

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı**

**SIÇANLARDA MİDE MOTİLİTESİ ÜZERİNE
OREKSİN-A'NIN PERİFERAL ETKİSİ**

Mehmet BÜLBÜL

Doktora Tezi

Antalya, 2008

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı**

SIÇANLARDA MİDE MOTİLİTESİ ÜZERİNE OREKSİN-A’NIN PERİFERAL ETKİSİ

Mehmet BÜLBÜL

Doktora Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nimet UYSAL**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2005.03.0122.007)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2008

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir./...../.....

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nimet UYSAL
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Oğuz Kerim BAŞKURT
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Gülsen ÖNER
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Sadi ÖZDEM
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Berrak YEĞEN
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2088 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nurettin Oğuz
Enstitü Müdürü

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı Enstitü Kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır (orjinalleri ekte sunulmuştur).

1. **Bülbül M**, Tan R, Gemici B, Ongüt G, Izgüt-Uysal VN. Effect of orexin-a on ischemia-reperfusion-induced gastric damage in rats. J Gastroenterol. 2008;43(3): 202-7.

ÖZET

Oreksinler, varlıkları ilk olarak iştah merkezi olarak bilinen lateral hipotalamustaki nöronların hücre gövdelerinde gösterilmiş olan bir peptid ailesidir. Oreksin-A, 33; Oreksin-B ise 28 amino asit içermektedir. OX1R ve OX2R olarak iki farklı reseptörü tanımlanan oreksinlerin, bilinen en önemli fonksiyonu iştah ve beslenmenin düzenlenmesidir. Gerek santral, gerekse periferik oreksin sentezinin en önemli uyarınının açlık olduğu bilinmektedir. Gastrointestinal sistemde enterik sinir sistemi, düz kas hücreleri, enterokromafin hücreleri ve vagal afferent nöronlar oreksinleri ve reseptörlerini içermektedir.

Açlık uygulamasına bağlı olarak artan endojen oreksin-A'nın mide motilitesine santral ve periferik etkilerinin araştırılması amacıyla planlanmış olan çalışmamızda Wistar sıçanlar: Tok (açlık uygulanmayan), Kontrol (18 saatlik açlık uygulaması), SB (18 saatlik açlık uygulaması+OX1R antagonisti SB-334867; 10mg/kg, i.v.), VG (18 saatlik açlık uygulaması+vagotomi), 36 s aç (36 saatlik açlık uygulaması), 36 s aç-SB (36 saatlik açlık uygulaması+OX1R antagonisti SB-334867; 10mg/kg, i.v.), 36 s aç-VG (36 saatlik açlık uygulaması+vagotomi) ve 36 s aç-VG-SB (36 saatlik açlık uygulaması+vagotomi+OX1R antagonisti SB-334867; 10mg/kg, i.v.) olarak 8 gruba ayrılmıştır. Mide boşalma hızı spektrofotometrik olarak, göç eden motor kompleks (MMC) aktivitesi ise manometrik yöntem ile ölçülmüştür. Plazma oreksin-A seviyesi radyoimmünoassay (RIA), mide ve hipotalamus dokularındaki preprooreksin ekspresyonu western blot, mide dokusundaki oreksinerjik immünoreaktivite ise immünohistokimya yöntemi ile değerlendirilmiştir.

36 saat süreyle aç bırakılan sıçanlarda plazma oreksin-A seviyesi, hipotalamus ve midedeki preprooreksin protein miktarı ile midedeki oreksinerjik immünoreaktivite gösteren hücre sayısı önemli derecede artmıştır. Düzeyi artan endojen oreksin-A, mide boşalma hızını arttırmış ve MMC döngüsünün süresini uzatmıştır. Oreksin-A'nın mide boşalımı ve MMC üzerine olan etkilerinin, OX1R selektif antagonisti olan SB-334867 uygulaması ile ortadan kaldırılması, söz konusu etkilerin OX1R aracılığı ile gerçekleştiğini göstermekte olup, vagotomi işlemi oreksin-A'nın bu etkilerini değiştirmemiştir.

Bu sonuçlar ışığında, açlık durumunda Oreksin-A'nın periferik olarak da artış gösterdiği, mide boşalımı üzerine hızlandırıcı, MMC üzerine inhibitör etkisi olduğu ve bu etkinin santral ve periferik olarak farklı mekanizmalar aracılığı ile gerçekleştiği anlaşılmaktadır.

Anahtar kelimeler: oreksin-A, açlık, mide boşalma hızı, göç eden motor kompleks, preprooreksin, oreksinerjik immünoreaktivite

ABSTRACT

At first, orexins were discovered in the neuronal cell bodies of the lateral hypothalamic area known as satiety center. Orexin-A and orexin-B contain 33 and 28 amino acids, respectively. Orexins have two different receptors described as OX1R and OX2R. Regulation of feeding and appetite is the mostest known effect of orexins. It is well-known that fasting is the most efficient stimulant for both central and peripheral orexin synthesis. Orexins and their receptors are found in enteric nervous system, smooth muscle cells, enterocromaffin cells and vagal afferent neurons in the digestive tract. Central administration of orexins has shown that orexinergic effect on gastrointestinal system motility is mediated by N. Vagus.

Our study was designed to investigate the central and peripheral effects of fasting-stimulated endogenous orexin-A on gastric motility. Wistar rats were divided into eight groups as: Satiated (no fasting), Control (fasting treatment for 18 hours), SB (fasting treatment for 18 hours+OX1R antagonist SB-334867; 10mg/kg, i.v.), VG (fasting treatment for 18 hours+vagotomy), 36 h fasting (fasting treatment for 36 hours), 36 h fasting-SB (fasting treatment for 36 hours+OX1R antagonist SB-334867; 10mg/kg, i.v.), 36 h fasting-VG (fasting treatment for 36 hours+vagotomy) and 36 h fasting-VG-SB (fasting treatment for 36 hours+vagotomy+OX1R antagonist SB-334867; 10mg/kg, i.v.).

The measurements of gastric emptying rate and migrating motor complex (MMC) were determined by spectrophotometric and manometric methods, respectively. Plasma orexin levels were assayed with radioimmunoassay (RIA), gastric and hypothalamic preproorexin expressions were measured with western blot and the orexinergic immunoreactivity in gastric tissues were determined with immunohistochemistry.

Plasma orexin levels, preproorexin protein expressions in gastric and hypothalamic tissues, orexinergic immunoreactivity were significantly increased in rats exposed to 36 h fasting. The stimulated endogenous orexin-A enhanced gastric emptying rate and increased duration of MMC cycle. The abolishment of these effects with administration of selective OX1R antagonist SB-334867 demonstrated that orexin-A acts on MMC and gastric emptying rate via OX1R. Vagotomy did not change these orexin-A mediated effects.

According to present results, it was concluded that orexin-A is peripherally stimulated upon fasting, accelerates the gastric emptying and inhibits the MMC. These effects are mediated both peripheral and central mechanisms.

Key Words: orexin-A, fasting, gastric emptying, migrating motor complex, preproorexin, orexinergic immunoreactivity.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması, projelendirilmesi ve gerekleşmesinde değerli katkı ve eleştirileriyle bana yol gsteren sevgili hocam Prof. Dr. Nimet UYSAL'a, deneysel çalışmalardaki katkılarından törü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ğretim üyesi Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL'e ve teknisyen Sibel ÖZER'e, Deney Hayvanları Ünitesi alışanlarından Erol NİZAMOğLU'na, değerli hocalarıma, teknik olanakları ile deneysel çalışmanın belirli basamaklarının gerçekleşmesini sağlayan Merkez Araştırma Laboratuvarı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve Deney Hayvanları ünitesi çalışanlarına, tezin yapım sürecindeki desteklerinden dolayı Fizyoloji Anabilim Dalındaki araştırma görevlisi arkadaşlarım Ruken TAN ve Burcu GEMİCİ'ye, istatistiksel değerlendirmelerdeki danışmanlığı ve sonsuz desteği için Biyoistatistik Anabilim Dalı Araş. Gör. Selen BOZKURT'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1.	Oreksinlerin Keşfi 3
2.2.	Oreksinlerin Yapısı 4
2.3.	Oreksinerjik Sinir Liflerinin Projeksiyonları 5
2.4.	Preprooreksin 6
2.5.	Oreksin Reseptörleri 8
2.5.1.	Oreksin Reseptörünün Yapısı 8
2.5.2.	Oreksin Reseptörlerinin Hücre İçi Etki Mekanizmaları 9
2.5.3.	Oreksin Reseptörlerinin Dağılımı 10
2.5.3.1.	Oreksin Reseptörlerinin Merkezi Sinir Sistemindeki Dağılımı 10
2.5.3.2.	Oreksin Reseptörlerinin Periferdeki Dağılımı 12
2.6.	Oreksinlerin Fizyolojik Etkileri 12
2.6.1.	Oreksinlerin Besin Tüketimine Etkileri 13
2.6.2.	Oreksinlerin Uyku/Uyanıklık Üzerine Etkileri 14
2.6.3.	Oreksinlerin Kalp-Damar Üzerine Etkileri 15
2.6.4.	Oreksinlerin Nöro-Endokrin Etkileri 15
2.6.5.	Oreksinlerin Ağrı İletimine Etkileri 16
2.7.	Sindirim Sisteminde Oreksinler ve Etkileri 16
2.7.1.	Oreksinlerin Sindirim Sistemi Motilitesine Etkisi 16
2.7.2.	Oreksinlerin Sindirim Sistemi Sekresyonuna Etkisi 17
2.8.	Açlık ve Oreksinler 18
2.8.1.	Açlığın Merkezi Sinir Sistemindeki Etkileri 18
2.8.2.	Açlığın Periferik Dokulardaki Etkileri 18
2.9.	Sindirim Sisteminin İnnervasyonu 19
2.9.1.	Enterik Sinir Sistemi 19
2.9.2.	Sindirim Sisteminin Otonomik İnnervasyonu 20
2.9.2.1.	Parasempatik İnnervasyon 20
2.9.2.2.	Sempatik İnnervasyon 21
2.9.3.	Sindirim Sisteminin Duysal İnnervasyonu 21
2.9.3.1.	Ekstrinsik Duysal İnnervasyon 21

2.9.3.2.	İntrinsik Duysal İnnervasyon	22
2.10.	Sindirim Sisteminin Myoelektriksel Aktivitesi	23
2.11.	Sindirim Sisteminde Motor Paternler	25
2.11.1.	Açlık Motor Paterni: Göç Eden Motor Kompleks (MMC)	25
2.11.1.1.	MMC'nin Sinirsel Kontrolü	28
2.11.1.2.	MMC'nin Hormonal Kontrolü	29
2.11.2.	Tokluk Motor Paterni	31
2.12.	Mide Boşalımı	32
2.12.1.	Mide Boşalımını Etkileyen Faktörler	32
2.12.2.	Mide Boşalma Hızının Kontrolü	33
2.12.2.1.	Mide Boşalma Hızının Kontrolünde Midenin Rolü	33
2.12.2.2.	Mide Boşalma Hızının Kontrolünde Duodenumun Rolü	34
GEREÇLER VE YÖNTEMLER		36
3.1.	Ön çalışma	36
3.1.1.	Açlık Süresinin Tayini	36
3.2.	Gruplandırma ve Deney Protokolü	37
3.2.1.	Mide Boşalma Hızının Ölçümü İçin Yapılan Gruplandırma	37
3.2.2.	MMC Aktivitesinin Ölçümü İçin Yapılan Gruplandırma	37
3.3.	Parametrelerin Tayini	38
3.3.1.	Mide Boşalma Hızının Ölçümü	38
3.3.2.	MMC Aktivitesinin Ölçümü	39
3.3.3.	Mide Asit Sekresyonu Ölçümü	42
3.3.4.	Plazma Oreksin-A Analizi	43
3.3.5.	Preprooreksin Analizi	44
3.3.5.1.	Numunelerin Hazırlanması	45
3.3.5.2.	Elektroforez ve Antikorların Uygulanması	45
3.3.5.3.	Görüntüleme ve Değerlendirme	45
3.3.6.	İmmunohistokimya	45
3.3.6.1.	Dokuların Hazırlanması	45
3.3.6.2.	Işık Mikroskopik Gözlemler	46
3.3.6.3.	İmmünohistokimyasal Protokol	46
3.3.6.4.	Morfometrik Değerlendirme	46
3.3.6.5.	Semikantitatif Değerlendirme	47
3.4.	İstatistiksel Analiz	47
BULGULAR		48
4.1.	Mide Boşalma Hızı	48
4.2.	MMC Aktivitesinin Ölçümü	49
4.2.1.	MMC Döngüsü Süresi	49
4.2.2.	Faz-III süresi	51
4.3.	Plazma Oreksin-A Seviyeleri	52
4.4.	Preprooreksin Analizi	53
4.4.1.	Midede Preprooreksin Analizi	53
4.4.2.	Hipotalamusta Preprooreksin Analizi	54
4.5.	İmmünohistokimyasal Bulgular	56

TARTIŞMA	59
SONUÇLAR	66
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	86
EKLER	87
EK-1: Effect of orexin-a on ischemia-reperfusion-induced gastric damage in rats.	

SİMGELER VE KISALTMALAR

α-MSH	: alfa-melanin uyarıcı hormon
ACTH	: adrenokortikotropik hormon
AGRP	: agouti geni ile ilişkili protein
ARC	: arcuat nucleus
BER	: bazal elektriksel ritim
cAMP	: siklik adenozin monofosfat
CART	: kokain-amfetamin ile düzenlenen transkript
CCK	: kolesistokinin
CGRP	: kalsitonin geni ile ilişkili peptid
CHO	: Çin hamster ovaryum
CIP	: kronik ideopatik bağırsak pseudoobstrüksiyonu
CRF	: kortikotropin salgılatıcı hormon
CSF	: serebrospinal sıvı
DAG	: diaçilgliserol
DMN	: dorsomedial nucleus
DRG	: dorsal kök gangliyon
EC	: enterokromafin
ECA	: elektriksel kontrol aktivitesi
EPAN	: ekstrinsik primer aferent nöron
ERA	: elektriksel cevap aktivitesi
ESS	: enterik sinir sistemi
GHS-R	: büyüme hormon sekretagog reseptörü
GIP	: gastrik inhibitör peptid
GLP-1	: glukagon benzeri peptid-1
GLP-2	: glukagon benzeri peptid-2
GLUT-1	: glukoz transporter-1
HPA	: hipotalamo-hipofizyer eksen
HPG	: hipotalamus-hipofiz-gonadlar
HPLC	: yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
IBS	: yangısal bağırsak sendromu
ICC	: interstisyel Cajal hücreleri
IP3	: inositoltrifosfat
IPAN	: intrinsik primer aferent nöron
IR	: immünoreaktif
LC	: locus coeruleus
LH	: luteinizan hormon
LHA	: lateral hipotalamik alan
MCH	: melanin konsantre edici hormon
MMC	: göç eden motor kompleks
NO	: nitrik oksit
NOS	: nitrik oksit sentaz
NA	: nucleus ambiguus
NG	: nodoz gangliyon
NKA	: nörokinin-A

NKB	: nörokinin-B
nNOS	: nöronal nitrik oksit sentaz
NPY	: nöropeptid-Y
NTS	: nucleus tractus solitarius
PCR	: polimeraz zincir reaksiyonu
pCREB	: cAMP cevap elemanını bağlayıcı protein
PKC	: proteinkinaz-C
PLC	: fosfolipaz-C
POMC	: proopiomelanokortin
PVN	: paraventricular nucleus
RIA	: radyoimmünoassay
SCN	: supra-chiasmatic nucleus
SNP	: sodyumnitroprusit
SP	: substance P
TMN	: tuberomamillar nucleus
TRH	: tirotropin serbestleştirici hormon
TSH	: tiroid uyarıcı hormon
VIP	: vazoaaktif intestinal peptid
VMN	: ventromedial nucleus

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>		<u>Sayfa</u>
2.1.	Oreksin-A ve Oreksin-B'nin Amino Asit Dizilimleri	4
2.2.	Oreksin-A ve Oreksin-B'nin İnsan ve Diğer Türlerdeki Benzerliği	5
2.3.	Oreksinerjik Sistemin Projeksiyonları	6
2.4.	Merkezi Sinir Sisteminde Preprooreksin mRNA'sı İçeren Hücreler	6
2.5.	Preprooreksin'den Oreksin-A ve Oreksin-B'nin Oluşumu	7
2.6.	OX1R'nin Kimyasal Yapısı	8
2.7.	Oreksin Reseptörlerinin Merkezi Sinir Sistemindeki Dağılımı	11
2.8.	Oreksin-A'nın Santral ve Periferel Dokulardaki Fonksiyonları	13
2.9.	Sindirim Sisteminin Sinirsel Kontrolü	20
2.10.	Sindirim Sisteminin İntrinsik ve Ekstrinsik Duysal İnnervasyonu	22
2.11.	Köpekte Sindirim Kanalının Farklı Bölgelerindeki Yavaş Dalga Frekansları	23
2.12.	Köpekte Pilorus Bölgesinden Elde Edilen Kayıt	24
2.13.	Köpekte Antrum Bölgesindeki ICC'lerin Organizasyonu	25
2.14.	İnsanda Açlık Motor Paterni (MMC)	26
2.15.	Sığıçanda Farklı Yöntemlerle Kaydedilen MMC Döngüleri	27
2.16.	Öğün Alımı ile Tokluk Motor Paterni'nin Oluşumu	31
3.1.	Açlık Süresinin Plazma Oreksin-A seviyesine Etkisi	36
3.2.	MMC Aktivitesinin Ölçümünde Uygulanan Cerrahi İşlem	40
3.3.	MMC Aktivitesinin Ölçümü İçin Kullanılan Düzenek	41
3.4.	MMC Döngüsünün Kaydı	42
3.5.	Mide Asit Sekresyonu Ölçümleri	43
3.6.	Oreksin-A Standart Grafiği	44
4.1.	Mide Boşalma Hızları	48
4.2.	MMC Döngüsü Süreleri	49
4.3.	MMC Aktivitesi Kayıtları	50
4.4.	Faz-III Süreleri	51
4.5.	Plazma Oreksin-A Seviyeleri	52
4.6.	Midede Preprooreksin Ekspresyonu	53
4.7.	Hipotalamusta Preprooreksin Ekspresyonu	54
4.8.	Preprooreksin Ekspresyonları	55
4.9.	Mide Dokusunda Oreksin-A Antikoru ile İmmünopozitif Boyanan Hücre Sayıları	56
4.10.	Mide Antrum Dokusunda Oreksin-A İmmünoboyanması	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. Mide Dokusunda Oreksin-A Antikoru ile Pozitif Boyanan Hücrelerin İmmünoboyanma Yoğunluklarının Semikantitatif Dağılımları	58

GİRİŞ

Oreksinler, hipotalamustan salınan ve genleri iştah merkezi olarak bilinen lateral hipotalamusta eksprese edilen bir nöropeptid ailesidir. Oreksin-A, 33 amino asit içeren, 3562 Da ağırlığında, oreksin-B ise 28 amino asit içeren, 2937 Da ağırlığında bir peptid olup, her ikisi de ortak öncül form olan, kemirgenlerde 130; insanda 131 amino asit içeren preprooreksinden meydana gelir [1, 3].

Oreksinler besin tüketimi ve iştah ile ilgili olmakla birlikte, uyku/uyanıklık, dikkat, öğrenme, hafıza, ısı regülasyonu, kan basıncının düzenlenmesi üzerine de etkilidir [2, 4].

Oreksinlerin reseptörleri olan OX1R ve OX2R, G protein bağlı reseptörler olarak tanımlanmış olup, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda artış yaparak etki göstermektedirler. Yapılan çalışmalarda, OX1R'nin oreksin-A'ya afinitesinin oreksin-B'den 100 kat daha yüksek olduğu, OX2R'nin ise her iki oreksin molekülüne afinitesinin eşit ya da yakın olduğu gösterilmiştir [3, 5]. OX1R ve OX2R farklı fizyolojik fonksiyonlara aracılık etmekte olup, OX1R daha çok beslenme ve enerji dengesi, OX2R ise uyku ve uyanıklık işlevi ile ilişkilidir [6].

Oreksinler ve reseptörlerinin varlığı enterik sinir sistemi (ESS)'nde gösterilmiştir. Oreksin-A ve OX1R immünoaktivitesi submukozal ve myenterik pleksustaki nöronlarda, sadece OX1R immünoaktivitesi ise enteroendokrin hücrelerde, dairesel ve uzunlamasına seyreden kas lifleri ile mukozada saptanmıştır. Bunun yanı sıra OX2R'nin de enterokromafin hücrelerde (EC) ekspresyonu gösterilmiştir [3,7].

Reseptörlerinin geniş dağılımından ötürü oreksinler, sindirim sistemi motilitesine hem santral hem de periferik mekanizmalar aracılığı ile etki etmektedir. Oreksin-A'nın intrasisternal uygulamasının sıçanlarda proksimal midede gevşeme yanıtı oluşturduğu [8], oreksin-A ve oreksin-B'nin sıçanlarda dorsal motor nucleus'a mikroenjeksiyon yoluyla uygulanmasının antral motilitede artışa neden olduğu gösterilmiştir [9]. Oreksin-A'nın santral [10] ve periferik [11] uygulamalarının sıçan midesinin boşalma hızını arttırdığı tespit edilmiştir.

Midedeki myoelektrik ve kontraktıl aktiviteler açlık ve tokluk durumunda iki ana patern gösterir [12]. Açlık sırasında, mide ve bağırsakta göç eden motor kompleks (MMC) olarak tanımlanan geçici koordineli bir motor patern gözlenir [13]. MMC, döngüsel şekilde oluşan, elektriksel ve mekanik özellik taşıyan, genellikle mide ve ince bağırsakta aynı anda başlayan ve ince bağırsakta uzunlamasına yayılan, insan ve birçok memelide gözlenen bir aktivitedir. İnsanda ve köpekte MMC, her 90-100 dakikada bir mide ve duodenumda başlar ve tüm ince bağırsağı kat etmesi

yaklaşık 90 dakika süre alır. Sıçanda ise bir döngünün uzunluğu 10-20 dakika arasındadır [14].

MMC'nin kontrolü ağırlıklı olarak motilin, ghrelin gibi peptidlerin rol aldığı hormonal, myenterik pleksusun görev aldığı intrinsik innervasyon ve N.vagus aracılığı ile sağlanan ekstrinsik innervasyonun katılımı ile sağlanmaktadır [12, 14, 15]. Periferik oreksin-A'nın sıçanda MMC'yi inhibe ederek döngü süresini uzattığı ve bu inhibisyonun OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması ile ortadan kalktığı gösterilmiştir [16, 17]. Hormonal ve nöral mekanizmalar tarafından denetlenen mide boşalımı mide ve duodenumun kontraktıl aktivitelerinin koordinasyonu aracılığı ile gerçekleşmekte olup, boşalma hızını belirleyen temel unsurlar antrum ve pilorusdaki kasılmaların frekansı, şiddeti, süresi ve yayılma hızlarıdır [18, 19, 20].

Gerek santral, gerekse enterik oreksin sentezinin en önemli uyarınının açlık olduğu bilinmektedir. Açlık uygulamalarının kemirgende hipotalamik alandaki oreksin-A, oreksin-B ve preprooreksin mRNA miktarını, oreksin immünoreaktif (IR) nöron sayısını [7, 21], insanda [22] ve sıçanda [23] plazma oreksin-A seviyesini arttırdığı gösterilmiştir.

Çalışmamız, açlık uygulamasına bağlı olarak artan oreksin-A'nın, mide motilitesine N.vagus aracılı etkisinin yanı sıra, periferik etkisinin olup olmadığını göstermek amacıyla planlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Oreksinlerin Keşfi

Oreksinler (hipokretinler) 1998 yılında birbirinden bağımsız iki farklı grup tarafından tanımlanmıştır. The Scripps Araştırma Enstitüsü'nde çalışan bir grup hipotalamusta eksprese olan mRNA'lar üzerinde çalışırken; Teksas Üniversitesi Southwestern Tıp Merkezi'ndeki diğer bir grup ise G-protein bağlı yetim reseptörlerin endojen ligandları üzerinde yaptıkları araştırmalar sırasında oreksinleri keşfetmişlerdir [24].

Southwestern Tıp Merkezi'nde Sakurai ve ekibi, her biri farklı bir G-protein bağlı reseptörün cDNA'sını eksprese eden 50'den fazla hücre dizisini, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile sıçan beyninden elde edilen fraksiyonlar ile muamele etmişler ve sitoplazmik kalsiyum konsantrasyonlarındaki artışları incelemişlerdir. Araştırmacılar bazı HPLC fraksiyonlarının, HFGAN72 adı verilen yetim reseptörü eksprese eden insan embriyonik böbrek hücre kültürü HEK293'de sitoplazmik kalsiyum konsantrasyonunu arttırdığını tespit etmişlerdir. Kalsiyum konsantrasyonunda en fazla artışı sağlayan fraksiyon saflaştırılıp, 33 amino asit uzunluğunda, N-terminalinde piroglutamil kalıntısı içeren ve C terminali amidlenmiş olan bir peptid ortaya çıkarılmıştır. Bu peptidin yanı sıra daha az düzeyde kalsiyum artışı sağlayan 28 amino asit uzunluğunda ilk peptide %46 homoloji gösteren ikinci bir peptid daha tanımlanmıştır [25].

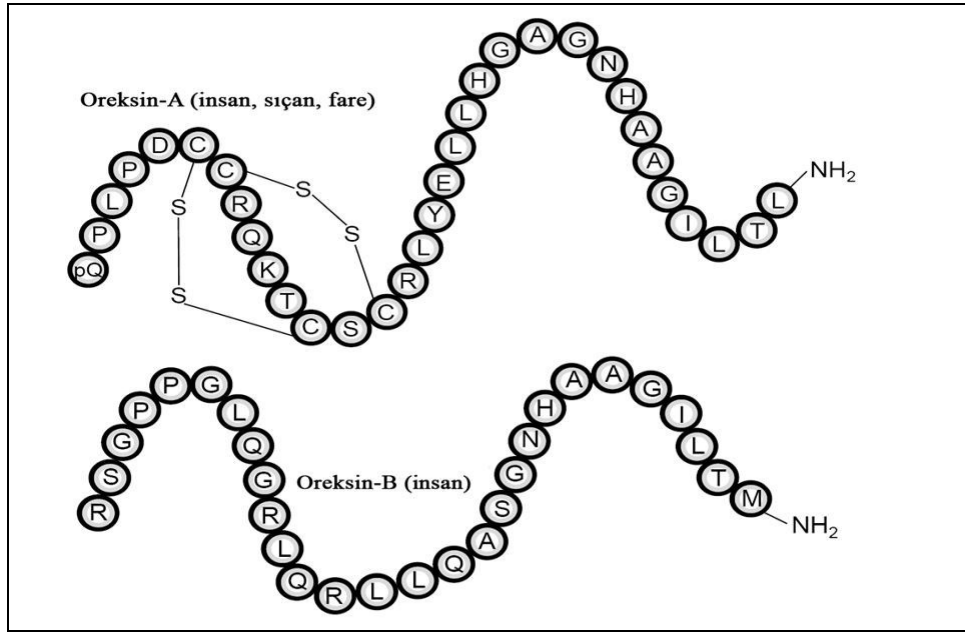
Aynı zamanlarda Sakurai ve ekibinden bağımsız olarak The Scripps Araştırma Enstitüsü'nde De Lecea ve arkadaşları "directional tag PCR subtraction" metodunu kullanarak hipotalamusa özgü, iki farklı ürün veren bir prepro-peptidin mRNA'sını tanımlamışlardır. De Lecea ve arkadaşları bu yeni peptidlere, hipotalamustaki yerleşimleri ve sekretin peptidine olan sekans homolojilerinden ötürü hipokretinler adını vermişlerdir [26]. Bu tarihten 6 hafta sonra yayınlanan çalışmalarında Sakurai ve arkadaşları söz konusu peptidlere hipotalamustan izole edilmeleri ve intraserebroventriküler yolla dışarıdan uygulandığında besin tüketimi üzerine uyarıcı etki göstermelerinden ötürü ve Yunanca'da iştah anlamına gelen "orexis" kelimesinden esinlenerek oreksinler adını vermişlerdir [25].

Oreksinler, keşfinden günümüze kadar olan 10 yıllık süre içerisinde pek çok farklı araştırmaya konu olmuştur. Oreksinlerin ve reseptörlerinin merkezi sinir sistemi dışında farklı dokularda üretildiği ve birçok fizyolojik fonksiyona aracılık ettiği gösterilmiştir. Oreksinlerin organizmadaki rolleri konusunda araştırmalar artan oranda devam etmektedir.

2.2. Oreksinlerin Yapısı

Oreksin-A, 33 amino asit içeren, 3562 Da ağırlığında bir peptid olup, N-terminalinde bir piroglutamil kalıntısı, 2 adet zincir içi disülfid bağı ve C-terminalinde amidasyon oluşumu bulunmaktadır. Bu kimyasal yapı temel olarak insan, fare, sıçan, sığır, ve domuz gibi memelilerde korunmaktadır [2, 4, 27].

Oreksin-A'nın Oreksin-B'den farkı N-terminalinde 5 amino asitlik bir zincir içermesidir [5, 28, 29]. Cys6-Cys12 ve Cys7-Cys14 arasındaki iki adet disülfid köprüsü ve C-terminal yönündeki ilk 19 amino asitin varlığı oreksin-A'nın biyolojik etkinliği için gereklidir [30].

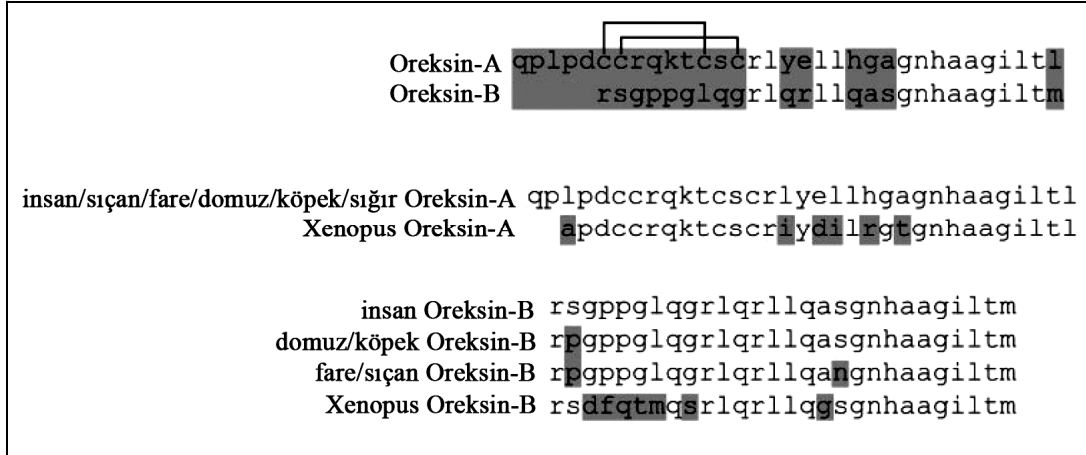


Şekil 2.1. Oreksin-A ve Oreksin-B'nin Amino Asit Dizilimleri [2].

Oreksin-B yapısında 28 amino asit barındıran, 2937 Da ağırlığında bir peptiddir. İnsanlarda oreksin-B'nin yapısı kemirgenlerdeki yapıya göre 2 amino asitte farklılık gösterir. Oreksin-B'nin C-terminali de tıpkı oreksin-A gibi amidlenmiş olup her iki peptid arasında %46 oranında bir homoloji vardır. Oreksin-A ve Oreksin-B peptidleri ortak öncül form olan, kemirgenlerde 130, insanda 131 amino asit içeren preprooreksin'den oluşur [2, 3, 5, 28].

Oreksin-A, oreksin-B'ye göre fizyolojik stabilitesi ve yağda çözünürlüğü yüksek olan bir moleküldür. Oreksin-A'nın yüksek lipofilik özelliği kan-beyin bariyerini geçmesini sağlar [31]. Serebrospinal sıvı (CSF)'de oreksin-B'nin gösterilememiş olmasına karşın oreksin-A, insanlarda [32, 33], sıçanlarda [34] ve köpeklerde [35] saptanmıştır. Plazmadaki oreksin-A'nın merkezi sinir sistemi kökenli olmayıp, periferik kaynaklardan köken aldığını gösteren bulgular vardır [3, 17, 30, 36]. Dalal ve arkadaşları narkoleptik bireylerden toplanan CSF örneklerinde oreksin-A'nın çok düşük düzeylerde olmasına karşın, plazmada normal düzeyde bulunduğunu bildirmişlerdir [37].

Oreksinler memelilerin yanı sıra Afrika pençeli kurbağası olarak bilinen *Xenopus laevis*'de de tanımlanmıştır. İlginç olarak insan preproreksini en fazla bu türdekine benzerlik gösterir. *Xenopus laevis*'de oreksin-A 33 yerine N-terminalindeki 2 amino asitten yoksun olarak 31 amino asit içerirken, yine amino terminalinde piroglutamil kalıntısını barındırmaz [4].



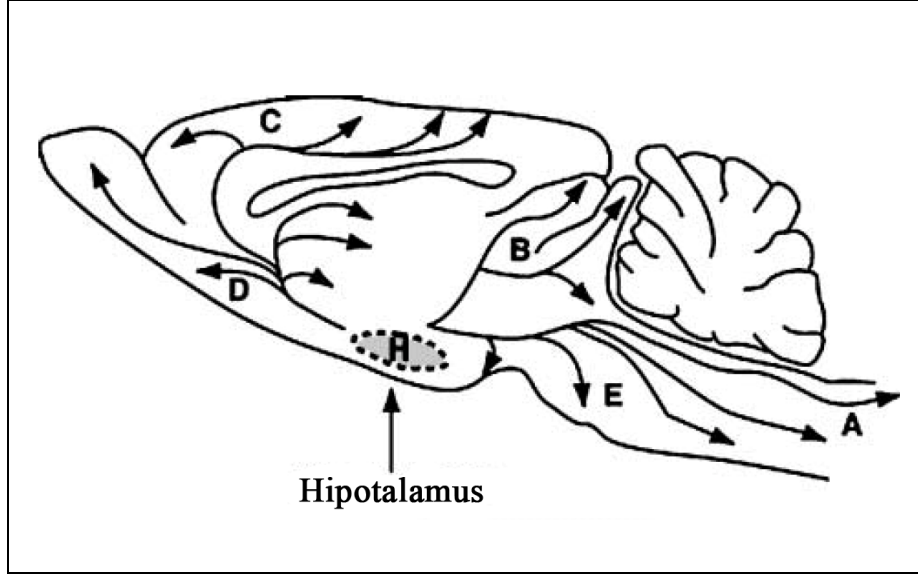
Şekil 2.2. Oreksin-A ve Oreksin-B'nin İnsan ve Diğer Türlerdeki Benzerliği [4].

2.3. Oreksinerjik Sinir Liflerinin Projeksiyonları

Hücre gövdeleri hipotalamusta bulunan oreksinerjik nöronların birçok alana ulaşan aksonları sayesinde merkezi sinir sisteminde yaygın projeksiyonları bulunmaktadır. Oreksinerjik lifler genelde immünohistokimyasal yolla gösterilmiştir. Sıçanlarda oreksin üreten hücrelerin locus coeruleus (LC) başta olmak üzere beyin sapı, bazal gangliyonlar, talamik alanlar, medullar retiküler formasyon, nucleus tractus solitarius (NTS) ve medulla spinalis'in tüm segmentlerine projeksiyonları bulunmaktadır [4, 6, 30].

İnsanlarda oreksin üreten nöronların gövdeleri dorso-lateral hipotalamusta olup LC, dorsal raphe nucleus'ları, amigdala, suprachiasmatic nucleus (SCN), bazal ön beyin, beyin sapı ve medulla spinaliste yaygın projeksiyonları bulunmaktadır [6].

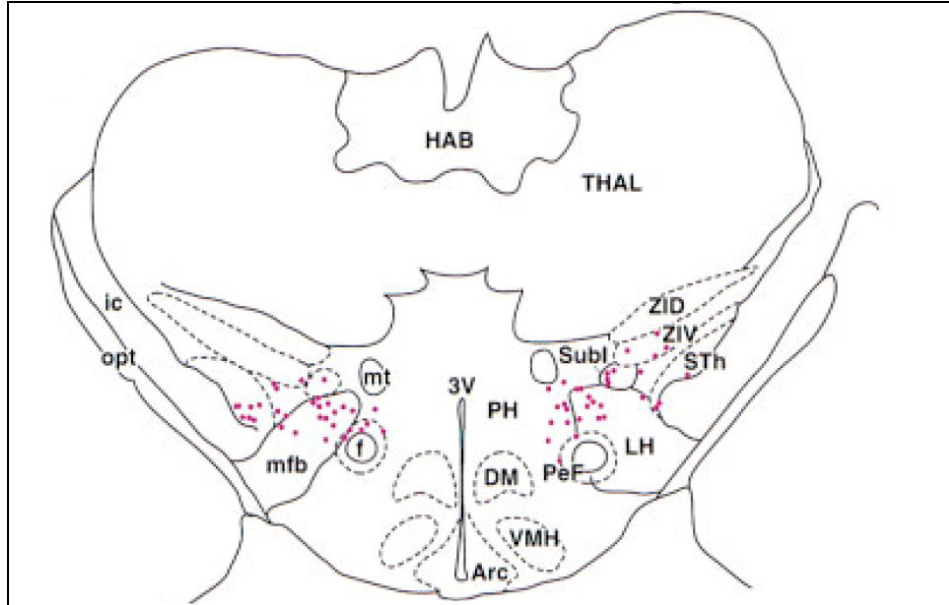
Oreksinerjik nöronların merkezi sinir sisteminin pek çok farklı alanına ulaşmasından dolayı çeşitli fizyolojik fonksiyonlar üzerine etkilidir. Örnek olarak oreksinerjik liflerle yoğun olarak innerve edilen bir bölge olan LC, uyku/uyanıklığın düzenlenmesinde görev almaktadır. Lateral hipotalamik alan (LHA) iştah merkezi olarak bilinmekte olup, uyarılmasında hiperfaji/canlı ağırlık artışı; lezyonunda ise hipofaji/canlı ağırlık kaybı görülür. Nöropeptid-Y (NPY) içeren nöronların aksonları da bu alanda sonlanmakta olup, oreksinerjik nöronların NPY reseptörlerinden Y5'i eksprese ettiği gösterilmiştir. Y5, NPY'nin hiperfajik etkilerinin bir bölümünden sorumludur. LHA ayrıca uyku, kalp döngüsü, kalp hızının ve kan basıncının düzenlenmesi gibi birkaç otonomik işlevde de rol almaktadır [38].



Şekil 2.3. Oreksinerjik Sistemin Projeksiyonları. (A)Hipotalamus, (B)Kolinergik nöronlar, retiküler formasyon, spinal kord, (C)Bazal önbeyin, (D)Amigdala, dopaminerjik nöronlar, suprachiasmatic nucleus, (E)Locus coeruleus [6].

2.4. Preprooreksin

Oreksinlerin her iki tipi de ortak öncül molekülleri olan 131 amino asit içeren preprooreksin'den meydana gelir [3]. Preprooreksin kemirgenlerde 130 amino asitten meydana gelir. İnsan ve fare preprooreksinleri sıçandaki molekül yapısına sırasıyla %83 ve %95 oranında homoloji gösterir [2].

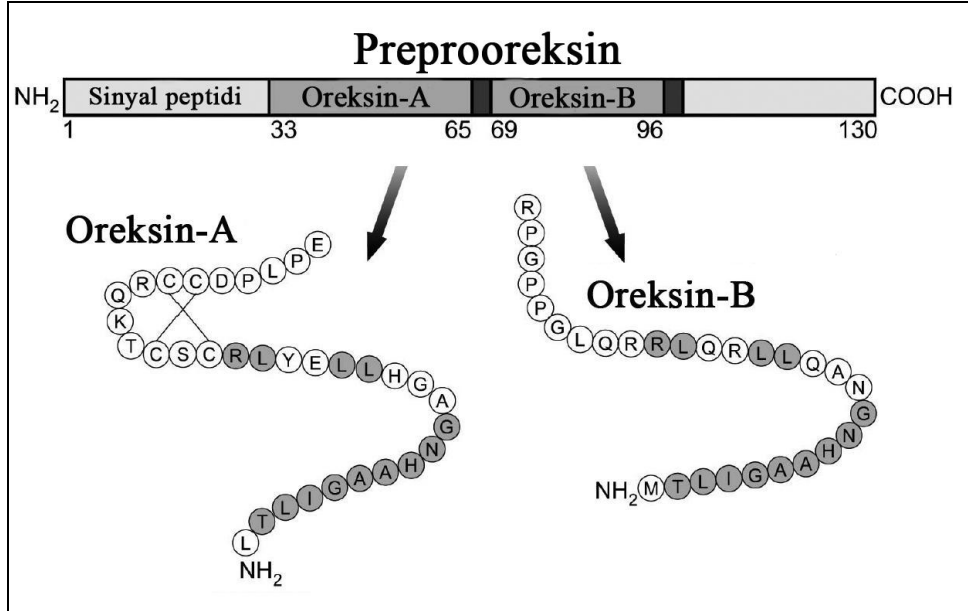


Şekil 2.4. Merkezi Sinir Sisteminde Preprooreksin mRNA'sı İçeren Hücreler [25].

THAL: talampus; **HAB:** habenular kompleks; **ic:** internal kapsül; **opt:** optik trakt; **mt:** mamilotalamik trakt; **f:** forniks; **mfb:** mediyal önbeyin; **3V:** üçüncü ventrikül; **Arc:** arcuat nucleus; **DM:** dorsomedial nucleus; **VMH:** ventromedial hipotalamus

İnsan preprooreksin geni 17. kromozomda yer almakta olup 17q21 bölgesine yerleşmiştir ve iki ekzondan meydana gelir [4]. Bu gen, nörodejeneratif hastalıklar gen grubu olarak bilinen “*chromosome 17-linked dementia*” grubuna dahil edilmiştir [3].

Preprooreksin en yoğun olarak lateral ve posterior hipotalamusta bulunmaktadır [3,39]. LHA’da preprooreksin eksprese eden nöronların, korteksten omuriliğin üst kısmına kadar geniş bir alanda projeksiyonları bulunmaktadır. Bu projeksiyonlar, hipotalamus ve diğer yapıların beslenme ile ilgili düzenlemelere katılımını sağlar. Arcuat nucleus (ARC) ve NTS bu alanlardan bazılarıdır. NTS barsaktan vagal yolla gelen aferent uyarıları alır ve LHA’ya iletir [38]. Bunun yanı sıra preprooreksin mRNA’sı merkezi sinir sisteminde ARC, dorsomedial nucleus (DMN), ventromedial nucleus (VMN), talamus, subtalamik alan, perifornical nucleus, subinsertal nucleus, ventral zona inserta, habenular kompleks, tractus opticus, mamillotalamik traktus, forniks, mediyal ön beyin ve üçüncü ventrikülde gösterilmiştir [25].



Şekil 2.5. Preprooreksin’den Oreksin-A ve Oreksin-B’nin Oluşumu [40].

Preprooreksin’in periferik dokulardaki sentezine dair tartışmalar vardır. Kummer ve arkadaşları preprooreksin protein ve mRNA’sını sıçan testisinin ependim hücrelerinde göstermişlerdir [41]. Öte yandan Sakurai ve Jöhren, preprooreksin mRNA’sını sıçanlarda testis ve kalpte tespit ederken mide, bağırsak, böbrek, pankreas, akciğer, adrenal bezde bulunmadığını göstermişlerdir [25, 42]. İnsanlarda ise preprooreksin proteini adrenal hücre membranında gösterilmiştir [43].

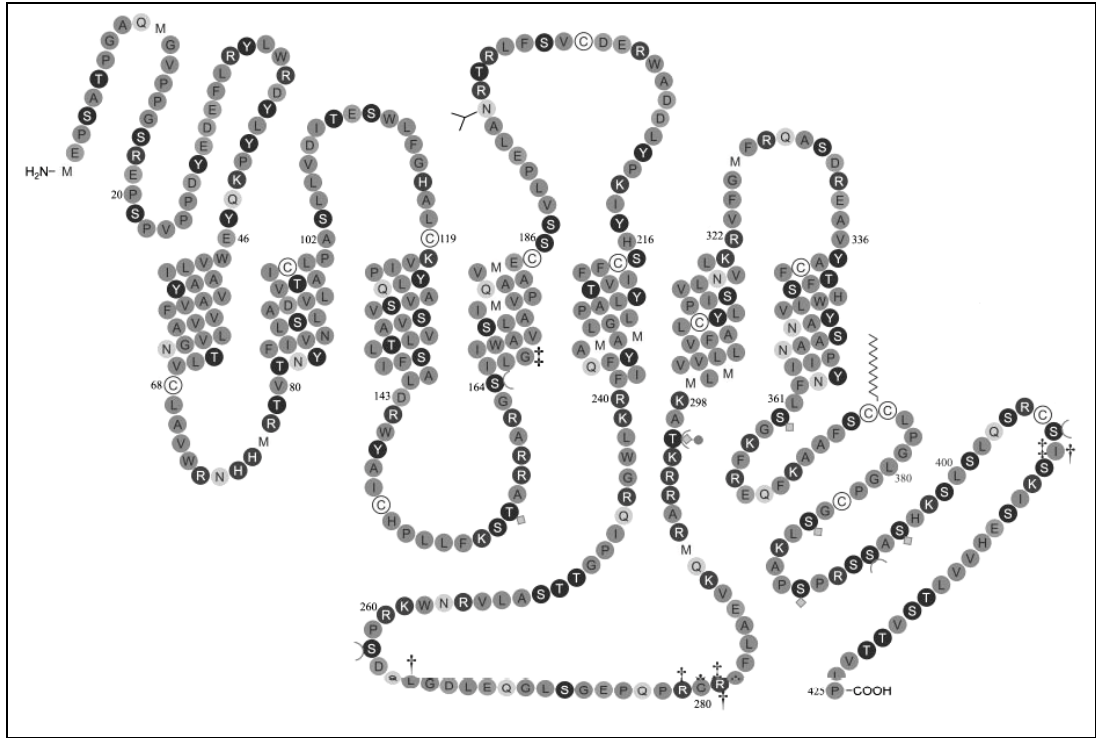
Oreksin-A ve preprooreksin mRNA konsantrasyonları sirkadien bir değişim gösterirken, hipotalamusta en yüksek seviyeleri aydınlık fazın başlangıcında, en düşük seviyesi ise karanlık fazın başlangıcında tespit edilmiştir. Sıçanda hipotalamik oreksinerjik nöronlar ile SCN arasında nöral bağlantı ışık ve oreksin arasındaki düzenlemeyi açıklamaktadır [4]. Bununla beraber preprooreksin mRNA’sının sıçan beyinde açlık uygulaması ile arttığı da gösterilmiştir [25].

2.5. Oreksin Reseptörleri

2.5.1. Oreksin Reseptörünün Yapısı

Oreksinlerin etkilerine OX1R ve OX2R adlı G protein-bağlı reseptörler aracılık eder. OX1R ve OX2R, orta uzunlukta NH₂ ve COOH terminalleri ile transmembran halkalarına sahiptirler. İnsanda 425 amino asit içeren OX1R geni 1.kromozomda, 444 amino asit uzunluğundaki OX2R geni ise 6. kromozomda yer almakta olup, OX1R, 1p33; OX2R ise 6cen bölgelerine lokalize olmuştur [4].

Oreksin reseptörlerinin türler arasındaki benzerlik oranı oldukça yüksektir. OX1R ile OX2R arasındaki homoloji %64 oranındadır. İnsan ve fare arasında OX1R için %94; OX2R için %95 oranında homoloji bulunmaktadır [6, 29, 30, 39]. G-protein bağlı reseptörler arasında OX1R en fazla benzerliği %26 oranında NPY reseptörü olan Y₂ ile göstermektedir. Bunu, %25 ile tirotropin serbestleştirici hormon (TRH) reseptörü, %23 ile kolesistokinin (CCK) tip-A reseptörü ve %20 benzerlik oranı ile nörokinin reseptörü NK₂ izlemektedir [5].



Şekil 2.6. OX1R' nin Kimyasal Yapısı [4].

Farede OX2R'nin OX2_αR ve OX2_βR olmak üzere iki farklı formu bulunmaktadır. Bu farklılık C-terminalindeki amino asit dizilimlerinden kaynaklanır. OX2_αR 443, OX2_βR ise 460 amino asitten meydana gelir. OX2_βR mRNA'sı beyin, dalak, akciğer, karaciğer, iskelet kası, böbrek ve testiste bulunurken, OX2_αR mRNA'sı ise akciğer, beyin, dalak ve testiste tespit edilmiştir [44].

OX1R ve OX2R farklı fizyolojik fonksiyonlara aracılık etmektedir. OX1R daha çok beslenme ve enerji dengesi, OX2R ise daha çok uyku ve uyanıklık işlevi ile ilişkilidir. OX1R'nin antikör ve antagonistleri, oreksinlerin beslenme ve vücut ağırlığı üzerine olan etkilerini ortadan kaldırmıştır. Narkolepsi hastalığının

köpeklerde OX2R gen mutasyonu sonucu ortaya çıktığı bulunmuştur [6]. OX2R aracılı besin tüketiminin arttığını öne süren bulgular olmasına karşın [25] elde edilen sonuçlar çelişkilidir [39].

Oreksin reseptörlerinin her iki oreksin molekülüne afinitesi farklıdır. I¹²⁵ ile işaretlenmiş Oreksin-A kullanılarak yapılan kompetitif radyoligand bağlama çalışmalarında OX1R'nin oreksin-A'ya afinitesinin, oreksin-B'den 10 ila 100 kat yüksek olduğu, OX2R'nin ise her iki oreksin molekülüne afinitesinin eşit ya da yakın olduğu gösterilmiştir [3, 5, 6, 27, 29, 39].

Oreksin-A'nın sahip olduğu iki adet disülfid köprüsü OX1R'nin afinitesinde önemli rol oynamaktadır. Darker ve arkadaşları oreksin-A'nın C-terminalindeki ilk 19 rezidünün OX1R'ye bağlanması için elzem olduğunu göstermişlerdir. Oreksin-A'nın N-terminal yönünden kesilip, 16 amino asitlik bir uzunluğa getirilmesi OX1R'ye bağlanma yeteneğini tamamen ortadan kaldırmış, C-terminali yönünden disülfid köprülerine kadar kesilmesi ise zayıflatmış, fakat tamamen ortadan kaldıramamıştır [45].

2.5.2. Oreksin Reseptörlerinin Hücre İçi Etki Mekanizmaları

Oreksin reseptörleri ligandlarının bağlanmasını takiben heterotrimerik G proteinlerini aktifleştirirler. OX1R'nin G_q; OX2R'nin ise G_i ve G_q altbirimlerine bağlandığını gösteren bulgular bulunmaktadır [5]. İnsan adrenal hücre membranlarının oreksin-A ile muamele edilmesi G_s, G_q ve daha az oranda G_i alt birimlerinin aktivasyonuna neden olurken, G_o alt biriminde aktivasyon gözlenmemiştir [43]. OX2R'nin etkilerinin pertussis toksini ile ortadan kaldırılması bu reseptörün GTP bağlayıcı proteinlerin G_i/G_o alt birimleri ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir [29]. Organizmanın metabolik durumu ve enerji dengesi oreksinlerin farklı hücre içi yolakları aktive ya da inhibe etmelerini sağlamaktadır. Sıçanlarda 24 saat süreyle açlık uygulaması hipotalamustaki oreksin reseptörlerinin G_q, G_s ve G_o proteinleriyle eşleşmelerini arttırırken, G_i ile eşleşmelerini azaltmaktadır [46].

Oreksinlerin her iki reseptörü de etkilerini hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artış aracılığı ile göstermektedir. Oreksin reseptörleri aracılı hücre içi kalsiyum artışının mekanizması net olmamakla birlikte, depo kontrollü kalsiyum kanalları, ikincil haberci kontrollü kalsiyum kanalları ve kalsiyuma duyarlı kalsiyum kanallarının sorumlu olabileceği öne sürülmüştür [47].

Oreksinlere bağlı kalsiyum yanıtı bifazik bir seyir izlemektedir. Hızlı bir pik evresini kademeli olarak azalan bir plato evresi takip eder. Bu seyirde, hem hücre içi hem de hücre dışı kalsiyum depolarının rol oynadığı düşünülmekte olup, her iki kaynağın rolüne ait bulgular bulunmaktadır [6, 27, 48]. Lund ve arkadaşları OX1R aktivasyonunun hücrede iki cevap oluşturduğunu; bunlardan birinin hücre içine kalsiyum iyonu girişi, ikincisinin ise fosfolipaz-C (PLC) aktivasyonu olduğunu bildirmişlerdir [47]. Öte yandan Çin hamster ovaryum (CHO) hücrelerinde oreksin-A aracılı hücre içi kalsiyum artışının PLC inhibitörü olan U73122 uygulaması ile engellenmesi ve tapsigargin uygulaması ile zayıflatılması OX1R'nin kalsiyum yanıtını PLC aracılı ve hücre içi depoların katılımıyla yaptığını düşündürmektedir [49].

Hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artışın ağırlıklı olarak plazma membranındaki kalsiyum kanalları aracılığıyla gerçekleştiğini işaret eden bulgular vardır [6]. CHO hücre kültüründe yapılan çalışmalarda, kültür ortamındaki kalsiyumun uzaklaştırılmasının oreksin-A'nın OX1R etkinliğinde 100 kata varan azalmalara neden olduğu saptanmıştır [47,49]. Proteinkinaz-C (PKC) inhibitörü bisindolmalemid uygulaması oreksin-A'nın neden olduğu hücre içi kalsiyum artışını engellemiştir. Buradan yola çıkarak, oreksin reseptörlerinin PKC'yi aktive ettiği, aktive olan PKC'nin de voltaj kapılı kalsiyum kanallarını aktive edip hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu arttırdığı düşünülmüştür. Benzer bulgular sıçan ventral tegmental nöronlarında, sıçan embriyonik omurilik ve hipotalamik hücre kültürlerinde gösterilmiştir [4, 50].

Hücre içi kalsiyum artışının ilk olarak PLC aracılı hücre içi depolardan salınan kalsiyum ile gerçekleştiği ve bunun daha sonra Gq proteini aracılı PKC aktivasyonunu uyardığı gösterilmiştir. Hücre içine kalsiyum girişinde, PKC aktivasyonunun ve voltaja duyarlı kalsiyum kanallarının rol aldığı bilinmektedir [29, 51].

Oreksin-B'nin kalsiyuma duyarlı potasyum kanallarını aktive ettiği de gösterilmiş olup, bu sayede oluşan depolarizasyon neticesinde voltaj kapılı kalsiyum kanallarının aktive olarak hücre içine kalsiyum girişinin arttığı düşünülmektedir. Bu görüşü destekleyen nitelikte nöronlardaki hücre içi kalsiyum artışının hücre içi depo kalsiyumdan bağımsız olduğunu öne süren bulgular vardır [4, 39].

Uramura ve arkadaşları izole sıçan tegmental nöronlarında oreksin-A'ya bağlı gelişen sitoplazmik kalsiyum artışının PKC inhibitörü kalfostin-C ve PLC inhibitörü D609 ile engellediğini göstermişlerdir. Söz konusu kalsiyum akımı ayrıca N ve L tipi voltaja duyarlı kalsiyum kanal blokörleri olan ω -conotoxin ve nitrendipine ile inhibe edilmiştir [52]. Bu sonuçlardan yola çıkarak oreksin reseptörlerinin etki mekanizmasının basamakları sırasıyla: fosfotidilkolin-spesifik PLC aktivasyonu, inositol trifosfat (IP3) ve diaçilgliserol (DAG) oluşumu, hücre içi depolardan kalsiyum salınımı, PKC aktivasyonu, N ve L tipi voltaja duyarlı kalsiyum kanallarının aktivasyonu ve hücre içine kalsiyum iyonu göçü şeklinde özetlenebilir.

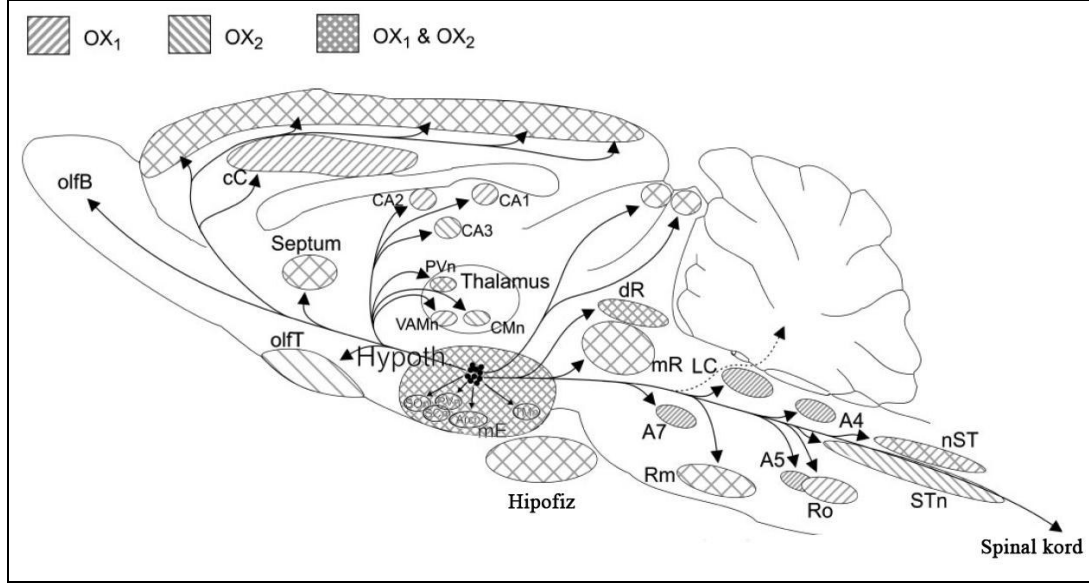
Oreksinlerin IP3'ün yanı sıra, siklik adenosin monofosfat (cAMP) üretimini arttırdığına dair bulgular da bulunmaktadır [4]. Adrenal bez hücrelerinin oreksin-A ile uyarılması, doza bağlı olarak cAMP üretimine neden olurken [43], insan embriyonik böbrek hücre kültürü HEK293'de oreksin-A ve oreksin-B'ye cevaben cAMP artışı gözlenmemiştir [44]. cAMP artışı, ilgili hücrede bulunan adenilat siklaz izoformuna göre değişiklik gösterebilir. Adrenal bez ve embriyonik böbrek hücre kültürü HEK293 hücrelerinde farklı adenilat siklaz izoformlarının üretiliyor olabileceği düşünülmektedir [4].

2.5.3. Oreksin Reseptörlerinin Dağılımı

2.5.3.1. Oreksin Reseptörlerinin Merkezi Sinir Sistemindeki Dağılımı

Oreksinler ve reseptör proteinleri ile mRNA'larının beyinde yaygın olarak bulunduğu moleküler biyolojik ve immünolojik yöntemlerle gösterilmiştir [4, 29].

Oreksin reseptörlerinin oreksinerjik nöronların projeksiyon yaptığı alanlarda yer alması bu nöronların pek çok nörotransmitter sistem alanlarıyla ilişki halinde olduğunu düşündürmektedir. Buna karşın, oreksin reseptörlerinin bulunuşu her zaman oreksinerjik innervasyonun yoğunluğu ile doğru orantılı değildir. Bazı oreksinerjik hücrelerin gövde ve uzantılarının ventrikül yüzeylerine yakın olması oreksinlerin parakrin ve endokrin etki şekillerini düşündürmektedir [49].



Şekil 2.7. Oreksin Reseptörlerinin Merkezi Sinir Sistemindeki Dağılımı [4].

Arcn, arcuate nucleus; **CA1-3**, hipokampus alanları; **cC**, cingulate korteks; **CMn**, centromedial nucleus; **dR**, dorsal raphe nucleus; **LC**, locus ceruleus; **mE**, median eminence; **mR**, median raphe nucleus; **nST**, nucleus solitary tract; **olfB**, olfactory bulb; **olfT**, olfactory tubercle; **PVn**, paraventricular nucleus; **Rm**, nucleus raphe magnus; **Ro**, nucleus raphe obscurus; **SCn**, suprachiasmatic nucleus; **SON**, supraoptic nucleus; **STn**, spinal trigeminal nucleus; **TMn**, tuberomamillary nucleus; **VAMn**, ventral anteromedial nucleus.

OX₁R ve OX₂R beyinde birbirine yakın oranlarda bulunmakta olup, her iki reseptörün mRNA'ları da bazı küçük farklılıklar dışında eşit yayılım gösterir. OX₁R, merkezi sinir sisteminde en fazla ventromedial hipotalamus'ta; OX₂R ise paraventricular nucleus (PVN)'da bulunmaktadır [29, 38, 53]. OX₁R immünoreaktivitesi gösteren nöronlar ağırlıklı olarak hipotalamik alandaki SCN, PVN, VMN, DMN ve tuberomamillar nucleus (TMN)'larda bulunur [29]. Hipotalamus dışında, tenia tecta, hipokampus, dorsal raphe ve LC'de yüksek seviyede OX₁R mRNA düzeyleri saptanmıştır. OX₂R mRNA'sı ise ağırlıklı olarak serebral korteks, nucleus accumbens, subtalamik nucleus, paraventriküler talamik nucleus, TMN ve anterior pretectal nucleus bölgelerinde saptanmıştır [5]. OX₂R protein ekspresyonu serebellumun moleküler ve granüler tabakalarında varken, OX₁R'e bu alanda rastlanmaz [4]. Spinal kord ve dorsal kök gangliyonlarında (DRG) ise sadece OX₁R mRNA'sı saptanmıştır [29]. Hipokampusta her iki oreksin reseptörünün de mRNA'sı tespit edilmiştir. Amigdala'da OX₁R mRNA'sı amigdaloid kompleks'te yer alırken, OX₂R ise amigdala'nın posterior cortical nucleus'unda bulunur. OX₂R mRNA düzeyleri ayrıca ventral tegmental alanda oldukça yüksektir [54].

Hipofiz bezinde her iki oreksin reseptörü de eksprese olmaktadır. İnsan hipofizinde OX1R mRNA'sı somatotrop hücrelerde, OX2R mRNA'sı ise kortikotrop hücrelerde daha fazla eksprese olur [55]. OX1R ayrıca adenohipofizdeki asidofilik hücrelerde, OX2R ise anterior hipofizdeki bazofilik hücrelerde gösterilmiştir [29]. Jöhren ve arkadaşları OX1R mRNA'sının hipofiz ve hipotalamusta erkek sıçanlarda, dişilere oranla daha yüksek oranda bulunduğunu ortaya koymuşlardır [42].

Hipotalamustaki oreksin reseptörlerinin açlıkla birlikte değişim gösterdiği tespit edilmiş olup, sıçanlarda 20 saatlik yem kısıtlaması ventromedial hipotalamustaki OX1R mRNA düzeylerini ve ARC'deki OX2R mRNA düzeylerini arttırmıştır [54].

2.5.3.2. Oreksin Reseptörlerinin Periferdeki Dağılımı

Oreksinler ve reseptörleri merkezi sinir sisteminin dışında mide, bağırsak, pankreas, adrenal bezler, böbrek, yağ dokusu, dişi ve erkek genital sistem, kalp, akciğer ve tiroid bezi gibi pek çok farklı dokuda tespit edilmiştir [3, 30, 42].

Sindirim sisteminde OX1R, sıçan midesinin korpus bölgesinde submukozal ve myenterik plexus nöronlarında tespit edilirken, OX2R ise enteroendokrin hücrelerde gösterilmiştir [3, 16]. Bir gece uygulanan açlık mukozal OX1R ve OX2R mRNA ve OX1R protein seviyelerini düşürmüştür [56].

OX1R immünoaktivitesi sıçan ve kobay pankreasında alfa ve beta hücrelerinde, pankreatik gangliyonlarda ve bunları çevreleyen damarların sinirlerinde gösterilirken [7, 23], OX2R mRNA'sı sıçan pankreas adacıklarında tespit edilmiştir [57].

Adrenal bezin medullar alanında OX2R yoğun olarak eksprese edilirken, kortikal alanda her iki reseptör bulunmaktadır. İlk olarak Lopez ve arkadaşları OX1R ve OX2R'yi sıçan adrenal medullasında göstermişlerdir [58]. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise OX2R mRNA'sı insanda adrenal kortikal alanda gösterilmiş, OX1R mRNA'sı bulunamamıştır [43, 59, 60]. Mazzocchi ve arkadaşları ise insanda hem OX1R, hem de OX2R mRNA'larının zona fasikülata, zona retikularis ve medullar alanda varlığını göstermişlerdir [61].

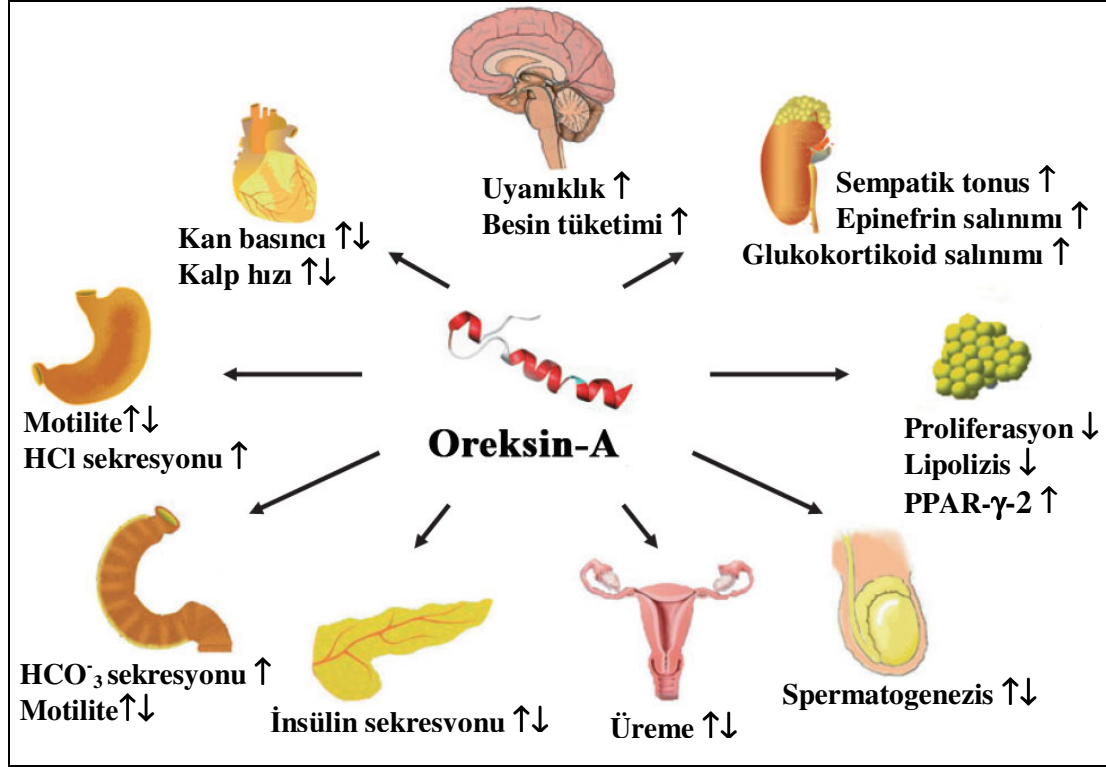
İnsan böbreğinde OX1R ve OX2R mRNA'ları; idrarında ise oreksin immünoaktivitesi gösterilmiştir [30]. Her iki reseptörün mRNA'ları insanlarda testis, epididimis, penis ve vezikula seminaliste; sıçanda ise ovaryumlarda tespit edilmiştir. Östrus siklusunun proöstrus fazında oreksin reseptörlerinin ekspresyonunun önemli derecede arttığı gösterilmiştir [30, 62].

Sıçanlarda OX1R vagal aferent liflerde; insanlarda ise OX1R ve OX2R nodoz gangliyon (NG) üzerinde gösterilmiştir. CCK tokluk etkisini vagal aferent liflerde bulunan CCK-1 reseptörü aracılığıyla gerçekleştirir. Buradan yola çıkarak oreksinlerin CCK ile etkileşim içinde olduğu düşünülmüştür [30].

2.6. Oreksinlerin Fizyolojik Etkileri

Öncelikli etkisi uyku-uyanıklığın düzenlenmesi ve beslenme üzerine olan oreksinlerin, enerji dengesi, nöroendokrin düzenleme, gastrointestinal ve

kardiyovasküler kontrol, su dengesi ve ağrı iletiminde de etkili olduğu bildirilmiştir [6]. Oreksinerjik hücrelerin yerleşimi, projeksiyonları ve diğer transmitter sistemlerle olan bağlantıları, farklı fizyolojik fonksiyonlar üzerine doğrudan ve dolaylı olarak düzenleyici etkilerinin olmasını sağlar. Bu karmaşık düzen oreksinlerin etki şekillerinin ayırt edilmesinde güçlük yaratmaktadır [4].



Şekil 2.8. Oreksin-A'nın Santral ve Periferel Dokulardaki Fonksiyonları [30].

2.6.1. Oreksinlerin Besin Tüketimine Etkileri

Açlık sırasında oreksin ekspresyonunun artışı oreksinlerin tokluk hissi veya iştahın düzenlenmesi ile ilgili olduğunu düşündürmüştür [38].

Oreksinlerin keşfi ile ilgili çıkan ilk araştırmada oreksin-A ve oreksin-B'nin intraserebroventriküler uygulamasının sıçanlarda yem tüketimini arttırdığı gözlenmiştir [25]. Oreksinlerin hipotalamusun farklı bölgelerine mikroenjeksiyon ile uygulandığı çalışmalarda, oreksin-A'nın LHA ve perifornikal alan, oreksin-B'nin ise sadece ventriküler alanda etkili olduğu gösterilmiştir [63]. İntraperitoneal yolla uygulanan OX1R antagonisti SB-334867, bazal ve oreksin-A'nın hipotalamusa enjeksiyonu sonucu uyarılan beslenmeyi inhibe etmiştir [64, 65]. Bunun yanı sıra, beslenme durumunun oreksin sentezi üzerine olan etkisini araştırmak üzere 48 saat süreyle aç bırakılan sıçanların hipotalamuslarında preprooreksin mRNA düzeyleri tok olan kontrol gurubuna göre 2.4 kat artış göstermiştir [66]. Oreksin-A'nın LHA'ya uygulanması bu bölgedeki enerji düzenlenmesi ile ilgili nöronların c-fos aktivitesini arttırmıştır [67].

Oreksinler NPY, melanin konsantre edici hormon (MCH), agouti geni ile ilişkili protein (AGRP), galanin, proopiomelanokortin (POMC), kokain-amfetamin ile düzenlenen transkript (CART) ve dinorfin gibi peptidlerin de yer aldığı iştah ve

besin alımını düzenleyen peptid ağının bir üyesidir [4]. Hipotalamustaki oreksinerjik nöronlar NPY üreten ARC nöronlarıyla sinaptik temas halindedir. ARC'deki bir diğer nöron topluluğu da POMC sentezlemektedir. POMC, iştah baskılayıcı etkisiyle bilinen alfa-melanin uyarıcı hormon (α -MSH)'un öncü maddesidir. POMC sentezleyen nöronlar da oreksinerjik nöronlarla çift yönlü bir ilişki içerisinde [38]. Oreksin-A ile NPY arasında fonksiyonel bir ilişki olduğu, oreksin-A'nın NPY'nin oreksijenik etkisine aracılık ettiği ileri sürülmektedir [4]. NPY'nin Y1 ve Y5 reseptörlerinin antagonistlerinin oreksin-A ile uyarılan beslenmeyi inhibe ettiği gösterilmiştir [68, 69].

Oreksinlerin besin tüketimi üzerine uzun süreli etkileri konusunda tartışmalar bulunmakla birlikte sadece akut dönemde besin tüketimini arttırdığı ileri sürülmektedir. Bunun yanı sıra oreksinlerin hiperfajik etkisinin uyanıklık süresinin artmasına bağlı olarak ortaya çıktığını savunan görüşler mevcuttur. Bu görüşe göre uyanık kalınan sürenin artışı enerji açığına neden olmakta ve organizma bu açığı kompanse etmek amacıyla besin alımını arttırmaktadır [4].

2.6.2. Oreksinlerin Uyku/Uyanıklık Üzerine Etkileri

Oreksinler uyarıcı nörotransmitterler olarak bilinmektedir. Sıçan ve maymunda oreksinlerin sistemik ve santral uygulanması sonrasında gözlenen LC'deki noradrenerjik hücrelerin aktivasyonu, oreksinlerin bu sisteme ait uyanıklık, dikkat, öğrenme ve hafıza gibi işlevlerde etkili olabileceğini düşündürmüştür [6].

OX1R ve OX2R uyku/uyanıklığın düzenlenmesi ile ilgili pedunkulopontin nucleus, laterodorsal tegmental nucleus, dorsal raphe nucleus, medial septal nucleus, TMN, diaogonal band nucleus, LC ve anterior hipotalamik alanda gösterilmiştir [4]. Oreksinerjik liflerin uyanıklığın düzenlenme merkezleri olan LC ve raphe nucleus'a uzanan projeksiyonları uyku/uyanıklık üzerine olan etkilerini açıklamaktadır [30].

Oreksinlerin intraserebroventriküler uygulaması sıçanlarda uyanıklığı arttırmaktadır. Oreksinlerin en belirgin etkileri REM uykusunun azalması ve yavaş dalga uyku episodlarının süre ve sayısının azalması şeklindedir. Oreksinlerin bu etkilerine histaminerjik nöronların katkısı bulunmaktadır [70-73].

Narkolepsi aşırı gündüz uykusu ve gün boyu şekillenen karşı konulması güç uyku atakları ile karakterize bir hastalıktır. Diğer sık gözlenen belirtisi ise katapleksi, uyku paralizi ve halüsinasyonlardır [6]. Narkoleptik bireylerin CSF'lerinde oreksin-A seviyesinin düşük olduğu gösterilmiştir [30]. Sağlıklı bireylerin CSF'lerindeki oreksin-A seviyesi dar bir aralıkta (250-280 pg/ml) seyretmekte olup, yaş ve cinsiyete bağlı değişkenlik gözlenmemektedir [6].

Köpek narkolepsisinde oreksin-B gen mutasyonu ve farelerde oreksin reseptör eksikliğinde narkolepsi benzeri belirtiler tanımlanmıştır. Deneysel narkolepsi hayvan türleri arasında farklılık göstermektedir. Farede narkoleptik belirtilerin ortaya çıkmasına hem OX1R hem de OX2R'nin eksikliği neden olurken, köpeklerdeki belirtilerden OX2R sorumludur [6].

2.6.3. Oreksinlerin Kalp-Damar Üzerine Etkileri

Hipotalamustaki oreksinerjik nöronların beyindeki kardiyovasküler düzenleyici alanlar olan NTS, NA, beyin sapı ve omurilik bölgelerine önemli projeksiyonları vardır. Sıçanda [74, 75], tavşanda [76] ve farede [77] oreksin-A ve oreksin-B'nin intraserebroventriküler uygulamalarının kalp hızını ve ortalama arter basıncını arttırdığı gösterilmiştir. Oreksinlerin kardiyovasküler uyarıcı etkilerinin hipotalamo-hipofizer eksen (HPA)'i aktive etmesi sonucu, sempatik aktivasyon artışına ve adrenalın salınımına bağlı olduğu düşünülmektedir [30]. Matsumura ve arkadaşları tavşanlara intraserebroventriküler yolla oreksin-A uygulaması ile ortalama arteriyel kan basıncında, renal sempatik sinir aktivasyonunda, plazma adrenalın ve glukoz seviyelerinde önemli artış sağlamışlardır [76]. Santral yolla uygulanan oreksinlerin kardiyovasküler tonus üzerine olan etkisi uygulama dozu ve yoluna göre farklılık gösterir. NTS'ye uygulanan düşük dozdaki (0.5–5 pmol) oreksin-A, ortalama arteriyel kan basıncını ve kalp hızını doza bağlı şekilde azaltırken, daha yüksek dozdaki uygulamalar kan basıncını arttırıp taşikardik belirtiler oluşturmuştur. Bunun yanında oreksin-A'nın rostral ventromediyal medulla ve NTS'ye mikroenjeksiyonu kalp hızı ve kan basıncını arttırmış, subfornikal organa enjeksiyonu ise azalmaya yol açmıştır [30].

Oreksinlerin kardiyovasküler sistem üzerine periferik etkilerinin olmadığı gösterilmiştir [75]. Sıçan kalp ve aortasında çok düşük düzeyde preprooreksin mRNA seviyesi tespit edilmiş olsa da [42], oreksinlerin kalp ve damar sistemi üzerine olan etkilerinin periferik direkt bir etkiden çok, sempatik tonus artışı üzerinden indirekt olarak gerçekleştiği görüşü benimsenmektedir [75, 76, 77].

2.6.4. Oreksinlerin Nöro-Endokrin Etkileri

Oreksinler ve reseptörleri çeşitli nöroendokrin hücrelerde tanımlanmış olup, mide bağırsak mukozasındaki ve pankreastaki endokrin hücreler, adrenal bezlerdeki medullar hücreler, hipofiz hücreleri ve epidermisteki Merkel hücreleri bunlara örnek olarak verilebilir [78]. Oreksinlerin nöroendokrin etkilerine plazma prolaktin ve büyüme hormon seviyelerini düşürmesi, kortikotropin, kortizol, insülin ve luteinizan hormon (LH) seviyelerini yükseltmesi örnek olarak sayılabilir [6].

Oreksinlerin hipotalamustan salınan birçok hormon üzerine doğrudan etki gösterdiği gibi hipotalamo-hipofizer hormon salınımını bazı sinirsel devreler aracılığıyla indirekt olarak da etkilediği düşünülmektedir [4]. Oreksin reseptörlerinin her ikisi de nöroendokrin düzenleme ile ilgili bölgelerde eksprese edilirler. Oreksinler median eminens'de, reseptörlerinin mRNA'ları ise hipofizin ön ve ara loblarında gösterilmiştir. Oreksinerjik sinir lifleri hipotalamus-hipofiz-gonad (HPG) ekseninde etkili alanları innerve etmektedir. Hipotalamustaki oreksin-A IR liflerinin HPG eksenine ilgili septal preoptic nucleus, ARC ve median eminence bölgelerine projeksiyonları vardır. Oreksinerjik nöronlar ayrıca seksüel davranışların kontrol edildiği amigdala ve olfactory bulbus bölgelerini de innerve ederler [4, 79]. Adenohipofizdeki asidofilik hücrelerde büyüme hormonu ve OX1R'nin, bazofilik hücrelerde ise adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve OX2R'nin birlikte eksprese edildiği gösterilmiştir [55].

Oreksin-A'nın sıçanlarda intravenöz ve hipotalamusa mikroenjeksiyon yolu ile uygulanması, plazma tiroid uyarıcı hormon (TSH) ve hipotalamik TRH

seviyelerini düşürürken plazma tiroid hormonlarını etkilememiştir. Oreksin-A'nın bu etkisinin hipofiz hücre kültüründe in-vitro olarak tekrar edilememesi oreksin-A'nın TSH üzerine olan etkisinin TRH üzerinden olduğunu ortaya koymuştur [80].

Oreksinerjik sistem, organizmada strese de aracılık etmekte olup strese maruz kalınan durumlarda hipotalamustaki oreksinerjik nöron aktivitesinin [81, 82, 83] ve CSF'de oreksin-A konsantrasyonunun arttığı [84] bildirilmiştir. Öte yandan oreksin-A'nın sıçanlarda intraserebroventriküler uygulaması HPA'yı aktive ederek plazmada kortikotropin salgılatıcı hormon (CRF), ACTH, kortikosteron ve epinefrin seviyelerini arttırmaktadır [82, 85, 86, 87].

2.6.5. Oreksinlerin Ağrı İletimine Etkileri

Omuriliğin tüm segmentlerinde bulunan oreksinerjik projeksiyonlar, oreksinlerin ağrı duyusu üzerine etkilerini ortaya koymaktadır. Ayrıca sakral kord'un kaudal bölümünün yoğun oreksinerjik innervasyonu hem sempatik hem de parasempatik düzenleyici etkiyi düşündürmüştür. Oreksinlerin analjezik etkileri opioid sistemden bağımsızdır ve hem beyin, hem de omurilikteki reseptörleri aracılığı ile gerçekleşir [6, 29].

Mobarakeh ve arkadaşları sıçanlarda farklı yollarla uyguladıkları oreksin-A ve oreksin-B'nin farklı ağrı çeşitlerine karşı antinosisseptif etkilerini incelemişlerdir. İntraserebroventriküler yolla uygulanan oreksin-A mekanik, kimyasal, termal uyarılara karşı oreksin-B'ye göre daha fazla antinosisseptif etki gösterirken, periferik uygulamalar etkisiz olmuştur. Bu etkiler adenosin tip-1 reseptör antagonisti ile ortadan kaldırılmıştır [88]. Bir başka çalışmada ise sıçanlara damar içi olarak uygulanan oreksin-A'nın analjezik etkisinin OX1R antagonisti SB-334867 ile inhibe edildiği gösterilmiştir [89].

2.7. Sindirim Sisteminde Oreksinler ve Etkileri

ESS'de oreksin immünoreaktivitesi gösteren nöronlar ve enteroendokrin hücreler, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve immünohistokimyasal çalışmalar ışığında gösterilmiştir [3]. Preprooreksin, oreksin-A, oreksin-B ve reseptörleri fare, sıçan, kobay ve insanda myenterik ve submukozal pleksuslar, enteroendokrin hücrelerde saptanmıştır [7, 16, 36, 90]. Oreksinlerin, sekretomotor nöronların elektriksel özelliklerini etkilediği ve kolonik motilitenin düzenlenmesine katkısı olduğu ortaya çıkarılmıştır [3].

Oreksin-A immünoreaktivitesi kobay midesinin antrum bölgesinde gastrin ile birlikte [7] ve fare midesinin pilor bölgesinde gösterilmiş, oreksin-B aktivitesi ise saptanamamıştır [91]. ESS'de OX1R immünoreaktivitesi myenterik ve submukozal pleksuslarda, sirküler ve longitudinal kas liflerinde ve mukozada saptanmıştır. Bunun yanı sıra OX2R, EC hücrelerde gösterilmiştir [16].

2.7.1. Oreksinlerin Sindirim Sistemi Motilitesine Etkisi

Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler sindirim sistemi motilitesi üzerine oreksin-A'nın iki yönlü etkisi olduğunu göstermektedir. Ekzojen oreksin-A sıçan [29] ve fare ince bağırsağında kasılmaya yol açmıştır [92, 93]. Atropin ve guanitidin varlığında ise oreksin-A'nın gevşetici etkisi gözlenmiştir [92]. Oreksinlerin mide ve bağırsak motilitesinin düzenlenmesinde santral ve periferik yollarla etki ettiği

gösterilmiştir [30]. Sıçanlarda oreksin-A ve oreksin-B'nin OX1R'nin yoğun olarak eksprese olduğu dorsal motor nucleus'a mikroenjeksiyon yoluyla uygulanmasının antral motilitede artışa neden olduğu gösterilmiştir [9]. Buna karşın, Kobashi ve arkadaşları oreksin-A'nın intrasisternal uygulamasının sıçanlarda proksimal midede gevşeme yanıtı oluşturduğunu tespit etmişlerdir [94]. Kobashi'nin verilerine uyumlu olarak, teknyum-99 ile işaretlenmiş omlet verilerek yapılan ölçümde, insanlarda oreksin-A infüzyonunun mide boşalımını inhibe ettiği gösterilmiştir [36]. İzole kobay submozal ve myenterik plexus nöronlarında oreksin-A'nın uyarıcı etkisi gözlenmiştir [7, 95].

Naslund ve arkadaşları, oreksin-A ve oreksin-B'nin intravenöz uygulamalarının sıçan ince bağırsağında MMC'yi inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada OX1R enterik nöronlarda, OX2R ise enteroendokrin hücrelerde gösterilmiş olup, oreksinlerin MMC'yi OX1R aracılığıyla direkt, OX2R aracılığıyla dolaylı olarak inhibe edebileceği öne sürülmüştür [16]. Oreksin-A'nın sıçan ince bağırsağındaki MMC'yi nitrik oksit (NO) aracılığı ile inhibe ettiği, nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü L-NNA ve OX1R antagonisti SB-334867 uygulamalarının, oreksin-A'nın inhibitör etkisini ortadan kaldırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca myenterik plexus nöronlarında OX1R ve nNOS immünoaktivitelerinin birlikte gösterilmesi oreksin-A'nın inhibitör etkisinde OX1R ve nitrejik yolağı kullandığını düşündürmektedir [17]. Satoh ve arkadaşları ise oreksin-A'nın fare ince bağırsağında non-adrenerjik, non-kolinerjik inhibitör etkisi olduğunu bu etkinin NOS inhibitörü L-NOARG ile tamamen ortadan kaldırıldığını bildirmişlerdir [92, 93].

Öte yandan Oreksin-B'nin de intestinal motilitede baskın etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Sıçanlardan elde edilen ince bağırsak segmentlerinde oreksin-A'nın kontraktıl etkileri OX1R antagonisti SB-334867 ile tamamen ortadan kaldırılmış, oreksin-B'nin etkileri ise değişmemiştir [29].

2.7.2. Oreksinlerin Sindirim Sistemi Sekresyonuna Etkisi

Mide sekresyonu üzerine oreksinlerin etkilerini inceleyen çalışmalarda sadece oreksin-A'nın etkili olduğu, oreksin-B'nin ise etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır [30, 96].

Oreksin-A'nın intraserebroventriküler enjeksiyonu sıçanlarda mide asit sekresyonunu uyarırken, intraperitoneal uygulamada etki gözlenmemiştir. Uyarıcı etkinin vagotomi ve atropin uygulamaları ile ortadan kaldırılması N.vagus aracılı santral etkiyi göstermektedir [96].

Sıçanlarda periferik olarak uygulanan oreksin-A'nın mide asit sekresyonuna etkisi olmadığı [11, 96], intravenöz yolla uygulanan SB-334867'nin bazal ve pentagastrin ile uyarılan asit sekresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar endojen oreksin-A'nın asit sekresyonunu gastrinden bağımsız olarak uyardığını düşündürmektedir [11].

Periferik yolla uygulanan oreksin-A'nın duodenal bikarbonat sekresyonu üzerine olan etkisi sıçanlarda gösterilmiştir [97]. Bengtsson ve arkadaşları mide asit sekresyonunun tersine oreksin-A ile uyarılan duodenal sekresyonun atropin

uygulamasından etkilenmediğini, oreksin-A'nın bu etkisinin N.vagus'tan bağımsız bir mekanizma ile gerçekleştiğini bildirmişlerdir [56].

2.8. Açlık ve Oreksinler

2.8.1. Açlığın Merkezi Sinir Sistemindeki Etkileri

Memelilerde iştah merkezi olarak bilinen, besin alımının ve vücut ağırlığının denetlenmesinde rol oynayan LHA, oreksinerjik nöronların yoğun olarak bulunduğu bir alandır. Bu alanın elektriksel olarak uyarılması beslenmeyi arttırırken, lezyonu ise inhibe eder. İnsülin ve 2-deoksi glukoz ile oluşturulan hipoglisemi de LHA'yı uyarmakta ve besin alımını arttırmaktadır [98].

LHA hipotalamustaki enerji homeostasisi ile ilgili diğer alanlardan ve NTS'den sinyaller alır. NTS sindirim sisteminden vagal aferentlerle taşınan sinyalleri algılayan bölgedir. Bu sebeple, LHA'daki oreksinerjik nöronlar stratejik olarak açlık ve tokluk durumu ile ilgili sinyalleri alır ve beynin çeşitli bölgelerine gönderdikleri projeksiyonlar sayesinde enerji homeostasisinde önemli rol oynarlar. Oreksinlerin iştah arttırıcı özellikleri ile açlık durumunda artan ekspresyonları, LHA'daki oreksinerjik nöronların oreksinleri açlığa cevaben salgıladığını ortaya koymaktadır [98].

Açlığın oreksinerjik nöronlar üzerine olan etkisi açlığın süresiyle ilişkilidir. Park ve arkadaşları açlığın hipotalamik oreksinerjik nöronlara etkisini 24.- 84. saatler aralığında her 12 saatte bir incelemişler, 24 ve 72. saatler arasında artış gözlenirken 84. saatten itibaren azalma tespit etmişlerdir [99].

Sıçanlarda 48 saat süreyle açlık uygulaması hipotalamik oreksin-A, oreksin-B, preprooreksin mRNA seviyelerinde artışa neden olmaktadır [21, 25, 66, 98]. Öte yandan Lu ve arkadaşları ise 20 saat süreyle uygulanan yem kısıtlamasının hipotalamustaki oreksin reseptörlerinin mRNA seviyelerini arttırdığını tespit etmişlerdir [54].

2.8.2. Açlığın Periferik Dokulardaki Etkileri

Yapılan çalışmalarda farklı bulgular elde edilmekle birlikte plazma oreksin-A konsantrasyonu insanda [21, 100, 101, 102] ve sıçanda [23] yaklaşık 30 pg/ml olarak tespit edilmiştir.

Açlık durumunda plazmadaki oreksin-A seviyesi yükselmektedir. Komaki ve arkadaşları açlık terapisi uygulanan hastalarda 3 günlük açlığın plazma oreksin-A düzeylerinde önemli artışlara neden olduğunu, 7. günde artışın devam ettiğini göstermişlerdir [22].

72 saat açlık uygulaması, kobay ince bağırsağındaki submukozal gangliyonda oreksinerjik nöron sayısını ve bu nöronlardaki kalsiyum/cAMP cevap elemanı bağlayıcı proteininin (pCREB) nükleer aktivitesini arttırmıştır [7].

Periferik dokularda oreksin reseptör ekspresyonu da metabolik aktivite ile düzenlenmektedir. Bir gece aç bırakılan sıçanlarda duodenumdaki mukozal OX1R ve OX2R mRNA ve OX1R protein seviyelerinin arttığı gösterilmiştir [56].

Açlık insanlarda uyku/uyanıklık döngüsünü bozmakta, mide ve bağırsakta MMC adı verilen spesifik bir motor patern oluşumunu sağlamaktadır [3]. Furukawa ve arkadaşları uykunun yavaş dalga fazının kolon motilitesi üzerine inhibitör etkisi bulunduğunu belirtmişlerdir [103]. Oreksinler hipotalamik ve enterik nöronlarda açlıkla birlikte eksprese olurlar, buna bağlı olarak uyanıklık, besin tüketimi, gastrointestinal motilite ve sekresyon artışı gözlenir. Beslenme, mide-bağırsak motilitesi ve uyku/uyanıklık paternleri arasında bir koordinasyon bulunmaktadır. Oreksinler bu fizyolojik aktivitelerin koordinasyonunda görev almaktadır [3].

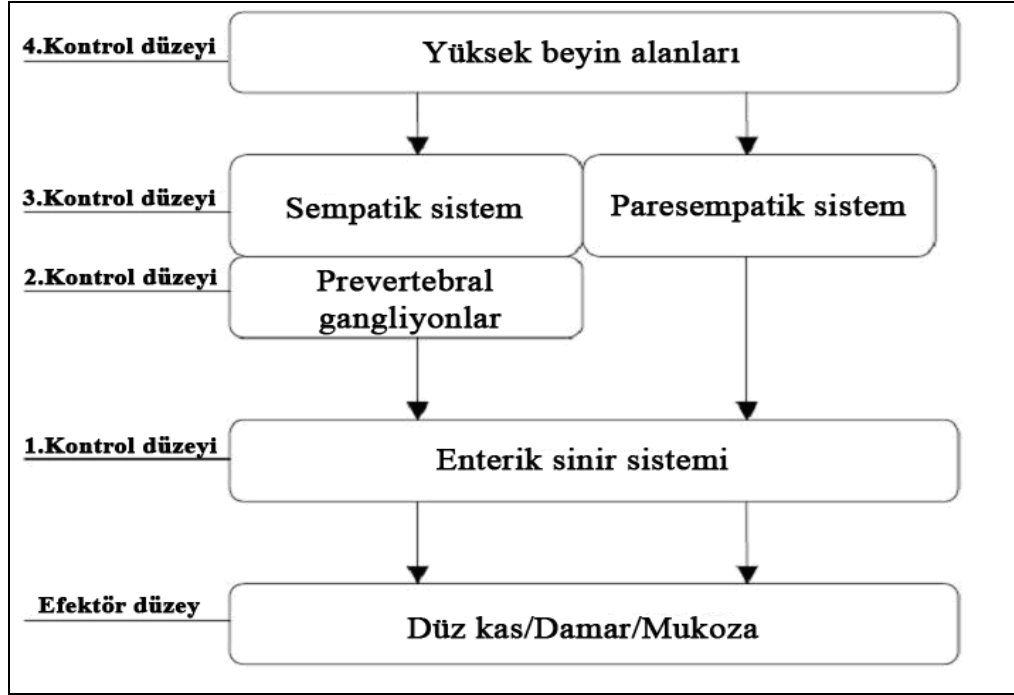
2.9. Sindirim Sisteminin İnnervasyonu

Sindirim sistemi fonksiyonları ekstrinsik ve intrinsik sinirsel yollar tarafından kontrol edilir. Proksimal özofagus ve eksternal anal sfinkter çizgili düz kastan meydana gelen yapılar olup, tamamına yakın oranda ekstrinsik kontrol altındadır. Sindirim kanalının düz kas içeren geri kalan kısımları büyük oranda ESS innervasyonu ile yönetilir. İnnersik nöral aktivite, ekstrinsik innervasyonun düzenleyici etkisi altında çalışır [104, 105].

İnnersik innervasyon ESS'deki myenterik ve submukozal plexus aracılığı ile gerçekleşirken, ekstrinsik innervasyon ise splanknik (sempatik) ve vagal-sakral (parasempatik) sinirler aracılığı ile sağlanır. ESS, peristaltizm ve MMC gibi lokal refleksi kendi başına üretebilir. Bu reflekslerin oluşumu için gerekli uyarıları intrinsik nöronların yanı sıra otonom sinir sistemi aracılığı ile merkezi sinir sisteminden alır. Sindirim sistemi ve merkezi sinir sistemi arasındaki nöral bağlantı eferent (otonomik) ve aferent (duysal) mekanizmalar aracılığı ile iki yönlü olarak çalışır [104].

2.9.1. Enterik Sinir Sistemi (ESS)

Yapı, fonksiyon ve nörokimyasal özellikleri bakımından merkezi sinir sistemine benzerliklerinden ötürü “enterik beyin” olarak da isimlendirilen ESS'de duysal, motor ve aranöron olmak üzere 3 tip nöron yer almaktadır. Duysal nöronlar ortamdaki değişimleri algılayıp uyarı şekline dönüştüren hücrelerdir. Aranöronlar duysal ve motor nöronlar arasındaki köprü görevini üstlenirken, motor nöronlar düz kas, mukoza, kan ve lenf damarlarından oluşan efektör sistemlere hem uyarıcı hem de inhibe edici sinyalleri götürürler. Enterik nöronların diğer hücresel hedefleri önder odak özelliğindeki interstisyel Cajal hücreleri (ICC), bağırsaktaki kimyasal ve mekanik uyarılara cevaben özel mediatörleri salgılayan enteroendokrin ve mast hücreleridir. ESS ve merkezi sinir sistemi arasındaki otonomik bağlantıya ilave olarak nöroendokrin tipte bağlantı da mevcut olup oreksin, kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP), TRH, substance P (SP), CCK, ghrelin, serotonin, vazopressin ve kalsitonin gibi birçok nöropeptid ve reseptörleri hem ESS hem de merkezi sinir sisteminde bulunmaktadır [105, 106, 107].



Şekil 2.9. Sindirim Sisteminin Sinirsel Kontrolü [105].

2.9.2. Sindirim Sisteminin Otonomik İnnervasyonu

Eferent sinirler sindirim sisteminin salgı ve motor fonksiyonlarını düzenlerler. Sindirim kanalı duvarında ESS nöronları ile sinaps yapan parasempatik liflerden salınan temel nörotransmitter asetil kolin iken sempatik liflerden salınan nörotransmitter norepinefrin'dir. Sindirim sistemine genel olarak sempatik innervasyon inhibe edici, parasempatik innervasyon ise uyarıcı niteliktedir [104, 107, 108].

2.9.2.1. Parasempatik innervasyon

Sindirim sistemini uyaran parasempatik sinirler kranial ve sakral olarak iki bölümden oluşmaktadır. Ağız ve farenks bölgelerine giden az sayıdaki parasempatik lif haricinde kranial parasempatik sinirler büyük oranda N.vagus içinde taşınır. Parasempatik postgangliyonik nöronlar myenterik ve submukozal pleksusların içine yerleşmiş olup, motor ve sekretuar fonksiyonları doğrudan uyarmak yerine ESS nöronları aracılığı ile etki ederler [104, 107, 108].

N.vagus kolonun distal üçte birlik kısmı haricindeki tüm sindirim sistemini innerve eder. Vagal pregangliyonik nöronların gövdeleri vagal motor nucleus'larda yer alır. Vagal motor nucleus'lar, nucleus ambiguus (NA) ve dorsal motor nucleus'dan oluşur. Dorsal motor nucleus, N.vagus'un ana motor merkezi olup, sindirim sistemi düz kasında sonlanan myenterik pleksus nöronlarıyla sinaps yapan eferent sinir liflerinin kaynağıdır. Dorsal motor nucleus, ayrıca davranış, emosyonel durum, korku, uyanıklık gibi önemli fizyolojik fonksiyonların düzenlendiği NTS, LC, hipotalamus, amigdala gibi alanlardan köken alan projeksiyonlara sahiptir [104, 106, 107, 108].

NA, ventromedial medulla'da yer alır ve rostrocaudal alt bölümleri bulunur. NA, sindirim sisteminin çizgili kas barındıran yapılarının motor innervasyonundan

sorumlu olup, NA'nın alt bölümlerinden köken alan uzantılarının, yutkunma gibi koordineli motor aktivitelerde rol alan retiküler formasyon'da önemli projeksiyonları vardır [104].

Kolon'un distal üçte birlik kısmı vagal paramempatik innervasyondan yoksundur. Omuriliğin S1-S5 düzeylerindeki gri cevherden köken alan sakral parasempatik sinirler pelvik gangliyonlara gelirler, buradan ayrılan postgangliyonik nöronlar kolonu innerve ederler [104, 107, 108].

2.9.2.2. Sempatik innervasyon

Sindirim sistemini uyan pregangliyonik sempatik sinirler, omuriliğin torakolumbar bölgesindeki T5-L2 segmentlerindeki gri cevherden köken alıp, sempatik zincir içerisine girer ve zinciri terk ettikten sonra çöliak, mezenterik gangliyonlarda sinaps yaparlar ve ESS'deki nöronlar ile sinaps yaparak sonlanırlar. Sempatik nöronlar sekretuar ve motor fonksiyonlar üzerine gerek direkt, gerekse vagal eferentleri inhibe etmek suretiyle indirekt olarak inhibitör etkilerini gösterirler. Tıpkı parasempatik pregangliyonik sinirler gibi sempatik pregangliyonik sinirler de düzenleyici sinyalleri üst merkezlerden alırlar [104, 107, 108].

2.9.3. Sindirim Sisteminin Duysal İnnervasyonu

2.9.3.1. Ekstrinsik Duysal İnnervasyon

Ekstrinsik aferent duysal nöronlar (EPAN) sindirim sisteminden aldıkları duysal bilgileri merkezi sinir sistemine taşımalarının yanı sıra sinir sonlanmalarından salgıladıkları bazı nöropeptid ve transmitterler aracılığı ile enterik nöronlar ve efektör sistemler üzerine düzenleyici etki gösterirler. Aferent liflerin merkezi sinir sistemine ilettikleri mekanik, kimyasal ve termal değişiklikler neticesinde açlık, tokluk, ağrı, bulantı hisleri meydana gelir [104, 108, 109]. Vagal EPAN'ların %80-%90'luk kısmının aksonlarının NTS'de projeksiyonları bulunurken, spinal EPAN'lar omuriliğin farklı segmentlerinde sonlanırlar [110].

Afferent duysal vagal yolaklar

Vagal EPAN'ların büyük bölümü myelinsiz C liflerinden oluşur. Mekanik uyarıya karşı düşük uyarı eşiğine sahip olan ve fizyolojik sınırlar içindeki düşük uyarı seviyelerinde doygunluğa ulaşan vagal aferentlerin ağrı duyusunun yanı sıra tokluk ve bulantı gibi ağrı verici olmayan fizyolojik duylara da aracılık ettikleri düşünülmektedir [104].

Vagal aferent sinirlerin gövdeleri NG'de yer almaktadır. NG'ler sindirim kanalının rostrocaudal organizasyonu olarak da tanımlanan yumuşak damak ve yutak haricinde kalan kısımların viserotropik innervasyonundan sorumludur. Nöronlar buradan sonra uyarıları talamus'un ventral posterior medial nucleus'u aracılığı ile viseral duysal kortikal alanlara ve direkt olarak beyindeki düzenleyici alanlara (LC, hipotalamus, amigdala) iletirler [108].

Afferent duysal spinal yolaklar

Spinal EPAN'lar başta ağrı olmak üzere fizyolojik ve patolojik uyarıları iletirler. Spinal primer aferent nöronların hücre gövdeleri DRG'de yer almaktadır ve omuriliğin dorsal kolon düzeyindeki nöronlarıyla sinaps yaparlar. Buradan sonra

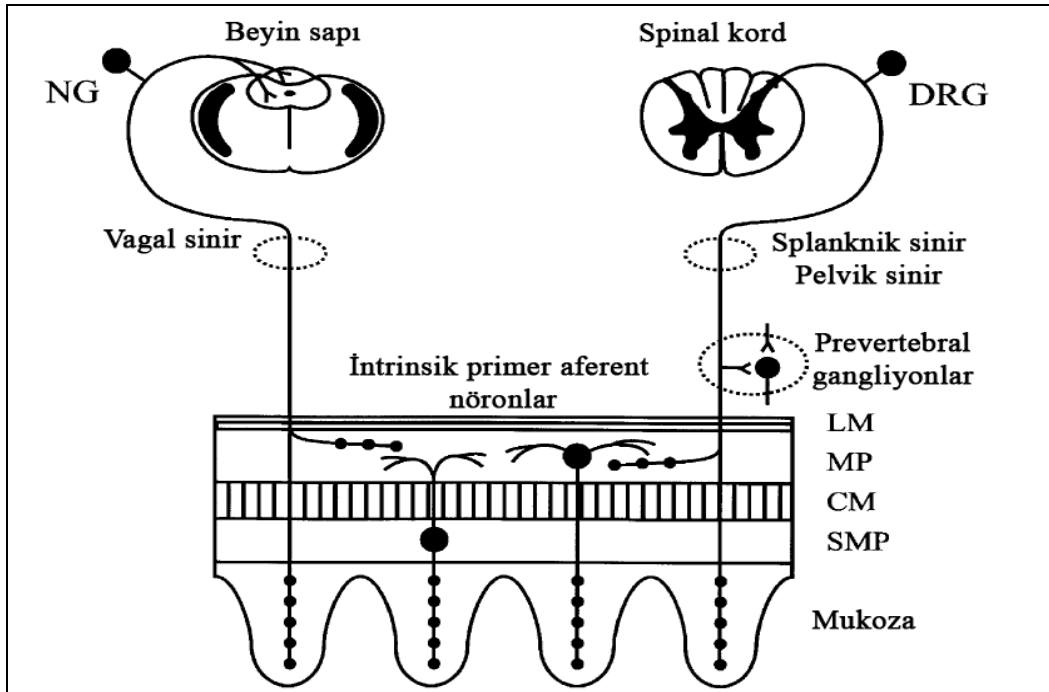
viseral duysal uyarı omurilik içerisindeki medial ve lateral sistemler aracılığı ile ilerler. Lateral sistem, spinotalamik sistem ve bu sistemin ventroposterior talamus ve viseral duysal kortikal alanlarla yaptığı sinapsları kapsar, ağrının yerleşimi ve şiddeti gibi duysal ayırım işlemini yürütür. Medial sistem ise spinotalamik, spinoreticular, spinomesencephalic ve spinohypothalamic sistemleri barındırır. Temel olarak beyin sapı ve ortabeyin bölgelerindeki LC, raphe nuclei, hipotalamus, N.vagus'un motor nucleus'u gibi önemli otonomik alanları innerve eder. Medial sistem ağrının motivasyonel derecelendirilmesi işlemini yürütür [108].

Spinal EPAN'lar, vagal EPAN'lardan farklı olarak aferent ileti fonksiyonu dışında sinir sonlanmalarından salgıladıkları CGRP, nörokinin-A (NKA), nörokinin-B (NKB) ve SP gibi lokal modülatörler aracılığı mukoza bütünlüğünün korunmasında rol oynarlar [111, 112, 113, 114].

Sakral aferentler kolonun distal üçte birlik kısmını innerve ederler. Hücre gövdeleri spinal aferent nöronlar gibi DRG'de bulunur ve uzantıları pelvik sinir liflerini takip eder [108].

2.9.3.2. İntrinsik duysal innervasyon

Hücre gövdeleri ve aksonları myenterik ve submukoza pleksus'ta yer alan intrinsik primer aferent nöron (IPAN)'lar sindirim kanalının mukoza ve kas katmanlarını innerve edip, birbirleriyle ve ESS'nin motor, sekretomotor ve internöronlarıyla sinaps yaparlar. IPAN'lar bağırsak içeriğindeki mekanik, kimyasal ve gerimdeki değişikliklere cevaben intrinsik refleksleri başlatırlar [109, 110].



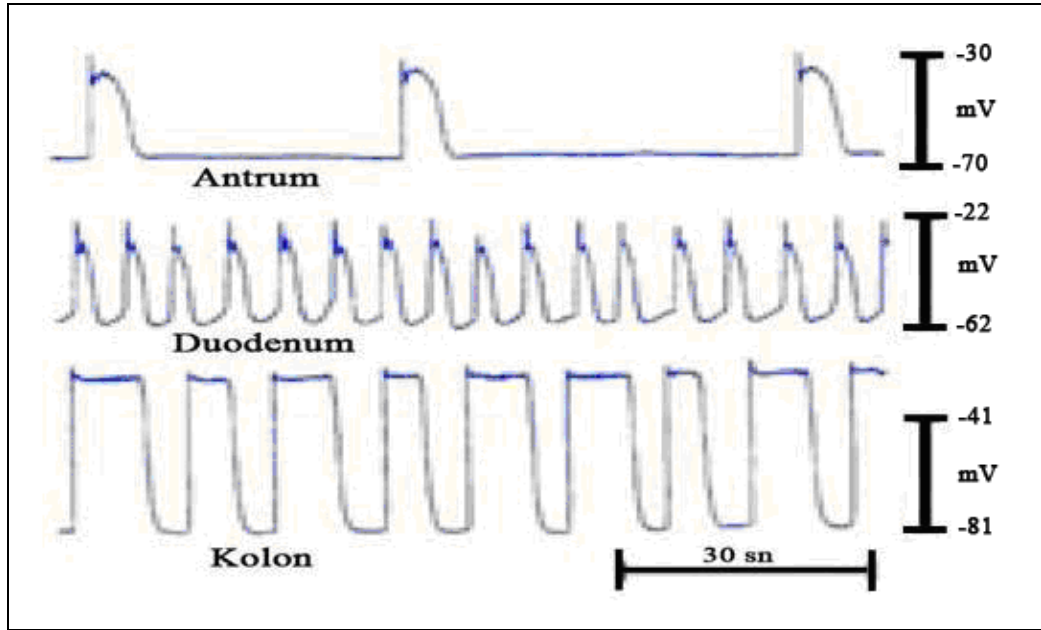
Şekil 2.10. Sindirim Sisteminin İntrinsik ve Ekstrinsik Duysal İnnervasyonu [110].

SMP: submukoza pleksus, MP: myenterik pleksus, NG: nodöz gangliyon, DRG: dorsal kök gangliyon CM: dairesel seyreden düz kas; LM: uzunlamasına seyreden düz kas.

2.10. Sindirim Sisteminin Myoelektriksel Aktivitesi

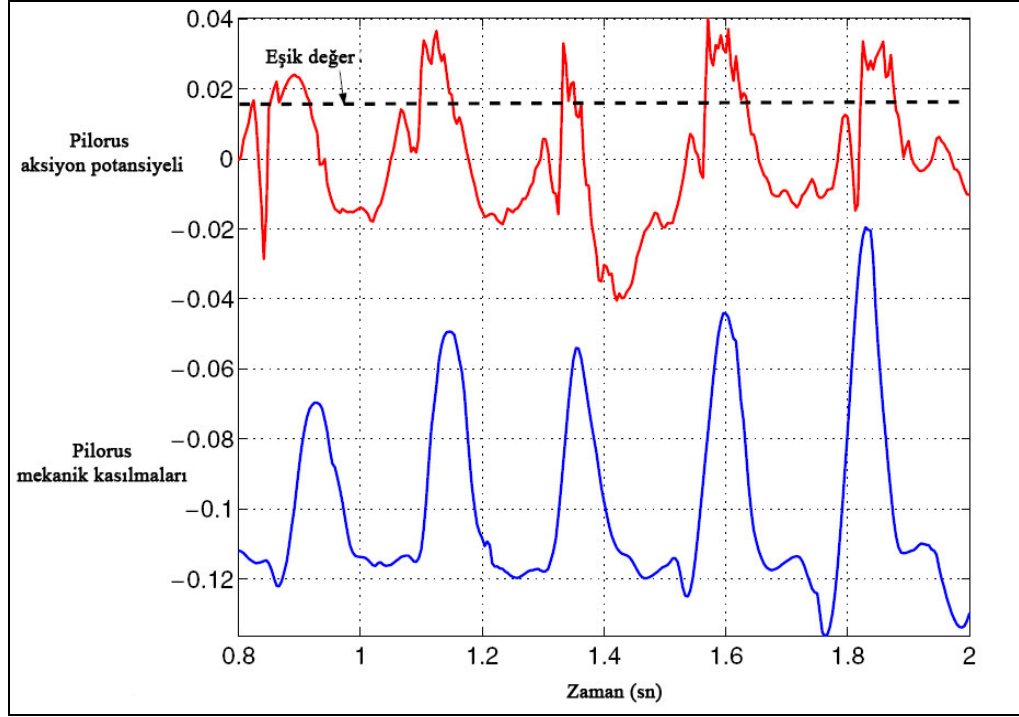
Sindirim sistemi düz kas hücrelerinin birbirine bağ doku ile bağlı demetler halinde kümelenmesi, iskelet kasına göre daha fazla yüzey/hacim oranına sahip olmalarını sağlar. Hücrelerin özelleşmiş organizasyonu ve hücreler arasında yer alan düşük dirençli yarık bağlantılar sayesinde, oluşan depolarizasyon dalgası hücreler arasında hızlı şekilde yayılım gösterir [115].

Sindirim sisteminde elektriksel kontrol aktivitesi (ECA) ve elektriksel cevap aktivitesi (ERA) olarak bilinen iki farklı elektriksel aktivite bulunmaktadır. Bazal elektriksel ritim (BER) veya yavaş dalga aktivitesi olarak da adlandırılan ECA sindirim sistemi düz kasının zar potansiyelinin düşük frekanslı dalgalanmaları olarak tanımlanır. ECA'da zar potansiyeli -55 ila -35 mV arasında bir seyir gösterir [116]. Midenin proksimal bölümü hariç kontraksiyona neden olmayan ECA'nın frekansı sindirim kanalının proksimalinden distaline doğru gidildikçe artış gösterir. İnsanda yavaş dalga frekansı dakikada midede 3, duodenumda 12, ileumda 8, kolonda ise 6-10'dur. [117, 118]. Yavaş dalga aktivitesinin frekansı sıçan duodenumunda dakikada 20-40'tır [116].



Şekil 2.11. Köpekte Sindirim Kanalının Farklı Bölgelerindeki Yavaş Dalga Frekansları [18].

ECA'nın eşik değeri aşması neticesinde meydana gelen ERA, dikensi potansiyeller olarak da bilinmekte olup, gerçek aksiyon potansiyelleridir ve düz kasta meydana gelen kontraksiyonlardan sorumludur. ERA'nın frekansı ve oluşan kontraksiyonun şiddeti yavaş dalganın eşik değer üzerindeki büyüklüğü ile doğru orantılıdır [115, 119, 120]. Yavaş dalgalar midenin büyük kıvrımındaki önder odak alanda yer alan kalpteki pürkinje hücreleri ile benzer özellikteki interstisyel ICC'ler tarafından oluşturulur ve antral bölgeye doğru yayılım gösterir [18, 115, 117, 120, 121].

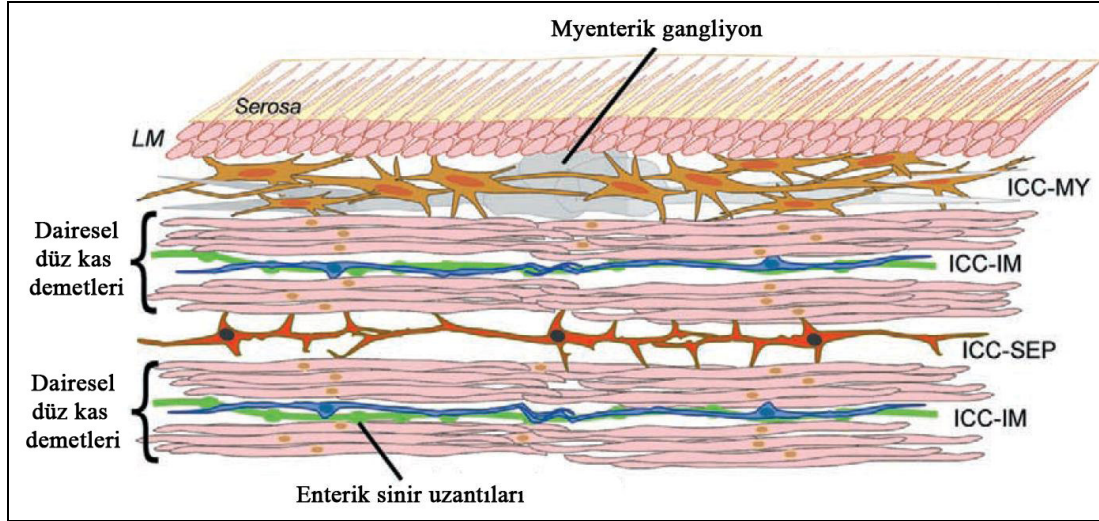


Şekil 2.12. Köpekte Pilonus Bölgesinden Elde Edilen Kayıt [115].

ICC'ler İspanyol sinir bilimci Cajal tarafından 1911 yılında bir tip sinir hücresi olarak tanımlanmış olup, bu hücrelerin elektriksel aktivitesi 90'lı yıllardaki çalışmalarla ortaya çıkmıştır [122]. Sindirim sisteminde yerleşim gösterdikleri alana göre isimlendirilen farklı tipte ICC'ler bulunmaktadır. Myenterik plexus içerisinde bulunanlar ICC-MY, dairesel ve uzunlamasına, düz kas tabakalarının içerisinde bulunanlar midede ICC-IM, bağırsakta ICC-DMP, düz kas demetleri arasında bağ doku içerisinde bulunanlar ICC-SEP, submukozada yer alanlar ise ICC-SM olarak adlandırılmıştır. Midede bulunan ICC tipleri ICC-MY, ICC-IM ve ICC-SEP iken, ICC-DMP ince barsakta, ICC-SM ise proksimal kolonda yerleşim gösterir [122, 123, 124, 125]. ICC'ler, düz kas hücreleri, sinir sonlanmaları ve birbirleri ile temas halinde bulunurlar [117].

Midenin proksimal kısmında ICC-IM'ler yaygın olarak yerleşim gösterirken ICC-MY'ye seyrek olarak rastlanır. Önder odak alandaki ICC-IM'lerden köken alan uyarılar daha sonra ICC-MY'leri aktive eder ve distal mideye doğru yayılım gösterir [126, 127]. ICC'lerin yavaş dalga aktivitesinin oluşumundaki rolleri white-spotting (W) farelerin kullanıldığı araştırmalarda ortaya konmaktadır. ICC-IM'lerden yoksun fakat ICC-MY'lere sahip olan heterozigot mutant (W/W^V) farelerin bağırsak düz kasında yavaş dalga aktivitesinin şekillenmemesi ICC-IM'lerin, ICC-MY'lerde başlayan yavaş dalga aktivitesinin düz kas hücrelerine iletilmesine aracılık ettiğini göstermektedir [18, 126].

ICC'lerin sindirim sistemi motilitesi üzerine önder odak özelliklerinin yanı sıra humoral etkileri de mevcuttur. Özellikle ICC-IM'ler salgıladıkları NO, CO, VIP, ATP, NK ve SP gibi nörohumoral maddeler aracılığı ile düz kas dinlenme potansiyeli ve uyarılabilirliği üzerine uyarıcı ve inhibe edici etkiler göstererek motiliteyi düzenler [117, 122].



Şekil 2.13. Köpekte Antrum Bölgesindeki ICC'lerin Organizasyonu [123].

LM: uzunlamasına seyreden düz kas, ICC-MY: myenterik interstisyel Cajal hücresi, ICC-IM: intramusküler interstisyel Cajal hücresi, ICC-SEP: septal interstisyel Cajal hücresi

ICC'lerin kaybı ya da hasarı durumunda sindirim sistemi motilitesinde anormallikler, mide distansiyonu, paralitik ileus, gastroparezi, akalazya, Chagas hastalığı, Hirschsprung hastalığı, yangısal bağırsak sendromu (IBS), kronik ideopatik bağırsak pseudoobstrüksiyonu (CIP) gibi patolojiler meydana gelir [117, 128, 129]. Deneysel diyabet modeli uygulanan sıçanlarda ICC'lerin yapısal hasarı ve buna bağlı olarak yavaş dalga aktivitesinin bozulduğu gösterilmiştir [130].

2.11. Sindirim Sisteminde Motor Paternler

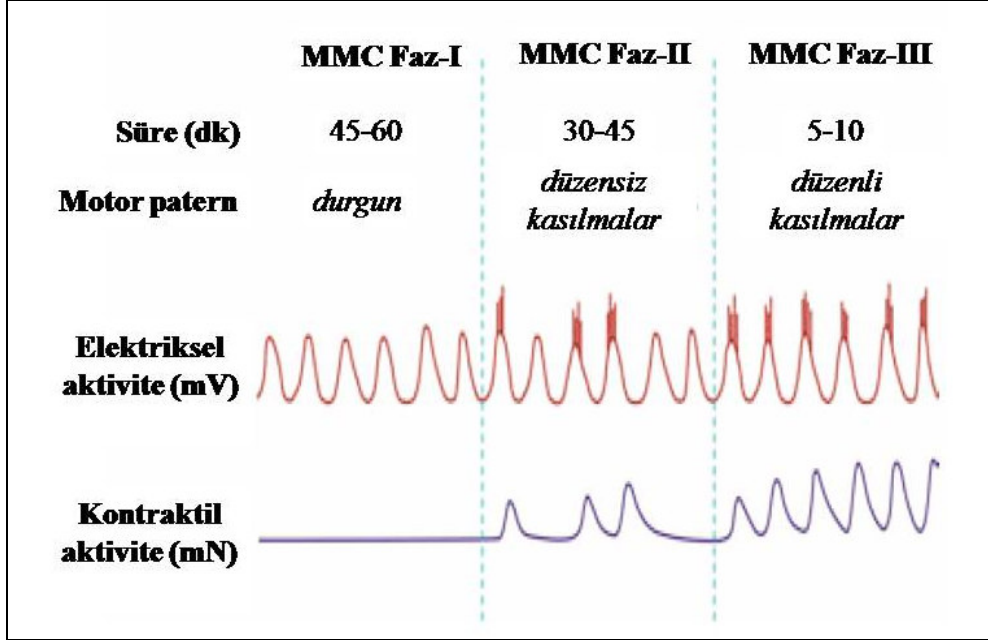
Açlık motor paterni antrum ve duodenumdan başlayarak tüm ince bağırsağı kat eden, döngüsel kasılmalar ile karakterize olan myoelektriksel bir aktivite olup besin alımı ile yerini tokluk motor paternine bırakır. Tokluk motor paterni uzun süreli ve düzensiz seyir gösteren kasılmalar ile karakterizedir [131].

2.11.1. Açlık Motor Paterni: Göç Eden Motor Kompleks (MMC)

Sindirim sisteminde açlıkta gözlenen periyodik aktivite ilk olarak 1858'de Bush tarafından insanda gösterilmiştir. Boldyreff, 1911 yılında yayınladığı çalışmasında köpekte açlık durumunda ince bağırsaktaki intralüminal basıncın pankreasın ekzokrin salgısına paralel bir seyir izleyerek artış gösterdiğini ve bu aktivitenin 90-110 dakikalık periyotlar ile tekrar şekillendiğini ortaya koymuştur. Daha sonra Babkin, bu aktivitenin atropin uygulaması ile bozulduğunu göstermiştir [132]. 1969 senesinde Szurszewski, köpekte mide ve ince bağırsağa yerleştirdiği elektrotlar ile yaptığı elektromyografik kayıtlarda elde ettiği açlık motor paternine "göç eden motor kompleks" adını vermiştir [13]. Code ve Marlett MMC döngüsünü gözlenen elektromotor karakteristiklere göre 4 ayrı evreye ayırmışlardır [133].

Myoelektriksel aktivite açısından MMC döngüsü toplam dört faza ayrılmıştır. Durgun faz olarak da tanımlanan Faz-I'de aksiyon potansiyeli gözlenmez, ikinci fazda zar potansiyelinin eşik değerini zaman zaman aşması neticesinde düzensiz dikensi potansiyeller ve bunun sonucunda da göç edici özellik göstermeyen kasılmalar gözlenir. Üçüncü fazda ise kümelenmiş dikensi potansiyeller ve yüksek

amplitüdüdü düzenli kasılmalar gözlenir. Dördüncü faz, üçüncü fazdan sonra birinci faz başlayana kadar geçen sessiz dönemdir. Besin alımı ile birlikte bu patern bozulur ve düzensiz deşarjlar oluşmaya başlar [117, 132, 134-139]. Birçok araştırmacı tarafından birinci ve dördüncü fazlar arasında çok fazla fark bulunmamasından ötürü MMC döngüsü üç faza ayrılmaktadır.



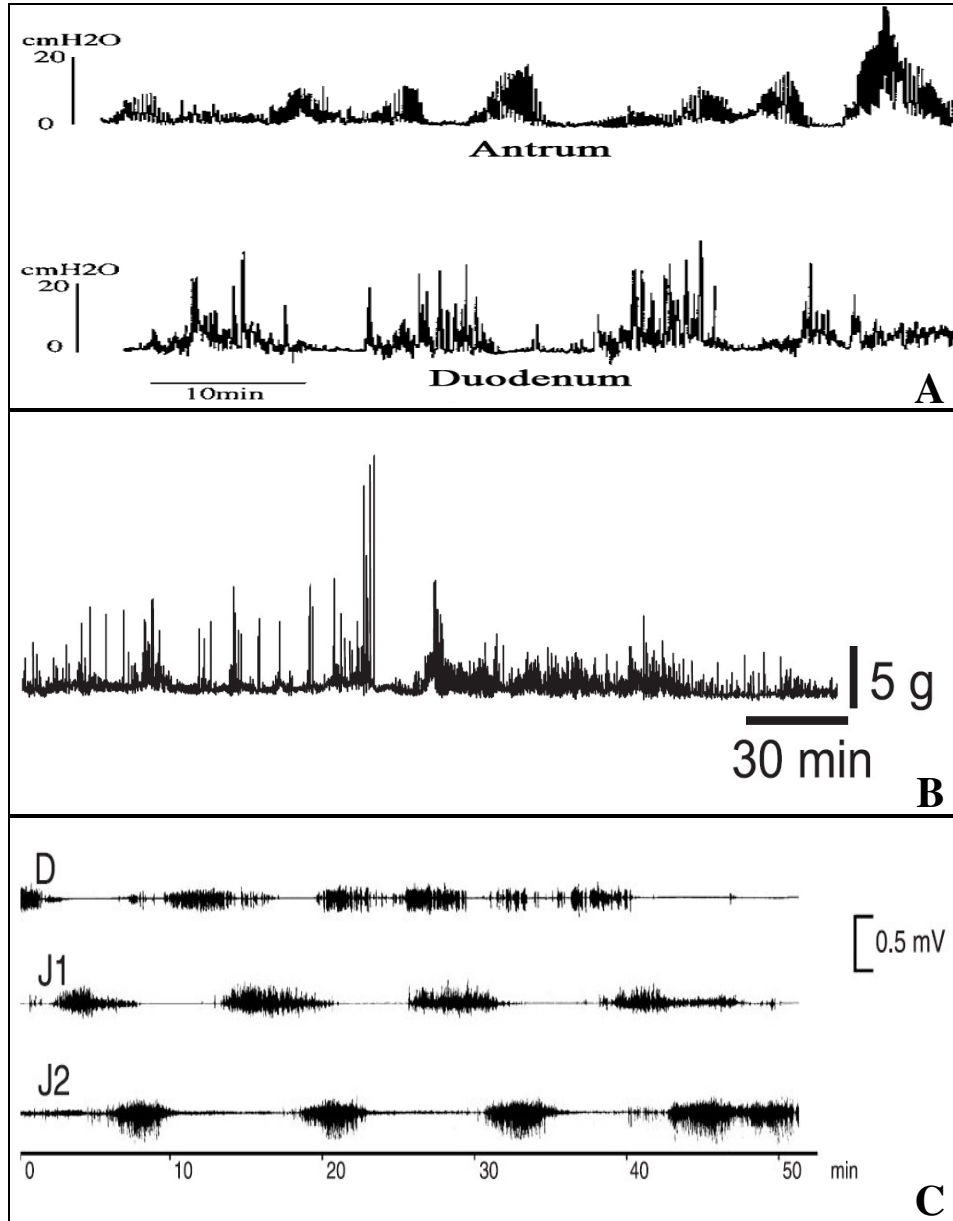
Şekil 2.14. İnsanda Açlık Motor Paterni (MMC) [18]

En fazla insan, köpek, domuz, kemirgen, sığır ve koyunda çalışılan MMC, mide ve ince bağırsağın yanı sıra pankreas ve safra kesesinde de gözlenmekte olup, en net olarak ince bağırsakta tespit edilmektedir. MMC aktivitesinin amacının mide içeriğinin propulsiyonu ve bağırsakta ilerletilmesinin yanı sıra sindirim kanalının sindirilmeyen besinsel artık ve bakterilerden temizlenerek bir sonraki öğüne hazır hale getirilmesi olduğu düşünülmektedir [14, 136].

Türler arasında farklılık gösteren MMC döngüsünün uzunluğu ortalama olarak insan ve köpekte 90-120, domuzda 80, sığırda 60, sığanda ise 15-20 dakikadır. İnsanlardaki MMC uzunluğu yaşa göre değişiklik göstermekte olup, süresi yeni doğanlarda 20-30 dakikadır [14, 132, 140]. MMC uzunluğunun faz-III aktivitesinin başladığı bölgeye bağlı olarak değiştiğini gösteren bulgular mevcuttur. İnsanlarda antral kökenli faz-III aktivitesinin gözleendiği MMC döngülerinin duodenal kökenli faz-III aktivitesinin gözleendiği MMC döngülerine göre daha uzun sürdüğü gösterilmiştir [141]. Benzer şekilde Fang ve arkadaşları deney gruplarındaki sığanların %67'sinde duodenal, %33'ünde ise antral kökenli MMC elde ettiklerini, antral kökenli MMC döngü süresinin daha uzun olduğunu bildirmişlerdir [137].

Türler arasında farklı seyirler gösteren MMC aktivitesi, sığanda insan ve köpektaki kadar düzenli bir seyir izlemez. Sığanda faz-III kasılmaları diğer fazların içinde kaybolabileceği gibi bazı durumlarda 24 saatlik açlığı takiben dahi gözlenemeyebilir [140]. Bu farklılıkların MMC'yi düzenleyen humoral etkenlerin farklılığından ileri geldiği düşünülmekte olup, faz-III kasılmalarının insan ve köpekte

plazma motilin, sıçanda ise plazma ghrelin konsantrasyonu ile eş zamanlı seyir izlediği bilinmektedir [14, 140]. Ekzojen motilin uygulaması ile insan ve köpekte faz-III benzeri kasılmalar elde edilmiştir [142]. Sıçanlarda ise periferel ghrelin uygulaması faz-III kasılmalarını oluştururken, motilin etkisiz bulunmuştur [143, 144]. MMC sürelerinin türler arasındaki farklılığının bir diğer nedeninin de farklı beslenme paternleri olduğu düşünülmektedir. İnsan ve köpek öğünlere dayalı, sıçan ise karanlık fazda sürekli bir beslenme paterni göstermektedir. Sıçanların öğüne dayalı beslenme şeklinin MMC döngüsündeki faz-III kasılmalarının amplitüdlerini arttırdığı bildirilmiştir [14].



Şekil 2.15. Sıçanda Farklı Yöntemlerle Kaydedilen MMC Döngüleri. A: antrum ve duodenuma yerleştirilen kateterler ile yapılan manometrik kayıt [146], B: mideye yerleştirilen gerime duyarlı transducer ile yapılan kayıt [140], C: duodenum ve jejunuma yerleştirilen bipolar elektrotlar ile yapılan myoelektriksel kayıt [145].

Deney hayvanlarında myoelektriksel aktivitenin ölçümü monopolar veya bipolar serozal elektrotlar kullanılarak elektriksel aktivitenin ölçülmesi [145], seromusküler olarak yerleştirilen gerime duyarlı transducerlar aracılığı ile kasılmalarla oluşan kas geriminin ölçülmesi [140] ve manometrik kateter aracılığı ile kasılmaya bağlı oluşan basınç değişikliklerinin ölçülmesi [146] esaslarına dayanmaktadır. İnsanlarda MMC ölçümü vücut yüzeyine yapıştırılan elektrotlar ve cerrahi girişim ile karın duvarına yerleştirilen tel elektrotlar aracılığıyla yapılmaktadır.

2.11.1.1. MMC'nin Sinirsel Kontrolü

MMC'nin nöro-humoral düzenlenmesi tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Yaygın bir görüş olarak, tokluk motor paterninin oluşumunda merkezi sinir sistemi tarafından gerçekleştirilen ekstrinsik innervasyonun görev aldığı kabul edilmektedir. MMC oluşumunun ise ekstrinsik innervasyondan bağımsız, intramural bir innervasyon mekanizması ile kontrol edildiği, N.vagus'un bütünlüğünün mide ve bağırsakta MMC oluşumu ve göçü için gerekli olmadığı düşünülmektedir [117, 147].

MMC'nin başlangıcında ve ilerletilmesinde ESS rol oynamaktadır. Görev alan intrinsik nöronların büyük bir kısmı myenterik pleksusta yer almakta olup, submukozal plexus da MMC'nin ilerlemesine katkı sağlamaktadır [117, 147]. Spencer ve arkadaşları ICC-MY hücrelerinden yoksun heterozigot white spotting (W/W^V) farelerin ince bağırsaklarından yaptıkları kayıta MMC aktivitesinin vahşi tipte olduğu gibi şekillendiğini göstermişlerdir. Yavaş dalga aktivitesinin gözlenmediği bu mutant farelerden elde edilen sonuçlar, MMC oluşumunu ESS nöronlarının henüz tanımlanmayan farklı bir intrinsik mekanizma aracılığı ile başlattıklarını göstermektedir [136].

MMC oluşumu ve sürdürülmesinde vagal tonusun etkisi konusunda tartışmalı bulgular bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar vagotominin mide ve duodenumda MMC oluşumunu engellemezken, sadece faz-III süresinde azalmaya yol açtığını bildirmişlerdir. Tanaka ve arkadaşları köpeklerde periferik motilin uygulamasına cevaben gözlenen faz-III benzeri kasılmalara ve besin tüketimi ile birlikte bozulan MMC'ye N.vagus'un aracılık etmediğini, vagotomi sonrasında MMC oluşumunda ve süresinde bir değişim olmazken, faz-III kontraksiyonlarının frekans ve amplitüdlerinde düşüş olduğunu göstermişlerdir [148]. Benzer sonuçlar sıçan, köpek ve insanda gösterilmiştir [17, 149, 150].

Ekstrinsik vagal innervasyonun MMC'ye etkisinin MMC'nin köken aldığı anatomik bölge ile değişkenlik gösterdiğine ait bulgular vardır. Köpeklerde vagal denervasyonun antral MMC'nin oluşumunu engellerken, duodenal MMC oluşumunu etkilemediği gösterilmiş ve vagal denervasyon sonrasında oluşan duodenal MMC aktivitesinden duodenumdan salınan motilin hormonunun sorumlu olduğu düşünülmüştür. Aynı çalışmada duodenektomi sonrasında antral ve jejunal faz-III benzeri kasılmaların ekstrinsik vagal innervasyon aracılığı ile tekrar ortaya çıktığı gözlenmiştir [15]. Bunun yanı sıra Fujino ve arkadaşları ghrelin antagonisti uygulamasının normal sıçanlarda gözlenen açlık motor paternine etki etmediğini, vagotomili sıçanlarda MMC'yi tamamen ortadan kaldırdığını göstermişlerdir [144]. Bu sonuçlar ghrelin'in MMC üzerine santral ve periferik etki mekanizmalarının bulunduğunu düşündürmektedir. Mental stres durumlarında MMC'nin faz-III

aktivitesinde düşüş gözlenmesi, MMC aktivitesinde ekstrinsik innervasyonun da rol aldığını göstermektedir [117]. Sindirim sistemi motilitesi üzerine çalışma yapan araştırmacılar tarafından psikolojik durumu iyi ve neşeli olan köpeklerde MMC aktivitesinin daha belirgin şekilde kaydedildiğini, domuzda ve sığanda her gün düzenli bir saatte yem verilmesinin MMC aktivitesinin oluşumunu kolaylaştırdığı bildirilmiştir [140, 151].

Antral ve duodenal MMC'lerin oluşumu birbiri ile ilişki içerisinde olup, duodenal MMC'nin baskılandığı durumlarda antral MMC'nin de oluşmadığı gösterilmiştir. Buna karşın bazı çalışmalarda vagal blokaj, spinal kord kesisi, diyabetik ve vagotomi sonrası gelişen gastroparezi, opiat enjeksiyonu, aspirin alımı gibi durumlarda duodenal MMC'nin oluşup, antral MMC'nin oluşmadığı gözlenmiştir. Vagal kesinti sırasında midede MMC'nin ortadan kalkması, antral MMC'nin oluşabilmesi için ekstrinsik vagal innervasyonun gerekliliğini düşündürmüştür [15]. Guo ve arkadaşları amigdalada tespit edilen motilin reseptörlerinin duodenal MMC üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında, amigdaloide alana mikroenjeksiyon ile motilin uygulamasının MMC süresini kısalttığını, faz-III potansiyellerinin amplitüd ve frekansını arttırdığını ve bu etkilerin vagotomi işlemi ile ortadan kalktığını bulmuşlardır [152]. Liu ve arkadaşları tarafından da teyit edilen bu sonuçlar duodenal MMC üzerine amigdala-hipotalamus-beyinsapı-N.vagus eksenini üzerinden etki gösteren bir santral yolağı ortaya koymaktadır [153, 154].

2.11.1.2. MMC'nin Hormonal Kontrolü

Sindirim sisteminden salınan çok sayıda molekül endokrin ve parakrin etki şekilleri ile MMC aktivitesinin düzenlenmesine katılmaktadır. MMC'yi uyaran humoral faktörlere örnek olarak, motilin, motilin reseptör analogu olan eritromisin, somatostatin, opioidler, SP, dopamin, prostaglandinler, epidermal büyüme faktörü, serotonin, histamin, ghrelin, MMC aktivitesini inhibe edip tokluk motor paterninin oluşumunu uyaran humoral faktörlere örnek olarak CCK, insülin, glukagon, nörotensin, nöromedin, NO, GABA, bombesin, GLP (glukagon benzeri peptid)-1, GLP-2, oreksin-A, enkefalinler ve prostaglandin E₂ verilebilir [17, 117, 155, 156, 157, 158].

Duodenumun başlangıcından salınan motilin hormonu özellikle antral MMC'nin temel uyarılarından biri olup, tokluk motor paterninin oluşumuna etkisi bulunmamaktadır [117]. Motilin'in köpekte ve insanda MMC döngüsünün faz-III kasılmalarını tetiklediği gösterilmiştir. Açlık fazında plazma motilin konsantrasyonunun döngüsel bir seyir izlediği ve MMC döngüsünün faz-III evrelerinde tepe noktası gösterdiği bilinmektedir. Motilin reseptörünün insan, köpek, tavşan ve kobayda gösterilmesine karşın sığanlarda saptanamamış olması ekzojen motilin uygulamasının sığanlarda mide motilitesi üzerine etkili olmamasını açıklamaktadır [14, 140, 143].

MMC döngüsü insan ve köpekte 90-100, sığanda ise yaklaşık 15-20 dakikadır [140]. Döngü sürelerinin farklı olması MMC'ye farklı biyolojik moleküllerin etki gösterdiğini düşündürmektedir. Ghrelin motilin'e, ghrelin reseptörü de motilin'in tip-1a reseptörüne yapısal olarak benzerlik göstermekte olup endojen ghrelin'in sığan midesinde gözlenen MMC'nin faz-III kasılmalarını düzenlediği gösterilmiştir [14].

Büyüme hormonu sekretagog reseptörünün (GHS-R) endojen ligandı olan ghrelin'in mide-bağırsak motilitesine etki gösterdiği bilinmekle birlikte, sıçanda plazma konsantrasyonu açlık fazında tokluk fazına göre daha yüksek olup besin alımı ile birlikte düşüş göstermektedir [14, 140, 159, 160]. Ghrelin uygulamasının sıçanda hem açlık hem de tokluk fazlarında faz-III kasılmalarını başlattığı ve MMC döngüsünün süresini kısalttığı [144], köpeklerde ise MMC'ye etkisinin bulunmadığı [161] gösterilmiştir.

Somatostatin'in MMC üzerine etkileri türlere göre değişkenlik gösterir. İnsan ve köpekte faz-III aktivitesini uyarıp, MMC süresini kısaltan somatostatin, sıçanda SST-2 reseptörlerine bağlanarak MMC'yi nitrejik yolak aracılığı ile inhibe etmektedir [117, 162].

Taşikininler, MMC aktivitesini NO'ya duyarlı bir mekanizma aracılığı ile uymaktadır. NK1 ve NK2 reseptör antagonistlerinin uygulamaları faz-III kontraksiyonlarını inhibe etmektedir [117]. Schmidt ve arkadaşları NKA ile uyarılan faz-II aktivitesinin NOS inhibitörü L-NNA ile arttığını, artan aktivitenin NK1 ve NK2 antagonistleriyle ortadan kalktığını göstermişlerdir [163].

Serotonin ince bağırsakta kontraksiyon hızını, süresini ve amplitüdlerini arttırarak ağırlıklı olarak uyarıcı etki gösterir. Sıçanların myenterik serotonerjik nöronlarının haraplanması MMC aktivitesinin bozulmasına ve geç hızında azalmaya neden olmaktadır. Spesifik reseptör antagonistleriyle yapılan çalışmalar neticesinde serotonin reseptörlerinden 5-HT₃ ve özellikle 5-HT₄'ün MMC aktivitesinin düzenlenmesinde etkili olan reseptör tipleri olduğu belirtilmiştir [117, 145].

Melatonin epifiz bezinde sentezlenir ve karanlık fazda salınan bir hormondur. Melatonin, prekürsörü olan serotonin'in asetilasyonu ve metilasyonu ile oluşur. Sindirim kanalındaki melatonin kaynağı APUD ve EC hücreleri olup, sindirim sistemi motilitesine düz kasta ve myenterik pleksusta bulunan selektif reseptörleri aracılığı ile etki etmektedir. Melatonin'in mide motilitesini vagal aferentlerde bulunan serotonin reseptörleri aracılığında vago-vagal inhibitör refleksin oluşumunu sağlayarak inhibe ettiğine dair bulgular vardır [116]. Bunun yanı sıra Kasımay ve arkadaşları, ekzojen melatonin'in mide motilitesini 5-HT₃ ve CCK2 reseptörleri aracılığında sempatik nöron aktivasyonu ile inhibe ettiğini göstermişlerdir [164]. Diğer taraftan endojen melatonin'in faz-II evresindeki düzensiz dikensi potansiyelleri inhibe ederek MMC döngüsünü hızlandırdığını gösteren çalışmalar vardır [165]. Melatonin'in sindirim sistemi motilitesi üzerine farklı etkileri, serotonerjik sistemin farklı reseptörleri ile farklı yerlerde etkileşime girdiğini düşündürmektedir.

NO'nun MMC siklusunu baskılayıcı etkisi bilinmektedir. Endojen NO'nun NOS inhibitörü ile ortadan kaldırılmasının faz-III aktivitesinin oluşmasına neden olduğu insanda ve sıçanda gösterilmiştir [117, 166, 167].

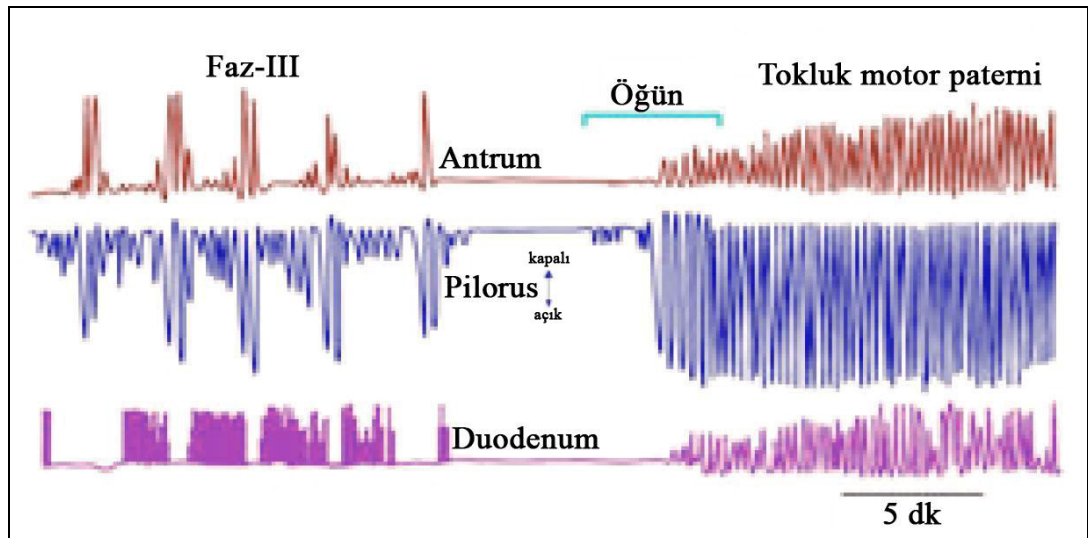
GLP-1 ve GLP-2 proglukagon'dan köken alan, ince bağırsaktaki L hücrelerinden besin alımını takiben dolaşıma salınan peptidlerdir. Merkezi sinir sisteminde de sentezlenen GLP-1 ve GLP-2'nin insan ve hayvanlarda besin tüketimini inhibe ettiği, periferal olarak ileal fren mekanizmasında rolü olduğu ve

mide boşalma hızını yavaşlattığı bilinmektedir. GLP-1 ve GLP-2'nin periferik uygulamalarının sıçan ve insan ince bağırsağında tokluk motor paternini etkilemezken, MMC'yi inhibe ettiği gösterilmiştir [158, 168]. Tolesa ve arkadaşları, sıçanda GLP-1'in MMC üzerine olan inhibe edici etkisinin nitroerjik yolak aracılığı ile gerçekleştiğini göstermişlerdir [169].

MMC'nin hormonal düzenlenmesini inceleyen çalışmalarda genel olarak peptid ve hormonların plazma düzeyleri ölçülmektedir. Öte yandan sindirim sisteminde sentezlenen peptidlerin motilitenin düzenlenmesine endokrin tarzda etki şekillerinin yanı sıra lümenal alana serbestlenerek parakrin tarzda da etki gösterdiğini düşündürülen bulgular vardır. Naslund ve arkadaşları plazma motilin seviyelerinin faz-III evreleri ile senkronize şekilde yükselmesinin yanı sıra duodenal içerikte VIP, somatostatin ve SP'nin faz-III öncesinde ve sırasında benzer değişimleri gösterdiğini tespit etmişlerdir [170].

2.11.2. Tokluk Motor Paterni

Besin alımı ile birlikte MMC paterni bozulur, uzun süreli, düzensiz deşarjlar ve kasılmalar ile karakterize tokluk paterni başlar [131,155].



Şekil 2.16. Öğün Alımı ile Tokluk Motor Paterni'nin Oluşumu [18].

MMC'nin inhibisyonunda besinlerin mideye girişi ile birlikte şekillenen kabul gevşemesini sağlayan vago-vagal refleksin ve final molekülü NO'nun rolü olduğu düşünülmektedir [167].

Tüketilen besinin yapısı ve kalorik değeri, açlık paterninin bozulma şekline, diğer bir ifade ile tokluk paterninin oluşum şekline etki eder. Tokluk motor paterni insanlarda öğün miktarı ve içeriğine bağlı olarak 2-6 saat sürebilir [135]. Öğünde tüketilen besindeki yağlar daha uzun süreli bir aktivite sağlarken, karbonhidratlar yüksek amplitüdümlü kontraksiyonlara neden olur [139]. Tokluk motor paterninin oluşumunda öğünün besinsel içeriğinin yanı sıra viskozitesi de önem taşır. Köpeklerde yapılan çalışmada kepek ve selüloz öğünlerinin birbirine yakın amplitüdümlere sahip, fakat frekansları farklı tokluk motor paternleri oluşturdukları tespit edilmiştir [171].

2.12. Mide Boşalımı

Midenin motor aktivitesi 3 fonksiyon için önemlidir. Bu fonksiyonlar: (1) özofagustan gelen besinlerin alınması ve depo edilmesi, (2) kimusun sindirilebilir kıvama getirilmesi, (3) antrum, pilor ve duodenumun proksimal bölgesinin ortak işbirliği ile kimusun ince bağırsağa yavaş bir hızda aktarılmasıdır [18, 19, 107]. Midenin myoelektriksel ve kontraktıl aktiviteleri ile yürütülen bu fonksiyonlar sinirsel (ekstrinsik, intrinsik) ve humoral (endokrin, parakrin) mekanizmalar ile kontrol edilmektedir (20).

Mide anatomik olarak fundus, korpus ve antrum olarak üç bölüme ayrılırken, fonksiyonel olarak proksimal ve distal olarak iki kısımda incelenir. Proksimal ve distal kısımlar mide boşalımında farklı işlevleri yerine getirirler. Proksimal midenin temel fonksiyonu depo işlevi iken, distal mide, öğütme ve karıştırma işlemleri sonucu kimus haline getirdiği besinleri pilorik direnci aşacak basıncı oluşturan kasılmalar aracılığı ile duodenuma pompalamaktır. Midenin gövde kısmından başlayıp antruma doğru yayılan bu kasılmaların frekansı yavaş dalga frekansı tarafından belirlenir [19, 172].

Beslenme esnasında alt özofageal sfinkter ve proksimal midede yutkunma ile başlayan ve daha sonra bu bölgede kalıcı olarak devam eden, besinlerin mideye geçişini kolaylaştıran “kabul gevşemesi” adı verilen bir yanıt gözlenir. Bu gevşeme vagovagal bir refleks ile düzenlenir [20, 117, 172, 173]. Özofagus ve mideden köken alıp, N.vagus içerisinde seyreden duysal lifler NTS’de sonlanır. NTS, eferent duysal uyarıları eferent vagal yolların köken aldığı DMN’ye iletir. Eferent yolağın sonundaki inhibitör motor nöronlardan salgılanan NO ve VIP ise mide düz kasında şekillenen kabul gevşemesine aracılık eder [20, 173]. Bu gevşeme insanlarda basınç artışına neden olmaksızın 2 litreye varan miktarlarda sıvı besin depolanabilmesine olanak sağlamaktadır [117].

Besinin mideye kabulünün ardından midenin proksimal bölgesinde zayıf, distal kısımlarında ise kuvvetli peristaltik dalgalar oluşur. Proksimal midedeki tonik kasılmalar mide iç hacminin daralmasına neden olarak besinlerin distal bölüme ilerlemesini sağlar. Antruma doğru dalgaların kasılma gücü artarak besinlerin karışmasını ve kimus formuna dönüşmesini sağlayan güçlü fazik konstriktör halkalar meydana gelir. Kimustaki katı besin partikülleri 1-2 mm çapından daha küçük olana dek mide boşalımı başlamaz. Her peristaltik dalga pilora ulaştığında pilorun kendisinin de kasılmasıyla kimusun büyük bir kısmı geri püskürtülür. Bu aktivite mide içeriğinin parçalanması ve karışmasında büyük önem taşımaktadır [19, 20, 117, 172].

2.12.1. Mide Boşalımını Etkileyen Faktörler

Besinler mideden duodenuma periyodik olarak bolus şeklinde aktarılır. Fizyolojik şartlar altında bu aktarımın hızı ince bağırsağın salgı ve emilim kapasitesini aşmayacak şekilde ayarlanır. Mide boşalım hızı üzerine etkili en önemli faktörler midenin doluluk oranı, besin tüketiminin frekansı ve kimusun fiziko-kimyasal kompozisyonudur [107, 117].

Mide içeriğinin asidite, osmolarite, besin madde kompozisyonu gibi kimyasal özellikleri ile katı, sıvı olması gibi fiziksel özellikleri pilor sfinkterinin ve mide

duvarının tonusunu etkileyerek, kimusun mideyi terk etme hızında önemli rol oynar [20, 172]. Sıvı ve katı maddelerin mideden boşalımı farklı paternler göstermekte ve farklı mekanizmalar ile kontrol edilmektedir.

Sıvılar öncelikli olarak mide ve duodenum arasındaki basınç gradienti yardımıyla mideyi kat eder ve bunu sağlayan mide basınç artışı proksimal midedeki zayıf kasılmalar ile sağlanır. Katı besin maddeleri ise antrumda meydana gelen güçlü ve koordineli kontraktıl fonksiyon aracılığı ile mideyi terk eder [174].

Sıvı besinler katı besinlere göre mideyi daha hızlı terk etmekte olup, zamana karşı doğrusal bir seyir izlerler. İnsanda besin maddesi içermeyen sıvıların midedeki yarılanma süresi ortalama 8-18 dakikadır. Sıvıların mide boşalma hızındaki en önemli faktör hacim olmasına karşın sıvının hipertonic, asidik olması veya yağ, amino asit gibi besin öğelerinden zengin olması boşalma hızını yavaşlatır. İzotonik sıvılar hipertonic sıvılara göre mideyi daha hızlı terk eder. Mideye alınan sıvının ısısı da boşalma hızında bir etkidir. Soğuk sıvılar boşalmayı yavaşlatır [117].

Katı besinlerin midedeki yarılanma süresi ortalama 2 saat olup bifazik bir patern gösterirler. Yavaş ilerleyen ve ortalama 30 dakika süren birinci fazı takiben hızlı ve doğrusal seyir gösteren ikinci faz gelir [20, 175, 176, 177].

Mide boşalma hızı besin madde kompozisyonu ile de yakından ilişkilidir. Besin maddesi içeren sıvılar mideyi ortalama 200 kcal/saat hızla kat ederler [20]. Besinlerin kalorik değeri yükseldikçe bağırsağa geçiş süreleri de uzamaktadır. Karbonhidratlar mideyi en hızlı şekilde terk ederken bunu sırasıyla proteinler ve yağlar izlemektedir. Öğün içeriğine glukoz ilave edilmesi mide boşalma hızını artırırken, kısa süreli açlık uygulaması yavaşlatır [20, 175].

2.12.2. Mide Boşalma Hızının Kontrolü

Mide boşalma hızının kontrolü mide ve duodenumun kontraktıl aktivitelerinin koordinasyonu aracılığı ile gerçekleşmekte olup, boşalma hızını belirleyen temel unsurlar antrumdaki kasılmaların frekansı, pilorik kasılmaların frekansı, şiddeti, süresi ve bu kasılmaların yayılma hızlarıdır. Mide boşalma hızı humoral ve nöral mekanizmalar tarafından denetlenmektedir. Bu mekanizmada yer alan en önemli humoral faktörler mideden salınan gastrin ve duodenumdan salınan CCK, sekretin ve gastrik inhibitör peptid (GIP)'tir [106].

2.12.2.1. Mide Boşalma Hızının Kontrolünde Midenin Rolü

Midede besin miktarının artışı ile yükselen mide içi basınç, vagovagal reflekslerin oluşumunu sağlayarak midenin boşalma hızını artırır. Bunun yanı sıra mide duvarında besinlerin oluşturduğu gerim, lokal myenterik reflekslerin ortaya çıkmasını sağlar. Bu refleksler mide duvarının yanı sıra pilor sfinkterinde de inhibisyona neden olur ve mide boşalma hızını artırır [20, 106].

Pilor bölgesindeki kasların midenin diğer bölgelerine oranla 50-100 kat daha kalın olması ve normal şartlarda bu kasların sürekli tonik kontraksiyon göstermesi pilorik sfinkter direncinin oluşumunu sağlar. Bunun yanı sıra midede besine bağlı gerime cevaben antral mukozadaki G hücrelerinden salınan gastrin hormonu distal midedeki kasılmaları ve pilor sfinkter kaslarını da uyararak tonusunu artırır. Bu

şekilde gastrin, bir yandan antral kasılmalar aracılığı ile mide boşalımını uyarırken, diğer yandan arttırdığı pilorik direnç ile mide boşalımında fren görevi üstlenmektedir [20, 106].

2.12.2.2. Mide Boşalma Hızının Kontrolünde Duodenumun Rolü

Beslenme sırasında sindirim kanalından merkezi sinir sistemine güçlü sinyaller gönderilir. Kimus emiliminin gerçekleştiği ince bağırsak tokluk sinyallerinin önemli bir kaynağıdır [178]. Mide boşalımı duodenal emilim ve distal midenin motilitesi arasında gerçekleşen nörofizyolojik refleksleriyle düzenlenmektedir [19]. Kimusta bulunan besin öğeleri ve ince bağırsakta yer alan reseptörler arasındaki etkileşim nöronal ve hormonal bir geri-besleme sağlamakta, bunun neticesinde antral kasılmalar inhibe olurken duodenumdaki tonik ve fazik motor aktivite uyarılmaktadır. Bu geri-beslemenin etkinliği kimusa temas eden ince bağırsak uzunluğu ile doğru orantılıdır [172].

Kimus duodenuma geçtiği zaman çeperden kaynaklanan birçok sinirsel refleks meydana gelir ve mide boşalımı inhibe olur. Mide boşalımını inhibe eden refleksler: (1) ESS üzerinden duodenumdan direkt mideye giderek, (2) ekstrensek sinirler aracılığıyla prevertebral gangliyonlara, oradan inhibitör sempatik lifler ile mideye giderek (3) vagal aferentler ile beyin sapına iletilip vagal eferentler ile taşınan uyarıcı sinyalleri inhibe ederek etki gösterirler [106, 107]. Duodenumun gerilme derecesi, mukozal iritasyon, kimusun asiditesi, ozmolaritesi ve kimusta bulunan yıkım ürünlerinin niteliği bu refleksleri doğurabilir [117]. Duodenum ve jejunum mukozasında kimusun asidite, ozmotik basınç ve yağ içeriğini algılayan reseptörler yer alır. Duodenumdaki pH'nın 3.5'in altında olması, yağ asitlerinin, monogliseritlerin, amino asit ve peptidlerin varlığı mide boşalımını yavaşlatır.

Boşalma hızında belirleyici olan humoral faktörlerin başında CCK hormonu gelmektedir. Bağırsağa gelen yağ, protein ve glukoz gibi sindirim ürünlerine cevaben ince bağırsağın üst bölümlerindeki I hücrelerinden salınan CCK, mide, safra kesesi ve pankreas salgı fonksiyonlarını uyarır, mide boşalımı ve açlık motor paternini inhibe eder [178, 179, 180]. İsimlerini buldukları yerlerin baş harflerinden alan CCK-A ve CCK-B olmak üzere iki tip CCK reseptörü tanımlanmış olup, sindirim sistemi ile ilgili olan CCK-A reseptörüdür [180]. CCK, alt özofageal sfinkteri ve mideyi gevşetirken, antrum ve pilor sfinkterindeki kasılmaları uyarır ve mide boşalma hızını yavaşlatır [117]. CCK'nın bu etkisi sıçanda [179, 181], köpekte [182] ve insanda [183] gösterilmiştir. CCK'nın A-tip reseptör antagonistlerinin sistemik uygulandığı çalışmalarda endojen CCK'nın mide boşalımı üzerine olan inhibitör etkilerinin ortadan kalktığı tespit edilmiştir. Diğer yandan CCK'nın merkezi sinir sisteminde nörotransmitter görevi üstlenerek mide boşalımını inhibe ettiğini gösteren bulgular da mevcuttur. Ekzojen CCK'nın santral uygulamaları neticesinde mide boşalımının ve myoelektriksel aktivitenin inhibe olduğu gösterilmiştir [179]. Borovicka ve arkadaşları insanlarda endojen CCK'nın hem katı hem de sıvılar üzerine mide boşalımını inhibe edici etkilerini A tipi reseptör antagonisti kullanarak, ortadan kaldırmışlardır [184]. CCK, endokrin etkilerinin yanı sıra parakrin etki mekanizması ile vagal duysal nöronları uyararak mide boşalımını inhibe etmektedir [179,185].

Duodenumdaki asiditenin artması Lieberkühn kriptalarında yer alan S hücrelerinden sekretin salınımına neden olur. Sekretin insan, kedi, köpek ve sıçanda mide boşalımını inhibe ederken, bir taraftan da pankreastan bikarbonat salınımını arttırıp, mideki G hücrelerinden gastrin salınımını azaltarak mide asit sekresyonunu inhibe eder [186, 187]. Sekretin antrumdaki kasılmaları inhibe eder ve pilor sfinkterinin kontraksiyonunu uyararak mide boşalma hızını düşürür [106] Sekretin'in mide boşalımını inhibe edici etkisinin kapsaisine duyarlı duysal vagal aferentler [117, 186, 188] ve gastrin sekresyonunun inhibisyonu [189] aracılığı ile yaptığı ileri sürülmüştür. Diyabete bağlı olarak azalan mide boşalma hızında sekretin'in rol aldığı düşünülmekte olup, diyabetik sıçanların ince bağırsağındaki nöronlarda sekretin immünoaktivitesinin arttığı gösterilmiştir [190].

GIP, duodenum ve proksimal jejunumdaki K hücrelerinden diyetdeki yağ sindirim ürünlerine cevaben salınan 42 amino asit içeren bir peptid olup, mide boşalımını inhibe ettiği bilinmektedir. GIP mide boşalımını inhibe etmenin dışında tıpkı sekretin gibi gastrin sekresyonunun inhibisyonu aracılığı ile mide asit salgısını baskılamaktadır [191, 192].

Yukarıda adı geçen hormonların yanı sıra mide boşalımı üzerine serotonin [193], CRF [194], CGRP [195], GLP-1 [174,196], NPY [120] ve galanin'in [197] inhibitör etkileri, asetilkolin [198], NO [199], histamin [200] ve motilin'in [170] hızlandırıcı etkileri gösterilmiştir.

Oreksinlerin mide boşalım hızına etkisi ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamakla birlikte, ekzojen oreksin-A'nın insanlarda mide boşalımını inhibe ederken, sıçanlarda arttırdığı gösterilmiştir [11, 36].

Amaç

Açlığın plazma oreksin-A konsantrasyonunu, hipotalamusta ve periferik dokularda preprooreksin ve oreksin ekspresyonlarını arttırdığı, santral ve periferik uygulanan oreksin-A'nın sindirim sistemi fonksiyonlarına etkili olabileceği gösterilmiştir.

Çalışmamız, açlık uygulamasına bağlı olarak artan endojen oreksin-A'nın, mide motilitesine N.vagus aracılı merkezi etkisinin yanı sıra, humoral etkisinin olup olmadığını göstermek amacıyla yapılmıştır.

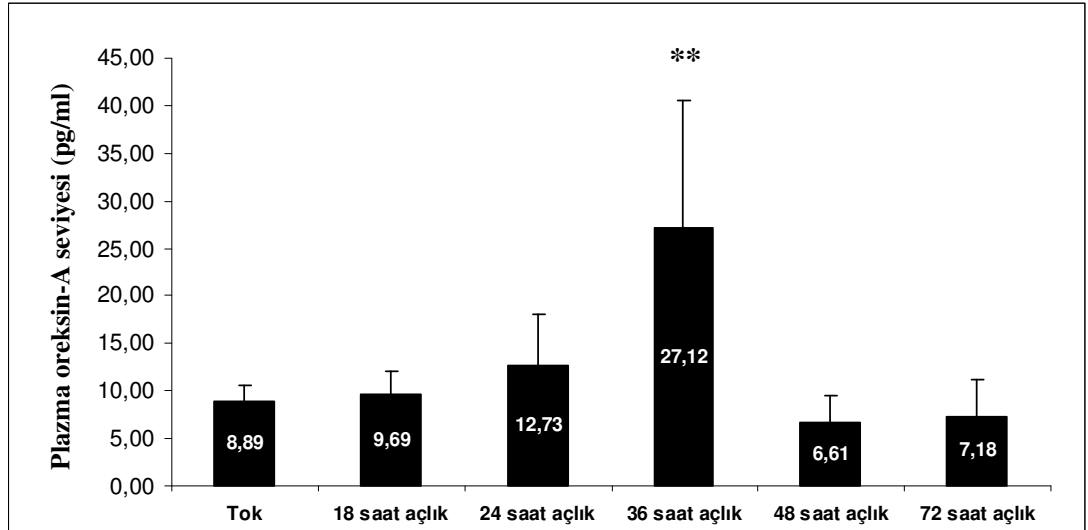
GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları, Merkezi Araştırma Laboratuvarı, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve Deneysel Hayvanlar Ünitesi'nde gerçekleştirilen çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanlar Ünitesi'nden sağlanan 250-350 g ağırlığında, erişkin, erkek, 210 adet Wistar sıçan üzerinde yapılmıştır. Sıçanlar tel kafeslerde standart laboratuvar yemi ve musluk suyu ile beslenmişlerdir. Deneye başlamadan önce sıçanlar tartılmış ve ağırlıkları kayıt edilmiştir.

3.1. Ön Çalışma

3.1.1. Açlık Süresinin Tayini

Endojen oreksin-A sentezini uyarmak üzere uygulanacak açlık süresinin tespiti için pilot çalışma yapılmış, 0, 18, 24, 36, 48 ve 72 saat açlık uygulanan sıçanlardan elde edilen plazma örneklerinde oreksin-A seviyesi Radioimmünonassay (RIA) yöntemi ile tespit edilmiştir. Açlık süresine bağlı olarak değişim gösteren plazma oreksin-A seviyeleri Şekil 3.1.'de verilmiştir. 18 ve 24 saatlik açlık uygulamaları tok gruba göre önemli bir artışa neden olmazken, en fazla artış 36 saatlik uygulamada gözlenmiş ve bu artış tok gruba göre önemli derecede farklı bulunmuştur ($p<0.01$). 48 ve 72 saatlik açlık uygulamalarında tok gruptan farklılık bulunmamıştır.



Şekil 3.1. Açlık Süresinin Plazma Oreksin-A Seviyesine Etkisi. (Her grup için n=10).

** $p<0.01$ Tok grubundan fark

3.2. Gruplandırma ve Deney Protokolü

Sıçanlar mide boşalma hızı ve MMC aktivitesinin ölçümü ile ilgili çalışmalar için iki ayrı gruba ayrılmıştır.

3.2.1. Mide Boşalma Hızının Ölçümü İçin Yapılan Gruplandırma

1. Tok: Hayvanlara herhangi bir işlem uygulanmadan mide boşalma hızı ölçülmüştür.

2. Kontrol: 18 saat açlık uygulamasının ardından mide boşalma hızı ölçülmüştür.

3. SB: 18 saat açlık uygulamasının ardından OX1R antagonisti SB-334867 uygulanmış ve mide boşalma hızı ölçülmüştür.

4. VG: Vagotomi işlemi yapılan hayvanlarda 18 saat açlık uygulamasının ardından mide boşalma hızı ölçülmüştür.

5. 36 s aç: 36 saat açlık uygulamasının ardından mide boşalma hızı ölçülmüştür.

6. 36 s aç-SB: 36 saat açlık uygulamasının ardından OX1R antagonisti SB-334867 uygulanmış ve mide boşalma hızı ölçülmüştür.

7. 36 s aç-VG: Vagotomi işlemi yapılan hayvanlarda 36 saat açlık uygulamasının ardından mide boşalma hızı ölçülmüştür.

8. 36 s aç-VG-SB: Vagotomi işlemi yapılan hayvanlarda 36 saat açlık uygulamasının ardından OX1R antagonisti SB-334867 uygulanmış ve mide boşalma hızı ölçülmüştür.

3.2.2. MMC Aktivitesinin Ölçümü İçin Yapılan Gruplandırma

1. Kontrol: 18 saat açlık uygulamasının ardından MMC aktivitesi ölçülmüştür.

2. SB: 18 saat açlık uygulamasının ardından OX1R antagonisti SB-334867 uygulanmış ve MMC aktivitesi ölçülmüştür.

3. VG: Vagotomi işlemi yapılan hayvanlarda 18 saat açlık uygulamasının ardından MMC aktivitesi ölçülmüştür.

4. 36 s aç: 36 saat açlık uygulamasının ardından MMC aktivitesi ölçülmüştür.

5. 36 s aç-SB: 36 saat açlık uygulamasının ardından OX1R antagonisti SB-334867 uygulanmış ve MMC aktivitesi ölçülmüştür.

6. 36 s aç-VG: Vagotomi işlemi yapılan hayvanlarda 36 saat açlık uygulamasının ardından MMC aktivitesi ölçülmüştür.

7. **36 s aç-VG-SB:** Vagotomi işlemi yapılan hayvanlarda 36 saat açlık uygulamasının ardından OX1R antagonisti SB-334867 uygulanmış ve MMC aktivitesi ölçülmüştür.

Vagotomi işlemi deneyden 1 hafta önce biletaral olarak subdiyafragmatik yapılmıştır. OX1R antagonisti SB-334867 (Tocris, 1960) kuyruk venine yerleştirilen kateter aracılığı ile mide boşalma hızının ve MMC aktivitesi ölçümlerinden 1 dakika önce 10 mg/kg dozda uygulanmıştır. SB-334867, 10 mg/ml konsantrasyonda DMSO içinde çözünerek hazırlanmış ve hayvanlara 100 µl/100g miktarda verilmiştir. DMSO'nun ölçülen parametrelere etkisinin olmadığı gerek literatürdeki çalışmalarda [11, 17], gerekse yaptığımız ön çalışmada belirlenmiştir.

3.3. Parametrelerin Tayini

3.3.1. Mide Boşalma Hızının Ölçümü

Tache ve arkadaşlarının yöntemine göre yapılmıştır [201].

Prensip:

Mideyi terk etme süresi diğer aköz çözeltilere göre çok daha yavaş olduğu bilinen konsantre metil selüloz çözeltisi ile mide tarafından emilmeyen ve sekrete edilmeyen fenol kırmızısı karışımının belli bir zaman dilimi içerisinde mideyi terk etme yüzdesi esas alınarak hesaplanmıştır.

İşlemler:

%1.5'lik metil selüloz (Sigma, M-0262) çözeltisi 80°C'de sürekli karıştırılarak hazırlanmış, homojen hale gelen solüsyon musluk suyu altında 37°C'ye soğutulmuştur. Bu çözelti içerisine fenol kırmızısı (Sigma, P-3532) 50 mg/100 ml oranında ilave edilmiş ve homojen hale gelinceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Her deney günü solüsyon taze olarak hazırlanmış ve deney boyunca 37°C'ye ayarlı su banyosunda (ElektroMag, M96-KP) tutulmuştur.

Fenol kırmızısı içeren 1.5 ml metil selüloz çözeltisi sıçanlara gavaj yolu ile verilmiştir. Deneyde standart olarak kullanılmak üzere 2 adet sıçan, solüsyon verildikten hemen sonra servikal dislokasyon yöntemi ile feda edilip, zaman kaybetmeden mideleri pilorus ve kardial bölgelerinden klempe edilip çıkarılmıştır. Deneydeki diğer hayvanlar ise 30 dakika bekleme süresinin ardından aynı şekilde feda edilerek mideleri çıkarılmıştır.

Çıkarılan mideler, %0.9'luk NaCl çözeltisi ile yıkandıktan sonra içerisinde 100 ml 0.1 N NaOH (Merck, C647762) bulunan beherlere alınmıştır. Mideler penset ve makas yardımı ile küçük parçalara ayrıldıktan sonra doku homojenizatörü ile (TRI-R STIR-R, Model K-43) 3500 rpm'de 30 saniye süre ile homojenize edilmiştir. Homojenatlar 1 saat boyunca oda ısısında bekletildikten sonra üstteki sıvı fazdan alınan 5'er ml örnek, 0.5 ml TCA (Carlo Erba, 411527) içeren tüplere aktarılmıştır. 2800 rpm'de 20 dakika süren santrifüj (Heraeus Labofuge-200) sonrasında elde edilen süpernatantlar, içerisinde 4 ml 0.5 N NaOH bulunan tüplere eklenmiş ve 10 saniye süreyle 40 Hz frekansta vorteks (Velp Scientifica-Zx³) uygulamasına tabi tutulmuştur. Daha sonra örnekler spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601) 560 nm dalga boyunda okunmuştur.

Elde edilen absorbans değerleri üzerinden mide boşalma hızları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmış ve % değer olarak ifade edilmiştir.

$$\text{Mide Boşalma Hızı (\%)} = 1 - (\text{Denek Mide Absorbansı} / \text{Standart Mide Absorbansı}) \times 100$$

Her hayvandan elde edilen örnekler iki ayrı seri olarak çalışılmış ve deney sonunda ortalamaları alınmıştır.

3.3.2. MMC Aktivitesinin Ölçümü

Serbest hareket eden uyanık sıçanlarda Kihara ve arkadaşlarının yöntemine göre yapılmıştır [146].

Prensip:

Mide ve duodenuma yerleştirilen kateterlere uygulanan sabit hızdaki sıvı infüzyon basıncında kasılmaya bağlı değişimlerin değerlendirilmesi esasına dayalıdır.

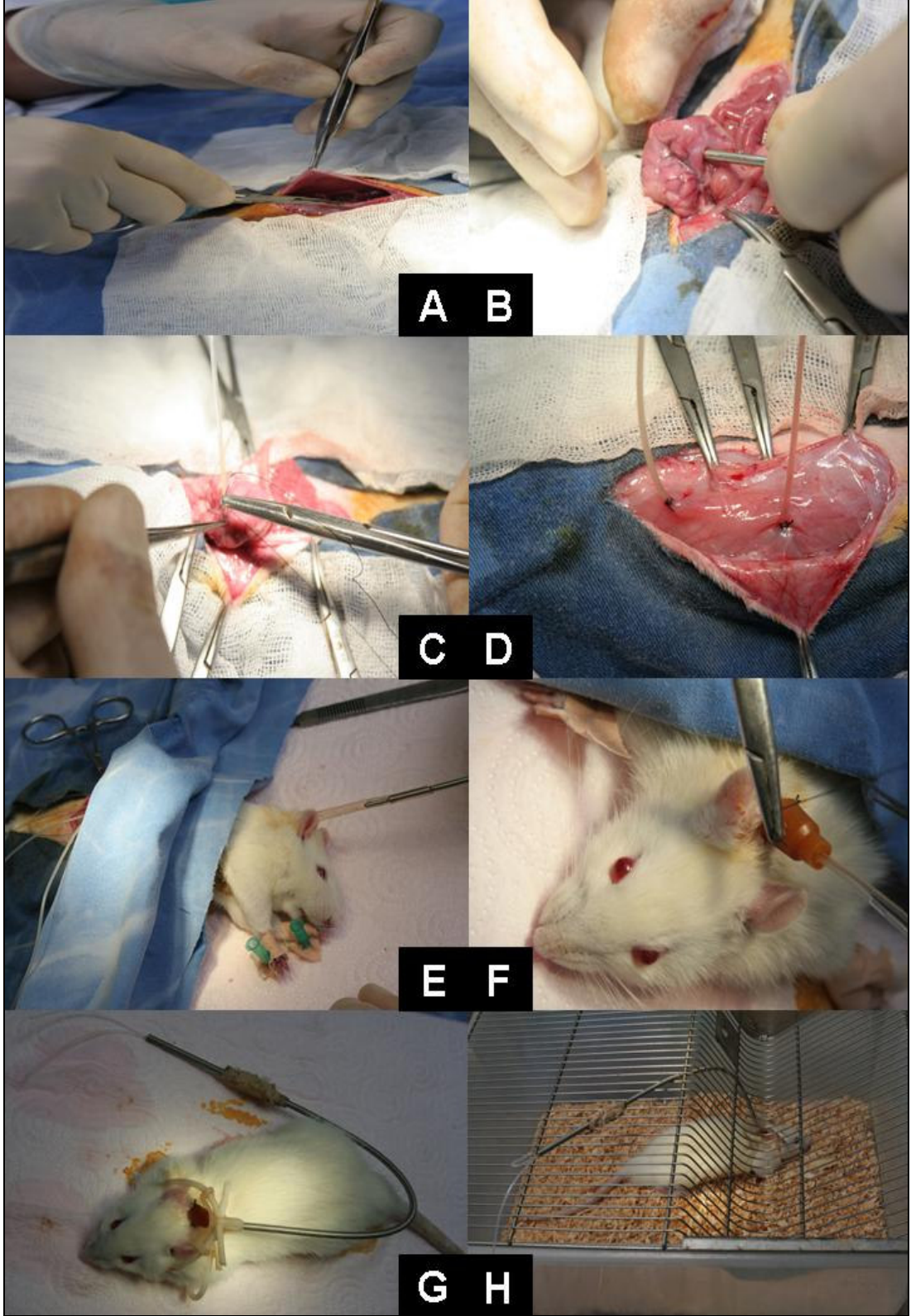
İşlemler:

Hayvanlar bir gece önceden yemleri alınıp aç bırakılmış, ertesi gün ksilazin ve ketamin anestezisi altında, tıraş ve dezenfeksiyon işlemlerini takiben cerrahi işlem uygulanmıştır. Tüm cerrahi işlemler steril koşullarda ve steril malzeme kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

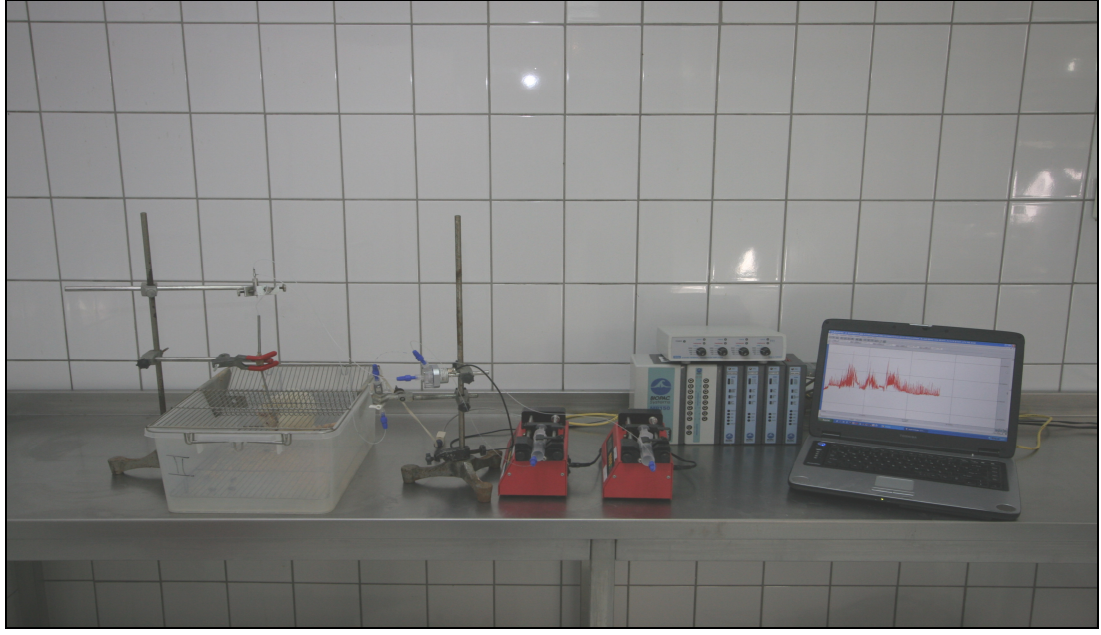
Şekil 3.2.'de görüldüğü gibi, karın bölgesinde orta hat üzerinden uygulanan kesi ile mide ve duodenum dışarı alınıp midenin antrum bölgesine, duodenumun ise pilorustan itibaren 3 cm distaline iç çapı 0.86 mm, dış çapı 1.27 mm olan polietilen kateterler (Harvard Apparatus-59-8330) yerleştirilmiştir. 12 G kalınlığında metal iğne kılavuzluğunda yerleştirilen kateterler, 5.0 ipek iplik ile uygulanan kese ağzı dikiş i ile organ duvarına sabitlenmiştir. Kateterler yine metal iğnenin yardımıyla karın bölgesindeki kaslarından geçirilmiş ve karın duvarına basit dikiş i ile tutturulmuştur. Karın bölgesinden ense bölgesine doğru deri altında oluşturulan kanaldan geçirilen kateterler ense derisine uygulanan kesiden dışarı çıkarılıp 3.0 ipek iplik ile uygulanan kese ağzı dikiş i yardımıyla sabitlenmiştir. Kas katmanları 4.0 katgüt; deri ise 3.0 ipek iplik ile dikilerek kapatılmıştır.

Vagotomi gruplarındaki hayvanlarda karın boşluğu açıldıktan sonra kateterler yerleştirilmeden önce subdiyafragmatik bilateral vagotomi yapılmış, ardından aynı cerrahi işlem uygulanmıştır.

Dışarı çıkarılan kateterlerin deney gününe kadar zarar görmemesi için hayvanların erişiminden infüzyon harness aparatı (Harvard Apparatus-BS4-61-0238) ile korunmuştur. Cerrahi işlem sonrasında analjezik olarak tramadol hidroklorür (20 mg/kg) ve antibiyotik olarak prokain penisilin G (100,000 IU/kg) uygulanmıştır. Kanamaya bağlı oluşabilecek tıkanmaları önlemek amacıyla kateterler heparin içeren %0.9'luk steril NaCl çözeltisi ile doldurulmuştur. Hayvanlar 1 haftalık toparlanma periyodunun ardından deneye alınmıştır. Deney süresince 3 tanesi cerrahi işlem sırasında, 4 tanesi ise toparlanma periyodunda olmak üzere toplam 7 hayvan kaybedilmiştir.



Şekil 3.2. MMC Aktivitesinin Ölçümünde Uygulanan Cerrahi İşlem. **A:**orta hat kesisi, **B:**kateterlerin yerleştirilmesi, **C:**kateterlerin organ duvarına sabitlenmesi, **D:**kateterlerin karın kaslarına sabitlenmesi, **E:**kateterlerin deri altından ilerletilerek enseden çıkarılması, **F:**kateterlerin ense bölgesine sabitlenmesi, **G:**kateterlerin hayvana giydirilen koruyucu aparat içinden geçirilmesi, **H:**hayvanın toparlanma periyodunu geçireceği kafesteki görüntüsü.



Şekil 3.3. MMC Aktivitesinin Ölçümü İçin Kullanılan Düzenek

Deney günü sıçanlar deneyin yapılacağı bölüme alınmış, deney düzeneğindeki bağlantılar yapıp, 30 dakika süre ile oda şartlarına alışmaları için bekletilmişlerdir. Şekil 3.3.'de görülen deney düzeneği şu cihaz ve malzemelerden oluşmaktadır:

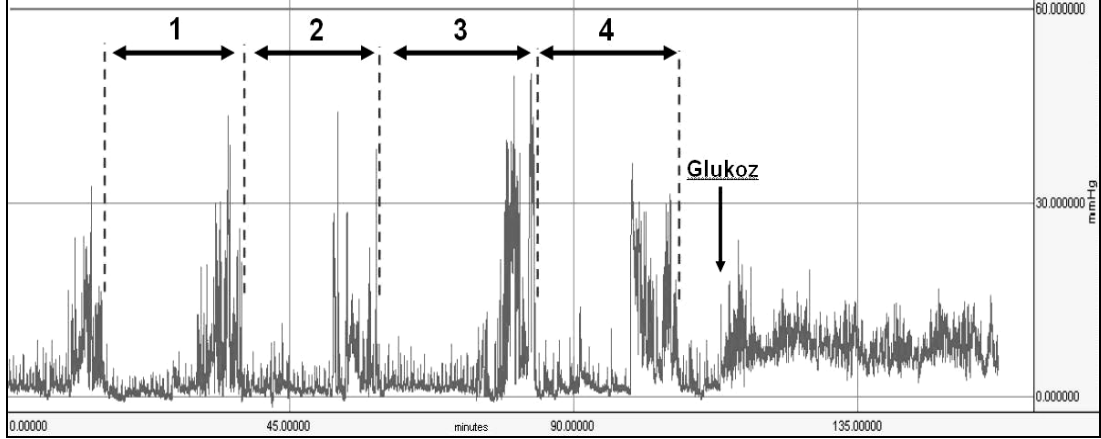
1. İnfüzyon pompaları (Kent Scientific-Genie Plus)
2. Basınç transducerları (Hugo Sachs P75-Type 379 ve Sasan-T-19000/B)
3. Çok kanallı transducer amplikatörü (MAY GTA-0303)
4. Çift kanallı swivel aparatı (Harvard Apparatus BS4-61-0003)
5. Biopac MP-150 sistemi
6. Kayıtların alınıp değerlendirildiği taşınabilir bilgisayar

Deney esnasında kateterler havası alınıp 37 °C'ye getirilmiş %0.9'luk steril NaCl çözeltisi ile infüze edilmiştir. İnfüzyon pompaları arada basınç transducer'ları olacak şekilde kateterlere seri şekilde bağlanmıştır. Transducer amplikatöründe gain: 1000, infüzyon pompalarında akım hızı 2 ml/saat olarak ayarlanmıştır. Kateterlerdeki ölü boşluk giderildikten sonra infüzyon ve kayıt işlemleri başlatılmıştır.

MMC'nin faz-III dönemine denk gelen ve düzenli kasılmaların gözleendiği aktiviteler dikkate alınarak 3 adet faz-III, diğer bir ifadeyle 2 adet MMC döngüsü elde edilene kadar kayda devam edilmiştir. Elde edilen veriler Biopac Data Acquisition yazılımından yararlanılarak bilgisayarda değerlendirilmiştir.

Şekil 3.4.'de MMC ölçümüne bir örnek verilmiştir. Şekilde X eksenini dakika birimi üzerinden zamanı, Y eksenini ise mmHg birimi üzerinden basıncı göstermektedir. Birbiri ardına seyreden faz-III kasılmalarının bitim noktaları arasındaki süre MMC döngüsünün süresi olarak hesaplanmıştır. Kaydın ilk 90

dakikalık kısmında tipik açlık paterni görülmekte olup 4 adet MMC döngüsü kaydedilmiştir. Dördüncü MMC döngüsünün ardından duodenal kateter yoluyla uygulanan 1.5 ml %30'luk glukoz çözeltisi açlık paternini bozmuş ve düzensiz elektro-motor aktivite ile karakterize tokluk paterninin oluşmasına neden olmuştur.



Şekil 3.4. MMC Döngüsünün Kaydı

3.3.3. Mide Asit Sekresyonu Ölçümü

Vagotomiden 1 hafta sonra cerrahi işlemin başarısının doğrulanması amacıyla 6 adet hayvanda mide asit sekresyonu ölçümü yapıp, elde edilen mide asit sekresyonu değerleri kontrol hayvanları ile kıyaslanmıştır.

Prensip:

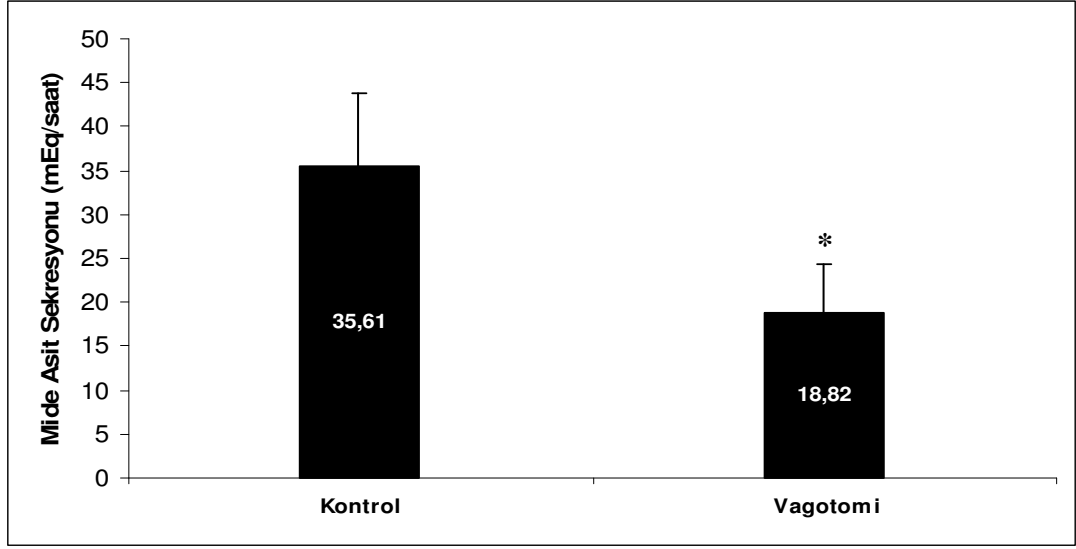
Belli bir zaman aralığında mideden toplanan sıvı örneğindeki HCl miktarı NaOH ile titre edilerek hesaplanmıştır.

İşlemler:

Orta hat kesisi ile sıçanların mideleri dışarı alınmış, midenin distal bölümüne sıvı toplamak amacıyla kateterizasyon işlemi uygulanmıştır. Mideler distile su ile yıkanarak içerikten arındırıldıktan sonra 2 ml distile su verilip 30 dakika sonra geri alınmış ve 0.01 N'lik NaOH ile titre edilmiştir. Titrasyon sonunda harcanan NaOH miktarları kaydedilmiş ve aşağıdaki formülden yararlanılarak mide asit sekresyonları mEq/L cinsinden hesaplanmıştır.

$$\text{HCl sekresyonu} = \text{NaOH(ml)} \times 0.01(\text{N}) \times \text{verilen sıvı miktarı (ml)} \times \text{süre katsayısı} \times 1000$$

Şekil 3.5.'de görüldüğü üzere, vagotomi işlemi mide asit sekresyonunda istatistiksel olarak önemli bir azalmaya neden olmuştur ($p < 0.05$).



Şekil 3.5. Mide Asit Sekresyonu Ölçümleri. (Her grup için n=3).

* p<0.05 Tok grubundan fark

3.3.4. Plazma Oreksin-A Analizi

MMC aktivitesinin ölçümünden sonra hayvanlar eter anestezisi altında kansızlaştırma yöntemi ile feda edilmiştir. Alınan kan örneklerinden elde edilen plazmalardaki oreksin-A düzeyi RIA yöntemi ile ticari kit (Phoenix, RK-003-30) kullanılarak ölçülmüştür.

Kan örnekleri vakumlu antikoagulan içeren tüplere alındıktan sonra içlerinde 0.6 TIU/ml aprotinin (Celliance, 7108) bulunan buzda soğutulmuş ependorf tüplerine nakledilip, 4°C'de 1600 g hızda 15 dakika süre ile santrifüj (Heraeus, Biofuge 15R) edilmiştir. Santrifüj sonrasında plazma örnekleri ayrılıp RIA analizi için -80 °C'de saklanmıştır.

Prensip:

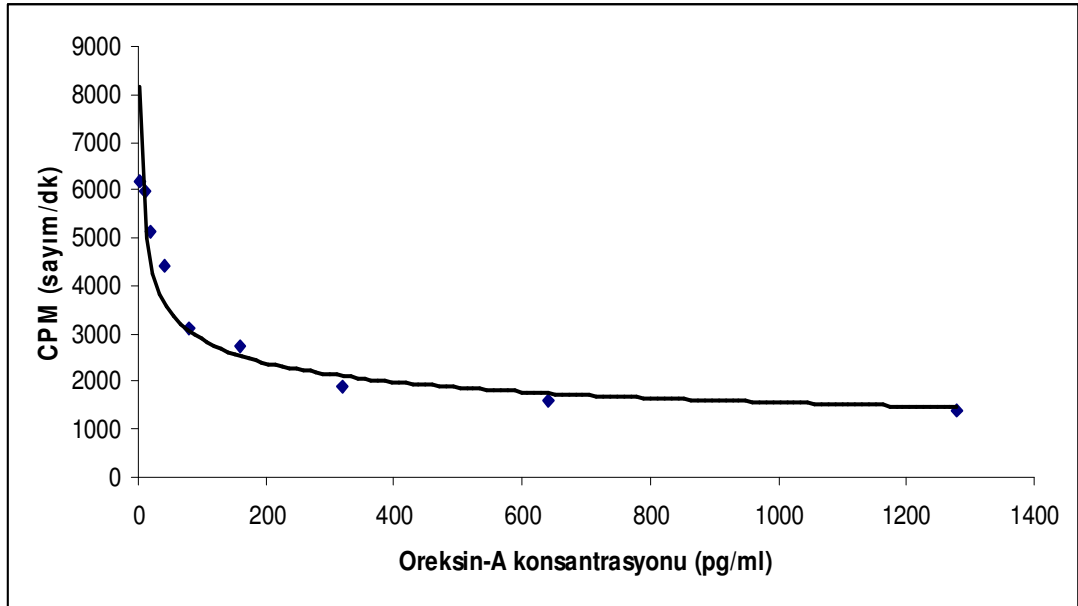
Yöntem kit içerisinde bulunan I¹²⁵ işaretli peptid ile ölçümü yapılan peptid arasındaki yarışmayı temel alan bir antijen-antikor reaksiyonudur.

İşlemler:

Oreksin-A kiti ve plazmalar oda ısısına getirildikten sonra,

1. Total sayım (TC), non-spesifik bağlanma (NSB), total bağlanma (TB), standart tüpleri, kontrol tüpleri ve çalışma tüpleri hazırlanmıştır.
2. Standartlar (1-128 pg/tüp olacak şekilde) dilüe edilmiştir.
3. Standart, kontrol ve çalışma serumları 100µL olarak RIA tüplerine eklenmiştir.
4. NSB tüpüne 200µL RIA buffer eklenmiştir.
5. TB tüpüne 100µL RIA buffer eklenmiştir.

6. TC ve NSB tüpleri dışındaki tüplere 100µL primer antikor (tavşan anti-peptide serumu) eklenip, tüm tüpler vortekslenmiştir.
7. Tüplerin üstü kapatılarak 24 saat 4°C’de inkübe edilmiştir.
8. I¹²⁵ ile işaretli peptid 8000-10000 cpm/100 µL olacak şekilde tüm tüplere 100’er µL eklenmiştir.
9. Tüpler vortekslenedikten sonra üzerleri kapatılarak 24 saat 4°C’de inkübe edilmiştir.
10. TC dışındaki tüplere 100’er µL normal tavşan serumu ile keçi anti-tavşan IgG serumu eklenmiştir.
11. Tüpler vortekslenedikten sonra, oda ısısında 90 dakika bekletilmiştir.
12. TC dışındaki tüplere 500 µL RIA buffer eklenip, tüpler vortekslenmiştir.
13. 4°C’de 3000 rpm’de 20 dakika santrifüjün ardından süpernatantlar dökülüp, peletler alınmıştır.
14. Peletlerin olduğu tüpler gama counter cihazında (DPC, Gambyte 20) 2 dakika boyunca saydırılmış, sayımlar CPM (count per minute) olarak kaydedilmiştir.
15. Standart grafiği (Şekil 3.4.) çizilmiş ve bu grafiğe bağlı olarak örneklerdeki oreksin-A miktarı pg/ml şeklinde hesaplanmıştır.



Şekil 3.6. Oreksin-A Standart Grafiği

3.3.5. Preprooreksin Analizi

Mide ve hipotalamus dokularında western blot yöntemi ile yapılmıştır. Deneylerin ardından kansızlaştırma yöntemi ile feda edilen hayvanların mide ve hipotalamus dokuları çıkarılıp deney gününe kadar sıvı nitrojen içerisinde saklanmıştır. Doku örneklerinde ölçülebilir miktarda oreksin-A proteini tespit edilememiş, fakat oreksin-A için bir gösterge olarak kabul edilen preprooreksin proteini saptanmıştır.

3.3.5.1. Numunelerin Hazırlanması

Sıvı nitrojenden çıkarılan örnekler önce sonikasyon için, buz üstünde küçük parçalara ayrılmıştır. 0.2 g doku için 600 µl lysis tampon ve lysis tampon + doku karışımının her 1 ml'si için 50 µl olacak şekilde protein inhibitör kokteyli (Sigma, 9417) eklenerek vortekslenmiş, buz içinde 30 dk bekletildikten sonra 15000 rpm de 4°C de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar hemen buz kalıbına alınmış ve örneklerin protein analizleri ticari protein kiti ile yapılmıştır (Pierce, 23236). Örnekler SDS jele yüklenmeden önce laemli tamponu ile karıştırılarak 5 dk kaynatılmış ve yüklemeye hazır hale getirilmiştir.

3.3.5.2. Elektroforez ve Antikorların Uygulanması

Elektroforez ve blotting aşamalarında BioRad Mini Protean 3 sistemi kullanılmıştır. Örnekler içerdikleri proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrışmaları için % 18'lik sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jele yüklenmiştir. Her örnek için 100 µg/ml protein içerecek şekilde hazırlanmıştır. Moleküler ağırlık standartı (Amersham, RPN 755) ve numuneler önce 80V (yükleme jelinde) sonra 100V (ayırışma jelinde) da elektroforez edilmiştir (BioRad, PowerPac-300). Jeldeki proteinler nitroselüloz membrana aktarıldıktan sonra, membran, % 5'lik süttozu (Biorad, 170-6404) içeren TBS tamponu kullanılarak 1 saat oda ısısında çalkalayıcı (Edmund Bühler, SM-30) üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında TBST ile 1-2 defa yıkanan membran TBST ile hazırlanmış %5'lik BSA ve primer antikorları (Chemicon, Anti-Orexin, AB3096, 1/500) içeren solüsyon ile 4°C'de çalkalayıcı (ABC Labo, Model SR-40) üzerinde 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası membran TBST ile 3-10 dakika yıkanarak fazla antikorlar uzaklaştırılmış, ardından membran, %5'lik süt tozu ve 1:3000 oranında dilüe edilmiş sekonder antikor içeren TBST tamponu ile 1 saat 22°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası TBST ile 3-10 dk yıkama yapılmış ve membranlar görüntüleme aşaması için hazır hale getirilmiştir.

3.3.5.3. Görüntüleme ve Değerlendirme

Sekonder antikorla konjuge peroksidaz enziminin, kemiluminisans oluşturan ürünü için substrat içeren ECL reaksiyon karışımı (Cemiluent detection system, Chemicon-2600), nitroselüloz membranların üzerine uygulanmış ve karanlıkta 5 dk bekletilmiştir. Bekleme süresi sonrasında membranların üzerindeki ECL solüsyonu kurutma kağıdı ile alınarak membranlar ve fotoğraf filmi western kasetine yerleştirilmiş membrandaki antikor bağlanmalarının görüntüsü fotoğraf filmine (Hyperfilm) aktarılmıştır.

Görüntülerin yarı kantitatif analizi için bilgisayar ortamına aktarılan film paternleri, bilgisayar yazılımı (image-J programı) yardımı ile değerlendirilmiş ve sonuçlar her grup için beta aktin protein miktarına oranlanarak hesaplanmıştır.

3.3.6. İmmünohistokimya

3.3.6.1. Dokuların Hazırlanması

Deney gruplarından elde edilen mide dokusu örnekleri %10'luk formalin fiksatifinde tespit edildikten sonra 6-7 saat musluk suyunda yıkanan dokular sıra ile %70, %80, %90 ve %100'lük alkol serilerinde 24'er saat tutularak dehidrasyon işleminden geçirilmiştir. Ksilol içinde 3 defa 5-7'şer dakika bekletilerek

şeffaflaştırılan örnekler 58°C'ye ayarlı etüvde dokular 3 defa 1'er saatlik parafin banyosunda tutulduktan sonra etüv dışında temiz erimiş parafin ile bloklanmıştır. Parafin bloklardan alınan 5 mikrometre kalınlığındaki kesitlere rutin ışık mikroskopik ve immünohistokimyasal teknikler uygulanmıştır.

3.3.6.2. Işık Mikroskopik Gözlemler

Sekiz gruba ait örneklerden 5'er mikrometre kalınlığında kesitler alınıp, hematoksilin-eozin boyaması yapılarak ışık mikroskobu (Axioplan Zeiss, Almanya) ile incelenmiştir.

3.3.6.3. İmmünohistokimyasal Protokol

Polilizin ile kaplı lamlara alınan 5 mikrometre kalınlığındaki parafin kesitler 1 gece boyunca 56°C'ye ayarlanmış etüvde tutulduktan sonra deparafinizasyon için 3 defa 10'ar dakika ksilolden geçirilmiştir. Daha sonra derecesi giderek azalan alkol serilerinde (%100, %90, %80, %70) 5'er dakika bekletilip, distile suda 5 dakika çalkalanan doku örneklerindeki antijenik maskelenmenin ortadan kaldırılması için kesitler, 200 ml sitrat tamponu (pH:6.0; 900 ml distile suda 2.1 gr sitrik asit) içine alınmış ve mikrodalga fırında (931 watt) iki defa 5'er dakika tutulmuştur. Bu işlemde sonra kesitler sitrik asit solüsyonu içerisinde 20 dakika oda ısısında bekletilmiş ve dokuların çevresi hidrofobik kalemle çizildikten sonra 3 defa 5'er dakika fosfat tamponlu tuz çözeltisinden (PBS; pH: 7.2-7.4) geçirilmiştir. Bir sonraki basamakta dokulardaki hidrojen peroksidad aktivitesini ortadan kaldırmak için 30 dakika boyunca hidrojen peroksit solüsyonu (13.5 ml metanol içerisinde 1.5 ml H₂O₂) ile muamele edilmiştir. Kesitler 3 defa 5'er dakika PBS'te yıkandıktan sonra dokulardaki özgül olmayan antikor bağlanmasını önlemek amacıyla oda sıcaklığında blokama serumu (Ultra UV Block, LabVision Corporation TA-125UB) ile 5 dakika muamele edildikten sonra, serumun fazlası alınarak primer antikor (Chemicon, Anti-Orexin, AB3096; 1/200) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Kontrol kesitlerine uygun serum ya da izotip IgG uygulanmıştır. Kesitlere inkübasyondan sonra, 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkama işlemi yapıldıktan sonra sırasıyla 20 dakika biyotinli sekonder antikor (DAKO, LSAB-2 system HRP code no:K0609) ve 20 dakika streptavidin-peroksidad kompleksi (DAKO, LSAB-2 system HRP code no:K0609) ile inkübe edilmiştir. Her iki uygulama sonrasında da PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkama yapılmış ve sinyali geliştirmek için dokular amino etil karbozol (AEC) kromojeni (Lab Vision Corporation, TA-125-UD) ile ortalama 3-5 dakika muamele edilmiştir. Distile suya alınıp hematoksilin ile zıt boyama yapılan kesitler tekrar distile suda çalkalandıktan sonra 1-2 dakika akar musluk suyunda yapılan yıkamanın ardından Kaiser's glycerol gelatine (MERCK, OB 514196, Darmstadt, Germany) marka kapatma solüsyonu ile kapatılmış ve axioplan mikroskopunda (Zeiss, Almanya) incelenip fotoğraflandırılmıştır.

3.3.6.4. Morfometrik Değerlendirme

Tüm deney gruplarından elde edilen mide dokusu örnekleri oreksin-A için immünohistokimyasal yöntemle boyandıktan sonra oreksin-A immünopozitif hücreler 40x ışık mikroskobu büyütmesinde sayılarak istatistiksel analiz için her bir mide örneğinden 4 farklı preparat, her preparattan 3 farklı alanın ortalamalarına ait değerler hesaplanmıştır.

3.3.6.5. Semikantitatif Değerlendirme

Tüm deney gruplarında oreksin-A için pozitif boyanan hücrelerin immünoboyanma yoğunlukları semikantitatif olarak [0:Negatif; (+):Zayıf pozitif; +:Pozitif; ++: Yoğun pozitif; +++: Çok yoğun pozitif] şeklinde değerlendirilmiştir.

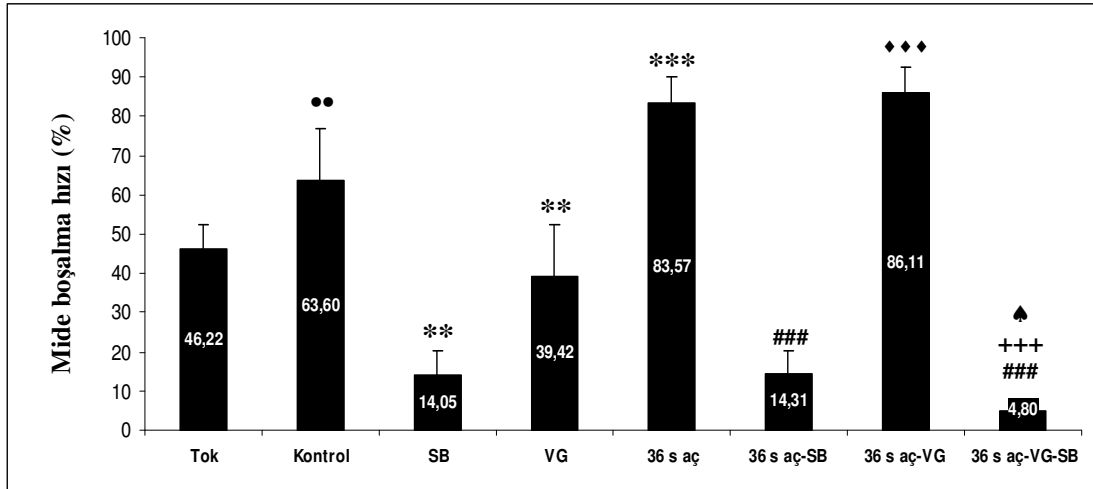
3.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS 13.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk Testi ile test edilmiş, uygun olduğu durumlarda gruplar arası farklılıklar varyans analizi, ikili gruplar arasındaki farklar T Testi; uygun olmadığı durumlarda ise gruplar arası farklılıklar Kruskal-Wallis Testi, ikili gruplar arasındaki farklar Mann-Whitney U Testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde ifade edilmiş olup, yapılan bütün analizlerde $p < 0.05$ 'i sağlayan değerler istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

BULGULAR

4.1. Mide Boşalma Hızı

Mide boşalma hızları Şekil 4.1.'de verilmiştir. Mide boşalma hızı Kontrol grubunda Tok gruba göre önemli ölçüde artmıştır ($p<0.01$). 36 s aç grubunda Kontrol grubuna göre önemli derecede artış saptanmış olup ($p<0.001$), bu artış SB-334867 uygulaması ile ortadan kaldırılmış ($p<0.001$) ve Kontrol değerlerinden daha düşük bulunmuştur. Vagotomi uygulaması 36 saatlik açlık uygulamasının mide boşalma hızına olan bu etkisini değiştirmemiştir. Vagotomi ve SB-334867'nin ayrı ayrı uygulamaları mide boşalma hızını Kontrol grubuna göre önemli derecede düşürürken ($p<0.01$), 36 saat açlık uygulanan deneklerde vagotomi ile birlikte uygulanan SB-334867, mide boşalma hızını 36 s aç-SB grubuna benzer şekilde inhibe etmiştir ($p<0.001$; 36 s aç-VG grubundan fark).



Şekil 4.1. Mide Boşalma Hızları.

•• $p<0.01$ Tok grubundan fark; ** $p<0.01$ Kontrol grubundan fark; *** $p<0.001$ Kontrol grubundan fark; ### $p<0.001$ 36 s aç grubundan fark; ◆◆◆ $p<0.001$ VG grubundan fark; ▲ $p<0.05$ 36 s aç-SB grubundan fark; +++ $p<0.001$ 36 s aç-VG grubundan fark. (Her grup için $n=9$).

Tok: Açlık uygulanmayan

Kontrol: 18 saat açlık uygulaması

SB: 18 saat açlık + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

VG: 18 saat açlık + vagotomi uygulaması

36 s aç: 36 saat açlık uygulaması

36 s aç-SB: 36 saat açlık + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

36 s aç-VG: 36 saat açlık + vagotomi uygulaması

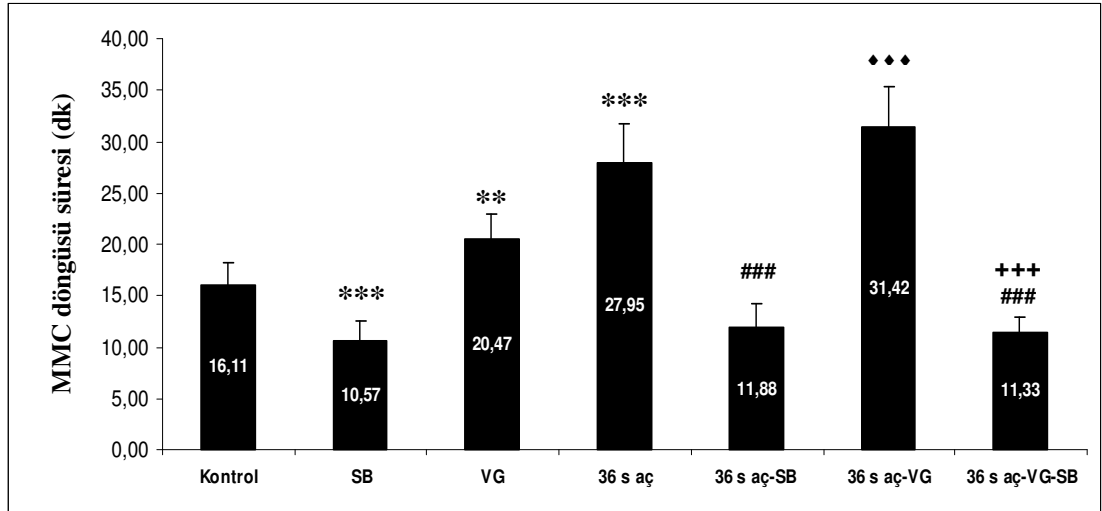
36 s aç-VG-SB: 36 saat açlık + vagotomi + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

4.2. MMC Aktivitesinin Ölçümü

4.2.1. MMC Döngüsü Süresi

MMC döngüsü süreleri Şekil 4.3.'de verilmiştir. MMC döngüsünün uzunluğu 36 saat açlık uygulaması ile Kontrol grubuna göre önemli derecede artmış olup ($p<0.001$), bu artış OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması ile ortadan kaldırılmıştır ($p<0.001$). Vagotomi uygulaması 36 saat açlığa bağlı gözlenen bu etkide herhangi bir değişikliğe neden olmamış, vagotomi ve SB-334867'nin birlikte uygulanması 36 saatlik açlığın MMC döngüsü üzerine olan inhibe edici etkisinin tamamen ortadan kalkmasına ve Kontrol değerlerinin altına inmesine neden olmuştur ($p<0.001$; 36 s aç-VG grubundan fark).

Subdiyafragmatik bilateral vagotomi işleminin 18 saat açlık uygulaması ile elde edilen MMC döngüsü üzerine inhibitör etkisi tespit edilmiştir ($p<0.01$). SB-334867 uygulaması ise MMC döngüsünün kontrol grubundan daha kısa sürmesine neden olmuştur ($p<0.001$).



Şekil 4.2. MMC Döngüsü Süreleri.

** $p<0.01$ Kontrol grubundan fark; *** $p<0.001$ Kontrol grubundan fark; ### $p<0.001$ 36 s aç grubundan fark; ◆◆◆ $p<0.001$ VG grubundan fark; +++ $p<0.001$ 36 s aç-VG grubundan fark. (Her grup için $n=8$).

Kontrol: 18 saat açlık uygulaması

SB: 18 saat açlık + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

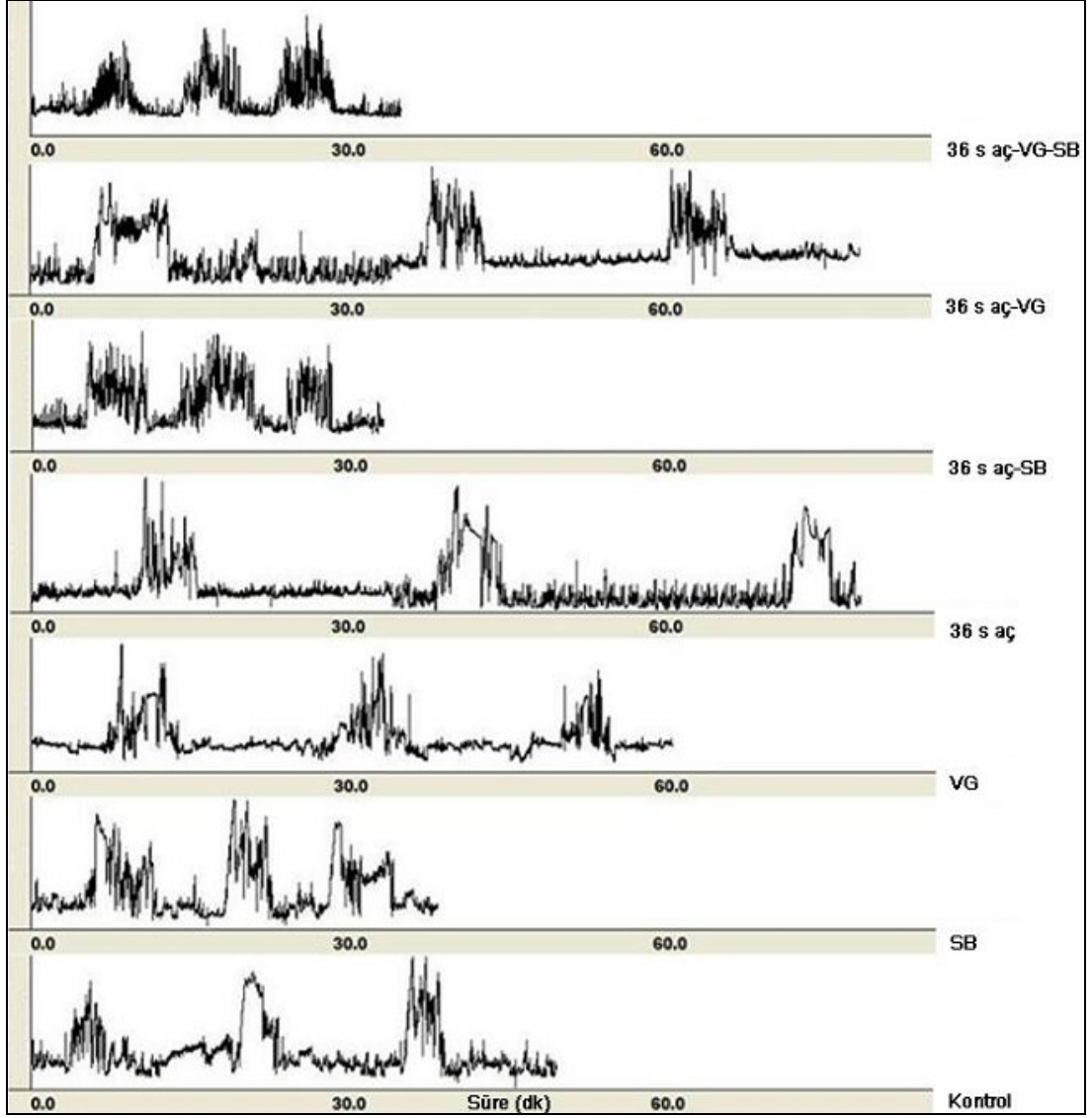
VG: 18 saat açlık + vagotomi uygulaması

36 s aç: 36 saat açlık uygulaması

36 s aç-SB: 36 saat açlık + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

36 s aç-VG: 36 saat açlık + vagotomi uygulaması

36 s aç-VG-SB: 36 saat açlık + vagotomi + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

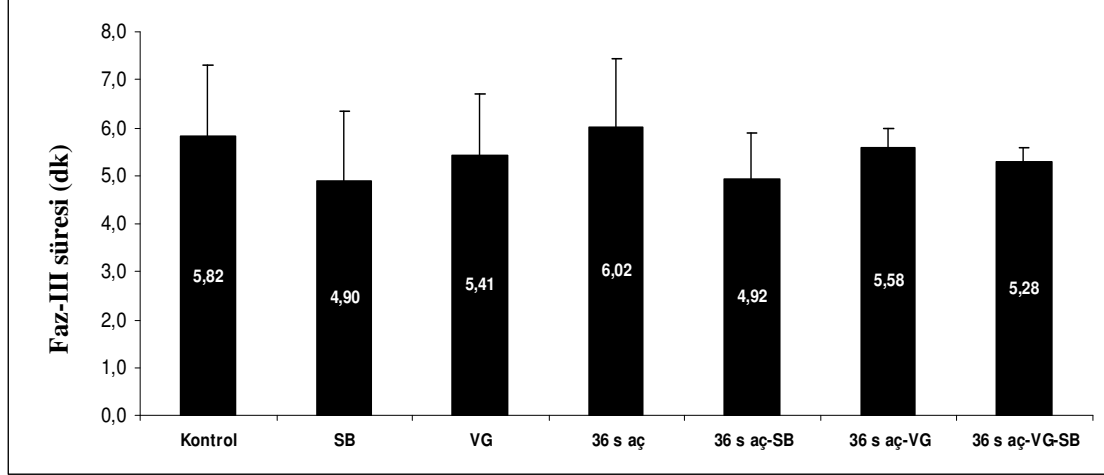


Şekil 4.3. MMC Aktivitesi Kayıtları.

- Kontrol:** 18 saat açlık uygulaması
SB: 18 saat açlık + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması
VG: 18 saat açlık + vagotomi uygulaması
36 s aç: 36 saat açlık uygulaması
36 s aç-SB: 36 saat açlık + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması
36 s aç-VG: 36 saat açlık + vagotomi uygulaması
36 s aç-VG-SB: 36 saat açlık + vagotomi + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

4.2.2. Faz-III Süresi

MMC döngülerine ait faz-III süreleri Şekil 4.5.'de verilmiştir. MMC döngüsünün faz-III süreleri açısından gruplar arasında istatistiksel öneme sahip bir farklılık bulunmamıştır.



Şekil 4.4. Faz-III süreleri.

Kontrol: 18 saat açlık uygulaması

SB: 18 saat açlık + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

VG: 18 saat açlık + vagotomi uygulaması

36 s aç: 36 saat açlık uygulaması

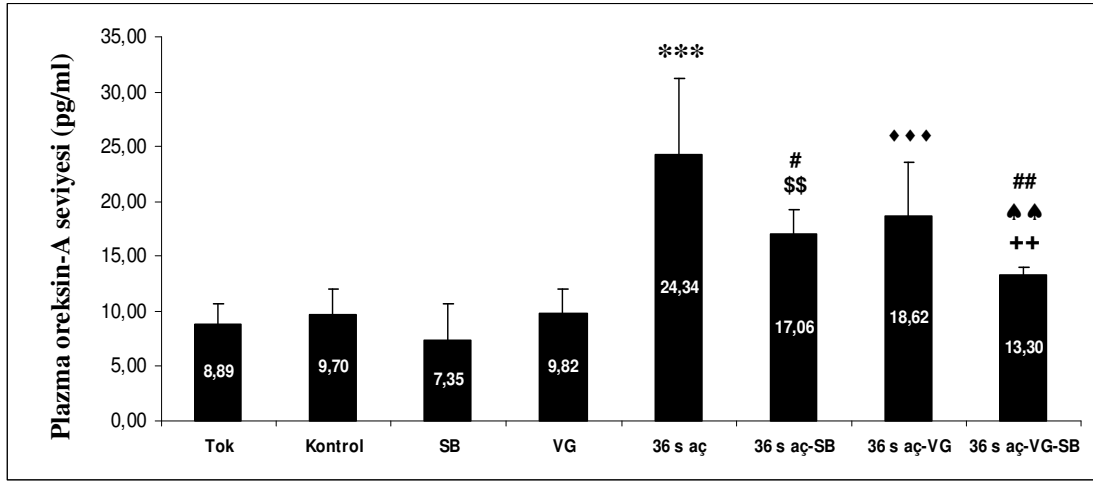
36 s aç-SB: 36 saat açlık + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

36 s aç-VG: 36 saat açlık + vagotomi uygulaması

36 s aç-VG-SB: 36 saat açlık + vagotomi + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

4.3. Plazma Oreksin-A Seviyeleri

Plazma oreksin-A seviyeleri Şekil 4.6.'de verilmiştir. SB-334867 veya vagotomi uygulaması plazma oreksin-A düzeyinde, kontrol grubuna göre herhangi bir değişiklik yapmamıştır. Deneklerin 36 saat süre ile aç bırakılması plazma oreksin-A miktarının artışına neden olmuştur ($p<0.001$; kontrol grubundan fark). 36 saat aç bırakılan deneklere SB-334867 uygulanması oreksin-A düzeyini azaltmış ($p<0.05$, 36 s aç grubundan fark), vagotomi uygulaması herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Plazma oreksin-A düzeyindeki azalma en fazla her iki işlemin birlikte uygulandığı 36 s aç-VG-SB grubunda görülmüş olup, 36 s aç-SB ve 36 s aç-VG gruplarına göre istatistiksel olarak önemli fark tespit edilmiştir (her iki grup için $p<0.01$).



Şekil 4.5. Plazma Oreksin-A Seviyeleri.

*** $p<0.001$ Kontrol grubundan fark; # $p<0.05$ 36 s aç grubundan fark; ## $p<0.01$ 36 s aç grubundan fark; \$\$\$ $p<0.01$ SB grubundan fark; ◆◆◆ $p<0.001$ VG grubundan fark; ▲▲ $p<0.01$ 36 s aç-SB grubundan fark; ++ $p<0.01$ 36 s aç-VG grubundan fark. (Her grup için $n=8$).

Tok: Açlık uygulanmayan

Kontrol: 18 saat açlık uygulaması

SB: 18 saat açlık + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

VG: 18 saat açlık + vagotomi uygulaması

36 s aç: 36 saat açlık uygulaması

36 s aç-SB: 36 saat açlık + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

36 s aç-VG: 36 saat açlık + vagotomi uygulaması

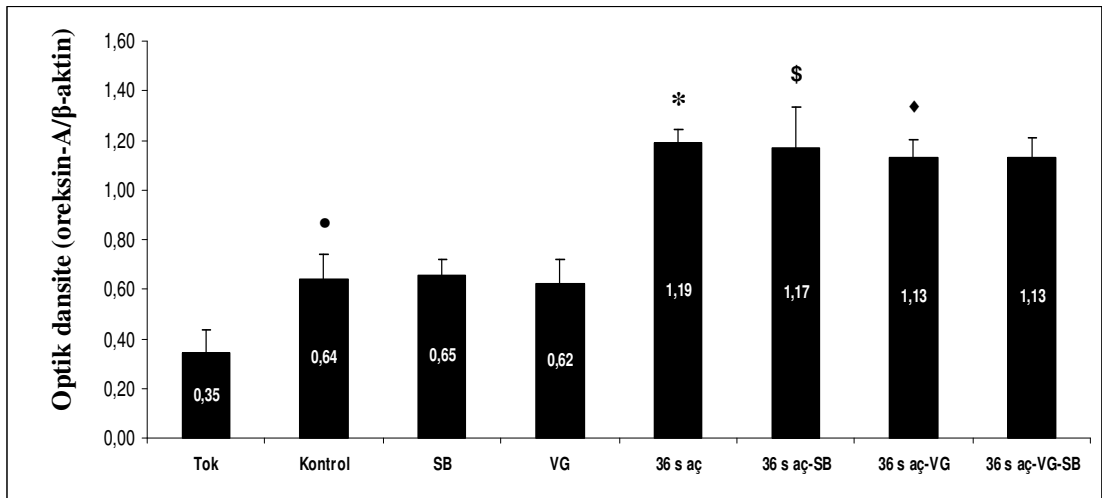
36 s aç-VG-SB: 36 saat açlık + vagotomi + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

4.4. Preproreksin Analizi

Mide ve hipotalamik doku örneklerinde ölçülebilir miktarda oreksin-A proteinine rastlanmamış olup, oreksin-A ekspresyonunun göstergesi olarak preproreksin tespit edilmiştir.

4.4.1. Midede Preproreksin Analizi

Midedeki preproreksin proteinine ait optik dansite değerleri Şekil 4.7.'de verilmiştir. Midede preproreksin ekspresyonunun açlığa bağlı uyarıldığı saptanmıştır. 18 saatlik açlık uygulaması Tok gruba göre, 36 saatlik açlık uygulaması ise Kontrol grubuna göre preproreksin ekspresyonunu anlamlı derecede arttırmış ($p<0.05$), bu deneklere SB-334867 veya vagotomi uygulanması preproreksin miktarını değiştirmemiştir.



Şekil 4.6. Midede Preproreksin Ekspresyonu.

- $p<0.05$ Tok grubundan fark; * $p<0.05$ Kontrol grubundan fark; \$ $p<0.05$ SB grubundan fark ; ♦ $p<0.05$ VG grubundan fark. (Her grup için $n=4$).

Tok: Açlık uygulanmayan

Kontrol: 18 saat açlık uygulaması

SB: 18 saat açlık + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

VG: 18 saat açlık + vagotomi uygulaması

36 s aç: 36 saat açlık uygulaması

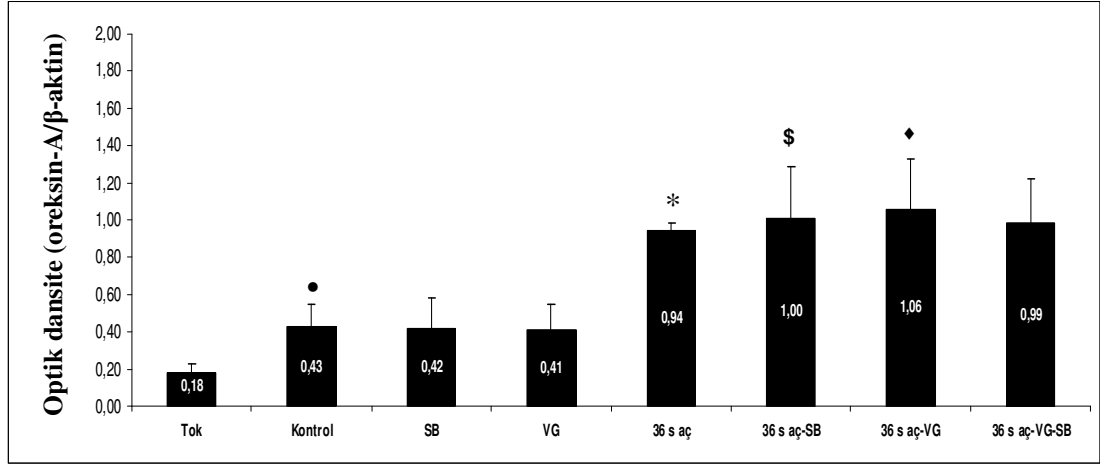
36 s aç-SB: 36 saat açlık + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

36 s aç-VG: 36 saat açlık + vagotomi uygulaması

36 s aç-VG-SB: 36 saat açlık + vagotomi + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

4.4.2. Hipotalamusta Preprooreksin Analizi

Hipotalamustaki preprooreksin proteinine ait optik dansite değerleri Şekil 4.8.'de verilmiştir. Hipotalamusta preprooreksin ekspresyonunun açlığa bağlı olarak uyarıldığı saptanmıştır. 18 saatlik açlık uygulaması Tok gruba göre, 36 saatlik açlık uygulaması ise Kontrol grubuna göre preprooreksin ekspresyonunu anlamlı derecede arttırmış (p<0.05), bu gruplara SB-334867 veya vagotomi uygulaması preprooreksin sentezinde bir değişikliğe neden olmamıştır.



Şekil 4.7. Hipotalamusta Preprooreksin Ekspresyonu.

- p<0.05 Tok grubundan fark; * p<0.05 Kontrol grubundan fark; \$ p<0.05 SB grubundan fark ; ♦ p<0.05 VG grubundan fark. (Her grup için n=4).

Tok: Açlık uygulanmayan

Kontrol: 18 saat açlık uygulaması

SB: 18 saat açlık + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

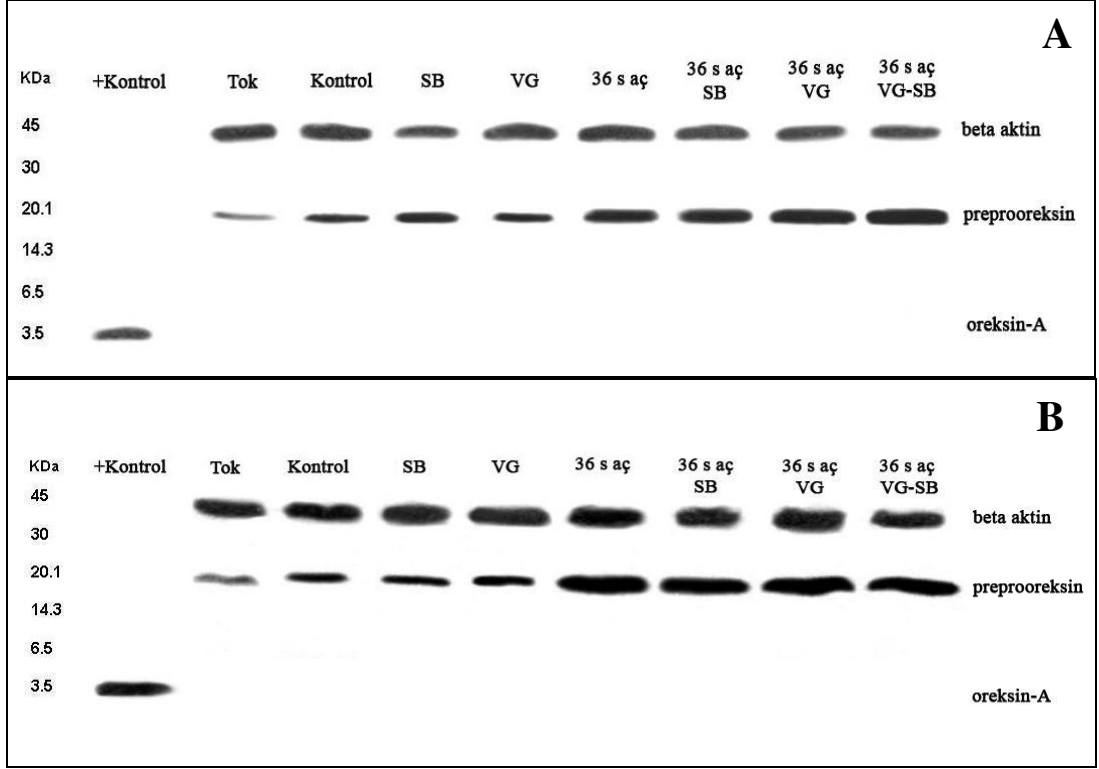
VG: 18 saat açlık + vagotomi uygulaması

36 s a: 36 saat açlık uygulaması

36 s a-SB: 36 saat açlık + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

36 s a-VG: 36 saat açlık + vagotomi uygulaması

36 s a-VG-SB: 36 saat açlık + vagotomi + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması



Şekil 4.8. Preprooreksin Ekspresyonları. A:Hipotalamus; B:Mide

Tok: Açlık uygulanmayan

Kontrol: 18 saat açlık uygulaması

SB: 18 saat açlık + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

VG: 18 saat açlık + vagotomi uygulaması

36 s aç: 36 saat açlık uygulaması

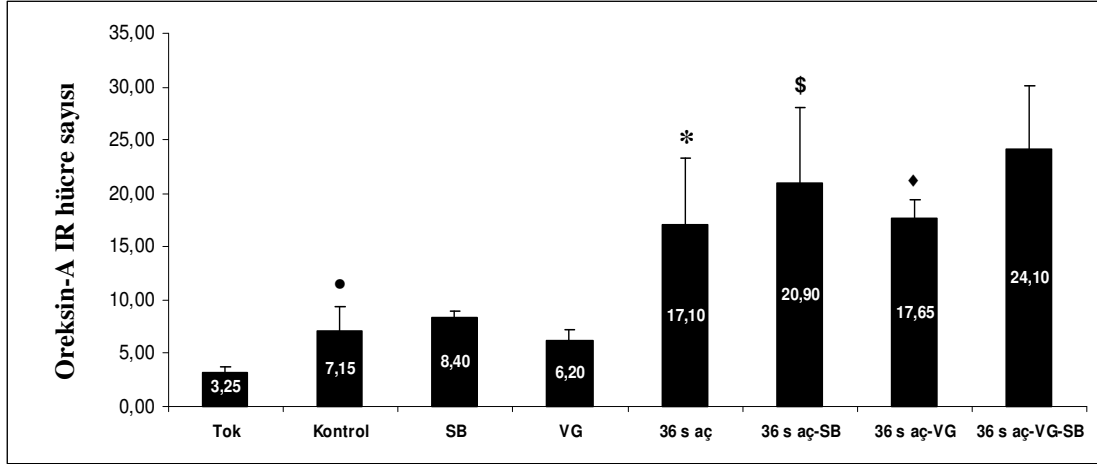
36 s aç-SB: 36 saat açlık + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

36 s aç-VG: 36 saat açlık + vagotomi uygulaması

36 s aç-VG-SB: 36 saat açlık + vagotomi + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

4.5. İmmunohistokimyasal Bulgular

Midenin fundus, korpus ve antrum bölgelerinden alınan doku kesitlerinde yapılan immünohistokimyasal gözlemler neticesinde oreksin-A immünoaktivitesi sadece antral bölgede tespit edilmiştir. Bu bölgede oreksin-A antikoru ile boyanan hücre sayısı açlığa bağlı olarak artış göstermiştir (Şekil 4.11). 18 saat açlık uygulaması Tok grubuna göre, 36 saatlik açlık uygulaması Kontrol grubuna göre oreksin-A immünoaktif hücre sayısını anlamlı derecede arttırmış ($p<0.05$), vagotomi veya SB-334867 uygulaması hücre sayısında değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.9. Mide Dokusunda Oreksin-A Antikoru ile İmmunopozitif Boyanan Hücre Sayıları.

- $p<0.05$ Tok grubundan fark; * $p<0.05$ Kontrol grubundan fark; \$ $p<0.05$ SB grubundan fark; ♦ $p<0.05$ VG grubundan fark. (Her grup için $n=5$).

Tok: Açlık uygulanmayan

Kontrol: 18 saat açlık uygulaması

SB: 18 saat açlık + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

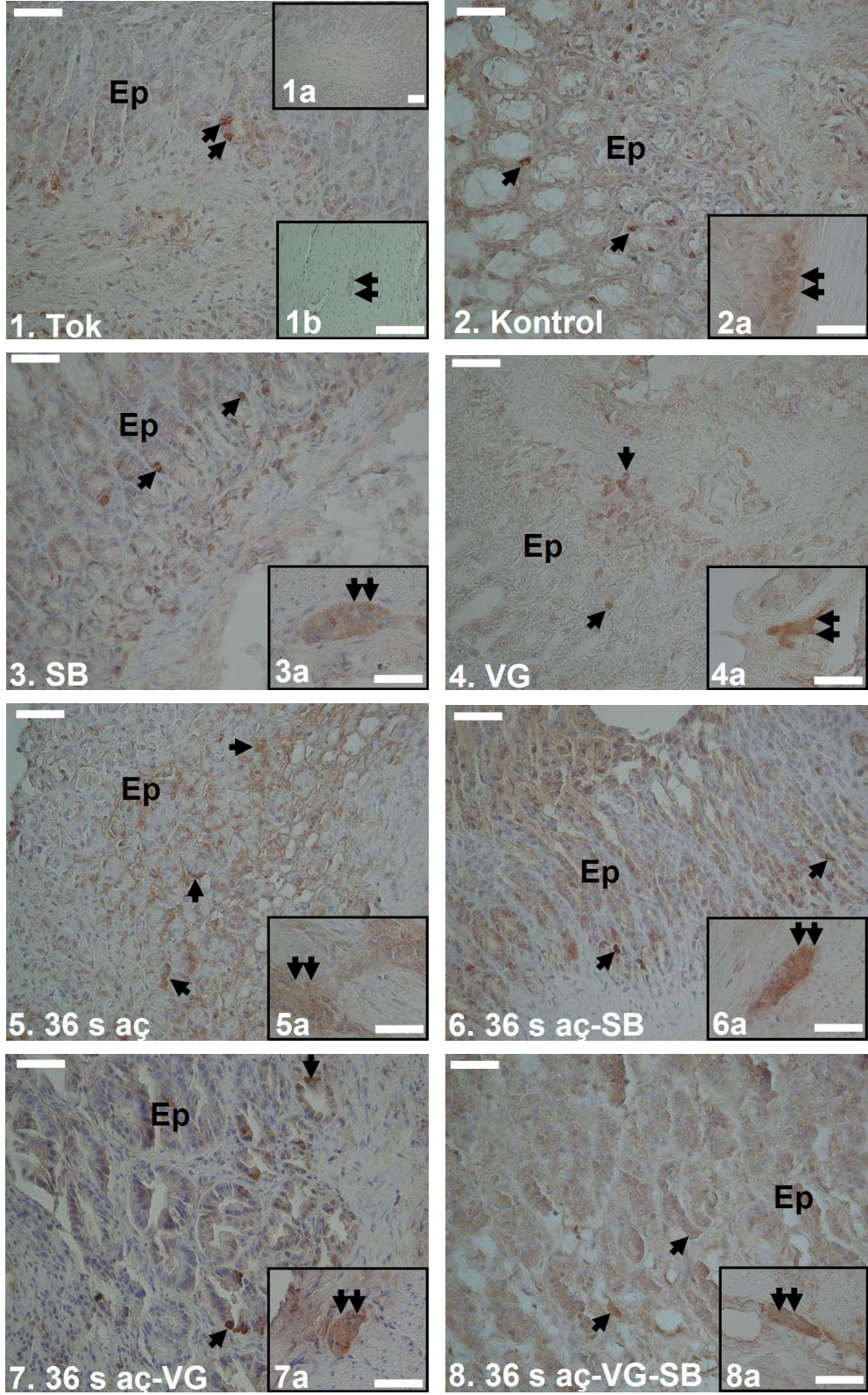
VG: 18 saat açlık + vagotomi uygulaması

36 s aç: 36 saat açlık uygulaması

36 s aç-SB: 36 saat açlık + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

36 s aç-VG: 36 saat açlık + vagotomi uygulaması

36 s aç-VG-SB: 36 saat açlık + vagotomi + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması



Şekil 4.10. Mide Antrum Dokusunda Oreksin-A İmmunoboyanması.

Tek ok: Nöroendokrin hücreleri, **Çift ok:** Myenterik pleksus hücreleri, **Ep:** Epitel hücreleri

- 1: Tok**, 40x, skala bar =75 µm; **1a:**Negatif kontrol, 40x, skala bar=75µm;
1b: Myenterik pleksus, 20x, skala bar= 150µm
2: Kontrol, 40x, skala bar=75µm; **2a:**Myenterik pleksus, 40x, skala bar=75µm
3: SB, 40x, skala bar=75µm; **3a:**Myenterik pleksus, 40x, skala bar=75µm
4: VG, 40x, skala bar=75µm; **4a:** Myenterik pleksus, 40x, skala bar=75µm
5: 36 s aç, 40x, skala bar=75µm; **5a:** Myenterik pleksus, 40x, skala bar=75µm
6: 36 s aç-SB, 40x, skala bar=75µm; **6a:** Myenterik pleksus, 40x, skala bar=75µm
7: 36 s aç-VG, 40x, skala bar=75µm; **7a:** Myenterik pleksus, 40x, skala bar=75µm
8: 36 s aç-VG-SB, 40x, skala bar=75µm; **8a:** Myenterik pleksus, 40x, skala bar=75µm

Çizelge 4.1. Mide Dokusunda Oreksin-A Antikoru ile Pozitif Boyanan Hücrelerin İmmünoboyanma Yoğunluklarının Semikantitatif Dağılımları

Hücre tipi	Tok	Kontrol	SB	VG	36 s aç	36 s aç SB	36 s aç VG	36 s aç VG-SB
Epitel	0	+	(+)	(+)	(+)	+	(+)	(+)
Bez	(+)	++	++	+	++	++	+	++
Nöroendokrin	++	+++	+++	++	+++	++	+++	++
Myenterik pleksus	(+)	+	++	+++	++	+++	++	+++

0: Negatif; **(+):** Zayıf pozitif ; **+**: Pozitif; **++:** Yoğun pozitif; **+++:** Çok yoğun pozitif

Tok: Açlık uygulanmayan

Kontrol: 18 saat açlık uygulaması

SB: 18 saat açlık + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

VG: 18 saat açlık + vagotomi uygulaması

36 s aç: 36 saat açlık uygulaması

36 s aç-SB: 36 saat açlık + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

36 s aç-VG: 36 saat açlık + vagotomi uygulaması

36 s aç-VG-SB: 36 saat açlık + vagotomi + OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması

TARTIŞMA

Açlık ile sentezi artan oreksin-A peptidinin mide motilitesine etkisini incelediğimiz çalışmamızda, 36 saat süreyle aç bırakılan sıçanlarda plazma oreksin-A seviyesi, hipotalamus ve midedeki preprooreksin proteininin miktarı ile midedeki oreksinerjik immünoreaktivite gösteren hücre sayısı önemli derece artmıştır. Düzeyi artan endojen oreksin-A mide boşalma hızını arttırmış, MMC döngüsünün süresini uzatmıştır. Oreksin-A'nın MMC'deki birinci ve ikinci fazların sürelerini uzattığı, üçüncü faz süresini ise değiştirmedeği gözlenmiştir. Oreksin-A'nın mide boşalımı ve MMC üzerine olan etkilerinin, OX1R'nin selektif antagonisti olan SB-334867'nin uygulanması ile ortadan kaldırılması, söz konusu etkilerin OX1R aracılığı ile gerçekleştiğini göstermekte olup, bilateral subdiyafragmatik vagotomi oreksin-A'nın bu etkilerini değiştirmemiştir.

Yapılan çalışmalarda, oreksin-A'nın mide boşalma hızına etkisinin insanda ve kemirgende farklı olduğu bulunmuştur. İntraserebroventriküler yolla uygulanan oreksin-A'nın, sıçanlarda besin alımını ve mide boşalma hızını arttırdığı gösterilmiştir [10, 25]. Ehrström ve arkadaşları sıçanlarda endojen oreksin-A'nın mide boşalımını hızlandırdığını [11], insanlarda ise intravenöz yolla uygulanan oreksin-A'nın mide boşalma hızını iştah üzerine etki etmeden yavaşlattığını göstermişlerdir [36].

Midenin proksimal ve distal bölgelerinin farklı fizyolojik fonksiyonları olduğu, proksimal midenin gevşeyerek depo, distal midenin ise kasılarak öğütücü görev üstlendiği bilinmektedir [18, 10]. Merkezi yolla uygulanan oreksin-A'nın mide boşalma hızını arttırırken, midenin proksimalinde gevşeme distalinde ise kasılmaya yol açtığı gösterilmiştir [10, 94]. Öte yandan Baccari ve Calamai, fare midesinden elde ettikleri fundus striplerinde SB-334867 ve L-NNA ile ortadan kalkan oreksin-A'ya bağlı gevşeme cevabı gözlerken, antral striplerde ise gerek spontan, gerekse elektriksel uyarı ile oluşturulan kasılmaların oreksin-A'dan etkilenmediğini göstermişlerdir [208]. Bu bulgulara paralel olarak, endojen oreksin-A'nın fare ince bağırsağında non-adrenerjik, non-kolinerjik inhibitör etkisi olduğu ve bu etkinin L-NOARG ile tamamen ortadan kaldırıldığı bildirmiştir [92].

NO'nun mide boşalımında düzenleyici rolü olduğu, mide boşalımını pilor sfinkterini ve duodenal tonusu inhibe ederek kolaylaştırdığı bilinmektedir [199, 209, 210]. NOS inhibisyonunun mide boşalımını geciktirdiği, insanda [211] ve sıçanda [212] gösterilmiştir. Deneylerimiz sonucunda endojen oreksin-A'nın mide boşalımını arttırıcı etkisinin, antral kontraktileteyi arttırmaktan çok pilorik sfinkter ve duodenal tonusun NO aracılı inhibisyonu sonucunda olabileceği düşünülmüştür. Myenterik

pleksustaki oreksin-A içeren sinir liflerinin nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) immünoaktivitesi gösteren hücrelerle yakın yerleşim göstermesi, ayrıca bazı oreksin-A immünoaktivitesi gösteren nöronlarda nNOS aktivitesinin de saptanması [11, 17], endojen oreksin-A'nın mide motilitesi üzerine etkilerine NO'nun aracılık ettiğini ileri süren çalışmaları desteklemektedir.

Çalışmamızda oreksin-A'nın mide boşalma hızını arttırıcı etkisinin 10 mg/kg i.v. dozda uyguladığımız SB-334867 ile ortadan kalkması ve kontrol değerlerinin de altına inmesi bu etkinin OX1R aracılığı ile gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. SB-334867'nin mide boşalımını kontrol değerlerinin altına indirmesi bazal koşullarda salgılanan endojen oreksin-A'nın etkinliğini akla getirmektedir. Sistemik uygulama sonrasında yarılanma süresi 4 saat olarak bildirilen [213] SB334867'nin, kan-beyin bariyerini etkin biçimde geçtiği gösterilmiştir [214]. SB-334867'nin çalışmamızda kullandığımız periferik dozunun (10 mg/kg i.v.) sıçanlarda oreksin-A'nın MMC aktivitesi ve mide asit sekresyonu üzerine olan etkilerini ortadan kaldırdığı gösterilmiştir [11, 17].

Merkezi sinir sistemine uygulanan oreksin-A'nın sıçanlarda mide motilitesini ve asit sekresyonunu N. Vagus aracılığı ile uyardığı gösterilmiş olup [9, 96], Kobashi ve arkadaşları ise sıçanlarda yapılan bir çalışmada vagotomi ile, santral oreksin-A uygulamasına bağlı olarak distal midede meydana gelen kasılmaların ortadan kalktığını, proksimal midedeki gevşeme cevabının ise azalan oranda devam ettiğini bildirmişlerdir [94]. Oreksin-A'nın iştah ve besin alımını uyarıcı etkisi göz önüne alındığında depo görevi üstlenen proksimal midenin genişlemesini sağlayarak mideyi daha fazla besin alımına adapte etmesi söz konusu olabilir.

Çalışmamızda oreksin-A'nın N.vagus aracılı merkezi etkilerini ortadan kaldırmak için uyguladığımız bilateral subdiyafragmatik vagotominin cerrahi başarısını göstermek amacıyla mide asit sekresyonu ölçümü yapılmış ve asit sekresyonunun vagotomiye bağlı olarak belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. Sıçanda mide boşalma hızının vagotomi işlemi ile inhibe olduğunu gösteren bulguları [174] destekler nitelikte, çalışmamızda da vagotomi grubundaki mide boşalma hızı kontrol grubuna göre önemli derecede düşük bulunmuştur. 36 saat aç bırakılarak oreksin-A artışı sağlanan 36 s aç-VG grubunda ise vagotominin mide boşalma hızına bir etkisi görülmemiştir. Benzer şekilde, Ehrström ve arkadaşları da intravenöz olarak verilen oreksin-A'nın bağırsaktaki açlık motilitesine etkisi üzerine vagotominin bir etkisini görmemişlerdir [17]. Vagotomi işlemi kontrol grubunda mide boşalımını inhibe etmiş, ancak 36 saatlik açlık neticesinde artan oreksin-A'nın mide boşalımını arttırıcı etkisini değiştirmemiştir. Elde ettiğimiz bulgular uzun süreli açlıkla artan endojen oreksin-A'nın mide boşalımı üzerine merkezi etkisinden ziyade parakrin etkisine bağlı mekanizmalar aracılığı ile gerçekleştirdiğini düşündürmektedir. Vagotomi işlemi 36 saat aç bırakılan sıçanlara uygulanan SB-334867'nin mide boşalma hızı üzerine yavaşlatıcı etkisini arttırmış ve 36 s aç-SB grubuna göre önemli ölçüde düşüşe neden olmuştur. Vagotominin bilinen mekanizmalarla açıklanamayan bu etkisi ile ilgili yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

MMC açlık durumunda ortaya çıkan, midenin antral bölgesi ve duodenumdan başlayarak ileri doğru yayılan fazik kasılmalar ile karakterize bir fizyolojik aktivitedir. İnsan, kemirgen, köpek, domuz ve tavşan gibi farklı türlerde gösterilen bu aktivite sindirim kanalındaki artıkların süpürülmesi ile bir sonraki öğüne hazırlık amacını taşır. [12, 15, 131]. MMC'deki Faz-III kasılmalarının düzensizleşmesi veya ortadan kalkması mide içeriğinin midede daha uzun süre kalmasına, aşırı bakteriyel üremeye ve dispeptik semptomların ortaya çıkmasına neden olur [140].

MMC'nin başlangıcında ve ilerletilmesinde myenterik plexus önemli rol almaktadır [117, 147]. Preprooreksin, oreksin-A ve oreksin-B proteinleri ESS'de gösterilmiş olup, PCR çalışmalarında ise preprooreksin ve oreksin reseptör mRNA'larının varlığı myenterik plexusta saptanmıştır [3, 7].

MMC döngüsünün açlıkta ortaya çıkan bir aktivite olması nedeniyle çalışmamızın bu parametresinde tok grup yer almamıştır. 18 saatlik açlık uyguladığımız kontrol grubunda tespit ettiğimiz MMC döngüsünün süresi, sıçanlarda MMC döngüsünün süresini 12-16 dakika olarak bildiren çalışmalarla paralellik göstermektedir [14, 16, 17, 140, 215]. Çalışmamızda 36 saatlik açlık ile artan oreksin-A'nın, MMC süresinin uzamasına neden olduğu tespit edilmiştir. MMC süresindeki artışın faz-III'den bağımsız olarak faz-I ve faz-II sürelerindeki artışa bağlı olduğu saptanmıştır. Söz konusu inhibisyonun selektif OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması ile ortadan kaldırılması oreksin-A'nın bu etkisini OX1R aracılığı ile gerçekleştirdiğini ortaya koymaktadır.

NO'nun mide boşalımını hızlandırıcı, MMC aktivitesini inhibe edici etkilerini ve myenterik plexustaki nNOS ve oreksin-A bağlantısını göz önünde bulundurduğumuzda, oreksin-A'nın mide motilitesi üzerine net etkisinin uyarıcı nitelikte olmayıp, nitreerjik yolak aracılığı ile inhibisyon yönünde olması düşünülebilir. NO molekülünün MMC'de düzenleyici olarak rol aldığı bilinmekte olup, tavuk ve sıçanda NO donörü olan sodyumnitroprusit (SNP) uygulaması ile aç hayvanlarda MMC döngüsünün inhibe olduğu, NOS inhibitörü L-NNA uygulaması ile tok hayvanlarda faz-III benzeri kasılmaların oluştuğu gösterilmiştir [216]. Oreksin-A'nın MMC üzerine olan inhibitör etkisinin NO aracılığı ile olabileceğini öne süren çalışmalar mevcuttur [17]. Bunun yanı sıra vazoaaktif intestinal peptid (VIP)'in, gerek direkt olarak gerekse NO'nun MMC üzerine olan inhibitör etkisine aracılık ederek MMC'yi inhibe ettiği gösterilmiştir [217, 218, 219]. Myenterik ve submukozal plexuslarda oreksinerjik sinir lifleri VIP içermekte iken bu bölgedeki VIP-erjik nöronların da oreksin-A eksprese ettiği göz önüne alınırsa [3, 17], oreksin-A'nın MMC döngüsü üzerine olan inhibitör etkisinde NO ve VIP'in rol alabileceği düşünülebilir.

18 ve 36 saat açlığın yanı sıra SB-334867 uygulanan deneklerde MMC döngüsünün uzunluğu kontrol değerlerinin de altında bulunmuştur. SB-334867 ile sağlanan bu önemli düşüş bazal koşullarda salgılanan oreksin-A'nın etkisini düşündürmektedir.

MMC'nin oluşumunda ve sürdürülmesinde N.vagus'un katkısı sınırlıdır. N.vagus'un köpekte ve koyunda MMC'nin oluşumundan ziyade, beslenmeye bağlı

sonlanmasında etkili olduğu, vagotominin mideden ve duodenumdan köken alan MMC döngüsünün oluşumunu engellemediği, ancak döngü süresini uzattığı ve faz-III kasılmalarını inhibe ettiği gösterilmiştir [148].

Çalışmamızda vagotomi işlemi MMC döngüsünün oreksin-A aracılı inhibisyonunu değiştirmezken, 18 saat açlık uygulanan hayvanlarda ise döngü süresinin artmasına neden olmuştur. Bulgularımıza paralel olarak bilateral subdiyafragmatik vagotominin MMC döngüsünü kontrol hayvanlarında uzattığı bilinmektedir [148]. Çalışmamızda 36 saat süreli açlıkla mide dokusunda ise preprooreksin ekspresyonu ve myenterik pleksustaki oreksinerjik hücre sayısında artış saptanmıştır. Myenterik pleksusun MMC'nin başlangıcında ve ilerletilmesindeki rolü göz önünde bulundurularak, artan oreksinerjik aktivitenin MMC döngüsü üzerine N.vagus'tan bağımsız olarak nöral ve parakrin mekanizmalar aracılığı ile etki gösterdiği düşünülmüştür.

Çalışmamızda ekzojen oreksin-A uygulaması yerine açlık ile endojen oreksin-A sentezinin arttırılması amaçlanmıştır. Açlığa bağlı plazma oreksin-A konsantrasyonundaki artış sıçanda [23] ve insanda [22] gösterilmiş olup, Ehrström ve arkadaşları sıçanlarda 18 saat açlık ile sağlanan plazma oreksin-A artışının beslenmeyle birlikte baskılandığını saptamışlardır [11]. Deneklerimizde oreksin-A düzeyini arttırmak için uygulanacak açlık süresinin belirlenmesi amacıyla bir ön çalışma yapılmıştır. En fazla artış 36 saatlik açlık uygulamasında saptanmış, meydana gelen bu artış 48 ve 72 saatlik uygulamalarda tok grup seviyesine düşüş göstermiştir. Bu bulgumuza paralel olarak Kappeler ve arkadaşları 72 saatlik açlığın Wistar sıçanlarda hipotalamik oreksin-A seviyesini değiştirmezken preprooreksin ekspresyonunu baskıladığını, Park ve arkadaşları ise sıçan hipotalamus nöronlarındaki oreksinerjik aktivitenin açlığın 84. saatinden itibaren azaldığını tespit etmişlerdir [99, 202]. Ayrıca, Mondal ve arkadaşları 48 saatlik açlığın sıçanda LHA dışında kalan beyin bölümlerindeki oreksin-A ve oreksin-B seviyelerini azalttığını göstermişlerdir [21]. Öte yandan Komaki ve arkadaşları insanlarda 72 saat açlık uygulaması ile plazma oreksin-A seviyesinde önemli artış saptamışlardır [22]. Literatürde ve bizim çalışmamızda açlık süresine bağlı olarak plazma oreksin-A düzeyindeki değişime ait farklı sonuçlar bulunması, açlık süresinin türlere göre farklı mekanizmalarla oreksin-A sentezi üzerine etki gösterdiğini düşündürmektedir.

Merkezi sinir sisteminde oreksin üreten nöronların en yoğun olarak yerleşim gösterdiği, iştah merkezi olarak da adlandırılan LHA iştah, besin tüketimi ve ağırlık kazancı kontrolünün yapıldığı bölgedir. LHA, hipotalamusun enerji homeostazisi ile ilgili diğer bölgelerinden ve NTS'den gelen uyarıları alır. NTS sindirim sisteminden gelen beslenme ile ilgili vagal aferent sinyalleri hipotalamusa iletmekte olup, aynı zamanda oreksinerjik sinir liflerini yoğun olarak barındırmaktadır [38, 98]. LHA, glukoz duyarlı özelleşmiş nöronların bulunduğu bir alandır. Bu nöronlar plazma glukoz konsantrasyonlarındaki azalma ile uyarılırken, bağırsakta besin bulunması, mide distansiyonu ve portal dolaşımdaki glukoz konsantrasyonunun artışı gibi beslenme sinyalleri ile inhibe olurlar [98, 23]. Glukoz duyarlı nöronlar hipotalamus dışında NTS'da ve ESS'de de gösterilmiştir [203, 204]. Yapılan ilk çalışmalarda hipoglisemi ile hipotalamik preprooreksin mRNA ekspresyonunun artışından yola çıkılarak, oreksinerjik nöronların glukoz duyarlı nöronlara karşılık geldikleri ileri

sürülse de, daha sonra glukozu duyarlı nöronların oreksin içermedikleri ortaya çıkmıştır. Oreksinlerin açlık durumunda glukozu duyarlı nöronları uyararak modülatör etki gösterdiği düşünülmektedir [23, 205]. Bu iki nöron topluluğu morfolojik açıdan yakın ilişki içerisinde olup gövdeleri ve uzantıları birbirini çevrelemektedir. Bu yakınlık iki nöron tipinin birbirlerini uyarmasını sağlar. Cai ve arkadaşları, 6 saat süreyle uygulanan akut hipoglisemi ile sağladıkları hipotalamik preprooreksin ekspresyonundaki artışın, 6 gün süreyle uyguladıkları kronik hipoglisemi modeli ile ortadan kalktığını, benzer durumun akut ve kronik besin kısıtlaması çalışmalarında da gözlemlendiğini bildirmişlerdir [98].

Deneysel açlık uygulaması enerji homeostazisinin düzenlenmesi ile ilgili incelemelerde en çok uygulanan modeldir. Sıçan dahil pek çok türde açlık 3 faza ayrılmaktadır. İlk 24 saati kapsayan birinci faz adaptasyon fazı olup bu dönemde iştah peptidlerinin aşırı ekspresyonu ve tokluk peptidlerinin down-regülasyonu gözlenmektedir. İkinci ve üçüncü fazlarda organizma hipoglisemik koşullara cevaben enerji ihtiyacını farklı kaynaklardan sağlama yönünde hareket eder. Açlığın 48.-96. saatler arasındaki ikinci ve 120. saatten itibaren başlayan üçüncü fazlarında ise organizma enerjisini sırasıyla lipidlerin ve proteinlerin oksidasyonu ile sağlamaktadır [202]. Kronik besin yetersizliği durumlarında merkezi sinir sistemi metabolizması nöronların keton cisimciklerinin kullanımı yönünde bir adaptasyonuna neden olmaktadır. Sıçanlarda uygulanan uzun süreli açlık ile oluşturulan ketonemi tablosunda 3-hidroksi bütirat molekülünün kan-beyin bariyerini iki kat daha hızlı kat ettiği gösterilmiştir. [206]. Keton cisimciklerinin bazı glukozu duyarlı nöronları inhibe ettikleri bildirilmiştir [98]. Bu durum glukozu duyarlı nöronların dolayısıyla yakın ilişki içerisindeki oreksinerjik nöronların da inhibisyonu anlamına gelebilir.

Stres sırasında hipotalamustaki PVN'den sentezlenen CRF hormonu CRF-R1 reseptörü aracılığı ile HPA'yı aktive eder. Hipofiz bezindeki kortikotrofik hücreler, CRF tarafından uyarılmaları sonucu ACTH hormonunu, ACTH hormonu da adrenal bezlerden glukokortikoidlerin serbestlenmesini sağlar [82]. Açlık fizyolojik ve psikolojik bir stres faktörü olup, açlıkla birlikte HPA'nın aktivasyonuna bağlı olarak plazma kortizol konsantrasyonunun arttığı [22], ayrıca santral yolla uygulanan oreksin-A'nın da HPA'yı uyardığı gösterilmiştir [85, 86]. Açlık durumunda erken dönemde artan plazma oreksin-A konsantrasyonunun da HPA'nın aktivasyonuna katkıda bulunuyor olması mümkün gözükmemektedir [22]. Winsky-Sommerer ve arkadaşları bu hipotezden yola çıkarak yaptıkları çalışmada hipotalamustaki CRF IR sinir uçlarının LHA'da bulunan oreksinerjik sinir lifleri ile direkt temas halinde bulunduğunu, bazı oreksinerjik sinirlerin CRF-R1 ve CRF-R2 reseptörlerini eksprese ettiğini ve hipotalamustan izole edilen oreksinerjik nöronlardaki membran potansiyellerinin CRF uygulaması ile depolarize olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar aynı çalışmada CRF-R1 den yoksun farelerdeki oreksinerjik nöronların akut strese cevaben uyarılma özelliklerinin ortadan kalktığını vurgulamışlardır [82]. Kronik deneysel hipoglisemi koşullarında kan-beyin bariyerinde bulunan glukoz transporter-1 (GLUT-1) glukoz taşıyıcı protein ve mRNA düzeylerinin arttığı bildirilmiştir [207]. Çalışmamızda açlık süresi, oreksin-A ve plazma glukoz konsantrasyonlarının ilişkisi incelenmemiştir. Ancak, kortizole bağlı olarak uyarılan glukoneogenesis sonucu plazma glukoz konsantrasyonunun artışı ve kan-beyin

bariyerinde meydana gelen bu değişimler nedeniyle glukozaya duyarlı nöronların ve buna bağlı olarak oreksinerjik nöronların inhibe olabileceği düşünölmüştür.

Çalışmamızda 36 saat açlık ile sağladığımız plazma oreksin-A konsantrasyonu üzerine SB-334867 uygulamasının azaltıcı etkisi olduğu, en fazla azalmanın vagotomi uygulaması ile birlikte SB-334867'nin verildiği 36 s aç-VG-SB grubunda gerçekleştiği saptanmıştır. SB-334867 maddesi mekanizması bilinmemekle birlikte, plazma oreksin-A seviyesi üzerine bir çeşit negatif geri beslemenin oluşumuna neden olmakta, vagal deşarjların ortadan kaldırılması, gözlenen negatif geri beslemeyi güçlendirmektedir.

Mide boşalma hızının ve açlık motor paterninin incelendiği çalışmalarda 18-24 saat açlık standart bir uygulama olup yaygın olarak kullanılmaktadır. Oreksinlerin ve reseptörlerinin sindirim sistemindeki varlığı ve açlıkla ekspresyonlarının uyarıldığı düşünöldüğünde çalışmalarda elde edilen verilerde oreksin-A'ya ait etkiler de göz önünde bulundurulmalıdır.

Western blot ile protein ekspresyonunu gösterdiğimiz çalışmamızda pozitif kontrol amacıyla yüklemesi yapılan ticari oreksin-A örneklerinde pozitif bantlar elde edilirken, hipotalamus ve mide dokularından hazırlanan örneklerde ölçülebilir miktarda oreksin-A proteini bulunamamıştır. Hem hipotalamus hem de mide örneklerinde yaklaşık 19 kDa ağırlığında, açlık süresiyle miktarı artan bir protein elde edilmiştir. Elde edilen protein moleküler ağırlık bakımından sıçan preprooreksin proteinine uymaktadır. Oreksin-A ve oreksin-B'nin ortak öncül formu olan preprooreksin kemirgende 131 amino asitten meydana gelir [2,3]. Preprooreksin proteinin moleküler ağırlığı insanda 15 kDa [43, 59], balıkta 16,2 kDa [220], kurbağada 15 ve 17 kDa [221], sıçanda ise yaklaşık 19 kDa [28, 222] olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda oreksin-A'ya özgü bir antikor kullanılmış olmasına rağmen, bu antikorun preprooreksin'e de duyarlı olduğu ticari firma tarafından belirtilmiştir. Preprooreksin miktarının oreksin-A miktarı için gösterge olabileceği düşünölmekle western blot ile preprooreksin ekspresyonuna bakılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre mide ve hipotalamus dokularında preprooreksin protein miktarı 18 saat açlık uygulanan tüm gruplarda tok gruba göre; 36 saatlik açlık uygulanan gruplarda da 18 saat açlık uygulanan gruplara göre önemli ölçüde artış tespit edilmiştir. Birçok farklı türde açlığın preprooreksin mRNA düzeylerini arttırdığı bilinmekte olup, bizim bulgularımız ile de desteklenmiştir [21, 25, 57, 66, 99, 223, 224].

Periferal uygulanan OX1R antagonisti SB-334867, 36 saat açlık ile artan plazma oreksin-A seviyesinde inhibisyona neden olurken preprooreksin ekspresyonuna herhangi bir etki göstermemiştir. SB-334867'nin buradaki inhibitör etkisinin preprooreksin molekülünden oreksin-A oluşumunu sağlayan proteolitik bölünme reaksiyonu üzerine olabileceğini düşöndürmüştür.

Oreksin-A immünoreaktivitesi sıçan duodenumunda, myenterik ve submukozal pleksustaki liflerde, uzunlamasına ve dairesel seyreden düz kas tabakalarının arasında yer alan sinir liflerinde, mukozada yer alan ince sinir liflerinde, mukozal kriplerde yer alan endokrin hücrelerde ve bağırsak vilüslerindeki

epitel hücrelerinde gösterilirken [16,17], insanda midenin antrum bölgesindeki mukozal sinir liflerinde, dairesel düz kas liflerindeki sinir liflerinde, antral endokrin hücrelerde, duodenumdaki myenterik ve submukozal plexus nöronlarında, dairesel düz kasta, enteroendokrin ve mukozal epitel hücrelerinde, kolondaki endokrin hücrelerde [36] gösterilmiştir. Mide dokusunda oreksin-A'ya spesifik antikorun kullanılarak yapıldığı immünohistokimyasal çalışmada midenin fundus ve korpus bölgelerinde oreksinerjik aktiviteye rastlanmamış, antral bölgede oreksin immünoaktivitesi saptanmıştır. Oreksinerjik aktivitenin, uygulanan açlık süresiyle doğru orantılı olarak arttığı gösterilmiş, aynı sürede açlık oluşturulan gruplar arasında istatistiksel açıdan fark saptanmamıştır. 18 ve 36 saat açlık uygulanan grupların mide epitel hücrelerinde zayıf oreksinerjik aktivite saptanmıştır. Oreksinerjik aktivite gösteren hücrelerin ağırlıklı olarak myenterik plexus ve nöroendokrin hücrelerde görülmesi literatürle uyumludur [3, 7, 16, 17, 36].

Çalışmamızda, 36 saate kadar açlık süresiyle doğru orantılı olarak, oreksin-A'nın merkezi sinir sistemi dışında periferde de sentezinin arttığı gösterilmiştir. Endojen oreksin-A'nın mide motilitesine OX1R aracılığı ile etki ederek mide boşalmasını arttırırken, MMC süresinin uzamasına neden olduğu ve oreksin-A'nın mide motilitesine etkisinde N.vagus'un rol oynamadığı tespit edilmiştir.

SONUÇLAR

1. 36 saat açlık ile indüklenen endojen oreksin-A mide boşalımını arttırmıştır. OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması bu artışı ortadan kaldırmış, vagotominin herhangi bir etkisi gözlenmemiştir. Bulgular oreksin-A'nın mide boşalımını hızlandırıcı etkisinin OX1R aracılığı ile olduğunu ve bu etkide N.vagus'un rol oynamadığını göstermiştir.
2. 36 saat açlık ile indüklenen endojen oreksin-A MMC döngüsünün süresini faz-III süresini etkilemeden uzatmıştır. OX1R antagonisti SB-334867 uygulaması bu artışı ortadan kaldırmış, vagotominin herhangi bir etkisi gözlenmemiştir. Elde edilen bulgular, oreksin-A'nın MMC döngüsünün süresini uzatıcı etkisinin OX1R aracılığı ile olduğunu ve bu etkide N.vagus'un rol oynamadığını göstermiştir.
3. Elde ettiğimiz bulgular, 36 saate kadar açlık süresi ile doğru orantılı olarak oreksin-A'nın merkezi sinir sistemi dışında, periferde de sentezinin arttığını göstermiştir. 36 saat açlık uygulaması plazma oreksin-A seviyesini, mide ve hipotalamustaki preprooreksin ekspresyonunu ve mide dokusundaki oreksin immünoreaktivitesi gösteren hücre sayısını önemli ölçüde arttırmıştır.
4. OX1R antagonisti olan SB-334867 uygulaması 36 saat açlık ile uyarılan plazma oreksin-A seviyesi üzerine inhibitör etki gösterirken, preprooreksin ekspresyonu ve oreksinerjik immünoreaktivite gösteren hücre sayısını etkilememiştir. Vagotomi uygulaması SB-334867'nin plazma oreksin-A düzeyi üzerine olan inhibitör etkisini arttırmıştır.

KAYNAKLAR

1. Siegel JM, Moore R, Thannickal T, Nienhuis R. A brief history of hypocretin/orexin and narcolepsy. *Neuropsychopharmacology*. 2001 Nov;25(5 Suppl):S14-20.
2. Samson WK, Resch ZT. The Hypocretin/Orexin Story. *Trends Endocrinol Metab*. 2000 Sep;11(7):257-62.
3. Kirchgessner AL. Orexins in the brain-gut axis. *Endocr Rev*. 2002 Feb;23(1):1-15.
4. Kukkonen JP, Holmqvist T, Ammoun S, Akerman KE. Functions of the orexinergic/hypocretinergic system. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Dec;283(6):C1567-91.
5. Sakurai T. Orexins and orexin receptors: implication in feeding behavior. *Regul Pept*. 1999 Nov 30;85(1):25-30.
6. Ebrahim IO, Howard RS, Kopelman MD, Sharief MK, Williams AJ. The hypocretin/orexin system. *J R Soc Med*. 2002 May;95(5):227-30.
7. Kirchgessner AL, Liu M. Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron*. 1999 Dec;24(4):941-51.
8. Kobashi M, Furudono Y, Matsuo R, Yamamoto T. Central orexin facilitates gastric relaxation and contractility in rats. *Neurosci Lett*. 2002 Nov 8;332(3):171-4.
9. Krowicki ZK, Burmeister MA, Berthoud HR, Scullion RT, Fuchs K, Hornby PJ. Orexins in rat dorsal motor nucleus of the vagus potentially stimulate gastric motor function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002 Aug;283(2):G465-72.
10. Furudono Y, Ando C, Yamamoto C, Kobashi M, Yamamoto T. Involvement of specific orexigenic neuropeptides in sweetener-induced overconsumption in rats. *Behav Brain Res*. 2006 Dec 15;175(2):241-8.
11. Ehrström M, Levin F, Kirchgessner AL, Schmidt PT, Hilsted LM, Grybäck P, Jacobsson H, Hellström PM, Näslund E. Stimulatory effect of endogenous orexin A on gastric emptying and acid secretion independent of gastrin. *Regul Pept*. 2005 Dec 15;132(1-3):9-16.

12. Tack J. Motilin and the enteric nervous system in the control of interdigestive and postprandial gastric motility. *Acta Gastroenterol Belg.* 1995 Jan-Feb;58(1):21-30.
13. Szurszewski JH. A migrating electric complex of canine small intestine. *Am J Physiol.* 1969 Dec;217(6):1757-63.
14. Ariga H, Tsukamoto K, Chen C, Mantyh C, Pappas TN, Takahashi T. Endogenous acyl ghrelin is involved in mediating spontaneous phase III-like contractions of the rat stomach. *Neurogastroenterol Motil.* 2007 Aug;19(8):675-80.
15. Chung SA, Rotstein O, Greenberg GR, Diamant NE. Mechanisms coordinating gastric and small intestinal MMC: role of extrinsic innervation rather than motilin. *Am J Physiol.* 1994 Nov;267(5 Pt 1):G800-9.
16. Naslund E, Ehrström M, Ma J, Hellström PM, Kirchgessner AL. Localization and effects of orexin on fasting motility in the rat duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002 Mar;282(3):G470-9.
17. Ehrström M, Näslund E, Ma J, Kirchgessner AL, Hellström PM. Physiological regulation and NO-dependent inhibition of migrating myoelectric complex in the rat small bowel by OXA. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003 Oct;285(4):G688-95.
18. Costa M. All together now: from pacemakers to gastric peristalsis. *J Physiol.* 2006 Feb 15;571(Pt 1):1.
19. Pal A, Bresseur JG, Abrahamsson B. A stomach road or "Magenstrasse" for gastric emptying. *J Biomech.* 2007;40(6):1202-10.
20. De Block CE, De Leeuw IH, Pelckmans PA, Van Gaal LF. Current concepts in gastric motility in diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev.* 2006 Feb;2(1):113-30.
21. Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Yanagisawa M, Matsukura S. Widespread distribution of orexin in rat brain and its regulation upon fasting. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Mar 24;256(3):495-9.
22. Komaki G, Matsumoto Y, Nishikata H, Kawai K, Nozaki T, Takii M, Sogawa H, Kubo C. Orexin-A and leptin change inversely in fasting non-obese subjects. *Eur J Endocrinol.* 2001 Jun;144(6):645-51.
23. Ouedraogo R, Näslund E, Kirchgessner AL. Glucose regulates the release of orexin-a from the endocrine pancreas. *Diabetes.* 2003 Jan;52(1):111-7.
24. Nishino S. The hypothalamic peptidergic system, hypocretin/orexin and vigilance control. *Neuropeptides.* 2007 Jun;41(3):117-33.

25. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. 1998 Mar 6;92(5): 573-85.
26. de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jan 6;95(1):322-7.
27. Kilduff TS, Peyron C. The hypocretin/orexin ligand-receptor system: implications for sleep and sleep disorders. *Trends Neurosci*. 2000 Aug;23(8):359-65.
28. Dun NJ, Le Dun S, Chen CT, Hwang LL, Kwok EH, Chang JK. Orexins: a role in medullary sympathetic outflow. *Regul Pept*. 2000 Dec 22;96(1-2):65-70.
29. Korczynski W, Ceregrzyn M, Matyjek R, Kato I, Kuwahara A, Wolinski J, Zabielski R. Central and local (enteric) action of orexins. *J Physiol Pharmacol*. 2006 Nov;57 Suppl 6:17-42.
30. Heinonen MV, Purhonen AK, Mäkelä KA, Herzig KH. Functions of orexins in peripheral tissues. *Acta Physiol (Oxf)*. 2008 Apr;192(4):471-85.
31. Kastin AJ, Akerstrom V. Orexin A but Not Orexin B Rapidly Enters Brain from Blood by Simple Diffusion. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 289(1): 219–223.
32. Heier MS, Evsiukova T, Vilming S, Gjerstad MD, Schrader H, Gautvik K. CSF hypocretin-1 levels and clinical profiles in narcolepsy and idiopathic CNS hypersomnia in Norway. *Sleep*. 2007 Aug 1;30(8):969-73.
33. Brundin L, Petersén A, Björkqvist M, Träskman-Bendz L. Orexin and psychiatric symptoms in suicide attempters. *J Affect Disord*. 2007 Jun;100(1-3):259-63.
34. Zhang S, Lin L, Kaur S, Thankachan S, Blanco-Centurion C, Yanagisawa M, Mignot E, Shiromani PJ. The development of hypocretin (orexin) deficiency in hypocretin/ataxin-3 transgenic rats. *Neuroscience*. 2007 Aug 10;148(1):34-43.
35. John J, Wu MF, Maidment NT, Lam HA, Boehmer LN, Patton M, Siegel JM. Developmental changes in CSF hypocretin-1 (orexin-A) levels in normal and genetically narcoleptic Doberman pinschers. *J Physiol*. 2004 Oct 15;560(Pt 2):587-92.

36. Ehrström M, Gustafsson T, Finn A, Kirchgessner A, Grybäck P, Jacobsson H, Hellström PM, Näslund E. Inhibitory effect of exogenous orexin a on gastric emptying, plasma leptin, and the distribution of orexin and orexin receptors in the gut and pancreas in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Apr;90(4):2370-7.
37. Dalal MA, Schuld A, Haack M, Uhr M, Geisler P, Eisensehr I, Noachtar S, Pollmächer T. Normal plasma levels of orexin A (hypocretin-1) in narcoleptic patients. *Neurology.* 2001 Jun 26;56(12):1749-51.
38. Cai XJ, Liu XH, Evans M, Clapham JC, Wilson S, Arch JR, Morris R, Williams G. Orexins and feeding: special occasions or everyday occurrence? *Regul Pept.* 2002 Mar 15;104(1-3):1-9.
39. Smart D. Orexins: a new family of neuropeptides. *Br J Anaesth.* 1999 Nov;83(5):695-7.
40. Jöhren O, Brüggemann N, Dominiak P. Orexins (hypocretins) and adrenal function. *Horm Metab Res.* 2004 Jun;36 :370-5.
41. Kummer M, Neidert SJ, Jöhren O, Dominiak P. Orexin (hypocretin) gene expression in rat ependymal cells. *Neuroreport.* 2001 Jul 20;12(10):2117-20.
42. Jöhren O, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A, Dominiak P. Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology.* 2001 Aug;142(8):3324-31.
43. Randeve HS, Karteris E, Grammatopoulos D, Hillhouse EW. Expression of orexin-A and functional orexin type 2 receptors in the human adult adrenals: implications for adrenal function and energy homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Oct;86(10):4808-13.
44. Chen J, Randeve HS. Genomic organization of mouse orexin receptors: characterization of two novel tissue-specific splice variants. *Mol Endocrinol.* 2004 Nov;18(11):2790-804.
45. Darker JG, Porter RA, Eggleston DS, Smart D, Brough SJ, Sabido-David C, Jerman JC. Structure-activity analysis of truncated orexin-A analogues at the orexin-1 receptor. *Bioorg Med Chem Lett.* 2001 Mar 12;11(5):737-40.
46. Karteris E, Machado RJ, Chen J, Zervou S, Hillhouse EW, Randeve HS. Food deprivation differentially modulates orexin receptor expression and signaling in rat hypothalamus and adrenal cortex. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005 Jun;288(6):E1089-100.
47. Lund PE, Shariatmadari R, Uustare A, Detheux M, Parmentier M, Kukkonen JP, Akerman KE. The orexin OX1 receptor activates a novel Ca²⁺ influx pathway necessary for coupling to phospholipase C. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):30806-12.

48. Kukkonen JP, Akerman KE. Orexin receptors couple to Ca²⁺ channels different from store-operated Ca²⁺ channels. *Neuroreport*. 2001 Jul 3;12(9):2017-20.
49. Smart, 1999-b Smart D, Jerman JC, Brough SJ, Rushton SL, Murdock PR, Jewitt F, Elshourbagy NA, Ellis CE, Middlemiss DN, Brown F. Characterization of recombinant human orexin receptor pharmacology in a Chinese hamster ovary cell-line using FLIPR. *Br J Pharmacol*. 1999 Sep;128(1):1-3.
50. van den Pol AN, Gao XB, Obrietan K, Kilduff TS, Belousov AB. Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin. *J Neurosci*. 1998 Oct 1; 18(19):7962-71.
51. Smart D, Haynes AC, Williams G, Arch JR. Orexins and the treatment of obesity. *Eur J Pharmacol*. 2002 Apr 12;440(2-3):199-212.
52. Uramura K, Funahashi H, Muroya S, Shioda S, Takigawa M, Ya da T. Orexin-a activates phospholipase C- and protein kinase C-mediated Ca²⁺ signaling in dopamine neurons of the ventral tegmental area. *Neuroreport*. 2001 Jul 3;12(9):1885-9.
53. Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett*. 1998 Oct 30;438(1-2):71-5.
54. Lu XY, Bagnol D, Burke S, Akil H, Watson SJ. Differential distribution and regulation of OX1 and OX2 orexin/hypocretin receptor messenger RNA in the brain upon fasting. *Horm Behav*. 2000 Jun;37(4):335-44.
55. Blanco M, López M, García-Caballero T, Gallego R, Vázquez-Boquete A, Morel G, Señarís R, Casanueva F, Diéguez C, Beiras A. Cellular localization of orexin receptors in human pituitary. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Apr;86(4):1616-9.
56. Bengtsson MW, Mäkelä K, Sjöblom M, Uotila S, Akerman KE, Herzig KH, Flemström G. Food-induced expression of orexin receptors in rat duodenal mucosa regulates the bicarbonate secretory response to orexin-A. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Aug;293(2):G501-9.
57. Novak CM, Jiang X, Wang C, Teske JA, Kotz CM, Levine JA. Caloric restriction and physical activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Lett*. 2005 Jul 22-29;383(1-2):99-104.
58. López M, Señarís R, Gallego R, García-Caballero T, Lago F, Seoane L, Casanueva F, Diéguez C. Orexin receptors are expressed in the adrenal medulla of the rat. *Endocrinology*. 1999 Dec;140(12):5991-4.

59. Karteris E, Randeva HS, Grammatopoulos DK, Jaffe RB, Hillhouse EW. Expression and coupling characteristics of the CRH and orexin type 2 receptors in human fetal adrenals. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Sep;86(9):4512-9.
60. Nanmoku T, Isobe K, Sakurai T, Yamanaka A, Takekoshi K, Kawakami Y, Goto K, Nakai T. Effects of orexin on cultured porcine adrenal medullary and cortex cells. *Regul Pept.* 2002 Mar 15;104(1-3):125-30.
61. Mazzocchi G, Malendowicz LK, Aragona F, Rebuffat P, Gottardo L, Nussdorfer GG. Human pheochromocytomas express orexin receptor type 2 gene and display an in vitro secretory response to orexins A and B. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Oct;86(10):4818-21.
62. Karteris E, Chen J, Randeva HS. Expression of human prepro-orexin and signaling characteristics of orexin receptors in the male reproductive system. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Apr;89(4):1957-62.
63. Sweet DC, Levine AS, Billington CJ, Kotz CM. Feeding response to central orexins. *Brain Res.* 1999 March; 821(2): 535-538.
64. Haynes AC, Jackson B, Overend P, Buckingham RE, Wilson S, Tadayyon M, Arch JR. Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides.* 1999;20(9):1099-105.
65. Rodgers RJ, Halford JC, Nunes de Souza RL, Canto de Souza AL, Piper DC, Arch JR, Upton N, Porter RA, Johns A, Blundell JE. SB-334867, a selective orexin-1 receptor antagonist, enhances behavioural satiety and blocks the hyperphagic effect of orexin-A in rats. *Eur J Neurosci.* 2001 Apr;13(7):1444-52.
66. Wolf G. Orexins: a newly discovered family of hypothalamic regulators of food intake. *Nutr Rev.* 1998 Jun;56(6):172-3.
67. Mullett MA, Billington CJ, Levine AS, Kotz CM. Hypocretin I in the lateral hypothalamus activates key feeding-regulatory brain sites. *Neuroreport.* 2000 Jan 17;11(1):103-8.
68. Dube MG, Horvath TL, Kalra PS, Kalra SP. Evidence of NPY Y5 receptor involvement in food intake elicited by orexin A in sated rats. *Peptides.* 2000 Oct;21(10):1557-60.
69. Jain MR, Horvath TL, Kalra PS, Kalra SP. Evidence that NPY Y1 receptors are involved in stimulation of feeding by orexins (hypocretins) in sated rats. *Regul Pept.* 2000 Feb 8;87(1-3):19-24.

70. Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 14;96(19):10911-6.
71. Methippara MM, Alam MN, Szymusiak R, McGinty D. Effects of lateral preoptic area application of orexin-A on sleep-wakefulness. *Neuroreport*. 2000 Nov 9;11(16):3423-6.
72. Bourgin P, Huitrón-Résendiz S, Spier AD, Fabre V, Morte B, Criado JR, Sutcliffe JG, Henriksen SJ, de Lecea L. Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. *J Neurosci*. 2000 Oct 15;20(20):7760-5.
73. Huang ZL, Qu WM, Li WD, Mochizuki T, Eguchi N, Watanabe T, Urade Y, Hayaishi O. Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 14;98(17):9965-70.
74. Samson WK, Gosnell B, Chang JK, Resch ZT, Murphy TC. Cardiovascular regulatory actions of the hypocretins in brain. *Brain Res*. 1999 Jun 12;831(1-2):248-53.
75. Chen CT, Hwang LL, Chang JK, Dun NJ. Pressor effects of orexins injected intracisternally and to rostral ventrolateral medulla of anesthetized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000 Mar;278(3):R692-7.
76. Matsumura K, Tsuchihashi T, Abe I. Central orexin-A augments sympathoadrenal outflow in conscious rabbits. *Hypertension*. 2001 Jun;37(6):1382-7.
77. Kayaba Y, Nakamura A, Kasuya Y, Ohuchi T, Yanagisawa M, Komuro I, Fukuda Y, Kuwaki T. Attenuated defense response and low basal blood pressure in orexin knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003 Sep;285(3):R581-93.
78. Beiras-Fernández A, Gallego R, Blanco M, García-Caballero T, Diéguez C, Beiras A. Merkel cells, a new localization of prepro-orexin and orexin receptors. *J Anat*. 2004 Feb;204(2):117-22.
79. Russell SH, Small CJ, Kennedy AR, Stanley SA, Seth A, Murphy KG, Taheri S, Ghatei MA, Bloom SR. Orexin A interactions in the hypothalamo-pituitary gonadal axis. *Endocrinology*. 2001 Dec;142(12):5294-302.
80. Mitsuma T, Hirooka Y, Mori Y, Kayama M, Adachi K, Rhue N, Ping J, Nogimori T. Effects of orexin A on thyrotropin-releasing hormone and thyrotropin secretion in rats. *Horm Metab Res*. 1999 Nov;31(11):606-9.

81. Sakamoto F, Yamada S, Ueta Y. Centrally administered orexin-A activates corticotropin-releasing factor-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and central amygdaloid nucleus of rats: possible involvement of central orexins on stress-activated central CRF neurons. *Regul Pept.* 2004 May 15;118(3):183-91.
82. Winsky-Sommerer R, Yamanaka A, Diano S, Borok E, Roberts AJ, Sakurai T, Kilduff TS, Horvath TL, de Lecea L. Interaction between the corticotropin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response. *J Neurosci.* 2004 Dec 15;24(50):11439-48.
83. Chang GQ, Karatayev O, Davydova Z, Leibowitz SF. Circulating triglycerides impact on orexigenic peptides and neuronal activity in hypothalamus. *Endocrinology.* 2004 Aug;145(8):3904-12.
84. Martins PJ, D'Almeida V, Pedrazzoli M, Lin L, Mignot E, Tufik S. Increased hypocretin-1 (orexin-a) levels in cerebrospinal fluid of rats after short-term forced activity. *Regul Pept.* 2004 Mar 15;117(3):155-8.
85. Kuru M, Ueta Y, Serino R, Nakazato M, Yamamoto Y, Shibuya I, Yamashita H. Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats. *Neuroreport.* 2000 Jun 26;11(9):1977-80.
86. Ida T, Nakahara K, Murakami T, Hanada R, Nakazato M, Murakami N. Possible involvement of orexin in the stress reaction in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Apr 2;270(1):318-23.
87. Al-Barazanji KA, Wilson S, Baker J, Jessop DS, Harbuz MS. Central orexin-A activates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and stimulates hypothalamic corticotropin releasing factor and arginine vasopressin neurones in conscious rats. *J Neuroendocrinol.* 2001 May;13(5):421-4.
88. Mobarakeh JI, Takahashi K, Sakurada S, Nishino S, Watanabe H, Kato M, Naghdi N, Yanai K. Enhanced antinociception by intracerebroventricularly administered orexin A in histamine H1 or H2 receptor gene knockout mice. *Pain.* 2005 Nov;118(1-2):254-62.
89. Bingham S, Davey PT, Babbs AJ, Irving EA, Sammons MJ, Wyles M, Jeffrey P, Cutler L, Riba I, Johns A, Porter RA, Upton N, Hunter AJ, Parsons AA. Orexin-A, an hypothalamic peptide with analgesic properties. *Pain.* 2001 May;92(1-2):81-90.
90. Nakabayashi M, Suzuki T, Takahashi K, Totsune K, Muramatsu Y, Kaneko C, Date F, Takeyama J, Darnel AD, Moriya T, Sasano H. Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Mol Cell Endocrinol.* 2003 Jul 31;205(1-2):43-50.

91. de Miguel MJ, Burrell MA. Immunocytochemical detection of orexin A in endocrine cells of the developing mouse gut. *J Histochem Cytochem.* 2002 Jan;50(1):63-9.
92. Satoh Y, Uchida M, Fujita A, Nishio H, Takeuchi T, Hata F. Possible role of orexin A in nonadrenergic, noncholinergic inhibitory response of muscle of the mouse small intestine. *Eur J Pharmacol.* 2001 Oct 12;428(3):337-42.
93. Satoh Y, Okishio Y, Azuma YT, Nakajima H, Hata F, Takeuchi T. Orexin A affects ascending contraction depending on downstream cholinergic neurons and descending relaxation through independent pathways in mouse jejunum. *Neuropharmacology.* 2006 Sep;51(3):466-73.
94. Kobashi M, Furudono Y, Matsuo R, Yamamoto T. Central orexin facilitates gastric relaxation and contractility in rats. *Neurosci Lett.* 2002 Nov 8;332(3):171-4.
95. Katayama Y, Homma T, Honda K, Hirai K. Actions of orexin-A in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine. *Neuroreport.* 2003 Aug 6;14(11):1515-8.
96. Takahashi N, Okumura T, Yamada H, Kohgo Y. Stimulation of gastric acid secretion by centrally administered orexin-A in conscious rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jan 27;254(3):623-7.
97. Flemström G, Sjöblom M, Jedstedt G, Akerman KE. Short fasting dramatically decreases rat duodenal secretory responsiveness to orexin A but not to VIP or melatonin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003 Dec;285(6):G1091-6.
98. Cai XJ, Widdowson PS, Harrold J, Wilson S, Buckingham RE, Arch JR, Tadayyon M, Clapham JC, Wilding J, Williams G. Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes.* 1999 Nov;48(11):2132-7.
99. Park ES, Yi SJ, Kim JS, Lee HS, Lee IS, Seong JK, Jin HK, Yoon YS. Changes in orexin-A and neuropeptide Y expression in the hypothalamus of the fasted and high-fat diet fed rats. *J Vet Sci.* 2004 Dec;5(4):295-302.
100. Higuchi S, Usui A, Murasaki M, Matsushita S, Nishioka N, Yoshino A, Matsui T, Muraoka H, Ishizuka Y, Kanba S, Sakurai T. Plasma orexin-A is lower in patients with narcolepsy. *Neurosci Lett.* 2002 Jan 25;318(2):61-4.
101. Igarashi N, Tatsumi K, Nakamura A, Sakao S, Takiguchi Y, Nishikawa T, Kuriyama T. Plasma orexin-A levels in obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Chest.* 2003 Oct;124(4):1381-5.
102. Bronski J, Nedvídková J, Zamrazilová H, Pechová M, Chada M, Kotaska K, Nevorál J, Průša R. Dynamic changes of orexin A and leptin in obese children during body weight reduction. *Physiol Res.* 2007;56(1):89-96.

103. Furukawa Y, Cook IJ, Panagopoulos V, McEvoy RD, Sharp DJ, Simula M. Relationship between sleep patterns and human colonic motor patterns. *Gastroenterology*. 1994 Nov;107(5):1372-81.
104. Aziz Q, Thompson DG. Brain-gut axis in health and disease. *Gastroenterology*. 1998 Mar;114(3):559-78.
105. Mulak A, Bonaz B. Irritable bowel syndrome: a model of the brain-gut interactions. *Med Sci Monit*. 2004 Apr;10(4):RA55-62.
106. Bern MR, Levy NM, Koeppen BM, Stanton BA. Fizyoloji. Güneş Tıp Kitabevleri. 2008. Beşinci baskı, bölüm 31, pp: 539-565.
107. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. Nobel Tıp Kitabevleri. 2007. Onbirinci baskı, bölüm 62, pp: 771-790.
108. Van Oudenhove L, Demyttenaere K, Tack J, Aziz Q. Central nervous system involvement in functional gastrointestinal disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004 Aug;18(4):663-80.
109. Furness JB, Kunze WA, Clerc N. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. *Am J Physiol*. 1999 Nov;277(5 Pt 1):G922-8.
110. Holzer P, Michl T, Danzer M, Jovic M, Schicho R, Lippe IT. Surveillance of the gastrointestinal mucosa by sensory neurons. *J Physiol Pharmacol*. 2001 Dec;52(4 Pt 1):505-21.
111. Stroff T, Plate S, Ebrahim JS, Ehrlich KH, Respondek M, Peskar BM. Tachykinin-induced increase in gastric mucosal resistance: role of primary afferent neurons, CGRP, and NO. *Am J Physiol*. 1996 Dec;271(6 Pt 1):G1017-27.
112. Holzer P, Pabst MA. Visceral Afferent Neurons: Role in Gastric Mucosal Protection. *News Physiol Sci*. 1999 Oct;14:201-206.
113. Holzer P. Sensory neurone responses to mucosal noxae in the upper gut: relevance to mucosal integrity and gastrointestinal pain. *Neurogastroenterol Motil*. 2002 Oct;14(5):459-75.
114. Konturek PC, Brzozowski T, Burnat G, Kwiecien S, Pawlik T, Hahn EG, Konturek SJ. Role of brain-gut axis in healing of gastric ulcers. *J Physiol Pharmacol*. 2004 Mar;55(1 Pt 2):179-92.
115. Akin A, Sun HH. Non-invasive gastric motility monitor: fast electrogastrogram (fEGG). *Physiol Meas*. 2002 Aug;23(3):505-19.
116. Thor PJ, Krolczyk G, Gil K, Zurowski D, Nowak L. Melatonin and serotonin effects on gastrointestinal motility. *J Physiol Pharmacol*. 2007 Dec;58 Suppl 6:97-103.

117. Hansen MB. Small intestinal manometry. *Physiol Res.* 2002;51(6):541-56.
118. Owyang C, Hasler WL. Physiology and pathophysiology of the interstitial cells of Cajal: from bench to bedside. VI. Pathogenesis and therapeutic approaches to human gastric dysrhythmias. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002 Jul;283(1):G8-15.
119. Hoshikawa T, Denno R, Yamaguchi K, Ura H, Hirata K. Chronic outcome of proximal gastrectomy with jejunal pouch interposition in dogs. *J Surg Res.* 2003 Jun 15;112(2):122-30.
120. Sanders KM, Koh SD, Ward SM. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:307-43.
121. Xing J, Brody F, Rosen M, Chen JD, Soffer E. The effect of gastric electrical stimulation on canine gastric slow waves. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003 Jun;284(6):G956-62.
122. Camborová P, Hubka P, Sulková I, Hulín I. The pacemaker activity of interstitial cells of Cajal and gastric electrical activity. *Physiol Res.* 2003;52(3):275-84.
123. Hirst GD. An additional role for ICC in the control of gastrointestinal motility? *J Physiol.* 2001 Nov 15;537(Pt 1):1.
124. Kito Y, Suzuki H. Electrophysiological properties of gastric pacemaker potentials. *J Smooth Muscle Res.* 2003 Oct;39(5):163-73.
125. Forrest AS, Ordög T, Sanders KM. Neural regulation of slow-wave frequency in the murine gastric antrum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006 Mar;290(3):G486-95.
126. Hirst GD, Edwards FR. Role of interstitial cells of Cajal in the control of gastric motility. *J Pharmacol Sci.* 2004 Sep;96(1):1-10.
127. Hirst GD, Garcia-Londoño AP, Edwards FR. Propagation of slow waves in the guinea-pig gastric antrum. *J Physiol.* 2006 Feb 15;571(Pt 1):165-77.
128. Burns AJ. Disorders of interstitial cells of Cajal. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007 Dec;45 Suppl 2:S103-6.
129. Sanjeevi A. Gastric motility. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007 Nov;23(6):625-30.
130. Long QL, Fang DC, Shi HT, Luo YH. Gastro-electric dysrhythm and lack of gastric interstitial cells of cajal. *World J Gastroenterol.* 2004 Apr 15;10(8):1227-30.

131. Fang P, Dong L, Zhang WJ, Luo JY. Relationship between entero-hepatic bile acid circulation and interdigestive migrating myoelectrical activity in rats. *World J Gastroenterol*. 2005 Sep 14;11(34):5377-80.
132. Zabielski R. Reefs in experimental gastroenterology--cyclic activities of the gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol*. 2004 Jul;55 Suppl 2:19-32
133. Code CF, Marlett JA. The interdigestive myoelectric complex of the stomach and small bowel of dogs. *J Physiol* 1975; 246: 289-309.
134. Tsukamoto M, Enjoji A, Ura K, Kanematsu T. Preserved extrinsic neural connection between gallbladder and residual stomach is essential to prevent dysmotility of gallbladder after distal gastrectomy. *Neurogastroenterol Motil*. 2000 Feb;12(1):23-31.
135. Quigley EM. Intestinal motility: Normal and disturbed patterns. *Chin J Dig Dis*. 2003; 4: 1-4.
136. Spencer NJ, Sanders KM, Smith TK. Migrating motor complexes do not require electrical slow waves in the mouse small intestine. *J Physiol*. 2003 Dec 15;553(Pt 3):881-93.
137. Fang P, Dong L, Luo JY, Wan XL, Du KX, Chai NL. Effects of motilin and ursodeoxycholic acid on gastrointestinal myoelectric activity of different origins in fasted rats. *World J Gastroenterol*. 2004 Sep 1;10(17):2509-13.
138. Schmidt PT, Degerblad M, Lindström E, Sundqvist M, Näslund E, Gillberg PG, Husebye E, Theodorsson E, Hellström PM. Circulating ghrelin levels after food intake during different phases of the migrating motor complex in man. *Eur J Clin Invest*. 2006 Jul;36(7):503-8.
139. Emmanuel A, Roy A. Small intestine and colon motility. *Medicine*. 2007; 35(5):272 -76.
140. Ariga H, Imai K, Chen C, Mantyh C, Pappas TN, Takahashi T. Fixed feeding potentiates interdigestive gastric motor activity in rats: importance of eating habits for maintaining interdigestive MMC. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008 Mar;294(3):G655-9.
141. Luiking YC, van der Reijden AC, van Berge Henegouwen GP, Akkermans LM. Migrating motor complex cycle duration is determined by gastric or duodenal origin of phase III. *Am J Physiol*. 1998 Dec;275:G1246-51.
142. Itoh Z. Motilin and clinical application. *Peptides*. 1997;18(4):593-608.
143. Depoortere I, De Winter B, Thijs T, De Man J, Pelckmans P, Peeters T. Comparison of the gastroprokinetic effects of ghrelin, GHRP-6 and motilin in rats in vivo and in vitro. *Eur J Pharmacol*. 2005 May 16;515(1-3):160-8.

- 144.** Fujino K, Inui A, Asakawa A, Kihara N, Fujimura M, Fujimiya M. Ghrelin induces fasted motor activity of the gastrointestinal tract in conscious fed rats. *J Physiol.* 2003 Jul 1;550(Pt 1):227-40.
- 145.** Axelsson LG, Wallin B, Gillberg PG, Sjöberg B, Söderberg C, Hellström PM. Regulatory role of 5-HT and muscarinic receptor antagonists on the migrating myoelectric complex in rats. *Eur J Pharmacol.* 2003 Apr 25;467(1-3):211-8.
- 146.** Kihara N, Fujimura M, Yamamoto I, Itoh E, Inui A, Fujimiya M. Effects of central and peripheral urocortin on fed and fasted gastroduodenal motor activity in conscious rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001 Mar;280(3):G406-19.
- 147.** Tanaka T, VanKlompberg LH, Sarr MG. Selective role of vagal and nonvagal innervation in initiation and coordination of gastric and small bowel patterns of interdigestive and postprandial motility. *J Gastrointest Surg.* 2001 Jul-Aug;5(4):418-33.
- 148.** Tanaka T, Kendrick ML, Zyromski NJ, Meile T, Sarr MG. Vagal innervation modulates motor pattern but not initiation of canine gastric migrating motor complex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001 Jul;281(1):G283-92.
- 149.** Nabae T, Yokohata K, Otsuka T, Inoue K, Yamaguchi K, Chijiwa K, Tanaka M. Effect of truncal vagotomy on sphincter of oddi cyclic motility in conscious dogs. *Ann Surg.* 2002 Jul;236(1):98-104.
- 150.** Qvist N, Oster-Jørgensen E, Pedersen SA, Rasmussen L. Gastric antrectomy with selective gastric vagotomy does not influence gallbladder motility during interdigestive and postprandial periods. *Dig Dis Sci.* 1996 May;41(5):835-9.
- 151.** Yao G, Woliński J, Korczyński W, Zabielski R. Daily changes in antroduodenal myoelectric activity in weaned pigs. *Anim Sci* 2003; 76: 273-281.
- 152.** Guo XY, Dong L, Liu M, Qin B. The distribution of motilin receptor in the amygdala of rats and its role in migrating myoelectric complex. *J Med Coll PLA.* 2007;22(6):329-336.
- 153.** Liu M, Dong L, Zhu WY. Distribution and role of motilin receptor in the amygdala of rats. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* 2005 Sep;25(9):1100-4.
- 154.** Liu M, Li FH, Dong L, Zhu WY. Effects of intra-amygdaloid injection of motilin on the interdigestive migrating myoelectrical complex in rat. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2006 Jul;37(4):530-3.
- 155.** Juanola C, Giralt M, Jiménez M, Mourelle M, Vergara P. Mucosal mast cells are involved in CCK disruption of MMC in the rat intestine. *Am J Physiol.* 1998 Jul;275(1 Pt 1):G63-7.

- 156.** Fioramonti J, Fargeas MJ, Bertrand V, Pradayrol L, Buéno L. Induction of postprandial intestinal motility and release of cholecystokinin by polyamines in rats. *Am J Physiol.* 1994 Dec;267(6 Pt 1):G960-5.
- 157.** Tolessa T, Gutniak M, Holst JJ, Efendic S, Hellström PM. Inhibitory effect of glucagon-like peptide-1 on small bowel motility. Fasting but not fed motility inhibited via nitric oxide independently of insulin and somatostatin. *J Clin Invest.* 1998 Aug 15;102(4):764-74.
- 158.** Hellström PM, Näslund E, Edholm T, Schmidt PT, Kristensen J, Theodorsson E, Holst JJ, Efendic S. GLP-1 suppresses gastrointestinal motility and inhibits the migrating motor complex in healthy subjects and patients with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* 2008 Jun;20(6):649-59.
- 159.** Bednarek MA, Feighner SD, Pong SS, McKee KK, Hreniuk DL, Silva MV, Warren VA, Howard AD, Van Der Ploeg LH, Heck JV. Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem.* 2000 Nov 16;43(23):4370-6.
- 160.** Rosicka M, Krsek M, Jarkovská Z, Marek J, Schreiber V. Ghrelin -- a new endogenous growth hormone secretagogue. *Physiol Res.* 2002;51(5):435-41.
- 161.** Ohno T, Kamiyama Y, Aihara R, Nakabayashi T, Mochiki E, Asao T, Kuwano H. Ghrelin does not stimulate gastrointestinal motility and gastric emptying: an experimental study of conscious dogs. *Neurogastroenterol Motil.* 2006 Feb;18(2):129-35.
- 162.** Abdu F, Hicks GA, Hennig G, Allen JP, Grundy D. Somatostatin sst(2) receptors inhibit peristalsis in the rat and mouse jejunum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002 Apr;282(4):G624-33.
- 163.** Schmidt PT, Bozkurt A, Hellström PM. Tachykinin-stimulated small bowel myoelectric pattern: sensitization by NO inhibition, reversal by neurokinin receptor blockade. *Regul Pept.* 2002 Apr 15;105(1):15-21.
- 164.** Kasimay O, Cakir B, Devseren E, Yegen BC. Exogenous melatonin delays gastric emptying rate in rats: role of CCK2 and 5-HT3 receptors. *J Physiol Pharmacol.* 2005 Dec;56(4):543-53.
- 165.** Merle A, Delagrance P, Renard P, Lesieur D, Cuber JC, Roche M, Pellissier S. Effect of melatonin on motility pattern of small intestine in rats and its inhibition by melatonin receptor antagonist S 22153. *J Pineal Res.* 2000 Sep;29(2):116-24.
- 166.** Hellström PM, Thollander M, Theodorsson E. Nociceptive inhibition of migrating myoelectric complex by nitric oxide and monoaminergic pathways in the rat. *Am J Physiol.* 1998 Mar;274(3 Pt 1):G480-6.

167. Kuiken SD, Tytgat GN, Boeckxstaens GE. Role of endogenous nitric oxide in regulating antropyloroduodenal motility in humans. *Am J Gastroenterol.* 2002 Jul;97(7):1661-7.
168. Bozkurt A, Näslund E, Holst JJ, Hellström PM. GLP-1 and GLP-2 act in concert to inhibit fasted, but not fed, small bowel motility in the rat. *Regul Pept.* 2002 Jul 15;107(1-3):129-35.
169. Tolessa T, Näslund E, Hellström PM. The inhibitory mechanism of GLP-1, but not glucagon, on fasted gut motility is dependent on the L-arginine/nitric oxide pathway. *Regul Pept.* 2001 Apr 2;98(1-2):33-40.
170. Näslund E, Backman L, Theodorsson E, Hellström PM. Intraduodenal neuropeptide levels, but not plasma levels, vary in a cyclic fashion with the migrating motor complex. *Acta Physiol Scand.* 1998 Nov;164(3):317-23.
171. Bueno L, Fioramonti J. Neurohormonal control of intestinal transit. *Reprod Nutr Dev.* 1994;34(6):513-25.
172. Rayner CK, Horowitz M. New management approaches for gastroparesis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2005 Oct;2(10):454-62.
173. Olsson C, Holmgren S. The control of gut motility. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2001 Mar;128(3):481-503.
174. Nakade Y, Tsukamoto K, Pappas TN, Takahashi T. Central glucagon like peptide-1 delays solid gastric emptying via central CRF and peripheral sympathetic pathway in rats. *Brain Res.* 2006 Sep 21;1111(1):117-21.
175. Doran S, Jones KL, Andrews JM, Horowitz M. Effects of meal volume and posture on gastric emptying of solids and appetite. *Am J Physiol.* 1998 Nov;275(5 Pt 2):R1712-8.
176. Kunz P, Feinle C, Schwizer W, Fried M, Boesiger P. Assessment of gastric motor function during the emptying of solid and liquid meals in humans by MRI. *J Magn Reson Imaging.* 1999 Jan;9(1):75-80.
177. Kaplan JM, Siemers WH, Smedh U, Schwartz GJ, Grill HJ. Gastric branch vagotomy and gastric emptying during and after intragastric infusion of glucose. *Am J Physiol.* 1997 Nov;273(5 Pt 2):R1786-92.
178. Beglinger C, Degen L. Fat in the intestine as a regulator of appetite--role of CCK. *Physiol Behav.* 2004 Dec 30;83(4):617-21.
179. Reidelberger RD, Castellanos DA, Hulce M. Effects of peripheral CCK receptor blockade on food intake in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003 Aug;285(2):R429-37.
180. Little TJ, Horowitz M, Feinle-Bisset C. Role of cholecystinin in appetite control and body weight regulation. *Obes Rev.* 2005 Nov;6(4):297-306.

- 181.** Reidelberger RD, Arnelo U, Granqvist L, Permert J. Comparative effects of amylin and cholecystokinin on food intake and gastric emptying in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001 Mar;280(3):R605-11.
- 182.** Zhao XT, Walsh JH, Wong H, Wang L, Lin HC. Intestinal fat-induced inhibition of meal-stimulated gastric acid secretion depends on CCK but not peptide YY. *Am J Physiol.* 1999 Feb;276(2 Pt 1):G550-5.
- 183.** Kissileff HR, Carretta JC, Geliebter A, Pi-Sunyer FX. Cholecystokinin and stomach distension combine to reduce food intake in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003 Nov;285(5):R992-8.
- 184.** Borovicka J, Kreiss C, Asal K, Remy B, Mettraux C, Wells A, Read NW, Jansen JB, D'Amato M, Delaloye AB, Fried M, Schwizer W. Role of cholecystokinin as a regulator of solid and liquid gastric emptying in humans. *Am J Physiol.* 1996 Sep;271(3 Pt 1):G448-53.
- 185.** Wickbom J, Herrington MK, Permert J, Jansson A, Arnelo U. Gastric emptying in response to IAPP and CCK in rats with subdiaphragmatic afferent vagotomy. *Regul Pept.* 2008 Jun 5;148(1-3):21-5.
- 186.** Li P, Chang TM, Chey WY. Secretin inhibits gastric acid secretion via a vagal afferent pathway in rats. *Am J Physiol.* 1998 Jul;275(1 Pt 1):G22-8.
- 187.** Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Hayakawa T. Feedback regulation of pancreatic secretion by peptide YY. *Peptides.* 2002 Feb;23(2):359-65.
- 188.** Lu Y, Owyang C. Secretin at physiological doses inhibits gastric motility via a vagal afferent pathway. *Am J Physiol.* 1995 Jun;268(6 Pt 1):G1012-6.
- 189.** Jin HO, Lee KY, Chang TM, Chey WY, Dubois A. Secretin: a physiological regulator of gastric emptying and acid output in dogs. *Am J Physiol.* 1994 Oct;267(4 Pt 1):G702-8.
- 190.** El-Salhy M. Gastric emptying in an animal model of human diabetes type 1: relation to endocrine cells. *Acta Diabetol.* 2001;38(3):139-44.
- 191.** Miholic J, Hoffmann M, Holst JJ, Lenglinger J, Mittlböck M, Bergmann H, Stacher G. Gastric emptying of glucose solution and associated plasma concentrations of GLP-1, GIP, and PYY before and after fundoplication. *Surg Endosc.* 2007 Feb;21(2):309-14.
- 192.** Theodorakis MJ, Carlson O, Michopoulos S, Doyle ME, Juhaszova M, Petraki K, Egan JM. Human duodenal enteroendocrine cells: source of both incretin peptides, GLP-1 and GIP. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Mar;290(3):E550-9.
- 193.** van Lelyveld N, Ter Linde J, Schipper M, Samsom M. Serotonergic signalling in the stomach and duodenum of patients with gastroparesis. *Neurogastroenterol Motil.* 2008 May;20(5):448-55.

- 194.** Nakade Y, Tsuchida D, Fukuda H, Iwa M, Pappas TN, Takahashi T. Restraint stress delays solid gastric emptying via a central CRF and peripheral sympathetic neuron in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005 Feb;288(2):R427-32.
- 195.** Calatayud S, Barrachina MD, García-Zaragozá E, Quintana E, Esplugues JV. Endotoxin inhibits gastric emptying in rats via a capsaicin-sensitive afferent pathway. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2001 Mar;363(3):276-80.
- 196.** Andrews CN, Bharucha AE, Camilleri M, Low PA, Seide BM, Burton DD, Nickander KK, Baxter KL, Zinsmeister AR. Effects of glucagon-like peptide-1 and sympathetic stimulation on gastric accommodation in humans. *Neurogastroenterol Motil.* 2007 Sep;19(9):716-23.
- 197.** Nagase H, Nakajima A, Sekihara H, York DA, Bray GA. Regulation of feeding behavior, gastric emptying, and sympathetic nerve activity to interscapular brown adipose tissue by galanin and enterostatin: the involvement of vagal-central nervous system interactions. *J Gastroenterol.* 2002 Nov;37 Suppl 14:118-27.
- 198.** Teff KL, Alavi A, Chen J, Pourdehnad M, Townsend RR. Muscarinic blockade inhibits gastric emptying of mixed-nutrient meal: effects of weight and gender. *Am J Physiol.* 1999 Mar;276(3 Pt 2):R707-14.
- 199.** Takahashi T. Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol.* 2003;38(5):421-30.
- 200.** Koskenpato J, Punkkinen JM, Kairemo K, Färkkilä M. Nizatidine and gastric emptying in functional dyspepsia. *Dig Dis Sci.* 2008 Feb;53(2):352-7.
- 201.** Taché Y, Maeda-Hagiwara M, Turkelson CM. Central nervous system action of corticotropin-releasing factor to inhibit gastric emptying in rats. *Am J Physiol.* 1987 Aug;253(2 Pt 1):G241-5.
- 202.** Kappeler L, Zizzari P, Grouselle D, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT. Plasma and hypothalamic peptide-hormone levels regulating somatotroph function and energy balance in fed and fasted states: a comparative study in four strains of rats. *J Neuroendocrinol.* 2004 Dec;16(12):980-8.
- 203.** Dallaporta M, Perrin J, Orsini JC. Involvement of adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channels in glucose-sensing in the rat solitary tract nucleus. *Neurosci Lett.* 2000 Jan 7;278(1-2):77-80.
- 204.** Liu M, Seino S, Kirchgessner AL. Identification and characterization of glucoresponsive neurons in the enteric nervous system. *J Neurosci.* 1999 Dec 1;19(23):10305-17.

- 205.** Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav.* 2001 Nov-Dec;74(4-5):683-701.
- 206.** Hasselbalch SG, Knudsen GM, Jakobsen J, Hageman LP, Holm S, Paulson OB. Blood-brain barrier permeability of glucose and ketone bodies during short-term starvation in humans. *Am J Physiol.* 1995 Jun;268(6 Pt 1):E1161-6.
- 207.** Kumagai AK, Kang YS, Boado RJ, Pardridge WM: Upregulation of bloodbrain barrier GLUT1 glucose transporter protein and mRNA in experimental chronic hypoglycemia. *Diabetes.* 1995; 44:1399–1404.
- 208.** Baccari MC, Calamai F. Influence of orexin A on the mechanical activity of mouse gastric strips. *Regul Pept.* 2008 Feb 7;146(1-3):67-72.
- 209.** Gentilcore D, Visvanathan R, Russo A, Chaikomin R, Stevens JE, Wishart JM, Tonkin A, Horowitz M, Jones KL. Role of nitric oxide mechanisms in gastric emptying of, and the blood pressure and glycemc responses to, oral glucose in healthy older subjects. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005 Jun;288(6):G1227-32.
- 210.** Lefebvre RA, Dick JM, Guérin S, Malbert CH. Involvement of NO in gastric emptying of semi-solid meal in conscious pigs. *Neurogastroenterol Motil.* 2005 Apr;17(2):229-35.
- 211.** Tomita R, Tanjoh K, Fujisaki S, Fukuzawa M. The role of nitric oxide (NO) in the human pyloric sphincter. *Hepatogastroenterology.* 1999 Sep-Oct;46(29):2999-3003.
- 212.** Corak A, Coşkun T, Alican I, Kurtel H, Yeğen BC. The effect of nitric oxide synthase blockade and indomethacin on gastric emptying and gastric contractility. *Pharmacology.* 1997 Jun;54(6):298-304.
- 213.** Akbari E, Naghdi N, Motamedi F. The selective orexin 1 receptor antagonist SB-334867-A impairs acquisition and consolidation but not retrieval of spatial memory in Morris water maze. *Peptides.* 2007 Mar;28(3):650-6.
- 214.** Porter RA, Chan WN, Coulton S, Johns A, Hadley MS, Widdowson K, Jerman JC, Brough SJ, Coldwell M, Smart D, Jewitt F, Jeffrey P, Austin N. 1,3-Biarylyureas as selective non-peptide antagonists of the orexin-1 receptor. *Bioorg Med Chem Lett.* 2001 Jul 23;11(14):1907-10.
- 215.** Tanabe Y, Calland JF, Schirmer BD. Effects of peritoneal injury and endotoxin on myoelectric activity and transit. *J Surg Res.* 2004 Feb;116(2):330-6.

- 216.** Rodríguez-Membrilla A, Martínez V, Jiménez M, Goñalons E, Vergara P. Is nitric oxide the final mediator regulating the migrating myoelectric complex cycle? *Am J Physiol.* 1995 Feb;268(2 Pt 1):G207-14.
- 217.** Hellström PM, Ljung T. Nitrergic inhibition of migrating myoelectric complex in the rat is mediated by vasoactive intestinal peptide. *Neurogastroenterol Motil.* 1996 Dec;8(4):299-306.
- 218.** Satoh Y, Takeuchi T, Yamazaki Y, Okishio Y, Nishio H, Takatsuji K, Hata F. Mediators of nonadrenergic, noncholinergic relaxation in longitudinal muscle of the intestine of ICR mice. *J Smooth Muscle Res.* 1999 Jun;35(3):65-75.
- 219.** Ljung T, Hellström PM. Vasoactive intestinal peptide suppresses migrating myoelectric complex of rat small intestine independent of nitric oxide. *Acta Physiol Scand.* 1999 Feb;165(2):225-31.
- 220.** Suzuki H, Miyoshi Y, Yamamoto T. Orexin-A (hypocretin 1)-like immunoreactivity in growth hormone-containing cells of the Japanese seaperch (*Lateolabrax japonicus*) pituitary. *Gen Comp Endocrinol.* 2007 Jan 15;150(2):205-11.
- 221.** Yamamoto T, Suzuki H, Uemura H, Yamamoto K, Kikuyama S. Localization of orexin-A-like immunoreactivity in prolactin cells in the bullfrog (*Rana catesbeiana*) pituitary. *Gen Comp Endocrinol.* 2004 Jan 15;135(2):186-92.
- 222.** de Lecea L, Sutcliffe JG. The hypocretins/orexins: novel hypothalamic neuropeptides involved in different physiological systems. *Cell Mol Life Sci.* 1999 Oct 30;56(5-6):473-80.
- 223.** Tritos NA, Mastaitis JW, Kokkotou E, Maratos-Flier E. Characterization of melanin concentrating hormone and preproorexin expression in the murine hypothalamus. *Brain Res.* 2001 Mar 23;895(1-2):160-6.
- 224.** Phillips-Singh D, Li Q, Takeuchi S, Ohkubo T, Sharp PJ, Boswell T. Fasting differentially regulates expression of agouti-related peptide, pro-opiomelanocortin, prepro-orexin, and vasoactive intestinal polypeptide mRNAs in the hypothalamus of Japanese quail. *Cell Tissue Res.* 2003 Aug;313(2):217-25.

ÖZGEÇMİŞ

Mehmet BÜLBÜL, 1977 yılında Antalya’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya’da tamamlayarak, 1995 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nde yüksek öğrenimine başladı. 2000 yılında mezun oldu ve Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Hayvan Besleme Anabilim Dalı’nda başladığı doktora eğitimini 2002 yılında sonlandırarak aynı yıl halen araştırma görevlisi olarak çalıştığı Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başladı. Yabancı dili İngilizce’dir.

EKLER

Effect of orexin-a on ischemia–reperfusion-induced gastric damage in rats

MEHMET BÜLBÜL¹, RUKEN TAN¹, BURCU GEMİCİ¹, GÖZDE ÖNGÜT², and V. NİMET İZGÜT-UYSAL¹

¹Department of Physiology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, 07070 Antalya, Turkey

²Department of Microbiology and Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, Antalya, Turkey

Background. Orexins are involved in the regulation of sleeping behavior and energy homeostasis, and they are also implicated in the regulation of gastrointestinal functions. Previous reports have demonstrated the expression of orexin receptors in the gastrointestinal system. The aim of this study was to investigate the gastroprotective effect of orexin-A in ischemia–reperfusion-induced gastric mucosal injury. **Methods.** The gastric ischemia–reperfusion model was established by clamping the celiac artery for 30 min and reperfusion for 60 min. Orexin-A was administered in doses of 500 pmol·kg⁻¹·min⁻¹ by infusion throughout the ischemia–reperfusion period. The mean lesion area, gastric prostaglandin E₂ and mucus content, myeloperoxidase activity, and production of thiobarbituric acid reactive substances were measured. **Results.** Orexin-A significantly attenuated the ischemia–reperfusion-induced gastric lesions and also decreased myeloperoxidase activity and the thiobarbituric acid reactive substances content in gastric mucosa of rats exposed to ischemia–reperfusion. However, the decline in gastric prostaglandin E₂ and mucus content was not restored by orexin-A treatment. **Conclusions.** Orexin-A exhibited a gastroprotective effect against ischemia–reperfusion-induced lesions by decreasing neutrophil activation and lipid peroxidation.

Key words: orexin-A, ischemia–reperfusion, mucus, myeloperoxidase, prostaglandin E₂

Introduction

Orexins/hypocretins are novel neuropeptides that are localized in neurons in the lateral hypothalamus. Orexins

may be implicated in a wide variety of physiological functions such as feeding behavior, behavioral activity, sleep/awake, energy balance, and the neuroendocrinological response.¹ The orexin family consists of orexin-A and orexin-B, whose receptors are OX1R and OX2R. Both receptors belong to the G-coupled receptor superfamily, which is proposed to have a seven-transmembrane topology. According to in vitro studies, OX1R is selective for orexin-A and OX2R is nonselective for orexin-A and orexin-B.^{1,3} Besides the brain, orexin peptides and receptors are found in the myenteric and submucosal plexuses in the enteric nervous system,⁴ enteric endocrine cells, pancreatic islets,² testis, ovary, kidney, lung, thyroid gland, adrenal gland,⁵ spleen, and liver⁶ in a number of species, including guinea pig, rat, mouse, and human.

Naslund et al.³ concluded that exogenous orexin-A increased the length of the myoelectric motor complex in rat duodenum, whereas Satoh et al.⁷ established that exogenous orexin-A induced transient contractions in mouse small intestine segments. This peptide has also been shown to enhance gastric motility and gastric secretion.^{8,9}

The gastric mucosa has an innate ability to defend against noxious stimuli. Indeed, exposure of the stomach to harmful stimuli or irritating agents that damage the surface epithelium rarely causes macroscopically visible lesions because of self-defense mechanisms, including an increase of mucosal blood flow and mucus secretion and a decrease of acid secretion.^{10–12} These responses of the damaged stomach are mediated by protective mediators such as prostaglandins, especially prostaglandin E₂ (PGE₂), in addition to nitric oxide and sensory peptides. The mediators contribute to the prevention of further injury and accelerate repair of injured tissue.^{11–13}

Acute gastric mucosal lesions are frequently observed in clinical situations, such as gastric ischemia–reperfusion (IR) injury caused by stress conditions or ischemic gastrointestinal disease. IR is known to induce

Received: July 17, 2007 / Accepted: December 5, 2007

Reprint requests to: V. N. İzgüt-Uysal

gastric lesions as a result of excessive formation of reactive oxygen metabolites, neutrophil activation, and microvascular dysfunction.¹⁴⁻¹⁶ Previous studies have reported that ischemia weakens the gastric mucosal barrier and increases acid back-diffusion, predisposing the gastric mucosa to damage.¹⁷ After reperfusion, reactive oxygen species form, especially from the xanthine-xanthine oxidase system and activated neutrophils, leading to tissue lipid peroxidation, which in combination with gastric acid, causes cellular death and mucosal injury.^{18,19}

Dohi et al.²⁰ established that orexin-A levels were lower in cerebrospinal fluid of subarachnoid hemorrhage patients. On the other hand, Irving et al.²¹ suggested that cerebral arterial occlusion causes a significant increment in OX1R expression in rats. These findings may suggest an involvement of orexin-A in the response to ischemic conditions.

It is not clear whether orexin-A plays a role in ischemic conditions. However, the role of orexin in the gastric mucosal defense mechanism and gastroprotection has not been investigated. The presence of orexin-A in gastrointestinal tract tissues suggests that orexin-A might be involved in the gastric IR injury response. The aim of this experiment was to test the effects of orexin-A on rat gastric IR injury.

Methods

Animals

Forty-six adult female Wistar rats (170–220 g) were fed a standard laboratory chow and given tap water ad libitum. Animals were randomly divided into four groups: sham-operated, IR, IR+orexin-A, and sham-operated+orexin-A. Each group was housed in wire mesh cages at room temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and a 12/12-h day/night cycle. The study protocol was approved by the Akdeniz University Animal Care and Use Committee.

Experimental protocol

Rats were fasted, with free access to water, for 18 h before the protocol. Animals were anesthetized with urethane (1 g/kg intraperitoneal) and catheterized through the “jugular vein” for drug infusion. Abdomens were opened by a midline incision, and the celiac artery was isolated from its adjacent tissues. The celiac artery was clamped with a small nontraumatic vascular clamp for 30 min to induce ischemia and then released to allow reperfusion for 60 min. Infusion of orexin-A was started at the same time as the ischemia induction and finished at the end of the reperfusion period. Orexin-A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in saline

for a stock solution, and infusion solutions were freshly prepared with saline every experiment day. Orexin-A $500 \text{ pmol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ was infused at a rate of $0.1 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Sham group animals were infused with saline as the vehicle. After reperfusion, the rats were killed and the stomach removed immediately.

Measurement of gastric mucosal injury

The stomachs were removed and opened by an incision along the greater curvature and pinned onto a platform. Lesion areas were measured with a ruler under a stereoscopic microscope (Zeiss Stemi SV 11, $\times 20$; Oberkochen, Germany), and the total area of hemorrhagic erosions was calculated as the lesion index (mm^2). After measuring the lesion index, stomachs were divided into four pieces along the greater curvature for measurement of other parameters.

Measurement of gastric mucus content

Acidic mucopolysaccharides, an indicator of the gastric mucosal barrier, were measured, based on the alcian blue-binding capacity of the gastric mucosa. The alcian blue-binding capacity of the gastric mucosa was measured by using the method of Corne et al.²² Stomach tissue was washed in ice-cold 0.25 M sucrose solution and weighed. Then, it was incubated for 2 h in 10 ml 0.1% alcian blue 8, dissolved in 0.16 M sucrose, buffered with 0.05 M sodium acetate, and the solution adjusted to pH 5.8 with HCl. All stomach tissues were transferred to 10 ml of 0.25 M sucrose, and two successive washes of 15 and 45 min in 0.25 M sucrose were carried out. Thereafter, the dye complexes with mucus were eluted by immersion for 2 h in aliquots of 0.5 M MgCl_2 , 10 ml/g of tissue, with occasional shaking; then, they were removed and the magnesium chloride solution was shaken briefly with 10 ml diethyl ether. The optical density of the aqueous layer was read at 605 nm. Results were expressed as micrograms per gram of wet weight of tissue.

Determination of PGE_2

The quantity of PGE_2 was measured by enzyme immunoassay (EIA). Tissues were homogenized in Tris-HCl buffer (pH 7.5) with 0.02 M EDTA and 5 mg/ml indomethacin. PGE_2 collection and purification was according to a modified protocol supplied with the PGE_2 EIA system (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Briefly, 0.5 ml of cold 1:4 water:ethanol solution was added to 0.5 ml of tissue homogenate. A 10-1 volume of glacial acetic acid was added to each sample followed by 5 min of incubation at room temperature. Samples were then centrifuged at 2500 g for 2 min. The superna-

tants were then applied to C18 minicolumns (Amersham Pharmacia Biotech), and the columns were washed with distilled water and hexane. PGE₂ was eluted into siliconized glass vials with two 0.75 ml volumes of ethyl acetate. This fraction was evaporated to dryness under a stream of argon and stored at -80°C. According to the protocol provided with the EIA kit, samples were brought up in 1 ml of buffer and assayed in 96-well plates. PGE₂ standards ranged from 50 to 6400 pg/ml. The relative concentration of PGE₂ was normalized against the wet weight of the tissue samples.

Determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Lipid peroxidation was measured by the method of Stocks et al.²³ The mucosa of the stomach was scraped with a blunt knife and frozen on dry ice with a tissue disruptor (STIR-R, model K43; TRI-R, Rockville Center, NY, USA) driven at 1360 g for 30 s. Two milliliters of trichloroacetic acid (TCA) was added to each tube containing 3 ml sample and homogenized for 15 s by vortex. Tubes were centrifuged at 1800 g for 10 min (Labofuge 200; Heraeus, Hanau, Germany). Three milliliters of the clear supernatant was added to the tubes, as was 1 ml thiobarbituric acid (TBA), and the tubes were kept in the boiling water for 15 min. Cooled samples were assayed by spectrophotometry at 532 nm (Shimadzu UV-1601). The reagent 1,1,3,3-tetraethoxypropane was used as a standard. The results were calculated as nmol TBA per gram protein.

Measurement of gastric myeloperoxidase activity

Leukocyte infiltration in gastric mucosa was assessed by determining gastric myeloperoxidase (MPO) activity by using a modification of the method of Murakami et al.²⁴ Briefly, the stomachs were weighed and suspended in 5 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) containing 1% hexadecyltrimethylammonium bromide. Samples were then homogenized, and the homogenate was sonicated and stored in a deep freezer at -80°C until the assay. The samples were centrifuged at 4500 g for 30 min at 4°C. Aliquots (0.1 ml) of supernatant to be measured were then mixed with 0.55 ml of a reaction buffer (50 mM phosphate, pH 6.0, containing 0.0005% hydrogen peroxide, and 1.25 mg/ml o-dianisidine dihydrochloride). The change in absorbance at 460 nm over a 6.5-min period was measured in a spectrophotometer (Shimadzu UV 1600, Kyoto, Japan). One unit (U) of MPO activity was defined as the amount of enzyme causing a change in absorbance of 0.001/min. Results are expressed as U/g protein.

Protein assay

The total protein concentration of each tissue homogenate was determined by using a dye reagent concentrated protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Statistics

Data are presented as means ± SD. Statistical analyses were performed with SPSS software and the Kruskal Wallis and Mann-Whitney *U* tests.

Results

Gastric lesion index

Figure 1 shows the total area of the erosions expressed as a morphological index of gastric injury. IR caused erosions in the gastric mucosa, whereas the sham-operated group did not have any lesions. After IR, the gastric mucosal injury index was $6.39 \pm 2.73 \text{ mm}^2$. When orexin-A was administered, the total area of mucosal erosions decreased to $3.56 \pm 0.98 \text{ mm}^2$. Orexin-A significantly ($P < 0.01$) improved gastric mucosal integrity against IR.

Gastric mucus content

Figure 2 shows the alcian blue-binding capacity, which indicates the acidic mucopolysaccharide content of the gastric mucus. In the sham-operated group, the mucus content was $109.61 \pm 29.71 \mu\text{g/g}$ wet weight of tissue. In the IR group, the mucus content of gastric mucosa was significantly ($P < 0.01$) reduced to $29.12 \pm 13.56 \mu\text{g/g}$ tissue. Neither the IR+orexin ($21.16 \pm 10.83 \mu\text{g/g}$ tissue) or the sham-operated+orexin ($37.22 \pm 12.90 \mu\text{g/g}$ tissue) groups differed significantly compared with the IR group.

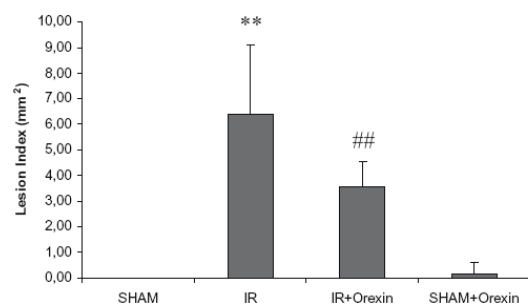


Fig. 1. Gastric lesion index. Results are expressed as means ± SD. ** $P < 0.01$ versus the sham-operated (SHAM) group. ## $P < 0.01$ versus the ischemia-reperfusion (IR) group

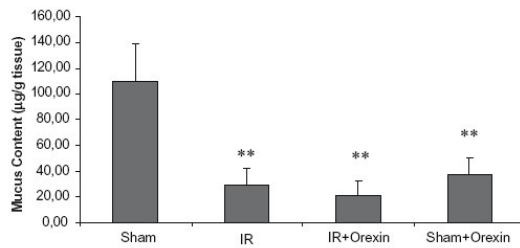


Fig. 2. Gastric mucus content. Results are expressed as means \pm SD. ** $P < 0.01$ versus the sham-operated (*Sham*) group

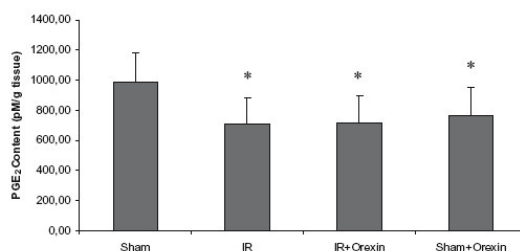


Fig. 3. Gastric mucosal prostaglandin E₂ (*PGE*₂) content. Results are expressed as means \pm SD. * $P < 0.05$ versus the Sham group

Gastric mucosal PGE₂ content

As seen in the Fig. 3, IR significantly ($P < 0.05$) reduced the PGE₂ content from 985.30 ± 197.14 pM/g tissue to 704.26 ± 180.96 pM/g tissue. PGE₂ production was not significantly different in the IR+orexin (718.36 ± 180.07 pM/g tissue) or sham+orexin groups (763.70 ± 190.11 pM/g tissue) compared with in the IR group.

TBARS content of the gastric tissue

Thiobarbituric acid-reactive substances in the gastric mucosa, an index of lipid peroxidation, increased significantly ($P < 0.05$; Fig. 4) after IR injury from a basal concentration of 252.89 ± 48.32 nmol/g protein to 325.38 ± 52.74 nmol/g protein. Treatment with orexin-A reduced TBARS production to 265.54 ± 50.51 compared with IR rats ($P < 0.05$). In the sham+orexin-A group, the TBARS content was 200.70 ± 35.60 nmol/g protein.

MPO activity in gastric tissue

MPO activity in the gastric mucosa of sham-operated rats was 1.16 ± 0.44 U/g protein, and this activity increased slightly in the IR group (1.36 ± 0.42 U/g protein); treatment with orexin-A significantly decreased the MPO activity (0.77 ± 0.31 U/g protein ($P < 0.05$

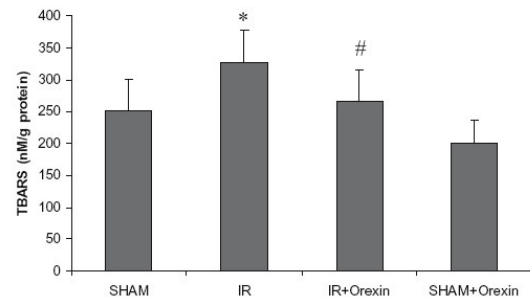


Fig. 4. Thiobarbituric acid-reactive substances (*TBARS*) content in gastric tissue. Results are expressed as means \pm SD. * $P < 0.05$ versus SHAM group. # $P < 0.05$ versus IR group

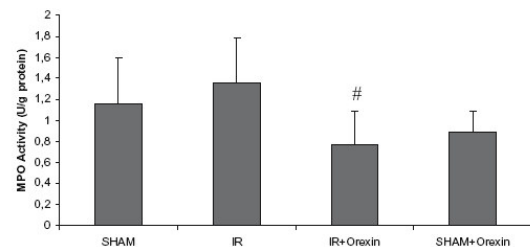


Fig. 5. Gastric myeloperoxidase (*MPO*) activity. Results are expressed as means \pm SD. # $P < 0.05$ versus IR group

versus the IR group; Fig. 5). In the sham+orexin group, activity was decreased compared with in the sham group, but this effect was not statistically significant.

Discussion

This study demonstrates that exogenous orexin-A administered by infusion exhibits a gastroprotective effect against IR-induced gastric lesions and is accompanied by a decline in gastric mucosal MPO activity and TBARS content. Exposure to IR caused a decrease in the gastric PGE₂ and mucus contents, but these effects were unchanged by orexin-A. These data suggest that the orexin-A-induced protection against IR injury can be explained, at least in part, by the suppressive effects exhibited by this peptide on neutrophil activation and oxidative stress caused by superoxide radicals independently of PGE₂.

Previous studies indicated that ischemic conditions lead to marked alterations in the orexinergic system. Yan et al.⁶ found that after acute stimulus with IR, orexin-A mRNA expression shows a fluctuating declining trend in the hypothalamus. This finding suggests that

the expression of orexin-A mRNA may be a marker of acute inflammation. However, it has been suggested that OX1R expression is significantly increased in response to ischemic conditions in rats²⁵ and mice.²¹ Moreover, a decline in orexin-A production has been found in subarachnoid hemorrhage patients.²⁰ The authors concluded that this reduction may be associated with alterations in brain orexin-A signaling in response to ischemia.²⁰ On the other hand, Lin et al.²⁶ found no significant difference in the expression level of orexin-A before and after intestinal IR injury in rats.

It is known that gastric mucosal perfusion is an essential factor in the ability of the mucosa to protect against harmful effects. Reperfusion of ischemic tissue causes tissue injury, and it has been suggested that the main factors producing IR-induced injury are oxygen-free radicals and neutrophil activation.²⁷⁻³⁰

The mucus is one of component of the gastric mucosal barrier and plays an important role in mucosal defense against harmful effects. Stimulation of mucus production helps to maintain mucosal integrity.²⁹ It is known that gastric mucus possesses antioxidant properties because of its rich glycoprotein content. In addition to its antioxidant effect, mucin associated with bicarbonate ions, by its barrier function, may play an important role in protecting the gastric mucosa against IR injury.²⁷

The stomach can defend itself from the injury caused by irritants and harmful agents via activation of mucus and bicarbonate secretion, mucosal hydrophobicity, and gastric microcirculation, by generation of protective prostaglandins within the gastric mucosa.¹² Prostaglandins exert potent protective effects, and inhibition of prostaglandin formation abolishes gastroprotection; thus, prostaglandins have been proposed to be key mucosal defense mediators.²⁹ PGE₂ obviously inhibits basal and stimulates gastric acid secretion, increases gastric mucin, and thickens the gastric mucosa gel layer. PGE₂ and PGI₂ dilate the blood vessels, and increase blood flow and carbohydrate secretion, enhance the resistance of the gastric mucosa against injury. In addition, prostaglandins extend the life span of epithelia and thicken the mucosa layer.³¹⁻³³

Our present study demonstrated that exogenous orexin-A attenuates the gastric lesions evoked by IR. It might be inferred that the gastroprotective effect of orexin-A is related to PGE₂ generation because of the PGE₂-mediated thermogenic effect of orexin-A.³⁴ In the present study, the exposure of rats to IR injury was associated with a significant decline in gastric PGE₂ and mucus content. In agreement with our findings, Kitano et al.³⁵ reported that the mucus layer was decreased during ischemia on the basis of microscopic observation. Also, another study reported that IR causes a significant reduction in gastric PGE₂ content.³⁶ In spite of its gastroprotective effect, we found that orexin-A did not

restore gastric the PGE₂ or mucus contents in rats exposed to IR, but that this peptide reduced MPO activity and TBARS content in gastric mucosa.

TBARS is an index of lipid peroxidation. The main TBARS is malondialdehyde (MDA); therefore, the concentration of TBARS is expressed as the content of MDA in tissue. MDA is a three-carbon compound formed from peroxidized polyunsaturated fatty acids, mainly arachidonic acid, used as a marker of lipid peroxidation, one of the end products of membrane lipid peroxidation. MDA levels are increased in metabolic states characterized by an excess of oxygen free radicals.³⁷ Free oxygen radicals, which are known to be mediators of gastric mucosal injury induced by IR, initiate a free radical chain reaction known as lipid peroxidation.^{29,37} We clearly showed that gastric mucosal injury and TBARS increased significantly following ischemia for 30 min and reperfusion for 60 min. Orexin-A administration decreased lipid peroxidation, and tended to reduce the TBARS content to sham group values. However, the decline in lipid peroxidation could possibly be attributed to the antioxidant features of orexin-A.

Neutrophils play an important role in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by IR. The main source of oxygen radicals may be polymorphonuclear leukocytes. MPO activity in tissues is considered an index of neutrophil infiltration. It has been demonstrated previously that there is a significant increase in MPO activity accompanying gastric mucosal damage by IR, and treatment with antioxidant drugs significantly decreases the rise in MPO activity.¹⁴ In this study we found a nonsignificant increase in gastric mucosal MPO activity due to IR. We also found that, similar to the TBARS result, orexin-A reduced the MPO activity induced by IR. This result can be explained as a suppressor effect on leukocyte activation due to IR.

In conclusion, orexin-A showed a gastroprotective effect against harmful effects of IR. However, the mechanism of this protection is poorly understood. The gastroprotective effect of orexin-A appeared to be independent of endogenous prostaglandins and may be related to a decrease in lipid peroxidation in gastric tissue. Additional studies are needed to investigate further the mechanism of these beneficial effects of orexin-A.

Acknowledgments. This study was supported by the Research Foundation of Akdeniz University (Project numbers: 2002.02.0122.005 and 2005.06.0103.018).

References

1. Okumura T, Takeuchi S, Motomura W, Yamada H, Egashira S, Asahi S, et al. Requirement of intact disulfide bonds in orexin-

- A-induced stimulation of gastric acid secretion that is mediated by OX1 receptor activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:976–81.
2. Ehrstrom M, Gustafsson T, Finn A, Kirchgessner A, Gryback P, Jacobsson H, et al. Inhibitory effect of exogenous orexin A on gastric emptying, plasma leptin, and the distribution of orexin and orexin receptors in the gut and pancreas in man. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2370–7.
 3. Naslund E, Ehrstrom M, Ma J, Hellstrom PM, Kirchgessner AL. Localization and effects of orexin on fasting motility in the rat duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:470–9.
 4. Kirchgessner AL. Orexins in the brain–gut axis. *Endocr Rev* 2002;23:1–15.
 5. Johnen O, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A, Dominiak P. Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology* 2001;142:3324–31.
 6. Yan GT, Lin J, Liao J. Distribution of orexin-A mRNA expression in different organs and its variation in acute inflammation. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 2005;17:207–10.
 7. Satoh Y, Uchida M, Fujita A, Nishio H, Takeuchi T, Hata F. Possible role of orexin A in nonadrenergic, noncholinergic inhibitory response of muscle of the mouse small intestine. *Eur J Pharmacol* 2001;428:337–42.
 8. Kobashi M, Furudono Y, Matsuo R, Yamamoto T. Central orexin facilitates gastric relaxation and contractility in rats. *Neurosci Lett* 2002;332:171–4.
 9. Ehrstrom M, Levin F, Kirchgessner AL, Schmidt PT, Hilsted LM, Gryback P, et al. Stimulatory effect of endogenous orexin A on gastric emptying and acid secretion independent of gastrin. *Regul Pept* 2005;132:9–16.
 10. Konturek PC, Brzozowski T, Walter B, Burnat G, Hess T, Hahn EG, et al. Ghrelin-induced gastroprotection against ischemia–reperfusion injury involves an activation of sensory afferent nerves and hyperemia mediated by nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 2006;536:171–81.
 11. Nejadkey F, Nahavandi A, Dehpour AR, Mani AR. Role of nitric oxide in the gastro-protective effect of lithium. *Pathophysiology* 2006;13:85–9.
 12. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowska I, Pawlik T. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. *J Physiol Pharmacol* 2005;56:33–55.
 13. Sanchez S, Martin MJ, Ortiz P, Motilva V, Herrerias JM, Alarcon de la Lastra C. Role of prostaglandins and nitric oxide in gastric damage induced by metamizol in rats. *Inflamm Res* 2002;51:385–92.
 14. Derin N, Agac A, Bayram Z, Asar M, Izgut-Uysal VN. Effects of L-carnitine on neutrophil-mediated ischemia–reperfusion injury in rat stomach. *Cell Biochem Funct* 2006;24:437–42.
 15. De La Lastra CA, Cabeza J, Motilva V, Martin MJ. Melatonin protects against gastric ischemia–reperfusion injury in rats. *J Pineal Res* 1997;23:47–52.
 16. Villegas I, Martin AR, Toma W, de la Lastra CA. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, protects against gastric ischemia–reperfusion damage in rats: role of oxygen free radicals generation. *Eur J Pharmacol* 2004;505:195–203.
 17. Silen W, Schiessel R, Kivilaakso E. The gastric mucosal barrier and ulceration. *Brain Res Bull* 1980;5:3–6.
 18. Yoshikawa T, Takahashi S, Naito Y, Ueda S, Tanigawa T, Yoshida N, et al. Effects of a platelet-activating factor antagonist, CV-6209, on gastric mucosal lesions induced by ischemia–reperfusion. *Lipids* 1992;27:1058–60.
 19. Wada K, Kamisaki Y, Kitano M, Kishimoto Y, Nakamoto K, Itoh T. A new gastric ulcer model induced by ischemia–reperfusion in the rat: role of leukocytes on ulceration in rat stomach. *Life Sci* 1996;59:295–301.
 20. Dohi K, Ripley B, Fujiki N, Ohtaki H, Shioda S, Aruga T, et al. CSF hypocretin-1/orexin-A concentrations in patients with subarachnoid hemorrhage (SAH). *Peptides* 2005;26:2339–43.
 21. Irving EA, Harrison DC, Babbs AJ, Mayes AC, Campbell CA, Hunter AJ, et al. Increased cortical expression of the orexin-1 receptor following permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurosci Lett* 2002;324:53–6.
 22. Corne S, Marrissey SM, Woods RJ. A method for quantitative estimation of gastric barrier mucus. *J Physiol (Lond)* 1974;242:1169–79.
 23. Stocks J, Offerman EL, Modell CB, Dormandy TL. The susceptibility to autooxidation of human red cell lipids in health and disease. *British J Haematol* 1972;23:713–24.
 24. Murakami K, Okajima K, Uchiba M, Harada N, Liu W, Okabe H, et al. Role of granulocyte elastase in indomethacin-induced gastric mucosal lesion formation in rats. *J Lab Clin Med* 1997;130:307–13.
 25. Nakamachi T, Endo S, Ohtaki H, Yin L, Kenji D, Kudo Y, et al. Orexin-1 receptor expression after global ischemia in mice. *Regul Pept* 2005;126:49–54.
 26. Lin J, Yan GT, Gao XN, Liao J, Hao XH, Zhang K. Effect of intestinal ischemia/reperfusion injury on leptin and orexin-A levels. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2006;26:719–24.
 27. Mojzis J, Hegedusova R, Mirossay L. Role of mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. *Physiol Res* 2000;49:441–6.
 28. Mojzis J, Hviscova K, Germanova D, Bukovicova D, Mirossay L. Protective effect of quercetin on ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. *Physiol Res* 2001;50:501–6.
 29. Derin N, Izgut-Uysal VN, Agac A, Aliciguzel Y, Demir N. L-carnitine protects gastric mucosa by decreasing ischemia–reperfusion induced lipid peroxidation. *J Physiol Pharmacol* 2004;55:595–606.
 30. Qiao WL, Wang L, Zhang JF, Zhang YM. Effects of gastric ischemia–reperfusion on gastric mucosal cellular apoptosis and proliferation in rats. *Sheng Li Xue Bao* 2006;58:237–43.
 31. Zhang LH, Yao CB, Gao MQ, Li HQ. Gastric mucosal injury due to hemorrhagic reperfusion and efficacy of *Salvia miltiorrhizae* extract F and cimetidine. *World J Gastroenterol* 2005;11:2830–3.
 32. Peskar BM. Role of cyclooxygenase isoforms in gastric mucosal defense and ulcer healing. *Inflammopharmacology* 2005;13:15–26.
 33. Pajdo R, Brzozowski T, Konturek PC, Kwiecien S, Konturek SJ, Sliwowski Z, et al. Ischemic preconditioning, the most effective gastroprotective intervention: involvement of prostaglandins, nitric oxide, adenosine and sensory nerves. *Eur J Pharmacol* 2001;427:263–76.
 34. Monda M, Viggiano A, Mondola P, De Luca V. Inhibition of prostaglandin synthesis reduces hyperthermic reactions induced by hypocretin-1/orexin A. *Brain Res* 2001;909:68–74.
 35. Kitano M, Wada K, Kamisaki Y, Nakamoto K, Kishimoto Y, Kawasaki H, et al. Effects of cimetidine on acute gastric mucosal injury induced by ischemia–reperfusion in rats. *Pharmacology* 1997;55:154–64.
 36. Brzozowski T, Konturek PC, Sliwowski Z, Pajdo R, Drozdowicz D, Kwiecien S, et al. Prostaglandin/cyclooxygenase pathway in ghrelin-induced gastroprotection against ischemia–reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;319:477–87.
 37. Skibska B, Jozefowicz-Okonkwo G, Goraca A. Protective effects of early administration of alpha-lipoic acid against lipopolysaccharide-induced plasma lipid peroxidation. *Pharmacol Rep* 2006;58:399–404.