

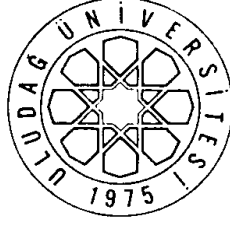
**T.C
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**KUZULARDA FARKLI BESLEME UYGULAMALARININ GHRELİN
VE BÜYÜME HORMONLARI SALGILANMASI ÜZERİNE ETKİLERİ
VE BU HORMONLARLA BESİ PERFORMANSI ARASINDAKİ
İLİŞKİLER**

C. Duygu UDUM

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2009



**T.C
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**KUZULARDA FARKLI BESLEME UYGULAMALARININ GHRELİN
VE BÜYÜME HORMONLARI SALGILANMASI ÜZERİNE ETKİLERİ
VE BU HORMONLARLA BESİ PERFORMANSI ARASINDAKİ
İLİŞKİLER**

C. Duygu UDUM

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Meltem TANRIVERDİ

Bursa-2009

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET	II
İNGİLİZCE ÖZET	III
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
Ghrelinin Yapısı	5
Ghrelinin Salgılanması	6
Ghrelinin Reseptörleri	9
Ghrelinin Genel Etkileri	9
Büyüme Hormonu Üzerine Etkileri	10
İştah Üzerine Etkileri	12
Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri	15
Kardiovasküler Sistem Üzerine Etkileri	15
İnsülin Sekresyonu Üzerine Etkileri.....	16
Hücre Proliferasyonu ve Apoptozisin Düzenlenmesi.....	16
Ghrelin Sekresyonunun Düzenlenmesi.....	17
Ghrelinin Klinik Kullanımı	19
GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
A. Hayvan Gereci, Bakım ve Besleme.....	23
B. Canlı ağırlık ve Yem Tartımları.....	24
C. Kan Örneklerinin Alınması ve Analizleri.....	24
1. Plazma Ghrelin Ölçümü.....	25
2. Plazma Büyüme Hormonu Ölçümü.....	29
3. Serum Toplam Protein Ölçümü.....	33
D. İstatistiksel Analizler.....	35
BULGULAR.....	36
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	44
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ.....	56
TEŞEKKÜR.....	57

SUMMARY

The effects of feeding frequency on ghrelin and growth hormone secretions and the relationships between these hormones and feeding performance in lambs

The study was performed to determine the association of live weight gains and feed conversion ratios with ghrelin, GH, and serum total protein levels in Awassi male lambs. The fifteen lambs with approximately body weight of 26 kg and 2 months of age were used. The lambs were assigned to each of the following three dietary treatment groups, each consisting of five lambs: First group was fed *ad libitum*; second group was fed once a day (09:00), and third group was fed twice a day (09:00 and 16:00). Blood samples were collected at the beginning of the study and then at 15 days intervals (15, 30, and 45th days). To determine ghrelin and GH levels, blood was collected for four times: 30 minutes before feeding and 1 hour after feeding. Ghrelin, GH, and total protein levels were determined by RIA, ELISA, and spectrophotometry, respectively.

Ghrelin levels were between 3.38 and 9.77 pg/ml. No statistically significant difference was determined among groups throughout feeding period. However, within groups, a significant difference was obtained between the beginning of study and 30th day values in all groups ($p < 0.01$ for *ad libitum* and fed twice a day groups; $p < 0.001$ for the fed once a day group). In the fed once a day group there was a significant difference between 30th and 15th, 45th day values ($p < 0.01$). No significant difference was obtained for ghrelin levels during the day in neither among groups nor within groups. However daily average values on the 45th day in the fed twice a day group was higher than other groups ($p < 0.05$).

Plasma GH levels were between 3.98 and 8.33 ng/ml and total protein levels were between 4.67 and 7.58 g/dl. No significant difference was found in neither among groups nor feeding periods.

Throughout the feeding period, live weight gains and feed conversion ratios of the fed once a day group were higher than those of the first and third groups. Live weight gain in the fed once a day group was higher than the *ad libitum* group ($p < 0.01$), whereas a significant difference was observed in feed conversion ratios of the fed a once a day and fed twice a day groups on the 30 and 45th day values ($p < 0.05$).

It may be concluded that, based on the observation that the feeding performance of the fed once a day group was better than other groups, change in ghrelin levels caused by feeding frequency may lead to improvements in food intake and feed conversion ratio.

Key Words: Ghrelin, GH, lambs, feeding frequency, feeding performance

ÖZET

İvesi erkek kuzularda plazma ghrelin, büyüme hormonu ve serum toplam protein düzeyleri ile canlı ağırlık kazancı, yemden yararlanma arasındaki ilişkileri incelemek amacıyla yapılan çalışma 2 aylık yaşta ve 26 kg ağırlıkta 15 adet kuzuda gerçekleştirildi. Her grupta 5 adet kuzu olacak şekilde 3 deneme grubu oluşturuldu. 1. grup *ad libitum*, 2. grup günde tek öğün (9:00), 3. grup ise günde çift öğün (9:00 ve 16:00) yemlendi. Çalışma başlangıcında ve 15, 30 ve 45. günlerde kan örnekleri toplandı. Ghrelin ve GH ölçümleri için yemlemelerden 30 dakika önce ve 1 saat sonra (8:30, 10:00, 15:30 ve 17:00) olmak üzere gün içinde toplam 4 kez kan alındı. Ghrelin düzeyleri RIA ile, GH düzeyleri ELISA ile, toplam protein konsantrasyonları spektrofotometrik yöntemle ölçüldü.

Plazma ghrelin düzeyleri genel olarak 3.38-9.77 pg/ml arasında bulundu. Besi süresince gruplar arasında istatistiki öneme sahip bir farklılık saptanmadı. Grup içi incelemede, besi başı ve 30.gün değerleri arasında *ad libitum* ve çift öğün yemlenen kuzularda $p<0.01$, tek öğün yemlenenlerde $p<0.001$ düzeyinde önemli farklılık tespit edildi. Tek öğün yemlenenlerde 30. gün ile 15. ve 45. gün değerleri arasında da istatistiki önem saptandı ($p<0.01$). Tüm yemleme gruplarında ve tüm periyotlarda gün içi ghrelin düzeylerinde gruplar arası ve grup içi istatistiki öneme sahip farklılık belirlenmedi. Çift öğün yemleme grubunun 45. gündeki gün ortalamalarının diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görüldü ($p<0.05$).

Plazma GH düzeyleri genel olarak 3.98-8.33 ng/ml, toplam protein konsantrasyonları 4.67-7.58 g/dl arasında belirlendi. Tüm gruplarda ve periyotlarda GH ve toplam protein düzeylerinde önemli bir fark gözlenmedi.

Besi süresi genelinde tek öğün yemlenen kuzuların canlı ağırlık kazançları ve yemden yararlanmalarının diğer gruplara göre daha iyi olduğu gözlemlendi. Tek öğün yemlenenlerde canlı ağırlık kazancı *ad libitum* grubuna göre $p<0.01$ düzeyinde daha fazlaydı, yemden yararlanma yönünden ise tek öğün ve çift öğün yemlenen kuzular arasında 30.gün-45.gün periyodunda $p<0.05$ düzeyinde önemli farklılık belirlendi.

Çalışmada besi performansının tek öğün yemlenen kuzularda, çift öğün ve *ad libitum* yemlenenlere göre daha iyi olarak gözlenmesi ghrelin düzeylerinin yemleme sıklığı ile düzenlenerek gıda alımı ve yemden yararlanmayı artırabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Ghrelin; GH, kuzu, farklı yemleme, besi performansı

GİRİŞ

Ghreltin 1999 yılında keşfedilen bir gastrointestinal peptit hormondur. 28 amino asitten oluşan bu peptidin üçüncü pozisyonunda yer alan serin amino asidinin hidroksil grubunda oktanoil modifikasyonu vardır ve bu modifikasyon ghreltinin biyoaktivitesinden sorumludur. Ghreltin genellikle Gr ya da X/A hücreleri olarak adlandırılan sindirim kanalının endokrin sisteminde yer alan bir kısım hücrelerde üretilir. İlk defa midenin okzintik mukozasından izole edilmiştir ve ghreltinin bu mukozalardan, sindirim kanalının diğer bölümlerine göre daha fazla salgılandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte merkezi sinir sistemi, böbrekler, kalp, paratiroid bezler, barsak, pankreas, testis gibi diğer bazı organlar ve bezlerden de salgılandığı belirlenmiştir (1-4).

Ghreltinin en önemli etkisi hipofizin somatotrop hücrelerinden büyüme hormonu salınımını güçlü bir şekilde uyarmasıdır. Bu aktivitenin yanında oreksijenik etkisi, asit sekresyonu, gastrik motilitenin kontrolü, pankreatik aktivite ve uyuma üzerine etkileri, kardiovaskular işlevlere ve çeşitli hücreler üzerine antiproliferatif etkileri bulunmaktadır (1,3,5-8).

Ghreltin etkisinin GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone) ve NPY (Neuropeptide Y) nöronlarında yer alan ghreltin reseptörlerinin aktivasyonundan sonra meydana geldiği bildirilmektedir. Ghreltin, G protein ile eşleşen bir reseptör olan GHSR-1a (Growth Hormone Secratagogue Receptor) olarak isimlendirilen GH (growth hormon-büyüme hormonu) salgılatıcı reseptörü aktive eder ve etkiler başlar. Gastrik ghreltin sekresyonu somatostatin, kortistatin, tiroid hormonlar ve insülin tarafından güçlü bir şekilde azaltılırken, kolesistokinin ve gastrin tarafından uyarılır (3).

Rodentlerde kanda ghreltin konsantrasyonları ve midede ghreltin mRNA'sı açlık sırasında artar ve beslenme sonrası düşer. Karşıt olarak midedeki ghreltin peptit kapsamı açlıkta önemli derecede düşer ve beslenme sonrası artar. Ghreltinin mide dokusu ve plazmada ters orantıda bulunması açlığa karşı cevap olarak mideden ghreltin salgılanmasının artması ve kana verilmesi, tekrar beslenme ile salınımın azalması sonucunda ortaya çıkabilir. Ghreltinin başlıca iki formu olan aktif n-oktanoil ghreltin ve inaktif des-açıl ghreltin kanda ve midede bulunur ve açlıktan sonra n-oktanoil ghreltinin des-açıl ghreltine oranı hafifçe artar (8, 9). İnsanlarda plazma ghreltin düzeylerinin yemekten önce belirgin bir şekilde arttığı ve yemekten sonra düştüğü belirlenmiştir. Bu bulgu ghreltinin kısa süreli bir enerji dengesi indikatörü olarak hizmet edebileceği ve bir yeme

sinyali olabileceği görüşünü desteklemektedir (8, 10). İnsanlarda plazma ghrelin düzeyleri kronik (obezite) ve akut (yemekten sonra) pozitif enerji dengesi durumlarında düşmekte, açlıkta ve kaşektik ya da anoreksik hastalarda artmaktadır (8, 11, 12). Ratlarda ghrelinin i.c.v (intraserebroventriküler) yolla kronik olarak verilmesi beslenmeyi güçlü bir şekilde uyarmakta ve canlı ağırlık kazancını artırmaktadır (10). Farelerde günlük s.c (subkutan) ghrelin verilmesinin vücut ağırlığında artışa neden olduğu ve bu artışın özellikle yağ kitlesinde meydana geldiği vurgulanmıştır (13).

Büyüme hormonu normal linear büyüme için esastır ve hayvan üretimi ve yetiştirilmesinde dikkate değer derecede güçlü bir anabolik ajandır. Örneğin GH verilen domuzlar daha hızlı büyür, her birim canlı ağırlık kazancı için daha az yem tüketir ve GH verilmemiş hayvanlardan daha az karkas yağına sahiptir. Laktasyondaki inekler GH verildiğinde daha az yemle daha fazla süt üretirler. Koyunlarda çeşitli büyüme hormonu salgılatıcıları etkili olmaktadır. Büyüme hormonu salgılatıcı faktörlerin i.v. (intra venöz) ya da s.c. verilmesine cevap olarak büyüme hormonu sekresyonu hızlı ve kısa süreli olarak artabilmektedir. Koyunlarda ekzojen büyüme hormonu verilmesinin yemden yararlanmayı geliştirdiği ve karkasın protein ve yağ kapsamını etkilediği bildirilmiştir (14-17). Henüz mekanizması tam olarak ortaya konmamış olmakla birlikte büyüme hormonu doğrudan yaşamla ilgili fizyolojik sistemlerin bir kısmı üzerinde önemli metabolik etkilere sahiptir. Bu etkiler enerji depoları olan yağ kitlesinin kullanılması, yağsız vücut kitlesinin yapımı, korunması ve kemik mineral yoğunluğunun sağlanması gibi fonksiyonları kapsar. Büyüme hormonunun sentezi gerçekleştirilmiştir. Fakat bu işlem oldukça pahalıdır. Büyüme hormonunun aynı biyolojik aktiviteyi gösterebilen 39 amino asitlik kısmı daha ekonomik olarak sentezlenmekle birlikte yine de pahalı olmaktadır. Bu nedenle alternatif olarak büyüme hormonu salgılanmasını uyarabilecek diğer yollar ve etkenler araştırılmaktadır. Ön hipofizden büyüme hormonu sekresyonunun düzenlenmesi biri arkuat nükleusta sentezlenen stimülatör GHRH ve diğeri paraventriküler nükleusta sentezlenen inhibitör somatostatin olmak üzere iki hipotalamik hormonun karşılıklı kontrolü altıdadır (15). Son yıllarda çalışmalar GHRP-6 (Growth Hormone Releasing Peptide)'dan geliştirilen, insan dahil birçok türde güçlü bir GH salgılatıcı etki gösteren ve GH salgılatıcıları olarak isimlendirilen yeni peptit ve peptit olmayan sentetik bileşikler sınıfı üzerinde yoğunlaşmıştır. GH salgılanması ile ilgili geçitlerin araştırıldığı çalışmalarda GH salgılanmasının düzenlenmesinde üçüncü bir nöyroendokrin geçit olduğu ileri sürülmüştür. 1999 yılında ghrelin adı verilen GHSR için doğal endojen bir ligandın keşfi GH araştırmalarına yeni ve ilgi çekici bir boyut sağlamıştır. Ghrelinin *in vitro* primer rat

hipofiz hücresinden GH salınımına neden olduğu bildirilmiştir (4). Yine insan ve ratlarda yapılan bazı çalışmalarda ghrelin verilmesinin GH salınımını sağladığı belirlenmiştir (6).

Besin tipi ve besi metotlarının yemden yararlanma, büyüme oranı, karkas kalitesi ve genel sağlık durumu üzerine önemli etkileri bulunmaktadır. *Ad libitum* besleme ve sınırlı besleme uygulamalarının besi hayvanlarında sırt yağı kalınlığı ve intramuskular yağ kapsamını etkilediği bildirilmiştir (18-20).

Bu tez projesi ile farklı besleme uygulamalarının; ghrelin salgılanması üzerine etkilerinin saptanması, ghrelin düzeylerinde meydana gelebilecek değişikliklerin büyüme hormonu salgılanmasına yansımaları, bu hormonlarla besi performansı arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

GENEL BİLGİLER

Ghrelın, gastroıntestinal sistem tarafından üretilen, merkezi etki ile yeme davranışı ve vücut ağırlığı düzenlenmesinde görev alan bir peptid hormondur. Keşfinin ilk yıllarında vücutta büyüme hormonu salınımını artırıcı bir hormon olarak görülse de, son yıllarda iştah ve vücut ağırlığının düzenlenmesi üzerine etkileri daha çok dikkat çekmektedir (4).

Endokrinolojide normal keşif prosedürüne göre önce hormon bulunmakta, sonra bulunan hormonun reseptörü klonlanmakta ve son olarak da hormonun klinik olarak etkiye sahip analogları keşfedilmektedir. Buna karşın ghrelinin ortaya konuluşu bu prosedüre tamamen zıttır; önce analogları elde edilmiş, daha sonra reseptörü klonlanmış ve en son reseptörün doğal ligandı olan ghrelın izole edilmiştir (21).

Bowers ve arkadaşları (22) 1977’de yaptıkları çalışmada opioid niteliklerin tamamından yoksun, *met-enkefalin*’den köken alan, büyüme hormonu salgılatıcı özelliğe sahip, “Büyüme Hormonu Salgılatıcıları (Growth Hormone Secratagogue; GHS)” olarak adlandırılan sentetik bileşiklerin varlığını öne sürmüşlerdir. Bununla birlikte GHS’ler ne GH ekspresyonunu artırır ne de GHRH reseptörüne bağlanır. Bu sentetik peptidlerden ilk bulunanı GHRP (Growth Hormone Releasing Peptide)’dir. Üretilen GHRP’nin, GH’ya cevabının *in vitro* olarak zayıf olduğu ve *in vivo* etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Ardından 2 D-amino asitli bir heksapeptid olan GHRP-6 üretilmiş ve daha sonra da D-triptofanın metilasyonu ile heksareline üretilmiştir. Bu maddeler güçlü etkilere sahiptir ve aynı zamanda *in vitro-in vivo* verildiklerinde aktiflerdir. Bu iki madde i.v. (intravenöz) ya da s.c.(subkutan) verildiklerinde güçlü bir şekilde GH salgılatmaktadırlar. Bu incelemelerin sonunda, GHRP’lerin basit moleküler yapıya sahip olmalarına ilaveten GH sekresyonunu artırabilen etkili moleküller olduğu ortaya çıkmıştır (21).

İlaç endüstrisi, peptid ve peptid olmayan maddeleri geliştirmek için büyük kaynaklar ayırmaktadır. Bu maddelerden en önemlisi Merck tarafından üretilen Spiroindolone MK0677 olmuştur (23). MK-0677 etkili biyoyararlanımı, uzun süreli etkisi, tek başına kullanıldığında 24 saat boyunca GH ve IGF-I (Insulin-like Growth Factor-I) seviyelerini artırabilmesinden dolayı büyüme hormonu eksikliği tedavisinde ve yaşlı bireylerde oral olarak aktif anabolik etki oluşturmada aday ilaç olmuştur (1).

MK-0677’nin 1996’da keşfini takiben sonunda bu sentetik peptidlerin bağlandığı reseptör olan GHSR klonlanmış ve bu reseptör ile ilgili bağlayıcı bölge çalışmaları yapılmıştır (1, 3, 21, 23, 24). GHSR’nin önemli miktarda hipotalamus-hipofiz bölgesinde

bulunduğu tespit edilmekle birlikte spesifik bağlayıcı bölgeler diğer merkezi sinir sistem bölgelerinde de bulunmuştur (1).

Son olarak, 1999’da Kojima ve arkadaşları (4) tarafından yürütölen çalışmalar ile birlikte GHSR için endojen bir ligand olan, asile edilmiş 28 amino asitli bir peptidin belirlendiği öne sürölmüş ve bu peptid ‘‘Ghrelin’’ olarak adlandırılmıştır. Bu terimin içerdiği ‘‘ghre’’ birçok dilde ‘‘growth’’ un (büyüme) etiyomolojik köküdür, ‘‘relin’’ ise ‘‘releasing’’(salgılatıcı) maddelerin bir köküdür ve ghrelin terimi, karakteristik büyüme hormonu salgılatıcı etkisine dikkat çeken bir kısaltmadır (5).

Ghrelinin Yapısı

Ghrelin 28 amino asitlik bir peptiddir. Bu peptit serin-3 rezidüsüne 8-karbonlu yağ asidi grubunun kovalent olarak bağlanması ile değişime uğramaktadır. İşlem ‘‘n-oktanoilasyon’’ olarak bilinmektedir ve ghrelinin biyoaktivitesi için gerekli bir işlemdir (1, 24, 25). Ghrelin hakkında ilk bilinen, bir yağ asidi ile modifiye edilmiş peptid hormon olmasıdır (23, 26) (Şekil 1).



Şekil 1: Ghrelin peptidinin moleküler yapısı

Ghrelinin prekürsörü preproghrelindir. N-terminal ucundaki reseptör bağlayıcı dizisi; primatlar, rodentler, balıklar, köpekler, amfibianlar ve kuşlarda neredeyse %100 aynıdır. Rat ve insan ghrelinleri sadece iki amino asit yönünden birbirinden farklıdır (1, 8,11,25).

Ghreltin ile peptid yapıdaki GHRP-6 ya da heksareline gibi GHS'ler arasında yapısal homoloji mevcut değildir (8).

Des-Gln14-ghreltin, rat midesinde ghreltin peptidinin ikinci bir tipi olarak saflaştırılarak tanımlanmıştır. *Des-Gln14-ghreltin*, ghreltinin güçlü aktivitelerine benzer etkiler göstermektedir (8, 21, 26).

İnsan midesinden saflaştırılan ghreltinde, peptidin farklı formları da izole edilmiştir. Bu formlar, serin-3'te elde edilen asilasyon tipleri ile 4 grup içinde sınıflandırılabilir; asile edilmemiş, oktanoile edilmiş (C8:0), oktanoile edilmemiş (C10:0) ve muhtemelen dekanole edilmiş (C10:1) formlardır. Bu peptidlerin hepsi 27- 28 amino asit uzunluğunda bulunmuştur (26).

Asile edilmemiş ghreltin formu olan *des-açıl ghreltin* hem mide hem de kanda önemli seviyelerde bulunmaktadır. *Des-açıl ghreltin*, asile edilmiş ghreltin'den daha fazla dolaşıma katılmaktadır. *Des-açıl ghreltin* hipotalamus ve hipofizdeki asile edilmiş ghreltinin bağlayıcı bölgelerindeki işaretli ghreltin ile yer değiştirmemektedir. Bu olay ratlarda *des-açıl ghreltinin* GH-salgılatıcı ve diğer endokrin aktivitelerinin olmadığını göstermektedir. Bundan dolayı *des-açıl ghreltinin* spesifik bir reseptörünün bulunup bulunmadığı ve bunun asilasyonlu ghreltin'den farklı bir spesifik fonksiyonunun olup olmadığı tartışma konusudur (26).

Ghreltinin Salgılanması

Tüm omurgalılarda ghreltin temel olarak midede üretilmektedir. Gastrik kanser ya da şiddetli gastrik ülserin tedavisinde uygulanan total gastrektomide, operasyondan 30 dakika sonra ölçülen ghreltin seviyelerinde operasyon öncesine göre yaklaşık % 30-50 kadar azalma gözlenmiştir. Bu seviyeler, operasyon öncesine göre dereceli olarak % 70'e kadar azalmıştır. Elde edilen bu sonuçlar dolaşım ghreltininin % 50-70'inin mide kaynaklı olduğunu göstermektedir. Fakat bu oranın ince bağırsaklar ve pankreas tarafından kompanse edildiği düşünülmektedir (26).

Midedeki ghreltin içeren hücreler fundusta pylorosa göre daha bol miktarda bulunmaktadır (5, 8, 21, 23, 26). Ghreltin içeren hücrelerin midenin mukoza tabakasında bulunan farklı tipte endokrin hücreler oldukları *in situ* hibridizasyon ve immunohistokimyasal analizler ile gösterilmiştir. Okzintik mukozada belirlenen bu

hücrelerin 4 tipi mevcuttur: ECL (*enterocromaffin like*), D, EC (*enterocromaffin*) ve X/A benzeri hücreler. Ratların okzintik bezi % 60-70 ECL hücreleri, % 20 X/A benzeri hücreler, % 2-5 D hücreleri ve % 0-2 EC hücrelerini içermektedir. İnsanlarda ise bu oranlar sırasıyla % 30, % 20, % 22 ve % 7'dir. Granüllerdeki en büyük ürünler ECL hücrelerinde histamin ve uroguanilin, D hücrelerinde somatostatin ve EC hücrelerinde serotoninidir. X/A benzeri hücrelerin granül içeriği ise ghrelinin keşfine kadar bilinmemekteydi.

X/A benzeri hücreler içi ghrelinle dolu olan yuvarlak, kompakt, elektron yoğunluğu olan granülleri içermektedir. Bu X/A benzeri hücreler olgun okzintik bezlerdeki endokrin hücre popülasyonunun % 20'sini oluşturmaktadır. Fötal midedeki X/A benzeri hücrelerin sayısı oldukça düşüktür ve ancak doğumdan sonra artmaktadır. Buna bağlı olarak fötal midedeki ghrelin seviyesi de oldukça düşüktür ve doğumdan sonra 5 haftaya kadar dereceli bir şekilde artmaktadır (26).

Gastrik X/A benzeri hücreler, ghrelinin asil formunun NH₂ ucuna spesifik bir antikör bağlanarak tespit edilebilmektedir. Rat midesindeki ghrelin düzeyi 377.31 fmol/ml (*n-oktanoil ghrelin*) ve 1779.8 fmol/ml (total ghrelin)'dir (26).

Ghrelin immunoreaktif hücreler aynı zamanda duodenum, jejunum, ileum ve kolonda da bulunmuştur. İnce bağırsaklardaki ghrelin düzeyi duodenumdan kolona doğru dereceli olarak azalmaktadır. Midede olduğu gibi intestinal ghrelinin asıl moleküler formu *n-oktanoil ghrelin* ve *des-açil ghrelin*dir (3, 5, 8, 21, 26).

Pankreas da ghrelin üreten bir organdır. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ve RIA (Radioimmunoassay) ile yapılan analizlerde rat pankreasında ghrelin ve *des-açil ghrelin*in her ikisi de bulunmuştur. Pankreatik adacıklarda üretilen ghrelinin α -hücrelerinde mi, β -hücrelerinde mi yoksa henüz yeni belirlenmiş ϵ -hücrelerinde mi üretildiği ise tartışma konusudur (26).

Beyin ve Hipofizden Salgılanması

Ghrelin reseptörü olan GHS-R, asıl olarak hipotalamus ve hipofizde eksprese edildiği için bunun endojen ligandının hipotalamik bölgede var olduğu düşünülmektedir. Diğer GH-salgılatıcı peptid olan GHRH hipotalamusta üretilmekte ve hipofiz somatotrop

hücrelerinden GH salgılanmasını uyararak için hipofizeal-portal sistem içine salgılanmaktadır.

Ghrelinin iştahın kontrolünde önemli bir bölge olan hipotalamik ARC (*arcuate nucleus*)’de mevcuttur. Buna ilaveten dorsal, ventral, paraventriküler ve arkuat hipotalamik nükleus arasında üçüncü ventriküle çok yakın olan, önceden karakterize edilmemiş hipotalamik nöronlarda ghrelinin varlığı bildirilmiştir. Bu ghrelinin içeren nöronlar NPY ve AgRP (Aguoti Related Peptid) içeren nöronlara efferent iplikçikler göndermektedir ve bu şekilde iştah açıcı peptidlerin salınımını uyarabilmektedir. Ghrelinin bu dağılım örnekleri, onun gıda alımını kontrol etmede bir rolü olduğunu göstermektedir. Hipofiz bezindeki GH salgılayıcı somatotroplar ghrelinin hedef hücreleridir. Aynı zamanda ghrelinin de hipofiz bezinde bulunmuştur. Burada otokrin ve parakrin olarak GH salgılanmasını etkileyebilme olasılığı yüksektir. Hipofizdeki ghrelinin ekspresyon seviyesi doğumdan sonra yüksektir ve puberte ile azalmaktadır. Adenomlar, kortikotrop tümörleri ve gonadotrop tümörleri gibi hipofiz tümörleri ghrelinin peptidini içermektedir (3, 8, 21, 26).

Diğer Dokulardan Salgılanması

Ghrelinin mRNA’sı böbrekte özellikle glomerullarda eksprese edilmektedir. Üstelik fare böbreğinden alınan peptid ekstraktlarının önemli miktarda hem *n-oktanoil* hem de *des-açil ghrelinin* peptidlerini içerdiği bulunmuştur. Plazma ghrelinin düzeyinin serum kreatinin konsantrasyonu ile belirli bir şekilde ilişkili olduğu ve son döneme giren böbrek hastalarının ghrelinin düzeylerinin normal böbrek hastalarına göre 2-8 kat daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu sonuca göre böbreğin ghrelinin yıkımı ve kleransında önemli bir yerinin olduğu ileri sürülmektedir (27). Ghrelinin immunoreaktif hücreler, interstisyel leydig hücreleri ve sertoli hücrelerinde de belirlenmiştir. Ghrelinin reseptörü, germ hücreleri ve asıl olarak pakiten spermatozoidlerde tespit edilmiştir (26).

Ghrelinin Reseptörleri

Ghrelın Reseptör Ailesi

GHS- R, 7 transmembran bölgesi ile tipik bir GPRC (G protein-coupled receptor)'dir. İki farklı ghrelın reseptör cDNA'sı izole edilmiştir. Birincisi GHS-R tip1a, ikincisi GHS-R tip1b'dir (26).

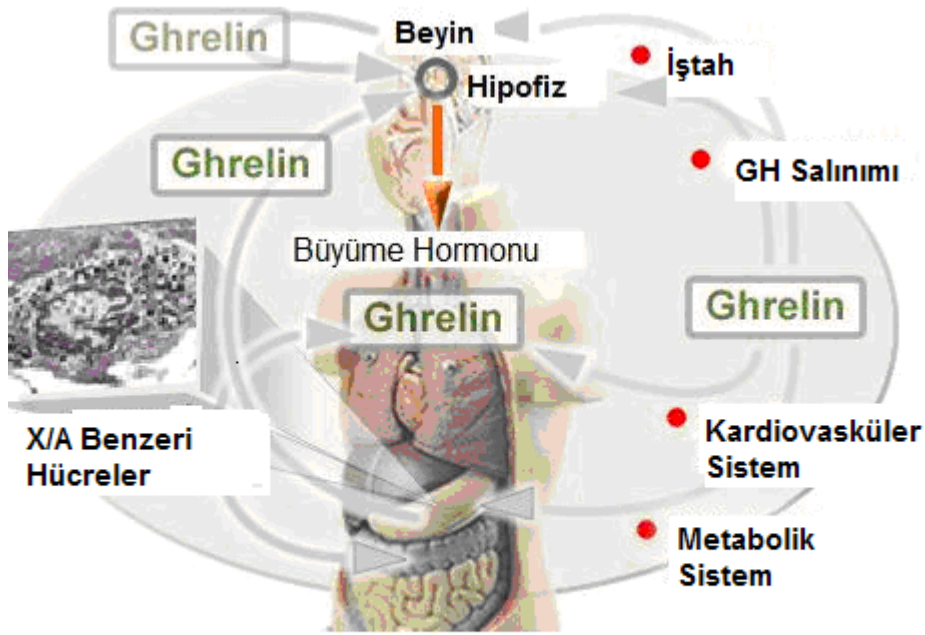
GHS-R çeşitli homologlara sahiptir, bunların endojen ligandları gastrointestinal ya da nöropeptidlerden oluşmaktadır. Ghrelın ailesi; ghrelın, motilin, nöromedin U ve nörotensin için reseptörler içermektedir. Bu peptidlerin hepsi gastrointestinal organlarda bulunmakta ve gastrointestinal hareketlerle düzenlenmektedir (5, 26).

İki endojen GH-salgılatıcı peptid belirlenmiştir; ghrelın ve GHRH . GHRH, GHRH-reseptörü üzerine etki ederek adenilat siklazı aktive eder ve hücre içi siklik AMP'yi artırır, bu da ikincil haberci olarak proteinkinaz A'yı aktive eder. Bu olay GHRH reseptörünün Gs alt ünitesiyle eşleştiğini göstermektedir. Diğer taraftan ghrelın, GHS-R üzerine etki eder ve IP₃ (inositole triphosphate) ile diaçilgliserolü oluşturmak için fosfolipaz C'yi aktive ederek hücre içi Ca⁺²,da bir artış meydana getirir. Bu olay da, ghrelın reseptörünün bir Gq alt ünitesiyle eşleştiğini göstermektedir (26).

Ghrelinin Genel Etkileri

Ghrelinin başlıca etkileri şunlardır (Şekil 2):

- Büyüme hormonu üzerine etki
- İştah üzerine etki
- Gastro-intestinal sistem üzerine etki
- Kardiovasküler sistem üzerine etki
- İnsülin sekresyonu üzerine etki
- Hücre proliferasyonu ve apoptozisin düzenlenmesi



Şekil 2- Ghrelinin genel etkileri

Büyüme Hormonu Üzerine Etkileri

Ghrelin çok yönlü bir peptid hormondur. Ghrelin GHS-R üzerine etki etmekte, GH salgılanmasını uyarmak için IP_3 yoluyla hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu artırmaktadır. Ratlara i.v. verildiğinde ghrelinin GH-salgılatıcı aktivitesi GHRH'nın etkilerine benzemektedir. Fakat ghrelinin meydana getirdiği uyarım GHRH'dan 2-3 kat daha büyüktür (3, 5, 8, 26).

Ghrelin verilen doza göre hem *in vitro* hem *in vivo* GH salgılanmasını uyarmaktadır. Rat ve insanlarda i.v. ghrelin enjeksiyonu güçlü bir şekilde GH-salgılanmasına neden olmaktadır. Ghrelinin 10 pmol minimum doz ile sadece i.c.v. verilmesi rat plazmasındaki GH düzeyini artırmıştır. Böylece i.c.v. enjeksiyonun i.v. enjeksiyondan daha güçlü olduğu görülmektedir. Ghrelinin aynı zamanda tavuk, balık ve kurbağa gibi memeli olmayan

omurgalılarda da GH salınımını uyardığı gösterilmiştir. Bunun yanında, ghrelinin *in vivo* ölçümü de bu türlerde ghrelinin güçlü bir GH-salgılatıcı peptid olduğunu doğrulamıştır (8).

Ghrelinin birinci olarak hipofiz hücrelerinden GH-salınımını uyarması, bu peptidin hipofiz üzerine direkt etki edebileceğini göstermektedir. Ghrelin aracılıklı GH salınımının uyarılmasında hipotalamusun da ilgili olduğu ileri sürülmektedir. Hipotalamik bölgede organik lezyonu olan hastalar, ghrelin tarafından uyarılsalar bile GH salgılanmasında yetersizlik göstermiştir. Ghrelinin *in vitro* olarak primer hipofiz hücrelerine uygulanması bazal seviyenin 2-3 kat üzerinde GH-salınımını artırmış, ratlara *in vivo* ghrelin verildiğinde ise bundan daha az GH uyarım seviyesi gözlenmiştir. Bu faktörler ghrelin verilmesi ile oluşturulan yüksek GH salgılanma seviyesine başka faktörlerin de *in vivo* olarak karıştığını göstermektedir. Bu durum için başka bir olasılık da vagus siniri yolu ile iletimdir. Nervus vagus kesildiğinde ghrelin enjeksiyonundan sonra GH-salınımının uyarılması çarpıcı bir şekilde azalmıştır, bundan dolayı *nervus vagusun*, ghrelinin maksimal uyarıcı etkilerine ihtiyacı olduğunu göstermektedir. Diğer bir olasılık primer hipofiz hücrelerinde GHRH eksikliğidir. Ghrelin ve GHRH'nin birlikte verilmesi GH sekresyonu üzerine üç ayrı sinerjik etki göstermiştir, bu birlikte kullanım GHRH ya da ghrelinin tek kullanımından daha fazla GH salgılanması ile sonuçlanmıştır. GH üzerine sinerjik etki, GHS'ler, sentetik ghrelin agonistleri ve GHRH'nin birlikte verilmesiyle de gözlenmiştir. Bu bulgular GHRH'nin GH salgılanmasını uyardırmada maksimum etki için gerekli olduğunu belirtmektedir (26).

Ghrelinin i.v. farmakolojik dozlarının GH düzeyini artırması tam bir kanıt olmamakla birlikte ghrelinin GH'nin fizyolojik olarak düzenlenmesinde rol aldığını ortaya koymaktadır. Ghrelinin düzenleyici rolünü savunan bulgulardan biri negatif enerji dengesi durumunda ghrelin ve GH'nin doğal olarak artması, diğeri ise obezite ve pozitif enerji dengesi durumunda kendiliğinden bu iki hormonun azalmasıdır. Fötusta ghrelin mRNA'sı tespit edilebilir düzeyde değildir fakat doğumdan sonra zamanla kademeli olarak artmaya başlamakta ve 3 hafta sonra pik düzeye ulaşmakta ve bundan sonra da azalmaktadır. Ghrelinin genel olarak izlediği yol, GH ve IGF-I sekresyonunun takip ettiği yolları anımsatmaktadır (3).

İştah Üzerine Etkileri

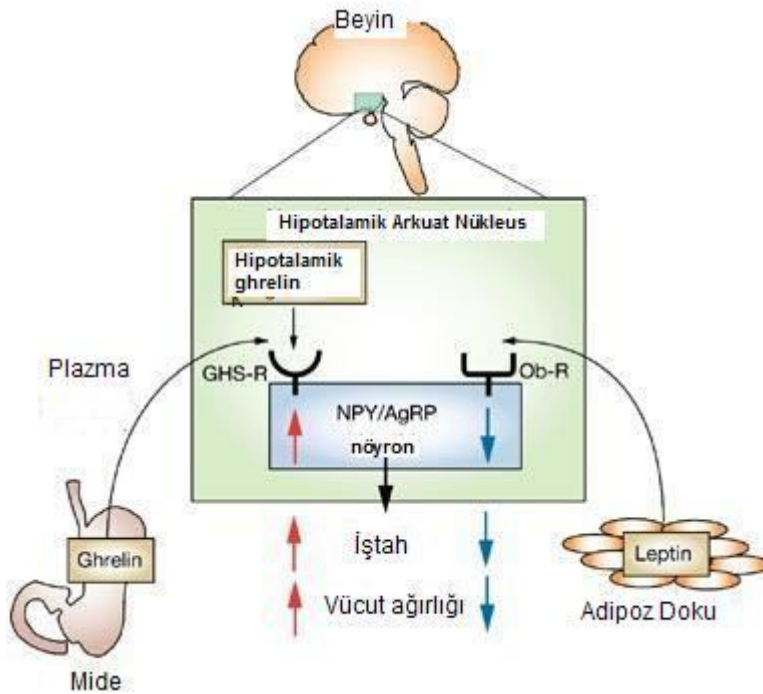
Beslenme yaşam için gerekli olan temel bir davranıştır. İştahın beyin tarafından kontrol edildiği kabul edilmektedir. Beslenme davranışı ise merkezi sinir sistemi kısmen de hipotalamusun kompleks mekanizmaları tarafından düzenlenmektedir. Lateral hipotalamus çıkarıldığında hipofaji oluşmakta ve şiddetli kilo kaybından dolayı ölüm meydana gelmektedir. Diğer taraftan ventromedial hipotalamusun çıkarılması hiperfajiye neden olmakta, bu uygulamaya tabi tutulan hayvanlarda hem beslenme sıklığı hem de gıda alım miktarı artmakta dolayısıyla kilo alma ile şiddetli obezite gelişmektedir. Bu şekilde beslenme, hipotalamustaki uyarıcı ve durdurucu güçlerin bir dengesi ile düzenlenmektedir (26).

Vücut ağırlığının düzenlenmesi, kompleks hormonal ve nöroendokrin yollar aracılığı ile olmaktadır. Leptin, insülin ve adinopektini içine alan bu kontrol sisteminin kritik elemanları, vücudun yağ miktarıyla orantılı olarak salgılanmaktadırlar ve merkezi sinir sistemi ile diğer hedef perifer dokularda işlev görmektedirler. Merkezi sinir sistemini hedef alan bu elemanlardan bir kısmı ağırlık kazancını teşvik eden anabolik yolları ve gıda alımını uyarırken diğer bir kısmı ağırlık kaybına sebep olan katabolik yolları uyarmakta ve gıda alımını azaltmaktadır. Ayrıca gıda alımının düzenlenmesinden bağımsız olarak birçok perifer dokuda lipit metabolizması gibi enerji metabolizmasını düzenleyen, leptin, insülin, adinopektin, kateşolaminler gibi çok sayıda hormon bulunmaktadır. Ghrelinin de enerji homeostazisi ve beslenme davranışının düzenlenmesinde görev aldığı görülmektedir (27).

Ghrelinin reseptörlerinin bulunduğu *arkuat nükleus* ve lateral hipotalamus aynı zamanda hipokretinler olarak adlandırılan NPY, AgRP, POMC (proopiomelanocortin), MCH (melanin-concentrating hormone) ve oreksinler gibi gıda alımının düzenlenmesinde görev alan nöropeptidleri üreten nöronları kapsamaktadır. Merkezi olarak ghrelinin verilmesi ile gıda alımı ve enerji homeostazisini düzenleyen bu peptidler birbiriyle etkileşime girer. Ghrelinin iştah açıcı mekanizması, NPY ve AgRP yollarıyla ilişkilidir, diğer düzenleyici sistemlerle etkileşimi ise açık değildir (8, 10, 28).

Ghrelinin, NPY ve AgRP peptidlerini üreten nöronları uyarmaktadır. Bu uyarıcı işlev sonucu NPY ve AgRP'nin her ikisi hipotalamik çekirdekten birlikte salgılanarak

nöronların aktivasyonu sağlanır. Yaklaşık bütün NPY/AgRP nöronları ghrelin reseptörlerini uyarır ve ghrelin tarafından da uyarılabilir. Ghrelinin iştah açıcı etkisi şu ana kadar en güçlü iştah açıcı olarak bilinen NPY'nin iştah açıcı etkisi kadar güçlüdür (25). Hipotalamusta NPY/AgRP nöronlarının uyarılmasıyla ghrelinin beslenme aktivitesi gerçekleşmektedir (8). NPY ve AgRP, ARC'de aynı nöron topluluğu tarafından üretilmektedir ve bunların iştah açıcı etkileri leptin tarafından direkt olarak inhibe edilmektedir. Leptin, ghrelin-uyarımlı gıda alımını durdurmaktadır ve ghrelin, leptinin iştah kesici etkisini tersine çevirmektedir, bu da NPY/AGRP sisteminin düzenlenmesinde ghrelinin leptin işlevini antagonize ettiğini göstermektedir (8, 10, 24).



Şekil 3- Ghrelin ve Leptin hormonlarının iştah ve vücut ağırlığı üzerine zıt etkileri

Ekzojen ghrelin farelerde besin alımını artırmakta, yağ kullanımını azaltmakta ve sonuçta yağ dokusu artışına neden olmaktadır. Ghrelinin yağ dokusunu ve iştahı artırıcı etkilerinin büyüme hormonu üzerine olan etkilerinden bağımsız olduğu ve bunun, leptinin de aracı olduğu merkezi sinir sistemindeki özel nöronlar tarafından düzenlendiği düşünülmektedir (13) (Şekil 3). İnsanlarda ghrelin düzeyleri obezite ve kalori alımı ile azalmakta, açlıkta ve anoreksiya nervozalı hastalarda artmaktadır (10). Buradan yola çıkarak ghrelinin enerji depolarının boşalmasını ve kaşeksiyi önleyen bir hormon olduğu, her öğün öncesi düzeylerinde artış olması nedeniyle iştahı uyardığı düşünülmektedir (11, 29).

Ghrelinin uzun süreli i.c.v. enjeksiyonu sonucunda gıda alımı gittikçe artmış, enerji harcaması düşmüş, vücut ağırlık kazancı meydana gelmiştir (10). Ghrelinin sadece merkezi olarak enjeksiyonu değil, aynı zamanda sistemik ya da periferal ve deri altı enjeksiyonu da gıda alımında artışa neden olmuştur. Ghrelin açlık ve ileri derecede açlığa cevaben birincil olarak gastrointestinal organlarda üretilip, beslenmeyi uyarmak amacıyla kana verilmekte, bu şekilde merkezi sinir sistemine periferal bir sinyal olarak hizmet etmektedir (8, 24, 26).

Periferal olarak ghrelin enjeksiyonu hipotalamik nöronları ve gıda alımını uyarmaktadır. Ghrelinin tersine, NPY, AgRP, oreksinler, MCH ve galanin gibi diğer hipotalamik peptidler, merkezi olarak verildiklerinde gıda alımını uyarırlar fakat periferal olarak etkili değildirler. Genelde periferal olarak enjekte edilen peptidler kan-beyin bariyerini geçememektedir. Ratlarda periferal ghrelinin bu bariyeri düşük oranlarda geçtiği gösterilmiştir. Bundan dolayı periferal ghrelinin, indirekt bir yolla uygun hipotalamik bölgeleri aktive ettiği düşünülmektedir (8, 21, 26).

Plazma ghrelin düzeyi öğünlerden hemen önce yükselirken, yemekten sonraki bir saat içinde minimum seviyelere düşmektedir. Plazma ghrelin düzeylerindeki bu öğünden önce yükselme ve sonrasında azalma, ghrelinin öğün başlangıcı için bir sinyal olduğu hipotezini desteklemektedir. (8, 26, 30). Gün içerisinde midedeki ghrelin düzeyinin gıda alımı ile baskılandığı, gece boyunca açlık ile birlikte arttığı görülmektedir. Buna karşın gün içerisinde hipotalamik ghrelin sekresyonu artmakta, gece ise azalmaktadır ve bu şekilde gıda alımı düzenlenmektedir (31). Başka bir araştırmada da insanlara ghrelin enjeksiyonları yapıldığında kendilerini çok fazla acıkmış hissettikleri ve normalden % 30 daha fazla yedikleri ortaya konmuştur. Bu cevap geneldir ve fazla gıda alımına rağmen kişilerde kusma ve bulantı oluşmamaktadır. Ghrelin, insanlarda ve rodentlerde gıda alımını uyarır ve iştaha etki eden endojen dolaşım ghrelin düzeyleri öğünlerden önce artar ve öğünlerden sonra da düşer. Bu öğün zamanı ve öğün başlangıcında oluşan açlık, ghrelinin fizyolojik rolü ile uyumludur. Benzer şekilde, doğal ghrelin salgılanma zamanı ratlarda yeme olayı ile bağlantılıdır (25, 32).

Plazma ghrelinin öğün sonrası baskılanması, öğün öncesi pik yapmasından daha çok çalışılmıştır. Ghrelinin bu etkisi fizyolojik olarak açıklığa kavuşmamakla birlikte öğün sonrası salgılanmasındaki baskılanma, gıdanın doyurucu etkisinde bir rol oynadığını düşündürmektedir. Kolesistokinin gibi doyma sinyalleri gastro-intestinal kanaldaki besinlere cevaben salgılanmaktadır. Dolaşım ghrelinin öğün sonrası azalması, bu doyma sinyallerinin ghrelinin iştah açıcı etkisinden daha kuvvetli bir fonksiyona sahip olduğunu

göstermektedir. Dolaşım ghrelin düzeylerindeki öğün sonrası azalma gerçekten doyma durumu ile ilişkili ise, sindirilen gıdadan elde edilen enerji ile hormonun baskılanmasının orantılı olduğu düşünülebilir. Öğün öncesi ghrelin düzeylerinin yükselmesi ise, sindirilen gıdalar ile ghrelinin baskılanması arasındaki bağlantı kadar açıklığa kavuşmamıştır, fakat elde edilen çalışmalara göre oluşturulan bu hipotez hala geçerliliğini korumaktadır (33).

Fare, rat, sığır ve insanlarda, ghrelin mRNA'sının ekspresyon seviyelerinin veya dolaşımdaki ghrelin düzeylerinin gıda yokluğunda arttığı ve öğünden sonra düştüğü gözlenmiştir (13, 34, 35).

Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri

Ghrelinin belirli dozlarda i.v. verilmesi gastrik asit sekresyonu ve gastrik motiliteyi artırmaktadır. Gastrik asit sekresyonu dönemlerinde, ghreline maksimum cevap histaminin s.c. verilmesiyle neredeyse aynıdır (3 mg/kg). Ghreline verilen bu cevaplar bir histamin H₂ reseptör antagonisti ile değil, atropin ya da bilateral servikal vagatomi ile yok edilmiştir (3, 26).

Ghrelinin i.c.v. verilmesi de doza bağımlı olarak gastrik asit sekresyonunu artırmaktadır. Ghrelinin i.c.v. verilmesinin, vagus sinirinin dorsomotor nükleusunda ghrelin ekspresyonunu uyardığı gözlenmiştir ve ghrelinin gastrik asit sekresyonunu uyarma özelliğinin vagus sinirinin aktivasyonu yoluyla olabileceğini göstermiştir (3, 26).

Kardiovasküler Sistem Üzerine Etkileri

Ghrelinin kardiovasküler işleviyle ilgili bir takım kanıtlar bulunmuştur. Hem ghrelini, hem de reseptörünü kodlayan mRNA'nın ekspresyonu kalp ve aortada belirlenmiştir. İnsanlara i.v. ghrelin enjeksiyonunun yapılması kan basıncında bir azalmaya yol açmıştır. Buna ilaveten, işaretlenmiş bir ghrelin olan [1125-His9]-ghrelinin kalbe ve periferel vasküler dokuya bağlandığı gösterilmiştir. Bu işaretlenmiş molekülün oluşturduğu sinyal, atherosklerotik bölgelerde artmakta ve ghrelin reseptör

ekspresyonunun bu bölgelerde düzenlendiğini ve sonuçta aterosklerozis gelişiminde ghrelinin rolü olduğunu düşündürmektedir (3, 26).

İnsülin Sekresyonu Üzerine Etkileri

Ghrelinin insülin sekresyonundaki rolü tartışmalıdır. Ghrelinin bazı deneylerde insülin sekresyonunu durdurduğu bazılarında ise uyardığı gözlenmiştir. Bu uyumsuzluk farklı türlerin kullanımı ya da deney düzeninden dolayı olabilir. Plazma ghrelin ve insülin düzeyleri kan glukoz konsantrasyonlarından etkilenmektedir; yüksek glukoz ghrelin sekresyonunu baskımlarken insülin sekresyonunu uyarmaktadır. Bundan dolayı deneylerdeki glukoz konsantrasyonları önemli olabilir (36). Date ve arkadaşları (37), yüksek glukoz konsantrasyonlarında (8.3mM) ghrelinin insülin salınımını uyardığını bildirmişlerdir. Aksine bazal glukoz seviyesinde (2.8 mM) ghrelinin insülin salınımı üzerine etkisi olmamaktadır (36).

Hücre Proliferasyonu ve Apoptozisin Düzenlenmesi

GHS bağlayıcı bölgeler neoplastik endokrin ve non-endokrin dokularda da bulunmuştur, ilginç olarak GHS reseptör alt tipleri fizyolojik durumlarda bu reseptörleri eksprese etmeyen örneğin akciğerler gibi tümörleri bulunan organlarda tespit edilmiştir (12).

Fizyolojik ve neoplastik tiroid dokuların her ikisi de GHS reseptörlerini eksprese etmektedir. Tüm folliküler kökenli tiroid tümörleri normal tiroid bezine göre daha fazla spesifik GHS bağlayıcı bölge içermektedir. Spesifik GHS bağlayıcı bölgeler aynı zamanda folliküler papillar ve anaplastik tiroid hücrelerinde de mevcuttur (38).

Spesifik GHS reseptörleri akciğer tümörlerinde de görülmüştür, fakat fibroadenomlar ve normal meme paransiminde görülmemiştir. Kardiovasküler sistemde de asile edilmemiş ghrelin asile edilmiş molekül gibi benzer etkilere sahiptir, hatta asile edilmemiş ghrelin antiproliferatif işlevlerde biyolojik olarak daha aktiftir (38). Asile edilmemiş ghrelin genellikle GHS reseptör tip 1a'ya bağlanamaz. Bu da akciğer kanser

hücrelerinde gözlenen antiproliferatif etkinin başka GHS reseptör alt ünitesi aracılığı ile olduğunu göstermektedir (4).

Ghrelın Sekresyonunun Düzenlenmesi

Vücut ağırlığı, enerji homeostazisi olarak bilinen bir işlem tarafından düzenlenir. Bu sistem, enerji dengesizliği durumlarında uygun cevapları düzenlemek üzere beyine vücuttaki enerji depolarının durumlarını haber veren bir mekanizmayı içermektedir (1).

Ghrelın sekresyonunun düzenlenmesi ile ilgili olarak, dolaşımdaki ghrelın düzeylerinin;

- a) Fazla su alımı ile oluşturulan mide şişkinliği tarafından değil glukoz tarafından düşürüldüğü,
- b) Somatostatin ve somatostatine yüksek yapısal benzerlik gösteren bir nöropeptid olan kortistatin infüzyonu ile düşürüldüğü,
- c) Obezite ve pozitif enerji dengesi durumlarında azaldığı,
- d) Açlık ve anoreksiya nervozalı hastalarda olduğu kadar beslenme bozukluğunda da arttığı ve
- e) İnsülin sekresyonuyla negatif olarak ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (24).

Elde edilen bu bilgiler ghrelın sekresyonunun endokrin ve metabolik kontrolün altında olduğunu, aynı zamanda non-endokrin ve metabolik cevaplar için büyük bir rol oynadığını düşündürmektedir (1, 32).

Ghrelın sekresyonunun düzenlenmesinde görevli faktörlerin ne olduğu aslında tam açık değildir. Ghrelın düzeyleri, düşük enerji diyetleri, kansere bağlı anoreksi ve kaşeksi, anoreksiya nervoza, kronik kalp, akciğer, karaciğer ve böbrek yetmezlikleri sonucunda kilo kaybına cevaben artmaktadır (28). Bu şekilde ghrelının temel olarak enerjiyi korumaya yönelik olarak salgılandığı ve kaşeksiyi önlemek için enerji eksikliği durumlarında tetikleyici olduğu görülmektedir.

Sağlıklı bireylere karşın obez bireylerde düşük plazma büyüme hormonu, yüksek plazma leptin düzeyleri ile birlikte plazma ghrelın düzeylerinin azaldığı gözlenmiştir (13). Bunlara ilaveten ghrelın gıda alımında artma ve yağ kullanımında azalma sağlayarak da enerji dengesini düzenlemektedir (10, 13, 28). Ghrelının kronik olarak verilmesi

sonucunda adipoziteyi uyararak vücut ağırlığını artırdığı ve enerji harcanması, yağ yıkımı ve lipolizisi azalttığı gözlenmiştir (35).

Ghrelin sekresyonunu belirleyen faktörlerden en önemlilerinin insülin, glukoz ve somatostatin olduğu görülmektedir (36, 39). Büyük olasılıkla büyüme hormonu, leptin, melatonin, tiroid hormonları, glukagon ve parasempatik sinir sistemi de ghrelin metabolizmasında rol oynamaktadır (13, 34, 40).

Ratlarda, açlık ile oluşan ghrelin ekspresyonu, insülin uyarımlı hipoglisemi ve leptin verilmesi ile de uyarılabilmektedir (29). Glukoz tüketimi ghrelin sekresyonunu baskılamaktadır (13). Bu incelemeler, insülin aracılığı ile olan etkiden ziyade glukoz ya da enerji alımının midedeki ghrelin içeren X/A benzeri hücrelerin üzerine direkt etkisini göstermektedir (28).

Ghrelin glukoz metabolizmasını da düzenlemektedir ve büyük olasılıkla bu etki insülinin aktivitesini düzenlemesinden ileri gelmektedir (36, 41). Glukozun oral ya da i.v. yolla verilmesi plazma ghrelin düzeyini düşürdüğünden, kan glukoz konsantrasyonu bu düzenlemede önemli olabilir. Ayrıca su alımı ile oluşan gastrik gerilim ghrelin düzeyini değiştirmez, sadece midenin mekanik olarak gerilimi de ghrelin salınımını uyarmaz. Plazma ghrelin düzeylerinin öğünlerde artmasına karşın, yüksek yağlı bir öğün ile bu düzeyler düşmektedir (8, 21, 26).

Plazma ghrelin düzeyi obez bireylerde düşük zayıf bireylerde ise yüksektir. Bu gerçekte ilişkili olarak plazma ghrelin düzeyi anoreksiya nervozalı hastalarda çok yüksektir ve ağırlık kazancı olduğunda ya da hastalık iyileştiği zaman tekrar normal düzeylerine dönmektedir. Gastrik bypasslı hastalar ise kilo kaybederken ghrelin düzeyleri düşmektedir. Gıda alımı ile ilişkili ghrelin düzeylerindeki değişiklikler bu hastalarda azalır çünkü mide, ghrelin üretiminin asıl yapıldığı yerdir. Plazma ghrelin düzeyi aynı zamanda kısa ince barsak sendromlu hastalarda da düşüktür, bu durum belki de ghrelin üreten dokunun kaybindan kaynaklanmaktadır (12).

Güçlü bir anoreksijenik peptid olan urokortin-1'in infüzyonunda olduğu kadar ocreotide gibi somatostatin ve analoglarının ekzojen verilmesi plazma ghrelin düzeyini baskılamaktadır. Bununla birlikte leptinin verilmesi ghrelinin düzeylerini değiştirmez (42).

Ekzojen GH, midedeki ghrelin mRNA ekspresyonunu ve plazma ghrelin düzeyini düşürmekte fakat midedeki ghrelin depolarını etkilememektedir. Bu sonuçlara göre, hipofiz büyüme hormonu, midedeki ghrelin üretimi üzerine bir feed-back düzenleme göstermektedir (26).

Anoreksiya nervoza; kilo kaybı, davranış değişiklikleri ile karakterize olan, sıklıkla genç kadınlarda gözlenen bir sendromdur. Anoreksiya nervozalı hastalarda plazma ghrelin düzeyleri yüksektir. Tekrar gıda alımı ve ağırlık kazancından sonra kontrol seviyelerine geri dönmektedir. Anoreksiya nervoza hastalarının GH düzeyleri belirgin bir şekilde artış göstermektedir ve bu da dolaşımdaki ghrelinin yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Bundan başka, yüksek ghrelin düzeyleri insanlarda ACTH, prolaktin ve kortizol düzeylerini artırmaktadır.

PWS (Prader-Willi Sendromu); orta derecede mental bozukluk, hiperfaji, kısa boyluluk, musküler hipotoni ve ayırıcı davranışsal özellikler ile karakterize kompleks bir genetik bozukluktur. PWS’de aşırı olan iştah, ilerleyici olduğundan şiddetli obeziteye neden olmaktadır ve bu durum da, kardiovasküler morbidite ve mortalitenin artışına sebep olmaktadır. PWS genotipi, kromozom 15’in üzerinde q11-13 bölgesindeki babaya ait bir veya daha fazla gen eksikliği ile karakterizedir. Bu genetik değişim de, iştah düzenleyici bölgeleri içine alan bazı hipotalamik bölgelerde fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır. Bunun yanı sıra PWS’de GH eksikliği yaygındır (3, 5, 8, 26).

PWS hastalarında plazma ghrelin düzeyleri incelenmiştir. Ghrelinin plazma düzeyleri PWS’de referans popülasyona göre 3-4 kat daha yüksektir. Bundan dolayı ghrelin, PWS’de görülen hiperfajiden sorumlu olabilir. Bu hastalarda yüksek ghrelin düzeylerinin nedeni henüz açıklanamamıştır. Kromozom 15 üzerindeki q11-13 bölgesindeki babaya ait genler, transkripsiyon faktörlerinin aşırı üretimini uyararak ghrelin ekspresyonunu artırabilir ya da alternatif olarak transkripsiyon durdurucu faktör kaybı ile normal olan ghrelin ekspresyonunu bozabilir. Ghrelin gen ekspresyonu düzenlenmesindeki kesin mekanizmanın bilinmesi ile PWS’de hiperfajinin genetik nedeninin açıklanabileceği düşünülmektedir (21, 24, 26).

Ghrelinin Klinik Kullanımı

Ghrelinin farklı fonksiyonlara sahip olması klinik kullanımını artırmaktadır. Güçlü GH-salgılatıcı aktivitesi ve özelliğinden dolayı GH eksikliğinin teşhis ve tedavisinde kullanılabilir. GH eksikliğinin teşhisi için en yaygın olarak insülin uyarımlı hipoglisemi yöntemi kullanılmaktadır. Bu durumda kan glukoz konsantrasyonu 40 mg/dl’nin altına düşmektedir. Bu test hipofiz hastalarında hem GH hem de ACTH salınımını

değerlendirebilmektedir. Bununla birlikte insülinin hipoglisemik işlevi bazen yan etkilere sebep olmaktadır. Bugün i.v. enjeksiyonu insanlar için hiçbir yan etki göstermediğinden ghrelin GH eksikliğinin teşhisi için daha yararlı bulunmaktadır (26).

GH yetersizliği gösteren erişkinler ve çocuklarda, ghrelin tedavisi yararlı olabilir. Ghrelinin GH-salgılatıcı aktivitesi GHRH kadar güçlüdür. Buna ek olarak ghrelin ve GHRH'nın birlikte verilmesi sinerjik etki gösterir ve bunların kombine verilmesi şu ana kadar belirlenen en güçlü GH salınımına neden olur (3, 26).

Ghrelin, i.v. enjeksiyonda etkili tek periferik iştah açıcı sinyaldir. Ghrelin işlevinin engellenmesi kronik obezite durumlarını tedavi etmek için mantıklı bir yaklaşımdır. Bununla birlikte iştah, birçok faktör tarafından düzenlenmekte ve bunlar birbirlerini dengelemektedirler. Bundan dolayı bir ghrelin antagonisti tek başına obezite üzerine kısıtlı bir etkiye sahiptir. Gerçekten de ghrelin geni eksik fareler beslenme davranışı üzerine tam bir anormallik göstermemiştir (26).

Şiddetli obeziteyi tedavi etmek için gastrik bypass operasyonları sıklıkla uygulanmaktadır. Bu prosedürün amacı gastrik kavitede gıdanın dolduracağı boşluğu azaltmak ve bu şekilde toplam kalori alımını da azaltmaktır. Son araştırmalar ghrelinin gastrik bypassı takiben meydana gelen vücut ağırlığındaki azalmada rolü olabileceğini açığa kavuşturmuştur. Böyle tedaviye alınan hastalarda, başarılı kilo kaybından sonra ghrelin miktarına bakılmış, toplam ghrelin sekresyonunun, normal kilolu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında % 77'ye kadar, obez grupla karşılaştırıldığında ise %72'ye kadar azaldığı bulunmuştur. Bu azalmanın mekanizması ise tam olarak açıklanamamıştır. Gastrik bypass durumunda ghrelin üretimi ve sekresyonunda gerekli olan, gıdanın gastrik mukoza ile temasının olmaması bu konudaki hipotezlerden biridir. Bundan başka normal öğünle ilişkili dalgalanmalar ve ghrelin düzeylerinin diurnal ritmi bu hastalarda kaybolmuştur. Bu durum ise bu hastaların hiperfajisinin yok olmasından ve kilo kayıplarının oluşmasından ghrelinin sorumlu olabileceğini göstermektedir.

Ghrelin, anoreksiya nervoza gibi yeme bozukluklarının tedavisinde iştah açıcı bir ajan olarak yararlı olabilmektedir. Ghrelin enjeksiyonu bu hastaların iştahını uyarabilir ve beslenme durumlarını düzeltebilir. Diğer taraftan anoreksiya nervoza hastalarında plazma ghrelin düzeyleri çok yüksektir. Bu sonuca göre, bu bireylerde ghreline duyarlılık şiddeti bozulmuştur (3, 21, 26).

Ghrelin gastrik motiliteyi uyarma yeteneğinden dolayı postoperatif gastrik ileusun tedavisine aday bir maddedir. Ghrelin verilmesi sonucu bu peptidin güçlü bir motilite

düzenleyici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Ghrelin gastrik boşalmayı ve sıvı gıdaların ince bağırsaklara geçişini hızlandırmakta ve bu şekilde gastrik ileusu çözmektedir (26).

Ghrelinin, i.c.v. ve periton içi verilmesi doza bağımlı olarak etki göstererek etil alkolün sebep olduğu gastrik ülseri azaltmaktadır. Bu etki nitrik oksit sentezinin inhibitörü olan NG-nitro-L-arjinin-metil ester (L-NAME) ve *capsaicin* tarafından engellenmektedir. Dolayısıyla ghrelinin gastroprotektif etkisi nitrik oksit aracılığı ile ve *capsaicin*'e duyarlı olan duyu sinir aktivitesine ihtiyaç göstermektedir (43).

Kan damarlarında ve kardiak ventriküllerde ghrelin reseptörünün tespit edilmesinden yola çıkılarak ghrelinin vasküler etkilere sahip olduğu sonucuna varılmıştır. *In vitro* olarak ghrelin verilmesi kardiomyositlerin ve endotel hücrelerin apoptozisini durdurmaktadır. Kalp yetmezliği olan insanlarda ghrelin infüzyonu sistemik vasküler rezistansı azaltmakta ve kardiak verimi artırmaktadır. Kalp yetmezliği olan ratlara ghrelin verilmesi kalbin yapısını ve fonksiyonunu düzeltir ve kardiak kaşeksinin gelişimine engel olur. Bu sonuçlara göre, ghrelinin kardiovasküler koruyucu etkilere sahip olduğu ve GH-bağımlı ve bağımsız mekanizmalar yoluyla enerji metabolizmasını düzenlediği belirtilmektedir. Bu etkisi nedeniyle ghrelin, şiddetli kronik kalp yetmezliğinin tedavisi için yeni bir terapotik ajan olabilir (44).

Çiftlik hayvanlarında da ghrelinin etkilerinin önemli olabileceği düşünülmektedir. Ghrelin gıda alımını artırarak ve vücutta yağ kullanımını azaltarak pozitif enerji dengesine ve vücut ağırlığının artmasına neden olur (13). Aslında ghrelinin enerji dengesini nasıl düzenlediği tam olarak ortaya konulmamıştır, ama GH'nın lipit metabolizmasını da içine alan birçok metabolik işlevlere sahip olduğu çok iyi bilinmektedir. GH somatik büyüme, genel metabolizmanın ve bireylerin enerji homeostazisinin düzenlenmesinde oldukça önemli anabolizan bir hormondur (3). Genel metabolizmada iskelet gelişimi ve protein sentezini uyarmaktadır (45). GH, çiftlik hayvanlarına uzun süreli verildiği zaman büyüme oranı ve gıda alımını iyi yönde etkilemektedir. Örneğin kuzulara ekzojen GH verildiğinde büyüme oranının arttığı ve yapılan karkas analizinde karkas proteininde artış, karkas lipidinde ise azalma olduğu gösterilmiştir (46). Francis ve arkadaşları (46) kuzularda plazma büyüme hormonu düzeyi arttıkça karkas yağının azaldığını göstermişlerdir. GH'nın bu etkisi kırmızı et üretimi ve tüketimini yakından ilgilendirmektedir (47). Ayrıca GH çiftlik hayvanlarında döl verimi ve süt kalitesine de etki etmektedir. Büyüme hormonunu salgılatarak hayvanların verimini ve besi kalitesini artırmak amacı ile çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bunun en güzel örneği GHS'lerin keşfidir. Daha sonra bu sentetik GH salgılatıcı ajanların yerini vücutta endojen olarak salgılanan ghrelin almıştır.

Çünkü kasaplık hayvan yetiştiriciliğinde hormonlar ve hormon gibi etki gösteren büyüme düzenleyici maddelerin, *in vitro* verildiği zaman kalıntı bırakma özelliği, sağlık açısından birçok sakınca oluşturmaktadır. Ghrelin güçlü bir GH salgılatıcı işleve sahip olduğundan çiftlik hayvanlarında endojen olarak ghrelini uyarmak büyüme hormonu ve GHS'lerin ekzojen kullanımına göre oldukça ekonomiktir.

Koyunlarda da plazma ghrelin düzeylerinin öğün ile ilişkili olduğu, yemlemeden önce en yüksek seviyeye ulaştığı, yemlemeden 2-4 saat sonra bazal seviyeye düştüğü belirtilmiştir (48). Ayrıca Japon esmer ırkı sığırlarda da aynı bulgular elde edilmiştir (49). Ghrelinin merkezi verilmesi ile de iştah açıcı ve adipojenik etkilerinin uyumlu ve güçlü olduğu ortaya çıkmıştır (10, 13). İnsanlarda da yapılan bir çalışmada, ghrelin düzeylerinin, beden kitle indeksi, beden yağ kitlesi, adipozit doku genişliği, plazma insülin düzeyleri, plazma glukoz konsantrasyonları ve plazma leptin düzeyleri ile negatif ilişkili olduğu gösterilmiştir (50). Hayvanların beslenme şekilleri de gıda alımı ve ghrelin salgılanmasını etkilemektedir. Farklı besleme rejimlerinin de plazma ghrelin düzeylerini etkileyebileceği öne sürülmüştür. Koyunlara kısıtlanmış besleme rejimleri uygulandığında metabolik enerjilerinin karşılanmasına rağmen açlık periyotlarının arttığı ve ghrelin düzeylerinin de artış gösterdiği bildirilmiştir (51). Aynı zamanda gıda alımı sonrası ghrelin salınımının baskılanması, gıdanın içerdiği karbonhidrat ile orantılı alınan glukoz miktarı ile ilişkilidir (50). Son zamanlarda keşfedilen ghrelinin genel metabolizma ve somatik büyüme arasında bir köprü oluşturabileceği düşünülmektedir. Öğün başlatıcı olarak düşünülen ve GH salınımına sebep olan ghrelinin vücutta anabolik değişimlere katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir (3).

GEREÇ VE YÖNTEM

A. Hayvan Gerci, Bakım ve Besleme

Çalışma Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma Uygulama Merkezi Çiftliği'nde gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan kuzular süttten kesildikten sonra aynı kilo ve yaşta olmalarını sağlamak üzere homojenite testine tabi tutuldular. Bu testin sonunda yaklaşık 2 aylık yaşta ve ortalama 26 kg ağırlıkta 15 adet İvesi ırkı erkek kuzu besiye alındı. Kuzular her grupta 5 hayvan olmak üzere üç gruba ayrılarak bireysel padoklara konuldu ve 1. grup *ad libitum* beslenirken, 2. gruba günde 1 kez (saat 9:00), 3. gruba günde 2 kez (saat 9:00 ve 16:00) yem verildi. Yemleme programı 45 gün süreyle günlük ihtiyaçları hesaplanarak sürdürüldü. Kaba yem olarak yonca kuru otu verildi. Su *ad libitum* sağlandı. Yem maddelerinin kaba yem içeriği 105°C'de 12 saat süreyle kurutularak ve ham protein Kjeldahl metodu ile yapıldı (52). Ham kül 550°C'de 6 saat süreyle kül fırınında yakılarak elde edildi. NDF (nötral deterjan lif) içeriği ısıya dayanıklı amilaz ve sodyum sülfid kullanımı ile Van Soest ve arkadaşları (53) tarafından geliştirilen metot yardımıyla belirlendi. Konsantre yem içeriği ile kaba ve konsantre yemin kompozisyonu Tablo 1 ve 2 de gösterildi.

Tablo-1 Konsantre yem içeriği yüzde bileşimi

Ham madde	%
Mısır	50.0
Arpa	18.5
Ayçiçek Küspesi	16.5
Soya Küspesi	13.2
Mermer Tozu	1.2
Tuz	0.50
Vitamin-Mineral Premiks*	0.10

* Vitamin- Mineral premiks (VM 3201)/kg : (1 ton yeme 1 kg katılacak şekilde) Vitamin A15 000 000 IU, Vitamin D₃ 3 000 000 IU, Vitamin E 30 000 mg, Mangan 50 000 mg, Demir 50 000 mg, Çinko 50 000 mg, Bakır 10 000 mg, İyot 800 mg, Kobalt 200 mg, Selenyum 300 mg, Antioksidan 10 000 mg bulunur.

Tablo-2 Konsantre ve kaba yem kompozisyonu (%)

Bileşen (g/kg)	Konsantre Yem	Kaba Yem
Kuru Madde	88.3	90.30
Ham Kül	4.67	9.93
NDF	15.09	39.4
Ham Protein	15.8	15.5
Ham Yağ	2.56	2.26
Kalsiyum	0.59	1.33
Fosfor	0.41	0.25

B. Canlı ağırlık ve Yem Tartımları

Kuzular çalışma başlangıcında ve 45. güne kadar her 15 günde bir tartılarak canlı ağırlıkları belirlendi ve yemden yararlanmalarını hesaplamak için tükettikleri yem miktarı kaydedildi.

C. Kan Örneklerinin Alınması ve Analizleri

Çalışma başlangıcı ve çalışma süresince her 15 günde bir hayvanların *Vena jugularis*'inden EDTA'lı ve antikoagulantsız vakumlu tüplere kan alındı. Ghrelin ve GH ölçümleri için kan alımları sabah yemlemeden yarım saat önce (8:30) ve yemlemeden bir saat sonra (10:00) ve yine 2. yemlemeden yarım saat önce (15:30) ve yemlemeden bir saat sonra (17:00) olmak üzere gün içinde toplam 4 kez olmak üzere yapıldı. Hormonların kayba uğramasını engellemek için EDTA'lı kanlardan 1 ml, 100 µl 0.6 TIU/ml (Tripsin İnhibitör Ünitesi) aktivitesine sahip Aprotinin içeren (Phoenix Pharmaceuticals, RK-APRO) Eppendorf tüplere aktarıldı ve soğutmalı santrifüjde (Sigma 3K30) +4°C'de, 3000 rpm'de 10 dakika santrifüje edilerek plazmalar ayrıldı. Serum elde etmek için kan örnekleri pıhtılaşma gerçekleşene kadar oda ısısında bekletildi ve serumlar temiz tüplere

aktarıldı. Elde edilen plazma ve serumlar analiz gününe kadar -20°C' de derin dondurucuda saklandı.

1.Plazma Ghrelin Ölçümü

Plazma ghrelin düzeyi ticari ghrelin kiti (Ghrelin RIA Kit, RK-0-31-31, Phoenix Pharmaceuticals) kullanılarak RIA (Radioimmunassay) (DPC Gambyt CR, England 95-3/1097) (Lisans No: KRN0142.04.00.1N) ile belirlendi.

Testin Prensibi

Bu test, reaksiyon karışımında sınırlı miktarda bulunan ghrelina spesifik antiseruma bağlanmak üzere, işaretli ghrelin (I^{125} -ghrelin) ile standart ve bilinmeyen numunelerdeki ghrelinin yarışması temeline dayanmaktadır. Reaksiyondaki standart ya da bilinmeyen numunelerin miktarı arttıkça antikora bağlanabilecek işaretli ghrelin (I^{125} -ghrelin) miktarı düşmektedir. Standart reaksiyon karışımlarındaki ghrelinin bir göstergesi olan bağlanmış işaretli ghrelin (I^{125} -ghrelin) miktarı ölçülerek bilinmeyen numunelerdeki ghrelin konsantrasyonunun belirlenebildiği bir standart eğrinin oluşturulması mümkündür.

Kullanılan Malzemeler

RIA tamponu

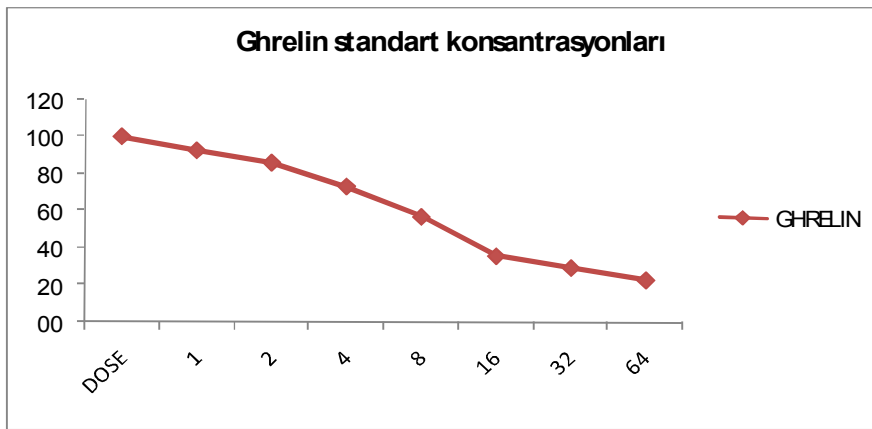
50 ml'lik konsantre çözelti şeklindedir. Çalışma öncesi 150 ml distile suyla sulandırılarak kullanıldı.

Ghrelin Standardı

12.8 µg liyofilize toz şeklindedir. Çalışma öncesi 1 ml RIA tamponu ile dikkatlice sulandırıldı ve bu stok standarttan yapılan sulandırmalarla diğer standartlar hazırlandı (Tablo 3).

Tablo 3- Ghrelin Standardı Sulandırmaları

Tüp	Numune	RIA Tamponu	RIA Reaksiyonundaki Standart Peptid Miktarı
Stok	Toz	1.0 ml	N/A
0	10 µl stok	990 µl	N/A
A	10 µl 0	990 µl	128pg/tüp
B	500 µl A	500 µl	64pg/tüp
C	500 µl B	500 µl	32pg/tüp
D	500 µl C	500 µl	16pg/tüp
E	500 µl D	500 µl	8pg/tüp
F	500 µl E	500 µl	4pg/tüp
G	500 µl F	500 µl	2pg/tüp
H	500 µl G	500 µl	1pg/tüp



Şekil-4 Ghrelin Standart Eğrisi

Primer Antikor

13 ml'lik şişede liyofilize toz şeklinde ghreline spesifik tavşan antiserumu içermektedir. Çalışma öncesi 13 ml RIA tamponu ile sulandırılarak kullanıldı.

I¹²⁵- Ghrelin

1.5 µCi I¹²⁵ ghrelin liyofilize toz şeklindedir. Kullanımdan önce 13 ml RIA tamponu ile sulandırıldı.

GAR (Keçi Anti-Tavşan IgG Serum)

13 ml'lik şişede liyofilize toz şeklindedir. Çalışma öncesi 13 ml RIA tamponu ile sulandırılarak kullanıldı.

NRS (Normal Tavşan Serumu)

13 ml'lik şişede liyofilize toz şeklindedir. Çalışma öncesi 13 ml RIA tamponu ile sulandırılarak kullanıldı.

Deney Prosedürü

Deney Tablo-4'te verilen 3 günlük prosedür takip edilerek gerçekleştirildi. Sonuçlar cihaz tarafından çizilen standart eğriden (Şekil 4) yine cihaz tarafından otomatik olarak hesaplanarak elde edildi (pg/ml).

Tablo 4- Ghrelin deney prosedürü

1.gün					2 gün		3. gün				
Hazırlık	1. adım	2- 3. adım	4. adım	5. adım	6. adım	7. adım	8. adım	9. adım	10. adım	11. adım	12.adım
Tüp numaraları	Deney tamponu ilave edildi	Standartlar ve numuneler ilave edildi	Primer antikor ilave edildi	Vorteksle karıştırıldı, ağızları kapatılarak	I- ¹²⁵ ghrelin solusyonu ilave edildi	Vorteksle karıştırıldı, ağızları kapatılarak 16-	GAR	NRS	Vorteksle karıştırıldı, ağızları kapatılarak	RIA Tamponu	+ 4°C'de 20 dakika 3.000 rpm (yaklaşık 1.700 xg) 'de 1. ve 2. tüpler dışında tüm tüpler santrifüj edildi, üstteki sıvı aspire edildi ve pelletin CPM ölçümü için bir Gamma-Counter kullanıldı.
1,2	-	-	-	16-24 saat	100 µl	24 saat +	-	-	90 dakika	-	
3,4	200 µl	-	-	+ 4°C'de	100 µl	4°C'de	100 µl	100 µl	oda ısıda	500 µl	
5,6	100 µl	-	100 µl	bekletildi	100 µl	bekletildi	100 µl	100 µl	bekletildi	500 µl	
7,8		100 µl H	100 µl		100 µl		100 µl	100 µl		500 µl	
9,10		100 µl G	100 µl		100 µl		100 µl	100 µl		500 µl	
11,12		100 µl F	100 µl		100 µl		100 µl	100 µl		500 µl	
13,14		100 µl E	100 µl		100 µl		100 µl	100 µl		500 µl	
15,16		100 µl D	100 µl		100 µl		100 µl	100 µl		500 µl	
17,18		100 µl C	100 µl		100 µl		100 µl	100 µl		500 µl	
19,20		100 µl B	100 µl		100 µl		100 µl	100 µl		500 µl	
21,22		100 µl A	100 µl		100 µl		100 µl	100 µl		500 µl	
23-n		100 µl	100 µl		100 µl		100 µl	100 µl		500 µl	

2. Plazma Büyüme Hormonu Ölçümü

Koyun plazma büyüme hormonu analizi Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi (54).

Testin Prensibi

Bir yumurta akı olan avidin, biotine karşı yüksek bir affiniteye sahiptir. Bu niteliklerinden yararlanılarak çok hassas EIA (Enzyme Immun Assay) metotları geliştirilmiştir. Bu çalışmada avidin yerine yapısında karbonhidrat içermemesi ve nötral pH'ya sahip olması nedeniyle nonspesifik bağlanma yapmayan, Streptomyces avidinii'den izole edilen Streptavidin kullanıldı.

Bu yöntemde biotin bağlı oGH (Ovine-GH)(işaretleyici) ile konsantrasyonu bilinmeyen oGH arasında plak yüzeyine kaplanan birinci antikora (Keçi IgG-anti tavşan IgG'si) bağlanmak için bir yarış gerçekleştirilir (Kompetitif EIA). Yöntemde birinci antikora bağlı işaretleyicinin streptavidin peroksidaz (Str-POD) ile enzimatik reaksiyonu ile düzeyler belirlenir. Bu nedenle elde edilen absorbanslarla örnekteki hormonun konsantrasyonu ters orantılıdır.

Biotinil oGH İşaretleyicisinin Hazırlanması

A Çözeltisi

National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, Maryland, USA)'dan temin edilen 25 µg NIDDK-oGH-1-4 (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases of the National Institutes of Health) bir reaksiyon tüpü içerisinde 500 µl 0.01 M NaHCO₃ (Merck 6329) ile çözülerek hazırlandı.

B Çözeltisi

500 µg Biotin-X-NHS (biotinil-ε-aminokaproik asit N-hidroksisüksinimid esteri; (Böhringer, 1008 960) 250 µl N-N-dimetil formamid (Aldrich, 22., 705.6) içerisinde çözülerek hazırlandı.

500 µl A çözeltisine 100 µl B çözeltisi ilave edildi ve oda ısısında manyetik karıştırıcıda yavaş yavaş karıştırılarak 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon 200 µl 0.01 M NaHCO₃'te çözeltiilmiş 0.5 mg glisin (Serva, Heidelberg, Germany) ilavesi ile durduruldu ve reaksiyon karışımı 1 gece buzdolabında (+4°C'de) inkübe edildi. Bu inkübasyon sonrasında işaretleyici kaybını önlemek amacıyla ortama 1 ml 0.01 M karbonat tamponunda çözeltiilmiş 2 mg BSA (bovine serum albumin) (Serva, 11930) ilave edildi ve karışım dializ kesesine (Servapor 44145) alındı, boşalan reaksiyon tüpü BSA içeren 1 ml karbonat tamponu ile yıkandı ve bu yıkama sıvısı da dializ kesesine aktarıldı. Karışım dializ kesesinden ekstraksiyon şişesine alındı. Ayrıca dializ kesesinin ağzı 1 ml BSA-karbonat tamponu ile yıkanarak yıkama sıvıları da ekstraksiyon şişesine ilave edildi. Son olarak ekstraksiyon şişesi içeriği BSA-karbonat tamponu ile 10 ml'ye tamamlandı ve 1'er ml (2.5 µg/ml oGH) eppendorf tüplerine pipetlenerek -20°C'de derin dondurucuda saklandı.

oGH antiserumu

NIDDK-oGH-2'ye karşı tavşanlardan elde edilen ve NIDDK-oGH-1-4'e karşı affinitesi aynı olan NIDDK-oGH-2 antiserumu National Hormone and Pituitary Program'dan sağlandı. Bu antiserumun diğer hipofiz hormonlarından oFSH, oLH, oTSH, ve oPRL ile çapraz reaksiyon vermediği bildirilmektedir.

Keçi IgG-anti tavşan IgG

Keçi IgG-anti tavşan IgG'si Dr. Klobosa (Institut für Tierzucht und Tierverhalten. Mariense, Germany)'dan temin edilmiştir.

Enzim İmmunoassay Prosedürü

EIA Pleytlerinin İlk Kaplanması

İlk kaplamada mikrotitre pleytlerinin (Nunc. Roskilde, Denmark, No.439454) her yuvasına 100 µl kaplama tamponunda (15 mM Na₂CO₃, ppH 9.6) çözülmüş 1 µg keçi-IgG anti-tavşan IgG'si pipetlendi ve pleytler 1 gece 0°C'de hafifçe çalkalanarak inkübe edildi ve inkübasyon sonunda pleytlerin içerikleri döküldü.

EIA Pleytlerinin İkinci Kaplanması

EIA pleytlerinin yuvalarının duvarlarında kaplanmamış bölgelerin doyurulması ve hormona spesifik antikorların spesifik olmayan bağlanmalarının önlenmesi amacıyla her yuvaya 350 µl deney tamponu (40 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7.5, % 0.1'lik BSA içerir) pipetlendi ve pleytlerin nonspesifik bağlanmalarının (NSB) optik dansiteleri 0.081-0.125 arasında bulundu. Kaplanmış pleytlerin içeriği döküldü. Bu şekilde kaplanan pleytler -20°C'de derin dondurucuda 6 ay süreyle bozulmadan saklanabilmektedir.

EIA Pleytlerinin Ölçüm Öncesi Yıkama

Ölçüme başlamadan önce kaplanan pleytler 2 kez 375 µl % 0.05'lik Tween 80 kullanılarak yıkama cihazı (Biotek EL403) ile otomatik olarak yıkandı.

Test Prosedürü

NIDDK-oGH-15, 0.15 M NaCl içinde hazırlanmış 0.03 M Na₂HCO₃ çözeltisinde çözülmüş 100 ng/ml konsantrasyonda olacak şekilde stok solüsyon hazırlandı. Çalışma standartları, ölçülemeyecek miktarda oGH içeren (< 0.2 ng/ml) bir plazma örneği ile 1:2 seri dilüsyonlar yapılarak 50-0.20 ng/ml konsantrasyonlarda hazırlandı. Ölçülemeyecek miktarda oGH içeren plazma örneği O standart olarak kabul edildi. Hazırlanan

standartlardan 300'er µl eppendorf tüplerine pipetlendi ve -20°C'de derin dondurucuda saklandı.

Test sırasında bir dilüatör dispensör (Hamilton Microlab 1000) yardımıyla standartlar ve plazma örneklerinden 40'ar µl, 1:500 000 oranında antiserum içeren 100 µl deney tamponuyla dilüe edilerek pleyt yuvalarına aktarıldı. Pleytler 48 saat +4°C'de hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sona erince pleyt içeriği döküldü, her yuvaya 100 µl assay tamponunda dilüe edilmiş 0.15 ng biyotinlenmiş-oGH ilave edildi ve 2 saat +4°C'de hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. Pleyt içeriği dökülerek her yuvaya 100 µl deney tamponunda hazırlanmış 20 ng streptavidin peroksidaz (Böhringer, 1089 153) ilave edildi ve 15 dakika +4°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda pleyt içeriği tekrar döküldü.

Substrat Reaksiyonu

Substrat A çözeltisi

Hidrojen peroksit-üre (Merck 818356)	1 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O (Merck 6580)	18 g
Sitrik asit monohidrat (Merck 244)	10.3 g
Kathon (Rohm and Haas, Frankfurt, Germany)	0.1 ml
pH 5	

Substrat B Çözeltisi

TMB (tetrametilbenzidin) (Böhringer 784974)	500 mg
DMSO (dimetilsulfoksit (Merck 2951)	40 ml
Sitrik asit monohidrat (Merck 244)	10.3 g
pH 2.4	

Substrat Çözeltisi

Substrat A ve Substrat B çözeltileri 1:1 oranında karıştırılarak hazırlanır.

Pleytler 5 kez 375 µl'lik %0.05 Tween-80 ile yıkandıktan sonra, her yuvaya 150 µl substrat çözeltisi pipetlendi ve çalkalamalı su banyosunda 40 dakika 26-28°C'de inkübe

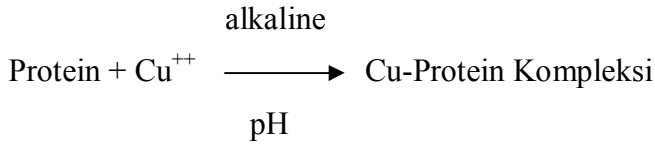
edildi. İnkübasyon sonunda 50 µl 2 M H₂SO₄ ilave edilerek reaksiyon durduruldu ve pleytlerin optik dansiteleri 450 nm’de EIA mikrotitrasyon pleyt fotometresi (Biotek EL 311) ile okundu. Sonuçlar Deltasoft II bilgisayar programıyla hesaplandı.

3. Serum Toplam Protein Ölçümü

Serum toplam protein ölçümü toplam protein kiti (TECO Diagnostics, Cat. No.T528-480) kullanılarak spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601) ölçüldü.

Testin Prensibi

Toplam Protein ölçümünde gerçekleşen enzimatik reaksiyon zinciri aşağıdaki gibidir:



Serum proteini alkali bir solüsyonda bakır iyonlarıyla reaksiyona girdiğinde mavi renkli bir komplekse dönüşür. Menekşe renginin yoğunluğu serumdaki protein miktarı ile orantılıdır.

Toplam Protein Çözeltilisi

Sodyum Hidroksit	600 mM
Bakır Sülfat	12 mM
Sodyum Potasyum Tartarat	32 mM
Potasyum İyodür	30 mM

ve reaktif olmayan bileşenlerden oluşmuştur.

Toplam Protein Standardı

Sığır Albumini ve koruyucu maddeden oluşmuştur (5.0 g/dl)

Testin Prosedürü

	Test	Standart	Blenk
Toplam protein çözeltisi	3 ml	3 ml	3 ml
Standart	-	50 µl	-
Numune	50 µl	-	-

Alt üst edilerek karıştırıldı ve 10 dakika 25 °C’de bırakıldı. Standart ve testin absorbanası 540 nm’de blenke karşı ölçüldü.

Hesaplanması

$$\frac{\text{Numunenin Absorbansı}}{\text{Standartın Absorbansı}} \times \text{Standartın Konsantrasyonu} = \text{Toplam Protein (g/dl)}$$

D. İstatistiksel Analizler

SPPS 13.0 adlı istatistik programı kullanılarak İvesi erkek kuzulara ait plazma ghrelin, büyüme hormonu, toplam protein düzeyleri, canlı ağırlık kazancı, yem tüketimleri, yemden yararlanma oranları ile besi sürelerinin aritmetik ortalamaları (X) ve standart hataları (SEM) hesaplandı. Kuzuların 15 günlük periyotlardaki verileri kendi içinde ve gruplar arasında tekrarlı ölçümlerde varyans analizi testi ile karşılaştırıldı ve istatistiksel önemin hangi periyotlar arasında olduğunu belirlemek amacıyla Tukey testi yapıldı. $p<0.001$, $p<0.01$ ve $p<0.05$ değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edildi. Kuzuların plazma ghrelin, büyüme hormonu, toplam protein düzeyleri, canlı ağırlık kazancı, yem tüketimi ve yemden yararlanmaları arasındaki ilişki Pearson's korelasyon testi ile incelendi. $p<0.01$ ve $p<0.05$ düzeyleri istatistiksel olarak önemli kabul edildi (55).

BULGULAR

Ad libitum, günde tek öğün ve çift öğün olmak üzere farklı yemleme programı uygulanan İvesi ırkı erkek kuzularda besi süresince tespit edilen ghrelin, GH düzeyleri ve toplam protein konsantrasyonları Tablo 5’de sunuldu.

Tablo-5 Farklı yemleme programı uygulanan kuzularda besi süresince ghrelin, GH ve toplam protein düzeyleri (n=15)

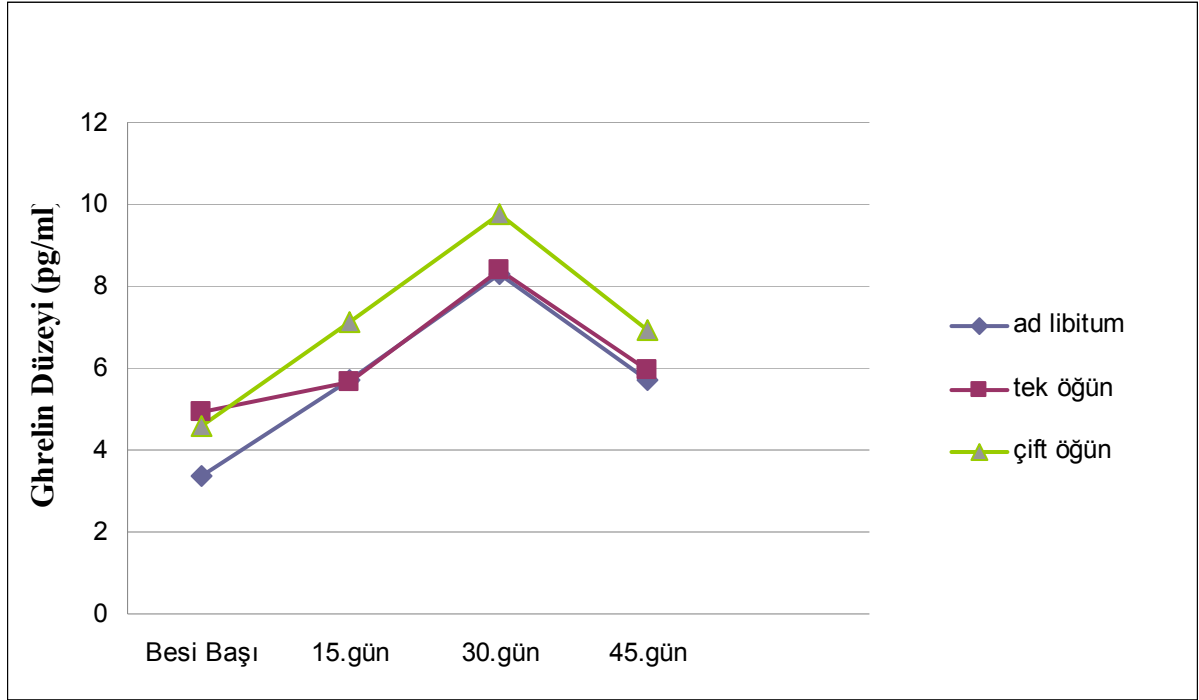
Kan Parametreleri	Besi Periyodu	Yemleme Grupları		
		Ad Libitum $\bar{X} \pm \text{SEM}$	Tek Öğün $\bar{X} \pm \text{SEM}$	Çift Öğün $\bar{X} \pm \text{SEM}$
Ghrelin (pg/ml)	Besi Başı	3.38 ±0.33a**	4.95 ±0.14a***	4.58 ±0.24a**
	15. gün	5.72 ±0.73ab	5.67 ±0.15a***	7.12 ±0.44ab
	30. gün	8.29 ±0.31b	8.41 ±0.15b	9.77 ±0.40b
	45. gün	5.73 ±0.33ab	5.95 ±0.22a***	6.94 ±0.50ab
GH (ng/ml)	Besi Başı	3.98 ±0.32	4.34 ±1.04	5.55 ±1.27
	15. gün	6.32 ±1.66	5.15 ±1.18	4.87 ±0.83
	30. gün	5.54 ±0.66	4.97 ±1.25	5.02 ±1.02
	45. gün	4.70 ±0.09	8.33 ±1.20	7.97 ±1.51
Toplam Protein (g/dl)	Besi Başı	5.25 ±0.24	5.61 ±0.16	4.67 ±0.21
	15. gün	5.23 ±0.13	5.43 ±0.14	5.37 ±0.05
	30. gün	5.37 ±0.08	7.58 ±0.06	7.00 ±0.14
	45. gün	7.20 ±0.19	6.75 ±0.08	6.93 ±0.14

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

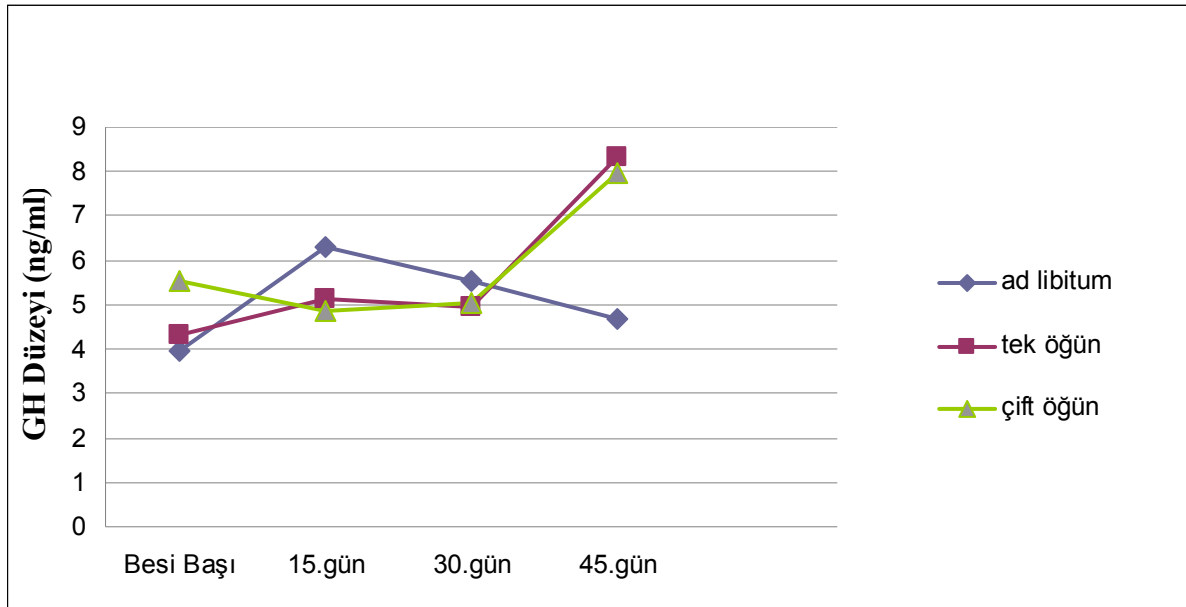
ab : Aynı sütunda farklı harfler arasında önem vardır.

Ad libitum yemlenen kuzularda besi periyodu süresince elde edilen ghrelin düzeyleri incelendiğinde sadece besi başı ve 30. gün değerleri arasında istatistiki yönden önemli fark tespit edildi (p<0.01). Tek öğün yemlenenlerde ghrelin düzeylerinde 30. gün değerleri ile besi başı, 15. gün, 45. gün değerleri arasında p<0.001 düzeyinde önemli farklılık saptanırken, günde çift öğün yemlenen kuzularda 30. gün değerleri ile besi başı değerleri arasında p<0.01 düzeyinde istatistiki önem belirlendi. Tüm gruplarda GH ve toplam

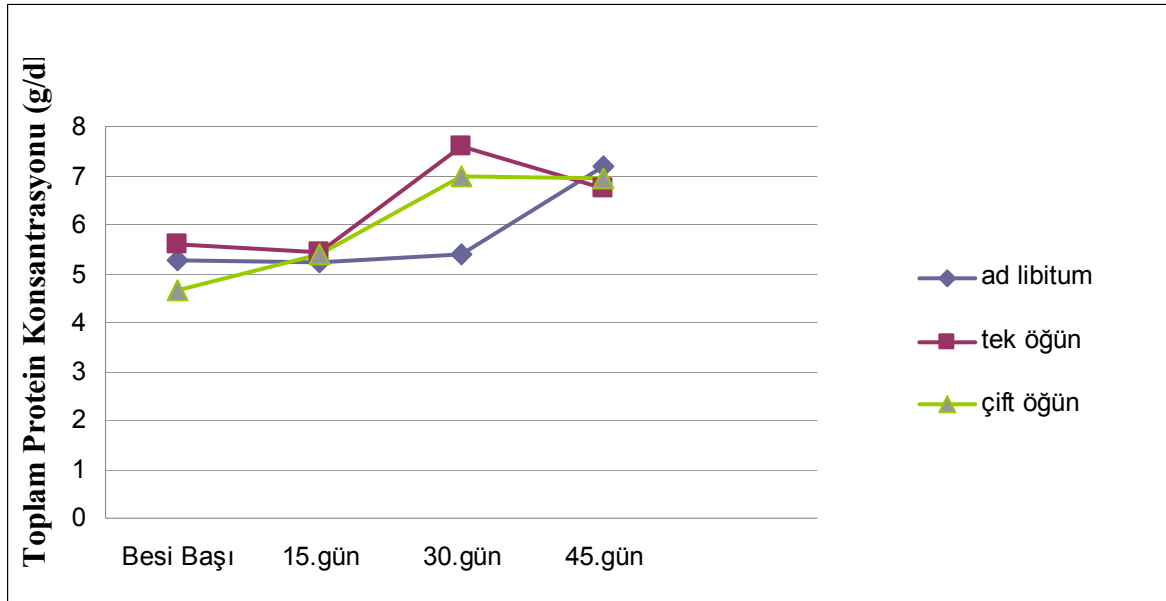
protein düzeyleri besi periyodu boyunca farklılık göstermedi. Besi periyodu boyunca yemleme grupları arasında ghrelin ve GH düzeyleri ile toplam protein konsantrasyonlarında istatistiki öneme sahip bir farklılık saptanmadı (Tablo 5, Şekil 5, 6).



Şekil-5 Farklı yemleme programı uygulanan kuzularda besi süresince plazma ghrelin düzeyleri



Şekil-6 Farklı yemleme programı uygulanan kuzularda besi süresince plazma GH düzeyleri



Şekil-7 Farklı yemleme programı uygulanan kuzularda besi süresince serum toplam protein konsantrasyonları

Deneme boyunca tüm yemleme grupları dikkate alınarak planlanan, yemleme saatlerinden (sabah 9:00 ve öğleden sonra 16:00) yarım saat önce ve sonra olacak şekilde saat 8:30, 10:00, 15:30 ve 17:00'de gerçekleştirilen kan alımlarında elde edilen ghrelin ve GH düzeylerine ilişkin değerler Tablo 6 ve 7' de sunuldu.

Tablo-6 Farklı yemleme programı uygulanan kuzularda günün belirli saatlerinde saptanan ghrelin düzeyleri (pg/ml).

Besi Periyotları	Kan Alma Saatleri	n	Yemleme Grupları		
			Ad libitum $\bar{X} \pm \text{SEM}$	Tek öğün $\bar{X} \pm \text{SEM}$	Çift öğün $\bar{X} \pm \text{SEM}$
15.gün	08:30	5	4.34 ± 1.03	5.05 ± 0.31	7.04 ± 0.77
	10:00	5	5.01 ± 1.00	5.37 ± 0.19	7.18 ± 0.36
	15:30	5	7.52 ± 0.87	6.84 ± 0.50	8.48 ± 0.57
	17:00	5	7.61 ± 0.58	7.47 ± 0.12	9.36 ± 0.50
	Gün Ortalaması	20	5.72 ± 0.71	5.67 ± 0.35	7.22 ± 0.57
30. gün	08:30	5	7.70 ± 0.19	7.09 ± 0.19	10.00 ± 0.79
	10:00	5	8.62 ± 0.34	8.50 ± 0.22	9.88 ± 0.51
	15:30	5	7.38 ± 0.34	8.21 ± 0.21	8.61 ± 0.34
	17:00	5	9.31 ± 1.52	8.22 ± 0.19	9.49 ± 0.55
	Gün Ortalaması	20	8.29 ± 0.59	8.41 ± 0.28	9.77 ± 0.47
45. gün	08:30	5	5.95 ± 0.21	6.82 ± 0.32	7.90 ± 0.58
	10:00	5	5.72 ± 0.50	5.58 ± 0.54	6.85 ± 0.45
	15:30	5	5.03 ± 0.53	5.29 ± 0.13	7.01 ± 0.75
	17:00	5	6.17 ± 0.40	5.39 ± 0.19	6.09 ± 0.46
	Gün Ortalaması	20	5.73 ± 0.33a	5.95 ± 0.31a	6.94 ± 0.44b*

* p<0.05

ab : Aynı satırda farklı harfler arasında önem vardır.

Sabah yemleme zamanı 9:00, öğleden sonra yemleme zamanı 16:00 'dır.

Gün boyu yapılan ghrelin incelemelerinde plazma ghrelin düzeyleri grup içi ve gruplar arasında istatistiki öneme sahip bir farklılık göstermedi. Belirtilen periyotlarda tüm saatlerdeki ghrelin düzeyi gün ortalamalarında ise 45. günde çift öğün yemlenenler ile *ad libitum* ve tek öğün yemlenen kuzular arasında p<0.05 düzeyinde önemli fark tespit edildi (Tablo 6).

Tablo-7 Farklı yemleme programı uygulanan kuzularda besi süresince günün belirli saatlerinde saptanan GH düzeyleri (ng/ml), (n=15)

Besi Periyotları	Kan Alma Saatleri	n	Yemleme Grupları		
			Ad libitum $\bar{X} \pm \text{SEM}$	Tek öğün $\bar{X} \pm \text{SEM}$	Çift öğün $\bar{X} \pm \text{SEM}$
15.gün	08:30	5	6.79 ± 0.70	4.57 ± 0.69	4.64 ± 0.59
	10:00	5	11.68 ± 2.88	3.45 ± 0.47	3.29 ± 0.50
	15:30	5	2.61 ± 0.35	9.80 ± 1.83	6.53 ± 1.12
	17:00	5	4.22 ± 0.56	2.76 ± 0.26	5.02 ± 0.98
	Gün Ortalaması	20	6.32 ± 1.44	5.15 ± 1.02	4.87 ± 0.72
30. gün	08:30	5	6.57 ± 0.55	11.82 ± 1.27	9.19 ± 1.43
	10:00	5	7.79 ± 0.45	2.14 ± 0.05	2.79 ± 0.35
	15:30	5	4.70 ± 0.66	3.82 ± 0.69	5.02 ± 0.72
	17:00	5	3.09 ± 0.31	2.11 ± 0.20	3.09 ± 0.71
	Gün Ortalaması	20	5.54 ± 0.57	4.97 ± 1.08	5.02 ± 0.89
45. gün	08:30	5	4.76 ± 0.73	7.61 ± 0.70	6.09 ± 1.44
	10:00	5	5.33 ± 0.46	5.89 ± 1.16	4.34 ± 0.88
	15:30	5	5.55 ± 0.47	8.93 ± 1.32	8.11 ± 1.12
	17:00	5	3.15 ± 0.33	10.91 ± 2.11	13.32 ± 2.57
	Gün Ortalaması	20	4.70 ± 0.46	8.33 ± 1.20	7.97 ± 1.51

Plazma GH düzeylerinde tüm periyotlardaki saatlerde grup içi ve gruplar arasında, gün ortalamalarında da yine gruplar arasında istatistiki yönden önemli fark tespit edilmedi (Tablo 7).

Farklı yemleme programı uygulanan kuzularda besi performansını değerlendirmeye yönelik parametrelerle ilgili veriler Tablo 8’de gösterildi.

Tablo-8 Farklı yemleme programı uygulanan kuzuların besi süresince elde edilen besi performansları

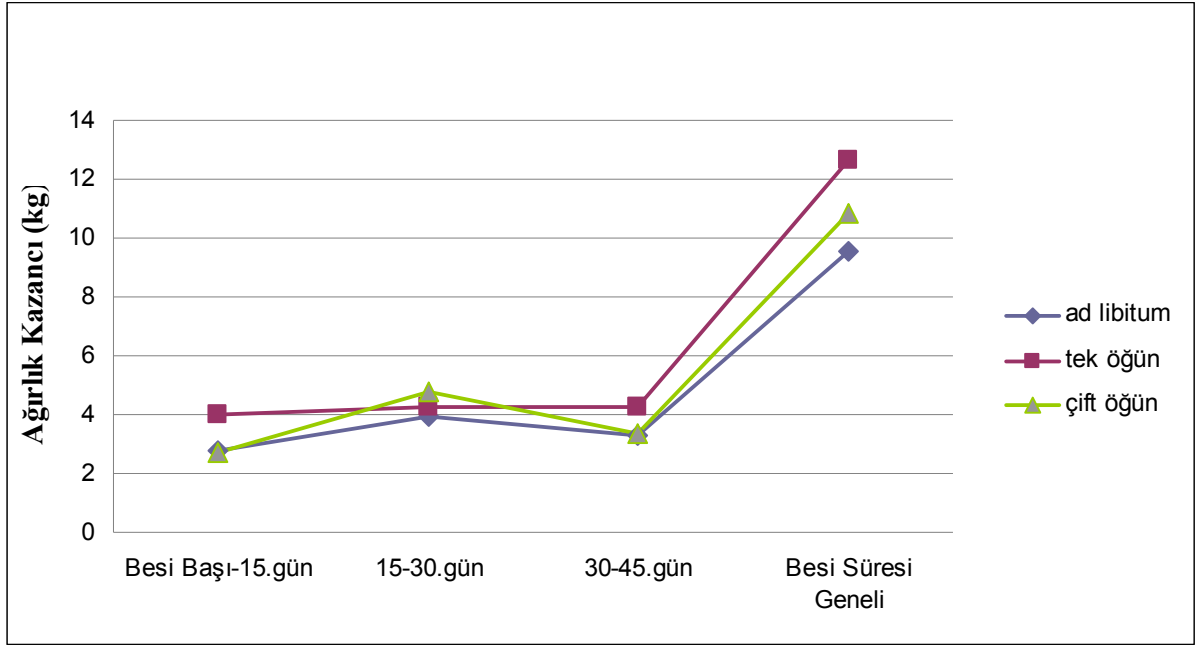
Özellikler	Yemleme Grupları				
	Besi Periyotları	n	Ad libitum $\bar{X} \pm SEM$	Tek Öğün $\bar{X} \pm SEM$	Çift Öğün $\bar{X} \pm SEM$
Canlı Ağırlık (kg)	Besi Başı	15	26.8 ± 0.82	26.8 ± 1.00	26.80 ± 0.81
	Besi Sonu	15	36.3 ± 0.64	38.0 ± 1.76	37.64 ± 0.68
Ağırlık Kazançları (kg)	Besi başı-15.gün	5	2.80 ± 0.30	4.00 ± 0.28	2.72 ± 0.42b ^{***}
	15.gün-30.gün	5	3.96 ± 0.28	4.28 ± 0.28	4.78 ± 0.28a
	30.gün-45.gün	5	3.26 ± 0.28	4.28 ± 0.32	3.34 ± 0.08b [*]
	Besi Süresi Geneli	15	9.52 ± 0.46B	12.64 ± 0.57A ^{**}	10.84 ± 0.48AB
Günlük Canlı Ağırlık Artışı (kg)	Besi Süresi Geneli	45	0.21 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.24 ± 0.02
Yem Tüketimi (kg)	Besi başı-15.gün	5	16.41 ± 0.19	15.55 ± 0.86	16.34 ± 0.61
	15.gün-30.gün	5	18.78 ± 1.13	18.68 ± 1.10	18.17 ± 1.17
	30.gün-45.gün	5	21.10 ± 2.31	23.84 ± 1.03	24.75 ± 0.68
	Besi Süresi Geneli	15	56.29 ± 3.12	58.44 ± 3.01	59.28 ± 2.41
Yemden Yararlanma	Besi başı-15.gün	5	6.42 ± 0.58	4.09 ± 0.58	6.66 ± 1.13b [*]
	15.gün-30.gün	5	4.77 ± 0.25	4.50 ± 0.21	3.87 ± 0.39a
	30.gün-45.gün	5	6.64 ± 0.58AB	5.34 ± 0.31A [*]	7.25 ± 0.25Bb [*]
	Besi Süresi Geneli	15	5.90 ± 0.20	4.64 ± 0.20	5.57 ± 0.69

* p<0.05 , ** p<0.01 , *** p<0.001

ab : Aynı sütunda yer alan değerler arasında önem vardır

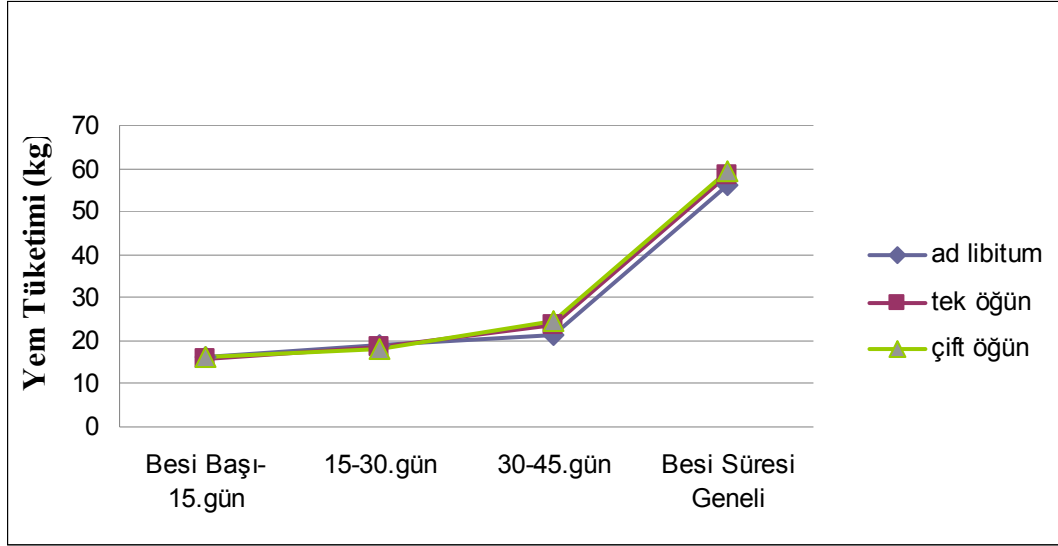
AB : Aynı satırda yer alan değerler arasında önem vardır

Çift öğün yemlenen kuzuların besi başı-15.gün ağırlık kazançları ile 15.gün- 30.gün değerleri arasında $p<0.001$ düzeyinde, 15.gün- 30.gün değerleri ile 30.gün-45.gün değerleri arasında $p<0.05$ düzeyinde istatistiki önem saptanırken diğer gruplarda bir önem bulunmadı. Besi süresi genelinde ağırlık kazancı incelendiğinde tek öğün yemlenen kuzular ile *ad-libitum* yemlenen kuzular arasında $p<0.01$ düzeyinde önem bulunduğu tespit edildi. Günlük canlı ağırlık kazançlarında gruplar ve periyotlar arasında bir önem saptanmadı (Tablo 8 ve Şekil 8).

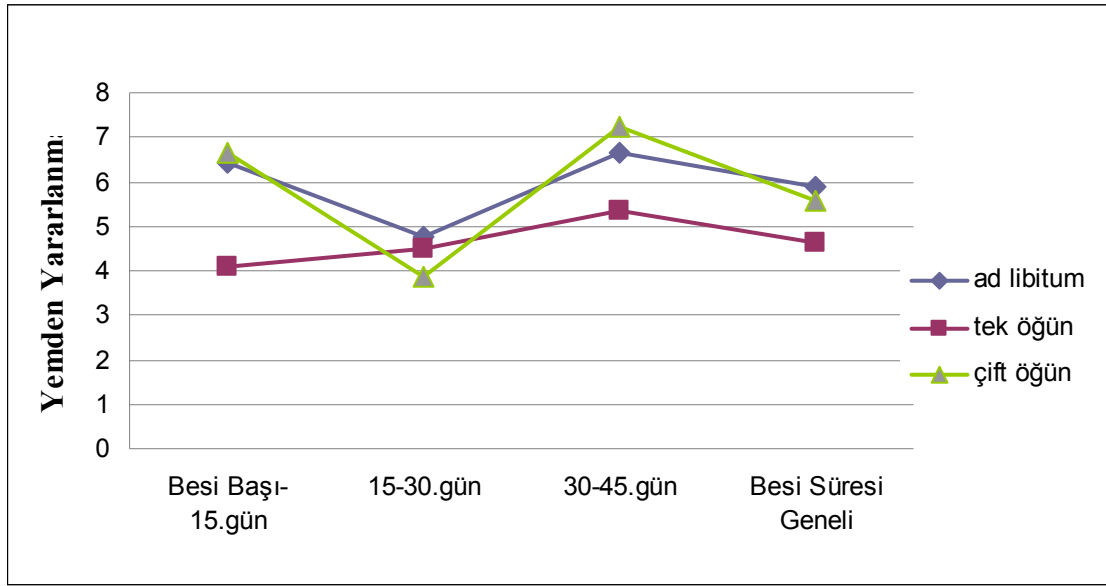


Şekil-8 Farklı yemleme programı uygulanan kuzularda besi süresince ağırlık kazançları

Hayvanların besi periyodu boyunca yem tüketimleri incelendiğinde periyotlarda grup içi ve gruplar arasında, besi süresi genelinde de yine gruplar arasında önemli bir farklılık saptanmadı. Yemden yararlanma yönünden tek öğün ve çift öğün yemlenenler arasında sadece 30.gün-45.günlerde $p<0.05$ düzeyinde önem belirlenirken, çift öğün yemlenen kuzuların 15.gün-30.gün değerleri ile besi başı-15.gün ve 30.gün-45.gün değerleri arasında $p<0.05$ düzeyinde önemli farklılık tespit edildi (Tablo 8 ve Şekil 9 ve 10).



Şekil-9 Farklı yemleme programı uygulanan kuzularda besi süresince yem tüketimleri



Şekil-10 Farklı yemleme programı uygulanan kuzularda besi süresince yemden yararlanma

TARTIŞMA ve SONUÇ

İvesi erkek kuzularda plazma ghrelin, büyüme hormonu ve serum toplam protein düzeyleri ile canlı ağırlık kazancı, yemden yararlanma arasındaki ilişkilerin incelendiği çalışmada, plazma ghrelin düzeyleri genel olarak 3.38-9.77 pg/ml arasında bulunurken besi başı, 15, 30 ve 45. günlerde yapılan incelemelerde sırasıyla *ad libitum* yemlenenlerde 3.38, 5.72, 8.29 ve 5.73 pg/ml, tek öğün yemlenenlerde 4.95, 5.67, 8.41, 5.95 pg/ml, çift öğün yemlenenlerde ise 4.58, 7.12, 9.77, 6.94 pg/ml olarak belirlendi (Tablo 5 ve Şekil 5).

Plazma ghrelin düzeyleri daha çok insanlarda ve ratlarda olmak üzere farklı hayvan türlerinde çalışılmıştır. Ghrelin düzeyleri insanlarda 185-715 pg/ml (56), 165-343 pg/ml (13), ratlarda 192-214 pg/ml (27), köpeklerde 476-497 fmol/ml (57), sığırlarda 123 pg/ml (58), koyunlarda 0.8-4.7 ng/ml (48), 0.5-3.7 ng/ml (51) olarak bulunmuştur.

Ghrelin düzeylerinin belirlenmesinde bazı araştırmacılar insanlarda insan spesifik (11, 40, 59-62), ratlarda rat spesifik (63, 64) hazır RIA kitlerini, bazı araştırmacılar insanlarda insan spesifik antijen (39, 65, 66), ratlarda rat spesifik antijen (49, 67), sığırlarda sığır spesifik antijen (49) kullanarak geliştirilen RIA yöntemlerini, bazı araştırmacılar (48, 51) ise koyunlarda TR-FIA (Time-resolved fluoro-immunoassay) yöntemini kullanarak ölçüm yapmışlardır. Murakami ve arkadaşlarının (49) yaptığı çalışmada, evcil hayvanlarda ghrelin düzeyini RIA ile belirlemek için iyotla işaretlenmiş sentetik rat [Tyr29]-ghrelin kullanılmıştır. Çalışmada belirlenen ortalama ghrelin düzeyleri, bildirilen diğer çalışmalara göre (41, 48, 51) daha düşük düzeydedir. Elde edilen farklı sonuçlar farklı ölçüm metotlarından kaynaklanabilir. Yine yaş, beslenme vb. bireysel farklılıklar da farklı değerler elde edilmesinde bir faktör olabilir.

Ghrelin düzeylerinde besi süresince gruplar arasında istatistiki öneme sahip bir farklılık saptanmadı. Bununla birlikte günde çift öğün yemlenen kuzuların ghrelin düzeylerinin, günde tek öğün ve *ad libitum* yemlenen kuzulara göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. Her grubun kendi içindeki değerleri besi süresince incelediğinde tüm gruplarda 30. gün değerlerinin diğer periyotlara göre daha yüksek tespit edildiği, besi başı değerlerine göre ise istatistiki derecede önemli şekilde yüksek olduğu gözlemlendi. Besi başı ve 30.gün değerleri arasındaki önem düzeyi *ad libitum* ve çift öğün yemlenen kuzularda $p<0.01$, tek öğün yemlenen kuzularda $p<0.001$ olarak tespit edildi. Tek öğün yemlenen kuzularda 30. gün değerleri ile 15. ve 45. gün değerleri arasında da istatistiki önem saptandı ($p<0.01$). Tüm gruplarda ghrelin düzeylerinin 30. güne kadar artması 45. günde tekrar düşüş göstermesi dikkat çekicidir (Tablo 5, Şekil 5). Besi başı ve 15. günde ghrelin

düzeylerinin 30. gündeki düzeylere göre daha düşük olması yemleme programına uyum ve 45. güne denk gelen süreç içinde adaptasyonun gerçekleşmiş olması olarak düşünülebilir. Literatürde koyun ve sığırlarda uzun dönemli yemleme programları uygulanarak yapılan bir çalışmaya rastlanmadığından karşılaştırma yapılamamıştır.

Çeşitli araştırmacılar ghrelin düzeylerinin, uygulanan değişik yemleme sıklıklarına ve gün içinde açlık tokluk durumlarına göre farklılık gösterdiğini saptamışlardır (13, 51, 68). Sugino ve arkadaşları (51), günde 2 kez yemlenen koçlarda günde 4 kez yemlenen koçlara göre daha yüksek ghrelin düzeyleri elde etmişler, en düşük ghrelin düzeylerini ise *ad libitum* yemlenen koçlarda saptamışlardır. Çalışmada *ad libitum* yemlenen kuzularda tek ve çift öğün yemlenenlere göre düşük değerlerin gözlenmesi bu literatürle uyumludur.

Dolaşım ghrelin düzeyleri gün içinde açlık halinde yükselmekte, gıda alımı sonrasında ise aniden düşmektedir (13, 50, 61). Bu nedenle ghrelinin öğün aralarının oluşumunda önemli bir faktör olabileceği düşünülmüştür (68). Yine Sugino ve arkadaşları (51) koyunlarda yaptıkları çalışmada ghrelin düzeylerinin her öğün öncesi yükseldiğini, öğünden 1 saat sonra düştüğünü, buna karşın birinci ve ikinci öğün arasındaki plazma ghrelin düzeylerinde bir fark olmadığını tespit etmişler, programlı yemleme zamanı uygulanan koçların öğün öncesi oluşan ghrelin düzeylerindeki geçici yükselmenin sefalik cevaplardan kaynaklanabileceği sonucuna ulaşmışlardır. Koyunlarda yapılan başka bir çalışmada gıda alımı ve ghrelin arasında bir ilişki bulunamamıştır (69). Iqbal ve arkadaşlarının (70) koyunlarda yaptıkları çalışmada, merkezi yolla verilmesine rağmen ghrelinin gıda alımında önemli bir etki oluşturmadığı belirtilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, hayvanların fizyolojik durumu ve gıda alımına etki eden diğer merkezi ve periferik faktörler olabileceğini düşündürmektedir. Ruminantlarda ghrelinin etkileri ile ilgili çok az çalışma vardır. Ruminant ve monogastrik türler arasında ghrelin üreten hücrelerin yerleşimi yönünden farklılık mevcuttur (26). Koyunlarda ghrelin üreten hücrelerin birincil olarak abomasum bölgesinde yerleştiği görülmüştür, bu durum ruminantlarda, dolaşım ghrelininin en büyük kaynağının abomasum olabileceğini göstermektedir. Ayrıca rumen ya da birinci mide gıdanın öğütülmesi ve sellülozun sindirimi için gerekli mikroorganizmaların yerleştiği yerdir ve bundan dolayı öğünler arasında rumen tamamen boşalmaz (49). Bundan başka *ad libitum* yemleme yapılan ruminantlarda sürekli yemlemeden dolayı gastrointestinal kanal boşalmaz ve ghrelin seviyeleri, gıdanın sürekli varlığından dolayı önemli ölçüde değişmeyebilir.

Çalışmada yemleme öncesi ve sonrası zamanları kapsayacak şekilde günün belirli saatlerinde saptanan ghrelin düzeylerinde, tüm yemleme gruplarında ve tüm periyotlarda

gruplar arası ve grup içi istatistiki öneme sahip farklılık belirlenmedi (Tablo 6). Gün ortalamaları incelendiğinde 45. gündeki değerlerde istatistiki önem ($p<0.05$) olmak üzere tüm periyotlarda çift öğün yemleme grubu ghrelin gün ortalamalarının diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görüldü. Koyunlarda ve diğer ruminantlarda yapılan çalışmalarda (48, 49, 51) yemleme öncesi ve sonrası oluşan ghrelin iniş-çıkışları bu çalışmada gözlenmemiştir. Salfen ve arkadaşları (71) domuzlarda 48 saat açlık süresinde plazma ghrelin düzeylerinin yüksek kaldığını ve hayvanlar yemlendikten sonra bu düzeylerde düşme gerçekleştiğini göstermişlerdir. Çalışmadaki açlık süresi bu literatürdeki kadar uzun olmadığından farklılık gözlenmemiş olabilir. Bununla birlikte çalışmadaki bulgular koyunlarda yemleme öncesi ve sonrası ghrelin sekresyonunda farklılık saptamayan Iqbal ve arkadaşlarının çalışmasıyla uyumludur (70).

Plazma GH düzeyleri genel olarak 3.98-8.33 ng/ml arasında bulunurken besi başı, 15, 30 ve 45. günlerde yapılan incelemelerde sırasıyla *ad libitum* yemlenenlerde 3.98, 6.32, 5.54 ve 4.70 ng/ml, tek öğün yemlenenlerde 4.34, 5.15, 4.97 ve 8.33 ng/ml, çift öğün yemlenenlerde ise 5.55, 4.87, 5.02 ve 7.97 ng/ml olarak belirlendi (Tablo 5 ve Şekil 6).

Plazma GH düzeyleri insanlarda 20-300 ng/ml (21), ratlarda 35-400 ng/ml (63), sığırlarda 5-55 ng/ml (17), koyunlarda 3.12-10.3 ng/ml (69), 3.83-6.52 ng/ml (46) 5.1 ng/ml (48) olarak bildirilmiştir. Çalışmada koyun için belirlenen ortalama GH düzeyleri diğer çalışmalarla (46, 48, 69) uyumluluk göstermiştir.

Besi süresince gruplar arası ve grup içi GH değerlendirmelerinde tüm periyotlarda istatistiki öneme sahip bir farklılık saptanmadı (Tablo 5). Yemleme öncesi ve sonrası zamanlarda alınan örneklerde ve gün ortalamalarında da istatistiki farklılık gözlenmedi (Tablo 7). Ghrelin ve GH düzeyleri arasında gruplar ve periyotlarda herhangi bir korelasyon belirlenmedi. Ghrelinin iştah üzerine etkileri ile GH sekresyonu üzerine etkilerinin farklı yollardan olduğu düşünüldüğünde büyümekte olan kuzuların GH düzeyleri bireysel farklılık ve bağımsızlık gösterebilir. Koyunlarda yapılan bir çalışmada yemleme süresince GH salınımında değişimler meydana geldiği bildirilmiştir (48). Sugino ve arkadaşları (48), koyunlardan beslenme esnasında alınan kan örneklerindeki GH düzeyinin beslenme öncesine göre daha yüksek olduğunu ve beslenme esnasında tespit edilen bu yüksek düzeyin beslenmeden bir saat sonra tekrar eski düzeyine döndüğünü belirtmişlerdir. Iqbal ve arkadaşları (70) koyunlarda merkezi olarak ghrelin uygulaması yapmışlar ve büyüme hormonunda akut bir artış elde etmişlerdir. Avram ve arkadaşlarının (72) insanlarda yaptıkları çalışmada ise ghrelin ve büyüme hormonu salgılanma zamanları arasında bir ilişki bulunamamıştır. Yine Salfen ve arkadaşları (71) da

domuzlarda yaptıkları çalışmada, ghrelin enjekte ettikleri ve etmedikleri hayvanların GH düzeyleri arasında bir fark olmadığını göstermişlerdir. Sığırlarda (58), domuzlarda (71), koyunlarda (73) yapılan araştırmalarda elde edilen sonuçlar ile uyumlu olarak bu çalışmada da ghrelinin GH üzerine etkisi görülmemiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda ghrelinin merkezi ve periferal verilmesi sonucu oluşan vücut ağırlığı artışının ve açlık hissinin büyüme hormonundaki değişimlerden bağımsız olduğu gösterilmiştir (13, 34). Yine Tannenbaum ve arkadaşları (7) ratlarda yaptıkları çalışmada ghreline büyüme hormonu cevabının alınması için GHRH sisteminin gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Bu şekilde yapılan çalışmalarda ghrelinin dışarıdan verilmesi büyüme hormonunu artırmaktadır fakat yine de büyüme hormonunun fizyolojik düzenlenmesine iştirak ettiğinin kesin kanıtı değildir. Dolayısıyla ruminant türlerinde ghrelinin gıda alımını uyarması ve GH sekresyonuna etkisini inceleyen daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Plazma toplam protein konsantrasyonları genel olarak 4.67-7.58 g/dl arasında belirlendi. Besi periyotları ve gruplara göre toplam protein konsantrasyonları besi başı, 15., 30. ve 45. günde *ad libitum*da sırasıyla 5.25, 5.23, 5.37 ve 7.20 g/dl, tek öğün yemlenenlerde 5.61, 5.43, 7.58 ve 6.75 g/dl, çift öğün yemlenenlerde 4.67, 5.37, 7.00 ve 6.93 g/dl olarak ölçüldü (Tablo 5 ve Şekil 7).

Koyunlarda normal serum toplam protein düzeyleri 6-7.9 g/dl (74), 6.7-7.5 g/dl (75) arasında bildirilmektedir. Büyüme süresince vücuttaki protein artışı, protein sentezinin protein yıkımından fazla olmasına bağlıdır. Vücut protein birikimi üzerine besinlerin etkisi, artan protein sentezi, azalan protein yıkımı arasındaki denge ile ilgilidir (76). Gelişmekte olan hayvanlardaki protein sentezi gıda alımına duyarlıdır. Bu çalışmada kuzulara ait toplam protein konsantrasyonları literatürlerle (74, 75) uyumlu olarak normal sınırlar arasında saptandı. Tüm gruplarda ve periyotlarda toplam protein düzeylerinde istatistiki öneme sahip bir farklılık gözlenmedi (Tablo 5 ve Şekil 7). Ayrıca toplam protein konsantrasyonları ile ghrelin ve GH düzeyleri arasında herhangi bir korelasyon saptanmadı. Bununla birlikte tek ve çift öğün yemleme gruplarında 30 ve 45. gün değerleri diğer periyotlara göre yüksektir. *Ad libitum* yemlenenlerde ise yükselme 45. günde gözlenmektedir. Tek ve çift öğün gruplarında özellikle ghrelinin de artış gösterdiği 30. günde toplam protein konsantrasyonlarının yüksek oluşu dikkat çekicidir.

Çalışmada besi sonu canlı ağırlık, günlük artış ve yem tüketimlerinde dikkati çeken bir farklılık gözlenmedi (Tablo 8 ve Şekil 9). Besi sonu canlı ağırlığın tek öğün yemlenenlerde *ad libitum* yemlenenlere göre biraz daha fazla olduğu gözlendi (Tablo 8). Bununla uyumlu olarak, önemli korelasyon saptanmamakla birlikte, ghrelin ve büyüme

hormonu düzeyleri de besi sonunda *ad libitum* yemlenenlere göre daha yüksek bulundu (Tablo 5).

Besi süresi genelinde tek öğün yemlenen kuzuların canlı ağırlık kazançları ve yemden yararlanmalarının diğer gruplara göre daha iyi olduğu gözlemlendi (Tablo 8, Şekil 8 ve Şekil 10). Canlı ağırlık kazancı besi süresi genelinde *ad libitum*, tek öğün ve çift öğün yemlenenlerde sırasıyla 9.52, 12.64 ve 10.84 kg olarak tespit edildi. Tek öğün yemlenenlerde canlı ağırlık kazancı *ad libitum* grubuna göre $p<0.01$ düzeyinde daha fazlaydı. Grupların kendi içinde periyotlara göre değerlendirilmesinde çift öğün yemleme grubunda istatistiki yönden önemli ($p<0.001$) olmak üzere diğer günlere göre en fazla artışın 15.-30. gün periyodunda olduğu dikkati çekmektedir. Yine tüm gruplarda canlı ağırlık kazancının daha fazla gözlemlendiği 15.-30. gün periyodunda yemden yararlanmanın da iyi olduğu dikkati çekmektedir. Tek öğün ve çift öğün yemlenen kuzularda yemden yararlanma değeri 30.gün-45.gün periyodunda $p<0.05$ düzeyinde farklı bulundu.

Gruplara göre yem tüketimleri ise en fazla çift öğün yemlenen kuzularda ve en düşük *ad libitum* yemlenen kuzularda tespit edilmiştir. Periyotlara bakıldığında 30. gün-45. gün periyodunda tüm grupların en yüksek yem tüketimi değerlerine sahip olduğu gözlemlendi. Bu periyotta yem tüketiminin en fazla olmasının sebebi kuzularda meydana gelen ağırlık artışı ve bununla birlikte oluşan yem tüketimi ihtiyacı olarak yorumlanabilir.

Ghrelinin gıda alımı ve vücut ağırlığını artırdığı, insan ve rodentleri kapsayan birçok türde vücut kompozisyonunu değiştirdiği bildirilmiştir (10, 13, 77). Bununla birlikte sığırlarda yapılan bir çalışmada (58) ghrelinin ekzojen olarak verilmesinin gıda alımına bir etkisi görülmemiştir. Salfen ve arkadaşları (71), domuzlarda yaptıkları bir araştırmada değişik ghrelin enjeksiyonları ile vücut ağırlığının arttığını fakat gıda alımında önemli bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Iqbal ve arkadaşları (73), koyunlarda hem koyun ghrelini hem de insan ghrelini i.c.v. enjeksiyonlarının gıda alımına etki etmediğini tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada tek öğün yemlenen kuzuların yem tüketimlerinin çift öğün yemlenen gruba göre biraz düşük olmasına rağmen ağırlık kazançları ve yemden yararlanmalarının daha yüksek tespit edilmesi, bu grubun aç kalma süresinin daha uzun olması ve açlığa cevaben salgılanan ghrelinin etkisi olarak yorumlanabilir. Ağırlık kazancı ve yem tüketiminin *ad libitum* yemlenen kuzularda diğerlerine göre daha düşük görülmesi Sugino ve arkadaşlarının (51) çalışması ile uyum göstermektedir. Vücut ağırlığı ve kompozisyonu, yemleme sıklığı, diyet kompozisyonu ve miktarı hayvanlar arasında ghrelin cevabının farklı olmasına sebep olabilir (73). Çalışmada tüm gruplara aynı

kompozisyon ve miktarda yem verilmesine rağmen, en fazla tüketimin çift öğün yemlenen kuzularda gözlemlendi ve en yüksek ghrelin düzeyleri de aynı grupta tespit edildi.

Çalışmada tek öğün yemlenen kuzuların besi performansı en iyi olarak değerlendirilebilir. Çift öğün yemlenen kuzuların ghrelin düzeylerinin diğerlerine göre biraz daha yüksek olması ve bununla birlikte en fazla yem tüketiminin de aynı grupta olması nedeniyle, ghrelinin gıda alımını artırdığı ve farklı yemleme programlarından etkilendiği sonucuna varılabilir. Ghrelin düzeyleri ile GH düzeyleri besi performansı arasında istatistiki olarak ifade edilebilen bir korelasyon saptanamamakla birlikte çalışmada gözlenen farklılıklar hayvanlarda ghrelin düzeylerinin yemleme sıklığı ile düzenlenmesiyle gıda alımı ve yemden yararlanmanın artırabileceğini düşündürmüştür. Bu çalışmanın sonuçlarının ruminantlarda yem içerikleri ve programlarının değiştirilmesi ile ghrelin salgılanmasının düzenlenmesi ve buna bağlı olarak besi performansının artırılması çalışmalarına katkıda bulunacağı kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

1. BROGLIO F, GOTTERO C, ARVAT E, GHIGO E. Endocrine and non-endocrine actions of ghrelin. *Hormone Research*, 59: 109-117, 2003.
2. BROGLIO F, GOTTERO C, ARVAT E, BENSO A, PRODAM F, DESTEFANIS S, AIMARETTI G, PAPOTTI M, GHIGO E. Natural and syntetic growth hormone secretagogues. *Treatmant Endocrinology*, 3: 153-163, 2003.
3. CASANUEVA F, DIEGUEZ C. Ghrelin a new hormone implicated in the regulation of growth hormone secretion and body energy homeostasis. *Growth, Genetics & Hormones*, 20: 1-8, 2004.
4. KOJIMA M, HOSODA H, DATE Y, NAKAZATO M, MATSUO H, KANGAWA K. Ghrelin is a growth hormone releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402: 656-660, 1999.
5. HORVATH TL, SABRINA D, SOTONYI P, HEIMAN M, TSCHOP M. Ghrelin and the regulation of energy balance-a hipotalamic perspective minireview. *Endocrinology*, 142: 4163-4169, 2001.
6. PEINO R, BALDELLI R, GARCIA JR, BEGADE SR, KOJIMA M, KANGAWA K, ARVAT E, GHIGO E, DIEGUEZ C, CASANEUVA FF. Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans. *European Journal of Endocrinology*, 143: 11-14, 2003.
7. TANNENBAUM GS, EPELBAUM J, BOWERS CY. Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology*, 144: 967-974, 2002.
8. HOSODA H, MASAYASU K, KANGAWA K. Ghrelin and the regulation of food intake and energy balance. *Molecular Interventions*, 2: 494- 503, 2002.
9. ARIYASU H, TAKAYA K, HOSODA H, IWAKURA H, EBIHARA K, MORI K, OGAWA Y, HOSODA K, AKAMIZU T, KOJIMA M, KANGAWA K, NAKAO K. Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: evidenced by a specific RIA for the active form of ghrelin. *Endocrinology*, 143: 3341-3350, 2002.
10. NAKAZATO M, MURAKAMI N, DATE Y, KOJIMA M, MATSUO H, KANGAWA K, MATSUKURA S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, 409: 194-8, 2001.
11. OTTO B, CUNTZ U, FRUEHAUF E, WAWARTA R, FOLWACZNY C, RIEPL RL, HEIMAN ML, LEHNERT P, FICHTER M, TSCHOP M. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *European Journal of Endocrinology*, 145: 669-73, 2001.
12. MUCCIOLI G, TSCHOP M, PAPOTTI M, DEGHENGI R, HEIMAN M, GHIGO E. Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *European Journal of Pharmacology*, 440: 235- 254, 2002.
13. TSCHOP M, SMILEY DL, HEIMAN ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 407: 908-913, 2000.
14. PELL JM, ELCOCK C, HARDING RL, MORRELL DJ, SIMMONDS AD, WALLIS M. Growth, body composition, hormonal and metabolic status in lambs treated long-term with hormone. *British Journal of Nutrition*, 63: 431-445, 1990.
15. MACHLIN LJ. Role of growth hormone in improving animal producing. *Environmental Quality and Safety Supplement*, 5: 43-55, 1976.

16. GODFREDSON JA, WHEATON JE, CROOKER BA, WONG EA, CAMPBELL RM, MOWLES TF. Growth performance and carcass composition of lambs infused for 28 days with a growth hormone-releasing factor analogue. *Journal of Animal Science*, 68: 3624-3632, 1990.
17. MCLAUGHLIN CL, BYATT JC, HEDRICK HB, VEENHUIZEN JJ, CURRAN DF, HINTZ RL, HARTNELL GF, KASSER TR, COLLIER RJ, BAILE CA. Performance, clinical chemistry, and carcass responses of finishing lambs to recombinant bovine somatotropin and placental lactogen. *Journal of Animal Science*, 71: 3307-3318, 1993.
18. HORNICK JL, VAN EE, NAEME C, DIEZ M, MINET V, ISTASSE L. Different periods of feed restriction before compensatory growth in Belgian Blue Bulls:II. Plasma metabolites and hormones. *Journal of Animal Science*, 76: 260-271, 1998.
19. FANIMO AO, ODUGUWA OO, ADESEHINWA AOK, OWOEYE EY, BABATUNDE OS. Response of weaner pigs to feed rationing and frequency of feeding. *Livestock Research for Rural Development*, 15: 6:, 2003.
20. KAZALA EC, LOZEMAN FJ, MIR PS, LAROCHE A, BAILEY DRC, WESELAKE A. Relationship of fatty acid composition to intramuscular fat content in beef from crossbred Wagyu cattle. *Journal of Animal Science*, 77: 1717-1725, 1999.
21. CASANUEVA FF, DIEGUEZ C. Ghrelin: the link connecting growth with metabolism and energy homeostasis. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 3: 325-338, 2002.
22. BOWERS CY, CHANG J, MOMANY F. Effects of enkephalines and enkephaline analogs on release of pituitary hormones in vitro. *Molecular Endocrinology*, 25: 287-292, 1977.
23. TOOGOOD AA, THORNER MO. Ghrelin, not just another growth hormone secretagogue. *Clinical Endocrinology*, 55: 589-593, 2001.
24. GUALLILO O, LAGO F, GOMEZ-REINO J, CASAUNOVA F, DIEGUEZ C. Ghrelin a widespread hormone: insights into molecular and cellular regulation of its expression and mechanism of action. *FEBS letters*, 27628: 1-5, 2003.
25. CUMMINGS DE, SHANNON MH. Roles for ghrelin in the regulation of appetite and body weight. *Archives of Surgery*, 138: 389-396, 2003.
26. KOJIMA M, KANGAWA K. Ghrelin: structure and function. *Physiological Reviews*, 85: 495-522, 2005.
27. YOSHIMOTO A, MORI K, SUGAWARA A, MUKOYAMA M, YAHATA K, SUGANAMI T, TAKAYA K, HOSODA H, KOJIMA M, KANGAWA K, NAKAO K. Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13: 2748-2752, 2002.
28. GIL-CAMPOS M, AGUILERA CM, CANETE R, GIL A. Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. *British Journal of Nutrition*, 96: 201-226, 2006.
29. TOSHINAI K, DATE Y, MURAKAMI N, SHIMADA M, MONDAL MS, SHIMBARAT, GUAN JL, WANG QP, FUNAHASHI H, SAKURAI T, SHIODA S, MATSUKURA S, KANGAWA K. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 144: 1506-1512, 2002.
30. CUMMINGS DE, FRAYO RS, MARMONIER C, AUBERT R, CHAPELOT D. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism*, 287: 297-304, 2004.

31. BOWERS CY. Unnatural growth hormone-releasing peptide begets natural ghrelin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86: 1464–1469, 2001.
32. CUMMINGS DE, WEIGLE DS, FRAYO RS, BREEN PA, MA MK, DELLINGER EP, PURNELL JQ. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *New England Journal of Medicine*, 23: 1623-1630, 2002.
33. WILLIAMS DL, CUMMINGS DE. Regulation of ghrelin in physiologic and pathophysiologic states. *The Journal of Nutrition*, 135: 1320-1325, 2005.
34. CUMMINGS DE, FOSTER KE. Ghrelin-leptin tango in body weight regulation. *Gastroenterology*, 124: 5, 2003.
35. ASAKAWA A, INUI A, KAGA T. Ghrelin is an appetite stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology*, 120: 337–345, 2001.
36. UKKOLA O. Ghrelin and insulin metabolism. *European Journal of Clinical Investigation*, 33: 183-185, 2003.
37. DATE Y, NAKAZATO M, MURAKAMI N, KOJIMA K, MATSUKURA S. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 280: 904-907, 2001.
38. CASSONI P, PAPOTTI M, CATAPANO F, GHE C, DEGHENGI R, GHIGO E, MUCCIOLI G. Specific binding sites for synthetic growth hormone secretagogues in non-tumoral and neoplastic human thyroid tissue. *Journal of Endocrinology*, 165: 139-146, 2000.
39. NAKAGAWA E, NAGAYA N, OKUMURA H, ENOMOTO M, OYA H, ONO F, HOSODA H, KOJIMA M, KANGAWA K. Hyperglycaemia suppresses the secretion of ghrelin, a novel growth-hormone-releasing peptide: responses to the intravenous and oral administration of glucose. *Clinical Science*, 103: 325–328, 2002.
40. ROSICKA M, KRSEK M, MATOULEK M, JARKOVSKA Z, MAREK J, JUSTOVA V, LACINOVA Z. Serum ghrelin levels in obese patient: The relationship to serum leptin levels and soluble leptin receptors levels. *Physiological Research*. 52: 61-66, 2003.
41. PATEL AD, STANLEY SA, MURPHY KG, FROST GS, GARDINER JV, KENT AS, WHITE NE, GHATEI MA, BLOOM SR. Ghrelin stimulates insulin-induced glucose uptake in adipocytes. *Regulated Peptides*, 134: 17–22, 2006.
42. DAVIS ME, PEMBERTON CJ, YANDLE TG, LAINCHBURY JG, RADEMAKER MT, NICHOLLS MG, FRAMPTON CM, AND RICHARDS AM. Urocortin-1 infusion in normal humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89: 1402–1409, 2004.
43. SIBILIA V, RINDI G, PAGANI F, RAPETTI D, LOCATELLI V, TORSELLO A, CAMPANINI N, DEGHENGI R, NETTI C. Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: Studies on the mechanisms of action. *Endocrinology*, 144: 353–359, 2003.
44. BALDANZI G, FILIGHEDDU N, CUTRUPPI S, CATAPANO F, BONISSONI S, FUBINI A, MALAN D, BAJ G, GRANATA R, BROGLIO F, PAPOTTI M, SURICO N, BUSSOLINO F, ISGAARD J, DEGHENGI R, SINIGAGLIA F, PRAT M, MUCCIOLI G, GHIGO E, GRAZIANI A. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *Journal of Cell Biology* 159: 1029-1037, 2002.
45. GLUCKAUQ PD, BREIA BH. Physiology of the somatotrophic axis with particular reference to the ruminant. *Journal of Dairy Science*, 70: 442, 1987.

46. FRANCIS SM, VEENVLIET BA, STUART SK, LITTLEJOHN RP, SUTTIE JM. Growth hormone secretion and pituitary gland weight in suckling lambs from genetically lean and fat sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 41: 387-393, 1998.
47. BAUMAN DE, REYNOLDS PJ, McCUTCHEON SN, TYRRELL HF, HAALAND GL. Effect of bovine growth hormone administration on metabolism of growing hereford heifers: protein and lipid metabolism and plasma concentrations of metabolites and hormones. *Journal of Nutrition*, 116: 2504-2515, 1986.
48. SUGINO T, YAMAURA J, YAMAGISHI M, OGURA A, HAYASHI R, KUROSE Y, KOJIMA M, KANGAWA K, HASEGAWA Y, TERASHIMA Y. A transient ghrelin surge occurs just before feeding in a scheduled meal-fed sheep. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 295: 255-260, 2002.
49. HAYASHIDA T, MURAKAMI K, MOGI K, NISHIHARA M, NAKAZATO M, MONDAL M.S, HORI Y, KOJIMA M, KANGAWA K, MURAKAMI N. Ghrelin in domestic animals: distribution in stomach and its possible role. *Domestic Animal Endocrinology*, 21: 17-24, 2001.
50. TSCHOP M, WAWARTA R, RIEPL RL, FRIEDRICH S, BIDLINGMAIER M, LANDGRAF R, FOLWACZNY C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *Journal of Endocrinological Investigation*, 24: 19-21, 2001.
51. SUGINO T, YAMAURA J, YAMAGISHI M, OGURA A, HAYASHI R, KUROSE Y, KOJIMA M, KANGAWA K, HASEGAWA, Y, TERASHIMA Y. A transient surge of ghrelin secretion before feeding is modified by different feeding regimens in sheep. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298: 785-788, 2002.
52. VAN SOEST DJ, ROBERTSON JB, LEWIS BA. Methods for Dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74: 3583-3597, 1991.
53. AOAC: Official methods of Analysis. 15th ed. Association Official Analyzes Chemical, Arlington, VA, 1990.
54. SERPEK B, HALILOGLU S. Development of an enzyme immunoassay for the determination of ovine growth hormone in plasma. *Turkish Journal of Animal Science*, 24: 163-168, 2000.
55. SPSS® 13.00 Computer Software SPSS Inc, Headquarters, 233 s, Wacker Drive, Chicago, Illinois 60606, 2004.
56. NATALUCCI G, RIEDEL S, GLEISS A, ZIDEK T, FRISCH H. Spontaneous 24-h ghrelin secretion pattern in fasting subjects: maintenance of a meal-related pattern. *European Journal of Endocrinology*, 152: 845-850, 2005.
57. YOKOYAMA M, NAKAHARA K, KOJIMA M, HOSODA H, KANGAWA K, MURAKAMI N. Influencing the between-feeding and endocrine responses of plasma ghrelin healthy dogs. *European Journal of Endocrinology*, 152: 155-160, 2005.
58. WERTZ-LUTZ AE, KNIGHT TJ, PRITCHARD RH, DANIEL JA, CLAPPER JA, SMART AJ, TRENKLE A, BEITZ DC. Circulating ghrelin concentrations fluctuate relative to nutritional status and influence feeding behavior in cattle. *American Society of Animal Science*, 84: 3285-3300, 2006.
59. TASSONE F, BROGLIO F, DESTEFANIS S, ROVERE S, BENSO A, GOTTERO C, PRODAM F, ROSSETTO R, GAUNA C, VAN DER LELY AJ, GHIGO E, MACCARIO M. Neuroendocrine and metabolic effects of acute ghrelin

- administration in human obesity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88: 5478-83, 2003.
60. WEIGLE D, CUMMINGS DE, NEWBY PD, BREEN PA, FRAYO RS, MATTHYS CC, CALLAHAN HS, PURNELL JQ. Roles of leptin and ghrelin in the loss of body weight caused by a low fat, high carbohydrate diet. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88: 1577-1586, 2003.
 61. PURNELL JQ, WEIGLE DS, BREEN P, CUMMINGS DE. Ghrelin levels correlate with insulin levels, insulin resistance, and high-density lipoprotein cholesterol, but not with gender, menopausal status, or cortisol levels in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88: 5747-52, 2003.
 62. BELLONE S, RAPA A, VIVENZA D, VERCELLOTTI A, PETRI A, RADETTI G, BELLONE J, BROGLIO F, GHIGO E, BONA G. Circulating ghrelin levels in the newborn are positively associated with gestational age. *Clinical Endocrinology*, 60: 423-435, 2004.
 63. WILLIAMS DL, GRILL HJ, CUMMINGS DE, KAPLAN JM. Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin. *Endocrinology*, 2: 1-18, 2003.
 64. ENGLISH PJ, GHATEI MA, MALIK IA, BLOOM SR, WILDING JP. Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87: 2984, 2002.
 65. GLUCKAUQ PD, BREIA BH. Physiology of the somatotrophic axis with particular reference to the ruminant. *Journal of Dairy Science*, 70: 442, 1987.
 66. AVRAM AM, JAFFE CA, SYMONS KV, BARKAN AL. Endogenous circulating ghrelin does not mediate growth hormone rhythmicity or response to fasting. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90: 2982-2987, 2005.
 67. LEE HM, WANG G, ENGLANDER EW, KOJIMA M, GREELEY GH JR. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology*, 143:185-90, 2002.
 68. AYDIN S, OZKAN Y, CAYLAK E, AYDIN S. Ghrelin ve biyokimyasal fonksiyonlari. *Turkiye Klinikleri Journal of Medicine Science*, 26: 272-283, 2006.
 69. MELENDEZ P, KRUEGER T, WHITE J, BADINGA L, VERSTEGEN J, DONOVAN GA, ARCHBALD LF. Effect of ghrelin in dry matter intake and energy metabolism in prepartum sheep: a preliminary study. *Theriogenology*, 66: 1961-1968, 2006.
 70. IQBAL J, KUROSE Y, CANNY B, CLARKE IJ. Effects of central infusion of ghrelin on food intake and plasma levels of growth hormone, luteinizing hormone, prolactin, and cortisol secretion in sheep. *Endocrinology*, 147:510, 2005.
 71. SALFEN BE, CARROLL JE, KEISLER DH. Endocrine responses to short-term feed deprivation in weanling pigs. *Journal of Endocrinology*, 178: 541-551, 2003.
 72. AVRAM AM, JAFFE CA, SYMONS KV, BARKAN AL. Endogenous circulating ghrelin does not mediate growth hormone rhythmicity or response to fasting. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90: 2982-2987, 2005.
 73. IQBAL J, HENRY BA, POMPOLO S, RAO A, CLARKE IJ. Long-term alteration in bodyweight and food restriction does not affect the gene expression of either preprorexin or prodynorphin in the sheep. *Neuroscience*, 118: 217-226, 2003.
 74. KANEKO J.J. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Academic Press, Fifth Edition, San Diego, USA, 1997.

75. TURGUT K. Veteriner Klinik Laboratuar Teşhis, Bahçivanlar Basım Sanayi A.Ş., Konya, Türkiye, 2000.
76. FULLER MF, CHEN CH. Nutrient intake and protein metabolism: responses to feeding. *Nutrient Intake and Protein Metabolism*, 36: 332-335, 1997.
77. WREN AM, SMALL CJ, WARD HL, MURPHY KG, DAKIN C. L, TAHERI S, KENNEDY AR, ROBERTS GH, MORGAN DGA, GHATEI MA, BLOOM SR. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*, 141: 4325-4328, 2000.

ÖZGEÇMİŞ

16.07.1979 tarihinde Batman’da doğdum. 1992 yılında Batman Atatürk İlköğretim Okulunu, 1994 yılında orta okulu ve 1996 yılında Balıkesir Edremit Lisesini bitirdim. 1997 yılında girdiğim Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden Haziran 2002 yılında mezun oldum. Eylül 2002 yılında Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı’nda Doktora eğitimine başladım. 2005 yılından itibaren aynı kurumda Araştırma görevlisi kadrosunda görev yapmaktayım.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, gerçekleştirilmesi ve yazımında yardımcı olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Meltem TANRIVERDİ'ye, tezimin çeşitli aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Ümit POLAT ve Yard. Doç. Dr. Nazmiye GÜNEŞ ve çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Saime GÜZEL, Dr. Deniz DOĞRUTEKİN ve Dr. Abdullah YALÇIN'a, tezimin planlanmasında ve materyal sağlanmasında yardımlarını esirgemeyen Zootekni Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hasan BAŞPINAR ve Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İsmet TÜRKMEN'e, kuzuların beslenmesi ve bakımında ve örnek alımlarında yardımcı olan U.Ü. Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Merkezi Et ünitesi çalışanları ve Mustafa ŞENTÜRK'e, Vet. Hek. Dr. Ahmet MISIRLIOĞLU ve Mustafa ULUÖZ'e, Taner KULAY ve diğer öğrenci arkadaşlarıma, GH çalışmalarımı gerçekleştirmede yardımlarını ve katkılarını esirgemeyen S. Ü. Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Behiç SERPEK, Prof. Dr. Seyfullah HALILOĞLU, Araş. Gör. Dr. Zafer BULUT ve Biyolog Avni İLİK'e, her türlü manevi desteğini esirgemeyen kardeşim Veysel UDUM ve çok değerli anne ve babama teşekkürlerimi sunarım.