



**GHRELİN HORMONUNUN AÇIL VE DESAÇIL FORMLARININ
RATLARDA KARACİĞER YAĞLANMASI VE BİYOKİMYASAL
BULGULARA ETKİSİ**

Emine ELİBOL

**DOKTORA TEZİ
BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2021

GHRELİN HORMONUNUN AÇIL VE DESAÇIL FORMLARININ RATLARDA KARACİĞER YAĞLANMASI VE BİYOKİMYASAL BULGULARA ETKİSİ

(Doktora Tezi)

Emine ELİBOL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2021

ÖZET

Bu çalışma ghrelin hormonunun açıl ve desaçil formlarının ratlarda karaciğer yağlanması ve biyokimyasal bulgulara etkisini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. Çalışma toplam 36 erkek Wistar rat ile yürütülmüştür. Ratlar kontrol, açıl ghrelin, desaçil ghrelin, açıl/desaçil 3:1, açıl/desaçil 1:1 ve açıl/desaçil 1:3 olmak üzere toplam 6 eşit gruba ayrılmıştır. Ratlara 14 gün boyunca günde 2 defa subkutan plasebo veya 200 ng/kg hormon uygulaması yapılmıştır. Çalışmanın 15. gününde Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT), 16. gününde ise İnsülin Tolerans Testi (İTT) uygulanmış ve 17. günde de sakrifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ratların kanında bazı biyokimyasal veriler ve karaciğerde diaçilgliserol (DAG), glikojen, protein kinaz C ve PPAR- γ düzeyleri saptanmıştır. Ayrıca ratların karaciğer dokusunda histolojik incelemeler de yapılmıştır. Çalışma sonucunda; en yüksek plazma toplam kolesterol ve VLDL-K düzeyi açıl/desaçil 1:3 grubunda gözlemlenmiş, insülin ve HOMA-IR düzeyleri açıl ve desaçil ghrelinin birlikte verildiği gruplarda daha düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Plazma açıl ghrelin ile fruktozamin (mmol/L), değerleri arasında pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmiştir ($p<0.05$). Kontrol grubuna göre açıl ghrelin ve açıl/desaçil 1:3 gruplarında PPAR- γ gen ekspresyon düzeyinin artış gösterdiği saptanmıştır ($p<0.05$). Protein kinaz C geninin ekspresyonu kontrol grubuna göre açıl/desaçil 1:3 grubunda en yüksek düzeyde bulunmuştur ($p<0.05$). Karaciğerde steatoz ile uyumlu en yoğun dejeneratif bulguların açıl ghrelin grubunda olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). Bu çalışmada açıl/desaçil 1:3 grubunun vücutta açıl ghrelin grubuna benzer şekilde, PPAR- γ gen ekspresyonu, serum toplam kolesterol, HDL-K ve VLDL-K düzeylerini artırdığı bulunmuştur. Ayrıca desaçil ghrelinin kan glukoz düzeyini regüle etmede daha etkili olduğu gösterilmiştir.

Bilim Kodu : 1007
Anahtar Kelimeler : Açıl ghrelin, Desaçil ghrelin, Açıl/desaçil düzeyi, Hepatosteatoz
Sayfa Adedi : 92
Danışman : Prof. Dr. Yasemin AKDEVELİOĞLU

EFFECTS OF ACYL AND DESACYL FORM OF GHRELIN HORMONE ON HEPATIC STEATOSIS AND BIOCHEMICAL FINDINGS IN RATS

(Ph. D. Thesis)

Emine ELİBOL

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

January 2021

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate the effect of acyl and desacyl forms of ghrelin hormone on fatty liver and biochemical findings in rats. The study was conducted with 36 male Wistar rats. Rats were divided into 6 equal groups as control, acyl ghrelin, desacyl ghrelin, acyl/desacyl 3:1, acyl/desacyl 1:1 and acyl/desacyl 1:3. The rats were administered subcutaneous placebo or 200 ng/kg hormones twice a day for 14 days. Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) was applied on the 15th day of the study, and the Insulin Tolerance Test (ITT) was applied on the 16th day and sacrifice was performed on the 17th day. Some biochemical data in the blood of rats and diacylglycerol (DAG), glycogen, protein kinase C and PPAR- γ levels in the liver were determined. In addition, histological examinations were made in the liver tissue of rats. In the results of working; The highest plasma total cholesterol and VLDL-C levels were observed in acyl/desacyl 1:3 group, and insulin and HOMA-IR levels were lower in groups given acyl and desacyl ghrelin together ($p<0.05$). It was found that PPAR- γ gene expression levels increased in acyl ghrelin and acyl/desacyl 1:3 groups compared to the control group ($p<0.05$). The expression of the protein kinase C gene was the highest in the acyl/desacyl 1: 3 group compared to the control group ($p<0.05$). It was observed that the most intense degenerative findings compatible with steatosis in the liver were in the acyl ghrelin group ($p<0.05$). In this study, it was found that acyl / desacyl 1: 3 group increased PPAR- γ gene expression, serum total cholesterol, HDL-C and VLDL-C levels in the body, similar to the acyl ghrelin group. It has also been shown that desacyl ghrelin is more effective in regulating blood glucose level.

Science Code : 1007
Key Words : Acyl ghrelin, Desacyl ghrelin, Acyl/desacyl level, Hepatosteatorsis
Page Number : 92
Supervisor : Prof. Dr. Yasemin AKDEVELİOĞLU

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde bana yol gösteren tez danışmanım Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Yasemin AKDEVELİOĞLU'na

Araştırmanın başlangıcından sonuna kadar desteğini esirgemeyen Sayın Prof Dr. Sevil BAŞOĞLU'na, Prof. Dr. Eda KÖKSAL'a

Tezimin planlanması ve uygulaması aşamasında akademik desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Barrios Sabador Vicente'ye, Prof. Dr. Mohammed Dallak'a ve Prof. Dr. Hiroshi Hosoda'ya

Hayvan deneylerini yaptığım Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM)'nde desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve katkı sağlayan Vet. Hek. Dr. Şeyda DİKER ve tüm laboratuvar çalışanlarına,

Tezim süresince bana desteğini ve yardımlarını esirgemeyen Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Yahya ÖZDOĞAN'a, biyokimyasal analizler hususundaki desteği ve tüm yardımları için Doç. Dr. Canan YILMAZ'a, hisolojik analizler için Dr. Arş. Gör. Merve SEĞMEN'e ve gen analizleri için Öğr. Gör. Serkan ŞEN'e

Hayatım boyunca desteğini benden esirgemeyen ve beni hiç yalnız bırakmayan canım annem Hatice ELİBOL'a, babam Mehmet ELİBOL'a ve kız kardeşim Hasibe ELİBOL'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje Kodu: 47/2019-12).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Ghrelin Hormonu	5
2.1.1. Keşfi	5
2.1.2. Yapısı.....	5
2.1.3. Sentezi	6
2.1.4. Vücutta dağılımı ve plazmadaki miktarı	8
2.2. Metabolik Etkileri	9
2.2.1. Büyüme hormonu	11
2.2.2. İnsülin sekresyonu ve glukoz hemoastazı	12
2.2.3. İştah	13
2.2.4. Adipogenez.....	16
2.2.5. Obezite.....	17
2.2.6. Yeme bozukluğu	18
2.2.7. Enerji harcaması	18
2.2.8. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı	19

	Sayfa
2.2.9. Kardiyovasküler hastalıklar.....	19
2.2.10. Üreme sağlığı	20
2.2.11. Kanser.....	21
2.2.12. Diğer hastalıklar	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	23
3.2. Etik Kurul İzni	23
3.3. Araştırma Desteği	23
3.4. Deney Hayvanlarının Seçimi	23
3.5. Araştırmanın genel planı.....	24
3.6. Deney Hayvanlarının Özellikleri ve Barınma Koşulları.....	26
3.7. Yem İçeriği ve Özellikleri.....	26
3.8. Ratların Yem Tüketimleri ile Vücut Ağırlığı Takibi	27
3.9. Açıl ve Desaçıl Hormonların Hazırlanması	28
3.10. Ratların Diseksiyonu ve Kan Örneklerinin Alınması	28
3.11. Doku Örneğinin Alınması.....	28
3.12. Gereçler.....	29
3.12.1. Deneyde kullanılan cihazlar	29
3.12.2. Deney kimyasalları.....	29
3.12.3. Kan biyokimyasalları	29
3.13. Biyokimyasal Analizler	30
3.13.1. Serum parametreleri	30
3.13.2. Karaciğer glikojen içeriğinin analiz edilmesi.....	30
3.13.3. Plazma insülin, glukagon, fruktozamin, hepatik diaçilgliserol, açıl ve desaçıl ghrelın düzeylerinin belirlenmesi	30
3.13.4. Oral glukoz tolerans testi (OGTT)	30

	Sayfa
3.13.5. İnsülin tolerans testi (İTT).....	31
3.14. Karaciğerde Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Analizi.....	31
3.14.1. Işık Mikroskopik ve Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi	31
3.14.2. RNA izolasyonu ve real time QRT-PCR ile mRNA ekspresyon analizleri	32
3.15. İstatistiksel Analizler	33
4. BULGULAR.....	35
4.1. Real Time PCR Çalışması ile mRNA Ekspresyon Düzeylerine Ait Sonuçlar	47
4.2. Agaroze Jel Elektrophorezi Sonuçları	49
4.3. Histolojik Bulgular.....	49
5. TARTIŞMA	57
5.1. Ratların Yem Tüketimleri ile Enerji Alımlarının Değerlendirilmesi.....	57
5.2. Ratların Vücut Ağırlığı ve Vücut Ağırlık Değişimlerinin Değerlendirilmesi ...	58
5.3. Ratların Biyokimyasal Parametrelerinin Değerlendirilmesi	59
5.3.1. Ratların plazma ghrelin değişiminin değerlendirilmesi	59
5.3.2. Ratların serum glukoz ve insülin düzeylerinin değerlendirilmesi.....	59
5.3.3. Ratların lipid metabolizmasının değerlendirilmesi	62
5.4. Ratların Karaciğer Glikojen ve DAG Miktarlarının Değerlendirilmesi	63
5.5. Ratların Karaciğer PPAR- γ ve PKC Gen Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi.....	64
5.6. Ratların Histolojik Olarak Hepatik Steatoz Durumunun Değerlendirilmesi ...	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
KAYNAKLAR	71
EKLER.....	85
EK-1. Etik Kurul Onayı	86
ÖZGEÇMİŞ	89

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Açıl ve desaçıl ghrelinin metabolik etkileri	10
Çizelge 3.1. Ratlara uygulanan hormonlar ve miktarı (ng/kg).....	24
Çizelge 3.2. Rat yeminin enerji ve besin ögeleri içeriği (100 g).....	27
Çizelge 4.1. Ratların gruplara göre günlük tükettikleri ortalama yem (g), enerji (kkal) ve makro besin ögeleri (g) miktarı.....	35
Çizelge 4.2. Gruplara göre ratların vücut ağırlığı değişimi (g)	36
Çizelge 4.3. Gruplara göre ratların karaciğer ağırlıkları (g).....	37
Çizelge 4.4. Plazma açıl ve desaçıl ghrelin düzeyleri ile vücut ağırlığı farkı (g) ve karaciğer ağırlığı (g) arasındaki ilişki*	38
Çizelge 4.5. Gruplara göre ratların açlık biyokimyasal bulgularının ortalama ve standart sapma değerleri.....	40
Çizelge 4.6. Plazma açıl ve desaçıl ghrelin düzeyleri (pg/mL) ile biyokimyasal bulgular arasındaki ilişki (n=36)	44
Çizelge 4.7. Gruplara göre ratların OGTT ve İTT değerlerinin zamana göre ortalama ve standart sapma düzeyleri	46
Çizelge 4.8. Plazma açıl ve desaçıl ghrelin düzeyleri ile OGTT ve İTT arasındaki ilişki (n=36).....	47
Çizelge 4.9. Kontrol grubuna kıyasla uygulama gruplarındaki ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen misli değişiklikler	48
Çizelge 4.10. Karaciğer dokusunda gözlenen dejenerasyon kriterleri	56

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Deney protokolü	25
Şekil 4.1. Ratların gruplara göre vücut ağırlıkları (g)	37
Şekil 4.2. Ratların gruplara göre toplam kolesterol, HDL-K, LDL-K ve VLDL-K değerleri.....	42
Şekil 4.3. Ratların karaciğer PKC ve PPAR- γ mRNA ekspresyon düzeyleri	48

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Ghrelin biyosentezi ve GAOT enzimi ile açillenmesi	7
Resim 2.2. Açıl (a) ve desaçıl (b) ghrelinin kimyasal formülü.....	8
Resim 2.3. Büyüme hormonu serbesleştirici hormon ve ghrelin tarafından büyüme hormonunun salınımının uyarılması	11
Resim 2.4. Pankreas β -hücrelerinde ghrelinin insülin salınımı üzerine olası etkisi	12
Resim 2.5. Ghrelinin iştah üzerine etkileri	15
Resim 2.6. Hipotalamusta açıl ghrelin'in iştah uyarıcı etkisinin hücre içi mekanizmaları.....	16
Resim 3.1. Ratların barınma koşulları	26
Resim 4.1. Agaroz jel elektroforezi sonuçları.....	49
Resim 4.2. Agaroz jel elektroforezi sonuçlar.....	49
Resim 4.3. Kontrol grubuna ait kesitler	50
Resim 4.4. Desaçıl ghrelin grubuna ait kesitler	51
Resim 4.5. Açıl/desaçıl 1:3 grubuna ait kesitler	52
Resim 4.6. Açıl/desaçıl 1:1 grubuna ait kesitler	53
Resim 4.7. Açıl/desaçıl 3:1 grubuna ait kesitler	54
Resim 4.8. Açıl ghrelin grubuna ait kesitler	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler **Açıklamalar**

cm	Santimetre
dL	Desilitre
fmol	Femtomol
g	Gram
IU	Uluslararası Birim
Kg	Kilogram
Kkal	Kilo kalori
m²	Metre kare
mcg	Mikrogram
mEq	Miliequant
mg	Miligram
mm	Milimetre
mL	Mililitre
Mmol	Milimol
ng	Nanogram
pg	Pikogram

Kısaltmalar **Açıklamalar**

ABCA1	ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı A1
ACC	Asetil koenzim A karboksilaz
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
ADP	Adenozin difosfat
AgRP	Agouti ile ilişkili peptit
AMP	Adenozim monofosfat
AMPK	Adenosin monofosfat ile aktive edilen protein kinaz
AN	Anoreksiya nervoza

Kısaltmalar	Açıklamalar
ApoA1	Apolipoprotein A1
ARC	Arkuat Nükleus
ALT	Alanin Aminotransferaz
AST	Aspartat Aminotransferaz
ATP	Adenozin Trifosfat
AUC	Eğri Altında Kalan Alan
AVP	Arginin Vasopressin
CaMKK2	Kalmodulin kinaz-kinaz 2
cAMP	Siklik Adenozin Mono Fosfat
CoA	Koenzim A
CPT 1	Karnitin Palmitoiltransferaz-1
CYP7A1	Sitokrom p450 7A1
DAG	Diaçilgliserol
DGAT	Diaçilgliserol açiltransferaz
DMN	Dorso Mediyal Nükleus
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EC	Enterokromaffin
ECL	Enterechromaffine
GH	Büyüme Hormonu
GHRH	Büyüme Hormonu Serbesleştirici Hormon
GHRH-R	Büyüme Hormonu Serbesleştirici Hormon Reseptörü
GHS	Büyüme Hormonu Salgılatıcı
GHS-R	Büyüme Hormonu Salgılatıcı Reseptör
GLUT1	Glukoz Taşıyıcı 1
GOAT	Ghrelin O-açiltransferaz
HbA1c	Glikozile Hemoglobin A1c
HDL-K	Yüksek Yoğunluklu Liprotein Kolesterol
LDL-K	Düşük Yoğunluklu Liprotein Kolesterol
LHA	Lateral Hipotalamus Alan
LXR	Karaciğer X Reseptörü
MBOAT	Membrana Bağlı O-asiltransferaz

Kısaltmalar	Açıklamalar
MCFA	Orta Zincirli Yağ Asidi
MCH	Melanin Konsantre Edici Hormon
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
mTOR	Rapamisin Memeli Hedefi
NAFLD	Non-Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı
NPY	Nöropeptit Y
OGTT	Oral Glukoz Tolerans Testi
PC1/3	Prohormon Konvertaz 1/3
Pi	İnorganik Fosfat
PKC	Protein Kinaz C
PPAR-γ	Peroksizom Proliferatör İle Aktive Edilmiş Reseptör γ
PVN	Paraventriküler Nükleus
PWS	Prader-Willi Sendromu
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SREBF1	Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü 1
SREBP	Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Protein
SREBP1	Sterol Regülatör Element Bağlayıcı Protein-1
TG	Trigliserit
TSH	Tiroit Stimüle Edici Hormon
UCP2	Uncoupling Protein-2
VMH	Ventromedial Hipotalamik Nükleus
VMN	Ventro Mediyal Nükleus
VLDL-K	Çok Düşük Yoğunluklu Lioprotein Kolesterol

1. GİRİŞ

Besinlere duyulan istek iştah olarak tanımlanmaktadır [1]. Enerji alımı ve iştah metabolizmasının düzenlenmesinde gastrointestinal sistem, hipotalamus, adipoz doku gibi birçok sistem rol oynamaktadır. Adipoz dokudan salınan leptin, sindirim sisteminden salınan kolesistokinin ve ghrelin gibi hormonlar iştah üzerinde etkili olmaktadır [1-3].

İştah hormonlarından birisi olan ghrelin 28 amino asit içermektedir [1-3]. Bu hormon başta mide olmak üzere beyin, böbrek, pankreas, karaciğer, adipoz doku, hipofiz bezi gibi bazı dokulardan salınmaktadır [4, 5]. Ghrelin hormonunun vücutta 4 farklı formu bulunmaktadır [6]. Bütün formlar aynı ghrelin öncülünden üretilmektedir. Total ghrelinin, açıl ve desaçil formları plazmada en yüksek düzeyde bulunan formlarıdır. Vücutta açıl ghrelinin desasilasyonu sonucu desaçil ghrelinin oluştuğu düşünülmektedir [7].

Ghrelin formlarının vücutta farklı fizyolojik fonksiyonlara sahip olduğu literatürde yer almaktadır [8]. İlk zamanlar, desaçil ghrelinin inaktif olduğu düşünülmekte iken günümüzde vücutta önemli endokrin aktivitesi olduğu bilinmektedir [7]. Açıl ghrelin iştahı, büyüme hormonu salınımını, vücut ağırlığını ve insülin direncini artırıcı özelliğe sahipken; desaçil ghrelinin iştahı ve vücut ağırlığını azaltıcı, insülin duyarlılığını artırıcı role sahip olabileceği gösterilmiştir [4, 9]. Yapılan bir çalışmada bireylere 14 gün boyunca günde 2 kez 3 mg/kg açıl ghrelin verilmiştir. Çalışma sonunda, açıl ghrelinin fonksiyonel dispepsisi olan anoreksiya nervoza hastalarında iştah üzerinde uyarıcı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir [10]. Yapılan başka bir araştırmada, 14 gün süreyle 23 bireye desaçil ghrelin, 24 bireye de plasebo verilmiştir. Çalışmada sadece desaçil ghrelin alan grupta iştahta azalma saptanmıştır. Vücut ağırlığı her iki grupta da değişmemiş, yalnızca desaçil ghrelin alan grupta bel çevresi ve yağ kütlesinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir [11]. Araştırmalar incelendiğinde anoreksiya nervoza, hemodiyaliz gibi malnutrisyonun önemli sağlık sorunları oluşturabileceği hastalıklarda plazma desaçil ghrelin düzeyinin sağlıklılardan daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir [12, 13].

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde yaygın bir halk sağlığı sorunudur ve basit steatozdan alkolik olmayan steatohepatite kadar değişen geniş bir karaciğer hasarı spektrumuyla karakterize edilir. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığında yağ asitlerinin de novo sentezinde artış ve

hepatositlerde trigliserit (TG) birikimi meydana gelmektedir [14]. Hepatositlerde TG sentezlenmesinde, açıl-CoA, lizofosfatidik asit, diaçilgliserol (DAG) lipid metabolitleri görev almaktadır. Diaçilgliserol, protein kinaz C (PKC) aktivasyonunu düzenleyerek TG sentezinde etkin rol oynamaktadır. Bu nedenle, DAG'ın aşırı üretilmesi, obezite yokluğunda bile NAFLD'nin gelişimine neden olur [14, 15].

Son yıllarda, bağırsak hormonlarının NAFLD hastalarında hepatik steatoz ve insülin direnci (IR) üzerinde önemli rolleri olduğu gösterilmiştir [16]. Mekanizması tam olarak anlaşılmamasına rağmen ghrelin hormonunun açıl ve desaçil formunun karaciğer yağlanması üzerinde farklı etkileri olduğu öne sürülmüştür [14]. Yapılan bir çalışmada açıl ghrelinin yağ oksidasyonunu inhibe ederek hepatik lipid birikimini arttırdığı [17] başka bir çalışmada ise, hepatik steatoz ve hepatik insulin direncini indüklediği saptanmıştır [18]. Ayrıca literatürde desaçil ghrelinin karaciğer yağlanmasını ve insulin direncini azalttığı gösterilmiştir [14].

Açıl ve desaçil ghrelinin ve bu iki formun birbirine oranının NAFLD'de hepatik lipogenez ve insulin direnci, yeme bozukluğunda iştahsızlığın altında yatan mekanizmanın araştırılmasında oldukça önemlidir. Literatür incelendiğinde; açıl ghrelinin, iştah ve karaciğer yağlanması üzerine etkilerinin araştırıldığı kapsamlı çalışmaların yapıldığı gözlemlenirken; desaçil ghrelinle ilgili kapsamlı çalışmalara rastlanmamıştır. Ayrıca son yıllarda yapılan araştırmalarda, açıl ve desaçil ghrelin miktarından ziyade bu iki hormonun birbirine oranının karaciğer yağlanması, insulin direnci ve biyokimyasal bulgular üzerindeki etkilerinin daha önemli olduğu görülmüştür. Ancak literatürde hangi açıl ve desaçil ghrelin oranının etkili olduğuna dair veriye rastlanmamıştır. Bu çalışma, ghrelin hormonunun açıl ve desaçil formlar ile bu formların farklı oranlarda ratlara uygulanmasının karaciğer yağlanması, insulin direnci ve biyokimyasal parametreler üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

Çalışmanın hipotezleri

- Ratlara verilen açıl ghrelin miktarı ile histolojik düzeyde hepatik steatoz arasında pozitif yönlü ilişki vardır.
- Ratların kan açıl/desaçil ghrelin düzeyi ile hepatik steatoz arasında pozitif yönlü ilişki vardır.

- Açıl/desaçıl oranı 1:3 verilen ratlarda hepatik steatoz daha azdır.
- Açıl ghrelin verilen ratlarda desaçıl ghrelin verilen ratlara göre kan lipit parametreleri daha yüksektir.
- Desaçıl ghrelin verilen ratlarda açıl ghrelin verilen ratlardan göre kan şekeri regülasyonu daha iyidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ghrelin Hormonu

2.1.1. Keşfi

Büyüme hormonu salgılatıcı (GHS) olarak adlandırılan Met5-enkefalin peptit analogunu 1976 yılında Bower ve arkadaşları [19] in vitro yaptığı çalışma sonucunda keşfetmişlerdir. Büyüme hormonu salgılatıcı, hipofiz bezinden büyüme hormonu (GH) salınımında rol oynamaktadır. Daha sonra 1996 yılında Howars ve arkadaşları [20] Büyüme Hormonu Salgılatıcı Reseptörü (GHS-R) tanımlamışlardır. Kojima ve arkadaşlarının 1999 yılında yaptığı in vivo ve in vitro çalışmalarda midede GHS-R uyaran bir ligand izole edilmiştir. Bu izole edilen ligand, 28 amino asit içeren 3. serin yan zincirine n-oktaonik asit bağlanmış olan ghrelinin aktif formu (açıl ghrelin)'dur [3]. Ghrelin kelimesi, büyüme hormonunu stimüle edici özelliği için 'grow' ve salınımı artırdığı için 'relin' kelimesinden türetilmiştir [21-23].

2.1.2. Yapısı

Rat ve insan ghrelin öncüleri, 117 amino asitten oluşmaktadır [3]. Bu öncülerde, ghrelin dizisi sinyal peptidinin dizisini takip etmektedir. Rat midesinde, proghrelini kodlayan iki mRNA izoformu, genler aracılığı ile üretilmektedir. mRNA'lardan birisi ghrelin öncüsünü kodlarken diğeri ghrelin ile özdeş olan ve 14 glisinin silinmesiyle oluşan des-Gln¹⁴-ghrelin öncülünü kodlamaktadır [24]. Böylece midede ghrelin ve des-Gln¹⁴-ghrelin olmak üzere iki tip aktif ghrelin peptit üretilmektedir. Des-Gln¹⁴-ghrelin sadece midede düşük miktarlarda bulunmaktadır [25].

İnsan, maymun, rat, fare, inek, koyun, köpek, kedi gibi memelilerde ghrelin homologları tanımlanmıştır. Tüm omurgalı canlılarda ghrelin esas olarak midede üretilmektedir ve orta zincirli yağ asidi ile modifiye edilmektedir. Açıl modifikasyonu için kullanılan yağ asitleri, n-oktanoik, n-dekanoik asit veya diğeri orta zincirli yağ asitleridir [26].

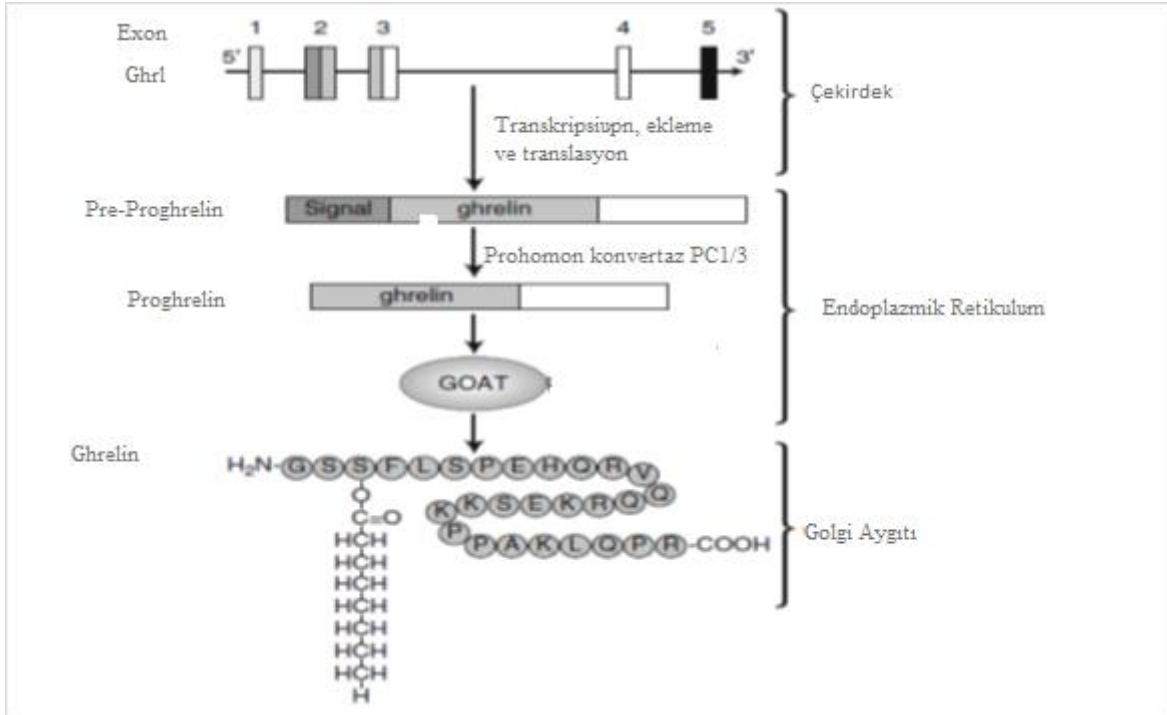
Midede ghrelinin birkaç minör formu izole edilmiştir. Bunlar nonacylated (desaçıl ghrelin), octanoylated (C8:0) (açıl ghrelin), decenoylated (C10:1) ve decanoylated (C10:0)'dir [6, 7].

2.1.3. Sentezi

Mide, karaciğer, pankreas, böbrek, hipofiz bezi, beyin ve adipoz doku gibi birçok dokudan ghrelin hormonu salgınmaktadır [12,27]. Bu hormon, çoğunlukta midede üretilmektedir [12]. Ghrelin içeren hücreler, midede fundus bölgesinde pilor bölgesinden daha fazla bulunmaktadır [28,29].

Midenin oksintik mukozasında; enterechromaffine (ECL), D, enterokromaffin (EC) ve X/A benzeri hücreler olmak üzere dört tip hücre tanımlanmıştır. Histamin ve üroguanilin, ECL hücrelerinde; somatostatin, D hücrelerinde; serotonin, EC hücrelerinde esas olarak salgınmakta iken ghrelin hormonu, X/A benzeri hücrelerden salgınmaktadır. Ghrelin keşfedilene kadar X/A benzeri hücrelerin granül içerikleri tam olarak bilinmiyordu. X/A benzeri hücreler ghrelin ile dolu yuvarlak, kompakt, elektron yoğun granüller içermektedir. Bağırsakta, ghrelin konsantrasyonu duodenumdan kolona doğru yavaş yavaş azalmaktadır. Midede olduğu gibi, bağırsakta da çoğunlukla açıl ve desaçıl ghrelin formları bulunmaktadır [26].

Yirmi sekiz amino asit içeren ghrelin peptiti, ghrelin geni Ghrl'nin ekson 2 ve 3'ü tarafından kodlanır. Daha sonra pre-proghrelin, prohormon konvertaz PC1/3 tarafından proghrelin oluşturmak üzere parçalanır. Endoplazmik retikulumda bulunan Ghrelin O-açıltransferaz (GOAT), koenzim A (CoA) ile aktifleştirilmiş orta zincirli bir yağ asidini (MCFA), proghrelinin üçüncü serin molekülüne bağlar. Açillenmiş proghrelin daha sonra açıl ghrelin oluşturmak üzere endoplazmik retikulumdan ayrılır ve golgi cisimciğinden salgılanmak için veziküllerde depolanır (Resim 2.1) [30].

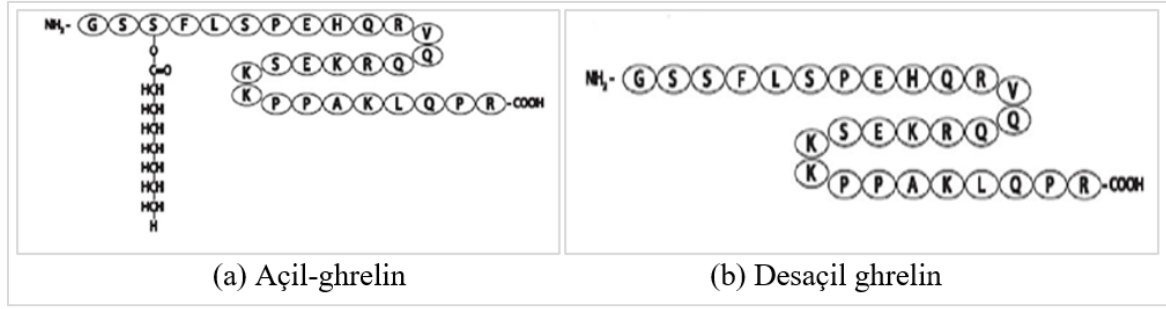


GOAT: Ghrelin O-açiltransferaz.

Resim 2.1. Ghrelin biyosentezi ve GAOT enzimi ile açillenmesi [30]

Ghrelin O-açiltransferaz (GOAT) enziminin ghrelin açillenmesinde görev alması, açıl modifikasyonunun ghrelin fizyolojisinde önemli rol oynadığını göstermektedir [31]. GOAT, ghrelinin açıl modifikasyonunu katalize ettiği bilinen tek enzimdir ve 16 enzimden oluşan membrana bağlı O-asiltransferaz (MBOAT) ailesine aittir. Bu enzim, bir politopik integral membran proteinidir [32]. Ghrelin vücutta nonacylated (desaçil ghrelin), octanoylated (C8:0) (açıl ghrelin), decenoylated (C10:1) ve decanoylated (C10:0) olmak üzere dört farklı formda bulunur [6, 7].

Ghrelin peptitinde 3. serinin hidroksil grubunun oktanoik asitle esterleşmesi aktif ghrelin yani açıl ghrelini meydana getirmektedir [33]. Açıl ghrelinin deaçillenmesi sonucu desaçil ghrelinin oluştuğu düşünülmektedir. Bu nedenle desaçil ghrelinin açıl ghrelin'in bir öncülü veya bir yıkım ürünü olduğu tartışmalıdır (Resim 2.2) [7].



Resim 2.2. Açıl (a) ve desaçıl (b) ghrelinin kimyasal formülü [7]

2.1.4. Vücutta dağılımı ve plazmadaki miktarı

Plazmada ghrelin hormonu çoğunlukta açıl ve desaçıl formlarında bulunmaktadır [34]. İnsanlarda plazmada toplam ghrelin düzeyi (açıl ve desaçıl ghrelin) 150–180 fmol/mL iken açıl ghrelin düzeyi 10–20 fmol/mL’dir. Toplam ghrelinin yaklaşık %80-90’ını desaçıl formu oluşturmaktadır [5]. İnsanlarda kan açıl/desaçıl ghrelin oranı 1:8-1:9 [7] iken ratlarda bu oran 1:2.5-1:3 olarak saptanmıştır [14, 35].

Desaçıl ghrelin, hem midede hem de kanda önemli seviyede bulunmaktadır [34]. Kanda, desaçıl ghrelin, açıl ghrelinden çok daha büyük miktarlarda dolaşmaktadır. Açıl ve desaçıl ghrelin kanda yüksek yoğunluklu lipoproteine (HDL-K) bağlanmaktadır. Bu HDL-K molekülü plazma klusterin (apolipoprotein J) esteraz ve paraoksonaz içermektedir [7].

Ghrelin hormonunun salgılanmasının düzenlenmesinde hangi faktörlerin rol aldığı net olarak bilinmemekle birlikte plazma ghrelin konsantrasyonunun açlık durumunda arttığı, tokluk durumunda azaldığı gösterilmiştir [36, 37]. Örneğin; oral veya intravenöz glikoz uygulaması plazma ghrelin konsantrasyonunu azaltırken [38, 39], su tüketimi değiştirmemektedir [26]. Ayrıca tüketilen öğünün içeriğine göre ghrelin salınımının da değiştiği bilinmektedir [26].

Literatürde, plazma total ghrelin konsantrasyonunun obez bireylerde düşük, zayıf bireylerde ise yüksek olduğu gösterilmiştir [37, 38, 40, 41]. Açıl ve desaçıl ghrelinin ayrı ayrı değerlendirildiği çalışmalar sonucunda; obez bireylerde anoreksijenik desaçıl ghrelin düzeyinin düşük, oreksijenik etkilere sahip olan açıl ghrelin hormon düzeyinin ise yüksek veya normal olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle açıl ve desaçıl ghrelin düzeyinin obezite üzerinde etkili olabileceği vurgulanmıştır [2, 5, 42, 43]. Ayrıca ghrelin salınımının hastalık durumunda da değiştiği bilinmektedir. Örneğin; anoreksiya nervoza (AN) hastalarında

plazma açıl ghrelin düzeyi normal veya düşük iken desaçil ghrelin düzeyi yüksektir [44]. AN hastalarında yüksek düzeydeki plazma total ghrelin seviyesi vücut ağırlığı artışı ile normale döner [45-47].

2.2. Metabolik Etkileri

Açıl ghrelin vücutta GHSR 1a'ya bağlanarak GH salınımını artırarak metabolik etki göstermektedir. Ancak desaçil ghrelin, hipotalamus ve hipofizde açıl ghrelinin bağlandığı reseptöre bağlanamamasına rağmen vücutta önemli metabolik aktivitelere sahiptir [26]. Açıl ve desaçil ghrelin hormonları vücutta glukoz metabolizması, endokrin sistem, kardiyovasküler hastalıklar, uyku ve hafıza gibi birçok metabolizma üzerinde etkilidir (Çizelge 2.1) [48]. Özellikle son yıllarda, ghrelin hormonu üzerine yapılan çalışmalarda, bu hormonun açıl ve desaçil formları üzerine odaklanılmıştır [4, 16-18, 42-47]. Literatürde, açıl ve desaçil ghrelinin bir çok hastalık üzerinde etki olduğu ancak etki mekanizmalarının henüz bulunamadığı vurgulanmıştır [48].

Çizelge 2.1. Açıl ve desaçıl ghrelinin metabolik etkileri [48]

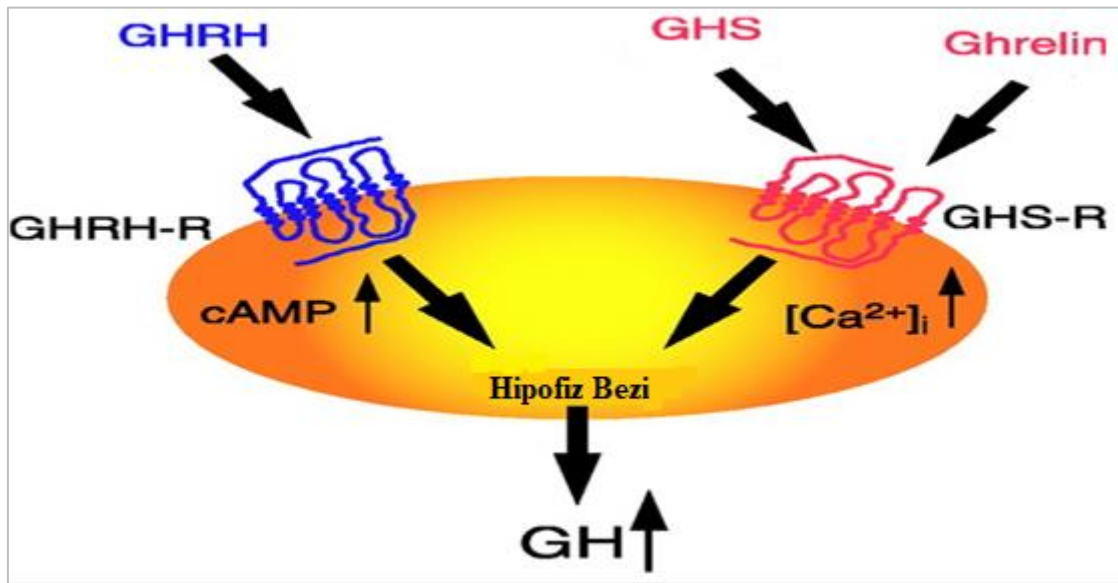
Etki	Açıl ghrelin	Desaçıl ghrelin
Endokrin Sistem		
<i>GH</i>	↑	↔↓
<i>ACTH, TSH, AVP</i>	↑	↔
İştah ve vücut ağırlığı	↑	↑↓
Metabolizma		
Glukoz metabolizması		
<i>Glukoz hassasiyeti</i>	↓	tanımlanmamış
<i>İnsülin sekresyonu</i>	↓↑	↓
<i>İnsülin etkisi</i>	↑ periferel/ ↓karaciğer	↔ periferel/ ↓karaciğer
<i>Glukoz üretimi</i>	↑	↓
<i>Lipit metabolizması</i>		
Karaciğer	↑	tanımlanmamış
Kas	↓	tanımlanmamış
Adipoz doku	↑	↑
Üreme sistemi		
<i>LH sekresyonu</i>	↓	↓
<i>Embriyogenezis</i>	↓	tanımlanmamış
<i>Testesteron sekresyonu</i>	↓	tanımlanmamış
<i>Spermatogenezis</i>	↓	tanımlanmamış
<i>Folikül sağkalımı ve aksiyon</i>	↑	tanımlanmamış
Gastrointestinal sistem		
<i>Ekzokrin salgısı</i>	↑↓↔ mide/↑ pankreas	↔ mide
<i>Epitel koruma</i>	↑	tanımlanmamış
<i>Motilite</i>	↑ mide ve barsak	↓ mide/↔jejunum
Kardiyovasküler Sistem		
<i>Vasküler Dinamik</i>		
Makro Damarların Genişlemesi	↑ sistemik/↓ koroner	↑ sistemik
Mikro Damarların Genişlemesi	↑	tanımlanmamış
<i>Endotel fonksiyonu</i>	↑	tanımlanmamış
<i>Kalp Fonksiyonu</i>	↑	↑
<i>Hücre çoğalması</i>	↑↓	↑↓
İmmün fonksiyon		
<i>İmmün hücre üretimi</i>	↑	↔
<i>Sitokin üretimi</i>	↓	↔
<i>Nötrofil eylemi</i>	↓	tanımlanmamış
Kemik		
<i>Osteoblast üretimi</i>	↑	↑
<i>Osteoblast eylem</i>	↑	tanımlanmamış
Uyku	↑	↔
Hafıza	↑	↔
Anksiyete	↑	↔
İris kas gevşemesi		
<i>Sfinkter</i>	↑	↑
<i>Kanal genişletici etki</i>	↑	↔

(↑), stimülasyon; (↓), inhibisyon; (↔), etkisiz

GH: Büyüme hormonu, ACTH: Adrenokortikotropik hormon, LH; Luteinleştirici Hormon, TSH: Tiroit Stimüle Edici Hormon, AVP: Arginin Vasopressin Hormon.

2.2.1. Büyüme hormonu

İlk zamanlar büyüme hormonu salınımının, büyüme hormonu serbesleştirici hormon (GHRH) ve somatostatin aracılığı ile düzenlendiği düşünülmekte iken 1996 yılında GHS'nin keşfinin ardından GHS'nin farklı yollarla büyüme hormonu salınımını artırdığı gösterilmiştir [19, 22, 49].



cAMP: Hücre içi siklik adenosin monofosfat, GH: Büyüme hormonu, GHS-R: Büyüme hormonu salgılatıcı reseptör, GHRH-R: Büyüme hormonu serbesleştirici hormon reseptör, GHRH: Büyüme hormonu serbesleştirici hormon

Resim 2.3. Büyüme hormonu serbesleştirici hormon ve ghrelin tarafından büyüme hormonunun salınımının uyarılması [8]

Büyüme hormonu serbesleştirici hormon, GHRH-R'yi uyarır ve hücre içi siklik adenosin monofosfatı (cAMP) artırarak büyüme hormonunu salınımını sağlamaktadır. Ghrelin hormonu ise büyüme hormonu salgılatıcı reseptörü (GHS-R) uyararak hücre içi Ca^{+2} artışını indükler ve GH salınımını artırmaktadır [50]. Ayrıca ghrelin; somatostatin salınımını inhibe ederken kortizol, adrenokortikotropik hormon (ACTH), aldesteron ve prolaktin salınımını stümüle etmektedir (Resim 2.3) [8].

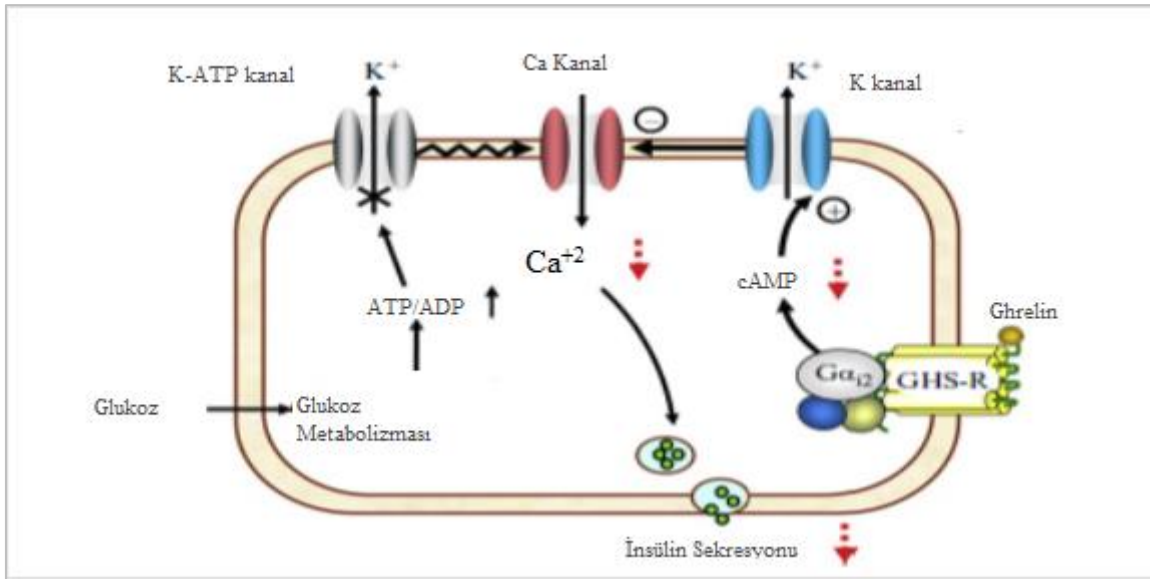
Vücutta GHS-R 1a ve GHS-R 1b olmak üzere iki adet büyüme hormonu salgılatıcı reseptör bulunmaktadır. Ghrelin molekülü GHS reseptörüne bağlanarak biyolojik etki gösterebilmektedir. Açıl ghrelin GHSR 1a'ya bağlanarak metabolik etki gösterirken, desaçil ghrelin yağ asidi grubunun olmamasından dolayı GHSR 1a'ya bağlanmamaktadır

[3]. Bununla birlikte, hem açıl hem de desaçıl ghrelin, GHS-R la'yı taşımayan hücreleri etkilediğinden, henüz bilinmeyen ilave ghrelin reseptörlerinin var olabileceği tartışılmaktadır [51]. Ghrelinin memeli hayvanlarda olduğu gibi memeli olmayan omurgalılarda (balık ve kurbağalar) da GH salınımını indüklediği gösterilmiştir [26].

2.2.2. İnsülin sekresyonu ve glukoz hemoastazı

Diabetes mellitus, hiperglisemi ile karakterize kronik bir metabolik hastalıktır. Tip I diyabet, pankreas β -hücrelerinin otoimmün yıkımından kaynaklanırken; tip II diyabet, yeterli insülin salınımının yapılamaması veya periferik hücrelerin insüline yeterince cevap verememesinden kaynaklanmaktadır. Ghrelin, besin tüketimi ve insülin salınımını etkileyen önemli faktörlerden birisidir [52].

Ghrelinin insülin salınımı üzerine etkisi henüz tam olarak anlaşılamamaktadır. Bu hormonun, insülin salınımına olan etkisini açıklayan mekanizmalar arasında; ghrelinin β -hücrelerinde GHS'yi aktive ederek hücre içi cAMP üretimini azaltması ve K^+ kanallarını ($Kv2.1$) aktive ederek Ca^{+2} akışını baskılaması ve sonuç olarak insülin sekresyonunu azaltması yer almaktadır. Pankreas β -hücrelerinde ghrelinin insülin salınımı üzerine olası etkisi Resim 2.4'de verilmiştir [53].



AMP: Adenozin monofosfat, ADP: Adenozin difosfat, ATP: Adenozin trifosfat, GHS-R: Büyüme hormonu salgılatıcı reseptör.

Resim 2.4. Pankreas β -hücrelerinde ghrelinin insülin salınımı üzerine olası etkisi [53]

Yapılan bazı çalışmalarda ghrelinin insülin sekresyonunu inhibe ettiği, bazılarında ise uyardığı gösterilmiştir [54-56]. Bu tutarsızlığın nedeninin farklı deney tasarımlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Özellikle ghrelinin açıl ve desaçıl formlarının farklı etkilere sahip olması nedeniyle ghrelinin etki mekanizması henüz netlik kazanmamıştır [53]. İnsanlarda intravenöz desaçıl ghrelin uygulamasının insülin duyarlılığını artırdığı, açıl ghrelinin uygulamasının ise glukozla uyarılmış Ca^{+2} konsantrasyonunu azaltarak insülin salınımını azalttığı gösterilmiştir [57, 58, 59].

Ghrelinin hepatik glukoz üretimi üzerinde de etkili olduğu bilinmektedir. Literatürde, açıl ghrelinin karaciğerde glukoz üretimini artırdığı, desaçıl ghrelinin ise azalttığı gösterilmiştir [60]. Ratlara açıl ghrelin verildikten sonra karaciğer glikojen kinaz düzeyinin azaldığı ve gamma koaktivatör 1-alfa (PGC1 α) (glukoneogenez aktivatörü) protein ekspresyonunun arttığı bulunmuştur [61, 49]. Ayrıca kan glukoz seviyesi de plazma ghrelin ve insülin düzeyini etkilemektedir. Yüksek glukoz seviyesi ghrelin sekresyonunu baskımlarken, insülin salınımını uarmaktadır [26]. Bu nedenle ghrelin hormonunun, tip II diyabet patogeneğinde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir [52].

2.2.3. İştah

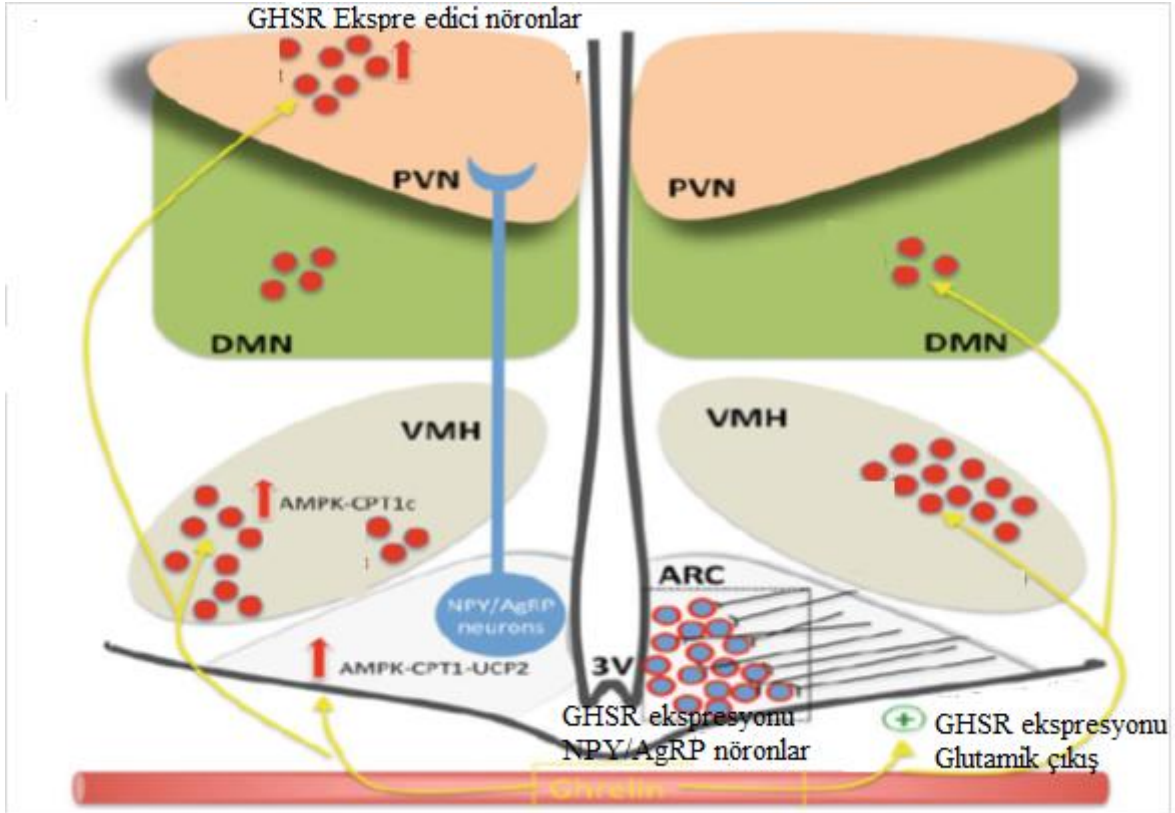
Beyin; iştah, vücut ağırlığı ve enerji homeostazının düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Enerji homeostazının sağlanması için merkezi sinir sistemi (MSS); periferik dokulardan gelen hormonlar, besinler veya afferent duysal nöronlarla (periferik sinir sistemi yoluyla) etkileşime girmektedir. Hormonal feedback mekanizması enerji homeostazını sağlamak için MSS'ni bilgilendirmeye yardımcı olmaktadır. Ghrelin, beyin-enerji dengesini kontrol etmeyi sağlayan bu metabolik hormonlardan birisidir [62].

Vücutta iştah metabolizmasını düzenlemede rol oynayan hipotalamus arkuat nükleus (ARC), dorso mediyal nükleus (DMN), ventro mediyal nükleus (VMN), paraventriküler nükleus (PVN) ve lateral hipotalamus alan (LHA)'dan oluşmaktadır [63]. Arkuat nükleusta, güçlü oreksijenik peptitler olan nöropeptit Y (NPY) ve agouti ile ilişkili peptit (AgRP) eksprese edilmektedir [62]. Ventromediyal hipotalamik nükleus iştahı, vücut ağırlığını ve glikoz homeostazını düzenlediği bilinen bir beyin bölgesidir [62]. Paraventriküler nükleusun enerji metabolizmasındaki ana rolü ARC'den gelen sinyalleri beynin diğer bölgelerine iletmektir. Lateral hipotalamik alanda, melanin konsantre edici

hormon (MCH) ve oreksinleri algılayan nöronlar bulunmaktadır. Dorsomedial nükleus, MCH ve nöropeptid Y yapılarından zengindir. Bu yapıda meydana gelen bir hasar obezite ve hiperfaji ile ilişkilendirilmektedir [63].

GHSR 1a, ARC'de fazla miktarda ekspre edilirken [62]; PVN ve DMN'de orta düzeyde ekspre edilmektedir [64, 65]. GHSR'nin DMH'deki rolü ise tam olarak bilinmemektedir [62]. LH'de GHSR 1a'nın varlığını destekleyen bir kanıt bulunmamaktadır [62]. Ancak, ARC'deki NPY ve AgRP nöronlar aracılığı ile ghrelinin LH üzerinde etkili olduğu varsayılmaktadır [66-68].

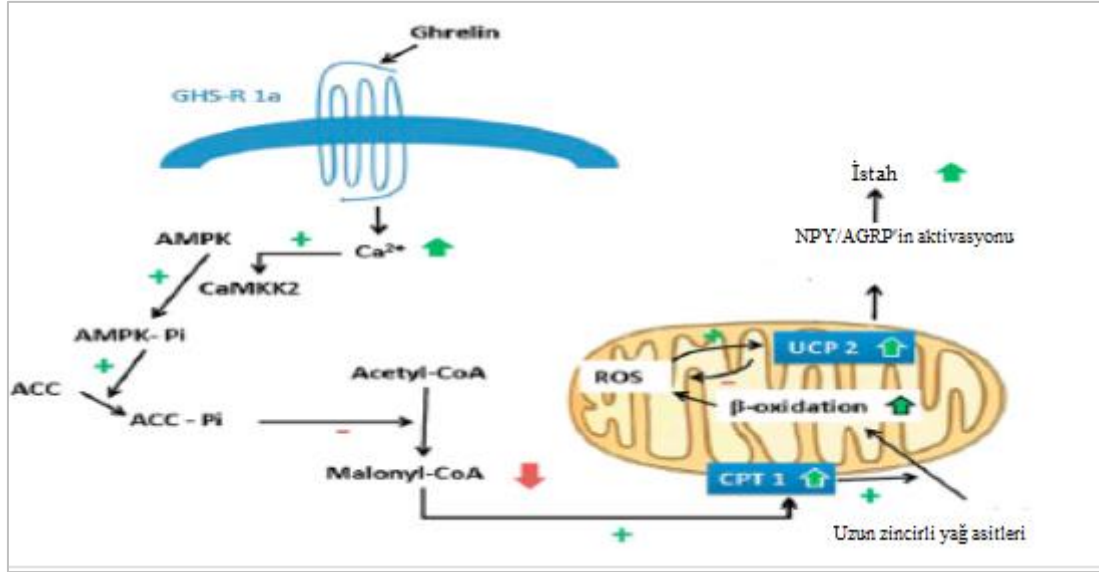
Beyine gelen açıl ghrelin hormonu ilk olarak GHSR reseptörüne bağlanmaktadır [62] ve iki farklı mekanizma ile iştah üzerinde rol oynamaktadır. İlk olarak, kan beyin bariyerini geçen açıl ghrelin [58], adenosin monofosfat ile aktive edilen protein kinaz-karnitin palmitoiltransferaz 1-uncoupling protein 2 (AMPK-CPT1-UCP2) yolunu uyararak veya glutamaterjik girdileri (input'ları) artırarak oreksijenik bir peptit olan NPY/AgRP'leri aktive etmektedir [62]. İkincisi; açıl ghrelin AMPK'ye bağımlı bir mekanizma aracılığı ile VMH'deki GHSR'ler üzerine etki ederek besin tüketiminden bağımsız olarak vücut ağırlığını artırabilir [58, 62]. Desaçıl ghrelinin iştahı azaltmadaki rolü tam olarak anlaşılmamasına rağmen bu hormonun kan beyin bariyerini geçtikten sonra ARC ve PVN'de büyüme hormonu stimülasyonunu sağlayan c-FOS ekspresyonunun artışına neden olduğu düşünülmüş ve anoreksijenik hipotalamik mediatörlerin sentezinde rol oynayabileceği görüşü ortaya atılmıştır (Resim 2.5) [69-72].



AMPK: Adenosin monofosfat ile aktive edilen protein-kinaz, CPT1: Karnitin palmitoiltransferaz-1, UCP: Uncoupling protein 2, AgRP: Ağırlık ile ilişkili reseptör, ARC: Arkut nükleus, DMN: Dorsal medial nükleus, GHS-R: Büyüme hormonu salgılatıcı reseptör, NPY: Nöropeptit Y, PVN: Paraventriküler nükleus, VMN: Ventro medial nükleus.

Resim 2.5. Ghrelinin iştah üzerine etkileri [62]

Açık ghrelin, hipotalamusta GHS-R'ye bağlandıktan sonra hücre içi kalsiyum artışını sağlayarak AMPK'yi fosforile eden kalmodulin kinaz 2'yi (CaMKK2) aktive etmektedir [73]. AMPK, malonil-CoA oluşumunu engelleyen ve CPT 1'i aktive eden asetil-koenzim A karboksilazı (ACC) fosforile ederek, malonil KoA'yı inhibe etmektedir. Daha sonra mitokondriyal β -oksidasyonun artmasıyla reaktif oksijen türleri (ROS) üretilerek UCP 2 uyarılır ve NPY/AGRP transkripsiyonu artar (Resim 2.6) [73].



+, uyarır; -, inhibe eder; ACC, asetil koenzim A karboksilaz; AMPK, adenosin monofosfat ile aktive edilen protein kinaz; CaMKK2, kalmodulin kinaz-kinaz 2; CPT 1, karnitin palmitoiltransferaz-1; ROS, reaktif oksijen türleri; UCP2, uncoupling protein-2; Pi, inorganik fosfat.

Resim 2.6. Hipotalamusta açıl ghrelin'in iştah uyarıcı etkisinin hücre içi mekanizmaları [73]

2.2.4. Adipogenez

Adipogenez, preadipositlerin olgun adipositlere dönüşmesi olarak tanımlanmaktadır. Adipogenez, peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör- γ (PPAR- γ) ve sterol regülatör element bağlayıcı protein-1 (SREBP1) gibi bazı spesifik transkripsiyon faktörler tarafından kontrol edilmektedir [58]. SREBP1, sterol düzenleyici element bağlayıcı transkripsiyon faktörü 1 (SREBF1 (SREBP1-a ve SREBP1-c)) geni tarafından kodlanmaktadır [74].

Literatürde ghrelinin, büyüme hormonu salınımından bağımsız olarak adipogenezde rol alabileceği gösterilmiştir. Ghrelin, adipoz dokuda yağ ekspresyonunu artırmakta ve lipogenez üzerinde doğrudan etkili olmaktadır [75]. Bir araştırmada açıl ve desaçıl ghrelin uygulamasının, insan visceral adipositlerinde PPAR- γ ve SREBF1 mRNA ekspresyon seviyelerini artırdığı saptanmıştır. Bu durum, ghrelinin preadipositlerin farklılaşması ve çoğalmasında etkili bir rol oynayabileceğini göstermektedir [58]. Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada ghrelinin, preadioposit hücrelerde adipogenezini inhibe ettiği bulunmuştur [76]. Ancak bazı hücre kültürü çalışmaları, desaçıl ve açıl ghrelinin, PPAR- γ gibi adipojenik faktörlerin gen ekspresyonunu artırarak hücre proliferasyonunu ve adiposit farklılaşmasını doğrudan uyardığını göstermektedir [77-80]. Hücre kültürü modellerinin

aksine [78-81], in vivo çalışmalar açıl ve desaçıl ghrelinin adipogenez üzerinde farklı etkilerinin olduğunu göstermektedir [82-85]. Literatürde desaçıl ghrelinin, adipoziteyi arttırdığı [83], hiçbir etkisi olmadığı [82] veya azalttığı gösterilmesine rağmen [84], son yapılan çalışmalar desaçıl ghrelinin adipogenezini önlediği fikrini desteklemektedir [11, 85].

2.2.5. Obezite

Obezite besin alımının enerji harcamasını açtığı durumda gözlemlenmektedir [86]. Gün geçtikçe dünya genelinde obezite prevalansı artmakta ve günümüzde en önemli halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Obezite, tip 2 diabetes mellitus, hiperlipidemi ve kardiyovasküler hastalık gibi birçok hastalıkla yakından ilişkilidir. Obeziteye neden olan mekanizmaların bilinmesi ve hastalığın tedavi edilmesi hem bireysel hem de toplumsal açıdan önemlidir. Bu nedenle son yıllarda yapılan çalışmalar, obezite tedavisinde yeni yaklaşımlara yönelmektedir [86].

Yapılan araştırmalarda obez bireylerde plazma total ghrelin düzeyinin zayıf bireylerden daha yüksek olduğu saptanmıştır [37, 86]. Bu konuda yapılan çelişkili çalışma sonuçları bulunsa da obez bireylerde oreksijenik etkilere sahip olan açıl ghrelin hormonunun plazmadaki düzeyinin yüksek veya normal; anoreksijenik desaçıl ghrelin hormonunun ise düşük olduğu bulunmuştur [2, 5, 42, 43].

Vücutta çoğunlukla açıl ve desaçıl formunda bulunan ghrelin hormonunun bu iki farklı formu, obezite üzerinde antagonist etkilere sahiptir. Açıl ghrelin, besin tüketimini artırarak ve enerji harcamasını azaltarak vücut ağırlığında artış meydana getirmekte ve adipogenezini indüklemektedir [69, 87]. Obez farelerde açıl ghrelin blokajının, besin tüketimini, vücut ağırlığını ve vücut yağ kütlesini azalttığı bulunmuştur [88]. Ghrelin reseptörleri çıkarılan farelerde diyetle indüklenen obezite gelişiminin azaldığı saptanmıştır [89]. Ayrıca obezite ile ilişkili olan Prider Willi hastalığının altında yatan mekanizmalardan birisinin de ghrelin hormonu olabileceği literatürde gösterilmiştir [90-96]. Bu nedenle, Zorilla ve arkadaşları [97], obez hastaları tedavi etmek amacıyla ghrelinin etkisini baskılamak için anti açıl ghrelin aşısı geliştirmiştir. Bu aşının ratlara uygulanması sonucu yağsız vücut kütlesinde azalma saptanmıştır. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda ghrelinin açılmasında rol alan GOAT enzimi, obezite tedavisinde başka bir potansiyel hedef olarak gösterilmiştir

[16, 98]. Farelere anti GOAT infizyonun vücut ağırlığını azaltmada etkili olduğu bulunmuştur [99].

2.2.6. Yeme bozukluğu

Anoreksiya nervoza, genç kadınlarda sıklıkla görülen, vücut ağırlığı kaybı, amenore ve davranış değişiklikleri ile karakterize bir sendromdur. AN hastalarında plazma toplam ghrelin düzeyleri yüksektir. Bu hastalarda tedaviden sonra vücut ağırlığı artışı sağlanmakta ve ghrelin hormon seviyesi normal değerlere ulaşmaktadır [26]. Yapılan bir araştırmada AN hastalarının, plazma açıl ghrelin düzeyi sağlıklı bireylere benzer ancak desaçil ghrelin düzeyi sağlıklı bireylerden yüksek bulunmuştur [12]. AN hastalarında, kada ghrelin seviyesi arttıkça ACTH, prolaktin ve kortizol düzeyinde de artış meydana gelmektedir, bu da AN hastalarında gözlenen amenore ve davranış değişikliklerini açıklayabilmektedir [26]. Sonuç olarak, bu hastalığının patogenezinde rol oynayan faktörlerden birisinin ghrelin hormonu olabileceği düşünülmektedir [12].

2.2.7. Enerji harcaması

Enerji homeostazı, enerji alımı ve enerji harcaması arasındaki dengeyi tanımlamaktadır. Enerji homeostazının düzensizliği obezite veya anoreksiya ile sonuçlanmaktadır. Ghrelin, enerji alımını ve enerji harcanmasını etkilemektedir [100]. Ghrelinin, iştah ve yeme davranışı üzerindeki etkileri bilinmesine rağmen, hem hayvanlarda hem de insanlarda enerji harcaması ile ilişkisi hakkında çok az bilgi bulunmaktadır [101].

Açıl ghrelinin, besin tüketimini arttırdığı ve enerji harcamasını azalttığı bu sayede vücut ağırlığında artış meydana getirdiği bildirilmiştir [102]. Ayrıca bu form, anoreksijenik maddelerin inhibisyonuna neden olarak karbonhidrat tüketimini artırmakta ve yağ deposunun kullanımını azaltmaktadır [103]. Gençler üzerinde yapılan bir çalışmada vücutta toplam ghrelin düzeyi arttıkça dinlenme metabolizma hızının azaldığı bulunmuştur. Bu durum ghrelin hormonunun, enerji harcaması üzerinde rol oynayabileceğini göstermektedir [104].

2.2.8. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde yaygın bir halk sağlığı sorunudur. NAFLD, alkol dışı nedenlerden dolayı karaciğerde meydana gelen yağlanma olarak tanımlanmaktadır. Bu hastalıkta yağ asitlerinin de novo sentezinde artış olmakta ve hepatositlerde TG birikimi meydana gelmektedir [14]. Hepatositlerde TG sentezlenmesinde, açıl-CoA, lizofosfatidik asit, diaçilgliserol (DAG) lipid metabolitleri görev almaktadır. Açıl ghrelin GHSR-1a'yı uyardıktan sonra PPAR- γ gen ekspresyonunda artış sağlayarak diaçilgliserol açiltransferaz (DGAT) enzimini aktive etmektedir. Ardında diaçilgliserol, protein kinaz C (PKC) aktivasyonunu artırarak TG sentezini uyarmaktadır. Desaçil ghrelinin ise GHSR-1a'dan bağımsız olarak kendine özgü reseptör aracılığı ile TG sentezini azalttığı düşünülmektedir [14, 15].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, NAFLD'de ghrelin gibi bazı gastrointestinal sistem hormonların, hepatik steatoz gelişimi ve insülin direnci (IR) üzerine etkilerine odaklanılmıştır [14, 16]. Ghrelin hormonun açıl ve desaçil formunun, karaciğer yağlanması üzerinde farklı metabolik ve fizyolojik etkileri olduğu öne sürülmüştür [14]. Ancak etki mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır. Yapılan bir çalışmada, 4 gün kısa süreli açıl ghrelin uygulamasının (200 ng/kg /gün, iki kez/gün), hücre içi AMPK aktivitesini artırarak yağ oksidasyonunu inhibe ettiği ve hepatik lipid birikimini arttırdığı bulunmuştur [96]. Yapılan başka bir araştırmada, açıl ghrelinin daha uzun süre (14 gün boyunca 11 nmol/kg/gün) verilmesinin, PPAR- γ gen ekspresyonunu aktive ederek hepatik steatoz ve hepatik insülin direncini indüklediği gösterilmiştir [18]. Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, açıl ghrelinin karaciğer yağlanmasını artırdığı desaçil ghrelinin azalttığı saptanmıştır [14].

2.2.9. Kardiyovasküler hastalıklar

Kardiyovasküler dokularda ghrelin hormonu ve reseptörünün yaygın olarak bulunması, kardiyovasküler sistemin ghrelin için bir hedef olduğunu göstermektedir [105]. Ghrelin, kardiyovasküler dokuların önemli bir otokrin ve parakrin faktörüdür. Ghrelin, miyokard kontraktilitesini artırmakta, vazodilatasyona neden olmakta ve enflamasyonu azaltmaktadır

[106]. Ghrelinin, açıl ve desaçil formlarının kardiyovasküler sistem üzerinde farklı etkilere sahip olduğu bilinmektedir [105].

Karaciğer X reseptörü (LXR), kolesterol homeostazının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle makrofajlardaki LXR aktivasyonu, ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı A1 (ABCA1) gen ekspresyonunu artırarak kolesterolün plazma membranına taşınmasını ve “HDL-K” üzerindeki apolipoprotein A1’e (ApoA1) aktarılmasını sağlamaktadır. Bu sayede LXR ateroprotektif etkilere sahip olmaktadır. Karaciğerde LXR, kolesterolün safra içine atılımını sağlamaktadır. Ayrıca LXR, sitokrom p450 7A1 (CYP7A1) enzim aktivasyonunu artırarak kolesterolün safra asitlerine dönüşümünü indükler. İnce bağırsaklarda ise ABCA1’in ekspresyonunu artırarak HDL-K oluşumunu tetiklemektedir [107].

Ghreltin hormonu kan basıncının düzenlenmesinde de rol almaktadır. Yapılan bir çalışmada metabolik sendrom hastalarında açıl ghreltin düzeyi arttıkça sistolik kan basıncının da arttığı saptanmıştır [108]. Yano ve arkadaşlarının [109] yaptığı araştırmada 590 yaşlı hipertansiyon hastası yaklaşık 3 yıl takip edilmiş ve bu hastaların 42’sinde kardiyovasküler problem saptanmıştır. Çalışmada kardiyovasküler hastalığı olan bireylerin bazal desaçil ghreltin düzeyinin daha düşük olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak; desaçil ghreltinin kardiyovasküler hastalıklar üzerinde koruyucu etkileri olabileceği vurgulanmıştır.

2.2.10. Üreme sağlığı

Ghreltin hormonunun gonadotropin salgılanmasını düzenlemedeki fizyolojik rolü tam olarak bilinmemekte ancak üreme sağlığı üzerine etkili olduğu görölmektedir. Açıl ghreltinin, gonadotropin salınımı üzerine olumsuz bir etkiye sahip olabileceği literatürde yer almaktadır [110]. Açıl ve desaçil ghreltinin gonadotropin salgılanmasını üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, desaçil ghreltinin açıl ghreltine benzer olarak lüteinleştirici hormon (LH) salınımını azalttığı ve açıl ghreltinin kanda folikül uyarıcı hormon seviyesini (FSH) daha fazla artırdığı saptanmıştır [110]. Yapılan bazı çalışmalarda ghreltinin in vivo LH salgılanmasını baskıladığı gösterilmiştir [111-114]. Broglio ve arkadaşlarının [115] yaptığı araştırmada açıl ghreltinin prolaktin, adrenokortikotropik hormon ve kortizol seviyelerini artırmada etkili olduğu desaçil ghreltinin etki etmediği

bulunmuştur. Sonuç olarak; açıl ve desaçıl ghrelinin üreme sağlığı üzerine etkilerinin çelişkili olduğu ve mekanizmasının tam olarak anlaşılamadığı görülmüştür.

2.2.11. Kanser

Ghrelinin açıl ve desaçıl formlarının, kanser hücre çoğalması üzerine etkileri henüz tam olarak anlaşılmamasına rağmen kanser türüne göre farklılık gösterebileceği belirtilmiştir [116]. Son yıllarda, ghrelinin kolonda hücre proliferasyonunu indükleyerek kolon kanseri oluşumuna katkı sağladığı bildirmiştir [117]. Yapılan bir araştırmada açıl ghrelinin, glukoz taşıyıcı 1 (GLUT1) ekspresyonuna etki ederek oral kanser proliferasyonunu artırdığı da saptanmıştır [118]. Cassoni ve arkadaşlarının [119] yaptığı çalışmada, insan prostat tümörlerinde ve DU-145, PC-3 ve LNCaP prostat karsinom hücrelerinde ghrelin hormonu varlığı ve bu hücreler üzerine etkisini değerlendirmek amaçlanmıştır. Araştırma sonunda açıl ve desaçıl ghrelinin, DU-145 hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, LNCaP hücreleri üzerine etkisi olmadığı saptanmıştır. Desaçıl ghrelin üzerine yapılan çalışmalarda bu hormonun, H345 akciğer kanser hücre proliferasyonunu inhibe ettiği [120], ancak SW-13 ve NCI-H295R adrenokortikal kanser hücrelerinde tam tersi bir etki meydana getirdiği görülmüştür [121]. Sonuç olarak; açıl ve desaçıl ghrelinin kanser üzerinde benzer etkilere sahip olabileceği düşünülmekte olup mekanizma henüz tam olarak anlaşılamamıştır [116].

2.2.12. Diğer hastalıklar

Uyku ve beslenme, metabolizmada benzer yollara sahiptir. Suprakiazmatik nükleus, lateral hipotalamus ve ventromedial hipotalamik nükleus gibi birçok hipotalamik alan, hem uyku hem de metabolizmanın ve besin tüketiminin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Son yıllarda preproghrelin gen ürünlerinin, beslenme ve uyku üzerinde etkili olduğu gösterilmektedir [122]. Yapılan bir çalışmada ratlara intravenöz ghrelin uygulamasının uyanıklığı artırdığı ve Non-REM'i azalttığı saptanmıştır [123].

Sempatik sinir sistemini ve ghrelin gibi bazı hormonlar kemik metabolizmasında önemli rollere sahiptir. Ghrelinin, doğrudan veya büyüme hormonu ve insülin benzeri büyüme faktörü aracılığı ile osteoblast farklılaşmasını ve fonksiyonunu modüle ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, son yıllarda ghrelinin kemik yapısını modüle etmede leptin ile birlikte rol aldığı bulunmuştur [124].

Literatürde ghrelinin nörobiyolojik davranışlar üzerine etkili olduğu gösterilmiştir. Bu hormonun hücrelerde apoptozu, inflamasyonu ve oksidatif stresi azaltarak mitokondriyal fonksiyonu iyileştirdiği ve nöronal sağkalımı artırdığı saptanmıştır. Ayrıca ghrelin, nöral kök/progenitör hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını uyarmaktadır. Ghrelinin inme veya travmatik beyin hasarı sonrası hafıza, ruh hali ve bilişsel işlev bozukluğunun geri kazanılmasında da yarar sağladığı belirtilmiştir [125].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu araştırma Gazi Üniversitesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında, Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı ve Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde 15.06.2019 ve 11.11.2020 tarihleri arasında yapılmıştır. Çalışmada deney hayvanlarına hormon uygulaması 6-22.07.2020; biyokimyasal analizler 22.07.2020-11.11.2020; histolojik analizler 22.07.2020-12.10.2020; gen analizleri 22.07.2020-31.10.2020 tarihleri arasında yapılmıştır.

3.2. Etik Kurul İzni

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından (Kod Numarası: G.Ü. ET 19.036) 08.07.2019 tarihinde onaylanmıştır (EK 1). Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (GÜDAM) yürütülen araştırmanın tüm aşamalarında Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu esaslarına uygun çalışılmıştır.

3.3. Araştırma Desteği

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) Birimi tarafından 47/2019-12 sayılı karar ile desteklenmiştir.

3.4. Deney Hayvanlarının Seçimi

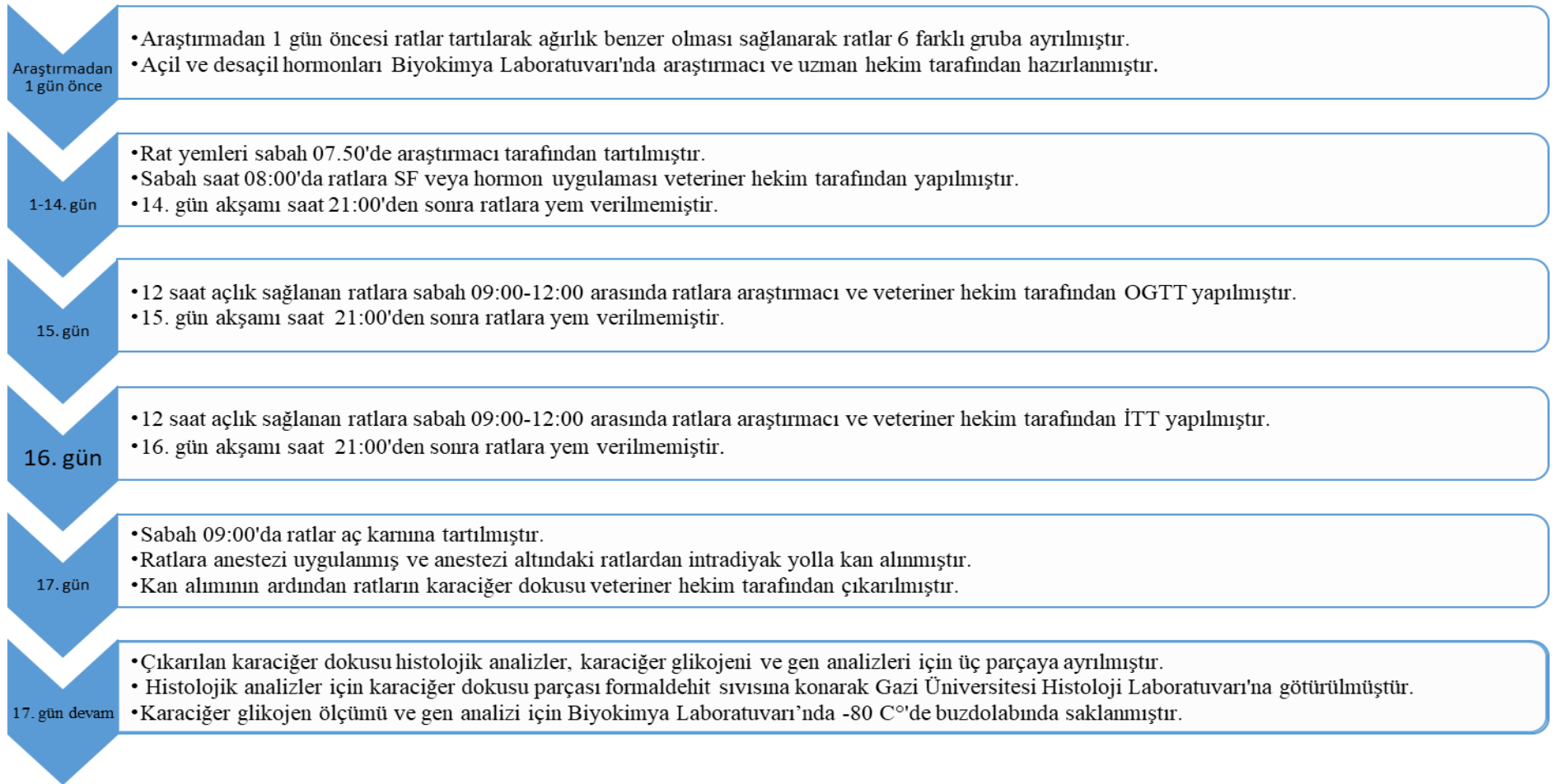
Çalışmada kullanılan ratların cinsi ve vücut ağırlıkları literatürde yer alan çalışmalara [14, 17, 126] göre belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu ratlarda meydana gelen vücut ağırlığı artışını daha net gözlemlemek için vücut ağırlığı 250 ± 30 g ve 7-8 haftalık olan genç ratlar seçilmiştir [14, 17, 126]. Ghrelin hormonu dişi ratlardan salının östrojen gibi cinsiyet hormonlarından etkilendiği için çalışmada erkek ratlar tercih edilmiştir [14]. Toplam 36 sağlıklı Wistar erkek rat Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" ilkelerine göre alınmıştır [127, 128].

3.5. Araştırmanın genel planı

Araştırmacı tarafından çalışmaya başlamadan bir gün önce ratlar Presica marka BJ 6100D model 0,1 g'a duyarlı hassas tartı ile duyarlı hassas terazi ile ölçülmüş ve her grupta yer alan ratların ağırlığı benzer olarak ayarlanmıştır. Araştırmada ratlar 6 gruba ayrılmış ve her grupta 6 adet rat bulunmaktadır. Ratların yemi her gün sabah saat 07.50'de araştırmacı tarafından ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Ratlara 14 gün boyunca subkutan 200 ng/kg ghrelin hormon uygulaması yapılmıştır (Çizelge 3.2). Yapılan literatür taraması sonucunda ratların vücut ağırlığı ve iştahında değişme meydana getirmeden uzun dönemde tolere edebilecekleri dozun 200 ng/kg olduğu saptanmış ve çalışmada bu doz kullanılmıştır [14, 17, 126]. Hormonlar sabah saat 08:00 ve akşam saat 20:00'da veteriner hekim tarafından subkutan enjeksiyon yapılmıştır. On beşinci gün 12 saat açlık sonrası araştırmacı ve veteriner hekim tarafından sabah 09.00-11.00 arası ratlara oral glukoz tolerans testi (OGTT), 16. gün 12 saat açlık sonrası sabah 09.00-11.00 arası insülin tolerans testi (İTT) yapılmıştır. On yedinci gün sabah 09.00'da anestezi işleminin ardından intradiak kan alımı gerçekleştirilmiş ardından karaciğer dokusu uzman veteriner tarafından çıkartılmıştır. Alınan kanlar Gazi Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarında analiz edilmiştir. Çıkarılan karaciğer dokusu histolojik analizler, karaciğer glikojeni ve gen analizleri için üç parçaya ayrılmıştır. Histolojik analizler için karaciğer dokusu parçası formaldehit sıvısı içerisinde Gazi Üniversitesi Histoloji Laboratuvarı'nda, karaciğer ölçümleri ve gen analizi için Biyokimya Laboratuvarı'nda -80°'de buzdolabında saklanmıştır.

Çizelge 3.1. Ratlara uygulanan hormonlar ve miktarı (ng/kg)

Gruplar	Açıl ghrelin	Desaçil ghrelin
Kontrol (n:6)	-	-
Açıl ghrelin (n:6)	200	-
Desaçil ghrelin (n:6)	-	200
Açıl:Desaçil ghrelin 1:1 (n:6)	100	100
Açıl:Desaçil 3:1 ghrelin (n:6)	150	50
Açıl:Desaçil 1:3 ghrelin (n:6)	50	150



SF: Serum Fizyoloji, OGTT: Oral Glukoz Tolerans Testi, İTT: İnsülin Tolerans Testi.

Şekil 3.1. Deney protokolü

3.6. Deney Hayvanlarının Özellikleri ve Barınma Koşulları

Ratlar vücut ağırlığı 250 ± 30 g olan sağlıklı erkek Wistar cinsidir. Ratlar uygun havalandırma sağlanmış kafeslerde, oda sıcaklığında (24 ± 2 °C), 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık odalarda, bağıl nemi % 35-40 olacak şekilde muhafaza edilmiştir. Ratlar tel kapakları olan kafesler içerisinde tutulmuştur (Resim 3.1). Araştırma boyunca ratlar laboratuvar koşulları altında standart kuru pelet yem ve su ile ad libitum şekilde beslenmiştir. Kafesler üç günde bir düzenli olarak temizlenerek gerekli hijyenik koşullar sağlanmıştır. Ratlar aynı kafeslerde kaldıkları için standart fiziksel aktiviteye sahiptirler. Ratların bakımı ve beslenmesi etik ilkeler ve kılavuzlar doğrultusunda sürdürülmüştür [127, 128].



Resim 3.1. Ratların barınma koşulları

3.7. Yem İçeriği ve Özellikleri

Ratlara çalışma süresince standart laboratuvar yemi ad libitum olarak verilmiştir. Standart pellet rat yemi (Korkuteli yem) GÜDAM'dan temin edilmiştir. Standart rat yeminin enerji ve besin öğeleri içerikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Standart rat yemi; soya fasulyesi küspesi, mısır, buğday kepeği, arpa, yonca unu, pelet bağlayıcı, dsp, BYP, SS yağ, toksin bağlayıcı, mineraller, DL metionin, kolin klorit, L-lizin ve DDSG mısır ham maddelerini içermektedir.

Çizelge 3.2. Rat yeminin enerji ve besin öğeleri içeriği (100 g)

İçerik	Miktar
Enerji (kkal)	382,8
Karbonhidrat (g)	64,7
Protein (g)	23,5
Yağ (g)	3,25
Kül (g)	5,26
Lizin (g)	1,28
Fosfor (g)	0,74
Metionin (g)	0,43
Kalsiyum (g)	0,55
Sodyum (g)	0,05
A Vitamini (IU)	1200
D Vitamini (IU)	300
E Vitamini (mg)	5,0
K Vitamini (mcg)	500
B ₁ Vitamini (mcg)	300
B ₃ Vitamini /mg)	3,0
B ₆ Vitamini (mcg)	500
B ₉ Vitamini (mcg)	100
B ₁₂ Vitamini (mcg)	3,0
C Vitamini (mg)	1,0
Biyotin (mcg)	100
Kolin (mg)	400

3.8. Ratların Yem Tüketimleri ile Vücut Ağırlığı Takibi

Araştırmadan 1 gün öncesi araştırmacı tarafından ratlar tartılarak gruplar arası rat ağırlıkları benzer olması sağlanarak 6 farklı gruba ayrılmıştır. Çalışmanın son günü ratların aç karnına vücut ağırlığı ölçümü araştırmacı tarafından yapılmıştır. Vücut ağırlığı ölçümleri Presica marka BJ 6100D model 0,1 g'a duyarlı hassas tartı ile yapılmıştır. Ratların yem tüketimleri günlük olarak kaydedilmiştir. Yem tüketimleri 14 gün boyunca sabah saat 07:50 de araştırmacı tarafından ölçülmüş ve günlük fark kaydedilmiştir. Günlük besin tüketimi kafes başına hesaplanmıştır ve her kafeste tüketilen yem miktarı 6'ya bölünerek rat başına günlük yem tüketim miktarı bulunmuştur.

3.9. Açıl ve Desaçıl Hormonların Hazırlanması

Çalışmada ratlara toplamda 200 ng/kg açıl ve/veya desaçıl ghrelin uygulaması toplam 200 µL solüsyon içerisinde verilmiştir. Satın alınan toplam 1 mg (1000000 ng) açıl ghrelin hormonu başlangıç olarak 1 mL distile su ile dilüe edilmiştir. Ardından 84 mL distile su içerisine 21 µL dilüe edilmiş hormon çözeltisinden eklenmiştir. Aynı işlemler 1 mg'lık desaçıl ghrelin hormonu için uygulanmıştır. Hazırlanan hormon çözeltileri 3 mL'lik 28'er cam tüpe (14 gün boyunca sabah ve akşam toplam 28 adet) konulmuş ve -20 °C'de dondurulmuştur. Tüpte bulunan hormonlar ratlara uygulama yapılmadan 20 dk önce buzdolabından çıkartılıp oda sıcaklığına getirilerek çözdürülmüştür. Açıl ve desaçıl ghrelin hormonunun hazırlanması Gazi Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı'nda araştırmacı ve biyokimya uzmanı tarafından yapılmıştır.

3.10. Ratların Diseksiyonu ve Kan Örneklerinin Alınması

Çalışma sonunda 17. gün 12 saat açlığın ardından 5 mg/kg Ksilazin (Alfazyne %2) + 45 mg/kg Ketamin (Alfamine %10) intramusküler (IM) yolla uygulanarak hayvanlara genel anestezi işlemi veteriner hekim tarafından yapılmıştır. Daha sonra kontrol grubundan başlayarak sırasıyla intrakardiyak yolla kan alınarak ratlar sakrifiye edilmiştir. 10 mL'lik enjektörlerle alınan kanların 3-4 mL'si plazma analizi yapılması için EDTA'lı tüpe alınmıştır. Protein yapıda olan ghrelin hormonun denatüre olmaması için EDTA'lı tüpteki kanların için 1 mL kan başına 20-30 µL DPP IV inhibitor eklenmiştir. Geri kalan kanlar ise serum analizi yapılabilmesi için jelli vakumlu tüplere konulmuştur. EDTA'lı ve jelli tüplere santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj sonrası ayrılan serum ve plazma örnekleri mikropipet ile çekilerek ependorf tüplere konulmuş, etiketleme işlemi yapılmış ve analizler için serum ve plazma örnekleri Gazi Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı'nda -80 °C'de saklanmıştır.

3.11. Doku Örneğinin Alınması

Anestezi işleminin ardından uzman veteriner hekim tarafından ratlar kontrol grubundan başlanarak sırasıyla sakrifiye edilmiş ve daha sonra karaciğer dokusu karaciğer glikojeni, histolojik analizler ve gen analizleri için üçe bölünmüştür. Ardından glikojen ve gen ölçümü için kullanılacak olan karaciğer dokusu sıvı azota alınarak -80°C'de Gazi

Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı'nda muhafaza edilmiştir. Histolojik analizler için kullanılacak olan karaciğer dokusu formaldehit sıvısı içine konulmuş ve daha sonra Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Laboratuvarı'na götürülmüş ve bir histology tarafından analiz edilerek yorumlanmıştır. Karaciğer dokusunun çıkarılması Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Karaciğer ağırlıkları Precisa marka XB 220A model 0,0001 g'a duyarlı hassas tartı ile ölçülmüştür.

3.12. Gereçler

3.12.1. Deneyde kullanılan cihazlar

Analizler sırasında Gazi Üniversitesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'nda bulunan soğutucu (+4 °C), derin dondurucu (-80 °C), santrifüj cihazları ve ELISA okuyucusu ve çalkalayıcısı kullanılmıştır. Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde bulunan soğutucu (+4 °C), derin dondurucu (-80 °C), santrifüj cihazları ve hassas teraziler kullanılmıştır. Histolojik analizler için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarı kullanılmıştır. Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Biyokimya Laboratuvarında PCR cihazı ile analizler yapılmıştır. OGTT ve İTT'i sırasında kan şekerinin ölçülebilmesi için On Call Plus marka kan şekeri cihazı ve stripleri kullanılmıştır.

3.12.2. Deney kimyasalları

Çalışmada AS-24159 Ghrelin, rat 1 mg (Eurogentec) ve AS-60981 (Des-octanoly)-Ghrelin, rat 1 mg (Eurogentec) hormonu kullanılmıştır. Protein yapıda olan ghrelin hormonun denatüre olmaması içine alınan kanlar için DPP IV inhibitör (Sigma) eklenmiştir. Ayrıca insülin tolerans testi için regular insülin olan humalog R uygulanmıştır. Kontrol grubuna serum fizyolojik (Salipad) verilmiştir.

3.12.3. Kan biyokimyasalları

Parametrelerinin ölçümü ticari kitler kullanılarak yapılmıştır. Analizler için rat açıl ghrelin ELİSA kiti (Reagentgenie), rat desaçıl ghrelin ELİSA kiti (Reagentgenie), rat insülin

ELISA kiti (SunRedBio), rat Glukogon ELISA kiti (SunRedBio), rat Fruktozamin ELISA kiti (SunRedBio), rat Diaçil gliserol ELISA kiti (SunRedBio) Total RNA İzolasyon Kit 96 Test (MN), cDNA Sentez Kit 100 APP (ABM) ve Syber Green Master Mix (ABM) kullanılmıştır.

3.13. Biyokimyasal Analizler

3.13.1. Serum parametreleri

Kan örneklerinden elde edilen serumlarda aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), trigliserit (TG), toplam kolesterol, HDL-K, LDL-K, VLDL-K ve glukoz Beckman AU5800 biyokimya otoanalizöründe standart laboratuvar yöntemleriyle Gazi Üniversitesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'nda tayin edilmiştir (EK-2).

3.13.2. Karaciğer glikojen içeriğinin analiz edilmesi

Doku glikojen seviyeleri karaciğer örneklerinde Seifter ve arkadaşlarının [129] metoduna göre Gazi Üniversitesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'nda analiz edilmiştir.

3.13.3. Plazma insülin, glukagon, fruktozamin, hepatik diaçilgliserol, açıl ve desaçil ghrelin düzeylerinin belirlenmesi

Hayvanlar kurban edilirken intrakardiyak yolla alınan kan örneklerinden elde edilen plazmalarda, insülin, glukagon, fruktozamin, hepatik deaçil gliserol, açıl ve desaçil ghrelin düzeyleri ELISA prensibi ile tayin edilmiştir. Sandwich enzim immunoassay prensibinde monoklonal antikorlarla kaplı reaksiyon plağına numunelerdeki ölçülecek madde bağlanır. Bu maddeye de enzim (HRP) işaretli ikinci bir monoklonal antikor bağlanır. Eklenen kromojenik solüsyon ile enzim etkileşimi sonucu oluşan rengin şiddeti ile ölçülmek istenen maddenin konsantrasyonu doğru orantılıdır [14]. Elisa testi Gazi Üniversitesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'nda uzman biyokimyacı tarafından yapılmıştır.

3.13.4. Oral glukoz tolerans testi (OGTT)

Oral glukoz tolerans testi 15. günün sabahı aç olan ratlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Ratlar 12 saat süreyle aç bırakılmış ve daha sonra oral gavaj yoluyla glukoz çözeltisi (2

g/kg) verilerek oral glukoz testi (OGTT) araştırmacı ve veteriner hekim tarafından uygulanmıştır. OGTT için kuyruk ucu delinip rattan 1 damla kan alınarak On Call Plus marka şeker striplerine damlatılmış ve ölçüm şeker aleti ile 0, 30, 60 ve 120. dakikalarda yapılmıştır. Ratlara kuyruk delinme işlemi yalnızca bir defa yapılmış olup diğerk ölçümler için kuyrukta sağıml yapılarak 1 damla kan çıkartılmıştır [2,14,84].

3.13.5. İnsülin tolerans testi (İTT)

İnsülin tolerans testi 16. günün sabahı gerçekleştirilmiştir. Ratlar 12 saat süreyle a bırakılmış ve ratlara intra peritonel yolla 0.75 U regular insülin araştırmacı ve veteriner hekim tarafından enjekte edilmiştir. İTT için kuyruk ucu delinip rattan 1 damla kan alınarak On Call Plus marka şeker strilerine damlatılmış ve ölçüm şeker aleti ile 0, 30, 60 ve 120. dakikalarda yapılmıştır. Ratlara kuyruk delinme işlemi yalnızca bir defa yapılmış olup diğerk ölçümler için kuyrukta sağıml yapılarak 1 damla kan çıkartılmıştır [2,14,84].

İnsülin direncinin hesaplanması

Ratlarda insülin direncini hesaplamak için HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance) formülü kullanılmıştır [130].

$$HOMA-IR = \frac{Alık\ serum\ inslin\ dzeyi\ (\mu U/mL) \times Alık\ serum\ glukoz\ dzeyi\ (mg/dL)}{405} \quad (3.1)$$

3.14. Karaciğerk Doku rneklerinin Hazırlanması ve Analizi

3.14.1. Işık Mikroskopik ve Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi

Dokular, uygulanan hormonların karaciğerk dokusunda histolojik düzeyde ne gibi değerişimlerin olaylandığını inceleyebilmek için karaciğerk dokusu hematoksilen eozin ile boyandı ve ışık mikroskopta Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Laboratuvarı'nda histolog tarafından incelenmiştir.

Tüm karaciğerk örnekleri ışık mikroskopik inceleme için ilk olarak % 10' luk formaldehit solüsyonunda tespit edilmiştir. Tespit işleminin ardından rutin ışık mikroskop takip işlemlerinden geçirilen dokular parafin bloklar haline getirilmiştir. Hazırlanan parafin

bloklardan elde edilen 4-5 mikron kalınlığındaki kesitlere tüm gruplar için Hematoksilen-Eozin boyaması uygulanmıştır. Kesitler Leica DCM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, LAS programında değerlendirilerek, fotoğraflanmıştır [131].

Deney gruplarından alınan kesitler 60°C etüvde 30 dakika bekletildikten sonra, 2x15 dakika ksilole alınarak parafinden arındırılmaları sağlanmıştır. Daha sonra lamalar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (%100, %96, %80, %70, %50) havada kurutulmuştur. 10 dakika akar suda yıkandıktan sonra, Harris Hematoksilen' de 10-15 dakika boyanmış ve 10 dakika akar suda yıkanmıştır. % 70 alkol + 2 – 3 damla glasiyel asedik asit karışımına batırılıp tekrar 10 dakika akar suda yıkanmıştır. Lamlar 5-10 dakika Eozin de bekletilip 10 dakika daha akar suda yıkandıktan sonra artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (%50, %70, %80, %96, %100), 2x15 dakika ksilole alındı ve entellan ile kapatılmıştır [132].

3.14.2. RNA izolasyonu ve real time QRT-PCR ile mRNA ekspresyon analizleri

Alınan karaciğer dokusunda RNA izolasyonları Gazi Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarında biyolog tarafından yapılmış ardından RNA'lar soğuk zincirle Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Biyokimya Laboratuvarında götürülmüştür. RNA'lardan PPAR- γ ve protein kinaz C analizleri PCR cihazında biyolog tarafından yapılmıştır.

Revers Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi yapılan transkripsiyon analizlerinde kullanılmış total RNA hazır ticari kit kullanarak hazırlanmıştır. Kontroller ve her bir gruptan inkübasyon sonu alınmış 1×10^7 sayıda hücre üzerine 1mL RNA izolasyon kiti konulmuş ve kılavuzunda belirtildiği gibi yaklaşık 2 saatlik süre sonunda total RNA hazırlanarak miktarı ve saflığı spektrofotometrede (OD 260nm ve 280nm'de) belirlenmiştir. RNA/DNA oranı 1.7 ve üzeri olanlar çalışmada kullanılmıştır. Ayrıca her bir izolattan 2.5 μ g alınarak %1'lik agarozda yürütülerek total RNA'nın varlığı UV lamba altında gözlemlenmiştir.

PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmak üzere her bir örneğe ait RNA'dan 1 μ g alınarak önce reverz transkriptaz (RT) ile komplementari DNA (cDNA) sentezi yapılmıştır. Daha sonra her bir örneğe ait cDNA'den 1 μ l alınarak üzerine SYBR green master mix ve bir çift primer (oligonükleotid) konulmuştur. Primerler her bir

transkripsiyon analizi için spesifik olup literatürde daha önce belirtilen baz dizgelerinin sentezi yaptırılarak elde edilmiş ve reaksiyonda yaklaşık 100 ng düzeyinde kullanılmıştır. Denatürasyon cdna primer yapışması ve zincir uzatma olmak üzere üç basamaktan oluşan amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile hesaplanmıştır.

Bu hesaplamada;

$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{beta actin}})_{\text{denek grubu}} - (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{beta actin}})_{\text{kontrol grubu}}$ formülü uygulanmış; hesaplanan değer her bir gen için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünde yerine konularak mRNA ekspresyon düzeyi misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlenmiştir. Endojen kontrol olarak beta aktin geni kullanılmış ve her bir örneğe ait beta aktin gen düzeyine göre diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulanmıştır. PCR çalışmalarında her gruptan 5 örnek rastgele seçilmiş ve bunların 3 tekrarı yapılarak ortalamaları alınmıştır.

Real Time PCR sisteminde sybr green boyası çift iplikcikli DNA parçasına bağlanarak elektriksel impuls ile birlikte floresan ışığa yapar ve bu ışığa sistemin lazer dedektörü tarafından alınarak, bilgisayar ortamında grafik formatına çevrilmektedir. Ölçülen floresans şiddeti PCR ürününün miktarı ile doğru orantılıdır. Karaciğer dokusunda PPAR- γ ve protein kinaz C, PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla uygulama gruplarındaki ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen artışlar misli değişiklikler olarak belirtilmiştir.

3.15. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS (IBM SPSS Statistics 24) adlı paket program kullanılarak yapılmıştır. Bulguların yorumlanmasında frekans tabloları ve tanımlayıcı istatistikler kullanılmıştır.

Normal dağılıma uygun olan ölçüm değerleri için parametrik yöntemler kullanılmıştır. Parametrik yöntemlere uygun şekilde, iki bağımsız grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında “Independent Sample-t” test (t-tablo değeri), bağımlı iki grubun ölçüm

değerleriyle karşılaştırılmasında “Paired Sample-t” test (t-tablo değeri), bağımsız üç veya daha fazla grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında “ANOVA” test (F-tablo değeri) yöntemi kullanılmıştır. Üç veya daha fazla grup için anlamlı fark çıkan değişkenlerin ikili karşılaştırmaları için varyansların homojenliği dikkate alınarak Tukey ikili karşılaştırmaları uygulanmıştır.

Normal dağılıma uygun olmayan ölçüm değerleri için parametrik olmayan yöntemler kullanılmıştır. Parametrik olmayan yöntemlere uygun şekilde, iki bağımsız grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında “Mann-Whitney U” test (Z-tablo değeri), bağımlı iki grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında “Wilcoxon” test (Z-tablo değeri), bağımsız üç veya daha fazla grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında “Kruskal-Wallis H” test (χ^2 -tablo değeri) yöntemi kullanılmıştır. Üç veya daha fazla grup için anlamlı fark çıkan değişkenlerin ikili karşılaştırmaları için Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır.

Normal dağılıma sahip olan iki nicel değişkenin ilişkilerinin incelenmesinde “Pearson”; normal dağılıma sahip olmayan verilerde ise “Spearman” korelasyon katsayısı kullanılmıştır.

RT PCR çalışmasına ait tüm veriler Wise Fixed Reallocation Randomization Test yöntemi kullanılarak REST 2009 V2.0.13 ve SPSS 19 paket programı kullanılarak hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmaya toplam 36 erkek Wistar rat dahil edilmiştir. Ratlar kontrol (n:6), açıl ghrelin (n:6), desaçil ghrelin (n:6), açıl/desaçil 1:1 (n:6), açıl/desaçil 3:1 (n:6) ve açıl/desaçil 1:3 (n:6) olmak üzere 6 gruba ayrılmış ve kontrol grubu dışındaki ratlara 14 gün boyunca farklı dozlarda hormon uygulaması yapılmıştır.

Ratların gruplara göre günlük tükettikleri ortalama yem (g), enerji (kkal) ve makro besin ögeleri (g) miktarı Çizelge 4.1’de verilmiştir. On dört gün boyunca rat başına tüketilen ortalama yem miktarı kontrol grubunda 19,86 g; açıl grubunda 20,16 g; desaçil grubunda 19,44 g; açıl/desaçil 1:1 grubunda 18,09 g; açıl/desaçil 3:1 grubunda 18,79 g ve açıl/desaçil 1:3 grubunda 19,56 g bulunmuştur. On dört gün boyunca rat başına alınan ortalama enerji miktarı kontrol grubunda 76,04 kkal; açıl grubunda 77,2 kkal; desaçil grubunda 74,41 kkal; açıl/desaçil 1:1 grubunda 69,27 kkal; açıl/desaçil 3:1 grubunda 71,92 kkal ve açıl/desaçil 1:3 grubunda 74,9 kkal’dır. En yüksek karbonhidrat, protein ve yağ tüketimi açıl ghrelin grubunda en düşük ise açıl/desaçil 1:1 grubunda gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Ratların gruplara göre günlük tükettikleri ortalama yem (g), enerji (kkal) ve makro besin ögeleri (g) miktarı

Değişken	Kontrol (n:6)	Açıl (n:6)	Desaçil (n:6)	Açıl/desaçil 1:1 (n:6)	Açıl/desaçil 3:1 (n:6)	Açıl/desaçil 1:3 (n:6)
Yem (g)	19,86	20,16	19,44	18,09	18,73	19,56
Enerji (kkal)	76,04	77,20	74,41	69,27	71,92	74,90
Karbonhidrat (g)	12,89	13,09	12,61	11,74	12,19	12,70
Protein (g)	4,67	4,74	4,57	4,25	4,41	4,60
Yağ (g)	0,65	0,66	0,63	0,59	0,61	0,64

Gruplara göre ratların vücut ağırlığı değişimi (g) Çizelge 4.2 ve Şekil 4.1’de verilmiştir. Gruplar arasında başlangıç vücut ağırlığı (g), son vücut ağırlığı (g) ve vücut ağırlığı farkı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.1).

Kontrol, açıl, desaçil, açıl/desaçil 1:1 ve açıl/desaçil 1:3 gruplarının kendi içlerinde başlangıç vücut ağırlığı (g) ile son vücut ağırlığı ve vücut ağırlığı farkı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Açıl/desaçil 3:1 grubunda başlangıç vücut

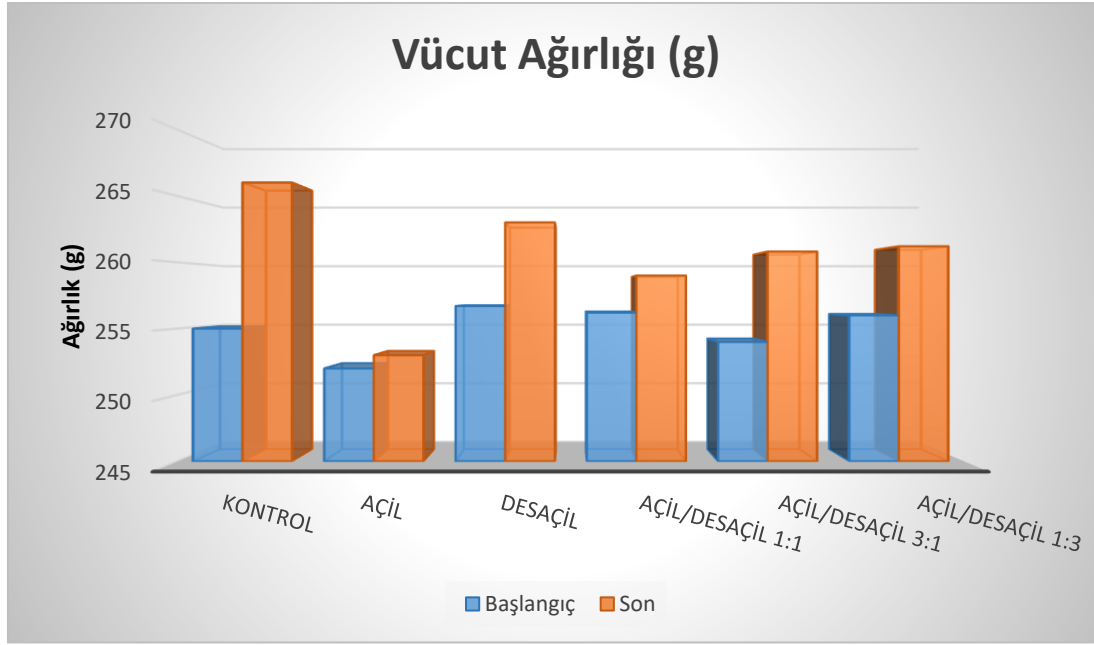
ağırlığı (g) ile son vücut ağırlığı arasındaki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($Z=-2,207$; $p=0,027$). Açıl/desaçıl 3:1 grubunda son vücut ağırlığı, başlangıç vücut ağırlığına (g) göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksektir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.1).

Çizelge 4.2. Gruplara göre ratların vücut ağırlığı değişimi (g)

Grup	Başlangıç $\bar{X} \pm SS$	Son $\bar{X} \pm SS$	Fark $\bar{X} \pm SS$	İstatistiksel analiz Olasılık (p1)
Kontrol (n:6)	255,00±24,84	265,83±12,94	10,83±13,03	$t=-2,037$ $p=0,097$
Açıl (n:6)	251,50±20,83	252,83±24,34	1,33±9,41	$t=-0,347$ $p=0,743$
Desaçıl (n:6)	256,67±19,69	263,00±23,77	6,33±6,98	$t=-2,224$ $p=0,077$
Açıl/desaçıl 1:1 (n:6)	256,17±14,73	259,50±12,85	3,33±5,43	$t=-1,504$ $p=0,193$
Açıl/desaçıl 3:1 (n:6)	253,50±14,90	260,83±16,90	7,33±4,84	$Z=-2,207$ $p=0,027$
Açıl/desaçıl 1:3 (n:6)	256,00±27,44	261,17±21,20	5,17±10,67	$Z=-0,736$ $p=0,462$
Analiz Olasılık	$F=0,053$ $p=0,998$	$\chi^2=2,737$ $p=0,740$	$F=0,826$ $p=0,541$	

p1: Başlangıç vücut ağırlığı (g) ile son vücut ağırlığı arasındaki değişimin olasılık değeri.

*Normal dağılıma sahip iki bağımlı grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında “Paired Sample-t” test (t-tablo değeri); üç veya daha fazla bağımsız grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında “ANOVA” test (F-tablo değeri) istatistikleri kullanılmıştır. Normal dağılıma sahip olmayan iki bağımlı grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında “Wilcoxon” test (Z-tablo değeri); üç veya daha fazla bağımsız grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında “Kruskal-Wallis H” test (χ^2 -tablo değeri) istatistikleri kullanılmıştır.



Şekil 4.1. Ratların gruplara göre vücut ağırlıkları (g)

Gruplara göre ratların karaciğer ağırlıkları Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Gruplar arasında karaciğer ağırlığı (g) açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Gruplara göre ratların karaciğer ağırlıkları (g)

Grup	$\bar{X} \pm SS$	İstatistiksel analiz Olasılık*
Kontrol (n:6)	9,48±0,81	
Açıl (n:6)	8,09±0,99	
Desaçıl (n:6)	8,79±0,91	$\chi^2=9,393$
Açıl/desaçıl 1:1 (n:6)	8,43±0,79	$p=0,094$
Açıl/desaçıl 3:1 (n:6)	9,26±1,17	
Açıl/desaçıl 1:3 (n:6)	9,24±0,79	

*Normal dağılıma sahip olmayan üç veya daha fazla bağımsız grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında "Kruskal-Wallis H" test (χ^2 -tablo değeri) istatistikleri kullanılmıştır.

Plazma açıl ve desaçıl ghrelin düzeyleri ile vücut ağırlığı farkı (g) ve karaciğer ağırlığı (g) arasındaki ilişki Çizelge 4.4'te verilmiştir. Karaciğer ağırlığı ile plazma açıl ghrelin ve açıl/desaçıl düzeyi arasında pozitif yönde, orta derecede ve istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Plazma açıl ve desaçıl ghrelin düzeyleri ile vücut ağırlığı farkı (g) ve karaciğer ağırlığı (g) arasındaki ilişki*

Değişkenler	Açıl ghrelin		Desaçıl ghrelin		Açıl/desaçıl	
	r	p	r	p	r	p
Vücut ağırlığı farkı	0,209	0,221	-0,067	0,697	0,170	0,321
Karaciğer ağırlığı	0,599	0,000	-0,190	0,268	0,509	0,002

*Normal dağılıma sahip olan iki nicel değişkenin ilişkilerinin incelenmesinde “Pearson”; normal dağılıma sahip olmayan verilerde ise “Spearman” korelasyon katsayısı kullanılmıştır.

Gruplara göre ratların açlık biyokimyasal bulgularının ortalama ve standart sapma değerleri Çizelge 4.5’te gösterilmiştir. Gruplar arasında ratların HOMA-IR düzeyi anlamlı farklılık göstermemiştir ($F=27,160$; $p=0,000$). Kontrol grubundakilerin HOMA-IR değerleri, açıl/desaçıl 1:1, açıl/desaçıl 3:1 ve açıl/desaçıl 1:3 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Gruplar arasında ratların insülin ($\mu\text{U/mL}$) düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($F=30,050$; $p=0,000$). Kontrol grubundakilerin insülin ($\mu\text{U/mL}$) değerleri, açıl/desaçıl 1:1, açıl/desaçıl 3:1 ve açıl/desaçıl 1:3 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Gruplar arasında ratların karaciğer diaçilgliserol (nmol/g) düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($F=2,737$; $p=0,037$). Kontrol grubundakilerin karaciğer diaçilgliserol değerleri, açıl/desaçıl 1:1 grubundakilere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük saptanmıştır (Çizelge 4.5).

Gruplar arasında ratların karaciğer glikojen (mg/g) düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($F=4,520$; $p=0,003$). Kontrol grubundakilerin karaciğer glikojen (mg/g) değerleri, açıl grubundakilere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Gruplar arasında ratların toplam kolesterol (mg/dL) düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($\chi^2=20,641$; $p=0,001$). Açıl grubundakilerin toplam kolesterol (mg/dL) değerleri, kontrol, desaçıl, açıl/desaçıl 1:1 ve açıl/desaçıl 3:1 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek saptanmıştır. Açıl/desaçıl 1:3

grubundakilerin toplam kolesterol (mg/dL) değerleri, kontrol, desaçil, açil/desaçil 1:1 ve açil/desaçil 3:1 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.2).

Gruplar arasında ratların HDL-K (mg/dL) ve LDL-K (mg/dL) düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Açil grubundakilerin HDL-K (mg/dL) değerleri, desaçil, açil/desaçil 1:1 ve açil/desaçil 3:1 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksektir. Açil/desaçil 3:1 grubunun LDL-K (mg/dL) değerleri, açil ve açil/desaçil 1:3 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşüktür (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.2).

Çizelge 4.5. Gruplara göre ratların açlık biyokimyasal bulgularının ortalama ve standart sapma değerleri

Biyokimyasal parametreler	Kontrol (n:6) ⁽¹⁾ $\bar{X} \pm SS$	Açıl (n:6) ⁽²⁾ $\bar{X} \pm SS$	Desaçıl (n:6) ⁽³⁾ $\bar{X} \pm SS$	Açıl/desaçıl 1:1 (n:6) ⁽⁴⁾ $\bar{X} \pm SS$	Açıl/desaçıl 3:1 (n:6) ⁽⁵⁾ $\bar{X} \pm SS$	Açıl/desaçıl 1:3 (n:6) ⁽⁶⁾ $\bar{X} \pm SS$	İstatistiksel analiz* Olasılık
Açıl ghrelin (pg/mL)	227,50±87,96	142,83±65,01	168,00±84,35	114,33±57,72	259,83±180,79	211,33±87,09	F=1,738 p=0,156
Desaçıl ghrelin (pg/mL)	466,00±67,90	435,00±177,54	490,00±103,83	547,33±145,58	372,17±108,15	460,33±121,13	$\chi^2=6,442$ p=0,266
Açıl/desaçıl	0,51±0,23	0,46±0,45	0,37±0,21	0,23±0,16	0,74±0,48	0,50±0,25	$\chi^2=8,240$ p=0,143
Glukoz (mg/dL)	119,80±7,10	124,81±14,55	118,05±9,73	122,56±18,04	114,04±14,18	112,03±7,29	$\chi^2=5,317$ p=0,378
HOMA-IR	2,08±0,27	2,03±0,53	0,98±0,63	0,81±0,16	0,40±0,21	0,26±0,11	F=27,160 p=0,000 [1-4,5,6]
İnsülin (µU/mL)	7,02±0,75	6,56±1,39	3,68±2,10	2,67±0,42	1,45±0,82	0,93±0,41	F=30,050 p=0,000 [1-4,5,6] [2-5,6]
Glukagon (ng/L)	83,45±15,86	83,92±10,41	83,45±9,32	76,53±15,12	65,03±9,54	67,13±7,34	F=2,490 p=0,084
Fruktozamin (mmol/L)	5,52±0,85	4,56±1,44	5,50±1,65	5,85±1,38	5,04±1,13	5,88±0,81	F=0,988 p=0,441
Karaciğer Diaçilgliserol (nmol/g)	23,00±7,01	30,00±12,46	30,50±8,19	40,83±7,41	33,33±9,56	34,50±6,16	F=2,737 p=0,037 [1-4]

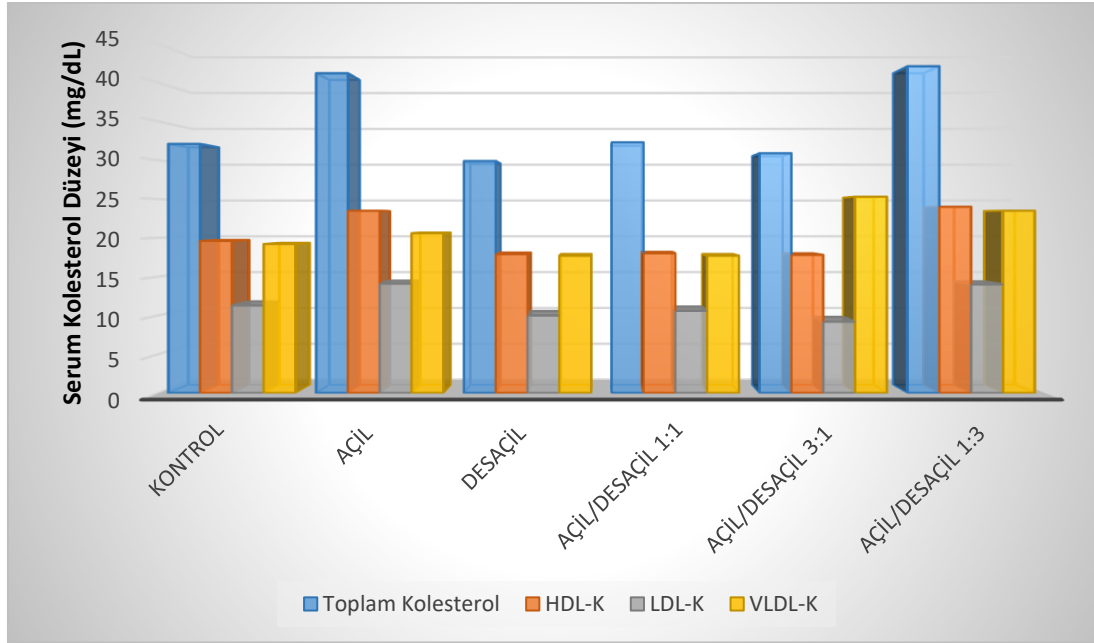
*Normal dağılıma sahip olan üç veya daha fazla bağımsız grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında “ANOVA” test (F-tablo değeri) istatistikleri kullanılmıştır. Normal dağılıma sahip olmayan üç veya daha fazla bağımsız grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında “Kruskal-Wallis H” test (χ^2 -tablo değeri) istatistikleri kullanılmıştır. Normal dağılıma olanlar arasında ikili karşılaştırmalarda Tukey, normal dağılım sahip olmayanlarda Bonferroni testi kullanılmıştır.

Çizelge 4.5. (devam) Gruplara göre ratların biyokimyasal bulgularının ortalama ve standart sapma değerleri

Grup Biyokimyasal parametreler	Kontrol (n:6) ⁽¹⁾ $\bar{X} \pm SS$	Açıl (n:6) ⁽²⁾ $\bar{X} \pm SS$	Desaçıl (n:6) ⁽³⁾ $\bar{X} \pm SS$	Açıl/Desaçıl 1:1 (n:6) ⁽⁴⁾ $\bar{X} \pm SS$	Açıl/Desaçıl 3:1 (n:6) ⁽⁵⁾ $\bar{X} \pm SS$	Açıl/Desaçıl 1:3 (n:6) ⁽⁶⁾ $\bar{X} \pm SS$	İstatistiksel analiz* Olasılık
AST (U/L)	145,33±20,72	147,00±13,25	161,17±64,62	167,00±44,71	142,17±36,59	118,00±27,06	$\chi^2=8,127$ p=0,149
Karaciğer glikojen (mg/g)	7,60±0,60	5,66±1,12	6,05±0,59	6,30±1,26	7,00±1,48	6,45±0,93	F=4,520 p=0,003 [1-2]
ALT (U/L)	48,33±5,89	46,50±7,71	45,33±5,68	46,50±10,48	48,17±7,25	41,67±4,76	F=0,689 p=0,636
Trigliserit (mg/dL)	95,87±49,43	103,07±28,30	88,48±12,63	88,57±26,30	126,30±26,10	117,20±28,73	F=1,560 p=0,201
Toplam kolesterol (mg/dL)	32,07±5,29	41,15±4,58	29,88±5,49	32,28±1,97	30,88±4,05	42,07±6,92	$\chi^2=20,641$ p=0,001 [2-1,3,4,5] [6-1,3,4,5]
HDL-K (mg/dL)	19,57±3,49	24,53±3,11	17,88±3,13	17,95±1,70	17,82±2,52	23,98±4,73	$\chi^2=18,801$ p=0,002 [2-3,4,5]
LDL-K (mg/dL)	11,32±2,63	14,08±2,62	10,02±2,52	10,60±2,06	9,18±1,17	14,03±2,43	F=4,892 p=0,002 [5-2,6]
VLDL-K (mg/dL)	19,17±9,87	20,60±5,66	17,68±2,51	17,72±5,26	25,25±5,24	23,45±5,76	F=1,561 p=0,201

*Normal dağılıma sahip olan üç veya daha fazla bağımsız grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında “ANOVA” test (F-tablo değeri) istatistikleri kullanılmıştır. Normal dağılıma sahip olmayan üç veya daha fazla bağımsız grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında “Kruskal-Wallis H” test (χ^2 -tablo değeri) istatistikleri kullanılmıştır. Normal dağılıma olanlar arasında ikili karşılaştırmalarda Tukey, normal dağılım sahip olmayanlarda Bonferroni testi kullanılmıştır.

AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, HDL-K: Yüksek yoğunluklu lipoprotein, LDL-K: Düşük yoğunluklu lipoprotein, VLDL-K: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein.



Şekil 4.2. Ratların gruplara göre toplam kolesterol, HDL-K, LDL-K ve VLDL-K değerleri

Plazma açıl ve desaçıl ghrelin düzeyleri ile biyokimyasal bulgular arasındaki ilişki Çizelge 4,6'da gösterilmiştir. Plazma açıl ghrelin ile desaçıl ghrelin düzeyleri arasında negatif yönde, zayıf derecede ve istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($r=-0,459$; $p=0,005$) (Çizelge 4.6).

Plazma açıl ghrelin ile açıl/desaçıl düzeyi arasında pozitif yönde, çok yüksek derecede ve istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmiştir ($r=0,925$; $p=0,000$). (Çizelge 4.6). Açıl/desaçıl düzeyi ile desaçıl ghrelin (pg/mL) arasında ise negatif yönde, orta derecede ve istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır ($r=-0,720$; $p=0,000$) (Çizelge 4.6).

Plazma açıl ghrelin ile glukagon (ng/L) ve AST (U/L) değerleri arasında negatif yönde, zayıf derecede ve istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Plazma açıl ghrelin ile fruktozamin (mmol/L), karaciğer glikojen (mg/g), trigliserit (mg/dL) ve VLDL-K (mg/dL) değerleri arasında pozitif yönde, zayıf derecede ve istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmiştir ($p<0,05$). Plazma açıl ghrelin (pg/mL) düzeyi arttıkça, fruktozamin (mmol/L), karaciğer glikojen (mg/g), trigliserit (mg/dL) ve VLDL-K (mg/dL) değerleri artmaktadır (Çizelge 4.6).

Açıl/desaçıl düzeyi ile glukagon (ng/L) ve AST (U/L) değerleri arasında negatif yönde, zayıf derecede ve istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmiştir ($p<0,05$). Açıl/desaçıl düzeyi düzeyi arttıkça, glukagon (ng/L) ve AST (U/L) değerleri azalmaktadır (Çizelge 4.6).

Açıl/desaçıl düzeyi (pg/mL) ile fruktozamin (mmol/L), karaciğer glikojen (mg/g), trigliserit (mg/dL) ve VLDL-K (mg/dL) değerleri arasında pozitif yönde, zayıf derecede ve istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmiştir ($p<0,05$). Açıl/desaçıl düzeyi arttıkça, fruktozamin (mmol/L), karaciğer glikojen (mg/g), trigliserit (mg/dL) ve VLDL-K (mg/dL) değerleri artmaktadır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Plazma açıl ve desaçıl ghrelin düzeyleri (pg/mL) ile biyokimyasal bulgular arasındaki ilişki (n=36)

Korelasyon*	Açıl ghrelin		Desaçıl ghrelin		Açıl/desaçıl	
	r	p	r	p	r	p
Açıl ghrelin (pg/mL)	1,000	-	-0,459	0,005	0,925	0,000
Desaçıl ghrelin (pg/mL)	-0,459	0,005	1,000	-	-0,720	0,000
Açıl/desaçıl	0,925	0,000	-0,720	0,000	1,000	-
Açlık Glukoz (mg/dL)	-0,014	0,936	0,029	0,867	-0,022	0,900
HOMA-IR	-0,182	0,287	0,189	0,271	-0,159	0,355
İnsülin (μU/mL)	-0,172	0,317	0,187	0,276	-0,152	0,376
Glukagon (ng/L)	-0,361	0,031	0,258	0,128	-0,402	0,015
Fruktozamin (mmol/L)	0,416	0,012	-0,206	0,228	0,393	0,018
Karaciğer Diaçilgliserol (nmol/g)	-0,133	0,438	0,218	0,202	-0,120	0,487
Karaciğer glikojen (mg/g)	0,372	0,026	-0,154	0,369	0,346	0,039
AST (U/L)	-0,447	0,006	0,073	0,672	-0,354	0,034
ALT (U/L)	-0,104	0,547	-0,009	0,960	-0,033	0,850
Trigliserit (mg/dL)	0,377	0,023	-0,177	0,302	0,375	0,024
Toplam kolesterol (mg/dL)	0,147	0,391	-0,174	0,309	0,171	0,317
HDL-K (mg/dL)	0,227	0,183	-0,114	0,507	0,199	0,245
LDL-K (mg/dL)	-0,107	0,534	-0,097	0,575	-0,063	0,717
VLDL –K (mg/dL)	0,377	0,023	-0,176	0,306	0,375	0,024

*Normal dağılıma sahip olan iki nicel değişkenin ilişkilerinin incelenmesinde “Pearson”; normal dağılıma sahip olmayan verilerde ise “Spearman” korelasyon katsayısı kullanılmıştır.

AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, HDL-K: Yüksek yoğunluklu lipoprotein, LDL-K: Düşük yoğunluklu lipoprotein, VLDL-K: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein.

Gruplara göre ratların OGTT ve İTT değerlerinin karşılaştırılması Çizelge 4.7’de gösterilmiştir. Gruplar arasında OGTT 60. dakikadaki glukoz düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($\chi^2=11,485$; $p=0,043$). Açıl grubunda olanların OGTT 60. dakikadaki glukoz düzeyi, kontrol ve desaçıl grubunda olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksektir (Çizelge 4.7).

Gruplar arasında İTT 30. ve 60. dakikadaki glukoz düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Açıl/desaçıl 3:1 grubunda olanların İTT 30. dakikadaki glukoz düzeyi, kontrol grubunda olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksektir. Desaçıl grubunda olanların İTT 60. dakikadaki glukoz düzeyi, kontrol grubunda olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksektir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Gruplara göre ratların OGTT ve İTT değerlerinin zamana göre ortalama ve standart sapma düzeyleri

Test	Kontrol (n:6) ⁽¹⁾ $\bar{X} \pm SS$	Açıl (n:6) ⁽²⁾ $\bar{X} \pm SS$	Desaçıl (n:6) ⁽³⁾ $\bar{X} \pm SS$	Açıl/desaçıl 1:1 (n:6) ⁽⁴⁾ $\bar{X} \pm SS$	Açıl/desaçıl 3:1 (n:6) ⁽⁵⁾ $\bar{X} \pm SS$	Açıl/desaçıl 1:3 (n:6) ⁽⁶⁾ $\bar{X} \pm SS$	İstatistiksel analiz* Olasılık
OGTT Glukoz							
0.dk	79,67±4,72	83,00±9,67	78,50±6,47	81,50±11,99	75,83±9,43	74,50±4,85	$\chi^2=5,317$ p=0,378
30.dk.	111,83±11,34	121,83±10,98	115,00±7,95	128,67±10,13	115,83±12,09	118,83±15,62	F=1,594 p=0,192
60.dk.	98,17±4,83	107,50±5,09	95,67±10,11	106,83±10,87	106,83±11,21	101,50±4,72	$\chi^2=11,485$ p=0,043 [2-1,3]
120.dk.	88,00±7,38	87,83±5,74	85,83±7,03	92,83±12,97	91,33±7,20	86,67±7,89	$\chi^2=2,789$ p=0,733
İTT Glukoz							
0. dk	83,17±6,65	78,83±10,72	77,50±4,42	79,67±17,20	80,50±8,29	87,17±10,32	$\chi^2=5,845$ p=0,322
30. dk	53,50±4,32	52,50±4,64	45,50±2,34	46,00±7,07	43,83±3,60	48,00±9,01	F=2,951 p=0,028 [1-5]
60. dk	66,00±5,62	61,17±5,23	53,17±1,94	59,50±9,42	58,67±7,20	63,67±5,61	F=3,028 p=0,025 [1-3]
120. dk	83,17±6,21	77,67±10,01	72,67±3,44	79,83±13,88	79,83±8,70	83,50±8,53	F=1,167 p=0,348

*Normal dağılıma sahip olan üç veya daha fazla bağımsız grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında “ANOVA” test (F-tablo değeri) istatistikleri kullanılmıştır. Normal dağılıma sahip olmayan üç veya daha fazla bağımsız grubun ölçüm değerleriyle karşılaştırılmasında “Kruskal-Wallis H” test (χ^2 -tablo değeri) istatistikleri kullanılmıştır. Normal dağılıma olanlar arasında ikili karşılaştırmalarda Tukey, normal dağılım sahip olmayanlarda Bonferroni testi kullanılmıştır. OGTT: Oral Glukoz Tolerans Testi, İTT: İnsülin Tolerans Testi.

Plazma açıl ve desaçıl ghrelin düzeyleri ile OGTT ve İTT arasındaki ilişki Çizelge 4.8’de verilmiştir. Plazma açıl ghrelin ile İTT 0. ve 60. dakikalardaki glukoz düzeyleri arasında pozitif yönde, zayıf derecede ve istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmiştir ($p<0,05$). İTT 0. ve 60. dakikadaki glukoz düzeyleri arttıkça, plazma açıl ghrelin (pg/mL) değerleri artmaktadır (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Plazma açıl ve desaçıl ghrelin düzeyleri ile OGTT ve İTT arasındaki ilişki (n=36)

Test	Açıl ghrelin		Desaçıl ghrelin		Açıl/desaçıl		
	r	p	r	p	r	p	
OGTT	0. dk	-0,014	0,936	0,029	0,867	-0,022	0,900
	30. dk	0,156	0,363	-0,095	0,582	0,136	0,430
	60. dk	-0,039	0,821	0,098	0,571	0,062	0,718
	120. dk	-0,019	0,910	-0,100	0,562	0,047	0,785
İTT	0. dk	0,334	0,047	-0,059	0,735	0,262	0,123
	30. dk	0,268	0,115	0,002	0,991	0,168	0,327
	60. dk	0,345	0,039	0,042	0,806	0,266	0,116
	120. dk	0,270	0,112	0,043	0,801	0,197	0,251

*Normal dağılıma sahip olan iki nicel değişkenin ilişkilerinin incelenmesinde “Pearson”; normal dağılıma sahip olmayan verilerde ise “Spearman” korelasyon katsayısı kullanılmıştır.

OGTT: Oral Glukoz Tolerans Testi, İTT: İnsülin Tolerans Testi.

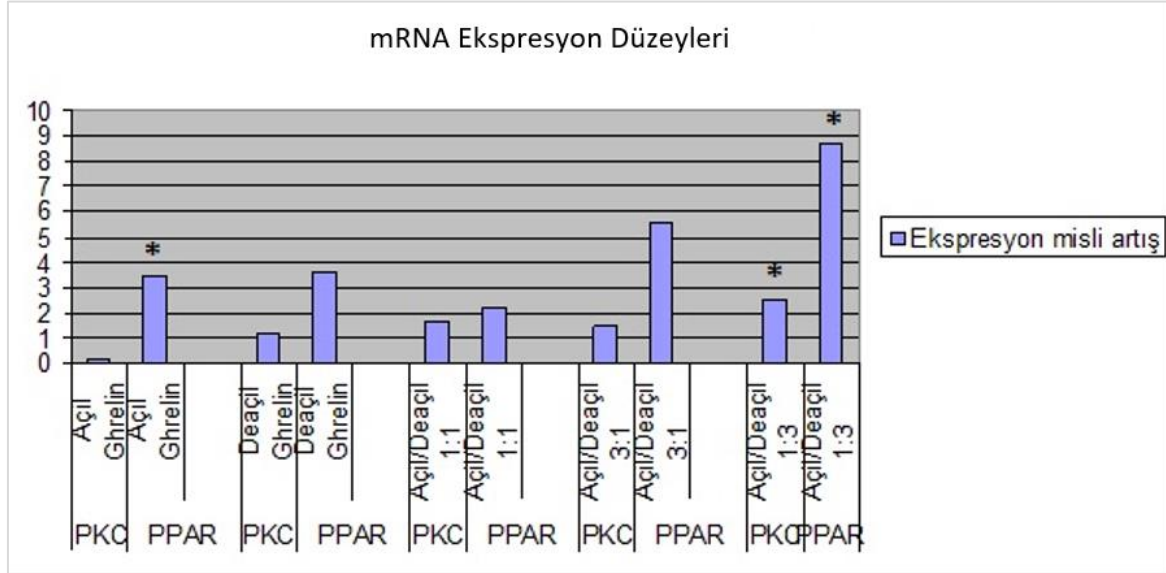
4.1. Real Time PCR Çalışması ile mRNA Ekspresyon Düzeylerine Ait Sonuçlar

Açıl ghrelin grubunda PPAR- γ geninin ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna nazaran 3,429 kat uyarıldığı ve bu up regülasyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Açıl ghrelin grubunun PKC geninin ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna göre ılımlı bir şekilde arttığı tespit edilmiş olsa da bu artışın istatistiki olarak anlamlılık teşkil etmeyecek boyutta olduğu gösterilmiştir (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.5).

Desaçıl ghrelin, açıl/desaçıl 1:1 ve açıl/desaçıl 3:1 gruplarının kontrol grubuna kıyasla hem PKC hem de PPAR- γ mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.5).

Tüm deney gruplarında kontrol grubuna kıyaslandığında hem PKC hem de PPAR- γ mRNA ekspresyon düzeylerindeki en fazla artışa açıl/desaçıl 1:3 grubunda rastlanılmıştır. Bu grubun karaciğer dokularında kontrol grubuna göre PKC mRNA ekspresyon

düzeylerinde 2,542 misli artış ve PPAR- γ mRNA ekspresyon düzeylerinde ise 8,738 misli bir artış saptanmıştır. Kontrol grubuna göre tespit edilen bu artışlar istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.5).



PKC: Protein Kinaz C, PPAR: Peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör.

Şekil 4.3. Ratların karaciğer PKC ve PPAR- γ mRNA ekspresyon düzeyleri

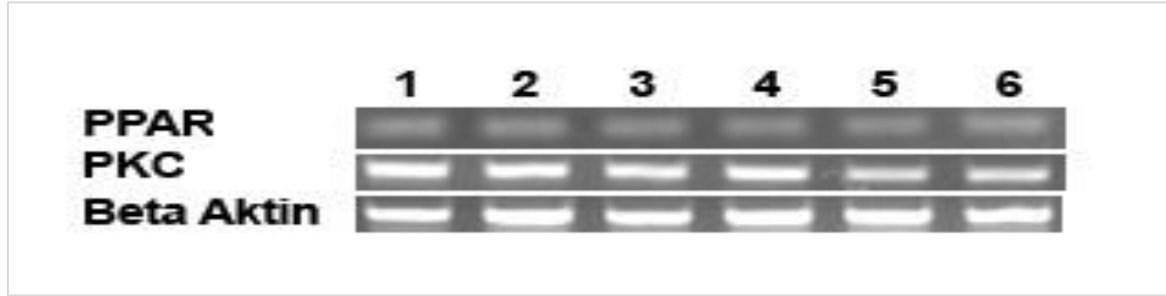
Çizelge 4.9. Kontrol grubuna kıyasla uygulama gruplarındaki ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen misli değişiklikler

Grup	Gen	Ekspresyon misli artış	p
Açıl Ghrelin	PKC	0,170	0,117
	PPAR	3,429	0,028*
Desaçıl Ghrelin	PKC	1,181	0,848
	PPAR	3,614	0,096
Açıl/desaçıl 1:1	PKC	1,601	0,622
	PPAR	2,226	0,282
Açıl/desaçıl 3:1	PKC	1,445	0,492
	PPAR	5,569	0,216
Açıl/desaçıl 1:3	PKC	2,542	0,034*
	PPAR	8,738	0,001*

PKC: Protein Kinaz C, PPAR: Peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör.

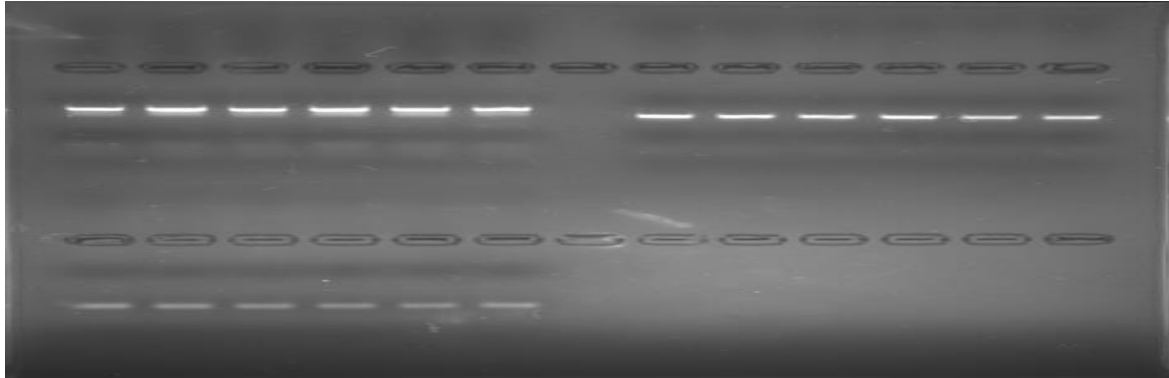
4.2. Agaroz Jel Elektroforezi Sonuçları

RT-PCR sonucunda oluşan PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve ortaya çıkan bant yoğunlukları ile RT-PCR sonucunda elde edilen Ct verilerinin uyumlu olduğu tespit edilmiştir (Resim 4.1 ve Resim 4.2).



PKC: Protein Kinaz C, PPAR: Peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptör.

Resim 4.1. Agaroz jel elektroforezi sonuçları (Image Analyze Programı ile netleştirilmiş görüntü, numaralar grupları ifade etmektedir)



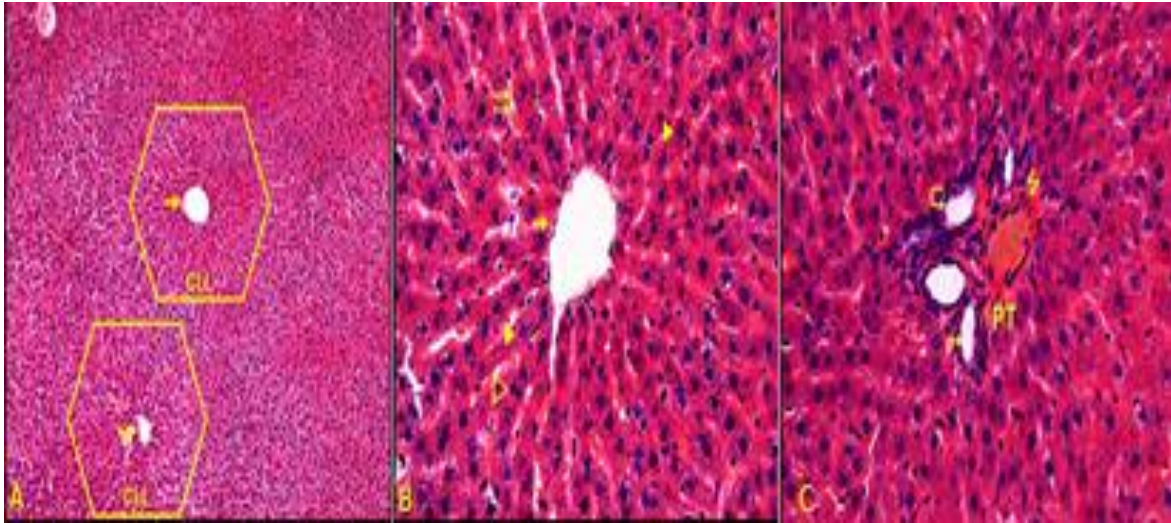
Resim 4.2. Agaroz jel elektroforezi sonuçları (Translüminatörden elde edilen orjinal jel görüntüsü, sol üst Beta Aktin (Referans Gen), sağ üst PKC ve sol alt PPAR-γ)

4.3. Histolojik Bulgular

Kontrol grubuna ait kesitler Resim 4.3 A-B-C'de verilmiştir. Kontrol grubuna ait karaciğer kesitlerinin küçük ve büyük büyültmeli incelemelerinde klasik karaciğer lobül yapısı merkezinde yerleşim gösteren vena centralis, vena centralis çevresinde ışınsal düzenlenim gösteren hepatositler ve hepatositler arasında bulunan sinüzoid yapıları ile normal görünümünde izlenmiştir. Vena centralis çevre endoteli ile normal görünümünde ayırt edilmiştir. Işınsal düzenlenim gösteren hepatositler klasik poligonal şekilleri, merkezi yerleşimli ve aktivite durumlarına göre mononükleer ya da polinükleer nükleusları, yine

aktivite durumlarına göre değişen asidofilik sitoplazmaları ve sitoplazmik glikojen birikimleri ile normal yapılarında ayırt edilmiştir. Hepatositler arasında yerleşim gösteren sinüzoidler de çevre endotel hücreleri ve lümendeki kan hücreleri ile normal seyrinde izlenmiştir (Resim 4.3. A-B).

Kontrol grubuna ait, klasik karaciğer lobüllerinin birleştiği bölgede bağ doku içerisinde yerleşim gösteren portal alanda (portal triad ya da portal üçgen) yapılan incelemede bağ doku yoğunluğu, vena porta dalı olan hepatik ven, arteria hepatica propria'nın dalı olan hepatik arter ve safra boşaltım kanalının uzantısı normal yapıları ile izlenmiştir. Hepatik ven ve arteri çevreleyen endotel hücreleri ile safra boşaltım kanalının uzantısını çevreleyen tek katlı kübik epitel hücreleri normal görünümünde ayırt edilmiştir (Resim 4.3 C).

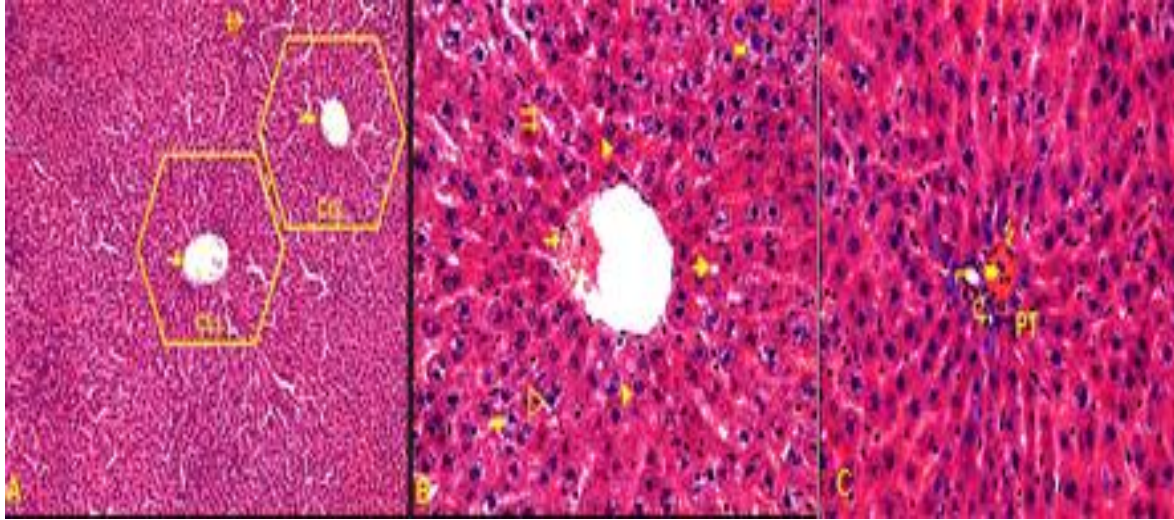


A ve B: CLL: klasik karaciğer lobülü, →: dilate vena centralis, ►: hepatosit, ▷: nucleus (Hematoksilen Eozin x100 [A], x400 [B]); C: PT: portal alan, ↗: dilate hepatik arter, ↘: safra kanalı, ➡: lipit damlacıkları görülüyor (Hematoksilen Eozin x400).

Resim 4.3. Kontrol grubuna ait kesitler

Desačil ghrelin grubuna ait kesitler Resim 4.4 A-B-C'de gösterilmiştir. Desačil ghrelin grubuna ait karaciğer kesitlerinde yapılan küçük ve büyük büyültmeli incelemelerde genel yapının kontrol grubu ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Buna karşılık kontrol grubundan farklı olarak bu grupta sinüzoidlerde yer yer dilatasyon ve bazı bölgelerinde konjesyon izlendi; bazı hepatositlerde ise vakuoler dejenerasyon ve hepatositlerin sitoplazmalarındaki lipit damlacıklarında artış gözlenmiştir (Resim 4.4.A-B).

Desaçıl ghrelin grubuna ait portal alanda yapılan incelemelerde hepatik ven, arter ve safra boşaltım kanalının genel yapısının kontrol grubu ile eşdeğer olduğu görülürken, kontrol grubundan farklı olarak hepatik arterde az oranda infiltrasyon ayırt edilmiştir (Resim 4.4 C).

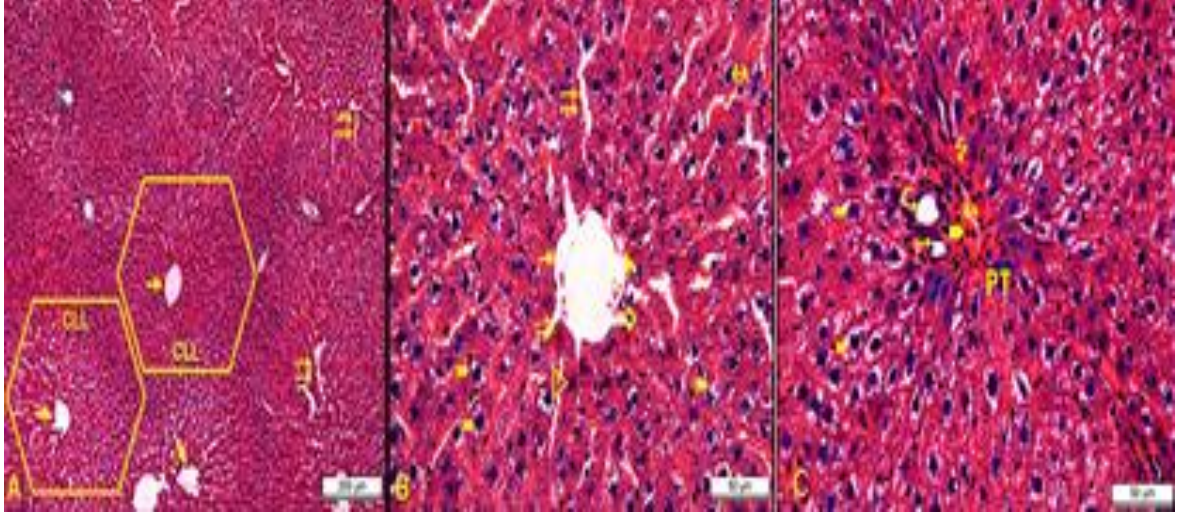


A ve B: CLL: klasik karaciğer lobülü, →: dilate vena centralis, ►: hepatosit, ▷: nucleus (Hematoksilen Eozin x100 [A], x400 [B]); C: PT: portal alan, ↗: dilate hepatik arter, ↘: safra kanalı, ➤: lipid damlacıkları görülüyor (Hematoksilen Eozin x400).

Resim 4.4. Desaçıl ghrelin grubuna ait kesitler

Açıl/desaçıl 1:3 grubuna ait kesitler Resim 4.5 A-B-C’de verilmiştir. Açıl/desaçıl 1:3 grubuna ait karaciğer kesitlerinde yapılan küçük ve büyük büyültmeli incelemelerde vena centralis ve sinüzoidlerde dilatasyon ve bazı dilate sinüzoidlerde konjesyon tespit edilmiştir. Klasik karaciğer lobülü merkezinde yerleşim gösteren bazı hepatositlerin normal morfolojide olmadıkları ve hücre sınırlarının net ayırt edilemeyerek, ışınal düzenlenimlerinden çıktıkları saptanmıştır. Bazı hepatositlerde sitoplazmik lipid damlacıkları bulunmuştur (Resim 4.5. A-B).

Açıl/desaçıl 1:3 grubuna ait portal alanında yapılan incelemelerde hepatik arterde dilatasyon, konjesyon ve infiltrasyon izlenirken, çevre hepatositlerde yoğun lipid damlacıkları saptanmış, hepatik ven ve safra boşaltım kanalı normal yapıları ile ayırt edilmiştir (Resim 4.5. C).

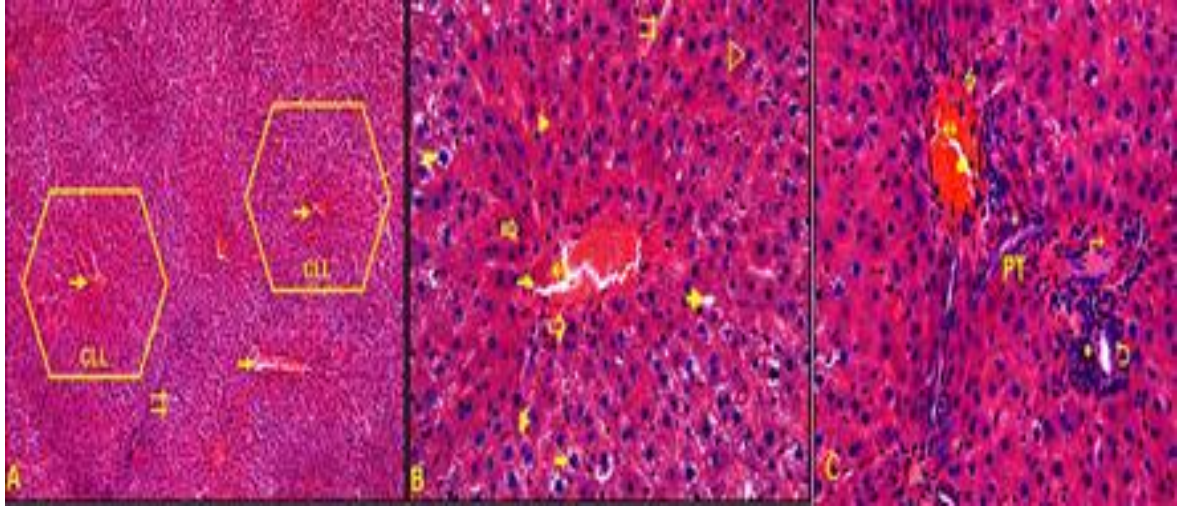


A ve B: CLL: klasik karaciğer lobülü, →: dilate vena centralis, ►: hepatosit, ▷: nucleus (Hematoksilen Eozin x100 [A], x400 [B]); C: PT: portal alan, ⇐: dilate hepatik arter, ⇐: safra kanalı, ➡: lipit damlacıkları görülüyor (Hematoksilen Eozin x400).

Resim 4.5. Açıl/desaçıl 1:3 grubuna ait kesitler

Açıl/desaçıl 1:1 grubuna ait kesitler Resim 4.6 A-B-C'de gösterilmiştir. Bu grupta yapılan büyük büyültmeli incelemelerde dilate vena centralis, konjesyon varlığı ve dilate sinüzod bulgularının yanısıra; klasik karaciğer lobülünün periferinde yerleşim gösteren hepatositlerde yoğun lipit damlacıkları gözlemlenmiştir. Lobül merkezinde ise yer yer piknotik nukleuslu hepatositlerin varlığı ayırt edilmiştir. Yine bu bölgedeki hepatositlerin normal poligonal şekillerini kaybederek hücre sınırları net olarak ayırt edilemeyen morfolojik bozukluklar sergilediği ve ışınal dizilimlerinde de bozulma olduğu saptanmıştır. Vakuoler dejenerasyon gösteren hepatositler de yer yer ayırt edilmiştir (Resim 4.6.B).

Açıl/desaçıl 1:1 grubuna ait portal alanda bağ doku miktarında artış, hepatik arterde yoğun dilatasyon ve konjesyon, az miktarda infiltrasyon ve safra boşaltım kanalı epitelinin normal tek katlı kübik epitel yapısı yerine bazı alanlarda çok katlı hal alarak epitelinde dejeneratif değişimin olaylandığı en dikkat çekici bulgular olarak nitelendirilmiştir (Resim 4.6. C).

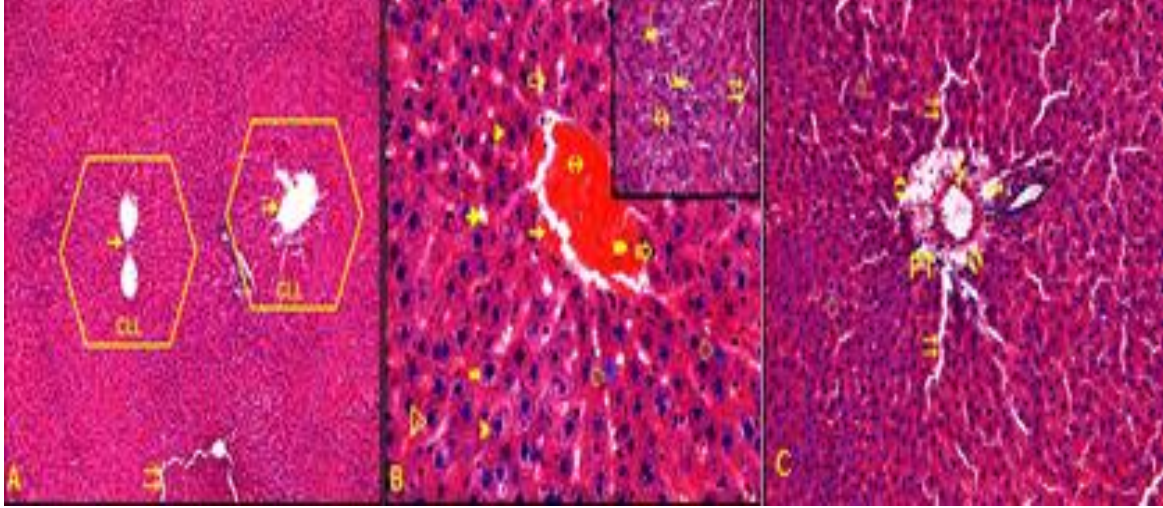


A ve B: CLL: klasik karaciğer lobülü, →: dilate vena centralis, ▶: hepatosit, ▷: nucleus (Hematoksilen Eozin x100 [A], x400 [B]); C: PT: portal alan, ↗: dilate hepatik arter, ↘: safra kanalı, ➤: lipit damlacıkları görülüyor (Hematoksilen Eozin x400).

Resim 4.6. Açıl/desaçıl 1:1 grubuna ait kesitler

Açıl/desaçıl 3:1 grubuna ait kesitler Resim 4.7 A-B-C’de verilmiştir. Açıl/desaçıl 3:1 grubuna ait karaciğer kesitlerinde yapılan incelemelerde açıl ghrelin uygulama miktarının artmasına paralel olarak, karaciğerde görülen dejenerasyonun arttığı saptanmıştır. Bu grupta vena centralis’de ve sinüzoidlerde dilatasyon ile yine vena centralis’de konjesyon ve infiltrasyon ayırt edilmiştir. Hepatositlerde vakuoler dejenerasyonun yaygınlaştığı ve yine lobül merkezindeki hepatositlerde morfolojik bozulma saptanmıştır. Bu gruptaki bazı hepatositlerde çok kuvvetli ve anormal görünümlü bazofili ayırt edilmiştir. Bu tip hepatositlerin görülme nedeninin, ileri immünohistokimyasal teknikler ile netleşebilecek olmakla birlikte, lipogenez, hücre proliferasyonu ya da lizozomal ribonükleaz kaynaklı olabileceği düşünülmüştür (Resim 4.7.A-B). Bu gruba ait klasik karaciğer lobüllerinde görülen en dikkat çekici bulgulardan biri de, steatoz ile uyumlu lipit damlacıklarının hepatositlerde son derece yaygınlaşmış olarak bulunmasıdır. Bu tip hepatositlerin yoğunlaştığı alanlarda ışınal düzenlenimin tamamen bozulduğu, yine bu alanlarda sinüzoidlerdeki dilatasyon ve konjesyonun da yoğunlaştığı izlenmiştir (Resim 7.B-Inset).

Açıl/desaçıl 3:1 grubuna ait portal alanda yapılan incelemelerde portal alan elemanlarının hepatositler ile bağlantılarının bozulduğu ve bu alanda hücreler arasında yoğun ayrılma görüldüğü saptanmıştır. Portal alan çevresi sinüzoidlerde yoğun dilatasyon ve bazofili gösteren hepatosit sayısının görece son derece arttığı bulunmuştur (Resim 4.7.C).



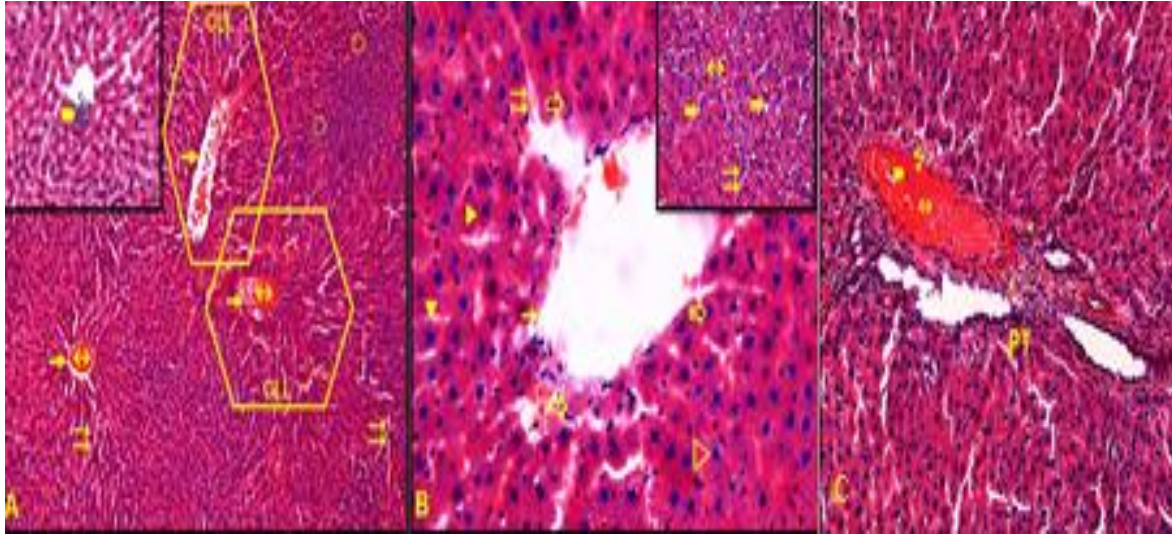
A ve B: CLL: klasik karaciğer lobülü, →: dilate vena centralis, ▶: hepatosit, ▷: nukleus (Hematoksilen Eozin x100 [A], x400 [B]); C: PT: portal alan, ↗: dilate hepatik arter, ↘: safra kanalı, ➤: lipid damlacıkları görülüyor (Hematoksilen Eozin x400).

Resim 4.7. Açıl/desaçıl 3:1 grubuna ait kesitler

Açıl ghrelin grubuna ait kesitler Resim 4.7 A-B-C’de gösterilmiştir. Açıl ghrelin grubunun histolojik olarak, diğer tüm gruplara kıyasla en yoğun dejenerasyon gösteren grup olduğu en önemli bulgu olarak nitelendirilmiştir. Bu grup karaciğer dokusu küçük büyültmeli incelemelerde vena centralis’in çoğu klasik karaciğer lobülünde dilate olduğu, hepatositlerin ve sinüzoidlerin düzenlenimlerini bozacak şekilde lobül içerisine uzanım göstererek genişlediği ve lobül yapılarının özellikle bu alanlarda bozulduğu bulunmuştur. Vena centralis’de görülen konjesyon ve infiltrasyonun yoğunlaştığı, sinüzoidal dilatasyon ile bu bölgelerdeki konjesyonun arttığı ayırt edilmiştir (Resim 4.8.A ve 4.8.A-Inset). Hepatositlerin ışınal düzenlenimlerini hemen her alanda kaybederek, hücre yığınları şeklinde organize oldukları izlenmiştir. Bu alanda hücreler arası bağlantılarda ayrılmalar olduğu ve yer yer piknotik nukleuslu hepatositlerin varlığı gözlenmiştir. Polinükleer hepatosit sayısının genel olarak açıl ghrelin uygulama miktarındaki artış ile doğru orantılı olarak azaldığı diğer gruplarda yapılan incelemelerde de ayırt edilmişti ancak tüm gruplara kıyasla en çok bu grupta görece azaldığı gözlemlenmiştir. Bunun nedeninin ise hepatositlerin metabolik aktivitelerinde bozulma olduğu düşünülmüştür. Lobülün merkezinde yer alan hepatositlerde hücre sınırları ayırt edilemeyecek şekilde morfolojik bozulma tespit edilmiştir (Resim 4.8B). Steatoz ile uyumlu lipid damlacıkları içeren hepatosit yoğunluğunun en fazla olduğu grup açıl ghrelin grubu olarak belirlenmiştir. Yine bu tip hepatositlerin yoğunlaştığı alanlarda hepatositlerin hücre yığınları şeklinde organize

oldukları ve sinüzoidal konjesyonun bu alanlarda görülme sıklığının yoğunlaştığı tespit edilmiştir (Resim 4.8.B-Inset).

Açıl ghrelin grubuna ait portal alanda yapılan incelemelerde de, tüm gruplar arasında bu bölgede görülen en yoğun dejenerasyonun bu grupta olduğu saptanmıştır. Fibrozis ile uyumlu bağ doku miktarında artışa ilaveten yoğun dilate haldeki hepatik arterde konjesyon izlenmiş, bu alanda hepatik ven ve safra boşaltım kanalının görülen yoğun dejenerasyon nedeni ile net ayrımının yapılamadığı görülmüştür. İnfiltrasyon, yine bu alanda da tespit edilmiştir (Resim 4.8.C).



A ve B: CLL: klasik karaciğer lobülü, →: dilate vena centralis, ►: hepatosit, ▷: nukleus (Hematoksilen Eozin x100 [A], x400 [B]); C: PT: portal alan, ↗: dilate hepatik arter, ↘: safra kanalı, ➤: lipid damlacıkları görülüyor (Hematoksilen Eozin x400).

Resim 4.8. Açıl ghrelin grubuna ait kesitler

Ratlara açıl ve desaçıl ghrelin hormon uygulamasından sonra en fazla karaciğer doku dejenerasyonunun açıl ghrelin grubunda, en az da kontrol grubunda olduğu gözlemlenmiştir. Açıl ghrelin miktarı arttıkça karaciğer dokusunda meydana gelen dejenerasyonun da arttığı saptanmıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Karaciğer dokusunda gözlenen dejenerasyon kriterleri

	Kontrol	Desaçıl	Açıl/desaçıl 1:3	Açıl/desaçıl 1:1	Açıl/desaçıl 3:1	Açıl
V. Centralis Dilatasyonu			+	++	+++	+++
Sinüzoid Dilatasyonu		+	++	++	+++	+++
Konjesyon		+	+	++	++	+++
Işınsal Düzenlenimde Bozulma				+	++	+++
Hepotosit Morfolojisinde Bozulma				+	++	+++
Polinükleer Hepatosit Sayısında Azalma			+	+	++	+++
Piknotik Nükleus			+	+	++	+++
Vakuoler Dejenerasyon			+	+	+	++
Steatoz ile Uyumlu Hepatositlerde Lipit Damlacıkları			+	+	++	+++
Hepatik Arter Dilatasyonu				+	+	+++
İnfiltrasyon			+	+	+	++

5. TARTIŞMA

Ghrelin, vücutta iştahın düzenlenmesinde rol oynayan hormonlar arasında yer almaktadır. Vücutta çoğunlukta açıl ve desaçıl olmak üzere iki formu bulunan bu hormonun bu iki farklı formu birbirlerine antagonist çalışmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda desaçıl ghrelinin vücut ağırlığını, iştahı ve insülin direncini azalttığı; açıl ghrelinin vücut ağırlığını, iştahı, karaciğer yağlanması ve insülin direncini artırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle; çalışma, ghrelin hormonunun açıl ve desaçıl formunun ratlarda karaciğer yağlanması ve biyokimyasal parametreler üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. Çalışmada ağırlığı 250 ± 30 g olan toplam 36 sağlıklı Wistar erkek rat kullanılmış ve kontrol grubu dışındaki ratlara 14 gün boyunca farklı dozlarda açıl ghrelin, ve/veya desaçıl ghrelin uygulaması yapılmıştır. On beşinci günde ratlara OGTT, 16. gün İTT yapılmış ve 17. gün sakrifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

5.1. Ratların Yem Tüketimleri ile Enerji Alımlarının Değerlendirilmesi

İştah hormonları obezitenin altında yatan temel faktörler arasında yer almaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, açıl ve desaçıl ghrelinin vücuttaki antagonist etkilerine odaklanmıştır [14, 71, 133]. Açıl ghrelin hormonunun beyinde GHSR'ye bağlanarak NPY/AgRP'lerin aktivasyonunu artırarak iştahı artırdığı bilinmekte iken desaçıl ghrelinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Inhoff ve arkadaşlarının [133] yapmış olduğu çalışmada, ratlar 4 farklı gruba ayrılmış ve her gruba plasebo, açıl ve/veya desaçıl ghrelin farklı dozlarda uygulanmıştır. Çalışmada açıl ghrelin grubunun besin tüketim miktarı plasebo gruptan yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Açıl ve desaçıl ghrelinin birlikte uygulandığı gruplarda desaçıl ghrelinin, açıl ghrelin hormonunun iştahı artırma isteğini baskıladığı için besin tüketim miktarı plasebo grubuyla benzer olarak bulunmuştur ($p > 0.05$). Chen ve arkadaşlarının [71] yapmış olduğu araştırmada ise birinci gruba plasebo, ikinci gruba açıl ghrelin ve üçüncü gruba desaçıl ghrelin intraperitonel olarak 150 dakika boyunca uygulanmıştır. Hormon uygulamasından 2 saat sonra açıl alan grubun besin tüketimi diğer gruplardan yüksek bulunurken en az besin tüketimi desaçıl alan grupta saptanmıştır ($p < 0.05$). Başka bir çalışmada ratlara 14 gün boyunca plasebo, açıl ghrelin ve desaçıl ghrelin uygulaması (200 ng/kg) yapılmış ve ratların besin tüketimleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır [14]. Yapılan bu araştırmada ratların günlük yem tüketimi kafes başına ($n:6$) tartıldığı ve rat başına tüketilen besin miktarı rat sayısına bölünerek

bulunduğu için istatistiki olarak gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığı saptanamamıştır (Çizelge 4.1). Ratların ortalama günlük yem gereksinimi 15-25 g arası olup [134] bu çalışmada bütün ratlar bu aralıkta yem tüketmiştir. İnhoff [133] (13 µg/kg açıl ghrelin, 64 µg/kg desaçil ghrelin ve 127 µg/kg desaçil ghrelin) ve Chen'in [71] (5 nmol açıl veya desaçil ghrelin) yapmış olduğu araştırmalarda yüksek düzeyde ghrelin uygulaması yapılmış ve kısa sürede yem tüketimleri değerlendirilmiştir. Bu araştırmada ise ratlara uzun süreli tolere edilebilen en yüksek doz olan 200 ng/kg ghrelin verilmiş ve 2 hafta gibi uzun bir sürede yem tüketim miktarları gözlenmiştir. Bu nedenle çalışmada diğer çalışmalara göre çok düşük doz (1 µg=1 000 nanogram ghrelin ve 1 nmol = 66 ng ghrelin) hormon uygulandığı için yem tüketim miktarı üzerinde herhangi bir değişiklik saptanamamıştır.

5.2. Ratların Vücut Ağırlığı ve Vücut Ağırlık Değişimlerinin Değerlendirilmesi

Ghrelin vücutta adipogenezde rol alan hormonlar arasında yer almaktadır [3]. Hipotalamustaki GHSR 1'i aktive eden açıl ghrelin, oreksijenik nöronları uyarak vücutta yağ depolanmasını artırmaktadır [3, 135]. Desaçil ghrelinin ise GHSR 1'den bağımsız olarak vücut yağında azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir [82]. Allas ve arkadaşlarının [11] yapmış olduğu insan çalışmasında, 14 gün boyunca desaçil ghrelin hormonu uygulanan grup ile plasebo alan grup arasında vücut ağırlığı farkı bulunmamıştır. Ratlara 7 gün boyunca açıl ghrelin, desaçil ghrelin veya plasebo verilen bir çalışmada, plasebo verilen gruba göre açıl ghrelin hormonu alan ratların vücut ağırlığında ve beyaz yağ dokusunda anlamlı bir fark olmadığı; desaçil ghrelin alanların ise vücut ağırlıklarında azalma olduğu; ancak yağ doku kütlelerinde herhangi bir değişiklik meydana gelmediği gösterilmiştir [82]. Yapılan bu çalışmada 14 günün sonunda kontrol, açıl, desaçil, açıl/desaçil 1:1 ve açıl/desaçil 1:3 grupların vücut ağırlığı arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Çizelge 4.2). Bunun nedeninin çalışmanın yalnızca 14 gün olması ve düşük doz hormon (200 ng/kg) uygulamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmada yalnızca açıl/desaçil 3:1 grubunun çalışma sonu ve başlangıç vücut ağırlığı arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (Çizelge 4.2). Bu durumun açıl/desaçil oranının 3:1 olmasının GHSR 1'i daha fazla uyarmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Daha önce açıl/desaçil 3:1 oranında hormon uygulaması yapılan bir çalışma bulunmadığı için bu verinin literatüre katkı sağladığı düşünülmektedir.

5.3. Ratların Biyokimyasal Parametrelerinin Değerlendirilmesi

5.3.1. Ratların plazma ghrelin değişiminin değerlendirilmesi

Proghrelin molekülünün üçüncü serinin hidroksil grubunun oktanoik asitle esterleşmesi sonucunda açıl ghrelin hormonu meydana getirmektedir [33]. Desaçıl ghrelinin ise açıl ghrelinin deasilasyonu sonucu meydana geldiği düşünülmektedir [7, 34]. Bu nedenle desaçıl ghrelinin açıl ghrelin'in bir öncülü ve/veya bir yıkım ürünü olduğu tahmin edilmektedir [7]. Ratlara yalnızca plasebo veya desaçıl ghrelin verilen bir çalışmada desaçıl ghrelin uygulamasının plazma açıl ghrelin seviyesinde artış sağlamadığı gözlemlenmiştir. Desaçıl ghrelin verilen grubun plazma desaçıl hormon seviyesi ise kontrol grubuna göre yaklaşık 3.47 kat daha yüksek, açıl/desaçıl ghrelin düzeyi ise daha düşük bulunmuştur [126]. Ratlara yalnızca açıl ghrelin uygulamasının, dolaşımdaki açıl ve desaçıl ghrelin seviyelerini önemli ölçüde artırdığı ve açıl:desaçıl ghrelin düzeyini 1:2.5'ten 1:1.2'ye düşürdüğü gösterilmiştir. Ancak yalnızca desaçıl ghrelin uygulaması yapılan ratların dolaşımdaki açıl ghrelin düzeyi değiştirmezken; açıl/desaçıl düzeyi 1:7'ye düşerken, açıl ile birlikte desaçıl ghrelin uygulandığında bu oranın 1:3'e kadar azalttığı saptanmıştır [14]. Yapılan bir insan çalışmasında benzer olarak açıl ghrelin uygulamasının vücutta açıl ve desaçıl ghrelin miktarını artırdığı ve açıl/desaçıl ghrelin düzeyini yükselttiği saptanmıştır [136]. Bu çalışmada ise ghrelin hormon uygulamasının ratların plazmalarında açıl ve desaçıl hormon seviyesinde artış sağlamadığı gösterilmiştir (Çizelge 4.5). Bunun nedeninin ghrelinin yarılanma ömrünün yalnızca 30 dakika olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu çalışmada en son hormon uygulaması 14. günün akşamında yapılmış, 15. günde OGTT ve 16. günde İTT yapıldığı için sakrifikasyon işlemi 17. günde gerçekleştirilmiştir. Bu sebeple en son hormon uygulamasından 60 saat sonra kan alımı gerçekleştiğinden hormonların vücutta metabolize olduğu düşünülmektedir.

5.3.2. Ratların serum glukoz ve insülin düzeylerinin değerlendirilmesi

Ghrelin reseptörleri (GHS-R1a), kas ve yağ dokusu dahil olmak üzere çeşitli dokularda bulunmakta ve glukoz metabolizması dahil vücutta bir çok metabolik olayda görev almaktadır [14, 33, 54, 126]. Ratlar üzerinde yapılan bir araştırmada ratlara açıl ghrelin, desaçıl ghrelin veya plasebo bir hafta uygulanmıştır. Bir hafta sonunda plazma açlık glukoz düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır [82]. Ratlara yalnızca

desaçil ghrelin veya plasebo verilen bir çalıřmada ise desaçil ghrelin alan grubun açlık kan řekeri plasebo alan gruptan anlamlı olarak daha dūřuk bulunmuřtur ($p<0.05$) [126]. Yapılan bařka bir arařtırmada serum açlık glukoz dūzeyi desaçil ghrelin alan grupta açil ghrelin alan gruptan anlamlı olarak daha dūřuk bulunduėu saptanmıřtır ($p<0.05$). En yūysek açlık kan glukoz dūzeyi açil ve desaçil ghrelin oranı 1:1 olan grupta saptanmıřtır [14]. Yapılan bu çalıřmada, gruplar arasında açlık kan glukoz dūzeyinde anlamlı bir farklılıėa rastlanmamıřtır (izelge 4.5). Bunun nedeninin yapılan çalıřmalarda verilen hormonların formları, dozları ve sūresi arasındaki metodolojik farklılıklardan kaynaklandığı dūřūnūlmektedir.

Ail ghrelin pankreas hūcresinde kalsiyumu uyararak cAMP dūzeyinde artıř meydana getirerek insūlin salınımını artırmaktadır. Desaçil ghrelinin ise insūlin duyarlılıėını bu mekanizmadan baėımsız olarak artırmakta ancak mekanizması tam olarak anlařılamamıřtır [53]. İnsanlar ūzerinde yapılan bir çalıřmada açlık insūlin dūzeyleri desaçil alan grupta plasebo grubundan daha dūřuk bulunmuřtur ($p<0.05$) [11]. Yapılan bir arařtırmada ratlara yalnızca desaçil ghrelin, plasebo, yūysek yaėlı diyet ve plasebo veya yūysek yaėlı diyet ve desaçil ghrelin verilmiřtir. Çalıřmada en dūřuk plazma insūlin ve HOMA-IR dūzeyi desaçil grubunda saptanmıřtır [126]. Yapılan insan ve hayvan çalıřmalarında plazma insūlin, glukoz ve HOMA-IR ile desaçil ghrelin arasında negatif yūnlū iliřki olduėu gūsterilmiřtir [2, 14, 81, 137]. Ayrıca desaçil ghrelinin, rat ve farelerde in vivo çalıřmaların yanı sıra hūcre kūltūrlerinde de hepatik glikoz çıkıřını ve insūlin salınımını azalttığı gūsterilmiřtir [2, 60, 137-140]. Yapılan bu çalıřmada desaçil ghrelin alan grubun plazma insūlin ve HOMA-IR dūzeyi, kontrol grubu ve açil ghrelin alan gruptan daha dūřuk bulunmuřtur. Dahası bu çalıřmada en yūysek insūlin dūzeyi kontrol ve açil ghrelin alan grupta gūzlemlenmiř ve desaçil ghrelinin varlığı ve farklı oranlarda kullanımı kan insūlin ve HOMA-IR dūzeyini dūřūrdūėu saptanmıřtır ($p<0.05$) (izelge 4.5). Bunun nedeninin açil ghrelinin pankreasta kalsiyum aracılığı ile insūlin salınımını artırmasından; desaçil ghrelinin ise azaltmasından kaynaklandığı dūřūnūlmektedir.

İnsanlar ūzerinde yapılan bir çalıřmada bireylere Mixed Meal Tolerans Testi (MTT) ūncesi plasebo veya ghrelin uygulaması yapılmıřtır. Ghrelin uygulaması yapılan bireylerin plazma glukoz ve insulin AUC (Eėri Altındaki Alan) dūzeyi plasebo alanlara gūre daha yūysek bulunmuřtur [141]. Yapılan benzer bir çalıřmada da açil ghrelin verilen saėlıklı bireylerin bazal insūlin ve glukoz dūzeyi plasebo alan grupla benzerken; MTT sūresince açil ghrelin

alan bireylerin plazma glukoz ve insülin düzeyleri yüksek bulunmuştur [142]. Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada ratlara OGTT ve İTT uygulanmıştır. Çalışmada OGTT ve İTT'nde plazma glukozun AUC alanı, açıl ghrelin alan ratlarda desaçıl alan ratlardan anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur. Bu durum OGTT ve İTT sürecinde desaçıl ghrelin alan ratların kan glukoz düzeylerinin daha düşük olduğunu göstermektedir [14]. Yapılan başka bir araştırmada ratlara 200 ng/kg desaçıl ghrelin veya plasebo uygulanmıştır ve 4 haftanın sonunda ratlara OGTT ve İTT yapılmıştır. Bu iki test boyunca plazma glukoz düzeyi ve AUC düzeyi desaçıl alan grupta plasebo grubuna göre anlamlı olarak daha az bulunmuştur [126]. Yapılan bu çalışmada OGTT'nin 60. dakikasında açıl ghrelin alan grubunun kan glukoz düzeyi, kontrol ve desaçıl alan gruplardan anlamlı olarak daha yüksek gözlemlenmiştir. Ayrıca İTT'nin 60. dakikasında da desaçıl alan grubun açlık kan glukoz düzeyi kontrol grubundan anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur (Çizelge 4.7). Bu durum desaçıl ghrelinin kan şekerini düşürmede, açıl ghreline antagonist olarak çalışabileceğini göstermektedir. En düşük glukoz düzeyi İTT'nin 30. dakikasında açıl/desaçıl 3:1 grubunda saptanmıştır. Açıl/desaçıl 3:1 oranının GHSR 1'i uyarması daha yüksek insulin salınımını neden olduğu için böyle bir sonucun ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu bilgi ile literatüre yeni bir katkı sağlanmakta ve açıl/desaçıl oranının kan glukoz düzeyini etkileyebileceğini göstermektedir.

Plazmadaki glikozillenmiş proteinleri gösteren fruktozamin 2-3 haftalık kan glukoz düzeyini yansıtmaktadır. Glikozile Hemoglobin A1c (HbA1c) ise 3 aylık kan glukoz düzeyini yansıtan glikozillenmiş proteindir. Diabetes Mellitus hastalarında fruktozamin ve HbA1c değeri yükselmektedir [143]. Yapılan bir çalışmada diyabet hastalarının serum HbA1c değerleri ve ghrelin arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır [144]. Ueno ve arkadaşlarının [145] yaptığı araştırmada ise diabetes mellitus hastalarının plazma toplam ghrelin düzeyi ile HbA1c arasında negative yönlü bir ilişki bulunmuştur. Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, ghrelin reseptörü çıkarılan ratların HbA1c değeri azalmıştır. Bu durum ghrelin varlığında HbA1c değerinin arttığını göstermektedir [146]. Literatür incelendiğinde; ghrelin uygulamasından sonra kan fruktozamin düzeyine bakılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, gruplar arasında fruktozamin düzeylerinde farklılık saptanmamasına rağmen (Çizelge 4.5), plazma açıl ghrelin ile fruktozamin (mmol/L), değerleri arasında pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). Bu çalışmada gruplar arasında ghrelin uygulaması ve fruktozamin arasında ilişki bulunamamasının nedeninin, hormon uygulamasının yalnızca 14 gün yapılmasından

kaynaklandığı ancak bu kısa dönemde bile açıl ghrelinin etki gösterebileceği görülmüştür. Bu nedenle gelecekte ghrelin uygulamasından sonra fruktozamin veya HbA1c değerine bakılacak daha fazla insan ve hayvan çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

5.3.3. Ratların lipit metabolizmasının değerlendirilmesi

Literatürde açıl ghrelinin serum ve yağ dokusunda trigliserit, kolesterol ve yağ asidi seviyeleri üzerindeki uyarıcı etkisi olduğu belirtilmiştir [147]. Rodriguez ve arkadaşlarının [81] çalışmasında trigliserit düzeyi ile açıl ghrelin arasında pozitif, desaçil ghrelin arasında ise negatif yönlü ilişkili bulunmuştur. Bu çalışmaya benzer olarak yapılan başka bir araştırmada, ratlar 4 farklı gruba ayrılmış ve 14 gün boyunca ratlara plasebo, açıl, desaçil ve açıl+desaçil ghrelin verilmiştir. Çalışma sonunda açıl ghrelin verilen grupta plazma TG düzeyi, desaçil ve açıl+desaçil grubundan daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Ayrıca en düşük karaciğer trigliserit düzeyi desaçil alan grupta gözlemlenmiştir ($p<0.05$) [14]. Ratlara 4 hafta boyunca 200 ng/kg desaçil ghrelin veya plasebo verilen bir çalışmada, desaçil ghrelin verilen grubun plazma trigliserit düzeyi, plasebo verilen gruptan anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur [126]. Davies ve arkadaşlarının [82] ratlara 1 hafta boyunca plasebo, açıl ghrelin veya desaçil ghrelin uyguladıkları çalışmada en düşük plazma trigliserit seviyesi desaçil ghrelin alan ratlarda, en yüksek ise plasebo alan grupta gözlemlenmiştir. Çalışmada açıl ghrelinin hücre içine lipit alımını sağlayan CD36 gen ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir [82]. Yapılan bu çalışmada plazma açıl ghrelin düzeyi ve açıl/desaçil düzeyi ile trigliserit arasında pozitif yönlü bir ilişki saptanmıştır (Çizelge 4.6). Bu çalışmada açıl ghrelin grubunda plazma lipitlerinin yüksek bulunmasının CD36 gen ekspresyonunu azaltmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Kolesterol homeostazının düzenlenmesinde rol oynayan karaciğer X reseptörü (LXR) aktivasyonu, kolesterolün safra asitlerine dönüşümünü ve safra içine atılmasını artırmaktadır [107]. Yapılan bir çalışmada açıl ghrelinin LXR'yi baskıladığı gösterilmiştir [82]. Dallak'ın [126], yapmış olduğu bir çalışmada 28 gün boyunca desaçil ghrelin uygulamasının serum kolesterol düzeyinde değişiklik meydana getirmediği gösterilmiştir. Ratlara 2 hafta boyunca açıl, desaçil veya plasebo verilen bir çalışmada, serum kolesterol düzeyinin açıl ghrelin alan grupta en yüksek, desaçil ghrelin alan grupta ise en düşük seviyede olduğu gözlemlenmiştir. Karaciğer kolesterol düzeyleri ise en düşük desaçil alan grupta gözlemlenmiştir [14]. Bir hafta boyunca açıl ve desaçil ghrelin hormonu veya

plasebo uygulaması yapılan ratlarda en düşük toplam plazma lipitleri desaçil ghrelin alan ratlarda, en yüksek ise plasebo alan grupta gözlemlenmiştir [82]. Jaskula ve arkadaşlarının [148] insanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada hiperkolesterolemi hastalarında sağlıklılara göre açıl ghrelin miktarlarının daha yüksek olduğu saptanmıştır. Yapılan bu çalışmada toplam kolesterol düzeyi açıl ve açıl/desaçil 1:3 gruplarında diğer gruplardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca en yüksek serum LDL-K düzeyi açıl ve açıl/desaçil 1:3 gruplarında gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Açıl ghrelin grubunda HDL-K düzeyi desaçil, açıl/desaçil 1:1 ve açıl/desaçil 3:1 gruplarından anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Çizelge 4.5). Ayrıca plazma açıl ghrelin ve açıl/desaçil ghrelin ile toplam kolesterol, VLDL-K ve HDL-K düzeyleri arasında pozitif yönlü anlamlı bir ilişki de saptanmıştır ($p<0.05$) (Çizelge 4.6). Bu çalışmada en yüksek kan kolesterol düzeyleri açıl ve açıl/desaçil 1:3 gruplarında gözlemlenmiştir. Bu gruplardaki artışın temel nedeninin PPAR- γ gen ekspresyonundaki artışa bağlı olduğu düşünülmektedir (Çizelge 4.9).

5.4. Ratların Karaciğer Glikojen ve DAG Miktarlarının Değerlendirilmesi

Açıl ghrelin GHSR-1a'yı uyardıktan sonra PPAR- γ gen ekspresyonunda artış sağlayarak diaçilgliserol açiltransferaz (DGAT) enzimini aktive etmektedir. Ardında diaçilgliserol, protein kinaz C (PKC) aktivasyonunu artırarak TG sentezini uyarmaktadır. Desaçil ghrelinin ise GHSR-1a'dan bağımsız olarak kendine özgü reseptör aracılığı ile TG sentezini azalttığı düşünülmektedir [14,15]. Yapılan çalışmalarda, DAG'ın, PKC membran translokasyonunun aktivasyonu ve JNK aktivasyonu artırarak 3 günlük yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda periferik insülin direnci (IR) yokluğunda bile hem hepatik steatozu hem de IR'yi indükleyebileceği gösterilmiştir [27, 149-150]. Ratlar üzerinde yapılan bir araştırmada karaciğer DAG düzeyi en yüksek açıl ghrelin verilen grupta (645 ± 32.1 ng/g) gözlemlenmiştir. Ayrıca karaciğer DAG düzeyi desaçil ghrelin verilen grupta, açıl/desaçil 1:1 grubundan anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur [14]. Yapılan bu çalışmada karaciğer DAG düzeyi açıl ve desaçil ghrelin verilen grupta benzerken; en yüksek DAG düzeyi açıl/desaçil ghrelin 1:1 verilen grupta saptanmıştır (Çizelge 4.5). Bunun nedeninin DAG'un vücutta hızlı metabolize olması (30 dakika) ve çalışmada ratların karaciğerlerinin alınmasının, hormon uygulamasından yaklaşık 60 saat sonra gerçekleşmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Literatürde açıl ghrelin uygulamasının karaciğerde gamma koaktivatör 1-alfa (PGC1 α) (glukoneogenez aktivatörü) protein ekspresyonunun artmasına ve glikojen sentez kinazın azalmasına neden olduğu gösterilmiştir [61, 49]. Yapılan bir araştırmada ghrelinin kısa dönemde glikojen sentezi üzerine etkisi araştırılmış ve hormon uygulamasından 1 saat sonra karaciğer glikojen miktarı analiz edilmiştir. Çalışmada açıl ghrelinin kısa dönemde glikojen sentezi üzerine etkisinin olmadığı gösterilmiştir [151]. Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada desaçıl ghrelin verilen ratların karaciğer glikojen düzeyleri açıl ghrelin verilen ratlardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur [14]. Yapılan bu çalışmada literatüre benzer olarak en düşük karaciğer glikojen düzeyi açıl ghrelin verilen grupta gözlemlenmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.5). Bunun açıl ghrelinin glikojen sentez kinazın aktivitesini azaltmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

5.5. Ratların Karaciğer PPAR- γ ve PKC Gen Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

Peroksizomlar, çoğu bitki ve hayvan hücresinde bulunan, yağ asitlerinin β -oksidasyonu ve kolesterol metabolizması dahil olmak üzere çeşitli metabolik fonksiyonları yerine getiren hücre altı organellerdir. PPAR- γ 'nın adiposit farklılaşmasını, yağ asidi depolamasını ve glukoz metabolizmasını düzenlediği bilinmektedir [18]. Yapılan bir çalışmada açıl ghrelin veya plasebo uygulaması yapılan ratlarda, açıl ghrelinin beyaz yağ dokusunda adipogenezi tetikleyen PPAR- γ ve C/EBP mRNA ekspresyonunda değişiklik meydana getirmediği ancak AP2 mRNA ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur [82]. Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada ise açıl ghrelinin adipoz dokuda lipogenezi uyaran SREBP 1c ekspresyonunu artırdığı saptanmıştır [58]. Li ve arkadaşlarının [18] ratlara 14 gün boyunca açıl ghrelin veya plasebo uyguladığı araştırma, açıl ghrelin uygulamasının mTOR ve PPAR- γ aktivesini artırarak hepatik steatozu indüklediği gösterilmiştir. Dallak'ın [14] yaptığı benzer bir çalışmada ratlara uygulanan açıl ghrelinin PPAR- α mRNA düzeyini azalttığı ve desaçıl ghrelinin ise artırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada kontrol grubu ile kıyaslandığında PPAR- γ mRNA ekspresyon düzeylerindeki istatistiksel bakımdan anlamlı düzeyde artışın, açıl ghrelin ve açıl/desaçıl 1:3 gruplarında olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Açıl ghrelin grubundaki ratların karaciğer dokularında kontrol grubuna kıyasla PPAR- γ mRNA ekspresyon düzeylerinde 3,429 kat, açıl/desaçıl 1:3 grubunda ise 8,788 kat artış saptanmıştır (Çizelge 4.9). Vücutta açıl ghrelin desaçıl ghrelin oranının değişmesi metabolik değişikliklere yol açmaktadır. Ancak açıl/desaçıl 1:3 oranının hangi metabolik yollarla bu artışa neden olduğu bilinmemektedir. Bu nedenle gelecekte açıl ve desaçıl

ghrelinin farklı oranlarının adipogenez üzerine etki mekanizmasını açıklayabilecek daha fazla insan ve hayvan çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Protein kinaz C, serin/treonin kinaz ailesi arasında yer almaktadır ve PKC izozimleri, lipide bağımlı kinazlardır. Protein kinaz C, DAG ve kalsiyum aracılığı ile aktive olmaktadır [14,15]. Yapılan bir çalışmada kontrol grubundaki ratlara kıyasla açıl ghrelin grubunun protein kinaz C membran fraksiyonunda 3-3.5 kat artış gözlemlenmiştir. Çalışmada desaçil ghrelin protein kinaz C üzerinde herhangi bir değişiklik meydana getirmemiştir [14]. Bu çalışmada açıl:desaçil 1:3 grubunun PKC mRNA ekspresyon düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla 8,738 misli bir artış meydana gelmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.9). Ayrıca DAG düzeyindeki değişmeden bağımsız olarak protein kinaz C düzeyinde artış meydana gelmiştir. Bunun nedeninin DAG'un vücutta hızlı metabolize olması ve çalışmada ratların karaciğerlerinin alınmasının, hormon uygulamasından yaklaşık 60 saat sonra gerçekleşmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Vücuttaki açıl ghrelinin, desaçil ghreline oranının değişmesi vücutta metabolik olarak değişikliğe yol açmaktadır. Ancak henüz hangi oranın hangi mekanizmalar üzerinde etkili olduğu bilinmemektedir. Bu nedenle, çalışmada en yüksek PKC artışının açıl/desaçil 1:3 grubunda gözlenmesinin nedeninin DAG üretimini sağlayan en iyi oranın 1:3 olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışmada en yüksek PKC artışı açıl/desaçil 1:3 grubunda gözlenmesi daha önce açıl/desaçil 1:3 oranında hormon uygulaması yapılan bir çalışma bulunmadığı için literatüre yeni bir bilgi sağlamaktadır.

5.6. Ratların Histolojik Olarak Hepatik Steatoz Durumunun Değerlendirilmesi

Literatürde açıl ghrelinin adipogenezini uyardığı, desaçil ghrelinin ise azalttığı bildirilmiştir [18, 85]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise açıl ve desaçil ghrelinin birbirine oranlarının adipogenez üzerinde etkili olduğu ve bu oranın değişmesiyle adipogenezin artıp azalabileceğini vurgulamaktadır [14, 83]. Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, açıl ghrelin uygulanan ratların karaciğerleri, küçük, orta ve büyük yağ vakuollerinin (yani hepatik steatoz) birikimi ile anormal şekilde bozulmuş hepatositler göstermiştir. Bununla birlikte, desaçil ghrelinin tek başına veya açıl ghrelin ile kombinasyon halinde uygulanması, kontrol rat karaciğerlerinde görülen normal hepatosit yapısını değiştirmemiştir [14]. Bu çalışmada, açıl ghrelin uygulamasının karaciğerde steatoz ile uyumlu yapısal dejenerasyonlara neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca desaçil ghrelinin,

açıl ghrelin'in karaciğer dokusunda gösterdiği dejenerasyonlar üzerinde antagonist olarak davrandığı ve desaçıl ghrelin uygulama miktarındaki azalma ile ters orantılı olacak şekilde karaciğer dejenerasyonunun gruplar arasında kademeli olarak arttığı tespit edilmiştir. Steatoz ile uyumlu lipit damlacıkları içeren hepatosit yoğunluğunun en fazla açıl ghrelin grubunda en az ise desaçıl ghrelin grubunda olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca kombine tedavilerde açıl ghrelin miktarı arttıkça lipit damlacıklarının da arttığı saptanmıştır (Resim 4.3-8). Bunun nedinin, açıl ghrelinin yağ asit sentezini uyaran genlerin ekspresyonunu artırmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu çalışmanın en güçlü yanı ratlara açıl ve desaçıl hormon uygulamasının belirli oranlarda (3:1, 1:1, 1:3) verilmiş olmasıdır. Son yıllarda, açıl ve desaçıl hormonun birbirine oranının vücuttaki metabolik olayları değiştirdiği vurgulanmaktadır. Önceki araştırmalarda genellikle açıl ghrelin veya desaçıl ghrelin hormonu uygulaması yapılarak, bu iki hormonun metabolik etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada, ilk defa ratlara açıl ve desaçıl ghrelin 3:1 ve 1:3 oranları uygulanarak karaciğer yağlanması, insulin direnci ve bazı kimyasal parametreler üzerine etkileri araştırılarak literatüre yeni bilgiler kazandırılmıştır. Ayrıca literatür incelendiğinde; ghrelin uygulamasından sonra kan fruktozamin düzeyinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Araştırma süresince 36 ratın sağ olarak çalışmayı tamamlaması araştırmanın bir diğer güçlü yanıdır.

Bu çalışmanın en önemli kısıtlılığı kısa dönemde (14 gün) yapılmış olmasıdır. Çalışmanın kısa sürede tamamlanmasının nedeni, 200 ng/kg ghrelinin en uzun 14 gün boyunca uygulanabilmesinden kaynaklanmaktadır. Bu sürenin artırılması ile glukoz gibi bazı serum parametrelerinde literatüre benzer verilere ulaşılabileceği düşünülmektedir. Ghrelinin yarılanma ömrünün yalnızca 30 dakika olmasından dolayı, çalışmada OGTT ve İTT nedeniyle sakrifikasyonun en son hormon uygulamasından yaklaşık 60 saat sonra gerçekleşmesinde bağlı olarak yapılan hormon uygulamasının plazmada açıl ve desaçıl ghrelin düzeyinde meydana getirdiği değişikliğe ulaşılamaması çalışmanın bir diğer sınırlılığıdır. Bu çalışmada günlük besin tüketim miktarı kafes başına (n:6) tartıldığı için rat başına tüketilen besin miktarı, toplam besin tüketiminin rat sayısına bölünerek bulunması ile hesaplanmıştır. Oyasa ratların en fazla ikiye bölünebilir biçimde kafeste barınmaları ile daha net bir yem tüketim miktarı saptanabilirdi. Ayrıca çalışmada ratların günlük su tüketimine bakılmamış olması da bir diğer sınırlılığıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ghrelinin açıl ve desaçıl formunun karaciğer yağlanması ve bazı serum parametreleri üzerine etkisini göstermek adına önemli veriler sunmaktadır. Çalışma açıl ve desaçıl ghrelinin 3:1 ve 1:3 oranında verildiği ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Araştırmada bazı biyokimyasal parametreler üzerinde açıl ve desaçıl ghrelinin birbirine antagonist olarak çalıştığı görülmüştür. Özellikle en yüksek trigliserit, toplam kolesterol, HDL-K ve VLDL-K düzeyinin ve en fazla PKC ve PPAR- γ mRNA ekspresyonlarının açıl/desaçıl 1:3 olan grupta gözlemlenmesi literatüre kazandırılan önemli bir veridir. Ayrıca insülin ve HOMA-IR düzeyi de açıl ve desaçıl ghrelinin birlikte verildiği gruplarda daha düşük bulunmuştur. Bu durum açıl ve desaçıl ghrelin oranının vücutta farklı metabolik etkilere sahip olabileceğini göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada plazma açıl ghrelin ve fruktozamin arasında pozitif yönlü bir ilişki saptanmıştır. Bu durum açıl ve desaçıl ghrelinin diyabet üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir. Karaciğerde histolojik analizler sonucunda açıl ghrelinin hepatik steatozu artırdığı, desaçıl ghrelinin ise bu etkiyi azaltarak açıl ghreline zıt yönde çalıştığı saptanmıştır.

Sonuçlar aşağıda verilmiştir;

1. Açıl/desaçıl 3:1 grubunda son vücut ağırlığı, başlangıç vücut ağırlığına (g) göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).
2. Plazma açıl ghrelin (pg/mL) ve açıl/desaçıl düzeyi ile son vücut ağırlığı ile arasında pozitif yönde bir ilişki tespit edilmiştir ($p<0.05$).
3. Kontrol grubundaki ratlarının insülin ve HOMA-IR düzeyleri, açıl/desaçıl 1:1, açıl/desaçıl 3:1 ve açıl/desaçıl 1:3 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).
4. Desaçıl ghrelin grubunun insülin ve HOMA-IR düzeyinin açıl ghrelin grubundan daha düşük olduğu saptanmıştır ($p>0.05$).
5. Plazma açıl ghrelin ile fruktozamin (mmol/L) düzeyi arasında pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmiştir ($p<0.05$).
6. Açıl/desaçıl 1:1 grubundaki ratların karaciğer DAG (nmol/g) düzeylerinin, kontrol grubundakilere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).

7. Açıl grubundaki ratların karaciğer glikojen (mg/g) düzeyleri, kontrol grubundakilerden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük bulunmuştur ($p<0.05$).
8. Açıl grubundakilerin toplam kolesterol düzeyleri, kontrol, desaçıl, açıl/desaçıl 1:1 ve açıl/desaçıl 3:1 gruplarına göre daha yüksek saptanmıştır ($p<0.05$).
9. Açıl/desaçıl 1:3 grubundakilerin toplam kolesterol düzeyleri, kontrol, desaçıl, açıl/desaçıl 1:1 ve açıl/desaçıl 3:1 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksektir ($p<0.05$).
10. Açıl grubundakilerin HDL-K düzeyleri, desaçıl, açıl/desaçıl 1:1 ve açıl/desaçıl 3:1 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksektir ($p<0.05$).
11. Açıl ve açıl/desaçıl 1:3 gruplarının LDL-K düzeyleri açıl/desaçıl 3:1 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).
12. Plazma açıl ghrelin ve açıl/desaçıl düzeyi arasında pozitif yönde; desaçıl ghrelin arasında ise negatif yönde bir ilişki tespit edilmiştir ($p<0.05$).
13. Desaçıl ghrelin ve açıl/desaçıl düzeyi arasında negatif yönde, orta derecede ve istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmiştir ($p<0.05$).
14. Plazma açıl ghrelin ve açıl/desaçıl ghrelin düzeyi ile fruktozamin, karaciğer glikojen, trigliserit ve VLDL-K düzeyleri arasında pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmiştir ($p<0,05$).
15. Açıl ghrelin grubunda olanların OGTT 60 glukoz düzeyi, kontrol ve desaçıl ghrelin grubunda olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksektir ($p<0,05$).
16. Kontrol grubunun İTT 60 glukoz düzeyi, desaçıl ghrelin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek saptanmıştır ($p<0,05$).
17. Plazma açıl ghrelin ile İTT 0. ve 60. dakikadaki glukoz düzeyleri arasında pozitif yönde, istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p<0,05$).
18. Açıl ghrelin verilen ratların PPAR- γ gen ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna kıyasla 3,429 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır.
19. Açıl ghrelin ve açıl/desaçıl 1:3 grubunun karaciğer dokularında PKC mRNA ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla 2,542 misli artış ve PPAR- γ mRNA ekspresyon düzeylerinde ise 8,738 misli bir artış tespit edilmiştir.
20. Karaciğerde steatoz ile uyumlu yapısal dejenerasyon en fazla açıl ghrelin grubunda gözlemlenmiştir.
21. Histolojik olarak; açıl ve desaçıl ghrelin uygulamalarının karaciğer dokusu üzerinde antagonist olarak çalıştığı ve steatoz ile uyumlu en yoğun dejeneratif bulguların açıl ghrelin grubunda görüldüğü saptanmıştır.

22. Histolojik olarak; desaçil ghrelin uygulamasının açil ghrelinin karaciğer dokusunda gösterdiği dejenerasyonlar üzerinde antagonist olarak davrandığı bulunmuştur.
23. Histolojik olarak; açil ve desaçil ghrelinin birlikte uygulandığı gruplarda karaciğerde lipit damlacıkları açil ghrelinle doğru orantılı olarak artış göstermiştir.

Bu çalışma non-alkolik karaciğer yağlanması altında yatan patogenezi açıklamaya yardımcı olacak veriler içermektedir. Ayrıca desaçil ghrelinin kan glukoz düzeyini regüle etmede daha etkili olduğu gösterilmiştir. İleride bu konuyu çalışacak olan araştırmacılara açil ve desaçil ghrelin hormonun bu çalışmada denen oranlardan farklı oranlarda ve yüksek dozda uzun süreli uygulandığı insan ve hayvan araştırmaları yapmaları önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Arusoğlu, G., ve Köksal, G. (2014). İştah kontrolüne genel bakış: iştah kontrolüne ilişkin teoriler. *Türkiye Klinikleri Pediatrik Bilimler-Özel Konular*, 10(3), 1-4.
2. Barazzoni, R., Zanetti, M., Ferreira, C., Vinci, P., Pirulli, A., Mucci, M., and Guarnieri, G. (2007). Relationships between desacylated and acylated ghrelin and insulin sensitivity in the metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(10), 3935-3940.
3. Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402(6762), 656-660.
4. Yoshimoto, A., Mori, K., Sugawara, A., Mukoyama, M., Yahata, K., Suganami, T., and Nakao, K. (2002). Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(11), 2748-2752.
5. Pacifico, L., Poggiogalle, E., Costantino, F., Anania, C., Ferraro, F., Chiarelli, F., and Chiesa, C. (2009). Acylated and nonacylated ghrelin levels and their associations with insulin resistance in obese and normal weight children with metabolic syndrome. *European Journal of Endocrinology*, 161(6), 861-870.
6. Hosoda, H., Kojima, M., and Kangawa, K. (2006). Biological, physiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Journal of Pharmacological Sciences*, 100(5), 398-410.
7. Kojima, M., and Kangawa, K. (2005). Ghrelin: structure and function. *Physiological Reviews*, 85(2), 495-522.
8. Schmidt, A., Fabrizii, V., Maier, C., Riedl, M., Schmidt, A., Kotzmann, H., and Luger, A. (2004). Normal regulation of elevated plasma ghrelin concentrations in dialysis patients. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 116(7-8), 235-239.
9. Delhanty, P. J., Neggers, S. J., and van der Lely, A. J. (2012). Mechanisms in endocrinology: Ghrelin: the differences between acyl-and des-acyl ghrelin. *European Journal of Endocrinology*, 167(5), 601-608.
10. Akamizu, T., Iwakura, H., Ariyasu, H., Hosoda, H., Murayama, T., Yokode, M., and Nakai, Y. (2008). Repeated administration of ghrelin to patients with functional dyspepsia: its effects on food intake and appetite. *European Journal of Endocrinology*, 158(4), 491-498.
11. Allas, S., Caixàs, A., Poitou, C., Coupaye, M., Thuilleaux, D., Lorenzini, F., and Potvin, D. (2018). AZP-531, an unacylated ghrelin analog, improves food-related behavior in patients with Prader-Willi syndrome: A randomized placebo-controlled trial. *PloS One*, 13(1), e0190849.

12. Harada, T., Nakahara, T., Yasuhara, D., Kojima, S., Sagiya, K. I., Amitani, H., and Inui, A. (2008). Obestatin, acyl ghrelin, and des-acyl ghrelin responses to an oral glucose tolerance test in the restricting type of anorexia nervosa. *Biological Psychiatry*, 63(2), 245-247.
13. Muscaritoli, M., Molino, A., Chiappini, M. G., Laviano, A., Ammann, T., Spinsanti, P., and Fanelli, F. R. (2007). Anorexia in hemodialysis patients: the possible role of des-acyl ghrelin. *American Journal of Nephrology*, 27(4), 360-365.
14. Dallak, M. A. (2018). Acylated ghrelin induces but deacylated ghrelin prevents hepatic steatosis and insulin resistance in lean rats: effects on DAG/PKC/JNK pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105, 299-311.
15. Harvey, R. A. and Ferrier D. R. (2015). *Lippincott görsel anlatımlı çalışma kitabı biyokimya*. Çev. E. Ulukaya, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi.
16. Gualillo, O., Lago, F., and Dieguez, C. (2008). Introducing GOAT: a target for obesity and anti-diabetic drugs?. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(8), 398-401.
17. Barazzoni, R., Bosutti, A., Stebel, M., Cattin, M. R., Roder, E., Visintin, L., and Guarnieri, G. (2005). Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 288(1), 22-235.
18. Li, Z., Xu, G., Qin, Y., Zhang, C., Tang, H., Yin, Y., and Zhang, W. (2014). Ghrelin promotes hepatic lipogenesis by activation of mTOR-PPAR γ signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(36), 13163-13168.
19. Bowers, C. Y., Momany, F., Reynolds, G. A., Chang, D., HONG, A., and Chang, K. (1980). Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology*, 106(3), 663-667.
20. Howard, A. D., Feighner, S. D., Cully, D. F., Arena, J. P., Liberator, P. A., Rosenblum, C. I., and Paress, P. S. (1996). A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, 273(5277), 974-977.
21. Kojima, M., Hosoda, H., and Kangawa, K. (2012). *Purification of rat and human ghrelins*, in *Methods in enzymology*, Elsevier, 45-61.
22. Wang, G., Lee, H. M., Englander, E., and Greeley Jr, G. H. (2002). Ghrelin—not just another stomach hormone. *Regulatory Peptides*, 105(2), 75-81.
23. Kojima, M. (2008). The discovery of ghrelin—a personal memory. *Regulatory Peptides*, 145(1-3), 2-6.
24. Hosoda, H., Kojima, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (2000). Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(29), 21995-22000.

25. Kojima M, Hosada H, Kaiya H, Kangawa K. (2004) *Ghrelin*. (Ed.). Ezio, G. Kluwer Academic Publishers, 10-150.
26. Civelli, O. (2008). *Orphan G protein-coupled receptors and novel neuropeptides*. (Ed.). Q. Y. Zhou, Springer, 15-125.
27. Choi, C. S., Savage, D. B., Kulkarni, A., Yu, X. X., Liu, Z. X., Morino, K., and Zhang, D. (2007). Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 282(31), 22678-22688.
28. Yabuki, A., Ojima, T., Kojima, M., Nishi, Y., Mifune, H., Matsumoto, M., and Suzuki, S. (2004). Characterization and species differences in gastric ghrelin cells from mice, rats and hamsters. *Journal of Anatomy*, 205(3), 239-246.
29. Date, Y., Kojima, M., Hosoda, H., Sawaguchi, A., Mondal, M. S., Suganuma, T., and Nakazato, M. (2000). Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*, 141(11), 4255-4261.
30. Smith, R. G., and Thorner, M. O. (Eds.). (2012). *Ghrelin in health and disease* (Vol. 10). Springer Science & Business Media, 20-170.
31. Müller, T. D., Nogueiras, R., Andermann, M. L., Andrews, Z. B., Anker, S. D., Argente, J., and Tschöp, M. H. (2015). Ghrelin. *Molecular Metabolism*, 4(6), 437-460.
32. Yanagi, S., Sato, T., Kangawa, K., and Nakazato, M. (2018). The homeostatic force of ghrelin. *Cell Metabolism*, 27(4), 786-804.
33. Kojima, M. (2010). Discovery of ghrelin and its physiological function. *Journal of Medical Sciences*, 3(2), 92-95.
34. Hosoda, H., Kojima, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (2000). Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(3), 909-913.
35. Stengel, A., Goebel, M., Wang, L., Reeve Jr, J. R., Taché, Y., and Lambrecht, N. W. (2010). Lipopolysaccharide differentially decreases plasma acyl and desacyl ghrelin levels in rats: potential role of the circulating ghrelin-acylating enzyme GOAT. *Peptides*, 31(9), 1689-1696.
36. Cummings, D. E., Purnell, J. Q., Frayo, R. S., Schmidova, K., Wisse, B. E., and Weigle, D. S. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*, 50(8), 1714-1719.
37. Tschöp, M., Wawarta, R., Riepl, R. L., Friedrich, S., Bidlingmaier, M., Landgraf, R., and Folwaczny, C. (2001). Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *Journal of Endocrinological Investigation*, 24(6), RC19-RC21.

38. Shiiya, T., Nakazato, M., Mizuta, M., Date, Y., Mondal, M. S., Tanaka, M., and Matsukura, S. (2002). Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(1), 240-244.
39. McCowen, K. C., Maykel, J. A., Bistran, B. R., and Ling, P. R. (2002). Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents. *The Journal of Endocrinology*, 175(2), R7-11.
40. Hanada, K. (2003). Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1632(1-3), 16-30.
41. Hansen, T. K., Dall, R., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., Christiansen, J. S., and Jørgensen, J. O. L. (2002). Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clinical Endocrinology*, 56(2), 203-206.
42. Nonogaki, K., Nozue, K., and Oka, Y. (2006). Hyperphagia alters expression of hypothalamic 5-HT_{2C} and 5-HT_{1B} receptor genes and plasma des-acyl ghrelin levels in Ay mice. *Endocrinology*, 147(12), 5893-5900.
43. Longo, K. A., Charoenthongtrakul, S., Giuliana, D. J., Govek, E. K., McDonagh, T., Qi, Y., and Geddes, B. J. (2008). Improved insulin sensitivity and metabolic flexibility in ghrelin receptor knockout mice. *Regulatory Peptides*, 150(1-3), 55-61.
44. Hotta, M., Ohwada, R., Katakami, H., Shibasaki, T., Hizuka, N., and Takano, K. (2004). Plasma levels of intact and degraded ghrelin and their responses to glucose infusion in anorexia nervosa. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(11), 5707-5712.
45. Ariyasu, H., Takaya, K., Tagami, T., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., and Shirakami, G. (2001). 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*, 86(10), 4753-4758.
46. Cuntz, U., Frühauf, E., Wawarta, R., Tschöp, M., Folwaczny, C., Riepl, R., and Otto, B. (2002). A role for the novel weight-regulating hormone ghrelin in anorexia nervosa. *American Clinical Laboratory*, 21(4), 22-23.
47. Otto, B., Cuntz, U., Frühauf, E. A., Wawarta, R., Folwaczny, C., Riepl, R. L., and Tschöp, M. (2001). Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *European Journal of Endocrinology*, 145(5), R5-R9.
48. Soares, J. B., and Leite-Moreira, A. F. (2008). Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin: three pieces of the same puzzle. *Peptides*, 29(7), 1255-1270.
49. Hosoda, H., Kojima, M., Mizushima, T., Shimizu, S., and Kangawa, K. (2003). Structural divergence of human ghrelin identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), 64-70.

50. Nagaya, N., and Kangawa, K. (2003). Ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in the treatment of chronic heart failure. *Regulatory Peptides*, 114(2-3), 71-77.
51. Stengel, A., Goebel, M., Wang, L., and Taché, Y. (2010). Ghrelin, des-acyl ghrelin and nesfatin-1 in gastric X/A-like cells: role as regulators of food intake and body weight. *Peptides*, 31(2), 357-369.
52. Napolitano, T., Silvano, S., Vieira, A., Balaji, S., Garrido-Utrilla, A., Friano, M. E., and Collombat, P. (2018). Role of ghrelin in pancreatic development and function. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 20, 3-10.
53. Kojima, M. and Kangawa, K. (2012). *Methods In Enzymology*, Edt. J.N. Abelson; and M.I. Simon. UK: Elsevier, 8-70.
54. Adeghate, E., and Ponery, A. S. (2002). Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 14(7), 555-560.
55. Broglio, F., Arvat, E., Benso, A., Gottero, C., Muccioli, G., Papotti, M., and Ghigo, E. (2001). Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(10), 5083-5083.
56. Data, Y., Nakazato, M., Hashiguchi, S., and Dezaki, K. (2002). Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes*, 51(1), 124.
57. Benso, A., St-Pierre, D. H., Prodam, F., Gramaglia, E., Granata, R., van der Lely, A. J., and Broglio, F. (2012). Metabolic effects of overnight continuous infusion of unacylated ghrelin in humans. *European Journal of Endocrinology*, 166(5), 911-916.
58. Churm, R., Davies, J. S., Stephens, J. W., and Prior, S. L. (2017). Ghrelin function in human obesity and type 2 diabetes: a concise review. *Obesity Reviews*, 18(2), 140-148.
59. Dezaki, K., Hosoda, H., Kakei, M., Hashiguchi, S., Watanabe, M., Kangawa, K., and Yada, T. (2004). Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca²⁺ signaling in β -cells: implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes*, 53(12), 3142-3151.
60. Gauna, C., Delhanty, P. J., Hofland, L. J., Janssen, J. A., Broglio, F., Ross, R. J., and van der Lely, A. J. (2005). Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(2), 1055-1060.
61. Barazzoni, R., Zanetti, M., Cattin, M. R., Visintin, L., Vinci, P., Cattin, L., and Guarnieri, G. (2007). Ghrelin enhances in vivo skeletal muscle but not liver AKT signaling in rats. *Obesity*, 15(11), 2614-2623.
62. Portelli, J., and Smolders, I. (Eds.). (2014). *Central functions of the ghrelin receptor*. New York: Springer 1-250.

63. Alptekin, İ. M. and Aydın, N. Y. (2018). *İştah Metabolizmasının Moleküler Regülasyonu ve Beslenme, içerisinde Beslenme ve Diyetetik Güncel Konular-7*, Ed. M. Tayfur, Ankara: Hatiboğlu Yayınevi, 10-25.
64. Guan, X. M., Yu, H., Palyha, O. C., McKee, K. K., Feighner, S. D., Sirinathsinghji, D. J., and Howard, A. D. (1997). Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Molecular Brain Research*, 48(1), 23-29.
65. Zigman, J. M., Jones, J. E., Lee, C. E., Saper, C. B., and Elmquist, J. K. (2006). Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*, 494(3), 528-548.
66. Toshinai, K., Date, Y., Murakami, N., Shimada, M., Mondal, M. S., Shimbara, T., and Shioda, S. (2003). Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology*, 144(4), 1506-1512.
67. Horvath, T. L., Diano, S., and Van Den Pol, A. N. (1999). Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *Journal of Neuroscience*, 19(3), 1072-1087.
68. Dube, M. G., Kalra, S. P., and Kalra, P. S. (1999). Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins: identification of hypothalamic sites of action. *Brain Research*, 842(2), 473-477.
69. Asakawa, A., Inui, A., Fujimiya, M., Sakamaki, R., Shinfuku, N., Ueta, Y., and Kasuga, M. (2005). Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut*, 54(1), 18-24.
70. Banks, W. A., Tschöp, M., Robinson, S. M., and Heiman, M. L. (2002). Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(2), 822-827.
71. Chen, C. Y., Inui, A., Asakawa, A., Fujino, K., Kato, I., Chen, C. C., and Fujimiya, M. (2005). Des-acyl ghrelin acts by CRF type 2 receptors to disrupt fasted stomach motility in conscious rats. *Gastroenterology*, 129(1), 8-25.
72. Inhoff, T., Wiedenmann, B., Klapp, B. F., Mönnikes, H., and Kobelt, P. (2009). Is desacyl ghrelin a modulator of food intake?. *Peptides*, 30(5), 991-994.
73. De Vriese, C., Perret, J., and Delporte, C. (2010). Focus on the short-and long-term effects of ghrelin on energy homeostasis. *Nutrition*, 26(6), 579-584.
74. Kotzka, J., Knebel, B., Haas, J., Kremer, L., Jacob, S., Hartwig, S., and Muller-Wieland, D. (2012). Preventing phosphorylation of sterol regulatory element-binding protein 1a by MAP-kinases protects mice from fatty liver and visceral obesity. *PLoS One*, 7(2), e32609.

75. Theander-Carrillo, C., Wiedmer, P., Cettour-Rose, P., Nogueiras, R., Perez-Tilve, D., Pfluger, P., and Tschöp, M. H. (2006). Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *The Journal of clinical Investigation*, 116(7), 1983-1993.
76. Zhang, W., Zhao, L., Lin, T. R., Chai, B., Fan, Y., Gantz, I., and Mulholland, M. W. (2004). Inhibition of adipogenesis by ghrelin. *Molecular Biology of the Cell*, 15(5), 2484-2491.
77. Kim, M. S., Yoon, C. Y., Jang, P. G., Park, Y. J., Shin, C. S., Park, H. S., and Kim, S. Y. (2004). The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Endocrinology*, 18(9), 2291-2301.
78. Liu, J., Lin, H., Cheng, P., Hu, X., and Lu, H. (2009). Effects of ghrelin on the proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 29(2), 227-230.
79. Zwirska-Korczala, K., Adamczyk-Sowa, M., Sowa, P., Pilc, K., Suchanek, R., Pierzchala, K., and Kuwahara, A. (2007). Role of leptin, ghrelin, angiotensin II and orexins. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 58(1), 53-64.
80. Miegueu, P., St Pierre, D., Broglio, F., and Cianflone, K. (2011). Effect of desacyl ghrelin, obestatin and related peptides on triglyceride storage, metabolism and GHSR signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(2), 704-714.
81. Rodriguez, A., Gómez-Ambrosi, J., Catalán, V., Gil, M. J., Becerril, S., Sáinz, N., and Frühbeck, G. (2009). Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes. *International Journal of Obesity*, 33(5), 541-552.
82. Davies, J. S., Kotokorpi, P., Eccles, S. R., Barnes, S. K., Tokarczuk, P. F., Allen, S. K., and Zigman, J. M. (2009). Ghrelin induces abdominal obesity via GHS-R-dependent lipid retention. *Molecular Endocrinology*, 23(6), 914-924.
83. Thompson, N. M., Gill, D. A., Davies, R., Loveridge, N., Houston, P. A., Robinson, I. C., and Wells, T. (2004). Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*, 145(1), 234-242.
84. Zhang, W., Chai, B., Li, J. Y., Wang, H., and Mulholland, M. W. (2008). Effect of des-acyl ghrelin on adiposity and glucose metabolism. *Endocrinology*, 149(9), 4710-4716.
85. Delhanty, P. J., Sun, Y., Visser, J. A., Van Kerkwijk, A., Huisman, M., Van IJcken, W. F., and Van der Lely, A. J. (2010). Unacylated ghrelin rapidly modulates lipogenic and insulin signaling pathway gene expression in metabolically active tissues of GHSR deleted mice. *PloS One*, 5(7), e11749.
86. Williams, D. L., Grill, H. J., Cummings, D. E., and Kaplan, J. M. (2006). Overfeeding-induced weight gain suppresses plasma ghrelin levels in rats. *Journal of Endocrinological Investigation*, 29(10), 863-868.
87. Tschöp, M., Smiley, D. L., and Heiman, M. L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 407(6806), 908-913.

88. Shearman, L. P., Wang, S. P., Helmling, S., Stribling, D. S., Mazur, P., Ge, L., and Strack, A. M. (2006). Ghrelin neutralization by a ribonucleic acid-SPM ameliorates obesity in diet-induced obese mice. *Endocrinology*, 147(3), 1517-1526.
89. Zigman, J. M., Nakano, Y., Coppari, R., Balthasar, N., Marcus, J. N., Lee, C. E., and Williams, T. D. (2005). Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(12), 3564-3572.
90. Briggs, D. I., Enriori, P. J., Lemus, M. B., Cowley, M. A., and Andrews, Z. B. (2010). Diet-induced obesity causes ghrelin resistance in arcuate NPY/AgRP neurons. *Endocrinology*, 151(10), 4745-4755.
91. Delhanty, P. J., Neggers, S. J., and van der Lely, A. J. (2014). Should we consider des-acyl ghrelin as a separate hormone and if so, what does it do?. In *How Gut and Brain Control Metabolism*. Karger Publishers, 163-174.
92. Cummings, D. E., Clement, K., Purnell, J. Q., Vaisse, C., Foster, K. E., Frayo, R. S., and Weigle, D. S. (2002). Elevated plasma ghrelin levels in Prader-Willi syndrome. *Nature Medicine*, 8(7), 643-644.
93. Haqq, A. M., Grambow, S. C., Muehlbauer, M., Newgard, C. B., Svetkey, L. P., Carrel, A. L., and Freemark, M. (2008). Ghrelin concentrations in Prader-Willi syndrome (PWS) infants and children: changes during development. *Clinical Endocrinology*, 69(6), 911-920.
94. Kuppens, R. J., Diene, G., Bakker, N. E., Molinas, C., Faye, S., Nicolino, M., and Julien, M. (2015). Elevated ratio of acylated to unacylated ghrelin in children and young adults with Prader-Willi syndrome. *Endocrine*, 50(3), 633-642.
95. Harvey, R., and Ferrier, D. (2015). *Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry*. Ankara: Nobel Tıp Kitapevi 150-183.
96. Barazzoni, R., Bosutti, A., Stebel, M., Cattin, M. R., Roder, E., Visintin, L., and Guarnieri, G. (2005). Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 288(1), E228-E235.
97. Zorrilla, E. P., Iwasaki, S., Moss, J. A., Chang, J., Otsuji, J., Inoue, K., and Janda, K. D. (2006). Vaccination against weight gain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35), 13226-13231.
98. Yang, J., Brown, M. S., Liang, G., Grishin, N. V., and Goldstein, J. L. (2008). Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell*, 132(3), 387-396.
99. Barnett, B. P., Hwang, Y., Taylor, M. S., Kirchner, H., Pfluger, P. T., Bernard, V., and Longo, P. A. (2010). Glucose and weight control in mice with a designed ghrelin O-acyltransferase inhibitor. *Science*, 330(6011), 1689-1692.
100. Pradhan, G., Samson, S. L., and Sun, Y. (2013). Ghrelin: much more than a hunger hormone. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 16(6), 619.

101. Gil-Campos, M., Aguilera, C. M., Canete, R., and Gil, A. (2006). Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. *British Journal of Nutrition*, 96(2), 201-226.
102. Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., and Wakabayashi, I. (2001). Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes*, 50(11), 2438-2443.
103. Casanueva, F. F., and Dieguez, C. (2002). Ghrelin: the link connecting growth with metabolism and energy homeostasis. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 3(4), 325-338.
104. St-Pierre, D. H., Karelis, A. D., Cianflone, K., Conus, F., Mignault, D., Rabasa-Lhoret, R., and Poehlman, E. T. (2004). Relationship between ghrelin and energy expenditure in healthy young women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(12), 5993-5997.
105. Zhang, G., Yin, X., Qi, Y., Pendyala, L., Chen, J., Hou, D., and Tang, C. (2010). Ghrelin and cardiovascular diseases. *Current Cardiology Reviews*, 6(1), 62-70.
106. Li, L., Zhang, L. K., Pang, Y. Z., Pan, C. S., Qi, Y. F., Chen, L., and Zhang, J. (2006). Cardioprotective effects of ghrelin and des-octanoyl ghrelin on myocardial injury induced by isoproterenol in rats 1. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(5), 527-535.
107. Bal, N. B., Uludağ, M. O., ve Yilmaz, E. D. (2019). Kardiyovasküler Sistemde Karaciğer X Reseptörleri. *Türkiye Klinikleri. Tıp Bilimleri Dergisi*, 39(4), 430-443.
108. Rodríguez, A., Gomez-Ambrosi, J., Catalan, V., Becerril, S., Sainz, N., Gil, M. J., and Frühbeck, G. (2010). Association of plasma acylated ghrelin with blood pressure and left ventricular mass in patients with metabolic syndrome. *Journal of Hypertension*, 28(3), 560-567.
109. Yano, Y., Nakazato, M., Toshinai, K., Inokuchi, T., Matsuda, S., Hidaka, T., and Kario, K. (2014). Circulating des-acyl ghrelin improves cardiovascular risk prediction in older hypertensive patients. *American Journal of Hypertension*, 27(5), 727-733.
110. Martini, A. C., Fernandez-Fernandez, R., Tovar, S., Navarro, V. M., Vigo, E., Vazquez, M. J., and Wells, T. (2006). Comparative analysis of the effects of ghrelin and unacylated ghrelin on luteinizing hormone secretion in male rats. *Endocrinology*, 147(5), 2374-2382.
111. Furuta, M., Funabashi, T., and Kimura, F. (2001). Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288(4), 780-785.

112. Vulli  moz, N. R., Xiao, E., Xia-Zhang, L., Germond, M., Rivier, J., and Ferin, M. (2004). Decrease in luteinizing hormone pulse frequency during a five-hour peripheral ghrelin infusion in the ovariectomized rhesus monkey. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(11), 5718-5723.
113. Fern  ndez-Fern  ndez, R., Tena-Sempere, M., Aguilar, E., and Pinilla, L. (2004). Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats. *Neuroscience Letters*, 362(2), 103-107.
114. Iqbal, J., Kurose, Y., Canny, B., and Clarke, I. J. (2006). Effects of central infusion of ghrelin on food intake and plasma levels of growth hormone, luteinizing hormone, prolactin, and cortisol secretion in sheep. *Endocrinology*, 147(1), 510-519.
115. Broglio, F., Gottero, C., Prodam, F., Gauna, C., Muccioli, G., Papotti, M., and Ghigo, E. (2004). Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), 3062-3065.
116. Lin, T. C., and Hsiao, M. (2017). Ghrelin and cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1868(1), 51-57.
117. Lien, G. S., Lin, C. H., Yang, Y. L., Wu, M. S., and Chen, B. C. (2016). Ghrelin induces colon cancer cell proliferation through the GHS-R, Ras, PI3K, Akt, and mTOR signaling pathways. *European Journal of Pharmacology*, 776, 124-131.
118. Kraus, D., Reckenbeil, J., Wenghoefer, M., Stark, H., Frentzen, M., Allam, J. P., and Meyer, R. (2016). Ghrelin promotes oral tumor cell proliferation by modifying GLUT1 expression. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(6), 1287-1299.
119. Cassoni, P., Gh  , C., Marrocco, T., Tarabra, E., Allia, E. T., Catapano, F., and Muccioli, G. (2004). Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. *European Journal of Endocrinology*, 150(2), 173-184.
120. Cassoni, P., Allia, E., Marrocco, T., Gh  , C., Ghigo, E., Muccioli, G., and Papotti, M. (2006). Ghrelin and cortistatin in lung cancer: expression of peptides and related receptors in human primary tumors and in vitro effect on the H345 small cell carcinoma cell line. *Journal of Endocrinological Investigation*, 29(9), 781-790.
121. Delhanty, P. J. D., van Koetsveld, P. M., Gauna, C., van de Zande, B., Vitale, G., Hofland, L. J., and van der Lely, A. J. (2007). Ghrelin and its unacylated isoform stimulate the growth of adrenocortical tumor cells via an anti-apoptotic pathway. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 293(1), E302-E309.
122. Conn, M., (2012). *Contemporary Endocrinology* (Ed.). Simith R.G. Thorner M. O. Humana Press, 140-145.
123. Tolle, V., Bassant, M. H., Zizzari, P., Poindessous-Jazat, F., Tomasetto, C., Epelbaum, J., and Blu  t-Pajot, M. T. (2002). Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology*, 143(4), 1353-1361.

124. Delhanty, P. J., van der Eerden, B. C., and van Leeuwen, J. P. (2014). Ghrelin and bone. *Biofactors*, 40(1), 41-48.
125. Jiao, Q., Du, X., Li, Y., Gong, B., Shi, L., Tang, T., and Jiang, H. (2017). The neurological effects of ghrelin in brain diseases: Beyond metabolic functions. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 73, 98-111.
126. Dallak, M. (2019). Unacylated ghrelin stimulates steroidogenesis in lean rats and reverses reproductive dysfunction in high fat diet-fed rats. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 65(2), 129-146.
127. Resmi Gazete. (2006). *Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik*. 06/07/2006 Tarih ve 26220 Sayılı, Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Ankara.
128. National Research Council. (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals*. Washington: National Academies Press, 1-246.
129. Seifter, S., Dayton, S., Novic, B., and Muntwyler, E. (1950). The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Arch. Biochemistry*, 25, 191-200.
130. Cacho, J., Sevillano, J., de Castro, J., Herrera, E., and Ramos, M. D. P. (2008). Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. *American journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 295(5), E1269-E1276.
131. Ünal, S. G., Take, G., Erdoğan, D., Göktas, G., and Sahin, E. (2016). The effect of di-n-butyl phthalate on testis and the potential protective effects of resveratrol. *Toxicology and Industrial Health*, 32(5), 777-790.
132. Luna, L. G. (1968). *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. New York: Blakiston Division, McGraw-Hill, 1-265.
133. Inhoff, T., Mönnikes, H., Noetzel, S., Stengel, A., Goebel, M., Dinh, Q. T., and Klapp, B. F. (2008). Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. *Peptides*, 29(12), 2159-2168.
134. National Research Council. (1995). *Nutrient requirements of laboratory animals: 1995*. National Academies Press, 11-58.
135. Shimbara, T., Mondal, M. S., Kawagoe, T., Toshinai, K., Koda, S., Yamaguchi, H., and Nakazato, M. (2004). Central administration of ghrelin preferentially enhances fat ingestion. *Neuroscience Letters*, 369(1), 75-79.
136. Vestergaard, E. T., Buhl, M., Gjedsted, J., Madsen, M., Jessen, N., Nielsen, S., and Jorgensen, J. O. L. (2011). Acute peripheral metabolic effects of intraarterial ghrelin infusion in healthy young men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(2), 468-477.

137. Gauna, C., Meyler, F. M., Janssen, J. A. M. J. L., Delhanty, P. J. D., Abribat, T., van Koetsveld, P., and van der Lely, A. J. (2004). Administration of acylated ghrelin reduces insulin sensitivity, whereas the combination of acylated plus unacylated ghrelin strongly improves insulin sensitivity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(10), 5035-5042.
138. Broglio, F., Gottero, C., Prodam, F., Gauna, C., Muccioli, G., Papotti, M., and Ghigo, E. (2004). Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), 3062-3065.
139. Gauna, C., Kiewiet, R. M., Janssen, J. A., van de Zande, B., Delhanty, P. J., Ghigo, E., and van der Lely, A. J. (2007). Unacylated ghrelin acts as a potent insulin secretagogue in glucose-stimulated conditions. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 293(3), E697-E704.
140. Sun, Y., Asnicar, M., Saha, P. K., Chan, L., and Smith, R. G. (2006). Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metabolism*, 3(5), 379-386.
141. Page, L. C., Gastaldelli, A., Gray, S. M., D'Alessio, D. A., and Tong, J. (2018). Interaction of GLP-1 and ghrelin on glucose tolerance in healthy humans. *Diabetes*, 67(10), 1976-1985.
142. Tong, J., Davis, H. W., Gastaldelli, A., and D'Alessio, D. (2016). Ghrelin impairs prandial glucose tolerance and insulin secretion in healthy humans despite increasing GLP-1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(6), 2405-2414.
143. Şahin, E., ve Öncel, M. (2014). Diyabet tanı ve takibinde geleneksel ve yeni biyokimyasal belirteçler. *Euro Journal Basic Medical Science*, 4(3), 66-73
144. Soriano-Guillén, L., Barrios, V., Lechuga-Sancho, A., Chowen, J. A., and Argente, J. (2004). Response of circulating ghrelin levels to insulin therapy in children with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *Pediatric Research*, 55(5), 830-835.
145. Ueno, H., Shiiya, T., Mizuta, M., Mondal, M. S., & Nakazato, M. (2007). Plasma ghrelin concentrations in different clinical stages of diabetic complications and glycemic control in Japanese diabetics. *Endocrine journal*, 54(6), 895-902.
146. Longo, K. A., Charoenthongtrakul, S., Giuliana, D. J., Govek, E. K., McDonagh, T., Qi, Y., and Geddes, B. J. (2008). Improved insulin sensitivity and metabolic flexibility in ghrelin receptor knockout mice. *Regulatory peptides*, 150(1-3), 55-61.
147. Pinkney, J. (2014). The role of ghrelin in metabolic regulation. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 17(6), 497-502.
148. Jaskula, M., Wasko, R., Komarowska, H., Dziubandowska, A., and Sowinski, J. (2009). Serum ghrelin levels and disturbances of the lipid profile in patients with acromegaly. *Neuroendocrinology Letters*, 30(2), 245-255.
149. Neschen, S., Morino, K., Hammond, L. E., Zhang, D., Liu, Z. X., Romanelli, A. J., and Coleman, R. A. (2005). Prevention of hepatic steatosis and hepatic insulin

- resistance in mitochondrial acyl-CoA: glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase 1 knockout mice. *Cell Metabolism*, 2(1), 55-65.
150. Samuel, V. T., Liu, Z. X., Qu, X., Elder, B. D., Bilz, S., Befroy, D., and Shulman, G. I. (2004). Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32345-32353.
 151. Bassil, M. S., Mrayati, M. M., Hwalla, N. C., and Obeid, O. A. (2007). Acute effect of leptin and ghrelin injection on postprandial glycogen and lipid synthesis in rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 51(1), 14-21.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 08/07/2019-E.84961



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Doç. Dr. Yasemin AKDEVELİOĞLU
Beslenme ve Diyetetik Bölüm Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Yasemin AKDEVELİOĞLU, Emine ELİBOL, Canan YILMAZ, Belkıs NARLI, Serkan ŞEN, Gülnur TAKE KAPLANOĞLU ve Cemile Merve SEYMEN'den oluşan G.Ü.ET-19.036 kod numaralı ve "*Ghrelin Hormununun Açıl ve Desaçıl Formunun Ratlarda Karaciğer Yağlanması ve İştah Hormonları Üzerine Etkileri*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-19.036 and entitled "*Effects of acyl and Desacyl Form of Ghrelin Hormone on Hepatic Steatosis and Appetite Hormones in Rats*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Hayvan Türü : Rat Wistar
Hayvan Sayısı : 36

Ek: 1 Liste

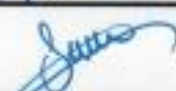
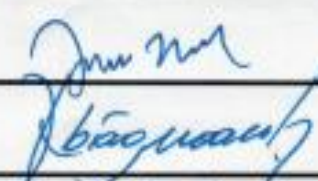
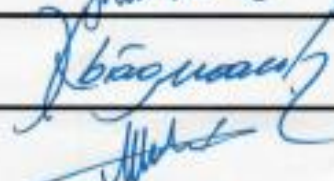


Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/

Bilgi için :Ayfer Çekmez
Özel Evrak Sorumlusu
Telefon No:202 18 07

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-1. (devam) Etik Kurul Onayı

GAZİ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ	
TOPLANTI TARİHİ :28/06/2019	TOPLANTI SAYISI : 05
ADI-SOYADI	İMZA
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)	
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)	
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU	
Prof.Dr.Tuncay PEKER	KATILAMADI
Prof.Dr.Fatma AKAR	
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK	
Prof.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ	
Doç.Dr.Emre BARIŞ	
Doç.Dr.İpek SÜNTAR	KATILAMADI
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR	KATILAMADI
Öğr.Gör.Dr.Şeyda DİKER	
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM	
Vet.Hek.Burcu AVCI	
Osman İÇ	KATILAMADI

Ek- 2. Laboratuvar Analiz Referans Değerleri

Biyokimyasal Parametreler	Değer
Açlık Plazma Glukozu (mg/dL)	80-110
Açlık İnsülin (ng/dL)	3,13-200
Açlık Glukagon (pg/mL)	62,5-4000
HOMA-IR	<2,5
Fruktozamin (mmol/L)	1.61-2.68
Toplam kolesterol (mg/dL)	0-200
LDL kolesterol (mg/dL)	0-100
VLDL kolesterol (mg/dL)	2-30
HDL kolesterol (mg/dL)	40-60
Trigliserid (mg/dL)	0-150

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ELİBOL, Emine
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 10.03.1990, Tokat
 Medeni hali : Bekâr
 Telefon : (0552) 605 27 03
 e-mail : semilay.5252@gmail.com



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi	Devam Ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi	2016
Lisans	Afyon Kocatepe Üniversitesi	2013
Lise	Gazi Lisesi	2005

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2014-devam ediyor	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2013-2014	Kastamonu Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI, SSCI, Arts and Humanities)

- Özturan, A., Arslan, S., Kocaadam, B., Elibol, E., İmamoğlu, İ., and Karadağ, M. G. (2019). Effect of inositol and its derivatives on diabetes: a systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(7), 1124-1136.

Uluslararası diğer hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

- Karadağ, M. G., Elibol, E., Yıldırım, H., Akbulut, G., Çelik, M. G., Değirmenci, M., Söğüt, M., Güneş, M., ve Dinler, M. F. (2016). Sağlıklı Yetişkin Bireylerde Yeme Tutum ve Ortorektik Davranışlar ile Obezite Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi. *Gazi Medical Journal*, 27(3), 107-114.

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Elibol, E., ve Karabudak, E. (2016) Hemodiyaliz Hastalarında Diyet Asit Yüğü (DAL) ile Kardiyovasküler Risk Etmenleri Arasındaki İlişki: Pilot Çalışma. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 44(1), 38-46.
2. Elibol, E., ve Şanlıer, N. (2017). Astım ve Beslenme Etkileşimi. *Türkiye Klinikleri Archives of Lung*, 18(1), 10-16.
3. Elibol, E., ve Akdevelioğlu, Y. (2017). İnositol ve Kadın Üreme Sağlığı. *Türkiye Klinikleri Journal of Health Sciences*, 2(3), 201-206.
4. Şanlıer, N., Adanur, E., Uyar, G. Ö., Elibol, E., Coşkun, A. B., Erdoğan, R., ve Bozbaş, E. (2017). Gençlerin Beslenme ve Gıda Güvenliğine İlişkin Bilgi ve Davranışlarının Değerlendirilmesi. *Kastamonu Eğitim Dergisi*, 25(3), 941-956.
5. Elibol, E., and Akdevelioğlu, Y. (2020). The Effects of Acyl and Desacyl Forms of The Ghrelin Hormone on The Body. *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2(1), 18-27.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Tam metni yayınlanan bildiriler

1. Elibol, E., Türk, Ö. P., Özdoğan, Y. (2018). *Probiyotikler ve Sağlık*. Uluslararası Avrasya Doğal Beslenme ve Sağlıklı Yaşam Zirvesi, 932-936. Ankara, Türkiye.
2. Elibol, E., Türk, Ö. P., Özdoğan, Y. (2018). *Mirisetin ve Sağlık Üzerine Etkisi*. Uluslararası Avrasya Doğal Beslenme ve Sağlıklı Yaşam Zirvesi, 736-739. Ankara, Türkiye.
3. Elibol, E., Göküstün, K. K., ve Alim, N. E. (2018). *Hesperidin ve Kanser*, Uluslararası Avrasya Doğal Beslenme ve Sağlıklı Yaşam Zirvesi, 694-697. Ankara, Türkiye.
4. Elibol, E., Karakaya, E., Akan, L. S. (2018). *Arı Sütü*. Uluslararası Avrasya Doğal Beslenme ve Sağlıklı Yaşam Zirvesi, 1047-1050. Ankara, Türkiye.
5. Elibol, E., Karakaya, E., Akan, L. S. (2018). *Bir Fonksiyonel Bileşen Olarak: Fitosteroller*. Uluslararası Avrasya Doğal Beslenme ve Sağlıklı Yaşam Zirvesi, 619-622. Ankara, Türkiye.
6. Elibol, E., Akan, L. S. (2018). Organik ve Sürdürülebilir Tarım. Anadolu 1. Uluslararası Multidisipliner Çalışmalar Kongresi, 148-152. Diyarbakır, Ankara
7. Erzurum-Alim, N., Elibol, E. (2018). Mikrobiyota ve Obezite. Anadolu 1. Uluslararası Multidisipliner Çalışmalar Kongresi, 30-31. Diyarbakır, Ankara

Özeti yayınlanan bildiriler

1. Elibol, E., ve Karabudak, E. (2016). *The Relationship between ghrelin forms and malnutrition in hemodialysis patients*, European Obesity Submit (EOS)- Joint Congress of EASO and IFSO-EC, 9(supply1),181. Gothenburg, Sweden.

2. Türközü, D., ve Elibol, E. (2016). *Quinoa, Food Intake and Satiety*, European Obesity Submit (EOS)- Joint Congress of EASO and IFSO-EC, 9(supply 1),142. Gothenburg, Sweeden.
3. Beyaz, A., Elibol, E., Adanur, E., Özata, G., Erdoğan, R., Boztaş, E., ve Şanlıer, N. (2016). *Relation of Food Intake and Body Mass Index in Young Students*, European Obesity Submit (EOS)- Joint Congress of EASO and IFSO-EC, 9(supply 1),138. Gothenburg, Sweeden.
4. Şanlıer, N., Türközü, D., Elibol, E., Beyaz, A., Şahin, G., ve Yassıbaş, E. (2016). *Effect of Eating Behaviours in Different Emotional States on Obesity*, European Obesity Submit (EOS)- Joint Congress of EASO and IFSO-EC, 9(supply 1),137. Gothenburg, Sweeden.
5. Şanlıer, N., Türközü, D., Beyaz, A., Elibol, E., Yassıbaş, E., ve Şahin, G. (2016). *Waist to Height Ratio: Is it related with Obesity and Anthropometric Measurements in Turkish Individuals?*, European Obesity Submit (EOS)- Joint Congress of EASO and IFSO-EC, 9(supply 1), 143. Gothenburg, Sweeden.
6. Yassıbaş, E., Şahin, G., Elibol, E., Beyaz, A., Duyar, Ş., ve Şanlıer, N. (2016). *Correlation Between Dietary Fat and Anthropometric Measures on Body Fat Composition in Healthy Individuals*, European Obesity Submit (EOS)- Joint Congress of EASO and IFSO-EC, 9(supply 1),233. Gothenburg, Sweeden
7. Şahin, G., Yassıbaş, E., Beyaz, A., Elibol, E., Duyar, Ş., ve Şanlıer, N. (2016). *An Evaluation of The Relationship Between Handgrip Strengrh, BMI and Dietary Components in Healthy Adults*, European Obesity Submit (EOS)- Joint Congress of EASO and IFSO-EC, 9(supply 1),234. Gothenburg, Sweeden.
8. Göküstün, K. K., Karakaya, R. E., Türk, Ö. P., Yılmaz, Ö., Elibol, E., Akan, L. S., ve Özdoğan, Y. (2017). *Çubuk'ta Çorba Kültürünün Bir Örneği: Tutmaç Aşısı*. Uluslararası 4. Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi, 214-215. Ankara, Türkiye.
9. Karakaya, R. E., Elibol, E., Göküstün, K. K., Türk, Ö. P., Yılmaz, Ö., Akan, L. S., ve Özdoğan, Y. (2017). *Efelek Plant- Efelek Otu*. Uluslararası 4. Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi, 226-227. Ankara, Türkiye.
10. Göküstün, K. K., Elibol, E., Türk, Ö. P., Karakaya, R. E., Yılmaz, Ö., Özdoğan, Y., ve Akan, L. S. (2017). *Hayvansal Kaynaklı Jelatine Alternatif: Pektin*. Uluslararası 4. Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi, 252-253. Ankara, Türkiye.
11. Elibol, E., Göküstün, K. K., Türk, Ö. P., Karakaya, R. E., Yılmaz, Ö., Özdoğan, Y., ve Akan, L. S. (2017). *Domatesin Ateroskleroz Üzerine Etkisi*. Uluslararası 4. Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi, 220-221. Ankara, Türkiye.
12. Elibol, E., Yılmaz, Ö., ve Akan, L. S. (2017). *Relationship between Quercetin and Diabetes*. II. Uluslararası Iğdır Sempozyumu, 238-238. Iğdır, Türkiye.
13. Elibol, E., Yılmaz, Ö., ve Özdoğan, Y. (2017). *Dietary Calcium Intake and Obesity*. II. Uluslararası Iğdır Symposium, 239. Iğdır, Türkiye.

14. Elibol, E., ve Karabudak, E. (2017). *Hemodiyaliz Hastalarının Yaşam Kalitesi, El Kavrama Gücü ve Diyet Enerji Alımlarının Değerlendirilmesi*. Adnan Menderes Üniversitesi I. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi, 453. Aydın, Türkiye.
15. Elibol, E., ve Karabudak, E. (2017). *Anoreksiya Nervozalı Hastalarda Ghrelin Fraksiyonlarının Değerlendirilmesi*. Adnan Menderes Üniversitesi I. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi, 452. Aydın, Türkiye.
16. Elibol, E., Türk, Ö. P., Özdoğan, Y. ve Akan, L. S. (2018). *Different Approaches In Elderly Obesity*. Uluslararası Yaşlı Sağlığı ve Bakımında Multidisipliner Yaklaşım Kongresi, 177. Ankara, Türkiye
17. Elibol, E., Türk, Ö. P., Özdoğan, Y. ve Akan, L. S. (2018). *Effect of Vitamin D in Elderly Alzheimer's Disease*. Uluslararası Yaşlı Sağlığı ve Bakımında Multidisipliner Yaklaşım Kongresi, 176. Ankara, Türkiye

Yazılan ulusal ve uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler

1. Akan, L. S., Elibol, E. (2018). *Sağlık Bilimlerinde Akademik Araştırmalar*. Murat A. Kuş (Ed.) *Fonksiyonel Besinler* (s. 27-45). Gece Kitaplığı, Ankara.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..