



T.C.

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**METİL DONÖR BESLENMENİN FARKLI FOTOPERİYOTLARDA
ÜREME EKSENİNDEKİ Kiss-1/GPR54 VE RFRP GEN
EKSPRESYONLARINA ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

GÜLSÜM AKKUŞ

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. BÜLENT GÜNDÜZ**

ÇANAKKALE – 2024



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**METİL DONÖR BESLENMENİN FARKLI FOTOPERİYOTLARDA ÜREME
EKSENİNDEKİ Kiss-1/GPR54 VE RFRP GEN EKSPRESYONLARINA
ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

GÜLSÜM AKKUŞ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. BÜLENT GÜNDÜZ

ÇANAKKALE – 2024



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Gülsüm AKKUŞ tarafından Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ yönetiminde hazırlanan ve **28/08/2024** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Metil Donör Beslenmenin Farklı Fotoperiyotlarda Üreme Eksenindeki Kiss-1/GPR54 ve RFRP Gen Ekspresyonlarına Etkileri**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ

(Danışman)

Prof. Dr. Murat TOSUNOĞLU

Prof. Dr. Meliha Merve ÇİÇEKLIYURT

Dr. Öğr. Üyesi Fevzi UÇKAN

Dr. Öğr. Üyesi Nihan ÇAKIR BİÇER

Tez No : 10678829

Tez Savunma Tarihi : 28/08/2024

.....
Doç. Dr. Melis ULU DOĞRU

Enstitü Müdürü

.././20..

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

(İmza)

Gülsüm AKKUŞ

28/08/2024

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Bölen GÜNDÜZ, alışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen laboratuvar arkadaşlarıma, hayatımın her evresinde bana destek olan değerli aileme sonsuz teőekkürlerimi sunarım.”

Gülsüm AKKUŞ
anakkale, Ağustos 2024



ÖZET

METİL DONÖR BESLENMENİN FARKLI FOTOPERİYOTLARDA ÜREME EKSENİNDEKİ Kiss-1/GPR54 VE RFRP GEN EKSPRESYONLARINA ETKİLERİ

Gülsüm AKKUŞ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ

28/08/2024, 67

Yaşamları boyunca tüm organizmalar çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Canlının maruz kaldığı fotoperiyot süresi ve beslenme çeşidi; genler ve çevreyle olan etkileşimin en önemli parametrelerindedir. Bu çalışma kapsamında Suriye hamsterleri 16L (04:00-20:00) ve 8L (12:00-20:00) olmak üzere iki ayrı ışık düzeneğinde bırakıldı. Yetişkin hamsterler gruplara ayrılıp normal ve metilce zengin besinlerle beslendi. Günlük yem tüketim miktarları ve haftalık vücut ağırlıkları takip edildi. 8 haftanın sonunda ışıklar açıldığında, gün ortasında, ışıklar kapandığında ve gece yarısı olmak üzere günün dört farklı saatinde dekapite edilen Suriye hamsterlerinin hipotalamus dokuları izole edildi. Trizol yöntemi ile DNA materyalleri elde edildikten sonra ELISA yöntemi ile global metilasyon miktarları ölçüldü. Elde edilen verilerde, metilce zengin beslenen bireylerin normal beslenen bireylere göre daha fazla besin tükettiği görüldü ($p<0,05$). Beslenme şeklinin vücut ağırlığına bir etkisi görülmezken, kısa fotoperiyotta uzun fotoperiyoda göre artış görüldüğü tespit edildi ($p<0,05$). Suriye hamsterlerinde vücut ağırlığı fotoperiyodik mekanizma tarafından kontrol edilmektedir. Hem uzun hem de kısa fotoperiyotta ışıkların kapalı olduğu saatlerde metilasyon miktarı artış gösterdi ($p<0,05$). Metilce zengin besinlerin her bir içeriği farklı enzim ya da hormonu etkilese de metabolizmal faaliyetlerde önemli bir yeri olduğu görülmektedir. Fotoperiyodik olarak değişen metilasyon dengelerinin aynı zamanda ortamdaki metil düzeyine bağlı olarak da çok yönlü değiştiği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fotoperiyot, Global metilasyon, *Mesocricetus auratus*, Suriye hamsteri



ABSTRACT

THE EFFECTS OF METHYL DONOR NUTRITION ON KISS-1 / GPR54 AND RFRP GEN EXPRESSIONS ON REPRODUCTIVE AXIS IN DIFFERENT PHOTOPERIOTES

Gülsüm AKKUŞ

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Doctoral Dissertation in Biology

Advisor: Prof. Dr. Bulent GÜNDÜZ

28/08/2024, 67

Organisms are continuously influenced by environmental factors throughout their lifespan, with photoperiod duration and dietary composition being key determinants of gene-environment interactions. In this study, Syrian hamsters were subjected to two distinct light conditions: a long photoperiod (16L, 04:00-20:00) and a short photoperiod (8L, 12:00-20:00). The hamsters were assigned to two primary dietary groups—control or methyl-rich—and their daily food intake and weekly body weights were recorded. At the conclusion of an 8-week period, hypothalamic tissues were collected from the hamsters, which were decapitated at four specific times: lights on, midday, lights off, and midnight. Global DNA methylation levels were assessed using the Trisole method and quantified via ELISA. Results indicated that hamsters on the methyl-rich diet consumed a greater amount of nutrients compared to those on the control diet ($p < 0.05$). However, there was no significant effect of diet type on body weight. Methylation levels increased during the lights-off periods in both long and short photoperiods ($p < 0.05$). While various components of a methyl-rich diet impact different enzymes or hormones, they play a crucial role in metabolic functions. Additionally, the balance of methylation exhibited significant variability depending on the photoperiod and environmental methyl levels.

Keywords: Photoperiod, Global methylation, *Mesocricetus auratus*, Syrian hamster

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

JÜRİ ONAY SAYFASI.....	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

1

1.1. Model Organizma Olarak Suriye Hamsteri	9
1.2. Çevresel Faktörler.....	10
1.3. Metil Donör Beslenme.....	11
1.4. Epigenetik.....	11
1.4.1. DNA Metilasyonu.....	12
1.5. RF-Amid Nöropeptidler.....	13
1.5.1. Kisspeptin.....	13
1.5.2. GPR54.....	14
1.5.3. RFRP.....	15

İKİNCİ BÖLÜM

KURAMSAL ÇERÇEVE/ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

16

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL YÖNTEM

20

3.1. Deney Hayvanlarının Üretilmesi ve Bakımı.....	20
3.2. Testis Ağırlığı.....	21

3.3. Vücut Ağırlığı	22
3.4. Yem Tüketimi.....	22
3.5. Doku Örneklerinin Alınması.....	22
3.5.1.. Nükleik Asitlerin İzolasyonu.....	22
3.5.2. 5mC Global DNA Metilasyonu Ölçülmesi.....	24
3.5.3. cDNA Sentezi.....	26
3.5.4. Gen bölgelerinin Optimizasyonu.....	27
3.5.5. Proteinlerin Saflaştırılması.....	28
3.5.6. ELİSA Gen Spesifik Protein Miktar Tayini.....	29
3.6. İstatistiksel Analiz.....	29
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM	
ARAŞTIRMA BULGULARI	
4.1. Testis Ağırlığı.....	30
4.2. Yem Tüketimi.....	31
4.3. Vücut Ağırlığı	31
4.4. Metilasyon Miktarı.....	32
4.5. Gen Bölgelerinin Optimizasyonu.....	35
4.6. Gen Regülasyon Düzeyleri.....	38
4.7. ELİSA Gen Spesifik Protein Miktarları	44
4.8. Tartışma.....	51
BEŞİNCİ BÖLÜM	
SONUÇ ve ÖNERİLER	
KAYNAKÇA	57
EKLER	I

SİMGELER VE KISALTMALAR

TUBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
AB	Avrupa Birliği
KİSS1	Kisspeptin
GPR54	G protein aracılı reseptör-54
g	Gram
%	Yüzde oranı
DNA	Deoksiribonükleik Asit
RFRP	RFamide bağlantılı protein
VKİ	Vücut kitle indeksi
FSH	Folikül uyarıcı hormon
Gn-RH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
SCN	Suprakiasmatik nükleus
SHS	Somatik hücre sayısı
n	Hamster sayısı
YÖK	Yüksek Öğretim Kurumu
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
5mC	5' metil Sitozin

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Negatif Kontrol ve Pozitif Kontrol hazırlaması	25
Tablo 2	Antikor hazırlama protokolü	26
Tablo 3	Kullanılan gen bölgelerine ait primer bilgileri	27
Tablo 4	Normal ve Metil Donör diyetle maruz bırakılan <i>Mesocricetus auratus</i> bireylerin 16L ve 8L fotoperiyoda ait metilasyon yüzdeleri .	33
Tablo 5	Normal ve Metil Donör diyetle maruz bırakılan <i>Mesocricetus auratus</i> bireylerin 16 L ve 8L fotoperiyoda ait Kisspeptin gen regülasyon miktarları.	40
Tablo 6	Normal ve Metil Donör diyetle maruz bırakılan <i>Mesocricetus auratus</i> bireylerin 16 L ve 8L fotoperiyoda ait GRP54 gen regülasyon miktarları.	42
Tablo 7	Normal ve Metil Donör diyetle maruz bırakılan <i>Mesocricetus auratus</i> bireylerin 16 L ve 8L fotoperiyoda ait RFRP gen regülasyon miktarları.	44
Tablo 8	Normal ve Metil Donör diyetle maruz bırakılan <i>Mesocricetus auratus</i> bireylerin 16 L ve 8L fotoperiyoda ait Kisspeptin protein miktarları.	46
Tablo 9	Normal ve Metil Donör diyetle maruz bırakılan <i>Mesocricetus auratus</i> bireylerin 16 L ve 8L fotoperiyoda ait GRP54 protein miktarları.	48
Tablo 10	Normal ve Metil Donör diyetle maruz bırakılan <i>Mesocricetus auratus</i> bireylerin 16 L ve 8L fotoperiyoda ait RFRP protein miktarları.	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Menstruel siklusta Kisspeptin/GPR54 sinyalizasyonu ve fizyolojik rolünün gösterilmesi	15
Şekil 2	Uzun ve kısa fotoperiyota ait aydınlık- karanlık saatleri	20
Şekil 3	Deney düzeneği	21
Şekil 4	Santrifüj sonrasında tüp içeriğindeki fazlar	23
Şekil 5	<i>Mesocricetus auratus</i> türünde haftalık testis boyutu takibi	30
Şekil 6	Normal ve Metil Donör diyeteye tabi tutulan bireylerin günlük yem tüketim kapasiteleri.	31
Şekil 7	Normal ve Metil Donör diyeteye tabi tutulan bireylerin haftalık vücut ağırlığı değişimleri	32
Şekil 8	Normal ve Metil Donör diyeteye maruz bırakılan <i>Mesocricetus auratus</i> bireylerin 16L uzun fotoperiyoda ait metilasyon yüzdeleri	33
Şekil 9	Normal ve Metil Donör diyeteye maruz bırakılan <i>Mesocricetus auratus</i> bireylerin 8L kısa fotoperiyoda ait metilasyon yüzdeleri	34
Şekil 10	58 °C de 0.5 µM Forward ve 0.5 µM Reverse primer içeren gen bölgelerinin bağlanma görüntüleri	36
Şekil 11	58 °C de 0,5 µM primer konsantrasyonunu için Melt Curve görüntüsü	37
Şekil 12	Normal ve Metil Donör diyeteye maruz bırakılan <i>Mesocricetus auratus</i> bireylerin 16L uzun fotoperiyoda ait kisspeptin gen regülasyon miktarları	38
Şekil 13	Normal ve Metil Donör diyeteye maruz bırakılan <i>Mesocricetus auratus</i> bireylerin 8L kısa fotoperiyoda ait kisspeptin gen regülasyon miktarları	39
Şekil 14	Normal ve Metil Donör diyeteye maruz bırakılan <i>Mesocricetus auratus</i> bireylerin 16L uzun fotoperiyoda ait GPR54 gen regülasyon miktarları	40

Şekil 15	Normal ve Metil Donör diyeteye maruz bırakılan <i>Mesocricetus auratus</i> bireylerin 8L kısa fotoperiyoda ait GPR54 gen regülasyon miktarları	41
Şekil 16	Normal ve Metil Donör diyeteye maruz bırakılan <i>Mesocricetus auratus</i> bireylerin 16L uzun fotoperiyoda ait RFRP gen regülasyon miktarları	42
Şekil 17	Normal ve Metil Donör diyeteye maruz bırakılan <i>Mesocricetus auratus</i> bireylerin 8L kısa fotoperiyoda ait RFRP gen regülasyon miktarları	43
Şekil 18	Normal ve Metil Donör diyeteye maruz bırakılan <i>Mesocricetus auratus</i> bireylerin 16L uzun fotoperiyoda ait Kisspeptin protein miktarı	45
Şekil 19	Normal ve Metil Donör diyeteye maruz bırakılan <i>Mesocricetus auratus</i> bireylerin 8L kısa fotoperiyoda ait kisspeptin protein miktarları	46
Şekil 20	Normal ve Metil Donör diyeteye maruz bırakılan <i>Mesocricetus auratus</i> bireylerin 16L uzun fotoperiyoda ait GRP54 protein miktarı	47
Şekil 21	Normal ve Metil Donör diyeteye maruz bırakılan <i>Mesocricetus auratus</i> bireylerin 8L kısa fotoperiyoda ait GRP54 protein miktarı	48
Şekil 22	Normal ve Metil Donör diyeteye maruz bırakılan <i>Mesocricetus auratus</i> bireylerin 16L uzun fotoperiyoda ait RFRP protein miktarı	49
Şekil 23	Normal ve Metil Donör diyeteye maruz bırakılan <i>Mesocricetus auratus</i> bireylerin 8L kısa fotoperiyoda ait RFRP protein miktarı	50

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Fotoperiyodik memelilerde üreme fonksiyonu, besin mevcudiyeti, sıcaklık değişimi gibi mevsimsel değişimlere son derece hassas olup, bu hayvanlar üreme sistemindeki değişimleri bu bilgiye göre düzenlemektedirler. Prepubertal evreden pubertal evreye geçişi mekanizmasının işleminde bu sistemi inhibe edici faktörlerin aktivitesinin düşmesi ve uyarıcı sistem faktörlerinin aktivitesinin artması ile gerçekleştiğine inanılmaktadır. Uyarıcı (glutamate, NPY vb.) ve inhibe edici (GABA, endojen opioidler vb.) faktörler bilinse de henüz daha bilinmeyen merkezi nörotransmitterlerin GnRH nöronal sistem üzerinden pubertal aktivasyonu etkilediği düşünülmektedir. Yetersiz beslenme hem insan hem de deneysel hayvanlarda pubertal başlangıcı etkilemekte ve üreme sağlığının başarısız olmasını sağlamaktadır. Bu durumun moleküler mekanizmaları açık değildir.

Canlıların maruz kaldığı çevresel faktörler yaşamı doğrudan ya da dolaylı olarak etkileyerek bireylerin sağlıklı-hastalıklı yaşam sürmesine neden olmaktadır. Beslenme gen ve çevreyle olan bu etkileşimlerden en önemli çevresel parametrelerden birini oluşturmaktadır (Kauwell, 2005). Canlıların maruz kaldığı beslenme diyetlerinin bilinmesi, bu durumun incelenilebilir olması ve istenilen düzeyde araştırılabilmesi bireylerin bilinçlendirilmesi ve sağlıklı bir yaşam sürebilmesi için önemli bir yer tutmaktadır (Ordovas ve Corella, 2004). Ordovas ve Corella'nın 2004 yılında yaptığı çalışmada diyetle karşı genetik çeşitliliğin incelenmesinde, 2005 yılında Mutch ve arkadaşlarının, beslenmenin çok yönlü oluşunu ve diyetlerin gen ekspresyonuna etkisinin anlaşılmasında önemli ölçüde katkı sağlamaktadır. Hastalıkların oluşmasında ve ilerlemesinde bireylerin diyet içeriklerine bakılarak yorumda bulunmak mümkündür.

Genotipte kendini göstermeyen fakat fenotipte karşımıza çıkan bu problemlerin epigenetik sistemler kullanılarak çözümlenmesi hedeflenmiştir. Gen ile çevresel etkileşimlerin düzenlenmesinde epigenetik mekanizmalar kilit rol oynamaktadır. Epigenetik, kelimenin tam anlamıyla 'genomun üstünde' hareket etmek anlamına gelen bir terimdir ve nükleotit dizisinde bir değişiklik içermeyen bir kromozomun fonksiyonel modifikasyonları gibi, tek başına DNA dizisine bağlanamayan gen aktivitesindeki ve ekspresyondaki değişiklikleri ifade eder. Gen ekspresyonlarının baskılanması sitozin bazının 5. karbonuna bağlanan metil gurubu baz eşleşmesini etkilemezken DNA'nın büyük oluşuna bağlantı

yaparak burada bir çıkıntı oluşturduğu için protein-DNA etkileşmesini etkilemektedir (Robertson ve Wolfee, 2000; Jones ve Takai, 2001). Bu durum, büyük organizmaların genomunda transkripsiyonun susturulmasına sebep olacak şekilde transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını da engellemektedir.

Kanserin tanımlanmasında ve erken teşhisinde önemli rol oynayan metilasyon, tedavi araştırmalarında da önemli bir role sahiptir. Genel olarak, epigenetik terimi, gelişim, farklılaşma ve/veya çevresel faktörlerin kontrolü altında ortaya çıkan gen ekspresyon potansiyelindeki değişiklikleri tanımlamak için kullanılır. Gen ekspresyonunun epigenetik mekanizmalar yoluyla kontrol edilmesi, hem kendinden programlanmış hem de çevresel sinyallerin entegrasyonunu mümkün kılar, böylece genlerin aktivitesini değiştirerek değişen bir ortama uyum sağlama yeteneğine izin verir (Bernstein vd., 2007; Kooistra ve Helin, 2012; Rando, 2012; Reik, 2007). Son zamanlarda yapılan birçok çalışma Kiss1 gen ekspresyonunun epigenetik düzenlemesine odaklanmıştır (Gill vd., 2012; Semaan vd., 2012; Tomikawa vd., 2012).

Çok hücreli bir organizma içindeki her hücre aynı DNA sekansına ve dolayısıyla tüm genetik plana sahiptir. Bununla birlikte, farklı hücrelerin fonksiyonel rolleri dokudan dokuya ve hatta doku içinde değişmektedir. Bu fonksiyonel roller, farklı gen ekspresyonlarının regülasyonu ile kontrol edilir. Gen ekspresyonundaki farklılıklar, esas olarak DNA sekansının kendisinin değiştirilmediği epigenetik mekanizmalar tarafından düzenlenir, ancak genomun “üstünde” etkili faktörler (epigenetik faktörler), gen ifadesi seviyesindeki değişikliklere izin verir (Bernstein vd., 2007; Goldberg vd., 2007; Jaenisch ve Bird, 2003). Bu epigenetik mekanizmaların en iyi araştırılmış iki tanesi, kromatin yapısını ve/veya transkripsiyon faktörlerinin DNA'yı bağlama yeteneğini etkileyerek gen ekspresyonunu değiştiren histon modifikasyonları ve DNA metilasyonudur. Ayrıca, bu farklı epigenetik mekanizmaların kendilerinin de işlevsel olarak etkileşime girebildiğine dair kanıtlar vardır; bu, farklı epigenetik işaretlerin, gen ekspresyonunu aktive etmek veya baskılamak için birlikte çalışabileceğini göstermektedir (Goldberg vd., 2007; Rando, 2012).

Beslenmenin gen ekspresyonuna etkisinin olabileceği gibi metilasyon düzeylerinin yeni nesillere aktarılan gen düzenlemesini etkilediği düşünülmektedir. Betain, kolin, folat, B12 vitamini ve metiyonin metil gruplarını sağlamada donör olabilir. Epigenetik bu çevresel faktörlerin fenotipe nasıl yansıdığını hatta biyolojik süreci nasıl etkilediğini açıklamamıza yardımcı olur. Organizmada meydana gelen metilasyonun miktarı metilleyici ajanlar ve

metil transferaz miktarı ile doğru orantılıdır. DNA hipometilasyonu kanser ile ilişkilendirilmektedir. Metiyonin ve kolin içermeyen diyet uygulanan sıçanlarda karaciğerde tümör oluştuğu görülmüştür. S-adenozil metiyonin aktivitesi için metilce zengin besinlerin gerekli olduğu düşünülmektedir. Beslenme ile DNA metiltransferaz aktivitesinin de uyumlu çalıştığı öne sürülmektedir. Agouti farelerde anneye uygulanan kolin, betain, folik asit, vitamin B12, çinko ve metiyoninden zengin diyet yavruların da kürk renginin değişmesine sebep olmaktadır (Yajnik ve Deshmukh, 2008).

İnsan Genom Projesi'ne başlarken düşünülen bir gen bir enzim teriminin proje sonuçlandığında doğru olmadığı, hastalıkların çözümlenmesinde epigenetik mekanizmaların işin içine girdiği görülmüştür. İnsan genom dizisinin aydınlatılması ile besinler ile genler arasındaki etkileşim ve besin öğelerinin gen ekspresyonu üzerindeki etkisi de araştırılmaya başlanmıştır (Coşkun, 2007). Bu düşünceye göre beslenme ve genom arasında dinamik ve karşılıklı bir etkileşimin var olduğu düşünülmektedir.

Laboratuvarımızda daha önceden yapılan çalışmalarda çevresel faktörlerin en önemlisi olan fotoperiyodun fotoperiyodik türlerde son derece önemli düzenlemelere sahip olduğu gösterilmiştir. Bunlar arasında özellikle fotoperiyot tarafından kontrol edilen melatonin hormonu, beslenme metabolizmasında yer alan leptin hormonu ile ilişkilendirilmiştir (Gündüz, 2002). Melatonin ve leptin hormonlarının fotoperiyot tarafından kontrol edilmesi her iki hormonun gerek beslenme metabolizmasında gerekse beslenme ile sıkı sıkıya ilişkili olan üreme sisteminde önemli etkilerinin olduğunu düşündürmektedir. Yapılan literatur çalışmalarında kisperitin miktarlarının da fotoperiyoddan etkilendiği gözlenmiştir. Balkan'ın 2023 yılında yaptığı tez çalışmasında uzun ve kısa fotoperiyotlarda SCN lezyonu ve pineal bezi alınan erkek Suriye hamsterlerinde KİSS1, GnRH ve GnIH gen ekspresyonlarının melatonin hormonundaki ritmik değişimler incelemiştir. Mevsimsel değişimlerin bu hormonlara etkilerinin incelendiği çalışmada melatonin seviyesiyle bağlantılı oldukları görülmüştür. Gündüz ve Okimoto'nu (2021) yaptığı bir çalışma da annelerin metil donörü öğelerinden zengin beslenmesi sonucunda yavrularda meydana gelen hormonal ve aktivite değişimleri incelenmiştir. Bu çalışmada metil donörü takviyesinin zamanlamasının yavruların gelişimi sırasında önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir.

Suriye hamsterleri (*Mesocricetus auratus*), üreme ve metabolizma gibi birçok biyolojik çalışmada model organizma olarak kullanılmaktadır. Bu türler, diğer tüm kemiricilerde olduğu gibi, üreme ve gelişim aktivitelerini gün uzunluğuna bağlı olarak

(fotoperiyodik düzenlemeler) ayarlamaktadır (Reiter, 1974). Özellikle kemirici türlerde, vücut ağırlığındaki değişiklikler fotoperiyodik etkiler tarafından düzenlenir (Bartness ve Wade, 1984, 1985; Bartness vd., 1985). Suriye hamsterlerinin üreme döngüsünü sürdürmesi ve testis gelişimini uyarması için günde en az 12,5 saatlik bir ışık süresi gerekmektedir (Elliott, 1976; Hoffman, 1982; Wade, 1982).

Bir çok tür mevsimsel değişimlere göre vücut ağırlıklarını değiştirmektedir. Çevresel faktörlere bağlı olarak gösterdikleri bu uyum özellikle yüksek bölgelerde yaşayan canlılar için kısa fotoperiyotta enerji depolarını artırmak üzerine kurulmuştur. Yer sincabı (*Spermophilus belding*), Suriye hamsteri (*Mesocricetus auratus*) ve Prairie sıçanı (*Microtus ochrogaster*) bu gruptaki canlılar arasında örnek olarak gösterilebilir (Morton, 1975; Wunder vd., 1977; Bartness ve Wade, 1984). Bununla birlikte pubertal gelişimde de fotoperiyodun etkili olduğu gösterilmiştir. Türk hamsterleriyle (*Mesocricetus brandii*) yapılan çalışmada henüz laktasyon sürecindeki bireylerin üreme sistemlerini fotoperiyoda göre düzenlediği gösterilmiştir (Gündüz ve Stetson, 1998). Kısa fotoperiyodun puberteye girişini engellediği ve vücut ağırlığını hatta gonadal gelişimi düzenlediği görülmektedir (Lee ve Zucker, 1988; Karakaş ve Gündüz, 2002).

Memelilerde pubertal zamanlamanın, genetik etmenlerin yanı sıra çevresel faktörlerden de etkilendiği bilinmektedir. Hipotalamus hipofiz gonad eksenini, merkezi sinir sisteminde üreme fonksiyonlarının düzenlendiği temel bir merkez olarak işlev görür. Puberteye geçiş sürecinde bu sistemin nasıl aktive olduğu henüz tam olarak anlaşılmamış olup, bu konu mevcut araştırmalar arasında önemini korumaktadır. Pulsatif olarak hipotalamustan salınan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) hipofiz bezini uyararak FSH ve LH salınımını tetikler ve ovaryum/testis hücrelerine gelen bu uyarılar ile östrojen ve testosteron hormonu salgılanmaktadır (Harris, 1964). Homeostaziste üreme ile ilgili nöronların başlangıç ortak yolu GnRH olduğu görülmektedir (Bronson, 1989). Birçok rodent türünde GnRH hücre gövdeleri çoğunlukla Broca diagonal nukleuslarda (NDB) ve medial preoptik bölgelerde (MPOA) bulunur. GnRH nöronları hipofiz gonadotropinlerinin salınımını uyarır ve böylece gametogenez ve eşey üreme hormonları (steroid) salınımını düzenler.

Beyin, nöroendokrin üreme ekseninin ana hormonal düzenleyicisi olan gonadotropin salgılayan hormonu (GnRH) salgılamasıyla ergenlik başlangıcını ve doğurganlığı yönetir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Kiss1 geninin ve protein ürünlerinin GnRH

salgılanmasında kilit bir rolü olduğu ve GnRH salgılanmasının kontrolündeki önemli bir rol oynayan nöropeptid kisspeptini ifade eden hipotalamik nöronlardan oluştuğu keşfedilmiştir. Kisspeptin sinyallemesi, insanlar dahil olmak üzere tüm memeli türlerinde fertilité ve pubertal gelişimde temel bir düzenleyici olarak gösterilmiştir (de Roux vd., 2003; Kauffman, 2010; Pineda vd., 2009; Pinilla vd., 2012; Seminara vd., 2003).

Kısa gün uzunluğu GnRH salınımını inhibe eder ancak üretimini engellemez, böylece kısa-gün Suriye hamsterlerinde GnRH immünoreaktif nöronların arttığı gösterilmiştir (Ronchi, vd., 1992). Ancak Sibiryaya hamsterlerinde uzun gün ile karşılaştırıldığında bir fark tespit edilememiştir (Yellon, 1994). Kiss1 sistemindeki değişiklikler ergenliğin başlaması ya da ilerlemesi, yetişkinlikte östrojen kaynaklı luteinize edici hormon (LH) salgılanmasında cinsiyet farklılıkları ve üreme fizyolojisinin diğer yönleriyle katkıda bulunabilir. Bu nedenle, Kiss1 ifadesinin nasıl ve ne zaman ortaya çıktığını ve kisspeptin sisteminin geliştirilmesini ve düzenlenmesini hangi olası düzenleyici mekanizmaların yönettiğini anlamak gerekmektedir (Semaan ve Kauffman, 2010).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, Kiss1 sisteminin birçok memeli türünde üreme fonksiyonu üzerindeki önemini vurgulamaktadır. İnsanlarda ve farelerde, Kiss1 veya kisspeptin reseptörü genlerindeki delesyonlar veya mutasyonlar ergenlikte olgunlaşmaya ve infertiliteye neden olur (Clarkson vd., 2008; d'Anglemont de Tassigny vd., 2007; de Roux vd., 2003; Seminara vd., 2003).

Balkan ve Gündüz (2023) yaptıkları çalışmada Kisspeptin GnRH ve GnIH genlerinin fotoperiyoda bağlı farklılıklarını ortaya koymuştur. Gen ekspresyon ve protein ifadelerinin bakıldığı bu çalışmada melatonin etkileşimleri SCN lezyonu ve pinealoktomi yapılarak farklı koşullarda da incelenmiştir. Her ne kadar epigenetik ve Kiss1 ekspresyonu konusundaki en yeni çalışmalar, Kiss1 gen ekspresyonunun düzenlenmesinde ve geliştirilmesinde rol oynayan farklı mekanizmalarla ilgili anlayışımızı arttırmış olsa da, henüz çözülmesi gereken önemli sorular vardır. Bu tür konular arasında, bu epigenetik mekanizmaların ne zaman aktive edileceği (veya devre dışı bırakılacağı) spesifik zamanlamanın tanımlanması ve bunların hepsinin Kiss1 gen ekspresyonunun uygun gelişimi ve düzenlenmesi için nasıl etkileşime gireceği hakkında verilerin belirlenmesini içerir.

Benzer şekilde, besin içeriğine göre epigenetik parametrelerin düzenlenmesinde yer alan karmaşık mekanizmalar aydınlatmak için, Kiss1 geninin önemli bir düzenleyici

bölgeleri tanımlamak ve Kiss1 düzenleyen kritik transkripsiyon faktörlerinin belirlenmesi için önemli olacaktır.

Bu tez çalışmayla metil donör ve metil donör olmayan besinlerle beslenen bireylerin maruz kaldığı ışık/karanlık miktarına bağlı olarak Kiss1/Kiss1r genleri üzerindeki DNA metilasyon miktarlarına bakılarak bu genlerin ifadesi kontrol edilmiştir. Bu sayede beslenmenin gen anlatımları üzerindeki anahtar/kilit etkisi de gözlenmiştir.

Son zamanlarda omurgalı hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda GnRH'nin Hipotalamus hipofiz gonad (HPG) eksen içerisinde sorumlu tek faktör olmadığı, bununla beraber iki hipotalamik nöropeptit olan Kisspeptin ve RFamide ailesinden olan Gonadotropin inhibe edici hormonun (GnIH) da üreme fonksiyonlarında önemli bir kilit rol oynadığı bulunmuştur (Greives vd., 2008; Simneaux vd., 2013; Tsutsui vd., 2013). Son dönemlerde, GnRH etkinliğini artıran mekanizmanın kisspeptin salgılanması ile ilişkili olduğu ve asıl tetikleyici mekanizma olduğu düşüncesi mevcuttur (Seminara vd., 2003; Dhillon, 2008; Seminara ve Crowley, 2008; Jayasena vd., 2009).

Memelilerde RFRP-3 (RFamide-ilişkili peptid- 3) geni mediobasal hipotalamusta bulunan nöronlarda ifade olmaktadır (Kriegsfeld vd., 2006; Revel vd., 2008). RFRP nöronları beyinde Arkuat nükleus (ARC) ve preoptik bölge (POA), anterior hipotalamusa gidebilmektedir (Ukena ve Tsutsui, 2001; Mason vd., 2010). RFRP-3 fotoperiyodik olmayan birçok türde üreme eksenini inhibe edici özelliğe sahiptir (Kriegsfeld, 2006; Ubuka vd., 2012).

Rodentlerde, Kiss1 sentezi yapan (ve kisspeptin-immünoreaktif) hücre gövdeleri, medial amigdalada (Kim vd., 2011) ve anteroventral periventriküler nükleustaki iki büyük hipotalamik popülasyon dahil olmak üzere, bir kaç ayrı beyin bölgesinde ve komşu periventriküler çekirdek (AVPV / PeN) ve arkuat nükleusta (ARC) bulunur (Gottsch vd., 2004; Kauffman vd., 2007; Smith vd., 2005).

Üremenin aktif olmadığı zaman (kısa-gün uzunluğunda) RFRP-3' ün eksojen olarak verilmesinin, üreme davranış ve fizyolojisini uyardığı saptanmıştır (Ancel vd., 2012; Ubuka vd., 2012). Kısa gün uzunluğuna maruz bırakılan ya da uzun süreli melatonin infüzyonu yapılan Suriye ve Sibirya hamstrlerinde RFRP-3 peptidi ve mRNA ekspresyonunun düştüğü gözlenmiştir (Revel vd., 2008; Mosan vd., 2010; Ubuka vd., 2012; Ancel vd., 2012). Ayrıca son yıllarda Kisspeptin, GPR54 ve GnRH nöropeptidlerinin de pubertal geçişte önemli role

sahip olduğu gösterilmiştir (Funes vd., 2003). Kisspeptin nöronlarının olmamasının ya da herhangi bir sebeple GnRH salınımının inhibe edilmesinin pubertal gecikmeye neden olduğu gösterilmiştir (de Roux vd., 2003). Ayrıca Kisspeptinin üremedeki fonksiyonu insanlardaki idiopatik hipogonadotropik hipogonadizm hastalığında kisspeptin reseptöründeki (Kiss1-r) mutasyon ile keşfedilmiştir (de Roux vd., 2003; Seminara vd., 2003).

Bunun yanı sıra Kisspeptin hem kısa hem de uzun fotoperiyotlarda gonadotropin salınımını uyarmaktadır (de Roux vd., 2003; Funes vd., 2003; Seminara vd., 2003; Gottsch vd., 2004; Navarro vd., 2005). Kisspeptin nöronlarının çoğu Anteroventral periventriküler nükleus bölgesinde (AVPV) ve arkuat nükleus bölgesinde (ARC) bulunur (Lehman vd., 2010). Erkek Suriye hamsterlerinde kısa gün uzunluğu ya da uzun süreli melatonin infüzyonu ARC'de kisspeptin mRNA seviyesini ve kisspeptin-pozitif hücre sayısını düşürmektedir. Bu etki pinealektomi ile ortadan kaldırılır (Revel vd., 2006; Simonneaux vd., 2013). Erkek ve dişi Sibirya hamsterlerinde ise kısa fotoperiyotta kisspeptin AVPV bölgesinde düşmekte ve ARC'de ise artmaktadır. Uzun güne maruz bırakılan hayvanlarla karşılaştırıldığında (Greives vd., 2007; Mason vd., 2007) inaktif olan erkek Suriye hamsterlerinde (*Mesocricetus auratus*) kisspeptin uygulaması üreme sistemini tekrar aktive eder (Revel vd., 2006; Ansel vd., 2011).

KISS1 ve KISS1-R genleri susturulan farelerde üreme ile ilişkili seksüel davranışta azalma, infertilite ve pubertal gelişmede gecikme gibi benzer fenotipler ortaya çıkmıştır (d'Anglemon de Tassigny vd., 2007). Kisspeptin üreme ekseninde gonadotropin salgılatıcı (GnRH) nöronları uyararak direkt olarak gonadotropin salgılamasıyla üremeyi düzenler. Özellikle kisspeptin nöronları Preoptik alan (POA) ve Median eminensia (ME) bölgesinde GnRH nöronlarına projeksiyon yapar (Clarkson ve Herbison, 2006) ve GnRH nöronlarının %60-90' ı Kiss1-r ifade eder (Herbison vd., 2010). Ayrıca Kisspeptin GnRH, LH ve FSH salınımını arttırmasını GnRH mRNA ekspresyonunu ve salgılanmasını GnRH-salgılatıcı nöronların hücre hattını uyararak yapar (Steiner ve Herbison, 2005; Liu vd., 2008).

Bu çalışmalar, Kisspeptinin üreme ekseninde kontrolünü GnRH nöronlarını düzenlemesiyle yaptığını açıklamaktadır. Birçok çalışma Anteroventral periventriküler nükleus bölgesinde (AVPV) bulunan kisspeptin nöronlarının östrojen salgılanmasını pozitif yönde etkilerken, Arkuat nükleus (ARC) bölgesinde bulunan kisspeptin nöronlarının ise östrojen salınımını düşürdüğü ortaya çıkarılmıştır (Smith vd., 2005, 2007). Gonadektomi yapılan farelerde AVPV bölgesinde KISS1 mRNA seviyesi azalırken, ARC bölgesinde

KISS1 mRNA seviyesinde artma olduğu yapılan çalışma ile ortaya koyulmuştur. Bu değişimin ayrıca seks steroidlerinin değiştirilmesi ile tersine dnştrldği gösterilmiştir (Smith vd., 2007).

Kisspeptin, GnRH sekresyonunun temel bir uyarıcısı olarak gösterilmiştir, bu nedenle muhtemelen pubertal ilerlemesi sırasında ortaya çıkan gelişmiş GnRH sekresyonunda rol oynar. Bununla birlikte, ergenlik döneminde kisspeptin sistemindeki değişiklikleri düzenleyen birçok endojen düzenleyici mekanizma bilinmemektedir.

Doğrudan ya da dolaylı olarak bireyin yaşam kalitesini etkileyen çevresel parametrelerin başında beslenme gelmektedir. Beslenme diyetinin içeriği ve kalitesi genetik faktörlerin etkilenmesine ve gen ekspresyonun değişmesine yol açmaktadır. Canlının maruz kaldığı beslenme diyetlerinin bilinmesi, bu durumun incelenebiliyor olması ve istenilen düzeyde araştırılabilmesi bireylerin bilinçlendirilmesi ve sağlıklı bir yaşam sürebilmesi için önemli bir yer tutmaktadır.

Genel olarak, epigenetik terimi, gelişim, farklılaşma ve / veya çevresel faktörlerin kontrolü altında ortaya çıkan gen ekspresyon potansiyelindeki değişiklikleri tanımlamak için kullanılır. Gen ekspresyonunun epigenetik mekanizmalar yoluyla kontrol edilmesi, hem kendinden programlanmış hem de çevresel sinyallerin entegrasyonunu mümkün kılar, böylece genlerin aktivitesini değiştirerek değişen bir ortama uyum sağlama yeteneğine izin verir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Kiss1 geninin ve protein rnlerinin GnRH salgılanmasında kilit bir rolü olduğu ve GnRH salgılanmasının kontrolünde önemli bir rol oynayan nöropeptid kisspeptini ifade eden hipotalamik nöronlardan oluştuğu keşfedilmiştir. Kisspeptin sinyallemesi, insanlar dahil olmak üzere tüm memeli türlerinde fertilitte ve pubertal gelişimde temel bir düzenleyicisi olarak gösterilmiştir. Kisspeptin, GnRH sekresyonunun temel bir uyarıcısı olarak gösterilmiştir, bu nedenle muhtemelen pubertal ilerlemesi sırasında ortaya çıkan gelişmiş GnRH sekresyonunda rol oynar. Bununla birlikte, ergenlik döneminde kisspeptin sistemindeki değişiklikleri düzenleyen birçok endojen düzenleyici mekanizma bilinmemektedir. Her ne kadar epigenetik ve Kiss1 ekspresyonu konusundaki en yeni alışmalar, Kiss1 gen ekspresyonunun düzenlenmesinde ve geliştirilmesinde rol oynayan farklı mekanizmalarla ilgili anlayışımızı arttırmış olsa da, henüz üzülmesi gereken önemli sorular vardır. Bu tür konular arasında, bu epigenetik mekanizmaların ne zaman aktive edileceği (veya devre dışı bırakılacağı) spesifik

zamanlamanın tanımlanması ve bunların hepsinin Kiss1 gen ekspresyonunun uygun gelişimi ve düzenlenmesi için nasıl etkileşime gireceği belirlenmesini içermektedir. Bu tez çalışması ile metil d6n6r ve metil d6n6r olmayan besinlerle beslenen bireylerin, maruz kaldığı ışık/karanlık miktarına bağlı olarak, Kiss1/Kiss1r genleri 6zerindeki DNA metilasyon miktarlarına bakılarak bu genlerin ifadesi kontrol edildi. Bu sayede beslenmenin gen anlatımları 6zerindeki anahtar/kilit etkisi de g6zlendi.

Ayrıca genotipte kendini g6stermeyen fakat fenotipte karşımıza 6ıkan bu problemlerin epigenetik sistemler kullanılarak 66z6mlenmesi hedeflendi. Epigenetiğin 6evresel fakt6rlere bağlı olarak değişen gen d6zenlemesini a6ıklamada 6nemli bir role sahip olduğu d6ř6n6lmektedir. DNA metilasyonunda meydana gelen hipometilasyolar ve hipermetilasyolar, beslenmedeki değişimler, genetik polimorfizler ve maruz kalınan kimyasallara karşı farklılıklar g6stermektedir. Bu 6zelliklerdeki değişimler klinik bulgulara da neden olabilmektedir. Benzer şekilde, besin i6eriğine g6re epigenetik parametrelerin d6zenlenmesinde yer alan karmaşık mekanizmaları aydınlatmak i6in, Kiss1 geninin 6nemli d6zenleyici b6lgelerini tanımlamaktadır. Bu durum Kiss1 d6zenleyen kritik transkripsiyon fakt6rlerinin belirlenmesi i6in 6nemli olacaktır.

1.1. Model Organizma Olarak Suriye Hamsteri

Suriye hamsteri (Golden hamster) bilimsel olarak '*Mesocricetus auratus*' olarak bilinmekle birlikte; biyoloji, tıp ve psikoloji de dahil olmak 6zere 6eşitli araştırma alanlarında uzun s6redir model organizma olarak kabul edilmektedir. 1930 yılında Suriye'de doğadan yakalanan golden hamster, o zamandan bu yana yaygın olarak kullanılan bir laboratuvar hayvanı haline gelmiştir ve laboratuvar kullanımını a6ısından fare ve sı6anlardan sonra ikinci sırada yer almaktadır.

Golden hamsterinin model organizma olarak en 6nemli avantajlarından biri benzersiz 6reme 6zellikleridir (Hirose ve Ogura, 2018). Hamster tutarlı ve 6ng6r6lebilir bir 6iftleşme d6ng6s6 sergilemektedir, bu da onu 6reme biyolojisi ve gelişimi 6zerine 6alışmalar i6in ideal bir konu haline getirmektedir. Ek olarak, Suriye hamsterleri geleneksel s6perov6lasyon rejimlerine olduk6a duyarlıdır ve bu araştırma alanında Suriye hamsterlerinin kullanımını olduk6a siktir (Hirose ve Ogura, 2018).

Suriye hamsterinin uyum yeteneği, istikrarlı kalıtımı ve köklü hastalık modelleri de model organizma olarak popüleritesine katkıda bulunmuştur (Lu vd., 2022). Suriye hamsteri dahil kemirgenler, yumurtalıkların olgunlaşması araştırmaları için özellikle kullanılır. Primatlarla birçok fizyolojik benzerliğe sahip olmalarına rağmen daha uygun maliyetli ve verimlidir (Lu vd, 2022). Fakat 1970'lerden bu yana sıçan ve farelerin model organizma olarak kullanımı ve alan çalışmlarında onların daha sık kullanılması gibi faktörlerden dolayı hamster kullanımı yaklaşık %67 oranında azalmıştır (Miedel ve Hankenson, 2015).

Bununla birlikte Suriye hamsteri, özellikle üreme biyolojisi gibi benzersiz özelliklerinin onu diğer kemirgenlerden daha uygun bir model haline getirdiği alanlarda bilimsel araştırmalarda değerli bir tür olmaya devam etmektedir (Hirose ve Ogura, 2018).

1.2. Çevresel Faktörler

Işık, sıcaklık, yem bulma kapasitesi gibi birçok çevresel stres faktörü, Suriye hamsterlerinin günlük ritimlerini ve hormon düzenlemesini bozarak doğurganlığın ve üreme başarısının bozulmasına yol açabileceğini göstermiştir (Honrado vd., 1991). Örneğin, yenidoğanın stresli ortamlara maruz kalması lipopolisakkarit (LPS) uygulaması gibi uyarılar, hamsterlerin nöroimmün tepkileri üzerinde uzun süreli etkilere sahip olabilir ve potansiyel olarak onların gelecekteki hastalıklara karşı duyarlılıklarını ve genel sağlıklarını değiştirebilir (Das vd, 2022).

Suriye hamsterinin çeşitli çevresel koşullara uyum sağlama yeteneği, onu çevresel faktörlerin çeşitli fizyolojik süreçler üzerindeki etkilerini incelemek için değerli bir model organizma haline getirmiştir. Araştırmacılar bu türü fotoperiyod, sıcaklık ve sosyal etkileşimler gibi faktörlerin cinsel davranış, doğurganlık ve sirkadiyen ritimler dahil olmak üzere bir dizi biyolojik fonksiyon üzerindeki etkisini araştırmak için kullanmışlardır. Araştırmacılar, çevresel ipuçlarının *Mesocricetus auratus*'un biyolojisini ve davranışını nasıl şekillendirdiğini anlayarak, bir organizma ile çevresi arasındaki karmaşık etkileşime ilişkin değerli bilgiler edinebilir; bu etkileşim, hem laboratuvar araştırmaları hem de koruma çabaları için öneme sahiptir.

1.3. Metil Donörü Besin Ögelerinden Zengin Beslenme

Metil donörü ögelerinden zengin beslenmesi, vücuttaki çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar için metil grupları sağlayan spesifik besinlerin tüketimini ifade etmektedir. Bu metil grupları, gen ekspresyonunda ve çeşitli hücrel fonksiyonların düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan DNA metilasyonu gibi işlemler için gereklidir. Bireyler, folat, B12 vitamini ve kolin gibi metil açısından zengin gıdaların yeterli miktarda alınmasını sağlayarak, uygun DNA metilasyonunu ve genel epigenetik düzenlemeyi destekleyebilir; bu da sağlık ve hastalık yönünden önemli olabilmektedir. Metil donörü ögelerinden zengin besinlerini kişinin diyetine dahil ederek, bireyler potansiyel olarak epigenetik profillerini ve gen ekspresyonunu etkileyebilir, bu da sağlık ve hastalıkların önlenmesi açısından önemli olabilir. Doğum öncesi beslenme bağlamında, metil donörlerin ve kofaktörlerin annenin diyetiyle birlikte alması, fetal ve plasental gelişimde kritik bir rol oynar (McGee vd., 2018). Annenin beslenmesi, DNA metilasyonu için gerekli metil gruplarını sağlayarak fetüsün genom yapısının ve fonksiyonunun oluşumunu etkilemektedir. Bunun, yavruların sağlık sonuçları üzerinde uzun vadeli etkileri olmaktadır ve potansiyel olarak yaşamlarının ilerleyen dönemlerinde kronik hastalıklara yakalanma risklerini etkileyebilmektedir. Ayrıca araştırmalar, hamilelik sırasında değişen metil donörü ögelerinden zengin besin düzeylerinin fetal büyüme ve gelişmede değişikliklere yol açabileceğini öne sürmektedir (Gündüz ve Okimoto, 2021). Bu nedenle anne adaylarının, optimal fetal gelişimi desteklemek ve yavrularında olumsuz sağlık sonuçları riskini azaltmak için yeterli miktarda metil donörü ögeleriyle zengin besinleri aldıklarından emin olmaları önemli hale gelmektedir.

1.4. Epigenetik

Epigenetik, DNA sekansında değişiklik olmaksızın ifadesinde meydana gelen değişiklikleri incelemek için ortaya çıkmış önemli bir alandır. DNA dizisinde değişiklik meydana gelmemesine rağmen biyolojik süreçlerde meydana gelen değişiklikleri açıklamayı amaçlamaktadır (Silahtaroglu ve Stenvang, 2010; Desplats, 2015; Calvanese vd., 2009). Bu alanda giderek artan çalışmalar, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarına ek olarak dinamik RNA modifikasyonlarının, gelişim ve yaşlanma sırasında gen ekspresyonunun ve

hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Sánchez-Vásquez vd., 2018; Desplats, 2015).

Bu alanda yapılan araştırmalar, çeşitli gelişim ve hastalık süreçlerinde N6-metiladenozin (m6A) ve 5-metilsitozin (m5C) gibi dinamik RNA modifikasyonlarının önemini vurgulamıştır (Sánchez-Vásquez vd., 2018). Bu moleküler mekanizmanın araştırılmasının gelecekteki çalışmalara yön vereceği öne sürülmektedir (Sánchez-Vásquez vd., 2018). Yaşlanma süreci özellikle transkripsiyon faktörü bağlanması, histon işaretleri, DNA metilasyonu, nükleozom konumlandırması ve kodlamayan RNA'lardaki değişiklikleri kapsayan epigenomik değişikliklerle ilişkilidir (Booth ve Brunet, 2016). Bu modifikasyonların aynı zamanda hücrelerin işlevini ve kimliğini belirlemede de kullanılabilceği görülmüştür (Booth ve Brunet, 2016).

1.4.1. DNA Metilasyonu

Metilasyon, canlı organizmalardaki çok çeşitli fizyolojik ve patolojik mekanizmalarda önemli bir rol oynayan temel bir biyolojik süreçtir. Bu epigenetik modifikasyon, temel genetik diziyi değiştirmeden gen ifadesinde değişikliklere yol açabilen, başta DNA ve histonlar olmak üzere spesifik moleküllere bir metil grubunun (CH₃) eklenmesini içerir. Özellikle DNA metilasyonu, kanser ve diğer hastalıklar bağlamında kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Meyer ve Hermiston, 2019; Kulis ve Esteller, 2010). Tümör baskılayıcı gen destekleyicilerinin hipermetilasyonu veya global hipometilasyon gibi aNormal metilasyon modelleri, çeşitli kanser türlerinin gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (Kulis ve Esteller, 2010).

Genom çapında analiz tekniklerindeki son gelişmeler, gen ifadesinin düzenlenmesinde DNA metilasyonu ile histon modifikasyonları gibi diğer epigenetik mekanizmalar arasındaki karmaşık etkileşimi ortaya çıkarmıştır (Fetahu ve Taschner-Mandl, 2021). Histon proteinlerine metil gruplarının eklenmesinden sorumlu enzimler olan histon metiltransferazlar, kanser tedavisinde potansiyel terapötik hedefler olarak ortaya çıkmıştır, çünkü bunların düzensizliği aynı zamanda aNormal gen ekspresyon modellerine de yol açabilir (Zagni vd., 2013).

Epigenetik çalışmalar, kanser ve diğer hastalıklar bağlamında metilasyonun DNA dizisi üzerindeki kalıpların oluşturulduğu, sürdürüldüğü ve bozulduğu karmaşık mekanizmaları açıklamaya devam etmektedir (Cheung vd., 2009).

1.5. RF-Amid Nöropeptidler

GnIH ile aynı etkiyi gösteren nöropeptidin, kanatlı hayvanlar haricindeki canlılarda RFRP-3 olduğu belirlenmiştir (Clarke vd., 2008; Sarı vd., 2009). Memeli canlı türlerinde GnIH eşdeğeri olan RF- amid ilişkili peptitler adlandırılmasının RFRP-3 olarak 15 kullanılmasına neden olmuştur (Clarke vd., 2008; Gibson vd., 2008). Mevsimsel üreme periyoduna sahip canlılarda GnRH ile zıt etki gösterdiği belirlenmiştir (Sarı vd., 2009). Üreme fizyolojisi ile ilgili yapılan sonraki çalışmalarda ise GnIH'nin tersi etki gösteren yani GnRH üzerinde uyarıcı etkiye sahip olan yeni bir nöropeptit ortaya çıkmıştır. GPR54 reseptörü (Lee vd., 1999) ve devamında birbirinden bağımsız olarak yapılan çalışmalarda, GPR54 reseptörüne bağlanan molekülün Kiss 1 genine ait ürün olduğu tespit edilmiştir (Ohtaki vd., 2001). Şu ana kadar memelilerde RFamid peptidinin beş farklı alt tipi tanımlanmıştır. Bu alt tipler şunlardır: nöropeptit FF (NPFF) grubu, piroglutamat RFamid peptidi/26RFamid peptidi (QRFP/26RFa) grubu, prolaktin salgılatıcı peptitler, kisspeptinler (kiss1 ve kiss2) ve GnIH (LPXRFamidleri) peptit ailesi (Kovacs vd., 2014; Osugi vd., 2015).

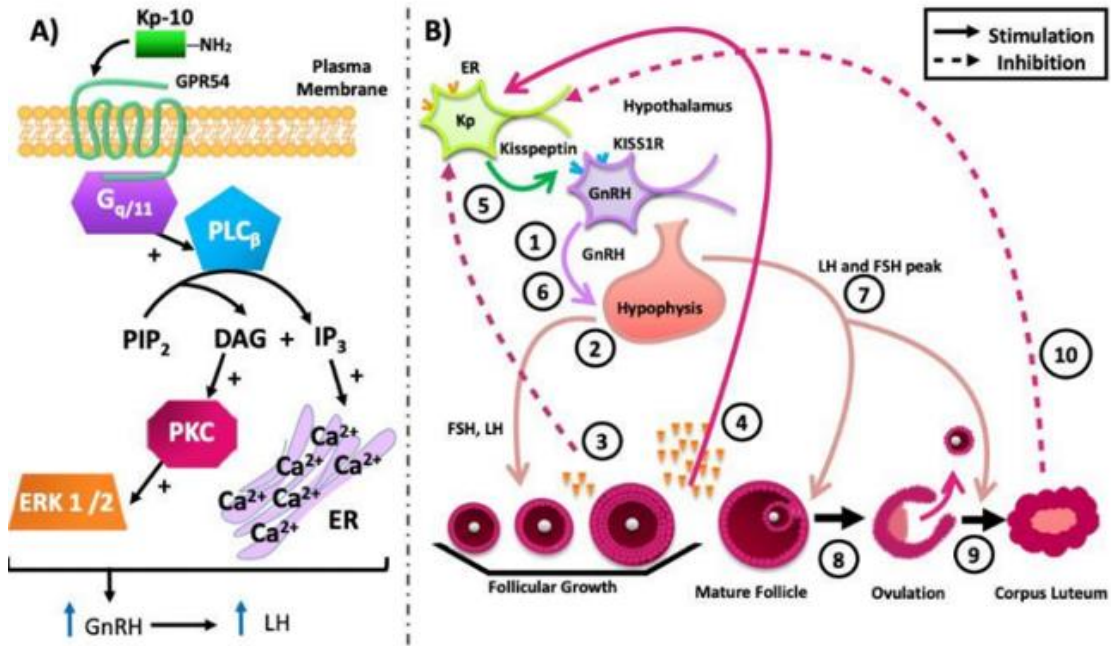
1.5.1. Kisspeptin

KISS1 geninin 145 aminoasitlik bir preküsörden türeyen -54, -14, -13 ve -10 amino asitli, N-terminallerinden kesilmiş ve C-terminalleri amidli, dört adet peptidi kodladığı belirlenmiştir. İnsanlarda plasenta hücrelerinde ve daha sonra beyin, testis, yumurtalık, pankreas ve ince bağırsak dokularında ekspresyon gösterdiği belirlenmiştir (Kotani vd., 2001).

1.5.2. GPR54

Kisspeptin reseptörü, GPR54 (Kiss1r) olarak bilinen ve bu peptide güçlü bir affinite ile bağlanan bir reseptördür (Ohtaki vd., 2001, Kotani vd; 2001; , Muir vd., 2001). Kisspeptin hücre membranındaki kisspeptin reseptörü ile bağlandığında fosfolipaz C aktifleşmekte ve inositol trifosfat ve diaçilgliserol ikincil haberci yolağı devreye girmektedir. Bunu takiben kalsiyum salınımı ve protein kinaz C aktivasyonunun tetiklenmekte ve kisspeptin fonksiyonu başlamaktadır (Muir vd., 2001, Constantin vd., 2009).

Reproduktif aks nöronal ve hormonal olarak birbiri ile iletişimdeki 3 ana kaynaktan oluşmaktadır. Bunlardan ilki GnRH'nin sentezlendiği ve salgılandığı anterior hipotalamustur. Bir diğeri FSH ve LH'nin salgılandığı anterior hipofizdir. Bunlara son olarak katılan gametlerin üretiminden ve seks steroidlerinin salgılanmasından sorumlu gonadlardır (Navarro vd., 2011; Clarke vd., 2011). Bu aksta etkili olduğu anlaşılması ile beraber kisspeptin/Kiss1r sinyalizasyonu yoğun olarak araştırılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalarla Kiss1r geninin baskılanmış veya mutasyona uğratılmış ve bunun sonucunda insan ve farede idiopatik hipogonadotropik hipogonadizm, hipogonadizm ve infertilite meydana geldiği gösterilmiştir (Seminara vd., 2003; Lapatto vd., 2007). Bu bulgular, kisspeptin / kiss1r sinyalizasyonunun üreme aksında özellikle de GnRH salgısı ve puberte başlangıcı 15 üzerindeki rolü ve işlevlerine katıldığını göstermektedir (Oakley vd., 2009). Kisspeptine yanıt olarak GnRH nöronlarının elektrofizyolojik özellikleri incelendiğinde, yetişkin erkek ve dişi farelerde kisspeptin uygulamasını takiben GnRH nöronlarının %90'ından fazlasının depolarizasyon gösterdiği ve bu oranın Kiss1r mRNA'yı eksprese eden benzer GnRH nöron yüzdesi ile uyumlu olduğu ortaya konulmuştur (Han vd., 2005).



Şekil 1. Menstruel siklusta Kisspeptin/GPR54 sinyalizasyonu ve fizyolojik rolünün gösterilmesi A) GPR54 ve hücre içi sinyalizasyonu B) LH pikinde kisspeptinin rolü (Trevisan vd., 2018).

1.5.3. RFRP

GnRH peptidi, memeli beyin araştırmalarının ilerlemesiyle tanımlanmıştır. RFamid peptitleri arasında yer alan ve karboksil ucunda Arg-Phe-NH₂ motifi taşıyan bu peptid, RFamid ilişkili peptid (RFRP) olarak adlandırılmıştır. LPXRFamid peptitlerini kodlayan cDNA'lar, RFamid ilişkili peptitler grubunda incelenmeye başlanmıştır. Analizler, LPXRFamid prekürsör cDNA'larının üç farklı RFRP (RFRP-1, -2 ve -3) kodladığını, ancak yalnızca RFRP-1 ve RFRP-3'ün C terminalinde LPXRFamid (X=L veya Q) motifi taşıdığını ortaya koymuştur. Kemirgenlerde ise yalnızca RFRP-1 ve RFRP-3 peptitleri gözlemlenmiştir (Hinuma vd., 2000). Literatür taraması sonucunda, insanlarda RFRP-1 ve RFRP-3 (Ubuka vd., 2009) ve kemirgenlerde ise RFRP-3 (Ukena vd., 2002) tanımlanmış endojen nöropeptidler olarak karşımıza çıkmaktadır.

İKİNCİ BÖLÜM

KURAMSAL ÇERÇEVE/ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

A.K. Roseweir ve R.P. Millar (2009) yaptıkları çalışmada kisspeptinin ve GPR54 sisteminin pubertede ve üremenin düzenlenmesinde kritik role sahip olduğunu kisspeptinin hipotalamus hipofiz gonad ekseninin düzenlenmesinde önemli rolü olduğu ve GnRH nöronlarını uyarak etki gösterdiğini saptamışlardır.

Diğer benzer çalışmalarda GPR54 reseptöründeki mutasyonlar puberte bozuklukları ve hipogonadotropik hipogonadizme sebep olduğu bulunmuştur. Farelerde GPR54 reseptör delesyonlarında hipogonadotropik fenotipe sahip oldukları, puberte ve üreme fonksiyonlarının kontrolünde olduğunu doğrular niteliktedir. Kisspeptin gonadotropik aksın güçlü bir stimulatörüdür. İdiopatik hipogonadotropik hipogonadizm de düşük seks steroidleri ve düşük gonadotropinler, GnRH' ın hipotalamustan pulsatil salınımında ki bozukluklardan oluşmaktadır. Bu tam veya parsiyel bozukluk endojen GnRH indüklediği LH da yokluk, normal hipofiz ve hipotalamusun radyolojik görüntüsünün olması ve normal hipotalomopituter aks olarak saptanır. Koku alma bozukluğu ve hipogonadotropik hipogonadizm Kallman sendromunda birlikte görülür. Koyun, maymun ve insanlarda kisspeptin gonadotropinlerin sekresyonunun güçlü bir uyarıcısıdır. LH ve FSH cevabına neden olur ve etkileri periferde de saptanabilir (Seminara, 2007).

Revital Nimri ve arkadaşları (2011) pubertede GnRH sekresyonunun stimülasyonunda GPR54 reseptörü gerekli olduğunu ve nadir olarak GPR54 reseptör mutasyonları ailesel normosmik izole hipogonadotropik hipogonadizme ile ilişkili olduğunu saptamışlardır.

L. G. Silveira ve arkadaşlarının (2010) yaptıkları çalışmada kisspeptinin kiss1 geni tarafından kodlanır ve GnRH stimüle eder ve pubertede rol oynar. Kiss1 reseptör genindeki inaktivatör mutasyonlar hipogonadotropik hipogonadizme neden olduğu ve kiss 1r aktivatör reseptörün puberte prekoksia neden olduğunu saptanmışlardır.

Sophie Messenger ve arkadaşları (2005) yaptıkları çalışmada hipotalamik-hipofizer-gonadal aksta GPR54 reseptörünü araştırmışlardır. Pubertal dönemde GnRH etkisi ile pulsatil LH ve FSH sekresyonu olmaktadır. GnRH nöronlarında GPR54 kolonize

olduğunu göstermişlerdir. Kisspeptin direkt olarak GnRH nöronlarını etkilemektedir. Koyunlarda serebrospinal sıvıda kisspeptin düzeylerin ölçmüşler ve GnRH yüksekliği ile korele bulmuşlardır. Bunun üzerine GnRH salınımında kisspeptinin-GPR54 major kontrol noktası oluşturmakta üreme aksında önemli etkinliğe sahip olmaktadır.

Silveira LF ve arkadaşları (2010) kisspeptin-GPR54 sinyal kompleksinin seksüel gelişim için kilit rol oynadığını göstermişlerdir. Kisspeptinin GnRH ın güçlü bir uyarandır. Hipotalamusta AVPV nükleus ve arkuat nükleusta daha fazla olmak üzere birçok yerde bulunmaktadır. Her iki cinste de kiss1 geni gonadal steroidlerin regülasyonunda önemli rol oynar. Hipotalamik kisspeptin artışı pubertede, reproduktif aksın gelişiminde rol oynar. Kisspeptin/gpr54 sistemi puberte gelişimi ve üreme fonksiyonlarında önemli olduğunu saptamışlardır (Silveira vd., 2010).

Kisspeptin santral veya iv olarak infüzyonu FSH, LH ve testosteron düzeyini yükseltmez. Hayvan modellerinde kisspeptin infüzyonu ile pubertal gelişim sağlanmaktadır. Kisspeptin-10 aralıklı olarak maymunlara 24 ay süresince uygulandığında FSH ve LH sekresyonu uyarılmakta ve 32-34 ay sonra puberte oluşmaktadır (Micol vd., 2007). GPR54 GnRH nöronları üzerinde eksprese olur. Kisspeptin hipotalamusta nükleuslarda bulunur. Arkuat nükleustaki kisspeptin nöronları östrojen ile negatif feedback uğrar. Periventriküler nükleustaki kisspeptin östrojen ile pozitif feedback uğrar. Farelerde seksüel gelişim sırasında periventriküler nükleusta kisspeptin düzeylerinin arttığı gözlenmiştir. Kiss1 ile ilgili çalışmalar göstermiştir ki puberte ve normal siklus da önemli bir role sahiptir. Kisspeptin-GPR54 ligandı veya reseptör mutasyonları prekoks puberteye, gecikmiş puberteye veya pubertenin oluşmamasına neden olmaktadır (Micol vd., 2007).

Jeremy T Smith ve arkadaşları (2008) yaptıkları çalışmada seks steroidlerinin arkuat nükleusta kiss1 gen ekspresyonunu inhibe eder. AVPV nükleusta ise tam tersine kiss1 uyarıcı etkisi olduğunu göstermişlerdir (Smith, 2008). E. Hrabovszky ve arkadaşları kisspeptin sinyalinin GPR-54 reseptör etkisi puberte ve memeli üreme sistemi üzerinde etkili olduğuna ve çalışmalarını da otopsi serilerinde topografik, seksüel farklılar, GnRH nöronları arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Bayanlarda kisspeptin inaktif aksonlar periventriküler pleksus ve infundibuler kökleri inerve ettiğini saptamışlardır (Hrabovszky vd., 2010).

Kisspeptin-GPR54 sinyal kompleksi insan seksüel gelişiminde önemli bir role sahiptir. GnRH'ın güçlü bir uyarandır. Ayrıca her iki cinste de gonadal steroidlerin

regülasyonunda önemli bir hedefdir. Pubertede hipotalamik kisspeptin artışı reproduktif aksın gelişiminde önemli rolü olduğuna inanılmaktadır. GPR54 genindeki mutasyonlar homozigot veya heterozigot, ailesel veya sporadik olsun koku defekti olmadan izole hipogonadotropik hipogonadizme neden olmaktadır (Silviera vd., 2010). Kiss1r veya GPR54 reseptörü üzerinden üremenin regülasyonunda anahtar rol oynar. Kiss1 veya Kiss1r hedef mutasyonları insanlarda hipogonadotropik hipogonadizme neden olmaktadır. Kisspeptin nöronları hipotalamusta ve birçok omurgalıda beyin bölgelerinde bulunur, dağılımda ve regülasyonunda çok çeşitlilik göstermektedir. Kisspeptin direkt olarak GnRH nöronlarını stimüle eder. Sonuçta ortak yolak üremenin regülasyonunu yapar. Kisspeptin nöronları beyinde hücresel ve transkripsiyonel olarak cinsiyetlere göre farklılık gösterir. Kisspeptin nöronlarından östrojen ve androjen reseptörleri bulunur. Bu reseptörler gonadal steroidlerin aktivasyonunda hedef rol oynar. Seks steroidleri kisspeptin üzerinde negatif feedback yapar. Kisspeptin GnRH/LH salınımını düzenler, pubertal maturasyonun tetiğini çeker, üremeyi kontrol eder. Laktasyonda üremenin aktivasyonunu sınırlar (Oakley vd., 2009).

Kisspeptin fragmanları arasında en uzun amino asit dizisine sahip olan kisspeptin-54'ün intravenöz infüzyonu, erkeklerde plazma LH seviyelerinde iki kat, FSH seviyelerinde %18 ve testosteron seviyelerinde %13 oranında artışa yol açarken; kisspeptin-54'ün kadınlarda derialtı enjeksiyonu, LH seviyelerinde 7 kat ve preovulatar fazda hem LH hem de FSH düzeylerinde belirgin bir artış sağlamıştır (Dhillon vd., 2007). İntravenöz kisspeptin uygulaması, sağlıklı erkeklerde plazma LH, FSH ve testosteron seviyelerinde yan etkisiz bir artışa neden olmaktadır. Ayrıca, plazma kisspeptin seviyeleri erkeklerde ve gebe olmayan kadınlarda düşük konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Gebelikte artış gösterir. Gebelikteki artışın nedeni plasenta olarak kabul edilmektedir. Anormal plasental proliferasyon olduğu gestasyonel trofoblastik neoplazilerde artar. Gestasyonel trofoblastik neoplazi (GTN) sonrası seviyesi düşer. Kisspeptin HPG aksinde uyarıcı ve gestasyonel trofoblastik neoplazilerde tümör markırı olarak rol oynar (Dhillon vd., 2007).

Östrojen ve testosteronu kiss1 geni regule etmektedir. Seks steroidlerinin hipotalamustaki reseptörlere etkileri farklıdır. Östrojen ve testosteron arkuat nükleustaki kiss 1 geni down regule ederken, AVPV nükleustaki geni arttırırlar. Arkuat nükleus gonadotropin sekresyonunda negatif feedback rolü oynar. AVPV kadınlarda preovulatar GnRH salınımı

sağlar. Hipotalamik kiss1 seviyesinin pubertenin tetiğini çektiği düşünülmektedir. Kisspeptin GPR54 sinyali GnRH sekresyonunda çok önemlidir (Dungan vd., 2006).

Jeremy T. Smith yaptıkları çalışmada kisspeptinin, GPR54 reseptörüne bağlandığını göstermişlerdir. GPR54 reseptörü üzerindeki etkileri ile inaktivatör mutasyonlarında hipogonadotropik hipogonadizme neden olur. Bu da bize kisspeptinin GnRH sekresyonunda önemli rol oynadığını gösterir. Seks steroidleri direkt olarak kiss1 mRNA regülasyonunda rol oynar. Kisspeptin seks steroid feedback ve GnRH sekresyonunda rol oynar. Kiss1 koyunlarda, rodentlerde ön beyinde bulunur. Çeşitli çekirdeklerde eksprese olur. Dişi koyunlarda ve rodentlerde seks steroidleri arkuat nükleusta kiss1 mRNA sentezini inhibe eder. Rodentlerde seks steroidleri anteroventral periventriküler nükleus da kisspeptini pozitif feedback yapar. Koyunlarda AVPV de Kiss nöronu yoktur ve arkuat nükleusta kiss1 mRNA ekspresyonu preovulatuvar GnRH/LH sekresyonunda artmayı sağlar. Koyunlarda arkuat nükleustaki hem pozitif hem de negatif feedback mekanizma rol oynar (Smith, 2008).

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

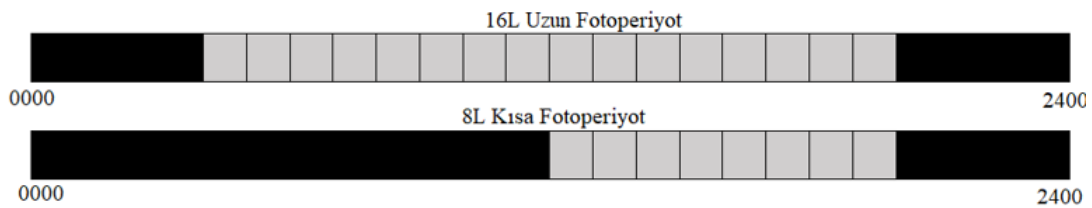
ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Üretilmesi ve Bakımı

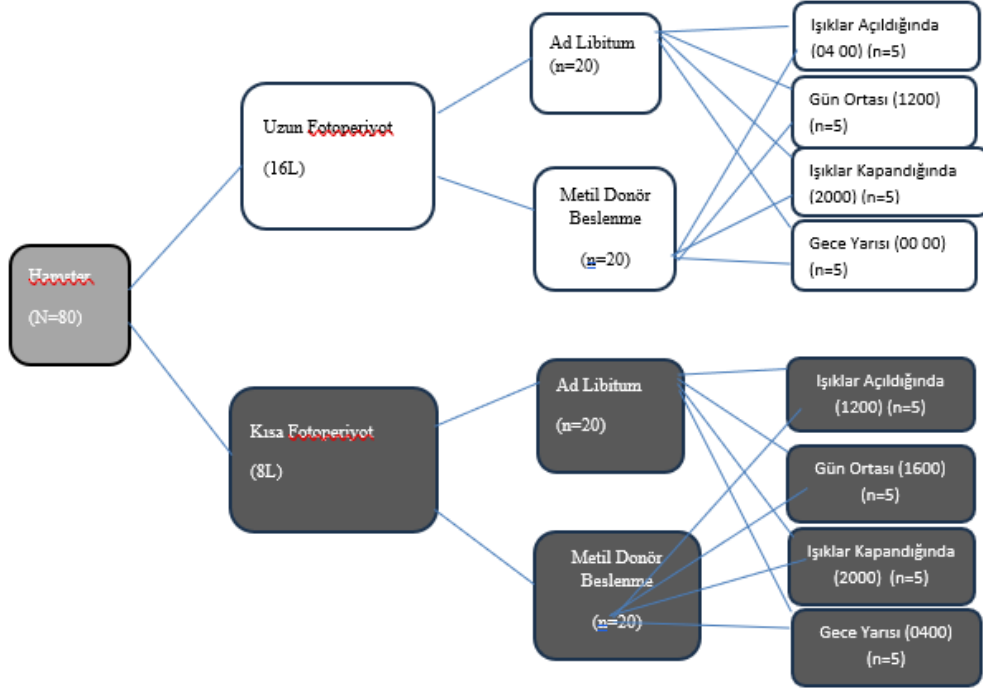
Deneylerde kullanılan erkek yetişkin Suriye hamsterleri (*Mesocricetus auratus*), Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (ÇOMÜDAM) bağlı Hamster ve Gerbil ünitesinden temin edildi. Hayvanların beslenme ve su gereksinimleri normal olarak karşılandı, odalardaki sıcaklık 22 ± 2 °C olarak kontrol altında tutuldu. Hayvanlar, fotoperiyot odalarında, aydınlık periyotta en az 200 lüks yoğunlukta beyaz florasan ışık altında tutuldu. Deneysel prosedürler, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından verilen 2019/06-08 numaralı etik onay çerçevesinde gerçekleştirildi (Ek-1).

Çalışma iki ayrı fotoperiyotta gerçekleştirildi. Uzun fotoperiyotta (16 L= 16 saat ışık) (n=40) ve kısa fotoperiyotta (8L=8 saat ışık) (n=40) hayvanlar 2 gruba ayrıldı. Bunlar; Metil Donörü öğeleriyle zengin besin ile beslenen grup (n=20) ve Standart besin ile beslenen grup (n=20). Her bir grupta doku ve kan örneklerinin alım zamanlarına bağlı olarak; ışıklar açılınca (n=5)(16L-04.00; 8L-12.00), ışıklar kapanınca (n=5)(16L-20.00; 8L-20.00), gün ortasında (n=5)(16-12.00; 8L-16.00) ve gece yarısı (n=5)(16L-00.00; 8L-04.00) dört alt gruba ayrıldı.

Çalışmada kullanılan yetişkin hamsterler en az 3 aylık hamsterler olup ağırlıkları yaklaşık 100 gram olan hayvanlardır. Bu hayvanlar 16 L ve 8 L fotoperiyoduna adapte olmuş üreme bakımından yetişkin erkek hamsterlerdir. Besleme işlemi toplamda 2 ay devam etmiş olup deney sonunda alt gruplarda belirtilen zaman dilimlerinde hayvanlardan hipotalamik dokular alındı.



Şekil 2. Uzun ve kısa fotoperiyota ait aydınlık- karanlık saatleri



Şekil 3. Deney düzeneği

3.2. Testis Ağırlığı

Deneyde kullanılacak hamsterler kısa fotoperiyotta 8L=8 saat ışık; ışıklar saat 20:00'da kapanıp, saat 12:00'da açılacak şekilde yeni bir ortama alınarak, hamsterlerin testislerindeki değişim gözlemlendi.

Testis ağırlığı Gündüz ve Stetson'ın (2002) yaptıkları çalışmada yer alan formüle göre testis boyutlarının kumpas yardımıyla ölçülmesi sonucu hesaplandı. Öncelikle tek testis hacmi (single testis volüme STV) hesaplanıp daha sonra ise eşli testis ağırlıkları (paired testes weight PTW) hesaplandı. Skrotumda her iki testisin dış palpasyonu ile hassas kumpas yardımı ile en ve boy ölçümleri yapıldı. Hesaplamalar için formüller aşağıdaki gibidir;

$$STW; \text{Hacim} = 0,5236 (\text{boy})(\text{en})$$

$$PTW = 1,846 (STV) - 0,015$$

3.3. Vücut Ağırlığı

Standart besin ve metilce zengin besin ile beslenen hamsterler haftalık olarak tartılarak takip edildi. Tartım işlemleri her iki fotoperiyot için de gün ortasına tekabül eden saatte yapıldı. Tartımı etkilememesi için hayvanların ağızlarında yem olup olmadığı kontrol edildi.

3.4. Yem Tüketimi

Yem takibinin yapılabilmesi için tüm bireyler tekli kafeslere alındı. Her bir kafese belirli miktarda yem koyuldu ve ertesi gün kalan miktar ölçüldü. Ölçüm işlemi esnasında hamsterlerin ağızındaki yemler de boşaltıldı, kafes içerisindeki kırıntılar da toplandı. Bu işlem her iki fotoperiyot için de gün ortasına tekabül eden saatte gerçekleştirildi. 8 hafta süren besleme aşamasında yem tüketimi her gün hesaplandı.

3.5. Doku Örneklerinin Alınması

Deneyin tamamlanmasının ardından, hamsterlerin beyinleri hızlı bir şekilde çıkarıldı. Beynin hipotalamus bölgesi, dokunun canlılığını korumak amacıyla %0,9'luk NaCl çözeltisi içinde ve stereodiseksiyon mikroskobu kullanılarak mikrodiseksiyon makası ile hızla ayrıştırıldı. Her bir grup için toplanan dokular, ayrı eppendorf tüplerine konulmuş ve hemen sıvı azot ile dondurularak, DNA izolasyonuna kadar -84°C'de saklandı.

3.5.1. Nükleik Asitlerin İzolasyonu

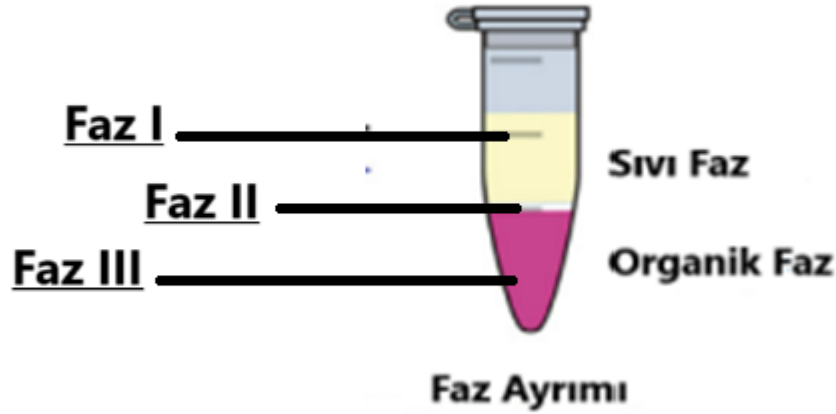
Dekapitasyon işlemi uygulanan kısa ve uzun fotoperiyotlu hayvanlardan alınan hipotalamus örneklerinde RNA izolasyonu Trizol yöntemi kullanılarak yapıldı. Doku örnekleri, her 100 gram doku için 1000 µl Trizol reaktifi içeren 2 ml tüpler içinde muhafaza edildi. Trizol, fenol ve guanidintiyosiyanat bileşenleri içeren pembe renkli bir solüsyondur ve yüksek kaliteli toplam RNA elde edilmesine olanak tanır. Trizol'ün bu süreçteki rolü, homojenizasyon aşamasında fiziksel parçalamanın yanı sıra kimyasal parçalama sağlayarak nükleazları denatüre etmektir, böylece işlem sırasında RNA ve DNA'nın bütünlüğü korunur.

Fiziksel parçalamayı desteklemek için, trizol içerisindeki dokulara seramik boncuklar ilave edilerek dokular homojenize (Retsch MM400; Almanya) edildi. Homojenizasyon sonrası, homojenat 2 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.

Dokular homojen hale getirildikten sonra, her tüpe 200 µl kloroform eklendi ve karışım oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Ardından, tüpler 12.000 rpm'de, 4 °C'de 20 dakika santrifüje edildi (Eppendorf 5424 R Santrifüj; Almanya). Bu işlem sonucu üç farklı faz oluştu ve her fazda DNA, RNA ve proteinler ayrı ayrı elde edildi.

Santrifüj sonrası oluşan fazlar şunlardır:

- **Faz I (Sulu faz):** RNA'yı içerir ve renksizdir.
- **Faz II:** DNA'yı içerir ve beyaz renktedir.
- **Faz III (Organik faz):** Proteinleri içerir ve kırmızı renktedir.



Şekil 4. Santrifüj sonrasında tüp içeriğindeki fazlar

Santrifüj işleminden sonra tüplerde oluşan renksiz üst faz, RNA içeren faz olarak kabul edildi. Bu faz, mikropipet kullanılarak steril bir mikro santrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 500 µl izopropanol eklendi. Karışım, elle karıştırıldıktan sonra RNA'nın DNA ve diğer moleküllerden ayrılmasını sağlamak için oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. İnkübasyon süresinin ardından, tüpler 12.000 rpm'de, 4 °C'de 10 dakika santrifüjlendi ve üst

faz süpernatant olarak atıldı. Kalan pellet üzerine 1 ml %75 etanol eklendi ve 7.500 x g'de, 4 °C'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldıktan sonra pellet, 60 °C'de etanolün uçması için kurutuldu ve 50-100 µl RNAaz içermeyen su eklenerek çözündürüldü. RNA'nın konsantrasyon ve saflığı, spektrofotometre (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific™, Finlandiya) ile ölçüldü. Ölçüm tamamlandıktan sonra, RNA örnekleri -80 °C'de saklandı.

DNA içeren beyaz renkli "orta faz" DNA izolasyonu için kullanıldı. Bu işlemde, ara fazın üzerindeki herhangi bir sulu fazın bırakılmaması sağlandı. TRIzol™ reaktifi ile dokuların lizizi için kullanılan her 1 ml reaktife 0,3 ml %100 etanol eklendi ve tüpler birkaç kez ters çevrilerek karıştırıldı. Karışım, 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında tüpler 4 °C'de, 2.000 x g'de 5 dakika santrifüjlendi ve DNA'nın tüp dibine çökmesi sağlandı. Protein içeren fenol-etanol süpernatantı yeni bir tüpe alındı.

DNA yıkama aşamasında, elde edilen pellet %10 etanol ve pH 8.5'te 1 ml 0.1 M sodyum sitrat çözeltisi ile yeniden süspansiyon edildi. Bu çözeltide, tüpler hafifçe ters çevrilerek 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda, tüpler 4 °C'de 2.000 x g'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Pellet, 1,5-2 ml %75 etanol içinde yeniden süspansiyon edildi ve 10-20 dakika inkübe edildi. Daha sonra, tüpler 4 °C'de 2.000 x g'de 5 dakika santrifüjlendi, süpernatant mikropipet ile atıldı ve pellet 10 dakika kurutuldu. Pellet, 0,3-0,6 ml 8 mM NaOH ile çözündürüldü ve çözünmeyen parçacıkları temizlemek için 4 °C'de 12.000 x g'de 10 dakika santrifüjlendi. Elde edilen süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı. DNA'nın konsantrasyon ve saflığı spektrofotometre ile belirlendi ve DNA miktarı Beer-Lambert formülü kullanılarak hesaplandı: A_{260}/A_{280} (1,0-1,8). Ölçümden sonra, DNA örnekleri -80 °C'de saklandı.

3.5.2. 5mC Global DNA Metilasyonunu Ölçülmesi

DNA metilasyon düzeylerinin tayininde, elde edilen DNA örnekleri 5-mC DNA ELISA Kiti (Zymo Research, ABD) kullanılarak analiz edildi. Bu kit, DNA örneklerinde 5-metilsitozin (5-mC) seviyelerini ölçmek için uygun ve etkili bir yöntem sunar. Kit, 5-mC miktarını belirlemek amacıyla özel olarak hazırlanmış kontrol standartlarıyla birlikte gelir, bu standartlar sayesinde elde edilen sonuçlar doğrulukla değerlendirilebilir.

Küresel metilasyon analizleri, bir organizmanın genomundaki toplam 5-metilsitozin (5-mC) yoğunluğunu belirlemeye yönelik yöntemleri kapsamaktadır. Global DNA metilasyon analizi ticari kit ile DNA denatürasyonu sonrası gerçekleştirildi. Bu çalışma için ELISA’da standart curve oluşturmak için aşağıdaki tabloda verilen karışımlar hazırlandı. Bu tablo standart bir eğri oluşturmak için kullanılması gereken yedi karışımın hazırlanışını göstermektedir.

Tablo 1

Negatif Kontrol ve Pozitif Kontrol hazırlaması

% 5-Mc	Negatif Kontrol (100ng/μl)	Negatif Kontrol (100ng/μl)
%0	1	0
%5	0,95	0,05
%10	0,9	0,1
%25	0,75	0,25
%50	0,5	0,5
%75	0,25	0,75
%100	0	1

Protokol :

ÇOMÜDAM Fizyoloji Laboratuvarında kullanılan MultiScanGo Spectrofotometre ile DNA miktarı ölçüldü. Her PCR tüpüne 100 ng DNA eklendi ve hacmi 100 μl'ye 5-mC Coating Buffer ile tamamlandı. DNA, bir termal döngü cihazında 98°C'de 5 dakika ısıtılarak denatüre edildi ve sonrasında 10 dakika buzda bekletildi. Daha sonra, gerekli sayıda plate kuyuları kullanılarak işlem devam edildi.

DNAlar denatüre edildikten sonra, 100 μl hacmindeki kuyucuklara eklendi ve alüminyum folyo ile kapatılarak 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, her kuyuda 200 μl 5-mC ELISA tamponu ile 3 kez yıkama yapıldı ve tampon her seferinde atıldı. Daha sonra, her kuyucuğa 200 μl 5-mC ELISA tamponu eklenip, plate tekrar alüminyum folyo ile kapatılarak 30 dakika daha 37°C'de inkübe edildi.

Son olarak, her kuyucuğa 100 µl antikor (5-mC ELISA tamponu ile karıştırılan Anti-5-metilsitozin ve ikinci antikor) eklendi. Plate tekrar kapatıldı ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Antikor hazırlama protokolü Tablo-3'te verildi.

Tablo 3

Antikor hazırlama protokolü

	Dilüsyonu	Hacmi (µl)	Örnek (18 kuyu)
5-mC ELISA Tampon	N/A	(# wells + 2) 100	2,000 µl
Anti-5-Metilsitozin	1:2,000	Buffer Vol. / 2,000	1 µl
İkincil Antikor	1:1,000	Buffer Vol. / 1,000	2 µl

İnkübasyonun ardından antikor karışımı kuyulardan atıldı ve her bir kuyucu 200 µl 5-mC ELISA tamponu ile 3 kez yıkandı. Yıkama işlemlerinin ardından, her kuyucuğa 100 µl HRP geliştirme çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 50 dakika renk gelişimi için bekletildi. Renk değişimi tamamlandıktan sonra, absorbans ölçümü 405-450 nm aralığında bir ELISA plaka okuyucusu (Thermo Microplate Spectrophotometer) kullanılarak gerçekleştirildi.

Kit protokolünde yer alan negatif ve pozitif kontrollerden elde edilen %5, %10, %25, %50 ve %75 standartlar hazırlandı. Bu standartlar ile 'GraphPad Prizm' programı ile standart grafiği oluşturuldu ve örneklerin değerlendirilmesi bu standart eğrisine göre hesaplandı.

Örneklerin metilasyon miktarları 'GraphPad Prizm' programında 'Interpolated Data' hesaplama sistemi ile hesaplandı. Bu hesaplama yöntemi ' $y=a+b \cdot \ln x$ ' forfümülüzasyon sistemi baz alınarak çalışıldı.

3.5.3. cDNA Sentezi:

RNA örneklerinin gerçek-zamanlı PCR gibi yöntemlerle analiz edilebilmesi için cDNA'ya çevrilmesi gerekmektedir. Bu aşama, reverstranskriptaz enzimi sayesinde gerçekleştirilmektedir.

Hipotalamus bölgelerinden izole edilen RNA'lar kalıp olarak kullanılarak cDNA sentez işlemi bittikten sonra tüpler -20°C'de saklandı.

Optimizasyon çalışmaları

Primer sentezi Primer3 dizayn programı ile gerçekleştirildi ve programdan elde edilen dizi bölgesi ve Tm sıcaklıkları Tablo 4'da verilmektedir.

Tablo 3

Kullanılan gen bölgelerine ait primer bilgileri

Gen bölgesi	Sekans (5'→3')	Baz sayısı (bp)	Tm °C
Kiss1 F	AGAATCCAGCCAAGCCTCTG	20	59
Kiss1 R	TTGATGAGTTCCTGGGGTCC	20	59
GRP54 F	TTCCCTGAAGACCTGAAGCC	20	59
GRP54 R	AATCAGAGGACGGCAAGGTG	20	59
RFRP F	CAGAATCCAGCCAAGCCTCT	20	59
RFRP R	CACACAGAGGAGAAGCAGCA	20	59
ACTB F	TGAAGATCAAGATCATTGCT	18	57
ACTB R	CTCATCGTACTCCTGCTT	18	57

Her bir gen bölgesi ise hem sıcaklık hem de primer konsantrasyon optimizasyonu yapıldı. İlk aşama olarak optimim primer konsantrasyonu için, her bir genin 60 °C'de 0,2 µM ve 0,5µM Forward -Revers olmak üzere iki farklı konsantasyonda bağlanma düzeylerine bakıldı. Optimum primer konsantrasyonu belirlendikten sonra ise 56 °C, 58 °C, 60 °C, 62 °C ve 64 °C' de optimum bağlanma sıcaklıklarına bakılmıştır.

3.5.4. Gen Bölgelerinin Optimizasyonu

Her bir gen bölgesi ise hem sıcaklık hem de primer konsantrasyon optimizasyonu yapıldı. İlk aşama olarak optimim primer konsantrasyonu için, her bir genin 60 °C'de 0,2 µM ve 0,5µM Forward-Revers olmak üzere iki farklı konsantasyonda bağlanma düzeylerine bakıldı. Optimum primer konsantrasyonu belirlendikten sonra ise 56 °C, 58 °C, 60 °C, 62 °C

ve 64 °C' de optimum bağlanma sıcaklıklarına bakıldı. Tüm gen bölgeleri için en uygun bağlanma dataları elde edildi.

3.5.5. Proteinlerin Saflaştırılması

Total RNA ekstraksiyonu sonrasında mikrosantrifüj tüplerinin alt kısmında organik fazın üzerine 300 µl %100 etanol eklendi. Süspansiyon 3 dk oda sıcaklığında inkübasyon eklendi. İnkübasyonun ardından +4 °C'de 2000 G X 5 dk santrifuj edildi. 500 µl süpernatant yeni mikrosantrifuj tüpüne aktarılarak üzerine 1,5 ml isoproponol eklendi. Süspansiyon 10 dk oda sıcaklığına bekletildikten sonra +4 °C'de 12000 G X 10 dk santrifuj edildi. Süpernatant mikrosantrifuj tüpünden atılarak üzerine 2 ml Wash Buffer (0,3 M Guanidine hydrochloride 95% etanol eklenerek 20 dk inkübasyon edildi. İnkübasyon sonrasında süspansiyon +4 °C'de 7500 G X 5 dk santrifuj yapılarak süpernatant atıldı. Pellet üzerine 2 ml wash buffer eklenerek 20 dk inkübasyon sonrası +4 °C'de 7500 G X 5 dk santrifuj yapılarak süpernatant atıldı. Yıkama işlemi sonrasında pellet üzerine %100 Etanol eklenerek vorteks yapılarak 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Süspansiyon +4 °C'de 7500 G X 5 dk santrifuj edilerek süpernatant atıldı ve pellet 10 dk oda sıcaklığında kurutuldu. Pellet üzerine %1 SDS solüsyonu eklenerek pellet çözünene kadar ara ara pipetaj yapılarak 50 °C'de bekletildi. Pellet çözüldükten sonra +4 °C'de 10000 G X 10 dk santrifuj yapılarak süpernatant farklı tüple aktarıldı. Protein numuneleri -20 °C'de saklandı.

Dilüsyon Katsayısının Hesaplanması

İstenilen gen bölgelerine ait proteinlerin miktarının belirlenmesi için satın alınan kitler öncelikle farklı dilüsyon katsayıları kullanılarak test edildi. Kit içeriğinde bulunan standartlar kullanılarak bir grafik elde edildi. Her bir protein tayin kiti için 480, 240, 120, 60 ve 30 ng olacak şekilde 5 adet standart kullanıldı.

Daha sonra örnek dokulardan izole edilen proteinler 1, 1/2, 1/5 ve 1/10 olmak üzere 4 farklı dilüsyon konsantrasyonunda test edildi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Kisspeptin ve GRP54 proteinleri için en uygun 1/5 dilüe protein olduğu bulunurken RFRP proteinin için bu katsayı 1/2 olarak tesbit edildi.

3.5.6. ELİSA Gen Spesifik Protein Miktar Tayini

Tüm solüsyonlar ve örnekler kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmelidir.

Her bir gene ait 50 ul standart 480, 240, 120, 60 ve 30 ng olacak şekilde kuyucuklara koyuldu.

Örnekler 40 ul olacak şekilde kuyucuklara dağıtıldı ve 10 ul seconder antibody eklendi.

Tüm kuyucuklara 50'şer ul streptavidin-HRP eklendi. Daha sonra bir seal yardımıyla kapatılan well-plate 37 °C de 60 dk inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda wash buffer ile 5 kez yıkama yapıldı.

Yıkama sonrası 50 ul solüsyon A ve ardından Solüsyon B eklenerek 37 °C de karanlık ortamda inkübe edildi.

Son olarak 50 ul stop solüsyonu eklenerek 10 dk boyunca sarıya dönmesi beklenen örnekler 450 nm dalga boyunda okutuldu.

Elde edilen veriler GraphPad Prism programı yardımıyla hesaplanmış olup protein değerleri tesbit edildi.

3.6. İstatistiksel Analiz

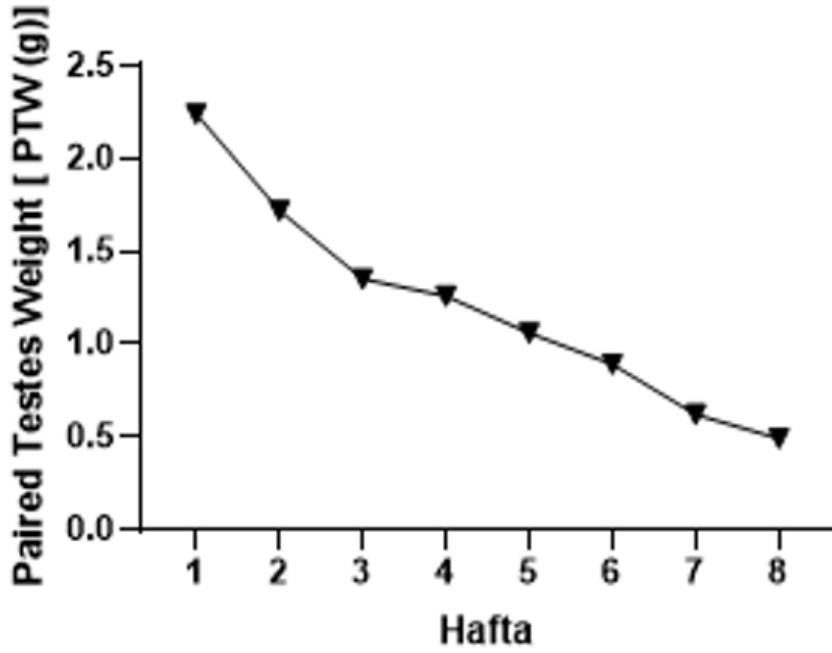
İstatistiksel analizler IBM SPSS Statistic 22.1 paket programıyla gerçekleştirildi. Vücut ağırlığı, besin tüketimi, metilasyon yüzdeleri ve Kisspeptin, GPR54 ve RFRP genlerinin mRNA ekspresyonu ve protein miktarının hesaplanmasıyla elde edilen verilerin sonuçları grup ortalamalarına karşı two-way ANOVA kullanıldı. Gruplar arası farklılıkların belirlenmesi için Post-Hoc çoklu karşılaştırma testi Duncan kullanıldı. Gruplar arası anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak belirlenmiştir. Grafikler GraphPrizm 9.0 programı ile hazırlandı. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak sunuldu.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Testis Ağırlığı

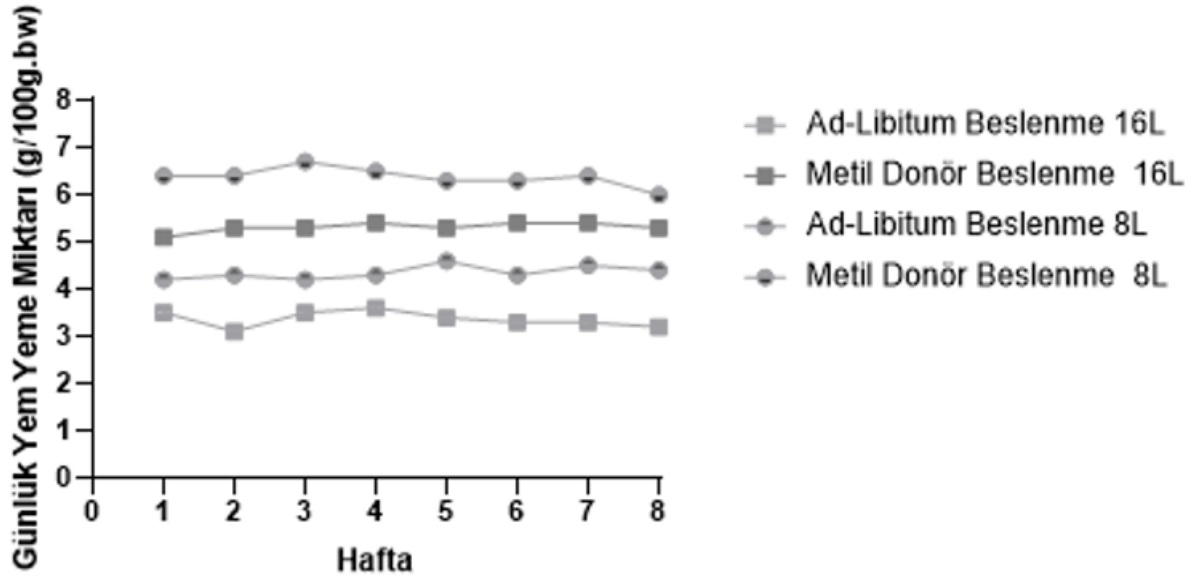
Uzun fotoperiyotta bulunan hamsterlerin kısa fotoperiyoda uyum sağlayıp sağlamadıklarını gözlemlemek amacıyla haftalık olarak testis ağırlığı ölçüldü. Uzun fotoperiyotta yaklaşık olarak 2 gram olan testis ağırlığı kısa fotoperiyoda alındıktan sonra zamanla küçülerek 8. haftanın sonunda 0,5 grama kadar düştü (Şekil 5.).



Şekil 5. *Mesocricetus auratus* türünde 8 haftalık testis boyutu takibi. Paired Testes Weight (PTW) yöntemi kullanılarak 16L uzun fotoperiyotta tutulan bireyler 8L kısa fotoperiyota alındıktan sonra mevsimsel adaptasyonları takip edilmiştir. Her bir nokta n=40 bireyin ortalama±standart sapma değerini göstermektedir.

4.2. Yem Tüketimi

Kısa fotoperiyotta hamsterlerin daha fazla besin tükettiği görülürken ($p<0,05$) metilce zengin besin tüketen hamsterlerin, normal besin ile beslenenlere göre daha fazla yem tükettiği görülmektedir ($p<0,05$) (Şekil 6.).

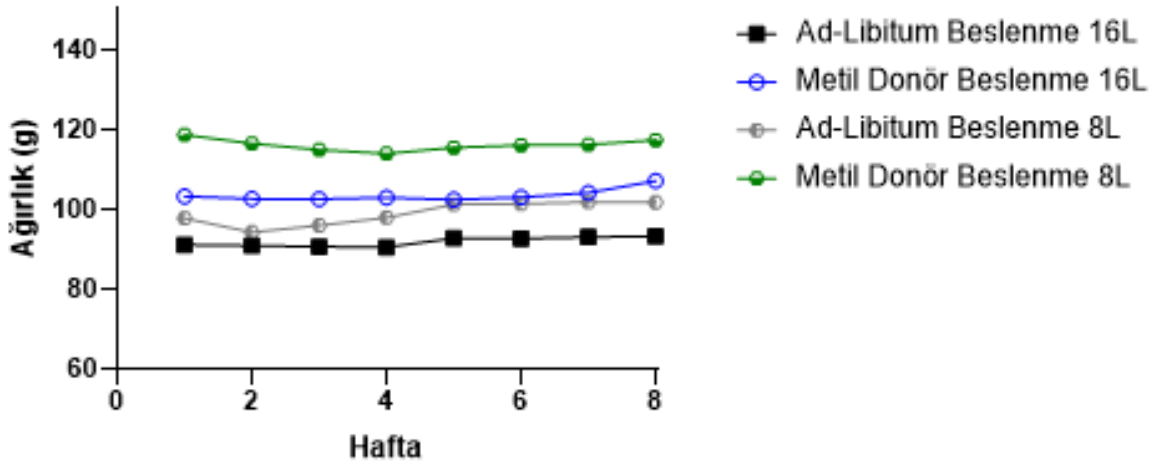


Şekil 6. Normal ve Metil Donör diyete tabi tutulan bireylerin günlük yem tüketim kapasiteleri. 16L uzun ve 8L kısa fotoperiyota maruz bırakılan bireyler her biri ayrı kafeste tutularak günlük yem yeme kapasiteleri hesaplandı ve tabloda haftalık ortalama±standart sapma olarak gösterildi. Her grup için örnek sayısı $n=20$ dir.

4.3. Vücut Ağırlığı

Bireylerin hem uzun hem de kısa fotoperiyotta ağırlıkları haftalık olarak takip edildi. Uzun fotoperiyotta (16L) normal besin ile beslenen bireylerde bireyler yaklaşık 90g olup takip eden haftalarda ağırlıklarında bir değişiklik görülmedi ($p>0,05$), metilce zengin besinle beslenen bireylerde ise 6. haftadan sonra artış görüldü ($p<0,05$). Kısa fotoperiyotta (8L) ise normal besin ile beslenen bireylerin ağırlığında önce azalış ardından 4. haftadan sonra biraz

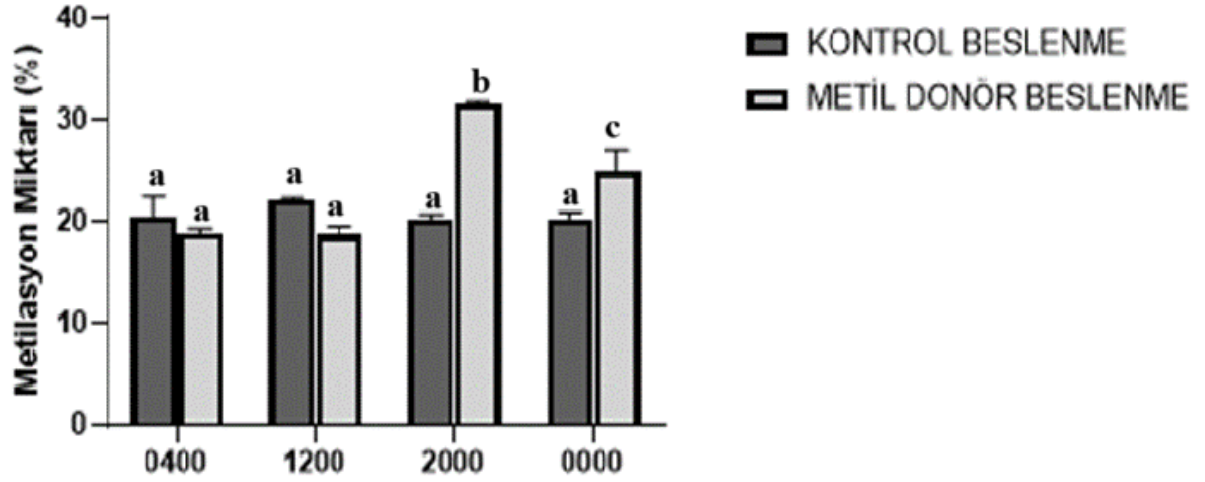
artış görülse de 6. haftadan sonra tekrar sabitlendiği görüldü ($p<0,05$). Ayrıca Şekil 7’de görüldüğü üzere kısa fotoperiyotta vücut ağırlıkları uzun fotoperiyoda göre pek fazla bir artış göstermedi ($p>0,05$)(Şekil 7.).



Şekil 7. Normal ve Metil Donör diyete tabi tutulan bireylerin haftalık vücut ağırlığı değişimleri. 16L uzun ve 8L kısa fotoperiyotta maruz bırakılan bireyler her biri ayrı ayrı haftalık olarak tartılarak, şekilde haftalık ortalama±standart sapma olarak gösterildi. Her grup için örnek sayısı $n=20$ dir.

4.4. Metilasyon Miktarı

Hamsterler günün 4 farklı zamanında (ışıklar açıldığında, gün ortasında, ışıklar kapandığında ve gece yarısında) dekapite edildi. Hipotalamus dokularından DNAları izole edildikten sonra kit yardımıyla 5mC global metilasyon miktarları ölçüldü. Hem kısa hem de uzun fotoperiyoda ait metilasyon miktarları şekilde gösterildiği gibidir (Şekil 8.-9., Tablo 4.).



Şekil 8. Normal ve Metil Donör diyete maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* bireylerin **16L** uzun fotoperiyoda ait **metilasyon yüzdeleri**. Doku örnekleri ışıklar açıldığında (n=5)(04.00), gün ortasında (n=5) (12.00), ışıklar kapatıldığında (n=5) (20.00) ve gece yarısında (n=5) (00.00) olmak üzere dört farklı zamanda alındı ve üç tekrarlı çalışıldı. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. Farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (Dunn's post hoc testi, $p<0.05$).

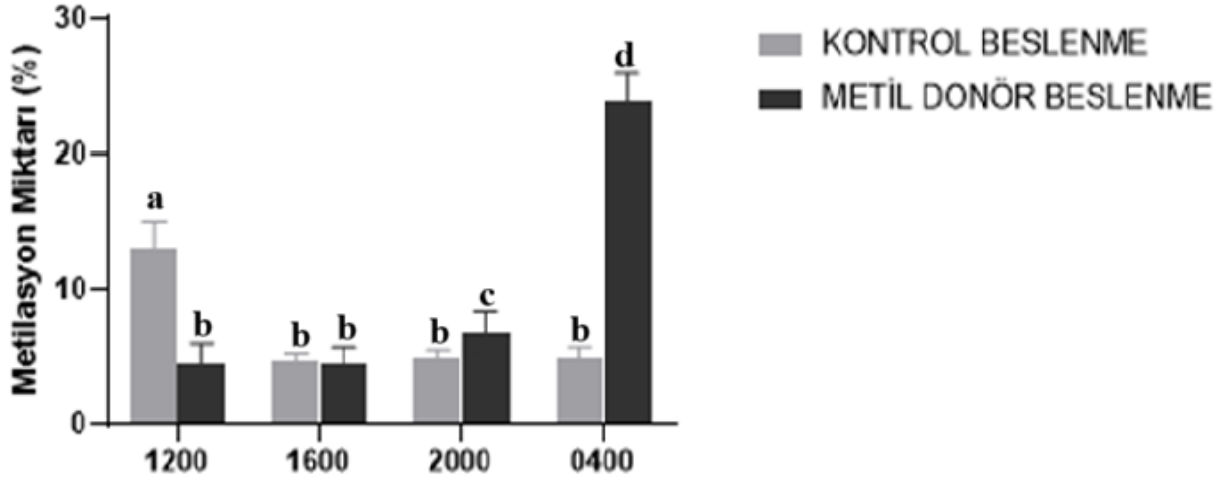
Tablo 4

Normal ve Metil Donör diyete maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* bireylerin **16L** ve **8L** fotoperiyoda ait **metilasyon yüzdeleri**

Dekapitasyon Zamanı	Uzun Fotoperiyot (16L)					Kısa Fotoperiyot (8L)				
	Saat	Kontrol Beslenme		Metil Donör Beslenme		Saat	Kontrol Beslenme		Metil Donör Beslenme	
		Ort.	Std.	Ort.	Std.		Ort.	Std.	Ort.	Std.
Işıklar açıldığında	04.00	20,47 ^a	1,88	18,85 ^a	0,41	12.00	13,12 ^a	1,78	4,57 ^b	1,33
Gün ortası	12.00	22,22 ^a	0,11	18,64 ^a	0,83	16.00	4,67 ^b	0,55	4,38 ^b	1,22
Işıklar kapandığında	20.00	20,21 ^a	0,41	31,67 ^b	0,11	20.00	4,97 ^b	0,50	6,85 ^c	1,4
Gece yarısı	00.00	20,29 ^a	0,52	24,92 ^c	1,99	04.00	4,88 ^b	0,79	23,93 ^d	1,88

Uzun fotoperiyotta (16L) normal ve metilce zengin besin ile beslenen bireylerde metilasyon yüzdeleri Şekil 8 ve Tablo 4'te verildi. Kontrol gruplarında metilasyon miktarı

değişmezken ($p>0.05$), metil beslenmenin olduğu 20.00 ve 00.00 gruplarında metilasyon miktarı diğer gruplara göre daha fazladır. En çok metilasyonun olduğu zaman ise ışıkların kapandığı zamandır (20.00; $p<0.05$) (hipermetilasyon).



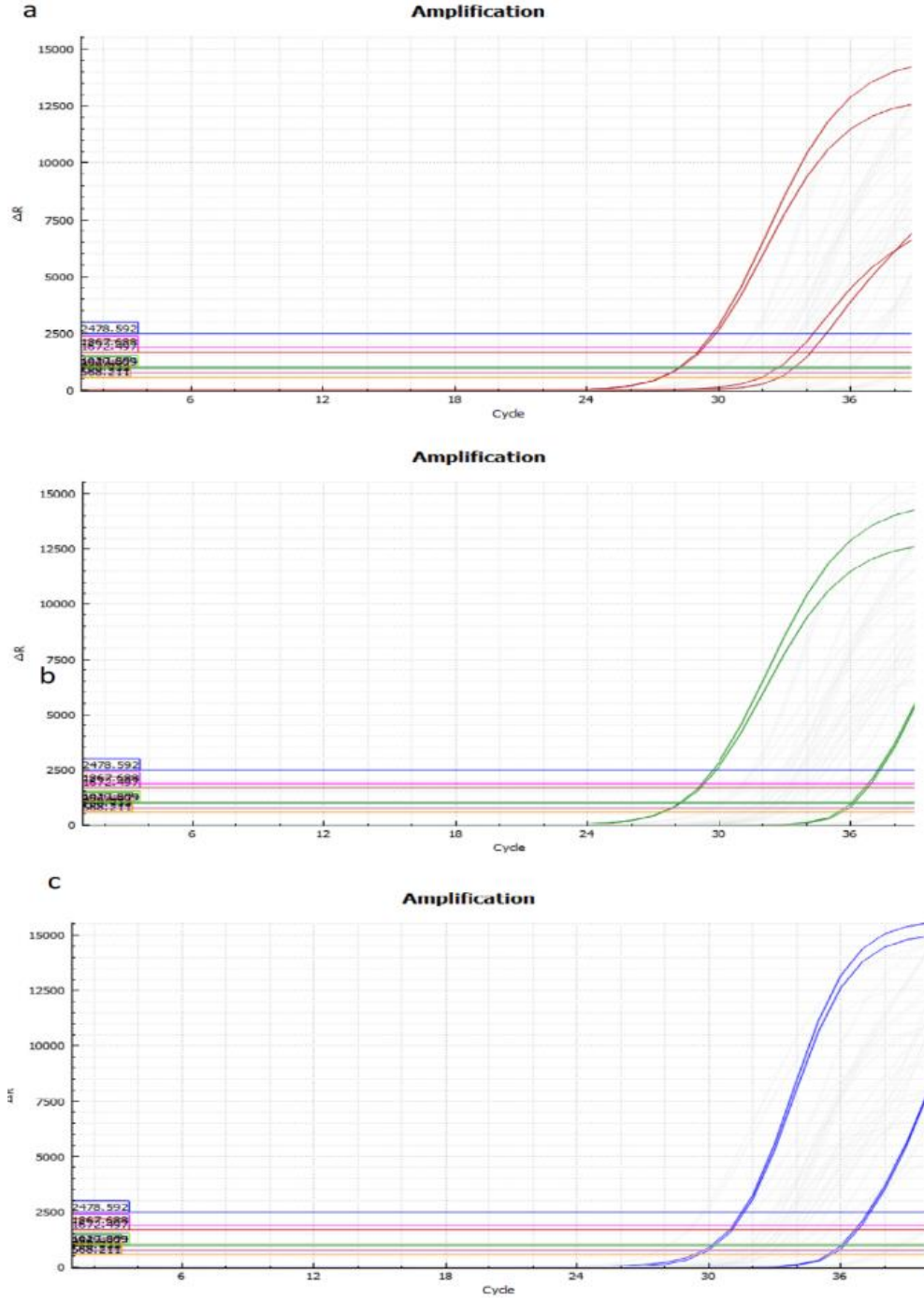
Şekil 9. Normal ve Metil Donör diyetle maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* bireylerin 8L kısa fotoperiyoda ait metilasyon yüzdeleri. Doku örnekleri ışıklar açıldığında (n=5)(12.00), gün ortasında (n=5) (16.00), ışıklar kapatıldığında (n=5) (20.00) ve gece yarısında (n=5) (04.00) olmak üzere dört farklı zamanda alındı ve üç tekrarlı çalışıldı. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. Farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (Dunn's post hoc testi, $p<0.05$).

Kısa fotoperiyotta (8L) normal ve metilce zengin besin ile beslenen bireylerde metilasyon yüzdeleri Tablo 4 ve Şekil 9'da verildi. Normal beslenme gruplarında metilasyon miktarı sadece 12.00 grubunda artış gösterdi. Metil donör ile beslenen gruplarda ise artış 20.00 ve 04.00 gruplarında olmasına karşın en fazla artış 04.00 grubunda (hipermetilasyon) gerçekleşti. Kısa fotoperiyotta hem kontrol hem de metil donörü öğeleriyle zengin beslenen gruplarda metilasyon miktarları düşüş gösterdi.

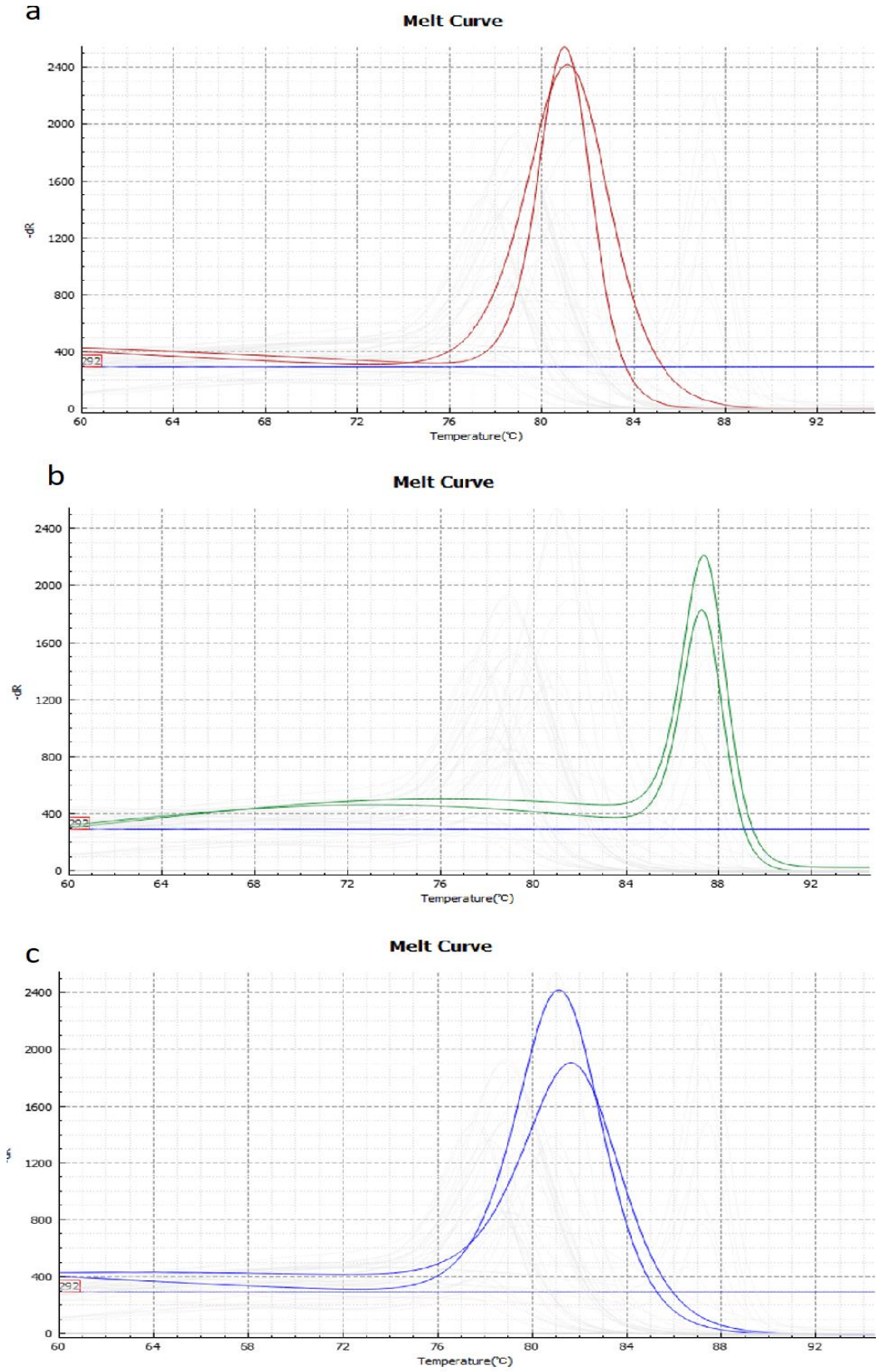
4.5. Gen Bölgelerinin Optimizasyonu

Optimizasyon işlemleri sonucunda en uygun verinin elde edildiği bağlanma ve melting curve görüntüleri aşağıdaki gibidir (Şekil10.-11.).





Şekil 10. 58 °C de 0.5 μ M Forward ve 0.5 μ M Reverse primer içeren gen bölgelerinin bağlanma görüntüleri a) Kisspeptin örneği ve kisspeptin NTC b) GRP54 örneği ve GRP54 NTC c) RFRP örneği ve RFRP NTC



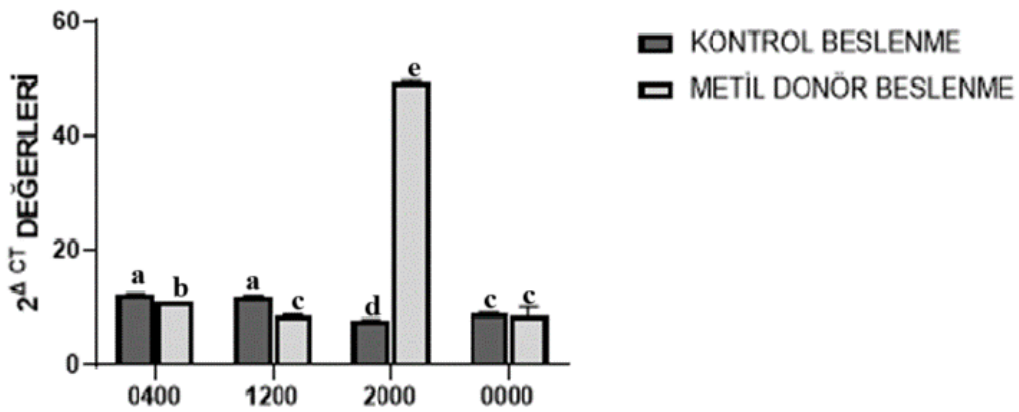
Şekil 11. 58 °C de 0,5 μ M primer konsantrasyonunu için Melt Curve görüntüsü

a) Kisspeptin geni b) GRP54 geni c)RFRP geni

Deney uygulamalarında ACTB gen bölgesi (housekeeping gen) normalizatör olarak kullanılmıştır. Analiz gurupları içerisinde tüm gurupların gen ekspresyon analizlerini çıkartmak için $2^{\Delta Ct}$ (Bustin vd., 2009) metodu kullanıldı.

4.6. Gen Regülasyon Düzeyleri

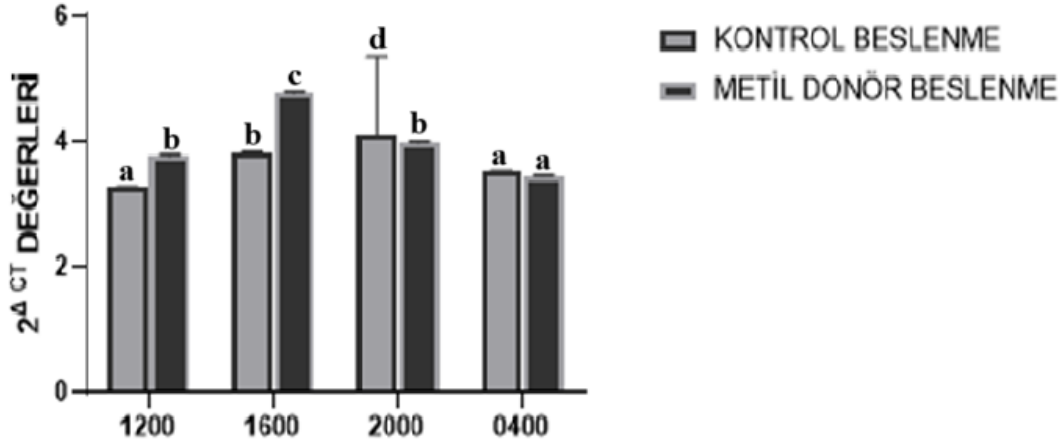
Deney uygulamalarında ACTB gen bölgesi (housekeeping gen) normalizatör olarak kullanıldı. Analiz gurupları içerisinde tüm gurupların gen ekspresyon analizlerini çıkartmak için $2^{\Delta Ct}$ (Bustin vd., 2009) metodu kullanıldı.



Şekil 12. Normal ve Metil Donör diyetle maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* bireylerin **16L** uzun fotoperiyoda ait **Kisspeptin** gen regülasyon miktarları. Doku örnekleri ışıklar açıldığında (n=5)(04.00), gün ortasında (n=5) (12.00), ışıklar kapatıldığında (n=5) (20.00) ve gece yarısında (n=5) (00.00) olmak üzere dört farklı zamanda alındı ve üç tekrarlı çalışıldı. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. Farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (Dunn's post hoc testi, $p < 0.05$).

Normal beslenen bireyler kendi aralarında değerlendirildiğinde ışıkların kapatıldığı saatlerde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu görüldü. Metilce zengin besin ile beslenen bireylerde ise ışıkların kapandığı 20.00 zaman diliminde en yüksek kisspeptin regülasyonu izlendi. Işığın var olduğu saatlere bakıldığında normal beslenen bireylerde

metilce zengin beslenen bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmektedir ($p<0,05$). Karanlık fazın orta saati olan 0000'da ise her iki grup arasında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 12. ve Tablo 5.).



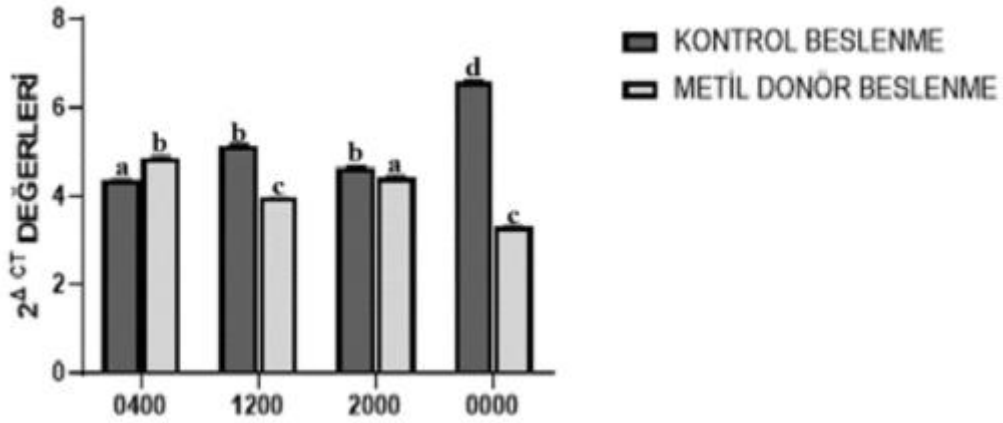
Şekil 13. Normal ve Metil Donör diyetle maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* bireylerin 8L kısa fotoperiyoda ait **Kisspeptin** gen regülasyon miktarları. Doku örnekleri ışıklar açıldığında (n=5)(12.00), gün ortasında (n=5) (16.00), ışıklar kapatıldığında (n=5) (20.00) ve gece yarısında (n=5) (04.00) olmak üzere dört farklı zamanda alındı ve üç tekrarlı çalışıldı. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. Farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (Dunn's post hoc testi, $p<0.05$).

Kısa fotoperiyota ait değerlere bakıldığında normal beslenen bireylerde ışıklar kapandığı 20.00 saatinde en yüksek Kiss1 gen regülasyonuna sahiptir. Metilce zengin beslenen bireylerde ise en yüksek aydınlık fazın orta saatine denk gelen 16.00'da en yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,05$)(Şekil 13 ve Tablo 5.).

Tablo 5

Normal ve Metil Donör diyete maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* bireylerin **16 L** ve **8L** fotoperiyoda ait **Kisspeptin** gen regülasyon miktarları.

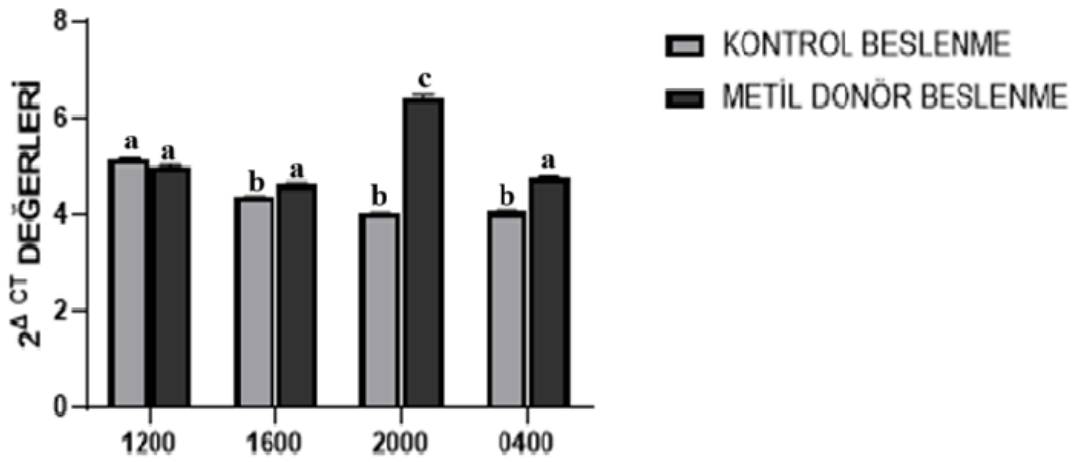
Dekapitasyon Zamanı	Uzun Fotoperiyot					Kısa Fotoperiyot				
	Saat	Kontrol Beslenme		Metil Donör Beslenme		Saat	Kontrol Beslenme		Metil Donör Beslenme	
		Ort.	Std.	Ort.	Std.		Ort.	Std.		
Işıklar açıldığında	04.00	12,38 ^a	0,07	10,91 ^b	0,03	12.00	3,37 ^a	0,01	3,77 ^b	0,01
Gün ortası	12.00	12,05 ^a	0,05	8,73 ^c	0,02	16.00	3,83 ^b	0,01	4,77 ^c	0,02
Işıklar kapandığında	20.00	7,85 ^d	0,02	49,56 ^e	1,51	20.00	4,1 ^d	1,17	3,98 ^b	0,01
Gece yarısı	00.00	9,03 ^c	0,06	8,55 ^c	0,02	04.00	3,52 ^a	0,01	3,44 ^a	0,01



Şekil 14. Normal ve Metil Donör diyete maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* bireylerin **16L** uzun fotoperiyoda ait **GPR54** gen regülasyon miktarları. Doku örnekleri ışıklar açıldığında (n=5)(04.00), gün ortasında (n=5) (12.00), ışıklar kapatıldığında (n=5) (20.00) ve gece yarısında (n=5) (00.00) olmak üzere dört farklı zamanda alındı ve üç tekrarlı çalışıldı. Değerler ortalama ±standart sapma olarak gösterildi. Farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (Dunn's post hoc testi, p<0.05).

Elde edilen verilere bakıldığında hem zamana bağlı hem de beslenme düzenine göre GRP54 gen regülasyon sonuçları arasında istatistiksel farklar değerlendirildi (p<0.05). Normal beslenen bireylerde gün ortası (12.00) ve ışıkların kapatıldığı (20.00) zaman dilimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmesine de bu değerler ile ışıkların açıldığı (04.00) ve gece yarısı (00.00) örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir

farklılık görüldü ($p<0.05$). Metilce zengin beslenen bireylerde ise gün ortası (12.00) ve gece yarısı (00.00) arasında anlamlı bir fark görülmezken ($p>0.05$) günün diğer zaman dilimlerine göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu ($p<0.05$). En yüksek değer normal beslenen bireylerde karanlık fazın orta saatine denk gelen 00.00 saatinde görülmektedir (Şekil 14. ve Tablo 5.).



Şekil 15. Normal ve Metil Donör diyete maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* bireylerin 8L kısa fotoperiyoda ait **GPR54** gen regülasyon miktarları. Doku örnekleri ışıklar açıldığında ($n=5$)(12.00), gün ortasında ($n=5$) (16.00), ışıklar kapatıldığında ($n=5$) (20.00) ve gece yarısında ($n=5$) (04.00) olmak üzere dört farklı zamanda alındı ve üç tekrarlı çalışıldı. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. Farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığını ifade etmektedir (Dunn's post hoc testi, $p<0.05$).

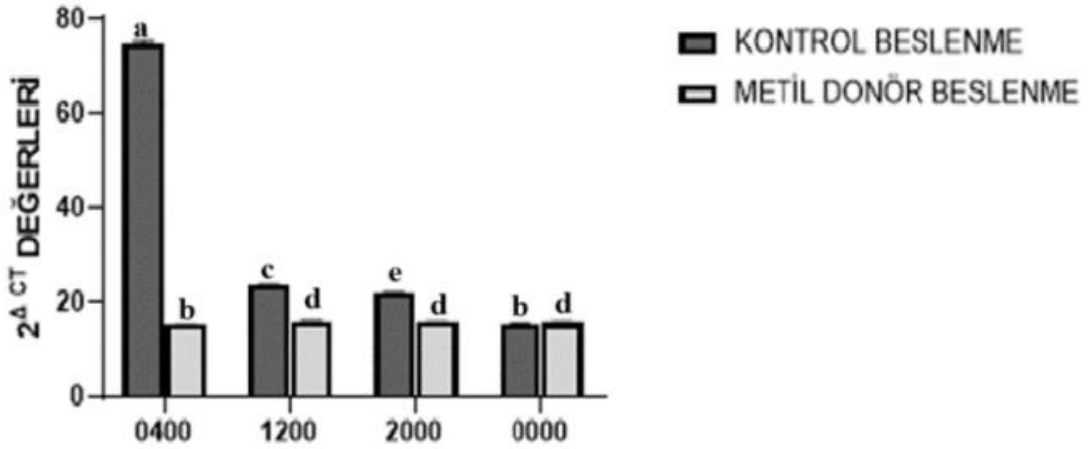
GPR54 değerinin kısa (8L) fotoperiyotta normal beslenen bireylerde ışıkların açıldığı (12.00) zaman dilimi istatistiksel olarak diğer zaman dilimlerinden yüksek ölçüldü ($p<0.05$), fakat diğer zamanlar arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$). Metilce zengin diyete tabi tutulan bireylerde ise ışıkların kapandığı zaman dilimi (20.00) anlamlı bir artış görülürken ($p<0.05$), diğer gruplarda fark bulunamadı ($p>0.05$) (Şekil 15.). Ayrıca GRP54

değerlerinde 16L-8L arasında Kisspeptin değerleri kadar çok farklılık görülmemektedir (Şekil 14.-15. ve Tablo 5.).

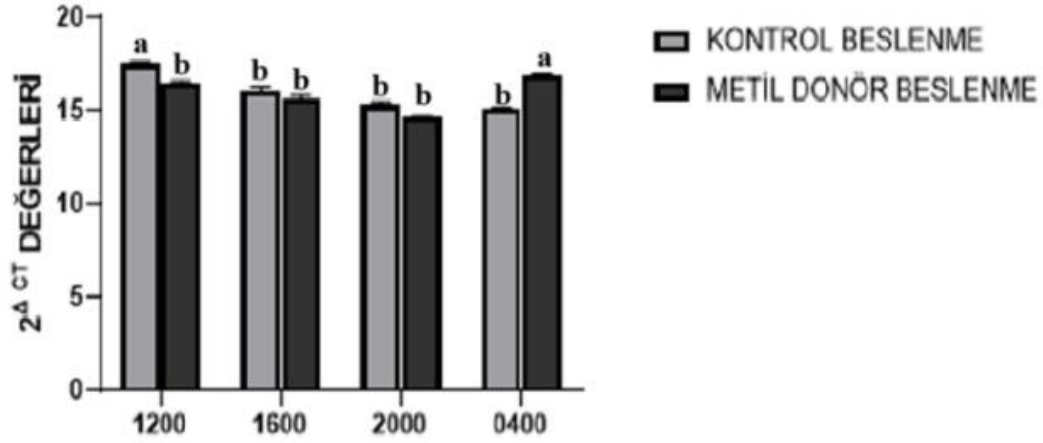
Tablo 6

Normal ve Metil Donör diyetle maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* bireylerin **16 L** ve **8L** fotoperiyoda ait **GRP54** gen regülasyon miktarları.

Dekapitasyon Zamanı	Uzun Fotoperiyot					Kısa Fotoperiyot				
	Saat	Kontrol Beslenme		Metil Donör Beslenme		Saat	Kontrol Beslenme		Metil Donör Beslenme	
		Ort.	Std.	Ort.	Std.		Ort.	Std.	Ort.	Std.
Işıklar açıldığında	04.00	4,36 ^a	0,01	4,88 ^b	0,02	12.00	5,15 ^a	0,01	4,98 ^a	0,02
Gün ortası	12.00	5,16 ^b	0,01	3,96 ^c	0,01	16.00	4,34 ^b	0,02	4,61 ^a	0,02
Işıklar kapandığında	20.00	4,65 ^b	0,02	4,45 ^a	0,02	20.00	4,02 ^b	0,01	6,44 ^c	0,05
Gece yarısı	00.00	6,59 ^d	0,03	3,30 ^c	0,01	04.00	4,06 ^b	0,03	4,76 ^a	0,01



Şekil 16. Normal ve Metil Donör diyetle maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* bireylerin **16L** uzun fotoperiyoda ait **RFRP** gen regülasyon miktarları. Doku örnekleri ışıklar açıldığında (n=5)(04.00), gün ortasında (n=5) (12.00), ışıklar kapatıldığında (n=5) (20.00) ve gece yarısında (n=5) (00.00) olmak üzere dört farklı zamanda alındı ve üç tekrarlı çalışıldı. Değerler ortalama ±standart sapma olarak gösterildi. Farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (Dunn's post hoc testi, p<0.05).



Şekil 17. Normal ve Metil Donör diyete maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* bireylerin **8L** kısa fotoperiyoda ait **RFRP** gen regülasyon miktarları. Doku örnekleri ışıklar açıldığında (n=5)(12.00), gün ortasında (n=5) (16.00), ışıklar kapatıldığında (n=5) (20.00) ve gece yarısında (n=5) (04.00) olmak üzere dört farklı zamanda alındı ve üç tekrarlı çalışılmıştır. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. Farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (Dunn's post hoc testi, $p<0.05$).

Kısa fotoperiyotta ise normal beslenen bireylerde ışıklar açıldığında (12.00) istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülürken ($p<0,05$), metilce zengin diyete tabi tutulan bireylerde gece yarısına (04.00) tekabül eden zaman diliminde anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0.05$). Uzun fotoperiyotta en yüksek değer $74,80\pm0,61$ iken en düşük $15,21\pm0,09$ olarak ışıkları açıldığı saatte görülmektedir. Kısa fotoperiyotta ise en yüksek $17,50\pm0,12$ değeri ile normal beslenen bireylerde ışıkların açıldığı saatte görülürken en düşük değer $14,7\pm0,04$ ile ışıkların kapandığı saatte metilce zengin beslenen bireylere aittir (Tablo 7. ve Şekil 16.-17.).

Tablo 7

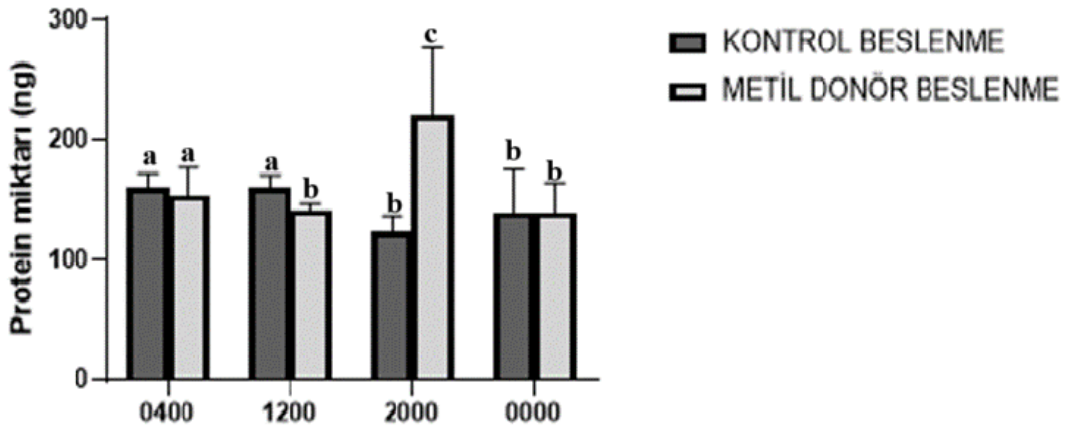
Normal ve Metil Donör diyete maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* bireylerin **16 L** ve **8L** fotoperiyoda ait **RFRP** gen regülasyon miktarları.

Dekapitasyon Zamanı	Uzun Fotoperiyot					Kısa Fotoperiyot				
	Saat	Kontrol Beslenme		Metil Donör Beslenme		Saat	Kontrol Beslenme		Metil Donör Beslenme	
		Ort.	Std.	Ort.	Std.		Ort.	Std.	Ort.	Std.
Işıklar açıldığında	04.00	74,80 ^a	0,57	15,21 ^b	0,08	12.00	17,51 ^a	0,12	16,48 ^b	0,11
Gün ortası	12.00	23,58 ^c	0,12	15,86 ^d	0,09	16.00	16,11 ^b	0,15	15,67 ^b	0,13
Işıklar kapandığında	20.00	21,85 ^e	0,19	15,74 ^d	0,07	20.00	15,29 ^b	0,15	14,64 ^b	0,04
Gece yarısı	00.00	15,29 ^b	0,23	15,66 ^d	0,08	04.00	15,05 ^b	0,11	16,84 ^a	0,12

4.7. ELİSA Gen Spesifik Protein Miktarları

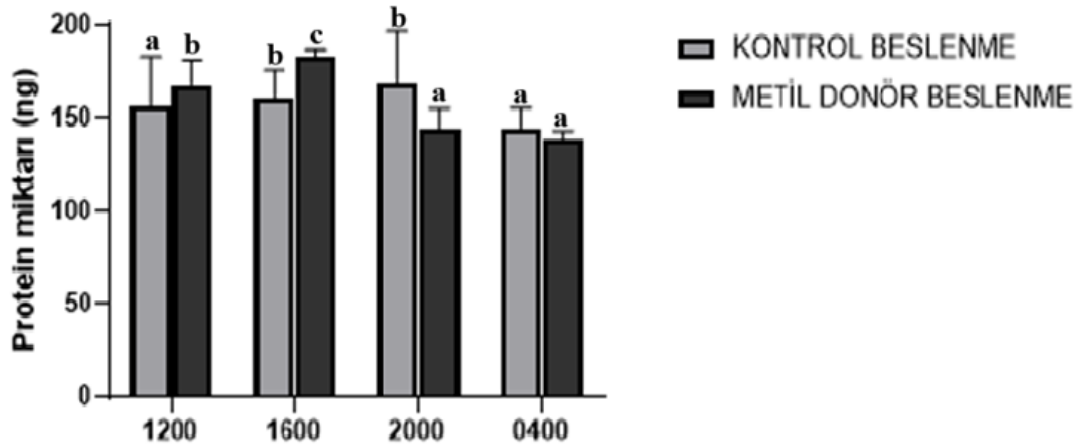
Tüm gen regülasyon değişimlerinin protein içeriğine etkisinin gözlenmesi için ELİSA yöntemi kullanılarak protein miktarları ölçülmüştür. Özel kitler kullanılarak ölçülen gen spesifik proteinlerin miktarları Tablo 8.-10. ve Şekil 18.-23. arası gösterildi.

Uzun (16L) fotoperiyotta normal beslenen bireylerde ışıkların açık olduğu 04.00 ve 12.00 saatlerinde alınan örneklerde 20.00 ve 00.00 saatlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik görülmektedir ($p<0.05$). Bununla birlikte en yüksek protein miktarının metilce zengin diyete tabi tutulan 20.00 örneklerinin en yüksek değeri gösterdiği tesbit edildi ($p<0.05$). (Tablo 8. ve Şekil 18.).



Şekil 18. Normal ve Metil Donör diyetle maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* bireylerin **16L** uzun fotoperiyoda ait **Kisspeptin** protein miktarı. Doku örnekleri ışıklar açıldığında (n=5)(04.00), gün ortasında (n=5) (12.00), ışıklar kapatıldığında (n=5) (20.00) ve gece yarısında (n=5) (00.00) olmak üzere dört farklı zamanda alındı ve üç tekrarlı çalışıldı. Değerler ortalama ±standart sapma olarak gösterildi. Farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (Dunn's post hoc testi, p<0.05).

Kısa (8L) fotoperiyotta ise kisspeptin protein miktarları normal beslenen bireylerde ışıkların açılma saati olan 12.00 ve gece yarısına tekabül eden 04.00 saatlerinde istatistiksel olarak daha düşük görüldü. Metilce zengin diyetle beslenen bireylerde ise ışığın var olduğu 12.00 ve 16.00 saatlerinde ışığın olmadığı saatlere nispeten istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek görüldü (Tablo 8.).



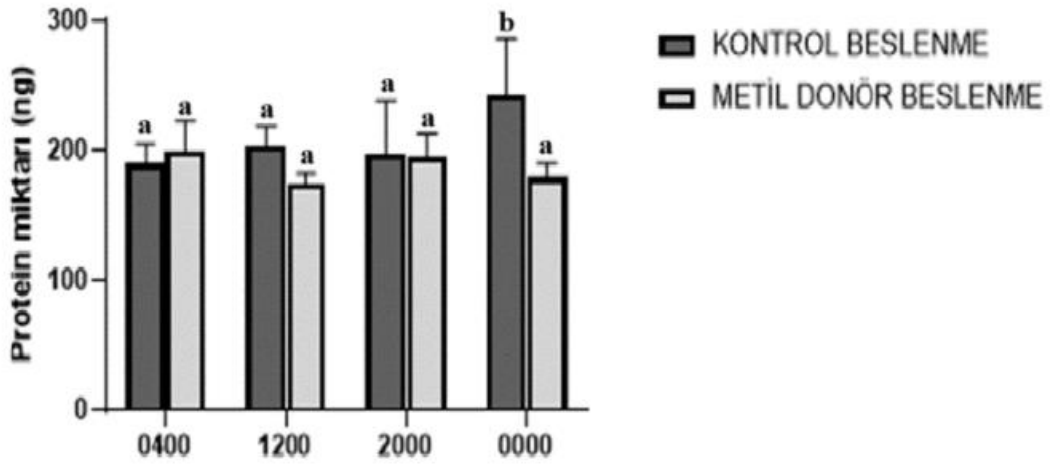
Şekil 19. Normal ve Metil Donör diyete maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* bireylerin **8L** kısa fotoperiyoda ait **Kisspeptin** protein miktarları. Doku örnekleri ışıklar açıldığında (n=5)(12.00), gün ortasında (n=5) (16.00), ışıklar kapatıldığında (n=5) (20.00) ve gece yarısında (n=5) (04.00) olmak üzere dört farklı zamanda alındı ve üç tekrarlı çalışıldı. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. Farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (Dunn's post hoc testi, $p < 0.05$).

Tablo 8

Normal ve Metil Donör diyete maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* bireylerin **16 L** ve **8L** fotoperiyoda ait **Kisspeptin** protein miktarları.

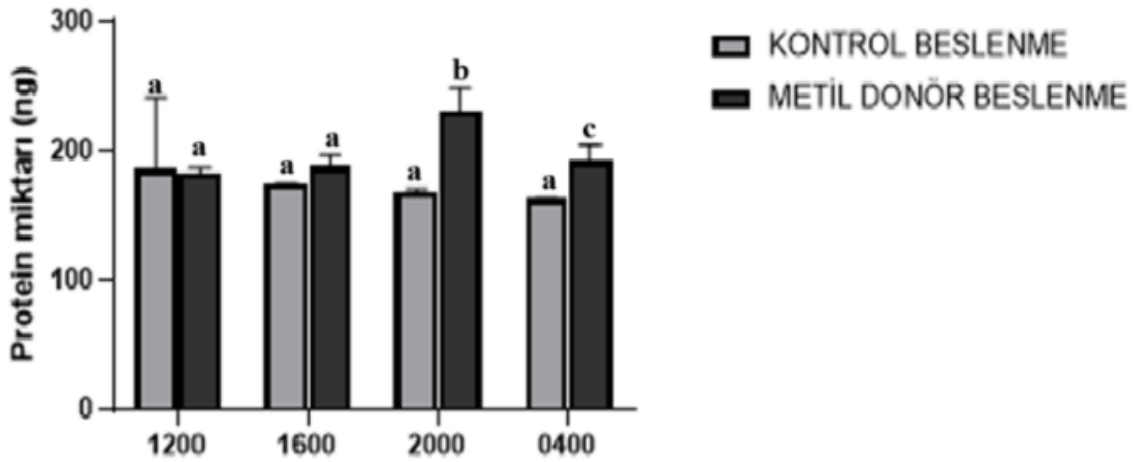
Dekapitasyon Zamanı	Uzun Fotoperiyot					Kısa Fotoperiyot				
	Saat	Kontrol Beslenme		Metil Donör Beslenme		Saat	Kontrol Beslenme		Metil Donör Beslenme	
		Ort.	Std.	Ort.	Std.		Ort.	Std.	Ort.	Std.
Işıklar açıldığında	04.00	159,18 ^a	10,26	153,14 ^a	19,60	12.00	156,65 ^a	21,29	168,056 ^b	10,54
Gün ortası	12.00	159,61 ^a	7,49	140,87 ^b	4,22	16.00	160,61 ^b	10,77	182,97 ^c	2,59
Işıklar kapandığında	20.00	123,06 ^b	10,64	219,53 ^c	41,10	20.00	169,27 ^b	22,47	143,75 ^a	9,42
Gece yarısı	00.00	138,07 ^b	26,41	138,09 ^b	17,98	04.00	144,21 ^a	7,90	137,84 ^a	3,44

16L ışığa maruz kalan bireylerde, metilce zengin diyetle beslenen bireylerde GPR54 protein miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Normal beslenen bireylerde ise gece yarısına tekabül eden zaman diliminde (04.00) istatistiksel olarak bir artış görüldü (Tablo 9. ve şekil 20.) .



Şekil 20. Normal ve Metil Donör diyetle maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* bireylerin **16L** uzun fotoperiyoda ait **GRP54** protein miktarı. Doku örnekleri ışıklar açıldığında (n=5)(04.00), gün ortasında (n=5) (12.00), ışıklar kapatıldığında (n=5) (20.00) ve gece yarısında (n=5) (00.00) olmak üzere dört farklı zamanda alındı ve üç tekrarlı çalışıldı. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. Farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (Dunn's post hoc testi, $p < 0.05$).

Kısa (8L) periyotta ise normal beslenen bireyler arasında GPR54 protein miktarı istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken ($p > 0.05$), metilce zengin besin tüketen gruplarda ışıkların kapalı olduğu 20.00 ve 04.00 zaman dilimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p < 0.05$) (Tablo 9. ve Şekil 21.).



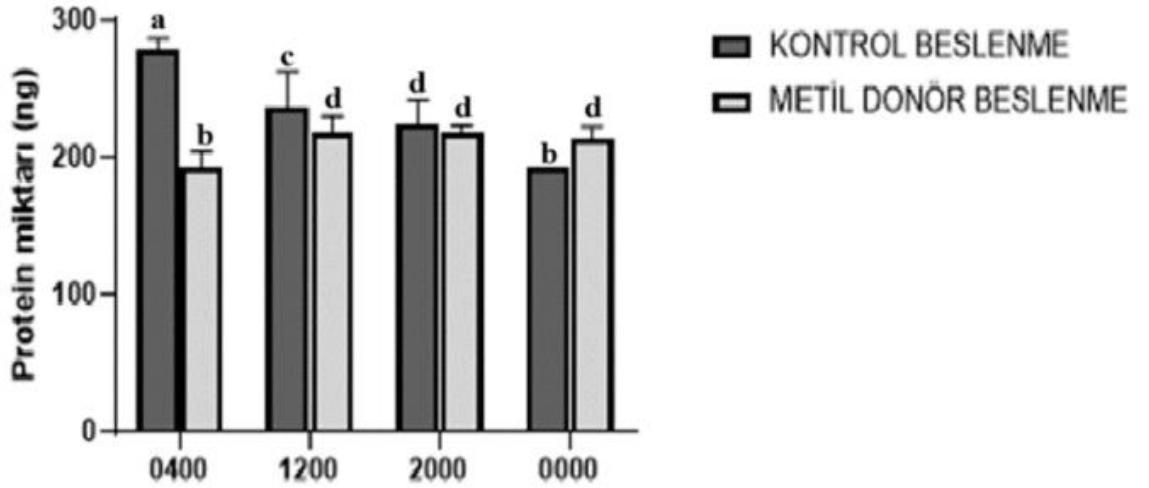
Şekil 21. Normal ve Metil Donör diyete maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* bireylerin **8L** kısa fotoperiyoda ait **GRP54** protein miktarı. Doku örnekleri ışıklar açıldığında (n=5)(12.00), gün ortasında (n=5) (16.00), ışıklar kapatıldığında (n=5) (20.00) ve gece yarısında (n=5) (04.00) olmak üzere dört farklı zamanda alındı ve üç tekrarlı çalışıldı. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. Farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (Dunn's post hoc testi, $p < 0.05$).

Tablo 9

Normal ve Metil Donör diyete maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* bireylerin **16 L** ve **8L** fotoperiyoda ait **GRP54** protein miktarları.

Dekapitasyon Zamanı	Uzun Fotoperiyot					Kısa Fotoperiyot				
	Saat	Kontrol Beslenme		Metil Donör Beslenme		Saat	Kontrol Beslenme		Metil Donör Beslenme	
		Ort.	Std.	Ort.	Std.		Ort.	Std.	Ort.	Std.
Işıklar açıldığında	04.00	189,83 ^a	12,38	198,33 ^a	20,07	12.00	185,72 ^a	45,12	182,20 ^a	3,70
Gün ortası	12.00	202,51 ^a	11,37	173,47 ^a	6,40	16.00	173,87 ^a	0,35	187,89 ^a	6,38
Işıklar kapandığında	20.00	197,45 ^a	33,65	194,91 ^a	14,64	20.00	167,55 ^a	1,8	229,58 ^b	15,76
Gece yarısı	00.00	242,37 ^b	31,01	179,34 ^a	7,96	04.00	162,91 ^a	0,31	191,78 ^c	8,99

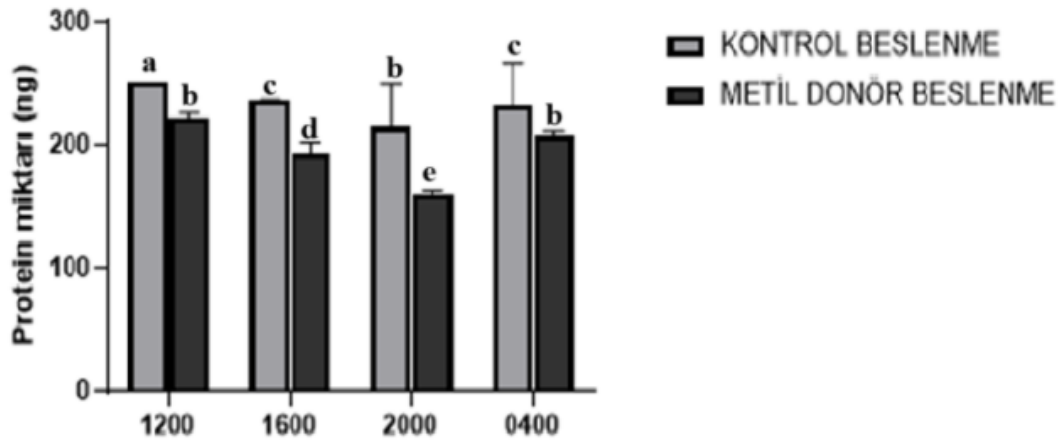
Uzun (16L) fotoperiyotta, RFRP protein seviyeleri normal beslenen bireylerde ışıkların açılmasından gece yarısına kadar olan süre içinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalış gösterdi ($p<0.05$). Farklı gruplar arasında da anlamlı istatistiksel farklılıklar gözlemlendi ($p<0.05$). Metilce zengin beslenen grupta ise ışıkların açıldığı saatte (04.00) en düşük protein seviyeleri ölçüldü ($p<0.05$) (Tablo 10. ve Şekil 22.).



Şekil 22. Normal ve Metil Donör diyetle maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* bireylerin 16L uzun fotoperiyoda ait RFRP protein miktarı. Doku örnekleri ışıklar açıldığında (n=5)(04.00), gün ortasında (n=5) (12.00), ışıklar kapatıldığında (n=5) (20.00) ve gece yarısında (n=5) (00.00) olmak üzere dört farklı zamanda alındı ve üç tekrarlı çalışıldı. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. Farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (Dunn's post hoc testi, $p<0.05$).

Kısa (8 saat) fotoperiyotta, normal beslenen bireylerde gün ortası ve gece yarısı arasında RFRP protein seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$). Ancak, bu iki zaman dilimi ile ışıkların açılış ve kapanış zamanları arasında anlamlı farklılıklar bulundu ($p<0.05$). Metilce zengin diyetle beslenen bireylerde, ışıkların açıldığı (12.00) saat ile gece yarısı (04.00) arasında RFRP protein seviyelerinde anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0.05$). Bununla birlikte, gün ortası (16.00) ile ışıkların kapalı

olduğu saat (20.00) arasında anlamlı bir düşüş gözlemlendi ($p<0.05$) (Tablo 10. ve Şekil 23.).



Şekil 23. Normal ve Metil Donör diyete maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* bireylerin **8L** kısa fotoperiyoda ait **RFRP** protein miktarı Doku örnekleri ışıklar açıldığında (n=5)(12.00), gün ortasında (n=5) (16.00), ışıklar kapatıldığında (n=5) (20.00) ve gece yarısında (n=5) (04.00) olmak üzere dört farklı zamanda alındı ve üç tekrarlı çalışıldı. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. Farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (Dunn's post hoc testi, $p<0.05$).

Tablo 10

Normal ve Metil Donör diyete maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* bireylerin **16 L** ve **8L** fotoperiyoda ait **RFRP** protein miktarları.

Dekapitasyon Zamanı	Uzun Fotoperiyot					Kısa Fotoperiyot				
	Saat	Kontrol Beslenme		Metil Donör Beslenme		Saat	Kontrol Beslenme		Metil Donör Beslenme	
		Ort.	Std.	Ort.	Std.		Ort.	Std.	Ort.	Std.
Işıklar açıldığında	04.00	277,53 ^a	7,61	251,85 ^b	0,01	12.00	192,95 ^a	9,39	156,65 ^b	21,30
Gün ortası	12.00	236,34 ^c	21,30	236,47 ^d	0,19	16.00	217,68 ^c	9,93	160,61 ^d	10,77
Işıklar kapandığında	20.00	223,67 ^d	14,88	214,76 ^d	28,58	20.00	217,173 ^b	4,80	169,27 ^c	22,48
Gece yarısı	00.00	192,12 ^b	0,03	232,42 ^d	27,84	04.00	213,78 ^c	7,07	144,21 ^b	7,90

4.8. Tartışma

Çevresel faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösteren epigenetik regülasyonlar büyüme, gelişme ve hastalık risklerinde regüle edici eleman olarak karşımıza çıkmaktadır (Faulk ve Dolinoy, 2011). Fotoperiyot ve beslenme şekli çevresel faktörlerin en önemli ikisini oluşturmaktadır. Bu çalışma kapsamında her iki parametre de ele alındı.

Suriye hamsteri fotoperiyottan etkilenecek testis kompozisyonunu mevsimsel olarak düzenleyen model bir organizmadır (Stetson ve Watson Whitmyre, 1976; Morales vd., 2007, Pastor vd., 2011, Crosnoe ve Kim, 2013). Gün uzunluğunun 12.5 saatin altına düştüğü dönemde testislerde spermatogenezis, steroidogenezis, sperm kalitesi ve testis ağırlığı gibi parametrelerde değişim gözleendiğinden dolayı yeniden düzenlemeye gidilir (Gündüz ve Stetson, 1994; Jin vd., 2002; Morgan vd., 2003; Butler vd., 2008, Morgan ve Shannonhouse, 2014). Kısa fotoperiyodun başlangıcından 3 hafta sonra testesteron sekresyonunda azalma görülürken altıncı haftadan itibaren atrofi başlamaktadır, sekizinci haftadan itibaren ise testis morfolojisi ve fonksiyonlarında gözle görülür değişimler meydana gelmektedir (Butler vd., 2008; Nelson ve Zucker, 1987). Çalışma sonucunda elde edilen veriler literatürü destekler niteliktedir (Şekil 5.). Kısa fotoperiyotta yapacağımız çalışmaların güvenilirliği açısından hayvanların kısa fotoperiyoda tam adapte olduklarının delili olan testislerdeki küçülme, bu çalışmamızda da gerçekleşmiş olup, bu hayvanlar deneye alındı.

Epigenetik mekanizmalar çevresel faktörlerin değişimlerine bağlı olarak düzenlenmektedir (Szyf ve Bick, 2012). DNA metilasyonu sadece yaşamın erken evrelerinde değişmekle sınırlı kalmayıp günlük sirkadiyen ritimle birlikte de değişimler göstermektedir. Bu fenomene göre epigenomun statik bir yapı olmadığı, aksine, çevresel faktörlere göre duyarlı ve uyarılabilir bir mekanizma olduğu savunulmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu ritmik değişimlerin, fizyolojik ve metabolik faaliyetlerin düzenlenmesinde rol alan Clock genlerin ekspresyon düzenlenmesinde etkili olduğu öne sürülmektedir (Wang ve Zhou, 2021; LaSalle vd., 2013).

Suriye hamsterlerinde vücut ağırlığındaki değişimler fotoperiyot tarafından kontrol edildiğinden, bu ve benzeri birçok türde de şişmanlık görülmemektedir. Ancak *M. auratus*'da vücut ağırlığı düzenleme mekanizmaları henüz net olarak aydınlatılamamıştır. Güçlü fotoperiyodik özellikler sergileyen Suriye hamsterlerinde, vücut ağırlığı ve yağ içeriği fotoperiyot tarafından düzenlenir (Czyba, 1968). Çalışmamızda kısa fotoperiyotlarda, Suriye

hamsterleri vücut ağırlıklarını uzun fotoperiyoda göre arttırmamıştır. Bunun başlıca nedeni deneysel çalışmamız 2 ay ile sınırlı olduğundandır. Ağırlık artışları genelde 6. Aydan sonra başlamaktadır.

Şekil 6. ve Şekil 7. birlikte değerlendirildiğinde bireylerin mevsime bağlı olarak ağırlıklarının arttığı görülmektedir. Değişen vücut kitlesine bağlı yem yeme kapasitesi de doğru orantılı bir biçimde artış gösterdi. Karakaş ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları çalışmada, yem yeme kapasitesinin bireylerin boyutları ile doğru orantılı olduğunu bildirmektedir. Çalışmamız bu hipotezi destekler niteliktedir. Suriye hamsteri ile yapılan çalışmalarda fotoperiyoda bağlı olarak birçok adaptasyon cevabı oluşturulmaktadır (Hoffman vd., 1965; Smit ve Smit-Vis, 1969; Figala vd., 1973; Rosen, 1973; Gordon vd., 1986; Ithinji vd., 2022). Bu ritmik değişimler metabolizmal faaliyetler ile senkronize bir şekilde gerçekleştiğinden dolayı akıllara gen anlatımının entegrasyonunda görev alabileceğini getirmektedir (LaSalle vd., 2013; Wang ve Zhou, 2021).

Metilce zengin besinin içeriği normal yeme göre biraz daha farklı olması, iştah uyarıcı hormonlar ile büyüme hormonlarının orantısız çalışması nedeniyle yüksek olabilir. Hem insanlar hem de hayvanlar üzerinde yapılmış çalışmalarda genç yaşta metilce zengin bir diyetle beslenen bireylerin gelişimsel fonksiyonlarının olumlu yönde etkilendiği görülmüştür (Ishii vd., 2014; Paternain vd., 2016; Ryan vd., 2018; Sahaa vd., 2019; Irvine vd., 2022).). Diğer taraftan Gündüz ve Okimoto'nun 2021 yılında yaptıkları bir çalışmada ise hamilelik döneminde metil döner beslenme yapılan hayvanların yavruları ile normal beslenen hamile hayvanın yavruları doğumdan sonra yer değiştirildiğinde, her bir deney grubunun vücut ağırlıkları benzer görülmüştür. Bu durum türden türe değişse de, özellikle melatonin ve leptin hormonları ile yakın ilişkilidir. Özellikle beslenme ile olan ilişkisi nedeniyle leptin hormonunun aktif olduğu dönem önemlidir.

Metilasyon seviyeleri, ortamda bulunan metil donörleri ve metil transferaz enzimlerinin varlığına bağlı olarak değişir. Uygulanan diyet DNA metiltransferaz aktivitesini düzenleyebilir. Çalışma kapsamında her iki fotoperiyotta da ışıklar kapandığında metilasyon miktarı arttığı görülmüştür (Tablo 4. ve Şekil 8.-9.). Xia ve arkadaşlarının 2015 yılında fareler üzerinde yaptıkları çalışmada karaciğer dokusundaki metilasyon seviyeleri ışıklar kapandığında ve karanlık fazda pik yaptığı görüldü. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler literatür bilgisiyle uyumaktadır. Hipermetilasyon durumlarında CpG bölgeleri metillenerek kapandığından gen anlatımı da kapanmaktadır (Mathers,2007). Suriye

hamsterinin nokturnal canlılar olduğu göz önünde bulundurularak hangi gen bölgelerinin kapatıldığı henüz bilinmemektedir.

Hipometilasyon, onkogenezin tanınmasında kullanılıyor olsa da hipermetilasyon için tam tersidir demek mümkün değildir. Hipermetilasyonun, tümör supressör genlerde ya da herhangi bir anlatım bölgesinin promotorunda olup olmaması önemli bir unsurdur (Kulis ve Esteller, 2010). Hipometilasyon üzerine birçok çalışma olsa da hipermetilasyon mekanizmasını açıklayan çalışmalar oldukça azdır. Metil donörü ögeleriyle zengin besinler birçok metabolizmal faaliyet gösteren enzimlerin oluşumunda farklılıklar oluşmasına sebebiyet verebilir (Samadien vd., 2019). Ayrıca homöostainin metiyonine dönüşümünde oluşan tek karbon metilasyonu sonucu hiperhomosisteinemia oluşabilir. Bu da metabolizmada defektler oluşturmaktadır (Forman vd., 2005). 2007 yılında Bönsch ve ekibinin otuz öğrenci (15 kız, 15 erkek) yaptıkları çalışmada total genom metilasyonunun gece daha yüksek olduğu, erkeklerde de dişilere göre yüksek olduğu görülmüştür. Plazma homosistein düzeylerinin de incelendiği araştırma ile verilerimiz oldukça benzerlik göstermektedir. Metilce zengin bir diyet uygulanan bireylerde ergenlik çağında gecikme olmaktadır bunun yanı sıra çiftleşme esnasında beklenen verimde azalma görülmektedir fakat oluşan yeni döllerin yaşam kalitesinin arttığı gözlenmiştir (Kohguchi vd., 2004).

Her içerik farklı bir enzim ya da hormonu etkilese de çalışmalar metilce zengin besinlerin metabolizmada etkili olduğunu göstermektedir (Tamai vd., 2011; Wu vd., 2020; Villatoro-Santos vd., 2020). Tüm bunlar birlikte değerlendirildiğinde; metilce zengin besinler ve fotoperiyot gibi çevresel faktörler Suriye hamsterlerinde üreme sağlığı dahil birçok mekanizmayı etkilemektedir diyebiliriz. İlerleyen çalışmalarda, epigenetik değişimlerin gen spesifik düzeyde incelenmesi planlanmaktadır.

Kisspeptin ve reseptör sistemi, olgun bir yumurtanın gelişiminde kritik bir rol oynadığı ve doğurganlığa katkıda bulunduğu yumurtalık gibi diğer organlarda da bulunur (Padda vd., 2021). Kisspeptin, fizyolojik rollerine ek olarak, polikistik over sendromu ve hiperprolaktinemi ile ilişkili kısırlık sorunları gibi patolojik durumlarda da rol oynadığı gösterilmiştir (Padda vd., 2021). Hipogonadizm ve erken ergenlik gibi durumların yönetimi için kisspeptin analogları ve antagonistlerinin kullanılmasına yönelik gelecekte beklentiler vardır ve kisspeptinin bir hastalık belirtici olarak potansiyel kullanımını değerlendirmek için çalışmalar yürütülmektedir (Padda vd., 2021). Önceki çalışmalar, *Mesocricetus auratus*'un hipotalamusunda Kiss1 ve GPR54 ekspresyonunun fotoperiyot tarafından modüle edildiğini,

daha uzun fotoperiyotların daha yüksek ekspresyon seviyeleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Franssen ve Tena-Sempere, 2018, Balkan, 2023). Çalışmamızda elde edilen bulgular da bu bilgiyi destekler niteliktedir (Tablo 5. ve Şekil 12.-13.).

GnRH salınımının düzenlenmesi, GPR54 ve kisspeptin sistemlerinin fonksiyonel sinyalleşmesine bağlıdır (de Roux vd., 2003; Seminara vd., 2003; Topaloglu vd., 2012). Kisspeptin, Kiss1 geni tarafından üretilen ve özellikle puberte ile ovulasyon gibi üreme süreçlerinde önemli rol oynayan bir nörohormondur. Kisspeptinin etkisi, GnRH üreten hücrelerde bulunan Kiss1R (veya GPR54) reseptörleri aracılığıyla gerçekleşir. Bu reseptörlerin aktivasyonu, hipotalamik-hipofizer-gonadal aksı modüle ederek ovülasyon ve ergenlik gibi üreme işlevlerini etkiler (d'Anglemont de Tassigny ve Colledge, 2010).

Diğer iki hipotalamik nöropeptit olan kisspeptin ve RFamide ailesinden olan gonadotropin inhibe edici hormonun (GnIH) üreme fonksiyonları üzerine anahtar rol oynadığı bulunmuştur (Mason vd., 2007; Simonneaux vd., 2013). Bu tez çalışmasında, GnIH (RFRP-3) mRNA seviyelerinin, ışığa bağımlı olduğu belirlenmiştir (Tablo 7. ve Şekil 16.-17.). Deney gruplarında ise mRNA seviyesinin aydınlık fazda en yüksek olduğu belirlenmiştir. İnsan RFRP geni, GnIH peptidinin gonadotropin sekresyonu üzerindeki inhibitör aktivitesi ile ilişkili olan kuş GnIH genine ortologdur (Tsutsui vd., 2000; Johnson vd., 2007). Memelilerde GnIH, GnRH nöronları yoluyla dolaylı olarak gonadotropin salınımını etkileyebilir. Suriye hamsteri de dahil olmak üzere birçok kemirgen çalışmasında, bu sinirlerin bağlandığı GnRH hücrelerinin sayısına kıyasla, medyan eminensin dış tabakasında çok az GnIH-immunreaktif hücre bulunmuştur (Johnson vd., 2007). Memelilerde RFRP-3 geni mediobasal hipotalamusta bulunan nöronlarda ifade olmaktadır (Kriegsfeld vd., 2006; Revel vd., 2008).

Fotoperiyot, melatonin ve RFRP arasındaki ilişki karmaşık ve dinamiktir. Kış aylarında yaşananlar gibi kısa fotoperiyotlarda melatonin salgılanması artar ve bu da üreme fonksiyonunun baskılanmasına yol açar (Erratum, 1997). Tersine, ilkbahar ve yaz aylarındaki daha uzun fotoperiyotlar melatonin salgılanmasının azalması ve RFRP ekspresyonunun artmasıyla ilişkilidir ve sonuçta gonadotropin salınımını uyarır ve üreme aktivitesini destekler (Kinch vd., 1986).

Kisspeptinin ritmik salınımının GnRH ile olan ilişkisinin gerçek zamanlı gösteriminde genelde LH hormonunun da ki artış ya da azalışa göre bir ilişki ortaya konmakla

beraber bizim çalışmamızda LH ölçümü yapılmadığı için bu durumu göz önüne almadık. Balkan (2023) yaptığı tez çalışmasında pinealektomi aracılığı ile melatonin uzaklaştırılmasının bu sonuçları verdiği, melatonin verilmesi ile doğrulanmayı beklemektedir. Melatonin Kiss1'i düzenliyorsa, 57 melatoninin doğrudan Kisspeptin nöronları üzerinde, ara hedefler (nöronlar) aracılığıyla mı yoksa her ikisi aracılığıyla mı etki ettiğini belirlemek önemli olduğunu vurgulamaktadır.

Suriye hamsterinin fotoperiyottaki değişikliklere doğru şekilde yanıt verme yeteneği, üreme davranışlarını optimum çevre koşullarıyla senkronize etmek için kritik öneme sahiptir. Ancak iklim değiştikçe bazı türlerin fotoperiyodik yanıtlarında genetik bir değişim yaşadığına dair kanıtlar vardır ve bu da üreme döngüleri ile mevsimsel çevre arasında bir uyumsuzluğa yol açabilir (Bradshaw ve Holzapfel, 2001).

Çalışmamızda KISS1, KISS1-R ve RFRP gen regülasyonlarının yanı sıra protein ifadeleri gün içerisindeki değişimlerini araştırmanın yanı sıra global DNA 5mC metilasyon yüzdeleri de gösterilmiştir. Bu alanda sınırlı sayıda çalışma olması nedeniyle kesin ifadeler kullanmak çok mümkün olmamakla birlikte memeli türlerinde çok sayıda elde edilen kanıt, GnIH ve kisspeptin'in HPG ekseninin kilit birer düzenleyicileri olduğunu göstermektedir. Bugüne kadar incelenen tüm türlerde, doğrudan veya dolaylı kanıtlar GnIH ve kisspeptin'in GnRH sistemi seviyesinde ve hipofiz gonadotropoları üzerinde bir rolü olduğunu düşündürmektedir.

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda farklı fotoperiyotlarda, normal ve metilce zengin diyetle maruz bırakılan *Mesocricetus auratus* türünde hipofizial gonadal eksen üzerinde yer alan KİSS1, KİSS1-R ve RFRP genlerinin ekspresyon düzeyleri gen regülasyonu üzerinden hesaplanmıştır. Beraberinde bu gen bölgelerinin ifadesi olan protein miktarlarına da bakılmıştır. Ayrıca epigenetik düzeyde global DNA metilasyon yüzdelerine de bakılmıştır. Deney düzenine göre günün dört farklı zaman diliminde örnekler birbiri ile karşılaştırılmıştır.

Mevsimsel değişimin hem gen ekspresyonları (KİSS1, KİSS1-R ve RFRP) üzerinde etkili olduğu hem de epigenetik düzeyde DNA metilasyonunu etkilediği görülürken, gün içindeki ışık-karanlık etkileşimleri de oldukça farklılık göstermektedir. Bu durumun ana nedenleri hakkında literatürde boşluklar görülmektedir. Bu açığın kapatılabilmesi için CLOCK genleri ile birlikte bakılacak gen bölgelerinin epigenetik düzeyde değişimlerinin gösterilmesi gibi daha ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Ayrıca 5mC global DNA metilasyon yüzdesi bakılan bu deney düzeninde, araştırılması planlanan her bir gen bölgesi de bisülfid yöntemiyle teker teker metilasyonun gen düzeyindeki yüzdeleri araştırılabilir. Ayrıca bu çalışmanın devamında HPG ekseninde yer alan tüm hormonlar ve protein ifadelerinin de ilerideki yapılacak çalışmalara dahil edilmesi planlanmaktadır.

KAYNAKÇA

- Ancel, C., Bentsen, A. H., Sébert, M. E., Tena-Sempere, M., Mikkelsen, J. D., Simonneaux, V. (2012). “Stimulatory effect of RFRP-3 on the gonadotrophic axis in the male Syrian hamster: the exception proves the rule”, *Endocrinology*, 153, 1352–1363.
- Ansel, L., Bentsen, A. H., Ancel, C., Bolborea, M., Klosen, P., Mikkelsen, J. D. (2011). “Peripheral kisspeptin reverses short photoperiod-induced gonadal regression in Syrian hamsters by promoting GnRH release”. *Reproduction* 142, 417–425.
- Bartness T.J., Wade G.N., (1984). “Photoperiodic Control of Body Weight and Energy Metabolism in Syrian Hamsters (*Mesocricetus auratus*), Role of Pineal Gland, Melatonin, Gonads and Diet”. *Endocrinology*, 114: 492–498.
- Booth, L. N.ve Brunet, A. (2016). “The Aging Epigenome”. *Molecular Cell*, 62 (5), 728-744.
- Bradshaw, W. E.ve Holzapfel, C. (2007). “Evolution of Animal Photoperiodism”. *Annual Review Of Ecology, Evolution, And Systematics*, 38 (2007), 1-25.
- Bronson, F. H. 1989. “Mammalian Reproductive Biology”, *University of Chicago Press: Chicago*,
- Butler, C. M., Shaw, G., Clark, J., & Renfree, M. B. (2008). “The functional development of Leydig cells in a marsupial”. *Journal of Anatomy*, 212(1), 55-66.
- Calvanese, V., Lara, E., Kahn, A.ve Fraga, M. F. (2009). “The role of epigenetics in aging and age-related diseases”. *Ageing Research Reviews*, 8 (4), 268-276.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2009.03.004>
- Cheung, H., Lee, T., Rennert, O. M.ve Chan, W. (2009). “DNA methylation of cancer genome”. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews*, 87 (4), 335-350.
- Clarke, H., Dhillon, W. S.ve Jayasena, C. (2015). “Comprehensive Review on Kisspeptin and Its Role in Reproductive Disorders”. *Endocrinology and Metabolism*, 30 (2), 124-141.
- Clarkson, J., d'Anglemont de Tassigny, X., Moreno, A. S., Colledge, W. H.ve Herbison, A. E. (2008). “Kisspeptin–GPR54 Signaling Is Essential for Preovulatory

- Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Activation and the Luteinizing Hormone Surge". *Journal of Neuroscience*, 28 (35), 8691-8697.
- d'Anglemont de Tassigny, X. ve Colledge, W. H. (2010). "The role of kisspeptin signaling in reproduction". *Physiology (Bethesda)*, 25 (4), 207-217.
- Das, M., Mohanty, S. R., Minocha, T., Mishra, N., Yadav, S. K. ve Haldar, C. (2022). "Circadian desynchronization in pregnancy of Golden hamster following long time light exposure: Involvement of Akt/FoxO1 pathway". *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 234, 112508-112508.
- Desplats P. A. (2015). "Perinatal programming of neurodevelopment: epigenetic mechanisms and the prenatal shaping of the brain". *Advances in Neurobiology*, 10, 335–361.
- Dhillon WS. (2008). "Kisspeptin: a novel regulator of reproductive function". *J Neuroendocrinol* 20:963–70.
- Díaz-Freije, E., Gestal, C., Castellanos-Martínez, S. ve Morán, P. (2014). "The role of DNA methylation on *Octopus vulgaris* development and their perspectives". *Frontiers in Physiology*, 5 (2014), 1-7.
- Elliott, J. A. (1976). "Circadian rhythms and photoperiodic time measurement in mammals". *Federation Proceedings*, 35, 2339-2346.
- Faulk, C., & Dolinoy, D. C. (2011). "Timing is everything. the when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals". *Epigenetics*, 6(7), 791-797.
- Fetahu, I. S. ve Taschner-Mandl, S. (2021). "Neuroblastoma and the epigenome". *Cancer and Metastasis Reviews*, 40 (1), 173-189.
- Figala, J., Hoffmann, K. ve Goldau, G. (1973). "Zur Jahresperiodik beim Dsungarischen Zwerghamster *Phodopus sungorus* Pallas". *Oecologia*, 12 (2), 89-118.
- Funes, S., Hedrick, J. A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., Yang, S., Monsma, F. J., Gustafson, E. L. (2003). "The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312, 1357-1363.

- Gordon, C. J., Fehlner, K. S. ve Long, M D. (1986). "Relationship between autonomic and behavioral thermoregulation in the golden hamster". *American Physiological Society*, 251 (2), 320-324.
- Gottsch, M. L., Cunningham, M. J., Smith, J. T., Popa, S. M., Acohido, B. V., Crowley, W. F., Seminara, S., Clifton, D. K., Steiner, R. A. (2004). "A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse". *Endocrinology*, 145, 4073-4077.
- Greives T. J., Mason A. O., Levine J., Ketterson E. D., Kriegsfeld L. I., Demas G. E., (2007). "Environmental control of kisspeptin: implications for seasonal reproduction". *Endocrinology*, 148, 1158-1166.
- Gresham, V. C. ve Haines, V. (2012). "Management, husbandry, and colony health". M. A. Suckow, K. A. Stevens ve R. P. Wilson (eds.). in: "The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents". *Academik Press, USA*. (pp. 603-619).
- Grieves, T, Kriegsfeld, L., Bentley, G., Tsutsui. K., Demas, G. (2008). "Recent advances in reproductive neuroendocrinology: a role for RFamide peptides in seasonal reproduction? ". *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, 275, 1943–1951.
- Gündüz B. (2002). "Daily rhythm in serum melatonin and leptin levels in the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) ", *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular Physiology*, 132, 393-401.
- Gündüz, B., & Balkan, E. İ., (2023). "Adult Male Syrian Hamsters (*Mesocricetus auratus*) Exhibit Daily Oscillations in Their Serum Levels of Melatonin and Leptin As Well As in the Expression of the GnRH, GnIH, and Kisspeptin Genes". *Turkish Journal Of Agricultural And Natural Science*, vol.10, no.1, 68-75.
- Gündüz, B., & Okimoto, D. K., (2021). "Methyl donor supplementation alters serum leptin levels and increases appetite but not body weight in cross-fostered male Syrian hamster offspring (*Mesocricetus auratus*) ". *Journal Of Animal Physiology And Animal Nutrition* , vol.2021, 1-9.
- Gündüz B., Stetson M.H., (1998). "The Impact of Photoperiods and Melatonin on Gonadal Development in Juvenile Turkish Hamsters (*Mesocricetus brandti*) ". *Journal of Pineal Research.*, 25: 193-200.

- Harris, G. W. (1964). "Sex Hormones, Brain Development and Brain Function". *Endocrinology*, 75, 627-648.
- Herbison, A. E., de Tassigny X., Doran, J., Colledge, W. H. (2010). "Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons". *Endocrinology*, 151, 312-321.
- Hirose, M. ve Ogura, A. (2018). "The golden (Syrian) hamster as a model for the study of reproductive biology: Past, present, and future". *Reproductive Medicine and Biology*, 18 (1), 34-39.
- Hoffman, R. A., Hester, R. J. Towns, C. (1965). "Effect of light and temperature on the endocrine system of the golden hamster (*Mesocricetus auratus Waterhouse*)". *Comparative Biochemistry and Physiology*, 15 (4), 525-533.
- Hoffmann, K. (1982). "The critical photoperiod in the Ojungarian hamster (*Phodopus sungorus*), In Vertebrate Circadian Systems (eds Aschoff, j., Daan, S., Groos, G.) ", *Springer*: Berlin.
- Honrado, G. I., Paalik, L. ve Fleming, A. S. (1991). "The effects of short day exposure on seasonal and circadian reproductive rhythms of female golden hamsters". *Physiology & Behavior*, 50 (2), 357-363.
- Irvine, N., England-Mason, G., Field, C. J., Dewey, D., & Aghajafari, F. (2022). "Prenatal folate and choline levels and brain and cognitive development in children. a critical narrative review". *Nutrients*, 14(2), 364.
- Ishii M, Iadecola C (2015). "Metabolic and non-cognitive manifestations of Alzheimer's disease. the hypothalamus as both culprit and target of pathology". *Cell Metabolism*, 22.761–776.
- Ithinji, D. G., Buchholz, D. W., Ezzatpour, S., Monreal, I. A., Cong, Y., Sahler, J., Bangar, A S., Imbiakha, B., Upadhye, V., Liang, J., Ma, A., Bradel-Tretheway, B., Kaza, B., Yeo, Y Y., Choi, E J., Johnston, G. P., Huzella, L., Kollins, E., Dixit, S., Yu, S., Postnikova, E., Ortega, V., August, A., Holbrook M. R. ve Aguilar, H. C. (2022). "Multivalent viral particles elicit safe and efficient immunoprotection against Nipah Hendra and Ebola viruses". *Vaccines*, 7 (1), 166.

- Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). "Epigenetic regulation of gene expression. How the genome integrates intrinsic and environmental signals". *Nature Genetics*, 33(S3), 245– 254.
- Jayasena CN, Dhillon WS, Bloom SR. (2009). "Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in humans". *Peptides*, 30:76–82.
- Karakaş, A., Çamsarı, Ç., Erdiñç, S., & Gündüz, B. (2005). "Effects of photoperiod and food availability on growth, leptin, sexual maturation and maintenance in the Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*)". *Zoological science*, 22(6), 665-670.
- Kohguchi, M., Inoue, S., Ushio, S., Iwaki, K., Ikeda, M. ve Kurimoto, M. (2004). "Effect of royal jelly diet on the testicular function of hamsters". *Food Science and Technology Research*, 10 (4), 420-423.
- Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J. M., Le Poul, E., Brézillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S. N. ve Parmentier, M. (2001). "The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54". *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (37), 34631-34636.
- Kriegsfeld, L. J., & Bittman, E. L. (2010). "Photoperiodism in mammals. reproduction. Photoperiodism". *Biological Calendar*, 503-542.
- Kriegsfeld, L. J., Mei. D. F., Bentley, G. E., Ubuka, T., Mason, A. O., Inoue, K., Ukena, K., Tsutsui, K., Silver, R. (2006). "Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 2410-2415.
- Kulis, M. ve Esteller, M. (2010). "2 - DNA Methylation and Cancer". *Advances in Genetics*, 70, 27-56.
- LaSalle, J. M., Powell, W. T. ve Yasui, D. H. (2013). "Epigenetic layers and players underlying neurodevelopment". *Trends in Neurosciences*, 36 (8), 460-470.
- Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR, O'Dowd BF. (1999). "Discovery of a receptor related to the galanin receptors". *FEBS Letter* 446:103–7.

- Lee T.M., Zucker I., (1988). “Vole Infant Development If Influenced Perinatally by Maternal Photoperiodic History”. *American journal of Physiology*, 255: 831-838.
- Lehman, M. N., Coolen, L. M., Goodman, R. L. (2010). “Minireview: Kisspeptin/Neurokinin B/Dynorphin (KNDy) Cells of the Arcuate Nucleus: A Central Node in the Control of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion”. *Endocrinology*, 151 (8), 3479-3489.
- Liu, X., Lee, K., Herbison, A. E. (2008). “Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone neurons through a phospholipase C/calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels”. *Endocrinology*, 149, 4605-46147.
- Mason, A. O., Duffy, S., Zhao, S., Ubuka, T., Bentley, G. E., Tsutsui, K. (2010). “Photoperiod and reproductive condition are associated with changes in RFamide-related peptide (RFRP) expression in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*)”. *Journal of Biological Rhythms*, 25, 176-185.
- Mason, A. O., Greives, T. J., Scotti, M. A., Levine, J., Frommeyer, S., Ketterson, E. D., Demas, G. E., Kriegsfeld, L. I., (2007). “Suppression of kisspeptin expression and gonadal axis sensitivity following exposure to inhibitory day lengths in female Siberian hamsters”. *Hormone Behaviour*, 52, 492-498.
- Mathers, J. C. (2007). “Early nutrition. impact on epigenetics”. *Nutrigenomics-Opportunities in Asia*, 60, 42-48.
- McGee, M., Bainbridge, S. ve Fontaine-Bisson, B. (2018). “A crucial role for maternal dietary methyl donor intake in epigenetic programming and fetal growth outcomes”. *Nutrition Reviews*, 76 (6), 469–478.
- Messenger, S., Chatzidaki, E. E., Ma, D., Hendrick, A. G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R. R., Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M. B., Colledge, W. H., Caraty, A. ve Aparicio, S. A. (2005). “Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (5), 1761–1766.
- Meyer, L. K. ve Hermiston, M. L. (2019). “The epigenome in pediatric acute lymphoblastic leukemia: drug resistance and therapeutic opportunities”. *Cancer Drug Resistance*, 2 (2), 313–325.

- Miedel, E. L. ve Hankenson, F. C. (2015). "Biology and Diseases of Hamsters". J. G. Fox, L. C. Anderson, G. M. Otto, K. R. Pritchett-Corning ve M. T. Whary (eds.). "Laboratory Animal Medicine", (pp. 209–245). *Elsevier*, UK.
- Morton M.L., (1975). "Seasonal Cycles of Body Weights and Lipids in Belding Ground Squirrels". *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences*, 4: 128-143.
- National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, (4th ed.). (1995). "Nutrient requirements of the hamster". (pp. 125-139). *National Academies Press*: Washington (DC).
- Navarro, V. M. ve Tena-Sempere, M. (2011). "Kisspeptins and the neuroendocrine control of reproduction". *Frontiers in Bioscience*, 3 (1), 267–275.
- Navarro, V. M., Castellano, J. M., Fernandez-Fernandez, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M. L., Casanueva, F. F., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere M. (2005). "Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat", *Endocrinology*, 146, 1689-1697.
- Nelson, R. J., & Zucker, I. (1987). "Spontaneous testicular recrudescence of Syrian hamsters. role of stimulatory photoperiods". *Physiology & Behavior*, 39(5), 615-617.
- Nimri, R., Lebenthal, Y., Lazar, L., Chevrier, L., Phillip, M., Bar, M., Hernandez-Mora, E., de Roux, N. ve Gat-Yablonski, G. (2011). "A novel loss-of-function mutation in GPR54/KISS1R leads to hypogonadotropic hypogonadism in a highly consanguineous family" . *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96 (3), E536–E545.
- Patel, R. ve Smith, J. T. (2020). "Novel actions of kisspeptin signaling outside of GnRH-mediated fertility: a potential role in energy balance". *Domestic Animal Endocrinology*, 73, 106467.
- Reiter R.J., (1974). "Circannual Reproductive Rhythms in Mammals Related to Photoperiod and Pineal Function: A Review". *Chorobiologia*, 1: 365-395.
- Revel, F.G., Saboureau. M., Masson-Pévet. M., Pévet. P., Mikkelsen, J.D., Simonneaux, V. (2006). "Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters", *Current Biology*, 16, 1730-1735.

- Revel, G., Saboureau, M., Pevet, P., Simonneaux, V., Mikkelsen, J. D. (2008). "RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene", *Endocrinology*, 149, 902-912.
- Ronchi, E., Aoki, C., Krey, L. C., Pfaff, D. W., (1992). "Immunocytochemical study of GnRH and GnRH-associated peptide in male Syrian hamsters as a function of photoperiod and gonadal alterations", *Neuroendocrinology*, 55, 134-145.
- Rosen, J. K. (1973). "Renal physiology of cold exposed and uninephrectomized golden hamsters". *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 44 (4), 1277-1287.
- Roseweir, A. K., veMillar, R. P. (2009). "The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion", *Human Reproduction Update*, 15 (2), 203–212.
- Ryan, J., & Casidy, R. (2018). "The role of brand reputation in organic food consumption: A behavioral reasoning perspective". *Journal of Retailing and Consumer Services*, 41, 239-247.
- Saha, A., Raut, R. D., & Kumar, M. (2024). "Leveraging blockchain technology to combat food fraud in the agri-food supply chain." *International Journal of Food Science & Technology*, 59(5), 3469-3477.
- Sánchez-Vásquez, E., Alata Jimenez, N., Vázquez, N. A. ve Strobl-Mazzulla, P. H. (2018). "Emerging role of dynamic RNA modifications during animal development". *Mechanisms of Development*, 154, 24–32.
- Seminara S. B. (2007). "Kisspeptin in reproduction". *Seminars in Reproductive Medicine*, 25 (5), 337–343.
- Seminara SB, Crowley WF Jr. (2008). "Kisspeptin and GPR54: discovery of a novel pathway in reproduction". *Journal of Neuroendocrinology*, 20:727–31.
- Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bobb Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA, Colledge WH. (2003). "The GPR54 gene as a regulator of puberty". *The New England Journal of Medicine*, 349:1614–27.

- Seminara, S. B., Messenger, S., Chatzidaki, E. E., Thresher, R. R., Acierno, J. S., Shagoury, J. K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K. M., Hendrick, A. G., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, U. B., Slaugenhaupt, S. A., Gusella, J. F., O'Rahilly, S., Carlton, M. B., Crowley, W. F., Aparicio, S. A., Colledge, W. H. (2003). "The GPR54 gene as a regulator of puberty", *The New England Journal of Medicine*, 349, 1614-1627.
- Silahtaroglu, A. ve Stenvang, J. (2010). "MicroRNAs, epigenetics and disease". *Essays in Biochemistry*, 48 (1), 165–185.
- Silveira, L. G., Noel, S. D., Silveira-Neto, A. P., Abreu, A. P., Brito, V. N., Santos, M. G., Bianco, S. D. C., Kuohung, W., Xu, S., Gryngarten, M., Escobar, M. E., Arnhold, I. J. P., Mendonca, B. B., Kaiser, U. B. ve Latronico, A. C. (2010). "Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty". *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95 (5), 2276–2280.
- Simonneaux, V., Ancel, C., Poirel, V. J., Gauer, F. (2013). "Kisspeptins and RFRP-3 Act in Concert to Synchronize Rodent Reproduction with Seasons", *Frontier in Neuroscience*, 7 (22), 1-11.
- Smit, G. J. ve Smit-Vis, J. H. (1969). "Hibernation in the golden hamster in relation to age and to season". *Netherlands Journal of Zoology*, 20 (1), 141-147.
- Smith, J. T., Acohido, B. V., Clifton, D. K. ve Steiner, R. A. (2006). "KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob Mouse". *Journal of Neuroendocrinology*, 18 (4), 298–303.
- Smith, J. T., Cunningham, M. J., Rissman, E. F., Clifton, D. K. ve Steiner, R. A. (2005). "Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female Mouse". *Endocrinology*, 146 (9), 3686–3692.
- Steiner, R. A., Herbison, A. E. (2005). "Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty", *Journal of Neuroscience*, 25, 11349- 11356.
- Szyf, M. ve Bick, J. (2013). "DNA methylation: a mechanism for embedding early life experiences in the genome". *Child Development*, 84 (1), 49–57.
- Tamai, Y., Wada, K., Tsuji, M., Nakamura, K., Sahashi, Y., Watanabe, K., ... & Nagata, C. (2011). "Dietary intake of vitamin B12 and folic acid is associated with lower blood

- pressure in Japanese preschool children”. *American journal of hypertension*, 24(11), 1215-1221.
- Tsutsui, K, Ubuka, T., Bentley, G. E., Kriegsfeld, L. J., (2013). “Review: regulatory mechanisms of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) synthesis and release in photoperiodic animals”, *Frontier in Neuroscience*, 60(7), 1-11.
- Ubuka, T., Inoue, K., Fukuda, Y., Mizuno, T., Ukena, K., Kriegsfeld, L, Tsutsui, K. (2012). “Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone”, *Endocrinology* 153, 373–385.
- Ukena, K., Tsutsui, K. (2001). “Distribution of novel RFamide-related peptide-like immunoreactivity in the mouse central nervous system”, *Neuroscience Letters*, 300, 153–156.
- Villatoro-Santos, C. R., Ramirez-Zea, M., & Villamor, E. (2021). “B-vitamins and metabolic syndrome in Mesoamerican children and their adult parents”. *Public health nutrition*, 24(14), 4537-4545.
- Wade G.N., (1982). “Obesity without Overeating in Golden hamsters”. *Physiology and Behaviour.*, 29: 701–707.
- Wagner, J. E. ve Farrar, P. L. (1987). “Husbandry and medicine of small rodents”. The Veterinary Clinics of North America. *Small Animal Practice*, 17 (5), 1061–1087.
- Wang, J. ve Zhou, W. H. (2021). “Epigenetic clocks in the pediatric population: when and why they tick?”. *Chinese Medical Journal*, 134 (24), 2901–2910.
- Wu, Y., Zhang, S., Gong, X., Tam, S., Xiao, D., Liu, S., & Tao, Y. (2020). “The epigenetic regulators and metabolic changes in ferroptosis-associated cancer progression”. *Molecular Cancer*, 19, 1-17.
- Wunder B.A., Dobkin D.S., Gettinger R.D., (1977). “Shifts of Thermogenesis in Prairie vole (*Microtus ochrogaster*) Strategies for Survival in a Seasonal Environment”, *Oecologia*, 29:11-26.
- Yellon, S. M. (1994). “Effects of photoperiod on reproduction and the gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive neuron system in the postpubertal male Djungarian hamster”, *Biology of Reproduction*, 50(2), 368-372.

Zagni, C., Chiacchio, U. ve Rescifina, A. (2013). "Histone methyltransferase inhibitors: novel epigenetic agents for cancer treatment". *Current Medicinal Chemistry*, 20 (2), 167-185.



EKLER
EK 1



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	:02.09.2019
TOPLANTI SAYISI	:2019/06
DOSYA KAYIT NUMARASI	:2019-1900121258
KARAR NUMARASI	:2019/06-08
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	:Gülsüm AKKUŞ
HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	: 80 adet erkek Sıfıya Hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)

Proje yürütücüsü Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ, tarafından Etik Kurulumuza sunulan "Metil Donör Beslenmenin Farklı Fotoperiyotlarda Üreme Eksenindeki Kiss-1/GPR54 ve RFRP Gen Ekspresyonlarına Etkileri" başlıklı proje Hayvan Deneylerine ilişkin ilgili mevzuat hükümleri çerçevesinde Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna; oybirliği ile karar verilmiştir.