

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

L-ARJİNİN VE AGMATİNİN İNSAN NCI-H716
HÜCRELERİNDE GLP-1 VE PYY SALGISI ÜZERİNE ETKİSİ:
KALSİYUM ALGILAYAN RESEPTÖRLERİN ROLÜ

SEVİM İPEK ACAR CÖMERT

Fizyoloji Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2023

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**L-ARJİNİN VE AGMATİNİN İNSAN NCI-H716
HÜCRELERİNDE GLP-1 VE PYY SALGISI ÜZERİNE ETKİSİ:
KALSİYUM ALGILAYAN RESEPTÖRLERİN ROLÜ**

SEVİM İPEK ACAR CÖMERT

Fizyoloji Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Esin İLERİ GÜREL

ANKARA

2023

**L-ARJİNİN VE AGMATİNİN İNSAN NCI-H716
HÜCRELERİNDE GLP-1 VE PYY SALGISI ÜZERİNE ETKİSİ:
KALSİYUM ALGILAYAN RESEPTÖRLERİN ROLÜ**

Sevim İpek ACAR CÖMERT
Danışman: Doç. Dr. Esin İLERİ GÜREL

Bu tez çalışması 18.08.2023 tarihinde jürimiz tarafından “Fizyoloji – Doktora Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Ahmet ERGÜN*

Üye: *Prof. Dr. Ayşen ERDEM*

Üye: *Prof. Dr. Şevin GÜNEY*

Üye: *Doç. Dr. Meltem TUNCER*

Üye: *Doç. Dr. Bilge PEHLİVANOĞLU*

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullanıldığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- × Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

18/08/2023

Sevim İpek ACAR CÖMERT

“**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Esin İLERİ GÜREL danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Sevim İpek ACAR CÖMERT

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana yol gösteren ve değerli katkılarını esirgemeyen danışmanım sayın Doç. Dr. Esin İLERİ GÜREL'e,

Fizyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan ve doktora eğitimim boyunca bana katkıda bulunan başta bölüm başkanımız sayın Prof. Dr. Ayşen ERDEM olmak üzere tüm değerli akademik ve idari personele,

Tez çalışmama değerli yorumlarıyla katkıda bulunan tez jüri üyeleri Prof. Dr. Sn. Ahmet ERGÜN, Prof. Dr. Sn. Ayşen ERDEM, Prof. Dr. Sn. Şevin GÜNEY, Doç. Dr. Sn. Esin İLERİ GÜREL, Doç. Dr. Sn. Meltem TUNCER ve Doç. Dr. Sn. Bilge PEHLİVANOĞLU'na,

Kendi hücre kültürü laboratuvarını deneylerim için kullanıma açan ve hücrelerimi saklamamı sağlayan Prof. Dr. Sn. Güneş ESENDAĞLI'ya,

Tezimin deneylerinde yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Adnan Berk DİNÇSOY'a ve Arş. Gör. Dr. Merve AYAN'a, Arş. Gör. Dr. Mehmet ÖZCAN'a, Uzm. Dr. Ahmet Onur Daştan'a ve Arş. Gör. Duygu Sevim'e, Manevi desteklerini her zaman hissettiğim değerli çalışma arkadaşlarım Dr. Fatma Büşra KARA ve Dr. Emine İNCE'ye,

Eğitim hayatım boyunca desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, beni cesaretlendirerek yol gösteren, motive eden ve her türlü fedakârlığı gösteren annem Funda ACAR ve babam Fatih Mehmet ACAR'a,

Varlıklarıyla bana güç veren ve her zaman yanımda olan canımdan çok sevdiğim oğlum Mert Kaan CÖMERT ve değerli eşim Remzi Turgay CÖMERT'e,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Acar-Cömert S.İ., L-arjinin ve Agmatinin İnsan NCI-H716 Hücrelerinde GLP-1 ve PYY Salgısı Üzerine Etkisi: Kalsiyum Algılayan Reseptörlerin Rolü, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara 2023. Agmatin, arjinin dekarboksilaz tarafından L-arjininden üretilen doğal bir poliamin olup yiyeceklerde de bol miktarda bulunmaktadır. Yiyecek alımına bağlı olarak enteroendokrin L hücrelerinden salgılanan glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1) ve peptit YY (PYY) hormonlarının en önemli etkileri yemek sonrasında insülin salgısını artırarak, kan glukozunu düzenlemeleridir. Bu çalışmada agmatinin ve L-arjininin GLP-1 ve PYY salgısı üzerine etkisini incelemek için insan enteroendokrin L-hücre hattı olan NCI-H716 hücreleri kullanılmış ve hücreler 20 ve 40 mM olacak şekilde agmatin ve L-arjininin iki farklı konsantrasyonu ile 2 saat süreyle inkübe edilerek GLP-1 ile PYY salgıları ölçülmüştür. Ayrıca hücrelere bu maddelerle birlikte hormon salgısında kalsiyum algılayan reseptörlerin (CaSR) rolünü araştırmak amacıyla sırasıyla CaSR'nin negatif ve pozitif allosterik modülatörleri olan NPS 2143 ve R568 ile kombinasyonları uygulanmıştır. Her ne kadar 20 ve 40 mM'lık agmatin ve L-arjinin dozları tek başlarına GLP-1 ve PYY salgısına yol açmasa da NPS 2143 ile birlikte uygulanmaları GLP-1 ve PYY salgısında azalmaya yol açmıştır. Bu sonuç GLP-1 ve PYY salgısında CaSR'nin aracı reseptör olabileceğini düşündürmüştür. NCI-H716 hücrelerinde GLP-1 ve PYY salgısında hücre içi ikinci mesajcıları belirlemeye yönelik çalışmaların sonucunda 40 mM agmatin + NPS 2143 grubunda cAMP seviyesinde düşüş, 40 mM agmatin + R568 grubunda ise cAMP seviyesinde artış görülmüştür. 40 mM L-arjinin ile hücre içi kalsiyum yoğunluğunun arttığı ve NPS 2143 ile birlikte uygulandığında da azaldığı bulunmuştur. CaSR immünreaktivite şiddeti ise gruplar arasında fark göstermemiştir. Sonuç olarak, insan enteroendokrin L-hücre hattı olan NCI-H716 hücrelerinde agmatin ve L-arjininin 20 ve 40 mM'lık dozları belirgin bir hormon salgısına yol açmazken, NPS 2143 uygulamasına bağlı olarak hem hormon hem de cAMP/kalsiyum düzeylerinde değişiklikler meydana geliyor olması GLP-1 ve PYY salgısında CaSR'lerin rolü olduğu fikrini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: L-arjinin, Agmatin, GLP-1, PYY, CaSR, NCI-H716 hücre hattı, NPS 2143, R568, Ca²⁺, cAMP.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir (Proje no: TSA-2021-19070).

ABSTRACT

Acar-Comert S.İ., Effect of L-arginine and Agmatine on GLP-1 and PYY Secretion in Human NCI-H716 Cells: The Role of Calcium Sensing Receptors. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Physiology Programme Doctoral Thesis, Ankara, 2023. Agmatine is a natural polyamine produced from L-arginine by arginine decarboxylase and is abundant in foods. One of the most significant effects of glucagon like peptide-1 (GLP-1) and peptide YY (PYY) hormones released from enteroendocrine L cells following food intake is their regulation of insulin secretion after meals, which helps in maintaining blood glucose levels. In this study, the effects of agmatine and L-arginine on the secretion of GLP-1 and PYY were investigated using NCI-H716 cells, a human enteroendocrine L cell line. The cells were incubated with different concentrations of agmatine and L-arginine (20 mM and 40 mM) for 2 hours, and the secretion of GLP-1 and PYY was measured. Additionally, negative and positive allosteric modulators of CaSR, NPS 2143 and R568, respectively, were applied in combination with these substances to explore the role of calcium-sensing receptors (CaSR) in hormone secretion. Although 20 and 40 mM doses of agmatine and L-arginine alone did not cause GLP-1 and PYY secretion, their co- administration with NPS 2143 resulted in a decrease in GLP-1 and PYY secretion. This result suggested that CaSR might be a mediator receptor in the secretion of GLP-1 and PYY. In tests to identify intracellular second messengers involved in the release of GLP-1 and PYY from NCI-H716 cells, cAMP levels were shown to drop in the 40 mM agmatine + NPS 2143 group and to increase in the 40 mM agmatine + R568 group. It was found that intracellular calcium density increased with 40 mM L-arginine and decreased when administered with NPS 2143. There was no difference in the levels of CaSR immunoreactivity between the groups. In conclusion, human enteroendocrine L-cell line NCI-H716 cells treated with 20 and 40 mM agmatine and L-arginine do not significantly increase hormone secretion, whereas NPS 2143 administration causes alterations in both hormone and cAMP/calcium levels. In conclusion, 20 and 40 mM doses of agmatine and L-arginine in NCI-H716 cells, which are the human enteroendocrine L-cell line, do not cause a significant hormone secretion, while changes occur in both hormone and cAMP/calcium levels due to NPS 2143 application. It supports the idea that CaSRs have a role in the secretion of GLP-1 and PYY.

Key Words: L-arginine, Agmatine, GLP-1, PYY, CaSR, NCI-H716 cell line, NPS 2143, R568, Ca^{+2} , cAMP.

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project no: TSA-2021-19070).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İnkretin Hormonlar	4
2.2. Glukagon Benzeri Peptit-1 (GLP-1)	5
2.2.1. GLP-1'in Yapısı, Sentezi ve Metabolizması	5
2.2.2. GLP-1 Salgısının Düzenlenmesi	6
2.2.3. GLP-1'in Biyolojik Etkileri	7
2.2.4. GLP-1 Hormonu Salgılayan Hücre Hatları	8
2.3. Enteroendokrin L hücrelerinin Diğer Salgıları	10
2.3.1. Peptit YY (PYY)	11
2.4. L-arjinin	11
2.4.1. L-arjininin Yapısı ve Biyolojik Etkileri	11
2.4.2. L-arjininin Diyabet ve Obezite ile İlişkisi	12
2.5. Agmatin (Guanido butanolamin)	13
2.5.1. Agmatinin Yapısı, Sentezi ve Metabolizması	13

2.5.2. Agmatinin Genel Biyolojik Etkileri	16
2.5.3. Agmatinin Diyabet ve Obezite Üzerine Etkileri	16
2.6. Kalsiyum Algılayan Reseptörler (CaSR)	17
2.6.1. CaSR'lerin Amino asitlerle Uyarılması	19
2.6.2. CaSR'lerin Agmatin ile İlişkisi	19
2.6.3. CaSR'lerin İncretinlerle İlişkisi	20
2.7. CaSR'lerin Allosterik Modulatorleri	20
2.7.1. NPS 2143	21
2.7.2. R568	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Hücre Kültürü	23
3.2. Hücre Kültürünün Dondurulması ve Çözülmesi	23
3.3. Hücrelerin Çoğaltılması	23
3.4. Hücrelerin Görüntülenmesi	24
3.5. Hücre Sayımı İçin Hazırlık	25
3.6. Tripan Mavisi ile Hücre Sayımı	26
3.7. Matrijel ile Hücrelerin Farklılaştırılması	26
3.8. Farklılaşmış Hücrelerin Görüntülenmesi	27
3.9. Uygulanan Maddelerin Dozlarının Belirlenmesi	28
3.10. Hücre canlılığının MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromür) Yöntemi ile Belirlenmesi	29
3.10.1. MTT Çözeltisinin Hazırlanması	29
3.10.2. MTT Analizi	29
3.11. Maddelerin Uygun Dozlarının Belirlenmesi	30
3.12. GLP-1, PYY ve cAMP Düzeylerinin Belirlenmesi	30

3.13. ELISA ile GLP-1 Düzeyinin Tayini	32
3.14. ELISA ile PYY Düzeyinin Tayini	33
3.15. ELISA ile cAMP Düzeyinin Tayini	35
3.16. Protein Miktarlarının Tayini	37
3.17. Sitolik Ca^{+2} Yoğunluğunun Belirlenmesi	39
3.18. İmmünfloresan İşaretleme Yöntemi ile CaSR Düzeyinin Belirlenmesi	39
3.19. İstatistik	40
3.20. Etik Kurul İzni	40
4. BULGULAR	41
4.1. Hücre Canlılığı	41
4.2. GLP-1 Düzeyi	48
4.3. PYY Düzeyi	51
4.4. cAMP Düzeyi	54
4.5. Protein Düzeyi	57
4.6. Kalsiyum Yoğunluğu	58
4.7. CaSR İmmünreaktivitesi	64
5. TARTIŞMA	69
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	80
7. KAYNAKLAR	82
8. EKLER	93
EK 1. Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni	
EK 2. Orjinallik Ekran Çıktısı	
EK 3. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Aa	Amino asit
AC	Adenilat siklaz
ADC	L-arjinin dekarboksilaz
ADMA	Asimetrik dimetilarginin
Agm	Agmatin
AGM	Agmatinaz
$\alpha 2$	Alfa adrenerjik reseptör
ALP	Agmatinaz benzeri protein
Bγ	Beta gama alt birimi
BCA	Bisinkoninik asit yöntemi
BSA	Sığır serum albümini
Ca⁺²	Kalsiyum
cAMP	Siklik adenosin monofosfat
CaSR	Kalsiyum algılayan reseptör
CCK	Kolesistokinin
DAG	Diaçilgliserol
DAO	Diamin oksidaz
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPBS	Dulbecco'nun fosfat tamponlu salini
DPP-IV	Dipeptitil peptitaz-4
EAA	Eğri altında kalan alan

ELISA	Enzim bağılı immuno absorbent ölçüm
ER	Endoplazmik retikulum
ERK	Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz
FFAR	Serbest yağ asidi reseptörleri
FBS	Fetal buzağı serumu
Gd⁺³	Gadolinium
GDP	Guanozin difosfat
GEF	Guanin nükleotit değişim faktörü
Gα _{i/o}	G _i alfa alt birimi
Gα _{q/11}	G _q alfa alt birimi
Gα _{12/13}	G ₁₂ /G ₁₃ alfa alt birimleri
GIP	Glukoz bağımlı insülinotropik peptit
GLP-1	Glukagon benzeri peptit-1
GLP-1R	Glukagon benzeri peptit-1 reseptörü
GLP-2	Glukagon benzeri peptit-2
GPCR	G proteini ile eşleşmiş reseptör
GPRC6A	G proteini ile eşleşmiş reseptör ailesi C grubu 6 üye A
GTP	Guanozin trifosfat
HBSS	Hanks tamponlu tuz solüsyonu
HRP	Streptavidin-yaban turpu peroksidaz
5-HT	Serotonin
IP₃	İnoзитol trifosfat
I1-R	İmidazolin reseptörleri 1
K⁺	Potasyum

L-Arj	L-arjinin
LCFA	Uzun zincirli yağ asitleri
L-Phe	L-fenilalanin
MAPK	Mitojenle etkinleşen protein kinaz
Mg⁺²	Magnezyum
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5- Diphenyltetrazolium bromür
nACh	Nikotinik asetilkolin reseptörü
NEP-24.11	Nötral endopeptitaz 24.11
NMDA	N-metil-D-aspartat reseptörü
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
OD	Optik yoğunluğu
ODC	Ornitin dekarboksilaz
PBS	Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi
PIP₂	Fosfatidil inozitol 4,5 bifosfat
PKA	Protein kinaz A
PKC	Protein kinaz C
PLCβ	Fosfolipaz C β
PMSF	Fenil metil sulfonil florid
PTH	Parathormon
PYY	Peptit YY
RAS	Retiküler aktivasyon sistemi
RhoA	Ras homoloji ailesinin A üyesi

RhoGEF	Rho ailesindeki küçük GTPazları düzenlemek için guanin nükleotit değişim faktörü (GEF) aktivitesine sahip iki farklı yapısal alan
RIPA	Radyo immünopresipitasyon deney tamponu
RPMI	Roswell park memorial institute-1640
SCFA	Kısa zincirli yağ asitleri
Sr⁺²	Stronsiyum
SR	Sarkoplazmik retikulum
STZ	Streptozotosin
T1R2	Tat reseptör tip 2
T1R3	Tat reseptör tip 3

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. L hücrelerinde GLP-1 salgısına yol açan mekanizmalar.	7
2.2. GLP-1'in fizyolojik etkileri.	8
2.3. Enteroendokrin hücrelerdeki reseptörler ve salgılanan hormonlar.	10
2.4. L-arjininin kimyasal yapısı.	11
2.5. L-arjininin başlıca metabolik yollarının şeması.	12
2.6. Agmatinin kimyasal yapısı.	14
2.7. Agmatin sentezi ve metabolik yollar.	14
2.8. Agmatinin reseptörleri ve etkileri.	15
2.9. Dimerik CaSR'nin şematik gösterimi.	17
2.10. CaSR aracılı sinyal yolları.	18
2.11. CaSR'lerin allosterik modulatorleri.	21
2.12. NPS 2143'ün etki mekanizması.	22
3.1. NCI-H716 hücre hattının pasajlanması.	24
3.2. NCI-H716 hücre hattının ters ışık mikroskopundaki görüntüsü.	25
3.3. NCI-H716 hücre hattının farklılaşma protokolünü özetleyen şema.	27
3.4. NCI-H716 hücre hattının farklılaşmış görüntüsü.	28
3.5. MTT protokolünü özetleyen şema.	29
3.6. GLP-1, PYY ve cAMP düzeylerinin belirlenmesiyle ilgili protokolü özetleyen şema.	31
3.7. ELISA ile GLP-1 ölçümünde standart solüsyonun seyreltilme işlemleri.	32
3.8. GLP-1 ölçümünün kalibrasyon eğrisi.	33

3.9. ELISA ile PYY ölçümünde standart solüsyonun seyreltilme işlemleri.	34
3.10. PYY ölçümünün kalibrasyon eğrisi.	35
3.11. ELISA ile cAMP ölçümünde standart solüsyonun seyreltilme işlemleri.	36
3.12. cAMP ölçümünün kalibrasyon eğrisi.	37
3.13. BCA protein ölçümünün kalibrasyon eğrisi.	38
4.1. Farklı L-arjinin konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi.	41
4.2. Farklı agmatin konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi.	42
4.3. Farklı NPS 2143 konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi.	43
4.4. Farklı R568 konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi.	44
4.5. L-arjinin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonlarının hücre canlılığına etkisi.	46
4.6. Agmatin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonlarının hücre canlılığına etkisi.	47
4.7. L-arjinin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen GLP-1 düzeyleri.	49
4.8. Agmatin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen GLP-1 düzeyleri.	50
4.9. L-arjinin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen PYY düzeyleri.	52
4.10. Agmatin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen PYY düzeyleri.	53
4.11. L-arjinin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen cAMP düzeyleri.	55

4.12. Agmatin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen cAMP düzeyleri.	56
4.13. L-arjinin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen kalsiyum yoğunlukları.	59
4.14. A) L-arjinin 40 mM ve B) L-arjinin 40 mM + NPS 2143 gruplarının 60. dakikadaki kalsiyum yoğunlukları.	60
4.15. Agmatin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen kalsiyum yoğunlukları.	61
4.16. L-arjinin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen EAA_{Ca+2} değerleri.	62
4.17. Agmatin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen EAA_{Ca+2} değerleri.	63
4.18. L-arjinin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen CaSR immünreaktivite şiddeti.	64
4.19. A) L-arjinin 20 mM ve B) L-arjinin 20 mM + NPS 2143 gruplarının CaSR immünreaktivite şiddeti.	65
4.20. Agmatin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen CaSR immünreaktivite şiddeti.	66
4.21. A) Agmatin 20 mM ve B) Agmatin 20 mM + NPS 2143 gruplarının CaSR immünreaktivite şiddeti.	67

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
3.1. ELISA ile GLP-1 ölçümünde seyreltmeler ile elde edilen konsantrasyonlar.	32
3.2. ELISA ile PYY ölçümünde seyreltmeler ile elde edilen konsantrasyonlar.	34
3.3. Seyreltilmiş BSA standartlarının hazırlanması.	38
4.1. L-arjinin uygulamasından sonra NCI-H716 canlı hücre oranı.	42
4.2. Agmatin uygulamasından sonra NCI-H716 canlı hücre oranı.	43
4.3. NPS 2143 uygulamasından sonra NCI-H716 canlı hücre oranı.	44
4.4. R568 uygulamasından sonra NCI-H716 canlı hücre oranı.	45
4.5. L-arjinin ve kombinasyonların uygulamasından sonra NCI-H716 canlı hücre oranı.	46
4.6. Agmatin ve kombinasyonların uygulamasından sonra NCI-H716 canlı hücre oranı.	48
4.7. L-arjinin ve kombinasyonların uygulamasından sonra NCI-H716 hücrelerinin GLP-1 düzeyi.	49
4.8. Agmatin ve kombinasyonların uygulamasından sonra NCI-H716 hücrelerinin GLP-1 düzeyi.	51
4.9. L-arjinin ve kombinasyonların uygulamasından sonra NCI-H716 hücrelerinin PYY düzeyi.	52
4.10. Agmatin ve kombinasyonların uygulamasından sonra NCI-H716 hücrelerinin PYY düzeyi.	54
4.11. L-arjinin ve kombinasyonların uygulamasından sonra NCI-H716 hücrelerinin cAMP düzeyi.	55

4.12. Agmatin ve kombinasyonların uygulamasından sonra NCI-H716 hücrelerinin cAMP düzeyi.	57
4.13. Grupların total protein düzeyleri.	58
4.14. L-arjinin, Agmatin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile NCI-H716 hücrelerinin $EAA_{Ca^{+2}}$ değerleri.	63
4.15. L-arjinin ve kombinasyonların uygulamasından sonra NCI-H716 hücrelerinin CaSR immünreaktivite şiddeti.	66
4.16. Agmatin ve kombinasyonların uygulamasından sonra NCI-H716 hücrelerinin CaSR immünreaktivite şiddeti.	68

1. GİRİŞ

Yiyecek alımına bağlı olarak sindirim kanalından glukoz metabolizması ve iştahı düzenleyen inkretin hormonların da dâhil olduğu birçok hormon salgılanmaktadır. Inkretin hormonlar esas olarak ince ve kalın bağırsaktaki enteroendokrin hücreler tarafından oral glukoz alımı sonrasında salgılanır. Birçok fizyolojik etkiye sahip bu hormonların en önemli etkileri, yemek sonrası insülin salgısını artırmak ve hipoglisemi yaratmadan kan şekerini düşürmektir (1).

Inkretin hormonların etkilerinin büyük kısmından glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1) sorumludur. Yiyecek alımına bağlı olarak özellikle distal ileum ve kolondaki enteroendokrin L hücreleri tarafından salgılanan GLP-1, insülin salgısını artırır, glukagon salgısını engeller, mide boşalmasını geciktirir ve besin alımını azaltır. Sindirim kanalının distal bölgelerinde bulunan enteroendokrin L hücreleri GLP-1 ile birlikte Peptit tirozin-tirozin (Peptit YY, PYY) olarak adlandırılan bir peptiti daha salgılamaktadır. Besin alımı sonrasında PYY düzeyinin artıyor olması, iştah ve enerji metabolizmasının düzenlenmesinde bu peptitin de etkili olduğunu düşündürmektedir (2).

Başlıca glukoz alımı sonrası GLP-1 ve PYY salgısı görülse de, besinlerle yağ ve protein alımı da bu hormonların salgısına yol açmaktadır. Özellikle bazı amino asitlerin enteroendokrin L hücrelerini uyararak inkretin hormon salgısına yol açtığı böylece insülin salgısının artışında ve tokluk hissinin oluşmasında rol oynadıkları bilinmektedir. Yarı esansiyel veya duruma göre esansiyel bir amino asit olan L-arjininin (L-arj) de GLP-1 ve PYY salgısını artırdığı ve gıda alımını azalttığı tespit edilmiştir. L-arjininin enteroendokrin L hücrelerinde yol açtığı GLP-1 ve PYY salgısının hücre dışı kalsiyum düzeyini algılayan kalsiyum algılayan reseptörler (CaSR) aracılığıyla olabileceği ileri sürülmektedir (3).

L-arjininin L-arjinin dekarboksilaz (ADC) enzimi aracılığıyla dekarboksilasyonu sonucunda doğal bir poliamin olan agmatin (Agm) sentezlenmektedir. Agmatin vücudumuzda bu yolak üzerinden sentezlendiği gibi, balık, kırmızı et, yumurta, peynir, kuruyemiş, şarap, bira gibi pek çok besin maddesi ile doğrudan da alınmaktadır. Agmatin merkezi sinir sisteminde ve enterik sinir sisteminde önemli bir nörotransmitter ve nöromodülatör olarak görev yapmaktadır.

Bunun haricinde pek çok fizyolojik işlevi olduğu gösterilen agmatinin glukoz metabolizmasını düzenleyici rolü olduğu da bilinmektedir. Son yıllarda agmatinin diyabet ve obezite tedavisinde terapötik bir ajan olarak kullanılması gündeme gelmiştir (4).

İnsan enteroendokrin L hücre hattı olan NCI-H716, G proteini ile eşleşmiş reseptörler (GPCR) dâhil olmak üzere çeşitli kemoreseptörleri ifade etmektedir. L hücrelerinde ifade edildiği gösterilen kalsiyum algılayan reseptörler (CaSR) hücre dışı kalsiyum seviyelerindeki değişiklikleri algılayan, G proteini ile eşleşmiş reseptörlerdir. Bu reseptörler esas olarak paratiroid hormon salgısında ve kalsiyumun böbreklerden geri emiliminde görev alırlar. CaSR'ler, kalsiyum dışında polivalan katyonlar (Mg^{+2} , Sr^{+2} , Gd^{+3}), L-amino asitler, poliaminler, bazik polipeptitler (protamin, poli-lizin) ve ufak peptitler tarafından da aktive edilebilmektedir (5).

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında yarı esansiyel bir amino asit olan L-arjininin ve doğal bir poliamin olan agmatinin glukoz metabolizması üzerindeki etkisinin GLP-1 ve PYY salgısı ile ilişkili olup olmadığı ve olası bir etkide kalsiyum algılayan reseptörlerin (CaSR) rolünün incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla bir insan kolon enteroendokrin L hücre hattı olan ve Türkiye'de ilk kez bu tez çalışmasında çalışılan NCI-H716 hücreleri kullanılmıştır. NCI-H716 hücrelerine farklı dozlarda L-arjinin ve agmatin uygulanarak GLP-1 ve PYY hormonlarının düzeylerine olan etkileri ve ortaya çıkabilecek etkide CaSR'lerin rolü araştırılmıştır. L-arjinin ve agmatinin GLP-1 ve PYY salgısıyla olan ilişkisi ve CaSR'lerin bu ilişkideki rolünün ortaya çıkarılması postprandiyal glukoz metabolizmasının daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Böylece diyabet ve obezite gibi hastalıkların tedavisi veya önlenmesinde yeni stratejiler geliştirmek mümkün olabilecektir.

Çalışmanın amaçları şu şekilde belirlenmiştir;

1. NCI-H716 hücrelerinde hücre canlılığını en az etkileyen L-arjinin ve agmatin dozlarının belirlenmesi,
2. NCI-H716 hücrelerinde hücre canlılığını en az etkileyen NPS 2143 ve R568 dozlarının belirlenmesi,
3. NCI-H716 hücrelerinde L-arjinin ve agmatinin farklı konsantrasyonlarının GLP-1 ve PYY salgısı üzerine etkilerinin incelenmesi,

4. NCI-H716 hücrelerinde L-arjinin ve agmatinin yol açacağı olası GLP-1 ve PYY salgısına kalsiyum algılayan reseptörlerin (CaSR) aracılık edip etmediğinin gösterilmesi,
5. NCI-H716 hücrelerinde L-arjinin ve agmatin aracılı olası GLP-1 ve PYY salgısında hücre içi ikinci mesajıcılardan Ca^{+2} ve cAMP'nin rollerinin araştırılması.

Bu amaçlara yönelik olarak da çalışmanın hipotezleri belirlenmiştir;

H1₀: NCI-H716 hücrelerine L-arjinin ve/veya agmatin uygulanması GLP-1 ve PYY hormonlarının salgısını değiştirmez.

H1₁: NCI-H716 hücrelerine L-arjinin ve/veya agmatin uygulanması GLP-1 ve PYY hormonlarının salgısına yol açar.

H2₀: L-arjinin ve/veya agmatin CaSR reseptörleri aracılığıyla NCI-H716 hücrelerinde GLP-1 ve PYY hormonları salgısına yol açmaz.

H2₁: L-arjinin ve/veya agmatin CaSR reseptörleri aracılığıyla NCI-H716 hücrelerinde GLP-1 ve PYY hormonları salgısına yol açar.

H3₀: L-arjinin + CaSR pozitif allosterik modülatörü (R568) ve agmatin + R568 uygulaması ile NCI-H716 hücrelerinde GLP-1 ve PYY salgısı değişmez.

H3₁: L-arjinin + R568 ve agmatin + R568 uygulaması ile NCI-H716 hücrelerinde GLP-1 ve PYY salgısı artar.

H4₀: L-arjinin + CaSR negatif allosterik modülatörü (NPS 2143) ve agmatin + NPS 2143 uygulaması ile NCI-H716 hücrelerinde GLP-1 ve PYY salgısı değişmez.

H4₁: L-arjinin + NPS 2143 ve agmatin + NPS 2143 uygulaması ile NCI-H716 hücrelerinde GLP-1 ve PYY salgısı azalır.

H5₀: NCI-H716 hücrelerinde L-arjinin ve agmatin aracılı GLP-1 ve PYY salgısında hücre içi ikinci mesajıcılardan Ca^{+2} ve/veya cAMP rol almaz.

H5₁: NCI-H716 hücrelerinde L-arjinin ve agmatin aracılı GLP-1 ve PYY salgısında hücre içi ikinci mesajıcılardan Ca^{+2} ve/veya cAMP rol alır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnkretin Hormonlar

Besin alımı sonrasında bağırsaklardan sindirim, emilim ve iştahı düzenleyen çok sayıda hormon salgılanmaktadır. Böylece glukoz, protein ve yağ metabolizması düzenlenir ve tokluk hissi oluşur. Bu hormonların arasında temel görevi pankreastan insülin salgısına yol açmak olan ‘inkretin hormonlar’ (inkretinler) bulunur (1).

İnkretinler başlıca oral glukoz alımından sonra ince ve kalın bağırsakta bulunan enteroendokrin hücrelerden salgılanır ve pankreastan insülin salgısını artırarak hipoglisemiye neden olmaksızın kan şekerini düşürür. Besin alımından sonrası insülin salgısının %50-70'i bu hormonların etkisiyle gerçekleşir. Enteroendokrin L hücreleri esas olarak glukagon-benzeri peptit-1 (GLP-1), enteroendokrin K hücreleri ise glukoz bağımlı insulintropik peptit (GIP) üretiminden sorumludur. GLP-1 ve GIP inkretin etkiden sırasıyla %80 ve %20 oranında sorumludur (1, 6, 7).

İlk olarak 1900'lerin başında, gıdaların sindirimi ile bağırsak mukozasından sentezlenen bazı faktörlerin endokrin pankreastan çeşitli maddelerin salgısını uyarması ile kan glukoz seviyesini düşürdüğüne dair fikirler ortaya çıkmıştır (8). 1932 yılında Jean LaBarre, kan şekerini düşüren fakat ekzokrin salgıya neden olmayan ve üst bağırsak mukozasından ekstrakte ettiği maddeye “inkretin” adını vermiş ve diyabetli hastaların tedavisinde kullanılabileceğini öne sürmüştür. Radyoimmünoesey yöntemi ile insülin seviyesinin ölçülmesi ve oral glukoz uygulamasının intravenöz uygulamaya nazaran daha yüksek düzeyde insülin salgılattığının gösterilmesiyle inkretinlerle ilgili çalışmalar hız kazanmıştır (9, 10). İlerleyen çalışmalarda gastrointestinal sistemden birden çok inkretin hormon salgılandığı tespit edilmiştir. Gastrik inhibitör polipeptit (GIP), domuz ince bağırsağından izole edilen ve köpeklerde gastrik asit salgısını inhibe ettiği ilk olarak belirlenen inkretin hormondur (11). Daha sonra yapılan çalışmalarda GIP'in gastrik asit salgısına inhibitör etkisinin sadece farmakolojik dozlarda, insulintropik etkisinin ise fizyolojik dozlarda ortaya çıktığı anlaşıldığından adı glukoz-bağımlı insulintropik polipeptit olarak düzeltilmiştir (1). 1980'li yıllarda memeli proglukagon geninin ve tamamlayıcı DNA'sının (cDNA) sekanslanma ve klonlanması, bağırsaklardan sentezlenen diğer bir inkretin olan GLP-1'in keşfine öncülük etmiştir (12). Günümüzde inkretin hormonlar

olarak kabul edilen GLP-1 ve GIP hormonlarının birbirlerinin etkisini güçlendirmek suretiyle glukozla uyarılan insülin salgısını kontrol ettiği düşünülmektedir (13).

2.2. Glukagon Benzeri Peptit-1 (GLP-1)

GLP-1 bağırsak, pankreas ve beyin aksında rol almaktadır. Bu hormon gıda alımına cevap olarak başlıca bağırsak mukozasının distalinde (ileum ve kolon) yer alan enteroendokrin L hücrelerinden salgılanmaktadır (14). Endokrin ve parakrin etkilerinin yanı sıra nörotransmitter olarak da rol oynayan GLP-1'in, pankreasta alfa ve beta hücreleri, bağışıklık sistemi hücreleri, akciğer, kalp, merkezi sinir sistemi, karaciğer, böbrek ve bazı beyin bölgelerinde reseptörleri olduğu tespit edilmiştir (15).

GLP-1 reseptörleri, G proteinleri ile etkileşerek etki gösterirler. Bu reseptörler adenilat siklaz ve fosfolipaz C aktivitesi ile hücre içi Ca^{+2} ve cAMP düzeyi değişikliğine yol açarlar ve sonrasında hedef dokularda farklı sinyal yollarını harekete geçirir (1). En önemli hedef doku olan pankreasın beta hücrelerinde GLP-1'in reseptörüne bağlanmasından sonra, adenilat siklaz aktivasyonu ve cAMP artışı görülür. Böylece ATP bağımlı K^{+} kanalları (K_{ATP}) kapanır, hücre zarında depolarizasyon olur ve voltaj bağımlı kalsiyum kanalları açılarak hücre içi kalsiyum düzeyi artar. Kalsiyum düzeyindeki artış insülin veziküllerinin ekzositozuna yol açar (1).

2.2.1. GLP-1'in Yapısı, Sentezi ve Metabolizması

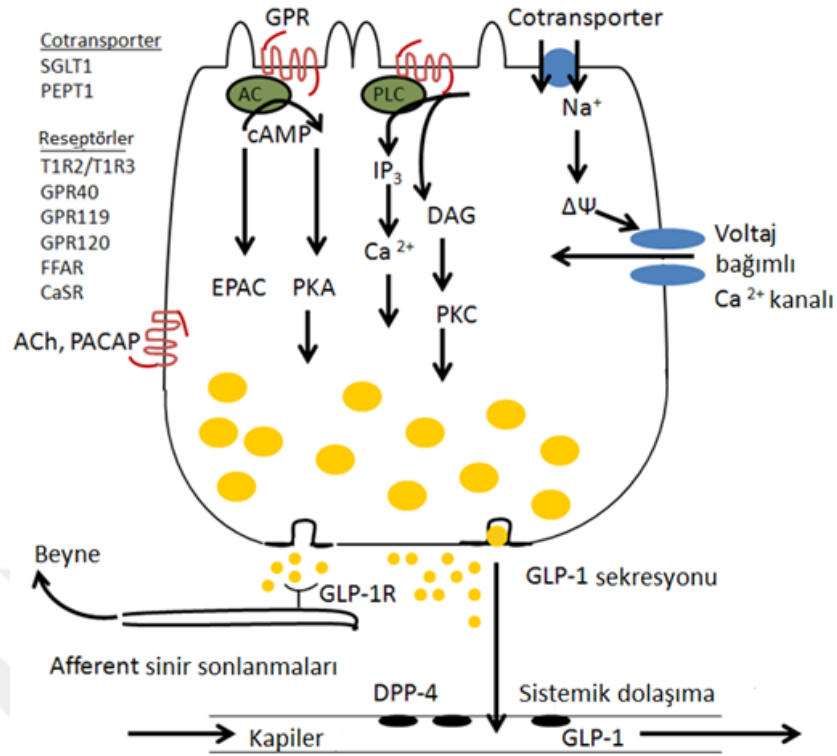
37 amino asitli ve peptit yapısında bir hormon olan GLP-1, proglukagon geni tarafından kodlanmakta ve amino asit dizilimi açısından %50 oranında glukagona benzemektedir (16). Pankreasın alfa hücrelerinde, başlıca ileum ve kolondaki enteroendokrin L hücrelerinde ve beyinde proglukagon geni bulunmaktadır (17). Prohormon konvertaz 1/3 enzimi ile L hücrelerinde GLP-1, GLP-2, oksintomodulin ve glisentini sentezlenmektedir (18). GLP-1 ile birlikte sentezlenen glukagon benzeri peptit-2 (GLP-2)'nin inkretin etkisinin olmadığı, sadece GLP-1'in insülin salgısını uyarma yeteneği olduğu belirlenmiştir (19).

GLP-1'in ilk formu GLP-1₍₇₋₃₇₎ olup bu peptitin C-terminalindeki glisin rezidüsünün amide edilmesiyle GLP-1_{(7-36)-NH₂} oluşmaktadır. Bu iki peptit eş zamanlı olarak salgılanmaktadır ve plazma yarı ömürleri de aynıdır. GLP-1_{(7-36)-NH₂}, dolaşımda görülen baskın form olup GLP-1'in %80'ini oluşturmaktadır (20). Bağırsak kapillerinden portal ven ve karaciğere sonra da pankreasa geçen GLP-1, beta hücrelerinde yer alan spesifik reseptörüne bağlanarak insülin salgısına yol açmaktadır (20).

Dolaşıma salgılanan GLP-1 kan, böbrek, bağırsak, karaciğer ve beyinde hızlı bir şekilde metabolize olmaktadır. Bu parçalanmayı sağlayan bir serin proteaz olan dipeptidil peptidaz IV (DPP-IV) enzimidir ve bu enzimin hücre zarına bağlı ve dolaşımda çözünür halde bulunan iki formu bulunmaktadır (21). DPP-IV enzimi, GLP-1'in amino ucundaki iki amino asiti kopartmak suretiyle aktivitesini durdurmaktadır. Böylece GLP-1'in inaktif analogları olan GLP-1₍₉₋₃₆₎ ve GLP-1₍₉₋₃₇₎ meydana gelmektedir (22). DPP-IV inhibitörleri kullanılarak DPP-IV enzimi inhibe edilmektedir (23). Böylece GLP-1 konsantrasyonu artmakta ve fizyolojik etkileri daha uzun süre devam edebilmektedir. DPP-IV inhibitörlerini kullanan Tip 2 diyabetli kişilerde beta hücre fonksiyonunda artış olduğu, plazma glukagon seviyesinin azaldığı, HbA1c düzeyinin düştüğü ve kilo kaybı olduğu gözlenmiştir (24, 25). DPP-IV enzimine ek olarak hücre zarına bağlı çinko metallopeptitaz olan nötral endopeptitaz 24.11 (NEP-24.11) tarafından da GLP-1 parçalanabilmektedir. Böbreklerde çok fazla ifade edilen bu enzim ile GLP-1 metabolitleri böbreklerden hızlıca uzaklaştırılmaktadır (26).

2.2.2. GLP-1 Salgısının Düzenlenmesi

L hücrelerinden GLP-1 salgısı için en önemli uyaranlardan biri gıda alımıdır. L hücrelerinin salgı granülleri uygun bir uyarı gelene kadar GLP-1'i depo etmektedir. L hücrelerinin bağırsak lümenine bakan apikal yüzleri ve salgı granüllerince zengin bazolateral yüzleri vardır böylece apikal yüzden doğrudan gıda uyarısıyla, bazolateral yüzden de nöral, hormonal ve parakrin faktörler aracılığıyla dolaylı olarak GLP-1 salgısı gerçekleşmektedir (27) (Şekil 2.1.).



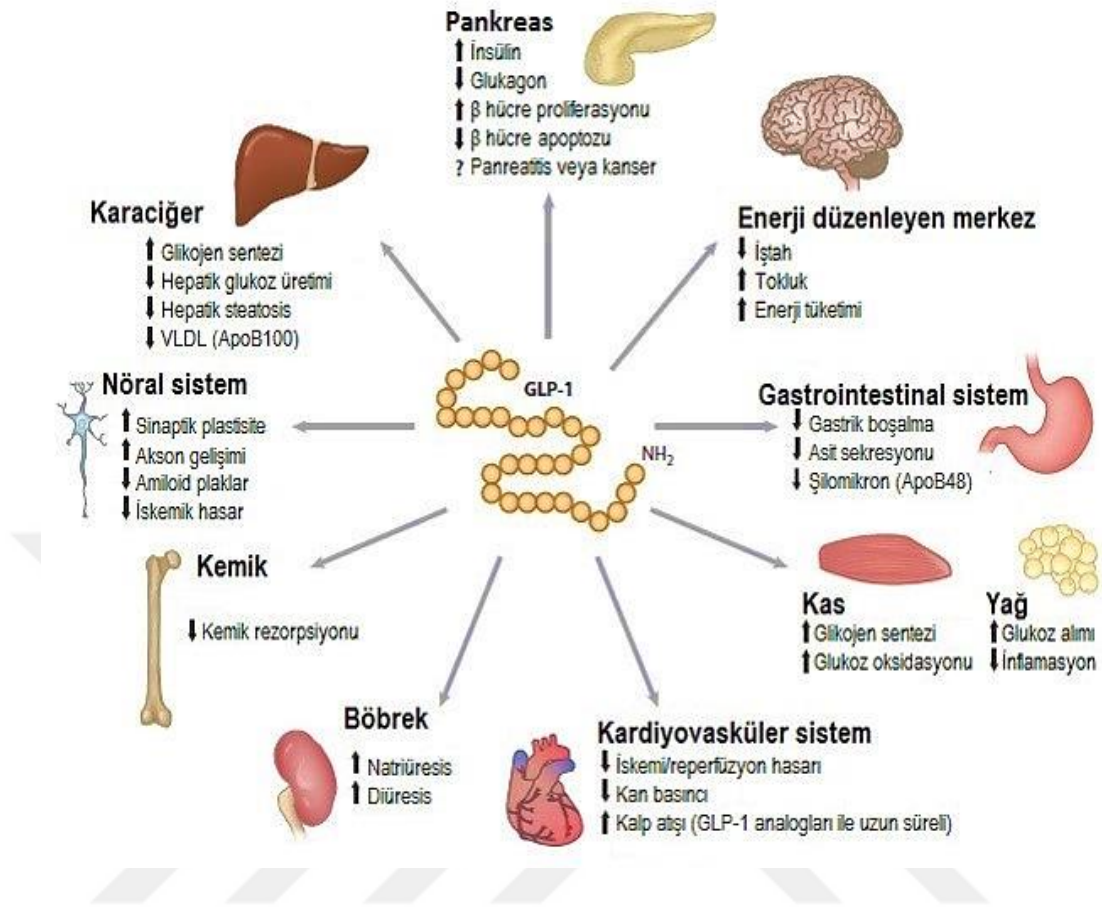
Şekil 2.1. L hücrelerinde GLP-1 salgısına yol açan mekanizmalar (28).

SGLT1- Sodyum-bağımlı glukoz taşıyıcısı 1, PEPT1- Oligopeptit taşıyıcısı 1, T1R2/T1R3- Tatlı tat reseptörleri, GPR- G-proteini ile eşleşmiş reseptörler, FFAR- Serbest yağ asidi reseptörleri, CaSR- Kalsiyum algılayan reseptör, ACh- Asetilkolin, PACAP- Pituiter adenilat siklaz-aktif polipeptit, AC- Adenilat siklaz, cAMP- Siklik adenosin monofosfat, EPAC- cAMP ile etkinleşen değiş-tokuş proteinini, PKA- Protein kinaz A, PKC- Protein kinaz C, IP3- İnositol trifosfat, DAG- Diaçil gliserol, PLC- Fosfolipaz C, DPP-4- dipeptidil peptidaz

2.2.3. GLP-1'in Biyolojik Etkileri

GLP-1, pankreastan insülin salgısını artırırken glukagon salgısını baskılar, beta hücrelerinin sayıca artmasını sağlar ve apoptozlarını önler. Ayrıca gastrik salgıyı azaltır, mide boşalmasını yavaşlatır, gastrointestinal motiliteyi engeller ve besin alımını inhibe eder (29). Şekil 2.2.'de GLP-1'in genel fizyolojik etkileri gösterilmiştir.

GLP-1'in tokluk hissi oluşturu ve anti-diyabetik etkileri, tip-2 diyabetin tedavisi için umut verici olarak düşünülmektedir (30). Modifiye edilmiş gıdaların ve diyetlerin endojen GLP-1 salgısını artırmak ve glukoz metabolizmasını daha iyi regüle etmek için olası terapötik kullanımı göz önüne alındığında, besin ve besin takviyeleri ile uyarılan GLP-1 salgısının mekanizmalarının anlaşılması önem arz etmektedir.



Şekil 2.2. GLP-1'in fizyolojik etkileri (30).

2.2.4. GLP-1 Hormonu Salgılayan Hücre Hatları

NCI-H716, GLUTag ve STC-1 hücre hatları, glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1) salgısının temel mekanizmalarını incelemek için yaygın olarak kullanılan hücre hatlarıdır (30).

NCI-H716 Hücre Hattı

NCI-H716 insan kolonundan elde edilmiş enteroendokrin hücre hattıdır. Günümüzde, NCI-H716 hücreleri, insan bağırsak L hücresinin işlevlerinin çalışılabilirdiği tek hücre hattıdır. İlk olarak Reimer ve arkadaşları bu hücrelerden GLP-1 salgılandığını ve bu salgının kültür ortamında regüle edilebildiğini göstermiştir. Bu çalışmada protein hidrolizatın, palmitik ve oleik asitin NCI-H716 hücre hattında GLP-1 salgısını güçlü bir şekilde uyardığı gösterilmiştir (31). Daha sonra bu hücre hattı kullanılarak nörotransmitterlerin (32), hormonların (33, 34), yağ asitlerinin (35) ve

anti-diyabetik ilaçların (36) GLP-1 salgısı üzerine olan etkilerini inceleyen çalışmalar yapılmıştır. Bu hücrelerde çeşitli amino asit taşıyıcılarının (30), tat reseptörlerinin (37), yağ asidi reseptörlerinin (35, 38) varlığı da gösterilmiştir. Bu çalışmalar net bir şekilde NCI-H716 hücrelerinin besin maddelerini, hormonları ve nörotransmitterleri algılayarak, GLP-1 salgısı ile cevap verecek reseptörlere ve hücre içi elemanlara sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

GLUTag Hücre Hattı

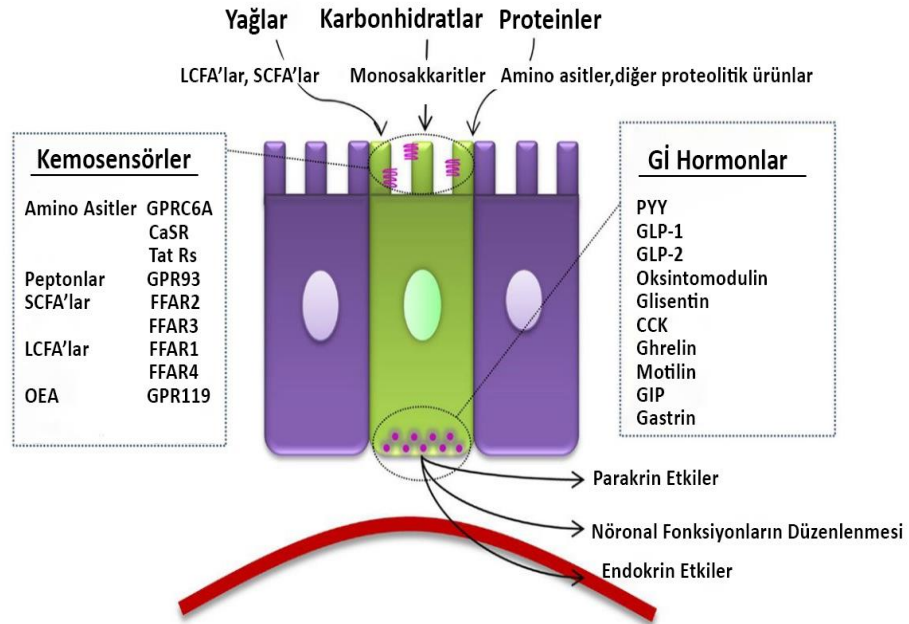
GLUTag hücre hattı, glukagon geni-SV40 T antijen transgenik farelerdeki glukagon üreten enterohormonal hücre tümöründen elde edilmiştir. GLUTag hücreleri proglukagon genini yüksek düzeyde ifade eder ve proglukagonu GLP-1 dâhil bir dizi proglukagon türetilmiş peptit olarak işler. GLUTag hücreleri yüksek seviyelerde GLP-1 ve kolesistokinin (CCK) ifade eder ve salgılar, ancak PYY ifadesi görülmez (39). GLUTag hücrelerinin, forskolin ve forbol esterleri gibi intrasellüler protein kinaz A (PKA) ve protein kinaz C (PKC) yollarını uyarıcılarına cevap olarak GLP-1 salgıladığı gösterilmiştir (40).

STC-1 Hücre Hattı

Bağırsak sekretin tümör hücre hattı olan STC-1, farelerin ince bağırsağındaki tümörlerden elde edilmiştir ve doğal bağırsak enteroendokrin hücrelerinin birçok özelliğini taşır (39). Bu nedenle, STC-1 hücreleri, gastrointestinal hormon salgısını *in vitro* ortamda düzenleyen gıdaları veya bileşiklerini belirlemek için rutin olarak kullanılmaktadır. CCK'nın yanı sıra, STC-1 hücreleri metabolizma, beslenme ve tokluk gibi rolleri ile bilinen geniş bir bağırsak hormon yelpazesini ifade eder ve salgılar. Bu hormonlar arasında GIP, peptid YY (PYY), pankreatik polipeptit, nörotensin ve proglukagondan türetilmiş peptitler GLP-1, GLP-2 ve oksintomodulin bulunmaktadır (41). STC-1 hücreleri bu hormonları çeşitli fizyolojik uyarıcılara yanıt olarak salgılar, ancak seviyeleri enteroendokrin hücrelere göre farklılık gösterebilir (42).

2.3. Enteroendokrin L hücrelerinin Diğer Salgıları

Bağırsak kanalında bulunduğu bölgelere göre L hücreleri farklı peptitleri birlikte salgılamaktadır. İleum ve kolonda daha çok, duodenum ve jejunumda ise daha az sayıda L hücresi bulunmaktadır. L hücrelerinin GLP-1 ve PYY salgısı, jejunumdan başlayarak distale doğru artarak devam etmektedir. Her iki hormonu salgılayan bu hücreler, enerji homeostazının düzenlenmesinden sorumludur. Bu hücreler, GLP-1 ile birlikte PYY, GIP, GLP-2 ve oksintomodulin gibi hormonlar da salgılanmaktadır (7). GLP-1 ve GIP üst bağırsak bölümleri, PYY ve CCK ise GLP-1 salgısı ile birlikte alt bölümlerdeki L hücrelerinden salgılanmaktadır. Enteroendokrin hücrelerdeki reseptörler ve salgılanan hormonlar Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Enteroendokrin hücrelerdeki reseptörler ve salgılanan hormonlar (43).

GPRC6A: G proteini ile eşleşmiş reseptör ailesi C grubu 6 üye A, CaSR: Kalsiyum algılayan reseptör, GPR: G proteini ile eşleşmiş reseptör, FFAR: Serbest yağ asidi reseptörleri, LCFA: Uzun zincirli yağ asitleri, SCFA: Kısa zincirli yağ asitleri, PYY: Peptit YY, GLP-1: Glukagon benzeri peptit-1, GLP-2: Glukagon benzeri peptit-2, CCK: Kolesistokinin, GIP: Glukoz bağımlı insülinotropik peptit

2.3.1. Peptit YY (PYY)

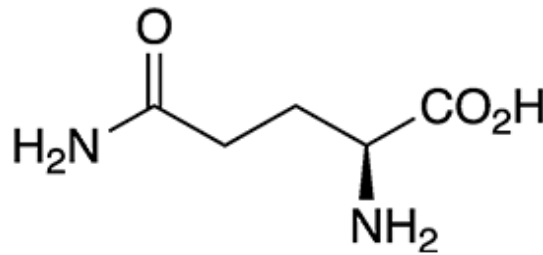
Sindirim kanalının distalinde bulunan enteroendokrin L hücreleri, hem GLP-1 hem de peptit tirozin-tirozin (Peptit YY, PYY) olarak adlandırılan başka bir peptit daha salgılamaktadır. Düz zincirli bir polipeptit olan PYY, 36 amino asit içermektedir. Bu polipeptitin C ve N terminallerinde tirozin aminoasidi olduğundan ve tirozin Y harfi ile temsil edildiğinden *Peptit YY* olarak adlandırılmıştır (44). PYY₍₁₋₃₆₎ ve PYY₍₃₋₃₆₎ olmak üzere dolaşımında iki aktif formu bulunmaktadır. PYY₍₁₋₃₆₎ bağırsaktaki asıl peptit olup DPP-IV enzimiyle PYY₍₃₋₃₆₎ formuna dönüşmektedir (2).

GLP-1 ile PYY'nin birlikte salgılanması sindirim kanalının distaline doğru artar (2). PYY mide asit salgısını ve diğer intestinal salgıları inhibe eder, böylece mide boşalmasında ve bağırsak hareketlerinde yavaşlama görülür (45). Oral olarak alınan glukoz, protein ve yağlar tarafından PYY salgısının uyarılabildiği ve obez olan kişilerde PYY salgısının azaldığı da gösterilmiştir. Bu sonuçlar beraberce değerlendirildiğinde, PYY'nin enerji metabolizması ve iştah üzerine önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (46).

2.4. L-arjinin

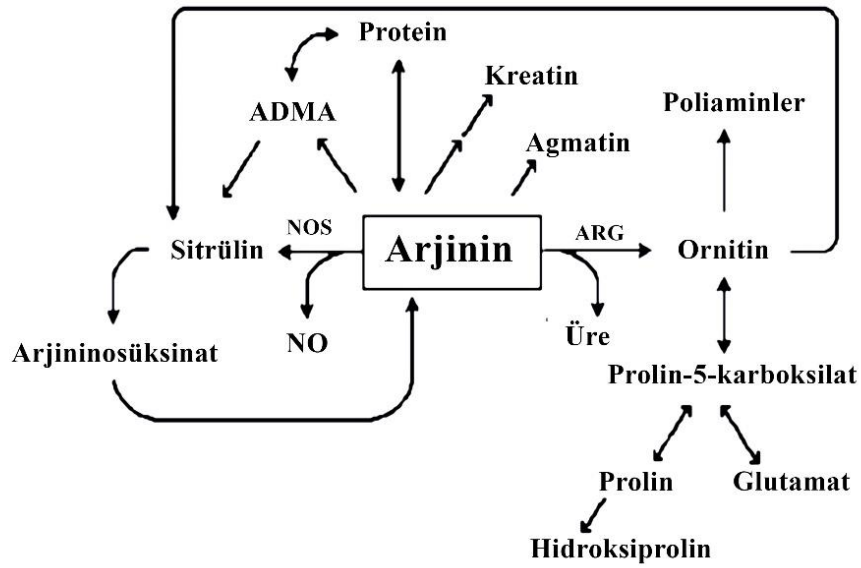
2.4.1. L-arjininin Yapısı ve Biyolojik Etkileri

1895 yılında Hedin tarafından keşfedilen bazik bir amino asit olan L-arjinin (2-amino-5-guanidino-pentanoik asit), D ve L olmak üzere iki formda bulunur (Şekil 2.4.). Protein sentezi ve amonyak detoksifikasyonuna katılan yarı esansiyel veya duruma göre esansiyel bir amino asit olan L-arjininin çoğu diyetle hücre dışı kaynaklardan karşılamakta olup protein döngüsü ve vücuttaki amino asitlerin dönüşümünden türetilmektedir (47, 48).



Şekil 2.4. L-arjininin kimyasal yapısı (49).

L-arjinin iştahı azaltmak için iyi bir aday olarak görülen katyonik bir amino asittir. Ayrıca bu amino asit doğrudan protein sentezine, ornitin, agmatin, sitrülün, kreatin ve nitrik oksit sentezine, ornitin üzerinden ise glutamat, putresin ve prolin sentezine katılmaktadır ve üre siklusunu, poliamin biyosentezini ve immün cevabı düzenlemektedir (Şekil 2.5.). L-arjinin ubiquitin-proteozom yolu ile protein yıkımında, büyüme hormonu, prolaktin, insülin benzeri büyüme faktörü uyarımında da rol oynamaktadır (50).



Şekil 2.5. L-arjininin başlıca metabolik yollarının şeması (51).

NO: nitrik oksit, NOS: nitrik oksit sentaz, ADMA: Asimetrik Dimetilarginin, ARG: L-arjinin

2.4.2. L-arjininin Diyabet ve Obezite ile İlişkisi

Son yıllarda yapılan çalışmalar L-arjininin (L-Arj) glukoz metabolizması üzerine olumlu etkilerinin olduğunu, ayrıca mide ve bağırsaklar üzerine düzenleyici etkilerinin bulunduğunu ortaya koymaktadır (50, 52, 53). L-arjinin, insülin, glukagon, büyüme hormonu ve GLP-1 dâhil olmak üzere enerji metabolizmasını yöneten hormonlar üzerinde güçlü bir kontrole sahiptir (54, 55). L-arjinin insanlara yüksek konsantrasyonlarda uygulandığında pankreastan hormon salgısını uyardığı bilinmektedir (56-58). L-Arj'nin plazma membranını depolarize ettiği, bunun glukoz tarafından güçlendirildiği ve voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarından Ca^{+2} girişini uyardığı

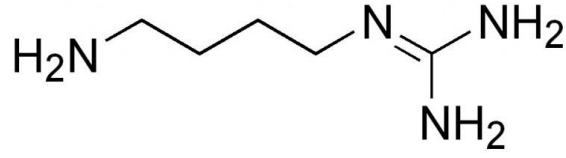
gösterilmiştir (59-61). Hücre dışı kalsiyumun hücreye akışı beta hücrelerinde, insülin granüllerinin mobilizasyonuna ve insülin salgısına yol açmaktadır (62). L-Arj'nin insülin salgısını uyarıcı etkisi spesifik amino asit taşıyıcıları yoluyla L-Arj'nin beta hücresine elektrojenik taşınmasının bir sonucu olarak gerçekleşmektedir (60). L-Arj, pankreas dışında hipofiz bezi dâhil olmak üzere diğer endokrin dokulardan da hormon salgısını etkileyebilmektedir (63). Örneğin L-arjinin, bağırsak hormonu salgısı üzerindeki etkisini yaklaşık 120 dakikada gösterir; bu durum, ince bağırsağın distalindeki amino asit algılayan L hücreleri ile doğrudan temas ettiği noktayı yansıtabilmektedir.

L-arjinin ile diyet takviyesinin hayvanlarda ve insanlarda glisemik kontrolü iyileştirme gibi olumlu metabolik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (64-67). L-Arj, protein sentezi ve bağışıklık gibi çeşitli fizyolojik süreçleri düzenlemektedir (68), plazma GLP-1'i ve pankreas beta hücrelerinden insülin salgısını artırdığı (56) ve glukoz klirensini önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir (55). L-glutamat, L-lösin ve L-arjininin hem *in vivo* hem de *in vitro* beta hücrelerinden insülin salgılanmasını akut ve kronik olarak düzenlediği bilinmektedir (60, 69, 70). L-Arj dahil olmak üzere spesifik L-amino asitlerin GLP-1 ve PYY salgısını uyarma yeteneği *in vitro* çalışmalarda da gösterilmiştir (3, 71). Ayrıca L-Arj, sıçanlarda en etkili anorektik amino asitlerden biridir (72). Hayvanlarda ve insanlarda en çok incelenen ve "doyurucu amino asit" olarak tanımlanan L-arjinin, CaSR, GPRC6A ve T1R1/T1R3 dâhil olmak üzere birçok kemoreseptörü aktive edebilmektedir (73).

2.5. Agmatin (Guanido butanolamin)

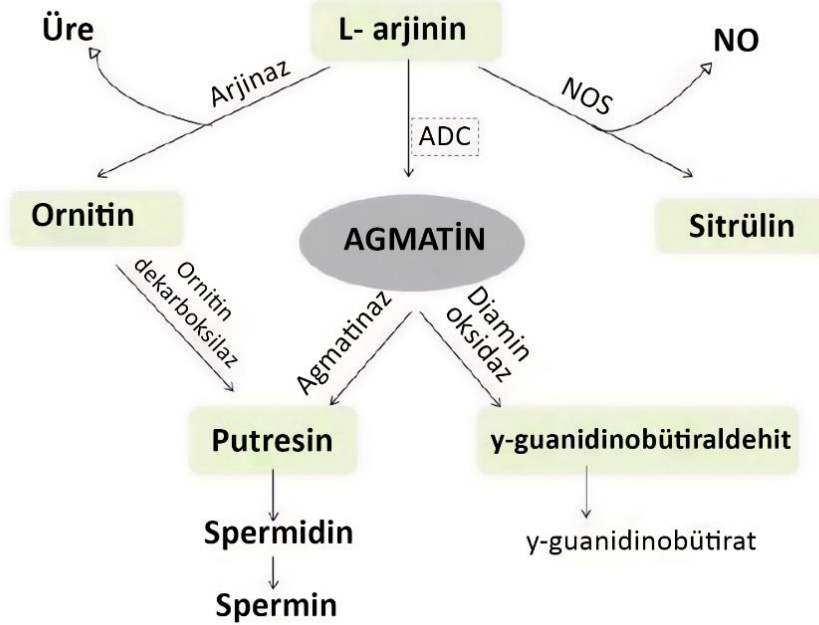
2.5.1 Agmatinin Yapısı, Sentezi ve Metabolizması

Agmatin, L-arjinin dekarboksilaz (ADC) enzimi tarafından L-arjininden üretilen doğal bir poliamindir (Şekil 2.6.) (74). 1994 yılında sığır beyinde agmatin ve ADC enzimi keşfedilmiş ve bu aminin adrenal bezlerden katekolamin salgısını uyaran α 2-adrenerjik ve imidazolin reseptörleri için endojen bir ligand olduğu bulunmuştur (75, 76).



Şekil 2.6. Agmatinin kimyasal yapısı (77).

ADC enzimi tarafından L-arjiniinden üretilen agmatin, poliamin biyosentetik yolunda agmatinaz (AGM) veya agmatinaz benzeri protein (ALP) tarafından putresine hidrolize edilebilir veya GABA sentezi için diamin oksidaz (DAO) tarafından guanidinobutiraldehite dönüştürülebilir. Ornitin dekarboksilaz (ODC), L-arjinini dekarboksile hale getirebilir ve aynı zamanda putresin üretebilir (Şekil 2.7.) (78).

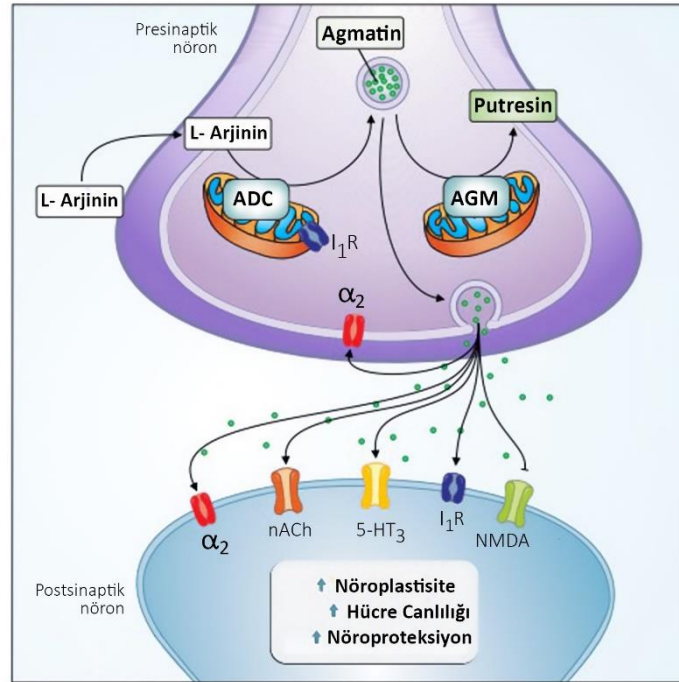


Şekil 2.7. Agmatin sentezi ve metabolik yollar (79).

NO: nitrik oksit, NOS: nitrik oksit sentaz, ADC: L-arjinin dekarboksilaz

Agmatin bakteriler ve bitkilerde poliamin biyosentezinin bir ara metabolitidir (80, 81). Memeliler de ADC enzimini kullanarak agmatin üretmektedir (82). Agmatinin dışarıdan besin yoluyla alımı da mümkün olmaktadır. Özellikle deniz ürünleri, et ve et ürünleri, yumurta, fermente sebzeler, süt, peynir, şarap ve birada agmatin bulunmaktadır (83).

Agmatin, L-arjinin ve türevlerinin metabolizmasında anahtar düzenleyici olarak görev yapmaktadır. Agmatin, kalp, böbrek, mide ve merkezi sinir sistemi dâhil birçok organ üzerinde koruyucu etkilere sahiptir (4). Merkezi sinir sisteminde agmatin, beyinde sentezlendiği, sinaptik veziküllerde depolandığı, alımla biriktiği ve depolarizasyonla salgılandığı için bir nörotransmitter/nöromodülatör olarak kabul edilmektedir. Agmatin nöronlarda veya glia hücrelerinde sentezlenebilir ve sinaptik aralığa salınabilir veya veziküllerde depolanabilir; burada agmatinaz tarafından putresine parçalanır. Ayrıca, agmatin, imidazolin bağlama bölgeleri ile etkileşime girebilir veya nöronlardan salınarak alfa adrenerejik reseptör (α_2), nikotinik asetilkolin reseptör (nACh), serotonin reseptörü (5-HT₃), imidazolin reseptör 1 (I₁R) veya N-metil-D-aspartat reseptörlerine (NMDA) bağlanabilir. Bu etkileşimler nöroplastisite, hücre canlılığı ve nöroproteksiyon artışıyla ilişkili çeşitli sinyal yollarının aktivasyonuna yol açmaktadır (Şekil 2.8.) (84, 85).



Şekil 2.8. Agmatinin reseptörleri ve etkileri (85).

ADC: L-arjinin dekarboksilaz, AGM: Agmatin, α_2 : Alfa-2 adrenerejik, nACh: Nikotinik asetilkolin, 5-HT₃: Serotonin, I₁R: İmidazolin reseptör 1, NMDA: N-metil-D-aspartat

2.5.2 Agmatinin Genel Biyolojik Etkileri

Memelilerde agmatin, pankreas hücrelerinden insülin salgısının düzenlemesi (86, 87), renal sodyum atılımı (88, 89) ve nöroprotektif etkiler (90, 91) dâhil olmak üzere birçok önemli hücresel fonksiyonla doğrudan ilişkilendirilmiştir. Ayrıca agmatin beyinde nitrik oksit sentazın bilinen tüm izoformlarını inhibe etmekte (92) ve morfine karşı toleransı artırmaktadır (93).

2.5.3 Agmatinin Diyabet ve Obezite Üzerine Etkileri

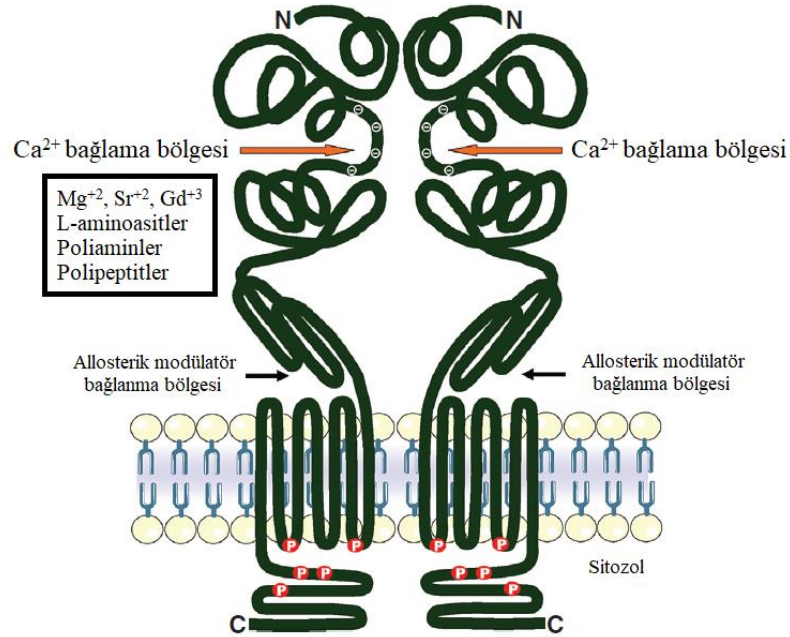
Son yıllarda agmatinin diyabet ve obezite için terapötik bir ajan olarak kullanımı gündeme gelmiştir. Agmatinin, sıçanlarda pankreas beta adacık hücrelerini uyatarak insülin salgısına yol açtığı gösterilmiştir (94). Yine yakın zamanda, agmatinin insülinden bağımsız şekilde plazma glukoz seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir (95). Agmatinin, yüksek yağlı diyetin neden olduğu obezite ile ilişkili metabolik ve hormonal bozukluğu iyileştirdiği de gösterilmiştir (96, 97). Agmatin, adenil siklazin yukarı doğru düzenlenmesi (up-regülasyonu) yoluyla cAMP'ye bağlı PKA sinyal yolunu aktive etmekte ve artan yağ asidi oksidasyonunun aracılık ettiği vücut ağırlığı artışını azaltmaktadır. Bu durum esas olarak, uzun zincirli yağ asitlerinin sonraki beta oksidasyonu için sitozolden mitokondriye translokasyonunda anahtar rol oynayan, karnitin biyosentezinin artmasına bağlanmıştır (98, 99). Dahası, agmatinin insülin direncini azalttığı ve katlanmamış proteinlerin ifadesini kolaylaştırdığı gösterilmiş, böylece artan enerji harcaması yoluyla vücut ağırlığı artışının azaltılmasına katkıda bulunduğu düşünülmüştür (100).

Agmatin ile ilgili yapılan çalışmalarda, agmatinin farklı dozlarının dokularda farklı etkiler gösterebileceği görülmüştür. Bu durumun agmatinin anti-inflamatuar ve anti-apoptotik etkilerinin yanı sıra NMDA reseptör baskılaması yoluyla mitojenle etkinleşen protein kinaz (MAPK) yolağının inhibisyonuyla ilgili olabileceği düşünülmektedir (101). Agmatinin hücre çoğalmasını konsantrasyona bağlı bir şekilde inhibe ettiği ve bu inhibisyonun agmatin ve hücre içi poliamin sistemi arasındaki etkileşime bağlı olabileceği düşünülmektedir (102). Glukoz metabolizması ile ilgili çalışmalara bakıldığında ise, agmatinin insülin salgısını uyardığı ve anti-hiperglisemik

etkisi olduğu gösterilmiş ancak GLP-1 ve PYY hormonları üzerine olan etkisine bakılmamıştır.

2.6. Kalsiyum Algılayan Reseptörler (CaSR)

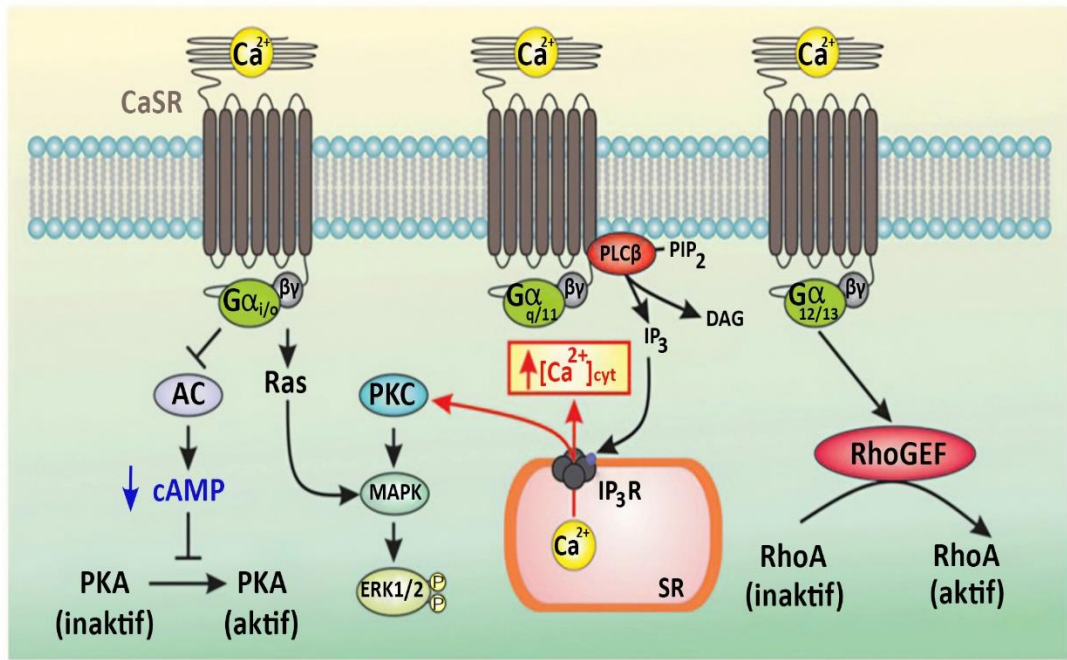
CaSR hücre dışı kalsiyum seviyelerindeki değişiklikleri algılayan G proteini ile eşleşmiş bir reseptördür. İlk olarak paratiroid bezi hücrelerinde tanımlanmıştır. Bu reseptörler parathormon (PTH) ile kalsitonin salgısında ve hücre dışı iyonize kalsiyum seviyesinin korunmasında önemli role sahiptir. CaSR'nin sindirim kanalı da dâhil olmak üzere birçok dokuda varlığı gösterilmiştir (103). CaSR reseptörlerinin birçok dokuda bulunduğu gösterilmesinden sonra, hücre dışı kalsiyumun birinci mesajcı olarak rolünü araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır. Reseptörün midede gastrin salgılayan G hücrelerinde, mukus salgılayan hücrelerde ve parietal hücrelerde, ince bağırsak ve kolon epitel hücrelerinde ve enteroendokrin hücrelerde ekspresyonu gösterilmiştir. Bu reseptörlerin midedeki G hücrelerinde asit ve gastrin; kolon hücrelerinde de sıvı salgısını düzenlediği bilinmektedir (103). CaSR'ler kalsiyum dışında polivalan katyonlar (Mg^{+2} , Sr^{+2} , Gd^{+3}), aromatik L-amino asitler, poliaminler, bazik polipeptitler (protamin, poli-lizin) ve ufak peptitler tarafından da aktive edilebilmektedir (Şekil 2.9) (5, 104).



Şekil 2.9. Dimerik CaSR'nin şematik gösterimi (105).

Ca^{2+} : Kalsiyum, Mg^{+2} : Magnezyum, Sr^{+2} : Stronsiyum, Gd^{+3} : Gadolinyum

CaSR'lerin üç ana heterotrimerik G-protein grubu olan $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ ve bazen $G_{12/13}$ aracılığıyla sinyal gönderdiği bilinmektedir (106, 107). $G_{q/11}$ 'in CaSR aracılı aktivasyonu, hücre içi Ca^{2+} depolarından sitozolik Ca^{2+} 'yi harekete geçiren inositol-1,4,5- trifosfat (IP_3) üretimi ve fosfolipaz C-beta ($PLC\beta$) aktivasyonuna yol açmaktadır. Böylece PKC'nin fosforilasyonu ile MAPK ve ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinazın ($ERK_{1/2}$) fosforilasyonu ve aktivasyonunu gerçekleştirmektedir. $G_{i/o}$ 'nun CaSR aracılı aktivasyonu, cAMP ve PKA aktivitesi seviyelerini azaltan AC'yi inhibe etmektedir. $G_{i/o}$ 'nun β/γ alt birimleri Ras'ı aktive ederek MAPK aktivasyonuna ve $ERK_{1/2}$ fosforilasyonuna yol açmaktadır. $G_{12/13}$ 'ün aktivasyonu ise, guanin nükleotit değişim faktörünü (GEF) aktive eden RhoGEF'in plazma zarında yer değiştirmesine neden olur ve daha sonra GTP için GDP değişimini katalize ederek RhoA'yı aktive etmektedir (Şekil 2.10.) (107).



Şekil 2.10. CaSR aracılı sinyal yolları (107).

Ca^{2+} : Kalsiyum, CaSR: Kalsiyum algılayan reseptör, $G_{i/o}$: Gi proteini alfa alt birimi, $\beta\gamma$: Beta gama alt birimi, RAS: Retiküler aktivasyon sistem, AC: Adenilat siklaz, cAMP: Siklik AMP, PKA: Protein kinaz A, PKC: protein kinaz C, MAPK: Mitojenle aktive olan protein kinaz, $ERK_{1/2}$: Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz, $PLC\beta$: Fosfolipaz C- beta, PIP_2 : fosfatidil inozitol 4,5 bifosfat, IP_3 : İnozitol trifosfat, IP_3R : İnozitol trifosfat Reseptörü, DAG: Diaçilgliserol, SR: Sarkoplazmik retikulum, RhoGEF: Rho ailesindeki küçük GTPazları düzenlemek için guanin nükleotit değişim faktörü (GEF) aktivitesine sahip iki farklı yapısal alan, RhoA: Ras homoloji ailesinin A üyesi.

2.6.1. CaSR'lerin Amino asitlerle Uyarılması

Amino asitlerin inkretin salgısını L hücreleri üzerindeki kalsiyum algılayan reseptörler (CaSR) üzerinden gerçekleşen sinyallerle düzenlediğini gösteren yayınlar mevcuttur (108-110). CaSR'nin L-amino asitlerle uyarılması protein ve kalsiyum metabolizması arasında bir bağlantı olduğunu düşündürmektedir. CaSR'nin kalsiyum ile aktivasyonu midede asit salgısını artırarak proteinlerin sindirimi için gerekli ortamı yaratmaktadır. Daha sonra ortaya çıkan L-amino asitler de CaSR üzerindeki sinerjistik etkileri nedeniyle kalsiyum emilimini artırmaktadırlar (111). Bu reseptörlerin iki ana ligandını oluşturan kalsiyum ve L-amino asitler için reseptör üzerinde farklı bağlanma bölgeleri bulunmaktadır (112).

Hayvanlarda ve insanlarda "doyurucu amino asit" olarak tanımlanan L-arjininin, CaSR'leri aktive edebildiği ve CaSR yoluyla kolesistokin ve GIP salgısını modüle edebildiği gösterilmiştir (113, 114). Ayrıca hücre dışı kalsiyuma ve sinakalset varlığına bağlı olarak L-Arj tarafından CCK ve GIP salgısının arttığı ve NPS 2143 veya Calhex 231 varlığında azaldığı tespit edilmiştir. Böylece CaSR'nin AC ve PLC'nin inhibisyonu ile CCK ve GIP salgısını kısmen azaltması sebebiyle L-Arj'nin etkisinde CaSR'nin rolü olduğu düşünülmektedir (114). Ayrıca L-Arj'nin, GIP, GLP-1 ve PYY salgısını indükleyen güçlü bir CaSR aktivatörü olduğu ve bu salgıların bir CaSR antagonisti tarafından zayıflatıldığı bu nedenle bu duruma kısmen CaSR'nin aracılık ettiği de düşünülmüştür (109).

2.6.2. CaSR'lerin Agmatin ile İlişkisi

Agmatinin ince bağırsaktan GLP-1 ve PYY hormonları salgısına aracılık edip etmediği, aracılık ediyorsa CaSR ile ilişkili olup olmadığı bilinmemektedir. Agmatin ve CaSR arasındaki ilişkiyi araştıran sadece tek bir çalışma bulunmaktadır. Sibirya yer sincaplarının kardiyomiyositlerinde agmatinin hücre içi Ca^{+2} üzerindeki etki mekanizmasının araştırıldığı bu çalışmada, agmatinin düşük dozlarının (500 μM 'ye kadar) etkili olduğu ve ilk kez agmatin tarafından Ca^{+2} düzenlenmesi ve kardiyomiyosit kasılmasının CaSR modülasyonu ile gerçekleştiği gösterilmiştir (115). Bu çalışma diğer dokularda da agmatinin CaSR üzerinden etkiler gerçekleştirebileceği fikrini gündeme getirmektedir.

2.6.3. CaSR'lerin İncretinlerle İlişkisi

CaSR'lerin inkretinlerden GLP-1 ve PYY ile ilişkisinin olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır. İntraduodenal L-triptofan uygulamasının CaSR aracılığıyla GLP-1 salgısını uyardığı belirlenmiştir (116). Benzer şekilde L-fenilalaninin (L-Phe) GLP-1, PYY ve insülin salgısını uyardığı ve glukoz toleransını geliştirdiği bulunmuştur. Ayrıca CaSR'nin farmakolojik blokajının L-Phe'nin anorektik etkisini hafiflettiği ve GLP-1 salgısını azalttığı tespit edilmiştir. Bu veriler sonucunda, L-Phe'nin anorektik etkilerine CaSR'lerin aracılık ettiği ve gastrointestinal kanalındaki L-Phe ve CaSR sisteminin obezite ve diyabet tedavisinde terapötik faydası olabileceği düşünülmüştür (117). Ayrıca CaSR'nin L-amino asitleri tespit edebildiği ve kolesistokinin salgılanmasına aracılık edebildiğini göstermiştir (118, 119). Bu bulgular L-amino asitlerin, inkretin/endokrin faktör salgısını uyarmak için CaSR agonistleri gibi hareket ettiğini göstermektedir.

2.7. CaSR'lerin Allosterik Modülatörleri

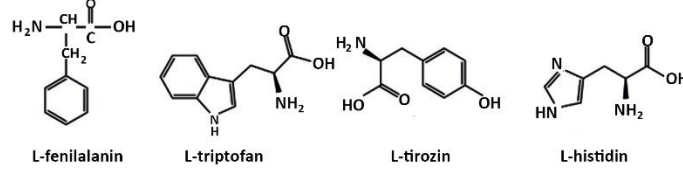
Allosterik modülatörler, reseptörün aktif bölgesinden farklı bir bölgeye bağlanan maddeler olup reseptörün endojen ligand için afinitesini değiştirebilirler ve reseptörde konformasyonel bir değişikliğe neden olurlar. Bu modülatörler, CaSR'lerin doğal agonistlerinin (örneğin kalsiyum iyonları) bağlandığı "ortosterik bağlanma bölgesi"ne değil, başka bir allosterik bağlanma bölgesine bağlanırlar.

Pozitif allosterik modülatörler afiniteyi artırırken, negatif allosterik modülatörler afiniteyi azaltmaktadır (120). CaSR'nin allosterik modülatörleri, reseptörün duyarlılığını ve aktivitesini değiştirerek hücrel sinyal iletimini etkilemektedir. Kalsimimetikler ve kalsilitikler, CaSR'leri doğrudan aktive etmez, bunun yerine Ca^{+2} ve diğer ortosterik agonistlerin konsantrasyon-tepki eğrilerini sırasıyla sola veya sağa kaydırmaktadır (121). Bu tür modülatörler, CaSR'lerin işlevini düzenlemek, kalsiyum metabolizması ve diğer biyolojik süreçler üzerinde etkili bir kontrol mekanizması sağlamak açısından önemlidir.

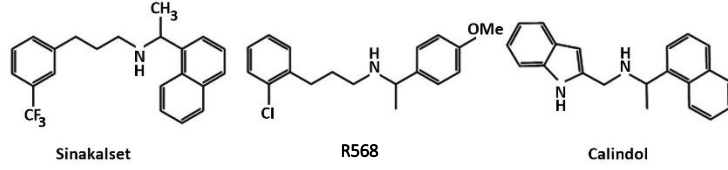
Aromatik L-amino asitlerden olan L-fenilalanin, L-triptofan, L-tirozin ve L-histidin CaSR'lerin allosterik modülatörlerindendir. Sinakalset, R568 ve calindol

CaSR'lerin pozitif allosterik modölatörleri (kalsimimetikler) iken, NPS 2143 ve calhex 231 negatif allosterik modölatörler (kalsilitikler) arasındadır (Şekil 2.11.).

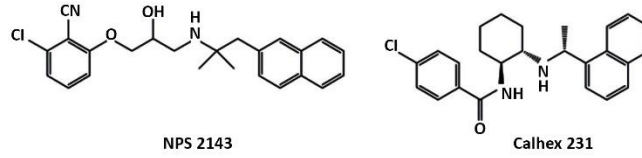
Aromatik L-amino asitler



Kalsimimetikler



Kalsilitikler

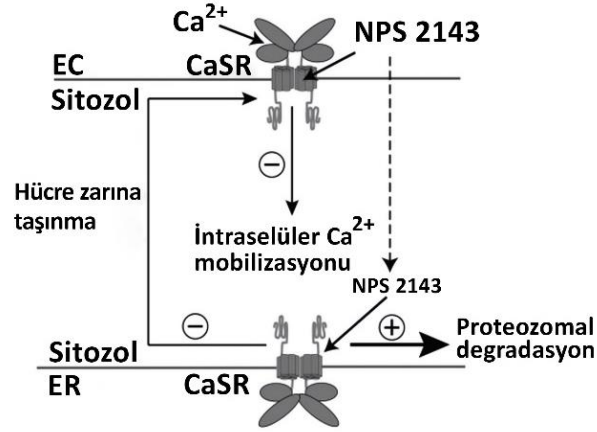


Şekil 2.11. CaSR'lerin allosterik modölatörleri (122).

2.7.1. NPS 2143

Kalsilitik grubunda yer alan NPS 2143, yakın zamanda CaSR'nin ilk negatif allosterik modölatörü olarak tanıtılmıştır. Bu bileşik, Ca^{+2} veya CaSR üzerinde etkili olan bir kalsimimetik tarafından ortaya çıkan biyolojik etkileri inhibe eder, ancak diğer bazı GPCR'lerin aktivasyonu ile ortaya çıkan tepkileri etkilemez (123).

NPS 2143, CaSR'leri eksprese eden plazma zarının transmembran alanına bağlanır ve Ca^{+2} mobilizasyonu gibi Ca^{+2} aracılı sinyal yanıtlarını da azaltır. CaSR ifade eden hücrelerin NPS 2143'e uzun süre maruz kalması, endoplazmik retikulum (ER) içinde yeni oluşan CaSR'lere bağlandığı düşünülen bu kalsilitik bileşiğin içselleştirilmesine yol açabilir böylece proteinlerin yanlış katlanmasına ve proteazomal olmasına yol açabilir (Şekil 2.12.) (124).



Şekil 2.12. NPS 2143'ün etki mekanizması.

Ca²⁺: Kalsiyum, CaSR: Kalsiyum algılayan reseptör, ER: Endoplazmik retikulum

2.7.2. R568

Pozitif allosterik modülatörlerden (kalsimimetikler) olan R568, CaSR'lerin işlevini ve kalsiyum iyonlarına olan duyarlılığını artırarak reseptörü etkinleştirmektedir. Bu modülatörler, CaSR'lerin doğal agonisti olan kalsiyumun etkisini güçlendirmeye yardımcı olurlar. Bu modülatörler, özellikle kalsiyum dengesinin düzenlenmesi, PTH salgısı ve kalsiyum metabolizması üzerinde etkili bir düzenleme mekanizması sunmaktadır ve bu modülatörlerin terapötik uygulamalardaki potansiyel etkisi araştırılmaktadır (125).

Tüm bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında, yarı esansiyel bir amino asit olan L-arjinin ve doğal bir poliamin olan agmatinin GLP-1 ve PYY salgısı üzerine etkisi ve CaSR'lerin bu etkideki olası rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla bir insan kolon enteroendokrin L hücre hattı olan NCI-H716 hücrelerine farklı dozlarda L-arjinin ve agmatin uygulanarak GLP-1 ve PYY hormonlarının düzeylerine olan etkileri ve ortaya çıkabilecek etkide CaSR'lerin rolü ayrıca bu etkiye aracılık edebilecek ikinci mesajcılar incelenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Çalışmamızda American type culture collection'dan (ATCC, Manassas, Virginia, ABD) ticari olarak temin edilen enteroendokrin hücre hattı olan NCI-H716 hücre hattı (CCL-251) kullanıldı. Bu hücre hattı süspanse özellikte olup başlangıçta yüksek glukozlu Roswell park memorial institute-1640 (RPMI-1640) ve sonrasında yüksek glukozlu Dulbecco's modified eagle medium solüsyonu (DMEM) ile çoğaltıldı.

3.2. Hücre Kültürünün Dondurulması ve Çözülmesi

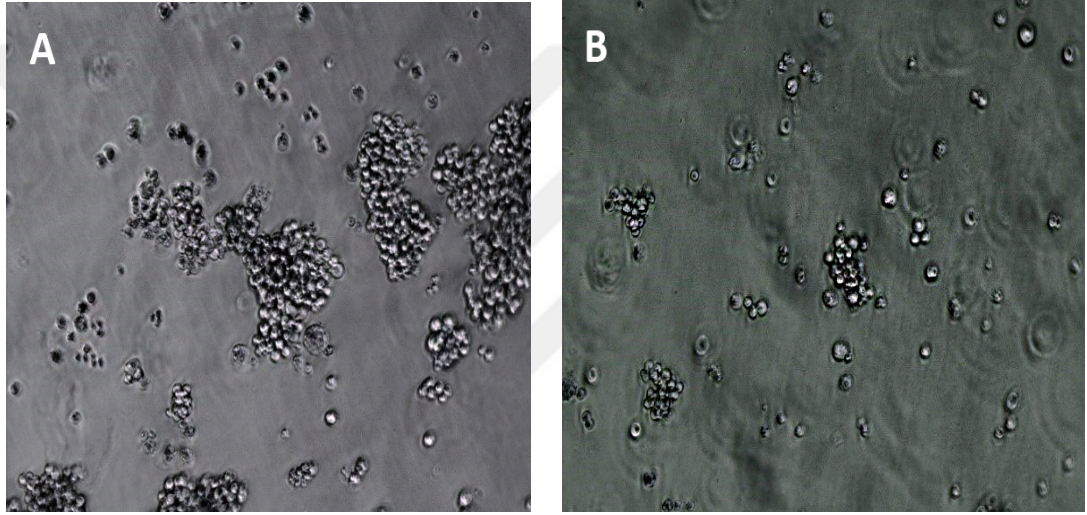
NCI-H716 hücre hattı, tam besiyeri ortamı (%50), fetal buzağı serumu (FBS) (%40) ve dimetil sulfoksit (DMSO) (%10) içeren çözeltiye alındı ve hücreler hızlıca kryoviallere aktarılarak alikotlandı. 'Mr. Frosty' dondurma kabına (Thermo Fisher Scientific, ABD) koyulan kryovialler bir gece -80°C'de saklandıktan sonra -196°C sıvı azot içeren tanka koyuldu.

Hücrelerin çözülmesi için sıvı azot tankındaki kryoviallerde bulunan hücreler hızlıca 37°C su banyosunda ısıtılmış distile su içerisine alınarak eritildi. Daha sonra hücre süspansiyonu daha önce 37°C'ye getirilmiş ve ATCC'nin önerdiği yüksek glukozlu RPMI-1640 besiyeri içeren 50 ml'lik falkonlara aktarıldı ve 1800 rpm'de 5 dakika olacak şekilde santrifüj edildi. Santrifüjden sonra DMSO içeren supernatant kısmı atıldı ve pellet kısmındaki hücrelere tekrar aynı besiyeri eklendi. Daha sonra bu hücreler 25 cm² kültür kabına aktarıldı. NCI-H716 hücreleri normalde süspansiyon kültüründe yetiştirildiği için dik bir şekilde inkübatöre konuldu ve 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. 25 cm² kültür kabındaki hücreler çoğaldıktan sonra 75 cm² kültür kabına alınarak hücreler yüksek glukozlu RPMI-1640 besiyerine ekildi ve çoğaltıldı.

3.3. Hücrelerin Çoğaltılması

Çözülme işleminden yaklaşık 1 hafta sonra çoğalan NCI-H716 hücreleri, %10 fetal sığır serumu (ATCC 30-2020), 100 ünite/ml penisilin (Invitrojen, Waltham, Massachusetts, ABD) ve 0,1 mg/ml streptomisin (Invitrojen, Waltham, Massachusetts,

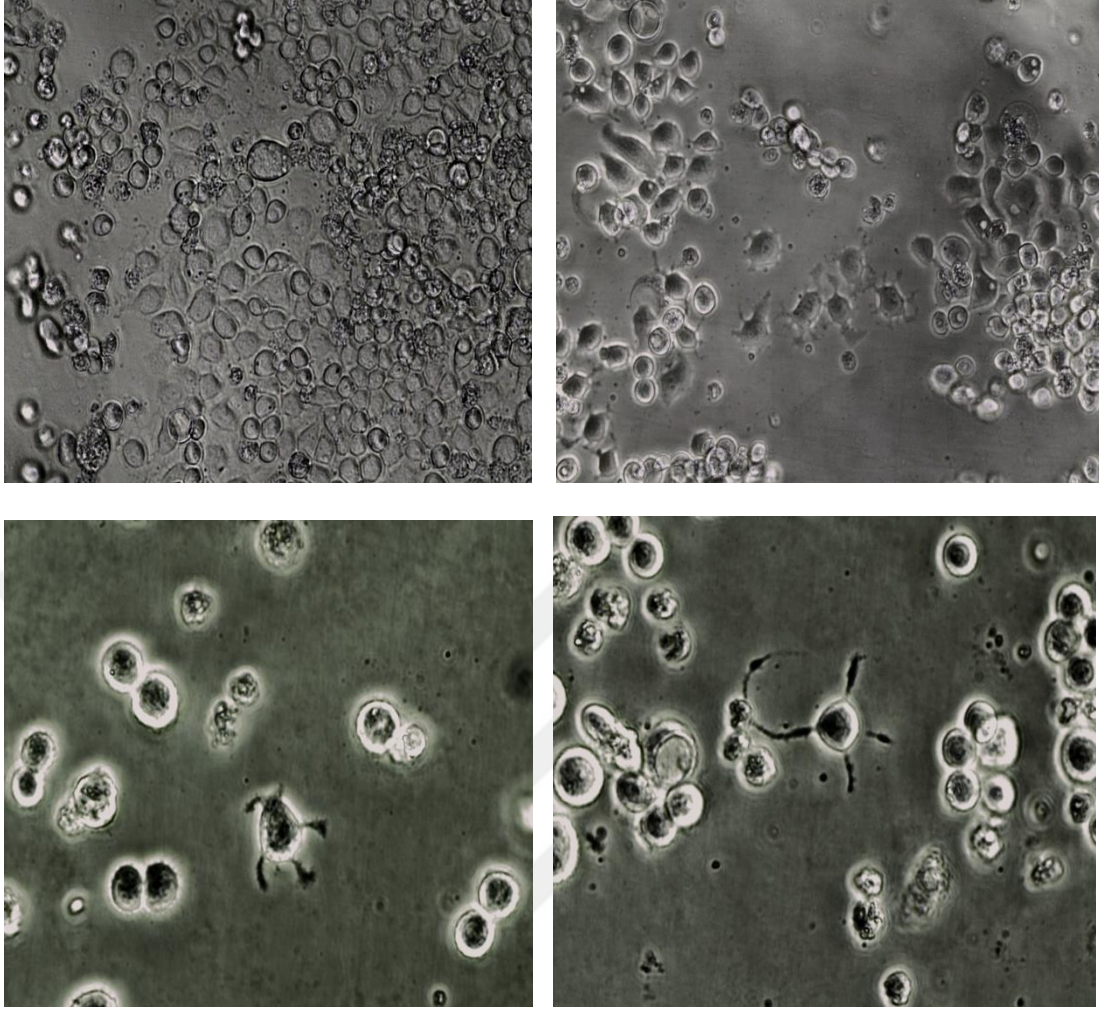
ABD) içeren yüksek glukozlu DMEM (Biowest-L0106, Nualléi, Fransa) besiyerine eklendi ve çoğaltılmaya devam edildi. Hücreler yaklaşık %80 yoğunluğa ulaştıktan sonra pasajlama yapıldı ve böylece besiyeri genelde her üç günde bir değiştirildi. Süspanse hücre hattı olduğu için pasajlama zamanında kültür kabındaki hücrelerin yaklaşık yarısı uzaklaştırılarak yerine aynı oranda yeni tam besiyeri çok yavaş bir şekilde eklendi ve kültürün devamlılığı bu şekilde sağlanmış oldu. Şekil 3.1.'de hücrelerin pasajlamadan önceki ve pasajlamadan sonraki görüntüsü görülmektedir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. NCI-H716 hücre hattının pasajlanması. A. Pasajlama öncesi hücreler, B. Pasajlama sonrası hücreler (10x büyütme).

3.4. Hücrelerin Görüntülenmesi

NCI-H716 hücreleri pasajlama öncesi ve sonrasında ayrıca farklılaşma protokolü boyunca belirli aralıklarla ters ışık mikroskobu ile gözlemlenerek 10x, 20x ve 40x büyütmede fotoğrafları çekildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. NCI-H716 hücre hattının ters ışık mikroskopundaki görüntüsü (Üstteki iki görüntü 20x ve alttaki iki görüntü 40x büyütme).

3.5. Hücre Sayımı İçin Hazırlık

75 cm²'lik kültür kabında çoğalan hücreler falkona alındıktan sonra, 2500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Peleti yeniden süspansiyon haline getirmek için 10 ml olacak şekilde yüksek glukozlu DMEM besiyeri ilave edildi. Homojen bir hücre süspansiyonu elde etmek amacıyla yavaş bir şekilde pipetaj yapıldı.

3.6. Tripan Mavisi ile Hücre Sayımı

İstenilen miktarda canlı hücre sayısının belirlenmesi amacıyla tripan mavisi kullanılarak hücreler boyanarak sayım yapıldı. Mavi renkli bir boya olan tripan mavisi hücre ortamına eklendiğinde canlı hücrelerin içine giremezken, ölü hücrelerin hücre zarından geçip hücreleri maviye boyamaktadır. Bu şekilde tripan mavisi boyasının hücre içine alınma düzeyine göre ölü ve canlı hücreler ayırt edilmektedir.

Hücre sayımına hazırlık için homojen bir hücre süspansiyonu elde edildikten sonra süspansiyondan 10 µl alınarak üzerine 10 µl tripan mavisi (%0,4) boyası eklendi (1:1 oranında) ve Thoma lamı ile ışık mikroskopunda 10x büyütmede canlı hücrelerin sayımı yapıldı. 16 küçük kareden oluşan alanın köşelerindeki 4 küçük karede bulunan ve Tripan mavisi ile boyanmayan hücreler sayıldı ve aritmetik ortalaması alınarak hücre sayısı aşağıdaki formül ile belirlendi. Böylece hem hücre yoğunluğu hem de canlılık, rutin bir hücre sayımı sırasında aynı anda belirlendi.

Toplam canlı hücre sayısı;

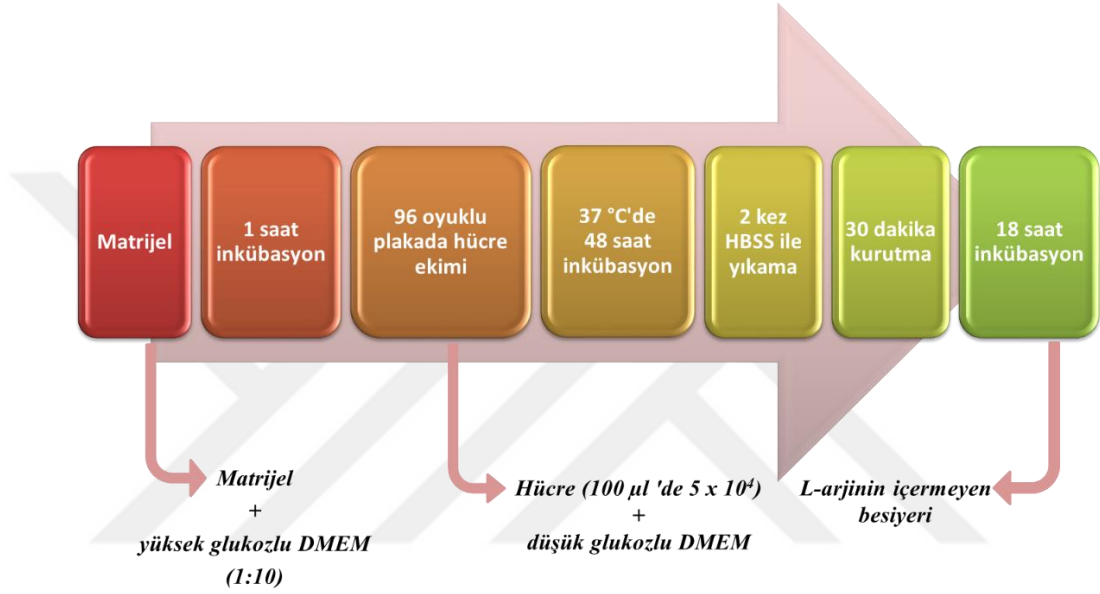
Toplam canlı sayısı = Sayılan canlı hücre x Dilüsyon faktörü x 10.000 formülü ile hesaplandı.

3.7. Matrijel ile Hücrelerin Farklılaştırılması

-80°C'de bulunan stok matrijel bir gün öncesinden +4°C'de buz içerisine alındı. Mikrosantrifüj tüpleri ve pipet uçları buz içerisine yerleştirildi ve soğumaya bırakıldı. Soğutulan mikrosantrifüj tüpüne yaklaşık 200 µl olacak şekilde matrijel solüsyonu eklenerek, alikotlar halinde -80°C'de saklandı. Kullanımdan bir gün önce, matrijel alikotlar -80°C'den 4°C'de buz üzerinde alınarak gece boyunca eritildi. Matrigel, 22°C'nin üzerinde çok hızlı şekilde jelleştiğinden, buzdolabının dışındayken buz üzerinde tutuldu.

Hücrelerin farklılaşması için kullanılacak olan Matrijel (4°C), yüksek glukozlu DMEM ile 10 kez seyreltildi (1:10). Önceden soğutulmuş 96 oyuklu plakaların kuyucuklarına 30 µl olacak şekilde yüksek glukozlu DMEM içerisinde çözünen matrijel aktarıldı ve 37°C'de 1 saat jelleşmesi sağlandı. Her oyuğa hücreler (100 µl 'de 5×10^4 hücre) eklendi ve %10 FBS içeren düşük glukozlu DMEM besiyerinde

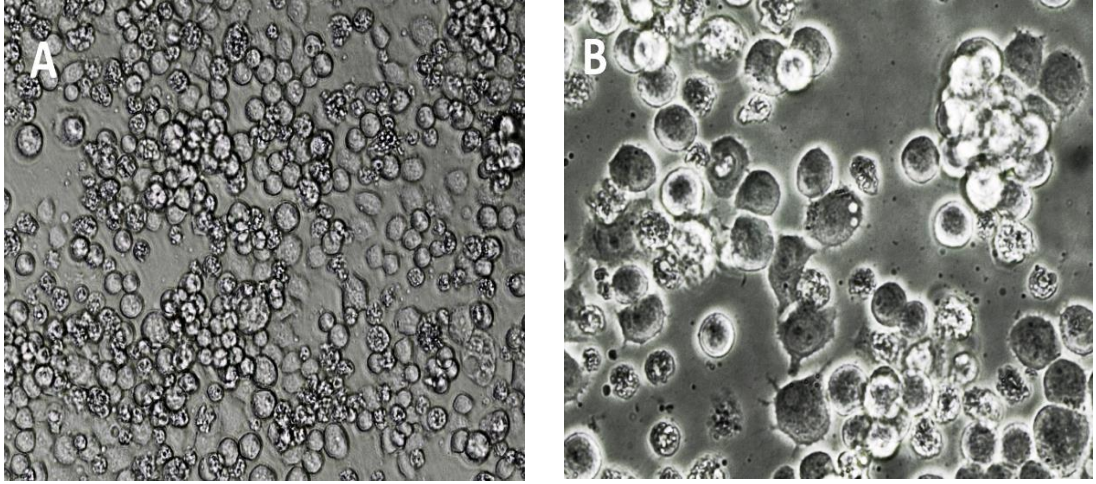
hücrelerin yapışması ve endokrin farklılaşması başlatıldı ve 37°C'de 48 saat büyümeye bırakıldı. 48 saat sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler iki kez 200 µl olacak şekilde HBSS ile yıkandı ve ardından 30 dakika kurumaya bırakıldı ve yüzey hücrelerin çoğalması için hazır hale getirilmiş oldu. Farklılaşmış hücreler 18 saat boyunca yüksek glukoz ve %10 FBS içeren L-arjinin ve L-lizin içermeyen DMEM'de çoğaltıldı. Daha sonra besiyeri uzaklaştırıldı. Farklılaşma protokolünü özetleyen şema Şekil 3.3.'de verilmiştir.



Şekil 3.3. NCI-H716 hücre hattının farklılaşma protokolünü özetleyen şema.

3.8. Farklılaşmış Hücrelerin Görüntülenmesi

In vitro olarak süspansiyon içinde yüzen agregatlar olarak büyüyen NCI-H716 hücreleri yuvarlak şekildediler. Matrijel ile farklılaştırılan NCI-H716 hücreleri ise daha büyük hacme sahip olup filiform şeklindeydi ve sitoplazmik uzantıları mevcuttu. Farklılaşmış hücreler Şekil 3.4.'te görülmektedir (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. NCI-H716 hücre hattının farklılaşmış görüntüsü, A. 20x büyütme, B. 40x büyütme.

3.9. Uygulanan Maddelerin Dozlarının Belirlenmesi

L-arjinin ve agmatinin 10, 20, 40, 60 ve 80 mM olacak şekilde farklı konsantrasyonları hazırlandı. Her iki madde için stok konsantrasyon 100 mM olacak şekilde ayarlandı ve 1100 µl Krebs-Ringer tamponunda çözüldü. Stok solüsyonun Krebs-Ringer tamponu ile seyreltilmesi sonucunda bahsi geçen farklı konsantrasyonlar elde edildi. Glukozun GLP-1 ve PYY salgısına etkisi bilindiği için pozitif kontrol olarak kullanıldı ve 30 mM olacak şekilde uygulandı.

Çalışmamızda CaSR'lerin GLP-1 ve PYY salgısına aracılık edip etmediğini test etmek amacıyla bir pozitif allosterik modölatör (R568) ve bir negatif allosterik modölatör (NPS 2143) kullanıldı. R568 ve NPS 2143'ün 5, 10, 20, 40 ve 80 µM olacak şekilde farklı konsantrasyonları hazırlandı. Her iki maddenin de stok solüsyonu hazırlanırken DMSO çözücü olarak kullanıldı. Stok solüsyon hazırlandıktan sonra Krebs-Ringer tamponu ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlar elde edildi. Ayrıca Krebs-Ringer tamponu ve %1 DMSO çözeltisi birlikte uygulanarak kontrol grubu oluşturuldu.

Hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki stok solüsyonlar 96 kuyulu düz tabanlı plaklara kuyu başına 50 µl olacak şekilde hücrelerin üzerine eklendi. Ayrıca her bir konsantrasyon için ayrı ayrı hücre olmadan kuyulara örnekler eklendi. Her bir konsantrasyon için 3 tekrar olacak şekilde deney planlandı. NCI-H716 hücreleri bu

farklı konsantrasyonlara 2 saat süreyle maruz bırakılarak %5 CO₂ içeren ortamda 37°C'de inkübe edildi.

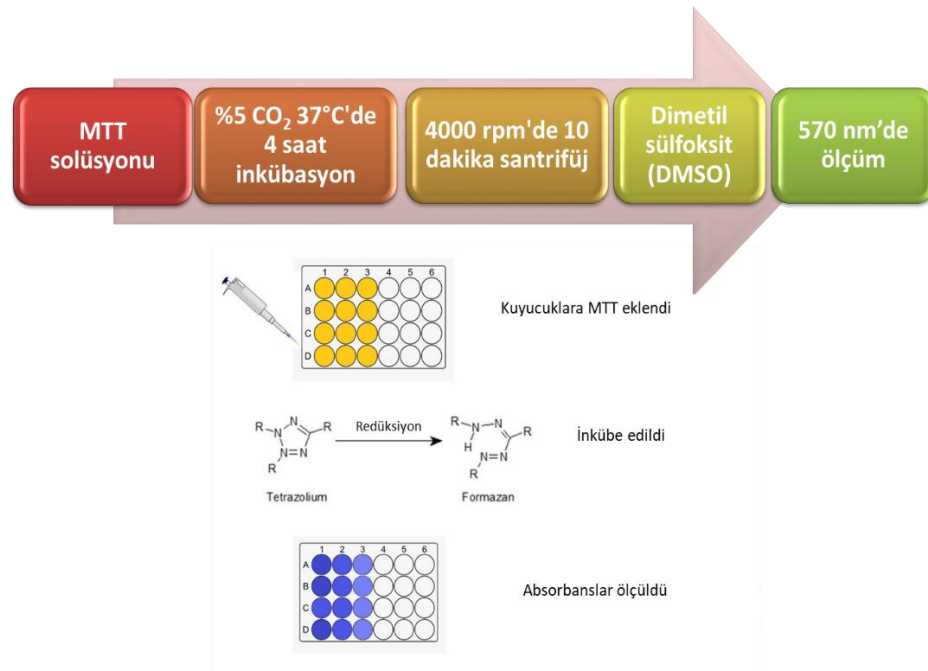
3.10. Hücre Canlılığının MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromür) Yöntemi ile Belirlenmesi

3.10.1. MTT Çözeltisinin Hazırlanması

5 mg/ml olacak şekilde MTT çözeltisi hazırlamak için 3,6 mg MTT tartılıp 720 µl PBS'de çözülür. Her analiz öncesi MTT solüsyonu taze hazırlandı ve MTT çözeltisi ışıktan etkilendiği için alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korundu.

3.10.2. MTT Analizi

MTT analizi için inkübatörde 2 saat bekletilen 96 kuyulu düz tabanlı plakların üzerine 0,5 mg/ml olacak şekilde MTT solüsyonu (5 µl) ilave edildi ve plakalar %5 CO₂ ortamında 37°C'de 4 saat boyunca inkübe edildi. Plakalar daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Kuyucuklara 150 µl olacak şekilde dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi. Spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Her deney üç tekrar olacak şekilde yapıldı ve canlılık kontrolün yüzdesi olarak hesaplandı. MTT protokolünü özetleyen şema Şekil 3.5.'de verilmiştir.



Şekil. 3.5. MTT protokolünü özetleyen şema.

3.11. Maddelerin Uygun Dozlarının Belirlenmesi

MTT analizi yapıldıktan sonra agmatin ve L-arjinin uygulanan gruplarda hücre canlılığını en az etkileyen konsantrasyonlar, hormon salgısı açısından uygun olacağı için seçildi. NPS 2143 ve R568 için de hücre canlılığını en fazla artıran tek doz olan 20 μ M seçildi. Çalışmamızın bundan sonraki kısmında uygulanan dozlar aşağıdaki gibi belirlendi.

Deney Grupları

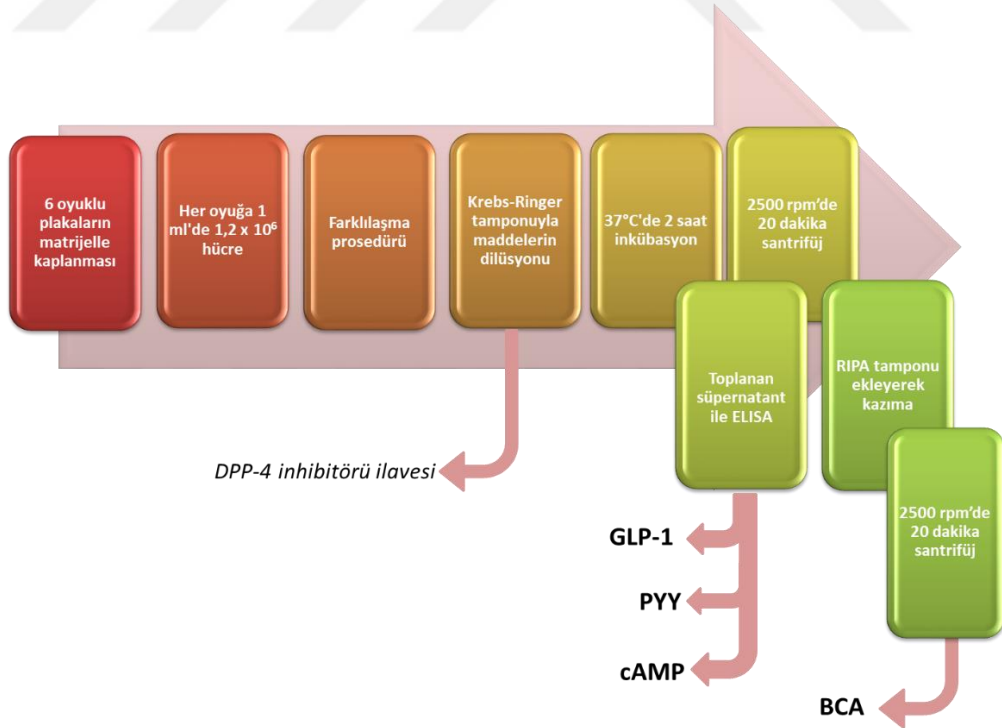
1. Kontrol (Krebs+DMSO)
2. Glukoz (30 mM)
3. NPS 2143 (negatif allosterik modölatör, 20 μ M)
4. R568 (pozitif allosterik modölatör, 20 μ M)
5. L-arjinin 20 mM
6. L-arjinin 20 mM + NPS 2143 (20 μ M)
7. L-arjinin 20 mM + R568 (20 μ M)
8. L-arjinin 40 mM
9. L-arjinin 40 mM + NPS 2143 (20 μ M)
10. L-arjinin 40 mM + R568 (20 μ M)
11. Agmatin 20 mM
12. Agmatin 20 mM + NPS 2143 (20 μ M)
13. Agmatin 20 mM + R568 (20 μ M)
14. Agmatin 40 mM
15. Agmatin 40 mM + NPS 2143 (20 μ M)
16. Agmatin 40 mM + R568 (20 μ M)

3.12. GLP-1, PYY ve cAMP Düzeylerinin Belirlenmesi

Önceden soğutulmuş 6 oyuklu plakaların kuyucuklarına 1 ml olacak şekilde yüksek glukozlu DMEM içerisinde çözünen matrijel aktarıldı ve 37°C'de 1 saat jelleşmesi sağlandı. Her oyuğa hücreler (1 ml'de $1,2 \times 10^6$ hücre) eklendi ve %10 FBS içeren düşük glukozlu DMEM besiyerinde hücrelerin yapışması ve endokrin farklılaşması başlatıldı ve 37°C'de 48 saat büyümeye bırakıldı. Kontrol olarak hücrelere direk olarak Krebs-Ringer tamponu uygulandı. Ayrıca maddeler Krebs-Ringer tamponu ile dilüe edilerek hücrelere uygulandı (totalde kuyu başına 1 ml). Krebs-Ringer tamponunda (118,4 mM sodyum klorür, 4,7 mM potasyum klorür, 1,2 mM magnezyum sülfat, 1,2 mM monopotasyum fosfat, 25 mM sodyum bikarbonat, pH 7.4, %0,2 BSA) 20 μ l/ml olacak şekilde DPP-4 inhibitörü ile hazırlanan L-arjinin

ve agmatinin farklı konsantrasyonları ve glukoz ilave edildi. Krebs tamponu ve %1 oranında DMSO'nun kombinasyonu negatif kontrol olarak kullanıldı. Hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren ortamda hormon salgısı için ideal olduğu kabul gören 2 saat boyunca agmatin ve L-arjinin dozları ve kombinasyonları ile inkübe edildi (31). 2 saat sonra, daha fazla salgılamayı durdurmak için plaka hemen buz üzerine yerleştirildi.

2 saatlik inkübasyondan sonra süpernatantlar toplandı ve her bir örnek için 10 µl olacak şekilde fenil metil sulfonil florid (PMSF) eklendi. 2500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi, süpernatantlar toplandı ve toplanan süpernatantlar enzim bağlı immuno absorbent ölçüm (ELISA) yöntemi ile hormon ölçümleri yapılana kadar -80°C'de saklandı. Plakada kalan hücrelere 100 µl olacak şekilde 1X radyo immünopresipitasyon deney tamponu (RIPA) eklendi ve hücreler hücre kazıyıcı ile kazınarak lize edildi. 2500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi, süpernatantlar toplandı ve bikinkoninik asit yöntemi (BCA) ile ölçüm için -80°C'de saklandı. Her kuyunun protein konsantrasyonu BCA ile belirlendi. Veriler, her numune kuyucuğuna karşılık gelen toplam protein konsantrasyonları ile normalleştirildi. GLP-1, PYY ve cAMP düzeylerinin belirlenmesiyle ilgili protokolü özetleyen şema Şekil 3.6.'da verilmiştir.

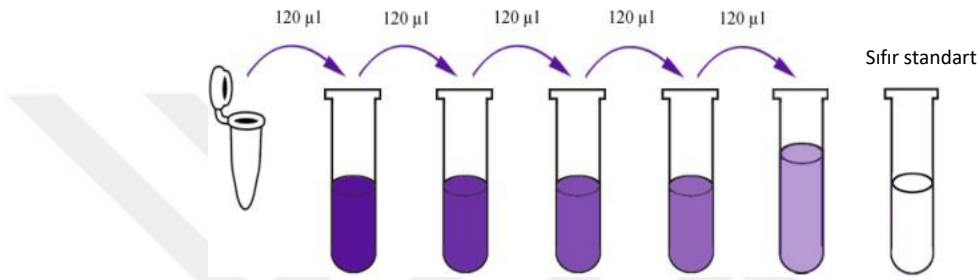


Şekil. 3.6. GLP-1, PYY ve cAMP düzeylerinin belirlenmesiyle ilgili protokolü özetleyen şema.

3.13. ELISA ile GLP-1 Düzeyinin Tayini

Reaktiflerin Hazırlanması

Tüm reaktifler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Kit içeriğindeki standart solüsyon (192 pmol/l), standart seyreltici ile yarıya sulandırarak 96 pmol/l'lik stok standart solüsyonu oluşturuldu (120 µl 192 pmol/l kit standartı + 120 µl standart seyreltici). Seyreltmeler yapmadan önce standart hafifçe çalkalandı. 48 pmol/l, 24 pmol/l, 12 pmol/l ve 6 pmol/l çözeltileri elde etmek için standart stok solüsyonu (96 pmol/l) standart seyreltici ile seri olarak seyreltildi (Şekil 3.7. ve Tablo 3.1.).



Şekil 3.7. ELISA ile GLP-1 ölçümünde standart solüsyonun seyreltilme işlemleri.

Tablo 3.1. ELISA ile GLP-1 ölçümünde seyreltmeler ile elde edilen konsantrasyonlar.

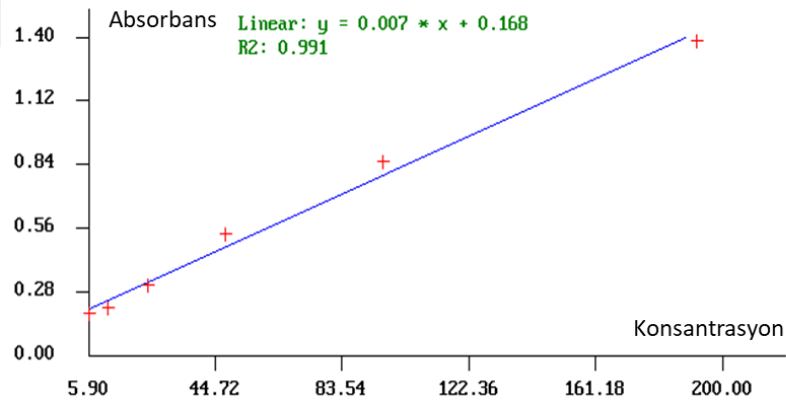
Standart konsantrasyon	Standart No.5	Standart No.4	Standart No.3	Standart No.2	Standart No.1
192 pmol/l	96 pmol/l	48 pmol/l	24 pmol/l	12 pmol/l	6 pmol/l

Yıkama tamponu için 20 ml yıkama tamponu konsantresi 25 kez deiyonize veya damıtılmış suda seyreltilerek 500 ml 1x yıkama tamponu elde edildi. Konsantrede kristaller oluşmuşsa, kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırıldı.

Deney Prosedürü

Tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve numuneler kullanılan kitlerin talimatlarına göre hazırlandı. Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi ve deney oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Standart kuyucuklarına 50 µl olacak şekilde

standartlar eklendi. Örnek kuyucuklarına 40 µl olacak şekilde numuneler eklendi. Ardından numune kuyucuklarına 10 µl olacak şekilde İnsan GCG antikoru eklendi. Daha sonra numune kuyucuklarına ve standart kuyucuklara 50 µl olacak şekilde streptavidin-yaban turpu peroksidaz (HRP) eklendi ve iyice karıştırılarak plakanın üzeri kapatıldı. 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. Kapatıcı çıkarıldıktan sonra plaka 5 kez yıkama tamponuyla yıkandı. Kuyular her yıkama için 30 saniye ila 1 dakika süreyle 300 µl olacak şekilde yıkama tamponu ile ıslatıldı. Her yıkamadan sonra yıkama tamponu boşaltıldı ve plaka kağıt havlu üzerinde kurulandı. Her kuyucuğa 50 µl olacak şekilde substrat solüsyonu A eklendi ve ardından her kuyucuğa 50 µl olacak şekilde substrat solüsyonu B eklendi. Karanlıkta 37°C'de 10 dakika boyunca yeni bir kapatıcı ile kaplı vaziyette inkübe edildi. Her kuyucuğa 50 µl olacak şekilde durdurma (Stop) solüsyonu eklendi ve mavi rengin hemen sarıya döndüğü gözlemlendi. Durdurma (Stop) solüsyonu ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropilaka okuyucu (Allsheng AMR-100, Çin) kullanarak hemen her kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlendi (Şekil 3.8.).



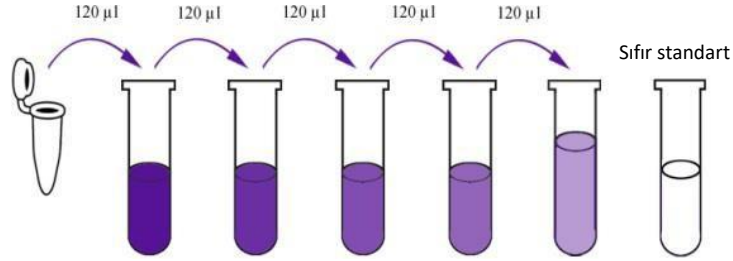
Şekil 3.8. GLP-1 ölçümünün kalibrasyon eğrisi.

3.14. ELISA ile PYY Düzeyinin Tayini

Reaktiflerin Hazırlanması

Tüm reaktifler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Standart solüsyon (960 pg/ml), standart seyreltici ile yarıya sulandırarak 480 pg/ml'lik stok standart solüsyonu oluşturuldu (120 µl 960 pg/ml kit standartı + 120 µl standart seyreltici).

Seyreltmeler yapmadan önce standart hafifçe çalkalandı. 240 pg/ml, 120 pg/ml, 60 pg/ml ve 30 pg/ml solüsyonlar üretmek için standart stok solüsyonunu (480 pg/ml) 1:2 standart seyreltici ile seri olarak seyreltildi (Şekil 3.9. ve Tablo 3.2.).



Şekil 3.9. ELISA ile PYY ölçümünde standart solüsyonun seyreltilme işlemleri.

Tablo 3.2. ELISA ile PYY ölçümünde seyreltmeler ile elde edilen konsantrasyonlar.

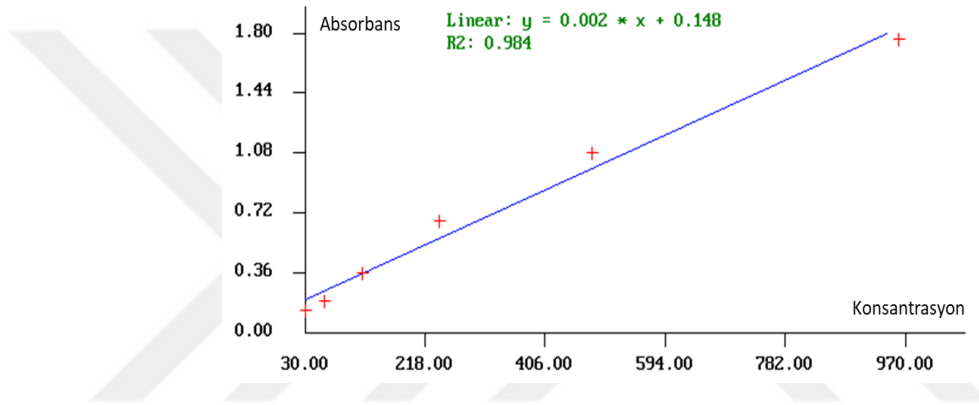
Standart kons.	Standart No.5	Standart No.4	Standart No.3	Standart No.2	Standart No.1
960 pg/ml	480 pg/ml	240 pg/ml	120 pg/ml	60 pg/ml	30 pg/ml

Yıkama tamponu için 20 ml yıkama tamponu konsantresi 25 kez deiyonize veya damıtılmış suda seyreltilerek 500 ml 1x yıkama tamponu elde edildi. Konsantrede kristaller oluşmuşsa, kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırıldı.

Deney Prosedürü

Tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve numuneler kullanılan kitin talimatlarına göre hazırlandı. Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi ve deney oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Standart kuyucuklarına 50 µl olacak şekilde standartlar eklendi. Örnek kuyucuklarına 40 µl olacak şekilde numuneler eklendi. Ardından numune kuyucuklarına 10 µl olacak şekilde insan PYY antikoru eklendi. Daha sonra numune kuyucuklarına ve standart kuyucuklara 50 µl olacak şekilde streptavidin-HRP eklendi ve iyice karıştırılarak plakanın üzeri kapatıldı. 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. Kapatıcı çıkarıldıktan sonra plaka 5 kez yıkama tamponuyla

yıkandı. Kuyular her yıkama için 30 saniye ile 1 dakika süreyle 300 µl olacak şekilde yıkama tamponu ile ıslatıldı. Her yıkamadan sonra yıkama tamponu boşaltıldı ve plaka kağıt havlu üzerinde kurulandı. Her kuyucuğa 50 µl olacak şekilde substrat solüsyonu A eklendi ve ardından her kuyucuğa 50 µl olacak şekilde substrat solüsyonu B eklendi. Karanlıkta 37°C'de 10 dakika boyunca yeni bir kapatıcı ile kaplı vaziyette inkübe edildi. Her kuyucuğa 50 µl olacak şekilde durdurma (Stop) solüsyonu eklendi ve mavi rengin hemen sarıya döndüğü gözlemlendi. Durdurma (Stop) solüsyonu ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropilaka okuyucu kullanarak hemen her kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlendi (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10. PYY ölçümünün kalibrasyon eğrisi.

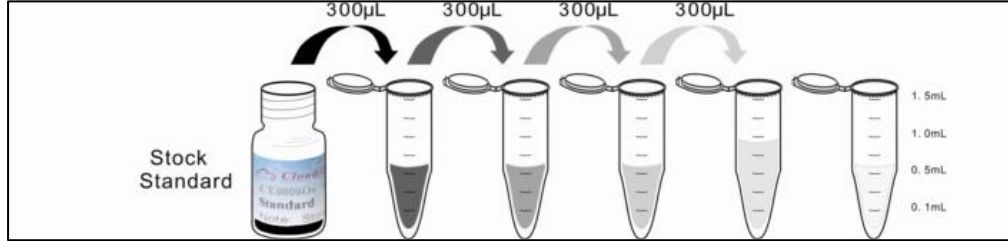
3.15. ELISA ile cAMP Düzeyinin Tayini

GLP-1 ve PYY hormonlarının salgısında hangi yolağın etkili olduğunu tespit etmek amacıyla hücre içindeki sinyal mekanizmalarına yönelik olarak bir ikinci mesajcı olan cAMP düzeyi ölçümleri yapıldı.

Reaktiflerin Hazırlanması

Kullanmadan önce tüm kit bileşenleri ve numuneleri oda sıcaklığına (18-25°C) getirildi. Standart 0,5 ml standart seyreltici ile sulandırıldı, 10 dakika oda sıcaklığında tutuldu ve köpürmemesi için hafifçe çalkalandı. Standartın stok solüsyondaki konsantrasyonu 20.000 pg/ml idi. 0,6 ml standart seyreltici içeren 5 tüp hazırlandı ve aşağıda gösterilen resme göre üçlü seyreltme serisi oluşturuldu. Bir sonraki

transferden önce her tüp iyice karıştırıldı. 20.000 pg/ml, 6.666,7 pg/ml, 2.222,2 pg/ml, 740,7 pg/ml, 246,9 pg/ml gibi 5 nokta seyreltilmiş standart ayarlandı ve standart seyrelticili son tüpü 0 pg/ml olarak boştu (Şekil 3.11.).



Tüp	1	2	3	4	5	6
pg/ml	20.000	6.666,7	2.222,2	740,7	246,9	0

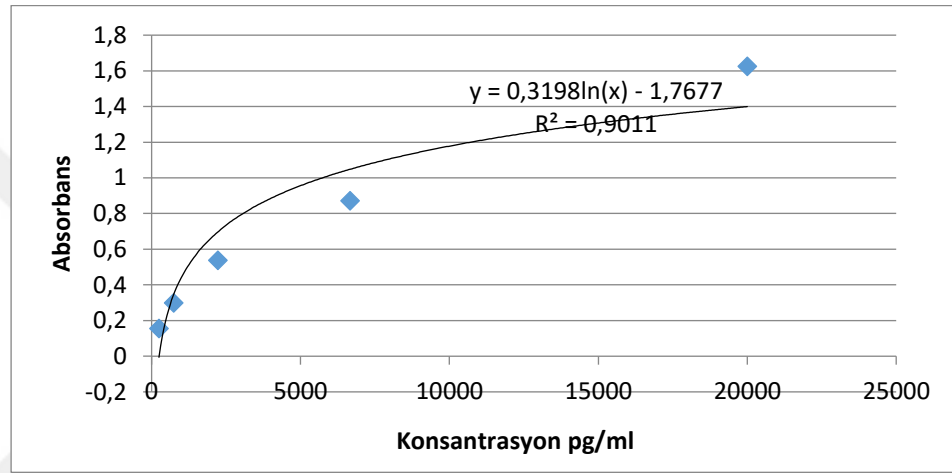
Şekil 3.11. ELISA ile cAMP ölçümünde standart solüsyonun seyreltilme işlemleri.

Saptama reaktifi A 150 µl olacak şekilde reaktif seyreltici ile sulandırıldı, 10 dakika oda sıcaklığında tutuldu, hafifçe çalkalandı. *Assay diluent A* (1:100) ile çalışma konsantrasyonuna seyreltildi. Saptama reaktifi B kullanılmadan önce santrifüjlendi ve *assay diluent B* (1:100) ile çalışma konsantrasyonuna seyreltildi. 20 mL yıkama solüsyonu konsantresini (30x) 580 ml deiyonize veya damıtılmış suyla seyreltilerek 600 ml yıkama solüsyonu (1x) hazırlandı.

Deney Prosedürü

Standart noktalar için 5 kuyu, kör için 1 kuyu hazırlandı ve sırasıyla standart dilüsyonların, körün ve numunelerin her birini uygun kuyulara 50 µl olacak şekilde eklendi. Ardından her kuyucuğa hemen 50 µl saptama reaktifi A eklendi. Plaka nazikçe çalkalandı ve üzeri kapatılarak 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Solüsyon uzaklaştırıldı ve çok kanallı pipet kullanılarak her kuyucuğa 350 µl 1X yıkama solüsyonu ile yıkanarak 1-2 dakika bekletildi. Plaka emici kağıt üzerine oturtularak kalan sıvı tüm kuyulardan tamamen çıkarıldı ve bu işlem 3 kez tekrarlandı. Son yıkamadan sonra kalan yıkama tamponu boşaltıldı ve plaka ters çevrilerek emici kağıt ile kurulandı. Her kuyucuğa

100 µl saptama reaktifi B çalışma solüsyonu eklendi ve plakanın üzeri kapatıldıktan sonra 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Yıkama işlemi önceden yapıldığı gibi toplam 5 kez tekrarlandı. Her kuyucuğa 90 µl substrat solüsyonu eklendi ve üzeri kapatılarak 10-20 dakika 37°C'de inkübe edildi. Işıktan korundu ve substrate solüsyonu eklendiğinde sıvı maviye döndü. Her bir kuyucuğa 50 µl durdurma (Stop) solüsyonu eklendi ve sıvının sarıya döndüğü görüldü. Plakanın kenarına vurarak sıvı karıştırıldı. Ardından mikrolaka okuyucuda hemen 450 nm'de ölçüm yapıldı (Şekil 3.12.).



Şekil 3.12. cAMP ölçümünün kalibrasyon eğrisi.

3.16. Protein Miktarlarının Tayini

Bisinkoninik asit yöntemi (BCA) temeline dayalı deterjanlarla uyumlu protein ölçüm kitleri kullanıldı. BCA için doğrusal çalışma aralığı 20-2000 µg/ml olarak belirtildi. Bütün çalışmalarda protein standardı olarak sığır serum albümini (BSA) kullanıldı (Tablo 3.3.).

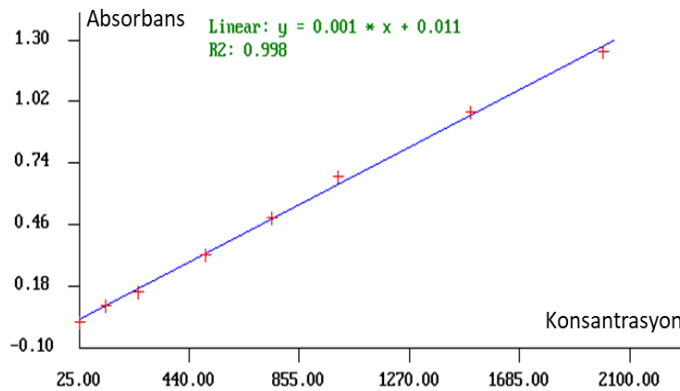
Mikrolaka Protokolü

Her bir standart veya bilinmeyen örnek uygun mikrolaka kuyularına 20 µl olarak pipetlendi. Her bir kuyuya 200 µl BCA çalışma reaktifi eklendi ve 30 saniye boyunca plaka çalkalayıcısıyla karıştırıldı ve kapatıldı. 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi ve plaka oda sıcaklığında soğutuldu. Plaka okuyucuyla 562 nm'de

emilim ölçüldü. Diğer tüm standart ve bilinmeyen örnek tekrarlarının 562 nm emilim ölçümlerinden, kör tekrarlarının 562 nm emilim ölçümleri çıkarıldı. Her BSA standardı için, ortalama düzeltilmiş 562 nm ölçümlerini $\mu\text{g/ml}$ cinsinden konsantrasyona karşı bir standart eğrisi oluşturuldu. Standart eğrisini kullanarak her bir bilinmeyen örneğin protein konsantrasyonu belirlendi (Şekil 3.13.).

Tablo 3.3. Seyreltilmiş BSA standartlarının hazırlanması.

Vial	Seyreltici Hacmi	BSA Hacmi ve Kaynağı	Nihai BSA Konsantrasyonu
A	0	300 μl Stok	2000 $\mu\text{g/ml}$
B	125 μl	375 μl Stok	1500 $\mu\text{g/ml}$
C	325 μl	325 μl Stok	1000 $\mu\text{g/ml}$
D	175 μl	175 μl Vial B seyreltmesinden	750 $\mu\text{g/ml}$
E	325 μl	325 μl Vial C seyreltmesinden	500 $\mu\text{g/ml}$
F	325 μl	325 μl Vial E seyreltmesinden	250 $\mu\text{g/ml}$
G	325 μl	325 μl Vial F seyreltmesinden	125 $\mu\text{g/ml}$
H	400 μl	100 μl Vial G seyreltmesinden	25 $\mu\text{g/ml}$
I	400 μl	0	0 $\mu\text{g/ml}$ (Kör)



Şekil 3.13. BCA protein ölçümünün kalibrasyon eğrisi.

3.17. Sitozolik Ca^{+2} Yoğunluğunun Belirlenmesi

GLP-1 ve PYY hormonlarının salgısında rol alan ve CaSR aktivitesine aracılık etmesi muhtemel ikinci mesajcıları belirleyebilmek amacıyla grupların hücre içi kalsiyum yoğunlukları ölçüldü. Kalsiyuma spesifik floresan boya olan Fura-2AM (Cayman) DMSO içerisinde çözülerek 10 mM stok hazırlandı. Stok çözelti 5 μ M konsantrasyonda kullanılmak üzere DMSO ile seyreltilti. Hücreler farklılaştırıldıktan sonra iki kez kalsiyum içermeyen DPBS (Biowest) ile yıkandı. 5 μ M Fura-2AM floresan boya 96 kuyulu plakaların her birine 100 μ l eklendi. 37°C’de 1 saat inkübe edildikten sonra hücreler iki kez daha yıkandı. Daha sonra 37°C’de DPBS ile karanlıkta 30 dakika daha inkübe edildi. Tekrar DPBS ile yıkama yapıldıktan sonra uzaklaştırıldı. Uygulama için agmatin ve L-arjininin daha yüksek konsantrasyonu olan 40 mM seçildi ve bu konsantrasyon ile birlikte kombinasyonlar hücrelere uygulandı. 0., 30., 60., 90., ve 120. dakikalarda Olympus IX73 floresan mikroskopunda (Evident, Tokyo, Japonya) görüntülendi. Tutunmuş olan hücrelerden hücre sınırları net olarak seçilen tek tek dağılmış hücreler fotoğraflanarak *Image J* programında floresan yoğunluk ölçümleri yapılarak ortalama değerleri alındı.

3.18. İmmünfloresan İşaretleme Yöntemi ile CaSR Düzeyinin Belirlenmesi

CaSR düzeyini belirlemek amacıyla yapılacak olan immünfloresan işaretleme için 8’li *chamber slide* (Millipore) kullanılarak her bir kuyucuğa 50 μ l matrijel eklendikten sonra hücreler ekildi (her bir kuyucuğa 100 μ l’de 5×10^4 hücre). Hücreler farklılaştırılma protokolleri gereği 2 saat boyunca 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler DPBS ile iki kez yıkandı. Hücreler oda sıcaklığında 10 dakika %4’lük paraformaldehit ile tespit edildi. Fiksasyon sonrası 3 kez 5’er dakika DPBS ile yıkama yapıldı. Permeabilizasyon için, 10 μ l Triton X ve 0,01 gram sitrat 10 ml distile su içerisinde çözüldü ve hücreler bu çözeltide 3-5 dakika bekletildi. Tekrar 3 kez 5’er dakika DPBS ile hücreler yıkandı. %5’lik keçi serumu her kuyucuğa 100 μ l olacak şekilde hücrelere uygulandı ve 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası serum uzaklaştırıldı ve 1:200 oranında %2 BSA ile hazırlanan primer antikör (tavşan anti-CaSR STJ92031, St. John’s Laboratory, Londra, İngiltere) hücrelere 100 μ l olacak şekilde uygulandı ve +4°C’de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler

tekrar 3 kez 5'er dakika DPBS ile yıkandı. 1:500 oranında %2 BSA ile hazırlanan sekonder antikör (Goat Anti-Mouse IgG1, Alexa Fluor® 647, Biolegend, San Diego, ABD) ile hücreler oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler tekrar 3 kez 5'er dakika DPBS ile yıkandı. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) içeren kapama mediumu ile kapatıldı. Leica DM6 B floresan mikroskopunda (Leica, Wetzlar, Almanya) görüntülendi. Tutunmuş olan hücrelerden hücre sınırları net olarak seçilen tek tek dağılmış hücreler fotoğraflanarak *Image J* programında floresan yoğunluk ölçümleri yapılarak ortalama değerleri alındı.

3.19. İstatistik

Deneylerde gruplar arasında farkın olup olmadığı GraphPad Prism 8 programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi ile belirlendi. Ayrıca gruplar arası ikili karşılaştırmalar Tukey *post-hoc* testi ile değerlendirildi. Zaman faktörünün önemli olduğu değişkenlerde (kalsiyum düzeyi) zaman ve grup etkileşiminin incelenmesi amacıyla tekrarlı ölçümlerde iki yönlü varyans analizi kullanıldı. Kalsiyum düzeyi için eğri altında kalan alan (EAA) değerleri trapezoid yöntemiyle hesaplandı ve gruplar arasındaki fark tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildi. Değişkenler arasındaki korelasyonların değerlendirilmesinde *Pearson* korelasyon analizi kullanıldı. Sonuçlar 3 tekrar şeklinde verildi ve veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak sunuldu. $P < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.20. Etik Kurul İzni

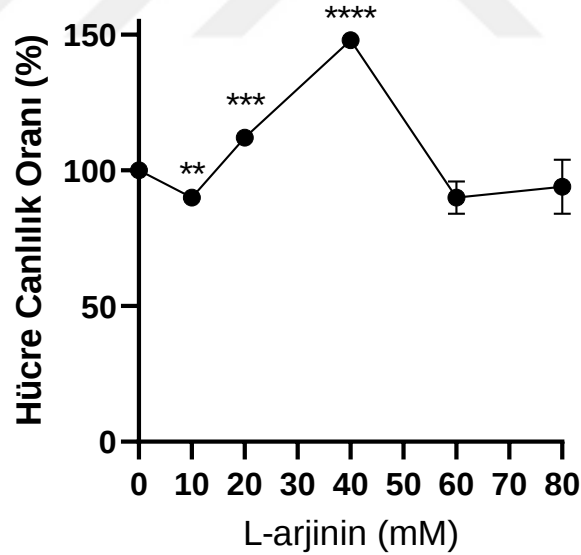
Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul'nun 29.06.2021 tarih ve 2022/08-03 izni ile gerçekleştirilmiştir (Ek 1).

4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığı

İnsan kolonundan elde edilmiş enteroendokrin hücre hattı olan NCI-H716 hücreleri L-arjinin, agmatin, NPS 2143 ve R568'in farklı konsantrasyonları ile 2 saat boyunca inkübe edilerek hücre canlılığı MTT testi ile % cinsinden belirlendi.

NCI-H716 hücrelerine 10, 20, 40, 60 ve 80 mM olacak şekilde farklı L-arjinin konsantrasyonlarının 2 saatlik inkübasyonundan sonra, 10 mM L-Arj konsantrasyonunun hücre canlılığını kontrole göre azalttığı görüldü ($P<0,01$). 20 mM L-Arj uygulanan grupta ise kontrole göre hücre canlılığı arttı ($P<0,001$). Hücre canlılığının en fazla arttığı grup ise 40 mM olarak belirlendi ($P<0,0001$). Bu nedenle L-arjininin hücre canlılığını en fazla artıran iki dozu olan 20 ve 40 mM çalışma için uygun dozlar olarak seçildi (Şekil 4.1. ve tablo 4.1.).

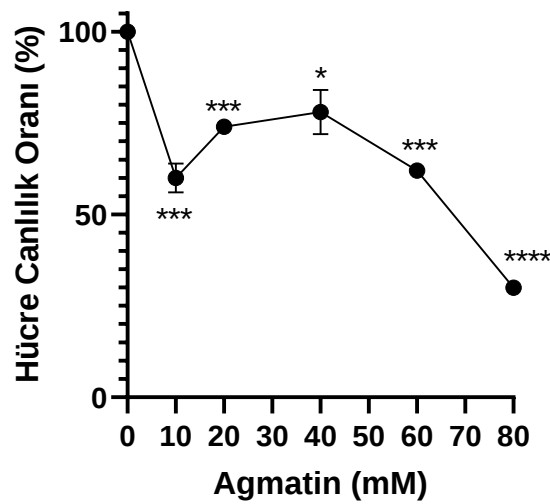


Şekil 4.1. Farklı L-arjinin konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi (** $P<0,01$; *** $P<0,001$; **** $P<0,0001$, kontrol grubuna göre).

Tablo 4.1. L-arjinin uygulamasından sonra NCI-H716 canlı hücre oranı (%) (ortalama $\pm$ standart hata, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$; kontrol grubuna göre).

L-arjinin	Hücre canlılık oranı (%)
Kontrol	100 $\pm$ 0
10 mM	90 $\pm$ 2**
20 mM	112 $\pm$ 1****
40 mM	148 $\pm$ 2****
60 mM	90 $\pm$ 6
80 mM	94 $\pm$ 10

NCI-H716 hücrelerinin 10, 20, 40, 60 ve 80 mM olacak şekilde farklı agmatin konsantrasyonları ile 2 saat inkübasyonundan sonra, 10, 20 ve 60 mM'lık konsantrasyonların hücre canlılığını kontrole göre belirgin olarak azalttığı bulundu ($P < 0,001$). Hücre canlılığında en fazla azalma 80 mM agmatin uygulanan grupta görüldü ($P < 0,0001$). NCI-H716 hücrelerine 40 mM agmatin uygulanan grupta ise diğer dozlara göre hücre canlılığının daha yüksek olduğu ancak kontrole göre hücre canlılığında azalma olduğu belirlendi ($P < 0,05$). Buna göre hormon salgısı açısından hücrelerin canlılığını en az etkileyeceği düşünülen dozlar olan 20 ve 40 mM'lık agmatin dozları çalışma için uygun dozlar olarak seçildi (Şekil 4.2 ve tablo 4.2).

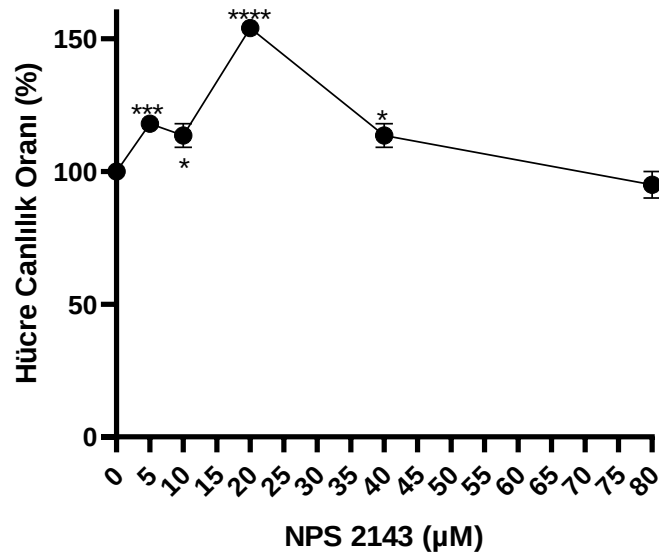


Şekil 4.2. Farklı agmatin konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$, kontrol grubuna göre).

Tablo 4.2. Agmatin uygulamasından sonra NCI-H716 canlı hücre oranı (%) (ortalama $\pm$ standart hata, * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$; kontrol grubuna göre).

Agmatin	Hücre canlılık oranı (%)
Kontrol	100 $\pm$ 0
10 mM	60 $\pm$ 4 ***
20 mM	74 $\pm$ 2 ****
40 mM	78 $\pm$ 6 *
60 mM	62 $\pm$ 2 ****
80 mM	30 $\pm$ 2 ****

NCI-H716 hücrelerinin CaSR'nin negatif allosterik modülatörü olan NPS 2143'ün 5, 10, 20, 40 ve 80 μ M'lık farklı konsantrasyonları ile 2 saatlik inkübasyonundan sonra, 5 μ M NPS 2143'ün hücre canlılığını kontrole göre artırdığı bulundu ($P < 0,001$). 10 ve 40 μ M NPS 2143 uygulanan grupta da kontrole göre hücre canlılığının arttığı belirlendi ($P < 0,05$). Hücre canlılığının en fazla arttığı grup ise 20 μ M olarak belirlendi ($P < 0,0001$). Bu nedenle NPS 2143'ün hücre canlılığını en fazla artıran dozu olan 20 μ M, deneylerimiz için uygun doz olarak seçildi (Şekil 4.3 ve tablo 4.3).

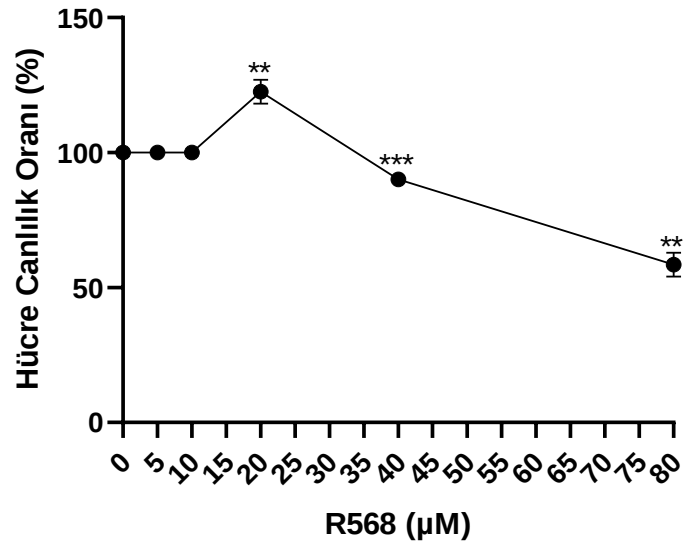


Şekil 4.3. Farklı NPS 2143 konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$, kontrol grubuna göre).

Tablo 4.3. NPS 2143 uygulamasından sonra NCI-H716 canlı hücre oranı (%) (ortalama $\pm$ standart hata, * $P<0,05$; *** $P<0,001$; **** $P <0,0001$; kontrol grubuna göre).

NPS 2143	Hücre canlılık oranı (%)
Kontrol	100 $\pm$ 0
5 μ M	118 $\pm$ 1 ***
10 μ M	114 $\pm$ 4 *
20 μ M	154 $\pm$ 1 ****
40 μ M	114 $\pm$ 4 *
80 μ M	95 $\pm$ 5

NCI-H716 hücrelerinin CaSR'nin pozitif allosterik modülatörü olan R568'in 5, 10, 20, 40 ve 80 μ M'lık farklı konsantrasyonları ile 2 saatlik inkübasyonu sonrasında, 5 ve 10 μ M R568 uygulanan gruplarda kontrole göre anlamlı bir fark bulunamadı. 40 μ M R568 uygulanan grupta ise kontrole göre hücre canlılığında azalma belirlendi ($P<0,001$). Hücre canlılığının en fazla azaldığı grup 80 μ M olarak belirlendi ($P<0,01$). 20 μ M olarak uygulanan grupta ise kontrole göre hücre canlılığında artış olduğu görüldü ($P <0,0001$). Böylece R568'in 20 μ M olan dozu deneylerimiz için uygun doz olarak çalışmaya dâhil edildi (Şekil 4.4 ve tablo 4.4).



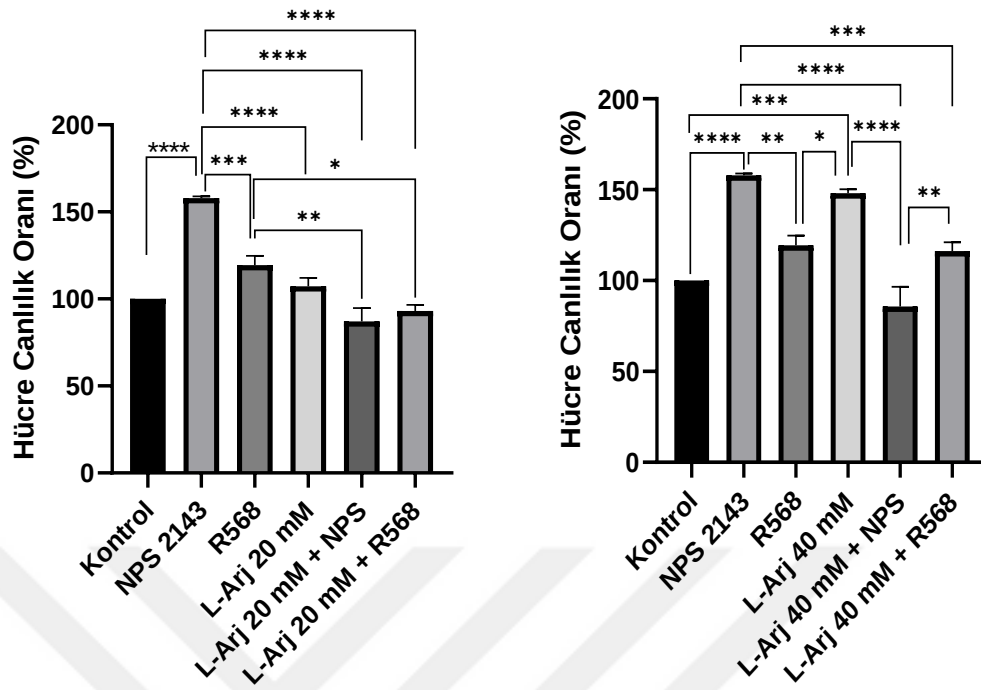
Şekil 4.4. Farklı R568 konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi (** $P<0,01$, *** $P<0,001$, kontrol grubuna göre).

Tablo 4.4. R568 uygulamasından sonra NCI-H716 canlı hücre oranı (%) (ortalama $\pm$ standart hata, ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; kontrol grubuna göre).

R568	Hücre canlılık oranı (%)
Kontrol	100 $\pm$ 0
5 μ M	100 $\pm$ 1
10 μ M	100 $\pm$ 1
20 μ M	123 $\pm$ 4 **
40 μ M	90 $\pm$ 1 ***
80 μ M	59 $\pm$ 4 **

Deneylerde kullanılacak konsantrasyonlar belirlendikten sonra hücrelere farklı konsantrasyonlardaki agmatin ve L-arjinin, NPS 2143 veya R568 ile birlikte uygulanarak 2 saat süreyle inkübe edildi ve hücre canlılıkları belirlendi.

NCI-H716 hücrelerine 20 ve 40 mM L-arjinin ve kombinasyonlarının uygulanması sonrasında, NPS 2143 grubunda hücre canlılığının diğer tüm gruplardan daha yüksek olduğu görüldü ($P < 0,0001$). Ayrıca R568 grubundaki hücre canlılığı L-Arj 20 mM'nin kombinasyonlarından daha yüksekti ($P<0,05$). Agmatin ve kombinasyonlarının uygulandığı gruplardan farklı olarak, L-arjinin ve kombinasyonlarının uygulandığı gruplardan L-Arj 40 mM grubundaki hücre canlılığı kontrole göre anlamlı şekilde daha yüksekti ($P<0,001$). L-Arj ve kombinasyonlarının uygulandığı diğer gruplarda ise kontrole göre anlamlı bir fark bulunamadı. Ayrıca R568 grubundaki hücre canlılığı, 40 mM L-Arj ve 40 mM L-Arj ile NPS 2143 kombinasyonundan daha yüksekti ($P<0,05$). L-Arj 40 mM grubundaki hücre canlılığı kombinasyonlarına göre anlamlı şekilde daha yüksekti ($P<0,01$). 40 mM L-Arj + NPS 2143 ile 40 mM L-Arj + R568 grupları karşılaştırıldığında ise, NPS 2143 içeren grupta canlılığın daha düşük olduğu görüldü ($P<0,01$) (Şekil 4.5. ve tablo 4.5.).



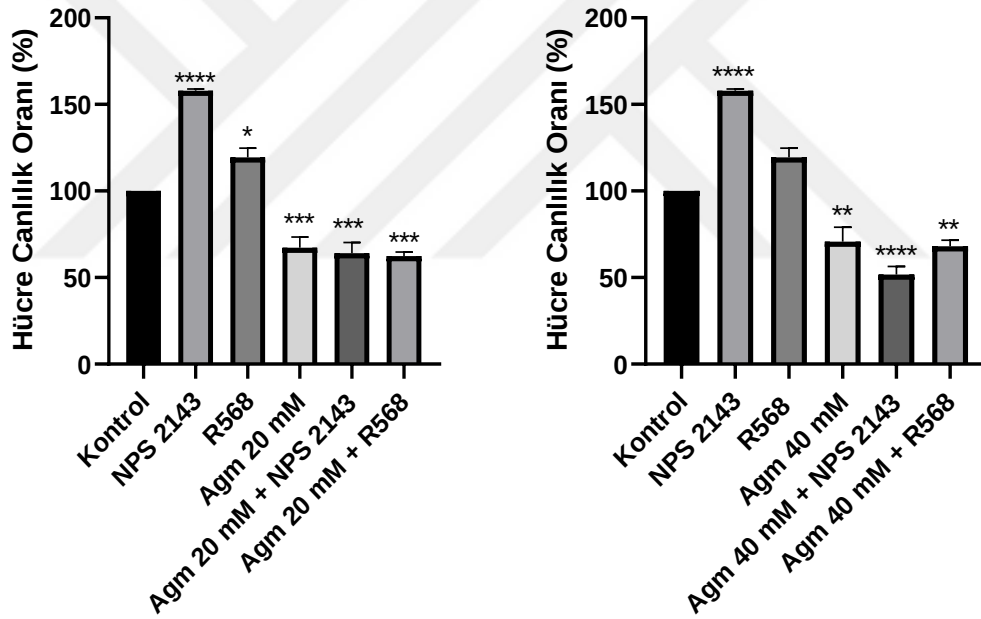
Şekil 4.5. L-arjinin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonlarının hücre canlılığına etkisi (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$).

Tablo 4.5. L-arjinin ve kombinasyonların uygulamasından sonra NCI-H716 canlı hücre oranı (%) (ortalama $\pm$ standart hata, *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$; kontrol grubuna göre).

Gruplar	Hücre canlılık oranı (%)
Kontrol	100 $\pm$ 0
NPS 2143	158 $\pm$ 1 ****
R568	120 $\pm$ 5
L-Arj 20 mM	107 $\pm$ 5
L-Arj 20 mM + NPS 2143	87 $\pm$ 8
L-Arj 20 mM + R568	93 $\pm$ 4
L-Arj 40 mM	148 $\pm$ 2 ***
L-Arj 40 mM + NPS 2143	86 $\pm$ 10
L-Arj 40 mM + R568	116 $\pm$ 5

Agmatin 20 mM ve kombinasyonların uygulandığı gruplarda ise hücre canlılığı kontrole göre anlamlı şekilde düşük düzeydeydi ($P<0,001$). Ayrıca NPS 2143 ve R568 grubunun hücre canlılığı kontrole göre anlamlı şekilde yüksekti ($P<0,05$) (Şekil 4.6. ve tablo 4.6.).

Agmatin 40 mM grubu ve 40 mM agmatin ile 20 μ M R568'in birlikte uygulandığı gruptaki hücre canlılığı kontrole göre daha düşüktü ($P<0,01$). Ayrıca 40 mM agmatin ile 20 μ M NPS 2143'ün birlikte uygulandığı gruptaki hücre canlılığı kontrole göre azalmıştı ($P<0,0001$) (Şekil 4.6. ve tablo 4.6.). Kontrol olarak hücrelere uygulanan Krebs-Ringer solüsyonu ve %1 oranında DMSO'nun hücre canlılığını düşürmediği görüldü.



Şekil 4.6. Agmatin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonlarının hücre canlılığına etkisi (* $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; **** $P<0,0001$, kontrol grubuna göre).

Tablo 4.6. Agmatin ve kombinasyonların uygulamasından sonra NCI-H716 canlı hücre oranı (%) (ortalama $\pm$ standart hata, * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; **** $P <0,0001$; kontrol grubuna göre).

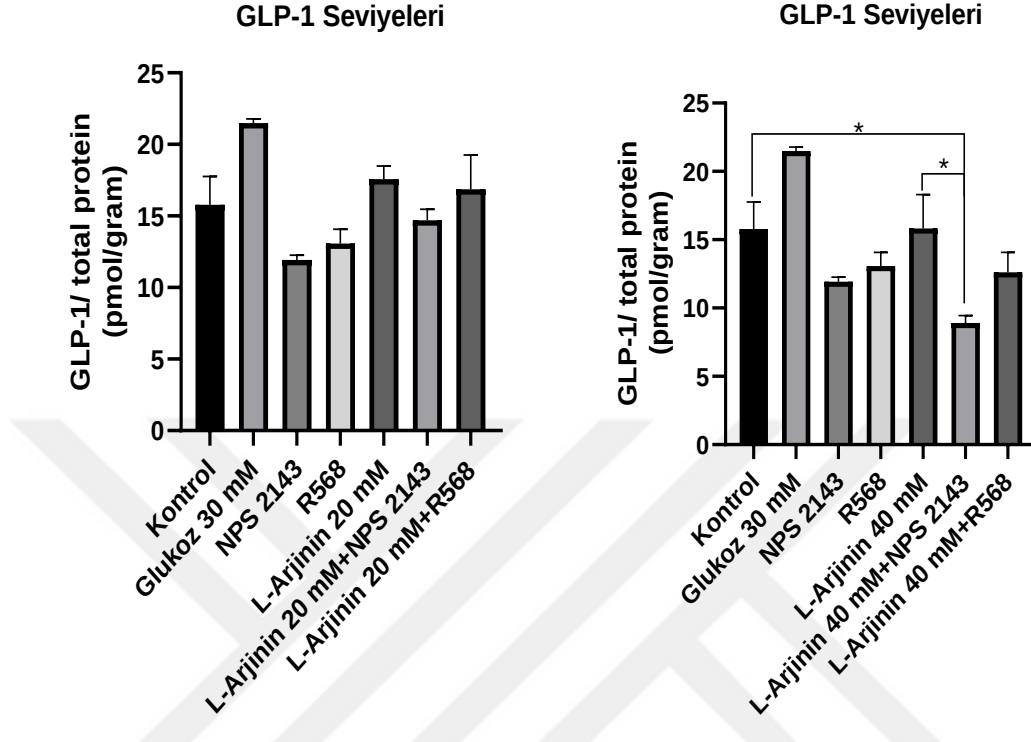
Gruplar	Hücre canlılık oranı (%)
Kontrol	100 $\pm$ 0
NPS 2143	158 $\pm$ 1****
R568	120 $\pm$ 5*
Agm 20 mM	67 $\pm$ 6***
Agm 20 mM + NPS 2143	64 $\pm$ 6***
Agm 20 mM + R568	63 $\pm$ 2***
Agm 40 mM	71 $\pm$ 8**
Agm 40 mM + NPS 2143	52 $\pm$ 5****
Agm 40 mM + R568	68 $\pm$ 4**

4.2. GLP-1 Düzeyi

NCI-H716 hücrelerine agmatinin 2 farklı konsantrasyonu ile NPS 2143 ve R568 kombinasyonları uygulandıktan sonra ELISA yöntemiyle GLP-1 düzeyleri ölçüldü ve sonuçlar BCA yöntemiyle belirlenen total protein miktarına göre oranlandı. Ayrıca enteroendokrin L hücrelerinde GLP-1 salgısına yol açan en kuvvetli uyaran olduğu bilinen glukoz, pozitif kontrol olarak kullanıldı. 30 mM glukoz uygulanan hücrelerin GLP-1 salgısı kontrolden ve diğer tüm gruplardan beklendiği üzere yüksek bulundu ($P<0,01$).

NCI-H716 hücrelerine L-arjininin iki farklı konsantrasyonu ve NPS 2143 ile R568'in kombinasyonları uygulandıktan sonra GLP-1 düzeyleri incelendiğinde, 30 mM glukoz uygulanan hücrelerin NPS 2143, R568 ve L-arjinin 20 mM + NPS 2143 uygulanan gruplara göre GLP-1 düzeyinin yüksek olduğu bulundu ($P<0,01$). 40 mM L-arjinin ve 20 μ M NPS 2143'ün birlikte uygulandığı grupta kontrole göre GLP-1 düzeyinde azalma olduğu görüldü ($P<0,05$). Benzer şekilde 40 mM L-arjinin ve 20 μ M NPS 2143'ün birlikte uygulandığı grupta 40 mM L-arjinin grubuna göre GLP-1 düzeyinin azaldığı saptandı ($P<0,05$) (Şekil 4.7 ve tablo 4.7). Böylece özellikle 40 mM L-arjinin ile NPS 2143 birlikte uygulandığında sadece 40 mM L-arjinin uygulamasına

göre GLP-1 düzeyinde anlamlı bir düşüş olması sebebiyle CaSR'lerin bu mekanizmada rolü olabileceği düşünüldü.



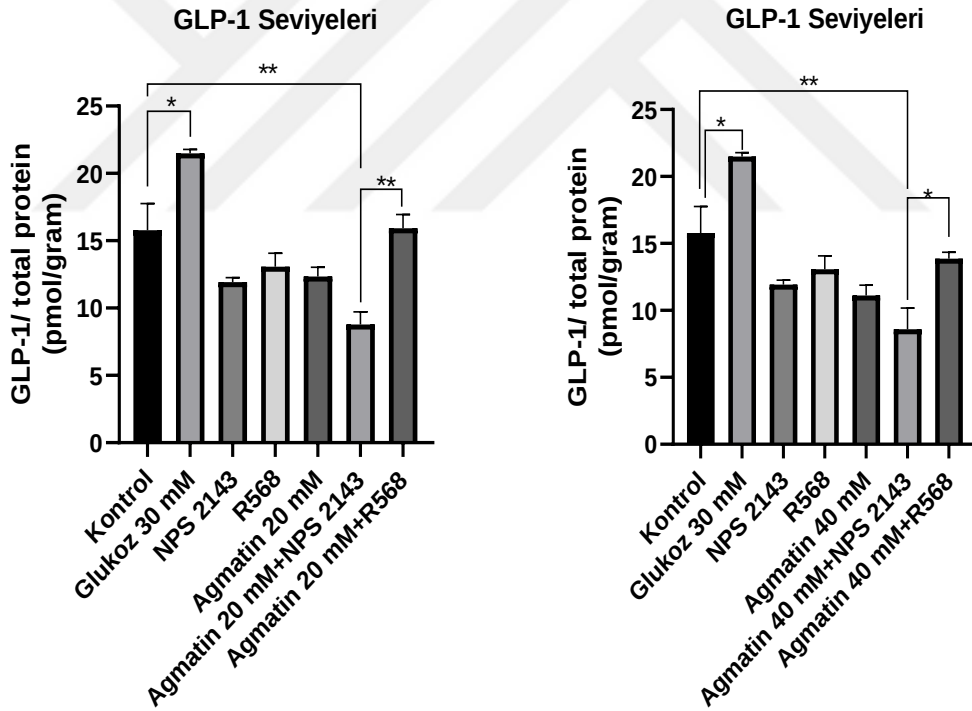
Şekil 4.7. L-arjinin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen GLP-1 düzeyleri (* $P < 0,05$).

Tablo 4.7. L-arjinin ve kombinasyonların uygulamasından sonra NCI-H716 hücrelerinin GLP-1 düzeyi (pmol/g total protein) (ortalama $\pm$ standart hata, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; kontrol grubuna göre).

Gruplar	GLP-1 düzeyi (pmol/g total protein)
Kontrol	15,78 $\pm$ 1,99
Glukoz 30 mM	21,49 $\pm$ 0,28
NPS 2143	11,93 $\pm$ 0,33
R568	13,06 $\pm$ 1,02
L-Arj 20 mM	17,57 $\pm$ 0,93
L-Arj 20 mM + NPS 2143	14,69 $\pm$ 0,78
L-Arj 20 mM + R568	16,87 $\pm$ 2,39
L-Arj 40 mM	15,83 $\pm$ 2,47
L-Arj 40 mM + NPS 2143	8,90 $\pm$ 0,53*
L-Arj 40 mM + R568	12,61 $\pm$ 1,47

Agmatin ve kombinasyonların uygulandığı gruplarda ise; 20 mM agmatin + NPS 2143 grubunda kontrole göre GLP-1 düzeyinde azalma olduğu görüldü ($P<0,01$). Ayrıca 20 mM agmatin + NPS 2143 grubunda 20 mM agmatin + R568 grubuna göre GLP-1 düzeyinde azalma saptandı ($P<0,01$) (Şekil 4.8).

40 mM agmatin ve 20 μ M NPS 2143'ün birlikte uygulandığı grupta da benzer şekilde kontrole göre GLP-1 düzeyinde azalma olduğu görüldü ($P<0,01$). Ayrıca 40 mM agmatin + NPS 2143 grubunda, 40 mM agmatin + R568 grubuna göre GLP-1 düzeyinin azaldığı görüldü ($P<0,05$) (Şekil 4.8 ve tablo 4.8). Böylece hem 20 mM hem de 40 mM agmatin uygulanan grupların GLP-1 düzeyinin NPS 2143 ile kombinasyonuna bağlı olarak azalması ve R568 ile kombinasyonu sonucu artışı sebebiyle bu hormonun salgısında CaSR'lerin aracılık ediyor olabileceği düşünüldü.



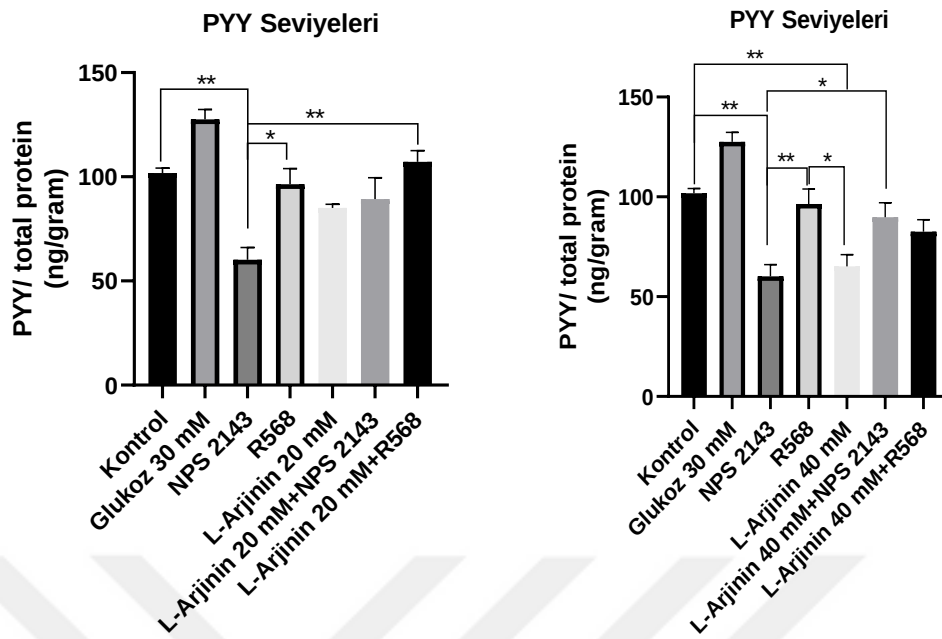
Şekil 4.8. Agmatin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen GLP-1 düzeyleri (* $P<0,05$; ** $P<0,01$).

Tablo 4.8. Agmatin ve kombinasyonların uygulamasından sonra NCI-H716 hücrelerinin GLP-1 düzeyi (pmol/g total protein) (ortalama $\pm$ standart hata, * $P<0,05$; ** $P<0,01$; kontrol grubuna göre).

Gruplar	GLP-1 düzeyi (pmol/g total protein)
Kontrol	15,78 $\pm$ 1,99
Glukoz 30 mM	21,49 $\pm$ 0,28 *
NPS 2143	11,93 $\pm$ 0,33
R568	13,06 $\pm$ 1,02
Agm 20 mM	12,34 $\pm$ 0,69
Agm 20 mM + NPS 2143	8,77 $\pm$ 0,94 **
Agm 20 mM + R568	15,93 $\pm$ 1,02
Agm 40 mM	11,11 $\pm$ 0,78
Agm 40 mM + NPS 2143	8,59 $\pm$ 1,57 **
Agm 40 mM + R568	13,87 $\pm$ 0,47

4.3. PYY Düzeyi

NCI-H716 hücrelerine L-arjinin uygulanması sonucu PYY düzeyleri incelendiğinde; NPS 2143 grubunun kontrole, R568 grubuna ve 20 mM L-arjinin ile R568'in birlikte uygulandığı gruba göre düşük düzeyde olduğu görüldü ($P<0,05$). Glukoz 30 mM uygulanan grubun PYY düzeyi diğer tüm gruplardan anlamlı şekilde yüksekti ($P<0,01$). 40 mM L-arjinin uygulanan grupta ise kontrole ve R568 grubuna göre PYY düzeyi azalmıştı ($P<0,05$) (Şekil 4.9 ve tablo 4.9). 40 mM L-arjinin uygulaması ile 20 mM L-arjinin'e kıyasla daha düşük PYY düzeyi gözlemlendi. Ayrıca 40 mM L-arjinin ile NPS'nin birlikte uygulandığı grubun PYY seviyesi, NPS 2143 grubuna göre daha yüksekti ($P<0,05$). Agmatinden farklı olarak L-arjinin uygulamasının NPS 2143 ile kombinasyonu PYY düzeyinde anlamlı bir düşüşe neden olmadı.



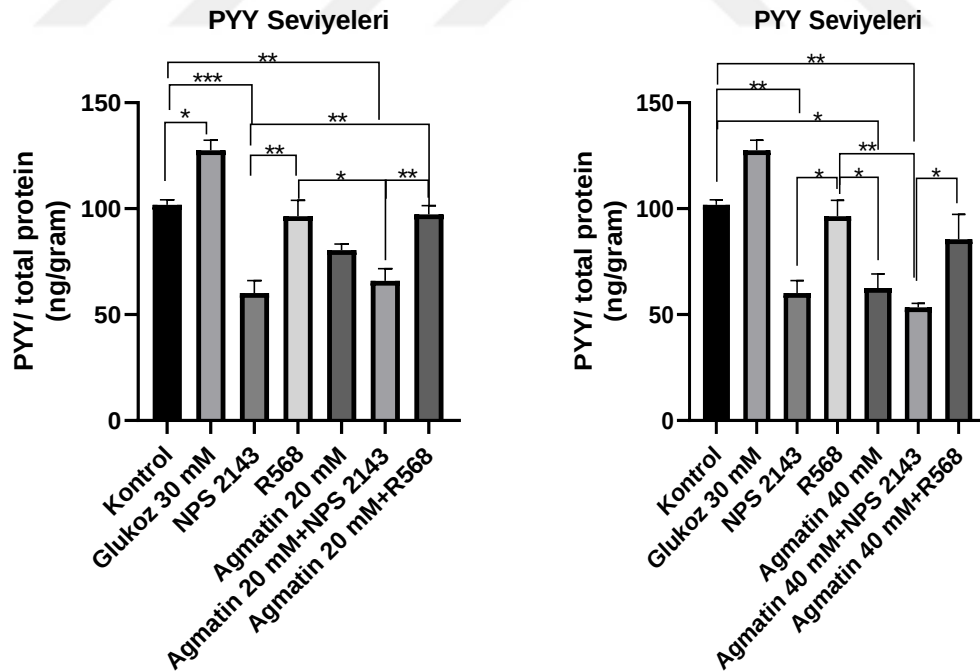
Şekil 4.9. L-arjinin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen PYY düzeyleri (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

Tablo 4.9. L-arjinin ve kombinasyonların uygulamasından sonra NCI-H716 hücrelerinin PYY düzeyi (ng/g total protein) (ortalama $\pm$ standart hata, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; kontrol grubuna göre).

Gruplar	PYY düzeyi (ng/g total protein)
Kontrol	101,80 $\pm$ 2,37
Glukoz 30 mM	127,50 $\pm$ 4,85
NPS 2143	60,23 $\pm$ 5,84 **
R568	96,47 $\pm$ 7,44
L-Arj 20 mM	85,03 $\pm$ 1,72
L-Arj 20 mM + NPS 2143	89,30 $\pm$ 10,27
L-Arj 20 mM + R568	107,10 $\pm$ 5,40
L-Arj 40 mM	65,17 $\pm$ 5,93 **
L-Arj 40 mM + NPS 2143	89,77 $\pm$ 7,23
L-Arj 40 mM + R568	82,50 $\pm$ 6,10

NCI-H716 hücrelerine agmatinin konsantrasyonları ve kombinasyonları uygulandıktan sonra PYY düzeyleri incelendiğinde, glukoz 30 mM grubunda tüm gruplara göre anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($P < 0,05$). Ayrıca NPS 2143 grubu ve

20 mM agmatin ile 20 μ M NPS 2143'ün birlikte uygulandığı grupta kontrole göre bir azalma olduğu görüldü ($P<0,01$). R568 grubu ve 20 mM agmatin ile 20 μ M R568'in birlikte uygulandığı gruptaki PYY düzeyleri NPS 2143 grubuna göre daha yüksekti ($P<0,01$). Ayrıca 20 mM agmatin ile 20 μ M NPS 2143'ün birlikte uygulandığı gruptaki PYY düzeyi, R568 grubu ve 20 mM agmatin ile 20 μ M R568'in birlikte uygulandığı gruba göre daha düşük bulundu ($P<0,001$) (Şekil 4.10.). 20 mM agmatin ile NPS 2143'ün birlikte uygulandığı gruptaki PYY düzeyinin kontrole ve R568 ile kombinasyona göre düşük bulunması PYY salgısında CaSR'lerin rolü olabileceğini düşündürdü. 40 mM agmatin uygulanan gruptaki PYY düzeyi 20 mM dozundan farklı olarak, kontrole göre daha düşük seviyedeydi ($P<0,05$). Ayrıca 40 mM agmatin ile birlikte NPS 2143'ün uygulandığı grubun da kontrole göre düşük olduğu görüldü ($P<0,01$). R568 grubunun PYY düzeyi 40 mM agmatin ve 40 mM agmatin ile 20 μ M NPS 2143'ün birlikte uygulandığı gruplardan daha yüksek bulundu ($P<0,05$). Agmatinin 20 mM gibi 40 mM konsantrasyonunun iki kombinasyonu arasında da anlamlı fark bulundu ve 40 mM agmatin düzeyinin 20 mM konsantrasyona göre PYY düzeyini daha fazla düşürdüğü görüldü ($P<0,05$) (Şekil 4.10. ve tablo 4.10.).



Şekil 4.10. Agmatin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen PYY düzeyleri (* $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$).

Tablo 4.10. Agmatin ve kombinasyonların uygulamasından sonra NCI-H716 hücrelerinin PYY düzeyi (ng/g total protein) (ortalama $\pm$ standart hata, * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; kontrol grubuna göre).

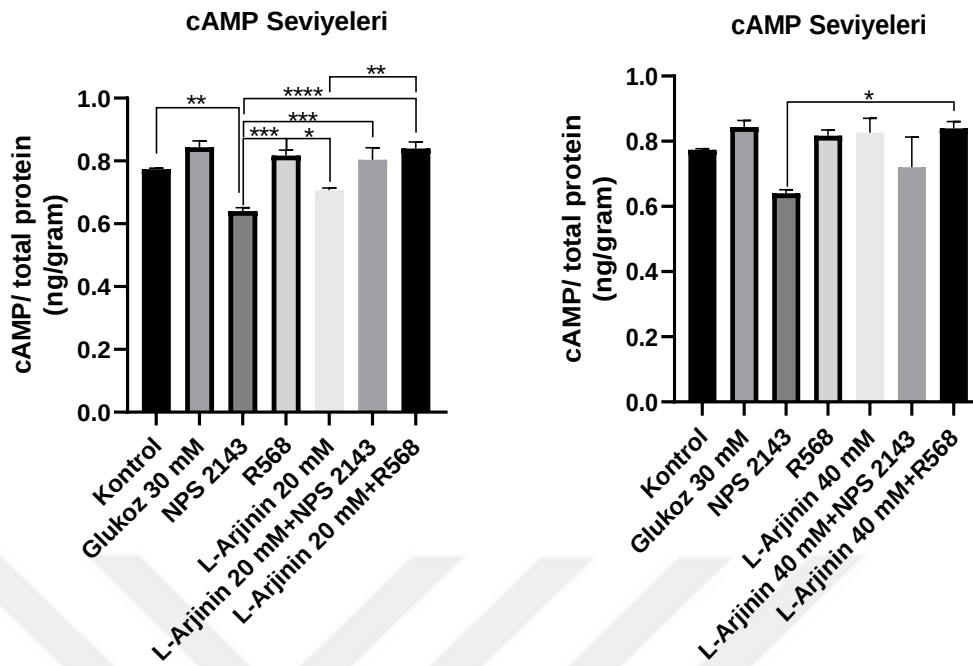
Gruplar	PYY düzeyi (ng/g total protein)
Kontrol	101,80 $\pm$ 2,37
Glukoz 30 mM	127,50 $\pm$ 4,85 *
NPS 2143	60,23 $\pm$ 5,84 ***
R568	96,47 $\pm$ 7,44
Agm 20 mM	80,43 $\pm$ 2,93
Agm 20 mM+NPS 2143	65,90 $\pm$ 5,77 **
Agm 20 mM+R568	97,27 $\pm$ 4,14
Agm 40 mM	62,60 $\pm$ 6,58 *
Agm 40 mM+NPS 2143	53,40 $\pm$ 1,97 **
Agm 40 mM+R568	85,57 $\pm$ 11,7

Tüm gruplarda salgılanan GLP-1 ve PYY hormon düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, GLP-1 ve PYY arasında pozitif korelasyon olduğu saptandı ($r=0,379$, $P<0,01$).

4.4. cAMP Düzeyi

NCI-H716 hücrelerine L-arjinin uygulamasına bağlı olarak cAMP düzeyinin değişimi incelendiğinde; NPS 2143 grubunun kontrol, glukoz, R568 ve 20 mM L-arjinin uygulanan iki kombinasyon gruplarına göre daha düşük seviyede olduğu görüldü ($P<0,01$). Glukoz grubunun cAMP düzeyi, NPS 2143 ve L-arjinin 20 mM gruplarından daha yüksekti ($P<0,01$). Ayrıca L-arjinin 20 mM grubunun R568 ve aynı konsantrasyonun R568 ile kombinasyonundan daha düşük düzeyde olduğu belirlendi ($P<0,05$).

40 mM L-arjinin uygulanan gruplara bakıldığında, R568 ile kombinasyonun NPS 2143 grubuna göre daha yüksek olduğu görüldü ($P<0,05$) (Şekil 4.11. ve tablo 4.11.). Sonuçlar incelendiğinde, L-arjinin 20 mM ve kombinasyonları arasında anlamlı fark olmadığı, cAMP düzeyini etkilemediği ancak 40 mM L-arjinin ile NPS 2143'ün birlikte uygulandığı grupta düşüş olsa da anlamlı bir fark olmadığı görüldü.

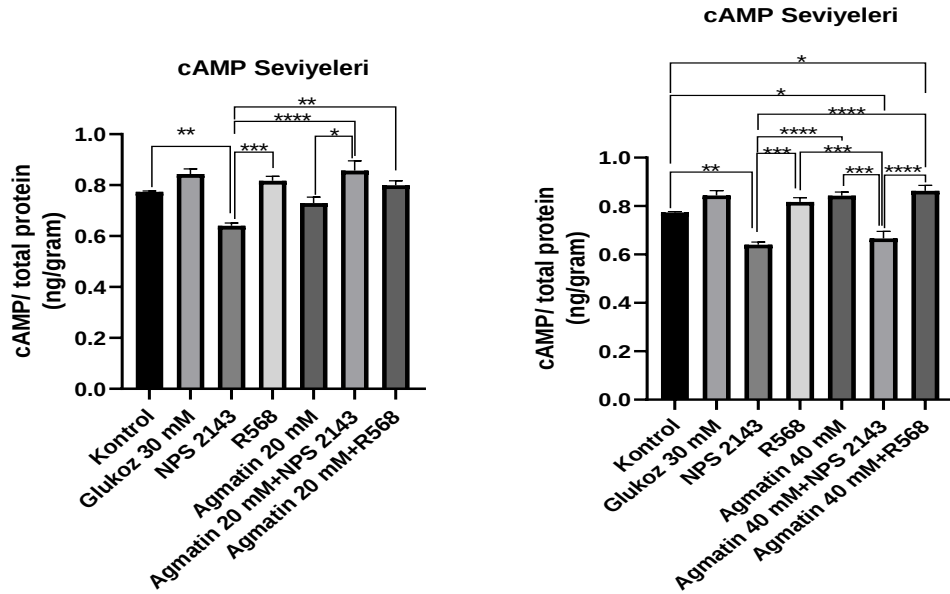


Şekil 4.11. L-arjinin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen cAMP düzeyleri (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$).

Tablo 4.11. L-arjinin ve kombinasyonların uygulamasından sonra NCI-H716 hücrelerinin cAMP düzeyi (ng/g total protein) (ortalama $\pm$ standart hata, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; kontrol grubuna göre).

Gruplar	cAMP düzeyi (ng/g total protein)
Kontrol	0,77 $\pm$ 0,01
Glukoz 30 mM	0,84 $\pm$ 0,02
NPS 2143	0,64 $\pm$ 0,01**
R568	0,81 $\pm$ 0,02
L-Arj 20 mM	0,70 $\pm$ 0,01
L-Arj 20 mM + NPS 2143	0,80 $\pm$ 0,04
L-Arj 20 mM + R568	0,84 $\pm$ 0,02
L-Arj 40 mM	0,82 $\pm$ 0,04
L-Arj 40 mM + NPS 2143	0,72 $\pm$ 0,09
L-Arj 40 mM + R568	0,84 $\pm$ 0,02

NCI-H716 hücrelerine 20 mM agmatin uygulamasına bağlı olarak cAMP düzeyinin değişimi incelendiğinde, NPS 2143 grubunun kontrole, R568 grubuna ve 20 mM agmatin ile kombinasyonun olduğu gruplara göre cAMP düzeyi anlamlı şekilde düşük bulundu ($P<0,01$). NPS 2143 ve agmatin 20 mM gruplarının cAMP düzeyi, glukoz grubuna göre düşüktü ($P<0,05$). Ayrıca agmatin 20 mM grubundaki cAMP düzeyinin 20 mM agmatin ile NPS 2143'ün birlikte uygulandığı gruptan düşük olduğu bulundu ($P<0,05$). 40 mM agmatin uygulamasına bağlı olarak cAMP düzeyinin değişimi incelendiğinde ise, 40 mM agmatin ile kombinasyonların uygulandığı her iki grupta da kontrole göre anlamlı fark olduğu görüldü. Buna göre NPS 2143 ile kombinasyonda düşüş, R568 ile kombinasyonda artış gözlemlendi ($P<0,05$). Glukoz grubuna göre 40 mM agmatin ile NPS 2143'ün birlikte uygulandığı grupta cAMP düzeyi daha düşüktü ($P<0,001$). NPS 2143 grubunun R568, agmatin 40 mM ve 40 mM agmatin + R568 gruplardan daha düşük düzeyde olduğu görüldü ($P<0,0001$). 40 mM agmatin + NPS 2143 grubunda cAMP düzeyinin, R568, agmatin 40 mM ve 40 mM agmatin + R568 gruplarından daha düşük olduğu saptandı ve NPS 2143'ün cAMP düzeyini düşürücü yönde etki ediyor olabileceği düşünüldü ($P<0,0001$) (Şekil 4.12. ve tablo 4.12.).



Şekil 4.12. Agmatin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen cAMP düzeyleri (* $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; **** $P<0,0001$).

Tablo 4.12. Agmatin ve kombinasyonların uygulamasından sonra NCI-H716 hücrelerinin cAMP düzeyi (ng/g total protein) (ortalama $\pm$ standart hata, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; kontrol grubuna göre).

Gruplar	cAMP düzeyi (ng/g total protein)
Kontrol	0,77 $\pm$ 0,01
Glukoz 30 mM	0,84 $\pm$ 0,02
NPS 2143	0,64 $\pm$ 0,01**
R568	0,81 $\pm$ 0,02
Agm 20 mM	0,73 $\pm$ 0,02
Agm 20 mM + NPS 2143	0,85 $\pm$ 0,04
Agm 20 mM + R568	0,80 $\pm$ 0,02
Agm 40 mM	0,84 $\pm$ 0,01
Agm 40 mM + NPS 2143	0,66 $\pm$ 0,03*
Agm 40 mM + R568	0,86 $\pm$ 0,02*

4.5. Protein Düzeyi

Tüm grupların uygulamalarından sonra NCI-H716 hücrelerinin total protein düzeyleri ölçüldü ve GLP-1, PYY ve cAMP düzeyleri belirlenirken total protein düzeyi ile orantılandı. Tablo 4.13'te tüm grupların total protein düzeyi ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Total protein düzeyi $\mu\text{g/ml}$ olarak ölçüldü ve gruplar karşılaştırıldığında total protein açısından anlamlı bir fark bulunamadı.

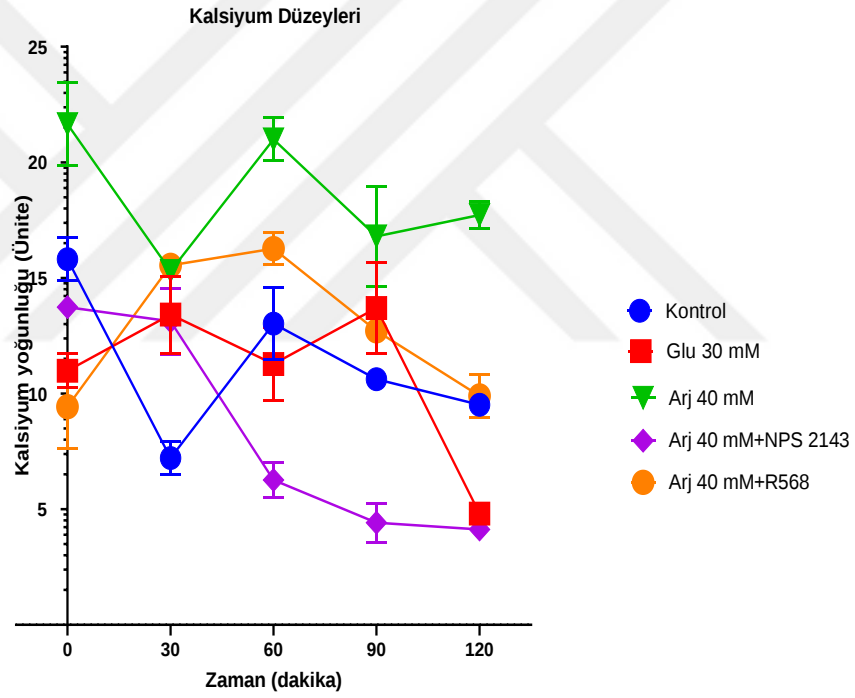
Tablo 4.13. Grupların total protein düzeyleri ($\mu\text{g/ml}$) (ortalama $\pm$ standart hata).

Gruplar	Total protein düzeyi ($\mu\text{g/ml}$)
Kontrol	1860 $\pm$ 12
Glukoz 30 mM	1661 $\pm$ 21
NPS 2143	2427 $\pm$ 60
R568	1887 $\pm$ 9
L-Arj 20 mM	2066 $\pm$ 102
L-Arj 20 mM + NPS 2143	1683 $\pm$ 25
L-Arj 20 mM + R568	1815 $\pm$ 32
L-Arj 40 mM	1809 $\pm$ 39
L-Arj 40 mM + NPS 2143	1761 $\pm$ 8
L-Arj 40 mM + R568	1849 $\pm$ 18
Agm 20 mM	1890 $\pm$ 30
Agm 20 mM + NPS 2143	1753 $\pm$ 16
Agm 20 mM + R568	1824 $\pm$ 10
Agm 40 mM	1887 $\pm$ 21
Agm 40 mM + NPS 2143	2207 $\pm$ 237
Agm 40 mM + R568	1781 $\pm$ 48

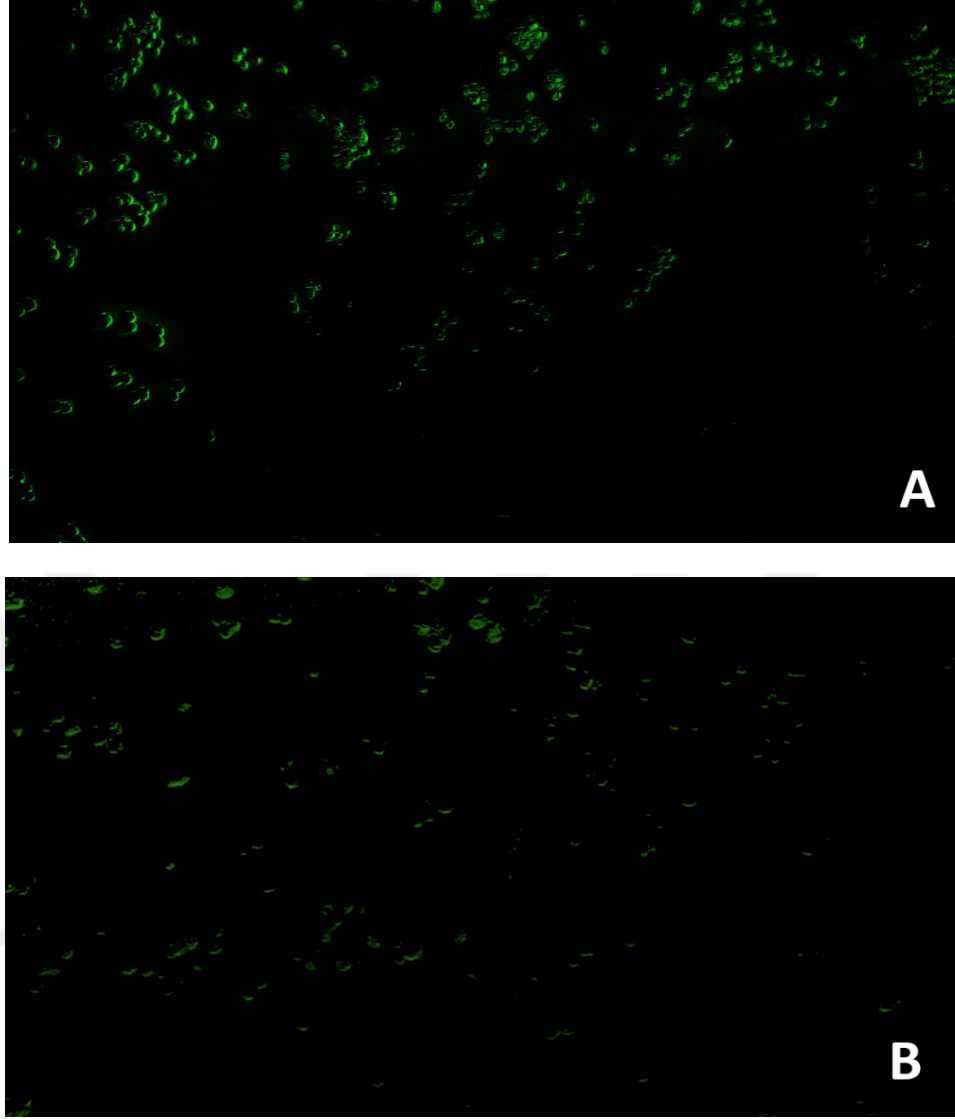
4.6. Kalsiyum Yoğunluğu

NCI-H716 hücrelerindeki kalsiyum yoğunluğunu daha net bir şekilde belirlemek adına L-arjinin ve agmatinin en yüksek dozu olan 40 mM ve kombinasyonları ile çalışıldı. 40 mM L-arjinin ve kombinasyonlarının uygulanmasından sonra kalsiyum yoğunluğu incelendiğinde; 0. dakikada Arj 40 mM grubu kalsiyum yoğunluğunun glukoz grubundan anlamlı şekilde yüksek olduğu görüldü ($P<0,05$). 30. dakikada da Arj 40 mM grubundaki kalsiyum yoğunluğu kontrole göre daha yüksekti ($P<0,05$). 60. dakikada da 0. dakikada olduğu gibi Arj 40 mM grubunda glukozu göre kalsiyum yoğunluğu daha yüksekti ($P<0,05$). Ayrıca 40 mM L-Arj + NPS 2143 grubunun kalsiyum yoğunluğunun hem Arj 40 mM hem de 40 mM Arj + R568 gruplarından daha düşük olduğu görüldü ($P<0,05$) (Şekil 4.13.). 90.

dakikada 40 mM L-Arj + NPS 2143 grubunda kalsiyum yoğunluğu hem kontrolden hem de 40 mM Arj + R568 grubundan daha düşük seviyede idi ($P<0,05$). 120. dakikada ise glukoz grubundaki kalsiyum yoğunluğu, kontrole ve Arj 40 mM grubuna göre daha düşük düzeydeydi ($P<0,05$). Ayrıca Arj 40 mM grubunun kontrole ve kombinasyonlarına göre daha yüksek kalsiyum yoğunluğuna sahip olduğu gözlemlendi ($P<0,05$). Arj 40 mM grubunda hücre içi kalsiyum yoğunluğunun fazla olması ve 40 mM Arj + NPS 2143 grubunda özellikle 30. dakikadan sonra hücre içi kalsiyum yoğunluğunun en düşük seviyede seyretmesi CaSR aracılı aktivasyonun ikinci mesajcı olarak kalsiyumu kullandığını düşündürmektedir ($P<0,05$) (Şekil 4.14.).



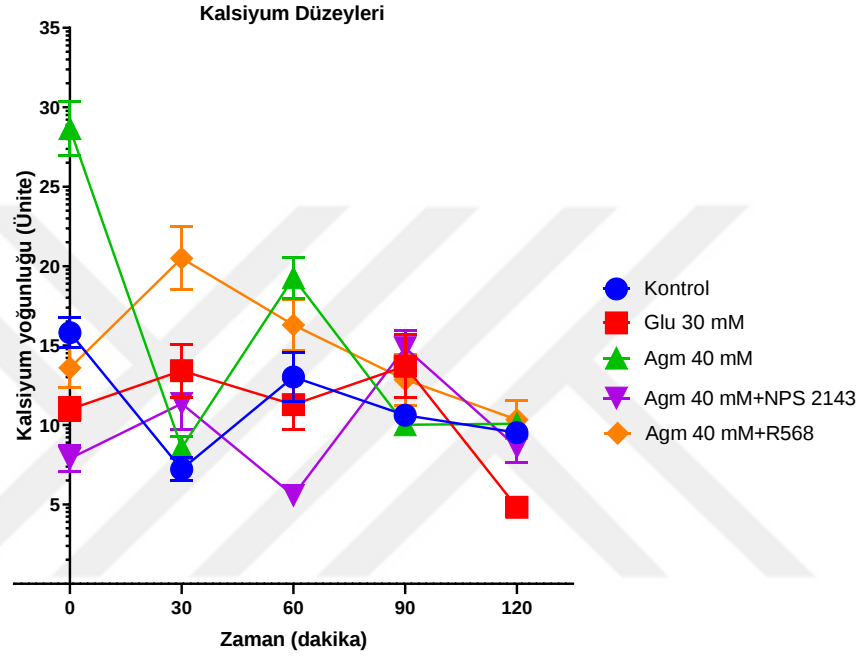
Şekil 4.13. L-arjinin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen kalsiyum yoğunlukları.



Şekil 4.14. A) L-arjinin 40 mM ve B) L-arjinin 40 mM + NPS 2143 gruplarının 60. dakikadaki kalsiyum yoğunlukları, 20x büyütme.

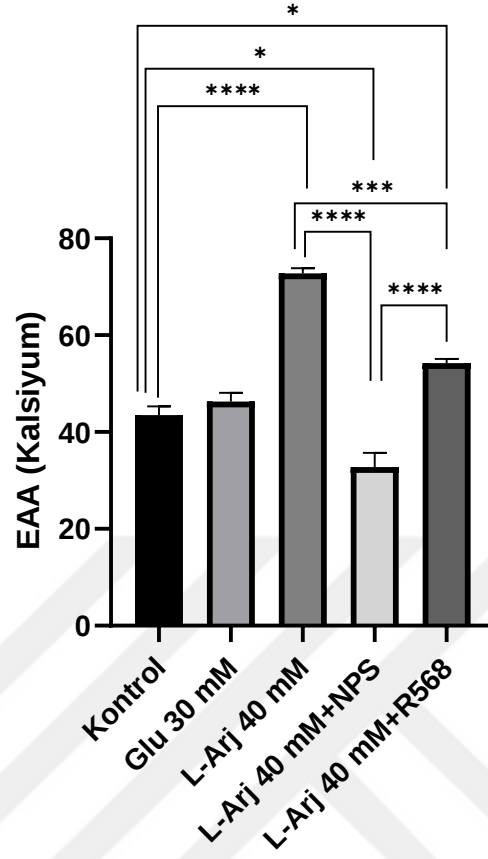
NCI-H716 hücrelerine agmatin ve kombinasyonlarının uygulanmasından sonra kalsiyum yoğunluğu incelendiğinde; 0. dakikada Agm 40 mM grubunda, glukoz ve diğer 40 mM Agm içeren gruplardan daha yüksek kalsiyum yoğunluğu olduğu gözlemlendi ($P<0,05$). 30. dakikada gruplar arasında hücre içi kalsiyum yoğunluğu açısından anlamlı bir fark bulunamadı. 60. dakikada Agm 40 mM grubundaki kalsiyum yoğunluğu; kontrol, glukoz ve 40 mM Agm + NPS 2143 gruplarından daha fazlaydı ($P<0,05$). Ayrıca 40 mM Agm + NPS 2143 grubunda yoğunluğun kontrolden düşük seviyede olduğu gözlemlendi ($P<0,01$). 90. dakikadaki ölçümlerde anlamlı bir fark bulunmadı ancak 120. dakikada glu 30 mM grubu kalsiyum yoğunluğunun, Agm 40

mM ve kontrol gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük olduğu saptandı ($P<0,05$) (Şekil 4.15.). 40 mM Agm uygulanan grupta da 40 mM L-Arj grubunda olduğu gibi diğer gruplara göre kalsiyum yoğunluğunun yüksek oluşu ve NPS 2143 ile kombinasyonu sonucu kalsiyum yoğunluğunun düşmesi, agmatinin CaSR'ler aracılığıyla etki gösterebileceğini düşündürdü.



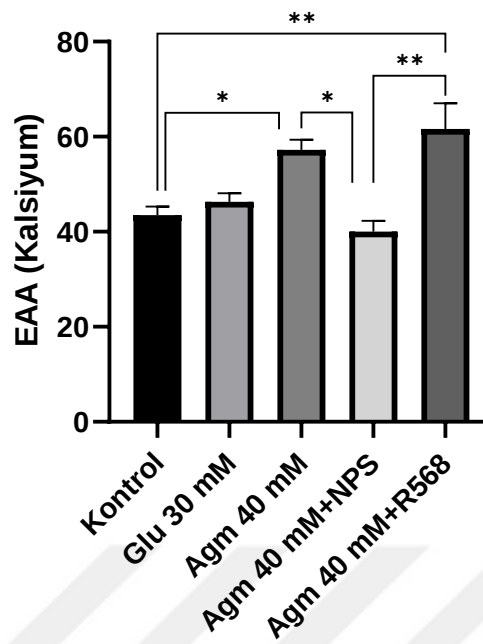
Şekil 4.15. Agmatin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen kalsiyum yoğunlukları.

0, 30, 60, 90 ve 120., dakikalardaki kalsiyum ölçümleri kullanılarak eğri altında kalan alanlar (EAA) hesaplandı ve 2 saatlik süre sonundaki toplam kalsiyum yoğunluklarına göre kıyaslama yapıldı. L-arjinin uygulanan grupların EAA değerlerine göre; L-Arj 40 mM grubu kalsiyum yoğunluğunun kontrole, glu 30 mM grubuna ve 40 mM L-Arj ile kombinasyonların uygulandığı gruba göre yüksek olduğu görüldü ($P<0,001$). 40 mM L-Arj + NPS 2143 grubunun kalsiyum yoğunluğu; kontrolden, glukoz grubundan ve 40 mM L-Arj + R568 grubundan daha düşüktü ($P<0,05$) (Şekil 4.16. ve tablo 4.14). L-Arj 40 mM grubunun toplam kalsiyum yoğunluğunun en fazla ve 40 mM L-Arj + NPS 2143 grubunun en düşük olması CaSR işlevleri ile kalsiyumun ilişkili olabileceğini gösterdi.



Şekil 4.16. L-arjinin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen $EAA_{Ca^{+2}}$ değerleri (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$).

Agmatin uygulanan grupların $EAA_{Ca^{+2}}$ değerlerine bakıldığında, kontrol grubu kalsiyum yoğunluğunun Agm 40 mM grubu ve 40 mM Agm + R568 grubundan daha düşük olduğu görüldü ($P < 0,05$). 40 mM Agm + R568 grubunun kalsiyum yoğunluğu, Glu 30 mM grubu ve 40 mM Agm + NPS 2143 grubundan daha yüksekti ($P < 0,05$) (Şekil 4.17. ve tablo 4.14.). Agmatin 40 mM grubunun EAA değerinin yüksek olması ve NPS 2143 ile kombinasyonu sonucu yoğunluğun azalıp, R568 ile birlikte artmasından dolayı agmatinin kalsiyum aracılığıyla etki gösteriyor olabileceği düşünüldü.



Şekil 4.17. Agmatin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen $EAA_{Ca^{+2}}$ değerleri (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

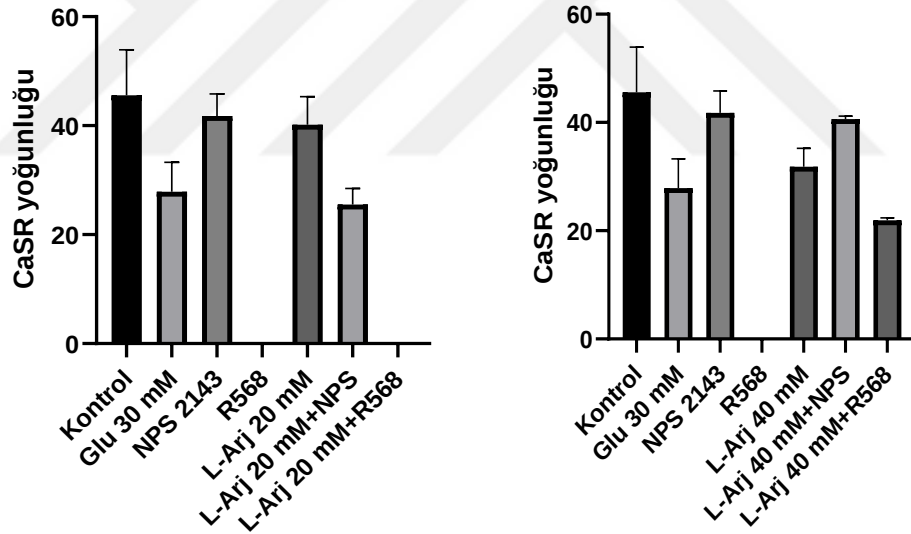
Tablo 4.14. L-arjinin, Agmatin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile NCI-H716 hücrelerinin $EAA_{Ca^{+2}}$ değerleri (ortalama $\pm$ standart hata) (* $P < 0,05$, **** $P < 0,0001$; kontrol grubuna göre).

Gruplar	$EAA_{Ca^{+2}}$
Kontrol	$43,53 \pm 1,75$
Glu 30 mM	$46,30 \pm 1,77$
L-Arj 40 mM	$72,78 \pm 1,06^{****}$
L-Arj 40 mM + NPS 2143	$32,75 \pm 2,92^*$
L-Arj 40 mM + R568	$54,21 \pm 0,91^*$
Agm 40 mM	$57,23 \pm 2,25$
Agm 40 mM + NPS 2143	$40,03 \pm 2,25$
Agm 40 mM + R568	$61,61 \pm 5,43^*$

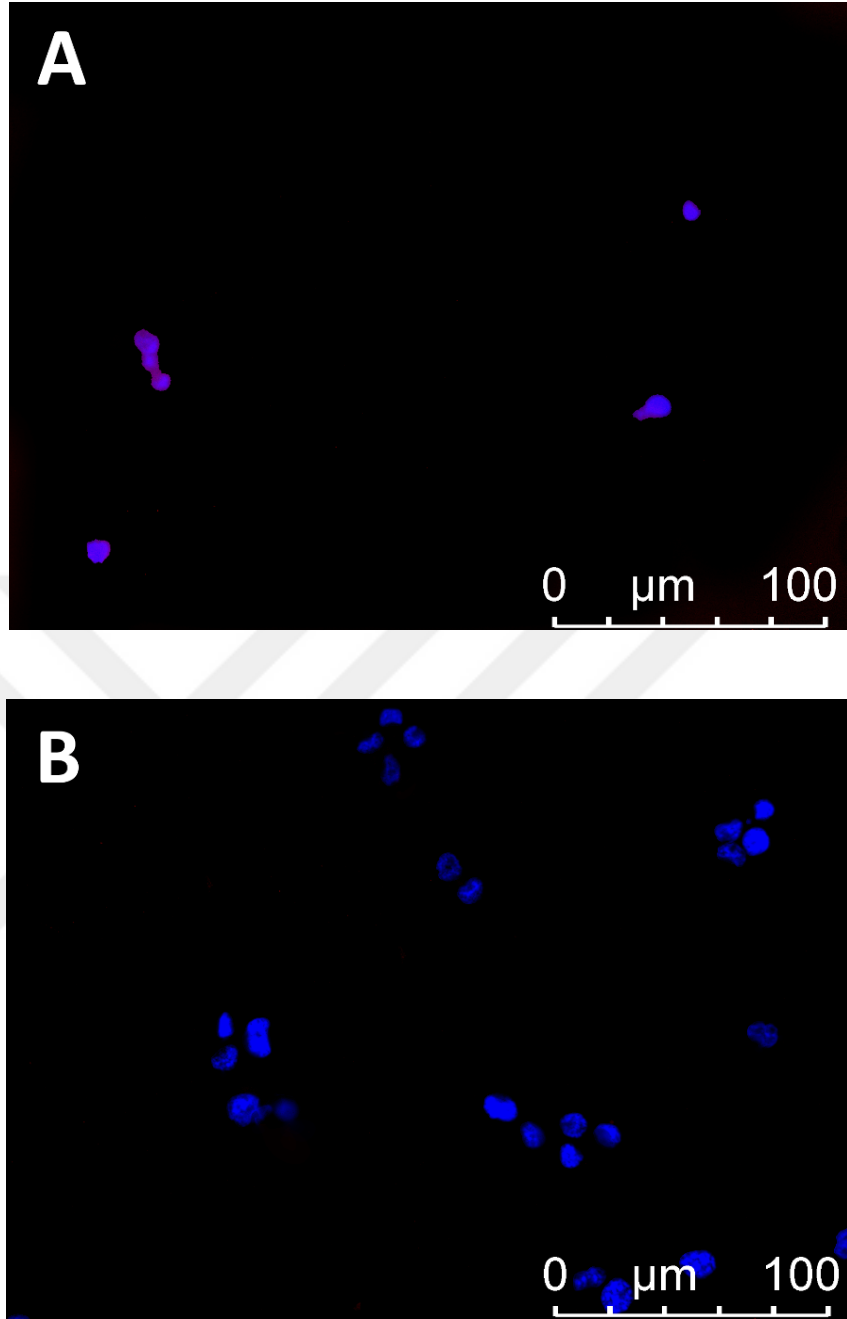
4.7. CaSR İmmünreaktivitesi

Agmatin, L-arjinin ve kombinasyonlarının uygulandığı grupların CaSR immünreaktivitelerine bakıldığında, R568 grubundaki hücrelerde CaSR immünreaktivitesi görülmedi. Bu durum CaSR'nin pozitif allosterik modülatörü olan R568'in tek başına CaSR düzeyine etkisi olmadığını ancak kalsiyum veya agonist varlığına bağlı olarak reseptörün aktivitesini artırıcı yönde etkilemekte olduğunu düşündürdü.

L-arjinin uygulanan gruplar incelendiğinde, 20 mM Arj + R568 grubunda R568 grubunda olduğu gibi CaSR immünreaktivitesi gözlenmedi (Şekil 4.18.). 20 mM L-arjinin + NPS grubunda, 20 mM L-arjinin grubuna göre daha düşük seviyede CaSR immünreaktivitesi görüldü ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (Şekil 4.19. ve tablo 4.15.).



Şekil 4.18. L-arjinin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen CaSR immünreaktivite şiddeti.

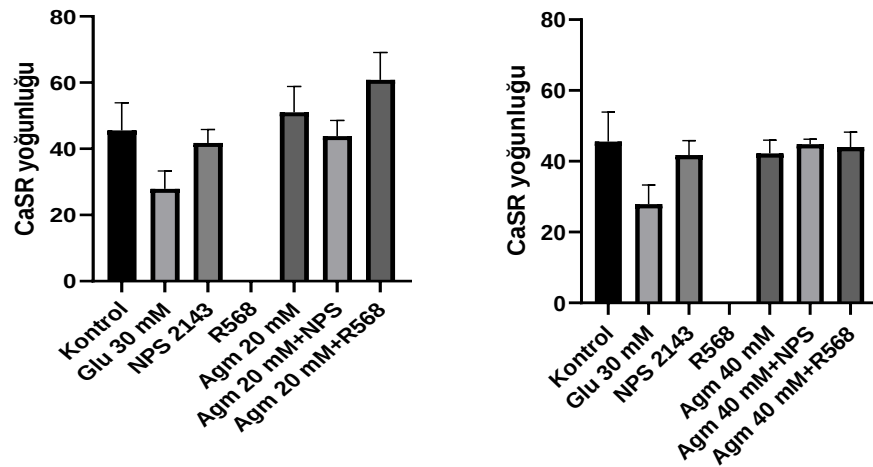


Şekil 4.19. A) L-arjinin 20 mM ve B) L-arjinin 20 mM + NPS 2143 gruplarının CaSR immünreaktivite şiddeti, 40x büyütme (mor renk CaSR varlığını göstermektedir).

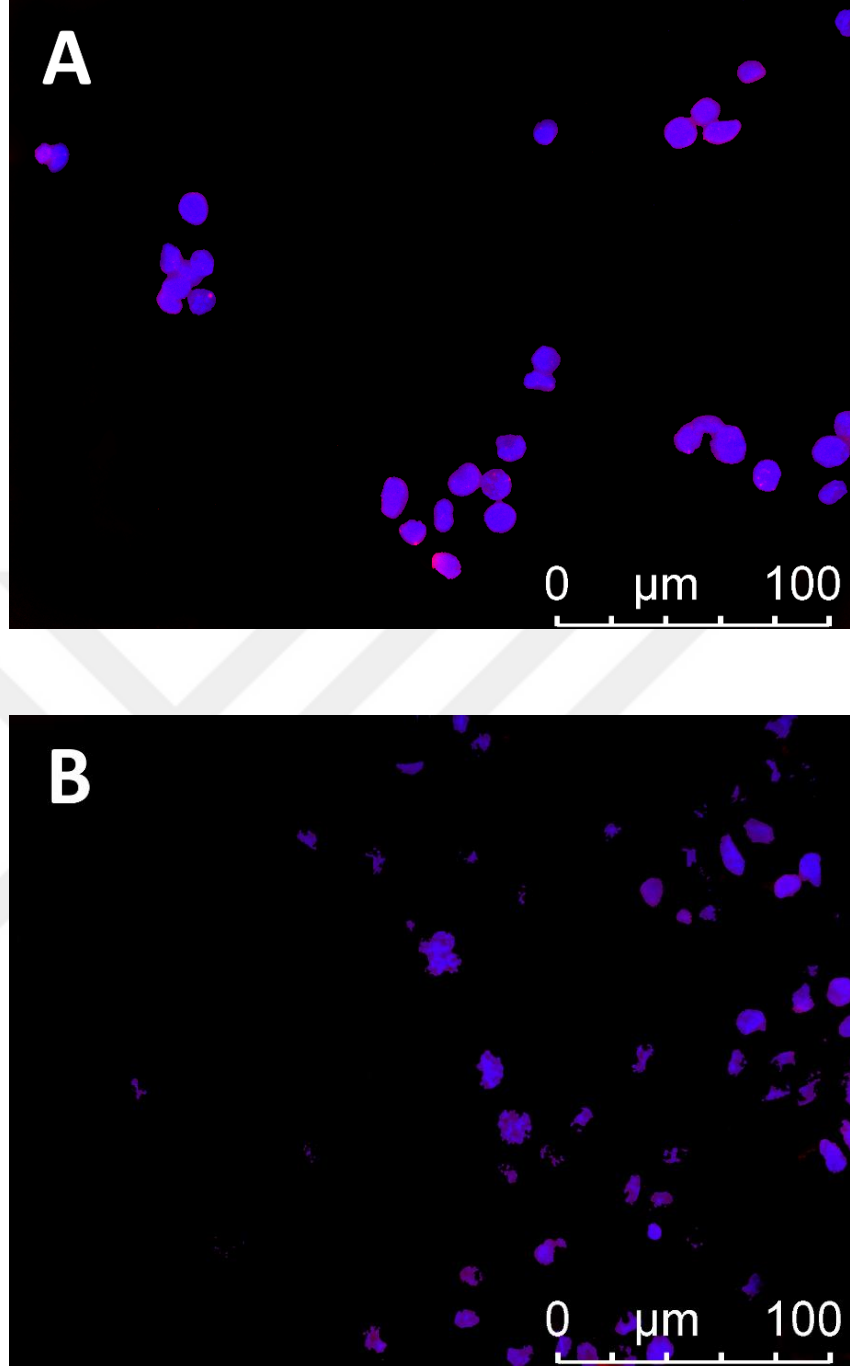
Tablo 4.15. L-arjinin ve kombinasyonların uygulamasından sonra NCI-H716 hücrelerinin CaSR immünreaktivite şiddeti (ortalama $\pm$ standart hata, * $P<0,05$; *** $P<0,001$; kontrol grubuna göre).

Gruplar	CaSR immünreaktivite şiddeti
Kontrol	45,59 $\pm$ 8,34
Glukoz 30 mM	27,89 $\pm$ 5,40
NPS 2143	41,76 $\pm$ 4,03
R568	0 ***
L-Arj 20 mM	40,16 $\pm$ 5,15
L-Arj 20 mM + NPS 2143	25,53 $\pm$ 2,96
L-Arj 20 mM + R568	0 ***
L-Arj 40 mM	31,83 $\pm$ 3,41
L-Arj 40 mM + NPS 2143	40,61 $\pm$ 0,53
L-Arj 40 mM + R568	21,91 $\pm$ 0,47 *

Agmatin uygulanan gruplar incelendiğinde ise, CaSR immünreaktivitesi 20 mM Agm + R568 grubunda glukoz grubundan daha yüksek bulundu ($P<0,05$). Agmatin ile birlikte R568 uygulandığında CaSR immünreaktivitesinin arttığı görüldü. 40 mM agmatinin tek başına uygulandığı grupta ise anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 4.20. ve tablo 4.16.). Ayrıca 20 mM agmatin ile NPS 2143'ün birlikte uygulandığı gruptaki hücrelerde immünreaktivitenin, 20 mM agmatin grubuna göre daha düşük seviyede olduğu gözlemlense de istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.21.).



Şekil 4.20. Agmatin, NPS 2143 ve R568 kombinasyonları ile elde edilen CaSR immünreaktivite şiddeti.



Şekil 4.21. A) Agmatin 20 mM ve B) Agmatin 20 mM + NPS 2143 gruplarının CaSR immünreaktivite şiddeti, 40x büyütme (mor renk CaSR varlığını göstermektedir).

Tablo 4.16. Agmatin ve kombinasyonların uygulamasından sonra NCI-H716 hücrelerinin CaSR immünreaktivite şiddeti (ortalama $\pm$ standart hata, $**P<0,01$; kontrol grubuna göre).

Gruplar	CaSR immünreaktivite şiddeti
Kontrol	45,59 $\pm$ 8,34
Glukoz 30 mM	27,89 $\pm$ 5,40
NPS 2143	41,76 $\pm$ 4,03
R568	0 **
Agm 20 mM	51,03 $\pm$ 7,81
Agm 20 mM + NPS 2143	43,81 $\pm$ 4,73
Agm 20 mM + R568	60,83 $\pm$ 8,24
Agm 40 mM	42,23 $\pm$ 3,74
Agm 40 mM + NPS 2143	44,84 $\pm$ 1,39
Agm 40 mM + R568	44,00 $\pm$ 4,24

5. TARTIŞMA

Bağırsaktan salgılanan hormonlar enerji homeostazı ve iştahın düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik etkiye sahiptir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bağırsaktan salgılanan hormonların obezite ve diyabet tedavisinde kullanılacak yeni hedef molekül ve stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunabileceğini göstermektedir (126). Bu nedenle bağırsaktan salgılanan GLP-1 ve PYY gibi hormonların, iştahı azaltıcı ve enerji metabolizmasını düzenleyici etkilerinin nasıl gerçekleştiğinin araştırılması önem arz etmektedir.

Diyabet tedavisinde önemli bir rol oynamaya başlayan GLP-1 ile ilişkili farmakoterapiler, yemek sonrası insülin salgısını artırırken, iştahı da baskılayarak kilo kaybına neden olmaktadır (127). GLP-1 hormonunun diyabet tedavisinde ilaç olarak kullanılması gündeme gelmiş olmasına rağmen, DPP-IV enzimi tarafından hızlı bir şekilde (1-2 dakika içinde) parçalanıyor olması etkinliğini sınırlamıştır (128). Son yıllarda GLP-1 analogları diyabet tedavisinde yaygın olarak kullanılsa da özellikle ilacın başlangıç dönemlerinde bulantı ve kusma gibi yan etkilerin görülmesi kullanımlarını zorlaştırmaktadır (129). Bu nedenle GLP-1 analoglarının yerine, GLP-1 hormonunun vücutta doğal yollardan salgılanmasını sağlayacak mekanizmaların araştırılması ve anlaşılması önemli hale gelmektedir. Bu şekilde, tedavi sürecinin daha organik ve etkili bir şekilde gerçekleştirilmesi ile potansiyel yan etkilerin ve tedavi uyumsuzluğunun önüne geçilebilir.

Özellikle karbonhidrat ve yağ içeren besinlerin alımının GLP-1 salgısını artırdığı bilinse de son yıllarda yapılan çalışmalar proteinlerin de GLP-1 salgısında etkili olduğunu göstermiştir (130-133). Bu sebeple çalışmamızda hücre kültüründe L-arjinin uygulamasına bağlı olarak GLP-1 salgısındaki değişim incelenmiştir. Enteroendokrin L hücrelerinden birlikte salınan GLP-1 ve PYY hormonlarının, metabolizma açısından benzer ya da birbirini tamamlayan etkiler gösterdiği düşünülmektedir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında her iki hormonun da salgısı ile aracı reseptör ve sinyal yolları hakkında bilgi elde edinilmeye çalışılmıştır.

L-arjinin takviyesinin hayvanlarda ve insanlarda olumlu metabolik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (64-67). Diyabetik sıçanlarda yapılan bir çalışmada, 10

mM L-arjinin enjeksiyonunun, 24 saatten itibaren glisemiye düzelttiği ve benzer şekilde hiperlipidemiye de azalttığı gösterilmiştir (134). Farelerle yapılan başka bir çalışmada, L-arjinin kullanımından 1-2 dakika sonra insülin ve glukagon salgısının maksimum seviyeye ulaştığı ve bunun hızlı bir süreç olduğu tespit edilmiştir (135, 136). Obez ergenlere sabit dozlu bir öğün ile L-arjinin, L-lösin, L-glutamin ve L-triptofan uygulandığında, L hücreleri tarafından dolaşıma salgılanan GLP-1'deki artışın aracılık ettiği bir anoreksijenik yanıtın oluştuğu belirlenmiştir (137). Hayvanlarda yapılan çalışmalar, L-arjininin gıda alımını azalttığını ve dolaşımdaki GLP-1 ile PYY düzeylerini artırdığını göstermiştir (55, 72, 109, 138). İnsan çalışmaları da L-arjininin PYY ve GLP-1 salgısını artırdığını ortaya koymuştur (131). Hücre kültürüyle yapılan çalışmalarda da L-arjinin uygulaması ile GLP-1 düzeyinin arttığı gösterilmiştir. Mürin primer kolonik L hücrelerinde yapılan bir çalışmada da L-arjininin GLP-1 ve PYY salgısını uyardığı ve 2 saat süreyle 100 mM L-Arj'ye maruz kalmanın kolonik kültürlerden PYY salgısını uyardığı ancak GLP-1 yanıtının farelere kıyasla kültürde daha zayıf şekilde olduğu görülmüştür (138).

Görüldüğü gibi yapılan çalışmalar L-arjininin inkretin hormon salgısına yol açtığını ortaya koymaktadır. Bizim çalışmamızda da bir insan enteroendokrin L hücre kültürü modeli (NCI-H716 hücreleri) kullanılarak L-arjininin GLP-1 ve PYY salgısı üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışmamızın sonucunda NCI-H716 hücrelerinde 20 ve 40 mM L-arjinin uygulamasının kontrole kıyasla GLP-1 salgısında herhangi bir değişikliğe yol açmadığı görülmüştür. Aynı şekilde 20 ve 40 mM L-arjinin uygulaması PYY salgısında da bir artışa sebep olmamıştır. Hatta 40 mM L-arjinin uygulaması, 20 mM L-arjine kıyasla daha düşük PYY düzeylerine neden olmuştur. Bu sonucun birkaç sebebi olabilir. Bunlardan ilki uyguladığımız L-arjinin dozlarının GLP-1 ve PYY salgısına yol açacak optimum dozlar olmaması olabilir. Diğer sebep GLP-1 ve PYY düzeylerinin 2 saatlik inkübasyon sırasında zamansal değişiminin incelenemeyişi olabilir. Alamshah ve ark. tarafından yapılan bir hücre kültürü çalışmasında 100 mM L-Arj ile GLP-1 ve PYY sekresyonlarının gerçekleştiği, GLP-1 ve PYY düzeylerindeki bu artışın 2 saatlik inkübasyonun 30. dakikasında belirgin olarak arttığı bulunmuştur (138). Hücre canlılıkları dikkate alınmadan daha geniş aralıktaki L-arjinin dozları denenerek ve hormon salgısındaki zamansal değişimler incelenerek bu soruların cevapları bulunabilir.

Çalışmamızda L-arjininin yanısıra bu amino asitin dekarboksilasyonu sonucu oluşan agmatinin de GLP-1 ve PYY salgısı üzerine etkileri araştırılmıştır. Nörotransmitter ve nöromodülatör özelliğe sahip olan agmatin hücrelerde endojen olarak üretilbildiği gibi diyet yoluyla ekzojen olarak da alınmaktadır. Agmatinin glukoz metabolizmasını düzenleyici etkileri ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. Fruktozdan zengin yemle beslenen sıçanlara agmatinin damar içine enjeksiyonundan 30 dakika sonra plazma glukoz seviyesinin azaldığı gösterilmiştir (139). Streptozotosin (STZ) ile diyabetik olan sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada, intraserebroventriküler agmatin enjeksiyonunun ortalama arter basıncını değiştirmeden konsantrasyona bağlı bir şekilde plazma glukoz seviyesini düşürdüğü görülmüştür (140). Hwang ve arkadaşları tarafından yapılan benzer bir çalışmada ise, STZ ile diyabetik olan sıçanlara açken 30 dakika boyunca intravenöz agmatin enjeksiyonundan sonra, sistolik kan basıncı değişmeden doz bağımlı bir şekilde plazma glukozunun düştüğü gözlenmiştir (141). Yine aynı şekilde diyabetik sıçanlara uzun süreli agmatin uygulamasının, kan şekeri düzeylerini önemli ölçüde azalttığı ve endotelial disfonksiyonu tersine çevirdiği görülmüştür (142). Diyabetik farelerde yapılan başka bir çalışmada, agmatinin plazma glukoz düzeyini düşürücü etkisinin, adrenal bezde bulunan imidazolin I2AR'nin aktivasyonu yoluyla tetiklendiği bulunmuştur (143). Diyabetik sıçanlarla yapılan başka bir çalışmada, yine agmatinin kan glukoz seviyesini düşürdüğü ve insülin salgısını artırdığı görülmüştür (144). Ayrıca agmatinin intraserebroventriküler STZ enjeksiyonu tarafından tetiklenen bilişsel gerilemeyi, beyinde insülin sinyal yollarını aktive ederek önlediği de gösterilmiştir (145).

Agmatinin insülin duyarlılığını artırıcı ve kan glukoz seviyesini düşürücü etkisi olduğu iyi bilinmesine rağmen, bu etkinin bağırsaklardan salgılanan inkretin hormonlar ile ilişkisi bilinmemektedir. Agmatinin glukoz metabolizmasındaki olumlu etkilerine insülin salgısını uyarıcı etki gösteren GLP-1 salgısının aracılık edip etmediği de bilinmemektedir. Bildiğimiz kadarıyla ilk kez bu çalışma ile agmatin ve GLP-1 ile PYY hormonları arasındaki ilişki incelenmiştir. Sonuçlarımız incelendiğinde, NCI-H716 hücrelerine tek başına uygulanan 20 ve 40 mM dozlarındaki agmatinin GLP-1 salgısında kontrole kıyasla bir artışa yol açmadığı görülmüştür. Benzer şekilde tek başına uygulanan agmatinin de PYY salgısında artışa yol açmadığı, hatta 40 mM

agmatin uygulamasının kontrol grubuna kıyasla PYY düzeylerini anlamlı derecede düşürdüğü bulunmuştur. Agmatin dozları ile elde edilen düşük hücre canlılık oranları da bu sonuçlar ile birlikte değerlendirildiğinde ileride yapılacak çalışmalarda daha düşük agmatin dozlarının denenmesi uygun olabilir.

G proteini ile eşleşmiş reseptörler (GPCR'ler), en büyük hücre zar reseptörleri ailesini oluşturmaktadır. Bu reseptörlerin birçoğu doğrudan besinler tarafından uyarılır veya düzenlenir. GPCR'ler arasında, kalsiyum algılayan reseptör (CaSR), hem kalsiyum hem de amino asitler tarafından ve aynı zamanda farklı katyonlar, poliaminler, polipeptitler gibi endojen ve eksojen bileşikler tarafından aktive veya modüle edilen tipik bir besin algılayan reseptördür. CaSR'nin ana ligandı olan kalsiyum iyonu pek çok hücresel işlev için gereklidir. Kalsiyum, sinyal iletimi sürecinde ikinci haberci görevi görenin yanı sıra, hücre zarı üzerindeki reseptörler tarafından doğrudan algılanan birinci haberci olarak da görev yapabilir. Genel olarak, hücre dışı Ca^{+2} konsantrasyonundaki ince değişiklikler, başta paratiroid bezi olmak üzere kemik, böbrek ve bağırsaklardaki çok sayıda CaSR tarafından algılanır ve kalsiyum homeostazi bu sayede sürdürülür.

Son yıllarda yapılan çalışmalar CaSR'nin moleküler yapısı ve çalışma şekli hakkında daha fazla bilgi sahibi olmamızı sağlamıştır. Liu ve ark. tarafından 2020 yılında yapılan bir çalışma Ca^{+2} 'nin tek başına CaSR'nin aktif konformasyonunu tamamen stabilize edebildiğini ancak amino asitlerin saf pozitif allosterik modülatörler gibi davrandığını ortaya koymuştur (146). Dolayısıyla Ca^{+2} 'nin etkisi amino asitlerin varlığında güçlenmektedir. Bir başka çalışma (protein açısından zengin bir öğünden sonra olacağı şekilde) plazma amino asit konsantrasyonundaki artışların Ca^{+2} 'nin CaSR üzerindeki etkisini artırdığını göstermiştir (147). Gerçekten de yemeklerden sonra fizyolojik olarak plazma PTH konsantrasyonunda azalma görülüyor olması bu sonuçları destekler mahiyettedir.

CaSR'ler aracılığıyla L-amino asitlerin inkretin hormon salgısına yol açtığına dair çalışmalar mevcuttur. CaSR'nin sıçanlarda intraduodenal L-triptofan uygulamasına akut yanıtta, GLP-1 salgısına aracılık ettiği daha önce tarafımızdan gösterilmiştir (116). Kemirgenlerde L-fenilalaninin (L-Phe) etkisinin değerlendirildiği bir başka çalışmada, L-Phe'nin GLP-1, PYY ve insülin salgısını uyardığı ve glukoz

toleransını artırdığı bulunmuştur. Ayrıca farelerde CaSR'nin farmakolojik olarak blokajının intra-ileal L-Phe'nin anorektik etkisini hafiflettiği ve STC-1 ve birincil L hücrelerinden L-Phe kaynaklı GLP-1 salgısının azaldığı tespit edilmiştir. Bu veriler sonucunda, L-Phe'nin anorektik etkilerine CaSR'lerin aracılık ettiği ve gastrointestinal kanalındaki L-Phe ve CaSR sisteminin obezite ve diyabet tedavisinde terapötik faydası olabileceği düşünülmüştür (117). Ayrıca, CaSR'nin L-amino asitlerle uyarılarak, duodenumdan kolesistokinin salgısına aracılık edebildiği gösterilmiştir (118, 119). Bu bulgular L-amino asitlerin, inkretin salgısını uyarmak için CaSR'leri uyardığını göstermektedir.

L-amino asitlerden biri olan L-arjininin bağırsak hormonlarının salgısını CaSR'ler aracılığıyla gerçekleştirdiğine dair çalışmalar da bulunmaktadır. Gıda alımını ve kan glukoz seviyelerini düzenlemede potansiyel bir role sahip olan L-arjinin, CaSR yoluyla kolesistokinin (CCK) ve GIP salgısını uyardığı gösterilmiştir (148). Mace ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, L-Arj'nin, sıçanların ince bağırsağında GIP, GLP-1 ve PYY salgısını indükleyen güçlü bir CaSR aktivatörü olduğu gösterilmiş ve oral L-arjininin *in vitro* bir GLP-1 sekretagogu olarak görev yaptığı bulunmuştur. Bu çalışmada izole sıçan ince bağırsaklarında L-Arj ile indüklenen GLP-1 ve PYY salgısının, bir CaSR antagonisti tarafından zayıflatıldığı bu nedenle bu duruma kısmen CaSR'nin aracılık ettiği düşünülmüştür (3).

Çalışmamızda L-arjinin ve agmatin uygulamalarına bağlı GLP-1 ve PYY salgısında CaSR'lerin aracı olup olmadığı da araştırılmıştır. Bu amaçla sırasıyla CaSR'nin pozitif ve negatif allosterik modülatörleri olan R568 ve NPS 2143 kullanılmıştır. Çalışmamızda her ne kadar agmatin ve L-arjininin tek başlarına uygulanmaları GLP-1 ve PYY salgısına yol açmamış olsa da NPS 2143 ile birlikte uygulandıkları gruplarda hormon salgısında azalma tespit edilmiştir. Özellikle 40 mM L-arjinin ile NPS 2143'ün birlikte uygulandığı grupta, tek başına 40 mM L-arjinin uygulamasına göre GLP-1 ve PYY düzeylerinde anlamlı azalma görülmüş ve bu nedenle NCI-H716 hücrelerinde L-arjinin uygulanmasına bağlı GLP-1 ve PYY hormonlarının salgısında CaSR'lerin aracılık ediyor olabileceği düşünülmüştür. Yine GLP-1 düzeyinin NPS 2143 ile azalırken, pozitif allosterik modülatör olan R568 ile artması bu hormonun salgısında CaSR'lerin etkisi olabileceği fikrini desteklemektedir.

L-arjinin uygulamasının hormon salgısını beklediğimiz kadar artırmaması, L-arjininin CaSR için en etkin amino asit olmaması ile açıklanabilir. L-fenilalanin ve L-triptofan gibi aromatik amino asitler CaSR'yi uyaran en kuvvetli amino asitlerdir. Aromatik amino asitlerin hormon salgısı açısından daha etkili olduğu ayrıca CaSR agonist ve antagonistlerine karşı daha hassas olduğu bilinmektedir (3). Amino asitlerin aslında CaSR için agonist olmaktan çok, pozitif allosterik modülatör gibi davranıyor olması ve kalsiyumsuz ortamda reseptör aktivitesinin bozuluyor olması da bir neden olabilir (146).

Agmatinin yağ metabolizması ile ilişkili olduğu da bilinmektedir. Yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda agmatinin kronik uygulaması ile vücut ağırlığı artışında ve yağ depolarında azalma olduğu görülmüştür. Dikkat çekici bir şekilde, bu çalışma ayrıca uzun süreli agmatin tüketiminin vücut ağırlığı ve yağlanma üzerindeki etkilerinin yağ oksidasyonu ve glukoneogenezin düzenlenmesine bağlı olabileceğini göstermiştir (97). İnsanlarda PYY'nin periferik infüzyonunun enerji harcamasını ve yağ oksidasyonunu artırdığı bilindiğinden, agmatinin bu etkisinde PYY hormonunun rol alıyor olması mümkündür (149). Ancak çalışmamızda NCI-H716 hücrelerine 20 ve 40 mM konsantrasyonlarında agmatin uygulandığında, PYY düzeyinde kontrole göre anlamlı bir artış saptanamamıştır. 20 ve 40 mM agmatin ile NPS 2143'ün birlikte uygulandığı gruplardaki PYY düzeyinin kontrole göre anlamlı şekilde düşük bulunması agmatin uygulamasına bağlı olarak PYY salgısında CaSR'lerin rolü olabileceğini düşündürmüştür.

Literatür incelendiğinde bizim çalışmamız dışında agmatinin GLP-1 ve PYY salgısına yol açıp açmadığını, yol açıyorsa aracılık eden reseptörü araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Hatta literatürde agmatin ve CaSR arasındaki ilişkiyi araştıran sadece tek bir çalışma bulunmuştur. Sibirya yer sincaplarının kardiyomiyositlerinde agmatinin hücre içi Ca^{+2} düzeyi üzerindeki etki mekanizmasının araştırıldığı bu çalışmada, agmatinin düşük dozlarının (500 μM 'ye kadar) etkili olduğu ve ilk kez agmatin tarafından Ca^{+2} düzenlenmesi ve kardiyomiyosit kasılmasının CaSR modülasyonu ile gerçekleştiği gösterilmiştir (115). Bu çalışma diğer dokularda da agmatinin CaSR üzerinden etkiler gerçekleştirebileceği fikrini gündeme getirmektedir. Bizim çalışmamızda da agmatin-CaSR ilişkisinin araştırılması amacıyla agmatin ile birlikte CaSR'nin sırasıyla pozitif ve negatif

allosterik modölatörleri olan R568 ve NPS 2143 kullanılmış ve L-arjinin gibi agmatin grubunda da NPS 2143 ile birlikte hormon salgısının azaldığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla agmatinin CaSR'ler aracılığıyla hormon salgısını gerçekleştiriyor olması muhtemeldir. Deneylerimizin sonucunda agmatinin doğrudan hormon salgılatıcı etkisini gösterememiş olmamız ya da bazı tutarsız sonuçlar elde etmiş olmamız agmatin konsantrasyonlarını yüksek tutmuş olmamızdan kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızda arjinin ve agmatinin GLP-1 ve PYY hormonlarının salgısına etkisi incelenirken, bu hormonların salgısında en güçlü uyaran olduğu bilinen glukoz, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Glukoz alımına bağlı olarak enteroendokrin L hücrelerinden güçlü bir şekilde GLP-1 ve PYY salgılandığı bilinmektedir (150-153). Literatürle uyumlu şekilde bizim çalışmamızda da 30 mM glukoz uygulanan gruptaki GLP-1 ve PYY düzeylerinin diğer gruplara nazaran yüksek olduğu görülmüştür.

Glukozun GLP-1 ve PYY salgısına yol açtığı ancak bu etkiyi CaSR dışında başka reseptörler aracılığıyla gerçekleştirdiği bilinmektedir. İnsan bağırsağında yapılan bir çalışmada, glukozla uyarılmış GLP-1 ve PYY'nin salgısının, bir tatlı tat antagonisti tarafından azaltıldığı ve bu insanlarda her iki peptitin glukozla uyarılmış salgısında bağırsakta ifade edilen tatlı tat reseptörlerinin görev aldığı bulunmuştur (152). Ayrıca insanlarda glukozun, enterik endokrin hücrelerdeki tatlı tat reseptörü (T1R2/T1R3) aracılığıyla gastrointestinal tokluk hormonlarının salgısını tetikleyebildiği gösterilmiştir (154).

Çalışmamızda L-arjinin ve agmatin uygulamasıyla ortaya çıkacak CaSR aktivitesinin hücre içi sinyal mekanizmalarına yönelik olarak hücre içi cAMP düzeyi ve kalsiyum yoğunluğu da ölçülmüştür. CaSR uyarılması ile aktive olan ikinci mesajcılar ve sinyal yolları, CaSR ifade eden dokuların tipine göre değişkenlik göstermektedir. L-arjinin uygulamasına bağlı olarak hücrelerde kalsiyum düzeyinde artış olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. 20 mM L-Arj'nin uygulandığı bir çalışmada, CCK ve GIP salgılaması artan hücre dışı Ca^{+2} konsantrasyonlarıyla önemli ölçüde artmıştır. Bu çalışma, hücre dışı Ca^{+2} konsantrasyonunun L-Arj ile indüklenen CCK ve GIP salgısı için gerekli olduğunu göstermiştir (114). Fare insülinom 6 (MIN6 hücre hattı) hücrelerine 10 mM L-arjininin uygulandığı başka bir çalışmada, hem inositol-1,4,5-trifosfat (IP_3) hem de Ca^{+2} 'nin serbest hücre içi konsantrasyonlarında artışa neden olduğu bulunmuştur (155). İnsan beta hücrelerine (EndoC-BH1 hücre

hattı) 20 mM olacak şekilde L-arjininin uygulandığı başka bir çalışmada, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun arttığı ancak GLP-1 salgısının Ca^{+2} artışının büyüklüğü veya zamanı ile değişmediği gösterilmiştir (156). İnsan böbrek hücrelerinde (HK-2 hücre hattı) yapılan başka bir çalışmada da, L-arjininin CaSR ile etkileşerek Ca^{+2} sinyallemesini aktive ettiği belirlenmiştir (157).

Literatürdeki bilgiler göz önüne alınarak çalışmamızda NCI-H716 hücrelerine L-arjinin uygulamasının Ca^{+2} düzeyini değiştirip değiştirmediği araştırılmıştır. Sonuç olarak 40 mM L-Arj grubunda kalsiyum yoğunluğunun yüksek olduğu ve 40 mM L-Arj + NPS 2143 grubunda kontrole göre daha düşük düzeyde olduğu görülmüştür. 40 mM L-Arj grubunun NPS 2143 ile kombinasyonuna bağlı olarak $EAA_{Ca^{+2}}$ değerinin düşük çıkması, enteroendokrin L hücrelerinde CaSR aktivasyonunun kalsiyum düzeyindeki değişiklikler ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Literatüre bakıldığında agmatinin de hücre içi Ca^{+2} düzeyini artırıcı yönde etki ettiği görülmektedir. Agmatinin, endotel hücrelerinde nitrik oksit (NO) son ürün oluşumunu ve hücre içi Ca^{+2} geçişlerini artırdığı bilinmektedir. NO ve agmatinin, kültürdeki hücrelerde ryanodin reseptör aracılı Ca^{+2} salgısını uyarmak için sinerjistik bir şekilde etki gösterebildiği bulunmuştur (158). Kardiyomiyositler üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise, agmatinin kendiliğinden aktif kardiyomiyositlerde hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu değişikliklerinin dinamiklerini etkilediği gösterilmiştir. Ortalama hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu, agmatin dozuna bağlı olarak farklı şekillerde değişim göstermiştir: 1-500 μ M arasındaki agmatin dozlarının hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu azalttığı, 500 μ M - 2 mM arasındaki agmatin dozlarının hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu değiştirmedeği ve 2 mM'nin üzerindeki konsantrasyonlarda agmatinin hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu arttığı gösterilmiştir (159).

Agmatinin, $\alpha 2$ -adrenerjik veya imidazolin reseptörlerine bağlanmasından bağımsız olarak gerçekleştirdiği bazı diğer etkileri de vardır. Agmatinin, kalp ve sinir dokusunda hücrelere kalsiyumun girişini azaltmak için voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını inhibe ettiği gösterilmiştir (160). Ventriküler kardiyomiyositlerde yapılan başka bir çalışmada agmatinin, gerilime bağımlı Ca^{+2} girişini engelleyebildiği ve hücre içi Ca^{+2} seviyelerini azaltabildiği de gösterilmiştir (115). Çalışmamızda 40 mM Agm uygulanan grupta, 40 mM L-Arj grubunda olduğu gibi diğer gruplara kıyasla kalsiyum

yoğunluğunun yüksek oluşu ve NPS 2143 ile kombinasyonu sonrası kalsiyum düzeyinin düşmesi, L-arjinin ile benzer şekilde agmatin 40 mM grubunun $EAA_{Ca^{+2}}$ değerinin yüksek olması ve NPS 2143 ile kombinasyonu sonucu değerin azalıp R568 ile birlikte artması, agmatinin CaSR'ler aracılığıyla kalsiyum düzeyini değiştiriyor olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda agmatin ile birlikte CaSR'nin pozitif allosterik modülatörü olan R568 uygulandığında CaSR immünreaktivite şiddetinin arttığı gözlenmiştir. Bu durumda R568'in tek başına CaSR immünreaktivite şiddetine etkisi olmadığı ancak kalsiyum veya bir başka agonist varlığına bağlı olarak reseptörün aktivitesini artırıcı yönde etkileyebildiği söylenebilir. 20 mM Arj ile R568'in birlikte uygulandığı grupta ise R568 grubunda olduğu gibi CaSR immünreaktivite şiddeti olan hücre görülmemiştir. Agmatin uygulanan dozlarla benzer şekilde, 20 mM L-arjinin ile NPS'nin birlikte uygulandığı grubun, 20 mM L-arjinin grubuna göre daha düşük immünreaktivite şiddeti olduğu görülsede istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Kalsiyum düzeyleri ile CaSR immünreaktivite şiddetinin benzer oranlarda olmadığı da tespit edilmiştir. Bu durum artan kalsiyum konsantrasyonunun CaSR'ler dışında başka reseptörler ve sinyal yolları aracılığıyla olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca ortamda CaSR'nin esas ligandı olan kalsiyumun varlığında, L-arjinin ve agmatin ile NPS 2143 ve R568'in kombinasyonunun uygulanması sonucunda CaSR'lerin immünreaktivite şiddetinin daha net bir şekilde görülebileceği öngörülebilir.

Literatürde CaSR stimülasyonunun aynı zamanda azalmış hücresel cAMP'ye yol açtığı gösterilmiştir (161). CaSR stimülasyonunun hem cAMP seviyesini hem de cAMP bağımlı protein kinaz A (PKA) aktivitesini azalttığı bilinmektedir (162). CaSR'nin, hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunda artışa yol açan Gq-PI-PLC yolak aktivasyonuna aracılık ettiği bildirilmiş ve birkaç hücre tipinde Gi-cAMP sinyaliyle cAMP birikiminin inhibisyonuna neden olduğu görülmüştür (163). CaSR aktivasyonu ve kalsimimetik R568 uygulaması ile Ca^{+2} konsantrasyonunda önemli bir artışın olduğu, R568 uygulamasının hücresel cAMP'yi önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (164). CaSR agonistlerinin insan embriyo böbrek hücrelerinde (HEK293 hücre hattı) cAMP birikimini inhibe ettiği de gösterilmiştir (165).

Agmatinin de cAMP düzeylerini etkilediği literatürde gösterilmiştir. Sıçanlara uzun süreli agmatin tedavisi uygulanan bir çalışmada, agmatinin cAMP düzeyini artırdığı, agmatinin metabolizma üzerindeki etkilerine cAMP-PKA'nın aracılık edebildiği ve obezite ile ilişkili metabolik ve hormonal bozuklukları azaltabildiği gösterilmiştir (166). Bizim çalışmamızda 40 mM agmatin + NPS 2143 grubunda, R568, 40 mM agmatin ve 40 mM agmatin + R568 gruplarına kıyasla daha düşük cAMP düzeyi olduğu, 20 mM L-arjinin ve kombinasyonlarının arasında anlamlı fark olmadığı ve cAMP düzeyini etkilemediği ancak 40 mM L-arjinin ile NPS 2143'ün birlikte uygulandığı grupta düşüş görülmesine rağmen anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Literatürdeki veriler göz önüne alındığında, cAMP düzeyinin CaSR dışında başka reseptörler üzerinden etkilenmiş olması olasıdır.

Çalışmamızda NCI-H716 hücrelerine 20 μ M olacak şekilde NPS 2143 uygulanması sonucu hücre canlılığının kontrole göre arttığı tespit edilmiştir. Literatürde yapılan bazı çalışmalarda da benzer şekilde NPS 2143 uygulamasına bağlı olarak hücrelerde proliferasyonun arttığı gösterilmiştir. İnsan akciğer kanseri hücrelerine (A549 hücre hattı) 24 saat boyunca NPS 2143'ün uygulandığı bir çalışmada, hücre proliferasyonunda değişiklikler gözlemlenmiş ve uygulama yapılmamış gruba kıyasla, tüm NPS 2143 uygulamalarının (0,025, 0,05, 0,1 ve 1 μ M) A549 hücre büyümesini teşvik ettiği gösterilmiştir (167). İnsan kolon kanseri hücrelerine (HT29 hücre hattı) NPS 2143'ün uygulandığı başka bir çalışmada, CaSR'nin ihmal edilebilir düzeyde ifadesi olan durumlarda hücre çoğalmasını artırdığı ve apoptozu engellediği gösterilmiştir. Bu beklenmedik sonuçlar, NPS 2143'ün CaSR aktivitesini düzenleme dışında ilave etkilerinin olduğunu düşündürmektedir. İlginç bir şekilde, 1 μ M NPS 2143'ün, HT29 hücrelerinde CaSR ifadesini hem mRNA hem de protein düzeyinde artırdığı gösterilmiştir. Fonksiyonel verilerde görülen etkilerin, NPS 2143'ün yeni sentezlenen CaSR'yi hedeflemesinden kaynaklanıp kaynaklanmadığı, ya da yan etkiler mi (veya her ikisi birden) olduğu net bir şekilde bilinmemektedir (168). Zhao ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada da, CaSR'nin negatif allosterik modülatörü olan NPS 2143'ün AC-V/cAMP/RAS yolu aktivasyonu aracılığıyla SHR vasküler düz kas hücrelerinde çoğalmayı teşvik ettiği ve apoptozu engellediği gösterilmiştir (169).

Çalışmamızda hücrelere uyguladığımız NPS 2143'ün hücre canlılığını artırıcı etkisinde DMSO'nun da uyarıcı etkisi olabileceği düşünülmüştür. NPS 2143, literatür bilgileri ışığında DMSO içerisinde çözünerek hazırlanmıştır. DMSO ve hücre çoğalması ile ilişkili yapılan çalışmalara bakıldığında, DMSO'nun düşük konsantrasyonlarının bazı hücre tiplerinin çoğalmasını uyarabildiği görülmüştür. %0,05-0,2 DMSO'nun uygulandığı bir çalışmada, DMSO'nun RPMI-8226 miyeloma hücrelerinin canlı hücre sayıları ve hücre çoğalma analizi ile tespit edilen hücre büyümesini önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir (170). Ayrıca DMSO'nun %2'ye kadar olan konsantrasyonlarının sitotoksositeye neden olmadığı da bilinmektedir (171).



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Hücre Canlılığı

- NCI-H716 hücrelerinin 10, 20, 40, 60 ve 80 mM agmatin ve L-arjinin konsantrasyonları ile 2 saatlik inkübasyonu sonrası, her ikisinde de 40 mM'lık konsantrasyonda hücre canlılığının en fazla olduğu bulundu.
- NCI-H716 hücrelerinin 5, 10, 20, 40 ve 80 μ M NPS 2143 ve R568 konsantrasyonları ile 2 saatlik inkübasyonu sonrası, her ikisinde de 20 μ M'lık konsantrasyonda hücre canlılığının en fazla olduğu bulundu.
- NCI-H716 hücrelerine agmatin uygulaması kontrole göre hücre canlılığında azalmaya yol açtı.
- NCI-H716 hücrelerine L-arjinin uygulaması hücre canlılığını artırdı; en belirgin artış 40 mM L-arjinin uygulanan grupta görüldü.

Hormon Düzeyleri

- NCI-H716 hücrelerine 20 mM ve 40 mM agmatin ve L-arjinin uygulamaları GLP-1 ve PYY hormonlarının salgısında belirgin bir artışa yol açmadı.
- Agmatin ve L-arjininin CaSR'nin negatif allosterik modülatörü olan NPS 2143 ile birlikte uygulanması GLP-1 ve PYY salgısında azalmaya yol açtı.

İkinci Mesajcılar

- NCI-H716 hücrelerinde GLP-1 ve PYY salgısında hücre içi ikinci mesajcılar belirlemeye yönelik çalışmaların sonucunda 40 mM agmatin + NPS 2143 grubunda cAMP seviyesinde düşüş, 40 mM agmatin + R568 grubunda ise cAMP seviyesinde artış görüldü.
- 40 mM L-arjinin ile hücre içi kalsiyum yoğunluğunun arttığı ve NPS 2143 ile birlikte uygulandığında da azaldığı bulundu.
- CaSR immünreaktivite şiddeti değerlendirildiğinde ise gruplar arasında fark bulunamadı.

ÖNERİLER

- Deneylerin CaSR'nin esas ligandı olan kalsiyumun varlığında tekrar edilmesi ile L-arjinin ve agmatinin GLP-1 ve PYY salgısındaki rolleri (agonist veya allosterik modölatör olarak) netleştirilebilir.
- NCI-H716 hücrelerinin L-arjinin ve agmatin ile daha uzun süreler inkübe edilmesiyle ya da daha düşük/yüksek konsantrasyonların denenmesiyle GLP-1 ve PYY hormonlarının salgısındaki değişiklikler daha doğru değerlendirilebilir.
- GLP-1 ve PYY salgısındaki değişikliklerin zaman içerisindeki seyrinin incelenmesiyle (örneğin 30 dk. ara ile) NCI-H716 hücrelerinden hormon salgısına yönelik dinamikler daha doğru olarak belirlenebilir.

Sonuç olarak, insan enteroendokrin L-hücre hattı olan NCI-H716 hücrelerinde L-arjinin ve agmatinin bu çalışmada denenilen dozları belirgin bir hormon salgısına yol açmazken, NPS 2143 uygulamasına bağlı olarak hem hormon hem de cAMP/kalsiyum düzeylerinde değişiklikler meydana geliyor olması GLP-1 ve PYY salgısında CaSR'lerin rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bu fikri destekleyecek daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 2007;132(6):2131-57.
2. Ballantyne GH. Peptide YY(1-36) and peptide YY(3-36): Part I. Distribution, release and actions. *Obes Surg*. 2006;16(5):651-8.
3. Mace OJ, Schindler M, Patel S. The regulation of K- and L-cell activity by GLUT2 and the calcium-sensing receptor CasR in rat small intestine. *J Physiol*. 2012;590(12):2917-36.
4. Piletz JE, Aricioglu F, Cheng JT, Fairbanks CA, Gilad VH, Haenisch B, et al. Agmatine: clinical applications after 100 years in translation. *Drug Discov Today*. 2013;18(17-18):880-93.
5. Rasoamanana R, Darcel N, Fromentin G, Tomé D. Nutrient sensing and signalling by the gut. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2012;71(4):446-55.
6. Habib AM, Richards P, Rogers GJ, Reimann F, Gribble FM. Co-localisation and secretion of glucagon-like peptide 1 and peptide YY from primary cultured human L cells. *Diabetologia*. 2013;56(6):1413-6.
7. Spreckley E, Murphy KG. The L-Cell in Nutritional Sensing and the Regulation of Appetite. *Front Nutr*. 2015;2:23.
8. Moore B. On the treatment of Diabetes mellitus by acid extract of Duodenal Mucous Membrane. *Biochem J*. 1906;1(1):28-38.
9. Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ, Jr., Arai Y. Plasma Insulin Response to Oral and Intravenous Glucose Administration. *J Clin Endocrinol Metab*. 1964;24:1076-82.
10. Perley MJ, Kipnis DM. Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest*. 1967;46(12):1954-62.
11. Buffa R, Polak JM, Pearse AG, Solcia E, Grimelius L, Capella C. Identification of the intestinal cell storing gastric inhibitory peptide. *Histochemistry*. 1975;43(3):249-55.
12. Bell GI, Sanchez-Pescador R, Laybourn PJ, Najarian RC. Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. *Nature*. 1983;304(5924):368-71.
13. Creutzfeldt W. The incretin concept today. *Diabetologia*. 1979;16(2):75-85.
14. Orskov C. Glucagon-like peptide-1, a new hormone of the entero-insular axis. *Diabetologia*. 1992;35(8):701-11.
15. Brubaker PL. Minireview: update on incretin biology: focus on glucagon-like peptide-1. *Endocrinology*. 2010;151(5):1984-9.
16. White JW, Saunders GF. Structure of the human glucagon gene. *Nucleic Acids Res*. 1986;14(12):4719-30.
17. Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF. Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J Biol Chem*. 1986;261(25):11880-9.
18. Damholt AB, Buchan AM, Holst JJ, Kofod H. Proglucagon processing profile in canine L cells expressing endogenous prohormone convertase 1/3 and prohormone convertase 2. *Endocrinology*. 1999;140(10):4800-8.
19. Kim W, Egan JM. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev*. 2008;60(4):470-512.
20. Opinto G, Natalicchio A, Marchetti P. Physiology of incretins and loss of incretin effect in type 2 diabetes and obesity. *Arch Physiol Biochem*. 2013;119(4):170-8.

21. Lambeir AM, Durinx C, Scharpe S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2003;40(3):209-94.
22. Kieffer TJ, McIntosh CH, Pederson RA. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology*. 1995;136(8):3585-96.
23. Ahren B. DPP-4 inhibitors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2007;21(4):517-33.
24. Ahren B, Pacini G, Foley JE, Schweizer A. Improved meal-related beta-cell function and insulin sensitivity by the dipeptidyl peptidase-IV inhibitor vildagliptin in metformin-treated patients with type 2 diabetes over 1 year. *Diabetes Care*. 2005;28(8):1936-40.
25. Pospisilik JA, Martin J, Doty T, Ehses JA, Pamir N, Lynn FC, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor treatment stimulates beta-cell survival and islet neogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 2003;52(3):741-50.
26. Plamboeck A, Holst JJ, Carr RD, Deacon CF. Neutral endopeptidase 24.11 and dipeptidyl peptidase IV are both mediators of the degradation of glucagon-like peptide 1 in the anaesthetised pig. *Diabetologia*. 2005;48(9):1882-90.
27. Kuhre RE, Holst JJ, Kappe C. The regulation of function, growth and survival of GLP-1-producing L-cells. *Clinical Science*. 2016;130(2):79-91.
28. Williams DL. Neural integration of satiation and food reward: role of GLP-1 and orexin pathways. *Physiol Behav*. 2014;136:194-9.
29. Campbell JE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab*. 2013;17(6):819-37.
30. Reimer RA. Meat hydrolysate and essential amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion, in the human NCI-H716 enteroendocrine cell line, is regulated by extracellular signal-regulated kinase1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Journal of Endocrinology*. 2006;191(1):159-70.
31. Reimer RA, Darimont C, Gremlich S, Nicolas-Metral V, Ruegg UT, Mace K. A human cellular model for studying the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology*. 2001;142(10):4522-8.
32. Anini Y, Brubaker PL. Muscarinic receptors control glucagon-like peptide 1 secretion by human endocrine L cells. *Endocrinology*. 2003;144(7):3244-50.
33. Anini Y, Brubaker PL. Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetes*. 2003;52(2):252-9.
34. Lim GE, Huang GJ, Flora N, LeRoith D, Rhodes CJ, Brubaker PL. Insulin regulates glucagon-like peptide-1 secretion from the enteroendocrine L cell. *Endocrinology*. 2009;150(2):580-91.
35. Lauffer LM, Iakoubov R, Brubaker PL. GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal enteroendocrine L-cell. *Diabetes*. 2009;58(5):1058-66.
36. Mulherin AJ, Oh AH, Kim H, Grieco A, Lauffer LM, Brubaker PL. Mechanisms underlying metformin-induced secretion of glucagon-like peptide-1 from the intestinal L cell. *Endocrinology*. 2011;152(12):4610-9.
37. Jang H-J, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim B-J, Zhou J, et al. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(38):15069-74.

38. Chen Y, Li Z-Y, Yang Y, Zhang H-J. Uncoupling protein 2 regulates glucagon-like peptide-1 secretion in L-cells. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2012;18(26):3451.
39. Kuhre RE, Albrechtsen NJW, Deacon CF, Balk-Møller E, Rehfeld JF, Reimann F, et al. Peptide production and secretion in GLUTag, NCI-H716 and STC-1 cells: a comparison to native L-cells. *Journal of molecular endocrinology*. 2016;56(3):201.
40. Drucker DJ, Jin T, Asa SL, Young TA, Brubaker PL. Activation of proglucagon gene transcription by protein kinase-A in a novel mouse enteroendocrine cell line. *Molecular endocrinology*. 1994;8(12):1646-55.
41. Hand KV, Bruen CM, O'Halloran F, Panwar H, Calderwood D, Giblin L, et al. Examining acute and chronic effects of short-and long-chain fatty acids on peptide YY (PYY) gene expression, cellular storage and secretion in STC-1 cells. *European journal of nutrition*. 2013;52:1303-13.
42. Reimann F, Habib AM, Tolhurst G, Parker HE, Rogers GJ, Gribble FM. Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell metabolism*. 2008;8(6):532-9.
43. Spreckley E, Murphy KG. The L-cell in nutritional sensing and the regulation of appetite. *Frontiers in nutrition*. 2015;2:23.
44. Tatemoto K. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(18):5485-9.
45. Lloyd KC, Grandt D, Aurang K, Eysselein VE, Schimiczek M, Reeve JR, Jr. Inhibitory effect of PYY on vagally stimulated acid secretion is mediated predominantly by Y1 receptors. *Am J Physiol*. 1996;270(1 Pt 1):G123-7.
46. Konturek PC, Konturek JW, Czesnikiewicz-Guzik M, Brzozowski T, Sito E, Konturek SJ. Neuro-hormonal control of food intake: basic mechanisms and clinical implications. *J Physiol Pharmacol*. 2005;56 Suppl 6:5-25.
47. Wu G, Morris SM, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*. 1998;336 (Pt 1):1-17.
48. Campbell BI, La Bounty PM, Roberts M. The ergogenic potential of arginine. *J Int Soc Sports Nutr*. 2004;1(2):35-8.
49. Şahin ZS, Öztürk Z, Yurdakul Ö, Köse DA. The structural and thermal characterization of new Cu-Arginate complex; experimental and simulated hydrogen adsorption properties. 2016.
50. Morris SM, Jr. Arginine Metabolism Revisited. *J Nutr*. 2016;146(12):2579S-86S.
51. Bratt JM, Zeki AA, Last JA, Kenyon NJ. Competitive metabolism of L-arginine: arginase as a therapeutic target in asthma. *Journal of biomedical research*. 2011;25(5):299-308.
52. Hu S, Han M, Rezaei A, Li D, Wu G, Ma X. L-Arginine Modulates Glucose and Lipid Metabolism in Obesity and Diabetes. *Curr Protein Pept Sci*. 2017;18(6):599-608.
53. Dubey H, Dubey A, Gulati K, Ray A. Protective effects of L-arginine on cognitive deficits and biochemical parameters in an experimental model of type-2 diabetes mellitus induced Alzheimer's disease in rats. *J Physiol Pharmacol*. 2022;73(1).
54. Alba-Roth J, Muller OA, Schopohl J, von Werder K. Arginine stimulates growth hormone secretion by suppressing endogenous somatostatin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988;67(6):1186-9.

55. Clemmensen C, Smajilovic S, Smith EP, Woods SC, Brauner-Osborne H, Seeley RJ, et al. Oral L-arginine stimulates GLP-1 secretion to improve glucose tolerance in male mice. *Endocrinology*. 2013;154(11):3978-83.
56. Adeghate E, Ponery AS, El-Sharkawy T, Parvez H. L-arginine stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. *Amino Acids*. 2001;21(2):205-9.
57. Bellone J, Valetto MR, Aimaretti G, Segni M, Volta C, Cardinale G, et al. Effects of phenylalanine, histidine, and leucine on basal and GHRH-stimulated GH secretion and on PRL, insulin, and glucose levels in short children. Comparison with the effects of arginine. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 1996;9(5):523-31.
58. Floyd JC, Jr., Fajans SS, Conn JW, Knopf RF, Rull J. Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J Clin Invest*. 1966;45(9):1487-502.
59. Hermans MP, Schmeer W, Henquin JC. The permissive effect of glucose, tolbutamide and high K⁺ on arginine stimulation of insulin release in isolated mouse islets. *Diabetologia*. 1987;30(8):659-65.
60. Smith PA, Sakura H, Coles B, Gummerson N, Proks P, & Ashcroft F. M. Electrogenic arginine transport mediates stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic beta-cells. *The Journal of physiology*. 1997;499(3):625-35.
61. Weinhaus AJ, Poronnik P, Tuch B. E., & Cook D. I. Mechanisms of arginine-induced increase in cytosolic calcium concentration in the beta-cell line NIT-1. *Diabetologia*. 1997;40(4):374-82.
62. Ishiyama N, Ravier MA, Henquin JC. Dual mechanism of the potentiation by glucose of insulin secretion induced by arginine and tolbutamide in mouse islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290(3):E540-9.
63. Villalobos C, Nunez L, Garcia-Sancho J. Mechanisms for stimulation of rat anterior pituitary cells by arginine and other amino acids. *J Physiol*. 1997;502 (Pt 2):421-31.
64. Jobgen W, Meininger CJ, Jobgen SC, Li P, Lee MJ, Smith SB, et al. Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. *J Nutr*. 2009;139(2):230-7.
65. Piatti PM, Monti LD, Valsecchi G, Magni F, Setola E, Marchesi F, et al. Long-term oral L-arginine administration improves peripheral and hepatic insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2001;24(5):875-80.
66. Tan B, Yin Y, Liu Z, Li X, Xu H, Kong X, ... & Wu G. Dietary L-arginine supplementation increases muscle gain and reduces body fat mass in growing-finishing pigs. *Amino acids*. 2009;37:169-75.
67. McKnight JR, Satterfield MC, Jobgen WS, Smith SB, Spencer TE, Meininger CJ, et al. Beneficial effects of L-arginine on reducing obesity: potential mechanisms and important implications for human health. *Amino Acids*. 2010;39(2):349-57.
68. Tong BC, Barbul A. Cellular and physiological effects of arginine. *Mini Rev Med Chem*. 2004;4(8):823-32.
69. Charles S, Henquin JC. Distinct effects of various amino acids on ⁴⁵Ca²⁺ fluxes in rat pancreatic islets. *Biochem J*. 1983;214(3):899-907.
70. Prentki M. New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion. *Eur J Endocrinol*. 1996;134(3):272-86.
71. Tolhurst G, Zheng Y, Parker HE, Habib AM, Reimann F, Gribble FM. Glutamine triggers and potentiates glucagon-like peptide-1 secretion by raising cytosolic Ca²⁺ and cAMP. *Endocrinology*. 2011;152(2):405-13.

72. Jordi J, Herzog B, Camargo SM, Boyle CN, Lutz TA, Verrey F. Specific amino acids inhibit food intake via the area postrema or vagal afferents. *J Physiol.* 2013;591(22):5611-21.
73. Wellendorph P, Johansen LD, Brauner-Osborne H. Molecular pharmacology of promiscuous seven transmembrane receptors sensing organic nutrients. *Mol Pharmacol.* 2009;76(3):453-65.
74. Kusano T, & Suzuki, H. . Polyamines. In *Polyamine catabolism in plants.* 2015:77-88.
75. Li G, Regunathan S, Barrow CJ, Eshraghi J, Cooper R, Reis DJ. Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science.* 1994;263(5149):966-9.
76. Molderings GJ, Haenisch B. Agmatine (decarboxylated L-arginine): physiological role and therapeutic potential. *Pharmacol Ther.* 2012;133(3):351-65.
77. Halaris A, Plietz J. Agmatine: metabolic pathway and spectrum of activity in brain. *CNS drugs.* 2007;21:885-900.
78. Benítez J, García D, Romero N, González A, Martínez-Oyanedel J, Figueroa M, et al. Metabolic strategies for the degradation of the neuromodulator agmatine in mammals. *Metabolism.* 2018;81:35-44.
79. Moretti M, Matheus FC, de Oliveira PA, Neis VB, Ben J, Walz R, et al. Role of agmatine in neurodegenerative diseases and epilepsy. *Frontiers in Bioscience-Elite.* 2014;6(2):341-59.
80. Fuell C, Elliott KA, Hanfrey CC, Franceschetti M, Michael AJ. Polyamine biosynthetic diversity in plants and algae. *Plant Physiol Biochem.* 2010;48(7):513-20.
81. Michael AJ. Polyamine function in archaea and bacteria. *J Biol Chem.* 2018;293(48):18693-701.
82. Zhu MY, Iyo, A., Piletz, J. E., & Regunathan, S. Expression of human arginine decarboxylase, the biosynthetic enzyme for agmatine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects.* 2004;1670(2):156-64.
83. Galgano F, Caruso M, Condelli N, Favati F. Focused review: agmatine in fermented foods. *Frontiers in Microbiology.* 2012;3:199.
84. Reis DJ, Regunathan S. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends in pharmacological sciences.* 2000;21(5):187-93.
85. Neis VB, Rosa PB, Olescowicz G, Rodrigues ALS. Therapeutic potential of agmatine for CNS disorders. *Neurochemistry international.* 2017;108:318-31.
86. Su C-H, Liu I-M, Chung H-H, Cheng J-T. Activation of I2-imidazoline receptors by agmatine improved insulin sensitivity through two mechanisms in type-2 diabetic rats. *Neuroscience letters.* 2009;457(3):125-8.
87. Lee J-P, Chen W, Wu H-T, Lin K-C, Cheng J-T. Metformin can activate imidazoline I-2 receptors to lower plasma glucose in type 1-like diabetic rats. *Hormone and metabolic research.* 2011;43(01):26-30.
88. Satriano J, Cunard R, Peterson OW, Dousa T, Gabbai FB, Blantz RC. Effects on kidney filtration rate by agmatine requires activation of ryanodine channels for nitric oxide generation. *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* 2008;294(4):F795-F800.
89. Penner B, Smyth DD. Natriuresis following central and peripheral administration of agmatine in the rat. *Pharmacology.* 1996;53(3):160-9.
90. Cunha AS, Matheus FC, Moretti M, Sampaio TB, Poli A, Santos DB, et al. Agmatine attenuates reserpine-induced oral dyskinesia in mice: Role of oxidative

stress, nitric oxide and glutamate NMDA receptors. *Behavioural brain research*. 2016;312:64-76.

91. Lee WT, Hong S, Yoon SH, Kim JH, Park KA, Seong GJ, et al. Neuroprotective effects of agmatine on oxygen-glucose deprived primary-cultured astrocytes and nuclear translocation of nuclear factor-kappa B. *Brain research*. 2009;1281:64-70.

92. Mun CH, Lee WT, Park KA, Lee JE. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by agmatine after transient global cerebral ischemia in rat brain. *Anatomy & cell biology*. 2010;43(3):230-40.

93. Li F, Wu N, Su R, Chen Y, Lu X, Liu Y, et al. Imidazoline receptor antisera-selected/Nischarin regulates the effect of agmatine on the development of morphine dependence. *Addiction Biology*. 2012;17(2):392-408.

94. Sener A, Lebrun P, Blachier F, Malaisse WJ. Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. Insulinotropic action of agmatine. *Biochem Pharmacol*. 1989;38(2):327-30.

95. Su CH, Liu, I. M., Chung, H. H., & Cheng, J. T. . Activation of I2-imidazoline receptors by agmatine improved insulin sensitivity through two mechanisms in type-2 diabetic rats. *Neuroscience letters*. 2009;457(3):125-8.

96. Nissim I, Daikhin Y, Nissim I, Luhovyy B, Horyn O, Wehrli SL, et al. Agmatine stimulates hepatic fatty acid oxidation: a possible mechanism for up-regulation of ureagenesis. *J Biol Chem*. 2006;281(13):8486-96.

97. Nissim I, Horyn O, Daikhin Y, Chen P, Li C, Wehrli SL, et al. The molecular and metabolic influence of long term agmatine consumption. *J Biol Chem*. 2014;289(14):9710-29.

98. Gutgesell A, Wen G, Konig B, Koch A, Spielmann J, Stangl GI, et al. Mouse carnitine-acylcarnitine translocase (CACT) is transcriptionally regulated by PPARalpha and PPARdelta in liver cells. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790(10):1206-16.

99. Muoio DM, Koves TR. Skeletal muscle adaptation to fatty acid depends on coordinated actions of the PPARs and PGC1 alpha: implications for metabolic disease. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007;32(5):874-83.

100. Zhang Y, Yuan S, Che T, He J. Agmatine and glycolipid metabolism. *Zhong nan da xue xue bao Yi xue ban= Journal of Central South University Medical Sciences*. 2021;46(8):889-93.

101. Han N, Yu, L., Song, Z., Luo, L., & Wu, Y. . Agmatine protects Müller cells from high-concentration glucose-induced cell damage via N-methyl-D-aspartic acid receptor inhibition. *Molecular medicine reports*. 2015;12(1):1098-106.

102. Molderings GJ, Kribben B, Heinen A, Schroder D, Bruss M, Gothert M. Intestinal tumor and agmatine (decarboxylated arginine): low content in colon carcinoma tissue specimens and inhibitory effect on tumor cell proliferation in vitro. *Cancer*. 2004;101(4):858-68.

103. Saidak Z, Mentaverri R, Brown EM. The role of the calcium-sensing receptor in the development and progression of cancer. *Endocr Rev*. 2009;30(2):178-95.

104. Kim KH, Kim, K. S., Shin, M. H., Jang, E. G., Kim, E. Y., Lee, J. H., & Jang, H. J. . Aqueous extracts of *Anemarrhena asphodeloides* stimulate glucagon-like peptide-1 secretion in enteroendocrine NCI-H716 cells. *Biochip Journal*. 2013;7(2):188-93.

105. Díaz-Soto G, Rocher A, García-Rodríguez C, Núñez L, Villalobos C. The calcium-sensing receptor in health and disease. *International review of cell and molecular biology*. 2016;327:321-69.
106. Hofer AM, Brown EM. Extracellular calcium sensing and signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003;4(7):530-8.
107. Smith KA, Ayon RJ, Tang H, Makino A, Yuan JX-J. Calcium-sensing receptor regulates cytosolic $[Ca^{2+}]$ and plays a major role in the development of pulmonary hypertension. *Frontiers in Physiology*. 2016;7:517.
108. Leech CA, Habener JF. Regulation of glucagon-like peptide-1 receptor and calcium-sensing receptor signaling by L-histidine. *Endocrinology*. 2003;144(11):4851-8.
109. Mace OJ, Schindler M, Patel S. The regulation of K-and L-cell activity by GLUT2 and the calcium-sensing receptor CasR in rat small intestine. *The Journal of physiology*. 2012;590(12):2917-36.
110. Diakogiannaki E, Pais R, Tolhurst G, Parker HE, Horscroft J, Rauscher B, et al. Oligopeptides stimulate glucagon-like peptide-1 secretion in mice through proton-coupled uptake and the calcium-sensing receptor. *Diabetologia*. 2013;56:2688-96.
111. Kim JY, Kim N, Yenari MA, Chang W. Hypothermia and pharmacological regimens that prevent overexpression and overactivity of the extracellular calcium-sensing receptor protect neurons against traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2013;30(13):1170-6.
112. Conigrave A, Diaz R, Quinn S, Brown E, editors. L-amino acids are allosteric modulators of the calcium-sensing receptor (CaR). *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH*; 2000: AMER SOC BONE & MINERAL RES 2025 M ST, NW, STE 800, WASHINGTON, DC 20036
113. Wellendorph P, Johansen LD, Jensen AA, Casanova E, Gassmann M, Deprez P, et al. No evidence for a bone phenotype in GPRC6A knockout mice under normal physiological conditions. *J Mol Endocrinol*. 2009;42(3):215-23.
114. Wang C, Kang C, Xian Y, Zhang M, Chen X, Pei M, et al. Sensing of L-arginine by gut-expressed calcium sensing receptor stimulates gut satiety hormones cholecystikinin and glucose-dependent insulinotropic peptide secretion in pig model. *Journal of food science*. 2018;83(9):2394-401.
115. Maltsev AV. Agmatine modulates calcium handling in cardiomyocytes of hibernating ground squirrels through calcium-sensing receptor signaling. *Cellular Signalling*. 2018;51:1-12.
116. Acar I, Cetinkaya A, Lay I, Ileri-Gurel E. The role of calcium sensing receptors in GLP-1 and PYY secretion after acute intraduodenal administration of L-Tryptophan in rats. *Nutritional neuroscience*. 2020;23(6):481-9.
117. Alamshah A, Spreckley E, Norton M, Kinsey-Jones J, Amin A, Ramgulam A, et al. L-phenylalanine modulates gut hormone release and glucose tolerance, and suppresses food intake through the calcium-sensing receptor in rodents. *International Journal of Obesity*. 2017;41(11):1693-701.
118. Feng J, Kang C, Wang C, Ding L, Zhu W, Hang S. L-phenylalanine increased gut hormone secretion through calcium-sensing receptor in the porcine duodenum. *Animals*. 2019;9(8):476.
119. Liou AP, Sei Y, Zhao X, Feng J, Lu X, Thomas C, et al. The extracellular calcium-sensing receptor is required for cholecystikinin secretion in response to L-

phenylalanine in acutely isolated intestinal I cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2011;300(4):G538-G46.

120. Hu J, Spiegel AM. Structure and function of the human calcium-sensing receptor: insights from natural and engineered mutations and allosteric modulators. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2007;11(5):908-22.

121. Ferry S, Chatel B, Dodd RH, Lair C, Gully D, Maffrand JP, et al. Effects of divalent cations and of a calcimimetic on adrenocorticotrophic hormone release in pituitary tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;238(3):866-73.

122. Saidak Z, Brazier M, Kamel S, Mentaverri R. Agonists and allosteric modulators of the calcium-sensing receptor and their therapeutic applications. *Molecular pharmacology*. 2009;76(6):1131-44.

123. Petrel C, Kessler A, Dauban P, Dodd RH, Rognan D, Ruat M. Positive and negative allosteric modulators of the Ca^{2+} -sensing receptor interact within overlapping but not identical binding sites in the transmembrane domain. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(18):18990-7.

124. Hannan FM, Walls GV, Babinsky VN, Nesbit MA, Kallay E, Hough TA, et al. The calcilytic agent NPS 2143 rectifies hypocalcemia in a mouse model with an activating calcium-sensing receptor (CaSR) mutation: relevance to autosomal dominant hypocalcemia type 1 (ADH1). *Endocrinology*. 2015;156(9):3114-21.

125. Rus R, Haag C, Bumke-Vogt C, Bähr V, Mayr B, Mohlig M, et al. Novel inactivating mutations of the calcium-sensing receptor: the calcimimetic NPS R-568 improves signal transduction of mutant receptors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008;93(12):4797-803.

126. Cummings DE, Overduin J. Gastrointestinal regulation of food intake. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(1):13-23.

127. Olivos DR, McGrath LE, Turner CA, Montaubin O, Mietlicki-Baase EG, Hayes MR. Intraduodenal milk protein concentrate augments the glycemic and food intake suppressive effects of DPP-IV inhibition. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2014;306(3):R157-R63.

128. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiological reviews*. 2007;87(4):1409-39.

129. Kelly AS, Metzger AM, Rudser KD, Fitch AK, Fox CK, Nathan BM, et al. Exenatide as a weight-loss therapy in extreme pediatric obesity: a randomized, controlled pilot study. *Obesity*. 2012;20(2):364-70.

130. Clemmensen C, Jørgensen CV, Smajilovic S, Bräuner-Osborne H. Robust GLP-1 secretion by basic L-amino acids does not require the GPRC6A receptor. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2017;19(4):599-603.

131. Amin A, Neophytou, C., Thein, S., Martin, N. M., Alamshah, A., Spreckley, E., ... & Murphy, K. G. L-Arginine increases postprandial circulating GLP-1 and PYY levels in humans. *Obesity*. 2018;26(11):1721-6.

132. Liao SY, Linderholm A, Showalter MR, Chen CH, Fiehn O, Kenyon NJ. L-arginine as a potential GLP-1-mediated immunomodulator of Th17-related cytokines in people with obesity and asthma. *Obesity science & practice*. 2021;7(3):339-45.

133. Modvig IM, Kuhre RE, Jepsen SL, Xu SFS, Engelstoft MS, Egerod KL, et al. Amino acids differ in their capacity to stimulate GLP-1 release from the perfused rat small intestine and stimulate secretion by different sensing mechanisms. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2021;320(5):E874-E85.

134. Mendez J, Balderas F. Regulation of hyperglycemia and dyslipidemia by exogenous L-arginine in diabetic rats. *Biochimie*. 2001;83(5):453-8.
135. Omar B, Sorhede-Winzell M, Ahren B. Conditional glucagon receptor overexpression has multi-faceted consequences for beta-cell function. *Metabolism*. 2014;63(12):1568-76.
136. Winzell MS, Brand CL, Wierup N, Sidelmann UG, Sundler F, Nishimura E, et al. Glucagon receptor antagonism improves islet function in mice with insulin resistance induced by a high-fat diet. *Diabetologia*. 2007;50(7):1453-62.
137. Rigamonti AE, Tamini S, Cicolini S, De Col A, Caroli D, Mai S, et al. Evaluation of an Amino Acid Mix on the Secretion of Gastrointestinal Peptides, Glucometabolic Homeostasis, and Appetite in Obese Adolescents Administered with a Fixed-Dose or ad Libitum Meal. *J Clin Med*. 2020;9(9).
138. Alamshah A, McGavigan AK, Spreckley E, Kinsey-Jones JS, Amin A, Tough IR, et al. L-arginine promotes gut hormone release and reduces food intake in rodents. *Diabetes Obes Metab*. 2016;18(5):508-18.
139. Ko WC, Liu I-M, Chung H-H, Cheng J-T. Activation of I2-imidazoline receptors may ameliorate insulin resistance in fructose-rich chow-fed rats. *Neuroscience letters*. 2008;448(1):90-3.
140. Jou S-B, Liu I-M, Cheng J-T. Activation of imidazoline receptor by agmatine to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neuroscience letters*. 2004;358(2):111-4.
141. Hwang S-L, Liu I-M, Tzeng T-F, Cheng J-T. Activation of imidazoline receptors in adrenal gland to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia*. 2005;48:767-75.
142. Özyazgan S, Bicakci B, Ozaydin A, Denizbasi A, Unluer E, Akkan A. The effect of agmatine on the vascular reactivity in streptozotocin-diabetic rats. *Pharmacological research*. 2003;48(2):133-8.
143. Chang C-H, Wu H-T, Cheng K-C, Lin H-J, Cheng J-T. Increase of β -endorphin secretion by agmatine is induced by activation of imidazoline I2A receptors in adrenal gland of rats. *Neuroscience letters*. 2010;468(3):297-9.
144. Li Y, Cheng KC, Asakawa A, Amitani H, Takimoto Y, Runtuwene J, et al. Activation of imidazoline-I3 receptors ameliorates pancreatic damage. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2015;42(9):964-71.
145. Song J, Hur BE, Bokara KK, Yang W, Cho HJ, Park KA, et al. Agmatine improves cognitive dysfunction and prevents cell death in a streptozotocin-induced Alzheimer rat model. *Yonsei medical journal*. 2014;55(3):689-99.
146. Liu H, Yi P, Zhao W, Wu Y, Acher F, Pin J-P, et al. Illuminating the allosteric modulation of the calcium-sensing receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(35):21711-22.
147. Conigrave AD, Quinn SJ, Brown EM. L-amino acid sensing by the extracellular Ca^{2+} -sensing receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(9):4814-9.
148. Wang C, Kang, C., Xian, Y., Zhang, M., Chen, X., Pei, M. & Hang, S. . Sensing of L-Arginine by Gut-Expressed Calcium Sensing Receptor Stimulates Gut Satiety Hormones Cholecystokinin and Glucose-Dependent Insulinotropic Peptide Secretion in Pig Model. *Journal of food science*. 2018;83(9):2394-401.
149. Sloth B, Holst JJ, Flint A, Gregersen NT, Astrup A. Effects of PYY1–36 and PYY3–36 on appetite, energy intake, energy expenditure, glucose and fat metabolism

in obese and lean subjects. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2007;292(4):E1062-E8.

150. Kuhre RE, Christiansen CB, Saltiel MY, Wewer Albrechtsen NJ, Holst JJ. On the relationship between glucose absorption and glucose-stimulated secretion of GLP-1, neurotensin, and PYY from different intestinal segments in the rat. *Physiological reports*. 2017;5(23):e13507.

151. Gerspach AC, Steinert RE, Schönenberger L, Graber-Maier A, Beglinger C. The role of the gut sweet taste receptor in regulating GLP-1, PYY, and CCK release in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2011;301(2):E317-E25.

152. Steinert RE, Gerspach AC, Gutmann H, Asarian L, Drewe J, Beglinger C. The functional involvement of gut-expressed sweet taste receptors in glucose-stimulated secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and peptide YY (PYY). *Clinical nutrition*. 2011;30(4):524-32.

153. Basso N, Capoccia D, Rizzello M, Abbatini F, Mariani P, Maglio C, et al. First-phase insulin secretion, insulin sensitivity, ghrelin, GLP-1, and PYY changes 72 h after sleeve gastrectomy in obese diabetic patients: the gastric hypothesis. *Surgical endoscopy*. 2011;25:3540-50.

154. Wu T, Bound MJ, Standfield SD, Bellon M, Young RL, Jones KL, et al. Artificial sweeteners have no effect on gastric emptying, glucagon-like peptide-1, or glycemia after oral glucose in healthy humans. *Diabetes care*. 2013;36(12):e202-e3.

155. Oya M, Suzuki H, Watanabe Y, Sato M, Tsuboi T. Amino acid taste receptor regulates insulin secretion in pancreatic β -cell line MIN6 cells. *Genes to Cells*. 2011;16(5):608-16.

156. Krishnan K, Ma Z, Björklund A, Islam MS. Calcium signaling in a genetically engineered human pancreatic β -cell line. *Pancreas*. 2015;44(5):773-7.

157. Shin S, Boadi EA, Shah S, Ezell M, Li P, Bandyopadhyay BC. Anti-inflammatory role of extracellular l-arginine through calcium sensing receptor in human renal proximal tubular epithelial (HK-2) cells. *International Immunopharmacology*. 2023;117:109853.

158. Satriano J. Agmatine: at the crossroads of the arginine pathways. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003;1009(1):34-43.

159. Maltsev A, Nenov M, Pimenov OY, Kokoz YM. Modulation of L-type Ca^{2+} currents and intracellular calcium by agmatine in rat cardiomyocytes. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 2013;7:100-12.

160. Li Q, Yin J-X, He R-R. Effect of agmatine on L-type calcium current in rat ventricular myocytes. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2002;23(3):219-24.

161. Lee G-S, Subramanian N, Kim AI, Aksentijevich I, Goldbach-Mansky R, Sacks DB, et al. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca^{2+} and cAMP. *Nature*. 2012;492(7427):123-7.

162. He Y, Zhang H, Teng J, Huang L, Li Y, Sun C. Involvement of calcium-sensing receptor in inhibition of lipolysis through intracellular cAMP and calcium pathways in human adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;404(1):393-9.

163. Brown EM, MacLeod RJ. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiological reviews*. 2001;81(1):239-97.

164. Di Mise A, Tamma G, Ranieri M, Centrone M, Van Den Heuvel L, Mekahli D, et al. Activation of Calcium-Sensing Receptor increases intracellular calcium and

decreases cAMP and mTOR in PKD1 deficient cells. *Scientific reports*. 2018;8(1):5704.

165. Chang W, Pratt S, Chen TH, Nemeth E, Huang Z, Shoback D. Coupling of calcium receptors to inositol phosphate and cyclic AMP generation in mammalian cells and *Xenopus laevis* oocytes and immunodetection of receptor protein by region-specific antipeptide antisera. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1998;13(4):570-80.

166. Nissim I, Horyn O, Daikhin Y, Chen P, Li C, Wehrli SL, et al. The molecular and metabolic influence of long term agmatine consumption. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(14):9710-29.

167. Li J, Liao P, Wang K, Miao Z, Xiao R, Zhu L, et al. Calcium sensing receptor inhibits growth of human lung adenocarcinoma possibly via the GSK3 β /Cyclin D1 pathway. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8:446.

168. Aggarwal A, Prinz-Wohlgenannt M, Tennakoon S, Höbaus J, Boudot C, Mentaverri R, et al. The calcium-sensing receptor: A promising target for prevention of colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2015;1853(9):2158-67.

169. Zhao Y, Tang N, Xi D, Huang Z, Zhang T, Liu Y, et al. Calcilytic NPS2143 promotes proliferation and inhibits apoptosis of spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells via activation of the renin-angiotensin system. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2020;20(2):818-29.

170. Wen J, Tong Y, Zu Y. Low concentration DMSO stimulates cell growth and in vitro transformation of human multiple myeloma cells. *British Journal of Medicine and Medical Research*. 2015;5(1):65-74.

171. Wang C-C, Lin S-Y, Lai Y-H, Liu Y-J, Hsu Y-L, Chen JJ. Dimethyl sulfoxide promotes the multiple functions of the tumor suppressor HLJ1 through activator protein-1 activation in NSCLC cells. *PloS one*. 2012;7(4):e33772.

8. EKLER

EK 1. Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 892

Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 10 MAYIS 2022 SALI
Toplantı No : 2022/08
Proje No : GO 20/1191 (Onay Tarihi: 29.06.2021)
Karar No : 2022/08-03

Kurulumuzun 29.06.2021 tarihli toplantısında GO 20/1191 kayıt numarası ile onaylanmış olan, Üniversitemiz Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Esin İleri GÜREL'in sorumlu araştırmacı olduğu, Arş. Gör. Adnan Berk DİNÇSOY, Prof. Dr. Yasemin BAYAZIT, Arş. Gör. Dr. Mehmet ÖZCAN'ın yardımcı araştırmacı olduğu, Arş. Gör. S. İpek Acar CÖMERT'in doktora tezi olan, GO 20/1191 kayıt numarası, "Agnatin ve L-arjininin İnsan Enteroendokrin NCI-H716 Hücrelerinde GLP-1 ve PYY Salgısı Üzerine Etkisi: Kalsiyum Algılayan Reseptörlerin (CaSR) Rolü" başlıklı proje için vermiş olduğunuz 28.04.2022 tarihli araştırmacı çıkarılması ve süre uzatma revizyonu dilekçeniz Kurulumuzun 10.05.2022 tarihli toplantısında görüşülmüş ve uygun bulunmuştur. Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Yasemin AKSOY ile Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi öğretim elemanlarından Arş. Gör. Dr. Mehmet ÖZCAN proje ekibinden çıkartılacağı bilgisi edinilmiş olup, Projenin yeni sonlanım tarihi 16 Haziran 2023 olarak belirlenmiş ve kayıtlarımıza eklenmiştir. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

1. Prof. Dr. G. Burçay AYDIN	(Başkan)	8. Doç. Dr. Betül Çelebi SALTIK	(Üye)
2. Prof. Dr. M. Özgür UYANIK	(Üye)	9. Doç. Dr. Hande Güneş DENİZ	(Üye)
3. Prof. Dr. Ayşe Kin İŞLER	(Üye)	İZİMLİ	
4. Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN	(Üye)	10. Doç. Dr. Merve BATUK	(Üye)
5. Prof. Dr. Nüket Paksoy İRBAYDAR	(Üye)	11. Doç. Dr. Gülsen KOÇ	(Üye)
İZİMLİ		12. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	(Üye)
6. Prof. Dr. Tolga YILDIRIM	(Üye)	İZİMLİ	
7. Doç. Dr. H. Tuna Çak ESEKİ	(Üye)	13. Ay. Buket ÇINAR	(Üye)

EK 2. Orjinallik Ekran Çıktısı

L-ARJİNİN VE AGMATİNİN İNSAN NCI-H716 HÜCRELERİNDE GLP-1 VE PYY SALGISI ÜZERİNE ETKİSİ: KALSİYUM ALGILAYAN RESEPTÖRLERİN ROLÜ

ORJİNALLİK RAPORU

% 13	% 12	% 2	% 8
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 7
2	Submitted to Ege Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 1
3	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	% 1
4	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
5	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	eprints.usm.my İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% 1
8	www.tbgeder.org İnternet Kaynağı	<% 1

EK 3. Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Sevim İpek Acar Cömert
 Ödev başlığı: L-ARJİNİN VE AGMATİNİN İNSAN NCI-H716 HÜCRELERİNDE ...
 Gönderi Başlığı: L-ARJİNİN VE AGMATİNİN İNSAN NCI-H716 HÜCRELERİNDE ...
 Dosya adı: S_pek_ACAR_C_MERT_TEZ.docx
 Dosya boyutu: 9.71M
 Sayfa sayısı: 80
 Kelime sayısı: 15,658
 Karakter sayısı: 101,237
 Gönderim Tarihi: 04-Eyl-2023 03:58ÖS (UTC+0300)
 Gönderim Numarası: 2157580279

1. GİRİŞ

Yüksek okulların bilgi olarak modern tıbbın geliştiği en önemli alanlarından biri olan tıbbin ilerletilmesi için araştırmaların yapılması gerekmektedir. Araştırmaların yapılması için araştırmacıların araştırmaları için gerekli olan verileri elde etmesi gerekmektedir. Araştırmacıların araştırmaları için gerekli olan verileri elde etmesi için araştırmacıların araştırmaları için gerekli olan verileri elde etmesi gerekmektedir.

Araştırmacıların araştırmaları için gerekli olan verileri elde etmesi için araştırmacıların araştırmaları için gerekli olan verileri elde etmesi gerekmektedir. Araştırmacıların araştırmaları için gerekli olan verileri elde etmesi için araştırmacıların araştırmaları için gerekli olan verileri elde etmesi gerekmektedir.

Araştırmacıların araştırmaları için gerekli olan verileri elde etmesi için araştırmacıların araştırmaları için gerekli olan verileri elde etmesi gerekmektedir. Araştırmacıların araştırmaları için gerekli olan verileri elde etmesi için araştırmacıların araştırmaları için gerekli olan verileri elde etmesi gerekmektedir.

Araştırmacıların araştırmaları için gerekli olan verileri elde etmesi için araştırmacıların araştırmaları için gerekli olan verileri elde etmesi gerekmektedir. Araştırmacıların araştırmaları için gerekli olan verileri elde etmesi için araştırmacıların araştırmaları için gerekli olan verileri elde etmesi gerekmektedir.

9. ÖZGEÇMİŞ

SEVİM İPEK ACAR CÖMERT

