

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇAY (*Camellia sinensis* L.) BİTKİSİNDEN OBESTATİN-BENZERİ
İMMÜNOREAKTİF MADDELERİN İZOLASYONU,
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

İftihar TEMİZYÜREK

Danışman

Doç. Dr. Mustafa CALAPOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2015**



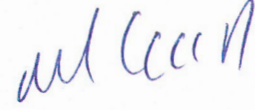
© 2015 [İftihar TEMİZYÜREK]

TEZ ONAYI

İftihar TEMİZYÜREK tarafından hazırlanan "Çay (*Camellia Sinensis* L.) Bitkisinden Obestatin-Benzeri İmmünoreaktif Maddelerin İzolasyonu, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Doç. Dr. Mustafa CALAPOĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. İsmail ÖZMEN
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Mehmet Sabih ÖZER
Celal Bayar Üniversitesi



Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Yasin TUNCER

.....

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

İftihar TEMİZYÜREK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Araştırılan Bitki Hakkında Genel Bilgiler.....	3
2.1.1. Araştırılan Bitkinin (<i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Kuntze) Sistematığı.....	3
2.1.2. <i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Kuntze Bitkisinin Botanik Özellikleri.....	4
2.1.3. Yeşil Çay Yapraklarının ve Yeşil Çayın Fitokimyasal Bileşimi	4
2.1.3.1. Yeşil Çay İnfüzyonlarının ve Ekstraktlarının Sağlık Üzerine Etkileri.....	7
2.2. Obestatin.....	10
2.2.1. Obestatinin Biyokimyasal Yapısı	11
2.2.2. Obestatin Reseptörü.....	12
2.2.3. Obestatinin Doku Dağılımı.....	13
2.2.4. Grelin Geni ve Obestatin	14
2.2.5. Obestatinin Biyolojik Fonksiyonları.....	16
2.2.5.1. Obestatinin Adiposit Fonksiyonu Üzerine Etkileri	17
2.2.5.2. Obestatinin Pankreatik Fonksiyonları	20
2.2.5.3. Obestatinin Kardiyovasküler Sistem ve İskelet Kası Üzerine Etkileri.....	22
2.2.5.4. Obestatinin Patolojik Olaylarla İlişkisi	23
3. MATERYAL METOD	25
3.1. Materyal.....	25

3.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	25
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
3.1.3. Bitki Materyali	27
3.2. Total Protein İzolasyonu	27
3.2.1. Deneyde Kullanılan Çözeltiler	27
3.2.2. Deneyin Yapılışı	29
3.3. Bitki Ekstraktlarının Obestatin İmmünorektivitesi	29
3.3.1. Numunelerin Hazırlanması	29
3.3.2. Deneyde Kullanılan Çözeltiler	30
3.3.3. Deneyin Yapılışı	31
3.3.4. Deney Sonuçlarının Hesaplanması	32
3.4. Trisin SDS-PAGE	33
3.4.1. Trisin SDS-PAGE Çözeltilerin Hazırlanması	33
3.4.1.1. Jel Çözeltileri	33
3.4.1.2. Elektroforez Çözeltileri	34
3.4.1.3. Gümüş Boyama Çözeltileri	34
3.4.1.4. Numune Çözeltisi	36
3.4.2. Deneyin Yapılışı	36
3.4.2.1. Jellerin Hazırlanması	36
3.4.2.2. Numune Hazırlama	37
3.4.3. Elektroforez	37
3.4.3.4. Boyama	38
3.5. Western Blot Yöntemi ile Grelin Karakterizasyonu	38
3.5.1. Western Blot Çözeltileri	38
3.5.2. Elektrobloklama	40
3.5.3. Probleme ve Görüntüleme	41
3.6. Obestatin İmmünorektivitesi Pozitif Trisin-SDS-PAGE Jel Fraksiyonlarının Trisin-SDS-PAGE ile Karakterizasyonu	41
3.7. Lowry Methoduna Göre Protein Tayini	42
3.7.1. Reaktiflerin Hazırlanması	42
3.7.2. Deneyin yapıılışı	43

3.7.3. Deney sonuçlarının hesaplanması.....	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	45
4.1. Protein Tayini Sonuçları.....	45
4.2. İnsan Serumu ve QB Ekstraktının Obestatin İmmünoaktivitesi	45
4.3. Trisin SDS-PAGE	47
4.4. SDS-PAGE ile ELISA Pozitif Obestatin-Benzeri İmmünoaktif Band Fraksiyonlarının Karakterizasyonu	49
4.5. Western Blot Analizi Sonuçları.....	50
5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	52
6. ÖNERİLER.....	56
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	67

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÇAY (*Camellia sinensis* L.) BİTKİSİNDEN OBESTATİN-BENZERİ İMMÜNOREAKTİF MADDELERİN İZOLASYONU, SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU

İftihar TEMİZYÜREK

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mustafa CALAPOĞLU

Obestatin son yıllarda grelin geni ürünü olarak tanımlanan 23 amino asitten oluşan yeni bir hormondur. Vücut ağırlığının denetiminde zıt etkili olan obestatin ve grelin peptid hormonları aynı grelin geninden oluşurlar. Obestatin besin alınımında azalma, kilo kaybı, gastrik boşalmada azalma, susama ve anksiyeteyi azaltma, hafızayı geliştirme, uykuyu düzenleme, pankreas suyu enzimlerinin salgılanmasında artış, G protein-bağımlı orphan reseptör 39 (GPR39) etkileşimi yoluyla intestinal motilitenin baskılanmasını sağlamakta ve ayrıca enerji ve glukoz metabolizmasında düzenleyici rol oynamaktadır. Obestatin memeliler, kuşlar ve amfibiler gruplarına ait türlerde de tanımlanmıştır ve grelin sekansı evölüsyon boyunca iyi korunmuştur.

Bu çalışmada amaç, Çay (*Cameelia sinensis* L.) bitkisinin taze dokularında grelin benzeri immünoreaktif maddeleri tesbit etmektir. Total protein, QB tamponu kullanılarak bitki örneklerinden ekstre edildi. *Cameelia sinensis* L. ekstraktında obestatin immünoreaktivitesi direk ELISA ile belirlendi. *Cameelia sinensis* L.'nin total protein ekstraktlarından insan obestatin benzeri immünoreaktif maddeler trisin-SDS-PAGE ve immünoblot teknikleri ile karakterize edildi.

Sonuç olarak, insan serumunda ve *Cameelia sinensis* L. 'nin total protein ekstraktında total obestatin immünoreaktivitesi sırasıyla $0,121 \pm 0,053$ µg/mL ve $0,087 \pm 0,012$ µg/mL olarak bulundu. Ayrıca trisin-SDS-PAGE ve western blot ile yapılan obestatin karakterizasyonda 12 kDa'lık moleküler kütleyle sahip tek bir obestatin immünoreaktivitesi gösteren protein bandı elde edildi.

Çalışmadan elde edilen veriler, obestatin hem hayvanlar aleminde ve hem de bitkiler aleminde de evrensel bir peptid olabileceğini göstermektedir. Bitkilerde farklı düzeylerde bulunan obestatin-benzeri immünoreaktif maddeler insanlarda kilo denetimine katkı sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Obestatin, *Camellia sinensis* (L.) Heynh. ghrelin-benzeri maddeler, trisin-SDS-PAGE

2015, 67 sayfa

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

ISOLATION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF OBESTATIN-LIKE IMMUNOREACTIVE SUBSTANCES FROM TEA (*Camellia sinensis* L.)

İftihar TEMİZYÜREK

Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Physics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa CALAPOĞLU

Obestatin is a novel 23–amino acid amidated peptide, recently identified as a product of the ghrelin gene. Obestatin and ghrelin peptide hormones with opposing action in weight regulation are derived from the same ghrelin gene. Obestatin has been reported to reduce food intake, body weight gain, gastric emptying, inhibiting thirst and anxiety, improving memory, regulating sleep, affecting cell proliferation, increasing the secretion of pancreatic juice enzymes, suppressing intestinal motility through an interaction with the G protein-coupled orphan receptor (GPR39), and also play a role regulation of energy and glucose metabolism. Obestatin has also been identified in many other species belonging to the mammals, birds, fish and amphibians, and its sequence is well conserved throughout evolution.

In this study, the aim is to determine obestatin-like immunoreactive substances in fresh vegetative tissue of tea (*Camellia sinensis* L.) Total proteins were extracted from the plant samples using the QB buffer as a extraction buffer. Obestatin-like immunoreactive substances in *Camellia sinensis* L. extracts were investigated using a direct home-made ELISA. Human obestatin-like immunoreactive substances from *Camellia sinensis* L. were isolated and characterised by tricine-SDS-PAGE and immunoblotting techniques.

As a result, ELISA demonstrated that human obestatin and human obestatin-like immunoreactive substances from *Camellia sinensis* L. were present at concentrations of $0,121 \pm 0,053 \mu\text{g/mL}$ and $0,087 \pm 0.012 \mu\text{g/mL}$, respectively. A single obestatin-like protein band appeared about molecular mass of 12 kDa on tricine-SDS-PAGE and western blotting in fresh vejetatif tissues of *Camellia sinensis* L.

Both animal and plant worlds give the idea that obestatin is universal. Plants contained different levels obestatin-like substances may be contribute on weight control in human.

Keywords: Obestatin, *Camellia sinensis* (L.) Heynh. obestatin-like substances, tricine-SDS-PAGE

2015, 67 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocam **Doç. Dr. Mustafa CALAPOĞLU'na** teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince çok yakın ilgi destek ve yardımlarını esirgemeyen güzel yürekli değerli Hocam **Doç. Dr. Nilüfer CALAPOĞLU'na**

Labaratuvar kullanımı ve laboratuvar çalışmalarım süresince yardım ve tecrübelerini esirgemeyen Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı öğretim üyelerinden **Sayın Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN, Doç. Dr. Duygu Kumbul DOĞUÇ, Arş. Gör. Dr. İlter İLHAN'a**

Tez çalışmam boyunca yanımda olan her türlü desteklerini esirgemeyen aşmam gereken her zorlukta yanımda olan **sevgili arkadaşlarıma,**

Yaşamımın her safasında yanımda olan bugünlere gelmeme vesile olan tecrübelerine sevgilerini kattıkları canım babam **Besim TEMİZYÜREK'e** ve canım annem **M. Zeliha TEMİZYÜREK'e**

3758-YL2-13 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

İftihar TEMİZYÜREK
ISPARTA, 2015

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.3.1. Çay yapraklarında bulunan başlıca flavan-3-ollerin kimyasal yapıları .	7
Şekil 2.2.2.1. Grelin ve obestatin sekansları	12
Şekil 2.2.4.1. Grelin, obestatin, grelin izoformları ve terminal peptitleri transisyonel, translasyonel ve post-translasyonel işlemlerin şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.2.5.1. Obestatinin biyolojik etkileri	17
Şekil 3.3.4.1. Obestatin direkt ELİSA standart grafiği	33
Şekil 3.7.3.1. Protein tayininde kullanılan BSA standart grafiği.....	44
Şekil 4.2.1. İnsan serumu ve çay ekstraktının obestatin konsantrasyonu	46
Şekil 4.2.2. İnsan serumu ve çay ekstraktının obestatin konsantrasyonu	47
Şekil 4.3.1. QB tamponu ile ekstrakte edilen çay ekstraktlarının farklı protein konsantrasyonlar da gliserollü %10'luk (%49,5 T; %3 C) Trisin- SDS-PAGE'deki görünüşleri	48
Şekil 4.3.2. Ekstrak, Obestatin, grelin ve protein markörünün %10'luk (% 49,5 T; % 3 C) gliserollü trisin-SDS-PAGE'deki elektroforetik bant profilleri .	49
Şekil 4.4.1. ELISA pozitif fraksiyonların % 10'luk trisin-SDS-PAGE'deki bant paterni.....	50
Şekil 4.5.1. <i>Camellia sinensis</i> L (çay) ekstraktında obestatin-benzeri immünoreaktif bileşiklerin western blot analizi ile elde edilen bandların görünümü	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1.3.1. Çay yapraklarının bileşimi.....	5
Çizelge 2.1.3.2. Çay yapraklarında, yeşil çayda ve yeşil çay infüzyonlarında flavonoid ve alkaloid bileşimi ranjları	6
Çizelge 2.1.4.1. YÇ ve YÇ kateşinlerinin antropometri, glukoregülasyon, lipid profili, kan basıncı ve koroner kalp hastalığı riski açısından sağlık üzerine etkilerinin değerlendirmesi.	8
Çizelge 2.1.4.2. YÇ ve YÇ kateşinlerinin koroner kalp hastalığı, inme ve kanser riski açısından sağlık üzerine etkilerinin değerlendirmesi.	9
Çizelge 2.2.5.4.1. Obestatin bazı hastalıklar ile ilişkisi	24
Çizelge 3.4.2.1.1. Ayırma jelinin hazırlamasında kullanılan çözeltiler ve miktarları	36
Çizelge 3.4.2.1.2. Yığma jelinin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler ve miktarları	36
Çizelge 3.4.2.2.1. Trisin-SDS-PAGE için numune hazırlama tablosu	37
Çizelge 3.7.2.1. Lowry methoduna göre protein tayini ve çözelti miktarları	43
Çizelge 4.1.1. QB ekstraksiyonu ile elde edilen <i>Camellia sinensis</i> L. Akstraktının ve serum havuzunun protein miktarları	45
Çizelge 4.2.1. Çay ekstraktının ve insan serumunun total grelin immünoreaktiviteleri	45
Çizelge 4.2.2. İnsan serumu ve çay ekstraktı örneklerinin ihtiva ettikleri proteine göre total grelin immünoreaktivitesi	46
Çizelge 5.1. Obestatin tayininde kullanılan yöntemler	52
Çizelge 5.2. Çay ve insan plazma örneklerinde obestatin seviyeleri	53

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AGRP	Agouti-related protein
AMA	Amerikan Tıp Derneği
AP2	Aktivatör proteini 2
ARC	Arkuat nukleus
bHLH	Basit heliks-ilmek-heliks
Da	Dalton
DMN	Dorsomediyal nukleus
EC	Enterokromaffin
EC	Epikateşin
ECL	Enterokromaffin-benzeri
EGC	Epigallokateşin
EGCG	Epigallokatekin galat
EKG	Epikateşin galat
ELİSA	Enzyme-linked İmmuno Sorbent Assay
GLP-1R	Glukagon benzeri peptid-1 reseptörü
GPR	Büyüme hormonuna bağlı reseptör
GPR39	G-protein kenetli reseptör 39 (obestatin reseptörü)
ICV	Intracerebroventriküler
KBB	Kan beyin bariyeri
kDa	Kilodalton
mg	Miligram
mL	Mililitre
NCI	Ulusal Kanser Enstitüsü
NF- κ B	Nükleer faktör κ -beta
NPY	Nöropeptid Y
NPY/AGRP	Nöropeptid Y / Agouti-Related Peptide

PEA-3	Polyomavirüs güçlendirici aktivatörü 3
pg	Pikogram
POMC	Propiomelanokortin
PVN	Paraventriküler nukleus
VMN	Ventromediyal nukleus
μ l	Mikrolitre



1. GİRİŞ

Günümüzde beslenme ve kilo denetimi ile ilgili olarak çeşitli programlar uygulanmaktadır. Bu programlardan yaşam biçimine müdahaleler, farmakolojik uygulamalar ve cerrahi girişimler yoğun olarak uygulanmaktadır. Kilo alınımının düzenlenmesinde çeşitli farmakolojik seçenekler yer almaktadır. Bu farmakolojik ajanların bir kısmının ancak kısa süreli olarak uygulanabilmesinin yanı sıra bir kısmı da uzun süreli olarak uygulanabilmektedir. Farmakolojik uygulamalar kilo denetiminde her ne kadar etkin bir yol olsa da çeşitli advers toksisitelerinden dolayı kullanımı sınırlandırılabilir.

Yerel toplumlar tarafından kullanılan *Hoodia gordonii*, *Caralluma fimbriata*, *zingiber officinale* ve *Agave tequilana* gibi bitkiler iştah üzerine etkili oldukları son yıllardaki çalışmalarda vurgulanmakta ve kilo denetiminde de uygulanmaktadır. Doğal kaynaklardan elde edilen tıbbi bitkilerin kilo denetiminde veya zayıflamada destek amaçlı olarak tercih edilmesi birçok araştırmacının dikkatini çekmesinin yanı sıra ticari olarak da bir pazar oluşturmaktadır.

Camellia sinensis (L.) O. Kuntze (*Thea sinensis* L.) Theaceae familyasına ait, Çin, Japonya, Kuzey Hindistan, Endonezya gibi Doğu ve Uzakdoğu ülkelerinde yetişen ve uygun iklim koşullarına sahip diğer ülkelerde de kültürü yapılan, binlerce yıldan beri tanınan bir bitkidir. Çay dünyada sudan sonra en çok içilen ikinci içecektir ve milattan önce 3000 yılından itibaren sosyal bir etkinlik ve alışkanlık olarak tüketilmektedir. Çayın çeşitli formlarının sindirime yardımcı etkisi, kan temizleyici, vücut sıcaklığını düşürücü, diş ve kemik güçlendirici, immün sistemi ve kalbi güçlendirme, besin zehirlenmesini engellemesi, virüslere karşı koruma ve kan şekerini düşürücü etkileri gibi bir çok terapötik etkileri olduğu bilinmektedir.

2005 yılında Zhan ve arkadaşları tarafından keşfedilen obestatin hem yapısal ve hem de biyolojik fonksiyonları yönünden anoreksijenik özellikte olan 23 amino asitlik biyoaktif bir peptid hormonudur. Obestatin grelin geni tarafından kodlanan 117 amino asitli preprogrelin peptidinin posttranslasyonel modifikasyonu sonucu oluşur.

2005 yılından günümüze kadar yapılan çalışmalar obestatin hormonunun omurgalılarda aynı gen tarafından kodlanan ve oroksijenik bir hormon olan grelin hormonunun metabolik ve fizyolojik etkilerine ters etki göstermesinin yanı sıra besin alınımı ve kullanımı, enerji kullanımı ve iştah üzerinde grelin hormonu ile birlikte düzenleyici etkilere sahip olduğu noktasında önemli bulgular ortaya koymaktadır.

Son yıllarda yapılan birkaç çalışma grelin immunoreaktif homologlarının bitkilerde de olduğu ispatlanmıştır. Grelinin hem gen ve hem de protein yapısı ile ilgili çalışmalar bu hormonun evrimsel süreçte iyi korunduğunu ve omurgalı türler arasında yüksek homoloji göstermeleri ayrıca çeşitli bitkisel ekstraktlarda yapılan immünoplojik çalışmalarda da insan obestatinine karşı geliştirilen antikolar ile pozitif sonuçların elde edilmesi, bu hormonun evrensel bir hormon olabileceği yönündeki hipotezi güçlendirmektedir.

Obestatin ve grelin hormonları aynı gen tarafından kodlanmalarına rağmen grelinin aksine obestatin hormonunun bitkilerdeki immunoreaktif homologların varlığı çalışmalarımızda ortaya koyulmuş olup bitkisel obestatin-benzeri immünoreaktif maddelerin saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili olarak yapılan literatür taramasında herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasının anahtar hipotezi obestatin veya obestatin-benzeri maddelerin bütün canlı organizmalarda evrensel olarak bulunabileceğidir. Dolayısıyla omurgalılarda grelin geni ürünü olan obestatin hormonu, grelinin hormonuna benzer şekilde evrensel bir polipeptid olması canlıların biyo regülasyonunda ciddi bir rol oynayabileceği hipotezine dayanarak *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. bitkisinde obestatin-benzeri immünoreaktif maddelerin varlığı veya yokluğu immünolojik, kromatografik ve elektroforetik yöntemler kullanılarak ortaya koyulmaya çalışıldı.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Araştırılan Bitki Hakkında Genel Bilgiler

Camellia sinensis (L.) O. Kuntze (*Thea sinensis* L.) Theaceae familyasına ait, Çin, Japonya, Kuzey Hindistan, Endonezya gibi Doğu ve Uzakdoğu ülkelerinde yetişen ve uygun iklim koşullarına sahip diğer ülkelerde de kültürü yapılan, binlerce yıldan beri tanınan bir bitkidir. Çay dünyada sudan sonra en çok içilen ikinci içecektir ve milattan önce 3000 yılından itibaren sosyal bir etkinlik ve alışkanlık olarak tüketilmektedir. *Amerikan Tıp Derneği* (*American Medical Association, AMA*), yeşil çayın kolesterol seviyesini düşürdüğü, kan basıncını artırdığını ve özellikle erkeklerde inme riskini azalttığını vurgulamaktadır. *Ulusal Kanseri Enstitüsü* (*National Cancer Institute-NCI*) yeşil çayda oldukça etkin antioksidan muhtevastan dolayı çeşitli kanser türlerini önlediğini rapor etmişlerdir. Yeşil çayın sindirime yardımcı etkisi, kan temizleyici, vücut sıcaklığını düşürücü, diş ve kemik güçlendirici, immün sistemi ve kalbi güçlendirme, besin zehirlenmesini engellemesi, virüslere karşı koruma ve kan şekerini düşürücü etkileri terapatik etkileri olarak değerlendirilmektedir. Tüm bu potansiyel terapatik etkiler göz önüne alınarak yapılan değerlendirmede yüksek derecede biyaktif moleküller ve yüksek antioksidan kapasitesinden dolayı sağlıklı bir içecek olarak tanımlanmıştır (de Mejia vd. 2009).

2.1.1. Araştırılan Bitkinin (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) Sistematigi

Kingdom: Plantae

Order: Ericales

Family: Theaceae

Genus: *Camellia*

Species: *C. Sinensis*

Binomial name: *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Davis, 1982)

2.1.2. *Camellia sinensis* (L.) O. kuntze Bitkisinin Botanik Özellikleri

Çay (Sinonimi: *Thea sinensis* L.), Tropik ve subtropik bölgelerde yayılım gösteren bir bitkidir. Türkiye’de doğal olarak yetişmez, ancak Doğu Karadeniz bölgesinde ziraatı yapılmaktadır. Anavatanı Çin ve Japonyadır ve buralardan dünyaya yayılmıştır. Yabanıl türleri 10-12 m’ye kadar uzayabilir, kültürde ise 2 m’yi aşmaz. Ağaç ve çalı şeklinde yaprak dökmeyen ve daima yeşil bir bitkidir. Bitkinin gövdesi esmer ya da koyu esmer renktedir. Yapraklar derimsi, alternat, nadiren opposit, basit, stipulsuzdur. Lamina derimsi, koyu yeşil renkli, eliptikten dar eliptiğe kadar değişir. Yaprak kenarlarındaki dişler geniş açılı, içe kavisli ve siyah uçludur. Çiçekleri gösterişli ve yaprakların koltuğunda tek tek veya 2-3 tanesi bir arada bulunurlar. Kaliks alt tarafta birbirine yapışmış 5-7 sepalden ibarettir. Korolla 7-8 petalli, petaller beyaz renkli, oval şekilli. Stamen çok sayıda serbest ya da bir tüp şeklinde tabanda birleşirler. Ginekeum tek pistilli, ovaryum üst durumlu, 3-5 lokuslu ve karpelli, ovül 2- çok sayıda, plasentalanma eksenseldir. Stilus basit ve stigma 3 parçalı. Sıcak iklime sahip ülkelerde yılın hemen hemen her ayında bitki çiçeklidir. Meyve, genellikle lokulusit veya septisit kapsül şeklinde, her gözünde 1-2 adet tohum bulunan, 3 gözlü bir kapsüldür. Meyveler oluşması yaklaşık bir yılda tamamlanır. Olgunlaşmadan önce yeşil olup, kalın kabuklu, 2,5 cm çapında, kısa saplıdır. Meyve olgunlaştığında tohumlar kahverengi olur ve bölmeler açılarak tohumlar dökülür. Tohumlar genelde 1-2 cm çapında ve küresidir (Baytop, 1963; Davis, 1967).

2.1.3. Yeşil Çay Yapraklarının ve Yeşil Çayın Fitokimyasal Bileşimi

Kuru ağırlık esasına göre, çay yapraklarının ana bileşimini polifenoller oluşturmaktadır. Özellikle flavan-3-oller (kateşinler) polifenoller içerisinde en fazla miktarda bulunan biyolojik aktif bileşiklerdir. Çay yapraklarının diğer bişenlerini lif, karbohidratlar (selüloz, pektin, glukoz, fruktoz, sükroz), proteinler (enemli kısmını enzimler oluşturur), amino asitler (L-theanin veya 5-N-etilglutamin, glutamik asit, triptofan, glisin, serin, aspartik asit, trosin, valin, lösin, treanin, arginin, lizin), alkaloidler (özellikle kafein ve daha az miktarda teofilin ve teo theobromin), mineraller ve eser elementler, pigmentler (klorofiller ve karotenoidler), uçucu

bileşikler (aldehidler, alkoller, esterler, laktonlar, hidrokarbonlar), lipidler (linoleik ve α - linolenik asitler), steroller (stigmasterol), ve vitaminler (B vitaminlerinin yanı sıra A, C, E, ve K vitaminleri) (Chacko vd., 2010;Cabrera vd., 2006; Wang vd., 2009; Butt vd., 2009). Çay yapraklarının ihtiva ettiği fitokimyasallar büyük ölçüde iklim, mevsim, yetiştirme yeri, bahçe tarımı uygulaması, kültür varyetesi, yaprakların ve bitkinin yaşı gibi tarımına, botanik ve genetik faktörlere ve ayrıca depolama süresi ve şartları gibi hasat sonrası faktörlere bağlıdır. Çay yapraklarının yaklaşık olarak bileşimleri Çizelge 2.1.3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1.3.1. Çay yapraklarının bileşimi (Chaturvedula and Prakash, 2011)

Bileşikler	% kuru ağırlık
Polifenoller	30
Lif	26
Protein	15-20
Karbohidrat	5-7
Mineraller	4-9
Alkaloidler (kafein)	2-4
Amino asitler	1-4
Pigmentler	Eser
Lipidler ve steroller	Eser
Uçucu bileşikler	Eser
Vitaminler	Eser

Çay yaprakları, yeşil çay infüzyonları ve ekstraktlar flavan-3-oller olarak EGCG, (-)-epikateşin (EC), (-)-epikateşin gallat (ECG), (-)-epigallokateşin (EGC), (+)-kateşin (C), ve (+)-gallokteşin (GC) içermektedirler. (Çizelge 2.1.3.2). Bu bileşiklerin kimyasal yapıları Şekil 2.1.3.1.’de gösterilmektedir. Diğer flavonoidler ve fonollik asitler kuru ağırlığın %1’ini oluşturmaktadır. Çaydaki ana flavonoller kersetin ve kaempforolün glukoz veya ramnoz konjugatlarıdır (Zhao vd., 2011). Çay yapraklarındaki fenolik asitler gallik ve kafeik esitin quinic asit esterlerinden oluşmaktadır (Zhao vd., 2011). Polifenoller yaprak tomurcuklu çay bitkisinde eşit olarak dağılmamıştır ve genellikle ilk yapraklar en yüksek konsantrasyonda polifenollerini içermektedirler (Saijo vd., 2004). Flavan-3-oller epidermal hücrelere en

yakın yaprak yapısının mezofil hücrelerinde yoğun olarak bulunurlar (Suzuki vd., 2003).

Çizelge 2.1.3.2. Çay yapraklarında, yeşil çayda ve yeşil çay infüzyonlarında flavonoid ve alkoloid bileşimi ranjları (Bhagwat vd., 2014; Cabreravd., 2003; Friedman vd., 2009; Komes vd., 2010; Nishitani and Sagesaka, 2004; Peterson vd., 2005; Wang vd., 2008; Xu vd., 2012)

Bileşikler	Taze çay yaprakları (mg/g kuru ağırlık)	Yeşil çay yaprakları ¹ (mg/g kuru ağırlık)	Yeşil çay infüzyonları ² (mg/L)
Flavonoidler			
(-)-EGCG	68 – 134	13 - 113	95 – 712
(-)-EGC	22 – 53	ND - 45	TE – 471
(-)-ECG	5.9 – 18	5.7 - 51	TE – 1508
(-)-EC	1.9 – 11	1.9 - 21.1	25 – 216
(+)-GCG	TE - 2.5	TE - 7.1	TE - 9.3
(+)-CG	TE	TE - 3.7	
(+)-C	TE - 1.2	TE – 1	TE – 688
EGCmG	NR	0.3 - 1.2	RE
Kersetin-rhamnosid-galaktosid	trace - 1.0	RE	RE
Kersetin-rhamnosid-glukosid	0.5 - 1.9	RE	RE
Rutin	0.6 - 2.6	RE	RE
Kaempferol	RE	RE	3.6 - 6.4
Mirisetin	RE	RE	4.8 - 7.3
Kersetin	RE	RE	13.4 - 20.7
Thearubiginler	RE	RE	TE – 221
Alkoloidler			
Kafein	16 – 28	26 - 39	99 – 338
Theobromin	0.2 - 1.6	RE	7.6 – 86

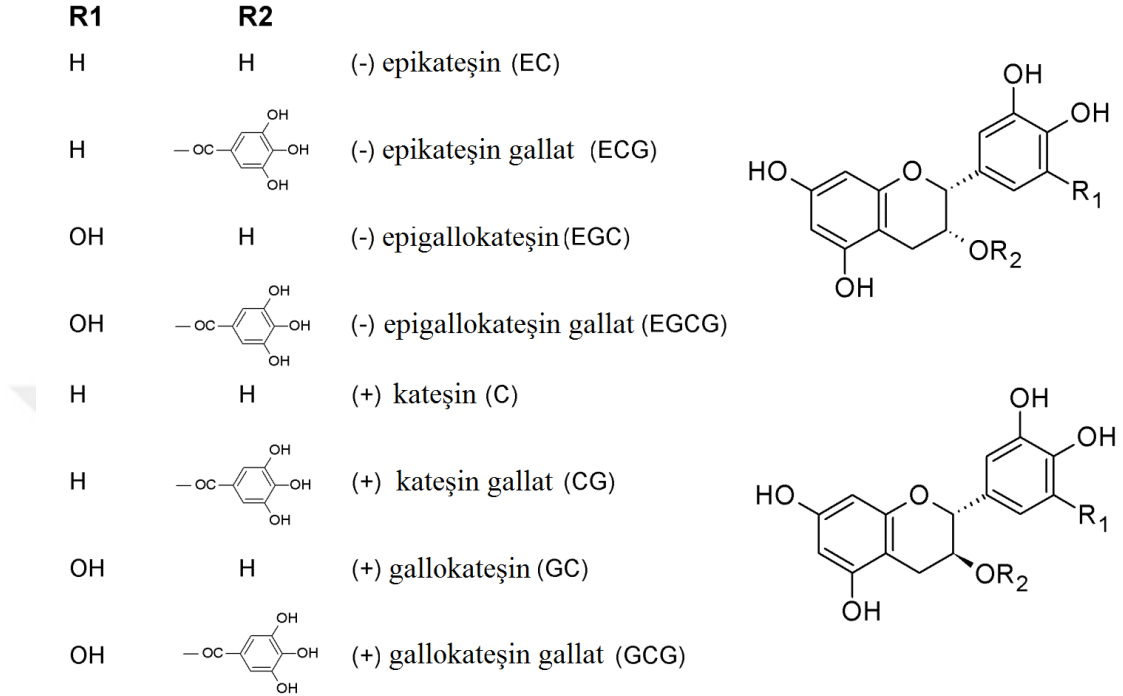
¹Veriler torba çay ve dökme çaydan elde edilmiştir

²Çay infüzyonları 2 gram çay 200 mL suda 80°C'de 3 dakika demlendirme ile yapılmıştır.

Kısaltmalar: C, Kateşin; CG, kateşin gallat; EC, epikateşin; ECG, epikateşin gallat; EGC, epigallokateşin; EGCG, epigallokateşin gallat; EGCmG, epigallokateşin 3-O-metilgallat; GCG, gallokateşin gallat; TE, tesbit edilemedi; RE, rapor edilmemiş

EGCG çay yapraklarında ve yeşil çay infüzyonlarında en bol bulunan flavan-3-oldür. Fakat EGCG konsantrasyonu çaylar ve çay preparasyonları arasında yaklaşık olarak 8 kata kadar değişebilmektedir (Çizelge 2.1.3.2) (Bhagwat vd., 2014; Cabreravd., 2003; Friedman vd., 2009; Komes vd., 2010; Nishitani and Sagesaka, 2004; Peterson vd., 2005; Wang vd., 2008; Xu vd., 2012). Miktar olarak EGCG'den sonra

en fazla bulunan ve daha az değişim gösteren flavan-3-oller ise EGC ve ECG'dir. Yeşil çay infüzyonlarında kalıcı olarak sadece EGCG ve EC bulunmaktadır.



Şekil 2.1.3.1. Çay yapraklarında bulunan başlıca flavan-3-ollerin kimyasal yapıları

2.1.3.1. Yeşil Çay İnfüzyonlarının ve Ekstraktlarının Sağlık Üzerine Etkileri

Yeşil çay infüzyonu veya yeşil çay ekstraktı tüketiminin kronik hastalıkların ara biyobelirteçlerinde düzelme ve/veya bazı kanser türleri, kardiyovasküler hastalıklar, tip 2 diabetes mellitus, alzheimer's ve Parkinson hastalıkları gibi nörodejeneratif durumlar ve diğer yaşla ilişkili hastalıklarda risk azalması ile ilişkilidir. Çay tüketimi ile ilişkili olan faydalar öncelikle yeşil çayın flavonoid bileşiminin özellikle flavan-3-ollerin gösterdiği antioksidasyon, anti-inflamasyon, anti-proliferasyon, enerji regülasyonu ve sinyal iletim yollarının düzenlenmesi gibi biyoaktivitelerinden kaynaklanmaktadır. Yeşil çay ve sağlık çıktıları arasındaki ilişkiyi ortaya koyan derlemeler ve meta-analizlerin sonuçları Çizelge 2.1.4.1. ve Çizelge 2.1.4.2.'de özetlenmektedir.

Çizelge 2.1.4.1. YÇ ve YÇ kateşinlerinin antropometri, glukoregülasyon, lipid profili, kan basıncı ve koroner kalp hastalığı riski açısından sağlık üzerine etkilerinin değerlendirilmesi.

Yazar	Çalışma sayısı (n)	Denek (n)	Süre	Kullanım dosajı	Hedefler	Bulgular
Antropometri						
Jurgens vd., (2012)	RKÇ (14)	1562	12-13 hafta	140.85-1206.9 mg YÇE/gün	Obez veya kilolu yetişkinlerde VA	VA: ↔ japon harici; ↓ Japan. BÇ: ↔
Hursel vd., (2009)	RKÇ (11)	1188	12-13 hafta	270-1207 mg YÇE/gün	VA	VA: ↓ Kafein ve etnisite etkili
Phung vd., (2010)	RKÇ (15)	1243	8-24 hafta	141-1207 mg YÇE/gün	VKİ, VA, BÇ, BKO	Kafein ile birlikte YÇE VKİ: ↓VA: ↓BÇ: ↓ BKO: ↔ Sadece YÇE: ↔
Glukoregülasyon						
Zheng vd., (2013)	RKÇ (22)	1548	3-24 hafta	236-1207 mg YÇE/gün	Glukoregülasyon	FG: ↓ FI: ↔ HbA1C: ↔ HOMA: ↔
Liu vd., (2013)	RKÇ (17)	1133	4-14 hafta	208-1207 mg YÇE/gün	Glukoregülasyon	AG: ↓ AI: ↓ HbA1C: ↓
Lipid profili						
Kim vd., (2011)	RKÇ (20)	1415	3-24 hafta	145-3000 mg YÇE/gün	Lipid profili	TK: ↓ LDL-C: ↓ HDL-C: ↔ TG: ↔
Zheng vd., (2011)	RKÇ (14)	1136	3-24 hafta	150-2500 YÇE mg/gün	Lipid profili	TK: ↓ LDL-C: ↓ HDL-C: ↔ TG: ↔
Koroner kalp hastalığı						
Hooper vd., (2008)	RKÇ (170) [12 YÇ]	6557 (515 YÇ)	0-52 hafta (0-12 hafta YÇ)	Veri yok	KKH riski	LDL-C: ↓ KB: ↔
Taubert vd., (2007)	RKÇ (10) [1 YÇ]	516 (343 YÇ)	2 ay	1 çay Poşet/gün, 544 mg fenol	KB	KB: ↔

Kısaltmalar: VKİ, body mass invücut kitle indeks; KB, kan basıncı; VA, vücut ağırlığı; KKH, koroner kalp hastalığı; AG, açlık kan glukozu; AI açlık insülini; YÇE, yeşil çay ekstraktı; HbA1c, glikemoglobin; HDL-C, yüksek dansiteli lipoprotein kolesterolü; HOMA, homoestatik model değerlendirmesi; LDL-C, düşük dansiteli lipoprotein kolesterolü; RKÇ, randomize klinik çalışma; TK, total kolesterol; TG, trigliserid; BÇ, bel çevresi; BKO, bel kalça oranı; YÇ, yeşil çay; ↓, azalma; ↔, değişiklik yok.

Yeşil çay infüzyonları ve yeşil çay ekstraktları kilo kaybı ve/veya kilo denetimi üzerine ılımlı etkiye sahiptir. Çayın bu faydasının öncelikle kafein ve flavonoid bileşikleri arasındaki etkileşimden kaynaklandığı düşünülmektedir. Randomize klinik

çalışmalar yeşil çay flavonoidlerinin kan glukozu üzerine pozitif etkiye sahip olduğunu vurgulamaktadırlar. Yeşil çayın, kan glukozu üzerine pozitif etkiye sahip olması, glukoz düzenlenmesi yetersiz olan ve tip 2 diyabet riski yüksek olan kişilere potansiyel yararı olabileceğinden tüketilmesi önerilmektedir. Klinik çalışmalardan elde edilen bulgular yeşil çayın serum total kolesterol ve LDL kolesterol seviyelerinde azalmaya yol açtığını göstermektedir. Gözlemsel çalışmalardan elde edilen veriler yeşil çayın inme riskinde azalma ile ilişkili olduğunu göstermektedir ve bu sonuçlar klinik çalışmalar ile de uyumludur. Kemirgen model çalışmaları yeşil çayın çeşitli kanser türleri üzerine belirgin kemokoruyucu etki gösterdiğini ortaya koyarken, arabiyobelirteçleri araştıran gözlemsel çalışmalardan ve klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar karışıktır ve kanser tipi, cinsiyet ve çalışma planına bağlıdır.

Çizelge 2.1.4.2. YÇ ve YÇ kateşinlerinin koroner kalp hastalığı, inme ve kanser riski açısından sağlık üzerine etkilerinin değerlendirmesi.

Yazar	Çalışma sayısı (n)	Denek sayısı (n)	Süre	Hedefler	Bulgular
Koroner kalp hastalığı					
Wang vd., (2011)	Kohort (12), Vaka-kontrol (6) [5 YÇ]	416,676 (13,978 vaka)	5-20 yıl	KAH (KKH ve MI)	RR=0.72 (0.58-0.89) 1 kupa/d: ↓ 10% KAH risk
İnme					
Arab vd., (2009)	Kohort (8), Vaka-kontrol (2), Kesitsel (1)	213,897 (5,537 vaka)	4-15 yıl	Total inme	RR=0.79 (0.73-0.85, ≥3 göre.<1 kupa/gün)
Kanser					
Zheng vd., (2012)	Vaka-kontrol (20), Kohort (4)	7,376 vaka, 487,894 kontrol vaka kontrol; 8,874,734kişi-yıl Kohort	NA3	Özofagus Kanseri	Kohort: RR=0.77 (0.57-1.04), en yüksek, içmeyen/en düşüklere göre) vaka-kontrol: RR=0.70 (0.51-0.96)
Zheng vd., (2013)	Vaka-kontrol (8), Kohort (2)	3,731 (3,557 vaka)	0-9 yıl	Özofagus Kanseri	Tümü: ↔ Vaka-kontrol: RR=0.32 (0.10-0.54, yüksek), 0.43 (0.21-0.66, orta), 0.45 (0.10-0.79, düşük) sadece çay içmeyen bayanlara gere.
Kang vd., (2010)	Kohort (7), Vaka-kontrol	223,044 (6814 vaka)	VB	Mide Kanseri	Tümü: RR=0.86 (0.74-1.00) Altgrup analizi (6

	(11)				çalışma): RR=0.68 (0.53-0.87, ≥ 5 kupa/gün endüşüğe göre)
Myung vd., (2009)	Vaka-kontrol (8), Kohort (5)	254,869 (6,636 vaka)	VB	Mide Kanseri	RR=1.10 (0.92-1.32, Enyüksek ve endüşük tüketime göre)
Wang vd., (2012)	Kohort (6)	352,275 (1,675 vaka)	VB	Kolorektal Kanser	Tümü RR=0.90 (0.72-1.08) Şangay : RR=0.70 (0.55-0.85, enyükseğe göre endüşük) Singapur: RR=1.36 (1.06-1.74)
Tang vd., (2009)	Kohort (5), Vaka-kontrol (7)	106,069 (5,495 vaka)	VB	Akciğer Kanseri	RR=0.78 (0.61-1.00) en yüksek alınımlı.
Ogunleye vd., (2010)	Vaka-kontrol (9)	164,943 (5,617 vaka)	VB	Meme Kanseri	RR=0.81, (0.75-0.88, >4 vs. ≤ 1 kupa/gün)
Tang vd., (2009)	Kohort (2), Vaka-kontrol (5)	107,764 (3,487 vaka)	VB	Endometrium Kanseri	Tümü: RR=0.85 (0.77-0.94) Kohort: RR=1.05 (0.85-1.28) Vaka-kontrol: RR=0.81 (0.71-0.93)
Zheng vd., (2011)	Kohort (6), Vaka-kontrol (7)	111,499 (3,608 vaka)	VB	Prostat Kanseri	Tümü: RR=0.72 (0.45-1.15) Vaka kontrol: RR=0.43 (0.25-0.73) Kohort: RR=1.00 (0.66-1.53)
Nagle vd., (2011)	Vaka-kontrol (3)	6,092 (2,567 vaka)	VB	Over Kanseri	RR=0.58 (0.33-1.01), ≥ 1 kupa/gün hiçe göre nadiren

Kısaltmalar: KAH; koroner arter hastalığı; KKH, koroner kalp hastalığı; MI, miyokart infarktüsü; RR, relativ risk; parantez içersindeki değerler %95 güvenlik aralığı değerleridir. Values in parenthesis is the 95% confidence interval; VB, veri bulunamadı.

2.2. Obestatin

Zhang vd. (2005), insan ghrelin geninin 11 memeli türünde preproghrelin dizilerini karşılaştırırken ghrelin ilişkili olarak obestatin ismini verdikleri yeni bir peptid keşfetmişlerdir. Anoreksi oluşturan etkilerinden dolayı bu peptide Latince ‘obedere’ yemeği bir çırpıda silip süpürmek ve ‘statin’ baskılamak kelimelerinin birleşiminden oluşturulmuş obestatin ismi verilmiştir (Zhang vd., 2005; Kojima and Kankava 2005). Obestatin ghrelin geni tarafından kodlanan, preproghrelinin konvertaz enzimi

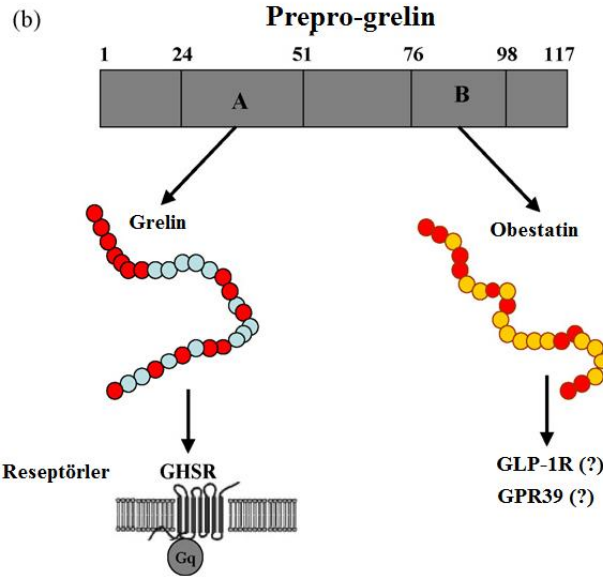
ile kesilerek sentezlenen, ve sıçan mide mukozasından izole edilen 23 aminoasitlik yeni bir hormondur (Zhang vd., 2005; Gourcerol vd., 2006; Gourcerol and Tache, 2007; Grönberg vd., 2008; Kapıcı vd., 2007).

2.2.1. Obestatinin Biyokimyasal Yapısı

Grelin hormonu posttranslasyonel parçalanma ile 117-rezidüden ibaret prepro-peptidinin 24-51. rezidülerinin oluşturduğu progrelin segmentinden oluşmaktadır (Kojima vd., 1999). Bilinen olgun grelin peptidine ilaveten, Zhang vd (2005) progrelin sinyal paptidine müteakip, C terminaline hemen bitişik korunmuş glisin rezidülü ve aynı zamanda 11 canlı türünde de yüksek düzeyde korunmuş 23 amino asitten oluşan diğer bir peptidi tanımlamışlardır ve bu progrelinin 76-98. rezidülerinden oluşan kısmına obestatin adını vermişlerdir. Farklı hayvan türlerindeki grelin ve obestatin sekansları Şekil 2.2.2.1.'de gösterilmiştir.

(a)

	Grelin
İnsan	GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR
Sıçan	GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR
Fare	GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR
Tavuk	GSSFLSPTYKNIQQQKDTRKPTARLHRR
	Obestatin
İnsan	FNAPFDVGIKLSGVQYQQHSQAL-NH2
Sıçan	FNAPFDVGIKLSGAQYQQHGRAL-NH2
Fare	FNAPFDVGIKLSGAQYQQHGRAL-NH2
Tavuk	FNVPF EIGVKITEREYQ EYGQAL-NH2



Şekil 2.2.2.1. Grelin ve obestatin sekansları. (a) insan, sıçan, fare ve tavuk grelin ve obestatin peptitlerinin amino asit sekanslarının karşılaştırması. (b) Obestatin ve grelinin reseptörleri ve amino asit segmentleri. A: Grelinin amino asit segmenti; B: Obestatinin amino asit segmenti. Bütün türlerdeki korunmuş amino asitler kırmızı renkteki harflerle gösterilmiştir (Tang vd., 2008).

2.2.2. Obestatin Reseptörü

Obestatinin keşfinden günümüze kadar yapılan çalışmalar, obestatin reseptörü ile ilgili olarak tartışmalı fikirler ortaya koymaktadırlar. Zhang vd., (2005) obestatinin G protein-kenetli reseptör-39 (GPR39) için endojen bir ligand olduğunu rapor etmişlerdir. Yabani-tip farede obestatin c-fos ekspresyonu indüklemekte fakat GPR39 null farelerde ise c-fos ekspresyonu indüklenmektedir. Bu çalışma modeli ile obestatin ve GPR39 arasındaki ligand-reseptör ilişkisini desteklemektedir (Zhang vd., 2008). Son çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre obestatinin GPR39 için endojen bir ligand olması muhtemel görünmemektedir. Chartrel vd., (Chartrel vd.,

2007) obestatinin GPR39 ile etkileşmediğini GPR39 transfekte edilen hücreler üzerinde çeşitli fonksiyonel tayin yöntemleri ile obestatinin etkisinin olmadığını gözlemleyerek belirlemişlerdir. GPR39 geninin faaliyetinin durdurulduğu farelerde (knockout mice) ile yapılan çalışmada GPR39'un obestatin reseptörü olamayacağı sonucuna ulaşılmıştır (Granada vd., 2008). Granata vd., (2008) yaptıkları çalışmada obestatinin glukagon-benzeri peptid-1 reseptör'e (GLP-1R) bağlanarak β -hücrelerinin ve insan isletinin sağkalımlarını promote ettiğini rapor etmişlerdir. Obestatin reseptörü hala bilinmemektedir ve obestatin, GPR39 ve GLP-1R arasındaki tam ilişki yapılacak olan çalışmalarla ortaya kuyulması gerekmektedir.

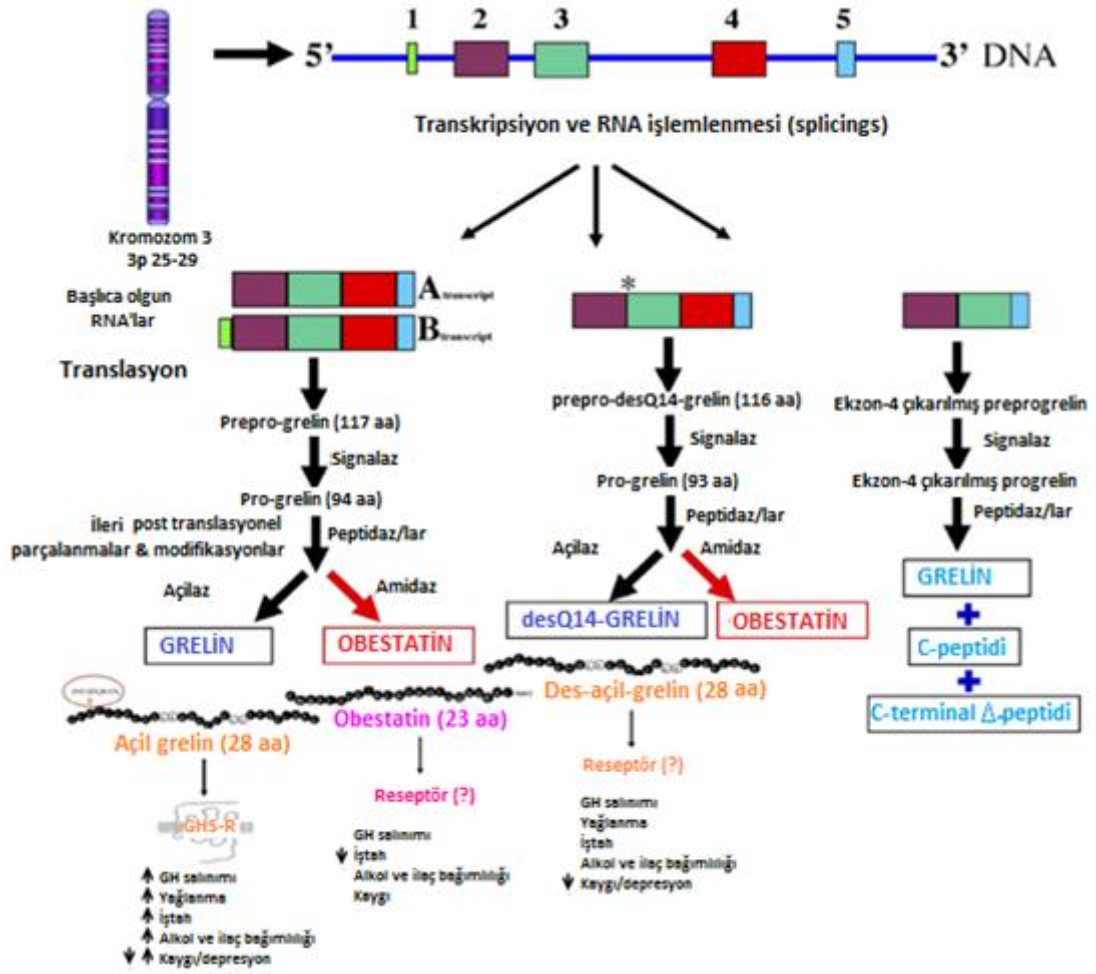
2.2.3. Obestatinin Doku Dağılımı

Obestatin ilk olarak kemirgenlerin midesinden izole edilmiştir (Dun vd., 2006; Zhang vd., 2005). İnce ve kalın barsakta, midede, dalakta, ratların beyin kortaksinde (Zhang vd., 2005) ve perinatal rat pankreasında (Chanoine vd., 2006) obestatin peptidinin, obestatine spesifik antikörlerin kullanıldığı radyoimmüntayin yöntemi ile bu dokularda bulunduğu rapor edilmiştir. Fare ve sıçan obestatine karşı üretilen antikörlerin kullanıldığı immünolojik yöntemler ile gastrik mukoza hücrelerinde, miyenterik pleksusta, fare/sıçan testislerinin Leydig hücrelerinde obestatin immünoreaktivitesi tespit edilmiştir. Fare/sıçan merkezi nöronlarında obestatin biyolojik aktivitesi mikroflorometrik Fura-2 metodu ile değerlendirilmiştir (Dun vd., 2006). İkili-immünofloresans boyama, immünoelektron mikroskopisi ve konvansiyonel elektron mikroskopisi kullanımıyla, obestatinin sıçanların mide, duodenum, jejunum, kolon ve pankreasında mevcut olduğu bulunmuştur (Zhao vd., 2008). Pan vd., (2006) in vivo ve in vitro tekniklerle obestatinin kan beyin bariyeri (KBB) geçişini araştırmışlardır. HPLC analizlerinin obestatin sonuçlarının yanıltıcı olabileceğini ve bu durumda obestatinin hızlı yarılanma ömrü olduğunu yansıtmaktadır. Yine aynı çalışmadan elde edilen veriler KBB'den obestatin geçişi olmadığı durumda beyinde obestatin ekspresyonu olmadığını göstermektedir.

2.2.4. Grelin Geni ve Obestatin

İnsanda grelin geni kromozonel lokasyonu 3p 25-26'dır. İlk yapılan çalışmalarda 4 ekzon ve 3 introna sahip olduğu belirlenen grelin geni, daha sonraki yapılan çalışmalarda 5 ekzondan oluştuğunu ve daha sonra belirlenen ekzon 20 bp uzunluğundaki 1. ekzondur. Tanaka ve arkadaşları (2001) fare grelin geninin 5 ekzon ve 4 introndan oluştuğunu ortaya koymalarının yanı sıra, fare grelin geninin insan grelin geni ile benzerlik gösterdiğini de vurgulamaktadırlar. Fare grelin genindeki ilk 1. ekzon insan grelin genindeki 1. ekzondan daha küçüktür ve 19 bp uzunluğundadır. İlave olarak, mRNA "splicing" varyantları fare testisinde bulunmaktadır. Grelin 5' "flanking" bölgesi çeşitli çalışma gruplarınca incelenmiştir. Start kodonundan 2000 bp "upstream" bölgesi, aktivatör proteini 2 (AP2), basit heliks-ilmek-heliks (bHLH), polima virüs güçlendirici aktivatör 3 (PEA-3), hepatosit nükleer faktör-5, nükleer faktör kapa B (NF-κB) gibi transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgeleri ve aynı zamanda östrojen ve glukokortikoid "response elements" için ise yarım bağlama bölgesi içerir. Grelin geni ve grelin geni promator bölgesi hayvanlar alemi içersinde karşılaştırıldığında yüksek derecede holomoloji göstermektedir. Bu durum grelin geni organizasyonun hayvanlar aleminde korunduğunu göstermektedir (Gualillo, 2006).

Grelin geninde iki farklı transkripsiyon başlangıç bölgesi tanımlanmıştır. Biri -80'de diğeri ise -555'dedir ve ATG başlangıç kodonuna karşılık gelmektedir. Böylece iki temel mRNA transkripti oluşur (A ve B). İnsan grelin cDNA çalışmaları A transkriptinin (ekzon 2'den ekzon 4'e kadar olan alternatif "splicing" ürünü) in vivo insan grelin mRNA'sının ana formu olduğunu ortaya koymuştur. Sıçan, fare ve domuzda 14. pozisyonda glutaminin kodlandığı diğeri "splicing" varyantı oluşmaktadır. Şekil 2.2.4.1.'de ayrıntılı olarak tarif edildiği gibi, ekson 4'dü çıkarılmış mRNA transkripti oluşmaktadır (Gualillo, 2006).



Şekil 2.2.4.1. Grelin, obestatin, grelin izoformları ve terminal peptitleri transisyonel, translasyonel ve post-translasyonel işlemlerin şematik gösterimi (Gualillo vd., 2006; Labarthe vd., 2014)

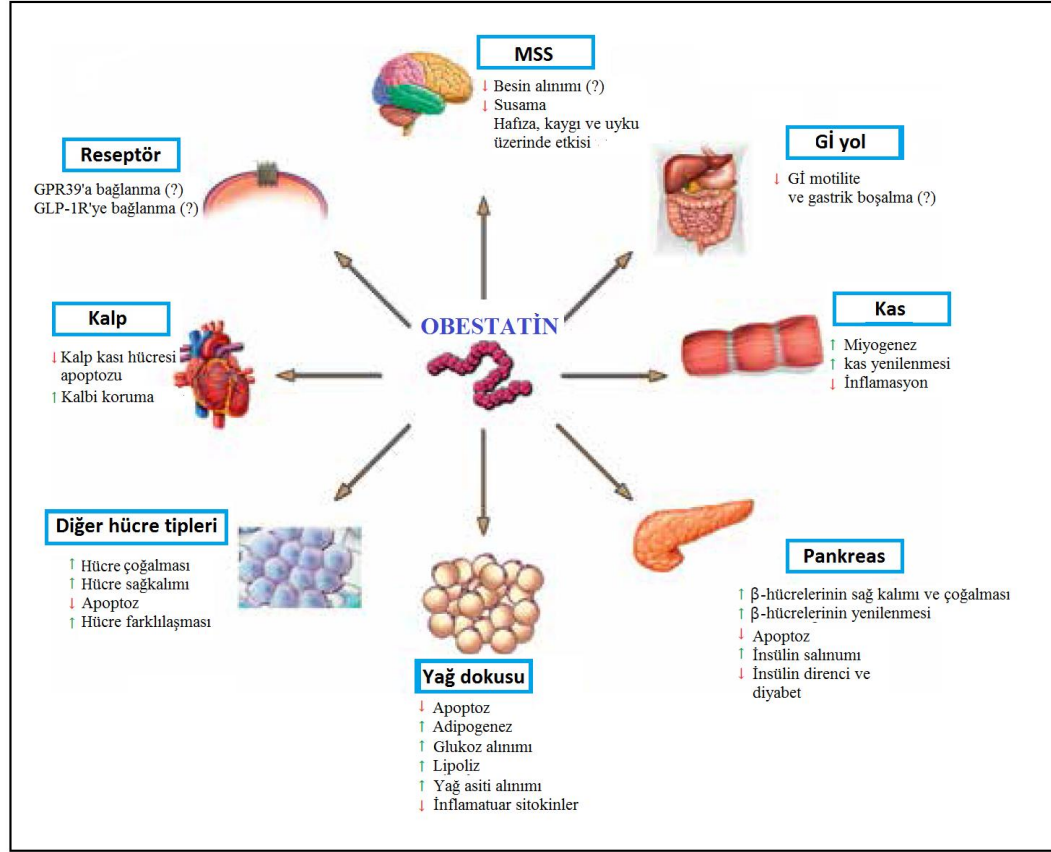
Şekil 2.2.4.1.'de gösterildiği gibi insan grelin geni, alternatif olarak grelinden başka temel olarak des-açıl grelin ve obestatin olmak üzere farklı aktif molekülleri de oluşturabilmektedir. Bu moleküller grelin ve analogları, C-ghrelin ve obestatin olmak üzere üç ana grupta sınıflandırılabilirler (Labarthe vd., 2014).

Post-translasyonel olarak N-terminal 3. amino asiti olan serin kalıntısına n-oktanoik asit bağlanması ile grelin fizyolojik olarak aktif formuna döner. Grelin peptidi üzerinde gerçekleşen bu açıl modifikasyonu, grelinin GHS-R'e bağlanabilmesi ve aktivite gösterebilmesi için gereklidir (Howard vd., 1996). Bu formu, aktif ya da açıl grelin olarak adlandırılır. Yağ asidi bağlanmamış formu ise des-açıl grelin olarak

isimlendirilir. Organizmada, dolaşımda bulunan grelinin, sadece yaklaşık %20'si açıl grelidir. Progrelininden geriye kalan 66 amino asitlik C grelininden ise, fizyolojik olarak grelinin antagonisti olarak davranan ve G proteini bağlı reseptör (GPR) ailesinden GPR39'a bağlanarak etkisini gösteren 'obestatin' sentezlenmektedir (Kojima vd., 1999).

2.2.5. Obestatinin Biyolojik Fonksiyonları

İnsanda obestatinin fizyolojik rolü hakkında çok az bilgi bilinmektedir. Obestatinin, mide ve barsaklardan hormonlar ve maddeler aracılığı ile beyine açlık veya doyumlukla ilgili sinyalizasyonun sağlandığı kompleks mide-beyin ağı kapsamında fonksiyonları olduğu aşikardır. Obestatin salgılanması pulsatildir ve ultradian ritim göstermektedir. obestatinin salgılanma şekli ve ritmik özellikleri grelin ve büyüme hormonları ile benzeşmesine rağmen, plazma grelin ve obestatin seviyeleri tamamen birbirleriyle bağlantılı değildir ve obestatinin pulsatil episodlarının sayısı grelin ve büyüme hormonu salınımında gözlenenden çok az düşük görülebilir (Zizzari vd., 2007). Grelinin aksine obestatin besin alımını azaltan, gastrik boşalmayı ve jejunal motiliteyi azaltan ve kemirgenlerde vücut kilo alımını azaltan anorektik hormon olarak görev yapmaktadır (Ariysu vd., 2001). Yapılan çalışmalarda obestatinin hafızayı güçlendirdiği (Carlini vd., 2007), uykuyu düzenlediği (Szentirmai ve Krueger, 2006), hücre çoğalmasını etkilediği (Camiña vd.,2007; Mészárosová vd., 2008; Pazos vd., 2007), pankreatik enzim sıvısının salgılanmasını artırdığı (Kapica vd., 2007), pankreatik β -hücrelerinin sağkalımını güçlendirdiği (Granata vd., 2008), glukoz-indüksiyonlu insülin salınımını inhibe ettiği (Ren vd., 2008) ortaya koyulmuştur. Dolaşımdaki obestatin, kan beyin bariyeri endotel hücreleri tarafından spesifik alınımı olmamasına rağmen KBB geçerek merkezi sinir sistemine ulaşabilmekte ve bu yolla MSS'ni etkileyebilmektedir (Pan vd., 2006). Obestatinin fizyolojik etkileri Şekil 2.2.5.1.'de özetlenmiştir.



Şekil 2.2.5.1. Obestatinin biyolojik etkileri. Soru işareti tartışmalı verileri belirtmektedir. GLP-1R = Glukagon-benzeri peptid-1 reseptör; GPR39 = G-protein-kenetli reseptör 39; MSS = merkezi sinir sistemi; Gİ = gastro-intestinal (Trovato vd., 2014).

2.2.5.1. Obestatinin Adiposit Fonksiyonu Üzerine Etkileri

Adiposit fonksiyonunda obestatinin hücre sağkalımının düzenlenmesi, adipogenez, glukoz ve lipid metabolizmasında ve adipokin salınımında rolü vardır. obestatin fare beyaz adipoz dokusunda c-fos'u ve 3T3-L1 preadipositlerde c-fos protein ekspresyonunu artırdığı bulunmuştur (Zhang vd., 2008). Obestatinin bu etkilerini GPR39 aktivasyonunu ile gerçekleştirmektedir ve bu durum bağlanma ve GPR39 null farelerde obestatin-indüksiyonlu c-fos upregülasyonu yoksunluğu çalışmalarıyla da desteklenmektedir. 3T3-L1 hücreler ve insan adipositlerinde, obestatinin ekstraselüler sinyal-ilışkili kinaz (ERK1/2) ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/Akt fosforilasyonunu artırdığı (Zhang vd., 2008; Granata vd., 2012), ayrıca bu hücrelerde gözlenen sağkalım ve metabolik etkiler ve diğer hücre tiplerinde sağkalım ve

çoğalma etkileri ile de uyumludur (Granata vd., 2012; Granata vd., 2008; Camiña vd., 2007; Pazos vd., 2007; Miegueu vd., 2011).

GPR39'dan başka, obestatin 3T3-L1 preadipositlere, insan derialtı preadipositlere ve farklılaşmış adipositlere bağlanma özgünlüğü göstermektedir (Granata vd., 2012). GLP-1R'ye bağlanan obestatin, GLP-1R'nin Ex-4 agonisti ve Ex-9 antogonisti ile yer değiştirmektedir ve GLP-1R'ye karşı "small interfering" RNA (siRNA) tarafından engellenmektedir. Bu durum, obestatinin GLP-1R ile etkileşiminin mümkün olabileceğini düşündürmektedir (Granata vd., 2012). Ayrıca GPR39'un tartışmalı rolü, adiposit ve diğer hücre tiplerinde yapılacak olan çalışmalar GLP-1R'nin gerçekten obestatin reseptörü olup olmadığını açıklığa kavuşturmak için gereklidir (Zhang vd., 2013).

Adipogenik sinyalizasyon göz önüne alındığında, obestatin CCAAT-enhancer-bağlayan proteinler (C-EBP) C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ ve perosisom proliferator-aktif eden reseptor- γ (PPAR- γ) gibi adipogenezin anahtar düzenleyicilerinin ekspresyonunu artırmaktadır (Gurriarán-Rodríguez vd., 2011). Obestatinin adipogenik rolü, in vivo şartlarda ratların beyaz adipoz dokusuna obestatin verilmesi ve aynı zamanda düşük-yağ diyeti (DYD) veya yüksek-yağ diyeti (YYD) ile beslen farelere obestatin verilerek yapılacak olan daha ileri çalışmalar ile onaylanması gerekmektedir (Granata vd., 2012; Aragno vd., 2012). Ayrıca obestatin, YYD verilen farelerden, hem obez hem de zayıf bireylerden izole edilen insan derialtı ve omental adipositlerden ve 3T3-L1 de gözlemlendiği gibi lipolizi inhibe ederek lipid metabolizmasını düzenlemektedir (Granata vd., 2012; Miegueu vd., 2011). Benzer şekilde, artışı lipilizin inhibisyonu ile ilişkili olan AMP kinaz (AMPK) fosforilasyonu, hem 3T3-L1 ve insan adipositlerinde obestatin tarafından artırıldığı bulunmuştur (Granata vd., 2012). ayrıca in vivo çalışmalar obestatinin N-terminal ucuna poli etilen glikol bağlanarak (pegilasyon) oluşturulan obestatin analogu ile kronik olarak 14-gün boyunca muamele edilen sıçanların plazma trigliserid seviyeleri anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir (Dun vd., 2006). gözlenen bu durum obestatinin lipid homeostasisinde muhtemel bir rolü olabileceği fikrini doğurmaktadır. bu çalışmalara ilaveten sığır beyaz adipoz dokusuna yapılan obestatin infüzyonları

çalışması ile bu dokuda ABCA1'in (ATP-binding cassette A1) ekspresyon seviyesinin azaldığı belirlenmiştir (Grala vd., 2010).

Obestatin ayrıca adipositlerde glukoz homeostasisini de düzenlemektedir. Gerçekte, obestatin hem 3T3-L1 ve insan derialtı adipositlerinde glukoz alımını artırmakta ve glukoz taşıyıcısı GLUT4'ün translokasyonunu indüklemektedir (Granata vd., 2012; Gurriarán-Rodríguez vd., 2011). NAD-bağımlı deasetilaz sirtulin 1-glukoz transportunun ve ve adipositlerde insülin sinyalinin pozitif düzenleyicisi- spesifik siRNA ile 3T3-L1 adipositlerde bloklanan obestatin-indüksiyonlu glukoz alımını ile SIRT1'in downregülasyonunun gerçekleşmesi obestatinin glukoz regülasyonunda rol oynadığını göstermektedir (Granata vd., 2012). PI3K/Akt hücre membranlarında insülin-sitümülasyonlu glukoz transportu ve GLUT4 translokasyonunda başlıca rolü oynamaktadır ve obestatinin 3T3-L1 insan derialtı adipositlerinde Akt fosforilasyonunu promote ettiği ve aynı zamanda GSK-3 β , mTOR ve S6K1 gibi Akt downstream yolunu da aktive ettiği bulunmuştur (Granata vd., 2012; Gurriarán-Rodríguez vd., 2011).

Akt aktivasyonu obestatin infüzyonu yapılan sıçan beyaz adipoz dokusunda ve YYD ile beslenen aynı zamanda obestatin verilen farelerin yağ, kas ve karaciğerinde in vivo olarak gösterilmiştir (Granata vd., 2012; Gurriarán-Rodríguez vd., 2011). 3T3-L1 ve insan derialtı adipositlerinde obestatin adiponektin salgılanmasını artırmakta ve leptini salgılanmasını ise inhibe etmesi obestatinin sırasıyla glukoz metabolizması üzerinde ya pozitif yada negatif .rolü olabileceğini düşündürmektedir (Granata vd., 2012; Kadowaki vd., 2006; Siegrist-Kaiser vd., 1997).

İn vivo çalışmalar glukoz ve lipid homeostasisini düzenlemede obestatinin pozitif etkisini kanıtlamışlardır. obestatin YYB ile beslenen farede inflanasyon ve insülin direncini hem plazma ve hem de paankreatik insülin seviyelerini artırması ve glukoz seviyelerine destek sağlayarak azaltmaktadır. Bu durum muhtemelen obestatinin insülinotropik faliyetinden dolayı gerçekleşmektedir (Granata vd., 2012). Obestatin YYB ve DYB farelerdeki pankreasın islet hücrelerinde glukoidüksiyonlu insülin salınımını artırmaktadır. obestatin lipoliz üzerine YYD'nin etkisine, apoptosise ve epidimal yağda glugoz alımındaki azalmaya karşı koymaktadır. obestatin verilen

farelerde plazma adiponektin seviyesinde artma leptin seviyesinde ise azalma gözlenmiştir. YFD verilen farelerin hem epidimal ve hem de derialtı yağ dokusunda kültüre edilen adipositlerde de aynı durum söz konusudur ve bu durum kültüre edilen adipositlerden elde edilen veriler ile de uyumludur. Farelerde, obestatin ayrıca glukoz metaboizması ve insülin sinyalizasyonunda yer alans inyalizasyon yollarının aktivasyonu yoluyla yağda proinflamatuvar stokin salınımını inhibe ederek insülin direncinin ve diyabetin ayırıcı bir özelliği olan inflamasyonu azaltmaktadır (Granata vd., 2012).

2.2.5.2. Obestatinin Pankreatik Fonksiyonları

Obestatin ekspresyonu hem fetal hem de yetişkin insan pankreasında grelin ile birlikte gerçekleşmektedir. Obestatin hormonunun grelin hormonu ile birlikte ekspresse edilmeleri β -hücre akıbetinin ve fonksiyonunun bölgesel düzenleyicisi olarak birlikte hareket edebildiklerini göstermektedir (Granata vd., 2008; Grönberg vd., 2008; Volante vd., 2009; Zhao vd., 2008; Walia vd., 2009; Turk vd., 2012) obestatin ayrıca pankreatik β -hücre hatları ve insan pankreatik isletleri tarafindanda salgılanmaktadır ve hem INS-1E β -hücreleri ve hem de anti-obestatin antikorlu insan isletlerinin inkübasyonu sonucu hücre viabilitesinin azaldığı gözlenmiştir. Bu durmda obestatin peptidinin otokrin/parakrin sağkalımda etkili olduğu fikrini ortaya çıkarmaktadır (Granata vd., 2008).

Obestatin ya serum-yoksunluğu şartlarında ya da inflamatuvar sitokinler ile birlikte kültüre edilen β -hücreleri ve insan pankreatik isletlerinin çoğalmasını promote ettiği ve apoptozu azalttığı gözlenmiştir (Granata vd., 2008). β -hücre sağkalımını fonksiyonunu güçlendiren molekülleri tanımlama diyabette yeni stratejik terapilerin dizaynı için ve islet transplantasyonunu güçlendirmek için -ki bu her iki durumda da β -hücre kaybı ve inflamasyonda artma sözkonusudur- birincil öneme sahiptir (Donath vd., 2004). β -hücrelerinde obestatin sağkalım etkileri PI3K/Akt ve ekstraselüler sinyal-ilişkili kinaz (ERK)1/2 gibi sağkalım yollarının aktivasyonuna ve cAMP artışına yol acmaktadır. Obestatin, insulin reseptor substrat 2 (IRS-2), cAMP respons element-bağlayan protein (CREB), pankreatik ve duodenal homeobox 1 (PDX-1) ve glukokinaz gibi İnsülin sinyalizasyonu, glukoz homeostazı, β -hücre

sağkalımı ve farklılaşmasında anahtar rol oynayan genlerin upregülasyonunu sağlamaktadır (Granata vd., 2008). B-hücrelerinde obestatinin etkileri ve altta yatan sinyal yolları GLP-1'inki ile oldukça benzer olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla, buradan obestatinin GLP-1R ile etkileştiği hipotezi ortaya çıkmaktadır. Aslında, β -hücrelerinde obestatin-indüksiyonlu sağkalımı GLP-1R antagonisti exendin-9 varlığında kaybetmektedir ve β -hücrelerinde spesifik bağlanmayı tanımanın yanı sıra, obestatinin GLP-1R'ye bağlandığı ve GLP-1R mRNA'sını upregüle ettiği gösterilmiştir (Granata vd., 2008). GLP-1R'den başka, β -hücrelerinde obestatin sağkalım etkileri grelin reseptör antagonisti [D-Lys3]-GHRP-6 ile kapatılmış olması durumunda bile obestatin grelin ve des-açıl grelin-bağlanma gölgeleri ile etkileşebilmesi grelin geninden oluşan farklı peptitlerin birbirleri ile etkileşebildiklerini ortaya koymaktadır (Granata vd., 2008).

Obestatin, grelin ve des-açıl grelin gibi kronik hiperglisemiye maruz bırakılan insan pankreatik islet mikroendotelyal hücrelerinde (MECs) antiapoptotik etkiler sergilediği gösterilmiştir. Bu etkiler GLP-1R agonisti exendin-4 (Ex-4) tarafından indüklenenler ile aynıdır; üstelik gerçekleşen sinyalizasyon yolu pankreatik β -hücrelerdeki uyarılanlar ile de aynıdır (Favaro vd., 2012). Bu bulgulara dayanarak, bütün grelin geni peptitlerinin islet damarlanmasını ve sonuçta islet hücre fonksiyonlarını güçlendirebileceği söylenebilir.

Kültüre edilen fare pankreatik isleten türeyen prokürsörlerden in vitro β -hücre üretimini promote edebilme yeteneği araştırılmıştır (Baragli vd., 2013). Kültüre edilen fare pankreatik isletlerde, obestatin islet-benzeri hücre kümelerinin (ICCs) oluşumunu indüklemiş olup obestatin ile muamele edilmeyen ICCs'ere göre karşılaştırıldığında insülin gen ekspresyonunu ve c-peptid salınımını artırdığı izlenmiştir. Bu bulgular, gelişen pankreasta obestatinin erken ekspresyonu ile birlikte pankreas rejenerasyonunda ve oluşumunda ayrıca diyabette hücre-tabanlı replasman tedavisinde potansiyel öneme sahip olabilir.

Streptozotosin (STZ) verilen yeni doğan sıçanlar, obestatin, grelin ve des-açıl grelin gibi β -hücre kaybı, glukoz seviyesinde azalma ve pankreatik isletlerde artmış insülin ekspresyonu ve salınımı yoluyla erken yaşta diyabeti azaltmaktadır (Granata vd., 2010). Obestatin ratlarda cerulein-indüksiyonlu pankreatit gelişimini sindirim

enzimlerinin pankreatit-uyarma aktivitelerini azaltarak, pankreatik kan akışını güçlendirerek ve proinflamatuvar interlokin-1 β serum seviyelerini azaltarak inhibe ettiği gösterilmiştir (Ceranowicz vd., 2009). Anestezi yapılmış ratlarda obestatinin intravenöz verilmesi pankreatik protein çıkışını kolesistokinin ve vagal-bağımlı mekanizmalar ile sitimüle etketedir (Aragno vd., 2012; Kellokoski vd., 2009).

Obestatinin insülin salınımındaki rolü hala tartışmalıdır. Hem sitimülatör ve hem de inhibitör etki gösterebilmektedir. Obestatin grelinden daha etkili olarak insülin salınımını inhibe edebilmekte ve yine somatostatin ve pankreatik polipeptid salınımını inhibe etmekte ve ayrıca izole edilmiş fare isletlerinde glukagon salınımını da stimüle etmektedir (Qader vd., 2008). Obestatinin ya sıçanlarda ve izole edilen sıçan pankreatik isletlerde in vivo insülin salınımını inhibe etmekte ya da sıçan ve farelerde hem bazal hem de açlık durumlarında glukoz ve insülin seviyeleri üzerinde herhangi bir etki göstermemektedir (Green vd., 2007). Aksine perfüze sıçan pankreasında, obestatin düşük yada yüksek konsantrasyonda kullanıldığında sırasıyla insülin salınımını ya güçlendirir ya da inhibe eder (Egido vd., 2009) ve arginin ile tolbutamidin sitimülatör etkilerini artırır (Egido vd., 2009). Glukoza cevap olarak obestatin indüksiyonlu insülin salınımı in vitro olarak insan pankreatik isletlerinde ve β -hücre hatlarında (Granata vd., 2008) ayrıca hem DYD ve YYD ile beslenen fare pankreatik isletlerinde in vivo olarak çalışılmıştır (Granata vd., 2012). Obestatinin insülinotropik etkisi GLP-1R’inde dahil olduğu β -hücreleri ve adipositlerde obestatinin sağkalım ve metabolik etkilerini gösteren çalışmalar ile desteklenmektedir (Granata vd., 2010; Granata vd., 2012; Granata vd., 2008).

2.2.5.3. Obestatinin Kardiyovasküler Sistem ve İskelet Kası Üzerine Etkileri

İnsanlarda açlık plazma obestatin seviyeleri sistolik kan basıncı ile negatif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (Anderwald-Stadler vd., 2007). Bununla birlikte yinede, obestatin seviyesi yüksek tansiyonlu sıçanlarda arttığı gözlenmiştir (Li vd., 2010). Diğer taraftan, obestatin kan basıncı düzenlenmesinde rol alabilir. Çünkü obestatin konsantrasyonları norma gebe kadınlarda ve gebelik-indüksiyonlu hipertansiyonlularda sistemik kan basıncı ile pozitif korelasyon göstermektedir (Ren vd., 2009).

İzole edilmiş kalpte, iskemiden önce rat obestatin ilavesi enfarktüs büyüklüğünü ve konsantrasyon-bağımlı tazda kontraktıl fonksiyon bozukluğunu azaltmıştır. Sıçan H9c2 kardiyak hücrelerinde veya izole ventriküler miyositler iskemi/reperfüzyona tabi tutulması durumunda, obestatin kardiyomiyosit apoptozunu ve kaspaz-3-aktivasyonunu azalttığı gözlenmiştir (Alloatti vd., 2010). Obestatin ayrıca sıçan diyabetik miyokardial dokusunda β 1-adrenoreseptörler ve α -myozin ağır zinciri (α -MHC) seviyelerinin yanı sıra papillar kas kasılmasını ve β -adrenerjik cevabı korumaktadır (Aragno vd., 2012). Fakat, obestatin arabinosid-indüksiyonlu apoptozu engellemede veya HL-1 kardiyomiyositlerin yaşayabilirliğini veya hücre döngüsünü modifiye edebilmede yetersiz olduğu bulunmuştur (Iglesias vd., 2007).

Obestatin/GPR39 için rolü kas yenilenmesinde gösterilmiştir, ki bu olayda obestatin GPR39 aracılığı ile miyojenik farklılaşma kontrolünde otokrin fonksiyon sergilemektedir (Gurriarán-Rodríguez vd., 2012). Sıçanlara obestatin infüzyonu miyogenik genlerin ekspresyonunu artırmaktadır ve sergilediği bu fonksiyon kas yenilenmesini de desteklemektedir (Gurriarán-Rodríguez vd., 2012).

2.2.5.4. Obestatinin Patolojik Olaylarla İlişkisi

Obestatin keşfinden itibaren hem fizyolojisi ve hem de hastalıklarla olan ilişkisi araştırılmaktadır. Özellikle obezite ile birlikte diyabet, psikojenik yeme bozukluğu ilişkisi en fazla araştırılan konuların başında gelmektedir. Son yıllarda obestatin peptidi dikkatleri üzerine toplayarak birçok araştırmacı obezite, metabolik ve enerjetik etkilerinden farklı sendromlarında çalışılma konuları içine alarak bu konudaki çalışmalarını yayınlamışlardır (Çizelge 2.2.5.4.1.).

İnsan çalışmalarında plazma obestatin seviyeleri zayıf kontrol grubuna göre obez grupta anlamlı olarak düşük bulunmuştur ve bu çalışmadaki veriler uzun-dönem vücut kilo denetiminde obestatinin rolü olduğunu göstermektedir (Huda vd., 2008). Zamrazilová vd., (2008) normal ağırlıktaki kadın grubu, anoreksik hasta grubu ile obez grubu karşılaştırdıklarında, obez grupta plazma obestatin seviyelerini diğer gruplara göre düşük bulmuşlardır. Anoreksia nervosa veya obez bireylerde, plazma obestatin VKİ, leptin, insülin, glukoz ve HOMA-IR ile negatif korelasyon

gösterirken açıl grelin ve des-açıl grelin ile pozitif korelasyon göstermektedir. Bu durum obestatin ve grelinin bazal sekresyonlarının benzer şekilde düzenlenebileceğini ve insülin direnci ve yağlanmaya karşı birlikte etkileneceğini göstermektedir (Nakahara vd., 2008). Obestatin çocukluk dönemi obezite üzerine obestatinin etkileri Zou vd., (2009) tarafından çalışılmıştır. Obez çocuklarda açlık obestatin ve grelin/obestatin oranı parametreleri değerlendirilmiş olup açlık plazma obestatin seviyelerinin azalma eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen en önemli sonuç, grelin/obestatin oranı yetişkinlerde grelin/obestatin çalışmalarının aksine obez çocuklarda anlamlı olarak düşüktür, kontroldekinlerden ise yüksek olmadığıdır. Butler and Bittel (2007) Prader-Willi sendromunda (PWS) – hızlı kilo alımı ve aşırı besin alımı ile karakterize bir obezite sendromu- plazma obestatin ve grelin seviyelerine bakmışlardır. PWS'li infantlarda obestatin seviyelerini kontrol infantlara göre daha yüksek bulmuşlardır.

Çizelge 2.2.5.4.1. Obestatin bazı hastalıklar ile ilişkisi

Hastalık	Etkileri	Mekanizma	Kaynak
Tip 2 diyabetes mellitus	Düşük glukoz konsantrasyonunda, obestatin glukoz cevapta insülini etkin hale getirir. Yüksek glukoz konsantrasyonunda, obestatin insülin salınımını inhibe eder.	Yüksek glukoz konsantrasyonunda, β -hücreleri normal glukoz seviyesinde olandan obestatine daha az duyarlıdır ve β -hücrelerindeki glukoz konsantrasyonuobestatinin insülinotropik rolü için kritik faktör olarak görülmektedir.	(Egido vd., 2009)
Ateroskleroz	Obestatin endotelial hücrelerde vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1)ekspresyonunu azaltır. Obestatin makrofajlara okside düşük-dansiteli lipoprotein (Ox-LDL) bağlanmasını artırır.	VCAM-1 ekspresyonunda azalma obestatine anti-aterojenik rol kazandırır. Obestatin lipid birikimine ve köpük hücresi oluşumuna götürebilir ve hemen ardından arter duvarında yağ çizgileri oluşumunu başlatabilir.	(Kellokoski vd., 2009)
Anoreksiya nervosa (AN)	AN'li hastalar yüksek plazma obestatin seviyesine sahiptirler.	AN'li bireylerde, artmış preprogrelin gen ekspresyonu obestatin sentezinde artışa yol açar.	(Nakahara vd., 2008)
Kanser	Obestatin-indüksiyonlu hücre çoğalması	Obestatinin etkinliği mitojen-aktive edici protein kinaz kinaz (MAPKK)/ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazlar $\frac{1}{2}$ (ERK1/2) fosforilasyonu ile artırılır.	(Pazos vd., 2007)

3. MATERYAL METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Derin Dondurucu (Liebherr, G 1211 Comfort, Germany).

Soğutmalı Santrifüj (Eppendorf MR 5415, Germany).

Manyetik karıştırıcı (IKAMAG RH, Janke & Kunkel Company GmbH und Co. KG, IKA. Labortechnik, Staufen, Germany).

Hassas Terazı (Precisa 205A SCS, Switzerland).

PH Metre (Metler Toledo MA235 pH/Ion Analyzer, Schwerzenbach, Switzerland).

ELISA plate reader (Epoch, BioTek Instruments, USA).

Orbital platform karıştırıcı (Rotomax 120, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany).

UV Spektrofotometre (Shimadzu UV 1601, Japonya).

Vorteks (Velp Scientifica, Usmate, Italy).

Saf Su Cihazı (Millipore Progard 2, USA)

Otomatik pipetler (Eppendorf, Hamburg, Germany).

Western Blot Güç kaynağı (BIO-RAD POWER. PAC 1000).

Western Blot Görüntüleme Sistemi(Kodak IMAGE STATION 2000MM).

Western Blot Elektroforez Sistemi(BIO-RAD Mini-PROTEAN 3 Cell).

SDS-PAGE Güç kaynağı (BIO-RAD POWER. PAC 1000).

SDS-PAGE Elektroforez Sistemi (BIO-RAD Mini-PROTEAN 3 Cell).

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tris (Tris-HCl), Etilendiamin tetra asidik asit (EDTA), 2-Merkaptoetanol (C_2H_6S), Sükroz ($C_{12}H_{22}O_{11}$), Amonyum Asetat (CH_3COONH_4), Aseton (C_3H_6O), Metanol (CH_3OH), Sodyum klorür (NaCl), Potasyum klorür (KCl), Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), Sodyum dodesil sülfat (SDS) [$CH_3(CH_2)_{11}SO_3Na$], Triton-X-100 ($C_8H_{17}C_6H_4(OC_2H_4)_{9-10}OH$), Gliserol ($HOCH_2CH(OH)CH_2OH$), Bovine Serum Albumin (BSA), Sodyum azid (NaN_3), Potasyum sodyum tartarat tetrahidrat [$KOCOCH(OH)CH(OH)COONa \times 4H_2O$], Sodyum karbonat (Na_2CO_3), Bakır sülfat ($CuSO_4$), Sodyum Hidroksit (NaOH), Hidrojen Klorür (HCl) Merck firmasından, Sodyum Tiyosülfat Çözeltisi ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$), Gümüş Nitrat Çözeltisi ($AgNO_3$), Ammonium Persulfate [$(NH_4)_2S_2O_8$], Akrilamid (C_3H_5NO), Bisakrilamid ($C_7H_{10}N_2O_2$), Tween20 ($C_{58}H_{114}O_{26}$), Hidrojen peroksit (H_2O_2), Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$), Sitrik Asit ($C_6H_8O_7$), Tris baz ($NH_2C(CH_2OH)_3$), Gliserol ($C_3H_8O_3$), Asetik Asit ($C_2H_4O_2$), Etanol (C_2H_6O), Trisin ($(HOCH_2)_3CNHCH_2CO_2H$), Tris Aminometan ($NH_2C(CH_2OH)_3$), N,N,N,N-Tetra-metiletilenenediamin (TEMED) ($C_6H_{16}N_2$), Polivilidenflorid (PVDF), Sodyum monohidrojen fosfat ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$), Gliserol ($C_3H_8O_3$), Proteaz inhibitörü (Lot No: D00114434), Glisin ($C_2H_5NO_2$), Monoklonal Anti-Rabbit IgG (γ -zinciri spesifik) alkalın fosfataz antikoru (Cat No: A2556), BCIP/NBT solution premixed (Lot No:SLBH9838V), Ultra Low Range Molecular Weight Marke (M.W.1,060-26,600 kDa; M3546), Obestatin Human (Pro No: O0141), proteaz inhibitör kokteyli (Cat No: P9599), o-Phenylenediamine dihydrochloride (Pro No: P8287) SIGMA firmasından, Kromatografi kağıdı (3MM Chr; Cat No: 3030 681) Whatman firmasından, Immobilon-P transfer membranı (Immobilon-P transfer membran 0.45 μ m; Cat No: IPVH00010), Anti-obestatin antibody (Cat No: AB9894) MILLIPORE firmasından, NRMWM Normal Range Molecular Weight Marker. (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder M.W.10,00-250,00 kDa; 26619) Thermo Scientific firmasından, Peroxidase-Conjugated Goat anti-Rabbit IgG(H+L) (Cat No:28177) ANASPEC firmasından temin edilmiştir.

3.1.3. Bitki Materyali

Tez çalışmasında model organizma olarak çay (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) kullanıldı. Bitki materyalleri Türkiye florasında doğal olarak yetişen 2014 yılı Mayıs ayı başında Trabzon ili Of ilçesinin Solaklı Mahallesiindeki çay bahçesinden temin edildi. Soğuk zincirde Isparta 'ya nakledildi. Toplanan bitkilerin analizi yapılacak olan uç filiz yaprakları ayrılarak analiz zamanına kadar yaş olarak -20 °C'de muhafaza edildi.

3.2. Total Protein İzolasyonu

Çay (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) örnekleri -20 °C'den + 4°C'ye çıkartılarak bu sıcaklıkta total protein izolasyonu Ni vd., (1996) önerdiği metoda göre yapıldı.

3.2.1. Deneyde Kullanılan Çözeltiler

PPS tamponu: 2 M KPO₄, pH: 7,8.

63.2 g K₂HPO₄ ve 5.0 g KH₂PO₄ tartılarak bir miktar suda çözüldü. pH 7,8' ayarlandıktan sonra son hacim 200 mL'ye tamamlandı.

EDTA çözeltisi: 0,5 M, pH:8.

46.52g EDTA tartıldı ve bir miktar dH₂O eklenerek bazik ortamda (10 N NaOH ile pH 8' ayarlanarak) çözünmesi sağlandı. Son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

NaOH: 10 N.

<u>Stok</u>	<u>250 mL için</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
NaOH	100g	10N

dH₂O ile 250 mL'ye tamamlanarak oda Sıcaklığında plastik şişede muhafaza edilir.

Gliserol: %80.

<u>Stok</u>	<u>250 mL için</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
%100 Gliserol	80ml	%80
dH ₂ O	20ml	

DTT:1M.

<u>Stok</u>	<u>10 mL için</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
DTT	1.545g	1M

0.01M NaOAc ile 10mL'ye tamamlanır. Filtreden geçirilir ve 1 mL'lik aligotlarına ayrılarak -80°C'de muhafaza edilir.

(0.01M NaOAc çözeltisi: 3M NaOAc'dan 33 µL alınarak dH₂O ile 10 mL'ye tamamlanır).

QB tamponu: 100 mM PPS, % 1 Triton-X 100, % 10 Gliserol, 1 mM EDTA, pH: 7,4.

<u>Çözeltiler</u>	<u>100 mL için</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
2 M KPO ₄ (pH 7.8)	5 ml	100 mM
0.5 M EDTA	200 µL	1 mM
Triton X-100	1 ml	%1
80% Glycerol	12.5 ml	%10
DTT 1M	10 mL	100 mM

dH₂O ile 100 mL'ye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilir. (QB'ye DTT ilave edildikten sonra kullanılması gerekir. Şayet çözelti bekletilecek ise -20°C muhafaza edilir).

3.2.2. Deneyin Yapılışı

Havan içerisinde sıvı azot ve PVPP (0.05 g/g bitki) ilave edilerek toz haline gelinceye kadar ezilen bitki örneklerine 1:2 (g doku/mL QB) oranında QB tamponu katıldı. Hamur kıvamı alana kadar karıştırıldı. Daha sonra falkon tüplerine alınan homejenatlar 6000 g x 4°C’de 3 kez 15 dakika olacak şekilde santrifüj edildi. Her bir santrifüj sonrası süpernatant kısımları toplandı. Süpernatantlara proteaz inhibitörü ilave edilerek (0,035 mL/g doku) -20 °C’ de bekletildi.

3.3. Bitki Ekstraktlarının Obestatin İmmünoaktivitesi

Bitki ekstraktı ve insan serum örneklerinde obestatin immünoaktivitesi direkt ELISA yöntemi ile belirlendi.

3.3.1. Numunelerin Hazırlanması

Bitki ekstraktlarının hazırlanması: -21 °C’de saklanan bitkisel protein ekstraktları analiz öncesi oda sıcaklığına getirilerek vortekslendi. Örnekler oda sıcaklığında 2000 rpm’de 3 dakika santrifüjlenerek çözünmemiş partiküllerin dibe çökmesi sağlandı. Süpernatant kısmı ELISA’da kullanıldı.

Serum havuzunun hazırlanması: Sabah aç karnına sağlıklı bireylerden antikoagülan içermeyen tüplere alınan kan örnekleri (n = 10) doğal pıhtılaşmaya müteakip 3000 rpm’de santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatant kısımdan elde edilen kan serumları tek bir tüpte toplanarak serum havuzu oluşturuldu. Serum havuzu günlük olarak hazırlandı. Serum havuzundaki obestatin konsantrasyonunun ELISA ile belirlenmesinde serumlar direk olarak ve ½ oranında kaplama tamponu ile seyreltilerek uygulandı.

Obestatin standartlarının hazırlanması: Liyofilize haldeki insan obestatinine (1mg/vial) 1 mL ddH₂O ilave edilerek 1mg/mL’lik standart obestatin çözeltisi elde edildi. Standart çözelti 1/100 oranında kaplama tamponu ile seyreltilerek obestatin

stok standart çözeltisi hazırlandı ve ardından stok standart çözelti kaplama tamponu ile ardışık seyreltmeler yapılarak 8 adet standart hazırlandı. Bu işlemler sonucunda 1'den 8'ye kadar olan ependorflardaki obestatin konsantrasyonu sırasıyla 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125, 0,1563 ve 0,07813 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Obestatin içermeyen tampon çözeltisi 0 ng/ml olarak kullanıldı.

Rabbit anti-obestatin poliklonal antikor çözeltisinin hazırlanması: 1mg/mL'lik stok antikor çözeltisinden 5 μL alarak 10 mL'ye kaplama tamponu ile tamamlandı (1/2000 dilüsyon).

İşaretli antikor çözeltisinin hazırlanması: Peroksidaz-konjuge edilmiş goat anti-rabbit IgG (H+L) stok çözeltisi (1 mg/mL) 1/10000 oranında numune seyreltme çözeltisi ile seyreltilti.

3.3.2. Deneyde Kullanılan Çözeltiler

Adsorpsiyon (Kaplama) tamponu: 50 mM arbonat, pH: 9,6.

1.59g Na_2CO_3 (0,015 M) ve 2.93g NaHCO_3 (0,035 M) bir miktar ddH₂O'da çözündükten sonra pH 9,6'ya ayarlandı ve son hacim 1 L'ye tamamlandı. Hazırlan çözelti 2 haftadan fazla oda sıcaklığında bekletilmez.

PBS: 10 mM PBS, pH: 7,4.

8.0g NaCl

1.15g Na_2HPO_4

0.2g KH_2PO_4

0.2g KCl

Tartılarak bir miktar ddH₂O'da çözüldü. pH 7,4'e ayarlandıktan sonra son hacim 1 L'ye tamamlandı.

Bloklama tamponu: %1 BSA içeren 10 mm PBS çözeltisi, pH:7,4.

2,5 g BSA tartılarak bir miktar PBS'de çözüldü ve son hacim PBS ile 250 mL'ye tamamlandı.

Yıkama tamponu: % 0.1 Tween-20 içeren 10 mM PBS tampon çözeltisi.

1 mL tween 20 999 mL PPS içinde yavaşça karıştırılarak hazırlandı.

Numune seyreltme çözeltisi: % 1 BSA içeren yıkama tamponu

1 gram BSA 100 mL yıkama tamponu içersinde çözülerek hazırlandı.

Sübstrat tamponu: 0,05 M fosfat sitrat tamponu, pH:5.0.

2,6 g sitrat ($C_6H_8O_7$) ve 6,9 g Na_2HPO_4 (susuz) bir miktar saf suda çözünerek pH =5'e 1N NaOH yavaş yavaş ilave edilerek ayarlandı ve son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

OPD substrat çözeltisi:

10 mg'lık 1 tablet OPD 0,4 mg/mL olacak şekilde fosfat sitrat tamponunda çözüldü. Hemen kullanmadan önce %30'luk H_2O_2 'den 0,4 μ L/mL olacak şekilde ilave edildi.

Durdurma çözeltisi: 2.5 M H_2SO_4 .

18 M H_2SO_4 stok çözeltiden 13,9 mL alındı ve 86 mL distile su içinde çözüldü.

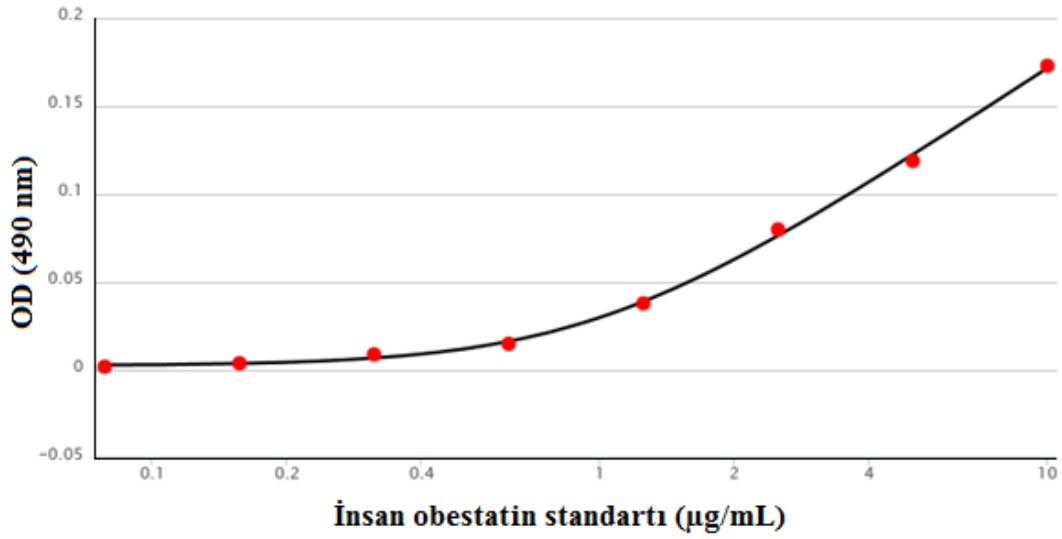
3.3.3. Deneyin Yapılışı

1. Kör, standartlar ve numune kuyularına 50 μ l adsorpsion (kaplama) tamponu eklendi.
2. Standart ve numune kuyularına 50 μ l numuneler yüklendi. Standartlar ve numuneler ikili olarak çalışıldı.
3. 1 gece +4° C de inkübe edildi.

4. Süre bitiminde plate +4° C den çıkartılarak oda ısına gelmesi beklendi. Ardından plate yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkandı.
5. Standart, kör ve numune kuyucuklarına 50 µl ploklaama tamponu ilave edilerek 37°C'de 1 saat bekletildi ve süre bitiminde kuyucuklardan ploklaama tomponu boşaltıldı.
6. Kuyucuklara rabbit anti-grelin antikorundan 50 µL ilave edilerek 37°C'de 1 saat bekletildi.
7. Süre bitiminde plate yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkandı.
8. Ardından tüm kuyucuklara 50 µL işaretli antikor çözeltisi ilave edilerek 37°C'de 1 saat bekletildi.
9. Plate yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkandı.
10. Standart, kör ve numune kuyucuklarına OPD substrat çözeltisinden 50 µl eklendi.
11. Karanlıkta 37°C'de 30 dakika beklendi veya renk oluşumu takip edildi.
12. Süre bitiminde veya renk dönüşümü gözlemlendikten sonra kuyucuklara 100 µL durdurma çözeltisi ilave edildi ve 492 nm'de ELİSA okuyucusunda absorbanları okundu.

3.3.4. Deney Sonuçlarının Hesaplanması

Obestatin standart konsantrasyonlarına karşı ELISA okuyusunda 490 nm'de elde edilen optik dansite değerleri semi-logaritmik olarak Master Plex® programı yardımıyla 5- parametrelili logistic regresyon yöntemi ile hesaplanarak standart grafiği çizildi (Şekil). Örneklerdeki obestatin ve bitki ekstraktlarındaki obestatin benzeri immünoreaktif maddelerin konsantrasyonları standart grafiğe göre belirlendi.



Şekil 3.3.4.1. Obestatin direkt ELİSA standart grafiği ($R^2= 0,9988$, $a= 0,002605$, $b= 1.852$, $c= 1.007$ $d=9.501$; a: alt asimptot, b: eğim, c: x değerine karşılık gelen y değeri, d: üst asimptot).

3.4. Trisin SDS-PAGE

3.4.1. Trisin SDS-PAGE Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1.1. Jel Çözeltileri

Akrilamid/bisakrilamid çözeltisi: % 49.5 T, % 3 C karışımı.

4,8 g Akrilamid ve 0,15 g bisakrilamid bir miktar ddH₂O içerisinde çözündükten sonra son hacim 10 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 7-10 °C'de saklandı.

Jel Tamponu Çözeltisi: 3 M tris, %0,3 SDS, pH:8,43: 3x

18.17 g Tris-Baz ve 0.15 g SDS tartılarak bir miktar ddH₂O'da çözündükten sonra pH= 8,45'e ayarlandı ve son hacim 50 mL'ye tamamlandı.

10 SDS (sodyum dodesil sülfat) çözeltisi:: %10 (w/v)

10 gr SDS tartıldı ve 100 mL distile su içinde çözüldü.

APS (amonyum persülfat) çözeltisi: %10 (w/v)

0,1 gr APS tartılarak ddH₂O ile 1 mL'ye tamamlandı. (APS tek kullanımlıktır ve günlük hazırlanır).

3.4.1.2. Elektroforez Çözeltileri

Anod tamponu (10x): 1 M Tris-HCl, 0.025 M HCl.

60.55 gram Tris-HCl 500 mL için

9.375 mL HCl 500 mL için

Yukarıdaki maddeler tartıldı ve 400 mL ddH₂O içinde çözündü. 1N NaOH ile pH'sı 8,9 'a ayarlandı. Son hacim ddH₂O ile 500 mL'ye tamamlandı.

Katot tamponu (5x): 1 M Tris-HCl, 1 M Trisin, 1 M SDS.

12.11 g Tris-HCl 100 mL için

17.92 g Trisin 100 mL için

1 g SDS 100 mL için

Yukarıdaki maddeler tartıldı ve 50 mL ddH₂O içinde çözündü. 1N NaOH ile pH'sı 8.25'e ayarlandı. Son hacim ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.4.1.3. Gümüş Boyama Çözeltileri

Fiksasyon çözeltisi: 0,1 M amonyum asetat (w/v), %50 metanol (v/v), %10 asetik asit (v/v)

3.854 g Amonyum asetat 500 mL için

250 mL Metanol 500 mL için

50 mL Asetik asit 500 mL için

200 mL dH₂O 500 mL için

Etanol çözeltisi: % 50 Etanol (v/v).

100 mL Etanol 200 mL için

100 mL dH₂O 200 mL için

Sodyum tiyosülfat çözeltisi: %0,01 sodyum tiyosülfat (w/v).

0,02 g sodyum tiyosülfat 100 mL distile suda çözüldü.

Gümüş nitrat çözeltisi: %0,01 gümüş nitrat (w/v).

0.02 g Gümüş nitrat 200 mL için

200 mL dH₂O 200 mL için

Sodyum karbonat çözeltisi: %3 sodyum karbonat (w/v), %0,0025 formaldehid (v/v), %0,0002 (w/v).

6 g Sodyum karbonat 200 mL için

50 µl Fornaldehit 200 mL için

2 mL Sodyum tiyosülfat 200 mL için

6 gram Sodyum karbonat tartıldı ve 150 mL distile su içinde çözüldü. Yukarıda hazırlanan sodyum tiyosülfattan 2 mL ilave edildi. Kullanılmadan 1 saat önce karışıma formaldehit eklendi ve son hacim 200 mL'ye tamamlandı.

EDTA Çözeltisi: 50 mM

7,31 g EDTA 500 mL distile su içerisinde çözüldü.

3.4.1.4. Numune Çözeltisi

2x Numune tamponu (SB):

100 mM Tris-HCl (pH:6,8), % 1'lik SDS (w/v), % 4'lük 2-merkaptoetanol (v/v), % 0.02 Brilliant blue G (w/v), % 24'lük Gliserol (v/v).

3.4.2. Deneyin Yapılışı

3.4.2.1. Jellerin Hazırlanması

Çizelge 3.4.2.1.1. Ayırma jelinin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler ve miktarları

Akrilamid / bisakrilamid	2 mL
Jel buffer	3.33 mL
Gliserol	1 mL
ddH ₂ O	3.7 mL
APS	50 µl
TEMED	5 µl

Çizelge 3.4.2.1.2. Yığılma jelinin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler ve miktarları

Akrilamid / bisakrilamid	0.5 mL
Jel buffer	1.5 mL
Gliserol	-
ddH ₂ O	4 mL
APS	45 µl
TEMED	4.5 µl

Trisin-SDS-PAGE'de "BIO-RAD Mini-PROTEAN 3 Cell" elektroforez sistemi kullanıldı. Tablo 3.4.2.1.1.'e göre hazırlanan %10'luk ayırma jeli camlar arasına yüklendi. Kabarcık kalmamasına dikkat edildi. Jel polimerleşene kadar bekletildi. Polimerleşmenin ardından Çizelge 3.4.2.1.2.'e göre hazırlanan % 4'lük

yıgma jeli ayırma jel üzerine döküldü. Numune kuyucuklarının oluşması için taraklar yerleştirildi. Jel polimerizasyonunun tamamlandığından emin olduğu zaman taraklar çekildi.

3.4.2.2. Numune Hazırlama

Numuneler: Numuneler Çizelge 3.4.2.2.1.'e göre hazırlandı.

Çizelge 3.4.2.2.1. Trisin-SDS-PAGE için numune hazırlama çizelgesi

Örnek cinsi	Örnek (µL)	Numune tamponu (µL)
QB ekstraktı	15	15
Obestatin standartı	15	15
ULRMWM (M.W. 1,060-26,600 kDa)	10	-
NRMWM (M.W. 10-250 kDa)	5	-

ULRMWM: Ultra Low Range Molecular Weight Marker; NRMWM Normal Range Molecular Weight Marker.

Çizelgeye göre pipetlemeleri yapılan, standart ve protein ağırlık markörleri 95°C'de 10 dakika bekletildi. 95°C'de denatürasyonun hemen ardından buzlu su içerisine alındı. Ve ardından jele yükleme işlemine geçildi.

3.4.3.3. Elektroforez

Anod tampon ve katot tampon hazırlandıktan sonra jel elektroforez tankı içerisine yerleştirildi. Kuyucukların üzerleri kapatılacak şekilde 1x katot tampon döküldü. Dış tank kısmına ise 1x anod tampon döküldü. Kuyucuklar insülin iğnesi yardımı ile temizlendi. Kuyucuk diplerinin temiz olmasına dikket edildi. Yaklaşık olarak 30 µg/kuyucuk olacak şekilde numuneler kuyucuklara pipet yardımı ile yüklendi. Elektroforez tankının kapağı kapatıldı. 50V'da yarım saat, 100 V'da 1 saat yürütüldü.

3.4.3.4. Boyama

1. Göç aşaması tamamlanmış olan jel, yığma jeli tarafından bir bisturi yardımı ile ayrıldı. Fiksasyon çözeltisinde yarım saat bekletildi.
2. % 50 etanol çözeltisi ile 2 kez 10 dakika yıkama yapıldı.
3. Sodyum tiyosülfatta 1 dk bekletildi.
4. ddH₂O ile 2 kez yıkama yapıldı.
5. Gümüş nitrat çözerlisinde 20 dakika bekletildi.
6. ddH₂O ile 2 kez yıkama yapıldı.
7. Sodyum karbonat çözeltisinde bantlar belirginleşene kadar bekletildi.
8. EDTA çözeltisine alınarak boyama işlemi sonlandırıldı.

3.5. Western Blot Yöntemi ile Grelin Karakterizasyonu

Çalışmada çay (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) bitkisinin QB ekstraktları, insan obestatin standartı ve insan kan serumu kullanıldı. Bitki ekstraktları kuyucuk başına 30 µg/mL ve 15 µg/mL olacak şekilde, insan obestatin standartı ise 10 µg/mL olacak şekilde kuyucuklara yüklendi. Western blotlamada, blotlama öncesi yapılan trisin-SDS-PAGE % 49.5 T, % 3 C karışımından hazırlanan %10'luk ayırma ve %4'lük yığma jeli kullanıldı. Yapılan tüm işlemler ve kullanılan çözeltiler "Trisin-SDS-PAGE" başlığı altında verilmiştir.

3.5.1. Western Blot Çözeltileri

Transfer tamponu

2,424 g Tris aminometan

11,528 g Glisin

4 mL % 10 SDS

Yukarıdaki maddeler 636 mL distile su içerisinde çözöldü ve son olarak 160 mL metanol ilave edildi.

PBS: 10 mM PBS, pH: 7,4

8.0g NaCl

1.15g Na₂HPO₄

0.2g KH₂PO₄

0.2g KCl

Tartılarak bir miktar ddH₂O'da çözöltü. pH 7,4'e ayarlandıktan sonra son hacim 1 L'ye tamamlandı.

Bloklama tamponu: %3 BSA içeren yıkama tamponu, pH:7,4

3g BSA tartılarak bir miktar PBS'de çözöldü ve son hacim PBS ile 300 mL'ye tamamlandı.

Yıkama tamponu: % 0.05 Tween-20 içeren 10 mM PBS tampon çözöltisi.

0,5 mL Tween-20 ve 999,5 mL PPS yavaşca karıştırılarak hazırlandı.

Numune seyreltme çözöltisi: % 1 BSA içeren yıkama tamponu.

1 gram BSA bir miktar yıkama tamponunda çözünerek son hacim 100 mL'ye yıkama tamponu ile tamamlandı.

Primer Ab çözöltisi: 1/500 (v/v).

Obestatin antikoru: 1/500 oranında numune seyreltme çözöltisi ile seyreltildi. (10 µl obestatin antikoru 5 mL numune seyreltme çözöltisi ile seyreltildi.

Sekonder Ab-HRP-konjugat: 1/5000 (v/v).

Monoklonal anti-rabbit Ab-HRP çözeltisinden 4 µl alınarak numune seyreltme çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlandı.

3.5.2. Elektrobloklama

SDS-PAGE'de İz boyası jelin alt kısmına ulaştığında güç kaynağı kapatıldı. Elektrobloklamada kullanılacak olan süngerler ve filtre kâğıtları transfer tamponu ile ıslatıldı. Göç aşaması tamamlanmış olan jel yığıma jeli tarafından bir bisturi yardımı ile camlardan ayrıldı. Ayırma jeli yığıma jelinden bir bisturi yardımı ile ayrılarak transfer tamponu içinde 15 dakika bekletildi. Bu arada Immobilon-P transfer membranı 30 saniye metanolde 2 dakika distile su içinde bekletildi. Son olarak transfer tamponunda 5 dakika bekletildi.

Transfer aşamasında ki işlemler dikkatli bir şekilde şu sıra ile yapıldı:

- Izgaranın (-) katot kısmına karşılık gelecek şekilde yerleştirildi.
- Kasetin üzerine ıslak sünger onun üzerine de ıslak filtre kâğıdı yerleştirildi.
- Jel elektroforez aletinden çıkarıldıktan sonra bir spatula yardımı ile ıslak filtre kağıdının üzerine alındı.
- Yerleştirme sırasında jel elle hava kabarcığı kalmayacak şekilde düzeltildi ve üzerine transfer membranı konuldu.
- Transfer membranın üzerine ıslak filtre kâğıdı ve onun üzerine 2 adet ıslak sünger konuldu.
- Kapak (+) anod kısmı kapatıldı.

Hazırlanan jel-membran sistemi, +4°C'de saklanan transfer tampon ile doldurulan tankın içine aktarıldı ve ısınmayı önlemek için yanına buz aküleri yerleştirildi. Tankın kapağı kapatıldı ve 95 V, 350 mA'de 1 saatlik akım uygulanarak transfer gerçekleştirildi.

3.5.3. Problema ve Görüntüleme

Transfer işlemi gerçekleştikten sonra membran jel dikkatlice birbirinden ayrıldı. Yıkama 2 defa 10'ar dakika olacak şekilde büyük kaptaki 150-200 mL PBS-T ile karıştırıcıda çalkalanarak yapıldı. Bloklama çözeltisinde 30 dakika karıştırıcıda çalkalama yapıldı. Primer AB çözeltisinde +4°C'de tüm gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası membran 3 defa 10'ar dakika olacak şekilde yıkama çözeltisi ile karıştırıcıda çalkalanarak yıkama yapıldı. Sekonder Ab-HRP-konjugatı ile 60 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Membran 10 mL BCIP-NBT solusyonunda bantlar belirginleşinceye kadar bekletildi. Kodak IMAGE STATION 2000 MM'de okuma yapıldı.

3.6. Obestatin İmmünoreaktivitesi Pozitif Trisin-SDS-PAGE Jel Fraksiyonlarının Trisin-SDS-PAGE ile Karakterizasyonu

Çalışmada çay (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) bitkisinin QB ekstraktları kuyucuk başına 30 µg/mL olacak şekilde tüm kuyucuklara yüklendi. Trisin-SDS-PAGE uygulaması, "Trisin-SDS-PAGE" ve "Western Blot Yöntemi ile Grelin Karakterizasyonu" başlığı altında verilen trisin-SDS-PAGE ile aynı şartlarda yapıldı. SDS-PAGE'de iz boyası jelin alt kısmına ulaştığında güç kaynağı kapatıldı. Cam plakalar dikkatlice birbirinden ayrıldıktan sonra jel 0,3 mm'lik parçalar şeklinde enlemesine bistüri ile kesildi. Elde edilen her bir jel parçası yine bistüri yardımıyla ince ince dilimler haline getirilerek 1,5 mL'lik eppendorf tüplere alındı. Eppendorf tüpe 1 mL ddH₂O ilave edilerek jel parçaları cam baget yardımıyla tekrar ezildi. Vortekslenen örnekler 1 gece +4° C de inkübe edildi. Süre bitiminde vortekslenen örnekler 8000 g'de 15 dakika santrifüzlendi. Elde edilen süpernatant kısımları "Materyal Metod" kısmında alt başlık olarak verilen "Bitki ekstraktlarının obestatin immünoreaktivitesi" yöntemi ile jel fraksiyonlarının immünoreaktivitesi direkt ELISA ile belirlendi. ELISA sonucuna göre obestatin immünoreaktivitesi gösteren jel fraksiyonlarının süpernatant kısımları tekrar "Trisin-SDS-PAGE" başlığı altında verilen yöntemle göre elektroforetik ayrımı sağlandı.

3.7. Lowry Methoduna Göre Protein Tayini

3.7.1. Reaktiflerin Hazırlanması

Lowry reaktifi

- | | |
|---|----------------------|
| A. 2 g Na_2CO_3 | +100 mL deiyonize su |
| B. 0,01 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | +100 mL deiyonize su |
| C. 0.02 g Sodyum Potasyum Tartarat | +100 mL deiyonize su |

Lowry reaktifi: A,B,C çözeltileri 100:1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.

NaOH çözeltisi: 2N NaOH

0.8 g NaOH 10 mL distile suda çözüldü.

Folin reaktifi: 1N folin reaktifi

2N Folin reaktifi ddH₂O ile 1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.

Standart çözeltiler

Standartlar 4 mg/ml olarak hazırlanan stok BSA çözeltisinden 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0313, 0.0156 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı. Seyreltmeler distile su ile yapıldı.

Numune seyreltmesi: 1/20 (v/v)

QB ekstraktı 1/20 oranında distile su ile seyreltildi.

3.7.2. Deneyin yapılışı

Deneyin yapılışı Çizelge 3.7.2.1.'e göre yapılır.

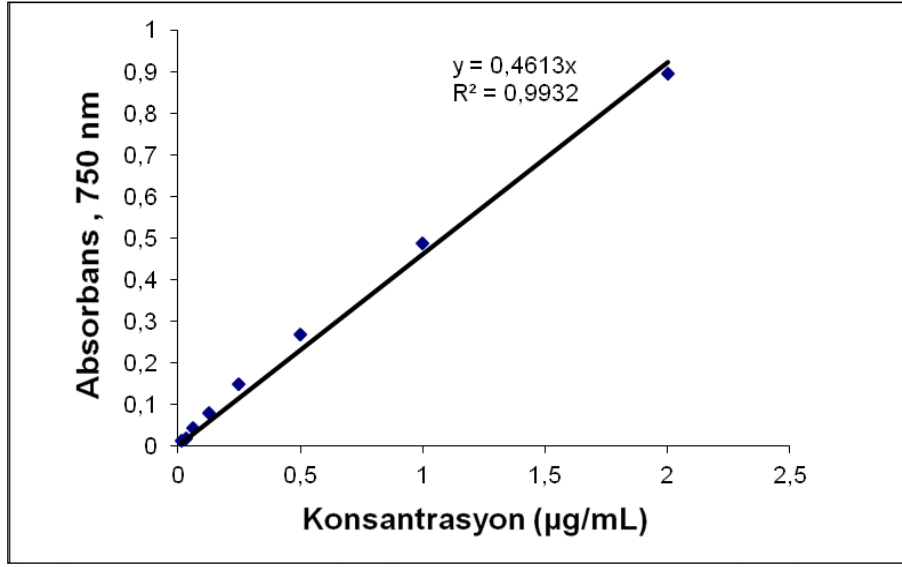
Çizelge 3.7.2.1. Lowry methoduna göre protein tayini ve çözelti miktarları

	Kör	Standart	Numune
Distile su	100 µl	-	-
Standart		100 µl	
Numune	-	-	100 µl
2N NaOH	100 µl	100 µl	100 µl
Lowry reaktifi	1 mL	1 mL	1 mL

Kör, standart ve numunelerin üzerine 2 N NaOH çözeltisinden 100 µl eklendi. 90°C'de 10 dakika bekletildi. Tüpler alt üst edildi. 1 mL lowry reaktifi ilave edildi. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 1N folin reaktifinden 100 µl ilave edildi. Tüpler hemen vortekslendi. 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra köre karşı 750 nm'de spektrofotometrede absorbanları okundu.

3.7.3. Deney sonuçlarının hesaplanması

Protein miktarları BSA standardı kullanılarak belirlendi. Standartların deney protokolüne uygulanmasından sonra elde edilen optik dansitelerin konsantrasyona karşı grafiği çizildi (Şekil 3.7.3.1.) ve numunelerin protein miktarları standart grafikten elde edilen eşitliğe göre hesaplandı.



Şekil 3.7.3.1. Protein tayininde kullanılan BSA standart grafiği

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Protein Tayini Sonuçları

QB ekstraksiyonu ile elde edilen *Camellia sinensis* L. akstraktının ve serum havuzunun Lowry metoduna göre belirlenen total protein miktarları Çizelge 4.1.1’de gösterilmiştir

Çizelge 4.1.1. QB ekstraksiyonu ile elde edilen *Camellia sinensis* L. akstraktının ve serum havuzunun protein miktarları

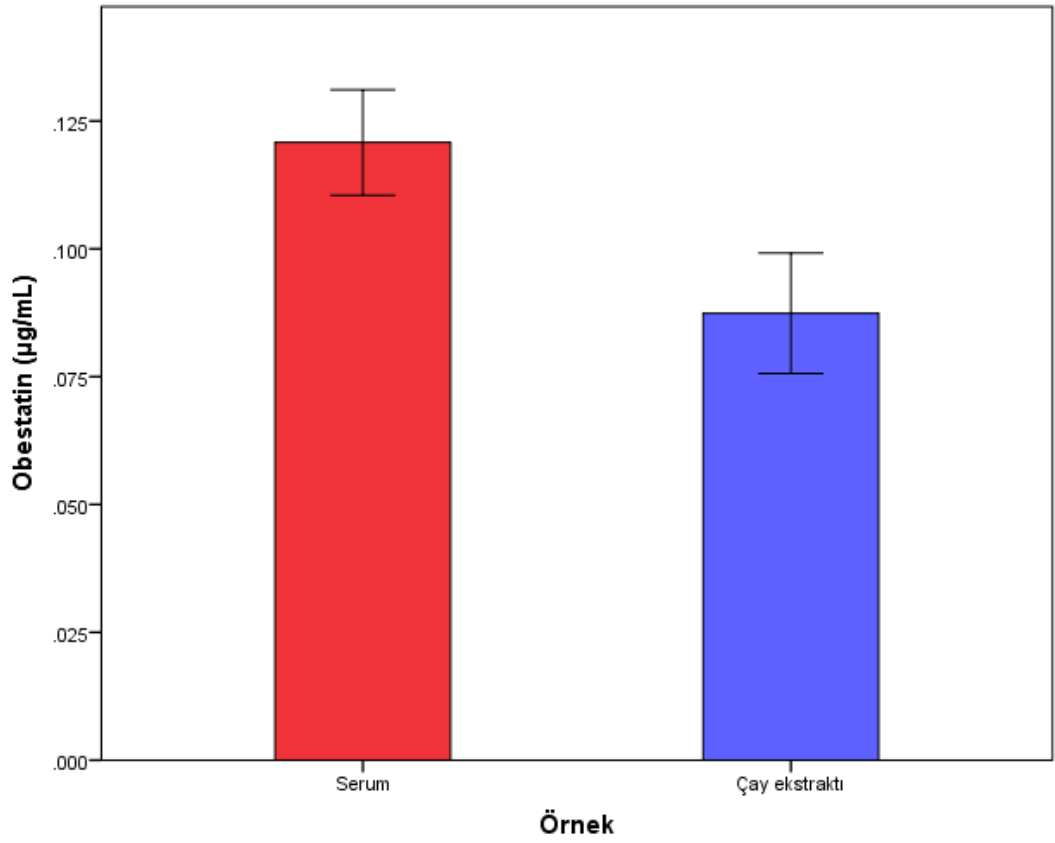
Örnek	Total Protein (mg/g yaş doku; n=3)	Total Protein (mg/mL; n=3)
İnsan serumu	-	72 ± 8,28
QB ekstraktı	4,994 ± 0,52	1,82 ± 0,22

4.2. İnsan Serumu ve QB Ekstraktının Obestatin İmmünoaktivitesi

Laboratuvarımızda Home-made direkt ELISA yöntemi kuruldu. ELISA yönteminin standart grafiği Şekil 3.3.4.1.’de gösterilmiştir. Bitki ekstraktlarındaki obestatin/obestatin-benzeri immünoaktif bileşikler home-made direkt ELISA yöntemi ile belirlendi. Çay ekstraktı ve insan serumunun total obestatin immünoaktivitesi Çizelge de ve Şekil de verilmiştir. Çizelge 4.2.1’de göre serumun ve çay ekstraktının total obestatin immünoaktivitesi µg/mL olarak sırasıyla 0,121 ± 0,053 ve 0,087 ± 0,012 bulunmuştur.

Çizelge 4.2.1. Çay ekstraktının ve insan serumunun total grelin immünoaktiviteleri

Örnek	n	Total obestatin immünoaktivitesi (X±SD; µg/mL)
Serum	5	0,121 ± 0,053
QB ekstraktı	5	0,087 ± 0,012

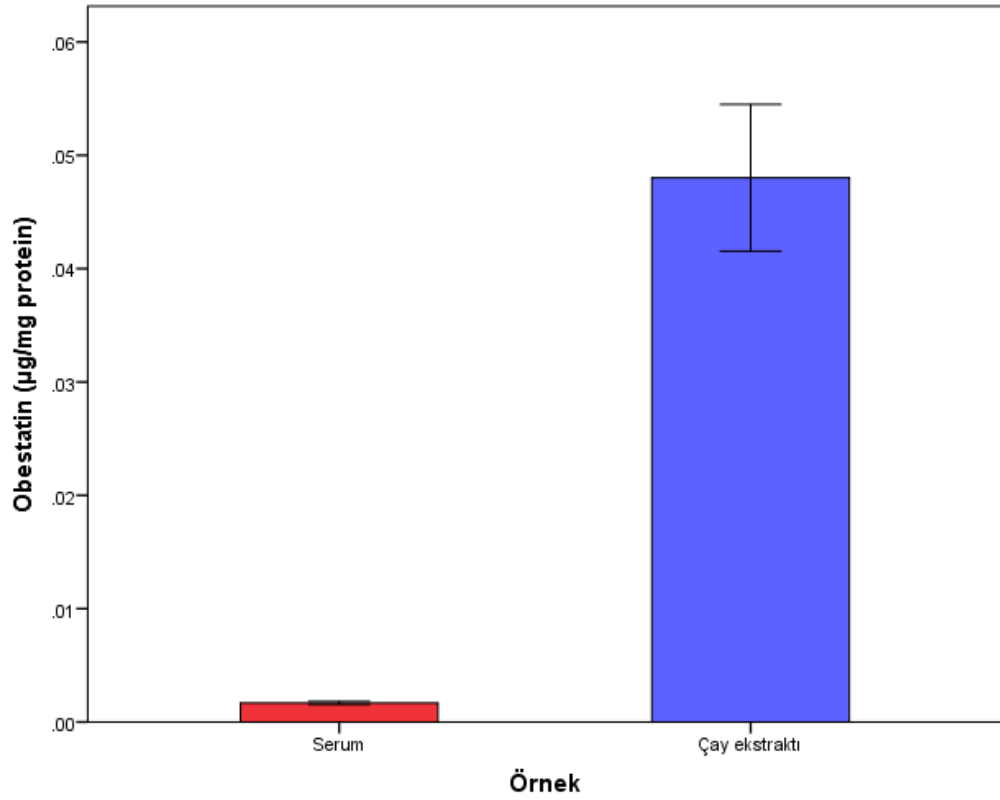


Şekil 4.2.1. İnsan serumu ve çay ekstraktının obestatin konsantrasyonu (µg/mL)

Çizelge 4.2.1. ve Şekil 4.2.1’de ise insan serum ve çay ekstraktı örneklerinin mg protein başına total obestatin immünoreaktiviteleri görülmektedir. Çizelge 4.2.1.’e göre serumun ve çay ekstraktının mg protein başına total obestatin immünoreaktivitesi sırasıyla $0,0017 \pm 0,0002$ ve $0,048 \pm 0,0064$ olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.2.2. İnsan serumu ve çay ekstraktı örneklerinin ihtiva ettikleri proteine göre total grelin immünoreaktivitesi

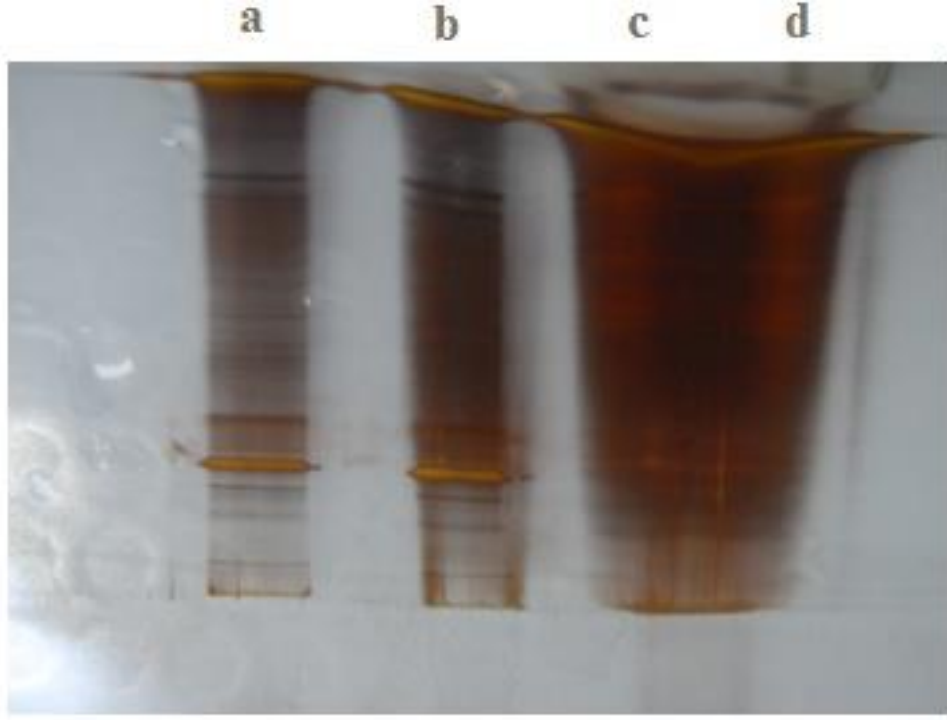
Örnek	n	Total Obestatin immünoreaktivitesi (X±SD; µg/mL)
Serum	5	$0,0017 \pm 0,0002$
QB ekstraktı	5	$0,048 \pm 0,0064$



Şekil 4.2.2. İnsan serumu ve çay ekstraktının obestatin konsantrasyonu (µg/mg protein)

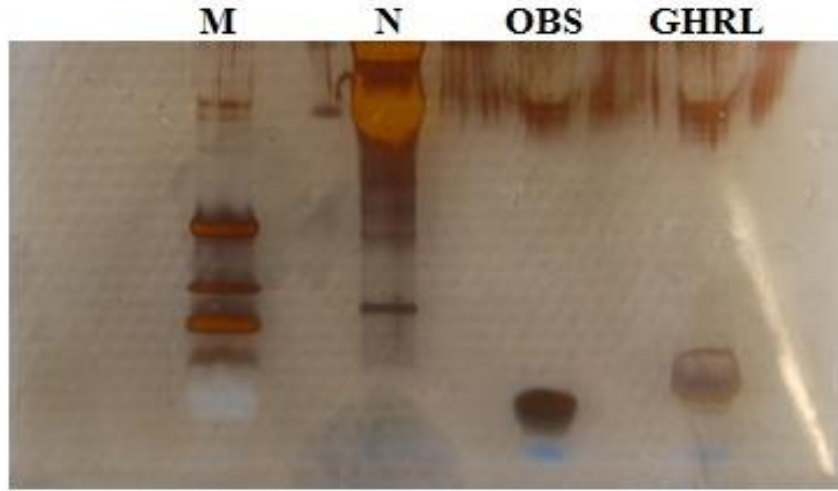
4.3. Trisin SDS-PAGE

Çay bitkisinin QB ekstraktlarının obestatin-benzeri immünorektif maddelerin karakterizasyonu, trisin-SDS-PAGE ile elektroforetik karakterizasyonu yapıldı. Metod optimizasyonunda farklı jel konsantrasyonları kullanılarak en iyi görünümün veya ayırımın sağlandığı % 10'luk trisin-SDS-PAGE tercih edildi. Trisin-SDS-PAGE'nin tercih edilmesinde düşük moleküllü proteinlerin ayırımında daha iyi sonuçlar vermesi göz önünde bulundurulmuştur. Ekstraktın farklı konsantrasyonda jele uygulanması ve ardından gümüş nitrat boyamaya tabi tutulan jel elektroforetik paternine göre değerlendirildiğinde en ideal ayırımın 30 µg/mL'lik protein konsantrasyonunda gözlenmiştir. (Şekil 4.3.1.) Ekstraktın değişen protein konsantrasyonlarındaki elektroforegramları görülmektedir.



Şekil 4.3.1. QB tamponu ile ekstrakte edilen çay ekstraktlarının farklı protein konsantrasyonlar da gliserollü %10'luk (%49,5 T; %3 C) Trisin-SDS-PAGE'deki görünüşleri. (a) 100 µg/mL; (b) 75 µg/mL; (c) 50 µg/mL; (d) 30 µg/mL.

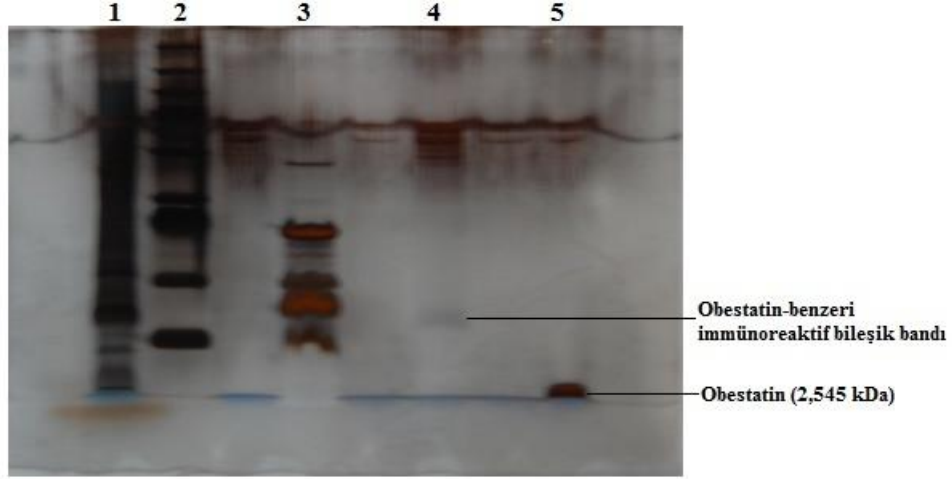
Şekil 4.3.2'de QB ekstraktı, çok düşük ranjlı moleküler ağırlık markörü (M.W. 1,060-26,600 kDa), protein markör (M.W. 10-250 kDa), ve insan grelin standartının elektroforegramları görülmektedir. % 10'luk (% 49,5 T; % 3 C) trisin-SDS-PAGE ile insan grelin hormonu tek band olarak görünümü sağlanmıştır. Şekil 8'deki görünüme göre hem western blotlama ve hem de ELISA pozitif fraksiyonların obestatin-benzeri immünoreaktif bileşiklerinin ortaya koyulması amacıyla yapılacak olan çalışma için PAGE şartlarının sağlanmış olduğu kanaatine varılmıştır. Çok düşük ranjlı protein moleküler ağırlık standartının (1,060-26,600 kDa) trisin-SDS-PAGE görüntüsünde beş bant görülmektedir. 1,060 kDa'luk bant görünümü sağlanamamıştır.



Şekil 4.3.2. Ekstrak, Obestatin, grelin ve protein markörünün %10'luk (% 49,5 T; % 3 C) gliserollü trisin-SDS-PAGE'deki elektroforetik bant profilleri. (N) QB ekstraktı; (Ghrl) insan grelin satandartı ve protein moleküler ağırlık standartı elektroforegramları. (N) Ekstrak 20 µg/mL; (OBS) obestatin standartı (MW: 2,545 kDa); (Ghrl) grelin satandartı (MW: 3,371 kDa) ; (M) Çok düşük ranjlı protein moleküler ağırlık standardı (1,060-26,600 kDa).

4.4. SDS-PAGE ile ELISA Pozitif Obestatin-Benzeri İmmünoreaktif Band Fraksiyonlarının Karakterizasyonu

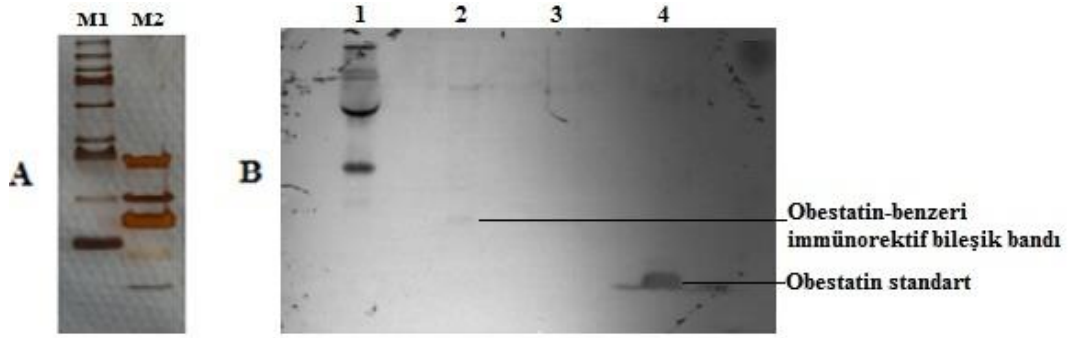
Bitki ekstraktının % 10'luk trisin-SDS PAGE'de yürütüldükten sonra boyama işlemine geçmeden jelin 3 mm'lik enine kesilmesi ile elde edilen jel parçalarının protein izolasyonu ardından tekrar % 10'luk trisin-SDS PAGE'de yürütülmesi ile elde edilen elektroforetik band görünümleri Şekil'da görülmektedir. Şekil 'ya göre insan-antigrelın antikorları ile ELISA tekniğine göre pozitif reaksiyon veren fraksiyon tek band olarak gözlenmiştir. Elde edilen band protein moleküler ağırlık standartları ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak 12 kDa ağırlığında olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.4.1. ELISA pozitif fraksiyonların % 10'luk trisin-SDS-PAGE'deki bant paterni. (1) Çay ekstraktı; (2) Protein moleküler ağırlık standartı (10-250 kDa); (3) Çok düşük ranjlı protein moleküler ağırlık standardı (1,060-26,600 kDa); (4) ELISA pozitif fraksiyon; (5) obestatin satandardı (MW: 2,545 kDa).

4.5. Western Blot Analizi Sonuçları

Camellia sinensis L (çay) ekstraktında obestatin benzeri immünoreaktif bileşiklerin karakterizasyonu western blot tekniği ile ortaya koyuldu. Western blot analizi sonucunda QB tamponu ile elde edilen ekstrakta obestatin-benzeri immünorekatif bileşiklerin mevcut olduğu ortaya koyulmuştur (Şekil 4.5.1.). Ayrıca, western blot analizinde elde edilen band görüntüsünün SDS-PAGE ile ELISA pozitif grelin benzeri immünoreaktif bileşiklerin band görünümü ile uyumludur.



Şekil 4.5.1. *Camellia sinensis* L (çay) ekstraktında obestatin-benzeri immünoaktif bileşiklerin western blot analizi ile elde edilen bandların görünümü. **A:** %10 tisin-SDS-PAGE protein moleküler ağırlık standartları. (1) Protein moleküler ağırlık standartı (10-250 kDa); (2) Çok düşük ranjlı protein moleküler ağırlık standartı (1,060-26,600 kDa). **B:** (1) insan serumu; (2) ekstrakt (30 µg/mL); (3) ekstrakt (15 µg/mL); (4) insan obestatin standartı (10 µg/mL).

5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Obestatin keşfinden itibaren hem fizyolojisi ve hem de hastalıklara olan ilişkisi araştırılmaktadır. Özellikle obezite ile birlikte diyabet, psikolojik yeme bozukluğu ilişkisi araştırılan konuların en başında gelmektedir. Obestatin peptiti dikkatleri üzerine çekmeyi başarmış ve birçok araştırmaya konu olmuştur.

Obestatinin biyolojik dokularda çeşitli formlarda olması ve tayini için farklı ölçüm yöntemlerinin kullanılması biyolojik örneklerde obestatin tayini analitik açıdan güvenilir sonuçların elde edilmesini etkilemektedir. İmmünolojik tayin yöntemleri ile obestatin tayininde çeşitli teknolojik problemlerle ve zorluklarla karşılaşmaktadır. Obestatin tayininde yaşanan zorluklar ve teknolojik problemler güvenilir sonuçların elde edilmesinde göz önüne alınmasını gerektirmektedir. Obestatin ölçümünde kullanılan farklı ölçüm yöntemleri (home-made veya ticari olarak sunulan tayinler) Çizelge 5.1.'de özetlenmiştir. Ticari olarak sunulan kitlerde obestatine karşı geliştirilen antikorlar peptidin amildenmiş C-terminal kısmını tanımaktadırlar.

Çizelge 5.1. Obestatin tayininde kullanılan yöntemler

Orjin	Örnek tipi	Tayin tipi	Antikor/spesifiklik	Numune işlenmesi
Phoenix pharmaceuticals	Serum/plazma	Competitive (RIA, ELISA)	Anti-obestatin-NH2	EDTA + Proteaz inhibitörü + C18 ekstraksiyonu
Alpco	Serum/plazma	Competitive (ELISA)	Anti-obestatin-NH2	NH2 EDTA + Proteaz inhibitörü
Millipore	Serum/plazma	Competitive (RIA)	Belirtilmemiş	EDTA + Proteaz inhibitörü
Sceti	Serum/plazma	Competitive (ELISA)	?	EDTA + Proteaz inhibitörü
Bachem	Serum/plazma	Competitive (ELISA)	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş

Yapılan literatür tarama çalışmasında insan, sıçan ve fare gibi omurgalı canlılarda obestatin seviyelerinin ölçümüne dayalı birçok verinin bulunmasına rağmen, bitki dokularında obestatin ölçümü ile ilgili hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır ve ilk defa bu tez çalışmasında çay (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) bitkisinin yeşil taze filizlerinde obestatin immünoreaktivitesine bakılmıştır. İnsan plazma ve çay bitkisi ekstraktından home-made ve diğer bir çalışmalarımızda kullandığımız ticari kitle

elde ettiğimiz sonuçlar kullanılan yöntemin özellikleri ile birlikte Çizelge 5.2.’de verilmiştir.

Çizelge 5.2. Çay ve insan plazma örneklerinde obestatin seviyeleri

Orjin	Örnek tipi	Tayin tipi	Antikor/spesifiklik	Numune işlemlenmesi	Obs. Kon. (ng/mg prot.)
Alpco	Plazma	Competitive (ELISA)	Anti-obestatin-NH2 (Monoklonal)	NH2 EDTA + Proteaz inhibitörü	0,052 ± 0,005 (Budak vd. 2014)
Alpco	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	Competitive (ELISA)	Anti-obestatin-NH2 (Monoklonal)	TCA/aseton presipitasyonu/fenol ekstraksiyonu + Proteaz inhibitörü	0.859 ± 0.072 (Budak vd 2014)
Home-made	Plazma	Direkt (ELISA)	Anti-obestatin-NH2 (Poliklonal)	EDTA + Proteaz inhibitörü	1,70 ± 0,20 (Bu çalışma)
Home-made	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	Direkt (ELISA)	Anti-obestatin-NH2 (Poliklonal)	QB ekstraksiyonu + Proteaz inhibitörü	48, 00 ± 6,40 (Bu çalışma)

Çizelge 5.2.’deki verilere göre ticari kitle elde edilen insan plazma ve çay obestatin sonuçları home-made yöntemle bulunan sonuçlardan daha düşüktür. Sonuçlardaki farklılıkların sebebi kullanılan immünolojik yöntem ve numune işlemlenmesinde farklılıklardan kaynaklanabilir. TCA/aseton presipitasyonu/fenol ekstraksiyonu ile total protein ekstraksiyonu QB ekstraksiyonuna göre daha fazla işlem basamağı içermektedir ve ekstraksiyon işlemi boyunca protein kayıplarının olması muhtemeldir. Tayin yönteminde monoklonal antikor kullanımının yerine poliklonal antikor kullanımı grelin geni ürünü olan obestatinin yanı sıra diğer grelin geni ürünleri (progrelin) ile de reaksiyon vermesine yol açabilir.

Hipotalamus veya gastrointestinal yolda üretilen biyolojik olarak aktif peptitler için uluslararası standart henüz yoktur. Obestatin de bu biyolojik olarak aktif peptidlerden biridir. Bu peptitlerin uluslararası standartlarının olmaması hızlı yıkılımlarına bağlıdır. Dolayısıyla farklı laboratuarlardan elde edilen sonuçlar büyük oranda farklılıklar gösterebilmektedir. Özellikle immünolojik tayin prensibine dayanan ve aynı ticari firmanın ürettiği kitlerle yapılan ölçümlerden elde edilen sonuçlar da bile laboratuvarlar arası farklılıklar gözlenebilmektedir.

Çay, Çin, Japonya, Kuzey Hindistan, Endonezya gibi Doğu ve Uzakdoğu ülkelerinde yetişen ve uygun iklim koşullarına sahip diğer ülkelerde de kültürü yapılan, binlerce yıldan beri tanınan bir bitkidir. Çay dünyada sudan sonra en çok içilen ikinci içecektir ve milattan önce 3000 yılından itibaren sosyal bir etkinlik ve alışkanlık olarak tüketilmektedir. Çayın çeçitli formlarının sindirime yardımcı etkisi, kan temizleyici, vücut sıcaklığını düşürücü, diş ve kemik güçlendirici, immün sistemi ve kalbi güçlendirme, besin zehirlenmesini engellemesi, virüslere karşı koruma ve kan şekerini düşürücü etkileri gibi birçok terapatik etkileri olduğu bilinmesinin yanı sıra yeşil çay infüzyonları ve yeşil çay ekstraktlarının aynı zamanda kilo kaybı ve/veya kilo denetimi üzerine ılımlı etkiye sahip olduğu da bilinmektedir.

Omurgalılarda grelin ve obestatin hormonlarının kilo denetiminde rolleri olduğu deneysel çalışmalrda ispatlanmıştır. Bitkilerde obestatin ile aynı grelin geni ürünlerinden olan grelin hormonunun İmmunohistokimyasal yöntemle erik ve dut bitkilerinin parankima dokularında grelin hormonu tespit edilmiştir. Bulgular Western Blot, RIA, HPLC yöntemleri ile de doğrulanmıştır. Bitkilerde grelinin moleküler ağırlığı ve amino asit dizilimi henüz bilinmemesine rağmen bitkilerde grelin hormonunun fonksiyonunun büyüme ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Aydın vd 2006). Aydın ve arkadaşlarının (2006) yaptıkları çalışmaya paralel olarak Budak ve arkadaşları (2014a) yoğun olarak tüketilen birçok bitkide grelin immünorektivitesini ELISA yöntemi ile ortaya koymuşlardır. Grelins ile aynı genin ürünü olan ve grelin hormonuna fizyolojik olarak zıt etki gösteren obestatin hormonunun yoğun olarak tüketilen birçok bitkide Budak ve arkadaşları (2014b) tarafından ELISA yöntemi ile çalışılan bitkilerdeki immünoreaktivitesi belirlenmiştir.

Bu çalışmada ise çay bitkisinin yeşil filizlerinde direkt ELISA yöntemi ile obestatin immünorektivitesi gösteren ekstrakta obestatin immünoreaktivitesine sebep olan peptidin trisin-SDS-PAGE ve Western Blot ile karakterizasyonu yapılmıştır. %10'luk trisin-SDS-PAGE ile ayırımı sağlanan bitki proteinlerinin enlemesine kesilmesi ile elde edilen jel parçalarında obestatin immünoreaktivitesi taranmıştır. Obestatin pozitif çıkan fraksiyonlar işlemlenerek tekrar %10'luk trisin-SDS-PAGE'de yürütölmüştür. İnsan-anti-obestatin antikorları ile ELISA tekniğine göre pozitif reaksiyon veren fraksiyon trisin-SDS-PAGE'de tek band olarak gözlemlendi.

Elde edilen band, protein moleküler ağırlık standartları ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak 12 kDa ağırlığına karşılık gelmektedir. Elde edilen band paterni insan obestatin standartı (MW: 2,545 kDa). ile karşılaştırıldığında insan anti-obestatinin antikorlarının insan obestatininden daha büyük moleküler ağırlıklı protein ile reaksiyona girdiğı gözlenmiştir. Bu durum ya bitkilerde obestatin ile aynı sekansa sahip başka bir proteinin bulunduğuna veya progrelin peptidinin obestatin ve grelin ürünlerine parçalanmamış formu ile reaksiyona girdiğine işaret etmektedir. Çünkü insan progrelin peptidi yaklaşık olarak 12 kDa civarında moleküler ağırlıklı bir peptiddir.

Çay ekstraktında obestatin-benzeri immünoreaktif bileşiklerin karakterizasyonu western blot tekniğı ile de ortaya koyulmuştur. Western blot analizi sonucunda QB tamponu ile elde edilen ekstrakta obestatin-benzeri immünoreaktif bileşiklerin mevcut olduğı gözlenmiştir. Ayrıca, western blot analizinde elde edilen band görüntüsünün trisin-SDS-PAGE ile ELISA pozitif obestatin-benzeri immünoreaktif bileşiklerin band görünümü ile de uyumludur.

Sonuç olarak çay bitkisinin taze filizlerinden elde edilen protein ekstraktında obestatin immünoreaktivitesi gözlenmiş olup Western blot ve trisin SDS-PAGE karakterize edilmiştir. Karakterizasyonu yapılan obestatin-benzeri immünoreaktif maddelerin yapısal özellikleri protein sakans çalışmaları ile belirlenmesi ve fizyolojik etkilerinin ortaya koyulabilmesi içinde hücre kültürü veya hayvan deneyleri gibi daha ileri çalışmaların yapılmasını gerektirmektedir. Ancak bu çalışmalar sonucunda yoğun olarak tüketilen çayın obestatine bağılı etkilerinin tartışılmasına imkan sağlanacaktır.

6. ÖNERİLER

1. İnsanda obestatinin fizyolojik rolü hakkında çok az bilgi bilinmektedir. Obestatinin, mide ve barsaklardan hormonlar ve maddeler aracılığı ile beyine açlık veya doyumlukla ilgili sinyalizasyonun sağlandığı kompleks mide-beyin ağı kapsamında fonksiyonları olduğu aşıkardır. Dolayısıyla, obestatin hormonunun obesite, kilo denetimi gibi son derece güncel olan sağlık durumları dikkate alındığında, bu hastalıklar üzerine etkilerinin ortaya koyulmasını gerektirmektedir.
2. Çalışılan omurgalı canlı türlerinde obestatin hormonu, grelin hormonu ile birlikte aynı gen tarafından kodlanmaktadır. Grelın hormonunun canlılar aleminde evrensel bir hormon olabileceğı fikrinin ortaya atılmasına rağmen bitkiler âlemindeki canlılar için yapılan çalışmalar son derece azdır ve bitkiler aleminde obestatin hormonunun karakterizasyonu ile ilgili çalışma sadece bu çalışma ile sınırlıdır. Dolayısıyla, obestatinin bitkiler âlemindeki canlırdaki fizyolojik etkilerinin ortaya koyulması ve bitkilerdeki obestatin-benzeri immünoreaktif bileşilerin tanımlanarak insan sağlığı üzerine etkilerinin tartışmaya açılması gerekmektedir.
3. Obestatin tayininde standart bir metod yoktur. Çeşitli vücut sıvılarında ve diğer canlıların biyolojik öneme sahip örneklerinde obestatin tayini için standart bir medtod kurularak ve uluslararası standardizasyonu sağlanarak hali hazırdaki yöntemlerden doğan farklılıkların ortadan kaldırılması gerekmektedir.
4. Bu tez çalışmasından elde ettiğimiz verilere göre yaklaşık olarak 12 kDa ağırlığında obestatin benzeri immünoreaktif bileşik karakterize edilmiştir. Bu protein insan progreline karşılık gelmektedir. Bu durumun açıklığa kavuşturulabilmesi için karakterize edilen proteininin peptid dizi analizinin yapılması gerekmektedir.
5. Bitkilerdeki obestatin-benzeri immünorektif bileşiklerin saflaştırılarak hücre, hayvan deneyleri ile olası fizyolojik etkilerinin ortaya koyulması çalışmaya değer bir konudur.

6. Bitkisel orjinli insan obestatin-benzeri immünoreaktif maddelerin bitki fizyolojisindeki rollerinin tanımlanması zirai uygulamalara katkı sağlayabilir.



KAYNAKLAR

- Alloatti, G., Arnoletti, E., Bassino, E., Penna, C., Perrelli, M.G., Ghé, C., Muccioli, G., 2010. Obestatin Affords Cardioprotection to the Ischemic-Reperfused Isolated Rat Heart and Inhibits Apoptosis in Cultures of Similarly Stressed Cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 299(2), H470-H481.
- anderwald-Stadler, M., Krebs, M., Promintzer, M., Mandl, M., Bischof, M.G., Nowotny, P., anderwald, C., 2007. Plasma Obestatin is Lower at Fasting and not Suppressed by Insulin in Insulin-Resistant Humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 293(5), E1393-E1398.
- Arab, L., Liu, W., Elashoff, D., 2009. Green and Black Tea Consumption and Risk of Stroke A Meta-Analysis. *Stroke*, 40(5), 1786-1792.
- Aragno, M., Mastrocola, R., Ghé, C., Arnoletti, E., Bassino, E., Alloatti, G., Muccioli, G., 2012. Obestatin Induced Recovery of Myocardial Dysfunction in Type 1 Diabetic Rats: Underlying Mechanisms. *Cardiovasc Diabetol*, 11(1), 129.
- Ariyasu, H., Takaya, K., Tagami, T., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Nakao, K., 2001. Stomach Is A Major Source of Circulating Ghrelin, and Feeding State Determines Plasma Ghrelin-Like Immunoreactivity Levels in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(10), 4753-4758.
- Aydin, S., Geckil, H., Zengin, F., Ozercan, H. I., Karatas, F., Aydin, S., Celik, V., 2006. Ghrelin in Plants: What Is the Function of an Appetite Hormone in Plants? *Peptides*, 27(7), 1597-1602.
- Baragli A, Grande, C., Gesmundo, I., Settanni, F., Taliano, M., Gallo, D., Gargantini, E., Granata, R., 2013. Obestatin Enhances In Vitro Generation of Pancreatic Islets Through Regulation of Developmental Pathways. *Plos One*, 8:E64374.
- Baytop, T., 1963. Türkiye'nin Tıbbi Ve Zehirli Bitkileri, İstanbul Üniversitesi Yayınları, No; 1039, İstanbul.
- Bhagwat, S., Haytowitz, D.B., Holden, J.M., 2011. USDA Database For the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 3.1. Beltsville: US Department of Agriculture, 03-1.
- Budak, K., Calapoğlu, M., Çiçek, E., Temizyürek, I. 2014a. Determination of Ghrelin-Like Immunoreactive Substances in Some Routinely Consumed Plants Affecting Appetite. *Cell Membranes and Free Radical Research*, 6(1), 140.
- Budak, K., Calapoğlu, M., Kocaman, Ş., Temizyürek, I., Çiçek, E. 2014b. Determination of Obestatin-Like Immunoreactive Substances in Appetite-Suppressant and Appetite-stimulating Plants. *Cell Membranes and Free Radical Research*, 6(1), 137.

- Butler, M.G., Bittel, D.C., 2007. Plasma Obestatin and Ghrelin Levels in Subjects with Prader-Willi Syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 143(5), 415-421.
- Butt, M.S., Sultan, M.T., 2009. Green Tea: Nature's Defense Against Malignancies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(5), 463-473.
- Cabrera, C., Artacho, R., Giménez, R., 2006. Beneficial Effects of Green Tea—A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 25(2), 79-99.
- Cabrera, C., Giménez, R., López, M.C., 2003. Determination of Tea Components with Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4427-4435.
- Camiña, J.P., Campos, J.F., Caminos, J.E., Dieguez, C., Casanueva, F.F., 2007. Obestatin-Mediated Proliferation of Human Retinal Pigment Epithelial Cells: Regulatory Mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*, 211(1), 1-9.
- Carlini, V.P., Schiöth, H.B., 2007. Obestatin Improves Memory Performance and Causes Anxiolytic Effects in Rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352(4), 907-912.
- Ceranowicz, P., Warzecha, Z., Dembinski, A., Cieszkowski, J., Dembinski, M., Sendur, R., Kato, I., 2009. Pretreatment with Obestatin Inhibits the Development of Cerulein-Induced Pancreatitis. *Acta Physiologica Polonica*, 12(3), 95.
- Chacko, S.M., Thambi, P.T., Kuttan, R., Nishigaki, I., 2010. Beneficial Effects of Green Tea: A Literature Review. *Chin Med*, 5(13), 1-9.
- Chanoine, J.P., Wong, A.C., Barrios, V., 2006. Obestatin, Acylated and Total Ghrelin Concentrations in the Perinatal Rat Pancreas. *Hormone Research in Paediatrics*, 66(2), 81-88.
- Chartrel, N., Alvear-Perez, R., Leprince, J., Iturrioz, X., Reaux-Le Goazigo, A., Audinot, V., Llorens-Cortes, C., 2007. Comment on" Obestatin, A Peptide Encoded by the Ghrelin Gene, Opposes Ghrelin's Effects on Food Intake". *Science*, 315(5813), 766-766.
- Davis, P.H., 1967. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburg: Edinburg University Press, Volume II.
- De Mejia, E.G., Ramirez-Mares, M.V., Puangraphant, S., 2009. Bioactive Components of Tea: Cancer, inflammation and Behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(6), 721-731.
- Donath, M.Y., Halban, P.A., 2004. Decreased Beta-Cell Mass in Diabetes: Significance, Mechanisms and Therapeutic Implications. *Diabetologia*, 47(3), 581-589.

- Dun, S.L., Brailoiu, G.C., Brailoiu, E., Yang, J., Chang, J.K., Dun, N.J., 2006. Distribution and Biological Activity of Obestatin in the Rat. *Journal of Endocrinology*, 191(2), 481-489.
- Egido, E.M., Hernández, R., Marco, J., Silvestre, R.A., 2009. Effect of Obestatin on Insulin, Glucagon and Somatostatin Secretion in the Perfused Rat Pancreas. *Regulatory Peptides*, 152(1), 61-66.
- Favaro, E., Granata, R., Miceli, I., Baragli, A., Settanni, F., Perin, P.C., Zanone, M.M., 2012. The Ghrelin Gene Products and Exendin-4 Promote Survival of Human Pancreatic Islet Endothelial Cells in Hyperglycaemic Conditions, Through Phosphoinositide 3-Kinase/Akt, Extracellular Signal-Related Kinase (ERK) 1/2 and Camp/Protein Kinase A (PKA) Signalling Pathways. *Diabetologia*, 55(4), 1058-1070.
- Friedman, M., Levin, C.E., Lee, S.U., Kozukue, N., 2009. Stability of Green Tea Catechins in Commercial Tea Leaves During Storage For 6 Months. *Journal of Food Science*, 74(2), H47-H51.
- Grala, T.M., Kay, J.K., Walker, C.G., Sheahan, A J., Littlejohn, M.D., Lucy, M.C., Roche, J.R., 2010. Expression Analysis of Key Somatotrophic Axis and Liporegulatory Genes in Ghrelin-and Obestatin-infused Dairy Cows. *Domestic Animal Endocrinology*, 39(1), 76-83.
- Granata, R., Baragli, A., Settanni, F., Scarlatti, F., Ghigo, E., 2010. Unraveling the Role of the Ghrelin Gene Peptides in the Endocrine Pancreas. *Journal of Molecular Endocrinology*, 45(3), 107-118.
- Granata, R., Gallo, D., Luque, R.M., Baragli, A., Scarlatti, F., Grande, C., Ghigo, E., 2012. Obestatin Regulates Adipocyte Function and Protects Against Diet-Induced Insulin Resistance and Inflammation. *The FASEB Journal*, 26(8), 3393-3411.
- Granata, R., Settanni, F., Gallo, D., Trovato, L., Biancone, L., Cantaluppi, V., Ghigo, E., 2008. Obestatin Promotes Survival of Pancreatic B-Cells and Human Islets and Induces Expression of Genes involved in the Regulation of B-Cell Mass and Function. *Diabetes*, 57(4), 967-979.
- Granata, R., Volante, M., Settanni, F., Gauna, C., Ghé, C., Annunziata, M., Papotti, M., 2010. Unacylated Ghrelin and Obestatin increase Islet Cell Mass and Prevent Diabetes in Streptozotocin-Treated Newborn Rats. *Journal of Molecular Endocrinology*, 45(1), 9-17.
- Green, B.D., Irwin, N., Flatt, P.R., 2007. Direct and Indirect Effects of Obestatin Peptides on Food intake and the Regulation of Glucose Homeostasis and insulin Secretion in Mice. *Peptides*, 28(5), 981-987.

- Grönberg, M., Tsolakis, A.V., Magnusson, L., Janson, E.T., Saras, J., 2008. Distribution of Obestatin and Ghrelin in Human Tissues Immunoreactive Cells in the Gastrointestinal Tract, Pancreas, and Mammary Glands. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 56(9), 793-801.
- Gualillo, O., Lago, F., Casanueva, F.F., Dieguez, C., 2006. One Ancestor, Several Peptides: Post-Translational Modifications of Preproghrelin Generate Several Peptides with Antithetical Effects. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 256(1), 1-8.
- Gurriarán-Rodríguez, U., Al-Massadi, O., Roca-Rivada, A., Crujeiras, A.B., Gallego, R., Pardo, M., Camiña, J.P., 2011. Obestatin as a Regulator of Adipocyte Metabolism and Adipogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(9), 1927-1940.
- Gurriarán-Rodríguez, U., Santos-Zas, I., Al-Massadi, O., Mosteiro, C.S., Beiroa, D., Nogueiras, R., Camiña, J.P., 2012. the Obestatin/GPR39 System is Up-Regulated by Muscle injury and Functions as an Autocrine Regenerative System. *Journal of Biological Chemistry*, 287(45), 38379-38389.
- Hooper, L., Kroon, P.A., Rimm, E.B., Cohn, J.S., Harvey, I., Le Cornu, K.A., Cassidy, A., 2008. Flavonoids, Flavonoid-Rich Foods, and Cardiovascular Risk: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(1), 38-50.
- Howard, A.D., Feighner, S.D., Cully, D.F., Arena, J.P., Liberators, P.A., Rosenblum, C.I., 1996. A Receptor in Pituitary and Hypothalamus That Functions in Growth Hormone Release. *Science* 273:974-977.
- Huda, M.S.B., Durham, B.H., Wong, S.P., Deepak, D., Kerrigan, D., McCulloch, P., Wilding, J.P.H., 2008. Plasma Obestatin Levels are Lower in Obese and Post-Gastrectomy Subjects, But Do Not Change in Response To A Meal. *International Journal of Obesity*, 32(1), 129-135.
- Hursel, R., Viechtbauer, W., Westerterp-Plantenga, M.S., 2009. The Effects of Green Tea on Weight Loss and Weight Maintenance: A Meta-Analysis. *International Journal of Obesity*, 33(9), 956-961.
- Iglesias, M.J., Salgado, A., Pineiro, R., Rodino, B.K., Otero, M.F., Grigorian, L., Lago, F., 2007. Lack of Effect of the Ghrelin Gene-Derived Peptide Obestatin on Cardiomyocyte Viability and Metabolism. *Journal of Endocrinological Investigation*, 30(6), 470-476.
- Jurgens, T.M., Whelan, A.M., Killian, L., Doucette, S., Kirk, S., Foy, E., 2012. Green Tea For Weight Loss and Weight Maintenance in Overweight or Obese Adults. *Cochrane. Database. Syst. Rev.*, 12.

- Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., Tobe, K., 2006. Adiponectin and Adiponectin Receptors in insulin Resistance, Diabetes, and the Metabolic Syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 116(7), 1784.
- Kapica, M., Zabielska, M., Puzio, I., Jankowska, A., Kato, I., Kuwahara, A., Zabielski, R., 2007. Obestatin Stimulates the Secretion of Pancreatic Juice Enzymes Through a Vagal Pathway in Anaesthetized Rats-Preliminary Results. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 58, 123.
- Kellokoski, E., Kunnari, A., Jokela, M., Mäkelä, S., Kesäniemi, Y.A., Hökkö, S., 2009. Ghrelin and Obestatin Modulate Early Atherogenic Processes on Cells: Enhancement of Monocyte Adhesion and Oxidized Low-Density Lipoprotein Binding. *Metabolism*, 58(11), 1572-1580.
- Kim, A., Chiu, A., Barone, M.K., Avino, D., Wang, F., Coleman, C.I., Phung, O.J., 2011. Green Tea Catechins Decrease Total and Low-Density Lipoprotein Cholesterol: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American Dietetic Association*, 111(11), 1720-1729.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., Kangawa, K., 1999. Ghrelin is a Growth-Hormone-Releasing Acylated Peptide From Stomach. *Nature*, 402(6762), 656-660.
- Komes, D., Horžić, D., Belščak, A., Ganić, K.K., Vulić, I., 2010. Green Tea Preparation and Its Influence on the Content of Bioactive Compounds. *Food Research International*, 43(1), 167-176.
- Labarthe, A., Fiquet, O., Hassouna, R., Zizzari, P., Lanfumey, L., Ramoz, N., Tolle, V., 2014. Ghrelin-Derived Peptides: A Link Between Appetite/Reward, GH Axis, and Psychiatric Disorders? *Frontiers in Endocrinology*, 5 (163), 1-19.
- Li, Z.F., Guo, Z.F., Cao, J., Hu, J.Q., Zhao, X.X., Xu, R.L., Zheng, X., 2010. Plasma Ghrelin and Obestatin Levels are Increased in Spontaneously Hypertensive Rats. *Peptides*, 31(2), 297-300.
- Liu, K., Zhou, R., Wang, B., Chen, K., Shi, L. Y., Zhu, J. D., Mi, M. T., 2013. Effect of Green Tea on Glucose Control and insulin Sensitivity: A Meta-Analysis of 17 Randomized Controlled Trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 98(2), 340-348.
- Mészárosóvá, M., Sirotkin, A.V., Grossmann, R., Darlak, K., Valenzuela, F., 2008. The Effect of Obestatin on Porcine Ovarian Granulosa Cells. *Animal Reproduction Science*, 108(1), 196-207.
- Miegun, P., St Pierre, D., Broglio, F., Cianflone, K., 2011. Effect of Desacyl Ghrelin, Obestatin and Related Peptides on Triglyceride Storage, Metabolism and GHSR Signaling in 3T3L1 Adipocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(2), 704-714.

- Myung, S.K., Bae, W.K., Oh, S.M., Kim, Y., Ju, W., Sung, J., Choi, H J., 2009. Green Tea Consumption and Risk of Stomach Cancer: A Meta Analysis of Epidemiologic Studies. *International Journal of Cancer*, 124(3), 670-677.
- Nagle, C.M., Olsen, C.M., Bain, C.J., Whiteman, D.C., Green, A.C., Webb, P.M., 2010. Tea Consumption and Risk of Ovarian Cancer. *Cancer Causes & Control*, 21(9), 1485-1491.
- Nakahara, T., Harada, T., Yasuhara, D., Shimada, N., Amitani, H., Sakoguchi, T., Inui, A., 2008. Plasma Obestatin Concentrations are Negatively Correlated with Body Mass index, Insulin Resistance Index, and Plasma Leptin Concentrations in Obesity and Anorexia Nervosa. *Biological Psychiatry*, 64(3), 252-255.
- Ni, M., Dehesh, K., Tepperman, J.M., Quail, P.H., 1996 GT-2: In Vivo Transcriptional Activation Activity and Definition of Novel Twin DNA Binding Domains with Reciprocal Target Sequence Selectivity. *Plant Cell*, 8, 1041-1059
- Nishitani, E., Sagesaka, Y.M., 2004. Simultaneous Determination of Catechins, Caffeine and Other Phenolic Compounds in Tea Using New HPLC Method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(5), 675-685.
- Ogunleye, A.A., Xue, F., Michels, K.B., 2010. Green Tea Consumption and Breast Cancer Risk Or Recurrence: A Meta-Analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 119(2), 477-484.
- Pan, W., Tu, H., Kastin, A.J., 2006. Differential BBB interactions of Three Ingestive Peptides: Obestatin, Ghrelin, and Adiponectin. *Peptides*, 27(4), 911-916.
- Pazos, Y., Alvarez, C.J., Camiña, J. P., Casanueva, F.F., 2007. Stimulation of Extracellular Signal-Regulated Kinases and Proliferation in the Human Gastric Cancer Cells KATO-III by Obestatin. *Growth Factors*, 25(6), 373-381.
- Peterson, J., Dwyer, J., Bhagwat, S., Haytowitz, D., Holden, J., Eldridge, A.L., Aladesanmi, J., 2005. Major Flavonoids in Dry Tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(6), 487-501.
- Phung, O.J., Baker, W.L., Matthews, L.J., Lanosa, M., Thorne, A., Coleman, C.I., 2010. Effect of Green Tea Catechins with Or without Caffeine on Anthropometric Measures: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(1), 73-81.
- Qader, S.S., Håkanson, R., Rehfeld, J.F., Lundquist, I., Salehi, A. 2008. Proghrelin-Derived Peptides Influence the Secretion of Insulin, Glucagon, Pancreatic Polypeptide and Somatostatin: A Study on Isolated Islets From Mouse and Rat Pancreas. *Regulatory Peptides*, 146(1), 230-237.

- Ren, A.J., Guo, Z.F., Wang, Y.K., Wang, L.G., Wang, W.Z., Lin, L., Yuan, W.J., 2008. Inhibitory Effect of Obestatin on Glucose-Induced Insulin Secretion in Rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 369(3), 969-972.
- Ren, A.J., He, Q., Shi, J.S., Guo, Z.F., Zheng, X., Lin, L., Yuan, W.J., 2009. Association of Obestatin with Blood Pressure in the Third Trimesters of Pregnancy. *Peptides*, 30(9), 1742-1745.
- Saijo, R., Kato, M., Takeda, Y., 2004. Changes in the Contents of Catechins and Caffeine During Leaf Development. In *Proceedings International Conference on Ocha (Tea) Culture and Science*, November, 251-254.
- Siegrist-Kaiser, C.A., Pauli, V., Juge-Aubry, C.E., Boss, O., Pernin, A., Chin, W.W., Meier, C.A., 1997. Direct Effects of Leptin on Brown and White Adipose Tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 100(11), 2858.
- Suzuki, T., Yamazaki, N., Sada, Y., Oguni, I., Moriyasu, Y., 2003. Tissue Distribution and Intracellular Localization of Catechins in Tea Leaves. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(12), 2683-2686.
- Szentirmai, E., Krueger, J.M., 2006. Obestatin Alters Sleep in Rats. *Neuroscience Letters*, 404(1), 222-226.
- Tanaka, M., Hayashida, Y., Iguchi, T., Nakao, N., Nakai, N., Nakashima K., 2001. Organization of the Mouse Ghrelin Gene and Promoter: Occurrence of A Short Noncoding First Exon. *Endocrinology*, 142 (8), 3697-3700.
- Tang, N., Wu, Y., Zhou, B., Wang, B., Yu, R., 2009. Green Tea, Black Tea Consumption and Risk of Lung Cancer: A Meta-Analysis. *Lung Cancer*, 65(3), 274-283.
- Tang, N.P., Li, H., Qiu, Y.L., Zhou, G.M., Ma, J., 2009. Tea Consumption and Risk of Endometrial Cancer: A Metaanalysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 201(6), 605-E1.
- Tang, S.Q., Jiang, Q.Y., Zhang, Y.L., Zhu, X.T., Shu, G., Gao, P., Dong, X.Y., 2008. Obestatin: Its Physicochemical Characteristics and Physiological Functions. *Peptides*, 29(4), 639-645.
- Taubert, D., Roesen, R., Schömig, E., 2007. Effect of Cocoa and Tea Intake on Blood Pressure: A Meta-Analysis. *Archives of Internal Medicine*, 167(7), 626-634.
- Trovato, L., Gallo, D., Settanni, F., Gesmundo, I., Ghigo, E., Granata, R., 2014. Obestatin: Is it Really Doing Something?. *Delhanty PJD, Van Der Lely AJ (Eds): How Gut and Brain Control Metabolism. Front Horm Res. Basel, Karger*, 42, 175–185.

- Turk, N., Dağistanlı, F.K., Sacan, O., Yanardag, R., Bolkent, S., 2012. Obestatin and Insulin in Pancreas of Newborn Diabetic Rats Treated with Exogenous Ghrelin. *Acta Histochemica*, 114(4), 349-357.
- Volante, M., Rosas, R., Ceppi, P., Rapa, I., Cassoni, P., Wiedenmann, B., Papotti, M., 2009. Obestatin in Human Neuroendocrine Tissues and Tumours: Expression and Effect on Tumour Growth. *The Journal of Pathology*, 218(4), 458-466.
- Walia, P., Asadi, A., Kieffer, T.J., Johnson, J.D., Chanoine, J.P., 2009. Ontogeny of Ghrelin, Obestatin, Preproghrelin, and Prohormone Convertases in Rat Pancreas and Stomach. *Pediatric Research*, 65(1), 39-44.
- Wang, D., Lu, J., Miao, A., Xie, Z., Yang, D., 2008. HPLC-DAD-ESI-MS/MS Analysis of Polyphenols and Purine Alkaloids in Leaves of 22 Tea Cultivars in China. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(5), 361-369.
- Wang, Y., Ho, C.T., 2009. Polyphenolic Chemistry of Tea and Coffee: A Century of Progress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8109-8114.
- Wang, Z.H., Gao, Q.Y., Fang, J.Y., 2012. Green Tea and Incidence of Colorectal Cancer: Evidence From Prospective Cohort Studies. *Nutrition and Cancer*, 64(8), 1143-1152.
- Wang, Z.M., Zhou, B., Wang, Y.S., Gong, Q.Y., Wang, Q.M., Yan, J.J., Wang, L.S., 2011. Black and Green Tea Consumption and the Risk of Coronary Artery Disease: A Meta-Analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(3), 506-515.
- Xu, W., Song, Q., Li, D., Wan, X., 2012. Discrimination of the Production Season of Chinese Green Tea by Chemical Analysis in Combination with Supervised Pattern Recognition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(28), 7064-7070.
- Zamrazilová, H., Hainer, V., Sedláčková, D., Papezová, H., Kunesová, M., Bellisle, F., Nedvídková, J., 2008. Plasma Obestatin Levels in Normal Weight, Obese and Anorectic Women. *Physiological Research*, 57(1), S49.
- Zhang, J. V., Li, L., Huang, Q., Ren, P.G., 2013. Obestatin Receptor in Energy Homeostasis and Obesity Pathogenesis. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 114, 89-107.
- Zhang, J.V., Jahr, H., Luo, C.W., Klein, C., Van Kolen, K., Ver Donck, L., Hsueh, A.J., 2008. Obestatin induction of Early-Response Gene Expression in Gastrointestinal and Adipose Tissues and the Mediatory Role of G Protein-Coupled Receptor, GPR39. *Molecular Endocrinology*, 22(6), 1464-1475.
- Zhang, J.V., Ren, P.G., Avsian-Kretchmer, O., Luo, C.W., Rauch, R., Klein, C., Hsueh, A.J., 2005. Obestatin, a Peptide Encoded by the Ghrelin Gene, Opposes Ghrelin's Effects on Food intake. *Science*, 310(5750), 996-999.

- Zhao, C.M., Furnes, M.W., Stenström, B., Kulseng, B., Chen, D., 2008. Characterization of Obestatin-and Ghrelin-Producing Cells in the Gastrointestinal Tract and Pancreas of Rats: An Immunohistochemical and Electron-Microscopic Study. *Cell and Tissue Research*, 331(3), 575-587.
- Zhao, Y., Chen, P., Lin, L., Harnly, J.M., Yu, L.L., Li, Z., 2011. Tentative Identification, Quantitation, and Principal Component Analysis of Green Pu-Erh, Green, and White Teas Using UPLC/DAD/MS. *Food Chemistry*, 126(3), 1269-1277.
- Zheng, J., Yang, B., Huang, T., Yu, Y., Yang, J., Li, D., 2011. Green Tea and Black Tea Consumption and Prostate Cancer Risk: An Exploratory Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrition and Cancer*, 63(5), 663-672.
- Zheng, J.S., Yang, J., Fu, Y.Q., Huang, T., Huang, Y.J., Li, D., 2013. Effects of Green Tea, Black Tea, and Coffee Consumption on the Risk of Esophageal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrition and Cancer*, 65(1), 1-16.
- Zheng, P., Zheng, H.M., Deng, X.M., 2012. Green Tea Consumption and Risk of Esophageal Cancer: A Meta-Analysis of Epidemiologic Studies. *BMC Gastroenterology*, 12(1), 165.
- Zheng, X X., Xu, Y.L., Li, S.H., Liu, X.X., Hui, R., Huang, X.H., 2011. Green Tea intake Lowers Fasting Serum Total and LDL Cholesterol in Adults: A Meta-Analysis of 14 Randomized Controlled Trials. *the American Journal of Clinical Nutrition*, 94(2), 601-610.
- Zheng, X.X., Xu, Y.L., Li, S.H., Hui, R., Wu, Y.J., Huang, X.H., 2013. Effects of Green Tea Catechins with or without Caffeine on Glycemic Control in Adults: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *the American Journal of Clinical Nutrition*, 97(4), 750-762.
- Zizzari, P., Longchamps, R., Epelbaum, J., Bluet-Pajot, M.T., 2007. Obestatin Partially Affects Ghrelin Stimulation of Food intake and Growth Hormone Secretion in Rodents. *Endocrinology*, 148(4), 1648-1653.
- Zou, C.C., Liang, L., Wang, C.L., Fu, J.F., Zhao, Z.Y., 2009. The Change in Ghrelin and Obestatin Levels in Obese Children After Weight Reduction. *Acta Paediatrica*, 98(1), 159-165.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : İftihar TEMİZYÜREK

Doğum Yeri ve Yılı : Antalya, 1988

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : iftt@hotmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Antalya Atatürk Lisesi, 2006

Lisans : SDÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya

1. Yayınlar

Budak, K., Calapoğlu, M., Çiçek, E., Temizyürek, İ., 2014. Determination of Ghrelin-Like Immunoreactive Substances in Some Routinly Consumed Plants Affecting Appetite. Cell Membranes and Free Radical Research, 6(1), 140.

Budak, K., Calapoğlu, M., Kocaman, Ş., Temizyürek, İ., Çiçek, E. 2014. Determination of Obestatin-Like Immunoreactive Substances in Appetite-Suppressant and Appetite Sitimulating Plants. Cell Membranes and Free Radical Research, 6(1), 137.