

ETİLEN GLİKOLÜN MİDE ÜZERİNE ETKİSİ: HİSTOLOJİK ÇALIŞMA

Effect of Ethylene Glycol on The Stomach: Histological Study

Derya KARABULUT¹(0000-0003-2067-6174), Emin KAYMAK²(0000-0002-3818-2693), Betül YALÇIN¹(0000-0003-1176-8843), Harun ÜLGER³(0000-0003-3893-6341), Ali Tuğrul AKİN⁴(0000-0002-1408-8571), Emel ÖZTÜRK¹(0000-0003-0756-0329), Birkan YAKAN¹(0000-0002-5456-4579)

ÖZET

Amaç: Etilen glikol (antifriz) yanlışlıkla ya da intihar amaçlı sindirim yoluyla alınması sonucu kısa sürede şiddetli belirtiler göstermekte, yaşam kalitesini etkilemekte uygun tedavi edilmediği takdirde ölüme neden olabilmektedir. Bu çalışmada etilen glikolün sıçan midesi üzerinde etkilerinin histolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Projede sıçanlar rastgele 2 gruba ayrılarak metabolik kafeslere yerleştirildi: Kontrol grubu (6 adet) ve Etilen glikol grubu (grup EG) (6 adet). Grup EG sıçanlarının içme sularına 21 gün boyunca %1 etilen glikol eklendi. 21 günün sonunda sıçanlar ketamin + xylazin anestezisi altında uyutulmuş mideleri alındı. Mide doku kesitlerine hematoxilen-eozin boyaması ve ghrelin-pozitif hücreleri belirlemek amacıyla immünohistokimya uygulandı.

Bulgular: Kontrol grubuyla kıyaslandığında EG grubuna ait mide doku epitelizasyonunda bozulmalar gözleendi. Ghrelin-immunopozitif hücre sayısında ise kontrol grubuna kıyasla EG grubunda artış olduğu belirlendi.

Sonuç: Sonuç olarak, ghrelin-immunopozitif hücre sayısındaki artışa bağlı olarak, ghrelin EG alımı sonrasında bozulmuş fizyolojinin düzeltilmesine katkı sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Etilen glikol; Mide; Sıçan; Ghrelin.

ABSTRACT

Aim: Ethylene glycol (antifreeze) may show severe symptoms in a short time as a result of accidental or suicidal ingestion and may cause death if not treated appropriately. The aim of this study was to investigate the effects of ethylene glycol on rat stomach by histological and immunohistochemical methods.

Materials and Methods: The rats were divided into two groups random, and placed in metabolic cages. Control group (6 units) and Ethylene glycol group (group EG) (6 units). 1% ethylene glycol was added to the drinking water of Group EG rats for 21 days. At the end of 21 days, rats were anesthetized under ketamine + xylazine anesthesia and their stomachs were removed. Hematoxylin-eosin staining and ghrelin-positive cells were applied to the gastric tissue sections for immunohistochemistry.

Results: Deterioration of gastric tissue epithelialization of was observed EG group compared to control group. There was an increase in the number of ghrelin-immunopositive cells in the EG group compared to the control group.

Conclusion: As a result, due to the increase in the number of ghrelin-immunopositive cells, ghrelin may contribute to the correction of impaired physiology after EG uptake.

Keywords: Ethylene Glycol; Stomach; Rat; Ghrelin.

¹Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

²Yozgat Bozok Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Yozgat

³Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Kayseri

⁴Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kayseri

Derya KARABULUT, Dr. Öğr. Üyesi
Emin KAYMAK, Araş. Gör.
Betül YALÇIN, Araş. Gör.
Harun ÜLGER, Prof. Dr.
Ali Tuğrul AKİN, Araş. Gör.
Emel ÖZTÜRK, Araş. Gör.
Birkan YAKAN, Prof. Dr.

İletişim:

Dr. Öğr. Üyesi Derya KARABULUT,
Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı,
Köşk, Talas Bulvarı, 38030
Melikgazi-Kayseri, TURKEY
Tel: +90 533 034 25 44,
+90 352 437 49 10
e-mail:
deryakus@hotmail.com
karabulutdry@gmail.com

Geliş tarihi/Received: :26.09.2019

Kabul tarihi/Accepted: 15.04.2020

DOI: 10.16919/bozoktip.625037

Bozok Tıp Derg 2020;10(2):111-6

Bozok Med J 2020;10(2):111-6

Giriş

Etilen glikol (EG) renksiz, kokusuz, sıvı, suda çözülebilen ve endüstriyel ürünlerde ticari olarak kullanılan bir alkoldür. EG çoğunlukla arabalarda donmayı önleyici ajan olarak kullanılmaktadır (1, 2). Ucuz olması, tatlı bir tada sahip olması, sarhoş edici etkisi nedeniyle intihar girişimlerinde kullanılmakta ya da su zannedilerek içilmesi sonucu sindirim sisteminden kolayca emilebilmekte, ayrıca deri ve solunum yoluyla da vücut tarafından absorbe edilebilmektedir (3). EG kazara ya da kasıtlı bir şekilde alındığında başta nörolojik bozukluklar olmak üzere dolaşım sistemi ve üriner sistemlerde hasara neden olarak, EG zehirlenmesine bağlı ağır metabolik asidoz, koma ve akut böbrek yetmezliği geliştiği bildirilmektedir (4, 5). Dünyada EG zehirlenmesine daha sık rastlanırken ülkemizde daha nadir görülmektedir. EG sindirim yoluyla alımından kısa bir süre sonra mide ve ince bağırsaklardan hızlı bir şekilde emilir ve 30 dakika içinde depresif etkisi görülmeye başlar (6). Ghrelin ilk olarak sıçan ve insan midesinde 28 aminoasitlik bir peptid olarak tanımlanmıştır (7). Anterior hipofizden büyüme hormonu (GH) salınımını uyaran büyüme hormonu salgılatıcı reseptör (GHS-R) için endojen bir ligand olarak görev yapmaktadır (8). Streptozotosinle deneysel diyabet oluşturduğumuz bir çalışmada bir aylık diyabetin sıçan mide dokusunda ghrelin-immunopozitif hücre sayısında önemli derecede azalmaya neden olduğunu gözlemledik (9). Ovariektomi uygulanan dişi sıçanların midesinde üçüncü ve beşinci günden sonra ghrelin-immunopozitif sayısında artma olduğu gözlenmiştir (10). Ethanol ile indüklenerek gastrik ülser oluşturulan sıçanlarda ghrelin uygulamasının endojen nitrik oksit salınımını etkileyerek ghrelinin gastroprotektif bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (11). Mide mukozasında yer alan ghrelin salgılayan hücrelerin çeşitli ilaç alımı, hastalıklar sebebiyle azalması ya da artması metabolizmanın düzenli işleyişini de etkileyebilmektedir. EG alımından sonra başlayan nörolojik bozulma, santral sinir sistemi depresyonu sonrasında bilinç kaybı, belirsiz konuşma, halüsinasyon, koma, kardiyopulmoner disfonksiyon, metabolik asidoz ve böbrek yetmezliği gibi rahatsızlıklar bilinmektedir (12, 13). Bu çalışmada da EG kullanımı sonrasında mide yapısında meydana gelebilecek değişiklikler ve ghrelin-immunopozitif hücrelerin gösterilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilen 12 adet 2-3 aylık / 8-12 haftalık, 200-300 gr ağırlığında yetişkin Wistar albino türü erkek sıçanlar kullanıldı. Metabolik kafesler içinde tutulan sıçanlara günün normal düzeninde 21 °C ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamında su ve besin ihtiyaçları sağlandı. Denekler tartılıp, ağırlıkları birbirine yakın olanlar bir araya getirilerek deney grupları oluşturuldu. Bu projede kullanılan dokular için Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 12.10.2017 tarih, toplantı sayısı 10 ve karar no 17/089 ile etik kurul onay belgesi alınmıştır. Kontrol grubu (6 adet) standart su ve besin ihtiyaçları sağlanarak, Etilen glikol (EG) grubu (6 adet) 21 gün boyunca deneklerin içme sularına %1 oranında EG karıştırılarak oluşturuldu. Deney sonunda ketamin+ksilazin anestezisi altında uyutulan deneklerin mide dokuları çıkarıldı.

Histolojik Prosedür

Deney sonunda alınan mide dokuları %10 luk formaldehid solüsyonunda tespit edildi. Tespit solüsyonunda 72 saat bekletildikten sonra yıkanan dokular artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (%50, %70, %80, %96, 3x%100) dehidrate edildi. Ksilol ile şeffaflandırılan dokular parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitlere histolojik yapıyı değerlendirmek amacıyla Hematoksilen-Eozin (H-E) boyaması ve ghrelin-pozitif hücreleri belirlemek amacıyla immunohistokimya boyaması uygulandı.

Hematoksilen-Eozin (H-E) Boyama Protokolü

Parafin kesitler 2 saat 58 °C' de inkübe edildi. Kesitler 3 kez 10'ar dk ksilende bekletildikten sonra azalan alkol (2x%100, %96, %80, %70 ve %50) serilerinde 5'er dk bekletilerek su aşamasına getirildi. Çeşme suyunda yıkanan kesitler oda sıcaklığında hematoksilen solüsyonu içinde 10 dk bekletildi. Çeşme suyunda tekrar yıkanan kesitler eosin solüsyonunda 5 dk bekletildikten sonra yeniden çeşme suyuna alınarak yıkandı. Artan dereceli alkol (%70, %96, 3x%100) serilerinden geçirilen kesitler ksilende bekletildikten sonra entellan ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi.

İmmunohistokimya Boyama Protokolü

Mide dokusundaki ghrelin-pozitif hücreleri belirlemek amacıyla avidin-biotin-peroksidaz yöntemiyle

immunohistokimya metodu uygulandı. Bunun için alınan 5 µm'lik kesitler bir gece 60°C'de tutularak, önce ksilen sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edildi, daha sonra fosfat tampon (PBS) ile yıkandı. Antijen geri kazanımı için %5'lik sitrat tamponu ile muamele edilen kesitler, 20 dakika oda ısısında aynı tampon solüsyon içinde bekletildi. PBS ile tekrar yıkanan kesitler endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için 5 dakika %3 hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edildi ve sonraki aşamalar için primer antikora uyumlu boyama kiti kullanıldı. Kesitlere ghrelin primer antikoru (sc-50297, Santacruz, California, USA) uygulandı. Negatif kontrol olarak, primer antikor yerine PBS kullanıldı. Kesitler Gill hematoksilen ile karşıt boyandı. Olympus BX51 model ışık mikroskobu altında DP71 model dijital fotoğraf makinesi ile görüntüleri alındı. Tüm mide dokusunda ghrelin-pozitif reaksiyon veren hücrelerin sayısı yapıldı.

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analiz için Graphpad Prism 7 versiyonu kullanıldı. Sürekli değişkenlerin ortalamalarını karşılaştırmak için bağımsız örneklem t-testi kullanıldı. P değeri < 0.05 olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 1. Ghrelin-immunopozitif hücre sayısı. Veriler ± standart sapma olarak gösterilmiştir. p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

Gruplar	Kontrol	EG	p
Hücre sayısı	4.51±3.85	10.02±6.89	0.001

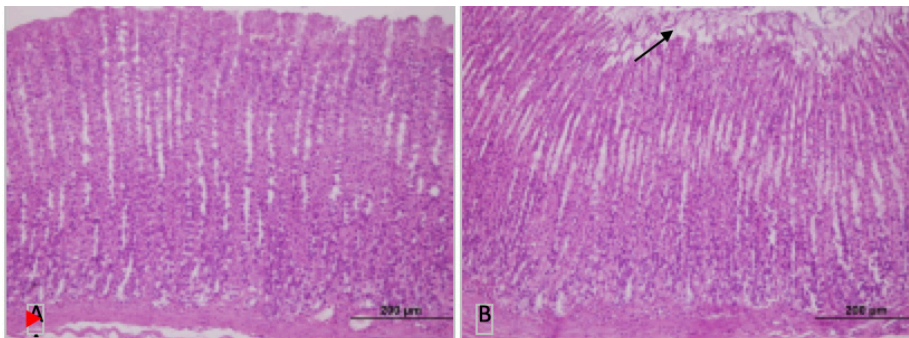
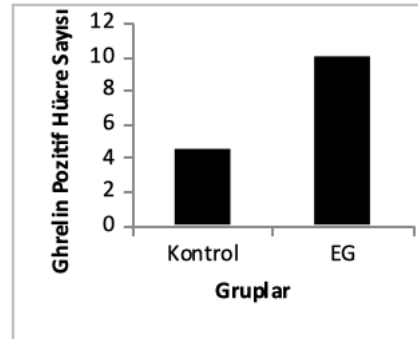
BULGULAR

Histolojik Bulgular

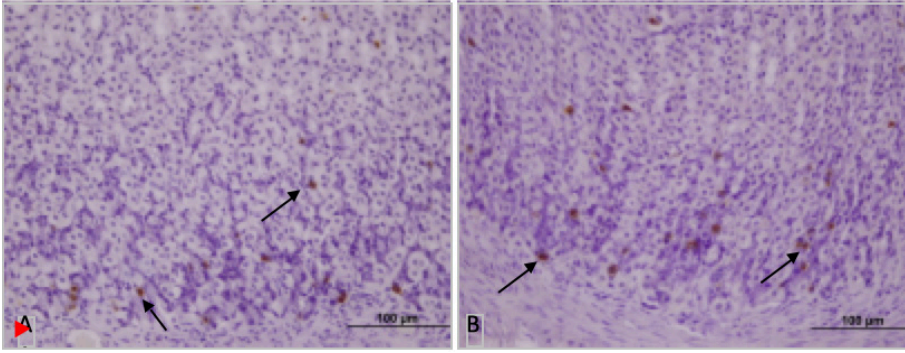
Kontrol grubuna ait mide dokuları incelendiğinde tek katlı prizmatik epitel yapısının korunduğu gözlemlendi. Epitel altında yer alan bağ dokusu (lamina propria), submukoza tabakası ve kas tabakası normal bir görünüme sahipti. Kontrol grubuna ait mide dokularının tamamında anormal bir histolojik değişikliğe rastlanmadı. EG grubuna ait doku kesitleri incelendiğinde ise histolojik olarak tek katlı prizmatik epitel yapısında kısmi dejenerasyon gözlemlendi. Epitele destek olan bağ dokusu, submukoza ve kas tabakasında şiddetli bir dağılıma ya da bozulma gözlemlenmedi (Şekil 1).

İmmunohistokimyasal Bulgular

Mide dokusuna uygulanan immunohistokimya boyaması sonrasında tüm kesitler taranarak ghrelin-pozitif reaksiyon gösteren hücreler sayıldı. Sayım sonucunda kontrol grubuyla kıyaslandığında EG grubunda ghrelin-pozitif hücre sayısında artış olduğu belirlendi (Tablo 1). Bu artış istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. (p<0.05) (Şekil 2).



Şekil 1. H-E boyama. A- Kontrol grubu mide doku kesiti, B- EG grubu mide doku kesiti. Ok, bozulmuş epitelizasyon. Objektif büyüklüğü x20.



Şekil 2.
İmunohistokimya boyama, ghrelin-immunopozitif hücreler. A-Kontrol grubu mide doku kesiti, B- EG grubu mide doku kesiti. Objektif büyüklüğü x40.

TARTIŞMA/SONUÇ

EG'ün yarı-ömrü 3-10 saattir ve alkol dehidrogenaz enzimi tarafından glikolaldehide metabolize olur ve oldukça hızlı bir şekilde mideden emilir. İçerdiği glikolaldehid, glikolat gibi metabolitler ile oksijen radikallerinin üretimine neden olur ve hücrede hasara yol açmaktadır (6). Hücre hasarı oluşumuna neden olması ile çeşitli sistem, organ ve dokuları da etkilemektedir. EG'un insanda akut böbrek rahatsızlıklarına neden olmasının yanı sıra düzenli bir şekilde alımı doğrultusunda deney hayvanları üzerinde böbrek taşı oluşturmak amacıyla kullanıldığı da bildirilmektedir (14, 15). Karaciğerde yağ infiltrasyonu, fokal hemoraji ve parankimal nekroza neden olduğu (16), spermatozoid dejenerasyonu, nekrozu ve testiküler testesteron seviyesinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (17). EG alımı sonrası endoskopi yapıldığında mide de tahriş edici etkisi olduğu, bulantı, kusma, karın ağrısı ve krampa neden olduğu, ayrıca bağırsak mukozasında kalsiyum oksalat birikintileri gözlenmiştir (6). Çalışmamızda EG verilen gruba ait mide doku kesitlerinde kontrol grubuna kıyasla farklılık tespit edildi. Mide mukozasını oluşturan tek katlı prizmatik epitel de kısmi dejenerasyon gözlenirken, bağ dokusu ve kas dokusunda anormal bir dağılım gözlenmedi. Mide gastrointestinal sistemin işleyişinin düzenlenmesinde, içerdiği bezlerin özelliği ve salgıladıkları maddelerle homeostazinin kontrolüne katkı sağlamak ve bu nedenle stratejik konumda bulunmaktadır. Ghrelin başlıca mide bezlerinden salgılanan peptid bir hormon olarak tanımlanmış, büyüme hormonu ile olan ilişkisiyle odak noktası haline gelmiştir. Sıçan ghrelin mRNA'sı northern blot analizi ve immunohistokimyasal

analizler ile mide fundus mukozası oksintik bezleri içerisinde eksprese olduğu gösterilmiştir (7, 8). Sıçan oksintik mukozası endokrin hücrelerden zengindir. Bunlar arasında histaminden zengin endokrin hücreler (%65-70), A-benzeri hücreler (%20-25) ve D hücrelerini (%10) (somatostatin hücreleri) içermektedir. Ghrelin içeren mide hücrelerinin pankreastatin içerebildiği fakat histamin ve somatostatin üreten enzimlerden yoksun olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle ghrelin A-benzeri hücrelerde meydana gelmektedir (18). Ayrıca, ghrelin-immunopozitif hücreler ince ve kalın bağırsakta bulunmakta, merkezi sinir sisteminde de düşük miktarda eksprese edilmektedir (8). Ghrelin peptidi ihtiva eden hücreler mide oksintik bez lümeni ile ilişkili değildir. Bu da hücreden ghrelin salınımının gastrointestinal kanal sistemi içine değil, gastrik damarlara olduğunu göstermektedir (19). Ghrelin GH salınımının artmasında, metabolizma ve enerji dengesinin korunmasında, açlığı ve yiyecek alımını artırarak kısa vadeli enerji homeostazisinin düzenlenmesinde rol oynar (20). Organizmadaki temel ghrelin kaynağı midedir ve ghrelinin %65-90 kısmını sentezler (18, 21). Ghrelin hem de homeostazi üzerindeki etkileri göz önünde bulundurulursa mideden salgısının artması ya da azalması organizmanın işleyişinin düzenlenmesinde etkili olabileceği sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Bir çalışmamızda bir, iki ve üç aylık diyabet oluşturarak mide ghrelin-immunopozitif hücre sayısını araştırdık. Bir aylık diyabet grubunda ghrelin-immunopozitif hücre sayısında kontrole kıyasla azalma gözlenirken, iki ve üç aylık diyabet gruplarında mide ghrelin-immunopozitif hücre sayısında artış olduğunu gözlemledik (9). Çalışmalarda deneysel diyabet

modeli yetersiz insülin salınımı, kilo kaybı ve ghrelin-immunopozitif hücre sayısı ile ilişkilendirilmiştir. Bir aylık diyabet oluşturulan sıçanların midesinde ghrelin-immunopozitif hücre sayısında azalma olmasına rağmen mide tarafından kana verilen ghrelin seviyesinde artış olduğu gözlenmiştir (22). *Helicobacter pylori* enfeksiyonlu obez hastaların mide ghrelin-immunopozitif hücre sayısında artış olduğu, bu artışın da obez erkeklerle kıyasla kadınlarda daha fazla olduğu gösterilmiştir (23). Hipoksiye maruz bırakılan sıçanların mide dokusuna ait ghrelin mRNA ve ghrelin protein seviyesinde de artış olduğu bildirilmektedir (24). Dolayısıyla mideyi doğrudan ya da dolaylı bir şekilde etkileyen hastalık modellerinin deneysel oluşturulması sonucu mide ghrelin hücre sayısında ve ghrelin ekspresyon yoğunluğunda değişiklikler olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmada da EG zehirlenmesine bağlı mide ghrelin-immunopozitif hücrelerdeki değişim incelendi. Deneysel olarak içme sularına %1 oranda karıştırılmasıyla oluşturulan EG grubuna ait mide dokusunda kontrol grubuna kıyasla ghrelin-immunopozitif hücre sayısında artış olduğu gözlemlendi. Bu artışın EG alımına bağlı oluşan toksisiteden kaynaklandığı düşünülmektedir. EG'ün kasıtlı ya da yanlışlıkla ağız yolu ile alınması sonrasında nörolojik değişiklikler başta olmak üzere bulantı ve kusmanın gerçekleşmesi fizyolojinin bozulmaya başladığının habercisidir. Büyüme hormonunun düzenlenmesi kompleks bir nöroendokrin sistem kontrolü altında olduğu bilinmektedir (25). Bu nedenle ghrelinin büyüme hormonu ile ilişkisi ve koruyucu etkisi de göz önünde bulundurulduğunda, EG alımına bağlı bozulmaya başlayan sistemler fizyolojisinin düzenlenmesine katkı sağlamak amacıyla ghrelin-immunopozitif hücre sayısında artış olabileceği sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır. Çalışmada kullanılan dokular TÜBİTAK tarafından destekli projeden (proje kodu 217S931) elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Vale JA, Bluett NH, Widdop B. Ethylene glycol poisoning. Postgraduate medical journal. 1976;52(611):598-602.
2. Tuero G, Gonzalez J, Sahuquillo L, Freixa A, Gomila I, Elorza MA,

et al. Value of glycolic acid analysis in ethylene glycol poisoning: A clinical case report and systematic review of the literature. Forensic science international. 2018;290:e9-e14.

3. Aşirdizer M, Gürpınar T, Yavuz Ms. Toksikolojik, klinik ve adli tıp yönleriyle etilen glikol zehirlenmesi. Türkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine and Forensic Sciences. 2010;7(2):79-90.
4. Van hee P, Neels H, De Doncker M, Maudens KE, Lambert W, Patteet L. Ethylene glycol poisoning: quintessential clinical toxicology; analytical conundrum. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2013;415:107-8.
5. Demirel İ, Levent A, Atalan G, Urfalioğlu A, Toprak GÇ. Antifriz İçen Bir Hastada Etilenglikol Zehirlenmesi: Olgu Sunumu. Fırat Tıp Dergisi. 2012;17(3):182-4.
6. Davis DP, Bramwell KJ, Hamilton RS, Williams SR. Ethylene glycol poisoning: case report of a record-high level and a review. The Journal of emergency medicine. 1997;15(5):653-67.
7. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature. 1999;402(6762):656-60.
8. Kojima M, Hosoda H, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. Trends in endocrinology and metabolism: TEM. 2001;12(3):118-22.
9. Sonmez MF, Karabulut D, Gunduz Y, Dundar M. The Effects of Long-Term Diabetes on Ghrelin Expression in Rat Stomachs. Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University. 2015;24(3):401-7.
10. Yakan B, Arzu Y, Rihtim T, Doğanıyğit Z. Dişi Sıçan Midesinde Ghrelin Ekspresyonu Üzerine Ovariektominin Etkilerinin Analizi. Bozok Tıp Dergisi.7(1):22-31.
11. Sibilia V, Rindi G, Pagani F, Rapetti D, Locatelli V, Torsello A, et al. Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: studies on the mechanisms of action. Endocrinology. 2003;144(1):353-9.
12. Porter WH. Ethylene glycol poisoning: quintessential clinical toxicology; analytical conundrum. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2012;413(3-4):365-77.
13. Alagöz H, Demir İ. Etilenglikol (Antifriz) entoksikasyonuna bağlı metabolik ensefalopati: Bir olgu sunumu. Çağdaş Tıp Dergisi. 2013;3(1):49-51.
14. Bawari S, Sah AN, Tewari D. Anticalcifying effect of *Daucus carota* in experimental urolithiasis in Wistar rats. Journal of Ayurveda and integrative medicine. 2019.
15. Bokor J, Danics K, Keller E, Szollosi Z. Time-dependent changes in kidney histopathology in ethylene glycol poisoning. Medicine, science, and the law. 2018;58(4):257-60.
16. Kawamoto T, Matsuno K, Kayama F, Arashidani K, Yoshikawa M, Kodama Y. The effect of ethylene glycol monomethyl ether and diethylene glycol monomethyl ether on hepatic gamma-glutamyl transpeptidase. Toxicology. 1992;76(1):49-57.
17. Matsuyama T, Yabe K, Kuwata C, Ito K, Ando Y, Iida H, et al. Transcriptional profile of ethylene glycol monomethyl ether-induced testicular toxicity in rats. Drug and chemical toxicology. 2018;41(1):105-12.
18. Dornonville de la Cour C, Bjorkqvist M, Sandvik AK, Bakke I,

Zhao CM, Chen D, et al. A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regulatory peptides*. 2001;99(2-3):141-50.

19. Bilgin HM. Ghrelin; gündemdeki hormon. *Dicle Tıp Dergisi*. 2006;33(4):268-72.

20. Al Massadi O, Tschop MH, Tong J. Ghrelin acylation and metabolic control. *Peptides*. 2011;32(11):2301-8.

21. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(10):4753-8.

22. Masaoka T, Suzuki H, Hosoda H, Ota T, Minegishi Y, Nagata H, et al. Enhanced plasma ghrelin levels in rats with streptozotocin-induced diabetes. *FEBS letters*. 2003;541(1-3):64-8.

23. Mihalache L, Arhire LI, Giusca SE, Gherasim A, Nita O, Constantinescu D, et al. Ghrelin-producing cells distribution in the stomach and the relation with *Helicobacter pylori* in obese patients. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2019;60(1):219-25.

24. Duraisamy AJ, Bayen S, Saini S, Sharma AK, Vats P, Singh SB. Changes in ghrelin, CCK, GLP-1, and peroxisome proliferator-activated receptors in a hypoxia-induced anorexia rat model. *Endokrynologia Polska*. 2015;66(4):334-41.

25. Muller EE, Locatelli V, Cocchi D. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiological reviews*. 1999;79(2):511-607.