

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ**

**SIÇANLARDA KARBON TETRAKLORÜR (CCl₄) İLE
OLUŞTURULAN OKSİDATİF STRES ÜZERİNE GRELİNİN
ETKİSİ**

PROJE NO: EUBAP - VA-06-03

Araştırma Makalesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Yrd. Doç. Dr. Ebru ÇETİN
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

Araştırmacının Adı Soyadı
Doç. Dr. Murat KANBUR
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Nazmi ÇETİN
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Gökhan ERASLAN
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı

Ağustos 2012

KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	4
ABSTRACT	5
1. GİRİŞ	6
2.AMAÇ VE KAPSAM	7
3. GENEL BİLGİLER	8
4. GEREÇ VE YÖNTEM	16
5. BULGULAR	18
6.TARTIŞMA VE SONUÇ	20
7. KAYNAKLAR	23

ÖZET

Sıçanlarda Karbon Tetraklorür (CCl₄) İle Oluşturulan Oksidatif Stres Üzerine Grelinin Etkisi

Son yıllarda yapılan araştırmalar grelinin bir antioksidan ve antiinflamatuvar ajan olabileceğini ortaya koymuştur. Oksidatif stres organizmada çeşitli hasarların gelişmesinde önemli bir etkindir. Araştırmada sıçanlarda CCl₄ ile oluşturulan oksidatif strese karşı grelinin olası koruyucu etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı. Toplam 40 adet erkek Sprague-Dawley ırkı sıçan kontrol, CCl₄, grelin ve grelin+ CCl₄ olmak üzere dört eşit gruba ayrıldı.

Değerlendirmeler lipid peroksidasyon, antioksidan enzim ve biyokimyasal parametreler açısından yapıldı. Yalnız CCl₄ uygulaması kontrol grubu ile karşılaştırıldığında plazma ve karaciğer malondialdehit (MDA) seviyesi ile plazma nitrik oksit (NO) düzeyini artırırken, eritrosit katalaz (CAT) ve karaciğer süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitelerini azalttı. Aynı zamanda, CCl₄ uygulaması serum aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) ve alkali fosfataz (ALP) aktivitelerini de artırdı. Buna karşılık, önceden grelin uygulanan grupta tek başına CCl₄ verilen gruba göre plazma ve karaciğer MDA seviyeleri ile plazma NO düzeyi düştü ve eritrosit ile karaciğer SOD, CAT ve GPx aktiviteleri yükseldi. Öte yandan, yalnız grelin ve grelin + CCl₄ uygulaması serum glikoz düzeyini artırdı. Sonuçlar grelin ön uygulamasının sıçanlarda CCl₄'ün yol açtığı oksidatif hasara karşı koruyucu olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Grelın, karbon tetraklorür, oksidatif hasar, sıçan

ABSTRACT

Effect of Ghrelin on Oxidative Stress Induced by Carbon Tetrachloride (CCl₄) in Rats

Recent studies have revealed that ghrelin may be an antioxidant and anti-inflammatory agent. Oxidative stress is an important factor in the development of several damages in the organism. The study was conducted to evaluate the possible protective effects of ghrelin in rats against oxidative stress induced by CCl₄. Forty male Sprague-Dawley rats were divided into four equal groups, as; control, CCl₄, ghrelin and ghrelin + CCl₄ group.

Evaluations were made for lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters. Compared with the control group only CCl₄ administration increased plasma and liver malondialdehyde (MDA) content and plasma nitric oxide (NO) levels, while erythrocyte catalase (CAT) and liver superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) activities were reduced. At the same time, CCl₄ administration also increased serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) activities. By contrast, ghrelin pretreatment reduced plasma and liver MDA content and plasma NO level, and increased erythrocyte and liver tissue SOD, CAT and GPx activities when compared with only CCl₄ treated group. On the other hand, both ghrelin alone and ghrelin plus CCl₄ treatment elevated serum glucose level. The results show that ghrelin pretreatment could protect against oxidative damage caused by CCl₄ in rats.

Key words: Ghrelin, carbon tetrachloride, oxidative damage, rat

1. GİRİŞ

Serbest radikaller, kaynakları ve etkileri, etki mekanizmaları, oluşturdıkları hasar, sonuçları ve önlenmesi gibi konular son zamanlarda üzerinde en fazla durulan ve sıkça çalışılan konular durumundadır. Oksidatif stres oluşumunda rol alan ve birçok araştırmacı tarafından karaciğer hasarı oluşturduğu tespit edilen en önemli kimyasallardan biri CCl_4 'dir.

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, tükrük 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. Grelin mRNA'sı 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 kardiyoji gibi bilim dallarında kullanımıyla ilgili birçok araştırma yapılmaktadır.

Grelin redoks aracılı hücresel yanıtı bloke etmek suretiyle reaktif oksijen türlerinden hidrojen peroksit (H_2O_2)'in indüklediği sitokin salınımını engelleyerek yangı oluşumunu önlediği tespit edilmiştir. Strese bağlı 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.

2. AMAÇ VE KAPSAM

Bu çalışma, sıçanlarda karbon tetraklorür (CCl₄) ile oluşturulan oksidatif stres üzerine grelin hormonunun etkisini ortaya koymak amacıyla planlanmıştır.

Serbest radikallerin zararlı etkileri bazı maddeler tarafından azaltılabilir veya tamamen ortadan kaldırılabilir. 28 amino asitten oluşan ve büyük çoğunluğu mideden sentezlenen bir hormon olan grelin 1999 yılında keşfedilmiştir (1). Grelinin keşfedilmesiyle birlikte bu hormonun biyolojik sistemler üzerindeki etkileri araştırılmaya başlanmıştır (2). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ghrelin hormonunun antioksidan özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir. Ratlarda etanol ile oluşturulan mide ülserinde grelinin endojen nitrik oksit salınımını düzenleyerek mideyi koruyucu özellik gösterdiği belirtilmektedir (3). Ghrelin ratlarda isoproterenol ile oluşturulan miyokardiyum hasarına karşı plazma malondialdehit (MDA) düzeyini düşürmek suretiyle koruyucu etki göstermiştir (4). Rat ovaryumunda lipid peroksidasyon oluşumunu azaltırken, antioksidan enzimleri artırdığı (5), kalp beyin ve böbrek dokularında oksidatif strese karşı koruyucu etki gösterdiği (6-8) bildirilmekle beraber ghrelinin genel olarak antioksidan enzimler üzerine etkisini inceleyen araştırmalar yetersizdir. Bu bağlamda yapılacak bu çalışma, grelinin antioksidan sistem üzerindeki etkileri araştırılacaktır. Araştırmada ayrıca, CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı grelinin olası koruyucu etkileri de değerlendirilecektir.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Karbon Tetraklorür (CCl₄)

Kuru temizleme, otomobil tamiri ve farmasötikal üretim gibi bazı iş alanlarında kullanılan karbon tetraklorür, oksidatif stres oluşumunda rol alan ve birçok araştırmacı tarafından karaciğer hasarı oluşturduğu tespit edilen en önemli kimyasallardan birisidir (9-13). CCl₄, toksik etkisini, bir serbest radikal olan triklorometil radikali oluşumu ile gösterir. Bu radikal daha sonra oksijen ile birleşerek peroksil radikalini oluşturur. Peroksil radikali, hücre zar yapısını bozarak hücre hasarı oluşmasında birincil mekanizma olarak rol oynayan güçlü bir lipid peroksidasyon başlatıcısıdır (10). Özellikle karaciğer üzerinde hasar oluşturduğu bilinen CCl₄'ün doğrudan eritrositlerde de oksidatif hasara neden olduğu bildirilmektedir (14). Ayrıca yapılan deneysel çalışmalarda CCl₄'ün beyin, kalp ve böbrek gibi organlarda hasar oluşturduğu gösterilmiştir (15-17).

3.2. Karbon tetraklorür (CCl₄)'ün hepatotoksitesi

Antelmantik olarak veteriner pratiğinde yer bulan CCl₄, akut veya gecikmiş tipte karaciğer toksikasyonlarına neden olmaktadır. Akut toksikasyonların histopatolojisinde karaciğerde hasar, yağlanma ve nekroz gözlenir. CCl₄, sitokrom P-450 monooksijenaz sistemi tarafından triklorometil ve triklorometilperoksi radikallerine dönüştürülür. Bu radikaller çok aktif olup, CCl₄'ün karaciğerde özellikle sentrolobüler bölgede neden olduğu nekroza sorumlu dururlar. Triklorometil radikali, makromoleküllerle dayanıklı adduct oluşturduğu gibi, oksijenle de birleşerek daha aktif metabolit olan triklorometilperoksi radikali meydana gelir. Bu radikal, lipid peroksidasyonun temel başlatıcısıdır. Lipid peroksidasyon, lipoprotein sentezi için gerekli olan yapıları da hasara uğratarak hepatik lipidozise yardımcı olur. Karaciğerde aşırı lipid birikimi sonucu, organın fonksiyon bozukluğu ve siroza doğru ilerleyen değişimler ortaya çıkar (18). Kazlarda oluşturulan deneysel CCl₄ zehirlenmesinde lipid peroksidasyonun göstergesi olan MDA düzeyleri kontrollere göre önemli derecede yüksek bulunmuş ve makroskopik olarak karaciğerde diffüz bir yağlanma şekillendiği görülmüştür (19).

CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarında serum alanin amino transferaz (ALT), aspartat amino transferaz (AST), alanin amino transferaz (ALP), nitrik oksit (NO), bilirubin seviyeleri ile plazma ve karaciğer MDA düzeylerinde artış görülür (9, 13, 20-23). Ratlarda CCl₄ uygulamasından 6 ve 24 saat sonra karaciğerde oluşan hasarın göstergeleri olarak

serum ALT ve AST, 24 saat sonra lipid peroksidasyonun göstergeleri olarak plazma ve karaciğer MDA seviyelerinin yükseldiği kaydedilmiştir (24).

3.3. Ghrelin

Ghrelin ilk kez 1999 yılında Kojima ve arkadaşları tarafından farelerin midesinde tanımlanmış 28 amino asitten oluşan, memeli hayvanlar dışında, balık, tavuk ve kurbağa gibi diğer omurgalı türlerde de var olan iştah açıcı peptid yapıda bir hormondur (1, 25). Ghrelinin varlığı bitkilerde de immunohistokimyasal, yüksek basınç sıvı kromatografisi “High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)” ve “radioimmuno-assay” (RIA) yöntemiyle gösterilmiştir (26). Ghrelin adı, Hint-Avrupa dilleri ailesindeki “ghre” ile “relın”ın birleşmesinden türetilmiştir. “ghre” modern İngilizce’de “grow” yani büyüme anlamında, “relın” ise salgılama anlamında kullanılmaktadır. Ghrelin aynı zamanda “hunger hormone” (açlık hormonu) olarak da adlandırılmaktadır (27, 28). İlk kez sıçan mide dokusundan izole edilen grelin, 28 aminoasitli açillenmiş peptid şeklinde karakterize edilmiştir (1) (Şekil 3.1.) (Tablo 3.1.).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	Tür
G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	R	V	Q	Q	R	K	E	S	K	K	P	P	A	K	L	Q	P	R	İnsan
G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	K	<i>T</i>	Q	Q	R	K	E	S	K	K	P	P	A	K	L	Q	P	R	Gerbil
G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	K	A	Q	Q	R	K	E	S	K	K	P	P	A	K	L	Q	P	R	Fare
G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	K	A	Q	Q	R	K	E	S	K	K	P	P	A	K	L	Q	P	R	Rat
G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	K	L	Q	Q	R	K	E	S	K	K	P	P	A	K	L	Q	P	R	Köpek
G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	K	V	Q	Q	R	K	E	S	K	K	P	A	A	K	L	K	P	R	Domuz
G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	K	L	□	Q	R	K	E	A	K	K	P	S	G	R	L	K	P	R	Sığır
G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	K	L	□	Q	R	K	E	P	K	K	P	S	G	R	L	K	P	R	Koyun
G	S	S	F	L	S	P	<i>T</i>	<i>Y</i>	K	<i>N</i>	<i>I</i>	Q	Q	Q	K	<i>D</i>	<i>T</i>	R	K	P	<i>T</i>	A	R	L	H	R	R	Tavuk
G	S	S	F	L	S	P	S	□	Q	R	□	P	Q	G	K	D	□	K	K	P	P	□	R	V	G	R	R	Yılanbalığı

Tablo 3.1. Bu tabloda insan ve diğer türlerdeki grelinin temel yapısı gösterilmektedir. **Kalın** ve *italik* yazılı aminoasitler insan grelininin amino asit dizilimine göre diğer türlerin aynı konumdaki farklı aminoasitlerini göstermektedir; □ işareti ise insan grelinindeki amino asitlere karşılık diğer türlerin aynı konumda amino asit bulundurmadığını göstermektedir.

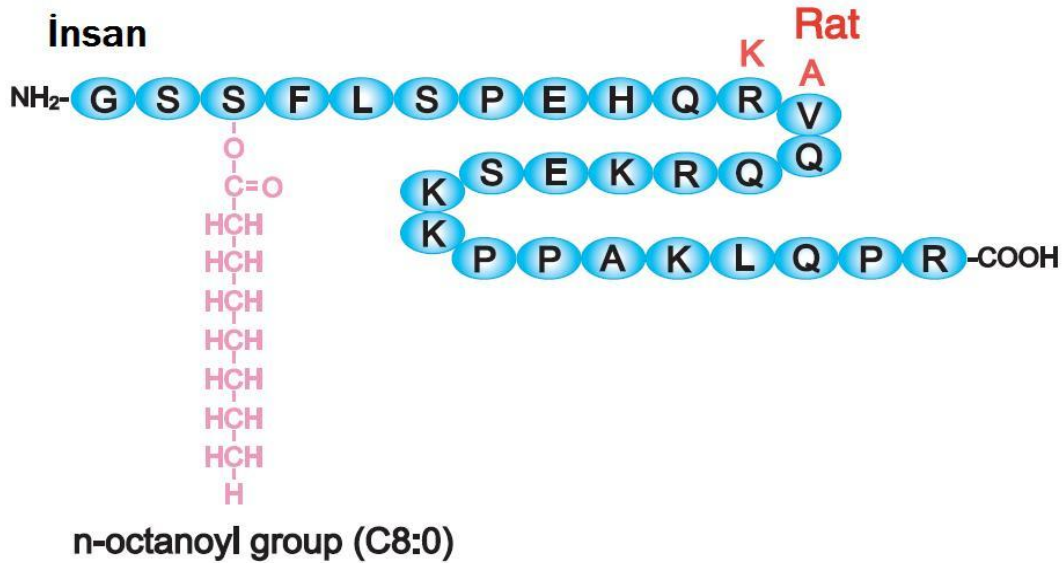
3.3.1. Ghrelinin Kimyasal Yapısı

Temel olarak midenin fundus mukozasında bulunan özelleşmiş enterokromafin

hücreleri tarafından eksprese edilen grelinin in vivo ve in vitro olarak incelenmesi sonucunda GH (büyüme hormonu) sekresyonunu stimule eden GHS-R (büyüme hormonu salgılatıcı hormon reseptörü) için spesifik endojen bir ligand olduğu tespit edilmiştir (1).

Ghreltin öncülü olan preproghreltin 117 amino asitten oluşur. Preproghreltin salınmadan önce sitoplazmada enzimatik bir işlemde geçerek üçüncü pozisyonundaki serinin hidroksil grubu bir oktanoik asit ile esterleşir. Bu esterleşme ghreltin molekülünün hidroforik özelliğini artırır ve kan beyin bariyerini kolaylıkla geçerek beyin dokusuna, özel olarak da hipotalamus ve hipofize geçiş imkanı bulur (1, 29, 30).

Ghreltin bir yağ asidi tarafından modifiye edildiği bilinen ilk peptid hormondur. İnsan ve sıçandan elde edilen ghreltin 28 amino asitten oluşur ve yalnız iki amino asit yönünden farklılık gösterir. Her ikisi de 3. Serin a'inde n-oktanoik asit kalıntısı içerir ve bu açıl yapısı ghreltinin reseptörüne bağlanıp onu uyarması için gereklidir (1, 31) (Şekil 3.1).



3.3.2. Ghrelin Sentezleyen Dokular

Ghrelin temel olarak midenin fundus mukozasında bulunan oksitik bezlerdeki X/A benzeri hücreler tarafından sentezlenir. Mide oksitik mukozasında enterokromafin, delta (D), enterokromafin benzeri ve X/A olmak üzere dört tip endokrin hücre bulunmaktadır. Bunlardan yalnızca X/A hücreleri grelin sentezi yapar. Midenin fundus bölgesi, pilorus bölgesine kıyasla daha fazla grelin üretebilme kabiliyetine sahiptir. Kan dolaşımında bulunan ghrelinin büyük miktarı gastrointestinal kaynaqlıdır. Bağırsakta duodenumdan kolona doğru inildikçe ghrelin konsantrasyonu azalır (32).

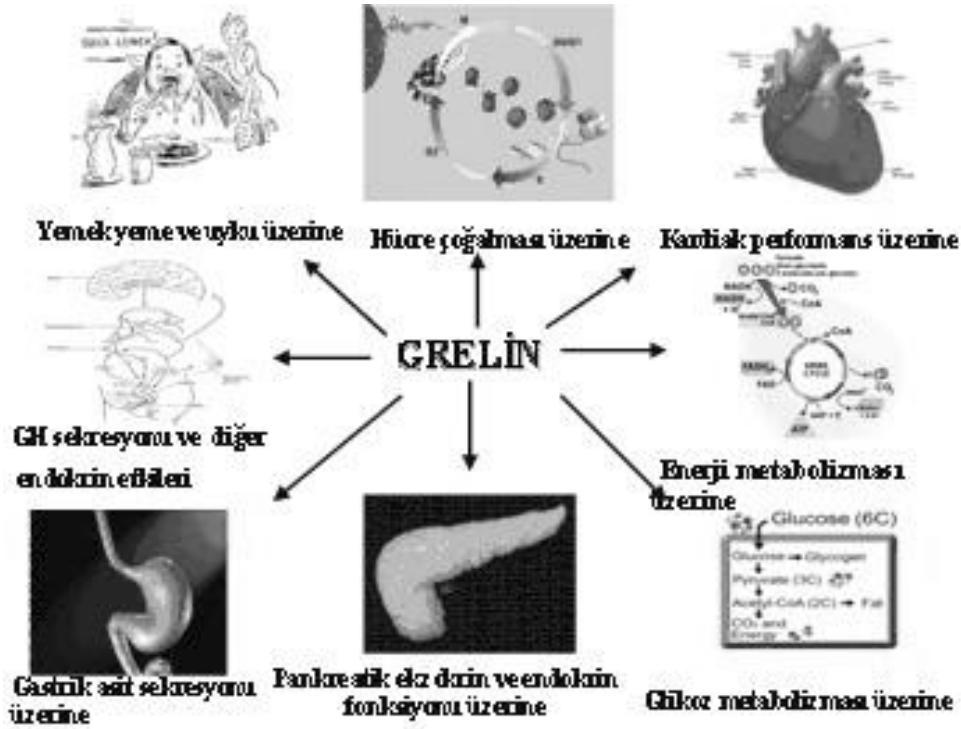
Hipotalamusta da ekspresyonu tespit edilen grelin peptidi, bu bölgedeki hipotalamik arkuat nükleus (ARC)'de sentezlenir. Hipotalamusta yerleşik olan grelin-pozitif nöronların sayısı düşüktür (1, 33). Grelinin kardiovasküler etkilerinin olabileceği düşüncesi ise kalp ventriküllerinde bulunan GHS-R reseptörlerinden ileri gelmektedir. Medüller tiroid ve tiroid karsinoması, nöroendokrin tümörler ve akciğer tümörleri gibi farklı tip tümör dokularında da grelin varlığına rastlanmıştır (34).

Tümöral ve normal dokulardaki tespit edilmiş grelin miktarı midedekinden daha azdır. Grelinin bu dokulardaki fizyolojik fonksiyonu henüz aydınlatılamamış olmasına rağmen otokrin/parakrin faktör seviyesinde olduğu bilinmektedir. Gastrointestinal sistem dışında grelinin endokrin rolü anlaşılamamıştır. Pankreas üzerinde yürütülen deneysel çalışmalar sonucunda grelin ve açillenmemiş grelin sıçan pankreasında tespit edilebilmiştir. Bu yapılan deneysel çalışmalardan bir kısmı grelini α veya β hücrelerinde, bir kısmı ise yeni adacık hücrelerinde bulunduğunu göstermektedir (35, 36).

Grelın mRNA'sı PCR yöntemiyle %30'u ince bağırsakta görülürken düşük miktarda da hipofiz, plasenta, pankreas, böbrek, prostat, kalp, over, beyin, testis, akciğer ve lenfositlerde tespit edilmiş olması onun çok çeşitli biyolojik aktivitelerde rolü olan bir peptid olduğunu kanıtlamaktadır (32, 37-44).

3.3.3. Ghrelinin Etkileri

Ghrelinin organizmada çok çeşitli sistemler üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Şekil 3.2) (28).



Şekil 3.2. Ghrelinin başlıca etkileri

Eksojen ghrelin verilmesi büyüme hormonu salgılanmasını uyarır. Ghrelin büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH) salınımını artırırken, somatostatin salınımını azaltır (30).

Kalp ve aortta ghrelin mRNA'sı bulunmaktadır (45). İnsanlara ghrelin verilmesi arterial kan basıncını değiştirmeden kalp atım hızının düşmesine sebep olur (46). Ghrelin sol ventrikül atım hacminde yükselmeye neden olur. Ghrelin, arterlerdeki endotelin-1'in vazokonstriksiyon etkisini ortadan kaldırır. Kronik kalp yetmezliği olan hastalara ghrelin uygulanması vasküler direnci düşürmüştü ve kardiyak outputu artırmıştır. Ghrelin sıçanlarda kalp yapısını ve fonksiyonunu iyileştirmiş ve kardiyak kaşeksiyi engellemiştir. Ghrelinin kalp ve damarları koruyucu etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (47).

İnsanlarda ghrelin uygulaması insülin salınımını azaltır (48). Ghrelinin GH salınımını artırması sonucu insülin direnci ve glikojenezis artar ve dolaşımdaki glukoz düzeyi artar (49).

Farelere ghrelin verilmesi besin tüketimini artırır, yağ kullanımını azaltır ve sonuçta yağ dokusu artışına sebep olur. Ghrelinin yağ doku ve iştah artırıcı etkilerinin Büyüme hormonu üzerine olan etkilerinden bağımsız olduğu ve bunun, leptinin de aracı olduğu merkezi sinir sistemindeki özel nöronlar tarafından düzenlendiği düşünülmektedir (50-52).

Grelin seviyeleri obez kişilerde düşüktür (52). Grelinin vücut ağırlığına etkisinin total vücut yağına ya da bölgesel yağlanmaya değil insülin düzenlenmesine bağlı olduğu gösterilmiştir. Grelinin intra venöz verilmesi açlık hissini uyarır. Grelinin bloke edilmesi obezite tedavisinde kullanılabilir (53).

Grelinin diş dokusunun yenilenmesine ve dişlerin oluşum evresinde de oluşumuna katkı yaptığı düşünülmektedir (54). Grelin ratlarda osteoblastların proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarır. Grelin kemik doku üzerine doğrudan etki ettiğinden ilerde osteoporozis tedavisinde kullanılabilir (55).

Ghrelilin hormonunun uykuyu artırdığı düşünülmekle birlikte bu etkisi kesin değildir. İnsanlarda hafif uyku getirdiği gösterilmiştir (56). Beden kitle indeksinden bağımsız olarak tıkayıcı uyku apnesi olan hastalarda grelin seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (57).

Grelin ve leptin feedback mekanizması ile birbirlerini etkilemektedir. Bu iki hormonun seviyeleri açlık-tokluk, glikoz, insülin, barsak hormonları, parasempatik aktivite, yaş, gebelik, cinsiyet, obezite, polikistik over sendromu ve enerji gibi faktörlere bağlı olarak ayarlanır (58).

Grelin sempatik aktiviteyi önler ve vazodilatasyona neden olarak kan basıncını düşürür. Üçüncü ventriküle intraserebroventriküler grelin verilmesi kahverengi yağ dokusunda ısı düzenlenmesinde etkili sempatik aktiviteyi azaltmaktadır (59). Grelinin otonom sinir sistemindeki kardiyovasküler ve vagal boşalma üzerinde durdurucu, gastrointestinal parasempatik aktivite üzerinde ise hızlandırıcı bir etki yaptığı belirlenmiştir (59, 60).

Grelin uygulaması GH salınımını artırmakta, dolayısıyla adrenokortikotropik hormon, prolaktin ve kortizol seviyelerini de hafif miktarda artırmaktadır; fakat folikül stimulan hormon, luteinleştirici hormon, tiroid stimulan hormon seviyelerinde bir değişiklik yapmaz (61). Ancak grelin hipertiroide azalmış ve hipotiroide artmıştır. Grelinin tiroid üzerine direkt inhibitör etkisi vardır (62). Grelinin büyüme hormonu salgılatıcı hormonla (GHRH) birlikte verilmesi sinerjik etki oluşturmaktadır (63).

Büyüme hormonu ve kanser arasında bir bağlantı olduğu ortaya konmuştur. Grelin de büyüme hormonu salgılanmasını uyardığına göre grelinle kanser arasında da bir ilişki olması muhtemeldir (64). Hepatoselüler karsinomu olan hastalarda grelin seviyesi artmıştır (65, 66). Gastrik ve mukaepidermoid karsinomlarda ise grelin üreten hücrelerin yokluğu dikkat çekmektedir (67, 68).

Ghrelilin damar içi yolla uygulandığında doza bağlı olarak mide asidi sekresyonunu ve mide

hareketlerini uyarır. Mide asidi sekresyonunu artırıcı etkisini Nervus Vagusu uyarmak suretiyle gerçekleştirir (60, 69).

3.4. Serbest Radikaller, Oksidatif Stres ve Bazı Antioksidan Enzimler

Serbest radikaller, bütün canlı hücrelerde üretilen dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren, kararsız 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 kullanıma 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. Organizmada fizyolojik koşullarda oksidan etkenler ile antioksidan savunma sistemi bir denge halindedir ve bu denge oksidatif denge olarak adlandırılır. Fazla SOR üretimi ya da antioksidan mekanizmaların yetersiz kaldığı durumlarda; oksidan-antioksidan sistem arasındaki dengenin bozulması 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, hidrojen peroksit (H_2O_2), nitrik oksit (NO) ve hipokloröz asit gibi reaktif ürünlerin ortaya çıkmasına yol açar (70, 71). Aşırı reaktif bu maddeler, diğer atom ve moleküllerle elektron alışverişine girerek, onların kimyasal yapılarını değiştirmek suretiyle kararsız (reaktif) bir atom haline gelmesine yol açabilirler.

Serbest radikaller hücrenin çeşitli bileşenleri ile etkileşime girerek hücrede metabolik, yapısal ve işlevsel bozukluğa yol açar. Serbest radikallerden etkilenen başlıca hücre bileşenleri nükleik asitler, lipidler, proteinler ve karbonhidratlardır. 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 gelişir (71). Günümüzde serbest radikaller ve reaktif moleküller ile bunların reaksiyonları ve ürünlerindeki artışın hücresel yaşamı olumsuz etkilediği, genetik mutasyonlara yol açtığı bilinmektedir. Bu bağlamda SOR'nin düzeylerini arttırarak oksidatif strese yol açan nedenlerin bilinmesi, bunlardan uzak durulması gerekmektedir (72, 73).

Serbest radikallerin oluşum hızı, bunları etkisiz hale getiren veya azaltan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) gibi bazı endojen antioksidan enzimlerden oluşan savunma sistemlerinin hızı ile dengede olduğu sürece, organizma etkilenmez. Ancak bu denge bozulursa, serbest radikaller zararlı olmaya başlar ve oksidatif stres olarak etkilerini gösterirler. Savunma sisteminde görev alan SOD enzimi iki molekül süperoksit anyonunu hidrojen peroksit'e dönüştürmektedir. Süperoksit, zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem sayesinde hücresel kompartmanlardaki O_2 düzeyleri kontrol altında tutulur. GSH-Px ve bu enzimle kenetli bir enzim olan glutatyon redüktaz, glutatyon harcayarak H_2O_2 'nin redüksiyonunu katalizler. Bu enzimlerin aktif olması hidroksil radikali gibi daha zararlı radikallerin oluşmasını önler. Karaciğerde en yüksek, kalp, akciğer ve beyinde orta, kasta düşük aktivitede bulunur. GSH-Px ve G-6-PD enziminin organizmada bulunuşu bilhassa klinik açıdan önemli olup, GSH-Px ile G-6-PD aktivitesi çeşitli hastalıklara ve fizyolojik durum değişimlerine bağlı olarak normalden sapmalar gösterebilmektedir. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksit düzeylerinin yükselmesine ve hücre hasarına yol açmaktadır. Katalaz hidrojen peroksidi, oksijen ve suya parçalar. Karaciğer ve eritrositlerde en yüksek aktiviteye sahiptir. Birçok hastalıkta örneğin kanser, Down sendromu ve anemide serumda katalaz aktivitesinin değiştiği bildirilmiştir (74).

Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiyobarbitürik asitle ölçülebilen MDA meydana gelir. MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamasına karşın, reaktif oksijen türlerinin hücresel membranlarla etkileşiminden kaynaklanan membran lipid peroksidasyonunun bir belirteci olarak kabul edilmektedir. MDA, tiyobarbitürik asit ile 1:2 oranında birleşerek spektrofotometre veya fluorometre ile ölçülebilen bir ürün oluşturur ki bu yöntem en çok kullanılan lipid peroksidasyon tayin yöntemidir.

Nitrik oksit oksijenle birleşerek bir radikal olan peroksinitrit'i ortama çıkarır ve bu da dokulara zarar verir. Böylece NO enflamatuvar olaylarda ortaya çıkan bir oksidan olarak ortamda bulunur (75).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Hayvan Materyali

Araştırmada Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezinden (DEKAM) temin edilen ağırlıkları 280-300 g arasında değişen toplam 40 adet erkek Sprague 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.

4.2. 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, 1. deneme grubuna 10 nmol/kg/gün grelin 5 gün süreyle deri altı yolla, 2. deneme grubuna 1.6 g/kg CCl₄ periton içi yolla tek doz olarak uygulandı. 3. deneme grubuna 5 gün süreyle, günde 10 nmol/kg grelin deri altı yolla verilerek, 5. günde ayrıca 1.6 g/kg CCl₄ tek doz olarak uygulandı.

Tablo 4.1. Kontrol ve deneme grubu uygulama çizelgesi

Grup	Uygulama
Kontrol	5 gün süreyle %0.9 NaCl deri altı
Grelın	10 nmol/kg/gün grelin deri altı 5 gün süreyle
CCl ₄	1.6 g/kg CCl ₄ periton içi tek doz
Grelın+CCl ₄	10nmol/kg grelin deri altı 5 gün süreyle + 1.6 g/kg CCl ₄ tek doz (5.günde)

4.3. Numunelerin Alınması ve İşlenmesi

Bütün gruplara son enjeksiyonun yapılmasından 24 saat sonra ketamin-ksilazin anestezisi altında kalbe punksiyon yapılarak heparinli ve kuru tüplere kan alındı. Ayrıca son ilaç uygulamasından 24 saat sonra tüm hayvanların karaciğeri çıkarılıp serum fizyolojik ile yıkandı.

Kanlar 5000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve serum, plazma ve eritrositlerine ayrıldı. Heparinli tüplere alınıp plazması ayrılan kanların altta kalan eritrosit tabakası tuzlu fosfat tampon çözeltisi ile 3 kere yıkandı. Ardından eşit miktarda tuzlu fosfat tampon çözeltisiyle tamamlandı (76). Analiz öncesi yıkanmış ve seyreltilmiş eritrosit buz soğukluğunda distile

su ile 1:5 oranında hemoliz edildi. Hemolizat hemoglobin, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitesi ölçümü için kullanıldı. Hemolizattan kloroform/etanol ile ekstrakte edilecek olan faz ise SOD aktivitesi ölçümü için kullanıldı. Karaciğer örnekleri pH 7.4 fosfat tamponda (1:5), buzlu ortamda mekanik homojenizatörle (Heidolph, SilentCrusher M) homojenize edildi. Homojenatlar +4°C’lik soğutmalı santrifüjde (Sigma 3K-30) 20000 devirde 1 saat santrifüj edildi. Süpernatantlar alınarak analiz zamanına kadar -80°C’lik derin dondurucuda saklandı.

4.4.Biyokimyasal Analizler

Karaciğer protein düzeyi Miller (77) tarafından modifiye edilen Lowry ve ark. (78)’nin metoduna göre, eritrosit hemolizatında hemoglobin düzeyi Fairbanks ve Klee (79)’nin metoduna göre spektrofotometrik (Shimadzu UV-1700) olarak ölçüldü.

Plazma MDA düzeyi Yoshioka ve ark. (80)’nin yöntemine göre, karaciğer dokusu MDA düzeyi Ohkawa ve ark. (81)’nin yöntemine göre spektrofotometrede (Shimadzu UV-1700) belirlendi. Plazma NO seviyesi Griess metoduna göre tayin edildi (82). Doku ve eritrosit CAT aktivitesi Luck (83)’un yöntemine göre, GSH-Px aktivitesi Paglie ve Valentie (84)’nin yöntemine göre SOD aktivitesi Sun ve ark. (85)’nin bildirdikleri yöntemle küçük modifikasyonlar yapılarak spektrofotometrik (Shimadzu UV-1700) olarak ölçüldü.

Serum glikoz, total protein, trigliserit seviyeleri ile AST, ALT, ve ALP aktiviteleri ticari kitler (Chema, İtalya) kullanılarak spektrofotometerde (Shimadzu UV-1700) ölçüldü.

4.5.İstatistiksel Analiz

Çalışmanın analizi bilgisayar ortamında SPSS 12.0 for Windows istatistik paket programında yapıldı. Gruplar arasında farklılığı tespit etmek amacıyla One-Way ANOVA ve Tukey’s testi kullanıldı. Veriler aritmetik ortalama ve standart sapma olarak verildi. Önemlilik düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

5. BULGULAR

Kontrol ve deneme deneme gruplarının plazmasına ait MDA ve NO seviyeleri ile eritrosit SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri Tablo 5.1.'de verildi. Oksidatif stres parametrelerinden MDA ve NO seviyeleri CCl₄ verilen grubun karaciğer dokusunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek ($p<0.05$) bulundu. Karbon tetraklorür verilen grupla karşılaştırıldığında grelin ön uygulaması yapılan grupta dokuların MDA ve NO düzeylerinde önemli bir azalma ($p<0.05$) kaydedildi.

Tablo 5.1. Kontrol ve deneme gruplarının plazmasında MDA ve NO seviyeleri ile eritrosit SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri

Gruplar	MDA (nmol/ml)	NO (nmol/ml)	SOD (U/mgHb)	CAT (U/gHb)	GSH-Px (μ molNADPH/gHb)
Kontrol	10.51± 0.61	215.23± 36.07	1.19± 0.15	70.31± 13.08	32.18± 5.68
Ghrelin	10.99± 0.81	207.01± 26.59	1.22± 0.12	79.50± 11.13	31.20± 3.14
CCl ₄	17.70± 1.85 ^a	297.17± 35.36 ^a	0.73± 0.15 ^a	22.72± 6.71 ^a	18.16± 2.53 ^a
Ghrelin + CCl ₄	11.63± 1.88 ^b	221.80± 37.19 ^b	1.26± 0.10 ^b	67.28± 7.80 ^b	35.90± 6.89 ^b

^a Kontrol grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P < 0.05$).

^b CCl₄ grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P < 0.05$).

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, CCl₄ uygulaması eritrosit ve karaciğer dokusu SOD, CAT and GSH-Px aktivitelerini düşürdü ($p<0.05$). Öte yandan grelin + CCl₄ grubunda, eritrosit ve karaciğer dokusu SOD, CAT and GSH-Px aktivitelerinin CCl₄ grubuna göre anlamlı olarak arttığı ($p<0.05$) belirlendi (Tablo 5.1., 5.2.).

Tablo 5.2. Kontrol ve deneme gruplarının karaciğer dokusunda MDA seviyeleri ile eritrosit SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri

Gruplar	MDA (nmol/mg-protein)	SOD (U/mg-protein)	CAT (U/mg-protein)	GSH-Px (U/mg-protein)
Kontrol	0.49± 0.09	0.38± 0.10	67.85± 20.08	53.61± 10.24
Ghrelin	0.51± 0.11	0.33± 0.07	65.56± 10.13	52.72± 13.14
CCl ₄	0.92± 0.14 ^a	0.69± 0.12 ^a	38.56± 12.44 ^a	28.90± 7.13 ^a
Ghrelin + CCl ₄	0.57± 0.12 ^b	0.45± 0.16 ^b	69.78± 14.05 ^b	47.01± 7.49 ^b

^a Kontrol grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P < 0.05$).

^b CCl₄ grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P < 0.05$).

Kontrol ve deneme deneme gruplarının serumuna ait AST, ALP ve ALT aktiviteleri ile glukoz, TP ve TG seviyeleri Tablo 5.3.'de verildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CCl₄

uygulanan grupta serum AST, ALT and ALP aktivileri anlamlı derecede ($p<0.05$) yükseldi. Karbon tetraklorür verilen grupla karşılaştırıldığında grelin ön uygulaması serum AST, ALT and ALP aktivilerini düşürdü ($p<0.05$). Kontrol grubu ile kıyaslandığında CCl_4 grubunun serum glukoz, TG ve TP seviyelerinde önemli olmayan derecede bir azalma ($p>0.05$) görüldü. Diğer yandan ghrelin ön uygulaması CCl_4 grubuna göre serum TG ve TP düzeylerini anlamlı olmayan derecede ($p>0.05$) yükseltti. Diğer gruplarla karşılaştırıldığında yalnız ghrelin ya da grelin+ CCl_4 grubunda serum glukoz seviyesi önemli derecede yükseldi ($p<0.05$).

Tablo 5.3. Kontrol ve deneme gruplarının serumunda AST, ALP ve ALT aktiviteleri ile glukoz, TP ve TG seviyeleri

Gruplar	AST (U/L)	ALP (U/L)	ALT (U/L)	Glukoz (mg/dl)	TP (g/dl)	TG (mg/dl)
Kontrol	167.2± 25.8	278.5± 37.6	42.9± 18.4	114,2± 14,4	6.31± 0.30	131.1± 7.7
Ghrelin	151.0± 21.4	246.4± 32.4	41.0± 7.9	130,4± 17,1 ^c	6.24± 0.49	130.7± 9.6
CCl_4	324.1± 36.5 ^a	386.0± 44.9 ^a	119.4± 38.6 ^a	104,0± 12,9	5.39± 0.34	119.0± 9.7
Ghrelin + CCl_4	180.3± 28.7 ^b	293.2± 35.0 ^b	46.4± 21.9 ^b	126,7±12,11 ^c	5.99± 0.17	128.2± 10.4

^a Kontrol grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P < 0.05$).

^b CCl_4 grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P < 0.05$).

^c Kontrol ve CCl_4 grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P < 0.05$).

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan son çalışmalar ghrelin hormonunun büyüme hormonu salınımını uyarmada, gıda alımını başlatmada, enerji metabolizmasında ve vucut ağırlığının kontrolünde anahtar bir görev yaptığını ortaya koymuştur. Ayrıca ghrelinin yangı giderici bir özelliği olduğu ve bunu nervus vagusu uyararak ya da bazı sitokinlerin etkisini baskılayarak gerçekleştirdiği bildirilmektedir. Kısa bir süre önce keşfedilmesine rağmen tüm bu fonksiyonlar ghrelini klinik uygulamalar yönünden önemli kılmaktadır (25, 86).

Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu normal metabolik faaliyetler sırasında oluşabildiği gibi diyet ve çevresel etkiler ile ilaç ve diğer ksenobiyotiklere bağlı olarak da oluşabilir. Serbest radikaller vücutta antioksidan savunma kapasitesini aştıkları zaman çeşitli bozukluklara yol açarlar. Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan ve hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna yol açan bir reaksiyondur. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda MDA oluşur ki bu lipid peroksidasyonunun en önemli göstergelerinden biridir (87, 88). Çalışmada CCL₄ ün plazma ve karaciğer dokusunda MDA düzeyini artırdığı gözlemlendi. MDA düzeyindeki artma CCL₄ uygulamasına bağlı olarak serbest oksijen radikallerinin arttığını göstermektedir. Benzer şekilde, CCL₄ verilen sıçanların beyin ve böbrek dokularında MDA düzeyinin yükseldiği bildirilmiştir (16, 17, 89, 90). Öte yandan, CCL₄ den önce uygulanan grelinin MDA düzeyini düşürdüğü tespit edildi. Bu durum, grelinin antioksidan etkisiyle ilişkili olabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar bulgularımızı destekler niteliktedir. Bu bağlamda; Obay ve ark. (7), ratlarda pentilentetrazol tarafından oluşturulan lipid peroksidasyonuna karşı grelinin koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir. İşeri ve ark. (91), sıçanlarda alendronatla oluşturulan gastrik doku hasarında MDA düzeyini azalttığını göstermişlerdir.

Nitrik oksit eşleşmemiş tek elektron içeren bir serbest radikaldir. Fizyolojik yoğunluklarda ve nitrik oksit sentaz aracılığı ile endotel hücrelerinden salıverilen nitrik oksit normalde toksik değildir. Nitrik oksit süperoksit anyon radikali ile reaksiyona girerek dokular için son derece zararlı olan peroksinitrit oluşturmaktadır. Oluşan bu madde hücre membranında lipid peroksidasyonu başlatarak hücre hasarına neden olmaktadır (92, 93). Çalışmada CCL₄ verildikten sonra plazma NO düzeyinde gözlenen artma Chamulitrat ve ark. (94)'nın bulgularıyla uyum içindedir. Benzer şekilde, Srinavasan ve ark. (13) CCL₄ alan sıçanların NO

düzeylerinde önemli bir artma tespit etmişlerdir. CCl_4 uygulanmasından sonra plazma NO düzeylerinde gözlenen önemli artış, oluşan serbest radikallerin hücre lipid membranlarını peroksidasyona uğrattığının bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Araştırmada, sadece CCl_4 verilen grupla karşılaştırıldığında, CCl_4 den önce grelin ön uygulmasının CCl_4 ün neden olduğu NO düzeyindeki artışı azalttığı tespit edildi. Nitrik oksit düzeyindeki azalma grelin tarafından iNOS mRNA ekspresyonunun azaltılmasına bağlanabilir (3).

Canlı dokularda serbest radikallere karşı savunma sisteminde öncelikle enzim sistemi etkili olmaktadır. Superoksit dismutaz, GSH-Px ve CAT enzimleri serbest radikallerin birikmesini ve lipid peroksidasyonunun başlamasını önleyen bileşiklerdir. Süperoksit dismutaz, süperoksidin hidrojen perokside dönüşümünü katalizlerken, CAT ve GPx ise SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksidi dokulardan uzaklaştıran reaksiyonlarda görev alır (72, 75). Bu enzimlerin aktivitesindeki azalma, hücre membranının bütünlüğünü ve fonksiyonunu bozan serbest radikal miktarındaki artmayla ilişkilidir (88). Araştırmada, sadece CCl_4 verilen grubun eritrosit ve karaciğer dokusunda SOD ve CAT aktivitelerinin kontrol grubuna göre önemli düzeyde azalması CCl_4 'ün bu dokularda H_2O_2 ve peroksinitrit oluşumunu tetiklediğini ve enzimlerin bu reaktiflerin ortamdan uzaklaştırılması sırasında azaldığını göstermektedir. Karbon tetraklorür'ün antioksidan enzimler üzerine etkisi üzerine yapılan çalışmalarda sıçanlara verilen CCl_4 'ün eritrosit ve çeşitli dokularda bulgularımızla uyumlu olarak SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde önemli bir azalma kaydedilmiştir (13, 15-17, 89, 90, 95-97).

Çalışmada elde edilen veriler grelin ön uygulamasının etkisi açısından incelendiğinde; sadece CCl_4 verilen grupla karşılaştırıldığında, grelin + CCl_4 uygulaması yapılan grubun eritrosit ve karaciğer dokusunda SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerinde önemli oranda bir artışın kaydedilmesi grelinin bu dokularda enzimatik antioksidan savunma sistemini artırdığını göstermektedir. Grelinin antioksidan özelliği ile ilgili olarak, grelinin preadipozit hücre kültürlerinde SOD, CAT ve GPx aktivitelerini (98), sıçan ovaryumlarında SOD aktivitesini (5), kalpte doxorubisin ve tilmikosin ile oluşturulan kardiyotoksistide SOD, CAT ve GSH-Px aktivitesini (6, 8), pentilen tetrazol ile oluşturulan oksidatif strese beyinde SOD aktivitesini (7), metilfenilpridinyum ile oluşturulan nörotoksiste modelinde ise SOD ve CAT aktivitelerini artırdığı yönündeki veriler bulgularımızı desteklemektedir. Grelinin antioksidan özelliği Nrf2 transkripsiyon faktörünü aktive etmesinden kaynaklanabilir. Nrf2, antioksidan enzim genlerinin ekspresyonunu düzenleyen bir faktördür (99) ve yapılan deneysel

Çalışmalarda karaciğer ve akciğer gibi çeşitli dokularda oksidatif hasarlara karşı antioksidan genleri düzenleyici etkisi gösterilmiştir (100).

Tek başına CCl₄ verilen grupta karaciğer hücre hasarının göstergeleri olarak serum AST, ALT ve ALP aktivitelerinde yükselme grlmştir. Bu bulgu daha önce yapılan çalışmalar ile (21-23) uyum içindedir. Bulgularımız ratlara CCl₄ uygulamasından önce ghrelin verilmesinin serum AST, ALT ve ALP aktivitelerini düşürmek suretiyle CCl₄'n oluşturduğu karaciğer hasarından korunulabileceğini göstermiştir. Bu sonuç ratlara asetaminofen verilerek yükselen plazma AST ve ALT seviyelerinin ghrelin ile düşürüldüğünü bildiren çalışma (101) ile örtüşmektedir. Benzer şekilde Moreno ve ark. (102), ghrelin n uygulamasının CCl₄'n neden olduğu AST aktivitesindeki artışı azalttığını bildirmektedir.

Diğer biyokimyasal parametreler açısından bakıldığında tek başına CCl₄ uygulaması serum glukoz, TP ve TG seviyesi üzerine istatistiksel olarak önemli bir değişiklik oluşturmadı. Öte yandan tek başına ghrelin ya da ghrelin ile birlikte CCl₄ verilmesi kontrol ve CCl₄ grubu ile karşılaştırıldığında kan glukoz düzeyini yükseltti. Bu bulguya dayanarak ghrelinin glukoz homeostazisinde düzenleyici bir rol oynayabileceği söylenbilir. Benzer şekilde sağlıklı gönüllü insanlar (48) ve endotoksik şoktaki ratlarda (103) ghrelinin plazma glukoz düzeyini yükselttiği bildirilmektedir.

Sonuç olarak, CCl₄ tarafından oluşturulan oksidatif strese karşı grelinin plazma ve karaciğer dokusunda MDA ve NO seviyelerini düşürerek ve SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerini artırarak antioksidan savunma mekanizmasını uyaradığı ve koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazo M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth hormone releasing acylated peptide from stomach. *Nature.*, 1999; 402: 656-660.
2. Aart J, Van der L, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocrin Rev.*, 2005; 25(3): 426-457.
3. Sibilia V., Rindi g, Pagani F, Rapetti D, Locatelli V, Torsello A, Campanini N, Deghenghi R, Netti C. Ghrelin protects against ethanol induced gastric ulcers in rats: studies on the mechanism of action. *Endocrinolgy.*, 2003; 144(1): 353-359.
4. Chang L, Zhao J, Li GZ, Geng B, Pan CS, Qi YF, Tang CS. Ghrelin protects myocardium from isoproterenol induced injury in rats. *Acta Pharmacol Sin.*, 2004; 25(9): 1131-1137.
5. Kheradmand A., Aliezael M., Birjandi M. Ghrelin promotes antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in the rat ovary. *Regul Pept.*, 2010.; 162, 84-89
6. Xu Z., Lin S., Wu W., Tan H., Wang Z., Cheng C., Lu L., Zhang X. Ghrelin prevents doxorubicin induced cardiotoxicity through TNF-alpha/NF- κ B pathways and mitochondrial protective mechanisms. *Toxicology.* 2008; 247: 133-138
7. Obay BD., Tasdemir E., Tumer C., Bilgin HM., Atmaca M. Dose dependent effects of ghrelin on pentylene tetrazole induced oxidative stres in a rat seizure model. *Peptides.* 2008; 29: 448-455.
8. Çetin N., Boyraz U., Çetin E. Ghrelin alleviates tilmicosin induced myocardial oxidative stress in rats. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2011; 10: 2038-2042.
9. Felix JIS, Fong DM, Muriel P, Santillan RL, Castillo D, Yahuaca P. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride induced acute hepatotoxicity in the rat. *J Ethopharmacol.*, 2002; 81: 145-154.
10. Kurt H, Başaran A, Musmul A. Sıçanlarda karbon tetrakloritin oluşturduğu oksidatif stresin kateşin ile önlenmesi. *Kocatepe Tıp Derg.*, 2004; 5: 29-34.

11. Nakahira K, Takahashi T, Shimizu H, Maeshima K, Uehara K, Fujii H, Nakatsuka H, Yokoyama M, Akagi R, Morita K. Protective role of heme oxygenase-1 induction in carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. *Biochem Pharmacol.*, 2003; 66: 1091-1105.
12. Noa M, Mendoza S, Mas R, Mendoza N. Effect of policosanol on carbon tetrachloride induced acute liver damage in Sprague Dawlwy rats. *Drugs R D.*, 2003; 4(1): 29-35.
13. Srinivasan M, Rukkumani A, Sudheer R, Menon VP. Ferulic acid, a natural protector against carbon tetrachloride induced toxicity. *Fundament Clin Pharmacol.*, 2005; 19: 491-496.
14. Adaramoye OA, Akinloye O. Possible protective effect of kolaviron on CCl₄ induced erythrocyte damage in rats. *Biosci Rep.*, 2000; 20(4): 259-264.
15. Lesiuk SS, Czechowska G., Stryjecka ZM, Slomka M et al. Catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication, *j Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 2003; 10: 309-315.
16. Karadeniz A., Yıldırım A., Çelebi F. Protective effect of Panax ginseng against carbon tetrachloride induced oxidative brain injury in rats. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* 2007; 2: 117-121
17. Karadeniz A., Yıldırım A., Karakoç A., Kalkan Y., Çelebi F. Protective effect of Panax ginseng on carbon tetrachloride induced liver, heart and kidney injury in rats. *Revue Med. Vet.*, 2009; 160: 237-243.
18. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYÜ. Vet. Fak. Derg.* 2004; 15:91-96.
19. Güven A, Erginsoy S, Kaya N. Kazlarda karbon tetraklorür zehirlenmesinin biyokimyasal ve patolojik parametrelere etkisi. *Kafkas Ü. Vet. Fak. Derg.*, 2003; 9: 131-136
20. Ramkumar KM, Rajesh R, Anuradha CV. Food restriction attenuates blood lipid peroxidation in carbon tetrachloride intoxicated rats. *Nutrition.*, 2003; 19:4 358-362.
21. Ohta Y, Sasaki E, Nishida K, Kobayashi T, Nagata M, Ishiguro I. Preventive effect of dai-saiko-to (da-chai-hu-tang) extract on disrupted hepatic active oxygen metabolism

- in rats with carbon tetrachloride-induced liver injury. *Am J Chin Med* 1995; 23: 53-64.
22. Ohta Y, Kongo M, Sasaki E, Nishida K, Ishiguro I. Therapeutic effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *J Pineal Res* 2000; 2:119-26.
23. Chandan BK, Saxena AK, Shukla S, Sharma N, Gupta DK, Suri KA, Suri J, Bhadauria M, Singh B. Hepatoprotective potential of *Aloe barbadensis* Mill. against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. *J Ethnopharmacol* 2007; 111:560-6.
24. Chen AS, Taguchi T, Sakai K, Matahira Y, Wang MW, Miwa I. Effect of chitobiose and chitotriose on carbon tetrachloride induced acute hepatotoxicity in rats. *Biol Pharm. Bull.*, 2005; 28(10): 1971-1973.
25. Arıkan F, Uysal H. Sağlıkta ve hastalıkta ghrelinin rolü. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.*, 2011; 51(1): 41-53.
26. Aydın S.,Geckil H., Zengin F. Ve ark. Ghrelin in plants. What is the function of an appptite hormone in plants? *Peptides*. 2006; 27: 1286-1292.
27. Aydın S., Özkan Y., Cayak E., Aydın S. Ghrelin ve biyokimyasal fonksiyonları. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2006; 26: 272-283.
28. İyidoğan Y. Grelinin yapısı ve organizmadaki fonksiyonları *İst Tıp Fak Derg*, 2007; 70: 82-92.
29. 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.
30. Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N et al. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000; 85: 4908-4911
31. Smith RG, Leonard R, Bailey AR, Palyha O, et al. Growth hormone secretagogue receptor family members and ligands, *Endocrine*, 2001; 14: 9-14
32. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin and feeding state determines plasma ghrelin-like immuno reactivity levels in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2001; 86: 4753-4758

33. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000; 279: 909-913.
34. Kanamoto N, Akamizu T, Hosoda H, Hataya Y, Ariyasu H, et al. Substantial production of ghrelin by a human medullary thyroid carcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4984-4990
35. Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, et al. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280: 904-907
36. 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
37. Volante M, Allia E, Gugliotta P, Funaro A, Broglio F, et al. Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1300-1308
38. Sleisenger C, Foltran B. *Gastrointestinal and Liver Disease*: WB Saunders 7th ed. 2002
39. Tanaka M, Hayashida Y et al. Testis-specific and developmentally induced expression of a ghrelin gene-derived transcript that encodes a novel polypeptide in the mouse. *Biochem Biophys Acta*, 2001; 1522: 62-65
40. 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
41. Gaytan F, Barrerio ML, Chopin LK. Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type Ia growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003; 88(2): 879-887
42. Barreiro ML, Gaytan F, Caminos JE. Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis. *Biol Reprod*, 2002; 67: 1768-1776
43. Volante M, Fulcheri E, Allia E. Ghrelin expression in fetal, infant and adult human lung. *J Histochem Cytochem*, 2002; 50: 1013-1021

44. Hattori N, Saito T, Yagyu T. GH, GH receptor, GH-secretagogue receptor and ghrelin expression in human T cells, B cells and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86: 4284-4291
45. Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, et al. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001; 280(5): R1483-R1487.
46. Nagaya N, Kangawa K. Ghrelin, a novel growth hormone- releasing peptide, in the treatment of chronic heart failure. *Regul Pept*. 2003; 114(2-3): 71-77
47. Chang L, Ren Y, Liu X, et al. Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004; 43(2): 165-170.
48. Broglio F, Arvat E, Benso A, 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.
49. Muller AF, Janssen JA, Hofland LJ, et al. Blockade of the growth hormone (GH) receptor unmasks rapid GH- relasing peptide-6-mediated tissue-specific insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 590-593.
50. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. 2001; 407: 908-913
51. Asakawa A, Inui A, Kaga T, et al. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut*. 2003; 52: 947-952
52. Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, et al. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*. 2001; 50: 707–709.
53. Purnell JQ, Weigle DS, Breen PA, et al. Ghrelin levels correlate with insulin levels, insulin resistance and high-density lipoprotein cholesterol, but not with gender, menopausal status, or cortisol levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88: 5747-5752.
54. Aydin S, Ozercan İH, Dagli F, ve ark. Ghrelin is present human theet. *J Biochem Mol Biol*. 2007; 40(3): 368-372.
55. Fukushima N, Hanada R, Teranishi H, et al. Ghrelin directly regulates bone formation. *Bone Miner Res*. 2005; 20 (5): 790-798

56. Wiekkel JC, Wichniak A, Ising M, et al. Ghrelin promotes slow-wave sleep in man. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 284: 407-415
57. Harsch IA, Konturek PC, Koebnick C, et al. Leptin and ghrelin levels in patients with obstructive sleep apnoea: effect of CPAP treatment. *Eur Respir J.* 2003; 22(2): 251-257.
58. Correia ML, Morgan DA, Sivitz WI, et al. Leptin acts in the central nervous system to produce dose-dependent changes in arterial pressure. *Hypertension.* 2001; 37: 936-942.
59. Date Y, Murakami N, Kojima M, et al. Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 275(2): 477-480
60. Date Y, Murakami N, Toshinai K, et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology.* 2002; 123(4): 1120-1128
61. Arvat E, Maccario M, Di Vito L, et al. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(3): 1169-1174.
62. Riis AL, Hansen TK, Moller N, et al. Hyperthyroidism is associated with suppressed circulating ghrelin levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: 853-857
63. Hataya Y, Akamizu T, Takaya K, 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: 4552-4555.
64. Perry JK, Emerald BS, Mertani HC, et al. The oncogenic potential of growth hormone. *Growth Horm IGF Res.* 2006; 16(5-6): 277-289.
65. Murata M, Okimura Y, Iida K, et al. Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem.* 2002; 277(7): 5667-5674.
66. Tacke F, Brabant G, Kruck E, et al. Ghrelin in chronic liver disease. *J Hepatol.* 2003; 38 (4): 447-454.
67. Aydin S, Ozercan IH, Dagli F, et al. Ghrelin immunohistochemistry of gastric

- adenocarcinoma and mucoepidermoid carcinoma of salivary gland. *Biotech Histochem.* 2005; 80(3-4): 163-168.
68. Mottershead M, Karteris E, Barclay JY, et al. Immunohistochemical and quantitative mRNA assessment of ghrelin expression in gastric and oesophageal adenocarcinoma. *J Clin Pathol.* 2006; 60(4): 405-409.
69. Dornonville De La Cour C, Lindstrom E, Norlen P, et al. Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells. *Regul Pept.* 2004; 120: 23-32.
70. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 479-481
71. 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
72. Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *The Lancet* 1984; 23:1396-1398
73. 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
74. Aydın A. Sayal A., Isimer A, 2001. Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi. Gata Basımevi, Ankara
75. Dunder Y., Aslan R., 2000. Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. Afyon. Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, Yayın No 29, Uyum Ajans, Ankara.
76. Winterbourn CC, Hawkins RE, Brain M, Carrel W. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med.*, 1975; 55: 337-341
77. Miller GL. Protein determination for large numbers of samples. *Anal. Chem* 1959; 31: 964.
78. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
79. Fairbanks VF, Klee GG. Biochemical aspect of haematology. In: Tiez NW, Saunders WB (eds), *Fundamentals of Clinical Chemistry*. Philadelphia 1987; pp: 803-804.

80. Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M. 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.
81. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbituric acid. *J Lipid Res* 1978; 19: 1053–1057.
82. Aydın A, Orhan H, Sayal A, Ozata M, Sahin G, Isimer A. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control, *Clin Biochem* 2001; 34: 65–70.
83. Luck HS. Catalase in methods in analysis. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods in Analysis*. Academic Press, London, 1965; pp. 855–884.
84. Paglia PE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158–169.
85. Sun Y, Oberley LW, Li YA. Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 1988; 34: 497–500.
86. Aydın S. 2007; Ghrelin hormonunun keşfi: araştırmaları ve klinik uygulamaları. *Türk Biyokimya Derg.*, 32:76-89.
87. Del Rio D., Stewart AJ., Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 2005; 15: 316-328.
88. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue damage. *Laboratory Investigation* 1982; 4: 412-426
89. Jayakumar T, Sakthivel M, Thomas PA, Geraldine P. *Pleurotus ostreatus*, an oyster mushroom, decreases the oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rat kidneys, heart and brain. *Chem. Biol. Interact.*, 2008; 176: 108-120.
90. Tirkey N., Pilkhwal S., Kuhad A., Chopra K. Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbontetrachloride in rat liver and kidney. *BMC Pharmacol*. 2005; 5: 2.
91. Işeri SO., Sener G., Saglam B., Ercan F., Gedik N., Yegen BC. Ghrelin alleviates biliary obstruction induced chronic hepatic injury in rats. *Regul. Pept.*, 2008; 146: 73-79.

92. Tamer, I., Polat, G., Eskandari, G., Ercan, B., Atik, U. Serbest Radikaller, Mersin Üniv. Tıp Fak. Derg. 2000; 1: 52-58.
93. Kılınç A., Kılınç K. Nitrik oksit, biyolojik fonksiyonları ve toksik etkileri, Palme Yayıncılık, 2003; Ankara.
94. Chamulitrat W, Jordan SJ, Mason RP. Nitric oxide production during endotoxic shock in carbon tetrachloride-treated rats. *Mol Pharm* 1994; 46: 391-397.
95. Ohta Y, Kongo-Nishimura M, Matsura T, Yamada K, Kitagawa A, Kishikawa T. Melatonin prevents disruption of hepatic reactive oxygen species metabolism in rats treated with carbon tetrachloride. *J Pineal Res* 2004; 36:10–17.
96. Taniguchi M, Takeuchi T, Nakatsuka R, Watanabe T, Sato K. Molecular process in acute liver injury and regeneration induced by carbon tetrachloride. *Life Sci* 2004; 75: 1539-1549.
97. Lee CP, Shih PH, Hsu CL, Yen GC. Hepatoprotection of tea seed oil (*Camellia oleifera* Abel.) against CCl₄-induced oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol* 2007; 45: 888-895.
98. 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. Role of leptin, ghrelin, angiotensin II and orexins in 3T3 L1 preadipocyte cells proliferation and oxidative metabolism. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58: 53-64.
99. Jung K., Kwak M. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules*, 2010; 15: 7266-7291
100. Chan K., Han XD., Kan YW. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001; 98: 4611-4616.
101. Jahromi MG, Nabavizadeh F., Vahedian J ve ark. Protective effect of ghrelin on acetaminophen-induced liver injury in rat. *Peptides* 2010, 11: 2114-2117
102. Moreno M, Chaves JF, Sancho-Bru P, Ramalho F, Ramalho LN, et al. Ghrelin attenuates hepatocellular injury and liver fibrogenesis in rodents and influences fibrosis progression in humans. *Hepatology* 2010; 51: 974-985.

103. Chang L, Zhao J, Yang J, Zhang Z, Du J, Tang C. Therapeutic effects of ghrelin on endotoxic shock in rats. *Eur J Pharmacol* 2003; 473: 171-176.