyen kontrol, M; 50 bp'lik DNA Marker ve (14-26) Meme CA hasta DNA ürünleri

4.3.2. $G_{12\alpha}$ 'nın 205. Kodonunu İçeren Bölgenin Çoğaltılması

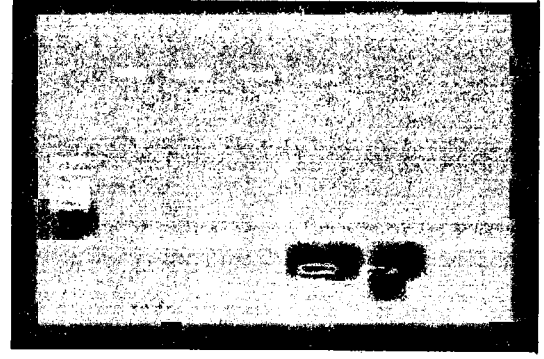
205 no'lu kodonu içeren 175 baz çifti uzunluğundaki bölge GC4 ve GD4 primerleri kullanılarak Gereç ve Yöntemler'de belirtilen koşullarda çoğaltıldı. (Şekil 4.10-13)



M 1 2 3 4 5 6 7 (-)

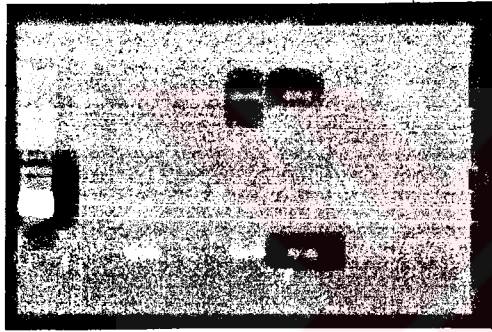
Şekil 4.10.

*Şekil 4.10-11. $G_{12\alpha}$ 'nın 205 nolu kodonunu içeren bölgenin PZR yöntemiyle çoğaltılması (-); DNA içermeyen kontrol, M; 50 bç'lik DNA Marker ve (1-13) over CA hasta DNA ürünleri



M 8 9 10 11 12 13 (-)

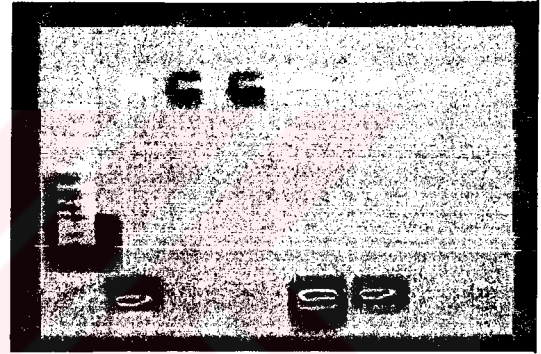
Şekil 4.11.



M 14 15 16 17 18 19 20 (-)

Şekil 4.12.

*Şekil 4.12-13. $G_{12\alpha}$ 'nın 205 nolu kodonunu içeren bölgenin PZR yöntemiyle çoğaltılması (-); DNA içermeyen kontrol, M; 50 bç'lik DNA Marker ve (14-26) meme CA hasta DNA ürünleri

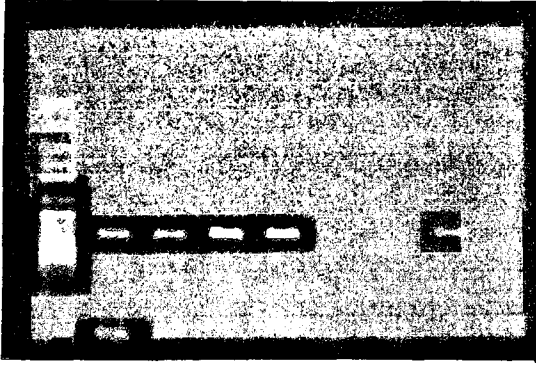


M 21 22 23 24 25 26 (-)

Şekil 4.13.

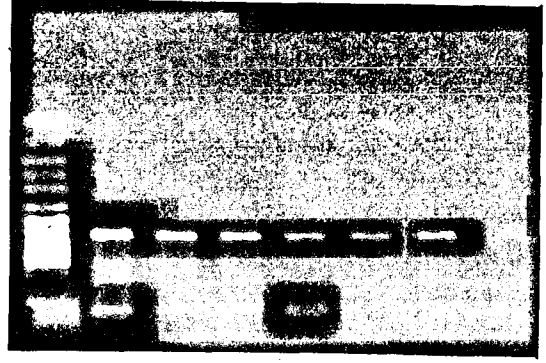
4.3.3. $G_{12\alpha}$ 'nın 179. ve 205. Kodonlarını İçeren Bölgenin Çoğaltılması

179 ve 205 no'lu kodonları ve aralarındaki intron bölgesini içeren 604 baz çifti uzunluğundaki bölge GC2 ve GD2 primerleri kullanılarak Gereç ve Yöntemler'de belirtilen koşullarda çoğaltılmıştır.(Şekil 4.14-16)



M 1 2 3 4 5 6 7 (-)

Şekil 4.14.



M 8 9 10 11 12 13(-)

Şekil 4.15.



M 15 16 17 18 19 20 21 22 (-)

Şekil 4.16.

*Şekil 4.14-16 $G_{12\alpha}$ 'nın 179 ve 205 nolu kodonlarını içeren bölgenin PZR yöntemiyle çoğaltılması (-); DNA içermeyen kontrol, M; 50 bp'lik DNA Marker ve (1-22) over CA ve meme CA hasta DNA ürünleri

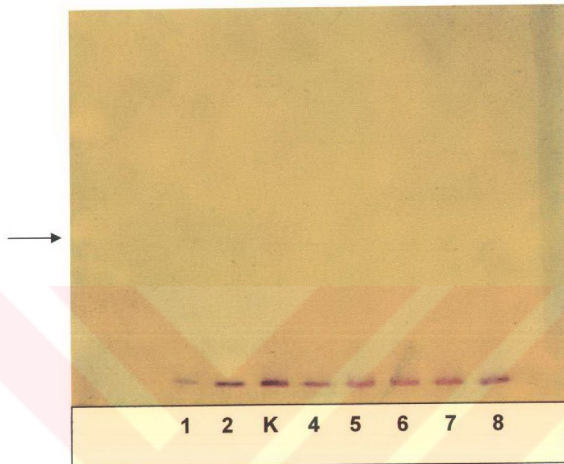
4.4.SSCP (Tek Sarmal Konformasyon Polimorfizmi) Yöntemiyle Mutasyonların İncelenmesi

Denatüre edilmemiş tek sarmal halindeki DNA, belirli bir konformasyona sahiptir. Aynı DNA dizisindeki tek bir nükleotid farklılığı (gerek delesyon, gerek insertion, gerekse nokta mutasyonu) bu konformasyonda bir değişikliğe neden olur. Bu konformasyon farklılığı DNA dizisinin jel elektroforezlerindeki göçme hızını etkiler. Göçme hızındaki bu farklılık denatüre edici olmayan poliakrilamid jellerinde yeni veya heterodupleks bantlar olarak ortaya çıkar.

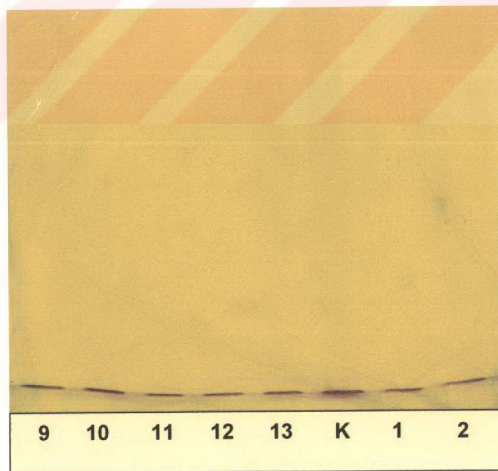
4.4.1. $G_{12\alpha}$ Genindeki gip Mutasyonların SSCP Yöntemiyle İncelenmesi

gip mutasyonlarını incelemek için çoğaltılan üç bölge denatürasyon işlemine

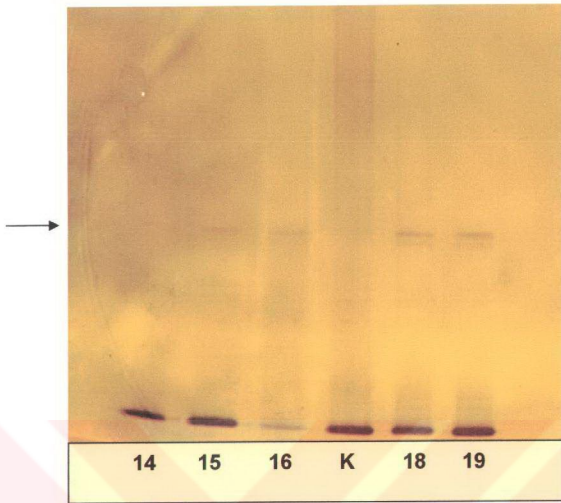
tabi tutulduktan sonra 179, 205 no'lu kodonları ve aradaki intron bölgesini de içeren uzun bölge gliserollü PAGE jeline yüklendi. Uzun bölge 250 V'ta 5 saat, diğer bölgeler ise 250 V'ta 2 saat yürütüldükten sonra gümüş nitrat ile boyandı (Şekil 4.17-20)



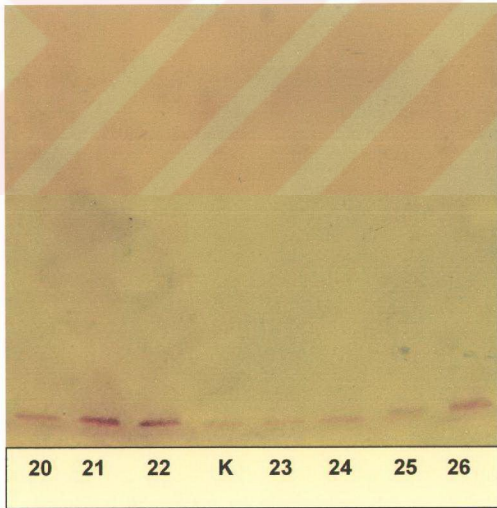
Şekil 4.17. 179. kodonu içeren over CA hastalarının PZR ürünleri



Şekil 4.18. 179. kodonu içeren over CA hastalarının PZR ürünleri

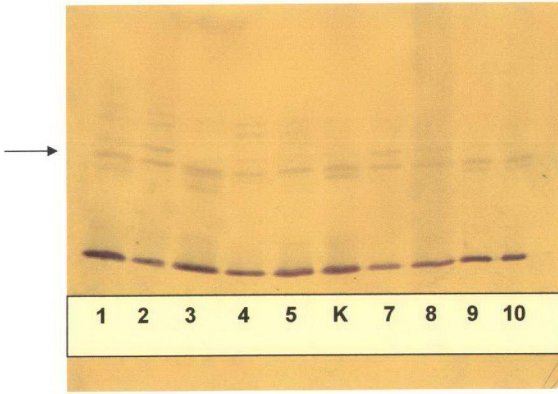


Şekil 4.19. 179. kodonu içeren meme CA hastalarının PZR ürünleri

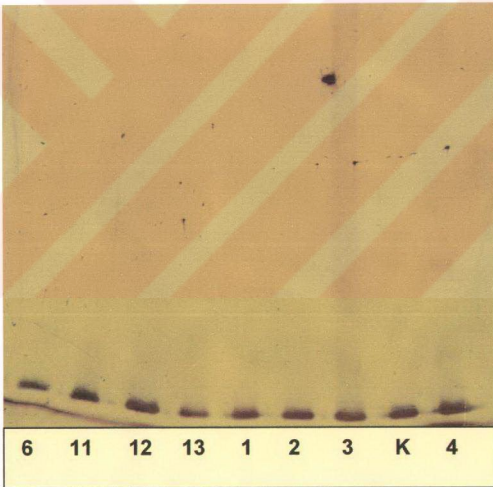


Şekil 4.20. 179. kodonu içeren meme CA hastalarının PZR ürünleri

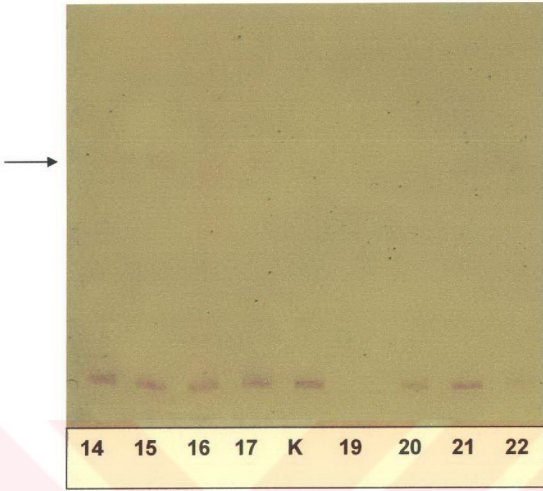
*Şekil 4.17-20 G_{12a}'nın 179 nolu kodonunu içeren bölgenin gliserollü % 6 PAGE'inde yürütüldü ve gümüş nitrattla boyandı. (→) Ek bantları gösterir.



Şekil 4.21. 205.kodonu içeren over CA hastalarının PZR ürünleri

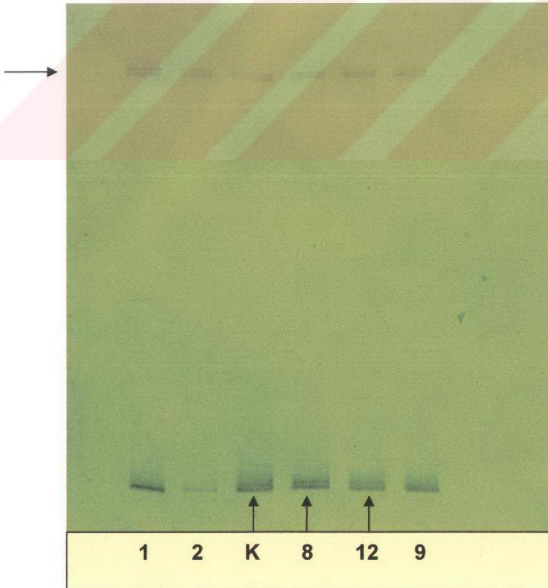


Şekil 4.22. 205. kodonu içeren over CA hastalarının PZR ürünleri

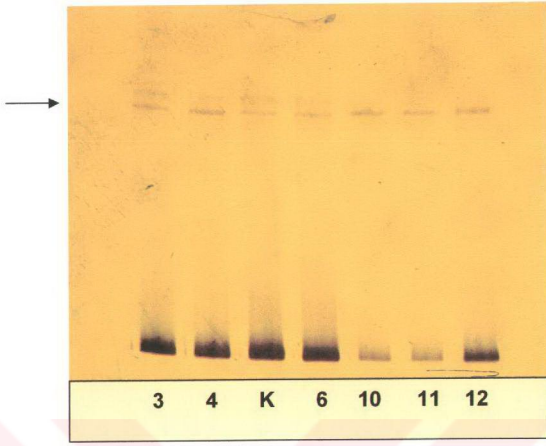


Şekil 4.23. 205. kodonu içeren meme CA hastalarının PZR ürünleri

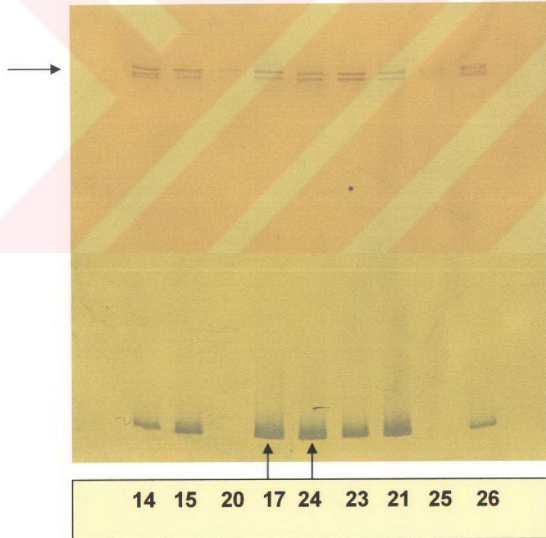
*Şekil 4.21-23 G_{120} 'nın 205 nolu kodonunu içeren bölgenin gliserollü % 6 PAGE'inde yürütüldü ve gümüş nitratla boyandı.(→) Ek bantları gösterir.



Şekil 4.24. 179.ve 205. kodonları içeren over CA hast. PZR ürünleri



Şekil 4.25. 179 ve 205. kodonları içeren over CA hast. PZR ürünleri



Şekil 4.26. 179 ve 205. kodonları içeren meme CA hast PZR ürünleri

Şekil 4.24-26 G_{12a} 'nın 179 ve 205 nolu kodonlarını içeren bölgenin gliserollü % 6 PAGE'inde yürütüldü ve gümüş nitrata boyandı. (→) Ek bantları, (↑) Heterodupleks bantları içeren örnekleri işaret etmektedir.

5. TARTIŞMA

Pineal bez ve salgıladığı en önemli madde olarak bilinen melatonin ile ilişkili çok çeşitli çalışmalar mevcuttur. Melatonin ile yapılan çalışmalar bu hormonun plazmadaki değişen düzeyinin bir çok fizyolojik süreçte ve çeşitli hastalıkların fizyopatolojisinde rol andığını göstermiştir. Pek çok faktör pineal bezde melatonin sentez ve salınımını dolayısı ile plazma melatonin düzeyini etkiler. Bu faktörlerden başlıcaları ortamın ışık durumu, kişinin yaşı, mevsim, ortam sıcaklığı, hormonlar, kanser vb. gibidir. Tümör gelişimi ile melatonin arasında olası ilişkilerin olduğu çok çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir.

Waldhauser ve ark'nın² çalışmasında 89 çocuk ve genç yetişkinin sabah 7³⁰ ile 10⁰⁰ saatleri ve gece 11⁰⁰ ile 01⁰⁰ saatlerinde serum melatonin değerlerini ölçmüşlerdir. Sonuçlar arasında anlamlı farklılıklar bulmuşlardır.

Pineal fonksiyonun baskılanması meme, prostat, over, maling melanoma gibi çeşitli kanser tiplerinin etiolojisinde rol oynamaktadır.

Lissoni ve ark²⁷ 250 metastatik tümörlü (104'ü mide CA'lı, 77'si meme CA'lı, 42'si gastrointestinal tümörlü ve 27'si baş ve boyun bölgesine ait tümörlü) hastayı kapsayan çalışmalarında hastaları iki gruba ayırıp bir gruba kemoterapi ile birlikte her gün (20mg/gün) melatonin, diğer gruba yalnız kemoterapi vermişlerdir. Çalışmanın sonunda Kemoterapi ile melatonin alan grupta, yalnız kemoterapi alan gruba göre yaşam süresinin uzadığı görülmüştür.

Melatoninin endokrin bezler üzerinde supresif bir etkisi vardır. Dolaşımdaki melatonin konsantrasyonlarının azalması gonadlardan östrojen ve testesteron salınımını artırır. Tümörün östrojen reseptör korelasyonu ile gece melatonin konsantrasyonu arasında önemli ölçüde negatif korelasyon vardır. Melatonin seviyesi düştükçe östrojen reseptör konsantrasyonu artar.

Over ve meme kanseri etiolojisinde uzamış östrojen fazlalığı olması ve melatoninin overlerde östrojen üretimini olumsuz etkilemesi; over ve meme kanseri gelişimi ile pinealden melatonin salınımının azalması arasında bir ilişki olup olmadığı yapılan çalışmalarla araştırılmıştır.

Bartsch ve ark'nın²⁶ meme CA'lı ve over CA'lı hastalarla gerçekleştirdikleri çalışmada 10^{-8} - 10^{-10} M'lık bir melatonin verildiğinde bazı hastalarda tümörün inhibe edildiği görülmüştür.

Yine Ram ve ark'nın²⁹ östrojen reseptör (+) meme CA'lı hastalar ile yaptığı çalışmada da tümörün melatonin salınımına etkileri konusunda anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

Sunulan çalışmada over CA, meme CA'lı ve bu hastalarla uygun yaşta seçilen kontrol grubunda serum melatonin düzeyleri çalışıldı. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda melatonin salınım ritminin hasta gruplarında, sağlıklı deneklere göre anlamlı ölçüde değiştiği bulundu. Ancak hastalar ve sağlıklı kontrol gruplarındaki sayı istatistiksel değerlendirme için yeterli olmadığından non-parametrik testler kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar bu çalışmadaki hasta ve kontrol gruplarını kapsamaktadır. Bunun nedeni melatonin kitinin pahalı olması ile hasta grupları ve kontrol gruplarından gece boyunca saat 22⁰⁰, 24⁰⁰, 02⁰⁰, 04⁰⁰ ve 06⁰⁰'da kanlarının alınması daha fazla sayıda hasta ile çalışmamızı engellemiştir. Bu nedenle over CA, meme CA ve melatonin salınım ritmi arasında ilişki olup olmadığı konusuna tam açıklık getirilemedi.

G proteinleri hücre yüzey reseptörleri ile hücre içi efektör molekülleri birbirine bağlayarak, hücre içi ikincil habercilerin oluşmasına aracılık eden bir protein ailesidir. α , β , γ alt birimlerinde oluşan bu heterotrimerik proteinler GDP-bağlı aktif olmayan form ve GTP-bağlı aktif form olmak üzere iki farklı konformasyonda bulunabilirler. Dinlenme halinde, G protein heterotrimerinin α -alt birimi GDP-bağlı durumdadır. GTP-bağlı aktif duruma geçtiğinde α -alt birimi $\beta\gamma$ kompleksinden ayrılır. Ve sonrasında hücre içi efektör molekülleri uyarır α -alt birimlerinin doğal GTPaz aktivitesi ile GTP GDP'ye hidrolizlenerek yeniden aktif olmayan durumuna gelir.

G proteinleri kenetlendikleri reseptörler yoluyla çok sayıda biyokimyasal etkileşime aracılık etmektedir.

G_s proteini yoluyla adenilat siklaz enziminin aktiflenmesi sonucu hem cAMP düzeyi artar, hemde Ca^{+2} kanalları aktiflenir.

G_i proteini yoluyla da adenilat siklaz enzimi baskılanır ve hem cAMP düzeyi azalır hem de K^+ kanalları açılır.

G_q proteini yoluyla ise fosfolipaz C- β enzimi aktiflenerek PIP2'yi IP3 ve DAG'ye ayırır.

Endokrin hastalıkların büyük bir çoğunluğu hormon yersizliğine neden olan endokrin bezi bozukluklarından kaynaklanmaktadır. Yetersizliğin bir diğer nedeni de hormon miktarında artışa neden olan hastalıklardır. Bunlar çoğunlukla tümör kökenlidir.

Endokrin tümörlerinin normal hücre büyümesini ve farklılaşmasını bozan genetik değişimlerin birikimi sonucu olduğu sanılmaktadır. Yaygın olarak gözlemlenen ve insan karsinogenesizin temeli olarak kabul edilen mutasyonel değişimler p53 tümör baskılayıcı genindeki ve ras proto-onkogenlerindeki nokta mutasyonlarıdır. Fakat karsinogenesizin mekanizmasının tam olarak açığa kavuşmamış olması ve bir çok G protein kenetli reseptörün ve G protein hücre büyümesinin kontrolünde görev alması bu proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonların insan tümörlerinin oluşumundaki etkenlerden biri olabileceğini düşündürmektedir.

İnsan endokrin tümörlerinde içsel GTPaz etkinliğini baskılayarak $G\alpha_s$ ve $G_{i2\alpha}$ 'yı sürekli aktifleyen mutasyonlar bulunmuştur.

Yoshimoto ve ark' tarafında yapılan çalışmada 43 hastada 4'ünde $G_{s\alpha}$ mutasyonları bulunmuştur.

Over ve adrenal korteks tümörlerinde de gip onkogeni tanımlanmıştır. gip onkogeninin tümör oluşumundaki rolü çok açık değilse de bilimli hücre tiplerini transforme edebileceği sanılmaktadır. İnsan tümörlerinde α_{2i} 'ye ait gip mutasyonları bulunmuştur.

Lyons ve ark'nın²⁵ insan over tümörleri ile ilgili yaptıkları çalışmada 42 hastadan 18'inde $G_{i2\alpha}$ 'ya ilişkin mutasyonlar bulunmuştur.

Suhulan çalışmanın ikinci aramasında over CA ve meme CA'lı hastaların tümörlü doku örneklerinden çalışıldı. $G_{i2\alpha}$ 'nın 179 ve 205 numaralı kodonlarının ikisini içeren bölge ile 179 ve 205 kodonlarını ayrı ayrı içeren bölgeler özgün pirimerler kullanılarak PZR yöntemiyle çoğaltıldı. Mutasyonlar Tek Sarmal Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) yöntemi ile belirlendi. Sonuç olarak over CA (% 15) ve meme CA (% 7) tümörlerinin DNA örneklerinde gip mutasyonları bulundu.

6. SONUÇ

Sunulun çalışmanın sonuçları over CA (n=13) ve meme CA (n=13)' lı hastalarda melatonin salınım ritminin olumsuz yönde etkilendiğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar, melatonin azalması endokrin tümörlerinin gelişimini arttırdığı yönündeki çalışmalarla uyumludur.

Çalışmamızda sağlıklı hasta gruplarında (n=13) serum melatonin düzeylerinde literatürde belirtildiği şekilde gece boyunca bir artış olduğu, sabahın erken saatlerinde ise azalış olduğu görüldü. Oysa hasta gruplarının serum melatonin düzeylerinde gece boyunca düzensiz artış-azalışlar gözlemlendi. Bu sonuçlardan yola çıkarak melatonin sirkadyen ritmindeki değişikliklerin tümörün varlığının erken dönemde saptanmasına yardımcı olup olamayacağı hasta sayısını artırarak araştırılabilir.

Çalışmamızın diğer bölümünde over CA ve meme CA'lı hastaların tümörlü dokularından DNA izole edildi. G_{12a}'nın 179. ve 205. kodonlarının ikisini içeren bölge ile 179. ve 205. kodonları ayrı ayrı içeren bölgeler uygun primerler kullanılarak PZR yöntemiyle çoğaltıldı. Mutasyonlar SSCP yöntemiyle belirlendi. Sonuç olarak over CA (%15) ve meme CA (%7) gip mutasyonları saptandı. İleride çalışmanın daha geliştirilip devam edilmesi düşünülmektedir.

7. ÖZET

Pineal bez ve onun salgıladığı en önemli madde olarak bilinen melatoninin kanser etiyojisi üzerine etkileri ile ilgili pek çok çalışma mevcuttur. Genel kanı melatonin salınımının azalması endokrin tümörlerinin gelişimini arttırdığı yöndedir. Ayrıca G protein aracılığı ile gerçekleşen sinyal ileti sistemlerinin bileşenlerinin yapı ve işlevlerine ait son yıllarda biriken bilgi bu bileşenlerdeki bozuklukların hastalığa yol açabileceğine işaret etmektedir.

Sunulan çalışma iki aşamada gerçekleştirildi. İlk aşamada over CA (n=13), meme CA (n=13) ve kontrol grubundan (n=13) gece boyunca saat 22⁰⁰, 24⁰⁰, 02⁰⁰, 04⁰⁰ ve 06⁰⁰'da kanları alınıp serum melatonin düzeylerine bakıldı. Elde edilen sonuçlar anlamlı derecede farklı bulundu. Bu çalışmanın sonuçları çalışmaya alınan hasta ve kontrol grupları için tümörün melatonin salınım ritmini etkilediği görüşünü desteklemektedir.

İkinci aşamada aynı hasta gruplarının tümörlü dokularında DNA elde edildi. G_{12α}'nın 179 ve 205 numaralı kodonlarının ikisini içeren bölge ile 179 ve 205 kodonlarını ayrı ayrı içeren bölgeler özgün primerler kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemiyle çoğaltıldı. Mutasyonlar Tek Sarmal Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) yöntemi ile belirlendi. Sonuç olarak over CA (% 15) ve meme CA (% 7) tümörlerinin DNA örneklerinde gip mutasyonları bulundu.

Anahtar kelimeler. Melatonin, G protein, mutasyon, over CA ve meme CA

8. SUMMARY

Melatonin Secretion Rhythm and G protein Mutations of Patients with Various Cancer Types Differing

In recent years, many studies have been carried out to show the effects of pineal gland and melatonin, which is known as the most important secretion produced by this gland, on the cancer etiology. It is generally accepted that the decrease in the melatonin secretion increases the development of the tumours of endocrin. Furthermore, the knowledge obtained from the recent studies about the structure and functions of the compounds of the signal systems conveyed through G protein has indicated that the malfunction of these compounds may lead to diseases.

The present study has been carried out in two step. In the first step, blood has been obtained from ovary CA (n=13), breast CA (n=13) and control group (n=13) at 22⁰⁰, 24⁰⁰, 02⁰⁰, 04⁰⁰ ve 06⁰⁰ through the night and the serum melatonin level has been checked. The results were significantly different, and this supports the idea that the tumour affects the melatonin secretion rhythm.

In the second step, the DNAs of the tissues with tumors of the same patients have been obtained. In G_{12α}, the regions including codons 179 and 205 and the regions including codons 179 and 205 separately have been propagated through the method of Polymerase Chain Reaction (PCR) by the use of original primers. The mutations have been identified by the method of Single Strand Conformation Polymorphism. Finally, gip mutations have been discovered in the DNA samples of the tumours of ovary CA (%15) and breast CA (%7).

Key words: Melatonin, G protein, mutation, ovary CA, breast CA

9. KAYNAKLAR

1. Noyan A: Fizioloji ders kitabı. Ankara: Metaksan Matbaası; 1993: 1095-9.
2. Waldhauser F, Weiszenbacher G, Frisch H, Zeitlhuber U. Fall in Nocturnal Serum Melatonin During Prepuberty and Pubescence. *The Lancet*. 1984; 362-364.
3. Brzezinski A. Melatonin in Humans. *The New England Journal of Medicine*. 1997; 336:186-195.
4. Ram Pt, Dai J, Yuan L, Dong C, Kiefer TL, Lai L. Involvement of the mt1 Melatonin Receptor in Human Breast Cancer. *Cancer Letters*. 2002; 179:141-150.
5. Conway S, Canning SJ, Barrett P, Morgan J. Characterization of Human Melatonin MT1 and MT2 Receptors by CRE-luciferase Reporter Assay. *European Journal of Pharmacology*. 2000; 390: 15-24.
6. Masana MI, Witt-Enderby PA, Dubacovich ML. Melatonin Differentially Modulates the Expression and Function of the h Mt1 and hMT2 Melatonin Receptors Upon Prolonged Withdrawal. *Biochemical Pharmacology*. 2003; 65:731-739.
7. Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka MJ. Melatonin Receptors and Their Regulation: Biochemical and Structural Mechanism. *Life Sciences*. 2003; 72: 2183-2198.
8. Teplitzky SR, Kiefer TL, Cheng Q, Dwivedi PD, Moroz K, Myers L, et al. Chemoprevention of NMU-induced Rat Mammary Carcinoma with the Combination of Melatonin and 9-cis-retinoic Acid. *Cancer Letters*. 2001; 168:155-163.
9. Ebisawa T, Kajimura N, Uchiyama M, Katoh M, Sekimoyo M, Watanabe T, et al. Allelic Variants of Human Melatonin 1a Receptor: Function and Prevalence in Subjects with Circadian Rhythm Sleep Disorders. 1999; 262:832-837.
10. Mert S. İnsanda serum Melatonin, T₃, T₄ Düzeyleri ve Eksojen Melatonin Serum T₃ ve T₄ Düzeylerine Etkileri. *Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, 2001.
11. Ekmekçiöğlü C, Haslmayer P, Philipp C, Mehrabi MR, Glogar HD, Grimm M, et al. 24h Variation in the Expression of the mt1 Melatonin Receptor Subtype in Coronary Arteries Derived From Patients with Coronary Heart Disease. *Chronobiology International*. 2001; 18(6):973-985.
12. Serenella Arangino MD, Cagnacci A, Angiolucci M, et al. Effects of Melatonin on Vascular Reactivity, Catecholamine Levels, and Blood Pressure in Healthy Men. *The American Journal of Cardiology*. 1999; 83:1417-1419.
13. Drew JE, Williams LM, Hannah LT, Barret P, Abramovich, Morgan PJ. Melatonin Receptors in Human Fetal Kidney: 2-(¹²⁵I) Iodomelatonin Binding Sites Correlated with Expression of Mel1a and Mel1b Receptor Genes. 1998; 156:261-267.
14. Dillon CD, Easley SE, Asch BB, Cheney RT, et al. *Anatomic Pathology*. 2002; 118:451-458.
15. Reppert SM. Melatonin Receptors: Molecular Biology of a New Family of G protein-coupled receptors. *J Biol Rhythms*. 1997; 6:528-531.
16. Pintor J, Martin L, Pelaez T, Hoyle HV, Peral A. Involvement of Melatonin MT₃ receptors in the regulation of Intraocular Pressure in Rabbits. *European Journal of Pharmacology*. 2001; 416:251-254.
17. Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beuverger P, Henlin JP, Lefoulon F, et al. Identification of The Melatonin-binding Site MT₃ as the Quinone Reductase 2. *J. Biol. Chem*. 2000; 275:31311-31317.
18. Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F, Delagrance P, Canet E, Boutin JA. Comparative Pharmacological Studies of Melatonin Receptors: mt1, mt2 and mt3/q₂. Tissue Distribution of mt3/q₂. *Molecular and Cellular pharmacology*. 2001; 61:1369-1379.

19. Yashimoto K, Iwahana H, Fukuda A, Sano T, et al. Rare Mutations of the G_s Alpha Subunit Gene in Human Endocrine Tumors. *Cancer*. 1993; 72:1386-1393.
20. Nishimoto I, Okamoto T, Matsura Y, Takahashi S, et al. Alzheimer Amyloid Protein Precursor Complexes with Brain GTP-binding Protein G₀. *Nature*. 1993; 362: 75-79.
21. Helper, JP: G proteins. *TIBS*. 1992; 383-87.
22. Raymond JR: Hereditary and Acquired Defects in Signaling Through the Hormone-receptor-G protein Complex. *The Am. Phys. Soc.* 1994; 163-174.
23. Kaziro Y, Itoh H, Kozasa T, Nakafuku M, Satoh T. Structure and Function of Signal-transducing GTP-binding Proteins. *Annu. Rev. Biochem*, 1991; 60:349-399.
24. Allen M, Spiegel A.M., Weinstein L.S., Shenker A: Abnormalities in Protein-coupled Signal Transduction Pathways in Human Disease. *The Jour of Clin. Inves.* 1993; 92:1119-1125.
25. Lyons J, Landis CA, Harsh G, Vallar L, Grünerwald K, et al. Two G protein in Human Endocrine Tumors. *Science*. 1990, 249:655-659.
26. Bartsch H, Buchberger A, Franz H, Bartsch C, Maidonis I, Mecke D. Effect of Melatonin and Pineal Extracts on Human Ovarian and Mammary Tumor Cells in Chemosensitivity Assay. *Life Sciences*. 2000; 67:2953-2960.
27. Ram PT, Kiefer T, Silverman M, Song Y, Brown MG, Hill SM. Estrogen Receptor Transactivation in MCF-7 Breast Cancer Cells by Melatonin and Growth Factors. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1998; 141:53-64.
28. Lissoni P, Barni S, Mandala M, Ardizzoia A, Paolorossi F, Vaghi M, et al. Decreased toxicity and Increased Efficacy of Cancer Chemotherapy Using the Pineal Hormone Melatonin in Metastatic Solid Tumour Patients with Poor Clinical Status. *European Journal of Cancer*. 1999; 35:1688-1692.
29. Yaprak M. Melatonin: Fizyolojik Etkileri. *Haseki Tıp Bülteni*. 1996; 34:157-163
30. Taner M, Balkancı . Melatonin ve fizyolojik olaylardaki rolü. *Fizyoloji Bülteni*. 1993, 5: 40-58.
31. Zubay G. *Biochemistry. Hormone Action*. Macmillan Publishing Company, New York. Collier Macmillan Publishers, London 1988, 1045-1087.
32. Emil LS. *Principles of Biochemistry (Mammalian Biochemistry) The Nervous System*. McGraw-Hill International Book Company. 1983; Chapter 7:243-272.
33. Emil LS. *Principles of Biochemistry (General Aspects): Viruses. The Interferons*. McGraw-Hill International Book Company. 1983; Chapter 30:810-1983.
34. Zubay G. *Biochemistry. Regulation of Gene Expression in Eukaryotes*. Macmillan Publishing Company, New York. Collier Macmillan Publishers, London. 1988; 1011-1044.
35. Guyton AC. *WB Saunders Company, United States of America*. 1986; Chapter 74: 876-883.
36. Yıldırım M. *Temel İnsan Anatomisi*. 1. Baskı. İstanbul. Beta Basım Yayın Dağıtım, 1990: 400-402.
37. Vollrath I., *The Pineal organ*, Springer, Berlin, 1981.
38. Erdinç F. *Epiphysis Cerebri Üzerine İncelemeler ve Ultrastrüktürel Değişiklikler*. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Doktora tezi, 1975.
39. Taner D. *Fonksiyonel Nöranatomi*. 1. Baskı. Ankara. Metu Press, 1998:201
40. Koçak A, Çolak A. Melatonin ve Santral Sinir Sistemi. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 1996;3(3):237-244.
41. Williams PL. *Gray's Anatomy*. 38. Ed. 1995; 1888-1891.
42. Touitou Y. Human ageing and melatonin Clinical relevance. *Experimental Gerontology*. 2000; 36:1083-1100.
43. Cagnacci A. Melatonin in Relation to Physiology in Adult Human. *J Pineal Res*. 1996;21:200-213.
44. Reiter RJ. Pineal Melatonin. Cell biology of Its Synthesis and of Its Physiological Interactions. *Endocrine Rev*. 1991, 12:151-180.
45. Özkay M, Yıldırım M, Yıldırım N. Pineal Organ ve Fonksiyon Bozuklukları. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 1987; 4(2-3):283-295.

46. Lismaa TP, Shine J: G protein-coupled Receptors. *Current Opinion in Cell Biology*. 1992; 4:203-211.
47. Spiegel AM. G protein in Cellular Control. *Current Opinion in Cell Biology*. 1992; 4:203-211.
48. Stryer L. *Biochemistry: Hormon Action*. W. H. Freeman and Company/ New York. 1988; Chapter 38:975-988.
49. Labbright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. Sutractural Determinants For Activation of the α -Subunit of a Heterocimeric G protein. *Nature*. 1994; 369:621-628.
50. Osawa S, Dhanasekaran N, Woon W, Johnson L. $G\alpha_i$ - $G\alpha_s$ Chimeras Define the Function of α Chain Domains in Control of G protein Activation and $\beta\gamma$ Subunit Complex Interactions. *Cell*. 1990; 63:697-706.
51. Hepler JR, Gilman AG. *G proteins*. Elsevier Science Publishers (UK). 1992;17:383-387.
52. Lupas AN, Lupas JM, Stock B. Do G protein Subunits Associate Via a Three-stranded Coiled Coil?. *FEBS*. 1992; 314:105-108.
53. Dratz E, Furstenau JE, Lambert CG, Thireault DL, Raick H, Schepers T, et al. NMR Structure of a Receptor-bound G-protein Peptide. *Letters*. 1993; 363:276-281.
54. Federman AD; Conklin BR, Schrader KA, Reed RR, Bourne H. Hormonal Stimulation of Adenylyl Cyclase Through G_i -protein $\beta\gamma$ subunits. *Lettes*. 1992; 356:159-161.
55. Rondard P, Liri T, Srinivasan S, Meng E, Fujita T. Mutand G protein α Subunit Activated by $G\beta\gamma$: A Model for Receptor Activation?. *PNAS*. 2001; 98:6150-6155.
56. Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, Vallar L. GTPase Inhibiting Mutations Activate the α Chain of G_s and Stimulate Adenylyl Cyclase in Human Pituitary Tumours. *Nature*. 1989; 340: 692-696.
57. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzimatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle cell Anemia. *Science*. 1985; 230:1350-1354.
58. Vallar L. Oncogenic Role of Heterotrimeric G proteins. *Cancer. Cancer Surveys*. 1996; 27:325-338.
59. Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. Diversity of G proteins is Signal Transduction. *Science*. 1991; 252:802-808.
60. Noel JP, Hamm He, Sigler PB. The 2.2 Å Crystal Structure of Transducine- α Complexed with $GTP\gamma S$. *Nature*. 1993; 654-663.
61. Irı T, Ohoka Y, Katada T. Foncnional Modification by Cholera-toxin-catalzyed ADP-ribosylation of a Guanine-nucleotid-binding Regulatory Protein Serving as the Substrate of Pertussis Toxin. *Eur J Biochem*. 1991; 202: 635-641.
62. Berlot CH, Bourne HR. Identification of Effector-activating Residues of G_{sa} . *Cell*. 1992; 68:911-922.
63. Gautam N, Baetscher M, Aebersold R, Simon MI. A G protein Gama Subunit Sharas Homology with Ras Proteins. *Science*. 1989; 244:971-974.
64. Sharan Sk, Morimatsu M, albrecht U, Lim DS, Regel E, Dinh C, et al. Embriyonic Lethality and Radiation Hpersensitivity Mediated by Rad51 in Mice Lacking Brca2. *Nature*. 1997; 804-810.
65. Yazici H, Bitisik o, akisik E, Cabioğlu N, Saip P, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations and Turkish breast/ovarian Families and Young Breast Cancer Patients. *British Journal of Cancer*. 2000; 83(6):737-742.
66. Fikri A. M.D. *Kanser*. 1992; 162-164.
67. Sencer E, Tiryaki D. *Radioimmunassay ve Tümör Antijenleri Belirleme Yöntemleri*. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi.
68. Melatonin I-125 RIA, Test Kit Determination of Melatonin in Serum and Plasma, Instuction Manual.

10. RESİMLEMELER LİSTESİ

10.1 Şekiller

Şekil 2.1. İnsan Beyni	6
Şekil 2.2. Melatonin ve Serotonin	7
Şekil 2.3. Melatonin sentez evreleri	8
Şekil 2.4. Sirkadyen serum melatonin ritmi	9
Şekil 2.5. Gözlerle pineal bez arasındaki sinirsel bağlantı ve pineal bezde melatonin biyosentezi	10
Şekil 2.6. G proteinlerinin GTPaz döngüsü	14
Şekil 2.7. Adenilat siklazın Gs tarafından uyarılması	14
Şekil 3.1. Sayım Değerlendirilmesi	30
Şekil 4.1. Grup 1'in Saatlere Göre Ortalama Melatonin Değerleri	39
Şekil 4.2. Grup 2'nin Saatlere Göre Ortalama Melatonin Değerleri	40
Şekil 4.3. Grup 3'ün Ortalama Melatonin Değerleri	41
Şekil 4.4. Saatlere göre ortalama Melatonin Değerleri	42
Şekil 4.5. Saatlere Göre Ortalama Melatonin Değerleri	43
Şekil 4.6. $G_{12\alpha}$ 'nın 179 nolu kodonunu içeren bölgenin PZR yöntemiyle çoğaltılması	45
Şekil 4.7 $G_{12\alpha}$ 'nın 179 nolu kodonunu içeren bölgenin PZR yöntemiyle çoğaltılması	45
Şekil 4.8. $G_{12\alpha}$ 'nın 179 nolu kodonunu içeren bölgenin PZR yöntemiyle çoğaltılması	45
Şekil 4.9. $G_{12\alpha}$ 'nın 179 nolu kodonunu içeren bölgenin PZR yöntemiyle çoğaltılması	45
Şekil 4.10. $G_{12\alpha}$ 'nın 205 nolu kodonunu içeren bölgenin PZR yöntemiyle çoğaltılması	46
Şekil 4.11. $G_{12\alpha}$ 'nın 205 nolu kodonunu içeren bölgenin	

PZR yöntemiyle çoğaltılması	46
Şekil 4.12. $G_{i2\alpha}$ 'nın 205 nolu kodonunu içeren bölgenin PZR yöntemiyle çoğaltılması	46
Şekil 4.13. $G_{i2\alpha}$ 'nın 205 nolu kodonunu içeren bölgenin PZR yöntemiyle çoğaltılması	46
Şekil 4.14. $G_{i2\alpha}$ 'nın 179 ve 205 nolu kodonlarını içeren bölgenin PZR yöntemiyle çoğaltılması	47
Şekil 4.15. $G_{i2\alpha}$ 'nın 179 ve 205 nolu kodonlarını içeren bölgenin PZR yöntemiyle çoğaltılması	47
Şekil 4.16. $G_{i2\alpha}$ 'nın 179 ve 205 nolu kodonlarını içeren bölgenin PZR yöntemiyle çoğaltılması	47
Şekil 4.17. 179. kodonu içeren over CA hastalarının PZR ürünleri	48
Şekil 4.18. 179. kodonu içeren over CA hastalarının PZR ürünleri	48
Şekil 4.19. 179. kodonu içeren meme CA hastalarının PZR ürünleri	49
Şekil 4.20. 179. kodonu içeren meme CA hastalarının PZR ürünleri	49
Şekil 4.21. 205.kodonu içeren over CA hastalarının PZR ürünleri	50
Şekil 4.22. 205.kodonu içeren over CA hastalarının PZR ürünleri	50
Şekil 4.23. 205. kodonu içeren meme CA hastalarının PZR ürünleri	51
Şekil 4.24. 179 ve 205. kodonları içeren over CA hastalarının PZR ürünleri	51
Şekil 4.25. 179 ve 205. kodonları içeren over CA hastalarının PZR ürünleri	52
Şekil 4.25. 179 ve 205. kodonları içeren meme CA hastalarının PZR ürünleri	52

10.2. Tablolar

Tablo 2.1. Pineal bezin salgıladığı başlıca ürünler	7
Tablo 2.2. Melatonin sentezini ve salınımını etkileyen başlıca faktörler	9
Tablo 2.3. İnsanlarda melatoninin etkili olabileceği bazı olaylar	12
Tablo 2.4. Memeli G proteini α -alt birimleri	15
Tablo 2.4 (devam). Memeli G proteini α -alt birimleri	16
Tablo 2.5. Memeli G proteini β ve γ Alt Birimleri	16
Tablo 2.5 (devam). Memeli G proteini β ve γ Alt Birimleri	17
Tablo.2.6. Over tümör tipleri	21
Tablo 3.1. Hastalara ait serum Tümör Belirteçlerinin Sonuçları	28
Tablo 3.2. Saflaştırılmış DNA'ların Derişimleri	35
Tablo 4.1. Grup 1'in Ortalama Melatonin Değerleri	38
Tablo 4.2. Grup 2'nin Ortalama Melatonin Değerleri	39
Tablo 4.3. Grup 3'nin Ortalama Melatonin Değerleri	40
Tablo 4.4. Gruplara Göre Melatonin Ortalama Değerleri	41
Tablo 4.5. Saatlere Göre İstatiksel Değerler	41
Tablo 4.6. Saatlere Göre Ortalama Melatonin Değerleri	42
Tablo 4.7. Saatlere Göre İstatistiksel Değer	43
Tablo 4.8. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'ün 2'li karşılaştırılmalarındaki istatistiksel Değerler	44

11. ÖZGEÇMİŞ

17.08.1969 Edirne de doğumdum. 1986 yılında Edirne Lisesinde mezun oldum. 1987 yılında başladığım Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 1992 yılında mezun oldum. 1994 yılından beri Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesinde kimyager olarak çalışmaktayım. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün Biyofizik Anabilim Dalında 2001 güz döneminde yüksek lisansa başladım. Halen Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda laboratuvar sorumlusu olarak çalışmaktayım.





T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURUL KARARLARI

Oturum Sayısı: 13

Karar Tarihi:

03.10.2002

14-Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu 03.10.2002 tarihinde "Farklı Türde Kanserli Hastaların Sağlıklı İnsanlara Göre Melatonin Ritmi ve G Protein Mutasyonları" adlı Orkide PALABIYIK'ın yüksek lisans tez çalışmasını incelemek üzere toplandı. Toplantıya üyelerden Doç.Dr.Ahmet TEZEL ile Uzm.Ecz.İmran OĞUZ izinli olmaları nedeniyle katılmadı ve diğer üyelerin katılımıyla çalışmanın incelenmesine geçildi.

Yapılan inceleme sonucunda çalışmanın, Fakültemiz Biyofizik Anabilim Dalında yapılacağı ve yürütücüsünün Yrd.Doç.Dr.Tammam SİPAHİ olduğu; çalışmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler açısından, Helsinki Deklerasyonu Kararlarına, Hasta Hakları Yönetmeliğine ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve yapılabileceğine mevcudun oybirliği ile karar verildi.

Doç.Dr.Ahmet ULUGÖL
BAŞKAN
(Farmakolog)

Doç.Dr.Ahmet TEZEL Yrd.Doç.Dr.Ümit N.BAŞARAN Yrd.Doç.Dr.Sevgi ESKİOĞAZ
Klinisyen Üye Klinisyen Üye Üye
İç Hastalıkları Çocuk Cerrahisi Biyokimya Uzmanı
Uzmanı Uzmanı Uzmanı
İZİNLI

Yrd.Doç.Dr.Şemsi ALTANER Yrd.Doç.Dr.Cengiz TUĞLU Uzm.Ecz.İmran OĞUZ
Patolog Üye Klinisyen Üye Eczacı Üye
Uzmanı Uzmanı Uzmanı
İZİNLI