



**T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMAKOLOJİ VE KLİNİK FARMAKOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**İNTRASEREBROVENTRİKÜLER VERİLEN CDP-KOLİN'İN  
SERUM GHRELİN VE LEPTİN DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dr. D. Sinem K. KIYICI**

**(DOKTORA TEZİ)**

**Bursa-2013**



T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMAKOLOJİ VE KLİNİK FARMAKOLOJİ  
ANABİLİM DALI

İNTRASEREBROVENTRİKÜLER VERİLEN CDP-KOLİN'İN  
SERUM GHRELİN VE LEPTİN DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. D. Sinem K. KIYICI

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Sinan ÇAVUN

Bursa-2013

## İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	II
İNGİLİZCE ÖZET.....	III
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
GEREÇ ve YÖNTEM.....	11
Laboratuar yöntemleri.....	12
İlaçlar ve serebroventriküler enjeksiyon.....	13
İstatistiksel analiz.....	13
BULGULAR.....	14
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	23
KAYNAKLAR.....	28
TEŞEKKÜR.....	35
ÖZGEÇMİŞ.....	36

## ÖZET

Ghrelin ve leptin yiyecek alımını kontrol eden iki önemli peptiddir. Yakın zamanda CDP-kolinin iştahı baskılayıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada intraserebroventriküler (isv) olarak verilen CDP-kolin'in serum ghrelin, leptin kortikosteron ve glukoz düzeyleri üzerine olası etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada Wistar-Albino sıçanlara 0.5 (n=8), 1.0 (n=8) ve 2.0 (n=8)  $\mu$ mol CDP-kolin ve tuzlu su isv olarak verildi. Bazal şartlarda ve CDP-kolin sonrası 5., 15., 30., 60. ve 120. dakikalarda serum leptin, ghrelin ölçümü için karotis artere yerleştirilmiş kanülden kan örneği alındı. İkinci aşamada; maksimum etkinliğin görüldüğü doza eşit ekimolar dozda kolin ve sitidin isv verilerek ölçümler tekrarlandı. Üçüncü aşamada; oluşan etkinin muskarinik ya da nikotinik reseptörler aracılığıyla gerçekleştiğinin aydınlatılması açısından CDP-kolin verilmesinden önce atropin ve mekamilamin verilerek deneyler tekrarlandı. 1 $\mu$ mol CDP-kolin enjeksiyonunu takiben serum ghrelin düzeyinde 60. dakikada anlamlı düzeyde baskılanma olduğu (p=0.025), leptin düzeylerinde ise, 60. ve 120 dakikalarda anlamlı artış olduğu (sırasıyla: p=0.012, p=0.017) saptandı. Santral CDP-kolin verilmesinin serum glukoz ve kortikosteron düzeylerinde de zaman ve doz bağımlı artışa neden olduğu belirlendi. CDP-kolin sonrası serum leptin ve ghrelin üzerine olan etkinin benzeri kolin verilmesini takiben gözlenirken, sitidin sonrası herhangi bir etki gözlenmedi. CDP-kolin öncesinde mekamilamin verildiğinde serum ghrelin düzeylerinde görülen baskılanmanın kaybolduğu, leptin artışının ise hem mekamilamin hem de atropin sonrası bloke olduğu belirlendi.

Sonuç olarak isv verilen CDP-kolin serum ghrelin düzeylerinde baskılanmaya yol açarken, serum leptin düzeylerini arttırmaktadır. Reseptör antagonisti verilmesini takiben

gözlenen etkiler ghrelin süpresyonunda nikotinic reseptörlerin, leptin artışında ise hem nikotinic hem de muskarinic reseptörlerin rol oynadığını düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** CDP-kolin, ghrelin, leptin

## SUMMARY

Ghrelin and leptin are two important peptides which control food intake. Recently it was shown that CDP-choline has suppressive effect on appetite. In present study we aimed to test intracerebroventricular (icv) administration of CDP-choline on serum ghrelin, leptin, glucose and corticosterone levels in rats.

Intracerebroventricular 0.5 (n=8), 1.0 (n=8) and 2.0 (n=8)  $\mu\text{mol}$  CDP-choline and saline were administered to male Wistar-Albino rats. For the measurement of serum leptin and ghrelin levels, blood samples were withdrawn baseline and 5<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup>, 60<sup>th</sup> and 120<sup>th</sup> min after icv CDP-choline injection from a canula that was inserted into the left carotid artery. Equimolar doses of icv choline and cytidine were administered and measurements were repeated at the second stage of the study. Atropine and mecamlamine were injected before CDP-choline and experiments were repeated in the third stage of the study to identify whether the observed effect of the drugs was relevant by muscarinic or nicotinic receptors. After 1  $\mu\text{mol}$  CDP-choline injection ghrelin levels were suppressed significantly at 60<sup>th</sup> min with ( $p=0.025$ ) whereas serum leptin levels were increased at 60<sup>th</sup> and 120<sup>th</sup> min ( $p=0.012$  and  $p=0.017$ , respectively). Central CDP-choline injections also induced a dose- and time dependent increase in serum glucose and corticosterone levels. The effect of choline on serum leptin and ghrelin levels was similar by CDP-choline while no effect was seen by cytidine. Suppression of serum ghrelin levels was abolished by mecamlamine pretreatment while increment of leptin was blocked by both atropine and mecamlamine pretreatments.

In conclusion; centrally injected CDP-choline was suppressed serum ghrelin levels while increasing serum leptin levels. The observed effects after receptor antagonists

suggest that nicotinic receptors play role in suppression of serum ghrelin levels whereas nicotinic and muscarinic receptors both take part in the increment of serum leptin levels.

**Key Words:** CDP-choline, ghrelin, leptin

## GİRİŞ

Obezite ve komplikasyonları önemli bir halk sağlığı sorunu olup, günümüzde özellikle endüstrileşmiş toplumlarda obezite prevalansında ciddi bir artış söz konusudur (1). Bu nedenle obezite etyopatolojisinin aydınlatılması ve obezitenin sağaltımı ile ilgili yapılan çalışmalar önem taşımaktadır. Beslenme üzerine önemli etkileri bulunan peptidlerden ikisi başlıca mideden salgılan ghrelin ile yağ dokusundan salgılanan leptin'dir (2, 3). Leptin gerek hayvan gerek insan çalışmalarında kısa ve uzun dönem yiyecek alımı üzerine düzenleyici etkisi bulunduğu gösterilmiş anoreksijenik bir peptiddir (4). Günümüzde oreksijenik etkinliği gösterilmiş tek gastrointestinal kaynaklı hormon ise ghrelin olup lokal olarak hipotalamus ve pitüiter bezde de sentezlenebildiği saptanmıştır (5).

Periferik dokulardan gelen beslenme ile ilgili sinyaller nukleus traktus solitarius (NTS) üzerinden hipotalamusun arkuat nukleusuna iletilirler. Arkuat nukleusda (ARC) yiyecek alımını kontrol eden iki ayrı hücre topluluğu bulunmaktadır. Nöropeptid Y/Agouti gene-related peptid (NPY/AgRP) içeren nöron topluluğunun uyarılması yiyecek alımını pozitif yönde etkilerken, proopiomelanokortin (POMC) içeren nöronal topluluğun uyarılmasının yiyecek alımı üzerine negatif yönde etkisi bulunmaktadır. Ghrelinin beslenme davranışı üzerine olan etkisinin NTS ve ARC üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir. Hipotalamusda ghrelinin leptine zıt yönde etki göstererek NPY/AgRP içeren nöronlar üzerine stimülasyona, POMC içeren nöron topluluğu üzerine ise inhibisyona neden olduğu saptanmıştır (6, 7). Deney hayvanlarında yapılmış parasempatik sistem ve ghrelin sekresyonunu inceleyen çalışmaların sonuçları çelişkilidir. Sıçan çalışmalarında vagotominin açlığını indüklediği ghrelin artışını inhibe ettiği ve atropin enjeksiyonunun ise açlık ghrelin seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (8, 9). Koyunlarda yapılmış bir çalışmada ise kolinerjik bloker kullanımının ghrelin düzeylerinde artışa yol açtığı gösterilmiş olup (10), bu çalışmaların sonuçları ghrelin sekresyonunda vagusun kolinerjik nöronlarının önemli rol oynadığını düşündürmektedir.

Cytidine-5'-diphosphate choline (CDP-kolin) endojen olarak da sentezlenebilen bir peptid olup pek çok hücrel olayda yer almaktadır (11). Oral, intravenöz veya intraserebroventriküler (isv) olarak verilen CDP-kolin in vivo ortamda hızla kolin ve sitidin/üridine metabolize olur. Sitidin ve kolinin her ikisi de intrasellüler metabolik fonksiyon ve enzimatik olaylarda rol oynamaktadır. Kolin, asetilkolinin prekürsörü olup, doku ve plazma kolin düzeylerinde artışa yol açan tedavilerin asetilkolin sentezinde de



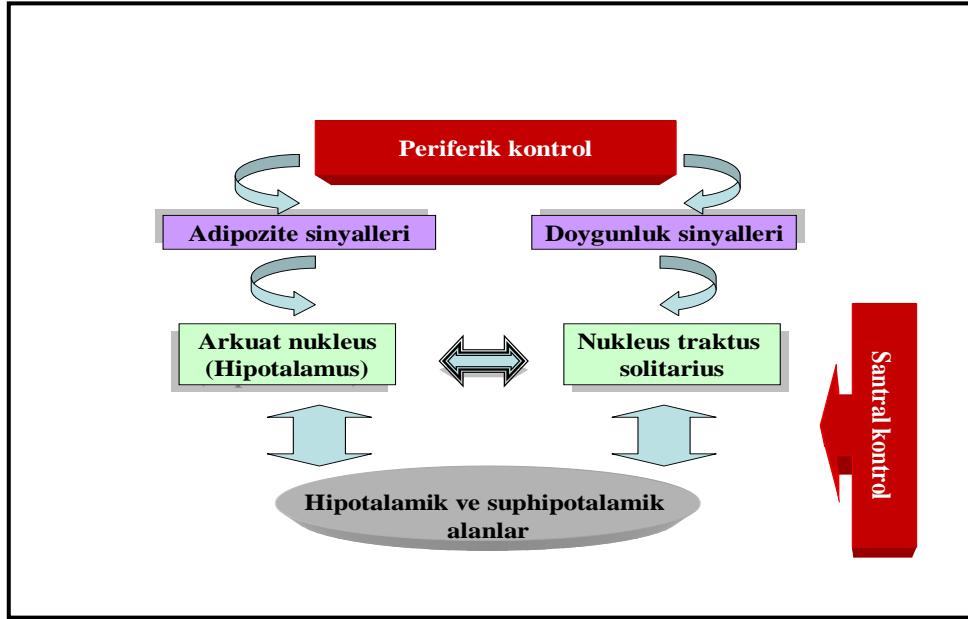
artıŖa yol açtığı gsterilmiŖtir (12, 13). Yapılan bir alıŖmada CDP-kolin kullanan hastalarda iŖtah azalması olduğu saptanmıŖtır (14). Bu etkisinin gerekleŖmesine serum leptin ve ghrelin düzeylerindeki deđiŖimin eŖlik edip etmediği bilinmemektedir. Beslenmenin kontrolünde önemli rol oynayan hipotalamusun yaygın kolinerjik innervasyonu (15–18) ve beslenme üzerine vagal uyarının etkisi (6) göz önüne alındığında CDP-kolin'in serum leptin ve ghrelin düzeyleri üzerine etkisinin olabileceği dŖnlmŖtir.

Bu nedenle alıŖmamızda isv olarak verilen CDP-kolin'in serum ghrelin ve leptin düzeyleri üzerine olası etkilerinin incelenmesi planlanmıŖtır. alıŖmamızda leptin ve ghrelinin ölçümlerinin yanı sıra bu peptidlerin kan düzeyindeki deđiŖimlerde etkisi olabileceği dŖnlen serum glukoz ve kortikosteron düzeylerinin de değerlendirilmesi amalanmıŖtır.

## GENEL BİLGİLER

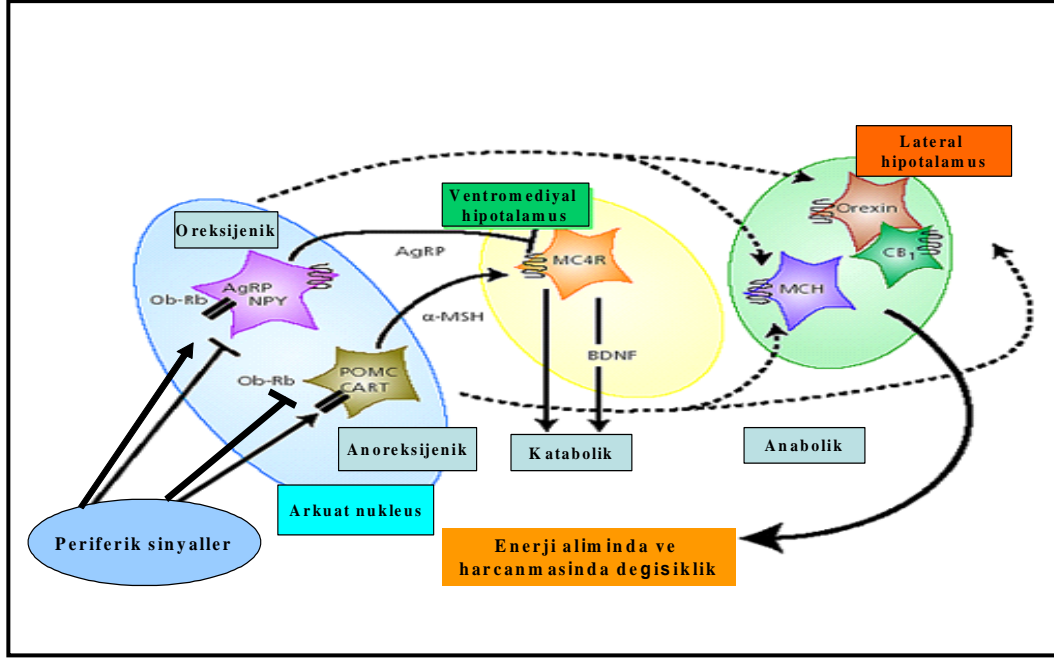
### İştah ve Beslenmenin Kontrolü

İştah santral ve periferik sinyaller tarafından regüle edilen kompleks bir durumdur. İştahın periferik regülasyonunda doyumluk ve adipozite sinyalleri rol oynarken, santral kontrolünde nöropeptiderjik, monoaminerjik ve endokannabinoid sistem gibi pek çok sistem olaya katılmaktadır. Hipotalamusda iştahın ana kontrol noktası ARC'dir. Paraventriküler nukleus, ventromedial nukleus, lateral hipotalamus ve perifornikal alanlar da iştahın kontrolünde önemli merkezlerdir. NTS kaudal beyin sisteminde yer alan ve beslenmenin kontrolünde önemli rol oynayan bir diğer merkezdir (6). GİS'den kaynaklanan pek çok doyumluk sinyalinin de vagus yoluyla önce NTS'e geldiği ve burada işlenerek ARC gibi hipotalamik ve suprahipotalamik alanlara iletiildiği düşünülmektedir (19) (şekil 1).



Şekil 1. Yiyecek alımını kontrol eden mekanizmalar. Valassi ve ark'nın (6) makalesinden uyarlanmıştır.

ARC'da yiyecek alımını kontrol eden iki ayrı hücre topluluğu bulunmaktadır. NPY/AgRP içeren nöron topluluğunun uyarılması yiyecek alımını pozitif yönde etkilerken, POMC içeren nöronal topluluğun uyarılmasının yiyecek alımı üzerine negatif yönde etkisi bulunmaktadır (6, 7, 20) (şekil 2).



Şekil 2. Beslenmenin merkezi kontrolü. Flier J.S.'nin (20) makalesinden uyarlanmıştır.

Beslenmenin kontrolünde merkezi sinyaller kadar periferik sinyallerde rol almaktadır. Leptin, insülin, kolesistokinin, glukagon like peptid-1 (GLP-1), pankretik polipeptid Y (PYY) ve midenin distansiyonu iştahın baskılanması yönünde etkili olurken (20-24) ghrelin ve midenin kontraksiyonu iştahı arttırıcı yönde etki göstermektedir (26).

## Ghrelin

1977 yılında Bowers ve arkadaşları (27) in vitro büyüme hormon sekreyonuna neden olan ilk sentetik peptid analogu met-enkefalini keşfetmiş ve ardından 1996 yılında bu sentetik peptid analogların bağlandığı büyüme hormonu sekretogog reseptörleri (GHS-R) tanımlanmıştır. 1999 yılında ise Kojimo ve arkadaşları (28) tarafından GHS-R'ünün doğal ligandı olan ghrelin keşfedilmiştir.

Ghrelin amino terminal ucundaki 3. aminoasitine yağ asidi zinciri bağlanmış 28 aminoasitlik bir peptiddir. Ghrelin primer olarak mide fundusundaki oksintik mukozadan üretilir. Midede ghrelin sekrete eden hücreler lümene değil kapiller dolaşıma açılırlar (28–31). Ghrelinin primer olarak midede üretilmesine rağmen bağırsaklar, pankreas, böbrek, plasenta, hipotalamus, pitüiter bez ve immün hücrelerde de az miktarda üretildiği gösterilmiştir (26). Dokularda N-octanoyl-ghrelin/acylated ghrelin ve Des-octanoyl ghrelin/des-ghrelin/unacylated ghrelin olarak iki major formda bulunur. Yayınlarda

'*acylated*' ghrelinin hormonun aktif formu olduğu ve metabolik etkilerinden bu formunun sorumlu olduğu bildirilmektedir. Ancak son dönemde yapılan çalışmalar '*unacylated*' ghrelinin de birtakım biyolojik etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir (32–34). Ghrelin etkisini GHS-R'üne bağlanarak gösterir. GHS-R'lerinin hipotalamus, dorsal vagal kompleks, parasempatik pregangliyonik nöronlar ve mide, barsak, böbrek, pankreas ve adipoz dokuda ekspresse edildiği gösterilmiştir (28, 35). GHS-R'ünün tip 1a ve tip 1b olmak üzere iki tipi tanımlanmış olup, tip 1b'nin farmakolojik olarak inaktif olduğu dşnlmektedir. GHS-R tip 1a tipik bir G protein ilişkili reseptör olup membranı 7 kez geçen transmembran alfa-helikol segment yapısı gösterir. Fosfolipaz c ve protein kinaz c aktivasyonu sonrası hücre içinde inositol 1,4,5-trifosfat ve kalsiyum artışına yol açarak etkisini gösterir (5, 26). GİS'den sekrete edilen ghrelinin üç farklı mekanizma ile:1)Direkt olarak kan dolaşımı ile hipofiz ve beyinde kan-beyin bariyeri ile korunmayan alanlara ulaşarak, 2) Doyurulabilir bir transport sistemi ile kan-beyin bariyerini geçerek 3) Vagus siniri aracılığıyla indirekt olarak beyine ulaştığı dşnlmektedir (26). Ghrelinin beslenme davranışı üzerine olan etkisinin NTS ve ARC üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir. Hipotalamusda ghrelinin leptine zıt yönde etki göstererek NPY/AgRP içeren nöronlar üzerine stimülasyona, POMC içeren nöron topluluğu üzerine ise inhibisyona neden olduğu saptanmıştır (6,7).

### **Ghrelinin Etkileri**

Ghrelinin beyin-barsak kaynaklı bir peptid olarak geniş bir doku dağılımı bulunmaktadır (28, 30, 32, 36). Bu da pek çok organda endokrin ve parakrin etkilerinin bulunduğunu göstermektedir. Büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH) ile sinerjistik olarak büyüme hormonu (GH) sekresyonunu arttırmaktadır. Çalışmalarda pitüiter hücrelerden GH sekresyonunu doza bağımlı olarak arttırırken, GH yapımını etkilemediği gösterilmiştir (9, 37). Ghrelin iştahı arttırmakta olup, insanlarda ve hayvanlarda yiyecek alımını stimüle ettiği gösterilmiştir. Preprandiyal plazma ghrelin dzeyelerindeki artışın beslenmeyi başlatıcı etkisinin bulunduğu ve postprandiyal 60–120. dakikalarda baskılandığı bildirilmektedir. Bunun yanı sıra serum ghrelin dzeyelerinin diurnal varyasyon gösterdiği, gece yüksek dzeyelerde bulunurken saat 02.00–04.00 arası azaldığı gözlenmiştir (30, 37–40). Ghrelin esas olarak anabolik bir hormon olarak kabul edilmekte olup lipojenik ve diyabetojenik yönde etkileri bulunmaktadır. Yeni veriler ghrelinin immün fonksiyonlar, bilişsel faaliyetler, gonadal aks, kemik metabolizması, gastrointestinal sistem (GİS) motilitesi, kardiyovasküler sistem üzerine etkilerinin bulunduğunu göstermiş olup, tüm bunlar ghrelinin multifonksiyonel bir hormon olduğuna işaret etmektedir (5, 26, 41).

## **Ghreltin Regölasyonu**

Akut ve kronik enerji imbalansının serum ghreltin düzeyleri üzerine etkili olduğu bilinmektedir. Açlık, düşük beden kitle indeksi, GHRH, testostosterone, parasempatik aktivite ghreltin sekresyonunu arttırmaktayken yiyecek alımı, yüksek beden kitle indeksi, glukoz, insülin, somatostatin, tiroid hormonları, GH, GHS, ürokortin, bazı GİS peptidleri ghreltin sekresyonunda baskılanmaya yol açtığı düşünölmektedir (41). İnsülin ve ghreltin arasında fonksiyonel bir ilişki olup olmadığını ve/veya serum glukoz düzeylerinin bu denklemde değiştirici bir faktör olarak yer alıp almadığını inceleyen pek çok çalışma bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda postpranial ghreltin baskılanmasında insülinin direkt etkisinin olduğu saptanırken bazılarında ise ghreltin düzeylerini insülinde çok GİS'te bulunan besin maddelerinin değiştirdiğine yönelik bulgular saptanmıştır (42–44). Flanagan ve ark'nın (43) çalışmasında ise hipergliseminin insülin düzeylerindeki artış ile birlikte ghreltin süpresyonu üzerine additif etkide bulunduğu ancak tek başına insülin artışının hiperglisemi olmaksızın da ghreltin süpresyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Genel olarak serum ghreltin düzeyinin insülin duyarlılığı ile doğru orantılı, insülin düzeyi ve insülin direnci ile ters orantılı olduğu kabul edilmektedir (26). Glukagonun da hipofiz bağımlı bir mekanizma üzerinden ghreltin süpresyonuna neden olduğu saptanmıştır (45). Ghreltin ve leptinin iştah ve NPY/AgRP nöronları üzerine birbirine zıt yönde etkilerinin olduğu bilinmektedir (3, 6). Ancak ghreltin ve leptinin aralarındaki ilişkiyi araştıran pek çok araştırmaya rağmen leptinin ghreltin sekresyonu üzerine olan etkisi net olarak bilinmemektedir. Bir insan çalışmasında fizyolojik ve farmakolojik dozlarda eksojen leptin uygulamasının ghreltin seviyeleri üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptanmıştır (46).

## **Ghreltin ve Vagal Aktivite**

Abdominal vagal afferentler başlıca dorsal beyin sistemindeki NTS'da sonlanmaktadır. Periferden gelen bilgiler buradan otonomik motor nukleuslara ve parabrakial nukleus, hipotalamus, amigdala ve insular korteks gibi beyin diğer üst merkezlerine iletilmektedir (6). Abdominal vagal afferentlerin hücre gövdeleri gangliyon nodasında yer almaktadır. Transmitter ve reseptörler bu gangliyonda sentez edilip sinir uçlarına ulaştırılmaktadır. İnsan gangliyo nodasında GHS-R mRNA ve leptin mRNA'sının birlikte sentez edildiği gösterilmiştir. Ghreltin reseptörleri sıçan gangliyon nodasındaki vagal afferent nöronlar üzerinde saptanmış olup, bu sonuçlar (47) mideden kaynaklanan ghreltin sinyallerinin vagus siniri aracılığıyla beyne gittiğini göstermektedir. Ek olarak vagotomi sonrası ghreltinin uyardığı yiyecek alımı, GH salınımı ve NPY ve

GHRH üreten nöron stimülasyonunun inhibe olduğu gösterilmiştir (9, 26). Bu bulgular vagal aktivitenin ghrelin etkisinde önemli rol oynadığını düşündürmektedir.

## **Leptin**

Leptin ilk olarak 1994 yılında keşfedilmiş olup 167 aminoasitten oluşan bir peptiddir (48). Esas olarak *ob* gen ürünü olarak adipositlerden üretilmekle birlikte overlerden, plasentadan, iskelet kası, mide ve karaciğerden de sentezlendiği gösterilmiştir (4, 49). Leptin reseptörü (OB-R) sitokin klas 1 reseptör ailesinin üyesidir. OB-R'leri üç isoforma ayrılır: Uzun, kısa ve soluble isoformlar. Leptin reseptörünün uzun isoformu (OB-Rb) vücutta yaygın (hipotalamus, monosit, lenfosit, pankreatik  $\beta$  hücreleri, enterosit, endotel düz kası gibi) olarak bulunur. Leptin OB-Rb'ne bağlanması hücre içinde JAK-STAT sinyal transdüksiyon yolağının aktivasyonu ile sonuçlanır. Leptin reseptörünün kısa isoformunun (OB-Ra) ise esas olarak leptinin kan-beyin bariyerini geçmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. OB-Re olarak adlandırılan leptin reseptörünün soluble isoformu leptin reseptörünün transmembran bölümünden ayrılması ile oluşur ve dolaşımında leptin bağlayan ana faktördür (50–52). Leptin'in hipotalamusda hedeflediği ana merkez ARC'dir. Gerek NPY/AgRP gerek POMC/CART içeren nöronların leptin reseptörü ekspresse ettiği gösterilmiştir. Leptinin, ghrelinin NPY/AgRP nöronları üzerine olan stimüle edici etkisini antagonize ettiği düşünülmektedir. Yine oreksin içeren nöronlar üzerine leptinin inhibe edici etkisi bulunurken, ghrelinin indükleyici etkisi olduğu gösterilmiştir (3, 6).

### **Leptinin Etkileri**

İnsan ve kemirgenlerde kilo kontrolünü sağlayan önemli hormonlardandır. Hipotalamusu etkileyerek yiyecek alımını süprese edip, enerji harcanmasını stimüle eder (53). Konjenital olarak leptin ya da leptin reseptörü yokluğunda ciddi obezite ve hiperfaji görülmektedir. Ancak insanlarda leptin ya da leptin reseptörü yokluğu oldukça nadir gözlenen bir durumdur. Eksojen obezite etyolojisinde leptin eksikliğinden çok leptin direncinden söz edilmektedir (6). Leptinin kilo kontrolünün ötesinde ciddi metabolik etkileri de mevcuttur. Leptin periferik insülin sensitivitesini arttırırken, pankreasdan insülin sekresyonunu azaltmaktadır. İskelet kasında glukoz alımını ve oksidasyonunu arttırırken hepatik glukoz çıkışını baskılamaktadır. Lipid metabolizması üzerine de etkileri bulunan leptinin lipotoksisiteyi de azalttığı gösterilmiştir (54). Bunların dışında leptinin pubertal gelişim, reproduktif fonksiyonlar, hematopoez, kemik metabolizması ve immün fonksiyonlar üzerine de önemli etkilerinin olduğu bildirilmektedir. Ek olarak leptinin

iskelet kası, karaciğer ve pankreas gibi çeşitli organ ve dokularda periferik etkileri mevcuttur (4, 53–55). Fizyolojik etkilerinin yanı sıra leptinin obezite ilişkili ateroskleroz, oksidatif stres ve kanser gelişiminde patolojik rol oynadığı düşünülmektedir (53).

### **Leptin Regülasyonu**

Leptin gen ekspresyonu hormonal ve beslenme durumundan etkilenmektedir. Farelerde yiyecek alımı sonrası leptin genini kodlayan *ob* gen ekspresyonunda artış olduğu (48) ve leptin infüzyonunun yiyecek alımını azalttığı saptanmıştır. İnsanlarda yiyecek alımı kısa vadede plazma leptin düzeylerinde akut değişikliklere neden olmaz. Yiyecek alımının kronik olarak artması ve/veya azalması plazma leptin düzeylerini değiştirmektedir. Yağ dokusu artışı leptin seviyelerini artırır. 24 saatlik bir salınım patterni vardır ve geceleri en yüksek seviyede bulunur. Kadınların erkeklere oranla daha yüksek leptin düzeylerine sahip olduğu saptanmıştır. Bunun yanı sıra insülin, glukoz, östrojen, glukokortikoidler, TNF- $\alpha$  ve IL-1'in de leptin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Renal yetmezlik ve akut inflamasyon durumlarında artar. B-adrenerjik reseptör agonistlerinin, androjenlerin, soğuğa maruziyetin, sigara ve glitazon kullanımının ise leptin düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (53, 56).

### **CDP-kolin**

CDP-kolin vücudumuzda doğal olarak oluşan endojen bir nükleotid olup beyin ve diğer dokularda serbest kolinin fosfatidilkoline dönüştüğü sentez yollarından birinde aracı bir bileşiktir (11, 57). Oldukça polar olan molekülün, monosodyum tuzu beyaz, kristalize, çok higroskopik toz şeklindedir. Bu şekliyle suda erirliği son derece yüksek iken alkolde hemen hemen hiç erimez. Sitikolin bu bileşiğin uluslararası genel ismi olarak önerilmiştir. CDP-kolin in vivo olarak hücre duvarındaki fosfodiesterazlar tarafından sitidin monofosfat ve fosfokoline hidroliz edilir. Bu iki molekülün defosforilasyonu sonucu sitidin ve kolin ortaya çıkar. Oluşan bu iki metabolit hücre içine alındıktan sonra kendileri ile ilgili hücresel yapılara katılırlar. CDP-kolin'in temel farmakolojik özelliklerini, dolaşım ve dokulardaki sitidin ve kolin konsantrasyonlarında artışa neden olarak gösterdiği düşünülmektedir (12, 58–60).

Sıçan ve insanlarda oral CDP-kolin verilmesi sonrasında plazma sitidin ve kolin konsantrasyonlarında anlamlı artışa neden olduğu gözlenmiş olup, oral yolla verilen CDP-kolin'in biyoyararlanımının % 92–95 gibi tama yakın oranda olduğu saptanmıştır. CDP-kolin intravenöz olarak verildiğinde ise plazma sitikolin düzeyleri dakikalar içinde

ölçülemeyecek düzeylere inerken, plazma kolin ve sitidin konsantrasyonlarında dozla ilişkili olarak anlamlı artış olmaktadır (59-61). CDP-kolin büyük ve polar bir bileşik olduğunda kan-beyin bariyerini geçemez. Periferik yolla verilen CDP-kolin'in sitidin ve koline hidrolize olduktan sonra kan-beyin bariyerini geçtiği ve beyinde endojen CDP-kolin sentezi olmak üzere, fosfolipid, asetilkolin, nükleik asit ve protein sentezinde kullanıldığı bilinmektedir (62). İntraserebroventriküler yolla verilen CDP-kolin sonrasında da beyin-omurilik sıvısı, hipotalamus, serebral ventrikül ve korpus striatumun kolin konsantrasyonunda anlamlı artış olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular CDP-kolin'in diğer hücre tiplerinde olduğu gibi sinir hücrelerine de sitidin ve kolin olarak ayrı ayrı alındığını ve kullanıldığını düşündürmektedir (59-61).

CDP-kolin ile yapılan insan çalışmaları bu molekülün serebral iskemide, travmatik beyin yaralanmasında ve Alzheimer gibi demansiyal hastalıklarda yararlı etkilerinin bulunduğunu göstermiştir. Bazı Avrupa ülkelerinde ve Japonya'da bahsi geçen endikasyonlarda reçete edilmesi onaylanmış olup genel olarak CDP-kolin'e tolerans çok iyidir. Kullanımı sırasında hafif gastrointestinal rahatsızlık ve sindirim bozuklukları gibi nadir yan etkiler görülebilmektedir (63, 64).

### **Kolin**

Kolin molekülü kolinerjik nörotransmitter olan asetilkolin sentezinde ön madde olarak önemli rol oynamanın yanı sıra, hücre membranlarında da fosfotidilkolin ve sfingomiyelinin polar subunitini oluşturur. Vücuttaki kolin molekülünün ana deposu fosfotidilkolindir. Yeni kolin sentezinden başlıca sorumlu olan organ karaciğerdir. Sentezlenen kolin buradan dokulara ve dolaşıma dağılır. Kolinin periferik dolaşımdan kan-beyin bariyerine geçişi koline spesifik bir taşıyıcı sistem eşliğinde çok hızlı olmaktadır. Dolaşımdaki kolin konsantrasyonunun arttırılması, kolini beyne taşıyan transport sistemlerinin doyurulmamış olması nedeni ile beyindeki kolin düzeylerinde artışa neden olmaktadır. Beyin kolin konsantrasyonunun artması ise asetilkolin sentezinde artışa ve kolinerjik iletinin güçlenmesine neden olmaktadır (65–67).

### **Sitidin**

Sitidin bir nükleoziddir. Nükleozidler, nükleik asitlerin temel yapı taşlarıdır. Nükleozidlerin fosforile olmaları sonucu nükleotidler oluşur. Nükleotidlerin kovalent



bağlarla birleşerek oluşturdukları zincir de nükleik asit adını alır. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda dışarıdan verilen sitidinin hücelere alındığı ve sitidin nükleotidlerine dönüştürüldüğü gözlenmiştir. Sitidin nükleotidleri, sadece RNA sentezinde değil, aynı zamanda fosfotidilkolin biyosentezinde kilit ara ürünlerden olan CDP-kolin'in sentezinde de kullanılmaktadır (62, 68).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada 350–400 gr ağırlığında erkek Wistar-Albino sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde bulunan Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Çalışmaya başlamadan önce Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'ndan çalışmanın etik kuralara uygunluğuna dair onay alındı (Karar No: 2009-04/3). Sıçanlar en az çalışmadan bir hafta önce merkezden alınarak sıcaklığı 18–24° C olan ve ışığı 12 saat karanlık 12 saat aydınlık olacak şekilde ayarlanan özel odalarda, 4–6 kadarı bir kafeste olacak şekilde su ve yem alımları serbest bırakılarak bakıldılar.

Yedi günlük adaptasyon sürecinin ardından, deneyler sırasında kan örneklerinin alınması için, eter anestezisi altında sıçanların sol karotis arterine heparinli tuzlu su (250 Ü/ml) ile doldurulmuş kateter (PE 60, Clay Adams) yerleştirildi. İntraserebroventriküler ilaç uygulaması için kafatasına bregmanın 1,5 mm kadar sağ yanında ve bregmanın 1–1,5 mm kadar arkasında olacak şekilde, bir delik açıldı. Bu delikten sağ ventriküle 21 gauge'luk paslanmaz çelik iğneden kesilerek hazırlanmış 10 mm uzunlukta bir zerk kanülü yerleştirildi. Kanülün alt ucu kafatası yüzeyinden 4-4,5 mm (The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, George Paxinos and Charles Watson) derinliğe inecek şekilde ve dik olarak yerleştirildi. Üste kalan kısım dişçi akriliği ile kafatasına tutturuldu. Cerrahi prosedürlerin gerçekleştirilmesinin ardından anestezisi etkisinin kaybolması açısından sıçanlar 4–5 saat tek başlarına özel kafeslerinde tutuldu.

İlk aşama deneylerde CDP-kolin'in serum ghrelin, leptin, kortikosteron ve glukoz düzeylerine olan doz yanıt etkisi araştırıldı. Bir haftalık bekleme süresinin sonunda dört gruba randomize edilen sıçanlara 0.5 (n=14), 1.0 (n=16), 2.0 (n=16) µmol CDP-kolin ve 5 µl (n=16) tuzlu su (% 0,9'lük NaCL) isv olarak verildi. Bazal şartlarda ve ilaç verilmesini takiben 5., 15., 30., 60. ve 120. dakikalarda serum ghrelin, leptin, kortikosteron ve glukoz ölçümü için karotis artere yerleştirilmiş olan kanülden 0.5-1 ml kan örneği alındı. Her grupta yer alan sıçanlardan planlanılmış üç zaman aralığında kan alındı ve alınan kan miktarı eş hacimli tuzlu su solüsyonu ile replase edildi. Deneyin bitmesini takiben deneylerde yer alan sıçanlar uygun şekilde yüksek doz anestezisi ile sakrifiye edildi. Alınan tam kan örneklerindeki glukoz düzeyleri glukometre cihazı ile test stripleri kullanılarak belirlenirken, serum leptin, ghrelin ve kortikosteron düzeyleri için serum örnekleri ayrılarak <-20° C'de saklandı ve ilk aşama deneylerin tamamlanmasını takiben toplu olarak çalışıldı.

Deneilerin ikinci aşamasında serum ghrelin ve leptin düzeyleri üzerine olan etkinin CDP-kolin'in hidrolizi sonucu oluşan kolin ve/veya sitidinden mi kaynaklandığı değerlendirildi. Bu amaçla maksimum etkinliğin görüldüğü doza eşit ekimolar doz olan 1,0 µmol dozda kolin, sitidin veya 5 µl tuzlu su isv olarak verildi. Üçüncü aşama deneylerde ise CDP-kolin'in etkisine aracılık eden kolinerjik reseptörler araştırıldı. Oluşan etkinin muskarinik ve/veya nikotinik reseptörler aracılığıyla mı gerçekleştiğinin aydınlatılması açısından 1,0 µmol isv CDP-kolin verilmesinden 15 dakika önce ön ilaç olarak bir gruba muskarinik reseptör antagonisti (atropin sülfat, 10 µg), bir gruba nikotinik reseptör antagonisti (mekamilamin HCL, 50 µg) ve diğer bir gruba da 5 µl tuzlu su isv verilerek deneyler tekrarlandı. Ayrıca üçüncü aşama deneylerde, atropin ve mekamilaminin ghrelin ve leptin düzeylerine olası etkisinin gözlenebilmesi açısından, bir gruba atropin (10 µg) ve bir diğer gruba da mekamilamin (50 µg) verilmesinden 15 dakika sonra isv tuzlu su verilerek deneyler gerçekleştirildi. İkinci ve üçüncü aşama deneylerde de ilk aşama deneylerde olduğu gibi erkek Wistar-Albino sıçanlar kullanıldı ve daha önce tanımlandığı şekilde cerrahi prosedürler gerçekleştirildi. Deneilerin ikinci ve üçüncü aşamalarında ilk aşama deneylerde maksimum etkinin gözleendiği zaman aralıkları olan 60. ve 120. dakikalarda kan numunesi (1,5 ml) alındı ve hacim kaybı eşit hacimli tuzlu su ile replase edildi. Deneinin bitmesini takiben deneylerde yer alan sıçanlar uygun şekilde yüksek doz anestezi ile sakrifiye edildi. Alınan tam kan örneklerindeki glukoz düzeyleri glukometre cihazı ile test stripleri kullanılarak belirlenirken serum leptin, ghrelin ve kortikosteron düzeyleri için serum örnekleri ayrılarak <-20° C'de saklandı ve deneylerin tamamlanmasını takiben toplu olarak çalışıldı.

### **Laboratuvar Yöntemleri**

Serum ghrelin, leptin ve kortikosteron ölçümü için polipropilen tüplere alınan kan örnekleri + 4° C'de 15 dakika 3000 g'de santrifüj edildi. Santrifüj işlemini takiben serumlar ayrılarak ölçüm yapılana dek <-20° C'de saklandı. Radyoimmünoassay yöntemi ile serum ghrelin (Millipore's Ghrelin (Total) Radioimmunoassay Kit, MO, ABD, sensitivite 93 pg/ml), leptin (Linco's Rat Leptin Radioimmunoassay Kit, MO, ABD, sensitivite 0,5 ng/ml) ve kortikosteron (ImmuChem Double Antibody Corticosterone RIA Kit, Orangeburk, NY, sensitivite 7,7 ng/ml) düzeyleri ölçümü gerçekleştirildi.

## **İlaçlar ve Serebroventriküler Enjeksiyon**

Bu çalışmada kullanılan CDP-kolin, kolin klorür, sitidin, atropin sülfat, mekamilamin HCL Sigma'dan (Sigma chem. Co., MO, ABD) satın alınmıştır. İlaçlar tuzlu su (% 0,9 NaCL) olarak hazırlanmıştır. İntraserebroventriküler enjeksiyonlarda metinde belirtilen dozlar 5 µl içinde Hamilton mikroenjektörü kullanılarak enjekte edilmiştir.

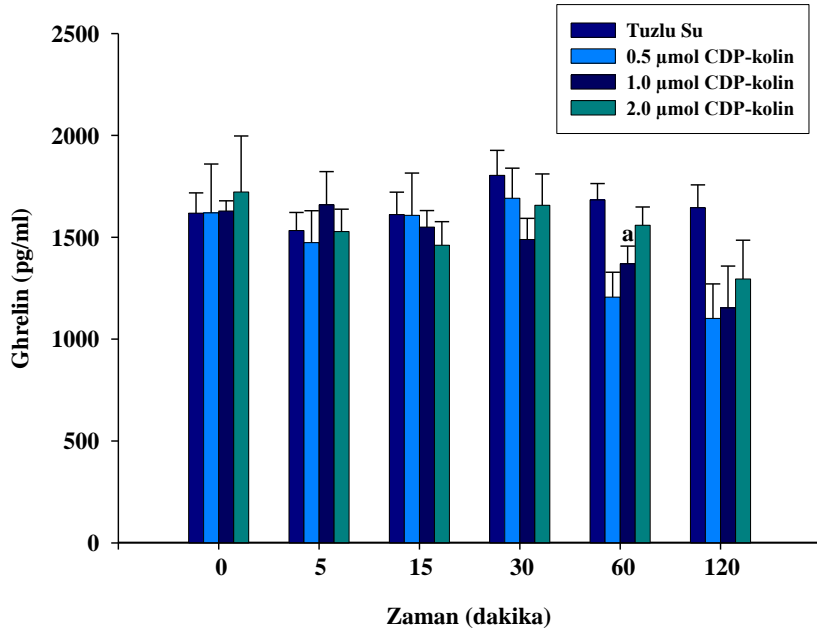
## **İstatistiksel Analiz**

Gruplar arasındaki ve grup içi karşılaştırmaların istatistiksel analizinde normal dağılım gösteren parametreler için "Student's *t*" testi ile "paired t test" kullanılırken, normal dağılmayan parametreler için ise "Mann-Whitney U testi" ile "Wilcoxon signed-rank" testi kullanıldı. Verilerin istatistiksel analizi "SPSS for Windows, Version 11.5" ile yapıldı. Veriler ortalama ± standart sapma olarak gösterilirken  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

### İntraserebroventriküler Verilen CDP-Kolin'in Serum Ghrelin, Leptin, Glukoz ve Kortikosteron Düzeylerine Etkisi:

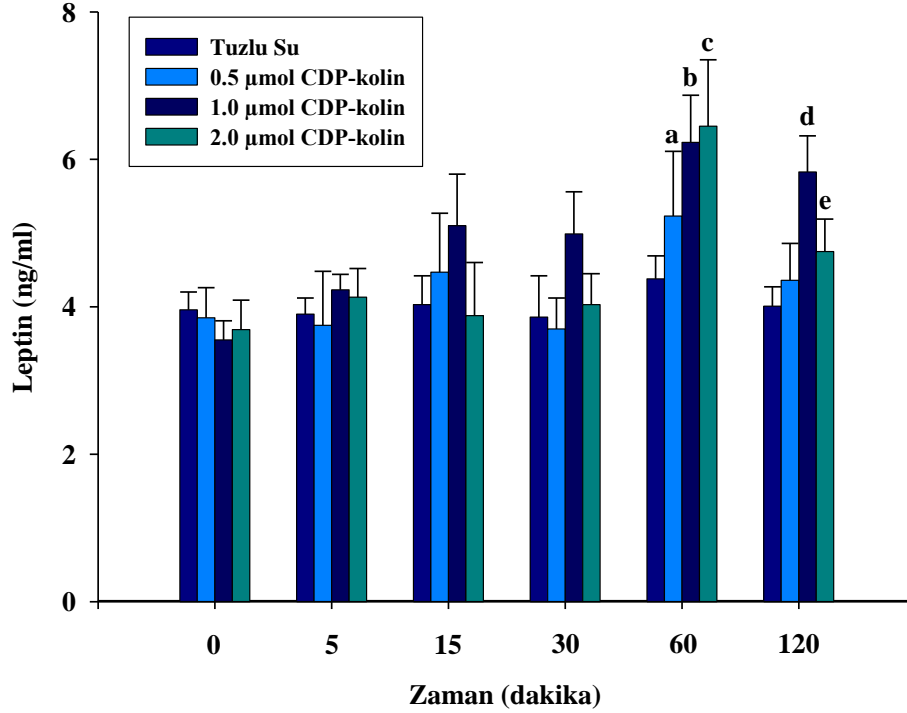
Grupların bazal serum ghrelin ve leptin düzeyleri arasında anlamlı fark yoktu. Grup içi analizlerde 1.0  $\mu\text{mol}$  CDP-kolin enjeksiyonunu takiben serum ghrelin düzeyinde 60. dakikada anlamlı düzeyde baskılanma olduğu gözlemlendi ( $p=0,025$ ) (şekil 3). Eğri altında kalan alan (EAA) hesaplandığında 0.5  $\mu\text{mol}$  ( $EAA=160\pm 11,4$  pg.dk/ml) ve 1.0  $\mu\text{mol}$  ( $EAA=147,5\pm 11,1$  pg.dk/ml) dozlarında CDP-kolin verildiğinde, tuzlu su ( $EAA=190\pm 18$  pg.dk/ml) verilen gruba kıyasla ghrelin düzeylerinde anlamlı baskılanma olduğu görüldü (sırasıyla  $p=0,035$  ve  $p=0,013$ ).



**Şekil 3:** İntraserebroventriküler verilen CDP-kolin'in serum ghrelin düzeylerine etkisi. a = Bazal düzeylere kıyasla istatistiksel anlamlı değişikliği göstermektedir.  $p^a = 0,025$ .

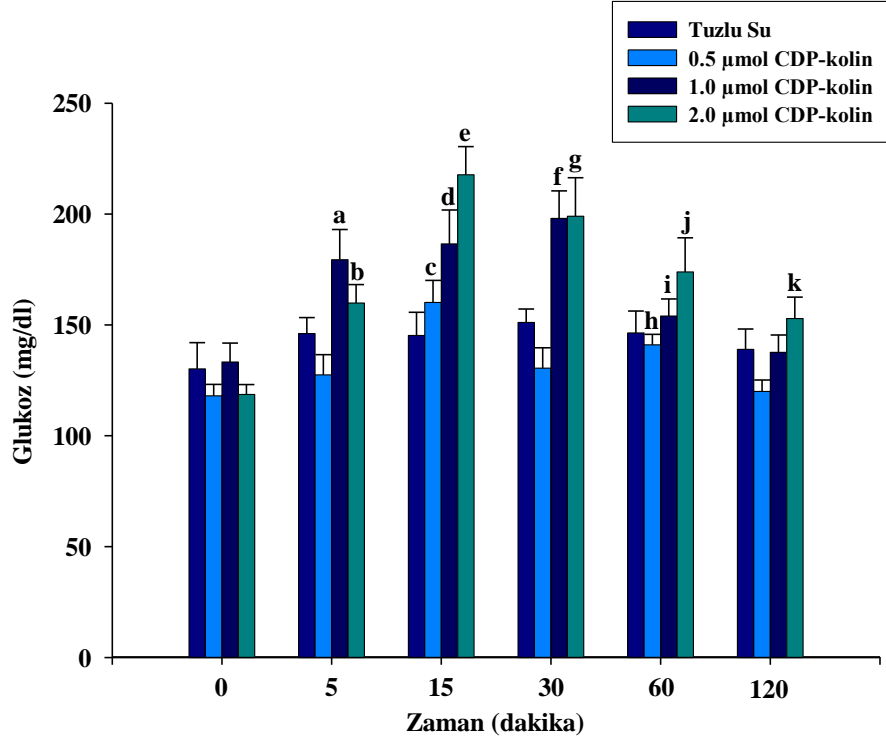
Serum leptin düzeylerinde ise 0.5, 1.0 ve 2.0  $\mu\text{mol}$  dozlarında CDP-kolin verilmesini takiben 60. dakikada anlamlı artış olduğu saptandı (sırasıyla  $p=0,036$ ,  $p=0,012$ ,  $p=0,043$ ). Ek olarak 1.0 ve 2.0  $\mu\text{mol}$  dozlarında CDP-kolin verilmesini takiben 120. dakikada serum leptin düzeylerinde bazal değerlere kıyasla anlamlı artış olduğu gözlemlendi ( $p=0,017$ ,  $p=0,046$ ) (şekil 4). Eğri altında kalan alan hesaplandığında 1.0  $\mu\text{mol}$  dozunda CDP-kolin ( $EAA=632,3\pm 116,0$  ng.dk/ml) verilmesinin tuzlu su ( $EAA=445,5\pm 80,9$

ng.dk/ml) verilen gruba kıyasla leptin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış yarattığı saptandı (p=0,005).

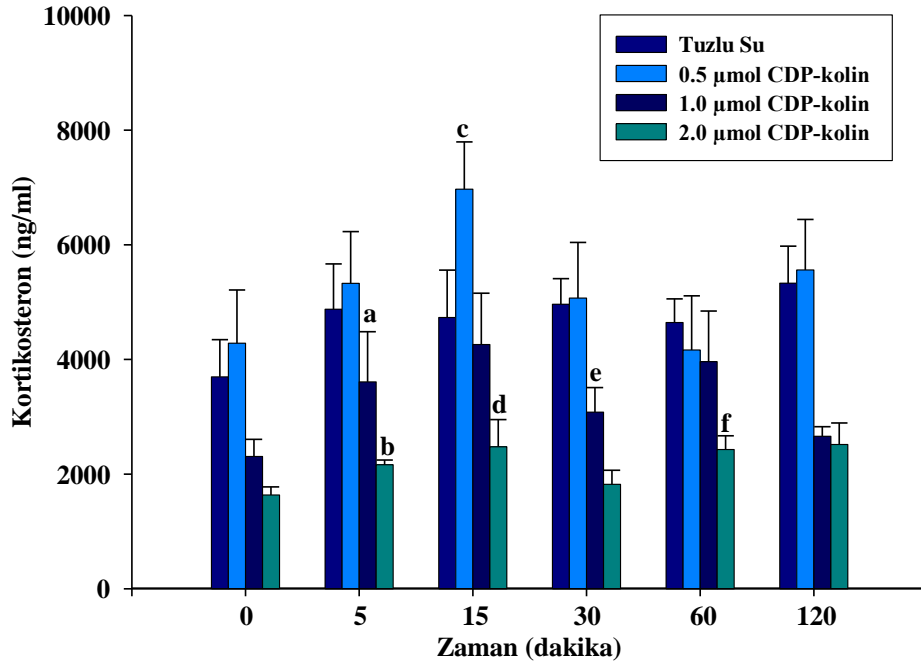


**Şekil 4:** İntraserebroventriküler verilen CDP-kolin'in serum leptin düzeylerine etkisi. a, b, c, d, e = Bazal düzeylere kıyasla istatistiksel anlamlı değişikliği göstermektedir.  $p^a = 0,036$ ,  $p^b = 0,012$ ,  $p^c = 0,043$ ,  $p^d = 0,017$ ,  $p^e = 0,046$ .

İntraserebroventriküler yolla CDP-kolin verilmesinin serum glukoz ve kortikosteron düzeylerinde de zaman ve doz bağımlı artışa neden olduğu saptandı. Bazal değerlerle kıyaslandığında serum glukoz düzeylerinde CDP-kolin'in 0.5 µmol dozunda 15. ve 60. dakikalarda (sırasıyla  $p=0,012$ ,  $p=0,025$ ), 1.0 µmol dozunda 5., 15., 30., ve 60. dakikalarda (sırasıyla  $p=0,024$ ,  $p=0,012$ ,  $p=0,012$ ,  $p=0,017$ ), 2.0 µmol dozunda ise 5., 15., 30., 60. ve 120. dakikalarda anlamlı artış olduğu saptandı (sırasıyla  $p=0,018$ ,  $p=0,012$ ,  $p=0,012$ ,  $p=0,012$ ,  $p=0,017$ ). Tüm gruplar karşılaştırıldığında 5., 15. ve 30. dakikalardaki serum glukoz düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ( $p=0,020$ ,  $p=0,006$  ve  $p=0,002$ ) (şekil 5). Bazal değerlerle kıyaslandığında serum kortikosteron düzeylerinde CDP-kolin'in 0.5 µmol dozunda 15. dakikada ( $p=0,018$ ), 1.0 µmol dozunda 5., ve 30. dakikalarda (sırasıyla  $p=0,028$  ve  $p=0,035$ ), 2.0 µmol dozunda ise 5., 15., ve 60. dakikalarda (sırasıyla  $p=0,027$ ,  $p=0,034$ ,  $p=0,028$ ) anlamlı artış olduğu gözlemlendi (şekil 6).



**Şekil 5.** İntraserebroventriküler verilen CDP-kolin'in serum glukoz düzeylerine etkisi. a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k = Bazal düzeylere kıyasla istatistiksel anlamlı değişikliği göstermektedir.  $p^a = 0,024$ ,  $p^b = 0,018$ ,  $p^c = 0,012$ ,  $p^d = 0,012$ ,  $p^e = 0,012$ ,  $p^f = 0,012$ ,  $p^g = 0,012$ ,  $p^h = 0,025$ ,  $p^i = 0,017$ ,  $p^j = 0,012$ ,  $p^k = 0,017$ .

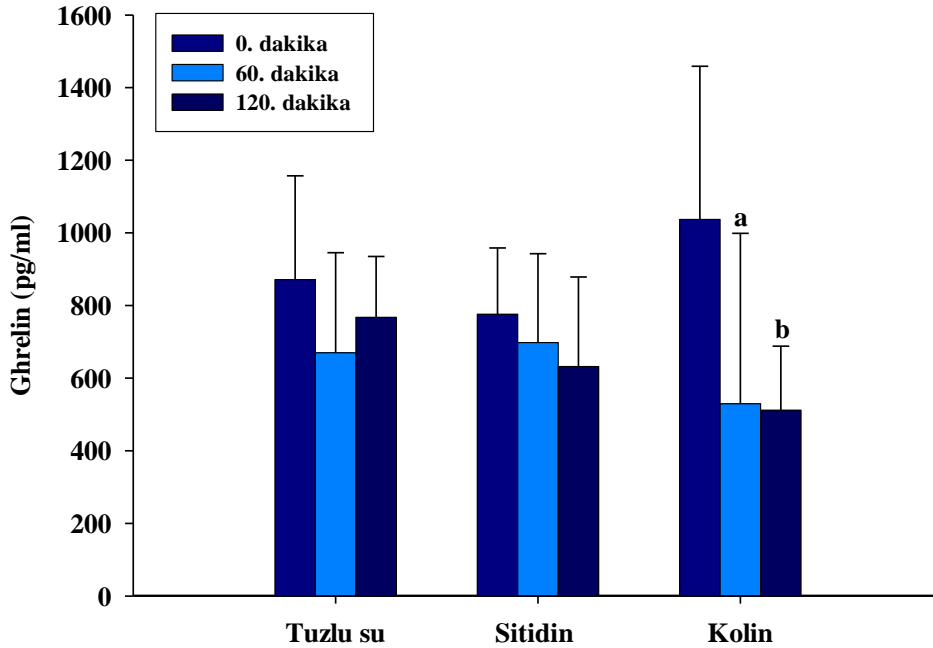


**Şekil 6.** İntraserebroventriküler verilen CDP-kolin'in serum kortikosteron düzeylerine etkisi. a, b, c, d, e, f = Bazal düzeylere kıyasla istatistiksel anlamlı değişikliği göstermektedir.  $p^a = 0,028$ ,  $p^b = 0,027$ ,  $p^c = 0,018$ ,  $p^d = 0,034$ ,  $p^e = 0,035$ ,  $p^f = 0,028$ .

## İntraserebroventriküler Verilen Kolin ve Sitidin'in Serum Ghrelin, Leptin ve Glukoz Düzeylerine Etkisi:

CDP-kolin ile elde edilen sonuçları takiben, CDP-kolin hidroliz ürünleri olan kolin ve sitidinin tek başına bu etkiye katkılarını değerlendirmek amacıyla, deneylerin ikinci aşamasında isv verilen kolin, sitidin ve tuzlu su sonrası serum ghrelin, leptin, ve glukoz düzeyleri değerlendirildi.

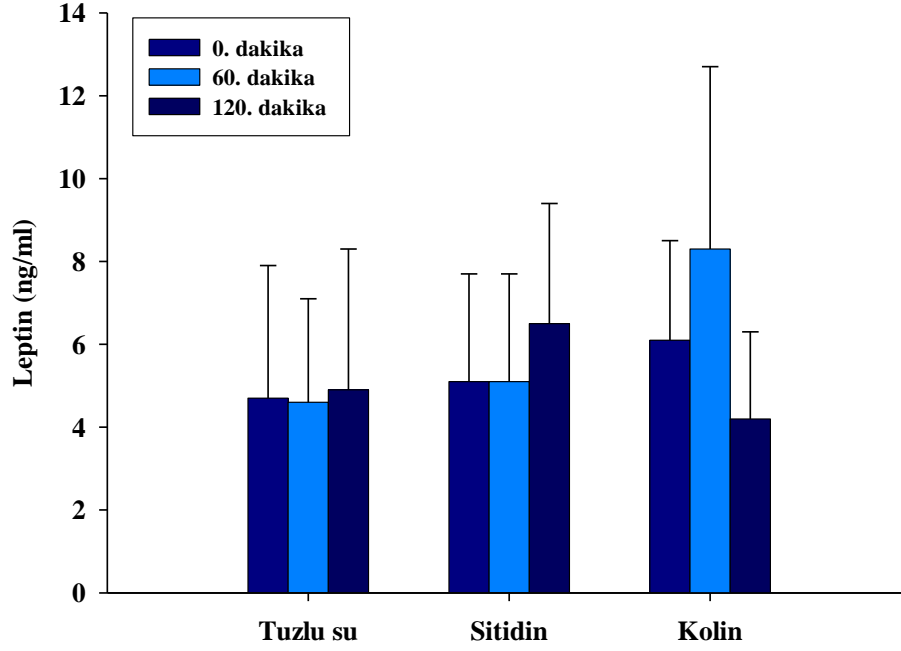
Grup içi değerlendirmelerde tuzlu su ve sitidin verilen gruplarda ghrelin düzeylerinde bazal değerlere göre anlamlı değişiklik saptanmadı. Kolin verilen grupta ise ghrelin düzeyinin bazale kıyasla 60. ( $p=0,043$ ) ve 120. ( $p=0,043$ ) dakikalarda anlamlı baskılanma gösterdiği saptandı. Her üç grup karşılaştırıldığında ise 120. dakika ghrelin düzeyindeki yüzde değişim düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği belirlendi ( $p=0,003$ ) (şekil 7).



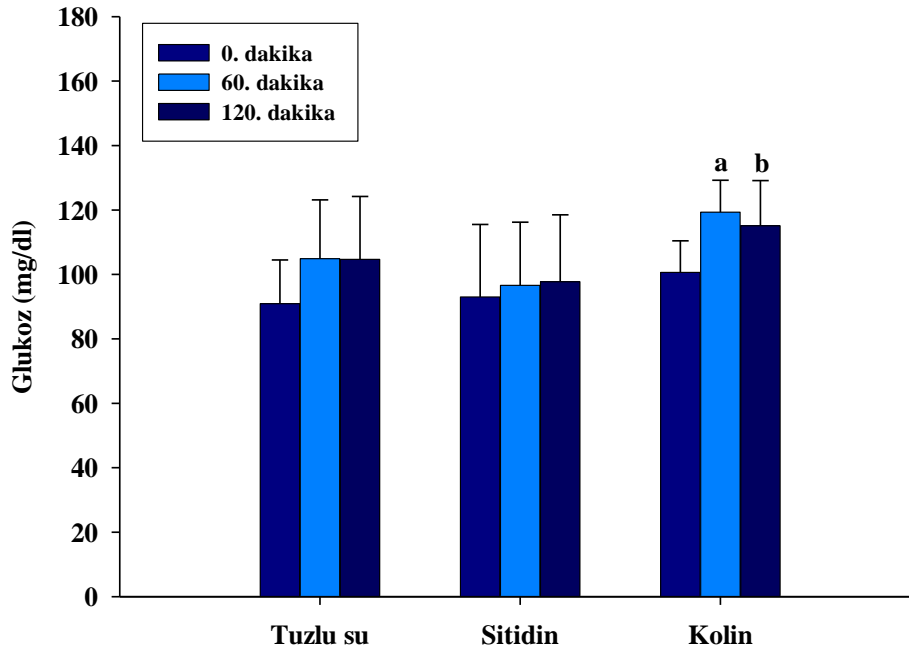
**Şekil 7.** İntraserebroventriküler yolla tuzlu su, sitidin ve kolin verilmesini takiben serum ghrelin düzeyleri. a, b = Bazal düzeylere kıyasla istatistiksel anlamlı değişikliği göstermektedir.  $p^a = 0,043$ ,  $p^b = 0,043$ .



Leptin düzeylerinde ise grup içi ve gruplar arası değerlendirmelerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (şekil 8).



Şekil 8. İntraserebroventriküler yolla tuzlu su, sitidin ve kolin verilmesini takiben serum leptin düzeyleri.



Şekil 9. İntraserebroventriküler yolla tuzlu su, sitidin ve kolin verilmesini takiben serum glukoz düzeyleri. a, b = Bazal düzeylere kıyasla istatistiksel anlamlı değişikliği göstermektedir.  $p^a = 0,018$ ,  $p^b = 0,050$ .

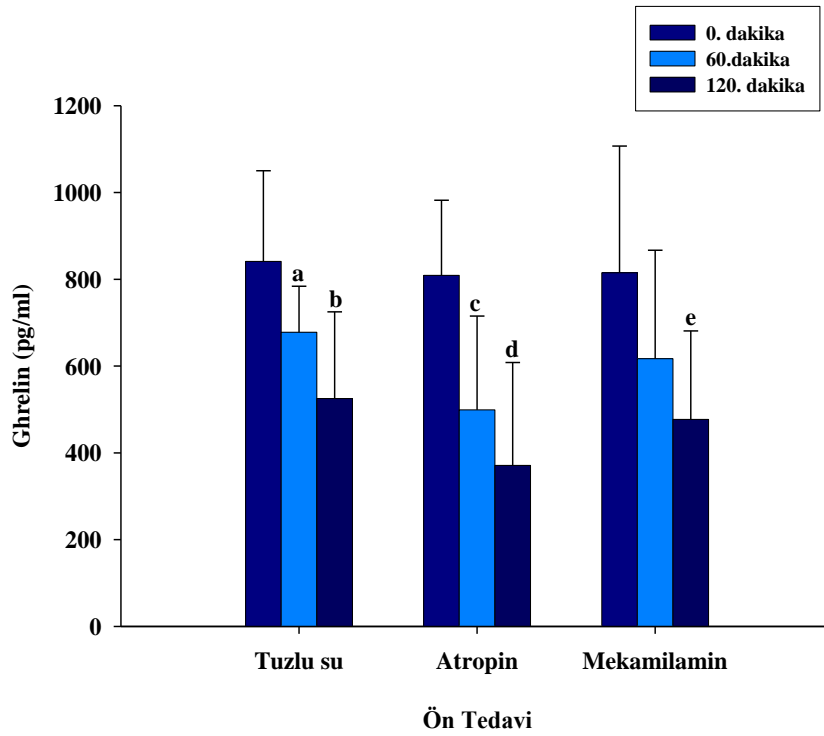
Serum glukoz düzeylerinde ise kolin grubunda bazale göre hem 60. dk ( $p=0,018$ ) hem de 120. dakikalarda ( $p=0,050$ ) anlamlı artış olduğu görüldü. Her üç grup karşılaştırıldığında ise glukoz düzeylerinde 60. dakikada anlamlı fark olduğu görüldü ( $p=0,042$ ) (şekil 9).

## Reseptör Antagonisti Ön Tedavisinin Serum Ghrelin, Leptin ve Gukoz

### Düzeyleri Üzerine Etkisi:

#### Serum Ghrelin Sonuçları

Sadece tuzlu su verilen grupta bazal değerlere kıyasla serum ghrelin düzeyinde istatistiksel anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Tuzlu su öncesinde atropin veya mekamilamin verilen gruplarda da serum ghrelin düzeylerinde anlamlı değişiklik gözlenmedi.



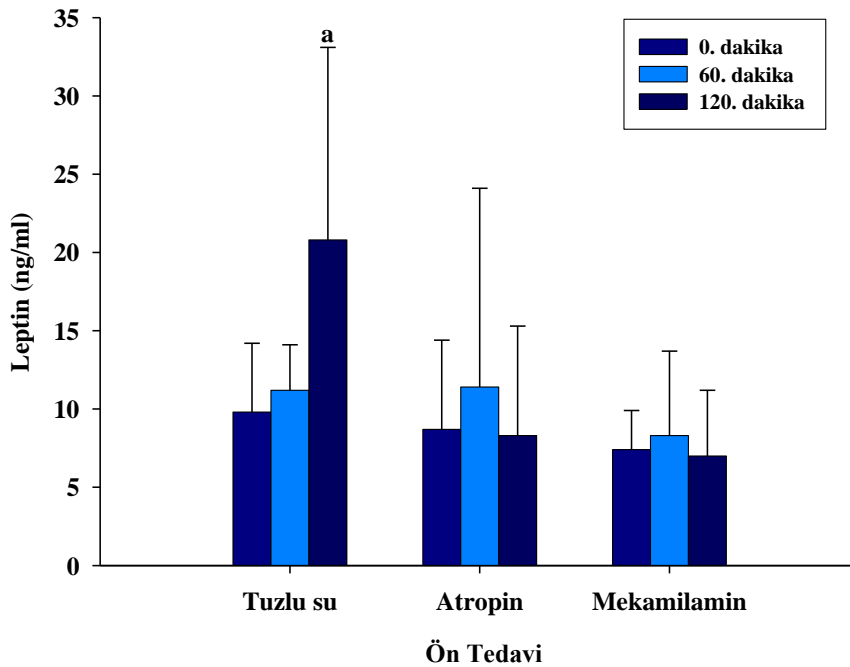
**Şekil 10.** Reseptör antagonisti verilmesini takiben serum ghrelin (pg/ml) düzeyleri. Sıçanlara ön tedavi olarak atropin (10 µg, isv), mekamilamin (50 µg, isv) ya da tuzlu su (10 µl, isv) verildikten 15 dakika sonra CDP-kolin (1.0 µmol) isv olarak zerk edildi. a, b, c, d, e = Bazal düzeylere kıyasla istatistiksel anlamlı değişikliği göstermektedir.  $p^a = 0,018$ ,  $p^b = 0,028$ ,  $p^c = 0,025$ ,  $p^d = 0,036$ ,  $p^e = 0,025$ .

Tuzlu su-CDP kolin verilen grupta ise serum ghrelin düzeyleri bazal düzeylere göre 60. ve 120. dakikalarda anlamlı baskılanma göstermekteydi (sırasıyla  $p=0,018$  ve  $p=0,028$ ). Atropin ön tedavisi uygulanan grupta ise bazal değerlere kıyasla ghrelin düzeylerinde 60. ve 120. dakikalarda görülen baskılanmanın devam ettiği gözlenmekteydi (sırasıyla  $p=0,025$  ve  $p=0,036$ ). Mekamilamin ön tedavisi uygulanan grupta ise serum ghrelin düzeyinde 60. dakikada gözlenen süpresyonun kaybolduğu, 120. dakika serum ghrelin düzeyinde ise halen bazal değere göre anlamlı süpresyon olduğu saptandı ( $p=0,025$ ) (şekil 10).

Bu sonuçlar CDP-kolin'in ghrelin üzerine olan etkisinde muskarinik reseptörlerden çok nikotinik reseptörlerin rol oynadığını düşündürmektedir.

### Serum Leptin Sonuçları

Sadece tuzlu su verilen grupta bazal değerlere kıyasla serum leptin düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Tuzlu su öncesinde atropin veya mekamilamin tedavisi uygulanmış hayvanların leptin düzeylerinde anlamlı değişiklik gözlenmedi.

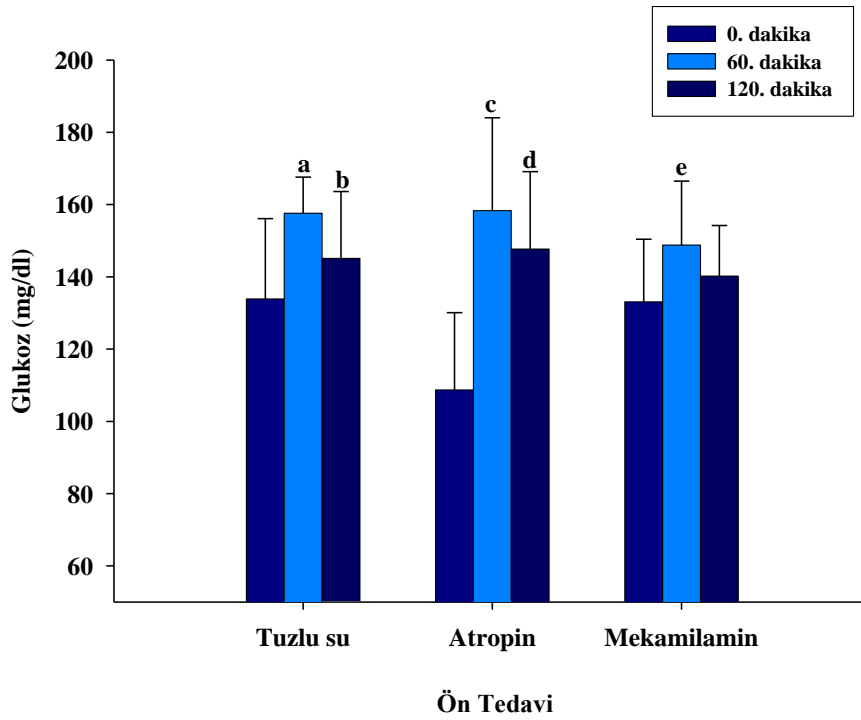


**Şekil 11.** Reseptör antagonisti verilmesini takiben serum leptin (ng/ml) düzeyleri. Sıçanlara ön tedavi olarak atropin (10  $\mu\text{g}$ , isv), mekamilamin (50  $\mu\text{g}$ , isv) ya da tuzlu su (10  $\mu\text{l}$ , isv) verildikten 15 dakika sonra CDP-kolin (1.0  $\mu\text{mol}$ ) isv olarak zerk edildi. a = Bazal düzeylere kıyasla istatistiksel anlamlı değişikliği göstermektedir.  $p^a = 0,043$ .

Tuzlu su-CDP kolin verilen grupta ise ilk aşama deney sonuçlarına benzer şekilde serum leptin düzeylerinde bazal düzeylere göre 120. dakikada anlamlı artış olduğu saptandı ( $p=0,043$ ). Atropin ve mekamilamin ön tedavisi uygulanan gruplarda CDP-kolin ile 60. ve 120. dakikalarda gözlenen leptin artışının kaybolduğu gözlemlendi (şekil 11). Bu sonuçlar CDP-kolin'in leptin üzerine olan etkisinde hem muskarinik hem de nikotinik reseptörlerin rol oynadığını düşündürmektedir.

### Serum Glukoz Sonuçları

Sadece tuzlu su verilen grupta bazal değerlere kıyasla serum glukoz düzeyinde istatistiksel anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Tuzlu su öncesinde atropin veya mekamilamin verilen gruplarda da serum glukoz düzeylerinde anlamlı değişiklik gözlemlenmedi.



**Şekil 12.** Reseptör antagonisti verilmesini takiben grupların serum glukoz (mg/dl) düzeyleri. Sıçanlara ön tedavi olarak atropin (10 µg, isv), mekamilamin (50 µg, isv) ya da tuzlu su (10 µl, isv) verildikten 15 dakika sonra CDP-kolin (1.0 µmol) isv olarak zerk edildi. a, b, c, d, e = Bazal düzeylere kıyasla istatistiksel anlamlı değişikliği göstermektedir.  $p^a = 0,028$ ,  $p^b = 0,028$ ,  $p^c = 0,008$ ,  $p^d = 0,008$ ,  $p^e = 0,038$ .

Tuzlu su-CDP kolin verilen grupta serum glukoz düzeyleri bazal düzeylere göre 60. ve 120. dakikalarda anlamlı artış göstermekteydi (sırasıyla  $p=0,028$  ve  $p=0,028$ ). Atropin ön tedavisi uygulanan grupta serum glukoz düzeylerinde 60. ve 120 dakikalarda görülen artışın devam ettiği saptandı (sırasıyla  $p=0,008$  ve  $p=0,008$ ). Mekamilamin ön tedavisi uygulanmış hayvanlarda ise serum glukoz düzeyinde 60. dakikada gözlenen artışın devam etmesine karşılık ( $p=0,038$ ), 120. dakika serum glukoz değerlerinde gözlenen artışın kaybolduğu saptandı (şekil 12). Bu sonuçlar CDP-kolin'in glukoz üzerine olan etkisinde muskarinik reseptörlerden çok nikotinik reseptörlerin rol oynadığını düşündürmektedir.

## TARTIŞMA

Çalışmamızda isv olarak verilen 1.0 µmol CDP-kolin enjeksiyonunu takiben bazal değerlere kıyasla serum ghrelin düzeyinde 60. dakikada anlamlı düzeyde baskılanma olduğu ( $p=0,025$ ), leptin düzeylerinde ise, 60. ve 120 dakikalarda anlamlı artış olduğu (sırasıyla  $p=0,012$ ,  $p=0,017$ ) saptandı. Eğri altında kalan alanlar hesaplandığında isv CDP-kolin sonrası, tuzlu su verilen gruba kıyasla, ghrelin düzeylerinde (0.5 µmol ve 1.0 µmol dozlarında) istatistiksel anlamlı baskılanma (sırasıyla  $p=0,035$  ve  $p=0,013$ ), leptin düzeylerinde (1.0 µmol dozunda) ise artış olduğu belirlendi ( $p=0,005$ ). Çalışmamızda leptin ve ghrelinin ölçümlerinin yanı sıra bu peptidlerin kan düzeyindeki değişimlerde etkisi olabileceği düşünülen serum glukoz ve kortikosteron düzeyleri de değerlendirildi. İntraserebroventriküler verilen CDP-kolin'in glukoz ve kortikosteron düzeylerinde doz ve zaman bağımlı artışa neden olduğu belirlendi.

CDP-kolin isv olarak verildiğinde beyin-omurilik sıvısı, hipotalamus, serebral ventrikül ve korpus striatumun kolin konsantrasyonunda anlamlı artış olduğu gözlenmiştir (59-61). CDP-kolin in vivo olarak hücre duvarındaki fosfodiesterazlar tarafından sitidin monofosfat ve fosfokoline hidroliz edilir. Bu iki molekülün defosforilasyonu sonucu da sitidin ve kolin ortaya çıkar. CDP-kolin'in temel farmakolojik özelliklerini, dolaşım ve dokulardaki sitidin ve kolin konsantrasyonlarında artışa neden olarak gösterdiği düşünülmektedir (12, 57–59). Bizim çalışmamızda da CDP-kolin sonrası serum leptin ve ghrelin üzerine olan etkinin benzeri kolin verilmesini takiben gözlenirken, sitidin sonrası herhangi bir etki saptanmamıştır. Bu bulgular daha önceki çalışma sonuçları ile uyumlu olarak isv CDP-kolin sonrası gözlenen etkinin kolin üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir.

Hipotalamohipofizer sistem yaygın kolinerjik innervasyonu olan ve kolinerjik reseptörlerin yoğun bulunduğu bir bölgedir. Kolinerjik mekanizmaların hipofizer hormon sekresyonunun düzenlenmesinde önemli rolleri olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, merkezi etkili kolinerjik ilaçların, örneğin kolinesteraz inhibitörleri olan soman, fizostigmin ve diizopropilflurorofosfatın, kolinerjik reseptör agonistleri olan asetilkolin, nikotin, arekolinin ve asetilkolin ön maddesi olan kolinin, hipotalamohipofizer sistemi aktive ettiği ve çeşitli hipofizer hormonların plazma düzeylerinde değişikliğe neden olduğu bildirilmektedir (69–76). Bazal şartlarda isv olarak verilen CDP-kolin'in ACTH ve

vazopressin sekresyonunu arttırdığı, TSH, GH, FSH ve LH sekresyonlarını değiştirmediği gözlenmiştir. Ek olarak isv uygulanan CDP-kolin'in klonidin-stimüle GH, TRH-stimüle TSH, ve LHRH-stimüle FSH sekresyonunda artışa neden olduğu saptanmıştır (77, 78). Hipotalamik arkuat nukleusdan orjinlenen nöronal sinir ağı enerji balansının düzenlenmesinde önemli rol oynar. Arkuat nukleusda yer alan nöronlar pek çok nöropeptid ve klasik transmitterler içermektedir (79). Yapılan immünohistokimyasal bir çalışmada hipotalamusun arkuat nukleusunda bulunan POMC/CART ekspresse eden nöronların hücre gövdelerinde immün boyama ile kolinerjik nörotransmisyonunda gerekli olan proteinlerin varlığı gösterilmiş olup bu sonuçlar enerji balansının kontrolünde ve leptin ve insülin gibi periferik hormonların etkilerinin oluşmasında asetilkolinin rolü olabileceğini düşündürmektedir (80). Çalışmamızda isv verilen CDP-kolin sonrası leptin ve ghrelin düzeylerinde saptanan anlamlı değişiklikler kolinerjik sistemin enerji balansını düzenleyen merkezi mekanizmalar ve hormonal regülasyon üzerinde etkisinin bulunduğunu gösteren çalışmaların sonuçlarını desteklemektedir.

Çalışmamız sıçanlarda isv verilen CDP-kolin'in ghrelin ve leptin düzeyleri üzerine etkilerini inceleyen ilk çalışmadır. Ghrelin mideden salgılanan oreksijenik bir peptid olup vagal aktivitenin ghrelin sekresyon ve etkisinde önemli rolü olduğu bilinmektedir (9, 26, 47). Shrestha ve ark'nın (81) çalışmasında mide perfüzyon modelinde asetilkolin (1 µmol) verilmesi mideden ghrelin sekresyonunu % 37 oranında arttırırken insülin (10 nM) verilmesinin % 30 oranında ghrelin sekresyonunda azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir. Sağlıklı erkek gönüllüler üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada kolinerjik antagonist olan atropin verilmesinin açlık ghrelin düzeylerinde % 25 oranında baskılanmaya sebep olurken, kolinesteraz inhibitörü olan piridostigmin verilmesinin ghrelin düzeylerinde değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir (82). Sağlıklı gönüllüler üzerinde gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise oral verilen indirekt kolinerjik agonist pridostigminin ghrelin düzeylerinde artışa neden olurken, muskarinik antagonist olan pirenzepin verilmesinin ghrelin düzeylerinde süpresyona neden olduğu saptanmıştır (83). Bu çalışmalarda bizim çalışmamızdan farklı olarak kolinerjik agonistlerin ghrelin düzeylerinde artışa neden olurken, kolinerjik antagonist kullanımının ghrelin düzeylerinde süpresyona neden olduğu saptanmıştır. Ancak Shrestha ve ark'nın (81) çalışması in vitro bir çalışma iken diğer iki çalışmada (82, 83) deneyler insanlar üzerinde gerçekleştirilmiş olup ilaçlar periferik yoldan uygulanmıştır. Bizim çalışmamızda ise kolinerjik aktivasyona sebep olduğu bilinen CDP-kolin isv olarak uygulanmış ve beklenin aksine ghrelin düzeylerinde süpresyona sebep

olmuştur. Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde koyunlarda yapılmış olan bir çalışmada plazma ghrelin düzeylerinin iv verilen kolinerjik blokör atropin ve heksametonyum ile artarken, kolinerjik akselatör olarak kullanılan metaklorpropamid ile azaldığı saptanmış olup, yazarlar bu sonuçlara göre kolinerjik aktivasyonun ghrelin sekresyonunda inhibisyona neden olduğunu ileri sürmektedirler (10).

Yağ dokusu büyük oranda sempatik sinir sistemi tarafından innerve edilmekte olup bilindiği gibi leptinde esas olarak yağ dokusundan üretilmekte olan bir peptiddir (49, 84). Kolinerjik sistem ve leptin sekresyonu üzerinde yapılmış fazla sayıda çalışma bulunmamaktadır. Erkek wistar sıçanlarda yapılan bir çalışmada sıçanların 3. ventrikülüne isv olarak kolinesteraz inhibitörü olan neostigminin verilmesini takiben plazma leptin düzeylerinde doza bağımlı bir artış olduğu saptanmıştır (85). Ayrıca neostigmin sonrası beyaz yağ dokusunda leptin mRNA'sının ekspresyonunda artış olduğu ve atropin verilmesinin neostigmine bağlı leptin artışını bloke ettiği gözlenmiştir. Aynı çalışmada neostigmin sonrası plazma kortikosteron düzeylerinde de artış olduğu ve adrenalectomi yapılan hayvanlarda neostigmin ile gözlenen leptin artışının kaybolduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda da CDP-kolin sonrası hem kortikosteron hem de leptin düzeylerinde artış tesbit edilmiştir.

Çalışmamızda CDP-kolin'e bağlı oluşan etkinin muskarinik ve/veya nikotinik reseptörler aracılığıyla mı gerçekleştiğinin aydınlatılması açısından isv CDP-kolin verilmesinden önce isv olarak nonselektif reseptör antagonistleri verilerek serum ghrelin ve leptin düzeylerindeki değişiklikler tekrar değerlendirildi. CDP-kolin öncesinde mekamilamin verildiğinde serum ghrelin düzeylerinde görülen baskılanmanın kaybolduğu, leptin artışının ise hem mekamilamin hem de atropin sonrası bloke olduğu belirlendi. Reseptör antagonisti verilmesini takiben gözlenen etkiler ghrelin supresyonunda nikotinik reseptörlerin, leptin artışında ise hem nikotinik hem de muskarinik reseptörlerin rol oynadığını düşündürmektedir.

Pek çok hayvan modelinde obezite ve hiperinsülineminin artmış vagal kolinerjik aktivite ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (86-88). Muskarinik asetilkolin reseptörlerinin subtipi olan M3 reseptörleri beyin ve periferik dokularda yaygın olarak ekspresse edilmekte olup, M3 reseptörlerinin vagal aktivitenin fizyolojik etkilerinin idamesinde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir (89, 90). M3 reseptörü bulunmayan farelerin yiyecek alımında, vücut ağırlıklarında, periferik yağ depolarında, serum leptin ve insülin



düzeylerinde azalma olduğu saptanmış olup benzer şekilde M3 muskarinik asetilkolin reseptörlerinin aktivasyonunun adipoziteyi artırdığı yönünde kuvvetli bulgular saptanmıştır (91, 92). Klasik nikotinik asetilkolin reseptör agonisti olan nikotinin verilmesinin ise yiyecek alımını azalttığı, metabolik hızı artırdığı ve adipozitede azalmaya neden olduğu bildirilmektedir (93). Leptin direnci olan diyabetik sıçan modelinde selektif alfa7 nikotinik reseptör agonisti (TC-7020) verilmesinin kilo artışı ve yiyecek alımının azalttığı, plazma glukoz, trigliserid ve proinflamatuvar sitokin düzeylerinde düşmeye neden olduğu saptanmıştır (94). Muskarinik ve nikotinik reseptörlerin stimülasyonunun fizyolojik ve davranışsal olarak birbirine zıt yönde etkisinin bulunduğunu gösteren pek çok farklı örnek bulunmaktadır. Örneğin nikotinin antidepresan ve lokomotor aktiviteyi arttırmak yönünde etkileri bulunmaktayken (95), merkezi yolla muskarinik agonist kullanımının depresyonu attırdığı ve lokomotor aktiviteyi azalttığı gösterilmiştir (96). Nikotinik ve muskarinik reseptörlerin pek çok alt tipinin ve farklı anatomik dağılımlarının bulunması birbirine zıt yönde gözlenen bu etkilerin muhtemel nedeni olabilir.

CDP-kolin ile yapılan insan çalışmaları bu molekülün serebral iskemide, travmatik beyin yaralanmasında ve Alzheimer gibi demansiyal hastalıklarda yararlı etkilerinin bulunduğunu göstermiştir (63, 64). Buna ek olarak, yapılan çalışmalar gerek CDP-kolin'in gerek kolinin bazı farmakolojik ve metabolik etkilerinin olduğunu göstermektedir. İntraperitoneal (ip) ve isv verilen CDP-kolin ve kolin verilmesinin kan basıncı ve kalp hızında değişikliğe neden olduğu saptanmıştır (59, 97). Sıçanlarda ip verilen kolinin serum insülin ve katekolamin düzeylerinde artışa neden olduğu ve kolinerjik nörotransmisyonu arttırarak hiperglisemiye sebep olduğu gösterilmiştir (98, 99). Kolinin isv olarak verildiğinde de santral sinir sisteminde kolinerjik nörotransmisyonu arttırarak ve sempatoadrenal sistemi aktive ederek hiperglisemiye neden olduğu (100) gösterilmiştir. Koline benzer şekilde ip verilen CDP-kolin'in de doz ve zaman bağımlı olarak hiperglisemiye, serum insülin ve katekolamin düzeylerinde artışa neden olduğu saptanmıştır (101-103). Pankreasın endokrin hücrelerinden insülinin yanı sıra glukagon sekresyonunun nöral kontrolünde de asetilkolinin major nörotransmitter olarak rol oynadığı düşünülmektedir (104). Sıçanlara ip ve isv olarak verilen CDP-kolin'in plazma glukagon düzeylerinde artışa neden olduğu saptanmıştır (105). Bizim çalışmamızda da önceki çalışmalar ile uyumlu olarak isv verilen CDP-kolin'in doz ve zaman bağımlı olarak serum glukoz ve ayrıca ek olarak kortikosteron düzeylerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Daha önce yapılmış çalışmalarda insülin ve glukoz artışının ghrelin

sekresyonunda baskılanmaya yol açtığı gösterilmiş olup, glukagonun da hipofiz bağımlı bir mekanizma üzerinden ghrelin süpresyonuna neden olduğu saptanmıştır (41–45, 106). Bunun yanı sıra insülin, glukoz ve glukokortikoidlerin leptin ekspresyonunu arttırdığı bilinmektedir (53, 56). Kolin ve CDP-kolin'in serum glukoz, insülin, kortikosteron ve glukagon düzeyleri üzerine olan etkisi göz önüne alındığında, çalışmamızda CDP-kolin sonrasında gözlenen ghrelin süpresyonu ve leptin artışı direkt bir etkiden çok sözü edilen hormon düzeylerindeki değişikliklere ikincil de olabilir.

Sonuç olarak, çalışmamızda isv verilen CDP-kolin'in serum ghrelin düzeylerinde baskılanmaya, serum leptin düzeylerinde ise artışa yol açtığı saptanmıştır. Reseptör antagonisti verilmesini takiben gözlenen etkiler, ghrelin süpresyonunda nikotinic reseptörlerin, leptin artışında ise hem nikotinic hem de muskarinic reseptörlerin rol oynadığını düşündürmektedir. Bu çalışma isv verilen CDP-kolinin serum ghrelin ve leptin düzeyleri üzerine etkisini inceleyen ilk çalışma olması nedeni ile önem taşımaktadır. Ancak CDP-kolin'in serum ghrelin ve leptin düzeyleri üzerine olan etkisinin daha net belirlenebilmesi açısından daha kapsamlı çalışmaların gerçekleştirilmesine ihtiyaç vardır. CDP kolin'in periferik yolla verilmesini takiben ve selektif reseptör blokörü kullanımı sonrası ghrelin ve leptin düzeylerinin ölçümü kolinerjik sistemin bu hormonların serum düzeyleri üzerine olan etkisinin daha net ortaya koyulmasını sağlayacaktır. Yine CDP-kolin ile kronik tedavi sonrasında vücut ağırlığı ve adipoz doku oranlarında değişiklik olup olmayacağı da cevaplanması gereken bir diğer sorudur. CDP-kolin bazı Avrupa ve Uzak Doğu ülkelerinde serebral iskemide, travmatik beyin yaralanmalarında ve Alzheimer gibi demansiyal hastalıklarda reçete edilen ruhsatlı bir ilaç olup (63, 64), hastaların tedavi sürecinde CDP-kolin'in çalışmamızda saptanan metabolik etkileri açısından incelenmesi ve takibinin yapılması bu konudaki bilgilerimizin artmasına katkı sağlayabilir.

## KAYNAKLAR

- 1) MOKDAD AH, BOWMAN BA, FORD ES, VINICOR F, MARKS JS, KOPLAN JP. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA*, 286: 1195–1200, 2001.
- 2) NÄSLUND E, HELLSTRÖM PM. Appetite signaling: from gut peptides and enteric nerves to brain. *Physiol Behav*, 92: 256-62, 2007.
- 3) NOGUEIRAS R, TSCHÖP MH, ZIGMAN JM. Central nervous system regulation of energy metabolism: ghrelin versus leptin. *Ann N Y Acad Sci*, 1126: 14-9, 2008.
- 4) HIMMS-HAGEN J. Physiological roles of the leptin endocrine system: differences between mice and humans. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 36: 575-655, 1999.
- 5) HOSODA H, KOJIMA M, KANGAWA K. Biological, physiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *J Pharmacol Sci*, 100: 398-410, 2006.
- 6) VALASSI E, SCACCHI M, CAVAGNINI F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 18: 158-68, 2008.
- 7) SPIEGELMAN BM, FLIER JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, 104: 531-43, 2001.
- 8) WILLIAMS DL, GRILL HJ, CUMMINGS DE, KAPLAN JM. Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin. *Endocrinology*, 144: 5184-7, 2003.
- 9) DATE Y, MURAKAMI N, TOSHINAI K, MATSUKURA S, NIIJIMA A, MATSUO H, KANGAWA K, NAKAZATO M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*, 123: 1120-8, 2002.
- 10) SUGINO T, YAMAURA J, YAMAGISHI M, KUROSE Y, KOJIMA M, KANGAWA K, HASEGAWA Y, TERASHIMA Y. Involvement of cholinergic neurons in the regulation of the ghrelin secretory response to feeding in sheep. *Biochem Biophys Res Commun*, 304: 308-12, 2003.
- 11) WEISS GB. Metabolism and actions of CDP-choline as an endogenous compound and administered exogenously as citicoline. *Life Sci*, 56: 637-60, 1995.
- 12) LÓPEZ-COVIELLA I, AGUT J, SAVCI V, ORTIZ JA, WURTMAN RJ. Evidence that 5'-cytidinediphosphocholine can affect brain phospholipid composition by increasing choline and cytidine plasma levels. *Neurochem*, 65: 889-94, 1995.
- 13) COHEN EL, WURTMAN RJ. Brain acetylcholine: control by dietary choline. *Science*, 191: 561-2, 1976.
- 14) KILLGORE WD, ROSS AJ, KAMIYA T, KAWADA Y, RENSHAW PF, YURGELUN-TODD DA. Citicoline affects appetite and cortico-limbic responses to images of high-calorie foods. *Int J Eat Disord*, 43: 6-13, 2010.
- 15) BURT DR, TAYLOR RL. Muscarinic receptor binding in sheep anterior pituitary. *Neuroendocrinology*, 30: 344-9, 1980.
- 16) MASON WT, HO YW, ECKENSTEIN F, HATTON GI. Mapping of cholinergic neurons associated with rat supraoptic nucleus: combined immunocytochemical and histochemical identification. *Brain Res Bull*, 11: 617-26, 1983.
- 17) MASON WT. Staining of the magnocellular nuclei of the rat hypothalamus by a monoclonal antibody directed against the alpha-subunit of the nicotinic cholinergic receptor *Neurosci Lett*, 59: 89-95, 1985.
- 18) MICHELS KM, MEEKER RB, HAYWARD JN. Differential distribution of muscarinic cholinergic and putative nicotinic cholinergic receptors within the hypothalamo-neurohypophysial system of the rat. *Neuroendocrinology*, 44: 498-507, 1986.

- 19) WOODS SC. Gastrointestinal satiety signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 286: 7-13, 2004.
- 20) FLIER, J.S. Obesity Wars: Molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*, 116: 337-350, 2004.
- 21) SCHWARTZ MW, WOODS SC, PORTE D JR, SEELEY RJ, BASKIN DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404: 661-71, 2000.
- 22) XU AW, KAELIN CB, TAKEDA K, AKIRA S, SCHWARTZ MW, BARSH GS. PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J Clin Invest*, 115: 951-8, 2005.
- 23) GUTZWILLER JP, DREWE J, KETTERER S, HILDEBRAND P, KRAUTHEIM A, BEGLINGER C. Interaction between CCK and a preload on reduction of food intake is mediated by CCK-A receptors in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279: R189-95, 2000.
- 24) MEERAN K, O'SHEA D, EDWARDS CM, TURTON MD, HEATH MM, GUNN I, ABUSNANA S, ROSSI M, SMALL CJ, GOLDSTONE AP, TAYLOR GM, SUNTER D, STEERE J, CHOI SJ, GHATEI MA, BLOOM SR. Repeated intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide or exendin-(9-39) alters body weight in the rat. *Endocrinology*, 140: 244-50, 1999.
- 25) BATTERHAM RL, COHEN MA, ELLIS SM, LE ROUX CW, WITHERS DJ, FROST GS, GHATEI MA, BLOOM SR. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med*, 349: 941-8, 2003.
- 26) KORBONITS M, GOLDSTONE AP, GUEORGUIEV M, GROSSMAN AB. Ghrelin--a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol*, 25: 27-68, 2004.
- 27) BOWERS CY, CHANG, MOMANY FA, FOLKERS K. Effect of the enkephalis and enkephalin analogues on release of pituitary hormones in vitro. *Mol. Endocrinol*, 7: 287-292, 1977.
- 28) KOJIMA M, HOSODA H, DATE Y, NAKAZATO M, MATSUO H, KANGAWA K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402: 656-60, 1999.
- 29) TOMASETTO C, KARAM SM, RIBIERAS S, MASSON R, LEFÈBVRE O, STAUB A, ALEXANDER G, CHENARD MP, RIO MC. Identification and characterization of a novel gastric peptide hormone: the motilin-related peptide. *Gastroenterology*, 119: 395-405, 2000.
- 30) ARIYASU H, TAKAYA K, TAGAMI T, OGAWA Y, HOSODA K, AKAMIZU T, SUDA M, KOH T, NATSUI K, TOYOOKA S, SHIRAKAMI G, USUI T, SHIMATSU A, DOI K, HOSODA H, KOJIMA M, KANGAWA K, NAKAO K. Stomach is a major source of circulating ghrelin and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 4753-8, 2001.
- 31) SAKATA I, NAKAMURA K, YAMAZAKI M, MATSUBARA M, HAYASHI Y, KANGAWA K, SAKAI T. Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides*, 23: 531-6, 2002.
- 32) HOSODA H, KOJIMA M, MATSUO H, KANGAWA K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 279: 909-13, 2000.
- 33) BEDENDI I, ALLOATTI G, MARCANTONI A, MALAN D, CATAPANO F, GHÉ C, DEGHENGI R, GHIGO E, MUCCIOLI G. Cardiac effects of ghrelin

- and its endogenous derivatives des-octanoyl ghrelin and des-Gln14-ghrelin. *Eur J Pharmacol*, 476: 87-95, 2003.
- 34) THOMPSON NM, GILL DA, DAVIES R, LOVERIDGE N, HOUSTON PA, ROBINSON IC, WELLS T. Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*, 145: 234-42, 2004.
  - 35) ZIGMAN JM, JONES JE, LEE CE, SAPER CB, ELMQUIST JK. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol*, 494: 528-48, 2006.
  - 36) KORBONITS M, BUSTIN SA, KOJIMA M, JORDAN S, ADAMS EF, LOWE DG, KANGAWA K, GROSSMAN AB. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 881-7, 2001.
  - 37) WREN AM, SMALL CJ, WARD HL, MURPHY KG, DAKIN CL, TAHERI S, KENNEDY AR, ROBERTS GH, MORGAN DG, GHATEI MA, BLOOM SR. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*, 141: 4325-8, 2000.
  - 38) WREN AM, SEAL LJ, COHEN MA, BRYNES AE, FROST GS, MURPHY KG, DHILLO WS, GHATEI MA, BLOOM SR. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 5992, 2001.
  - 39) CUMMINGS DE, PURNELL JQ, FRAYO RS, SCHMIDOVA K, WISSE BE, WEIGLE DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*, 50: 1714-9, 2001.
  - 40) TSCHÖP M, WAWARTA R, RIEPL RL, FRIEDRICH S, BIDLINGMAIER M, LANDGRAF R, FOLWACZNY C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest*, 24: RC19-21, 2001.
  - 41) HIGGINS SC, GUEORGUIEV M, KORBONITS M. Ghrelin, the peripheral hunger hormone. *Ann Med*, 39: 116-36, 2007.
  - 42) MURDOLO G, LUCIDI P, DI LORETO C, PARLANTI N, DE CICCO A, FATONE C, FANELLI CG, BOLLI GB, SANTEUSANIO F, DE FEO P. Insulin is required for prandial ghrelin suppression in humans. *Diabetes*, 52: 2923-7, 2003.
  - 43) FLANAGAN DE, EVANS ML, MONSOD TP, RIFE F, HEPTULLA RA, TAMBORLANE WV, SHERWIN RS. The influence of insulin on circulating ghrelin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284: E313-6, 2003.
  - 44) SAAD MF, BERNABA B, HWU CM, JINAGOUDA S, FAHMI S, KOGOSOV E, BOYADJIAN R. Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 3997-4000, 2002.
  - 45) ARAFAT MA, OTTO B, ROCHLITZ H, TSCHÖP M, BÄHR V, MÖHLIG M, DIEDERICH S, SPRANGER J, PFEIFFER AF. Glucagon inhibits ghrelin secretion in humans. *Eur J Endocrinol*, 153: 397-402, 2005.
  - 46) CHAN JL, BULLEN J, LEE JH, YIANNAKOURIS N, MANTZOROS CS. Ghrelin levels are not regulated by recombinant leptin administration and/or three days of fasting in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 335-43, 2004.
  - 47) SAKATA I, YAMAZAKI M, INOUE K, HAYASHI Y, KANGAWA K, SAKAI T. Growth hormone secretagogue receptor expression in the cells of the stomach-projected afferent nerve in the rat nodose ganglion. *Neurosci Lett*, 342: 183-6, 2003.
  - 48) ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L, FRIEDMAN JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372: 425-32, 1994.

- 49) HUBE F, LIETZ U, IGEL M, JENSEN PB, TORNQVIST H, JOOST HG, HAUNER H. Difference in leptin mRNA levels between omental and subcutaneous abdominal adipose tissue from obese humans. *Horm Metab Res*, 28: 690-3, 1996.
- 50) LEE GH, PROENCA R, MONTEZ JM, CARROLL KM, DARVISHZADEH JG, LEE JI, FRIEDMAN JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*, 379: 632-5, 1996.
- 51) BARR VA, LANE K, TAYLOR SI. Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms. *J Biol Chem*, 274: 21416-24, 1999.
- 52) GHILARDI N, ZIEGLER S, WIESTNER A, STOFFEL R, HEIM MH, SKODA RC. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 6231-5, 1996.
- 53) KOERNER A, KRATZSCH J, KIESS W. Adipocytokines: leptin--the classical, resistin--the controversial, adiponectin--the promising, and more to come. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 19: 525-46, 2005.
- 54) YILDIZ BO, HAZNEDAROGLU IC. Rethinking leptin and insulin action: therapeutic opportunities for diabetes. *Int J Biochem Cell Biol*, 38: 820-30, 2006.
- 55) FRIEDMAN JM. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev*, 60: 1-14, 2002.
- 56) CONSIDINE RV, CARO JF. Leptin and the regulation of body weight. *Int J Biochem Cell Biol*, 29: 1255-72, 1997.
- 57) SUNDLER R, AKESSON B. Biosynthesis of phosphatidylethanolamines and phosphatidylcholines from ethanolamine and choline in rat liver. *Biochem J*, 146: 309-15, 1975.
- 58) WURTMAN RJ, REGAN M, ULUS I, YU L. Effect of oral CDP-choline on plasma choline and uridine levels in humans. *Biochem Pharmacol*, 60: 989-92, 2000.
- 59) SAVCI V, CAVUN S, GOKTALAY G, ULUS IH. Cardiovascular effects of intracerebroventricularly injected CDP-choline in normotensive and hypotensive animals: the involvement of cholinergic system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 365: 388-98, 2002.
- 60) LOPEZ G, COVIELLA I, AGUT J, VON BORSTEL R, WURTMAN RJ. Metabolism of cytidine (5')-diphosphocholine (CDP-choline) following oral and intravenous administration to the human and the rat. *Neurochem. Int*, 11: 293-297, 1987.
- 61) PARONI R, CIGHETTI G, DEL PUPPO M, KIENLE MG. Evidence for a different metabolic behaviour of cytidine diphosphate choline after oral and intravenous administration to rats. *Pharmacol Res Commun*, 17: 805-29, 1985.
- 62) GALLETI P, DE ROSA M, COTTICELLI MG, MORANA A, VACCARO R, ZAPPALÀ V. Biochemical rationale for the use of CDPcholine in traumatic brain injury: pharmacokinetics of the orally administered drug. *J Neurol Sci*, 103 Suppl: 19-25, 1991.
- 63) DÁVALOS A, SECADES J. Citicoline preclinical and clinical update 2009-2010. *Stroke*, 42(1 Suppl): S36-9, 2011.
- 64) HURTADO O, LIZASOAIN I, MORO MÁ. Neuroprotection and recovery: recent data at the bench on citicoline. *Stroke*, 42(1 Suppl): 33-5, 2011.
- 65) BLUSZTAJN JK, WURTMAN RJ. Choline and cholinergic neurons. *Science*, 221: 614-20, 1983.
- 66) COHEN EL, WURTMAN RJ. Brain acetylcholine: increase after systemic choline administration. *Life Sci*, 16: 1095-102, 1975.

- 67) HIRSCH MJ, GROWDON JH, WURTMAN RJ. Increase in hippocampal acetylcholine after choline administration. *Brain Res*, 125: 383-5, 1977.
- 68) LOPEZ G, COVIELLA I, WURTMAN RJ. Enhancement by cytidine of membrane phospholipid synthesis. *J Neurochem*, 59: 338-343, 1992.
- 69) SLADEK CD, JOYNT RJ. Characterization of cholinergic control of vasopressin release by the organ-cultured rat hypothalamo-neurohypophyseal system. *Endocrinology*, 104: 659, 1979.
- 70) GREGG CM. The compartmentalized hypothalamo-neurohypophysial system: evidence for a neurohypophysial action of acetylcholine on vasopressin release. *Neuroendocrinology*, 40: 423-9, 1985.
- 71) RISCH SC, JANOWSKY DS, MOTT MA, GILLIN JC, KALIR HH, HUEY LY, ZIEGLER M, KENNEDY B, TURKEN A. Central and peripheral cholinesterase inhibition: effects on anterior pituitary and sympathomimetic function. *Psychoneuroendocrinology*, 11: 221-30, 1986.
- 72) MATTA SG, MCALLEN KM, SHARP BM. Role of the fourth cerebroventricle in mediating rat plasma ACTH responses to intravenous nicotine. *J Pharmacol Exp Ther*, 252: 623-30, 1990.
- 73) CORDIDO F, DIEGUEZ C, CASANUEVA FF. Effect of central cholinergic neurotransmission enhancement by pyridostigmine on the growth hormone secretion elicited by clonidine, arginine, or hypoglycemia in normal and obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 70: 1361-70, 1990.
- 74) KELIJMAN M, FROHMAN LA. The role of the cholinergic pathway in growth hormone feedback. *J Clin Endocrinol Metab*, 72: 1081-7, 1991.
- 75) SAVCI V, GÜRÜN MS, ULUS IH, KIRAN BK. Effect of intracerebroventricularly injected choline on plasma ACTH and beta-endorphin levels in conscious rats. *Eur J Pharmacol*, 309: 275-80, 1996.
- 76) GÜRÜN MS, SAVCI V, ULUS IH, KIRAN BK. Centrally administered choline increases plasma prolactin levels in conscious rats. *Neurosci Lett*, 232: 79-82, 1997.
- 77) CAVUN S, SAVCI V. CDP-choline increases plasma ACTH and potentiates the stimulated release of GH, TSH and LH: the cholinergic involvement. *Fundam Clin Pharmacol*, 18: 513-23, 2004.
- 78) CAVUN S, SAVCI V, ULUS IH. Centrally injected CDP-choline increases plasma vasopressin levels by central cholinergic activation. *Fundam Clin Pharmacol*, 18: 71-7, 2004.
- 79) EVERITT BJ, MEISTER B, HÖKFELT T, MELANDER T, TERENIUS L, RÖKAEUS A, THEODORSSON-NORHEIM E, DOCKRAY G, EDWARDSON J, CUELLO C. The hypothalamic arcuate nucleus-median eminence complex: immunohistochemistry of transmitters, peptides and DARPP-32 with special reference to coexistence in dopamine neurons. *Brain Res*, 396: 97-155, 1986.
- 80) MEISTER B, GÖMÜÇ B, SUAREZ E, ISHII Y, DÜRR K, GILLBERG L. Hypothalamic proopiomelanocortin (POMC) neurons have a cholinergic phenotype. *Eur J Neurosci*, 24: 2731-40, 2006.
- 81) SHRESTHA YB, WICKWIRE K, GIRAUDO SQ. Direct effects of nutrients, acetylcholine, CCK, and insulin on ghrelin release from the isolated stomachs of rats. *Peptides*, 30: 1187-91, 2009.
- 82) MAIER C, SCHALLER G, BURANYI B, NOWOTNY P, GEYER G, WOLZT M, LUGER A. The cholinergic system controls ghrelin release and ghrelin-induced growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 4729-33, 2004.

- 83) BROGLIO F, GOTTERO C, VAN KOETSVELD P, PRODAM F, DESTEFANIS S, BENSO A, GAUNA C, HOFLAND L, ARVAT E, VAN DER LELY AJ, GHIGO E. Acetylcholine regulates ghrelin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 2429-33, 2004.
- 84) BERTHOUD HR, FOX EA, NEUHUBER WL. Vagaries of adipose tissue innervation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291: 1240-2, 2006.
- 85) UEDA M, TAMAYA N, MIURA H, KUZUYA M, HATTORI A, MURAGUCHI M, OHMOTO Y, IGUCHI A, UEMURA K. Rise in plasma leptin levels after stimulation of hypothalamic cholinergic neurons by neostigmine in rats. *Drugs Exp Clin Res*, 27: 185-92, 2001.
- 86) BRAY GA, YORK DA. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev*, 59: 719-809, 1979.
- 87) ROHNER-JEANRENAUD F. A neuroendocrine reappraisal of the dual-centre hypothesis: its implications for obesity and insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 19: 517-34, 1995.
- 88) GILON P, HENQUIN JC. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev*, 22: 565-604, 2001.
- 89) CAULFIELD MP, BIRDSALL NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev*, 50: 279-90, 1998.
- 90) LEVEY AI, EDMUNDS SM, HEILMAN CJ, DESMOND TJ, FREY KA. Localization of muscarinic m3 receptor protein and M3 receptor binding in rat brain. *Neuroscience*, 63: 207-21, 1994.
- 91) YAMADA M, MIYAKAWA T, DUTTARROY A, YAMANAKA A, MORIGUCHI T, MAKITA R, OGAWA M, CHOU CJ, XIA B, CRAWLEY JN, FELDER CC, DENG CX, WESS J. Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature*, 410: 207-12, 2001.
- 92) GAUTAM D, GAVRILOVA O, JEON J, PACK S, JOU W, CUI Y, LI JH, WESS J. Beneficial metabolic effects of M3 muscarinic acetylcholine receptor deficiency. *Cell Metab*, 4: 363-75, 2006.
- 93) LI MD, KANE JK, KONU O. Nicotine, body weight and potential implications in the treatment of obesity. *Curr Top Med Chem*, 3: 899-919, 2003.
- 94) MARRERO MB, LUCAS R, SALET C, HAUSER TA, MAZUROV A, LIPPIELLO PM, BENCHERIF M. An alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-selective agonist reduces weight gain and metabolic changes in a mouse model of diabetes. *J Pharmacol Exp Ther*, 332: 173-80, 2010.
- 95) PICCIOTTO MR, CALDARONE BJ, KING SL, ZACHARIOU V. Nicotinic receptors in the brain. Links between molecular biology and behavior. *Neuropsychopharmacology*, 22: 451-65, 2000.
- 96) BYMASTER FP, FELDER CC. Role of the cholinergic muscarinic system in bipolar disorder and related mechanism of action of antipsychotic agents. *Mol Psychiatry*, 7 Suppl 1: 57-63, 2002.
- 97) CANSEV M, YILMAZ MS, ILCOL YO, HAMURTEKIN E, ULUS IH. Cardiovascular effects of CDP-choline and its metabolites: involvement of peripheral autonomic nervous system. *Eur J Pharmacol*, 577: 129-42, 2007.
- 98) ILCOL YO, GURUN MS, TAGA Y, ULUS IH. Intraperitoneal administration of choline increases serum glucose in rat: involvement of the sympathoadrenal system. *Horm Metab Res*, 34: 341-7, 2002.



- 99) ILCOL YO, GURUN MS, TAGA Y, ULUS IH. Choline increases serum insulin in rat when injected intraperitoneally and augments basal and stimulated acetylcholine release from the rat minced pancreas in vitro. *Eur J Biochem*, 27: 991-9, 2003.
- 100) GÜRÜN MS, ILÇÖL YO, TAGA Y, ULUS IH. Hyperglycemia induced by intracerebroventricular choline: involvement of the sympatho-adrenal system. *Eur J Pharmacol*, 438: 197-205, 2002.
- 101) ILCOL YO, CANSEV M, YILMAZ MS, HAMURTEKIN E, ULUS IH. Intraperitoneal administration of CDP-choline and its cholinergic and pyrimidinergic metabolites induce hyperglycemia in rats: involvement of the sympathoadrenal system. *Arch Physiol Biochem*, 113: 186-201, 2007.
- 102) ILCOL YO, CANSEV M, YILMAZ MS, HAMURTEKIN E, ULUS IH. Peripheral administration of CDP-choline and its cholinergic metabolites increases serum insulin: muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors are both involved in their actions. *Neurosci Lett*, 431: 71-6, 2008.
- 103) CANSEV M, ILCOL YO, YILMAZ MS, HAMURTEKIN E, ULUS IH. Peripheral administration of CDP-choline, phosphocholine or choline increases plasma adrenaline and noradrenaline concentrations. *Auton Autacoid Pharmacol*, 28: 41-58, 2008.
- 104) AHRÉN B. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia*, 43: 393-410, 2000.
- 105) CANSEV M, ILCOL YO, YILMAZ MS, HAMURTEKIN E, ULUS IH. Choline, CDP-choline or phosphocholine increases plasma glucagon in rats: involvement of the peripheral autonomic nervous system. *Eur J Pharmacol*, 589: 315-22, 2008.
- 106) ARAFAT AM, PERSCHEL FH, OTTO B, WEICKERT MO, ROCHLITZ H, SCHÖFL C, SPRANGER J, MÖHLIG M, PFEIFFER AF. Glucagon suppression of ghrelin secretion is exerted at hypothalamus-pituitary level. *J Clin Endocrinol Metab*, 91: 3528-33, 2006.

## TEŞEKKÜR

Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji doktora çalıőmam boyunca yakın ilgi ve desteklerini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı'nda çalıőan tüm değerli hocalarıma çok teşekkür ederim. Tez izleme komitesi üyeleri olan Prof. Dr. Mine Sibel Gürün, Prof. Dr. Canan Ersoy ve Prof. Dr. Őazi İmamoğlu'na da tez çalıőmam sırasındaki yakın ilgi ve katkılarından dolayı teşekkür ediyorum. Yine bu projenin Őekillenmesinde önemli katkısı olan Prof. Dr. Vahide Savcı'ya çok teşekkür ederim. Tez danışmanım olan Prof. Dr. Sinan avun'a tez çalıőmam süresince göstermiş olduğu destek, katkı ve sabır için ayrıca teşekkür ediyorum. Son olarak tez çalıőmam sırasındaki yardımları ve içten dostluğu için Dr. Nesrin Filiz Baőaran'a, her zaman sevgi ve desteklerini gördüğüm tüm çalışma arkadaşlarıma, aileme ve eőime sonsuz teőekkürler...

## ÖZGEÇMİŞ

15-06-1974 yılında İzmir’de doğdum. Orta öğrenimimi İzmir 60. Yıl Anadolu Lisesi’nde tamamladım. 1992 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi’ne girdim ve 1998 yılında mezun oldum. 1999 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım. Aralık 2003 tarihinde “Tip 1 diyabetes mellituslu hastalarda diyabetik nefropati gelişiminde serum monosit kemotaktik protein-1 düzeyinin ve monosit adezyon moleküllerinin rolü” isimli uzmanlık tezimi vererek İç Hastalıkları uzmanı olmaya hak kazandım. Mart 2004 tarihinde Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji ve Metabolizma Bilim Dalı’nda Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları yan dal ihtisasına başladım. Aynı yıl Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitü’sünde Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji doktora programına başladım. Haziran 2009’da “Metabolik sendromu bulunan hipertansif hastalarda telmisartan tedavisinin insülin direnci, metabolik parametreler ile serum adiponektin ve tümör nekrozis faktör – alfa düzeyleri üzerine olan etkisi” isimli tezimi vererek Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları yan dal uzmanı olarak çalışmaya başladım. 04 Aralık 2012’de Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Doçenti ünvanını aldım. Halen Bursa Devlet Hastanesinde, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Uzmanı olarak görev yapmaktayım. Evliyim, 6 yaşında bir kızım var ve İngilizce bilmekteyim.

Doç. Dr. D. Sinem KÜÇÜKSARAÇ KIYICI