T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS
TEZİ

DİYABETİK SIÇAN MİDESİNDE GHRELİN VE İNFLAMASYON İLİŞKİSİ

BİLGENUR BİLGE

DANIŞMAN
PROF. DR. SEMA BOLKENT

TIBBİ BİYOLOJİ

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

Bu çalışma 10.11.2020 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JURİSİ

Prof. Dr. Halide Sema Bolkent
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Müjgan Cengiz
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Zeynep Mine Coşkun
İstanbul Demiroğlu Bilim Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

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, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

BİLGE NUR BİLGE

Hayatını bilim için kaybeden bütün canlılara…

TEŞEKKÜR

Akademik hayata adım attığım bu dönemde dolu dolu bir eğitim-öğretim dönemi geçirmeme sebep olan, eleştirileriyle yeni yollar keşfettiğim, desteğini her konuda hissettiğim, sabır ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışmanım Prof. Dr. Sema Bolkent'e

Tez çalışmalarım boyunca pratik çözümleriyle yardımlarını esirgemeyen, her konuda bilgisini paylaşan gelişimimdeki emekleri ve değerli vakti için Doç. Dr. Zeynep Mine Coşkun'a

Eğitimime olan katkılarından dolayı çok kıymetli Anabilim Dalı hocalarıma,

İlk günden beri her konuda desteğini hissettiğim ekip arkadaşı olmanın çok ötesinde her sıkıntımda, heyecanımda yanımda bulduğum ayrıca eğitimime olan katkıları için Bahar Beydoğan'a

Hayatı paylaşmanın yanında akademik paylaşımın da çok kıymetli olduğunu her zaman birbirimize hatırlattığımız, motivasyon ve dostluklarıyla yanımda olan ve sorularıma birlikte cevap aradığımız çok değerli çalışma arkadaşlarım Tugay Çamoğlu, Zuhal Yurttaş, Dilara Kamer Çolak, Ceren Orhan, Asuman Çelebi ve BNHAL üyeleri'ne,

Lisans eğitimimden bu yana bütün yolculuklarımda yanımda olan her anımı tamamlayan canım dostum Gülnihal Bulut'a,

Bugünlere gelmemi sağlayan her konuda arkamda olan, umutsuz olduğumda gücüm, vazgeçtiğimde inancım olan aileme,

En değerli şeyin zaman olduğunu öğrendiğim bu süreçte zamanını benimle paylaşan bu süreci dolu dolu birlikte geçirdiğimiz yollarımızın kesiştiği herkese

Teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 31869

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİİ
TABLOLAR LİSTESİ X
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİİ
ÖZET XV
ABSTRACT ..... XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Mide 4
2.2. Ghrelin 10
2.1.1. Ghrelinin yapısı ve dokularda dağılımı 10
2.1.2. Ghrelin Hormonunun Fonksiyonları 11
2.1.3. Ghrelin ve İnflamasyon İlişkisi 12
2.2. Diabetes Mellitus 13
2.2.1. Tip 1 ve Tip 2 Diyabet 14
2.2.2. Deneysel Diyabet Modelleri 14
2.2.3. Tip 2 Diyabet ve İnflamasyon İlişkisi 16
2.3. İmmünohistokimya (İHK) Yöntemi 19
2.3.1.Streptavidin-Biotin-Peroksidaz Yöntemi 20
2.4. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) 21
2.5. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem 21
2.5.1. Lipid Peroksidasyonu 22
2.5.2. Protein Oksidasyonu 22
2.5.3. Glutatyon (GSH) 22
3. GEREÇ VE YÖNTEM 24

3.1. Deney Modeli 24
3.2. Morfolojik İnceleme 25
3.2.1. Hematoksilen&Eozin 25
3.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) 25
3.3.1. RNA İzolasyonu 26
3.3.2. RNA Saflık ve Miktar Tayini 27
3.3.3. cDNA Sentezi 27
3.4. İMMÜNOHİSTOKİMYA (İHK) YÖNTEMİ 30
3.4.1. Ghrelin antikoru ile İHK 30
3.4.2. NF-κβ antikoru ile İHK 31
3.5. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER 32
3.5.1. Dokuda Protein Miktarının Belirlenmesi 32
3.5.2. Malondialdehit (MDA) Aktivitesi 32
3.5.3. Protein Karbonil (PCO) Tayini 33
3.5.4. Glutatyon (GSH) Tayini 34
3.6.İstatistiksel Analiz 34
3.7. Kullanılan Cihazlar 35
3.8. Kullanılan Kimyasal Maddeler 35
4. BULGULAR 38
4.1. Su ve Yem Tüketim Ölçümleri 38
4.1.1. Günlük tüketilen yem miktarı 38
4.1.2. Günlük tüketilen su miktarı 39
4.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-PZR) Analizleri 39
4.2.1. IL-6 mRNA ekpresyon seviyesi 40
4.2.2. IL-1β mRNA ekspresyon seviyesi 40
4.2.3. TNF-α mRNA ekspresyon seviyesi 42
4.2.4. IL-10 mRNA ekspresyon seviyesi 42
4.3. İmmünohistokimya (İHK) Analizleri 44
4.3.1. Ghrelin İHK analizi 44
4.3.2. NF-Kβ İHK analizi 46
4.4. Biyokimyasal Analizler 49

4.4.1. Malondialdehit Tayini 49
4.4.2. Protein Karbonil (PCO) Tayini 50
4.4.3. GSH Tayini 51
5. TARTIŞMA 52
ÖNERİ VE KISITLAMALAR 57
6. KAYNAKLAR 58
ETİK KURUL KARARI 70
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 71
ÖZGEÇMİŞ 72

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Sitokin çeşitleri (70)..... 17
Tablo 2-2: Önemli sitokinler, reseptörleri ve fonksiyonları (70)..... 18
Tablo 3-1: cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon karışımı 28
Tablo 3-2: cDNA reaksiyonu için bir siklusun süreleri 28
Tablo 3-3: Primer dizileri. İnterlökin-6 (IL-6), interlökin-1 beta (IL-1β), tümör nekroz faktör- α (TNF-α), interlökin-10 (IL-10)..... 29
Tablo 3-4: RT-PZR reaksiyon karışımı..... 29
Tablo 3-5: RT-PZR reaksiyonunda her bir siklusun süreleri..... 30
Tablo 4-1: mRNA ekspresyonlarının istatistiksel değerlendirilmesi..... 43
Tablo 4-2: Ghrelin ve nüklear faktör-kappa β (NF-Kβ) immün pozitif hücre sayısı istatistiksel analizi..... 49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 : Histolojik olarak mide kısımları (23)..... 5
Şekil 2.2: Fundus hücreleri (23) 9
Şekil 4.1: Sıçanların günlük tüketilen yem miktarı (mg) ortalamaları. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak verildi (n=7). 38
Şekil 4.2:Sıçanların günlük su tüketim miktarları değerlendirildiğinde T2DM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış görüldü. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak değerlendirildi (p^a=0,000 kontrol grubuna göre) (n=7)..... 39
Şekil 4.3: Gerçek zamanlı RT-PZR yöntemi ile kontrol grubuna ait genlerin CT değerleri 40
Şekil 4.4: IL-6 mRNA ekspresyon seviyesi diğer gruplar ile karşılaştırıldığında T2DM grubunda yüksek bulundu 41
Şekil 4.5: IL-1β mRNA seviyesi T2DM grubunda en yüksek saptandı. (p^a=0,000 kontrol grubuna göre) T2DM+Gh grubunda IL-1β mRNA seviyesi T2DM grubuna göre azaldı (p^b= 0,000 T2DM grubuna göre)..... 41
Şekil 4.6: TNF-α mRNA ekspresyon seviyesinde gruplar arasında anlamlı bir değişiklik saptanmadı 42
Şekil 4.7: IL-10 mRNA ekspresyon seviyesinin T2DM grubunda en yüksek seviyede (p^a=0,000 kontrol grubuna göre); T2DM+Gh grubunda ise T2DM grubuna göre azaldığı görüldü (p^b= 0,000 T2DM grubuna göre)..... 43
Şekil 4.8: Ghrelin immün pozitif hücre sayısı..... 44
Şekil 4.9: Kontrol grubuna ait sıçan fundus kesitinde ghrelin immün pozitif hücreler (ok). Streptavidin-biotin-peroksidaz tekniği, hematoksilen zıt boyama. 45
Şekil 4.10: T2DM grubunda ghrelin hücreleri (ok). Streptavidin-biotin-peroksidaz tekniği, hematoksilen zıt boyama. 45
Şekil 4.11: Mide sıçan fundus kesiti. T2DM+Gh grubunda ghrelin hücreleri (ok). Streptavidin-biotin-peroksidaz tekniği, hematoksilen zıt boyama. 46

Şekil 4.12: NF-Kβ immün pozitif hücre sayısı T2DM grubunda arttı, T2DM+Gh grubunda ise azaldı (p^a= <0,000 kontrol grubuna göre, p^b= 0,005 T2DM grubuna göre)..... 47
Şekil 4.13: Fundus kontrol grubuna ait kesitte NF-Kβ hücreleri (ok). Streptavidin-biotin-peroksidaz tekniği, hematoksilen zıt boyama. 47
Şekil 4.14: Fundus kesitinde T2DM grubuna ait NF-Kβ hücrelerinin (ok) sayısı artmıştır. Streptavidin-biotin-peroksidaz tekniği, hematoksilen zıt boyama. 48
Şekil 4.15: Fundus kesiti T2DM+Gh grubuna ait NF-Kβ immün pozitif hücreler (ok). Streptavidin-biotin-peroksidaz tekniği, hematoksilen zıt boyama. 48
Şekil 4.16: MDA seviyeleri. 49
Şekil 4.18: PCO seviyeleri. 50
Şekil 4.17: GSH seviyeleri. 51

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ADP	Adenozin difosfat
AEC	3- amino- 9 etil karbazol
ANOVA	Varyans Analizi
BSA	Bovine serum albumin
CRP	C-reaktif protein
CN	4-kloro-1- naptol
cDNA	Tamamlayıcı DNA
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Deoksiribonükleik asit
DEPC	Dietil pirokarbonat
dNTP	Deoksinükleosid trifosfat
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazin
DTNB	5-5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
Gh	Ghrelin
GHS-R	Büyüme hormonu salgılatıcı reseptör
GPCR	G protein bağlı reseptör
GTG	Goldthioglukoz
GLUT-2	Glukoz taşıycı-2
GSH	Glutatyon
HCl	Hidroklorik asit
H&E	Hematoksilen&Eosin
IL-6	İnterlökin-6
IL-1β	İnterlökin-1β
IL-10	İnterlökin-10
IFN-γ	İnterferon-gama
ip	İntraperitoneal
İHK	İmmünohistokimya
MHC	Majör histokompatibilite kompleksi
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit

MDA	Malondialdehit
NACl	Sodyum klorür
NF-κβ	Nüklear faktör-kappa β
NK	Doğal öldürücü hücreler
PCO	Protein karbonil
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PAS	Periyodik asit Schiff
PBS	Fosfat tamponu
RT-PZR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROS	Reaktif oksijen türleri
SEM	Standart hata
-SH	Sülfhidril
STZ	Streptozotosin
T2DM	Tip 2 Diyabetes Mellitus
TBA	Tribarbitürik asit
TCA	Trikloroasetikasit
Th	Yardımcı T hücresi
TNF-α	Tümör nekroz faktör-α
TLR-4	Toll benzeri reseptör-4
q-PZR	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

ÖZET

Bilge, B.N. (2020). Diyabetik sıçan midesinde ghrelin ve inflamasyon ilişkisi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Tip 2 diyabet sadece pankreası değil insülin hormonundaki bozukluk sebebi ile tüm metabolizmayı etkileyen bir hastalıktır. Çalışmanın amacı insandaki tip 2 diyabete en yakın deneysel modellerden biri olan fruktoz ve streptozotosin (STZ) ile oluşturulmuş diyabet modeli üzerine önemli bir hormon ve aynı zamanda antioksidan olan ghrelinin diyabetik sıçan mide dokusu üzerindeki etkilerini inflamasyon ve oksidatif stres parametreleri ile incelemek idi.

8-10 haftalık erkek Spraque Dawley sıçanlar (n=21), kontrol, tip 2 diyabet (T2DM) ve diyabetik sıçanlara ekzojen ghrelin uygulanan (T2DM+Gh) gruplar olmak üzere ayrıldı. Hayvanların günlük yem ve su alımları ölçüldü. Mide dokularında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) yöntemi kullanılarak interlökin (IL)-6, IL-1β, tümör nekroz faktör (TNF)-α ve IL-10 mRNA seviyeleri ölçüldü. Ghrelin ve nüklear faktör (NF)-κβ peptid içerikleri streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile gösterildi. Oksidatif stres belirteçlerinden Ledwozyw yöntemine göre malondialdehit, Reznik ve Packer yöntemine göre protein karbonil, antioksidan belirteci olarak ise glutatyon Beutler metoduna göre tayin edildi.

T2DM grubunda kontrol grubuna göre günlük su alınımında anlamlı bir artış bulundu. IL-6, IL-1β ve IL-10 mRNA ekspresyon seviyeleri T2DM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. T2DM+Gh grubunda IL-1β ve IL-10 mRNA ekspresyon seviyelerinin T2DM grubuna göre anlamlı olarak azaldığı saptandı. NF-κβ immün pozitif hücre sayıları T2DM grubunda kontrole göre artarken, T2DM+Gh grubunda ise anlamlı şekilde azaldı. Oksidatif stres belirteçlerinde ise gruplar arası anlamlı fark görülmedi.

Bulgularımıza göre, ghrelin alınmasının tip 2 diyabetik sıçan mide dokusunda inflamasyonu düşürmede oldukça etkili olabileceği saptandı.

Anahtar Kelimeler: ghrelin, tip 2 diyabet, mide, sıçan, inflamasyon.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 31869

ABSTRACT

Bilge, B.N. (2006). Relationship between ghrelin and inflammation in diabetic rat stomach. İstanbul University-Cerrahpasa, Medical Biology, Master Thesis. İstanbul.

Type 2 diabetes is a disease that affects not only the pancreas but also the all metabolism due to the defect in the insulin hormone. The aim of the study was to examine the effects of ghrelin, an important hormone and antioxidant, on the diabetic stomach tissue with inflammation and oxidative stress parameters on a diabetes model created with fructose and streptozotocin (STZ), which is one of the closest experimental models to human type 2 diabetes.

Male Spraque Dawley rats 8-10 weeks old (n=21) were divided into three groups as control, type 2 diabetes (T2DM) and diabetic rats with exogenous ghrelin (T2DM+Gh). The daily feed and water intake of the animals were measured. Interleukin (IL)-6, IL-1β, tumor necrosis factor (TNF)-α and IL-10 mRNA levels were measured using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method in stomach tissues. Ghrelin and nuclear factor (NF)-κβ peptides were shown by streptavidin-biotin-peroxidase method. Among oxidative stress markers, malondialdehyde according to Ledwozyw method, protein carbonyl according to Reznik and Packer method, and glutathione as an antioxidant marker were determined by Beutler method.

A significant increase in daily water intake was observed in the T2DM group compared to the control group. IL-6, IL-1β and IL-10 mRNA expression levels significantly increased in T2DM group compared to conrol group. It was found that IL-1β and IL-10 mRNA expression levels were significantly decreased in T2DM+Gh group compared to T2DM group. NF-κβ immun positive cell numbers increased in T2DM group compared to control and decreased in T2DM+Gh group compared to T2DM group, significantly. Non-significant differences were observed in oxidative stress markers.

According to our findings, it was found that ghrelin administration can be quite effective in reducing inflammation in type 2 diabetic rat stomach tissue.

Key Words: ghrelin, type 2 diabetes, stomach, rat, inflammation.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University-Cerrahpasa. Project No. 31869

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya sağlık örgütü (2020) diyabetli hasta sayısının 1980'den günümüze 4 kat artarak 422 milyon olduğunu bildirmektedir (1). Diyabetli hastaların yaklaşık %95'ini T2DM oluşturmaktadır (2,3). Metabolik bir bozukluk olan T2DM, hiperglisemi ve insülin direnci ile karakterizedir. T2DM gelişim mekanizmaları arasında hiperglisemi, oksidatif stres, endoplazmik retikulum stresi sayılabilir. Tüm bu mekanizmalara cevap olarak inflamatuvar yanıt tetiklenebilir (4,5). T2DM hastalığının prevalansının artmasının yanı sıra, klinikte birçok komplikasyonu bilinmektedir. Son yıllarda, halk sağlığını ciddi şekilde etkileyen T2DM mortalite ve morbiditesinin artmasıyla dikkat çekmektedir. Klinikte egzersiz, diyet, oral hipoglisemik ajanlar ve insülin tedavisi gibi birçok terapötik strateji vardır (6). Toplum içinde diyabetik hasta sayısının gittikçe artması nedeni ile yeni ve kişiselleştirilmiş terapötik stratejilere ihtiyaç vardır.

Ghrelin 1999 yılında Kojima ve ark. tarafından mideden salınan açlık hormonu olarak tanımlandı (7). Ghrelinin hem mide dışında salgılandığı doku çeşitliliği hem de çeşitli biyolojik etkilerinden dolayı farklı hastalıkların tedavileri üzerindeki rolleri çalışılmıştır. Araştırmalar, ghrelinin iştahı açıcı ve lipogeneze enden olduğunu, karbohidratların enerji kaynağı olarak kullanılmasını sağladığını, mide asit salgısını ve hareketliliğini uyardığını, kan basıncını düşürerek böbrekleri, kalbi ve beyni koruduğunu göstermiştir. Bununla birlikte ghrelinin, inflamasyonun inhibisyonu ve otofajinin indüksiyonu gibi farklı mekanizmalarla metabolizmayı koruduğu ileri sürülmektedir (8). Düşük ghrelin seviyesinin yüksek kan basıncı, insülin direnci ve tip 2 diyabet ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (9). Tip 2 diyabet hastalarında pankreasındaki langerhans adacıklarındaki adacık ghrelin hücre sayısının azaldığı rapor edilmiştir (10). Ghrelinin tip 2 diyabetli hastalarda insülin salgılanmasını doza bağlı olarak baskıladığı çalışmada insülin uyarıcı tedavi olarak ghrelin değerlendirilmesi gerektiği vurgulamıştır (10). Ghrelinin anti-inflamatuvar etkisine dikkat çekilmesi ile metabolik inflamatuvar hastalıklar başta olmak üzere çeşitli anti-inflamatuvar tedavi gerektiren hastalıkların yenilikçi tedavilerindeki etkisi üzerine yapılan

araştırmalar önem kazanmıştır (11,12). Diyabet kronik inflamasyon ile karakterizedir, pankreatit adacık iltihabı içerirken, sistemik düşük dereceli iltihaplanma da T2DM bir özelliğidir. Bağışıklık sisteminin uzun süreli aktivasyonu insülin salınımını bozar ve inflamasyon diyabetin makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlarına neden olur. Ayrıca diyabetli hastalarda inflamatuvar yolların stratejik olarak hedeflenmesinin önemi birçok çalışmada gösterilmesine rağmen bağışıklık sistemini hedefleyen onaylanmış bir tedavi yöntemi yoktur (2).

Ghrelinin ilk kez insan endotelyal hücrelerde NF-κβ aktivasyonunun inhibisyonuna aracılık ederek anti-inflamatuvar etkilerinin oluştuğu öne sürülmüştür (13). Ghrelinin beyinde nöronları harekete geçirerek açlık ve tokluk hissini yönetmesinin (14) yanı sıra ghrelin reseptörlerinin bağışıklık sistemi hücreleri üzerinde bulunması ile de inflamasyona olan etkisi dikkat çekmiştir (15). Ghrelinin anti-inflamatuvar etkisi son zamanlarda inflamasyon ile ilişkilendirilen hastalıklarda çalışılmaya başlanmıştır (11,16). Fakat inflamasyon ve otoimmünite mekanizmalarındaki rolü henüz tam olarak bilinmemektedir. Yapılan literatür araştırmasında ghrelinin mide dokusunda inflamasyon özelliği ile ilgili çalışmaya rastlanılmamıştır. Yirmisekiz amino asitlik ghrelinin anti-inflamatuvar etkisi üzerine yapılan çok az sayıda çalışmada, üçüncü serin amino asidine n-oktanil grubu adlı bir yağ asidinin bağlanması ile oluşan aktif formunun (açil ghrelin) pro-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca ghrelinin anti-inflamatuvar sitokinlerden IL-10 ekspresyonunu arttırarak ağrı üzerinde (17) ve obezite durumunda etkili olabileceği bildirilmiştir (18).

Diyabette reaktif oksijen türlerinin rolü 1980'li yıllardan beri geniş çapta tartışılan bir konu olmuştur (19). Oksidatif stres, serbest radikal üretimi ile antioksidan sistem arasındaki dengesizliği ifade eder ve periferik insülin duyarlılığında azalmaya yol açarak çeşitli moleküler mekanizmalar yoluyla T2DM'nin gelişimine katkıda bulunur (20). Oksidatif stres ve diyabetin birlikte geliştiği düşünülürse oksidatif stresi baskılamak için enzimatik antioksidanlar (SOD / CAT / GPx mimetikleri), vitaminler (A, C, E), β-karoten, flavonoidler,

selenyum, çinko ve CoQ10 gibi antioksidan takviyesi olarak hedeflenen diyabetik tedavi stratejileri son zamanlarda önerilmektedir. Ancak antioksidan denemeleri, diyabet ve diyabetik komplikasyonlar için yeterli iyileştirici etkiyi gösterememiştir (21, 22). B ve T lenfosit, makrofajlar gibi inflamatuvar hücrelerin beta hücrelerine toksik etkilerini de serbest radikaller aracılığıyla yaptığı düşünülmektedir (17,21).

Ghrelin endokrin sistemdeki çoğu hormonun salgılanması üzerinde uyarıcı bir etkiye sahiptir. Aynı zamanda anti-inflamatuvar, antimikrobiyal, antifibrotik ve antiapoptotik etkisi ile kronik inflamatuvar hastalıkları önleme özelliği mevcuttur (8). Yapılan literatür taramasında diyabet çalışmaları içinde mide ve ghrelinin inflamasyon ilişkisi üzerine yeterli çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda ghrelinin iştah ve obezite ile ilgili bilinen anti-inflamatuvar etkilerine ilave olarak, T2DM sıçan modeline ait mide dokusunda sitokin ve TLR4 / NF-κβ sinyal yolakları üzerinden inflamasyon etkisinin araştırılması ve bununla birlikte ghrelinin oksidatif stres belirteçleri olan lipid peroksidasyonu, protein karbonil ve glutatyon seviyeleri üzerindeki aktivitesinin incelenmesi ve literatüre katkı yapılması amaçlanmıştır. ve literatüre katkı yapılması amaçlanmaktadır. Bununla birlikte, değişen oksidatif hasar için lipid peroksidasyon, glutatyon, proten karbonil seviyeleri saptanacaktır. Bu çalışmada, ekzojen ghrelin uygulaması ile tip 2 diyabetin önlenmesi ve tedavisinde inflamatuvar yolaklar ve oksidatif stres ilişkisine açıklık getirilmeye çalışılmıştır.

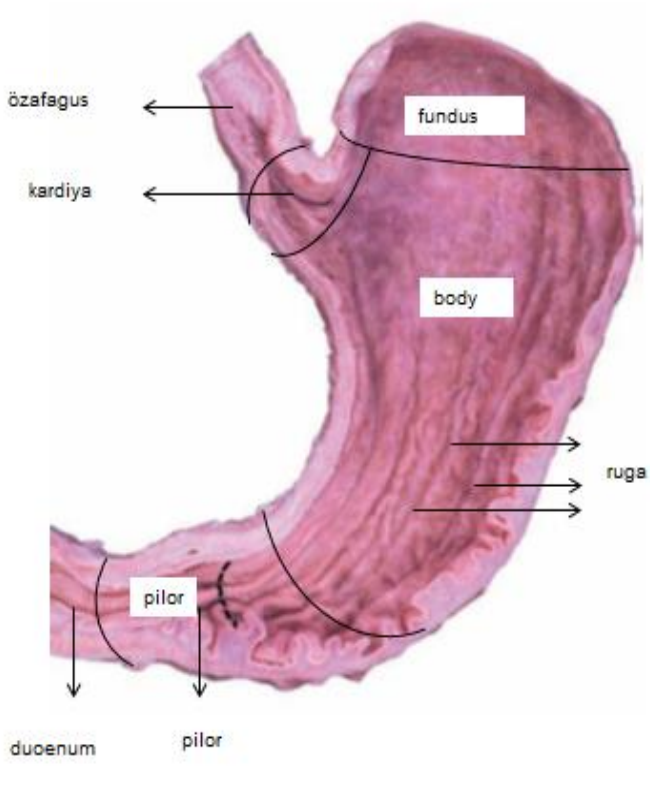
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mide

Mide özofagustan duodenuma kadar uzanan sindirim sistemi organıdır. Midenin işlevi, yutulmuş yarı katı yiyecekleri homojenleştirmek ve kimyasal olarak işlemektir. Hem midenin kas duvarının kasılması hem de mide mukozasının salgıladığı asit ve enzimler bu işleve katkıda bulunur. Gastrik salgılar ile midede yiyeceklerin karıştırılması ve kısmi sindirimi, kimus adı verilen karışımı üretir (23). Yiyecekler akışkan hale dönüştürüldüğünde daha fazla sindirim ve emilim için mideden yavaş yavaş duodenuma geçerler (24).

Anatomik olarak kardiya, fundus, korpus (body) ve pilor olarak dört bölüme ayrılan mide, histolojik olarak içerdiği bez tipine göre üç bölümde incelenir. Histolojik olarak midenin bölümleri şekil 2.1'de gösterilmektedir. Kardiya bölgesi, özofagusdan geçişin olduğu kardiyak bezleri içerir. Fundus, kardiya ve pilor arasında yer alan mide bezlerini içeren midenin en büyük bölümüdür. Pilor bölgesi ise pilor bezleri içeren duodenuma girişin üst kısmını kapsar (23,24).

Mide mukoza, submukoza, muskularis ve serozadan oluşan bir histolojik yapıya sahiptir. Lamina muskularis mukoza, mukoza tabakasını submukozadan ayırır. İç kısımda dairesel, dışta uzamına iki düz kas tabakası içerir. Submukoza kısmı kan ve lenf damarları içeren sıkı bağ dokusundan oluşmuştur. Bol miktarda lenfoid hücre, makrofaj ve mast hücresi içerir. Muskularis tabakası üç yönde düzenlenmiş dış tabaka longitunal, orta tabaka sirküler ve iç tabaka oblik düz kas liflerinden meydana gelir (23). Seroza ise gevşek bağ dokusu içerir. Boş mide iç yüzeyinde uzunlamasına bulunan mukoza ve submukoza tabakalarının oluşturduğu makroskopik katlantılara ruga adı verilir. Ruga kıvrımları midenin daha dar bölgelerinde belirgindir ancak üste doğru genişleyen bölgelerinde daha seyrek belli olmaktadır. Rugalar toplam yüzey alanını değiştirmez; daha ziyade midenin genişlemesine ve dolmasına uyum sağlarlar (24).



Şekil 2.1 : Histolojik olarak mide kısımları (23)

Mide mikroskobik olarak incelendiğinde, mukozayı düzensiz alanlara bölen gastrik çukurcuklar içerdiği görülür. Bu çukurcuklar salgılama için arttırılmış yüzey alanı sağlamaktadır. Yüzey mukoza epitel hücreleri, midenin iç yüzeyinde sıralanmış tek katlı prizmatik salgı hücrelerdir. Yüzey mukus hücreleri 3-5 günde, diğer hücreler ise daha uzun sürede yenilenirler. Yüzey mukus hücreleri uygun fiksasyon ile korunduğunda, hücrelerin apikalinde yer alan glikoprotein yapıdaki musin granülleri Periyodik Asit-Schiff (PAS) boyası ile yoğun bir şekilde boyanır. Musin granülleri hücre yüzeyine salındığında suyla birlikte koruyucu müköz bir örtü tabakası oluşturur. Boyun mukus hücreleri ise fundus bezlerinin boyun bölgesinde yer alan pariyetal (oksintik) hücreler arasında bulunur (23).

Yüzey mukus hücreleri tarafından üretilen bikarbonat mukus içeriğini alkali yaparak hücreleri asit etkisinden korumaktadır. Mukozanın lamina propria kısmında yer alan gastrik bezler veya fundus bezleri, kardiyak ve pilor bezlerinin olduğu bölgeler hariç tüm mide mukozasında bulunur. Fundus bezleri, mide çukurlarının dibinden muskularis mukozasına uzanan basit, dallı, boru şeklindeki bezlerdir. Fundus bezleri aynı zamanda isthmus/boyun kök hücrelerin çoğaldığı ve farklılaştığı bir kök hücre nişidir. Mukoza yüzey hücrelerine dönüşen bu kök hücreler, mide çukurlarında mide yüzeyine yukarı doğru göç ederler. Gastrik bez hücreleri, çeşitli maddeler içeren mide suyu (yaklaşık 2 L / gün) üretir. Su ve elektrolitlere ek olarak, mide suyu dört ana bileşen içerir: Hidroklorik asit (HCl) mide suyuna düşük pH 1-2 sağlayan 150 ila 160 mmol/L arasındaki bir konsantrasyondadır. HCl ile protein sindirimi midede başlar ayrıca inaktif pepsinojeni aktif pepsin'e dönüştürür. Pepsin, güçlü bir proteolitik enzim olup esas hücreler tarafından üretilen pepsinojenden 5'ten küçük bir pH değerinde dönüştürülür. Pepsin, iç peptit bağlarını keserek proteinleri küçük peptitlere hidrolize eder. Peptitler ayrıca ince bağırsakta enzimler tarafından amino asitlere ayrılır (23,24).

Mukus, çeşitli mukus üreten hücreler tarafından salgılanan mide içi asit koruyucu yapıdadır. Mukoza tabakası içinde mukus ve bikarbonatlar nötr pH değerini koruyarak gastrik mukoza bariyerine katkıda bulunur. Mukus mide mukoza hücreleri ile midenin lümeni arasında fiziksel bir bariyer görevi görür. Pariyetal hücreler tarafından salgılanan intrinsik faktör ve HCl dir. İntrinsik faktör B_{12} vitaminine bağlanan bir glikoproteindir. B_{12} vitamini ileumun distal kısmında meydana gelen emilim için gereklidir (23). Fundus bezlerindeki enteroendokrin hücreler tarafından gastrin, diğer hormonlar ve hormon benzeri salgılar üretilir ve dolaşıma girdikleri veya diğer hücreler üzerinde lokal olarak etki ettikleri lamina propria içine salgılanırlar. Fundus bezlerini oluşturan hücre tipleri şunlardır (23,24).

Boyun mukus hücreleri, fundus bezlerinin boyun bölgesinde yer alır (Şekil 2.2). Pariyetal hücreler genellikle bu hücre grupları arasında bulunur. Boyun mukus hücresi, yüzey mukus hücrelerinden çok daha kısadır ve apikal

sitoplazmada önemli ölçüde daha az musinojen içerir. Bazal sitoplazmada bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum bulunduğundan hücrenin bu kısmına bazofilik iken, apikal sitoplazma enzim öncüleri içerdiğinden salgı veziküllerinin varlığı nedeniyle eozinofiliktir (23).

Esas (Chief) hücreler, fundus bezlerinin alt bölümünde daha fazla yer alır (Şekil 2.2). Esas hücreler pepsinojen ve gastrik lipaz salgılar. Asit mide suyu ile temas ettiğinde, pepsinojen bir proteolitik enzim olan pepsin'e dönüştürülür (23).

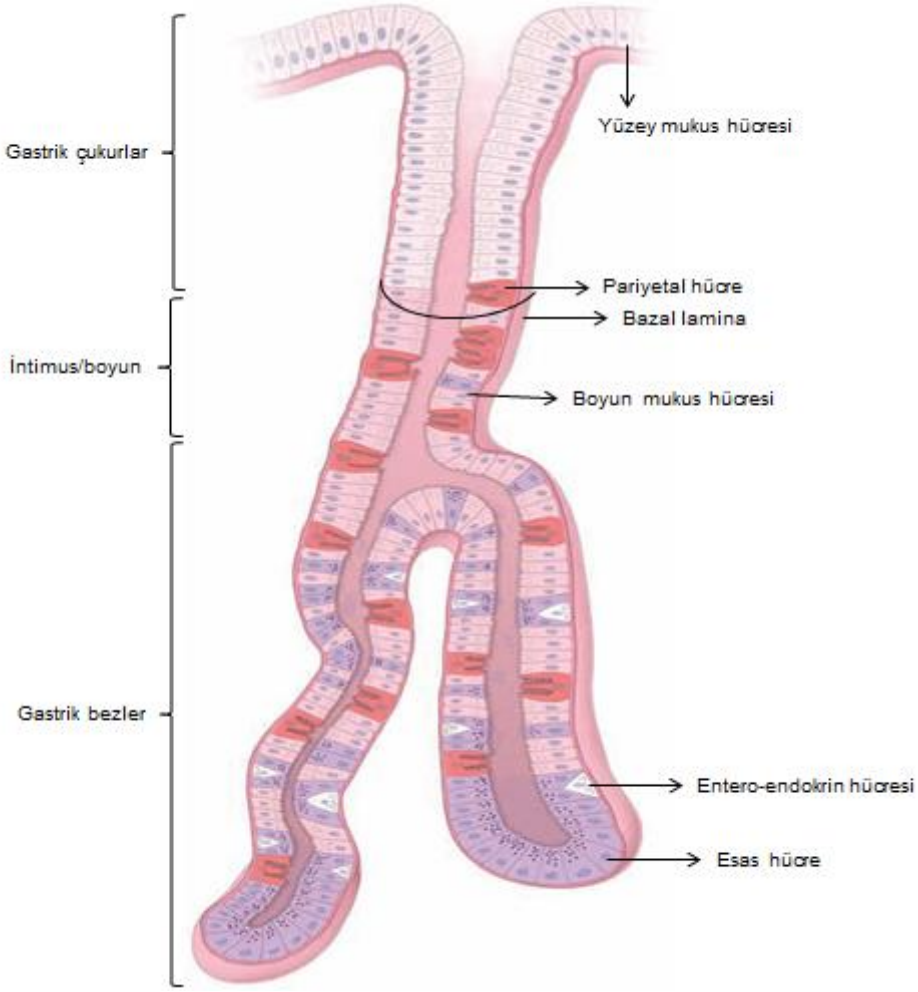
Pariyetal (oksintik) hücreler, mide bezlerinin boyun hücreleri arasında yoğun ve bezin daha alt kısımlarında ise seyrek olarak bulunurlar. Yuvarlak veya piramidal şekilli pariyetal hücrelerin merkezi nukleusları yuvarlak olup sitoplazmaları eozin ve diğer asidik boyalarla boyanır. Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile incelendiğinde, pariyetal hücrelerin, bezin lümeni ile iletişim kuran geniş bir hücre içi kanaliküller sisteme sahip olduğu görülür (Şekil 2.2). Kanaliküllerin yüzeyinden çok sayıda mikrovillus ve dinlenme evresindeki hücrelerin sitoplazmalarında tubuloveziküler yapılar mevcuttur. Tubuloveziküler membranlar aktif proton pompaları içeren bir plazma membranı öncüsü olarak iş görürler. HCl, hücre içi kanalikülilerin lümeninde üretilir. HCl salgısı için uyarıldığında, tübüloveziküler yapılar hücre membranı ile kaynaşır. Aktif hücrede, kanaliküllerdeki mikrovillus sayısı artar ve hücre membranı yüzeyinde büyük bir artış sağlanır. Pariyetal hücrelerde HCl salgılanmasını aktive eden maddeler için üç farklı tipte membran reseptörü bulunur: gastrin reseptörleri, histamin H2 reseptörleri ve asetilkolin M3 reseptörü. Gastrin reseptörünün bir gastrointestinal peptit hormonu olan gastrin tarafından aktivasyonu, pariyetal hücre uyarılmasının ana yoludur (23,24).

Farklılaşmamış (Kök) hücreler: Az sayıda boyun bölgesinde bulunurlar. Erişkin kök hücreler yüksek bölünme özelliğinde olup farklılaşacakları hücrenin bulunduğu bez bölgesine doğru göç ederler (23).

Enteroendokrin hücreler: Ghrelin, gastrin, somatostatin hücreleri gastrik bezlerin tabanında yer alırlar ve ürünlerini lamina propriaya veya altta yatan kan damarlarına salgılarlar. Gastrointestinal sistem boyunca genel olarak iki tip

enteroendokrin hücre ayırt edilebilir. Çoğu, bazal lamina üzerine yerleşen ve her zaman lümene ulaşmayan kapalı hücreleri temsil ederken bazıları bez lümenine ulaşan mikrovilluslu yüzeye sahip olan açık enteroendokrin hücrelerdir (Şekil 2.2). Salgı kapalı hücrelerden dolaylı olarak nöral ve parakrin mekanizmalar yoluyla lümen içeriği ile düzenlenir (23,24).

Enteroendokrin hücreler gastrointestinal sistem boyunca dağılırken, iştah düzenlenmesinde yer alan endokrin hormonların önemli bir kısmı gastrik mukoza tarafından üretilir ve salgılanır. Bu hücreler hem endokrin hem de parakrin yol ile mide salgı fonksiyonlarını kontrol ederler. Gastrin midenin pariyetal hücreleri tarafından gastrik asit (HCl) salgılanmasını uyaran ve gastrik hareketliliğe yardımcı olan ve mide asidi salgısını düzenleyen bir peptit hormondur. Gastrin, gastrik çukurlarda özellikle midenin pilor bölgesinde bulunan G hücrelerinde sentezlenir ve pariyetal ve enterokromafin-benzeri hücrelerde (ECL) bulunan reseptörlerine bağlanır. Gastrin salgılanması, mide lümeninde peptitlerin ve amino asitlerin varlığı ile uyarılır (25).



Şekil 2.2: Fundus hücreleri (23)

Midede HCl salınımı, midede bulunan esas hücrelerden pepsinojenin salınmasını uyarır. Pepsinojenin ana sindirim işlevi proteinleri polipeptitlere ayırmaktır (26). Leptin ise beslenme davranışı ve kilo kontrolü ile ilişkili bir hormondur. Esas olarak yağ dokusu tarafından üretilir. Mide önemli bir leptin kaynağı olarak tanımlanmıştır. Leptin, gastrointestinal sisteminin motilitesi üzerinde çeşitli etkilere sahiptir (27). Midede leptin eksikliği gastrik boşalma oranını arttırır, jejunumda geçiş aktivitesini arttırır ve ince bağırsakta toplam geçiş süresini kısaltır (28,29). Leptin sindirim sisteminde trofik bir faktör olarak işlev görebilir ve ekzojen olarak verildiğinde bağırsak epitel hücre çoğalmasını uyarabilir (30). Ghrelin çok yönlü bir peptid hormondur ve büyüme hormonu

salınımını uyarır. Ayrıca bu hormon gıda alımı ve iştah düzenlenmesinde görevlidir ve bu sebepten dolayı Bu sebeple de daha çok açlık hormonu olarak bilinir (31).

2.2. Ghrelin

Ghrelin (1999) Kojima ve ark. tarafından keşfedilen peptid hormondur. Ghrelin kelimesini oluşturan “ghre” proto-Hint Avrupa kelime köküne göre “grow” büyüme, “relin” ise büyüme hormonu salgılatıcı anlamına gelmektedir. Ghrelinden önce G protein bağlı reseptör ailesinden olan büyüme hormonu salgılatıcı reseptörü (GHS-R) keşfedilmiştir (31-33). Fare mide ekstraktından izole edilen 28 amino asitlik bu polipeptid, büyüme hormonu salgılatıcı reseptörüne (GHS-R1a) bağlanmış endojen bir ligand olarak tanımlanmıştır. GHS-R'nin GHS-R1a ve GHS-R1b olarak iki izoformu vardır. GHR-S1a 336 amino asitten oluşan 7 transmembran geçişli; GHR-S 1b 289 amino asitten oluşan 5 transmembran geçişlidir. Ghrelin, GHS-R ailesinden olan büyüme hormonu reseptörü tip 1a (GHS-R1a)’nın doğal ligandıdır (15,33). G protein bağlı reseptör (GPCR) ailesinden olan ghrelin-reseptörü (GHR-R) diğer GPCR’lerin aksine büyüme hormonu bağlantılı peptid-6 (GHRP-6) diğer ismi ile hegzarelinin yapay ligandını bağlamaktadır (34). Ghrelinin, insanlar dışında hayvan, bitki ve gram negatif bakterilerde de gösterilmesi canlıların evrimsel sürecinde korunduğu göstermektedir. Ayrıca GHS-R’nin beyin, hipotalamus, böbrek, pankreas, kalp, mide ve bağırsak dokularında bulunması çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynadığını göstermektedir (27,32).

2.1.1. Ghrelinin yapısı ve dokularda dağılımı

Kojima ve ark. ghrelini ilk olarak sıçan midesinden izole etmişlerdir. Amino asit dizisi incelendiğinde sıçan ve insan ghrelini arasında 2 amino asit fark olduğu ve 117 amino asitten oluştuğunu bildirmişlerdir (33). Ghrelin preproghrelin olarak sentezlenir. N terminal ucunda 23 amino asitlik bir sinyal peptid, C terminal ucunda 66 amino asitten oluşan bir kuyruk bulunur (35).

Ghrelinin translasyon sonrası uğradığı modifikasyona göre açil ve açil olmayan iki formu vardır. Ghrelin aktivitesi için önemli olan N ucundaki 3. serin amino asitine n-oktanil grubu bağlanmasıyla bir modifikasyon geçirerek ~~geçirir~~ ve aktif formunu kazandırmasıdır. Bu açil modifikasyonu ghrelinin GHS-R1a'ya bağlanmasını sağlar. Ayrıca kan-beyin bariyerini geçmesinde bu modifikasyonun etkili olduğu düşünülmektedir (36). Deaçil ghrelin (n-oktanil grubu içermeyen) ise mide ve kanda önemli miktarda bulunmaktadır (37). Dolaşımda ghrelinin %80'nin deaçil formda bulunduğu açil ghrelin miktarının ise %20 olduğu bilinmektedir. Ghrelin reseptörünün GHS-R1a'ya bağlanması için açil formda olması gerektiğinden deaçil ghrelin farklı reseptörler aracılığıyla etkisini gösterir ve büyüme hormonu salgılatıcı etkisi yoktur.

Ghrelin keşfedildiğinde midenin fundus bölümünde bulunmuştur. Midenin fundustan pilor kısmına doğru ghrelin içeren hücrelerin miktarı artmaktadır (38). Bu hormon mide mukoza epitelinde özel bir endokrin hücre tipi olarak ghrelin hücrelerinden salgılanır. Ayrıca duodenum, ileum, jejunum ve kolonda da ghrelin bulunmaktadır. Bağırsaklarda ghrelin konsantrasyonu duodenumdan kolona doğru azalır (39).

2.1.2. Ghrelin Hormonunun Fonksiyonları

Ghrelin, büyüme hormonu salınımını uyarmak için inositol trifosfat (IP3) yoluyla hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırarak GHS-R üzerine etki eder (15,23,25). Ghrelin, büyüme hormonu salınımını doza bağlı bir şekilde hem *in vitro* hem de *in vivo* uyarır (7). İnsan ve sıçanlarda ghrelinin intravenöz enjeksiyonu ile büyüme hormonu salınımının arttığı bildirilmiştir (38). Hipofizden büyüme hormonunun salınımı sadece hipotalamik GH-salgılatıcı hormon (GH-RH) tarafından değil aynı zamanda mideden salınan ghrelin tarafından da düzenlenmektedir. Ghrelin yiyecek alınımını kontrol eden bölge olan hipotalamik arkuat çekirdek üzerine etki ederek iştahı uyarmaktadır (38).

Plazma ghrelin seviyeleri her yemekten hemen önce artar ve yemekten sonraki bir saat içinde minimum seviyelere düşer (40). Plazma ghrelin

düzeylerindeki net preprandiyal artış ve postprandiyal düşüş ghrelinin yemek tüketimi için bir başlangıç sinyali olduğu hipotezini desteklemektedir. Aort ve kalp dokusunda ghrelin ve reseptörünü kodlayan mRNA'nın ifadesi kardiyovasküler fonksiyonuna ilişkin kanıtlar sunmaktadır (41). Ghrelinin insülin salınımına ilişkin bazı deneylerde insülin sekresyonunu inhibe ettiği bazılarında ise insülin salınımını uyardığı gösterilmiştir (10). Gastrointestinal sistemdeki etkileri üzerine yapılan çalışmalarda intravenöz ghrelin uygulanmasının doza bağlı gastrik salgıyı ve gastrik hareketliliği arttırdığı gösterilmiştir (25). İnsan calışmalarında leptinin interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktör (TNF)-α'yı arttırdığı gösterilmiştir. Ghrelin ve leptinin hipotalamusta iştah üzerine zıt düzenleyici etkilerinin immün sistem sitokin ekspresyonları üzerinde de olduğu düşünülmektedir. İnsan T hücrelerinden ghrelin salgılandığı gösterilmiştir. Buna bağlı olarak immün sistemde ghrelinin anti-inflamatuvar etkisi olabileceği ifade edilmiştir (42).

2.1.3. Ghrelin ve İnflamasyon İlişkisi

Bağışıklık sistemi hücrelerinden B ve T hücreleri, nötrofiller, makrofajlar, monositler, dendritik hücreler, doğal öldürücü hücreler ve çeşitli lösemi hücrelerinde ghrelin mRNA ekspresyonu gösterilmesiyle ghrelin ve immün sistem arasındaki bağlantı araştırılmaya başlanmıştır (15,42). Ghrelin hormonunun T hücrelerinde eksprese olduğu ve anti-inflamatuvar etkileri bildirilmiştir (42). İnsan immün sistem hücreleri yanı sıra, dalak, lenf nodları ve timus gibi immün sisteme ait dokularda da ghrelin mRNA'ları gösterilmiştir (13,42). Ghrelin ve GHS-R1a'nın lenfoid sistemdeki yüksek ekspresyonu bağışıklık sistemi aktivitesinin düzenlenmesindeki rolünü desteklemektedir. Ghrelinin anti-inflamatuvar aktivitesi üzerine yapılan bazı çalışmalarda açil ghrelin formunun pro-inflamatuvar sitokinlerden IL-1a, IL-1b, IL-6 ve TNF-α'nın ekspresyonunun azalttığı gösterilmiştir (39,43,44). Açil ghrelinin anti-inflamatuvar fonksiyonu olarak IL-1β, IL-6 ve TNF-α gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu inhibe etmesi T lenfosit ve monosit üzerine direkt

etkisine bağlıdır. Li ve arkadaşları tarafından insan endotelyal hücrelerinde ilk kez ghrelinin NF-κβ inhibisyonuna aracılık ettiği anti-inflamatuvar etkilerinin olduğu, buna benzer olarak Liu ve arkadaşları da ghrelinin anti-inflamatuvar etkileri olduğunu rapor etmişlerdir (13,45). Yapılan çalışmalarda ghrelinin pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımı üzerindeki etkisinin NF-κβ transkripsiyon faktörünün ekspresyonu ile yakından ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca ekzojen ghrelin alınımının anti-inflamatuvar sitokinlerden IL-10 ekspresyonunu arttırarak ağrı üzerinde ve obezite durumunda etkili olduğu bildirilmiştir (17,18,42).

Ghrelinin çeşitli patolojik koşullarda anti-inflamatuvar bir hormon olarak oksidatif stres ve inflamasyon üzerinde etkileri olduğu ileri sürülmektedir (46-50). Bağışıklık sistem hücreleri metabolizma ve enerji durumundaki değişikliklere cevap olarak bağışıklık yanıtlarını ve sitokin ekspresyonunu değiştirirler (51). Phosat ve arkadaşları çalışmalarında tip 2 diyabet gelişiminde inflamasyon belirteci olan yüksek IL-6 seviyesinin önemini vurgulamışlardır (52). Ghrelin ekspresyonundaki değişikliklerin aynı zamanda, inflamasyonun klasik belirteçleri olan proinflamatuvar sitokinlerin TNF-α, IL-6 ve IL-1β ekspresyonu ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (53). Madison ve arkadaşları IL-1β reseptörünün mide mukozasında üretildiğini ve inflamatuvar hastalıklarda terapötik bir ajan olabileceğini bildirmişlerdir (54).

2.2. Diabetes Mellitus

Yunanca ‘’Diabetes’’ M.Ö. 250 yılında vücuttan sıvı kaybını belirtmek için kullanılmıştır. 1675 yılında ise diyabetiklerin idrar tatlarının şekerli olması nedeniyle Thomas Willis ‘’diabetes mellitus’’ terimini latincede bal anlamında kullanılan ‘’mellitus’’ kelimesinden türetmiştir (55,56). Diabetes Mellitus protein, yağ ve karbohidrat metabolizmasındaki çeşitli mikrovasküler (diyabetik nefropati, diyabetik retinopati) ve makrovasküler (ateroskleroz, inme) komplikasyonların ve diyabetik nöropatinin eşlik ettiği kandaki glukoz seviyesinin artışı ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Diyabet hastalığında

kan glukozunun yüksek seviyede olmasının sebebi yetersiz insülin salınımı ya da dokuların insülin salgılanmasına cevabının yetersizliğidir (57).

2.2.1. Tip 1 ve Tip 2 Diyabet

İnsüline bağlımlı ya da jüvenil diyabet olarak isimlendirilen tip 1 diyabet dünyadaki diyabetlilerin %5-10'unu oluşturmaktadır. Hastalarda genellikle kilo kaybı, halsizlik, poliüri, polidipsi ve görme bulanıklığı gözlemlenir. Tip 1 diyabet kişide insülin eksikliği ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. Bu eksiklik pankreas β hücresi yıkımı ile oluşmaktadır β hücresi yıkımı çocuklarda yetişkinlere kıyasla daha hızlı gerçekleşmektedir. Tip 1 diyabetli hastalar insüline bağımlı yaşamaktadırlar (57,58).

T2DM insüline bağımlı olmayan diyabet veya yetişkin diyabeti olarak da adlandırılan tüm diyabetlerin % 90-95'ini oluşturur. Tip 2 diyabetli hastalarda insülin eksikliği ve periferik insülin direnci mevcuttur (59). Tip 2 diyabetin çeşitli nedenleri vardır. Tip 1 diyabette olduğu gibi pankreas beta hücrelerinin otoimmün yıkımı oluşmasa da β hücre fonksiyon bozukluğu görülür. Tip 2 diyabetli hastaların çoğu fazla kilolu veya obezdir. T2DM sıklıkla yıllarca teşhis edilemeyebilir çünkü hiperglisemi yavaş yavaş gelişir ve daha erken aşamalarda hastanın klasik diyabet semptomlarını fark etmesi için yeterince şiddetli değildir. Bununla birlikte, tanı konulmamış hastalarda bile makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyon gelişme riski altındadır. Tip 2 diyabetik hastalarda görülen insülin salgılanması bozukluğu insülin direncini telafi etmek için yetersiz kalır. T2DM insülin direnci, kilo azalması ve/veya hipergliseminin farmakolojik tedavisi ile düzelebilir ancak nadiren normale döner (58).

2.2.2. Deneysel Diyabet Modelleri

Cerrahi yöntemlerle oluşturulan pankreatektomi, hipotalamik lezyon gibi modeller, beslenme ve diyet aracılığı ile oluşturulan yüksek şekerli ve yağlı beslenme modelleri, genetik modeller: obez (Zucker Diabetic Fatty (ZDF) sıçan

tip 2 diyabet modeli,db/db,ob/ob modelleri) ve obez olmayan (Cohen/ALS/Lt/ Goto-Kakizaki modelleri) ve transgenik-knockout hayvan modelleri yanısıra kimyasal maddeler kullanılarak oluşturulan modeller: streptozotosin (STZ), alloksan, goldthioglukose (GTG) sayılabilir (60,61).

Deneysel tip 1 ve tip 2 diyabet modellerinde geniş kullanıma sahip bir kimyasal olan STZ (2-deoksi-2-[3-metilnitrosourido]-D-glukopiranoz) *Streptomycetes achromogenes*'den sentezlenerek vücutta serbest radikallerin üretimini arttırmaktadır (61). STZ, insülin sekresyonunu inhibe ederek insülin bağımlı diyabete neden olur (62). Özellikle pankreas β hücrelerinde deoksiribonükleik asit (DNA) kırıklarına neden olarak pankreas β hücrelerinin fonksiyonlarının zarar görmesine neden olur ve sonraki aşamada da β hücreleri nekrozla yok edilir. Bu süreç DNA tamiri için poli-ADP riboz sentezini aktive eder ve tamir için nikotinamid dinükleotid'in büyük bir miktarı tüketilir (61). STZ hidrofilik yapıya sahip olduğundan glukoza benzer yolu kullanarak GLUT-2 taşıyıcıları ile hücre membranından kolaylıkla geçerek β hücrelerine girer. β hücreleri için toksik glukoz analoğu olarak iş görür. Ayrıca oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi β hücre yıkımını ve insülin bağımlı diyabet gelişimini hızlandırır (62).

STZ ile oluşturulan tip 2 diyabet modelleri olarak Fruktoz+STZ, Yağlı Diyet+STZ, Nikotinamid+STZ ve yenidoğan STZ diyabet modeli kullanılmaktadır. Deneysel tip 2 diyabet modellerinden hastalığın patogenezini en iyi taklit ettiği düşünülen model Wilson ve İslam'ın 2012 yılında geliştirdikleri genetik olmayan alternatif bir modeldir. Fruktoz metabolik sendrom oluşturmak için de kullanılmatadır. Sadece fruktoz diyeti ile oluşturulan modellerde insülin direncinin tetiklenmesinin sonra tip 2 diyabet gelişmesinin birkaç haftayı alması deneyin maliyetini artırmaktadır. Bu nedenle Wilson ve İslam yeni model geliştirmek için yaptıkları çalışmada 6 haftalık Sprague-Dawley sıçanların iki hafta boyunca sıçanların içme suyuna %10-40 fruktoz uygulamalarını takiben 40 mg/kg STZ enjeksiyonu kullanarak T2DM modeli oluşturmuştur. Ayrıca fruktozlu su içirilen hayvanlarda fruktozun insülin direncine sebep olduğu gösterilmiştir (63,64).

2.2.3. Tip 2 Diyabet ve İnflamasyon İlişkisi

İnflamasyon immün sistemin verdiği kompleks bir reaksiyondur. Enfeksiyon veya doku hasarının olduğu bölgede lökositler ve plazma proteinlerinin birikmesi ve etkinleşmesi ile karakterizedir. Hücre içi virüslere karşı doğal bağışıklık savunması, virüs ile enfekte hücreleri öldüren doğal öldürücü hücreler (NK) ve konak hücrede viral çoğalmayı durduran tip I interferonlar olarak adlandırılan sitokinler aracılığı ile sağlanır. Organizma bir patojene maruz kaldığında ilk olarak gelişen doğal bağışıklık ile gastrointestinal kanal mukus tarafından korunmaktadır. Kazanılmış bağışıklık yanıtları inflamasyonu arttırabilmektedir (65).

İnflamatuvar süreçler kas, karaciğer ve pankreas dokusunda lipotoksisite, glikotoksisite ve oksidatif stres gibi patolojik mekanizmalar ile yakından ilişkilidir (66). Yaşam şekillerinin değişmesiyle uyku bozukluğu, sigara, fiziksel aktivite yetersizliği, alkol gibi çeşitli uyaranlar, farklı dokulardan pro-inflamatuvarların salınımını artırarak insülin direnci ve hücre fonksiyon bozukluklarının ilerlemesi ile tip 2 diyabet gelişmektedir (67). T2DM gibi kronik hastalıkların gelişiminde ve ilerlemesinde inflamasyonun önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (2). Çalışmalar kronik inflamasyonun insülin direnci ve β hücre disfonksiyonu ile ilişkili olabileceğini ve bu komplikasyonlarının tip 2 diyabet patogenezinde anahtar rolü olduğunu göstermektedir (68). Çalışmalar tip 2 diyabet durumunda dolaşımda yüksek C-reaktif protein düzeyi (CRP), TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-1 reseptör antagonist düzeylerinin yüksek seviyede olduğunu göstermektedir (69).

İmmün yanıt organizmanın immün reseptörler ile tanıyabileceği antijen ya da bir immün cevabı başlatan immünojen adı verilen madde ile karşılaşması ile başlar. İmmün sistem hücreleri kemik iliği hematopoetik kök hücrelerinden oluşur. Hematopoetik kök hücrelerinden iki tip özelleşmiş kök hücresi meydana gelir: Birincisi B ve T lenfositleri oluşturan lenfoid kök hücreler, ikincisi lökosit, eritrosit, platelet ve makrofajları oluşturan myeloid kök hücreleridir. B lenfositler

kemik iliğinde farklılaşır. Kemik iliği dışında aktifleşen B hücreleri plazma hücrelerine farklılaşır. T lenfositler ise timusda yardımcı ve sitotoksik hücrelere farklılaşır. Bağışıklık sistemi hem vücut sıvılarındaki antikorlar hem de dokulara bağlı T hücre ve monositler/makrofajlara bağımlı etki mekanizmalarını kapsar. T hücre cevaplarının bazıları çevredeki hücrelere sitokinler aracılığı ile sağlanır. Sitokinler reseptörleri olan hücrelerde farklı biyolojik etkiler gösteren, lokal olarak üretilen, yarılanma ömürleri kısa, yüksek düzeyde özgüllük gösteren proteinlerdir (Tablo 2-1 ve Tablo 2-2), (70).

Tablo 2-1: Sitokin çeşitleri (70)

Pro-inflamatuvar sitokinler	IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α, TGF-β
Anti-inflamatuvar sitokinler	IL-10, IL-13, TGF-β
İmmün düzenleyici sitokinler	IL-2, IL-4, IL10, IL-12, IL-13,IFN-γ
Anti-proliferatif sitokinler	IFN-γ, TNF-α

İnterlökin-6 (IL-6)

Lökositler, endotelyal hücreler ve adipositler de dahil olmak üzere çeşitli hücreler tarafından üretilen IL-6, insülin direnci ile ilişkilendirilen pro-inflamatuvar bir sitokindir (73). IL-6 İnflamasyon düzenlenmesinde immün akut faz yanıtlarında görev almaktadır (74). Ayrıca IL-6 inflamasyonun inhibisyonu, insülin salınımı ve/veya duyarlılığının artırılmasında kritik bir rol oynamaktadır (75).

İnterlökin-1 beta (IL-1β)

IL-1β pankreas β hücre hasarı ve insülin direncinde anahtar rol oynayan pro-inflamatuvar bir sitokindir (76).

Tablo 2-2: Önemli sitokinler, reseptörleri ve fonksiyonları (70)

Sitokinler	Reseptör	Üretildikleri yerler	Fonksiyonları
IL-6	CD126, CD_w130	T hücreleri, makrofajlar	B ve T hücrelerinin büyümesi
TNF-α	P55,p75, CD120a CD120b	Makrofajlar Doğal öldürücü hücreler	Lokal yangılar Endotel aktivasyonu
IL-1β	CD_w121a	Makofajlar, Epitel hücreler	Ateş, T-hücre aktivasyonu, Makrofaj aktivasyonu
IL-10		T yardımcı hücreler, Makrofajlar	Makrofaj aktivasyonu için etkili inhibitör, Yangısal reaksiyonları baskılar

Tümör Nekroz Faktör-alfa (TNF-α)

Glukoz ve lipid metabolizmasını etkileyen TNF-α, pro-inflamatuvar bir sitokindir ve pankreas hücre fonksiyonu üzerindeki inhibisyon etkisiyle insülin direncine yol açabilir. Bu nedenle TNF-α'nın tip 2 diyabet araştırmalarında önemi artmıştır (5,71). TNF-α'nın tip 2 diyabetik hastalarda insülin ile anlamlı bir korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (72).

İnterlökin-10 (IL-10)

IL-10 aktive edilmiş makrofajlar ve Th2 hücreleri tarafından üretilen doğal bağışıklıkda önemli rol oynayan anti-inflamatuvar bir sitokindir. IFN-γ'nın Th1 hücreleri tarafından üretiminin inhibe edilmesi bağışık yanıtın Th2 ile gerçekleşmesini sağlar. Ayrıca sınıf II MHC ekspresyonunu, aktive edilmiş makrofajlarda sitokin üretimini ve makrofaj üzerindeki ko-stimulatör molekülleri

inhibe ederek immün yanıtta azalmaya sebep olabilir (77). Düşük IL-10 üretim kapasitesinin metabolik sendrom ve tip 2 diyabet ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (78).

2.3. İmmünohistokimya (İHK) Yöntemi

İmmünohistokimya dokuya ait antijenlerin, antijen-antikor etkileşimden faydalanarak işaretli antikorlar ile dokuda bulundukları yerde mikroskopik olarak gösterilmesini sağlayan yöntemdir (79). Bu yöntem antijene özgü antikorlar kullanılarak dokudaki hücrelerin kökeni, farklılaşmaları, inflamasyon, çoğalma ve invazyon gibi hücresel cevapların değerlendirilmesini sağlar. Yöntemde incelenecek dokular genellikle parafine gömülü kesitlerden oluşsa da kriyostat ve rezin kesitler de kullanılmaktadır. Doku kesiti araştırılmak istenen antijenlere karşı oluşturulmuş monoklonal ya da poliklonal antikorlar ile inkübe edildiğinde spesifik bir bağlanma ile antijen-antikor kompleksi oluşmaktadır. Bu kompleks ışık ya da elektron mikroskop kullanılarak saptanabilir (80,81).

Antikorların işaretlenmesine göre immünohistokimya yöntemi üçe ayrılır (79-81). İmmünoenzim Yöntemi: İmmünohistokimyasal boyama yöntemleri ile dokudaki işaretlemenin görünür kılınması enzim-substrat reaksiyonu sayesinde olmakta ve son ürün ışık mikroskobunda incelenmektedir. İşaretleme için sık kullanılan enzimler alkali fosfataz ve peroksidaz enzimleridir. Yöntemin diğer işaretleme yöntemlerine göre avantajı reaksiyonun uzun süre görünür kalabilmesidir. İmmünofluorasan Yöntemi: Antikorlara çeşitli dalga boyundaki fluoresan yayan fluorokromlar bağlanarak reaksiyon fluoresan mikroskopda incelenir. Yöntemin diğer yöntemlere göre dezavantajı sinyallerin çabuk solması ve morfolojik yapının tam korunamamasıdır. İmmünometal Yöntemi: İşaretleyici olarak en çok kolloidal altın kullanılmaktadır. Kolloidal altın ışık ve elektron mikroskopda izlenebilmektedir. Yöntem diğer yöntemlere göre duyarlılığının az olması bakımından dezavantajlıdır.

İşaretli antikorun doğrudan antijen ile birleşmesi direkt yöntem olarak ilk kez uygulanmıştır. Daha sonra ise işaretlenmiş olan ikinci (sekonder) antikor-

enzim ile reaksiyonun görünür hale getirildiği indirekt yöntem geliştirilmiştir. İmmünohistokimya yöntemi ışık ve elektron mikroskopda direkt ve indirekt olmak üzere iki şekilde uygulanır. Direkt yöntem: Spesifik işaretli antikorun antijene direkt olarak bağlanması ile antijenin yerinin mikroskopda incelenmesidir. En çok alkali fosfataz, peroksidaz ve fluorokrom antikor işaretleme için kullanılmaktadır. İndirekt yöntem: İşaretsiz birinci (primer) antikor dokuda bulunan antijenle reaksiyona sokulur. Sonra işaretli ikinci antikor ile inkübe edilir. Sekonder antikor primer antikorun farklı antijenik bölgelerine bağlandığından oluşan reaksiyon daha büyük bir sinyal olarak gözlenir. Antijenin yeri işaretlenmeye uygun mikroskopda görülür. Bu yöntem direkt yönteme göre daha hassastır. En yaygın kullanılan antikor işaretleme peroksidaz yöntemidir (80,81).

2.3.1.Streptavidin-Biotin-Peroksidaz Yöntemi

Avidin glikoproteini yüksek bir izoelektrik noktaya sahip olduğundan dokuda nukleus gibi negatif yüklü moleküllere kolayca bağlanması ve karbonhidrat molekülleriyle reaksiyona girebilmesi bakımından dezavantajlıdır. Bu nedenle *Streptomyces avidinii* adlı bakteriden elde edilen streptavidin proteini kullanılmaktadır. İzoelektrik noktasının nötre yakın olması ve karbonhidrat moleküllerine bağlanamaması streptavidini avidine göre avantajlı yapmaktadır. Güçlü pozitif sinyallerin gösterilmesi bakımından hassas bir tekniktir (79,82). İmmünohistokimyasal boyama yönteminde işaretlemenin görünür olması için enzim-substrat reaksiyonuna bağlı olarak ortaya çıkan son ürünün gösterilmesi kromojenler ile mümkün olur. En çok kullanılan kromojenlerden biri kırmızı reaksiyon ile görünmesini sağlayan AEC (3- amino-9 etil karbazol)'dir. Preparat su bazlı bir kapama solüsyonu ile kapatılmalıdır. Kromojenlere bir diğer örnek ise kahverengi reaksiyon görünmesini sağlayan DAB (Diaminobenzidin), tetrametil benzidin ve CN (4-kloro-1- naptol)'dır (82).

2.4. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR)

RT-PZR önce ribonükleik asit (RNA)'ten tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezlendiği daha sonra sentezlenen cDNA'nın standart PZR ile çoğaltılmasının gerçekleştirildiği iki adımdan oluşan bir yöntemdir. RT-PZR, mRNA miktarlarının belirlenmesi ile gen ekspresyon çalışmaları için uygundur. cDNA sentezi için farklı kaynaklardan izole edilmiş, DNA polimeraz aktivitesine sahip, ters transkriptaz enzimleri kullanılır. Ters transkriptaz işlemi gen spesifik primerler, raslantısal hekzamer primerler ya da oligo-dT primerleri kullanılarak gerçekleştirilir (79). PZR devam ederken aynı zamada veriler toplandığından çoğalma ve inceleme tek bir aşamada gerçekleşmektedir. Bu işlem, PZR ürün konsantrasyonları ile fluoresan yoğunluğunun ilişkilendirilmesini sağlayan farklı fluoresanlar kullanılarak yapılmaktadır (79,83). DNA-bağlayıcı boyalar ve fluoresan işaretli primerler kullanılan kimyasallardandır. Ölçülen fluoresan, her döngüde çoğalan ürün miktarı ile doğru orantılı olarak ifade edilir. Gerçek zamanlı PZR sonuçları kalitatif olarak ifade edilen dizinin olması ya da yokluğu ya da kantitatif olarak ifade edilen DNA'nın kopya sayısı ile RT-PZR aynı zamanda kantitatif qRT-PZR olarak da ifade edilmektedir.

2.5. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem

Serbest radikaller eşleşmemiş en az bir elektronu bulunan dayanıksız yapıda atom veya moleküllerdir. Elektron alıp dengelemek istedikleri için diğer moleküllerle reaksiyona girerler (82). Bu şekilde oksidatif stres oluşur. Oksidatif stres, organizmadaki pro-oksidan ve anti-oksidan dengesinin pro-oksidanlar lehine bozulması durumudur. Oksidatif stresin tetiklediği inflamatuvar mekanizmalar tarafından şiddetlenen süreçlerden biri insülin direncidir. Diyabetik komplikasyonların klinik bulguları ortaya çıkmadan önce oksidatif stres oluştuğu ve bu durumun hastalığın patogenezinde anahtar rol oynadığı belirtilmiştir. Glutatyon antioksidan belirteçlerinden iken lipid peroksidasyonu ve protein karbonil oksidatif stres için biyolojik belirteçlerdir (84, 85).

2.5.1. Lipid Peroksidasyonu

Serbest radikallerin oluşturduğu çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak tanımlanmaktadır. Yağ asitlerinin oksidasyonu serbest radikallerle reaksiyona giren yağ asitlerinin metilen gruplarından bir hidrojen atomunun koparılmasıyla başlar ve lipid radikalini oluşturur. Daha sonra oluşan lipid radikalinin oksijenle reaksiyona girmesiyle de lipid hidroperoksitleri meydana gelir. Süperoksit radikal anyonu hücresel lipidlerle reaksiyona girince oluşan lipid peroksitler malondialdehit (MDA) ve hidroksinonenal (4-HNE)'e metabolize olurlar ve hücre hasarı meydana gelir. Serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerinden birini oluştururlar. Lipid peroksidasyonun son ürünlerinden olan MDA hücresel hasarının derecesi için önemlidir (86).

2.5.2. Protein Oksidasyonu

Proteinlerin reaktif oksijen türleri ile reaksiyonu sonucunda protein oksidasyonu meydana gelmektedir. Proteinlerin oksidatif reaksiyonları amino asit yan zincirlerinin hidroksil ya da karbonil gruplarının modifikasyonu, protein-protein çapraz bağlarının oluşumu, polipeptid zincirlerinin parçalanması gibi sonuçlara neden olmaktadır. Protein karbonil gruplar lipid hasarı sonucunda oluşan aldehitlere göre daha uzun ömürlü olduklarından hücresel oksidatif hasarın belirteci olarak kabul edilirler (90).

2.5.3. Glutatyon (GSH)

Oksidatif strese karşı koruyucu rol oynayan tripeptit (γ-glutamil-sisteinil-glisin) yapıda önemli bir antioksidandır. Organizmalarda GSH zararlı bileşiklerin etkisizleştirilmesinde önemli rol oynar. Hücre içerisinde indirgenmiş formda bulunur. Proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarının redükte halde kalmasını sağlayarak bu grupları oksidasyona karşı korur. GSH antioksidan enzimlere substrat olarak radikal kaynaklı hasarı ve hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşmesini engeller (87,88). GSH glutatyon peroksidaz ve redüktaz enzimlerinin aktiviteleri için önemlidir. Oksidatif stres ile GSH

konsantrasyonunu azalmaktadır. GSH'ın DNA, protein ve lipid gibi hücresel makromoleküllerini çevresel ve sitotoksik ajanlara karşı koruyucu etkisi vardır. Yapılan çalışmalarda GSH düzeylerinin diyabetli hastalarda sağlıklı kişilere kıyasla anlamlı şekilde düşük olduğu bildirilmiştir (89, 90).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE)'nden temin edilen 8-10 haftalık 200-250 g Sprague Dawley türü erişkin erkek sıçanlar her kafeste tek hayvan olacak şekilde kullanıldı ve araştırma deneyleri bu merkezde gerçekleştirildi. Hayvanlar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyodunda 21± 2 derecede, çeşme suyu ve *ad libitum* pellet olarak beslendi.

3.1. Deney Modeli

Yirmi bir adet Sprague Dawley sıçanlar rastgele üç gruba ayrıldı.

1. Grup (n = 7): Kontrol grubu

Hayvanlar standart sıçan yemi *ad libitum* ve çeşme suyu ile beslendi.

2. Grup (n = 7): Tip 2 Diyabet (T2DM) grubu

Sıçanların içme suyuna iki hafta boyunca % 10'luk fruktoz uygulamasını takiben tek doz 40 mg/kg streptozotosin (STZ) intraperitoneal (ip) olarak uygulandı. Ayrı kafeslerde beslenen sıçanların yem ve su tüketmeleri takip edilerek günlük olarak ölçüldü STZ enjeksiyonundan 72 saat sonra sıçanların kuyruk kan örneklerinden glukoz ölçüm cihazı (Accu-Chek glucometer; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) kullanılarak glukoz düzeyleri tayin edildi. Açlık kan glukoz seviyesi > 200 mg/dL olarak saptanan hayvanlar diyabet olarak kabul edildi.

3. Grup (n = 7): Tip 2 diyabet + ghrelin (T2DM+Gh) grubu

Tip 2 diyabetik sıçanlara 2 hafta süresince 25 µg/kg/gün ghrelin (Kat No: AnaSpec, 24160) ip. olarak uygulandı. Ayrı kafeslerde beslenen sıçanların yem ve su tüketmeleri takip edilerek günlük olarak ölçüldü. Deney sonunda bir gece aç bırakılan hayvanlardan anestezi altında mide doku örnekleri alındı. Alınan doku örnekleri ikiye ayrıldı fundus dokuları fikse edilmek üzere %10'luk nötral formaline alındı ve 16 saat +4 °C' de tespit edildikten sonra çeşme suyu ile

yıkanarak %70'lik alkole alındı. Ardından yükselen alkol serilerinden sonra toluole alınıp parafine gömüldü. Ayrılan diğer doku kısmı ise -80 °C' de çalışma gününe kadar saklandı.

3.2. Morfolojik İnceleme

Parafin bloklardan mikrotom ile 4 µm kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen&Eosin (H&E) boyası uygulandı. İmmünohistokimyasal boyama öncesi H&E boyama ile fundus mukoza kesit uygunluğu teyit edildi.

3.2.1. Hematoksilen&Eozin

- Kesitlerin parafini toluolde (30') giderildi. Kesitler azalan alkol serisinden (%100 - %96 - %70) geçirilerek saf suya indirildiler.

- Ehrlich Hematoksilen ile (35') boyama yapıldı.

- Kesitlere çeşme suyu ile (20') mordanlama uygulandı.

- Eozin ile (2'') boyandı.

- Kesitler saf suda çalkalanıp yükselen alkol serisinden (%70 - %96 - %100) geçirilerek toluole alındı.

- Kesitler entellan kapama medyumu kullanılarak kapatıldı.

3.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Dondurulmuş dokulardan önce total RNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra RNA saflığı ve miktar tayini yapıldı. Ardından tüm örneklerden eşit miktarda RNA alınarak cDNA sentezlendi. Primerler (Tablo 3-3) kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon (RT-PZR) yöntemiyle IL-6, IL-1β, TNF-α ve IL-10 mRNA ekspresyon seviyeleri saptandı. Normalizasyon için β aktin kullanılarak hesaplamalar pfaffl metoduna göre yapıldı.

3.3.1. RNA İzolasyonu

Mide dokularından RNA izolasyonu için Hibrigen kit (Kat No: MG-RNA-01) protokolü uygulandı.

- Ortalama 75 mg doku, steril bistüri ile kesilerek tartıldı.

- Deneye buz üzerinde devam edilerek dokunun üzerine 500 µl liziz buffer eklendi ve bistüri ile küçük parçalara bölündü. Ardından 500 µl daha liziz buffer eklenerek 1 ml içinde doku tamamen parçalandı.

- Parçalanan mide doku homojenatı mikrotüpe alınarak oda ısısında 5’ inkübe edildi.

- Homojenat 5’ 12.000 rpm de santifüj edildi.

- Süpernatant mikrotüpe alındı ve üzerine 200 µl kloroform eklendi.

- Homojenat 20’’ hızlıca vortekslendikten sonra 3’ oda ısısında inkübe edildi.

- Sonrasında 10’ 12.000 rpm de santifüj edildi.

- Mikrotüpte 3 farklı faz gözlemlendi. Üst faz dikkatlice yeni bir mikrotüpe alındı.

- Alınan miktarın yarısı kadar absolü etanol eklendi ve hızlıca karıştırılarak kolona aktarıldı.

- Kolon 12.000 rpm de 30’’ santrifüj edildi.

- Kolondan geçerek altta kalan etanol atıldı. Filtre üzerine 500 µl yıkama tamponu eklendi.

- Kolon 12.000 rpm de 30’’ santrifüj edildi.

- Altta kalan yıkama tamponu atıldı.

- Filtre üzerine 500 µl ikinci yıkama tamponu eklendi. Oda ısısında 1’ inkübe edildi.

- Kolon 12.000 rpm de 30’’ santrifüj edildi. Ardından altta kalan ikinci yıkama tamponu atıldı.

- Kolon 12.000 rpm de 30'' santrifüj edildi. Ardından altta kalan ikinci yıkama tamponu atıldı, kolon kuruması için 2' 12.000 rpm de santrifüj edildi.

- Filtreler RNaAz içermeyen mikrotüplere aktarıldı. Üzerine 40 µl elution solüsyonu (DEPC içeren su) eklendi. 2' oda ısısında inkübe edildi.

- Örnekler 2' 12.000 rpm de santrifüj edildi.

- Filtreler atılarak mikrotüpler kademeli olarak önce -20 sonra -80 °C 'ye alındı.

3.3.2. RNA Saflık ve Miktar Tayini

Mide dokularından elde edilen total RNA'lanın saflık ve miktarının belirlenebilmesi için nanodrop cihazı kullanıldı. Ölçümde 1 µL RNA kullanılarak 230, 260 ve 280 nm dalga boylarınd

a spektrofotometrik olarak saflık ve konsantrasyon incelemeleri yapıldı. Saflık açısından 260/280 ve 260/230 oranlarına göre sonuçlar sırasıyla 1.8 ve 2.0 kadar olanlar uygun olarak kabul edildi.

3.3.3. cDNA Sentezi

Her örnekten 200 ng RNA alınarak reaksiyon karışımı (Tablo 3.1) eklendi. +25 °C'de 10', +37 °C'de 120' ardından da +85 °C'de 5' inkübe edildi (Tablo 3.2). Oluşturulan cDNA örnekleri -80 °C'de muhafaza edildi.

Deney sonrası elde edilen cDNA örnekleri, kademeli sıcaklık düşürülerek önce -20 ℃ daha sonra ise -80 ℃ de muhafaza edildi. Deney grupları arasında IL-6, IL-1β, TNF-α ve IL-10 mRNA düzeyindeki değişiklikler RT-PZR yöntemi ile incelendi. Housekeeping gen olarak her dokuda eksprese edildiği bilinen β-aktin kullanıldı (Tablo 3-3).

Tablo 3-1: cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon karışımı

10X tampon	**2 µl**
25X dNTP	**0.8 µl**
Ters transkriptaz	**1 µl**
Nükleaz içermeyen su	**4.2 µl**
Random primer	**2 µl**
Toplam	**10 µl**

Tablo 3-2: cDNA reaksiyonu için bir siklusun süreleri

Süre (dk)	**Sıcaklık (℃)**
10 ‘	25 ℃
120 ’	37 ℃
5’	85 ℃
∞	+4 ℃

Liyofilize primerler üzerine 250 µl RNAz içermeyen su eklenerek µl başına 250 pmol olacak şekilde dilue edilerek vortekslendi ve alikotlandı. Çalışma öncesinde ise primerler 1:10 olacak şekilde sulandırıldı. Her örnek primer ve reaksiyon karışımı ile birlikte eklendi (Tablo 3-4). SYBR green qPZR sentez kiti (Kat no: MG-SYBRMX-01) kullanıldı.

Tablo 3-3: Primer dizileri. İnterlökin-6 (IL-6), interlökin-1 beta (IL-1β), tümör nekroz faktör- α (TNF-α), interlökin-10 (IL-10).

mRNA	Primer dizileri
IL-6	Forward : 5’ –ACC ACC CAC AAC AGA CCA GT -3’ (20mer) Reverse : 5’ –TTT GGA AGC ATC CAT CAT TTC -3’ (21mer)
IL-1β	Forward: 5’ –TGT GAT GAA AGA CGG CAC AC -3’ (20mer) Reverse : 5’ –CTG CTT GAG AGG TGC TGA TG -3’ (20mer)
TNF-α	Forward : 5’- ACC ACG CTC TTC TGT CTA CTG - 3’ (21mer) Reverse : 5’- CTT GGT GGT TTG CTA CGA C -3’ (19 mer)
IL-10	Forward : 5’ –CCC AGA AAT CAA GGA GCA TT -3’ (20mer) Reverse: 5’ –ATG GCC CAG GCT TAC CTT AT -3’ (20mer)
β-Aktin	Forward : 5’ –GAG GCC CAG AGC AAG AGA G -3’ (19mer) Reverse : 5’ –TCT CCG GAG TCC ATC ACA AT -3’ (20mer)

Tablo 3-4: RT-PZR reaksiyon karışımı

Master mix (SYBR Green)	10 µl
Primer (0,5 forward + 0,5 reverse)	1 µl
cDNA	2 µl
RNAz içermeyen su	7 µl

Toplam 20 µl hacim olacak şekilde reaksiyon karışımı kuyucuklara konuldu. RT-PZR siklus süreleri (Tablo 3-5) işaretlenerek cihazda reaksiyon başlatıldı ve 40 siklus devam ettirildi.

Tablo 3-5: RT-PZR reaksiyonunda her bir siklusun süreleri.

Sıcaklık (℃)	Süre (dk)
95℃	3’
95℃	10’’
59℃	30’’
72℃	30’’

3.4. İMMÜNOHİSTOKİMYA (İHK) YÖNTEMİ

Mide fundus dokularından yaklasık 4 µm kalınlığında alınan kesitler toluolde bekletildi, azalan alkol sersinden geçirilerek (%100 - %96 - %70) ghrelin (H-031-30,phoenix Pharm.Inc) ve NF-κβ (Santa cruz sc-8414) antikorları ile streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemine göre boyandı. Histostain plus IHK kit (İnvitrogen 85-9643) ve AEC substrat kit (İnvitrogen 00-2007) üretici firma protokollerine göre uygulandı.

3.4.1. Ghrelin antikoru ile İHK

- Kesitlere sitrat tampon (pH=6.0) ile 3x5’ mikrodalgada antijen iyileştirme uygulandı.

- Kesitler 5’ distile suda sonra 10’ PBS’te bekletildi.

-Metanol içinde çözülen %3’lük hidrojen peroksit 10’ boyunca uygulanarak endojen peroksit bloklama yapıldı.

- 3x5’ PBS’ten geçirildi.

- 20’ bloklama solüsyonu olarak %10 keçi serumu uygulandı.

- Ghrelin antikoru (1:30) ile 72 saat süresince +4℃’de inkübe edildi.

- Kesitler 3x5’ PBS ile yıkandı.

- Sonrasında 20’ biyotin ile işaretlenmiş sekonder antikor uygulandı.

- 3x5’ PBS ile yıkandı.

- 20’ streptavidin-peroksidaz uygulandı.

- 3x5’ PBS ile yıkandı.

- Kesitlere AEC kromojeni uygulanarak ışık mikroskobunda reaksiyon alındı.

- Mayer’s hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

- Kesitler gliserin jel ile kapatıldı.

3.4.2. NF-κβ antikoru ile İHK

- Kesitlere Tris-EDTA tamponu (pH=9.0) ile 5x3’ mikrodalgada antijen iyileştirme uygulandı.

- Önce 5’ distile suda sonra 10’ PBS’te bekletildi.

- %3’lük hidrojen peroksit 10’ uygulandı.

- Kesitler 3x5’ PBS’ten geçirildi.

- 20’ bloklama solüsyonu olarak %10 keçi serumu uygulandı.

- Kesitler NF-κβ antikoru 1:50 dilüsyon ile 48 saat +4℃’de inkübe edildi.

- 3x5’ PBS ile yıkandı.

- 20’ sekonder antikor uygulandı.

- 3x5’ PBS ile yıkandı.

- 20’ streptavidin-peroksidaz uygulandı.

- 3x5’ PBS ile yıkandı.

- Kesitlere AEC kromojeni uygulanarak ışık mikroskobunda reaksiyon alındı.

- Mayer’s hematoksilen ile zıt (nukleus) boyama yapıldı.

- Kesitler gliserin jel ile kapatıldı.

3.5. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

Mide dokularından serum fizyolojik içerisinde %10'luk homojenatlar hazırlandı. Homojenatlar santrifüj edilerek elde edilen supernatantlardan lipid peroksidasyon belirteci olan malondialdehit (MDA) Ledwozyw yöntemine göre (91), protein karbonil (PCO) seviyesi Reznik ve Packer yöntemine (93) göre ve glutatyon (GSH) ise Beutler metoduna göre (92) göre tayin edildi.

3.5.1. Dokuda Protein Miktarının Belirlenmesi

Mide doku homojenatında total protein miktarı Bradford yöntemine (94) göre ölçüldü. Commassie Brilant blue G-250 boyası ile hazırlanan Bradford solüsyonu kullanıldı. Standart için bovine serum albumin (BSA) stok 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 ve 0.0625 mg/ml dilüsyonlarda olacak şekilde hazırlandı. Örnekler Bradford solüsyonu ile karanlıkta 10' muamele edildikten sonra 595 nm absorbansta ölçüm yapıldı. Hesaplama standart eğri formülü kullanılarak mg/ml olarak yapıldı.

3.5.2. Malondialdehit (MDA) Aktivitesi

- Dokuda malondialdehid tayini için, %30'luk trikloroasetik asit (TCA), 5 M HCI, %0.75 tribarbitürik asitin (TBA) 100 ml saf suda çözülerek hazırlanan çözelti kullanıldı.

- Çözelti tüplere eklendikten sonra vorteks ile karıştırılıp oda sıcaklığında 15' bekletildi.

- Tüpler su banyosunda ağızları kapalı bekletildi.

- İnkübasyon sonrası alınan tüplerin ağızları açılarak soğumaya bırakıldı.

- Tüpler 10' 4000 rpm' de santrifüj edildi.

- Oluşan pembe renkli çözelti santrifüj edildi ve berrak olan üst sıvı alınarak 532 nm'de köre karşı okundu.

- Sonuçlar dokunun protein miktarına oranlanarak nmol/mg olarak hesaplandı.

MDA (mikromol/L) = (Absorbans/1.56 X 10^5) x (Total hacim / Örnek hacim) X (10^6)

3.5.3. Protein Karbonil (PCO) Tayini

- Tüplere 60 µl doku homojenatı ve 140 µl soğuk % 0.9'luk NaCI eklendi ve vortekslendi.

- Örneklere 800 µl 2,4-Dinitrofenilhidrazin (DNPH) çözeltisi eklendi. 15 dakikada bir kez vortekslenerek bir saat karanlıkta inkübasyon gerçekleştirildi.

- Proteinleri çöktürmek için tüplerin içine 1 ml %20'lik TCA eklendi ve çalkalandı.

- Vorteks sonrası 5000 g'de 5' soğuk santrifüj gerçekleştirildi.

- Süpernatant fraksiyonu, pelet kaybı olmamasına dikkat edilerek atıldı.

- Yıkama için kalan pellet üzerine 800 µl %10'luk TCA eklendi.

- Vorteks işleminden sonra 5000 g de 5' soğuk santrifüj yapıldı.

- Peletler etanol:etil asetat (1:1) ile yıkandı.

- Yıkama sonrası pelet üzerine 400 µl guanidin-HCL çözeltisi konularak vortekslendi ve çözünmesi sağlandı. Örnekler guanidin körüne karşılık 360 nm'de okundu.

- Elde edilen sonuçlar kromoforik hidrazonların molar ekstinksiyon katsayısı olan 22000 M^{-1} cm^{-1} kullanılarak PCO konsantrasyonları hesaplanarak protein konsantrasyonuna oranlandı.

3.5.4. Glutatyon (GSH) Tayini

-Çöktürme çözeltisi 1.67 g glasiyel metafosforik asit, 0.2 g EDTA-Na_2HPO_4 ve 30 g NACl distile suda çözülerek 100 ml' ye tamamlandı.

-Deney tüpüne 75 µl çöktürme çözeltisi ve 50 µl doku homojenatı konularak vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra 4000 rpm'de santrifüj edildi.

-Santrifüj sonrası süpernatant ayrıldı ve 50 µl süpernatant, 200 µl sekonder sodyum fosfat (0.3 M) ve 25 µl 5-5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) eklendi.

-Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra oda ısısında 5' bekletildi.

-Örneklerin 412 nm dalga boyunda köre karşı absorbansları okundu.

-Absorbans sonuçları (mikromol/L) standart eğri grafiğine göre hesaplandı ve dokunun protein konsantrasyonuna oranlanarak glutatyon miktarı nmol/mg olarak verildi.

3.6.İstatistiksel Analiz

İHK yöntemine göre boyanan kesitlerde immün pozitif hücre sayısı kesitlerde rastgele bir alan atlayarak belirlendi. Toplamda 10 alan Nikon Eclipse 80i model ışık mikroskobu kullanılarak NIS Elements D 3.1 ölçüm programı ile immün pozitif hücreler sayıldı. RT-PZR, İHK ve biyokimyasal parametrelerin istatistiksel hesaplamalarında sonuçlara normalite testi yapıldı. Normal dağılan verilerin gruplar arası çoklu karşılaştırmalarında One Way ANOVA, ikili karşılaştırmalarında ise Tukey HSD testi kullanıldı. Normal dağılmayan verilerin ise gruplar arası çoklu karşılaştırmalarında Kruskal Wallis, ikili karşılaştırmalarda ise Mann Whitney U testleri kullanıldı.

İstatistiksel analizlerde IBM SPSS Statistics 20 ve *GraphPad Prism 8* programları kullanıldı. $p< 0.05$ ise anlamlı, $p< 0.01$ ise ileri derecede anlamlı ve $p< 0.001$ ise çok ileri derecede anlamlı olarak kabul edildi.

3.7. Kullanılan Cihazlar

Etüv, Elektro-Mag M420B

Hassas terazi, Radwag, AS60/220.R2

Manyetik karıştırıcı, Elektro-Mag M21

Mikrodalga fırın, Beko 1550

Mikropipetler, Ependorf, Thermo, İnterlab

pH metre, Scheat pH-meter CG825

Saf su cihazı, Millipore Elix3

Işık mikroskobu- Olympus CX21

Işık Araştırma mikroskobu, Nikon Eclipse 80i.

Su banyosu, Köttermann

Mikrotom, Reichert 390965

Buzdolabı, Vestel Eco NF465

RT-PZR cihazı, Bio-rad CFX96

Nanodrop, Thermo-Fisher

86℃ Derin dondurucu, ELCOLD EL-19

Santrifüj cihazı, Beckman Coulter Allegra 64R, X-30R

Spektrofotometre, Shimadzu, 1800

Homojenizatör, IKA RW16

3.8. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Toluol, Merck 1.08323.2500

Parafin, Merck 1.07337.1000

Asetik asit, Atabay AA 002 L50

Gliserin, Atabay AS040L50

Jelatin, Sigma G-8150

Ethanol, Merck 1.00986.2500

Na_2HPO_4, Fluka 71640

NaH_2PO_4 Fluka 71496

$NaH_2PO_4H_20$, Merck 6345.1000

$Na_2HPO_42H_20$, Merck 1.06576.1000

NaCl, Merck 6400.1000

Trikloroasetik asit, Sigma T9159

Triklorobarbitürik asit, Merck 108180

Kloroform Sigma SK.R.24216

Poli-L-lisin Sigma S.B.P8920

Sodyum Sitrat, Sigma S4641

Sitrik Asit, Riedel 27102

Streptozotosin (STZ) Sigma-Aldrich Kat No:S0130

SyBR Green qPZR Mix, MG-SYBRMX-01

cDNA sentez kiti,Hibrigen Kat No:4387406

RNA Ekstraksiyon Kiti, RNA izolasyon Hibrigen kit MG-RNA-01

Histostain Plus Broad Spectrum kiti, Life technologies Kat No:85-9043

AEC Substrate Kit, İnvitrogen Kat No:00-2007

Fruktoz, Merck, 104005

Guanidin -HCl Sigma, G7284

2,4-dinitrofenilhidrazin, Sigma D19893

Etilendiamin tetraasetik asit, Sigma E5134-50G

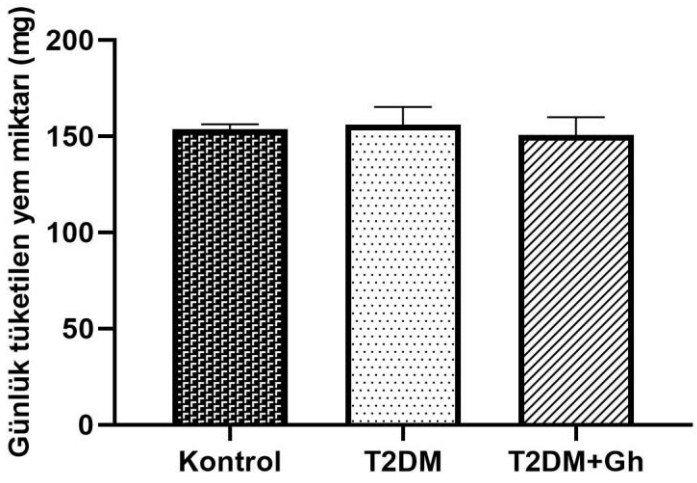
4. BULGULAR

Her üç grubun açlık kan glukoz ortalama değerleri kontrol grubunda 82.14 ± 4.72, T2DM grubunda 340.33 ± 19.49 ve T2DM+Gh grubunda 328.2± 53.19 olarak saptandı (95).

4.1. Su ve Yem Tüketim Ölçümleri

4.1.1. Günlük tüketilen yem miktarı

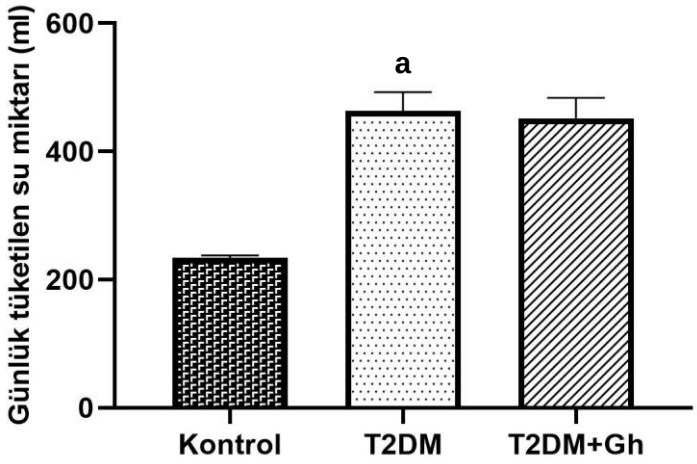
Sıçanların günlük tüketilen yem miktarı takip edilip deney sonunda karşılaştırıldığında gruplar arasında yem miktarları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (p^{ANOVA}=0,4081) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Sıçanların günlük tüketilen yem miktarı (mg) ortalamaları. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak verildi (n=7).

4.1.2. Günlük tüketilen su miktarı

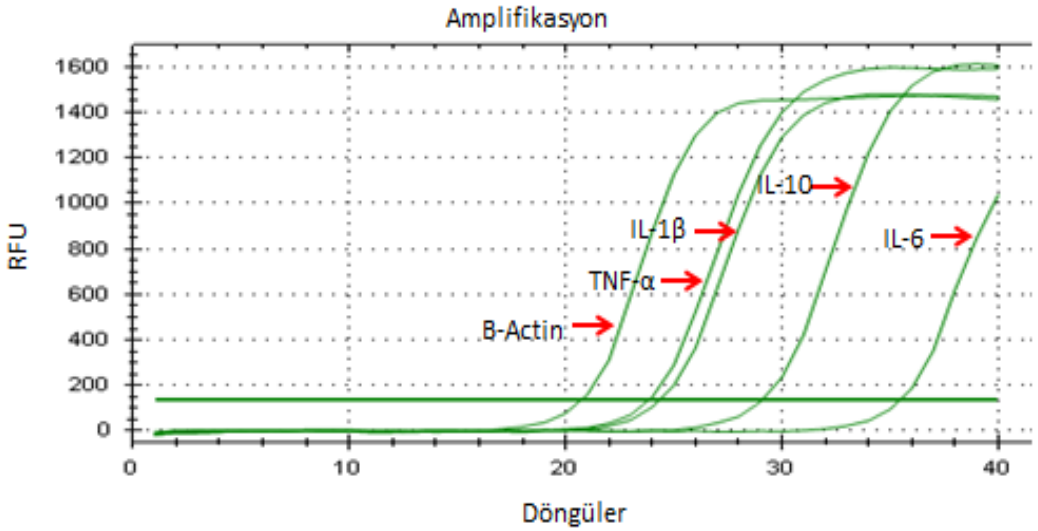
Hayvanların günlük su tüketimleri takip edildi ve deney sonunda karşılaştırıldığında, gruplar arasındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p^{ANOVA}=0,000). Kontrol grubu ile T2DM grubu karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre T2DM grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü (p^{a}=0,000). T2DM ve T2DM+Gh grupların ise günlük su tüketimlerinin benzer olduğu görüldü.



Şekil 4.2:**Sıçanların günlük su tüketim miktarları değerlendirildiğinde T2DM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış görüldü. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak değerlendirildi (p^{a}=0,000 kontrol grubuna göre) (n=7).**

4.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-PZR) Analizleri

Deney grupları arasında CT değerleri cihazdan gerçek zamanlı takip edildi (Şekil 4.3).



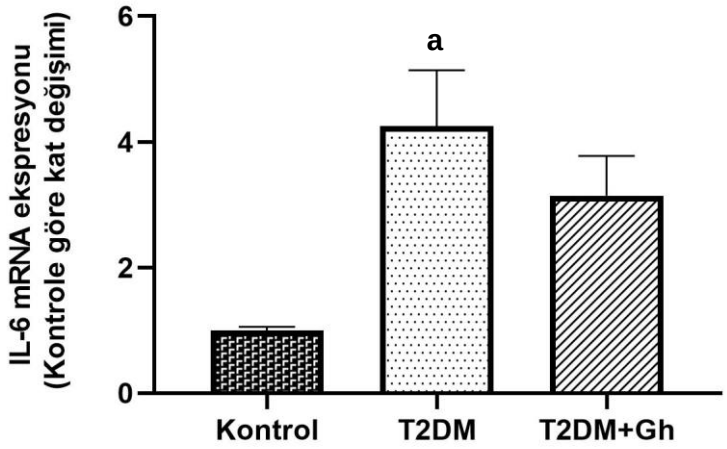
Şekil 4.3: Gerçek zamanlı RT-PZR yöntemi ile kontrol grubuna ait genlerin CT değerleri

4.2.1. IL-6 mRNA ekpresyon seviyesi

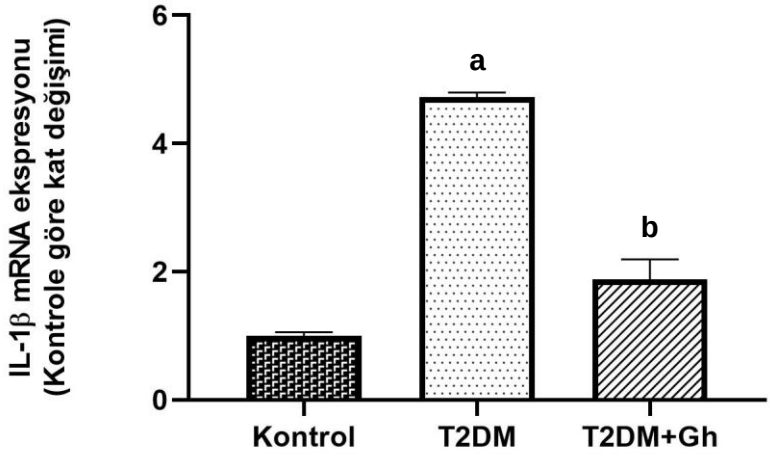
Pro-inflamatuvar sitokinlerden IL-6 mRNA ekspresyon seviyeleri ANOVA testi ile üç grup arasında karşılaştırıldığında gruplar arasındaki değişimler Şekil 4.4'de gösterildiği gibi istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p^{ANOVA}= 0,028). Kontrol grubu ile T2DM karşılaştırıldığında T2DM grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu (p^{a}=0,026). T2DM ile T2DM+Gh grubu karşılaştırıldığında T2DM+Gh grubu IL-6 mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan düşüş saptandı (p= 0,478).

4.2.2. IL-1β mRNA ekspresyon seviyesi

IL-1β mRNA ölçümlerine göre şekil 4.5'de gösterilen üç grup arasındaki değişimler istatistiksel olarak anlamlı olarak bulundu (p^{ANOVA}= 0,000). Kontrol grubuna göre T2DM grubunda IL-1β mRNA seviyesinde ileri düzeyde artış bulundu (p^{a}=0,000). T2DM+Gh grubu T2DM ile karşılaştırıldığında T2DM+Gh grubunda azalma saptandı (p^{b}= 0,000).



Şekil 4.4: IL-6 mRNA ekspresyon seviyesi diğer gruplar ile karşılaştırıldığında T2DM grubunda yüksek bulundu. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak ifade edildi (p^a=0,026 kontrol grubuna göre) (n=7).



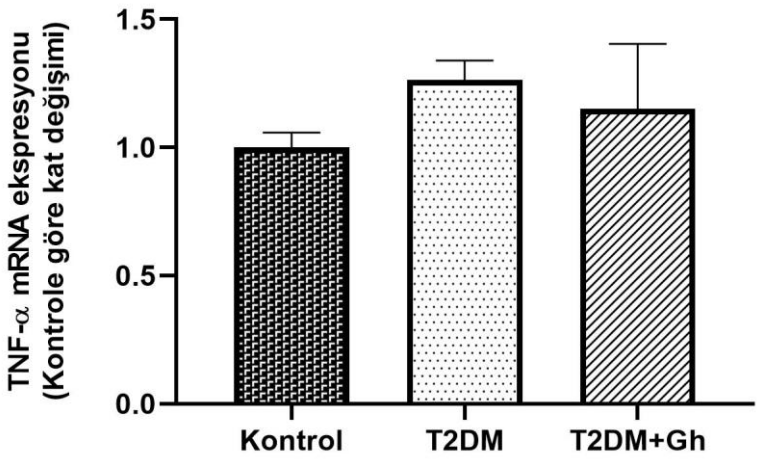
Şekil 4.5: IL-1β mRNA seviyesi en yüksek T2DM grubunda saptandı. (p^a=0,000 kontrol grubuna göre) T2DM+Gh grubunda IL-1β mRNA seviyesi T2DM grubuna göre azaldı (p^b= 0,000 T2DM grubuna göre). Sonuçlar ortalama±standart hata olarak ifade edildi (n=7).

4.2.3. TNF-α mRNA ekspresyon seviyesi

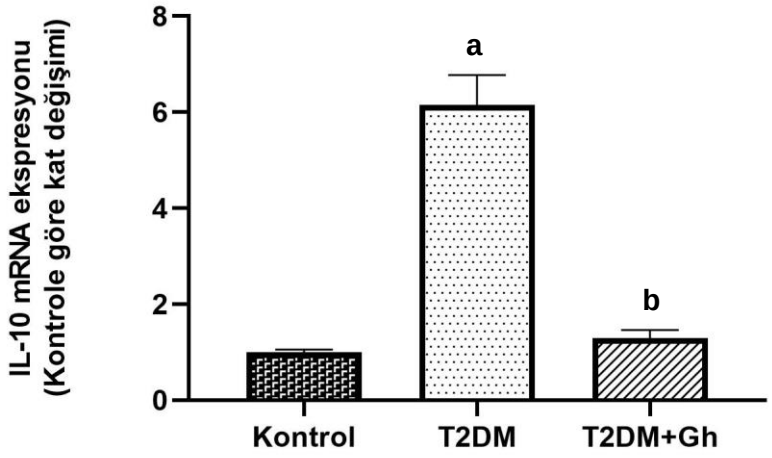
TNF-α mRNA ekspresyon seviyeleri şekil 4.6'da üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim bulunmadı (p^{ANOVA}=0,529).

4.2.4. IL-10 mRNA ekspresyon seviyesi

Anti-inflamatuvar bir belirteç olan IL-10 mRNA seviyesindeki değişiklikler şekil 4.7'de gösterilmiştir. Gruplar arasında saptanan değişimler istatistiksel olarak anlamlılık gösterdi (p^{ANOVA}=0,000). Kontrol ve T2DM karşılaştırıldığında T2DM grubu mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu (p^{a}=0,000). T2DM ile T2DM+Gh grubu karşılaştırıldığında tedavi grubunda istatistiksel olarak da anlamlı bir azalma vardı (p^{b}=0,000).



Şekil 4.6: TNF-α mRNA ekspresyon seviyesinde gruplar arasında anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak değerlendirildi (n=7).



Şekil 4.7: IL-10 mRNA ekspresyon seviyesinin T2DM grubunda en yüksek seviyede saptandı (p^a=0,000 kontrol grubuna göre); T2DM+Gh grubunda ise T2DM grubuna göre azaldı (p^b= 0,000 T2DM grubuna göre). Sonuçlar ortalama±standart hata olarak değerlendirildi (n=7).

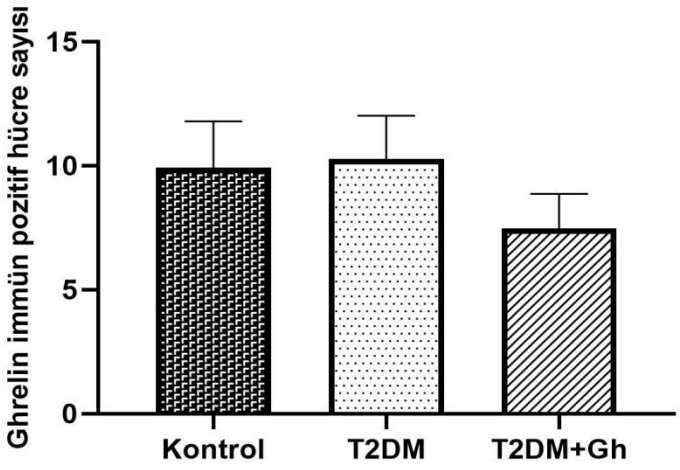
Tablo 4-1: mRNA ekspresyonlarının istatistiksel değerlendirilmesi. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak ifade edildi.

	Kontrol	T2DM	T2DM+Gh
IL-6	1,0000±0,5	4,24±0,89	3,14±0,63
IL-1 β	1,0000±0,5	4,72±0,07	1,87±0,31
TNF-α	1,0000±0,5	1,26±0,07	1,15±0,25
IL-10	1,0000±0,5	6,15±0,61	1,29±0,16

4.3. İmmünohistokimya (İHK) Analizleri

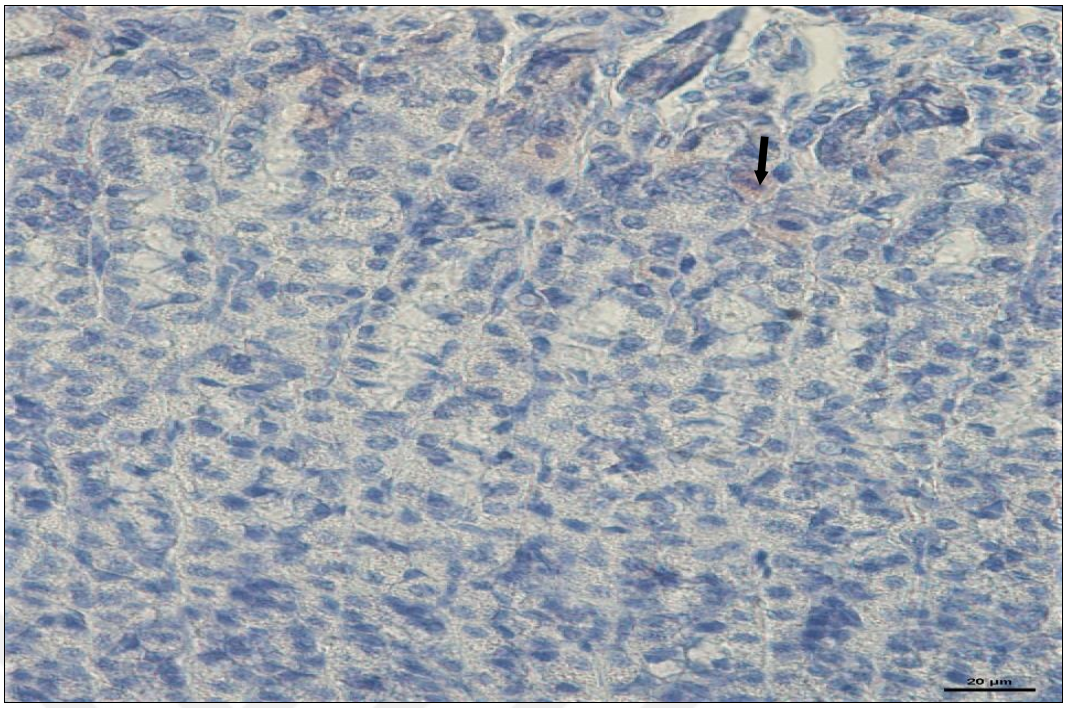
4.3.1. Ghrelin İHK analizi

Sıçan fundus kesitlerine ait immün pozitif hücre sayıları üç grup arasında ANOVA testi ile karşılaştırıldığında gruplar arasındaki değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p^{ANOVA} =0,157).

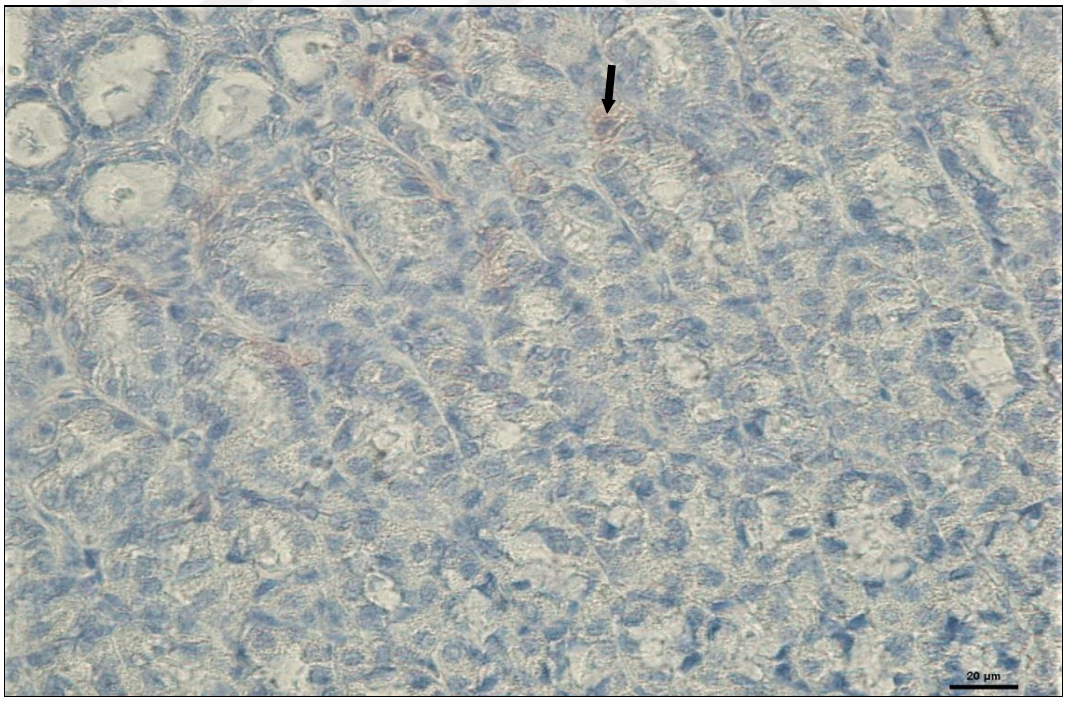


Şekil 4.8: Ghrelin immün pozitif hücre sayısı.

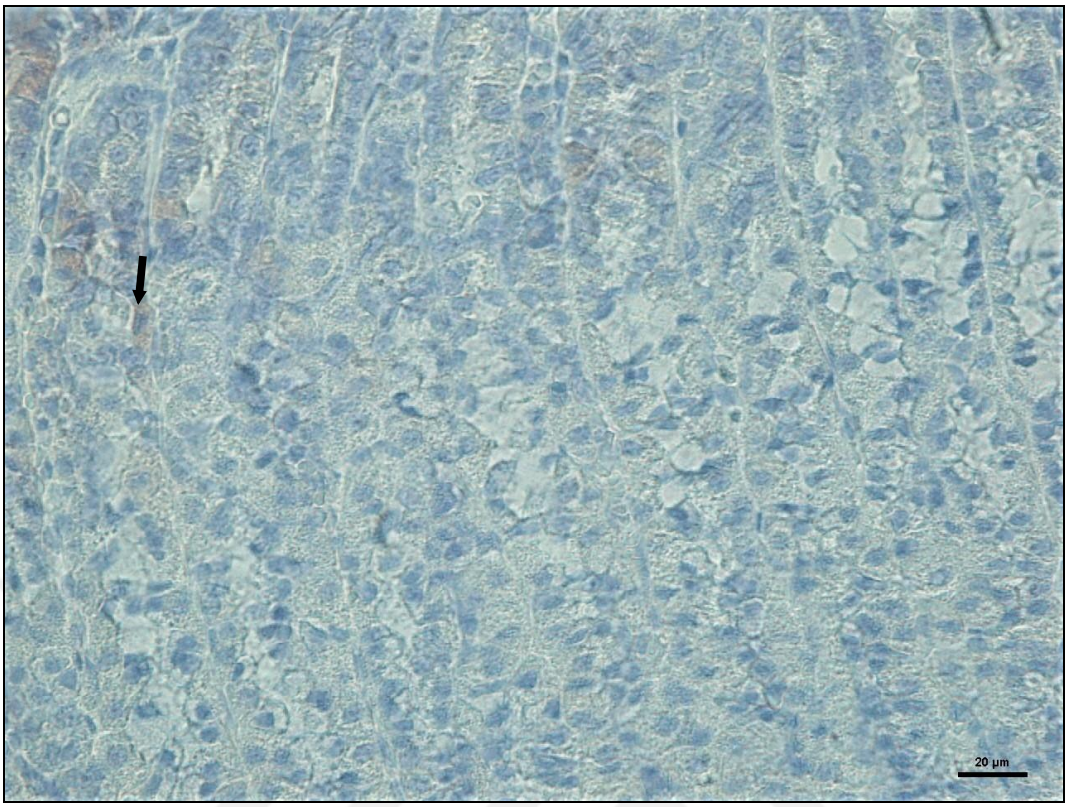
Sonuçlar ortalama±standart hata olarak verildi (n=6).



Şekil 4.9: Kontrol grubuna ait sıçan fundus kesitinde ghrelin immün pozitif hücreler (ok). Streptavidin-biotin-peroksidaz tekniği, hematoksilen zıt boyama.



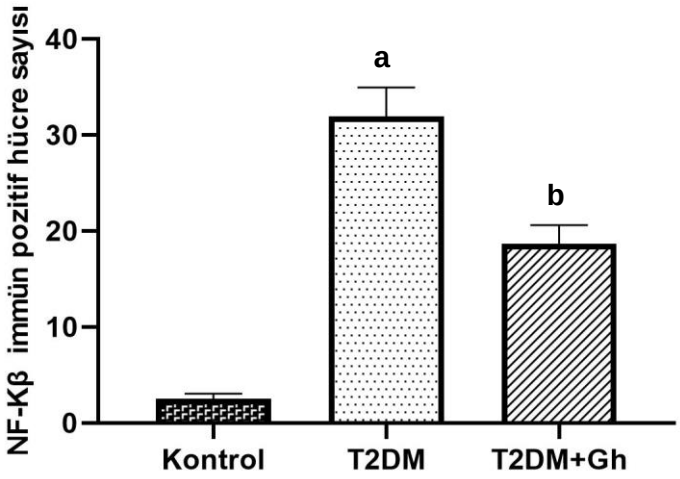
Şekil 4.10: T2DM grubunda ghrelin hücreleri (ok). Streptavidin-biotin-peroksidaz tekniği, hematoksilen zıt boyama.



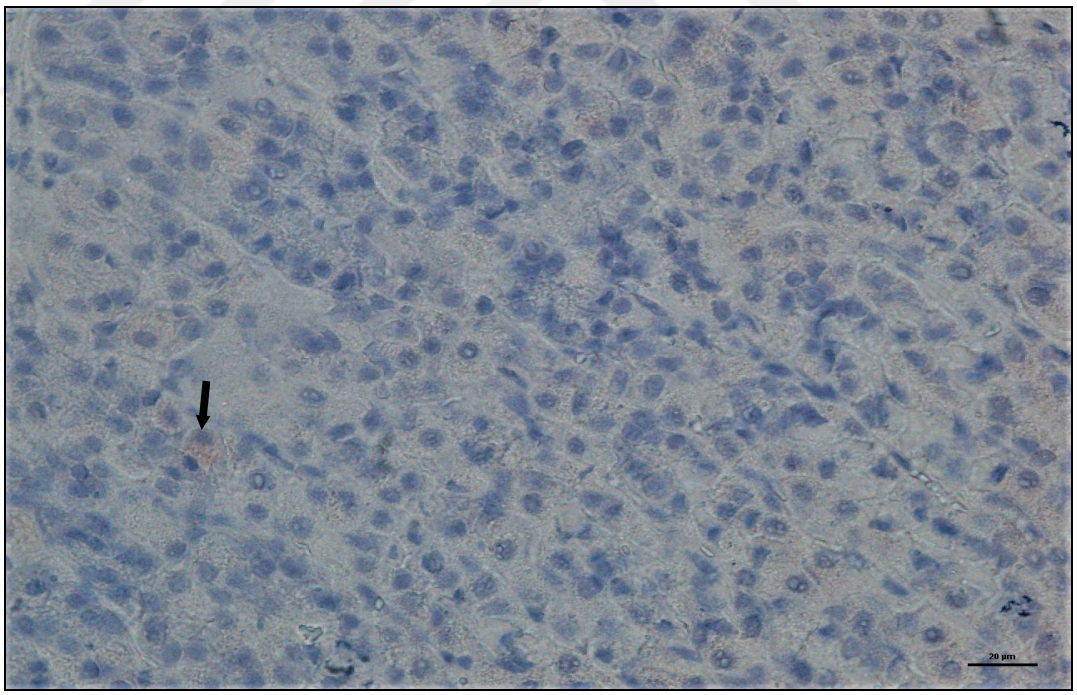
Şekil 4.11: Mide sıçan fundus kesiti. T2DM+Gh grubunda ghrelin hücreleri (ok). Streptavidin-biotin-peroksidaz tekniği, hematoksilen zıt boyama.

4.3.2. NF-Kβ İHK analizi

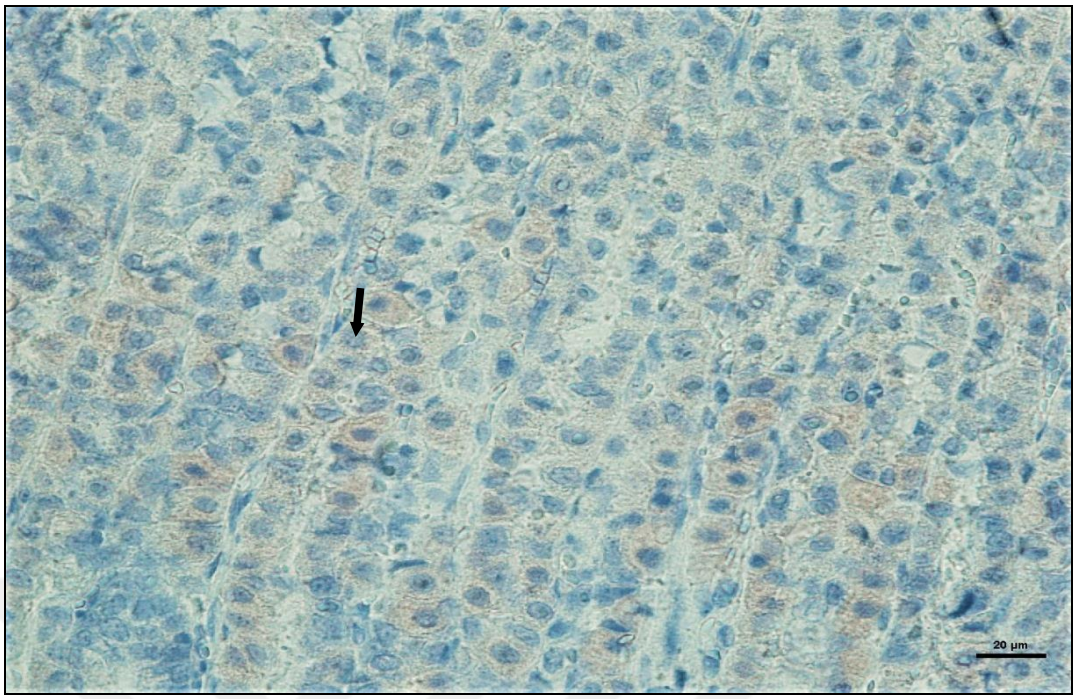
Fundus kesitlerinde immün pozitif hücre sayıları üç grup arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p^{ANOVA}=0,000),(Şekil 4.9). Kontrol grubu T2DM ile karşılaştırıldığında T2DM grubunda NF-Kβ immün pozitif hücre sayısının ileri düzeyde anlamlı olarak arttığı saptandı (p^{a}= 0,000). T2DM ve T2DM+Gh grubları karşılaştırıldığında ise tedavi grubunda anlamlı bir azalma bulundu. (p^{b}= 0,005).



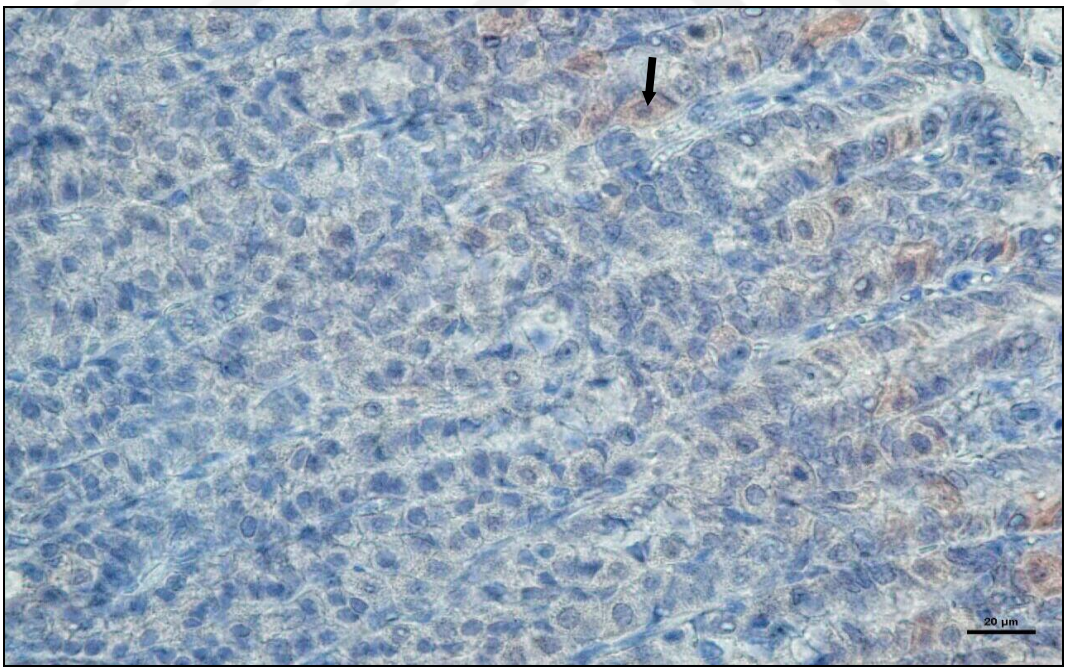
Şekil 4.12: NF-Kβ immün pozitif hücre sayısı T2DM grubunda arttı, T2DM+Gh grubunda ise azaldı (p^a= <0,000 kontrol grubuna göre, p^b= 0,005 T2DM grubuna göre). Sonuçlar ortalama±standart hata olarak değerlendirildi (n=6).



Şekil 4.13: Fundus kontrol grubuna ait kesitte NF-Kβ hücreleri (ok). Streptavidin-biotin-peroksidaz tekniği, hematoksilen zıt boyama.



Şekil 4.14: Fundus kesitinde T2DM grubuna ait NF-Kβ hücrelerinin (ok) sayısı arttı. Streptavidin-biotin-peroksidaz tekniği, hematoksilen zıt boyama.



Şekil 4.15: Fundus kesiti T2DM+Gh grubuna ait NF-Kβ immün pozitif hücreler (ok). Streptavidin-biotin-peroksidaz tekniği, hematoksilen zıt boyama.

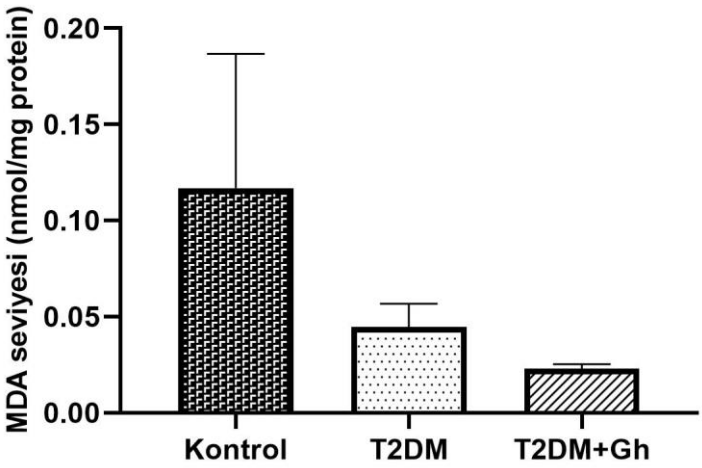
Tablo 4-2: Ghrelin ve nüklear faktör-kappa β (NF-Kβ) immün pozitif hücre sayısı istatistiksel analizi. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak verildi (n=6).

	Kontrol	T2DM	T2DM+Gh
Ghrelin	9,917±1,881	10,28±1,734	7,467±1,401
NF-Kβ	2,50±0,56	31,58±3,082	18,65±1,95

4.4. Biyokimyasal Analizler

4.4.1. Malondialdehit Tayini

Deney grupları arasında Şekil 4.16'da gösterilen mide MDA seviyelerinin değişimleri ANOVA testine göre istatistiksel olarak anlamlılık bulunamadı (p^{ANOVA}=0,157).

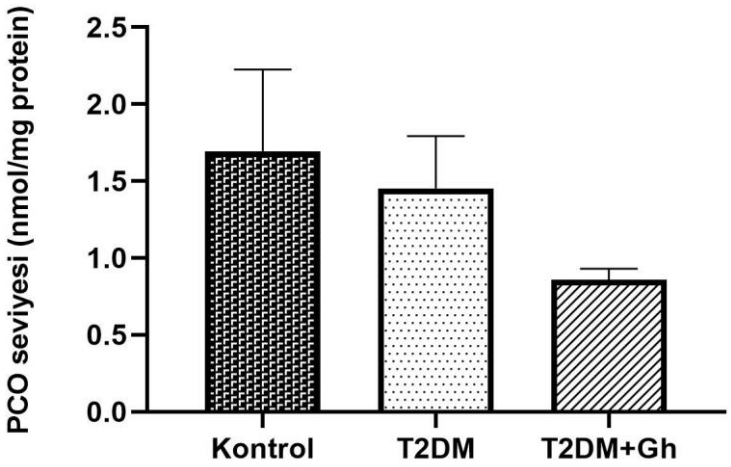


Şekil 4.16: MDA seviyeleri.

Sonuçlar ortalama±standart hata olarak ifade edildi (n=7).

4.4.2. Protein Karbonil (PCO) Tayini

Gruplar arasında Şekil 4.18'da gösterilen değişimler istatistiksel olarak anlamlılık göstermedi (p^{ANOVA}=0,277).

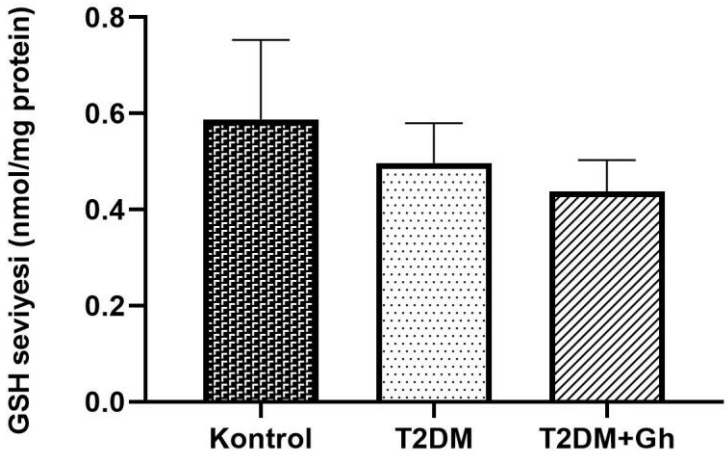


Şekil 4.17: PCO seviyeleri.

Sonuçlar ortalama±standart hata olarak ifade edildi (n=7).

4.4.3. GSH Tayini

Gruplar arasında Şekil 4.17'da gösterilen değişimler istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı (p^{ANOVA}=0,439).



Şekil 4.18: GSH seviyeleri.

Sonuçlar ortalama±standart hata olarak ifade edildi (n=7)

5. TARTIŞMA

T2DM, pankreas Langerhans adacıklarında insülin salgısında görev alan β hücre fonksiyon bozukluğu olarak tanımlansa da tüm metabolizmayı etkiler. Bu araştırmada, T2DM'nin mide üzerine olan etkisi ghrelin tedavisi ile birlikte pro/anti-inflamasyon ve oksidatif stres yolakları üzerinden ilk kez aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, diyetin T2DM üzerinde azımsanmayacak etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Araştırmalar, tam tahıllı beslenmenin hem vücut kitle indeksi hem de sağlık açısından diyabet riskini düşürdüğüne yöneliktir (96). Açlık durumunda plazma ghrelin seviyesinin yaklaşık iki katına çıkması yemek sonrası ise düşmesi ghrelinin beslenme üzerine doğrudan etkili olduğunu göstermiştir (97). Kronik intraserebroventriküler (ICV) ghrelin verilmesinin, kemirgenlerde besin alınımını ve vücut ağırlığını artırdığı, anti-ghrelin immünoglobulin uygulamasının ise beslenmeyi baskıladığı bildirilmiştir (98). Açil ghrelin infüzyonunun insanlarda diürez ya da sodyum atılım oranını etkilemeksizin susuzluk hissini arttırdığı ileri sürülmüştür (99). Hayvanlar üzerine yapılan bir başla çalışmada ghrelinin su alımı üzerine dipsojenik etki oluşturmamasına rağmen ghrelinin sadece gıda alımıyla sınırlı olmayıp su alımındaki değişiklikleri de içerebileceği belirtilmiştir (100). Ghrelinin açlığa karşı korucuyu bir mekanizma sağlayan hormon olduğu düşünüldüğünde, çalışmamızda T2DM ve T2DM+Gh grupları arasında yem alımı açısından etkisinin olmadığı söylenebilir. Kontrol grubuna kıyasla T2DM ve T2DM+Gh gruplarındaki su alım artışı ise ghrelinden çok diyabetin etkisi ile ilişkilendirilebilir.

T2DM, multifaktöriyel bir hastalık olup, erken ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir (101). İnflamatuvar sitokinlerin insülin direnci üzerinden T2DM görülme sıklığını arttırma potansiyelinde olduğu bilinmektedir. Phosat ve arkadaşları çalışmalarında pro-inflamatuvar sitokinlerden IL-6 artışını T2DM gelişimi ile ilişkilendirmişlerdir (52). T2DM'li bireylerin serum IL-6 ve TNF-α ekspresyonları, sağlıklı bireyler ile kıyaslandığında yüksek olduğu bildirilmiştir

(101). Bir başka çalışmada ise, TNF-α ve IL-6 inflamatuvar sitokinlerin diyabetli bireylerde sağlıklılara kıyasla yüksek, anti-inflamatuvar sitokin olan IL-10 seviyesinin ise düşük olduğu açıklanmıştır. Ayrıca sitagliptin tedavisi ile T2DM grubunda IL-10 seviyesi anlamlı derecede artarken, inflamatuvar sitokinlerin seviyesi azalmıştır (102). Madison ve arkadaşları IL-1β reseptörünün inflamatuvar hastalıklarda terapötik bir ajan olabileceğini ileri sürmüşlerdir (54). Sağlıklı ve diyabetli bireylerin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada ise IL-1β ve TNF-α seviyelerinin tip 2 diyabetli grupta anlamlı derecede arttığı ileri sürülmüştür (103). Ghrelin reseptörlerinin bağışıklık sistemi hücreleri üzerinde bulunması inflamasyona etkisini desteklemektedir (49,50). Açil ghrelinin anti-inflamatuvar aktivitesi üzerine yapılan çalışmalarda pro-inflamatuvar sitokinlerden IL-1a, IL-1b, IL-6 ve TNF-α'nın ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (13,42,104). Çalışmamızda T2DM grubuna ait mide dokularında araştırmalara paralel olarak, IL-6, IL-1β ve TNF-α mRNA ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna göre artış saptandı. Aynı zamanda T2DM grubuna ekzojen ghrelin verilmesinin inflamatuvar sitokinlerde düşüşe neden olduğu görüldü. Lontchi-Yimagou ve arkadaşları inflamatuvar yolları hedef almanın diyabet ve ilgili komplikasyonları önleme ve kontrol etme stratejilerinin bir parçası olabileceğini vurgulamışlardır (4). Açil ghrelinin anti-inflamatuvar fonksiyonu olarak IL-6, IL-1β ve TNF-α gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu inhibe etmesi T lenfosit ve monosit üzerine direkt etkisine bağlı olabilir. Ghrelin alınımının anti-inflamatuvar sitokinlerden IL-10 ekspresyonunu arttırarak ağrı üzerinde ve obezite durumunda etkili olduğu bildirilmiştir (17,48). T2DM grubunda IL-10 mRNA seviyesi inflamatuvar sitokinlere paralel olarak arttı. Oysa ghrelin uygulaması ile IL-10 mRNA seviyesinin kontrole yakın seviyeye düşmesinin ghrelinin immün düzenleyici rolünü açıklamaktadır. Bağışıklık sistem hücreleri metabolizma ve enerji durumundaki değişikliklere cevap olarak bağışıklık yanıtlarını ve sitokin ekspresyonunu değiştirirler (52). Çalışmamızda fruktoz ve STZ ile birlikte oluşturulan T2DM modelinde, mide dokusunda hem anti-inflamatuvar hem de pro-inflamatuvar sitokinlerin artışını fruktoz etkisi ile açıklayabiliriz. Bu artışın ghrelin ile azalması, ghrelin tedavisinin

T2DM'li sıçan mide dokusunda terapötik etkiye sahip olduğuna işaret etmektedir.

Tip 2 diyabet gelişiminde NF-kβ sinyal yolağının aktivasyonu, beta hücre bozukluğu sonucu ortaya çıkar (20). Li ve arkadaşları ilk kez ghrelinin NF-κβ aktivasyonunun inhibisyonuna aracılık ettiği ve anti-inflamatuvar etkilerinin olduğunu ileri sürmüşlerdir (13). Transgenik hayvanlar üzerinde yapılan araştırma sonuçlarına göre NF-kβ aktivitesinin baskılanması bozulmuş glukoz alımı, oksidatif hasar ve insülinin ekzositozunda rol oynayan genlerin ekspresyon değişikliklerine neden olmuştur (105). Zhang ve ark'ları (2019), Sprague-Dawley sıçanlarda oluşturdukları akut akciğer hasarı modelinde ekzojen ghrelinin uygulamasının, inflamatuvar yanıtı ve inflamasyonun oluşturduğu hasarı önemli ölçüde zayıflattğını rapor etmişlerdir. Bu koruyucu etki IKKβ fosforilasyonunun inhibisyonu, IκBα parçalanması, NF-κβ aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Ghrelin akut akciğer hasarında histolojik hasarı önemli ölçüde azaltmakta, plazma IL-6 ve TNF-α seviyelerine göre pro-inflamatuvar yanıtı inhibe etmekte, nötrofil infiltrasyonundaki protein seviyelerini bastırmakta ve IKK / IκBα / NFκβ sinyal yolunun aktivasyonunu inhibe ederek inflamasyon üzerine etki etmektedir (106). Tip 2 diyabetik sıçan mide dokusunda NF-kβ immün pozitif hücre sayısının ghrelin uygulaması ile anlamlı olarak düşüşü, ghrelinin inflamasyonu NF-kβ yolağı üzerinden düşürdüğünü desteklemektedir.

Oksidatif stres, çeşitli moleküler mekanizmalar yolu ile T2DM'nin gelişimine katkıda bulunur. Ganjifrockwala ve ark (2017) çalışmalarında, tip 2 diyabetli bireylerde antioksidan açısından zengin diyetin, oksidatif stres belirteçlerinde düşüşe neden olduğunu açıklamışlardır (107). Abdulmalek ve ark (2019) diyabetik deney hayvan modeli üzerine yaptıkları araştırmalarında, selenyumun diyabetik sıçanlarda inflamasyonu ve oksidatif stresi iyileştirici etkisini bildirmişlerdir (108). Ghrelinin çeşitli patolojik koşullarda anti-inflamatuvar bir hormon olarak oksidatif stres ve inflamasyon üzerinde etkileri olduğu ileri sürülmektedir (12,45,50). Bulgularımız, diyabet ve oksidatif stres ile ilişkili yapılan bu çalışmalarla zıt sonuçlar içermektedir. MDA ve PCO analizlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Bulgularımıza

göre ghrelinin antioksidan sistem belirteçlerinden olan GSH üzerinden mide dokusu için anlamlı bir etkisinin olmadığıdır. Bu sonuç ile birlikte antioksidan olarak ekzojen ghrelin uygulamasının T2DM hayvanların mide dokularında endojen antioksidan üretimini düşürdüğü söylenebilir. Ghrelin hormonunun insülin salınımını baskıladığı, glukoz ve enerji homeostazını düzenlediği bilinmektedir (109). Yapılan bir çalışmada, dört gün intravenöz uygulanan deaçil ghrelinin, diyabet olmayan deney hayvanlarında, açlık ya da tokluk insülin ve glukoz seviyelerine etki etmediği belirtilmiştir (110). Midede üretilerek dolaşıma verilen ghrelin iştah uyarıcı ve büyüme hormonu salgılanmasına neden olan bir peptid hormondur. Çalışmamızda, ghrelin tedavi grubunda, T2DM grubuna kıyasla ghrelin immün pozitif hücre sayısında istatistiksel olarak bir anlamlılık saptanmadı.

Sonuç olarak,

- T2DM'li sıçanların IL-1β, IL-6 ve TNF-α mRNA ekspresyon seviyeleri kontrole göre artmıştı. Diyabetik sıçanlara ekzojen ghrelin verilmesi ile pro-inflamatuvar sitokin ekspresyon seviyelerinin düşüşü inflamasyonun inhibisyonunda NF-kβ üzerinden etkili olduğunu düşündürmektedir.

- Anti-inflamatuvar ve immün düzenleyici IL-10 mRNA ekspreyon seviyesinin ghrelin alınımı ile kontrole yakın seviyeye düşüşü ghrelinin anti-inflamatuvar etkisini açıklamaktadır.

- Ekzojen ghrelin alınımı ile fundus ghrelin immün pozitif hücre sayılarında anlamlı bir değişiklik olmaması ghrelin pozitif hücrelerin artmasında etkisi olmadığını göstermektedir.

- Ghrelin tedavisinin mide dokusunda oksidatif stres ve antioksidan belirteçleri üzerinde anlamlı bir değişikliğe sebep olmaması ghrelinin sadece inflamasyon yolu üzerinden etki ettiğini desteklemektedir.

- Fruktoz ve STZ ile oluşturulmuş T2DM modeli üzerine 14 günlük sistemik ghrelin uygulamasının sıçan mide dokuları üzerine anti-inflamatuvar etkilerinin olduğunu söyleyebiliriz.

Bu çalışma ghrelinin diyabetik sıçan mide dokusunda inflamasyon ve oksidatif stres mekanizmaları üzerindeki anti-inflamatuvar ve anti-oksidan özelliklerinin araştırılması bakımından literatürdeki ilk çalışmadır. Gelecekte T2DM hastalarının tedavisi için terapötik bir ajan olabileceği düşünülen ghrelinin hayvan modeli sonuçları açısından ön çalışma niteliğindedir. Dünyada büyük bir nüfusu ilgilendiren T2DM'nin ilerlemesine katkısı olan inflamasyonu hedef alan yeni tedavi yolları üzerinde umut vadetmektedir.

ÖNERİ VE KISITLAMALAR

Çalışmamızda kullanılan yöntemlerde mide dokusu kullanılmıştır. Deney hayvanlarımıza ait biyokimyasal analizlerimizi hem doku hem kan örneği üzerinden çalışarak karşılaştırmalı sonuçlar elde edebilirdik. Bütçemizin kısıtlı olması nedeniyle biyokimyasal parametreler için daha fazla çalışma yapılamadı.

Çalışmamızda ghrelinin anti-inflamatuvar etkisini NF-kβ yolağı üzerinden yürütebileceğine dair çarpıcı sonuçlar elde ettik. NF-kβ nukleusta aktif formda sitoplazmada inaktif formda bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. Bu sebeple NF-kβ nukleusta sitoplazmada bulunan alt birimlerine ait antikorlar ile immünohistokimya yöntemi sonrası ışık mikroskobunda değerlendirilebilir. Nukleus ve sitoplazmada sinyalleri takip edebilmek adına NF-kβ yolağı için ileri çalışmalar yapılabilir. İmmünohistokimya yöntemi ile dokuda incelediğimiz protein lokalizasyon ve seviyeleri western yöntemi kullanılarak total protein miktarı bakımından bulgularımızı destekleyebilir.

RT-PZR yöntemi ile mRNA seviyelerini çalıştığımız inflamasyon ve anti-inflamasyon belirteçlerinin immünohistokimya yöntemi ile protein seviyesi bakımından farkları tartışılabilir. Bütçemiz kısıtlı olduğu için daha fazla yolak değerlendirebilmek adına yöntemlerimizde faklı belirtçeleri inceledik.

Çalışmamızın devamında özellikle IL-1β ve NF-kβ belirteçlerinin inflamasyon ilişkisi ile ilgili elde ettiğimiz gruplar arası farklılıkları, hücre ölüm yolllarından inflamasyona bağlı hücre ölüm yolağı olan piroptoz belirteçleri ile değerlendirebiliriz.

6. KAYNAKLAR

1. Diabetes [Internet]. [Erişim 12.10.2020]. WHO :Erişim yeri: https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1
2. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease, *Nature Reviews Immunology* 2011; **11**(2): 98-107
3. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *American Diabetes Association* 2012; **35**: 64–71.
4. Lontchi-Yimagou E, Sobngwi E, Matsha TE, Kengne AP. Diabetes mellitus and inflammation. *Curr Diab Rep* 2013; **13**(3): 435–44.
5. Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabletes. *Diabetes Care* 2004; **27**(3): 813–23.
6. Wang H, Fa X, Qu W, Fu J, Fan K, Liu J ve ark. Therapeutic effects of sleeve gastrectomy and ileal transposition on type 2 diabetes in a non-obese rat model by regulating blood glucose and reducing ghrelin levels. *Med Sci Monit* 2019; **25**: 3417–24.
7. Bowers CY. History to the discovery of ghrelin. *Methods in enzymology* 2012; **514**: 3-32.
8. Akalu Y, Molla MD, Dessie G, Ayelign B. Physiological effect of ghrelin on body systems. *Int J Endocrinol* 2020; (5277):1-26
9. Pöykkö SM, Kellokoski E, Hörkkö S, Kauma H, Kesäniemi YA, Ukkola O. Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; **52**(10): 2546–53.
10. Lindqvist A, Shcherbina L, Prasad RB, Miskelly MG, Abels M, Martínez-Lopéz JA, ve ark. Ghrelin suppresses insulin secretion in human islets and type 2 diabetes patients have diminished islet ghrelin cell number and lower plasma ghrelin levels. *Mol Cell Endocrinol* 2020; **5**:11.

11. Yamashita Y, Makinodan M, Toritsuka M, Yamauchi T, Ikawa D, Kimoto S ve ark. Anti-inflammatory effect of ghrelin in lymphoblastoid cell lines from children with autism spectrum disorder. *Front Psychiatry* 2019; **10**: 152.

12. Pamukcu O, Kumral ZNO, Ercan F, Yegen BÇ, Ertem D. Anti-inflammatory effect of obestatin and ghrelin in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013; **57**(2): 211–8.

13. Li WG, Gavrila D, Liu X, Wang L, Gunnlaugsson S, Stoll LL, ve ark. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-κB activation in human endothelial cells. *Circulation* 2004; **109**(18): 2221–6.

14. Xu J, Bartolome CL, Kong D. Neural regulation of metabolism. Adv Exp Med Biol 2018; 49–77.

15. 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. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**(6): 2988.

16. Qu R, Chen X, Hu J, Fu Y, Peng J, Li Y ve ark. Ghrelin protects against contact dermatitis and psoriasiform skin inflammation by antagonizing TNF-α/NF-κB signaling pathways. *Sci Rep* 2019; **9**(1): 983–94.

17. Azizzadeh F, Mahmoodi J, Sadigh-Eteghad S, Farajdokht F, Mohaddes G. Ghrelin exerts analgesic effects through modulation of IL-10 and TGF-β levels in a rat model of inflammatory pain. *Iran Biomed J* 2017; **21**(2): 114–9.

18. Churm R, Caplin S, Barry J, Davies JS, Stephens JW, Prior SL. Acyl-ghrelin mediated lipid retention and inflammation in obesity-related type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 2019; **481**: 8–13.

19. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *American Diabetes Association* 1991; **40**(4):405–12.

20. Yaribeygi H, Sathyapalan T, Atkin SL, Sahebkar A. Molecular mechanisms linking oxidative stress and diabetes mellitus. *Oxid Med Cell Longev* 2020; **2020**: 8609213.

21. Golbidi S, Alireza Ebadi S, Laher I. Antioxidants in the treatment of diabetes. *Curr Diabetes Rev* 2011; **7**(2): 106–25.

22. Belch J, MacCuish A, Campbell I, Cobbe S, Taylor R, Prescott R ve ark. The prevention of progression of arterial disease and diabetes (POPADAD) trial: factorial randomised placebo controlled trial of aspirin and antioxidants in patients with diabetes and asymptomatic peripheral arterial disease. *BMJ* 2008; **16**: 337.

23. Michael H. Ross WP. *Histology (A text an atlas).* 2016; 569–627.

24. Kierszenbaum LA, Tres L. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology E-Book* 2019; 824.

25. Schubert ML. Gastric secretion. *Curr Opin Gastroenterol* 2014; **30**(6): 578-82.

26. Bornschein J, Selgrad M, Wex T, Kuester D, Malfertheiner P. Serological assessment of gastric mucosal atrophy in gastric cancer. *BMC Gastroenterol* 2012; 12.

27. Hunt R H, Camilleri M, Crowe S E, El-Omar E M, Fox J G, Kuipers E J ve ark. The stomach in health and disease. *Gut* 2015; 1650- 68.

28. Asakawa A, Inui A, Ueno N, Makino S, Fujino MA, Kasuga M. Rapid communications urocortin reduces food intake and gastric emptying in lean and ob/ob obese mice. *Gastroenterology* 1999; **116**: 1287-1292.

29. Kiely JM, Noh JH, Graewin SJ, Pitt HA, Swartz-Basile DA. Altered intestinal motility in leptin-deficient obese mice. *J Surg Res* 2005; **124**(1): 98–103.

30. Hardwick JCH, Van Den Brink GR, Offerhaus GJ, Van Deventer SJH, Peppelenbosch MP. Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 2001; **121**(1): 79–90.

31. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: Structure and function. *Physiol Rev* 2005; **85**(2): 495–522.

32. McKee KK , Tan CP, Palyha OC, Liu J, Feighner SD, Hreniuk DL ve ark Cloning and characterization of two human G protein-coupled receptor genes (GPR38 and GPR39) related to the growth hormone secretagogue and neurotensin receptors. *Genomics* 1997; **46**(46): 426–34.

33. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999 ;**402**(6762): 656–60.

34. Nargund RP, Patchett A, Dean C, Smith RG. Human Growth Hormone. *Research and Clinical Practice 2000*; **19**: 57–61.

35. Pemberton C, Wimalasena P, Yandle T, Soule S, Richards M. C-terminal pro-ghrelin peptides are present in the human circulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **310**(2): 567–73.

36. Banks WA, Tschöp M, Robinson SM, Heiman ML. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; **302**(2): 822–7.

37. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: Two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **279**(3): 909–13.

38. Date Y, Murakami N, Kojima M, Kuroiwa T, Matsukura S, Kangawa K ve ark. Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **275**(2): 477–80.

39. Aydin S, Halifeoglu I, Ozercan IH, Erman F, Kilic N, Aydin S ve ark. A comparison of leptin and ghrelin levels in plasma and saliva of young healthy subjects. *Peptides* 2005; **26**(4): 647–52.

40. 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**(8): 1714–9.

41. Wu R, Zhou M, Cui X, Simms HH, Wang P. Upregulation of cardiovascular ghrelin receptor occurs in the hyperdynamic phase of sepsis. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 2004; **287**(3): 56-3.

42. Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, Collins GD, Sakthivel SK, Palaniappan R ve ark. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. J *Clin Invest* 2004; **114**(1): 57–66.

43. Adeghate E, Ponery AS. Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. *J Neuroendocrinol* 2002; **14**(7): 555–60.

44. Reimer MK, Pacini G, Ahrén B. Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology* 2003; **144**(3): 916–21.

45. Liu L, Xu H, Jiang H, Wang J, Song N, Xie J. Ghrelin prevents 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced cytotoxicity through antioxidation and NF-KB modulation in MES23.5 cells. *Exp Neurol* 2010; **222**(1): 25–9.

46. Ghigo E, Broglio F, Arvat E, Maccario M, Papotti M, Muccioli G. Ghrelin: More than a natural GH secretagogue and/or an orexigenic factor. *Clinical Endocrinology* 2005; **62**(1): 1-17.

47. Muccioli G, Pons N, Ghe C, Catapano F, Granata R, Ghigo E. Ghrelin and des-acyl ghrelin both inhibit isoproterenol-induced lipolysis in rat adipocytes via a non-type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Eur J Pharmacol* 2004; **498**(1–3): 27–35.

48. Prenzler NK, Macke C, Horn R, Brabant G, Pabst R, Richter M, ve ark. Obesity influences the food consumption and cytokine pattern in ghrelin-treated endotoxemic rats. *Life Sci* 2007; **81**(1): 80.

49. Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang BH, Kitagawa K, Inagaki C. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and Ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**(9): 4284–91.

50. Dixit VD, Yang H, Cooper-Jenkins A, Giri BB, Patel K, Taub DD. Reduction of T cell-derived ghrelin enhances proinflammatory cytokine expression: Implications for age-associated increases in inflammation. *Blood* 2009; **113**(21): 5202–5.

51. O'Connor JC, McCusker RH, Strle K, Johnson RW, Dantzer R, Kelley KW. Regulation of IGF-I function by proinflammatory cytokines: At the interface of immunology and endocrinology. *Cell Immunol* 2008; 91–110.

52. Phosat C, Panprathip P, Chumpathat N, Prangthip P, Chantratita N, Soonthornworasiri N ve ark. Elevated C-reactive protein, interleukin 6, tumor necrosis factor alpha and glycemic load associated with type 2 diabetes mellitus in rural Thais: A cross-sectional study. *BMC Endocr Disord* 2017; **17**(1): 44.

53. Zhou X, Xue C. Ghrelin inhibits the development of acute pancreatitis and nuclear factor κB activation in pancreas and liver. *Pancreas* 2009; **38**(7): 752–7.

54. Madison LD, Scarlett JM, Levasseur P, Zhu XX, Newcomb K, Batra A ve ark. Prostacyclin signaling regulates circulating ghrelin during acute inflammation. *J Endocrinol* 2008; **196**(2): 263–73.

55. Ahmed AM. History of diabetes mellitus. *Saudi Med J* 2002; **23**(4): 373-8.

56. MacCracken J, Hoel D. From ants to analogues: Puzzles and promises in diabetes management. *Postgraduate Medical Journal* 1997; **101**: 138-140.

57. Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998; **15**(7): 539–53.

58. Demiriz Ş ve Demiriz B. Inzucchi S E. *Diabetes Mellitus El Kitabı*. 6th ed.İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. 2009.

59. Association AD. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes 2019. *Diabetes Care* 2019; **42**:13–28.

60. İrer SV, Alper G. Deneysel diyabet modelleri experimental models of diabetes mellitus. *Turk J Biochem* 2004; **2**(3): 127-136.

61. Nakamura T, Terajima T, Ogata T, Ueno K, Hashimoto N, Ono K ve ark. Establishment and pathophysiological characterization of type 2 diabetic mouse model produced by streptozotocin and nicotinamide. *Biol Pharm Bull* 2006; **29**(6): 1167–74.

62. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008; **51**(2): 216–26.

63. Islam MS, Wilson RD. Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes. *Methods Mol Biol* 2012; **933**:161–74.

64. Wilson R, Shahidullislam. Fructose-fed streptozotocin-injected rat: an alternative model for type 2 diabetes. *Pharmacological Reports* 2012; **64**(1): 129-39.

65. Abul K. Abbas AHL. *Temel İmmünoloji*. 2007; 1–21.

66. Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med* 2012; **8**(3): 363-74.

67. Grandner MA, Seixas A, Shetty S, Shenoy S. sleep duration and diabetes risk: population trends and potential mechanisms. *Curr Diab Rep* 2016; **16**(11): 106.

68. Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev* 2013; **9**(1): 25-53.

69. Knudsen SH, Pedersen BK. targeting inflammation through a physical active lifestyle and pharmaceuticals for the treatment of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 2015; **15**(10): 82.

70. Fritz H. Kayser, Kurt A. Bienz, Johannes Eckert RMZ. Ed: Anğ Küçüker M,Tümbay E, Anğ Özdem, Zayre E. *Tıbbi Mikrobiyoloji* 2002; 43–136.

71. Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes central role of tumor necrosis factor-a key words: cytokines –metabolism. *NIDDM* 1994; **94**: 1543–9.

72. Swaroop J, Naidu J, Rajarajeswari D. Association of TNF-α with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Indian J Med Res* 2012; **135**(1): 127.

73. Wang X, Bao W, Liu J, Ouyang YY, Wang D, Rong S, ve ark Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 2013; **36**(1): 166–75.

74. Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; **13**(4–5): 357–68.

75. Zunino SJ, Storms DH, Stephensen CB. Diets Rich in polyphenols and vitamin a inhibit the development of type i autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Nutr* 2007; **137**(5): 1216–21.

76. Donath MY. Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: Time to start. *Nat Rev Drug Discov* 2014; **13**(6): 465–76.

77. Mayer G. immünoloji sitokinler ve immünoregülasyon (Internet). (erişim 12.10.2020), https://www.microbiologybook.org/Turkish immunol/immunolchapter13turk.htm

78. Van Exel E, Gussekloo J, De Craen AJM, Frölich M, Wiel AB Van Der, Westendorp RGJ. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes: The Leiden 85-plus study. *Diabetes* 2002; **51**(4): 1088–92.

79. Temizkan G AN. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. 2nd ed. 2007.

80. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Temel histoloji*, Barış Kitabevi, İstanbul. 1998.

81. Bancroft JD, Gamble M. Theory and practice of histological techniques, 5. edition. *Churchill livingstone* 2002.

82. Demir R. *Histolojik boyama teknikleri*. Ankara, Palme Yayıncılık. 2001.

83. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology* 1993; **11**(9): 1026–30.

84. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. *Saudi Pharm J* 2016; **24**(5): 547–53.

85. Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med* 2011; **51**(5): 993–9.

86. Altan N, Sepici Dinçel A, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres Diabetes Mellitus and Oxidative Stress. *Turk J Biochem* 2006; **31**(2): 51–56. 5

87. Maher P, Lewerenz J, Lozano C, Torres JL. A novel approach to enhancing cellular glutathione levels. *J Neurochem* 2008; **107** (3): 690–700.

88. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev* 2004; **25**(4): 612–28.

89. Abou-Seif MA, Youssef AA. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta* 2004; **346**(2): 1 61–70.

90. Büyükgüzel E. Protein oksidasyonun biyokimyasal ve moleküler mekanizması. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi* 2013; **3**(1): 40-51.

91. Ledwozyw A, Michalak J, Stepien A, Kaadziolka A. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 1986; **155**(3): 275–83.

92. Beutler E. This Week's Citation Classic, *J. Lab Clin Med* 1963.

93. Reznick AZ, Packer L, Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; **233**: 357–63.

94. Bradford M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**(1–2): 248–54.

95. Coskun ZM, Beydogan AB, Bolkent S. Changes in the expression levels of CB1 and GLP-1R mRNAs and microRNAs 33a and 122 in the liver of type 2 diabetic rats treated with ghrelin. *J Biochem Mol Toxicol* 2019; **33**(10): 1–7.

96. Hu Y, Ding M, Sampson L, Willett WC, Manson JAE, Wang M, ve ark. Intake of whole grain foods and risk of type 2 diabetes: Results from three prospective cohort studies. *BMJ* 2020; **370**: 1–12.

97. Nakazato, M, Murakami, N, Date, Y. ve ark. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; **409:** 194–98.

98. Cummings DE, Purnell JO, Frayo RS, Schmidova K, Wisse R, Weigle DS, A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal ınitiation in humans. *Diabetes* 2001; **50**(8); 1714-19

99. Vestergaard ET, Moller N, Andersen RF, Rittig S, Jorgensen JOL. Acute intravenous acyl ghrelin infusion induces thirst but does not affect sodium excretion: two randomized, double-blind, placebo-controlled crossover studies in hypopituitary patients. *Eur J Endocrinol* 2019; **181**(1): 23-30.

100. Mietlicki EG, Erica L. Nowak, and Daniels D. The effect of ghrelin on water intake during dipsogenic conditions. *Physiol Behav* 2009; **96**(1): 37–43.

101. Bashir H, Bhat SA, Majid S, Hamid R, Koul RK, Rehman MU, ve ark. Role of inflammatory mediators (TNF-α, IL-6, CRP), biochemical and hematological parameters in type 2 diabetes mellitus patients of Kashmir, India. *Med J Islam Repub Iran* 2020; **34**(1): 1–6.

102. Telikani Z, Sheikh V, Zamani A, Borzouei S, Salehi I, Amirzargar MA ve ark. Effect of sitagliptin on serum levels of TNF-α, IL-1β and IL-10 in patients with type 2 diabetes mellitus. *Koomesh* 2020; **22**(1): 71–7.

103. Koleva-Georgieva DN, Sivkova NP, Terzieva D. Serum inflammatory cytokines IL-1beta, IL-6, TNF-alpha and VEGF have influence on the development of diabetic retinopathy. *Folia Med* 2011; **53**(2): 44–50.

104. Theil M-M, Miyake S, Mizuno M, Tomi C, Croxford JL, Hosoda H ve ark. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by ghrelin. *J Immunol* 2020; **183**(4): 2859–66.

105. Stride A, Ellard S, Clark P, Shakespeare L, Salzmann M, Shepherd M, Hattersley AT. β-Cell dysfunction, insulin sensitivity, and glycosuria precede diabetes in hepatocyte nuclear factor-1α mutation carriers. *Diabetes Care* 2005; **28**(7): 1751-56.

106. Zhang LN, Gong WD, Luo J, Yu YJ, Qi SH, Yue ZY. Exogenous ghrelin ameliorates acute lung injury by modulating the nuclear factor κB inhibitor kinase/nuclear factor κB inhibitor/nuclear factor κB pathway after hemorrhagic shock. *Int Immunopharmacol* 2019; **69**: 95–102.

107. Ganjifrockwala F, Joseph J, George G. Decreased total antioxidant levels and increased oxidative stress in South African type 2 diabetes mellitus patients. *J Endocrinol Metab Diabetes South Africa* 2017; **22**(2): 21–5.

108. Abdulmalek SA, Balbaa M. Synergistic effect of nano-selenium and metformin on type 2 diabetic rat model: Diabetic complications alleviation

through insulin sensitivity, oxidative mediators and inflammatory markers. Bader M. *PLoS One* 2019; **14**(8).

109. Heppner KM, Tong J. Regulation of glucose metabolism by the ghrelin system: Multiple players and multiple actions. *Eur J Endocrinol* 2014; **171**(1): 21–32.

110. Kiewiet RM, Van Aken MO, Van Der Weerd K, Uitterlinden P, Themmen APN, Hofland LJ ve ark. Effects of acute administration of acylated and unacylated ghrelin on glucose and insulin concentrations in morbidly obese subjects without overt diabetes. *Eur J Endocrinol* 2009; **161**(4): 567–73

ETİK KURUL KARARI

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayın Prof. Dr. Sema BOLKENT
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Karar No:2018/ 55

Başvuru : 11.09.2018

Toplantı Tarihi : 27.09.2018

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, **Yüksek Lisans Öğrencisi Bilge Nur BİLGE**'ye ait "Diyabetik sıçan midesinde ghrelin ve inflamasyon ilişkisi" isimli projeniz; Etik Kurulumuz 27.09.2018 tarihli toplantısında değerlendirilmiş olup, daha önce almış olduğunuz 27.07.2016 tarih ve 2016/61 karar no'lu Etik Kurul onayının, kullanacağınız materyal gereği bu çalışma için de geçerli olmasına oy birliği ile kabul edilmiştir.
Gereği için bilgileriniz rica olunur.

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
Üye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Prof. Dr. Mustafa Oral ÖNCÜL
Üye

Prof. Dr. Alper OKYAR
Üye

Doç. Dr. Aygül EKİCİ
Üye

Doç. Dr. Uğur AKSU
Üye

Dr. Öğretim Üyesi Altan ARMUTAK
Üye

Dr. Öğretim Üyesi Aydın ÇEVİK
Üye

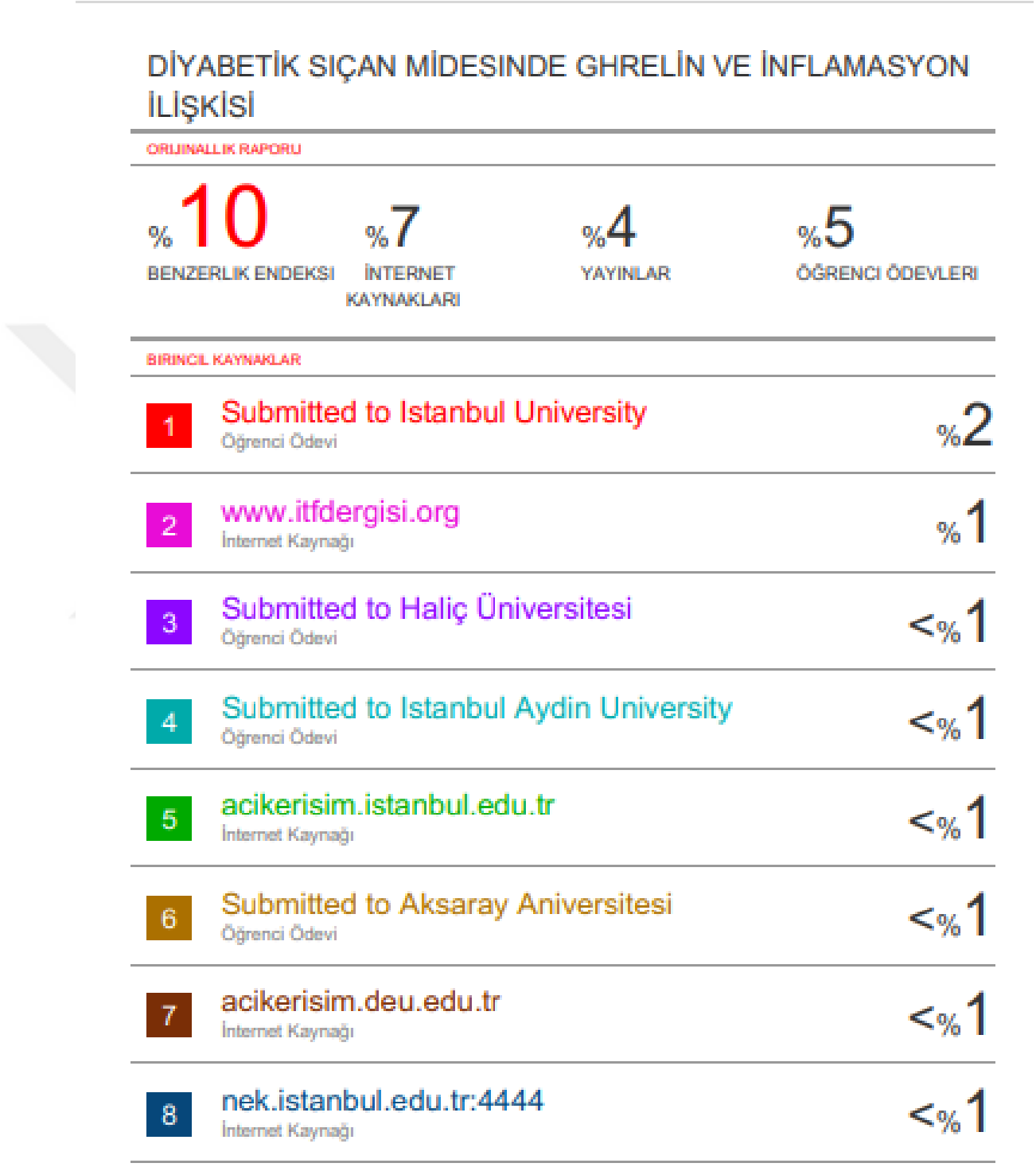
Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye

Dr. Burak OLGUN
Mak.Yük. Müh
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlık katı A 221 nolu Oda Avcılar –İSTANBUL TEL : (0 212) 4737070/ 17031 E mail: hadyek@istanbul.edu.tr

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



DİYABETİK SIÇAN MİDESİNDE GHRELİN VE İNFLAMASYON İLİŞKİSİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%10	%7	%4	%5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%2
2	www.itfdergisi.org İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Haliç Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
4	Submitted to Istanbul Aydin University Öğrenci Ödevi	<%1
5	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to Aksaray Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
7	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Bilge Nur	**Soyadı**	Bilge
Doğ.Yeri	Kadıköy/İstanbul	**Doğ.Tar.**	07.07.1992
Uyruğu	T.C	**TC Kim No**	32581575578
Email	bilgenurbilgee@gmail.com	**Tel**	531 507 91 12

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa	2020
Lisans	Yeni Yüzyıl Üniversitesi (%50 burslu)	2015
Lise	Erkut Soyak Lisesi	2010

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Klinik araştırmacı	HIV Enfeksiyonu Derneği	2016-...

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	iyi	orta	iyi		YÖKDİL (72.5)

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	69		

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Word,Excel	iyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

1- Beydoğan AB, Çolak DK, Bilge BN, Bolkent S. The Effects of COVID-19 on Immune System and Diabetes. *Cerrahpasa Med J* 2020; 44: 65-73. doi: 10.5152/cjm.2020.20016

2- HIV Enfeksiyonunda SUMO Modifikasyonu. HIV/AIDS Kongresi 2019, Antalya. Sözlü sunum

3- Ghrelin tedavisi tip 2 diyabetik sıçanlarda kannabinoid-1 ve glukagon benzeri peptid-1 reseptörlerinin ekspresyonunu azaltır. XVI. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 2019,Bodrum. Sözlü sunum

4- Türkiye'de Elvitegravir/Kobisistat/Emtrisitabin/Tenofovir Disoproksil Fumarat Kullanan Hastalarda Lipid Profili : Gerçek Yaşam Verisi. HIV/AIDS Kongresi 2017. Poster sunumu.

5- HIV Enfeksiyonunda Ruhsal Yakınmalara ve Tedaviye Yönelik Tutumun Klinik Özellikler ile İncelenmesiHIV/AIDS Kongresi 2017. Poster sunumu

6- Türkiye'de Tedavi Deneyimli Hastalarda Elvitegravir/Kobisistat/ Emtrisitabin/Tenofovir Disoproksil Fumaratın Etkililiği : Gerçek Yaşam VerisiHIV/AIDS Kongresi 2017. Poster sunumu

7- Türkiye'de Tedavi Naif Hastalarda Elvitegravir/Kobisistat/ Emtrisitabin/Tenofovir Disoproksil Fumaratın Etkililiği : Gerçek Yaşam Verisi. HIV/AIDS Kongresi 2017. Poster sunumu

8- Efficacy of elvitegravir/cobicictat/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate in treatment-experienced HIV patients in a real-life settingin TurkeyEACS 16th European AIDS Conference. Poster sunumu

9- The Assesment Of Long Term Magnesium Deficiency On The Spindle Checkpoint Genes : Mad1 and Cdc201. Uluslararası Kanser ve İyon Kanalları Kongresi 2016. Poster sunumu.

Burs Ödülleri

1- International AIDS Society: Geneva, International AIDS Congress, Amsterdam (2018)
2- International AIDS Society: Geneva, CH International AIDS Congress, San Francisco (2020).

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Latin dansları, fotoğrafçılık, scuba diving, kürek sporları, kış sporları