

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GHRELİNİN İSKEMİ-REPERFÜZYONA BAĞLI  
İSKELET KASI VE UZAK ORGAN HASARI  
ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

GONCA KAMACI

**LABORATUVAR HAYVANLARI BİLİMİ**

**DOKTORA TEZİ**

**İZMİR-2016**

**TEZ KODU:** DEU.HSI.PhD-2011970049

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GHRELİNİN İSKEMİ-REPERFÜZYONA BAĞLI  
İSKELET KASI VE UZAK ORGAN HASARI  
ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**LABORATUVAR HAYVANLARI BİLİMİ**

**DOKTORA TEZİ**

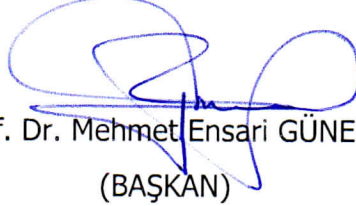
**GONCA KAMACI**

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Mehmet Ensari Güneli

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2012.KB.SAG.038 sayılı proje ile desteklenmiştir.

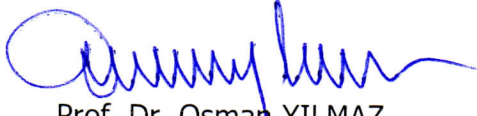
**Tez Kodu:** DEU.HSI.PhD-2011970049

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı, Laboratuvar Hayvanları Bilimi Doktora programı öğrencisi Gonca KAMACI '**GHRELİNİN İSKEMİ-REPERFÜZYONA BAĞLI İSKELET KASI VE UZAK ORGAN HASARI ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**' konulu Doktora tezini 21.10.2016 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



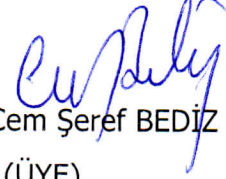
Prof. Dr. Mehmet Ensari GÜNELİ  
(BAŞKAN)

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Hiz. MYO



Prof. Dr. Osman YILMAZ  
(ÜYE)

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Hiz. MYO



Prof. Dr. Cem Şeref BEDİZ  
(ÜYE)

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fak.



Prof. Dr. Abdurrahman AKSOY  
(ÜYE)

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fak.



Doç. Dr. Meral KARAMAN  
(ÜYE)

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fak.

Prof. Dr. Necati GÖKMEN

(YEDEK ÜYE)

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fak.

Prof. Dr. Mine ÖZYAZICI

(YEDEK ÜYE)

Ege Üniversitesi Eczacılık Fak.

## İÇİNDEKİLER

|   |     |
|---|-----|
| İÇİNDEKİLER.....  | İ   |
| TABLolar DİZİNİ .....   | Vi  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....  | Vii |
| KISALTMALAR.....  | Xi  |
| ÖZET .....  | 1   |
| ABSTRACT .....  | 3   |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ .....  | 5   |
| 2. GENEL BİLGİLER .....   | 7   |
| 2.1 C57bl/6 Susu Farelerin Genel Özellikleri .....                        | 7   |
| 2.2 Fare Arka Bacak Anatomisi, Histolojisi ve Fizyolojisi.....            | 8   |
| 2.3 İskemi .....  | 11  |
| 2.4 İskemi Oluşum Mekanizmaları .....                                     | 12  |
| 2.5 İskemi-Reperfüzyon Hasarı.....  | 14  |
| 2.5.1 İskelet Kası İ-R Mekanizmaları .....                                | 15  |
| 2.6 İ-R Hasarı Sonucu Oluşan Akut İnflamasyon ve Yanıt Mediatörleri ..... | 17  |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.6.1 | İnflamasyon .....                           | 17 |
| 2.6.2 | Serbest Oksijen Radikalleri .....           | 19 |
| 2.6.3 | Polimorf Nüveli Lökositler .....            | 21 |
| 2.6.4 | Endotel Hücreler .....                      | 24 |
| 2.6.5 | Sitokinler.....                             | 26 |
| 2.6.6 | Komplemanın Rolü.....                       | 28 |
| 2.6.7 | Muscle Ring-Finger Protein-1 .....          | 29 |
| 2.6.8 | Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit..... | 29 |
| 2.7   | Antioksidanlar.....                         | 30 |
| 2.7.1 | Endojen Kaynaklı Antioksidanlar.....        | 31 |
| 2.7.2 | Ekzojen Kaynaklı Antioksidanlar .....       | 31 |
| 2.8   | Ghrelin.....                                | 32 |
| 3.    | GEREÇ VE YÖNTEM .....                       | 35 |
| 3.1   | Araştırmanın Tipi .....                     | 35 |
| 3.2   | Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....            | 35 |
| 3.3   | Çalışma Grupları .....                      | 35 |
| 3.4   | Çalışma Materyali.....                      | 37 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 3.4.1   | Fare Üretimi/Yetiştirilmesi, Bakımı ve Kullanımı .....            | 38 |
| 3.4.2   | Deneklerin Deney Odasına Taşınması .....                          | 42 |
| 3.5     | Araştırmanın Değişkenleri.....                                    | 42 |
| 3.6     | Veri Toplama Araçları.....  | 42 |
| 3.6.1   | Kullanılan Cihazlar.....  | 42 |
| 3.6.2   | Kullanılan Sarf Malzemeler.....                                   | 43 |
| 3.6.3   | Anestezi .....  | 44 |
| 3.6.4   | Ghrelinin Muhafazası, Hazırlanışı, Doz Hesabı ve Enjeksiyonu..... | 47 |
| 3.6.5   | Arka Bacakların Tıraş Edilmesi .....                              | 49 |
| 3.6.6   | Alt Ekstremitede Turnike ile İ-R Tekniği.....                     | 50 |
| 3.6.7   | Deney Prosedürü .....   | 52 |
| 3.6.8   | Sakrifikasyon Tekniği .....                                       | 53 |
| 3.6.9   | Doku Örneği Toplama .....   | 55 |
| 3.6.9.1 | Kan Örneği Alma.....  | 55 |
| 3.6.9.2 | Böbrek Örneği Alma .....  | 56 |
| 3.6.9.3 | Akciğer Örneği Alma.....  | 57 |
| 3.6.9.4 | Gastrokinemius Kası Örneği Alma.....                              | 58 |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 3.6.10   | Kadavra İmhası.....                                     | 61 |
| 3.6.11   | Toplanan Doku Örneklerinin Muhafazası ve Transferi..... | 61 |
| 3.6.11.1 | Kan .....   | 61 |
| 3.6.11.2 | Böbrek .....  | 61 |
| 3.6.11.3 | Akciğer .....   | 62 |
| 3.6.11.4 | Gastrokinemius Kası .....                               | 62 |
| 3.6.12   | Yapılan Analiz Yöntemleri ve Hedefleri.....             | 63 |
| 3.6.12.1 | Histopatolojik Analiz Yöntemleri .....                  | 63 |
| 3.6.12.2 | Biyokimyasal Analiz Yöntemleri .....                    | 67 |
| 3.6.12.3 | İstatistiksel Analiz Yöntemleri.....                    | 70 |
| 3.7      | Araştırma Planı ve Takvimi .....                        | 70 |
| 3.8      | Verilerin Değerlendirilmesi.....                        | 72 |
| 3.9      | Araştırmanın Sınırlılıkları .....                       | 73 |
| 3.10     | Etik Kurul Onayı.....                                   | 73 |
| 4.       | BULGULAR .....  | 73 |
| 4.1      | Biyokimyasal Bulgular .....                             | 73 |
| 4.1.1    | Serum TNF- $\alpha$ Miktarı .....                       | 73 |

|       |                                |     |
|-------|--------------------------------|-----|
| 4.1.2 | MDA Miktarı.....               | 74  |
| 4.1.3 | MuRF-1 Ekspresyon Miktarı..... | 76  |
| 4.2   | Histopatolojik Bulgular .....  | 78  |
| 4.2.1 | Kas Doku.....                  | 78  |
| 4.2.2 | Böbrek Dokusu .....            | 89  |
| 4.2.3 | Akciğer Dokusu.....            | 99  |
| 5.    | TARTIŞMA.....                  | 109 |
| 6.    | SONUÇ VE ÖNERİLER .....        | 117 |
| 7.    | EKLER.....                     | 131 |
| EK-1  | Etik Kurul Onayı .....         | 131 |
| EK-2  | Özgeçmiş .....                 | 132 |



## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa No

|   |    |
|---|----|
| Tablo 1. Bazı Dokularda Gözlenen Kritik İskemi Süreleri ..... | 12 |
| Tablo 2: Çalışma Grupları ve Grupların Tanımı .....           | 36 |
| Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar. ....                  | 42 |
| Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler. ....           | 43 |
| Tablo 5. Yapılan Analiz Yöntemleri ve Hedefleri .....         | 63 |
| Tablo 6. Rutin Doku Takibi .....                              | 64 |
| Tablo 7. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü .....            | 65 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

|   |    |
|---|----|
| Şekil 1. Arka Bacak Kaslarının Lateral Görünümü .....   | 9  |
| Şekil 2. Gastrokinemius Kasının Histolojik Görünümü .....   | 10 |
| Şekil 3. Fare Arka Bacak Anatomisi .....  | 10 |
| Şekil 4. Normal Şartlarda Hipoksantin Metabolize Edilmesi .....   | 13 |
| Şekil 5. İskemik Dönemde Meydana Gelen Biyokimyasal Olaylar .....   | 13 |
| Şekil 6. Reperfüzyon Döneminde Hipoksantin Metabolize Edilmesi.....   | 15 |
| Şekil 7. Bacakta Kan Akımının Azalması Bağlı Gelişen Mekanizma ve Sonuçları.....  | 16 |
| Şekil 8. Oksijen Molekülünden Serbest Radikal Oluşumu. ....   | 20 |
| Şekil 9. SOR'nin İ-R'ye Bağlı Oluşan Akut İnflamatuvar Yanıttaki Rolü .....   | 21 |
| Şekil 10. Postiskemik İskelet Kasında Kan Akımının Yeniden Sağlanmaması<br>Durumunda Postkapiler Venüllerde Lökosit Adezyonunun Rolü .....      | 22 |
| Şekil 11. Lokal İ-R Hasarına Bağlı Gelişen Uzak Organ Hasarının Oluşum Şeması. ...  | 24 |
| Şekil 12. İ-R Hasarında Endotelyal Hücrelerin Rolü .....  | 25 |
| Şekil 13. Sitokinler ile Uyarılmış Kas Dokuda Meydana Gelen, Ubikitin Konjugasyonu<br>ve Protein Kaybı ile Sonuçlanan SOR Aracılı Olaylar ..... | 29 |
| Şekil 14. Fare ve İnsan Ghrelininin Yapısı .....  | 33 |
| Şekil 15. Ghrelinin Kardiyovasküler Sistem Kontrolü Üzerine Biyolojik Etkileri.....   | 34 |
| Şekil 16. Katım Kafesi .....  | 39 |
| Şekil 17. Barındırma Kafesi.....  | 39 |
| Şekil 18. Gebe Barındırma Kafesi .....  | 40 |
| Şekil 19. Kemirgen Ad Libitum Besleme Sistemi.....  | 41 |
| Şekil 20. Canlı Ağırlık Tartımı .....   | 44 |
| Şekil 21. %10'luk Ketamin Solüsyonu Hazırlama .....   | 45 |
| Şekil 22. Anestetik Madde Uygulaması ve Genel Anestezi Evreleri .....   | 46 |
| Şekil 23. Pençe Kısıtararak Yapılan Anestezi Derinliği Muayenesi .....  | 46 |
| Şekil 24. İntraperitoneal Enjeksiyon Bölgesi .....  | 49 |
| Şekil 25. Bilateral Arka Bacak Tıraşı ve Vücut Isısının Korunması.....  | 50 |
| Şekil 26. Ortodontik Lastik Bantların Bilateral Kalça Eklemine Yerleştirilmesi .....  | 50 |

|   |    |
|---|----|
| Şekil 27. Lazer Doppler Akım Ölçer Cihazı ile İskemi Sürecinin Doğrulanması.....                    | 51 |
| Şekil 28. Reperfüzyon Sürecinin Lazer Doppler Akım Ölçer Cihazı ile Doğrulanması .                  | 52 |
| Şekil 29: Genel ve Gruplara Özgü Deney Prosedürü .....  | 53 |
| Şekil 30. Vena Cava Caudalisin Makroskobik Görünümü .....   | 54 |
| Şekil 31. İnsülin Enjektörünün Vena Cava Caudalise Girmek Üzere Hazırlanmış Hali                    | 55 |
| Şekil 32. Eksanguinasyon Yöntemi ile Sakrifikasyon Aşaması .....                                    | 55 |
| Şekil 33. Sol Böbreğin Kadavra Üzerindeki Anatomik Konumu ve Dokunun Alımı.....                     | 56 |
| Şekil 34. Sol Böbreğin Makroskobik Görüntüsü .....  | 57 |
| Şekil 35. Sol Akciğerin Makroskobik Görüntüsü ve Vücuttan Uzaklaştırılma Aşaması                    | 58 |
| Şekil 36. Sol Akciğerin Makroskobik Görüntüsü.....  | 58 |
| Şekil 37. Arka Bacak Deri Diseksiyonu.....  | 59 |
| Şekil 38. Semitendinosus ve Gastrokinemius Kaslarının Diseksiyonu.....                              | 59 |
| Şekil 39. Gastrokinemius Kasının Diseksiyonu ve Örnek Alma .....                                    | 60 |
| Şekil 40. Kas Doku, Gruplara Ait MDA Miktarları.....  | 74 |
| Şekil 41. Akciğer Dokusu, Gruplara Ait MDA Miktarları.....  | 75 |
| Şekil 42. Böbrek Dokusu, Gruplara Ait MDA Miktarları .....  | 76 |
| Şekil 43. Western Blot Jel Görüntüsü .....  | 77 |
| Şekil 44. Kas Dokudaki, Gruplara Ait Murf-1 Protein Ekspresyon Miktarları.....                      | 77 |
| Şekil 45. Sham Grubu, Kas Doku (Longitudinal Kesit) (H-E, x100) .....                               | 79 |
| Şekil 46. İR Grubu, Kas Doku (Longitudinal Kesit) (H-E, x40) .....                                  | 79 |
| Şekil 47. G10+İR Grubu, Kas Doku (Longitudinal Kesit) (H-E, x40).....                               | 80 |
| Şekil 48. G30+İR Grubu, Kas Doku (Longitudinal Kesit) (H-E, x40).....                               | 80 |
| Şekil 49. G100+İR Grubu, Kas Doku (Longitudinal Kesit) (H-E, x100) .....                            | 81 |
| Şekil 50. İR+G10 Grubu, Kas Doku (Longitudinal Kesit) (H-E, x40).....                               | 81 |
| Şekil 51. İR+G30 Grubu, Kas Doku (Longitudinal Kesit) (H-E, x100) .....                             | 82 |
| Şekil 52. İR+G100 Grubu, Kas Doku (Longitudinal Kesit) (H-E, x40) .....                             | 82 |
| Şekil 53. Sham Grubu, Kas Doku (Longitudinal Kesit), TNF- $\alpha$ İmmunreaktivitesi (x40)<br>..... | 83 |
| Şekil 54. İR Grubu, Kas Doku (Longitudinal Kesit), TNF- $\alpha$ İmmunreaktivitesi (x40) .          | 83 |
| Şekil 55. İR Grubu, Kas Doku (Transversal Kesit), TNF- $\alpha$ İmmunreaktivitesi (x20) ..          | 84 |
| Şekil 56. G10+İR Kas Doku (Longitudinal Kesit), TNF- $\alpha$ İmmunreaktivitesi (x40)....           | 84 |

|  |     |
|--|-----|
| Şekil 57. G10+İR Kas Doku (Transversal Kesit), TNF- $\alpha$ İmmunreaktivitesi (x20) ..... | 85  |
| Şekil 58. G30+İR Kas Doku (Longitudinal Kesit), TNF- $\alpha$ İmmunreaktivitesi (x20) .... | 85  |
| Şekil 59. G100+İR Kas Doku (Longitudinal Kesit), TNF- $\alpha$ İmmunreaktivitesi (x40) ..  | 86  |
| Şekil 60. İR+G10 Kas Doku (Longitudinal Kesit), TNF- $\alpha$ İmmunreaktivitesi (x40) .... | 87  |
| Şekil 61. İR+G10 Kas Doku (Transversal Kesit), TNF- $\alpha$ İmmunreaktivitesi (x20) ..... | 87  |
| Şekil 62. İR+G30 Kas Doku (Longitudinal Kesit), TNF- $\alpha$ İmmunreaktivitesi (x40) .... | 88  |
| Şekil 63. İR+G100 Kas Doku (Longitudinal Kesit), TNF- $\alpha$ İmmunreaktivitesi (x40) ..  | 88  |
| Şekil 64. Kas Doku, Gruplara Ait TNF- $\alpha$ İmmunreaktivite Düzeyleri .....             | 89  |
| Şekil 65. Sham Grubu, Böbrek Dokusu (H-E, x40).....  | 90  |
| Şekil 66. İR Grubu, Böbrek Dokusu (H-E, x40) .....   | 91  |
| Şekil 67. G10+İR Grubu, Böbrek Dokusu (H-E, x40) .....                                     | 91  |
| Şekil 68. G30+İR Grubu, Böbrek Dokusu (H-E, x40) .....                                     | 92  |
| Şekil 69. G100+İR Grubu, Böbrek Dokusu (H-E, x40) .....                                    | 92  |
| Şekil 70. İR+G10 Grubu, Böbrek Dokusu (H-E, x40) .....                                     | 93  |
| Şekil 71. İR+G30 Grubu, Böbrek Dokusu (H-E, x40) .....                                     | 93  |
| Şekil 72. İR+G100 Grubu, Böbrek Dokusu (H-E, x40) .....                                    | 94  |
| Şekil 73. Böbrek Dokusu, Gruplara Ait Doku Hasarlanma Düzeyleri .....                      | 94  |
| Şekil 74. Sham Grubu, Böbrek Dokusu, TNF- $\alpha$ İmmunreaktivitesi (x40).....            | 95  |
| Şekil 75. İR Grubu, Böbrek Dokusu, TNF- $\alpha$ İmmunreaktivitesi (x40) .....             | 95  |
| Şekil 76. G10+İR Grubu, Böbrek Dokusu, TNF- $\alpha$ İmmunreaktivitesi (x40) .....         | 96  |
| Şekil 77. G30+İR Grubu, Böbrek Dokusu, TNF- $\alpha$ İmmunreaktivitesi (x40) .....         | 96  |
| Şekil 78. G100+İR Grubu, Böbrek Dokusu, TNF- $\alpha$ İmmunreaktivitesi (x40) .....        | 97  |
| Şekil 79. İR+G10 Grubu, Böbrek Dokusu, TNF- $\alpha$ İmmunreaktivitesi (x40) .....         | 97  |
| Şekil 80. İR+G30 Grubu, Böbrek Dokusu, TNF- $\alpha$ İmmunreaktivitesi (x40) .....         | 98  |
| Şekil 81. İR+G100 Grubu, Böbrek Dokusu, TNF- $\alpha$ İmmunreaktivitesi (x40) .....        | 98  |
| Şekil 82. Böbrek Dokusu, Gruplara Ait TNF- $\alpha$ İmmunreaktivite Düzeyleri .....        | 99  |
| Şekil 83. Sham Grubu, Akciğer Dokusu (H-E, x40) .....                                      | 100 |
| Şekil 84. İR Grubu, Akciğer Dokusu (H-E, x40) .....  | 101 |
| Şekil 85. G10+İR Grubu, Akciğer Dokusu (H-E, x40).....                                     | 101 |
| Şekil 86. G30+İR Grubu, Akciğer Dokusu (H-E, x40).....                                     | 102 |
| Şekil 87. G100+İR Grubu, Akciğer Dokusu (H-E, x40).....                                    | 102 |

|  |     |
|--|-----|
| Şekil 88. İR+G10 Grubu, Akciğer Dokusu (H-E, x40).....                       | 103 |
| Şekil 89. İR+G30 Grubu, Akciğer Dokusu (H-E, x40).....                       | 103 |
| Şekil 90. İR+G100 Grubu, Akciğer Dokusu (H-E, x40).....                      | 104 |
| Şekil 91. Sham Grubu, Akciğer Dokusu, TNF-a İmmunreaktivitesi (x40) .....    | 104 |
| Şekil 92. İR Grubu, Akciğer Dokusu, TNF-a İmmunreaktivitesi (x40).....       | 105 |
| Şekil 93. G10+İR Grubu, Akciğer Dokusu, TNF-a İmmunreaktivitesi (x40).....   | 105 |
| Şekil 94. G30+İR Grubu, Akciğer Dokusu, TNF-a İmmunreaktivitesi (x40).....   | 106 |
| Şekil 95. G100+İR Grubu, Akciğer Dokusu, TNF-a İmmunreaktivitesi (x40).....  | 106 |
| Şekil 96. İR+G10 Grubu, Akciğer Dokusu, TNF-a İmmunreaktivitesi (x40).....   | 107 |
| Şekil 97. İR+G30 Grubu, Akciğer Dokusu, TNF-a İmmunreaktivitesi (x40).....   | 107 |
| Şekil 98. İR+G100 Grubu, Akciğer Dokusu, TNF-a İmmunreaktivitesi (x40).....  | 108 |
| Şekil 99. Akciğer Dokusu, Gruplara Ait TNF-a İmmunreaktivite Düzeyleri ..... | 108 |

## KISALTMALAR

ATP: Adenozin trifosfat

BCA: Bisinkoninik asit

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay - Enzimle işaretlenmiş immunosorbent test

ET: Endotelin

G: Gauge

GH: Growth hormone - Büyüme hormonu

GSH-Px: Glutatyon peroksidaz

GST: Glutatyon S-transferaz

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen peroksit

H-E: Hematoksilen-Eozin

HPLC: High Performance Liquid Chromatography - Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

IHC: Immunohistochemistry - İmmünohistokimya

İCAM-1: Intercellular adhesion molecule-1 - İnterselüler adezyon molekülü-1

İL-1 $\beta$ : İnterlökin-1 Beta

İL-6: İnterlökin-6

İL-8: interlökin-8

ip: İntraperitoneal

İ-R: İskemi-reperfüzyon

KDH: Ksantin dehidrojenaz

KO: Ksantin oksidaz

MAFbx: Muscle atrophy F-box – Kas atrofi F-box

MAPKs: Mitogen activated protein kinase - Mitojenle etkileşen protein kinazları

MDA: Malondialdehit

MuRF-1: Muscle ring finger-1

NAD<sup>+</sup>: Nikotinamid adenin dinükleotid

NF-κB: Nükleer Faktör-kappa B

NO: Nitrik oksit

O<sup>2</sup>: Moleküler oksijen

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Süperoksit

OH<sup>•</sup>: Hidroksil

PBS: Phosphate buffered saline-Fosfat tamponlu tuzlu su

PECAM-1: Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 - Trombosit-endotel hücre adezyon molekülü 1

PMNL: Polimorf nüveli lökositler

PSGL-1: P-selektin glikoprotein 1

sc: Subkutan

SF: Serum fizyolojik

SH: Standart hata

SOD: Süperoksit dismutaz

SOR: Serbest oksijen radikalleri

TBA: Tiyobarbitürük asit

TNF- $\alpha$ : Tümör nekroz faktör-alfa

Ub: Ubikitin

VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule-1 - Vasküler hücre adezyon molekülü-1





# **Ghrelinin İskemi-Reperfüzyona Bağlı İskelet Kası ve Uzak Organ Hasarı Üzerine Etkisinin İncelenmesi**

Gonca KAMACI, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Laboratuvar  
Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı, İzmir

## **ÖZET**

**Giriş:** Alt-ekstremitede oluşan iskemi-reperfüzyon (İ-R) hasarında, serbest oksijen radikalleri ve inflamatuvar yanıtlar önemli rol oynamaktadır. Ghrelin, mideden sentezlenen bir peptid olup; anti-inflamatuvar etki göstermektedir. Çalışmamızın amacı; ghrelinin alt-ekstremitte İ-R hasarı üzerine etkisini farelerin arka bacağına İ-R modeliyle gastroknemius kasında, uzak organ olarak böbrek ve akciğerde incelemektir.

**Materyal ve Metod:** Çalışmada 56 (8 grup; n=7) adet C57BL/6 erkek fare kullanıldı. İ-R modeli (2 saat iskemi-3 saat reperfüzyon) farelerin kalça eklemine bilateral turnike yerleştirilerek oluşturuldu. Ghrelin (10,30,100 µ/kg) iskemiden 30dk önce (G+İR grupları) ve reperfüzyon başlangıcında (İR+G grupları) uygulandı ve gastroknemius kası, böbrek ve akciğer dokuları incelendi.

### **Bulgular:**

**Kas:** Hematoksilen-Eozin (H-E); İR grubunda hasar gözlenirken, G+İR gruplarında İR grubuna benzer olduğu, İR+G gruplarında ise hafif seyrettiği gözlemlendi. TNF-α; İR gruplarında artmış immunreaktivite, G+İR ve İR+G gruplarında ise azalan derecelerde olduğu görüldü. MDA; İR grubunda artmış, G+İR ve İR+G gruplarında (İR+G10 hariç) düşmüştür. MuRF-1; ekspresyonu İR grubunda artarken, G+İR ve İR+G gruplarında (G10+İR ve G30+İR) İR grubuna kıyasla azalmıştır.

**Böbrek:** H-E; İR grubunda hasar gözlenirken, G+İR ve İR+G gruplarında İR'ye benzer bulgular görüldü. TNF- $\alpha$ ; İR grubunda artan, G+İR ve İR+G gruplarında ise azalan immunreaktivite görüldü. MDA; İR grubunda artmış, ghrelin gruplarında (G30+İR ve İR+G30 hariç) düşmüştür.

**Akciğer:** H-E; İR grubunda hafif inflamasyon gözlenirken, ghrelin grupları sham grubuna benzer özellikler gösterdi. TNF- $\alpha$ ; İR grubunda artmış, ghrelin gruplarında azalmış immunreaktivite görüldü. MDA; İR grubunda artmış, ghrelin gruplarında (G10+İR ve G30+İR hariç) azalmıştır.

**Sonuç:** Arka bacak İ-R modelinde kas, böbrek ve kısmen akciğer dokularında hasar gözlenirken, ghrelinin farklı dozlarda koruyucu etki gösterdiği bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Ghrelin, Arka bacak iskemi-reperfüzyon hasarı, M. gastrokinemius, Böbrek, Akciğer, Fare.

# **Investigation of Effects of Ghrelin on Skeletal Muscle and Remote Organ Injury Induced by Hindlimb Ischemia-Reperfusion**

Gonca KAMACI, Dokuz Eylul University, Institute of Health Sciences, Department of Laboratory Animal Science, 35340, İnciraltı, İzmir

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Reactive oxygen species and inflammatory response play important role in hindlimb ischemia-reperfusion(IR) injury. Ghrelin is synthesized in stomach, has anti-inflammatory effects. The aim is to investigate ghrelin's effects on muscle and remote organs (kidney-lung) in hindlimb-IR mice model biochemically and histopathologically.

**Materials-Methods:** Male C57BL/6mice was used. In the I-R model [ischemia(2h)-reperfusion(3h)], bilateral tourniquets were located on the hipjoint of mice. Ghrelin (10,30,100 $\mu$ /kg) was administered. 30min before ischemia and the onset of reperfusion.

### **Findings:**

Muscle: Hematoxylin-Eosin(HE); damage in G+IR and IR groups was similar. There was less damage in IR+G groups than IR group. TNF- $\alpha$ ; immunoreactivity increased in IR group and decreased in G+IR and IR+G groups. MDA increased in IR group and decreased in G+IR and IR+G groups. MuRF-1 expression increased in IR group and decreased in G10+IR and G30+IR groups.

Kidney: H-E; there was reperfusion damage in IR group. Similar findings were observed in G+IR and IR+G groups. TNF- $\alpha$  increased in IR group and there was a decreasing immunoreactivity in G+IR and IR+G groups. MDA increased in IR group and decreased in ghrelin groups (excluding G30+IR, IR+G30).

Lung: H-E; there was a mild inflammation in IR and ghrelin groups were similar to sham group. TNF- $\alpha$  increased in IR group and there was a decreased immunoreactivity in ghrelin groups. MDA increased in IR group and decreased in ghrelin groups (excluding G10+IR, G30+IR).

**Conclusion:** Reperfusion damage was observed in muscle, kidney, and partially lung tissues in IR model. Ghrelin exhibited protective effects.

**Key words;** Ghrelin, Ischemia-reperfusion injury of the hindlimb, M. gastrocnemius, Kidney, Lung, Mouse.



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dokulara kan sağlayan damarların tıkanması sonucu, dokunun beslenememesine iske mi, dokunun yeniden kanlanmasına ise reperfüzyon denir. Dokularda iske miye bağlı hasarın reperfüzyonla devam ettiği bilinmektedir (reperfüzyon hasarı) (1, 2). Alt ekstremit e kaslarında iske mi-reperfüzyon (İ-R) ile ciddi hasarlanmalar oluşmaktadır (3). Transplantasyon cerrahisinde, turnike uygulamasında, serbest doku transferlerinde ve ampute ekstremitenin replantasyonunda ciddi alt-ekstremit e İ-R hasarı oluşabilmektedir. İ-R hasarında, serbest oksijen radikallerinin (SOR) ve inflamatuvar yanıt ların (TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuvar bir sitokinin) önemli rol oynadığı bilinmektedir (4-6). Alt-ekstremitelerde İ-R sonrasında serumda, akciğer ve böbrek dokularında TNF- $\alpha$  düzeyi yüksek bulunmuştur (7-9). Sitokinler sistemik inflamatuvar yanıtı başlatarak uzak organ hasarına yol açarlar (10). Dolayısıyla iske mi hipoksik/anoksik hücre ölü müyle sonuçlanırken, reperfüzyon inflamatuvar yanıt lar oluşturarak hem lokal hasara, hem de sistemik etkilerle uzak organ/doku inflamatuvar yanıt larına ve çoklu organ yetmezliğine yol aça bilmektedir.

Ghrel in mideden sentezlenen bir peptid olup, büyü me hormonu (Growth Hormone= GH) salgılanmasında, iştah ve enerji dengesi gibi birçok sistemin regülasyonunda rol oynamaktadır (11). Ayrıca TNF- $\alpha$ , İL-1 $\beta$  ve İL-6 gibi sitokinleri ve NF- $\kappa$ B'yi azaltarak anti-inflamatuvar etki gösterdiği belirlenmiştir (12-16). Ghrelinin kalp (17), böbrek (18), intestinal (19), mide (20), beyin (21), kortikal nöron (22) pankreas (23), testis (24), karaciğer (25), ve omurilik (26) dokularında da deneysel İ-R hasarında etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak, alt-ekstremit e İ-R'ye bağlı gastroknemius kası ve ilişkili uzak organ hasarı üzerine ghrel in etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Araştırmamızın hipotezleri;

H1: Ghrelin alt ekstremitede İ-R'ye bağlı gelişen lokal doku hasarını azaltır.

H2: Ghrelin alt ekstremitede İ-R'ye bağlı gelişen uzak organ hasarını azaltır.

H3: Ghrelin alt ekstremitede İ-R'ye bağlı gelişen hasarda iskemi öncesi uygulandığında koruyucudur.

H4: Ghrelin alt ekstremitede İ-R'ye bağlı gelişen hasarda reperfüzyon başlangıcında uygulandığında koruyucudur.

H5: Ghrelinin alt ekstremitede İ-R'ye bağlı gelişen hasarındaki koruyucu etkisi doza bağlı olarak değişir.

Araştırmamızın amacı;

Ghrelinin alt ekstremitte İ-R hasarı üzerine etkisini ve proinflatuvar sitokinlerle ilişkisini, deneysel olarak farelerin alt ekstremitesinde turnike yöntemi ile oluşturulan İ-R modeliyle gastroknemius kasında, uzak organ olarak böbrek ve akciğerde biyokimyasal ve histopatolojik olarak incelemektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 C57BL/6 Suşu Farelerin Genel Özellikleri

Laboratuvar faresi (*Mus musculus*) taksonomik olarak *Mus* cinsinden olup, Murinae alt familyasına ve Muridae familyasına ait rodent sınıfından bir canlıdır (27). Laboratuvar faresi soyundan gelen C57BL/6 suşu fareler ise 'genetik olarak özdeş bireylerin ölümsüz klonları' olarak nitelendirilen inbred (inbred; yakın akrabalı çiftleşmeler sonucu 20. jenerasyonda elde edilen genetik özdeşliği olan) bir suş olmakla beraber genetik sekanslaması yapılan ilk inbred fare soyudur (28-30).

Diğer fare soylarında olduğu gibi gece aktif (noktürnal) hayvanlardır, 24 saatlik sirkadiyen ritimlerinin 12 saatlik kısmında aydınlık geriye kalan 12 saatlik diliminde ise karanlığa ihtiyaç duyarlar. Yem ve su ihtiyaçlarını ad libitum olarak karşılamak gerekir (31). Koyu kahverengiden siyaha dönük kürk rengine sahiptirler. Yetişkin dönemdeki canlı ağırlığı cinsiyete bağlı olarak değişkenlik gösterir. Dişilerin erişkin canlı ağırlığı 25-30 g civarında iken, erkek canlı ağırlığı 30-35 g civarındadır. Bu suş, barındırıldığı tesiste çok özel dizayn edilmiş izolasyon prosedürlerini gerektirmez. Davranış biçimleri ele alındığında ise genel olarak hırçındırlar, gürültü ve kokuya karşı çok duyarlı olmaları ile birlikte bu hassasiyetlerine karşılık veren makro- ve mikroçevrelerde iyi üreyen hayvanlardır (32-34). Farelerin yaşam süreleri suşlara göre farklılık göstermekte olup, C57BL/6 suşu diğer suşlara kıyasla daha uzun ömürlüdür ve yaşam süreleri 25-30 aydır (35).

Sosyal hiyerarşinin fiziksel görüntüsü olarak nitelendirebileceğimiz 'barbering' berberlik davranışı (Dalila etkisi), bu suşun erkeklerinde daha sık görülen bir durumdur. Uzun süre aynı kafeste yaşayan fareler arasında gözlenen bu durum,

baskın olan erkeğin çekinik kalan diğer farelerin bıyıklarını, sakallarını ve sırt tüylerini yolarak tıraş etmesi şeklinde gözlemlenir. Bu davranışsal fenotip, bir hastalık belirtisi olmamakla birlikte ciltte derin yaralanmalara sebep olmuşsa sepsise kadar ilerlemesi muhtemel bir durumdur (36-38).

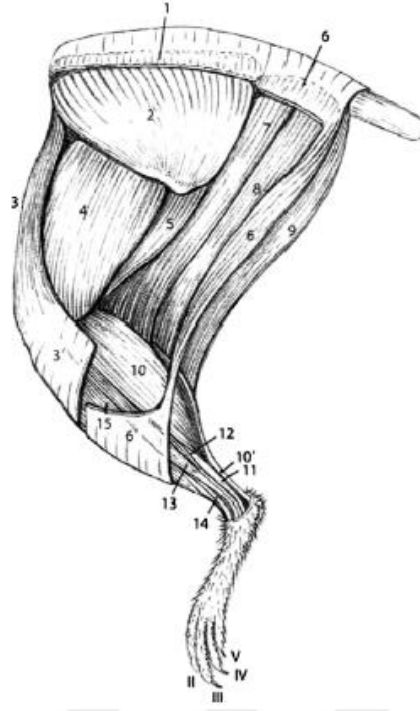
Bu suş yaygın kullanım alanına sahiptir; özellikle farmakoloji ve davranış çalışmalarında, fizyoloji, diyetle bağlı obezite, transgenik/knockout model oluşturmada, güvenilirlik ve etkililik testlerinde, immünoloji çalışmalarında idealdirler (39). Ayrıca; yapılan çalışmalara göre C57BL/6 suşu farelerin, diğer inbreed fare suşlarına kıyasla solunum yolları alerjenlerine karşı gelişen aşırı duyarlılığa karşı daha dirençli oldukları tespit edilmiştir (40, 41).

Fareler arasında suşlara bağlı farklılıkların olmasının yanı sıra, aynı suş içinde cinsiyete bağlı sebepler nedeniyle de farklılıklar görülmektedir. Nitekim çalışmamızda da olduğu gibi inflamasyon yanıtların önemli olduğu araştırmalarda erkek fareler kullanılır. Çünkü; inflamasyona yanıt olarak salınan sitojen mediatörlerden biri olan histamin, dişi farelerde erkek farelere nazaran daha yüksektir (42, 43).

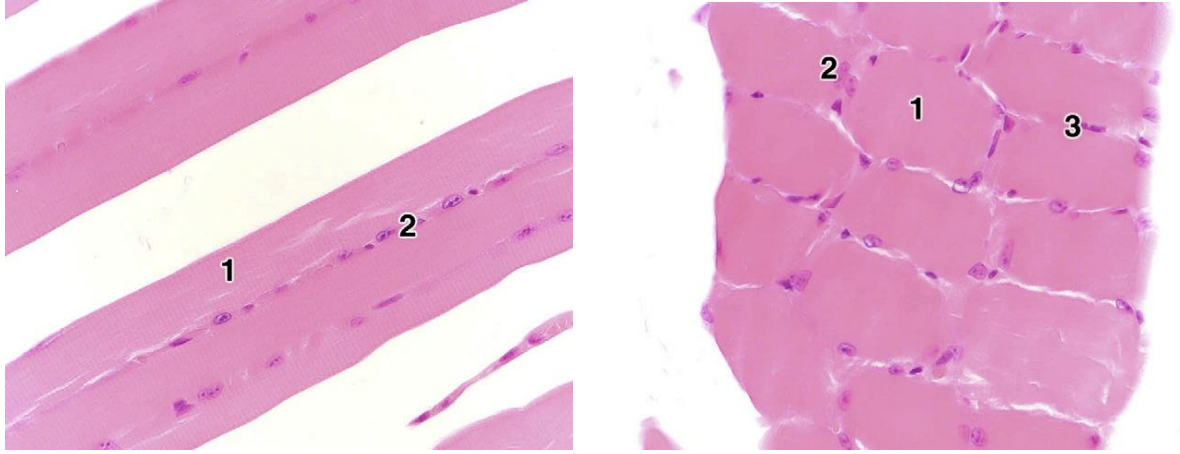
## **2.2 Fare Arka Bacak Anatomisi, Histolojisi ve Fizyolojisi**

Farelerin arka bacakları da diğer türlerde olduğu gibi istemli kasılan bir grup iskelet kasını ihtiva eder. Bu çizgili kaslar ekstra- ve intrafüzal kas lifleri, bağ doku, kan damarları, sinir lifleri, motor ve duyu sinir uçlarını içerir (44). Arka bacak kaslarından gastrokinemius kası predominant glikolitik, soleus kası ise predominant oksidatifdir. Sahip oldukları bu özellikler nedeniyle gastrokinemius kası soleus kasına kıyasla iskemiye daha duyarlıdır (45). C57BL/6 suşunun anatomik ve histolojik yapıları sırasıyla Şekil 1, 3 ve Şekil 2'deki gibidir.

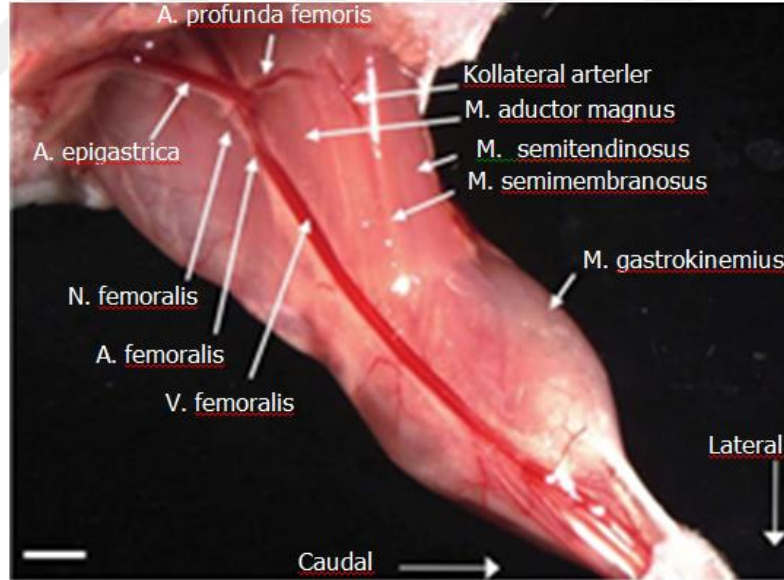




Şekil 1. Arka bacak kaslarının lateral görünümü. 1. M. gluteus superficialis, 2. m. gluteus medius, 3. m. tensor fasciae latae, 3'. fascia lata, 4. m. rectus femoris, 5. m. vastus lateralis, 6. m. biceps femoris, 6'. fascia cruris, 7. m. adductor, 8. m. semimebranosus, 9. m. semitendinosus, 10. M. gastrokinemius'un caput laterale'si, 10'. tendo musculi tricipitis surae, 11. m. flexor digiti I, (hallucis) longus, 12. m. extensor digitorum lateralis, 13. m. extensor digitorum longus, 14. tendo musculi peronei longi, 15. m. tibialis cranialis, II-V digitus secundus, tertius, quartus, quintus (46).



Şekil 2. Gastrokinemius kasının longitudinal (soldaki) kesitinin (1; kas fibrillerinin çapraz çizgili sitoplazması, 2; periferale yerleşmiş çekirdekler) ve transversal kesitinin (sağdaki) (1; sitoplazma, 2; kas fibrillerinin çekirdekleri (solgun, oval), 3; endomisiyal çekirdekler (koyu, uzamış)) histolojik görünümü (sağdaki) (47).



Şekil 3. Fare arka bacak anatomisi (48)

C57BL/6 suşunun diğer inbreed suşlara kıyasla, özellikle de BalB/c suşuna kıyasla iskelet kaslarının fibriler yapısı daha belirgin ve damar çapı daha geniş

olduğundan iskelet kası üzerine yapılan İ-R çalışmaları için daha uygun olduğu öne sürülmektedir (49, 50).

### 2.3 İskemi

İskemi, damarlar aracılığı ile dokulara gelen kan miktarının azalması veya kan akımının kesilmesidir (51). Tarihte ilk kez 1881 yılında Volkmann, fraktürler sonrası iskemik kontraktürü, iskemik kasa ilişkin bir komplikasyon olarak tanımlamıştır (52). 1926 yılında ise ortopedi cerrahisi alanında uzman doktor Jepson, köpekler üzerinde yaptığı çalışmasında ekstremiteye turnike uygulandığında uygulamayı takip eden dönemde bölgede ödem meydana geldiğini deneysel olarak tanımlamıştır (53).

Sıcaklık ve kas fiber tipi gibi parametreler iskelet kasının iskemiye karşı toleransını etkiler (54, 55). Sıçanlarda, gastrokinemius kası (predominant glikolitik) soleus kasına (predominant oksidatif) kıyasla iskemiye daha duyarlıdır. Paradis ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları araştırmalar sonucu (45), gastrokinemius kasının iskemiye en duyarlı iskelet kaslarından biri olmasının nedenini, azalmış antioksidan kapasitesi olarak öngörmüştür.

İskeminin üç ana nedeni vardır;

- a) Lezyonlar; damar çeperini daraltıp lumeni daraltır.
- b) Dolaşan kan miktarının azalması.
- c) Spazm; damarın şiddetli kasılması (51).

Dokularda iskemiye bağlı olarak üç yolla hasar oluşur;

- a) Hipoksi; dokuların yetersiz oksijenlenmesi.
- b) Dokuda metabolizma artıklarının birikimi.
- c) Dokunun yetersiz beslenmesi (51).

Yukarıda belirtilen hasarlanma yollarından olan hipoksi, en ağır hasarlanmaya sebep olur. Ancak bunun yanısıra iskemiye maruz kalan dokunun oksijensizliğe dayanıklılığı, iskeminin gelişme hızı, damarın daralma derecesi ve kollateral dolaşımın durumu da hasarlanmanın şiddetini etkileyen faktörlerdir (45, 51). Bazı dokularda gözlenen kritik iskemi süreleri Tablo 1’de gösterilmektedir.

Tablo 1. Bazı dokularda gözlenen kritik iskemi süreleri (52).

| <b>Doku</b> | <b>Süre</b> |
|-------------|-------------|
| Kas         | 4 saat      |
| Sinir       | 8 saat      |
| Yağ         | 13 saat     |
| Deri        | 24 saat     |
| Kemik       | 4 gün       |

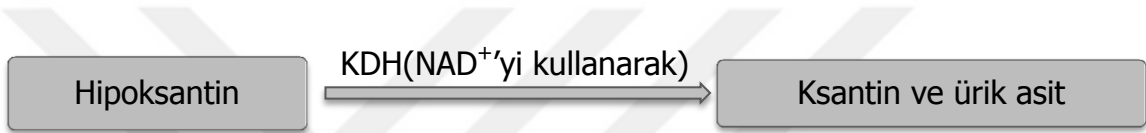
## **2.4 İskemi Oluşum Mekanizmaları**

İskemi süresince; inorganik fosfat ve laktatın artışı, adenozin trifosfat (ATP), kreatin ve pH’ın düşüşü anaerobik metabolizmayı baskın kılar. ATP yoksunluğu, transmembran pompalarında ve hücrelerdeki iyon değişiminde yetmezliğe sebep olur. Böylelikle hücre içinde kalsiyum ve sodyum birikimi sonucu ödem meydana gelir (45, 56).

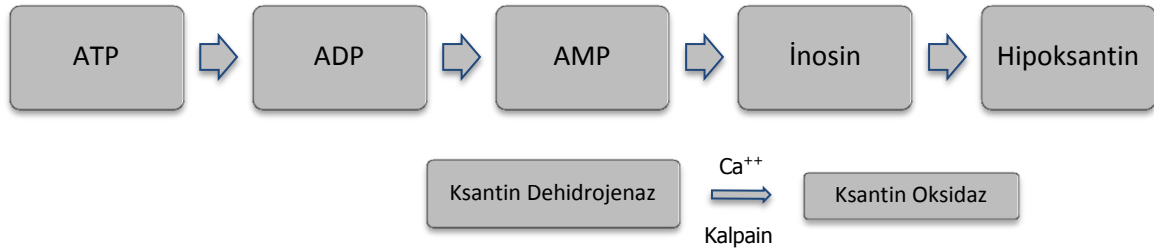
İntrasellüler kalsiyum artışı esasen; fosfolipaz A<sub>2</sub>, kalpain ve diğer sitoplazmik proteazları aktive ederek lizozomal hidrojen pompalarının yetmezliğine ve lizozomal enzimlerin aktifleşmesiyle düşen pH, hücresel organellerin doğrudan hasarlanmasına sebep olur. Fosfolipaz A<sub>2</sub>’nin araşidonik asidi indirgemesi sonucu lökotrienler, prostaglandinler ve tromboksanlar gibi inflamatuvar mediatörler oluşur. Bu maddelerin aktivesi iskemi bölgesinde adezyon ve nötrofil aktivasyonuna,

vazokonstriksiyona, doku hasarlanmasına, trombosit agregasyonuna ve kemotaksiye neden olur (56).

Normal koşullar altında; hipoksantin, ksantin dehidrojenaz (KDH) enzimi aracılığı ile nikotinamid adenin dinükleotid ( $\text{NAD}^+$ ) substrat olarak kullanılarak ksantin ve ürik aside dönüştürülür (Şekil 4). Ancak, iskemi süresince kalpain, anaerobik metabolizma tarafından üretilen ksantin dehidrojenazı ksantin oksidaza dönüştürür, bu da reperfüzyon hasarında önemli bir role sahiptir (56, 57). İskemi sürecinde meydana gelen biyokimyasal olaylar Şekil 5'de gösterilmektedir.



Şekil 4. Normal şartlarda hipoksantin metabolize edilmesi (58).



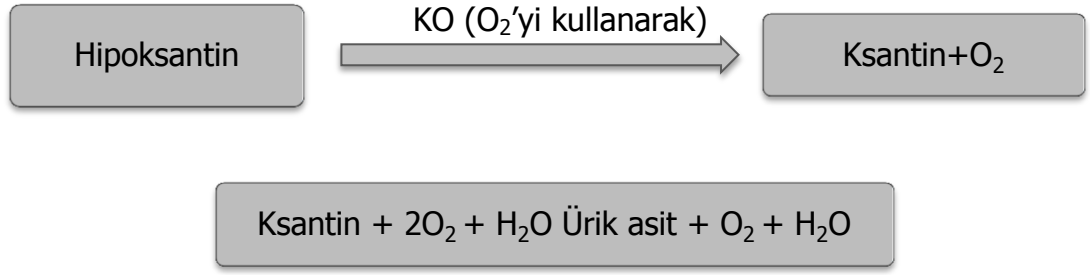
Şekil 5. İskemik dönemde meydana gelen biyokimyasal olaylar (56, 58, 59).

## 2.5 İskemi-Reperfüzyon Hasarı

İskemi süresince hipoksiye maruz kalan dokuda hücrel enerji yoksunluğu ve toksik madde birikimi nedeniyle ölüm meydana gelir. Bu durumun önüne geçebilmek için yapılması gereken şey; en kısa zamanda kan akımının yeniden sağlanmasıdır. Reperfüzyon; iskemiye neden olan etkenin çeşitli etmenlerle ortadan kalkmasıyla birlikte, dokunun oksijenlenmiş kan akımı ile yeniden kanlanmasıdır (45, 58).

İskemi sonrası reperfüzyonu sağlanan dokuda; dokunun tipine ve maruz kaldığı iskemi süresine bağlı olarak, iskemide gözlenenenden daha ciddi bir hasarlanma meydana gelir. Bu hasarlanmaya 'İ-R hasarı' denir (60). Bu terim genellikle iskemik dokunun oksijenlenmiş kan ile restorasyonu sonucu ortaya çıkan olumsuz değişikliklerin tümünü adlandırmak için kullanılır. İ-R hasarı mekanizmasının gerçekleşmesinde nötrofillerin, endotelial hücrelerin ve SOR'un önemli rolü olduğu düşünülmektedir (1, 61, 62).

Daha önce değinildiği gibi normal şartlarda; hipoksantin, KDH enzimi aracılığı ile  $\text{NAD}^+$  substrat olarak kullanılarak ksantin ve ürik aside dönüştürülürken, iskemi döneminde KDH ksantin oksidaz (KO)'a dönüştüğünden reperfüzyon ile birlikte hipoksantin KO enzimi aracılığıyla moleküler oksijen ( $\text{O}_2$ ) kullanılarak ürik aside dönüştürülür (Şekil 6) (58).

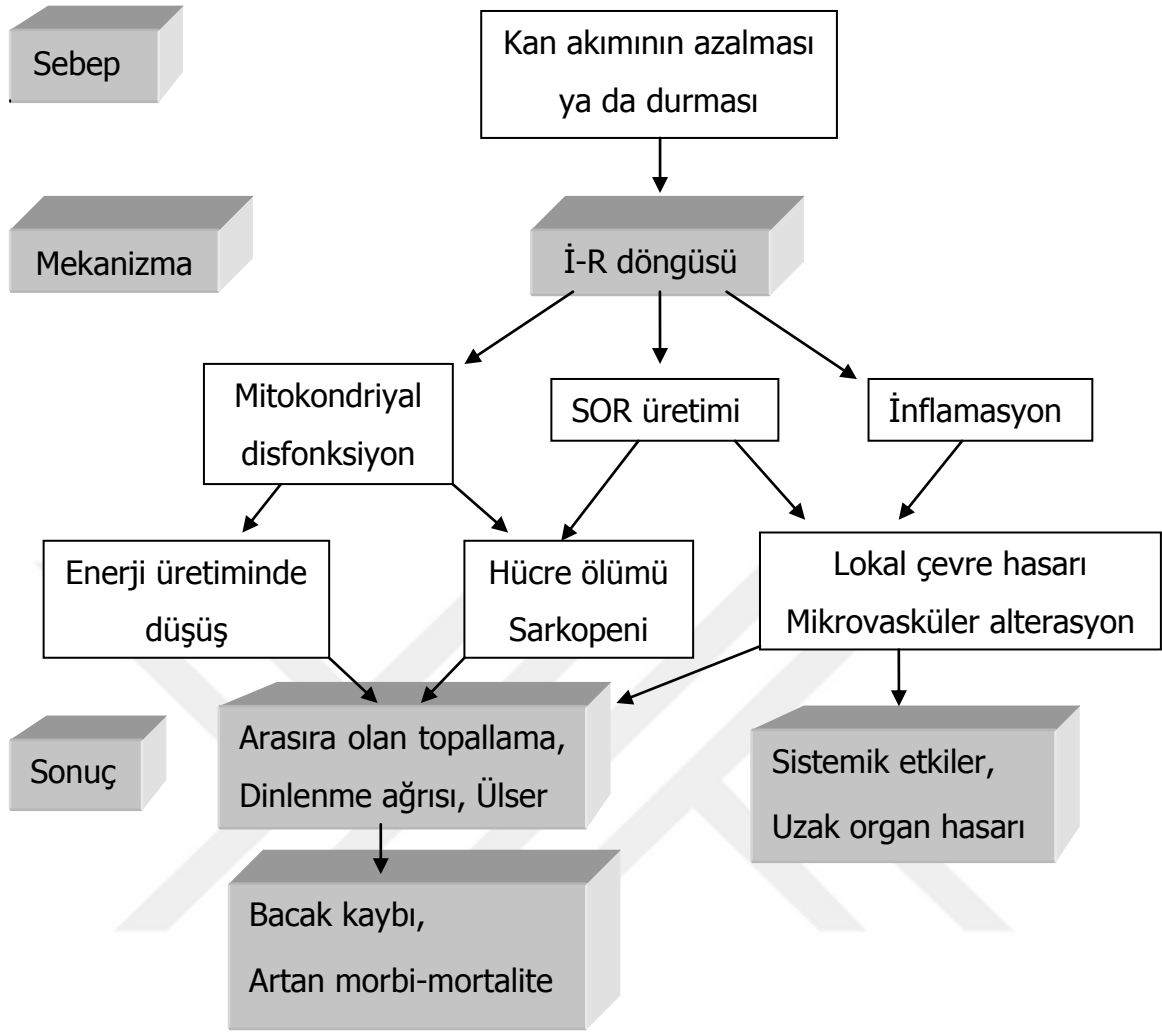


Şekil 6. Reperfüzyon döneminde hipoksantin metabolize edilmesi.

### 2.5.1 İskelet Kası İ-R Mekanizmaları

İskelet kası; omurgalıların en büyük organı olmakla birlikte yalnızca motor fonksiyonlar ve vücut şeklini belirlemede değil, aynı zamanda metabolik hemostaz açısından da önemli bir yere sahiptir (63). Aktif bir metabolizmaya sahip olması nedeniyle, diğer dokulara nazaran iskemiye karşı daha hassas olmakla birlikte, yine İ-R hasarından en çok etkilenen dokulardandır (60).

Alt bacak İ-R'si esnasında mitokondriyal disfonksiyon, artmış SOR üretimi ve inflamasyon gözlenir. Meydana gelen inflamasyon sonucu; lokal olarak ilgili kas ve çevresindeki damarlar, sinirler, endotel hücreler ve kas hücreleri hasara uğrar, mikrovasküler alterasyon gözlenir. Meydana gelen bu hasarlanmalar; kas fonksiyon kaybı ve uzak organ yetmezliğine neden olur. Ancak, hasarlanmanın şiddeti ve maruz kalınan iskemi süresi meydana gelen İ-R hasarının derecesini doğrudan etkilemektedir (45). Bacakta kan akımının azalması ya da durmasına bağlı gelişen mekanizma ve sonuçları Şekil 7'de gösterilmektedir.



Şekil 7. Bacakta kan akımının azalması ya da durmasına bağlı gelişen mekanizma ve sonuçları (45).

Belkin ve arkadaşlarının (64) 1988 yılında yaptıkları çalışma sonucunda, sıçanlarda 3 saatlik iskemi süreci sonunda ilk kez kasta hasarlanma olduğunu ve hatta 4-6 saat süren iskemi döneminde daha şiddetli hasarlanma meydana geldiğini göstermişlerdir. Hipoksi ve normoksi dönemlerinin iskelet kası üzerine etkisini inceleyen Martou ve arkadaşlarının (65) 2006 yılında yaptıkları çalışmada, 3-4 saatlik hipoksinin ardından 2 saatlik normoksi döneminin iskelet kasında ciddi değişikliklere sebep olduğu rapor edilmiştir.



## **2.6 İ-R Hasarı Sonucu Oluşan Akut İnflamasyon ve Yanıt Mediatorleri**

İskemi-reperfüzyon süreci, granüositlerin önemli rol oynadığı akut inflamasyon formlarından biridir (66, 67). İskemiye maruz kalan dokunun reperfüzyonu, nekroza ve lokal vasküler endotel ile parankim hasarına sebep olarak geri dönüşü olmayan hücre hasarlanmasına sebep olur (67). İskelet kasında meydana gelen İ-R hasarı sonucu oluşan akut inflamatuvar yanıt, sadece ilgili kası değil uzak organları da etkiler (52, 68).

İskemi-reperfüzyon hasarı sonucu oluşan akut inflamatuvar yanıt polimorf nüveli lökositleri (PMNL), reaktif oksijen metabolitleri (serbest oksijen radikalleri), endotel hücreleri, kompleman sistemi gibi mediatorleri içerir (58, 69). Antinötrofil serumlarla, reperfüzyon hasarına karşı yapılan çalışmalarda; reperfüzyon dönemindeki mikrovasküler geçirgenlik artışından nötrofillerin sorumlu olduğu ortaya konmuştur (70).

### **2.6.1 İnflamasyon**

İnflamasyon; kimyasal, fiziksel veya biyolojik ajanlar sebebiyle oluşan hasarlanma veya anormal durumdan etkilenmiş yakın doku veya kan damarlarında meydana gelen kompleks ve oldukça dinamik bir dizi reaksiyondan oluşan temel bir patolojik süreçtir (66). İnflamasyonun temel amacı organizmanın zararlı etkenlerden korunmasıdır, yani bu patolojik süreç aslında organizmanın lehinedir ancak inflamasyonun şiddeti arttıkça süreç organizmanın aleyhine işlemektedir. Öyle ki şiddetli inflamasyon sonucu dokularda ve organlarda fonksiyon kaybı ve ölüm görülebilir (51, 71).

Bilinen üç tip inflamasyon çeşidi mevcuttur;

*a) Akut inflamasyon:* Hasarlanmaya sebep olan etkene karşı dakikalar ya da birkaç gün süren, ani gelişen ve genellikle geçici olan bir yanıttır (51, 71, 72). Damardan dokuya plazma proteinleri, sıvı ve lökositlerin çıkışı ile karakterizedir (51). Akut inflamasyona örnek olarak iskemi sonucu oluşan infarktlar gösterilebilir, organizma tarafından artık yabancı cisim olarak algılanan iskemik infarktların ortadan kaldırılması ve yerini canlı dokunun alması için inflamatuvar yanıt oluşur (51, 71). Akut inflamatuvar yanıt ortadan kalktıktan sonra rejenerasyon dönemi başlar ve tam iyileşme gözlenebilir (72).

Akut inflamasyon bölgesinde sırasıyla gözlenen belirtiler;

- Isı artışı (Calor), inflamasyon bölgesinde artış gösteren arteriyel kan miktarına ilişkin bir sonuçtur.
- Kızarıklık (Rubor), inflamasyon bölgesine kan akımının artışı sonucunda gözlenir.
- Şişme (Tumor), inflamasyon bölgesindeki damarların genişlemesi ve bu damarlardan çevreye sızan sıvı sebebiyle gözlemlenir.
- Ağrı (Dolor), inflamasyon bölgesine sızarak biriken sıvının buradaki sinir uçlarına yaptığı basıncın bir sonucu olarak gözlemlenir.
- Fonksiyon kaybı (*Functio laesa*), yukarıda bahsedilen dört belirtinin sonucu olarak inflamasyonun gözlemlendiği doku veya organda gelişen fonksiyon bozukluğudur (71, 72).

*b) Subakut inflamasyon:* Akut ve kronik inflamasyon süreçleri arasında seyreder ve bu iki inflamasyon tipinin arasında bir geçit gibidir, proliferatif olaylar gözlemlenir (72).

*c) Kronik inflamasyon:* Hasarlanmaya sebep olan ve süregelen ya da belli aralıklarla tekrarlayan etkene karşı haftalar veya aylar süren bir yanıttır (51, 71). İnflamatuvar

yanıtın geliştiği dokuda makrofaj, lenfosit, plasmosit birikimi, bağ doku (nedbe) ve kapillar oluşumu ile karakterizedir (51).

Doku hasarının onarımı, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimini gerektiren bir sağkalım sürecidir. Doku homeostazisinin kaybedilmesi ve zarar görmesinden dakikalar sonra parankimal hücrelerden, hasarlanmış dokulardan veya kandan sitokinler ve kemokinler salınır (73).

### **2.6.2 Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)**

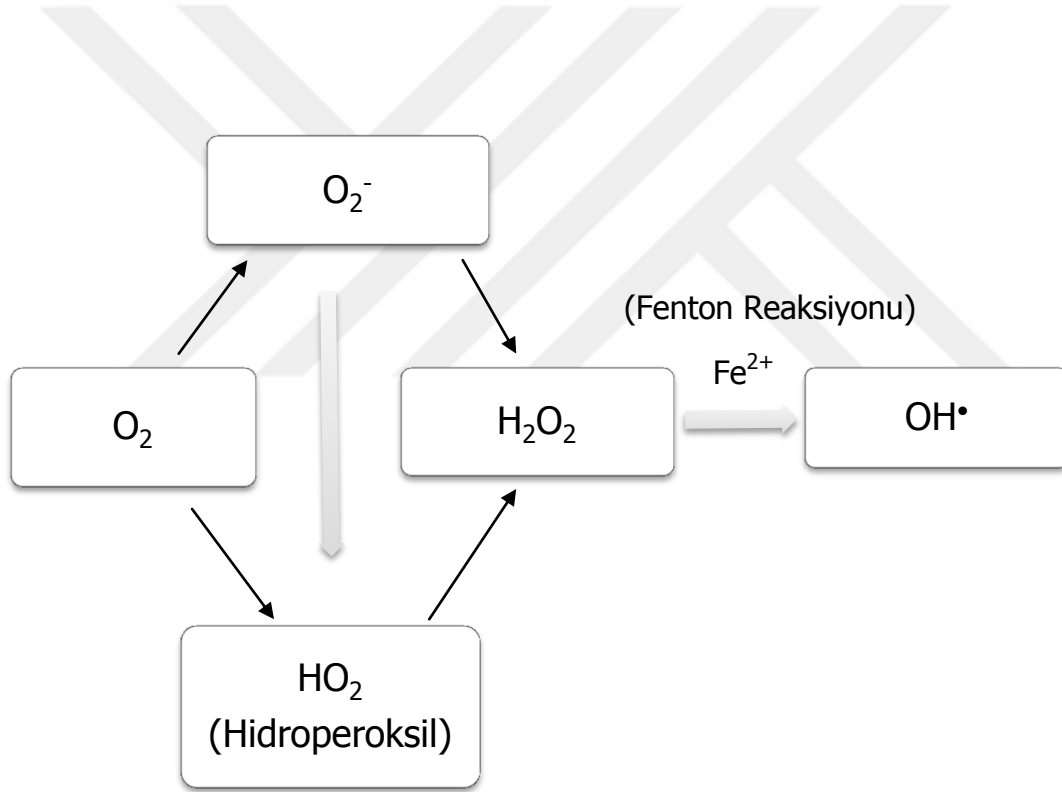
İnflamasyon patofizyolojik olarak; oksidan ve antioksidanlar arasındaki homeostazın bozulmasına yol açarak oksidatif stres oluşumuna neden olur (74, 75).

Serbest radikaller, bir atom veya molekülün eşlenmemiş elektron veya elektronlara sahip olması şeklinde tanımlanır.  $O_2$  ise, iki eşlenmemiş paralel spin durumlu elektronu olan bir radikaldir (76).

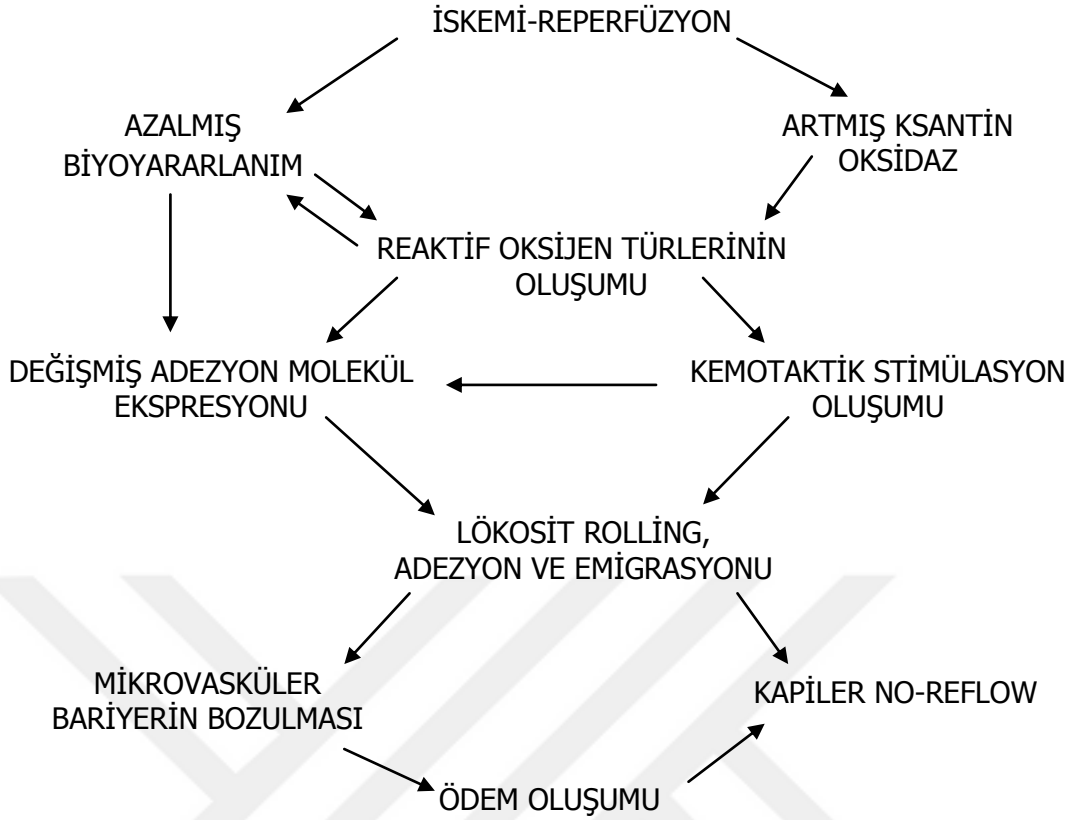
Memeli doku ve hücrelerinde, moleküler oksijene elektron ilavesi ve bazı enzimlerin reaksiyona girmesi sonucu serbest oksijen radikalleri (süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil) açığa çıkar (74, 76).

Oksijen molekülüne bir elektronun katılmasıyla birlikte süperoksit ( $O_2^-$ ) radikali açığa çıkar. Böylelikle oksidan hasarı meydana gelir. Meydana gelen bu hasara cevap olarak serbest radikal hasarına karşı koruyucu özelliğe sahip antioksidan bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) ortamda artar. Böylelikle SOD aracılığı ile, süperoksit

radikali hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )'e indirgenir. Hidrojen peroksit eşlenmemiş elektron içermez yani tek başına bir radikal değildir. Ancak geçiş metalleri ile etkileşip Fenton reaksiyonuna uğrarsa oldukça reaktif, az seçici ve sitotoksik olan hidroksil ( $OH^\bullet$ ) radikaline dönüşür (Şekil 8). Bu üç serbest radikal; hücre zarı hasarı, permeabilizasyon, DNA mutasyonu ve işlevsiz protein oluşumu süreçlerinde önemli rol oynarlar. Serbest radikaller arasında en hasarlayıcı etkiye sahip olan, büyük molekül yapısı ve elektronegativitesi ile hidroksildir. İskemi sürecinde ise, SOR üretimine esasen süperoksit ve hidrojen peroksit radikalleri katılarak iskemi hasarı nedenleri arasındaki yerlerini alırlar (45, 58, 76). İ-R hasarının nedenleri arasında yer alan akut inflamasyon yanıtındaki SOR'nin rolü Şekil 9'da şematize edilmiştir.



Şekil 8. Oksijen molekülünden serbest radikal oluşumu.

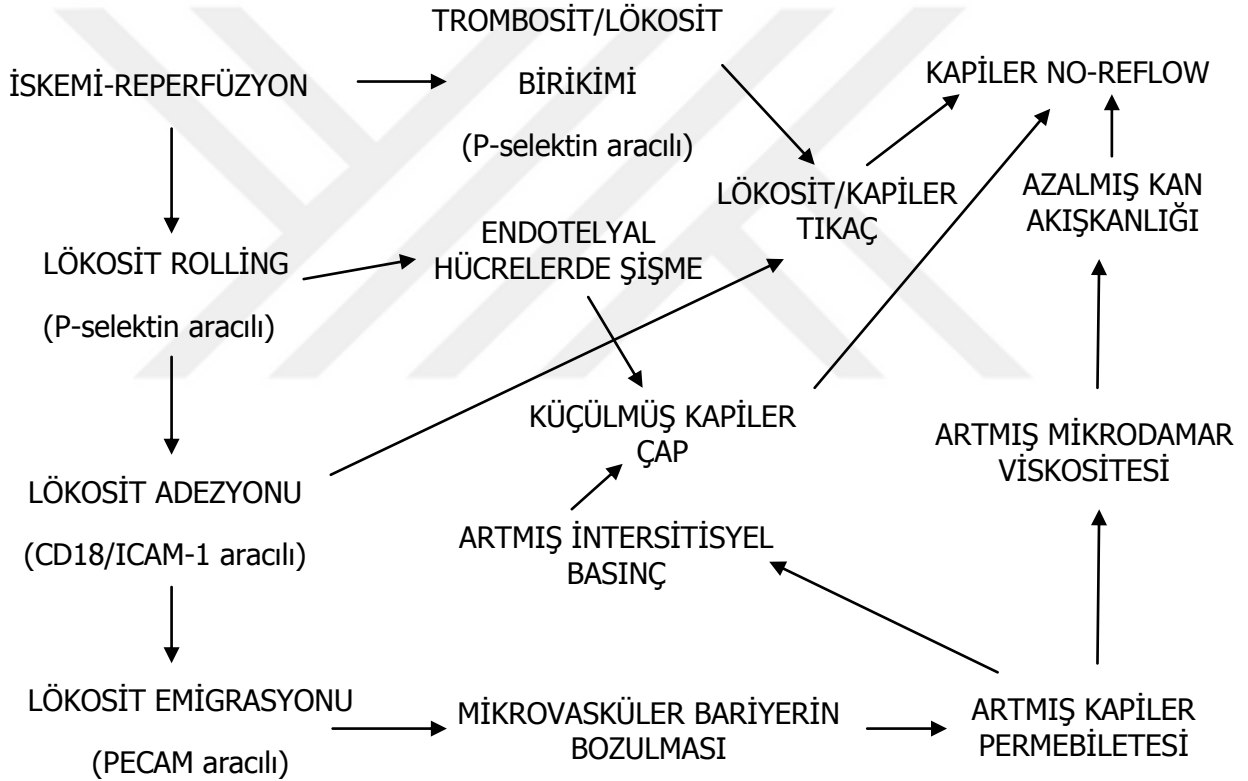


Şekil 9. SOR'nin iskemi-reperfüzyona bağlı oluşan akut inflamatuvar yanıtındaki rolleri (66).

### 2.6.3 Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL)

Reperfüzyon süreciyle; PMNL'lerin adezyon molekülleri aracılığıyla aktive edilmesi ile birlikte lökosit aktivasyonu, lökosit endotel hücre adezyonu, kemotaksis ve transmigrasyon meydana gelir (57, 77). Adezyon moleküllerinin üç familyasından biri olarak bilinen selektin familyasındaki üç üyeden (P-, L- ve E- selektin) P- ve E-selektinin endoteldeki salınımı, İ-R süreci ile birlikte artar ve PMNL'lerde mevcut olan P-selektin glikoprotein 1 (PSGL-1) adlı reseptör ile etkileşir. Bu etkileşim sonucunda düşük afiniteli lökosit endotel bağlantısı oluşur buna ayrıca 'Lökosit Rolling' de denir (78-80). Bir sonraki süreçte ise lökosit beta<sub>2</sub> integrinler (CD11a/CD18 ve

CD11b/CD18) ile endoteldeki interselüler adezyon molekülü 1 (İCAM-1) arasındaki sıkı bir etkileşim meydana gelir ve bu etkileşim sonucunda lökosit adezyonu ve agregasyonu gelişir. Bu olayın ardından intersitisyel lökosit transmigrasyonu, trombosit-endotel hücre adezyon molekülü 1 (PECAM-1) ile endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim ile gerçekleştirilir. Damar dışına çıkan aktive olmuş lökositler toksik SOR salınımı yaparlar, hasarlı bölgeye göç ederler (kemotaksis). Bunun sonucu olarak artmış mikrovasküler permeabilite ile birlikte tromboz, ödem ve parankimal hücre ölümü gözlenir (Şekil 10) (66, 79, 81, 82).



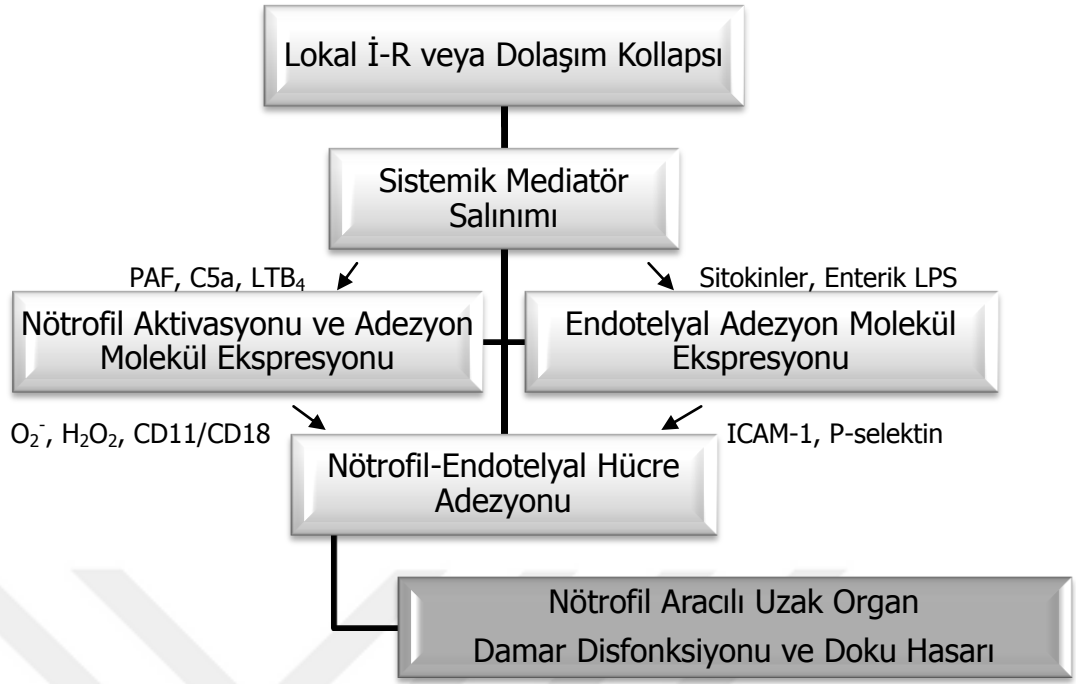
Şekil 10. Postiskemik iskelet kasında kan akımının yeniden sağlanmaması durumunda postkapiler venüllerde lökosit adezyonunun rolü (66).

Ekstravasküler kompartmana PMNL birikimi ile hipoksik dokudan interlökin 8 (İL-8) salınımını kolaylaştırır. Bu durum nötrofillerin kemotaktik eğilimle doğrudan

intravasküler alandan hipoksik intersitisyuma geçişini sağlar (79).  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  SOR'nin üretimini sağladığı bilinen nötrofillerin aracılığında reperfüzyon süreciyle başlayan hasarlanma, iskemik süreçte aktive edilmiş endotelial hücrelerin başlattığı moleküler sinyallere göre daha ağırdır (1, 83).

Nötrofil aracılı reperfüzyon hasarı histolojik olarak; kontraksiyon bandı oluşumu fenomeni ile hücre zarının rüptürü sonucu hücre içeriğinin dışarıya ani salınması ile karakterizedir. Bu tabloya hücre zarının rüptür nedenleri arasında yer alan yüksek reaktif olmuş aktif nötrofiller ve SOR sebep olmaktadır. SOR bu moleküllerin tepkime kapasitesi kadar sitotoksiktir. Sitotoksite sonucu endotelial hücrelerde, miyosit membran lipidlerinde ve nükleik asitlerde hasarlanma meydana gelir, bunun sonucu olarak ise; hücre fonksiyon kaybı, ödem ve hücre ölümü gerçekleşir (84, 85).

PMNL'lerden olan nötrofil, uzak organ hasarında aktif rol oynar. Postiskemik dokularda inflamatuvar mediatörler oluşur ve bu mediatörler dolaşımdaki nötrofilleri kendilerine çekerler ya da aktive ederler. Bu da İ-R sonrası sistemik nötrofil aktivasyonuna sebep olarak lökosit ve endotelial hücre adezyon molekülü salınımının artmasına sebep olur ve nötrofil-endotelial hücre adezyonu gerçekleşir. Nötrofil-endotelial hücre adezyonu ise damar disfonksiyonuna, doku hasarına ve nötrofil aracılı uzak organ hasarına sebep olur. Nötrofil aracılı uzak organ hasarı Şekil 11'de şematize edilmiştir (1).



Şekil 11. Lokal İ-R hasarına bağlı gelişen uzak organ hasarının oluşum şeması.

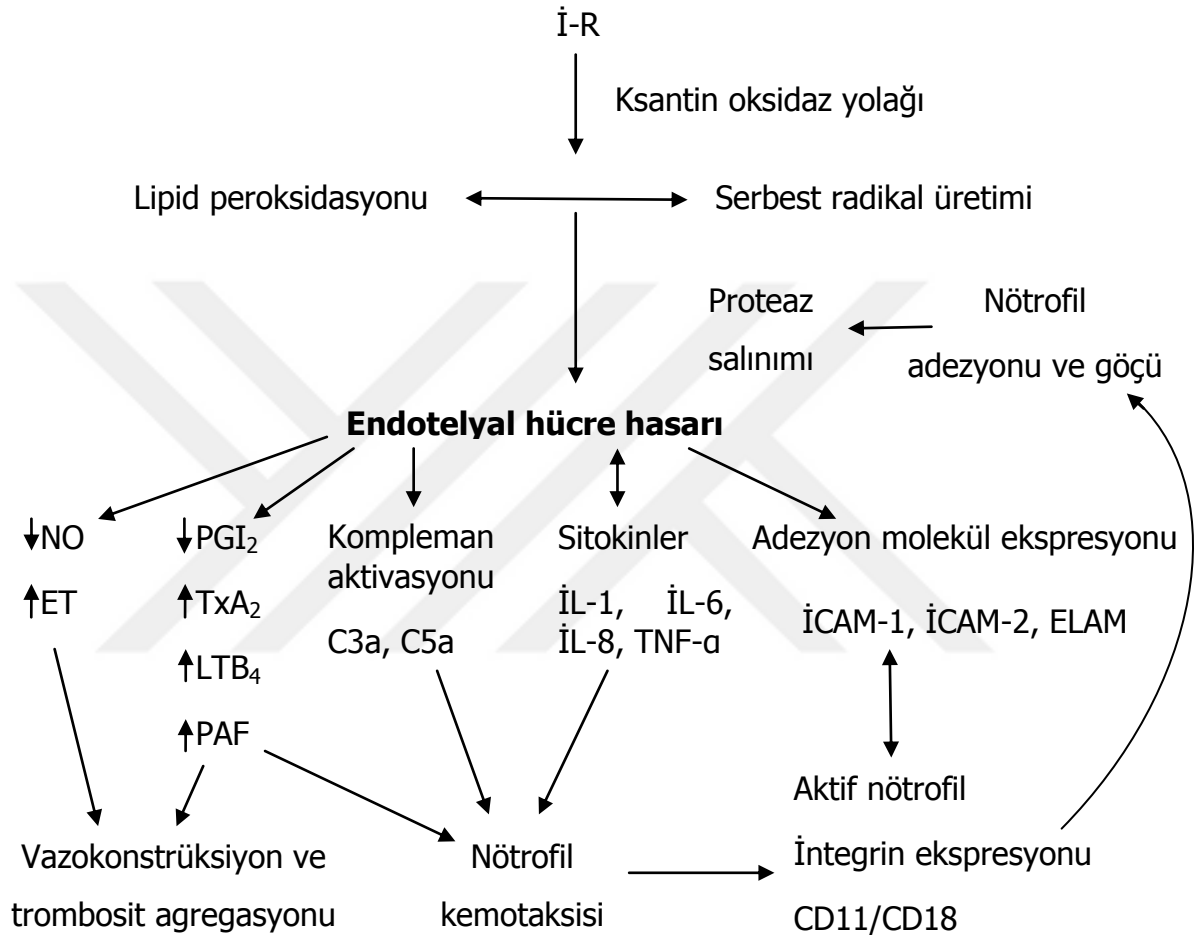
#### 2.6.4 Endotel Hücreler

İ-R hasarı oluşum mekanizmasında önemli bir yere sahip olan endotel hücrelerinde, oksidatif stresle birlikte hücre aktivasyonunda ve işlevlerinde bozulma meydana gelir. Ayrıca endotel hücreleri SOR kaynağı olarak da bilinirler. Mikrovasküler homeostaz dengesinin sağlanmasından sorumlu olan endotelin (ET)-1 ve nitrik oksit (NO) için üretim kaynağıdır. İ-R prosesinde ET/NO oranı ET yönünde artar ve böylelikle venlerde dilatasyon, arteriyellerde ise vazokonstriksiyon meydana gelir (86).

Başka bir açıdan bakacak olursak İ-R sürecinde, ksantin oksidaz yolağıyla üretilen SOR ile lipid peoksidasyon meydana gelir bu da endotel hücre hasarına



sebepler. Endotel hasarı gerçekleştiğinde metabolizma buna vazokonstriksiyon, trombosit agregasyonu, n6trofil kemotaksisi ve endotel h6cre adezyonu ile karşılık verir. Dokulara n6trofil g6u, SOR ve proteaz salınımının ardından ileri doku hasarı meydana gelir (şekil 12) (61).



şekil 12. İ-R hasarında endotelial h6crelerin rolü. NO; nitrik oksit, PGI<sub>2</sub>; prostasiklin, TxA<sub>2</sub>; tromboksan A<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>; lökotrien B<sub>4</sub>, PAF; trombosit aktive edici faktör, İL; inrelökin, TNF; tümör nekrozis faktör, İCAM; interselüler adezyon molekölü, ELAM; endotelial lökosit adezyon molekölü.

## 2.6.5 Sitokinler

Sitokinler; iyileşme, hücre büyümesi ve lokal/sistemik inflamatuvar yanıt gibi prosesleri düzenleyen çeşitli hücre tipleri tarafından salgılanan polipeptidlerdir (87). Uyarıldıklarında bazal miktarlarda mikroçevreleri ile kısıtlı olarak salınırlar ve salındıkları yerde parakrin etki gösterirler. Küçük miktarlarda dolaşıma karışmaları homeostazi etkilemez. Tedavi amacıyla vücuda enjekte edildiklerinde faydalarından ziyade toksik etkileri görülür. Birçok sitokin pro-inflamatuvar etki gösterir ve hasarlanmaya cevap olarak nötrofiller, makrofajlar ve endotelial hücrelerce salınırlar. İ-R süresince salınımları artar ve bu süreç boyunca PMNL'ler üzerine kemotaktik, endotelial reseptör ekspresyon düzeyi üzerine ise artırıcı etkileri vardır (88-90).

İ-R hasarı söz konusu ise hasarın oluşmasına etki eden katabolik sitokinler; TNF- $\alpha$ , İL-1 $\beta$ , İL-6, İL-8 ve İFN- $\gamma$ 'dır. İnflamasyon alanında nötrofil agregasyonu interselüler adezyon için belirleyicidir, invitro olarak kemotaktik uyarılmış nötrofil-miyosit adezyonunun oluşması için miyositlerin sitokinlerce (TNF- $\alpha$ , İL-1 $\beta$  ve İL-6) uyarılmış olması gerekmektedir. TNF- $\alpha$ , İL-1 $\beta$  ve İL-6 öncelikli olarak aktif makrofajlarca üretilirler ve bu sitokinler miyositlerde İCAM-1 sentezini ve yüzey alandaki ekspresyonunu indüklerler. İCAM-1 ise nötrofillerin miyositlere hızlıca ve lokalize adezyonunu sağlar. SOR üretimini sağlayan kemotaktik olarak uyarılmış nötrofillerin ise, bu üretimi gerçekleştirebilmeleri nötrofil-miyosit adezyonuna bağlıdır. Benzer şekilde TNF- $\alpha$  ve İL-1 $\beta$ 'nin endotelial hücre yüzeyinde de İCAM-1 ekspresyonunu indüklerler. TNF- $\alpha$ , İL-1 $\beta$  ve İL-6'nın protein kaybında önemli rol oynadıkları bilinmekle birlikte İL-1 $\beta$  ve İL-6'nın iskelet kasındaki bu etkilerinin mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır. Kas katabolizmasını stimüle eden sitokinler arasında hücrel mekanizmaları en iyi anlaşılan TNF- $\alpha$ 'dır. (90-93).

TNF- $\alpha$  : TNF- $\alpha$ , 17 kDa multiptent bir sitokindir. İR hasarı, infeksiyöz hastalıklar, aşırı duyarlılık ve anjiyogenez gibi durumlarda önemli biyolojik role sahiptir (94).

İnflamasyon durumunda direkt olarak vasküler endotelyuma, miyositlerde lökosit adezyonuna etki eder. TNF- $\alpha$  endotelial NO salınımını deprese eder, ve böylece mikrovasküler homeostazı bozarak venlerde dilatasyon arterlerde ise vazokonstriksiyona sebep olur. Farklı kas tipleri üzerinde intraselüler oksidan aktivitesi, nükleer faktör -kappa B (NF- $\kappa$ B)'nin ve mitojenle etkileşen protein kinazları (MAPKs)'nin aktivasyonu, artan ubiquitin konjugasyonu gibi etkileri vardır. Bu etkiler net kas protein kaybına neden olur. TNF- $\alpha$ 'ya taşıdığı bu özellikler nedeniyle katabolik sitokinlerin prototipi diyebiliriz. Ayrıca iskemik dokudaki varlığı ile kemokin sentezini sitümüle eder. (77, 90, 93, 95, 96).

İL-1 $\beta$ : Temel olarak inflamasyon sürecini regüle eden multifonksiyonel bir sitokindir. Makrofajlara ek olarak doğal katil hücreler ve B lenfositlerce de üretilmekle birlikte, lokal inflamasyon durumlarında da hasarlanan dokuda üretilir. Fibroblast büyümesi, İCAM-1 ekspresyonu ve B- ve T- hücrelerinin olgunlaşması ve farklılaşmasında önemli rol oynar. Enfeksiyon sonucu ortaya çıkan akut semptomlardan ateşin başlamasına aracılık eder. Öncelikle sitokin gibi davranır, inflamasyon durumunda ateşe ve prostaglandin oluşumunda artışa neden olur ve ayrıca İ-R hasarında önemli rol oynayan nötrofil kemotaksisini uyarır (91, 92, 97, 98).

Karaciğer İ-R modeli uygulanan bir çalışma sonucu elde edilen bulgulara göre, İL-1 sinyalizasyonu sonucu azalmış kemokin upregülasyonu ve zayıflamış nötrofil infiltrasyonu gözlenmiştir (99).

İL-6: İnsanlarda beşinci farelerde 7. kromozoma lokalize olmuş 28 kDa tek zincirli protein olan pluripotent bir sitokindir. İlk olarak fibroblastlarca üretildiği gösterilmiştir sonrasında epitel hücreler ve aktif bazı T hücrelerince de üretildiği saptanmıştır. Biyolojik fonksiyonlar açısından oldukça geniş bir yelpazeye sahip olmakla birlikte, B-hücrelerinin farklılaşması ve akut faz inflamasyon yanıtta önemli bir rol oynar. İskemi döneminde hipoksiye maruz kalan endotelial hücrelerde İL-6 salınımı artar, nükleer

analizler sonucu elde edilen verilere göre hipoksik dönemde İL-6 salınımı normoksik döneme göre 8 kat fazladır (92, 96, 98, 100).

***Kemokinler:*** İnflamatuvar yanıt prosesinde lökositlerin hasara ilişkin dokulara yerleşimi oldukça önemlidir. Lökositlerin göçü, kemotaktik sitokinler olarak da bilinen kemokinler tarafından kontrol edilir. Kemokinler, homeostaz ve inflamasyon olaylarında kök hücrelere ve lökositlere kemotaksi yaptıran sitokinlerdir. Lökosit göçünün yanı sıra lökosit degranülasyonu ve anjiyogenez proseslerine de katılırlar ve ayrıca SOR üretiminin artmasına neden olurlar. Kemokin sekresyonunu artıran başlıca uyarıcı, erken proinflamatuvar sitokinlerdir. İnflamatuvar yanıt boyunca sekresyonları artmakla birlikte birçok dokuda varlığı tespit edilmiştir (77, 101).

### **2.6.6 Komplemanın Rolü**

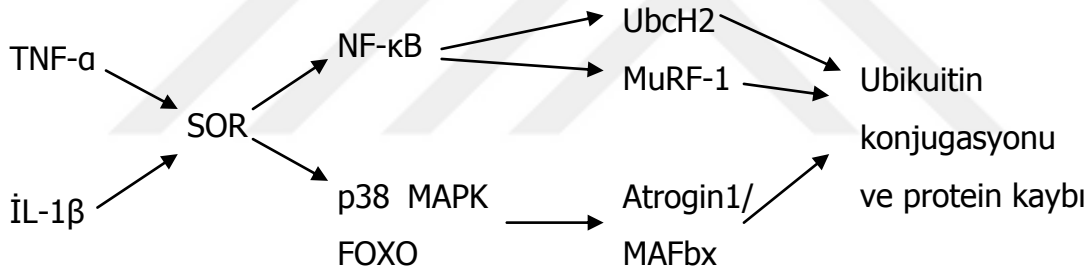
Kompleman sistemi, birçoğu enzim aktivasyon kaskadlarıyla etkileşim halinde olan otuzdan fazla plazma ve hücre zarı proteininden oluşmaktadır. Komplement sistemi üç yolla (klasik, alternatif ve lektin yolu) aktive olur. Komplement sistemin aktivasyonu ile birlikte proinflamatuvar komponentler (C3a, C5a, iC3b C5b-9) açığa çıkar. Açığa çıkan komponentlerden C3a ve C5a lökositleri aktive eder, anaflatoksinlerdir. C5a komponenti kemotaksis ve lökosit aktivasyonu uyarımının yanı sıra proinflamatuvar sitokinlerden TNF- $\alpha$ , İL-1 ve İL-6 üretimini de şiddetlendirir.

Kompleman sistemi aracılığı ile üretimi uyarılan lökosit adezyon molekülleri şunlardır;

- E-selektin
- P-selektin
- Vasküler hücre adezyon molekülü 1 (VCAM-1)
- İnterselüler adezyon molekülü 1 (İCAM-1) (58, 102).

### 2.6.7 Muscle RING-finger protein-1 (MuRF-1)

Kas proteinlerinin, özellikle de miyofibril proteinlerinin ubikitin (Ub)-proteozom sistemi ve kalpain sistemi tarafından bozunabildiği düşünülmektedir. MuRF-1, ubikitinasyonda görevli ubikitin ligaz (E3) enzim ailesinin bir üyesidir. NF-κB aktivasyonu, hareketsizlik, açlık ve denervasyon gibi durumlarda gerçekleşir ve kasta MuRF-1 ve MAFbx/Atrogin-1'in ekspresyonunda artışa yol açar. Öte yandan NF-κB aktivasyonuna yol açan nedenlerden birisi de SOR'dur. Bu nedenle SOR, NF-κB ve adı geçen E3 ligazlar arasında bir ilişkiden söz edilebilir (Şekil 13) (93). Nicolas A. Dumont ile Jérôme Frenette'nin 2013 yılında yaptığı deneysel bir hayvan çalışmasına (103) göre, atrofiye iskelet kasında MuRF-1 düzeyi yüksek bulunmuştur.



Şekil 13. Sitokinler ile uyarılmış kas dokuda meydana gelen, ubikitin konjugasyonu ve protein kaybı ile sonuçlanan SOR aracılı olaylar.

### 2.6.8 Lipid Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA)

Poliansatüre yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri ile etkileşmesi lipid peroksidasyonuna neden olur. Hücre zarı yağ asitleri ve kolesterolün doymamış bağları serbest oksijen radikalleri ile kolayca reaksiyona girer ve peroksidasyona uğrar, bu da hücre fonksiyon ve yapısını bozar. Lipid peroksidasyonunu stimüle eden başlıca

serbest oksijen radikali HO•'dur. İ-R süreci ile birlikte açığa çıkan serbest oksijen radikalleri hücre zarından doymamış yağ asitlerin metilenik karbonlarından hidrojen atomunu çıkarır ve böylece lipid peroksidasyonu meydana gelir. Lipid peroksidasyonunun ana katabolik ürünü malondialdeit (MDA)'dir. İ-R hasar seviyesi değerlendirilirken, serum veya dokudaki MDA düzeyi kullanılır. Bu düzey, MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi ile oluşan kimyasal ürünün ölçülmesi ile kantitatif olarak belirlenir. Hasarın düzeyi bu ölçüme göre yorumlanır (104, 105).

## 2.7 Antioksidanlar

Canlı metabolizmasında pro-oksidan/antioksidan dengesi sağlıklı yaşam sürdürebilmek için elzemdir. İ-R sürecinde ise bu denge bozulur ve oluşan SOR'nin oluşturduğu hasar hücrede koruyucu enzimlerle engellenmeye çalışılır. Ancak metabolizmada doğal olarak var olan antioksidanlar yetersiz kalır ve hücre homeostazı antioksidanlar aleyhine değişir. Bunun sonucunda ise doku hasarı meydana gelir (106). SOR oluşumu ve beraberinde oluşturdukları hasarı önlemek ve detoksifikasyonu sağlayıp metabolizmayı koruyan 'antioksidan savunma sistemi' dört şekilde etki eder.

1. İnaktif forma dönüştürücü etki; SOR ile etkileşime girip bir hidrojen aktarıp aktivitelerini azaltma yoluyla. Flavanoidler ve vitaminler bu yolla etki ederler.
2. Onarıcı etki; SOR'un meydana getirdiği hasarlanmanın giderilmesi yoluyla.
3. Zincir kırıcı etki; SOR'ları bağlayarak zincirlerini kırıp aktivasyonlarını engelleme yoluyla. Mineraller, hemoglobin ve seruloplazmin bu yolla etki ederler.

4. Süpürücü etki; SOR'ları tutma ve yok etme yoluyla. Küçük moleküller ve antioksidan enzimler bu yolla etki ederler.

Birçok maddenin antioksidan özelliği, endojen veya eksojen kaynaklı oluşu ve antioksidan etkinlikleri çeşitli İ-R deney modelleri ile test edilerek kanıtlanmıştır.

### **2.7.1 Endojen Kaynaklı Antioksidanlar**

Enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere ikiye ayrılırlar.

1. *Enzim olan endojen antioksidanlar:* Katalaz, hidroperoksidaz, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi.
2. *Enzim olmayan endojen antioksidanlar:* Melatonin, albümin, urat, ferritin, seruloplazmin, miyogloblin, laktoferrin, transferin, metiyonin, bilirubin, sistein, glutatyon ve hemogloblin.

### **2.7.2 Eksojen kaynaklı antioksidanlar**

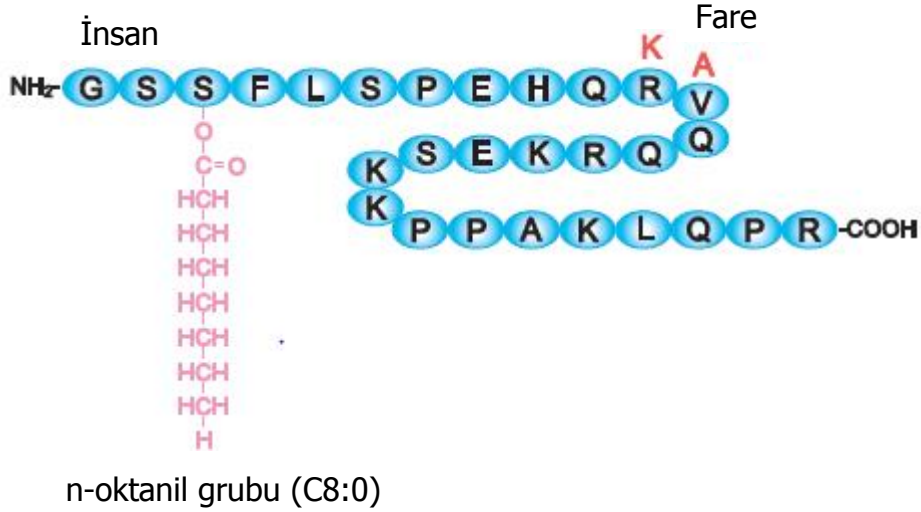
1. *Vitamin eksojen antioksidanlar:*  $\beta$ -karoten, folik asit (folat), askorbik asit (C vitamini),  $\alpha$ -tokoferol (E vitamini).
2. *İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar:*
  - Rekombinant süperoksit dismutaz
  - Nötrofil adezyon inhibitörleri
  - Barbitüratlar
  - Sitokinler (TNF- $\alpha$ , İL-1)
  - Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)

- Ksantin oksidaz inhibitörleri (okspürinol, tungsten, allopürinol, pterin aldehit)
- Trolox-C (E vitamini analogu)
- Demir şelatörleri
- Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)
- NADPH oksidaz inhibitörleri (lokal anestezikler, nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlar, kalsiyum kanal blokerleri, adenozin)
- Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein) (58).

## 2.8 Ghrelin

Ghrelin, Kojima ve ark. tarafından sıçanlar üzerinde yapılan çalışma sonucu 1999 yılında keşfedilmiştir (11). Ghrelin (ön hint-avrupa dilleri ailesinde 'büyüme' anlamına gelen "*ghre*" sözcüğünden türetilmiştir) en çok mide fundusundan salınan, 28 aminoasitten oluşan bir peptid hormondur (11, 107, 108). Büyüme hormonu salınım reseptörünün doğal endojen ligandı olarak tanımlanan bu peptid, fare ve insanda 28 rezidüsünden ikisinde gözlenen farklılık (insan ghrelininde 11 numaralı lizinin yerini fare ghrelininde arjinin, 122 numaralı alaninin yerini fare ghrelininde valin almıştır) ile birbirinden ayırt edilmektedir (108, 109). Hem fare hem de insan ghrelinindeki 3 numaralı serine, bir oktanil açıl ile reaksiyona girer, bu reaksiyon sonucu vücuttaki ghrelin aktif hale geçer (Şekil 14) (110).



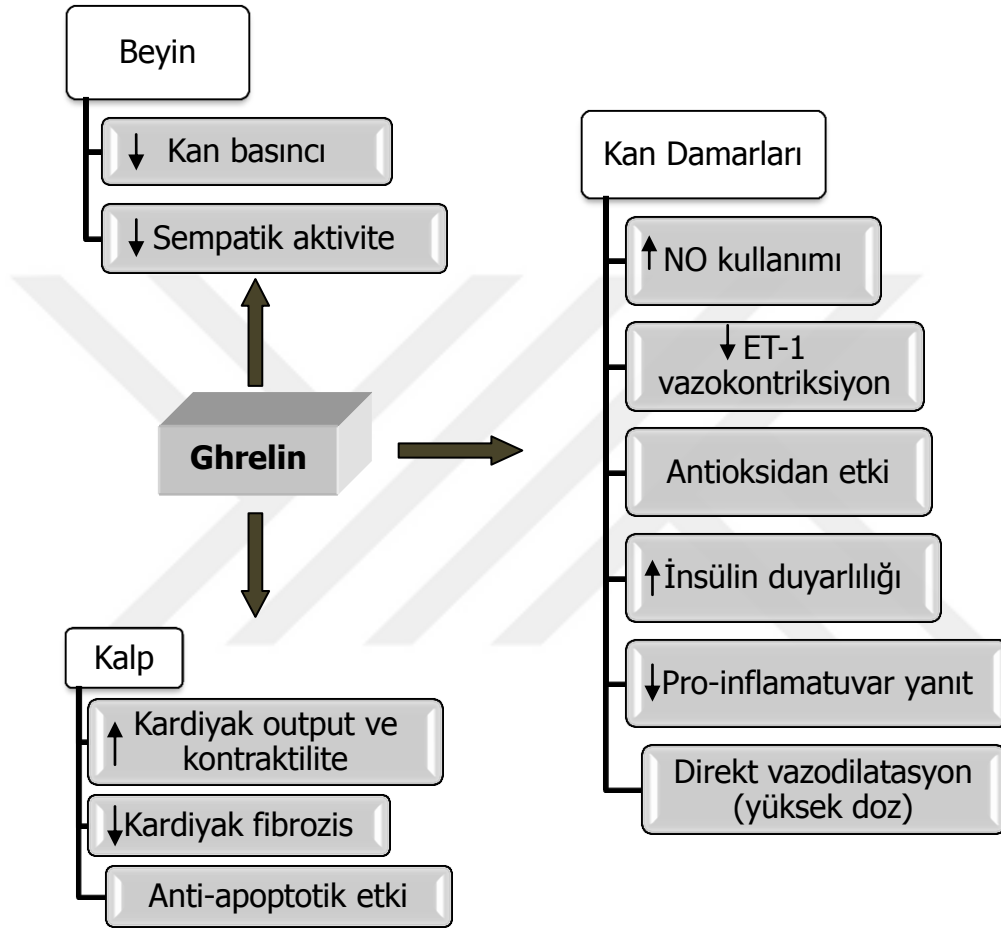


Şekil 14. Fare ve insan ghrelininin yapısı (110).

Ghrelin, insanların gastrik mukozal hücrelerinin %20'sini oluşturan fundus mukazasının endokrin X/A benzeri hücreleri tarafından sentezlenir ve yarılanma ömrü yaklaşık 10-30 dakikadır (109, 111). Vücutta aktif ve inaktif olmak üzere iki formu vardır. Aktifleşmesi için yağ asidine ihtiyaç duyar. Dolayışındaki ghrelinin %90'undan fazlasını des-açil (inaktif form) ghrelin, %10'undan daha azını ise açillenmiş (aktif form) ghrelin oluşturmaktadır (109, 112). Gnanapavan S. ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptığı çalışmada (113) mRNA seviyesine göre en yüksek ghrelin dağılımı mide fundusu'nda olmakla birlikte; sırasıyla jejunum, duodenum, midenin antrumu ve akciğer dokularında da kayda değer oranda yüksek bulunmuştur. Ayrıca yine aynı çalışmada eser miktarlarda da olsa ghrelin varlığı çoktan aza doğru sırasıyla; pankreas dokusu, venöz sistem, safra kesesi, lenf nodu, özefagus, sol kolon, yanak, hipofiz, meme, böbrek, ovaryum, prostat, sağ kolon, ileum, karaciğer, dalak, fallop tüpü, lenfositler, testis, yağ dokusu, plasenta, adrenal bez, iskelet kası, mesane, kalbin atriyumu, tiroid, myokardiyum ve deride tespit edilmiştir.

Ghrelinin antinosiseptif ve anti-inflamatuvar etkisi vardır. Ghrelinin gözlenen anti-inflamatuvar etkisi pro-inflamatuvar sitokinler olan TNF- $\alpha$  ve İL-1 $\beta$ 'nin salınımını azaltması ile ortaya çıkmıştır (16). Ghrelinin kardiyovasküler sistem kontrolünde de bir takım biyolojik etkileri vardır. Bu etkiler beyin düzeyinde kan basıncında ve sempatik sinir aktivitesinde düşüş olarak gözlenirken kalpte kardiyak output ve

kasılmada artış, kardiyak fibrozisde düşüş ve ayrıca apoptoz inhibisyonu olarak görülür. Bunlara ek olarak ghrelin, vasküler sistemi çeşitli patogeneze mekanizmaları inhibe ederek aterosklerotik süreçten korur (Şekil 15) (114).



Şekil 15. Ghrelinin kardiyovasküler sistem kontrolü üzerine biyolojik etkileri.

Şen LS ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı çalışmaya (115) göre ileal İ-R modeli uygulanan sıçanların, hedef organ olarak ileumlarında ve uzak organ olarak akciğerlerinde ghrelinin koruyucu etki gösterdiği öne sürülmüştür. 2014 yılında Yan Qin ve arkadaşlarının fareler üzerinde karaciğer iskemi reperfüzyon modeli uyguladığı çalışmasında da (25) ghrelinin koruyucu etkikisi olduğu gösterilmiştir.

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1 Araştırmanın Tipi**

Çalışma deneysel nitelikte bir *in vivo* araştırmadır.

#### **3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı**

Dokuz Eylül Üniversitesi (DEÜ) Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi, DEÜ Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, DEÜ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve DEÜ Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nda Ocak 2012-Temmuz 2015 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

#### **3.3 Çalışma Grupları**

Çalışma deney hayvanlarından fare üzerinde gerçekleştirilmiş olup, insan üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Deney prosedüründe kullanılacak C57BL/6 suşu erkek fareler, canlı ağırlıklarının 22-35 g aralığında olması gözetilerek üretim kafeslerinden rastgele seçildi ve barındırma kafeslerine aktarıldı. Denek seçimi esnasında yan tutmanın önüne geçebilmek için, deneklerin ikişerli ve üçerli gruplar halinde bulunduğu barındırma kafesleri numaralandırılarak etiketlendi. Fareler, kafes etiket numaralarının bulunduğu bir torbadan kura çekilerek, başka bir işaretleme olmaksızın seçildi.

Seçilen 56 fare dört ana grup olmak üzere toplamda sekiz gruba ayrıldı. Grup adlandırması ve gruplara göre yapılan işlemler Tablo 2'deki gibidir;

Tablo 2: Çalışma grupları ve grupların tanımı.

|  |   |
|--|---|
| <b>Sham</b><br><b>(Sham kontrol)</b><br><b>(Sham+SF)</b>     | Bu gruptaki deneklere herhangi bir işlem yapılmadı, sadece İ-R süresince anestezi altında bekletildi ve süreç sonunda yaşamları sonlandırılıp dokuları toplandı (n=7).  |
| <b>İR</b><br><b>(Pozitif kontrol)</b><br><b>(İ-R+SF)</b>     | Bu gruptaki deneklerin alt ekstremitesinde bilateral İ-R oluşturuldu ve reperfüzyon süreci sonunda yaşamları sonlandırılıp dokuları toplandı (n=7).   |
| <b>G+İR</b><br><b>(Deney grubu)</b><br><b>(Ghreltin+İ-R)</b> | <p>Bu gruptaki deneklere ghreltinin üç dozu (10, 30, 100 µg/kg) iskemiden 30 dk önce ip yolla enjekte edildi ve ghreltin enjeksiyonundan 30 dakika sonra alt ekstremitelerinde bilateral İ-R oluşturuldu (n=21).</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>G10+İR:</b> İskemiden 30 dk önce 10 µg/kg ghreltin verilen grup (n=7).</li><li>• <b>G30+İR:</b> İskemiden 30 dk önce 30 µg/kg ghreltin verilen grup (n=7).</li><li>• <b>G100+İR:</b> İskemiden 30 dk önce 100 µg/kg ghreltin verilen grup (n=7).</li></ul> <p>Reperfüzyon süreci sonunda yaşamları sonlandırılıp dokuları toplandı.</p> |
| <b>İR+G</b><br><b>(Deney grubu)</b><br><b>(İ-R+Ghreltin)</b> | Bu gruptaki deneklerin alt ekstremitelerinde bilateral İ-R oluşturuldu ve ghreltinin üç dozu (10, 30, 100 µg/kg) reperfüzyon başlangıcında ip yolla enjekte edildi (n=21).  |

|  |  |
|--|--|
|  | <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>İR+G10:</b> Reperfüzyon başlangıcında 10 µg/kg ghrelin verilen grup (n=7).</li><li>• <b>İR+G30:</b> Reperfüzyon başlangıcında 30 µg/kg ghrelin verilen grup (n=7).</li><li>• <b>İR+G100:</b> Reperfüzyon başlangıcında 100 µg/kg ghrelin verilen grup (n=7).</li></ul> <p>Reperfüzyon süreci sonunda yaşamları sonlandırılıp dokuları toplandı.</p> |
|--|--|

### 3.4 Çalışma Materyali

Bu araştırma projesinde 10-12 haftalık, 22-35 g ağırlığında 56 adet yetişkin C57BL/6 suşu erkek fare kullanılmıştır. Sorumlu veteriner hekimler olarak, bu suşun çoğaltılmasından kullanım aşamasına kadar olan süreç, Prof. Dr. M. Ensari GÜNELİ ve Arş. Gör. Gonca KAMACI tarafından yönetilip denetlenmiştir. Tüm denekler, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'ndeki mevcut optimal koşullarda (12 saat gündüz/ 12 saat gece periyodu, 20-24°C çevre sıcaklığı, %50-60 rölatif nem oranı) barındırılmış ve kemirgenlere özgü standart yem-su ile *ad libitum* olarak beslenmiştir. Deneyi planlarken ve uygularken William Russell and Rex Burch'ın dünyaca kabul görmüş 3R (Replacement: Laboratuvar hayvanı kullanımı yerine alternatif materyal kullanma. Reduction: Laboratuvar hayvanı kullanımının azaltılması. Refinement: Deney süreci ve sonunda laboratuvar hayvanlarının refahının gözetilmesi.) kuralı prensip alınmıştır (116). Araştırmaya başlamadan önce deney hayvanı kullanımı için Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik onay alınmıştır (Protokol No: 42/2011).

Çalışma materyali olarak; deneklerden toplanan örnek materyaller (kan, böbrek, akciğer, gastrokinemius kası) DEÜ Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları'na ısı yalıtımlı kapların içindeki buzun üstünde bulunan mikrosantrifüj tüpleri içinde, DEÜ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'na içinde %10'luk formaldehit solüsyonu bulunan doku kaplarında, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'na ise doku homejanatı eldesinden sonra ısı yalıtımlı kapların içindeki buzun üstünde bulunan mikrosantrifüj tüpleri içinde ulaştırılmıştır.

### **3.4.1 Fare Üretimi/Yetiştirilmesi, Bakımı ve Kullanımı**

Temelde, T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın belirlediği sınırlar ve ölçütler esas alınarak hayvanların üretimi, bakımı ve barındırılması gerçekleştirildi. Bu çalışmada kullanılmak üzere, 56 adet C57BL/6 suşu erkek fare üretmek için, toplam üç yıl süren üretim aşamasında ki öncelik, mevcut yaşlı koloninin bakımı ve ıslahının ardından damızlık hayvanların seçimi oldu. Üretimin ilk üç ayında *vaginal smear* yöntemi ile seçilen dişi damızlıklar katıma alınıp ayrı bir koloni oluşturuldu. Seçilen damızlıklar Şekil 16'daki 369 x 156 x 132 mm ebatlarında ve zemin alanı 435 cm<sup>2</sup> olan 1145T kodlu (Tecniplast®) kafeslerde, iki dişi bir erkek olmak üzere poligami yetiştirme sistemi ile grup kimliklendirmesi yapılarak katıma alındı.



Şekil 16. Katım kafesi (1145T, Tecniplast®).

Ancak, kış aylarında bu yetiştirme sistemi uygulandığında yavru veriminde düşüş olduğu gözlemlendi. Bunun üzerine soğuk ve güneşiği şiddetinin değiştiği bu aylarda, damızlık hayvanların bir erkek beş dişi olmak üzere Şekil 17'deki 425 x 266 x 155 mm ebatlarında ve zemin alanı 820 cm<sup>2</sup> olan 1290D Eurostandard Type III kodlu (Tecniplast®) kafeslerde, harem yetiştirme sistemi ile katıma alınmasına karar verildi. Alınan bu karar neticesinde kış aylarında gözlenen yavru verimindeki düşüş sorununun azalma gözlemlendi.



Şekil 17. Barındırma kafesi (1290D, Tecniplast®).

Damızlık hayvanlardan oluşturulan katım grupları haftada en az iki kez kontrol edilip, kafeste tek gebe hayvan varsa Şekil 18'deki 267 x 207 x 140 mm ebatlarındaki zemin alanı 370 cm<sup>2</sup> olan 1264C Eurostandard Type II kodlu (Tecniplast®) kafeslerde bireysel, eğer birden fazla sayıda gebe hayvan varsa 1290D Eurostandard Type III kodlu (Tecniplast®) kafeslerde bireysel olarak ve grup kimliklendirmesi yapılarak yavruları ile birlikte süttten kesme yaşına (21 gün) kadar barındırıldı. Süttten kesme yaşı geldiğinde ise, yavrular cins ayrımı yapılarak kafeslendi. Bir kafesten elde edilen yavru sayısı üçten fazla ise 1290D Eurostandard Type III kodlu (Tecniplast®) kafeslere, üç veya üçten az ise 1145T kodlu (Tecniplast®) kafeslere grup kimliklendirmesi yapılarak alındı.



Şekil 18. Gebe barındırma kafesi (1264C, Tecniplast®).

Hayvanların üretimi ve yetiştirilmesi aşamasında kafes içi ortamı (mikroçevre) zenginleştirmek amacıyla kafes içine rulo karton ve/veya pamuk koyuldu. Kafeslerin bulunduğu konvansiyonel üretim ve barındırma odalarında (makroçevre) ise temizlik ve bakım süreçleri olabildiğince stres faktörlerinden arı gerçekleştirildi.

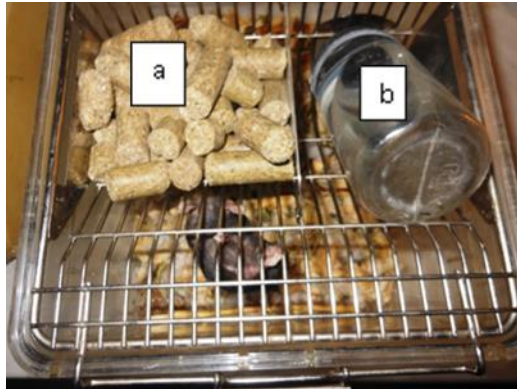
Hayvanlar, standart besleme prosedürüne uygun olan, yeme ve suya istedikleri zaman ulaşabildikleri ad libitum besleme sistemi (Şekil 19) ile beslendi.



Beslemede kullanılan yem ve su hakkında;

- Yem formu; 10 mm çapında standart kemirgen pelet yemi (Bil-Yem®).
- Yem içeriği; %23 ham protein, %8 ham kül, %7 ham selüloz, %3 ham yağ, %1,0-2,5 kalsiyum, %0,5-1 sodyum, %0,9 fosfor.
- Yem ambalajı; nem ve ışık geçirmez, 25 kg kapasiteli ambalaj.
- Yem depolama koşulları; DEÜ Deney Hayvanları Birimi'ne ait yem deposunda, tabanı paletler (iki taraflı, tek kademeli, düz, ters çevrilemeyen kirişli paletler) ile yükseltilmiş ve hava sirkülasyonunun olduğu, karanlık ve rölatif nemi kontrol edilen yem deposunda, oda tabanına temas etmeden muhafaza edildi.
- Su zellikleri; DEÜ Deney Hayvanları Birimi'nde barındırılan konvansiyonel hayvanlara verilen standart arıtılmış su verildi.

Katıma alınan damızlık hayvanlara, gebelere ve sütten kesilmiş ge hayvanlara, besin takviyesi amacıyla kafes zeminine bırakılan kuru yonca ve içme sularına karıştırlarak oral yolla multivitamin (Vitamin A, vit. B1, vit. B2 , vit. B6, Nikotinamid, D-Pantenol, vit. C, vit. D3, vit. E 5, Polivit Şurup, Abdi İbrahim®) verildi.



Şekil 19. Kemirgen ad libitum besleme sistemi. a; standart, kemirgenlere özgü sıkıştırılmış yem, b; arıtılmış standart su.

### 3.4.2 Deneklerin Deney Odasına Taşınması

Rastgele denek seçimi ve gruplandırılmaların ardından denekler DEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'ndeki üretim ünitesinden yine aynı birim bünyesindeki ve üretim ünitesiyle aynı katta bulunan kullanım ünitesine deney prosedürünün uygulanmasından bir hafta önce taşındı. Kullanım ünitesine taşınan denekler deney günü geldiğinde, deney prosedürü başlamadan bir saat önce deneyin yapıldığı ameliyathaneye alındı.

### 3.5 Araştırmanın Değişkenleri

*Bağımlı değişken:* Gastroknemius kası, böbrek ve akciğer dokularından elde edilen veriler.

*Bağımsız değişken:* Ghrelin'in 10 µg, 30 µg ve 100 µg'lık dozları.

### 3.6 Veri Toplama Araçları

#### 3.6.1 Kullanılan Cihazlar

Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar.

| Cihaz Adı                | Marka             | Model    |
|--------------------------|-------------------|----------|
| Lazer Doppler Akım Ölçer | Vasamedics        | Laserflo |
| Soğutmalı Santrifüj      | Heracus           | Biofuge  |
| Buz Makinesi             | Scotsman          | AF80     |
| Isıtmalı Çalkalayıcı     | Stuart            | S1500    |
| +4°C Buzdolabı           | Uğur              |          |
| -20°C Derin Dondurucu    | Uğur              |          |
| -80°C Derin Dondurucu    | Thermo Scientific | 705      |
| Ultra Saf Su Cihazı      | Millipore         | Milli Q  |

|                               |                 |                         |
|-------------------------------|-----------------|-------------------------|
| Vorteks                       | Biocote         | Stuart SA8              |
| Işık Mikroskobu               | Olympus         | CH-2                    |
| Hassas Terazi                 | Precisa         | XB220A                  |
| Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı | İkamag          |                         |
| Ph Metre                      | Selecta         | PH2005                  |
| HPLC                          | Shimadzu        | RF-10AXL                |
| Rotary Mikrotom               | Leica           | RM 2255                 |
| Etüv                          | Elektro-Mag     | M6040BP                 |
| Su Banyosu                    | Termofin        | -                       |
| Plak Okuyucu                  | BioTek          | Synergy HT              |
| Su Banyosu                    | Memmert         | -                       |
| Çevirici                      | Labnet          | C1301B                  |
| Elektroforez                  | Bio-rad         | Mini-Protean Tetra Cell |
| Protein Transfer Cihazı       | GenScript eBlot | L03010                  |
| Homojenizatör                 | Qiagen          | Tissuelyser II          |
| Blok Isıtıcı                  | Wise Thermo     | HB48                    |
| Film Banyo Cihazı             | AGFA            | CP1000                  |

### 3.6.2 Kullanılan Sarf Malzemeler

Tablo 4. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.

| Sarf Adı  | Marka                | Kod        |
|---|----------------------|------------|
| Ortodontik lastik bant                            | Creatures of the Sea | Manta Ray  |
| Ketamin   | Ketasol              |            |
| Ksilazin  | Alfazyne             |            |
| Ghrelin   | Calbiochem           | 494127     |
| Metanol   | Sigma                | 24229      |
| Preparat Saklama Kutusu                           | BioSigma             | N40.3002   |
| Lam   | Isolab               | 075.02.005 |
| Lamel   | Isolab               | 075.01.004 |
| Mayers Hematoksilen Solüsyonu                     | Bio-Optica           | 05-06002/L |
| PVDF Membran                                      | Millipore            | IPVH00010  |
| ECL Solüsyonu                                     | Thermo               | 32106      |
| ELISA Kiti, Mouse (TNF- $\alpha$ )                | BosterBio            | EK0527     |
| Mikrotom Bıçağı                                   | Feather              | S35        |
| Mavi Pipet Ucu (0-1000 $\mu$ l)                   | Corning              | 4846       |
| Goat Polyclonal Seconder Antikor (Tavşan IgG-HRP) | Abcam                | Ab97051    |
| HPLC Vial   |                      | 401B5-530  |
| Tüp (1,5 mL'lik)                                  | Ssibio               | 1210-00S   |

|                                       |            |             |
|---------------------------------------|------------|-------------|
| Complete Protease Inhibitore Cocktail | Roche      | 4693159001  |
| Western Blot Röntgen Filmi            | Kodak      |             |
| MuRF-1 Poliklonal Antikor             | Abcam      | Ab77577     |
| Bisakrilamid                          | Sigma      | M7279-25G   |
| Poly-L-Lysine Solüsyonu               | Sigma      | P8920-100ML |
| Yağsız Süt Tozu                       | Pınar      | 141515 5    |
| DAB Substrate                         | Roche      | 11718096001 |
| TNF- $\alpha$ 52B83                   | Santa Cruz | sc-52746    |
| PBS                                   | Bio-Optica | -           |
| Hishostain-plus kit                   | Invitrogen | 85-9043     |
| Digest-All 2 (Trypsin)                | Invitrogen | 3008        |
| Eosin Alcoholic                       | Bio-Optica | 05-10003/L  |
| Glisin                                | Applchem   | A1067, 1000 |
| Tween 20                              | Applchem   | A4974, 0100 |
| Blomold 37x24x5 mm                    | Tekno      | TMM-BM37245 |
| Anti-beta Aktin Antikor               | Abcam      | Ab8227      |
| Anti-MuRF1                            | Abcam      | AB183094    |
| Protein Transfer Pedleri              | GenScript  | L03011      |
| Siğır Albumin                         | Amresco    | AI0332-100  |

### 3.6.3 Anestezi

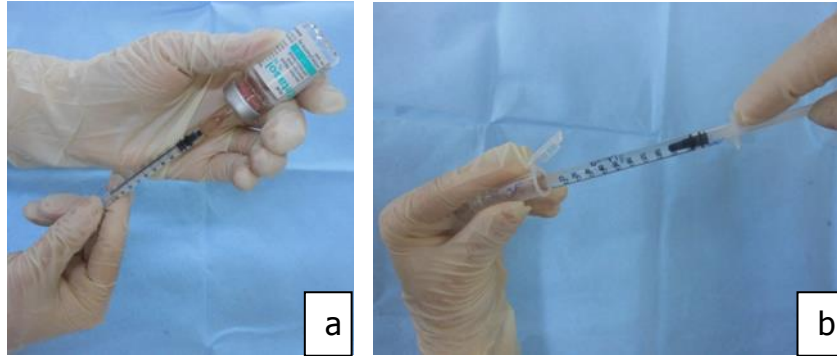
Anestezi öncesi canlı ağırlık tartımı Şekil 20'deki gibi yapıldı ve böylelikle her deneğe kendi canlı ağırlığına uygun anestezi dozu hesaplanarak enjekte edildi.



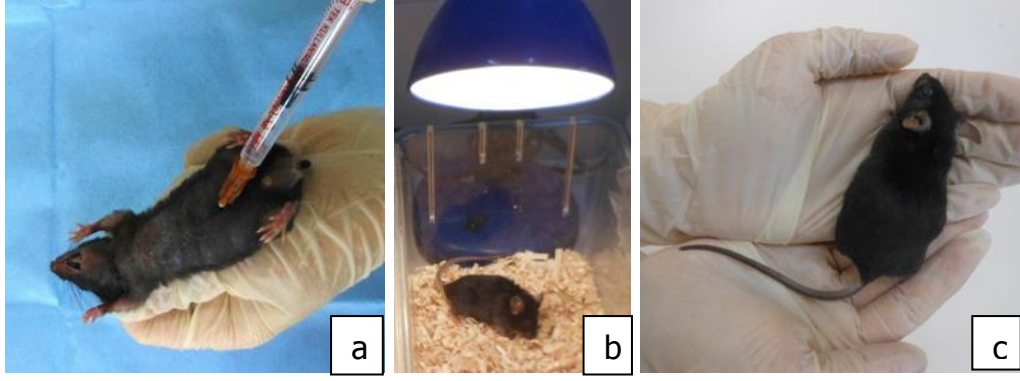
Şekil 20. Canlı ağırlık tartımı (Casio).

Deneklerin anestezisi 100 mg/kg ketamin (ketasol %10, Richter Pharma AG®) ve 8 mg/kg ksilazin (Alfazyne %2 , Alfasan International B.V.®) kombinasyonunun ip yolla uygulanması ile gerçekleştirildi (117).

Deneyde kullanılacak hayvanların canlı ağırlığı oldukça düşük olduğundan hatalı doz uygulamamak için, kullanılacak her iki anestezi madde de serum fizyolojik (SF) ile seyreltilip %10'luk anestezi solüsyon elde edildikten sonra ip yolla uygulandı. %10'luk solüsyon eldesi için önce insülin enjektörüne 0,1 cc ketamin çekilip, ardından SF ile 1 cc'ye tamamlandı (Şekil 21). Elde edilen %10'luk seyreltilmiş ketamin temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve mikrosantrifüj tüpün üzerine cama yazar kalem ile içerik bilgisi not edildi. Aynı işlem, %10'luk seyreltilmiş ksilazin elde etmek için tekrarlandı. Genel anestezi için 26 gauge (G) iğneye sahip insülin enjektörüne, seyreltilmiş anesteziklerin her ikisinden de daha önce belirtilen dozlarda çekilip ip yolla enjekte edildi (Şekil 22).

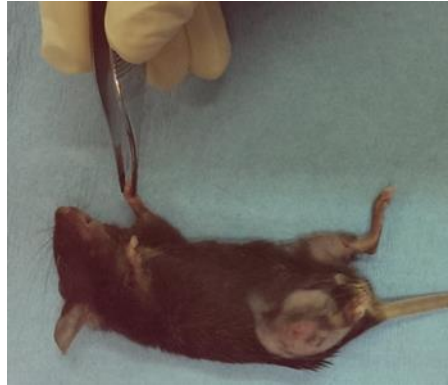


Şekil 21. %10'luk ketamin solüsyonu hazırlama. a; boş insülin enjektörüne (26 G) 0,1 cc ketamin (100 mg/mL) aktarımı, b; 0,1 cc ketamin alınan enjektörün SF ile 1 cc'ye tamamlanması.



Şekil 22. Anestetik madde uygulaması ve genel anestezi evreleri. a; ip. ketamin + ksilazin uygulaması ve bu uygulama ile başlayan analjezi ve amnezi evresi, b; lamba ile vücut ısısının korunması, anestezinin izlenmesi ve eksitasyon/deliryum evresi, c; lamba ile vücut ısısının korunması, anestezinin izlenmesi ve cerrahi anestezi evresi.

Anestezi derinliği, solunuma bakılarak ve dişsiz penset yardımıyla pençe kısıtılarak değerlendirildi (Şekil 23). Anestezinin idamesi SF ile seyreltilmiş ketamin solüsyonu (40 mg/kg) ile sağlandı.



Şekil 23. Pençe kısıtılarak yapılan anestezi derinliği muayenesi.

### 3.6.4 Ghrelinin Muhafazası, Hazırlanışı, Doz Hesabı ve Enjeksiyonu

Tercih ettiğimiz ghrelin müstahzarı katı halde iken +4°C'de son kullanma tarihine kadar, stok solüsyon halde ise -20°C sıcaklıkta üç ay bozulmadan muhafaza edilebiliyordu (118). Bu sebeple, deney süreci üç ayı aşmayacağından deneylere başlamadan üç gün önce trifloroasetat tuzu olarak tedarik edilen ürün, damıtık su ile çözülerek stok hale getirilip -20°C'de muhafaza edildi.

#### Stok Hazırlama:

Kullanılacak madde miktarı çok küçük olduğundan madde kaybının önüne geçmek için, ghrelini muhafaza eden şişe içindeki ependorfa 1 mL damıtık su ilave edildi ve vorteks ile homejenizasyonu sağlandı. Ardından 15 mL'lik şişe içerisine aktarılıp üzerine 9 mL damıtık su ilave edilerek vorteks ile homojen bir karışım elde edildi. Elde edilen 10 mL'lik stok solüsyonun birçok defa dondurma-çözme işlemine maruz kalmaması amacıyla, her grup için farklı miktarlarda olmak kaydı ile ependorflara pay edildi. Bu işlemde pay edilen madde miktarı, deneklerin canlı ağırlığı ortalama 30 g kabul edilerek tayin edildi.

#### 10 µg/kg; n=14 için;

Canlı ağırlığı 30 g olan bir denek için 0,3 µg ghreline ihtiyaç duyulduğundan ve 10 µg/kg ghrelin verilecek 14 denek olduğundan, toplamda 4,2 µg ghreline ihtiyaç vardı. 0,1 mL'sinde 1 µg ghrelin bulunan stoktan 0,03 mL kullanmak gerekecekti, ancak madde miktarı düşük olduğundan oluşabilecek madde miktarı kaybını önlemek ve hatalı doz uygulamasının önüne geçebilmek amacıyla elde edilen stoğun 0,5 mL'si alınıp 4,5 mL damıtık su ile dilüe edilip ependorfa aktarıldı. Bu grup için elde edilen yeni stok toplamda 5 mL hacimde olup 5 µg ghrelin ihtiva ediyordu. Bu durumda elde

edilen stok, birer mL'lik hacimler halinde beş ependorfa aktarıldı ve deney vaktine kadar -20°C'de muhafaza edildi.

#### 30 µg/kg; n=14 için;

Canlı ağırlığı 30 g olan bir denek için 0,9 µg ghrelina ihtiyaç duyulduğundan ve 30 µg/kg ghrelina verilecek 14 denek olduğundan, toplamda 12,6 µg ghrelina ihtiyaç vardı. Stoğun 0,1 mL'sinde 1 µg ghrelina bulunduğundan madde kaybı da göz önünde bulundurularak 14 denek için 2 mL'lik stok 4 adet 0,5 mL hacimler halinde 4 ayrı ependorfa aktarıldı ve deney vaktine kadar -20°C'de muhafaza edildi.

#### 100 µg/kg; n=14 için;

Canlı ağırlığı 30 g olan bir denek için 3 µg ghrelina ihtiyaç duyulduğundan ve 30 µg/kg ghrelina verilecek 14 denek olduğundan, toplamda 42 µg ghrelina ihtiyaç vardı. Stoğun 0,1 mL'sinde 1 µg ghrelina bulunduğundan, her bir denek için 0,3 mL stok gerekmektedir. Günde 4 denek üzerinde çalışma planlandığından, stok 4 adet ependorfa 1,5 mL'lik hacimler halinde aktarıldı ve deney vaktine kadar -20°C'de muhafaza edildi.

### **İntraperitoneal Ghrelina Enjeksiyonu**

Ghrelina verilecek olan, G+İR (n=21, iskemiden 30 dakika önce) ve İR+G (n=21, reperfüzyon başlangıcı) olarak ayrılan deneklerin canlı ağırlık tartımının ardından, ghrelinin 10 µg/kg (n=14), 30 µg/kg (n=14) ve 100 µg/kg'lık (n=14) dozu, 26 G'lık iğnesi olan insülin enjektörüne çekildi ve ardından serum fizyolojik (119) ile 0,5 mL hacme tamamlandı. Elde edilen solüsyon, Şekil 24'de gösterildiği gibi; fare, aktif



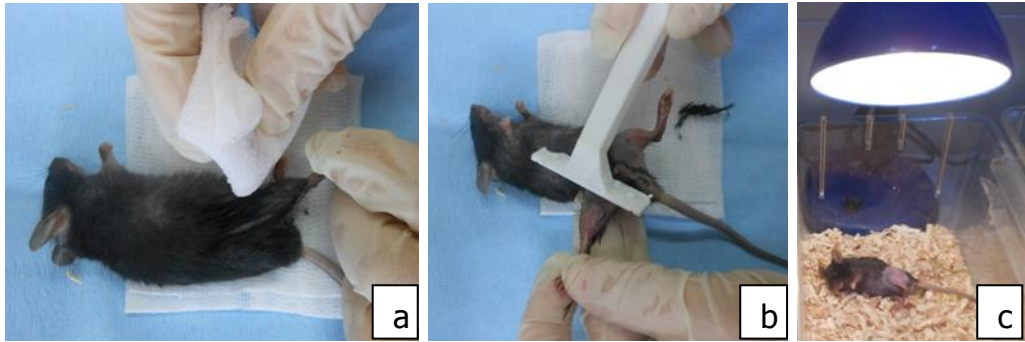
olarak kullanılmayan elin başparmağına sırt üstü ve baş aşağı pozisyonda yatırıldı ve linea albası rehber alınarak sağ kadrından ip. yolla uygulandı.



Şekil 24. İntraperitoneal enjeksiyon bölgesi.

### 3.6.5 Arka Bacakların Tıraş Edilmesi

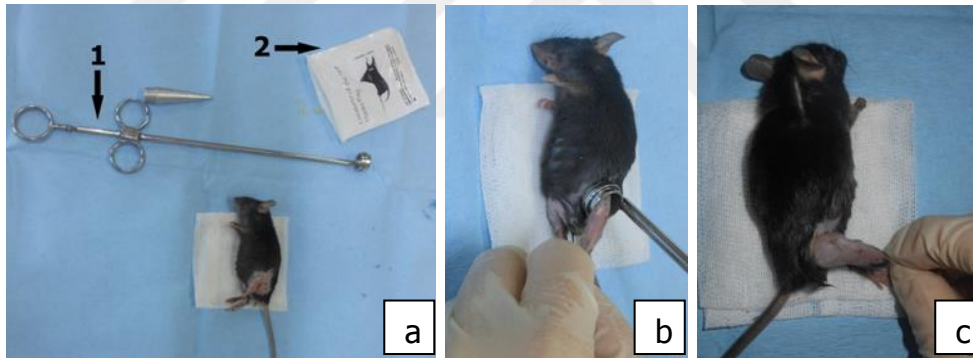
Tıraş edilecek bölgenin; ılık sabunlu su yardımı ile ıslatılıp, kayganlaştırılmasından sonra tıraş bıçağı ile anestezi altındaki deneklerin arka bacakları, kalça eklemi hizasına kadar nazikçe tıraş edildi ve süreç boyunca hipotermimin önüne geçmek için denekler sarı lamba ışığı altında barındırıldı (Şekil 25).



Şekil 25. Bilateral arka bacak tıraşı ve vücut ısısının korunması. a; tıraş edilecek bacağın ılık sabunlu su ile hazırlanması, b; arka bacak tıraşı ve tıraş edilen bölgenin gerilmesi, c; tıraş sonrası lamba ile deneklerin hipotermiden korunması.

### 3.6.6 Alt Ekstremitede Turnike ile İ-R Tekniği

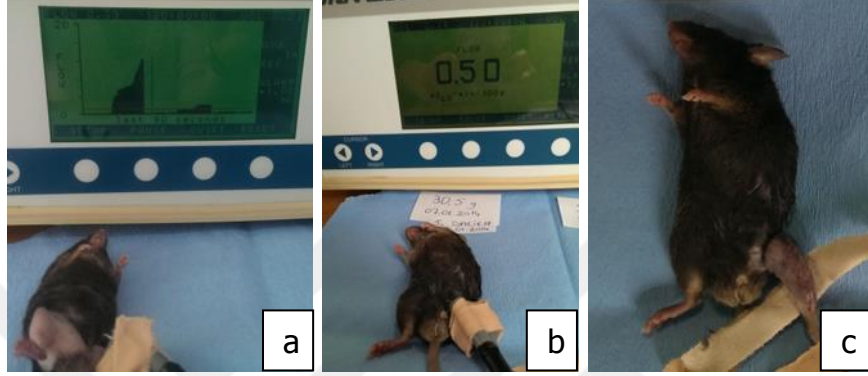
Arka bacak tıraşları yapılan, anestezi altındaki deneklerin turnike yöntemi ile bilateral arka bacak iskemi sürecini başlatmak amacıyla kalça eklemi hizasında her iki bacağa ayrı ayrı olmak kaydıyla McGivney hemoroidal ligatür aplikatörü kullanılarak, 3,22 mm çapındaki, 4,5 ons basınçlı ortodontik lastik bantlar yerleştirildi (Şekil 26).



Şekil 26. Ortodontik lastik bantların bilateral kalça eklemine yerleştirilmesi. a; 1- McGivney hemoroidal ligatür aplikatörü, 2- ortodontik lastik bantlar, b; iskemi oluşturmak amacıyla sol ard bacağa kalça eklemi üzerinden turnike uygulaması, c; ard bacağın turnike uygulaması sonrası görünümü ve iskemi sürecinin başlangıcı.

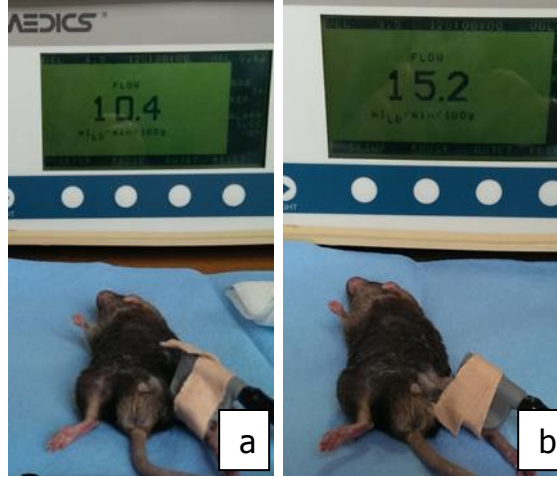
İskemi oluşturulması hedeflenen bölgedeki kan akımı ve şiddeti, turnike uygulaması öncesinde lazer doppler akım ölçer cihazı (Vasamedics, Laserflo®) ile tespit edildi. İskemi öncesi kan akımı 15 birim civarında tespit edildi. Sonrasında ise

arka bacakta iskemi oluşturmak amacıyla, kalça eklemi hizasında turnike uygulandı ve uygulama sonrası hedef bölgedeki kan akımının 0.50 birim civarına düştüğü tespit edildi. İskemi öncesi ve sonrası değerler kıyaslanarak kansızlaştırma doğrulandı (şekil 27).



şekil 27. Lazer doppler akım ölçer cihazı ile iskemi sürecinin doğrulması. a; iskemi öncesi ve sürecindeki ilk bir dakika içerisinde iskemi bölgesindeki dokunun kanlanmasının grafiksel gösterimi, b; iskeminin 5. dakikasında turnikeye alınan bölgenin kanlanmasının numerik gösterimi, c; iskeminin 8. dakikasında turnikeye alınan bacağıın dış bakısı (tek taraflı arka bacak İ-R, ön çalışma fotoğrafı).

İki saatlik iskemi süreci sonunda, kalça eklemi üzerine yerleştirilen ortodontik lastik bant küt uçlu cerrahi makas ile kesildi ve böylelikle üç saat sürececek olan reperfüzyon süreci başlatıldı. Reperfüzyon sürecinin başladığı, lazer doppler akım ölçer cihazı ile doğrulandı (şekil 28).

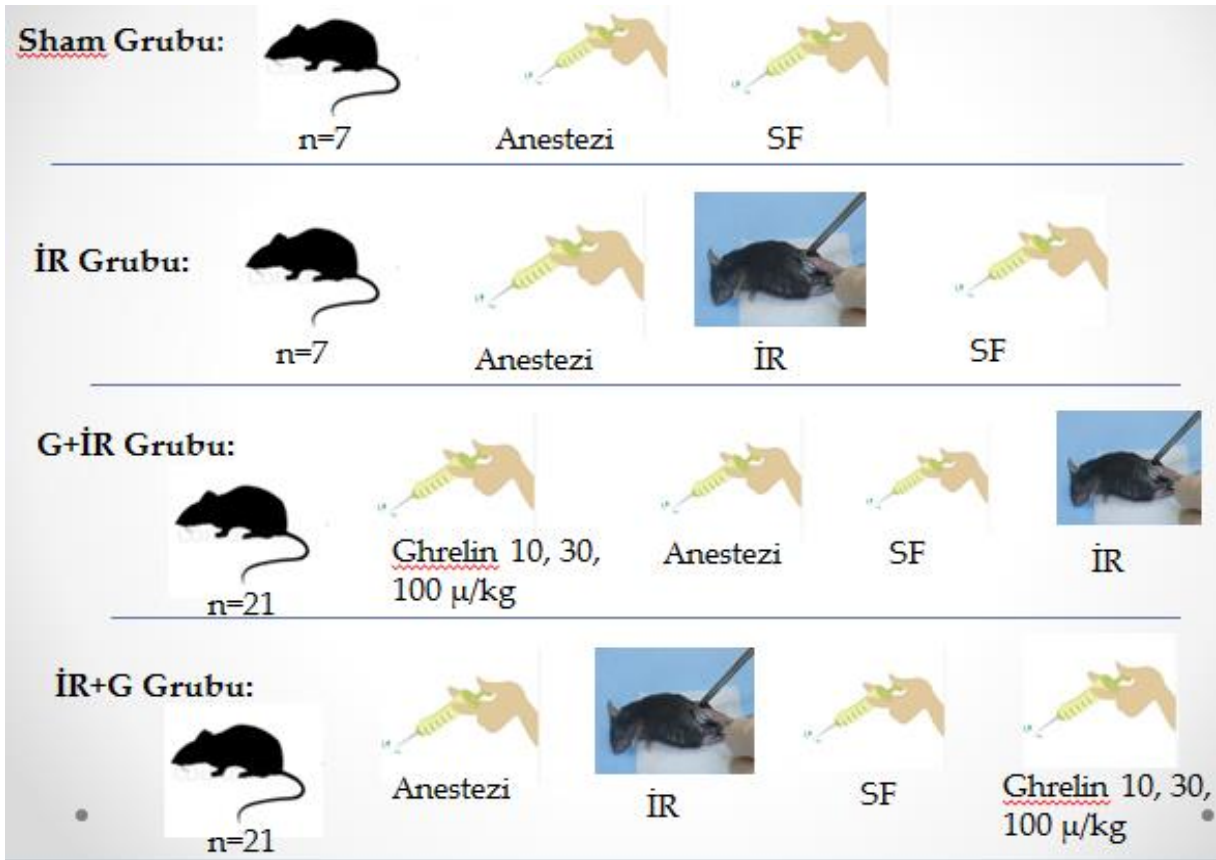
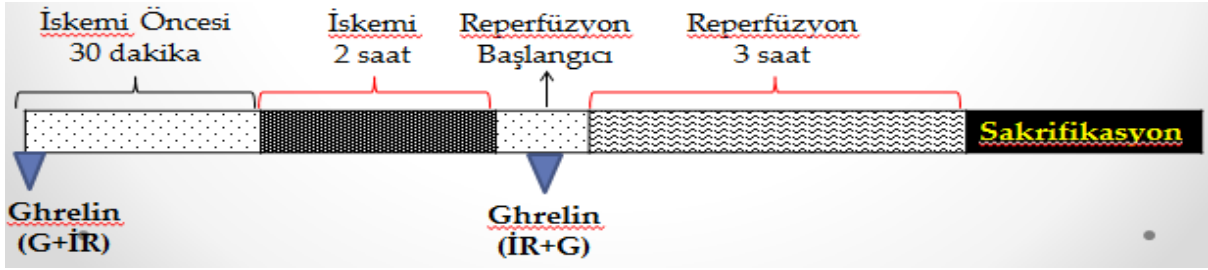


Şekil 28. *Reperfüzyon* sürecinin lazer doppler akım ölçer cihazı ile doğrulanması. a; *reperfüzyon* sürecinin 10. dakikasında bölgenin kanlanmasının sayısal gösterimi, b; *reperfüzyon* sürecinin 1. saatinde bölgenin kanlanmasının sayısal gösterimi (tek taraflı arka bacak İ-R, ön çalışma fotoğrafı).

Beş saat süren tüm deney prosesi boyunca; anestezi altında kalan deneklere, düşen kalp debisini ve kan basıncını artırmak ve ayrıca bazal sıvı gereksinimi takviye etmek amacıyla iki saatte bir subkutan (sc) yolla 0,2 mL SF takviyesi yapıldı (67, 120, 121).

### 3.6.7 Deney Prosedürü

Çalışmamızda kullanılan C57BL/6 suşu, 10-12 haftalık, 22-32 g ağırlığında, dört ana deney grubuna ayrılmış 56 adet yetişkin fare, Şekil 29'da şematize edilen deney prosedürüne tabi tutulmuştur.



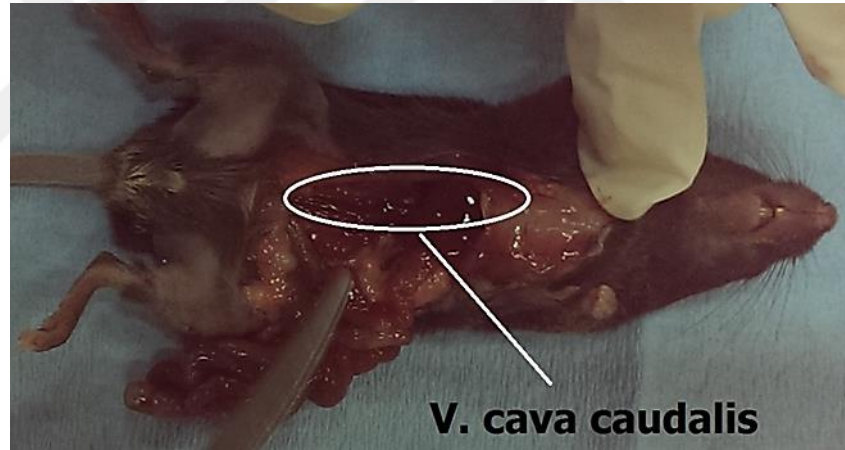
Şekil 29: Genel ve gruplara özgü deney prosedürü.

### 3.6.8 Sakrifikasyon Tekniği

Deneklerin hayatını sonlandırma aşamasında *sakrifikasyon* tekniklerinden biri olan *eksanguinasyon* (kansızlaştırma) yöntemi kullanıldı. Anestezi altındaki denekler

cerrahi operasyonun yapılacağı tabla üzerine, sırtüstü pozisyonda sabitlendi ve karın bölgesinin orta hattı üzerinde yaklaşık 2,5 cm büyüklüğünde bir kesi oluşturularak karın boşluğu açıldı.

SF ile ıslatılmış gazlı bez üzerine bağırsak penseti kullanılarak bağırsaklar alınıp vena cava caudalis açığa çıkarıldı. Açığa çıkan damar küt uçlu penset yardımı ile çevre dokulardan ayrılıp kan alma işlemi için uygun hale getirildi (Şekil 30), iğnesi yaklaşık 45° eğilmiş insülin enjektörü (Şekil 31) ile kan toplama işlemi gerçekleştirildi. Kan örneğinin toplanması sırasında yüksek kan kaybının meydana gelmesi ile kansızlaştırılan deneğin hayatı sonlandırılmış oldu (Şekil 32).



Şekil 30. Karın boşluğu açılıp, bağırsaklar vücudun soluna ve dışına alındığında ortaya çıkan v. cava caudalisin makroskobik görünümü.



Şekil 31. İnsülin enjektörünün, 26 G'lık iğnesinin yaklaşık 45° eğilip v. cava caudalise girmek üzere hazırlanmış hali.



Şekil 32. Kanın vena cava caudalisten toplanarak gerçekleştirilen, eksanguinasyon yöntemi ile sakrifikasyon aşaması.

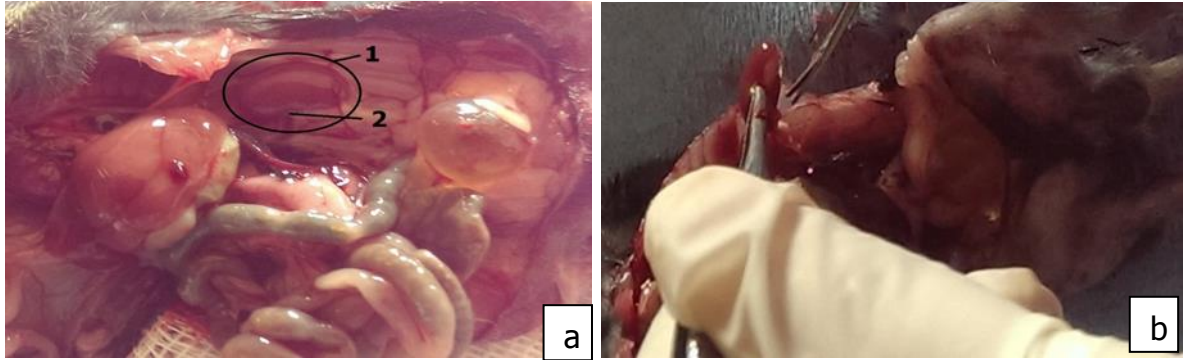
### 3.6.9 Doku Örneği Toplama

#### 3.6.9.1 Kan Örneği Alma

Eksanguinasyon yöntemi ile sakrifiye edilen deneklerden alınan ortalama 0,7 ml kan örneği, enjektörün ucundaki iğne çıkarıldıktan sonra ve ependorf duvarına temas ettirilerek sızıntı şeklinde ependorfa aktarıldı.

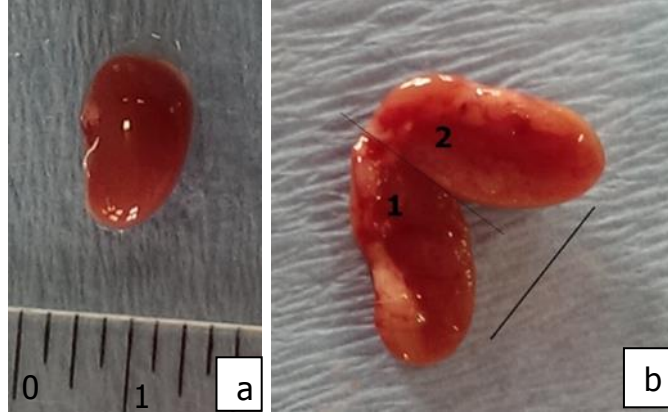
### 3.6.9.2 Böbrek Örneği Alma

Kan örneği alındıktan sonra hayvanın soluna çıkarılan bağırsakları sağına alınarak sol böbrek gözlendi. Anatomik olarak karın boşluğunda ve sırt bölgesinde yer alan sol böbrek, diğer dokulardan ayrıldıktan sonra, 3. ve 4. bel omurları seviyesinde yer alan ve *aorta abdominalis*'in lateral yüzünden orijin alan *a. renalis sinistra*'nın böbreğe girdiği *hilus renalis* sınır kabul edilerek cerrahi makas yardımı ile ayrılıp (Şekil 33), içinde SF bulunan petri kabına alınarak üzerinde bulunan kandan arındırıldı. Dış yüzeyi kandan arındırılan böbrek bütün halde yine hilus renalis bölgesinden tutularak dişsiz penset yardımı ile kuru petri kabı içine alındı ve yine aynı penset yardımı ile dokuya zarar vermeden sabitlenip, 22 numara bistüri ucu ile medialinden longitudinal olarak iki parçaya ayrıldı (Şekil 34). Ayrılan sol yarım histopatolojik bakı sağ yarım ise biyokimyasal analizler için uygun kaplara aktarıldı.



Şekil 33. Sol böbreğin kadavra üzerindeki anatomik konumu ve dokunun alımı. a; 1- sol böbrek, 2- renal arter ve renal hilus, b; böbreğin, komşu doku ve bağlardan ayrımlandıktan sonra dişsiz penset ile tutulup makas yardımı ile vücuttan uzaklaştırılması.

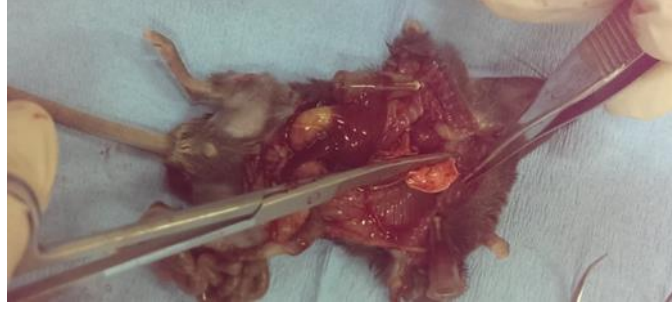




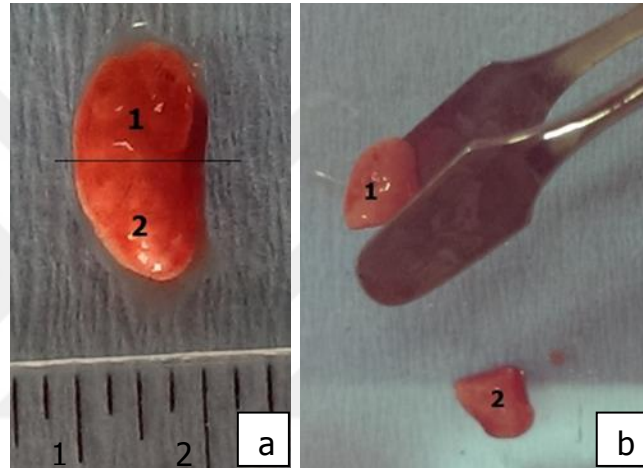
Şekil 34. a; sol böbreğin makroskobik görüntüsü, b; *medialinden longitudinal* olarak ikiye ayrılan böbreğin makroskobik görünümü, 1- böbreğin sol yarımı, 2- böbreğin sağ yarımı.

### 3.6.9.3 Akciğer Örneği Alma

Böbrek örneğinin alınmasının ardından akciğer örneğine ulaşmak için deneğin göğüs boşluğu açıldı. Göğüs boşluğu açılırken akciğerlere zarar vermemek ve kaburgaları kolayca kesebilmek için öncelikle diyafram kası bağlantılı olduğu dokulardan ayrıldı. Kaburga keskesi ile göğüs kemiği longitudinal olarak kesildi ve kaburgalar her iki yana ayrılarak göğüs boşluğu açıldı. Açığa çıkan akciğerlerden tek loblu olan sol akciğer hilusundan cerrahi makas yardımı ile kesilip (Şekil 35) aynı yerden dişsiz penset yardımı ile tutularak içinde SF bulunan petri kabına aktarıldı. Doku üzerindeki kan, SF yardımı ile arındırıldıktan sonra akciğer dokusu yine hilus kısmından aynı penset yardımı ile tutularak kuru petri kapına aktarıldı ve burada 22 numara bistüri ucu ile transversal olarak ayrılıp (Şekil 36) kaudal yarım histopatolojik bakı kranial yarım ise biyokimyasal analizler için uygun kaplara aktarıldı.



Şekil 35. Sol akciğerin makroskobik görüntüsü ve vücuttan uzaklaştırılma aşaması.



Şekil 36. Sol akciğerin makroskobik görüntüsü. a; bütün haldeki sol akciğerin makroskobik görünümü ve dokunun longitudinal olarak kesim yönü 1- kranial yarım, 2- kaudal yarım, b; longitudinal olarak ayrılan dokunun makroskobik görünümü, 1- kranial yarım, 2- kaudal yarım.

#### 3.6.9.4 Gastrokinemius Kası Örneği Alma

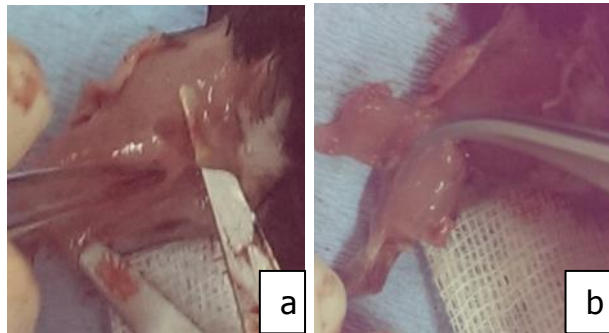
Akciğer örneğinin alınmasının ardından sol gastrokinemius kasını bütün olarak almak için, sırtüstü pozisyonundaki deneğin karın boşluğundaki organlar gazlı bez yardımı ile reddedildi ve denek yüzüstü pozisyonda sabitlendi. Önceden tıraş edilmiş sol bacak gergin olarak sabitlendikten sonra deriye, kalça-uyluk eklemi hizasından

başlamak suretiyle aşil tendonuna kadar kesi yapıldı ve küt uçlu makasla komşu dokulardan ayrımlandı (Şekil 37).



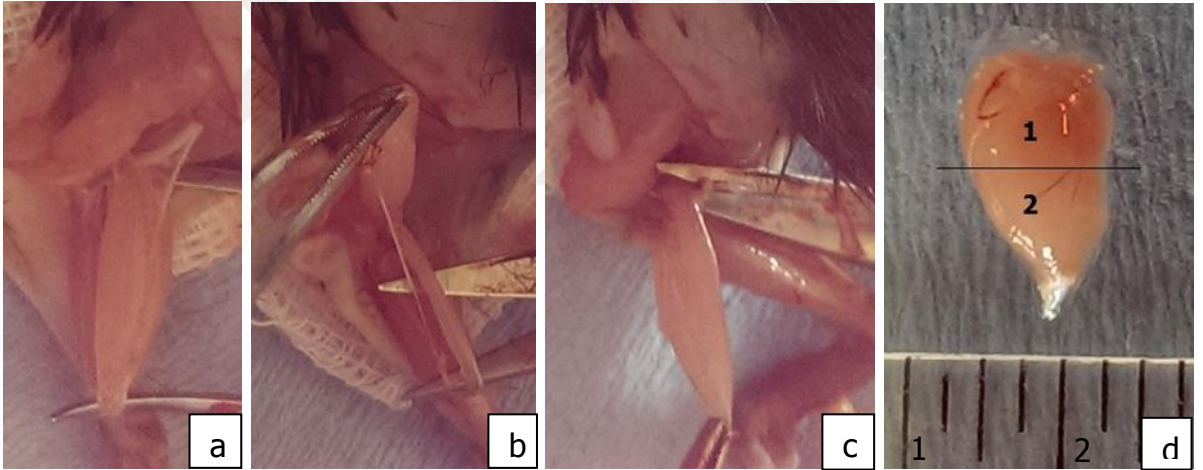
Şekil 37. Arka Bacak Deri *Diseksiyonu*.

Uyluk bölgesinde ve bacağın arkasında yer alan *semitendinosus* kasına transversal kesi atılıp, küt uçlu cerrahi makas yardımı ile sagittal olarak genişletilip, gastrokinemus kasının çift başlı tendonuna ulaşıldı. Klavuz bölge olarak tercih edilen bu bölgeden gastrokinemius kası boyunca kesi genişletildi (Şekil 38).



Şekil 38. Semitendinosus ve Gastrokinemius Kaslarının Diseksiyonu. a; semitendinosus kasının ayrımlanması, b; gastrokinemius kasının ayrımlanması.

Gastrokinemius kası, yakın dokulardan ve hemen altında yer alan soleus kasından ayrılandıktan sonra küt uçlu makas yardımı ile önce aşil tendonundan, daha sonra ise gastrokinemius kasının lateral ve medial olmak üzere ikiye ayrılan ve uyluğun arka iki yanından başlayan çift başlı tendonundan küt uçlu cerrahi makas yardımı ile kesilerek vücuttan uzaklaştırıldı (Şekil 39). Vücuttan uzaklaştırılan kas doku, üzerinde kalan aşil tendonundan dişsiz penset yardımı ile tutularak içinde SF bulunan petri kabına aktarıldı. Doku üzerindeki kan, SF yardımı ile arındırıldıktan sonra kas dokusu yine aşil tendonundan aynı penset yardımı ile tutularak kuru petri kabına aktarıldı ve burada 22 numara bistüri ucu ile horizontal olarak ayrılıp distal yarımı histopatolojik bakı, proksimal yarımı ise biyokimyasal analizler için uygun kaplara konuldu.



Şekil 39. Gastrokinemius Kasının Diseksiyonu ve Örnek Alma. a; total olarak *diseke* edilen kasın makroskobik görünümü, b; soleus kasının makroskobik görünümü, c; total gastrokinemius kasının vücuttan ayrılması, d; alınan örneğin proksimal ve distal yarımlara ayrılması.

### **3.6.10 Kadavra İmhası**

Deneyler sonunda, deneklerden toplanması gereken tüm dokuların eldesinin ardından geriye kalan kadavralar, imha edilmek üzere kırmızı tıbbi atık poşetlerine alınıp, DEÜ Tıbbi Atık İmha Birimi çalışanlarına teslim edildi.

### **3.6.11 Toplanan Doku Örneklerinin Muhafazası ve Transferi**

#### **3.6.11.1 Kan**

Alınan kan örnekleri 1,5 mL'lik ependorflar içinde yirmişer dakika oda sıcaklığına maruz bırakıldıktan sonra biyokimya laboratuvarlarına transfer edilene kadar buz üstünde en fazla 90 dakika olmak şartıyla bekletildi. İlgili birime ulaştırılan kanlar, santrifüj edilip serum elde edildi ve elde edilen serumlar biyokimyasal ölçümleri yapılana kadar kademeli olarak soğutulup -80 °C'de saklandı.

#### **3.6.11.2 Böbrek**

Medialinden longitudinal olarak iki parçaya ayrılan böbrek örneklerinin, sol yarımı histopatolojik bakı için; içinde %10'luk nötral formalin bulunan doku kaplarına aktarılıp DEÜ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'na oda sıcaklığında 3 gün muhafaza edilmek üzere transfer edildi, sağ yarımı ise 2 mL'lik ependorflara aktarılıp en fazla 90 dakika olmak şartıyla buz üzerinde bekletilip DEÜ Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları'na transfer edildi ve buz üzerinden alınan dokular önce

+4 °C daha sonra -20 °C ve sonunda -80 °C olmak üzere kademeli olarak donduruldu.

### **3.6.11.3 Akciğer**

Transversal olarak iki parçaya ayrılan akciğer dokusunun kaudal yarımı histopatolojik bakı için; içinde %10'luk nötral formalin bulunan doku kaplarına aktarılıp DEÜ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'na oda sıcaklığında 3 gün muhafaza edilmek üzere transfer edildi, kranial yarımı ise 2 mL'lik ependorflara aktarılıp en fazla 90 dakika olmak şartıyla buz üzerinde bekletilip DEÜ Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları'na transfer edildi ve buz üzerinden alınan dokular önce +4 °C daha sonra -20 °C ve sonunda -80 °C olmak üzere kademeli olarak soğutulup donduruldu.

### **3.6.11.4 Gastrokinemius Kası**

Horizontal olarak iki parçaya ayrılan kas dokusunun distal yarımı histopatolojik bakı için; içinde %10'luk nötral formalin bulunan doku kaplarına aktarılıp DEÜ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'na oda sıcaklığında 3 gün muhafaza edilmek üzere transfer edildi, proksimal yarımı ise 2 mL'lik ependorflara aktarılıp en fazla 90 dakika olmak şartıyla buz üzerinde bekletilip DEÜ Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları'na transfer edildi ve buz üzerinden alınan dokular önce +4 °C daha sonra -20 °C ve sonunda -80 °C olmak üzere kademeli olarak soğutulup donduruldu.

### 3.6.12 Yapılan Analiz Yöntemleri Ve Hedefleri

Tablo 5. Yapılan Analiz Yöntemleri ve Hedefleri

| Birim                                      | Analiz Yöntemi           | Doku                                       | Analiz Hedefi                                |
|--|--------------------------|--|--|
| DEÜ Tıp. Fak.<br>Biyokimya<br>Laboratuvarı | ELISA                    | Serum                                      | TNF-alfa düzeyinin belirlenmesi.             |
|  | SDS-PAGE<br>WESTERN BLOT | Gastrokinemius<br>kası                     | MuRF-1 ekspresyonunun incelenmesi.           |
| DEÜ Tıp Fak.<br>Ar. Lab.                   | HPLC<br>TBARS            | Böbrek, Akciğer,<br>Gastrokinemius<br>kası | MDA düzeyinin belirlenmesi.                  |
| DEÜ Tıp. Fak.<br>Histoloji<br>Laboratuvarı | H&E Boyama               | Böbrek, Akciğer,<br>Gastrokinemius<br>kası | Histopatolojik olarak hasarlanmanın gözlemi. |
|  | İmmünohistokimya         | Böbrek, Akciğer,<br>Gastrokinemius<br>kası | TNF-alfa varlığı ve skorlanması.             |

#### 3.6.12.1 Histopatolojik Analiz Yöntemleri

##### 3.6.12.1.1 Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

Kas; böbrek ve akciğer dokuları %10' luk tamponlanmış nötral formalin içerisinde 3 gün süreyle tespit edilerek rutin doku takip işlemi başlatıldı. Tespit maddesinin uzaklaştırılması için 1 gece akarsu altında yıkandıktan sonra, 60 °C'de

etüvde 20' şer dakika sırasıyla %70, %80, %96 artan etil alkol serilerinden geçirildi. Daha sonra 60 °C'de etüvde 20'şer dakika dört değişim asetonda dehidrate edildi. Şeffaflandırma amacıyla 60 °C'de etüvde 30'ar dakika iki kez ksilolde bekletildi. 60 °C' lik etüvde iki değişim halinde 1'er saat parafin ile immersiyouu sağlanarak parafin bloklar içerisine gömüldü (tablo 6). Rotary mikrotom (RM 2255, Leica®, Germany) aracılığı ile 5 µm'lik kesitler alındı.

Her deneğe ait kesitler dokunun genel histolojik özelliklerini değerlendirmek için hematoksilen-eozin ile boyanırken, diğer kesitler polilizinli lamlara alınarak TNF-α için immunohistokimya uygulandı.

Tablo 6. Rutin Doku Takibi

| <b>İşlem</b>             | <b>Madde</b>        | <b>Süre</b> |
|--------------------------|---------------------|-------------|
| Fiksasyon                | %10'luk Formaldehit | 3 gün       |
| Fiksatiften Uzaklaştırma | Akarsu              | 1 Gece      |
| Dehidratasyon            | %70'lik Alkol       | 20 Dakika   |
| Dehidratasyon            | %80'lik Alkol       | 20 Dakika   |
| Dehidratasyon            | %96'lık Alkol       | 20 Dakika   |
| Post Fiksasyon           | Aseton 1            | 20 Dakika   |
| Post Fiksasyon           | Aseton 2            | 20 Dakika   |
| Post Fiksasyon           | Aseton 3            | 20 Dakika   |
| Post Fiksasyon           | Aseton 4            | 20 Dakika   |
| Şeffaflandırma           | Ksilol 1            | 30 Dakika   |
| Şeffaflandırma           | Ksilol 2            | 30 Dakika   |
|                          | Parafin 1           | 60 Dakika   |
|                          | Parafin 2           | 60 Dakika   |
| Bloklama                 | Parafin             |             |



### 3.6.12.1.2 Hematoksilen-Eozin Boyama

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 2 saat 60 °C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi onar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için iki değişim absolü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirildi. Kesitler damıtık su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve iki seri absolü alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla yirmişer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck®, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (tablo 7). Böbrek hasar skorlaması için; skorlama 0=hiç yok, 1= % 1-25, 2= % 26-50, 3= % 51-75, 4= % 76-100 olarak uygulandı.

Tablo 7. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

| İşlem            | Madde                   | Süre      |
|------------------|-------------------------|-----------|
| Deparafinizasyon | 60°C Etüvde             | 30 Dakika |
| Deparafinizasyon | Ksilen 1 (Etüvde)       | 20 Dakika |
| Deparafinizasyon | Ksilen 2 (Oda Isısında) | 10 Dakika |
| Deparafinizasyon | Ksilen 3                | 10 Dakika |
| Rehidratasyon    | Absolü Alkol            | Çalkalama |
| Rehidratasyon    | Absolü Alkol            | Çalkalama |
| Rehidratasyon    | % 96 Alkol              | Çalkalama |
| Rehidratasyon    | % 80 Alkol              | Çalkalama |

|                |              |           |
|----------------|--------------|-----------|
| Rehidratasyon  | % 70 Alkol   | Çalkalama |
| Yıkama         | Distile Su   | Çalkalama |
| Boyama         | Hematoksilen | 10 Dakika |
| Yıkama         | Akarsu       | 10 Dakika |
| Boyama         | Eosin        | 2 Dakika  |
| Yıkama         | % 70 Alkol   | Çalkalama |
| Dehidratasyon  | % 80 Alkol   | Çalkalama |
| Dehidratasyon  | % 96 Alkol   | Çalkalama |
| Dehidratasyon  | Absolü Alkol | Çalkalama |
| Dehidratasyon  | Absolü Alkol | Çalkalama |
| Şeffaflaştırma | Ksilen 1     | 20 Dakika |
| Şeffaflaştırma | Ksilen 2     | 20 Dakika |
| Şeffaflaştırma | Ksilen 3     | 20 Dakika |
| Kapama         | Entellan     |           |

### 3.6.12.1.3 TNF- $\alpha$ İmmunreaktivitesi

İmmunohistokimyasal inceleme için 60 °C'lik etüvde 1 gece ve de 3 değişim 20'şer dakika deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra 10 dakika distile su ile yıkandı. Dokuya zarar vermeden kurulanıp dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandı. Sitrat buffer (pH:6) içerisinde ısıtıldıktan sonra soğumaya bırakıldı. Daha sonra kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük Hidrojen peroksit uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler 1 saat oda ısısında bloklama

solüsyonu ile enkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan anti-TNF- $\alpha$  1:100 (SC-52746, Santa Cruz®) antikoru ile +4°C'de enkübe edildi. Ardından fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor ile 30 dk enkübe edildi. PBS solüsyonu ile yıkama yapıldıktan sonra enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) 30 dakika uygulandı. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. Zemin boyaması Mayer hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan (UN 1866, Merck®, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı.

### **3.6.12.2 Biyokimyasal Analiz Yöntemleri**

Biyokimyasal analizlerde kullanılacak doku örnekleri, uygun miktar ve solüsyonlar ile homojenize edildi. Homojenizasyon işleminin ardından elde edilen sıvı formdaki örnekler her analiz yöntemi için uygun miktarlarda mikrosantrifüj tüplerine pay edilip derin dondurucuda (-80 °C) muhafaza edildi. Bu işlemin ardından sırasıyla ELISA, Western blot ve HPLC analizleri yapıldı.

#### **3.6.12.2.1 Homojenizasyon**

Deney hayvanı çalışmalarından elde edilen dokular derin dondurucudan (-80 °C) alınarak 0,02-0,03 g'lık doku parçası ayrıldı. Taze RIPA çözeltilisinde (MDA için PBS'de yapıldı) boncuklu homojenizatör ile 30 frekans, 45 saniye süreyle homojenize edildi. Analizler, +4 °C'de 20,000 g'de 10 dakika santrifüj sonrası elde edilen süpernatanttan analizler gerçekleştirildi.

### 3.6.12.2.2 Protein Tayini

Örneklerin protein miktarları BCA (bisikoninik asit) kiti ile saptandı. Kit protokolüne göre, 96 kuyucuklu şeffaf plaklara 25 mikrolitre uygun dilüsyon oranındaki örnek ve 200 mikrolitre BCA reaktifi eklenip 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda örneklerin 562 nm'de absorbanları ölçüldü. Örneklerdeki total protein konsantrasyonları, 25-2000 mikrogram/mililitre aralığındaki BCA standart eğrisinden yararlanarak hesaplandı.

### 3.6.12.2.3 Western Blot

BCA yöntemiyle protein tayini edildikten sonra, süpernatantlardan jele 40-50 mikrogram protein yüklemek için gerekli hacimler hesaplandı ve %10'luk poliakrilamid jele yüklendi. Her jelin bir kuyucuğuna protein markeri yüklendi. Örneklerin paketlenmesi amacıyla toplayıcı jelde 75 V'da 15 dakika gerilim uygulanması sonrası, ayırıcı jelde 120 V'da 1 saat daha işlem sürdürülerek proteinlerin ayırılması sağlandı. Jeller, elektroforez sonrası 0.45 µm por çapındaki PVDF membranlara yarı-kuru transfer sistemi ile aktarıldı. Transfer öncesi membranlar önce saf metanolde 1 dakika ardından da Towbin transfer çözeltisinde 5 dakika bekletildi. Membranlar %5 ticari süt tozu içeren TBS-T'de (%01 Tween-20 içeren Tris tamponu, pH:7,6) oda sıcaklığında 1 saat çalkalanarak bloklendi. Ardından saptanacak proteine karşılık gelen primer antikor içeren %3 süt tozu içeren TBS-T'de +4 °C hafifçe çalkalanarak bir gece bekletildi. Primer antikorlar önceden en uygun dilüsyon oranını belirlemek amacıyla optimize edildi. Yıkama tamponu (TBS-T) ile üç kez yıkama işlemi sonrası yine uygun sekonder antikor ve %3 süt tozu içeren TBS-T'de oda sıcaklığında 1 saat hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. Üç kez yıkama işlemi sonrası elektrokemilüminesans yöntemiyle görüntülendi. Elde edilen bantların dansimetrik analizleri yapıldı. Her bir örneğe ait bant ile beta-aktine ait bantın optik dansiteleri oranlanarak normalize edildi (122).

### 3.6.12.2.4 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

#### Kullanılan Reaktifler;

- Butillenmiş hidroksi toluen (BTH); 2.8 mmol/L, etanolde çözüldü.
- Sodyum dodesil sülfat (SDS); %8.1
- Asetik asid; 200 mL/L
- Sodyum hidroksit; 2 N
- Tiyobarbitürik asit (TBA); 8 g/L, hafif ısıtma ve karıştırılarak çözüldü. 1:1 oranında asetik asid ile karıştırıldıktan sonra, pH sodyum hidroksit ile 3.5'e ayarlandı. Günlük olarak hazırlanıp kullanıldı.
- Mobil faz; 10 mM potasyum fosfat, pH 7, % 30 metanol.
- Piridin-n-butanol karışımı; 1:15 piridin ve n-butanol karıştırılarak hazırlandı.

#### Yapılışı;

Kırk µL doku homojenatı, 15 mL'lik falkon tüpüne koyuldu. Doku homojenatı üzerine sırasıyla 100 µL saf su, 20 µL BHT, 40 µL SDS, 600 µL TBA reaktifi eklendi ve falkon tüplerin ağzı buharlaşmayla oluşabilecek madde kaybının önüne geçmek için sıkıca kapatıldı ve dik pozisyonda metal tüp raklarına yerleştirilip 95°C'deki su banyosunda 1 saat bekletildi. Süre sonunda reaksiyonu durdurma amacıyla falkonlar hızlıca buz üzerine alındı. Soğutulan falkonların içine 1 mL piridin-butanol karışımı eklenip vortekslendi. Karışımın üstünde kalan organik faz mikrosantrifüj tüplerine alınarak 15000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar viallere aktarıldıktan sonra C18 [150x4,6 cm, partikül çapı 5 µm, (MN/EC 150/4.6 Nucleosil 100-5 C18, CatNo. 720120.46)] kolonuna enjekte edildi. Elüsyon işlemi 0,8 mL/dakika akış hızında gerçekleştirildi. Pikler Ex.515/Em.553 dalga boylarında dedekte edildi. Örnek pikleri standart grafiği ile kantite edildi. Elde edilen MDA değerleri protein başına düzeltildi (119).

### 3.6.12.3 İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Çalışmamızda elde edilen biyokimyasal ve histopatolojik verilerin istatistiksel değerlendirmesi için IBM SPSS Statistics Version 22 programı kullanıldı. Elde edilen numerik ve nominal verilerin tamamı non-parametrik bir test olan Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Gruplar arası anlamlı fark bulunanlar ise Mann Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı. Sayısal değerler ortalama  $\pm$  standart hata (SH) şeklinde ifade edildi ve istatistiksel olarak  $p < 0,05$  değeri anlamlı kabul edildi.

### 3.7 Araştırma Planı ve Takvimi

#### Ekim-Aralık 2011

- Projenin belirlenmesi ve tez önerisi sunumu.

#### Ocak-Haziran 2012

- Proje maddi destek almak için DEÜ BAP Koordinasyon Birimi'ne sunuldu.
- Hayvan üretimine başlandı.

#### Mart-Aralık 2013

- İskemi-reperfüzyon model confirmasyonu için pilot çalışma.
- Pilot çalışma sonucu elde edilen dokuların histopatolojik bakışı.
- Elde edilen verilerin yorumlanması.

#### Ocak-Haziran 2014

- Deneysel model değişikliği kararı alınıp DEÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na bildirildi.
- Pozitif kontrol grubundan dört adet denek ile projeye başlandı.
- Gerekli malzemelerin temini.

### **Temmuz-Aralık 2014**

- Pozitif kontrol grubundan dört denek ile yapılan deneylerin histopatolojik bakışı sonucu, deneysel model karara bağlandı ve DEÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na bildirildi.
- Hayvan deneylerine 33 adet denek ile başlandı.

### **Ocak-Haziran 2015**

- Hayvan deneyleri 23 adet denek üzerinde daha çalışılarak tamamlandı.
- HPLC analizi için, DEÜ Tıp Fakültesi Dekanlığı'nda Araştırma Laboratuvarları'nda çalışma izni alındı.
- Biyokimyasal analizler yapıldı ve sonuçlar yorumlandı.
- Tez yazımına başlandı.

### **Temmuz-Aralık 2015**

- DEÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na deney sonuçları bildirilip ek hayvan talebinde bulunuldu.
- Ek deneyler yapıldı.
- Tüm biyokimyasal ve histopatolojik bulgular elde edildi.
- Tez yazımına devam edildi.

### **Ocak-Eylül 2016**

- Elde edilen bulgular analiz edilip yorumlandı.
- Tez yazımına devam edildi.

### 3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

Doku kesitlerinden elde edilen görüntülerin incelenmesinde bilgisayarlı video kamera esaslı görüntü analiz yöntemi kullanıldı (UTHSC Image software). Tüm kesitler analize edilerek; sadece boyamaya bağlı belirgin artefaktları olan kesitler değerlendirme dışı tutuldu. Boyama tamamlandıktan sonra kesitler ışık mikroskopunda (Olympus BX-51 Tokyo®, Japan) incelenerek, görüntüler yüksek çözünürlüğe sahip kamera yardımıyla bilgisayara aktarılarak değerlendirildi (Olympus DP-71®, Japan). Bütün kesitler dijital olarak fotoğraflandı.

İmmünohistokimyasal skorlamalar için onluk büyütmeye birbiriyle örtüşmeyen alanlar rastgele yöntemle seçildi. Pozitif boyanmanın derecesi, yoğunluk ve dağılım açısından 0'dan 3'e kadar olan bir gösterge çizelgesi kullanılarak semikantitatif skorlama ile değerlendirildi. İmmunreaktivite yok ise 0, hafif ise 1, orta ise 2 ve belirgin olması durumunda 3 puan verildi. Sayım sonucu elde edilen numerik sonuçların ortalamaları alındı (123).

Biyokimyasal analiz yöntemlerinden olan Western blot (semikantitatif olarak değerlendirildi) ve HPLC yöntemleri kullanılarak doku homojenatlarından sayısal veriler elde edildi.

Elde edilen verilerin tamamı non-parametrik bir test olan Mann Whitney U testi ile IBM SPSS Statistics Version 22 kullanılarak karşılaştırıldı. Gruplar kıyaslandığında elde edilen sonuçların değeri,  $p < 0,05$  ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sayısal değerler ortalama  $\pm$  standart hata (SH) şeklinde ifade edildi.



### **3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları**

Birimimize bitişik iki binanın yıkımı ve bunun akabinde birimiz üretim bölümünde yapılan yeniden yapılandırma çalışmalarına bağlı olarak hayvan üretiminde sıkıntı yaşanmıştır. Yetersiz hayvan sayısı deneylere başlama sürecini olumsuz etkilemiştir.

### **3.10 Etik Kurul Onayı**

Proje önerimiz, 10 Haziran 2016 tarihli DEÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu toplantısında, 42/2011 protokol numarası ile etik onay almıştır.

## **4. BULGULAR**

### **4.1 Biyokimyasal Bulgular**

Turnike yöntemi ile oluşturduğumuz bilateral arka bacak İ-R hasarı üzerine, ghrelinin üç farklı dozunun (10, 30 ve 100 µg/kg) etkisini belirlemek amacıyla; HPLC ile kas, böbrek ve akciğer dokularındaki MDA düzeyleri, Western Blot ile kas dokudaki MuRF-1 ekspresyon düzeyleri analiz edildi.

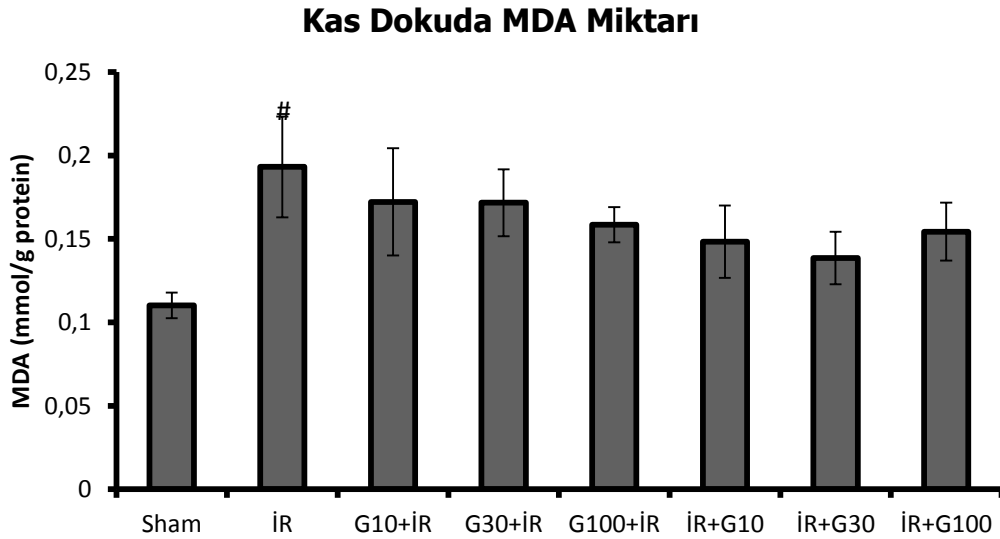
#### **4.1.1 Serum TNF-α Miktarı**

Serum örneklerinde TNF-α düzeyini belirlemek için ELISA yöntemine başvuruldu, ancak tüm örnekler dilüe edilmeden doğrudan çalışıldığında dahi standart eğrinin altında absorbans verdiği için değerlendirme yapılamadı.

#### 4.1.2 MDA Miktarı

Gruplar arası MDA miktarları kıyaslanırken, HPLC analizi sonucu elde edilen numerik veriler grup ortalamaları±standart hata (sh) baz alınarak değerlendirildi.

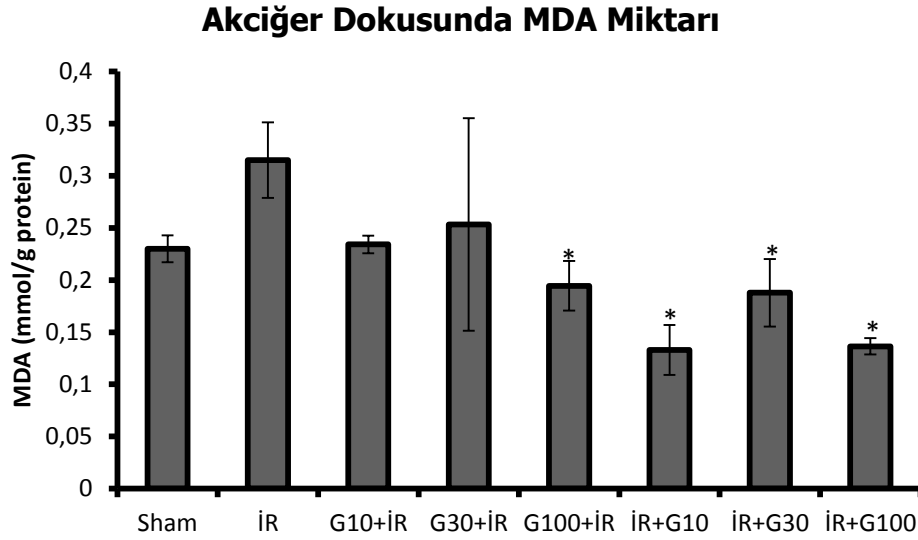
Kas doku değerlendirildiğinde; SPSS programı yardımı ile elde edilen bu verilere göre İR grubu ile sham grubu arasındaki p değeri 0,05'ten küçük, ghrelin verilen gruplar ile arasındaki p değeri 0,05'ten büyük çıkmıştır. Ortaya çıkan bu tablo bize İR grubu ile sham grubu arasında anlamlı bir fark olduğu, ghrelin verilen gruplar ile ise anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir (Şekil 40).



Şekil 40. Kas dokudaki, gruplara ait MDA miktarları. Veriler, grup ortalama±standart hata değerini ifade etmektedir (Gruplar n=5-7) #p<0,05 kabul edildiğinde Sham grubu ile arasında anlamlı fark var.

Akciğer örneklerinden elde edilen veriler istatistiksel analiz yöntemleri ile değerlendirildiğinde, İR grubu ile İR+G10 ve İR+G100 grupları arasındaki p değeri

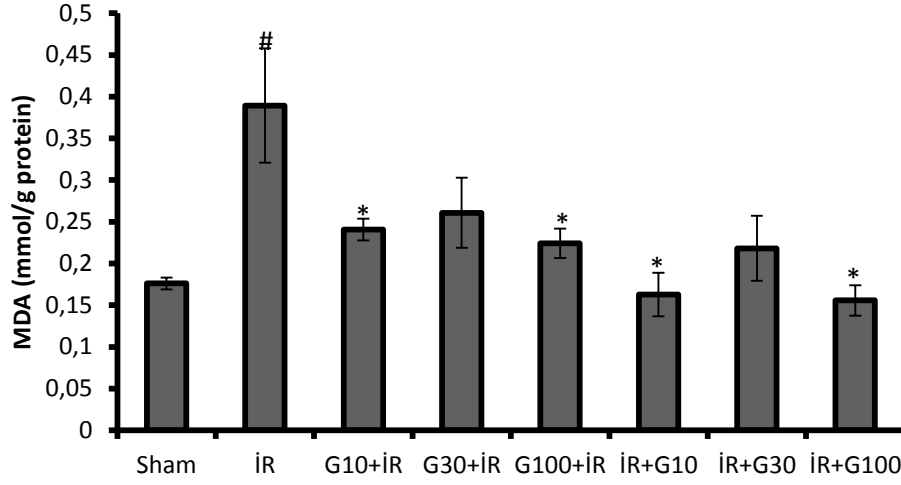
0,05'ten küçük çıkmıştır. Yani akciğer dokularından yapılan analiz sonucu MDA miktarları kıyaslandığında gruplar arası anlamlı fark vardır (Şekil 41).



Şekil 41. Akciğer dokusundaki, gruplara ait MDA miktarları. Veriler, grup ortalaması±standart hata değerini ifade etmektedir (Gruplar n=5-7). \*p<0,05 İR grubu ile anlamlı fark var.

Böbrek örneklerinden elde edilen sonuçlar istatistiksel analiz yöntemleri ile değerlendirildiğinde; İR grubu ile Sham, İR+G10 ve İR+G100 grupları arasındaki p değeri 0,05'ten küçük çıkmıştır. Yani böbrek dokularından yapılan analiz sonucu MDA miktarları kıyaslandığında gruplar arası anlamlı fark vardır (Şekil 42).

### Böbrek Dokuda MDA Miktarı

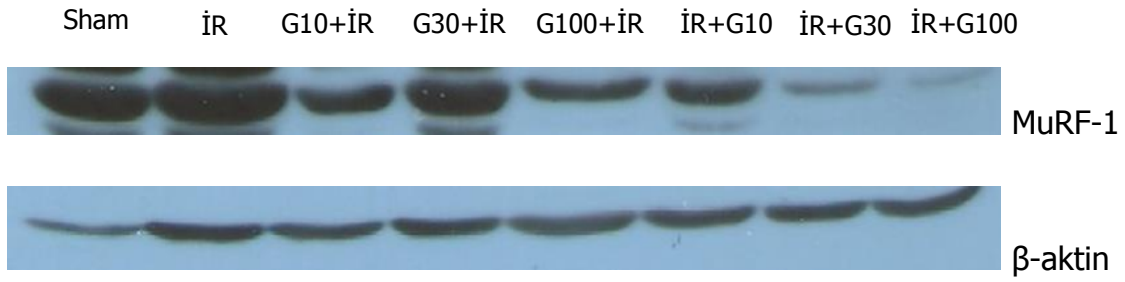


Şekil 42. Böbrek dokusundaki, gruplara ait MDA miktarları. Veriler, grup ortalaması±standart hata değerini ifade etmektedir (Gruplar n=5-7). #p<0,05 kabul edildiğinde Sham grubu ile arasında anlamlı fark var, \*p<0,05 kabul edildiğinde İR grubu ile arasında anlamlı fark var.

#### 4.1.3 MuRF-1 Ekspresyon Miktarı

Gruplar arası MuRF-1 ekspresyon miktarları kıyaslanırken, Western Blot analiz yöntemiyle elde edilen numerik veriler grup ortalamaları±standart hata (sh) baz alınarak değerlendirildi.

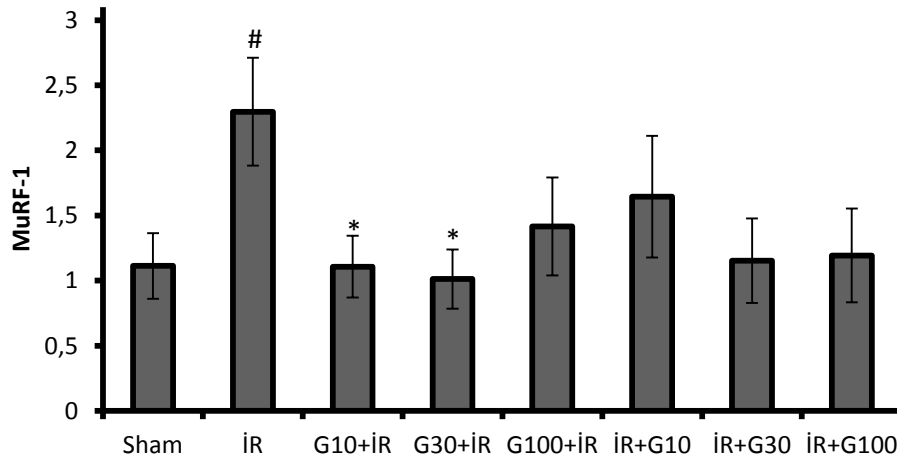
Her bir deney grubundan bir örnekle kas dokuda meydana gelen MuRF-1 ekspresyonu ve semi-kantitatif analizde kıyaslama amaçlı kullanılan  $\beta$ -aktin bantları Şekil 43'te yan yana (sırasıyla; Sham, İR, G10+İR, G30+İR, G100+İR, İR+G10, İR+G30, İR+G100) jel görüntüsü ile gösterilmiştir.



Şekil 43. Western Blot Jel Görüntüsü (Temsilidir).

Kas doku örneklerinden elde edilen bu sonuçlar, istatistiksel analiz yöntemleri ile değerlendirildiğinde İR grubu ile Sham, G10+İR ve G100+İR grupları arasındaki p değeri 0,05'ten küçük çıkmıştır. Yani kas dokularından yapılan analiz sonucu MuRF-1 miktarları kıyaslandığında gruplar arası anlamlı fark vardır (Şekil 44).

#### Kas Dokuda MuRF-1 Ekspresyon Miktarı



Şekil 44. Kas dokudaki, gruplara ait MuRF-1 protein ekspresyon miktarları. Veriler, grup ortalama±standart hata değerini ifade etmektedir (Gruplar n=7) #p<0,05 kabul edildiğinde Sham grubu ile arasında anlamlı fark var, \*p<0,05 kabul edildiğinde İR grubu ile arasında anlamlı fark var.

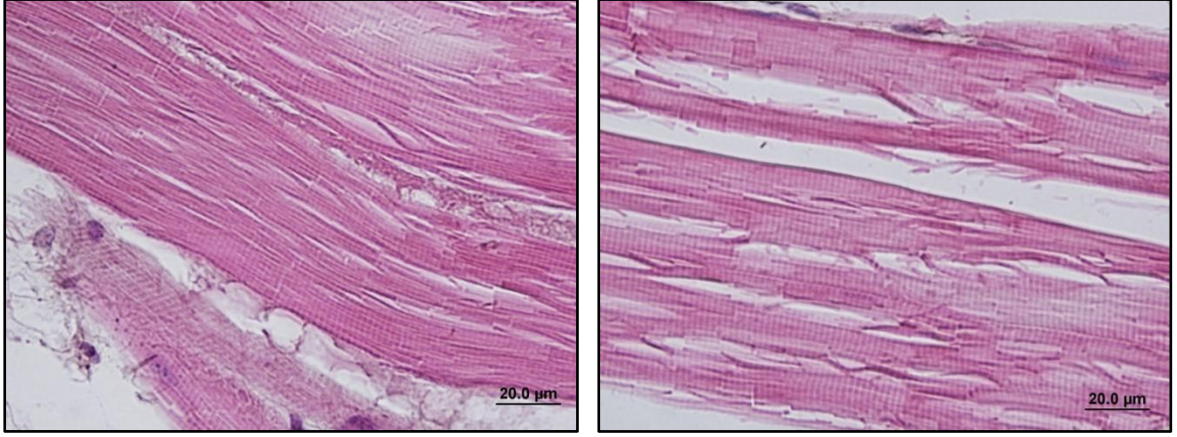
## 4.2 Histopatolojik Bulgular

### 4.2.1 Kas Doku

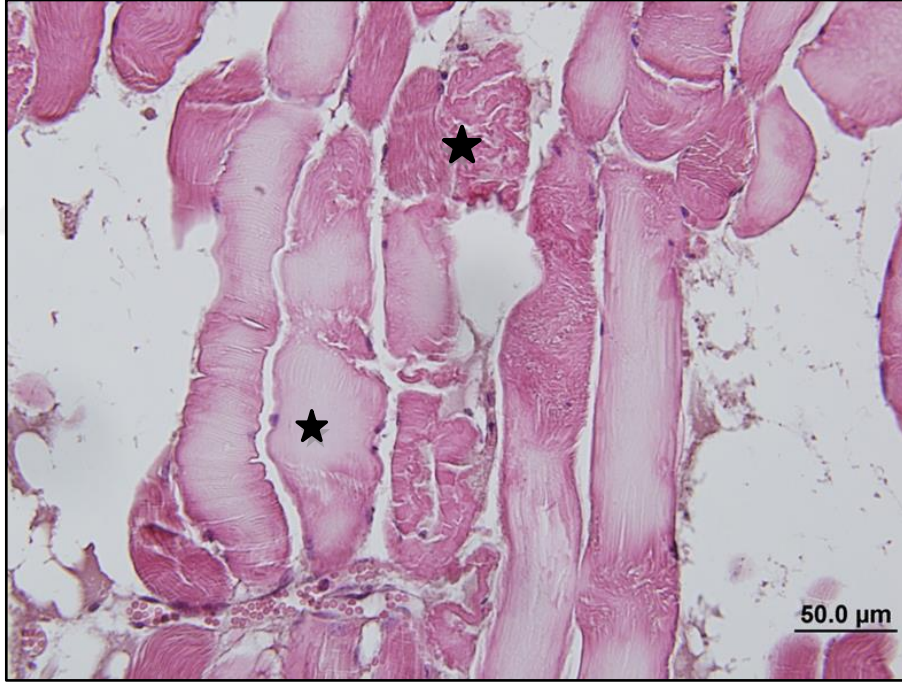
Gastrokinemius kas dokusu kesitlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde Sham grubunun normal yapıda olduğu gözlenirken (Şekil 45), İ-R grubunda ise miyofibrillerde dejenerasyon, vasküler konjesyon, hemoraji ve mononükleer hücre infiltrasyonu saptandı (Şekil 46).

İskemi öncesi ghrelin verilen deney gruplarında miyofibrillerde az miktarda dejenerasyon ve disorganizasyon olduğu gözlenirken (Şekil 47-49), reperfüzyon başlangıcında verilen ghrelin deney gruplarında miyofibril dejenerasyon ve disorganizasyonun iskemi öncesi gruplara göre daha az olduğu (Şekil 50-52), 100 µg/kg dozunda verilen ghrelinin ise daha etkili olduğu görüldü (Şekil 52).

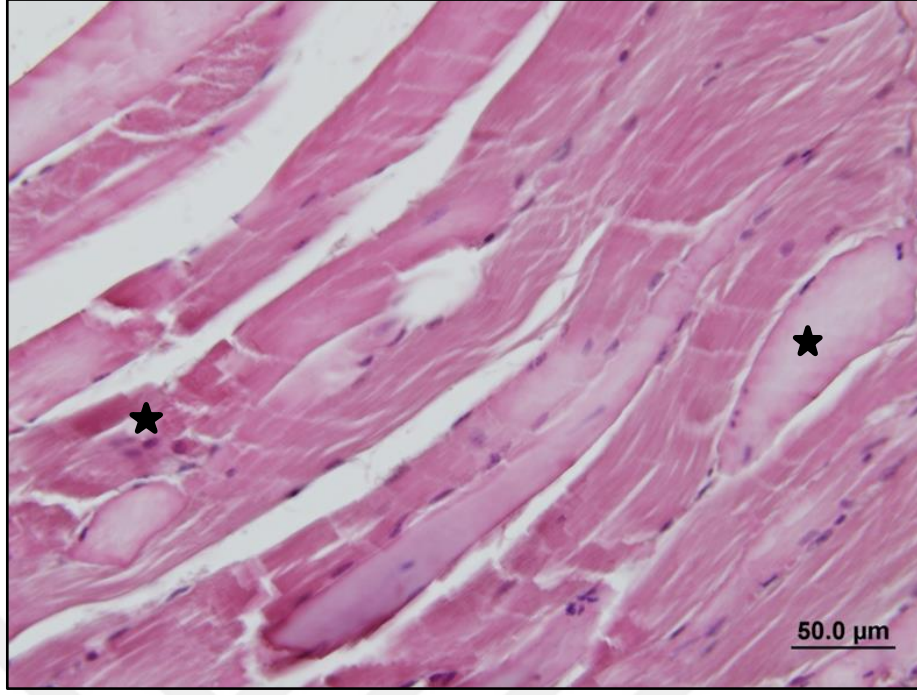
Kas dokularının TNF-α immünohistokimyasal incelemelerinde Sham grubunda az miktarda gözlenen immunreaktivitenin (Şekil 53) İ-R grubundada arttığı (Şekil 54, 55), iskemi öncesi ghrelin verilen deney gruplarında (Şekil 56-59) ve reperfüzyon başlangıcında ghrelin verilen deney gruplarında ise değişen ve azalan derecelerde immunreaktivitenin olduğu görüldü (Şekil 60-63). Şekil 64'te elde edilen veriler değerlendirilip grafik ile sunulmuştur.



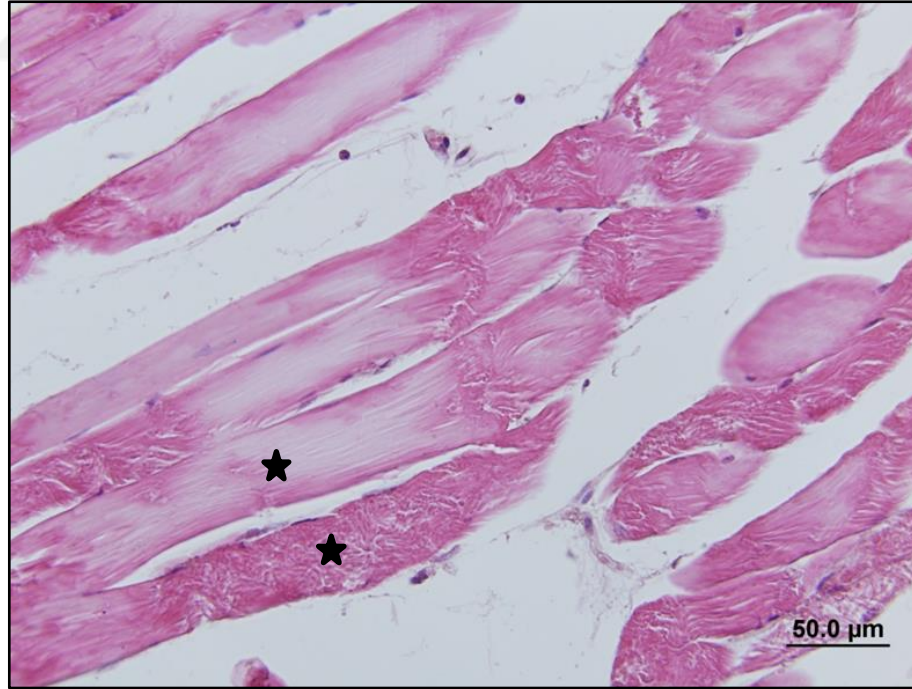
Şekil 45. Sham grubunda, gastrokinemus kas dokusu (longitudinal kesit) olağan olarak izlenmektedir (H-E x 100).



Şekil 46. İR grubunda gastrokinemius kas dokusunda (longitudinal kesit) miyofibrillerde dejenerasyon ve disorganizasyon gözlenmektedir (★, H-E x 40).

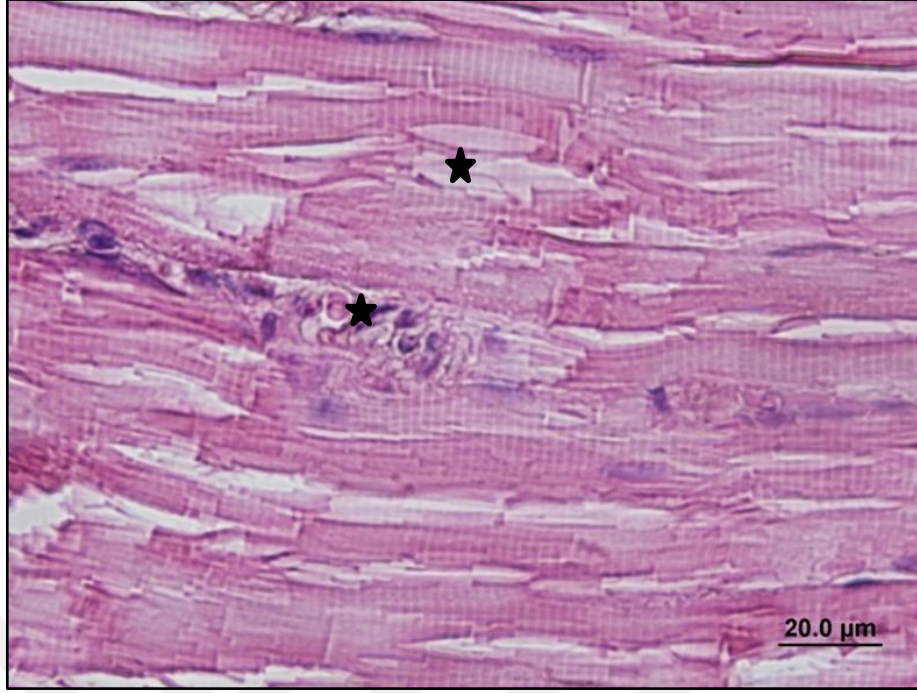


Şekil 47. G10+İR grubunda gastrokinemius kas dokusunda (longitudinal kesit) miyofibrillerde dejenerasyon ve disorganizasyon gözlenmektedir (★, H-E x 40).

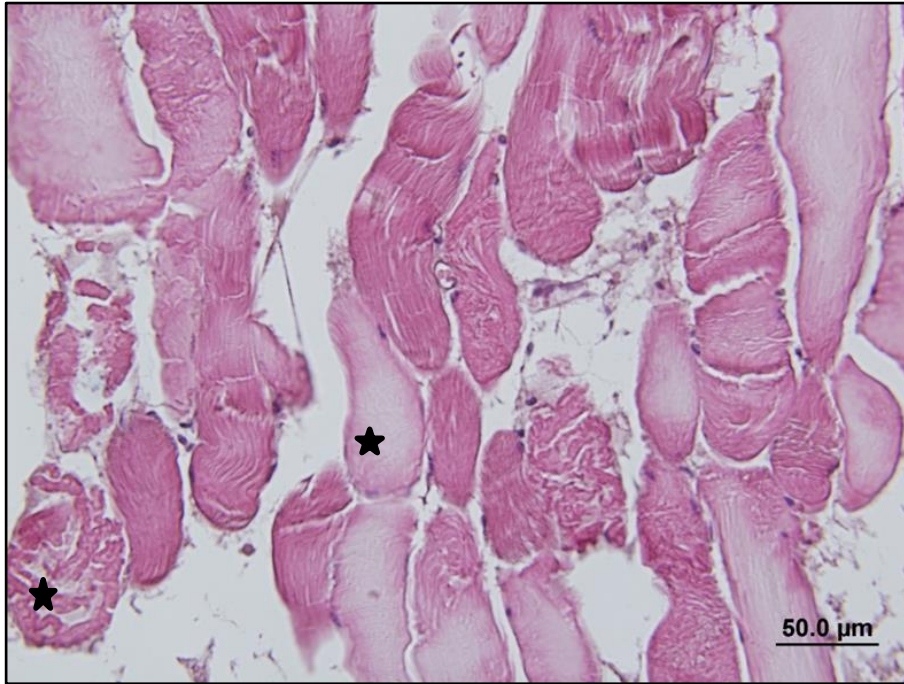


Şekil 48. G30+İR grubunda gastrokinemius kas dokusunda (longitudinal kesit) miyofibrillerde dejenerasyon ve disorganizasyon gözlenmektedir (★, H-E x 40).

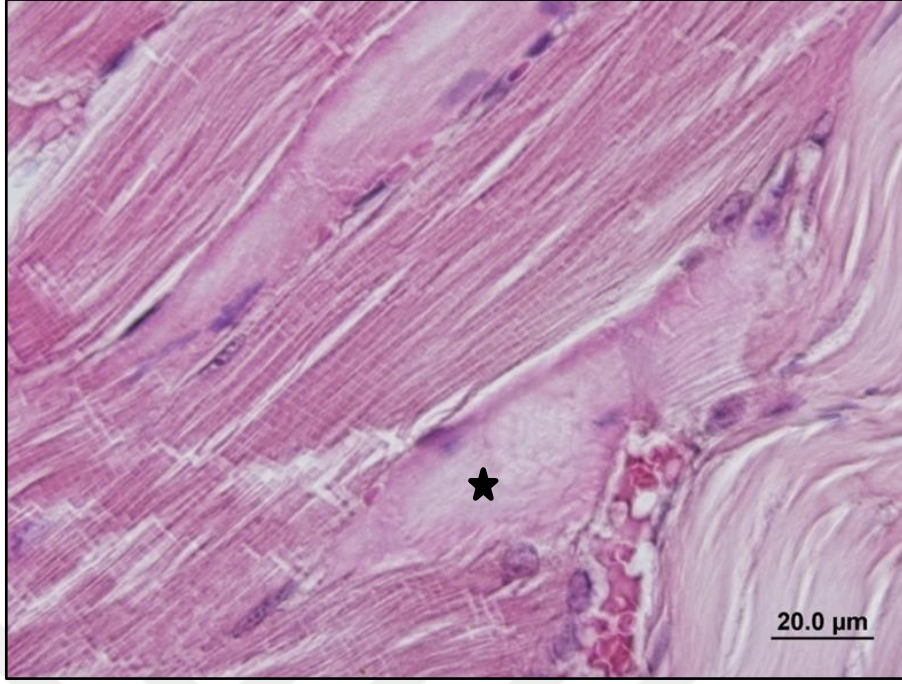




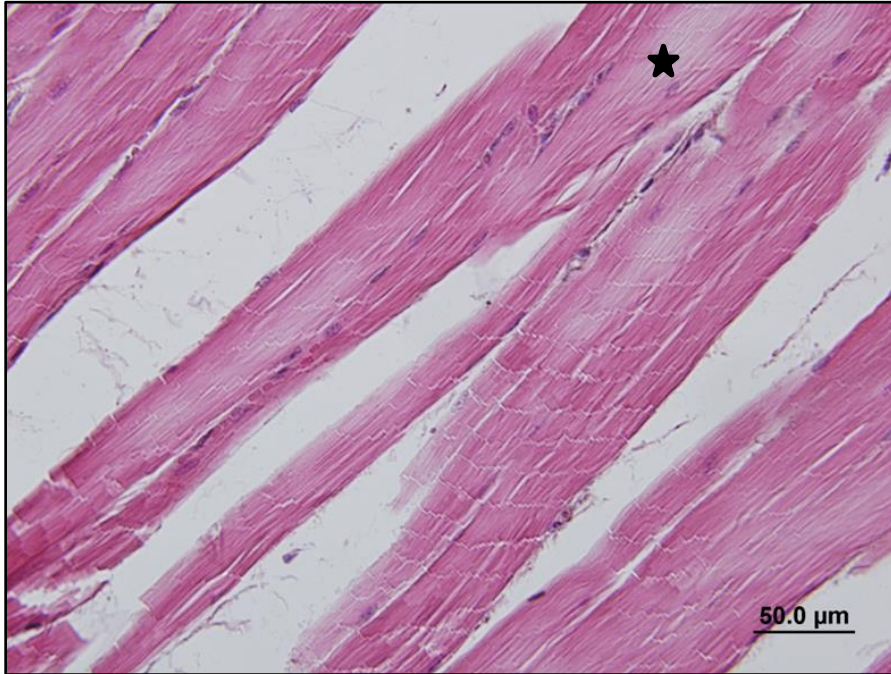
Şekil 49. G100+İR grubunda gastrokinemius kas dokusunda (longitudinal kesit) miyofibrillerde dejenerasyon ve disorganizasyon gözlenmektedir (★, H-E x 100).



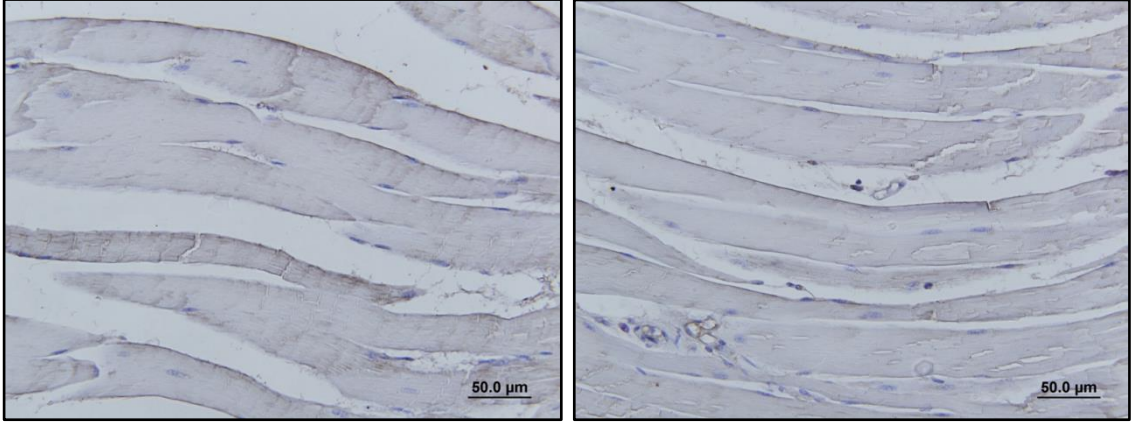
Şekil 50. İR+G10 grubunda gastrokinemius kas dokusunda (longitudinal kesit) miyofibrillerde dejenerasyon ve disorganizasyon gözlenmektedir (★, H-E x 40).



Şekil 51. İR+G30 grubunda gastrokinemius kas dokusunda (longitudinal kesit) miyofibrillerde dejenerasyon ve disorganizasyon gözlenmektedir (★, H-E x 100).

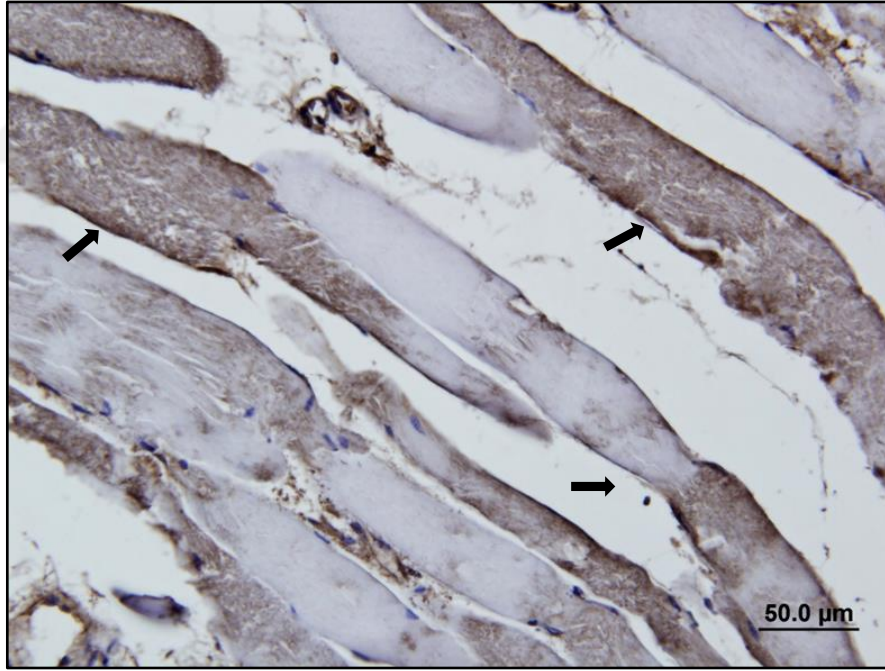


Şekil 52. İR+G100 grubunda gastrokinemius kas dokusunda (longitudinal kesit) miyofibrillerde dejenerasyon ve disorganizasyon gözlenmektedir (★, H-E x 40).

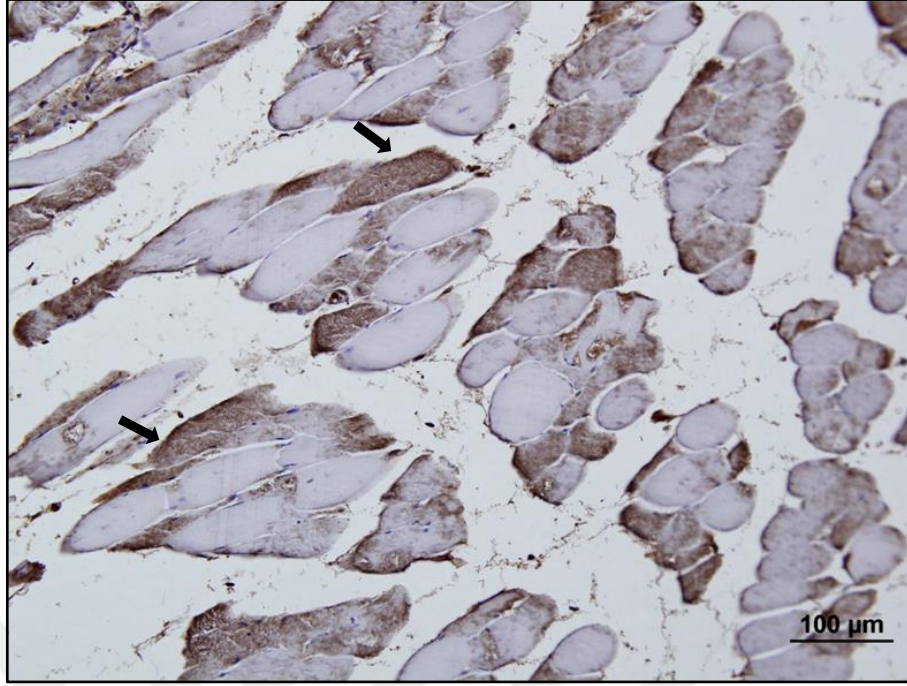


Şekil 53. Sham grubunda normal yapıdaki gastrokinemius kas dokusu (longitudinal kesit), TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi (x40).

İR Grubu:

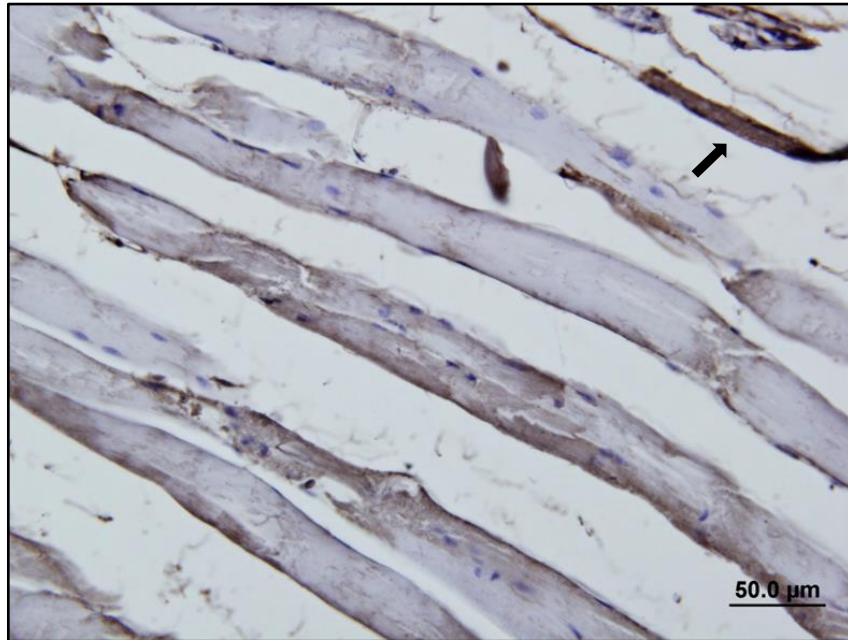


Şekil 54. Gastrokinemius kas dokusunda (longitudinal kesit) TNF- $\alpha$  pozitif alanlar (→), TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi (x40).

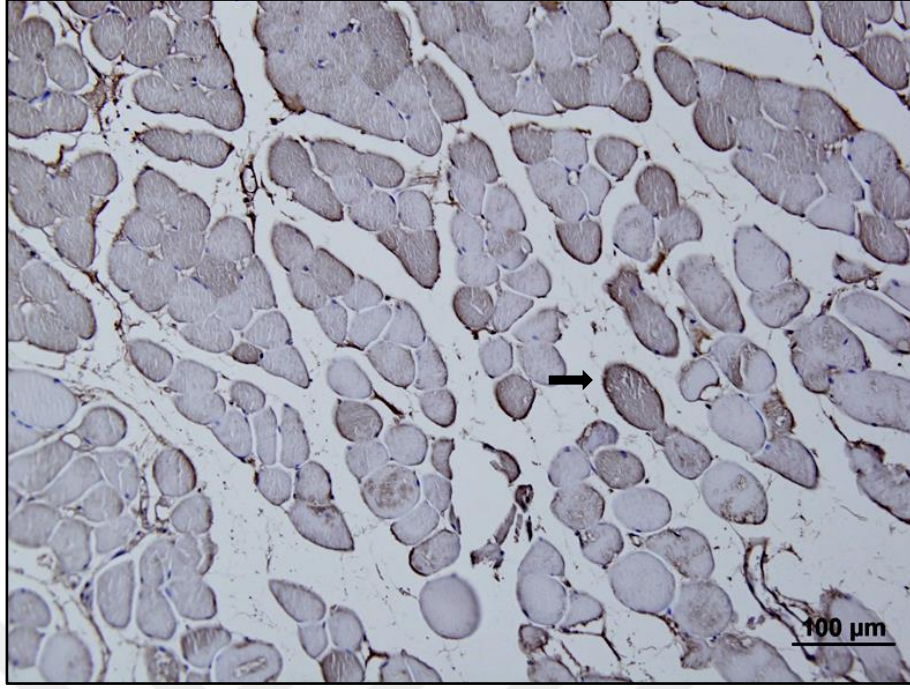


Şekil 55. Gastrokinemius kas dokusunda (transversal kesit) TNF- $\alpha$  pozitif alanlar (→), TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi (x20).

G10+İR Grubu:

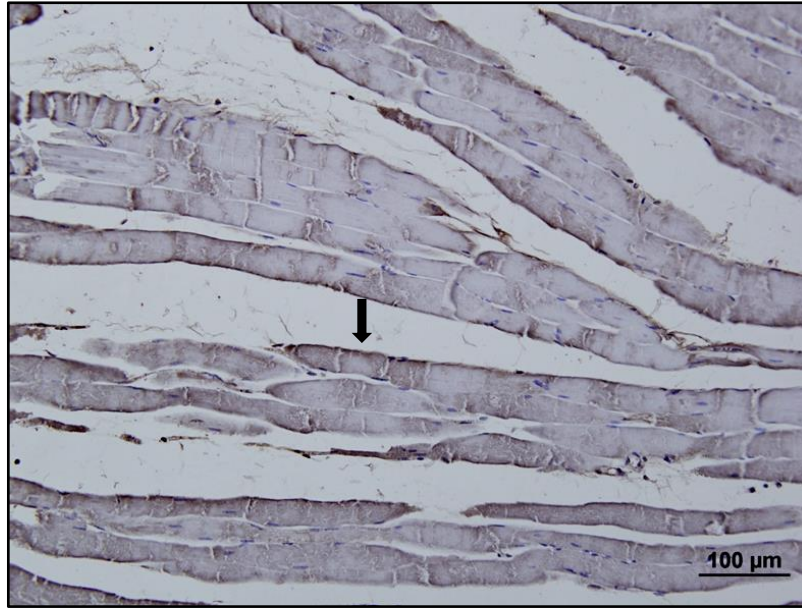


Şekil 56. Gastrokinemius kas dokusunda (longitudinal kesit) TNF- $\alpha$  pozitif alanlar (→), TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi (x40).



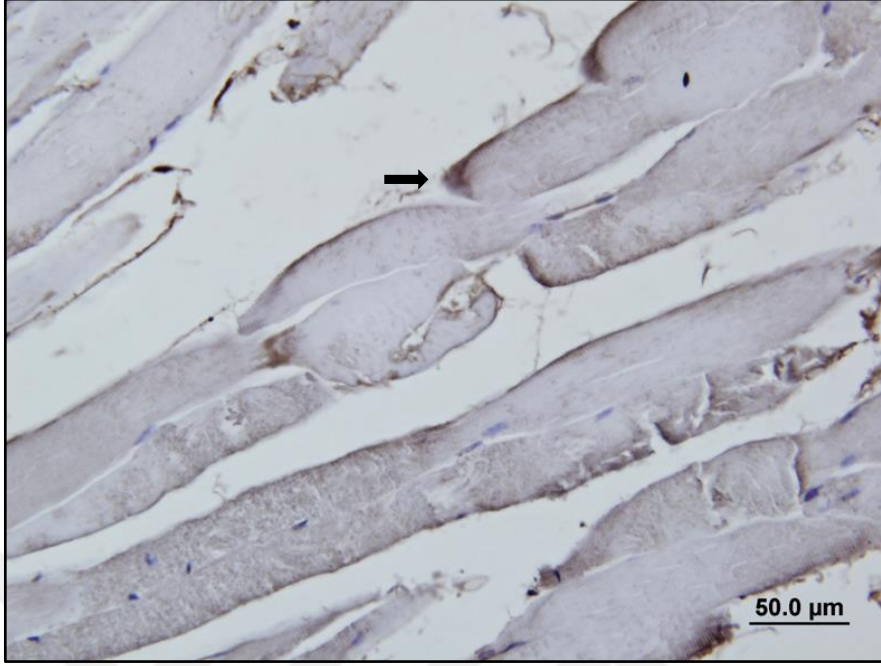
Şekil 57. Gastrokinemius kas dokusunda (transversal kesit) TNF- $\alpha$  pozitif alanlar (→), TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi (x20).

G30+İR Grubu:



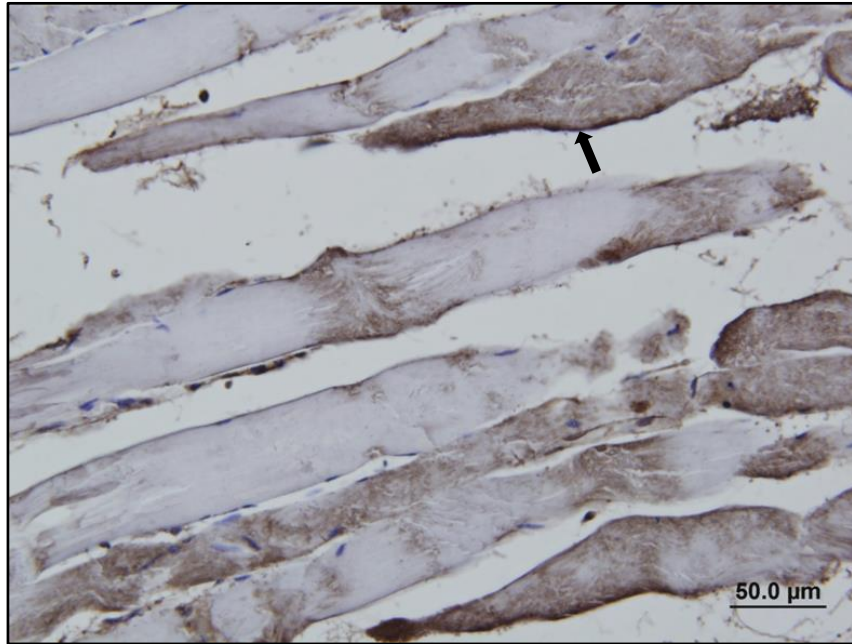
Şekil 58. Gastrokinemius kas dokusunda (longitudinal kesit) TNF- $\alpha$  pozitif alanlar (→), TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi (x20).

G100+İR Grubu:

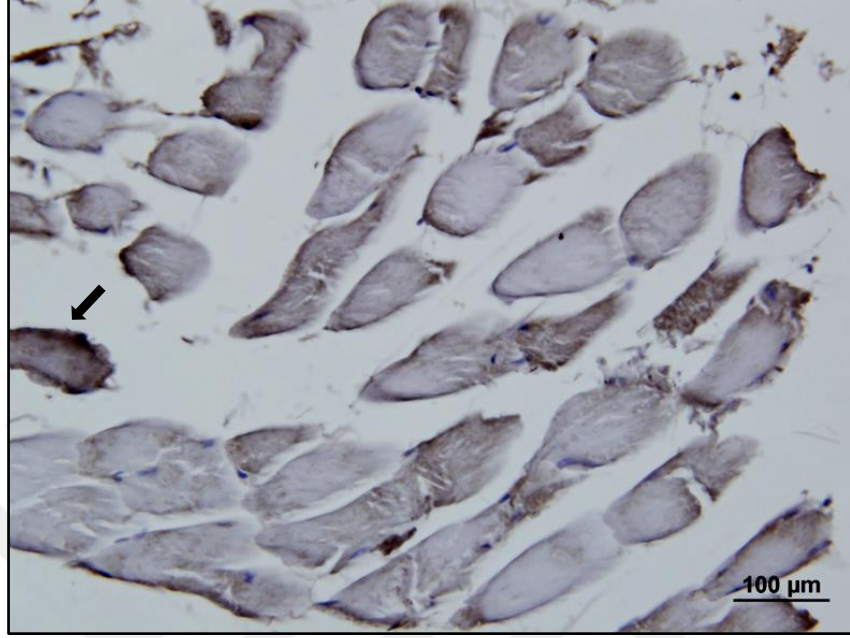


Şekil 59. Gastrokinemius kas dokusunda (longitudinal kesit) TNF- $\alpha$  pozitif alanlar (→), TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi (x40).

İR+G10 Grubu:

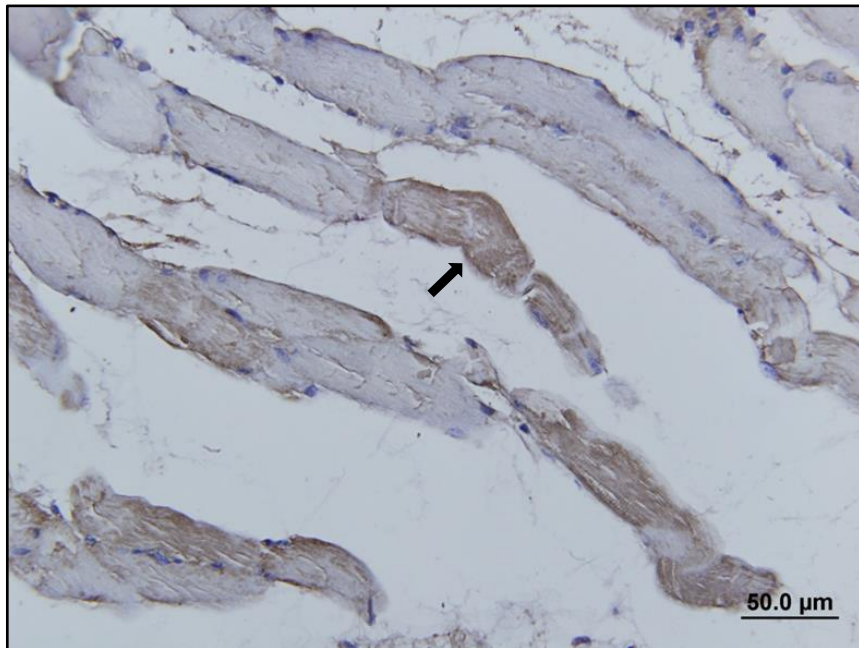


Şekil 60. Gastrokinemius kas dokusunda (longitudinal kesit) TNF- $\alpha$  pozitif alanlar (→), TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi (x40).



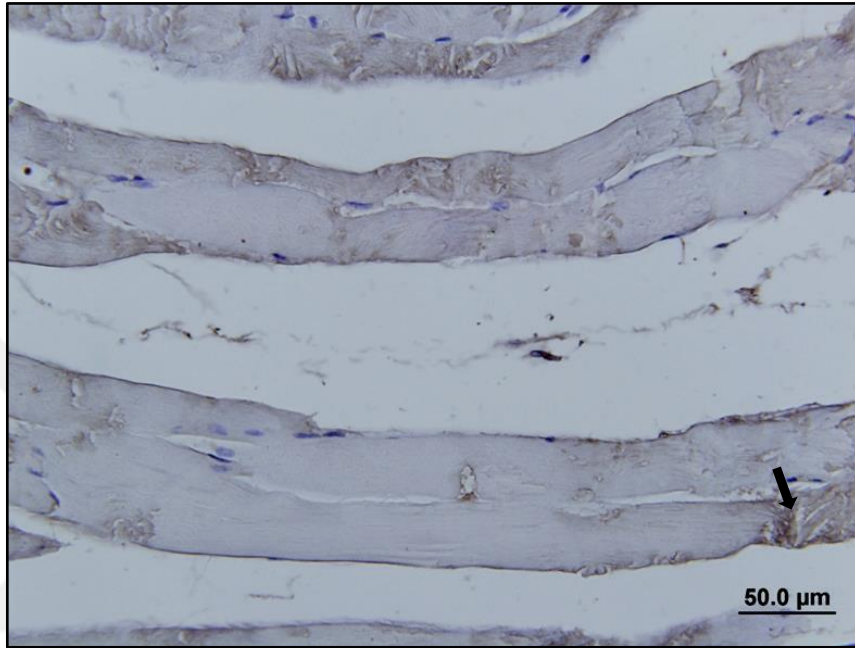
Şekil 61. Gastrokinemius kas dokusunda (transversal kesit) TNF- $\alpha$  pozitif alanlar (→), TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi (x20).

İR+G30 Grubu:

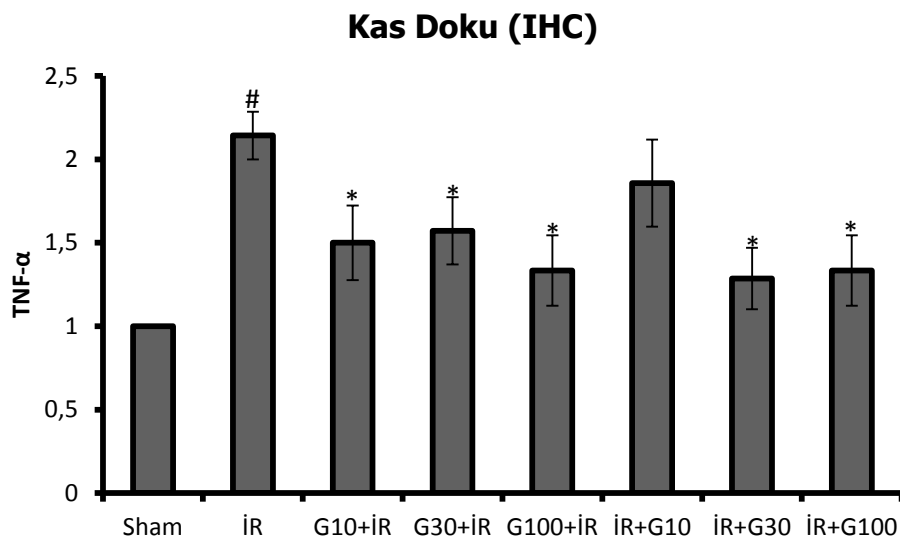


Şekil 62. Gastrokinemius kas dokusunda (longitudinal kesit) TNF- $\alpha$  pozitif alanlar (→), TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi (x40).

İR+G100 Grubu:



Şekil 63. Gastrokinemius kas dokusunda (longitudinal kesit) TNF- $\alpha$  pozitif alanlar (→), TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi (x40).





Şekil 64. Kas dokusundaki, gruplara ait TNF- $\alpha$  immunreaktivite düzeyleri. Veriler, grup ortalaması±standart hata değerini ifade etmektedir (Gruplar n=5-7). # p<0,05 Sham grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark var, \*p<0,05 İR grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark var.

#### 4.2.2 Böbrek Dokusu

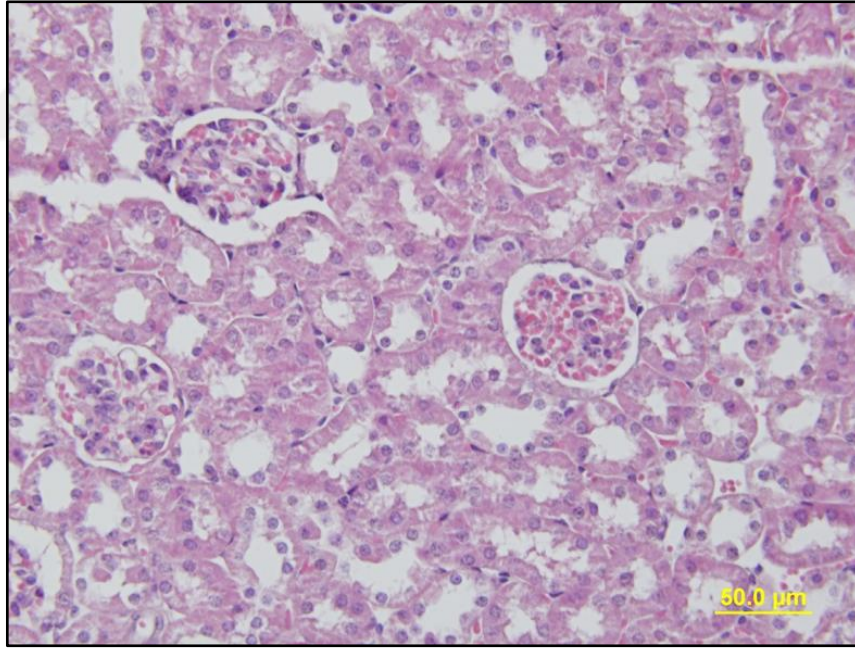
DeneySEL olarak oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarında böbrek dokusunun histomorfolojik olarak incelenmesinde; kesitlerde ışık mikroskopik olarak; mononükleer hücre infiltrasyonu, eritrosit ekstravazasyonu, renal korpüskül morfolojisi, proksimal tübüluslarda vakuolizasyon, fırçamsı kenar kaybı, tübüler dilatasyon ve kast formasyonu değerlendirildi. Kesitlerden elde edilen görüntüler değerlendirilirken semikantitatif olarak tübülointertisyel hasar için bu bulgular açısından skorlama yapıldı.

Böbrek dokusunun kesitlerinin H-E ile incelenmesinde Sham grubunda normal morfolojik özellikler gözlemlendi. Korteksteki renal korpüsküllerin, Bowman kapsülünün pariyetal ve visseral yaprağının normal histolojik yapıda olduğu belirlendi. Proksimal tübül ve distal tübül, Henle kulbu, kollektör tübüllerde yapıların normal olduğu gözlemlendi. Epitel hücreleri karakteristik yapı ve özelliklerini korumaktaydı (Şekil 65).

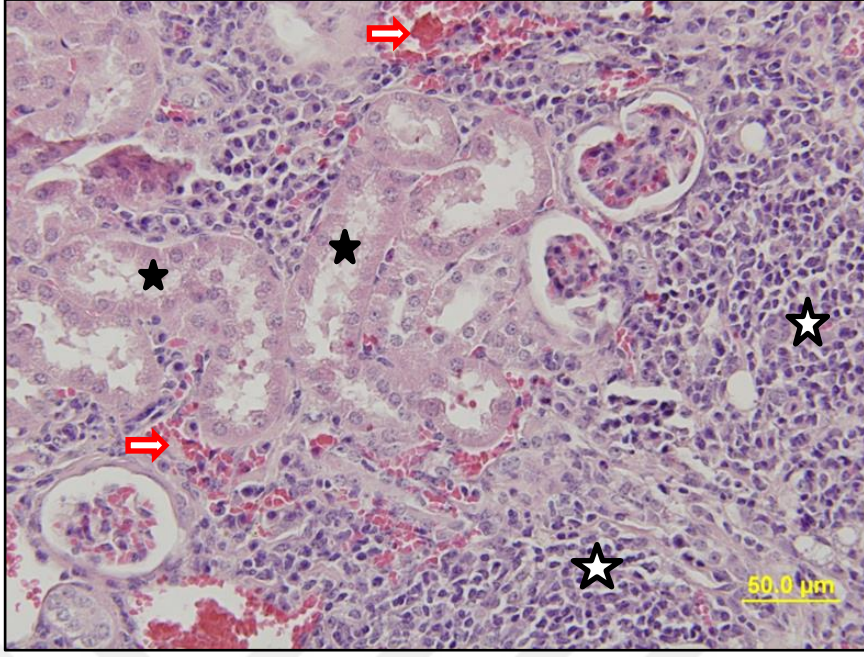
İR grubunda peritübüler alanda bazı alanlarda mononükleer hücre infiltrasyonu, nadiren tübüler atrofi, tübüler dilatasyon ve vakuolizasyon gözlemlendi. Kortekste damarlarda bol miktarda vazodilatasyon ve eritrosit ekstravazasyonu dikkati çekti (Şekil 66).

Ghrelinin iskemi öncesi koruyucu etkisinin (Şekil 67-69), reperfüzyon başlangıcında ghrelin verilen gruba (Şekil 70-72) göre daha az olduğu, özellikle reperfüzyon başlangıcında 100 µg/kg ghrelin verilen grupta (Şekil 72), tedavinin daha etkili olduğu görüldü. H-E boyama ile yapılan skorlama sonucu elde edilen veriler Şekil 73'te grafik ile sunulmuştur.

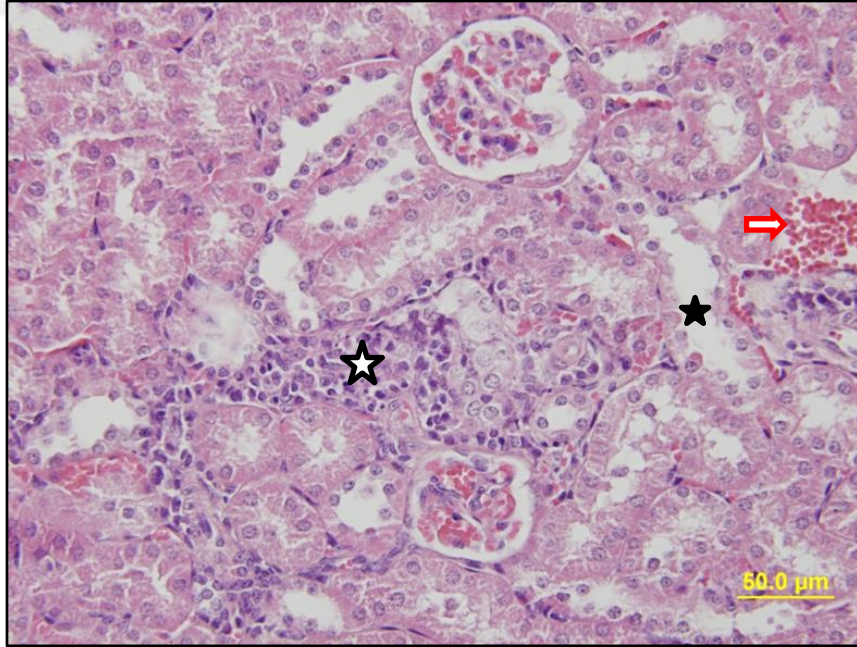
Böbrek dokularının TNF-α immünohistokimyasal incelemelerinde Sham grubunda (Şekil 74) az miktarda gözlenen immunreaktivitenin İR grubunda (Şekil 75) arttığı, ghrelin gruplarında (Şekil 76-81) ise değişen derecelerde immunreaktivitenin olduğu görüldü. Yapılan skorlama sonucu elde edilen veriler Şekil 82'de grafik ile sunulmuştur.



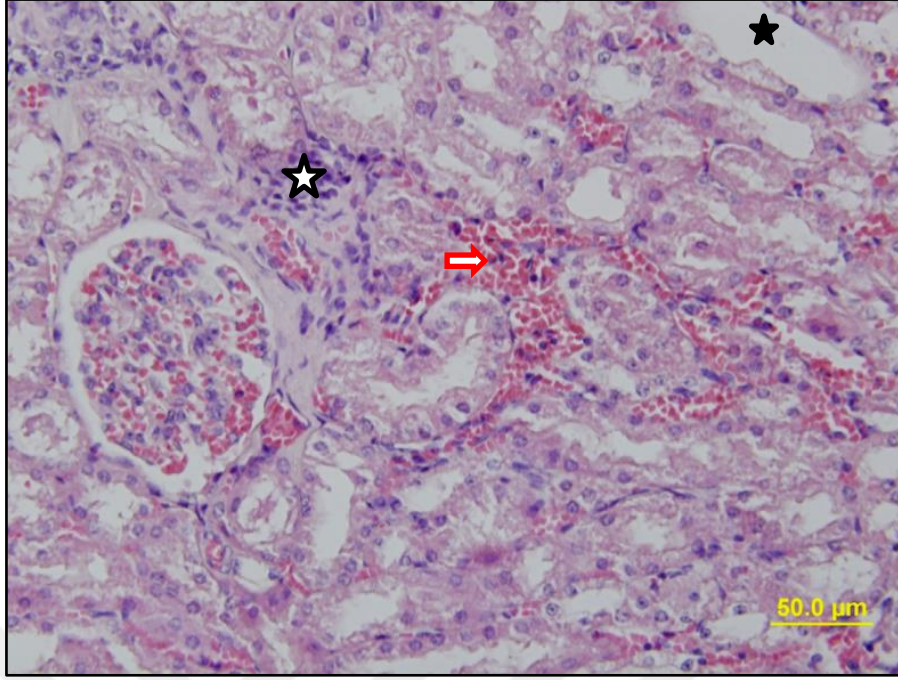
Şekil 65. Sham grubunda böbrek dokusu olağan izlenmektedir, H-E x40.



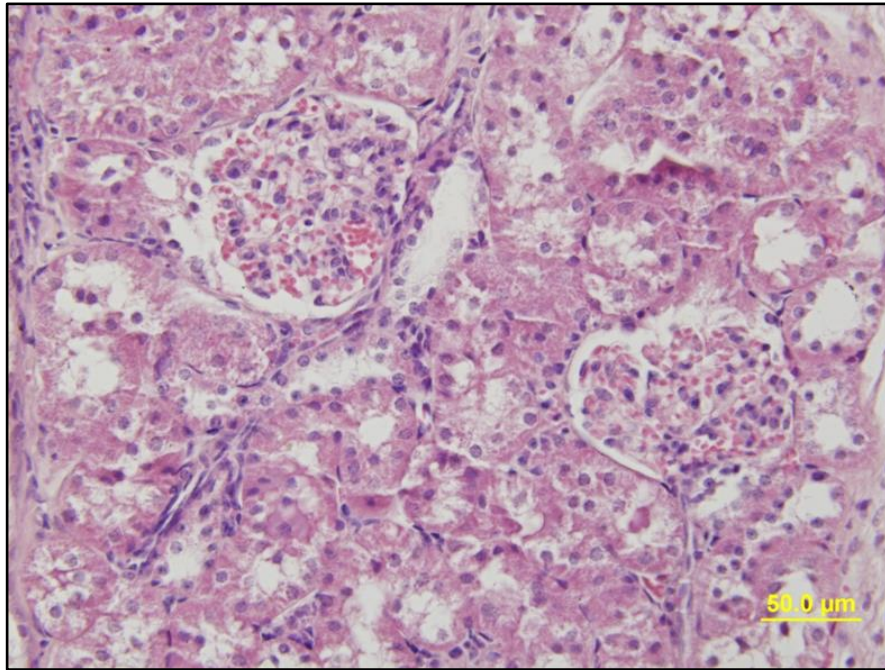
Şekil 66. İR grubunda böbrek dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonu (★), eritrosit ekstravazasyonu (⇒) ve tübüler dilatasyon gözlenmektedir (★), H-E x40.



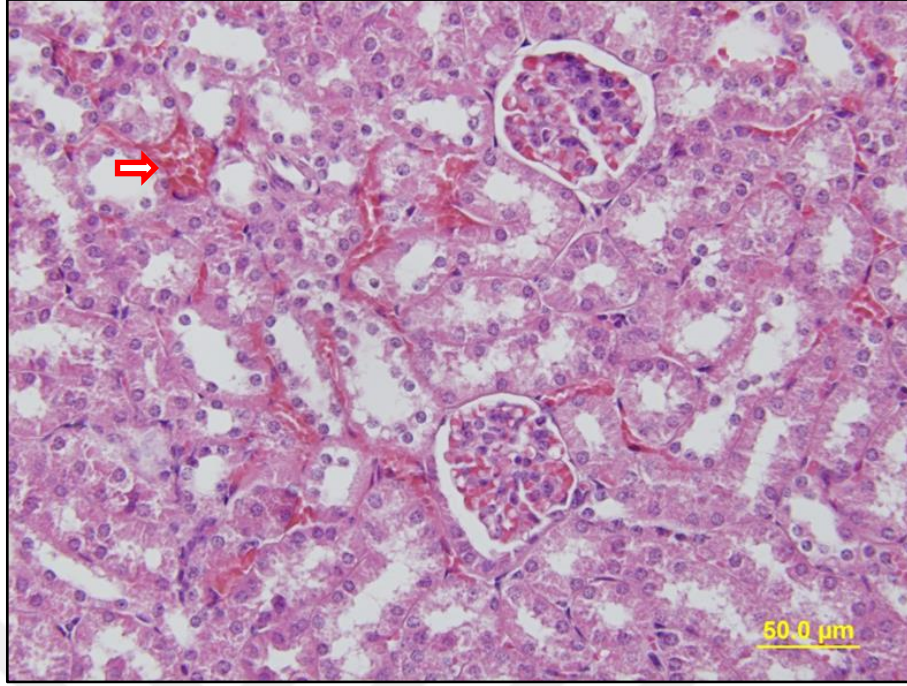
Şekil 67. G10+İR grubunda böbrek dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonu (★), eritrosit ekstravazasyonu (⇒) ve tübüler dilatasyon gözlenmektedir (★), H-E x40.



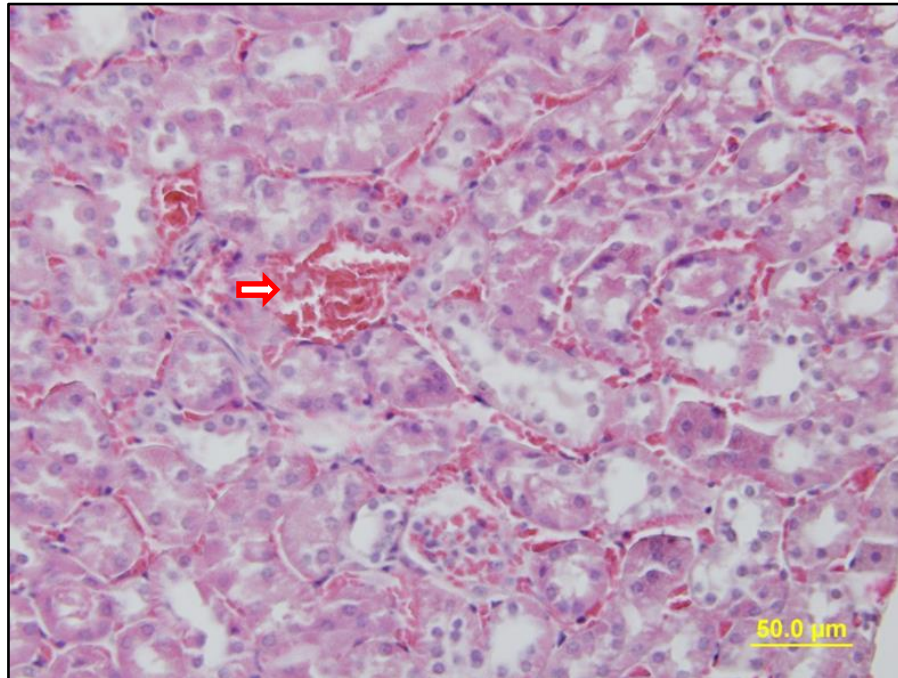
Şekil 68. G30+İR grubunda böbrek dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonu (★), eritrosit ekstravazasyonu (⇨) ve tübüler dilatasyon gözlenmektedir (★), H-E x40.



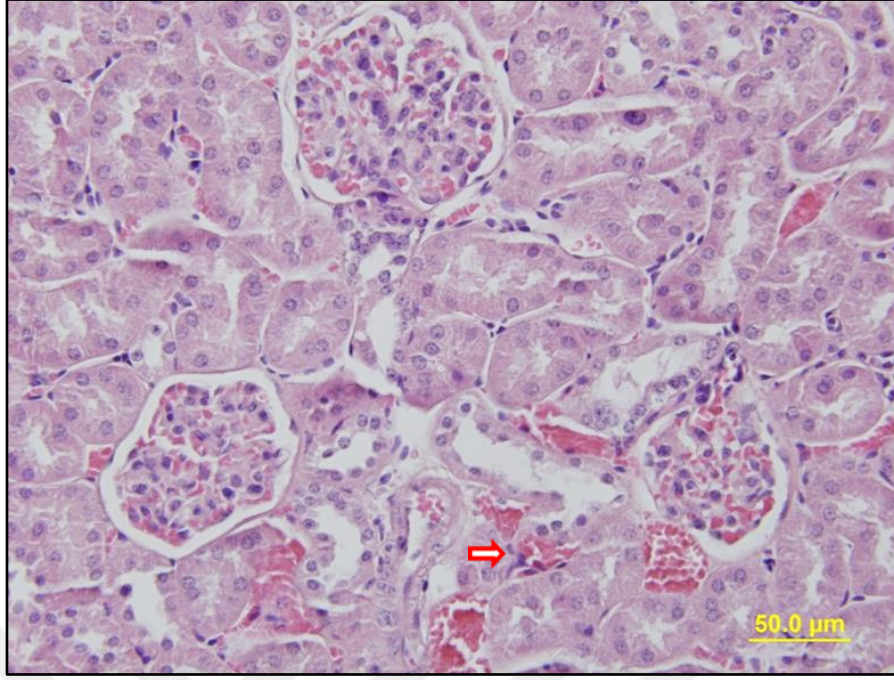
Şekil 69. G100+İR grubunda böbrek dokusu olağan izlenmektedir, H-E x40.



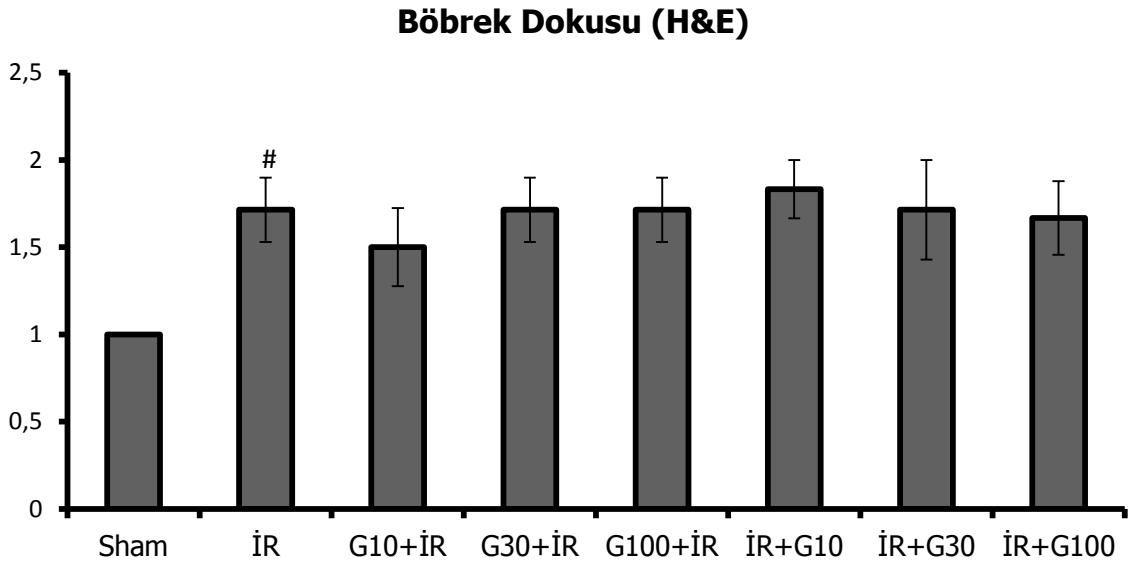
Şekil 70. İR+G10 grubunda böbrek dokusunda eritrosit ekstravazasyonu gözlenmektedir (⇒), H-E x40.



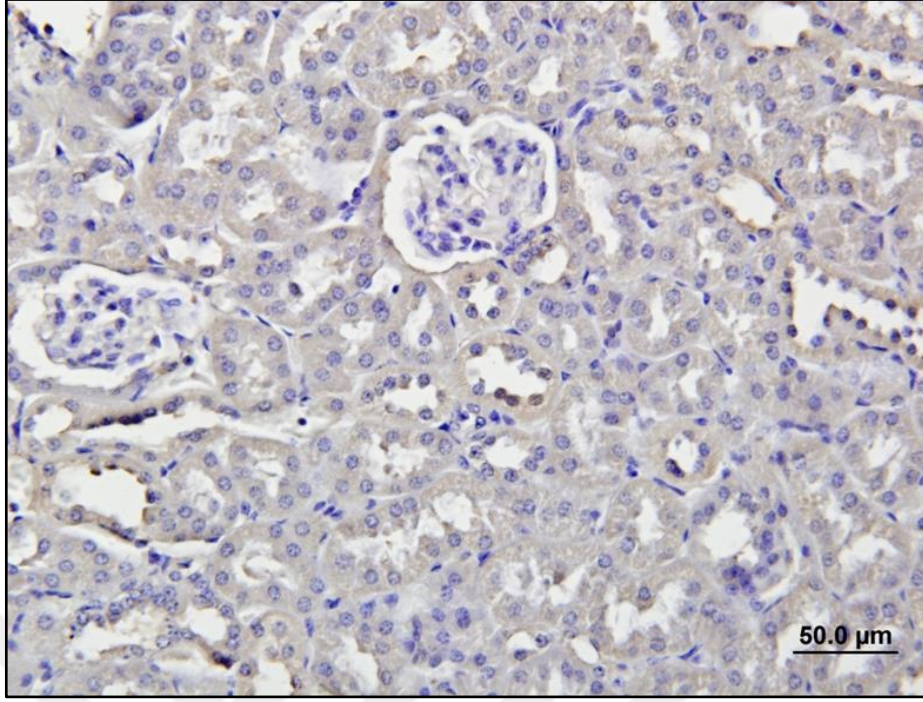
Şekil 71. İR+G30 grubunda böbrek dokusunda eritrosit ekstravazasyon gözlenmektedir (⇒), H-E x40.



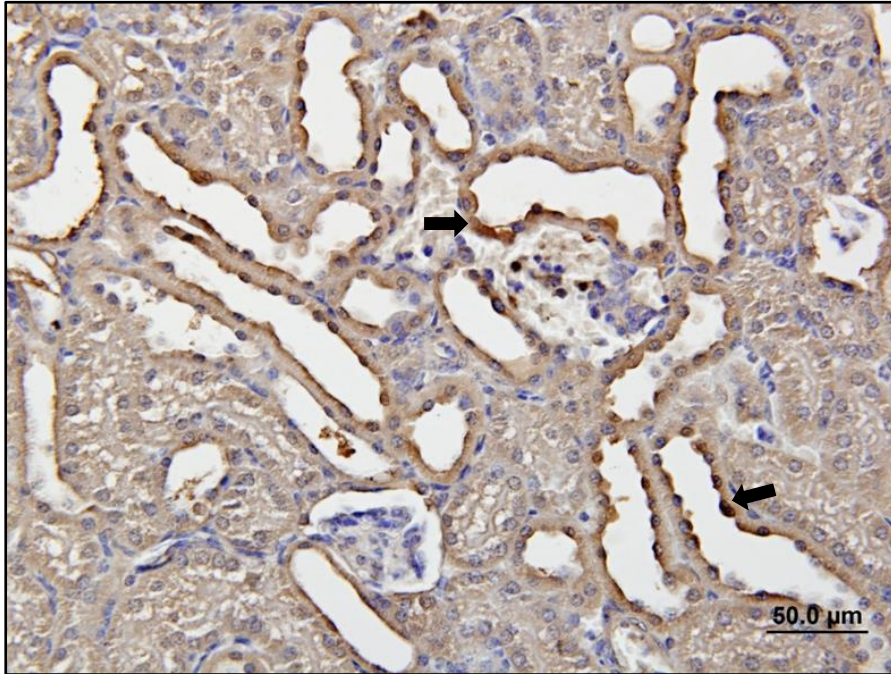
Şekil 72. İR+G100 grubunda böbrek dokusunda eritrosit ekstravazasyonu gözlenmektedir (⇒), H-E x40.



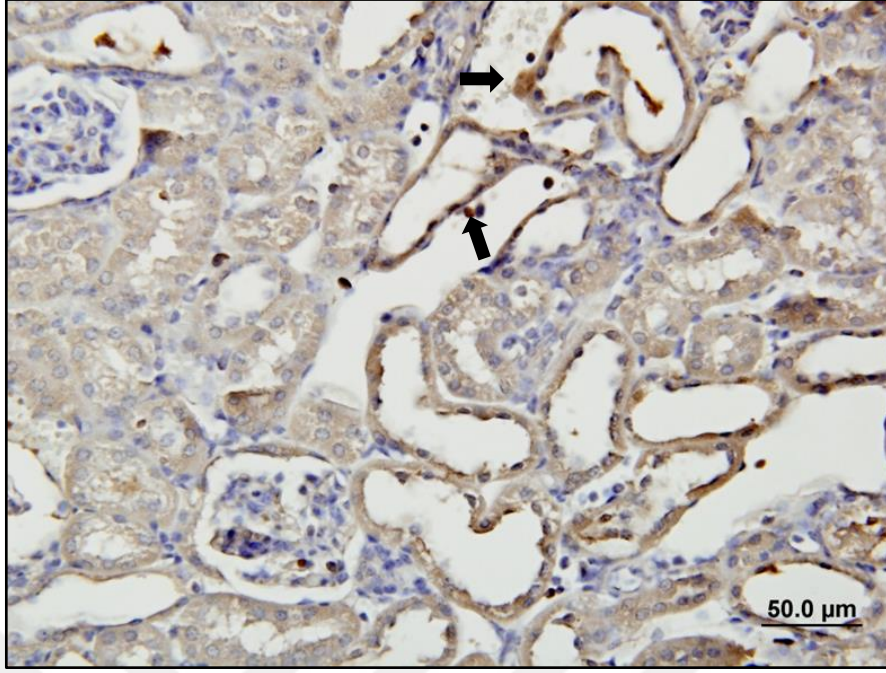
Şekil 73. Böbrek dokusundaki, gruplara ait doku hasarlanma düzeyleri. Veriler, grup ortalaması±standart hata (Gruplar n=5-7) değerini ifade etmektedir. #p<0,05 Sham grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark var.



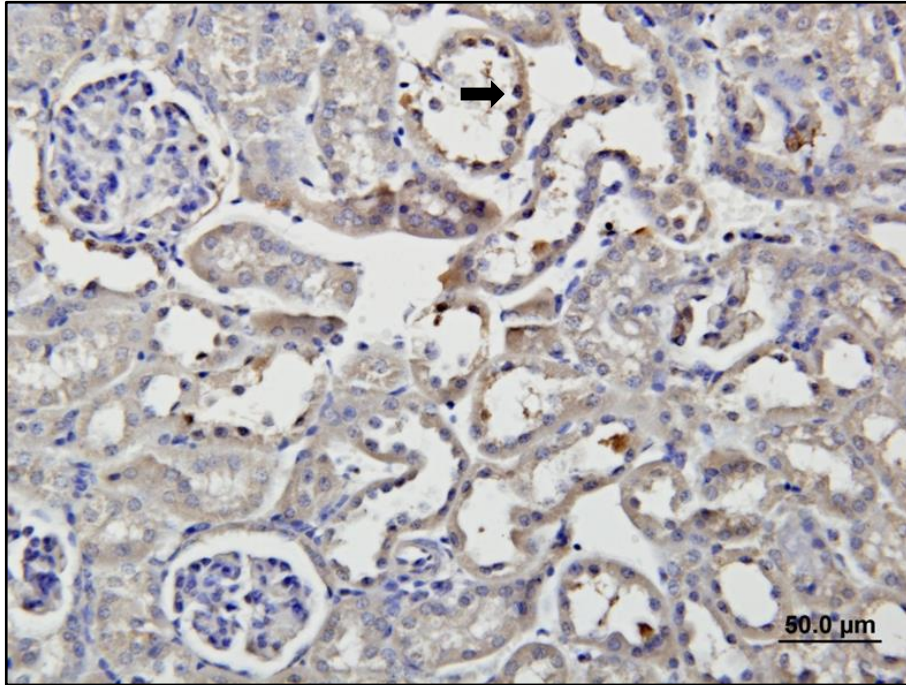
Şekil 74. Sham grubuna ait normal yapıdaki böbrek dokusu TNF-α immunreaktivitesi, x40.



Şekil 75. İR grubuna ait böbrek dokusunda TNF-α pozitif hücreler (➡), TNF-α immunreaktivitesi, x40.

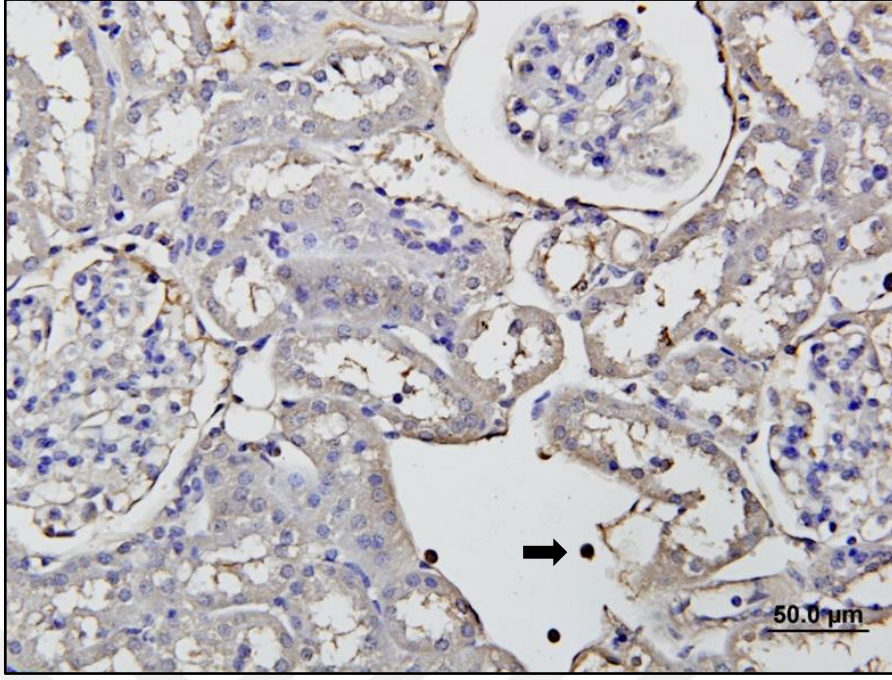


Şekil 76. G10+İR grubuna ait böbrek dokusunda TNF- $\alpha$  pozitif hücreler (➡), TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi, x40.

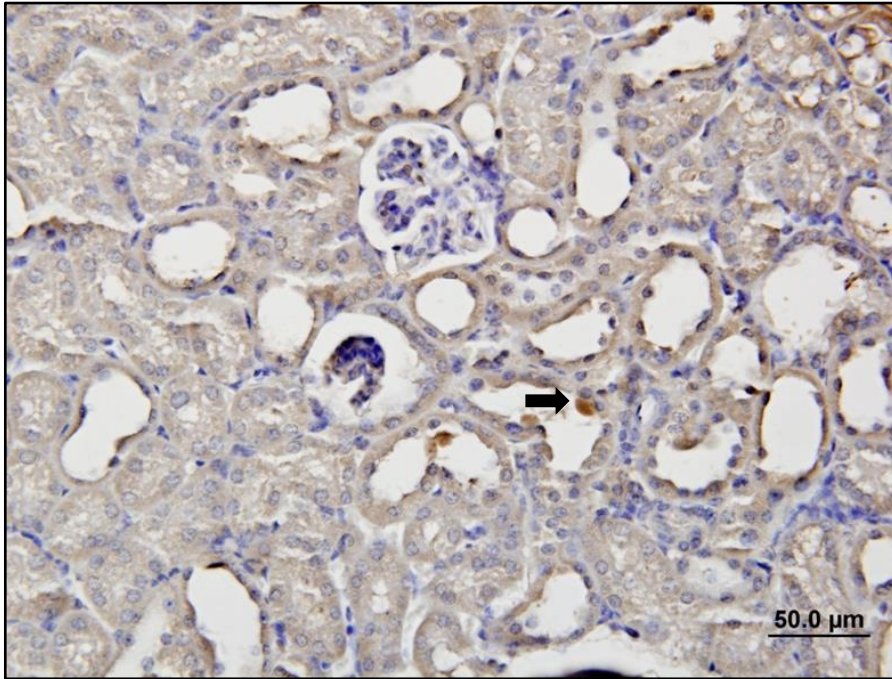


Şekil 77. G30+İR grubuna ait böbrek dokusunda TNF- $\alpha$  pozitif hücreler (➡), TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi, x40.

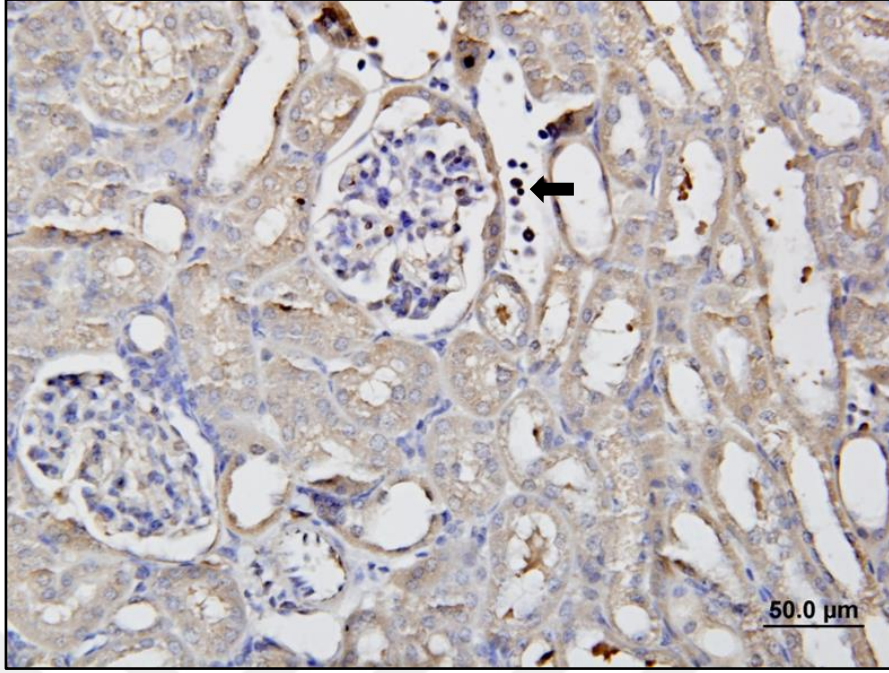




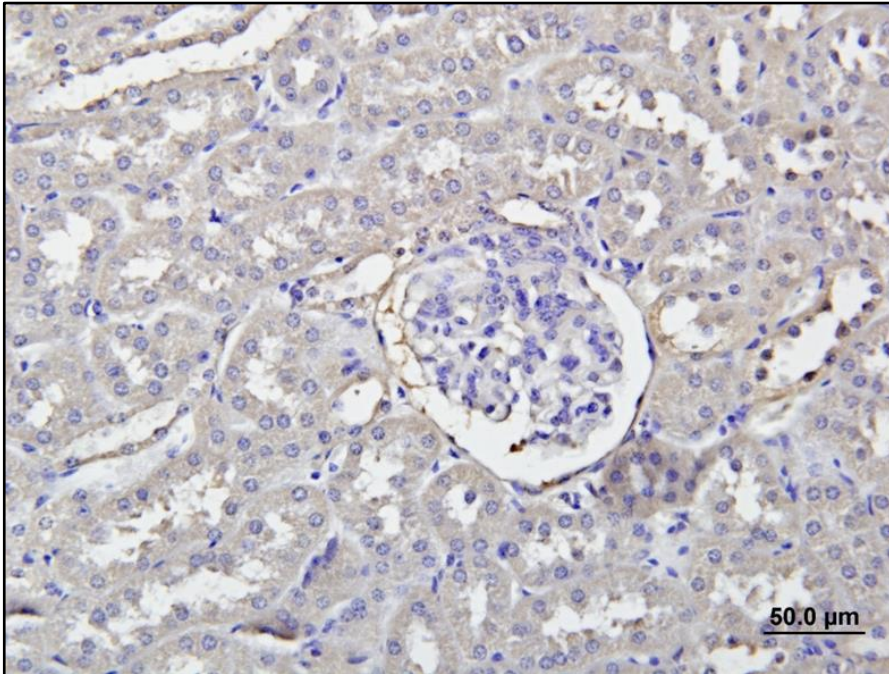
Şekil 78. G10+İR grubuna ait böbrek dokusunda TNF-α pozitif hücreler (➡), TNF-α immunreaktivitesi, x40.



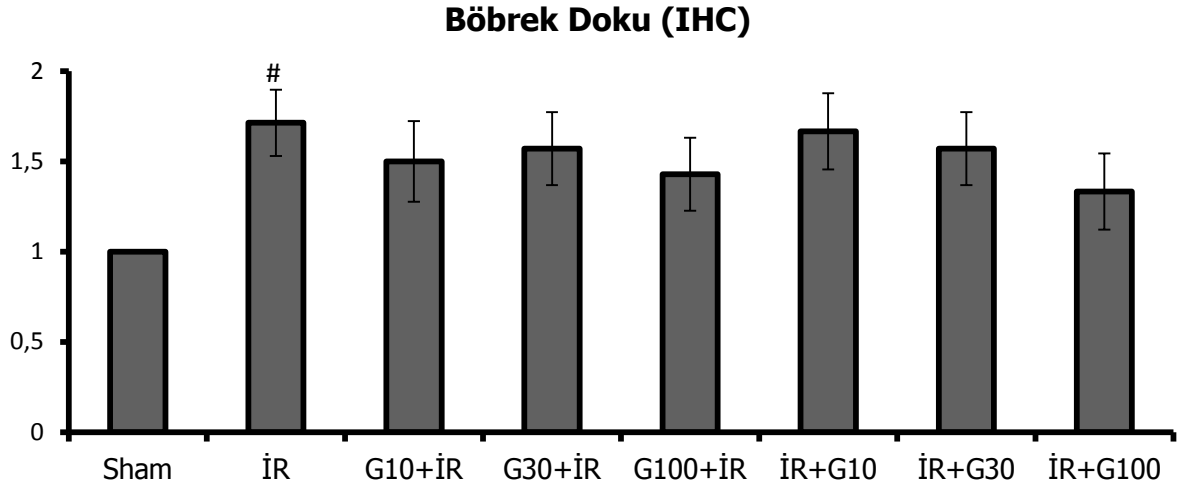
Şekil 79. İR+G10 grubuna ait böbrek dokusunda TNF-α pozitif hücreler (➡), TNF-α immunreaktivitesi, x40.



Şekil 80. İR+G30 grubuna ait böbrek dokusunda TNF- $\alpha$  pozitif hücreler (➔), TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi, x40.



Şekil 81. İR+G100 grubuna ait böbrek dokusu, TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi, x40.



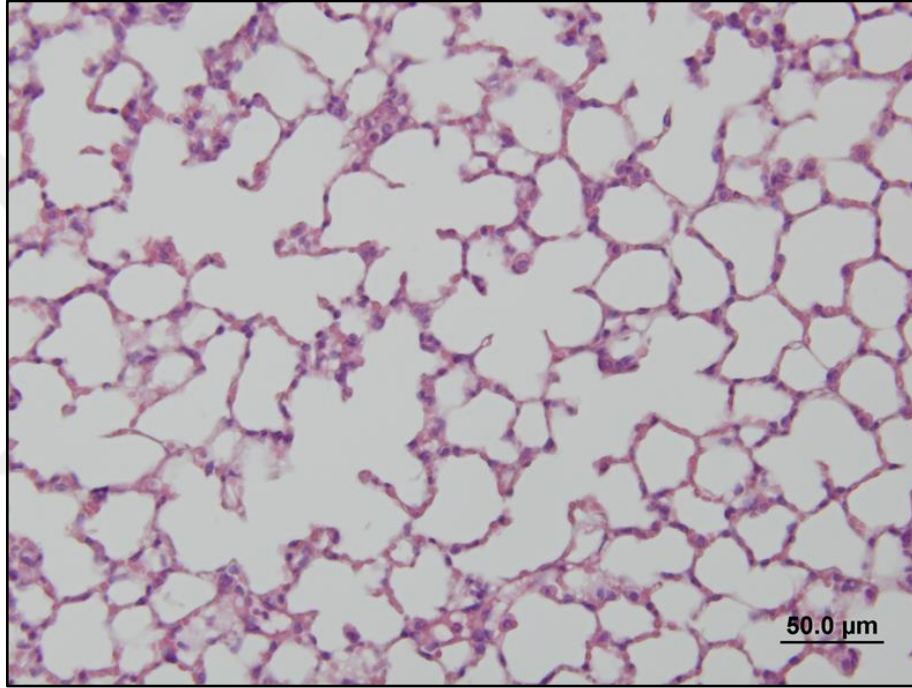
Şekil 82. Böbrek dokusundaki, gruplara ait TNF- $\alpha$  immünreaktivite düzeyleri. Veriler, grup ortalama $\pm$ standart hata değerini ifade etmektedir (Gruplar n=5-7) #p<0,05 Sham grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark var.

#### 4.2.3 Akciğer Dokusu

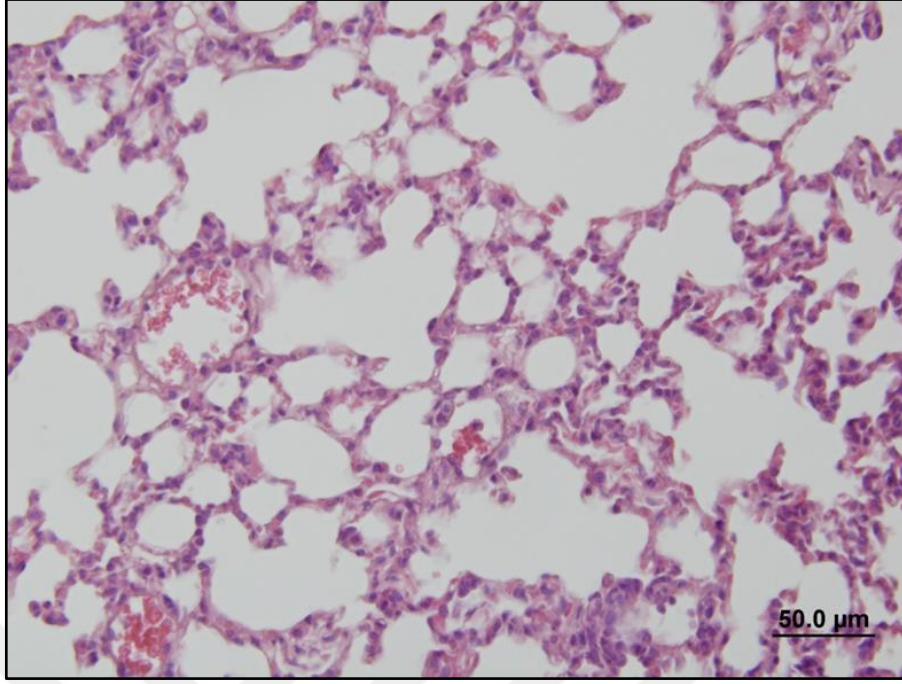
Deneysel olarak oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarında akciğer dokusunun histomorfolojik olarak incelenmesinde; kesitlerde ışık mikroskopik olarak alveol yapıları, alveolar septumlarda kalınlaşma, parankimada hemoraji, ödem ve konjesyon değerlendirildi.

Akciğer dokusunun kesitlerinin H-E ile incelenmesinde Sham grubunda (Şekil 83) alveol yapılarının normal olduğu, inflamasyon, alveolar septumlarda kalınlaşma olmadığı, parankimada hemoraji, ödem ve konjesyona ait bulgular saptanmadığı gözlemlendi. İR grubunda (Şekil 84) bazı deneklerde septumda hafif kalınlaşma ve parankimada az miktarda mononükleer hücre infiltrasyonu dışında Sham grubuna benzer özellikler gösterirken, diğer grupların tümü Sham grubuna benzer özellikler gösterdi (Şekil 85-90).

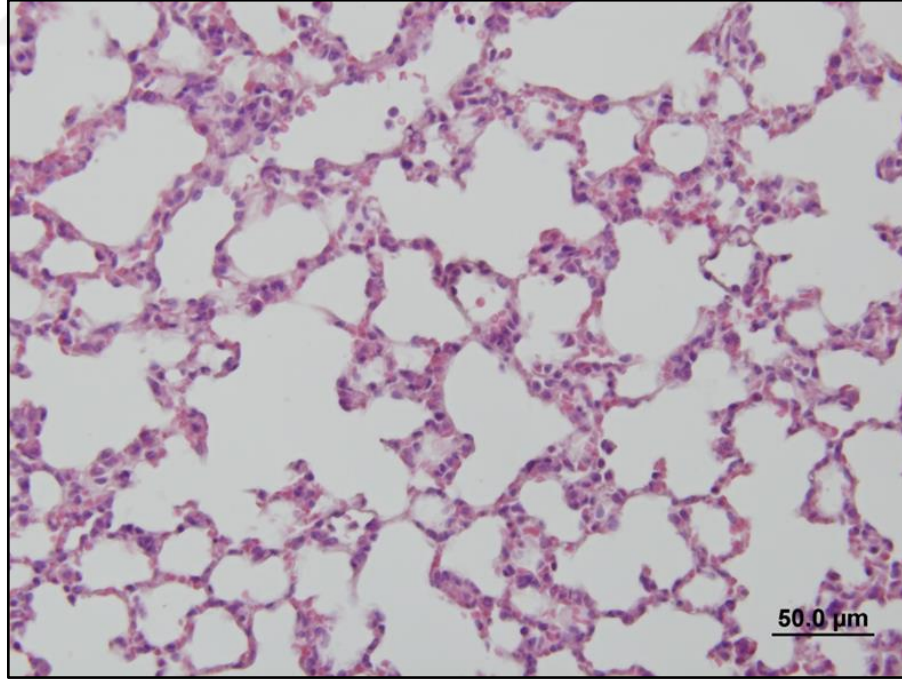
Akciğer dokularının TNF- $\alpha$  immünohistokimyasal incelemelerinde Sham grubunda (Şekil 91) az miktarda gözlenen immunreaktivitenin İR gruplarında arttığı (Şekil 92), ghrelin gruplarında (Şekil 93-98) ise değişen derecelerde immunreaktivitenin olduğu görüldü. Yapılan skorlama sonucu elde edilen veriler Şekil 99'da grafik ile sunulmuştur.



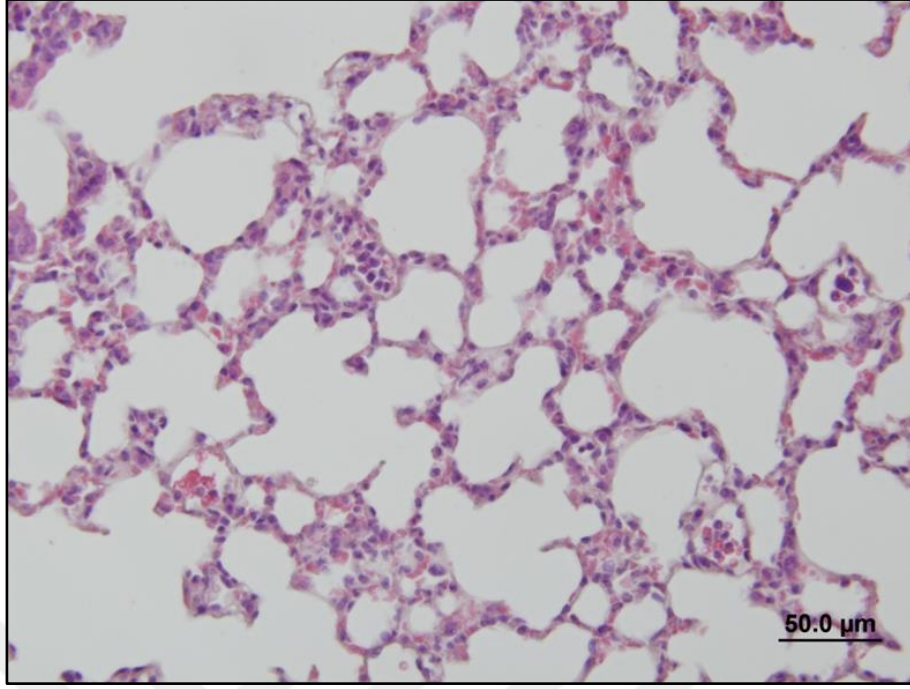
Şekil 83. Sham grubunda akciğer dokusu olağan izlenmektedir (H-E, x40).



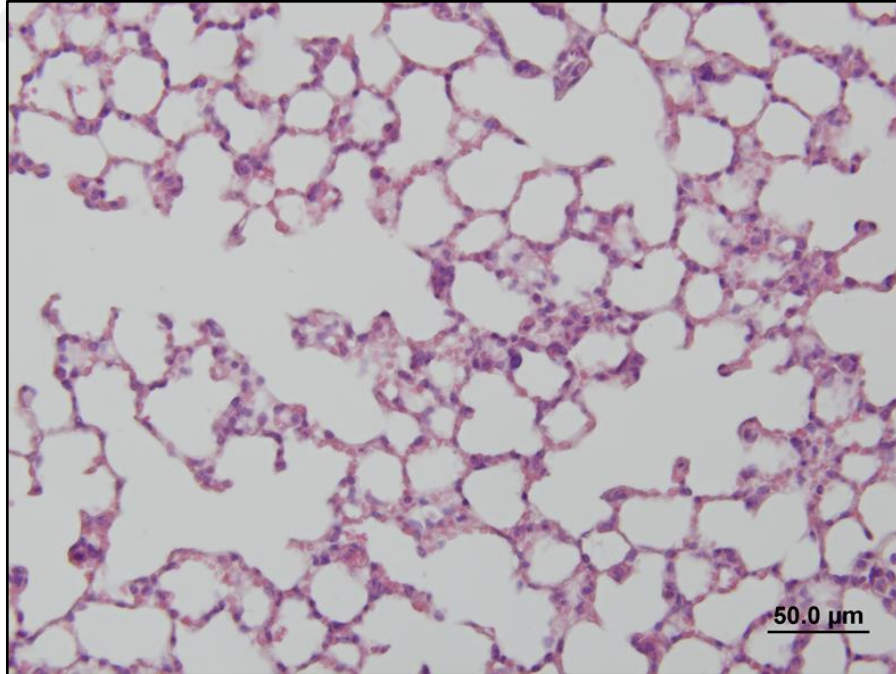
Şekil 84. İR grubuna ait akciğer dokusu (H-E, x40).



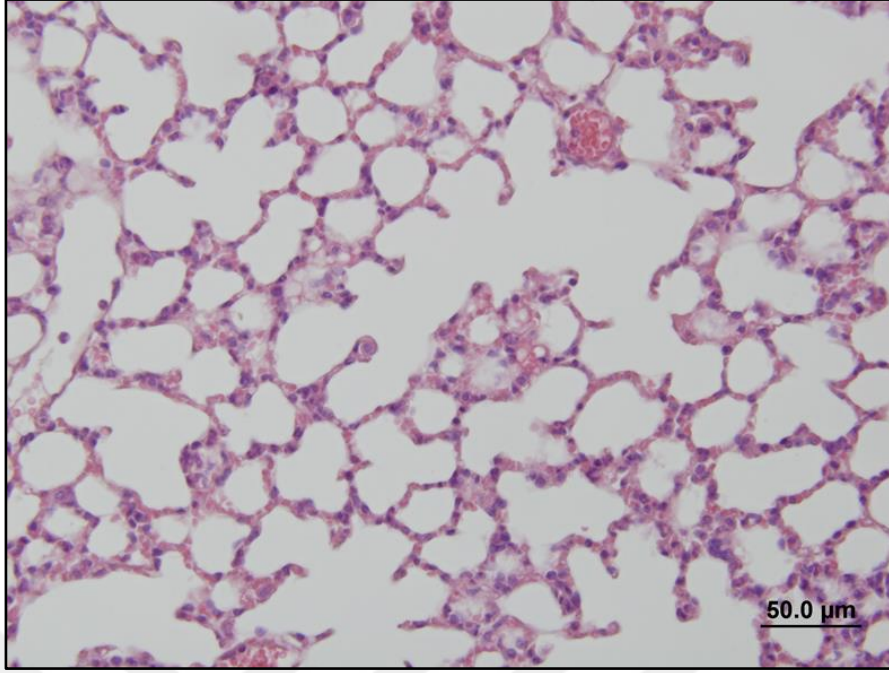
Şekil 85. G10+İR grubuna ait akciğer dokusu (H-E, x40).



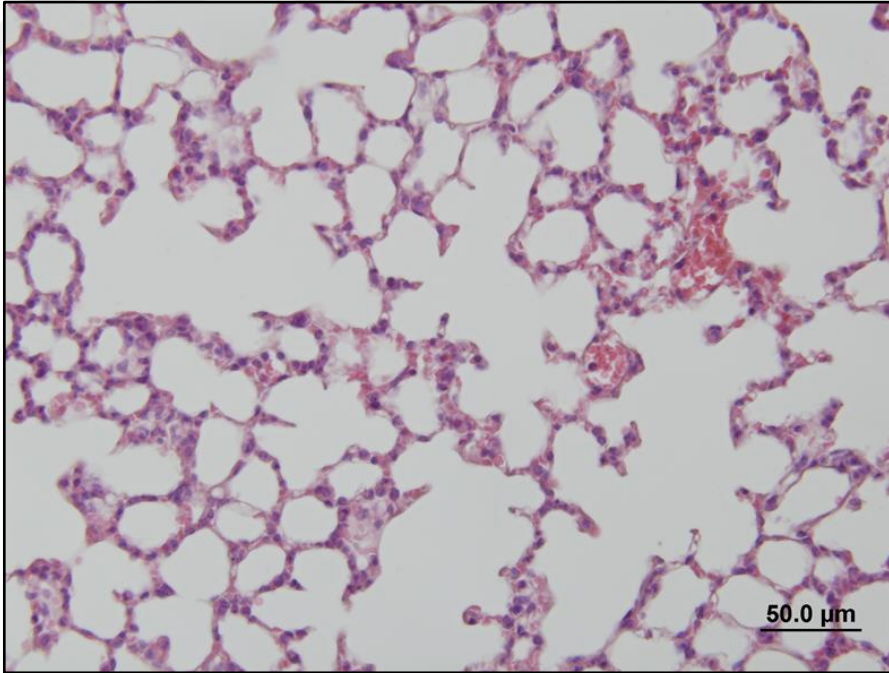
Şekil 86. G30+İR grubuna ait akciğer dokusu (H-E, x40).



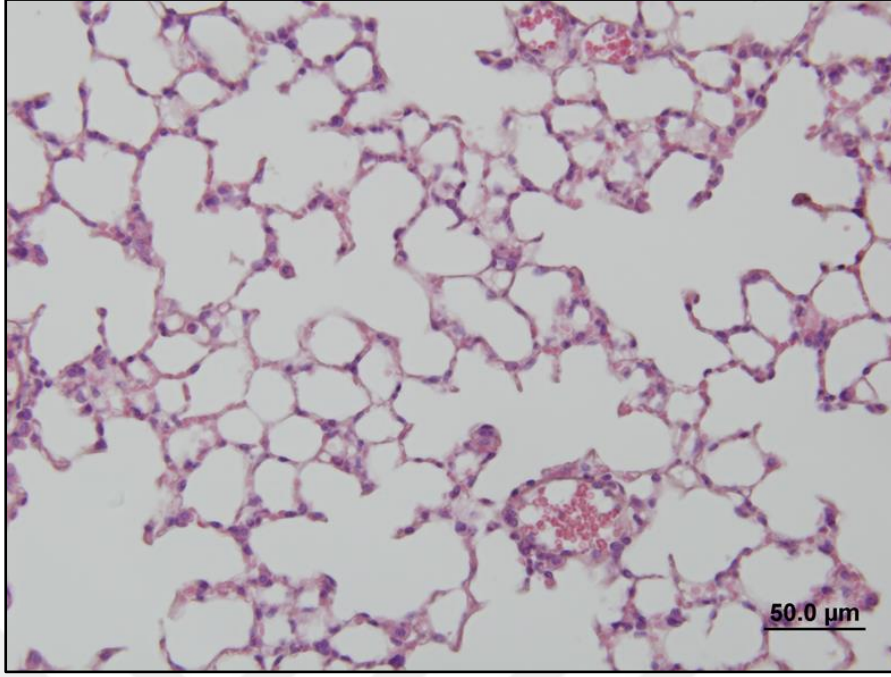
Şekil 87. G100+İR grubuna ait akciğer dokusu (H-E, x40).



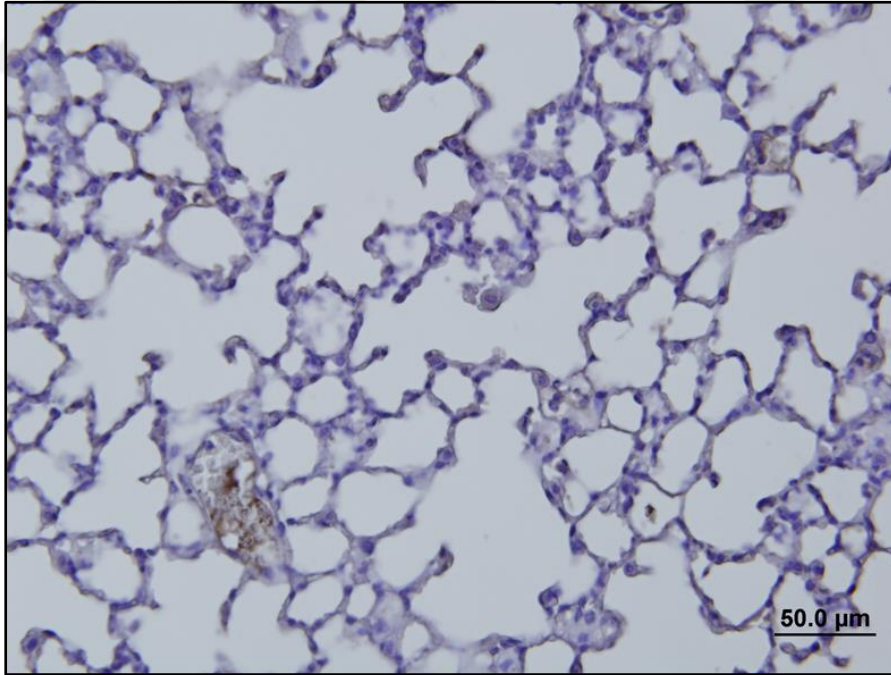
Şekil 88. İR+G10 grubuna ait akciğer dokusu (H-E, x40).



Şekil 89. İR+G30 grubuna ait akciğer dokusu (H-E, x40).

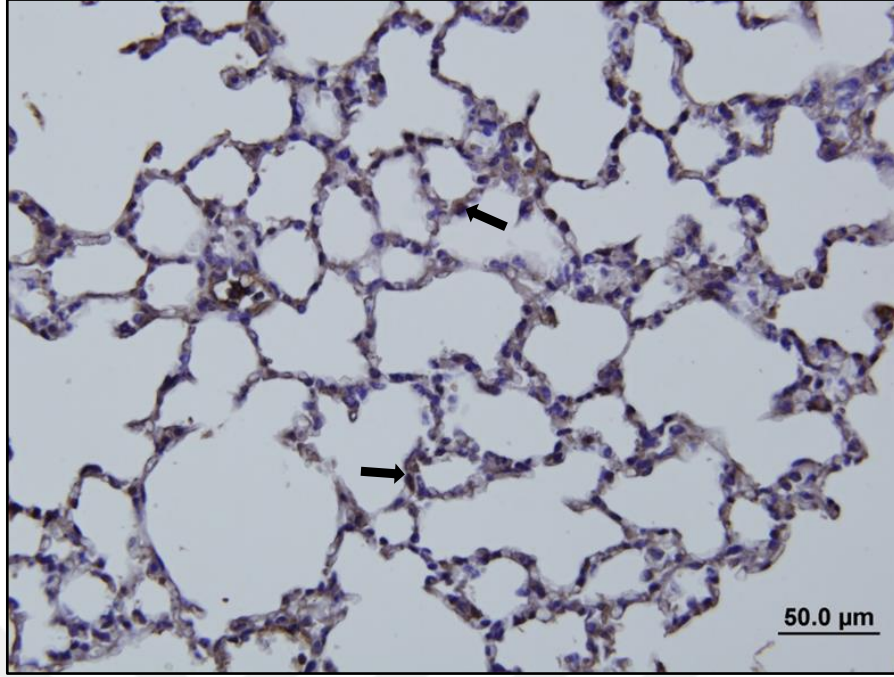


Şekil 90. İR+G100 grubuna ait akciğer dokusu (H-E, x40).

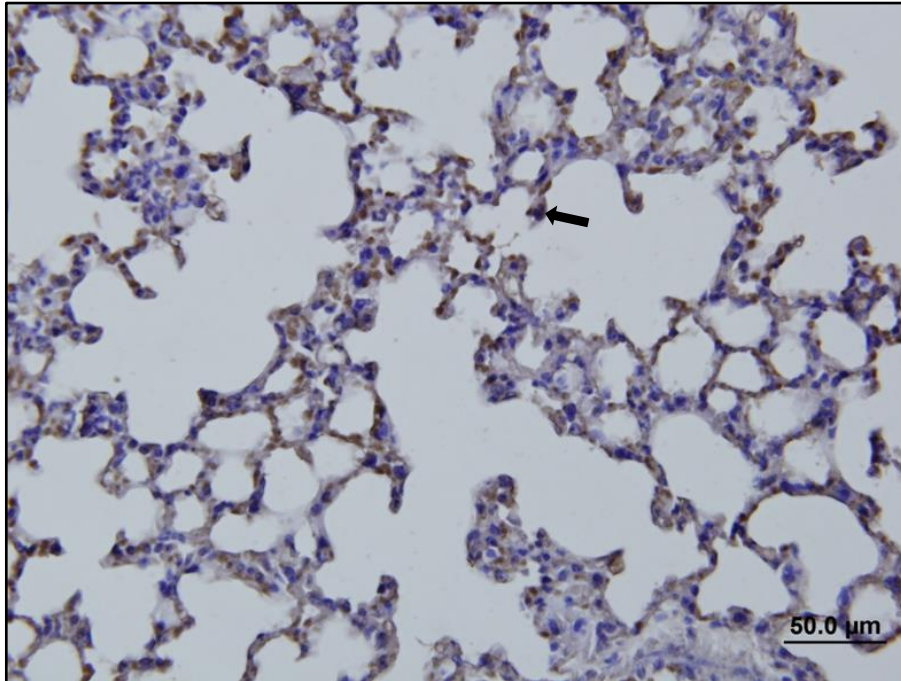


Şekil 91. Sham grubuna ait normal yapıdaki akciğer dokusu, TNF-α immunreaktivitesi, x40.

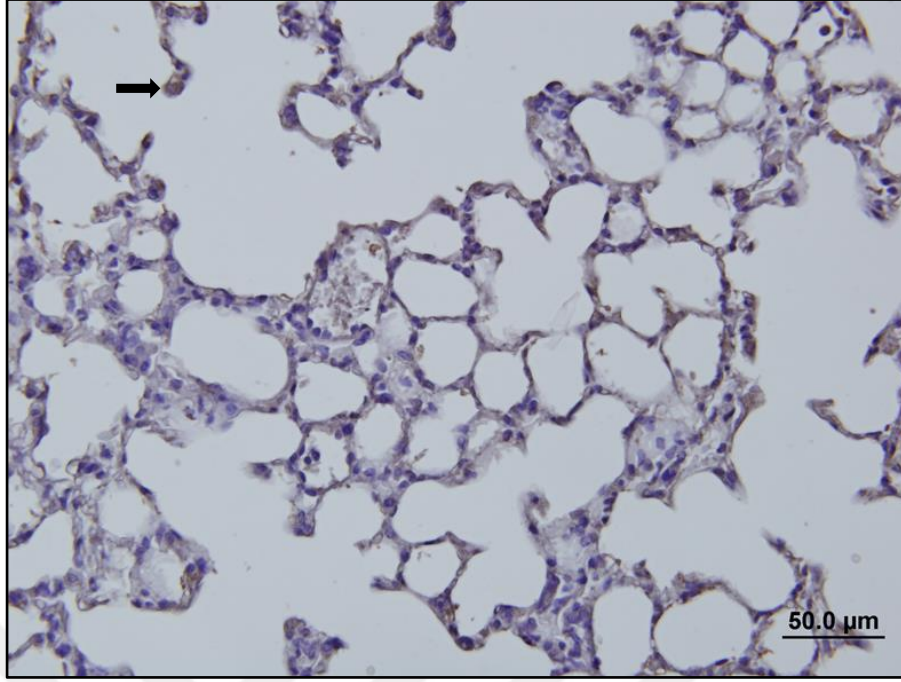




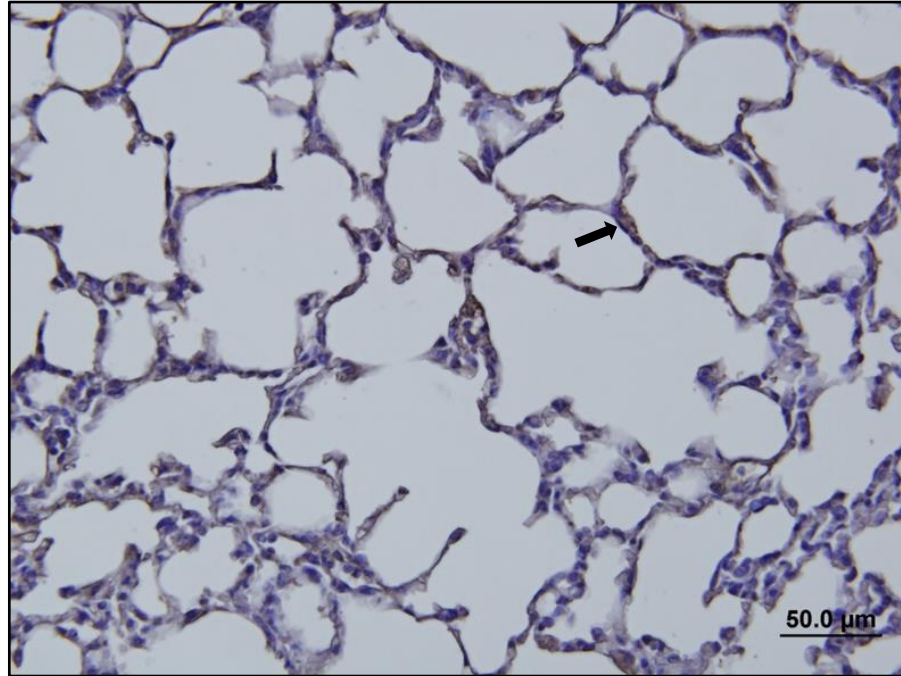
Şekil 92. İR grubuna ait akciğer dokusunda TNF- $\alpha$  pozitif hücreler (➡), TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi, x40.



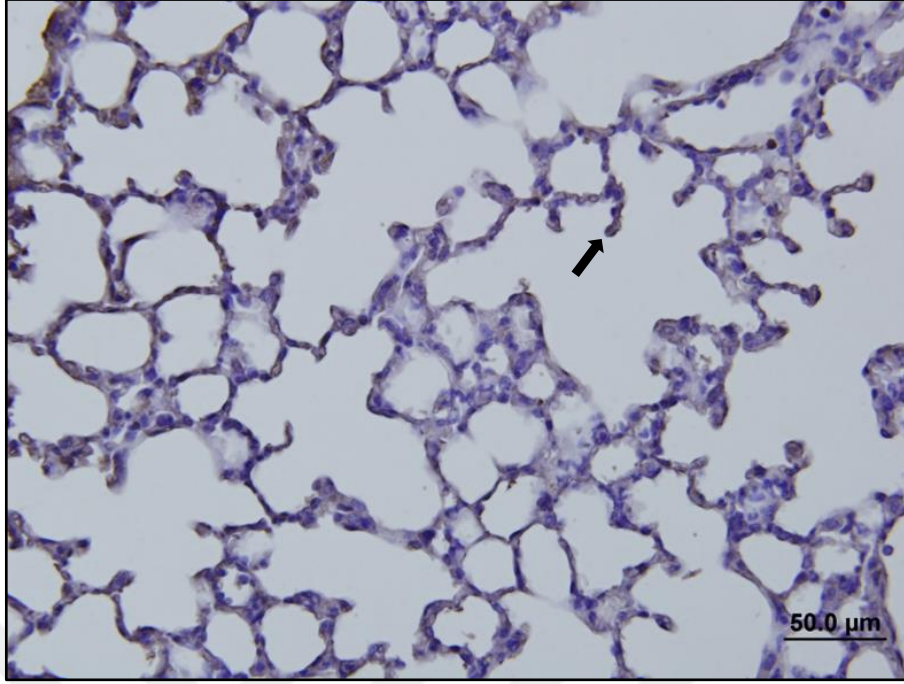
Şekil 93. G10+İR grubuna ait akciğer dokusunda TNF- $\alpha$  pozitif hücreler (➡), TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi, x40.



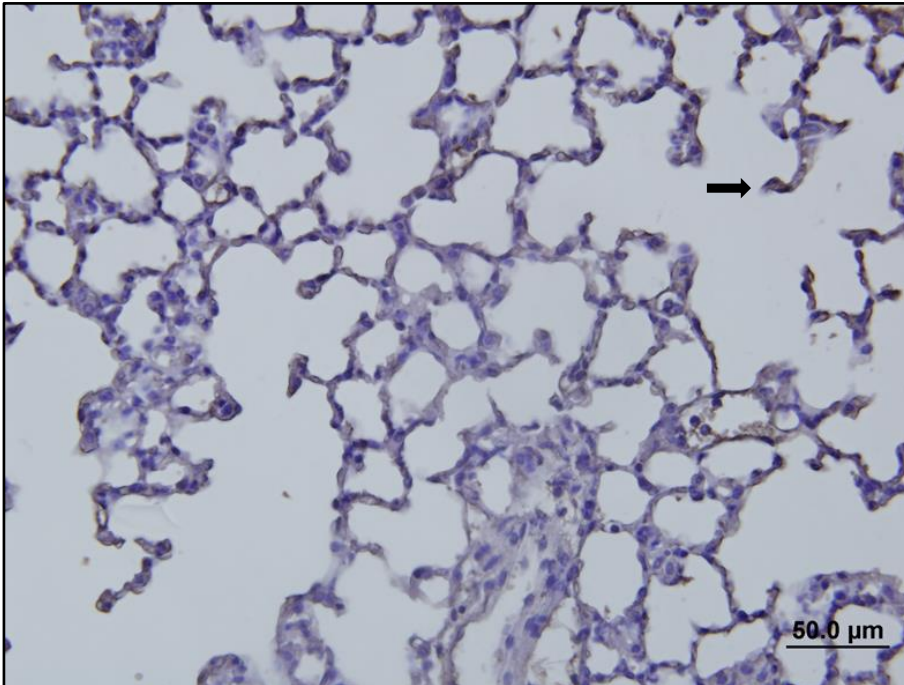
Şekil 94. G30+İR grubuna ait akciğer dokusunda TNF- $\alpha$  pozitif hücreler (➡), TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi, x40.



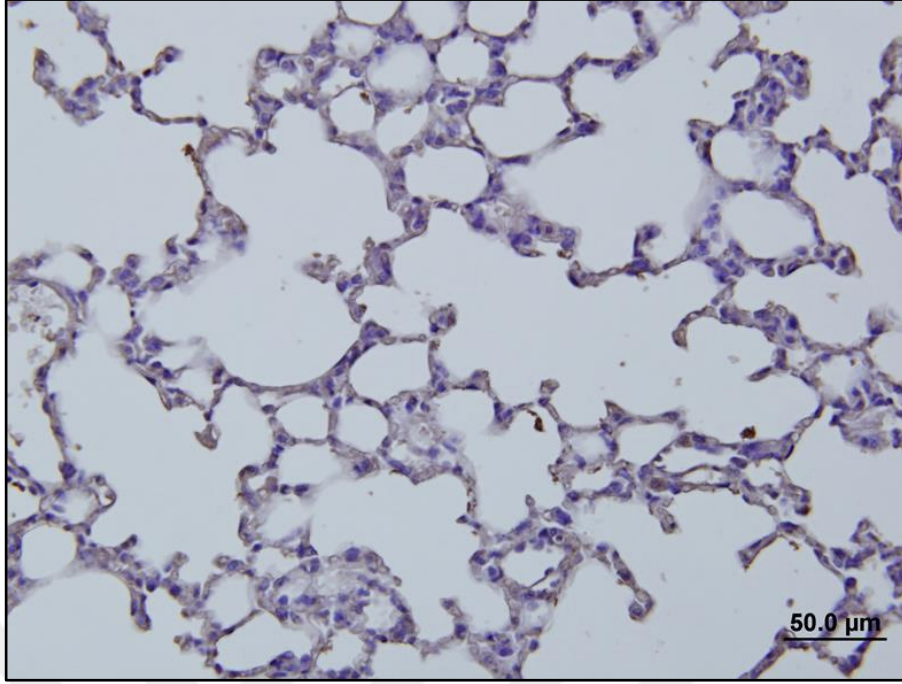
Şekil 95. G100+İR grubuna ait akciğer dokusunda TNF- $\alpha$  pozitif hücreler (➡), TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi, x40.



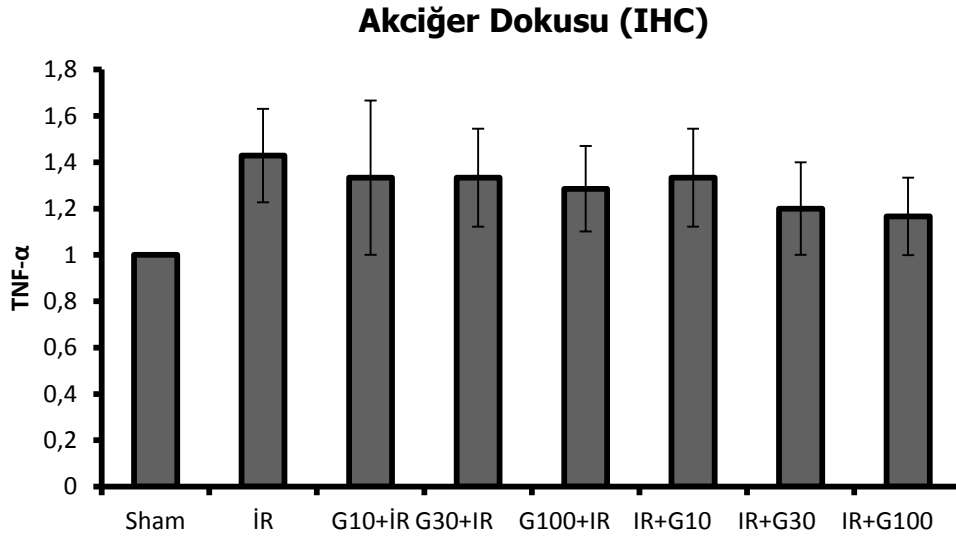
Şekil 96. İR+G10 grubuna ait akciğer dokusunda TNF- $\alpha$  pozitif hücreler (➡), TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi, x40.



Şekil 97. İR+G30 grubuna ait akciğer dokusunda TNF- $\alpha$  pozitif hücreler (➡), TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi, x40.



Şekil 98. İR+G100 grubuna ait akciğer dokusu, TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi, x40.



Şekil 99. Akciğer dokusundaki, gruplara ait TNF- $\alpha$  immunreaktivite düzeyleri. Veriler, grup ortalaması  $\pm$  standart hata (Gruplar n=5-7) değerini ifade etmektedir.  $\alpha=0,05$  olarak kabul edildiğinde İR grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamız sonucu elde edilen verilere göre; farelerde arka bacak İ-R sonrasında birincil organ olarak iskelet kası, uzak organ olarak ise akciğer ve böbrekte meydana gelen hasar üzerine ghrelinin doza bağlı değişen derecelerde koruyucu etkisi gözlenmiştir.

İskelet kasında oluşan İ-R hasarı, sistemik bir takım reaksiyonlar sebebiyle uzak organların da hasarlanmasına sebep olur (124, 125). Bu tip vakalarda, İ-R hasarını önlemek ya da en aza indirmek için temel ilke turnike uygulamasının mümkün olduğunca kısa süreli olmasıdır. İskelet kasına 4 saat turnike uygulanması geri dönüşümsüz nöromusküler hasara sebep olabilen kritik bir süreçtir. Bizim çalışmamızda ise güvenli kabul edilebilen 2 saatlik turnike uygulaması gerçekleştirildiğinden geri dönüşümsüz hasarlanmaya sebep olmayıp, subletal hipoksik hücre hasarı ile sınırlı kalmıştır (52, 126). Doza bağlı etkisini incelediğimiz ghrelin ise, esasen mide fundusundan salınan bir hormondur. Yapılan deneysel çalışmalarla bu hormonun TNF- $\alpha$ , İL-1 $\beta$  ve İL-6 gibi sitokinleri ve NF- $\kappa$ B'yi azaltarak anti-inflamatuvar etki gösterdiği kanıtlanmıştır (12, 16, 19, 25, 113, 127-129).

Biyokimyasal olarak iskelet kası (gastrokinemius kası), akciğer ve böbrek dokularında İ-R hasarını belirlemede; HPLC analiz yöntemi ile MDA seviyesini ölçme, Western-Blot analiz yöntemi ile ise iskelet kası MuRF-1 protein ekspresyon seviyesini değerlendirme yoluna gittik. MDA, oksidatif stres sonucu meydana gelen lipid peroksidasyonunun bir ürünüdür ve hücre hasarı belirteci olarak kabul görür (130). MuRF-1 ise atrofiye dokuda artmış protein ekspresyonunu gösteren, ubiquitin protezom sisteminde yer alan, kasa spesifik E3 ligazlardan birisidir ve kas atrofisinin belirteci olarak kabul edilir (131). Histopatolojik açıdan ise; çalışmamızda kullanılan model ve İ-R süresi, ilgili dokularda nekroz veya apoptozis oluşturmaya uygun ve

yeterli olmadığından, İ-R sonucu doku düzeyinde meydana gelen dolaşım bozuklukları neticesinde sekonder olarak gelişebilen inflammatuar yanıtları gözlemleyebilmek için H-E boyama yöntemi ile dejeneratif değişiklikler ve mononükleer hücre infiltrasyonu, IHC boyama yöntemi ile ise ilgili dokulardaki hasarı belirlemek için TNF- $\alpha$  immunreaktivite değerlendirildi.

Tartışma kısmında İ-R hasarı ve ghrelinin koruyucu etkisi, hedef doku bazında analizlerin karşılaştırılması yoluyla kıyaslanarak ele alınmıştır.

### **Gastrokinemius Kası:**

Çalışmamızda, İ-R süreci sonunda kas dokudaki MDA seviyesinin sham grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir. Oksidatif stresin önemli bir göstergesi olan MDA düzeyleri yapılan İ-R çalışmalarında da anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Sarı N. ve arkadaşlarının (132) 2014 yılında sıçanların kalça eklemi üzerine bilateral turnike uygulaması ile oluşturdukları İ-R modeli çalışmasında dört saat iskemi ve dört saat reperfüzyon uygulaması sonucu sham grubu ile İ-R grubu karşılaştırıldığında kas dokudaki MDA seviyesi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ayrıca Wang L. ve arkadaşlarının (133) 2016 tarihinde sıçanlarda üç saat boyunca femoral arterin klemplenip ardından iki saat klempin kaldırılması ile oluşturdukları arka bacak İ-R modeli çalışmasında da sham grubu ile İ-R grubu arasında MDA seviyeleri açısından anlamlı fark gözlenmiştir. Turnike uygulamasından 30 dk önce ve reperfüzyon başlangıcında ip. yolla ghrelin verilen gruplarımızda; MDA miktarlarının istatistiksel olarak anlamlı olmasa da değişen derecelerde düştüğü gözlenmiştir. İ-R hasarını belirlemede kullanılan MDA seviyesindeki farklı derecelerdeki düşüşe bağlı olarak, ghrelinin MDA oluşumunu baskılamakta kısmen etkili olduğu ifade edilebilir. Feller A.M. ve arkadaşlarının (134) 1989 yılında yaptığı çalışma tavşanların femoral arterlerine mikroklemple uygulanması ile oluşturulan iskelet kası İ-R hasarı modelinde

antioksidan enjeksiyonunun iyileştirici etkisi olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla ghrelinin oksidatif strese bağlı oluşan lipid peroksidasyonunun bir belirteci olan MDA oluşumunu engelleyerek/azaltarak koruyucu etki gösterdiği düşünülebilir.

Deneyimizde atrofiye kas belirteci olarak kullanılan MuRF-1 protein ekspresyon miktarı; İ-R modeli uygulanan grupta sham grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Kas atrofi modeli uygulanan diğer çalışmalarda da pozitif kontrol gruplarında sham gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Koyama S. ve arkadaşlarının (63) 2008 yılında yaptığı çalışmada sham grubu (ad libitum besleme) ve atrofi grubu (%10'luk glikoz solüsyon ve su ile 1 hafta besleme) gastrokinemius kaslarına ait MuRF-1 miktarları arasında anlamlı fark olduğu gözlenmiştir. Yaptığımız çalışmada İR grubuna kıyasla G10+İR ve G30+İR grupları anlamlı olarak düşük bulunmuştur. MuRF-1 miktarının iskemiden 30 dakika önce ghrelin verilen gruplarda İR grubuna kıyasla anlamlı ölçüde düşük bulunması, iskemi öncesi verilen ghrelinin kas atrofisine karşı koruyucu etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. Sheriff S. ve arkadaşlarının (135) yaptıkları çalışmada, sıçanlarda yanık modeli ile oluşan iskelet kası hasarında artan MuRF-1 ekspresyonunu ghrelin reseptör agonistinin azaltarak iyileştirdiğini, dolayısıyla ghrelinin MuRF-1 ekspresyonu üzerine azaltıcı etkisi olduğunu göstermektedir. Ayrıca Balasubramaniam A. ve arkadaşlarının (136) yaptıkları çalışmada da, sıçanlarda termal hasar modeli ile meydana gelen iskelet kası hasarı ile birlikte artan MuRF-1 ekspresyon düzeyini ghrelinin düşürerek iyileşme sağladığı ifade edilmektedir, dolayısıyla yapılan bu çalışma ile de ghrelinin MuRF-1 ekspresyonu üzerine azaltıcı etkisi olduğu gösterilmektedir.

Gastrokinemius kasının H-E boyama yöntemi ile incelendiği arka bacak İ-R modeli çalışmalarında, kas dokuda hasarlanma olduğu tespit edilmiştir. Austen W.G. ve arkadaşlarının (120) 2004 yılında C57BL/6 suşu farelerin kalça eklemine bilateral uygulanan turnike yöntemi ile iki saat iskemi ve üç saat reperfüzyon modeli

uygulanan çalışmada, H-E ile boyanan dokuların histomorfolojik olarak incelenmesi sonucu iskelet kası dokusunda miyofibrillerde dejenerasyon, disorganizasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonu gözlenmiştir. Yine Weeks C. ve arkadaşlarının (121) 2007 yılında, C57BL/6 suşu farelerin kalça eklemine turnike yöntemi ile iki saat iskemi ve üç saat reperfüzyon uyguladıkları İ-R modeli çalışmasında, H-E ile boyanan dokuların histomorfolojik olarak incelenmesi sonucu iskelet kası hasarına işaret eden benzer bulgular gözlenmiştir. Buna paralel doğrultuda, bizim deneyimizde de kas dokuda histomorfolojik olarak benzer bulgular gözlenmiş olup iskemi öncesi ghrelin verilen gruplarda miyofibrillerde az miktarda dejenerasyon ve disorganizasyon olduğu gözlenirken, reperfüzyon başlangıcında ghrelin verilen gruplarda miyofibriler dejenerasyon ve disorganizasyonun iskemi öncesi gruplara göre daha az olduğu, İR+G100 grubunda ise ghrelin koruyucu etkisinin daha fazla olduğu görülmüştür. Ghrelinin, İ-R hasarı ile meydana gelen inflamasyon durumunda direkt olarak miyositlerde lökosit adezyonunu stimüle eden TNF- $\alpha$  üzerine azaltıcı etkisi vardır (16, 90). Çalışmamızda da İ-R hasarı aracılığı ile oluşturduğumuz kas doku hasarını, ghrelinin TNF- $\alpha$  üzerine azaltıcı etkisi ile iyileştirdiğini düşünebiliriz.

Yaptığımız çalışmada IHC boyamadan elde edilen bulgulara göre; İR grubunda gözlenen TNF- $\alpha$  immunreaktivite, sham grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Wang L. ve arkadaşlarının (133) 2016 tarihinde sıçanlarda üç saat boyunca femoral arterin klemplenip ardından iki saat klempin kaldırılması ile oluşturduğu arka bacak İ-R modeli çalışmasında da; ELISA yöntemi ile TNF- $\alpha$  seviyesi ölçüldüğünde, İR grubuna ait kas doku homejenatındaki TNF- $\alpha$  seviyesinin sham grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir. İskemiden 30 dakika önce ghrelin verilen deney gruplarımızda, İR grubuna kıyasla TNF- $\alpha$  immunreaktivite anlamlı olarak düşük bulunmuş olup, ayrıca yine reperfüzyon başlangıcında ghrelin verilen deney gruplarımızdan İR+G30 ve İR+G100'de de İR grubuna kıyasla TNF- $\alpha$  immunreaktivite anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Yani iskemi öncesi ve reperfüzyon başlangıcında farklı dozlarda verilen ghrelinin koruyucu etkisi vardır diyebiliriz. İn vivo çalışmalarda ghrelinin konvülsif



nöbet (137), miyokardiyal İ-R (138), nefrotoksisite (139), sepsis (140) modellerinde gelişen hasarlanmalara bağlı aktive olan proinflammatuvar sitokinlerden TNF- $\alpha$ 'yı sistemik olarak baskıladığını göstermektedir. Bu da sistemik olarak uygulanan ghrelinin İ-R'ye bağlı gelişen inflammatuvar olayları proinflammatuvar sitokinleri inhibe edici etkisi ile iyileştirebileceğini göstermektedir.

### **Akciğer Dokusu:**

Kalça eklemi üzerinden uygulanan turnike yöntemi ile oluşturulan İ-R hasarı modellerinde akciğer dokusunda hasarlanma meydana gelmektedir. Köksel O. ve arkadaşlarının (141) 2005 yılında yaptığı çalışmada, sıçanların kalça eklemi üzerine bilateral turnike uygulanarak bir saat iskemi ve ardından turnikenin açılması ile ise iki saatlik reperfüzyon oluşturulmuştur. Deneklerden alınan akciğer dokuları homojenize edilip TBA ile reaksiyona sokulmuş, elde edilen verilere göre ise İ-R grubunun MDA seviyesi sham grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Akgün S. ve arkadaşlarının (142) yine sıçanların kalça eklemine turnike uygulayarak yaptıkları bir başka çalışmada iki saat iskemi ve iki saat reperfüzyon modeli uygulanmıştır. Akciğer dokuları incelendiğinde İ-R grubunun MDA seviyesi, sham grubuna kıyasla yüksek bulunmuştur. Ancak bizim çalışmamızda uygulanan iki saat iskemi üç saat reperfüzyon modelinde, akciğer dokusundaki MDA seviyelerinde artış gözlenmiş olmasına rağmen istatistiksel olarak bir anlamlılık saptanmamıştır. Ghrelin uygulanan gruplarda İR grubuna kıyasla MDA miktarında değişen derecelerde düşüş gözlenmekle beraber, G100+İR ve reperfüzyon başlangıcında ghrelin verilen grupların tamamında MDA miktarı anlamlı olarak düşmüştür. Ortaya çıkan bu tablo, ghrelinin oksidatif stres sonucu meydana gelen lipid peroksidasyonunun bir belirteci olan MDA oluşumu üzerine baskılayıcı etkisi olduğunu düşündürmektedir. Şen L.S. ve arkadaşlarının (115) 2015 yılında yaptığı çalışma sıçanların mezenterik arterinin klemplenmesi ile oluşturulan bağırsak İ-R modelinde ghrelinin uzak organ olarak

akciğer üzerine antioksidan etkisi olduğunu göstermektedir Dolayısıyla ghrelinin, antioksidan özelliği ile oksidatif stresi baskılayıcı etkisi olduğu düşünülebilir.

Weeks C. ve arkadaşlarının (121) 2007 yılında bilateral olarak kalça eklemi üzerinden yaptığı iki saat iskemi üç saat reperfüzyon İ-R modeli çalışmasında uzak organ olarak incelenen akciğer dokusunun H-E boyaması sonucu, İ-R modeli uygulanan grupta pnömoni ve perivasküler infiltrasyon gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise; İR grubundaki bazı deneklerin akciğer kesitlerinde, septumda hafif kalınlaşma ve parankimada az miktarda mononükleer hücre infiltrasyonu gözlenmekle birlikte ghrelin verilen gruplarda sham grubuna benzer özellikler gözlemlendi. Elde edilen bu sonuca göre; sistemik olarak verilen ghrelinin, non-kardiyak akciğer inflamasyonunu azaltıcı etkisi olduğu düşünülebilir. Akciğer dokularını IHC boyama ile TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi bakımından ele aldığımızda çalışma modelimize örnek teşkil edecek bir araştırma bulunmamakla birlikte Liangyi Zhou ve arkadaşlarının (143) 2012 yılında karaciğer İ-R modeli uyguladıkları çalışmalarında IHC yöntemi ile uzak organ olarak akciğer dokusunun TNF- $\alpha$  immunreaktivitesinde artış olduğu gözlenmiştir. Ancak bunun yanı sıra abdominal aort iskemi reperfüzyon modelini uygulayan Ebenezer M. Mbachu ve arkadaşlarının (144) çalışmasına göre uzak organ olarak incelenen akciğer dokusunun ELISA yöntemi ile TNF- $\alpha$  seviyesinde bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Nitekim bizim çalışmamızda da TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi baz alınan, IHC boyama yöntemi ile yapılan skorlamada, sham grubu ile İR grubu arasında anlamlı fark olmayıp, İR grubuyla ghrelin grupları arasında azalan ve değişen derecelerde immunreaktivite olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Şen L.S. ve arkadaşlarının (115) 2015 yılında yaptığı çalışma sıçanların mezenterik arterinin klemplenmesi ile oluşturulan bağırsak İ-R modelinde ghrelinin uzak organ olarak akciğer üzerine anti-inflamatuvar etkisi olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla ghrelinin pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımını azaltarak anti-inflamatuvar etkisi ile akciğer hasarı üzerine iyileştirici etkisi olduğu düşünülebilir.

## **Böbrek Dokusu:**

Çalışmamızda, uygulanan İ-R modeli sonucu uzak organ olarak incelenen böbrek dokuda sham grubuna kıyasla MDA miktarı istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Arka bacakta İ-R hasarı oluşturulan diğer deneysel çalışmalarda da, uzak organ hasarı açısından incelenen böbreklerde hasarlanma gözlenmiştir. Sarı N. ve arkadaşlarının (132) 2014 yılında sıçanların kalça eklemi üzerine bilateral turnike uygulaması ile oluşturdukları İ-R modeli çalışmasında dört saat iskemi ve dört saat reperfüzyon uygulaması sonucu, sham grubu ile İ-R grubu karşılaştırıldığında böbrek dokusundaki MDA seviyesi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Çalışma gruplarımızdan iskemiden 30 dakika önce ve reperfüzyon başlangıcında ghrelin uygulanan gruplarda İR grubuna kıyasla değişen ve azalan derecelerde MDA seviyesi tespit edilmiştir. Kasımay Ö. ve arkadaşlarının (145) 2006 yılında yaptığı çalışma sıçanların pankreatik kanal ligasyonu ile oluşturulan pankreas obstrüksiyon modelinde ghrelinin uzak organ olarak böbrek üzerine MDA seviyesini azaltıcı antioksidan etkisi olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla ghrelinin antioksidan özelliği ile böbrek dokusu üzerine iyileştirici etkisi olduğu düşünülebilir.

Böbrek dokusu kesitlerinden elde edilen görüntüler değerlendirilirken semikantitatif olarak tübüointertisyel hasar için ışık mikroskopik olarak; mononükleer hücre infiltrasyonu, eritrosit ekstravazasyonu, renal korpüskül morfolojisi, proksimal tübüslarda vakuolizasyon, fırçamsı kenar kaybı, tübüler dilatasyon ve kast formasyonu değerlendirildi ve skorlandı. Skorlama sonucu elde edilen verilerimize göre; İR grubu sham grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede hasarlı olduğu gözlendi. Karahan M.A. ve arkadaşlarının (146) 2016 yılında yaptığı çalışmada da arka bacak İ-R modeli uygulanan sıçanların böbrek dokuları H-E ile boyanıp kesitler değerlendirildiğinde, sham grubuna kıyasla İ-R grubunda hasarlanma (tübüler nekroz, hafif intersitisyel ödem) gözlenmiştir. Kasımay Ö. ve arkadaşlarının (145) 2006 yılında yaptığı çalışma sıçanların pankreatik kanal ligasyonu ile oluşturulan

pankreas obstrüksiyon modelinde ghrelinin böbrek mikroskobik hasarı (lökosit infiltrasyonu, vazokonjesyon, glomerüler ve tubüler dejenerasyon) üzerine anti-inflamatuvar etkisi olduğunu göstermektedir. Ancak, bizim çalışmamızda ghrelin verilen gruplarımızda ghrelinin koruyucu etkisi anlamlı olarak gözlenmemiştir. Bu veriler ışığında ghrelinin anti-inflamatuvar özelliği ile böbrek dokusu üzerine kısmen iyileştirici etkisi olduğu düşünülebilir.

Çalışmamızda IHC boyama yöntemi ile yapılan, TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi esas alınan skorlamada, İR grubunda gözlenen TNF- $\alpha$  immunreaktivite, sham grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu. Yaptığımız literatür taramasında uyguladığımız deneysel modelde, uzak organ olarak değerlendirilen böbrekte IHC boyama yoluyla TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi tespit edilen çalışmaya rastlanmadı. Ancak Liangyi Zhou ve arkadaşlarının (143) 2012 yılında karaciğer İ-R modeli uyguladıkları çalışmada da IHC yöntemi ile uzak organ olarak incelenen böbrek dokusunun TNF- $\alpha$  immunreaktivitesi incelendiğinde sham grubu ile İR grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu gözlenmiştir. Yaptığımız çalışmada, İR grubuyla ghrelin verilen gruplarımız arasında azalan ve değişen derecelerde immunreaktivite olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. Sun G.X. ve arkadaşlarının (147) 2014 yılında yaptığı çalışma sıçanların üreterlerinin tek taraflı ligasyonu ile oluşturulan unilateral üreteral obstrüksiyon modelinde ghrelin TNF- $\alpha$  salınımını baskılayarak anti-inflamatuvar etkisi olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla elde edilen veri ve bilgilere göre ghrelinin böbrek üzerine iyileştirici özelliği proinflamatuvar sitokinleri inhibe etkisinden kaynaklı olduğu düşünülebilir.

Çalışmamız sonucu ortaya çıkan bulgular değerlendirildiğinde ghrelinin farklı dozlarda değişen derecelerde İ-R hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu ve bu etkinin ghrelinin antioksidan ve anti-inflamatuvar özelliğinden geldiği düşünülebilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Projemiz kapsamında gerçekleştirilen arka bacak İ-R modeli ve uzak organ olarak akciğer ve böbrek doku hasarı üzerine, doza ve veriliş zamanına bağlı ghrelinin değişen derecelerde koruyucu etkisi olduğu yapılan biyokimyasal analizler ve morfolojik incelemelerle ortaya konmuştur. İskelet kasında ve uzak organlarda İ-R'ye bağlı hasarlanma oksidatif stres kaynaklı olup, ghrelinin koruyucu etkisinin anti-inflamatuvar/antioksidan özelliğinden geldiği düşünülmektedir.

Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz iki saat iskemi üç saat reperfüzyon süreci iskelet kası için geri dönüşümü olmayan bir hasarlanmaya sebep olmamaktadır. Ancak buna rağmen primer organ ya da uzak organlarda hasarlanma meydana gelmektedir. Bu yüzden bu hasardan korunmak ve iyileştirmek için etkin yöntem ve ajanlar üzerine çalışılmalıdır. Ghrelin ise bu amaç için kullanılacak önemli ajanlardan biri olabilir.

Sonuçta klinik olarak; ghrelinin anti-inflamatuvar/antioksidan özelliğinden yararlanılarak yapılan cerrahi operasyonlarda koruyucu olarak kullanılabilirliğinin daha detaylı araştırılmasının faydalı olacağı kanaatindeyiz. Bunun için ileri teknikler yardımı ile ghrelinin insanlar üzerindeki etkileri araştırılıp klinik açıdan etkileri değerlendirilmelidir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000;190(3):255-66.
2. Nichols TC. NF-kappaB and reperfusion injury. *Drug News Perspect* 2004;17(2):99-104.
3. Tran TP, Tu H, Pipinos, II, Muelleman RL, Albadawi H, Li YL. Tourniquet-induced acute ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscles: Involvement of superoxide. *Eur J Pharmacol* 2011;650(1):328-34.
4. Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986;548:47-63.
5. Rose S, Floyd RA, Eneff K, Buhren V, Massion W. Intestinal ischemia - reperfusion-mediated increase in hydroxyl free-radical formation as reported by salicylate hydroxylation. *Shock* 1994;1(6):452-456.
6. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci* 2004;49(9):1359-77.
7. Yassin MM, Barros D'Sa AA, Parks G, Abdulkadir AS, Halliday I, Rowlands BJ. Mortality following lower limb ischemia-reperfusion: a systemic inflammatory response? *World J Surg* 1996;20(8):961-6; discussion 966-7.
8. Seekamp A, Warren JS, Remick DG, Till GO, Ward PA. Requirements for tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in limb ischemia/reperfusion injury and associated lung injury. *Am J Pathol* 1993;143(2):453-63.
9. Seekamp A, Ward PA. Ischemia-reperfusion injury. *Agents Actions Suppl* 1993;41:137-52.
10. Brock RW, Lawlor DK, Harris KA, Potter RF. Initiation of remote hepatic injury in the rat: interactions between Kupffer cells, tumor necrosis factor-alpha, and microvascular perfusion. *Hepatology* 1999;30(1):137-42.
11. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;402(6762):656-660.

12. Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, Collins GD, Sakthivel SK, Palaniappan R, et al. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest* 2004;114(1):57-66.
13. Li WG, Gavrilu D, Liu X, Wang L, Gunnlaugsson S, Stoll LL, et al. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in human endothelial cells. *Circulation* 2004;109(18):2221-6.
14. Dembinski A, Warzecha Z, Ceranowicz P, Tomaszewska R, Stachura J, Konturek SJ, et al. Ghrelin attenuates the development of acute pancreatitis in rat. *J Physiol Pharmacol* 2003;54(4):561-73.
15. Granado M, Priego T, Martin AI, Villanua MA, Lopez-Calderon A. Anti-inflammatory effect of the ghrelin agonist growth hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in arthritic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288(3):E486-92.
16. Guneli E, Onal A, Ates M, Bagriyanik HA, Resmi H, Orhan CE, et al. Effects of repeated administered ghrelin on chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Neurosci Lett* 2010;479(3):226-30.
17. Chang L, Ren Y, Liu X, Li WG, Yang J, Geng B, et al. Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;43(2):165-70.
18. Takeda R, Nishimatsu H, Suzuki E, Satonaka H, Nagata D, Oba S, et al. Ghrelin improves renal function in mice with ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(1):113-21.
19. Wu R, Dong W, Ji Y, Zhou M, Marini CP, Ravikumar TS, et al. Orexigenic hormone ghrelin attenuates local and remote organ injury after intestinal ischemia-reperfusion. *PLoS One* 2008;3(4):e2026.
20. El Eter E, Al Tuwaijiri A, Hagar H, Arafa M. In vivo and in vitro antioxidant activity of ghrelin: Attenuation of gastric ischemic injury in the rat. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2007;22(11):1791-1799.
21. Zhou F, Xu J, Ying GY, Wang L, Zhu XD. Ghrelin attenuated cerebral Ischemia reperfusion injury in rats. *Cns Neuroscience & Therapeutics* 2012;18(11):945-946.

22. Miao Y, Xia Q, Hou Z, Zheng Y, Pan H, Zhu S. Ghrelin protects cortical neuron against focal ischemia/reperfusion in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;359(3):795-800.
23. Bukowczan J, Warzecha Z, Ceranowicz P, Kusnierz-Cabala B, Tomaszewska R, Dembinski A. Therapeutic effect of ghrelin in the course of ischemia/reperfusion-induced acute pancreatitis. *Current Pharmaceutical Design* 2015;21(17):2284-2290.
24. Taati M, Moghadasi M, Dezfoulian O, Asadian P, Kheradmand A, Abbasi M, et al. The effect of ghrelin pretreatment on epididymal sperm quality and tissue antioxidant enzyme activities after testicular ischemia/reperfusion in rats. *J Physiol Biochem* 2012;68(1):91-7.
25. Qin Y, Li Z, Wang Z, Li Y, Zhao J, Mulholland M, et al. Ghrelin contributes to protection of hepatocellular injury induced by ischaemia/reperfusion. *Liver Int* 2014;34(4):567-75.
26. Zhang Q, Huang C, Meng B, Tang TS, Shi Q, Yang HL. Acute effect of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the rat spinal cord. *International Journal of Molecular Sciences* 2012;13(8):9864-9876.
27. Jacoby RO, Fox JG, Davisson M. Biology and diseases of mice. In: Fox JG, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW, editors. *Laboratory Animal Medicine*. Second ed. USA: Academic Press; 2002. p. 35-120.
28. Davisson MT, Linder CC. Historical foundations. In: Hedrich HJ, Bullock G, editors. *The Laboratory Mouse*. USA: Elsevier Academic Press; 2004. p. 15-24.
29. Festing MFW. Laboratory animals genetics and genetic quality control. In: Hau J, Hoosier GLV, editors. *Handbook of Laboratory Animal Science*. second ed. USA: CRC Press; 2003. p. 173-203.
30. Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki K, et al. Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Experimental Animals* 2009;58(2):141-149.
31. Schwartz WJ, Zimmerman P. Circadian timekeeping in BALB/c and C57BL/6 inbred mouse strains. *J Neurosci* 1990;10(11):3685-94.



32. Bryant CD, Zhang NN, Sokoloff G, Fanselow MS, Ennes HS, Palmer AA, et al. Behavioral differences among c57bl/6 substrains: implications for transgenic and knockout studies. *Journal of Neurogenetics* 2008;22(4):315-331.
33. [http://www.criver.com/files/pdfs/rms/c57bl6/rm\\_rm\\_d\\_c57bl6n\\_mouse.aspx](http://www.criver.com/files/pdfs/rms/c57bl6/rm_rm_d_c57bl6n_mouse.aspx). In; 02.11.2015.
34. <https://en.wikipedia.org/wiki/C57BL/6>. In; 01.11.2015.
35. Anver MR, Haines DC. Gerontology. In: Hans J Hedrich GB, editor. *The Laboratory Mouse*. First ed. USA: Elsevier Academic Press; 2004. p. 327-343.
36. Long SY. Hair-nibbling and whisker-trimming as indicators of social hierarchy in mice. *Anim Behav* 1972;20(1):10-2.
37. Sarna JR, Dyck RH, Whishaw IQ. The Dalila effect: C57BL6 mice barber whiskers by plucking. *Behavioural Brain Research* 2000;108(1):39-45.
38. Kalueff AV, Minasyan A, Keisala T, Shah ZH, Tuohimaa P. Hair barbering in mice: Implications for neurobehavioural research. *Behavioural Processes* 2006;71(1):8-15.
39. Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002;420(6915):520-62.
40. Takeda K, Haczku A, Lee JJ, Irvin CG, Gelfand EW. Strain dependence of airway hyperresponsiveness reflects differences in eosinophil localization in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281(2):L394-402.
41. Atochina EN, Beers MF, Tomer Y, Scanlon ST, Russo SJ, Panettieri RA, et al. Attenuated allergic airway hyperresponsiveness in C57BL/6 mice is associated with enhanced surfactant protein (SP)-D production following allergic sensitization. *Respiratory Research* 2003;4(15).
42. Lebel B, Scheinmann P, Canu P, Burtin C. Histamine levels in mouse tissues of different strains: influence of sex. *Agents Actions* 1980;10(1 Pt 2):149-50.
43. Scheinmann P, Lebel B, Canu P, Burtin C. Histamine levels in mouse tissues: influence of castration. *Agents Actions* 1980;10(1 Pt 2):150-1.
44. Krinke GJ. Normative Histology of Organs. In: Hedrich HJ, Bullock G, editors. *The Laboratory Mouse*. USA: Elsevier Academic Press; 2004. p. 133-166.

45. Paradis S, Charles AL, Meyer A, Lejay A, Scholey JW, Chakfe N, et al. Chronology of mitochondrial and cellular events during skeletal muscle ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2016;310(11):C968-82.
46. Komarek V. Gross anatomy. In: Hedrich HJ, Bullock G, editors. *The Laboratory Mouse*. USA: Elsevier Academic Press; 2004. p. 117-132.
47. Krinke GJ, Weber K. Histology. In: HJ H, G B, editors. *The Laboratory Mouse*. USA: Elsevier Academic Press; 2004. p. 161-192.
48. Haller MJ, Atkinson MA, Schatz D. Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation, and management. *Pediatr Clin North Am* 2005;52(6):1553-78.
49. McClung JM, McCord TJ, Keum S, Johnson S, Annex BH, Marchuk DA, et al. Skeletal muscle-specific genetic determinants contribute to the differential strain-dependent effects of hindlimb ischemia in mice. *American Journal of Pathology* 2012;180(5):2156-2169.
50. Helisch A, Wagner S, Khan N, Drinane M, Wolfram S, Heil M, et al. Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2006;26(3):520-526.
51. Gülşen Özbay CÇ, Sergülen Dervişoğlu, Sibel Erdamar. Genel patoloji ders kitabı. 2008.
52. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 2002;10(6):620-30.
53. Jepson PN. Ischaemic contracture: experimental study. *Ann Surg* 1926;84(6):785-95.
54. Woitaske MD, McCarter RJ. Effects of fiber type on ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg* 1998;102(6):2052-63.
55. Petrasek PF, Homer-Vanniasinkam S, Walker PM. Determinants of ischemic injury to skeletal muscle. *J Vasc Surg* 1994;19(4):623-31.
56. Francischetti I, Moreno JB, Scholz M, Yoshida WB. Leukocytes and the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2010;25(4):575-84.

57. Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischemia reperfusion injury - central role of the neutrophil. *British Journal of Surgery* 1991;78(6):651-655.
58. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim* 2009;22(3):5-13.
59. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988;255(6 Pt 2):H1269-75.
60. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery* 2004;24(6):468-75.
61. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994;81(5):637-47.
62. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* 1991;78(6):651-5.
63. Koyama S, Hata S, Witt CC, Ono Y, Lerche S, Ojima K, et al. Muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) as a connector of muscle energy metabolism and protein synthesis. *Journal of Molecular Biology* 2008;376(5):1224-1236.
64. Belkin M, Brown RD, Wright JG, Lamorte WW, Hobson RW. A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia-reperfusion injury in skeletal-muscle. *American Journal of Surgery* 1988;156(2):83-86.
65. Martou G, O'Blenes CA, Huang N, McAllister SE, Neligan PC, Ashrafpour H, et al. Development of an in vitro model for study of the efficacy of ischemic preconditioning in human skeletal muscle against ischemia-reperfusion injury. *Journal of Applied Physiology* 2006;101(5):1335-1342.
66. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 1998;179(1-2):169-87.
67. Weiser MR, Williams JP, Moore FD, Jr., Kobzik L, Ma M, Hechtman HB, et al. Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement. *J Exp Med* 1996;183(5):2343-8.
68. Yassin MM, Harkin DW, Barros D'Sa AA, Halliday MI, Rowlands BJ. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World J Surg* 2002;26(1):115-21.

69. Huda R, Solanki DR, Mathru M. Inflammatory and redox responses to ischaemia/reperfusion in human skeletal muscle. *Clin Sci (Lond)* 2004;107(5):497-503.
70. Lopez-Neblina F, Paez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH. Mechanism of protection of verapamil by preventing neutrophil infiltration in the ischemic rat kidney. *J Surg Res* 1996;61(2):469-72.
71. Bozdoğan Ö. *Bozdoğan Patoloji*. 2007.
72. Erer H. *Veteriner Genel Patoloji*. 2000.
73. Chanson M, Derouette JP, Roth I, Foglia B, Scerri I, Dudez T, et al. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 2005;1711(2):197-207.
74. Bonetto A, Penna F, Muscaritoli M, Minero VG, Rossi Fanelli F, Baccino FM, et al. Are antioxidants useful for treating skeletal muscle atrophy? *Free Radic Biol Med* 2009;47(7):906-16.
75. Ji LL. Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Exp Gerontol* 2007;42(7):582-93.
76. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001;53(1):135-59.
77. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost* 2007;97(5):738-47.
78. McEver RP. Leukocyte-endothelial cell interactions. *Curr Opin Cell Biol* 1992;4(5):840-9.
79. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion-from mechanism to translation. *Nature Medicine* 2011;17(11):1391-1401.
80. Williams FM. Neutrophils and myocardial reperfusion injury. *Pharmacol Ther* 1996;72(1):1-12.
81. Gahmberg CG. Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Current Opinion in Cell Biology* 1997;9(5):643-650.

82. Coito AJ. Leukocyte transmigration across endothelial and extracellular matrix protein barriers in liver ischemia/reperfusion injury. *Curr Opin Organ Transplant* 2011;16(1):34-40.
83. Boyle EM, Pohlman TH, Cornejo CJ, Verrier ED. Ischemia-reperfusion injury. *Annals of Thoracic Surgery* 1997;64(4):S24-S30.
84. Ganote CE. Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol* 1983;15(2):67-73.
85. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320(6):365-76.
86. Garcia-Villalon AL, Amezcua YM, Monge L, Fernandez N, Salcedo A, Dieguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascular Pharmacology* 2008;48(2-3):109-114.
87. Noronha IL, Niemir Z, Stein H, Waldherr R. Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10(6):775-86.
88. Marcus BC, Wyble CW, Hynes KL, Gewertz BL. Cytokine-induced increases in endothelial permeability occur after adhesion molecule expression. *Surgery* 1996;120(2):411-417.
89. Bocci V. Interleukins - clinical pharmacokinetics and practical implications. *Clinical Pharmacokinetics* 1991;21(4):274-284.
90. Nose PS. Cytokines and reperfusion injury. *Journal of Cardiac Surgery* 1993;8(2):305-308.
91. Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ. Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol* 2002;86(1):41-59.
92. Bendtzen K. Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. *Immunol Lett* 1988;19(3):183-91.
93. Reid MB, Andrade FH, Balke CW, Esser KA. Redox mechanisms of muscle dysfunction in inflammatory disease. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2005;16(4):925-49, ix.
94. Tracey KJ, Cerami A. Tumor-Necrosis-Factor - a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annual Review of Medicine* 1994;45:491-503.

95. Lin H, Chensue SW, Strieter RM, Remick DG, Gallagher KP, Bolling SF, et al. Antibodies against Tumor-Necrosis-Factor prolong cardiac allograft survival in the rat. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 1992;11(2):330-335.
96. Sharma HS, Das DK. Role of cytokines in myocardial ischemia and reperfusion. *Mediators of Inflammation* 1997;6(3):175-183.
97. Dinarello CA. Biology of Interleukin-1. *Faseb Journal* 1988;2(2):108-115.
98. Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines - IL-6 and related molecules (IL-1 and Tnf). *Faseb Journal* 1990;4(11):2860-2867.
99. Kato A, Gabay C, Okaya T, Lentsch AB. Specific role of interleukin-1 in hepatic neutrophil recruitment after ischemia/reperfusion. *Am J Pathol* 2002;161(5):1797-803.
100. Pinsky DJ, Yan SF, Lawson C, Naka Y, Chen JX, Connolly ES, et al. Hypoxia and modification of the endothelium - implications for regulation of vascular homeostatic properties. *Seminars in Cell Biology* 1995;6(5):283-294.
101. Çağlar M, Kansu E. Kemokinler, kemokin reseptörleri ve inflamasyon. *Ankem Derg* 2004;18:164-168.
102. Banz Y, Rieben R. Role of complement and perspectives for intervention in ischemia-reperfusion damage. *Annals of Medicine* 2012;44(3):205-217.
103. Dumont NA, Frenette J. Macrophage colony-stimulating factor-induced macrophage differentiation promotes regrowth in atrophied skeletal muscles and C2C12 myotubes. *American Journal of Pathology* 2013;182(2):505-515.
104. Jesberger JA, Richardson JS. Oxygen Free-radicals and brain-dysfunction. *International Journal of Neuroscience* 1991;57(1-2):1-17.
105. Babizhayev MA, Costa EB. Lipid peroxide and reactive oxygen species generating systems of the crystalline lens. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1994;1225(3):326-337.
106. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984;222(1):1-15.
107. Rosicka M, Krsek M, Jarkovska Z, Marek J, Schreiber V. Ghrelin - a new endogenous growth hormone secretagogue. *Physiological Research* 2002;51(5):435-441.

108. Chang L, Ren YS, Liu XH, Li WG, Yang JH, Geng B, et al. Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2004;43(2):165-170.
109. Delporte C. Structure and physiological actions of ghrelin. *Scientifica (Cairo)* 2013;2013:518909.
110. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 2005;85(2):495-522.
111. Strassburg S, Anker SD, Castaneda TR, Burget L, Perez-Tilve D, Pfluger PT, et al. Long-term effects of ghrelin and ghrelin receptor agonists on energy balance in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295(1):E78-84.
112. Aydin S. Discovery of ghrelin hormone: Research and clinical applications. *Turkish Journal of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi* 2007;32(2):76-89.
113. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002;87(6):2988-2991.
114. Viridis A, Lerman LO, Regoli F, Ghiadoni L, Lerman A, Taddei S. Human ghrelin: a gastric hormone with cardiovascular properties. *Current Pharmaceutical Design* 2016;22(1):52-58.
115. Sen LS, Karakoyun B, Yegen C, Akkiprik M, Yuksel M, Ercan F, et al. Treatment with either obestatin or ghrelin attenuates mesenteric ischemia-reperfusion-induced oxidative injury of the ileum and the remote organ lung. *Peptides* 2015;71:8-19.
116. Flecknell P. Replacement, reduction and refinement. *ALTEX* 2002;19(2):73-8.
117. Adanir T, Aksun M, Yilmaz Karaoren G, Karabuga T, Nazli O, Sencan A, et al. Effect of epidural anesthesia on anastomotic leakage in colonic surgery: experimental study. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2012;18(1):5-10.
118. <https://www.merckmillipore.com/TR/tr/product/Ghrelin%2C-Rat%2C-Mouse%2C-Synthetic---Calbiochem> EB-.
119. Lykkesfeldt J. Determination of malondialdehyde as dithiobarbituric acid adduct in biological samples by HPLC with fluorescence detection: Comparison with ultraviolet-visible spectrophotometry. *Clinical Chemistry* 2001;47(9):1725-1727.

120. Austen WG, Zhang M, Chan R, Friend D, Hechtman HB, Carroll MC, et al. Murine hindlimb reperfusion injury can be initiated by a self-reactive monoclonal IgM. *Surgery* 2004;136(2):401-406.
121. Weeks C, Moratzc C, Zachariac A, Stracener C, Egan R, Peckham R, et al. Decay-accelerating factor attenuates remote ischemia-reperfusion-initiated organ damage. *Clinical Immunology* 2007;124(3):311-327.
122. Fjallstrom AK, Evertsson K, Norrby M, Tagerud S. Forkhead box O1 and muscle RING finger 1 protein expression in atrophic and hypertrophic denervated mouse skeletal muscle. *J Mol Signal* 2014;9:9.
123. Kumral A, Tuzun F, Ozbal S, Ergur BU, Yilmaz O, Duman N, et al. Lipopolysaccharide-preconditioning protects against endotoxin-induced white matter injury in the neonatal rat brain. *Brain Research* 2012;1489:81-89.
124. Watson JD, Gifford SM, Clouse WD. Biochemical markers of acute limb ischemia, rhabdomyolysis, and impact on limb salvage. *Semin Vasc Surg* 2014;27(3-4):176-81.
125. Wu D, Wang J, Li H, Xue M, Ji A, Li Y. Role of Hydrogen Sulfide in Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev* 2015;2015:186908.
126. Ostman B, Michaelsson K, Rahme H, Hillered L. Tourniquet-induced ischemia and reperfusion in human skeletal muscle. *Clin Orthop Relat Res* 2004(418):260-5.
127. Angelino E, Reano S, Ferrara M, Agosti E, Graziani A, Filigheddu N. Antifibrotic activity of acylated and unacylated ghrelin. *Int J Endocrinol* 2015;2015:385682.
128. Taati M, Moghadasi M, Dezfoulian O, Asadian P. Effects of ghrelin on testicular ischemia/reperfusion-induced injury. *Acta Med Iran* 2016;54(1):32-8.
129. Khowailed A, Younan SM, Ashour H, Kamel AE, Sharawy N. Effects of ghrelin on sepsis-induced acute kidney injury: one step forward. *Clinical and Experimental Nephrology* 2015;19(3):419-426.
130. Aynur Kırbaş SK, Ömer Anlar, Hasan Efe, Adnan Yılmaz. İskemik inmeli hastalarda serum malondialdehid ve paraoksonaz enzim aktivitesi. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2011;2:47-51.



131. Assi M, Derbre F, Lefevre-Orfila L, Rebillard A. Antioxidant supplementation accelerates cachexia development by promoting tumor growth in C26 tumor-bearing mice. *Free Radic Biol Med* 2015.
132. Sari AN, Kacan M, Unsal D, Sahan Firat S, Kemal Buharalioglu C, Vezir O, et al. Contribution of RhoA/Rho-kinase/MEK1/ERK1/2/iNOS pathway to ischemia/reperfusion-induced oxidative/nitrosative stress and inflammation leading to distant and target organ injury in rats. *Eur J Pharmacol* 2014;723:234-45.
133. Wang L, Shan Y, Chen L, Lin B, Xiong X, Lin L, et al. Colchicine protects rat skeletal muscle from ischemia/reperfusion injury by suppressing oxidative stress and inflammation. *Iran J Basic Med Sci* 2016;19(6):670-5.
134. Feller AM, Roth AC, Russell RC, Eagleton B, Suchy H, Debs N. Experimental evaluation of oxygen free-radical scavengers in the prevention of reperfusion injury to skeletal-muscle. *Annals of Plastic Surgery* 1989;22(4):321-331.
135. Sheriff S, Joshi R, Friend LA, James JH, Balasubramaniam A. Ghrelin receptor agonist, GHRP-2, attenuates burn injury-induced MuRF-1 and MAFbx expression and muscle proteolysis in rats. *Peptides* 2009;30(10):1909-13.
136. Balasubramaniam A, Joshi R, Su C, Friend LA, Sheriff S, Kagan RJ, et al. Ghrelin inhibits skeletal muscle protein breakdown in rats with thermal injury through normalizing elevated expression of E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;296(4):R893-901.
137. Oztas B, Sahin D, Kir H, Eraldemir FC, Musul M, Kuskay S, et al. The effect of leptin, ghrelin, and neuropeptide-Y on serum Tnf-Alpha, Il-1beta, Il-6, Fgf-2, galanin levels and oxidative stress in an experimental generalized convulsive seizure model. *Neuropeptides* 2016.
138. Sun N, Wang H, Wang L. Protective effects of ghrelin against oxidative stress, inducible nitric oxide synthase and inflammation in a mouse model of myocardial ischemia/reperfusion injury via the HMGB1 and TLR4/NF-kappaB pathway. *Mol Med Rep* 2016;14(3):2764-70.
139. Nojiri T, Hosoda H, Kimura T, Tokudome T, Miura K, Takabatake H, et al. Protective effects of ghrelin on cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Peptides* 2016;82:85-91.

140. Sun N, Wang H, Ma L, Lei P, Zhang Q. Ghrelin attenuates brain injury in septic mice via PI3K/Akt signaling activation. *Brain Res Bull* 2016;124:278-85.
141. Koksel O, Yildirim C, Cinel L, Tamer L, Ozdulger A, Basturk M, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates lung tissue damage after hind limb ischemia-reperfusion in rats. *Pharmacol Res* 2005;51(5):453-62.
142. Akgun S, Tekeli A, Isbir SC, Civelek A, Ak K, Sirvanci S, et al. FK506 to prevent lung injury after hindlimb ischemia and reperfusion in a rat model: an electron microscopic study. *Surg Today* 2004;34(8):678-84.
143. Zhou L, Yao X, Chen Y. Dexamethasone pretreatment attenuates lung and kidney injury in cholestatic rats induced by hepatic ischemia/reperfusion. *Inflammation* 2012;35(1):289-96.
144. Mbachu EM, Klein LV, Rubin BB, Lindsay TF. A monoclonal antibody against cytokine-induced neutrophil chemoattractant attenuates injury in the small intestine in a model of ruptured abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2004;39(5):1104-11.
145. Kasımay Ö, Iseri SO, Barlas A, Bangir D, Yegen C, Arbak S, et al. Ghrelin ameliorates pancreaticobiliary inflammation and associated remote organ injury in rats. *Hepato Res* 2006;36(1):11-9.
146. Karahan MA, Yalcin S, Aydogan H, Buyukfirat E, Kucuk A, Kocarlan S, et al. Curcumin and dexmedetomidine prevents oxidative stress and renal injury in hind limb ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Renal Failure* 2016;38(5):693-698.
147. Sun GX, Ding R, Li M, Guo Y, Fan LP, Yue LS, et al. Ghrelin attenuates renal fibrosis and inflammation of obstructive nephropathy. *J Urol* 2015;193(6):2107-15.

## 8. EKLER

### EK-1 Etik Kurul Onayı



Toplantı No : 07/12/2011  
Toplantı Tarihi : 10 Haziran 2011

#### Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı Başkanlığı'na

42/2011 Protokol No'lu; Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı Başkanlığı Öğretim Üyelerinden Doç.Dr.Ensari GÜNELİ'nin yürütücüsü olduğu "Ghrelinin İskemi-reperfüzyona bağlı iskelet kısı ve uzak organ hasarı üzerine etkisinin incelenmesi" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik  
Kurul Başkanı  
(Araştırmacı)

Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN  
Başkan Yardımcısı

Prof.Dr.Alper SOYLU  
Üye

Prof.Dr.Ayşe GELAL  
Üye

Prof.Dr.Selman SÖKMEN  
Üye  
(topl. katılmadı)

Prof.Dr.O.Nejat SARIOSMANOĞLU  
Üye  
(topl. katılmadı)

Prof.Dr.Abdullah KUMRAL  
Üye(topl.katılmadı)

Prof.Dr.Hüseyin BASKIN  
Üye  
(topl. katılmadı)

Doç.Dr.Turna İLKNUR  
Üye  
(topl. katılmadı)

Doç.Dr.H.Alper BAGRIYANIK  
Üye

Doç.Dr.Tonay İNCEBOZ  
Üye

Vtr.Hekim Adnan SERPEN  
Üye

Ayşe Nur BALİN  
Üye (topl.katılmadı)

Doç.Dr.Sermin GENÇ  
Üye

NOT: Projede yapılan dizi testlerin metni içinde bold karekter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından önemlidir

## EK-2 Özgeçmiş



# ÖZGEÇMİŞ

## Araştırma Görevlisi GONCA KAMACI

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| <b>TC Kimlik No / Pasaport No:</b> | 25205400110  |
| <b>Doğum Yılı:</b>                 | 1985   |
| <b>Yazışma Adresi :</b>            | Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Kayseri/Türkiye |
| <b>Telefon :</b>                   | 352-2076666/29752  |
| <b>e-posta :</b>                   | goncakamaci@gmail.com                                    |

### EĞİTİM BİLGİLERİ

| Ülke    | Üniversite           | Fakülte/Enstitü     | Öğrenim Alanı       | Derece | Mezuniyet Yılı |
|---------|----------------------|---------------------|---------------------|--------|----------------|
| Türkiye | Erciyes Üniversitesi | VETERİNER FAKÜLTESİ | Veteriner Fakültesi | Lisans | 2010           |

### AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

| Kurum/Kuruluş            | Ülke    | Şehir   | Bölüm/Birim                   | Görev Türü          | Görev Dönemi |
|--------------------------|---------|---------|-------------------------------|---------------------|--------------|
| Erciyes Üniversitesi     | Türkiye | Kayseri | Veteriner Fakültesi           | Araştırma Görevlisi | 2016-        |
| Dokuz Eylül Üniversitesi | Türkiye | İzmir   | Laboratuvar Hayvanları Bilimi | Araştırma Görevlisi | 2012-2016    |
| Erciyes Üniversitesi     | Türkiye | Kayseri | Veteriner Fakültesi           | Araştırma Görevlisi | 2011-2012    |

### UZMANLIK ALANLARI

| Uzmanlık Alanları |
|-------------------|
| Diğer             |

**PROJE DENEYİMİ**

| <b>Proje Adı</b>  | <b>Kurum</b>                                | <b>Bütçe</b> | <b>Tarih</b>          | <b>Görev</b>       | <b>Proje Türü</b> |
|---|---|--------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| Diyabetik Sıçanlarda Direkt İskemik Önkoşullama İletak Ve Çift Taraflı Ekstremiteler Uzak İskemik Önkoşullamanın Renal İskemi Reperfüzyon Hasarına Etkileri   | Münferit                                    | 10000        | 23.03.2015-23.07.2015 | Araştırmacı/ Uzman | Ulusal            |
| Diyabette Gözlenen Kas Kaybında Kalp Enzimlerinin Rolünün Araştırılması   |   | 29787        | 15.06.2014-15.06.2015 | Araştırmacı/ Uzman | Ulusal            |
| İntrakranial Cerrahi Sırasında Kullanılan Hemostatik Matriksin Serebral Arterler Üzerine Vasospazmik Etkisi   | Dokuz Eylül Üniversitesi                    | 35000        | 27.08.2013-02.11.2013 | Araştırmacı/ Uzman | Ulusal            |
| Tavşanlarda Fasiyal Sinirin Ekstratemporal Segmentinin Klempleneşme İle Oluşturulacak Travmatik Fasiyal Paralizide Nimodipin Uygulamasının Paralizinin İyileşme Süreci Üzerine Olan Etkilerinin Değerlendirilmesi | İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi | 24000        | 05.07.2013-04.09.2013 | Araştırmacı/ Uzman | Ulusal            |
| Tavşanlarda Sugammadeksin Karaciğer Mast Hücre Sayısı, Degranülasyonu Ve Kan Triptaz Düzeyi Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi   | Dokuz Eylül Üniversitesi                    | 15000        | 15.01.2013-13.02.2014 | Araştırmacı/ Uzman | Ulusal            |

|  |                          |       |                       |                    |                     |
|--|--------------------------|-------|-----------------------|--------------------|---------------------|
| Verapamil İntoksikasyonunda Sugammadeksin Etkinliğinin Değerlendirilmesi   | Dokuz Eylül Üniversitesi | 14000 | 02.11.2012-04.04.2013 | Araştırmacı/ Uzman | Ulusal              |
| Digoksin İntoksikasyonunda Sugammadeksin Etkinliğinin Değerlendirilmesi  | Dokuz Eylül Üniversitesi | 18000 | 04.10.2012-05.12.2012 | Araştırmacı/ Uzman | Ulusal              |
| Sıçanlarda Renal İskemi Reperfüzyon Hasarında İnflximabın Etkisi   | Dokuz Eylül Üniversitesi | 20000 | 16.06.2012-16.08.2012 | Araştırmacı/ Uzman | Kurumsal (BAP v.b.) |
| Rat Renal İskemi Reperfüzyon Hasarı Modelinde Magnezyum Sülfatın Koruyucu Etkinliğinin Araştırılması               | Dokuz Eylül Üniversitesi | 20000 | 01.05.2012-01.06.2013 | Araştırmacı/ Uzman | Ulusal              |
| Streptozotosinle Oluşturulan Diyabet Modelinde Gelişen Kognitif Bozukluklarda Etil Pirüvat Etkisinin Araştırılması | Dokuz Eylül Üniversitesi | 20000 | 14.01.2012-14.06.2012 | Araştırmacı/ Uzman | Kurumsal (BAP v.b.) |
| Deneysel Astım Bronşiale Tedavisinde Thymoquinone Yeri   | Bireysel                 | 15000 | 02.11.2011-01.06.2012 | Araştırmacı/ Uzman | Ulusal              |
| Ghrelinin İskemi-Reperfüzyona Bağlı İskelet Kası Ve Uzak Organ Hasarı Üzerine Etkisinin İncelenmesi                | Dokuz Eylül Üniversitesi | 63000 | 30.05.2011-30.04.2015 | Yürütücü           | Kurumsal (BAP v.b.) |

## DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

|  |               |            |            |
|--|---------------|------------|------------|
| Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı |               |            |            |
| Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı                                       |               |            |            |
| Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı  |               |            | 11         |
| Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı   |               | Tamamlanan | Devam Eden |
|  | Yüksek Lisans |            |            |
|  | Doktora       |            |            |
|  | Uzmanlık      |            |            |
| Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)                           |               |            |            |

## ÖDÜLLER

| Ödülün Adı   | Alındığı Kuruluş     | Yılı |
|--------------|----------------------|------|
| Poster Ödülü | Türk Toraks Derneği  | 2013 |
| Poster Ödülü | Erciyes Üniversitesi | 2013 |

## YAYINLARI

### SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

|  |
|--|
| Yurtlu, Bulent Serhan; Ozbilgin, Sule; Yurtlu, Derya Arslan; Boztas, Nilay; Kamaci, Gonca; Akaltun, Mahmut; Hanci, Volkan; Yilmaz, Osman, Intravenous lipid emulsion prolongs survival in rats intoxicated with digoxin, 2016, American Journal Of Emergency Medicine  |
| Hancı Volkan, Özbilgin Şule, Özbal Seda, Kamacı Gonca, Ateş Hasan, Boztaş Nilay, Ergür Bekir Uğur, Arıkanoğlu Ahmet, Yılmaz Osman, Yurtlu Bülent Serhan, Evaluation of the effects of intra-arterial sugammadex and dexmedetomidine: an experimental study, 2015, Revista Brasileira de Anestesiologia                           |
| Hanci, Volkan; Ozbilgin, Sule; Boztas, Nilay; Yurtlu, Derya A.; Onat, Levent; Kamaci, Gonca; Yurtlu, Bulent S.; Guneli, M. Ensari; Sisman, Ali R.; Arıkanoglu, Ahmet, Evaluation of the Effectiveness of Sugammadex for Theophylline/Aminophylline Intoxication: an Experimental Study, 2014, Latin American Journal Of Pharmacy |
| Ozbilgin S, Ozbilgin M, Kucukoztas B, Kamaci G, Unek T, Yurtlu BS, Ensari  |

Güneli M, Hanci V, Gunerli A, Evaluation of the effectiveness of sugammadex for verapamil intoxication., 2013, Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology

Kalemci S, Cilaker Micili S, Acar T, Senol T, Dirican N, Omeroglu G, Bagriyanik A, Kamaci G, Yilmaz O, Effectiveness of thymoquinone in the treatment of experimental asthma, 2013, Clinica Therapeutica

### **Diğer dergilerde yayınlanan makaleler**

#### **Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar**

Investigation of Effects of Ghrelin on Skeletal Muscle and Remote Organ Injury Induced by Hindlimb Ischemia-Reperfusion, FELASA Congress, 2016

Ghrelinin İskemi-Reperfüzyona Bağlı İskelet Kası Ve Uzak Organ Hasarı Üzerine Etkisinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi, 4. Laboratuvar Hayvanları Bilimi Ulusal Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 2015

Rat renal iskemi reperfüzyon hasarı modelinde magnezyum sülfatın koruyucu etkinliğinin araştırılması, TARK 2013 Türk Anesteziyoloji ve Reanimasyon Derneği 47. Ulusal Kongre, 2013

Digoksin İntoksikasyonunda Sugammadex Etkinliğinin Değerlendirilmesi, TARK 2013 Türk Anesteziyoloji ve Reanimasyon Derneği 47. Ulusal Kongresi, 2013

Dokuz Eylül Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Biriminde Konvansiyonel Olarak Yetiştirilen Wistar Albino Sıçanların Zamana Bağlı Ağırlık Değişimlerinin İncelenmesi, 3. Laboratuvar Hayvanları Bilimi Ulusal Kongresi, 2013

DEÜTF deney hayvanları laboratuvarında konvansiyonel olarak yetiştirilen BALB/c farelerde mikrobiyolojik izlem, 3. Laboratuvar Hayvanları Bilimi Kongresi, 2013

Streptozotosinle Oluşturulan Diyabet Modelinde Gelişen Kognitif Bozukluklarda Etil Pirüvat Etkisinin Araştırılması, 3. Laboratuvar Hayvanları Bilimi Ulusal Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 2013

### **Diğer yayınlar**

**Düzenleme Tarihi:** 23/09/2016