

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KRONİK ARALIKLI AÇLIĞIN GASTROİNTESTİNAL
MOTOR FONKSİYONLAR ÜZERİNE GHRELİN
ARACILI ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sadettin Mert YÜKSEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2025-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

KRONİK ARALIKLI AÇLIĞIN GASTROİNTESTİNAL
MOTOR FONKSİYONLAR ÜZERİNE GHRELİN
ARACILI ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sadettin Mert YÜKSEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet BÜLBÜL

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2025-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı Y¼ksek Lisans Programında
Y¼ksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mehmet B¼LB¼L
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

ye : Prof. Dr. Filiz BASRALI
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

ye : Doç. Dr. Ersen ERASLAN
Bandırma Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri yeleri tarafından uygun
g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun/...../..... tarih ve
...../..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstit¼ M¼d¼r¼

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Sadettin Mert YÜKSEL

İmza

Prof. Dr. Mehmet BÜLBÜL

Danışman

İmza

TEŞEKKÜR

Bu çalışma sürecindeki akademik yönlendirme ve katkıları için danışmanım Sayın Prof. Dr. Mehmet BÜLBÜL'e teşekkür ederim.

Ayrıca Fizyoloji Bölümü'ndeki tüm değerli hocalarıma akademik katkıları ve destekleri için teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında birlikte emek verdiğimiz, deneylerin planlanması, yürütülmesi ve verilerin değerlendirilmesi aşamalarında özveriyle yanımda olan ekip arkadaşlarıma minnettarım.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu süreçte de koşulsuz sevgi ve desteklerini esirgemeyen aileme; annem Emine BURSALI ve babam Demirtaş YÜKSEL'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmaya doğrudan ya da dolaylı katkı sunan tüm kişi ve kurumlara da şükranlarımı arz ederim.

ÖZET

Amaç: Bu çalışma ile aralıklı açlık beslenme modelinin sıçanlarda gastrointestinal sistem üzerinde ghrelinergic sistem aracılı etkisinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

Yöntem: Bu çalışmada 20 erkek Sprague-Dawley sıçan kullanılmış; 10'u ad-libitum, 10'u ise 14 gün süreyle aralıklı açlık (AA) diyetine tabi tutulmuştur. GIS (ileum, fundus) dokularının kasılma ve gevşeme yanıtları organ banyosu yöntemiyle değerlendirilmiştir. Kasılma için bethanekol, gevşeme için SNP; elektriksel aktivite için ise EFS protokolü uygulanmıştır. Ayrıca mide-bağırsak geçiş süresi (GIT) ve katı mide boşalımı ölçülmüştür. Tüm hayvanlardan elde edilen plazmalardan ve GIS dokularından total ghrelin düzeyi ELISA yöntemiyle analiz edilmiştir. Protein miktarlarını gruplar arası karşılaştırmak adına Western-Blot yöntemi uygulanmıştır.

Bulgular: Aralıklı açlıkta vücut ağırlığı azalmış, ağırlığa göre normalize edilen besin alımı artmış; katı mide boşalımı ve toplam gastrointestinal transit hızlanmıştır. Plazma ghrelin düzeyleri değişmezken, doku düzeyinde fundusta ghrelin ve ileumda GHSR sinyali artış eğilimi göstermiştir. Organ banyosunda fundusun spontan kasılma frekansı korunmuş, ileumda artmıştır; motilite indeksi her iki dokuda da benzerdir. Betanekol kasılmaları konsantrasyona bağlı artırmış, GHSR antagonisti yüksek konsantrasyonlarda yanıtı azaltmıştır; SNP fundusta belirgin, ileumda sınırlı gevşeme oluşturmuştur. EFS ile kasılmada fundusta grup farkı görülmezken, ileumda yüksek frekanslarda aralıklı açlık grubunun yanıtları daha büyüktür; EFS ile gevşemede grup farkı saptanmamıştır.

Sonuç: Bu çalışma, sıçanlarda kronik aralıklı açlığın enterik ghrelin ekspresyonunu artırarak gastrointestinal motiliteyi uyardığını ve GI motor disfonksiyonlarda tamamlayıcı bir tedavi yaklaşımı potansiyeline işaret ettiğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: aralıklı açlık, gastrointestinal sistem, ghrelin, izole organ banyosu

ABSTRACT

Objective: This study aims to investigate the ghrelinergic system-mediated effects of an intermittent fasting feeding model on the gastrointestinal system in rats.

Method: In this study, twenty male Sprague–Dawley rats were used; ten served as controls and ten were subjected to a 14-day intermittent fasting (IF) diet. Contractile and relaxant responses of gastrointestinal tissues (ileum and fundus) were evaluated using an organ bath system. Bethanechol was applied to assess contraction, sodium nitroprusside (SNP) to assess relaxation, and electrical field stimulation (EFS) was used to probe neural activity. Gastrointestinal transit (GIT) and solid gastric emptying were also measured. Total ghrelin levels in plasma and GI tissues were analyzed by ELISA, and protein expression was compared between groups using Western blotting.

Results: Under intermittent fasting, body weight decreased while food intake normalized to body weight increased; solid gastric emptying and total gastrointestinal transit were accelerated. Plasma ghrelin levels were unchanged, whereas at the tissue level fundic ghrelin and ileal GHSR signals showed a tendency to increase. In organ bath assays, the spontaneous contraction frequency in the fundus was maintained but increased in the ileum; the motility index was similar between groups in both tissues. Bethanechol increased contractions in a concentration-dependent manner, and the GHSR antagonist reduced responses at higher concentrations; sodium nitroprusside produced pronounced relaxation in the fundus and limited relaxation in the ileum. For EFS-evoked contractions, no group difference was observed in the fundus, whereas responses were greater at higher frequencies in the intermittent fasting group in the ileum; no group differences were detected for EFS-evoked relaxation.

Conclusion: This study suggests that chronic intermittent fasting in rats increases enteric ghrelin expression, thereby stimulating gastrointestinal motility, and points to a potential complementary therapeutic approach for gastrointestinal motor dysfunction.

Key words: intermittent fasting, gastrointestinal system, ghrelin, isolated organ bath

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLO LİSTESİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Ghrelinin Keşfi	2
2.2. Ghrelin Üretimi	3
2.2.1. GI Ghrelin Salgılanmasının Merkezi Kontrolü	4
2.2.2. GI Ghrelin Salgılanmasının Periferik Kontrolü	5
2.3. Ghrelinin Yapısı	7
2.4. Ghrelin Açile ve Des-açile formları	8
2.4.1 Ghrelin'in Açillenmesi	8
2.4.2 Des-açil Ghrelinin Etkileri	9
2.5 Ghrelin Reseptörleri	10
2.6 GHSR Antagonistleri	11
2.6.1 Karaciğer Kaynaklı Antimikrobiyal Peptit 2 (LEAP2)	12
2.6.2 BIM-28163	13
2.6.3 1,2,4-Triazol Türevleri	13
2.6.4 [D-Lys-3]-GHRP-6	14
2.7 Ghrelinin Fizyolojik İşlevleri	15
2.7.1 Büyüme Hormonu Salınımı	15
2.7.2 Oreksijenik Etki	16
2.7.3 Motilite Üzerine Etkisi	18

2.7.4 Otonom Sinir Sistemi Üzerine Etkisi	20
2.8 Beslenmenin Bilişsel Kontrolü	21
2.9 Açlık	22
2.9.1 Spesifik Açlık	22
2.9.2 Genel Açlık	23
2.10 Açlığı Kontrol Eden Sinir Devreleri	24
2.11 Ghrelin ve Beslenmenin Bilişsel Kontrolü	25
2.12 Aralıklı Açlık	27
2.13 Aralıklı Açlık ve Ghrelin	27
2.14 Hipotez	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM	29
3.1. Deney Grupları	29
3.2. Aralıklı Açlık Beslenme Modeli	29
3.3. Vücut Ağırlıkları ve Yem Tüketimi	30
3.4. Gastrointestinal Transit	30
3.5. Katı Mide Boşalımı	30
3.6. ELISA Analizleri	30
3.6.1. ELISA Plazma Analizleri	30
3.6.2. ELISA Doku Analizleri	32
3.7. Western Blot	33
3.8. Parafin Kesitte IHC Boyaması	34
3.9. Parafin Kesitte Floresan Boyaması	35
3.10. İleum Whole mount düz kas miyenterik pleksus (LMMP) analizleri	36
3.10.1. İleal LMMP preparatlarında kuprolinik mavi boyaması	36
3.10.2. İleum LMMP preparatlarında immünofloresan etiketleme	37

3.11. İzole Organ Banyosu	38
3.11.1 Farmakolojik Ajan Uygulamaları	38
3.11.2 Elektriksel Alan Stimülasyonu (EFS)	39
3.12 İstatistiksel Analizler	39
4. BULGULAR	40
4.1. In-vivo Ölçümler	40
4.1.1. Besin Tüketimi ve Vücut Ağırlığı Takibi	40
4.1.2. Katı Mide Boşalımı ve Gastrointestinal Transit	42
4.1.3. ELISA Analizleri	43
4.1.4. Western Blot Analizleri	45
4.1.5. Histolojik Analizler (Ghrelin-GHSR)	47
4.2. In-vitro Ölçümler	56
4.2.1. Bazal Motor Aktivite	56
4.2.2. Kimyasal Ajan Uygulamaları	57
4.2.3. Elektriksel Alan Uyarımı	60
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
KAYNAKLAR	69
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Ghrelinin açillenmesi ve ghrelinin üretimi.	9
Şekil 2.2.	Ghrelinin salınması ve motiliteye etkisi.	20
Şekil 4.1.	Günlük yem tüketim grafiği.	40
Şekil 4.2.	Vücut ağırlığı değişim (%) grafiği.	41
Şekil 4.3.	Yem tüketimi/vücut ağırlığı oran grafiği.	41
Şekil 4.4.	Katı mide boşalımı (%)	42
Şekil 4.5.	Gastrointestinal transit (%)	42
Şekil 4.6.	Ghrelin ELISA kitine ait standart grafiği.	43
Şekil 4.7.	Plazma ghrelin konsantrasyonları.	44
Şekil 4.8.	Fundus ve ileum ghrelin seviyelerinin ELISA konsantrasyonları.	45
Şekil 4.9.	Bradford plate görüntüsü.	45
Şekil 4.10.	BSA standart konsantrasyon grafiği.	46
Şekil 4.11.	Fundus ve ileum protein lizatlarında ghrelin seviyelerinin Western blot görüntüsü.	46
Şekil 4.12.	Fundus ve ileum dokularına ait Western blot analiz grafiği.	47
Şekil 4.13.	Fundus kesitlerinde ghrelin immünreaktivitesinin gösterimi.	48
Şekil 4.14.	İleum kesitlerinde ghrelin immünreaktivitesinin gösterimi.	49
Şekil 4.15.	Fundus kesitlerinde GHSR immünreaktivitesinin gösterimi.	50

Şekil 4.16.	İleum kesitlerinde GHSR immünreaktivitesinin gösterimi.	51
Şekil 4.17.	Kuprolinik mavisi boyama görüntüsü	51
Şekil 4.18.	GFAP immünofloresan boyama görüntüleri	52
Şekil 4.19.	PGP 9.5 ve ChAT ekspresyonlarını gösteren immünofloresan görüntüleri	53
Şekil 4.20.	PGP 9.5 ve nNOS ekspresyonlarını gösteren immünofloresan görüntüleri	54
Şekil 4.21.	PGP 9.5 ve Ghrelin ekspresyonlarını gösteren immünofloresan görüntüleri	55
Şekil 4.22.	GHSR ve ChAT ekspresyonlarını gösteren immünofloresan ve immünohistokimya görüntüleri	56
Şekil 4.23.	Bazal kasılma frekansları grafiği.	56
Şekil 4.24.	Bazal motilite indeksi (AUC) grafiği.	57
Şekil 4.25.	Betanekeol aracılı kontraksiyon yanıtları.	58
Şekil 4.26.	Sodyum nitroprussid aracılı gevşeme yanıtları.	58
Şekil 4.27.	Betanekeol (10^{-9} – 10^{-4} M) uygulanmasıyla elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri grafiği.	59
Şekil 4.28.	Sodyum nitroprussid (10^{-9} – 10^{-3} M) ile oluşturulan konsantrasyon-yanıt eğrileri grafiği.	60
Şekil 4.29.	EFS yanıtlarının atropin aracılı baskılanması	60
Şekil 4.30.	EFS ile artan gevşeme yanıtlarının L-NAME ile baskılanması	61

Şekil 4.31. Elektriksel alan stimölasyonu ile indüklenen nöral kasılma yanıtları grafiğı.

62

Şekil 4.32. Elektriksel alan stimölasyonu ile indüklenen gevşeme yanıtları grafiğı.

62



TABLO LİSTESİ

Şekil 3.1. Kullanılan primer antikorlara ait detaylar

37



SİMGELER ve KISALTMALAR

AG	: Açıl Ghrelin
AA	: Aralıklı Açlık
BBB	: Kan Beyin Bariyeri
cAMP	: Halkasal Adenozin Monofosfat
CNS	: Merkezi Sinir Sistemi
ECL	: Geliştirilmiş Kemilüminesans
EFS	: Elektriksel Alan Stimülasyonu
ELISA	: Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi
GH	: Büyüme Hormonu
GHRH	: Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon
GHS	: Büyüme Hormonu Salgılatıcı
GHSR	: Büyüme Hormonu Salgılatıcı Reseptör
GIS	: Gastrointestinal Sistem
GOAT	: Ghrelin O-Açıltransferaz
IHC	: İmmünohistokimya
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuzlu Su
PVDF	: Poliviniliden Florür
RIPA	: Radyoimmünopresipitasyon Tamponu
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Ayırımı
SNP	: Sodyum Nitroprussid
UAG	: Des-açıl Ghrelin
WB	: Western Blot

1. GİRİŞ

Gastrointestinal sistem (GIS), sadece sindirim işlevlerini yerine getirmekle kalmayıp aynı zamanda endokrin, sinirsel ve immunolojik sistemlerle sürekli etkileşim hâlinde olan dinamik bir yapıdır. Bu sistemin motor fonksiyonları, içsel düzenleyici peptitler, vagal ve sempatik sinyaller ile modüle edilir. Bu düzenleyici faktörler arasında ghrelin, son yıllarda giderek artan bir bilimsel ilgi odağı hâline gelmiştir. Ghrelin, öncelikle mide fundusundaki X/A-benzeri hücrelerden sentezlenen ve büyüme hormonu salınımını uyarmasının yanı sıra enerji dengesi, iştah ve gastrointestinal motilite üzerinde etkili olan bir peptit hormondur.

Ghrelinin, hem merkezi sinir sistemi hem de periferik organlar aracılığıyla besin alımını ve mide-bağırsak motilitesini yönlendirdiği bilinmektedir. Bu hormonun fizyolojik işlevleri, hipotalamustaki oreksijenik nöronlar üzerinde oluşturduğu uyarıcı etkilerle ve enterik sinir sistemi aracılığıyla mide kaslarına gönderdiği sinyallerle açıklanmaktadır. Ghrelinin bu çok yönlü etkileri, enerji homeostazının sağlanmasında kritik bir rol oynadığını ortaya koymaktadır.

Öte yandan, günümüzde gerek sağlık gerekse yaşam tarzı bağlamında giderek popülerleşen aralıklı açlık (AA) uygulamalarının metabolik ve nörofizyolojik etkileri üzerinde birçok araştırma yapılmaktadır. Aralıklı açlık, sadece kilo kontrolü amacıyla değil, aynı zamanda hücrel stres yanıtlarını, hormonal dengeyi ve gastrointestinal fonksiyonları etkileyen bir model olarak değerlendirilmektedir. Bu bağlamda, aralıklı açlık uygulamasının ghrelin düzeyleri ve ghrelin aracılı sinyalleme üzerindeki etkileri, henüz yeterince aydınlatılmamış bir araştırma alanı olarak dikkat çekmektedir.

Bu tez çalışmasında, kronik aralıklı açlık uygulamasının gastrointestinal motor fonksiyonlar üzerindeki ghrelin aracılı etkileri araştırılmıştır. Bu araştırma, ghrelinin GIS motor fonksiyonları üzerindeki rolünü açlık modeli ile bütünleştirerek değerlendiren bütüncül bir yaklaşım sunmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ghrelin'in Keşfi

1970'lerin sonlarında Cyril Bowers ve Frank Momany tarafından gerçekleştirilen çalışmalar, hexarelin ve GHRP-6 gibi büyüme hormonu (GH) salgılatıcı peptitlerin (GHRP) geliştirilmesine zemin hazırlamıştır. Bu peptitler, başlangıçta metiyonin-enkefalin analoglarından türetilmiş olup ön hipofizden (adenohipofiz) GH salınımını uyarmada yüksek aktivite göstermiştir (Bowers ve ark., 1980; Momany ve ark., 1981). Başlangıçta GHRP'lerin yalnızca hipofiz düzeyinde etkili oldukları düşünülmüşse de, ilerleyen araştırmalar bu peptitlerin merkezi sinir sistemi üzerinde de önemli rol oynadığını göstermiştir. Özellikle hipotalamusun arkuat çekirdeği (ARC) ve burada yer alan GHRH nöronları aracılığıyla etkiler ortaya konmuş, ayrıca hipotalamik GHRH-somatostatin (SST) dengesini modüle ettikleri anlaşılmıştır (Dickson ve ark., 1997). GHRP'lerin GH salınımını artırıcı etkilerinin, hücre içi sinyal iletiminde fosfolipaz C (PLC) aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir. PLC aktivasyonu sonucunda inositol trifosfat (IP₃) ve diacylglycerol (DAG) oluşmakta, bu da protein kinaz C (PKC) aktivasyonu ve hücre içi Ca²⁺ mobilizasyonu ile sonuçlanmaktadır. Böylece GHRP'lerin etkileri, klasik GHRH-SST mekanizmasından bağımsız fakat onunla etkileşim içinde işlev görmektedir (Cheng ve ark., 1991).

Bu süreç, 1999 yılında Kojima ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çığır açıcı çalışma ile yeni bir boyut kazanmıştır. Araştırmacılar, mide kaynaklı 28 amino asitlik bir peptit olan ghrelini tanımlamış ve bunun GHS-R'nin endojen ligandı olduğunu göstermiştir (Kojima M. ve ark., 1999a). Ghrelin, hipofiz üzerinde bulunan GHS-R reseptörleri aracılığıyla doğrudan GH salınımını tetiklemekte ve bu etkisini hipotalamik GHRH yolaklarından bağımsız olarak da gösterebilmektedir. Ayrıca, ghrelin molekülünde üçüncü pozisyonda yer alan serin (Ser3) aminoasidinin n-oktanilasyon ile modifiye olduğu, bu yapısal değişikliğin biyolojik aktivite için zorunlu olduğu belirlenmiştir. Bu akilasyon sürecinin, daha sonra tanımlanan GOAT (ghrelin O-acyltransferase) enzimi aracılığıyla gerçekleştiği ortaya konmuştur.

Sonuç olarak, ghrelinin keşfi GH salınımında mide kaynaklı yeni bir mekanizmayı ortaya çıkarmış; aynı zamanda ghrelinin metabolizma, iştah kontrolü, enerji dengesi ve gastrointestinal motilite gibi birçok fizyolojik süreçte kritik roller üstlenebileceğine işaret etmiştir. Bu keşif, büyüme hormonu fizyolojisi ve endokrinoloji alanında paradigma değişikliğine yol açmış, ghrelin üzerine yapılan ileri araştırmaların önünü açmıştır.

2.2. Ghrelin Üretimi

Ghrelin, başlıca mide fundusunda yer alan nöroendokrin hücreler tarafından sentezlenen ve dolaşıma salgılanan bir peptit hormondur. Bu hücreler insanlarda P/D1 hücreleri, kemirgenlerde ise X/A-benzeri hücreler olarak adlandırılmaktadır (Inui ve ark., 2004). Ghrelin sentezi esas olarak midede gerçekleşmekle birlikte, düşük seviyelerde de olsa kalp, akciğer, lenfoid doku, böbrek, adrenal bezler, tiroid bezi, pankreas, gonadlar, çeşitli tümör dokuları ve bazı kanser hücre hatlarında da ifade edilmektedir. Ayrıca, merkezi sinir sistemi içerisinde hipotalamusun arcuate ve ventromedial çekirdekleri, beyincik ve beyin sapında ghrelin ile ilişkili nöronların bulunduğu gösterilmiştir (Khatib ve ark., 2014).

Mide içerisindeki ghrelin üreten hücrelerin yoğunluğu, fundus bölgesinde pilora kıyasla daha yüksektir ve bu hücreler ilk tanımlandıklarında X/A-benzeri hücreler olarak adlandırılmıştır. Erişkin oksintik bezlerdeki endokrin hücre popülasyonunun yaklaşık %20'sini oluşturan bu hücrelerin fetal dönemde sayısı oldukça sınırlıdır. Doğumdan sonra giderek artan X/A-benzeri hücre sayısına paralel olarak, fetal midede düşük olan ghrelin düzeylerinin postnatal dönemde yaklaşık 5. haftaya kadar kademeli olarak yükseldiği bildirilmiştir (Konturek ve ark., 2004). Bu bulgu, ghrelinin gelişimsel süreçte postnatal dönemde kazanılan fizyolojik rollerle ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Ghrelin sentezi, öncül protein olan pre-proghrelinin, prohormone convertase 1/3 (PC1/3) enzimi tarafından proghreline dönüştürülmesi ile başlar. Ardından proghrelinin belirli bölgelerinden proteolitik olarak kesilmesi sonucunda olgun ghrelin peptiti oluşur. Bu peptitin biyolojik olarak aktif hale gelebilmesi için, ghrelin O-acyltransferase (GOAT) enzimi tarafından üçüncü pozisyonundaki serin (Ser3) kalıntısına yağ asidi eklenmesi gerekir. Bu süreçte en sık kullanılan açıl donörü oktanoik asit olup, ghrelinin fonksiyonel

aktivitesi için zorunludur. Dolaşımdaki ghrelinin yaklaşık %10'u bu şekilde açıl formda (aktif ghrelin) bulunurken, geri kalanı des-açıl (inaktif) ghrelin formundadır (Nunez-Salces ve ark., 2021).

İnsan preproghrelin geni, kromozom 3p25-26 bölgesinde lokalize olup beş ekzon ve dört introndan oluşmaktadır. Ekzonların birleştirilmesiyle oluşan ghrelin mRNA'sı, 117 amino asit uzunluğunda bir preproghrelin öncül peptidine çevrilir. Bu öncül peptit proteolitik olarak işlenerek aktif ghrelin molekülünü oluşturur. Ayrıca, preproghrelinin alternatif bir parçalanma ürünü olarak obestatin de tanımlanmıştır. Obestatin, 23 amino asitlik bir peptit olup ilk kez sıçan mide özütlerinden saflaştırılmış ve ghrelin geninin potansiyel bir ürününden türediği gösterilmiştir (Hassouna ve ark., 2010).

2.2.1. GI Ghrelin Salgılanmasının Merkezi Kontrolü

Merkezi sinir sistemi (MSS), gastrointestinal (Gİ) sistem ile iletişimini başlıca iki yol üzerinden sağlar: dorsal motor nucleus of the vagus (DMV)'dan çıkan vagus siniri ve torasik omurilikten kaynaklanan sempatik spinal afferentler (Bray, 2000). Periferik ghrelin salgılayan hücrelerin bu iki yol tarafından doğrudan kontrol edildiği gösterilmiştir. Nitekim vagus sinirine uygulanan subdiafragmatik (SDA) lezyonlar veya periferik kolinerjik antagonisti atropin uygulaması, kalori kısıtlaması ile uyarılan ghrelin salınımını ortadan kaldırmaktadır (Williams ve ark., 2003b). Bu bulgular, kolinerjik sinyalleme periferik ghrelin salınımı üzerinde kritik bir kontrol mekanizması olduğunu ortaya koymaktadır. Ek çalışmalar, hipotalamusta üretilen üç amino asitlik bir peptit olan TRH (thyrotropin-releasing hormone)'nin de bu süreçte rol oynayabileceğini göstermiştir. TRH'nin sisternal yolla uygulanması, anestezi altındaki sıçanlarda periferik ghrelin salınımını ve gıda alımını artırmaktadır (Ao ve ark., 2006). Bu etkinin, servikal vagotomi ile ortadan kaldırılması, arka beyinden gelen TRH sinyallemesinin ghrelin salınımını uyarmak için vagus sinirini bir iletim hattı olarak kullandığını güçlü biçimde desteklemektedir.

Gİ sisteme ulaşan sempatik nöronlar da ghrelin salınımının düzenlenmesinde önemli rol oynar. Omurilikten çıkan sempatik nöronlar, termojenez, mide motilitesi ve mide sekresyonunun kontrolünde kritik öneme sahiptir. Elektriksel veya kimyasal olarak aktive

edilen sempatik spinal nöronların, anestezi altındaki sıçanlarda ghrelin salınımını artırdığı bildirilmiştir (Mundinger ve ark., 2006). Ancak bu sempatik bağlantının şartlanmış ghrelin salınımı için gerekli olup olmadığı halen netlik kazanmamıştır. Sempatik nöronlar ayrıca çevresel veya metabolik stres tarafından aktive edilir. Bununla birlikte sempatik nöronların, çevresel ya da metabolik stres koşullarında aktive oldukları bilinmektedir. Dikkate değer şekilde, salındıktan sonra ghrelinin, strese maruz kalan kemirgenlerde hipotalamus–hipofiz–adrenal (HPA) eksenini aktivitesini azalttığı ve depresif benzeri davranışları hafiflettiği gösterilmiştir (Lutter ve ark., 2008; Lambert ve ark., 2011; Spencer ve ark., 2012). Bu veriler, Gİ sistemdeki ghrelin hücrelerinin sempatik innervasyonunun, hem strese hem de beslenme davranışına verilen fizyolojik yanıtların düzenlenmesinde önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca, kısıtlı gıda erişimine (RFS) maruz bırakılan kemirgenlerde Gİ ghrelin hücrelerinde sirkadiyen saat genlerinin ifadesinde artış gözlenmiştir. Bu artış, periferik ghrelin salınımındaki yükselişle korelasyon göstermektedir (Silver ve ark., 2011). Nitekim saat geni BMAL1'in genetik olarak ortadan kaldırılması, RFS ile indüklenen gıda alımı ve ghrelin salınımındaki artışı azaltmaktadır (Laermans ve ark., 2015). Bu bulgular, arka beyin ve omurilikten gelen inen projeksiyonların, öğrenme gerçekleşikten sonra Gİ ghrelin hücrelerini belirli bir şekilde programlayarak ghrelin salgılayabileceğini düşündürmektedir. Böylece, Gİ ghrelin hücrelerinin sirkadiyen uyumu, MSS girdisi olmaksızın dahi, önceden koşullandırılmış ghrelin salınımının sürdürülmesini sağlayabilir.

2.2.2. GI Ghrelin Salgılanmasının Periferik Kontrolü

Ghrelin, sıçanlarda X/A-benzeri oksintik hücrelerden, insanlarda ise P/D1 hücrelerinden üretilmektedir (Muller ve ark., 2015). Bu hücreler, gastrointestinal sistemdeki endokrin hücre popülasyonu içerisinde ikinci en yoğun hücre grubu olarak tanımlanır. X/A-benzeri hücreler, ince bağırsaklara kıyasla özellikle fundus ve gastrik korpus bölgelerinde daha yüksek yoğunlukta bulunur (Laermans ve ark., 2015). Bununla birlikte, X/A-benzeri hücreler kolonda da yer almakta ve burada doğrudan lümene temas eden bir dağılım göstermektedir; oysa gastrik X/A-benzeri hücreler lümene temas etmez (Sakata ve ark., 2002). Bu hücrelerin işlevsel önemini gösteren bulgulardan biri, gastrektomi sonrası

ghrelin sekresyonunda gözlenen belirgin azalmadır (Jeon ve ark., 2004). Açlık koşulları, X/A-benzeri hücrelerde ghrelin mRNA ekspresyonunun artmasına, buna karşılık hücre içi ghrelin peptit içeriğinin azalmasına yol açmaktadır (Toshinai ve ark., 2001). Bu durum, açlık sırasında ghrelin üretiminin artıp hızla dolaşıma salındığını göstermektedir. Bunun tersine, obezite ve aşırı vücut ağırlığı koşullarında plazma ghrelin düzeylerinin azaldığı rapor edilmiştir (Tschop ve ark., 2000).

Periferik düzenleyiciler açısından, hem in vitro hem de in vivo veriler mevcuttur. Örneğin, ghrelinoma MGN 3-1 hücre hattı kullanılarak yapılan in vitro çalışmalar ile kemirgenlerde yapılan in vivo deneyler, çeşitli gastrointestinal peptitlerin ghrelin sekresyonunu modüle ettiğini ortaya koymuştur (Ao ve ark., 2006; Hosoda ve ark., 2008). Ghrelin sekresyonu, gastrointestinal sistemden salınan çeşitli peptitler tarafından da düzenlenmektedir. Bu peptitlerin bir kısmı ghrelin salınımını uyarırken, diğerleri inhibe edici etkilere sahiptir. Örneğin, somatostatin (GHIH), X/A-benzeri ve P/D1 hücrelerindeki somatostatin-2 reseptörleri üzerinden ghrelin sekresyonunu inhibe etmektedir (Shimada ve ark., 2003; Iwakura ve ark., 2011). Ayrıca, hem sıçanlarda hem de insanlarda GLP-1'in ghrelin salınımını baskıladığı gösterilmiştir (Hagemann ve ark., 2007; Perez-Tilve ve ark., 2007). Bununla birlikte, bu sonuçlar bazı laboratuvarlar tarafından tekrarlanamamış ve özellikle in vitro çalışmalar ile sıçan modellerinde çelişkili bulgular rapor edilmiştir (Mundinger ve ark., 2006; Hosoda ve ark., 2008). Benzer şekilde, insülin (Saad ve ark., 2002; Iwakura ve ark., 2011) ve CCK-8 (Brennan ve ark., 2007) ghrelin sekresyonu üzerinde baskılayıcı etki göstermektedir. Ayrıca, sıçanlarda gastrin salgılatıcı peptit (GRP) uygulaması sonrasında da ghrelin sekresyonunun azaldığı bildirilmiştir (de la Cour ve ark., 2007).

Öte yandan, bazı ajanların ghrelin sekresyonunu uyarıcı etkileri mevcuttur. Oksitosin, dopamin, noradrenalin, adrenalin ve glukagon gibi faktörlerin ghrelin salınımını artırdığı gösterilmiştir (Mundinger ve ark., 2006; de la Cour ve ark., 2007; Gagnon ve ark., 2013). Ayrıca kannabinoidlerin de ghrelin sekresyonu üzerinde uyarıcı etkileri vardır. Özellikle endojen kannabinoid anandamid ve sentetik CB1 reseptör (CB1R) agonisti CPP-540, farmakolojik olarak uygulandığında ghrelin sekresyonunu artırmaktadır. Bu bileşiklerin, X/A hücrelerinde ghrelin immünreaktivitesini azaltmaları, CB1R aktivasyonunun ghrelin salınımını teşvik ettiğini desteklemektedir (Zbucki ve ark., 2008). Daha yeni veriler,

CB1R aracılı ghrelin sekresyonunun muhtemelen mTOR sinyal yolunun kannabinoid aracılı aktivasyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Senin ve ark., 2013).

2.3. Ghrelinin Yapısı

Ghrelin geni insanda 3p25-26 kromozom bölgesinde lokalizedir ve yaklaşık 511 baz çifti uzunluğunda mRNA dizisine sahiptir. Bu gen yapısı altı ekzon ve dört introndan oluşmaktadır. Ghrelin proteini, öncül formu olan 117 amino asitlik preproghrelin üzerinden sentezlenir. Preproghrelin, 23 amino asitlik bir sinyal peptidi ve 94 amino asitlik proghrelin bölgesinden meydana gelir. Proghrelin, post-translasyonel modifikasyonlarla iki temel bileşene ayrılır: 28 amino asitlik ghrelin ve 66 amino asitlik C-ghrelin. C-ghrelin ise proteolitik süreçler sonucu 23 amino asitlik obestatin hormonuna dönüşebilmektedir. İnsan ve sıçan ghrelin dizileri arasında yüksek oranda korunmuşluk bulunmakta olup yalnızca 11. ve 12. pozisyonlardaki amino asitler farklılık göstermektedir. Bu yapısal benzerlik, ghrelinin evrimsel olarak korunmuş bir hormon olduğunu ve türler arasında temel biyolojik işlevlerinde büyük ölçüde ortaklık gösterdiğini ortaya koymaktadır (Kojima M. ve ark., 1999a; Delporte, 2013).

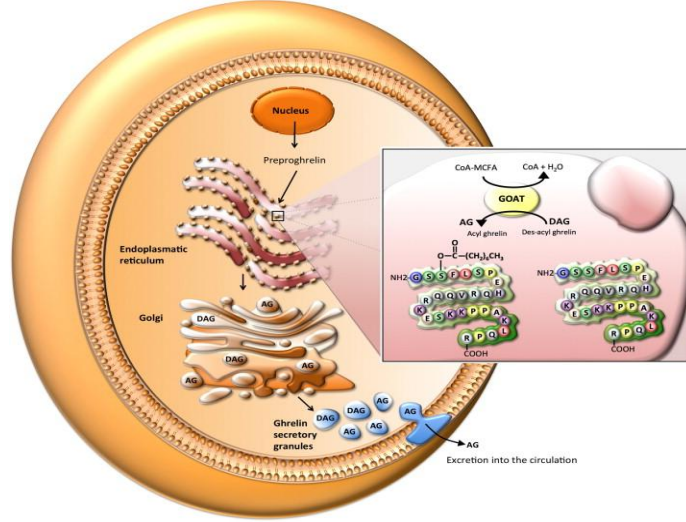
Memelilere ait ghrelin dizilerinde, özellikle NH₂-terminal bölgesindeki ilk 10 amino asit kalıntısı tamamen aynıdır. Bu korunmuşluk, ghrelinin biyolojik aktivitesinde NH₂-terminal bölgenin merkezi öneme sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca üçüncü pozisyonda yer alan serin kalıntısının asil modifikasyona (akilasyona) uğraması zorunludur; bu modifikasyon hormonun reseptör aktivasyonu ve biyolojik fonksiyonunu kazanabilmesi için kritik öneme sahiptir. Nitekim, sıçan ve insan ghrelinleri tüm amino asit dizisi boyunca yalnızca iki amino asit farklılığı göstermekte ve bu da ghrelinin yapısal bütünlüğünün ve işlevsel öneminin memeliler arasında evrimsel süreçte güçlü biçimde korunduğunu kanıtlamaktadır (Kojima M. ve ark., 2005).

2.4. Ghrelin Açile ve Des-açile formları

2.4.1 Ghrelinin Açillenmesi

Ghrelin-O-açiltransferaz (GOAT) enzimi, proghrelin molekülüne oktanoil grubunu ekleyerek aktif açil-ghrelin üretimini sağlar. Dolaşımdaki ghrelin iki formda bulunur: açil-ghrelin (aktif form) ve des-açil ghrelin (inaktif form). Ancak yalnızca açil formu reseptörüne bağlanarak endokrin etkileri tetikleyebilir (Murray ve ark., 2003; Airapetov ve ark., 2021). GOAT, endoplazmik retikulum zarına bağlı bir transmembran enzim olup, membran bağımlı O-açil-transferaz (MBOAT) ailesinin bir üyesidir. Açil-ghrelin, kan-beyin bariyerini geçebilme özelliğine sahiptir ve hipotalamustaki GHSR1a reseptörlerine bağlanarak iştahı artırır (Mihalache ve ark., 2016). Bu etkisini, anabolik peptitler olan NPY (nöropeptit Y) ve AgRP (agouti-related protein) eksprese eden nöronları uyarak gerçekleştirir (Cummings ve ark., 2003).

Ghrelinin sentezi sırasında, endoplazmik retikulumdan geçişi esnasında, GOAT enzimi ghrelinin N-terminalinde yüksek derecede korunan GSSFLS motifini tanır ve substrat olarak bağlanır. Bu bağlanmayı takiben, GOAT'un katalitik merkezinde yer alan korunmuş histidin-338 kalıntısı aracılığıyla oktanoil grubu, ghrelinin serin-3 pozisyonundaki hidroksil grubuna transfer edilir. Bu süreç sonucunda serin-3 ile oktanoil grubu arasında kovalent bir ester bağı oluşur. Böylece ghrelin, büyüme hormonu sekretagog reseptörü 1a (GHSR1a) ile etkileşime girebilecek biyolojik aktif formuna ulaşır (Gutierrez ve ark., 2008).



Şekil 2.1. Ghrelinin açılınması ve ghrelinin üretimi (Muller ve ark., 2015). GOAT: ghrelin O-açıl transferaz, AG: açıl ghrelin, DAG: des-açıl ghrelin.

2.4.2 Des-açıl Ghrelinin Etkileri

Açıl-ghrelinin serum yarı ömrü türler arasında farklılık göstermektedir. İnsanlarda yaklaşık 240 dakika, sıçanlarda ise 30 dakika civarında bulunmuştur (De Vriese ve ark., 2004). Bu farklılık, ghrelinin des-açılasyonu ve parçalanmasından sorumlu enzimlerin türler arasında farklılık göstermesinden kaynaklanmaktadır. İnsanlarda ghrelin inaktivasyonundan sorumlu baskın enzim bütirilkolinesteraz iken, rodentlerde karboksilesterazlar, ghrelinin des-oktanoylasyonunu insanlara göre yaklaşık sekiz kat daha hızlı gerçekleştirmektedir (De Vriese ve ark., 2004). Rodentlerde des-oktanoyl ghrelin, mide dokusunda iki farklı hücre popülasyonunda lokalize edilmiştir: yalnızca des-oktanoyl ghrelin içeren hücreler ve hem des-oktanoyl hem de oktanoyl ghrelin içeren hücreler (Mizutani ve ark., 2009; Janssen ve ark., 2011). Çoğu çalışmada hem des-açıl hem de açıl ghrelin birlikte analiz edilmiş ve dolaşımdaki ghrelinin büyük kısmının des-açıl formda olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, des-açıl ghrelin için özgül bir reseptör henüz tanımlanmamıştır. Hatta bir çalışmada, insan plazmasında kütle spektrometrisi ile yapılan ölçümlerde dolaşımdaki tüm ghrelinin açıl formda olduğu ve des-açıl ghrelinin örnekleme sırasında ortaya çıkan bir artefakt olabileceği öne sürülmüştür (Blatnik ve ark., 2012).

Fonksiyonel açıdan bakıldığında, des-açıl ghrelin'in pek çok biyolojik etkisi olduğu rapor edilmiştir. Bu hormonun, C2C12 iskelet kası hücrelerinde farklılaşmayı ve füzyonu teşvik ettiği (Filigheddu ve ark., 2007), kas atrofisini önlediği (Porporato ve ark., 2013), enerji ve glukoz metabolizması üzerinde GHSR1a'dan bağımsız etkiler gösterdiği (Thompson ve ark., 2004; Zhang W. ve ark., 2008) ortaya konmuştur. Ayrıca, des-açıl ghrelinin endotel hücreleri ve kardiyomiyositler üzerinde kardiyoprotektif etkiler sağladığı da bildirilmiştir (Baldanzi ve ark., 2002; Li L. ve ark., 2006). Besin alımı üzerindeki etkisi ise GHSR1a ve NPY sinyallemesinden bağımsız olup muhtemelen oreksin aracılığıdır (Toshinai ve ark., 2006). Öte yandan, bazı çalışmalar des-açıl ghrelin'in sıçanlarda besin alımını azalttığını ve açlık koşullarında mide motor aktivitesini bozduğunu bildirmiştir (Chen ve ark., 2005). Ayrıca, des-açıl ghrelin'i aşırı eksprese eden transgenik farelerde, standart yem ile beslendiklerinde vücut yağ kütlelerinde azalma olduğu; yüksek yağlı diyetle beslendiklerinde ise diyet kaynaklı obeziteye karşı korundukları gözlenmiştir (Chen ve ark., 2005).

Metabolik açıdan önemli bir bulgu, ghrelin uygulandığında sıklıkla gözlenen plazma glukoz düzeyinde artış ve plazma insülin düzeyinde azalma etkilerinin (Broglia ve ark., 2001; Egido ve ark., 2002; Broglia ve ark., 2003) des-açıl ghrelin eşzamanlı uygulandığında antagonize edilmesidir (Broglia ve ark., 2004a). Dahası, merkezi olarak yüksek farmakolojik dozlarda uygulanan des-açıl ghrelinin, GHSR-bağımlı bir mekanizma yoluyla yağlanmayı artırabileceği ve glukoz ile uyarılmış plazma insülin düzeyini yükseltebileceği yönünde veriler mevcuttur (Heppner ve ark., 2014).

2.5 Ghrelin Reseptörleri

G proteinine bağlı reseptörler (GPCR'ler) allosterik komplekslerdir; hücre dışı uyarıları algılayıp hücre içi aktarıcılarla farklı bağlanma/etkileşim kipleri üzerinden sonuç sinyalleri oluştururlar. Ortaya çıkan farklı yanıt profilleri “eğilimli (biased) sinyal iletimi/ fonksiyonel seçicilik” olarak tanımlanır. Bu sınıfta yer alan ghrelin reseptörü (GHSR1a), enerji dengesi bozulduğunda metabolik homeostazın yeniden sağlanması ve sürdürülmesinde kilit rol oynar (Gross ve ark., 2023).

GHSR geni, iki ekleme varyantı kodlar: GHSR1a (fonksiyonel) ve GHSR1b (görünürde işlevsiz). GHSR1a ghrelin ile aktive olan asıl reseptördür; GHSR1b ise ghrelin veya sentetik GHS ligandlarıyla aktive olmaz ve reseptör olarak işlevselliği belirsizdir (Chan ve ark., 2004). Çalışmalar, GHSR1b'nin hücre içinde düzgün taşınmadığını, nükleusta biriktiğini ve bu nedenle yüksek olasılıkla inaktif olduğunu göstermiştir (Smith ve ark., 2005).

GHSR1a, rodopsin-benzeri sınıf A GPCR'dir ve peptit agonisti ghrelin ile peptit antagonisti/ters agonist LEAP-2'ye karşı yüksek özgüllük/afinite gösterir (Howard ve ark., 1996). Açıl-ghrelin, oktanoil grubunu doğrudan bağlanma belirleyicisi olarak kullanarak nanomolar düzeyde afinitelerle GHSR1a'ya bağlanır; buna karşılık des-açıl ghrelin oktanoil grubu olmadığından reseptöre bağlanma afinitesi belirgin düşüktür ve fizyolojik koşullarda sinyalleme başlatamaz (Gauna ve ark., 2007). GHSR1a'nın ayırt edici özelliği yüksek konstitutif aktivite sergilemesidir. ECL2 bölgesindeki bazı missens mutasyonlar bu konstitutif aktiviteyi ortadan kaldırır ve insanlarda idiyopatik kısa boy ile anormal vücut ağırlığı fenotipleriyle ilişkilendirilir (Pantel ve ark., 2006).

Fonksiyonel olarak, GHSR1a aktivasyonu hem sağlıklı bireylerde hem de diyabetik gastroparezi hastalarında mide boşalmasını uyarır (Levin ve ark., 2006). Sentetik bir GHSR1a agonisti olan relamorelin, tip 1 ve tip 2 diyabet hastalarında gastric emptying'i hızlandırır ve GI semptomları azaltır; bu nedenle klinik ilgi görmektedir (Williams ve ark., 2003a).

Ekspresyon açısından GHSR1a başlangıçta hipofiz ve hipotalamusta tanımlanmış, daha sonra mide ve bağırsaklar dahil çeşitli periferik dokularda da gösterilmiştir (Kojima M. ve ark., 2005). İnsan ve sıçan mide/kolonik doku kesitlerinde GHSR1a ve GHSR1b'nin nöronal hücre gövdeleri ve lifleri, ayrıca korpus mide bezleri ve mast hücreleri ile ilişkili hücrelerde eksprese edildiği bildirilmiştir (Dass ve ark., 2003).

2.6 GHSR Antagonistleri

GHSR1a'nın aşağı akış sinyalleme, başlıca G proteinlerinin (G α q, G α s, G α i, G α 12/13) aktivasyonu ve β -arrestin alımı yoluyla gerçekleşmektedir. Ghrelinin iştah artırıcı etkisi

özellikle NPY/AgRP nöronları üzerinde, $G_{\alpha s}$ – cAMP – protein kinaz A (PKA) sinyal yolu aracılığıyla iletilmektedir. Buna karşılık, hipofizde baskın olan yolak $G_{\alpha q}$ – fosfolipaz C (PLC) – inositol (1,4,5)-trifosfat (IP_3) kaskadıdır ve bu mekanizma büyüme hormonu (GH) salınımının düzenlenmesinde temel rol oynar (Yin Y. ve ark., 2014). GHSR1a'nın dikkat çekici özelliklerinden biri, ghrelin bulunmadığında dahi yüksek düzeyde konstitutif aktivite göstermesidir. Reseptör, herhangi bir ligand olmadan, maksimum kapasitesinin yaklaşık %50'si kadar bazal aktivite sergiler (Holst ve ark., 2003). Bu yüksek bazal sinyal, GHSR1a'nın ghrelin uyarımı olmaksızın da hem GH sekresyonunu hem de beslenme davranışını sürdürebilmesini sağlamaktadır (Pantel ve ark., 2006). Bu bağlamda, ters agonistler GHSR1a fonksiyonunu baskılamada rekabetçi antagonistlerden daha etkili kabul edilmektedir. Çünkü ters agonistler yalnızca ghrelinin bağlanmasını engellemekle kalmaz, aynı zamanda reseptörün yüksek bazal aktivitesini de azaltarak fonksiyonel blokaj sağlarlar (Els ve ark., 2010).

2.6.1 Karaciğer Kaynaklı Antimikrobiyal Peptit 2 (LEAP2)

2018'de Ge ve ark., 168 farklı rekombinant ve stabil GPCR eksprese eden hücre hattında yaptıkları geniş taramada LEAP-2'nin GHSR1a'nın endojen bir blokörü olduğunu ilk kez göstermiştir (Ge ve ark., 2018). Bunu takiben 2020'de, alanin tarama mutagenesi kullanılarak LEAP-2–GHSR1a etkileşiminin bağlanma bölgeleri ve anahtar temasları haritalanmış ve böylece yeni GHSR1a antagonistlerinin rasyonel tasarımı için kritik yapısal bilgi tabanı oluşturulmuştur (Li H. Z. ve ark., 2020).

LEAP-2'nin işlevi çift yönlüdür: (i) ters agonist olarak GHSR1a'nın konstitutif aktivitesini düşürür; (ii) rekabetçi antagonist olarak ghrelin ile aynı bağlanma cebini paylaşarak reseptöre bağlanma için yarışır (M'Kadmi ve ark., 2019). Ters agonist etkisinde LEAP-2, GHSR1a'yı inaktif bir konformasyona stabilize ederek bazal sinyali bastırır (M'Kadmi ve ark., 2019); bu özellik, onu sentetik GHSR1a antagonistlerine kıyasla obezite tedavisi açısından ümit verici bir aday haline getirir. Rekabetçi antagonizm boyutunda, LEAP-2 ile ghrelinin bağlanma afiniteleri neredeyse eşdeğerdir (Wang ve ark., 2019). Mutasyon analizleri, GHSR1a üzerinde Phe279 kalıntısının hem LEAP-2 hem de ghrelin için ortak bağlanma düğümü olduğunu ortaya koymuştur (Li H. Z. ve ark., 2020).

2.6.2 BIM-28163

Tam uzunlukta insan ghrelinine ait bir analog olan BIM-28163, GHS-R1a reseptörüne bağlanmasına karşın reseptörü aktive etmeden etkileşir ve bu nedenle tam antagonistik etki gösterir. Literatürde BIM-28163'ün, ghrelinin GHS-R1a üzerindeki aktivasyonunu engellediği ve in vivo koşullarda ghrelin kaynaklı büyüme hormonu (GH) salınımını baskıladığı rapor edilmiştir. Dikkat çekici biçimde, BIM-28163'ün vücut ağırlığını artırma yönünde agonist benzeri bir etki sergilediği bildirilmiştir.

BIM-28163'ün GH salınımı üzerindeki etkileri bağlamında, hipotalamustaki mediyal arkuat çekirdekte ghrelin tarafından uyarılan Fos proteini immünreaktivitesini (Fos-IR) antagonize ettiği gösterilmiştir; bu çekirdek, ghrelinin GH salınımını düzenlediği bilinen temel bir merkezdir. Buna karşılık, besin alımının nörofizyolojik kontrolüyle ilişkilendirilen dorsal mediyal hipotalamusta (DMH) ise hem ghrelinin hem de BIM-28163'ün agonist etkilerle Fos-IR düzeylerini artırdığı rapor edilmiştir.

Ghrelin ve BIM-28163'ün DMH'de Fos-IR oluşturma etkinliklerinin farklılık göstermesi ve birlikte uygulandıklarında yalnızca BIM-28163'ün oluşturduğu seviyede Fos-IR gözlenmesi, iki molekülün DMH'de aynı reseptör üzerinden etkili olabileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte, söz konusu reseptörün GHS-R1a olmadığına dair bulgular vardır. Bu durum, ghrelinin kilo alımını artırıcı etkisinin GHS-R1a dışındaki alternatif bir reseptör aracılığıyla gerçekleşebileceğini ve dolayısıyla GHS-R1a'nın obezite tedavisine yönelik farmakolojik yaklaşımlar açısından her zaman uygun bir hedef olmayabileceğini düşündürmektedir (Halem ve ark., 2005).

2.6.3 1,2,4-Triazol Türevleri

1,2,4-triazol iskeleti, G proteinine bağlı reseptörlere (GPCR) etki eden moleküllerin farmakoforlarında yer alabilen ve bu reseptörler üzerinde agonist ya da antagonist etki gösterebilen bir yapısal öge olarak tanımlanmaktadır. Ghrelin reseptörü üzerindeki

etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmalarda, GHS-R1a'yı eksprese edecek şekilde genetik olarak modifiye edilmiş domuz böbreği kökenli epitel hücreleri (LLC-PK1) kullanılmış; farklı triazol türevlerinin reseptöre bağlanma kapasiteleri incelenmiştir. Analizler, yan zincirinde iki karbon atomu bulunan JMV2866 ve JMV2844 bileşiklerinin ghrelinin reseptöre bağlanmasını anlamlı düzeyde engellediğini göstermiştir. Buna ek olarak, GHS-R1a ekspresyonu yapılan in hamsteri over (CHO) hücrelerinde yürütülen deneylerde, ghrelin ile uyarılan hücre içi kalsiyum yanıtının söz konusu iki triazol türevi tarafından etkin biçimde baskılandığı gözlenmiştir. Bu bulgular, JMV2866 ve JMV2844'n test edilen analoglar arasında ghrelin antagonisti olarak en yüksek etkinliğe sahip adaylar olduğunu düşündürmektedir (Demange ve ark., 2007).

Ayrı deneysel çalışmalarda, JMV2959, JMV3031 ve JMV3021 bileşiklerinin sıçanlara akut subkutan uygulanmasının, hexarelin kaynaklı iştah artışını anlamlı ölçüde bastırđı gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu bileşiklerin tek başına verilmesi, büyüme hormonu (GH) salınımında bir değişiklik oluşturmamıştır. Toplu olarak değerlendirildiğinde, bu sonuçlar ilgili 1,2,4-triazol türevlerinin ghrelin yolakları üzerinden iştah mekanizmasını modüle edebildiğini, ancak GH eksenini üzerinde doğrudan bir etkilerinin olmadığını desteklemektedir (Moulin ve ark., 2007).

2.6.4 [D-Lys-3]-GHRP-6

GHRP-6, metiyonin-enkefalin yapısına benzerliği bulunan ve hem hücre kültürlerinde hem de canlı organizmalarda büyüme hormonu (GH) salınımını uyardığı gösterilmiş sentetik bir peptit türevidir (Bowers ve ark., 1984).

Lateral ventriküle (i.c.v.) uygulanan GHRP-6'ya verilen GH yanıtının, aynı dozun sistemik uygulanmasına kıyasla daha yüksek bulunması, büyüme hormonu sekretagolarının (GHS) hipotalamik düzeyde etkili olduğuna dair güçlü kanıt sunmaktadır (Fairhall ve ark., 1995).

Öte yandan, damar yoluyla yapılan akut GHRP-6 uygulaması, hipotalamus ile hipofiz arasındaki bağlantısı cerrahi olarak kesilmiş koyunlarda (HPD; her iki cinsiyette) dahi GH salınımını tetikleyebilmiştir. Bu bulgu, GHRP-6'nın doğrudan hipofiz düzeyinde etkili

olabildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, GHRP-6'nın etkinliği, aynı amaçla kullanılan GHRH'ye göre daha düşüktür: sinirsel bütünlüğü korunmuş hayvanlarda yanıt yaklaşık beş kat, HPD hayvanlarda ise on beş kat daha zayıf gözlenmiştir. Bu fark, GHRP-6'nın GHRH üreten nöronlar üzerinde de uyarıcı etkiler oluşturabileceğini; dolayısıyla etki mekanizmasının yalnızca hipofizle sınırlı kalmayıp hipotalamik bileşeni de içerdiğini düşündürmektedir (Fletcher ve ark., 1994).

GHRP-6'nın antagonisti olarak kullanılan [D-Lys-3]-GHRP-6'nın merkezi ya da sistemik uygulanmasının benzer fizyolojik etkiler oluşturduğu bildirilmiştir. Farelerde yapılan çalışmalarda hem intraperitoneal (ip) hem de intraseberoventriküler (i.c.v.) enjeksiyonla verilen [D-Lys-3]-GHRP-6, doza bağımlı biçimde anlamlı iştah azalmasına yol açmıştır. Ayrıca ip yolla uygulanan ghrelinin oluşturduğu iştah artışı, merkezi [D-Lys-3]-GHRP-6 enjeksiyonu ile belirgin biçimde baskılanmıştır (Asakawa ve ark., 2003).

2.7 Ghrelinin Fizyolojik İşlevleri

Ghrelins çok geniş bir biyolojik etki yelpazesine sahiptir ve hem metabolik–gastrointestinal süreçleri hem de kardiyovasküler, iskelet, sinir ve bağışıklık sistemlerine ait işlevleri modüle eder. Temel etkiler özetle şöyledir: besin alımı ve enerji metabolizmasının düzenlenmesi; mide asidi sekresyonu, gastrointestinal motilite ve pankreastan protein salınımının uyarılması (Kojima M. ve ark., 1999a), kardiyovasküler fonksiyonların modülasyonu (Zhang G. ve ark., 2010), osteoblast proliferasyonu ve kemik oluşumunun teşviki (Fukushima ve ark., 2005), nörojeniz (Li E. ve ark., 2013) ve miyogenez (Zhang W. ve ark., 2007), öğrenme ve hafıza süreçlerinin desteklenmesi (Diano ve ark., 2006), timus gelişimi (timopoez) (Dixit ve ark., 2007), uyku-uyanıklık ritminin düzenlenmesi (Szentirmai ve ark., 2007), yaşlanma süreci (Andrews ve ark., 2009), ve nörodejeneratif hastalıklarda (örneğin Parkinson hastalığı) nöroprotektif etkiler (Moon ve ark., 2009).

2.7.1 Büyüme Hormonu Salınımı

Ghrelins tanımlandıktan sonra yapılan çalışmalar, bu peptidin özellikle hipofiz bezindeki somatotrof hücrelerden büyüme hormonu (GH) salınımını uyardığını göstermiştir. Ayrıca,

hipotalamusun da bu süreçte rol oynadığı düşünülmektedir; nitekim hipotalamus hasarı bulunan bireylerde GH düzeylerinde belirgin azalma saptanmıştır (Popovic ve ark., 2003).

Ghrelin ve GH sekretagoglarıyla yapılan deneysel araştırmalar, GH salınımında anlamlı ve tekrarlanabilir bir artış olduğunu ortaya koymuştur (van der Lely ve ark., 2004). Nitekim ghrelinin pulsatil salınımı, çapraz yakınsama entropisi (X-ApEn) analiziyle incelendiğinde, gece boyunca açlık döneminde ghrelin ile GH salınımları arasında eş zamanlı bir düzenlilik gözlenmiştir (Koutkia ve ark., 2004). Benzer şekilde, sağlıklı ve anoreksiya tanılı adolesanlarda yapılan dekonvolüsyon analizleri, açlık ghrelin düzeyinin bazal GH salınımı ile GH pulslarının sıklığının bağımsız bir belirleyicisi olduğunu göstermiştir (Misra ve ark., 2005). Sekiz sağlıklı genç erkekte yürütülen bir çalışmada ise GH atımlarının genliği ile bu atımlardan önce ve atım sırasında ölçülen ortalama açıl-ghrelin düzeyi arasında anlamlı bir korelasyon bulunmuştur. Bu sonuçlar, tokluk koşullarında açıl-ghrelinin GH salınımında pozitif bir düzenleyici rol üstlendiğini düşündürmektedir (Nass ve ark., 2008).

Genetik çalışmalar da ghrelinin GH salınımındaki önemini desteklemektedir. GHSR geni silinmiş farelerde IGF-I düzeyleri yabani tip göre daha düşük bulunmuştur (Sun ve ark., 2004). Benzer şekilde, ghrelin geni silinmiş farelerde de IGF-I düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla düşük olma eğiliminde olduğu rapor edilmiştir (Sun ve ark., 2003). Ayrıca, GHSR antagonistinin uygulanması kemirgenlerde GH atımlarının genliğini azaltmaktadır (Zizzari ve ark., 2005).

Ghrelinin GH salınımını uyarması birden fazla mekanizma ile gerçekleşir: doğrudan hipofizdeki somatotrof hücreler üzerindeki etkisiyle (Picha ve ark., 2009), GHRH ile sinerjistik etkileşimiyle (Leal-Cerro ve ark., 1995) ve vagal afferentlerin uyarılması yoluyla (Date Y., 2012). Ayrıca, yüksek dozlarda uygulandığında ghrelin, insanlarda prolaktin, kortikotropin ve kortizol salınımını da uyaramaktadır (Coiro ve ark., 2011).

2.7.2 Oreksijenik Etki

Ghrelin düzeylerinin yemek öncesinde yükselmesi ve yemek sonrasında düşmesi, bu hormonun öğün başlatılmasında rol oynayan bir “açlık hormonu” olduğuna işaret

etmektedir. Ghrelin, kısa vadede besin alımını düzenlerken, uzun vadede yağ kullanımını azaltarak vücut ağırlığının korunmasına katkı sağlamaktadır (Castaneda ve ark., 2010). Ghrelinin iştah artırıcı etkisinin GHSR1a aracılığıyla gerçekleştiği, bu reseptörün genetik olarak silindiği farelerde oreksijenik etkinin ortadan kalkmasıyla gösterilmiştir (Sun ve ark., 2004). GHSR1a'nın hipotalamusta, özellikle enerji dengesi ve beslenme kontrolünde görevli nöronlarda yüksek düzeyde eksprese edilmesi bu mekanizmayı desteklemektedir (Cowley ve ark., 2003).

Hipotalamik arcuate çekirdekte (ARC), ghrelin nöronları NPY ve AgRP eksprese eden nöronlara eferent projeksiyonlarla bağlanmakta ve bu oreksijenik peptitlerin salınımını uyarmaktadır. Aynı zamanda ghrelin, POMC nöronlarının ateşleme frekansını inhibe ederek leptin etkisine karşı fonksiyonel bir antagonizma oluşturur. Bu inhibisyonun, POMC nöronlarına yönelik spontan GABA salınım sıklığını artırarak gerçekleştiği bildirilmiştir. İlginç olarak, bu süreçte POMC mRNA ekspresyonu değişmemekte, ghrelinin etkisinin esas olarak fonksiyonel modülasyon düzeyinde olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca ghrelinin, MCH ve prepro-oreksin (OX) mRNA düzeylerinde bir değişiklik oluşturmaması, etkisinin özellikle AgRP/NPY nöronları üzerinden gerçekleştiğini doğrulamaktadır. Daha yakın tarihli çalışmalar, ghrelinin oreksijenik etkisinde AMP ile aktive edilen protein kinaz (AMPK) yolunun merkezi rol oynadığını göstermektedir (Kola ve ark., 2008).

Periferik düzeyde, sıçanlarda vagal afferent nöronlarda ghrelin reseptörlerinin bulunması, mide kaynaklı ghrelin sinyallerinin beyne vagus siniri aracılığıyla iletebileceğini düşündürmektedir (Date Y., 2012). Bununla birlikte, sıçanlarda periferik ghrelin enjeksiyonu sonrası iştah artışı için vagal afferentlerin kesilmesinin gerekli olmadığı bildirilmiştir (Arnold ve ark., 2006). Benzer şekilde, insanlarda vagotomi ile birlikte yapılan gastrektomiye rağmen ghrelin tedavisi iştah artışına yol açmıştır (Adachi ve ark., 2010). Bu sonuçlar, ghrelinin oreksijenik etkisinin vagus sinirine bağımlı olmadığını ve merkezi sinir sistemi düzeyinde doğrudan etkiler gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

2.7.3 Motilite Üzerine Etkisi

Kojima ve Kangawa tarafından ghrelin keşfedildikten kısa süre sonra, başka bir araştırma grubu bu peptiti “motilinle ilişkili peptit” olarak adlandırmış ve bu isimlendirme motilin ile yapısal benzerliğine dayandırılmıştır. Motilin, mide boşalması üzerinde etkili olan ve göç eden motor kompleksin (MMC) düzenlenmesinde görev alan bağırsak hormonudur (Tomasetto ve ark., 2000; De Smet ve ark., 2009). Ancak bu gruplar ghrelinin biyolojik aktivitesi için kritik olan oktanoilasyon sürecine değinmemiştir. Kısa süre içinde ghrelinin motilinin gastrointestinal motilite üzerindeki etkilerini taklit edebileceği ileri sürülmüştür. Sağlıklı bireylere intravenöz ghrelin uygulanması, açlık durumunda MMC’yi uyarmış, gastrik akomodasyonu baskılamış ve postprandiyal dönemde mide boşalmasını hızlandırmıştır (Levin ve ark., 2006; Tack ve ark., 2006; Ang ve ark., 2009). Genetik düzeyde incelendiğinde, GHRL ile MLN’in ortak bir atasal genden türediği ve aynı peptit ailesine ait olduğu görülmektedir (Hara ve ark., 2018). Ayrıca GHSR1a ile MLN reseptörünün (MLN-R) amino asit dizilerinde %52, transmembran bölgelerinde ise %86 benzerlik bulunur (Asakawa ve ark., 2001; Peeters, 2005). MLN yalnızca memelilerde GI motiliteyi düzenlerken, ghrelin hem memeli hem de memeli olmayan omurgalılarda gastrointestinal fonksiyonları düzenler. Sıçan ve fareler doğal olarak MLN sisteminden yoksundur (He ve ark., 2010); bunun yerine ghrelin sistemiyle motilite kontrolünü sağlarlar (Kojima M. ve ark., 1999a; Kojima M. ve ark., 2005).

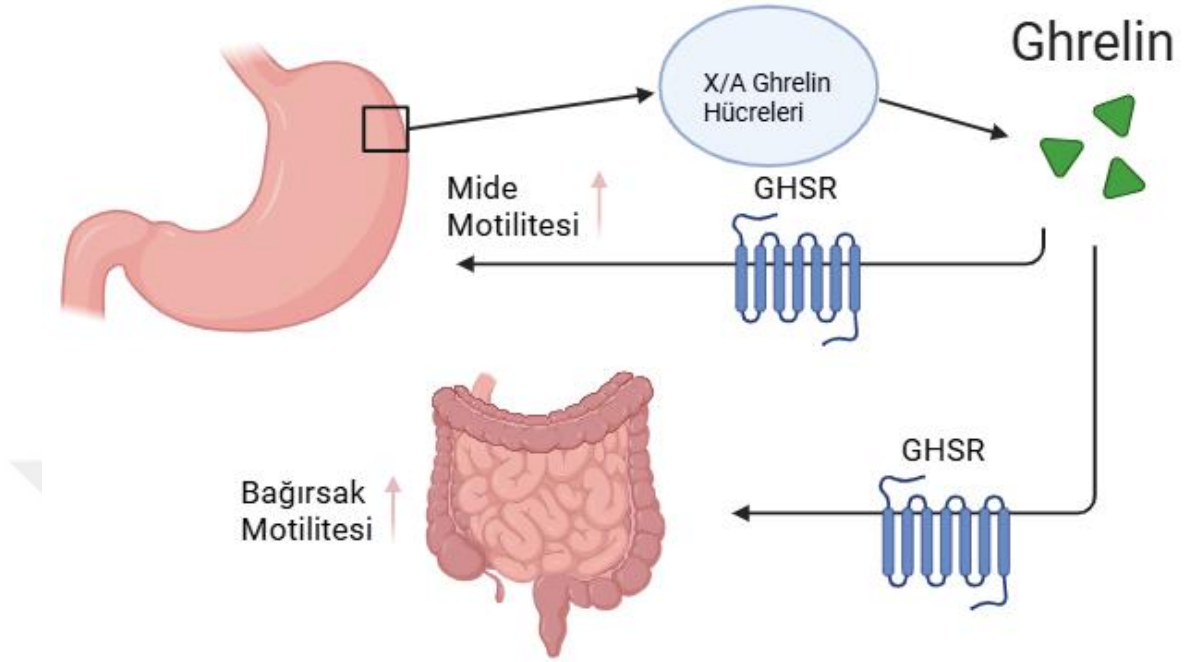
Ghrelin, hem in vivo hem in vitro koşullarda mide boşalmasını artırarak gastrointestinal motiliteyi düzenler (Fujino ve ark., 2003; Fukuda ve ark., 2004; Kitazawa ve ark., 2005). Bu etki, enterik sinir yollarının ve kapsaisin-duyarlı vagal afferent nöronların doğrudan uyarılması ile başlar ve parasempatik kolinerjik efferentlerin aktivasyonu ile devam eder (Fujino ve ark., 2003; Fukuda ve ark., 2004). GHSR1a düz kaslarda eksprese edilmediğinden (Dass ve ark., 2003) ve izole edilip uyarılmamış mide kas şeritleri ghreline yanıt vermediğinden (Kitazawa ve ark., 2005), ghrelinin etkilerinin doğrudan düz kaslar aracılığıyla değil, motilinden farklı olarak nöral mekanizmalar üzerinden gerçekleştiği anlaşılmaktadır.

Rodentlerde, midede 15–20 dakikalık aralıklarla interdigestive migrating complex (IMC)-benzeri aktivite gözlenmiştir (Fujino ve ark., 2003; Ariga H. ve ark., 2007; Zheng ve ark.,

2009). Ghrelin bu aktivitenin sıklığını artırırken, GHSR1a antagonisti [D-Lys3]-GHRP-6 bu aktiviteyi azaltmaktadır (Ariga H. ve ark., 2007; Zheng ve ark., 2009). Bu bulgular, ghrelinin sıçan ve farelerde MLN'in yokluğunu telafi ederek IMC'nin düzenlenmesinde görev aldığını göstermektedir.

Mide motilitesinin ötesinde ghrelinin kolonik motiliteyi de düzenlediği ortaya konmuştur. Lumbosakral omurilikteki defekasyon kontrol merkezine uygulanan ghrelin ve agonistleri, pelvik sinirler aracılığıyla dışkılamayı uyarır (Shimizu ve ark., 2006). Buna karşın, intravenöz ghrelin dışkılama yanıtı oluşturmazken, kan-beyin bariyerini geçebilen merkezi etkili bir agonist olan GSK894281 dışkılamayı uyarmıştır (Shafton ve ark., 2009). Lumbosakral defekasyon merkezinde ghreline duyarlı nöronların bulunması, ghrelinin kolon motilitesi üzerinde merkezi düzeyde düzenleyici rol oynadığını göstermektedir (Naitou ve ark., 2015). Bu nedenle, rodentlerde GHRL hem mide hem de kolon motilitesini düzenleyen bir gastrointestinal motilite faktörüdür.

Köpeklerde ghrelinin etkileri farklılık gösterebilse de, insan çalışmalarında mide motilitesini uyardığı ve mide boşalmasını hızlandırdığı belirlenmiştir (van der Lely ve ark., 2004; Levin ve ark., 2006; Tack ve ark., 2006; Sallam ve ark., 2010). Bu nedenle, ghrelinin gecikmiş mide boşalması veya postoperatif ileus gibi gastrointestinal motilite bozukluklarının tedavisinde farmakolojik bir hedef olabileceği öne sürülmüştür (Greenwood-Van Meerveld ve ark., 2011).



Şekil 2.2. Ghrelinin salınması ve motiliteye etkisi (Zahid ve ark., 2023). GHSR: Büyüme hormonu salgılatıcı reseptör. Bu şekil BioRender kullanılarak hazırlanmıştır.

Açlık döneminde IMC düzenlenmesine dair olarak, intravenöz ghrelinin faz-I sessiz dönemde prematür faz-III mide aktivitesini uyardığı gösterilmiştir. Bu etki, MLN salınımından bağımsız gerçekleşmiş ve mide tonusunda uzun süreli artışla birlikte gözlenmiştir (Tack ve ark., 2006). Bununla birlikte, plazma ghrelin düzeyleri IMC döngüsü boyunca MLN gibi düzenli dalgalanma göstermemekte ve dalgalanma büyüklüğü MLN'e kıyasla daha düşük kalmaktadır (Deloose ve ark., 2015). Ayrıca, prematür IMC'ye neden olan ghrelin konsantrasyonlarının fizyolojik seviyelerin oldukça üzerinde olması, ghrelinin farmakolojik dozlarda faz-III benzeri kasılmaları başlatabildiğini; ancak insanlarda fizyolojik IMC'nin asıl düzenleyicisinin motilin olduğunu göstermektedir (Deloose ve ark., 2015).

2.7.4 Otonom Sinir Sistemi Üzerine Etkisi

Otonom sinir sistemi, ghrelin salınımının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle vagus sinirinin uyarılması, mide mukozasındaki ghrelin üreten hücreleri

doğrudan etkileyerek ghrelin salgısını artırabilmektedir. Hem sıçanlarda hem de insanlarda yapılan deneylerde, muskarinik agonistlerin uygulanmasının ghrelin düzeylerini yükselttiği, buna karşılık muskarinik antagonistlerin uygulanmasının ghrelin düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (Sugino ve ark., 2003; Matsubara ve ark., 2004). Bu etkinin, enterik sinir sistemi tarafından kontrol edilen ghrelin üreten hücreler üzerinde doğrudan ortaya çıktığı düşünülmektedir (Yin X. ve ark., 2009).

Sempatik sinir sistemi de ghrelin regülasyonunda rol oynar. Plazma açil-ghrelin düzeyi, alfa-adrenerjik antagonistlerin ve beta-adrenerjik agonistlerin uygulanmasıyla artmaktadır. Bu bulgular, adrenerjik ajanların ghrelin salgılayan hücrelerdeki $\beta 1$ adrenerjik reseptörler aracılığıyla doğrudan etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Zhao ve ark., 2010).

Klinik ve deneysel gözlemler ayrıca vagotomi sonrası ghrelin salınımının iki yönlü bir düzenlenme geçirdiğini ortaya koymaktadır. Kısa vadede vagotomi mide ghrelin sekresyonunu baskılamakta, uzun vadede bu salgının yeniden aktive olduğu bildirilmiştir. Bu durum, ghrelin sekresyonunun enterik sinir sistemini kontrol eden kolinerjik ve adrenerjik tonlar arasındaki denge tarafından modüle edildiğini göstermektedir (Broglio ve ark., 2004b; Hosoda ve ark., 2008).

2.8 Beslenmenin Bilişsel Kontrolü

Beslenme davranışı, doğrudan ve dolaylı mekanizmalarla kontrol edilmektedir. Doğrudan kontrol, öğün sırasında besinlerin birikimiyle birlikte gastrointestinal (Gİ) peptitlerin salınması yoluyla gerçekleşir. Bu öğüne bağlı geribildirim mekanizmalarının toplam sonucu, tokluk sinyallerinin devreye girmesi ve besin alımının azaltılmasıdır. Bu noktada özellikle arka beyin, Gİ sistemden gelen afferent sinyaller ile merkezi sinir sisteminden (MSS) gelen efferent girdileri bütünleştiren kritik bir merkez olarak öne çıkmaktadır (Bray, 2000; Schwartz ve ark., 2000; Moran, 2004; Begg ve ark., 2013).

Buna karşılık, dolaylı kontrol, öğün beklentisinin ve başlatılmasının ön beyin ve hipotalamik bölgelerin aktivasyonu yoluyla sağlandığı bir mekanizmadır. Dolaylı kontrol yolları, enerji rezervleri dolmuş olsa bile, arka beyindeki tokluk sinyallerini baskılayarak

beslenmenin devam etmesine imkân tanıyabilir. Ayrıca, bu mekanizmalar çevresel ipuçları (Balleine, 2005; Petrovich, 2011; Johnson, 2013; Yu Y. H. ve ark., 2015) veya metabolik durum hakkında bilgi veren sinyaller tarafından tetiklenebilir (Davidson ve ark., 1993; Davidson ve ark., 2009).

Öğün beklentisi, yiyecek ile ilişkilendirilmiş çevresel ipuçlarının hafızada pekişmesi sonucu ortaya çıkar. Bu ipuçları, planlanmış öğünlerin öngörüsünü artırarak öğün boyutlarının genişlemesine ve dolayısıyla vücut ağırlığında artışa yol açabilir (Woods, 1991). Dolaylı kontrol mekanizmalarının kalıcı hale gelmesi, merkezi sinir sisteminde uyumsuz (maladaptif) değişikliklere sebep olur ve besin alımının homeostatik düzenini zayıflatır. Bunun sonucunda, aşırı kilo alımı ve obezite gelişimi görülebilir (Gormally ve ark., 1982; Gearhardt ve ark., 2012).

2.9 Açlık

Açlık, Spesifik açlık ve Genel açlık olarak ikiye ayrılmıştır (Stevenson R. J., 2024).

2.9.1 Spesifik Açlık

Spesifik açlık kavramının teorik kökeni, çağrışımlı öğrenmenin öncülerinden Ivan Pavlov'un çalışmalarına dayandırılmıştır. Pavlov, köpeklerin yiyeceğin gelişini haber veren ipuçları (örneğin bir çan sesi) ortaya çıktığında salya salgılamaya başladıklarını gözlemlemiş ve bu bulgu, beslenme davranışında öğrenilmiş ipuçlarının önemine işaret etmiştir (Cannon ve ark., 1912). Mayer de Pavlovcu öğrenmenin, lezzetli yiyeceklerin ipuçları ile bu yiyeceklerin kendileri arasında bağlantı kurulmasında temel rol oynadığını vurgulamıştır (Mayer, 1953). Spesifik açlık en güçlü haliyle aşerme (craving) olarak tanımlanır ve belirli bir yiyeceğe yöneliktir. Bu açlık, söz konusu yiyecek ile ilişkili bir ipucuyla karşılaşıldığında tetiklenir. İpuçları yiyeceğin görüntüsü, adının duyulması veya yazılı olarak görülmesi ya da kokusunun alınması olabilir (Bilman ve ark., 2017). Böyle bir ipucuyla karşılaşıldığında, kişide o yiyeceği tükettiğine dair bir anı zihninde yeniden canlanır. Bu zihinsel süreçler; episodik bellek, zihinsel simülasyon ve zihinsel imgeleme olarak farklı kavramlarla tanımlansa da, özünde benzer işlevleri ifade eder (Lowe ve ark., 2007; Papies ve ark., 2020; Stevenson Richard J. ve ark., 2024). Bu süreç farklı

kavramlarla tanımlansa da özünde aynı işlevi ifade eder: episodik bellek (geçmiş olayın yeniden yaşanması hissi) (Tulving, 2002) , zihinsel simülasyon (özgün deneyim sırasında etkinleşen beyin bölgelerinin yeniden aktive olması) (Papies ve ark., 2020), ve zihinsel imgeleme (beynin duyuşal sistemlerini kullanarak algısal deneyimin yeniden yaratılması) (Tiggemann ve ark., 2005).

Bellek çağırma, imgeleme veya simülasyon süreçlerindeki bozulmalar, spesifik açlık hissini zayıflatabilmekte ya da ortadan kaldırabilmektedir. Bu yaklaşım, özellikle yüksek enerjili ve işlenmiş gıdalara yönelik aşermelerin yönetiminde potansiyel bir strateji olarak araştırılmıştır (Kemps ve ark., 2007; Schulte ve ark., 2015). Lezzetli yiyecek görselleri sunulduğunda yalnızca medial temporal lob (MTL) değil, aynı zamanda ödül sistemiyle ilişkili beyin bölgeleri de aktive olmaktadır (van der Laan ve ark., 2011). Bu bulgular, spesifik açlığın yalnızca bilişsel değil aynı zamanda duygusal açıdan güçlü bir deneyim olduğunu göstermektedir (Pelchat ve ark., 2004).

2.9.2 Genel Açlık

Genel açlık kavramları, büyük ölçüde enerji açığının yemek yeme arzusuna yol açtığını varsayan modeller üzerine inşa edilmiştir (Kissileff ve ark., 1982; Rogers ve ark., 2016). Bu modellere göre enerji homeostazından sapmalar psikolojik sonuçlar doğurur ve bunlardan biri de açlık hissidir. Vücudun her hücresinin yeterli enerji almasını sağlayan son derece verimli ve düzenli bir metabolik sisteme sahip olduğu, bu sistemin ise sıkı bir homeostatik kontrol altında çalıştığı bilinmektedir (Yu S. B. ve ark., 2018; Tu-Sekine ve ark., 2022).

Enerji depoları incelendiğinde, karbonhidrat rezervlerinin sınırlı kapasiteye sahip olduğu ve yaklaşık bir günlük enerji sağlayabildiği görülmektedir. Buna karşın, vücutta özellikle yağ dokusu şeklinde, haftalarca (4–6 hafta) yetecek enerji rezervi bulunmaktadır. Belirli bir miktar protein deposu da enerji kaynağı olarak kullanılabilir. Bu nedenle günlük yaşamda “enerji tükenmesi” olağan bir durum değildir ve enerji eksikliği, her gün karşılaşılan bir sorun olmaktan uzaktır (Rogers ve ark., 2016).

Evrimsel açıdan değerlendirildiğinde, yiyecek mevcutken onu tüketmek avantaj sağlamıştır; ancak bu avantaj yalnızca metabolik veya fizyolojik bir maliyet yaratmadığında geçerlidir. Aşırı besin alımı sindirim kapasitesini zorlayabilir, mide ve bağırsakta yapısal hasara yol açabilir veya büyük bir öğün sonrası hareket kabiliyetini düşürerek bireyi yırtıcılara karşı savunmasız bırakabilir. Bu çerçevede, mide ve bağırsakların doluluk/boşluk durumu, kısa vadede açlığın düzenlenmesinde, enerji seviyelerinden veya uzun dönemli rezervlerden daha belirleyici bir faktör olarak öne çıkmaktadır (Assanand ve ark., 2006; Liu ve ark., 2018).

2.10 Açlığı Kontrol Eden Sinir Devreleri

Hem preklinik hem de klinik çalışmalar, beslenme davranışının bilişsel kontrolünde merkezi sinir sistemi (MSS) çekirdeklerinin geniş bir dağılımını ortaya koymuştur. Preklinik düzeyde, sınırlı erişimli beslenme programları (Restricted Feeding Schedules, RFS) kemirgenlerde planlanan öğünleri öngörme davranışını ortaya çıkarmaktadır. Bu durum, öğün verilmeden hemen önce artan lokomotor aktiviteyle anlaşılmaktadır (Poulin ve ark., 2008). RFS uygulanan hayvanlar başlangıçta kilo kaybederler de zamanla öğün dağıtımını öngörmeyi öğrenir ve kısa sürede yüksek kalorili alım gerçekleştirerek kilo kazanırlar. Bu öğrenilmiş yanıt, “besine ayarlanabilir osilasyon” (Food Entrainable Oscillation, FEO) olarak adlandırılır ve hipokampus (Hp), medial prefrontal korteks (mPFC), nucleus accumbens (NAc), ventral tegmental alan (VTA), arkuat nukleus (Arc) ve dorsomedial hipotalamus (DMH) aktivasyonu ile ilişkilidir (Poulin ve ark., 2008).

Çok sayıda lezyon çalışması, FEO’nun tek bir beyin bölgesi tarafından kontrol edilmediğini, farklı bölgeler arasında dağıtılmış bir ağ yapısının işlev gördüğünü göstermiştir. Bununla birlikte, sınırlama uygulanmamış (Non-Restricted, NR) sıçanlarda lezzetli besinlere sınırlı erişim (Restricted Palatable Meals, RPM) sağlandığında mPFC, VTA, NAc ve Arc bölgelerinde aktivasyon gözlemlenmektedir. Dikkat çekici bir bulgu, bu sinirsel aktivasyonun hayvanlar artık RPM protokolünde tutulmasalar bile devam etmesidir. Bu durum, beyin ödül devrelerinin hedonik besin alımında bir zaman tutma işlevi üstlenebileceğini düşündürmektedir (Blancas ve ark., 2014).

Klinik görüntüleme çalışmaları da benzer şekilde, kısıtlamaya tabi tutulmamış bireylerde lezzetli yiyecek ipuçlarının görsel sunumunun frontal korteks, amigdala (AMG), striatum ve orta beyin gibi ön beyin bölgelerinde aktivasyon oluşturduğunu göstermektedir (Grill ve ark., 2007; Stice ve ark., 2008; Siep ve ark., 2009). Ayrıca, yiyecek ipuçları tok bireylerde dahi beslenmeyi teşvik edebilmekte ve bu süreçte ön beyin ağlarını aktive etmektedir (Petrovich ve ark., 2005; Petrovich, 2011). Deneysel bulgular, frontal korteksin veya amigdalanın inaktivasyonu ya da amigdalanın lateral hipotalamustan (LH) işlevsel olarak ayrılması durumunda, tok hayvanlarda yiyecek ipuçlarının beslenmeyi tetikleyici etkisinin azaldığını göstermektedir (Petrovich ve ark., 2005). Öte yandan, frontal korteksin farmakolojik aktivasyonu, lezzetli yiyeceklerin aşırı (tıkınırcasına) tüketimini tetiklemekte ve bu etki LH'deki nöronal aktivasyon artışıyla korelasyon göstermektedir (Mena ve ark., 2013; Blasio ve ark., 2014).

2.11 Ghrelin ve Beslenmenin Bilişsel Kontrolü

Dolaşımdaki ghrelinin baskın kaynağı, mide mukozasındaki X/A-benzeri oksintik hücrelerdir (Toshinai ve ark., 2001; Muller ve ark., 2015). Ghrelin bu hücrelerde sentezlenip salındıktan sonra pasif difüzyonla merkezi sinir sistemine (MSS) taşınır (Banks ve ark., 2002). Ghrelinin dışarıdan uygulanması hem insanlarda hem de kemirgenlerde yiyecek alımını, vücut ağırlığını ve iştahı artırmaktadır (Tschop ve ark., 2000; Nakazato ve ark., 2001; Wren ve ark., 2001). Bu etki, periferik ve MSS'de bulunan ghrelin reseptörü GHSR-1a aracılığıyla gerçekleşmektedir (Muller ve ark., 2015). Özellikle ventral tegmental alan (VTA), ghrelinin yiyecek arama davranışı ve lezzetli besinlerin alımını uyarmada kritik bir hedeftir (Dickson ve ark., 2011; Skibicka ve ark., 2012; Skibicka ve ark., 2013). Ghrelinin GHSR-1a üzerinde tam aktivite gösterebilmesi için ise üçüncü serin kalıntısı üzerinde asilasyon işlemi gereklidir (Kirchner ve ark., 2009).

Fonksiyonel görüntüleme çalışmalarında, tok bireylere ghrelin uygulandığında iştaha ilişkin öznel puanlamaların arttığı ve bu durumun medial prefrontal korteks (mPFC), amigdala (AMG) ve striatumda artan nöral aktiviteyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Malik ve ark., 2008). İlginç bir bulgu olarak, ghrelin düzeyleri hem insanlarda hem de

kemirgenlerde planlı öğünlerden hemen önce zirve yapmakta ve bu özellik ghrelinin bir “öngörücü sinyal” rolü üstlendiğini düşündürmektedir (Drazen ve ark., 2006; Frecka ve ark., 2008). Gastrointestinal sistemden salınan ghrelin hipokampusa ulaşarak hafıza pekiştirilmesinde görev alır (Diano ve ark., 2006; Davidson ve ark., 2009). Hipokampusa doğrudan uygulanan ghrelin, ipuçlarına dayalı beslenme davranışını başlatmaktadır (Kanoski ve ark., 2013). Bu süreç, lateral hipotalamus (LH) nöronlarının aktivasyonu ile gerçekleşmektedir (Hsu ve ark., 2015). Bu bulgular birlikte ele alındığında, periferik ghrelinin ipuçlarına dayalı beslenmeyi tetiklemek için bilişsel beyin bölgelerini hedef aldığını ve bu etkinin sonuçta yiyecek alımını artırmak için homeostatik kontrol merkezleriyle iletişim gerektirdiğini göstermektedir.

Hayvan modellerinde de benzer şekilde, kısıtlanmamış sıçanlarda çikolataya şartlandırılmış maruziyet veya sınırlı beslenme programı sonrasında yemek beklentisi, mPFC ve LH’de artan nöronal aktiviteyle ilişkilidir (Choi ve ark., 2010). Bu nöronal aktivite, şartlandırılmış ghrelin salınımıyla zamansal bir paralellik göstermektedir (Drazen ve ark., 2006). Yüksek yağlı diyet (HFD) şartlandırılmış beklenti, davranışsal beklenti artışına, ghrelin düzeylerinde yükselmeye ve aşırı HFD tüketimine yol açmaktadır. Daha da önemlisi, periferik ghrelin salınımının farmakolojik blokajı bu aşırı yemeyi azaltmıştır; bu da yemek öncesinde şartlandırılmış ghrelin salınımının aşırı yeme davranışını güçlendirebileceğini göstermektedir (Sirohi ve ark., 2017). İnsanlarda yapılan çalışmalar, özellikle obez bireylerde yemek öncesinde belirgin şartlandırılmış ghrelin salınımı olduğunu ve bu artışın öğün sonrası baskılanmayla birlikte aşırı yeme davranışını sürdürebileceğini ortaya koymuştur (Frecka ve ark., 2008).

Tüm bu veriler, şartlandırılmış ghrelin salınımının kalori gereksinimi olmasa bile beslenmeyi başlatabilecek güçlü bir süreç olduğunu ortaya koymaktadır. Nitekim, GHSR sinyallemesinin merkezi blokajı, kısıtlanmamış sıçanlarda çikolataya yönelik davranışsal beklentiye zayıflatmıştır (Merkestein ve ark., 2012). Ayrıca, GHSR’nin genetik olarak silinmesi, kalori kısıtlamalı farelerde besin beklenti davranışlarını ve mekânsal öğrenmeyi bozmuş, bu da öğrenme süreçlerindeki aksaklıkların besin beklentisiyle ilişkili tepkileri zayıflatabileceğini düşündürmüştür (Davis ve ark., 2011). Bu veri bütünü, kalori ihtiyacı

olmaksızın beslenme davranışını başlatan bilişsel süreçlerin temel tetikleyicisi olarak şartlandırılmış ghrelin salınımının altını çizmektedir.

2.12 Aralıklı Açlık

Aralıklı açlık (AA), uzun süreli açlık dönemlerinin yer aldığı çeşitli beslenme protokollerini kapsayan geniş bir üst terimdir. Bu tanımın içinde, örneğin gün aşırı oruç (alternate-day fasting, ADF) gibi uygulamalar bulunur; bu yöntemde kişi gün aşırı oruç tutar ya da haftada 1–2 gün oruç uygular, kalan günlerde ise ad libitum (sınırsız) beslenir. AA başlığı altındaki zaman temelli bir başka alt grup ise zaman kısıtlı beslenme (time-restricted feeding, TRF) olarak adlandırılır. TRF, belirli bir zaman aralığında enerji alımının sınırlandırılması (su alımına izin verilerek) şeklinde tanımlanır (Paoli ve ark., 2019). TRF uygulamaları bireye ve protokole göre değişkenlik göstermekle birlikte, sıklıkla 12–21 saatlik açlık periyotlarını, ardından 3–12 saatlik ad libitum beslenme pencerelerini içerir (Anton ve ark., 2018).

2.13 Aralıklı Açlık ve Ghrelin

Ghrelin, yemeklerden önce salgılanır ve dolaşımdaki konsantrasyonu yemek başlamadan hemen önce zirveye ulaşır; yemek tüketiminden sonraki 1 saat içinde ise düşüş gösterir (Cummings ve ark., 2001). Ghrelinin dolaşımdaki konsantrasyonu, insanlarda ve kemirgenlerde sirkadiyen ritme göre değişir ve bu değişim, uyku sırasında ghrelin salgısının baskılanmasına bağlı olarak öğünlerden bağımsız biçimde gerçekleşir (Spiegel ve ark., 2011). Ayrıca ghrelin seviyesi açlık sırasında artar; yeniden beslenme ise plazma ghrelin düzeylerini azaltır (Ariyasu ve ark., 2001).

TRF (zaman kısıtlı beslenme) diyetinin ghrelin konsantrasyonlarını düzenleme kapasitesi henüz net değildir. Bazı çalışmalar, izokalorik TRF rejimlerinin (4–8 hafta) ardından açlık ghrelin düzeylerinde anlamlı fark olmadığını bildirmiştir (Alzoghaibi ve ark., 2014; Sutton ve ark., 2018; Zouhal ve ark., 2020); bu sonuç, kilo kaybı eşlik etsin ya da etmesin değişmemektedir. Öte yandan, bazı çalışmalar, TRF uygulamalarının başlangıç ölçümlerine kıyasla 4–30 gün içinde açlık ghrelin düzeylerinde anlamlı azalmalar gösterdiğini rapor etmiştir (Ravussin ve ark., 2019; Al-Rawi ve ark., 2020), bu bulgu da

kilo kaybı olsun ya da olmasın geçerlidir. Hutchison ve arkadaşları, fazla kilolu/obez yetişkinlerde sabah erken TRF (08:00–17:00) ile öğleden sonra TRF (12:00–21:00) uygulamalarını 7 gün karşılaştırmış; sonuçta sabah TRF grubunda açlık ghrelin düzeyleri daha düşük, buna karşılık tokluk sonrası ghrelin eğrisi altında kalan alan (iAUC) öğleden sonra TRF grubunda daha düşük bulunmuştur; bu da yeme penceresinin zamanlamasının ghrelin düzeylerinin günlük değişim ritmini etkilemede rolü olabileceğini düşündürmektedir (Hutchison ve ark., 2019).

Deneyisel hayvan çalışmalarında, günlük 4 saatlik beslenme içeren ve 14 gün süren aralıklı açlık (AA) modeli plazma ghrelin düzeylerinde belirgin artışa yol açmıştır (Crowley ve ark., 2005). AA uygulanan hayvanlarda ghrelin düzeyleri, belirlenen beslenme saatinden yaklaşık 2 saat önce yükselmeye başlayıp yemek saatine 30 dakika kala en yüksek seviyeye ulaşmıştır (Drazen ve ark., 2006). Benzer şekilde, Ariga ve arkadaşları sıçanlara yalnızca 12:00–16:00 saatleri arasında besin vermiş ve rejimi 14 gün sürdürmüştür. Sonuçlar, bu sınırlı zaman penceresinde beslenen hayvanlarda toplam yiyecek alımı ile vücut ağırlığında anlamlı azalmalar olduğunu; buna ek olarak plazma ghrelin düzeylerinin de protokolün ilk gününe kıyasla belirgin şekilde arttığını göstermiştir (Ariga H. ve ark., 2008b).

2.14 Hipotez

Bu çalışmanın amacı, kronik aralıklı açlık (AA) ile indüklenen endojen ghrelinin gastrointestinal motor fonksiyonlara etkisini incelemek ve bu etkinin enterik sinir sisteminde (fundus ve ileum) GHSR-aracılı kolinerjik/nitrerjik mekanizmalar yoluyla gerçekleşip gerçekleşmediğini açığa çıkarmaktır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu deneysel çalışma, Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir. Araştırmada, Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen erişkin erkek Sprague-Dawley sıçanlar kullanılmıştır. Deney süresince hayvanlar bireysel kafeslerde, standart laboratuvar koşullarında barındırılmış ve serbest erişimle standart kemirgen yemi ile musluk suyuna ulaşmaları sağlanmıştır.

3.1. Deney Grupları

Sıçanlar, her biri ayrı kafeste bireysel olarak barındırılmıştır. Deneyde iki grup yer almıştır: aralıklı açlık (AA) ve ad-libitum. Ad-libitum grubundaki hayvanlar herhangi bir besin kısıtlamasına maruz bırakılmamış, AA grubundaki hayvanlar ise belirlenen protokole göre besin kısıtlamasına tabi tutulmuştur.

3.2. Aralıklı Açlık Beslenme Modeli

Çalışmada, her biri 10 hayvandan oluşan iki grup halinde toplam 20 erişkin erkek sıçan kullanılmıştır. Hayvanlar, aralıklı açlık (deney grubu) ve ad libitum beslenen (ad-libitum grubu) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Ad-libitum grubundaki hayvanlar standart pelet yem ve musluk suyuna serbest erişimle (ad libitum) beslenirken, deney grubuna 14 gün süresince aralıklı açlık protokolü uygulanmıştır. Deney süresi boyunca tüm sıçanlar tekli kafeslerde barındırılmış ve her iki grubun da suya serbest erişimi sağlanmıştır.

Aralıklı açlık protokolünde, deney grubundaki hayvanlara her gün yalnızca 12:00–16:00 saatleri arasında yeme ad libitum erişimine izin verilmiş, günün geri kalan 20 saatinde ise besin kısıtlaması uygulanmıştır. Uygulamanın 15. gününde, deney grubundaki hayvanlar beslenme saatinden 30 dakika önce, ad-libitum grubundaki hayvanlar ise eş zamanlı olarak feda edilmiştir.

3.3. Vücut Ağırlıkları ve Yem Tüketimi

Deneyisel çalışma kapsamında, saat 12:00'de her hayvana önceden tartılmış ve beklenen tüketimi karşılayacak fazlalıkta yem verilmiştir. Saat 16:00'da hayvanlar tekrar tartılmış, kafeslerde kalan yem (döküntüler dâhil) toplanıp tartılarak kaydedilmiştir. Bu veriler kullanılarak gerçek yem tüketimi verilenyem-artıkyem hesaplanmış ve yem tüketim miktarları ile hayvan ağırlıkları istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

3.4. Gastrointestinal Transit

Hayvanlar deneyden bir gece önce aç bırakılmış ve %2'lik kömür süspansiyonu gavaj yoluyla verilmiştir. Uygulamadan yaklaşık 20 dakika sonra sıçanlar, üretan (1,25 g·kg⁻¹, i.p.) ile anestezi altına alınmış ve gastrointestinal sistem (GİS) dokusu çıkarılarak kömürün ilerlediği mesafe ölçülmüştür.

3.5. Katı Mide Boşalımı

Vagal efferent fonksiyon katı mide boşalımı üzerinden değerlendirildi. Bu amaçla, bir gece önceden aç bırakılan sıçanlara önceden tartılmış 1,6 g ağırlığında pelet yemler verildi. Peletlerin tüketilmesini takiben geçen 90 dakika sonunda hayvanlar izofluran anestezisi altında eksanguinasyon ile feda edildi ve mideleri çıkarıldı. Mide içerikleri, ağırlığı önceden hesaplanmış tartım kaplarına alınarak oda ısısında 72 saat kurutuldu. Kurutma işlemi sonunda mide içerikleri tartıldı ve başlangıç ağırlığına oranlanarak mideyi terk eden kısım hesaplandı. Mideyi terk eden kısım, aşağıdaki formüle göre yüzde (%) olarak ifade edildi.

$$\text{Mide Boşalımı (\%)} = 1 - (\text{kurutulan içerik ağırlığı} / \text{tüketilen total pelet ağırlığı}) \times 100$$

3.6. ELISA Analizleri

3.6.1. ELISA Plazma Analizleri

Abdominal aortadan alınan kan örnekleri EDTA içeren kan tüpleri içerisine alınmıştır. 2500 g değerinde 6 dakika boyunca 25°C sıcaklıkta santrifüj edildikten sonra elde edilen plazma örnekleri alikuatlanarak -80°C'de muhafaza edilmiştir. Plazma açile Ghrelin

konsantrasyonları, ticari olarak satılan bir ELISA kiti kullanılarak ölçülmüştür (E0868Ra, BT-LAB).

- 1) Tüm reaktifler, standart çözeltiler ve örnekler talimatlara uygun şekilde hazırlandı. Tüm reaktifler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi. Deney oda sıcaklığında gerçekleştirildi.
- 2) Deney için gerekli olan kuyucuk sayısı belirlendi. Kullanılmayan stripler 2-8 °C'de saklandı.
- 3) Her bir standart kuyusuna 50 µl standart çözeltisi eklendi.
- 4) Her bir örnek kuyusuna 40 µl örnek eklendi, ardından aynı kuyulara 10 µl anti-AG antikor ilave edildi. Daha sonra hem örnek kuyularına hem de standart kuyularına 50 µl streptavidin-HRP eklendi (boş kontrol kuyusuna eklenmedi). İyiçe karıştırıldı. Plaka yapışkan kapak ile kapatıldı ve 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
- 5) Kapak çıkarıldı ve kuyucuklar yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. Her yıkama için kuyucuklara 300 µl yıkama tamponu eklendi ve 30 saniye ile 1 dakika arasında bekletildi. Otomatik yıkayıcı kullanıldıysa, kuyucuklardaki sıvı çekilerek boşaltıldı ve 5 kez yıkandı. Kuyucuklar kağıt havluya hafifçe vurularak kurutuldu.
- 6) Her kuyucuğa 50 µl Substrat Solüsyonu A, ardından 50 µl Substrat Solüsyonu B eklendi. Kuyucuklar yeni bir kapakla kapatıldı ve karanlıkta 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
- 7) Her kuyucuğa 50 µl Durdurma Solüsyonu eklendi ve mavi renk anında sarıya dönüştü.
- 8) Durdurma solüsyonu eklendikten sonraki 10 dakika içinde, her kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değeri) 450 nm dalga boyuna ayarlanmış mikroparka okuyucu ile ölçüldü.

3.6.2. ELISA Doku Analizleri

Çalışmada BT LAB Rat Acylated Ghrelin ELISA kiti kullanıldı (Bioassay Technology Laboratory, Çin; Cat. No: E0868Ra, sandwich format; standart eğri aralığı 3–900 ng/L, duyarlılık 1.47 ng/L). Plaka 96 kuyucukludur (strip format). Reaktifler üretici önerildiği gibi 2–8 °C’de saklandı; çalışma günü oda ısısına getirildi. Yıkamalar için kitin 25× Wash Buffer konsantresi, substrat basamağı için TMB Substrat A ve B, reaksiyon sonlandırma için Stop solüsyonu kullanıldı. Okumalar 450 nm’de mikroparka okuyucuda gerçekleştirildi. Fundus ve ileum dokuları disseke edilip buz üzerinde soğuk PBS ile hızla yıkandı, fazla yüzey sıvısı filtre kâğıdı ile alındı ve tartıldı; örnekler asitli ve proteaz inhibitörlü homojenizasyon tamponunda (örn. 0.1 N HCl + 5 mM EDTA + proteaz inhibitör kokteyli) yaklaşık 1:10 (w/v) oranında buz üzerinde homojenize edildi. Homojenatlar 4 °C’de $\approx 12.000\text{--}15.000 \times g$, 15 dk santrifüj edilerek üst faz ayrıldı, alikvotlanarak –80 °C’de saklandı ve çalışma gününde çözündürülüp oda ısısına getirildi. Bu kitte üretici numune dilüsyonunun matriks etkisi nedeniyle doğruluğu azaltabileceğini belirttiğinden, doku homojenatları mümkün olduğunca dilüe edilmeden çalışıldı. Yıkama tamponu 1×: 25× konsantreden 20 mL alınarak deiyonize su ile 500 mL’ye tamamlandı (kristal varsa tamamen çözündürüldü). (ii) Standartlar: Kit ile birlikte gelen 960 ng/L stok standart, 120 µL stok + 120 µL standart dilüent karıştırılarak 480 ng/L çalışma çözeltisi elde edildi; nazikçe vortexlenip 15 dk dinlendirildi. Ardından 1:2 seri dilüsyonla 240, 120, 60 ve 30 ng/L standartlar hazırlandı; 0 ng/L için yalnızca dilüent kullanıldı. Kullanılmayan stripler folyolanarak 4 °C’de muhafaza edildi. Plaka yerleşimi. Tüm örnekler duplikat çalışıldı. Plakada sırasıyla blank, 0–480 ng/L standartlar ve örnek kuyucukları yer aldı.

1. Standart kuyucuklara 50 µL ilgili standart çözeltileri eklendi.
2. Örnek kuyucuklarına önce 40 µL doku homojenatı süpernatanı, ardından 10 µL anti-AG antikoru ilave edildi; bunu takiben hem örnek hem standart kuyucuklarına 50 µL streptavidin-HRP eklendi (blank kuyucuğa HRP konjugatı eklenmedi). İçerikler pipetle nazikçe karıştırıldı.

3. Plaka sealer ile kapatılarak 37 °C'de 60 dk inkübe edildi (laboratuvar uygulamamızda 60 yerine sıklıkla 90 dk uygulanmıştır; süre uzatıldıysa metin buna göre güncellendi).
4. Sealer çıkarıldı; her kuyucuğa 300 µL 1× yıkama tamponu verilerek 5 kez yıkandı. Her yıkamada tampon 30–60 sn kuyucukta bekletildi; aspirasyon/decant sonrası plaka kâğıt havlu üzerine ters çevrilerek kurutuldu.
5. Her kuyucuğa sırayla 50 µL Substrat A ve 50 µL Substrat B eklendi. Plaka yeniden sealanıp ışık almadan 37 °C'de 10 dk inkübe edildi (renk maviye döner).
6. Her kuyucuğa 50 µL Stop solüsyonu ilave edildi; renk sarıya döndü. Stop eklenmesini takiben 10 dk içinde mikropilaka okuyucuda 450 nm'de OD değerleri ölçüldü (okuyucu blank ile sıfırlandı). Her kuyucuk çifti için OD'ler ortalandı; gerekirse blank düzeltmesi yapıldı. 0–480 ng/L noktalarından standart eğri (tercihen 4-parametre lojistik, 4PL) oluşturularak örnek konsantrasyonları ng/L cinsinden enterpole edildi. Duplikatlar arası varyasyon %15'i aşarsa numune tekrarı yapıldı; çalışma-içi (CV < %8) ve çalışmalar-arası (CV < %10) değişkenlik sınırları sağlandı. Tüm süreler kronometre ile tutuldu; pipet kalibrasyonları ve yıkama adımları standartlaştırıldı.

3.7. Western Blot

Projemizde Sprague-Dawley sıçanlardan alınan ileum ve fundus dokularında ghrelin protein düzeyleri, western blotlama (immunoblotlama) yöntemi ile belirlendi. İleum ve fundus dokularından elde edilen örneklerin protein miktar tayini Bradford boyası ile yapıldı ve jele eşit miktarda protein yüklenerek house-keeping proteinlerle karşılaştırılan protein bantlarının analizi gerçekleştirildi.

Doku hemen parçalanmadığı durumlarda 1×PBS solüsyonu ile yıkanarak sıvı azot içerisinde -80 °C'de saklandı. Lizatların hazırlanmasında, 1× proteaz inhibitör kokteyli içeren soğuk hücre parçalama tamponu (Radioimmunoprecipitation Assay tamponu –

RIPA) kullanıldı. Toplanan lizatların protein konsantrasyon ölçümü için Bradford boyası ve bovine serum albumin (BSA) standartları hazırlandı. Dilüe edilmiş (1:4 oranında) 100 µl Bradford boyası, 0–13 µg arasında yüklenen 1 mg/ml BSA ve 1 µl lizat 96 kuyucuklu plakaya eklendi. Yaklaşık 5 dakika sonra renk gelişimi gözlemlendi ve spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Kalibrasyon eğrisi kullanılarak protein lizatlarının miktarı hesaplandı.

Bradford ile protein konsantrasyonu belirlenen protein lizatlarının 50 µg'ı 95 °C'de 4 dakika kaynatıldı ve ardından 1 dakika santrifüj edilerek jelle yüklemeye hazır hale getirildi. Hazırlanan lizatlar %10–12 SDS-PAGE dikey elektroforez sisteminde jelle yüklendi. SDS + β-merkaptoetanol içeren yükleme tamponu (2×) ile örnekler jel kuyucuklarına yüklendi ve 40 V'da, proteinlerin hizalanması için belirteç çizgisine kadar yürütüldü. Ardından 80 V'da, renkli belirteç takip edilerek elektroforez tamamlandı.

SDS-PAGE sonrası proteinler PVDF membrana transfer edildi ve soğuk transfer tamponu kullanılarak +4 °C'de 20 V'da 1 saat süreyle ıslak transfer yapıldı. Proteinler, %1 BSA içeren 1×PBS-Tween20 içerisinde membrana bloklendi. Daha sonra kesitler, primer antikor ile %1 BSA içinde +4 °C'de bir gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün membranlar üç kez (10'ar dakika) 1×PBS-T ile yıkandı ve horseradish peroxidase (HRP) konjuge sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Tekrar üç kez PBS-T ile yıkandıktan sonra, oluşan antijen–antikor kompleksleri hızlandırılmış kemiluminesans (ECL) yöntemi ile geliştirildi ve C280 Azure görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülendi.

3.8. Parafin Kesitte IHC Boyaması

Anestezi altındaki sıçanlardan elde edilen gastrointestinal sistem (GİS) dokuları (ileum ve fundus), %10'luk formalin solüsyonuna alınarak 24 saat süreyle fiksasyon altına alındı. Fiksasyonun ardından dokular 3 saat boyunca distile suda bekletilmiştir. Daha sonra sırasıyla %70, %80, %90 ve %100'lük alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilmiş, ksilol ile şeffaflaştırıldıktan sonra parafin içerisine gömülmüştür.

Hazırlanan parafin bloklardan 7 µm kalınlığında kesitler alınarak SuperFrost lamlara aktarılmış ve bir gece 56 °C'lik etüvde bekletilmiştir. Deparafinizasyon için kesitler, iki kez 10'ar dakika ksilolde tutulmuş, ardından rehidrasyon amacıyla sırasıyla %100, %90, %80 ve %70'lik alkol serilerinde 5'er dakika bekletilmiştir.

Alkol serilerinden sonra distile suya alınan kesitlerde, antijen geri kazanımı amacıyla sitrat tamponu (pH 6,0) içerisinde 7 dakika kaynatma işlemi uygulanmıştır. Oda sıcaklığında 20 dakika soğumaya bırakılan kesitler üç kez beşer dakika fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle çizilmiş ve endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla %3'lük hidrojen peroksit çözeltisinde 20 dakika inkübe edilmiştir.

PBS ile yıkandıktan sonra, spesifik olmayan immünoglobulin bağlanmalarını engellemek için bloklama solüsyonunda 7 dakika inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra kesitler, primer antikor (anti-Ghrelin) ile +4 °C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Negatif kontrol için hazırlanan kesitlerde ise primer antikor yerine izotip kontrol antikoru kullanılmıştır.

Primer antikor inkübasyonunun ardından PBS ile üç kez (beşer dakika) yıkanan kesitler, biyotin ile işaretlenmiş sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra streptavidin-peroksidaz kompleksi ile 30 dakika inkübasyon yapılmıştır. Son yıkama basamağının ardından, reaksiyonun görünür hale gelmesi için diaminobenzidin (DAB) kromojen solüsyonu uygulanmıştır.

Hematoksilen ile zıt boyama yapıldıktan sonra, artan alkol serilerinde yeniden dehidratasyon gerçekleştirilmiş ve kesitler Entellan ile kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

3.9. Parafin Kesitte Floresan Boyama

Deparafinizasyon amacıyla doku kesitleri, her biri 10 dakika olacak şekilde iki kez ksilen işlemine tabi tutulmuş, ardından sırasıyla %100, %90, %80 ve %70 etanol içeren alkol serilerinde (her biri 5 dakika) rehidrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Antijen geri kazanımı, kesitlerin sitrik asit tamponu (pH 6,0) içerisinde 7 dakika süreyle kaynatılmasıyla sağlanmıştır. PBS ile yıkamayı takiben, özgül olmayan immünoglobulin bağlanmasını önlemek amacıyla kesitler 7 dakika boyunca UV bloklayıcı serum (Ultra V block, TA-125-UB, Thermo Scientific) ile bloke edilmiştir.

Primer antikorlar, 4 °C’de çalkalayıcı üzerinde bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün kesitler PBS ile 3 × 5 dakika yıkandıktan sonra, sekonder antikorlar oda sıcaklığında 1 saat süreyle uygulanmıştır. Tüm primer ve sekonder antikorlar UltrAb seyreltici (TA-125-UB, Thermo Scientific) içerisinde seyreltilerek kullanılmıştır. PBS ile yapılan yıkamaların ardından dokular, lamel kullanılarak Dako floresan montaj ortamı (Dako, 11556954) ile kapatılmıştır. Görüntüler, sekonder antikorlara uygun filtrelerle donatılmış bir floresan mikroskobu (Olympus BX43, Tokyo, Japonya) kullanılarak elde edilmiştir

3.10. İleum Whole-mount Düz Kas-Myenterik Pleksus (LMMP) Analizleri

Çalışmamızda, AA’ya bağlı olarak enterik nöron ve glial hücre popülasyonlarında ve myenterik hücrelerin nörokimyasal profillerinde gerçekleşen değişiklikler whole-mount LMMP preparatlarında çift sitokimyasal boyama ve immünofloresan etiketleme yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Hayvanlar feda edildikten hemen sonra mide dokuları çıkarılıp PBS solüsyonu bulunan agar kaplı petri kaplarına alınarak dokular iğne yardımıyla gerilmiştir. Ardından, doku örnekleri paraformaldehit solüsyonuna alınıp 1 gece boyunca +4°C’de inkübe edilmiştir. Ertesi gün, örnekler PBS solüsyonuna tekrar alınıp, mikroskop altında mikro cerrahi pensetler yardımıyla ayrılarak LMMP elde edilmiş ve LMMP doku örnekleri %0.05 sodyum azit içeren PBS içerisinde immünoboyama protokollerine kadar 4°C’de saklanmıştır.

3.10.1. İleal LMMP Preparatlarında Kuprolinik Mavi Boyaması

İleumdaki myenterik nöron popülasyonu ve enterik gangliyon morfolojisinin incelenmesi için LMMP preparatlarında kuprolinik mavi boyaması yapılmıştır. Bu amaçla, preparatlar distile suda durulandıktan sonra 42°C’de 2 saat boyunca kuprolinik mavi (0,05 M sodyum asetat-1,0 M magnezyum klorür tamponunda %0,3 kinolinik ftalosianin, pH 4,9) ile inkübe edilmiştir. Ardından, LMMP doku örnekleri distile suda yıkanarak, yukarıda

belirtilen tamponda 2 dakika süreyle tutulmuş ve PBS ile yıkanmıştır. Dokular daha sonra kademeli etanol serisinde (%80, %90 ve %100, her biri iki dakika süreyle) ve ksilende dehidrate edilmiş ve son olarak, slaytlar entellan ile monte edilmiştir. Kurumaya bırakılan preparatlar ışık mikroskobu ile incelenerek fotoğraflanmıştır.

3.10.2. İleum LLMP Preparatlarında İmmüno Floresan Etiketleme

Örnekler distile suda çalkalandıktan sonra PBS ile (pH: 7.2 -7.4) 3 kez 5 dakika boyunca yıkanmıştır. Hidrofobik kalemle etrafı çizilen kesitler, spesifik olmayan immunoglobulin (Ig) bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklama solüsyonu ile 5 dakika boyunca muamele edilmiştir. Bloklama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra kesitler, primer antikorlar ile + 4°C’de gece boyu inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kesitler, PBS ile 3 defa 5 dakika süreyle yıkanmıştır. Ardından, sırasıyla 45 dakika anti-fare, anti- tavşan veya anti-keçi floresan işaretli sekonder antikorlar ile 3 saat boyunca oda ısısında inkübe edilmiştir. Daha sonar, 3 kez 5’er dakika PBS ile yıkanan örnekler nükleer işaretleme için DAPI içeren kapatma solüsyonu ile kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlardaki immüno reaktiviteler floresan mikroskopunda (Olympus BX43, Japan) incelenerek fotoğraflanmıştır.

Çalışmamızda kullanılan antikorlar, dilüsyonları ve uygulanan tekniklere ilişkin detaylar Tablo 3.1.’de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Kullanılan primer antikorlara ait detaylar

Antikor	Marka ve Katalog No	Dilüsyon	Yöntem
anti-Ghrelin	AFFBIO/DF6389	1/50	İmmünohistokimya / İmmüno floresan
anti-GHSR	Bioss-USA/BS-11529R	1/75	İmmünohistokimya / İmmüno floresan
anti-ChAT	Merck/AB144P	1/400	İmmüno floresan
anti-PGP9.5	Abcam/AB8189	1/100	İmmüno floresan
anti-nNOS	Abcam/AB1376	1/200	İmmüno floresan
anti-GFAP	Abcam/PAA068RA01	1/600	İmmüno floresan

3.11. İzole Organ Banyosu

Sıçanlar, üretan ($1,25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.p.) ile anestezi altına alındıktan sonra ileum ve mide fundus dokuları çıkarılmıştır. Bu dokulardan elde edilen düz kas preparatları, GHSR antagonisti $[D\text{-Lys}^3]\text{-GHRP-6}$ (10^{-6} M) uygulamasının (1) farmakolojik ajanlarla ve (2) elektriksel alan stimülasyonu (EFS) ile uyarılan kontraktıl ve relaksan motor yanıtlara etkilerini incelemek amacıyla izole organ banyosu düzeneğinde kullanılmıştır.

Mide fundus bölgesinden elde edilen düz kas şeritleri ve ileum segmentleri, mezenterik dokuların uzaklaştırılmasının ardından yaklaşık 1 cm uzunluğunda hazırlanarak 20 ml hacmindeki organ banyosu düzeneğine yerleştirilmiştir. Preparatların farmakolojik ajanlara ve elektriksel stimülasyona verdikleri yanıtlar, izometrik güç transdüserleri (Commat, Model FDT05, Ankara, Türkiye) aracılığıyla kaydedilmiştir.

Deney süresince dokular, sıcaklığı 37°C 'de sabitlenen ve %95 O_2 ile %5 CO_2 gaz karışımıyla sürekli gazlandırılan Krebs solüsyonunda tutulmuştur. Krebs solüsyonunun bileşimi şu şekilde hazırlanmıştır: NaCl (119,4 mM), KCl (4,7 mM), MgSO_4 (2,5 mM), NaHCO_3 (22,3 mM), CaCl_2 (2,5 mM) ve glukoz (11 mM). Düz kas preparatları, 1 g gerim altında, her 20 dakikada bir solüsyon değişimi yapılarak 1 saat süreyle dengeye bırakılmıştır. Daha sonra, farmakolojik ajanlar ve EFS uygulanarak iki farklı organ banyosu protokolü gerçekleştirilmiştir.

3.11.1 Farmakolojik Ajan Uygulamaları

Dinlenim sonrasında, düz kas preparatlarına muskarinik reseptör agonisti betanekol (10^{-9} – 10^{-4} M) ve nitrik oksit (NO) donörü sodyum nitroprusid (SNP, 10^{-9} – 10^{-3} M) kümülatif olarak uygulanmıştır. Bu uygulamalar, GHSR antagonisti $[D\text{-Lys}^3]\text{-GHRP-6}$ (10^{-6} M) verilmeden önce ve verildikten sonra gerçekleştirilmiş, yanıtların kaydedilmesinin ardından preparatlar 1 saat süreyle yıkanmıştır. Deneyin sonunda, $[D\text{-Lys}^3]\text{-GHRP-6}$ (10^{-6} M) uygulaması öncesinde (bazal) ve sonrasında elde edilen betanekol ve SNP yanıtlarına ait doz-yanıt eğrileri çizilmiş ve istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

3.11.2 Elektriksel Alan Stimülasyonu (EFS)

Stabilizasyon periyodunun ardından, düz kas preparatlarında EFS-aracılı kontraksiyon (2–16 Hz, 1 ms, 100 V, 10 s) ve 10^{-6} M guanetidin ile 2×10^{-6} M atropin varlığında relaksasyon yanıtları kaydedilmiştir. Her frekans uygulaması arasında 2 dakikalık aralıklar verilmiştir. Bazal ([D-Lys³]-GHRP-6 öncesi) yanıtlar alındıktan sonra 1 saatlik dinlenme periyodu uygulanmış, sonrasında aynı protokol [D-Lys³]-GHRP-6 (10^{-6} M) varlığında tekrarlanmıştır. Deney protokolünün sonunda elde edilen yanıtlar grafiklere aktarılmış ve istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

3.12 İstatistiksel Analizler

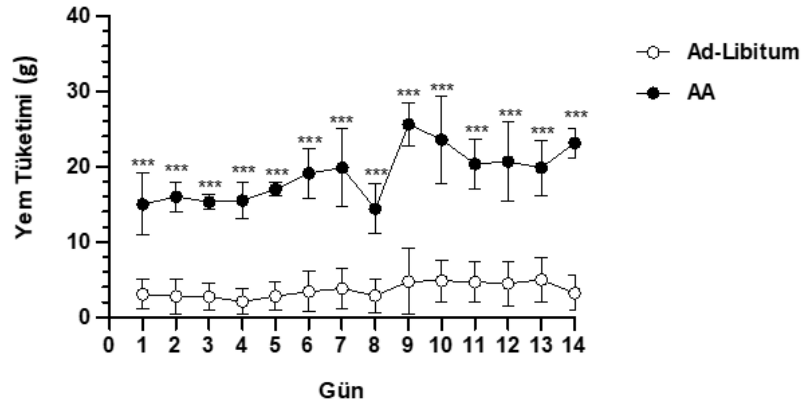
Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur. Spontan kasılma frekansı ve motilite indeksi için iki grubun karşılaştırılmasında bağımsız örneklem t-testi kullanılmıştır (ör. fundus: $p=0,343$; ileum: $p=0,016$; $n=5-6$ /grup). Bethanekol ve SNP konsantrasyon–yanıt verileri ile EFS’ye bağlı frekans–yanıt verileri, grup $\times$ konsantrasyon/frekans iki yönlü ANOVA ile analiz edilmiş; çoklu karşılaştırmalar Tukey testiyle yapılmıştır. Grafiklerde anlamlılık * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ ve “ns” olarak gösterilmiştir. Anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir (organ banyosu deneyleri $n=6$ /grup). Pozitif miyenterik nöronlar, her bir preparatta üç gangliyon üzerinden sayıldı. Yarı-kantitatif analiz amacıyla immüno pozitif nöronal hücre sayımı, deney gruplarına kör olan üç bağımsız gözlemci tarafından gerçekleştirildi ve elde edilen veriler ortalama alınarak Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. In-vivo Ölçümler

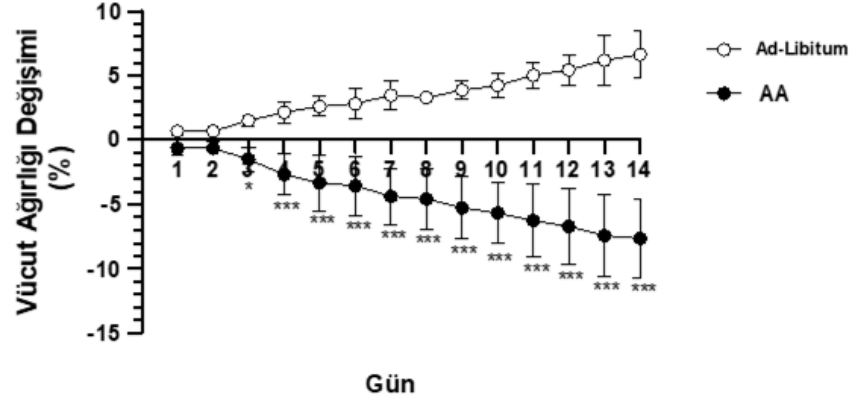
4.1.1. Besin Tüketimi ve Vücut Ağırlığı Takibi

Aralıklı açlık (AA) uygulanan sıçanların besin alımı, deneyin tüm günlerinde ad-libitum grubuna kıyasla belirgin biçimde daha yüksekti (günler arası dalgalanma olsa da genel düzey korunmuştur; Şekil 4.1). AA grubunda tüketim 1–14. günler arasında yaklaşık 18–30 g aralığında seyrederek 5–10. günlerde tepe değerlerine ulaşırken, ad-libitum grubunda aynı 4 saatlik pencerede tüketim ~5–8 g düzeyinde ve görece stabildi.



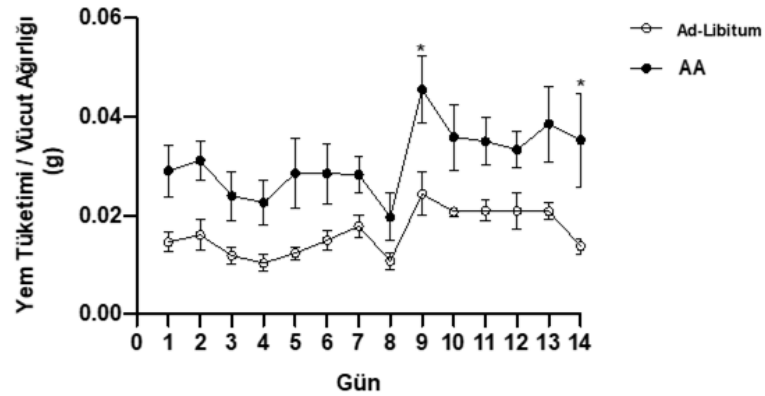
Şekil 4.1 12:00–16:00 arası günlük yem tüketimi, tüm günlerde ad-libitumdan daha yüksektir (ortalama±SEM; ***p<0,001).

Vücut ağırlığı değişimi (gün 0'a göre, %). Aralıklı açlık (AA) grubunda vücut ağırlığı günler içinde kademeli olarak azalarak 14. günde yaklaşık %–10–12'a ulaştı; ad-libitum grubunda ise kademeli artış görülerek yaklaşık +6–7 % seviyesine çıktı. İki yönlü tekrar-ölçümlü ANOVA, grup ve gün ana etkileri ile grup×gün etkileşiminin anlamlı olduğunu gösterdi; post-hoc karşılaştırmalarda gruplar arası fark ikinci günden itibaren anlamlıdır (ortalama ± SEM; bkz. Şekil 4.2). Bu bulgular, 14 günlük AA protokolünün net kilo kaybı, ad-libitum koşullarının ise kilo kazanımı ile seyrettiğini göstermektedir.



Şekil 4.2 Vücut ağırlığı değişimi. Noktalar ortalama, hata çubukları SEM. AA'da ağırlık kademeli azalır (~-10-12%), ad-libitumda artar (~+6-7%). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

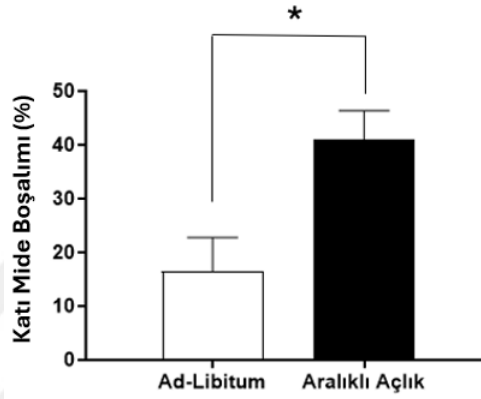
Yem tüketiminin vücut ağırlığına oranı (g/g, 12:00-16:00). AA grubunda oransal tüketim, 14 gün boyunca ad-libitum grubundan yüksek seyretmiştir (yaklaşık ~0,025-0,040 g/g vs ~0,010-0,025 g/g). İki yönlü tekrar-ölçümlü ANOVA grup ana etkisinin ve grup×gün etkileşiminin anlamlı olduğunu göstermiştir. Ad-libitum grubunda 9. günde kısa süreli bir pik (~0,05 g/g) izlenirken, AA grubunda 14. günde nispi tüketimde artış görülmüştür; işaretli günlerde fark $p < 0,05$ düzeyindedir (ortalama±SEM; bkz. Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Yem tüketimi/vücut ağırlığı oranı (g/g, 12:00-16:00). Noktalar ortalama, hata çubukları SEM. AA genel olarak daha yüksek; işaretli günlerde fark anlamlıdır (* $p < 0,05$).

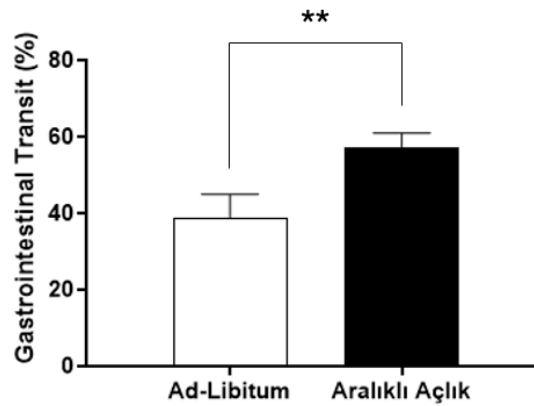
4.1.2. Katı Mide Boşalımı ve Gastrointestinal Transit

Katı mide boşalımı (%). AA grubunda katı içeriklerin mide boşalımı belirgin şekilde daha yüksekti; ad-libitum grubuna kıyasla yaklaşık iki kattan fazla boşalma izlendi (ortalama $\pm$ SEM; * $p < 0,05$; Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Katı mide boşalımı (%). Sütunlar ortalama $\pm$ SEM'i gösterir. AA, Ad-libitumdan daha yüksektir ($p < 0,05$)

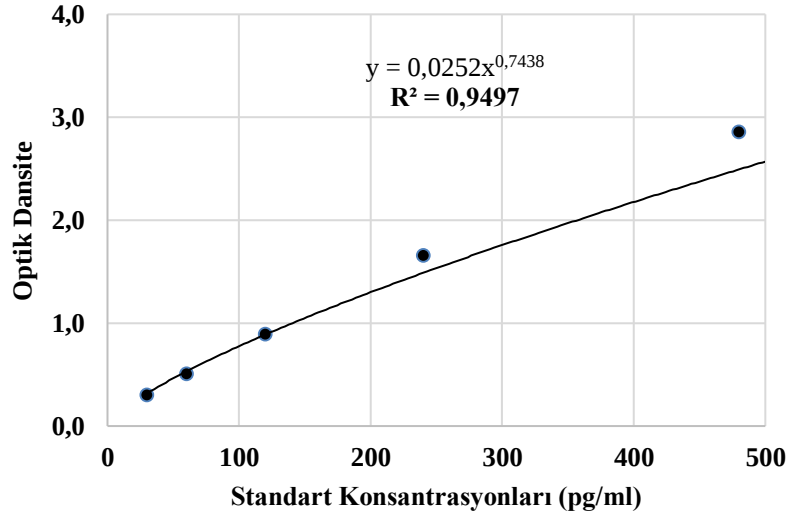
Gastrointestinal transit (%). AA grubunda gastrointestinal transit, ad-libitum grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (ortalama $\pm$ SEM; $p < 0,01$; Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Gastrointestinal transit (%). Sütunlar ortalama $\pm$ SEM'i gösterir. AA, Ad-libitumdan daha yüksektir ($p < 0,01$ **).

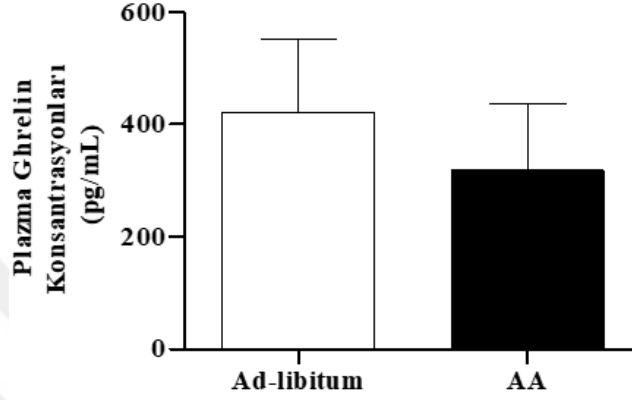
4.1.3. ELISA Analizleri

Ad-libitum ve AA modellerinde plazma, fundus ve ileum dokularında Ghrelin seviyelerinin değerlendirilmesi için ticari olarak satılan sıçana özgü kit (katalog no: E0868Ra, BT LAB, Bioassay Technology Laboratory, Jiaxing, Zhejiang, China) kullanılarak sandviç ELISA yöntemi uygulanmıştır. Yapılan deneyin doğruluğunu belirleyebilmek için kit içerisinde çıkan 960 pg/ml standartı 30pg/ml en düşük konsantrasyon olacak şekilde her seferinde 1:1 oranda dilue edilerek ELISA uygulanmış ve standart grafiği Şekil 4.6’de verildiği gibi elde edilmiştir. Plazma ve dokulardan elde edilen optik dansite değerleri, bu standartların optik dansite aralığına denk gelecek şekilde seçilmiş ve grafikteki denklem kullanılarak Ghrelin miktarları hesaplanmıştır.



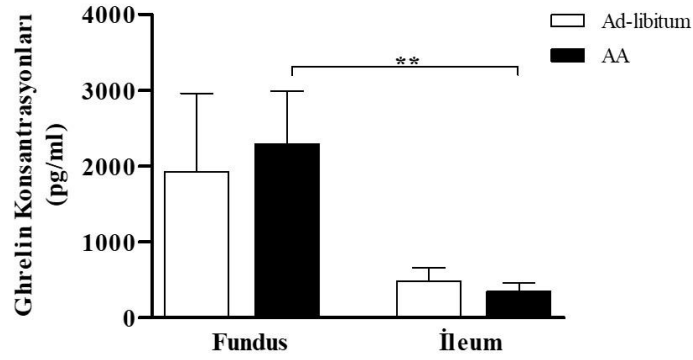
Şekil 4.6 Ghrelin ELISA kitine ait standart grafiği.

ELISA yöntemiyle değerlendirilen plazma Ghrelin konsantrasyonlarında Ad-libitum ($421,4 \text{ pg/ml} \pm 39,63$; $n=11$) ve AA ($318,7 \text{ pg/ml} \pm 37,26$; $n=10$) grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,0758$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Plazma Ghrelin konsantrasyonları. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

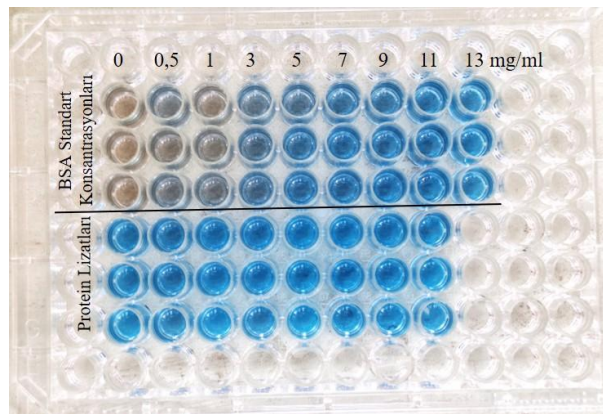
ELISA yöntemiyle değerlendirilen fundus dokusuna ait Ghrelin konsantrasyonlarında Ad-libitum ($1929 \text{ pg/ml} \pm 597,0$ $n=3$) ve AA ($2293 \text{ pg/ml} \pm 403,8$ $n=3$) grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p= 0,6482$). ELISA yöntemiyle değerlendirilen ileum dokusuna ait Ghrelin konsantrasyonlarında Ad-libitum ($483,1 \text{ pg/ml} \pm 102,4$ $n=3$) ve AA ($348,3 \text{ pg/ml} \pm 64,35$ $n=3$) grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p= 0,3275$) (Şekil 4.8). Öte yandan fundus ve ileum dokularının aralıklı açlık modellerinin Ghrelin konsantrasyonları karşılaştırıldığında fundus dokusundaki Ghrelin protein konsantrasyonunun ileum dokusuna göre yaklaşık 6,6 kat artış gösterdiği tespit edilerek istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p= 0,0089$).



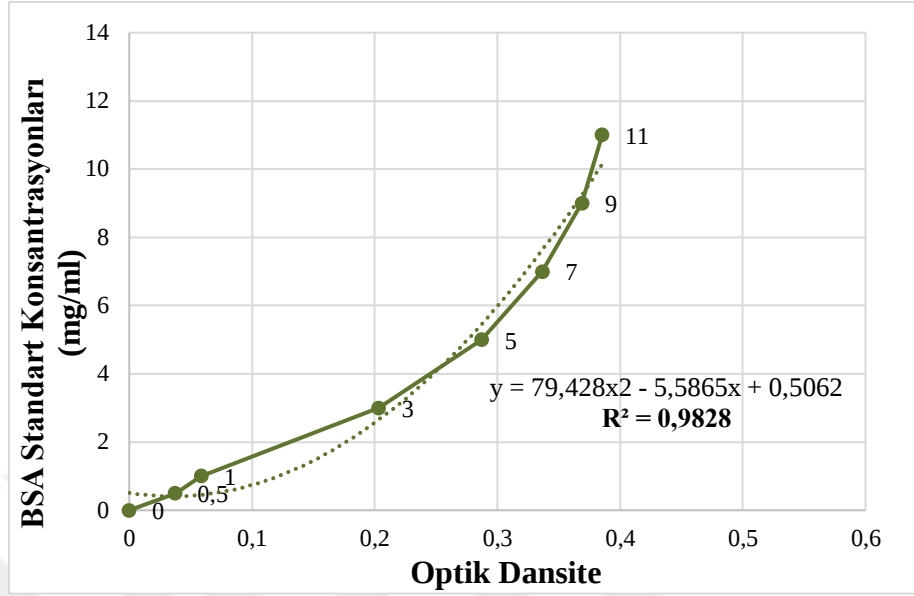
Şekil 4.8 Fundus ve ileum Ghrelin seviyelerinin ELISA konsantrasyonları. Doku grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$) ancak her iki dokunun AA model grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (** $p=0,0089$).

4.1.4. Western Blot Analizleri

Hayvanlardan alınan dokuların protein eşitleme çalışması yapılabilmesi için Bradford ile protein konsantrasyon tayini yapılmıştır (Şekil 4.9). Bu çalışmadan elde edilen standart polinomsal grafiği Şekil 4.10'de verilmiş olup elde edilen optik dansite sonuçları grafikteki x değeri yerine koyularak protein miktarları tespit edilmiştir. Standart grafiği Microsoft Excel yazılımıyla düzenlenmiştir.

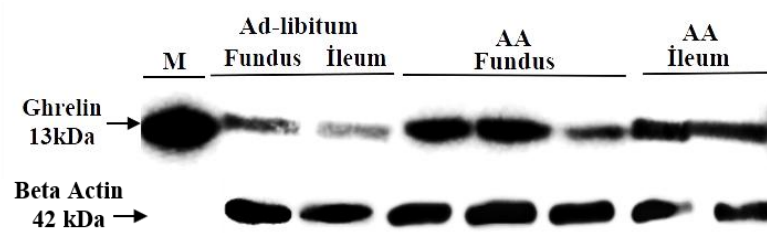


Şekil 4.9 Bradford plate görüntüsü

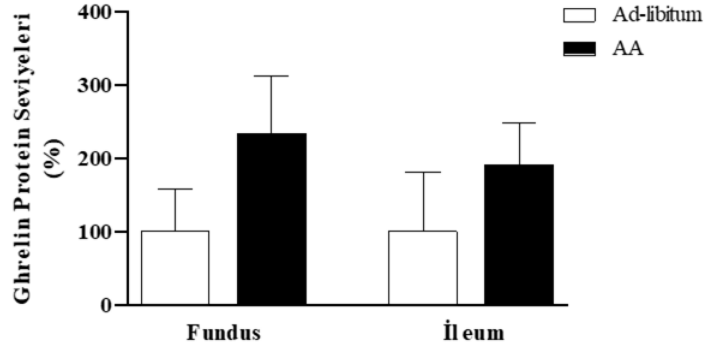


Şekil 4.10 BSA standart konsantrasyon grafiği. Denklem sonucunda R^2 değeri 0,9828 olarak bulunmuştur.

Fundus dokusuna ait western blotlama deneyinden elde edilen sonuçlarda, AA modelinde (n=12) ad-libitum hayvanlarına (n=5) göre ghrelin protein oranında 3 kat artış (%143) olduğu tespit edilmiştir. İleum dokusuna ait western blotlama deneyinden elde edilen sonuçlarda ise, AA modelinde (n=10) ad-libitum hayvanlarına (n=3) göre ghrelin protein oranında %60 artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.11). Sonuçlar ImageJ yazılımında analiz edilerek Graphpad Prism 5.0 yazılımıyla grafiksel olarak düzenlenmiştir (Şekil 4.12).



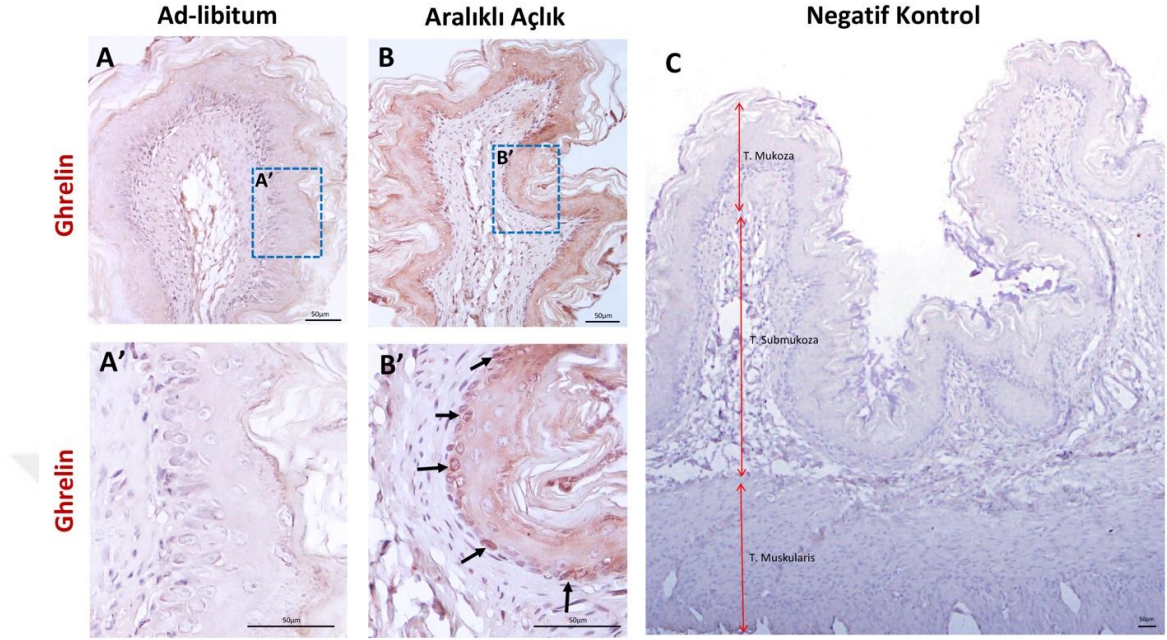
Şekil 4.11 Fundus ve ileum protein lizatlarına ait Ghrelin seviyelerinin Western blot görüntüsü. Fundus ve ileum dokularında, ad-libituma göre AA modelinde bant yoğunluğunun arttığı gösterilmiştir. AA: Aralıklı Açlık; M:Marker (belirteç).



Şekil 4.12 Fundus ve ileum dokularına ait western blotlama analiz grafiği.

4.1.5. Histolojik Analizler (Ghrelin-GHSR)

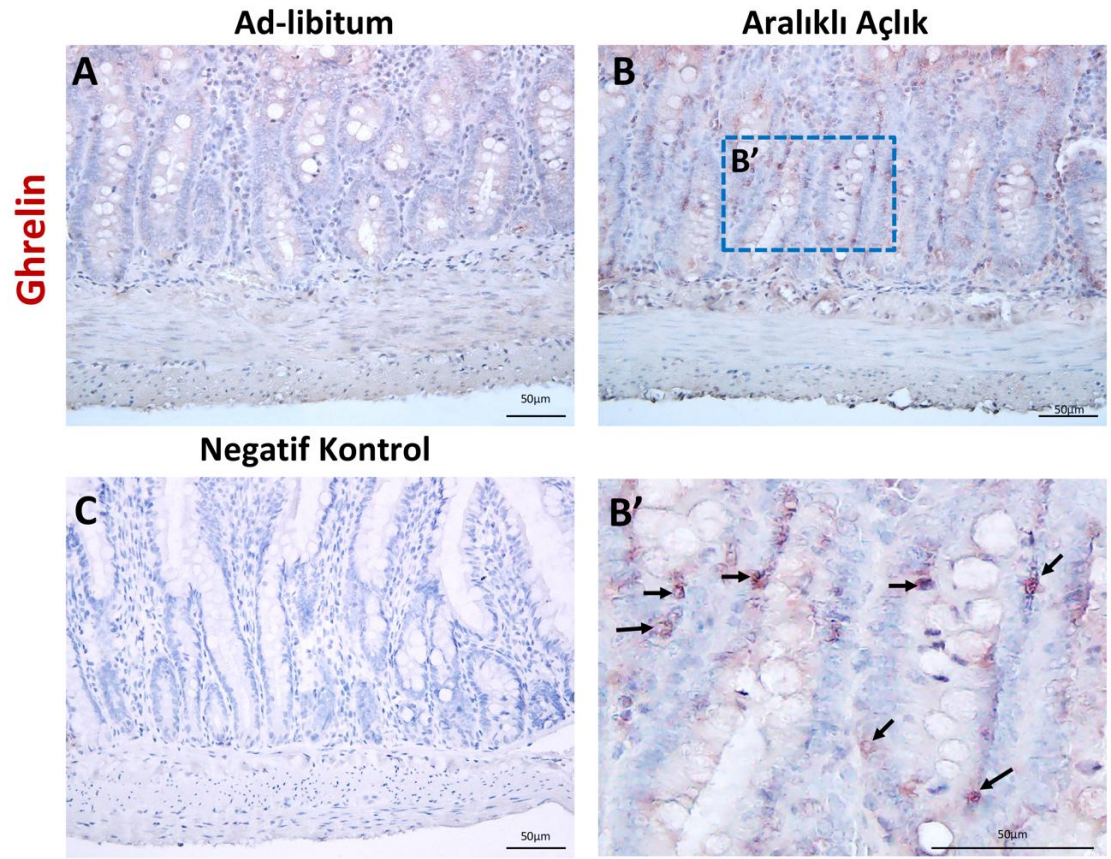
İmmünohistokimya – Ghrelin (fundus). Ad-libitum (A–A') ve aralıklı açlık (AA; B–B') gruplarından alınan fundus parafin kesitlerinde ghrelin immünreaktivitesi değerlendirildi. AA grubunda mukoza kıvrımları/gland alanlarında kahverengi DAB sinyali daha yaygın ve yoğun izlenirken, ad-libitum grubunda daha sınırlı ve düşük yoğunlukta boyanma görüldü. Negatif kontrolde (C) spesifik boyanma saptanmadı; fundusun tabakaları (tunika mukoza, submukoza, muskularis) gösterildi. A' ve B' panelleri, kesikli kutularla işaretlenen bölgelerin yakınlaştırmalarıdır (ölçek çubuğu: 50 µm).



Şekil 4.13 Adlibitum olarak beslenen (A-A') ve aralıklı açlık uygulanan hayvanların (B-B') fundus kesitlerinde Ghrelin immünreaktivitesinin (siyah ok) immünohistokimyasal yöntemle gösterimi. A' ve B' görüntüleri A ve B'de bulunan, kesikli çizgi ile işaretlenmiş bölgelerin yakınlaştırılmış halidir. İki hafta aralıklı açlık modeli uygulanan gruba ait fundus dokularında adlibituma göre Ghrelin ekspresyonunda artış olduğu, negatif kontrolde (C) ise herhangi bir reaksiyon gözlenmediği görülmüştür. Negatif kontrol (C) kesitinde fundusun histolojik tabakaları gösterilmiştir.

(T. mukoza: Tunika mukoza T. submukoza: Tunika submukoza T. muskularis: Tunika muskularis Skala bar: 50 µm)

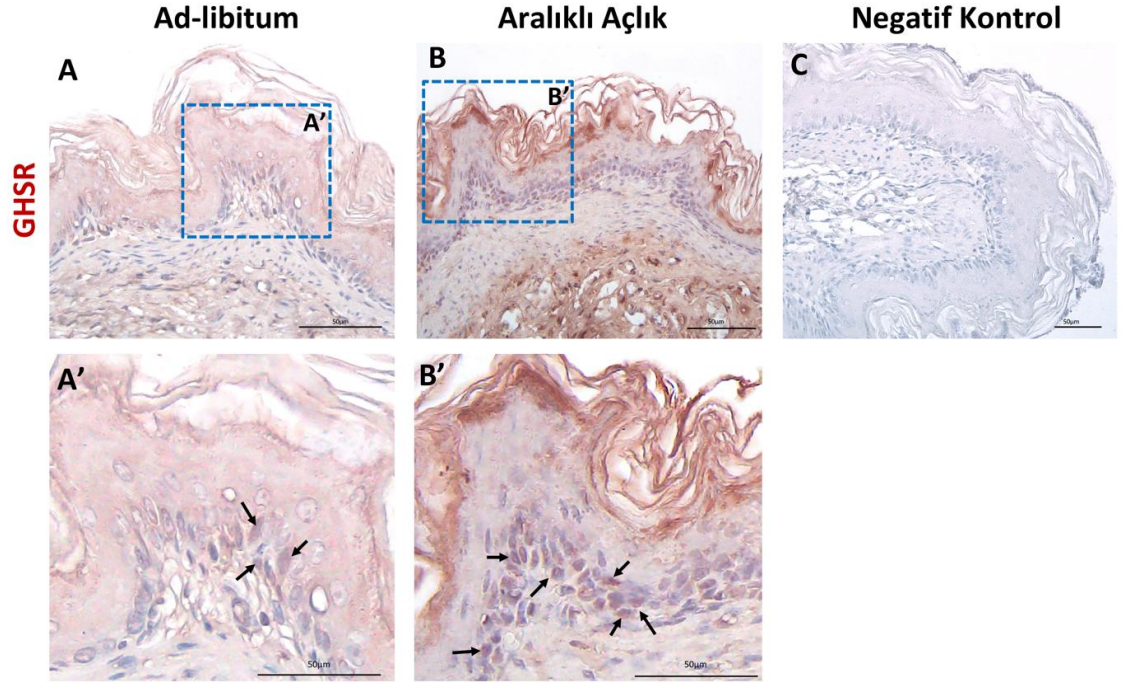
İmmünohistokimya – Ghrelin (ileum). Ad-libitum (A) ve aralıklı açlık (AA; B) gruplarından alınan ileum parafin kesitlerinde ghrelin immünreaktivitesi değerlendirildi. Boyanma, ağırlıklı olarak mukozal epitel/kript bölgesinde kahverengi DAB sinyali şeklinde izlendi. AA grubunda pozitif hücre sayısı ve boyanma yoğunluğu daha fazlaydı; B panelindeki kesikli kutunun yakınlaştırması (B') oklarla gösterilen sitoplazmik pozitif hücreleri ayrıntılı olarak göstermektedir. Negatif kontrolde (C) spesifik boyanma saptanmadı. (Ölçek çubuğu: 50 µm.)



Şekil 4.14 Adlibitum olarak beslenen (A) ve aralıklı açlık uygulanan hayvanların (B-B') ileum kesitlerinde Ghrelin immünreaktivitesinin (siyah ok) immünohistokimyasal yöntemle gösterimi. B' figürü, B de bulunan, kesikli çizgi ile işaretlenmiş bölgenin yakınlştırılmış halidir. Aralıklı açlık modeli uygulanan gruba ait ileum dokularında adlibituma göre Ghrelin ekspresyonunda artış olduğu, negatif kontrolde (C) ise herhangi bir reaksiyon gözlenmediği görülmüştür. (Skala bar: 50 μ m)

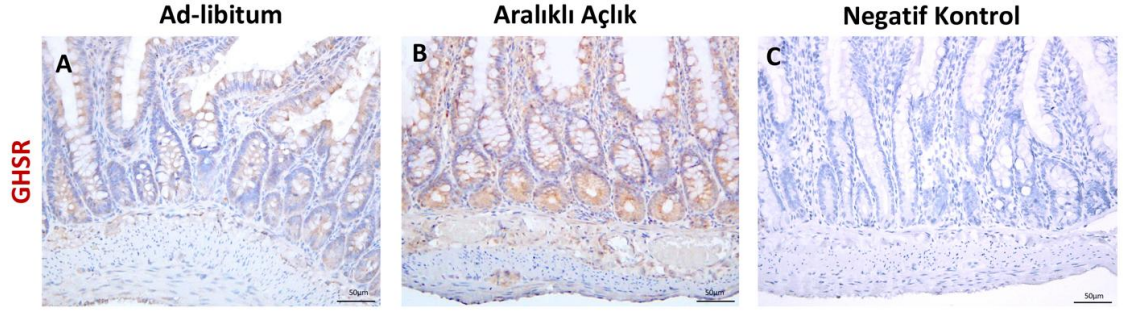
İmmünohistokimya – GHSR (fundus). Ad-libitum (A-A') ve aralıklı açlık (AA; B-B') gruplarının fundus parafin kesitlerinde GHSR immünreaktivitesi değerlendirildi.

Boyanma ağırlıkla mukoza kıvrımları ve gland epitelinde kahverengi DAB sinyali olarak izlendi. AA grubunda pozitif hücre dağılımı ve boyanma yoğunluğu ad-libituma göre daha fazlaydı; A' ve B' yakınlştırmalarında ok başları ile artmış sitoplazmik sinyal alanları gösterilmiştir. Negatif kontrolde (C) spesifik boyanma saptanmadı. (Ölçek çubuğu: 50 μ m.)



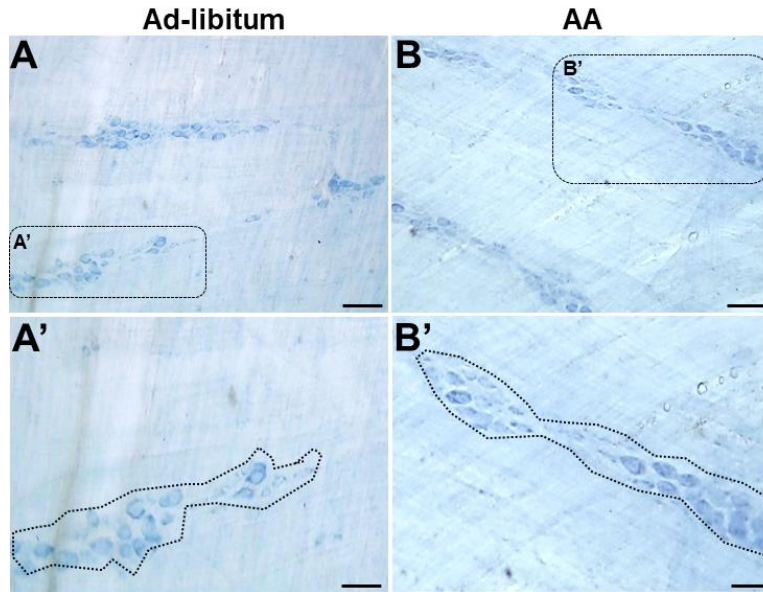
Şekil 4.15 Adlibitum olarak beslenen (A-A') ve aralıklı açlık uygulanan hayvanların (B-B') fundus kesitlerinde GHSR immünreaktivitesinin (siyah ok) immünohistokimyasal yöntemle gösterimi. A' ve B' görüntüleri A ve B de bulunan, kesikli çizgi ile işaretlenmiş bölgelerin yakınlaştırılmış halidir. Aralıklı açlık modeli uygulanan gruba ait fundus dokularında adlibituma göre GHSR ekspresyonunda artış olduğu, negatif kontrolde (C) ise herhangi bir reaksiyon gözlenmediği görülmüştür. (Skala bar: 50 µm)

İmmünohistokimya – GHSR (ileum). Ad-libitum (A) ve aralıklı açlık (AA; B) gruplarına ait ileum parafin kesitlerinde GHSR immünreaktivitesi değerlendirildi. Boyanma, ağırlıklı olarak mukozal epitel/kript bölgelerinde kahverengi DAB reaksiyon ürünü olarak izlendi. AA grubunda pozitif hücrelerin yayılımı ve boyanma yoğunluğu ad-libituma göre daha fazlaydı. Negatif kontrolde (C) spesifik boyanma saptanmadı. (Ölçek çubuğu: 50 µm.)

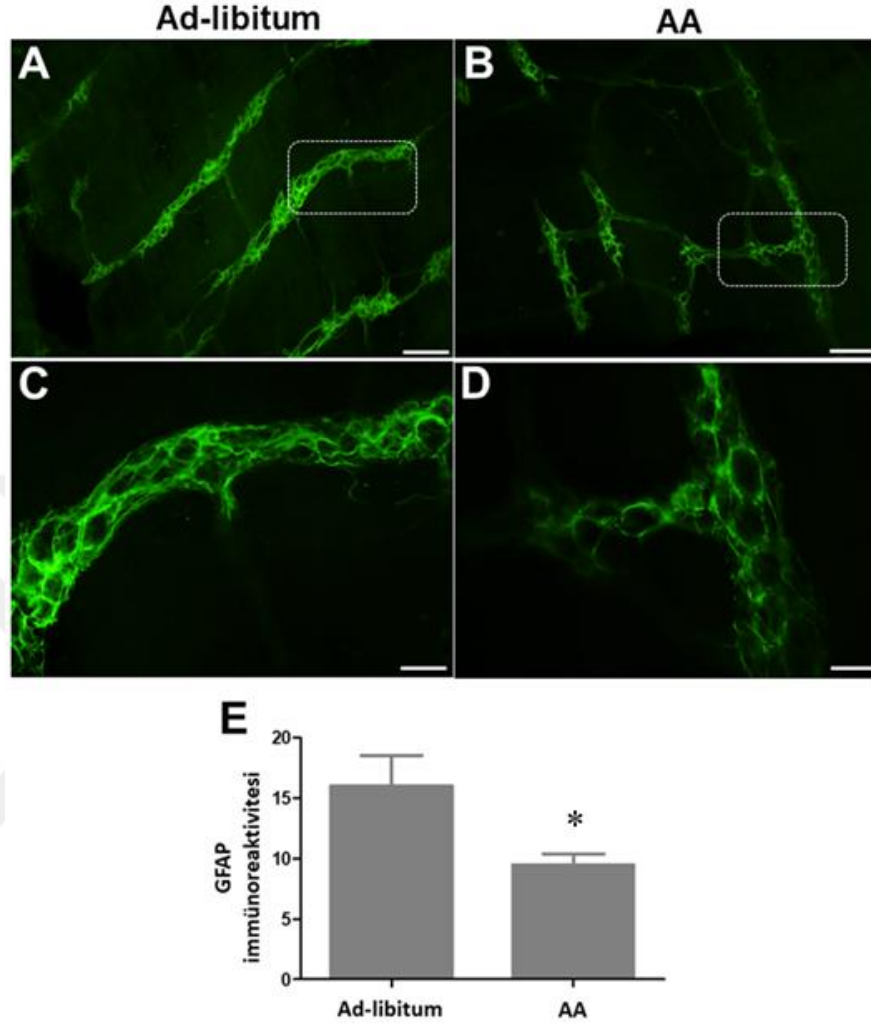


Şekil 4.16 Adlibitum olarak beslenen (A) ve aralıklı açlık uygulanan hayvanların (B) ileum kesitlerinde GHSR immünreaktivitesinin (siyah ok) immünohistokimyasal yöntemle gösterimi. Aralıklı açlık modeli uygulanan gruba ait ileum dokularında adlibituma göre GHSR ekspresyonunda artış olduğu, negatif kontrolde (C) ise herhangi bir reaksiyon gözlenmediği görülmüştür. (Skala bar: 50 µm)

Çalışmamızda, AA ve Ad-libitum grupları arasında myenterik nöron popülasyonu açısından belirgin bir farklılık saptanmazken (Şekil.4.17), 14 gün süreyle uygulanan AA beslenme modelinin ileumda GFAP immünoreaktivitesini anlamlı şekilde azalttığı tespit edilmiştir (Şekil.4.18).

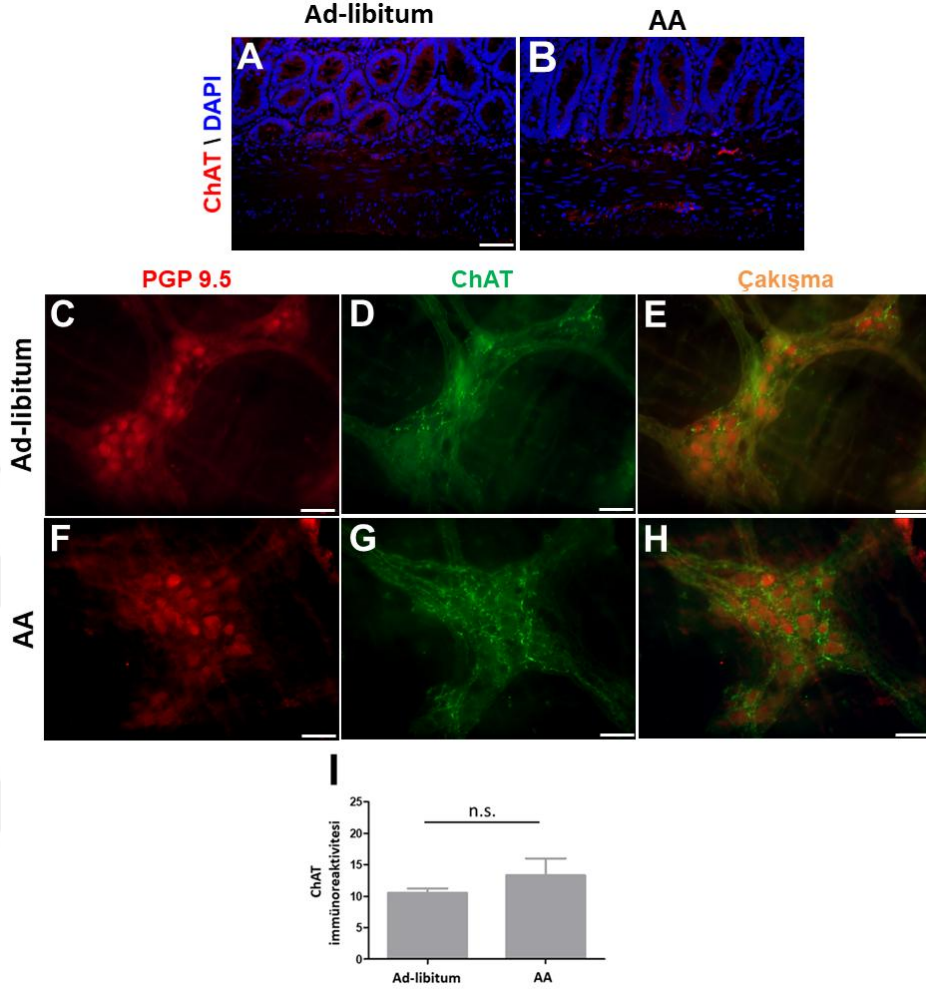


Şekil 4.17 Adlibitum olarak beslenen (A-A'') ve aralıklı açlık uygulanan hayvanların (B-B'') ileum kesitlerinde ileal myenterik nöronların kuprolinik mavi aracılı histokimyasal boyama yöntemi ile gösterimi. AA: aralıklı açlık. 200µm (A-B), 100µm (A'-B').



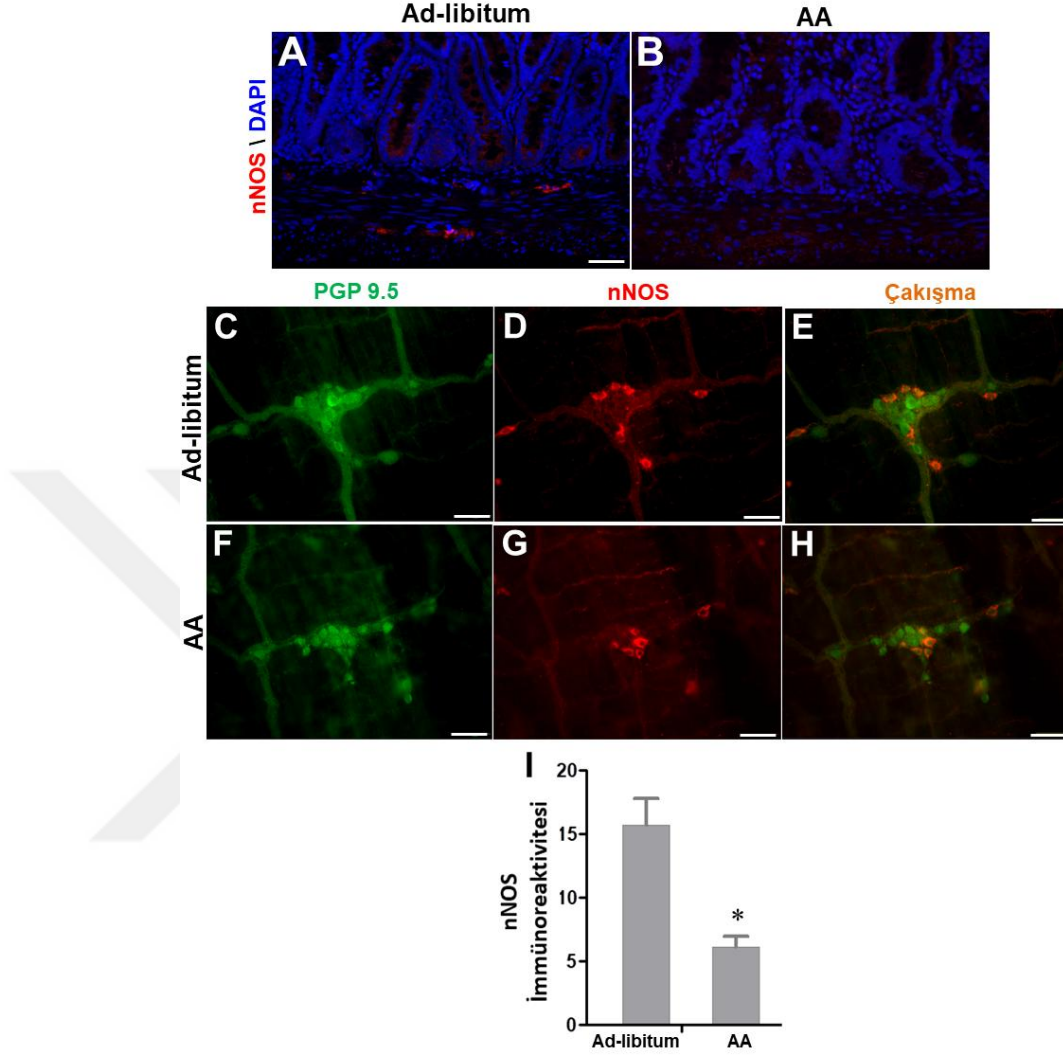
Şekil 4.18 Ad-libitum olarak beslenen (A-C) ve aralıklı açlık uygulanan sıçanlardan (B-D) elde edilen ileum kesitlerindeki enterik glial marker GFAP ekspresyonunun immünofloresan yöntem ile gösterimi. AA: aralıklı açlık. * $p < 0.05$ ad-libitum grubuna göre farkı işaret etmektedir. 200 μ m (A-B), 100 μ m (C-D).

Çalışmamızda, AA grubunda, ad-libitum grubuna kıyasla ileal myenterik kolin asetil transferaz (ChAT) ekspresyonunda hafif bir artış gözlenmiştir. Koronal kesitlerde saptanan ChAT ekspresyon artışının (Şekil. 4.19B), LMMP preparatlarında yapılan boyamalarda ileumdaki PGP9.5 işaretli enterik nöron popülasyonunda ortaya çıktığı tespit edilmiştir (Şekil. 4.19H). Öte yandan, söz konusu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil. 4.19I).



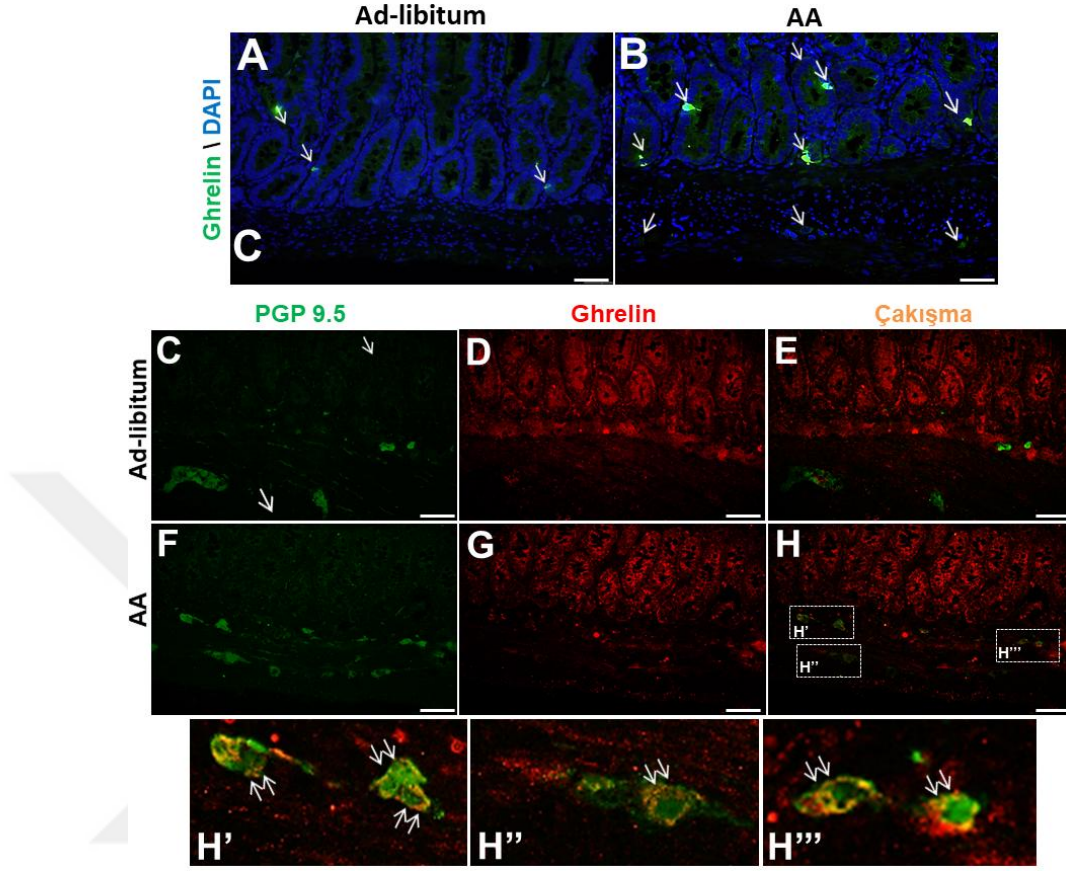
Şekil 4.19 Ad-libitum olarak beslenen (A-C) ve aralıklı açlık uygulanan sıçanlardan (B-D) elde edilen ileum örneklerindeki kolin asetil transferaz (ChAT) ekspresyonunun koronal kesitlerde (A-B) ve LMMP preparatlarında (C-H) immüno Floresan yöntem ile gösterimi. AA: aralıklı açlık, ns: istatistiksel öneme sahip olmayan değişim. Kırmızı: enterik nöronal belirteç PGP9.5, yeşil: ChAT. 100µm (A-H).

Çalışmamızda, AA grubunda, ad-libitum grubuna kıyasla ileal nöronal nitric oksit sentaz (nNOS) ekspresyonunda belirgin bir azalma gözlenmiştir. Koronal kesitlerde saptanan nNOS ekspresyon azalışının (Şekil. 4.20B), LMMP preparatlarında yapılan boyamalarda ileumdaki PGP9.5 ile işaretlenen enterik nöron popülasyonunda ortaya çıktığı saptanmış olup (Şekil. 4.20H), söz konusu artış istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil. 4.20I).

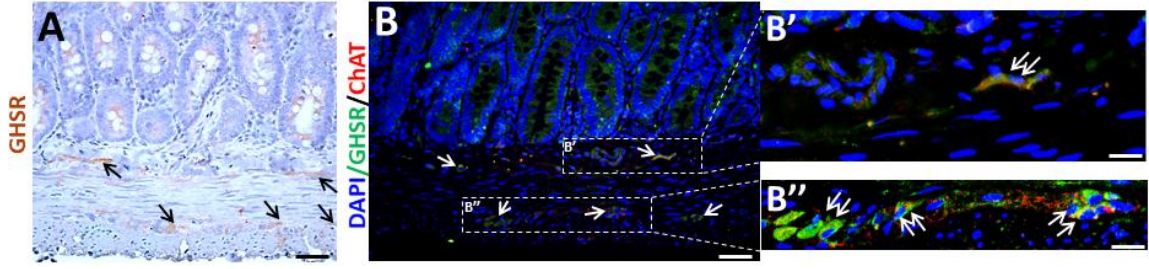


Şekil 4.20 Ad-libitum olarak beslenen (A-C) ve aralıklı açlık uygulanan sıçanlardan (B-D) elde edilen ileum örneklerindeki nöronal nitric oksit sentaz (nNOS) ekspresyonunun koronal kesitlerde (A-B) ve LMMP preparatlarında (C-H) immüno Floresan yöntem ile gösterimi. AA: aralıklı açlık, * $p < 0.05$ ad-libitum grubuna göre tespit edilen istatistiksel farklılık. Yeşil: enterik nöronal belirteç PGP9.5, kırmızı: nNOS. 100 μ m (A-H).

Çalışmamızda, AA grubunda, ad-libitum grubuna kıyasla ileal ghrelin ekspresyonunda belirgin bir artış gözlenmiştir. Koronal kesitlerde saptanan ghrelin ekspresyon artışının (Şekil. 4.21B), LMMP preparatlarında yapılan boyamalarda ileumdaki PGP9.5 ile işaretlenen enterik nöron popülasyonunda ortaya çıktığı saptanmıştır (Şekil. 4.21F-H). Benzer şekilde, çalışmamızdaki immüno Floresan bulgular, GHSR'in ileal myenterik ve submukozal nöronlarda eksprese olduğunu işaret etmektedir (Şekil.4.22B).



Şekil 4.21 Ad-libitum olarak beslenen (A-C) ve aralıklı açlık uygulanan sıçanlardan (B-D) elde edilen ileum örneklerde ghrelin ekspresyonunun koronal kesitlerde immüno Floresan çift etiketleme yöntemi ile gösterimi. AA: aralıklı açlık. . Yeşil: enterik nöronal belirteç PGP9.5, yeşil: Ghrelin. Tek oklar (A-B) koronal kesitlerdeki ghrelin-pozitif hücreleri, çift oklar myenterik gangliyonlardaki çift-pozitif hücreleri (H'-H''') işaret etmektedir. 100µm (A-H), 50µm (H'-H''').

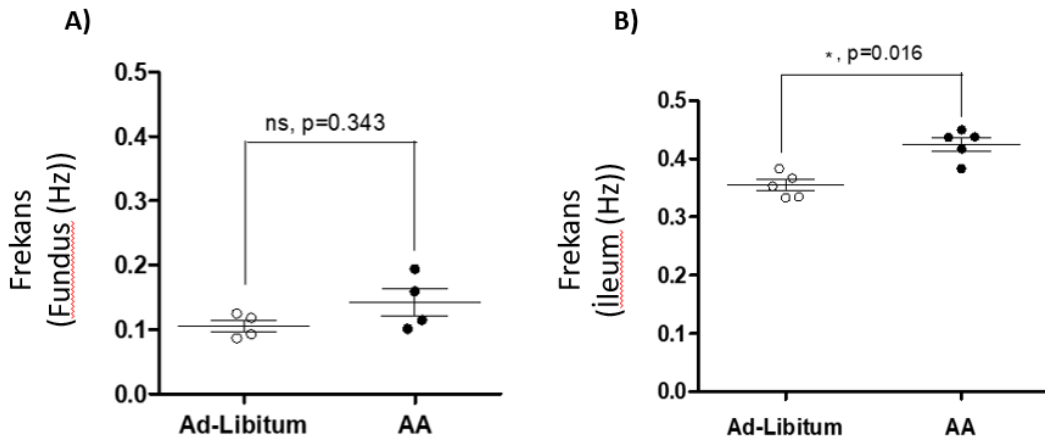


Şekil 4.22 Sıçandan elde edilen ileum örneklerde GHSR ekspresyonunun koronal kesitlerde immünohistokimyasal (A) ve immünofloresan çift etiketleme yöntemi ile (B) gösterimi. Mavi: DAPI, yeşil: enterik nöronal belirteç PGP9.5, kırmızı: GHSR. Tek oklar (B) koronal kesitlerdeki ghrelin-pozitif hücreleri, çift oklar submukozal ve myenterik gangliyonlardaki çift-pozitif hücreleri (B'-B'') işaret etmektedir. 100µm (A-B), 50µm (B'-B'').

4.2. In-vitro Ölçümler

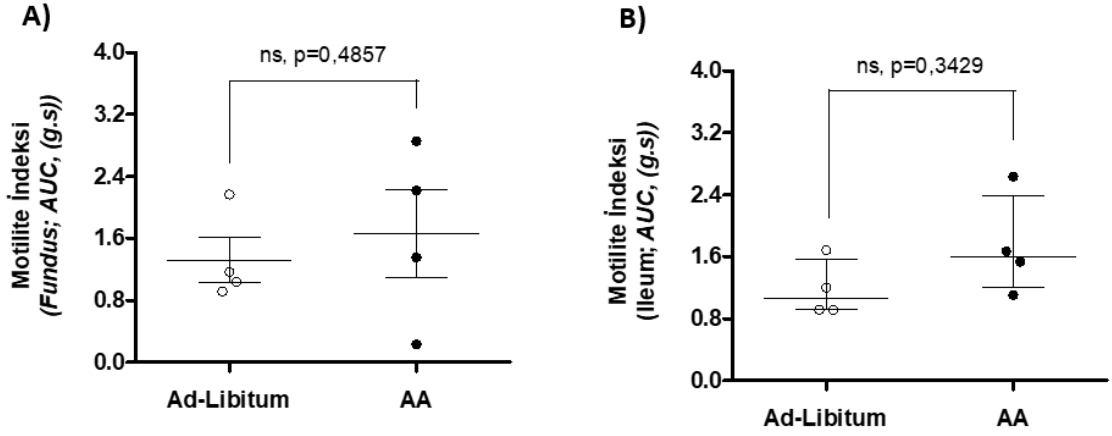
4.2.1. Bazal Motor Aktivite

Bazal kasılma frekansı, fundus ve ileum için ayrı ayrı değerlendirildi (Şekil 4.23). Fundusta Ad-libitum ve kronik aralıklı açlık (AA) grupları arasında anlamlı bir fark saptanmadı (bağımsız örneklem t-testi, ns; $p=0,343$; $n=5-6$ /grup). Buna karşılık, ileumda AA grubunun spontan kasılma frekansı Ad-libitum grubuna göre belirgin biçimde daha yüksekti (t-testi, $*p=0,016$; $n=5-6$ /grup).



Şekil 4.23 Spontan (bazal) kasılma frekansı karşılaştırması. (A) Fundus, (B) İleum; gruplar: Ad-libitum ve kronik aralıklı açlık (AA). İstatistik: bağımsız örneklem t-testi. Fundusta gruplar arasında fark yoktur (ns, $p=0,343$), ileumda ise AA grubunun frekansı Ad-libitum'a göre daha yüksektir (*, $p=0,016$; $n=5-6$ /grup).

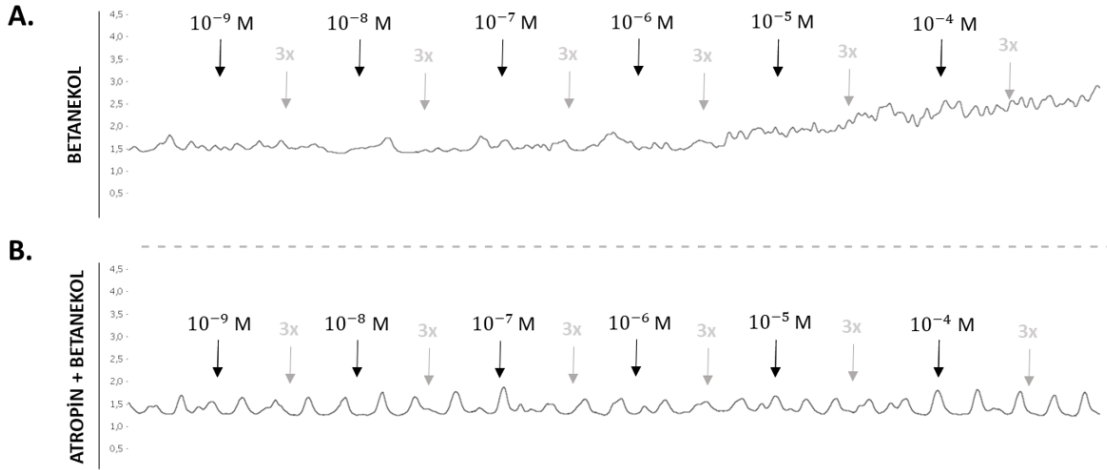
Organ banyosu kayıtlarından hesaplanan motilite indeksi (alan-altı, AUC; g·s) fundus ve ileum için Ad-libitum ve kronik aralıklı açlık (AA) grupları arasında karşılaştırıldı (Şekil 4.24). Fundusta grup ortalamaları benzer olup anlamlı bir fark saptanmadı (bağımsız örneklem t-testi, ns; $p=0,4857$). Benzer biçimde, ileumda da AA ile Ad-libitum arasında motilite indeksi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi (ns; $p=0,3429$).



Şekil 4.24 Bazal motilite indeksi (AUC, g·s) karşılaştırması. (A) Fundus, (B) İleum; gruplar: Ad-libitum ve kronik aralıklı açlık (AA). İstatistik: bağımsız örneklem t-testi. Fundusta gruplar arasında fark yok (ns, $p=0,4857$), ileumda da fark saptanmadı (ns, $p=0,3429$; $n=5-6$ /grup).

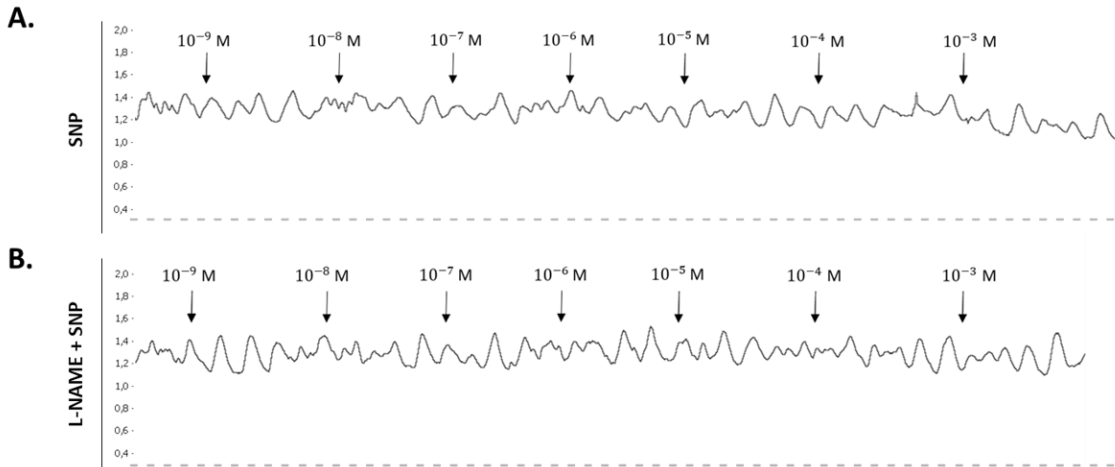
4.2.2. Kimyasal Ajan Uygulamaları

Betanekeolün kümülatif uygulanmasıyla kasılma genliği derişime bağılı olarak arttı; atropin ön-inkübasyonu bu kasılmaları belirgin biçimde baskıladı.



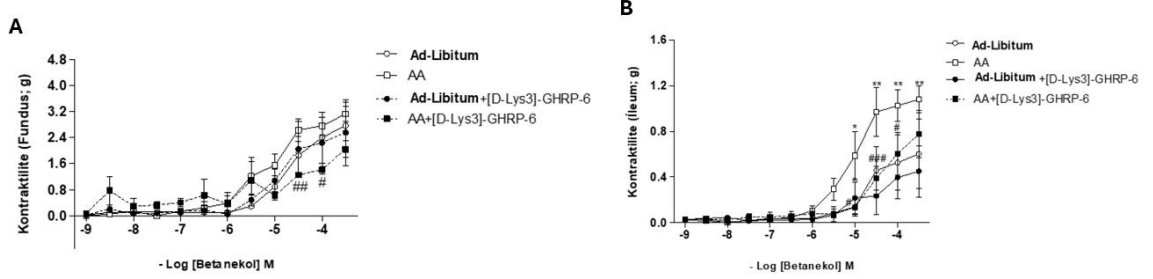
Şekil 4.25. Betanekol ile artan kasılmalar atropinle baskılandı. (A) Kümülatif bethanekol uygulaması (10^{-9} – 10^{-4} M) derişime bağı kasılma artışı oluşturdu. (B) Atropin ön-inkübasyonu sonrasında aynı protokolde bethanekol yanıtları belirgin biçimde baskılandı. Oklar derişim basamaklarını, gri oklar tekrarlanan uygulamaları (3×) göstermektedir; izler temsilidir.

SNP'nin kümülatif uygulanmasıyla gevşeme genliği derişime bağı olarak arttı; L-NAME ön-inkübasyonu bu gevşemeleri belirgin biçimde baskıladı.



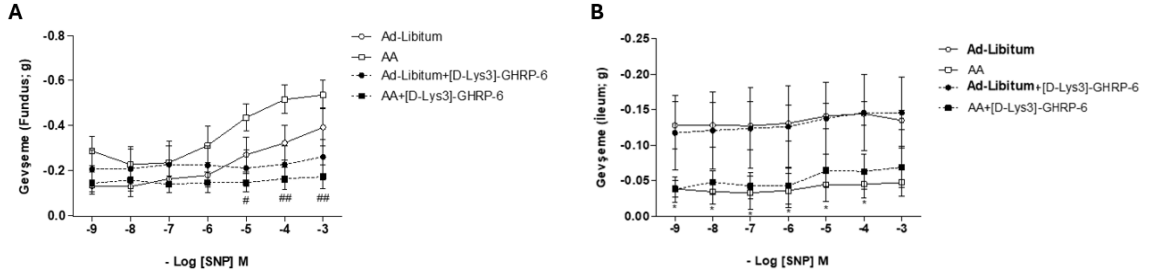
Şekil 4.26. SNP ile artan gevşemeler L-NAME ile baskılandı. (A) Kümülatif SNP uygulaması (10^{-9} – 10^{-3} M) derişime bağı gevşeme artışı oluşturdu. (B) L-NAME ön-inkübasyonu sonrasında aynı protokolde SNP'ye verilen gevşemeler belirgin biçimde baskılandı. Oklar derişim basamaklarını göstermektedir; izler temsilidir.

Betanekol (10^{-9} – 10^{-4} M, kontraksiyon; Fundus): Her iki grupta da yanıtlar doza bağlı olarak arttı. AA ve ad-libitum gruplarının betanekol yanıt düzeyleri genel olarak benzerdi. [D-Lys³]-GHRP-6 (10^{-6} M) eklenmesi, her iki grupta da yüksek konsantrasyonlarda ($\approx 10^{-5}$ – 10^{-4} M) kontraksiyon genliğini azalttı (# $p<0,05$; ## $p<0,01$, aynı grubun antagonistsiz koşuluna göre)(Şekil 4.27A). Veriler ortalama $\pm$ SEM'dir. Betanekol (10^{-9} – 10^{-4} M, kontraksiyon; İleum): Yanıtlar konsantrasyona bağlı olarak arttı. AA grubunun kontraksiyon genliği, özellikle 10^{-5} – 10^{-4} M aralığında Ad-libitum grubundan daha yüksekti (işaretli konsantrasyonlarda $p<0,05$ – $0,01$). [D-Lys³]-GHRP-6 eklendiğinde her iki grupta da yüksek konsantrasyonlardaki kontraksiyonlar azaldı (Şekil 4.27B).



Şekil 4.27 Betanekol (10^{-9} – 10^{-4} M; kümülatif) uygulanmasıyla elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri: (A) fundus, (B) ileum. Gruplar: Ad-libitum, kronik aralıklı açlık (AA) ve her iki grubun GHSR antagonisti [D-Lys³]-GHRP-6 ile ön-inkübe edilmiş halleri. Y-ekseni: kasılma kuvveti (g, ortalama $\pm$ SEM). İstatistik: iki yönlü ANOVA (grup $\times$ konsantrasyon) ve çoklu karşılaştırma (Tukey). * $p<0,05$, ** $p<0,01$: Ad-libitum ile AA arasındaki fark; # $p<0,05$, ## $p<0,01$: aynı beslenme grubunda [D-Lys³]-GHRP-6'nın araç kontrolüne göre etkisi. Betanekol artan konsantrasyonlarda her iki dokuda da kasılmayı belirgin olarak artırmıştır. İleumda Ad-libitum grubunun maksimum yanıtı AA'ya göre daha yüksektir; [D-Lys³]-GHRP-6 ön-inkübasyonu yanıtları özellikle yüksek konsantrasyonlarda baskılamıştır. Fundusta gruplar arası farklar sınırlı olup antagonist etkisi üst konsantrasyonlarda daha belirgindir (n=6/grup).

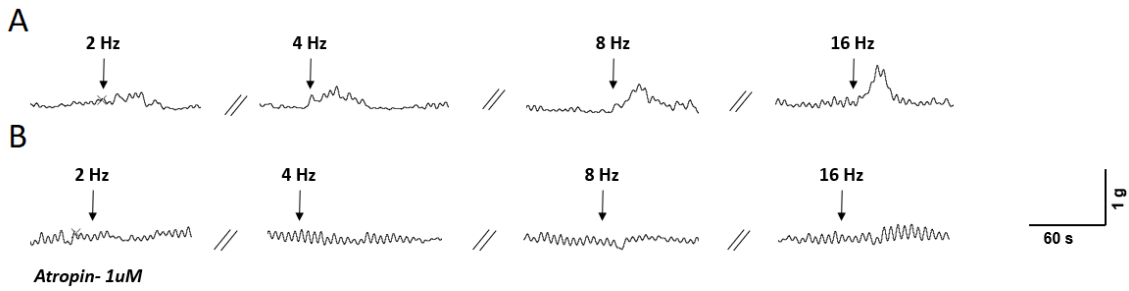
SNP (10^{-9} – 10^{-3} M, gevşeme; Fundus): SNP kademeli gevşeme oluşturdu. AA grubunda gevşeme genliği Ad-Libitum'a kıyasla daha büyüktü. [D-Lys³]-GHRP-6 varlığında, her iki grupta da 10^{-6} – 10^{-3} M aralığında gevşeme arttı (# $p<0,05$; ## $p<0,01$, aynı grubun antagonistsiz koşuluna göre)(Şekil 4.28A). Veriler ortalama $\pm$ SEM'dir. SNP (10^{-9} – 10^{-3} M, gevşeme; İleum): Tüm gruplarda düşük genlikli gevşeme oluştu (yaklaşık 0 ile -0,12 g). Ad-libitum grubunda gevşeme genliği AA'ya göre daha yüksektir; gruplar arası fark anlamlıdır (işaretli konsantrasyonlarda, $p<0,05$ – $0,01$). [D-Lys³]-GHRP-6 varlığı gevşeme yanıtlarını değiştirmemiştir (her iki grupta da ns; Şekil 4.28B). Veriler ortalama $\pm$ SEM'dir.



Şekil 4.28 Sodyum nitroprussid (SNP; 10^{-9} – 10^{-3} M, kümülatif) ile oluşturulan konsantrasyon–yanıt eğrileri: (A) fundus, (B) ileum. Gruplar: Ad-libitum, kronik aralıklı açlık (AA) ve her iki grubun GHSR antagonisti [D-Lys³]-GHRP-6 ile ön-inkübe edilmiş halleri. Y-ekseni gevşeme (g, ortalama $\pm$ SEM; negatif değerler tonusta azalmayı gösterir). İstatistik: iki yönlü ANOVA (grup $\times$ konsantrasyon) ve Tukey çoklu karşılaştırma. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$: Ad-libitum ile AA arasındaki fark; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$: aynı beslenme grubunda [D-Lys³]-GHRP-6'nın araç kontrolüne göre etkisi. SNP fundusta belirgin konsantrasyona bağlı gevşeme oluştururken [D-Lys³]-GHRP-6 yüksek konsantrasyonlarda bu yanıtı azaltmıştır; ileumda gevşeme küçüktür ve antagonist etkisi istatistiksel olarak anlamlı değildir (n=6/grup).

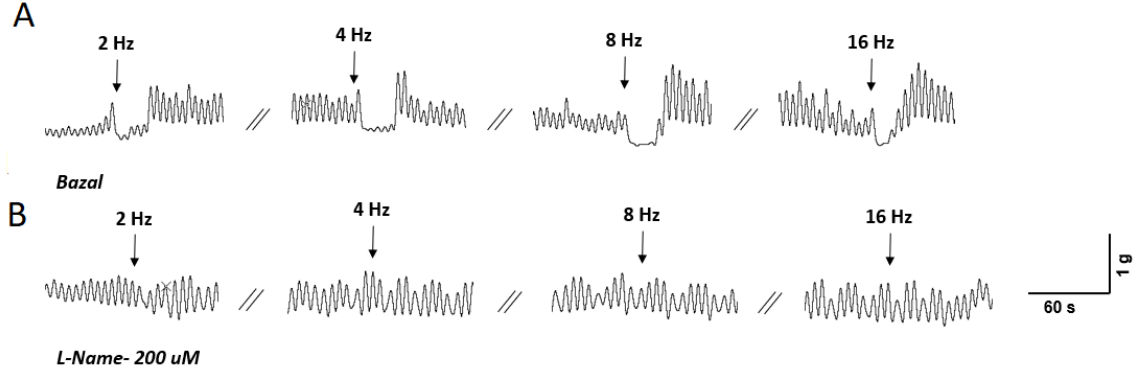
4.2.3. Elektriksel Alan Uyarımı

EFS'nin 2–16 Hz aralığında uygulanmasıyla kasılma genliği frekansa bağlı olarak arttı; 1 μM atropin ön-inkübasyonu bu EFS aracılı kasılmaları belirgin biçimde baskıladı, kolinerjik (muskarinik) bileşeni doğruladı.



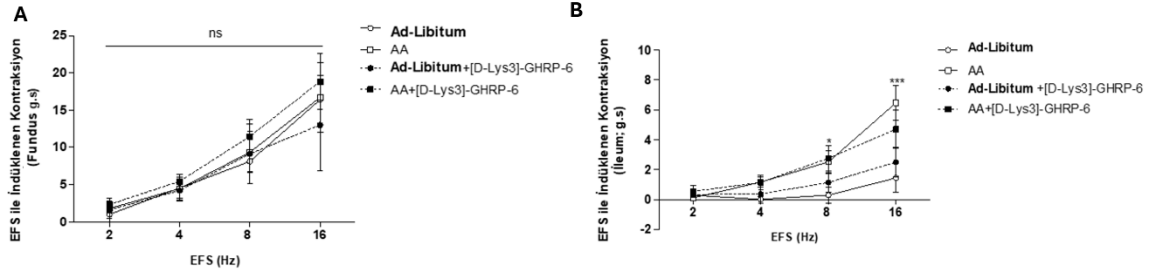
Şekil 29 EFS ile artan kasılmalar atropinle baskılandı. (A) 2, 4, 8 ve 16 Hz'de EFS'ye verilen kasılmalar frekansla arttı. (B) 1 μM atropin ön-inkübasyonu sonrası aynı protokolde EFS'ye verilen kasılmalar belirgin biçimde azaldı. Ölçek: 1 g, 60 s.

EFS'nin 2–16 Hz aralığında uygulanmasıyla gevşeme genliği frekansa bağlı olarak arttı; 200 μM L-NAME ön-inkübasyonu bu EFS-aracılı gevşemeleri belirgin biçimde baskıladı, yanıtın NO aracılı bileşenini doğruladı.



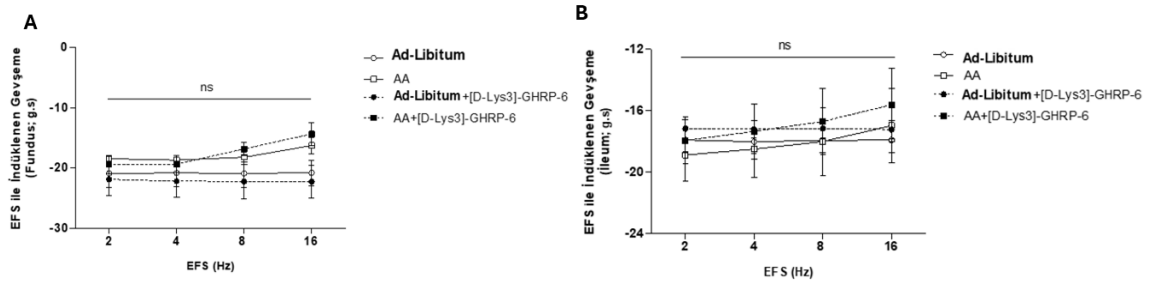
Şekil 4.30 EFS ile artan gevşemeler L-NAME ile baskılandı. (A) Bazal koşulda 2, 4, 8 ve 16 Hz’de EFS’ye verilen gevşeme yanıtları. (B) 200 μ M L-NAME ön-inkübasyonu sonrası aynı frekanslarda gevşemelerin belirgin biçimde azalması. Ölçek: 1 g, 60 s.

Fundus – EFS ile indüklenen yanıtlar (izole organ banyosu). EFS uygulaması 2–16 Hz aralığında tüm gruplarda frekansa bağımlı olarak kontraksiyon oluşturdu. AA ve ad-libitum grupları arasında kontraksiyon büyüklüğü açısından anlamlı fark saptanmadı; [D-Lys³]-GHRP-6 (10^{-6} M) eklenmesi de yanıtları değiştirmede (ns; ortalama $\pm$ SEM; Şekil 4.31A). İleum – EFS ile indüklenen yanıtlar (izole organ banyosu). EFS (2–16 Hz) ile oluşan kontraksiyon entegrali (g·s) frekansla arttı ve AA grubu, Ad-libituma kıyasla yüksek frekanslarda daha büyük yanıt verdi (8 Hz: $p < 0,05$; 16 Hz: $p < 0,001$). [D-Lys³]-GHRP-6 (10^{-6} M) varlığında kontraksiyon yanıtlarında her iki grupta da anlamlı fark gözlenmedi (ns; Şekil 4.31B).



Şekil 4.31 Elektriksel alan stimülasyonu (EFS; 2–16 Hz, kümülatif frekans artışı) ile indüklenen nöral kasılma yanıtları: (A) fundus, (B) ileum. Gruplar: Ad-libitum, kronik aralıklı açlık (AA) ve her iki grubun GHSR antagonisti [D-Lys³]-GHRP-6 ile ön-inkübe edilmiş halleri. Y-ekseni, kasılma alanını (g·s, ortalama $\pm$ SEM) göstermektedir. İstatistik: iki yönlü ANOVA (grup $\times$ frekans) ve Tukey çoklu karşılaştırma; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ilgili frekansta gruplar arası anlamlı farkı, “ns” fark olmadığını gösterir. Fundusta EFS’ye yanıt frekansa bağlı olarak artsa da gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (A, ns). İleumda yanıtlar frekansla belirgin şekilde artmış; 8 ve özellikle 16 Hz’de AA (ve AA+[D-Lys³]-GHRP-6) gruplarının yanıtları Ad-libitum’a kıyasla daha yüksek bulunmuştur (B; -). (n=6/grup).

Fundus EFS uygulaması 2–16 Hz aralığında tüm gruplarda frekansa bağımlı olarak değerlendirilen gevşeme yanıtları da gruplar arasında benzer seyir gösterdi ve GHSR antagonisti varlığında anlamlı değişiklik olmadı (ns; Şekil 4.32A). İstatistik: iki yönlü tekrar-ölçümlü ANOVA; frekans ana etkisi anlamlı, grup ve grup $\times$ frekans etkileşimi için anlamlılık bulunmadı. Aynı frekans aralığında değerlendirilen ileum gevşeme entegrali gruplar arasında fark saptanmadı ve [D-Lys³]-GHRP-6 varlığında da değişim gözlenmedi (ns; Şekil 4.32B). Değerler ortalama $\pm$ SEM; istatistik: iki yönlü tekrar-ölçümlü ANOVA ve uygun post-hoc.



Şekil 4.32 EFS ile indüklenen gevşeme yanıtları: (A) fundus, (B) ileum. Gruplar: Ad-libitum, kronik aralıklı açlık (AA) ve her iki grubun GHSR antagonisti [D-Lys³]-GHRP-6 ile ön-inkübe edilmiş halleri. EFS frekansları 2–16 Hz’dir. Y-ekseni, gevşeme alanını göstermektedir (g·s, ortalama $\pm$ SEM; negatif değerler bazal tonusta azalmayı ifade eder). İstatistik: iki yönlü ANOVA (grup $\times$ frekans) ve Tukey çoklu karşılaştırma. Tüm frekanslarda gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ve [D-Lys³]-GHRP-6 ön-inkübasyonu gevşeme yanıtını anlamlı biçimde değiştirmede (ns, $p \geq 0,05$; n = 6/grup).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, 14 gün süreyle uygulanan AA beslenme modelinin GİS motor fonksiyona etkileri ve bu etkide enterik ghrelinin rolü araştırılmıştır. Elde edilen veriler, 14 gün boyunca uygulanan AA beslenme modelinin sıçanlarda besin alımını artırırken vücut ağırlığını azalttığı gözlenmiştir. Ad-libitum beslenen grup ile kıyaslandığında, AA beslenme modelinin enterik dokulardaki Ghrelin ve GHSR ekspresyonlarını uyarırken; GI motor fonksiyonlarında ve kontraktilitisinde artışa neden olduğu saptanmıştır.

Günümüzde, besin tüketimi ve vücut ağırlığının kontrolü dışında; AA beslenme modelleri farklı fizyolojik sistemler üzerine çeşitli faydalarının ortaya konmasıyla dünya çapında giderek popülerlik kazanmıştır (Lee ve ark., 2020; Mishra ve ark., 2023). Çalışmamızda, 14 günlük AA beslenme modelinin enterik ghrelin üretimini ve GHSR protein ifadesini arttırdığı saptanırken bu hayvanlardan yapılan in-vivo ölçümlerde katı mide boşalımı ve GI transit hızlarının arttığı saptadık. GHSR-knock out fare ve vagotomi ile GHSR protein ifadesinin azaltıldığı sıçanlarda yapılan çalışmalar mide boşalımının ve intestinal pasajın yavaşladığı gösterilmiştir (Yang ve ark., 2011; Yang ve ark., 2013). Ghrelin, ilk olarak sıçan midesinin fundus bölgesindeki oksintik bezlerde bulunan X/A hücrelerinde keşfedilen bir peptit olup, mRNA ekspresyonu ve plazma seviyelerinin açlık durumunda yükseldiği ve ghrelinin sıçan ince bağırsak sindirim arası göç eden miyoelektrik kompleksi (MMC) uyardığı bilinmektedir (Kojima Masayasu ve ark., 1999b; Edholm ve ark., 2004). Midede en fazla fundus bölgesinde olmakla birlikte, sıçanlarda mideden kolona dek ghrelin immünoreaktivitesinin varlığı gösterilmiştir (Kojima Masayasu ve ark., 1999b; Date Yukari ve ark., 2000). Öte yandan, insan sindirim sisteminde ghrelin mRNA ekspresyonu; duodenum, jejunum, midenin antrum bölgesinde gösterilmiştir (Gnanapavan ve ark., 2002).

İnsan ve kemirgenlerde yapılan önceki çalışmalarda AA beslenme modelinin plazma ghrelin seviyelerini artırdığı tespit edilmiştir (Ariga Hajime ve ark., 2008a; Abedelmalek ve ark., 2015; Akan ve ark., 2023). Çalışmamızda Ariga ve ekibinin daha önceki çalışmalarında kullandığı 20:4 açlık:beslenme paterni uygulanmış ve bu kapsamda her gün 12:00-16:00 saatleri arasında 4 saat süreyle hayvanların yem tüketmelerine izin

verilmiştir (Ariga Hajime ve ark., 2008a). Ariga ve arkadaşları, 14 günün sonunda hem öğün-öncesi hem de öğün-sonrası toplanan plazma örneklerindeki açile ghrelin seviyelerinin, ad-libitum beslenen sıçanlarınkine kıyasla önemli derecede yüksek olduğunu tespit ederken, bizim çalışmamızda gerçekleştirilen ELISA analizlerinde plazma Ghrelin seviyelerinde ad-libitum ve AA uygulanan hayvanlar arasında farklılık tespit edilmemiştir. Söz konusu farklılığın nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, kullanılan ticari ölçüm kitlerindeki duyarlılık farklılıkları ve/veya kitlerin açile ve total ghreline olan özgünlükleri ilk akla gelen nedenler olarak ön plana çıkmaktadır.

Çalışmamızda 14 gün süreyle uygulanan AA beslenme modeli sonunda sıçanların vücut ağırlığı giderek azalırken, ad-libitum beslenen sıçanlarda kilo alımı gerçekleştiği gözlenmiştir. Mevcut bulgularımıza paralel olarak, Ariga ve arkadaşlarının çalışmasında da 14 günlük AA modelinin uygulandığı sıçanlarda, ad-libitum beslenen sıçanlara göre vücut ağırlığının anlamlı derecede düşük seyrettiği gösterilmiştir (Ariga Hajime ve ark., 2008a). AA takvimi süresince artan yem tüketimine karşın ortaya çıkan vücut ağırlığındaki azalmanın olası nedeninin, beslenme modelinin 20 saatlik açlık fazında meydana gelen katabolik süreç ile ortaya çıkan yemden yararlanma düşüşü olabileceği akla yatkın gelmektedir. Buna ilave olarak, açlık sürecinde ghrelinin yanı sıra fazla sayıda santral ve periferik hormon ve/veya nöromediyatörün üretiminde değişimler şekillenmekte olup, söz konusu moleküllerin beyin-bağırsak ekseninde hem beyin, hem de enterik düzeyde farklı roller üstlendiği bilinmektedir. Dolayısıyla; AA beslenme modelinde, Ghrelin dışında kronik açlık uygulamasına bağlı değişim gösteren diğer mediyatörlerin farklı metabolik etkilerinin ortaya çıkabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Son olarak, AA beslenme modeli aracılı olarak ortaya çıkan vücut ağırlık kaybının altında yatan mekanizmaların aydınlatılması, çalışmamızın öncelikleri hedefleri arasında yer almamaktadır. Söz konusu etkinin aydınlatılması için, plazma GH seviyesi, yağ kütlesi ölçümleri ve başta yağ, GİS ve sinir dokuları olmak üzere açlıkta üretimi artan metabolik mediyatörlerin plazma/BOS seviyeleri gibi değişkenlerin incelendiği farklı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu açıktır.

Bu çalışmada, GI transit ve mide boşalımı ölçümlerinde elde ettiğimiz sonuçlar her ne kadar artan endojen enterik Ghrelin'in prokinetik etkilerini işaret etse de in-vivo

ölçümlerde periferik GHSR antagonisti uygulanan grupların olmaması bir eksiklik olarak değerlendirilebilir. Öte yandan, ghrelinin GIS motor fonksiyonlar üzerine uyarıcı etkileri enterik mekanizmalar ile sınırlı olmayıp, bu etkide vagal otonom yolların rol aldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Swartz ve ark., 2014; Gong ve ark., 2017). Buna ilave olarak, endojen ghrelinin, GIS dokularının dışında beyinde; hipotalamus özelinde arkuat çekirdek (ARC) lateral hipotalamik alan (LHA) ve paraventriküler çekirdek (PVN) alanlarında ve serebral korteksteki az sayıda hücrede üretildiği gösterilmiştir (Mondal ve ark., 2005; Sato ve ark., 2005; Hou ve ark., 2006). Son ve önemli olarak, ghrelin spesifik transport sistemi aracılığıyla kan beyin bariyerinin her iki yönüne doğru da geçiş yapabilmesi, açlıkta artan ghrelinin enterik etikelerinde rol alan santral ve periferik mekanizmaların aydınlatılması için bu yolların etkinliklerinin selektif olarak ortadan kaldırıldığı daha detaylı deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızdaki in-vivo ölçümlerde, 14 gün süreyle uygulanan AA modeli ile artan katı mide boşalım ve intestinal transit hızında GHSR-aracılı mekanizmalarının rolünün aydınlatılması için izole organ banyosu deneyleri gerçekleştirilmiştir. Ad-libitum beslenen sıçanlara kıyasla, AA uygulamasına maruz kalan sıçanlardan elde edilen ileum düz kas preparatlarında betanekol-aracılı kasılmaların yanı sıra SNP-aracılı gevşeme yanıtlarının belirgin şekilde potansiyalize olduğu, ortaya çıkan bu etkilerin GHSR antagonisti ön uygulaması ile ortadan kalktığı saptanmıştır. Öte yandan, AA beslenme modeline bağlı olarak ileumda gözlenen bu etkiler, mide fundus düz kas preparatlarında belirgin şekilde saptanmamıştır. Bu sonuçlar, moleküler analizlerde tespit edilen AA modeline bağlı artan endojen ghrelinin etkinliğini işaret etmektedir. Bulgularımıza paralel olarak, Edholm ve arkadaşları sıçan düz kas şeritlerinde yaptıkları in-vitro çalışmalarında ghrelin-aracılı ortaya çıkan kontraktilite atropin varlığında ortadan kalktığını göstermişlerdir (Edholm ve ark., 2004). Elde ettiğimiz bulgulardan yola çıkarak, AA-aracılı üretimi artan enterik endojen ghrelinin, kolinerjik nöronal mekanizmalar aracılığıyla GI motiliteyi uyardığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda western blot ile AA-aracılı ghrelin artışını gösterdiğimiz bulgularımıza dayanak, söz konusu etkide rol oynayan endojen ghrelinin kaynağının gastrik fundus bölgesi olması ve burada üretilen ghrelinin gerek lümenal yolla ileuma ulaşarak parakrin,

gerekse dolaşıma katılarak endokrin etki mekanizmaları ile ileumu uyarma olasılığı kuvvetli görünmektedir. Öte Yandan enteroendokrin hücrelerin yanı sıra enterik nöronların da ghrelin üretip üretmediği net olmamakla birlikte enterik nöronal hücrelerde üretilen GHSR'nin ghrelinin prokinetik etkisinde rol alıp almadığına dair kesin bir yargıya varmak güçtür. Ayrıca GHSR'nin özellikle mide düz kas katmanlarındaki myenterik sinir hücrelerinde ifade edildiği farelerde gösterilmiştir (Yang ve ark., 2013).

Çalışmamızda, 14 günlük AA beslenme modelinin sıçan ileumundaki ChAT immünoaktivitesini hafif şekilde arttırtırken, nNOS immünoaktivitesini ise belirgin şekilde azalttığı tespit edilmiştir. Enterik ChAT ve nNOS ekspresyonlarındaki değişimler, AA grubunda saptanan intestinal transit hızı artışı ve bazal motilite artışını kısmen açıklamaktadır. GFAP, astrositlerin ara filament bir yapısal protein olup, normal nöronal gelişim ve fonksiyon için gereklidir. Buna karşın, enterik GFAP ekspresyonundaki artış, bağırsakta şekillenen nöroinflamatuvar bir sürecin belirteci olarak da değerlendirilmektedir. Çalışmamızda, AA beslenme modelinin GFAP immünoaktivitesini azaltması, AA'nın anti-inflamatuvar ve nöroprotektif etkisini düşündürmektedir. Öte yandan, GHSR'nin enterik nöronlardaki varlığına ilave olarak, AA'ya bağlı olarak artan ghrelin ekspresyonunun sadece mukozal hücrelerde değil, aynı zamanda myenterik nöronlardaki artışı, AA'ya bağlı ortaya çıkan motor değişikliklerde ghrelin-aracılı nöronal mekanizmaların rol alabileceğini düşündürmektedir.

Literatürde, izole organ banyosu tekniği kullanılarak kemirgen GIS dokularında ghrelinin kontraktıl aktiviteye etkisini inceleyen az sayıda çalışma (Edholm ve ark., 2004; Yang ve ark., 2013) bulunmakla birlikte, izole GIS dokularında EFS-aracılı kasılma ve gevşeme yanıtlarında endojen ghrelinin rolü net değildir. Bu sebeple, çalışmamızda enterik nöronal mekanizmaların rolünün incelenebilmesi amacıyla izole doku preparatlarında EFS uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Elde ettiğimiz bulgular, EFS-aracılı ileumda gözlenen atropine duyarlı kasılmaların GHSR antagonisti varlığında zayıfladığını gösterirken, EFS-aracılı ileal gevşeme yanıtlarında ad-libitum grubuna göre farklılık tespit edilmemiştir. Bu sonuçlar, AA maruziyetine bağlı olarak artan ghrelin üretiminin enteroendokrin hücreler ile sınırlı olmayabileceğini ve enterik nöronal mekanizmaların rolünü akla getirmektedir. Bulgularımıza paralel olarak; Yang ve ekibi, GHSR-/- farelerden elde edilen gastrik düz

kas şeritlerinde EFS ve kabakol-aracılı intraluminal basınç değişiminin azaldığını ve buna in-vivo olarak mide boşalımındaki gecikmenin eşlik ettiğini göstermişlerdir (Yang ve ark., 2013). Benzer şekilde, vagotomize sıçanlarda yavaşlayan mide boşalım hızına GHSR ekspresyonunun down-regülasyonunun eşlik ettiği gösterilmiştir(Yang ve ark., 2011). İleum dokularında elde ettiğimiz EFS yanıtları, (i) ileumda EFS-aracılı uyarılan ghrelinerjik enterik nöronların varlığı ve/veya EFS-aracılı ileumdan salınan lokal uyarıcı nöronal mediyatörlerin (ACh veya Substans-P olması kuvvetle muhtemel görünmektedir) reseptörleri ile GHSR'nin koeksprese olduğu düz kas hücrelerinin varlığını düşündürmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Güncel literatürde kemirgenlerde gerek endojen, gerekse periferik ekzojen Ghrelin uygulamasının mide motilitesini uyardığına dair çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Öte yandan; bu çalışma, sıçanlara uygulanan kronik AA beslenme modelinin enterik ghrelin ekspresyonunu arttırdığını, artan endojen ghrelinin gastrointestinal motor fonksiyonu stimüle ettiğini gösteren ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular, AA beslenme modelinin GI motor disfonksiyon ile karakterize olan hastalıklarda farmakolojik tedavi yöntemlerini destekleyici ve tedavi etkinliğini arttıracak bir terapötik yaklaşım olabileceğini işaret etmektedir. Bununla birlikte, AA beslenme modelinin GHSR-aracılı olarak rol aldığı santral ve enterik nöronal mekanizmaların detaylı olarak aydınlatılabilmesi için yeni deneysel çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.



KAYNAKLAR

- Abdelmalek S, Denguezli M, Chtourou H, Souissi N, Tabka Z. Does ramadan fasting affect acylated ghrelin and growth hormone concentrations during short-term maximal exercise in the afternoon? *Biological Rhythm Research*. 2015; 46: 691-701.
- Adachi S, Takiguchi S, Okada K, Yamamoto K, Yamasaki M, Miyata H , ve ark. Effects of ghrelin administration after total gastrectomy: A prospective, randomized, placebo-controlled phase ii study. *Gastroenterology*. 2010; 138: 1312-1320.
- Airapetov MI, Eresko SO, Lebedev AA, Bychkov ER, Shabanov PD. Expression of the growth hormone secretagogue receptor 1a (ghs-r1a) in the brain. *Physiological reports*. 2021; 9: e15113.
- Akan M, Unal S, Gonenir Erbay L, Taskapan MC. The effect of ramadan fasting on mental health and some hormonal levels in healthy males. *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*. 2023; 59: 1-9.
- Al-Rawi N, Madkour M, Jahrami H, Salahat D, Alhasan F, BaHamam A , ve ark. Effect of diurnal intermittent fasting during ramadan on ghrelin, leptin, melatonin, and cortisol levels among overweight and obese subjects: A prospective observational study. *PloS one*. 2020; 15: e0237922.
- Alzoghaibi MA, Pandi-Perumal SR, Sharif MM, BaHamam AS. Diurnal intermittent fasting during ramadan: The effects on leptin and ghrelin levels. *PloS one*. 2014; 9: e92214.
- Andrews ZB, Erion D, Beiler R, Liu ZW, Abizaid A, Zigman J , ve ark. Ghrelin promotes and protects nigrostriatal dopamine function via a ucp2-dependent mitochondrial mechanism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009; 29: 14057-14065.
- Ang D, Nicolai H, Vos R, Mimidis K, Akyuz F, Kindt S , ve ark. Influence of ghrelin on the gastric accommodation reflex and on meal-induced satiety in man. *Neurogastroenterology and motility*. 2009; 21: 528-533, e528-529.
- Anton SD, Moehl K, Donahoo WT, Marosi K, Lee SA, Mainous AG, 3rd , ve ark. Flipping the metabolic switch: Understanding and applying the health benefits of fasting. *Obesity (Silver Spring)*. 2018; 26: 254-268.
- Ao Y, Go VL, Toy N, Li T, Wang Y, Song MK , ve ark. Brainstem thyrotropin-releasing hormone regulates food intake through vagal-dependent cholinergic stimulation of ghrelin secretion. *Endocrinology*. 2006; 147: 6004-6010.
- Ariga H, Imai K, Chen C, Mantyh C, Pappas TN, Takahashi T. Fixed feeding potentiates interdigestive gastric motor activity in rats: Importance of eating habits for maintaining interdigestive mmc. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2008a; 294: G655-G659.
- Ariga H, Imai K, Chen C, Mantyh C, Pappas TN, Takahashi T. Fixed feeding potentiates interdigestive gastric motor activity in rats: Importance of eating habits for maintaining interdigestive mmc. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. 2008b; 294: G655-659.

- Ariga H, Tsukamoto K, Chen C, Mantyh C, Pappas TN, Takahashi T. Endogenous acyl ghrelin is involved in mediating spontaneous phase iii-like contractions of the rat stomach. *Neurogastroenterology and motility*. 2007; 19: 675-680.
- Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001; 86: 4753-4758.
- 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006; 26: 11052-11060.
- Asakawa A, Inui A, Kaga T, Katsuura G, Fujimiya M, Fujino MA, et al. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut*. 2003; 52: 947-952.
- Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, et al. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology*. 2001; 120: 337-345.
- Assanand S, Pinel JPJ, Lehman DR. Personal theories of hunger and eating¹. *Journal of Applied Social Psychology*. 2006; 28: 998-1015.
- Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonisconi S, Fubini A, et al. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through erk1/2 and pi 3-kinase/akt. *The Journal of cell biology*. 2002; 159: 1029-1037.
- Balleine BW. Neural bases of food-seeking: Affect, arousal and reward in corticostriatolimbic circuits. *Physiology & behavior*. 2005; 86: 717-730.
- Banks WA, Tschop M, Robinson SM, Heiman ML. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2002; 302: 822-827.
- Begg DP, Woods SC. The endocrinology of food intake. *Nature reviews. Endocrinology*. 2013; 9: 584-597.
- Bilman E, van Kleef E, van Trijp H. External cues challenging the internal appetite control system-overview and practical implications. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2017; 57: 2825-2834.
- Blancas A, Gonzalez-Garcia SD, Rodriguez K, Escobar C. Progressive anticipation in behavior and brain activation of rats exposed to scheduled daily palatable food. *Neuroscience*. 2014; 281: 44-53.
- Blasio A, Steardo L, Sabino V, Cottone P. Opioid system in the medial prefrontal cortex mediates binge-like eating. *Addiction biology*. 2014; 19: 652-662.
- Blatnik M, Soderstrom CI, Dysinger M, Fraser SA. Prandial ghrelin attenuation provides evidence that des-acyl ghrelin may be an artifact of sample handling in human plasma. *Bioanalysis*. 2012; 4: 2447-2455.
- Bowers CY, Momany F, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Chang K. Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology*. 1980; 106: 663-667.
- Bowers CY, Momany FA, Reynolds GA, Hong A. On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology*. 1984; 114: 1537-1545.
- Bray GA. Afferent signals regulating food intake. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2000; 59: 373-384.

- Brennan IM, Otto B, Feltrin KL, Meyer JH, Horowitz M, Feinle-Bisset C. Intravenous cck-8, but not glp-1, suppresses ghrelin and stimulates ppy release in healthy men. *Peptides*. 2007; 28: 607-611.
- Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M , ve ark. Ghrelin, a natural gh secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001; 86: 5083-5086.
- Broglio F, Gottero C, Benso A, Prodam F, Destefanis S, Gauna C , ve ark. Effects of ghrelin on the insulin and glycemic responses to glucose, arginine, or free fatty acids load in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003; 88: 4268-4272.
- Broglio F, Gottero C, Prodam F, Gauna C, Muccioli G, Papotti M , ve ark. Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004a; 89: 3062-3065.
- Broglio F, Gottero C, Van Koetsveld P, Prodam F, Destefanis S, Benso A , ve ark. Acetylcholine regulates ghrelin secretion in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004b; 89: 2429-2433.
- Cannon WB, Washburn AL. An explanation of hunger. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 1912; 29: 441-454.
- Castaneda TR, Tong J, Datta R, Culler M, Tschop MH. Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2010; 31: 44-60.
- Chan CB, Cheng CH. Identification and functional characterization of two alternatively spliced growth hormone secretagogue receptor transcripts from the pituitary of black seabream *acanthopagrus schlegeli*. *Molecular and cellular endocrinology*. 2004; 214: 81-95.
- Chen CY, Inui A, Asakawa A, Fujino K, Kato I, Chen CC , ve ark. Des-acyl ghrelin acts by crf type 2 receptors to disrupt fasted stomach motility in conscious rats. *Gastroenterology*. 2005; 129: 8-25.
- Cheng K, Chan WW, Butler B, Barreto A, Jr., Smith RG. Evidence for a role of protein kinase-c in his-d-trp-ala-trp-d-phe-lys-nh2-induced growth hormone release from rat primary pituitary cells. *Endocrinology*. 1991; 129: 3337-3342.
- Choi DL, Davis JF, Fitzgerald ME, Benoit SC. The role of orexin-a in food motivation, reward-based feeding behavior and food-induced neuronal activation in rats. *Neuroscience*. 2010; 167: 11-20.
- Coiro V, Volpi R, Stella A, Cataldo S, Chiodera P. Oxytocin does not modify gh, acth, cortisol and prolactin responses to ghrelin in normal men. *Neuropeptides*. 2011; 45: 139-142.
- Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL , ve ark. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the cns demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*. 2003; 37: 649-661.
- Crowley WR, Ramoz G, Keefe KA, Torto R, Kalra SP, Hanson GR. Differential effects of methamphetamine on expression of neuropeptide y mrna in hypothalamus and on serum leptin and ghrelin concentrations in ad libitum-fed and schedule-fed rats. *Neuroscience*. 2005; 132: 167-173.
- Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*. 2001; 50: 1714-1719.
- Cummings DE, Shannon MH. Roles for ghrelin in the regulation of appetite and body weight. *Arch Surg*. 2003; 138: 389-396.

- Dass NB, Munonyara M, Bassil AK, Hervieu GJ, Osbourne S, Corcoran S, ve ark. Growth hormone secretagogue receptors in rat and human gastrointestinal tract and the effects of ghrelin. *Neuroscience*. 2003; 120: 443-453.
- Date Y. Ghrelin and the vagus nerve. *Methods in enzymology*. 2012; 514: 261-269.
- Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T , ve ark. 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.
- Davidson TL, Chan K, Jarrard LE, Kanoski SE, Clegg DJ, Benoit SC. Contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex to energy and body weight regulation. *Hippocampus*. 2009; 19: 235-252.
- Davidson TL, Jarrard LE. A role for hippocampus in the utilization of hunger signals. *Behavioral and neural biology*. 1993; 59: 167-171.
- Davis JF, Choi DL, Clegg DJ, Benoit SC. Signaling through the ghrelin receptor modulates hippocampal function and meal anticipation in mice. *Physiology & behavior*. 2011; 103: 39-43.
- de la Cour CD, Norlen P, Hakanson R. Secretion of ghrelin from rat stomach ghrelin cells in response to local microinfusion of candidate messenger compounds: A microdialysis study. *Regulatory peptides*. 2007; 143: 118-126.
- De Smet B, Mitselos A, Depoortere I. Motilin and ghrelin as prokinetic drug targets. *Pharmacology & therapeutics*. 2009; 123: 207-223.
- De Vriese C, Gregoire F, Lema-Kisoka R, Waelbroeck M, Robberecht P, Delporte C. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: Identification of the cleavage sites. *Endocrinology*. 2004; 145: 4997-5005.
- Deloose E, Vos R, Corsetti M, Depoortere I, Tack J. Endogenous motilin, but not ghrelin plasma levels fluctuate in accordance with gastric phase iii activity of the migrating motor complex in man. *Neurogastroenterology and motility*. 2015; 27: 63-71.
- Delporte C. Structure and physiological actions of ghrelin. *Scientifica*. 2013; 2013: 518909.
- Demange L, Boeglin D, Moulin A, Mousseaux D, Ryan J, Berge G , ve ark. Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo evaluations of novel triazole derivatives as ligands of the ghrelin receptor. 1. *Journal of medicinal chemistry*. 2007; 50: 1939-1957.
- Diano S, Farr SA, Benoit SC, McNay EC, da Silva I, Horvath B , ve ark. Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nature neuroscience*. 2006; 9: 381-388.
- Dickson SL, Egecioglu E, Landgren S, Skibicka KP, Engel JA, Jerlhag E. The role of the central ghrelin system in reward from food and chemical drugs. *Molecular and cellular endocrinology*. 2011; 340: 80-87.
- Dickson SL, Luckman SM. Induction of c-fos messenger ribonucleic acid in neuropeptide y and growth hormone (gh)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the gh secretagogue, gh-releasing peptide-6. *Endocrinology*. 1997; 138: 771-777.
- Dixit VD, Yang H, Sun Y, Weeraratna AT, Youm YH, Smith RG , ve ark. Ghrelin promotes thymopoiesis during aging. *The Journal of clinical investigation*. 2007; 117: 2778-2790.
- Drazen DL, Vahl TP, D'Alessio DA, Seeley RJ, Woods SC. Effects of a fixed meal pattern on ghrelin secretion: Evidence for a learned response independent of nutrient status. *Endocrinology*. 2006; 147: 23-30.
- Edholm T, Levin F, Hellstrom PM, Schmidt PT. Ghrelin stimulates motility in the small intestine of rats through intrinsic cholinergic neurons. *Regul Pept*. 2004; 121: 25-30.

- Egido EM, Rodriguez-Gallardo J, Silvestre RA, Marco J. Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion. *European journal of endocrinology*. 2002; 146: 241-244.
- Els S, Beck-Sickinger AG, Chollet C. Ghrelin receptor: High constitutive activity and methods for developing inverse agonists. *Methods in enzymology*. 2010; 485: 103-121.
- Fairhall KM, Mynett A, Robinson IC. Central effects of growth hormone-releasing hexapeptide (ghrp-6) on growth hormone release are inhibited by central somatostatin action. *The Journal of endocrinology*. 1995; 144: 555-560.
- Filigheddu N, Gnocchi VF, Coscia M, Cappelli M, Porporato PE, Taulli R , ve ark. Ghrelin and des-acyl ghrelin promote differentiation and fusion of c2c12 skeletal muscle cells. *Molecular biology of the cell*. 2007; 18: 986-994.
- Fletcher TP, Thomas GB, Willoughby JO, Clarke IJ. Constitutive growth hormone secretion in sheep after hypothalamopituitary disconnection and the direct in vivo pituitary effect of growth hormone releasing peptide 6. *Neuroendocrinology*. 1994; 60: 76-86.
- Frecka JM, Mattes RD. Possible entrainment of ghrelin to habitual meal patterns in humans. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. 2008; 294: G699-707.
- Fujino K, Inui A, Asakawa A, Kihara N, Fujimura M, Fujimiya M. Ghrelin induces fasted motor activity of the gastrointestinal tract in conscious fed rats. *The Journal of physiology*. 2003; 550: 227-240.
- Fukuda H, Mizuta Y, Isomoto H, Takeshima F, Ohnita K, Ohba K , ve ark. Ghrelin enhances gastric motility through direct stimulation of intrinsic neural pathways and capsaicin-sensitive afferent neurones in rats. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2004; 39: 1209-1214.
- Fukushima N, Hanada R, Teranishi H, Fukue Y, Tachibana T, Ishikawa H , ve ark. Ghrelin directly regulates bone formation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2005; 20: 790-798.
- Gagnon J, Anini Y. Glucagon stimulates ghrelin secretion through the activation of mapk and epac and potentiates the effect of norepinephrine. *Endocrinology*. 2013; 154: 666-674.
- Gauna C, van de Zande B, van Kerkwijk A, Themmen AP, van der Lely AJ, Delhanty PJ. Unacylated ghrelin is not a functional antagonist but a full agonist of the type 1a growth hormone secretagogue receptor (ghs-r). *Molecular and cellular endocrinology*. 2007; 274: 30-34.
- Ge X, Yang H, Bednarek MA, Galon-Tilleman H, Chen P, Chen M , ve ark. Leap2 is an endogenous antagonist of the ghrelin receptor. *Cell metabolism*. 2018; 27: 461-469 e466.
- Gearhardt AN, White MA, Masheb RM, Morgan PT, Crosby RD, Grilo CM. An examination of the food addiction construct in obese patients with binge eating disorder. *The International journal of eating disorders*. 2012; 45: 657-663.
- Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P , ve ark. The tissue distribution of the mrna of ghrelin and subtypes of its receptor, ghs-r, in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002; 87: 2988-2991.
- Gong Y, Liu Y, Guo Y, Su M, Zhong Y, Xu L , ve ark. Ghrelin projection from the lateral hypothalamus area to the dorsal vagal complex and its regulation of gastric motility in cisplatin-treated rats. *Neuropeptides*. 2017; 66: 69-80.
- Gormally J, Black S, Daston S, Rardin D. The assessment of binge eating severity among obese persons. *Addictive behaviors*. 1982; 7: 47-55.
- Greenwood-Van Meerveld B, Kriegsman M, Nelson R. Ghrelin as a target for gastrointestinal motility disorders. *Peptides*. 2011; 32: 2352-2356.

- Grill HJ, Skibicka KP, Hayes MR. Imaging obesity: Fmri, food reward, and feeding. *Cell metabolism*. 2007; 6: 423-425.
- Gross JD, Zhou Y, Barak LS, Caron MG. Ghrelin receptor signaling in health and disease: A biased view. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2023; 34: 106-118.
- Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z , ve ark. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008; 105: 6320-6325.
- Hagemann D, Holst JJ, Gethmann A, Banasch M, Schmidt WE, Meier JJ. Glucagon-like peptide 1 (glp-1) suppresses ghrelin levels in humans via increased insulin secretion. *Regulatory peptides*. 2007; 143: 64-68.
- Halem HA, Taylor JE, Dong JZ, Shen Y, Datta R, Abizaid A , ve ark. A novel growth hormone secretagogue-1a receptor antagonist that blocks ghrelin-induced growth hormone secretion but induces increased body weight gain. *Neuroendocrinology*. 2005; 81: 339-349.
- Hara Y, Yamaguchi K, Onimaru K, Kadota M, Koyanagi M, Keeley SD , ve ark. Shark genomes provide insights into elasmobranch evolution and the origin of vertebrates. *Nature ecology & evolution*. 2018; 2: 1761-1771.
- Hassouna R, Zizzari P, Tolle V. The ghrelin/obestatin balance in the physiological and pathological control of growth hormone secretion, body composition and food intake. *Journal of neuroendocrinology*. 2010; 22: 793-804.
- He J, Irwin DM, Chen R, Zhang YP. Stepwise loss of motilin and its specific receptor genes in rodents. *Journal of molecular endocrinology*. 2010; 44: 37-44.
- Heppner KM, Piechowski CL, Muller A, Ottaway N, Sisley S, Smiley DL , ve ark. Both acyl and des-acyl ghrelin regulate adiposity and glucose metabolism via central nervous system ghrelin receptors. *Diabetes*. 2014; 63: 122-131.
- Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, Ankersen M, Schwartz TW. High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Mol Endocrinol*. 2003; 17: 2201-2210.
- Hosoda H, Kangawa K. The autonomic nervous system regulates gastric ghrelin secretion in rats. *Regulatory peptides*. 2008; 146: 12-18.
- Hou Z, Miao Y, Gao L, Pan H, Zhu S. Ghrelin-containing neuron in cerebral cortex and hypothalamus linked with the dvc of brainstem in rat. *Regulatory peptides*. 2006; 134: 126-131.
- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI , ve ark. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*. 1996; 273: 974-977.
- Hsu TM, Hahn JD, Konanur VR, Noble EE, Suarez AN, Thai J , ve ark. Hippocampus ghrelin signaling mediates appetite through lateral hypothalamic orexin pathways. *eLife*. 2015; 4.
- Hutchison AT, Regmi P, Manoogian ENC, Fleischer JG, Wittert GA, Panda S , ve ark. Time-restricted feeding improves glucose tolerance in men at risk for type 2 diabetes: A randomized crossover trial. *Obesity (Silver Spring)*. 2019; 27: 724-732.
- Inui A, Asakawa A, Bowers CY, Mantovani G, Laviano A, Meguid MM , ve ark. Ghrelin, appetite, and gastric motility: The emerging role of the stomach as an endocrine organ. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004; 18: 439-456.
- Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Yamada G, Hosoda K, Nakao K , ve ark. Oxytocin and dopamine stimulate ghrelin secretion by the ghrelin-producing cell line, mgn3-1 in vitro. *Endocrinology*. 2011; 152: 2619-2625.

- Janssen S, Laermans J, Verhulst PJ, Thijs T, Tack J, Depoortere I. Bitter taste receptors and alpha-gustducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108: 2094-2099.
- Jeon TY, Lee S, Kim HH, Kim YJ, Son HC, Kim DH , ve ark. Changes in plasma ghrelin concentration immediately after gastrectomy in patients with early gastric cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004; 89: 5392-5396.
- Johnson AW. Eating beyond metabolic need: How environmental cues influence feeding behavior. *Trends in neurosciences*. 2013; 36: 101-109.
- Kanoski SE, Fortin SM, Ricks KM, Grill HJ. Ghrelin signaling in the ventral hippocampus stimulates learned and motivational aspects of feeding via pi3k-akt signaling. *Biological psychiatry*. 2013; 73: 915-923.
- Kemps E, Tiggemann M. Modality-specific imagery reduces cravings for food: An application of the elaborated intrusion theory of desire to food craving. *Journal of experimental psychology. Applied*. 2007; 13: 95-104.
- Khatib N, Gaidhane S, Gaidhane AM, Khatib M, Simkhada P, Gode D , ve ark. Ghrelin: Ghrelin as a regulatory peptide in growth hormone secretion. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2014; 8: MC13-17.
- Kirchner H, Gutierrez JA, Solenberg PJ, Pfluger PT, Czyzyk TA, Willency JA , ve ark. Goat links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nature medicine*. 2009; 15: 741-745.
- Kissileff HR, Van Itallie TB. Physiology of the control of food intake. *Annual review of nutrition*. 1982; 2: 371-418.
- Kitazawa T, De Smet B, Verbeke K, Depoortere I, Peeters TL. Gastric motor effects of peptide and non-peptide ghrelin agonists in mice in vivo and in vitro. *Gut*. 2005; 54: 1078-1084.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999a; 402: 656-660.
- Kojima M, Hosoda H, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999b; 402: 656-660.
- Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: Structure and function. *Physiological reviews*. 2005; 85: 495-522.
- Kola B, Farkas I, Christ-Crain M, Wittmann G, Lolli F, Amin F , ve ark. The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PloS one*. 2008; 3: e1797.
- Konturek PC, Brzozowski T, Pajdo R, Nikiforuk A, Kwiecien S, Harsch I , ve ark. Ghrelin-a new gastroprotective factor in gastric mucosa. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2004; 55: 325-336.
- Koutkia P, Canavan B, Breu J, Johnson ML, Grinspoon SK. Nocturnal ghrelin pulsatility and response to growth hormone secretagogues in healthy men. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2004; 287: E506-512.
- Laermans J, Vancleef L, Tack J, Depoortere I. Role of the clock gene *bmal1* and the gastric ghrelin-secreting cell in the circadian regulation of the ghrelin-goat system. *Scientific reports*. 2015; 5: 16748.
- Lambert E, Lambert G, Ika-Sari C, Dawood T, Lee K, Chopra R , ve ark. Ghrelin modulates sympathetic nervous system activity and stress response in lean and overweight men. *Hypertension*. 2011; 58: 43-50.
- Leal-Cerro A, Garcia E, Astorga R, Casanueva FF, Dieguez C. Growth hormone (gh) responses to the combined administration of gh-releasing hormone plus gh-releasing peptide 6 in adults with gh deficiency. *European journal of endocrinology*. 1995; 132: 712-715.

- Lee JH, Verma N, Thakkar N, Yeung C, Sung H-K. Intermittent fasting: Physiological implications on outcomes in mice and men. *Physiology*. 2020; 35: 185-195.
- Levin F, Edholm T, Schmidt PT, Gryback P, Jacobsson H, Degerblad M , ve ark. Ghrelin stimulates gastric emptying and hunger in normal-weight humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006; 91: 3296-3302.
- Li E, Chung H, Kim Y, Kim DH, Ryu JH, Sato T , ve ark. Ghrelin directly stimulates adult hippocampal neurogenesis: Implications for learning and memory. *Endocrine journal*. 2013; 60: 781-789.
- Li HZ, Shou LL, Shao XX, Liu YL, Xu ZG, Guo ZY. Identifying key residues and key interactions for the binding of leap2 to receptor ghr1a. *The Biochemical journal*. 2020; 477: 3199-3217.
- Li L, Zhang LK, Pang YZ, Pan CS, Qi YF, Chen L , ve ark. Cardioprotective effects of ghrelin and des-octanoyl ghrelin on myocardial injury induced by isoproterenol in rats. *Acta pharmacologica Sinica*. 2006; 27: 527-535.
- Liu CM, Kanoski SE. Homeostatic and non-homeostatic controls of feeding behavior: Distinct vs. Common neural systems. *Physiology & behavior*. 2018; 193: 223-231.
- Lowe MR, Butryn ML. Hedonic hunger: A new dimension of appetite? *Physiology & behavior*. 2007; 91: 432-439.
- Lutter M, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Anderson JG, Jung S , ve ark. The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nature neuroscience*. 2008; 11: 752-753.
- M'Kadmi C, Cabral A, Barrile F, Giribaldi J, Cantel S, Damian M , ve ark. N-terminal liver-expressed antimicrobial peptide 2 (leap2) region exhibits inverse agonist activity toward the ghrelin receptor. *Journal of medicinal chemistry*. 2019; 62: 965-973.
- Malik S, McGlone F, Bedrossian D, Dagher A. Ghrelin modulates brain activity in areas that control appetitive behavior. *Cell metabolism*. 2008; 7: 400-409.
- Matsubara M, Sakata I, Wada R, Yamazaki M, Inoue K, Sakai T. Estrogen modulates ghrelin expression in the female rat stomach. *Peptides*. 2004; 25: 289-297.
- Mayer J. Glucostatic mechanism of regulation of food intake. *The New England journal of medicine*. 1953; 249: 13-16.
- Mena JD, Selleck RA, Baldo BA. Mu-opioid stimulation in rat prefrontal cortex engages hypothalamic orexin/hypocretin-containing neurons, and reveals dissociable roles of nucleus accumbens and hypothalamus in cortically driven feeding. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013; 33: 18540-18552.
- Merkestein M, Brans MA, Luijendijk MC, de Jong JW, Egcioglu E, Dickson SL , ve ark. Ghrelin mediates anticipation to a palatable meal in rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2012; 20: 963-971.
- Mihalache L, Gherasim A, Nita O, Ungureanu MC, Padureanu SS, Gavril RS , ve ark. Effects of ghrelin in energy balance and body weight homeostasis. *Hormones (Athens)*. 2016; 15: 186-196.
- Mishra A, Sobha D, Patel D, Suresh PS. Intermittent fasting in health and disease. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2023: 1-13.
- Misra M, Miller KK, Kuo K, Griffin K, Stewart V, Hunter E , ve ark. Secretory dynamics of ghrelin in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy adolescents. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2005; 289: E347-356.
- Mizutani M, Atsuchi K, Asakawa A, Matsuda N, Fujimura M, Inui A , ve ark. Localization of acyl ghrelin- and des-acyl ghrelin-immunoreactive cells in the rat stomach and their

- responses to intragastric ph. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology. 2009; 297: G974-980.
- Momany FA, Bowers CY, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Newlander K. Design, synthesis, and biological activity of peptides which release growth hormone in vitro. Endocrinology. 1981; 108: 31-39.
- Mondal MS, Date Y, Yamaguchi H, Toshinai K, Tsuruta T, Kangawa K , ve ark. Identification of ghrelin and its receptor in neurons of the rat arcuate nucleus. Regulatory peptides. 2005; 126: 55-59.
- Moon M, Kim HG, Hwang L, Seo JH, Kim S, Hwang S , ve ark. Neuroprotective effect of ghrelin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of parkinson's disease by blocking microglial activation. Neurotoxicity research. 2009; 15: 332-347.
- Moran TH. Gut peptides in the control of food intake: 30 years of ideas. Physiology & behavior. 2004; 82: 175-180.
- Moulin A, Demange L, Berge G, Gagne D, Ryan J, Mousseaux D , ve ark. Toward potent ghrelin receptor ligands based on trisubstituted 1,2,4-triazole structure. 2. Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo evaluations. Journal of medicinal chemistry. 2007; 50: 5790-5806.
- Muller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J , ve ark. Ghrelin. Molecular metabolism. 2015; 4: 437-460.
- Mundinger TO, Cummings DE, Taborsky GJ, Jr. Direct stimulation of ghrelin secretion by sympathetic nerves. Endocrinology. 2006; 147: 2893-2901.
- Murray CD, Kamm MA, Bloom SR, Emmanuel AV. Ghrelin for the gastroenterologist: History and potential. Gastroenterology. 2003; 125: 1492-1502.
- Naitou K, Shiina T, Sugita R, Nakamori H, Shimizu Y. Characterization of ghrelin-sensitive neurons in the lumbosacral defecation center in rats. Neurogastroenterology and motility. 2015; 27: 147-155.
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K , ve ark. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. Nature. 2001; 409: 194-198.
- Nass R, Farhy LS, Liu J, Prudom CE, Johnson ML, Veldhuis P , ve ark. Evidence for acyl-ghrelin modulation of growth hormone release in the fed state. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2008; 93: 1988-1994.
- Nunez-Salces M, Li H, Feinle-Bisset C, Young RL, Page AJ. The regulation of gastric ghrelin secretion. Acta Physiol (Oxf). 2021; 231: e13588.
- Pantel J, Legendre M, Cabrol S, Hilal L, Hajaji Y, Morisset S , ve ark. Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. The Journal of clinical investigation. 2006; 116: 760-768.
- Paoli A, Tinsley G, Bianco A, Moro T. The influence of meal frequency and timing on health in humans: The role of fasting. Nutrients. 2019; 11.
- Papies EK, Barsalou LW, Rusz D. Understanding desire for food and drink: A grounded-cognition approach. Current Directions in Psychological Science. 2020; 29: 193-198.
- Peeters TL. Ghrelin: A new player in the control of gastrointestinal functions. Gut. 2005; 54: 1638-1649.
- Pelchat ML, Johnson A, Chan R, Valdez J, Ragland JD. Images of desire: Food-craving activation during fmri. NeuroImage. 2004; 23: 1486-1493.
- Perez-Tilve D, Gonzalez-Matias L, Alvarez-Crespo M, Leiras R, Tovar S, Dieguez C , ve ark. Exendin-4 potently decreases ghrelin levels in fasting rats. Diabetes. 2007; 56: 143-151.
- Petrovich GD. Forebrain circuits and control of feeding by learned cues. Neurobiology of learning and memory. 2011; 95: 152-158.

- Petrovich GD, Holland PC, Gallagher M. Amygdalar and prefrontal pathways to the lateral hypothalamus are activated by a learned cue that stimulates eating. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005; 25: 8295-8302.
- Picha ME, Strom CN, Riley LG, Walker AA, Won ET, Johnstone WM , ve ark. Plasma ghrelin and growth hormone regulation in response to metabolic state in hybrid striped bass: Effects of feeding, ghrelin and insulin-like growth factor-i on in vivo and in vitro gh secretion. *General and comparative endocrinology*. 2009; 161: 365-372.
- Popovic V, Miljic D, Micic D, Damjanovic S, Arvat E, Ghigo E , ve ark. Ghrelin main action on the regulation of growth hormone release is exerted at hypothalamic level. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003; 88: 3450-3453.
- Porporato PE, Filigheddu N, Reano S, Ferrara M, Angelino E, Gnocchi VF , ve ark. Acylated and unacylated ghrelin impair skeletal muscle atrophy in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2013; 123: 611-622.
- Poulin AM, Timofeeva E. The dynamics of neuronal activation during food anticipation and feeding in the brain of food-entrained rats. *Brain research*. 2008; 1227: 128-141.
- Ravussin E, Beyl RA, Poggiogalle E, Hsia DS, Peterson CM. Early time-restricted feeding reduces appetite and increases fat oxidation but does not affect energy expenditure in humans. *Obesity (Silver Spring)*. 2019; 27: 1244-1254.
- Rogers PJ, Brunstrom JM. Appetite and energy balancing. *Physiology & behavior*. 2016; 164: 465-471.
- Saad MF, Bernaba B, Hwu CM, Jinagouda S, Fahmi S, Kogosov E , ve ark. Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002; 87: 3997-4000.
- Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K , ve ark. Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides*. 2002; 23: 531-536.
- Sallam HS, Chen JD. The prokinetic face of ghrelin. *International journal of peptides*. 2010; 2010.
- Sato T, Fukue Y, Teranishi H, Yoshida Y, Kojima M. Molecular forms of hypothalamic ghrelin and its regulation by fasting and 2-deoxy-d-glucose administration. *Endocrinology*. 2005; 146: 2510-2516.
- Schulte EM, Avena NM, Gearhardt AN. Which foods may be addictive? The roles of processing, fat content, and glycemic load. *PloS one*. 2015; 10: e0117959.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000; 404: 661-671.
- Senin LL, Al-Massadi O, Folgueira C, Castela C, Pardo M, Barja-Fernandez S , ve ark. The gastric cb1 receptor modulates ghrelin production through the mtor pathway to regulate food intake. *PloS one*. 2013; 8: e80339.
- Shafton AD, Sanger GJ, Witherington J, Brown JD, Muir A, Butler S , ve ark. Oral administration of a centrally acting ghrelin receptor agonist to conscious rats triggers defecation. *Neurogastroenterology and motility*. 2009; 21: 71-77.
- Shimada M, Date Y, Mondal MS, Toshinai K, Shimbara T, Fukunaga K , ve ark. Somatostatin suppresses ghrelin secretion from the rat stomach. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003; 302: 520-525.
- Shimizu Y, Chang EC, Shafton AD, Ferens DM, Sanger GJ, Witherington J , ve ark. Evidence that stimulation of ghrelin receptors in the spinal cord initiates propulsive activity in the colon of the rat. *The Journal of physiology*. 2006; 576: 329-338.
- Siep N, Roefs A, Roebroek A, Havermans R, Bonte ML, Jansen A. Hunger is the best spice: An fmri study of the effects of attention, hunger and calorie content on food reward

- processing in the amygdala and orbitofrontal cortex. *Behavioural brain research*. 2009; 198: 149-158.
- Silver R, Balsam PD, Butler MP, LeSauter J. Food anticipation depends on oscillators and memories in both body and brain. *Physiology & behavior*. 2011; 104: 562-571.
- Sirohi S, Van Cleef A, Davis JF. Patterned feeding induces neuroendocrine, behavioral and genetic changes that promote palatable food intake. *Int J Obes (Lond)*. 2017; 41: 412-419.
- Skibicka KP, Shirazi RH, Hansson C, Dickson SL. Ghrelin interacts with neuropeptide γ γ 1 and opioid receptors to increase food reward. *Endocrinology*. 2012; 153: 1194-1205.
- Skibicka KP, Shirazi RH, Rabasa-Papio C, Alvarez-Crespo M, Neuber C, Vogel H, ve ark. Divergent circuitry underlying food reward and intake effects of ghrelin: Dopaminergic vta-accumbens projection mediates ghrelin's effect on food reward but not food intake. *Neuropharmacology*. 2013; 73: 274-283.
- Smith RG, Jiang H, Sun Y. Developments in ghrelin biology and potential clinical relevance. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2005; 16: 436-442.
- Spencer SJ, Xu L, Clarke MA, Lemus M, Reichenbach A, Geenen B, ve ark. Ghrelin regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and restricts anxiety after acute stress. *Biological psychiatry*. 2012; 72: 457-465.
- Spiegel K, Tasali E, Leproult R, Scherberg N, Van Cauter E. Twenty-four-hour profiles of acylated and total ghrelin: Relationship with glucose levels and impact of time of day and sleep. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011; 96: 486-493.
- Stevenson RJ. The psychological basis of hunger and its dysfunctions. *Nutrition reviews*. 2024; 82: 1444-1454.
- Stevenson RJ, Yeomans MR, Francis HM. Human hunger as a memory process. *Psychological review*. 2024; 131: 174-193.
- Stice E, Spoor S, Bohon C, Veldhuizen MG, Small DM. Relation of reward from food intake and anticipated food intake to obesity: A functional magnetic resonance imaging study. *Journal of abnormal psychology*. 2008; 117: 924-935.
- Sugino T, Yamaura J, Yamagishi M, Kurose Y, Kojima M, Kangawa K, ve ark. Involvement of cholinergic neurons in the regulation of the ghrelin secretory response to feeding in sheep. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003; 304: 308-312.
- Sun Y, Ahmed S, Smith RG. Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Molecular and cellular biology*. 2003; 23: 7973-7981.
- Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG. Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101: 4679-4684.
- Sutton EF, Beyl R, Early KS, Cefalu WT, Ravussin E, Peterson CM. Early time-restricted feeding improves insulin sensitivity, blood pressure, and oxidative stress even without weight loss in men with prediabetes. *Cell metabolism*. 2018; 27: 1212-1221 e1213.
- Swartz EM, Browning KN, Travagli RA, Holmes GM. Ghrelin increases vagally mediated gastric activity by central sites of action. *Neurogastroenterol Motil*. 2014; 26: 272-282.
- Szentirmai E, Kapas L, Sun Y, Smith RG, Krueger JM. Spontaneous sleep and homeostatic sleep regulation in ghrelin knockout mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007; 293: R510-517.
- Tack J, Depoortere I, Bisschops R, Delpoort C, Coulie B, Meulemans A, ve ark. Influence of ghrelin on interdigestive gastrointestinal motility in humans. *Gut*. 2006; 55: 327-333.
- Thompson NM, Gill DA, Davies R, Loveridge N, Houston PA, Robinson IC, ve ark. Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*. 2004; 145: 234-242.

- Tiggemann M, Kemps E. The phenomenology of food cravings: The role of mental imagery. *Appetite*. 2005; 45: 305-313.
- Tomasetto C, Karam SM, Ribieras S, Masson R, Lefebvre O, Staub A , ve ark. Identification and characterization of a novel gastric peptide hormone: The motilin-related peptide. *Gastroenterology*. 2000; 119: 395-405.
- Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Kojima M , ve ark. Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001; 281: 1220-1225.
- Toshinai K, Yamaguchi H, Sun Y, Smith RG, Yamanaka A, Sakurai T , ve ark. Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*. 2006; 147: 2306-2314.
- Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. 2000; 407: 908-913.
- Tu-Sekine B, Kim SF. The inositol phosphate system-a coordinator of metabolic adaptability. *International journal of molecular sciences*. 2022; 23.
- Tulving E. Episodic memory: From mind to brain. *Annual review of psychology*. 2002; 53: 1-25.
- van der Laan LN, de Ridder DT, Viergever MA, Smeets PA. The first taste is always with the eyes: A meta-analysis on the neural correlates of processing visual food cues. *NeuroImage*. 2011; 55: 296-303.
- van der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocrine reviews*. 2004; 25: 426-457.
- Wang JH, Li HZ, Shao XX, Nie WH, Liu YL, Xu ZG , ve ark. Identifying the binding mechanism of leap2 to receptor ghsr1a. *The FEBS journal*. 2019; 286: 1332-1345.
- Williams DL, Cummings DE, Grill HJ, Kaplan JM. Meal-related ghrelin suppression requires postgastric feedback. *Endocrinology*. 2003a; 144: 2765-2767.
- Williams DL, Grill HJ, Cummings DE, Kaplan JM. Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin. *Endocrinology*. 2003b; 144: 5184-5187.
- Woods SC. The eating paradox: How we tolerate food. *Psychological review*. 1991; 98: 488-505.
- Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG , ve ark. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001; 86: 5992.
- Yang CG, Qiu WC, Wang ZG, Yu S, Yan J, Zheng Q. Down-regulation of ghrelin receptors in the small intestine delays small intestinal transit in vagotomized rats. *Mol Med Rep*. 2011; 4: 1061-1065.
- Yang CG, Wang WG, Yan J, Fei J, Wang ZG, Zheng Q. Gastric motility in ghrelin receptor knockout mice. *Mol Med Rep*. 2013; 7: 83-88.
- Yin X, Li Y, Xu G, An W, Zhang W. Ghrelin fluctuation, what determines its production? *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2009; 41: 188-197.
- Yin Y, Li Y, Zhang W. The growth hormone secretagogue receptor: Its intracellular signaling and regulation. *International journal of molecular sciences*. 2014; 15: 4837-4855.
- Yu SB, Pekkurnaz G. Mechanisms orchestrating mitochondrial dynamics for energy homeostasis. *Journal of molecular biology*. 2018; 430: 3922-3941.
- Yu YH, Vasselli JR, Zhang Y, Mechanick JI, Korner J, Peterli R. Metabolic vs. Hedonic obesity: A conceptual distinction and its clinical implications. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2015; 16: 234-247.

- Zahid SA, Tated R, Mathew M, Rajkumar D, Karnik SB, Pramod Roy A , ve ark. Diabetic gastroparesis and its emerging therapeutic options: A narrative review of the literature. *Cureus*. 2023; 15: e44870.
- Zbucki RL, Sawicki B, Hryniewicz A, Winnicka MM. Cannabinoids enhance gastric x/a-like cells activity. *Folia histochemica et cytobiologica*. 2008; 46: 219-224.
- Zhang G, Yin X, Qi Y, Pendyala L, Chen J, Hou D , ve ark. Ghrelin and cardiovascular diseases. *Current cardiology reviews*. 2010; 6: 62-70.
- Zhang W, Chai B, Li JY, Wang H, Mulholland MW. Effect of des-acyl ghrelin on adiposity and glucose metabolism. *Endocrinology*. 2008; 149: 4710-4716.
- Zhang W, Zhao L, Mulholland MW. Ghrelin stimulates myocyte development. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2007; 20: 659-664.
- Zhao TJ, Sakata I, Li RL, Liang G, Richardson JA, Brown MS , ve ark. Ghrelin secretion stimulated by beta1-adrenergic receptors in cultured ghrelinoma cells and in fasted mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107: 15868-15873.
- Zheng J, Ariga H, Taniguchi H, Ludwig K, Takahashi T. Ghrelin regulates gastric phase iii-like contractions in freely moving conscious mice. *Neurogastroenterology and motility*. 2009; 21: 78-84.
- Zizzari P, Halem H, Taylor J, Dong JZ, Datta R, Culler MD , ve ark. Endogenous ghrelin regulates episodic growth hormone (gh) secretion by amplifying gh pulse amplitude: Evidence from antagonism of the gh secretagogue-r1a receptor. *Endocrinology*. 2005; 146: 3836-3842.
- Zouhal H, Bagheri R, Triki R, Saeidi A, Wong A, Hackney AC , ve ark. Effects of ramadan intermittent fasting on gut hormones and body composition in males with obesity. *International journal of environmental research and public health*. 2020; 17.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Sadettin Mert	Uyruğu	T.C.
Soyadı	Yüksel	Tel no	
Doğum Tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun Olduğu Kurum		
Lise	Kampüs Temel Lisesi	2017
Lisans	Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2022

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Stajyer	Kepez Belediyesi Sağlık Merkezi	2019 (1 Ay)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL	51,25000

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Radyofrekans Alan Uygulamasının Gastrik Motor Fonksiyon Üzerine Etkilerinin Sağlıklı ve Dispeptik Sıçanlarda Araştırılması	TÜBİTAK	2024-2026
Santral Nöropeptit-W Sisteminin Vagal Fonksiyonlara Etkilerinin Bazal ve Kronik Stres Koşullarında Araştırılması	TÜBİTAK	2023-2025
Subtalamik Çekirdek ve Dorsal Vagal Kompleks Arasındaki Nöronal Bağlantının Sağlıklı ve Deneysel Parkinsonizm Oluşturulmuş Koşullarda Araştırılması	TÜSEB	2023-2026

Makaleler ve Bildiriler:

❖ **The Inhibitory Effect of Central Neuropeptide-W on Gastric Motor Functions (Sözlü Bildiri)**

Ebral Çubukcu, İrem Akçalı, S. Mert Yüksel, Mehmet Bülbül Kasım 2022 – Acta Physiologica – DOI: 10.1111/apha.13909
47. Ulusal Fizyoloji Kongresi – Türk Fizyolojik Bilimler Derneği

❖ **The Regulatory Role of Brain Neuropeptide-S in Locomotor Functions (Poster Bildirisi)**

İrem Akçalı, Ebral Çubukcu, S. Mert Yüksel, Mehmet Bülbül, Aysel Ağar Eylül 2022 – Acta Physiologica – DOI: <https://doi.org/10.1111/apha.13877>
Europhysiology 2022 – Kopenhag/Danimarka

❖ **Effect of sex on chronic stress induced alterations in hindbrain catecholaminergic system and autonomic dysfunction resulting in gastrointestinal dysmotility**

Amirali Zaman, Hüseyin Özçelik, Elif Yücel, Simla Su

Akkan, Tanaz Onsinejad, Sadettin Mert Yüksel, Mehmet Bülbül

2024 - Brain Reserch – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2024.149112>

