

Yoğun olarak tüketilen bitkilerde obestatin-benzeri immünoreaktif maddelerin belirlenmesi

Determination of obestatin-like immunoreactive substances in some commonly consumed plants

* Mustafa Calapoğlu,
* Şeyma Kocaman,
* Kamil Budak,
* Defne Cebeci,
** Nilüfer Şahin Calapoğlu

* Süleyman Demirel Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya
Bölümü, Isparta.

** Süleyman Demirel Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve
Genetik AD, Isparta

Öz

Amaç: Bu çalışmada, iştah üzerine etkili olduğu düşünülen ve yoğun olarak tüketilen *Opuntia ficus-indica*, *Asparagus officinalis*, *Anethum graveolens*, *Brassica oleracea capitata*, *Camellia sinensis*, *Zeo mays*, *Brassica oleracea acephala*, *Morus spp*, *Vitis vinifera*, *Lepidium sativum L*, *Crataegus sp.* ve *Allium cepa* bitkilerinde obestatin-benzeri immünoreaktif maddeler belirlenmesi amaçlanmıştır. **Materyal ve Metod:** Bitkilerden TCA/aseton presipitasyonunu ile fenol ekstraksiyonun kombine edildiği yöntemle total protein izolasyonu yapıldı. Bitki ekstraktlarında obestatin-benzeri immünoreaktif maddeler sandwich ELISA yöntemi ile tarandı. **Bulgular:** Çalışılan tüm bitkilerde değişen miktarlarda obestatin immünoreaktivitesi belirlendi ($0,77\pm0,5 - 3,78\pm0,6$ ng/mg protein). Çalışılan bitkiler içerisinde *Brassica oleracea acephala*'da obestatin immünoreaktivitesi ($3,78\pm0,6$ ng/mg protein) en yüksek seviyede bulundu. **Sonuç:** Çalışmamızda obestatin-benzeri maddelerin hayvanlar aleminin yanı sıra bitkilerde de bulunması obestatin hormonu evrensel bir hormon olabileceğini güçlendirmektedir. Farklı seviyelerde obestatin-benzeri maddeler ihtiva eden bitkilerin insanlarda ve hayvanlarda kilo denetimi üzerine etkileri olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Obestatin, Enzim bağlı immünosorbent testi, Obestatin-benzeri maddeler, Bitki, İştah

Abstract

Aim: In this study, the aim is to determine obestatin-like immunoreactive substances in the plants *Opuntia ficus-indica*, *Asparagus officinalis*, *Anethum graveolens*, *Brassica oleracea capitata*, *Camellia sinensis*, *Zeo mays*, *Brassica oleracea acephala*, *Morus spp*, *Vitis vinifera*, *Lepidium sativum L*, *Crataegus sp.* and *Allium cepa* which are effective on appetite and are consumed intensely. **Material and Methods:** In this study, protein isolation was performed from the plants according to TCA/acetone and phenol extraction protocol. Obestatin-like immunoreactive substances were determined with sandwich ELISA. **Results:** In all studied plants exhibited obestatin immunoreactivity but varying levels of obestatin-like substances ($0,77\pm0,5 - 3,78\pm0,6$ ng/mg protein). The obtained results demonstrated that protein extract of leaves of *Brassica oleracea acephala* showed higher obestatin immunoreactivity ($3,78\pm0,6$ ng/mg protein) than found in the other studied plants. **Conclusion:** The existence of obestatin and obestatin-like substances in both animal world and also plant world gives the idea that this greline hormone is universal. Plants contained different levels obestatin-like substances suggest that may will expression on weight control in animal and human.

Keywords: Obestatin, Enzyme-linked immunosorbent assay, Obestatin-like substances, Plant, Appetite

Yazışma Adresi:
Doç. Dr. Mustafa Calapoğlu
Süleyman Demirel Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi,
Kimya Bölümü, Isparta.
e-mail: mustafacalapoglu@sdu.
edu.tr

Giriş

Zhang ve arkadaşları, insan grelin geninin 11 memeli türünde preprogrelin dizilerini karşılaştırırken grelinle ilişkili olarak obestatin ismini verdikleri yeni bir peptid keşfetmişlerdir (1). Anoreksi oluşturan etkilerinden dolayı bu peptide Latince 'obedere' yemeği bir çırpıda silip süpürmek ve 'statin' baskılamak kelimelerinin birleşiminden oluşturulmuş obestatin ismi verilmiştir (1, 2). Obestatin grelin geni tarafından kodlanan, preprogrelinin konvertaz enzimi ile kesilerek sentezlenen ve sıçan mide mukozasından izole edilen 23 aminoasitlik yeni bir hormondur (1, 3-5).

Grelın hormonu posttranslasyonel parçalanma ile 117-rezidü içeren prepro-peptidinin 24-51. rezidülerinin oluşturduğu progrelin segmentinden oluşmaktadır (6). Bilinen olgun grelin peptidine ilaveten, Zhang ve arkadaşları progrelin sinyal peptidine müteakip, C terminaline hemen bitişik korunmuş glisin rezidülü ve aynı zamanda 11 canlı türünde de yüksek düzeyde korunmuş 23 amino asitten oluşan diğer bir peptidi tanımlamışlardır ve bu progrelinin 76-98. rezidülerinden oluşan kısmına obestatin adını vermişlerdir (1).

Grelın aksine obestatin besin alınımını ve aynı zamanda gastrik boşalmayı ve jejunal motiliteyi de azaltan ayrıca kemirgenlerde vücut kilo alınımını da azaltmasından dolayı anorektik hormon olarak görev yapmaktadır (7). Yapılan çalışmalarda obestatinin hafızayı güçlendirdiği (8), uykuyu düzenlediği (9), hücre çoğalmasını etkilediği (10-12), pankreatik enzim sıvısının salgılanmasını artırdığı (5), pankreatik β -hücrelerinin sağkalımını güçlendirdiği (13), glukoz-indüksiyonlu insülin salınımını inhibe ettiği (14) ortaya koyulmuştur. Dolaşımdaki obestatin, kan beyin bariyeri endotel hücreleri tarafından spesifik alınımı olmamasına rağmen, kan-beyin bariyerini geçerek merkezi sinir sistemine ulaşabilmekte ve bu yolla merkezi sinir sistemini etkileyebilmektedir (15).

Son yıllarda yapılan birkaç çalışmada, grelin-immünoaktif homologlarının bitkilerde de olduğu ispatlanmıştır (16-18). Grelınin hem gen ve hem de protein yapısı ile ilgili çalışmalar bu hormonun evrimsel süreçte iyi korunduğunu ve omurgalı türler arasında yüksek homoloji göstermeleri bu hormonun evrensel bir hormon olabileceği yönündeki hipotezi

güçlendirmektedir. Obestatin ve grelin hormonları aynı gen tarafından kodlanmalarına rağmen grelinin aksine obestatin hormonunun bitkilerdeki immunoreaktif homologların olup olmadığı ile ilgili olarak yapılan literatür taramasında herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmanın anahtar hipotezi, obestatin veya obestatin-benzeri maddelerin bütün canlı organizmalarda evrensel olarak bulunabileceğidir. Dolayısıyla obestatin hormonu, grelinin hormonuna benzer şekilde evrensel bir polipeptid olması canlıların bio-regülasyonunda ciddi bir rol oynayabileceği hipotezine dayanarak iştah üzerine etkili olduğu düşünülen ve yoğun olarak tüketilen *Opuntia ficus-indica*, *Asparagus officinalis*, *Anethum graveolens*, *Brassica oleracea capitata*, *Camellia sinensis*, *Zea mays*, *Brassica oleracea acephala*, *Morus spp*, *Vitis vinifera*, *Lepidium sativum L*, *Crataegus sp.* ve *Allium cepa* bitkilerinde obestatin-benzeri immünoaktif maddelerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bitkilerde obestatin homologlarının belirlenmesi, canlılardaki fonksiyonu ve evölüsyonu ile ilgili bilimsel anlayışta değişiklikler ortaya koyabileceği düşüncesiyle, bu çalışma bir "ön çalışma" olarak planlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bitki Materyalleri

Bitki materyalleri Türkiye florasında doğal olarak yetişen ve geleneksel olarak iştah ile ilgili kullanım alanına sahip olan Tablo 1'de belirtilen 11 adet bitki, 2011 yılı Mayıs ortasından başlayarak aktif vejetasyon periyodu sonuna kadar doğal alanlarından toplandı. Toplanan bitkilerin sistematigi yapılarak analizi yapılacak bitki kısımları (yaprak, çiçek, meyve vb.) analiz zamanına kadar yaş olarak -20 °C'de muhafaza edildi. Çalışmada başta Isparta ili olmak üzere Türkiyenin farklı bölgelerinden toplanan bitkilerin kullanım kısımları ve yetiştiği bölgeler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan bitkilerin çalışılan bitki kısımları ve yetiştirme alanları.

| Bitki Örneği | Bitki kısımları | Temin edildiği il |
|--|-----------------|-------------------|
| <i>Opuntia ficus-indica</i> (dikenli incir) | Meyve | Antalya |
| <i>Anethum graveolens</i> (dere otu) | Yaprak | Isparta |
| <i>Brassica oleracea capitata</i> (beyaz lahana) | Yaprak | Isparta |
| <i>Camellia sinensis</i> (çay) | Yaprak | Rize |
| <i>Vitis vinifera</i> (üzüm) | Meyve | Isparta |
| <i>Morus spp.</i> (dut) | Meyve | Isparta |
| <i>Asparagus officinalis</i> (kuskonmaz) | Yaprak | Isparta |
| <i>Allium cepa</i> (soğan) | Gövde | Isparta |
| <i>Zea mays</i> (mısır) | Tohum | Isparta |
| <i>Lepidium sativum</i> L (tere otu) | Yaprak | Isparta |
| <i>Brassica oleracea acephala</i> (kara lahana) | Yaprak | Trabzon |
| <i>Crataegus sp.</i> (alıç) | Meyve | Isparta |
| <i>Allium cepa</i> (soğan) | Gövde | Isparta |

Total Protein İzolasyonu

Bitki materyalden total protein izolasyonu, Wang ve arkadaşlarının geliştirdiği TCA/aseton presipitasyonunu ile fenol ekstraksiyonun kombine edildiği yöntem kullanıldı (19). Derin dondurucudan çıkartılan bitki örneklerinden 20 g tartıldı. Buz içerisinde bulunan havana alındı. Sıvı azot altında havan içerisinde 50 µL proteaz inhibitörü (P9599, Sigma, St. Louis) ilave edildi ve pudra halini alıncaya kadar ezildi. 0,15 g yaş doku tartılarak 2 mL'lik ependorf içerisine alındı ve ependorf dolana kadar % 10'luk TCA/Aseton çözeltisi ilave edildi. Vortekslenip +4 °C'de 6000 x g'de 3 dak. sanrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Ependorf dolana kadar 0,1 M amonyum asetat içeren % 80'lik metanol çözeltisi ilave edildi. Vortekslenip +4 °C'de 6000 x g'de 3 dak. sanrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Ependorflar dolana kadar % 80'lik aseton çözeltisi ilave edildi. Pellet dağılına kadar vortekslenip +4 °C'de 6000 x g'de 3 dak. sanrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Oda sıcaklığında aseton kısmı uçana kadar inkübasyon yapıldı. 0,15 g yaş doku için 0,6 mL 1:1 oranında fenol (pH=8.0 Sigma) / SDS Tamponu (%30

sucrose, %2 SDS, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, %5 2-mercaptoethanol) eklendi ve 5 dakika karıştırıldı. Vortekslenip +4 °C'de 6000 x g'de 3 dak. sanrifüj edildi. Yeni ependorf tüpüne 0,3 mL üst kısım alındı ve ependorf dolana kadar 0,1 M amonyum asetat içeren metanol ilave edildi. 1 gece -20°C'de beklemeye bırakıldı. Vortekslenip +4 °C'de 6000 x g'de 15 dak. sanrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Pellet kısmı bir kez %100 metanol ve bir kez de % 80 aseton ile yıkandı. Her bir adımda sanrifüjleme ve vorteksleme yapıldı. Oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Oda sıcaklığında bekletilerek sıvı kısmı ayrılan pellete 1 mL PPS (10 mM PBS, pH=7,4) tamponuna ilave edilerek analiz zamanına kadar -20 °C'de bekletildi. Ekstraksiyon sonrası total protein ekstraktlarında protein konsantrasyonları sıgır albümini standart olarak kullanılarak Lowry ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (20).

Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi (ELISA)

-20°C'de saklanan bitki protein ekstraktları analiz öncesi oda sıcaklığına getirilerek vortekslenip ve oda sıcaklığında 30 s aralıklarla 10 kez sonikasyona tabi tutuldu. Sonikasyonun ardından örnekler oda sıcaklığında 3000 rpm'de 10 dak. sanrifüjlenerek çözünmemiş partiküllerin dibe çökmesi sağlandı. Süpernatant kısmı ELISA'da kullanıldı. Pozitif kontrol olarak insan serumu örnekleri kullanıldı. Serum havuzu, sabah aç karnına sağlıklı bireylerden antikoagülan içermeyen tüplere alınan kan örnekleri (n=10) doğal pıhtılaşmaya müteakip 3000 rpm'de sanrifüjlendi. Sanrifüj sonrası süpernatant kısımdan elde edilen kan serumları tek bir tüpte toplanarak serum havuzu oluşturuldu. Serum havuzu günlük olarak hazırlandı. Serum havuzundaki obestatin konsantrasyonunun ELISA ile belirlenmesinde serumlar 1/2 oranında PPS (10 mM, pH=7,4) ile seyreltilerek uygulandı.

Bitki ve insan serum havuzu örneklerinde obestatin immünoreaktivitesi tamamen insan obestatine spesifik antikor ve biotin-avidin affinite sisteminin kombinasyonunu kullanan yarışmalı enzim immünotayini kiti (ALPCO Diagnostics, Salem, NH, USA) ile ölçüldü. 96-kuyucuklu pleyt keçi antirabbit

immüoglobülin G ile kaplandı. Biotinlenmiş insan obestatin, insan obestatin standartları, örnekler ve rabbit antihuman obestatin antikoları yarışmalı immünoreksiyon oluşturmak üzere kuyucuklara ilave edildi. PBS negatif, insan serum havuzu örnekleri ise pozitif kontrol olarak kullanıldı. İnkübasyon ve yıkamanın ardından HRP etiketli streptavidin ilave edilerek HRP etiketli, Streptavidin-biotinlenmiş insan obestatin-antikor kompleksleri oluşumu sağlandı. Son olarak HRP enzim aktivitesi substrat olarak 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin kullanılarak ölçüldü. Örneklerdeki obestatin konsantrasyonları, obestatin standartına göre belirlendi. Üretici firmaya göre tayinin hassasiyeti 0,412 -100 pg/mL, intraassay ve interassay CV değerleri sırasıyla %3,5 - %9,9; %5,6 - %9,0 arasındadır.

Bulgular

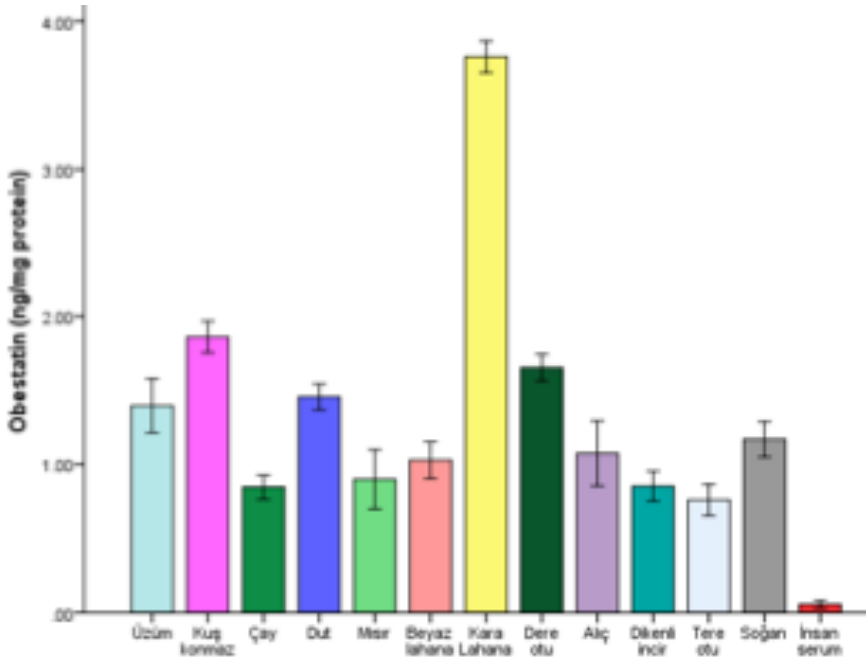
Çalışmaya dahil ettiğimiz farklı bitki örneklerinin farklı doku tiplerinde hem standardizasyonu ve hem de bir sonraki aşamalarda uygulanan ELISA yöntemi için yüksek kalitede protein kullanabilmek için TCA/aseton fenol ekstraksiyonu protokolü tercih edildi. TCA/aseton fenol ekstraksiyonu protokolüne göre yapılan total protein ekstraksiyonunda, çalışılan bitki örneklerinde değişen miktarlarda (0,76±0,15 - 4.25±0,25 mg/mL) protein izolasyonu gerçekleştiği gözlemlendi. Farklı bitkilerde farklı oranda protein ihtiva etmeleri, doğal olarak aynı protokol uygulanması durumunda dahi aynı miktarda protein izole edilememesine açıklık getirmektedir. Diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre daha düşük protein eldesi, kullanılan yöntemin fazla sayıda basamak içermesinden kaynaklanabilmektedir. Bitki örneklerinin TCA/aseton presipitasyonu/fenol ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktların protein miktarları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. TCA/aseton presipitasyonu/fenol ekstraksiyonu yöntemi ile protein izolasyonu ile elde edilen bitkisel ekstraktların total protein miktarları.

| Bitki Örneği | Protein (mg/mL)* |
|--|------------------|
| <i>Vitis vinifera</i> (üzüm) | 2,12±0,03 |
| <i>Asparagus officinalis</i> (kuskonmaz) | 1,87±0,06 |
| <i>Camellia sinensis</i> (çay) | 3,66±0,05 |
| <i>Morus</i> spp. (dut) | 2,72±0,06 |
| <i>Zea mays</i> (mısır) | 2,80±0,10 |
| <i>Brassica oleracea capitata</i> (beyaz lahana) | 3,60±0,20 |
| <i>Brassica oleracea acephala</i> (kara lahana) | 0,76±0,15 |
| <i>Anethum graveolens</i> (dereotu) | 1,92±0,14 |
| <i>Crataegus</i> sp. (alıç) | 1,39±0,17 |
| <i>Opuntia ficus-indica</i> (dikenli incir) | 4,25±0,25 |
| <i>Lepidium sativum</i> L (tere otu) | 2,83±0,18 |
| <i>Allium cepa</i> (soğan) | 1,77±0,19 |

*Bitki örneklerinde protein ölçümleri her bir üç ölçümün ortalama değerleri ve standart sapmaları (X±SD) şeklinde ifade edilmiştir.

Bu araştırmada, yarışmalı enzim immüntayin yöntemi ile Tablo 1'de sunulan bitkilerinin dokularında TCA/aseton fenol ekstraksiyonu protokolüne göre elde edilen total protein ekstraktlarında obestatin immünoreaktivitesi ölçümü yapılmıştır. Çalışılan tüm bitki örneklerinde değişen miktarlarda obestatin immünoreaktivitesi (0,77±0,5 - 3,78±0,6 ng/mg protein) bulundu. Aynı yöntem ile çalışılan insan plazma havuzu örneğinde ise obestatin seviyesi 0,06±0,01 ng/mg protein olarak ölçüldü. Çalışılan bitkilerin total protein ekstraktlarındaki obestatin immünoreaktivitesi seviyeleri, insan obestatin seviyesine göre oldukça yüksek bulundu. Bitki örneklerinde en yüksek obestatin immünoreaktivitesi *Brassica oleracea* var. *Acephala* DC. (karalahana)'da (3,78±0,6 ng/mg protein) en düşük obestatin immünoreaktivitesi ise *Lepidium sativum* L (tere otu)'de 0,76±0,5 ng/mg protein) gözlemlendi. TCA/aseton presipitasyonu/fenol ekstraksiyonu yöntemi ile elde edilen bitki ekstraktlarında ve insan serum örneğinde ELISA tekniği ile obestatin immünoreaktivitesi ölçüm sonuçları Şekil 1'de sunulmuştur.



Şekil 1. Bitki ekstraktları ve insan serum örneklerinin obestatin konsantrasyonları. Obestatin konsantrasyonları her bir üç ölçümün ortalama değerleri olarak verilmiştir (SD değerleri hata çubukları şeklinde ifade edilmiştir).

Tartışma ve Sonuç

2005 yılından günümüze kadar yapılan çalışmalar, obestatin hormonunun omurgalılarda aynı gen tarafından kodlanan ve oroksijenik bir hormon olan grelin hormonunun metabolik ve fizyolojik etkilerine ters etki göstermesinin yanı sıra besin alınımlı ve kullanımı, enerji kullanımı ve iştah üzerinde grelin hormonu ile birlikte düzenleyici etkilere sahip olduğu noktasında önemli bulgular ortaya koymaktadır (1). Obestatin keşfinden itibaren hem fizyolojisi ve hem de hastalıklara olan ilişkisi araştırılmaktadır. Özellikle obezite ile birlikte diyabet, psikolojik yeme bozukluğu ile ilişkisi araştırılan konuların en başında gelmektedir. Bu çalışmada ise obestatin hormonunun grelin hormonu gibi evrensel bir hormon olabileceği düşüncesi ve fizyolojik olarak iştah üzerine düzenleyici etkileri olması dikkate alınarak, yoğun olarak tüketilen ve iştah üzerine etkili olabilecek olan bazı bitkilerde obestatin seviyelerine bakıldı.

Fenol tabanlı ekstraksiyon ile TCA/aseton temizleme basamaklarının birlikte uygulanması

protein ekstraksiyonunda ilk sırada yer almaktadır. TCA/aseton fenol ekstraksiyonu protokolü, hem TCA/aseton presipitasyonunun (fenolik bileşilerin, lipid ve pigmentlerin uzaklaştırılması) ve hem de fenol ekstraksiyonunun (fenolik bileşiklerin, pigmentlerin, polisakkaritlerin, nükleik asitlerin ve tuzların uzaklaştırılması) yararlı katkılarına bir araya getirmektedir. TCA/aseton fenol ekstraksiyonunda toz haline getirilmiş doku, TCA/aseton ile temizlenerek proteinlerin fenol ekstraksiyonu için başlangıç materyali olarak kullanılmaktadır. TCA/aseton fenol ekstraksiyonu protokolüne göre ekstrakte edilen proteinler elektroforetik ve immunolojik metodların yanı sıra proteomiks çalışmaları için de üstün özelliklere sahiptir. Farklı

türdeki bitkilerin dokularının yanı sıra aynı bitkiye ait yaprak, kök, gövde ve çiçek gibi çeşitli bitki dokuları protein ekstraksiyonu bakımından bir takım zorluklar ve farklılıklar gösterebilmektedir. Ortaya çıkan zorluklardan biri bitki dokularının ihtiva ettiği sekonder metabolitlerdeki farklılıklardır. Her bir doku için etkili tek bir ekstraksiyon yönteminin olması düşünülemez. Doku ve protein tipine göre protein ekstraksiyonu metodlarında bazı modifikasyonların yapılması gerekebilir. Bitkisel proteinlerin izolasyonunda tavsiye edilen ilk temel ekstraksiyon yöntemi TCA/aseton presipitasyonu ve fenol ekstraksiyonudur. TCA/aseton fenol ekstraksiyonu protokolü ise yüksek kalitede protein eldesi vermesine rağmen daha sonra uygulanacak yöntem olarak göz önüne alınmaktadır. TCA/aseton fenol ekstraksiyonu protokolü diğer protokollere göre daha fazla zaman alması ve birçok temizleme basamağı içermesinden dolayı protein kaybına yol açması bakımından daha çok sekonder metabolitler yönünden zengin ve sert dokulu bitkiler için kullanılmaktadır.

Saravanan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada fenol

ekstraksiyonunun yüksek interferans maddeler içeren bitki örneklerinde daha elverişli olduğunu rapor etmektedirler (21). Ayrıca Budak ve arkadaşları PBS ve QB homojenatlarında grelin immünoaktivitesini TCA/aseton fenol ekstraksiyonu yöntemine göre daha düşük bulmuşlardır (16). Bu verilere dayanarak bitkilerdeki sekonder metabolitler gibi interferans bileşiklerin tayin sonuçlarını etkileyebileceği sonucuna varılabilir. Dolayısıyla bitkilerin protein ekstraktlarından enzim immün assay yöntemine göre elde edilen obestatin immünoaktivitelerindeki farklılıklar çeşitli interferanslardan, bitkilerin mevsimsel metabolik aktivitelerinden ve obestatin benzeri immünoaktif madde içeriklerindeki farklılıklardan kaynaklanabilmektedir.

Obestatin hormon tayininde ELISA, ve RIA en çok kullanılan yöntemlerdir (22). Serolojik testler içerisinde yer alan ELISA'nın çapraz reaksiyona yol açmaması, bekletilmiş numunelerle çalışılabilmesi, özgüllüğünün ve duyarlılığının çok yüksek olması gibi avantajları nedeniyle diğer serolojik testlere göre tercih edilen bir metottur. Obestatinin biyolojik dokularda çeşitli formlarda bulunabilmesi ayrıca tayini için farklı ölçüm yöntemlerinin kullanılması biyolojik örneklerde obestatin tayini, analitik açıdan güvenilir sonuçların elde edilmesini etkilemektedir. İmmünolojik tayin yöntemleri ile obestatin tayininde çeşitli teknolojik problemlerle ve zorluklarla karşılaşmaktadır. Obestatin tayininde yaşanan zorluklar ve teknolojik problemler güvenilir sonuçların elde edilmesinde göz önüne alınmasını gerektirmektedir. Ticari olarak sunulan kitlerde obestatinine karşı geliştirilen antikolar, peptidin amidlenmiş C-terminal kısmını tanımaktadırlar.

Çalışılan bitkilerde obestatin-benzeri immünoaktif maddelerin varlığının belirlenmesi, insan obestatinine karşı oluşturulan monoklonal antikoların bitki protein ekstraktlarındaki insan obestatinine benzer maddeler ile reaksiyona girdiğini ifade etmektedir. Bitki protein ekstraktları ile insan obestatinine karşı oluşturulan antikoların reaksiyon vermesi, bitkilerde immünoaktif maddelerin insandaki obestatin ile aynı yapıda ve özellikte olduğunu göstermez. Bitkilerde obestatin immünoaktivitesinin görülmesi durumu, bitkilerde insan obestatinine benzer sekansa sahip proteinlerin varlığına işaret etmektedir. Hayvanlar aleminde obestatin peptidi sekansı farklılıklar göstermesine

rağmen korunmuş sekans dizilerine sahiptir. Ayrıca, insan obestatin peptidi grelin peptidi ile aynı gen tarafından kodlanmaktadır ve preprogrelin peptidinin proteolitik parçalanması sonucu ortaya çıkmaktadır. Bitkilerdeki obestatin immünoaktivitesi gösteren peptitler, preprogrelin peptidine benzer sekansa sahip olan peptitler de olabilir. Dolayısıyla insan obestatinine karşı geliştirilen antikolar ile reaksiyona giren bitki proteinlerinin moleküler karakterizasyonu yapılarak moleküler ve fizyolojik özellikleri hakkında yorum yapabileme imkanına ulaşılabilmektedir.

Yemek yememiz, sinir sistemi dışında hormonal olarak da kontrol edilmektedir. Kolesistokinin ve obestatin yeme esnasında salınarak doyum hissi vermektedir. Öğünlerde mide ve diğer dokulardan grelin salınımı arttığından tükürük ve kandaki derişimi %70-80 oranında yükselmektedir (23). Dolayısıyla grelin yemeyi başlatırken obestatin iştahı baskılamakta (24), kolesistokinin ise yemek yemeyi sonlandırmaktadır.

Günümüzde beslenme ve kilo denetimi ile ilgili olarak çeşitli programlar uygulanmaktadır. Fiziksel aktivite yoluyla enerji sarf edilmesi kilo denetiminde en etkin/uygun program olmasına rağmen çok fazla rağbet edilmemektedir. Tıp 2 diyabet gibi rahatsızlıkları olanların zaten hareket zorlukları vardır. Fiziksel aktivite ile zayıflama yerine piyasaya sürülen birçok yenilebilir zayıflama destekleri kilo denetiminde tercih edilmektedir. Yerel toplumlar tarafından kullanılan *Hoodia gordonii*, *Caralluma fimbriata*, *zingiber officinale* ve *Agave tequilana* gibi bitkiler iştah üzerine etkili oldukları son yıllardaki çalışmalarda vurgulanmakta ve kilo denetiminde de uygulanmaktadırlar. Doğal kaynaklardan elde edilen tıbbi bitkilerin kilo denetiminde veya zayıflamada destek amaçlı olarak tercih edilmesi birçok araştırmacının dikkatini çekmesinin yanı sıra ticari olarak da bir pazar oluşturmaktadır (25-28).

Sonuç olarak, yapılan literatür tarama çalışmasında insan, sıçan ve fare gibi omurgalı canlılarda obestatin seviyelerinin ölçümüne dayalı birçok verinin bulunmasına rağmen, bitki dokularında obestatin ölçümü ile ilgili hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. İlk defa bu çalışmada bitkisel dokularda obestatin immünoaktivitesine bakılmıştır. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre memeli türlerinin yanı sıra bitkilerde de obestatin-benzeri immünoaktif

maddeler belirlemiştir. Bu ön çalışmanın verileri iştah üzerine etkili olduğu bilinen bazı bitkilerin ihtiva ettikleri obestatin-benzeri immünoreaktif maddeler yönünden değerlendirilebilmesine imkan sağlamaktadır. Bitkisel obestatin analoglarının beslenme ve kilo denetimindeki rolünün ortaya koyulması dünyadaki başlıca sağlık sorunlarından olan obezitenin tedavisinde yeni bir terapötik yaklaşımın ortaya çıkmasına yol açabilir.

Teşekkür

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 3082-YL-12 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, et al. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 2005;310(5750):996-99.
- Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: Structure and function. *Physiological Reviews* 2005;85(2):495-522.
- Gourcerol G, Tache Y, Obestatin—a ghrelin-associated peptide that does not hold its promise to suppress food intake and motility. *Neurogastroenterology & Motility* 2007;19(3):161-65.
- Grönberg M, Tsolakis AV, Magnusson L, Janson ET, Saras J. Distribution of obestatin and ghrelin in human tissues Immunoreactive cells in the gastrointestinal tract, pancreas, and mammary glands. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2008;56(9):793-801.
- Kapica M, Zabielska M, Puzio I, Jankowska A, Kato I, Kuwahara A, et al. Obestatin stimulates the secretion of pancreatic juice enzymes through a vagal pathway in anaesthetized rats-preliminary results. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2007;58:123.
- 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(6762):656-60
- Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2001;86(10):4753-58.
- Carlini VP, Schiöth HB. Obestatin improves memory performance and causes anxiolytic effects in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007;352(4):907-12.
- Szentirmai E, Krueger JM. Obestatin alters sleep in rats. *Neuroscience Letters* 2006;404(1):222-26.
- Camiña JP, Campos JF, Caminos JE, Dieguez C, Casanueva FF. Obestatin-mediated proliferation of human retinal pigment epithelial cells: regulatory mechanisms. *Journal of Cellular Physiology* 2007;211(1):1-9.
- Mészárosóvá M, Sirotkin AV, Grossmann R, Darlak K, Valenzuela F. The effect of obestatin on porcine ovarian granulosa cells. *Animal Reproduction Science* 2008;108(1):196-207.
- Pazos Y, Alvarez CJ, Camiña JP, Casanueva FF. Stimulation of extracellular signal-regulated kinases and proliferation in the human gastric cancer cells kato-III by obestatin. *Growth Factors* 2007;25(6):373-81.
- Granata R, Settanni F, Gallo D, Trovato L, Biancone L, Cantaluppi V, et al. Obestatin promotes survival of pancreatic B-cells and human islets and induces expression of genes involved in the regulation of B-cell mass and function. *Diabetes* 2008;57(4):967-79.
- Ren AJ, He Q, Shi JS, Guo ZF, Zheng X, Lin L, et al. Association of obestatin with blood pressure in the third trimesters of pregnancy. *Peptides* 2009;30(9):1742-45.
- Pan W, Tu H, Kastin AJ. Differential BBB Interactions of Three ingestive peptides: obestatin, ghrelin, and adiponectin. *Peptides* 2006;27(4):911-16.
- Budak K, Calapoğlu M, Çiçek E, Temizyürek İ. Determination of ghrelin-like immunoreactive substances in some routinely consumed plants affecting appetite. *Cell Membranes and Free Radical Research* 2014; 6:140.
- Aydin S, Geckil H, Zengin F, Ozercan HI, Karatas F, Aydin S, et al. Ghrelin in plants: What is the function of an appetite hormone in plants? *Peptides* 2006;27(7):1597-602.
- Aydin S, Dagli AF, Ozkan Y, Kendir Y, Sahin I, Aksoy A, et al. Immunohistochemical and quantitative analysis of ghrelin in *Syzygium aromaticum*. *Cell Biology International* 2011;35(5):437-41.
- Wang W, Vignani R, Scali M, Cresti MA. Universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*

- 2006;27:2782-86.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
 21. Saravanan R, Jose JKC. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* 2004;4:2522-32.
 22. Hassouna R, Zizzari P, Tolle V. The ghrelin/obestatin balance in the physiological and pathological control of growth hormone secretion, body composition and food intake. *Journal of Neuroendocrinology* 2010;22(7):793-804.
 23. de la Cour CD, Lindström E, Norlén P, Håkanson R. Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells. *Regulatory Peptides* 2004;120(1):23-32.
 24. Cassoni P, Papotti M, Ghe C, Catapano F, Sapino A, Graziani A, et al. Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1738-45.
 25. MacLean DB, Luo LG. Increased ATP content/production in the hypothalamus may be a signal for energy-sensing of satiety: Studies of the anorectic mechanism of a plant steroidal glycoside. *Brain Research* 2004;1020:1-11.
 26. Kuriyan R, Raj T, Srinivas SK, Vaz M, Rajendran R, Kurpad AV. Effect of *Caralluma fimbriata* extract on appetite, food intake and anthropometry in adult Indian men and women. *Appetite* 2007;48:338-44.
 27. Hasani-Ranjbar S, Nayebi N, Larijani B, Abdollahi MA. Systematic review of the efficacy and safety of herbal medicines used in the treatment of obesity. *World Journal of Gastroenterology* 2009;15:3073-85.
 28. Talpur NA, Echard BW, Manohar V, Preuss HG. Influence of a combination of herbs on appetite suppression and weight loss in rats. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2001;3:181-85.