

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

TİLKOMİSİN VERİLEN SIÇANLARDA
GRELİNİN KALP ANTİOKSİDAN SİSTEM ÜZERİNE ETKİSİ

Proje No: TSY_09_803

Yüksek Lisans Tez Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Doç.Dr.Nazmi ÇETİN
Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Araştırmacı:
Uğur BOYRAZ
Veteriner Fizyoloji

Eylül 2010

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yardımcı olan, tezimin hazırlanmasında büyük desteklerini gördüğüm Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanımız ve danışmanım çok değerli sayın Doç.Dr.Nazmi ÇETİN'e ve her konuda desteklerini esirgemeyen çok değerli Yrd.Doç.Dr.Ebru ÇETİN'e teşekkür ederim.

TİLKOMİSİN VERİLEN SIÇANLARDA GRELINİN KALP ANTİOKSİDAN SİSTEM ÜZERİNE ETKİSİ ÖZET

Bu çalışma, sıçanlarda tilmikosin uygulaması ile oluşturulan miyokardiyal hasarda grelin uygulamasının malondialdehit (MDA) düzeyi ile süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri üzerine etkisini incelemek amacıyla yapıldı.

Bu amaçla 40 adet erkek Sprague Dawley ırkı sıçan eşit şekilde 4 gruba ayrılarak kontrol grubuna deri altı yolla 5 gün %0.9 NaCl, 2. gruba deri altı yolla tek doz tilmikosin (75 mg/kg), 3. gruba deri altı yolla 5 gün süreyle günde 10 nmol/kg dozunda grelin, 4. gruba ise 5 gün süreyle 10 nmol/kg/gün dozda deri altı yolla grelin uygulamasını takiben 5. günde tek doz tilmikosin uygulandı. Uygulamalardan 24 saat sonra gruplardan kalp dokusu örnekleri alınarak MDA düzeyi, GSH-Px, SOD ve CAT enzim aktiviteleri değerlendirildi.

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tilmikosin verilen grubunun MDA düzeyinde önemli bir artma ($p<0.05$), SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde ise önemli bir azalma ($p<0.05$) gözlemlendi. Tilmikosin verilen grupla karşılaştırıldığında, tilmikosin verilmeden önce ön grelin uygulaması yapılan grupta ise MDA düzeyi azalırken, SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri ise anlamlı bir şekilde artırmıştır.

Sonuç olarak, bulgularımız tilmikosinin sıçanlarda miyokardiyal hasara neden olabileceğini, grelin uygulamasının ise tilmikosinin bu zararlı etkilerini azaltabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Sıçan, tilmikosin, miyokart hasarı, grelin, antioksidan enzimler

EFFECT OF GHRELIN ON CARDIAC ANTIOXIDANT SYSTEM IN THE TILMICOSIN-ADMINISTERED RATS

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of ghrelin administration on malondialdehit (MDA) and antioxidant enzyme system (SOD, CAT and GSH-Px) in rats given tilmicosin.

Fourty male Sprague Dawley rats were equally divided into four groups including group 1 (saline control, for 5 days), group 2 (tilmicosin, s.c., single dose of 75mg/kg), group 3 (ghrelin, s.c., 10 nmol/kg/day, for 5 days) and group 4 (ghrelin, 10 nmol/kg/day, for 5 days plus tilmicosin, s.c., single dose of 75mg/kg on the 5th day) From each animal, samples of cardiac tissue were taken 24 h after the end of treatment, and MDA level, SOD, CAT and GSH-Px activity were evaluated.

When compared with the control group, a significant increase of MDA level ($p<0.05$) and decrease in SOD, CAT and GSH-Px activity ($p<0.05$) were observed in tilmicosin-treated only group. Pre-treatment with ghrelin prior to the administration of tilmicosin led to a significant decrease in MDA level and a significant increase SOD, CAT and GSH-Px value when compared with tilmicosin-treated only group.

In conclusion, our findings show that tilmicosin may cause myocardial injury in rats, but ghrelin pre-treatment may prevent the tilmicosin-induced myocardial injury in rats.

Key words: Rat, tilmicosin, ghrelin, antioxidant enzyme, myocardial injury

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇ KAPAK	I
KABUL VE ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR	X

1. GİRİŞ VE AMAÇ	
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. GRELİNİN YAPISI.....	3
2.2. GRELİN RESEPTÖRÜ VE BÜYÜME HORMONU SALGILATICILARI	4
2.3. GRELİNİN DOKULARDA DAĞILIMI	5
2.4. GRELİNİN BAŞLICA FONKSİYONLARI.....	6
2.4.1. Yemek Yeme Ve Uyku Üzerine Etkisi	6
2.4.2. Hücre Proliferasyonuna Etkisi	7
2.4.3. Kardiovasküler Etkiler	7
2.4.4. Karbonhidrat Metabolizması Üzerine Etkileri	7
2.4.5. Gastrointestinal Etkileri	8
2.4.6. Otonomik Sinir Sistemi Üzerine Etkileri	8
2.4.7. Pankreatik Ekzokrin Ve Endokrin Fonksiyonu Üzerine Etkisi	8
2.4.8. Diğer Endokrin Etkiler	8
2.5. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidatif Stres	8
2.5.1. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları	9
2.5.2. Serbest Oksijen Radikal Türleri.....	10
2.5.3. Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri.....	11
2.5.3.1. Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Degisiklikler	11
2.5.3.2. Proteinlerde Meydana Gelen Yapısal Degisiklikler	11

Sayfa No

2.5.4. Enzimatik Ve Nonenzimatik Antioksidan Sistemler	12
2.5.4.1. Nonenzimatik Antioksidanlar	12
2.5.4.2. Enzimatik Antioksidanlar	13
2.5.4.2.1. Glutasyon Peroksidaz	13
2.5.4.2.2. Katalaz	13
2.5.4.2.3. Süperoksit Dismutaz.....	14
2.6. TİLMİKOSİN	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. GEREÇ VE KİMYASALLAR	16
3.1.1. Hayvan Materyali.....	17
3.2. YÖNTEM	17
3.2.1. Gruplar.....	17
3.2.2. Doku örneklerinin alınması ve homojenizasyonu	17
3.2.3. Dokuda MDA, SOD, CAT ve GSH-Px analizi	18
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	1
4. BULGULAR	2
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	23
6. KAYNAKLAR.....	27
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa no

Tablo 3.1.	Kontrol ve deneme grubu uygulama çizelgesi	18
Şekil 2.1:	Glutasyonun okside ve redükte formları arasında dönüşümü.....	13
Şekil 4.1.	Kontrol ve deney gruplarında ortalama MDA düzeyleri.....	21
Şekil 4.1.	Kontrol ve deney gruplarında ortalama SOD aktiviteleri	22
Şekil 4.1.	Kontrol ve deney gruplarında ortalama CAT aktiviteleri	22
Şekil 4.1.	Kontrol ve deney gruplarında ortalama ortalama GSH-Px aktiviteleri	23

KISALTMALAR

ACTH	:Adrenokortikotropik hormon
AGRP	: Agouti bağlantılı protein
ARC	: Hipotalamik arkuat çekirdek
Ca ⁺⁺	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
DAG	: Diaçilgliserol
GH	: Büyüme hormonu
GHS	: Büyüme hormonu salgılatıcı
GHS-R	: Büyüme hormonu salgılatıcı reseptör
GHSs	: GH salgılatıcılar
GHS-R1a	: Büyüme hormonu salgılatıcı reseptör tip 1a
GHS-R1b	: Büyüme hormonu salgılatıcı reseptör tip 1b
GSH	: Redükte glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GHRP-1	: Büyüme hormonu salıcı peptid-1
GHRP-2	: Büyüme hormonu salıcı peptid-2
GHRP-6	: Büyüme hormonu salıcı peptid-6
GHRH	: Büyüme hormonu salıcı hormon
GR	: Glutatyon redüktaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HOCl	: Hipoklorik asit
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IP3	: İnoзитol trifosfat
Kg	: Kilogram
LOOH	: Lipit hidroperoksit
LPO	: Lipit peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
Na ⁺	: Sodyum
NaCl	: Sodyum klorür

Nmol	: Nanomol
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrikosit sentaz
NPY	: Nöropeptid Y
PCR yöntemi	: Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
X/A hücreleri	: Ghrelin hücreleri

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tilmikosin özellikle sığırlarda solunum sistemi hastalılarının tedavisinde kullanılan uzun etkili, makrolit grubu bir antibiyotiktir. Klinik kullanım açısından güvenilir ilaçlar arasında düşünülmesine rağmen bazı makrolitlerin kardiyovasküler sistem üzerine olumsuz etkiler yaptığı tespit edilmiştir. Akut tilmikosin toksikasyonunda hedef organın kalp olduğu bildirilirken, tedavi dozunun üzerinde verilen tilmikosinin kalpte negatif inotrop ve pozitif kronotrop etkiler oluşturduğu, kardiyak enzim düzeylerini artırdığı ve miyokartta antioksidan enzim aktivitelerini azaltmak suretiyle de oksidatif strese neden olduğu bildirilmiştir.

Grelin 1999 yılında Kojima ve ark. tarafından keşfedilen temel olarak mide fundusundan salınan 28 aminoasit'lik peptit yapılı bir hormondur. Bu hormon mideden başka hipotalamus, hipofiz, tükürük bezi, tiroid bezi, ince barsak, böbrekler, kalp, pankreasın alfa, beta ve epsilon hücreleri, santral sinir sistemi, akciğer, plasenta, gonadlar, immün sistem, meme ve dişlerde de sentezlenmektedir. Grelinin mRNA'sı kalp dahil hemen hemen bütün dokularda tespit edilmiştir.

Grelin büyüme hormonu salgılatıcı reseptörleri aktive ederek büyüme hormonunun salgılanmasını düzenler. İştah, pozitif enerji dengesi, hipotalamus ve üreme fonksiyonları, uyku, davranış, mide, pankreas ve kardiyovasküler sistem fonksiyonları üzerine etkilidir.

Bu etkilerinden dolayı grelinin, gastroenteroloji, immunoloji, onkoloji ve kardiyoloji gibi bilim dallarında kullanımıyla ilgili birçok araştırma yapılmaktadır.

Grelin redoks aracılı hücresele yanıtı bloke etmek suretiyle reaktif oksijen türlerinden hidrojen peroksit (H_2O_2)'in indüklediği sitokin salınımını engelleyerek yangı oluşumunu önlediği tespit edilmiştir. Strese bağı olarak oluşan mide yangısında da grelin koruyucu rol oynadığı saptanmıştır. İzole edilmiş rat kalbinde grelinin iskemi reperfüzyon hasarını engellediği bildirilmektedir. 10 ve 20 nmol/kg dozlarındaki grelin rat pankreasında korelen'in neden olduğu akut pankreas yangısını koruyucu etki gösterdiği, böbrek yetmezliği olan farelerde grelinin böbrek fonksiyonlarını düzelttiğini bildirilmiştir. Grelinin mide ve beyin hasarı oluşturulan ratlarda antioksidan etki göstererek koruyucu rol oynadığı saptanmıştır.

Bu çalışma, sıçanlarda tilmikosin ile deneysel olarak oluşturulan akut miyokart hasarında grelinin miyokartta malondialdehit (MDA) düzeyi ile süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) enzim aktiviteleri üzerine etkisi incelenerek grelinin miyokart hasarında olası koruyucu etkilerini ortaya koymak amacıyla planlanmıştır. Grelinin kalp üzerine olan etkisiyle ilgili bilgiler oldukça yetersiz olup yapılacak bu çalışma ile miyokardiyal hasarda dışarıdan uygulanan grelin hormonunun koruyucu etkisinin olup olmadığı ortaya konacak ve grelin hormonunun işlevleri hakkında yeni bilgiler elde edilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. GRELİNİN YAPISI

İlk kez sıçan mide dokusundan izole edilen grelin, 28 aminoasitli açillenmiş peptid şeklinde karakterize edilmiştir (1).

Grelın prekürsörü (preprogrelin) 117 aminoasit'den oluşur. Grelın preprogrelin olarak sentezlenir ve preprogrelin salınımından önce sitoplazmada enzimatik bir prosese uğrayarak grelin molekülüne hidrofobik özellik kazandırılır ve bu özellik sayesinde grelin kan-beyinbarrierini kolaylıkla geçerek beyin dokusuna, spesifik olarak da hipotalamus ve hipofize geçiş imkanı bulur (1-3). Bu açılasyonu katalizleyen açıl transferaz henüz bilinmiyor. Bu orijinal sentezin sonunda olgun grelin oluşur. Moleküler ağırlığı yaklaşık 3315 dalton olan memeli grelinlerinde NH₂ terminal ucundaki ilk 10 amino asit peptidin aktivite gösterebilmesi için ana rol üstlenmektedir. Vücutta açillenmemiş grelin, açillenmiş forma kıyasla daha yüksek oranlarda dolaşımda yer alır (4). Ancak bu form in vivo olarak sıçanlarda ve insanlarda büyüme hormonu salınımına yeterli gelmemektedir. HPLC ve kütle spektrofotometresi kullanılarak grelinin aminoasit dizilimi belirlenmiştir. Hücre içi Ca⁺⁺ düzeylerindeki değişiklikler gözlemlenerek en fazla hücre içi Ca⁺⁺ düzeyindeki artış, mide ekstratları ile elde edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda sentetik grelinin doğal grelin'e kıyasla hücre içi Ca⁺⁺ seviyesini yükseltmediği ve sentetikgrelinin doğal olana göre daha kısa ömürlü olduğu gözlenmiştir (1).

2.2. GRELİN RESEPTÖRÜ VE BÜYÜME HORMONU SALGILATICILARI

Büyüme hormonu salgılatıcı reseptörlerin (GHS-R) böbrek, pankreas, hipotalamus, beyin, kalp, hipofiz bezi, mide ve bağırsak dokularında bulunduğu tespit edilmiştir. GHS-R'nin bu dağılımı grelinin ve GH (büyüme hormonu) salgılatıcıların (GHSs)'nin çeşitli organlarda bir çok fizyolojik roller üstlendiğini göstermektedir. (5). GHS-R geni insan 3q26 kromozomunda yer alır. Periferik organlarda ve beyinde bulunan tip 1a ve 1b olarak tanımlanmış iki izoformu bilinmektedir (6). Sentetik GH salgılatıcılar GHS-R1a bağlanması neticesinde hipofiz bezi somatotrop hücrelerinden GH salınımına neden olurlar.

GHS'ler G protein ailesinden bir reseptöre ve GHS reseptörüne (GHS-R) bağlanarak etkinlik gösterirler (7,8). GHS-R aktivasyonu ve amaçlanan sinyal iletimi, protein kinaz C sistemi ile ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarının artması sonucu gerçekleşir. GH salgılayıcı peptid 6 (GHRP-6) hücre içi Ca^{++} konsantrasyonlarını balıca iki yolla artır. Birinci yolda GHS-R1a'a bağlanan grelin, fosfolipaz C'i aktive eder; plazma membranında depolanmış olarak bulunan fosfatidil inozitol 4,5 bifosfat hidrolize uğrar ve diaçilgliserol (DAG) ve inozitol trifosfat (IP_3) ayrılır. IP_3 , endoplazmik retikulumdaki IP_3 reseptörüne bağlanarak Ca^{++} depolarından kalsiyum salınımı sağlar (9). İkinci yolda da DAG, plazma membranında bulunan protein kinaz C'i aktive eder. Aktive olan protein kinaz C, tirozin fosforilasyonu ile potasyum kanallarını bloke edilirken sodyum kanalları açılır ve depolarizasyon oluşur, bu sayede voltaj duyarlı L tipi kalsiyum kanalları açılmış olur (9, 10).

Grelinin etkisini GHS-R1a üzerinden gösterdiği bilinmektedir (5). Des-açıl grelin, greline oranla daha yüksek miktarlarda bulunmasına karşın, GHS-R1a'ya tutunamaz ve hormonal etkinliği yoktur (4). Sentetik büyüme hormonu salgılatıcıları (GHS), spesifik reseptörler aracılığı ile büyüme hormonu salgılamasını tetikleme olanağına sahip olan sentetik bileşiklerdir. GHS'ler morfin reseptörleri baz alınarak, bu reseptörlere affinite gösteren sentetik ligand sentezi sayesinde geliştirilmeye başlanmıştır. Sentezlenen bu ligandlar enkefalinlerin peptik analoglarıdır. Sentetik enkefalin analoglarından bir kısmı düşük miktarlarda GH salgılatıcı etki gösterebilmiştir. GHRP-6, ilk in vitro GH salgılatma özelliğine sahip GHRP'dir (11). GHRP-6'nın yapılan deneyler sonucu sadece invitro ortamda etkili olmadığı, aynı zamanda invivo ortamda da etkili olduğu tespit edilmiştir (12). Hexarelin ve benzeri peptid analoglarının geliştirilmesi, GHRP-6 ile sağlanmıştır (13). Peptid yapıda olamayan GHS lerden L-692, 492 ve diğer non-peptid GHS olan L-163,191 (MK-0677) etki mekanizmaları açısından incelenmiştir. Bu bileşikler özellikle ağızdan veya sindirim harici bir yolla alındığında büyüme hormonu salınımını artırdığı olduğu için klinik açıdan önem kazanmıştır (14,15).

2.3. GRELİNİN DOKULARDA DAĞILIMI

Grelın bütün omurgalılarda başlıca mide fundus mukozasındaki oksintik bez ve sinir sisteminde olmak üzere iki çeşit hücresel alan içerisinde üretilmektedir. Grelinin ana sentez yeri midenin fundus mukozasındaki oksintik bezlerinde yerleşik olan X/A hücreleridir (1). Midenin fundus bölgesi, piloris bölgesine kıyasla daha fazla grelin üretebilme kabiliyetine sahiptir. Bilindiği gibi mide oksintik mukozada enterokromafin, delta (D), enterokromafin benzeri ve X/A olmak üzere dört çeşit hücre bulunmaktadır. Bunlardan yalnızca X/A hücreleri grelin sentezi yapar (16,17).

Hipotalamusta da ekspre edilen grelin peptidi, bu bölgedeki hipotalamik arkuat nükleus (ARC)'de sentezlenir. (1,4). Grelinin kardiovasküler etkilerinin olabileceği düşüncesi ise kalp ventriküllerinde bulunan GHS-R reseptörlerinden ileri gelmektedir. Medüller tiroid ve tiroid karsinoması, nöroendokrin tümörler ve akciğer tümörleri gibi farklı tip tümör dokularında da grelin saptanmıştır (18). Gastrointestinal sistem dışında grelinin endokrin rolü henüz anlaşılamamıştır.

Sıçan pankreasında yürütölen deneysel çalışmalar sonucunda grelin ve açillenmemiş grelinin bir kısmının α veya β hücrelerinde, bir kısmının ise yeni adacık hücrelerinde bulunduğunu göstermektedir (19,20).

Grelın mRNA'sı PCR yöntemiyle %30'u ince bağırsakta görülürken düşük miktarda da hipofiz, plasenta, pankreas, böbrek, prostat, over, beyin, testis, akciğer ve lenfositlerde tespit edilmiş olması onun çok çeşitli biyolojik aktivitelerde rolü olan bir peptid olduğunu kanıtlamaktadır (3,21,22).

2.4. GRELİNİN BAŞLICA FONKSİYONLARI

Grelinin organizmada çok çeşitli sistemler üzerine etkili olduğu gösterilmiştir. Grelinin vücuttaki etkilerini şu başlıklar altında inceleyebiliriz.

1. Yemek yeme ve uyku üzerine etkisi
2. Hücre proliferasyonu üzerine etkisi
3. Kardiovasküler etkileri
4. Karbonhidrat metabolizması ve enerji metabolizması üzerine etkileri
5. Pankreatik ekzokrin ve endokrin fonksiyonu üzerine etkisi
6. Gastrointestinal sistem üzerine etkisi

7. Diğer endokrin etkiler

2.4.1. Yemek Yeme ve Uyku Üzerine Etkisi

İştahın beyin tarafından kontrol edildiği ve yemek yemenin merkezi sinir sistemindeki ve özellikle hipotalamustaki kompleks mekanizmalar tarafından düzenlendiği kabul edilmektedir (23). Grelinin yemek yeme üzerine etkisi GH'dan bağımsızdır. GHS'larının yemek yeme üzerine pozitif etkili olduğu sıçanlar üzerinde gösterilmiştir. Tüm memeli canlılarda grelin oreksijenik ve adipogenik etkili bir moleküldür (24). Oreksijenik etki hızlı ve kısa ömürlüdür. Hipotalamus, enerji homeostazisi için kontrol merkezidir. Greltin hipotalamusta iştah üzerine etkisini üç yolla yapar: 1) Mideden salgılanan grelin kan yoluyla arkuat nükleus hücrelerine ulaşır ve kan-beyin bariyerini geçerek aktif transport yolu ile diğer beyin hücrelerine ulaşır. 2) Periferde sentezlenen grelin, vagal etkileşimlerle GHSR ekspresyonunu sağlar ve vagal etkileşimler nükleus traktusa erişerek hipotalamusu etkiler. 3) Greltin lokal olarak hipotalamusta sentezlenir ve NYP/AGRP ve diğer hipotalamik hücrelerle direkt etkileşimde bulunur. (1).

Greltin üreten nöronlar hipotalamusta arkuat nükleus bölgesinde bulunur. Bu bölge leptinin de etki yaptığı bölgedir. Nöropeptid Y (NPY) ve iştah etkili protein adlı oreksijenik peptidler, arkuat nükleusta aynı nöronlarla leptin reseptörü üzerinden etkisini gösterir. İntraserebroventriküler grelin uygulamasının ARC'de NPY ve iştah etkili protein mRNA düzeylerini arttırdığı, periferel grelin uygulanmasının ise hipotalamik nöronları ve gıda alımını stimule ettiği gösterilmiştir. Periferel grelinin bariyeri geçme hızı son derece yavaştır. Uykuyu arttırdığı belirtilmişse de bu tanı kesin değildir. İnsanlarda hafif uyku getirdiği daha önceki bazı çalışmalarda gösterilmiştir (1).

2.4.2. Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Birçok tümör dokusunda grelin ve grelin reseptörlerinin eksprese edilmiş ve bu oluşumlarla grelin arasında bir ilişki olabileceği düşünülmüştür. İn vitro çalışmalarla grelinin veya analoglarının tümör hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. İn vitro ortamda greline maruz bırakılan prostat kanserli hücrelerin proliferasyonunda görülen artış, grelinin otokrin/parakrin yollarıyla hücre proliferasyonunu stimüle etme yeteneğine sahip olduğunu akla getirmiştir (25,26).

2.4.3. Kardiovasküler Etkiler

Grelin ve sentetik GHS'in kardiyovasküler sistemde farklı alt tipde reseptörlerinin bulunduğu tespit edilmiştir (27-30). Bu reseptörlerin varlığı, grelinin kardiyovasküler sistemde değişik etkilere sahip olabileceğini göstermektedir (31).

Grelinin kan basıncını düşürdüğü, kardiyak hacmi arttırdığı gönüllü deneklerde yapılan intravenöz grelin enjeksiyonu neticesinde görülmüştür (27,32). Ayrıca, kardiyovasküler sistemde iskemi gibi çeşitli bozukluklara karşı koruyucu rol oynamaktadır (30,33).

2.4.4. Karbonhidrat Metabolizması Üzerine Etkileri

İnsanlarda (normal kilolu ve obezlerde) intravenöz grelin uygulanması akut olarak insülin salınımını inhibe eder (34). İnsulin direnci ve glikoneogenezde artış ve dolaşımdaki glukoz düzeylerindeki yükselme, grelinin GH salınımını arttırması sonucu gerçekleşir (35).

Grelin GH reseptör antagonisti benzer etkiler göstererek insülin direncini arttırır. Özetle, grelinin insülin salınımı üzerine etkisi GH yolu ile dolaşımdaki glukoz düzeylerini düzenleyerek, insulin direncini arttırarak ve glikoneogenezde stimule ederek olduğu düşünülmektedir (36).

Kemirgenlerde kronik grelin alımı vucut yağ düzeylerini arttırır. Grelin veya GHS'lar dolaşımdaki leptin düzeylerini ve mRNA ekspresyonunun arttırır (24)). İnsulin direncinde ve obezitede patogenezi bildirilen adiponektin kahverengi yağ dokusuna, in vitro grelin uygulanmasından sonra inhibe olur. Bunlar grelinin adipogenezde ve enerji depolanmasında önemli rol oynadığını gösterir (37).

2.4.5. Gastrointestinal Etkileri

Yapılan çalışmalarda intravenöz grelin uygulanmasının doza bağımlı gastrik asit salgılanmasını ve gastrik hareketliliği arttırdığı gösterilmiştir (1).

Grelinin intraserebroventriküler uygulanması da gastrik asit salgılanımını arttırır.

2.4.6. Otonomik Sinir Sistemi Üzerine Etkileri

Leptin sempatik aktiviteyi uyarıcı etki göstermesine karşın grelin, sempatik aktiviteyi azaltarak ve vazodilatasyonu arttırmak suretiyle kan basıncını düşürebilmektedir. Grelinin kardiyovasküler sistemin sempatik aktivitesini azaltıcı, vagal afferent sinirin boşalması üzerine engelleyici ve gastrointestinal parasempatik aktiviteyi artırıcı (gastrik motilite ve asit salgılanması) etki gösterdiği tespit edilmiştir (38,39).

Vagal afferent nöron bölgesinde grelin reseptörlerinin tespit edilmesi, grelinin vagal sinirle olan ilişkisini göstermektedir. Grelın vagal afferent frekans seviyesini düşürmektedir. Bu nedenle, grelinin vagal sinir aktivitesi ile gıda alımı üzerine olan etkileri birbirine zıttır. Yapılan çalışmalar vagus sinirinin kesilmesiyle birlikte gıda alımında değişiklik meydana gelmesi vagus siniri grelin derişiminden bağımsız olarak iştahı etkilediğini göstermektedir (40).

2.4.7. Pankreatik Ekzokrin ve Endokrin Fonksiyonu Üzerine Etkisi

Pankreasta grelin üretilmektedir. Grelinin pankreasda yeni tanımlanan α adacık hücrelerinde sentezlendiği gösterilmiştir (3,41). Pankreastaki etkileri tam olarak bilinmemektedir.

2.4.8. Diğer Endokrin Etkiler

İntravenöz olarak uygulanan grelinin GH salınımını dolayısıyla da adrenokortikotropik hormon (ACTH), kortizol ve prolaktin seviyelerini az miktarda arttırdığı görülmüştür. Grelinin tek başına GH salgılanması üzerine etkisinin, GHRH ile birlikte verilmesi sonucu artmış olduğu tespit edilmiştir (42).

2.5. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ VE OKSİDATİF STRES

Serbest radikaller, orbitallerinde eşlenmemis elektron taşıyan ve diğer biyolojik materyallerle reaksiyona girme eğilimi gösteren maddelerdir. Genellikle radikal olmayan herhangi bir molekül veya atoma elektronun girmesi çıkması ile meydana gelirler. Vücutta bütün hücrelere kolaylıkla giren ve en çok kullanılma özelliğine sahip olan moleküler oksijen (O_2), yapısı itibarıyla radikal olmaya çok uygun olduğudur, bu nedenle serbest radikal denilince a serbest oksijen radikalleri (SOR) akla gelir. Normal şartlarda vücutta olusan SOR ile antioksidan savunma sistemi bir denge halindedir. Fazla SOR üretimi ya da antioksidan savunmanın azalması, biyomoleküllerde yapısal ve fonksiyonel değişimlere yol açarak oksidatif strese neden olur. Polimorf nükleer lökositlerin aktive olması ile ortaya çıkan solunum patlamasında rol alan NADPH oksidaz, SOD, nitrik oksit sentaz (NOS) ve MPO gibi enzimler süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), nitrik oksit (NO) ve hipokloröz asit gibi reaktif ürünlerin ortaya çıkmasına yol açar (43,44). Asırı reaktif bu maddeler, diğer atom ve moleküllerle elektron alısvorisine girerek, onların kimyasal yapılarını değiştirmek suretiyle kararsız (reaktif) bir atom haline gelmesine yol açabilirler.

Serbest radikaller hücrede protein, DNA, lipit ve karbonhidrat gibi önemli hücresel yapı ve bileşiklere etkilidir. Membranı oluşturan fosfolipitler, glikolipitler, gliseritler gibi doymamıs

yag asitleri ve membran proteinleri radikaller için oldukça çekici hedeflerdir Oksidanların arttığı veya antioksidanların yetersiz kaldığı durumlarda organizmanın maruz kaldığı “oksidatif stres”, sonuçta bozulan hücresel metabolizma, moleküler yıkım ve doku hasarını getirir. Oksidatif hasarın olduğu dokuda artan radikal metabolitler ve bunların oluşturduğu lipid peroksidasyonu ile protein ve DNA oksidasyonu sonucu hücre membranında kontrol kaybolur; geçirgenlik artışı ve hücresel ölüm gelir (45). Günümüzde serbest radikaller ve reaktif moleküller ile bunların reaksiyonları ve ürünlerindeki artışın hücresel yaşamı olumsuz etkilediği, genetik mutasyonlara yol açtığı bilinmektedir (46,47). Bu bağlamda SOR’nin düzeylerini arttırarak oksidatif strese yol açan nedenlerin bilinmesi, bunlardan uzak durulması gerekmektedir.

2.5.1.Serbest Oksijen Radikal Kaynakları

Serbest oksijen radikallerinin iki önemli kaynağı vardır :

A) Eksojen kaynaklar

- Radyasyon etkisi
- Bağışıklık yapan maddeler
- Ksenobiyotikler
- Antineoplastik ilaçlar
- Stres; strese katekolamin düzeyi artar, artan katekolamin oksidasyonu ile radikal üretimi artmaktadır.

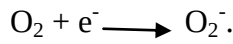
B) Endojen kaynaklar

- Mitokondrial elektron transport sistemi
- Oksidatif stres durumları
- Peroksizomlarda bulunan enzimler
- Enzimler ve proteinler; triptofan dioksijenaz, hemoglobin vs.
- Küçük moleküllerin otooksidasyonu; tioller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, tetrahidroproteinler, antibiotikler vs.
- Endoplazmik retikulum ve nükleus membran elektron transport sistemleri (sitokrom p-450)
- Makrofaj gibi fagositik hücrelerin aktivasyonu ile meydana gelen solunumsal patlama

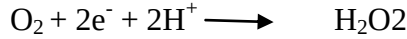
- Plazma membranı enzimleri; NADPH oksidaz, lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz, lipid peroksidasyonu vs. Nötrofiller fagositoz esnasında, membran ve sitoplazmalarında bulundurdıkları NADPH oksidaz ve myeloperoksidaz enzimleri ile hem serbest oksijen radikalleri hem de aşırı okside edici bazı ajanları üreterek karşılaştıkları virus, bakteri, mantar gibi ajan patojenleri yok ederler. Bu işlemler esnasında hem ana hem de ara ürün olarak çok fazla miktarda SOR oluşur (48).

2.5.2.Serbest Oksijen Radikal Türleri

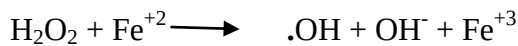
Serbest radikaller ortaklanmamış elektron taşıyan kimyasal bir yapı olarak tarif edilmektedir. Biyolojik ortamlardaki en önemli serbest radikaller şüphesiz oksijen radikalleridir. iskemi, hemoraji, intoksikasyon, radyoaktivite gibi durumlarda mitokondrilerde aerobik oksidatif fosforilasyon dengesi etkilenir ve elektron taşıma sisteminden elektron kaçakları oluşur. Tek bir elektronun transfer yoluyla oksijene verilip redüklenmesi süperoksit serbest radikal anyonunu (süperoksit, $O_2^{\cdot-}$) oluşturmaktadır.



Oksijenin 2 elektronla redüklenmesi ise hidrojen peroksiti (H_2O_2) olusturur.



Hidrojen peroksit, serbest radikal biyokimyasında önemli bir bileşiktir. Çünkü geçiş metal iyonlarının varlığında kolaylıkla parçalanıp oksijen radikallerinin daha reaktif ve biyolojik sistemlerde daha fazla hasar oluşturan hidroksil radikalini ($OH^{\cdot}$) olusturur.



Bu ifade edilen reaksiyon demir katalizli Haber-Weiss (Fenton) reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır (49).

2.5.3.Serbest Radikallerin Hücreler Üzerindeki Etkileri

2.5.3.1.Lipidlerde Meydana Gelen Yapısal Değişiklikler

Plazma membranı, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi biyolojik membranlara serbest radikallerin etki etmesi lipid peroksidasyonu üzerinden membranların çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımına yol açabilir. Poliansatüre (çoklu doymamış) yağ asitlerinin oksidatif hasarı lipid peroksidasyonu olarak bilinmektedir. Lipid peroksidasyonu, bir lipid molekülünde iki doymamış bağ arasında yerleşmiş olan bir metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkarılması ile başlayan kompleks bir fenomendir. Lipid peroksidasyonu sonucunda

hücrede kendiliğinden devam eden zincirleme reaksiyonlar başlamaktadır. Oksidasyon sonucunda oluşan lipid peroksil radikalleri (LOO.) bir sonraki poliansatüre yağ asidini okside ederek yeni zincirleme reaksiyonları başlatırlar. Bu ürünlerin daha ileri parçalanmaya uğraması ile rölatif olarak daha stabil olan son ürün MDA (malondialdehit) oluşur. Dolayısıyla bir dokuda MDA düzeyinin artması serbest oksijen radikallerinin arttığını gösterir. MDA'nın kendisi de üretildiği yerde iki yönlü hareket edebilir; hem dış ortama hem de hücrenin iç kısmına yönelebilir. Hücre içinde bir çok yapıya zararlı etkileri vardır. Dolayısıyla serbest oksijenlerin lipidlere etkisi sonucu açığa çıkan patolojik ürün olan MDA da daha ileri yıkımlara sebep olabilir. Hücre membranlarının lipid kısmının büyük çoğunluğu fosfolipid ve bunların yapısındaki poliansatüre yağ asitlerinden oluşmuştur. Bu hasar sonucunda membranın yapısı ve fonksiyonları büyük ölçüde bozulur (48,50).

2.5.3.2. Proteinlerde Meydana Gelen Yapısal Degisiklikler

Protein ve nükleik asitler serbest radikal etkilerine karşı poliansatüre yağ asitlerine göre daha dirençlidir. Bunun başlıca sebebi, hasar oluşturunca zincir reaksiyonlarının protein ve nükleik asit moleküllerinde gerçekleşme ihtimalinin çok zayıf olmasıdır (49). Serbest radikaller DNA molekülüne çok yakın bir bölgede meydana geliyorsa, okside edici radikaller tarafından DNA molekülü kolaylıkla hasara uğratılabilmektedir (51).

2.5.4. Enzimatik ve Nonenzimatik Antioksidan Sistemler

2.5.4.1. Nonenzimatik Antioksidanlar

E Vitamini: Lipid peroksidlerini inaktive eder. Ayrıca lipid peroksid zincirini kırar ve LPO (lipit peroksidasyonu) tepkimelerini durdurur.

C vitamini: Hücre dışı sıvılarda bulunur. O_2^- ve $OH^\cdot$ leri direkt olarak temizleyebilmektedir.

Seruloplazmin: O_2^- ve $OH^\cdot$ leri temizler. Ferröz demirin, ferrik demire yükseltgenmesini sağlar böylelikle Fenton tepkimesini inhibe eder. Bu olayın sonucunda serbest radikal oluşumu inhibe olur .

Transferin: Dolaşımda serbest halde bulunan demiri bağlar .

Ürik asit: Normal plazma konsantrasyonlarında O_2^- , $OH^\cdot$ ve peroksil radikallerini temizlemektedir .

Albümin: Geçiş metallerini bağlar, lipid hidroperoksit (LOOH) ve hipoklorit (HOCl) toplayıcısıdır .

Bilirubin: Serbest radikalleri tutar, O_2^- ve $OH^\cdot$ toplar.

Piruvat: H_2O_2 tutucusudur, güçlü bir antioksidandır

Taurin: Ksenobiotiklere bağlanır. Hipoklorit ile tepkimeye girer ve etkisini azaltırlar. LPO ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe eder. Antioksidan etkisinin olduğu gösterilmiştir.

β -Karoten: A vitamininin öncüsüdür ve membranlarda bulunur. Serbest radikal temizleyicisidir. Peroksitlere doğrudan etki ederek peroksitleri inaktif hale getirir.

Melatonin: Primer olarak pineal bezde sentezlenen, özellikle gece salgılanan ve triptofandan sentez edilen bir hormondur. Lipofilik özelliği yüksek olup membranları kolaylıkla geçer. Organizmada yapılan ve tahrip edici özelliği çok yüksek olan hidroksil radikali temizler.

Glutasyon: Glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinden genetik bilgiye sahip olmadan karaciğerde tripeptid yapıda sentezlenmektedir. Glutasyon, oksidatif stresin ölçümünde kullanılan çok güçlü bir antioksidandır. Redükte glutasyon (GSH) /okside glutasyon (GSSG) oranı, oksidatif durumlarda azalmaktadır. Proteinlerdeki $-SH$ gruplarını redükte halde tutarak oksidasyondan korur. Serbest radikaller ve peroksitlerle tepkimeye giren glutasyon; hücreleri oksidatif hasara karşı korur .

Sistein: Potent bir antioksidandır. Glutasyon sentezi için prekürsördür (44,52).

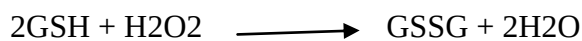
2.5.4.2. Enzimatik Antioksidanlar

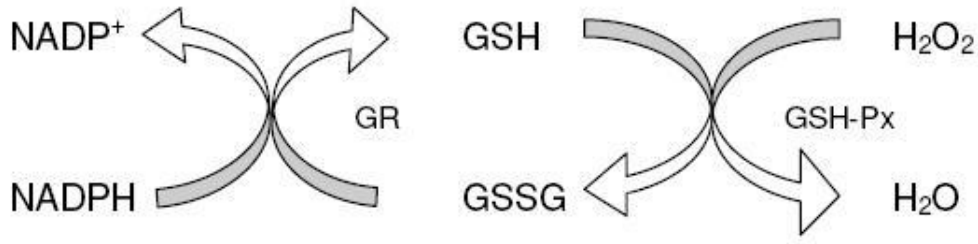
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD)

belli başlı antioksidan enzimlerdir .

2.5.4.2.1. Glutasyon Peroksidaz

Yapısında selenyum metalini bulundurur. Bu nedenle metalloenzim grubunda değerlendirilir. İn vitro ortamda GSH'ı GSSG'ye çevrilir. Bu tepkimede H_2O_2 'yi yüksek özgülük ile katalizleyerek detoksifiye eder (şekil 3). Tepkimede GSH, GSSG haline dönüşürken glutasyon peroksidaz enzimi H_2O_2 'yi suya indirger. GSSG ise glutasyon redüktaz (GR) enziminin katalizlediği tepkimeyle NADPH harcanarak tekrar redükte hale çevrilir Tepkime aşağıda verilmiştir:





Şekil 2.1: Glutatyonun okside ve redükte formları arasında dönüşümü (GSH=Redükte glutatyon, GSSG=Okside glutatyon, GSH-Px=Glutatyon peroksidaz, GR=Glutatyon redüktaz, H₂O₂=Hidrojen peroksit).

Ortamda H₂O₂ düşük konsantrasyonda bulunduğunda GSH-Px enzimi CAT enziminine göre daha etkili bir antioksidandır (51,53).

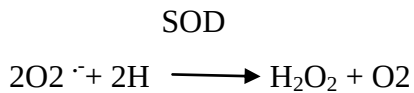
2.5.4.2.2. Katalaz

CAT enzimi glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Ferriprotoporfirin grubu içeren dört alt üniteden oluşmuştur. Prostetik grubunda Fe⁺³ bulunan protoporfirin IX içerir. Dokularda enzimin aktivitesi büyük farklılık gösterir. Karaciğer ve böbrekte en yüksek aktivite, destek dokuda ise en düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. H₂O₂'in yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda oldukça etkilidir. Ortamda oluşan H₂O₂'yi okside edici enzimlerin etkisiyle direkt olarak suya dönüştürür. CAT enzim aktivitesi, ortamda H₂O₂ konsantrasyonunun çok arttığı durumlarda; aşikar olarak artmaktadır. Ortamdaki H₂O₂ konsantrasyonu düşük olduğu durumlarda hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (GSH-Px gibi) devreye girerek hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştırırlar. CAT ve GSH-Px enzimlerinin benzer etkisi olduğu halde hücre içindeki yerleşim ve etki yerleri bakımından farklılık vardır. GSH-Px enzimi başlıca sitozol ve mitokondride bulunurken, CAT enzimi peroksizomlarda mevcuttur (46,50).

2.5.4.2.3. Süperoksit Dismutaz

SOD, O₂^{-•}'in, H₂O₂'e dismutasyonunu katalizleyen enzim grubudur.

Katalizlediği tepkime aşağıda verilmiştir:



Spontan olarak bu tepkime oluşabilmektedir, SOD enzimi bu tepkimeyi katalize ettiğinde hız normale göre 4 kat artar. Radikallere karşı hücreyi koruyan savunma mekanizmaları arasında SOD enzimi ilk görevi üstlenir. SOD enzimi ile katalizlenen tepkime sonucu oluşan ürünlerin birikmesi CAT enzimi tarafından bertaraf edilmektedir. Fizyolojik şartlarda metabolik aşamalarda O_2^- radikalinin oluşumu oldukça fazladır. O_2^- radikalinin hücre içi konsantrasyonunu düşük seviyelerde tutarak O_2^- seviyelerinin kontrolünü sağlayıp hücreleri O_2^- radikallerinin etkilerinden korur (52).

2.6.TİLMİKOSİN

Tilmikosin 20-deoxo-20-(3,5-dimethylpiperidin-1-yl) desmycosin yapısında semisentetik makrolid grubu bir antibiyotiktir. Desmycosinin C-20 aldehit gruplarının redüktif aminasyonu ile elde edilmiş ve bu yapısal değişim ile Gram pozitif mikroorganizmalara yönelik etki spektrumunda genişleme ve antibakteriyel aktivitede artış sağlanmıştır. Böylece bir çok hayvan türlerinde sürekli kontrol altında tutulması gereken solunum sistemi patojen etmenlerinden *Pasteurella* türlerine karşı kullanımı gündeme gelmiştir. Tilmikosinin diğer makrolidler ngibi ribozomların 50S alt birimine bağlanarak bakteriyel protein sentezinin engelleyerek antibakteriyel etki gösterir. Ayrıca oral yolla kullanımı takiben hızla absorbe edilmesi, uzun bir yarı ömre sahip olması ve dokulara penetrasyon yeteneğinin yüksek olması gibi farmakokinetik özellikleri sayesinde solunum sistemi enfeksiyonlarının tedavisinde rasyonel kullanım olanağı doğmuştur (54,55,56).

Tilmikosinin özellikle besi sığırlarında ve kuru dönemdeki süt sığırlarında *Pasteurella* ve *Mycoplasma* türlerinin neden olduğu solunum sistemi enfeksiyonlarına (BRD) karşı uzun süreli tedavi edici ve koruyucu etkiye sahip olduğu bildirilmektedir. Ayrıca domuzlarda *Actinobacillus pleuropneumonia* ve *Pasteurella multocida*'dan kaynaklanan bulaşıcı pneumoniaya karşı etkenlerin enzootik yayılımı gösterdiği yerlerde koruyucu amaçla yem katkı maddesi olarak kullanımı önerilmektedir. Tavuklarda ise solunum sistemi patojenlerine karşı etkinliği ile ilgili yapılan araştırmalarda *Pasteurella* spp., *Mycoplasma* spp. ve *Ornithobacterium rhinotracheale* için minimum inhibitör konsantrasyonun (MIK) <6,25 µg/ml ve *Pasteurella multocida* için MIK değerinin 4 kat fazlasının bakterisit etkiye sebep olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde *Mycoplasma gallisepticum* ile oluşturulan deneysel enfeksiyonlarda da tilmikosinin, mortalite ve lezyonların görülme oranını azaltmasından başka canlı ağırlık kazancında da önemli düzeyde artışa neden olduğu vurgulanmıştır (56-58).

Klinik kullanım açısından en güvenli ilaçlar arasında düşünülmesine rağmen bazı makrolitlerin kardiyovasküler sistem üzerine olumsuz etkiler yaptığı tespit edilmiştir. Oral ya da parenteral verilen tilmikosinin laboratuvar ya da evcil hayvanlarda kalp atımını artırdığı (taşikardi) kantraktiliteyi azalttığı (negative inotrop), kardiyak enzim düzeylerini artırdığı ve miyokartta antioksidan enzim aktivitelerini azaltmak suretiyle de oksidatif strese neden olduğu bildirilmiştir (59-61).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER ve KİMYASALLAR

1. Tilmikosin (Micotil 300, Lilly Elanco, İstanbul- Türkiye)
2. Grelin (Sigma G8903, sıçan)
3. %0.9 NaCl
4. SOD kiti
5. CAT kiti
6. GSH-Px kiti
7. Otomatik pipet (0.1-10µ)
8. Homojenizatör
9. Spektrofotometre
10. Hassas terazi
11. pH metre
12. De iyonize su cihazı
13. Buz dolabı

14.Etüv

15.Su banyosu

14. Trikloroasetik asit (Merck 100.807)

15. 2-thiobarbutirik asit (Merck 108.180)

16. n-butanol (Aldrich 27, 067-9)

3.1.1. Hayvan Materyali

Araştırmada Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezinden temin edilen 260-305 g ağırlığında 40 adet erkek Sprgue Dawley ırkı sıçan kullanıldı. Çalışmadaki ratların hepsi deney süresince standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/12 saat karanlık) ve oda ısısı koşullarında (20- 22 C⁰) bulunduruldu. Standart rat yemi ile beslendi. Ratların her bir grubu ayrı kafeslere konarak yeterli miktarda içme suyu ve standart rat pellet yemi verildi.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Gruplar

Araştırmada her bir grupta 10 rat olmak üzere 1 kontrol ve 3 deneme grubu kullanıldı. Kontrol grubuna (grup 1) 5 gün boyunca 0.9 % NaCl deri altı yolla enjekte edilirken, 2.gruba deri altı yolla 5 gün süreyle 10 nmol/kg/gün grelin, 3. deneme grubuna deri altı yolla tek doz tilmikosin (75 mg/kg), 4. gruba ise günde 10 nmol/kg grelin deri altı yolla 5 gün süreyle verildikten sonra ayrıca bu gruba 5. günde 75 mg/kg tilmikosin tek doz, deri altı olarak uygulandı. Son ilaç uygulamasından 24 saat sonra tüm hayvanların kalbi çıkarılıp serum fizyolojik ile yıkandı ve analiz yapılıncaya kadar -20⁰C’de saklandı. Alınan kalp dokusu örneklerinde MDA düzeyi, GSH-Px, SOD ve CAT enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

3.2.2. Doku  rneklerinin Alınması ve Homojenizasyonu

Ratlar, son enjeksiyondan 24 saat sonra (deneyin 6. günü) i.p. 20 mg/kg sodyum thiopental ile anestezi yapılarak sakrifiye edildi. Orta hat median insizyonla ratların batinları açıldı ve kalp dokusu örnekleri çıkarıldı. Doku  rnekleri biyokimyasal çalışmalar gerçekleştirilene kadar - 20 C’lik derin dondurucuda saklandı.

Dokular 1:4 oranında fosfat tampon (50 mmol, pH 7.0) içinde ve soğuk ortamda 20000 rpm hızda 30 sn süreyle homojenize edildi. Elde edilen doku homojenatları 20 000 devirde 1 saat

boyunca soğutmalı santrifüjde (+ 4 C’de) santrifüj edildi. Süpernatantlar ependorfa alındı ve analiz zamanına kadar -80 C’lik derin dondurucuda muhafaza edildi.

Tablo 3.1. Kontrol ve deneme grubu uygulama çizelgesi

Grup	Uygulama
Kontrol	5 gün süreyle %0.9 NaCl deri altı
Tilmikosin	75 mg/kg tilmikosin deri altı, tek doz
Grelin	10 nmol/kg/gün grelin deri altı 5 gün süreyle
Grelin+CCl ₄	10 nmol/kg grelin deri altı 5 gün süreyle + 75 mg/kg tilmikosin deri altı, tek doz (5.günde)

3.2.3. Doku MDA, CAT, SOD ve GSH-Px analizi

MDA ölçümü tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA’in asit ortamda pembe renkli bir ürün oluşturması esasına dayanan Yoshioka ve ark (62)’nin yöntemine göre spektrofotometrik olarak yapıldı. Analizlerde 0.5ml numune vida kapaklı cam tüpe alındı ve üzerine 2.5ml %20’ lik TCA ilave edildi. Ardından 0.5 ml % 0.67’lik TBA ilave edildi. Kör hazırlamak için kör tüpüne tüpüne 3ml TCA konarak aynı miktarda TBA ilave edildi. Kapakları sıkıca kapatılan tüpler 90 C’lik su banyosuna alındı ve 30 dakika tutuldu. Sürenin sonunda tüpler buzlu soğuk su içerisinde soğutuldu. Tüplerin kapakları açıldı ve 4ml n-butanol ilave edilip 30 sn vortekslendi, 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjü takiben üstte kalan n-butanol tabakası küvetlere alınarak 535nm’de köre karşı absorbans ölçümleri yapıldı. Absorbans değerleri 1.1.3.3 tetraetoksipropenla hazırlanmış standart eğrisi yardımıyla nmol/ml cinsinden hesaplandı.

CAT, SOD vee GSH-Px analizi ticari kitler kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmanın analizi bilgisayar ortamında SPSS 12.0 for Windows istatistik paket programında yapıldı. Gruplarda yer alan sonuçların normal dağılıma sahip olup olmadıklarını belirlemek için non-parametrik testlerden one-sample Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Gruplar normal dağılım gösteriyordu. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile tespit edildikten sonra gruplar arasında farklılığı tespit etmek amacıyla One-Way ANOVA ve Tukey's testi kullanıldı. Veriler aritmetik ortalama ve standart hata olarak verildi. Önemlilik düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

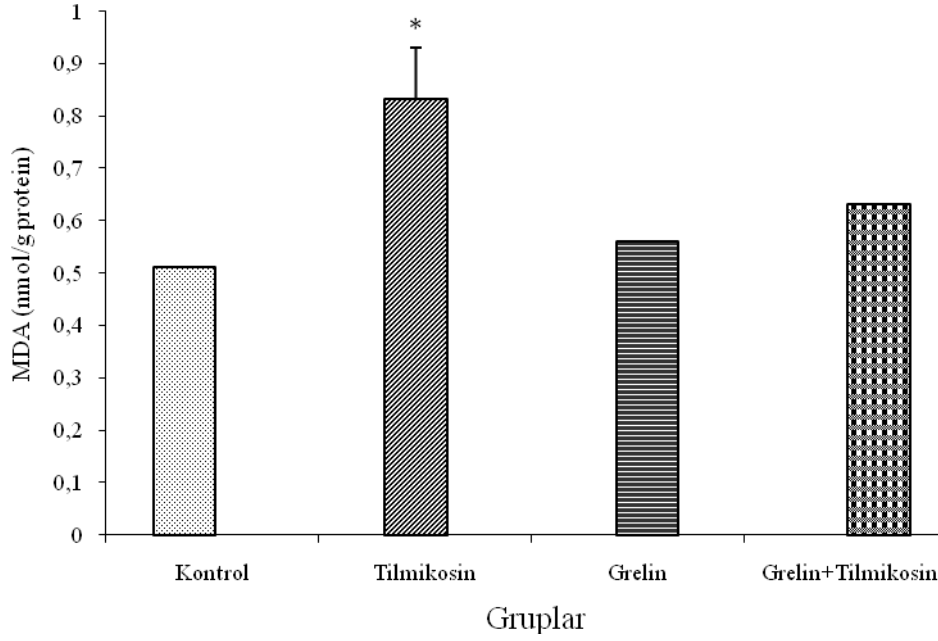
Bütün gruplara son enjeksiyonun yapılmasından 24 saat sonra alınan kalp dokusu örneklerinden elde edilen kontrol ve deney gruplarına ait MDA, SOD, CAT ve GSH-Px verileri Şekil 4.1-4.4'te gösterildi.

Yalnız tilmikosin verilen grupta MDA değerleri kontrol grubu değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu ($p<0.05$) belirlenirken, 5 gün süreyle verilen grelini takiben tek doz tilmikosin uygulanan grupta ölçülen MDA düzeylerinin ise kontrol grubu değerlerine yaklaştığı gözlemlendi. Yalnız grelin verilen grupta ise MDA değerleri açısından kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilemedi.

Gruplar SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktiviteleri açısından karşılaştırıldığında yalnız tilmikosin verilen grubun SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinde diğer gruplara göre anlamlı bir azalma ($p<0.05$) kaydedildi. Öte yandan 5 gün süreyle verilen grelini takiben tek doz tilmikosin uygulanan grupta ölçülen SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinin kontrol grubu değerine yaklaştığı gözlemlendi.

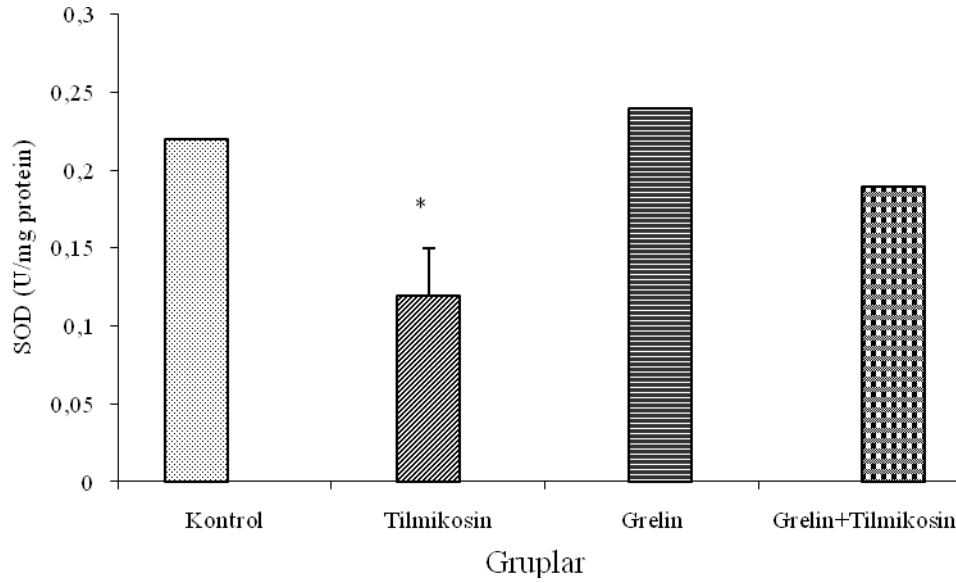
Bu verilere göre tilmikosinin oksidatif stresi uyarak lipit peroksidasyonunu artırdığı ve kalpte anti oksidanenzim düzeylerini azalttığı buna karşılık grelinin ise tilmikosinin uyardığı lipit peroksidasyonu azaltmak ve antioksidan enzim düzeylerini artırmak suretiyle kalp dokusunu koruyucu etki gösterdiği söylenebilir.

Yalnız grelin uygulanan grupta MDA düzeyleri ile SOD, CAT ve GSH_Px enzim aktiviteleri kontrol grubu verilerine yakın bulundu.



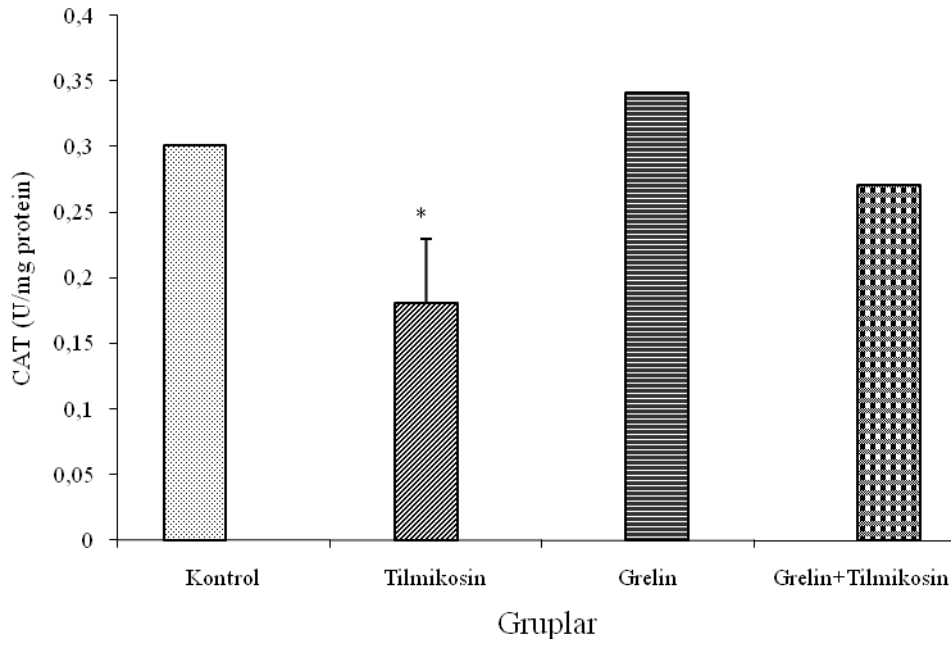
Şekil 4.1. Kontrol grubu ile tilmikosin, grelin ve grelin+ tilmikosin uygulanan gruplarda ortalama MDA düzeyleri.

*: Diğer gruplara göre istatistiksel olarak önemli bir artmayı göstermektedir ($P<0.05$).



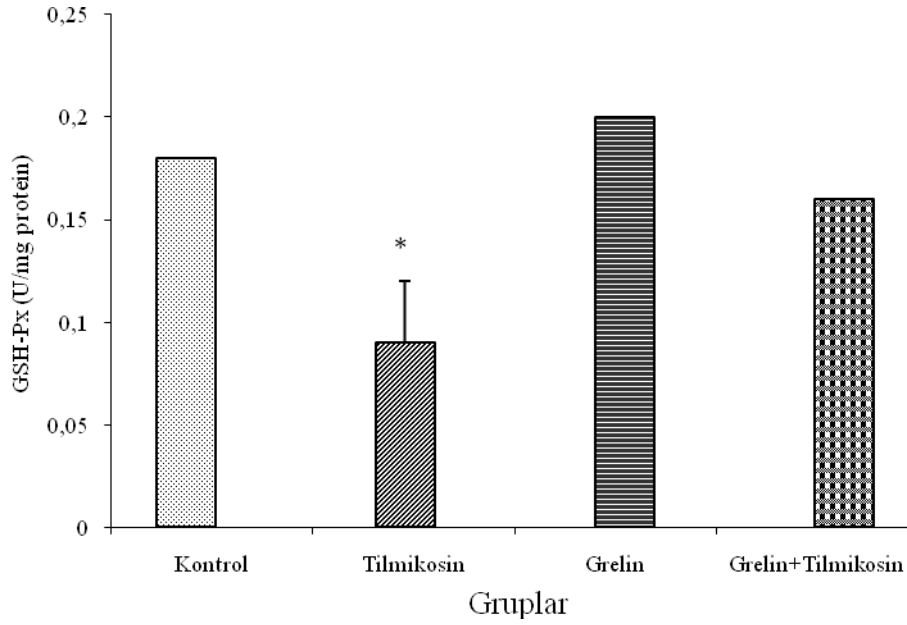
Şekil 4.2. Kontrol grubu ile tilmikosin, grelin ve grelin+ tilmikosin uygulanan gruplarda ortalama SOD aktiviteleri.

*: Diğer gruplara göre istatistiksel olarak önemli bir azalmayı göstermektedir ($P<0.05$).



Şekil 4.3. Kontrol grubu ile tilmikosin, grelin ve grelin+ tilmikosin uygulanan gruplarda ortalama CAT aktiviteleri.

*: Diğer gruplara göre istatistiksel olarak önemli bir azalmayı göstermektedir ($P<0.05$).



Şekil 4.4. Kontrol grubu ile tilmikosin, grelin ve grelin+ tilmikosin uygulanan gruplarda ortalama GSH-Px aktiviteleri.

*: Diğer gruplara göre istatistiksel olarak önemli bir azalmayı göstermektedir ($P<0.05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tilmikosin veteriner amaçlı olarak hayvanlarda solunum sistemi enfeksiyonlarını tedavi etmek amacıyla kullanılan makrolit grubu bir antibiyotiktir. Makrolit grubu antibiyotiklerin başlıca yan etkileri gastrointestinal rahatsızlıklar, karaciğer bozuklukları olmakla birlikte tilmikosinin kalp üzerine de toksik etki yaptığı bildirilmiştir. Tilmikosin verilmesinden sonra kalpte pozitif kronotrop ve negative inotrop olduğu kaydedilmiştir (63,64). Yanlışlıkla tilmikosin alan kişilerde de elektrokardiyogramda değişiklikler ve kalp kası hasarının göstergesi olan keratin kinaz gibi çeşitli enzimlerde artışlar gözlenmiştir (65).

Çalışmamızda tilmikosinin lipit peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyini artırdığı tespit edilmiştir. Okside edici radikaller, hücre membranlarında bolca bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinde kolaylıkla hasar oluştururlar. Oluşan hasar sonucunda membranın yapısı ve fonksiyonları büyük ölçüde bozular. Çoklu doymamış yağ asitlerinde oluşan oksidatif hasar lipit peroksidasyonu (LPO) olarak bilinmektedir (66,67). Lipid molekülünde iki doymamış bağ arasında yerleşmiş olan bir metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkarılması ile başlayan kompleks olay LPO'dur. LPO bir kez oluşuktan sonra hücrede kendi kendine devam eden zincir tepkimeler başlar. LPO sonucu oluşan lipid peroksil radikalleri (LOO.) bir sonraki çoklu doymamış yağ asitlerini okside eder ve yeni zincirleme tepkimeleri başlatırlar (68). Devam eden tepkimeler sonucunda hidroperoksitler (LOOH) ve bunların da

devam eden parçalanması ile daha şiddetli radikal özelliği olan türlere özellikle de rölatif olarak daha kararlı hal alan MDA'ya dönüşürler. Dokuda MDA seviyesinin artması o dokuda serbest oksijen radikallerinin (SOR) arttığını gösterir. MDA oluştuğu ortamda diffüze olarak ya hücrenin dış ortamına ya da iç kısmına gidip hasar oluşturabilir. Hücre içine girince birçok yapı için zararlı etki gösterir (68,69). Bulgularımıza benzer şekilde farelere çeşitli dozlarda (50, 70 ve 75 mg/kg) verilen tilmikosinin kalp dokusunda MDA düzeyini artırmak suretiyle oksidatif strese neden olduğu tespit edilmiştir (70,71).

Çalışmada tek doz tilmikosin verilen grupla karşılaştırıldığında tilmikosin verilmeden önce 5 gün süreyle verilen grelinin kalp dokusunda MDA düzeyini oldukça azalttığının tespit edilmesi tilmikosinin neden olduğu oksidatif hasarın grelin tarafından önlediğini göstermektedir. Son yıllarda grelinin antioksidan ve antiinflamator etkili bir ajan olduğu ileri sürülmektedir. Bulgularımıza paralel olarak Chang ve ark (72) grelinin ratlarda lipit peoksidasyonunu önlediği ve iskemik hasara karşı kalbi koruyucu etki gösterdiğini kaydetmişlerdir. Benzer şekilde, Zvirska-Korcza ve ark (73) grelinin preadipozit hücre kültürlerinde MDA düzeyini azalttığını göstermişlerdir. İşeri ve ark (74) ratlarda alendronat ile oluşturulan mide dokusu hasarında grelin uygulamasının MDA düzeyini ve serbest oksijen radikallerinin oluşumunu azalttığını göstermişlerdir. Obay ve ark (75) grelinin ratlarda beyin, karaciğer ve eritrositlerde artan lipit peoksidasyonunu önlediğini gözlemişlerdir. Aynı zamanda grelinin vasküler NADPH oksidazın inhibisyonu ile oluşturulan hipertansif ratlarda vasküler süperoksit üretimini önlediği bildirilmiştir (76).

Çalışmamızda kontrol verileriyle karşılaştırıldığında tilmikosin verilen grubun kalp dokusunda SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde önemli bir azalma belirlendi. Dokularda ortaya çıkan oksijen radikalleri antioksidan enzim aktivitelerini değiştirmektedir. Bu antioksidan enzimlerden SOD süperoksit anyonlarını ortadan kaldırırken GSH-Px ile CAT'da hidrojen peroksit miktarını azaltmaya çalışır. Ortamda O_2^- radikalinin artması SOD enzim aktivitesini, H_2O_2 'in artması GSH-Px ve CAT enzim aktivitelerini dolaylı olarak artırmaktadır. SOD, O_2^- radikalini H_2O_2 'e dönüştüren reaksiyonu katalize ederek O_2^- radikalinin toksik etkisine karşı hücreyi korur (77). Çalışmada kaydedilen SOD enzim aktivitesi artışı da kalp dokusunda oksidatif stres artışının bir başka belirtisi olabilir. Kalp dokusunda tespit edilen GSH-Px aktivite artışı hasarlı kalp dokusunda oluşan H_2O_2 miktarının artısına işaret edebilir.

Literatürde tilmikosinin oksidatif stress üzerine etkisiyle ilgili çok az veri bulunmaktadır. Yapar ve ark. (70) 50 ve 70 mg/kg tek doz olarak verilen tilmikosinin feralerde gultasyon düzeyini azalttığı yönündeki bulguları ile Yazar ve ark. (59) nın farelerde tilmikosinin kalp dokusunda SOD ve GPX aktivitesinde azalmaya neden olduğu yönündeki bildirimleri bulgularımızla uyuşmaktadır. Çalışmada tilmikosine bağlı olarak SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerindeki azalmanın nedeni tam olarak bilinmemle birlikte kalpte oluşan hidrojen peroksit ve super oksit radikallerinin SOD ve GPX aktivelerini inhibe etmelerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (78,79).

Araştırmada tilmikosin öncesi uygulanan grelinin yalnız tilmikosin verilen grupla karşılaştırıldığında SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerini anlamlı bir şekilde artırdığı tespit edilmiştir. Grelın uygulaması söz konusu radikallerin ortamdan süpürölmek amacıyla antioksidan enzim düzeylerini artırmış olabilir. Obay ve ark. (75) ratlarda pentylenetetrazole ile oluşturulan oksidatif strete karaciğer, beyin ve eritrositlerde antioksidan enzimlerin aktivitelerinde artışa neden olarak koruyucu rol oynadığını saptamışlardır. Bulgularımıza bezer olarak İşeri ve ark. (74) ratlarda alendronat ile oluşturulan mide dokusu hasarında grelin uygulamasının GSH-Px aktivitesini artırarak serbest oksijen radikallerinin oluşumunu azalttığını vurgulamışlardır. Zvirska-Korcza ve ark. (73) grelinin preadipozit hücre kültürlerinde SOD, CAT ve GSH-Px aktivitesini artırdığını bildirmeleri bulgularımızı desteklemektedir. Aynı zamanda, ratlarda yapılan bir çalışmada 10 günsüreyle grelin verilmesinin testis dokusunda GSH-Px aktivitesini arttığı tespit edilmiştir (80). Ayrıca grelinin vasküler NADPH oksidazın inhibisyonuyla oluşturulan hipertansif ratlarda vasküler süperoksit üretimini önlediği bildirilmiştir (76). Yetişkinlerde büyüme hormonu eksikliğinin oksidatif stresi artırdığı, büyüme hormonu tedavisinin ise bu durumu iyileştirdiği bildirilmiştir (81). Grelın büyüme hormonunun salınımını uyarır (1). Bu nedenle çalışmamızda tilmikosinin oluşturduğu oksidatif stres üzerine grelinin antioksidan etki göstermesi büyüme hormonu salınımının artmasıyla ilişkili olabilir. Grelın reseptörünün, böbrek, pankreas, hipotalamus, beyin, kalp, hipofiz bezi, mide ve bağırsak dokularında bulunduğı tespit edilmiştir (82). Grelın reseptörlerinin bu geniş dağılımı grelinin kalp dokusunda gözlenen antioksidan rolünü açıklayabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada ratlara verilen tilmikosinin kalp dokusunda lipit peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan MDA düzeyini artırdığı antioksidan enzimlerden SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerini ise azalttığı tespit edilmiştir. Öte yandan çalışmada tek doz tilmikosin verilen grupla karşılaştırıldığında tilmikosin verilmeden önce 5

gün süreyle uygulanan grelinin kalp dokusunda MDA düzeyini oldukça azalttığı, CAT, SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerini ise anlamlı şekilde artırdığının tespit edilmesi kalpte tilmikosinin neden olduğu oksidatif hasarın grelin tarafından önlendiğini göstermektedir. Bulgularımız projenin öneri aşamasında ortaya konulan hedeflerle örtüşmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660
2. Wren AM, Small CJ, Ward HL, et al. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 2000; 141: 4325-4328
3. Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, et al. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4908-4911
4. Nakazato M, Murakami N, Date Y, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409: 194-198
5. Tschöp M, Weyer C, Tataranni A, et al. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001; 50: 707-709
6. Soriano-Guillen L, Barrios V, Campos-Barros A, Argente J. Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. *J Pediatr* 2004; 144: 36-42
7. Tokunaga K, Fukushima M, Kemnitz JW, Bray GA. Comparison of ventromedial and paraventricular lesions in rats that become obese. *Am J Physiol* 1986; 251: 1121-1227

8. Van den Pol AN. Lateral hypothalamic damage and body weight regulation: a role of gender, diet and lesion placement. *Am J Physiol* 1982; 243: 265-274
9. Clark JT, Karla PS, Crowley WR, Karla SP. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behaviour in rats. *Endocrinology* 1984; 115: 427-429
10. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; 92: 573-585
11. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5992-5995
12. Gualillo O, Caminos J, Blanco M, et al. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 2001; 142: 788-794
13. Gregory JW, Greene SA, Jung RT, et al. Metabolic effects of growth hormone treatment: an early predictor of growth hormone response? *Arch Dis Child* 1993; 68: 205-209
14. Mori K, Yoshimoto A, Takaya K, et al. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett* 2000; 486: 213-216
15. Clark RG, Jansson JO, Isaksson O, Robinson IC. Intravenous growth hormone: growth responses to patterned infusions in hypophysectomized rats. *J Endocrinol* 1985; 104: 53-61
16. Date Y, Kojima M, Hosoda H, et al. 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* 2000;141: 4255-4261
17. Wierup N, Svensson H, Mudler H, Sundler F. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept* 2002; 107: 63-69
18. Soriano-Guillen L, Barrios V, Chowen J, et al. Ghrelin levels from fetal life through early adulthood: relationship with endocrine and metabolic and anthropometric measures. *J Pediatr* 2004; 144: 30-35

19. Chanoine JP, Yeung LP, Wong AC, Birmingham CL. Immunoreactive ghrelin in human cord blood: relation to anthropometry, leptin, and growth hormone. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 35: 282-286
20. Broglio F, Arvat E, Benso A, et al. Ghrelin, natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5083-5086
21. Baker J, Lui JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 1993; 75: 73- 82
22. Caixas A, Bashore C, Nash W, et al. Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1902-1906
23. Dornonville De La Cour C, Lindstrom E, Norlen P, Hakanson . Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells. *Regul Pept* 2004; 120: 23-32
24. Asakawa A, Inui A, Kaga T, Katsuura G, Fujimiya M, et al. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut* 2003; 52: 947-952
25. Jeffery PL, Herington AC, Chopin LK: Expression and action of the GHR peptide ghrelin and its receptor in prostatic cancer cell lines. *J Endocrinol*, 2002; 172: 7-11
26. Papotti M, Cassoni P, Volante M, Deghenghi R, Muccioli G, et al. Ghrelin-producing endocrine tumors of the stomach and intestine. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86: 5052
27. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA et al: The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes on its receptor, GHS-R, in humans. *Clin Endocrinol Metab*, 2002; 87: 298
28. Muccioli G, Pons N, Ghe C, Catapano F, Granata R, et al. Ghrelin and des-acyl ghrelin both inhibit isoproterenol-induced lipolysis in rat adipocytes via a non-type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Eur J Pharmacol* 2004; 498: 27-35

29. Papotti M, Ghe C, Cassoni P, Catapano F, Deghenghi R, et al. Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2000; 85: 3803 -3807
30. Bodart V, Febbraio M, Demers A, McNicoll N, Pohankova P, et al. CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circulation Research*, 2002; 90: 844- 849
31. Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Date Y, Nakazato M, et al. Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors. *Circulation* 2001; 104: 2034-2038
32. Chan JL, Bullen J, Lee JH, Yiannakouris N, Mantzoros CS. Ghrelin levels are not regulated by recombinant leptin administration and/or three days of fasting in healthy subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2004; 89, 335 -343
33. Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, et al. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5083–5086
34. Muller AF, Janssen JA, Hofland LJ, Lamberts SW, Bidlingmaier M, et al. Blockade of the growth hormone (GH) receptor unmasks rapid GH-releasing peptide-6-mediated tissue-specific insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 590-593
35. Iyidogan Y. Grelinin Yapısı ve Organizmadaki Fonksiyonları, *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi* 2007; 70; 82-92
36. Ott V, Fasshauer M, Dalski A, Meier B, Perwitz N, et al. Direct peripheral effects of ghrelin include suppression of adiponectin expression. *Horm Metab Res* 2002; 34: 640-645
37. Date Y, Murakami N, Kojima M, et al. Central effects of a noval acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 477-80
38. Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijima A, et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*. 2002; 123: 1120-1128

39. Arnold M, Mura A, Langhans W, Geary N. Gut vagal afferents are not necessary for the eating-stimulatory effect of intraperitoneally injected ghrelin in the rat. *J Neurosci.* 2006; 26: 11052-11060
40. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, et al. 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* 2000; 141: 4255-4261
41. Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F. The ghrelin cell: A novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept* 2002; 107: 63-69
42. Hataya Y, Akamizu T, Takaya K, Kanamoto N, Ariyasu H, et al. A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 552-4555
43. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 479-481
44. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working? *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995; 35: 21-39
45. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue damage. *Laboratory Investigation* 1982; 4: 412-426
46. Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *The Lancet* 1984; 23:1396-1398
47. Reilly PM, Schiller, IIJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991; 161: 488-503
48. Alhan CC, San M. Koroner Kalp Hastalığı Tedavisinde Anti-Oksidanlar Yararlı mı? *T Klin J Cardiol* 2002; 15:203-213
49. Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH. Jageethesan J, Clancy et al. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs* 2005; 21: 24-28

50. Akkus İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkiler. Mimoza Yayınları, Konya.1995;1-132
51. Kayalı R, Cakatay U. Basic mechanisms of protein oxidation. Cerrahpasa J Med 2004; 35: 83-89
52. Gilbert DL, Colton CA. Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach. Kluwer Academic Publisher 2002
53. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. Toxicology 2003;189: 41-54
54. Debono, M, Willard, KE, Kirst HA, Wind JA, Crouse GD, et al. Synthesis and antimicrobial evaluation of 20-deoxo-20-(3,5-dimethylpiperidin-1-yl) desmycosin (tilmicosin, EL-870) and related cyclic amino derivatives. J Antibiot 1989; 42: 1253-1267
55. Papich MG. Veterinary Drugs. 2007; 2 nd edition. Elsevier , USA
56. Şanlı, Y. Veteriner klinik farmakoloji ve ilaçla sağaltım ilkeleri. Medisan yayınevi. Ankara, 1999
57. Ose, EE. In vitro antibacterial properties of EL-870, a new semisynthetic macrolide antibiotic. J Antibiot 1987; 40: 190-194
58. Modric S, Webb AI, Derendorf H. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tilmicosin in sheep and cattle. J Vet Pharmacol Ther. 1998; 21: 444-452
59. Yazar E, Altunok V, Elmas M, Tras M, Bas AL et al. The effect of tilmicosin on cardiac superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities. J Vet Med B 2002; 49: 209–210
60. Periti P, Mazzei T, Mini E, Novelli A. Adverse effects of macrolide antibacterials. Drug Safety, 1993; 9: 346- 364
61. Ohtani H, Tanmaka C, Hanada E, Kotaki H, Sato H, et al. Comparative Pharmacodynamic Analysis of Q-T Interval Prolongation Induced by the Macrolides Clarithromycin, Roxithromycin, and Azithromycin in Rats. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2000; 44: 2630–2637

62. Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood, *Am J Obstet Gynecol*, 1979; 135: 372-376
63. Jordan WH, Byrd RA, Cochrane RL, Hanasono GK, Hoyt JA, et al. A review of the toxicology of the antibiotic Micotil 300. *Vet Hum Toxicol* 1993; 35:151-158
64. McGuigan MA. Human exposures to tilmicosin. *Vet Hum Toxicol* 1994; 36: 306-308
65. Von Essen S, Spencer J, Hass B, List P, Seifert SA. Unintentional human exposure to tilmicosin (Micotil 300®). *J Toxicol Clin Toxicol* 2003; 41: 229-233
66. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 222-230
67. Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med* 1989;82: 747-752
68. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84
69. Karithala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 2007; 115: 81-103
70. Yapar K, Kart A, Karapehlivan M. Effects of different doses of tilmicosin on some biochemical parameters and antioxidant status in serum and cardiac tissues in mice. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2006; 50: 605-608
71. Kart A, Yapar K, Karapehlivan M, Çitil M. The Possible Protective effect of L-carnitine on Tilmicosin-induced Cardiotoxicity in Mice. 2007; 54: 144-146
72. Chang L, Yongsheng R, Xiuhua L, Wei Gen L, Jinghui Y, Geng, Weintraub B, Neal L; Chaoshu T. Protective Effects of Ghrelin on Ischemia/Reperfusion Injury in the Isolated Rat Heart. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2004; 43: 165-170
73. Zwirska-Korczala K, Adamczyk-Sowa M, Sowa P, Pilc K, Suchanek R, Pierzchala K, Namyslowski G, Misiolek M, Sadowski K, Kato I, Kuwahara A, Zabielski R. (2007) Role of leptin, ghrelin, angiotensin II and orexins in 3T3 L1 preadipocyte cells proliferation and oxidative metabolism. *J Physiol Pharmacol*. 58:53-64

74. Işeri SO, Sener G, Yüksel M, Contuk G, Cetinel S, Gedik N, Yegen BC. Ghrelin against alendronate-induced gastric damage in rats. *J Endocrinol.* 2005; 187: 399-406
75. Obay BD, Tasdemir E, Tumer C, Bilgin HM, Atmaca M (2008) Dose dependent effects of ghrelin on pentylentetrazole-induced oxidative stress in a rat seizure model. *Peptides* 2008; 29: 448–455
76. Kawczynska-Drozd A, Olszanecki R, Jawein J, Brzozowski T, Pawlik WW, Korbut R, Guzik TJ. Ghrelin inhibits vascular superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2006; 19:764–767
77. Karithala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 2007; 115: 81-103
78. Turrens J F. The potential of antioxidant enzymes as pharmacological agents in vivo. *Xenobiotica* 1991; 8: 1033–1040
79. Sodhi C P, Rana SV, Mehta SK, Vaiphei K, Atari S, et al. Study of oxidative stress in isoniazid-rifampicin induced hepatic injury in young rats. *Drug Chem. Toxicol.* 1997; 20: 255–269
80. Kheradmand A, Alirezaei M, Asadian P, Rafiei A E, Joorabi S. Antioxidant enzyme activity and MDA level in the rat testis following chronic administration of ghrelin. *Andrologia*, 2009; 41: 335-340
81. Evans LM, Davies JS, Anderson RA, Ellis GR, Jackson SK, Lewis MS. The effect of GH replacement therapy on endothelial function and oxidative stress in adult growth hormone deficiency. *Eur J Endocrinol* 2000;142:254–62
82. Ghigo E, Avrat E, Broglio F, Giordano R et al. Endocrine and non-endocrine activities of growth hormone secretagogues in humans. *Horm. Res.* 1999; 51:9-15

EK: Projeden yapılan yayın

Çetin N, Boyraz U, Çetin E. 2011. Ghrelin alleviates tilmicosin-induced myocardial oxidative stress in rats, J Anim Vet Adv. 10: 2038-2042.