

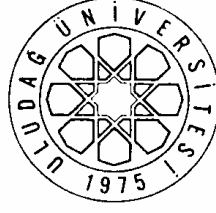
**T.C
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**YUMURTACI TAVUKLARDA AMYLİNİN
KALSİYUM METABOLİZMASI VE KEMİK GELİŞİMİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Saime GÜZEL

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2008



**T.C
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**YUMURTACI TAVUKLARDA AMYLİNİN
KALSİYUM METABOLİZMASI VE KEMİK GELİŞİMİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Saime GÜZEL

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Nazmiye GÜNEŞ

Bursa-2008

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüęü'ne,

Bu tez, jürimiz tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Adı ve Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Yrd. Doç. Dr. Nazmiye GÜNEŞ	
Üye	Prof. Dr. Meltem ÇETİN	
Üye	Prof. Dr. Gülhan TÜRKAY HOŞTÜRK	
Üye	Doç. Dr. Ümit POLAT	
Üye	Doç. Dr. Hüseyin YILDIZ	

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih,
.....sayılı toplantısında alınan.....numaralı
kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kasım ÖZLÜK
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET	II
İNGİLİZCE ÖZET	III
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
Amylinin Yapısı	4
Amylinin Salgılanması ve Kontrolü	5
Amylin Reseptörleri	7
Amylinin Etki Alanları	10
Gıda Alımı Üzerine Etkisi	10
Gıdaların Mideden Barsaklara Salınımı Üzerine Etkisi	12
Sindirim Salgıları Üzerine Etkisi	13
Glukagon Salınımı Üzerine Etkisi	14
Amylin ve Glukoz Homeostazisi	15
Kemik Gelişimi Üzerine Etkisi	17
Hormonlar ve Kemik Gelişimi Arasındaki İlişki.....	19
GEREÇ VE YÖNTEM	22
A. Hayvan Gereci, Bakım ve Besleme	22
B. Kan Alımı ve Laboratuvar Analizleri.....	22
1.Serum Kalsiyum Ölçümü	22
2.Serum Fosfor Ölçümü	23
3.Plazma Amylin Ölçümü	25
4.Plazma Kalsitonin Ölçümü	28
5.Plazma PTHrP Ölçümü	32
6.Plazma 1,25-(OH) ₂ Vitamin D Ölçümü	36
7.Serum Osteokalsin Ölçümü	39
8.Kemik Ölçümleri	42
9.Yumurta ile İlgili ölçümler	43
C. İstatistiksel Analizler	43
BULGULAR	44
TARTIŞMA ve SONUÇ	56
KAYNAKLAR	63
TEŞEKKÜR	75
ÖZGEÇMİŞ	76

ÖZET

Çalışma 10 haftalık 60 adet yumurtacı tavukta gerçekleştirildi. Deneme grubunu oluşturan 30 adet tavuğa gün aşırı subkutan yolla 75 µg/kg dozda amylin enjekte edildi. Geri kalanlar kontrol grubunu oluşturdu. 14, 16, 18 ve 20. haftalarda 5'i kontrol ve 5'i deneme grubundan olmak üzere 10'ar hayvan kesilerek kanları alındı. Serum kalsiyum ve fosfor konsantrasyonları spektrofotometre ile, plazma amylin, PTHrP (parathyroid hormone related peptid), kalsitonin, 1,25 (OH)₂ vitamin D (1,25 dihidroksikolekalsiferol), serum osteokalsin konsantrasyonları ELISA ile ölçüldü. Tibiotarsusun kortikal kalınlığı, ağırlığı, uzunluğu ve total hacmi hesaplandı. Kemik kalsiyum ölçümleri spektrofotometrik yöntemle yapıldı. 40 hayvan kesildikten sonra deneme ve kontrol grubundan kalan 10'ar hayvan amylin enjeksiyonu yapılmadan 35. haftaya kadar beslendi. Bu süreçte elde edilen yumurtalarda kabuk kalınlığı ve yumurta ağırlıkları ölçüldü, yumurta sayısı belirlendi. 35. hafta sonunda bu hayvanlar da kesilerek serum ve kemik parametreleri değerlendirildi.

Serum kalsiyum konsantrasyonları 14 (p<0.05), 16, 18 ve 20. (p<0.01) haftalarda deneme gruplarında kontrollerden daha düşüktü. Kalsitonin konsantrasyonları 18 ve 20. haftalarda deneme gruplarında kontrollerden yüksekti (p<0.05). Plazma amylin, PTHrP, osteokalsin ve 1,25 (OH)₂ vitamin D konsantrasyonlarında istatistiki açıdan önemli bir fark bulunmamakla birlikte deneme gruplarında kontrollere göre daha yüksek değerler gözlemlendi. Kemik kalsiyum düzeyleri 14, 16 ve 18. haftalarda (p<0.05) ve 20. haftada (p<0.01) deneme gruplarında kontrollerden yüksek bulundu. Tibiotarsusun kortikal kalınlığı 16 (p<0.05), 18 ve 20. (p<0.01) haftalarda deneme gruplarında kontrollerden daha yüksekti, ağırlığı, uzunluğu ve total hacminde ise önemli bir fark belirlenmedi.

35. haftada yapılan incelemelerde tibiotarsusun kortikal kalınlığı (p<0.05) dışındaki parametrelerde önemli bir fark bulunmadı. 20. haftadan 35. haftaya kadar bakılan tavuklarda yumurta ağırlığı deneme grubunda kontrol grubundan yüksek bulunmakla birlikte istatistiki açıdan önemli değildi. Deneme grubunda yumurta kabuk kalınlıkları kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu (p<0.05). Bu süreçte hayvan başına düşen günlük yumurta sayısı deneme grubunda (0.85) kontrol grubuna (0.82) göre daha fazlaydı.

Sonuç olarak çalışmada amylin uygulanan grupta incelenen parametrelerdeki olumlu değişiklikler amylinin yumurtacı tavuklarda kemik gelişimini uyarıcı yönde etki gösterdiğini ortaya koymuş ve verim kalitesiyle süresini artıracaklarını düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Amylin; yumurtacı tavuk; kemik; kalsiyum

SUMMARY

The effects of amylin on calcium metabolism and bone development in laying hens

The study was performed in 60 laying hens with 10 weeks old age. Thirty hens constituting treatment group were subcutaneously injected amylin at 75 µg/kg dose every other day. The remaining hens were used as control. Five animals from treatment and control groups were slaughtered at 14, 16, 18 and 20th weeks of age and blood samples were collected from all slaughtered animals. Serum calcium and phosphorus concentrations were measured by a spectrophotometer, while plasma amylin, PTHrP (parathyroid hormone related peptid), calcitonin, 1,25 (OH)₂ vitamin D (1,25 dihydroxycholecalciferol) and serum osteocalcin concentrations were determined by ELISA. Cortical width, weight, length and total volume of tibiotarsus were determined. After slaughtering 40 hens, remaining 10 hens from treatment and control groups were fed until 35th week without any amylin injection. Shell thickness and weights of eggs obtained during this period were measured and numbers of eggs were determined. All hens at the end of the 35th week were slaughtered and then parameters of serum and bone were evaluated.

Serum calcium concentrations were lower in treatment groups than in control groups at 14 (p<0.05), 16, 18 and 20th (p<0.01) weeks of ages. Calcitonin concentrations were significantly higher in treatment groups than in control groups at 18 and 20th weeks (p<0.05). Though statistically insignificant, values of plasma amylin, PTHrP, osteocalcin and 1,25 (OH)₂ vitamin D were observed higher in treatment groups than in control groups. Bone calcium levels were higher in treatment groups than in control groups at 14, 16 and 18th weeks (p<0.05) and 20th (p<0.01) week. While cortical widths of tibiotarsuses were higher in treatment groups than in control groups at 16 (p<0.05), 18 and 20th (p<0.01) weeks of ages, no significant differences were observed in weights, lengths and total volumes of tibiotarsuses between treatment and control groups.

No significant difference was observed at 35th week except cortical width of tibiotarsus (p<0.05). Egg weights of hens fed from the 20th through 35th week of age were higher in treatment group than control group, albeit with no statistical significance. Eggshell thickness was found thicker in treatment group than in control group (p<0.05).

During this period mean egg numbers per animal per a day was higher in treatment group (0.85) than in control group (0.82).

As a result it might be concluded that, based on observed positive effects of amylin on parametes measured, amylin stimulates the bone development positively and may increase the quality and sustainability of yield in laying hens.

Key words: Amylin; laying hen; bone; calcium

GİRİŞ

Amylin molekül ağırlığı 4 kDA olan, 37 aminoasitten oluşmuş, doğal polipeptid yapıda nöroendokrin bir hormondur (1-3). IAPP (Islet amyloid polypeptide) olarak da bilinen amylin insülinle birlikte pankreasın β hücrelerinde sentezlenir ve depo edilir. Gıda alımından sonra yine insülinle birlikte buradan salgılanır (4, 5). Çok az miktarlarda akciğer, mide bağırsak kanalı ve hipotalamustan da salgılanır. Bağırsakta pankreastan % 1 daha az oranda bulunur. Ancak tavuklarda amylin salınımı pankreasa göre bağırsakta ve beyinde daha fazla olmaktadır. İnsülinoma, osteoblastoma, pankreatik tümörler gibi tümörlerden de amylin salınımı olabilir. Buna ek olarak midede antrum ve fundus bölgelerinde somatostatinle birlikte lokalize olmaktadır ve burada amylin için spesifik bağlanma yerleri bulunmaktadır. Bu bilgilere dayanarak amylinin gastrik fonksiyonlarda otokrin veya parakrin hormon olarak rol aldığı, ayrıca gastrik asit sekresyonunu da inhibe edici özelliği nedeniyle gastrik ülserlerin tedavisinde kullanılabileceği belirtilmiştir (6, 7).

Amylin için özellikle beynin belirgin bölgelerinde yüksek affiniteli bağlanma yerleri bulunmaktadır. Bu bölgeler *area postrema*, *nucleus accumbens* ve dorsal *raphe* bölgeleridir. *Area postrema*, dorsal *vagal* kompleksin bir parçasıdır ve 5 önemli beyin bölgesinden biridir ve amylinin glukoregulator etkisinin oluşumunda kritik öneme sahiptir (8, 9). Bu bölgelerdeki reseptörler aracılığı ile glukoz homeostazisinin sağlanmasında yeni bir pankreatik ada hormonu olarak önemli role sahiptir (10). Gıda alımı sonrası glukagon konsantrasyonunu baskılayarak karaciğerden kana glukoz akışını hafifletir (11). Gıda alımı sonrası insülinle birlikte dolaşımdan çıkan glukoz oranını yükseltip, dolaşıma giren glukoz oranını azaltarak plazma glukozunu kontrol eder (9).

Beyinden başka; kemik yapısında, osteoblast ve osteoklastların yüzeyinde ve böbrek korteksinde amylin reseptörleri bulunmaktadır. Bu bölgelerdeki reseptörler aracılığıyla kemikler üzerinde önemli etkiler oluşturur. Amylin, kalsitonin ailesinin bir üyesi olduğu için yapısal olarak CGRP (calcitonin-gene related peptide) adrenomedüllin ve kalsitonine benzemektedir. 37 aminoasitlik olgun formdaki amylin peptidinin 2. ve 7. pozisyonundaki sistin aminoasitleri arasında bir disülfid bağı vardır. Bu disülfid bağı amylinin kemikler üzerindeki etkilerinin meydana gelmesinde rol oynar (3). Amylin molekülünün indirgenmesi bu disülfid bağının bozulmasına neden olur. Bu nedenle indirgenmiş amylin molekülü kemikler üzerinde önemli bir etki oluşturmaz (10).

Amylin, kalsitonin gen ailesinden olan kalsitonin ve CGRP ile yapısal olarak benzediği için vücutta oluşturduğu etkiler de bu peptidlerinki ile benzerdir. Amylin ve CGRP *in vivo* olarak kalsitonin benzeri bir hipokalsemik aktiviteye sahiptir. İnsan amylini ve CGRP, 1,25 (OH)₂ vitamin D (1,25 dihidroksikolekalsiferol)'nin neden olduğu kemik rezorpsiyonunu inhibe eder. Osteoblast proliferasyonunu artırırken, osteoklast proliferasyonunu da inhibe eder (12). Cornish ve arkadaşları (13) erkek farelere amylin (1-8) oktapeptidinin sistemik olarak ilavesinin kemik hacmini artırdığını belirtmişler, buna dayanarak amylin ve analoglarının osteoporozisin tedavisinde uygulanabileceğini bildirmişlerdir. Yine Cornish ve arkadaşları (14) erkek farelere amylinin sistemik olarak ilavesinin total kemik hacmini, kortikal kalınlığı, tibial uzunluğu ve vücut ağırlığını artırdığını vurgulamışlardır. Bir başka çalışmada fetal rat osteoblastlarında tam bir amylin molekülünün (1-37), amylinin (1-8)'lik fragmentinin hücre proliferasyonunu uyardığı, amylinin (8-37)'lik fragmenti, amid grubu olmayan amylin, indirgenmiş amylin ve indirgenmiş (1-8)'lik amylin fragmentinin ise herhangi bir etki göstermediği vurgulanmıştır (15). Bronsky ve arkadaşları (3) insanlar üzerinde yaptıkları çalışmada osteoporozisli hastalarda amylinin açlık plazma düzeylerinin düşük olduğunu ve amylin eksikliğinin osteoporozisin oluşumunda katkısının olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Yumurtacı tavuk yetiştiriciliğinde kalsiyum metabolizması ve kemik gelişimi özel bir öneme sahiptir. Midede hidroklorik asidin etkisiyle kalsiyum iyonları haline geçen kalsiyum bağırsaklara geçer ve orada serbest yağ asitleriyle birleşerek kalsiyum sabunları şeklinde emilir. Bu şekilde kandan emilen kalsiyum ile metabolizma olayları neticesinde oluşan karbondioksitin su ile tepkimeye girmesi sonucu meydana gelen bikarbonat iyonları birleşerek kalsiyum karbonattan oluşan yumurta kabuğunu oluştururlar (16). Tavuk, yumurtladığı her yumurta ile beraber 2 gramdan fazla kalsiyumu vücudundan kaybeder. Uterusta gerçekleşen kabuk sentezi için gerekli olan kalsiyumun önemli bir kısmı yemdeki kalsiyum kaynaklarından gelirken % 30 kadari da kemiklerden rezorbe edilir. Hayvanların seksüel olgunluğa ulaştıkları dönem ile ilk yumurtanın alındığı dönem arasındaki devre kemik gelişimi açısından en hızlı ve son derece önemli bir zamandır (17, 18).

Bu çalışmada yeni bir hormon olan ve yumurtacı tavuklarda henüz çalışılmamış olan amylinin, iyi bir kemik oluşumunun önemli olduğu yumurtacı tavuklara uygulanmasıyla kemik gelişimi, kalsiyum metabolizması ve yumurta ile ilgili bazı parametreler üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

GENEL BİLGİLER

1987 yılında tam olarak tanımlanan amylin esas olarak pankreasın β hücreleri tarafından sentezlenen peptid yapıda bir hormondur. Amylinin keşfinden önce yapılan çalışmalarda diyabetli hastaların Langerhans adacıklarında homojen cam görünümlü bir hiyalinin varlığı keşfedilmiştir (19). Karakteristik boyanma özellikleri olan ekstrasellüler protein yapılı bu hiyalin maddesi diyabeti olan hastaların pankreasında amiloid olarak isimlendirilmiştir (20). Amiloid molekülünün özelliklerini tanımlamak için yapılan denemeler düşük konsantrasyonu ve suda erimemesi gibi özelliklerinden dolayı boşa çıkmıştır. Yapılan bazı çalışmalarda insülin ya da insülin fragmentleri içeren adacık amiloidlerinin içinde bazı maddelerin varlığı ileri sürülmüştür. Ancak bunların ne olduğu ve yapısı ile ilgili herhangi bir açıklama yapılamamıştır (21, 22).

İnsülinomalı dokulardan elde edilen amiloidler ile ilgili çalışan Westermarck ve arkadaşları (23) Kasım 1986'da IAPP olarak isimlendirdikleri kısmi bir yapının varlığını ortaya koymuşlardır.

Cooper ve arkadaşları (24) 1987'de tip 2 diyabetli hastaların pankreasında amiloid içeren yapılardan ekstrakte edilen 37 aminoasitli bir peptidin tam yapısını tanımlamışlardır. 1988'de Cooper başka bir grup araştırmacı ile birlikte (25) 37 aminoasitlik bu peptidin sağlıklı bireylerde bulunan bir hormon olabileceğini ileri sürmüştür. Cooper'ın ilk tanımlamasında diyabet ilişkili peptid olarak adlandırdığı bu peptid histolojik orijinini (amiloid) yansıtmak amacıyla bu çalışmada Cooper tarafından amylin olarak değiştirilmiştir. Çalışmada sulu solüsyonlarda oksidasyon ile disülfit bağının şekillenmesi sağlanmış ve liyofilizasyon ile geri kazandırılarak solid faz teknikleriyle amylin bütün halinde sentezlenmiştir.

Westermarck ve arkadaşları (26) daha sonraki yayınlarında ilk bulduklarına göre daha kompleks olan tam yapıyı ortaya koymuşlar ve daha önceden yaptıkları IAP isimlendirmesini IAPP olarak değiştirmişlerdir. Bugünkü literatürlerde ise sadece amylin ve IAPP terimleri kullanılmaktadır (7, 27).

Sanke ve arkadaşları (28) IAPP'nin proteolitik yöntemlerle 89 aminoasitli bir prekürsörden köken aldığını ortaya koymuşlardır. Sonuçta oluşan 37 aminoasitli peptid, amino ve karboksil uçlarından lys-arg ve gly-lys-arg ile desteklenmiştir. Bu amiloid peptid proinsülin ve diğer adacık prohormonlarına benzer proteolitik yöntemlerle meydana getirilmiştir. Ayrıca bu peptidler karboksi uçlarından amidlenmişlerdir.

Mosselman ve arkadaşları (29) 1988 yılında insan IAPP genini izole etmişlerdir. 1989'da yaklaşık 5 kb ve prekürsörün amino ucunda ard arda olduğu varsayılan bir sinyal dizisi ile sentezlenen bir protein olan 89 aminoasitli prepro IAPP'yi kodlayan 2 tane ekson bulmuşlardır (30). 1989 yılında Robert ve arkadaşları (31) bu peptidin proamylin olarak isimlendirilen prokürsör peptid olarak sentezlendiğini ortaya koymuşlardır. Amylin ve CGRP için gen yapısı çok fazla benzerlik göstermektedir. Özellikle intramoleküler disülfid bağı içeren ilk beş kodlanma bölgesi ve CGRP gibi karboksi terminalinde glisin kodonları içeren ilk üç kodlanma bölgesi amidlenmiştir. Disülfid köprüsü ve amidlenme olan ya da olmadan sentezlenen amylinin biyolojik aktivitesi üzerinde yapılan çalışmalarda Roberts ve arkadaşları (31) tam biyolojik aktivite için gerekli olan özellikleri göstermişler ve moleküldeki bu bölgelerin fonksiyonel önemini doğrulamışlardır.

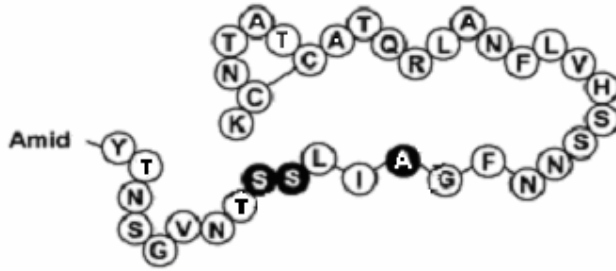
Johnson ve arkadaşları (32) 1989 yılında adacık amiloid ve diyabetes mellitus arasındaki ilişkiyi keşfetmişler ve buna göre adacık amiloid depoları ve diabetogenezis arasında ilişki olduğunu ortaya koymuşlardır. IAPP molekülünün 20 ve 29. pozisyonlar arasındaki bölgesi insan, kedi ve rakun gibi bazı türlerde amiloidojeniktir (amiloid şekillenmesinden sorumludur). IAPP'nin artan β hücre üretimi amiloid depolarını etkileyebilir ve periferel dokularda insülinin rolüne karşı koyarak insülin rezistansına neden olabilir. Amiloid şekillendirmek için IAPP'nin polimerizasyonu, adacık hücrelerini hasara uğratarak ve glukozun geçişini bozarak tip 2 diyabetes mellitusun gelişimine katkıda bulunabilmektedir.

Westermarck ve arkadaşları (33) 1990 yılında ala-ile-leu-ser-ser yapısını ve insan IAPP'sinde 25-29. aminoasitler arasına denk gelen bölgenin kuvvetli bir şekilde amiloidojenik olduğunu göstermişlerdir. 28. pozisyonundaki serin prolin substitüsyonu bazı rodentlerde normal olarak meydana gelmektedir, bu nedenle IAPP kaynaklı amiloid oluşmamaktadır. Amiloid fibrilleri şekillenmesini de tamamen inhibe etmektedir.

Amylinin Yapısı

Amylin kromozom 12 'de gen ekspresyonu ile üretilmektedir. İlk olarak 89 aminoasitli preproamylin olarak kopya edilmekte, sonra 67 aminoasitli proamyline dönüşmektedir. Bu daha sonra pankreasın β hücrelerinde prohormon konvertaz 2 ve 3 enzimleri ile olgun forma çevrilip, insülin ve C peptid ile aynı granüllerde depolanmaktadır

(6). Olgun formdaki bu amylin peptidi, 37 aminoasitten (H-Lys-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Ala-Thr-Gln-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe-Leu-Val-His-Ser-Ser-Asn-Asn-Phe-Gly-Ala-Ile-Leu-Ser-Ser-Thr-Asn-Val-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr-NH₂) oluşmaktadır (Şekil-1). Bunlardan 2. ve 7. pozisyondaki sistin aminoasitleri arasında bir disülfid bağı bulunmaktadır. Bu disülfid bağı amylinin kemikler üzerindeki önemli etkilerinin meydana gelmesinde rol oynar ve osteoblast proliferasyonunun uyarılması bakımından da önemlidir (3). Amylin molekülünün indirgenmesi bu disülfid bağının bozulmasına neden olmaktadır. Amylin molekülünde peptidin karboksi ucunda amid molekülü bağlıdır. Amid molekülü olmayan amylin, amylin asit olarak adlandırılmaktadır. İnsanlarda 25, 28, 29. pozisyondaki aminoasitlerin yerine 3 prolin eklenerek insan amylin analogu olan pramlintid üretilmiştir. 20. ve 29. aminoasitler arasındaki bölge ise insan ve kedilerde amiloid şekillenmesinden sorumludur (8).



Şekil-1 Amylin molekülünün yapısı

Amylin, kalsitonin ailesinin bir üyesi olduğu için yapısal olarak CGRP (% 43-49), adrenomedüllin (% 20) ve kalsitonine (% 13) benzemektedir (34). İnsan ve diğer memeli türleri arasında amylin % 85-90 homoloji gösterirken, insan ve tavuk amylini arasında ise bu oran % 76-82 arasındadır (7).

Amylinin Salgılanması ve Kontrolü

Amylin biyosentezinin gerçekleştiği başlıca yer pankreasın β hücreleri olmasına rağmen küçük miktarlarda akciğer, mide bağırsak kanalı ve hipotalamustan da

salgılanmaktadır. Ayrıca insülinoma, osteoblastoma ve pankreatik tümörlerden de salgılandığı gözlenmiştir (6). Tavuklarda ise memelilerdekinin aksine beyin ve bağırsakta pankreastan 10 kat daha yüksek düzeylerde üretilmektedir (7).

İnsanlarda tip 1 ve tip 2 diyabetes mellitusun son safhalarında insülin ve amylin eksikliği ortaya çıkmaktadır. Amylin eksikliğinin şiddetinin insülin eksikliğinin şiddeti ile orantılı olduğu görülmektedir. Amylin ve insülin salgılanmasındaki eksikliğin bu uyumu diyabetin gelişimi ile birlikte incelenmiştir. Amylin böbreklerde proteolitik bir indirgenme ile temizlenmektedir. Amylinin yarı ömrü ratlarda 13 dakika ve insanlarda pramintide için 20-45 dakikadır (35).

Amylin molekülünün köken aldığı amiloid materyalin kaynağı pankreatik adacıklar olarak belirlendiğinden beri (24) yapılan diğer çalışmalarda da bu bölgelere odaklanılmıştır (36). Adacıkların içerdiği immünreaktivitenin dağılımı insülininki ile uyusmaktadır. Dağılımın bu uygunluğu sadece β hücrelerinde değil, aynı zamanda β hücre sekretör granüllerinde de gözlenmiştir (37, 38).

Rat, fare ve insanda amylin immünreaktivitesi bağırsakta bazı bölgelerde, özellikle pilorik antrumun belirli bölgelerinde de tanımlanmıştır. Amylinin mRNA'sı da benzer bir dağılım göstermektedir. İmmünreaktivite midede daha az gözlenmekte ve seyrek olarak duodenumdan kolona yayılmaktadır (39). Filogenetik bir çalışmada balık hariç bütün vertebralı türlerin duodenum ve midesinde amylin immünreaktivitesi saptanmıştır (40). Midede amylinin varlığı insülin ile ilişkili değildir (41). Fakat rat ve insanda G (gastrin) hücreleri ile benzemektedir. Somatostatin, peptid YY, serotonin ve kromograninler gibi diğer çeşitli nöropeptidlerle de ilişkili bulunmuştur (39, 40, 42, 43).

Amylin immünreaktivitesi dorsal nöronlarda, trigeminal gangliyonda, *jugular nodos* ve dorsal kök ganglionlarındaki küçük ve orta büyüklükteki sinir hücresi cisimcikleri popülasyonunda tanımlanmıştır. Burada adenilat siklazı aktive eden polipeptid, substans P, CGRP içeren iplikçiklerle birlikte yerleşmiştir. Uyarıları alan periferel dokularda da daha az miktarda bulunmaktadır (44). Spesifik amylin immünreaktivitesi ayrıca *amigdala* (45) ve diğer merkezi beyin bölgelerinde de bulunmaktadır (46). Amylin ayrıca osteoblastlar tarafından da üretilmekte ve kemiklerde lokal faktör olarak rol oynamaktadır (47).

İnsan ve hayvanlarda amylin ve insülin salgılanmasının seyrindeki uyum ile ilgili yapılan çalışmalar, birlikte salgılandıklarının bir delili olmuştur (5, 48, 49). Yapılan iki çalışma amylin ve insülin genlerinin paralel regülasyonunu ortaya koymaktadır (50, 51). Amylin ve insülin pankreatik β hücrelerinde birlikte lokalize olmuşlardır ve buradan

birlikte salgılanmaktadırlar. İnsülin salgılanmasını düzenleyen faktörler amylin salgılanmasının zorunlu olarak ayarlanmasına neden olmaktadır. Bu salgılanma glukoz, arjinin ve karbakol tarafından uyarılırken somatostatin tarafından inhibe edilmektedir (5, 52). Amylin ve insülinin plazma konsantrasyon profilinde önemli bir benzerlik bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda araştırmacılardan bir kısmı salgılanan insülin ve amylinin molar oranında bir tutarsızlık olduğunu belirtirken, diğer araştırmacılar ise amylin/insülin oranında fark bulunmadığını ve bu tutarsızlığın klerens yerlerindeki ya da oranlarındaki farklılıktan kaynaklanabileceğini savunmaktadırlar. İnsülinin klerens oranı amylininkinden daha hızlıdır ve insülin için başlıca karaciğerde meydana gelirken amylin için böbreklerde meydana gelir (53-55).

Amylin Reseptörleri

Amylin için özellikle beynin belirgin bölgelerinde yüksek affiniteli bağlanma yerleri bulunmaktadır. Bunlar *area postrema*, *nucleus accumbens* ve *dorsal raphe* bölgeleridir. Kan-beyin bariyerinden yoksun olan *area postrema*, *dorsal vagal* kompleksin bir parçasıdır ve beş önemli beyin bölgesinden biridir. Bu bölge amylinin glukoregulator etkisinde kritik öneme sahiptir (56, 57). Beyinden başka kemik yapısında, osteoblast ve osteoklastların yüzeyinde ve böbrekte, özellikle de böbrek korteksinde amylin reseptörleri bulunmaktadır (58).

En büyük ve ilk tanımlanan amylin bağlanma bölgesi *nucleus accumbens*tedir. Yoğun amylin bağlanması *subfornical* organ, *organum vasculosum lateralis terminalis* ve *area postrema*yı kapsayan sirküventriküler organlarda mevcuttur. Bu yapılarda diffüzyonel (kan-beyin) bariyer yoktur, bu nedenle dolaşımdaki β hücre kaynaklı amyline karşılık verebilmektedirler. Bazı periferik dokularda amylin duyarlılığı ile ilgili farmakolojik delillere rağmen beyin dışındaki seçici amylin bağlanması sadece böbrek korteksinde incelenmiştir (57, 58).

Amylin reseptörleri ile ilişkili olan bölgelerin dağılımı ilk olarak Sexton ve arkadaşları (59) tarafından 1988'de ortaya koyulmuştur. Bu bölgeler ilk olarak C3 bağlanma bölgeleri olarak adlandırılmışlar ve aynı zamanda sCT (salmon calcitonin) ve CGRP'ye de yüksek affiniteleri olduğu için kalsitonin bağlanma bölgeleri olarak tanımlanmışlardır. Fakat amylin daha sonraları keşfedildiği için yazarlar C3 bölgelerinin ayrıca yüksek affinite ile

amyline bağlandığının farkına varamamışlardır. Bu bölgelerin amylin reseptörlerini içerdiğinin keşfi 1990 yılında Beaumont ve arkadaşları tarafından yapılmıştır ve 1993 yılında açıklanmıştır (57).

Beyinde yüksek affiniteli amylin bağlanma yerleri tanımlanmıştır. Rat beyinde en yüksek bağlanma yoğunluğundaki bölgeler otoradyografik çalışmalarla belirlenmiştir (56, 57). Bu bölgeler *nucleus accumbens* ve *fundus striati*, *area postrema*, *subfornical* organ, *lamina terminalisin vascular* organı ve *locus coeruleus* (60). Amylin reseptörlerinin dağılımı *area postrema*, *tractus solitariusun nucleusu*, *locus coeruleus* ve *dorsal raphe* bölgelerinde daha yüksek yoğunluktadır (61).

Amylin reseptörlerinin moleküler olarak tanımlanmasına öncülük eden geçitler karışıktır. Bunların tanımlanmasından önce bazı çalışmalar amylin reseptörleri ve kalsitonin gen ürünü arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. MCF-7 (Human breast adenocarcinoma cell line) hücrelerinde amylin için yüksek affiniteli bağlanma yerleri bulunmuştur. MCF-7 hücrelerinde kalsitonin reseptör geninin iki izoformu tanımlanmıştır. Hücre sınırlarında bu kalsitonin reseptör izoformlarından birinin ekspresyonu yüksek affiniteli küçük bir amylin bağlanma yeri kadar tipik bir kalsitonin reseptörü yaratmıştır (62).

Yüksek affiniteli amylin bağlanma yeri ayrıca fare tirotrop hücrelerinde de tanımlanmıştır. MCF-7 hücreleri gibi bu tirotrop hücreler de kalsitonin reseptör geninin en az iki izoformunu eksprese etmişler, yüksek affiniteli amylin bölgeleri oluşturmuşlar ve tipik kalsitonin reseptörlerini kapsamışlardır. Fakat amylin reseptörleri tirotrop hücrelerindeki başlıca kalsitonin reseptörlerinden biyokimyasal olarak farklılıklar göstermektedirler (63).

Amylin üzerine de etki yapan kalsitonin reseptörlerinin birkaç formu ortaya koyulmuştur. Bunlardan bir tanesi insan MCF-7 hücrelerinde bulunan kalsitonin reseptörünün değişik bir çeşididir (64). Ek olarak aminoasit yapısı kalsitonin reseptörü ile % 55 aynı olan CRLR (calcitonin receptor-like receptor) tanımlanmıştır (65).

CGRP ve adrenomedüllin reseptörlerinin ekspresyonu için aksesör protein ailesi olan RAMP'lere (receptor activity modifying protein) gerek vardır. RAMP'ler CRLR'lerin taşınması için gerekmektedirler (66). Üç tane belirgin RAMP tanımlanmıştır. Bunlardan RAMP1 ve RAMP2'nin CRLR geni ile birlikte sentezlenmesi farklı farmakolojik etkilerin oluşumuna yol açmaktadır. RAMP1'in CRLR geni ile birlikte salgılanması CGRP reseptörünün farmakolojik etkilerine benzer bir reseptör kompleksinin oluşumu ile sonuçlanmaktadır. RAMP2'nin CRLR geni ile birlikte sentezlenmesi ise

adrenomedüllinin farmakolojik etkilerine benzer bir reseptör oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Böylece tek bir gen ürünü (CRLR), RAMP aksesör proteinleri ile ilişkili olarak ya CGRP ya da adrenomedüllin reseptörüne çevrilmektedir. İlginç olarak RAMP3 ayrıca kalsitonin reseptörü ile ilişkiye girerek farklı farmakolojik etkiye sahip olan diğer bir amylin reseptörünü üretmektedir. Bu reseptör amylin ve sCT'ye eşit şekilde duyarlıyken CGRP'ye duyarlı değildir ve reseptör memeli kalsitoninine CTR (calcitonin receptor)+RAMP1 yapısından daha az duyarlıdır (67). RAMP2, hCTR_{II} (ayrıca hCT_a olarak da bilinir) ile ilişkili olarak bir amylin reseptör subtipi oluşturmaz fakat hCTR_{II}+kalsitonin reseptör varyantı ile ilişkili olduğunda oluşturabilir (68).

Muff ve arkadaşları (69) RAMP1'in kalsitonin reseptörü ile uzun süre birlikte salgılanmasının *nucleus accumbens*teki amylin bağlanma bölgesine benzer farmakolojik etki ile bir reseptör kompleksi oluşumu ile sonuçlandığını ortaya koymuşlardır. RAMP1 ile kalsitonin reseptörlerinin birlikte salgılanması transfektanlarda amylin bağlanmasını artırmaktadır. RAMP1, amylin ve CGRP için eksprese edilen reseptörlerin duyarlılığını artırırken memeli kalsitoninine duyarlılığını düşürmektedir. Bu işlemi kalsitonin reseptörlerini amylin reseptörlerine dönüştürerek gerçekleştirmektedir. Bu nedenle amylin reseptörü kalsitonin reseptörünün bir veya daha fazla RAMP ile etkileşimi sonucu da oluşabilmektedir (67, 69).

Yüksek CGRP affiniteli amylin reseptörü, CTR+RAMP1 yapısı *nucleus accumbens* ve *amigdala*da bulunan bağlanma yerlerinin farmakolojik etkileri ile uyuyor gibi görünmektedir (67). Bu bölgelerde RAMP1 mRNA'sının fazla bulunması *nucleus accumbens*te amylin reseptörünün predominant subtipinin CTR+RAMP1 olduğunu düşündürmektedir (70). CTR+RAMP3 formu daha düşük CGRP affinitesi ile *dorsomedial* ve *arcuate hipotalamic nucleusta* bulunan amylin bağlanma yerleri ile ilişkili görünmektedir (67).

Kalsitonin reseptörünün başlıca 2 formu bulunmaktadır. Bunlardan amylin için önemli olan birinci formu Goldring ve arkadaşları (71) tarafından tanımlanmıştır ve T47D akciğer karsinomasındaki kalsitonin reseptörleri ile benzerlik göstermektedir. Bir varyant şekli ilk intrasellüler lobun içinde 16 aminoasit içermektedir ve ilk ekstrasellüler lopta 37 aminoasit bulunmaktadır (72). Bunlar CTR_{II-} ve CTR_{II+} veya daha basit olarak CT (a) ve CT(b) olarak isimlendirilmektedirler. Bunların her birinin 3 RAMP subtipinin her biri ile kombinasyonu 66 mümkün dimerik form üretmektedir ve prensipte 6 farklı farmakolojik etki oluşmaktadır. Mümkün olan fenotipler sırasıyla CTR ve RAMP komponentlerine dayandırılarak amylin 1 (a), 2 (a), 3 (a), 1 (b), 2 (b), 3 (b) reseptörleri olarak dizayn

edilmiştir (73). Aslında bunlardan 2 tanesi en önemli amylin duyarlı dokularda (*nucleus accumbens*, *subfornical* organlar ve *area postrema/nucleus tractus solitarius*) predominant gibi görünmektedir. Örneğin CT (b) *area postrema*da ve RAMP3 ise *subfornical* organlarda bulunmamaktadır (74). *Nucleus accumbens*teki asıl kombinasyon amylin (a) [CT (a) + RAMP1 dimeri] gibi görünmektedir (70). Affinitelerin sırasıyla ilişkili olarak sCT>amylin>CGRP>>hCT şeklinde olduğu ortaya koyulmuştur (57). *Subfornical* organların benzer formu da amylin 1 (a)'dır. Ratlar da iskelet kasında amyline, amylin 1 (a) benzeri farmakolojik etki ile cevap vermektedir fakat bu bölgedeki bağlanma henüz incelenmemiştir (74).

Metabolik kontrolde önemli olan *area postrema* amylin 3 (a) [CTa+ RAMP3 dimer]'ı içerir gibi görünmektedir. Sonuçta oluşan farmakolojik etki amylin ve sCT bağlanması ile eşit güçte olmasına rağmen CGRP ve memeli kalsitonin bağlanması için daha düşük affiniteye sahiptir (74).

Amylinin Etki Alanları

Çeşitli türlerde amylin ya da pramlintide kullanılarak yapılan çalışmalarda amylinin birçok farklı etkisinin olduğu ileri sürülmüştür. Amylinin bugüne kadar açıklanmış etkilerinden en önemlileri gıda alımı, gıdaların mideden bağırsaklara salınımı, sindirim salgıları, glukagon salınımı, glukoz homeostazisi ve kemik gelişimi üzerindeki etkileri olarak sıralanabilir.

Gıda Alımı Üzerine Etkisi

Amylinin gıda alımını azaltıcı etkisi vardır ve yapılan ilk çalışmalarda bu etki, diğer peptidlerle karşılaştırıldığında oldukça önemli düzeylerde bulunmuştur (75, 76). Amylin uygulanmış farelerde % 53 ile 57 oranlarında gıda alımında azalma gözlenmiştir (77). 100 µg intravenöz amylin enjeksiyonu ratlarda gıda alımını azaltmıştır (78). Yapılan bir başka çalışmada ratlara 3 saat süreyle intravenöz amylin infüzyonunun gıda alımını % 78'e kadar azalttığı gözlenmiştir (79). Amylinin anorektik etkisi merkezi olarak meydana

gelmektedir. Amylin direkt beyne verildiğinde intraperitoneal enjeksiyona göre 50 kat daha kuvvetli olarak gıda alımını azaltmaktadır (80, 81). Periferal olarak amylinin anorektik etkisi *area postrema/nucleus tractus solitarius* üzerindeki direkt rolü ile gerçekleşmektedir. Tanımlanmış amylin reseptörlerinde çeşitli ligandların güç sırası sCT>amylin \geq CGRP>>memeli kalsitoninleri şeklindedir (57). Aynı ligandlar gıda alımı üzerine etkilerine bakıldığında benzer güç sırasına sahiptirler (82). Örneğin sCT, ICV (intracerebroventricular) ilave edildiğinde gıda alımını azaltmaktadır (83). Amylin gıda alımını azaltmada merkezi ve periferal olarak verildiğinde CGRP'den daha kuvvetli etkiye sahiptir (84, 85). Bu etkilerin amylin reseptörleri aracılığı ile olabileceği düşünülmektedir ve bu etkiler amylin aracılıklı gıda alımı düşmesini AC187 (amylin antagonisti) aracılığı ile durdurabilmektedir. Fakat AC187'nin aksine CGRP antagonisti CGRP (8-37) amylinin anorektik etkisini bloke etmede etkili değildir. Sonuç olarak bu role aracılık eden reseptörler amylin/kalsitoninden daha çok CGRP'ye yanıt vermektedirler (77). Yaşlı hayvanlarda plazma amylin konsantrasyonu artma eğilimindeyken, amylinin anorektik etkisi ise zayıflama eğilimindedir. Bu durum, yaşlı hayvanlardaki amylin rezistansının oluşma olasılığı ile açıklanabilir (86).

Amylin akut olarak verildiğinde doza bağlı olarak gıda alımını azaltıcı etkisi amylin reseptörlerinin merkezi işlevi ile gerçekleşmektedir. Fakat bu etki vagal iletim ile ilişkili değildir. Amylinin gıda alımını azaltıcı bu etkisi CCK-8 (cholecystokinin octapeptide)'e benzemektedir. Gıda alımını inhibe etmede amylin ve CCK-8 arasında güçlü bir sinerji ortaya koyulmuştur. CCK-8 ve amylinin normalde bir etki oluşturmayan dozlarda bile birlikte verilmesi kuvvetli bir etki meydana getirmektedir. Amylin ve CCK-8 klinik olarak birlikte önemlidir. Bu tokluk hormonlarının karışımı gıda alımının tam bir inhibisyonu için gereklidir. (87).

Büyüme hormonu salgılatan ghrelinin rodentlerde gıda alımı ve yağlanmayı artırdığı ortaya koyulmuştur (88, 89). İnsülin ve amylin ghrelin sekresyonunun inhibisyonu üzerine etkiye sahiptir. Amylin insüline göre ghrelin sekresyonunun inhibisyonunda çok daha kuvvetli bir etkiye sahiptir. Amylin kuvvetli bir β hücre ghrelin inhibitörüdür. Diğer bazı etkiler gibi amylin ghrelin sekresyonunun inhibisyonunu da *area postrema* aracılığı ile yapar. Amylinin gıda alımını ve yağlanmayı azaltıcı etkilerinin ne kadarının ghrelin ile ilişkili olarak gerçekleştiği bilinmemektedir (90).

Gıda tüketimini azaltan birçok peptid beraberinde su tüketimini de azaltmaktadır. Periferal olarak amylin enjeksiyonu dipsojenik (su alımını uyaran) hormon angiotensin II'ye benzer şekilde su alımını uyarmıştır (91). Diğer birçok araştırmacı da amylinin su

alımını inhibe etmeden gıda alımını inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır (92, 93). Pıgme keçilerde yapılan çalışmada amylin ve sCT'nin ikisinin de anoreksijenik olduğu görülmüştür ve sCT'nin de düşük derecede dipsojenik olduğu ortaya koyulmuştur (94). Bir amylin agonisti olan CGRP de gıda alımını azaltır fakat su alımını azaltmaz. Amylin su içme içgüdüğü üzerine olan etkisini *subfornical* organlar üzerindeki rolü aracılığı ile gerçekleştirir (95).

Gıdaların Mideden Bağırsaklara Salınımı Üzerine Etkisi

Fizyolojik konsantrasyonlarda amylin, doza bağılı olarak gıdaların mideden bağırsaklara salınımını azaltmaktadır. Amylinin bu etkisi merkezi mekanizma ile desteklenmektedir. Sağlam bir vagus siniri ve *area postrema* bölgesi amylinin etkisini göstermesi için gereklidir. Bu etkiler reseptör bağlanma yerleri vasıtasıyla sürekli kılınmaktadır. Amylin özellikle *area postrema*daki reseptörler aracılığı ile rolünü yapmaktadır. Böylece midenin vagal inervasyonu ile gıda salınımı azaltılmaktadır. İnsülinle birlikte pankreastan salgılandıktan sonra beynin merkezi bölgesindeki multipl reseptörlere bir sinyal yollamakta ve bu sinyal daha sonra beynin çeşitli bölgelerine ve mide, pankreas gibi amylinin etkisini göstereceği bölgelere ulaştırılmaktadır. Amylin vagus siniri aracılığıyla dolaşıma giren ve dolaşımdan çıkıp kas ve yağ hücrelerine taşınan glukozu insülinle birlikte dengelemeye çalışarak gıda salınımı üzerine etkisini gerçekleştirmektedir (96). İnce barsağa gıdaların salınım oranı yemek sonrası glisemiye belirleyen başlıca faktördür. Eğer gıda salınımı insülinin rolü ile beraber olmazsa yemek sonrası sürekli bir hiperglisemi oluşabilir. Diyabetlilerde amylin eksikliğinden dolayı mideden gıda salınımı ve buna bağılı olarak dolaşıma giren glukoz oranı sürekli artmaktadır. Amylinle ilgili yapılan bir çalışmada normal ve diyabetli ratlarda gıda salınım oranı ölçülmüştür. Diyabetli Wistar ratlarının sadece insülinle tedavisi sonucunda gıda salınımının önemli derecede arttığı görülmüş ve bu da amylin eksikliğine bağlanmıştır. Gıda salınımının bu artan oranları amylinin subkutan ilavesi ile normal değerlere ulaşmıştır (97).

Amylinin gıda salınımı üzerindeki etkileri GLP-1 (Glucagon-like peptide-1), CCK-8, GIP (Gastric inhibitory polypeptide), glukagon ve PP (Pancreatic polypeptide) ile karşılaştırıldığında, bu peptidlerden amylin, GLP-1 ve CCK-8'in gıda salınımını

yavaşlattığı, GIP, glukagon ve PP'in ise yavaşlatmadığı görülmektedir. Amylinin gıda salınımını yavaşlatıcı etkisi GLP-1'den 15 ve CCK-8'den ise 20 kat daha kuvvetlidir. İntraserebroventriküler olarak amylin infüzyonu 4. ventriküle yapıldığında gıda salınımını subkutan ya da lateral ventriküldeki infüzyona göre üç kat daha kuvvetli inhibe etmektedir (96).

Sindirim Salgıları Üzerine Etkisi

Kompleks yapıda olan karbonhidrat, protein ve lipid üç temel gıda grubudur ve bunların oluşumu kondenzasyon reaksiyonları ile gerçekleşmektedir. Bu gıdaların sindirilebilir daha küçük yapıtaşlarına dönüşümü ise bu reaksiyonların tersine dönüşümü ve hidroliz ile gerçekleşmektedir. Gastrik asit de bu reaksiyonlarda etkilidir ve özellikle de protein ile lipid sindiriminden sorumludur (98). Amylin periferik ve merkezi olarak verildiğinde gastrik asit sekresyonu üzerine önemli bir inhibitör etki göstermektedir. Amylin memelilerde bugüne kadar tanımlanmış mide boşalmasının en kuvvetli inhibitörüdür (96). Amylinin subkutan verilen her molar dozu sekretin, CCK, GLP-1 ve PYY (peptid YY) gibi diğer fizyolojik mide boşalması inhibitörlerine göre çok daha kuvvetlidir (99). Amylinin mide boşalması üzerine olan bu etkisi normal plazma konsantrasyonlarında meydana geldiği için amylinin fizyolojik bir fonksiyonudur. Fizyolojik dozlarda mide boşalmasını yavaşlatan bağırsak peptidleri, sekretin, GLP-1 ve PYY, CCK ayrıca tipik olarak mide asit sekresyonunu da inhibe etmektedirler (100-102). Bu ilişkiden dolayı ve gıda kullanılabilirliğinin kontrolünde asit sekresyonunun kuvvetli rolü nedeniyle amylinin gastrik asit sekresyonundaki etkisi önemli yer tutmaktadır. Mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte gastrik asit sekresyonunun merkezi kontrolünün *nucleus tractus solitarius*, *area postrema*, *vagusun dorsal motor nucleusundaki kolinerjik geçitlerle ilişkili olabileceği* düşünülmektedir. Mide asit sekresyonunun kontrolündeki amylinin rolü merkezi amylin reseptörlerinin *area postrema /nucleus tractus solitariusda* yoğun dağılımı ile desteklenmektedir (60).

Mide asit sekresyonunun inhibisyonunda amylinin merkezi etkilerinin midedeki somatostatinin etkisine benzer bir mekanizmaya sahip olduğu düşünülmektedir (103). Bu etki doza bağlı olarak değişmektedir ve peptid direkt olarak beyin ventriküllerine enjekte edildiğinde periferik enjekte edilenden daha kuvvetli olmaktadır. Amylin gastrik endokrin

hücrelerde somatostatinle birlikte yer almasına ve rat mide antrumundan somatostatin salgılanmasını uyarmasına rağmen, somatostatinin amylinin gastrik asit sekresyonundaki inhibitör etkisi ile bir ilişkisi bulunmamaktadır. Bazal asit sekresyonunun inhibisyonunun yanında amylin insülinin uyardığı gastrik asit sekresyonunu da baskılamaktadır. Yüksek dozlarda amylin uygulandığında gastrik asit sekresyonu % 93.4 oranlarında inhibe edilmektedir. Mide hasarı % 67'ye kadar onarılabilmektedir (104).

Rat amylini CCK'nın uyardığı amilaz ve lipaz pankreatik enzimlerinin sekresyonunu da % 60'a kadar inhibe etmektedir (105). Amylinin ayrıca pankreatitisin şiddetini de hafiflettiği, rodentlerde yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (106). Bir amylin analogu olan pramlintidin safra kesesindeki boşalmayı inhibe ettiği tespit edilmiştir (107).

Amylinin gastrik asit sekresyonunu, safra salgısını ve pankreatik enzim sekresyonunu inhibe etmesi, gıda akışını kontrol etmesini sağlamaktadır. Sindirim fonksiyonlarını ayarlaması amylinin gıda alımını düzenlemesindeki genel rolü ile uyumaktadır (104).

Amylinin indometasin ve etanol ile indüklenen gastrik ülserlerde de koruyucu bir role sahip olduğu ortaya koyulmuştur. Peptidin bu antiülser aktivitesi, peptid merkezi olarak verildiğinde gerçekleşmekte fakat periferik olarak verildiğinde gözlenmemektedir (108).

Glukagon Salınımı Üzerine Etkisi

Glukagon sekresyonunun inhibisyonu üzerine amylinin fizyolojik etkilerinin olduğu açıklanmıştır. Sağlıklı bireylerde glukagon açlık periyodu boyunca, öğün aralarında ve uyku süresince glukoz konsantrasyonunu kabul edilebilir düzeylerde tutmaya çalışmaktadır. Glukagon, ayrıca hepatik glukoz depolarının salınımını uyararak ciddi hipoglisemik olaylar karşısında güvenlik mekanizması olarak rol oynamaktadır (11). Glukagonun uygunsuz hipersekresyonu ve hepatik glukoz çıkışının gıda alımı süresince yeterli baskılanamaması tip 1 ve tip 2 diabetli hastalarda büyük problem oluşturmaktadır. Bu iki anormaliliğin bu hastalarda yemek sonrası yetersiz glisemik kontrole neden olacağı düşünülmektedir. Gıda alımından sonra glisemik kontroldeki bu eksiklik ekzojen olarak ilave edilen insülinin portal venedeki gıda alımından sonra normal insülin konsantrasyonunu yerine koyamamasına ve portal glukagon insülin oranının anormal yükselmesine neden olmaktadır (8, 109).

Son yıllara kadar amylinin glukagon konsantrasyonu üzerine bir etkisi olduğu bilinmemektedir. Bu etkisi son yıllarda ratlar üzerinde yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur. Ratlarda glukoz konsantrasyonu normal düzeylerdeyken amylinin gıda alımını takiben doza bağlı olarak glukagon sekresyonunu baskıladığı gözlenmiştir. Fakat aynı ratlar hipoglisemik duruma maruz kaldıklarında amylinin glukagon üzerine baskılayıcı etkisi gözlenmemiştir. Sadece insülinle tedavi edilen tip 1 ve 2 diyabetli hastalarda sık görülen yemek sonrası glukagondaki anormal yükselme amylin eksikliğine bağlanmıştır (109, 110).

Amylin ve Glukoz Homeostazisi

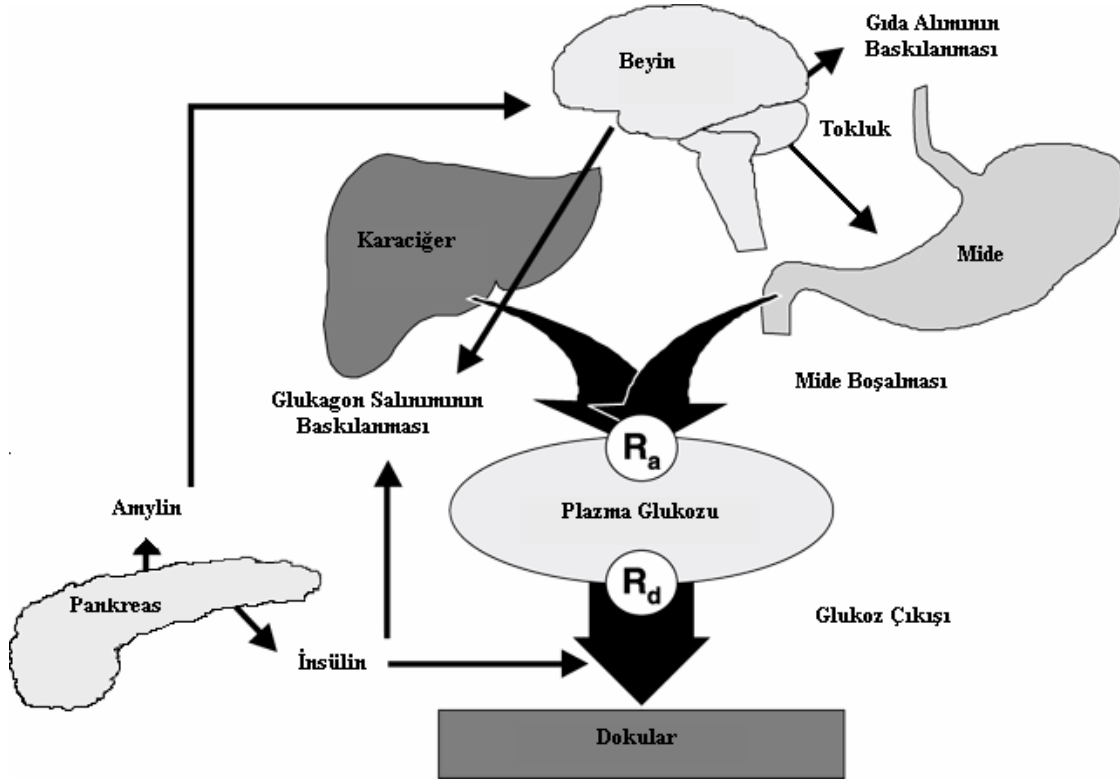
Önceleri insülinin kan şekerini düşürdüğü ve glukagonun ise kan şekerini artırdığı bilindiğinden glukoz homeostazisinin sadece bu iki hormon tarafından kontrol edildiği düşünülmektedir. Bir öğün sonrası, artan kan glukozuna cevap olarak pankreasın β hücreleri insülini salgılamaktadırlar. İnsülin de glukozu enerji olarak kullanan periferel dokular veya glukozu daha sonra kullanılmak üzere glikojen olarak depolayan karaciğerden glukoz alımını uyarmaktadır. Açlık boyunca glukagon kan glukoz düzeylerini dengelemek için gerekmektedir. Gıdalar glukoz sağlamak için kullanılmadığında pankreatik alfa hücrelerinden glukagon sekresyonu karaciğer glikojeninin glukoz dönüşümünü uyarmaktadır. Son yıllarda insülin ve glukagona ek olarak diğer hormonların da glukoz homeostazisinde önemli bir role sahip olduğu belirlenmiştir. Pankreatik hormon amylin, GLP-1, GIP ve CCK hormonlarının da glukoz dengesinde rollerinin olduğu ortaya koyulmuştur (111).

Amylinin glukoz homeostazisindeki mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak amylinin iki farklı mekanizma ile glukoz metabolizması üzerine etki edebileceği düşünülmektedir. Bunlardan bir tanesinde glikojen üzerine cAMP (cyclic adenosine monophosphate) aracılığı ile, diğerinde ise cAMP aracılığı olmadan glikolizin inhibisyonuna neden olarak ve G-6-P'ı artırarak etki ettiği ortaya koyulmuştur. Amylin glukoz alımını inhibe eder ve kan laktat düzeylerini artırır. Kasa glukoz alımını da azaltır. Bunu glikojen sentezini inhibe ederek ve glikogenolizisi uyarak 3'-5' cAMP aracılığı ile yapar. Bu durum hücre içi glukoz-6-fosfat düzeylerini artırarak glukoz alımını sınırlayabilir. Artan G-6-P, glukozun fosforilasyonu ve taşınan glukozun net

retensiyonunun düşmesi ile sonuçlanarak, heksokinazın inhibisyonuna neden olur (10). Ayrıca glukozun glikojene dönüşümünü azaltarak da kasa glukoz alımını sınırlar. Amylin, glikogenolizisi de kuvvetle uyarır. Amylin konsantrasyonunun yükselmesi ile kas glikojen konsantrasyonu gittikçe azalır. Amylin insülin yokluğunda glikojen konsantrasyonunu azaltır ve kasta laktatın üretimini artırır. Kas glikojenindeki bu azalma glikojen fosforilaz a aktivitesinin artması ile sağlanır. Amylin glikogenolizisi uyarmasının yanında glikojen sentezini de inhibe ettiği için sadece glikojen fosforilaz a aktivitesini artırmaz, aynı zamanda glikojen sentaz aktivitesini de inhibe eder. Amylin glikolizin relatif olarak inhibisyonuna da neden olabilir. Amylinle glikolizin düzenlenmesindeki başlıca basamak fosfofruktokinaz basamağıdır. Glikojenin parçalanması kas laktat konsantrasyonunda yükselme ve kas laktatının çıkışı ile ilişkilidir (112).

Yapılan çalışmalara göre amylin cAMP konsantrasyonunu artırarak da etkisini gösterir. cAMP deki hücre içi yükselme glikojen fosforilazın aktivasyonu ve protein kinaz A'nın aktivasyonu aracılığı ile glikojen sentazın inhibisyonuna neden olur. Amylinin rolünü yapabilmesi için 2. haberci olarak cAMP gerekmektedir. cAMP artışına cevap olarak glikojen fosforilaz a aktivitesi de artmakta, glikojen konsantrasyonu düşmekte ve laktat üretimi yükselmektedir. Amylin glikojen üzerindeki etkilerini CGRP reseptörü aracılığı ile de yapabilir. CGRP 37 aminoasitli peptiddir ve amylinde çok az farklıdır. Çünkü yapı olarak amylin de kalsitonin ailesinden gelmektedir. 2 tip CGRP reseptöründen biri adenilat siklaza bağlanır ve amylin bu reseptörü aktive edebilir. Ancak CGRP reseptörlerine ek olarak amylin spesifik reseptörler de vardır (10).

Sonuç olarak amylin gıda alımından sonra insülinle birlikte, glukoz dengesinin sağlanmasında önemli bir görev üstlenir. Amylin gastrik boşalmayı hafifletirken glukagon sekresyonu ve gıda alımını baskılar. Böylece dolaşıma giren (R_a) glukoz oranını düzenler. İnsülin ise dolaşımdan çıkan (R_d) ve dolayısıyla dokulara giren glukoz miktarını artırarak kan glukozunu düzenler (Şekil 2) (112, 113).



Şekil-2 Amylinle plazma glukozunun düzenlenmesi

Kemik Gelişimi Üzerine Etkisi

Amylinin keşfinden bu yana genelde diyabetin tedavisi ve patogenezi üzerine etkileri ile ilgili çalışmalara odaklanılmıştır. Diğer taraftan kalsitonin, CGRP ve adrenomedüllin ile de ilişkili olduğu için kemik metabolizması üzerine de etkileri bulunmaktadır. Amylinin kemik gelişimi üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Bugüne kadar yayınlanan bilgilerin büyük bir kısmı insan ve rodentlerde yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Özellikle kalsiyum ve kemik gelişiminin çok önemli olduğu yumurtacı tavuklarda, amylinin kemik gelişimi üzerine etkileri ile ilgili bilgiye ise rastlanmamaktadır (113, 114).

37 aminoasitten oluşan olgun formdaki amylin peptidinin 2. ve 7. pozisyonundaki sistin aminoasitleri arasında bulunan disülfid bağı amylinin kemikler üzerinde önemli etkilerinin meydana gelmesinde rol oynar ve osteoblast proliferasyonunun uyarılması bakımından da

önemlidir. Amylin molekülünün indirgenmesi bu disülfit bağının bozulmasına neden olur. Bu nedenle indirgenmiş amylin molekülü kemikler üzerinde önemli bir etki oluşturmaz (3).

Amylinin kemik üzerindeki rolleri yapılan bazı çalışmalarla incelenmiştir (12, 115-117). MacIntyre (118) amylinin ya da onun derivatlarının veya agonistlerinin osteoporozis, paget hastalığı, endokrin rahatsızlıklar, otoimmün artiritler, kırık ya da çatlaklar, immobilité ya da hiperkalsemi ile sonuçlanan kemik kayıplarında tedavi amacıyla kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Bazı çalışmalarda insan amylini (113, 119) rat amylini (96, 114) ve pramlintid (96) gibi amylinomimetik ajanların serum kalsiyumunu düşürücü etkilerinin olduğu ortaya koyulmuştur. İnsan amylini kalsitoninden sonra en kuvvetli kalsiyum düşürücü peptiddir. Kalsitonin ile yapı benzerliği % 13 olduğu için bu ilişki şaşırtıcıdır. Aksine kalsitoninle % 30 identikal olmasına rağmen CGRP'nin serum kalsiyumu düşürücü etkisi kalsitoninden 1000 kat daha azdır. Amylinin hipokalsemiye de neden olan bu etkisi kemik rezorpsiyonunu inhibe eden osteoklastlar üzerindeki direkt etkisi ile açıklanabilir (120). Amylinin kalsiüretik etkisinin de olduğu ortaya koyulmuş ancak bu etkinin plazma kalsiyumundaki düşmenin nedeni olacak kadar yeterli olmadığı açıklanmıştır (121).

Amylinin hipokalsemiyi indüklemesine ek olarak osteoklastlar tarafından gerçekleştirilen kemik rezorpsiyonunu da durdurduğu bildirilmiştir. Kemik kesiti başına rezorpsiyon alanlarının direkt karşılaştırılmasını ölçen bir başka osteoklast-kemik rezorpsiyon deneyinde anti rezorptif etkiler yönünden güç farklılıkları şu şekilde bildirilmiştir; amylin > β CGRP (10:1) ; sCT >>amylin (800:1) ve insan CT > amylin (12:1) (120). Amid grubu ayrılmış amylinin gücünün amid grubuna sahip olan amylininkinden daha az olduğu ve β CGRP'ye yakın olduğu ortaya koyulmuştur. Hipokalsemik potansiyelle birlikte rezorpsiyonu engelleyici etkileri yönünden güç sırası CT \geq amylin > CGRP olarak açıklanmıştır. Kemik rezorpsiyonunun inhibisyonu sadece tam amylin peptidi ile gerçekleşir ve bu etkinin oluşumu peptidin karboksi ucundaki amid grubunun varlığına bağlıdır. Amylin cAMP'yi artırarak ve osteoklast gelişimini azaltarak osteoklastların aktivitesini inhibe eder. Yapılan bazı çalışmalar amylinin cAMP üretimini uyarak kemik rezorpsiyonunu inhibe ettiğini doğrulamaktadır (15, 122).

Amylin osteoklast aktivitesini inhibe etmesinin yanında osteoblastların proliferasyonunu da uyarak kemiklerde büyüme faktörü olarak rol alır. Fötal rat osteoblastlarında tam amylin molekülünün ve amylin (1-8)'in hücre proliferasyonunu uyardığı gösterilmiştir. Tam amylin molekülünün oluşturduğu etkiyi meydana getirmesi için amylin (1-8) fragmentinden yaklaşık 10 kat daha yüksek uygulanması gerekmektedir.

Amylin (8-37), karboksi ucunda amid grup molekülü bulunmayan amylin ve indirgenmiş amylin (disülfit bağı kırılmış amylin) tam amylin molekülüne antagonistik etkiye sahiptir. Osteoblastlarda amylin cAMP'yi artırarak ve mitojen aktif proteinkinazı ve proteinkinaz C'yi aktive ederek rol alır. Amylinin kemik şekillenmesi ve kemik rezorpsiyonu üzerindeki bu etkileri iki reseptör aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bunlardan bir tanesi osteoklastlar üzerinde (CTR ile RAMP 1 ve 3 kombinasyonu) ikincisi de osteoblastlar üzerindedir (123).

Amylinin bu etkilerinin dışında, hipotalamik dopamin salınımını inhibe etme (124), yağ/protein oranında düşme (125), merkezi olarak uygulandığında vücut ısısında yükselme (126), aldosteron salınımının uyarımını sağlama (127), tubuler sodyum salgılanmasında yükselme (128), üriner sodyum atılımında artma (129), kan basıncında azalma (114), yangı giderilmesi (130), ağrı giderilmesi (131) gibi etkileri de bulunmaktadır.

Hormonlar ve Kemik Gelişimi Arasındaki İlişki

Amylin, kalsitonin gen ailesinden olan kalsitonin ve CGRP ile yapısal olarak benzediği için vücutta oluşturduğu etkiler de bu peptidlerinki ile benzerdir. Amylin ve CGRP *in vivo* olarak kalsitonin benzeri bir hipokalsemik aktiviteye sahiptir. İnsan amylini ve CGRP, 1,25 (OH)₂ vitamin D'nin neden olduğu kemik rezorpsiyonunu inhibe eder. Osteoblast proliferasyonunu artırırken, osteoklast proliferasyonu ve kemik rezorpsiyonunu da inhibe eder (117). Cornish ve arkadaşları (13) erkek farelere amylin (1-8) oktapeptidinin sistemik olarak ilavesinin kemik hacmini artırdığını belirtmişler, buna dayanarak amylin ve analoglarının osteoporozisin tedavisinde uygulanabileceğini bildirmişlerdir. Yine Cornish ve arkadaşları (14) erkek farelere amylinin sistemik olarak ilavesinin total kemik hacmini, kortikal kalınlığı, tibial uzunluğu ve ayrıca vücut ağırlığını artırdığını vurgulamışlardır. Bir başka çalışmada fotal rat osteoblastlarında tam bir amylin molekülünün (1-37), amylinin (1-8)'lik fragmentinin hücre proliferasyonunu uyardığı, amylinin (8-37)'lik fragmenti, amid grubu olmayan amylin, indirgenmiş amylin ve indirgenmiş (1-8)'lik amylin fragmentinin ise herhangi bir etki göstermediği vurgulanmıştır (15). Bronsky ve Prusa (3) insanlar üzerinde yaptıkları çalışmada osteoporozisli hastalarda amylinin açlık plazma düzeylerinin düşük olduğunu ve amylin eksikliğinin osteoporozisin oluşumunda katkısının olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Başlıca kalsiotropik polipeptid hormonlar olan kalsitonin ve PTH (parathyroid hormone) kemik metabolizması ve kalsifikasyon üzerine önemli etkilere sahiptirler. Kalsitonin artan kan kalsiyumuna cevap olarak salgılanır ve osteoklastik kemik rezorpsiyonunu inhibe eder (132). Bunun zıt olarak PTH, düşük kan kalsiyum düzeylerine cevap olarak salgılanır ve dolaşımdaki kalsiyumu ve inorganik fosfatı düzenler. Kronik olarak PTH ilavesi osteoklast hücre sayısında ve aktivitesinde artmaya neden olur (133). Bu hücreler aracılığı ile kemikten kalsiyumun salınımına inorganik fosfor ve kollajen fragmentleri gibi matriks komponentlerinin salınımı eşlik eder (134). Bazı çalışmalar embriyonik kıkırdağın kalsiotropik hormonlara duyarlılığını ortaya koymuşlardır. Örneğin bir çalışmada CT'nin embriyonik civciv pelvik kıkırdağında büyümeyi ve maturasyonu uyardığı ortaya koyulmuştur (135). Aynı kişiler bir başka çalışmada PTH ve analoglarının embriyonik civciv pelvik ve domuz büyüme plağı kıkırdağının proliferasyonunu uyardığını göstermişlerdir (136). Chin ve arkadaşları (137) ise sentetik human PTH (1-34) hipertrofik civciv büyüme plağı kondrositlerinin primer kültürünün büyümesini uyardığını göstermişlerdir. Elde edilen bilgilere göre hipertrofik tavuk büyüme plağı kondrositlerinin primer kültürleri aracılığı ile mineral depoları üzerine etkilerinin olduğu ortaya koyulmuştur. Ayrıca bu hormonların hücre bölünmesi ve büyümesi üzerine de etkileri bulunmaktadır. Amylin ve kalsitoninin yapısal benzerliğinden dolayı çok fazla benzer etkileri mevcuttur. Fakat amylinde farklı olarak kalsitonin reseptörleri osteoklastların üzerinde bulunmakta osteoblastların üzerinde ise bulunmamaktadır.

PTHrP (parathyroid hormone related peptid), normal endokondrial kemik şekillenmesinde temel hormondur. Büyüme plağının gelişiminde ve endokondrial kemik büyümesinde anahtar role sahiptir. Rollerinin birçoğunu PTH/PTHrP reseptörleri aracılığı ile gerçekleştirmektedir (138).

Kemik dokusu, metabolik yönden aktif ve dinamik bir doku olarak sürekli dönüşüm gösterir. Osteokalsin, kemiğin yapılanmasından sorumlu olan osteoblastlarda sentez edilir ve bunun % 10 ile % 30 kadarı dolaşıma salınır. Kemik yapılanmasının ve osteoblastlar tarafından osteokalsin üretiminin bir göstergesi olan serum osteokalsin düzeyi, böbrekler tarafından oldukça hızlı bir şekilde dolaşımdan temizlendiğinden, kolaylıkla izlenebilir. Dolaşımdaki yarılanma ömrü yaklaşık 5 dakikadır. Kemik yapılanmasından sorumlu olan ve protein matriks yapımında kullanılan, kemiğe özgü ALP (alkalen phosphatase) ve osteokalsin gibi dolaşımda bulunan belirteçlerin ölçülmesi, kemik dönüşüm hızının bir göstergesi olup tanı ve tedavinin izlenmesinde yol göstericidir. Osteokalsin, 49 aminoasitten oluşan küçük bir proteindir ve molekül ağırlığı yaklaşık 5669 Da' dır. Bone

GLA OC (gama carboxylated osteocalcin) proteini olarak da adlandırılır, nonkollajenöz karakterdedir ve toplam kemik proteinlerinin % 1'ini oluşturur. Osteokalsinin K vitaminine bağılı enzimatik karboksilasyonu sonucu oluşan özel bir aminoasit, kalsiyum iyonlarını bağlar, kanın koagulasyon ve kalsiyum taşınma sürecinde rol alan proteinlerinin yapısına girer. Osteokalsin, normal kemik mineralizasyonunun sağlanmasında gerekli olan ve kalsiyum metabolizmasını düzenleyen hormonlar (kalsitonin, PTH, vitamin D) tarafından direkt olarak etkilenir (139, 140).

GEREÇ VE YÖNTEM

A. Hayvan Gereci, Bakım ve Besleme

Çalışma gereci olarak Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama çiftliğine alınan 10 haftalık 60 adet Super Nick genotipli yumurtacı tavuk kullanıldı. Aynı bakım ve besleme şartları altında bulunan yumurtacı tavuklara *ad libitum* yemleme yapıldı.

B. Kan Alımı ve Laboratuvar Analizleri

Yumurtacı tavuklar iki gruba bölündü. 30 adet tavuk deneme grubu olarak ayrıldı ve bu hayvanlara gün aşırı subkutan yolla 75 µg/kg dozda amylin enjekte edildi. Geri kalanlar da kontrol grubunu oluşturdu. Denemenin 14, 16, 18 ve 20. haftalarında kontrol ve deneme gruplarından 5'er hayvan kesilerek EDTA'lı ve antikoagulantsız tüplere kan alındı. Kanlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüje (Hettich EBA 21) edilerek plazma ve serumları ayrıldı, hemen serum kalsiyum ve fosfor analizleri yapıldı. Amylin, kalsitonin, PTHrP, 1,25-(OH)₂ vitamin D, osteokalsin ölçümleri için plazma ve serumlar derin dondurucuda -80°C'de analiz gününe kadar saklandı. Kesim sonrası elde edilen sağ tibiotarsuslar hemen çevre doku ve yağlarından temizlendi, tibiotarsusların total kemik hacmi, uzunluğu, kortikal kalınlığı, kemik ağırlığı ve kemik kalsiyum düzeyleri ölçüldü. Kalan 20 hayvan 20. haftadan sonra enjeksiyon yapılmaksızın yumurta verim parametrelerinin incelenmesi açısından 35. haftaya kadar bakıldı. Günlük olarak yumurta verimleri kaydedildi. 15 günde 1 kez toplanan yumurtalarda yumurta kabuk kalınlığı ve yumurta ağırlıkları ölçüldü. 35. haftada bu 20 hayvan da kesilerek serum ve plazmada aynı parametrelere bakıldı ve kemik parametreleri değerlendirildi.

1. Serum Kalsiyum Ölçümü

Serumda kalsiyum konsantrasyonu kalsiyum kiti (TECO DIAGNOSTICS, Cat. No C503-480) kullanılarak spektrofotometrede (Schimadzu UV-1601) ölçüldü.

Prensibi

Kalsiyum 8-hidroksiquinoline içinde kresolftalein kompleksi ile reaksiyona girer ve 570 nm (550-580 nm) de absorbe olan mor renkli bir komplekse dönüşür. Rengin yoğunluğu kalsiyum konsantrasyonu ile orantılıdır.

Çalışma Ayırıcının Bileşimi ve Hazırlanması

Kalsiyum Renk Ayıracı (A): O-kresolftalein kompleksi 0.14 mM, 8-hidroksiquinoline 13 mM.

Kalsiyum Tamponu : Dietilamid 363 mM, potasyum siyanid, 2mM, nonreaktif ayıraçlar, ayıraç A ve B için stabilizör.

Kalsiyum renk ayıracı (A) ve kalsiyum tamponu eşit miktarda karıştırıldı ve kullanmadan önce 10 dakika oda ısısında bekletildi.

Deney Prosedürü

	Test	Standart	Blenk
Serum	20 µl	-	-
Standart	-	20 µl	-
Çalışma Ayıracı	1 ml	1 ml	1 ml

Karıştırıldı ve standart ile testin absorbansı 570 nm’de blenke karşı ölçüldü.

Hesaplama

$$\text{Kalsiyum konsantrasyonu (mg/dl)} = \frac{A_{\text{test}}}{A_{\text{standart}}} \times \text{Standartın konsantrasyonu (10 mg/dl)}$$

2. Serum Fosfor Ölçümü

Serumda fosfor konsantrasyonu fosfor kiti (TECO DIAGNOSTICS, Cat. No I515-480) kullanılarak spektrofotometrede ölçüldü.

Prensibi

İnorganik fosfor asit ortamda amonyum molibdat ile reaksiyona girer ve fosfomolibdat kompleksi şekillenir. Bu kompleks ferros amonyum sülfat tarafından indirgenerek molibden mavisi kompleksini oluşturur. Oluşan renk 675 nm’de okunur. Rengin yoğunluğu inorganik fosfor konsantrasyonu ile orantılıdır.

Çalışma Ayıracının Bileşimi

Amonyum molibdat	2.4 mM
Sülfürik asit	750 mM
Ferros amonyum sülfat	10.2 mM

Deney Prosedürü

	Test	Standart	Blenk
Serum	20 µl	-	-
Standart	-	20 µl	-
Çalışma Ayıracı	1 ml	1 ml	1 ml

Karıştırıldı ve 10 dakika oda ısısında bekletildi. Standart ve testin absorbanı 675 nm’de blenke karşı ölçüldü.

Hesaplama

$$\text{Fosfor konsantrasyonu (mg/dl)} = \frac{A_{\text{test}}}{A_{\text{standart}}} \times \text{Standartın konsantrasyonu (5 mg/dl)}$$

3. Plazma Amylin Ölçümü

Plazma amylin konsantrasyonu, insan amylin düzeylerini non-radyoaktif ölçmek için geliştirilmiş amylin kiti (LINCO, Human Amylin ELISA Kit, Cat. # EZHA-52K) kullanılarak floresan ELISA okuyucu (Biotek FL_x800) ile belirlendi.

Testin Prensibi

Human amylin ELISA insan plazmasında amylin konsantrasyonlarının belirlenmesi için kullanılan bir sandviç immunoassaydir. Elde edilen antikolar insan amylini, amylin asit ve 1-20 amylin fragmentini tanırlar fakat indirgenmiş amylini tanımazlar. Bulunan antikolar indirgenmiş veya indirgenmemiş human amyline bağlanırlar fakat amylin asidine bağlanmazlar ve streptavidin ALP kompleksi ile karıştırılırlar. Substrat, 4 metilumbeliferil fosfat, tam sandviç modele uygulanır ve floresan sinyali 355/460 nm'de izlenir. Bu da örnekteki amylin konsantrasyonu ile orantılıdır.

Ayırıcıların Bileşimi

Konsantre Yıkama Tamponu (10 X)

50 mM tween 20 ve sodyum azid ile TBS (tris buffered saline) içermektedir. 50 ml'lik konsantre yıkama tamponu 450 ml deiyonize su ile sulandırılarak kullanıldı.

Standartlar

Standartlar deney tamponunda 1, 2, 5, 10, 40, 100 pM konsantrasyonlarında saflaştırılmış insan amylini içerecek şekilde hazırlanmıştır. Liyofilizedir, 250 µl'lik şişelerde bulunmaktadır. 250 µl deiyonize su ile sulandırılarak kullanıma hazır hale getirildi.

Kalite Kontrol 1 ve 2 Solüsyonları

Deneyin işleyişini kontrol edebilmek amacıyla deney tamponunda iki ayrı düzeyde saflaştırılmış human amylin içeren kontrol solüsyonu hazırlanmıştır. Her biri 250 µl'lik şişelerde liyofilize halde bulunmaktadır. 250 µl deiyonize su ile sulandırılarak kullanıldı.

Deney Tamponu:

Tween 20

Proteaz inhibitörleri

Sodyum azid % 0.08

BSA (bovine serum albumin) % 1

içeren 0.05 M PBS (Phosphate buffered saline) tamponudur (pH 7.4). 6 ml'lik şişelerde kullanıma hazırdır.

Antikor

11 ml'lik şişelerde anti-human amylin-ALP konjugatı şeklinde kullanıma hazır halde bulunmaktadır.

Substrat Dilüenti

21 ml'lik şişede kullanıma hazır olarak bulunmaktadır.

Substrat

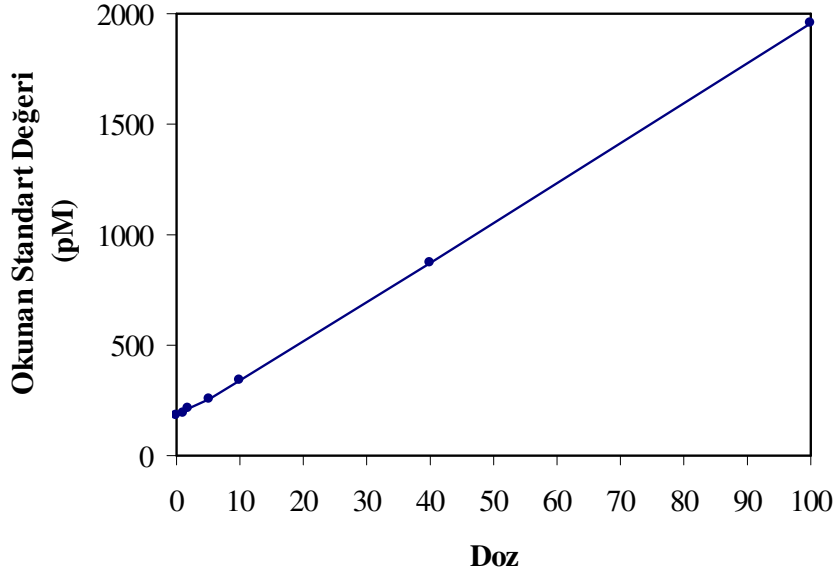
4 metilumbelliferil fosfat 10 mg'lık şişede bulunmaktadır. Kullanmadan önce 1ml deiyonize su ile sulandırıldı. Substrat dilüentinde 1:200 dilüsyon yapıldı.

Stop Solüsyonu

6 ml'lik şişelerde kullanıma hazır olarak bulunmaktadır. Kullanmadan önce oda ısısına getirilip presipitasyonu önlemek için iyi bir şekilde karıştırıldı.

Deney Prosedürü

1. Konsantre yıkama tamponu 450 ml deiyonize su ile 10 kat sulandırıldı.
2. Standartlar, QC1 ve QC2 250 µl deiyonize su ile sulandırıldı. Yavaşça karıştırıldı. Tam bir karışım elde etmek için ara sıra hafifçe karıştırılarak en az 5 dakika bekletildi.
3. Deney pleytindeki her bir kuyucuğa 300 µl dilüe yıkama tamponundan eklendi. Oda ısısında 10 dakika karıştırmadan inkübe edildi.
4. Yıkama tamponu pleytten yavaşça alındı ve her kuyucuğun dibindeki kalıntılar dikkatli bir şekilde döküldü. Bunun için pleyt ters çevrildi ve emici bir havlunun üzerine yerleştirilip birkaç kez alt kısmından vuruldu. Daha sonraki basamağa geçmeden kuyucukların kurumamasına dikkat edildi.
5. Her kuyucuğa 50 µl deney tamponu eklendi.
6. Standart, kontrol ve numuneden her kuyucuğa 50'şer µl ilave edildi. Pleyt sabitlenip oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Kuyucukların dibindeki kalıntılar dikkatli bir şekilde alındı.
7. Her kuyucuk 300 µl TBS yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı. Kalan tamponu tamamen almak için her yıkamadan sonra pleyt ters çevrilip hafifçe altına vuruldu.
8. Her kuyucuğa 100 µl antikor ilave edildi ve pleyt iyice kapatılarak sabitlendi. Çalkalayıcı üzerine koyularak oda ısısında 2 saat inkübe edildi.
9. İnkübasyon basamağı tamamlandığında 10 mg'lık substrata 1 ml deiyonize su eklenerek sulandırıldı, iyice karıştırıldı ve tam bir karışım elde etmek için ara sıra karıştırılarak 15 dakika bekletildi. Sulandırılmış substrattan 105 µl alındı ve 21 ml'lik substrat dilüenti şişesine eklendi, iyice karıştırıldı.
10. Antikorlar pleytten döküldü ve pleyt, emici bir havlunun üzerine ters çevrilerek birkaç kez vuruldu.
11. Her kuyucuk 300 µl TBS yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı. Kalan tamponu almak için her yıkamadan sonra peyt ters çevrilerek hafifçe vuruldu.
12. Her kuyucuğa 100 µl substrat solüsyonu ilave edildi. Oda ısısında ve karanlıkta, karıştırmadan 15 dakika inkübe edildi.
13. Bir okuma yapıldı. En üst seviyedeki standart noktasının RFU (relative fluorescence units) değeri kaydedildi. 2000 RFU değerinde iken 50 µl stop solüsyonu ilave edildi, hafifçe karıştırıldı ve 5 dakika sonra floresan pleyt okuyucuda okuma yapıldı. Sonuçlar cihaz tarafından çizilen standart eğriden (Şekil-3) yine cihaz tarafından otomatik olarak hesaplanarak elde edildi.



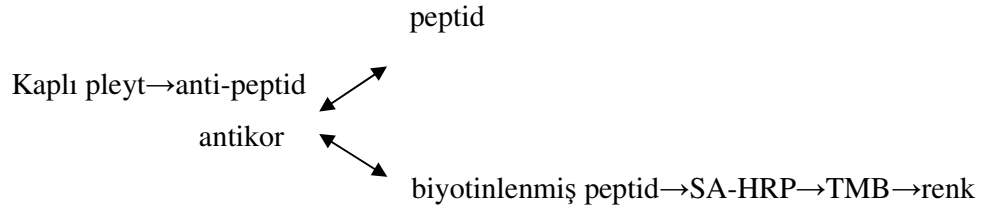
Şekil-3 Amylin standart eğrisi

4. Plazma Kalsitonin Ölçümü

Plazma kalsitonin konsantrasyonu, tavukta da çalışılabilirliği kanıtlanmış salmon I kalsitonin EIA kiti (BACHEM, calcitonin (Salmon I) EIA kit, Cat no: S -1154) kullanılarak ELISA (Biotek EL_x808) ile belirlendi.

Testin Prensibi

Peptid antikor, biyotinlenmemiş peptid (standart ya da test) ve biyotinlenmiş peptid sırasıyla aynı kuyucuğa yerleştirilir. Biyotinlenmiş peptid antikor bağlanma bölgeleri için standart peptid ya da bilinmeyen örnek peptidlerle yarışır. İnkubasyondan sonra bağlanmamış biyotinlenmiş peptid yıkanarak atılır ve SA-HRP (streptavidin conjugated horseradish peroxidase) ilave edilerek immobilize primer antikor-biyotinlenmiş peptid kompleksine bağlanması sağlanır. SA-HRP ile yıkamadan sonra TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin dihidroklorid)'ye bağlı HRP ile reaksiyona girer. Rengin yoğunluğu immobilize antikorun bağlandığı biyotinlenmiş peptidin miktarına bağlı olarak değişir. Biyotinlenmemiş peptid sınırlı sayıda antikor için yarıştığında az sayıda biyotinlenmiş peptid-SA-HRP immobilize olabilir ve substrat tarafından daha az renk üretilebilir.



Ayırdaçların Bileşimi

Deney Tamponu

Konsantre deney tamponu 1000 ml steril deiyonize su ile sulandırıldı ve iyice karıştırıldı.

Primer Antikor

Liyofilize peptid antikoruna (1 kutu) ölçüm tamponundan 10 ml ilave edildi ve iyice karıştırıldı.

Biyotinlenmiş Peptid

Biyotinlenmiş peptid şişesine deney tamponundan 5 ml ilave ederek sulandırıldı ve iyice karıştırıldı. Kullanımdan hemen önce hazırlandı.

Streptavidin-HRP

SA-HRP konsantre solüsyonu (15 µl) 2 dakika süreyle santrifüje edildi ve hafifçe karıştırıldı. 15 ml'lik bir tüpe 12 ml deney tamponu transfer edildi. 12 ml'lik deney tamponuna 6 µl SA-HRP ilave edildi ve iyice karıştırıldı. SA-HRP 4°C 'de karanlık ortamda kullanıma kadar bekletildi

Substrat Solüsyonu

11 ml TMB ve H₂O₂ içermektedir.

Stop Solüsyonu

2N HCl içermektedir. 15 ml'lik şişede kullanıma hazır halde bulunmaktadır.

Standartlar

Liyofilize peptid standardının kutusuna standart dilüentinden 1ml eklendi ve iyice karıştırıldı. Bu stok solüsyonda konsantrasyon 1000 ng/ml'dir.

Standartın sulandırılması için 12x75'lik test tüpleri etiketlendi (S1,S2,...S9,0 doz). Tablo 1'de gösterildiği şekilde sulandırma yapıldı ve iyice karıştırıldı. Kros reaksiyonları önlemek için pipet uçları her ilaveden sonra değiştirildi.

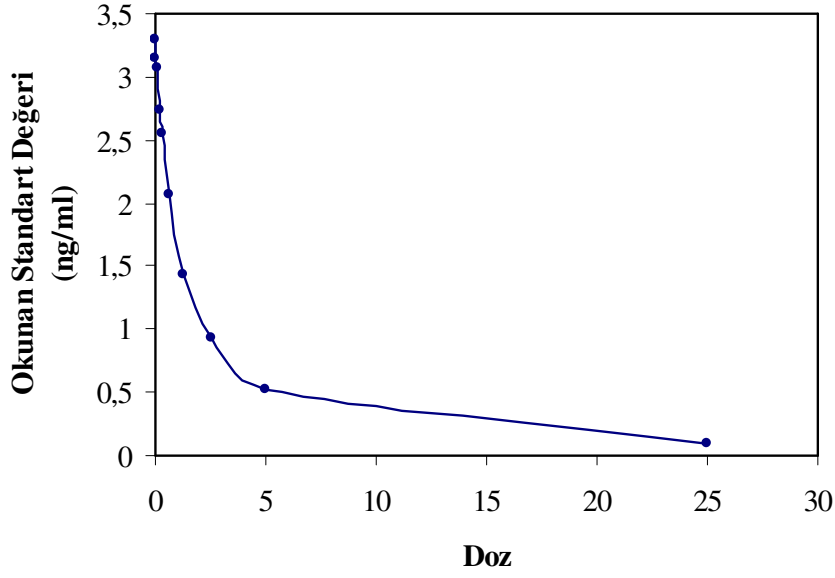
Tablo-1 Kalsitonin Standartlarının sulandırılması

Standart Numarası	Standart Hacmi	Standart Dilüenti	Konsantrasyon
Stok	1000 µl	1000 ng/ml
S1	25 µl stok	975 µl	25 ng/ml
S2	200 µl S1	800 µl	5.0 ng/ml
S3	500 µl S2	500 µl	2.5 ng/ml
S4	500 µl S3	500 µl	1.25 ng/ml
S5	500 µl S4	500 µl	0.63 ng/ml
S6	500 µl S5	500 µl	0.31 ng/ml
S7	500 µl S6	500 µl	0.16 ng/ml
S8	500 µl S7	500 µl	0.08 ng/ml
S9	500 µl S8	500 µl	0.04 ng/ml
0 Doz	1000 µl	0 ng/ml

Deney Prosedürü

1. Blenk için 2 tane kuyucuk ayrıldı.
Blenk kuyucukları içine sadece 100 µl TMB ve 100 µl HCl solüsyonları eklendi.
2. Her kuyucuğa 25 µl primer antiserum ilave edildi. Oda ısısında 1 saat inkube edildi.

3. Hazırlanan standartlar ve numuneler pleyt yıkanmadan sırasıyla kuyucuklara ilave edildi. Oda ısısında 2 saat inkube edildi.
4. Biyotinlenmiş peptid şişesine deney tamponundan 5 ml ilave edilerek sulandırıldı ve iyice karıştırıldı.
5. Pleyt yıkanmadan, her kuyucuğa biyotinlenmiş peptid solüsyonundan 25 µl ilave edildi.
6. Yavaşça karıştırıldı.
7. 2°-8°C 'de 1 gece inkube edildi.
8. Kuyucukların içindekiler atıldı ve pleyt deney tamponu ile 5 kez yıkandı ve kurulandı.
9. Her kuyucuğa 100 µl sulandırılmış streptavidin-HRP solüsyonundan eklendi.
10. Oda ısısında 60 dakika inkube edildi.
11. Pleyt deney tamponu ile 5 kez yıkandı ve kurutuldu.
12. Blenk kuyucuğu da dahil olmak üzere her kuyucuğa 100 µl TMB solüsyonu ilave edildi. TMB 4°C'de ve karanlıkta saklandı .
13. Pleyt 0.5-1 saat oda ısısında inkube edildi.
14. Reaksiyonu sonlandırmak için blenk dahil her kuyucuğa 100 µl 2 N HCl ilave edildi, solüsyonun rengi sarıya döndü ve 10 dakika içinde sonraki basamağa geçildi.
15. Pleytin altı % 70'lik etanol ile temizlendi ve pleyt okuyucuya yerleştirildi.
16. Absorbans 450 nm'de 100 µl TMB solüsyonu ve 2N HCl ilave edilen blenke karşı okundu. Sonuçlar cihaz tarafından çizilen standart eğriden (Şekil-4) yine cihaz tarafından otomatik olarak hesaplanarak elde edildi.



Şekil-4 Kalsitonin standart eğrisi

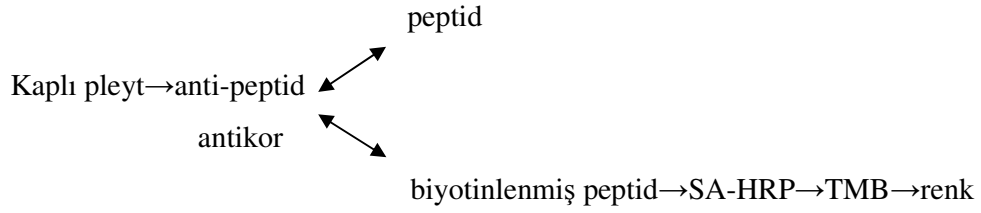
5. Plazma PTHrP Ölçümü

Plazma PTHrP konsantrasyonu tavukta da çalışılabilirliği kanıtlanmış EIA kiti (BACHEM, parathyroid hormone related peptide EIA kit, cat no: S-1227) kullanılarak ELISA ile belirlendi.

Testin Prensibi

Peptid antikor, biyotinlenmemiş peptid (standart ya da test) sırasıyla bir kuyucuğa yerleştirilir ve karıştırılır. Biyotinlenmemiş peptid, peptid antikorlarına bağlanır. Peptid antikor ve biyotinlenmemiş (standart ya da test) peptidin preinkubasyon basamağından sonra biyotinlenmiş peptid ilave edilir. Biyotinlenmiş peptid, antikor bağlanma bölgeleri için standart peptid ve bilinmeyen örnekteki peptidlerle yarışır. İnkubasyondan sonra bağlanmamış biyotinlenmiş peptid ve biyotinlenmemiş peptid yıkanarak atılır ve SA-HRP ilave edilerek immobilize primer antikor/biyotinlenmiş peptid kompleksine bağlanması sağlanır. SA-HRP ile yıkamadan sonra TMB bağlı HRP ile reaksiyona girer. Rengin yoğunluğu immobilize antikorun bağlandığı biyotinlenmiş peptidin miktarına bağlı olarak değişir. Biyotinlenmemiş peptid sınırlı sayıda antikor için yarıştığı az sayıda

biyotinlenmiş peptid / SA-HRP immobilize olabilir ve substrat tarafından daha az renk üretilebilir.



Ayıracıların Bileşimi

Deney Tamponu

Konsantre deney tamponu 1000 ml steril deiyonize su ile sulandırıldı ve iyice karıştırıldı.

Primer Antikor

Liyofilize antikor şişesine 5 ml deney tamponu ilave edildi ve iyice karıştırıldı.

Biyotinlenmiş Peptid

Biyotinlenmiş peptid şişesine 5 ml deney tamponu ilave edilerek sulandırıldı ve iyice karıştırıldı. Kullanımdan hemen önce hazırlandı.

Streptavidin-HRP

Konsantre solüsyonu SA-HRP solüsyonu (15 µl) 2 dakika süreyle santrifüje edildi ve hafifçe karıştırıldı. 15 ml'lik bir tüpe 12 ml deney tamponu transfer edildi. 12 ml'lik deney tamponuna 6 µl SA-HRP ilave edildi ve iyice karıştırıldı. SA-HRP'in 4°C 'de ve karanlıkta depolandı.

Substrat Solüsyonu

11 ml TMB ve H₂O₂ içermektedir.

Stop Solüsyonu

2N HCl içermektedir. 15 ml'lik şişede kullanıma hazır halde bulunmaktadır.

Standartlar

Liyofilize standart peptid kutusuna 1ml deney tamponu eklendi ve iyice karıştırıldı. Bu stok solüsyonda konsantrasyon 1000 ng/ml'dir.

Standartın sulandırılması için 12x75'lik test tüpleri etiketlendi (S1,S2,...S9,0 doz). Tablo-2'de gösterildiği şekilde sulandırma yapıldı ve iyice karıştırıldı. Kros reaksiyonları önlemek için pipet uçları her ilaveden sonra değiştirildi.

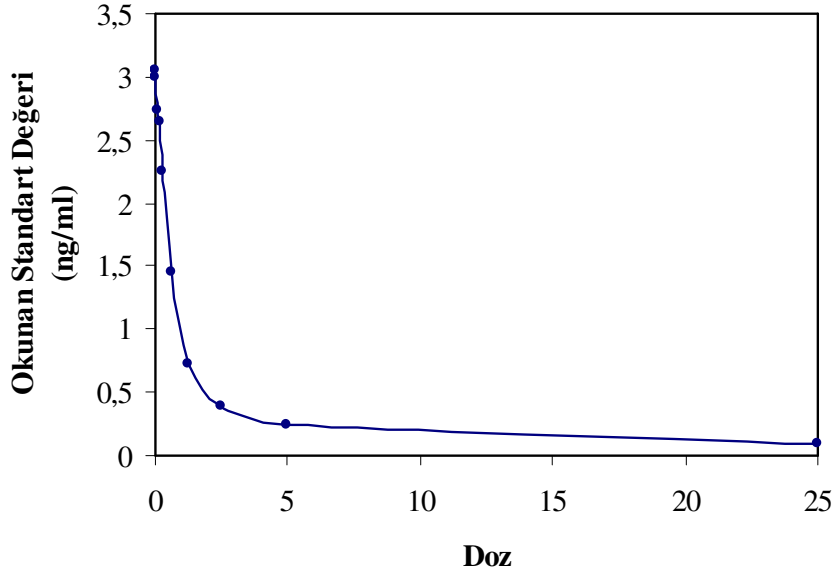
Tablo-2 PTHrP Standartlarının sulandırılması

Standart Numarası	Standart Hacmi	Deney Tamponu	Konsantrasyon
Stok	1000 µl	1000 ng/ml
S1	25 µl stok	975 µl	25 ng/ml
S2	200 µl S1	800 µl	5.0 ng/ml
S3	500 µl S2	500 µl	2.5 ng/ml
S4	500 µl S3	500 µl	1.25 ng/ml
S5	500 µl S4	500 µl	0.63 ng/ml
S6	500 µl S5	500 µl	0.31 ng/ml
S7	500 µl S6	500 µl	0.16 ng/ml
S8	500 µl S7	500 µl	0.08 ng/ml
S9	500 µl S8	500 µl	0.04 ng/ml
0 Doz	1000 µl	0 ng/ml

Deney Prosedürü

1. Blenk için 2 tane kuyucuk ayrıldı. Blenk kuyucukları için sadece 100 µl TMB solüsyonu ve 100 µl HCl solüsyonu eklendi.
2. Hazırlanan standartlardan sırasıyla her kuyucuğa 50 µl ilave edildi.

3. Her kuyucuğa 50 µl numune eklendi.
4. Her kuyucuğa 25 µl primer antikor ilave edildi ve hafifçe karıştırıldı.
5. Pleyt oda ısısında 1 saat inkube edildi.
6. Biotinlenmiş peptid şişesine 5 ml deney tamponu ilave ederek sulandırıldı ve iyice karıştırıldı.
7. Pleyt yıkanmadan her kuyucuğa biyotinlenmiş peptid solüsyonundan 25 µl ilave edildi ve yavaşça karıştırıldı.
8. Oda ısısında 2 saat inkube edildi
9. Kuyucukların içindekiler atıldı ve pleyt deney tamponu ile 5 kez yıkanarak kurulandı.
10. Her kuyucuğa 100 µl sulandırılmış streptavidin-HRP solüsyonundan eklendi.
11. Oda ısısında 60 dakika inkube edildi.
12. Pleyt deney tamponu ile 5 kez yıkandı ve kurutuldu.
13. Blenk kuyucuğu da dahil olmak üzere her kuyucuğa 100 µl TMB solüsyonu ilave edildi.
14. Pleyt 0.5-1 saat oda ısısında ve karanlıkta inkube edildi.
Renk her 5-10 dakikada bir kontrol edildi ve koyu maviye döndüğünde hemen bir sonraki basamağa geçildi. Ayrıca hava kabarcıklarının oluşmamasına da dikkat edildi.
15. Reaksiyonu sonlandırmak için blenk dahil her kuyucuğa 100 µl 2 N HCl ilave edildi. Solüsyonun rengi sarıya döndü.
16. Pleytin altı % 70'lik etanol ile temizlenerek pleyt okuyucuya yerleştirildi.
17. Absorbans 450 nm'de 100 µl TMB solüsyonu ve 2N HCl ilave edilerek oluşturulan blenk'e karşı okundu. Sonuçlar cihaz tarafından çizilen standart eğriden (Şekil-5) yine cihaz tarafından otomatik olarak hesaplanarak elde edildi.



Şekil-5 PTHrP standart eğrisi

6. Plazma 1,25-(OH)₂ Vitamin D Ölçümü

Plazma 1,25-(OH)₂ Vitamin D konsantrasyonu tavukta da çalışabilirliği kanıtlanmış EIA kit (IMMUNODIAGNOSTIK AG, 1,25 (OH)₂ ELISA kit, Cat no: K2112) kullanılarak ELISA ile belirlendi.

Testin Prensibi

Bu ölçümde, biyolojik olarak aktif olan vitamin D metaboliti, 1,25-(OH)₂ vitamin D₂ iki ayrı ekstraksiyon kolonundan ekstrakte edildi. Bu prosedür 1,25-(OH)₂ vitamin D'yi diğer vitamin D metabolitlerinden, özellikle 25-(OH) vitamin D ve 24,25- (OH)₂ vitamin D'den ayırt etmek için gereklidir. Bu ölçüm 1,25 (OH)₂ vitamin D'nin ölçümü için bir yarışmalı enzim immunoassaydir. Testin prensibi numunede var olan 1,25 (OH)₂ vitamin D'nin vitamin D spesifik antikoruna bağlanmak için işaretlenmiş 1,25 (OH)₂ vitamin D ile yarışması esasına dayanır.

Ayıraçlar

Yıkama Tamponu

Konsantre ELISA yıkama tamponu (10×) 100 ml'lik şişede kullanıma hazır halde bulunmaktadır. 100 ml konsantre yıkama tamponu 900 ml bidistile su ile sulandırılarak kullanıldı.

Tris-HCl

Tris HCl tamponu 30 ml'lik şişede kullanıma hazır halde bulunmaktadır.

Antikor

1,25-(OH)₂ vitamin D antikorunu kullanıma hazır halde 25 ml'lik şişede bulunmaktadır.

Standart

Standartlar (7 şişe) 2.5 ml'lik şişelerde kullanıma hazır halde bulunmaktadır.

Kontroller

Kontroller 2.5 ml'lik şişelerde kullanıma hazır halde bulunmaktadır.

Antikor-Konjugat Solüsyonu

Konjugat, poliklonal peroksidazla işaretli antikor-konjugat solüsyonu 22 ml'lik şişede bulunmaktadır.

Substrat

TMB substrat 15 ml'lik şişelerde kullanıma hazır halde bulunmaktadır

Stop Solüsyonu

1 N HCl içermektedir. 7 ml'lik şişede kullanıma hazır halde bulunmaktadır.

Kromabond Kolon ve Silika Kartuşlar

Ekstraksiyon işlemi her numune için bir tane kromabond kolon ve silika kartuş kullanılarak gerçekleştirildi.

Ekstraksiyon

1. Ekstraksiyon ünitesi 3 parçadan oluşturuldu. En alta cam tüp, üzerine kartuş ve en üste de kromabond kolonlar yerleştirildi. Bu şekilde her numune için bir ekstraksiyon ünitesi oluşturuldu ve bunlar bir düzeneğin üzerinde sabitlendi.

2. Standart, numune ve kontrollerden 1000 µl en üstteki kromabond kolonlara eklenerek, 10 dakika inkube edildi.

3. Kolonlar 1 ml diizopropileterle (% 99) 4 kez muamele edilerek ekstraksiyon ünitesinden uzaklaştırıldı.

4. Kartuşlar 2 ml izopropanol (%99.9)/hekzan(%98.3) (4/96 v/v) karışımı ile 5 kez yıkandı.

5. Daha sonra kartuşlar 2 ml izopropanol/hekzan (6/94 v/v) karışımı ile 3 kez yıkandı.

6. 1,25 (OH)₂ vitamin D'yi kartuştan tamamen almak için son olarak kartuşlar 2 ml izopropanol/hekzan (25/75 v/v) karışımı ile muamele edildi.

7. Cam tüplerde biriken solüsyonlar nitrojen buharı altında, 37°C'de vakumlu santrifüj ile uçurularak her numune için 1,25 (OH)₂ vitamin D ekstraktları elde edildi.

Deney Prosedürü

1. Uçurma işleminden sonra her cam tüpe 20 µl etanol ilave edilerek santrifüj edildi.

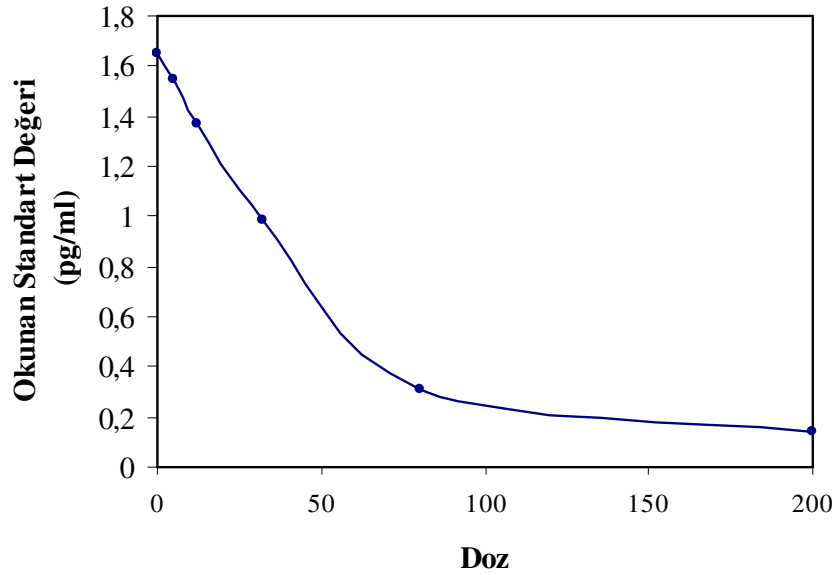
2. Her cam tüpe 450 µl antikor solüsyonu ilave edildi ve iyice karıştırıldı.

3. Cam tüpler plastik film ile kapatılarak 1 saat oda ısısında inkube edildi.

4. Bütün kit içeriği ve pleyt oda ısısına getirilerek standart, kontrol ve ekstrakte edilen numunelerden ilgili kuyucuklara 200 µl ilave edildi.

5. Pleyt kapatılarak buzdolabında 20 saat inkube edildi.

6. İnkubasyon sonrasında pleyt içeriği boşaltıldı ve her kuyucuk 250 µl yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
7. Kuyucuklara 200 µl konjugat eklendi ve pleyt kapatılarak oda ısısında, pleyt karıştırıcıda 1 saat inkube edildi.
8. Kuyucukların içeriği dökülerek her biri 250 µl sulandırılmış yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
9. Her kuyucuğa 200 µl substrat ilave edildi ve 30 dakika oda ısısında ve karanlıkta inkube edildi.
10. Kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklendi ve iyice karıştırıldı.
11. Pleyt okuyucu ile 450 nm’de absorbans ölçüldü. Absorbansın mümkün olduğu kadar çabuk okunması sağlandı. Sonuçlar cihaz tarafından çizilen standart eğriden (şekil-6) yine cihaz tarafından otomatik olarak hesaplanarak elde edildi.



Şekil-6 1,25 (OH)₂ vitamin D standart eğrisi

7. Serum Osteokalsin Ölçümü

Serum osteokalsin konsantrasyonu tavukta da çalışabilirliği kanıtlanmış EIA kit (ZYMED, Osteokalsin EIA kit, Cat no: 99-0054) kullanılarak ELISA ile belirlendi.

Testin Prensiibi

Gla-OC EIA kit solid faz EIA kitidir. Gla-OC' yi belirlemek için 2 fare monoklonal anti Gla-OC antikoru kullanır. Fare monoklonal anti Gla-OC'nin biri pleyte sabitlenir ve non spesifik bağlanmaya karşı engellenir. Numuneler ve standartlar pleytte inkube edilir. 2. basamak pleyti yıkamak ve peroksidazla (HRP) işaretlenmiş 2. anti-OC'yi eklemektir. Bu inkubasyon süresince Gla-OC bir kenardaki anti-Gla-OC'ye bağlanır ve diğer yana da HRP-anti-OC koyulur. HRP ve substrat (H₂O₂ ve TMB) arasındaki reaksiyon renk değişimi ile sonuçlanır. Bununla birlikte örnek ve standartlarda var olan Gla-OC'nin miktarındaki yoğunlukta da değişim olur. Gla-OC'nin miktarı EIA pleyt okuyucu kullanılarak ölçülür.

Ayıraçların Bileşimi

Antikor-HRP Konjugat Solüsyonu

Liyofilize HRP ile konjuge olmuş murine monoklonal OC'ye karşı antikor içerir. 4 °C'de, uzun süreli ışığa maruz bırakılmadan saklandı. 11 ml distile su ile sulandırıldı ve yavaş bir şekilde yaklaşık 10 dakika karıştırıldı.

Yıkama Tamponu

PBS

8 g NaCl, 0.2 g KCl, 2.9 g Na₂HPO₄12H₂O ve 0.2 g KH₂PO₄ 1000 ml distile suda çözündürülerek hazırlandı.

Numune Sulandırıcı

11 ml'lik şişelerde kullanıma hazır halde bulunmaktadır. Tamponlanmış protein solüsyonu içerir. Sıfır standardı, standartların dilüsyonu ve kalibrasyon eğrisinin üzerindeki numunelerin sulandırılması için kullanıldı. 4°C 'de saklandı.

Substrat Solüsyonu

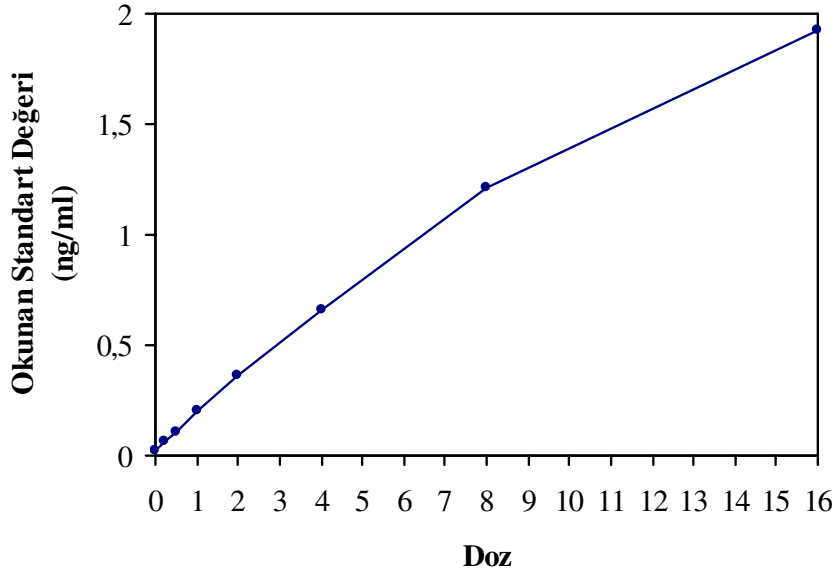
12 ml'lik şişede kullanıma hazır halde bulunmaktadır. Tampon solüsyonunda tetrametilbenzidin ve hidrojen peroksit içerir. 4°C'de depolanır.

Standartlar

Standartlar 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 ng/ml konsantrasyonlarda liyofilize Gla-OC içermektedir. Her biri 1 ml numune sulandırıcı ile sulandırılarak kullanıma hazır hale getirildi.

Deney Prosedürü

1. Kullanmadan önce bütün kit içeriği oda ısısına getirildi. Tam bir karışım elde etmek için pleyt yavaş bir şekilde pleyt karıştırıcıda karıştırıldı.
2. 100 µl numune ve 100 µl hazırlanan standartlardan 5 dakika içinde belirlenen kuyucuklara koyuldu ve karıştırıldı. Pleyt folyo ile kapatıldı ve oda ısısında (20-25°C) 2 saat inkube edildi. Antijenin denaturasyonunu önlemek için serumun 37°C'de inkube edilmesine dikkat edildi.
3. Pleyt içeriği döküldü ve 400 µl PBS ile 3 kez yıkandı. Yıkama basamaklarından sonra, özellikle son yıkama sonrası pleyt boşaltıldı ve kağıt havlunun üzerine ters çevrilerek dikkatlice vuruldu.
4. Kuyucuklara antikor-HRP konjugat solüsyonundan 100 µl pipetlenip karıştırıldı. Pleyt folyo ile kapatıldı ve 1 saat oda ısısında (20-25°C) inkube edildi.
5. Pleyt içeriği dökülerek kuyucuklar 4 kez daha önceki basamaktaki gibi PBS ile yıkandı.
6. Her kuyucuğa 100 µl substrat solüsyonu eklendi ve 15 dakika oda ısısında inkube edildi.
7. Kuyucuklara 100 µl 1 N H₂SO₄ stop solüsyonu olarak ilave edildi. Pleyte hafifçe vurularak karışması sağlandı.
8. Pleyt okuyucu ile 450 nm'de absorbans ölçüldü. Absorbansın mümkün olduğu kadar çabuk okunması sağlandı. Sonuçlar cihaz tarafından çizilen standart eğriden (Şekil-7) yine cihaz tarafından otomatik olarak hesaplanarak elde edildi.



Şekil-7 Osteokalsin standart eğrisi

8. Kemik Ölçümleri

Tavuklar kesildikten sonra tibiotarsusları ayrılarak çevre dokulardan temizlendi. Dijital terazide tibiotarsusun kemik ağırlığı (Precisa XB 4200C, Switzerland) saptandı. Kemik uzunluğu dijital kumpas (Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Japan) ile ölçüldü. Uzunluk kemiğin alt uç noktası ile tibiotarsusun *caputu* arasındaki mesafeden alındı. Ölçülü silindir ile tibiotarsusun total hacmi tespit edildi. Daha sonra kemiğin uzunluğunun orta noktasından corpus çapı ölçüldü. Kortikal kalınlığın tespiti için kemik corpus çapı noktasından tibiotarsusa horizontal bir kesit yapılarak kemiğin alt parçasının ön kenarından dijital kumpas ile kortikal kalınlığı saptandı (141, 142).

Kemik kalsiyum düzeylerinin belirlenmesi için tibiotarsus HCl (% 27.66) içinde 5 dakika kaynatıldı, kemik iliği ve çevre dokuları iyice temizlendi ve tamamen yağlarından ve sudan arındırmak için 24 saat sokslet ekstraksiyon cihazında (Gerhardt/Soxtherm Automatic, Cäsariusstraße 97 D-53639 Königswinter) bekletildi. Kemikler daha sonra yağların ayrılması amacıyla susuz eterde 24 saat bekletildi, ikinci ekstraksiyondan sonra oda ısısında 24 saat kurutuldu. Bunu takiben bir gece 600°C de kül fırınında (Gallenkamp FR 612, Britain, England) yakıldı (143). Kül haline getirildikten sonra kemik kalsiyum düzeyleri spektrofotometrede glikokal bis metodu ile ölçüldü (144).

9. Yumurta ile İlgili Ölçümler

Yumurta Verimi: Kontrol ve deneme gruplarının yumurtaları her gün aynı saatlerde toplandı. Hayvanlar yumurtlamaya başladıktan itibaren 114 gün boyunca kontrol ve deneme gruplarının verim kayıtları düzenli olarak tutuldu. Toplam yumurta sayısı verim kayıtlarının tutulduğu toplam gün sayısına (114) ve toplam hayvan sayılarına (10) bölünerek kontrol ve deneme gruplarına ait hayvan başına düşen günlük yumurta sayısı hesaplandı.

Yumurta Ağırlığı: Yumurta ile ilgili analizlerin yapılabilmesi için 15 günde bir belirli gün ve saatlerde o güne ait yumurtalar her iki grupta da ayrı ayrı toplandı. Ertesi gün analizler yapıldı. Yumurta ağırlıkları hassas terazi ile belirlendi ve bulunan değerler kaydedildi.

Yumurta Kabuk Kalınlığı: Analiz için toplanan yumurtaların alt, üst ve orta olmak üzere üç kısmından yumurta kabuğu numunesi alındı. Bu numunelerin kalınlığı mikrometre (Mitutoyo, Japan) ile ölçülüp, bu üç bölgeden elde edilen değerlerin ortalaması alınarak kaydedildi.

C. İstatistiksel Analizler

SPSS 11.5 adlı istatistik program kullanılarak, incelenen haftalarda kontrol ve deneme gruplarına ait serum kalsiyum, fosfor, plazma amylin, kalsitonin, PTHrP, 1,25 (OH)₂ vitamin D, serum osteokalsin konsantrasyonlarının ve kemik kalsiyum düzeyi, tibiotarsusun kortikal kalınlığı, ağırlığı, uzunluğu ve total hacminin aritmetik ortalamaları (\bar{x}) ve standart hataları (S.E.M.) hesaplandı. Kontrol ve deneme gruplarına ait veriler arasındaki farklılıklar parametrik test varsayımları yerine gelmediği için Mann Whitney U testi ile araştırılarak $p < 0.01$ ve $p < 0.05$ düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (145).

BULGULAR

Yumurtacı tavuklarda kontrol gruplarında 14, 16, 18, 20. haftalarda sırasıyla serum kalsiyum konsantrasyonları 13.65, 12.39, 10.66, 12.51 mg/dl, serum fosfor konsantrasyonları 6.25, 5.13, 5.53, 3.22 mg/dl, plazma amylin konsantrasyonları 12.06, 30.33, 24.64, 25.89 pM, plazma kalsitonin konsantrasyonları 3.24, 2.41, 1.34, 0.55 ng/ml, plazma PTHrP konsantrasyonları 1.41, 0.99, 0.76, 0.66 ng/ml, plazma 1,25 (OH)₂ vitamin D konsantrasyonları 40.64, 52.42, 51.99, 60.77 pg/ml, serum osteokalsin konsantrasyonları 1.18, 1.15, 1.15, 0.83 ng/ml (Tablo-3), kemik kalsiyum düzeyleri % 18.18, 18.50, 17.85, 19.27 g, tibiotarsusun kortikal kalınlığı 0.67, 0.78, 1.01, 1.11 mm, ağırlığı 5.43, 6.22, 8.88, 7.55 g, uzunluğu 11.29, 11.49, 11.65, 11.69 cm, total hacmi 5.90, 6.40, 7.30, 6.60 cm³ olarak belirlendi (Tablo-4).

Deneme gruplarında 14, 16, 18, 20. haftalarda sırasıyla serum kalsiyum konsantrasyonları 11.32, 10.12, 9.62, 10.54 mg/dl, serum fosfor konsantrasyonları 5.08, 5.36, 5.73, 3.95 mg/dl, plazma amylin konsantrasyonları 15.00, 33.78, 31.42, 35.52 pM, plazma kalsitonin konsantrasyonları 3.26, 2.56, 2.61, 1.00 ng/ml, plazma PTHrP konsantrasyonları 1.98, 1.31, 0.85, 0.71 ng/ml, plazma 1,25 (OH)₂ vitamin D 54.69, 67.70, 72.45, 73.02 pg/ml, serum osteokalsin konsantrasyonları 1.19, 1.26, 1.29, 0.84 ng/ml (Tablo-3), kemik kalsiyum konsantrasyonları % 21.31, 19.53, 20.38, 23.20 g, tibiotarsusun kortikal kalınlığı 0.78, 0.87, 1.60, 1.66 mm, ağırlığı 5.38, 6.42, 8.85, 7.53 g, uzunluğu 11.24, 11.56, 11.49, 11.51 cm ve total hacmi 6.00, 6.40, 7.40, 6.80 cm³ olarak belirlendi (Tablo-4).

Serum kalsiyum konsantrasyonları 14 haftalık yumurtacı tavuklarda p<0.05; 16, 18 ve 20 haftalıklarda ise p<0.01 düzeyinde olmak üzere deneme gruplarında kontrol gruplarından daha düşük bulundu (Tablo-3 ve Şekil-8). Plazma kalsitonin konsantrasyonlarında 14 ve 16 haftalık tavuklarda deneme ve kontrol grupları arasında bir fark bulunamazken, 18 ve 20 haftalıklarda deneme gruplarında kontrol gruplarına göre daha yüksek kalsitonin değerleri belirlendi (p<0.05) (Tablo-3 ve Şekil-11). Serum fosfor, plazma amylin, plazma PTHrP, 1,25 (OH)₂ vitamin D ve serum osteokalsin konsantrasyonlarında bütün haftalarda deneme ve kontrol grupları arasında istatistiki açıdan herhangi bir fark bulunamadı (Tablo-3, Şekil-9,10,12-14). Kemik kalsiyum düzeyleri bütün haftalarda deneme gruplarında kontrol gruplarına göre daha yüksek bulundu. Bu fark 14, 16, 18 haftalık yumurtacı tavuklarda p<0.05, 20 haftalıklarda ise

$p < 0.01$ düzeyinde önemliydi (Tablo-4 ve Şekil-15). Tibiotarsusun kortikal kalınlığında 14 haftalık yumurtacı tavuklarda deneme ve kontrol grupları arasında istatistiki açıdan önemli bir fark bulunamazken, 16 haftalıklarda $p < 0.05$ ve 18, 20 haftalıklarda ise $p < 0.01$ düzeyinde deneme gruplarında kontrol gruplarından daha yüksek bulundu (Tablo-4 ve Şekil-16). Tibiotarsusun ağırlığı, uzunluğu ve total hacminde deneme ve kontrol gruplarında istatistiki açıdan önemli bir fark bulunamadı (Tablo-4, Şekil-17-19).

20. haftadan 35. haftaya kadar bakılan yumurtacı tavuklarda ortalama yumurta ağırlığı, kontrol grubunda 54.49 g, deneme grubunda 55.97 g olarak belirlendi. İstatistiki incelemede gruplar arasında önem saptanmadı. Yumurta kabuk kalınlıkları kontrol grubunda 35.29 mm×100 ve deneme grubunda 36.69 mm×100 olarak ölçüldü. Deneme grubunda yumurta kabuk kalınlıkları kontrol grubuna göre istatistiki olarak daha yüksek bulundu ($p < 0.05$) (Tablo-5). Belirtilen süreçte bu tavuklardan elde edilen yumurtalar sayıldığında günlük hayvan başına düşen yumurta sayısı deneme grubunda 0.85, kontrol grubunda 0.82 olarak tespit edildi. Gruplar arasında istatistiki açıdan önemli düzeyde farklılık belirlenmedi.

35. haftadaki tavuklarda kontrol grubunda serum kalsiyum konsantrasyonları 12.51 mg/dl, serum fosfor konsantrasyonları 3.69 mg/dl, plazma amylin konsantrasyonları 6.93 pM, plazma kalsitonin konsantrasyonları 0.66 ng/ml, plazma PTHrP konsantrasyonları 0.63 ng/ml, plazma 1,25 (OH)₂ vitamin D konsantrasyonları 73.25 pg/ml, serum osteokalsin konsantrasyonları 0.81 ng/ml (Tablo-6) kemik kalsiyum düzeyleri % 20.17 g, tibiotarsusun kortikal kalınlığı 1.38 mm, ağırlığı 7.26 g, uzunluğu 11.64 cm ve total hacmi 6.50 cm³ olarak belirlendi (Tablo-7).

35. haftadaki deneme grubunda serum kalsiyum konsantrasyonları 12.64 mg/dl, serum fosfor konsantrasyonları 3.47 mg/dl, plazma amylin konsantrasyonları 9.43 pM, plazma kalsitonin konsantrasyonları 1.48 pg/ml, plazma PTHrP konsantrasyonları 0.76 ng/ml, plazma 1,25 (OH)₂ vitamin D konsantrasyonları 72.75 pg/ml, serum osteokalsin konsantrasyonları 0.84 ng/ml (Tablo-6), kemik kalsiyum düzeyleri % 20.24 g, tibiotarsusun kortikal kalınlığı 1.93 mm, ağırlığı 7.34 g, uzunluğu 11.92 cm ve total hacmi 6.60 cm³ olarak belirlendi (Tablo-7).

35. haftada tibiotarsusun kortikal kalınlığı hariç diğer kemik ölçümlerinde deneme ve kontrol grupları arasında istatistiki açıdan önemli bir fark gözlenmedi. Tibiotarsusun kortikal kalınlığı deneme grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu ($p < 0.05$) (Tablo-6 ve 7).

Tablo-3 14-20 haftalık yumurtacı tavuklarda bazı kan parametreleri (n=5)

Kan Parametreleri	14. hafta		16. hafta		18. hafta		20. hafta	
	Kontrol $\bar{x} \pm S.E.M.$	Deneme $\bar{x} \pm S.E.M.$	Kontrol $\bar{x} \pm S.E.M.$	Deneme $\bar{x} \pm S.E.M.$	Kontrol $\bar{x} \pm S.E.M.$	Deneme $\bar{x} \pm S.E.M.$	Kontrol $\bar{x} \pm S.E.M.$	Deneme $\bar{x} \pm S.E.M.$
Serum Kalsiyum (mg/dl)	13.65 ± 0.59	11.32 ± 0.43*	12.39 ± 0.37	10.12 ± 0.27**	10.66 ± 0.18	9.62 ± 0.13**	12.51 ± 0.23	10.54 ± 0.14**
Serum Fosfor (mg/dl)	6.25 ± 0.53	5.08 ± 0.81	5.13 ± 0.39	5.36 ± 0.35	5.53 ± 0.22	5.73 ± 0.47	3.22 ± 0.14	3.95 ± 0.29
Plazma Amylin (pM)	12.06 ± 3.50	15.00 ± 5.70	30.33 ± 7.30	33.78 ± 3.92	24.64 ± 3.96	31.42 ± 5.80	25.89 ± 4.32	35.52 ± 9.42
Plazma Kalsitonin (ng/ml)	3.24 ± 0.38	3.26 ± 0.29	2.41 ± 0.22	2.56 ± 0.41	1.34 ± 0.11	2.61 ± 0.27*	0.55 ± 0.13	1.00 ± 0.18*
Plazma PTHrP (ng/ml)	1.41 ± 0.22	1.98 ± 0.68	0.99 ± 0.10	1.31 ± 0.26	0.76 ± 0.67	0.85 ± 0.10	0.66 ± 0.04	0.71 ± 0.12
Plazma 1,25 (OH) ₂ Vitamin D (pg/ml)	40.64 ± 5.69	54.69 ± 8.39	52.42 ± 11.63	67.70 ± 12.47	51.99 ± 5.32	72.45 ± 10.18	60.77 ± 6.18	73.02 ± 7.49
Serum Osteokalsin (ng/ml)	1.18 ± 0.08	1.19 ± 0.15	1.15 ± 0.09	1.26 ± 0.27	1.15 ± 0.15	1.29 ± 0.34	0.83 ± 0.08	0.84 ± 0.07

* :Aynı haftada kontrol ve deneme grupları arasındaki fark p<0.05 düzeyinde önemlidir (Mann-Whitney U testi)

** :Aynı haftada kontrol ve deneme grupları arasındaki fark p<0.01 düzeyinde önemlidir (Mann-Whitney U testi)

Tablo-4 14-20 haftalık yumurtacı tavuklarda kemik değerlendirmeleri (n=5)

Kemik Parametreleri	14. hafta		16. hafta		18. hafta		20. hafta	
	Kontrol $\bar{x} \pm S.E.M.$	Deneme $\bar{x} \pm S.E.M.$	Kontrol $\bar{x} \pm S.E.M.$	Deneme $\bar{x} \pm S.E.M.$	Kontrol $\bar{x} \pm S.E.M.$	Deneme $\bar{x} \pm S.E.M.$	Kontrol $\bar{x} \pm S.E.M.$	Deneme $\bar{x} \pm S.E.M.$
Kemik Kalsiyum (% g)	18.18 \pm 0.61	21.31 \pm 0.62*	18.50 \pm 0.33	19.53 \pm 0.34*	17.85 \pm 0.78	20.38 \pm 0.94*	19.27 \pm 0.51	23.20 \pm 0.87**
Tibiotarsusun Kortikal Kalınlığı (mm)	0.67 \pm 0.19	0.78 \pm 0.19	0.78 \pm 0.03	0.87 \pm 0.03*	1.01 \pm 0.03	1.60 \pm 0.03**	1.11 \pm 0.01	1.66 \pm 0.01**
Tibiotarsusun Ağırlığı (g)	5.43 \pm 0.14	5.38 \pm 0.16	6.22 \pm 0.121	6.42 \pm 0.28	8.88 \pm 0.37	8.85 \pm 0.22	7.55 \pm 0.27	7.53 \pm 0.12
Tibiotarsusun Uzunluğu (cm)	11.29 \pm 0.13	11.24 \pm 0.16	11.49 \pm 0.13	11.56 \pm 0.19	11.65 \pm 0.19	11.49 \pm 0.04	11.69 \pm 0.16	11.51 \pm 0.48
Tibiotarsusun Total Hacmi (cm ³)	5.90 \pm 0.24	6.00 \pm 0.15	6.40 \pm 0.24	6.40 \pm 0.40	7.30 \pm 0.53	7.40 \pm 0.24	6.60 \pm 0.24	6.80 \pm 0.20

* :Aynı haftada kontrol ve deneme grupları arasındaki fark p<0.05 düzeyinde önemlidir (Mann-Whitney U testi)

** :Aynı haftada kontrol ve deneme grupları arasındaki fark p<0.01 düzeyinde önemlidir (Mann-Whitney U testi)

Tablo-5 20-35. haftalar arası amylin enjeksiyonu yapılmadan beslenen tavuklarda yumurta verimi değerlendirmeleri (n=65)

Yumurta Parametreleri	Kontrol $\bar{x} \pm S.E.M.$	Deneme $\bar{x} \pm S.E.M.$
Yumurta ağırlığı (g)	54.49 \pm 0.57	55.97 \pm 0.86
Yumurta Kabuk Kalınlığı (mm \times 100)	35.29 \pm 0.30	36.69 \pm 0.45*

* : Kontrol ve deneme grupları arasındaki fark $p < 0.05$ düzeyinde önemlidir

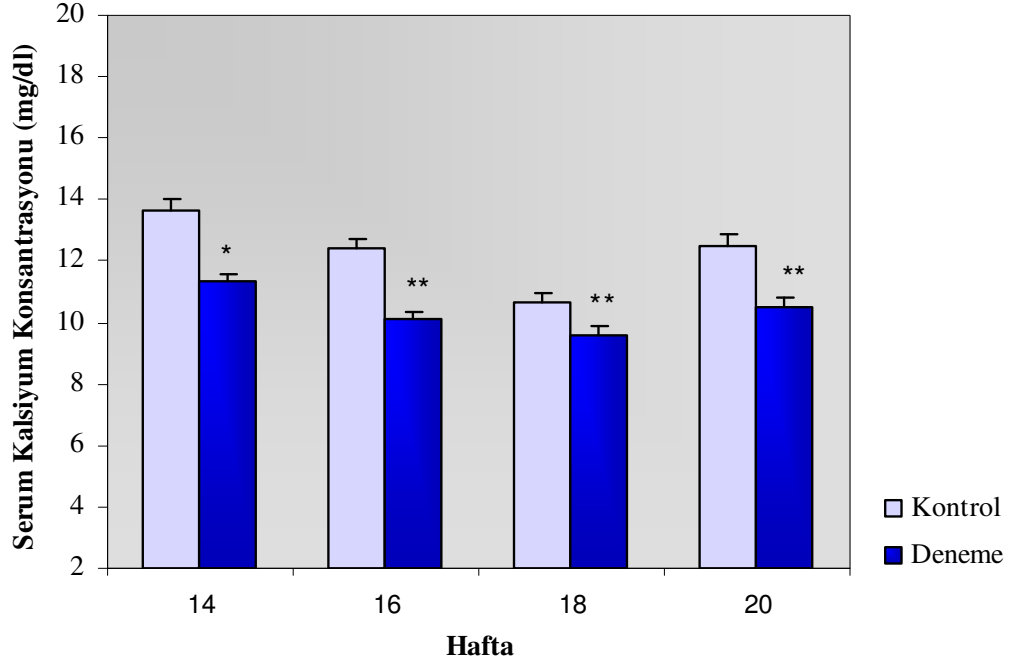
Tablo-6 20-35. haftalar arası amylin enjeksiyonu yapılmadan beslenen tavuklarda 35.haftadaki bazı kan parametreleri (n=5)

Kan Parametreleri	Kontrol $\bar{x} \pm S.E.M.$	Deneme $\bar{x} \pm S.E.M.$
Serum Kalsiyum (mg/dl)	12.51 \pm 0.23	12.64 \pm 0.27
Serum Fosfor (mg/dl)	3.69 \pm 0.36	3.47 \pm 0.33
Plazma Amylin (pM)	6.93 \pm 0.94	9.43 \pm 1.46
Plazma Kalsitonin(ng/ml)	0.66 \pm 0.08	1.48 \pm 0.90
Plazma PTHrP(ng/ml)	0.63 \pm 0.04	0.76 \pm 0.07
Plazma 1,25 (OH) ₂ Vitamin D (pg/ml)	73.25 \pm 14.11	72.75 \pm 15.89
Serum Osteokalsin (ng/ml)	0.81 \pm 0.04	0.84 \pm 0.20

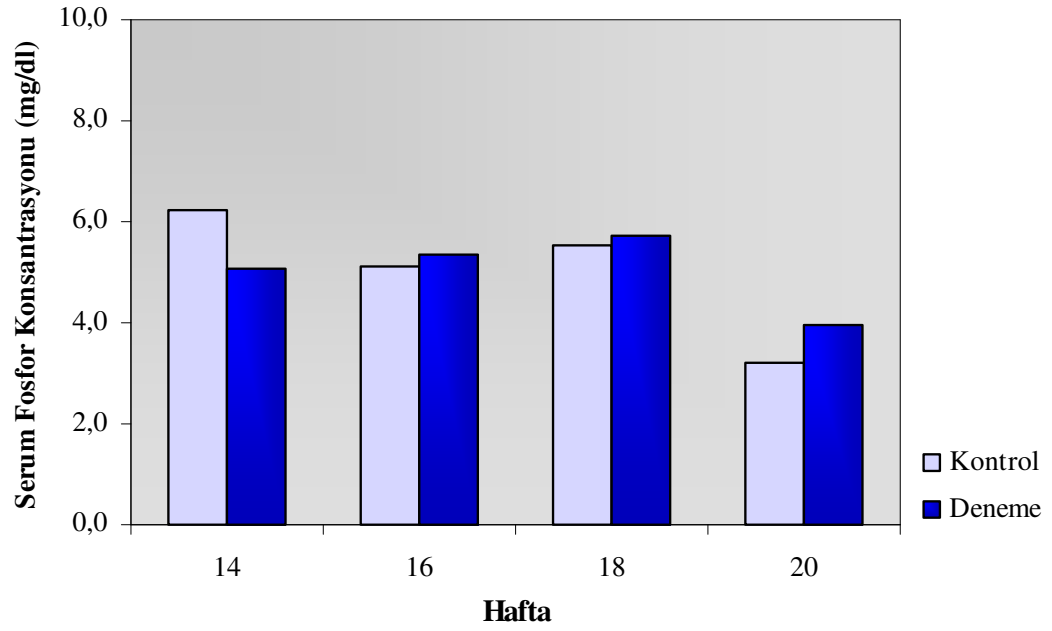
Tablo-7 20-35. haftalar arası amylin enjeksiyonu yapılmadan beslenen tavuklarda 35.haftadaki kemik değerlendirmeleri (n=5)

Kemik Parametreleri	Kontrol $\bar{x} \pm S.E.M$	Deneme $\bar{x} \pm S.E.M$
Kemik Kalsiyum (%g)	20.17 \pm 0.22	20.24 \pm 0.37
Tibiotarsusun Kortikal Kalınlığı (mm)	1.38 \pm 0.03	1.93 \pm 0.03*
Tibiotarsusun Ağırlığı (g)	7.26 \pm 0.33	7.34 \pm 0.31
Tibiotarsusun Uzunluğu (cm)	11.64 \pm 0.95	11.92 \pm 0.20
Tibiotarsusun Total Hacmi (cm ³)	6.50 \pm 0.31	6.60 \pm 0.29

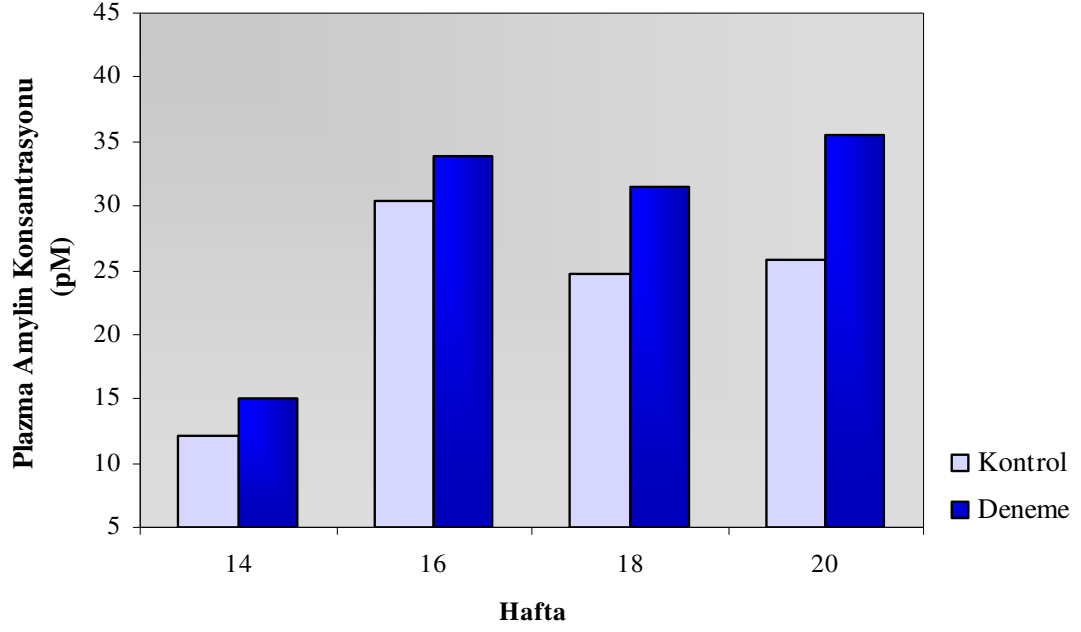
* : Kontrol ve deneme grupları arasındaki fark p<0.05 düzeyinde önemlidir



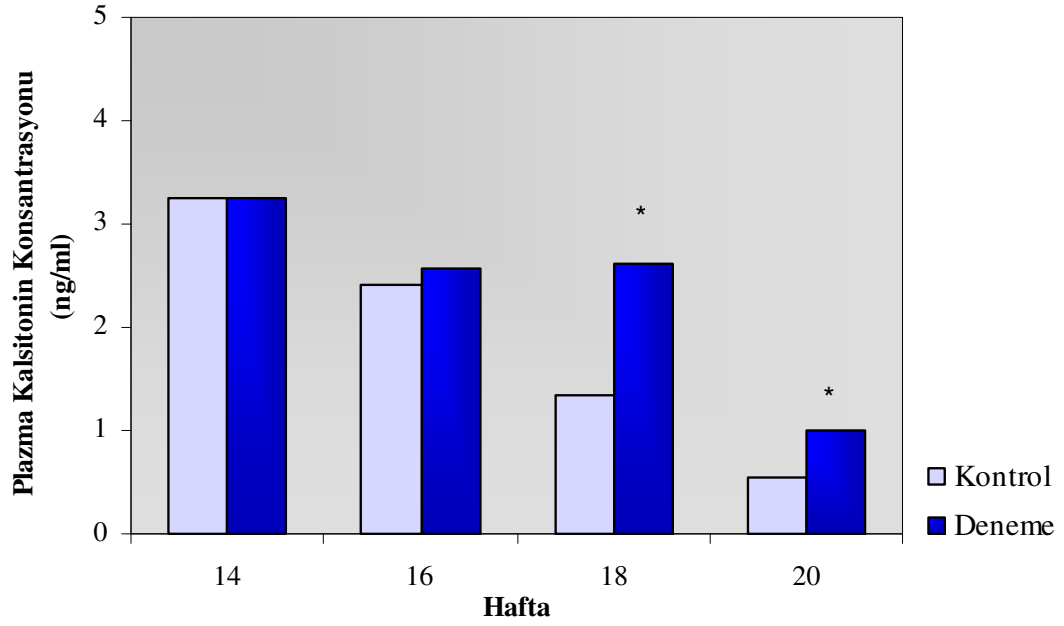
Şekil-8 Kontrol ve deneme gruplarında haftalara göre serum kalsiyum konsantrasyonu
 * p<0.05, ** p<0.01



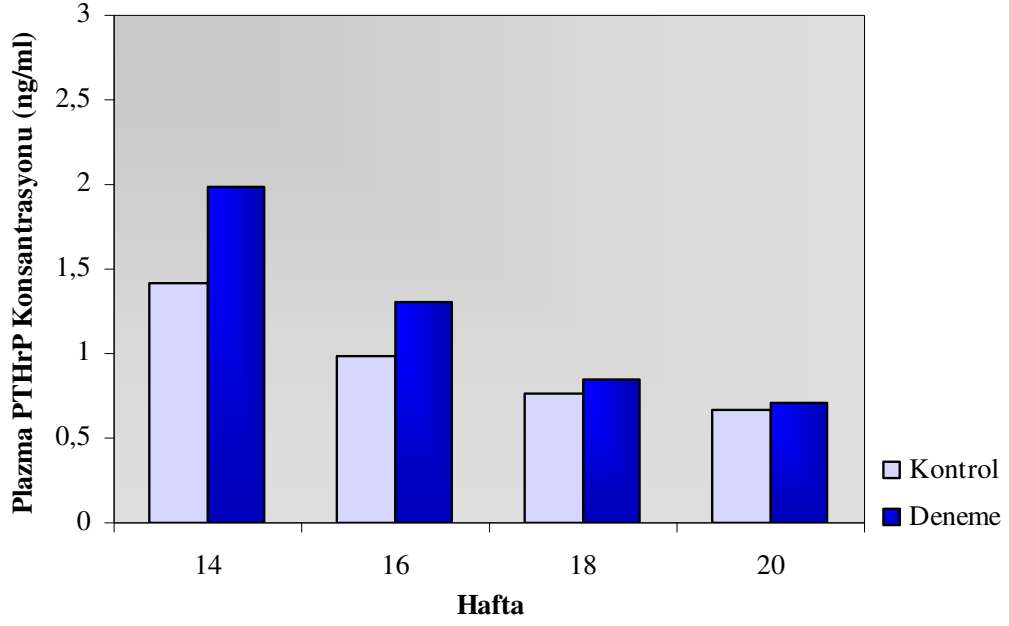
Şekil-9 Kontrol ve deneme gruplarında haftalara göre serum fosfor konsantrasyonu



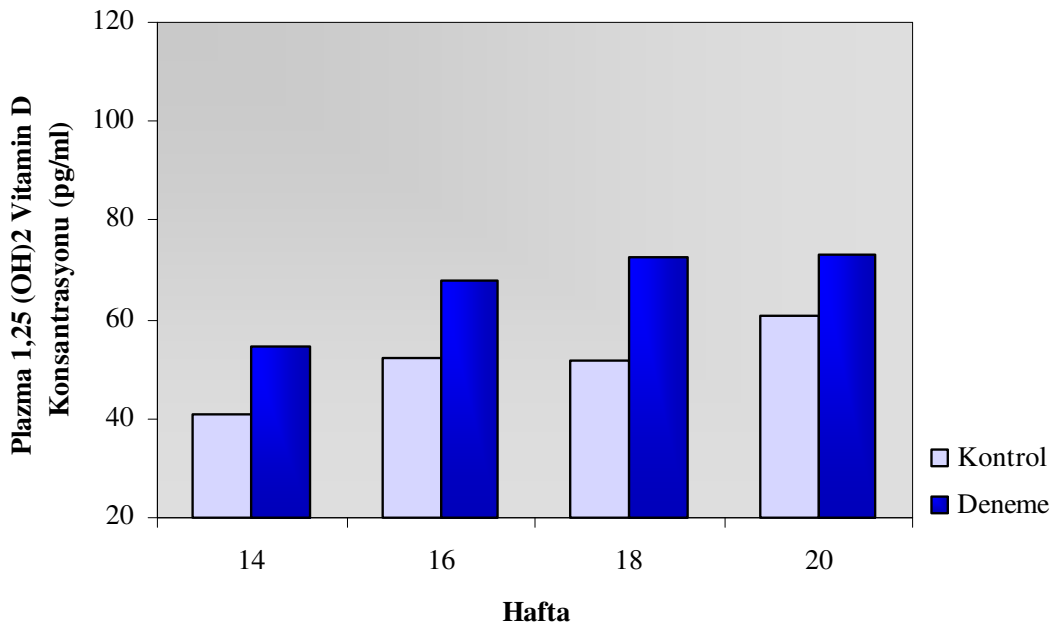
Şekil-10 Kontrol ve deneme gruplarında haftalara göre plazma amylin konsantrasyonu



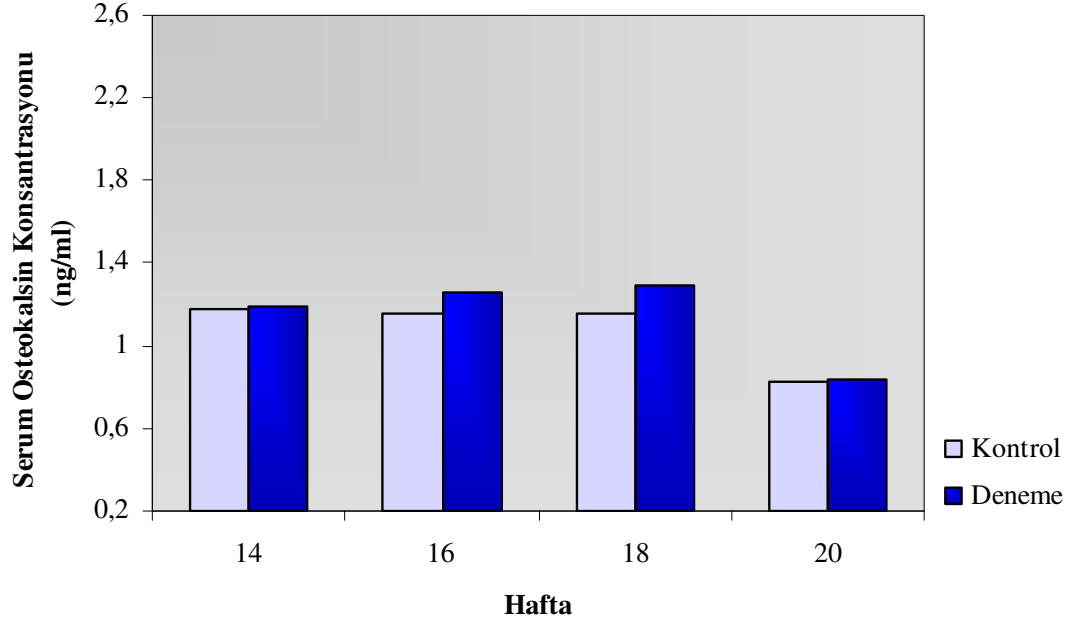
Şekil-11 Kontrol ve deneme gruplarında haftalara göre plazma kalsitonin konsantrasyonu
* p<0.05



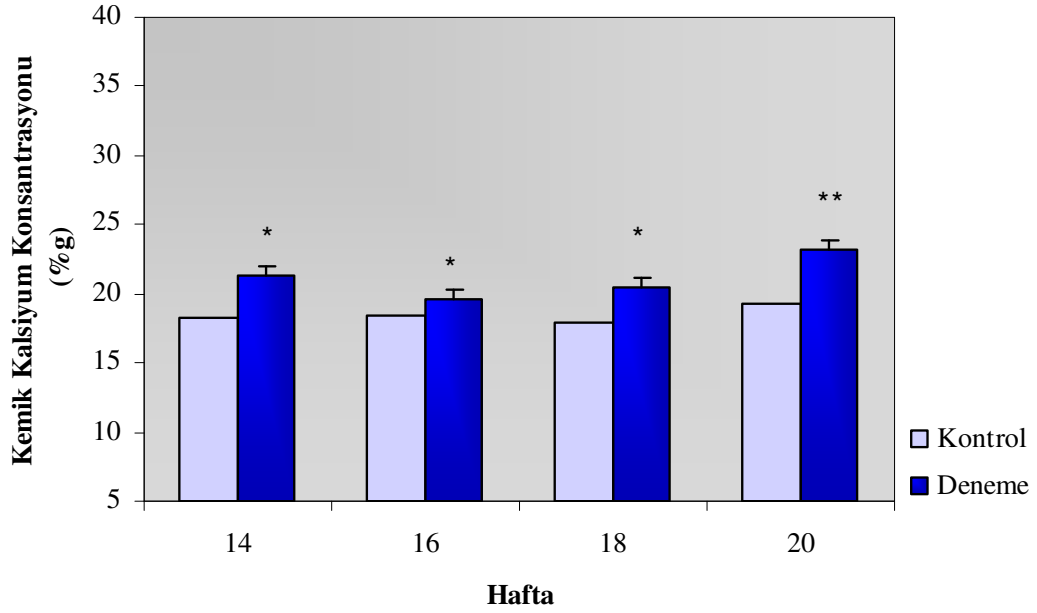
Şekil-12 Kontrol ve deneme gruplarında haftalara göre plazma PTHrP konsantrasyonu



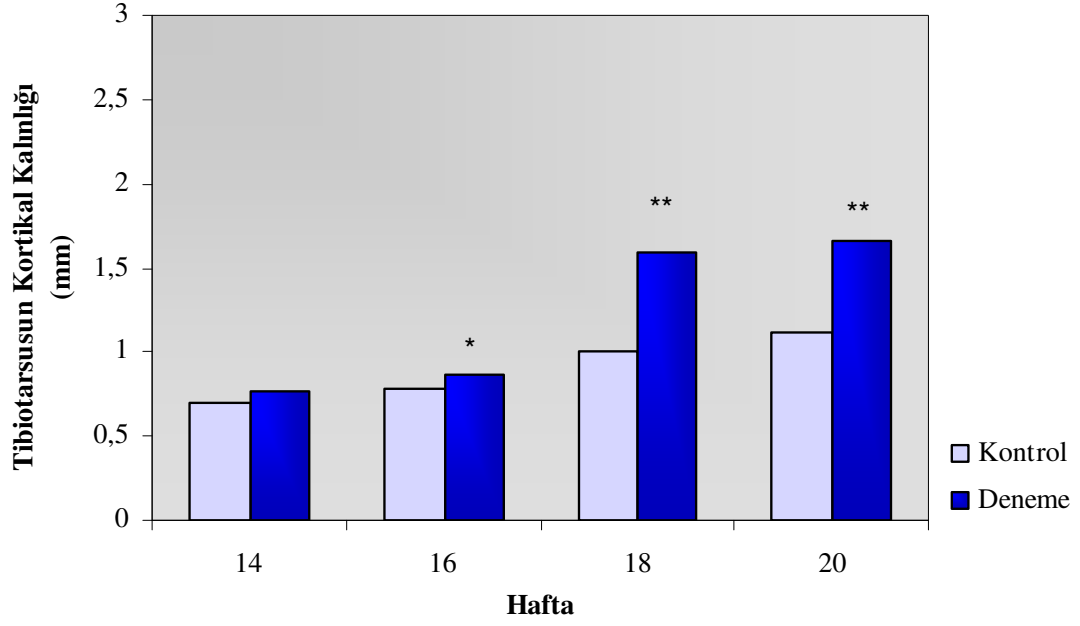
Şekil-13 Kontrol ve deneme gruplarında haftalara göre plazma 1,25 (OH)₂ vitamin D konsantrasyonu



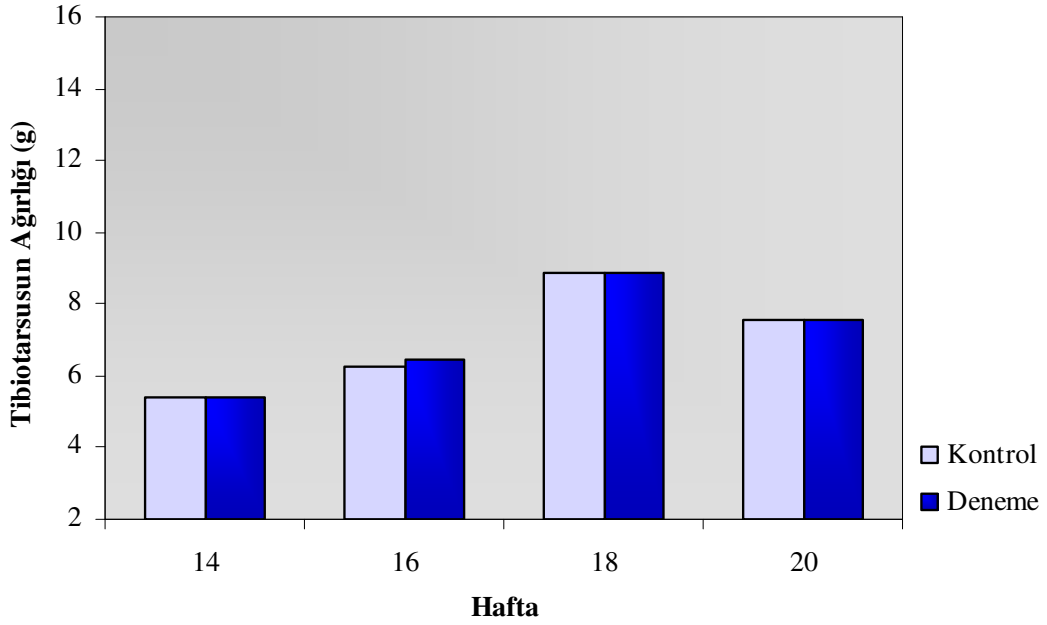
Şekil-14 Kontrol ve deneme gruplarında haftalara göre serum osteokalsin konsantrasyonu



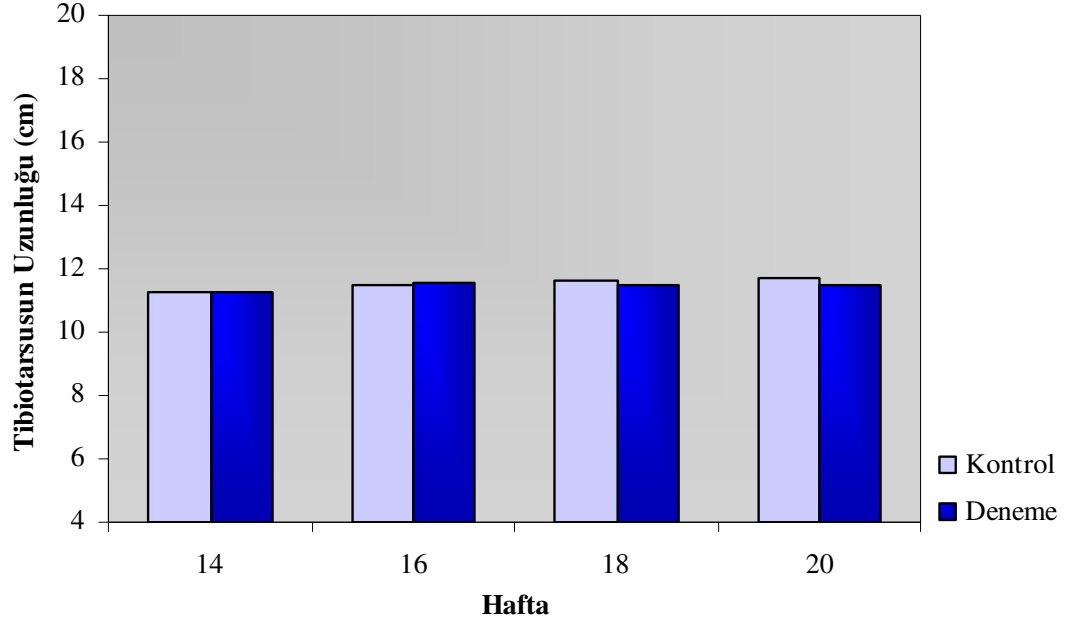
Şekil-15 Kontrol ve deneme gruplarında haftalara göre kemik kalsiyum konsantrasyonu
* p<0.05, ** p<0.01



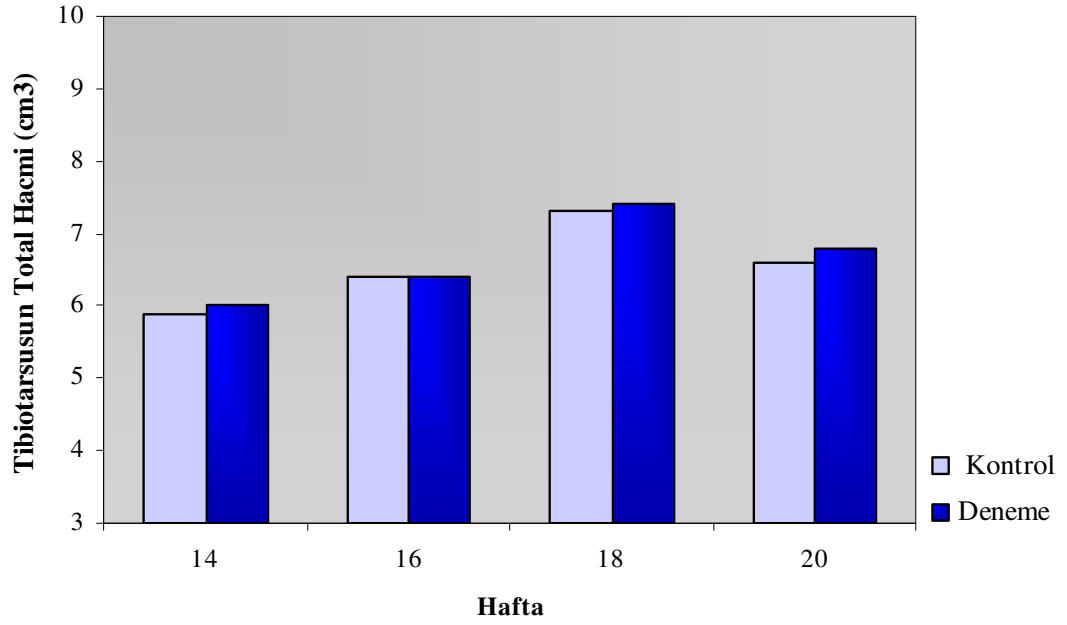
Şekil-16 Kontrol ve deneme gruplarında haftalara göre tibiotarsusun kortikal kalınlığı
* p<0.05, **p<0.01



Şekil-17 Kontrol ve deneme gruplarında haftalara göre tibiotarsusun ağırlığı



Şekil-18 Kontrol ve deneme gruplarında haftalara göre tibiotarsusun uzunluğu



Şekil-19 Kontrol ve deneme gruplarında haftalara göre tibiotarsusun total hacmi

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yumurtacı tavuklarda amylinin serum kalsiyum ve fosfor, plazma amylin, kalsitonin, PTHrP, 1,25(OH)₂ vitamin D ve serum osteokalsin konsantrasyonu, kemik kalsiyum düzeyi, tibiotarsusun kortikal kalınlığı, ağırlığı, uzunluğu ve total hacmi üzerine etkileri incelendi.

Bu çalışmada plazma amylin konsantrasyonları kontrol grubunda 12.06, 30.33, 24.64, 25.89 pM, deneme grubunda 15.00, 33.78, 31.42, 35.52 pM, olarak belirlendi (Tablo-3 ve Şekil-10). Amylinin etkileriyle ilgili insan ve rodentlerde çalışmalar yapılmış, yumurtacı tavuklar dahil olmak üzere diğer hayvan türleri üzerindeki etkileri ise henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Plazma amylin konsantrasyonu insan, rat ve bir çalışmada da keçilerde araştırılmıştır. İnsanlarda amylin konsantrasyonunun açlıkta 4 pmol/L iken gıda alımı sonrası 25 pmol/L düzeylerine kadar çıktığı belirtilmiştir (35). Başka çalışmada insanlarda açlık amylin konsantrasyonu 7 pg/ml olarak belirtilmiştir (146). Ratlarda yapılan bir çalışmada hayvanlar aç bırakıldığında amylin düzeyleri 1.63 pM düzeylerinde bulunmuş, besleme sonrası bu değer 7.70 pM'a kadar yükselmiştir (147). Keçilerde amylinin metabolik etkilerini araştıran bir çalışmada intravenöz amylin enjeksiyonu yapılmış, enjeksiyondan önce amylin konsantrasyonu 10.8 pmol/L olarak belirlenirken, enjeksiyon süresince 66.7 pmol/L düzeylerinde saptanmıştır (148). Bu çalışmada deneme grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek değerler bulunmakla birlikte enjeksiyonlar subkutan ve gün aşırı yapıldığı için bu fark istatistikî açıdan bir önem oluşturmadı (Tablo-3 ve Şekil-10).

Serum kalsiyum konsantrasyonları kontrol grubunda 13.65, 12.39, 10.66, 12.51 mg/dl, deneme grubunda 11.32, 10.12, 9.62, 10.54 mg/dl olarak belirlendi (Tablo-3 ve Şekil-8). Yumurtacı tavuklarda çeşitli literatürlerde serum kalsiyum konsantrasyonları 18.13-24.54 mg/dl (149), 13.7-17 mg/dl (150), 11.8 mg/dl (151) olarak bildirilmiştir. Kontrol grubu değerleri literatürlerin bir kısmı ile benzerlik göstermekle birlikte deneme grubuna ait değerler daha düşük olarak bulundu (150, 151). İnsan ve hayvanlarda daha önce yapılan çalışmalarda amylinin serum kalsiyum düzeylerini düşürücü etkisinin olduğu ortaya koyulmuştur (96, 113, 114, 152). Min ve arkadaşları (148) 1999 yılında yaptıkları çalışmada laktasyondaki keçilerde amylinin hipokalsemik bir ajan olduğunu belirlemişlerdir. Bunun yanında amylin, dolaşımdaki kalsiyum miktarını artıran renal atılım ile de azaltabilir. Fizyolojik dozlarda amylinin ratlara subkutan yolla enjeksiyonunun

kalsiyumun üriner yolla atılımını artırdığı ortaya koyulmuştur (153). Benzer şekilde Miles ve arkadaşları (121) köpeklerde amylinin serum kalsiyum düzeylerini düşürdüğünü ve kalsitoninden bağımsız olarak kalsiyumun renal atılımını artırdığını belirtmişlerdir. Bu mekanizmanın yanında amylinin hipokalsemik rolünü osteoklastlar aracılığı ile kemik rezorpsiyonunu azaltarak gösterdiğine dair çalışmalar da fazladır (114, 120). Belirtilen çalışmalardakine benzer şekilde bu çalışmada da amylin infüzyonunun yumurtacı tavuklarda serum kalsiyum konsantrasyonlarını önemli derecede düşürdüğü gözlemlendi ve bu bulgu amylinin yumurtacı tavuklardaki hipokalsemik etkisini ilk defa ortaya koyması açısından önemli olarak değerlendirildi. Hipokalsemik etki amylinin kalsitonin ailesinin bir üyesi olmasına bağlanabilir.

Serum fosfor konsantrasyonları kontrol grubunda 6.25, 5.13, 5.53, 3.22 mg/dl, deneme grubunda 5.08, 5.36, 5.73, 3.95 mg/dl olarak belirlendi (Tablo-3 ve Şekil-9). Serum fosfor konsantrasyonları çeşitli literatürlerde tavuklar için 7.10-12.61 mg/dl (149), 5.66-6.91 mg/dl (150) olarak bildirilmiştir. Çalışmada belirlenen değerler kontrol grubunda 3.22 ile 6.25 mg/dl, deneme grubunda 3.95 ile 5.73 mg/dl arasında değişmektedir ve bu değerler genel olarak literatürlerde bildirilen değerlerle benzerlik göstermektedir (150). Bu çalışmada yumurtacı tavuklara subkutan olarak amylin uygulanması fosfor konsantrasyonlarında önemli bir değişiklik meydana getirmedir (Tablo-3 ve Şekil-9).

Plazma kalsitonin konsantrasyonları kontrol grubunda 3.24, 2.41, 1.34, 0.55 ng/ml deneme grubunda 3.26, 2.56, 2.61, 1.00 ng/ml olarak ölçüldü (Tablo-3 ve Şekil-11). 2-8 haftalık broyler tavuklarda yapılan bir çalışmada 0.25-0,60 ng/ml değerleri arasında bulunduğu belirtilmiştir (154). Plazma kalsitonin konsantrasyonları 18 ve 20 haftalık yumurtacı tavuklarda deneme gruplarında kontrol gruplarına göre daha yüksek bulundu. Amylin enjeksiyonu bir süre sonra plazma kalsitonin düzeylerinde bir yükselme meydana getirdi (Tablo-3 ve Şekil-11).

Plazma PTHrP konsantrasyonları kontrol grubunda 1.41, 0.99, 0.76, 0.66 ng/ml deneme grubunda 1.98, 1.31, 0.85, 0.71 ng/ml olarak belirlendi (Tablo-3 ve Şekil-12). Yapılan çalışmalarda farede 1 pM (155, 156) olarak belirtilmiştir. Bu çalışmada değerler kontrol grubunda ortalama 1.11 ng/ml ve deneme grubunda ortalama 1.05 ng/ml olarak bulundu (Tablo-3 ve Şekil-12). Kontrol ve deneme grubu arasında plazma PTHrP konsantrasyonlarında önemli bir fark gözlemlenmedi. PTHrP, endokrin bezler, kaslar, beyin, lenfositler, böbrek, akciğerler, kemik, deri gibi birçok doku tarafından üretilmektedir. Bu dokuların çoğunda fonksiyonu henüz tam anlaşılammış olmasına rağmen, normal insan ve hayvanlarda dolaşımdaki düzeyleri düşük olduğu için otokrin ve parakrin düzenleyici

faktör olarak görev yaptığı düşünülmektedir. Gebelik süresince birçok dokunun farklılaşmasında rol oynamaktadır. Fötal dokularda özellikle kemik büyümesi ve gelişmesinde önemlidir. Kondrositlerin proliferatif bölgeden hipertrofik bölgeye geçerek olgunlaşmasını inhibe ederken, kıkırdakta kondrosit proliferasyonunu aktive ederek epifizeal plağın gelişmesini düzenlemektedir. Normal endokondrial kemik gelişmesinin temel hormonu olarak bilinmektedir (139).

Plazma 1,25 (OH)₂ vitamin D konsantrasyonları kontrol grubunda 40,64, 52.42, 51.99, 60.77 pg/ml deneme grubunda 54.69, 67.70, 72.45, 73.02 pg/ml olarak bulundu (Tablo-3 ve Şekil-13). Yumurtacı tavuklarda 23. haftada 142.21 pg/ml, 15. haftada 53.59 pg/ml değerleri bildirilmiştir (157).

Vücutta kalsiyum seviyesinin azalması, yani kalsiyum gereksinimi parathormon salınımını uyarmaktadır ve bunun sonucu olarak salgılanan paratiroid hormon 1-hidroksilaz enzimini aktive ederek bir D vitamini türevi olan 1,25 (OH)₂ vitamin D'nin aktif hale geçmesini sağlamaktadır. 1,25 (OH)₂ vitamin D bir yandan bağırsaklardan kalsiyum emilimini artırırken, diğer yandan da kemiklerden kana kalsiyum salınımını uyarmaktadır (16). Plazma kalsiyum düzeyinin düzenlenmesinde PTH yanında iki hormon daha rol oynar. Kalsitrol, bağırsaklardan kalsiyum iyonları emilimini artırarak plazma kalsiyum düzeyini yükseltmektedir. Başlıca tiroidin C hücrelerinden salınan kalsitonin ise kemik yıkımını ve bağırsaktan emilimini azaltarak plazma kalsiyum düzeyini düşürmektedir (158).

Serum osteokalsin konsantrasyonları kontrol grubunda 1.18, 1.15, 1.15, 0.83 ng/ml deneme grubunda 1.19, 1.26, 1.29, 0.84 ng/ml olarak belirlendi (Tablo-3 ve Şekil-14). Serum osteokalsin konsantrasyonları yaş, cinsiyet, çevre gibi birçok faktörden etkilenmektedir. İnsanlarda erkekte 3-13 ng/ml, dişilerde ise 0.4-11 ng/ml arasında değişmektedir (140). Bıldırcınlarda yapılan bir çalışmada 8.72 ng/ml olarak bulunmuştur (159). Yumurtacı tavuklarda subkutan olarak amylin uygulaması serum osteokalsin konsantrasyonlarında bir fark oluşturmadı (Tablo-3 ve Şekil-14). Osteokalsin kemik oluşumundan sorumlu hücreler olan osteoblastlar tarafından iskelette sentezlenmektedir. Sentezi 1,25 (OH)₂ vitamin D tarafından uyarılmaktadır. Osteokalsinin % 10-30'luk kısmı dolaşıma salındığı için serum osteokalsin düzeyi, kemik oluşumu ve osteoblastlar tarafından sentezlenen osteokalsini yansıtmaktadır (140).

Amylin, kalsitonin gen ailesinden olan kalsitonin ve CGRP ile yapısal olarak benzediği için vücutta oluşturduğu etkiler de onlarla benzerdir. Amylin ve CGRP *in vivo* olarak kalsitonin benzeri bir hipokalsemik aktiviteye sahiptir. İnsan amylini ve CGRP,

1,25 (OH)₂ vitamin D'nin neden olduğu kemik rezorpsiyonunu inhibe etmektedir. Osteoblast proliferasyonunu artırırken, osteoklast proliferasyonu ve kemik rezorpsiyonunu da inhibe etmektedir. Bu durum amylinin kemiklerden kalsiyum rezorpsiyonunu inhibe etmesi ve bağırsaklardan kalsiyum emilimini arttıran 1,25 (OH)₂ vitamin D sentezini uyarıcı yönde etki göstermesiyle açıklanabilir (12).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, incelenen hormonların fonksiyonları ve etki mekanizmaları ile ilgili bilgileri destekleyecek şekilde uyumlu bulunmuştur. İstatistiki analizlerde amylin, PTHrP, osteokalsin, 1,25 (OH)₂ vitamin D konsantrasyonlarında kontrol ve deneme gruplarında önemli bir fark bulunamamasına rağmen veriler incelendiğinde deneme gruplarına ait değerlerin kontrol gruplarından biraz daha yüksek olduğu görülmektedir (Tablo-3). Amylin enjekte edilen deneme gruplarında amylin ve kalsitonin konsantrasyonlarının artması serum kalsiyum konsantrasyonunun düşmesine neden olmuştur. Bu durum ise amylinin kemiklerden kalsiyum rezorpsiyonunu inhibe etmesinden dolayı parathormon vasıtasıyla bağırsaklardan kalsiyum emilimini artıran 1,25 (OH)₂ vitamin D uyarılmasını sağlamıştır. Deneme gruplarındaki hayvanlarda kemik kalsiyum konsantrasyonlarının artması da bu durumu desteklemektedir.

Deneme gruplarında biraz daha yüksek bulunan PTHrP ve osteokalsin konsantrasyonları da kemik gelişimleri yönünden pozitif bir etkinin varlığını yansıtmaktadır. Plazma kalsitonin değerleri incelendiğinde 14 ve 16 haftalık yaşlarda önemli bir fark bulunamamasına rağmen deneme grubunun değerleri kontrol grubunun değerlerinden daha yüksek olarak belirlenmiştir. 18 ve 20 haftalık yaşlarda ise deneme ve kontrol gruplarında p<0.05 düzeyinde önem bulunmuştur. Bu önem hayvanlara amylin verilmesine devam edildiğinde aynı aileden olan kalsitonin ile sinerjik etki oluşturması ile açıklanabilir.

Kemik kalsiyum düzeyleri kontrol grubunda % 18.18, 18.50, 17.85, 19.27 g, deneme grubunda % 21.31, 19.53, 20.38, 23.20 g olarak bulundu (Tablo-4 ve Şekil-15). Yapılan çalışmalarda 69 haftalık kahverengi yumurtacı tavuklarda kemik kalsiyum düzeyleri % 37-38 g (160), 68 haftalık beyaz leghorn ırkında % 38.9-40.2 g (161) olarak bulunmuştur. Amylinin kemik yapısında, osteoblast ve osteoklastların yüzeyinde, böbreklerde reseptörlerinin bulunduğu ve bu bölgelerdeki reseptörler aracılığıyla kemikler üzerinde de önemli etkiler oluşturduğu bildirilmektedir (3). Bazı çalışmalar amylin infüzyonunun kemik kalsiyum düzeylerini artırdığını ortaya koymuştur. Bununla ilişkili olarak Cornish ve arkadaşları (1) yetişkin farelerin calvaria bölgesine haftada 5 gün süreyle amylin enjekte etmişler ve kemik şekillenmesinin histomorfometrik indekslerinde artma, kemik

rezorpsiyonunda azalma ve mineralize kemik bölgesinde önemli bir yükselme olduğunu açıklamışlardır. Amylin kalsitonin ailesinin bir üyesi olduğu için kandan kemiğe kalsiyum geçişini uyarmakta ve kemik rezorpsiyonunu inhibe etmektedir. Bu nedenle serum kalsiyum düzeyleri düşerken kemik kalsiyum düzeyleri artmaktadır (12). Yapılan çalışmada da kemik kalsiyum değerleri deneme gruplarında kontrol gruplarına göre önemli ($p<0,05$) düzeyde yüksek bulundu (Tablo-4 ve Şekil-15).

Tibiotarsusun kortikal kalınlığı kontrol grubunda 0.67, 0.78, 1.01, 1.11 mm, deneme grubunda 0.78, 0.87, 1.60, 1.66 mm olarak ölçüldü (Tablo-4 ve Şekil-16). Bir çalışmada 72 haftalık yumurtacı tavuklarda kafes sistemi ile beslenenlerde tibianın kortikal kalınlığı ortalama 0.87 mm olarak bulunmuştur (162). Daha önceki bir çalışmada farelere amylin (1-8) enjekte edilmiş ve tibianın kortikal kalınlığının % 8 (kontrol grubunda 0.160 iken deneme grubunda 0.173'e yükselmiştir) arttığı gözlemlenmiştir (13). Cornish ve arkadaşları (14) yaptıkları bir başka çalışmada yetişkin farelere verilen tam amylin peptidinin tibiotarsusun kortikal kalınlığında önemli bir yükselme oluşturduğunu ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada da tam amylin peptidi yaklaşık aynı dozlarda enjekte edildi ve 16,18, 20 ve 35 haftalık tavuklarda tibiotarsusun kortikal kalınlığında önemli bir yükselme olduğu belirlendi (Tablo-4 ve Şekil-16).

Tibiotarsusun ağırlığı kontrol grubunda 5.43, 6.22, 8.88, 7.55 g, deneme grubunda 5.38, 6.42, 8.85, 7.53 g olarak bulundu (Tablo-4 ve Şekil-17). Bir çalışmada bu değer 50 haftalık yumurtacı tavuklarda ortalama 5.69 g (163) olarak bildirilmiştir.

Tibiotarsusun uzunluğu kontrol grubunda 11.29, 11.49, 11.65, 11.69 cm, deneme grubunda 11.24, 11.56, 11.49, 11.51 cm olarak ölçüldü (Tablo-4 ve Şekil-18).

Tibiotarsusun total hacmi kontrol grubunda 5.90, 6.40, 7.30, 6.60 cm³, deneme grubunda 6.00, 6.40, 7.40, 6.80 cm³ olarak hesaplandı (Tablo-4 ve Şekil-19). Bir çalışmada 50 haftalık yumurtacı tavuklarda ortalama 7.06 cm³ olarak bulunduğu belirtilmiştir (163). Bu çalışmada yumurtacı tavuklara subkutan olarak uygulanan amylinin bu dozları tibiotarsusun ağırlığı, uzunluğu ve total hacminde istatistiki açıdan önemli bir fark oluşturmadı (Tablo-4 ve Şekil-17-19).

Yumurtacı tavuk yetiştiriciliğinde kalsiyum metabolizması ve kemik gelişimi özel bir öneme sahiptir. Tavuk, yumurtladığı her yumurta ile beraber 2 g'dan fazla kalsiyumu vücudundan kaybeder. Uterusta cereyan eden kabuk sentezi için gerekli olan kalsiyumun önemli bir kısmı yemdeki kalsiyum kaynaklarından gelirken % 30 kadarı da kemiklerden rezorbe edilir. Bu mekanizmalar yoluyla da yeterli kalsiyum sağlanamadığında yumurta veriminde azalma ve ince kabuklu yumurta üretimi görülmeye başlanmaktadır (17, 18).

Yumurta tavukçuluğunda kabuk kırıkları nedeniyle oluşan kayıplar oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Üretilen yumurtalar içinde kabuk kırıkları nedeniyle satışa sunulamayan yumurtaların oranını, Harms ve arkadaşları % 6.5 (164), Keshavarz %6-16 (165) olarak bildirmektedir. Hunton (166) 100.000 kapasiteli bir işletmede her % 1'lik kırık artışının yıllık kazançta 10.000 dolar kayba yol açtığını belirtmektedir. Kabuk kırıkları nedeniyle değerlendirilemeyen yumurtalar sadece üreticiler açısından ekonomik kayıp olarak kalmayıp, aynı zamanda artan dünya nüfusunun sağlıklı beslenmesi için başlıca protein kaynaklarından biri olan yumurtanın da kaybı anlamına gelmektedir. Kabuk bütünlüğü bozulmuş yumurtaların tüketiciye sunulması gıda güvenliği açısından risk taşımaktadır. Bu çalışmada amylin ilavesi ile günlük hayvan başına düşen yumurta sayısında istatistiki açıdan önemli olmasa da artma kaydedilmiştir. Deneme grubundaki hayvanlar kontrol grubuna göre daha önce yumurtlama dönemine geçmişlerdir. Ayrıca deneme grubunda çift sarılı yumurtaya fazla miktarda rastlanmasına rağmen kontrol grubunda hiç çift sarılı yumurta elde edilmemiştir. Çift sarılı yumurta tüketici açısından önem verilen ve istenen bir durumdur. Yumurta kabuk kalınlığı kontrol grubunda 35.29 mm×100, deneme grubunda 36.69 mm×100 olarak bulunmuştur (Tablo-5). Bazı çalışmalarda 20 haftalık yumurtacı tavuklarda 0.36 mm (167), 31 haftalıklarda 34.8 (×100 mm) (168), 21-30 haftalıklarda 0.358 mm ve 31-41 haftalıklarda 0.356 mm (169) olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada subkutan amylin enjeksiyonu ile yumurta kabuk kalınlığında da artma gözlenmiştir (p<0.05) (Tablo-5). Bu artış düşük serum kalsiyum konsantrasyonunun diğer bir sebebi olabilir. Amylin serum kalsiyumunu kandan kemiğe depolayıp kemik rezorpsiyonunu engellerken, yumurta kabuğu oluşumu için de serumdan kalsiyum çekmektedir.

Yumurta ağırlığı kontrol grubunda 54.49 g, deneme grubunda 55.97 g olarak bulundu (Tablo-5). Bazı çalışmalarda yumurtacı tavuklarda 62.2 g (167), 22 haftalık beyaz yumurtacı tavuklarda 54.33 g, kahverengi yumurtacı tavuklarda 61.39 g (170) olarak bulunduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada amylinin uygulanan bu dozu yumurta ağırlığında istatistiki açıdan önemli bir fark oluşturmadı (Tablo-5). Elde edilen veriler amylinin yumurta veriminin artmasında da etkili bir hormon olabileceğini düşündürmüştür

35.nci haftada yapılan ölçümlerde tibiotarsusun kortikal kalınlığı hariç diğer parametrelerde önemli bir farklılık tespit edilemedi (Tablo-6 ve 7). Bu durum 20. haftadan sonra amylin enjeksiyonunun kesilmesi nedeniyle olabilir. Kortikal kalınlık kontrol grubunda 1.38 mm, deneme grubunda ise 1.93 mm olarak tespit edildi (Tablo-7).

Çalışmada amylin uygulanan grupta elde edilen bu bulgular, amylinin kalsiyum metabolizması ve kemik gelişimini olumlu yönde etkilediği görüşünü desteklemektedir. Ayrıca yumurtacı tavuklarda yumurta sayısı, ağırlığı, kabuk kalınlığı ve kemik kalsiyumundaki artışlar, amylinin verim süresiyle kalitesini artıracağını düşündürmektedir. Çalışmada elde edilen verilerin bu konuda yapılacak araştırmalara kaynak oluşturması açısından önemli olduğu kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

1. CORNISH J, CALLON KE, COOPER GJS, REID IR. Amylin stimulates osteoblast proliferation and increases mineralized bone volume in adult mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 207: 133-139, 1995.
2. COOPER GJ, WILLIS AC, CLARK A, TURNER RC, SIM RB, REID KB. Putrifaction and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84: 8628-8632, 1987.
3. BRONSKY J, PRUSA R. Amylin fasting plasma levels are decreased in patients with osteoporosis. *Osteoporosis International*, 15: 243-247, 2004.
4. MOORE CX, COOPER GJS. Co-secretion of amylin and insulin from cultured islet β -cells: modulation by nutrient secretagogues, islet hormones and hypoglycemic agents. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 179: 1-9, 1991.
5. OGAWA A, HARRIS V, MCCORKLE SK, UNGER RH, LUSKEY KL. Amylin secretion from the rat pancreas and its selective loss after streptozotocin treatment. *Journal of Clinical Investigation*, 85: 973-976, 1990.
6. GUIDOBONO F. Amylin and gastrointestinal activity. *Genetic Pharmacology*, 31: 173-177, 1998.
7. FAN L, WESTERMARK G, CHAN SJ, STEINER DF. Altered gene structure and tissue expression of islet amyloid polypeptide in the chicken. *Molecular Endocrinology*, 8: 713-721, 1994.
8. LUDVIK B, KAUTZKY WA, PRAGER R, THOMASETH K, PACINI G. Amylin: history and overview. *Diabetic Medicine*, 14: 9-13, 1997.
9. HOPPENER JW, NIEUWENHUIS MG, VROOM TM, AHREN BO, LIPS CJM. Role of islet amyloid in type 2 diabetes mellitus: Consequence or cause. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 197: 205-212, 2002.
10. CASTLE AL, KUO CH, IVY JL. Amylin influences insulin-stimulated glucose metabolism by two independent mechanism. *The American Journal of Physiology*, 274: 6-12, 1998.
11. YOUNG A. Inhibition of glucagon secretion. *Advances in Pharmacology*, 52: 151-171, 2005.
12. TAMURA T, MIYAURA C, OWAN I, SUDA T. Mechanism of action of amylin in bone. *Journal of Cell Physiology*, 153: 6-14, 1992.
13. CORNISH J, CALLON KE, GASSER JA, BAVA U, GARDINER EM, COY DH, COOPER GJS, REID IR. Systemic administration of a novel octapeptide, amylin (1-8), increases bone volume in male mice. *Animal Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 279: 730-735, 2000.
14. CORNISH J, CALLON KE, KING AR, COOPER GJS, REID IR. Systemic administration of amylin, increases bone mass, linear growth, and adiposity in adult male mice. *Animal Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 275: 694-699, 1998.
15. CORNISH J, CALLON KE, LIN CQX, XIAO CL, MULVEY TB, COY DH, COOPER GJS, REID IR. Dissociation of the effects of amylin on osteoblast proliferation and bone resorption. *Animal Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 274: 827-833. 1998.
16. ASI T. Tablolarla biyokimya, 1. cilt, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, sayfa 37-47, 1996.

17. ŞENKÖYLÜ N. Modern tavuk üretimi, 2. baskı, Anadolu Matbaa ve Ticaret Kollektif Şirketi, Tekirdağ, sayfa 30-35, 1995.
18. NORTH MO, BELL D. Commercial chicken production manual, 4th edition, Chapman 8 Hall, New York-London, page 56-58, 1990.
19. YOUNG A. Historical background. *Advances in Pharmacology*, 52: 1-18, 2005.
20. AGEEV AK. Amyloidosis of the pancreatic islets and diabetes mellitus. *Arkhiv Patologii*, 48: 11-15, 1986.
21. NAKAZATO M, ASAI J, KANGAWA K, MATSUKURA S, MATSUO H. Establishment of radioimmunoassay for human islet amyloid polypeptide and its tissue content and plasma concentration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 164: 394-399, 1989.
22. WESTERMARK P, WILANDER E. Islet amyloid in type 2 non-insulin-dependent diabetes is related to insulin. *Diabetologia*, 24: 342-346, 1983.
23. WESTERMARK P, WERNSTEDT C, WILANDER E, SLETTEN K. A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 140: 827-831, 1986.
24. COOPER GJ, WILLIS AC, CLARK A, TURNER RC, SIM RB, REID KB. Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84: 8628-8632, 1987.
25. COOPER GJS, LEIGHTON B, DIMITRIADIS GD, PARRY-BILLINGS M, KOWALCHUK JM, HOWLAND K, ROTHBARD JB, WILLIS AC, REID KB. Amylin found in amyloid deposits in human type 2 diabetes mellitus may be a hormone that regulates glycogen metabolism in skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 85: 7763-7766, 1988.
26. WESTERMARK P, WERNSTEDT C, O'BRIEN TD, HAYDEN DW, JOHNSON KH. Islet amyloid in type 2 human diabetes mellitus and adult diabetic cats contains a novel putative polypeptide hormone. *The American Journal of Pathology*, 127: 414-417, 1987.
27. CORNISH J, GREY A, CALLON KE, NAOT D, HILL BL, LIN CQX, BALCHIN LM, REID IR. Shared pathways of osteoblast mitogenesis induced by amylin, adrenomedullin and IGF-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318: 240-246, 2004.
28. SANKE T, BELL GI, SAMPLE C, RUBENSTEIN AH, STEINER DF. An islet amyloid peptide is derived from an 89-amino acid precursor by proteolytic processing. *The Journal of Biological Chemistry*, 263: 17243-17246, 1988.
29. MOSSELMAN S, HOPPENER JWM, ZANDBERGJ, VANMANSFELD ADM, GUERTS-VAN KESSEL AHM, LIPS CJM, JANSZ HS. Islet amyloid polypeptide: Identification and chromosomal localization of the human gene. *FEBS Letters*. 23: 227-232, 1988.
30. MOSSELMAN S, HOPPENER JWM, LIPS CJM, JANSZ HS. The complete islet amyloid polypeptide precursor is encoded by two exons. *FEBS Letters*, 247: 154-158, 1989.
31. ROBERTS A, LEIGHTON B, TODD JA, COCKBURN D, SCHOFIELD PN, SUTTON R, HOLT S, BOYD Y, DAY AJ, FOOT EA, WILLIS AC, REID KBM, COOPER GJS. Molecular and functional characterization of amylin, a peptide associated with type 2 diabetes mellitus. *Proceedings of The National Academy of Sciences of United States of America*, 86: 9662-9666, 1989.

32. JOHNSON KH, O'BRIEN TD, BETSHOLTZ C, WESTERMARK P. Islet amyloid, islet amyloid polypeptide, and diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, 321: 513-518, 1989.
33. WESTERMARK P, ENGSTROM U, JOHNSON KH, WESTERMARK GT, BETSHOLTZ C. Islet amyloid polypeptide: Pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 87: 5036-5040, 1990.
34. WIMALAWANSA SJ. Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: A peptide superfamily. *Critical Reviews in Neurobiology*, 11: 167-239, 1997.
35. YOUNG A. Tissue expression and secretion of amylin. *Advances in Pharmacology*, 52: 19-45, 2005.
36. LEFFERT JD, CHICK WL, LUSKEY KL. Islet specific expression of rat amylin. *Clinical Research*, 37: 571, 1989.
37. DEVROEDE M, FORIERS A, VAN DEWINKEL M, MADSEN O, PIPELEERS D. Presence of islet amyloid polypeptide in rat islet B and D cells determines parallelism and dissociation between rat pancreatic islet amyloid polypeptide and insulin content. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 182: 886-893, 1992.
38. LUKINIUS A, KORSGREN O, GRIMELIUS L, WILANDER E. Expression of islet amyloid polypeptide in fetal and adult porcine and human pancreatic islet cells. *Endocrinology*, 137: 5319-5325, 1996.
39. MULDER H, LINDH AC, EKBLAD E, WESTERMARK P, SUNDLER F. Islet amyloid polypeptide is expressed in endocrine cells of the gastric mucosa in the rat and mouse. *Gastroenterology*, 107: 712-719, 1994.
40. D'ESTE L, WIMALAWANSA SJ, RENDA TG. Amylin-immunoreactivity is costored in a serotonin cell subpopulation of the vertebrate stomach and duodenum. *Archives of Histology and Cytology*, 58: 537-547, 1995.
41. NICHOLL CG, BHATAVDEKAR JM, MAK J, GIRGIS SI, LEGON S. Extrapancreatic expression of the rat islet amyloid polypeptide (amylin) gene. *Journal of Molecular Endocrinology*, 9: 157-163, 1992.
42. MULDER H, EKELUND M, EKBLAD E, SUNDLER F. Islet amyloid polypeptide in the gut and pancreas: Localization, ontogeny and gut motility effects. *Peptides*, 18: 771-783, 1997.
43. D'ESTE L, BUFFA R, PELAGI M, SICCARDI AC, RENDA T. Immunohistochemical localization of chromogranin A and B in the endocrine cells of the alimentary tract of the green frog, *Rana esculenta*. *Cell and Tissue Research*, 277: 341-349, 1994.
44. MULDER H, LECKSTROM A, UDDMAN R, EKBLAD E, WESTERMARK P, SUNDLER F. Islet amyloid polypeptide (amylin) is expressed in sensory neurons. *The Journal of Neuroscience*, 15: 7625-7632, 1995.
45. DILTS RP, PHELPS J, KODA J, BEAUMONT K. Comparative distribution of amylin and calcitonin gene related peptide (CGRP): immunoreactivities in the adult rat brain. *Society for Neuroscience*, 21: 1116, 1995.
46. SKOFITSCH G, WIMALAWANSA SJ, JACOBOWITZ DM, GUBISCH, W. Comparative immunohistochemical distribution of amylin-like and calcitonin gene related peptide like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 73: 945-956, 1995.

47. GILBEY SG, GHATEI MA, BRETHERTON-WATT D, ZAIDI M, JONES PM, PERERA T, BEACHAM J, GIRGIS S, BLOOM SR. Islet amyloid polypeptide: Production by an osteoblast cell line and possible role as a paracrine regulator of osteoclast function in man. *Clinical Science*, 81: 803-808, 1991.
48. CHOU J, BUTLER PC, WANG YN, BU BH, CHANG D, CARTER B, RIZZA R, CHANG JK. Co-secretion of amylin and insulin in the rat. *Diabetes*, 39: 133, 1990.
49. HAMMONDS P, PALMIERI L, TROGE J, MERTZ R. Co-ordinate regulation of insulin and amylin secretion from rat islets of Langerhans and HIT-T15 b-cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 15: 66, 1991.
50. KORANYI L, BOUREY R, TURK J, MUECKLER M, PERMUTT MA. Differential expression of rat pancreatic islet beta-cell glucose transporter (GLUT 2), proinsulin and islet amyloid polypeptide genes after prolonged fasting, insulin-induced hypoglycaemia and dexamethasone treatment. *Diabetologia*, 35: 1125-1132, 1992.
51. MULDER H, AHREN B, SUNDLER F. Islet amyloid polypeptide and insulin gene expression are regulated in parallel by glucose *in vivo* in rats. *The American Journal of Physiology*, 271: 1008-1014, 1996.
52. SHIOMI K, NAKAZATO M, MIYAZATO M, KANGAWA K, MATSUO H, MATSUKURA S. Establishment of hypersensitive radioimmunoassay for islet amyloid polypeptide using antiserum specific for its N-terminal region. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 186: 1065-1073, 1992.
53. KODA JE, FINEMAN MS, KOLTERMAN OG, CARO JF. 24 hour plasma amylin profiles are elevated in IGT subjects vs. normal controls. *Diabetes*, 44: 238, 1995.
54. HIRAMATSU S, INOUE K, SAKO Y, UMEDA F, NAWATA H. Insulin treatment improves relative hypersecretion of amylin to insulin in rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus induced by neonatal streptozocin injection. *Metabolism*, 43: 766-770, 1994.
55. LUDVIK B, NOLAN JJ, THOMASETH K, PACINI G, CLODI M, PRAGER R. Direct assessment of secretion, kinetics and clearance of beta-cell peptides during hepatic vein catheterization. *Diabetes*, 45: 253, 1996.
56. VAN ROSSUM D, MENARD DP, FOURNIER A, ST PIERRE S, QUIRION R. Autoradiographic distribution and receptor binding profile of [I-125]Bolton Hunter-rat amylin binding sites in the rat brain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 270: 779-787, 1994.
57. BEAUMONT K, KENNEY MA, YOUNG AA, RINK TJ. High affinity amylin binding sites in rat brain. *Molecular Pharmacology*, 44: 493-497, 1993.
58. COOPER ME, WOOKEY PJ. Amylin-its role in kidney. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 12: 8-10, 1997.
59. SEXTON PM, MCKENZIE JS, MENDELSON FAO. Evidence for a new subclass of calcitonin/calcitonin gene-related peptide binding site in rat brain. *Neurochemistry International*, 12: 323-335, 1988.
60. SEXTON PM, PAXINOS G, KENNEY MA, WOOKEY PJ, BEAUMONT K. *In vitro* autoradiographic localization of amylin binding sites in rat brain. *Neuroscience*, 62: 553-567, 1994.
61. CHRISTOPOULOS G, PAXINOS G, HUANG XF, BEAUMONT K, TOGA AW, SEXTON PM. Comparative distribution of receptors for amylin and the related peptides calcitonin gene related peptide and calcitonin in rat and monkey brain. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 73: 1037-1041, 1995.

62. ZIMMERMANN U, FLUEHMANN B, BORNW, FISCHER JA, MUFF R. Coexistence of novel amylin-binding sites with calcitonin receptors in human breast carcinoma MCF-7 cells. *The Journal of Endocrinology*, 155: 423-431, 1997.
63. PERRY KJ, QUIZA M, MYERS DE, MORFIS M, CHRISTOPOULOS G, SEXTON PM. Characterization of amylin and calcitonin receptor binding in the mouse alpha-thyroidstimulating hormone thyrotroph cell line. *Endocrinology*, 138: 3486-3496, 1997.
64. BEAUMONT K, PITTNER RA, HERICH J, ALBRANDT K, MOORE CX. Coupling of two cloned rat calcitonin receptor isoforms to adenyl cyclase and phospholipase C. Program and Abstracts, Endocrine Society 76th Annual Meeting, June 15-18, Anaheim, CA 424, 1994.
65. NJUKI F, NICHOLL CG, HOWARD A, MAK JCW, BARNES PJ, GIRGIS SI, LEGON S. A new calcitonin-receptor-like sequence in rat pulmonary blood vessels. *Clinical Science*, 85: 385-388, 1993.
66. MCLATCHIE LM, FRASER NJ, MAIN MJ, WISE A, BROWN J, THOMPSON N, SOLARI R, LEE MG, FOORD SM. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*, 393: 333-339, 1998.
67. CHRISTOPOULOS G, PERRY KJ, MORFIS M, TILAKARATNE N, GAO Y, FRASER NJ, MAIN MJ, FOORD SM, SEXTON P. Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product. *Molecular Pharmacology*, 56: 235-242, 1999.
68. TILAKARATNE N, CHRISTOPOULOS G, ZUMPE ET, FOORD SM, SEXTON PM. Amylin receptor phenotypes derived from human calcitonin receptor/RAMP coexpression exhibit pharmacological differences dependent on receptor isoform and host cell environment. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 294: 61-72, 2000.
69. MUFF R, BUHLMANN N, FISCHER JA, BORN W. An amylin receptor is revealed following co-transfection of a calcitonin receptor with receptor activity modifying proteins-1 or -3. *Endocrinology*, 140: 2924–2927, 1999.
70. OLIVER KR, KANE SA, SALVATORE CA, MALLEE JJ, KINSEY AM, KOBLAN KS, KEYVAN-FOULADI N, HEAVENS RP, WAINWRIGHT A, JACOBSON M, DICKERSON IM, HILL RG. Cloning, characterization and central nervous system distribution of receptor activity modifying proteins in the rat. *The European Journal of Neuroscience*, 14: 618–628, 2001.
71. GOLDRING SR, GORN AH, YAMIN M, KRANE SM, WANG JT. Characterization of the structural and functional properties of cloned calcitonin receptor cDNAs. *Hormon and Metabolic Research*, 25: 477–480, 1993.
72. ALBRANDT K, BRADY EM, MOORE CX, MULL E, SIERZEGA ME, BEAUMONT K. Molecular cloning and functional expression of a third isoform of the human calcitonin receptor and partial characterization of the calcitonin receptor gene. *Endocrinology*, 136: 5377-5384, 1995.
73. HAY DL, CHRISTOPOULOS G, CHRISTOPOULOS A, SEXTON PM. Amylin receptors: Molecular composition and pharmacology. *Biochemical Society Transactions*, 32: 865-867, 2004.
74. BARTH SW, RIEDIGER T, LUTZ TA, RECHKEMMER G. Peripheral amylin activates circumventricular organs expressing calcitonin receptor a/b subtypes and receptor-activity modifying proteins in the rat. *Brain Research*, 997: 97-102, 2004.
75. CHANCE WT, BALASUBRAMANIAM A, ZHANG FS, WIMALAWANSA SJ, FISCHER JE. Anorexia following the intrahypothalamic administration of amylin. *Brain Research*, 539: 352-354, 1991.

76. MORLEY JE, FLOOD JF. Amylin decreases food intake in mice. *Peptides*, 12: 865-869, 1991.
77. WATKINS J, BHAVSAR S, YOUNG AA. Effect of amylin to inhibit food intake in rats can be blocked with the selective amylin receptor antagonist, AC187. In Program and Abstracts, 10th International Congress of Endocrinology, page 419, 1996.
78. CHANCE WT, BALASUBRAMANIAM A, STALLION A, FISCHER JE. Anorexia following the systemic injection of amylin. *Brain Research*, 607: 185-188, 1993.
79. REIDELBERGER RD, ARNELO U, GRANQVIST L, PERMERT J. Comparative effects of amylin and cholecystokinin on food intake and gastric emptying in rats. *American Journal of Physiology, Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 280: 605-611, 2001.
80. BHAVSAR S, WATKINS J, YOUNG A. Comparison of central and peripheral administration of amylin on reduction of food intake in rats. *Diabetologia*, 40: 302, 1997.
81. BHAVSAR S, WATKINS J, YOUNG A. The effect of amylin on food intake appears to be centrally mediated in rats. *Diabetes*, 40: 254, 1997.
82. REIDELBERGER RD, KELSEY L, HEIMANN D. Effects of amylin-related peptides on food intake, meal patterns, and gastric emptying in rats. *American Journal of Physiology, Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 282: 1395-1404, 2002.
83. WIELINGA PY, ALDER B, LUTZ TA. The acute effect of amylin and salmon calcitonin on energy expenditure. *Physiology and Behavior*, 91: 212-217, 2007
84. CHANCE WT, BALASUBRAMANIAM A, CHEN X, FISCHER JE. Tests of adipsia and conditioned taste a version following the intrahypothalamic injection of amylin. *Peptides*, 13: 961-964, 1992.
85. LUTZ TA, ROSSI R, ALTHAUS J, DEL PRETE E, SCHARRER E. Amylin reduces food intake more potently than calcitonin gene-related peptide (CGRP) when injected into the lateral brain ventricle in rats. *Peptides*, 19: 1533-1540, 1998.
86. MORLEY JE, MORLEY PM, FLOOD JF. Anorectic effects of amylin in rats over the life span. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 44: 577-580, 1993.
87. BHAVSAR S, WATKINS J, YOUNG A. Synergy between amylin and cholecystokinin for inhibition of food intake in mice. *Physiology and Behaviour*, 64: 557-561, 1998.
88. WREN AM, SMALL CJ, WARD HL, MURPHY KG, DAKIN CL, TAHERI S, KENNEDY AR, ROBERTS GH, MORGAN DG, GHATEI MA, BLOOM SR. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*, 141: 4325-4328, 2000.
89. TSCHOP M, SMILEY DL, HEIMAN ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 407: 908-913, 2000.
90. YOUNG AA, SMITH P, GEDULIN G, BARON A, GEDULIN BR. Amylin inhibition of ghrelin secretion depends upon an intact *area postrema*. *Diabetologia*, 47: 237, 2004.
91. RIEDIGER T, RAUCH M, SCHMID HA. Actions of amylin on *subfornical* organ neurons and on drinking behavior in rats. *The American Journal of Physiology*, 276: 514-521, 1999.
92. ASARIAN L, ECKEL LA, GEARY N. Behaviorally specific inhibition of sham feeding by amylin. *Peptides*, 19: 1711-1718, 1998.

93. BALDO BA, KELLEY AE. Effects of insulin or amylin infusion into the *nucleus accumbens* shell on unconditioned exploratory and ingestive behaviors. The Society for Neuroscience, 25: 2141, 1999.
94. DEL PRETE E, SCHADE B, RIEDIGER T, LUTZ TA, SCHARRER E. Effects of amylin and salmon calcitonin on feeding and drinking behavior in pygmy goats. Physiology and Behaviour, 75: 593-599, 2002.
95. MORLEY JE, FARR SA, FLOOD JF. Peripherally administered calcitonin gene related peptide decreases food intake in mice. Peptides, 17: 511-516, 1996.
96. YOUNG AA, GEDULIN BR, RINK TJ. Dose-responses for the slowing of gastric emptying in a rodent model by glucagon like peptide (7-36) NH₂, amylin, cholecystokinin, and other possible regulators of nutrient uptake. Metabolism, 45: 1-3, 1996.
97. GREEN GM, GUAN D, SCHWARTZ JG, PHILLIPS WT. Accelerated gastric emptying of glucose in Zucker type 2 diabetic rats: Role in postprandial hyperglycaemia. Diabetologia, 40: 136-142, 1997.
98. GUYTON AC, HALL JE. Digestion and absorption in the gastrointestinal tract. 9th edition, W.B. Saunders, Philadelphia page 833-844, 1996.
99. YOUNG A, GEDULIN B, SRIVASTAVA V, JODKA C, NIKOULINA S. Peptide YY[3-36] inhibits gastric emptying via a neuroendocrine pathway that includes the *area postrema*. Diabetes, 51: 405, 2002.
100. BURCKHARDT B, DELCO F, ENSINCK JW, MEIER R, BAUERFEIND P, AUFDERHAAR U, KETTERER S, GYR K, BEGLINGER C. Cholecystokinin is a physiological regulator of gastric acid secretion in man. European Journal of Clinical Investigation, 24: 370-376, 1994.
101. SCHJOLDAGER BT, MORTENSEN PE, CHRISTIANSEN J, ORSKOV C, HOLST JJ. 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: 703-708, 1989.
102. GUO YS, SINGH P, GOMEZ G, GREELEY GH JR, THOMPSON JC. Effect of peptide YY on cephalic, gastric, and intestinal phases of gastric acid secretion and on the release of gastrointestinal hormones. Gastroenterology, 92: 1202-1208, 1987.
103. GUIDOBONO F, COLUZZI M, PAGANI F, PECILE A, NETTI C. Amylin given by central and peripheral routes inhibits gastric acid secretion. Peptides, 15: 699-702, 1994.
104. YOUNG A. Effects on digestive secretions. Advances in Pharmacology, 52: 123-150, 2005.
105. GEDULIN BR, JODKA C, LAWLER R, HOYT JA, YOUNG AA. Amylin inhibits lipase and amylase secretion from the exocrine pancreas in rats. Diabetes, 47: 280, 1998.
106. WARZECHA Z, DEMBINSKI A, CERANOWICZ P, KONTUREK PC, STACHURA J, KONTUREK SJ, And NIEMIEC J. Protective effect of calcitonin gene-related peptide against caerulein-induced pancreatitis in rats. Journal of Physiology and Pharmacology, 48: 775-787, 1997.

107. BIGNON E, ALONSO R, ARNONE M, BOIGEGRAIN R, BRODIN R, GUEUDET C, HEAULME M, KEANE P, LANDI M, MOLIMARD JC, OLLIERO D, PONCELET M, SEBAN E, SIMIAND J, SOUBRIE P, PASCAL M, MAFFRAND JP, LE FUR G. SR146131: A new potent, orally active, and selective nonpeptide cholecystokinin subtype 1 receptor agonist. II. *In vivo* pharmacological characterization. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289: 752-761, 1999.
108. GUIDOBONO F, PAGANI F, TICOZZI C, SIBILIA V, PECILE A, NETTI C. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. *British Journal of Pharmacology*, 120: 581-586, 1997.
109. SILVESTRE RA, RODRIGUEZ-GALLARDO J, JODKA C, PARKES DG, PITTLNER RA, YOUNG AA, MARCO J. Selective amylin inhibition of the glucagon response to arginine is extrinsic to the pancreas. *The American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 280: 443-449, 2001.
110. FINEMAN MS, WEYER C, MAGGS DG, STROBEL S, KOLTERMAN OG. The human amylin analog, pramlintide, reduces postprandial hyperglucagonemia in patients with type 2 diabetes mellitus. *Hormone and Metabolic Research*, 34: 504-508, 2002.
111. MARTIN C. The physiology of amylin and insulin: maintaining the balance between glucose secretion and glucose uptake. *The Diabetes Educator*, 32: 101-104, 2006.
112. KRUGER DF, GATCOMB PM, OWEN SK. Clinical implication of amylin and amylin deficiency. *The Diabetes Educator*, 25: 389-398, 1999.
113. DATTA HK, ZAIDI M, WIMALAWANSA SJ, GHATEI MA, BEACHAM JL, BLOOM SR, MACINTYRE I. *In vivo* and *in vitro* effects of amylin and amylin-amide on calcium metabolism in the rat and rabbit. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 162: 876-881, 1989.
114. YOUNG AA, RINK TJ, WANG MW. Dose response characteristics for the hyperglycemic, hyperlactemic, hypotensive and hypocalcemic actions of amylin and calcitonin gene-related peptide-I (CGRP-alpha) in the fasted, anaesthetized rat. *Life Sciences*, 52: 1717-1726, 1993.
115. ZAIDI M, SHANKAR VS, HUANG CLH, PAZIANAS M, BLOOM SR. Amylin in bone conservation-current evidence and hypothetical considerations. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 4: 255-259, 1993.
116. MACINTYRE I. The calcitonin peptide family: Relationship and mode of action. *Bone and Mineral*, 16: 160-161, 1992.
117. TAMURA T, OWAN I, MIYAURA C, AKATSU T, SUDA T. The mechanism of action of amylin on osteoclasts and osteoblasts. *Calcified Tissue International*, 50: 42, 1992.
118. MACINTYRE I. Treatment of bone disorders. *Amylin Pharmaceuticals*, 405: 831, 1995.
119. ZAIDI M, MOONGA BS, GHATEI MA, GILBEY S, WIMALAWANSA SJ, BLOOM SR, MACINTYRE I, DATTA HK. Amylin: A new bone-conserving hormone from the pancreas: *In vivo* and *in vitro* studies on potency and mode of action. *Journal of Bone and Mineral Research*, 5: 76, 1990.
120. ALAM ASM, MOONGA BS, BEVIS PJR, HUANG CLH, ZAIDI M. Amylin inhibits bone resorption by a direct effect on the motility of rat osteoclasts. *Experimental Physiology*, 78, 183-196, 1993.

121. MILES PDG, DEFTOS LJ, MOOSSA AR, OLEFSKY JM. Islet amyloid polypeptide (amylin) increases the renal excretion of calcium in the conscious dog. *Calcified Tissue International*, 55: 269-273, 1994.
122. CORNISH J, CALLON KE, BAVA U, KAMONA SA, COOPER GJ, REID IR. Effects of calcitonin, amylin, and calcitonin gene-related peptide on osteoclast development. *Bone*, 29: 162-168, 2001.
123. CORNISH J, NAOT D. Amylin and adrenomedullin: novel regulators of bone growth. *Current Pharmaceutical Design*, 8: 2009-2021, 2002.
124. BRUNETTI L, RECINELLA L, ORLANDO G, MICHELOTTO B, DI NISIO C, VACCA M. Effects of ghrelin and amylin on dopamine, norepinephrine and serotonin release in the hypothalamus. *European Journal of Pharmacology*, 454: 189-192, 2002.
125. ROTH J, HUGHES H, ANDERSON C. Amylin-induced changes in body weight and body composition in high-fat fed female rats: Effects of prior or concurrent food restriction. *Obesity Research*, 12: 109-110, 2004.
126. CHANCE WT, BALASUBRAMANIAM A, ZHANG FS, FISCHER JE. Hyperthermia following the intrahypothalamic administration of amylin. *Surgical Forum* 42: 84-86, 1991.
127. NUTTALL A, BRYAN GL, MOYSES C. Administration of human amylin increases plasma renin activity and plasma aldosterone in man. *American Journal of Hypertension*, 8: 108, 1995.
128. HARRIS PJ, COOPER ME, HIRANYACHATTADA S, BERKA JL, KELLY DJ, NOBES M, WOOKEY PJ. Amylin stimulates proximal tubular sodium transport and cell proliferation in the rat kidney. *The American Journal of Physiology*, 41: 13-21, 1997.
129. VINE W, SMITH P, LACHAPPELL R, BLASE E, YOUNG A. Effects of rat amylin on renal function in the rat. *Hormon and Metabolic Research*, 30: 518-522, 1998.
130. CLEMENTI G, CARUSO A, CUTULI VMC, PRATO A, DEBERNARDIS E, FIORE C E, AMICOROXAS M. Anti-inflammatory activity of amylin and CGRP in different experimental models of inflammation. *Life Science*, 57: 193-197, 1995.
131. YOUNG A, Central nervous system and other effects. *Advances in Pharmacology*, 52: 281-288, 2005.
132. DEFTOS LJ. Calcitonin. Editor: Favus MJ. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. American Society for Bone and Mineral Research, 2nd Edition, Raven Press, New York, NY, U.S.A., page 70-76, 1993.
133. KRONENBERG HM. Parathyroid hormone: mechanism of action. Editor: Favus MJ. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, American Society for Bone and Mineral Research, 2nd Raven Press, New York, NY, U.S.A. Edition, page. 58-60, 1993.
134. TALMAGE RV, TALMAGE DW. Calcium homeostasis: solving the solubility problem. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 6: 402-407, 2007.
135. BURCH WM. Calcitonin stimulates growth and maturation of embryonic chick pelvic cartilage *in vitro*. *Endocrinology*, 114: 1196-1202, 1984.
136. BURCH WM, LEOVITZ HE. Parathyroid hormone stimulates growth of embryonic chick pelvic cartilage *in vitro*. *Calcified Tissue International*, 35: 526-532, 1983.

137. CHIN JE, SCHALK EM, KEMICK MLS, WUTHIER RE. Effect of synthetic human parathyroid hormone on the levels of alkaline phosphatase activity and formation of alkaline phosphatase-rich matrix vesicles by primary cultures of chicken epiphyseal growth plate chondrocytes. *Bone and Mineral*, 1: 421-436, 1986.
138. MEDILL NJ, PRAUL CA, FORD BC, LEACH RM. Parathyroid hormone-related peptide expression in the epiphysial growth plate of the juvenile chicken: Evidence for the origin of the parathyroid hormone-related peptide found in the epiphyseal growth plate. *Journal of Cellular Biochemistry*, 80: 504-511, 2001.
139. KANEKO JJ, HARVEY JW, BRUSS ML. Clinical biochemistry of domestic animals, 5th Edition, Academic Press, California, page 634-639, 1997.
140. BURTIS CA, ASHWOOD ER. Tietz textbook of clinical chemistry, 3th Edition, WB Saunders, Philadelphia, page 1423-1427, 1999.
141. KESTIN, SC, SU G, SORENSEN P. Different commercial broiler crosses have different susceptibilities to leg weakness. *Poultry Science*, 78: 1085-1090, 1999.
142. REITER K, KUTRITZ B. Behavioral patterns and leg weakness among four breeds of broiler chicks. *Archiv fur Geflugelkunde*, 65: 137-141, 2001.
143. HALL LE, SHIRLEY RB, BAKALLI RI, AGGREY SE, PESTI GM, EDWARDS HM. Power of two methods for the estimation of bone ash of broilers. *Poultry Science*, 82: 414-418, 2003.
144. MERT N. Veteriner klinik biyokimya, Ceylan Matbaacılık, Bursa, sayfa 135-136, 1997.
145. SPSS® 11.5 Computer Software SPSS Inc, Headquarters, 233 s., Wacker Drive, Chicago, Illinois 60606, USA, 2000.
146. ALEVIZAKI M, GRIGORAKIS SI, TSELENI-BALAFOUTA S, ALEVIZAKI CC, PHILIPPOU G, ANASTASIOU E, SOUVATZOGLO A. High plasma amylin/islet amyloid polypeptide levels in patients with residual medullary thyroid carcinoma after total thyroidectomy. *European Journal of Endocrinology*, 145: 585-589, 2001.
147. VINE W, BLASE E, KODA J, YOUNG A. Plasma amylin concentrations in fasted and fed rats quantified by a monoclonal immunoenzymometric assay. *Hormone and Metabolic Research*, 30: 581-585, 1998.
148. MIN SH, FARR VC, LEE J, PROSSER CG, COOPER GJS, DAVIS SR. Metabolic effects of amylin in lactating goats. *Journal of Animal Science*, 77: 1241-1248, 1999.
149. EREN M, UYANIK F, KUÇUKERSAN S. The influence of dietary boron supplementation on egg quality and serum calcium, inorganic phosphorus, magnesium levels and alkaline phosphatase activity in laying hens. *Research in Veterinary Science*, 76: 203-210, 2004.
150. USAYRAN N, FARRAN MT, AWADALLAH HHO, AL-HAWI IR, ASMAR RJ, ASHKARIAN VM. Effects of added dietary fat and phosphorus on the performance and egg quality of laying hens subjected to a constant high environmental temperature. *Poultry Science*, 80: 1695-1701, 2001.
151. MITCHELL RD, EDWARDS HM JR., MCDANIEL GR. The effects of ultraviolet light and cholecalciferol and its metabolites on the development of leg abnormalities in chickens genetically selected for a high and low incidence of tibial dyschondroplasia. *Poultry Science*, 76: 346-354, 1997.

152. FURNSINN C, NOWOTNY P, RODEN M, ROHAE M, PIEBER T, PARZER S, WAIDHÄUSL W. Insulin resistance caused by amylin in conscious rats independent of induced hypocalcaemia and fades during long term exposure. *Acta Endocrinologica*, 129: 360-365, 1993.
153. BLAKELY P, VAUGHN DA, FANESTIL DD. Amylin, calcitonin gene related peptide, and adrenomedullin: Effects on thiazide receptor and calcium. *The American Journal Physiology*, 272: 410-415, 1997.
154. KLANDORF H, BOYCE CS, HOLT SB, IQBAL M, KILLEFER J, PETERSON RA, DEEVER DR. Effect of thyroid hormone on concentrations of plasma calcitonin in broiler chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 122: 55-60, 1999.
155. BURTIS WJ. Parathyroid hormone related protein: Structure, function and measurement. *Clinical Chemistry*, 38: 2171-2183, 1992.
156. GRONE A, WECKMANN MT, BLOMME EAG, CAPEN CC, ROSOL TJ. Dependence of humoral hypercalcemia of malignancy on parathyroid hormone-related protein expression in the canine anal *sac apocrine* gland adenocarcinoma (CAC-8) nude mouse model. *Veteriner Pathology* 35: 344-351, 1998.
157. SEDRANI SH. Changes in serum levels of 1,25-hydroxyvitamin D, calcium and phosphorus with age and vitamin D status in chickens. *British Journal of Nutrition*, 52: 329-334, 1984.
158. YILMAZ B. Hormonlar ve üreme fizyolojisi. I. Baskı, Feryal Matbaacılık, Ankara, sayfa 136-147, 158-189, 1999.
159. ŞAHİN K, ÖNDERCI M, ŞAHİN N, BALCI TA, GÜRSU MF, JUTURU V, KÜÇÜK O. Dietary arginine silicate inositol complex improves bone mineralization in quail. *Poultry Science* 85: 486-492, 2006.
160. NEWMAN S, LEESON S. Effect of housing birds in cages or an aviary system on bone characteristics. *Poultry Science*, 77: 1492-1496, 1998.
161. NEWMAN S, LEESON S. The effect of feed deprivation and subsequent refeeding on the bone characteristics of aged hens. *Poultry Science*, 78: 1658-1663, 1999.
162. YILDIZ H, PETEK M, GÜNEŞ N, POLAT Ü. Farklı barındırma sistemlerinin tavuklarda (Tetra SL) humerus ve tibiotarsusun çeşitli parametreleri üzerine etkileri. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences*, 27: 979-982, 2003.
163. ZHANG B, COON CN. The relationship of various tibia bone measurements in hens. *Poultry Science* 76: 1698-1701, 1997.
164. HARMS RD, DOUGLAS CR, SLOAN DR. Can midnight feeding improve shell quality in layers. *Journal of Applied Poultry Research*, 5: 1-5, 1996.
165. KESHAVARZ K. Development in research. A Reminder the 2000 Cournell *Poultry Pointers*, 50: 12-14, 2000.
166. HUNTON P. Understanding the architecture of the eggshell. *World's Poultry Science Journal*, 51: 140-147, 1995
167. PARDIO VT, LANDIN LA, WALISZEWSKI KN, PEREZ-GIL F, DIAZ L, HERNANDEZ B. The effect of soybean soapstock on the quality parameters and fatty acid composition of the hen egg yolk. *Poultry Science*, 84: 148-157, 2005.
168. MASHALY MM, HENDRICKS GL, KALAMA MA, GEHAD AE, ABBAS AO, PATTERSON PH. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. *Poultry Science*, 83:889-894, 2004.

169. LIM HS, NAMKUNG H, PAIK IK. Effects of phytase supplementation on the performance, egg quality, and phosphorous excretion of laying hens fed different levels of dietary calcium and nonphytate phosphorous. *Poultry Science*, 82: 92-99, 2003.
170. ÇETİN S, GÜRCAN İS. Kahverengi ve beyaz yumurtacı hibrit tavuk yemlerine istiridye kabuğu ilavesinin yumurta kabuk kalitesine ve serum kalsiyum düzeyine etkileri. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü. Dergisi*, 46: 23-31, 2006.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, gerçekleştirilmesi ve yazımında bana yol gösteren danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Nazmiye GÜNEŞ'e, tez çalışmalarım süresince bana zaman ayırıp yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Meltem ÇETİN'e, tezimin değişik aşamalarında yardımcı olan Anabilim Dalımız öğretim üyesi Doç. Dr. Ümit POLAT'a ve çalışma arkadaşlarım Dr. Deniz DOĞRUTEKİN, Araş. Gör. Duygu UDUM'a, Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Hüseyin YILDIZ'a, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Şule GEZEN'e, U. Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Uzman Dr. Arzu YILMAZTEPE ORAL'a, Zootekni Anabilim dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Faruk BALCI'ya, U. Ü. Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Merkezi çalışanlarına, bana her zaman destek olan çok kıymetli anne ve babama, sevgili eşim Veteriner Hekim Oktay GÜZEL'e çok teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

06.07.1979 tarihinde Bursa'da doğdum. 1992 yılında Bursa Merinos İlkokulu'nda ilköğrenimimi, 1994 yılında Bursa Atatürk Lisesi'nde orta öğrenimimi ve 1997 yılında Bursa Erkek Lisesi'nde lise öğrenimimi tamamladım. Aynı yıl Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazandım ve Haziran 2002 yılında mezun oldum. Eylül 2002 yılında Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimime başladım. 2005 yılından itibaren aynı kurumda Araştırma Görevlisi kadrosunda görev yapmaktayım. Evliyim.