

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA AKUT İNTRADUODENAL L-TRİPTOFAN UYGULAMASINA BAĞLI GLP-1  
VE PYY SALGISINDA KALSİYUM ALGILAYAN RESEPTÖRLERİN ROLÜ

SEVİM İPEK ACAR

Fizyoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2016

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA AKUT İNTRADUODENAL L-TRİPTOFAN UYGULAMASINA BAĞLI GLP-1  
VE PYY SALGISINDA KALSİYUM ALGILAYAN RESEPTÖRLERİN ROLÜ

SEVİM İPEK ACAR

Fizyoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Esin İLERİ GÜREL

ANKARA

2016

Anabilim Dalı :FİZYOLOJİ  
 Program :FİZYOLOJİ  
 Tez Başlığı :Sıçanlarda Akut İntraduodenal L-Triptofan Uygulamasına Bağlı  
 GLP-1 ve PYY Salgısında Kalsiyum Algılayan Reseptörlerin  
 Rolü  
 Öğrenci Adı-Soyadı :Sevim İpek ACAR  
 Savunma Sınavı Tarihi :25 Ağustos 2016

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: **Prof. Dr. Ethem GELİR**  
 (Hacettepe Üni. Tıp Fak. Fizioloji AD)  
 Tez danışmanı: **Doç. Dr. Esin İLERİ GÜRELİ**  
 (Hacettepe Üni. Tıp Fak. Fizioloji AD)  
 Üye: **Prof. Dr. K. Gonca AKBULUT**  
 (Gazi Üni. Tıp Fak. Fizioloji AD)  
 Üye: **Doç. Dr. Bilge PEHLİVANOĞLU**  
 (Hacettepe Üni. Tıp Fak. Fizioloji AD)  
 Üye: **Doç. Dr. Ergül ALÇİN**  
 (Hacettepe Üni. Tıp Fak. Fizioloji AD)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Müdür

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren ve değerli katkılarını esirgemeyen danışmanım Sn. Doç. Dr. Esin İLERİ GÜREL'e,

Fizyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana katkıda bulunan başta anabilim dalı başkanımız Sn. Prof. Dr. Z. Dicle BALKANCI olmak üzere tüm değerli akademik ve idari personele,

Tez çalışmama değerli yorumlarıyla katkıda bulunan tez jüri üyeleri Sn. Prof. Dr. Ethem GELİR, Sn. Prof. Dr. K. Gonca AKBULUT, Sn. Doç. Dr. Esin İLERİ GÜREL, Sn. Doç. Dr. Bilge PEHLIVANOĞLU ve Sn. Doç. Dr. Ergül ALÇİN'e

Tez çalışmamın büyük kısmını gerçekleştirdiğim Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda görev alan ve büyük emek sarf eden veteriner hekim Sn. Doç. Dr. Mehmet Alper ÇETİNKAYA'ya ve laboratuvarında çalışan tüm personele,

Tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen ve çok büyük destek veren Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Sn. Doç. Dr. İncilay LAY'a ve Arş. Gör. Müslüm GÖK'e, Tezimin deneylerinde yardımlarını esirgemeyen, zaman ve emek harcayan Merkez Laboratuvarı'nda görevli Sn. Yasin KIRAN'a ve Zeliha ERDOĞAN'a,

Tez çalışmamda yardımcı olan Metabolizma Laboratuvarı'nda görev yapan personele,

Tezimin deneylerinde yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Nigar TAŞDEMİROĞLU'na ve Ecem ÖZDEMİR'e,

Eğitim hayatım boyunca desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, beni cesaretlendirerek yol gösteren, motive eden ve her türlü fedakarlığı göstererek her zaman yanımda olan canımdan çok sevdiğim annem Funda ACAR ve babam Fatih Mehmet ACAR'a,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından THD-2015-5687 numaralı Hızlı Destek ve TBB-2015-5477 numaralı Bilimsel Başarı projeleri ile desteklenmiştir.

## ÖZET

**Acar S.İ., Sıçanlarda Akut İntraduodenal L-Triptofan Uygulamasına Bağlı GLP-1 ve PYY Salgısında Kalsiyum Algılayan Reseptörlerin Rolü, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara 2016.** Bir esansiyel aminoasit olan L-triptofan insülin düzeyini artırır ve yiyecek alımını azaltır. L-triptofan'ın bağırsaklardaki enteroendokrin L hücrelerinden glukagon benzeri peptit 1 (GLP-1) ve peptit YY (PYY) hormonlarının salgısına yol açtığı ve bu etkide kalsiyum algılayan reseptörlerin (CaSR) rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bu çalışma ile sıçanlarda akut intraduodenal L-triptofan uygulamasının GLP-1 ve PYY düzeylerine olan etkisi ve bu etkide CaSR'lerin rolünün incelenmesi amaçlanmıştır. Erkek Wistar sıçanlar (n=21) L-triptofan, L-triptofan+CaSR antagonisti ve L-triptofan+çözücü gruplarına ayrıldı. Bütün solüsyonlar doğrudan bağırsaklara intraduodenal kateter ile verildi. İntraduodenal infüzyonlardan önce (0.dk) ve sonra (30, 60, ve 90. dk) plazma glukoz, L-triptofan, insülin, GLP-1 ve PYY ölçümleri için kuyruk veninden kan örnekleri alındı. Kan glukozu test stripleri ile ölçüldü. L-triptofan düzeyi HPLC ile ve GLP-1, PYY, insülin düzeyleri ELISA kitleri ile ölçüldü. 90 dakika boyunca elde edilen glukoz, insülin, GLP-1 ve PYY düzeyleri için eğri altında kalan alanlar hesaplandı. Tüm gruplarda plazma L-triptofan düzeyleri 30. dakikada en yüksek değerine ulaştı ( $P<0,05$ ). Plazma insülin ve GLP-1 salınımı antagonist grubunda, diğer gruplara kıyasla daha düşüktü ( $P<0,05$ ). PYY düzeyleri gruplar ve zamanlar arasında farklı değildi. Plazma glukoz düzeyi antagonist grubunda daha yüksek seyretmesine rağmen gruplar arasında anlamlı fark yoktu. Bu çalışma, L-triptofan'ın intestinal GLP-1 salınımına neden olduğunu ve bu etkide CaSR'lerin rol oynadığını göstermiştir. Sonuç olarak, L hücrelerinde bu yolların hedeflenmesi GLP-1 salgısını artırmak için kullanılabilir, böylece diyabet ve obezite gibi hastalıkları önlemek ya da tedavi etmek için yeni yaklaşımlar geliştirmek mümkün olabilir.

Anahtar kelimeler: L-Triptofan, GLP-1, PYY, CaSR, insülin, kan şekeri

**ABSTRACT**

**Acar S.İ., The Role of Calcium Sensing Receptors on GLP-1 and Peptide YY Secretion After Acute Intraduodenal L-tryptophan Administration in Rats. Hacettepe University, Institute of Health Sciences, Physiology Programme Master of Science Thesis, Ankara, 2016.** L- tryptophan, which is an essential amino acid, increases insulin level and decreases food intake. It is thought that L- tryptophan causes release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and peptide YY (PYY) hormones from intestinal enteroendocrine L cells and calcium-sensing receptors (CaSR) may play a role in this effect. In this study, it was aimed to investigate the effect of acute intraduodenal L-tryptophan administration on GLP-1 and PYY levels and the role of CaSR in this effect in rats. Male Wistar rats (n=21) were divided into L-tryptophan, L-tryptophan+CaSR antagonist and L-tryptophan+vehicle groups. All solutions were directly given to the intestines with intraduodenal catheter. Before (min 0) and after (min 30, 60, and 90) intraduodenal infusions, blood samples were taken from tail vein for plasma glucose, L-tryptophan, insulin, GLP-1 and PYY measurements. Blood glucose was measured by test stripes. L-tryptophan level was measured by HPLC and GLP-1, PYY and insulin levels were measured by ELISA kits. Area under the curves were calculated for glucose, insulin, GLP-1 and PYY levels obtained throughout 90 minute. In all groups, plasma L-tryptophan levels were maximum on the 30<sup>th</sup> min ( $P<0.05$ ). Plasma insulin and GLP-1 secretions were lower in the antagonist group compared to other groups ( $P<0.05$ ). PYY levels were not different between groups and time points. Although plasma glucose levels were higher in the antagonist group, there was no significant difference between groups. This study demonstrates that L-tryptophan causes intestinal GLP-1 release and CaSRs play a role in this effect. As a result, targeting these pathways in L-cells can be used to increase GLP-1 secretion, so it could be possible to develop new approaches to prevent or treat diseases like diabetes and obesity.

**Keywords:** L- tryptophan, GLP-1, PYY, CaSR, insulin, blood sugar

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnkretin Hormonlar	3
2.1.1. Glukagon Benzeri Peptit-1 (GLP-1)	5
GLP-1'in Yapısı ve Sentezi	5
GLP-1'in Plazma Konsantrasyonları ve Metabolizması	7
GLP-1 Reseptörleri ve İkinci Mesajcılar	8
GLP-1 Salgısının Düzenlenmesi	9
GLP-1'in Biyolojik Etkileri	18
2.1.2. L hücrelerinin Diğer Salgıları	24
Peptit YY (PYY)	24
2.2. L-Triptofan	27
2.3. Kalsiyum Algılayan Reseptörler	29
2.3.1. Kalsiyum Algılayan Reseptörlerin proteinlerle uyarılması	31

2.3.2. Kalsiyum Algılayan Reseptörlerin inkretinlerle ilişkisi	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Deney Hayvanları	34
3.2. Cerrahi İşlemler	34
3.2.1. İntraduodenal Kateter Yerleştirilmesi	34
3.2.2. Post-operatif Dönem	38
3.3. Deney Protokolü	38
3.3.1. Deney Grupları	39
L-Triptofan Grubu (T Grubu)	39
L-Triptofan + CaSR Antagonisti (NPS 2143) Grubu (N Grubu)	39
L-Triptofan + Siklodekstrin Grubu (S Grubu)	39
3.3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar	40
3.3.3. Plazma Örneklerinin Elde Edilmesi	40
3.3.4. Plazma L-Triptofan Düzeyi	40
3.3.5. Plazma Hormon Düzeyleri	41
3.3.6. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi	42
4. BULGULAR	44
4.1. Genel Özellikler	44
4.2. Plazma L-Triptofan Düzeyi	46
4.3. Plazma Glukoz Düzeyi	48
4.4. Plazma Hormon Düzeyleri	49
4.4.1. Plazma GLP-1 Düzeyi	49
4.4.2. Plazma PYY Düzeyi	51
4.4.3. Plazma İnsülin Düzeyi	52



5.TARTIŞMA	54
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	63
Sonuçlar	63
Öneriler	64
KAYNAKLAR	65
Ekler- Etik Kurul Onayı	82



## SİMGELER VE KISALTMALAR

Ala	Alanin
ATP	Adenozin trifosfat
AUC	Eğrinin altında kalan alan
Ca <sup>+2</sup>	Kalsiyum
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CaSR	Kalsiyum algılayan reseptör
CCK	Kolesistokinin
CGRP	Kalsitonin-jeni ile ilişkili peptit
cm	Santimetre
dk	Dakika
DPP-IV	Dipeptidil peptitaz-IV
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	Enzim bağlı immuno absorbent ölçüm
Epac 2	cAMP ile etkinleşen değiş-tokuş proteini 2
ER	Endoplazmik retikulum
ERK	Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz
ESS	Enterik sinir sistemi
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
Gd <sup>+3</sup>	Gadolinyum
GEF II	Guanin Nükleotid Değişim Faktörü II
GİP	Glukoz bağımlı insülinotropik peptit
Gln	Glutamin
GLP-1	Glukagon benzeri peptit 1

GLP-2	Glukagon benzeri peptit 2
GLP-1R	Glukagon benzeri peptit 1 reseptörü
GLUT-2	Glukoz taşıyıcısı 2
GPR	G proteini ile ilişkili reseptör
gr	Gram
GRP	Gastrin salgılatıcı peptit
G <sub>s</sub>	Uyarıcı G proteini
G <sub>i</sub>	İnhibitör G proteini
H <sup>+</sup>	Hidrojen
HCl	Hidroklorik asit
HHA	Hipotalamo-hipofizer adrenokortikal
His	Histidin
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IP <sub>3</sub>	İnositol trifosfat
K <sup>+</sup>	Potasyum
kcal	Kilokalori
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
lt	Litre
LH	Lüteinize edici hormon
MAPK	Mitojen aktive edici protein kinaz
mg	Miligram
Mg <sup>+2</sup>	Magnezyum
mGluR4	Metabotropik glutamat reseptör 4

ml	Mililitre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MOR	Mu-Opioid reseptörü
mRNA	Mesajcı RNA
MSS	Merkezi sinir sistemi
MUP	Metil-umbeliferil fosfat
Na <sup>+</sup>	Sodyum
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NEP-24.11	Nötral endopeptitaz 24.11
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
NPY	Nöropeptit Y
NTS	Nukleus traktus solitarius
PepT1	Oligopeptit taşıyıcısı 1
Phe	Fenilalanin
PI-3K	Fosfotidilinozitol-3-kinaz
PKA	Protein kinaz A
PKC	Protein kinaz C
pmol	Pikomol
PP	Pankreatik polipeptit
PTH	Parathormon
PYY	Peptit YY

SF	Serum fizyolojik
SGLT1	Sodyum bağımlı glukoz taşıyıcısı 1
Sr <sup>+2</sup>	Stronsiyum
STAT3	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3
T1R	Tip 1 tat reseptörleri
T2DM	Tip 2 diabetes mellitus
TNF- $\alpha$	Tümör nekrotizan faktör- $\alpha$
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
UV	Ultraviyole
VİP	Vazoaktif intestinal peptit
%	Yüzde
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
°C	Santigrat derece
$\mu$ l	Mikrolitre
>	Büyüktür
<	Küçüktür
$\geq$	Büyüktür veya eşittir

## ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. İnce bağırsak duvarındaki villus yapısı içinde yer alan enteroendokrin hücreler	4
2.2. İnsan proglukagon geninin şematik gösterimi	6
2.3. Dokulara göre üretilen proglukagon gen ürünleri	7
2.4. GLP-1'in DPP-IV tarafından parçalanması	8
2.5. L hücrelerinde GLP-1 salgısının olası mekanizmaları	11
2.6. GLP-1'in iştah ve vücut ağırlığı üzerine etkileri	23
2.7. Triptofanın L ve D izoformlarının yapısı	27
3.1. İntraketin abdominal insizyon bölgesinden subkutan olarak interskapular bölgeye ilerletilmesi ve kateterin abdominal boşluğa alınması	35
3.2. İntraketin duodenum içine yerleştirilmesi ve kateterin intraket yardımıyla bağırsak lümenine alınması	36
3.3. Kateterin bağırsağa girdiği yere dikiş uygulanması	37
3.4. Kateterin uç kısmının interskapular bölgeye sabitlenmesi ve Elizabethan yakalık takılması	38
4.1. Sıçanların deney süresince ölçülen vücut ağırlıkları	45
4.2. HPLC yöntemi ile tayin edilen L-triptofan düzeylerine ait bir ölçüm	47
4.3. Sıçanların deney protokolü boyunca ölçülen L-triptofan değerlerinin zamansal değişimi	47
4.4. Sıçanların plazma glukoz düzeyleri	49
4.5. Plazma GLP-1 düzeylerinin farklı gruplar ve zamanlardaki değişimi	50
4.6. Plazma insülin düzeylerinin farklı gruplar ve zamanlardaki değişimi	53

## TABLOLAR

	Sayfa
4.1. Sıçanların ölçülen ilk ve son vücut ağırlığı değerleri	44
4.2. Sıçanların deney protokolü boyunca ölçülen vücut sıcaklığı değerleri	45
4.3 Sıçanların deney protokolü boyunca HPLC yöntemiyle farklı zamanlarda ölçülen L-triptofan düzeyleri	46
4.4. Sıçanların deney protokolü boyunca ölçülen plazma glukoz düzeyleri	48
4.5. ELISA yöntemiyle ölçülen plazma GLP-1 düzeyleri	50
4.6. Gruplara ait plazma GLP-1 <sub>AUC</sub> değerleri	51
4.7. ELISA yöntemiyle ölçülen plazma PYY düzeyleri	51
4.8. ELISA yöntemiyle ölçülen plazma insülin düzeyleri	52
4.9. Sıçanların deney protokolü boyunca ölçülen plazma insülin <sub>AUC</sub> değerleri	53

## 1. GİRİŞ

Yiyecek alımı sindirim kanalından glukoz metabolizmasını ve iştahı düzenleyen bir seri hormonun salınımına yol açar. Bu hormonlar arasında inkretin hormonlar da bulunmaktadır. İnkretin hormonlar başlıca oral glukoz alımından sonra ince ve kalın bağırsakta bulunan enteroendokrin hücrelerden salınırlar. Çok sayıda fizyolojik etkileri bulunmakla beraber inkretinlerin en önemli etkileri yemek sonrasında insülin salgısını artırarak, hipoglisemiye neden olmaksızın kan şekerini düşürmeleridir.

İnkretin hormonlar tarafından oluşturulan etkinin büyük kısmını glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1) oluşturmaktadır. GLP-1, yiyecek alımını takiben başlıca distal ileum ve kolonda bulunan enteroendokrin L hücreleri tarafından salınır ve pankreastan insülin salgısını artırırken, glukagon salgısını baskılar, ayrıca gastrik boşalmayı ve besin alımını inhibe eder. Sindirim kanalının distalindeki enteroendokrin L hücreleri GLP-1'in yanı sıra Peptit tirozin-tirozin (Peptit YY, PYY) adı verilen bir diğer peptiti de salgılar. Postprandiyal olarak plazma PYY seviyesinde ortaya çıkan belirgin artışlar, PYY'nin enerji metabolizması ve iştah üzerine önemli etkisinin olduğunu düşündürmektedir.

Genel olarak glukoz alımından sonra gerçekleşen GLP-1 ve PYY salınımının, yağ ve protein alımını takiben de gerçekleştiği gösterilmiştir. Bazı aminoasitler bağırsaklardaki enteroendokrin L-hücrelerini uyararak inkretin hormonların salgısına yol açabilmekte ve böylece insülin salgısının artırılmasında, farklı besin içeriklerinin beyne iletilmesinde ve tokluk hissinin oluşturulmasında rol almaktadırlar. Yapılan çalışmalar bir esansiyel aminoasit olan L-triptofanın insülin düzeylerini artırdığını, yiyecek alımını azalttığını, mide ve bağırsaklar üzerine düzenleyici etkilerinin bulunduğunu göstermektedir. L-triptofanın enteroendokrin L hücrelerini uyararak GLP-1 ve PYY salınımına yol açtığı ve L-triptofan ile uyarılan reseptörün de L hücrelerinde eksprese edilen kalsiyum algılayan reseptörler (CaSR) olabileceği ileri sürülmektedir. CaSR'ler ekstraselüler kalsiyum seviyelerindeki değişiklikleri algılayan, G proteini ile eşleşmiş reseptörlerdir. Bu reseptörler esas olarak paratiroid



hormonun salınmasında ve kalsiyumun böbreklerden geri emiliminde görev alırlar. Kalsiyum ve L-aminoasitler bu reseptörün iki ana ligandını oluşturur ve reseptör üzerinde farklı bölgelere bağlanırlar.

Bu çalışmada sıçanlarda akut intraduodenal L-triptofan uygulamasının kan glukoz, insülin, GLP-1 ve PYY düzeylerine olan etkisinin ve ortaya çıkabilecek etkide CaSR'lerin rolünün incelenmesi amaçlanmıştır. Bir esansiyel aminoasit olan L-triptofan ile GLP-1 ve PYY salınımı arasındaki ilişkinin ve enteroendokrin L hücrelerinde bulunan CaSR'lerin bu ilişkideki rolünün ortaya konması postprandiyal glukoz metabolizmasının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Bu sayede kan glukozunu düzenleyen fizyolojik süreçler daha iyi anlaşılabilir, diyabet ve obezite gibi hastalıkların tedavisinde veya önlenmesinde yeni stratejiler geliştirmek mümkün olabilecektir.

### **Hipotez**

- Sağlıklı sıçanlarda akut intraduodenal L-triptofan infüzyonu GLP-1 ve PYY salgısında artışa yol açar ve bu etkiyi CaSR'ler üzerinden gerçekleştirir.

### **Amaçlar**

- Sağlıklı sıçanlarda akut intraduodenal L-triptofan uygulamasının GLP-1 ve PYY salgısı üzerine olan etkisini araştırmak
- Ortaya çıkabilecek bu etkide CaSR'lerin rolünü incelemek

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İnkretin Hormonlar

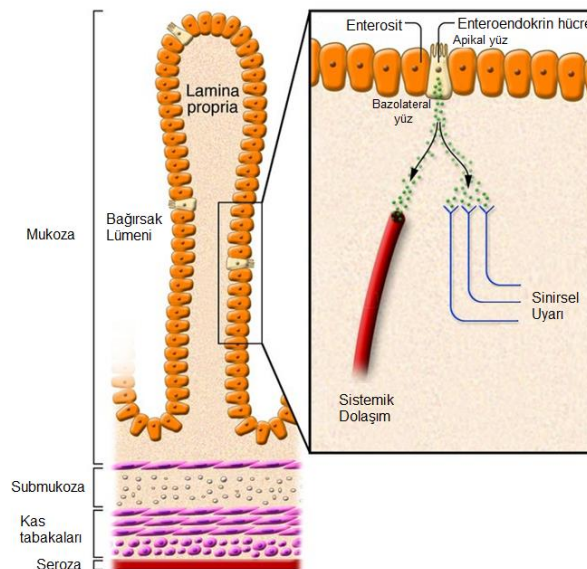
Karbonhidrat, yağ ve protein içeren besinlerin alımı sonucu sindirim kanalından besinlerin sindirimini, emilimini ve iştahı düzenleyen bir seri hormon kana salınmakta, böylece farklı besin içerikleri ile glukoz metabolizmasının düzenlemesi ve tokluk hissinin yaratılması mümkün olmaktadır. Bu hormonlar arasında pankreastan insülin salınımını düzenleyen “inkretin hormonlar” da yer almaktadır.

Besin maddelerinin sindirimine bağlı olarak bağırsak mukozası tarafından üretilen bazı faktörlerin, endokrin pankreastan çeşitli maddelerin salınmasını uyarak kan glukoz düzeylerini düşürdüğüne dair iddialar ilk olarak 1900'lerin başında ortaya atılmıştır (1,2). 1932'de Jean LaBarre, üst bağırsak mukozasından kan şekerini düşüren ancak ekzokrin salgıya sebep olmayan bir maddeyi ekstrakte etmiş, bu maddeye “inkretin” adını vererek, diyabetik hastaların tedavisi için kullanılabileceğini öne sürmüştür (3). Radyoimmünoesey yöntemi ile insülin hormon düzeyinin ölçülmeye başlanması ve intravenöz (iv) glukoz uygulamasına göre oral glukoz uygulamasının daha yüksek oranda insülin salgısına sebep olduğunun gösterilmesi inkretinlerle ilgili çalışmaların hız kazanmasına yol açmıştır (4-6). 1969 yılında Ungar ve Eisentraut bağırsak ve pankreas adacık hücreleri arasındaki ilişkiyi "entero-insular aks" olarak adlandırmıştır (7,8). İlerleyen çalışmalar ile gastrointestinal sistemden birden fazla inkretin hormon salgılandığı saptanmıştır (9). İlk olarak tanımlanan inkretin hormon, domuz ince bağırsağından izole edilmiş ve köpeklerde gastrik asit salgılanmasını inhibe ettiği için Gastrik İnhibitör Polipeptit (GİP) olarak adlandırılmıştır (10). Bununla birlikte GİP'in daha saflaştırılmış preparasyonlarının kullanıldığı çalışmalarda, bu hormonun insanlarda ve hayvanlarda insülin salgısını uyardığı gösterilmiştir (11,12). Daha sonra yapılan çalışmalarla GİP'in gastrik asit salgısı üzerine olan inhibitör etkisinin sadece farmakolojik dozlarda görüldüğü, insülinotropik etkisinin ise fizyolojik dozlarda ortaya çıktığı ve daha potent olduğu anlaşılmıştır (9,13). Bu sebeple GİP'in adı Glukoz-bağımlı İnsülinotropik Polipeptit olarak değiştirilmiştir (14).

1980'lerde memeli proglukagon geni ve tamamlayıcı DNA'nın (cDNA) sekanslanması ve klonlanması, bağırsaklarda üretilen diğer bir peptid olan Glukagon Benzeri Peptid-1 (GLP-1)'in keşfine ön ayak olmuştur (15,16). Günümüzde GLP-1 ve GİP, inkretin hormonlar olarak kabul edilmektedir. Her iki hormon birbirlerinin etkilerini güçlendirerek glukozla uyarılan insülin salgısını yönetmektedir (9).

Inkretin hormonlar (inkretinler), başlıca oral glukoz alımından sonra salınırlar, pankreastan insülin salgısını artırarak hipoglisemiye neden olmaksızın kan şekerini düşürürler (17). Besin alımından sonra gerçekleşen insülin salgısının %50-70'i inkretinlerin etkisi sonucu gerçekleşir (14,18). GLP-1 inkretinlere bağlı insülinotropik etkinin %80'inden sorumlu iken, GİP'in katkısı %20'ler civarındadır (14).

Mide-bağırsak kanalının epitel örtüsü içinde epitel hücrelerinin %1'ini oluşturan, endokrin aktivitesi olan, değişik şekilli çok sayıda hücre bulunmaktadır. Mideden kolona kadar dağınık biçimde yani tek tek yer alan ve 15 kadar çeşidi olduğu saptanan bu hücelere enteroendokrin hücreler adı verilmektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. İnce bağırsak duvarındaki villus yapısı içinde yer alan enteroendokrin hücreler (19)'dan değiştirilerek

Enteroendokrin hücreler, luminal yüzlerindeki mikrovillusları sayesinde besinlerle doğrudan temas eden, bazolateral yüzleri ile de enterik sinir sistemi ve nervus vagus aracılığıyla santral sinir sistemi ile etkileşebilen konik şekilli hücrelerdir (17). Enteroendokrin hücreler 20'den fazla peptid hormon ve parakrin madde salgırlar. Enteroendokrin L hücreleri esas olarak GLP-1 üretiminden sorumluyken, enteroendokrin K hücreleri GIP'i üretmektedir (20-22).

### **2.1.1. Glukagon Benzeri Peptid-1 (GLP-1)**

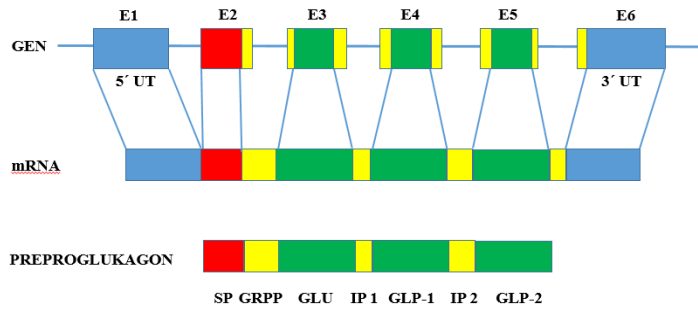
GLP-1 bağırsak-pankreas-beyin aksında yer alan, 37 aminoasit içeren, peptid yapıda bir hormondur. Endokrin ve parakrin etkiler göstermekle birlikte, sinir sisteminde nörotransmitter olarak da görev alır (23). Esas olarak bağırsak mukozasının distalindeki (ileum ve kolon) enteroendokrin L hücrelerinden besin alımına yanıt olarak salgılanır (17,24). Başta pankreasın alfa ve beta hücreleri olmak üzere, merkezi sinir sistemi, kalp, akciğer, karaciğer, böbrek, bağışıklık sistemi hücreleri ve çeşitli beyin dokularında GLP-1 reseptörleri bulunmaktadır (23,25,26). Ayrıca beynin birçok alanındaki nöronlarda da (hipotalamus, nukleus traktus solitarius, retiküler nukleusun dorsal ve ventral nöronları) GLP-1 ekspres edilmektedir (23,25,26).

GLP-1, pankreastan insülin salınımını artırırken, glukagon salınımını baskılar, beta hücrelerinin sayıca artışına yol açarak apoptozlarını önler ve beta hücre proliferasyonunu sağlar (27-29). Ayrıca GLP-1 gastrointestinal motiliteyi engeller, gastrointestinal salgıyı ve gastrik boşalmayı azaltır ve santral etkileri ile besin alımını inhibe eder (30-32). GLP-1 aynı zamanda antidiyabetik etki gösteren bir hormondur ve Tip 2 diyabeti olan hastalarda GLP-1 salınımının azaldığı bilinmektedir (33). Bu sebeple diyabet ve obezite gibi hastalıkların tedavisinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

#### **GLP-1'in Yapısı ve Sentezi**

GLP-1 proglukagon geni tarafından kodlanır ve aminoasit dizilimi %50 oranında glukagona benzerlik gösterir (34). İnsan proglukagon geni 2. kromozomun

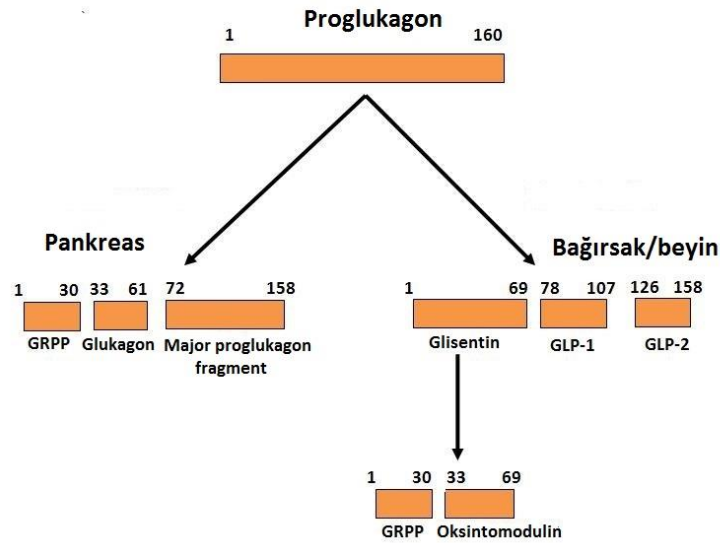
uzun kolunda bulunur ve 6 ekzon, 5 intron içerir (34,35). Genin ürünlerinden olan glukagon ekzon 3'te, GLP-1 ekzon 4'te ve GLP-2 ise ekzon 5'te kodlanmaktadır (34). Şekil 2.2'de insan proglukagon geni şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.2. İnsan proglukagon geninin şematik gösterimi

Proglukagon geni pankreasın alfa hücrelerinde, öncelikle ileum ve kolon olmak üzere bağırsaktaki enteroendokrin L hücrelerinde ve beyinde bulunmaktadır (36,37). Memeli proglukagon genini, her üç dokuda da yapısal olarak aynı olan tek bir mRNA sentezler. Proglukagon mRNA'sından 180 aminoasit uzunluğunda, 18 kDa ağırlığında, büyük öncül bir molekül olan preproglukagon sentezlenir. Daha sonra bu öncül molekülden dokuya özgü farklı ürünler oluşur (38,39). Pankreasın alfa hücrelerinde prohormon konvertaz 2 enzimi ile glukagon sentezi, intestinal L hücrelerinde ise prohormon konvertaz 1/3 enzimi ile GLP-1, GLP-2, glisentin ve oksintomodulin sentezi gerçekleştiği Şekil 2.3'te gösterilmiştir (32,40,41).

GLP-1'in oluşan ilk formu 37 aminoasit içeren bir peptittir: GLP-1<sub>(7-37)</sub>. Bu peptit, C-terminalindeki glisin rezidüsünden amide edilerek GLP-1<sub>(7-36)-NH<sub>2</sub></sub> elde edilir (42). Bu iki peptit eş zamanlı olarak salınır ve ikisi de aynı plazma yarı ömrüne sahiptir (26). GLP-1'in dolaşımdaki baskın formu GLP-1<sub>(7-36)-NH<sub>2</sub></sub>'dir ve GLP-1'in %80'ini oluşturmaktadır (41). Salındıktan sonra bağırsak kapillerlerine geçen GLP-1, buradan portal ven ve karaciğere, oradan da pankreasa ulaşarak beta hücrelerindeki özgül reseptörüne bağlanır ve insülin salgısını gerçekleştirir.



Şekil 2.3. Dokulara göre üretilen proglukagon gen ürünleri

Proglukagon geninin intestinal L hücrelerinde işlenmesiyle GLP-1 ile beraber oluşan glukagon benzeri peptit-2 (GLP-2)'nin inkretin etkisinin olup olmadığı araştırılmış ancak sadece GLP-1'in insülin salgısını uyarma yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (14,18).

### GLP-1'in Plazma Konsantrasyonları ve Metabolizması

GLP-1 düzeyi yakın zamana kadar radyoimmünoesey (RIA) ve kromatografik yöntemlerle ölçülmekteyken, son yıllarda plazma sandviç ELISA (enzim bağlı immuno absorbent ölçüm) yöntemi kullanılmaktadır. İnsanlarda GLP-1'in plazma düzeyi açlıkta 5-10 pmol/lit iken, besin alımından yaklaşık yarım saat sonra alınan besinin çeşidine ve yemek süresine göre değişmekle beraber 15-50 pmol/lit düzeylerine çıkmaktadır. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada ise, plazma GLP-1 düzeyinin açlıkta 5-20 pmol/lit olduğu ve yiyecek alımıyla 20-40 pmol/lit seviyesine çıktığı gösterilmiştir (43).

GLP-1 salındıktan sonra dolaşımda çok hızlı bir şekilde metabolize olur. GLP-1'in tüm formları bir serin proteaz olan dipeptidil peptidaz IV (DPP-IV) enzimi tarafından parçalanır (44). DPP-IV'ün hem hücre zarına bağlı, hem de dolaşımda çözünür olarak bulunan iki şekli vardır (45). DPP-IV enzimi enterositlerin fırçası

kenarında ve bağırsakların lamina propriasındaki kapillerlerin endotelinde bulunur (46). Ayrıca lenfositlerde, makrofajlarda, böbrek, akciğer, adrenal bez, dalak, testis gibi dokularda da bulunmaktadır (47,48).

GLP-1 salındıktan sonra DPP-IV aracılığıyla kan, karaciğer, bağırsak, böbrek ve beyinde hızlıca metabolize olur (49). DPP-IV enzimi, GLP-1'in amino ucundan iki adet aminoasiti kopartarak hormonun aktivitesini sonlandırır (Şekil 2.4). GLP-1'in yarılanma ömrü 2-5 dakikadır (50,51). GLP-1 DPP-IV tarafından etkili ve hızlı bir şekilde parçalandığından, üretilen GLP-1'in yaklaşık %10-15'i sistemik dolaşıma geçebilmektedir. GLP-1'in parçalanmasıyla inaktif analoglar olan GLP-1<sub>(9-36)</sub> ve GLP-1<sub>(9-37)</sub> oluşur (38,49). Ayrıca GLP-1, membrana bağlı bir çinko metallopeptidaz olan nötral endopeptidaz 24.11 (NEP-24.11) tarafından da parçalanmaktadır. Bu enzim böbreklerde yüksek oranda bulunur ve GLP-1 metabolitleri böbrekler aracılığıyla hızla uzaklaştırılır (52).



Şekil 2.4. GLP-1'in DPP-IV tarafından parçalanması

DPP-IV enzimi, DPP-IV inhibitörleri ile inaktif hale getirilir (53). DPP-IV aktivitesindeki inhibisyonla GLP-1 konsantrasyonu artar, böylece fizyolojik etkileri daha uzun süre devam eder. Tip 2 diyabeti olan ve DPP-IV aktivitesini inhibe eden ilaç kullanan kişilerde kilo kaybı, HbA<sub>1c</sub> seviyesinde düşme, beta hücre fonksiyonunda artma ve plazma glukagon düzeyinde azalma görülmüştür (54,55).

### GLP-1 Reseptörleri ve İkinci Mesajcılar

GLP-1 reseptörü (GLP-1R), 463 aminoasit uzunluğunda ve 7 transmembran domain içeren heterotrimerik G proteini ile eşleşmiş (GPR), GİP ve glukagon reseptörleriyle aynı aileye ait bir reseptördür (56). İlk olarak 1992'de Bernard Thorens tarafından sıçan pankreatik adacığında tanımlanmıştır (46). Kemirgenlerde ve insanlarda GLP-1 reseptörünün yapısal olarak aynı olduğu bilinmektedir (14).

GLP-1 reseptörü ilk olarak pankreas adacıklarında, midede ve akciğerde tespit edilmiştir (56). Fare, sıçan ve insan dokularında immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak GLP-1 reseptörlerinin adacıklardaki beta hücrelerinde ve pankreatik kanallarda varlığı gösterilmiştir (57). Daha sonra hipotalamus, beyin sapı, kalp, böbrek, iskelet kası, hepatoportal bölge ve adipoz dokuda da bulunduğu tespit edilmiştir (57).

GLP-1 reseptörleri G proteinleri ile etkileşerek adenilat siklaz aktivitesinde, fosfolipaz C aktivitesinde ve hücre içi  $Ca^{+2}$  seviyesinde değişikliğe yol açan reseptörlerdir. Bu değişiklikler hedef dokularda protein kinaz A (PKA), protein kinaz C (PKC), fosfotidilinozitol-3-kinaz (PI-3K), Epac 2 (cAMP-GEF II) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yollarının aktivasyonuna yol açar (14). GLP-1'in en önemli hedef dokusu olan pankreasın beta hücrelerinde GLP-1R aktivasyonu, adenil siklaz aktivasyonuna ve cAMP artışına neden olur. cAMP artışı ile aktive olan PKA/Epac 2 yolları ATP bağımlı  $K^{+}$  kanallarının kapanmasına ( $K_{ATP}$ ), hücre zarında depolarizasyona, voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının açılmasına ve hücre içi kalsiyum seviyesinin artışına yol açar (57). GLP-1R aktivasyonu aynı zamanda endoplazmik retikulumdan PKA ile aktive olan inositol trifosfat ( $IP_3$ ) reseptörleri ve Epac 2 ile aktive olan ryanodin reseptörleri üzerinden de kalsiyum salınımına yol açar. Artan kalsiyum konsantrasyonu da insülin veziküllerinin ekzositozuna neden olur. Beta hücrelerinde GLP-1 reseptörünün ekspresyonu, artmış plazma glukoz ve GLP-1 düzeyleri ile baskılanır (14).

### **GLP-1 Salgısının Düzenlenmesi**

Sindirim ve emilimin gerçekleştirildiği ince bağırsaklar duodenum, jejunum, ileum olmak üzere üç kısma ayrılır. Bağırsak mukozasında emilim yüzeyini arttırmak amacıyla bazı özelleşmiş yapılar bulunur. Mukoza ve epitel hücreleri bağırsak lümenine doğru villus adı verilen parmaklı çıkıntılar oluşturarak yüzey alanını ve dolayısıyla besinlerin emilimini artırır (Şekil 2.1). Villuslar pilordan 5-6 cm sonra başlarlar; en sık duodenumda ve jejunumun ilk parçasında görülürler. Ancak villus yapıları bağırsakların distaline doğru gidildikçe azalır ve terminal ileumda kaybolur.



Epitel hücrelerinin arasına yerleşmiş ve hormon sentezleyen enteroendokrin hücreler peptid hormonlar ve parakrin maddeler sekrete ederler. Enteroendokrin L hücreleri GLP-1 ve PYY salgısından sorumludur. L hücrelerinin sayısı bağırsağın distal kesimlerine özellikle ileum ve kolona doğru gidildikçe artar. Ancak mukozal alanın villuslar nedeniyle proksimal bağırsak kesimlerinde daha fazla olmasından dolayı L hücrelerinin sayısı üst bölgelerde de oldukça fazladır. Sadece duodenumun başlangıç kısmında L hücrelerinin sayısı çok düşüktür (58).

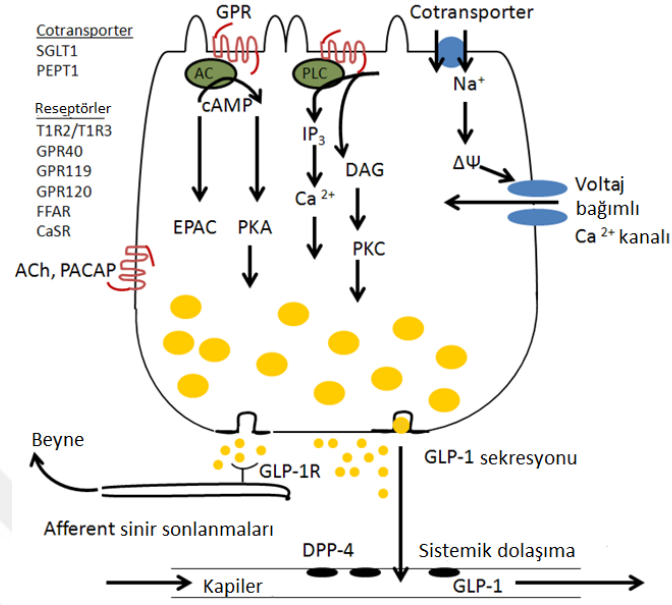
GLP-1, L hücrelerinin salgı granüllerinde uygun bir uyarıya kadar depo edilir. L hücrelerinin apikal yüzleri bağırsak lümenine bakarken, bazolateral yüzleri salgı granüllerinden zengindir. Bu morfoloji GLP-1'in apikal yüzden doğrudan besin uyarısı ile salınmasını sağlarken, bazolateral yüzden de nöral uyarılar, hormonlar ve parakrin faktörler tarafından dolaylı olarak salınmasını mümkün kılar (Şekil 2.1) (58).

### **GLP-1 Salgısının Besinlerle Düzenlenmesi**

GLP-1 salgısı karışık bir besin tarafından uyarılabileceği gibi tek başına şekerler, yağlar, aminoasitler ve hatta safra asitleri tarafından da uyarılabilir (59). Özellikle glukozun oral yolla alınması önemli bir uyarandır; intravenöz olarak uygulanan glukoz GLP-1 salgısını uyarmamaktadır. Farklı besin çeşitleri ve içerikleri salınan GLP-1 seviyesini değiştirmektedir (60). İnsanlarda yapılan çalışmalar karbonhidrat, yağ ve proteinden oluşan bir öğünü takiben L hücrelerinden GLP-1 salınımının yaklaşık 10 dakika içinde arttığını, 30 dakika içinde en yüksek düzeyine ulaştığını ve 3-4 saat kadar yüksek seyrettiğini ortaya koymaktadır (61). L hücrelerinin cevabı, besin miktarına bağlıdır ve gastrik boşalma hızıyla büyük ölçüde ilişkilidir (62,63).

L hücrelerinden GLP-1 salgısının nasıl gerçekleştiği tam olarak bilinmemektedir. Ancak L hücrelerinde çeşitli uyarılarla depolarizasyon, aksiyon potansiyeli ve GLP-1'in ekzositozuna yol açan  $Ca^{+2}$  artışı meydana gelmektedir.  $Na^{+}$  bağımlı glukoz veya aminoasit taşınması,  $K_{ATP}$  kanallarının kapanmasına yol açan glukoz metabolizması, hücre büzüşmesine yol açan luminal ozmolarite artışı veya gerimle açılan katyon kanalları depolarizasyona yol açabilmektedir. Hücre içi cAMP

artışı da GLP-1 salınımı için önemli bir uyarandır (Şekil 2.5). Hormonal, nöral veya besinlere ait sinyaller cAMP düzeyini artırarak salgıyı düzenleyebilmektedir (57).



Şekil 2.5. L hücrelerinde GLP-1 salgısının olası mekanizmaları (64)'den değiştirilerek

SGLT1- Sodyum-bağımlı glukoz taşıyıcısı 1

PEPT1- Oligopeptit taşıyıcısı 1

T1R2/T1R3- Tatlı tat reseptörleri

GPR- G-proteini ile eşleşmiş reseptörler

FFAR- Serbest yağ asitlerinin bağlandığı G proteini bağımlı reseptör

CaSR- Kalsiyum algılayan reseptör

Ach- Asetilkolin

PACAP- Pituitier adenilat siklaz-aktive polipeptit

AC- Adenilat siklaz

cAMP- Siklik adenzin monofosfat

EPAC- cAMP ile etkinleşen değiş-tokuş proteini

PKA- Protein kinaz A

PKC- Protein kinaz C

IP<sub>3</sub>- İnositol trifosfat

DAG- Diasil gliserol

PLC- Fosfolipaz C

## I. Karbonhidratlar

Karbonhidratlar özellikle de glukoz, hem *in vivo* hem de *in vitro* şartlarda GLP-1'in güçlü bir uyarandır. Glukoz-bağımlı GLP-1 salınımının nasıl uyarıldığına dair farklı hipotezler bulunmaktadır. Önerilen mekanizmalardan bazıları sodyum-bağımlı glukoz taşıyıcısı 1 (SGLT1), glukoz taşıyıcısı 2 (GLUT-2) ve tat reseptörlerinin aktivasyonudur (60).

Bağırsaklarda glukoz Emilimi, SGLT1 aracılığıyla gerçekleşir ve L hücrelerinin apikal yüzünde SGLT1 eksprese edilmektedir. L hücrelerine SGLT1 aracılığıyla glukoz alınırken içeri giren sodyum depolarizasyona, depolarizasyon voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının açılmasına ve sitozolik kalsiyum artışı da GLP-1 içeren veziküllerin ekzositozuna yol açar (65). Farelerde yapılan bir çalışmada, SGLT1'i bloke eden phlorizin varlığında glukozla indüklenen GLP-1 salgısının inhibe edildiği gösterilmiştir (66). Ayrıca SGLT-1 taşıyıcısının bulunmadığı farelerde glukoz Emiliminin ve erken dönem GLP-1 salgısının bozulduğu, ancak geç dönem GLP-1 salgısının arttığı gözlenmiştir (65). Bu şaşırtıcı sonuç bazı hipotezlerin ortaya atılmasına yol açmıştır. Bir hipoteze göre bağırsağın üst kısımlarında glukoz Emiliminin engellenmesi, distal bağırsak bölgelerine daha fazla glukozun ulaşmasına ve mikrobiyal fermentasyon sonucu kısa zincirli yağ asitlerinin oluşmasına yol açmaktadır. Kısa zincirli yağ asitleri de alternatif yollardan bağırsağın distalindeki L hücrelerinden GLP-1 salgısına yol açmaktadır (67,68).

Glukozun hücre içine taşınmasında rol oynayan GLUT-2 L hücrelerinde eksprese edilmektedir ve GLP-1 salınımında rol oynayabileceğine dair çalışmalar vardır. GLUT-2 taşıyıcısının bloke edildiği veya GLUT-2 geninin faaliyetinin durdurulduğu (knock-out) farelerde GLP-1 salgısının bozulduğu gösterilmiştir.

Tatlı tat reseptörleri olan T1R'nin aktivasyonu da olası mekanizmalardan birisidir. İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda, oral glukoz yüklemesine yanıt olarak uyarılan tat reseptörlerinin, GLP-1 salgısına yol açtığı gösterilmiştir (60,69). İnsanlarda tatlı tat reseptörü inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda glukoz bağımlı GLP-1 ve PYY salgısının azaldığı gösterilmiştir (70,71). Diğer yandan farelerde

yapılan çalışmalar tatlandırıcıların GLP-1 salınımına yol açmadığını ortaya koymaktadır.

## II. Yağlar

Yağlar, L hücrelerinden GLP-1 salınımının güçlü uyarıcılarıdır ancak karbonhidratlara göre gecikmeli şekilde GLP-1 cevabı oluştururlar (60). Yağ asitlerinin uzunluğu ve doymamışlık oranı verilen yanıtın derecesini belirler (60). Örneğin, doymamış uzun-zincirli yağ asitleri, kısa-zincirli veya orta-zincirli yağ asitlerine göre daha etkili bir şekilde GLP-1 sekresyonunu uyarır (65). Sağlıklı kişilerde zeytinyağının tereyağına göre GLP-1 salgısını daha fazla uyardığı gösterilmiştir (72). Yağların doza bağlı olarak GLP-1 sekresyonunu değiştirdiği de bilinmektedir (73). Ayrıca insanlarda yapılan bir çalışmada, lipaz inhibitörü olan orlistat varlığında GLP-1 yanıtının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (60).

G-proteini ile eşleşmiş reseptörler, bağırsaktaki L hücrelerinde lokalize olan ve özellikle uzun-zincirli doymamış yağ asitlerine afinite gösteren yağ reseptörleridir (65). GPR120 uzun zincirli doymamış yağ asitleri için reseptör olarak görev yapmakta ve hücre içi kalsiyum artışına paralel olarak GLP-1 salgısını düzenlemektedir (74).  $\alpha$ -Linoleik asit, GPR120'nin  $G_q$  alt ünitesinin aktivasyonu ve hücre içi kalsiyum seviyesi artışı sonucu GLP-1 sekresyonunu artırmaktadır (65). GPR120 reseptörünün çalışmadığı (knock-out) farelerde GLP-1 salgısının belirgin olarak bozulduğu ve glukoz intoleransının geliştiği gösterilmiştir. GPR119 L hücrelerinde eksprese edilen  $G_s$  ile eşleşmiş bir başka yağ reseptördür. Lizofosfatidilkolin ve oleyetanolamit, GPR119'un ligandlarıdır ve  $G_s$  aktivasyonu ile intraselüler cAMP artışına yol açarak GLP-1 salınımını artırır (65).

## III. Proteinler

Aminoasit ve peptitlerin algılanması daha çok duodenumda ve düşük seviyede de ileumda gerçekleşir (65). Sıçan bağırsağında ve mürin duodonal endokrin hücre kültüründe yapılan çalışmalar, protein hidrolizatların proglukagon gen transkripsiyonunu ve GLP-1 sekresyonunu artırdığını göstermiştir (65).

Yakın zamana kadar proteinlerin L hücrelerinden GLP-1 salınımını yağlara ve karbonhidratlara göre daha zayıf şekilde uyardığı düşünülmüş olsa da, son yıllarda yapılan çalışmalar bu düşünceyi değiştirmeye başlamıştır. Sağlıklı kişilerde yüksek protein içeren diyetlerle yapılan çalışmalarda, eş kaloriye sahip yüksek karbonhidrat veya yağ içeren diyetlere kıyasla post-prandiyal GLP-1 ve PYY seviyelerinin yükseldiği ve tokluk hissinin arttığı gösterilmiştir (75,76). Protein içeriğinin yüksek olduğu diyetle beslenen kemirgenlerde de benzer sonuçlar elde edilmiş; PYY salgısı yükselmiş, kilo alımı azalmış ve leptin seviyelerinde artma gözlenmiştir (69).

Farklı proteinler GLP-1 cevabını farklı şekilde uyarmaktadır. Örneğin, peynir altı suyu proteini (whey protein), kazeine göre GLP-1 seviyelerinde önemli artışa neden olmaktadır (60). Bu etki proteinlerin aminoasit içeriğine bağlıdır. Reimann ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, enteroendokrin hücre kültüründe farklı aminoasitlerin GLP-1 sekresyonuna etkisi bakılmış ve en güçlü etkinin glutaminle ortaya çıktığı bulunmuş, fenilalanin ve arjininin etkisinin olmadığı gösterilmiştir (77). Glutaminin bu etkisi sağlıklı, obez ve diyabetik kişilerde yapılan çalışmalarla da teyit edilmiştir (78,79). İnce bağırsak hücre kültürleriyle yapılan bir çalışmada glutaminle ortaya çıkan GLP-1 salgısının kalsiyum algılayan reseptör (CaSR) inhibitörleri ile baskılandığı gösterilmiştir (69). Ayrıca glisin ve alanin aminoasitlerinin de GLP-1 salınımını uyardığı bilinmektedir (65).

Aminoasit alımı ile meydana gelen GLP-1 salgısının nasıl gerçekleştiği ve hangi reseptörlerin mekanizmada yer aldığı tam olarak bilinmemektedir. Enteroendokrin hücrelerde yer alan ve protein algılayan bazı reseptörler şunlardır:

- Pepton Reseptörü:

Oligopeptit taşıyıcısı 1 (PepT1), bir dipeptit ve tripeptit taşıyıcısıdır. İnce bağırsak ve kolondaki L hücrelerinde geniş şekilde dağılmıştır. Murin L hücre kültürüyle yapılan bir çalışmada, pepton uygulamasına cevap olarak PepT1 aracılığıyla GLP-1 salındığı görülmüştür (22). Benzer şekilde hücre kültürü çalışmalarında, protein hidrolizatların doza bağlı olarak inkretin salınımını

gerçekleştirdiği ve bu etkinin PepT1 transfekte edilen hücrelerde daha fazla olduğu görülmüştür (65,80).

- $\mu$ -Opioid Reseptörü:

Oligopeptitler, inhibitör G proteini ile eşleşmiş reseptörler olan  $\mu$ -opioid reseptörlerini (MOR) de aktive ederler. MOR, ince bağırsakta ve beyinde özellikle nükleus akumbens bölgesinde bulunur. Portal venin duvarında yerleşmiş olan MOR'un *in vivo* şartlarda protein sindirim ürünleriyle uyarılabildiği ve bağırsaklarda glukoneogenezi uyardığı görülmüştür. Proteinden zengin bir diyet alındığında bu mekanizmanın devreye girmesiyle, portal glukoz seviyesinin ve gıda alımını regüle eden hipotalamik çekirdeklere giden sinyallerin arttığı gösterilmiştir. Portal ven denerve edildiğinde bu etki ortadan kalktığından, gastrointestinal kanalda protein varlığı ile merkezi tokluk hissi arasında bu mekanizma ile gerçekleşen bir bağlantı olması muhtemeldir (22).

- Kalsiyum Algılayan Reseptörler (CaSR):

CaSR, insan ve kemirgen bağırsağında L-aminoasit sensörü olarak rol oynayan ve özellikle aromatik aminoasitler olan L-fenilalanin ve L-triptofan'a güçlü şekilde bağlanan reseptörlerdir. Mace ve arkadaşları tarafından yapılan bir *in vitro* çalışmada, L-aminoasitlerden fenilalanin, triptofan, asparajin, arjinin ve glutamin'in CaSR aktivasyonu ile GLP-1 ve PYY sekresyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (81). Bu nedenle CaSR'ler diyabet ve obezite tedavisinde potansiyel terapötik hedef olarak görülmektedir. CaSR aracılığıyla oluşan bu yanıt, CaSR inhibitörü varlığında veya ekstraselüler kalsiyum yokluğunda ortadan kalkar. Aminoasitlerin allosterik agonist olarak etkilerini başlatmak için kalsiyum eklenmesi gerekir. Murin primer kolon kültürlerinde de, CaSR antagonistlerinin varlığında veya ekstraselüler kalsiyum uzaklaştırıldığında peptonla uyarılan GLP-1 sekresyonunun bozulduğu görülmüştür (22,81).

- GPRC6a:

G proteini ile eşleşmiş reseptörlerin C ailesinden olan GPRC6a, aminoasit sensörü olarak görev yapar. L-arjinin, L-lizin ve L-ornitin gibi bazik aminoasitlere bağlanırken, aromatik aminoasitlere afinite göstermez. Bu reseptör tıpkı CaSR gibi hücre dışında kalsiyum bağlayan bir bölgeye sahiptir ancak kalsiyum bu bölgeye daha düşük afinite ile bağlanır. GPRC6a bağırsak, karaciğer, dalak, akciğer, kalp, böbrek, iskelet kası, beyin ve kemikte eksprese edilmektedir (22).

GPRC6a besinlerin algılanmasında ve dokuların metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bağırsakta GPRC6a reseptörlerinin bulunması ve L- aminoasitler ile reseptörün uyarılabilirliği olması, bu reseptörün proteinlerin enerji metabolizmasındaki etkisine aracılık ettiğini düşündürmektedir (22).

Bu reseptörün hem insan hem de kemirgen L hücrelerinde varlığı gösterilmiştir. Reseptörün L-arjinin ya da L-ornitin gibi aminoasitlerle uyarılmasıyla fosfolipaz C aktivasyonu ve hücre içi kalsiyum artışına bağlı olarak GLP-1 sekresyonu gerçekleşir. Bu yolak inhibe edildiğinde GLP-1'in ekzositozu azalmaktadır (22).

- Tat Reseptörleri:

G proteini ile eşleşmiş reseptörlerin C ailesi aynı zamanda tip 1 tat reseptörlerini (T1Rs) de içerir. Bu reseptörlerin T1R1, T1R2 ve T1R3 olmak üzere 3 alt ünitesi vardır. T1R1 ve T1R3 alt ünitelerinin kombinasyonu, lingual epitelde L- aminoasit reseptörü olarak bilinen umami tat reseptörünü oluşturur. Umami tat reseptörü genel olarak alifatik aminoasitlere, özellikle L-glutamin ve L-aspartata karşı duyarlıdır. İnsan T1R1, glutamata diğer aminoasitlere göre çok daha duyarlı iken, T1R2 aspartam ve siklamat gibi yapay tatlandırıcılara duyarlıdır. Gustducin, G proteini olarak T1R'lerin tat sinyallerini iletmesinde rol oynar. T1R'lere gustducin bağlanması fosfodiesteraz aktivitesini uyarır ve cAMP hidrolizi gerçekleşir. Gustducin ile T1R1 ve T1R3'ün koekspresyonu hem fungiform ve damak tat tomurcuklarında, hem de GLP-1 üreten hücrelerde görülür. Ancak T1R1/T1R3'ün aminoasitlere duyarlı L hücrelerinde fizyolojik rolü olup olmadığı net değildir (22).

- Özel Reseptörler:

Seçici olmayan aminoasit reseptörlerine ek olarak, spesifik aminoasit sensörleri de bağırsakta eksprese edilir. Glutamat, merkezi sinir sistemindeki temel eksitator nörotransmitterdir ancak reseptörü gastrointestinal sistem dahil olmak üzere periferde yaygın olarak bulunur. Metabotropik glutamat reseptörleri G proteini ile eşleşmiş reseptörlerdir ve üç gruba ayrılır. Grup III'de metabotropik glutamat reseptör 4 (mGluR4) bulunur ve mGluR4 fare ve insanda proksimal kolonda en fazla olmak üzere distal bağırsakta eksprese edilir. mGluR4'ün glutamat ile aktivasyonu, adenilat siklaz aktivitesini inhibe ederek hücre içi cAMP üretimini azaltır (22).

Glutamin, enteroendokrin hücre serilerinde fizyolojik seviyelerde bile GLP-1 salgısını uyarıcı yönde etki eder. Mekanizma net olmamakla birlikte, aminoasitin hücre içine alımı ile sitozolik  $Ca^{+2}$  ve cAMP artışı olduğu düşünülmektedir. Zayıf, obez ve diyabetli kişilerde yapılan bir çalışmada, oral glutamin alımına bağlı olarak GLP-1 salgısının bifazik olarak arttığı görülmüştür (22,82).

### **GLP-1 Salgısının Besin Dışı Uyarılarla Düzenlenmesi**

Besinlerle uyarılmaya ek olarak humoral faktörler ve sinirsel düzenlemeler de GLP-1 salınımını değiştirebilmektedir (65).

- Humoral Faktörler:

Endokrin hücrelerden salınan çok sayıda hormon GLP-1 salgısının düzenlenmesinde rol oynar. İnsülin, *in vitro* şartlarda Akt ve ERK sinyal yollarını uyararak L hücrelerinden GLP-1 salınımını uyarır. Ayrıca insan insülin analogu, L hücrelerinde proglukagon gen ekspresyonunu uyarmakta ve GLP-1 sekresyonunu artırmaktadır. Leptin de STAT3 fosforilasyonu aracılığıyla kemirgen ve insan intestinal L hücrelerinden GLP-1 salgısını artırır. Kemirgenlerde K hücrelerinden sentezlenen GIP'in GLP-1 salgısını artırdığına dair kanıtlar bulunsa da, insan çalışmaları ile teyit edilememiştir. Tümör nekrotizan faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ve interleokin-6'nın da GLP-1 salgısını artırıcı etkileri bulunmaktadır. Somatostatin, bağırsak endokrin hücrelerinden salınan inhibitör bir hormondur. Somatostatin, L



hücrelerinde inhibitör G proteini ( $G_i$ ) aktivasyonu ile adenilat siklazı inhibe ederek ve cAMP seviyelerini düşürerek GLP-1 sekresyonunu baskılar. Ekzojen olarak uygulanan glukagon da insanlarda GLP-1 salınımını baskılamaktadır (65,69).

- Sinirsel Düzenlemeler:

Enterik sinir sistemi (ESS) milyonlarca nöron içermesi ve otonom çalışabilmesi nedeniyle ikinci beyin olarak adlandırılmaktadır. ESS bağırsak kanalında motilite ve salgı başta olmak üzere pek çok işlevden sorumludur, ayrıca bağırsak epitelinde yerleşmiş enteroendokrin hücrelerden hormon salınımını da düzenlemektedir. GLP-1 salgısının düzenlenmesinde besinin L hücreleri ile doğrudan etkileşimine ek olarak, üst bağırsak segmentlerinden başlayan refleksler de dolaylı etkiler göstermektedir. GLP-1'in besin alımından sonraki 15-30 dakika içinde gerçekleşen erken salgısında bu reflekslerin rolü olduğu düşünülmüş ancak son yıllarda yapılan çalışmalarla L hücreleri ile besinlerin doğrudan etkileşiminin hem erken hem de geç salgiya yol açtığı gösterilmiştir (69).

L hücreleri gastrointestinal sistemdeki nöronlarla ve kan damarları ile yakın komşuluk içindedir. Sıçanlardan izole edilen kolon ve ileumlarla yapılan çalışmalarda kalsitonin-geci ile ilişkili peptit (CGRP) ve gastrin salgılatıcı peptit (GRP)'in GLP-1 salgısına yol açtığı bulunmuştur. Sıçanlarda yapılan çalışmalarda GRP antagonize edildiğinde GLP-1 salgısının azaldığı bulunmuştur. GLP-1 salgısının kolinerjik nöronlar üzerinden de gerçekleşebildiği bilinmektedir.  $M_1$  ve  $M_2$  muskarinik reseptör alt tipleri insan L hücrelerinde eksprese edilmektedir ve bu reseptörlerin GLP-1 salgısının nöral düzenlenmesine aracılık ettiği düşünülmektedir (65). Muskarinik reseptör antagonistleri verilerek veya vagus siniri kesilerek yapılan çalışmalarda özellikle yağlara cevaben gerçekleşen GLP-1 salgısının azaldığı ve hatta durduğu gösterilmiştir (65,69,81,82).

### **GLP-1'in Biyolojik Etkileri**

GLP-1'in başlıca etkileri glukoz homeostazı, gastrointestinal işlevler, gıda alımı ve iştah üzerinedir (57).

## GLP-1'in Pankreas Üzerine Etkileri

- **İnsülin Salgısının Uyarılması**

Pankreasın beta hücrelerinde GLP-1 reseptörleri yüksek oranda eksprese edilir (65). GLP-1, glukoz bağımlı insülin sekresyonunu artırarak ve glukagon sekresyonunu inhibe ederek tokluk kan glukozunu düşürür (Şekil 2.6) (46). Sıçan pankreasında yapılan bir çalışmada, GLP-1 tedavisi ile GLUT-2 ve glukokinaz mRNA'sının ekspresyonunun ve glukoz bağımlı insülin salınımının arttığı görülmüştür (83). Kemirgenlerde ve insanlarda yapılan çalışmalarda da, GLP-1 reseptör antagonisti olan exendin-4 (9-39) ile postprandiyal insülin sekresyonunun azaldığı ve glukoz toleransının bozulduğu gösterilmiştir (65).

GLP-1 beta hücrelerindeki G proteini ile eşleşmiş özgül reseptörüne bağlandığında adenilat siklaz aktivasyonu ve cAMP üretiminde artış olur. Protein kinaz A ve cAMP-GEF 2 (Epac 2) sinyal yollarının aktivasyonu sonucu iyon kanallarının aktivitesi değişir, intraselüler kalsiyum konsantrasyonu artar ve insülin içeren granüllerin ekzositozu gerçekleşir (46). Ayrıca GLP-1 beta hücrelerindeki reseptörüne bağlandığında, insülin gen transkripsiyonu ve biyosentezi de uyarılır (84). Böylece insülin depolarının doldurulmasını sağlar.

- **$\beta$ -Hücre Proliferasyonu ve Apoptoz**

GLP-1, pankreas hücrelerinin farklılaşma ve proliferasyonu üzerine de etkiler gösterir. Beta hücrelerinin apoptozunu inhibe eder, adacık neogenezi uyarır ve ekzokrin kanal hücrelerinde farklılaşmayı artırır (85,86). Diyabetik sıçanlara GLP-1 uygulandığında, hücre proliferasyonunda artış ve beta hücre apoptozunda azalma görülmüştür (87). Ayrıca GLP-1 reseptör aktivasyonu, beta hücrelerinde endoplazmik retikulum stresini azaltmaktadır (65). Sonuç olarak GLP-1 reseptör agonistleri, apoptotik yolları inhibe ederek beta hücre kütlelerinin gelişmesini ve korunmasını sağlar.

- **Glukagon Salınımının Baskılanması**

GLP-1, pankreasta alfa ve gama hücrelerine de bağlanabilmektedir. GLP-1 alfa hücrelerindeki reseptörüne bağlandığında glukagon salınımı inhibe olur. GLP-1, pankreatik somatostatin sekresyonunu da uyarır ve parakrin etkileşimle glukagon sekresyonu inhibe edilir (46).

- **Diyabetle Olan İlişkisi**

GLP-1 analogları klinikte tip 2 diyabetin tedavisi için kullanılmaktadır. Tip 2 diyabet, inkretin etkinin azalması veya yokluğuyla karakterizedir ve insülin direnci vardır. Tip 2 diyabeti olan hastalarda GLP-1 tedavisi insülin sekresyonunu artırır, kan şekerini düşürür ve beta hücre fonksiyonlarını artırır (88).

Tip 2 diyabetli kişilere açken intravenöz olarak GLP-1 uygulandığında, başta insülin sekresyonunun arttığı, plazma glukoz seviyesi düştüğünde tekrar başlangıç seviyesine indiği gösterilmiştir. Bu arada glukagon sekresyonu da baskılanmış, glukoz seviyesi normal değerlere indiğinde glukagon seviyesi tekrar artmıştır. Zander ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise, 6 hafta boyunca GLP-1'in subkutanöz infüzyonu ile, Tip 2 diyabetli hastalarda glisemik kontrol ve insüline duyarlılık artmış ve  $\beta$ -hücre fonksiyonları düzelmiştir (89). Diyabetik sıçanlarda yapılan bir çalışmada ise, GLP-1 reseptörü agonisti olan exendin-4'ün kan glukozu seviyesini düşürdüğü, insülin sekresyonunu artırdığı gösterilmiştir (90). GLP-1 agonistleri beta hücre kütesini artırıcı etkileri nedeniyle de diyabetli hastaların tedavisinde tercih edilmektedir.

Tip 1 diyabetlilerde de GLP-1'in olumlu etkileri görülmektedir. Tip 1 diyabetliler üzerinde yapılan bir çalışmada, yemekten sonra intravenöz olarak GLP-1 uygulandığında, glukagon salınımının baskılandığı, insülin salgısının arttığı dolayısıyla kan şekerinin daha iyi şekilde regüle edildiği gösterilmiştir.

### **GLP-1'in Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri**

Gastrointestinal sistemin düzenlenmesinde önemli rol oynayan GLP-1, gastrik boşalmayı yavaşlatır, gastrik asit sekresyonunu ve motiliteyi inhibe eder.

GLP-1 reseptörleri, midedeki pariyetal hücrelerde eksprese edildiğinden GLP-1R agonistleri direkt olarak etki gösterebilmektedir (14). İnsanlarda yapılan çalışmalarda, GLP-1'in gastrin salınımını ve besinle uyarılan gastrik asit sekresyonunu azalttığı gösterilmiştir (91,92).

Ayrıca GLP-1'in, ince bağırsağın distalindeki besin miktarına bağlı olarak proksimal kısımda ileal fren etkisi gösterip sindirimi yavaşlattığı görülmüştür (26,46). GLP-1'in bu etkisine bağırsaktan salınan PYY hormonu da katkıda bulunmaktadır (46). GLP-1'in gastrointestinal sistemdeki etkisinin incelendiği çalışmalarda, sağlıklı, obez ve tip 2 diyabetli kişilerde ekzojen olarak uygulanan GLP-1'in gastrik boşalmayı ve glukoz emilimini yavaşlattığı görülmüştür (93,94). Tip 1 ve Tip 2 diyabetli hastalarda doza bağlı olarak intravenöz GLP-1 infüzyonunun da gastrik boşalmayı yavaşlattığı ve postprandiyal kan glukozu seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir (95,96).

GLP-1'in gastrik fonksiyonlar üzerine olan etkisi gastrik boşalmanın düzenlenmesinde önemli rol oynadığı düşünülen vagal yolak aracılığıyla da gerçekleşmektedir (97). Vagal sistemin etkisine bakmak amacıyla trunkal vagotomi yapılan duodenal ülserli hastalarda, GLP-1'in inhibitör etkisinin ortadan kalktığı görülmüştür (98).

### **GLP-1'in İştah ve Vücut Ağırlığı Üzerine Etkileri**

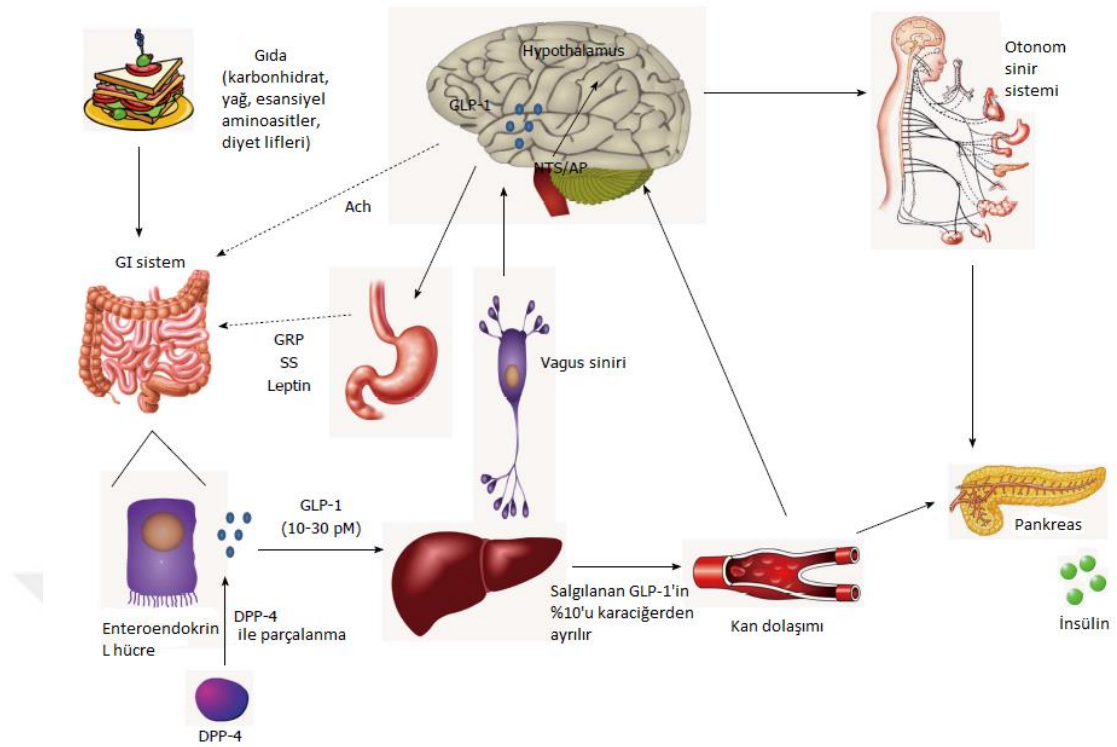
Beyin dokusu GLP-1 sentezinin gerçekleştiği dokulardan biridir ve GLP-1 reseptörleri merkezi sinir sisteminde yaygın şekilde eksprese edilmektedir (14,65). Merkezi sinir sisteminde özellikle nükleus traktus solitarius (NTS) ve area postrema da GLP-1 sentezleyen nöronlar vardır ve bu nöronlar hipotalamusa projekte olurlar. Hipotalamusun paraventriküler, dorsomedial ve arkuat çekirdekleri ise GLP-1 reseptörlerince zengindir. Bu bölgeler dışında talamik ve kortikal alanlarda, retiküler formasyonda, subfornikal organda ve medulla spinalisde de GLP-1 salgılayan nöronlar bulunmaktadır (99). Hipotalamus ve beyin sapı gibi enerji homeostazı ve otonom işlevlerden sorumlu beyin bölgelerinde GLP-1 salgılayan nöronların bulunması, bu hormonun beslenme davranışı ve glukoz metabolizmasını içeren homeostatik düzenlemelerde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir

(14). Ayrıca küçük ve kan beyin bariyerini geçebilen bir molekül olması nedeniyle, enterik kaynaklı GLP-1'in de MSS'de enerji homeostazı ile ilgili işlevlere katkıda bulunuyor olması muhtemeldir. Ancak bu konuda yeterli kanıt bulunmamaktadır (99).

L hücrelerinden salınan GLP-1'in periferik nöral bir yolak üzerinden besin alımı ile ilgili etkilerini gerçekleştirdiğine dair bilgiler de bulunmaktadır. Enterik afferent vagal lifler üzerinde bulunan GLP-1R, portal dolaşıma ulaşan GLP-1 tarafından uyarılmakta ve buradan kalkan sinyaller nükleus traktus solitarius'a oradan da hipotalamusa ulaşmaktadır. Bu mekanizmanın inkretinlerin dakikalar içinde ortaya çıkan salgısından sorumlu olduğuna dair ortaya atılan iddialar, son yıllarda besinlerin L hücreleri ile doğrudan etkileşmesiyle erken salgının gerçekleştiğinin gösterilmesi ile geçerliliğini yitirmiştir.

GLP-1'in besin alımını azaltıcı etkisiyle ilgili yapılan çalışmalar çoğunlukla hayvan çalışmalarıdır. İntraserebroventriküler olarak GLP-1 uygulanan sıçanlarda, gıda alımının azaldığı görülmüştür (100). Hipotalamusun lateral, ventromedial ve dorsomedial bölgelerine GLP-1 enjekte edildiğinde gıda alımının baskılandığı, amigdala'da ise anoreksi olmadan tattan memnuniyetsizliğe sebep olduğu görülmüştür. GLP-1 reseptör agonistleri, merkezi ve periferik olarak kemirgenlere uygulandığında, kısa süreli besin ve su alımında azalma ve kilo kaybı görülmüştür (101). Benzer şekilde sağlıklı, diyabetik ve obez kişilere GLP-1R agonistlerinin periferik uygulanması ile enerji alımı azalmış, kilo kaybı görülmüştür.

GLP-1'in bu etkileri nasıl gerçekleştirdiği tam olarak anlaşılamamıştır. Santral etkilere, bulantı ve gastrik boşalmada azalma da katkıda bulunmaktadır. Sonuç olarak, GLP-1'in hem periferik hem de merkezi etkileri sayesinde iştah ve vücut ağırlığının düzenlendiği Şekil 2.6'da gösterilmiştir (62).



Şekil 2.6. GLP-1'in iştah ve vücut ağırlığı üzerine etkileri (102)'den değiştirilerek

Ach- Asetilkolin

GRP- Gastrin salgılatıcı peptit

SS- Somatostatin

NTS- Nukleus traktus solitarius

AP- Area postrema

### • GLP-1 ve Obezite

Obezite ve inkretinler arasında bir ilişki olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Normal glukoz toleransına sahip obez kişilerde yapılan bir çalışmada, sağlıklı kişilere göre inkretin etkinin önemli ölçüde azaldığı ve açlık plazma glukagon seviyesinin arttığı gösterilmiştir (103). Morbid obezlerde yapılan bir çalışmada, diüurnal L hücre sekresyonunun azaldığı ve yemek sonrası GLP-1 sekresyonunda artış olmadığı saptanmıştır (104). Benzer şekilde, obez kişilerde oral karbonhidrat alımına cevap olarak görülen postprandiyal GLP-1 sekresyonunda da azalma görülmüştür (105).

Obezitede görülen GLP-1 sekresyonundaki azalmaya dair mekanizma net olarak anlaşılamamıştır ancak bu durumun insülin direnci, serbest yağ asitlerinde ve

proinflamatuvar sitokinlerde artış, leptin direnci gibi sebeplerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Leptin, hipotalamusta tokluk sinyali olarak rol oynar ve bu hormon adipoz dokudan salınır. Obezitede kronik olarak yüksek seviyede bulunan leptin hormonuna karşı direnç gelişimi görülür. Leptin, normal şartlarda insan ve kemirgen L hücrelerinden GLP-1 sekresyonunu uyarır ancak obez kişilerde leptin direnci olduğundan GLP-1 salgısında azalma ortaya çıkar. Obezitede serbest yağ asitlerinin birikmesi de GLP-1 sekresyonunu inhibe etmektedir (103).

GLP-1 agonistleri ile uzun süreli tedavi sonucunda hayvanlarda obezitenin azaldığı bulunmuştur. Benzer şekilde subkutan olarak GLP-1 uygulanan obez kişilerde kalori alımı ve kilo azalmıştır. Ayrıca obez hastalarda gastrik bypass ile postprandiyal GLP-1 sekresyonunun arttığı da gösterilmiştir (14,103).

### **2.1.2. L hücrelerinin Diğer Salgıları**

L hücreleri, bağırsak kanalında buldukları yere göre farklı peptitleri bir arada salgılar. Bu hücreler, GLP-1'in dışında GİP, peptit YY (PYY), oksintomodulin ve GLP-2 gibi hormonları da salgılar (22). Üst bağırsak segmentlerinde L hücrelerinin GLP-1'in yanı sıra GİP salgıladığı, alt bağırsak segmentlerinde ise PYY ve CCK'nin GLP-1 salgısına eşlik ettiği görülmektedir. İntestinal L hücreleri daha çok ileum ve kolonda, az oranda da duodenum ve jejunumda bulunmaktadır. GLP-1 ve PYY salgılayan L hücreleri proksimal jejunumda ortaya çıkar ve sayıları kanal boyunca giderek artar. Dolayısıyla besinlerin L hücreleri ile teması sindirim kanalı boyunca artış gösterir. GLP-1 ve PYY'yi beraber salgılayan L hücrelerinin özellikle enerji homeostazının düzenlenmesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir.

#### **Peptit YY**

Peptit YY (PYY), diğer üyeleri pankreatik polipeptit (PP) ve nöropeptit Y (NPY) olan pankreatik polipeptit ailesinin bir üyesidir. PYY 36 aminoasit içeren, düz zincirli bir polipeptittir. İlk olarak 1980 yılında izole edilen bu polipeptitin hem C hem de N

terminallerini tirozin aminoasidi oluşturur. Tirozin Y harfi ile temsil edildiğinden, iki ucunda tirozin bulunan bu peptite *Peptit YY* adı verilmiştir (106-109).

PYY, özellikle ileum ve kolonda bulunan L hücrelerinden GLP-1 ile birlikte salgınır. PYY'nin dolaşımında PYY<sub>(1-36)</sub> ve PYY<sub>(3-36)</sub> olmak üzere iki aktif formu bulunur. PYY<sub>(1-36)</sub> bağırsakta oluşan esas peptit olup, DPP-IV'ün enzimatik aktivitesi ile ilk iki aminoasidini kaybederek PYY<sub>(3-36)</sub> formuna dönüşür. Köpek bağırsağındaki immünoreaktif incelemelerde, PYY<sub>(1-36)</sub>'nin %60, PYY<sub>(3-36)</sub>'nin %40 oranında bulunduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde insanda yapılan bir çalışmada da her iki form dokularda neredeyse eşit seviyede bulunmuştur. İnsanda PYY'nin yarı ömrü yaklaşık olarak 9 dakikadır (106).

PYY, G proteini ile eşleşmiş "Y" reseptörleri aracılığıyla etkilerini göstermektedir (110). PYY<sub>(1-36)</sub> Y1, Y2, Y4, Y5 ve Y6 reseptörlerine değişik afinitelerle bağlanabilirken; PYY<sub>(3-36)</sub> özellikle Y2 reseptörüne bağlanır. PYY<sub>(1-36)</sub> ve PYY<sub>(3-36)</sub> her ne kadar gastrointestinal hormonlar olsalar da, kan beyin bariyerini geçtikten sonra santral Y reseptörlerine bağlanarak nöropeptit olarak da görev yapar (111). Yapılan çalışmalarda PYY<sub>(1-36)</sub>'nin merkezi sinir sistemindeki Y1 ve Y5 reseptörleri aracılığıyla iştah ve kilo alımını uyardığı, PYY<sub>(3-36)</sub>'nin ise santral Y2 reseptörleri aracılığıyla arkuat nükleustan NPY salınımını inhibe ettiği, besin alımını baskıladığı tespit edilmiştir (106,112). PYY'nin merkezi sinir sistemi, hipotalamus, medulla ve ponsta da eksprese edildiği bilinmektedir (113).

PYY salgısı bağırsak kanalının proksimalinden distaline kadar devam eder ve bağırsağın distalinde PYY düzeyi daha yüksektir (114). Sıçan, koyun ve insan bağırsağında duodenum ve jejunumda PYY konsantrasyonu düşük, ileum ve kolonda yüksek iken, en yüksek PYY konsantrasyonu rektumdadır (114). İnsanlarda yapılan başka bir çalışmada ise, PYY seviyesinin midede 3.4 pmol/g, duodenum ve proksimal jejunumda 17.1 pmol/g, distal jejunumda 65.4 pmol/g ve terminal ileumda 100 pmol/g olduğu gösterilmiştir. Sigmoid kolon mukozası örneklerine bakıldığında ise PYY seviyesi 1965±484 pmol/g olarak bulunmuş ancak kolonun kas tabakasında bulunamamıştır (106).



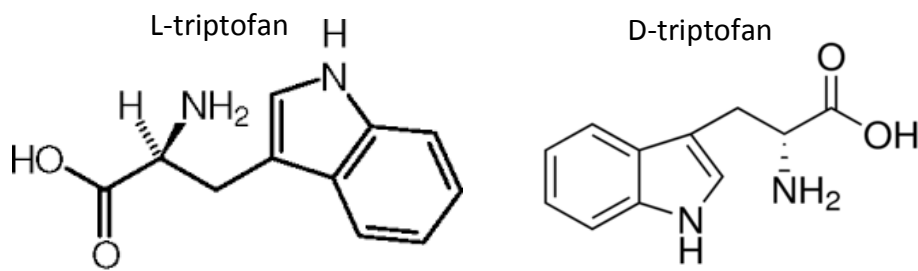
PYY salınımı, gıda alımıyla gerçekleşir ve kalori yüklemesiyle PYY seviyesi de artmaktadır (113). Sağlıklı bireylerde yapılan bir çalışmada, kalori içeriği arttıkça PYY seviyesinin yükseldiği gözlenmiştir (106). Ayrıca açlık durumunda plazmadaki PYY konsantrasyonunun 8,5 pmol/lit olduğu, 870 kilokalori besin takviyesiyle bu seviyenin 16,2 pmol/lit'ye ve 4500 kilokalori ile 45 pmol/lit'ye çıktığı gösterilmiştir (106). Tavşan kolonunda yapılan bir çalışmada ise, safra tuzu ve kısa zincirli yağ asitlerinin portal vendeki PYY seviyesini artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca köpeklerde tuz, yağ asidi, aminoasit karışımı, glukoz ve karaciğer ekstraktının intrakolonik infüzyonunun PYY salınımını önemli derecede artırdığı bulunmuştur. Nöral ve hormonal regülatör sistemler de PYY salınımında önemli rol oynamaktadır. Hayvanlarda yapılan bir çalışmada, vazoaaktif intestinal peptitin (VIP) ve kolesistokininin PYY salınımını uyardığı, gastrinin ise PYY salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir (106).

PYY'nin GLP-1 ile ko-sekresyonu sindirim kanalının distaline doğru gidildikçe artış gösterir ve postprandiyal olarak plazma peptit YY seviyesinde belirgin artış görülür (106). Yiyecek alımından 15 dakika sonra peptit YY seviyeleri artmaya başlar ve saatlerce yüksek kalır. Sadece oral glukoz tarafından değil, oral olarak alınan proteinler ve yağlar tarafından da PYY salınımının uyarılabildiği gösterilmiştir. Proteinden zengin bir öğün tüketildiğinde postprandiyal açlık hissini azaldığı gösterilmiştir. Sonuç olarak besinin çeşidine, kalori içeriğine göre PYY salınımının değiştiği ve obez olan kişilerde PYY salınımının azaldığı da bilinmektedir. PYY ayrıca gastrik asit salgısını ve diğer intestinal salgıları da inhibe etmektedir (115). Böylece gastrik boşalmada ve bağırsak motilitesinde yavaşlama görülür. PYY'nin ince bağırsağın distalinde artan besin miktarına bağlı olarak bağırsağın proksimal kısımlarında sindirimin yavaşlaması ile karakterize olan "ileal fren" mekanizmasının bir parçası olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlar beraber değerlendirildiğinde PYY'nin enerji metabolizması ve iştah üzerine önemli bir rolünün olduğu düşünülmektedir (116,117).

## 2.2. L-Triptofan

Sistematik adı (S)-2-Amino-3-(1H-indol-3-yl)-propiyonik asit olan triptofanın, kimyasal formülü  $C_{11}H_{12}N_2O_2$  olup molekül ağırlığı 204,23 g/mol'dür. Erime noktası 289°C ve yoğunluğu 1,34 g/cm<sup>3</sup>'tür. Ayrıca bu aminoasit sıcak alkol ve alkali hidroksitlerle çözünürken, kloroform içinde çözünmemektedir.

Triptofan izolasyonu ilk kez 1901 yılında Frederick Hopkins tarafından kazeinin hidrolizi yoluyla gerçekleştirilmiştir (118,119). Triptofan en büyük nötral aminoasit olup Trp ve W kısaltmaları ile gösterilir (120). Tüm aminoasitlerde görüldüğü gibi, triptofanın da L ve D olmak üzere iki izoformu vardır. Triptofanın D-formu bazı bakterilerin hücre duvarı proteinleri ve peptit antibiyotikler ile sınırlıyken, L-formu ise özellikle yüksek yapılı organizmaların biyolojik sistemlerinde yapısal protein veya enzimlerde yaygın olarak görülmektedir (121). L-triptofan (L- $\alpha$ -amino indolo-3 propiyonik asit) diyetle alınan, esansiyel bir aromatik  $\alpha$  aminoasit olup nonpolar, glukojenik ve ketojenik özelliğe sahiptir (122). Ayrıca triptofanın diğer aminoasitlerden yapısal ayırt edici özelliği, Şekil 2.7'de gösterildiği gibi yapısındaki karbon atomuna bağlı fonksiyonel indol grubudur (120).



Şekil 2.7. Triptofanın L ve D izoformlarının yapısı

Triptofan 9 esansiyel aminoasitten birisidir, dolayısıyla vücut tarafından sentezlenemez ve yiyeceklerle alınması gerekir. Triptofan hayati önemi olan proteinlerin sentezi için gereklidir ve genellikle protein sentezinde hız sınırlayıcı rol oynamaktadır (123). Ayrıca triptofan serotonin, melatonin, triptamin, kinolinik asit,

kinurenik asit, niasin, nikotinamid adenin dinükleotit (NAD) ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP) gibi çeşitli biyolojik bileşiklerin öncü maddesidir (120).

Triptofan pek çok protein içeren gıdada ve süt ürünlerinde bulunmaktadır. Özellikle çikolata, yulaf, süt, yoğurt, peynir, kırmızı et, beyaz et, balık, susam, nohut, badem, ay çekirdeği, muz ve fıstıkta yüksek miktarlarda bulunur. İnsanlarda triptofan alımının tavsiye edilen günlük dozu 250-425 mg (kg başına ortalama 4 mg) arasında değişmektedir. Yenidoğan ve çocukların günlük triptofan ihtiyacı ise çok daha yüksektir (kg başına ortalama 12 mg) (120).

Son yıllarda triptofan ile yapılan çalışmalar bu aminositin glukoz metabolizması ve tokluk ile ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır. L-triptofan benzeri aromatik aminoasitlerle yapılan çalışmalarda tokluk hissinin arttığı ve anti-diyabetik etkiler gösterdikleri bulunmuştur. L-triptofanın glukoz metabolizması üzerine olumlu etkilerinin olduğu, ayrıca mide ve bağırsaklar üzerine düzenleyici etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir (124-129).

Sıçanlara L-triptofanın oral yoldan hem tek doz hem de 3 haftalık uygulamasının kan şekeri ve insülin düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir (130). Diyabetik sıçanlarda L-triptofanın etkisinin incelendiği başka bir çalışmada, oral glukoz uygulamasından sonra serum glukoz ve insülin seviyelerinin baskılandığı ve bağırsaktan glukoz emiliminin inhibe olduğu gösterilmiştir. Ayrıca L-triptofan *in vivo* olarak tip 2 diyabetik sıçanlarda glukoz bağımlı enerji tüketimini artırmıştır (131). Triptofanın *in vivo* hepatik glukoneogenezi inhibe ettiği de bilinmektedir (132).

L-triptofanın tokluk ve gıda alımıyla ilişkili olabileceğine dair çalışmalar mevcuttur. Sıçanlarda intraperitoneal olarak verilen düşük doz (75-110 mg/kg) triptofan ilk bir saat içinde yiyecek alımında %40 oranında azalmaya sebep olmuştur (133). Benzer şekilde, L-triptofanın dakikada 0,15 kcal olacak şekilde infüzyonunun, gıda alımı ve tokluk açısından önemli etkileri olduğu ve %19 oranında azalma görüldüğü belirtilmiştir (134). Yapılan bazı çalışmalar triptofanın bu etkilerinin GLP-1 salınımına bağlı olabileceğini ileri sürmektedir (135,136). Yakın zamanda sağlıklı erkek gönüllülerde yapılan bir çalışmada L-triptofanın 90 dakikalık intraduodenal

infüzyonunun GLP-1 ve PYY salınımını artırdığı, bağırsaklardaki etkisinden bağımsız olarak santral etkilerle iştahı azalttığı gösterilmiştir (134). İntestinal epitelyal hücre modellerinde yapılan bir çalışmada, glutamin, fenilalanin ve triptofan içeren serbest aminoasitlerin GLP-1 sekresyonunu uyardığı gösterilmiştir (81). Sağlıklı gönüllülerde gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise jelatinden zengin bir kahvaltıya L- triptofan eklenmesinin GLP-1, ghrelin, iştah ve besin alımı üzerine bir etkisi saptanamamıştır (128). Benzer şekilde, yüksek protein içeren diyet (%30), normal protein içeren diyet (%15) ve %15 oranında enerji içeren aminoasit ve protein karışımı içeren diyet uygulanan kilolu ve obez bireylerde insülin, ghrelin ve PYY hormonlarına bakıldığında açlık konsantrasyonlarına göre farklılık bulunmamıştır (137).

### **2.3. Kalsiyum Algılayan Reseptörler**

Kalsiyum algılayan reseptörler (CaSR), ekstraselüler kalsiyum seviyesindeki değişiklikleri algılayan G proteini ile eşleşmiş reseptörlerdir ve ilk olarak paratiroid bezi hücrelerinde tanımlanmıştır. Yedi transmembran domain içeren reseptörün N-terminal baş kısmı ekstraselüler sıvı içinde bulunurken, C-terminal kuyruk kısmı sitozolde yer almaktadır. G-protein bağımlı reseptörlerin C-alt sınıfına ait bu reseptör ailesinin mensupları bir veya daha fazla heterotrimerik G-proteinini aktive ederek etkilerini göstermektedir (138).

CaSR'ler metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR) ve GABA (B) reseptörleri ile aynı ailede yer almaktadırlar. Bu ailedeki reseptörlerin ortak özellikleri yaklaşık olarak 600 aminoasitlik devasa bir N-terminal baş kısmına sahip olmalarıdır ve bu özellik düşünüldüğünde fizyolojik ligandlarının  $Ca^{+2}$  gibi küçük bir inorganik katyon olması oldukça şaşırtıcıdır. Bununla birlikte, CaSR ve mGluR'ların bahsi geçen baş kısımlarının besin algılayıcı sensör olarak görev yapan bakteriyel periplasmik bağlayıcı proteinler ile yüksek oranda homoloji göstermeleri de şaşırtıcı bir diğer özellikleridir (139).

CaSR'ler, ekstraselüler kalsiyum seviyelerindeki değişiklikleri algılayan, dolayısıyla ekstraselüler iyonize kalsiyum seviyesinin korunmasında önemli role sahip olan reseptörlerdir. Bu reseptörün temel görevi ekstraselüler iyonize kalsiyum

seviyesini sabit tutacak şekilde paratiroid bezinden parathormon salgısını, böbreklerden kalsiyum geri emilimini ve kemiklerde osteoblast/osteoklast işlevlerini düzenlemektir (138). CaSR'nin paratiroid bezi, tiroid bezi, böbrekler, sindirim kanalı ve kemikler de dahil olmak üzere bir çok dokuda varlığı gösterilmiştir (140-143). CaSR'nin gastrointestinal kanaldaki dağılımına daha detaylı olarak bakıldığında midede gastrin salgılayan G hücrelerinde, mukus salgılayan hücrelerde ve parietal hücrelerde, ince bağırsak ve kolon epitel hücrelerinde ve enteroendokrin hücrelerde eksprese edildiği görülmektedir. Bu reseptörlerin midedeki G hücrelerinde asit ve gastrin; ince bağırsak ve kolon hücrelerinde de sıvı ve hormon sekresyonunu düzenlediği bilinmektedir (143,144).

Özellikle paratiroid bezi ve tiroid bezi parafoliküler C hücrelerinde CaSR'ler sırasıyla parathormon (PTH) ve kalsitonin salgısı için geri bildirim mekanizması içinde yer alırlar (138). CaSR'lerin kalsiyum metabolizması üzerindeki hayati rolü, CaSR geni susturulan (knock-out) farelerde yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Bu hayvanlarda PTH salgısı üzerindeki negatif geri bildirim kalkması ile şiddetli hiperparatiroidi, hiperkalsemi, kemik anomalileri, gelişme geriliği ve prematür ölümler ortaya çıkmıştır (145). CaSR'ler ek olarak, PTH seviyelerinden bağımsız olarak artan plazma  $Ca^{+2}$  seviyelerine cevaben renal kalsiyum atılımının ve geri emiliminin düzenlenmesini sağlarlar. CaSR'lerin osteoklastlar ve olası olarak osteoblastlardaki ekspresyonu da bu reseptörlerin kemik mineral dengesi üzerindeki etkileri hakkında ipuçları vermektedir. Bahsi geçen dokulara ek olarak CaSR'lerin beyinde (nöronlar ve glial hücreler) (140,146,147), deride (148,149), meme dokusunda (140), pankreasta (150), karaciğerde (151), plasentada (152,153) ve kemik iliğinde (154) de ekspresyonunun olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

CaSR'lerin birçok dokuda bulunduğu gösterilmesinden sonra, ekstraselüler kalsiyumun birinci mesajcı olarak rolünü araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır. CaSR'ler, kalsiyum dışında polivalan katyonlar ( $Mg^{+2}, Sr^{+2}, Gd^{+3}$ ), L-triptofan gibi aromatik L-aminoasitler, poliaminler, bazik polipeptitler (protamin, poli-lizin) ve ufak peptitler tarafından da aktive edilebilmektedir (155,156).

### 2.3.1. Kalsiyum Algılayan Reseptörlerin proteinlerle uyarılması

CaSR'nin, gastrointestinal sistem lümenindeki aminoasitlerle ilişki kurduğu ve aminoasit konsantrasyonu artırıldıkça reseptör aktivitesinin de arttığı görülmüştür. Yiyeceklerde doğal olarak bulunmaları ve hızlı etki göstermeleri nedeniyle son yıllarda aromatik L-aminoasitlerin CaSR'ler ile olan etkileşimleri merak konusu olmaya başlamıştır. CaSR'nin L-aminoasitlerce uyarılması, protein ve kalsiyum metabolizması arasında bir bağlantı olduğunu düşündürmektedir (157). CaSR'nin kalsiyum ile aktivasyonu midede asit salınımını artırarak proteinlerin sindirimi için gerekli ortamı yaratmaktadır. Daha sonra ortaya çıkan L-aminoasitler de CaSR'ler üzerindeki sinerjistik etkileri nedeniyle kalsiyum emilimini artırmaktadırlar (155). Bu reseptörlerin iki ana ligandını oluşturan kalsiyum ve L-aminoasitler için reseptör üzerinde farklı bağlanma bölgeleri bulunmaktadır ve L-aminoasitler bu reseptörlerle allosterik olarak etkileşmektedir (158).

CaSR'lerin  $Ca^{+2}$  gibi küçük bir inorganik katyonun yanı sıra, L-aminoasitler için de moleküler hedef oldukları, HEK293 ve CHO-K1 hücrelerinde gösterilmiştir (158,159). Bu çalışmalarda, aromatik L aminoasitlerden L-Phe, L-Tyr, L-Trp ve L-His'in kalsiyum algılayan reseptörlerin ekspresyonunu artırdığı, ayrıca bu aktivitenin ekstraselüler kalsiyum konsantrasyonuna bağlı olduğu bulunmuştur (159). Kalsiyum konsantrasyonu eşik değerin altında ise bu aminoasitlerin etki gösteremediği, eşik üstü  $Ca^{+2}$  değerleri veya eşik üstü CaSR agonist varlığında ise aminoasitlerin CaSR'leri aktive ettiği hücre içi kalsiyum mobilizasyonu ile gösterilmiştir. İlave olarak CaSR ekspresse eden HEK293 hücrelerinde  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu 2,5 mmol/lit de iken aromatik aminoasitlerin diğer aminoasitlere oranla daha etkili olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte etkinin stereo-selektif olduğu yani reseptör protein üzerinde spesifik amino asit bağlanma noktalarının bulunduğu tespit edilmiştir.

Literatür kapsamında yapılan çalışmalar CaSR'lerin pozitif yüklü veya dallanmış aminoasitlere kıyasla aromatik ve alifatik aminoasitlere karşı daha seçici olduğunu göstermiştir. Böylece etki derecesi çoktan aza doğru sıralandığında; aromatikler, alifatikler ve polarlar, asidikler, bazikler ve dallı-zincirli aminoasitler

olarak bulunmuştur (158). Ayrıca insan paratiroid hücrelerinde, aromatik aminoasitlerden L-Phe ve L-Trp, diğer aminoasitlerden daha güçlü etki göstermiştir. Bunun yanısıra L-Phe ve L-Trp, L-His ve L-Ala'nın intraselüler  $Ca^{+2}$  mobilizasyonunu uyardığı da bulunmuştur (157).

### 2.3.2. Kalsiyum Algılayan Reseptörlerin inkretinlerle ilişkisi

L-aminoasitlerin inkretin salınımını L hücreleri üzerindeki CaSR'ler üzerinden gerçekleşen sinyallerle düzenlediğini gösteren yayınlar mevcuttur (81,160,161). Mace ve ark. tarafından yapılan *in vitro* bir çalışma, CaSR'lerin bağırsaklarda bulunan L-aminoasitlerden fenilalanin, triptofan, asparajin, arjinin ve glutamin'i algılayarak peptit (GIP, GLP-1 ve PYY) salınımını düzenlediğini göstermiştir (81). Diakogiannaki ve ark. ise fare kolon hücre kültürü ile yaptıkları çalışmada pepton ve oligopeptitlerin doz bağımlı olarak, CaSR aktivasyonu yoluyla, L hücrelerinden GLP-1 salgısına yol açtığını göstermişlerdir (160). İntestinal hücre modellerinde yapılan başka çalışmalarda, L-aminoasitlerden glutamin, fenilalanin ve triptofan'ın GLP-1 sekresyonunu uyardığı gösterilmiştir (77,162). Benzer şekilde ince bağırsağın primer kültürlerinde; et, kazein, pepton (5 mg / ml), L-amino asitlerden Phe, Trp, Gln, Ala (20 mM) ve dipeptit glisin-sarkosin'in (20 mM) GLP-1 sekresyonunu uyardığı görülmüştür (69). Bu bulgular CaSR'lerin enteroendokrin L ve K hücrelerinde besin alımına karşılık oluşturulan cevapta önemli bir düzenleyici reseptör olarak görev yaptığını ortaya koymaktadır. Enteroendokrin L hücrelerinden GLP-1 ve PYY salınımını CaSR'lerin yanı sıra GLP-1 reseptörleri, NPY Y1 reseptörleri ve/veya P2Y1 reseptörleri üzerinden gerçekleşen sinyallerle düzenleyebileceğini gösteren farklı çalışmalar da mevcuttur (81,160,163,164).

Yakın zamanda sıçanlarda yapılan bir diğer çalışma ise CaSR agonistlerinin glukoz intoleransını azalttığını ortaya koymuştur (165). Pankreasın beta hücrelerinde bulunan CaSR'lerin aminoasit sensörü olarak görev yaptığı ve glukoz bağımlı insülin salınımını artırdığı da bilinmektedir. Bu bilgiler birlikte değerlendirildiğinde bazı aminoasitlerin enteroendokrin L-hücrelerini uyarak inkretin hormonu salgısına yol açması ve oluşan sinyalin de CaSR'ler üzerinden gerçekleşiyor olması muhtemeldir.

Bir aromatik aminoasit olan L- triptofan ile CaSR aktivasyonunun intestinal GLP-1 ve PYY salınımı üzerine olan ilişkisinin *in vivo* olarak ortaya konabilmesi diyabet ve obezite tedavisine ışık tutabilir.





### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındıktan sonra, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Yetiştirme Ünitesi'nden temin edilen 21 adet, 4 aylık Wistar türü erişkin erkek sıçan (250-350 gr) kullanıldı. Sıçanlar Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Yetiştirme Ünitesi'nde 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık, havalandırılmalı,  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklığı olan odalarda standart kafeslerde barındırıldı. Deney gününe kadar standart yem ve suya erişimleri sağlandı. Deney hayvanları tartılarak rastgele L-triptofan (T), siklodekstrin (S) ve NPS 2143 (N) olmak üzere üç farklı deney grubuna ayrıldı.

#### 3.2. Cerrahi İşlemler

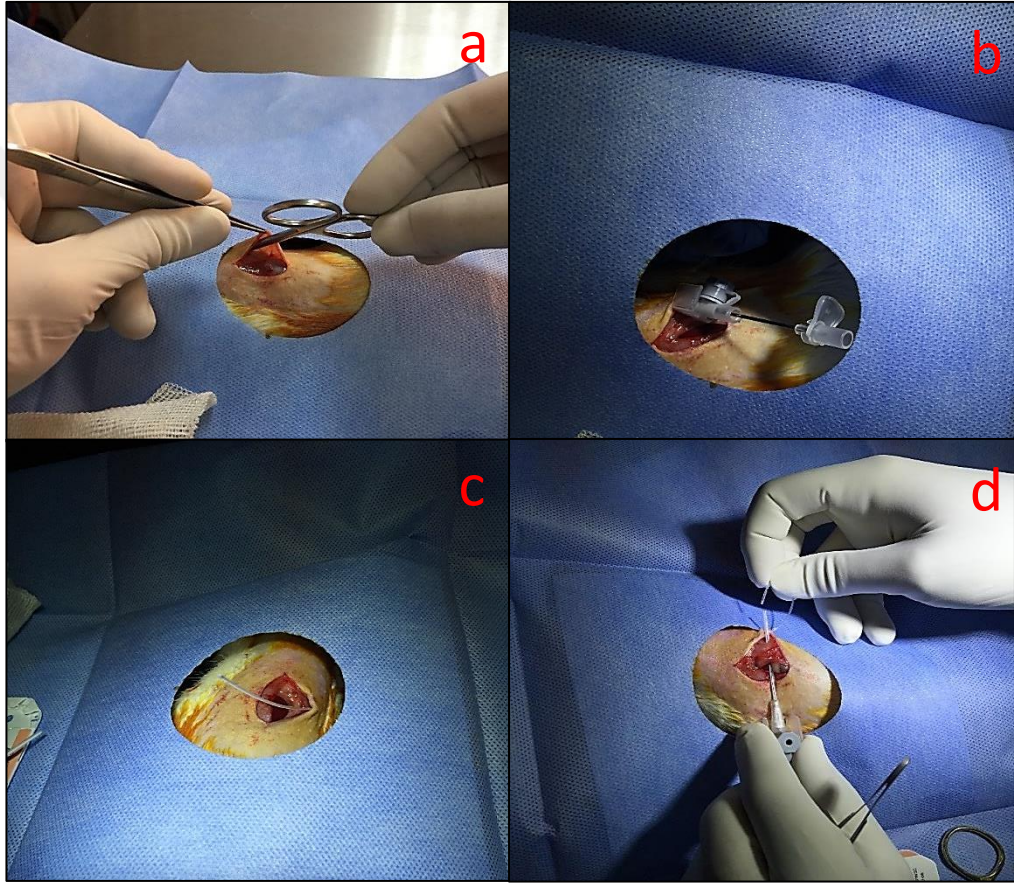
##### 3.2.1. İntraduodenal Kateter Yerleştirilmesi

Cerrahi işlemler su ve yiyecek kısıtlaması yapılmaksızın sabah saatlerinde gerçekleştirildi. Operasyona alınacak sıçanlara, 90 mg/kg ketamin (ketasol %10, 100 mg/ml ketamine HCl, EgeVet) ve 5-10 mg/kg ksilazin (alfazyne %2, 20 mg/ml ksilazine HCl, EgeVet) karışımı intraperitoneal olarak uygulandı ve anestezi sağlandı. Kateterin yerleştirileceği kraniyal abdomen bölgesi ve kateterin enjektör takılabilen arka ucunun yerleştirileceği interskapular bölge tıraş edilerek, dezenfeksiyon sağlandı. Sıçanlar operasyon masasına sırt üstü pozisyonda yatırıldıktan sonra cerrahi alanın üzeri steril cerrahi örtü ile kapatılarak sınırlandırıldı.

Abdominal laparotomi için orta hat boyunca ksifoid kıkırdaktan kaudal yönde ilerletilen 1,5-2 cm'lik deri insizyonu yapıldı. Linea alba üzerinden yapılan kas ve periton insizyonlarından sonra abdominal boşluğa ulaşıldı.

İntraduodenal kateterin enjektör takılabilen arka ucunun, sıçanın interskapular bölgesinde durmasını sağlamak amacıyla bir intraket (gri 16x1,7x45 mm, Galena©, INDIA) abdominal insizyon bölgesinden subkutan olarak interskapular bölgeye doğru ilerletilerek ucu deriden dışarı çıkartıldı (Şekil 3.1 a, b). İntraketin kanülü geri çekildikten sonra, intraduodenal kateterin amaçlanan şekilde

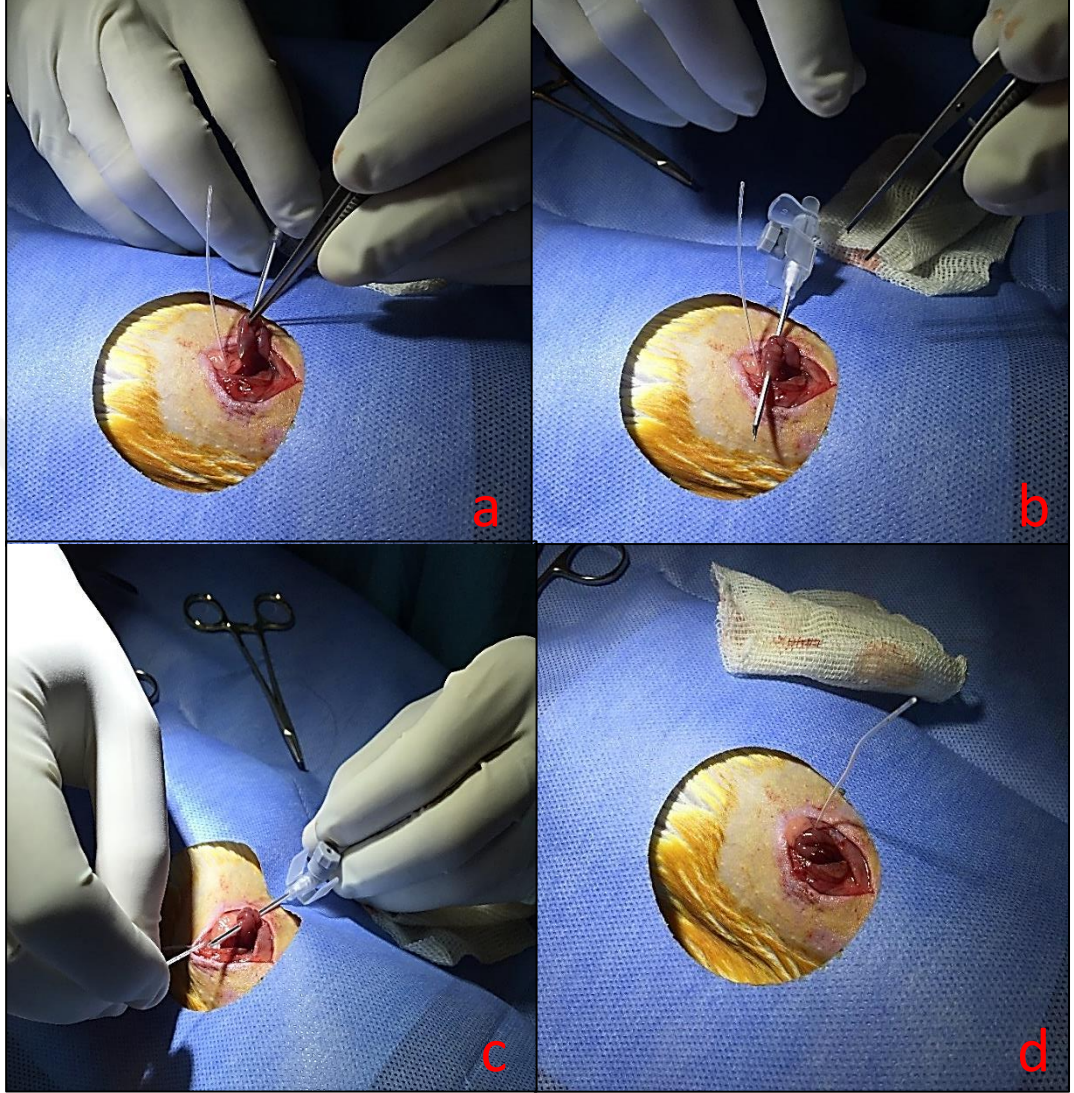
yerleştirilebilmesi için kateterin uç kısmı intraket ucundan içeri doğru ilerletildi. Daha sonra intraketin yavaş yavaş geri çekilmesiyle, subkutan olarak seyreden kateter abdominal insizyon hattına getirildi (Şekil 3.1 c). Kateterin abdominal insizyon hattının 0,5 cm lateralinden abdominal boşluğa alınmasını sağlamak için, aynı intraket abdominal kaslardan içeriden dışarıya olacak şekilde geçirildikten sonra kateterin uç kısmı intraket içinden geçirilerek abdominal boşluğa alındı (Şekil 3.1 d).



Şekil 3.1. İntraketin abdominal insizyon bölgesinden subkutan olarak interskapular bölgeye ilerletilmesi ve kateterin abdominal boşluğa alınması

Kateteri duodenum içine yerleştirmek için yine intraket kullanıldı. Duodenumun başlangıç kısmı belirlendikten sonra intraketin ucu, duodenumun başlangıç kısmının kaudalinden bağırsak lümeni içerisine doğru sokulup içeride 1-1,5 cm kadar ilerletildikten sonra, duodenumun başlangıç kısmının kranialinden dışarı

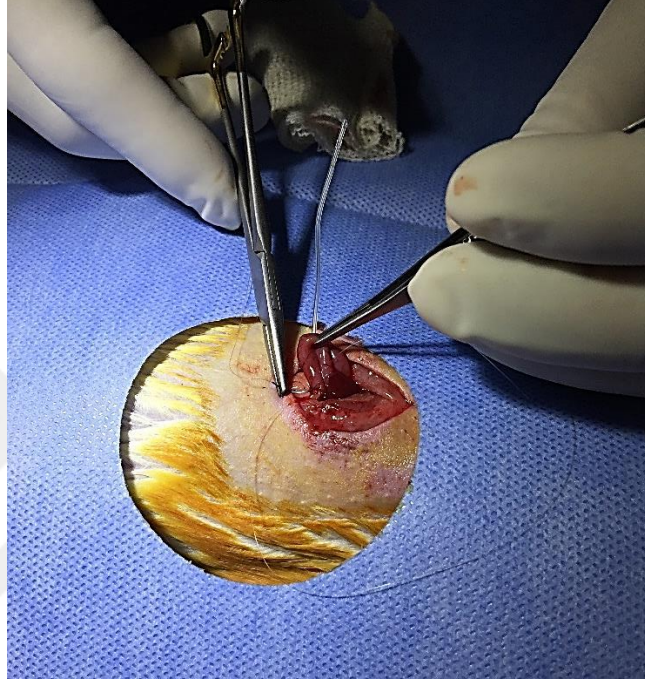
çıkartıldı (Şekil 3.2 a, b). Daha sonra kateter yine intraket yardımıyla bağırsak lümeni içerisine alındı (Şekil 3.2 c, d).



Şekil 3.2. İntraketin duodenum içine yerleştirilmesi ve kateterin intraket yardımıyla bağırsak lümenine alınması

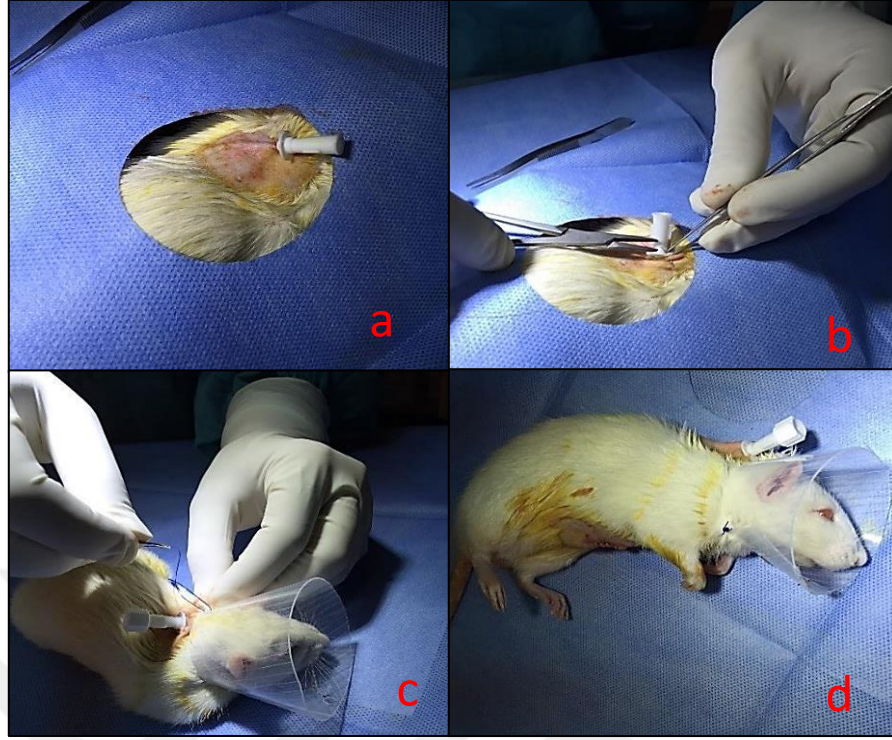
Kateterin dışarıda kalan fazla ucu kesilmeden önce intraketin iğnesi vasıtasıyla kateterin bağırsak lümeninde kalacak kısmına 2 ila 3 adet delik açıldı. Bu uygulama ile kateterden uygulanacak maddelerin bağırsak lümenine geçişini kolaylaştırmak amaçlandı. Kateter ucunun uzun olan fazla kısmı kesildikten sonra emilebilir monofilament cerrahi iplik (atravmatik iğneli 6/0, monosorb®, Orhan Boz ©) kullanarak, kaudaldeki perforasyon noktası tütün kesesi dikişi ile kapatıldı. Aynı

dikiş uygulaması kateterin bağırsağa giriş yaptığı yerde, kateter etrafına da uygulandı (Şekil 3.3). Bu sayede bağırsak dışına sızıntı ihtimali önlenmiş oldu. Ayrıca kateterin bağırsağa giriş yaptığı yer ile abdominal duvar kasları arasında emilebilir monofilament cerrahi iplik kullanarak uygulanan basit sürekli dikişle enteropeksi işlemi gerçekleştirilerek duodenum abdominal kaslara sabitlendi.



Şekil 3.3. Kateterin bağırsağa girdiği yere dikiş uygulanması

İnterskapular bölgede yer alan kateterin dışarıda kalan kısmından serum fizyolojik (SF) verilerek kateterin açık olup olmadığı ve cerrahi bölgesinde sızıntı olup olmadığı kontrol edildi. Abdomen kasları ve deri insizyonu emilebilir multifilament cerrahi iplik (atravmatik iğneli 4/0, sentesorb®, Orhan Boz©) kullanarak, basit sürekli dikişlerle kapatıldı. Kateterin enjektör takılabilen interskapular bölgedeki uç kısmı da basit dikişlerle deriye sabitlendi (Şekil 3.4 a, b). Post-operatif dönemde sıçanın interskapular bölgeye ulaşmasını engellemek amacıyla Elizabethan yakalığı takıldı. Yakalığı dikişlerle deriye tutturuldu (Şekil 3.4 c, d). İnterskapular bölgede ve ventral karın duvarında dikiş uygulanan yerlere sprey formundaki adheziv yara örtücü uygulanarak kontaminasyon engellenmeye çalışıldı.



Şekil 3.4. Kateterin uç kısmının interskapular bölgeye sabitlenmesi ve Elizabethan yakalılık takılması

### 3.2.2. Post-operatif Dönem

Sıçanlar cerrahi sonrasında deney gününe kadar her kafeste tek bir sıçan olacak şekilde 5-6 gün bekletildi. Post-operatif dönemde kateterde oluşabilecek tıkanıklığın engellenmesi ve sıçanların bu işleme alışması amacıyla deney gününe kadar her gün 1 ml SF yavaş infüzyonla intraduodenal olarak verildi. Post-operatif ağrı kontrolü için cerrahi operasyondan sonra her bir sıçana deri altı olacak şekilde 0,01 ml meloksikam enjekte edildi. Diğer zamanlarda kateterin ucu steril bir tıkaçla kapatıldı. Ayrıca cerrahi öncesi ve sonrası dönemde meydana gelen kilo değişimlerini tespit etmek amacıyla sıçanların kiloları ölçülerek, kilo kaybı takip edildi.

### 3.3. Deney Protokolü

Intraduodenal kateter yerleştirilen ve sorunsuz olarak iyileşen sıçanlar, deney protokolünden bir gece önce aç bırakıldı ve ertesi sabah deneye tabi tutuldu. Kateter yerleştirilmeden önce kiloları ölçülen ve post-operatif dönemde kiloları

takip edilen sıçanların, deney günü kiloları tekrar ölçüldü. Deney protokolünde uygulanan kimyasal maddelerin miktarları sıçanların son kilolarına göre hesaplandı.

### **3.3.1. Deney Grupları**

Deney protokolüne başlamadan önce sıçanlara Ketamin-Ksilazin anestezisi (90 mg/kg ketamin, 5-10 mg/kg ksilazin) uygulandı. Deney protokolü boyunca rektal prob ile vücut sıcaklığı takibi yapıldı. 30 ve 60. dakikalarda kan alındıktan sonra hemodinamik dengenin bozulmaması için 1 ml SF yavaş infüzyonla intraduodenal olarak uygulandı. 90. dakikada kan aldıktan sonra sıçanların göğüs kafesi altından girilerek kalp kesildi ve ötenazi işlemi gerçekleştirildi.

#### **L-Triptofan Grubu (T Grubu)**

Sıçanların kuyruk veninden ilk kan örneği alındıktan sonra, intraduodenal olarak 100 mg/kg L-triptofan interskapular bölgede ucu bulunan intraduodenal kateterden enjektör yardımıyla verildi ve süre (0. dakika) başlatıldı. Bu işlemden sonra yine kuyruk veninden 30, 60 ve 90. dakikalarda 1 ml'lik EDTA'lı eppendorf tüplerine kan örnekleri alındı. Her kan örneğinden glukoz ölçüm cihazı ve test stripleri ile anlık olarak kan şekeri düzeyi tayini yapıldı.

#### **L-triptofan + CaSR Antagonisti (NPS 2143) Grubu (N Grubu)**

Sıçanların kuyruk veninden ilk kan örneği alındıktan sonra bir CaSR antagonisti olan NPS 2143, 0,1 mg/kg dozunda intraduodenal kateterden enjektör yardımıyla verildi. 5 dakika sonra yine intraduodenal olarak 100 mg/kg L-triptofan uygulandı ve süre (0. dakika) başlatıldı. 30, 60 ve 90. dakikalarda kuyruk veninden 1 ml'lik EDTA'lı eppendorf tüplerine kan alma işlemi tekrarlandı. Her kan örneğinden glukoz ölçüm cihazı ve test stripleri ile anlık olarak kan şekeri düzeyi tayini yapıldı.

#### **L-triptofan + Siklodekstrin Grubu (S Grubu)**

Sıçanların kuyruk veninden ilk kan örneği alındıktan sonra NPS 2143'ün çözücüsü olan %15'lik siklodekstrin intraduodenal olarak verildi. 5 dakika sonra yine intraduodenal olarak 100 mg/kg L-triptofan uygulandı ve süre (0. dakika) başlatıldı.

30, 60 ve 90. dakikalarda kuyruk veninden 1 ml'lik EDTA'lı eppendorf tüplerine kan alma işlemi tekrarlandı. Her kan örneğinden glukoz ölçüm cihazı ve test stripleri ile anlık olarak kan şekeri düzeyi tayini yapıldı.

### **3.3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar**

#### **L-triptofanın Hazırlanması**

L- triptofan (MERCK®), SF içinde çözüldü. Her bir sıçana 100 mg/kg olacak şekilde 1ml SF içinde verildi.

#### **NPS 2143'ün Hazırlanması**

NPS 2143 ( $\geq$  %98, SIGMA®) çözücüsü olan %15'lik siklodekstrin içinde çözüldü. 0,5 ml'de 0,1 mg NPS 2143 olacak şekilde doz ayarlandı ve sıçanlara kilogram başına 0,1 mg olacak şekilde verildi.

#### **Siklodekstrin'in Hazırlanması**

Hidroksipropil- $\beta$ -siklodekstrin (Sigma)'in %15'lik solüsyonu distile su içinde çözülerek hazırlandı. Bu çözültiden toplamda 0,5 ml verildi.

### **3.3.3. Plazma Örneklerinin Elde Edilmesi**

1 ml'lik EDTA'lı eppendorf tüpleri içindeki kan örneklerine GLP-1'in DPP-IV enzimi tarafından parçalanmasını önlemek amacıyla 10  $\mu$ l DPP-IV inhibitörü (MERCK) ilave edildi. 0, 30, 60, 90. dakikalarda elde edilen kan örnekleri santrifüj cihazına konularak 3000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonunda eppendorfun üst kısmında kalan plazma örnekleri pipetle ayrılarak 0,5 ml'lik eppendorf tüpleri içine aktarıldı. Elde edilen plazma örnekleri L-triptofan, GLP-1, PYY ve insülin ölçümleri yapılana kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

### **3.3.4. Plazma L-Triptofan Düzeyi Tayini**

Deney protokolünün başlangıcında intraduodenal olarak verilen L-triptofanın protokol boyunca plazmada nasıl bir seyir izlediğini takip edebilmek amacıyla 0, 30, 60 ve 90. dakikalarda elde edilen plazma örneklerinden yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile ölçümler yapıldı. HPLC yöntemiyle L-triptofan ölçümü,

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Metabolizma ve Beslenme Ünitesinde gerçekleştirilmiştir. Ölçümler için Immuchrom HPLC cihazı ile kolon (IC4000rp) ve kontrol (IC4000ko) içeren HPLC kiti kullanıldı. Analizi yapılacak plazmalara internal standart içeren presipitasyon solüsyonu eklendi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant HPLC sistemi içine enjekte edildi. HPLC ile izokratik ayırıştırma 30°C'de 10 dakika sürdü. Kromatogramlar bir detektör tarafından kaydedildi. Miktar ölçümü plazma kalibratörü ile yapıldı. Konsantrasyonlar sırasıyla pik yüksekliklerinin alanlarının entegrasyonu ile "internal standart yöntem" aracılığıyla hesaplandı. 210 nm'de UV ile ve 260-300 nm'de floresan algılama ile L-triptofan seviyeleri belirlendi.

### 3.3.5. Plazma Hormon Düzeylerinin Tayini

Plazma GLP-1, PYY ve insülin düzeyleri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez ve Acil Laboratuvarlarında ELISA yöntemiyle tayin edilmiştir.

- **Plazma GLP-1 Düzeyi Tayini**

Elde edilen plazma örneklerinden, plazma GLP-1 düzeyi ölçümü için sıçan GLP-1 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kiti (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) kullanıldı. Protokol şu şekilde uygulandı;

1. GLP-1 molekülünün N terminal bölgesine spesifik olarak bağlanan monoklonal antikolarla örneklerde bulunan aktif GLP-1'in tutulması
2. Örneklerden bağlanmayan materyalin yıkamayla uzaklaştırılması
3. Sabitlenen GLP-1'e anti GLP-1 alkalın fosfataz konjugatının bağlanması
4. Bağlanmayan konjugatın yıkanarak uzaklaştırılması
5. MUP (Metil-umbeliferil fosfat) eklenerek konjugatın bağlanmasının ölçümü
6. Plakların 355 nm/460 nm dalga boyunda floresan plak okuyucu ile okunması

- **Plazma PYY Düzeyi Tayini**

Sıçanların plazma örneklerindeki PYY seviyesini belirlemek amacıyla sıçan PYY ELISA kiti (Hangzhou Eastbiopharm Co.,Ltd., Hangzhou) kullanıldı. Sıçanlardan



alınan örneklerin PYY seviyelerini ölçmek için çift antikor sandviç enzime-bağlı immunosorbent (ELISA) test yapıldı. Sıçan PYY monoklonal antikoruna ile kaplanmış enzim eklendi ve inkübasyondan sonra biyotin ile işaretlenmiş PYY antikorları eklendi. İmmün kompleks oluşturmak için Streptavidin-HRP ile kombine edildi, inkübasyondan sonra bağlanmayan enzimler yıkılarak uzaklaştırıldı. Daha sonra Chromogen solüsyon A,B eklendi, solüsyonun rengi maviye doğru değişti ve asitin etkisiyle son olarak renk sarıya dönüştü (rengin parlaklığı ve sıçan plazma örneklerindeki PYY konsantrasyonu arasında pozitif ilişki bulunmaktadır). Örneklerin optik yoğunlukları 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

- **Plazma İnsülin Düzeyi Tayini**

İnsülin düzeyi sıçan/fare ELISA kiti (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) ile ölçüldü. Protokol şu şekilde uygulandı;

1. Önceden titre edilen monoklonal anti-rat insülin antikorlarıyla kaplanmış mikrotiter plakanın kuyularına konan örneklerdeki insülin moleküllerinin tutulması ve yakalanan insülin moleküllerine biyotinlenmiş poliklonal antikorların bağlanması
2. Örneklerden bağlanmayan materyalin yıkamayla uzaklaştırılması
3. Sabitlenen biyotinlenmiş antikorlar için peroksidazın bağlanması
4. Serbest enzim konjugatlarının yıkamayla uzaklaştırılması
5. 3,3',5,5'-tetra metilbenzidin substratı varlığında peroksidaz aktivitelerine bakılarak sabitlenen antikor-enzim konjugatlarının miktarının ölçümü

Enzim aktivitesi 450 nm absorbansda spektrofotometrik olarak ölçüldü ve elde edilen ürünlerin asidifikasyonundan sonra 590 nm absorbans ile doğrulandı (absorbansın artırılması ve bilinmeyen örneklerden insülin miktarının tespiti arasında direk orantı bulunmaktadır).

### **3.3.6 Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi**

Deneyler planlanırken G-power programı kullanılarak üç ortalama arasındaki farkın anlamlılık testi için tek yönlü varyans analizi ile birlikte tekrarlı ölçümlerde

varyans analizi kullanılarak  $\alpha=0,05$  anlamlılık ve  $\beta=0,80$  güç değeri ile örneklem genişliği hesaplandı ve istatistiksel değerlendirmelerin yapılabilmesi için gereken en az hayvan sayısı ( $n=6$ ) belirlendi.

Kantitatif verilerin istatistiksel analizi ve grafik çizimleri Excel ve SPSS (USA) programları kullanılarak gerçekleştirildi. Normal dağılım gösteren değişkenler için gruplar arasındaki farklılıkların belirlenebilmesi amacıyla tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Tek yönlü varyans analizini takiben değişkenlerdeki grupların ikili karşılaştırmaları, Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma (Post-hoc.) analizi ile gerçekleştirildi. Zaman faktörünün önemli olduğu değişkenlerde zaman ve grup etkileşiminin incelenmesi amacıyla tekrarlı ölçümlerde iki yönlü varyans analizi kullanıldı. Tekrarlı ölçümlerde iki yönlü varyans analizinin kullanıldığı değişkenler; vücut sıcaklığı, vücut ağırlığı, plazma PYY düzeyi, plazma L-triptofan düzeyi ve plazma glukoz düzeyiydi.

Verilerin küresellik testi için Mauchly's Test of Sphericity yöntemi kullanıldı. Küresellik varsayımının sağlanamadığı durumlarda Greenhouse-Geisser testi ile hesaplamalarda kullanılan serbestlik derecesi düzeltildi.

Normal dağılım göstermediği belirlenen değişkenler olan GLP-1 ve insülin hormonlarına ait verilerin logaritmik dönüşümü yapılarak, gruplar arasındaki farklılıkların belirlenebilmesi amacıyla Pillai's Trace (Pillai İz) testi uygulandı. Ayrıca plazma insülin, GLP-1, PYY ve glukoz düzeyleri için AUC (eğrinin altında kalan alan) değerleri trapezoid yöntemiyle hesaplandı ve gruplar arasındaki fark tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildi.

Deney gruplarına ait sayısal değerler ortalama  $\pm$  standart hata ( $ort \pm SH$ ) şeklinde ifade edildi. Sonuçlar değerlendirilirken  $P < 0,05$  olan değerler anlamlı kabul edildi.

### **Etik Kurul İzni**

Bu araştırma Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 12 Mart 2015 tarih ve 2015/03 sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir (Ek 1).

## 4. BULGULAR

### 4.1. Genel Özellikler

Çalışmaya 21 adet erkek Wistar sıçan dahil edilmiş ve üç gruba ayrılmıştır. Bu gruplar şu şekildedir;

1. L-Triptofan grubu (T grubu, n=8)
2. Siklodekstrin grubu (S grubu, n=6)
3. NPS 2143 grubu (N grubu, n=7)

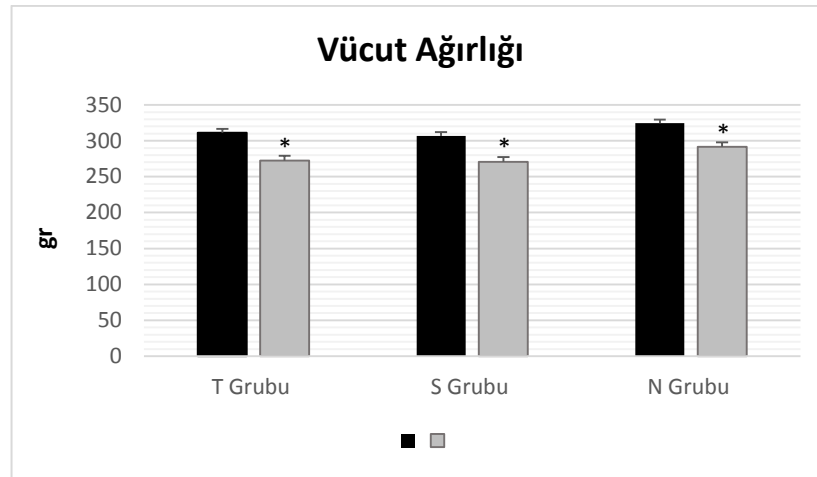
Sıçanların kateter takma işlemi öncesinde ölçülen vücut ağırlıkları (ilk ölçüm) ile deney protokolünün uygulandığı gün ölçülen vücut ağırlıkları (son ölçüm) Tablo 4.1’de verilmiştir. Başlangıç kiloları açısından bakıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $F=0,320$ ,  $P=0,730$ ). Her üç grupta da kateter takma işleminden deney protokolünün gerçekleştiği zamana kadar olan dönemde kilo kaybı olduğu görülmüş ( $F=278,10$ ,  $P=0,000$ ), ancak kilo kaybının yüzde değişimine bakılarak grupların zaman içindeki değişimi incelendiğinde anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $F=0,615$ ,  $P=0,552$ ). Şekil 4.1’de sıçanların deney süresince belirlenen vücut ağırlığı değişimleri grafiksel olarak da gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Sıçanların ölçülen ilk ve son vücut ağırlığı değerleri

#### Vücut Ağırlığı (gr)

	İlk ölçüm	Son ölçüm	% değişim
<b>T Grubu (n=8)</b>	311,1 ± 8,7	272,5 ± 8,3*	%12,4*
<b>S Grubu (n=6)</b>	306,7 ± 8,3	270,5 ± 7,8*	%11,8*
<b>N Grubu (n=7)</b>	324,4 ± 7,6	291,4 ± 6,2*	%10,3*

\*  $P<0,05$  grup içi ilk ve son vücut ağırlıkları arasında



Şekil 4.1. Sıçanların deney süresince ölçülen vücut ağırlıkları

\*  $P < 0,05$  grup içi ilk ve son vücut ağırlıkları arasında

Hipoterminin kan glukozu homeostazını ve insülin duyarlılığını bozduğu bilindiğinden deney protokolünün devam ettiği 90 dakika boyunca sıçanların vücut sıcaklığı takibi yapılmıştır ve hipotermiyi engelleyecek bir ortam sağlanmıştır. Deney protokolü boyunca sıçanların rektal prob ile ölçülen vücut sıcaklığı değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir. Deney protokolünün başlangıcında ölçülen sıcaklık değerleri gruplar arasında farklı bulunmamıştır ( $F=0,641$ ,  $P=0,539$ ). Ayrıca tüm gruplarda deney protokolü boyunca zamansal açıdan anlamlı bir sıcaklık değişimi görülmemiştir ( $F=1,769$ ,  $P=0,196$ ). Grupların zaman içindeki vücut sıcaklığı değişimleri incelendiğinde de birbirlerine benzer oldukları bulunmuştur ( $F=0,839$ ,  $P=0,549$ ).

Tablo 4.2. Sıçanların deney protokolü boyunca ölçülen vücut sıcaklığı değerleri

	Vücut Sıcaklığı (°C)			
	0. dakika	30. dakika	60. dakika	90. dakika
<b>T Grubu (n=8)</b>	35,6 ± 0,6	35,8 ± 0,7	35,3 ± 0,6	35,1 ± 0,6
<b>S Grubu (n=6)</b>	35,3 ± 0,1	35,6 ± 0,3	35,6 ± 0,3	35,5 ± 0,3
<b>N Grubu (n=7)</b>	35,6 ± 0,2	35,8 ± 0,2	35,1 ± 0,2	35,2 ± 0,2

#### 4.2. Plazma L-triptofan Düzeyi

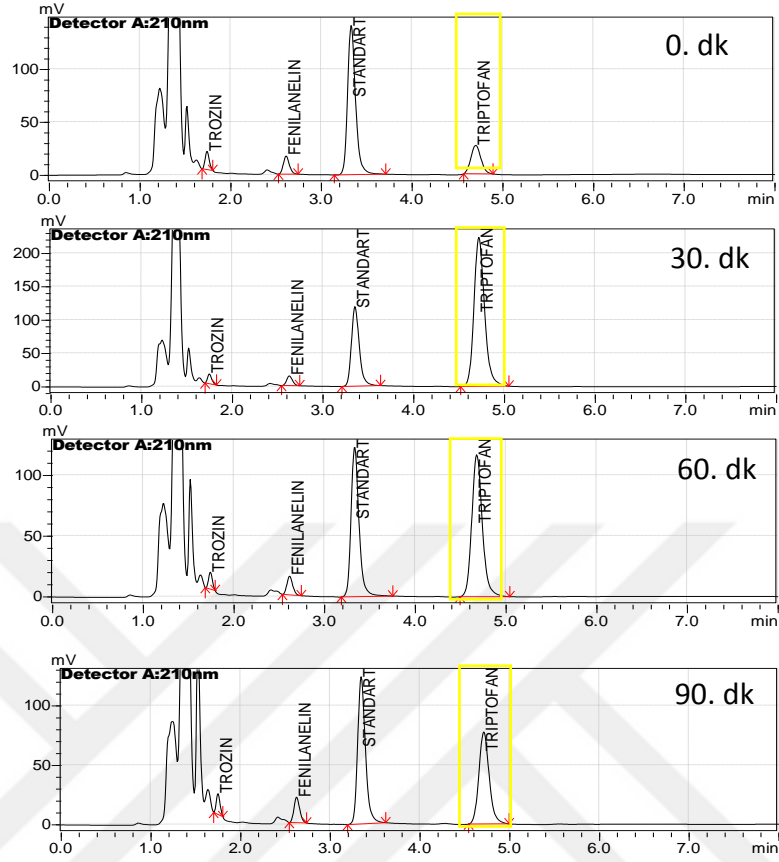
Deney protokolünün başında tüm gruplardan kan örnekleri alındıktan sonra intraduodenal olarak L-triptofan verilmiş ve plazmadaki seviyesini göstermek amacıyla HPLC yöntemi ile tüm zamanlarda (0, 30, 60 ve 90. dk) alınan örneklerden L-triptofan düzeyi tayini yapılmıştır. Tablo 4.3’de zamana bağlı olarak L-triptofan düzeyini gösteren HPLC analizi sonuçları verilmiştir. Ayrıca şekil 4.2’de HPLC yöntemi ile tayin edilen L-triptofan düzeylerine ait bir ölçüm gösterilmiştir. İstatistiksel analiz sonucuna göre, tüm gruplardaki başlangıç L-triptofan düzeylerinde anlamlı farklılık olmadığı görülmüştür ( $F=0,992$ ,  $P=0,390$ ). Tüm grupların deney protokolü boyunca plazma L-triptofan düzeyi açısından zamansal değişimi değerlendirildiğinde ise, 30, 60 ve 90. dakikalarda 0. dakikaya göre anlamlı bir fark bulunmuştur ( $F=43,319$ ,  $P=0,000$ ). Beklediğimiz şekilde 30. dakikadaki L-triptofan düzeyleri maksimum seviyelere ulaşmış, 60 ve 90. dakikalarda da bu seviyeler giderek azalmıştır. Ayrıca grupların zaman içindeki L-triptofan seviyesi değişimine bakıldığında birbirlerine benzer olarak görülmüştür ( $F=0,287$ ,  $P=0,823$ ). Şekil 4.3’te sıçanların deney protokolü boyunca ölçülen L-triptofan değerlerinin zamansal değişimi görülmektedir.

Tablo 4.3. Sıçanların deney protokolü boyunca HPLC yöntemiyle farklı zamanlarda ölçülen L-triptofan düzeyleri (mg/dl)

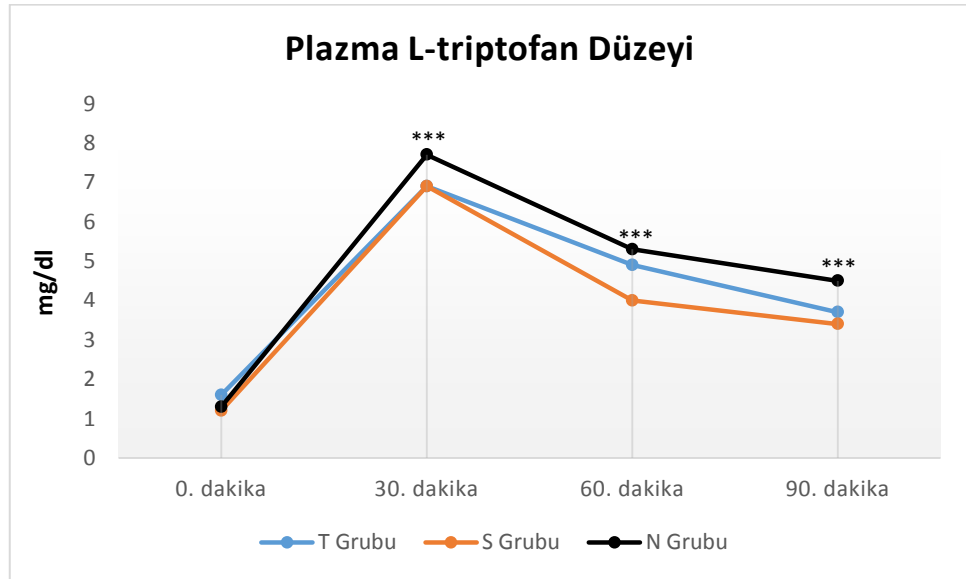
#### Plazma L-triptofan Düzeyi

	0. dakika	30. dakika	60. dakika	90. dakika
<b>T Grubu (n=8)</b>	1,6 ± 0,2	6,9 ± 0,9***	4,9 ± 0,6***	3,7 ± 0,4***
<b>S Grubu (n=6)</b>	1,2 ± 0,1	6,9 ± 0,9***	4,0 ± 0,4***	3,4 ± 0,8***
<b>N Grubu (n=7)</b>	1,3 ± 0,1	7,7 ± 0,9***	5,3 ± 0,8***	4,5 ± 0,3***

\*\*\*  $P<0,0001$  her grubun 30, 60, 90. dk’ları 0. dk’ya göre



Şekil 4.2. HPLC yöntemi ile tayin edilen L-triptofan düzeylerine ait bir ölçüm



Şekil 4.3. Sıçanların deney protokolü boyunca ölçülen L-triptofan değerlerinin zamansal değişimi, \*\*\* $P < 0,0001$  her grubun 30, 60, 90. dk'ları 0. dk'ya göre

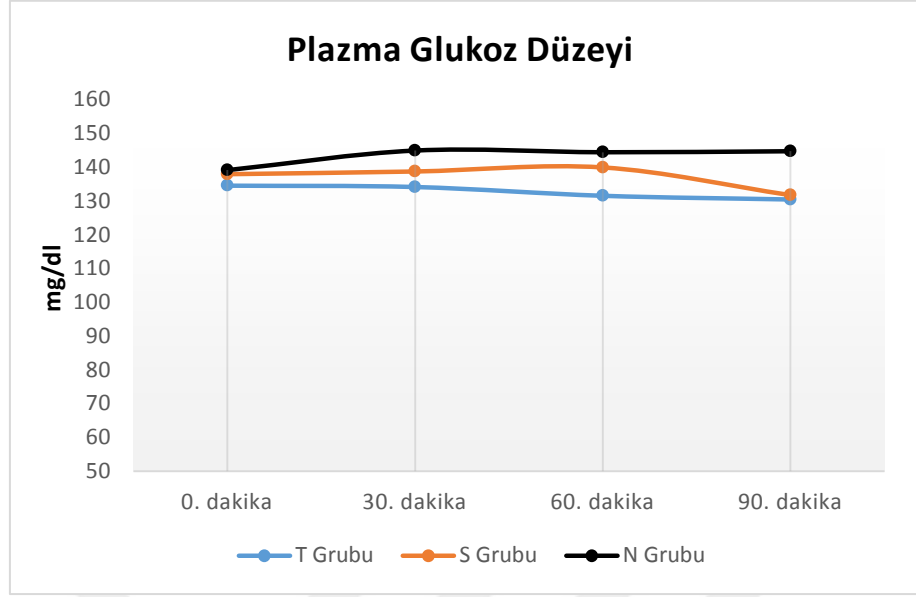
### 4.3. Plazma Glukoz Düzeyi

Sıçanların plazma glukoz düzeyi, deney protokolü boyunca 0, 30, 60 ve 90. dakikalarda alınan kan örneklerinden glukoz ölçüm cihazı ve test stripleri ile anlık olarak tayin edilmiştir. Sıçanların deney protokolü boyunca ölçülen plazma glukoz düzeyleri Tablo 4.4'te verilmiştir. İstatistiksel verilere göre, plazma glukoz düzeyinin gruplar arasında farklı olmadığı ( $F=0,285$ ,  $P=0,755$ ) ve zamana bağlı olarak glukoz düzeylerinde anlamlı bir değişimin gerçekleşmediği ( $F=0,304$ ,  $P=0,822$ ) görülmüştür. Her ne kadar N grubunda 90. dakikada kan şekeri diğer gruplara kıyasla daha yüksek seyretse de bu fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır ( $P>0,05$ ). Ayrıca grupların zaman içindeki plazma glukoz düzeyi değişimleri incelendiğinde, birbirlerine benzer oldukları bulunmuştur ( $F=0,340$ ,  $P=0,911$ ). Şekil 4.4'de bu değerler grafiksel olarak gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Sıçanların deney protokolü boyunca ölçülen plazma glukoz düzeyleri (mg/dl)

#### Plazma Glukoz Düzeyi

	0. dakika	30. dakika	60. dakika	90. dakika
<b>T Grubu (n=8)</b>	135 ± 9	134 ± 14	132 ± 8	131 ± 17
<b>S Grubu (n=6)</b>	138 ± 10	139 ± 12	140 ± 10	132 ± 17
<b>N Grubu (n=7)</b>	139 ± 7	145 ± 8	145 ± 7	145 ± 8



Şekil 4.4. Sıçanların plazma glukoz düzeyleri

#### 4.4. Plazma Hormon Düzeyleri

L-triptofan, NPS 2143 ve siklodekstrin gruplarından 0, 30, 60 ve 90. dakikalarda elde edilen plazma örneklerinde GLP-1, PYY ve insülin hormon düzeylerinin tayini sıçanlara uyumlu ELISA kitleri ile yapılmıştır.

##### 4.4.1. Plazma GLP-1 Düzeyi

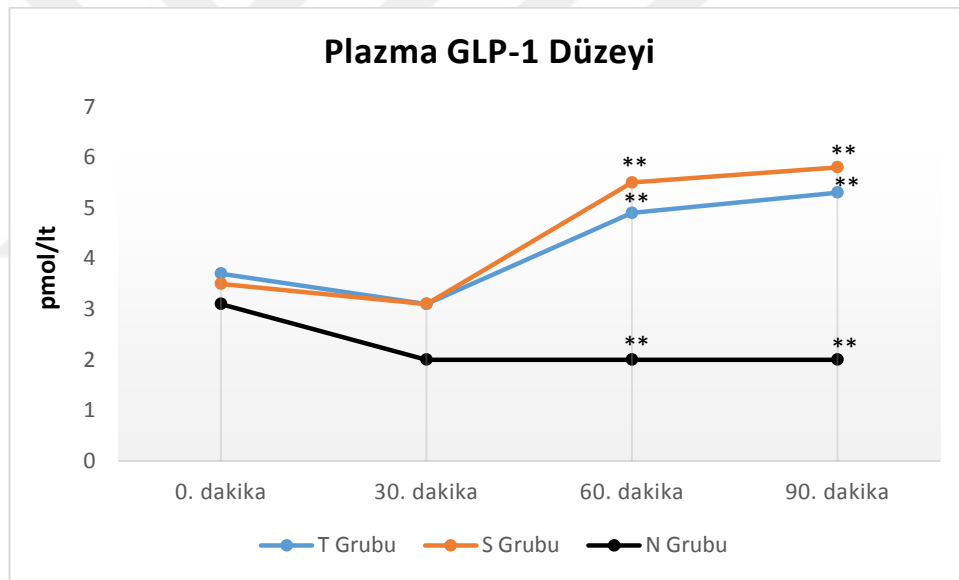
Plazma GLP-1 düzeylerinin belirlendiği ELISA sonuçları üzerinden logaritmik dönüşüm yapılarak istatistiksel analiz sonuçları değerlendirilmiştir. Buna göre, tüm gruplara zamansal açıdan bakıldığında, 60. ve 90. dakikalardaki GLP-1 düzeylerinin 0 ve 30. dakikalardan anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur ( $F=3,460$ ,  $P=0,022$ ). N grubunda her ne kadar GLP-1 salgısı baskılanmış olarak görülse de bu fark örnek sayısındaki azlık nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı farklılığa ulaşmamıştır ( $P>0,05$ ). Plazma GLP-1 düzeyi sonuçları Tablo 4.5'te verilmiştir. Şekil 4.5'te ise GLP-1 düzeylerinin farklı gruplar ve zamanlardaki değişimi grafiksel olarak gösterilmiştir.



Tablo 4.5. ELISA yöntemiyle ölçülen plazma GLP-1 düzeyleri (pmol/lt)

Plazma GLP-1 Düzeyi				
	0.dakika	30.dakika	60.dakika	90.dakika
<b>T Grubu (n=8)</b>	3,7 ± 1	3,1 ± 0,7	4,9 ± 0,8**	5,3 ± 1,2**
<b>S Grubu (n=6)</b>	3,5 ± 1,3	3,1 ± 0,9	5,5 ± 1,5**	5,8 ± 1,3**
<b>N Grubu (n=7)</b>	3,1 ± 0,8	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,2**	2,0 ± 0,2**

\*\*  $P < 0,01$  grup içi 60 ve 90. dk'lar 0 ve 30. dk'lara göre



Şekil 4.5. Plazma GLP-1 düzeylerinin farklı gruplar ve zamanlardaki değişimi

\*\*  $P < 0,01$  grup içi 60 ve 90. dk'lar 0 ve 30. dk'lara göre

Deney süresince salgılanan toplam GLP-1 hormonu miktarını gruplar arasında karşılaştırmak için AUC değerleri hesaplanarak istatistiksel analiz yapılmıştır. AUC değerlerine bakıldığında, GLP-1 hormonu salgısı açısından gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur. Buna göre N grubunda, T ve S gruplarına göre GLP-1 salgısının anlamlı şekilde daha düşük olduğu görülmüştür ( $F=4,314$ ,  $P=0,029$ ). Gruplara ait plazma GLP-1<sub>AUC</sub> değerleri Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6. Gruplara ait plazma GLP-1<sub>AUC</sub> değerleri**GLP-1<sub>AUC</sub> Değerleri**

<b>T Grubu</b>	12,5 ± 2,1*
<b>S Grubu</b>	13,3 ± 1,8*
<b>N Grubu</b>	6,5 ± 0,4

\*  $P < 0,05$  T ve S grupları N grubuna göre**4.4.2. Plazma PYY Düzeyi**

Sıçanların plazma örneklerinden ELISA yöntemiyle elde edilen PYY hormonu düzeyleri değerlendirildiğinde, gruplar arasında PYY hormon düzeyi açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $F=1,698$ ,  $P=0,211$ ). Tüm grupların zamana bağlı olarak PYY hormonu seviyesinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ( $F=0,292$ ,  $P=0,831$ ). Ayrıca grupların zaman içindeki PYY hormonu değişimlerinin birbirlerine benzer olduğu görülmüştür ( $F=1,214$ ,  $P=0,323$ ). Tablo 4.7’de ELISA yöntemiyle ölçülen plazma PYY düzeyleri verilmiştir. Deney süresince salgılanan toplam PYY hormonu miktarını gruplar arasında karşılaştırmak için PYY<sub>AUC</sub> değerleri hesaplanarak istatistiksel analiz yapılmıştır. AUC değerlerine bakıldığında, PYY hormonu salgısı açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $P > 0,05$ ).

Tablo 4.7. ELISA yöntemiyle ölçülen plazma PYY düzeyleri (ng/lt)

**Plazma PYY Düzeyi**

	0. dakika	30. dakika	60. dakika	90. dakika
<b>T Grubu (n=8)</b>	5,9 ± 0,8	5 ± 0,7	6,2 ± 1,6	5,4 ± 0,7
<b>S Grubu (n=6)</b>	3,8 ± 0,2	4,4 ± 0,2	4,4 ± 0,2	4,3 ± 0,3
<b>N Grubu (n=7)</b>	4,3 ± 0,3	4,6 ± 0,4	4,4 ± 0,4	5,1 ± 0,6

#### 4.4.3. Plazma İnsülin Düzeyi

Plazma insülin düzeylerinin istatistiksel analizi yapılarak tüm gruplara zamansal açıdan bakıldığında, 60. ve 90. dakikalarda diğer zamanlardan farklı olarak insülin seviyesinin anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur ( $F=9,099$ ,  $P=0,001$ ). Gruplar kendi içinde kıyaslandığında N grubunda insülin düzeyleri daha düşük bulunmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $F=2,037$ ,  $P=0,159$ ). Tablo 4.8'de sıçanların plazma insülin düzeyleri verilmiştir. Şekil 4.6'da plazma insülin düzeylerinin farklı gruplar ve zamanlardaki değişimi de gösterilmiştir.

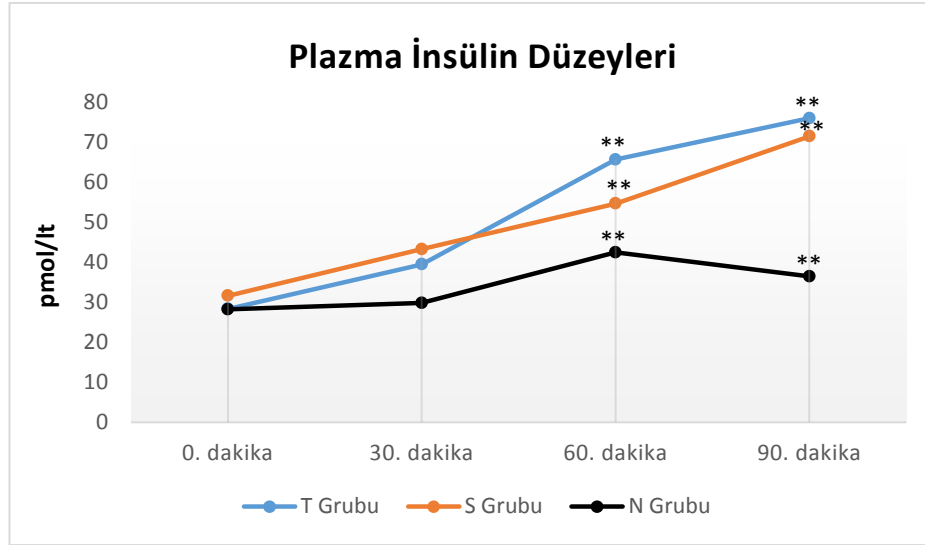
Tablo 4.8. ELISA yöntemiyle ölçülen plazma insülin düzeyleri (pmol/lt)

#### Plazma İnsülin Düzeyleri

	0. dakika	30. dakika	60. dakika	90. dakika
<b>T Grubu (n=8)</b>	28,3 ± 5,2	39,4 ± 10,8	65,6 ± 12,7**	75,9 ± 9,1**
<b>S Grubu (n=6)</b>	31,6 ± 4,5	43,2 ± 14,8	54,6 ± 9,1**	71,4 ± 11,3**
<b>N Grubu (n=7)</b>	28,2 ± 5,8	29,8 ± 9,7	42,4 ± 8,9**	36,4 ± 7,5**

\*\*  $P<0,01$  grup içi 60 ve 90. dk'lar 0 ve 30. dk'lara göre

Her üç grubun zaman içinde değişen plazma insülin düzeyleri kullanılarak AUC değerleri hesaplanmıştır. AUC değerleri analiz edildiğinde, NPS 2143 grubunda L-triptofan ve siklodekstrin gruplarına göre insülin salgısının anlamlı şekilde daha düşük seyrettiği bulunmuştur ( $F=5,387$ ,  $P=0,015$ ). Tablo 4.9'da sıçanların deney protokolü boyunca ölçülen plazma insülin<sub>AUC</sub> değerleri verilmiştir.



Şekil 4.6. Plazma insülin düzeylerinin farklı gruplar ve zamanlardaki değişimi

\*\* $P < 0,01$  grup içi 60 ve 90. dakikalar ile 0 ve 30. dakikalar arasında

Tablo 4.9. Sıçanların deney protokolü boyunca ölçülen plazma insülin<sub>AUC</sub> değerleri

**İnsülin<sub>AUC</sub> Değerleri**

<b>T Grubu</b>	173,5 ± 12,9*
<b>S Grubu</b>	173,7 ± 18,2*
<b>N Grubu</b>	104,4 ± 17,4

\*  $P < 0,05$  T ve S grupları N grubuna göre

## 5. TARTIŞMA

Günlük besin alımlarındaki büyük dalgalanmalara rağmen hayvanların dikkate değer biçimde sabit bir vücut ağırlığına sahip olmaları, çeşitli enerji homeostazı mekanizmaları sayesinde uzun dönemde total kalori alımı ve harcamalarının dengelenmesine bağlanabilmektedir. Santral ve periferik sinyaller mevcut enerji dengesinin durumu hakkındaki bilgileri hipotalamus ve beyin sapı gibi ilgili beyin alanlarına ileterek çeşitli düzenleme mekanizmalarının devreye girmesini sağlamaktadır. Yani beyin, vücudumuzun enerji durumuna dair çeşitli hormonal, nöral ve metabolik sinyalleri alarak, enerji alımı ve harcaması ile ilişkili süreçleri koordine etmektedir. Besin alımının düzenlenmesinde beyin için en önemli bilgi kaynağı beyin-bağırsak aksından gelmektedir. Bağırsaktan gelen nöral ve hormonal uyarılarla birleşen bu sinyaller açlık ve tokluk durumlarının ortaya çıkmasını sağlar. Son yıllarda, bahsi geçen beyin-bağırsak arası nöral ve hormonal iletişimin enerji homeostazı üzerine etkilerini anlama konusunda önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bağırsak hormonları, spesifik olarak beyni hedef alarak iştahın düzenlenmesini sağlamak gibi birçok fizyolojik etkiye sahiptir. Son çalışmalar, bağırsak hormonlarının insanlarda enerji homeostazını düzenlemede bir araç olarak kullanılabileceğini ve bu rolü ile de anti-obezite ve anti-diyabet ilaçları için yeni hedef ve stratejilerin gelişmesine büyük katkı sağlayacağını göstermektedir (19,166). Bu sebepten çalışmamızda incelediğimiz GLP-1 ve PYY gibi bağırsak hormonları, iştahı azaltıp enerji tüketimini artırarak vücut ağırlığını düzenlediğinden önem arz etmektedir.

GLP-1 ile ilişkili farmakoterapiler, postprandiyal insülin sekresyonunu artırıp, gıda alımını baskılayarak kilo kaybına sebep olduğundan diyabet tedavisinde önemli rol oynamaktadır (167,168). Son yıllarda tip 2 diyabetin tedavisinde, GLP-1 hormon analoglarının uzun dönem kullanımı gündeme gelmiştir (169). Endojen GLP-1, DPP-IV enzimi tarafından 1-2 dakika içerisinde hızlı şekilde parçalandığından doğal GLP-1'in diyabet tedavisinde kullanılması pratik ve kullanışlı bir yöntem değildir (46). Literatür kapsamında yapılan çalışmalar, obezite ve diyabet için GLP-1 analogları kullanılmasının ümit verici yeni bir yaklaşım olduğunu göstermektedir (170). Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından sitagliptin gibi çeşitli GLP-1 analogları

T2DM tedavisi için, GLP-1 reseptör agonisti olan liraglutide ise son olarak obezite tedavisi için onaylanmıştır (168).

Diyabeti olan ve olmayan kişilerde yapılan çalışmalar, GLP-1 analoglarının insülin salgısını ve duyarlılığını artırdığını, açlık kan şekerini düşürdüğünü ve plazma glukagon seviyelerini azalttığını göstermiştir (171-173). Ayrıca GLP-1 analogları sağlıklı, diyabetli ve obez kişilerde tokluk hissini artırıp, iştahı azaltarak ve mide boşalmasını yavaşlatarak kilo kaybına sebep olmaktadır (172,174-176). Ancak GLP-1 analogları kullanımında özellikle ilk haftalarda bulantı ve kusma en sık rastlanan yan etkilerdir ve kademeli şekilde dozun yükseltilmesi tavsiye edilmektedir (172,177). Dolayısıyla hazır olarak alınan GLP-1 analoglarının kullanılmasından ziyade bu hormonun doğal yoldan salınımını gerçekleştirecek mekanizmaların aydınlatılması önem arz etmektedir. GLP-1 hormonunun salgılanmasında karbonhidratlar, yağlar ve proteinlerin etkili olduğu bilinmektedir. Özellikle karbonhidrat ve yağ alımına bağlı olarak bağırsaktan GLP-1 sekresyonunun arttığına dair insan ve hayvan çalışmaları mevcuttur (178-180). Yakın zamana kadar proteinlerin GLP-1 sekresyonu üzerine etkili olmadığı veya çok az etki gösterdiği düşünülmesine rağmen yapılan çalışmalar proteinlerin de GLP-1 salınımında etkili olduğunu ortaya koymaya başlamıştır (20,77,81,134,162). Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda esansiyel bir aminoasit olan L- triptofan uygulamasıyla fizyolojik yollardan GLP-1 salgısının değişip değişmediği incelenmiştir. GLP-1 ve PYY hormonlarının enteroendokrin L hücrelerinden birlikte salındığı ve metabolizma açısından benzer etkiler gösterdikleri düşünülmektedir. Bu nedenle çalışmamızda GLP-1 hormonunun yanı sıra PYY hormon düzeyleri de ölçülmüştür. Bu hormonların salgısının glukoz metabolizması üzerine olan etkisine bakabilmek için insülin düzeyi ve kan glukozu konsantrasyonuna da bakılmıştır.

Esansiyel bir aminoasit olan L-triptofan, protein sentezine ek olarak serotonin, melatonin, triptamin, kinolinik asit, kinurenik asit, koenzimlerden NAD ve NADP gibi bileşiklerin öncüsüdür (120). Diğer aminoasitlerden yapısal olarak ayırt edici özelliği, yapısındaki karbon atomuna bağlı fonksiyonel indol grubudur (120). Aynı zamanda L-triptofan nonpolar, glukojenik ve ketojenik özelliklere sahiptir (122).

Bu özelliklerinin yanı sıra, L-triptofanın metabolik faaliyetlerde de önemli rol oynadığını, tokluk hissini artırdığını veya anti-diyabetik etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (156,181,182). Örneğin, sıçanlara intraperitoneal olarak düşük doz (75-110 mg/kg) triptofan verilmesi ilk bir saat içinde yiyecek alımında %40 oranında azalmaya sebep olmuştur (133). Benzer şekilde, sağlıklı erkeklerde dakikada 0,15 kcal olacak şekilde L-triptofan infüzyonunun gıda alımını %19 oranında azalttığı ve tokluk hissi yarattığı bulunmuştur (134). Sağlıklı gönüllülerde gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise jelatinden zengin bir kahvaltıya L-triptofan eklenmesinin iştah ve besin alımı üzerine bir etkisi saptanamamıştır (128).

Bazı çalışmalar triptofanın bu etkilerinin metabolizma ile ilişkili hormonların salınımına bağlı olabileceğini göstermektedir. Tsiolakis ve Marks'a göre, oral L-triptofan alımı insanlarda ve sıçanlarda insülin salınımına yol açmaktadır (183). Buna ek olarak, hipertansif sıçanlara oral tek doz olarak verilen L-triptofanın kan basıncının yanı sıra, kan glukozu ve insülin seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir (130). Steinert ve arkadaşları, sağlıklı erkeklerde L-triptofanın 90 dakikalık intraduodenal infüzyonunun kolesistokinin, glukagon, GLP-1 ve PYY seviyelerini artırdığını ve ghrelin üzerinde etkili olmadığını bulmuşlardır. Bu çalışmada L-triptofan uygulamasının kontrole göre 75-90. dakikalarda GLP-1, 60-90. dakikalarda PYY, 30-90 dk'lar arasında glukagon ve 75. dk'da insülin seviyesini artırdığı tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada L-triptofanın bağırsaktaki etkisinden bağımsız olarak santral etkilerle iştahı azalttığı da gösterilmiştir (134). Benzer şekilde Zhang ve arkadaşları, triptofan ve fenilalanin karışımının (Trp+Phe, 100 mM) intrakolonik infüzyonunun PYY salınımına yol açtığını, Trp+Phe karışımının intravenöz infüzyonuyla PYY salınmadığını göstermişlerdir (184). Triptofanın bağırsaktaki bakteriler tarafından üretilen metaboliti olan indolün, kısa süreli uygulanması sonucu bağırsaktaki L hücrelerinden GLP-1 salgılandığı da görülmüştür (20). Benzer şekilde Mace ve arkadaşları, izole sıçan bağırsağı ile yaptıkları deneylerde L-triptofan'ın GLP-1 salgısını artırdığını bulmuşlardır (81).

Çalışmamızın sonucunda sağlıklı sıçanlara intraduodenal olarak uygulanan L-triptofanın GLP-1 salgısına yol açtığı bulunmuştur. GLP-1 salgısındaki artış 60. dakikada ortaya çıkmış ve 90. dakikada da yüksek seyretmiştir. Bu bulgu literatürle uyumluluk göstermektedir. GLP-1 hormonunun gıda alımından 15 dakika sonra seviyesinin yükselmeye başladığı, 30-45 dakika içinde pik yaptığı ve 2-3 saat sonra bazal düzeyine döndüğü bilinmektedir (61,85). Bu sebeple çalışmamızda, sıçanlara intraduodenal kateter ile L-triptofan uygulandıktan sonra 0, 30, 60 ve 90. dakikalardaki kan örnekleri alınarak GLP-1, PYY ve insülin hormonlarının salgısı incelenmiştir. GLP-1 salgısının L-triptofan uygulamasına bağlı olarak zaman içerisinde arttığı eğri altında kalan alan (AUC) hesaplanarak gösterilmiştir.

PYY özellikle ileum ve kolonda bulunan L hücrelerinden GLP-1 ile birlikte salınmaktadır. GLP-1 gibi PYY sekresyonu da bağırsak lümenindeki besinlerin varlığına bağlı olarak uyarılır ve her iki hormon birçok türde benzer gastrointestinal işlevler gösterir (185). Çalışmamızın sonucunda L-triptofanın intraduodenal infüzyonunun GLP-1 salgısına yol açmasına rağmen PYY seviyesinde değişikliğe yol açmadığı bulunmuştur. Bu sonucun bize göre üç farklı nedeni olabilir.

Bunlardan ilki, PYY salgısında proteinlerin etkisinin zayıf olması olabilir. Ullrich ve arkadaşlarının sağlıklı erkeklerde yaptığı bir çalışmada, hem lipit hem de proteinlerin plazma PYY seviyesini artırdığı ancak 30-90. dakikalar arasında lipitlerin proteinlerden daha fazla etki gösterdiği bulunmuştur (186). Benzer şekilde, yüksek protein içeren diyet (%30, HP), normal protein içeren diyet (%15, NP) ve %15 oranında enerji içeren aminoasit ve protein karışımı içeren diyet (NPAA) uygulanan kilolu ve obez bireylerde insülin, ghrelin ve PYY hormonlarına bakıldığında açlık konsantrasyonlarına göre farklılık bulunamamıştır (137). Ryan ve arkadaşlarının sağlıklı kişilerde yaptığı çalışmalarda, intraduodenal protein infüzyonunun antropiloro duodenal motilite, gastrointestinal hormon salınımı, glukoz ve insülin ile ilişkili olduğu ve enerji alımının baskılandığı görülmüştür. Ayrıca intraduodenal protein uygulaması ile GLP-1 ve kolesistokinin hormonlarının uyarılıp, PYY ve ghrelin hormonlarının uyarılmadığı bulunmuştur (136,187). Yine benzer bir çalışmada, bir yağ asidi olan oleik asidin intraduodenal uygulamasının PYY salınımını uyardığı ancak



intraduodenal olarak verilen aminoasit karışımının (fenilalanin+triptofan), glukozun veya karaciğer ekstraktının plazma PYY seviyelerini yükseltmediği bulunmuştur (188). Dolayısıyla proteinlerin PYY salınımı açısından önemli bir faktör olmayabileceği görülmektedir. Çalışmamızda L-triptofan uygulamasına bağlı olarak GLP-1 hormonu salgısı artarken PYY hormonu salgısında artış olmaması aminoasitlerin yağlar kadar etkili olmamasına bağlı olabilir.

İkinci neden PYY hormonunun sindirim kanalının distalinden daha fazla salınması ile ilişkili olabilir. PYY'nin GLP-1 ile ko-sekresyonu sindirim kanalının distaline doğru gidildikçe artış göstermekte ve özellikle kolonun uyarılması PYY salgısına yol açmaktadır. İzole tavşan kolonlarında, safra tuzu ve kısa zincirli yağ asitlerinin portal vendeki PYY düzeylerinde anlamlı artışa sebep olduğu görülmüştür. Tuz, yağ asiti, aminoasit karışımı, glukoz ve karaciğer ekstraktının köpeklere intrakolonik olarak uygulanması PYY salınımını önemli ölçüde uyarmıştır. İnsan kolonunun tüm kısımlarına deoksikolat infüzyonu yapıldığında yine dolaşımdaki PYY düzeylerinde önemli bir artış görülmüştür (106). Greeley ve arkadaşları tarafından yapılan benzer bir çalışmada ise, bir yağ asidi olan oleik asidin intraduodenal uygulamasının PYY salınımını uyardığı ancak intraduodenal olarak verilen aminoasit karışımının (fenilalanin+triptofan), glukozun veya karaciğer ekstraktının plazma PYY seviyelerini yükseltmediği bulunmuştur (188). Bizim çalışmamızda L-triptofanın intraduodenal olarak uygulanmasının PYY salgısına yol açmamış olması salgının duodenum ve jejunumdan ziyade kolonun uyarılmasına bağlı olmasıyla açıklanabilir.

Diğer bir neden, GLP-1 ile PYY arasındaki geri bildirim mekanizmasıyla ilişkili olabilir. Enteroendokrin L hücrelerinde GLP-1 tarafından yönetildiği düşünülen bir oto-regülasyon sistemi bulunmakta ve bu sistem PYY salınımını modüle edebilmektedir. İnsanlarda yapılan bir çalışmada, GLP-1 infüzyonu ile plazma PYY konsantrasyonunun bazal seviyenin altına düştüğü ve GLP-1'in direkt olarak inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur (185). Böylece sindirim kanalının proksimal kısımlarının uyarılmasıyla artan GLP-1 seviyelerinin daha distalde bulunan L hücrelerinin salgısını inhibe ettiği ve PYY salınımının baskılanmasını sağlayan negatif geri bildirim etkisi yarattığı düşünülebilir (185).

Sıçanlara intraduodenal olarak verdiğimiz L-triptofanın bağırsaklardan emildiğini gösteren plazma L-triptofan düzeyi deney protokolü boyunca takip ettiğimiz parametrelerden birisidir. Sıçanlara intraduodenal olarak verdiğimiz L-triptofanın plazma düzeyinin tespiti için HPLC yöntemi kullanılmıştır (189,190). Sonuç olarak, intraduodenal olarak uygulanan L-triptofan'ın tüm gruplarda 30. dakikada pik yaptığı ve 60-90. dakikalarda seviyesinin yavaş şekilde düştüğü görülmüştür. Böylece beklenildiği şekilde, tüm gruplarda bu artışın anlamlı ve korele şekilde gerçekleştiği ve gruplar arasında fark olmadığı tespit edilmiştir.

Kalsiyum algılayan reseptörler, ekstraselüler kalsiyum seviyelerindeki değişiklikleri algılayan G proteini ile eşleşmiş reseptörlerdir ve memelilerde tüm vücudun kalsiyum homeostazında önemli rol oynarlar. CaSR'lerin sindirim kanalı dahil olmak üzere bir çok dokuda varlığı gösterilmiştir. Özellikle paratiroid, kemik ve böbrek hücrelerinde, midede gastrin salgılayan G hücrelerinde, mukus salgılayan pariyetal hücrelerde, ince bağırsak ve kolon epitel hücrelerinde, enteroendokrin hücrelerde eksprese edilmektedir (191). CaSR'lerin esas ligandı ekstraselüler kalsiyum olmasına rağmen, polivalan katyonlar ( $Mg^{+2}$ ,  $Sr^{+2}$ ,  $Gd^{+3}$ ), poliaminler, bazik polipeptitler (protamin, poli-lizin) ve triptofan gibi aromatik L-aminoasitler de reseptörü aktive edilebilmektedir (155,156).

CaSR'ler ve L-aminoasitler arasındaki etkileşim son yıllarda oldukça gündemde olup bu etkileşimin önemi tam olarak bilinmemektedir. Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında, CaSR transfekte edilen insan embriyonik böbrek (HEK293) hücrelerinde, L-aminoasitlerden fenilalanin, triptofan ve histidin CaSR'leri aktive ettiği gösterilmiştir (158). Ayrıca insan paratiroid hücrelerinde, aromatik aminoasitlerden fenilalanin ve triptofanın, diğer aminoasitlerden daha güçlü şekilde CaSR'leri uyardığı tespit edilmiştir (157). Benzer şekilde intestinal yerleşimli CaSR'lerin de aminoasitlerle etkileştiği ve bu etkileşim sonucunda hormon salgısının değiştiği düşünülmektedir. İntestinal hücre modellerinde yapılan çalışmalarda, L-aminoasitlerden glutamin, fenilalanin ve triptofan'ın GLP-1 salgısını uyardığı gösterilmiştir (77,162). L hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada, peptonlarla uyarılan GLP-1 sekresyonunun CaSR antagonisti olan NPS 2143'e karşı

duyarlı olduğu görülmüştür (160). Mace ve ark. tarafından izole sıçan bağırsağında yapılan bir çalışmada ise, CaSR'lerin bağırsaklarda bulunan aminoasitleri algılayarak peptit (GIP, GLP-1 ve PYY) salınımını düzenlediği gösterilmiştir (81). Bu bulgular CaSR'lerin besin alımına karşılık oluşturulan cevapta önemli bir düzenleyici reseptör olarak görev yaptığını düşündürmektedir.

Bu bulgulardan yola çıkarak planladığımız çalışmamız daha önce yapılan *in vitro* çalışmalara ek olarak L-triptofanın bağırsaktaki kalsiyum algılayan reseptörler üzerinden etki göstererek GLP-1 salınımını uyardığını *in vivo* ortamda göstermesi açısından önemlidir ve bildiğimiz kadarıyla bu konuda yapılmış ilk *in vivo* çalışmadır. Çalışmamızda yer alan ilk gruba sadece L-triptofan (100 mg/kg) uygulanırken; ikinci gruba önce CaSR aktivitesini inhibe ettiği bilinen NPS 2143 (0,1 mg/kg), ardından L-triptofan (100 mg/kg) ve üçüncü gruba da NPS 2143'ün çözücüsü olan siklodekstrin (%15) ve sonrasında L-triptofan (100 mg/kg) uygulanmıştır. Literatürde sıçanlara oral veya intraduodenal olarak uygulanan günlük L-triptofanın dozlarına bakıldığında 10 ila 500 mg/kg arasında değişen değerler görülebilmektedir ve bu bilgiler ışığında bakıldığında çalışmamızda kullandığımız 100 mg/kg L-triptofan dozunun orta seviyede bir doz olduğu söylenebilir (131,192-194). 1986 yılında sıçanlarda yapılan bir çalışmada, 250 mg/kg/gün dozundaki L-triptofanın 3 gün boyunca oral uygulanmasının karaciğerde patolojik değişikliklere yol açtığı gösterildiğinden, çalışmamızda L-triptofanın 100 mg/kg'lık konsantrasyonunun kullanılmasına karar verilmiştir (195). L-triptofan ve NPS 2143'ün oral yoldan gavaj ile veya intravenöz olarak verilmesinden ziyade intraduodenal olarak verilmesinin sebebi de, intestinal kalsiyum algılayan reseptörleri başka etkileşimler olmaksızın doğrudan uarmak ve L hücreleri ile ilişkili olası bir mekanizmanın varlığını ortaya koymaktır. Literatürde de benzer şekilde intraduodenal kateter uygulamasıyla farklı peptitlerin bağırsaktaki CaSR'leri uyardığı gösterilmiştir (165).

Çalışmamızda intraduodenal kateter uygulaması yapılmadan önce ve yapıldıktan sonra sıçanların kiloları ölçülmüştür. Sıçanların ilk ve son kiloları arasında fark olduğu ve son ölçümlerde ilk ölçümlere göre anlamlı bir şekilde kilo kaybı meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu durumun intraduodenal kateter takılmasından

sonraki dönemde sıçanların gıda alımlarında azalma olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak her üç grupta da kilo kaybı benzer oranda olmuştur.

Çalışmamızda CaSR aktivitesini inhibe ettiği bilinen kalsiyum reseptör antagonisti NPS 2143 kullanılmıştır (196). NPS 2143 siklodekstrin çözeltisi içerisinde çözünebilmektedir. Literatür bilgisine bağlı olarak, saf suda çözülerek hazırlanan %15 oranında siklodekstrin solüsyonu kullanılmış ve NPS 2143 bu solüsyonda çözülmüştür (197,198). Çalışmamızda çözücünün etkisini dışlayabilmek için ayrıca siklodekstrin grubu da oluşturulmuştur. Siklodekstrin solüsyonunda çözünen NPS 2143, 0,1 mg/kg olacak şekilde sıçanlara intraduodenal kateterle verilmiştir. Literatürde NPS 2143'ün 1 mg/kg dozunda verildiğine dair çalışmalar da bulunmaktadır ancak bu uygulamalar venöz kateterle yapılmış ve bu dozda NPS 2143'ün hipertansif etkisinin olduğu gösterilmiştir (197,198). Muramatsu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, 0,1 mg/kg NPS 2143 intraduodenal olarak uygulanmış ve CaSR aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (165). Bu sebepten çalışmamızda, NPS 2143'ün intraduodenal dozu 0,1 mg/kg olarak seçilmiştir. GLP-1 sekresyonu açısından bakıldığında NPS 2143 grubunda diğer gruplara göre anlamlı şekilde düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla NPS 2143 grubunda CaSR aktivitesinin inhibisyonuna bağlı olarak GLP-1 sekresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Bulgularımız CaSR'lerin aminoasitlere cevaben aktive olarak bağırsak peptitlerinden GLP-1'in salgısına aracılık ettiğini göstermektedir.

GLP-1 ve insülin kan glukozunu düzenleyen hormonlar olduklarından çalışmamızda sıçanların kuyruk veninden 0, 30, 60 ve 90. dakikalarda kan örnekleri alınarak kan glukozu düzeyleri takip edilmiştir. Kan şekeri takibi için glukoz ölçüm cihazı ve test stripleri kullanılmıştır. Ölçümler sonucunda gruplar arasında ve grup içerisinde zamansal açıdan istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Her ne kadar aminoasitler glukoneogenez için potansiyel substrat olsa da, hem sağlıklı hem de tip 2 diyabetli kişilerde protein alımının kan glukoz konsantrasyonunu artırmadığı bilinmektedir. Sağlıklı kişilerin yumurta beyazındaki proteinleri tek öğün tüketmesiyle kan glukoz konsantrasyonlarının artmadığı, tip 2 diyabetli kişilerde yapılan başka bir çalışmada protein alımının postprandiyal glukoz

konsantrasyonunda azalmaya sebep olduğu bulunmuştur (199,200). Tip 2 diyabetli kişilerde yüksek oranda protein içeren bir kahvaltının HbA<sub>1c</sub> oranını, postprandiyal glukoz ve insülin seviyelerini, sistolik kan basıncını düşürdüğü bulunmuştur (201,202). Benzer şekilde sağlıklı ve tip 2 diyabetli kişilerde tek öğünlük protein diyetiyle yapılan bir çalışmada, aminoasitlerin glukoneogenez yolağında kullanılmasına rağmen glukoz konsantrasyonunu artırmadığı bulunmuştur (201). Tip 2 diyabetli kişilerde yapılan başka bir çalışma, bu kişilere verilen aminoasitin deaminasyonuna göre üretilmesi beklenen net glukoz miktarını yaklaşık 11-13 gr bulmuşken, kanda ölçülen glukoz miktarının yaklaşık 2 gr olduğu görülmüştür (203). Bu durum, protein alımı sonucunda dolaşımda artan glukagon seviyesinin karaciğerde aminoasitlerden glukoz üretimini uyarmasına rağmen artan insülin konsantrasyonunun iskelet kaslarını uyarak glukoz alımını ve glikojen depolarını artırmasına bağlıdır (204).

Çalışmamızla benzer şekilde Inubushi ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada spesifik olarak L- triptofanın kan glukozu artışını baskıladığı bulunmuştur (131). Ayrıca Tip 2 diyabetik hayvan modelinde, L-triptofanın 15 dakika oral olarak uygulanmasının kan glukoz düzeyini değiştirmedeği görülmüştür (205). Ancak hipertansif sıçanlarda oral tek doz L-Trp uygulaması ile kan glukozu seviyesi artmıştır (130). Yapılan başka bir çalışmada ise diyabetik sıçanlarda triptofan açlık kan şekerini yükseltirken, diyabetik olmayan kontrollerde yükseltmemiştir.

Çalışmamızda kan şekeri ve hormon seviyesi gibi parametreler incelenirken bu değerleri değiştirebilecek bir parametre olan vücut sıcaklığı, deney protokolü boyunca rektal prob ile takip edilmiştir. Hipoterminin kan şekeri homeostazını ve insülin duyarlılığını bozduğu, kan glukozunda artışa yol açtığı bilinmektedir (206,207). Bu sebepten kan glukozuyla ilgili optimizasyonu sağlamak amacıyla, deney süresince sıçanların hipotermiye girmesini engelleyecek bir ortam sağlanmıştır. Gruplar ve zamanlar açısından sonuçlara bakıldığında, anlamlı bir fark bulunamamıştır.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### Sonuçlar

- 1) İntraduodenal L-triptofan uygulamasına bağlı olarak GLP-1 salgısı artmıştır.
- 2) İntraduodenal L-triptofan uygulamasının PYY salgısında anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı görülmüştür.
- 3) İnsülin salgısı intraduodenal L-triptofan uygulamasına bağlı olarak artmıştır.
- 4) İntraduodenal L-triptofan uygulaması kan glukoz düzeyini değiştirmemiştir.
- 5) NPS 2143 grubunda GLP-1 salgısının baskılandığı dolayısıyla bu etkide CaSR'lerin rol oynadığı gösterilmiştir.
- 6) NPS 2143 grubunda L-triptofan ve siklodekstrin gruplarına göre insülin salgısının daha az olduğu görülmüştür.
- 7) NPS 2143'ün çözücüsü olan siklodekstrinin glukoz metabolizması veya kalsiyum algılayan reseptörler üzerine herhangi bir etki göstermediği bulunmuştur.
- 8) Sıçanlara intraduodenal kateter takılmasından sonraki iyileşme sürecinde kilo kaybettikleri görülmüştür.
- 9) Sıçanlara intraduodenal olarak verilen L-triptofanın bağırsaklardan emildikten sonra seviyesinin tüm gruplarda 30. dakikada pik yaptığı ve 60-90. dakikalarda yavaş şekilde düştüğü bulunmuştur.

## Öneriler

Bu tez çalışmasıyla, bir esansiyel aminoasit olan L-triptofan'ın sıçanlara akut intraduodenal uygulamasının bağırsaklardan GLP-1 ve PYY salgısı üzerine olan etkisi ve bu etkide CaSR'lerin rolü olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamız sonucunda akut intraduodenal L-triptofan uygulamasına bağlı olarak plazma GLP-1 ve insülin düzeylerinde anlamlı şekilde bir artış olduğu, ancak plazma PYY ve glukoz düzeylerinde fark olmadığı görülmüştür. Çalışmamızda ayrıca kalsiyum algılayan reseptörlerin L-triptofanın olası GLP-1 ve PYY salgılatıcı etkisine aracılık eden reseptörlerden olup olmadığını belirleyebilmek amacıyla bir kalsiyum antagonisti olan NPS 2143 kullanılmıştır. NPS 2143 kullanılan grupta GLP-1 ve GLP-1'in hedefi olan insülin salgısının baskılandığı gözlenmiştir. Bu bulgu da, L-triptofanın bağırsaklardan GLP-1 salgılatıcı etkisinin kalsiyum algılayan reseptörler aracılığıyla da gerçekleştiğini kanıtlamaktadır. Bu mekanizmanın anlaşılması, gelecekte L-triptofan gibi doğal aminoasitler kullanılarak herhangi bir yan etkiye yol açmaksızın diyabet ve obezite gibi hastalıklarla mücadele edilmesi açısından önemlidir. Gelecekte insanlar üzerinde yapılacak çalışmalarda benzer sonuçlar alınması durumunda, bu aminoasitin glukoz metabolizması üzerine olumlu etkileri göz önünde bulundurularak terapötik ajan olarak kullanılması gündeme gelebilir.

## KAYNAKLAR

1. Bayliss, W., Starling, E.H. (1901) On the Causation of the So-Called 'Peripheral Reflex Secretion' of the Pancreas. (Preliminary Communication.). *Royal Society of London Proceedings Series I*, 69, 352-353.
2. Moore, B., Edie, E.S., Abram, J.H. (1906) On the treatment of Diabetes mellitus by acid extract of Duodenal Mucous Membrane. *Biochemical Journal*, 1 (1), 28.
3. Labarre, J. (1932) Sur les possibilites d'un traitement du diabete par l'incretine. *Bull Acad R Med Belg*, 12, 620-634.
4. Elrick, H., Stimmler, L., Hlad Jr, C., Arai, Y. (1964) Plasma Insulin Response to Oral and Intravenous Glucose Administration 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 24 (10), 1076-1082.
5. Perley, M.J., Kipnis, D.M. (1967) Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *Journal of Clinical Investigation*, 46 (12), 1954.
6. Yalow, R.S., Berson, S.A. (1959) Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* 184, 1648 - 1649.
7. Kieffer, T.J., Francis Habener, J. (1999) The glucagon-like peptides. *Endocrine reviews*, 20 (6), 876-913.
8. Unger, R.H., Eisentraut, A.M. (1969) Entero-insular axis. *Archives of Internal Medicine*, 123 (3), 261-266.
9. Creutzfeldt, W. (1979) The incretin concept today. *Diabetologia*, 16, 75-85.
10. Buffa, R., Polak, J.M., Pearse, A., Solcia, E., Grimelius, L., Capella, C. (1975) Identification of the intestinal cell storing gastric inhibitory peptide. *Histochemistry and Cell Biology*, 43 (3), 249-255.
11. Dupre, J., Ross, S., Watson, D., Brown, J. (1973) Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 37 (5), 826-828.
12. Pederson, Raymond A, Brown, J.C. (1978) Interaction of Gastric Inhibitory Polypeptide, Glucose, and Arginine on Insulin and Glucagon Secretion from the Perfused Rat Pancreas\*. *Endocrinology*, 103 (2), 610-615.
13. Falko, J.M., Crockett, S.E., Cataland, S., Mazzaferri, E.L. (1975) Gastric inhibitory polypeptide (GIP) stimulated by fat ingestion in man. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 41 (2), 260-265.
14. Baggio, L.L., Drucker, D.J. (2007) Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, 132 (6), 2131-2157.
15. Bell, G.I., Sanchez-Pescador, R., Laybourn, P.J., Najarian, R.C. (1983) Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene.



- 16.Schmidt, W., Siegel, E.,Creutzfeldt, W. (1985) Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Diabetologia*, 28 (9), 704-707.
- 17.Eissele, R., Goke, R., Willemer, S., Harthus, H.P., Vermeer, H., Arnold, R. ve diğeri. (1992) Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest*, 22 (4), 283-291.
- 18.Kim, W.,Egan, J.M. (2008) The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev*, 60 (4), 470-512.
- 19.Cummings, D.E.,Overduin, J. (2007) Gastrointestinal regulation of food intake. *The Journal of clinical investigation*, 117 (1), 13-23.
- 20.Chimerel, C., Emery, E., Summers, D.K., Keyser, U., Gribble, F.M.,Reimann, F. (2014) Bacterial metabolite indole modulates incretin secretion from intestinal enteroendocrine L cells. *Cell Rep*, 9 (4), 1202-1208.
- 21.Habib, A.M., Richards, P., Rogers, G.J., Reimann, F.,Gribble, F.M. (2013) Co-localisation and secretion of glucagon-like peptide 1 and peptide YY from primary cultured human L cells. *Diabetologia*, 56 (6), 1413-1416.
- 22.Spreckley, E.,Murphy, K.G. (2015) The L-Cell in Nutritional Sensing and the Regulation of Appetite. *Front Nutr*, 2, 23.
- 23.Franek, E., Gajos, G., Gumprecht, J., Krętownski, A., Zahorska-Markiewicz, B.,Małacki, M.T. (2009) The role of glucagon-like peptide 1 in glucose homeostasis and in other aspects of human physiology. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, 119 (11), 743-751.
- 24.Ørskov, C. (1992) Glucagon-like peptide-1, a new hormone of the entero-insular axis. *Diabetologia*, 35 (8), 701-711.
- 25.Brubaker, P.L. (2010) Minireview: update on incretin biology: focus on glucagon-like peptide-1. *Endocrinology*, 151 (5), 1984-1989.
- 26.Gautier, J., Fetita, S., Sobngwi, E.,Salaün-Martin, C. (2005) Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes. *Diabetes & metabolism*, 31 (3), 233-242.
- 27.Komatsu, R., Matsuyama, T., Namba, M., Watanabe, N., Itoh, H., Kono, N. ve diğeri. (1989) Glucagonostatic and insulinotropic action of glucagonlike peptide I-(7–36)-amide. *Diabetes*, 38 (7), 902-905.
- 28.Perfetti, R., Zhou, J., Doyle, M.E.,Egan, J.M. (2000) Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. *Endocrinology*, 141 (12), 4600-4605.
- 29.Stoffers, D.A., Kieffer, T.J., Hussain, M.A., Drucker, D.J., Bonner-Weir, S., Habener, J.F. ve diğeri. (2000) Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes*, 49 (5), 741-748.

30. Campbell, J.E., Drucker, D.J. (2013) Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell metabolism*, 17 (6), 819-837.
31. Giralt, M., Vergara, P. (1999) Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) participation in ileal brake induced by intraluminal peptides in rat. *Digestive diseases and sciences*, 44 (2), 322-329.
32. Holst, J.J. (1994) Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-A newly discovered GI Hormone. Review. *Today in Medicine. Gastroenterology* (107), 1848-1855.
33. Gutniak, M., Ørskov, C., Holst, J.J., Ahrén, B., Efendić, S. (1992) Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7–36) amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 326 (20), 1316-1322.
34. White, J.W., Saunders, G.F. (1986) Structure of the human glucagon gene. *Nucleic acids research*, 14 (12), 4719-4730.
35. Tricoli, J.V., Bell, G.I., Shows, T.B. (1984) The human glucagon gene is located on chromosome 2. *Diabetes*, 33 (2), 200-202.
36. Drucker, D., Asa, S. (1988) Glucagon gene expression in vertebrate brain. *Journal of Biological Chemistry*, 263 (27), 13475-13478.
37. Mojsov, S., Heinrich, G., Wilson, I.B., Ravazzola, M., Orci, L., Habener, J.F. (1986) Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J Biol Chem*, 261 (25), 11880-11889.
38. Bojanowska, E. (2005) Physiology and pathophysiology of glucagon-like peptide-1 (GLP-1): the role of GLP-1 in the pathogenesis of diabetes mellitus, obesity, and stress. *Medical Science Monitor Basic Research*, 11 (8), RA271-RA278.
39. Kuhre, R.E., Albrechtsen, N.J.W., Hartmann, B., Deacon, C.F., Holst, J.J. (2015) Measurement of the incretin hormones: glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic peptide. *Journal of Diabetes and its Complications*, 29 (3), 445-450.
40. Damholt, A.B., Buchan, A.M., Holst, J.J., Kofod, H. (1999) Proglucagon processing profile in canine L cells expressing endogenous prohormone convertase 1/3 and prohormone convertase 2. *Endocrinology*, 140 (10), 4800-4808.
41. Opinto, G., Natalicchio, A., Marchetti, P. (2013) Physiology of incretins and loss of incretin effect in type 2 diabetes and obesity. *Archives of physiology and biochemistry*, 119 (4), 170-178.
42. Ørskov, C., Rabenhøj, L., Wettergren, A., Kofod, H., Holst, J.J. (1994) Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes*, 43 (4), 535-539.
43. Tolessa, T., Gutniak, M., Holst, J.J., Efendić, S., Hellström, P.M. (1998) Inhibitory effect of glucagon-like peptide-1 on small bowel motility. Fasting but not fed motility inhibited via nitric oxide independently of insulin and somatostatin. *Journal of Clinical Investigation*, 102 (4), 764.

44. Misumi, Y., Hayashi, Y., Arakawa, F., Ikehara, Y. (1992) Molecular cloning and sequence analysis of human dipeptidyl peptidase IV, a serine proteinase on the cell surface. *Biochim Biophys Acta*, 1131 (3), 333-336.
45. Lambeir, A.-M., Durinx, C., Scharpé, S., De Meester, I. (2003) Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 40 (3), 209-294.
46. Holst, J.J. (2007) The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiological reviews*, 87 (4), 1409-1439.
47. De Meester, I., Durinx, C., Bal, G., Proost, P., Struyf, S., Goossens, F. ve diğerleri. (2002). Natural substrates of dipeptidyl peptidase IV. Cellular peptidases in immune functions and diseases 2 (s. 67-87): Springer
48. Mentzel, S., Dijkman, H., Van Son, J., Koene, R., Assmann, K. (1996) Organ distribution of aminopeptidase A and dipeptidyl peptidase IV in normal mice. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 44 (5), 445-461.
49. Kieffer, T.J., McIntosh, C., Pederson, R.A. (1995) Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology*, 136 (8), 3585-3596.
50. Deacon, C.F., Nauck, M.A., Toft-Nielsen, M., Pridal, L., Willms, B., Holst, J.J. (1995) Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH<sub>2</sub>-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes*, 44 (9), 1126-1131.
51. Meier, J.J., Nauck, M.A., Kranz, D., Holst, J.J., Deacon, C.F., Gaeckler, D. ve diğerleri. (2004) Secretion, degradation, and elimination of glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide in patients with chronic renal insufficiency and healthy control subjects. *Diabetes*, 53 (3), 654-662.
52. Plamboeck, A., Holst, J.J., Carr, R., Deacon, C. (2005) Neutral endopeptidase 24.11 and dipeptidyl peptidase IV are both mediators of the degradation of glucagon-like peptide 1 in the anaesthetised pig. *Diabetologia*, 48 (9), 1882-1890.
53. Ahren, B. (2007) DPP-4 inhibitors. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 21 (4), 517-533.
54. Ahren, B., Pacini, G., Foley, J.E., Schweizer, A. (2005) 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*, 28 (8), 1936-1940.
55. Pospisilik, J.A., Martin, J., Doty, T., Ehses, J.A., Pamir, N., Lynn, F.C. ve diğerleri. (2003) Dipeptidyl peptidase IV inhibitor treatment stimulates  $\beta$ -cell survival and islet neogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, 52 (3), 741-750.

- 56.Thorens, B. (1992) Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (18), 8641-8645.
- 57.Silva, A.M., Lopes, C.M., Misler, S., Cooper, G.D., Andreani, T.,Souto, E.B. (2009) Glukagon-like peptide 1: Biochemistry, secretion and main physiological effects. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*, 6.
- 58.Kuhre, R.E., Holst, J.J.,Kappe, C. (2016) The regulation of function, growth and survival of GLP-1-producing L-cells. *Clinical Science*, 130 (2), 79-91.
- 59.Parker, H., Wallis, K., Le Roux, C., Wong, K., Reimann, F.,Gribble, F. (2012) Molecular mechanisms underlying bile acid-stimulated glucagon-like peptide-1 secretion. *British journal of pharmacology*, 165 (2), 414-423.
- 60.Moran-Ramos, S., Tovar, A.R.,Torres, N. (2012) Diet: friend or foe of enteroendocrine cells—how it interacts with enteroendocrine cells. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 3 (1), 8-20.
- 61.Ahren, B., Carr, R.D.,Deacon, C.F. (2010) Incretin hormone secretion over the day. *Vitam Horm*, 84 (1), 203-220.
- 62.Gribble, F. (2008) RD Lawrence Lecture 2008 Targeting GLP-1 release as a potential strategy for the therapy of Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine*, 25 (8), 889-894.
- 63.Wachters-Hagedoorn, R.E., Priebe, M.G., Heimweg, J.A., Heiner, A.M., Englyst, K.N., Holst, J.J. ve diğerleri. (2006) The rate of intestinal glucose absorption is correlated with plasma glucose-dependent insulinotropic polypeptide concentrations in healthy men. *J Nutr*, 136 (6), 1511-1516.
- 64.Williams, D.L. (2014) Neural integration of satiation and food reward: role of GLP-1 and orexin pathways. *Physiology & behavior*, 136, 194-199.
- 65.Cho, Y.M., Fujita, Y.,Kieffer, T.J. (2014) Glucagon-like peptide-1: glucose homeostasis and beyond. *Annu Rev Physiol*, 76, 535-559.
- 66.Moriya, R., Shirakura, T., Ito, J., Mashiko, S.,Seo, T. (2009) Activation of sodium-glucose cotransporter 1 ameliorates hyperglycemia by mediating incretin secretion in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297 (6), E1358-1365.
- 67.Powell, D.R., DaCosta, C.M., Gay, J., Ding, Z.-M., Smith, M., Greer, J. ve diğerleri. (2013) Improved glycemic control in mice lacking Sglt1 and Sglt2. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 304 (2), E117-E130.
- 68.Powell, D.R., Smith, M., Greer, J., Harris, A., Zhao, S., DaCosta, C. ve diğerleri. (2013) LX4211 Increases Serum Glucagon-Like Peptide 1 and Peptide YY Levels by Reducing Sodium/Glucose Cotransporter 1 (SGLT1)–Mediated Absorption of Intestinal Glucose. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 345 (2), 250-259.

- 69.Pais, R., Gribble, F.M.,Reimann, F. (2015) Signalling pathways involved in the detection of peptones by murine small intestinal enteroendocrine L-cells. *Peptides*.
- 70.Gerspach, A.C., Steinert, R.E., Schonenberger, L., Graber-Maier, A.,Beglinger, C. (2011) The role of the gut sweet taste receptor in regulating GLP-1, PYY, and CCK release in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 301 (2), E317-325.
- 71.Steinert, R., Gerspach, A., Gutmann, H., Asarian, L., Drewe, J.,Beglinger, C. (2011) 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*, 30 (4), 524-532.
- 72.Thomsen, C., Rasmussen, O., Lousen, T., Holst, J.J., Fenselau, S., Schrezenmeir, J. ve diğeri. (1999) Differential effects of saturated and monounsaturated fatty acids on postprandial lipemia and incretin responses in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*, 69 (6), 1135-1143.
- 73.Yoder, S.M., Yang, Q., Kindel, T.L.,Tso, P. (2009) Stimulation of incretin secretion by dietary lipid: is it dose dependent? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 297 (2), G299-305.
- 74.Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M. ve diğeri. (2005) Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med*, 11 (1), 90-94.
- 75.Klaauw, A.A., Keogh, J.M., Henning, E., Trowse, V.M., Dhillon, W.S., Ghatei, M.A. ve diğeri. (2013) High protein intake stimulates postprandial GLP1 and PYY release. *Obesity*, 21 (8), 1602-1607.
- 76.Lejeune, M.P., Westerterp, K.R., Adam, T.C., Luscombe-Marsh, N.D.,Westerterp-Plantenga, M.S. (2006) Ghrelin and glucagon-like peptide 1 concentrations, 24-h satiety, and energy and substrate metabolism during a high-protein diet and measured in a respiration chamber. *The American journal of clinical nutrition*, 83 (1), 89-94.
- 77.Reimann, F., Williams, L., da Silva Xavier, G., Rutter, G.A.,Gribble, F.M. (2004) Glutamine potently stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. *Diabetologia*, 47 (9), 1592-1601.
- 78.Greenfield, J.R., Farooqi, I.S., Keogh, J.M., Henning, E., Habib, A.M., Blackwood, A. ve diğeri. (2009) Oral glutamine increases circulating glucagon-like peptide 1, glucagon, and insulin concentrations in lean, obese, and type 2 diabetic subjects. *The American journal of clinical nutrition*, 89 (1), 106-113.
- 79.Samocho-Bonet, D., Wong, O., Synnott, E.-L., Piyaratna, N., Douglas, A., Gribble, F.M. ve diğeri. (2011) Glutamine reduces postprandial glycemia and augments the glucagon-like peptide-1 response in type 2 diabetes patients. *The Journal of nutrition*, 141 (7), 1233-1238.

80. Matsumura, K., Miki, T., Jhomori, T., Gono, T., Seino, S. (2005) Possible role of PEPT1 in gastrointestinal hormone secretion. *Biochem Biophys Res Commun*, 336 (4), 1028-1032.
81. Mace, O.J., Schindler, M., Patel, S. (2012) The regulation of K- and L-cell activity by GLUT2 and the calcium-sensing receptor CasR in rat small intestine. *The Journal of physiology*, 590 (12), 2917-2936.
82. Reimann, F., Habib, A.M., Tolhurst, G., Parker, H.E., Rogers, G.J., Gribble, F.M. (2008) Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell metabolism*, 8 (6), 532-539.
83. Drucker, D.J. (2003) Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Molecular endocrinology*, 17 (2), 161-171.
84. Cernea, S., Raz, I. (2011) Therapy in the early stage: incretins. *Diabetes care*, 34 (Supplement 2), S264-S271.
85. Ranganath, L.R. (2008) Incretins: pathophysiological and therapeutic implications of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1. *J Clin Pathol*, 61 (4), 401-409.
86. Vilsbøll, T. (2009) The effects of glucagon-like peptide-1 on the beta cell. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 11 (s3), 11-18.
87. Farilla, L., Hui, H., Bertolotto, C., Kang, E., Bulotta, A., Di Mario, U. ve diğeri. (2002) Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology*, 143 (11), 4397-4408.
88. Nauck, M., Holst, J.J., Willms, B., Schmiegel, W. (1996) Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) as a new therapeutic approach for type 2-diabetes. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes: official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 105 (4), 187-195.
89. Zander, M., Madsbad, S., Madsen, J.L., Holst, J.J. (2002) Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet*, 359 (9309), 824-830.
90. Greig, N., Holloway, H., De Ore, K., Jani, D., Wang, Y., Zhou, J. ve diğeri. (1999) Once daily injection of exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose concentrations. *Diabetologia*, 42 (1), 45-50.
91. Schjoldager, B., Mortensen, P., Christiansen, J., Ørskov, C., Holst, J. (1989) GLP-1 (glucagon-like peptide 1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibit gastric acid secretion in humans. *Digestive diseases and sciences*, 34 (5), 703-708.
92. Wettergren, A., Schjoldager, B., Mortensen, P.E., Myhre, J., Christiansen, J., Holst, J.J. (1993) Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and

- pancreatic functions in man. *Digestive diseases and sciences*, 38 (4), 665-673.
93. Marathe, C.S., Rayner, C.K., Jones, K.L., Horowitz, M. (2011) Effects of GLP-1 and incretin-based therapies on gastrointestinal motor function. *Experimental diabetes research*, 2011.
94. Nauck, M.A., Niedereichholz, U., Ettl, R., Holst, J.J., Ørskov, C., Ritzel, R. ve diğerleri. (1997) Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 273 (5), E981-E988.
95. Dupre, J., Behme, M.T., Hramiak, I.M., McFarlane, P., Williamson, M.P., Zabel, P. ve diğerleri. (1995) Glucagon-like peptide I reduces postprandial glycemic excursions in IDDM. *Diabetes*, 44 (6), 626-630.
96. Meier, J.J., Gallwitz, B., Salmen, S., Goetze, O., Holst, J.J., Schmidt, W.E. ve diğerleri. (2003) Normalization of glucose concentrations and deceleration of gastric emptying after solid meals during intravenous glucagon-like peptide 1 in patients with type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88 (6), 2719-2725.
97. Imeryuz, N., Bozkurt, A., Alican, I., Ulusoy, N., Yegen, B. (1997). The role of GLP-1 in glucose-induced inhibition of gastric emptying in conscious rats [Bildiri]. *Gastroenterology*.
98. Wettergren, A., Wøjdemann, M., Meisner, S., Stadil, F., Holst, J.J. (1997) The inhibitory effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 7-36 amide on gastric acid secretion in humans depends on an intact vagal innervation. *Gut*, 40 (5), 597-601.
99. Cabou, C., Burcelin, R. (2011) GLP-1, the gut-brain, and brain-periphery axes. *Rev Diabet Stud*, 8 (3), 418-431.
100. Tang-Christensen, M., Larsen, P., Goke, R., Fink-Jensen, A., Jessop, D., Møller, M. ve diğerleri. (1996) Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 271 (4), R848-R856.
101. Kanoski, S.E., Fortin, S.M., Arnold, M., Grill, H.J., Hayes, M.R. (2011) Peripheral and central GLP-1 receptor populations mediate the anorectic effects of peripherally administered GLP-1 receptor agonists, liraglutide and exendin-4. *Endocrinology*, 152 (8), 3103-3112.
102. Candeias, E.M., Sebastião, I.C., Cardoso, S.M., Correia, S.C., Carvalho, C.I., Plácido, A.I. ve diğerleri. (2015) Gut-brain connection: The neuroprotective effects of the anti-diabetic drug liraglutide. *World journal of diabetes*, 6 (6), 807.
103. Laferrère, B., Heshka, S., Wang, K., Khan, Y., McGinty, J., Teixeira, J. ve diğerleri. (2007) Incretin levels and effect are markedly enhanced 1 month after Roux-

en-Y gastric bypass surgery in obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes care*, 30 (7), 1709-1716.

104. Morínigo, R., Lacy, A.M., Casamitjana, R., Delgado, S., Gomis, R., Vidal, J. (2006) GLP-1 and changes in glucose tolerance following gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *Obesity surgery*, 16 (12), 1594-1601.
105. Ranganath, L., Beety, J., Morgan, L., Wright, J., Howland, R., Marks, V. (1996) Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence? *Gut*, 38 (6), 916-919.
106. Ballantyne, G.H. (2006) Peptide YY (1-36) and peptide YY (3-36): Part I. Distribution, release and actions. *Obesity surgery*, 16 (5), 651-658.
107. Tatemoto, K. (1982) Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79 (18), 5485-5489.
108. Tatemoto, K., Carlquist, M., Mutt, V. (1982) Neuropeptide Y—a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide.
109. Tatemoto, K., Mutt, V. (1980) Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides.
110. Eva, C., Keinanen, K., Monyer, H., Seeburg, P., Sprengel, R. (1990) Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor that may belong to the neuropeptide receptor family. *FEBS Lett*, 271 (1-2), 81-84.
111. Price, S.L., Bloom, S.R. (2014) Protein PYY and its role in metabolism.
112. Mannon, P.J., Mervin, S.J., Sheriff-Carter, K.D. (1994) Characterization of a Y1-preferring NPY/PYY receptor in HT-29 cells. *Am J Physiol*, 267 (5 Pt 1), G901-907.
113. Beglinger, C., Degen, L. (2006) Gastrointestinal satiety signals in humans—physiologic roles for GLP-1 and PYY? *Physiology & behavior*, 89 (4), 460-464.
114. Ekblad, E., Sundler, F. (2002) Distribution of pancreatic polypeptide and peptide YY. *Peptides*, 23 (2), 251-261.
115. Lloyd, K.C., Grandt, D., Aurang, K., Eysselein, V.E., Schimiczek, M., Reeve, J.R., Jr. (1996) Inhibitory effect of PYY on vagally stimulated acid secretion is mediated predominantly by Y1 receptors. *Am J Physiol*, 270 (1 Pt 1), G123-127.
116. Flint, A., Raben, A., Ersbøll, A., Holst, J., Astrup, A. (2001) The effect of physiological levels of glucagon-like peptide-1 on appetite, gastric emptying, energy and substrate metabolism in obesity. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders*, 25 (6).
117. Konturek, P., Konturek, J., Cześnikiewicz-Guzik, M., Brzozowski, T., Sito, E., Konturek, S. (2005) Neuro-hormonal control of food intake: basic mechanisms and clinical implications. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, 56, 5-25.



- 118.Cox, G.J.,King, H. (1943) L-Tryptophane. *Organic Syntheses*, 100-100.
- 119.Hopkins, F.G.,Cole, S.W. (1901) A contribution to the chemistry of proteids. *The Journal of physiology*, 27 (4-5), 418-428.
- 120.Palego, L., Betti, L., Rossi, A.,Giannaccini, G. (2016) Tryptophan Biochemistry: Structural, Nutritional, Metabolic, and Medical Aspects in Humans. *Journal of Amino Acids*, 2016.
- 121.Kuhn, J.,Somerville, R.L. (1971) Mutant strains of Escherichia coli K12 that use D-amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68 (10), 2484-2487.
- 122.Nayak, B.N.,Buttar, H.S. (2015) Evaluation of the antioxidant properties of tryptophan and its metabolites in in vitro assay. *J Complement Integr Med*.
- 123.Sainio, E.-L., Pulkki, K.,Young, S. (1996) L-Tryptophan: Biochemical, nutritional and pharmacological aspects. *Amino Acids*, 10 (1), 21-47.
- 124.Carney, B.I., Jones, K.L., Horowitz, M., Sun, W.M., Hebbard, G.,Edelbroek, M.A. (1994) Stereospecific effects of tryptophan on gastric emptying and hunger in humans. *J Gastroenterol Hepatol*, 9 (6), 557-563.
- 125.Cook, J.S.,Pogson, C.I. (1983) Tryptophan and glucose metabolism in rat liver cells. The effects of DL-6-chlorotryptophan, 4-chloro-3-hydroxyanthranilate and pyrazinamide. *Biochem J*, 214 (2), 511-516.
- 126.Hrboticky, N., Leiter, L.A.,Anderson, G.H. (1985) Effects of L-tryptophan on short term food intake in lean men. *Nutrition Research*, 5 (6), 595-607.
- 127.Jordi, J., Herzog, B., Lutz, T.A.,Verrey, F. (2014) Novel anti-diabetic nutrients identified by in vivo screening for gastric secretion and emptying regulation in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, ajpgu. 00273.02014.
- 128.Nieuwenhuizen, A.G., Hochstenbach-Waelen, A., Veldhorst, M.A., Westerterp, K.R., Engelen, M.P., Brummer, R.-J.M. ve diğeri. (2009) Acute effects of breakfasts containing  $\alpha$ -lactalbumin, or gelatin with or without added tryptophan, on hunger, 'satiety' hormones and amino acid profiles. *British journal of nutrition*, 101 (12), 1859-1866.
- 129.Zhang, H., Yin, J., Li, D., Zhou, X.,Li, X. (2007) Tryptophan enhances ghrelin expression and secretion associated with increased food intake and weight gain in weanling pigs. *Domest Anim Endocrinol*, 33 (1), 47-61.
- 130.Ardiansyah, Shirakawa, H., Inagawa, Y., Koseki, T.,Komai, M. (2011) Regulation of blood pressure and glucose metabolism induced by L-tryptophan in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Nutr Metab (Lond)*, 8 (1), 45.
- 131.Inubushi, T., Kamemura, N., Oda, M., Sakurai, J., Nakaya, Y., Harada, N. ve diğeri. (2012) L-tryptophan suppresses rise in blood glucose and preserves insulin secretion in type-2 diabetes mellitus rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 58 (6), 415-422.

132. Martinsone, D., Ligere, R., Martinsons, A. (1996). The effect of L-tryptophan load on endocrine system of pancreas in diabetes mellitus. *Recent Advances in Tryptophan Research* (s. 413-416): Springer
133. Ng, L.T., Anderson, G.H. (1992) Route of administration of tryptophan and tyrosine affects short-term food intake and plasma and brain amino acid concentrations in rats. *J Nutr*, 122 (2), 283-293.
134. Steinert, R.E., Luscombe-Marsh, N.D., Little, T.J., Standfield, S., Otto, B., Horowitz, M. ve diğerleri. (2014) Effects of intraduodenal infusion of L-tryptophan on ad libitum eating, antropyloroduodenal motility, glycemia, insulinemia, and gut peptide secretion in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab*, 99 (9), 3275-3284.
135. Ponter, A.A., Seve, B., Morgan, L.M. (1994) Intra-gastric tryptophan reduces glycemia after glucose, possibly via glucose-mediated insulinotropic polypeptide, in early-weaned piglets. *J Nutr*, 124 (2), 259-267.
136. Ryan, A.T., Luscombe-Marsh, N.D., Saies, A.A., Little, T.J., Standfield, S., Horowitz, M. ve diğerleri. (2013) Effects of intraduodenal lipid and protein on gut motility and hormone release, glycemia, appetite, and energy intake in lean men. *Am J Clin Nutr*, 98 (2), 300-311.
137. Siervo, M., Faber, P., Lara, J., Gibney, E.R., Milne, E., Ritz, P. ve diğerleri. (2015) Imposed rate and extent of weight loss in obese men and adaptive changes in resting and total energy expenditure. *Metabolism*, 64 (8), 896-904.
138. Brown, E.M., MacLeod, R.J. (2001) Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiological reviews*, 81 (1), 239-297.
139. Bräuner-Osborne, H., Jensen, A.A., Sheppard, P.O., O'Hara, P., Krogsgaard-Larsen, P. (1999) The agonist-binding domain of the calcium-sensing receptor is located at the amino-terminal domain. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (26), 18382-18386.
140. Cheng, I., Klingensmith, M.E., Chattopadhyay, N., Kifor, O., Butters, R.R., Soybel, D.I. ve diğerleri. (1998) Identification and Localization of the Extracellular Calcium-Sensing Receptor in Human Breast 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83 (2), 703-707.
141. Galal, A.Z., Shoeb, S.A., Tawfeek, A.R., Mostafa, K.S. (2013) Calcium-sensing receptors, biology, and clinical significance: a systemic review. *Menoufia Medical Journal*, 26 (2), 105.
142. Ray, J.M., Squires, P.E., Curtis, S.B., Meloche, M.R., Buchan, A. (1997) Expression of the calcium-sensing receptor on human antral gastrin cells in culture. *Journal of Clinical Investigation*, 99 (10), 2328.
143. Saidak, Z., Mentaverri, R., Brown, E.M. (2009) The role of the calcium-sensing receptor in the development and progression of cancer. *Endocr Rev*, 30 (2), 178-195.

144. Geibel, J.P., Hebert, S.C. (2009) The functions and roles of the extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor along the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol*, 71, 205-217.
145. Felsenfeld, A., Rodriguez, M., Levine, B. (2013) New insights in regulation of calcium homeostasis. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 22 (4), 371-376.
146. Chattopadhyay, N., Ye, C., Singh, D.P., Kifor, O., Vassilev, P.M., Shinohara, T. ve diğerleri. (1997) Expression of extracellular calcium-sensing receptor by human lens epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 233 (3), 801-805.
147. Ruat, M., Snowman, A.M., Hester, L.D., Snyder, S.H. (1996) Cloned and Expressed Rat Ca-sensing Receptor Differential Cooperative Responses To Calcium and Magnesium. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (11), 5972-5975.
148. Bikle, D.D., Ratnam, A., Mauro, T., Harris, J., Pillai, S. (1996) Changes in calcium responsiveness and handling during keratinocyte differentiation. Potential role of the calcium receptor. *Journal of Clinical Investigation*, 97 (4), 1085.
149. Oda, Y., Tu, C.-L., Pillai, S., Bikle, D.D. (1998) The calcium sensing receptor and its alternatively spliced form in keratinocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (36), 23344-23352.
150. Bruce, J.I., Yang, X., Ferguson, C.J., Elliott, A.C., Steward, M.C., Case, R.M. ve diğerleri. (1999) Molecular and functional identification of a Ca<sup>2+</sup> (polyvalent cation)-sensing receptor in rat pancreas. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (29), 20561-20568.
151. Canaff, L., Petit, J.-L., Kisiel, M., Watson, P.H., Gascon-Barré, M., Hendy, G.N. (2001) Extracellular calcium-sensing receptor is expressed in rat hepatocytes coupling to intracellular calcium mobilization and stimulation of bile flow. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (6), 4070-4079.
152. Bradbury, R., Sunn, K., Crossley, M., Bai, M., Brown, E., Delbridge, L. ve diğerleri. (1998) Expression of the parathyroid Ca (2+)-sensing receptor in cytotrophoblasts from human term placenta. *Journal of endocrinology*, 156 (3), 425-430.
153. Kovacs, C.S., Ho-Pao, C.L., Hunzelman, J.L., Lanske, B., Fox, J., Seidman, J. ve diğerleri. (1998) Regulation of murine fetal-placental calcium metabolism by the calcium-sensing receptor. *Journal of Clinical Investigation*, 101 (12), 2812.
154. House, M.G., Kohlmeier, L., Chattopadhyay, N., Kifor, O., Yamaguchi, T., Leboff, M.S. ve diğerleri. (1997) Expression of an Extracellular Calcium-Sensing Receptor in Human and Mouse Bone Marrow Cells. *Journal of bone and mineral research*, 12 (12), 1959-1970.

- 155.Kirchhoff, P.,Geibel, J. (2006) Role of calcium and other trace elements in the gastrointestinal physiology. *World journal of gastroenterology: WJG*, 12 (20), 3229-3236.
- 156.Rasoamanana, R., Darcel, N., Fromentin, G.,Tomé, D. (2012) Nutrient sensing and signalling by the gut. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71 (04), 446-455.
- 157.Conigrave, A.D., Mun, H.-C.,Lok, H.-C. (2007) Aromatic L-amino acids activate the calcium-sensing receptor. *The Journal of nutrition*, 137 (6), 1524S-1527S.
- 158.Conigrave, A.D., Quinn, S.J.,Brown, E.M. (2000) L-amino acid sensing by the extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (9), 4814-4819.
- 159.Conigrave, A.D., Mun, H.-C., Delbridge, L., Quinn, S.J., Wilkinson, M.,Brown, E.M. (2004) L-amino acids regulate parathyroid hormone secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (37), 38151-38159.
- 160.Diakogiannaki, E., Pais, R., Tolhurst, G., Parker, H.E., Horscroft, J., Rauscher, B. ve diğerleri. (2013) Oligopeptides stimulate glucagon-like peptide-1 secretion in mice through proton-coupled uptake and the calcium-sensing receptor. *Diabetologia*, 56 (12), 2688-2696.
- 161.Leech, C.A.,Habener, J.F. (2003) Regulation of glucagon-like peptide-1 receptor and calcium-sensing receptor signaling by L-histidine. *Endocrinology*, 144 (11), 4851-4858.
- 162.Tolhurst, G., Zheng, Y., Parker, H.E., Habib, A.M., Reimann, F.,Gribble, F.M. (2011) Glutamine triggers and potentiates glucagon-like peptide-1 secretion by raising cytosolic Ca<sup>2+</sup> and cAMP. *Endocrinology*, 152 (2), 405-413.
- 163.Diakogiannaki, E., Gribble, F.M.,Reimann, F. (2012) Nutrient detection by incretin hormone secreting cells. *Physiol Behav*, 106 (3), 387-393.
- 164.Bowen, J., Noakes, M., Trenerry, C.,Clifton, P.M. (2006) Energy intake, ghrelin, and cholecystokinin after different carbohydrate and protein preloads in overweight men. *J Clin Endocrinol Metab*, 91 (4), 1477-1483.
- 165.Muramatsu, M., Hira, T., Mitsunaga, A., Sato, E., Nakajima, S., Kitahara, Y. ve diğerleri. (2014) Activation of the gut calcium-sensing receptor by peptide agonists reduces rapid elevation of plasma glucose in response to oral glucose load in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 306 (12), G1099-1107.
- 166.Murphy, K.G.,Bloom, S.R. (2006) Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature*, 444 (7121), 854-859.
- 167.Gutzwiller, J.-P., Drewe, J., Göke, B., Schmidt, H., Rohrer, B., Lareida, J. ve diğerleri. (1999) Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2. *American Journal of*

*Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 276 (5), R1541-R1544.

168. Olivos, D.R., McGrath, L.E., Turner, C.A., Montaubin, O., Mietlicki-Baase, E.G., Hayes, M.R. (2014) 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*, 306 (3), R157-R163.
169. Drucker, D.J., Sherman, S.I., Bergenstal, R.M., Buse, J.B. (2011) The safety of incretin-based therapies—review of the scientific evidence. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96 (7), 2027-2031.
170. Aaboe, K., Krarup, T., Madsbad, S., Holst, J.J. (2008) GLP-1: physiological effects and potential therapeutic applications. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 10 (11), 994-1003.
171. Drucker, D.J., Nauck, M.A. (2006) The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *The Lancet*, 368 (9548), 1696-1705.
172. Kelly, A.S., Metzger, A.M., Rudser, K.D., Fitch, A.K., Fox, C.K., Nathan, B.M. ve diğerleri. (2012) Exenatide as a weight-loss therapy in extreme pediatric obesity: a randomized, controlled pilot study. *Obesity (Silver Spring)*, 20 (2), 364-370.
173. Moretto, T.J., Milton, D.R., Ridge, T.D., Macconell, L.A., Okerson, T., Wolka, A.M. ve diğerleri. (2008) Efficacy and tolerability of exenatide monotherapy over 24 weeks in antidiabetic drug-naïve patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Clin Ther*, 30 (8), 1448-1460.
174. Astrup, A., Carraro, R., Finer, N., Harper, A., Kunesova, M., Lean, M.E. ve diğerleri. (2012) Safety, tolerability and sustained weight loss over 2 years with the once-daily human GLP-1 analog, liraglutide. *Int J Obes (Lond)*, 36 (6), 843-854.
175. Dushay, J., Gao, C., Gopalakrishnan, G.S., Crawley, M., Mitten, E.K., Wilker, E. ve diğerleri. (2012) Short-term exenatide treatment leads to significant weight loss in a subset of obese women without diabetes. *Diabetes Care*, 35 (1), 4-11.
176. Näslund, E., Barkeling, B., King, N., Gutniak, M., Blundell, J., Holst, J. ve diğerleri. (1999) Energy intake and appetite are suppressed by glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in obese men. *International journal of obesity*, 23 (3), 304-311.
177. DeFronzo, R.A., Okerson, T., Viswanathan, P., Guan, X., Holcombe, J.H., MacConell, L. (2008) Effects of exenatide versus sitagliptin on postprandial glucose, insulin and glucagon secretion, gastric emptying, and caloric intake: a randomized, cross-over study. *Curr Med Res Opin*, 24 (10), 2943-2952.

178. Feinle, C., Chapman, I.M., Wishart, J., Horowitz, M. (2002) Plasma glucagon-like peptide-1 (GLP-1) responses to duodenal fat and glucose infusions in lean and obese men. *Peptides*, 23 (8), 1491-1495.
179. Feltrin, K.L., Little, T.J., Meyer, J.H., Horowitz, M., Smout, A.J., Wishart, J. ve diğerleri. (2004) Effects of intraduodenal fatty acids on appetite, antropyloroduodenal motility, and plasma CCK and GLP-1 in humans vary with their chain length. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287 (3), R524-R533.
180. Knapper, J., Heath, A., Fletcher, J., Morgan, L., Marks, V. (1995) GIP and GLP-1 (7–36) amide secretion in response to intraduodenal infusions of nutrients in pigs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 111 (3), 445-450.
181. Ayaso, R., Ghattas, H., Abiad, M., Obeid, O. (2014) Meal pattern of male rats maintained on amino acid supplemented diets: the effect of tryptophan, lysine, arginine, proline and threonine. *Nutrients*, 6 (7), 2509-2522.
182. Lin, H.V., Efanov, A.M., Fang, X., Beavers, L.S., Wang, X., Wang, J. ve diğerleri. (2016) GPR142 Controls Tryptophan-Induced Insulin and Incretin Hormone Secretion to Improve Glucose Metabolism. *PLoS one*, 11 (6), e0157298.
183. Tsiolakis, D., Marks, V. (1984) The differential effect of intragastric and intravenous tryptophan on plasma glucose, insulin, glucagon, GLI and GIP in the fasted rat. *Horm Metab Res*, 16 (5), 226-229.
184. Zhang, T., Brubaker, P.L., Thompson, J.C., Greeley, G.H., Jr. (1993) Characterization of peptide-YY release in response to intracolonic infusion of amino acids. *Endocrinology*, 132 (2), 553-557.
185. Näslund, E., Bogefors, J., Skogar, S., Grybäck, P., Jacobsson, H., Holst, J.J. ve diğerleri. (1999) GLP-1 slows solid gastric emptying and inhibits insulin, glucagon, and PYY release in humans. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 277 (3), R910-R916.
186. Ullrich, S.S., Otto, B., Hutchison, A.T., Luscombe-Marsh, N.D., Horowitz, M., Feinle-Bisset, C. (2015) Comparative effects of intraduodenal protein and lipid on ghrelin, peptide YY, and leptin release in healthy men. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 308 (4), R300-304.
187. Ryan, A.T., Feinle-Bisset, C., Kallas, A., Wishart, J.M., Clifton, P.M., Horowitz, M. ve diğerleri. (2012) Intraduodenal protein modulates antropyloroduodenal motility, hormone release, glycemia, appetite, and energy intake in lean men. *Am J Clin Nutr*, 96 (3), 474-482.
188. Greeley, G.H., Jr., Hashimoto, T., Izukura, M., Gomez, G., Jeng, J., Hill, F.L. ve diğerleri. (1989) A comparison of intraduodenally and intracolonicly administered nutrients on the release of peptide-YY in the dog. *Endocrinology*, 125 (4), 1761-1765.

189. Fabiani, A., Versari, A., Parpinello, G., Castellari, M., Galassi, S. (2002) High-performance liquid chromatographic analysis of free amino acids in fruit juices using derivatization with 9-fluorenylmethyl-chloroformate. *Journal of chromatographic science*, 40 (1), 14-18.
190. Ilisz, I., Berkecz, R., Péter, A. (2006) HPLC separation of amino acid enantiomers and small peptides on macrocyclic antibiotic-based chiral stationary phases: A review. *Journal of separation science*, 29 (10), 1305-1321.
191. Letz, S., Rus, R., Haag, C., Dörr, H.-G.n., Schnabel, D., Möhlig, M. ve diğerleri. (2010) Novel activating mutations of the calcium-sensing receptor: the calcilytic NPS-2143 mitigates excessive signal transduction of mutant receptors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95 (10), E229-E233.
192. Ikram, H., Mushtaq, F., Haleem, D.J. (2014) Dose-dependent effects of tryptophan on learning and memory. *Pak. J. Pharm. Sci*, 27 (5), 1131-1135.
193. Bülbüller, N., Pektaş, B., Özdarendeli, A., Doğru, O., Aygen, E., Akpolat, N. (2005) The effect of L-tryptophan on hemorrhagic shock induced bacterial translocation 1. *Journal of Surgical Research*, 123 (2), 194-199.
194. Walz, J.C., Stertz, L., Fijtman, A., dos Santos, B.T., de Almeida, R.M.M. (2013) Tryptophan diet reduces aggressive behavior in male mice. *Psychology & Neuroscience*, 6 (3), 397.
195. Trulson, M.E., Sampson, H.W. (1986) Ultrastructural changes of the liver following L-tryptophan ingestion in rats. *The Journal of nutrition*, 116 (6), 1109-1115.
196. Nakamura, A., Hotsubo, T., Kobayashi, K., Mochizuki, H., Ishizu, K., Tajima, T. (2013) Loss-of-function and gain-of-function mutations of calcium-sensing receptor: functional analysis and the effect of allosteric modulators NPS R-568 and NPS 2143. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98 (10), E1692-E1701.
197. Rybczynska, A., Jurska-Jasko, A., Boblewski, K., Lehmann, A., Orlewska, C. (2010) Blockade of calcium channels and AT1 receptors prevents the hypertensive effect of calcilytic NPS 2143 in rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 61 (2), 163.
198. Rybczynska, A., Lehmann, A., Jurska-Jasko, A., Boblewski, K., Orlewska, C., Foks, H. ve diğerleri. (2006) Hypertensive effect of calcilytic NPS 2143 administration in rats. *Journal of endocrinology*, 191 (1), 189-195.
199. Nuttall, F.Q., Gannon, M.C. (1991) Plasma glucose and insulin response to macronutrients in nondiabetic and NIDDM subjects. *Diabetes Care*, 14 (9), 824-838.
200. Nuttall, F.Q., Mooradian, A.D., Gannon, M.C., Billington, C., Krezowski, P. (1984) Effect of protein ingestion on the glucose and insulin response to a standardized oral glucose load. *Diabetes care*, 7 (5), 465-470.

- 201.Gannon, M.C., Nuttall, F.Q., Saeed, A., Jordan, K.,Hoover, H. (2003) An increase in dietary protein improves the blood glucose response in persons with type 2 diabetes. *The American journal of clinical nutrition*, 78 (4), 734-741.
- 202.Rabinovitz, H.R., Boaz, M., Ganz, T., Jakubowicz, D., Matas, Z., Madar, Z. ve diğeri. (2014) Big breakfast rich in protein and fat improves glycemic control in type 2 diabetics. *Obesity*, 22 (5), E46-E54.
- 203.Gannon, M., Nuttall, J., Damberg, G., Gupta, V.,Nuttall, F. (2001) Effect of Protein Ingestion on the Glucose Appearance Rate in People with Type 2 Diabetes 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86 (3), 1040-1047.
- 204.Unger, R.H. (1971) Glucagon physiology and pathophysiology. *New England Journal of Medicine*, 285 (8), 443-449.
- 205.Tormo, M., de Tejada, A.R., Morales, I., Paredes, S., Sánchez, S., Barriga, C. ve diğeri. (2004) Orally administered tryptophan and experimental type 2 diabetes. *Molecular and cellular biochemistry*, 261 (1), 57-61.
- 206.Cueni-Villoz, N., Devigili, A., Delodder, F., Cianferoni, S., Feihl, F., Rossetti, A.O. ve diğeri. (2011) Increased blood glucose variability during therapeutic hypothermia and outcome after cardiac arrest\*. *Critical care medicine*, 39 (10), 2225-2231.
- 207.Curry, D.L.,Curry, K.P. (1970) Hypothermia and insulin secretion. *Endocrinology*, 87 (4), 750-755.



## EKLER

Ek-1. Etik Kurul İzni



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**

06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580  
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index\_hdk.php

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/

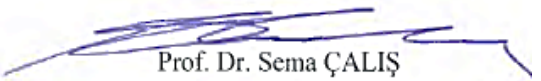
Sayı: 52338575 - 38

### HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

<b>TOPLANTI TARİHİ</b>	: 12.03.2015 (PERŞEMBE)
<b>TOPLANTI SAYISI</b>	: 2015/03
<b>DOSYA KAYIT NUMARASI</b>	: 2015/28
<b>KARAR NUMARASI</b>	: 2015/28-03
<b>ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ</b>	Doç.Dr.Esin İleri GÜREL
<b>HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI</b>	Doç.Dr.Esin İleri GÜREL ve Doç.Dr.Mehmet Alper ÇETİNKAYA
<b>YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR</b>	: Arş.Gör. Sevim İpek ACAR
<b>ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI</b>	: 47 adet sprague- dawley türü erişkin erkek sıçan

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr. Esin İleri GÜREL'in araştırma yürütücüsü olduğu 2015/28 kayıt numaralı "*Sıçanlarda Akut Duodenal L-Triptofan Uygulamasına Bağlı GLP-1 ve Peptit YY Salgısında Kalsiyum Algılayan Reseptörlerin (CaSR) Rolü*" isimli çalışma hayvan deneylerinden sorumlu araştırmacı olarak da Doç.Dr.Esin İleri GÜREL ve Doç.Dr.Mehmet Alper ÇETİNKAYA'nın bildirildiği proje Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına dair yönetmeliğin 18. maddesi uyarınca uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir. Kurul üyesi Doç.Dr.Mehmet Alper ÇETİNKAYA çıkar çatışması nedeni ile tartışma ve oylamaya katılmamıştır.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

  
Prof. Dr. Sema ÇALIŞ  
Etik Kurul Başkanı

## HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU GÜNDEMİ - İMZA SİRKÜLERİ

TOPLANTI TARİHİ : 12.03.2015 (PERŞEMBE)  
 TOPLANTI SAYISI : 2015/03  
 TOPLANTI SAATİ : 08.30

## EK GÜNDEM

 Prof. Dr. Sema Çalış (Başkan)	 Prof. Dr. Nüket Örnek Büken (Üye)	- KATILMADI - Prof. Dr. M. Yıldırım Sara (Üye)
 Prof. Dr. Neslihan H. Dikmenoğlu Falkmarken (Üye)	- KATILMADI - Prof. Dr. İlken Kocadereli (Üye)	 Prof. Dr. Mehmet Ali Onur (Üye)
- KATILMADI - Prof. Dr. Belgin Can (Üye)	 Doç. Dr. Aytakin Akyol (Üye)	- KATILMADI - Doç. Dr. Ersoy KONAŞ (Üye)
 Doç. Dr. İlyas Önbaşılar (Üye)	 Doç. Dr. Mehmet Alper Çetinkaya (Üye)	 Yrd. Doç. Dr. Banu Cahide Tel (Üye)
 Mevlüt Öksüzöğlü (Üye)	 Avukat Yasemin Özselçuk (Üye)	