

**T.C  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**FRUKTOZLA METABOLİK SENDROM OLUŞTURULMUŞ  
RATLARDA SERUM VE GONADAL GHRELİN, OBESTATİN  
VE NESFATİN-1 EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Zekiye ÇATAK**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Süleyman AYDIN**

**ELAZIĞ  
2012**

## DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Nevin İLHAN

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı**

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Süleyman AYDIN

\_\_\_\_\_  
**Danışman**

**Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri**

..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_

## TEŞEKKÜR

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda; uzmanlık eğitimimde; mesleki bilgi, beceri, pratik ve teorik anlamda yetişmemi sağlayan, tez çalışmalarım sırasında benden gerekli her türlü desteği ve yardımı esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Süleyman AYDIN'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca çalışmalarım sırasında ve eğitimim süresince yardım ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim, iyi bir eğitimci ve yönetici olan Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Nevin İLHAN'a,

Anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Necip İLHAN'a, Prof. Dr. İhsan HALİFEOĞLU'na, Prof. Dr. M. Ferit GÜRSU'ya, Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ'a, Doç. Dr. Dilara KAMAN'a,

Çalışmalarım sırasında yardımını gördüğüm Yrd. Doç. Dr. İbrahim ŞAHİN'e ve Doç. Dr. Adile Ferda DAĞLI'ya, asistan arkadaşlarıma, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında görevli tüm personel arkadaşlarıma, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Biriminde (FÜDAM) tezimin deneysel çalışmalarını gerçekleştirmemde bana yardımcı olan personele, bu tez çalışmasını 1927 no'lu proje ile destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projelendirme (FÜBAP) fonuna,

Bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan ve hayatımın tüm aşamalarında olduğu gibi asistanlığım süresince de bana sevgi ve desteklerini bir an bile eksik etmeyen ve sabırlarını sunan sevgili annem, babam ve kardeşlerime,

Varlığıyla güven veren, her zaman yanımda olup bir an olsun desteğini esirgemeyen, yol arkadaşım, sevgili eşim Uz. Dr. Onur ÇATAK'a biricik oğlumuz Onur Ege'ye, küçük kızımız Asya Beren'e

Teşekkür etmekten büyük mutluluk ve onur duyarım.

Dr. Zekiye ÇATAK

## ÖZET

Metabolik sendrom (MetS) mekanizması tam olarak bilinmeyen; obezite, insülin direnci, proinflamatuvar durum ve hormonlar ile bağlantısı olan komplike bir hastalıktır. Dolayısıyla çalışmada amaçlarımız; MetS oluşturulmuş sıçanların üreme sistemi dokularında ghrelin, obestatin (OBS) ve nesfatin-1 (NES) ekspresyonlarının nasıl değiştiğini, serum değerleriyle aralarında bir ilişkinin olup olmadığını, ayrıca infertiliteyle ilişkili diğer hormonlarla da bağlantılarının olup olmadığını ortaya koymaktır. Çalışma; *Sprague Dawley* türü her iki cinsi içeren sıçanlardan gerçekleştirildi. MetS grubu sıçanlar (standart sıçan yemi + içme sularına %10 fruktoz) 12 hafta *ad libitum* beslendi. Kontrol sıçanları; deney süresince *ad libitum* standart sıçan yemiyle beslendi. Biyokimyasal parametreler Konelab-60 otoanalizör; infertilite hormonları Immulite-2000'le ölçüldü. Serum, doku ghrelin, OBS ve NES ELISA yöntemiyle ölçülürken, üreme sistemi dokularının peptid hormonlarının immünoreaktivitesi ABC yöntemiyle ölçüldü. MetS gruplarında açlık serum insülin, glukoz, ALT, GGT, trigliserid, LDL-K, total kolesterol düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı yüksek iken; HDL-K miktarlarının anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir. İnfertilite hormon değerlerindeki değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildi. MetS'li sıçanların serum NES değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştı. Serum OBS ve ghrelin değerlerinde düşüş gözlemlendi, fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi. MetS'li hayvanların üreme organlarının dokularında ghrelin miktarlarında da azalma tespit edilirken, NES'in aynı dokularda ekspresyonunu artmıştı. OBS'de de; seminal bez hariç azalma tespit edildi. Hormonların üreme sistemi dokularındaki ekspresyonu, immünoreaktivite şiddeti de doku hormon miktarlarıyla paralellik göstermekteydi. Yukarıdaki sonuçlara göre; MetS'le meydana gelen değişimler, üreme sistemlerini olumsuz etkilediğinden, değişen hormonların normal fizyolojik sınırlara çekilmesinin önemli olduğu, sonuçların üreme biyokimyasına ışık tutacağı görülmektedir

**Anahtar kelimeler:** Metabolik Sendrom, ghrelin, obestatin, nesfatin-1, infertilite

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF SERUM AND GONADAL GHRELIN, OBESTATIN, NESFATIN-1 EXPRESSION IN RATS WITH FRUCTOSE-INDUCED METABOLIC SYNDROME

Metabolic syndrome (MetS) is a complicated disease. The exact mechanism is not known, but has been associated with obesity, insulin resistance, proinflammatory status and hormonal level. The objective of this study is to show how ghrelin, obestatin (OBS) and nesfatin-1 (NES) expressions change in the reproductive system tissues of rats. Whether their expressions are correlated with serum values and whether they are connected to other hormones associated with infertility. The study included four groups of *Sprague Dawley* rats, male and female – controls and male and female – MetS groups. The rats in the MetS group were fed *ad libitum* (with standard rat pellets and a 10% fructose solution in their drinking water) for 12 weeks. The control rats were fed *ad libitum* with standard rat pellets over the same week period. Biochemical parameters were measured using Konelab-60 equipment and infertility hormones in Immunlight-2000. Serum and tissue ghrelin, OBS and NES values were determined by the ELISA method and the immunoreactivity of the peptide hormones of reproductive system tissues were quantified by the ABC method. Açlık serum insulin, glucose, ALT, GGT, triglyceride, LDL-C, and total cholesterol (TC) levels were found statistically significantly higher and the HDL-C amount was found significantly lower in the MetS groups. Changes in the infertility hormone values were not statistically significant. NES amounts in the serum of the rats with MetS were observed to increase significantly in comparison to those in the control group. Serum OBS and ghrelin levels were lower, but the decrease did not have a statistical significance. Amounts of ghrelin in the reproductive organ tissues of the animals with MetS were found to have decreased, while NES expression in the same tissues increased. Obestatin was also found to have decreased, but not in the seminal glands. Expression of the hormones in the reproductive tissues and the intensity of immunoreactivity were parallel to tissue hormone quantities. According to these results, it is seen that as changes brought about by MetS have a negative impact on reproductive systems, it is important to restore the altered hormones to the normal physiological limits and these results will provide insights into reproductive biochemistry.

**Key words:** Metabolic syndrome, ghrelin, obestatin, nesfatin-1, infertility

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
<b>BAŞLIK SAYFASI</b>	<b>i</b>
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
KISALTMALAR LİSTESİ	x
1.GİRİŞ	1
1.1. Metabolik Sendrom	3
1.1.1. Metabolik Sendrom Terimi ve Tarihçesi	3
1.1.2. Metabolik Sendrom Prevalansı	3
1.1.3. Metabolik Sendromun Etiyolojisi	4
1.1.4. Diyetle İndüklenerek Oluşturulan Metabolik Sendrom Modelleri	5
1.1.4.1. Fruktozla İndüklenmiş Metabolik Sendrom ve Mekanizması	6
1.1.5.1. Metabolik Sendromun Üreme Fizyolojisi Üzerine Etkileri	8
1.2. Ghrelin	9
1.2.1. Ghrelin Formları	10
1.2.2. Ghrelin Reseptörü	11
1.2.3. Ghrelin'in Biyokimyasal ve Fizyolojik Etkileri	12
1.2.3.1. İnsan Üreme Sisteminde Ghrelin Ekspresyonları	13
1.2.3.2. Hayvan Üreme Sisteminde Ghrelin Ekspresyonları	14
1.2.4. Üreme Aksı Üzerinde Ghrelin'in Rolü	16
1.3. Obestatin	17
1.3.1. Obestatin Reseptörü	18
1.3.2. Obestatinin Biyokimyasal ve Fizyolojik Etkileri	19
1.3.3. İnsan ve Hayvan Dokularında Obestatin Dağılımları	20
1.3.4. Üreme Aksı Üzerinde Obestatin'in Muhtemel Rolü	21
1.4. Nesfatin	21

1.4.1. Nesfatin Formları	22
1.4.2. Nesfatin Reseptörü	23
1.4.3. Nesfatin-1'in Biyokimyasal ve Fizyolojik Etkileri	23
1.4.4. İnsan ve Hayvan Dokularında Nesfatin-1 Dağılımları	24
1.4.5. Üreme Aksı Üzerinde Nesfatin-1'in Rolü	25
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>28</b>
2.1. Deney Hayvanları ve Diyet Protokolü	28
2.2. Sıçanlarda Metabolik Sendrom Kriterleri ve Vücut Kitle İndeksi	28
2.3. Örneklerin Hazırlanması ve Saklanması	29
2.4. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	30
2.5. Biyokimyasal Parametrelerin Analizi	30
2.6. Enzim-Bağlı İmmün Assay Yönteminin Prensipleri	33
2.6.1. Hormon analizleri	33
2.6.1.1. Ghrelin Analizleri	34
2.6.1.2. Obestatin Analizleri	40
2.6.1.3. Nesfatin-1 Analizleri	43
2.7. İmmünohistokimyasal Analizler	47
2.7.1. İmmünohistokimyasal Yöntemin İlkesi	47
2.7.2. Deneilerin Yapılışı	48
2.7.2.1. Dokuların İmmünohistokimyasal Yöntemle Boyanması	48
2.8. İstatistiksel Analizler	49
<b>3. BULGULAR</b>	<b>51</b>
3.1. Vücut Kitle İndeksi Değişimleri	51
3.2. Biyokimyasal Parametreler	53
3.3. Hormonal Parametreler	55
3.3.1. Serum Ghrelin, Obestatin ve Nesfatin-1 Düzeyleri	55
3.3.2. Doku Ghrelin, Obestatin ve Nesfatin-1 Ekspresyonları	58
3.4. İlişki Analizleri	67
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>75</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b>	<b>87</b>
<b>6. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>103</b>

## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
<b>Tablo 1.</b> Ghrelin, obestatin ve nesfatin-1'in metabolik özellikleri.	26
<b>Tablo 2.</b> Sıçan pellet yemi bileşimi.	29
<b>Tablo 3.</b> Analiz işlemlerinde kullanılan aletler ve cihazlar.	31
<b>Tablo 4.</b> Analiz işlemlerinde kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeleri.	32
<b>Tablo 5.</b> Analiz işlemlerinde kullanılan hormon kitleri.	32
<b>Tablo 6.</b> Deney sürecinde sıçanların vücut kitle indeksi değişimleri.	52
<b>Tablo 7.</b> Biyokimyasal parametrelerin serum düzeyleri.	54
<b>Tablo 8.</b> Kitlerin doku süpernatantlarındaki hormonları ölçüm karakteristikleri.	55
<b>Tablo 9.</b> Sıçanlarda; ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 düzeyleri.	56
<b>Tablo 10.</b> MetS grubu; ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 ekspresyon değişim oranları.	61
<b>Tablo 11.</b> Sıçanda; ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 ekspresyonlarının dağılımı.	66
<b>Tablo 12.</b> Ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 ekspresyonlarının immünohistokimyasal değerlendirmesi.	66
<b>Tablo 13.</b> Kontrol grubu vücut kitle indeksi pozitif ilişkileri.	67
<b>Tablo 14.</b> Kontrol grubu vücut kitle indeksi negatif ilişkileri.	68
<b>Tablo 15.</b> Kontrol grubu biyokimyasal parametrelerin pozitif ilişkileri.	69
<b>Tablo 16.</b> Kontrol grubu biyokimyasal parametrelerin negatif ilişkileri.	70
<b>Tablo 17.</b> MetS grubu vücut kitle indeksi pozitif ilişkileri.	71
<b>Tablo 18.</b> MetS grubu vücut kitle indeksi negatif ilişkileri.	72
<b>Tablo 19.</b> MetS grubu biyokimyasal parametrelerin pozitif ilişkileri.	73
<b>Tablo 20.</b> MetS grubu biyokimyasal parametrelerin negatif ilişkileri.	74

## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
<b>Şekil 1.</b> Metabolik sendrom klinik tanı kriterleri.	2
<b>Şekil 2.</b> Metabolik sendromun fizyolojik ve biyokimyasal etkileri	8
<b>Şekil 3.</b> Sıçan desaçile ghrelin amino asit dizilimi.	10
<b>Şekil 4.</b> Sıçan açillenmiş ghrelin amino asit dizilimi.	11
<b>Şekil 5.</b> İnsan ve sıçan'da ghrelin aminoasit dizilim farkları.	11
<b>Şekil 6.</b> Ghrelin'in hipotalamik-hipofizel-üreme aksına etkileri.	17
<b>Şekil 7.</b> Sıçan obestatin amino asit dizilimi.	18
<b>Şekil 8.</b> İnsan ve sıçan'da obestatin aminoasit dizilim farkları.	18
<b>Şekil 9.</b> Sıçan nesfatin-1 amino asit dizilimi.	22
<b>Şekil 10.</b> İnsan ve sıçan'da nesfatin-1 aminoasit dizilim farkları.	23
<b>Şekil 11.</b> Friedewald formülü.	32
<b>Şekil 12.</b> Oktanile ghrelin analizi için ELISA pleyti kuyucuk düzeni.	36
<b>Şekil 13.</b> Oktanile ghrelin deneyinin kısa şematik özeti.	38
<b>Şekil 14.</b> Desaçile ghrelin deneyinin kısa şematik özeti.	39
<b>Şekil 15.</b> Obestatin deneyinin kısa şematik özeti.	43
<b>Şekil 16.</b> Nesfatin-1 deneyinin kısa şematik özeti.	47
<b>Şekil 17.</b> 12. hafta sonunda erkek sıçanların örnek görünüşleri.	51
<b>Şekil 18.</b> Sıçanların diyet öncesi ve sonrası vücut kitle indeksi.	53
<b>Şekil 19.</b> Serum ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 düzeyleri.	57
<b>Şekil 20.</b> Erkek sıçanlarda doku ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 düzeyleri.	59
<b>Şekil 21.</b> Dişi sıçanlarda doku ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 düzeyleri.	60
<b>Şekil 22.</b> Seminal bezde; ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 ekspresyonlarının immünohistokimyası..	62
<b>Şekil 23.</b> Testiste; ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 ekspresyonlarının immünohistokimyası.	63
<b>Şekil 24.</b> Ovaryumda; ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 ekspresyonlarının immünohistokimyası.	64
<b>Şekil 25.</b> Uterusta; ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 ekspresyonlarının immünohistokimyası.	65

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>aa</b>	amino asit
<b>AACE</b>	<i>American Association of Clinical Endocrinology</i>
<b>ABC</b>	<i>Avidin-Biotin-peroxidase Complex</i>
<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>AChE-T</b>	<i>Acetylcholinesterase-Tracer</i>
<b>ACTH</b>	<i>Adrenocorticotropic Hormone</i>
<b>AEC</b>	<i>3-Amino-9-Ethyl Carbazole</i>
<b>AgRP</b>	<i>Agouti-Related Peptide</i>
<b>AHA/NHLBI</b>	<i>American Heart Association and the National Heart, Lung and Blood Institute</i>
<b>ALT</b>	<i>Alanine Aminotransferase (SGOT)</i>
<b>ASG</b>	Açlık Serum Glukoz
<b>ASİ</b>	Açlık Serum İnsülin
<b>AST</b>	<i>Aspartate Aminotransferase (SGPT)</i>
<b>ATP III</b>	<i>Adult Treatment Panel III</i>
<b>BAG</b>	Bozulmuş Açlık Glukozu
<b>BÇ</b>	Bel Çevresi
<b>BGT</b>	Bozulmuş Glukoz Toleransı
<b>BKO</b>	Bel Kalça Oranı
<b>BMI</b>	<i>Body Mass Index</i>
<b>BP</b>	<i>Biotinylated Peptide</i>
<b>cAMP</b>	<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
<b>CCK</b>	Kolesistokinin
<b>CL</b>	<i>Corpus Luteum</i>
<b>CV</b>	<i>Coefficient of Variation</i>
<b>DGH</b>	Desağile Ghrelin
<b>DK</b>	Dişi Kontrol
<b>DKB</b>	Diastolik Kan Basıncı
<b>DM</b>	<i>Diabetes Mellitus</i>
<b>DMetS</b>	Dişi Metabolik Sendrom
<b>DSÖ</b>	Dünya Sağlık Örgütü

<b>E<sub>2</sub></b>	Östrodiol
<b>EASD</b>	<i>European Association for the Study of Diabetes</i>
<b>EEG</b>	<i>Electroencephalograph</i>
<b>EGIR</b>	<i>European Group for the Study of Insulin Resistance</i>
<b>EIA</b>	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
<b>EK</b>	Erkek Kontrol
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
<b>EMetS</b>	Erkek Metabolik Sendrom
<b>FSH</b>	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
<b>FÜDAM</b>	Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Birimi
<b>GGT</b>	<i>Gamma Glutamyltransferase</i>
<b>GH</b>	<i>Growth Hormone</i>
<b>GHS-R</b>	<i>Growth Hormone Secretagogue Receptor</i>
<b>GLP-1R</b>	<i>Glucagon Like Peptide 1 Receptor</i>
<b>GLUT</b>	<i>Glucose Transporter</i>
<b>GnRH</b>	<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
<b>hCG</b>	<i>Human Chorionic Gonadotropin</i>
<b>HDL-K</b>	<i>High Density Lipoprotein Cholesterol</i>
<b>HIV</b>	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
<b>HOMA-IR</b>	<i>Homeostasis Model Assessment For Insulin Resistance</i>
<b>hPL</b>	<i>Human Placental Lactogen</i>
<b>HRP</b>	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
<b>IDF</b>	<i>International Diabetes Federation</i>
<b>IR</b>	Isı regülasyonu
<b>İCV</b>	İntraserebroventriküler
<b>İHK</b>	İmmünohistokimya
<b>İP3</b>	Fosfotidilinisitol-3
<b>İR</b>	İmmünoreaktivite
<b>İRS</b>	İnsülin Reseptör Substrat
<b>İV</b>	İntravenöz
<b>KAGİ</b>	Koroner Aterosklerozun Ghrelin'le İlişkisi

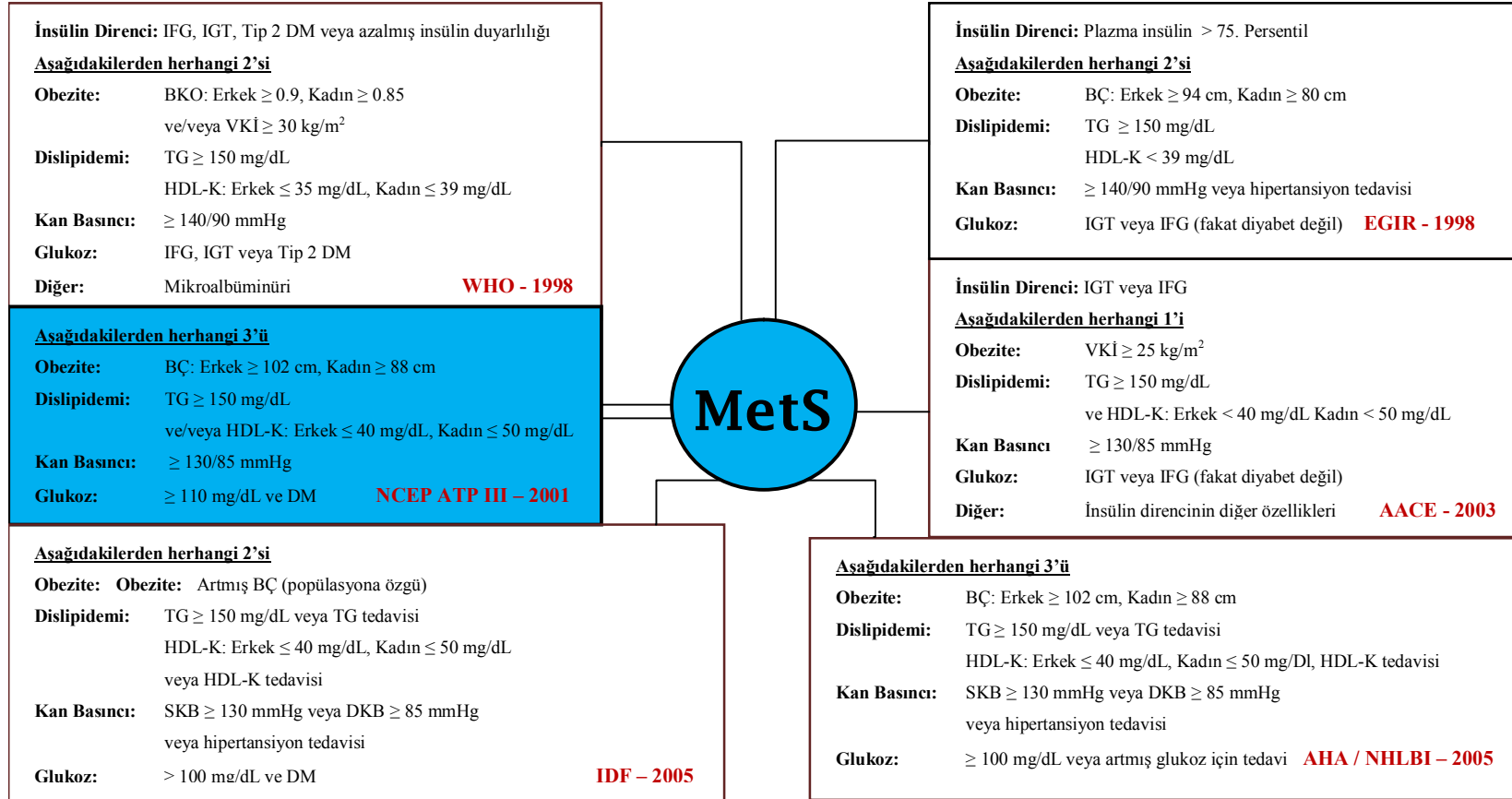
<b>KIU</b>	<i>Kallikrein Inhibitor Unit</i>
<b>KM</b>	Karbohidrat Metabolizması
<b>LDL-K</b>	<i>Low-Density Lipoprotein Cholesterol</i>
<b>LH</b>	<i>Luteinizing Hormone</i>
<b>LHA</b>	Lateral Hipotalamik Alan
<b>MetS</b>	Metabolik Sendrom
<b>METSAR</b>	Türkiye Metabolik Sendrom Sıklığı Araştırması
<b>NAFL</b>	<i>Non-Alcoholic Fatty Liver</i>
<b>NCEP ATP III</b>	<i>National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III</i>
<b>NCEP</b>	<i>National Cholesterol Education Program</i>
<b>NES</b>	Nesfatin-1
<b>NHANES III</b>	<i>National Health and Nutrition Evaluation Survey</i>
<b>NREM</b>	<i>Non-Rapid Eye Movement</i>
<b>NSB</b>	<i>Non Spesific Bindin</i>
<b>NST</b>	Nesfatin-1 Standart Tüpü
<b>NUCB2</b>	<i>Nucleobindin II</i>
<b>OBS</b>	Obestatin
<b>OGH</b>	Oktanile Ghrelin
<b>OGST</b>	Oktanile Ghrelin Standart Tüpü
<b>OPERA</b>	<i>Oulu Project Elucidating Risk of Atherosclerosis</i>
<b>OST</b>	Obestatin Standart Tüpü
<b>Ov</b>	Ovaryum
<b>P<sub>4</sub></b>	<i>Progesterone</i>
<b>PA</b>	<i>Primirary Antiserum</i>
<b>PB</b>	Psikiyatrik bozukluk
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
<b>PC</b>	<i>Positive Control</i>
<b>PCOS</b>	<i>Poly Cystic Over Syndrome</i>
<b>PLB/FB</b>	Plasental ve Fetal Büyüme
<b>PP</b>	<i>Pancreatic Polypeptide</i>
<b>PR</b>	Proliferasyon

<b>PVN</b>	Paraventriküler Nükleus
<b>QC</b>	<i>Quality Control</i>
<b>RIA</b>	Radioimmunoassay
<b>SA-HRP</b>	<i>Streptavidin-Horse Radish Peroxidase</i>
<b>SAS</b>	<i>Sleep Apnea Syndrome</i>
<b>Sb</b>	Seminal bez
<b>SD</b>	<i>Standart Deviation</i>
<b>SD-LDL</b>	<i>Small Density Low Density Lipoprotein</i>
<b>Ser</b>	Serum
<b>SHBG</b>	<i>Sex Hormone Binding Globulin</i>
<b>SKB</b>	Sistolik Kan Basıncı
<b>SON</b>	Supraoptik Nükleus
<b>SYA</b>	Serbest Yağ Asidi
<b>TEKHARF</b>	Türk Erişkinleri Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı Taraması
<b>TG</b>	Trigliserid
<b>TK</b>	<i>Total Cholesterol</i>
<b>TMB-S</b>	<i>TMB Substrate</i>
<b>TP</b>	Total Protein
<b>TSH</b>	<i>Thyroid-Stimulating Hormone</i>
<b>TT</b>	<i>Total Testosterone</i>
<b>VD</b>	Vazodilatasyon
<b>VKİ</b>	Vücut Kitle İndeksi
<b>VLDL</b>	<i>Very Low-Density Lipoprotein</i>
<b>VLDL-K</b>	<i>Very Low-Density Lipoprotein Cholesterol</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
<b>YO</b>	Yağ oksidasyonu
<b>ZI</b>	<i>Zona Incerta</i>
<b><math>\alpha</math>-MSH</b>	<i>Alfa-Melanocyte-Stimulating Hormone</i>

## 1.GİRİŞ

İnsülin direnci sendromu, sendrom X, polimetabolik sendrom, ölümcül dördlü, uygarlık sendromu gibi farklı isimlerle de ifade edilen metabolik sendrom (MetS) dünyada giderek yaygınlaşan kardiyak ve metabolik komplikasyonları ile yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan ve üreme organları dahil tüm biyolojik sistemleri etkileyen ciddi bir halk sağlığı sorunudur (1-4). Genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimine bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülen MetS, aralarında abdominal obezite, insülin direnci, glukoz intoleransı, dislipidemi, alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması [*Non-Alcoholic Fatty Liver* (NAFL)] ve hipertansiyonun yer aldığı kardiyometabolik risk belirleyicilerinin bileşiminden oluşmaktadır (1,4). Tüm bu faktörlerin bilinmesine rağmen MetS tanısında kullanılan kriterleri standardize etme çalışmaları henüz tamamlanamamıştır. Klinik uygulamada kullanılabilecek çeşitli tanı kriterleri şekil 1’de verilmiş olup 4 nolu kaynaktan değiştirilerek çizilmiştir (4). Bugün en yaygın olarak kullanılan kriter 1988 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO)’nün önerdiği kriterdir. WHO’ye göre MetS tanısı için, diyabet, bozulmuş açlık glukozu, bozulmuş glukoz toleransı veya insülin direnci ile birlikte, hipertansiyon (>130/85 mmHg), hiperlipidemi, santral obezite ve mikroalbuminüriden en az ikisinin bir arada olması zorunludur (4). Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’de ulusal kolesterol eğitim programı [*National Cholesterol Education Program* (NCEP)] uzman paneli ise, 2001 yılında yetişkinlerde yüksek kan kolesterolü tespiti, değerlendirme ve tedavisi raporunu [*Adult Treatment Panel III* (ATP III)] hazırlamış olup bu rapora göre, MetS tanısı için şekilde belirtilen kriterlerden üçünün varlığının yeterli olabileceğini bildirmiş ve bugün birçok klinik tarafından yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (4).

Metabolik düzenlemeyi detayları ile düşündüğümüzde; üreme fonksiyonunun ortaya çıkışı ve devam ettirilmesinin, uygun enerji rezervlerine bağlı olduğu ve bu karmaşık santral ve periferik sinyal ağının düzenlenmesinde, ghrelin, OBS ve NES’in önemli roller üstlenmiş olabileceği ve bu sinyal ağının da MetS’den etkileneceği kaçınılmazdır.



**Şekil 1.** Metabolik sendrom klinik tanı kriterleri.

AACE: American Association of Clinical Endocrinology. AHA/NHLBI: American Heart Association and the National Heart, Lung and Blood Institute. BÇ: Bel çevresi. BKO: Bel kalça oranı. DKB: Diyastolik kan basıncı. EGIR: European Group for the Study of Insulin Resistance. HDL-K: High density lipoprotein cholesterol. IDF: International Diabetes Foundation. IFG: Bozulmuş açlık glukozu (Impaired Fasting Glucose). IGT: Bozulmuş glukoz toleransı (Impaired Glucose Tolerance). NCEP ATP III: National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III. SKB: Sistolik kan basıncı. TG: Trigliserid. VKİ: Vücut kitle indeksi. WHO: World Health Organization..

## **1.1. Metabolik Sendrom**

### **1.1.1. Metabolik Sendrom Terimi ve Tarihçesi**

İlk kez 1923 yılında hipertansiyon, hiperglisemi ve gut hastalığının birlikteliği olarak tanımlanan MetS'in 1940'lı yılların sonunda santral obezite, diyabet, ateroskleroz ve gutla bağlantılı olduğu bildirilmiştir (5). Daha sonra Avrupa Diyabet Çalışma Birliği'nin [*European Association for the Study of Diabetes (EASD)*] 1965'teki yıllık toplantısında hipertansiyon, hiperglisemi ve obeziteden oluşan bir sendrom olduğu bildirilmiştir (6). 1970'li yıllarda ise Alman araştırmacılar ilk kez metabolik sendrom terimini kullanarak sendromun aterosklerozla ilişkisini incelemiştir. Reaven 1988 yılında hipertansiyon, glukoz toleransı, yüksek Trigliserid (TG) ve yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol'ün (HDL-K, High Density Lipoprotein Cholesterol) azalması ile oluşan bu kardiyovasküler risk faktörleri grubunu "Sendrom X" olarak tanımlamıştır (7). İnsülin direnci ve kompensatuar hiperinsülineminin, MetS'yi oluşturan kriterlerin altında yatan en önemli mekanizma olduğu ve dolayısıyla sendrom X'in kardiyovasküler hastalıklar için ciddi bir risk faktörü olduğunda bildirilmiştir (8). Tarihsel süreç boyunca dismetabolik sendrom, plurimetabolik sendrom, kardiyometabolik sendrom, dislipidemik sendrom, prediyabet, dislipidemik hipertansiyon, hipertrigliseridemik bel ve ölümcül dördü olarak da adlandırılmış olan MetS (4, 9) için aralarında hipertansiyon, dislipidemi, NAFL hastalığı, polikistik over sendromu [*Polycystic Ovary Syndrome (PCOS)*], uyku apnesi sendromu [*Sleep Apnea Syndrome (SAS)*], Alzheimer hastalığı, akciğer, prostat ve pankreas kanserlerinin de yer aldığı birçok klinik tablonun bu sendromun klinik yansımaları olduğu kabul edilmiştir (4, 10-12).

### **1.1.2. Metabolik Sendrom Prevalansı**

Metabolik sendromun tüm dünyada kabul gören tek bir tanımı olmadığından, MetS'nin yaygınlığına ilişkin veriler de farklılıklar göstermektedir. Finlandiya'da yapılan 24-39 yaş arası kişileri kapsayan bir çalışmada, İnsülin Direnci Avrupa Çalışma Grubu [*European Study Group of Insulin Resistance (EGIR)*] kriterlerine göre MetS prevalansı % 9,8 iken, Uluslararası Diyabet Federasyonu [*International Diabetes Federation (IDF)*] kriterlerine göre MetS prevalansı % 14,3 olarak

saptanmıştır (13). ABD’de 1988-1994 yılları arasında, 20 yaş üstü yetişkinlerde yapılan, Ulusal Sağlık ve Beslenme Değerlendirme Araştırması [*National Health and Nutrition Examination Survey III* (NHANES III)] çalışmasının sonuçları, Ulusal Kolesterol Eğitim Programı Erişkin Tedavi Paneli III [*National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP III)] kriterlerine göre tanımlanan MetS prevalansının % 23,9, WHO kriterlerine göre ise % 25,1 olduğunu ortaya koymuştur (14).

Ülkemizde Onat ve ark. (15) tarafından NCEP ATP-III kriterleri kullanılarak yapılan Türk Erişkinleri Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı Taraması (TEKHARF) çalışmasına göre MetS prevalansı toplumumuzda, 30 yaş ve üstü erkeklerde % 28, kadınlarda % 45 olarak tespit edilmiştir. Buna göre ülkemizde 30 yaş üzerindeki 9,1 milyon yetişkinde (5,1 milyonu kadın) MetS olduğu tahmin edilmektedir. MetS sıklığının, 1990 yılında % 24,4 iken, 2000 yılında % 36,2’ye yükseldiği görülmüştür (16). 2004 yılında yapılan diğer bir çalışma olan Türkiye Metabolik Sendrom Sıklığı Araştırması (METSAR) sonuçlarına göre, 20 yaş ve üzerindeki erişkinlerde MetS sıklığı % 35 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada MetS sıklığı kadınlarda (% 41,1) erkeklere (% 28,8) göre daha yüksek bulunmuştur (17). Sanisoglu ve arkadaşlarının 2006 yılında (18) MetS ve ilişkili bozuklukları araştırdıkları çalışmalarında, ülkemizde MetS prevalansı erkeklerde % 10, kadınlarda % 27 olarak tespit edilmiştir.

### **1.1.3. Metabolik Sendromun Etiyolojisi**

Metabolik sendromun gelişiminde en fazla suçlanan faktörler, insülin direnci ve obezitedir (2-4, 19). MetS’de görülen insülin direncinde, patoloji postreseptör düzeyde olup insülinin reseptörüne bağlanmasından sonra hücre içi yolaklardaki bozukluklara bağlı olarak gelişmektedir. Obezite, sedanter yaşam tarzı, sigara içimi, düşük doğum ağırlığı ve perinatal malnütrisyonun insülin direnci gelişimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Adipoz dokudan salgılanan hormonlar, hipotalamus-hipofiz-adrenal aks bozuklukları, aşırı yağlanma, genetik ve çevresel nedenler de insülin direnci gelişmesinde rol alan diğer faktörler arasında sayılabilir (20). MetS’yi oluşturan patolojilerden olan dislipidemi, hiperglisemi, hipertansiyon ve obezitenin temelinde insülin direncinin önemli rolü bulunmaktadır (21).

Obezite MetS'nin gelişiminde temel bileşen olarak kabul edilse de, tüm obez bireylerin bozulmuş metabolik profil ve insülin direncine sahip olmadığı gösterilmiştir (8, 10, 22). Farklı etnik gruplarda yapılan çalışmalarda insülin direnci olan bireylerde MetS'nin farklı fenotiplerde olduğunun görülmesi genetik mirasın etkisinin araştırılmasına yol açmış ve insülin direncinin sık görüldüğü bir popülasyonda yapılan çalışmada tip 2 diyabet sıklığı artmışken, hiperlipidemi ya da hipertansiyon prevalansının yüksek olmaması bu duruma örnek teşkil etmiştir (8, 10, 23). Abdominal veya visseral obezitenin hiperinsülinemi, insülin direnci, serbest yağ asidi (SYA) düzeylerinde artma, hipertansiyon, tromboza eğilim; hipertrigliseridemi, küçük yoğun LDL [*Small Density Low Density Lipoprotein* (SD-LDL)] partikülleri ve HDL-K'da azalma ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (4, 24).

#### **1.1.4. Diyetle İndüklenecek Oluşturulan Metabolik Sendrom Modelleri**

Metabolik sendrom da birçok hastalık gibi genlerin ve çevresel etmenlerin etkisi altında gelişmektedir (25, 26). Canlıların genetiği ve genetik bilginin ifadesi ile ortaya çıkan fenotipler uzun yıllar değişmediğine göre MetS'nin gelişmesinde günlük fiziksel aktivitenin azalması (dolayısı ile daha az kalori harcanması) ve yüksek fruktoz içeren gıdaların (kola gibi) daha fazla tüketilmesi çok önemli bir role sahiptir. Diyetle indüklenecek MetS oluşturma modelleri şöyledir: 1) Yüksek yağ içerikli diyet [obezite ve diyabet oluşmaktadır] (27); 2) Yüksek yağ içerikli diyet ve karbonhidrat karışımı [obezite ve insülin direnci gelişmektedir] (28); 3) Diyete % 8'lik tuz (NaCl) eklenmesi [hipertansiyon gelişmektedir] (29, 30); 4) Diyete % 60-70 sükröz eklenmesi [insülin direnci ve hipertrigliseridemi gelişmektedir] (31); 5) Diyete yüksek doymuş yağ asidi, % 1'lik kolesterol, % 0,25'lik kolik asit eklenmesi [aterosklerozis ve hiperkolesterolemi oluşmaktadır] (32); 6) Diyete % 0,1-1,25 kolesterol eklenmesi [aterosklerozis ve hiperkolesterolemi oluşmaktadır] (33); 7) Diyete yüksek doymuş yağ asidi ve % 0,05-1 kolesterol eklenmesi [aterosklerozis ve hiperkolesterolemi oluşmaktadır] (34); 8) Diyete yüksek doymuş yağ asidi ve % 0,3'lük kolesterol eklenmesi [aterosklerozis ve hiperkolesterolemi oluşmaktadır] (35); 9) Diyete, % 60-70 kaloriyi verebilecek fruktoz eklenmesi [insülin direnci ve hipertrigliseridemi gelişmektedir] (36) ve 10) Diyete % 60 fruktoz eklenmesi [hipertansiyon gelişmektedir] (37) olarak sayılabilir. Fakat bu diyet

modelleri farklı hayvan gruplarında farklı yanıtlar oluşturduğundan, hayvanın türüne göre model belirlenmelidir (25, 26). Bu çalışmada kullanılan *Sprague Dawley* türü sıçan için diyetle % 60 fruktoz eklenmesi (25, 37) veya içme sularına % 10 fruktoz eklenmesi uygundur (37). Anabilim Dalı'mızda da daha önce içme sularına % 10 fruktoz eklenerek deneysel MetS oluşturulmuştur (38-40). Fruktozla indüklenerek MetS oluşturmanın mekanizması aşağıda açıklandığı gibidir.

#### **1.1.4.1. Fruktozla İndüklenmiş Metabolik Sendrom ve Mekanizması**

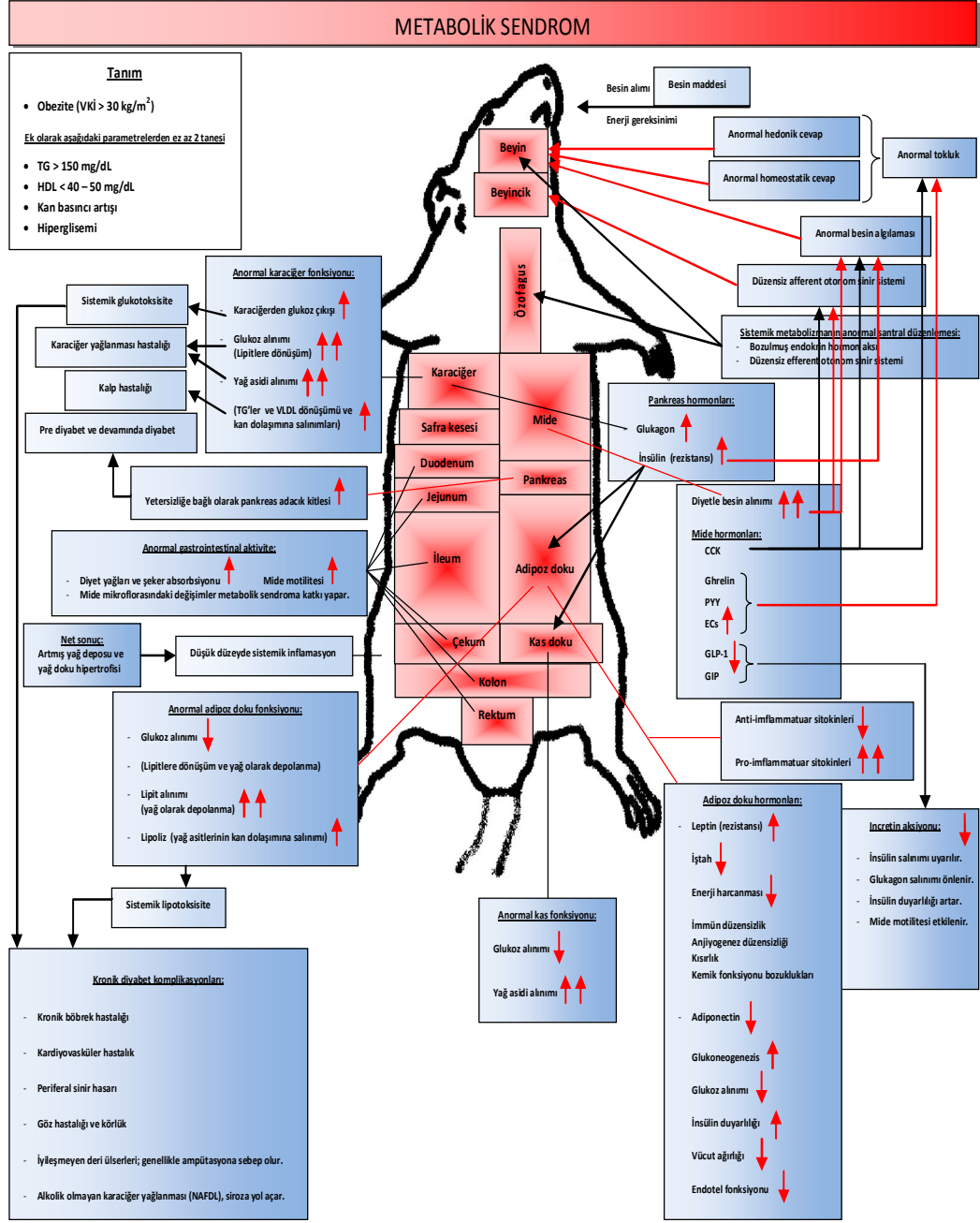
İnsanlarda; fruktoz bazlı bir yemek, glukoz bazlı bir yemekle eşdeğer tokluk seviyesine neden olmamaktadır (41). Sıçanların içeceklerine fruktoz ve glukoz katılarak verilmiş ve farklı etkiler gözlenmiş, bunun yanında fruktozun akut olarak insülin ve leptin salgılanmasının stimülasyonunda ve ghrelin salınımının inhibisyonunda yeterli olmadığı rapor edilmiştir (41). Fruktozun MetS'ye neden olan mekanizmaları şöyle sıralanabilir: 1) Fruktoz hem insanlarda (42) hem de kemirgenlerde (43) ürik asit konsantrasyonlarını artırmaktadır. Fruktoz bazlı bir öğün sonrasında ürik asit miktarı 1-4 mg/dL'ye kadar çıkabilmektedir (44). Artan ürik asit konsantrasyonları; hipertansiyon, hiperinsülinemi, insülin rezistansı ve hipertrigliseridemiye neden olmaktadır. Nakagawa ve arkadaşları ürik asit konsantrasyonları düşürüldüğünde, fruktozun indüklediği MetS kriterlerinin yani hipertansiyon, hiperinsülinemi, insülin rezistansı ve hipertrigliserideminin ortadan kalktığını rapor etmiş olup, yukarıda ileri sürülen mekanizmayı desteklemektedir (45). 2) Glukoz taşıyıcı-5 [*Glucose Transporter-5 (GLUT-5)*], aynı zamanda fruktozun da hücre içine alınmasına aracılık eder ve bu taşınım insülinin bağımsız olarak gerçekleşir. Beyin ve pankreasın  $\beta$  hücrelerinde GLUT-5 bulunmadığından fruktoz bu dokularda hücre içine alınamamaktadır. Dolayısı ile fruktozdan zengin bir diyetle beslenirken, beyinde GLUT-5 olmaması nedeni ile doyumluk hissi oluşmaz. Doyumluk hissi ortadan kalktığı için de daha fazla gıda alınımına bağlı olarak MetS gelişmektedir (46). 3) Karaciğerde fruktoz'u substrat olarak kullanan iki enzim bulunmaktadır. Bunlardan biri heksokinaz diğer ise fruktokinazdır. Heksokinazın fruktoza affinitesi glukozla olan affinitesinin yaklaşık olarak 1/20'sidir. Toklukta ya da sükröz içeren gıda maddelerinden zengin beslendikten sonra heksokinaz glukozla doyurulduğu için fruktoz fruktokinaz ile reaksiyona girer(47) ve böylece glikolizin

düzenlenmesinde en önemli basamak olan fosfofruktokinaz-1 basamağı atlanmış olur. Böylece alınan bütün fruktoz hızlı bir şekilde asetil KoA'ya metabolize edilir. Toklukta, hücre enerjiden zengin olduğu için asetil KoA TCA siklusuna girmek yerine yağ asidi sentezine kayar. Bu mekanizmayla fruktoz aynı zamanda uzun zincirli yağ asitlerine de karbon atomu sağlar. Dolayısıyla fruktoz triaçilgliserol miktarını artırarak MetS'ye neden olmaktadır (48). Fruktoz hepatosit, adiposit ve intestinal epitelyum hücreleri dahil diğer hücrelere girer, tamamı fruktokinaz tarafından ATP kullanılarak metabolize edilmektedir. Glukoz metabolizmasından farklı olarak fruktoz, ATP tüketiminde düzenleyici mekanizması olmadığından bu yolla da MetS'ye yol açmaktadır (46). 5) Fruktozun bazal metabolik hızı yavaşlatarak da MetS'ye yol açabileceği ileri sürülmüştür (49). 6) Fruktozun ince barsak ve böbreklerde NaCl emilimini arttırarak hipertansiyona neden olması MetS'ye yol açar (50).

#### **1.1.5. Metabolik Sendromun Fizyolojik ve Biyokimyasal Etkileri**

MetS, biyolojik sistemlerde üreme fonksiyonunu da kapsayan birçok biyokimyasal olayı etkilemektedir. MetS, kaslarda glukoz kullanımını azaltırken yağ asidi alımını arttırmaktadır. Karaciğerde TG miktarlarını, çok düşük yoğunluklu lipoprotein [*Very Low-Density Lipoprotein* (VLDL)] dönüşümlerini ve kan dolaşımına salınımlarını arttırmaktadır. Ayrıca yine bu dokuda glukoz salınımı artmakta ve glukozun yağ asitlerine dönüşümü hızlanmaktadır. Dolaşımda MetS'ye bağlı olarak leptin miktarları artarken adiponektin düzeyleri düşmektedir. MetS'nin neden olduğu fizyolojik ve biyokimyasal etkiler şekil 2'de verilmiştir (51). Kısaca MetS, anormal adipoz doku fonksiyonlarına, karaciğer yağlanmasına, kalp hastalıklarına, anormal gastrointestinal aktivitelere, sistemik inflamasyona, pankreas hormonlarının salınımına, mide hormonlarının aktivitelere, kronik diyabet komplikasyonları gibi birçok fizyolojik ve biyokimyasal olaylara etki etmektedir.

Şekil 2 tüm bu karmaşık olayların tamamını özetlemektedir.



**Şekil 2.** Metabolik sendromun fizyolojik ve biyokimyasal etkileri (51 nolu kaynaktan değiştirilerek çizilmiştir).

### 1.1.5.1. Metabolik Sendromun Üreme Fizyolojisi Üzerine Etkileri

Son yıllarda MetS ve testiküler fonksiyon arasındaki etkileşimin varlığına dair kanıtlar artmaktadır. MetS, özellikle obezitede total testosteron (TT) ve seks hormon bağlayıcı globulin [*Sex Hormone Binding Globulin* (SHBG)] düzeylerini azaltarak spermatogenez üzerinde olumsuz etkiler yapmakta ve hipogonadizm ile

oluşan MetS, esas patofizyolojik mekanizmalarından biri olan insülin rezistansını daha da arttırmaktadır (52, 53). Kadınlarda obezite ve *sub-fertilite* arasındaki ilişki, ovulasyon sıklığının azalması, özellikle de vücut kitle indeksinin (VKİ) [*Body Mass Index* (BMI)]  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$  olması ile yakından ilişkilidir (52). Gerçekten de bel/kalça oranında 0,1 ünitelik bir artış, siklus başına konsepsiyon oranını % 30 azaltmaktadır (53). Yukarıda belirtildiği gibi bu sendromun fizyopatolojik mekanizmaları tam olarak açıklanamamasına rağmen, biyoaktif yapıdaki peptidlerle özellikle de ghrelin, leptin ve resistin ile MetS ve testiküler disfonksiyon arasındaki ilişkiyi gösteren bazı araştırmalar mevcuttur (54). Ancak ghrelin, obestatin (OBS) ve nesfatin-1 (NES)'in hipotalamus-hipofiz ve gonadal aks üzerinde nasıl bir etkileşim içinde olduğunu gösteren bir çalışma yoktur. Bu araştırma özellikle MetS oluşturulmuş sıçanların genital sistemlerinde (seminal bez, testis, ovaryum ve uterus) ghrelin, OBS ve NES ekspresyonlarının nasıl değiştiğini ortaya koymak için planlanmıştır.

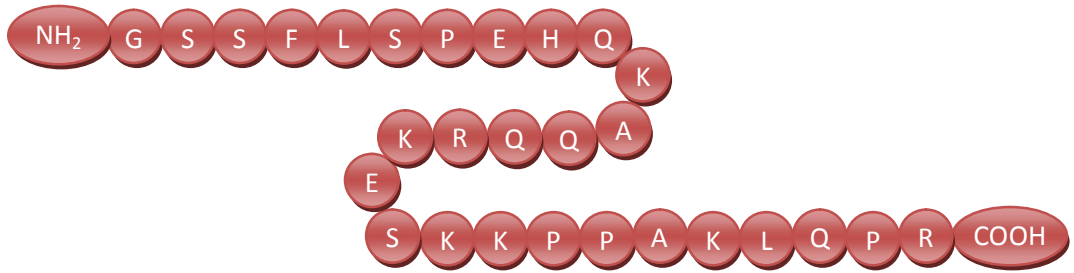
## 1.2. Ghrelin

Kojima ve arkadaşları Aralık 1999'da sıçan midesinden ghrelin adını verdikleri bir hormon izole ettiklerini dünyaya duyurdular (55). Ghrelin adı; Hint-Avrupa dilindeki büyüme manasına gelen "ghre" kelimesi ve ayrıca büyüme hormonu [*Growth Hormone* (GH)] salınımı aktivitesinden dolayı da sonuna "relin" eki eklenerek (ghre + relin = ghrelin) türetilmiştir (55). Ghrelin'in moleküler ağırlığı yaklaşık 3315 dalton ve yarılanma ömrü ise 15-20 dakikadır. Dolaşımdaki miktarlarının sıçan ve insan serumda oktanile ghrelin (OGH) (açile ghrelin: 8 karbon yağ asitli ghrelin) için 10-20 fmol/mL (32.61-65.2 pg/mL), desaçile ghrelin (DGH) için 90-130 fmol/mL (300-430 pg/mL) ve total ghrelin (8 karbonlu yağ asitli ve desaçile) için 100-150 fmol/mL (326-489 pg/mL) arasında değiştiği bildirilmiştir (56,57). Hormonun amino asit (aa) diziliminden hesaplanan moleküler ağırlığı ile jel üzerinde gözlemlenen moleküler ağırlığı birbirinden farklı bulunmuştur (56). Bu farklılığın temel nedeni; posttranslasyon modifikasyon esnasında N-terminal ucundaki üçüncü serin aa'ya bir yağ asidi eklenmesinden kaynaklanmaktadır. Bugün itibarı ile bilinen posttranslasyon modifikasyon ile yağ asidi bağlanan tek peptid yapılı hormon ghrelin'dir (56, 57).

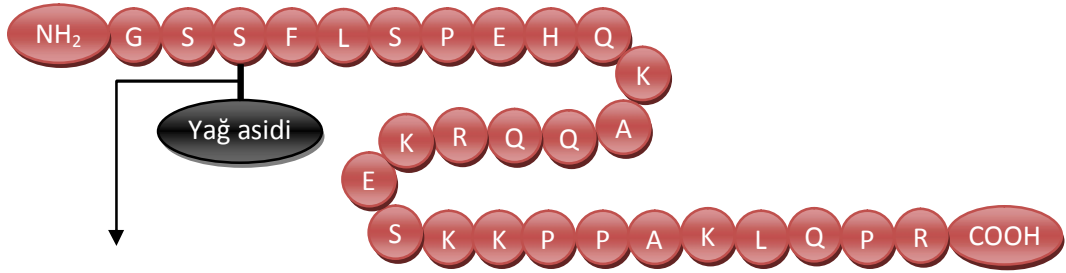
### 1.2.1. Ghrelin Formları

Preproghrelin'in (117 aa) posttraslasyonel modifikasyonu ile ghrelin (28 aa) oluşur. Lipopeptid yapıda bir hormon olan ghrelin (57), aa sekansına bir yağ asidinin bağlanmasına göre 4 farklı formda olabilir. Biyolojik sıvı ve dokularda N-terminal bölgesindeki 3. serin aa'ya bağlanan yağ asidinin tipine göre; n-oktanoil gruplu açile ghrelin (C 8:0), n-dekanoil gruplu açile ghrelin (C10:0), n-desenoil gruplu açile ghrelin (C10:1) ve yağ asidi bağlanmayan (sadece 28 aa'dan oluşan) desaçile ghrelin olarak isimlendirilir (58-60) (Şekil 3, Şekil 4).

Bugüne kadar yapılan çalışmaların hemen hepsinde oktanoil grup bağlanan OGH ve DGH veya total ghrelin miktarlarına bakılmıştır. Son zamanlarda 10 karbon bağlanan yağ asitli açile ghrelin'ler de araştırmalara dahil edilmiştir (58-60). Bu araştırma planlandığında 10 karbon bağlanan yağ asitli ghrelin'ler için herhangi bir ölçüm yöntemi yoktu. Dolayısıyla bu çalışmada n-oktanoil gruplu (C 8:0) OGH ve DGH formlarının araştırılması tez kapsamına dahil edilmiştir. Fakat artık diğer OGH'lerin de birçok hayvan türlerinde araştırılması yapılmaya başlanmıştır (örneğin teleos balığı). On karbonlu yağ asidi bağlı ghrelin'lerin biyolojik ve fizyolojik fonksiyonlarının da oktanoil yağ asidi içeren ghrelin'ler ile aynı olduğu bildirilmiştir. Yani ghrelin reseptörünü [*Ghrelin Hormone Secretor Receptor 1a* (GHS-R1a)] benzer şekilde aktive ettiği rapor edilmektedir (58-61). Bundan başka 10 karbon yağ asidi bağlı ghrelin'lerin, 8 karbon yağ asidi bağlı ghrelin'ler gibi beslenmeyi stimüle ettiği ve GH'yı salgılattığı yani aynı derecede fonksiyon gördüğü bildirilmiştir (61).



**Şekil 3.** Sığan desaçile ghrelin amino asit dizilimi. A: Alanin, E: Glutamik Asit, F: Fenilalanin, G: Glisin, H: Histidin, K: Lizin, L: Lösin, P: Prolin, Q: Glutamin, R: Arjinin, S: Serin.

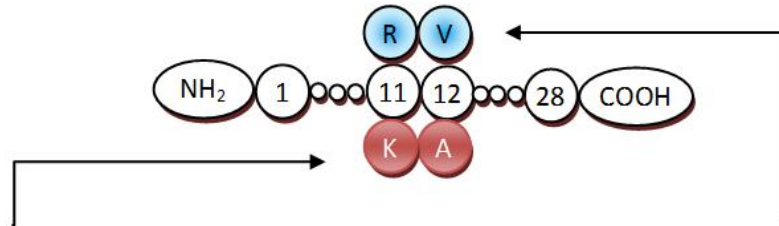


Ester bağı

**Şekil 4.** Sıçan açillenmiş ghrelin amino asit dizilimi.

Yağ asidi (8 karbonlu: n-oktanoil, 10 karbonlu: n-dekanoil, 10 karbonlu-1 çift bağı: n-desenoil). A: Alanin, E: Glutamik Asit, F: Fenilalanin, G: Glisin, H: Histidin, K: Lizin, L: Lösin, P: Prolin, Q: Glutamin, R: Arjinin, S: Serin.

Ghrelin'in 3. amino asidi olan serin kalıntısının daha uzun alifatik zincirlerle, doymamış veya dallanmış oktanoil grupları ile açilasyonu ghrelin aktivitesini değiştirmez, ancak asetil grupları gibi daha kısa hidrofobik grupların bağlanması peptidin aktivitesini azaltmaktadır (56, 61). Dolaşımında DGH açillenmiş forma göre çok daha yüksek oranlarda bulunmaktadır (57, 62-63). Ancak bu formun *in vivo* olarak sıçanlarda ve insanlarda büyüme hormonu salgılatmaya yeterli olmadığı bildirilmiştir (56, 57). Ghrelin'in yapısı özellikle de açil modifikasyon bölgeleri evrimsel süreç içerisinde vertebrata türlerinde iyi derecede korunmuştur (56). İnsan ve sıçanların ghrelin aa dizilimleri arasında % 92.86 oranında benzerlik bulunmaktadır (56) (Şekil 5).



Sıçan ghrelin amino asiti dizilim farkı.

İnsan ghrelin amino asiti dizilim farkı.

**Şekil 5.** İnsan ve sıçan'da ghrelin aminoasit dizilim farkları. A: Alanin, K: Lizin, R: Arjinin, V: Valin.

### 1.2.2. Ghrelin Reseptörü

Ghrelin hormonunun keşfedilmesinden önce, 1996 yılında reseptörü [*Growth Hormone Secretagogue Receptor* (GHS-R)] tanımlanmış ve G protein ailesine ait olduğu bildirilmiştir (64-66). Ghrelin reseptörü 3q26.2 geninde kodlanmış, 4 ekson ve 3 intron bölgeden ibarettir (65-67). GHS-R, 1a ve 1b olarak adlandırılan iki

izoformu bulunmaktadır (67). GHS-R1a, 336 aa ve 7 transmembran bölgeden oluşmaktadır. Ghrelin, GHS-R 1a tipi reseptöre bağlanır. Bu reseptör (GHS-R 1a) domuz, insan, köpek, sıçan ve farelerde % 93 ile % 99 arasında homoloji göstermektedir (67). GHS-R 1b, 289 aa, 5 transmembran bölgeden oluşmaktadır. GHS-R reseptörünün, hipotalamus, hipofiz, beyin, böbrek, pankreas, kalp, mide ve bağırsak dokularında bulunduğu gösterilmiştir (66, 67). GHS-R'nin bu kadar yaygın dağılımı ghrelin'in çok önemli biyolojik fonksiyonlar üstlendiğini göstermektedir.

### 1.2.3. Ghrelin'in Biyokimyasal ve Fizyolojik Etkileri

Ghrelin; GH'nin salınımını artırmakta, gıda alınımını stimüle etmekte ve enerjinin dengesini düzenlemektedir. Prolaktin ve adenokortikotropik hormon [*Adrenocorticotropic Hormone (ACTH)*] salınımının stimülasyonunu sağlamaktadır. Kan glukozu ve insülin sekresyonunu regüle etmektedir. Öğrenmeyi artırmakta ve hafızayı güçlendirmektedir. Kronik kalp rahatsızlığı olanlarda kardiyak performansı iyileştirmektedir (56, 57, 67).

Üreme fonksiyonu nöroendokrinale düzenlemenin kontrolü altındadır. Ghrelin laktasyon, gebelik ve reproduktif fonksiyonların düzenlenmesinde rol olmaktadır. Üreme sisteminde ghrelin ilk olarak testislerde bulunmuştur. Gonadal fonksiyonların enerji dengesini sağlayarak reproduktif fonksiyonları doğrudan etkilemektedir. Ghrelin ve reseptörünün (GHSR1a) gonadlarda sentezlenmesi gonadlar üzerinde önemli bir role sahip olduğu bildirilmiş ve yapılan araştırmalar MetS'nin ghrelin sentez miktarlarında değişikliğe yol açtığı da gösterilmiştir (63). MetS için ön koşul olan bel çevresi (BÇ) ile ghrelin miktarları arasında negatif ilişki bulunmaktadır. (68). *Oulu Project Elucidating Risk of Atherosclerosis (OPERA)* kapsamında yapılan kesitsel kohort çalışması, plazma ghrelin konsantrasyonlarının MetS'nin birkaç komponenti ve kümelenen metabolik komponentlerle ilişkili olduğunu göstermektedir (69). Diğer yandan MetS'deki düşük ghrelin düzeylerinin obezite ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (70, 71). İnsülin direnci MetS'nin altında yatan ana fizyolojik etkendir (7). İnsülin direnci ve açlık insülin konsantrasyonu ile düşük ghrelin konsantrasyonu arasında bağımsız bir ilişki vardır (72). Yapılan çalışmalarda ghrelin'in insülin karşıtı hormonlar olan GH, kortizol, epinefrin ve muhtemelen de glukagon salınımını uyardığı belirtilmektedir (73). İnsanlara akut olarak ghrelin

verilmesi plazma glukoz seviyesini arttırmakta ve insülin salınımını inhibe etmektedir (74-77). Ghrelin'in hiperglisemik etkisi yalnızca endokrin etkileriyle değil, aynı zamanda hepatositler üzerindeki direkt etkisiyle glikojen sentezi ve glukoneogenezi ayarlayarak (76), hepatik glukoz üretimini stimüle etmesiyle olmaktadır (77). Ghrelin erkekte testiküler fonksiyonda önemli rollere sahiptir (78-80). Fakat MetS ghrelin sentezini azaltmaktadır (70, 71). Dolayısı ile tezin bu kısmında amaçlarımızdan biri MetS oluşturulmuş sıçanların serum ve üreme sistemi dokularında ghrelin ekspresyonlarının nasıl değiştiğini incelemek olduğundan, üreme sistemi ile ilgili ghrelin araştırmalarını insan ve hayvan çalışmaları başlıkları altında anlatmakta fayda bulunmaktadır.

### **1.2.3.1. İnsan Üreme Sisteminde Ghrelin Ekspresyonları**

GHS-R1a reseptörünün ve ghrelin'in hücrel lokalizasyonu poliklonal antikolar kullanılarak immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir (81). Ovarian interstisyel hilus hücrelerinde ghrelin kuvvetli boyanmasına karşın çok erken gelişim döneminde korpus luteumda [*Corpus Luteum* (CL)] tespit edilememiştir (82). Diğer yandan erken ve geç dönem CL'de spesifik ghrelin immünoreaktivitesi gözlenirken, luteal dokunun gerileme döneminde peptidin ekspresyonu ortadan kalkmaktadır. GHS-R1a proteininin doku dağılımı; oositler, somatik folikül hücreleri, genç, erken dönem ve son dönem CL'nin gerilemesinde ve interstisyel hilus hücrelerinde olmak üzere çok yaygınlık göstermektedir (81-83). GHS-R1a peptidi sağlıklı antral foliküllerin teka tabakasında ve granüloza hücrelerinde foliküler gelişim ile paralellik göstermektedir (82). Ghrelin ve reseptörünün varlığı, hem fizyolojik hem de patofizyolojik koşullarda ovarian fonksiyonda önemli bir düzenleyici rol üstlenmektedir (83). GHSR1a'nın metaplastik ve neoplastik dokulardaki varlığı ve ovaryumun epitelyum düzeylerinde immünohistokimyasal olarak tespit edilmiştir (84). Fallopiyan tüp epitelyumundaki siliat hücrelerinde de kuvvetli GHSR1a ekspresyonu mevcuttur. Endometrium ve endoservik kısımlar ise GHSR1a bakımından immünoreaktif olarak negatiftir. Normal dokularda olduğu gibi kist yüzeyi epitelyumu da GHS-R1a'yı sentezlemektedir (83). Benzer şekilde fallopiyan tüp epitelyumunun seröz tümörlerinde GHSR1a sentezlenirken, seröz kist adenokarsinomunda yüksek diferansiye numunelerinde GHSR1a görülmüştür (83).

Ghrelın insan testis dokularında ve kısmen de leydig ve sertoli hücrelerinde bulunmakta olup, germ hücrelerinde tespit edilmemiştir. İnsan testisinde ghrelın'ın leydig hücreleri tarafından ekspresyonu hücre diferansiyasyonunun derecesi ile yakından ilişkilidir (83, 84). Bundan başka normozoospermia, obstrüktif azospermia veya varikoseldeki testesteron düzeyleri ile ters ilişki göstermektedir (85). İnsan ve rodentlerdeki bulguların tersine koyun testislerinde ghrelın'ın güçlü bir şekilde immünohistokimyasal olarak boyanması, sadece leydig ve sertoli hücrelerinde değil spermatojenik siklusun mitoz ve mayotik profaz safhalarındaki germ hücrelerinde artmış ghrelın immünoaktivitelerinin gösterilmesi ile tespit edilmiştir (86).

### 1.2.3.2. Hayvan Üreme Sisteminde Ghrelın Ekspresyonları

Erişkin sıçan ovaryumunda ghrelın mRNA ekspresyonu ve peptidin kendisi mevcuttur (87). Sıçan ovaryumunda ghrelın gen ekspresyonunun fizyolojik regülasyonu östrus siklusunun farklı dönemlerinde araştırılmış ve ghrelın mRNA seviyeleri siklusun fazı ile bağlantılı bulunmuştur. Buna göre östrus başında en düşük ekspresyon, östrus orta fazında ise en yüksek ekspresyon gözlenmiştir. Siklik ekspresyonda olduğu gibi luteal dönemde ghrelın'ın pik seviyelerine rastlanmıştır. Böylece ghrelın mRNA seviyeleri, CL fonksiyonel fazına girdiğinde en yüksek seviyeye ulaşmakta, CL formasyonu ve regresyonu fazında ise daha düşük seviyelere inmektedir (88). Bu bulgular steroidojenik luteal hücrelerin sitoplazmasında yoğun ve spesifik ghrelın immünoaktivitesi ile uyumluluk göstermektedir. Önceki siklusta CL'ye gerileyen non-apoptotik hücrelere ek olarak interstisyel alandaki ghrelın immünoaktivitesi tespit edilmiştir. *Corpus luteum*'da ghrelın ekspresyon profili progesteron (P<sub>4</sub>; yapısında dört çift bağ var) sekresyonu ile paralellik göstermekte, buna ek olarak CL'de fonksiyonel aktivitenin pik gösterdiği durumla ghrelın ekspresyonunun profili aynı olmaktadır. Bu veriler luteal gelişim regülasyonunda veya fonksiyonunda ghrelın'ın önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (87, 88). Ghrelın mRNA'sı sıçan ovaryumlarına tek doz *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH) verilmesi durumunda östrus öncesi safhada sabit kalırken, diöstrus-1 ve diöstrus-2 ovaryum sikluslarında ise artmaktadır. Muhtemelen ovulasyonun önlenmesi önce yeni CL'nin inhibe olmasına ve buna bağlı olarak ghrelın ekspresyonunun düşmesine yol açmaktadır (88).

Lutinleştirici hormon [*Luteinizing hormone* (LH)] seviyesindeki düşüş *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH) antagonisti verilmesinden sonra ovaryan ghrelin mRNA'sının düşüşüne neden olmaktadır (88). Ovaryan ghrelin ekspresyonu gebelikle kayda değer bir şekilde değişmektedir. Örneğin, erken gebelik döneminde ghrelin mRNA'sı yüksek, gebeliğin geç döneminde ise düşmektedir. Sıçanlarda luteal fonksiyon gebeliğin ilk haftasında gebeliğin devamını sağlamakta bu da LH ve prolaktin ile modüle edilmektedir. Fakat gebeliğin geç dönemlerinde insan plasental laktojen [*Human Placental Lactogen* (hPL)] ve CL'de üretilen östrojen ve progesteron gebeliğin devamından sorumludur. Fonksiyonel CL'de maksimal olarak ghrelin eksprese ederken, CL'nin fonksiyonel gerilemesi ile de ghrelin seviyesi düşmektedir. GHS-R1a geninin sıçan testislerindeki ekspresyonu postnatal gelişim esnasında stabil düzeyde bulunmuştur (89). Buna karşın GHS-R1a mRNA'sı ise ergenlikte pik değerlerdeyken prepubertal dönemde düzeyi tespit edilememektedir (90). Buna göre pubertal gelişim esnasında sıçan testisindeki GHS-R1a geninin katlanmasında meydana gelen kayma biyolojik olarak aktif olan Tip1a reseptör formuna eğilimi artırır, bu da seksüel maturasyon ile ilgili ghrelin sensitivitesinde gözle görülür değişikliklere neden olmaktadır (90, 91).

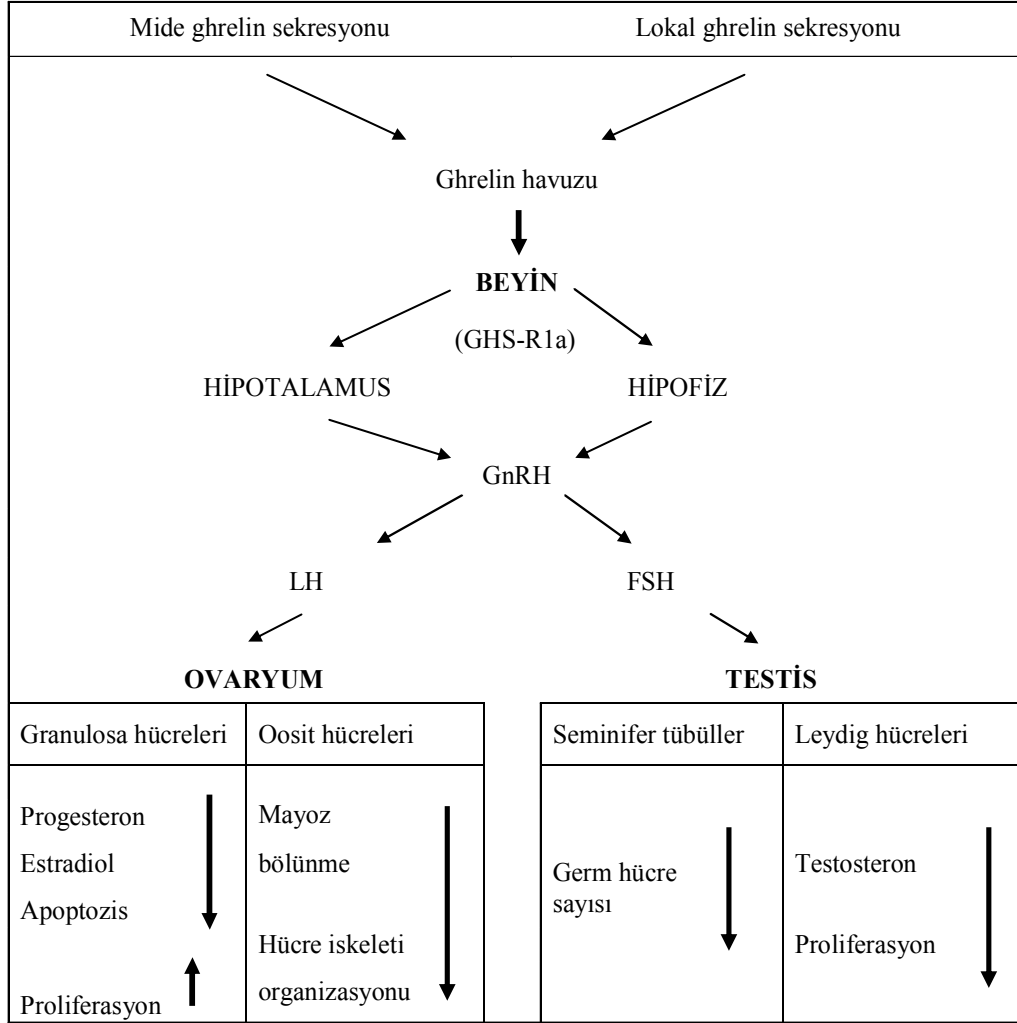
Sıçan testislerinde immünohistokimyasal veya *insitu hibridizasyon* yöntemleri ile yapılan lokasyon analizlerine dayanılarak; germ hücreleri, somatik sertoli hücreleri ve leydig hücrelerindeki spesifik ekspresyonları ile GHS-R1a'nın ekspresyonu rapor edilmiştir (91). GHS-R geninin testiküler ekspresyonu hormonal düzenlenme ile gerçekleşmektedir. GHS-R1a mRNA seviyeleri ghrelin ve hipofizden salınan Folikül uyarıcı hormon (*Follicle Stimulating Hormone*; FSH) aracılığı ile doz bağımlı olarak stimüle edilmektedir. Böylece hem ghrelin ekspresyonu hem de testiküler ghrelin duyarlılığı hormonal sinyaller ile regüle edilmektedir. Ghrelin stimüle edilmiş testesteron sekresyonunu doz bağımlı olarak inhibe etmektedir. Ghrelin'in tübüler kök hücre (*stem cell*) mRNA'sı üzerine olan etkileri spermatogenezis ve aynı zamanda leydig hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde rol almaktadır (89-91). Ghrelin'in testiküler ekspresyonunda ana uyarıcı hipofizer LH'dir. Buna göre ghrelin'in, gonadotropik stimülasyona cevap olarak testiküler testosteronun kendi kendine sınırlanmasına katılabilen LH'nin steroidojenik aktivitesinin dengelenmesinde lokal düzenleyici görevi bulunmaktadır (90). *In vitro*

şartlarda ghrelin doz bağımlı olarak leydig hücreleri tarafından *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG) ve *Cyclic Adenosine Monophosphate* (cAMP)'in stimüle ettiği testesteronu inhibe eder. Testesteron sekresyonundaki ghrelin'in bu inhibitör etkisi, hCG'nin stimüle ettiği steroidojenik yolda anahtar rolü olan mRNA seviyelerinde de düşüş ile karakterizedir (88-91).

#### 1.2.4. Üreme Aksı Üzerinde Ghrelin'in Rolü

Üreme aksı üzerinde ghrelin'in rolü tam olarak ortaya konmamışsa da dolaşımdaki ghrelin'in üreme sistemi aksını enerji dengesini düzenleyerek kontrol ettiği düşünülmektedir (91, 92). Ghrelin'in hipotalamik-hipofizel-gonadal üreme aksına etkileri şekil 6'da şematik olarak gösterilmiştir. Ghrelin, gonadotropin ve prolaktin sekresyonunda önemli bir role sahip olup, santral olarak ghrelin verilmesi ovarektomize dişi sıçanlarda pulsatil LH sekresyonunu baskılamaktadır. Ayrıca 3 nmol ghrelin'in intraserebroventriküler (İCV) olarak verilmesi dişi sıçanların siklusunda LH sekresyonunu östrus siklusu (proöstrus, östrus, metöstrus) boyunca inhibe etmiştir (91). Benzer şekilde ovarektomize dişi sıçanların hipotalamusundan GnRH sekresyonu ghrelin salınımı ile kayda değer bir şekilde inhibe edilmektedir. Fakat bu bilgilerin aksine hipofiz dokularında *in vitro* olarak bazal LH ve FSH'nin ghrelin'in dozuna bağılı olarak stimüle edildiği gösterilmiş ve östrus siklusunun safhalarında da teyit edilmiştir (89-92). Yine aksine olarak *in vitro* GnRH'nin stimüle ettiği LH sekresyonunun siklusun safhasına bakılmaksızın ghrelin tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir (92). Oysa ki uyarılan FSH sekresyonunun ghrelin tarafından sadece östrus safhasında inhibe edildiği bilinmektedir (91). Günlük OGH enjeksiyonunun erkek sıçanlarda puberte süresince dişi sıçanlara benzer bir şekilde LH konsantrasyonlarını düşürdüğü tespit edilmiştir (88). Kronik OGH veya DGH infüzyonu dolaşımdaki LH ve FSH seviyesinde önemli bir düşüşe sebep olmaktadır. Son zamanlarda *in vitro* olarak yapılan bir çalışmada da ghrelin fare embriyosunun preimplantasyonunu inhibe ettiğini bildirmiştir. Başka bir çalışmada kronik ghrelin uygulamasının gebeliğin ilk yarısında embriyo gelişimini engellediği bildirilmiştir (92). Uzun süre testosteron replasmanı dolaşımdaki ghrelin seviyelerini normal seviyelere getirmiştir (91). Bu da ghrelin ve seks steroidleri arasında karşılıklı etkileşimde bulunduğunu göstermektedir. Yani ghrelin androjen sekresyonunu

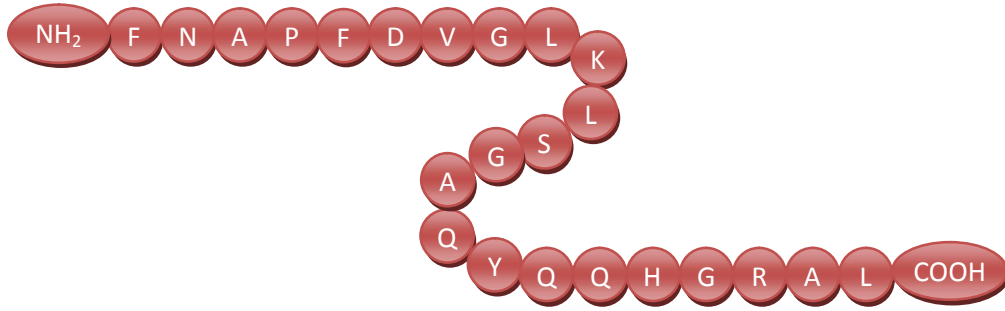
düzenlerken androjenler de ghrelin sekresyonunu ayarlamaktadır (88–92). Bu etkileşim de ghrelin'in üreme sistemi ve enerji dengesinde önemli rolü olduğunu göstermektedir. Enerji dengesinin düzenlenmesinde rolü olduğu düşünülen ve bu tez çalışmasına dahil edilen bir diğer hormon da OBS'dir. Dolayısı ile tezin genel bilgilerinin bu kısmında OBS hakkında güncel bilgiler verilecektir.



Şekil 6. Ghrelin'in hipotalamik-hipofizer-üreme aksına etkileri.

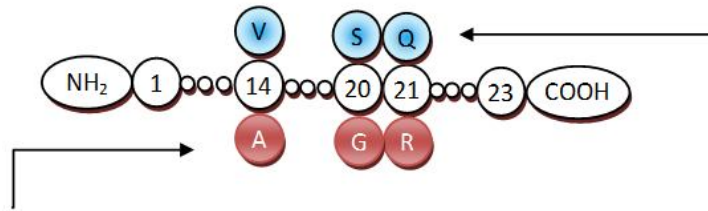
### 1.3. Obestatin

Bu peptid ghrelin geninin bir ürünüdür. 117 amino asitlik preproghrelin'in posttranslasyonel modifikasyonu sonunda ortaya çıkan moleküler ağırlığı 2516.3 olan 23 aminoasitlik bir hormondur (93). OBS aa dizilimi Şekil 7'de gösterilmiştir.



**Şekil 7.** Sıçan obestatin amino asit dizilimi. A: Alanin, D: Aspartik asit, F: Fenilalanin, G: Glisin, K: Lizin, L: Lösin, N: Asparajin, P: Prolin, Q: Glutamin, R: Arjinin, S: Serin, Y: Tirozin, V: Valin.

İnsan ve sıçanların OBS aa dizilimleri arasında % 86.96 oranında benzerlik bulunmaktadır (Şekil 8). Biyolojik aktivitesi için karboksi terminalinde amidasyona ihtiyaç göstermektedir (94, 95). Zhang ve arkadaşları tarafından ilk kez mideden izole edilmiştir (93). Farelere periferal veya İCV olarak OBS verilmesi besin alınımını azaltmaktadır (96). 24 saat aç kalan farelerde ghrelin düzeyleri yükselirken obestatin düzeyleri ise azalmaktadır. OBS'nin sıçan plazmasındaki miktarı yaklaşık olarak 0,32 ng/mL, yarılanma ömrünün ise yaklaşık 2 dakika olduğu (96) ve kan beyin bariyerini geçemediği bilinmektedir (97). İnsanlarda dolaşımdaki miktarları 5- 268 ng/mL olduğu bildirilmiştir. İnsan serumunda OBS konsantrasyonlarının bu kadar farklılık göstermesi, ölçüm yöntemlerinin tam güvenilir olmadığını düşündürmektedir.



Sıçan obestatin amino asiti dizilim farkı.

İnsan obestatin amino asiti dizilim farkı.

**Şekil 8.** İnsan ve sıçan'da obestatin aminoasit dizilim farkları. A: Alanin, G: Glisin, Q: Glutamin, R: Arjinin, S: Serin, V: Valin.

### 1.3.1. Obestatin Reseptörü

Obestatin reseptörü ile ilgili araştırmalarda ilk olarak GHS-R ailesinden GPR39'un büyüme hormonu sekresyonunu uyardığı için OBS'nin reseptörü (97) olduğu ileri sürülmesine rağmen, Holst ve arkadaşları GPR39 eksprese eden iki farklı hücrede OBS'nin bağlanmadığını ve böylece GPR39'un obestatin reseptörü

olamayacağını bildirmişlerdir (98). Holst ve arkadaşlarının gözlemlerinden başka pek çok çalışmada da OBS'nin hipotalamusta GPR39'a bağlanmadığı veya aktivasyonunu sağlamadığı rapor edilmiştir. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda OBS'nin HIT-T15 ve INS-1 beta hücrelerinde Glukagon Benzeri Peptid-1 Reseptörüne [*Glucagon Like Peptide 1 Receptor (GLP-1R)*] bağlandığını ve GLP-1R antagonisti olan eksendin (9-39) formu verildiğinde de OBS'nin etkilerinin ortadan kalktığı rapor edilmiştir (98). Fakat Unniappan ve arkadaşları OBS'nin, INS-1 beta hücrelerine ve GLP-1R eksprese edebilen insan embriyonik böbrek hücrelerine bağlanmadığını bildirmişlerdir (99). Dolayısıyla OBS'nin reseptörü tam olarak saptanamadığından enerji dengesinin düzenlenmesinde nasıl bir rolü olduğu henüz tam olarak bilinmemektedir.

### **1.3.2. Obestatinin Biyokimyasal ve Fizyolojik Etkileri**

Obestatin insülin biyosentezinin düzenlenmesine yardımcı olmaktadır. Örneğin, 10 nm OBS glukoz bağımlı insülin sekresyonunu inhibe etmektedir (97, 100). İntravenöz (İV) olarak verilen OBS sıçanlarda vagus bağımlı bir mekanizmayla pankreatik peptid salgısını stimüle etmektedir (97). Son zamanlarda Qader ve ark. sıçan ve fare adacık hücrelerinde OGH ve OBS'nin glukagon sekresyonunun stimülasyonu ile somatostatin ve pankreatik polipeptid [*Pancreatic Polypeptide (PP)*] inhibisyonunda olduğu gibi benzer etkilere sahip olduğunu bildirmişlerdir (101). İV veya İCV verilen OBS'nin plazma GH, prolaktin, ACTH ve tiroid stimüle edici hormon [*Thyroid-Stimulating Hormone (TSH)*] salınımları üzerine herhangi bir etkisi bulunmamaktadır (97). Bazı çalışmalarda OBS'nin su alımını inhibe ettiğini bildirilmiştir (97, 102). Buna karşın OBS'nin su alımı inhibisyonunda yeterli olmadığını bildiren farklı çalışmalar da literatürde yer almaktadır (97). OBS'nin gastrik motilite üzerine etkileri de çelişkilidir. İnsanlarda kan OBS düzeyleri sistolik kan basıncı ile negatif ilişki göstermektedir (97). OBS tedavisiyle yavaş göz hareketi [*Non-Rapid Eye Movement (NREM)*], azalmış uyku ve elektroensefalograf'ta [*Electroencephalograph (EEG)*] yavaş dalga izlenmiştir (103). Ayrıca OBS'nin hafızayı kuvvetlendirdiği de bulunmuştur (104). Bazı çalışmalar OBS'nin anoreksijenik olduğunu bildirirken, bazıları da böyle bir etkisinin bulunmadığını rapor etmişlerdir (97, 104). Sonuç olarak OBS'nin iştah üzerine etkileri büyük

tartışmalara neden olmuş, araştırmalarda OBS'nin yalnız başına besin alınımı ve vücut ağırlığı üzerine bir etkisinin olmadığı (104) ve kolesistokinin (CCK) salınımını değiştirmedığı ve ghrelin'le indüklenmiş besin alınımını azaltmadığı bildirilmiştir (97). Başlangıçta OBS'nin enerji dengesinin kontrolünde ghrelin'le işbirliği içinde olabileceği öne sürülmüş fakat daha sonra yapılan araştırmalarda OBS'nin enerji dengesi, besin alınımı, vücut ağırlığı, vücut kompozisyonu, enerji harcanması veya enerji dengesiyle ilişkili hipotalamik merkezlerle arasında bir ilişkinin olmadığı rapor edilmiştir (97, 104). OBS; bel çevresi, bel/kalça oranı, açlık insülin düzeyleri ve insülin rezistansı [*Homeostasis Model Assessment For Insulin Resistance* (HOMA-IR)] ile negatif ilişkili iken, insülin sensitivite indeksi ile pozitif ilişkilidir (97). OBS'nin genel olarak, hafızayı güçlendirdiği, anksiyeteyi tetiklediği, uykuyu inhibe ettiği, hücre proliferasyonunu arttırdığı, pankreasın adacık hücre stimülasyonunu ve glukagon sekresyonunu arttırdığı rapor edilmiştir (104). Plazma OBS düzeylerinin bozulmuş glukoz toleransı olanlarda, tip 2 diyabetlilerde, insülin rezistansında, kronik atrofik gastritte, ülseratif kolitte, karaciğer yağlanmasında, hemodiyalizde ve oral skuamoz hücreli kanserde azaldığı buna karşın, anoreksia ve epilepsi hatalıklarında kandaki düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (97,104).

### **1.3.3. İnsan ve Hayvan Dokularında Obestatin Dağılımları**

Obestatin yanak epitelyumu, duodenum, jejenum, kolon, ince ve kalın bağırsaklar, dalak, meme bezi ile fetal ve erişkin pankreas adacıklarının sitoplazmalarında tespit edilmiştir (97, 104). Sıçan midesinin oksintik mukozasının cerrahi olarak çıkarıldığı çalışmalarda dolaşımdaki ghrelin ve OBS düzeylerinin % 50-80 oranında azaldığı görülmüş, buna dayanarak mide oksintik mukozasının ghrelin ve OBS ekspresyonlarının en yoğun gerçekleştiği doku olduğu bildirilmiştir (104). Tükürük bezinde ve testislerin Leydig hücrelerinde de OBS sentezlediği rapor edilmiştir (97). OBS'nin ghrelin'in eksprese edildiği endokrin dokularda üretildiği bildirilmiştir (104). Bu da bize ovaryum dokularında da OBS sentezinin mevcut olabileceğini göstermektedir. MetS'ye bağlı olarak testis ve ovaryumlarda OBS ekspresyonlarının nasıl değiştiği bu tez tamamlanmadan önce bilinmemektedir.

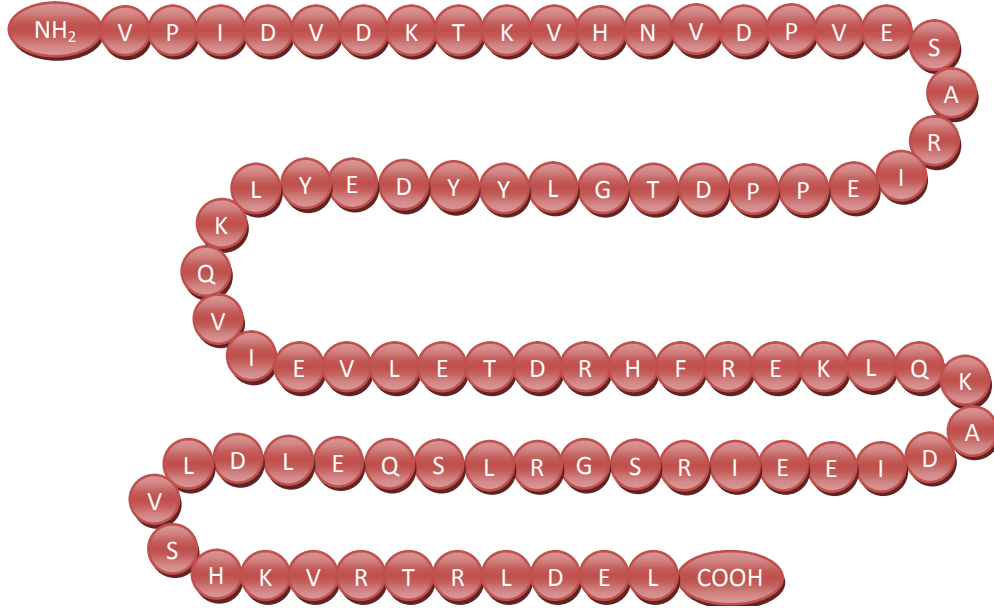
### 1.3.4. Üreme Aksı Üzerinde Obestatin'in Muhtemel Rolü

Üreme aksı üzerinde OBS'nin rolü henüz bilinmemektedir. OBS hakkında mevcut bilgiler çelişkili olmasına rağmen bu tez çalışmasında bizim hipotezimiz dolaşımdaki OBS'nin tıpkı ghrelin gibi üreme sistemi aksında enerji dengesini düzenleyerek kontrol ettiği yönündedir. Bu tezi destekleyen bazı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin ovarektomize dişi sıçanlara ghrelin'in santral olarak verilmesi, pulsatil LH sekresyonunu baskılamaktadır. OBS'nin de ghrelin'e zıt etki ettiğini (tüm deneysel bulgular böyle olmasa da) düşündüğümüzde (97), OBS'nin LH sekresyonunu arttırması teorik olarak beklenmektedir. Yine kronik OGH veya DGH infüzyonu dolaşımdaki LH ve FSH seviyesinde önemli bir düşüşe sebep olmaktadır. Bu durumda yine OBS'nin LH ve FSH seviyesinde teorik olarak bir artışa neden olması beklenmektedir. Ayrıca ghrelin ve seks streoidleri arasında karşılıklı etkileşim bulunması, OBS ve seks streoidleri arasında bir etkileşim olabileceğini düşündürmektedir. Fakat bugün itibarı ile literatürde bu kapsamda OBS ile ilgili henüz veri bulunmamaktadır. Bu tez çalışması sonunda LH, FSH ve OBS arasında bir bağlantının olup olmadığı ve MetS ile düzeylerinin nasıl değiştiğinin gün ışığına çıkması beklenmektedir. Enerji dengesinin düzenlenmesinde rolü olduğu düşünülen ve leptin benzeri fonksiyonu olduğu ileri sürülen bir diğer hormon da NES olup bu tez çalışmasına dahil edilmiştir. Dolayısı ile tezin genel bilgilerinin bu kısmında son olarak NES hakkında güncel bilgileri verilecektir.

### 1.4. Nesfatin

Ohi ve arkadaşları tarafından 2006 yılında keşfedilen ve yeni bir doyumluk molekülü olan NES, 82 aminoasitten oluşmaktadır ve molekül ağırlığı 9700 daltondur (105). NES'in aa dizilimi şekil 9'da gösterilmiştir. İnsan ve sıçanların NES aa dizilimleri arasında % 86.59 oranında benzerlik bulunmaktadır (Şekil 10). Dolaşımdaki miktarları hem insan hem de hayvanlarda 0-5 ng/mL arasında değişmektedir. Dolaşımdaki yarılanma ömrü 9-10 dakikadır. NES, *Nucleobindin II* (NUCB2) geni tarafından kodlanmaktadır. Yapılan tüm hayvan deneyi çalışmalarında NES'in doyumluk hissi verdiği rapor edilmiştir (105, 106). Doyumluk hissi vermesi ve yağ miktarlarını da etkilemesi sebebiyle bu yeni peptide

nesfatin adı takılmıştır (105). NES leptin benzeri fizyolojik etkiler göstermektedir (107).

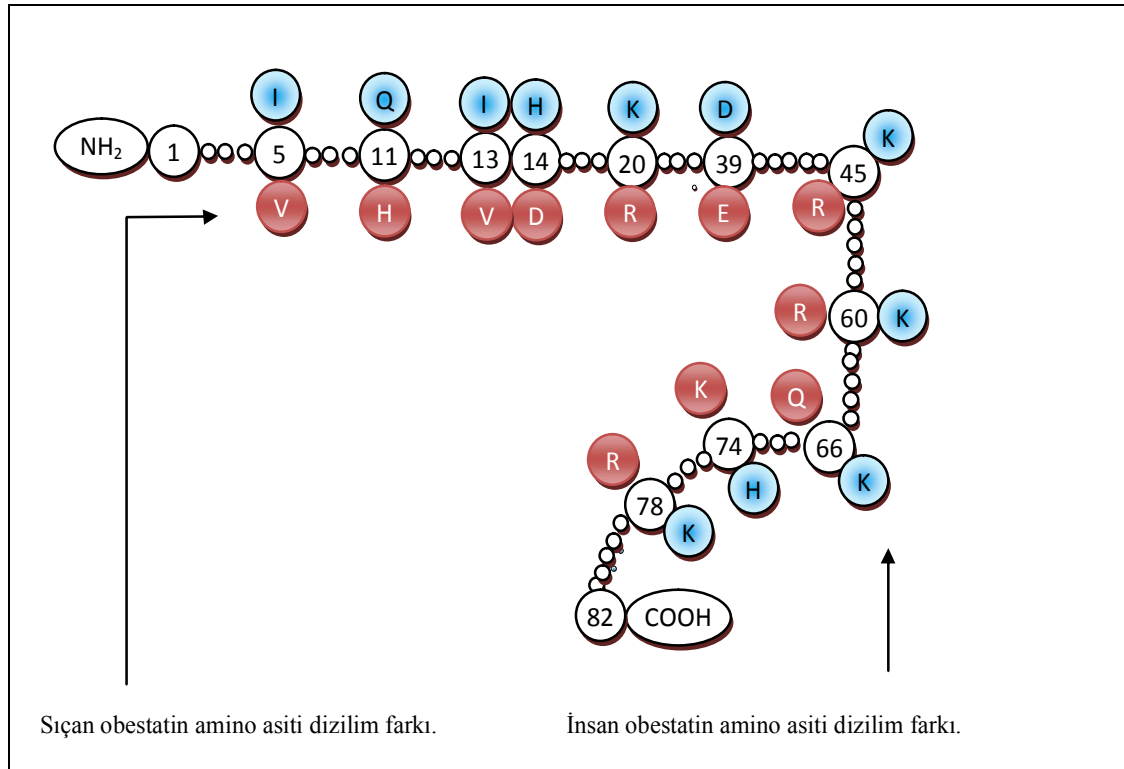


**Şekil 9.** Sıçan nesfatin-1 amino asit dizilimi. A: Alanin, D: Aspartik asit, E: Glutamik Asit, F: Fenilalanin, G: Glisin, H: Histidin, I: İzolösin, K: Lizin, L: Lösin, N: Asparajin, P: Prolin, Q: Glutamin, R: Arjinin, S: Serin, T: Treonin, V: Valin, Y: Tirozin.

#### 1.4.1. Nesfatin Formları

Nesfatin-1, NUCB2 tarafından kodlanan üç ürününden biridir (108). Diğer nesfatin formları ise nesfatin-2 ve nesfatin-3'dür. NUCB2/nesfatin 24 aa'lık bir sinyal peptid ve 396 aa'dan meydana gelmektedir. NUCB2/Nesfatin prohormon konvertaz enzimi tarafından posttranlasyonel olarak N-terminal bölümü, NES ve iki C-terminal peptid olan, nesfatin-2 ve nesfatin-3 olmak üzere üç parçaya ayrılmaktadır. NUCB2/nesfatinin ayırıcı bir proteolitik işleme yoluyla, birkaç aktif peptidi ortaya çıkaran bir prekürsörü olduğunu göstermektedir (108-113). Ayrıca NES, N-terminal segment (1-23), mid segment (23-53) ve C-terminal segment olmak üzere üç kısımdan ibarettir (108-110). Parantez içindeki rakamlar aa sayılarını göstermektedir. NES'in doz bağımlı besin alınımını kısıtlamasından mid segment sorumlu olup, bu kısmın aa dizilimi *Alfa-Melanocyte-Stimulating Hormone* ( $\alpha$ -MSH) ve *Agouti-Related Peptide* (AgRP) ile benzerlik göstermektedir. Fakat NUCB2 diğer bir adıyla *nuclear EF-hand acidic* (NEFA)'dan köken alan diğer nesfatinlerin

(Nesfatin-2 ve Nesfatin-3), anoreksijenik aktivitesi bulunmamaktadır (108-113). Bu sebeple bugüne kadar yapılan araştırmalarda NES üzerine odaklanılmıştır.



Şekil 10. İnsan ve şıçan'da nesfatin-1 aminoasit dizilim farkları (109).

#### 1.4.2. Nesfatin Reseptörü

Nesfatin-1'in henüz yapısı bilinmeyen G proteiniyle eşleşmiş bir reseptörle görev yaptığı düşünölmektedir (11, 109). Bu olası reseptör, kalsiyum kanalları aracılığıyla, protein kinazları aktive ederek  $Ca^{+2}$ 'un içeri alınımını sağlar ve böylece intrasellöler  $Ca^{+2}$  konsantrasyonlarında bir artışa neden olmaktadır (109-114). Ancak nesfatin reseptörünün/reseptörlerinin klonlanmasının bugüne kadar başarılammış olması da bir o kadar dikkat çekicidir (110). Bu durum, reseptörün bazı özgül özelliklerini yansıtır olabilir; örneğin, henüz bilinmeyen bir etkileşim partner(ler)ile hetero-dimerize olma gerekliliği böyle bir özellik olabilir (110).

#### 1.4.3. Nesfatin-1'in Biyokimyasal ve Fizyolojik Etkileri

Nesfatin-1'in İCV enjeksiyonu doza bağımlı olarak besin alımını azaltmıştır (109-113). Antikor enjeksiyonuyla NES nötrale edildiğinde ise iştahın uyarıldığı gözlenmiştir. Tip 2 DM hastalarının serumlarında NES azalmıştır (115). NES düzeylerindeki azalışın obeziteden kaynaklanabileceği ileri sürölmüştür. Buna karşın

tip 1 ve tip 2 DM hastalarında VKİ ile plazma NES düzeyleri arasında bir ilişki olmadığı da bildirilmiştir (115). Bu nedenle daha sonra tip 2 DM hastalarında azalan NES düzeylerinin insülin direncinden kaynaklanmış olabileceği ileri sürülmüştür. Gonzalez ve arkadaşları fare ve sıçanlarda pankreasta insülin salgılayan beta hücrelerinde prepronesfatinin NES ile birlikte bulunduğunu ve bu nedenle prepronesfatin türevlerinin insülin salgılanması ve glukoz metabolizmasında potansiyel bir rolü olduğunu belirtmişlerdir (116). Tip 2 DM hastalarında azalan plazma nesfatini bu hastalardaki hiperfajiden sorumlu tutulmaktadır. Azalan ghrelin düzeylerinin de tip 2 DM'deki hiperfajide katkı sağlayabileceği belirtilmiştir (115). Yapılan bir diğer çalışmada hiperglisemik hayvanlara İV uygulanan NES'in antihiperglisemik etki gösterdiği bulunmuş ve diğer antihiperglisemik ajanlarla karşılaştırıldığında nesfatinin insüline yardımcı yeni bir sınıf olabileceği ifade edilmiştir (117). Yapılan bir çalışmada periferik NES konsantrasyonları ile VKİ, vücut yağ oranı ve kan glukozu arasında negatif ilişki olduğu gösterilmiştir. VKİ yüksek olanlar ile nonobez hastalar kıyaslandığında; açlık NES düzeyleri VKİ yüksek olanlarda anlamlı olarak düşük bulunmuştur (118). Kısa süreli açlığın pubertal sıçanların hipotalamusunda NUCB2 mRNA ve protein düzeylerinde azalma ile sonuçlandığı da rapor edilmiştir (108). Ghrelin, OBS ve NES'in biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri tablo halinde (Tablo 1) özetlenmiştir (113).

#### **1.4.4. İnsan ve Hayvan Dokularında Nesfatin-1 Dağılımları**

Sıçan hipotalamusunda NES için belirgin immünoaktivite (İR) gözlenmiştir. Yetişkin ve puberte dönemindeki sıçanların immünohistokimya (İHK) analizleri, diğerlerinin yanı sıra lateral hipotalamik alan (LHA), paraventriküler nükleus (PVN), zona incerta (ZI) ve supraoptik nükleus (SON) da dahil olmak üzere anahtar hipotalamus çekirdeklerinde yoğun bir şekilde varlığı gösterilmiştir (109-112). NES'in, gastrik mukoza bezlerinin orta ve alt segmentlerinde, ayrıca sıçanlarda duodenumun mukoza altı tabakasında İR'si bulunmuştur. NES İR'si, yakın zamanda, insan ve sıçan  $\beta$  adacık hücrelerinde bildirilmiş, ancak endokrin pankreasın diğer hücre tiplerinde bildirilmemiştir. Son zamanlarda NES'in insan, sıçan ve fare testisinde ve sıçan ovaryumlarında da ekspresyonu gösterilmiştir (110).

#### 1.4.5. Üreme Aksı Üzerinde Nesfatin-1'in Rolü

Pubertal hayvanlardaki ekspresyon analizlerinde geç infantil dönem ve peripubertal dönem arasındaki geçiş boyunca NUCB2 mRNA seviyeleri LHA, PVN ve SON da anlamlı şekilde arttığı, toplam prenesfatin içeriğinin ise yaklaşık 3 kat arttığı bildirilmiştir (110). Gonadotropin salgısının baskılanması ve/veya ergenliğin başlaması ile eşleşen negatif enerji dengesi durumları da NUCB2 ekspresyonlarında ölçülebilir düzeyde değişikliklere neden olmaktadır. NUCB2/N sinyal iletiminin ergenlikte gonadotropik aks aktivasyonunda rolü bulunmaktadır.

NUCB2/nesfatin-1'in ergenlikte gonadotropik aksın kontrolündeki pozitif rolü *ad libitum* beslenen pubertal dişilerde NES'in İCV enjeksiyonuyla FSH düzeylerinde daha az olmak üzere, LH düzeylerinde hafif ama saptanabilir bir artış sergilediği rapor edilmiştir. Erişkin dişi sıçanlara eksojen NES verilmesi, açlık ve tokluk serum gonadotropin seviyelerinde düşüşe neden olmuştur. NUCB2, üreme fonksiyonunun merkezi kontrolünde de rol oynamaktadır (106, 110). Ayrıca NES'in dişilerin puberte maturasyonunun düzenleyicisi olan oksitosinin salgılanmasını uyardığı da gösterilmiştir (119). Enerji durumu ile zorunlu vücut fonksiyonları arasındaki sıkı bağın yansıması olarak iştah düzenleyici mekanizmalar ve çeşitli nörendokrin sistemler arasında karşılıklı etkileşimler bulunmaktadır. Yapılan birçok çalışma ghrelin'in biyolojik fonksiyonlarının hipofizal gonadal aks ve üreme sistemi üzerinde farklı seviyelerde olduğunu göstermiştir. Testislerde ghrelin doz bağımlı olarak cAMP oluşumunu azaltarak hem LH hem de hCG sekresyonunu inhibe etmektedir (120). Ayrıca korpora lutea'daki ghrelin ve progesteron ekspresyonlarının pik seviyeleri paralellik göstermektedir (121). Bu da sıçanlarda luteal gelişim ve fonksiyonlarında ghrelin'in önemli bir rol oynadığını göstermektedir (121).

**Tablo 1.** Ghrelin, obestatin ve nesfatin-1'in metabolik özellikleri.

Fonksiyon	Ghrelin	OBS	NES	Fonksiyon	Ghrelin	OBS	NES	Fonksiyon	Ghrelin	OBS	NES	Fonksiyon	Ghrelin	OBS	NES
Glukoz	+	?	-	Anksiyete	+	-	?	Kalp inotropisi	+	?	?	AP	+	+/-	?
İnsülin	+/-	?	+	Susuzluk	Ø	-	-	VD	+	?	?	PHP	+	+	?
AHH	+	Ø	?	KAGİ	+	?	?	Arteriyel basınç	-	?	-	HHP	?	?	?
ADH	+	-	?	PB	?	?	?	Tümör büyümesi	?	?	?	YHP	+	+/-	?
Kortizol	+	?	?	İmmün sistem	?	?	?	PLB/FB	+	?	?	PR	+/-	?	?
YO	-	?	?	RPEH	Ø	+	?	GT	+	?	?	REM Uykusu	-	+	?
Hafıza	+	+	?	İntestinal mukoza	+	?	?	GHB	+	-	-	Kemik oluşumu	+	?	?
İştah, GA	+	-	-	PA	+	?	?	İŞK.	Ø	+	?	IR	-	?	+
Yağ doku	+	?	?	KM	+/-	?	?	KHC	+	Ø	?	Kilo	+	?	?

ADH: *Antidiuretic hormone*, AHH: Adenohipofiz hormonları, AP: Adiposit proliferasyonu, GA: Gastrik asit, GHB: Gastrik hareket ve boşalma, GT: Gastrik turnover, HHP: Hepatik hücre proliferasyonu, IR: Isı regülasyonu, İSK: İris sifinkter kontraksiyonu, KAGİ: Koroner aterosklerozun ghrelinle ilişkisi, KHC: Kardiyomyosit hücre canlılığı, KM: Karbohidrat metabolizması, PA: Parasempatik aktivite, PB: Psikiyatrik bozukluk, PHP: Pankreatik hücre proliferasyonu, PLB/FB: Plental ve fetal büyüme, PR: Proliferasyon, RPEH: Retinal pigment epitel hücreleri, VD: Vazodilatasyon, YHP: Yumurta hücresi proliferasyonu, YO: Yağ oksidasyonu. +: Arttırır, -: Azaltır, Ø: Etkisiz, +/-: Fizyolojik koşullara bağlı olarak hem arttırır hem de azaltır, ?: Etki şekli bilinmiyor.

MetS'nin iki majör komponenti olan obezite ve insülin rezistansının insan ve hayvan çalışmalarında oosit kalitesini, gebe kalma oranlarını ve üremeyi olumsuz etkilediği belirtilmiştir. Ayrıca MetS'nin progresyonunda ghrelin'in etkilerinin majör belirleyicisi olarak kabul edilen leptin gibi, NES'in de benzer bir mekanizmayla MetS gelişiminde önemli bir rolünün olabileceği aşikardır.

Tüm bu veriler ışığında metabolik düzenlemeyi detayları ile yeniden düşündüğümüzde; üreme fonksiyonunun ortaya çıkışı ve devam ettirilmesinin, uygun enerji rezervlerine bağlı olduğu ve bu karmaşık santral ve periferik sinyal ağının düzenlenmesinde, ghrelin, OBS ve NES'in önemli roller üstelenmiş olabileceği ve bu karmaşık santral ve periferik sinyal ağının da MetS'den etkileneceği kaçınılmazdır. Fakat MetS'de ghrelin, OBS ve NES'in nasıl değiştiği ve üreme aksı üzerine nasıl etki ettiğine dair deneysel veriler bulunmamaktadır. Dolayısı bu tezde amaçlarımız;

1) MetS oluşturulmuş sıçanların üreme sistemi dokularında ghrelin, OBS ve NES seviyelerinin nasıl değiştiğini,

2) Bu sıçanların serumlarında OGH, DGH, OBS ve NES derişimlerinin nasıl değiştiğini ve aralarında bir ilişkinin olup olmadığını,

3) Yine bu peptidlerin, FSH, LH, P<sub>4</sub>, TT ve E<sub>2</sub> ile aralarında ilişkilerinin olup olmadığını ortaya çıkarmaktır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Deney Hayvanları ve Diyet Protokolü

Çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 13.08.2009 tarih ve 50 sayılı kararıyla etik kurul onayı alındıktan sonra Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Birimi'nde (FÜDAM) yürütüldü. Deneyde 32 adet beş haftalık *Sprague Dawley* türü sıçan kullanıldı. Metabolik sendrom gelişip gelişmediğini kontrol etmek amacıyla gruplardan rastgele bir sıçan seçilip kurban edileceğinden deney tamamlandığında her bir grupta 6'şar sıçan kalacağı düşünülmüş olup, çalışmamız her bir grupta 8 rat olacak şekilde 4 grup üzerinde yapılmıştır. Sıçanlar cinsiyetlerine dikkat edilerek; erkek kontrol (EK) (n:8), erkek metabolik sendrom (EMetS) (n:8), dişi kontrol (DK) (n:8) ve dişi metabolik sendrom (DMetS) (n:8) olmak üzere rastgele 4 gruba ayrıldı. Bir haftalık uyum süresinin sonunda VKİ'yi tespit etmek amacıyla sıçanların boy ve kiloları ölçüldü. Bütün gruplardaki sıçanlar 8 mm'lik standart sıçan pellet yemiyle *ad libitum* olarak beslendi. Yem içeriği tablo 2'de verilmiştir. Bu çalışmada metabolik sendrom oluşturmak için MetS grubundaki sıçanların su ihtiyaçları; % 10'luk fruktoz çözeltisi ile *ad libitum* olarak karşılandı (37). Sıçanlarda MetS gelişimini tespit edebilmek için 2 haftalık periyotlarda VKİ değerleri ölçüldü.

### 2.2. Sıçanlarda Metabolik Sendrom Kriterleri ve Vücut Kitle İndeksi

Metabolik sendrom kriterleri arasında; obezite (özellikle abdominal obezite) artan açlık serum glukoz (ASG) seviyesi, hipertansiyon, artan serum TG seviyeleri, ve azalan HDL-K düzeyleri önemli yer tutmaktadır. İnsülin rezistansı da bu farklı metabolik değişimlere bağlıdır ancak patolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır.

Obezitenin tespiti için VKİ ölçümü kullanılmaktadır. Sıçanlarda VKİ şu formülle belirlenir;  $VKI = \text{vücut ağırlığı (g)} / \text{boy uzunluğu}^2 (\text{cm}^2)$ . Vücut ağırlığını tespit etmek için her bir sıçan darası alınmış kapaklı plastik bir kaptan tartıldı. Boy uzunluğunu tespit etmek için burun ucundan anüse kadar olan mesafe ölçüldü. Sağlıklı sıçanlar için  $VKI = 0.72 \text{ g/cm}^2$  iken obez sıçanlarda VKİ değeri  $VKI \geq 1.00 \text{ g/cm}^2$  olarak belirlendi (122).

**Tablo 2.** Sıçan pellet yemi bileşimi (40).

Parametre	Miktar
Su (en fazla)	% 12
Ham protein (en az)	% 24
Ham selüloz (en fazla)	% 7
Ham kül (en fazla)	% 8
HCl'de çözünmeyen kül (en fazla)	% 2
NaCl (en fazla)	% 1
Mineral karması *	% 1.25
Vitamin karması #	% 1.25
Metabolik enerji	2650 kcal/kg

\*Mineral karması: Kalsiyum (% 1 – 2.8), Fosfor (% 0.9), Sodyum (% 0.5 – 0.7), Mangan (10 mg/kg), Çinko (4 mg/kg).

#Vitamin karması: Vitamin A (300 IU/kg), Vitamin D3 (1000 IU/kg), Vitamin E (60 mg/kg), Vitamin B2 (4 mg/kg)

### 2.3. Örneklerin Hazırlanması ve Saklanması

Sıçanlar 12 haftalık diyet programının sonunda steril teçhizatlar kullanılarak sakrifiye edildi. Elde edilen kanların yarısı içi boş olan, diğer yarısı ise içinde 500 *Kallikrein Inhibitor Unit* (KIU) aprotinin bulunan düz biyokimya tüplerine alındı (123). Biyokimyasal parametreler aprotininsiz serum örnekleri kullanılarak analiz edildi. Hormon (ghrelin, OBS ve NES) analizlerinde kullanılmak üzere aprotininli tüplere alınan kanlar oda ısısında 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar ependorf tüplerine alındıktan sonra (ghrelin'ler için) üzerine 1/10 oranında 1N'lik HCl eklendi (123, 124). Bu serumlar analiz edilinceye kadar -20°C'de derin dondurucuda saklandı. Doku örnekleri; İHK boyamaları ve hormon düzeylerinin tespiti için 2 gruba ayrıldı. İHK boyamalarında kullanılacak olan doku örnekleri derhal % 10'luk formaldehit içine alındı. Hormon düzeylerinin analizinde kullanılacak olan doku örnekleri ise, proteazların hormonları denatüre etmesini önlemek için sakrifikasyonu takiben kaynar su banyosunda 5 dakika bekletildi (56, 57). Daha sonra, 50 mg tartılan doku örnekleri, içerisine 5 mL % 5 w/v (weight-in-volume) fosfat tampon çözeltisi *Phosphate Buffer Saline* (PBS) konarak hazırlanan düz biyokimya tüplerine alındı. Bir cam baget kullanılarak PBS içerisindeki doku örnekleri ezildi. Daha sonra bu karışım +4°C'de 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj

edildi. Elde edilen süpernatantlar içinde 500 KIU aprotinin bulunan ependorf tüplere alındı. Hormonlar analiz edilinceye kadar -20°C’de derin dondurucuda saklandı.

#### **2.4. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar**

Laboratuar analizleri Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde; Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları ile Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı’nda yapıldı. Çalışmada kullanılan; aletler, cihazlar, kimyasallar ve sarf malzemeler tablo halinde sunuldu (Tablo 3, Tablo 4, Tablo 5).

#### **2.5. Biyokimyasal Parametrelerin Analizi**

Diyetle indüklenmiş metabolik sendromun bazı biyokimyasal parametrelere olan etkileri araştırıldı. Sakrifikasyonu takiben alınan aprotininsiz serum örnekleri soğuk zincir ile Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi (Ankara) Biyokimya Laboratuvarı’na gönderildi. Burada; ASG, TG, HDL-K, total kolesterol [*Total Cholesterol* (TK)], total protein (TP), alanin aminotransferaz [*alanine aminotransferase* (ALT)], aspartat aminotransferaz [*aspartate aminotransferase* (AST)] ve gamma glutamiltransferaz [*gamma glutamyltransferase* (GGT)] seviyeleri Konelab 60 marka otoanalizör ile, açlık serum insülin (ASİ), östrodiol (E<sub>2</sub>), FSH, LH, progesteron [*Progesterone* (P<sub>4</sub>)] ve TT seviyeleri ise Immulite-2000 otoanalizör ile kit prosedürüne uygun olarak ölçüldü. Otoanalizörde ölçülemeyen düşük yoğunluklu kolesterol [*Low-Density Lipoprotein Cholesterol* (LDL-K)] ve çok düşük yoğunluklu kolesterol [*Very Low-Density Lipoprotein Cholesterol* (VLDL-K)] düzeyleri ise matematiksel olarak hesaplandı (125). Bu amaçla kullanılan Friedewald formülü Şekil 11’de şematik olarak gösterilmiştir.

**Tablo 3.** Analiz işlemlerinde kullanılan aletler ve cihazlar.

Sıra	Alet / cihaz	Marka / model	Sıra	Alet / cihaz	Marka / model
1.	Buzdolabı	Arçelik 5092NF Ankara, Türkiye	10.	Mikrotom	Leica RM 2255 Microsystems nussloch GmbH, Almanya
2.	Çalkalayıcı ( <i>orbital shaker</i> )	Oxoid ltd. RS911, Basingstok Hants, İngiltere	11.	Otoanalizör	1 - Konelab 60 2 - İmmulite 2006, EMA Diagnostic Products Corporation, Los. Angeles, Amerika Birleşik Devletleri
3.	Derin dondurucu	Arçelik 2573D, Türkiye	12.	Otomatik pipet	1 - Biohit proline 100 µl 2 - Biohit proline 1000 µl
4.	ELISA okuyucu	ELX800, BioTek Instruments, Amerika Birleşik Devletleri	13.	Parafin takip cihazı	Shandon Cryotome SME 77200101 İngiltere
5.	ELISA yıkayıcı	ELX50, BioTek Instruments, Amerika Birleşik Devletleri	14.	Ph metre	Thermo Electron Corporation, Orion 3 star pH Benchtop, Amerika Birleşik Devletleri
6.	Etüv	Nüve FN400, Türkiye	15.	Santrifüj	Hettich Universal K2S, Tuttlingen, Almanya
7.	Fotoğraf Makinesi	Olympus DP71	16.	Su banyosu	Nüve BM402, Türkiye
8.	Mikrodalga ısıtıcı	Arçelik MD 820, Türkiye	17.	Vorteks	Nüve MN110, Türkiye
9.	Mikroskop	Olympus BX51	18.		_____

**Tablo 4.** Analiz işlemlerinde kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeleri.

Sıra	Alet / cihaz	Marka / model	Sıra	Alet / cihaz	Marka / model
1.	Aprotinin (Trasyol)	Bayer Türk Kimya San LTD. Şti., İstanbul, Türkiye	4.	Mavi pipet ucu	İsolab laborgeräte GmbH, Almanya
2.	Deney tüpü	Borosilikat cam tüp 12 x 75 mm	5.	Sarı pipet ucu	İsolab laborgeräte GmbH, Almanya
3.	Ependorf tüp	ETPP 0004 Eppendorf tubes (polypropylene), ISOLAB Laborgerate GmbH, Almanya	6.	Polizimli lam	Bayer Türk Kimya San LTD. Şti., İstanbul, Türkiye

**Tablo 5.** Analiz işlemlerinde kullanılan hormon kitleri.

Hormon Kiti	Yöntem	Katalog No	Üretici Firma	Minimal Ölçüm Sınırları
OGH (sıçan)	ELISA	A05117	SPIbio	1 – 3.5 (pg/mL)
DGH (sıçan)	ELISA	A05118	SPIbio	6 – 8 (pg/mL)
OBS (sıçan)	ELISA	EK031-90	Phoenix Pharmaceuticals	0 – 100 (ng/mL)
NES (sıçan)	ELISA	EIA-NES-1	RayBiotech	147 – (pg/mL)
Ghrelin doku (sıçan)	İHK	H-031-31	Phoenix Pharmaceuticals	
Obestatin doku (sıçan)	İHK	H-031-90	Phoenix Pharmaceuticals	
Nesfatin-1 doku (sıçan)	İHK	H-003-22	Phoenix Pharmaceuticals	
AEC kromojen	İHK	TA-125-HA	Lab Vision Corporation	
Biotinylated Goat Anti-Mouse	İHK	TM-125-BN	Lab Vision (Thermo Fisher Scientific)	
Streptavidin peroxidase	İHK	TS-125-HR	Lab Vision (Thermo Fisher Scientific)	

ELISA: *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*. İHK: İmmünohistokimya.

- $VLDL-K = \text{Trigliserid} / 5$
- $LDL-K = TK - (HDL-K + VLDL-K)$

**Şekil 11.** Friedewald formülü (125). HDL-K: High-density lipoprotein kolesterol. LDL-K: Low-Density lipoprotein kolesterol. TK: Total kolesterol. VLDL-K: Very low-density lipoprotein kolesterol.

## 2.6. Enzim-Bağlı İmmün Assay Yönteminin Prensibi

Enzim-bağlı immün assay [*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA)] yöntemi, serum ve doku homojenatlarında araştırılan maddelerin (antijen) spesifik antikor molekülleri ile kompleks oluşturmaları prensibine bağlıdır. Benzer amaçla kullanılan radioimmunoassay (RIA) yönteminden farklı olarak ELISA yönteminde radyoaktif işaretleyiciler yerine spesifik enzimler kullanılmaktadır (126). Alkalen fosfataz ve *Horse Radish Peroxidase* (HRP) çalışmalarda yaygın olarak kullanılan enzimlerdir. ELISA ile RIA yöntemleri karşılaştırıldığında; radyoaktivite tehlikesi olmaması, otomasyona uygun oluşu ve çalışma süresinin daha kısa oluşu ELISA yöntemini daha üstün hale getirmektedir. ELISA yöntemi; insan, hayvan ve bitkilerde hastalıkların teşhisi [örn: *Human Immunodeficiency Virus* (HIV), Hepatit], besinlerdeki alerjenlerin tespiti, doping maddeleri ile uyuşturucular gibi kullanımı özel izne bağlı olan ilaçların ve hormonların [örn: *Triiodothyronine*, *Thyroxine*, TSH, LH] dolanımdaki düzeylerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Analiz aşaması antijenin pleyt yüzeyine (*Sorbent*) absorbe edilmesiyle başlamaktadır. Antijenin spesifik (özgül) antikoru ile reaksiyona girmesi *immunasyon* sağlanmaktadır. Bu kompleks antikor (primer antikor) kısmından enzim bağlanmış ikinci bir antikor (sekonder antikor) ile reaksiyona sokulmaktadır (*Enzyme-Linked*). Substrat renkli ürün oluşturacak şekilde mevcut kompleks içerisindeki enzim ile reaksiyona girmektedir. Son ürün renklidir. Elde edilen bu renkli ürün kompleksi ELISA sayacında okutularak konsantrasyon hesaplanır (*Assay*) (126).

### 2.6.1. Hormon analizleri

Serum ve dokularda hormon (OGH, DGH, OBS ve NES) düzeyleri ELISA yöntemiyle analiz edildi. Bu amaçla önceden hazırlanarak -20 °C'de derin dondurucuda saklanan serum ve doku süpernatantları kullanıldı. Hormon düzeylerinin tespit işlemleri ilgili kataloglarda belirtilen prosedürlere göre tamamlandı. Doku hormonlarının tayininde serum kitleri kullanıldığından; doku süpernatantlarında da bu kitlerin kullanılıp kullanılmayacağı daha önceden tanımlanan yöntemle göre (linerite, intra-inter assay vs) test edildi (127). Ölçümler hazırlık, analiz ve hesaplama olmak üzere üç aşamada yapıldı. OGH (1/5) ve DGH (1/10) dilüe edilerek çalışıldı. Hesaplamalar yapılırken OGH için elde edilen değerler 5, DGH değerleri ise 10 ile çarpıldı. Tüm analizler aynı deney serisinde yapıldı.

1) Bütün çözeltiler, kit içerisinde mevcut olan reaktifler kullanılarak, üretici firmanın önerdiği prosedürlere göre analiz öncesinde taze olarak hazırlandı. 2) Pipetleme aşamasında her bir reaktif ve numune için daha önce kullanılmamış yeni bir pipet ucu kullanıldı. 3) Bütün ayıraçlar ve numuneler analiz aşaması öncesinde oda ısısına getirildi. 4) Ölçüm yapılmadan önce pipet uçları ölçümü yapılacak çözeltilerle hafifçe ıslatıldı. 5) Kuyucuklara aynı sıra ile pipetleme yapıldı. 6) Birbirine eklenen çözeltiler iyice karışmaları için birkaç kez yavaşça pipetlenerek karıştırıldı. Miktarlarını tayin ettiğimiz hormonların ELISA prosedürleri aşağıda detayları ile bahsedilmektedir.

#### **2.6.1.1. Ghrelin Analizleri**

Ghrelinin bu çalışmada oktanile ve desaçile olmak üzere iki farklı formu ölçüldü. Ölçüm prosedürleri detayları ile aşağıda verilmektedir.

##### **Oktanile (*Acylated*) Ghrelin Assay**

##### **A-Hazırlık**

##### **A.1. Çözeltilerin Hazırlanışı**

##### **A.1.1. Tampon Çözeltileri ve Numunelerin Hazırlanışı**

1. Kit içerisindeki liyofilize halde bulunan tampon çözeltisi (*EIA buffer*) şişesi açıldı ve içerisine 50 mL distile su katıldı. Beş dakika beklendikten sonra çözeltinin iyice karışması için yavaşça çalkalandı.
2. Kit içerisindeki yıkama tamponu çözeltisi (*Wash buffer*) şişesi açıldı ve içerisine 400 mL distile su ve 200 µL *Tween-20* çözeltisi katıldı ve manyetik bir karıştırıcı ile çözelti hazırlandı.
3. Bütün numuneler EIA tamponu ile 1/5 oranında dilüe edildi.

##### **A.1.2. Standart Çözeltileri ve Dilüentlerin Hazırlanışı**

1. Boş deney tüpleri [oktanile ghrelin standart tüpü (OGST)] sırasıyla OGST1, OGST2, OGST3, OGST4, OGST5, OGST6, OGST7, OGST8 olacak şekilde etiketlendi.
2. Kit içerisindeki liyofilize halde bulunan açile ghrelin standart şişesi açıldı ve içerisine 1 mL distile su katıldı. Beş dakika beklendikten sonra çözeltinin iyice karışması için yavaşça çalkalandı.
3. İlk tüpe (OGST1) hazırlanan 1 mL standart çözelti eklendi.
4. Diğer tüplere 500 µL EIA tamponu konuldu.

5. OGST1'den alınan 500 µL çözelti OGST2'ye eklendi ve karıştırıldı (toplam çözelti miktarı: 1000 µL).
6. OGST2'den alınan 500 µL çözelti OGST3'e eklendi ve karıştırıldı (toplam çözelti miktarı: 1000 µL).
7. Bu şekilde 8 tüpten oluşan dilüsyon serisi hazırlandı.

#### ***A.1.3. Kalite Kontrol Çözeltilerinin (Quality Control) Hazırlanışı***

1. Kit içerisindeki liyofilize halde bulunan kalite kontrol (QC) şişelerinden QC-1 açıldı ve içerisine 1 mL distile su katıldı. Beş dakika beklendikten sonra çözeltinin iyice karışması için yavaşça çalkalandı.
2. Aynı metotla kalite kontrol-2 (QC-2) çözeltisi de hazırlandı.

#### ***A.1.4. Anti-Açile Ghrelin Tracer Çözeltisi ve Ellman's Ayıracı Hazırlanışı***

1. Kit içerisindeki liyofilize halde bulunan [*Acetylcholinesterase-Tracer (AChE-T)*] şişesi açıldı ve içerisine 10 mL EIA tamponu katıldı. Beş dakika beklendikten sonra çözeltinin iyice karışması için yavaşça çalkalandı.
2. Ellman's ayıracı (*Ellman's reagent*) kullanımından 5 dakika önce hazırlandı. Kit içerisindeki liyofilize halde bulunan Ellman's ayıracı şişesi açıldı ve içerisine 49 mL distile su ve 1 mL yıkama tamponu çözeltisi katıldı. Çözeltinin iyice karışması için yavaşça çalkalandı.

#### ***A.2. Pleytin Hazırlanışı***

1. Pleyt paketinden çıkarıldı. Kullanılacak kuyucuklar belirlendi. Etiketlemede; analiz aşamasında kullanılacak reaktifler ile serum ve doku numuneleri için spesifik simgeler [kör (K), *Non Spesific Binding* (NSB), standart (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8), *Quality Control* (QC1, QC2), Numune (N1, N2, ... N68)] kullanıldı (Şekil 12).
3. Kullanılacak bütün kuyucuklar 5 kez 300 µL yıkama tamponu ile çalkalandı ve kurulandı.

ELISA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K	NSB	S 1	QC 1	N 5	N 13	N 21	N 29	N 37	N 45	N 53	N 61
B	K	NSB	S 2	QC 1	N 6	N 14	N 22	N 30	N 38	N 46	N 54	N 62
C	K	NSB	S 3	QC 2	N 7	N 15	N 23	N 31	N 39	N 47	N 55	N 63
D	K	NSB	S 4	QC 2	N 8	N 16	N 24	N 32	N 40	N 48	N 56	N 64
E	K	NSB	S 5	N 1	N 9	N 17	N 25	N 33	N 41	N 49	N 57	N 65
F	K	NSB	S 6	N 2	N 10	N 18	N 26	N 34	N 42	N 50	N 58	N 66
G	K	NSB	S 7	N 3	N 11	N 19	N 27	N 35	N 43	N 51	N 59	N 67
H	K	NSB	S 8	N 4	N 12	N 20	N 28	N 36	N 44	N 52	N 60	N 68

Şekil 12. Oktanile ghrelin analizi için ELISA pleyti kuyucuk düzeni.

### ***B-Analiz***

1. Pleytteki kör kuyucukları boş bırakıldı.
2. NSB kuyucuklarına 100 µL EIA tamponu konuldu.
3. Standart kuyucuklarına 100 µL ilgili standart çözeltisinden konuldu.
4. QC1 ve QC2 kuyucuklarına 100 µL ilgili kalite kontrol çözeltilerinden konuldu.
5. Numune kuyucuklarına 100 µL ilgili numune dilüentlerinden konuldu.
6. Kör haricindeki tüm kuyucuklara 100 µL *AChE-T* çözeltisi konuldu.
7. Pleytin üzeri parafilm ile kapatılarak oda ısısında 3 saat inkübasyona bırakıldı.
8. Bütün kuyucuklar ELISA yıkayıcıda 5 kez 300 µL yıkama tamponu ile yıkandı.
9. Çalkalayıcı (*Orbital shaker*) (350 rpm) ile oda ısısında 5 dakika çalkalandı.

ELISA yıkayıcıda 5 kez 300 µL yıkama tamponu ile yıkandı (Şekil 13).

### ***C-Hesaplama***

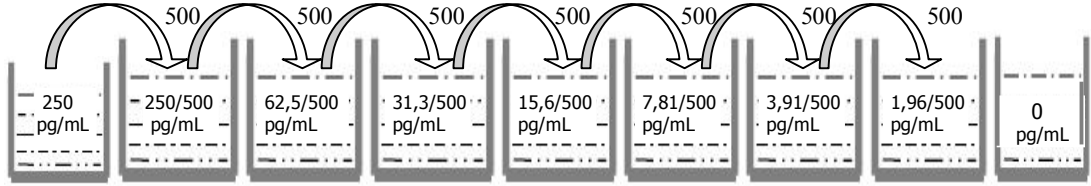
1. Duplike çalışılan; K, NSB, QC, standart ve numunelerin absorbands değerlerinin ortalamaları belirlendi.
2. Pleytin ilk kolonundaki Ellman's ayırıcı için okunan absorbands değerleri (kör değerleri) diğer değerlerden çıkarıldı.
3. Elde edilen sonuçlardan standart grafiği hazırlandı.

Numunelerin belirlenen absorbands değerleri standart grafiğine yerleştirilerek konsantrasyonları tespit edildi.

Numuneler 1/5 oranında dilüe edildiği için son değerler 5 ile çarpıldı ve serum düzeyleri pg/mL, doku düzeyleri ise pg/mg doku olarak belirlendi.

E/A Tamponu	⇐	50 mL Distile su
Standart	⇐	1 mL Distile su
Kontrol	⇐	1 mL Distile su
Tracer	⇐	10 mL E/A Tamponu
Yıkama	⇐	1 mL Konsantre yıkama tamponu 400 mL Distile su 20 µL Tween®20
Ellman's Reagent	⇐	49 mL Distile su, 1 mL Konsantre yıkama tamponu

### Standart Hazırlama



Stok E/A Tampon

Şekil 13. Oktanile ghrelin deneyinin kısa şematik özeti.

### Çalışma

- ⇐ Örnekleri 1:5 E/A Tamponu ile sulandır.
- ⇐ Pleyti 5 kez 300 µL'de yıka.
- ⇐ 100 µL Standart, örnek ve kontrol koy.
- ⇐ 100 µL Tracer koy, 3 saat oda ısısında bekle.
- ⇐ 5 kez 300 µL'de yıka.
- ⇐ 200 µL. Ellman's ayırıcı koy, karanlıkta inkübe et.
- ⇐ 405-414 nm'de okut.

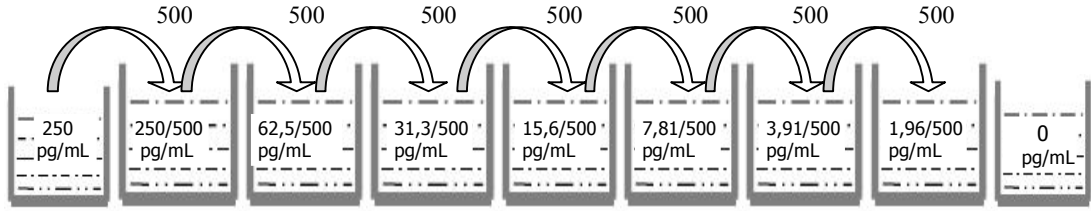
### Desaçile Ghrelin Deneyinin Kısa Şematik Özeti

Desaçile ghrelin ölçümünün genel hazırlık ve reagent'ların hazırlanması OGH ölçümünün prosedürü ile benzer olduğundan DGH deneyi burada sadece şematik olarak verilmiştir (Şekil 14). Numuneler hazırlık aşamasında 1/10 oranında

dilüe edildiği için son değerler 10 ile çarpıldı ve serum düzeyleri pg/mL, doku düzeyleri ise pg/mg doku olarak belirlendi.

E/A Tampon	⇨	50 mL Distile su
Standart	⇨	1 mL Distile su
Kontrol	⇨	1 mL Distile su
Tracer	⇨	10 mL E/A Tampon
Yıkama	⇨	1 Ml Konsantre yıkama tamponu 400 mL Distile su 20 µL Tween®20
Ellman's ayıracı	⇨	49 mL Distile su, 1 mL Konsantre yıkama tamponu

### Standart Hazırlama



Stok E/A Tampon

Şekil 14. Desaçile ghrelinin deneyinin kısa şematik özeti.

### Çalışma

- ⇨ Örnekleri 1:10 E/A Tamponu ile sulandır.
- ⇨ Pleyti 5 kez 300 µL'de yıka.
- ⇨ 100 µL Standart örnek ve kontrol koy.
- ⇨ 100 µL Tracer koy, 3 saat oda ısısında bekle.
- ⇨ 5 kez 300 µL'de yıka.
- ⇨ 200 µL Ellman's ayıracı koy, karanlıkta inkübe et.
- ⇨ 405–414 nm'de okut.

## 2.6.1.2. Obestatin Analizleri

### *A-Hazırlık*

#### *A.1. Çözeltilerin Hazırlanışı*

##### *A.1.1. Tampon Çözeltileri ve Numunelerin Hazırlanışı*

1. Kit içerisindeki konsantre tampon çözelti (20 X *Assay buffer*) şişesi açıldı ve içerisine 950 mL distile su katılarak hazırlandı. Şişenin içindeki kristaller kaybolana kadar yaklaşık 20 dakika karıştırıldı.
2. Bütün numuneler *Assay* tamponu ile 1/5 oranında dilüe edildi.
3. 12 mL *Assay* tamponu içerisine 12 µL *Streptavidin-Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP) çözeltisi (kullanılmadan hemen önce 4000 rpm de 5 saniye santrifüj edildi) konuldu ve vortekslendi.

##### *A.1.2. Standart Çözeltisi ve Dilüentlerin Hazırlanışı*

1. Kit içerisindeki obestatin standart şişesi açıldı ve içerisine 1 mL *Assay* tamponu katıldı. Çözeltinin iyice karışması için oda ısısında 10 dakika bekletildi. Kullanımından hemen önce vorteks ile karıştırılarak santrifüj edildi.
2. Tüpler [obestatin standart tüpü (OST)] sırasıyla OST1, OST2, OST3, OST4, OST 5 şeklinde yazılarak hazırlandı ve her birine 900 µL *Assay buffer* konuldu.
3. Birinci tüpe (OST1) 100 µL standart çözelti eklendi ve karıştırıldı. Tablo 1'den alınan 100 µL çözelti OST2'ye eklendi ve karıştırıldı. Bu şekilde 5 tüpten oluşan dilüsyon serisi hazırlandı.

##### *A.1.3. Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanışı*

1. Kit içerisindeki pozitif kontrol çözelti [*Positive Control* (PC)] şişesi açıldı ve içerisine 200 µL *Assay* tamponu katıldı. Çözeltinin tamamen çözünmesi için 5 dakika beklendikten sonra iyice karıştırıldı.

##### *A.1.4. Antikor Çözeltilerinin Hazırlanışı*

1. Kit içerisindeki primer antikor [*Primary Antiserum* (PA)] şişesi açıldı ve içerisine 5 mL *Assay* tamponu katıldı. Çözeltinin tamamen çözünmesi için 5 dakika beklendikten sonra iyice karıştırıldı.

2. Kit içerisindeki sekonder antikor [*Biotinylated Peptide* (BP)] şişesi açıldı ve içerisine 5 mL *Assay* tamponu katıldı. Çözeltinin tamamen çözünmesi için 5 dakika beklendikten sonra iyice karıştırıldı.

#### **A.2. Pleytin Hazırlanışı**

1. Pleyt paketinden çıkarıldı. Kullanılacak kuyucuklar belirlendi. Etiketlemede; analiz aşamasında kullanılacak reaktifler ile serum ve doku numuneleri için spesifik simgeler [kör (Kr), Standart (St1a, St1b, St2a, St2b, St3a, St3b, St4a, St4b, St5a, St5b), *Positive Control* (PC), Numune (Nu1, Nu2, ... Nu80)] kullanıldı.

#### **B-Analiz**

1. Pleytteki kör kuyucukları boş bırakıldı.
2. TB kuyucuklarına duplike olarak 50 µL *Assay* tamponu konuldu.
3. Standart kuyucuklarına duplike olarak 50 µL standart çözeltileri (S5 → S1a, S1b; S4 → S2a, S2b; S3 → S3a, S3b; S2 → S4a, S4b; S1 → S5a, S5b) konuldu.
4. PC kuyucuklarına çift olarak 50 µL pozitif kontrol çözeltisi konuldu.
5. Numune kuyucuklarına 50 µL ilgili numune dilüentlerinden konuldu.
6. Kör haricindeki tüm kuyucuklara 25 µL PA çözeltisi konuldu.
7. Kör haricindeki tüm kuyucuklara 25 µL BP çözeltisi konuldu.
8. Pleytin üzeri kit içerisinde mevcut olan pleyt asetadı ile kapatılarak çalkalayıcı (350 rpm) ile oda ısısında 2 saat inkübasyona bırakıldı.
9. Pleyt asetadı çıkarılarak kuyucukların üzeri açıldı ve kuyucuklardaki çözeltiler döküldü.
10. Bütün kuyucuklar 350 µL *Assay* tamponu ile yıkandı ve *Assay* tamponu döküldü. Daha sonra pleyt ters çevrilerek lekeler kurulandı. Bu işlemler 3 kez daha tekrarlandı.
11. Bütün kuyucuklara taze olarak hazırlanan 100 µL *SA-HRP* çözeltisi konuldu.
12. Pleytin üzeri kit içerisinde mevcut olan bir pleyt asetadı ile kapatılarak, çalkalayıcı (350 rpm) ile oda ısısında 1 saat inkübasyona bırakıldı.
13. Pleyt asetadı çıkarılarak kuyucukların üzeri açıldı.

14. Bütün kuyucuklar 350  $\mu$ L *Assay* tamponu ile yıkandı ve *Assay* tamponu döküldü. Daha sonra pleyt ters çevrilerek lekeler kurulandı. Bu işlemler 3 kez daha tekrarlandı.
15. Bütün kuyucuklara 100  $\mu$ L substrat [*TMB Substrate* (TMB-S)] çözeltisi konuldu.
16. Substrat çözeltisi eklendikten hemen sonra ışıktan korumak için pleyt asetatıyla sıkıca sarıldı. Çalkalayıcı (350 rpm) ile oda ısısında 1 saat inkübasyona bırakıldı.
17. Pleyt asetatı çıkarılarak kuyucukların üzeri açıldı. Reaksiyonu durdurmak için bütün kuyucuklara 100  $\mu$ L 2N HCl konuldu. Reaksiyonun tamamen durması için 20 dakika beklendi.
18. Pleyttteki kuyucukların 450 nm deki absorbans değerleri spektrofotometrik olarak, ELISA cihazında okutuldu (Şekil 15).

### ***C-Hesaplama***

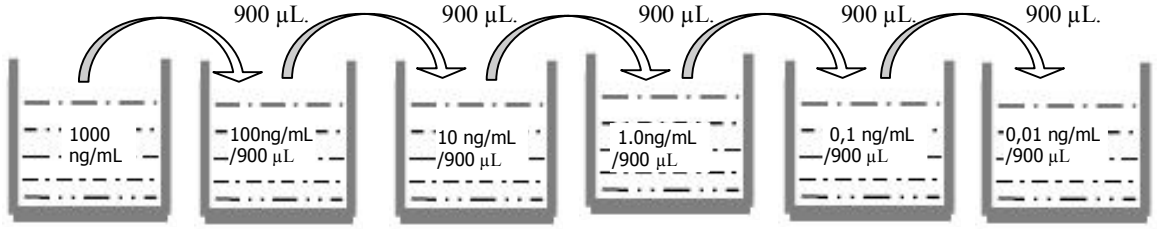
1. Duplike çalışılan; QC, standart ve numunelerin absorbans değerlerinin ortalamaları belirlendi.
2. Semi-log grafik kağıdına (X eksenine standart peptidin bilinen konsantrasyon noktaları, Y eksenine ELISA okuyucuda okunan değerler işaretlenerek) standart grafiği çizildi.
3. Numunelerin belirlenen absorbans değerleri standart grafiğine yerleştirilerek absorbanslara karşılık gelen konsantrasyon değerleri tespit edildi.

Serum düzeyleri ng/mL, doku düzeyleri ise ng/mg doku olarak belirlendi.

### ***Obestatin Deneyinin Kısa Şematik Özeti***

<i>Assay</i> tamponu 20X	▣=————→	950 mL Distile suda çöz.
Standart (Stok)	▣=————→	1X <i>Assay</i> tamponu = 900 $\mu$ L.
<i>Antibody</i>	▣=————→	5 mL 1X <i>Assay</i> tamponu.
Biotin	▣=————→	5 mL 1X <i>Assay</i> tamponu.
Pozitif kontrol	▣=————→	200 $\mu$ L.1X 1X <i>Assay</i> tamponu.
<i>SA-HRP</i>	▣=————→	12 $\mu$ L <i>SA-HRP</i> 'yi, 12 mL 1X <i>Assay</i> tamponu.

### Standart Hazırlama



Stok 1X Assay Buffer

Şekil 15. Obestatin deneyinin kısa şematik özeti.

### Çalışma:

- ⇒ 50 µL standart (5 standart) örnek ve kontrol (1 kontrol) koy.
- ⇒ 25 µL *Antibody* koy.
- ⇒ 25 µL Biotin koy.
- ⇒ 2 saat oda ısısında beklet (*Shaker*'da)
- ⇒ 4 kez 350 µL 1X *Assay* tamponu ile yıka.
- ⇒ 100 µL *SA-HRP* koy.
- ⇒ 1 saat oda ısısında çalkalayıcıda (*Orbital shaker*) beklet.
- ⇒ 4 kez yıka.
- ⇒ 100 TMB koy (reaksiyon renklendi mi?).
- ⇒ 1 saat oda ısısında beklet.
- ⇒ 100 µL 2 N HCl koy.
- ⇒ 450 nm'de okut.

### 2.6.1.3. Nesfatin-1 Analizleri

#### A-Hazırlık

##### A.1. Çözeltilerin Hazırlanışı

##### A.1.1. Tampon Çözeltileri ve Numunelerin Hazırlanışı

Konsantre tampon çözeltisine (*Wash Buffer Concentrate*: 20 mL) 400 mL distile su katılarak, yıkama tamponu (*Wash buffer*) çözeltisi hazırlandı.

#### **A. A.1.2. Standartlar ve Dilüentlerin Hazırlanışı**

1. Boş deney tüpleri [nesfatin-1 standart tüpü (NST)] sırasıyla NST1, NST2, NST3, NST4, NST5, NST6, NST7, NST8 olacak şekilde etiketlendi.
2. NST1'e 10 µL Nesfatin standart peptid kondu ve üzerine 990 µL *Biotinylated nesfatin* çözeltisi katılarak, *Nesfatin standart* çözeltisi hazırlandı (toplam çözelti miktarı: 1000 µL).
3. NST2'ye 450 µL *Biotinylated nesfatin* çözeltisi kondu ve üzerine 50 µL *nesfatin standart* çözeltisi katılarak, *Nesfatin standart stok* çözeltisi hazırlandı (toplam çözelti miktarı: 500 µL).
4. Diğer deney tüplerinin (NST3, NST4, NST5, NST6, NST7, NST8) her birine 450 µL *biotinylated nesfatin* çözeltisi konarak dilüsyon serisi oluşturuldu (toplam çözelti miktarları: 450 µL).
5. NST3'e 50 µL *nesfatin standart stok* çözeltisi kondu (toplam çözelti miktarı: 500 µL).
6. NST3'de hazırlanan bu karışımdan 50 µL alınarak NST4'e kondu (toplam çözelti miktarı: 500 µL).
7. Bu şekilde toplam 5 tüpten oluşan dilüsyon serisi hazırlandı.

#### **A.1.3. Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanışı**

1. Kit içerisindeki *Positive Control* şişesi açıldı ve içerisine 103 µL *Assay diluent B* ve 2 µL *biotinylated nesfatin* (10 kez dilüe edilmiş) çözeltisi konarak, pozitif kontrol çözeltisi hazırlandı.

#### **A.1.4. Antikorlar ve Streptavidin Peroksidaz Çözeltilerinin Hazırlanışı**

1. *Assay diluent B* şişesi açılarak distile su ile 5 kat dilüe edilerek, *1 x assay diluent B* hazırlandı.
2. *Anti-Nesfatin Polyclonal Antibody* şişesi açılarak içerisine 50 µL *1 x assay diluent B* katıldı. Elde edilen karışım birkaç kez yavaşça pipetlenerek *Anti-Nesfatin Antibody Stok* çözeltisi hazırlandı.
3. *Anti-nesfatin antibody stok* çözeltisi *1 x assay diluent B* ile 100 kez dilüe edilerek, *Anti-Nesfatin Antibody* çalışma çözeltisi hazırlandı.

4. *Biotinylated Nesfatin Peptide* şişesi açılarak içerisine; serum örnekleri için 5 mL *assay diluent A*, doku örnekleri için 5 mL *1 x assay diluent B* katılarak, *Biotinylated Nesfatin* çözeltileri hazırlandı.
5. *HRP-Streptavidin Concentrate* şişesi açıldı ve 2 µL *HRP-Streptavidin Concentrate* içerisine 198 µL *1 x Assay diluent B* konarak, *100 x HRP-Streptavidin* çözeltisi hazırlandı.
6. 100 µL *100 x HRP-Streptavidin* bir tüpe alındı. Üzerine 10 mL *1 x assay diluent B* katılarak dilüe edildi. Bu şekilde 10 000 x *HRP-Streptavidin* çözeltisi hazırlandı.

#### **A.2. Pleytin Hazırlanışı:**

1. Pleyt paketinden çıkarıldı. Kullanılacak kuyucuklar belirlendi. Etiketlemede; analiz aşamasında kullanılacak reaktifler ile serum ve doku numuneleri için spesifik simgeler [Kör (K), Standart (S1, S2, S3, S4, S5, S6), *Positive Control* (PC), Numune (N1, N2, ... N80)] kullanıldı.
2. Kullanılacak bütün kuyucuklar 5 kez 300 µL *wash buffer* ile çalkalandı ve kurulandı.

#### **B-Analiz**

1. Bütün kuyucuklara 100 µL *Anti-nesfatin antibody* kondu.
2. Pleytin üzeri kit içerisinde mevcut olan bir pleyt asetatı ile kapatılarak, oda ısısında 1.5 saat inkübasyona bırakıldı.
3. Çözeltiler döküldü ve bütün kuyucuklara 200 µL yıkama tamponu konduktan sonra kuyucuklar yıkandı. Bu işlem toplam 5 kez yapıldı.
4. Yıkama tamponu döküldü ve kör haricindeki ilgili kuyucuklara, standart çözeltisi, pozitif kontrol çözeltisi ve numune dilüentlerinden 100 µL konuldu.
5. Pleytin üzeri kit içerisinde mevcut olan bir pleyt asetatı ile kapatılarak, oda ısısında 2.5 saat inkübasyona bırakıldı.
6. Çözeltiler döküldü ve bütün kuyucuklara 200 µL yıkama tamponu konduktan sonra kuyucuklar yıkandı. Bu işlem toplam 4 kez yapıldı.
7. Yıkama tamponu döküldü ve bütün kuyucuklara 100 µL *10 000 x HRP-Streptavidin* kondu.

8. Pleytin üzeri kit içerisinde mevcut olan bir pleyt asetatı ile kapatılarak, oda ısısında 45 dakika inkübasyona bırakıldı.
9. Çözeltiler döküldü ve bütün kuyucuklara 200 µL yıkama tamponu konduktan sonra kuyucuklar yıkandı. Bu işlem toplam 5 kez yapıldı.
10. *Wash buffer* döküldü ve bütün kuyucuklara 100 µL *TMB One-Step Substrate Reagent* kondu.
11. Karanlıkta, oda ısısında 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
12. Reaksiyonu durdurmak için bütün kuyucuklara 50 µL reaksiyon durdurucu çözeltisi (*Stop Solution*) eklendi.
13. Pleytteki kuyucukların 450 nm deki absorbans değerleri spektrofotometrik olarak, ELISA cihazında okutuldu (Tablo 6).

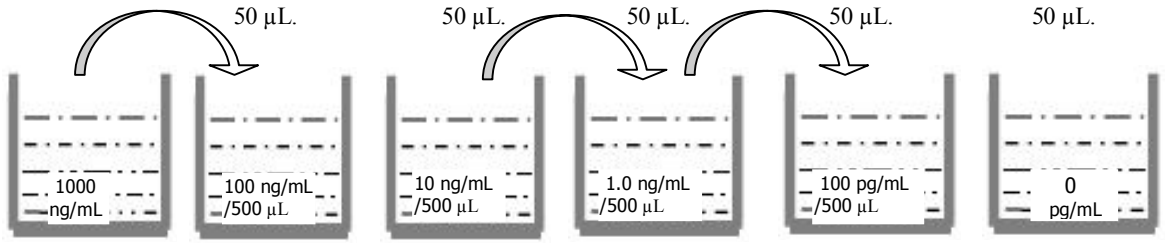
### ***C-Hesaplama***

1. Standartlar, kontroller ve örneklerin ortalama değerlerini hesaplandı. Sonuçlardan kör değerleri çıkarıldı.
2. Standart konsantrasyonları X eksenine, absorbans değerleri Y eksenine yerleştirilerek standart grafiği hazırlandı.
3. Standart grafiğinde absorbanslara karşılık gelen konsantrasyon değerleri tespit edildi. Serum düzeyleri ng/mL, doku düzeyleri ise ng/mg doku olarak belirlendi (Şekil 16).

### ***Nesfatin – 1 Deneyinin Kısa Şematik Özeti***

Assay tamponu 20X	⇐=====➤	400 mL Distile suda çöz.
Standart (Stok)	⇐=====➤	1X Assay tamponu = 1000 ng/mL
<i>Antibody</i>	⇐=====➤	5 mL 1X Assay tamponu
Biotin	⇐=====➤	5 mL 1X Assay tamponu
Pozitif Kontrol	⇐=====➤	200 µL 1X Assay tamponu
HRP	⇐=====➤	12 µL HRP'yi, 12 mL 1X Assay tamponu

### Standart Hazırlama



Stok 1X Assay tamponu

**Şekil 16.** Nesfatin-1 deneyinin kısa şematik özeti.

#### Çalışma:

- ➡ 100 µL standart (5 standart) örnek ve kontrol (1 kontrol) koy.
- ➡ 100 µL *Anti-Nesfatin Antibody* koy 1,5 saat oda ısısında beklet.
- ➡ 200 µL yıkama tamponu ile 5 kez yıka.
- ➡ 100 µL standart, pozitif kontrol ve numune dilüentleri koyuldu ve 2,5 saat oda ısısında beklet.
- ➡ 4 kez 200 µL yıkama tamponu ile yıka.
- ➡ Kuyucuklara 100 µL 10000 x *HRP-Stravidin* koyup, 45 dakika inkübe et.
- ➡ 200 µL yıkama tamponu ile 5 kez yıka.
- ➡ 100 µL TMB koy oda ısısında 30 dakika bekle.
- ➡ 50 µL reaksiyon durdurucu çözelti ekle.
- ➡ 450 nm'de okut.

Deney aşamasında kullanılan çözeltiler taze olarak hazırlandı. Kromojen çözeltisi (*3-Amino-9-Ethyl Carbazole: AEC*) kullanımından yaklaşık 15 saniye önce hazırlandı.

## 2.7. İmmünohistokimyasal Analizler

### 2.7.1. İmmünohistokimyasal Yöntemin İlkesi

Dokulardaki spesifik maddeler (antijen) ilk kez 1940'lı yıllarda immünohistokimyasal olarak tespit edilmeye başlanmıştır (126). İHK; immünolojik, histolojik, biyokimyasal ve anatomik tekniklerin kombine edilmesiyle geliştirilmiştir.

Yöntemin en önemli özelliği, dokulardaki antijen varlığını çok küçük konsantrasyonlarda bile görsel olarak tespit edebilmesine dayanmaktadır.

### **2.7.2. DeneYlerin Yapılışı**

Sakrifikasyon işleminden sonra % 10'luk formaldehit çözeltisine alınan doku örneklerindeki; Ghrelin, OBS ve NES ekspresyonları; spesifik kitler kullanılarak, Hsu ve arkadaşlarının önerdiği (128) şekilde (*Avidin-Biotin-peroxidase Complex: ABC yöntemi*) immünohistokimyasal yöntemle belirlendi. Bu amaçla doku örnekleri kullanıldı. İHK boyama; hazırlık ve analiz olmak üzere iki basamakta yapıldı.

#### **2.7.2.1. Dokuların İmmünohistokimyasal Yöntemle Boyanması**

##### ***A-Hazırlık***

1. % 10'luk formaldehit içindeki doku örnekleri parafinizasyon işlemiyle doku bloklarına alındı.
2. Parafin bloklardan elde edilen kesitler (4µm) polizimli lamlara alındı.
3. Deparafinizasyon işleminin ilk basamağı için etüvde (+80 °C) 20 dakika bekletildi.
4. Deparafinizasyon işleminin ikinci basamağı için 20 dakika saf ksilol serilerinden geçirildi (4 x 5').
5. Ksilolün dokudan uzaklaştırılması için 15 dakika alkol serilerinden (% 99.5 → % 96 → % 90 → % 80 → % 70) geçirildi (5 x 3').
6. Alkolün dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika distile suda yıkandı.
7. Endojen peroksidazları inaktive etmek için 10 dakika metanolde hazırlanan % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içinde bekletildi (2 x 5').

##### ***B-Analiz***

1. 15 dakika mikrodalga ısıtıcıda (750 mw) % 10'luk sitrat tamponu (*Citrate buffer*, pH: 6.0) içinde inkübe edildi.
2. Kesitleri tampon sıcaklığına getirmek için 20 dakika oda ısısında bekletildi.
3. 5 dakika PBS (0.01 M, pH: 7.4) tampon çözeltisinde bekletildi.
4. 10 dakika *Horse Radish Peroxidase Blocking* ile inkübe edildi.

5. 30 dakika spesifik primer doku antikoru (*ghrelin / OBS / NES*) ile su banyosunda (+38 °C) inkübe edildi.
6. 5 dakika PBS’de bekletildi.
7. Primer antikorun sekonder antikorla reaksiyonunu gerçekleştirmek için 10 dakika su banyosunda (+38 °C) *Biotinylated Goat Anti-Mouse* ile inkübe edildi.
8. 5 dakika PBS’de bekletildi.
9. 10 dakika su banyosunda (+38 °C) *Streptavidin Peroxidase* ile inkübe edildi.
10. 5 dakika PBS’de bekletildi.
11. Sekonder antikorun renkli işaretleyici (kromojen) ile reaksiyonunu gerçekleştirmek için 10 dakika su banyosunda (+38 °C) *AEC chromogen* ile inkübe edildi.
12. 1 – 2 dakika distile suda yıkandı.
13. Kesitlerin suyu süzüldü (tamamen kurutmamaya dikkat edildi).
14. Kontrast boyama için 2 dakika *Mayer Hematoksilen* ile boyandı.
15. 1 – 2 dakika distile suda yıkandı.
16. Kesitlerin suyu süzüldü (tamamen kurutmamaya dikkat edildi).
17. İHK olarak boyanan kesitler lamel kapatılarak daimi preparat haline getirildi.
18. Işık mikroskobu kullanılarak ve ışıktan korumak amacıyla mümkün olduğunca hızlı bir şekilde dokuların İHK fotoğrafları çekildi.

İHK boyamalar esnasında pozitif kontrol olarak tükürük bezleri, negatif kontrol olarak ise PBS kullanıldı (122). Elde edilen boyanmaların İHK değerlendirilmesi pozitif (+1, +2, +3) ve negatif (–) değerlerle sayısal olarak yapıldı (126).

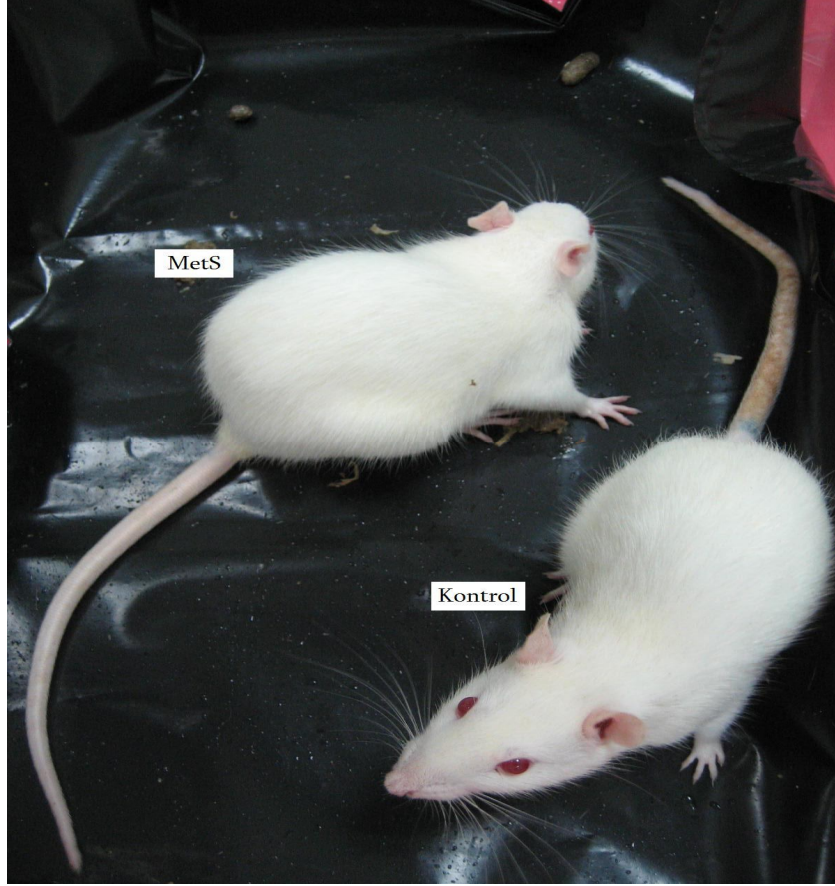
## **2.8. İstatistiksel Analizler**

İstatistiksel analizlerin yapılmasında SPSS 10.00 paket programı kullanıldı. Çalışma parametreleri ortalama  $\pm$  standard sapma (*Standart Deviation: SD*) olarak sunuldu. İstatistiksel analizler sonucunda elde edilen; OGH, DGH, OBS ve NES düzeyleri ile bu analiz parametrelerinin MetS ve kontrol grupları arasındaki değişim

yüzde değerleri virgülden sonra iki basamak içeren yuvalanmış rakamlar olarak hesaplandı. Gruplar arası verilerin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi, tekrarlayan ölçümlerin istatistiksel anlamlılığının belirlenmesinde ise Wilcoxon rank testi uygulandı. Parametreler arasındaki ilişkiler ise Pearson's testi uygulanarak değerlendirildi.  $P \leq 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3. BULGULAR

Çalışmaya beş haftalık 32 adet (16 erkek, 16 dişi) *Sprague Dawley* türü sıçan dahil edildi. Diyet programı süresince kontrol ve MetS gruplarındaki sıçanlarda ölüm saptanmadı. Kontrol ve MetS gruplarından erkek sıçanların 12. haftadaki görünüşleri Şekil 17’de gösterilmiştir.



**Şekil 17.** 12. hafta sonunda erkek sıçanların örnek görünüşleri. MetS: Metabolik Sendrom.

#### 3.1. Vücut Kitle İndeksi Değişimleri

Vücut kitle indeksi, diyet programı başlangıcından itibaren 2 haftalık periyotlar şeklinde kaydedildi. Bazal, 2. hafta, 4. hafta, 6. hafta, 8. hafta, 10. hafta ve 12. hafta VKİ ölçümleri tablo 6’da verilmiştir.

**Tablo 6.** Deney sürecinde sıçanların vücut kitle indeksi değişimleri (Mann-Whitney U testi, Wilcoxon rank testi).

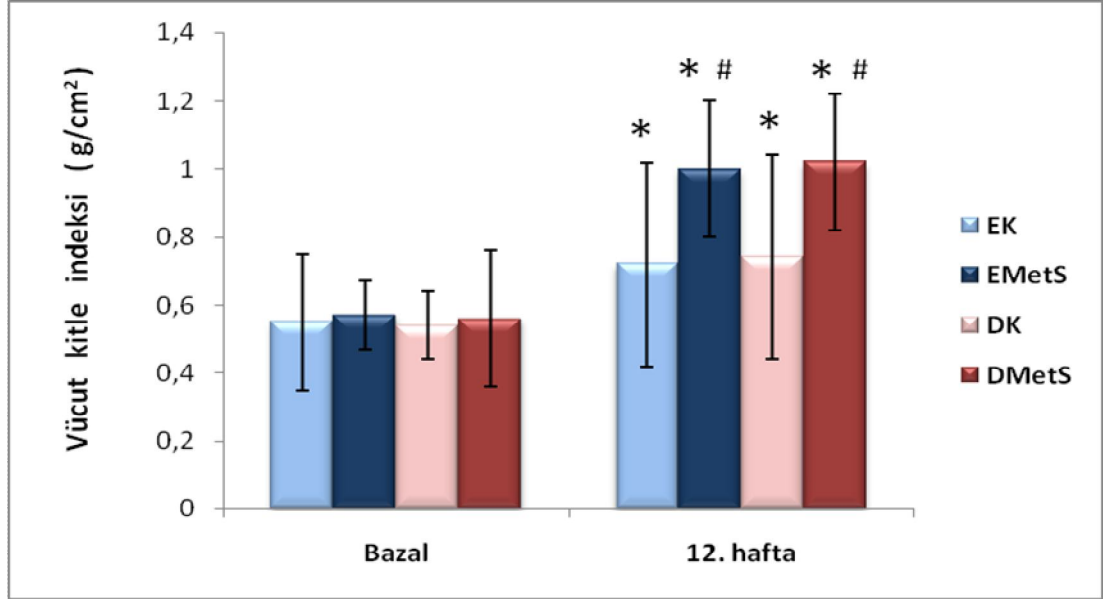
GRUP	VKİ (g/cm <sup>2</sup> )						
	Bazal	2. hafta	4. hafta	6. hafta	8. hafta	10. hafta	12. hafta
EK (n: 8)	0.55 ± 0.2	0.56 ± 0.3	0.59 ± 0.4	0.63 ± 0.2	0.65 ± 0.3	0.67 ± 0.3	0.72 ± 0.3 <sup>a</sup>
EMetS (n: 8)	0.57 ± 0.1	0.59 ± 0.2	0.63 ± 0.3	0.69 ± 0.2	0.76 ± 0.4	0.88 ± 0.3	1.00 ± 0.2 <sup>a,b</sup>
DK (n:8)	0.54 ± 0.1	0.55 ± 0.2	0.59 ± 0.3	0.60 ± 0.2	0.64 ± 0.2	0.68 ± 0.2	0.74 ± 0.3 <sup>a</sup>
DMetS (n:8)	0.56 ± 0.2	0.56 ± 0.3	0.62 ± 0.2	0.69 ± 0.3	0.78 ± 0.3	0.91 ± 0.3	1.02 ± 0.2 <sup>a,b</sup>

DK: Dişi kontrol. DMetS: Dişi metabolik sendrom. EK: Erkek kontrol. EMetS: Erkek metabolik sendrom. VKİ: Vücut kitle indeksi.

<sup>a</sup> $p < 0.05$ , bazal değerle karşılaştırıldığında.

<sup>b</sup> $p < 0.01$ , kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında.

Bazal VKİ değerleri incelendiğinde; EK grubunda  $0.55 \pm 0.2$  g/cm<sup>2</sup>, EMetS grubunda  $0.57 \pm 0.1$  g/cm<sup>2</sup>, DK grubunda  $0.54 \pm 0.1$  g/cm<sup>2</sup>, DMetS grubunda  $0.56 \pm 0.2$  g/cm<sup>2</sup> olup, kontrol ve MetS grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p > 0.05$ ). 12 haftalık diyet programının sonunda VKİ düzeyleri; EK grubunda  $0.72 \pm 0.3$  g/cm<sup>2</sup>, EMetS grubunda  $1.00 \pm 0.2$  g/cm<sup>2</sup>, olup gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p < 0.01$ ). Dişilerde 12 haftalık diyet programının sonunda VKİ düzeyi DK grubunda  $0.74 \pm 0.3$  g/cm<sup>2</sup>, DMetS grubunda  $1.02 \pm 0.2$  g/cm<sup>2</sup> olup, gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $p < 0.01$ ) saptandı. Erkek ve dişi gruplarındaki sıçanların VKİ değerleri bazal ve 12. hafta sonu itibariyle karşılaştırıldığında; EK bazal → EK 12. hafta, EMetS bazal → EMetS 12. hafta, DK bazal → DK 12. hafta, DMetS bazal → DMetS 12. hafta aralarındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $p < 0.05$ ) belirlendi. Sıçanların bazal ve 12. hafta sonundaki VKİ düzeyleri grafiksel olarak ifade edildi (Şekil 18).



**Şekil 18.** Sıçanların diyet öncesi ve sonrası vücut kitle indeksi (Mann-Whitney U testi, Wilcoxon rank testi).

EK: Erkek kontrol. EMetS: Erkek metabolik sendrom. DK: Dişi kontrol. DMetS: Dişi metabolik sendrom.

\* $p < 0.05$ , bazal değerleri ile karşılaştırıldığında  
# $p < 0.01$ , kontrol grupları ile karşılaştırıldığında

### 3.2. Biyokimyasal Parametreler

Erkek MetS grubunda; ASG, LDL-K, TK, TP, ALT, GGT, TT ( $p < 0.01$ ), ASİ ve TG ( $p < 0.05$ ) düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı belirlendi. MetS grubunda HDL-K düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı ( $p < 0.01$ ) saptandı. MetS grubunda; VLDL-K, E<sub>2</sub>, FSH ve P<sub>4</sub> düzeylerinin arttığı, AST düzeylerinin ise azaldığı belirlendi. VLDL-K, E<sub>2</sub>, FSH, P<sub>4</sub> ve AST değişimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. LH düzeylerinin kontrol ve MetS grupları arasında kayda değer bir değişim göstermediği saptandı. MetS ve kontrol gruplarındaki sıçanlarda saptanan biyokimyasal ölçümler Tablo 7’de gösterilmiştir.

**Tablo 7.** Biyokimyasal parametrelerin serum düzeyleri (Mann-Whitney U testi).

Parametre	EK (n:8)	EMetS (n:8)	DK (n:8)	DMetS (n:8)
ASG (mg/dL)	93.13 ± 6.85	185.63 ± 11.40 <sup>#</sup>	96.38 ± 9.83	198.25 ± 13.83 <sup>#</sup>
ASİ (µIU/mL)	0.24 ± 0.07	0.88 ± 0.08 <sup>*</sup>	0.33 ± 0.07	0.72 ± 0.27 <sup>*</sup>
TG (mg/dL)	124.25 ± 7.19	132.75 ± 7.78 <sup>*</sup>	128.25 ± 8.31	142.00 ± 7.31 <sup>#</sup>
HDL-K (mg/dL)	43.63 ± 5.40	31.63 ± 5.68 <sup>#</sup>	41.50 ± 3.74	34.25 ± 5.70 <sup>*</sup>
LDL-K (mg/dL)	87.38 ± 6.23	130.88 ± 7.79 <sup>#</sup>	93.88 ± 6.33	137.63 ± 8.53 <sup>#</sup>
VLDL-K (mg/dL)	24.63 ± 3.50	27.88 ± 5.00	24.88 ± 6.29	30.00 ± 6.89 <sup>*</sup>
TK (mg/dL)	152.13 ± 9.03	195.88 ± 17.07 <sup>#</sup>	164.13 ± 5.57	202.63 ± 10.20 <sup>#</sup>
TP (mg/dL)	6.51 ± 0.42	7.19 ± 0.26 <sup>#</sup>	5.97 ± 1.84	6.80 ± 2.82
ALT (IU/L)	51.13 ± 3.27	64.25 ± 3.06 <sup>#</sup>	50.38 ± 3.07	61.13 ± 3.56 <sup>#</sup>
AST (IU/L)	219.75 ± 9.60	205.75 ± 13.64	222.88 ± 6.10	228.13 ± 8.56
GGT (IU/L)	4.36 ± 0.35	5.06 ± 0.25 <sup>#</sup>	4.27 ± 0.59	5.05 ± 1.04 <sup>#</sup>
E <sub>2</sub> (pg/mL)	21.37 ± 2.54	27.76 ± 13.56	25.06 ± 9.04	30.07 ± 8.72
FSH (mIU/mL)	0.14 ± 0.07	0.32 ± 0.05	0.23 ± 0.02	0.14 ± 0.06
LH (mIU/mL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.09	0.10 ± 0.03	0.12 ± 0.04
P <sub>4</sub> (ng/mL)	1.53 ± 0.77	2.51 ± 1.35	17.75 ± 7.87	12.47 ± 1.24
TT (ng/dL)	86.86 ± 48.55	291.86 ± 101.01 <sup>#</sup>	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00

ALT: Alanin aminotransferaz. ASG: Açlık serum glukoz. ASİ: Açlık serum insülin. AST: Aspartat aminotransferaz. DK: Dişi kontrol. DMetS: Dişi metabolik sendrom. E<sub>2</sub>: Östrodiol. EK: Erkek kontrol. EMetS: Erkek metabolik sendrom. FSH: Folikül stimüle edici hormon. GGT: Gamma glutamiltransferaz. HDL-K: Yüksek yoğunluklu kolesterol. LDL-K: Düşük yoğunluklu kolesterol. LH: Lüteinize edici hormon. P<sub>4</sub>: Progesteron. TG: Trigliserid. TK: Total kolesterol. TP: Total protein. TT: Total testosteron. VLDL-K: Çok düşük yoğunluklu kolesterol. \*:  $p < 0.05$ . #:  $p < 0.01$ , kontrolleri ile karşılaştırıldı.

Dişilerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MetS grubunda ASG, TG, LDL-K, TK, TP, ALT, GGT ( $p < 0.01$ ) ve VLDL-K ( $p < 0.05$ ) düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı tespit edildi. MetS grubunda ASİ ve HDLK düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı ( $p < 0.01$ ) saptandı. MetS grubunda; AST, E<sub>2</sub> ve LH düzeylerinin arttığı, FSH ve P<sub>4</sub> düzeylerinin ise azaldığı tespit edildi. AST, E<sub>2</sub>, LH, FSH ve P<sub>4</sub> değişimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Dişilerde TT düzeyleri ise hem DK hem de DMetS gruplarında ölçülemedi.

### 3.3. Hormonal Parametreler

Hormon analizlerinde kullanılan kitlerin ölçüm karakteristikleri birbirinden bağımsız 3'er deneyin ortalama değerlerinden oluşturulmuştur (Tablo 8).

**Tablo 8.** Kitlerin doku süpernatantlarındaki hormonları ölçüm karakteristikleri.

Parametre	Intra-Assay (% CV)	Inter-Assay (CV)	Geri kazanım %	Ölçüm Aralığı	Sensitivite
OGH	< 9	< % 12	98.3	2 – 400 §	2.0 §
DGH	< 10	< % 13	97.6	0.5 – 500 §	0.5 §
OBS	< 7	< % 11	105	0 – 50 ‡	0.0 ‡
NES	< 8	< % 14	93.7	0.10- 50 ‡	0.10 ‡

CV: Değişim katsayısı (*Coefficient of variation*). §: pg/mL. ‡: ng/mL.

#### 3.3.1. Serum Ghrelin, Obestatin ve Nesfatin-1 Düzeyleri

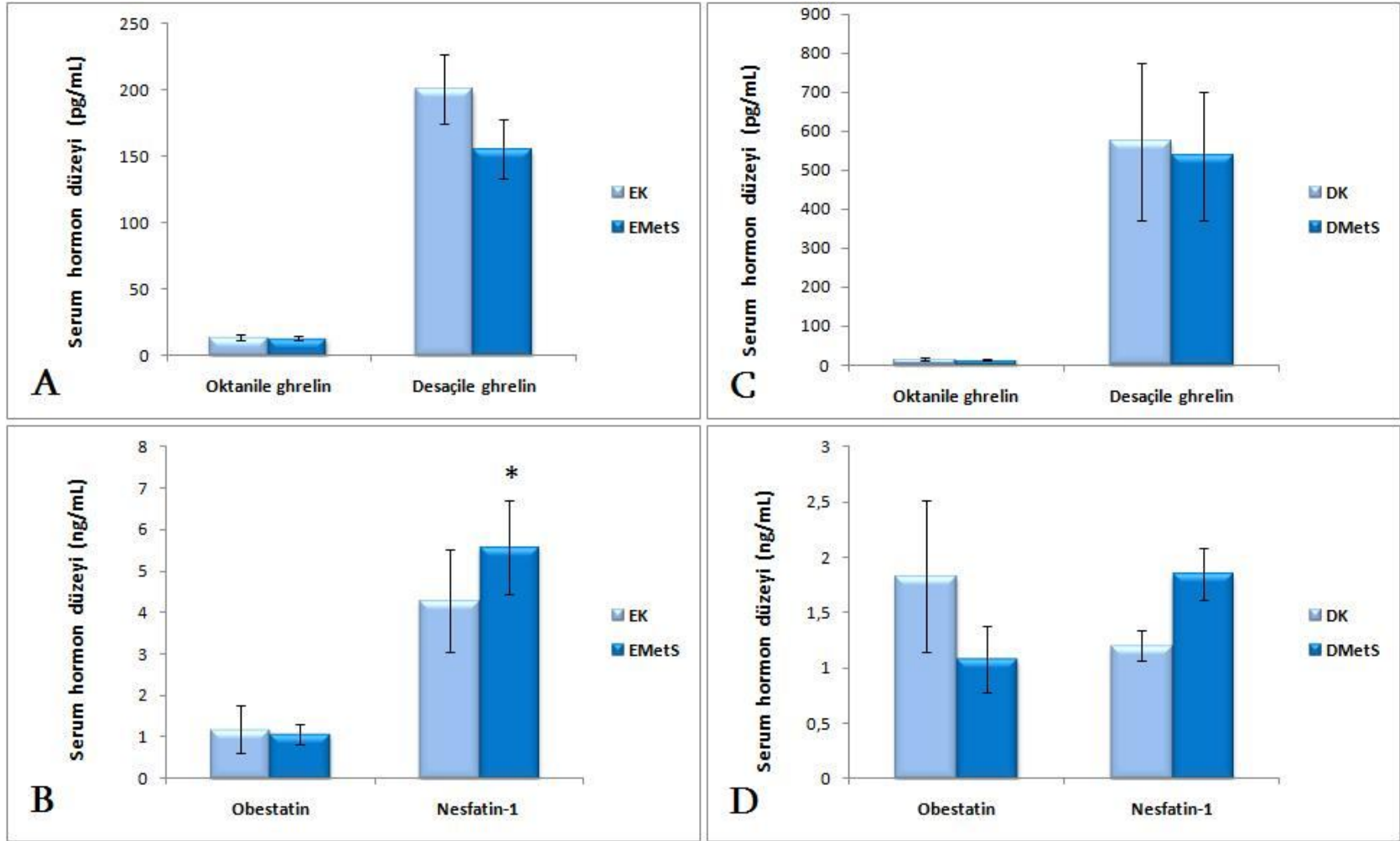
Erkek sıçanlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MetS grubunda serum OGH, DGH ve OBS düzeylerinin azaldığı, N düzeylerinin ise arttığı tespit edildi. NES düzeylerindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $p < 0.05$ ), buna karşın OGH, DGH ve OBS değişimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p > 0.05$ ) saptandı.

Dişi sıçanlarda MetS grubunda serum OGH, DGH ve OBS düzeylerinin azaldığı, NES düzeylerinin ise arttığı belirlendi. MetS grubunda hormon düzeylerinde belirlenen değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Erkek ve dişi sıçanların serum hormon (OGH, DGH, OBS ve NES) düzeyleri tablo ve grafik olarak sunulmuştur (Tablo 9, Şekil 19).

**Tablo 9.** Sıçanlarda; ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 düzeyleri (Mann-Whitney U testi).

Lokalizasyon	Parametre	ERKEK		DIŞI		Parametre	Lokalizasyon
		EK (n:8)	EMetS (n:8)	DK (n:8)	DMetS (n:8)		
Serum	OGH	13.70 ± 1.78	13.09 ± 1.81	15.69 ± 4.04	13.68 ± 2.78	OGH	Serum
	DGH	200.62 ± 26.12	155.44 ± 22.13	573.07 ± 201.00	536.11 ± 165.03	DGH	
	OBS	1.18 ± 0.57	1.08 ± 0.32	1.83 ± 0.68	1.08 ± 0.30	OBS	
	NES	4.29 ± 1.24	5.57 ± 1.12 *	1.20 ± 0.14	1.85 ± 0.24	NES	
Seminal bez	OGH	25.80 ± 13.17	13.88 ± 3.02 #	18.97 ± 4.23	15.16 ± 2.87	OGH	Ovaryum
	DGH	41.07 ± 11.08	20.79 ± 11.07 *	43.64 ± 10.76	27.31 ± 11.38 *	DGH	
	OBS	3.26 ± 1.07	5.00 ± 2.76 #	8.17 ± 4.74	2.26 ± 0.67	OBS	
	NES	3.02 ± 0.85	13.24 ± 4.95 *	1.82 ± 1.08	27.22 ± 8.91 #	NES	
Testis	OGH	15.69 ± 3.38	13.32 ± 2.68	23.65 ± 6.60	20.30 ± 8.60	OGH	Uterus
	DGH	21.89 ± 4.86	15.14 ± 1.99 #	79.75 ± 27.17	52.00 ± 13.10	DGH	
	OBS	9.19 ± 3.28	8.30 ± 3.24	7.99 ± 1.89	1.78 ± 0.47	OBS	
	NES	1.79 ± 1.09	14.18 ± 4.34 #	1.20 ± 0.48	22.56 ± 8.54 #	NES	

DGH: Desaçile ghrelin (pg/mL). MetS: Metabolik sendrom. NES: Nesfatin-1 (ng/mL). OBS: Obestatin (ng/mL). OGH: Oktanile ghrelin (pg/mL). \*:  $p < 0.05$ . #:  $p < 0.01$ .



Şekil 19. Serum ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 düzeyleri. A, B: Erkek. C, D: Dişi. (Mann-Whitney U testi).

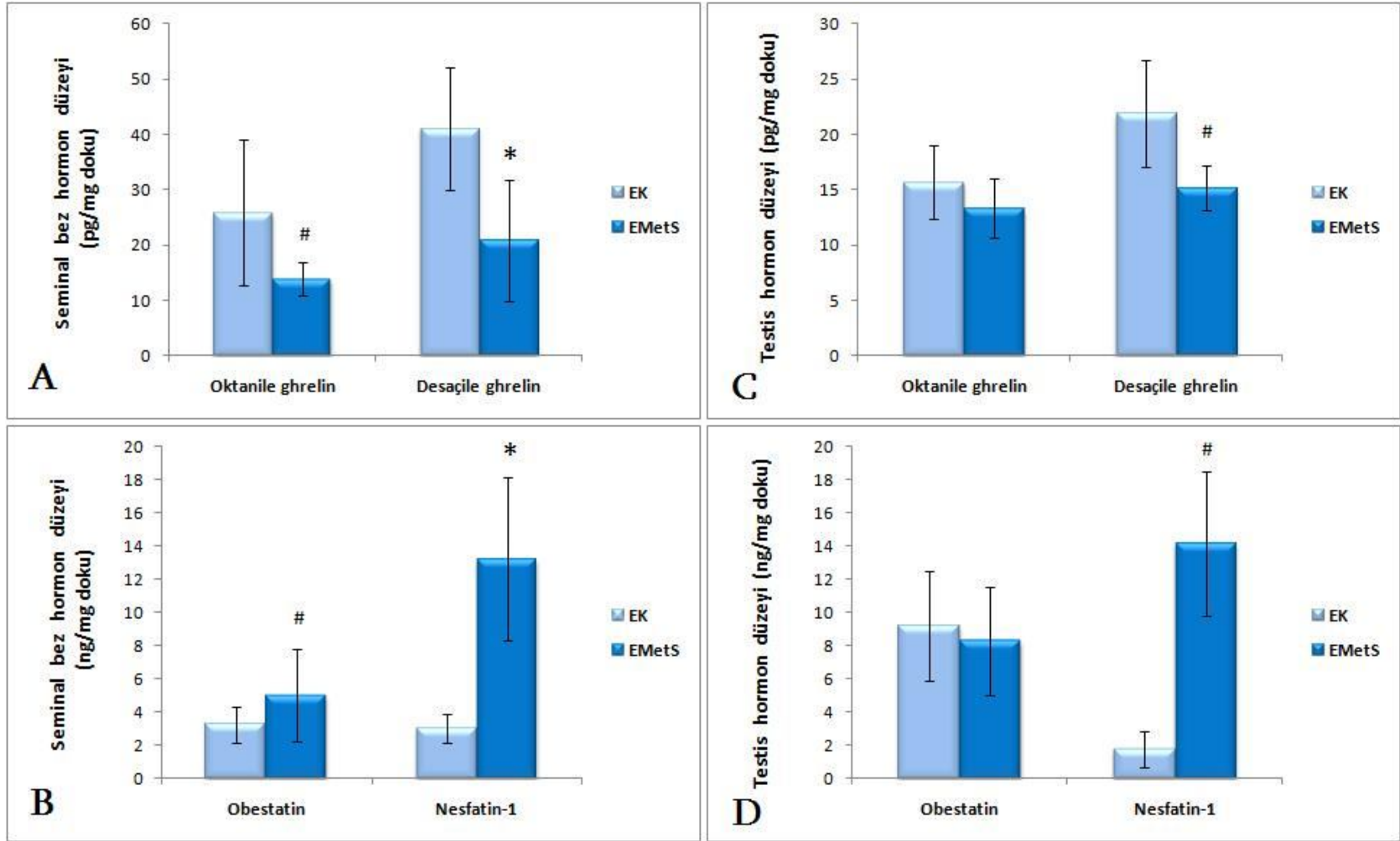
\*:  $p < 0.05$ , EK ile karşılaştırıldığında.

### 3.3.2. Doku Ghrelin, Obestatin ve Nesfatin-1 Ekspresyonları

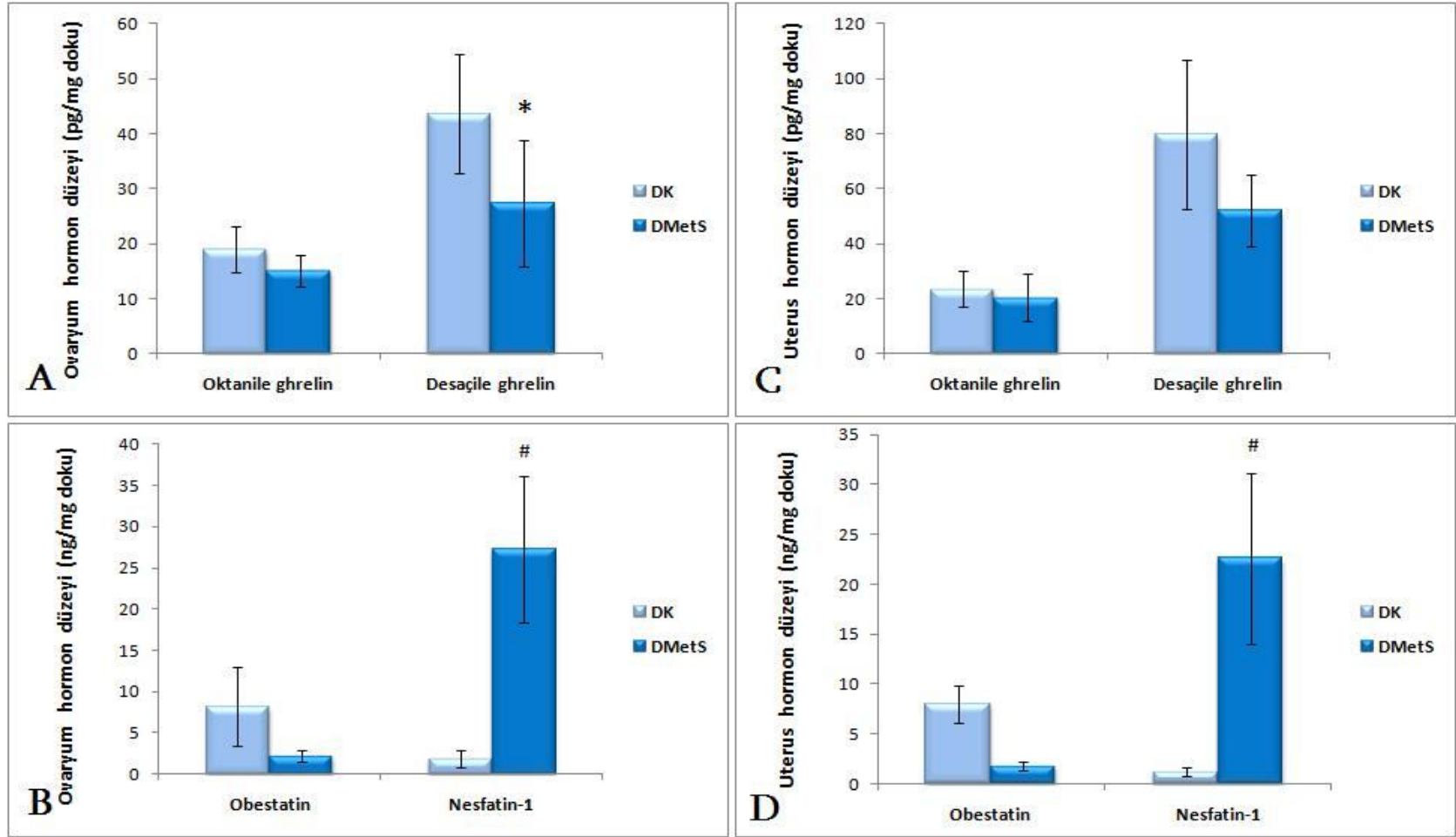
Erkek (seminal bez, testis) ve dişi (ovaryum ve uterus) dokularında OGH, DGH, OBS ve NES ekspresyonları ELISA ve İHK yöntemleriyle analiz edilmiş olup, bulgular bu sıralama ile sunulmuştur. ELISA yöntemiyle ölçülen doku OGH, DGH, OBS ve NES düzeyleri tablo ve grafik halinde sunulmuştur (Tablo 9, Şekil 20, Şekil 21).

Erkek genital sistem organlarından seminal bezde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MetS grubunda; OGH ( $p < 0.01$ ) ve DGH ( $p < 0.05$ ) düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı, OBS ( $p < 0.01$ ) ve NES ( $p < 0.05$ ) düzeylerinin ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı saptandı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MetS grubunda erkek genital sistem organlarından testiste; NES düzeylerinin arttığı, OGH, DGH ve OBS düzeylerinin ise azaldığı belirlendi. NES ve DGH düzeylerindeki değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $p < 0.01$ ), OGH ve OBS düzeylerindeki değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p > 0.05$ ) saptandı. Dişi genital sistem organlarından ovaryumda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MetS grubunda; OGH, DGH ve OBS düzeylerinin azaldığı, NES düzeylerinin ise arttığı belirlendi. Ovaryumda MetS grubunda OGH ve OBS düzeylerindeki değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p > 0.05$ ) buna karşın DGH ( $p < 0.05$ ) ve NES ( $p < 0.01$ ) düzeylerindeki değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. Dişi genital sistem organlarından uterusda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MetS grubunda; OGH, DGH ve OBS düzeylerinin azaldığı, NES düzeylerinin ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı ( $p < 0.01$ ) belirlendi. Uterusta MetS grubunda OGH, DGH ve OBS düzeylerindeki azalmaların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p > 0.05$ ) saptandı. Erkek (seminal bez, testis) ve dişi (ovaryum, uterus) genital sistem organlarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MetS grubunda; OGH, DGH, OBS ve NES düzeylerindeki değişim oranları hesaplandı (Tablo 10).

Erkek (seminal bez, testis) ve dişi (ovaryum, uterus) genital sistem dokularında immünohistokimyasal yöntemle saptanan; Ghrelin, OBS ve NES



**Şekil 20.** Erkek sıçanlarda doku ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 düzeyleri. EK: Erkek kontrol. EMetS: Erkek metabolik sendrom. (Mann-Whitney U testi). \* $p < 0.05$ , # $p < 0.01$ , kontrolleri ile karşılaştırıldığında.



**Şekil 21.** Dişi sıçanlarda doku ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 düzeyleri. DK: Dişi kontrol. DMetS: Dişi metabolik sendrom. (Mann-Whitney U testi).

\*  $p < 0.05$ , #  $p < 0.01$ , DK ile karşılaştırıldığında.

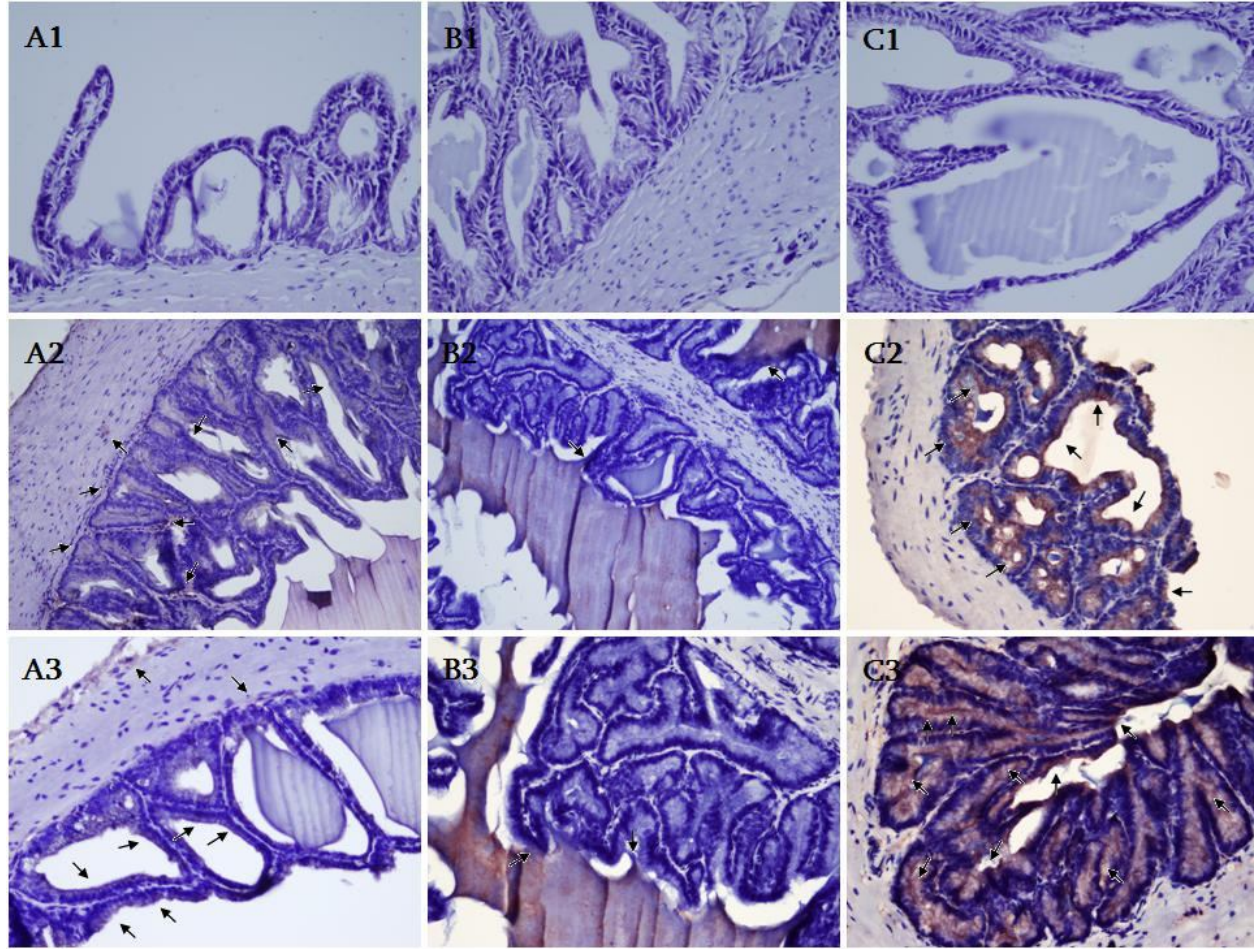
ekspresyonlarını gösteren İHK fotoğrafları şekil 22 – 25’de, immünoaktivite dağılımları ise Tablo 11’de gösterilmiştir. İHK’sal analizlerde tüm hücre nükleuslarının kontrast boyama (*Mayer Hematoksilen*) ile mavi renge boyandığı tespit edildi. Ghrelin, OBS ve NES eksprese eden hücrelerde; ekspresyonların hücre sitoplazmasında olduğu, epitel hücrelerin apikal kısımlarında yoğunlaştığı ve hormonların ekspresyon oranlarına bağlı olarak hücrelerin spesifik bölümlerinin kırmızıdan kahverengiye kadar değişen renklerde boyandığı belirlendi.

**Tablo 10.** MetS grubu; ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 ekspresyon değişim oranların (Mann-Whitney U testi).

Parametre	Doku hormon değişim oranı (%)			
	Seminal bez	Testis	Ovaryum	Uterus
Oktanile Ghrelin	-46.20 #	-15.11	-20.08	-14.16
Desaçile Ghrelin	-49.38 *	-30.84 #	-37.42 *	-34.80
Obestatin	+53.37 #	-9.68	-72.33	-77.72
Nesfatin-1	+338.41 * (~4 kat)	+692.18 # (~7 kat)	+1395.60 # (~14 kat)	+1780 # (~20 kat)

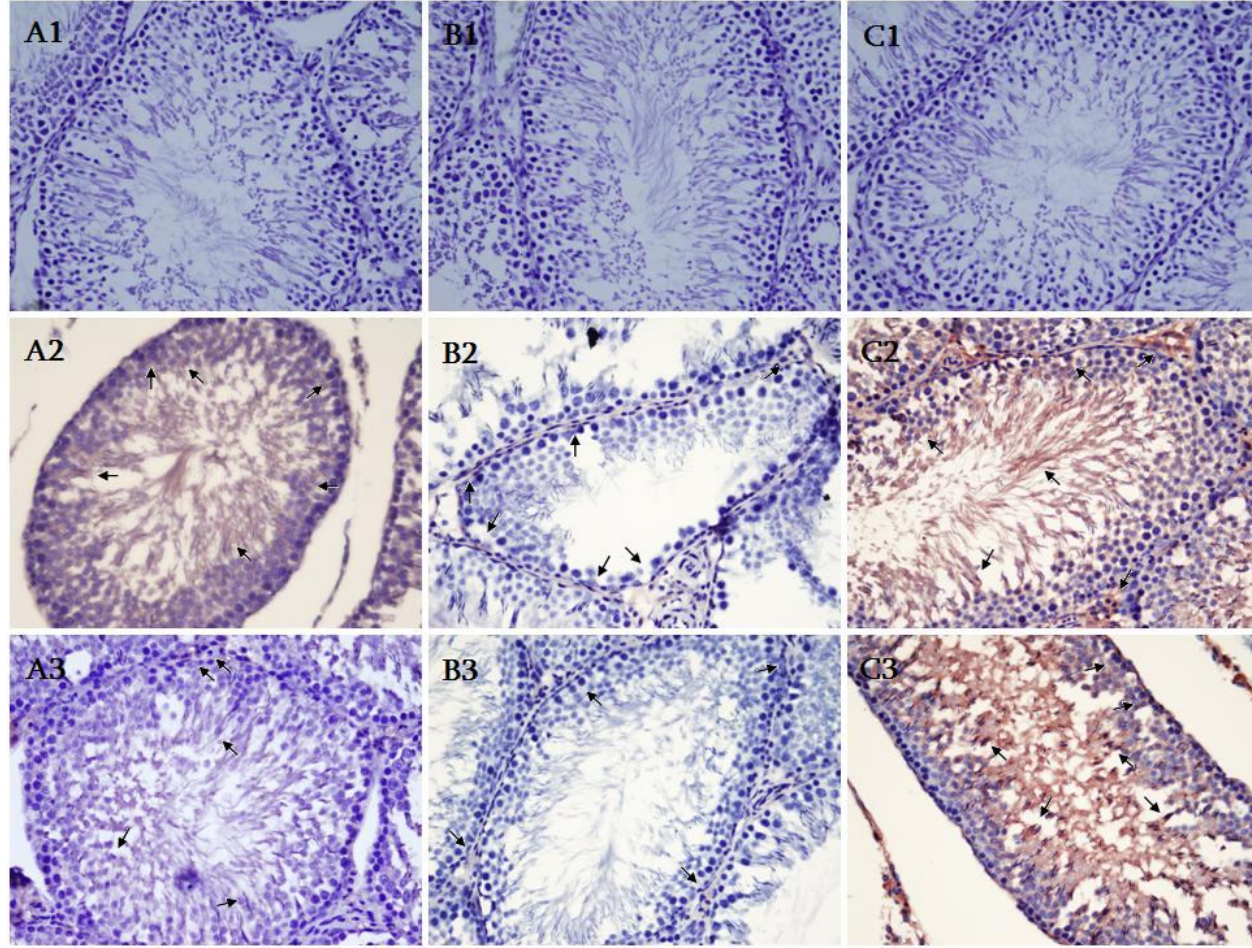
+: Artış. -: Azalış. \*:  $p < 0.05$ . #:  $p < 0.01$ , kontrolleri ile karşılaştırıldığında.

Dokular İHK’sal boyanma yoğunluklarına göre istatistiksel olarak değerlendirildi. Erkek ve dişi genital dokularındaki ghrelin İHK boyanmaları karşılaştırıldığında boyanma yoğunluklarının istatistiksel olarak kontrol grubunda; seminal bez, testis ve ovaryumda +2, uterusda +1, MetS grubunda tüm dokularda +1 olduğu saptandı. Ob İHK boyanma yoğunluklarının ise istatistiksel olarak hem kontrol hem de MetS grubunda analiz edilen tüm genital dokularda +1 olduğu belirlendi. N İHK boyanma yoğunluklarının kontrol grubunda istatistiksel olarak erkek genital dokularında +3, dişi genital dokularında +2, MetS grubunda ise her iki cinsiyete ait tüm genital dokularda +3 olduğu saptandı (Tablo 12).



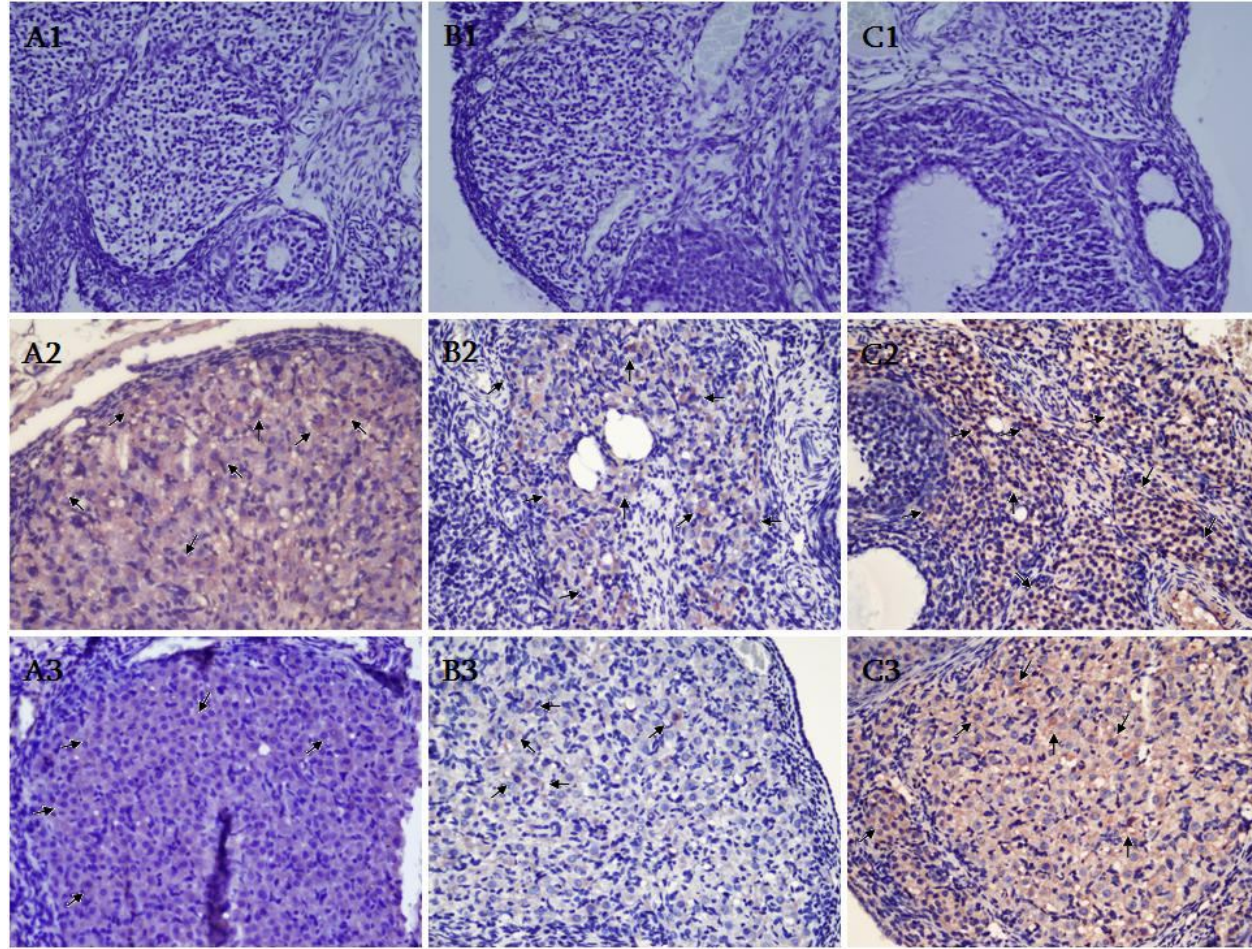
**Şekil 22.** Seminal bezde; ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 ekspresyonlarının immünohistokimyası

A1, B1, C1: Negatif boyama. A2: Kontrol ghrelin pozitif. B2: Kontrol obestatin pozitif. C2: Kontrol nesfatin-1pozitif. A3: MetS ghrelin pozitif. B3: MetS obestatin pozitif. C3: MetS nesfatin-1pozitif. Büyütme x 400.



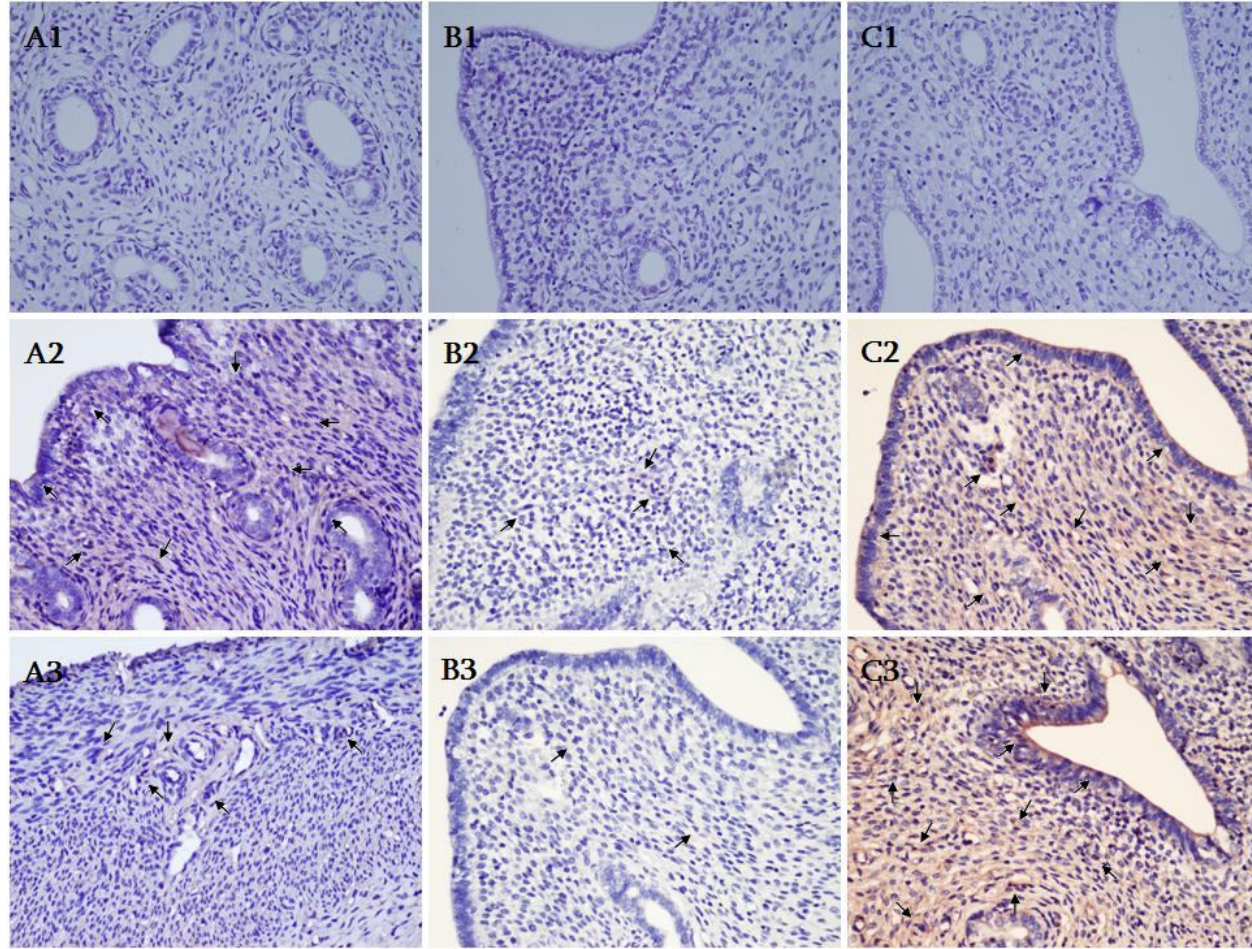
**Şekil 23.** Testiste; ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 ekspresyonlarının immünohistokimyası.

A1, B1, C1: Negatif boyama. A2: Kontrol ghrelin pozitif. B2: Kontrol obestatin pozitif. C2: Kontrol nesfatin-1pozitif. A3: MetS ghrelin pozitif. B3: MetS obestatin pozitif. C3: MetS nesfatin-1pozitif. Büyütme x 400.



**Şekil 24.** Ovaryumda; ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 ekspresyonlarının immünohistokimyası.

A1, B1, C1: Negatif boyama. A2: Kontrol ghrelin pozitif. B2: Kontrol obestatin pozitif. C2: Kontrol nesfatin-1pozitif. A3: MetS ghrelin pozitif. B3: MetS obestatin pozitif. C3: MetS nesfatin-1pozitif. Büyütme x 400.



**Şekil 25.** Uterusta; ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 ekspresyonlarının immünohistokimyası.

A1, B1, C1: Negatif boyama. A2: Kontrol ghrelin pozitif. B2: Kontrol obestatin pozitif. C2: Kontrol nesfatin-1pozitif. A3: MetS ghrelin pozitif. B3: MetS obestatin pozitif. C3: MetS nesfatin-1pozitif. Büyütme x 400.

**Tablo 11.** Sıçanda; ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 ekspresyonlarının dağılımı.

Parametre	Seminal bez	Testis	Ovaryum	Uterus
Ghrelin	Salgı bezi epitelinde apikalde immün pozitiflik.	Seminifer tübüllerdeki spermatitlerde (sperm kuyruğu).	Corpus luteum: <i>Theca</i> hücrelerinde immün pozitiflik.	Endometriyum stroma tabakası ve uterin bez epitel hücrelerinde immün pozitiflik.
Obestatin	Salgı bezi epitelinde apikalde zayıf immün pozitiflik.	Seminifer tübüllerdeki epitel doku ve spermatit hücrelerinde (sperm kuyruğu) zayıf immün pozitiflik.	Corpus luteum: <i>Granulosa</i> hücrelerinde zayıf immün pozitiflik.	Endometriyum stroma tabakası hücrelerinde zayıf immün pozitiflik.
Nesfatin-1	Salgı bezi epitelinde apikalde kuvvetli immün pozitiflik	Seminifer tübüllerdeki sertoli hücreleri ve spermatositlerde (sperm kuyruğu) kuvvetli immün pozitiflik.	Corpus luteum: <i>Granulosa</i> hücrelerinde kuvvetli immün pozitiflik.	Endometriyum stroma tabakası ve uterin bez epitel hücrelerinde kuvvetli immün pozitiflik.

**Tablo 12.** Ghrelin, obestatin ve nesfatin-1 ekspresyonlarının immünohistokimyasal değerlendirmesi.

Parametre	Seminal bez		Testis		Ovaryum		Uterus	
	Kontrol	MetS	Kontrol	MetS	Kontrol	MetS	Kontrol	MetS
Negatif	–	–	–	–	–	–	–	–
Ghrelin	+2	+1	+2	+1	+2	+1	+1	+1
Obestatin	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
Nesfatin-1	+3	+3	+3	+3	+2	+3	+2	+3

MetS: Metabolik sendrom. +: pozitif immünohistokimyasal reaksiyon. –: negatif immünohistokimyasal reaksiyon.

### 3.4. İlişki Analizleri

Kontrol ve MetS grubu sıçanlardan elde edilen serumlar ile erkek ve dişi genital sistem dokularında çalışılan parametrelerde pek çok değişim saptandı. Bu parametreler arasındaki ilişki Pearson's testi analizleri ile araştırıldı. Kontrol ve MetS gruplarında saptanan ilişkiler türlerine göre; pozitif ve negatif ilişki tabloları halinde sunuldu (Tablo 13 – 20).

**Tablo 13.** Kontrol grubu vücut kitle indeksi pozitif ilişkileri (Pearson's testi).

İlişki	R	p	İlişki	r	P
♂VKİ <sub>Bazal</sub> – ♀ALT	+0.922	0.001	♀VKİ <sub>Bazal</sub> – ♀VKİ <sub>2. hafta</sub>	+0.869	0.005
♂VKİ <sub>2. hafta</sub> – ♂VKİ <sub>4. hafta</sub>	+0.765	0.027	♀VKİ <sub>Bazal</sub> – ♀VKİ <sub>4. hafta</sub>	+0.834	0.010
♂VKİ <sub>2. hafta</sub> – ♀VKİ <sub>4. hafta</sub>	+0.776	0.024	♀VKİ <sub>Bazal</sub> – ♀VKİ <sub>6. hafta</sub>	+0.764	0.027
♂VKİ <sub>2. hafta</sub> – ♀HDL-K	+0.755	0.030	♀VKİ <sub>2. hafta</sub> – ♀Ser DGH	+0.709	0.049
♂VKİ <sub>4. hafta</sub> – ♀ASİ	+0.825	0.022	♀VKİ <sub>4. hafta</sub> – ♀AST	+0.726	0.042
♂VKİ <sub>4. hafta</sub> – Ov DGH	+0.829	0.021	♀VKİ <sub>4. hafta</sub> – ♀HDL-K	+0.846	0.008
♂VKİ <sub>8. hafta</sub> – ♂VLDL-K	+0.716	0.046	♀VKİ <sub>4. hafta</sub> – ♀TK	+0.788	0.020
♂VKİ <sub>10. hafta</sub> – ♂HDL-K	+0.744	0.034	♀VKİ <sub>4. hafta</sub> – ♀FSH	+0.868	0.011
♂VKİ <sub>12. hafta</sub> – ♂FSH	+0.920	0.009	♀VKİ <sub>8. hafta</sub> – ♀LDL-K	+0.800	0.017
♂VKİ <sub>12. hafta</sub> – Sb DGH	+0.799	0.031	♀VKİ <sub>12. hafta</sub> – ♂Ser DGH	+0.756	0.049

ALT: Alanin aminotransferaz. ASİ: Açlık serum insülin. AST: Aspartat aminotransferaz. DGH: Desaçile ghrelin. FSH: Folikül stimüle edici hormon. HDL-K: Yüksek yoğunluklu kolesterol. LDL-K: Düşük yoğunluklu kolesterol. Ov: Ovaryum. Sb: Seminal bez. Ser: Serum. TK: Total kolesterol. VKİ: Vücut kitle indeksi. VLDL-K: Çok düşük yoğunluklu kolesterol. ♂: Erkek. ♀: Dişi.

**Tablo 14.** Kontrol grubu vücut kitle indeksi negatif ilişkileri (Pearson's testi).

İlişki	R	p	İlişki	R	P
♂VKİ <sub>Bazal</sub> – ♂VKİ <sub>12. hafta</sub>	-0.740	0.036	♀VKİ <sub>Bazal</sub> – ♀GGT	-0.719	0.044
♂VKİ <sub>Bazal</sub> – ♀P <sub>4</sub>	-0.871	0.011	♀VKİ <sub>Bazal</sub> – ♀TG	-0.781	0.022
♂VKİ <sub>2. hafta</sub> – ♀TG	-0.756	0.030	♀VKİ <sub>4. hafta</sub> – ♀GGT	-0.794	0.019
♂VKİ <sub>2. hafta</sub> – Ov OBS	-0.818	0.024	♀VKİ <sub>6. hafta</sub> – ♂LDL-K	-0.885	0.004
♂VKİ <sub>2. hafta</sub> – Uterus NES	-0.796	0.032	♀VKİ <sub>8. hafta</sub> – ♀VLDL-K	-0.854	0.007
♂VKİ <sub>4. hafta</sub> – ♀TG	-0.877	0.004	♀VKİ <sub>8. hafta</sub> – ♀Ser OGH	-0.739	0.036
♂VKİ <sub>4. hafta</sub> – ♀Ser OGH	-0.711	0.048	–		
♂VKİ <sub>6. hafta</sub> – ♂VKİ <sub>10. hafta</sub>	-0.772	0.025			
♂VKİ <sub>6. hafta</sub> – ♂LH	-0.825	0.022			
♂VKİ <sub>8. hafta</sub> – ♂Ser OBS	-0.786	0.036			
♂VKİ <sub>12. hafta</sub> – ♀TK	-0.804	0.016			
♂VKİ <sub>12. hafta</sub> – ♀ALT	-0.787	0.020			
♂VKİ <sub>12. hafta</sub> – ♀AST	-0.707	0.050			
♂VKİ <sub>12. hafta</sub> – Uterus OBS	-0.800	0.031			

ALT: Alanin aminotransferaz. AST: Aspartat aminotransferaz. GGT: Gamma glutamiltransferaz. LDL-K: Düşük yoğunluklu kolesterol. LH: Lüteinize edici hormon. NES: Nesfatin-1. OBS: Obestatin. OGH: Oktanile ghrelin. Ov: Ovaryum. P<sub>4</sub>: Progesteron. Ser: Serum. TG: Trigliserid. TK: Total kolesterol. VLDL-K: Çok düşük yoğunluklu kolesterol. VKİ: Vücut kitle indeksi. ♂: Erkek. ♀: Dişi.

**Tablo 15.** Kontrol grubu biyokimyasal parametrelerin pozitif ilişkileri (Pearson's testi).

İlişki	R	p	İlişki	r	P
♂ASİ – ♀E <sub>2</sub>	+0.852	0.031	♀ASG – ♀E <sub>2</sub>	+0.794	0.033
♂TG – ♂LDL-K	+0.792	0.019	♀HDL-K – ♀TK	+0.840	0.009
♂TG – ♂TK	+0.770	0.025	♀TP – ♂GGT	+0.874	0.005
♂TK – ♂LDL-K	+0.753	0.031	♀ALT – ♀TK	+0.750	0.032
♂TP – ♀TK	+0.807	0.015	♀AST – ♀HDL-K	+0.779	0.023
♂TP – ♀AST	+0.734	0.038	♀AST – ♀TK	+0.955	0.000
♂E <sub>2</sub> – ♂LH	+0.943	0.001	♀E <sub>2</sub> – ♂AST	+0.879	0.009
♂Ser OGH – ♂ALT	+0.819	0.024	♀E <sub>2</sub> – ♀FSH	+0.777	0.040
♂Ser OGH – ♀Ser OBS	+0.842	0.017	♀E <sub>2</sub> – ♂TT	+0.769	0.043
♂Ser OBS – ♂HDL-K	+0.767	0.044	♀FSH – ♀AST	+0.770	0.043
Sb DGH – ♂FSH	+0.915	0.011	♀FSH – ♀TK	+0.830	0.021
Sb OBS – ♀FSH	+0.883	0.020	♀Ser OGH – ♀TG	+0.750	0.032
Sb NES – ♂ALT	+0.841	0.018	♀Ser OBS – ♂ALT	+0.738	0.036
Sb NES – ♀Ser OBS	+0.928	0.003	♀Ser NES – ♂VLDL-K	+0.838	0.019
Sb NES – ♀Ser NES	+0.947	0.004	♀Ser NES – ♀P <sub>4</sub>	+0.871	0.024
Testis OGH – Testis OBS	+0.855	0.014	Ov OGH – ♂P <sub>4</sub>	+0.824	0.023
Testis DGH – ♀TG	+0.834	0.020	Uterus OGH – ♀ASG	+0.762	0.047
Testis OBS – ♂P <sub>4</sub>	+0.787	0.036	Uterus OGH – ♂AST	+0.907	0.005
Testis NES – ♀ASG	+0.841	0.018	Uterus OGH – ♀E <sub>2</sub>	+0.919	0.003
Testis NES – ♂AST	+0.934	0.002	Uterus OGH – Uterus DGH	+0.843	0.017
Testis NES – ♀E <sub>2</sub>	+0.907	0.005	Uterus DGH – ♂AST	+0.830	0.021
Testis NES – ♂TT	+0.829	0.021	Uterus NES – ♂AST	+0.793	0.033
Testis NES – Uterus OGH	+0.905	0.005	Uterus NES – ♂TT	+0.803	0.030
Testis NES – Uterus NES	+0.827	0.022	–	–	–

ALT: Alanin aminotransferaz. ASG: Açlık serum glukoz. ASİ: Açlık serum insülin. AST: Aspartat aminotransferaz. DGH: Desaçile ghrelin. E<sub>2</sub>: Östrodiol. FSH: Folikül stimüle edici hormon. GGT: Gamma glutamiltransferaz. HDL-K: Yüksek yoğunluklu kolesterol. LDL-K: Düşük yoğunluklu kolesterol. LH: Lüteinize edici hormon. NES: Nesfatin-1. OBS: Obestatin. OGH: Oktanile ghrelin. Ov: Ovaryum. P<sub>4</sub>: Progesteron. Sb: Seminal bez. Ser: Serum. TG: Trigliserid. TK: Total kolesterol. TP: Total protein. TT: Total testosteron. ♂: Erkek. ♀: Dişi.

**Tablo 16.** Kontrol grubu biyokimyasal parametrelerin negatif ilişkileri (Pearson's testi).

İlişki	R	p	İlişki	r	P
♂ASG – ♂ASİ	-0.911	0.012	♀ASİ – ♀TG	-0.931	0.002
♂ASG – ♀VLDL-K	-0.825	0.012	♀HDL-K – ♀GGT	-0.902	0.002
♂ASG – ♀E <sub>2</sub>	-0.792	0.034	♀LDL-K – ♀VLDL-K	-0.718	0.045
♂TG – ♂HDL-K	-0.789	0.020	♀LDL-K – ♀TP	-0.796	0.018
♂HDL-K – ♀FSH	-0.850	0.015	♀ALT – ♀AST	-0.796	0.018
♂VLDL-K – ♀GGT	-0.808	0.015	♀ALT – ♀P <sub>4</sub>	-0.922	0.003
♂GGT – ♀LDL-K	-0.717	0.045	♀Ser OGH – ♀LDL-K	-0.818	0.014
♂P <sub>4</sub> – ♂ALT	-0.897	0.006	♀Ser OGH – Ov DGH	-0.759	0.048
♂Ser DGH – ♂TG	-0.815	0.025	♀Ser DGH – ♀ASG	-0.805	0.016
♂Ser NES – ♂TG	-0.949	0.004	♀Ser DGH – ♂Ser OBS	-0.829	0.021
Sb OGH – TT	-0.772	0.042	♀Ser NES – ♀ASG	-0.893	0.007
Sb OGH – Uterus OBS	-0.876	0.010	♀Ser NES – ♂P <sub>4</sub>	-0.844	0.035
Sb OGH – Ov NES	-0.763	0.046	Ov OGH – ♂ALT	-0.814	0.026
Sb DGH – Uterus OBS	-0.934	0.002	Ov OBS – ♂GGT	-0.771	0.042
Sb OBS – ♂HDL-K	-0.859	0.029	Uterus OGH – ♂ASG	-0.767	0.044
Sb NES – ♂P <sub>4</sub>	-0.855	0.014	Uterus DGH – ♂ASG	-0.834	0.020
Testis DGH – ♀ASİ	-0.833	0.020	Uterus OBS – ♂FSH	-0.899	0.015

ALT: Alanin aminotransferaz. ASG: Açlık serum glukoz. ASİ: Açlık serum insülin. AST: Aspartat aminotransferaz. DGH: Desaçile ghrelin. E<sub>2</sub>: Östrodiol. FSH: Folikül stimüle edici hormon. GGT: Gamma glutamiltransferaz. HDL-K: Yüksek yoğunluklu kolesterol. LDL-K: Düşük yoğunluklu kolesterol. NES: Nesfatin-1. OBS: Obestatin. OGH: Oktanile ghrelin. Ov: Ovaryum P<sub>4</sub>: Progesteron. Sb: Seminal bez. Ser: Serum. TG: Trigliserid. TP: Total protein. TT: Total testosteron. VLDL-K: Çok düşük yoğunluklu kolesterol. ♂: Erkek. ♀: Dişi.

**Tablo 17.** MetS grubu vücut kitle indeksi pozitif ilişkileri (Pearson's testi).

İlişki	R	p	İlişki	r	P
♂VKİ <sub>Bazal</sub> – ♂TK	+0.758	0.029	♀VKİ <sub>Bazal</sub> – ♀ASG	+0.820	0.013
♂VKİ <sub>2. hafta</sub> – ♀ASG	+0.712	0.048	♀VKİ <sub>2. hafta</sub> – ♂VKİ <sub>10. hafta</sub>	+0.806	0.016
♂VKİ <sub>2. hafta</sub> – ♂E <sub>2</sub>	+0.897	0.006	♀VKİ <sub>2. hafta</sub> – ♂TK	+0.797	0.018
♂VKİ <sub>4. hafta</sub> – ♀TG	+0.779	0.023	♀VKİ <sub>6. hafta</sub> – Testis DGH	+0.784	0.037
♂VKİ <sub>6. hafta</sub> – ♀HDL-K	+0.828	0.011	♀VKİ <sub>6. hafta</sub> – Uterus OGH	+0.718	0.045
♂VKİ <sub>6. hafta</sub> – ♀E <sub>2</sub>	+0.764	0.046	♀VKİ <sub>8. hafta</sub> – ♂LDL-K	+0.840	0.009
♂VKİ <sub>8. hafta</sub> – ♂ASG	+0.853	0.007	♀VKİ <sub>8. hafta</sub> – ♀VLDL-K	+0.831	0.011
♂VKİ <sub>8. hafta</sub> – ♂VLDL-K	+0.749	0.032	♀VKİ <sub>10. hafta</sub> – ♂ASİ	+0.870	0.011
♂VKİ <sub>10. hafta</sub> – ♂TK	+0.866	0.005	♀VKİ <sub>10. hafta</sub> – ♂P <sub>4</sub>	+0.902	0.006
♂VKİ <sub>10. hafta</sub> – ♂Ser OBS	+0.831	0.021	–		
♂VKİ <sub>12. hafta</sub> – ♀LDL-K	+0.830	0.011			
♂VKİ <sub>12. hafta</sub> – ♂TP	+0.770	0.025			

ASG: Açlık serum glukoz. ASİ: Açlık serum insülin. DGH: Desaçile ghrelin. E<sub>2</sub>: Östrodiol. HDL-K: Yüksek yoğunluklu kolesterol. LDL-K: Düşük yoğunluklu kolesterol. OBS: Obestatin. OGH: Oktanile ghrelin. P<sub>4</sub>: Progesteron. Ser: Serum. TG: Triglicerid. TK: Total kolesterol. TP: Total protein. VKİ: Vücut kitle indeksi. VLDL-K: Çok düşük yoğunluklu kolesterol. ♂: Erkek. ♀: Dişi.

**Tablo 18.** MetS grubu vücut kitle indeksi negatif ilişkileri (Pearson's testi).

İlişki	R	p	İlişki	r	P
♂VKİ <sub>Bazal</sub> – ♂TG	-0.747	0.033	♀VKİ <sub>Bazal</sub> – ♀VKİ <sub>8. hafta</sub>	-0.713	0.047
♂VKİ <sub>2. hafta</sub> – ♀TK	-0.979	0.018	♀VKİ <sub>Bazal</sub> – ♀AST	-0.778	0.023
♂VKİ <sub>2. hafta</sub> – ♂GGT	-0.783	0.022	♀VKİ <sub>2. hafta</sub> – ♀VKİ <sub>10. hafta</sub>	-0.781	0.022
♂VKİ <sub>2. hafta</sub> – Testis OGH	-0.832	0.020	♀VKİ <sub>2. hafta</sub> – ♂P <sub>4</sub>	-0.924	0.003
♂VKİ <sub>4. hafta</sub> – ♂VKİ <sub>6. hafta</sub>	-0.710	0.048	♀VKİ <sub>4. hafta</sub> – ♂GGT	-0.810	0.015
♂VKİ <sub>4. hafta</sub> – ♀HDL-K	-0.882	0.004	♀VKİ <sub>4. hafta</sub> – ♀Ser OGH	-0.795	0.018
♂VKİ <sub>4. hafta</sub> – Uterus OGH	-0.842	0.009	♀VKİ <sub>4. hafta</sub> – ♀Ser DGH	-0.741	0.035
♂VKİ <sub>6. hafta</sub> – ♂TP	-0.726	0.042	♀VKİ <sub>6. hafta</sub> – ♀ASİ	-0.911	0.004
♂VKİ <sub>10. hafta</sub> – ♂TG	-0.814	0.014	♀VKİ <sub>10. hafta</sub> – ♀GGT	-0.913	0.002
♂VKİ <sub>10. hafta</sub> – ♂P <sub>4</sub>	-0.869	0.011	♀VKİ <sub>10. hafta</sub> – ♀LH	-0.805	0.029
♂VKİ <sub>10. hafta</sub> – ♂TT	-0.887	0.008	♀VKİ <sub>10. hafta</sub> – Sb OGH	-0.857	0.014
♂VKİ <sub>12. hafta</sub> – Sb OBS	-0.848	0.016	♀VKİ <sub>12. hafta</sub> – ♀HDL-K	-0.737	0.037
♂VKİ <sub>12. hafta</sub> – Ov NES	-0.782	0.038	♀VKİ <sub>12. hafta</sub> – ♀E <sub>2</sub>	-0.838	0.019

ASİ: Açlık serum insülin. AST: Aspartat aminotransferaz. DGH: Desaçile ghrelin. E<sub>2</sub>: Östrodiol. GGT: Gamma glutamiltransferaz. HDL-K: Yüksek yoğunluklu kolesterol. LH: Lüteinize edici hormon. NES: Nesfatin-1. OBS: Obestatin. OGH: Oktanile ghrelin. Ov: Ovaryum. P<sub>4</sub>: Progesteron. Sb: Seminal bez. Ser: Serum. TG: Trigliserid. TK: Total kolesterol. TP: Total protein. TT: Total testosteron. VKİ: Vücut kitle indeksi. ♂: Erkek. ♀: Dişi.

**Tablo 19.** MetS grubu biyokimyasal parametrelerin pozitif ilişkileri (Pearson's testi).

İlişki	R	p	İlişki	r	p
♂ASİ – ♀AST	+0.801	0.030	♀TP – ♂ALT	+0.729	0.040
♂VLDL-K – ♀ASG	+0.821	0.013	♀GGT – ♂TP	+0.752	0.031
♂P <sub>4</sub> – ♂ASİ	+0.829	0.021	♀P <sub>4</sub> – ♂FSH	+0.973	0.000
♂P <sub>4</sub> – ♀AST	+0.755	0.050	♀Ser DGH – Testis OBS	+0.765	0.045
♂TT – ♂TG	+0.925	0.003	♀Ser OBS – ♀LH	+0.905	0.005
♂Ser OGH – ♀TK	+0.975	0.000	♀Ser OBS – Testis NES	+0.827	0.022
♂Ser OBS – ♂TK	+0.885	0.008	♀Ser OBS – Sb OGH	+0.862	0.013
Sb OGH – ♀LH	+0.988	0.000	♀Ser NES – ♀HDL-K	+0.720	0.044
Sb OGH – Testis NES	+0.824	0.023	♀Ser NES – ♀FSH	+0.886	0.008
Sb DGH - ♂HDL-K	+0.813	0.026	♀Ser NES – ♂Ser NES	+0.949	0.001
Sb OBS – ♀ALT	+0.868	0.011	Ov OGH – ♂ALT	+0.796	0.032
Sb NES – ♂Ser DGH	+0.875	0.010	Ov OGH – Ov NES	+0.789	0.035
Sb NES – ♂Ser OBS	+0.767	0.044	Ov OBS – ♀FSH	+0.980	0.000
Testis OBS – ♂ASİ	+0.795	0.032	Ov OBS – ♀Ser NES	+0.874	0.010
Testis OBS – ♂GGT	+0.787	0.036	Ov NES – Sb OBS	+0.760	0.047
Testis NES – ♀VLDL-K	+0.785	0.036	Uterus DGH – ♂Ser OGH	+0.822	0.023
Testis NES – ♀FSH	+0.755	0.050	Uterus OBS – ♂Ser DGH	+0.852	0.015
Testis NES – ♀LH	+0.857	0.014	–	–	–

ALT: Alanin aminotransferaz. ASG: Açlık serum glukoz. ASİ: Açlık serum insülin. AST: Aspartat aminotransferaz. DGH: Desaçile ghrelin. FSH: Folikül stimüle edici hormon. GGT: Gamma glutamiltransferaz. HDL-K: Yüksek yoğunluklu kolesterol. LH: Lüteinize edici hormon. NES: Nesfatin-1. OBS: Obestatin. OGH: Oktanile ghrelin. Ov: Ovaryum. P<sub>4</sub>: Progesteron. Sb: Seminal bez. Ser: Serum. TG: Trigliserid. TK: Total kolesterol. TP: Total protein. TT: Total testosteron. VLDL-K: Çok düşük yoğunluklu kolesterol. ♂: Erkek. ♀: Dişi.

**Tablo 20.** MetS grubu biyokimyasal parametrelerin negatif ilişkileri (Pearson's testi).

İlişki	R	p	İlişki	r	p
♂ASİ – ♀GGT	-0.879	0.009	♀ASG – ♀AST	-0.782	0.022
♂HDL-K – ♂VLDL-K	-0.802	0.017	♀E <sub>2</sub> – ♂FSH	-0.837	0.019
♂ALT – ♂AST	-0.735	0.038	♀FSH – ♀TG	-0.833	0.020
♂GGT – ♀ASG	-0.711	0.048	♀LH – ♂TG	-0.764	0.045
♂E <sub>2</sub> – ♀TK	-0.783	0.037	♀P <sub>4</sub> – ♀E <sub>2</sub>	-0.886	0.008
♂E <sub>2</sub> – ♂GGT	-0.782	0.038	♀Ser DGH – ♀ALT	-0.771	0.025
♂P <sub>4</sub> – ♂TK	-0.821	0.024	♀Ser DGH – ♂VLDL-K	-0.752	0.031
♂P <sub>4</sub> – ♀GGT	-0.865	0.012	♀Ser DGH – ♂E <sub>2</sub>	-0.772	0.042
♂Ser NES – ♀Ser DGH	-0.764	0.045	♀Ser DGH – ♀Ser NES	-0.758	0.029
Sb OBS – ♀LDL-K	-0.848	0.016	♀Ser OBS – ♂TG	-0.785	0.021
Sb OBS – ♂TP	-0.755	0.050	♀Ser NES – ♀TG	-0.816	0.014
Testis OGH – Ov OGH	-0.898	0.006	Ov NES – ♀LDL-K	-0.949	0.001
Testis OBS – Uterus NES	-0.783	0.037	Ov OBS – ♀TG	-0.832	0.020
Testis OBS – ♂TP	-0.864	0.012	Uterus OGH – Ov DGH	-0.821	0.024
Testis NES – Uterus OBS	-0.778	0.040	Uterus DGH – ♂LDL-K	-0.823	0.012

ALT: Alanin aminotransferaz. ASG: Açlık serum glukoz. ASİ: Açlık serum insülin. AST: Aspartat aminotransferaz. DGH: Desaçile ghrelin. E<sub>2</sub>: Östrodiol. FSH: Folikül stimüle edici hormon. GGT: Gamma glutamiltransferaz. HDL-K: Yüksek yoğunluklu kolesterol. LDL-K: Düşük yoğunluklu kolesterol. LH: Lüteinize edici hormon. NES: Nesfatin-1. OBS: Obestatin. OGH: Oktanile ghrelin. Ov: Ovaryum. P<sub>4</sub>: Progesteron. Sb: Seminal bez. Ser: Serum. TG: Trigliserid. TK: Total kolesterol. TP: Total protein. VLDL-K: Çok düşük yoğunluklu kolesterol. ♂: Erkek. ♀: Dişi.

#### 4. TARTIŞMA

Metabolik sendrom ve üreme fonksiyonu arasında bağlantı olduğuna dair bilimsel veriler gün geçtikçe artmaktadır (4, 5, 10, 129). MetS tanısının kriterleri arasında yer alan VKİ'nin artması yani obezite gelişmesi ve insulin direncinin de obezite ile birlikte seyretmesi dolaşımdaki glukoz derişimlerinin artmasına neden olmaktadır (1-4). Tüm bu değişen biyokimyasal olaylara bağlı olarak SHBG seviyeleri azalmakta ve sonuçta spermatogenez olumsuz etkilenmektedir (129). Kadınlarda, obezite ve sub-fertilite arasındaki ilişki ovulasyon sıklığının azalması ve özellikle de VKİ  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> olması ile yakından ilişkilidir (52). Bel/kalça oranında 0,1 ünitelik bir artışın, siklus başına konsepsiyon oranını %30 azalttığı bildirilmektedir (52, 53). Organizmalarda MetS'ye bağlı olarak değişen enerji dengesi, vücutta fizyolojik homeostasinin sağlanması için enerji dengesini düzenleyen hormonların düzeylerinde de değişimlere neden olmaktadır (130-132). Dolayısı ile bu tezde fruktoz diyeti ile MetS oluşturduktan sonra, enerji dengesinde rolü olan; OGH, DGH, OBS ve NES'in üreme sistemi dokuları ve dolaşımdaki değişimlerinin nasıl olduğunu araştırdık.

Çalışmamızda diyet başlangıcından 12 hafta sonra ATP III kriterlerine göre (artmış ASG, VKİ ve TG) MetS oluştu (4). Sıçanların içme sularına %10'luk fruktoz eklenmesi 12 haftalık sürede MetS'ye neden olduğundan, sıçanlarda deneysel olarak MetS oluşturacak araştırmacılar için bu protokolün birincil tercih olacağını düşünmekteyiz. MetS oluşturmada birçok deneysel model bulunmasına rağmen (örneğin; %60'luk fruktozun sıçan yemine eklenerek MetS oluşturulması) söz konusu metotlar araştırma maliyetlerini arttırmaktadır (25, 37). Bu çalışmadan da anlaşıldığı gibi %10'luk fruktozun içme suyuna eklenmesi daha avantajlı olmaktadır (37-40). Dünya genelinde genel olarak fruktozla MetS oluşturmada *Sprague Dawley* veya *Wistar albino* türü sıçanlar tercih edilmektedir (25). Standart sıçan yemine %60 fruktoz eklenmesi ile 6 – 8 hafta arasında MetS oluştuğu bildirilmektedir (25). Çalışmamızda sıçanların içme sularına % 10'luk fruktoz eklediğimizde (37) ATP III kıstaslarından üç tanesini 12 hafta sonunda elde edebildik. MetS modelimizin 4 hafta daha uzun sürmesinin ana nedenlerinin; standart sıçan yem içeriği, yeme %60 fruktoz ekleme (25) yerine içme sularına %10 fruktoz eklenmesi (37) veya kıstas aldığımız üçlü parametrenin kendisinden kaynaklanmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Artmış ASG, VKİ ve LDL-K üçlüsü kıstası yerine başka bir üçlü kıstas alsaydık; örneğin hipertansiyon, artmış ASG ve artmış VKİ muhtemelen MetS oluşturulması için 8 hafta yeterli olabilirdi (25). Sıçanların tansiyonlarını ölçmek çok zor olduğundan standart analizlerin yapılabilmesi için tansiyon ölçmeyi tercih etmedik. Bu sebeple ülkemizde gelecekte yapılacak MetS deneylerinde bu verinin göz önüne alınmasının önem arz ettiğini düşünmekteyiz (38-40).

Burada fruktozla MetS oluşmasının ana mekanizmasını ise şöyle açıklayabiliriz; fruktozu beyne taşıyan GLUT 5 reseptörü beyinde bulunmadığından, beynin doygunluk merkezi uyarılamamakta ve buna bağlı olarak hayvanlar sürekli yem yemekte, bu durum ise kilo artışına yani obeziteye yol açmaktadır (46). Obezite insülin direncine, insülin direnci de dolaşımda glukoz birikimine yol açmakta ve sonuçta tüm bu mekanistik olaylar lipit profilini değiştirerek MetS oluşturmaktadır (1-4).

Glukoz değerlerimiz deneyin başlangıcında ve deney sonunda 93–96 mg/dL arasında değişirken MetS oluşturduğumuzda bu değerlerin 185–198 mg/dL'ye kadar yükseldiği saptandı. Ayrıca deney sonunda MetS'ye bağlı olarak sıçanların VKİ değerlerinin de arttığı gözlemlendi. VKİ değerlerinin artması obezitenin gelişmesi manasına gelmektedir. Şahin ve arkadaşları sıçanlarda VKİ değerlerinin 0.72 (g/cm<sup>2</sup>) olmasının normal olduğunu, 1.0 (g/cm<sup>2</sup>) üzerine çıkmasının ise sıçanlarda obezite gelişimine yol açtığını rapor etmişlerdir (122). Obezite insülin direncine neden olmakta, insülin direncinin gelişmesi de dolaşımda hem glukoz hem de insülin miktarlarının artmasına neden olmaktadır (1-4). Ayrıca bilindiği gibi hiperglisemi serin kinaz kaskatlarını aktive etmektedir (133). Bu kinazlar ( tirozin kinaz aktivitesi olan) insülin reseptör substrat (İRS) ve proteinlerinin fosforilasyonuna yol açmaktadır. İRS-1 ve İRS-2 serin fosfarilasyonunda yükselmeye ve tirozin fosforilasyonunda azalmaya neden olmaktadır (134). Sonuçta fosfotidilinisitol-3 (İP3) gibi sinyal moleküllerinde aktivite azalması insülin etkisinin azalmasına, insülin etkisinin azalması da insülin direncinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (134). Bu tez çalışmasında gözlemlediğimiz ASİ ve ASG verileri daha önceki bulguları teyit etmektedir.

Çalışmamızda MetS'nin karaciğer enzim profili üzerine etkisinin olup olmadığı da araştırıldı. AST seviyeleri istatistiksel olarak kayda değer şekilde

MetS'den etkilenmez iken, ALT ve GGT seviyelerinin MetS'le birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı saptandı. MetS'de ortak laboratuvar bulgularında ALT [*Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase (SGOT)*], AST [*Serum Glutamic Pyruvate Transaminase (SGPT)*] ve GGT enzimlerinin arttığı bildirilmiştir (135). Artma genellikle orta düzeylerde olmakta, normalin 2–3 katını geçmemektedir. MetS ALT sınır değerleri erkekler için 31 IU/L ve kadınlar için 18 IU/L olarak rapor edilmiştir. (136). Diğer yandan sigara ve alkol tüketiminin VKİ ve bel çevresindeki artışlara paralel olarak aminotransferazları baskıladığı bildirilmiştir (137, 138). Dolayısıyla MetS hastalarında sigara ve alkol tüketimi ALT, AST ve GGT düzeylerini baskılayacağından hem MetS hem de ilgili diğer hastalıkların insidanslarını değiştirebilir. Fruktozun inflamasyona neden olduğu rapor edildiğinden (139-141), bu enzimlerin artışının ana sebeplerinin; obeziteye bağlı karaciğer yağlanması ya da fruktozun neden olduğu inflamasyon olduğunu düşünmekteyiz. Serum AST düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış oluşmamasının ana sebebi; AST ekspresyonu yapan organların (karaciğere ek olarak; kalp, böbrek, kas, beyin, akciğer) MetS'den eşit oranda hasar görmemesine bağlı olarak dolaşımdaki AST seviyesi dengeleme olasılığıdır. Oysaki ALT'nin ana sentez yeri karaciğer olduğundan, karaciğerde oluşabilecek en ufak hasar dolaşıma ALT salınımına neden olmaktadır. Diğer bir anlatımla ALT miktarı karaciğer hasarının doğrudan göstergesidir. Ayrıca ALT, AST'ye göre daha dayanıklı olup, daha yavaş yıkılmaktadır (142). Bu yüzden ölçülen dolaşım ALT miktarı yüksek olabilir. Bu çalışmada MetS'ye bağlı GGT artışını şöyle açıklamaktayız; bu enzim karaciğer hastalıklarında oldukça spesifik ve duyarlı bir enzimdir. Hepatobiliyer fonksiyon bozukluğunu çok iyi yansıtmaktadır. Gama glutamil transpeptidaz karaciğer ve böbrekte yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Hepatoselüler hasarlanmalarda, safra yolu GGT düzeyleri yükselmektedir (142). Yani MetS'ye bağlı olarak enterohepatik hasar oluşmakta ve dolaşıma GGT salınımı artmaktadır.

Bu çalışmada MetS'ye bağlı olarak lipid profilinin nasıl değiştiği de araştırıldı. Çalışmada MetS grubunda kontrol gruplarına göre, TG, VLDL-K, LDL-K ve TK derişimleri istatistiksel olarak anlamlı yüksek, HDL-K düzeyleri ise kayda değer şekilde düşük bulundu. Modi ver ark. yaptıkları bir çalışmada fruktoza bağlı olarak hiperinsülinemi ve hiperlipidemi geliştiğini ve lipid profillerinde (HDL-K

hariç) bir yükselişe neden olduğunu rapor etmişlerdir (143). Bizim gözlemlediğimiz lipid profili sonuçları da bu verilerle uyumluluk göstermektedir. TK, TG, VLDL-K ve LDL-K artışının muhtemel nedeni şöyle olabilir; adiposit, intestinal epitelyum ve karaciğer dokusunda hücre içine alınan fruktoz, fruktoz 1-fosfata dönüşmekte (46) ve aldolazlar tarafından da triozlara çevrilmektedir. Bu yol üzerinden de yağ asidi sentezine gider ki böylece fruktoz aynı zamanda uzun zincirli yağ asitlerine de karbon atomu sağlamış olur. Dolayısıyla fruktoz, lipit (triacilgliserol) seviyelerini bu yolla artırmaktadır. Lipit düzeylerinin artışı da MetS'ye neden olmaktadır (46). HDL-K seviyesindeki azalma MetS'nin neden olduğu oksidatif stresi ortadan kaldırırken, kullanıma bağlı olarak miktarı azalmış olabilir. Örneğin paraoksonaz HDL'ye bağlı bir proteindir (144). Bu tez çalışmasına konu olan ghrelin hormonu da dolaşımında HDL-K'ya bağlı olarak taşınmaktadır (145). Yani organizmalardaki hem ghrelin hormonu hem de paraoksonaz enzimi endojenik antioksidant moleküllerdir (144, 146). MetS gibi ağır bir fizyolojik stresten uzaklaşmak için endojenik antioksidantların kullanımı kaçınılmazdır. Nitekim HDL-K ve ghrelin miktarlarında paralel bir düşüş gözlenmiştir. Tartışmanın ilerleyen kısımlarında (TP ve üreme hormonlarından sonra) bu mekanizma yeniden gözden geçirilecektir.

Bu çalışmada MetS'ye bağlı olarak TP miktarlarında bir artış gözlemlendi. Yaptığımız geniş literatür taramasında MetS'de TP düzeylerinin nasıl değiştiği konusunda bir çalışmaya rastlayamadık. Serum proteinlerindeki patolojik durumlar genellikle albumin azalması veya globulinlerin artışı şeklindedir. Çalışmamızda sıçanlar standart sıçan yemine ek olarak içme sularında %10 fruktozla beslendiler. Yani açlık ve proteinden fakir beslenmeye maruz kalmadılar ve deney süresince sıçanlarımızda MetS haricinde herhangi bir sistemik rahatsızlık gözlenmedi. Dolayısı ile buradaki TP artışının MetS'ye bağlı olduğu ve pozitif enerji dengesinden veya bozulmuş lipit (artmış kolesterol, LDL-K vb.) metabolizmasından veya fruktozun neden olduğu inflamasyondan kaynaklandığını düşünmekteyiz (139-141). İnflamasyonun CRP ve immunoglobulinlerin artışına neden olduğu bilinmektedir (147).

Çalışmada hipofizden salgılanan ve menstrual siklusu yöneten FSH ve LH miktarlarının nasıl değiştiği de araştırıldı. FSH miktarlarının erkeklerde MetS ile birlikte arttığı, dişilerde ise azaldığı saptandı. LH düzeyleri MetS'li dişilerde

artarken, erkek sıçanlarda kayda değer bir değişiklik olmamıştır. MetS ile insülin hormonu arasında bir ilişki bulunmaktadır (1-4). İnsülin glukozun hücre içine alınımı sağlamaktadır. MetS'de insuline karşı bir direnç oluşmaktadır (2,4).

Pankreas bu olayın üstesinden gelebilmek için, bu çalışmada da rapor edildiği gibi, daha fazla insülin salgılamaktadır. Bu yüksek dozda insülin yumurtalıkları etkileyerek ovulasyonu engeller ve sonuçta, androjen düzeylerinde (testosteronlar) artış meydana gelir. LH üretimi ve etkisinin fazlalığı yoluyla da aromatazların aktiviteleri inhibe olabilir.

Aromatazların inhibiyonu, androstendion ve testosteronunun vücut periferlerinde veya ovaryumlarda östrojenlere dönüşmemesi manasına gelmektedir. Bu durumda androjen derişimi artmakta ve artan testosteron da burada dişi MetS'li sıçanlarda gözlemlediğimiz gibi FSH salgısını baskılamaktadır (148). Ayrıca azalan FSH düzeyleri ile granuloza hücrelerinde testosteron ve androstendiondan, östrol ile E<sub>2</sub>'nin oluşması için şart olan FSH etkili aromataz aktivitesi inhibe olmaktadır. Dolayısıyla azalan FSH düzeyleriyle de TT düzeylerinin artması beklenmiştir. Fakat bizim çalışmamızda dişi TT seviyelerinde bir değişiklik meydana gelmemiştir.

Bu çalışmada FSH ve LH üzerine etkisi olan ghrelin'lerin dolaşımdaki seviyelerinin MetS'de nasıl değiştiğini de inceledik. MetS ile hem oktanile hem de desaçile ghrelin'in kayda değer bir şekilde azaldığını rapor ettik. Yapılan bir çalışmada ghrelin'in santral olarak verilmesi pulsatil LH sekresyonunun ovarektomize dişi sıçanlarda baskıladığı bildirilmiştir (89). Ayrıca 3 nmol ghrelin'in İCV olarak verilmesi dişi sıçanların siklusunda LH sekresyonunu östrus siklusu (proestrus, estrus, metesterus) boyunca inhibe ettiği gözlemlenmiştir (88). Günlük oktanile ghrelin enjeksiyonunun erkek sıçanlarda puberte süresince dişi sıçanlara benzer bir şekilde LH konsantrasyonlarını düşürdüğü tespit edilmiştir.

MetS ile dolaşımdaki ghrelin derişimleri düşmekte ve bunun sonucu olarak da üreme aksı üzerindeki baskısı azalmaktadır. Bu durumda da bu çalışmada gözlemlediğimiz gibi dişi sıçanlarda LH artışına neden olmaktadır. Kronik oktanile veya desaçile ghrelin infüzyonu dolaşımdaki LH ve FSH seviyesinde önemli bir düşüşe sebep olmaktadır (88-90). LH düzeyinin artışının, MetS'nin ghrelin seviyesini düşürmesiyle bağlantılı olduğunu

düşünmekteyiz. Ghrelin'in üreme aksı üzerinde çok önemli role sahip olduğu görülmektedir. Örneğin ghrelin, *in vitro* olarak yapılan bir çalışmada fare embriyosunun preimplantasyonunu inhibe etmiştir.

Başka bir çalışmada da kronik ghrelin uygulamasının gebeliğin ilk yarısında embriyo gelişimini engellediği bildirilmiştir. Çalışmamızda MetS grubunda erkek sıçanlarda TT seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını kaydettik. TT artışının muhtemel sebebi; MetS'a veya obeziteye bağlı olarak dolaşımda ghrelin düzeylerinin azalması olabilir (122). Çünkü uzun süre testosteron replasmanı dolaşımdaki ghrelin seviyelerini normal seviyelere getirmiştir. Bu etkileşim ghrelin ve seks steroidleri arasında karşılıklı interaksiyon bulunduğunu göstermektedir. Yani ghrelin'in androjen sekresyonunu module ettiği gibi androjen de ghrelin sekresyonunu module etmektedir.

Çalışmamızda MetS oluşturulmuş sıçanların üreme sistemi dokularında ghrelin ekspresyonlarının nasıl değiştiğini de araştırdık. Seminal bez, testis, uterus ve ovaryumlarda hem oktanile hem de des-açile ghrelin ekspresyonlarının immunohistokimyasal olarak dokularda ve ELISA ile supernatanlarında MetS'ye bağlı olarak azaldığını tespit ettik. Sıçan testislerinde immunohistokimyasal ve insitu hibridizasyon yöntemleri ile yapılan lokasyon analizleri sonucunda germ hücreleri, somatik sertoli hücreleri ve leydig hücrelerinde ghrelin ve spesifik reseptörünün (GHS-R1a) ekspresyonu rapor edilmiş olup, bizim bulgularımızla uyumluk göstermektedir (88-90). Ancak MetS ile birlikte bu dokulardaki ghrelin ekspresyonları baskılanmaktadır. Dolayısı ile MetS doğrudan üreme sistemini etkilemektedir. Ayrıca GHS-R1a mRNA seviyelerinin doz bağımlı olarak ghrelin ve pituiter FSH aracılığı ile stimüle edildiği de bildirilmiştir. Böylece sadece ghrelin ekspresyonu değil aynı zamanda ghrelinin testiküler duyarlılığı da hormonal sinyaller ile düzenlenmektedir. Ghrelin testosteron sekresyonunu doz bağımlı olarak inhibe etmektedir. Ghrelin'in tubuler kök hücre mRNA'sı üzerine etki ettiği için hem spermatogenezis hem de leydig hücre proliferasyonunu düzenlenmesinde rolü olduğu ileri sürülmektedir (89,90). Ghrelin'in testiküler ekspresyonunda ana uyarıcı hipofizer LH'dir. Buna göre; ghrelin'in gonadotropik stimülasyona cevap olarak testiküler testosteronun kendi kendine sınırlamasına katılabilen LH'nın steroidojenik aktivitesinin dengelenmesinde lokal düzenleyici görevi de bulunmaktadır. *In vitro*

şartlarda ghrelin'in doz bağımlı olarak leydig hücreleri tarafından hCG ve CAMP'ın stimüle ettiği testosteronu inhibe ettiği bildirilmiştir (88). Testosteron sekresyonunda ghrelin'in bu inhibitör etkisini hCG'nin stimüle ettiği steroidojenik yolakla da bağlantısı bulunmaktadır. Ghrelin'in MetS'ye bağılı olarak derişiminin düşme sebeplerinden birisisi; MetS'de glukoz miktarının yükselmesi olabilir. Çünkü glukoz ile ghrelin arasında ters ilişki olduğu bildirilmiştir (149). Ghrelin'in MetS'ye bağılı olarak miktarının azalmasının bir diğer nedeni; MetS'nin getirdiği metabolik yükü ortadan kaldırmak için antioksidan olarak kullanılma olasılığıdır (146). Ghrelin vücudun önemli antioksidan moleküllerinden biridir (146). Bilindiği gibi MetS oluşturmada kullanılan fruktoz inflamasyona yol açmaktadır (140, 141). Ghrelin'lerin anti-influmatuvar özellikleri bulunduğundan, inflamasyonu ortadan kaldırmak için biyokimyasal yollarda kullanıldığı için azalmış olabilir (150). Biz bu çalışmada üreme sistemlerindeki ghrelin ekspresyonlarını analiz ettiğimizde OGH ve DGH düzeylerinde azalma tespit ettik. Ghrelin'in birçok organ ve dokuda sentezlendiği düşünöldüğünde, MetS organizmanın tüm sistemlerindeki ghrelin ekspresyonlarına etki etmiş olabilir. Bu sebeple ghrelin havuzuna yeterince ghrelin salınmadığından dolaşımdaki miktarları düşük bulunmuş olabilir. Üreme aksı üzerinde sıkı bir denetimi olan ghrelin, enerji düzenlenmesini sağlamak için biyokimyasal ve fizyolojik homeostasis nedeni ile de azalmış olabilir (88-90).

Bu çalışmada MetS oluşturulmuş sıçanların üreme sistemi dokularında OBS ekspresyonlarının nasıl değiştirdiğini de araştırdık. MetS ile seminal bez dokusunda OBS sentezi artarken testis, ovaryum ve uterus dokularında ise OBS düzeyleri ghrelin gibi düşüş sergilemiştir. Ghrelin ve OBS tek bir genin ürünü olduğundan aslında teorik olarak paralel düşüş veya da paralel artış beklenebilir. Fakat yapılan birçok çalışmada deneysel veriler bu teoriyi desteklememektedir (93, 95, 97). Bu çalışmada seminal bezde neden artış olurken diğer dokularda düşüş olmuştur mevcut verilerimizle bu sorunun cevabını bulamıyoruz.

Obestatin'in enerji dengesinin kontrolünde ghrelin'le işbirliği içinde olabileceği öne sürölmektedir. Ancak yapılan araştırmalarda OBS'nin enerji dengesi, besin alınımı, vücut ağırlığı, vücut kompozisyonu, enerji harcanması veya enerji dengesiyle ilişkili hipotalamik merkezlerle arasında bir ilişkinin olmadığı rapor edilmektedir (97). OBS ve ASİ düzeyleri arasında bir ilişki mevcuttur (100). Bu

ilişki bu çalışmada da gözlemlendi. Yani OBS düşerken insülin miktarı artmaktadır. Plazma OBS düzeylerinin; bozulmuş glukoz toleransı olanlarda ve tip 2 DM'lilerde, insülin direnci gelişimine bağlı olarak azaldığı bildirilmiştir (101,104). Çalışmamızda MetS ile birlikte insülin direnci gelişti. Dolayısı ile genel olarak gözlemlediğimiz azalmış OBS bulguları ile bu sonuçlar uyumluluk göstermektedir.

Biz bu çalışmada seminal bez, testis, uterus ve ovaryumlarda OBS sentezlendiğini immünohistokimyasal olarak ve ELISA yöntemleri ile gösterdik. Daha önce OBS; yanak epitelyumu, duodenum, jejunum, kolon, pankreas, ince ve kalın bağırsaklar, dalak, meme bezi ve fetal ve erişkin pankreas adacıklarının sitoplazmalarında tespit edilmiştir (97, 104). Tükürük bezindeki glandular hücreler ile testislerdeki leydig hücrelerinin OBS sentezlediği rapor edilmiştir (122). OBS'nin ghrelin'in üretildiği endokrin dokularda üretildiği bildirilmiş olup, üreme sistemlerinde varlığını göstermemiz de bu bilgiyi teyit etmektedir. Ayrıca ghrelin ve seks streoidleri arasında karşılıklı etkileşim bulunması, OBS ve seks streoidleri arasında bir etkileşim bulunduğunu göstermektedir (148). Üreme sistemlerinde enerji dengesinin düzenlenmesinde OBS ghrelin'le birlikte karşılıklı etkileşim göstererek otokirin, parakirin ve endokrin olarak görev yapmaktadırlar.

Bu çalışmada enerji homeostasisinde rol aldığı bilinen ve gonadal dokularda sentezi daha önceden gösterilmiş olan NES düzeyleri de değerlendirildi. Kontrol grubuyla kıyasladığımızda MetS'li grupta; serum NES düzeylerini yüksek bulundu. NES düzeylerindeki değişikliklerin cinsiyetler arasında istatistiksel olarak farklı olduğu da (erkek;  $p < 0.05$ , dişi;  $p > 0.05$ ) rapor edildi. Yaptığımız geniş literatür taramasında MetS'de NES düzeyleriyle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Çalışmamızda MetS'de yükselen NES düzeyleri, leptin'de olduğu gibi muhtemel bir nesfatin direncinin varlığını düşündürmektedir. Çünkü NES'in azalması iştah stimülasyonuna ve dolayısıyla obeziteye neden olmaktadır (106, 111). Diğer yandan MetS ile artan NES düzeyleri ortaya çıkan insülin resistansına karşı gelişmiş bir savunma sistemi de olabilir. Çünkü NES'in antihiperglisemik etkili olduğu daha önceden rapor edilmiştir (117).

Bu çalışmada seminal bez, testis, uterus ve ovaryumların NES sentezlendiği immünohistokimyasal ve ELISA yöntemleri ile tespit edildi. Literatürde MetS'li sıçanların üreme sistemlerinde NES düzeyleriyle ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada seminal bezin salgı bezlerinin epitellerinin apikal bölgelerinde, testislerin seminifer tübüllerindeki sertoli hücreleri ve spermatozoidlerde, ovaryumlarda *corpus luteum*'un granulosa lutein hücrelerinde ve uterusun endometriyum stroma tabakası ve uterin bez epitel hücrelerinde NES sentezi olduğu ve MetS ile sentezlerinin arttığı tespit edildi. İnsan, sıçan ve fare testisinde, ayrıca sıçan ovaryumlarında NUCB2 mRNA'sı ve Leydig hücrelerinde de NES immünoaktivitesi gösterilmiştir (110). Bu bulgular bizim çalışmamızdaki testis ve ovaryum dokularının NES immünoaktiv lokalizasyonu ile uyumluluk göstermektedir. NES'in bu dokulardaki varlığının gösterilmesi bu dokular üzerinde endokrin ve/veya direkt parakrin etkilerinin varlığına işaret etmektedir. MetS'de NES'in doku ve serum düzeyleri yüksek bulundu. García-Galiano ve arkadaşları NUCB2/nesfatin-1'in pubertenin başlamasına katkıda bulunduğunu öne sürmüştür (110). Dolayısıyla obez kız çocuklarının menarşe normal kilodaki kız çocuklarına kıyasla daha erken yaşta ulaşmalarında (113) yüksek NES düzeylerinin etkili olabileceği ileri sürülmektedir. Aynı zamanda artan obezitenin anovulatuvar siklusların sıklığında artışla birlikte olduğu ve obez kadınlarda artan sayıda atretik foliküller bulunduğu da gösterilmiştir(117). NUCB2/nesfatin-1'in hipotalamo-hipofizer düzeyde üreme fonksiyonu üzerindeki uyarıcı etkisine ilişkin kanıtlar, MetS'de yüksek LH düzeyleri ile ilişkili olabilir (117). García-Galiano ve arkadaşları *ad libitum* beslenen pubertal dişilere NES'in İCV enjeksiyonunun FSH ve LH düzeylerinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. 48 saatlik açlıktan sonra, NES'e gonadotropin yanıtının daha da arttığı gözlenmiştir (110). Dolayısıyla süreklilik arzeden bir LH yüksekliği anovulasyona neden olabilir. Çünkü ovulasyonun gerçekleşmesi için LH pikinin gerekli olduğu bilinmektedir. Bu alanda yeterli çalışma olmadığından NES'in ovaryan steroidogeneze ve Leydig hücrelerinde üretilen testosteron üzerine etkilerinin olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Bu sebeple MetS'de artan NES düzeylerinin foliküler atreziye ve spermatogeneze ne gibi etkilerinin olduğu henüz bilinmemektedir. Hipofizektominin NES sentezini azalttığı, LH ekspresyonunun ise testislerin NES ekspresyonu arttırdığı bildirilmiştir (117). NES sıçan testislerinde testosteron sekresyonunu arttırmaktadır. Ancak uterus dokusu ve seminal bez'de NES düzeylerindeki artışın biyokimyasal açıdan üreme sistemini nasıl etkilediği bilinmediğinden, santral ve periferel sinyallerle hipotalamo-

hipofizer gonadal aks üzerine etkili yeni bir olası metabolik düzenleyici olarak nitelendirilebileceği öne sürülen NES'in (110) etkilerinin açıklanması için ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

VKİ MetS'nin en önemli kriterlerinden biridir. Dolayısıyla bu çalışmada VKİ değerleri ile çalışılan diğer parametreler arasındaki muhtemel ilişkileri de araştırıldı. Çalışmamızda sıçanların VKİ değerleri ile ghrelin, OBS ve NES değerleri arasında ilişkiler bulunduğu belirlendi (ilişki tabloları sonuçlar kısmındadır). Ghrelin eksprese eden dokularda (böbrek haricindeki) ekspresyonlar obeziteyle ters ilişkilidir (151). Cesur ve ark. tarafından 1 aylık bebeklerde OGH ve VKİ arasında negatif ilişki bulunduğu bildirilmiştir (152). Yenidoğan ve obezlerde OGH ve DGH'nın birbirleriyle pozitif, ASI ve VKİ ile ters ilişkili ( $-0,566$ ,  $p<0.0001$ ) oldukları bildirilmiştir (153). Li ve arkadaşları tarafından Çinli çocuk ve gençlerde serum ve tükürük bezi ghrelin düzeyleri ile VKİ arasında pozitif ilişki olduğu rapor edilmiştir (154). Uygulanan analiz yöntemleri VKİ ile hormon düzeyleri arasındaki muhtemel ilişkilerin yönünü belirlemektedir. Böbrek transplantasyonunda tek değişkenli analizlerde obestatin ile VKİ arasında kuvvetli negatif ilişki ( $p<0.0001$ ;  $r: -0.52$ ), çok değişkenli analizlerde ise pozitif ilişki olduğu gösterilmiştir ( $\beta= -0.53$ ;  $p=0.01$ ) (97). Mafra ve ark. hemodiyaliz hastalarında OBS ve ghrelin etkileşimini incelediklerinde DGH ile OBS arasında kuvvetli pozitif ilişki ( $r = +0.56$ ,  $p = 0.0001$ ) tespit etmelerine karşın, VKİ ile OBS arasında negatif ilişki ( $r = -0.40$ ,  $p = 0.007$ ) bulunduğunu rapor etmişlerdir (155). Deniz ve ark. PCOS'ta VKİ ile NES arasında negatif ilişki bulunduğunu saptamışlardır (156). Zhang ve ark. henüz yeni tip 2 DM tanısı almış hastalar ile bozulmuş glukoz toleransı olanlarda basit regresyon analizleri sonucunda VKİ ile NES arasında pozitif ilişki bulunduğunu tespit etmişlerdir (157).

MetS'de insülin direnci gelişimine bağlı olarak serum glukoz düzeyleri artmakta ve lipit profili bozulmaktadır. Chock ve ark. 1479 hastanın kayıtlarından *Framingham risk skoru* yöntemini kullanarak retrospektif olarak yaptıkları çalışma neticesinde VKİ ile TT arasında negatif ilişki bulunduğunu rapor etmişlerdir (158). 40 yaş ve üzerindeki erkeklerde TT serum düzeylerinin araştırıldığı bir çalışmada TT ve VKİ arasında negatif bir ilişki olduğu bildirilmiştir (159). Bu bulgular çalışma sonuçlarımızla doğrulanmıştır. Ekwurugwu ve ark. VKİ'nin  $P_4$  ve  $E_2$  ile kuvvetli (% 96), ayrıca TT, LH, Prolaktin ve sperm motilitesiyle de ilişkili olduğunu rapor

etmişlerdir (160). Bu sonuçlar bizim bulgularımızla da örtüşmektedir. Bel çevresi ve VKİ ölçümlerinin artan AST ve ALT ile pozitif ilişkili olduğu orta yaşlı Çinlilerde yapılan bir çalışmada bildirilmiştir. Ayrıca serum aminotransferaz artışlarının tip 2 DM ve MetS ile ilişkili olduğu da vurgulanmıştır. Bu çalışmada fiziksel aktivitenin ALT ve AST düzeylerini azaltarak kilo kaybına yol açtığı bildirilmiştir (161).

Bu çalışmamızdan elde edilen verilerin evrensel bilime katkıları kısaca şöyle özetlenebilir; 1) MetS oluşturulmuş gruplarda; ASG, LDL-K, TK, TP, ALT, GGT, TT, ASİ ve TG düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak arttığı tespit edilirken, HDL-K düzeylerinin ise azaldığı saptandı. 2) MetS'li sıçanların serumlarında OBS (azalma anlamlı değil) ve ghrelin miktarlarında kontrol grubu değerleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma NES düzeylerinde ise anlamlı bir artış gözlemlendi. 3) Bu çalışmayla ile kez MetS oluşturulmuş sıçanların üreme sistemi dokularında kontrol dokuları ile karşılaştırıldığında; seminal bez dokularında OGH %46.20, DGH %49.38; testis dokularında OGH %15.11; DGH %30.84 ve OBS %9.68; ovaryum dokularında OGH %20.08; DGH %37.42 ve OBS %72.33; uterus dokularında OGH %14.16; DGH %34.80 ve OBS %77.72 azaldığı rapor edilirken, seminal bez dokularında OBS %53.37 ve NES 4 kat; testis dokularında NES 7 kat; ovaryum dokularında NES 14 kat, uterus dokularında NES 20 kat arttığı rapor edildi. 4) Seminal bezlerde ghrelin, OBS ve NES, epitel hücrelerin apikal kısımlarında, testis dokularında seminifer tübüllerdeki spermatitlerde, ovaryum dokularında *Corpus Luteum*'un *theca* ve *granulosa* hücrelerinde, uterus dokularında ise endometriyum stroma tabakası ve uterin bez epitel hücrelerinde lokalize olduğu kayıt edildi. 5) Üreme organlarında lokal olarak üretilen ghrelin, OBS ve NES'in gonadal aksın çok önemli komponentleri olabileceği ve böylece lokal olarak üretilen bu hormonların enerji homostasisini sağlayarak, FSH ve LH salınımını da kontrol altında tutarak, puberte başlangıcı ve gonadal fonksiyonların düzenlenmesinde roller üstlenmiş olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak bu verilerin ışığı altında, diyebiliriz ki ; ghrelin, OBS ve NES 'in sıçanların üreme sistemi dokularında lokal olarak sentezlendiği ve MetS'le gerek lokal sentezlerinin gerekse serum seviyelerinin değiştiği ve üreme aksında rolleri olduğu görülmektedir.

Gelecekte üreme aksı üzerinde rolleri olan diğer peptid yapılı hormonların (örneğin kisleptinin) MetS'le nasıl değiştiiğinin araştırılmasının üreme fizyolojisinin açıklığa kavuşturulmasında yeni ışıklar tutacağı ve üreme aksı bozukluklarının tedavi edilmesinde etkin terapotiklerin geliştirilmesine yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz.

## 5. KAYNAKLAR

1. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285: 2486–2497.
2. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey *JAMA* 2002; 287: 356–359.
3. Pyorala M, Miettinen H, Halonen P, Laakso M, Pyorala K. Insulin resistance syndrome predicts the risk of coronary heart disease and stroke in healthy middle-aged men: the 22-year follow-up results of the Helsinki Policemen Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 538–544.
4. Bruce KD, Byrne CD. The metabolic syndrome: common origins of a multifactorial disorder. *Postgrad Med J* 2009; 85: 614-621.
5. Balkau B, Valensi P, Eschwège E, Slama G. A review of the metabolic syndrome. *Diabetes & Metabolism* 2007; 33: 405–413.
6. Alberti G. Introduction to the metabolic syndrome. *European Heart Journal Supplements* 2005; 7: 3–5.
7. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37: 1595-1607.
8. Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM. NCEP-Defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes* 2003; 52: 1210-1214.
9. Grundy SM. Does the metabolic syndrome exist? *Diabetes Care* 2006; 29: 1689-1692.
10. Handelsman Y. Metabolic syndrome pathophysiology and clinical presentation. *Toxicologic Pathology* 2009; 37: 18-20.
11. Reaven GM. The Metabolic Syndrome: Requiescat in pace. *Clinical Chemistry* 2005; 51: 931–938.

12. Rocic P. Why is coronary collateral growth impaired in type II diabetes and the metabolic syndrome? *Vascul Pharmacol* 2012 (Baskıda)
13. Mattsson N, Rönnemaa T, Juonala M, Viikari JSA, Raitakari OT. The prevalence of the metabolic syndrome in young adults. The cardiovascular risk in young Finns study. *J Intern Med* 2007; 261: 159–169.
14. Ford ES, Giles WH. A comparison of the prevalence of the metabolic syndrome using two proposed definitions. *Diabetes Care* 2003; 26: 575-581.
15. Onat A, Sansoy V. Halkımızda koroner hastalığın başsuçlusu metabolik sendrom: sıklığı, unsurları, koroner risk ile ilişkisi ve yüksek risk kriterleri. *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi* 2002; 30: 8-15.
16. Karcier (Münipoğlu) S. Metabolik sendromun tanı ve tedavisi. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 2006; 2: 21-29.
17. METSAR (Metabolik Sendrom Sıklığı Araştırması) sonuçları. XX. Ulusal Kardiyoloji Kongresi. Antalya, 2004
18. Sanisoglu SY, Oktenli C, Hasimi A, Yokusoğlu M, Uğurlu M. Prevalence of metabolic syndrome-related disorders in a large adult population in Turkey. *BMC Public Health* 2006; 6: 92-97.
19. Fulop T, Tessier D, Carpentier A. The metabolic syndrome. *Pathologie Biologie* 2006; 54: 375-386.
20. Oğuz A. Metabolik sendrom. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni* 2008; 18: 57-61.
21. Özbakkaloğlu M, Demirci C. Yüzyılın Salgını: Metabolik Sendrom. *SSK Tepecik Hastanesi Dergisi* 2003; 13: 121-127.
22. Abbasi F, Brown BW, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM. Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk *JACC* 2002; 40: 937-943.
23. Carr MC, Brunzell JD. Abdominal obesity and dyslipidemia in the metabolic syndrome: Importance of type 2 diabetes and familial combined hyperlipidemia in coronary artery disease risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2601–2607.

24. Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004; 109: 433-438.
25. <http://www.researchdiets.com/pdf/Diet-Induced%20Metabolic%20Syndrome.pdf>. Erişim Tarihi; 03.02.2012.
26. Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 351982.
27. Corsetti JP, Sparks JD, Peterson RG, Smith RL, Sparks CE. Effect of dietary fat on the development of non- insulin dependent diabetes mellitus in obese Zucker diabetic fatty male and female rats. *Atherosclerosis* 2000; 148: 231-241.
28. Prpic V, Watson PM, Frampton IC, Sabol MA, Jezek GE, Gettys TW. Adaptive changes in adipocyte gene expression differ in AKR/J and SWR/J mice during diet-induced obesity. *J Nutr* 2002; 132:3325-3332.
29. Ogihara T, Asano T, Ando K, Sakoda H, Anai M, Shojima N, et al. High-salt diet enhances insulin signaling and induces insulin resistance in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 2002; 40: 83- 89.
30. Kobayashi N, Yoshida K, Nakano S, Ohno T, Honda T, Tsubokou Y, Matsuoka H. Cardioprotective mechanisms of eplerenone on cardiac performance and remodeling in failing rat hearts. *Hypertension* 2006; 47: 671-679.
31. Pagliassotti MJ, Gayles EC, Podolin DA, Wei Y, Morin CL. Developmental stage modifies diet-induced peripheral insulin resistance in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278: 66-73.
32. Nishina PM, Lowe S, Verstuyft J, Naggert JK, Kuypers FA, Paigen B. Effects of dietary fats from animal and plant sources on diet-induced fatty streak lesions in C57BL/6J mice. *J Lipid Res* 1993; 34: 1413-1422.
33. Lichtman AH, Clinton SK, Iiyama K, Connelly PW, Libby P, Cybulsky MI. Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice fed defined semipurified diets with and without cholate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1938-1944.

34. Wilson TA, Nicolosi RJ, Delaney B, Chadwell K, Moolchandani V, Kotyla T, et al. Reduced and high molecular weight barley beta-glucans decrease plasma total and non-HDL-cholesterol in hypercholesterolemic Syrian golden hamsters. *J Nutr* 2004; 134: 2617-2622.
35. Zern TL, West KL, Fernandez ML. Grape polyphenols decrease plasma triglycerides and cholesterol accumulation in the aorta of ovariectomized guinea pigs. *J Nutr* 2003; 133: 2268-2272.
36. Kasim-Karakas SE, Vriend H, Almario R, Chow LC, Goodman MN. Effects of dietary carbohydrates on glucose and lipid metabolism in golden Syrian hamsters. *J Lab Clin Med* 1996; 128: 208-213.
37. Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Jimenez A, Bautista P, Cristobal M, Nepomuceno T, et al. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: 423-429.
38. Parmaksız A. Metabolik sendrom oluşturulan ratlarda, Kuerstin, Alfa Lipoik Asit ve Tiazolidindion uygulamasının serum Resistin düzeyleri etkilerinin araştırılması. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 2009.
39. Atlas S. Metabolik sendrom oluşturulan ratlarda resveratrol uygulamasının serum resistin ve apelin düzeyleri üzerine etkileri. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 2011.
40. Özdoğan MS. Metabolik sendrom oluşturulmuş ratlarda Alfa Lipoik Asit ve Koenzim Q10 uygulamasının oksidatif Stres ve Endotelial disfonksiyon belirteçlerine etkileri. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 2011.
41. Teff KL, Elliott SS, Tschop M, Kieffer TJ, Rader D, Heiman M. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2963–2972.
42. Stirpe F, Della Corte E, Bonetti E, Abbondanza A, Abbati A, De Stefano F. Fructose-induced hyperuricaemia. *Lancet* 1970; 2: 1310 –1311.

43. Stavric B, Johnson WJ, Clayman S, Gadd RE, Chartrand A. Effect of fructose administration on serum urate levels in the uricase inhibited rat. *Experientia* 1976; 32: 373– 374.
44. Perheentupa J, Raivio K. Fructose-induced hyperuricaemia. *Lancet* 1967; 2: 528 –531.
45. Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, et al. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: 625–631.
46. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 537-543.
47. Mayes PA. Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr* 1993; 58: 754–765.
48. Bray GA. Fructose: should we worry? *Int J Obes (Lond)* 2008; 32: 127-131.
49. Jürgens H, Haass W, Castañeda TR, Schürmann A, Koebnick C, Dombrowski F, et al. Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obes Res* 2005; 13: 1146 –1156.
50. Soleimani M. Dietary fructose, salt absorption and hypertension in metabolic syndrome: towards a new paradigm. *Acta Physiologica* 2011; 201: 55-62.
51. <http://www.nature.com/nm/poster/index.html>. Erişim Tarihi; 01.03.2012.
52. Metwally M, Ong KJ, Ledger WL, Li TC. Does high body mass index increase the risk of miscarriage after spontaneous and assisted conception? A meta-analysis of the evidence. *Fertil Steril* 2008; 90: 714-726.
53. Bellver J, Rossal LP, Bosch E, Zúñiga A, Corona JT, Meléndez F, et al. Obesity and the risk of spontaneous abortion after oocyte donation. *Fertil Steril* 2003; 79: 1136-1140.
54. Goulis DG, Tarlatzis BC. Metabolic syndrome and reproduction: I. testicular function. *Gynecol Endocrinol* 2008; 24: 33-39.
55. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660.

56. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 2005; 85: 495-522.
57. Aydın S. Ghrelin Hormonunun Keşfi: Araştırmaları ve Klinik Uygulamaları. Derleme makalesi. *Türk Biyokimya Dergisi* 2007; 32: 495-522.
58. Nishi Y, Yoh J, Hiejima H, Kojima M. Structures and molecular forms of the ghrelin-family peptides. *Peptides* 2011; 32: 2175-2182.
59. Yoh J, Nishi Y, Hosoda H, Tajiri Y, Yamada K, Yanase T, et al. Plasma levels of n-decanoyl ghrelin, another acyl- and active-form of ghrelin, in human subjects and the effect of glucose- or meal-ingestion on its dynamics. *Regul Pept* 2011; 167: 140-148.
60. Hiejima H, Nishi Y, Hosoda H, Yoh J, Mifune H, Satou M, et al. Regional distribution and the dynamics of n-decanoyl ghrelin, another acyl-form of ghrelin, upon fasting in rodents. *Regul Pept* 2009; 156: 47-56
61. Kang KS, Yahashi S, Matsuda K. Central and peripheral effects of ghrelin on energy balance, food intake and lipid metabolism in teleost fish. *Peptides* 2011; 32: 2242-2247.
62. Chanoine JP. Editorial: Individual Differences in the Hormonal Control of Appetite: A Step toward a (More) Successful Treatment of Childhood Overweight? *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91: 2864-2866.
63. Nonogaki K. Ghrelin and feedback systems, Gerald Litwack (ed), *Vitamins and hormones, Ghrelin. Volumes 77.* Amsterdam, Hollanda. Elsevier 2008; 149-170.
64. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996; 273: 974-977.
65. Nass R, Gaylinn BD, Thorner MO. The role of ghrelin in GH secretion and GH disorders. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 340: 10-14.
66. Córdoba-Chacón J, Gahete MD, Castaño JP, Kineman RD, Luque RM. Homologous and heterologous in vitro regulation of pituitary receptors for somatostatin, growth hormone (GH)-releasing hormone, and ghrelin in a nonhuman primate (*Papio anubis*). *Endocrinology* 2012; 153: 264-272.

67. Davenport AP, Bonner TI, Foord SM, Harmar AJ, Neubig RR, Pin JP, et al. "International Union of Pharmacology. LVI. Ghrelin receptor nomenclature, distribution, and function". *Pharmacol Rev* 2005; 57: 541–546.
68. Fagerberg B, Hultén LM, Hulthe J. Plasma ghrelin, body fat, insulin resistance, and smoking in clinically healthy men: the atherosclerosis and insulin resistance study. *Metabolism* 2003; 52: 1460-1463.
69. Ukkola O, Pöykkö SM, Antero Kesäniemi Y. Low plasma ghrelin concentration is an indicator of the metabolic syndrome. *Ann Med* 2006; 38: 274-279.
70. Langenberg C, Bergstrom J, Laughlin GA, Barrett-Connor E. Ghrelin and the metabolic syndrome in older adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6448-6453.
71. Langenberg C, Bergstrom J, Laughlin GA, Barrett-Connor E. Ghrelin, adiponectin, and leptin do not predict long-term changes in weight and body mass index in older adults: longitudinal analysis of the Rancho Bernardo cohort. *Am J Epidemiol* 2005; 162: 1189-1197.
72. Pöykkö SM, Kellokoski E, Hörkkö S, Kauma H, Kesäniemi YA, Ukkola O. Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 2546-2553.
73. Coiro V, Volpi R, Stella A, Cataldo S, Chiodera P. Oxytocin does not modify GH, ACTH, cortisol and prolactin responses to Ghrelin in normal men. *Neuropeptides* 2011; 45: 139-1342.
74. Chuang JC, Sakata I, Kohno D, Perello M, Osborne-Lawrence S, Repa JJ, Zigman JM. Ghrelin directly stimulates glucagon secretion from pancreatic alpha-cells. *Mol Endocrinol* 2011; 25: 1600-1611.
75. Peng Z, Xiaolei Z, Al-Sanaban H, Chengrui X, Shengyi Y. Ghrelin inhibits insulin release by regulating the expression of inwardly rectifying potassium channel 6.2 in islets. *Am J Med Sci* 2012; 343: 215-219.
76. Itoh F, Komatsu T, Kushibiki S, Hodate K. Effects of ghrelin injection on plasma concentrations of glucose, pancreatic hormones and cortisol in Holstein dairy cattle. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2006; 143: 97-102.

77. Broglio F, Gottero C, Benso A, Prodam F, Destefanis S, Gauna C, et al. Effects of ghrelin on the insulin and glycemic responses to glucose, arginine, or free fatty acids load in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4268-4272.
78. Ishikawa T, Fujioka H, Ishimura T, Takenaka A, Fujisawa M. Ghrelin expression in human testis and serum testosterone level. *J Androl* 2007; 28: 320-324.
79. Kheradmand A, Roshangar L, Taati M. The role of ghrelin on the morphometry and intracellular changes in the rat testis. *Tissue Cell* 2009; 41: 105-111.
80. Saad A, Abbas OA. Ghrelin as a regulator of gonadal function in adult male offsprings exposed to cigarette smoking in utero. *Endocr Regul* 2009; 43: 141-148.
81. Dupont J, Maillard V, Coyral-Castel S, Ramé C, Froment P. Ghrelin in female and male reproduction. *Int J Pept* 2010; 2010: 158102.
82. Harrison JL, Adam CL, Brown YA, Wallace JM, Aitken RP, Lea RG, Miller DW. An immunohistochemical study of the localization and developmental expression of ghrelin and its functional receptor in the ovine placenta. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; 5: 25.
83. Arvat E, Gianotti L, Giordano R, Broglio F, Maccario M, Lanfranco F, et al. Growth hormone-releasing hormone and growth hormone secretagogue-receptor ligands: focus on reproductive system. *Endocrine* 2001; 14: 35-43.
84. Gaytan F, Morales C, Barreiro ML, Jeffery P, Chopin LK, Herington AC, et al. Expression of growth hormone secretagogue receptor type 1a, the functional ghrelin receptor, in human ovarian surface epithelium, mullerian duct derivatives, and ovarian tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 1798-1804.
85. Panidis D, Goulis DG, Katsikis I, Koliakos G, Georgopoulos NA, Diamanti-Kandarakis E. Serum and seminal plasma ghrelin levels in men with normospermia and dyspermia. *Gynecol Endocrinol* 2008; 24: 320-325.
86. Miller DW, Harrison JL, Brown YA, Doyle U, Lindsay A, Adam CL, Lea RG. Immunohistochemical evidence for an endocrine/paracrine role for ghrelin in the reproductive tissues of sheep. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 60.

87. Fang F, Wang L, Zhang Y, Li Y, Su S, Zhang X. Role of Ghrelin on Estrogen and Progesterone Secretion in the Adult Rat Ovary During Estrous Cycle. *Syst Biol Reprod Med* 2012; 58: 116-119.
88. Zhang W, Lei Z, Su J, Chen S. Expression of ghrelin in the porcine hypothalamo-pituitary-ovary axis during the estrous cycle. *Anim Reprod Sci* 2008; 109: 356-367.
89. Tena-Sempere M. Ghrelin and reproduction: ghrelin as novel regulator of the gonadotropic axis. *Vitam Horm* 2008; 77: 285-300.
90. Caminos JE, Tena-Sempere M, Gaytán F, Sanchez-Criado JE, Barreiro ML, Nogueiras R, Casanueva FF, Aguilar E, Diéguez C. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology* 2003; 144: 1594-1602.
91. Repaci A, Gambineri A, Pagotto U, Pasquali R. Ghrelin and reproductive disorders. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 340: 70-79.
92. Unniappan S. Ghrelin: an emerging player in the regulation of reproduction in non-mammalian vertebrates. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 167: 340-343.
93. Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, Hsueh AJ. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 2005; 310: 996-999.
94. Gualillo O, Lago F, Casanueva FF, Dieguez C. One ancestor, several peptides post-translational modifications of preproghrelin generate several peptides with antithetical effects. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 256: 1-8.
95. Nogueiras R, Pfluger P, Tovar S, Arnold M, Mitchell S, Morris A, et al. Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology* 2007; 148: 21-26.
96. Sibilía V, Bresciani E, Lattuada N, Rapetti D, Locatelli V, De Luca V, et al. Intracerebroventricular acute and chronic administration of obestatin minimally affect food intake but not weight gain in the rat. *J Endocrinol Invest* 2006; 29: 31-34.
97. Lacquaniti A, Donato V, Chirico V, Buemi A, Buemi M. Obestatin: an interesting but controversial gut hormone. *Ann Nutr Metab* 2011; 59: 193-199.

98. Holst B, Egerod KL, Schild E, Vickers SP, Cheetham S, Gerlach LO, et al. GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. *Endocrinology* 2007; 148: 13-20.
99. Unniappan S, Speck M, Kieffer TJ. Metabolic effects of chronic obestatin infusion in rats. *Peptides* 2008; 29: 1354-1361.
100. Shrestha YB, Wickwire K, Giraud SQ. Direct effects of nutrients, acetylcholine, CCK, and insulin on ghrelin release from the isolated stomachs of rats. *Peptides* 2009; 30:1187-1191.
101. Qader SS, Håkanson R, Rehfeld JF, Lundquist I, Salehi A. Proghrelin-derived peptides influence the secretion of insulin, glucagon, pancreatic polypeptide and somatostatin: a study on isolated islets from mouse and rat pancreas. *Regul Pept* 2008; 146: 230-237.
102. Hashimoto H, Fujihara H, Kawasaki M, Saito T, Shibata M, Otsubo H, et al. Centrally and peripherally administered ghrelin potently inhibits water intake in rats. *Endocrinology* 2007; 148: 1638-1647.
103. Szentirmai E, Krueger JM. Obestatin alters sleep in rats. *Neurosci Lett* 2006; 404: 222-226.
104. Li JB, Asakawa A, Cheng K, Li Y, Chaolu H, Tsai M, Inui A. Biological effects of obestatin. *Endocrine* 2011; 39: 205-211.
105. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 2006; 443: 709-712.
106. Stengel A, Taché Y. Minireview: nesfatin-1--an emerging new player in the brain-gut, endocrine, and metabolic axis. *Endocrinology* 2011; 152: 4033-4038.
107. Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, et al. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology* 2009; 150: 662-671.
108. Gonzalez R, Mohan H, Unniappan S. Nucleobindins: Bioactive precursor proteins encoding putative endocrine factors? *Gen Comp Endocrinol* 2012; 176: 341-346.

109. Shimizu H, Oh-I S, Okada S, Mori M. Nesfatin-1: an overview and future clinical application. *Endocr J* 2009; 56: 537-543.
110. García-Galiano D, Navarro VM, Gaytan F, Tena-Sempere M. Expanding roles of NUCB2/nesfatin-1 in neuroendocrine regulation. *J Mol Endocrinol* 2010; 45: 281-290.
111. Stengel A, Taché Y. Interaction between gastric and upper small intestinal hormones in the regulation of hunger and satiety: ghrelin and cholecystokinin take the central stage. *Curr Protein Pept Sci* 2011; 12: 293-304.
112. Stengel A, Goebel M, Taché Y. Nesfatin-1: a novel inhibitory regulator of food intake and body weight. *Obes Rev* 2011; 12: 261-271.
113. Stengel A, Goebel M, Wang L, Taché Y. Ghrelin, des-acyl ghrelin and nesfatin-1 in gastric X/A-like cells: role as regulators of food intake and body weight. *Peptides* 2010; 31: 357-369.
114. Iwasaki Y, Nakabayashi H, Kakei M, Shimizu H, Mori M, Yada T. Nesfatin-1 evokes Ca<sup>2+</sup> signaling in isolated vagal afferent neurons via Ca<sup>2+</sup> influx through N-type channels. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390: 958-962.
115. Li QC, Wang HY, Chen X, Guan HZ, Jiang ZY. Fasting plasma levels of nesfatin-1 in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and the nutrient-related fluctuation of nesfatin-1 level in normal humans. *Regul Pept* 2010; 159: 72-7.
116. Gonzalez R, Tiwari A, Unniappan S. Pancreatic beta cells colocalize insulin and nesfatin immunoreactivity in rodents. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 381: 643-648.
117. Su Y, Zhang J, Tang Y, Bi F, Liu JN. The novel function of nesfatin-1: anti-hyperglycemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 1039-1042.
118. Könczöl K, Pintér O, Ferenczi S, Varga J, Kovács K, Palkovits M, et al. Nesfatin-1 exerts long-term effect on food intake and body temperature. *Int J Obes (Lond)* 2012 (Baskıda).
119. Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S, Kohno D, Onaka T, Takano E, et al. Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway. *Cell Metab* 2009; 10: 355-365.

120. Palasz A, Krzystanek M, Worthington J, Czajkowska B, Kostro K, Wiaderkiewicz R, Bajor G. Nesfatin-1, a unique regulatory neuropeptide of the brain. *Neuropeptides* 2012 (Baskıda).
121. Mendoza-Rodríguez CA, Merchant-Larios H, Segura-Valdez ML, Moreno-Mendoza N, Cruz ME, Arteaga-López P, et al. c-fos and estrogen receptor gene expression pattern in the rat uterine epithelium during the estrous cycle. *Mol Reprod Dev* 2003; 64: 379-388.
122. Sahin I, Aydin S, Ozkan Y, Dagli AF, Akin KO, Guzel SP, et al. Diet-induced obesity suppresses ghrelin in rat gastrointestinal tract and serum. *Mol Cell Biochem* 2011; 355: 299-308.
123. Hosoda H, Doi K, Nagaya N, Okumura H, Nakagawa E, Enomoto M, et al. Optimum collection and storage conditions for ghrelin measurements: octanoyl modification of ghrelin is rapidly hydrolyzed to desacyl ghrelin in blood samples. *Clin Chem* 2004; 50: 1077-1080.
124. Aydin S. Is it appropriate to study blood ghrelin and obestatin in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) without using protease inhibitors? *Ann Hepatol* 2012; 50: 1077-1080.
125. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
126. Şahin İ. Diyetle indüklenmiş, obez sıçanlarda ghrelininin organ dağılım haritalarıyla birlikte serum ghrelin, paraoksanaz ve arilesteraz düzeylerinin araştırılması. Doktora tezi, Elazığ, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 2009.
127. Aydin S. A comparison of ghrelin, glucose, alpha-amylase and protein levels in saliva from diabetics. *J Biochem Mol Biol* 2007; 40: 29-35.
128. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin–biotinperoxidasecomplex (ABC) in immunoperoxidase technique. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577–580.
129. Chughtai B, Lee RK, Te AE, Kaplan SA. Metabolic syndrome and sexual dysfunction. *Curr Opin Urol* 2011; 21: 514-518.

130. Boguszewski CL, Paz-Filho G, Velloso LA. Neuroendocrine body weight regulation: integration between fat tissue, gastrointestinal tract, and the brain. *Endokrynol Pol* 2010; 61: 194-206.
131. Maury E, Ramsey KM, Bass J. Circadian rhythms and metabolic syndrome: from experimental genetics to human disease. *Circ Res* 2010; 106: 447-462.
132. Halmos T, Suba I. Role of the brain in the regulation of metabolism and energy expenditure: the central role of insulin, and insulin resistance of the brain. *Orv Hetil* 2011; 152: 83-91.
133. Fan X, Ding Y, Brown S, Zhou L, Shaw M, Vella MC, et al. Hypothalamic AMP-activated protein kinase activation with AICAR amplifies counterregulatory responses to hypoglycemia in a rodent model of type 1 diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 296: 1702-1708.
134. Thakker JK, DiMarchi R, MacDonald K, Caro JF. Effect of insulin and insulin-like growth factors I and II on phosphatidylinositol and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate breakdown in liver from humans with and without type II diabetes. *J Biol Chem* 1989; 264: 7169-7175.
135. Zhang Y, Lu X, Hong J, Chao M, Gu W, Wang W, Ning G. Positive correlations of liver enzymes with metabolic syndrome including insulin resistance in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Endocrine* 2010; 38: 181-187.
136. Hsieh MH, Ho CK, Hou NJ, Hsieh MY, Lin WY, Yang JF, et al. Abnormal liver function test results are related to metabolic syndrome and BMI in Taiwanese adults without chronic hepatitis B or C. *Int J Obes (Lond)* 2009; 33: 1309-1317.
137. Jeong SK, Nam HS, Rhee JA, Shin JH, Kim JM, Cho KH. Metabolic syndrome and ALT: a community study in adult Koreans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28: 1033-1038.
138. Marques-Vidal P, Pécoud A, Hayoz D, Paccaud F, Mooser V, Waeber G, Vollenweider P. Normal weight obesity: relationship with lipids, glycaemic status, liver enzymes and inflammation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010; 20: 669-675.
139. Zhou J, Cerny V, Lehmann C. Fructose--the sweet poison. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2011; 35: 158-159.

140. Mattioli LF, Thomas JH, Holloway NB, Schropp KP, Wood JG. Effects of intragastric fructose and dextrose on mesenteric microvascular inflammation and postprandial hyperemia in the rat. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2011; 35: 223-228.
141. Roncal-Jimenez CA, Lanasa MA, Rivard CJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Jalal D, et al. Sucrose induces fatty liver and pancreatic inflammation in male breeder rats independent of excess energy intake. *Metabolism* 2011; 60: 1259-1270.
142. Hafkenschied JC, Kohler BE. Effects of temperature on measurement of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in commercial control sera. *Clin Chem* 1986; 32: 184-185.
143. Modi HR, Patil N, Katyare SS. Effect of treatment with cadmium on kinetic properties of Na(+), K(+)-ATPase and glucose-6-phosphatase activity in rat liver microsomes a correlative study on influence of lipid/phospholipid make-up. *Toxicology* 2008; 254: 29-41.
144. Kumru S, Aydin S, Gursu MF, Ozcan Z. Changes of serum paraoxonase (an HDL-cholesterol-associated lipophilic antioxidant) and arylesterase activities in severe preeclamptic women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 114: 177-181.
145. Beaumont NJ, Skinner VO, Tan TM, Ramesh BS, Byrne DJ, MacColl GS, et al. Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. *J Biol Chem* 2003; 278: 8877-8880.
146. El Eter E, Al Tuwaijiri A, Hagar H, Arafa M. In vivo and in vitro antioxidant activity of ghrelin: Attenuation of gastric ischemic injury in the rat. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1791-1799.
147. Nillawar AN, Bardapurkar JS, Bardapurkar SJ. High sensitive C-reactive protein as a systemic inflammatory marker and LDH-3 isoenzyme in chronic obstructive pulmonary disease. *Lung India* 2012; 29: 24-29.
148. Liao CH, Li HY, Yu HJ, Chiang HS, Lin MS, Hua CH, Ma WY. Low serum sex hormone-binding globulin: Marker of inflammation? *Clin Chim Acta* 2012; 413: 803-807.
149. Chen CY, Asakawa A, Fujimiya M, Lee SD, Inui A. Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility. *Pharmacol Rev* 2009; 61: 430-481.

150. Erşahin M, Toklu HZ, Erzik C, Cetinel S, Akakin D, Velioğlu-Oğünç A, et al. The anti-inflammatory and neuroprotective effects of ghrelin in subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage in rats. *J Neurotrauma* 2010; 27: 1143-1155.
151. Aydın S, Sahin I, Ozkan Y, Dag E, Gunay A, Guzel SP, et al. Examination of the tissue ghrelin expression of rats with diet-induced obesity using radioimmunoassay and immunohistochemical methods. *Mol Cell Biochem* 2012; 365: 165-173.
152. Cesur G, Ozguner F, Yilmaz N, Dundar B. The relationship between ghrelin and adiponectin levels in breast milk and infant serum and growth of infants during early postnatal life. *J Physiol Sci* 2012; 62: 185-190.
153. Bellone S, Prodam F, Savastio S, De Rienzo F, Demarchi I, Trovato L, et al. Acylated and unacylated ghrelin levels in normal weight and obese children: influence of puberty and relationship with insulin, leptin and adiponectin levels. *J Endocrinol Invest* 2012; 35: 191-197.
154. Li BB, Chen ZB, Li BC, Lin Q, Li XX, Li SL, et al. Expression of ghrelin in human salivary glands and its levels in saliva and serum in Chinese obese children and adolescents. *Arch Oral Biol* 2011; 56: 389-394.
155. Mafra D, Farage NE, Lobo JC, Stockler-Pinto MB, Leal VO, Carvalho DP, Leite M Jr. Relationship between total ghrelin and inflammation in hemodialysis patients. *Peptides* 2011; 32: 358-361.
156. Deniz R, Gurates B, Aydın S, Celik H, Sahin I, Baykus Y, et al. Nesfatin-1 and other hormone alterations in polycystic ovary syndrome. *Endocrine* 2012 (Baskıda).
157. Zhang Z, Li L, Yang M, Liu H, Boden G, Yang G. Increased plasma levels of nesfatin-1 in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2012; 120: 91-95.
158. Chock B, Lin TC, Li CS, Swislocki A. Plasma testosterone is associated with Framingham risk score. *Aging Male* 2012 (Baskıda).
159. Kim YS, Ko H, Yoon C, Lee DH, Sung J. Social determinants of smoking behavior: the healthy twin study, Korea. *J Prev Med Public Health* 2012; 45: 29-36.

160. Egwurugwu JN, Nwafor A, Chike CP, Ufearo CS, Uchefuna RC, Iwuji SC, et al. The relationship between body mass index, semen and sex hormones in adult male. *Niger J Physiol Sci* 2011; 26: 29-34.
161. Villegas R, Xiang YB, Elasy T, Cai Q, Xu W, Li H, et al. Liver enzymes, type 2 diabetes, and metabolic syndrome in middle-aged, urban Chinese men. *Metab Syndr Relat Disord* 2011; 9: 305-11.

## 6. ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Çermik'te (Diyarbakır) doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Çermik'te tamamladım. 2001 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yüksek öğrenimime başladım ve 2007 yılında bu fakülteden mezun oldum. Aynı yıl Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım. Halen aynı Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım. Evliyim. İki çocuğum var.