



**SIÇANLARA METEORİN-LİKE PROTEİN
UYGULAMASININ HİPOTALAMUS-HİPOFİZ-
TİROİD AKSI VE PERİFERAL UNCOUPLİNG
PROTEİNLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

Güldeniz ŞEKERCİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Suat TEKİN**

Yüksek Lisans Tezi-2021

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARA METEORİN-LİKE PROTEİN UYGULAMASININ
HİPOTALAMUS-HİPOFİZ-TİROİD AKSI VE PERİFERAL UNCOUPLİNG
PROTEİNLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Güldeniz ŞEKERCİ

Fizyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Suat TEKİN

İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje no: TYL-2020-2219)
tarafından desteklenmiştir.

MALATYA

2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Metnrl.....	3
2.1.1. Keşfi ve Adlandırılması	3
2.1.2. Lokalizasyonu ve Biyokimyasal Yapısı	3
2.1.3. Etki Mekanizması	4
2.1.4. Fizyolojik Rollerini.....	7
2.2. Hipotalamus	12
2.3. Hipofiz	16
2.3.1. Ön Hipofiz (Adenohipofiz).....	17
2.3.2. Arka Hipofiz (Nörohipofiz).....	19
2.4. Tiroid Uyarıcı Hormon	19
2.5. Tiroid Bezi	19
2.5.1. Tiroid Hormonları.....	21
2.5.2. İyodür İyonlarının Tutulması ve Konsantre Edilmesi	21
2.5.3. İyodürün İyoda Dönüşmesi ve Organifikasyon	22
2.5.4. Eşleşme Reaksiyonu ve Tiroglobulinin Depolanması	23
2.6. Tiroid Hormonlarının Serbestlenmesi ve Kanda Taşınması.....	24
2.7. Hipotalamus-Hipofiz-Tiroid Aksı ve Düzenlenmesi	24
2.8. Tiroid Hormonlarının Enerji Metabolizmasındaki Etkileri	26
2.9. Eşleşme Bozucu Proteinler (UCP'ler)	26
2.9.1. UCP'lerin Enerji Metabolizması Üzerindeki Etkisi	27
2.9.2. UCP'lerin Tiroid Hormonları ile İlişkisi	28
3. MATERYAL VE METOD.....	30
3.1. Araştırmanın Yapıldığı Merkez	30
3.2. Deney Hayvanlarının Temini.....	30

3.3. Hayvanların Gruplara Ataması	30
3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	31
3.5. Deney Hazırlıkları.....	33
3.5.1. Yapay Beyin Omurilik Sıvısının Hazırlanması	33
3.5.2. Metrnl Konsantrasyonlarının Hazırlanması	33
3.5.3. Beyin İnfüzyon Kitinin Hazırlanması.....	33
3.5.4. Ozmotik Mini Pompaların Hazırlanması	34
3.5.5. Sıçanların Operasyona Hazırlanması.....	35
3.6. Hayvanların Stereotaksik Cihaza Yerleştirilmesi ve BİK İmplantasyonu.....	35
3.7. Ozmotik Mini Pompaların Yerleştirilmesi	40
3.8. Deneyin Sonlandırılması ve Dokuların Toplanması.....	41
3.9. Analizlerin Yapılması	41
3.9.1. Serum TSH Düzeyinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi	41
3.9.2. Serum T3 ve T4 Seviyelerinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi	43
3.9.3. Western Blot Analizi	44
3.10. Verilerin İstatistiksel Analizi	46
4. BULGULAR.....	47
4.1. Metrnl'nin TRH Protein İfade Düzeyi Üzerine Etkisi.....	47
4.2. Metrnl'nin Serum TSH İfade Düzeyi Üzerine Etkisi	48
4.3. Metrnl'nin Serum T3 ve T4 İfade Düzeyleri Üzerine Etkisi.....	48
4.4. Metrnl'nin Periferel UCP'lerin Protein İfade Düzeyi Üzerine Etkileri.....	51
4.4.1. Metrnl'nin Beyaz Yağ UCP1 Protein İfade Düzeyi Üzerine Etkisi	51
4.4.2. Metrnl'nin Kahverengi Yağ UCP1 Protein İfade Düzeyi Üzerine Etkisi.....	52
4.4.3. Metrnl'nin Kas UCP3 Protein İfade Düzeyi Üzerine Etkisi.....	53
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
KAYNAKLAR	60
EKLER.....	73
EK.1. ETİK KURUL KARARI.....	73
EK.2. ÖZGEÇMİŞ.....	74

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmama maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje no: TYL-2020-2219),

Tezimin tüm aşamalarında katkı ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Suat Tekin'e, Fizyolojinin temel ilkelerini öğrendiğim İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalındaki tüm öğretim üyesi hocalarıma, Western Blot analizlerinin yapılmasında katkı ve yardımlarını esirgemeyen Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Erden'e, tez çalışmamın deney ve yazım aşamalarındaki katkılarından dolayı asistan arkadaşlarım Mehmet Refik BAHAR, Dilara ALTAY ÖZTÜRK, Tuba KESKİN, Furkan YÜKSEL ve Engin KORKMAZ'a,

Hayatım boyunca sevgisini ve desteğini benden esirgemeyen aileme, eğitim hayatım boyunca yol göstericim olan sevgili ablam Doç. Dr. Yadigar ŞEKERCİ FIRAT'a,

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Güldeniz ŞEKERCİ

ÖZET

Sıçanlara Meteorin-Like Protein Uygulamasının Hipotalamus-Hipofiz-Tiroid Aksı ve Periferel Uncoupling Proteinler Üzerindeki Etkileri

Amaç: Yağ dokudan salgılanan Metnrl yakın zamanda keşfedilmiş peptid yapılı bir hormon olarak tanımlanmaktadır. Metnrl'nin beyin dokusunda varlığı belirlenmiş olup, soğuğa maruziyette ve obezitede serumdaki seviyesi artarak, beyaz yağ dokudaki UCP1 aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu çalışma icv Metnrl uygulamasının HHT aksı ve periferel UCP'ler üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla yapıldı.

Materyal ve Metot: Çalışmada erkek *Sprague Dawley* cinsi 40 adet sıçan kullanıldı. Sıçanlar; kontrol, sham 10 ve 100 nM Metnrl uygulanan grup olmak üzere 4'e ayrıldı (n=10). Kontrol grubu dışındaki sıçanlara ozmotik mini pompalar yardımıyla icv olarak 5µl/saat/14 gün (sham grubuna yBOS, uygulama gruplarına 10 ve 100 nM Metnrl) infüzyon gerçekleştirildi. Deney sonunda sıçanlar dekapite edilerek kan, hipotalamus, kas ile beyaz ve kahverengi yağ doku örnekleri toplandı. Alınan kan dokusundan ELISA yöntemi kullanılarak serum TSH, T3 ve T4 seviyeleri belirlendi. Ayrıca Western Blot yöntemi kullanılarak sıçanların hipotalamus dokusundan TRH, beyaz ve kahverengi yağ dokusundan UCP1, kas dokusundan UCP3 protein düzeyleri belirlendi.

Bulgular: Icv olarak infüze edilen Metnrl'nin serum TSH, T3 ve T4 hormon seviyesini kontrol ve sham grubuna kıyasla artırdığı görüldü ($p<0.05$). Öte yandan Metnrl uygulamasının hipotalamusta TRH, beyaz ve kahverengi yağ dokuda UCP1, kas dokuda UCP3 protein seviyesini arttırdığı görüldü ($p<0.05$).

Sonuç: Bu çalışmanın sonuçları Metnrl'nin HHT aksında rol alan hormonlar ile periferel UCP'leri aktive ettiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Metnrl, TSH, T3, T4, TRH, UCP1,UCP3

ABSTRACT

Effects of Meteorin-Like Protein to Rats on Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis and Peripheral Uncoupling Proteins

Aim: Metrnl secreted from adipose tissue is defined recently discovered peptide hormone. Metrnl in the brain tissue has been determined, its level in serum increases in cold exposure and obesity, causing UCP1 activation in white adipose tissue. This study was conducted to investigate the effects of icv Metrnl application on HHT axis and peripheral UCPs.

Material and Method: Forty male *Sprague Dawley* rats were used in the study. Rats; control was divided sham 10 and 100 nM Metrnl applied group (n = 10). 5µl / hour / 14 days (yBOS in sham group, 10 and 100 nM Metrnl in treatment groups) infusion was performed to the rats except the control group with the osmotic mini pumps. At the end of the experiment, rats were decapitated and blood, hypothalamus, muscle, and white and brown adipose tissue samples were collected. Serum TSH, T3 and T4 levels were determined from the taken blood tissue using ELISA method. The protein levels of TRH from hypothalamus tissue, UCP1 from white and brown adipose tissue; UCP3 from muscle tissue were determined using Western Blot method.

Results: It was observed Metrnl infused intravenously increased serum TSH, T3 and T4 hormone levels compared to the control and sham groups (p <0.05). In addition to, it was found that Metrnl , increased TRH in the hypothalamus, UCP1 in white and brown adipose tissue, UCP3 in muscle tissue (p <0.05).

Conclusion: The results of this study show that Metrnl activates peripheral UCPs with hormones plays role in the HHT axis.

Key Words: Metrnl, TSH, T3, T4, TRH, UCP1,UCP3

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMPK	: Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz
ATP	: Adenozin trifosfat
BİK	: Beyin infüzyon kiti
BYD	: Beyaz yağ doku
DIT	: Diiodotirozin
DRG	: Dorsal kök ganglion
HDAC5	: Histon deasetilasyon 5
HHT	: Hipotalamus-hipofiz-tiroid
IgG	: İmmüoglobulin G
İcv	: İntaserebroventriküler
ip	: İntaperitoneal
KYD	: Kahverengi yağ doku
LP	: Gizli aşama
MIT	: Monoiyodotirozin
Metrn	: Meteorin
Metrnl	: Meteorin benzeri peptid
OMP	: Ozmotik mini pompa
PGC-1α	: Peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gama ortak aktifleştirici 1-alfa
PGC-1α1	: Peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gama ortak aktifleştirici 1-alfa-1
PGC-1α4	: Peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gama ortak aktifleştirici 1-alfa-4
PPAR-γ	: Peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gamma
PVN	: Paraventriküler çekirdek
RT-PZR	: Reel time polimeraz zincir reaksiyonu
SF	: Serum fizyolojik
T2DM	: Tip 2 diyabet
T3	: Triiodotironin
T4	: Tiroksin
TNFα	: Tümör nekroz faktör α

TR	: Tiroid hormonu reseptörü
TSH	: Tirotropin düzenleyici hormon
UCP'ler	: Eşleşme bozucu proteinler
UCP1	: Eşleşme bozucu protein 1
UCP2	: Eşleşme bozucu protein 2
UCP3	: Eşleşme bozucu protein 3
UCP4	: Eşleşme bozucu protein 4
UCP5	: Eşleşme bozucu protein 5
yBOS	: Yapay beyin omurilik sıvısı
YYD	: Yüksek yağlı diyet



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Metrn1'nin insan kromozomundaki gen lokasyonu.....	4
Şekil 2.2. İnsan, fare ve sıçan Metrn1 gen dizilimi benzerliği	4
Şekil 2.3. Metrn1'nin etki mekanizması.....	6
Şekil 2.4. Metrn1'nin GLUT4 transkripsiyon mekanizmasındaki rolü	8
Şekil 2.5. Egzersiz sonrası kas dokuda Metrn1 aktivasyonu.....	11
Şekil 2.6. Hipotalamusun anatomik yapısı	12
Şekil 2.7. Hipotalamik nükleusların yerleşimi	14
Şekil 2.8. Hipotalamus-hipofiz-tiroid eksenine.....	16
Şekil 2.9. Hipotalamus-hipofiz arasındaki anatomik ve fonksiyonel ilişki.....	17
Şekil 2.10. Ön hipofizde yer alan hücre gruplarının dağılımı	18
Şekil 2.11. Tiroid bezinin konumu.	20
Şekil 2.12. Tiroid bezinin fonksiyonel birimleri	20
Şekil 2.13. Tiroid bezi tarafından iyodür konsantrasyonunun mekanizması	22
Şekil 2.14. Tiroid hormon sentezinin biyokimyası.....	23
Şekil 2.15. Hipotalamus-hipofiz-tiroid aksının geribildirim düzenlenmesi	25
Şekil 2.16. Mitokondriyal enerji düzenlenmesi ve UCP'lerin rolü	27
Şekil 2.17. Tiroid hormonlarının kahverengi yağ doku oluşumundaki rolü.....	29
Şekil 3.1. Beyin infüzyon kiti ve kanül özellikleri.....	34
Şekil 3.2. Ozmotik mini pompa.....	34
Şekil 3.3. Sıçanların stereotaksik cihaza sabitlenmesi (A), sıçanların stereotaksik cihaza sabitlenmesinin ardından kesi bölgesine povidon iyodür sürülmesi (B), kafa derisinin kesilip (C), kemik dokunun görünür hale getirilmesi (D) ve bregma noktasının belirlenmesi (E).....	36
Şekil 3.4. Sıçan beyin atlasına göre lateral ventrikül koordinatları.....	37
Şekil 3.5. Kanülün alzet tutucuya takılması (A), lateral ventrikül için delinecek bölgenin iğnenin ucuyla tespit edilmesi (B), lateral ventrikülün bregmaya göre konumunun belirlenmesi (C) ve matkapla delinmesi (D).....	38
Şekil 3.6. Beyin infüzyon kitinin delinen kısımdan lateral ventriküle indirilmesi (A), kanül etrafının dış yapıştırıcısıyla yapıştırılması (B), kanül başının kesilmesi (C) ve kanülün üstünün dış yapıştırıcısıyla kapatılarak kafatasına sabitlenmesi (D).	39

Şekil 3.7. Sıçanların ense derisinde bulunan kanülün tespit edilmesi (A) ve ense derisine kesi açılması (B) kanül ucunun çıkartılarak kontrol edilmesi (C), kanülün fazla kısmının kesilmesi (D) ve ozmotik mini pompanın takılarak infüzyonun başlatılması (E).	40
Şekil 3.8. Serum TSH ELISA standart solüsyonunun dilüe edilmesi.	42
Şekil 3.9. Serum T3 ve T4 ELISA kit standardının dilüe edilmesi.	43
Şekil 3.10. Genel ELISA protokolü.....	44
Şekil 3.11. Western Blot analizine genel bakış.	45
Şekil 3.12. Western Blot için hazırlanan sandviçin yapısı.	46
Şekil 4.1. Metrnl'nin hipotalamus TRH protein düzeyi üzerine etkisi.....	47
Şekil 4.2. Metrnl'nin serum TSH ifade düzeyi üzerine etkisi	48
Şekil 4.3. Metrnl'nin serum T3 ifade düzeyi üzerine etkisi	49
Şekil 4.4. Metrnl'nin serum T4 ifade düzeyi üzerine etkisi	50
Şekil 4.5. Metrnl'nin beyaz yağ UCP1 protein ifade düzeyi üzerine etkisi	51
Şekil 4.6. Metrnl'nin kahverengi yağ UCP1 protein ifade düzeyi üzerine etkisi.....	52
Şekil 4.7. Metrnl'nin kas UCP3 protein ifade düzeyi üzerine etkisi	53

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Hipotalamusun fonksiyonları.....	13
Tablo 2.2. Ön hipofiz bezinin salgısını düzenleyen hormonlar	14
Tablo 2.3. Ön hipofizde yer alan hücre grupları ve salgıladıkları hormonlar.....	18
Tablo 3.1. Hayvanların bilgisayara dayalı algoritma kullanılarak gruplara ataması.	31
Tablo 3.2. yBOS için kullanılan bileşikler ve miktarları	33



1. GİRİŞ

Meteorin-like protein (Metrl) yağ dokudan sentezlenen Jorgensen ve ark. tarafından 2012 yılında keşfedilen (1) ve 311 aminoasitten oluşan bir proteindir (2). Metrl için; Meteorin benzeri, Cometin ve Subfatin gibi adlandırmaları da literatürde yer almaktadır (2). Yapılan çalışmalarda Metrl'nin insandaki ve faredeki gen diziliminin %77 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (1). Ayrıca insanda ve farede subkutan kahverengi yağ doku (KYD)'de yüksek düzeyde salgılanan Metrl (bu nedenle subfatin denmektedir) aynı zamanda iskelet kası, testis, böbrek, karaciğer, kalp, stromal hücreler, makrofajlar, dalak ve beyin (ön, orta ve arka beyin) de dahil olmak üzere çeşitli dokularda da varlığı tespit edilmiştir (3, 4).

Metrl ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda Metrl'nin enerji metabolizması ve insülin duyarlılığı üzerinde önemli fizyolojik roller üstlenebileceği fikri ileri sürülmüştür (4, 5). Metrl'nin bej yağ termojenezini ve antiinflamatuvar sitokinlerin üretildiği gen ifadesini uyardığı, beyaz yağ dokuda (BYD)'da kahverengileşmeyi sağlayarak yağ fonksiyonunu iyileştirdiği ve obeziteye bağlı insülin direncini azalttığı belirlenmiştir (2). Metrl'nin mitokondriyal biyogenezin asıl düzenleyicisi olan peroksizom proliferatör-aktive edici reseptör gama koaktivatörü-1 α (PGC-1 α) aracılığıyla gerçekleşen fizyolojik süreçlere dahil olduğu düşünülmektedir. Egzersiz sonrasında Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz (AMPK) aracılığıyla PGC-1 α 'nın BYD seviyesini artırdığı ve bu artışla birlikte tüm vücut enerji harcanmasının arttığı rapor edilmiştir (6, 7).

Hipotalamus enerji dengesini sağlama olayını büyük ölçekte hipotalamus-hipofiz-tiroid (HHT) aksında yer alan hormonlar üzerinden ortaya koymaktadır (8). Bu aksdaki endokrin fonksiyonlar tirotropin serbestleştirici hormon (TRH), Tirotropin düzenleyici hormon (TSH), Triiyodotironin (T3) ve Tiroksin (T4) hormonları tarafından yerine getirilmektedir. Hipotalamustan TRH biyosentezi gerçekleştikten sonra, sentezlenen peptid hipofizden TSH sentezini ve salınımını uyarmak üzere akson terminalleri boyunca medyan eminense taşınır ve buradan da hipofizyal portal sistem kapilleri içerisine serbestlenir (9, 10). Ön hipofize ulaşan TRH, hipofiz tirotrop hücre zarındaki reseptörlerine bağlanarak fosfolipaz ikinci haberci sistemini aktive eder ve bu aktivasyonla tirotrop hücrelerde sentezlenen TSH dolaşıma katılır (11). HHT aksının fonksiyonel faktörleri olan T3 ve T4 vücudun enerji tüketimini, ısı üretimini, vücut ağırlığını ve lipid metabolizmasını düzenlediği bilinmektedir (12-15). T3 ve T4

hormonları hemen hemen tüm hücrelerdeki kimyasal reaksiyonları hızlandırarak enerji harcanmasını arttırmakta ve aynı zamanda ısı oluşumuna neden olmaktadır. Artmış kimyasal reaksiyonlar alınan enerjinin daha fazla kullanılmasına, yağ olarak depo edilmesinin engellenmesine eşlik etmekle birlikte obezite gelişimini de sınırlandırmaktadır (16).

Eşleşme bozucu protein 1 (UCP1) KYD'ye özgü bir protein olup, kastaki homoloğu ise eşleşme bozucu protein 3 (UCP3)'tür. Öte yandan BYD'de bulunan UCP1 kahverengileşmenin (beyaz yağ dokunun yanması, kahverengi/bej yağ dokuya dönüşmesi) bir ölçüsü olarak kabul edilmektedir (17). Bu proteinler elektron taşıma zinciri boyunca mitokondrinin zarlar arası alanında meydana gelen proton gradyanını, protonları kendi üzerlerinden matrikse taşıyarak azaltır. Böylece Adenozin Trifosfat sentaz (ATP sentaz) tarafından kullanılacak olan proton miktarı azalır ve ATP sentezi kısmen engellenmiş olur. Proton gradyanı içerisinde depolanmış enerji ise eşleşme bozucu proteinler (UCP'ler) tarafından matrikse taşındığı sırada ısıya dönüşür titreşimsiz termojenez gerçekleşir (18, 19).

Bu bulgular Metrn'l'nin obezite ve enerji harcanmasıyla olan ilişkisinin HHT aksı ve periferik UCP'ler tarafından kontrol edilebileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışma Metrn'l'nin HHT aksında görev alan hormonlar ve periferik UCP'ler üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla yapıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Metrnl

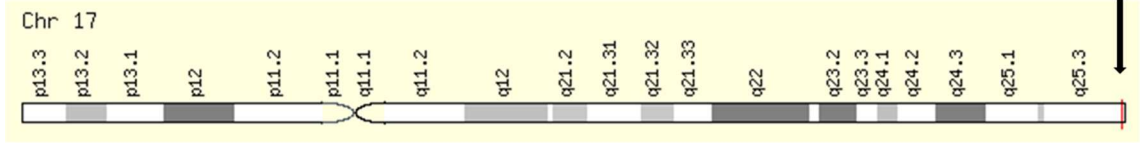
2.1.1. Keşfi ve Adlandırılması

İnsan genomu, protein kodlaması yapan yaklaşık 20687 gen içermektedir (3), fakat bunların ifade kalıplarının ve işlevlerinin çoğu bilinmemektedir (2). Yeni işlevsel proteinleri keşfetmek üzere ileri düzey biyoinformatik yöntemler kullanılarak (3, 20-22), Metrnl geni bulunmuştur. Metrnl, ilk olarak 2004 yılında Nishino ve ark. tarafından Meteorin'e (metrn) homolog bir protein olarak rapor edilmiş (23), 2012 yılında ise Jorgensen ve ark. tarafından Metrnl'e nöronal gelişimi desteklemesi yönünden benzediği ortaya konmuştur (1). Böylece Metrnl'nin merkezi sistemdeki nörotrofik işlevi sebebiyle metrne benzetilmiştir (1).

Metrnl, metrn'e yaklaşık %40 aminoasit özdeşliği göstermektedir (24). Bu protein Metrnl'e homolog bir protein olarak tanımlandığından metrn benzeri gibi değerlendirilip Metrnl ismi kullanımı uygun görülmüştür (3). Metrnl için önerilen farklı isimler ise Subfatin, IL-41, Cometin, Metrnlβ'dır (1, 3, 25, 26). Metrnl başlangıçta IL-39 olarak da isimlendirilmiş (27) fakat yapılan çalışmalar sonrasında IL-39, IL-12 ailesine dahil edilmiştir (28).

2.1.2. Lokalizasyonu ve Biyokimyasal Yapısı

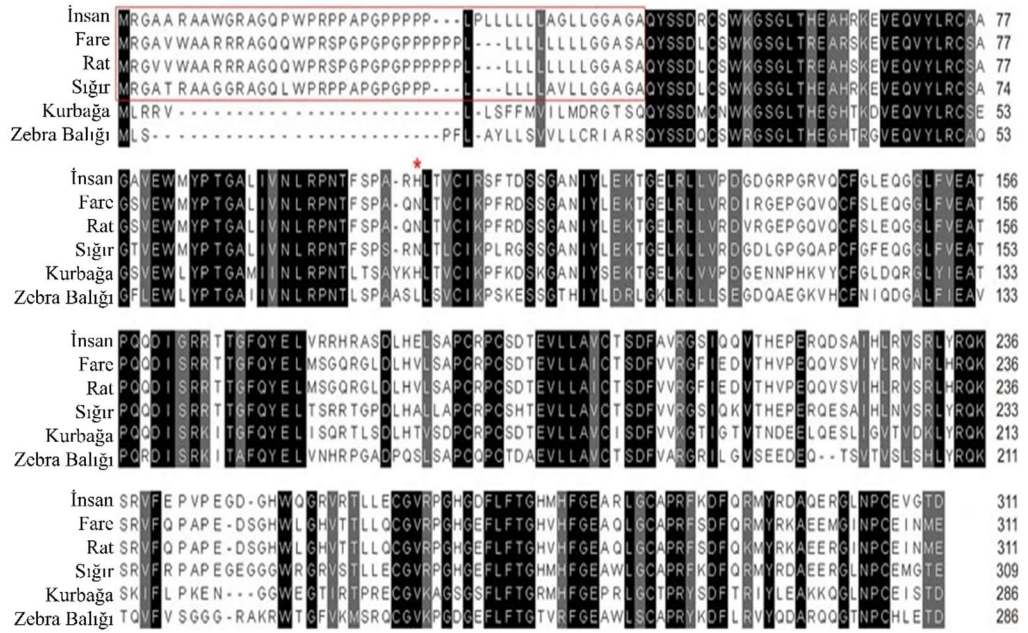
Metrnl geni fare kromozomu 11qE2 ve insan kromozomu 17q25.3 bölgesinde bulunur (Şekil 2.1) (1). İlk olarak Metrnl'e benzer bir protein olarak rapor edilmiş sonrasında adipoz doku ile ilgili bir gen olduğu Li ve ark. tarafından ortaya konmuştur (3). Ayrıca insanda ve farede subkutan kahverengi yağ yoku (KYD)'da yüksek düzeyde salgılanan Metrnl aynı zamanda iskelet kası, testis, böbrek, karaciğer, kalp, stromal hücreler, makrofajlar, dalak ve beyin (ön, orta ve arka beyin) de dahil olmak üzere çeşitli dokularda da varlığı tespit edilmiştir (3, 4). Yeni genler keşfetmek üzere yapılan bir çalışmada deri üzerinde de Metrnl'nin geninin varlığı da tespit edilmiştir (27).



Şekil 2.1. Metrnl'nin insan kromozomundaki gen lokasyonu (1, 29).

Serum Metrnl seviyesini tespit etmek için yapılan çalışmalar sonucunda insan serum Metrnl seviyesinin yaklaşık 300 pg/ml olduğu farelerde ise 2500 pg/ml olduğu belirlenmiştir (30, 31).

Metrnl proteini insan, fare ve sıçanda 45 NH₂-terminal sinyal peptidine sahip ve 266 ön dizisi olmayan toplamda 311 aminoasitten (~30 kDa) oluşur. İnsan ve fare genleri karşılaştırıldığında 239 aminoasit özdeşliğiyle yaklaşık %77 benzerlik ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.2) (1).



Şekil 2.2. İnsan, fare ve sıçan Metrnl gen dizilimi benzerliği.

2.1.3. Etki Mekanizması

Metrnl'nin JAK-STAT3 ve MEK-ERK kinaslar yoluyla nörit büyümesini teşvik eden ve nöroblast göçünü destekleyen bir nörotrofik faktör olduğu dorsal kök ganglionu (DRG) üzerinde yapılan bir çalışmayla ortaya çıkarılmıştır (1). DRG'nin 0, 1, 3, 10, 100

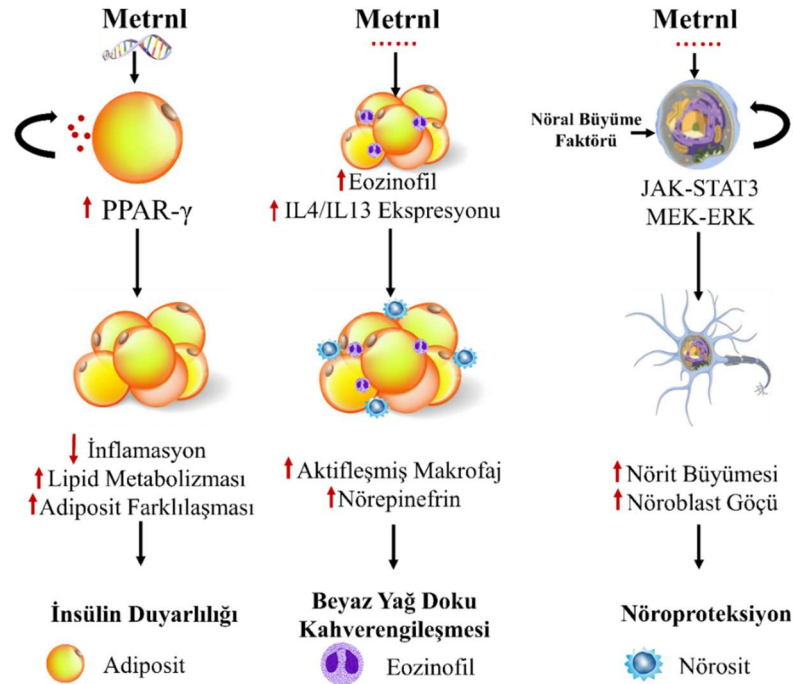
ve 300 ng/ml konsantrasyonlarında 24 saat Metrn1 ve Metrn'e maruz bırakılması sonrasında bir görselleştirme yazılımı kullanılarak her hücrenin nörit uzunluğu hesaplanmış ve uygulama gruplarında nörit uzunluğunun arttığı tespit edilmiştir (1). Aynı çalışmada sağır kobaylara infüzyon pompasıyla 2 gün boyunca infüze edilen ototoksik ilaç olan Neomisin'in zararlı etkilerine karşın Metrn1'nin koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. 12 gün infüzyon pompasıyla Metrn1 uygulanmış ve çalışma sonunda spiral ganglionlar incelendiğinde koruyucu etkisi saptanmıştır (1).

Hücresel fonksiyon için hazırlık süreci olan gizli aşama (LP) genlerini belirlemek üzere yapılan bir *in vitro* çalışmada ise Metrn1'nin bir LP geni olduğu Watanabe ve ark. tarafından saptanmıştır (32). Rat adrenal feokromasitoma hücre hattı olan nörit büyümesinin açıkça görülebildiği PC12 hücrelerinin kullanıldığı çalışmada (22) hemaglutinin etiketli LP genleri transfekte edilmiş. PC12 hücreleri ekzojen nöral büyüme faktörüyle inkübe edilmeden önce ve 12 saat inkübasyon sonrasında LP genlerinin lokalizasyonları analiz edilmiş. İnkübasyon öncesinde hücre gövdesinde dağılım gösteren Metrn1 geni inkübasyon sonrasında nörit terminallerinde saptanmıştır. Bu da Metrn1'nin bir LP geni olduğunu ve JAK-STAT3/MEK-ERK yolakları dışında hücre boyutunda da etkili olduğunu göstermektedir (32).

Adipoz dokuda yüksek düzeyde varlığı tespit edilen Metrn1'nin (3) beyaz yağ dokudaki farklılaşma ve fizyolojik etkilerinin *in vitro* ve *in vivo* incelendiği bir çalışmada 3T3-L1 preadiposit hücre hattı üzerinde Lentivirüs aracılı yüksek doz Metrn1'le 24 saat inkübe edildikten sonra hücre hattı pre-adipositlerinin adipositlere farklılaştığı saptanmıştır (5). Metrn1'nin yüksek doz uygulaması aynı zamanda peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gamma (PPAR- γ) gen ekspresyonunu da artırmıştır (5). Aynı çalışmanın *in vivo* aşamasında C57BL/6J Metrn1'nin adiposite özgü aşırı ekspresyon transgenik farelerinde (Metrn1 Tg) 16 hafta yüksek yağlı diyetle (YYD) ve normal yağlı diyetle (NYD) beslenmiştir. Her gruba 2 farklı PPAR- γ inhibitörü (GW9662 ve BADGE) 8 mg/kg/gün ve 30 mg/kg/gün 3 hafta boyunca intraperitoneal uygulanmıştır. Metrn1 Tg farelerinde YYD ile beslenen grupta her iki PPAR- γ inhibitörü uygulanmasından sonra Metrn1'nin insülin duyarlılaştırıcı etkisinin ortadan kalktığı görülmüştür (5). Bu çalışmada Metrn1'nin PPAR- γ aracılı yolla insülin duyarlılığını sağladığı ve adiposit farklılaşmasını teşvik ettiği ortaya çıkarılmıştır (5). Çalışmada adiposite özgü Metrn1 Tg farelerinde PPAR- γ ifadesini artırarak lipid metabolizmasını düzenlediği ve inflamasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (5).

C57BL/6J fareleri üzerinde yapılan bir çalışmada kontrol grubu olarak Lac Z geni enjekte edilmiş uygulama grubunda ise ektopik adenoviral aracılı Metrn1 enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. 5. günün sonunda Metrn1 enjeksiyonuna bağlı termojenez ve mitokondriyal gen programlarıyla ilgili UCP1, peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gama ortak aktifleştirici 1-alfa-1 (PGC-1 α) gibi belirteçlerin subkutan BYD, epididimal BYD mRNA seviyelerinde artış görülmüştür (4). Metrn1 enjekte edilen farelerin subkutan BYD dokusundaki eozinofil sayısı akış sitometrisi ile ölçülmüş ve yaklaşık 2.7 kat artış olduğu gözlenmiştir. Çalışmada eozinofil artışının bej yağ termojenik genlerinin ekspresyonunu uyararak IL-4/IL-13 sitokinlerinin ifadesini indüklediği belirlenmiştir. Bu çalışmada Metrn1'nin tüm vücut enerji harcanmasını UCP1 ve PGC-1 α mRNA seviyelerini artırarak, eozinofil sayısındaki artışa bağlı sitokin ekspresyonunu uyararak termojenik yolla sağladığı gösterilmiştir (4).

Metrn1 tedavisinin C2C12 fare iskelet kası hücre hattı ve fare soleus iskelet kası üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada hem hücrede hem de kas dokuda AMPK seviyesini ve PPAR- γ ifadesini artırdığı ortaya çıkarılmıştır (33). Farelerin iskelet kasındaki AMPK ve PPAR- γ aracılı yolla PGC-1 α mRNA seviyesini artırıp lipid düzeyindeki artışa bağlı inflamasyon ve insülin direncini azalttığı ifade edilmiştir (33). Metrn1'nin etki mekanizması Şekil 2.3'de şematize edilmiştir (2).



Şekil 2.3. Metrn1'nin etki mekanizması (2).

2.1.4. Fizyolojik Roller

Obezite ve İnsülin Metabolizması Üzerindeki Etkisi

Adiposit Metrnl'nin insülin duyarlılığına etki mekanizmasının araştırıldığı bir çalışmada Metrnl yüksek doz transgenik farelerinde Metrnl'nin PPAR- γ aracılı yolla insülin duyarlılığını sağladığı ve adiposit farklılaşmasını teşvik ettiği ortaya çıkarılmıştır (5).

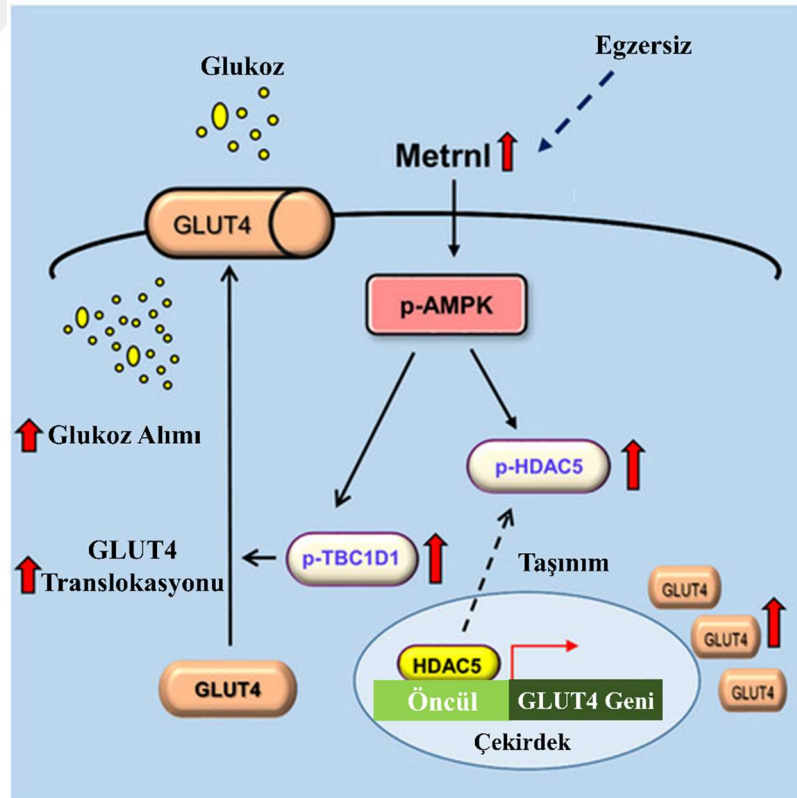
Metrnl'nin obezite başlangıcına etkisinin incelenmesi için 4 haftalık obez olmayan diyabetik dişi farelerde yapılan bir çalışmada kuyruk veninden 2 $\mu\text{g}/\text{fare}/\text{gün}$ Metrnl 24 hafta boyunca intravenöz uygulanmıştır. Kan şekeri seviyesi haftalık olarak ölçülüp pankreasın histolojik incelemesiyle düzenleyici T hücrelerinin arttığı, otoreaktif T hücrelerinin baskılandığı, sitokin salgılanmasının da değiştiği ve bununla birlikte lökositlerin azaldığı gözlenmiştir. Tüm bunlar değerlendirildiğinde intravenöz Metrnl uygulamasının adacık lenfosit infiltrasyonunu iyileştirdiğini ve immün hücre yanıtlarını denetlediği ve obezite oluşumunu geciktirdiği gözlenmiştir (34).

Metrnl'nin tüm dokularda metabolizmayı düzenleyip obeziteyi hafifletebileceği düşünülerek 16 hafta YYD ile beslenen obez farelerde serum, kas ve periferik dokulardaki seviyesini tespit etmek için bir *in vivo* çalışma yapılmıştır. Serum, kas ve adipoz dokuda Metrnl protein seviyeleri incelendiğinde obez farelerde düşük bulunmuştur (35). 6 hafta YYD ile beslenerek obezite modeli oluşturulan bir başka çalışmada ise subkutan adipoz dokuda Metrnl mRNA seviyesi kontrole kıyasla yüksek bulunmuştur (3).

YYD ile indüklenen obezite modelinin oluşturulduğu bir çalışmada 8 haftalık erkek farelere 2 $\mu\text{g}/\text{fare}/\text{gün}$ 8 hafta boyunca intravenöz olarak uygulanmış ve YYD'nin neden olduğu glikoz toleransı ve insülin direncini iyileştirdiği tespit edilmiştir (33).

Metabolik hastalıklar için terapötik bir görevi olabileceği düşünülen bir çalışmada Metrnl'nin Tip 2 diyabet (T2DM)'li ve normal glikoz toleransına sahip bireylerdeki serum seviyeleri ve insülin direncine etkisi incelenmiştir. Çalışmada T2DM'li bireylerde serum Metrnl seviyesi yüksek bulunmuştur ve insülin direnci ile de pozitif bir korelasyon göstermiştir. Hasta gruptaki bireylerin yüksek serum Metrnl seviyesine sahip olması insülin direncine karşı alınmış bir savunma mekanizması olabileceği düşünülmüştür (36).

Metnrl'nin glukoz metabolizmasındaki rolünün araştırıldığı bir çalışmada YYD ile indüklenen obez ve diyabetik fare modelleri kullanılmıştır. Rekombinant Metnrl'nin ip enjeksiyonunun YYD ile indüklenen obez ve T2DM'li farelerde glukoz toleransını iyileştirdiği ve hatta bu etkisini AMPK α 2 aracılı yolla gerçekleştirdiği sonucuna ulaşılmıştır (7). Aynı çalışmada AMPK'nın, Histon deasetilaz 5 (HDAC5)'i fosforile ederek hücre içi glukoz taşıyıcısı olan GLUT4 transkripsiyonunu artırdığından yola çıkarak (37) C2C12 miyoblastlarının Metnrl'e maruziyetiyle HDAC5 fosforilasyonunun artıp artmadığı incelenmiştir. C2C12 hücre hattının 100 ng/ml Metnrl'le inkübasyonu sonunda HDAC5 seviyesinin arttığı rapor edilmiştir. Böylelikle Metnrl'nin AMPK-HDAC5 sinyal yolu aracılığıyla GLUT4 transkripsiyonunu artırdığı düşünülmektedir. Metnrl'nin GLUT4 ekspresyonunu artırarak diyabet tedavisinde kullanılabilecek bir terapötik ajan olduğu öne sürülmektedir (7). Aynı zamanda C2C12 hücrelerine egzersiz taklit eden elektriksel darbe uyarımı uygulanmış ve Metnrl mRNA seviyesinin de arttığı tespit edilmiştir. Egzersizle birlikte mRNA seviyesi artan Metnrl'nin GLUT4 transkripsiyonundaki rolü Şekil 2. 4'de gösterilmiştir (7).



Şekil 2.4. Metnrl'nin GLUT4 transkripsiyon mekanizmasındaki rolü (7).

Kemik Metabolizması Üzerindeki Etkisi

Kemik hücrelerinin öncülü olarak bilinen adiposite ve kasa farklılaşabilen olgunlaşmamış hücreler olan osteoblastlarda tanımlanmamış gen tespiti yapmak üzere bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışmada insan osteosarkom hücre hattı (MG63)'de yapılan gen analizi sonucunda Metrnl'e rastlanmıştır. MG63 hücrelerine transfeksiyon yoluyla Metrnl aşırı eksprese hücreler oluşturulmuştur. Metrnl'nin aşırı ekspresyonu MG63 hücrelerinin mineralize nodül oluşumunu azaltarak farklılaşmasını engellemiştir (38).

Femur başı osteonekrozlu ve kalça osteoartritine sahip hastalarda mikroyarar gen tayini yapılan bir çalışmada her iki hastalıkta ortak görülen 8 genden birinin Metrnl geni olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmadan yola çıkarak farklı 2 hastalığın benzerlik ve farklılıklarının tespitinin yolu açılmıştır (39).

Kardiyovasküler Metabolizma Üzerindeki Etkisi

Koroner arter hastalığına sahip bireylerde serum Metrnl seviyelerini tespit etmek için yapılan bir çalışmada serum Metrnl seviyesi düşük bulunurken IL-6, tümör nekroz faktör α (TNF α) seviyeleri yüksek bulunmuştur. Aynı çalışmada T2DM hastalığına sahip bireylerde de serum Metrnl seviyesinin düşük olduğu tespit edilmiştir (40). Bu da akıllara koroner kalp hastalığı ve T2DM'den kaynaklı oluşabilecek inflamasyonun Metrnl tedavisiyle önlenebileceği düşüncesini getirmiştir (40).

Kardiyovasküler hastalıklar ve T2DM için risk faktörü oluşturan dislipidemi ile Metrnl'nin arasındaki ilişkiyi incelemek için yapılan bir çalışmada 7 hafta boyunca YYD ile beslenen farelerin serum Metrnl seviyesi yüksek bulunmuştur (30). Aynı çalışmada total Metrnl ve karaciğere özgü Metrnl geni nakavtlanan farelere (Metrnl^{-/-}) 16 hafta boyunca YYD uygulanmış ve kan lipid parametreleri incelendiğinde total Metrnl^{-/-} farelerde serum yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ve total kolesterol (TC) seviyelerinin düşük olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte karaciğere özgü Metrnl^{-/-} farelerde de serum düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), HDL ve TC seviyelerinin düşük olduğu ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar Metrnl'nin kan lipidleri üzerinde lokal ve endokrin etkisi olduğunu düşündürmektedir (30).

Boşaltım Metabolizması Üzerindeki Etkisi

Tip-2 diyabeti (T2DM) olan ve olmayan hastalarda Metrn1'nin dolaşımdaki seviyesinin tespiti için yapılan bir klinik çalışmada kronik böbrek hastalığına sahip bireyler de değerlendirilmiştir. Buna göre kronik böbrek hastası olan kişilerde Metrn1'nin dolaşımdaki seviyesinin yüksek olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda Metrn1 seviyesi ile glomerül filtrasyon hızı arasında da negatif bir korelasyon bulunmuştur (41).

T2DM hastaları ve sağlıklı bireylerden oluşan bir grup insan üzerinde yapılan bir başka çalışmada kişiler normoalbuminüri, mikroalbuminüri ve makroalbuminüri olmak üzere 3 gruba ayrılarak serum Metrn1 seviyeleri ölçülmüştür. T2DM hastaların bulunduğu 3 grupta da serum Metrn1 düzeyleri düşük bulunmuştur. Bununla birlikte serum Metrn1 seviyelerinin diyabetik nefropati ve böbrek fonksiyonları ile ters orantılı olduğu; Metrn1'nin ileride T2DM ve diyabetik nefropati için bir teröpatik ajan veya ilaç olarak kullanılabilceği belirtilmiştir (42).

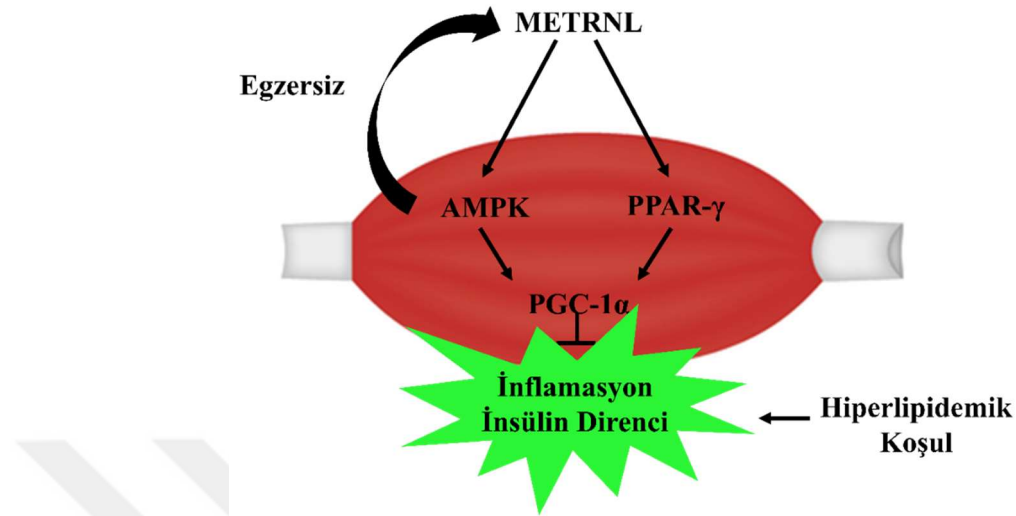
İmmün Sistem Metabolizması Üzerindeki Etkisi

Metrn1'nin immün sisteme etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 8 haftalık knock-out Metrn1^{-/-} dişi farelerin enflamatuvar yanıtları takip edilmiş. Fareler 4-8 aylık vücut ağırlığı ve enflamatuvar yanıtın izlemi sonrasında dekapite edilmiş ve serum total immünoglobulin G (IgG) seviyeleri ölçülmüştür. Vücut ağırlığında önemli bir değişim görülmezken IgG seviyesinin düşük olduğu rapor edilmiştir. IgG seviyesindeki düşüğe Metrn1^{-/-} farelerinde eksik sitokin üretiminin neden olabileceği düşünülmüştür (26). Aynı çalışmada Metrn1^{-/-} farelerinin uterusunda histolojik incelemeler sonrasında lezyonlar görülmüş ve TNF α seviyesinde de önemli düzeyde artış görülmüştür (26). Metrn1'nin immün sistemde düzenleyici etkisi olduğu düşünülerek Metrn1 α /Metrn1 β şeklinde yeniden adlandırılması gerektiğinin üzerinde durulmuştur (26).

Kas ve Adipoz Doku Metabolizması Üzerindeki Etkisi

Egzersiz ve soğuga maruziyet sonucunda serum Metrn1 seviyelerinin incelendiği bir çalışmada, dolaşımdaki Metrn1 seviyesinin artmasıyla kasa özgü PGC-1 α 4 ekspresyonunun arttığını rapor etmişlerdir. Bununla birlikte kastaki PGC-1 α 4 seviyesinin

artması subkutan BYD'nin kahverengileşmesini sağladığını öne sürmüşlerdir (4). Kas dokuda artan Metrn1 seviyesinin PGC-1 α seviyesine etkisi Şekil 2.5'de gösterilmiştir.



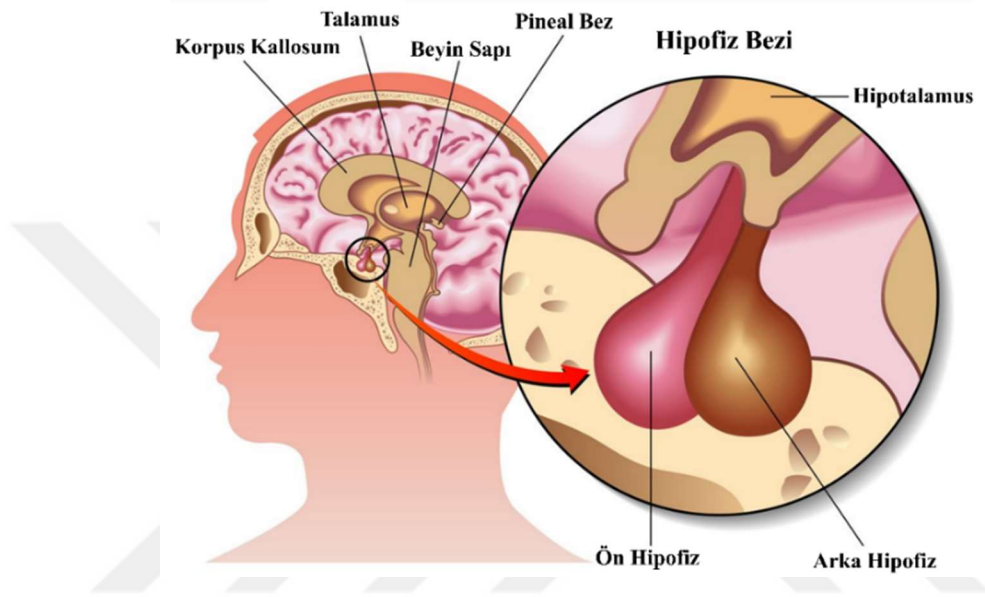
Şekil 2.5. Egzersiz sonrası kas dokuda Metrn1 aktivasyonu.

Metrn1'nin insan adipogenezindeki rolünü ve çocuklarda obezite, beyaz yağ doku kahverengileşmesi ve hiperinsülinemiyle ilişkisinin değerlendirildiği bir çalışmada insandan izole edilen adiposit hücrelerindeki Metrn1 mRNA seviyesi stromal vasküler fraksiyon (SVF) hücrelerine kıyasla daha düşük bulunmuş. Bununla birlikte obez çocukların adipoz dokusundaki Metrn1 mRNA seviyesi ise zayıf çocuklara kıyasla daha yüksek bulunmuştur (43).

Egzersizle birlikte kas ve adipoz dokudaki Metrn1 seviyesi değişiminin araştırıldığı bir çalışmada 48 haftalık erkek C57BL6 farelere normal diyet ve yüksek yağlı diyet uygulanmış. 16 haftanın ardından farelere egzersiz yaptırılmış ve kas, plazma ve adipoz dokudaki Metrn1 seviyeleri incelenmiştir. Yüksek yağlı diyet ve egzersiz uygulanan grupta kas, plazma ve adipoz doku Metrn1 seviyesi diğer gruplara kıyasla daha yüksek bulunmuştur (35).

2.2. Hipotalamus

Merkezi sinir sisteminde diensefalonun ön ucunun bir parçası olup hipotalamik sulkusun alt bölgesinde ve interpedinküler çekirdeklerin önünde yerleşmiştir (44). Yaklaşık 4 gr ağırlığındadır (beyin hacminin % 0.3'ünü oluşturur) ve komplike bir yapıya sahip olup vücutta çeşitli fizyolojik roller üstlenir (Şekil 2.6) (45).



Şekil 2.6. Hipotalamusun anatomik yapısı.

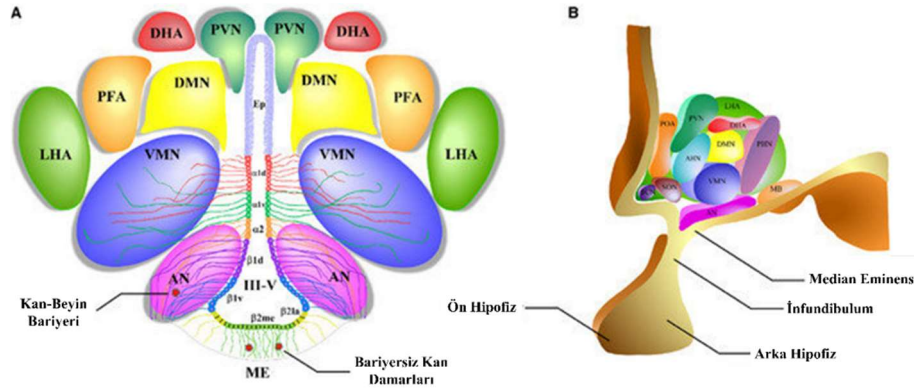
Hipotalamus otonom sinir sisteminin sempatik ve parasempatik sinirlerinin etkilerini koordine eder ve vücut fonksiyonlarıyla da yakından ilişkilidir (45). Hipotalamus birçok yaşamsal sürecin kontrolünü sağlar (Tablo 2.1). Hipotalamus bulunduğu anatomik bölgeden kaynaklı olarak beyin omurilik sıvısı (BOS) ile bağlantılıdır. Böylelikle beynin diğer bölgelerinden gelen nörotransmitterler ve diğer maddeler hipotalamusu etkilediği gibi hipotalamustan salgılanan benzer maddeler de beynin diğer bölgelerini etkilemektedir (45).

Tablo 2.1. Hipotalamusun fonksiyonları (45).

Hipotalamus Fonksiyonları
Sempatik ve parasempatik sinir sisteminin kontrolü
Vücut ısısının denetlenmesi
Kalp atımı ve kan basıncının denetlenmesi
Sıvı-elektrolit dengesi ve susama mekanizmasının denetlenmesi
İştah-vücut ağırlığının denetlenmesi
Sindirim sisteminin denetlenmesi
Hipofizden hormon salınımının denetlenmesi
Duygu durum değişikliklerinin kontrolünün sağlanması
Biyolojik ritimlerin denetlenmesi

Hipotalamik Çekirdekler

Hipotalamus çeşitli fizyolojik fonksiyonları denetleyen birçok heterojen çekirdek bulundurur (46). Bu çekirdekler hipotalamusun bölgeleri olan periventriküler, medial ve lateral alanda bulunmaktadır. Periventriküler alan (PVN), arkuat çekirdek (ARC), suprakiazmatik çekirdek ve periventriküler çekirdek olarak isimlendirilen dört farklı hücre kümesi içerir. Medial hipotalamik alan; medial preoptik çekirdek, anterior hipotalamus, dorsomedial çekirdek, ventromedial çekirdek ve mamiler çekirdekten oluşur. Lateral hipotalamik alan ise preoptik alanı içerir (Şekil 2.7). Magnoselüler ve parvoselüler nörosekretuar sistemler hipotalamik nörosekretuar hücre gruplarını oluştururlar ve bunlar hipotalamus boyunca dağılım gösterir (47). Bu çekirdekler nöroendokrin sistemin ana gelişim merkezleridir ve birçok endokrin öncül sentezleyerek beynin diğer bölümlerine salınmasını sağlarlar (46).



Şekil 2.7. Hipotalamik nükleusların yerleşimi (48). (Hipotalamik çekirdeklerin ve tanositlerin koronal görünümü (A), sagittal görünümü (B). Ep: ependimositler; AN: arkuat çekirdek; VMN: ventromedial çekirdek; DMN: dorsomedial çekirdek; PVN: paraventriküler çekirdek; DHA: dorsal hipotalamik alan; PFA: periformik alan; LHA: lateral hipotalamik alan; SCN: üst kiyazmatik çekirdek; SON: supraoptik çekirdek; POA: preoptik alan; MB: mamiller cisim; ME: median eminens; III-V: üçüncü ventrikül.).

Hipotalamo-Hipofizer Hormonlar

Hipotalamustan; büyüme hormonu serbestleştirici hormon (GHRH), büyüme hormonu baskılayıcı hormon (GHIH, somatostatin), tirotropin serbestleştirici hormon (TRH), kortikotropin serbestleştirici hormon (CRH), prolaktin inhibe edici faktör (PIF, dopamin) ve gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH) salgılanmaktadır. Bu hormonlar ön hipofiz bezindeki hormon salgılanmasını düzenler (Tablo 2.2) (45, 49).

Tablo 2.2. Ön hipofiz bezinin salgısını düzenleyen hormonlar (45).

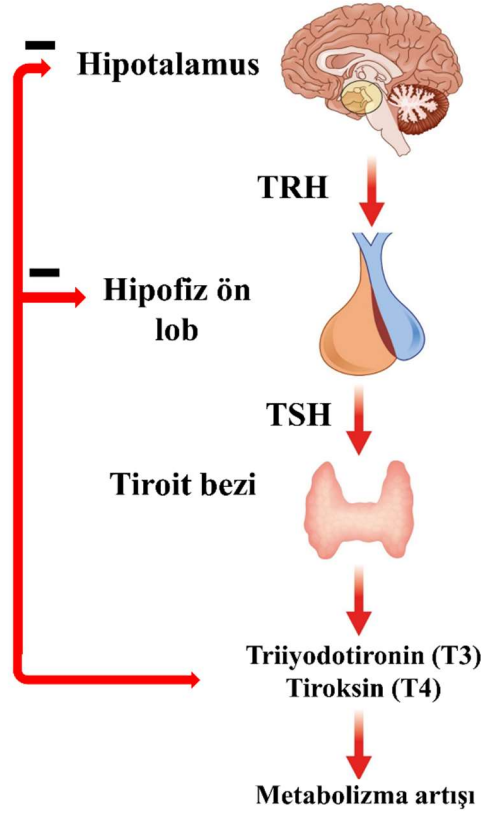
Hormon	Ön hipofiz bezindeki etkisi
Büyüme hormonu serbestleştirici hormon (GHRH)	Somatotropik hücrelerin uyarılması
Büyüme hormonu baskılayıcı hormon (GHIH, somatostatin)	Somatotropik hücrelerin baskılanması
Tirotropin serbestleştirici hormon (TRH)	Tirotropik hücrelerin uyarılması
Kortikotropin serbestleştirici hormon (CRH)	Kortikotropik hücrelerin uyarılması

Prolaktin inhibe edici faktör (PIF, dopamin)	Laktotropik hücrelerin baskılanması
Gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH)	Gonadotropik hücrelerin baskılanması

Hipotalamik TRH Nöronları ve Tirotropin Serbestleştirici Hormon

Hipofizyotropik TRH nöronları, PVN'de yer alır ve medyan eminensin dış katmanına akson terminalleriyle bağlanarak ön hipofize ulaşır ve TRH'nin portal dolaşıma salınmasını sağlar (50, 51). Beynin diğer bölgeleri, PVN'ye doğrudan monosinaptik bağlantıya sahip hipotalamusun ventrolateral medulla ve dorsomedial çekirdeği dahil olmak üzere TRH nöronları için metabolik sensörler olarak da yardım edebilir (52). Hipotalamustan TRH biyosentezi gerçekleşmesinin ardından, sentezlenen peptid hipofizden TSH sentezini ve salınımını uyarmak üzere akson terminalleri boyunca medyan eminense taşınır ve buradan da hipofizyal portal sistem kapilleri içerisine serbestlenir (9, 10). TSH dolaşımdaki tiroid hormon düzeyinin önemli bir düzenleyicisidir (53).

TRH, prepro-TRH'nin (ppTRH) enzimleri (prohormon dönüştürücü enzimler 1, 2 ve 3; PC1-3) ile dönüştürülmesi sonrası türetilen tripeptid amid (pro-Glu-His-Pro-NH₂) yapısında bir peptittir (54). İnsan ppTRH 242 aminoasitten meydana gelir ve TRH için projenitör dizisinin altı kopyasını oluşturur. Sıçan ppTRH 255, fare ppTRH 256 aminoasitten oluşur ve her ikisi de insandan farklı olarak TRH için beş projenitör diziye sahiptir. Sıçan, fare ve insan proTRH salgısını tetikleyen sinyallere yanıt olarak TRH moleküllerin yeterli miktarda üretimini sağlamak için projenitör sekansın (Gln-His-Pro-Gly) birden çok kopyası bulunur (55, 56). Serumdaki tiroid hormon seviyesindeki değişiklik prohormon konvertazlarını değiştirerek PVN'de TRH ve prohormon dönüştürücü enzim sentezini uyarır (57, 58). TRH direkt olarak ön hipofiz bezindeki tirotropik hücreleri uyarak, TSH sekresyonunu artırır. Şekil 2. 8'de TRH'nin TSH'ı uyarma mekanizması gösterilmiştir (45).



Şekil 2.8. Hipotalamus-hipofiz-tiroid eksenli (45).

2.3. Hipofiz

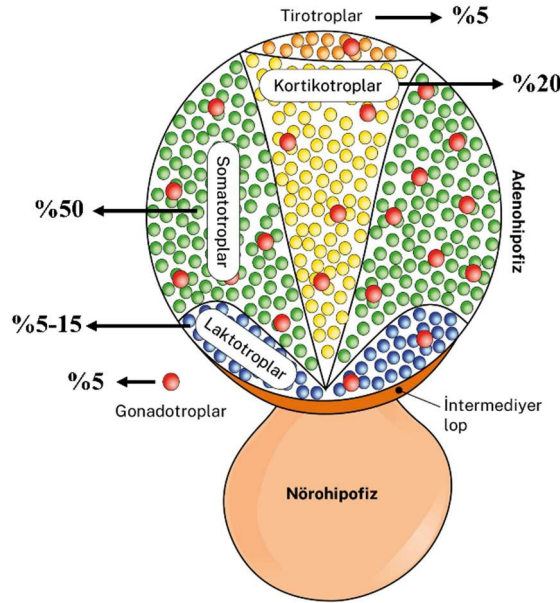
Hipofiz bezi (Yunanca *hypophysis* yani “az gelişmiş”) ya da pitüiter bez (Latince pituita yani “kalın mukus”) insanda yaklaşık 1 cm çapında ve 0.5-1 gr ağırlığında olmasına karşın birçok vücutta çok önemli fonksiyonların yerine getirilmesinde merkezi bir rol oynar. Beyin tabanında bulunan ve *sella turcica* adı verilen kemik bir kovuk içine yerleşmiş, *diaphragm sellae* adındaki duranın kıvrımıyla kaplıdır. Büyüme, üreme, enerji metabolizması, stres ve farklı fizyolojik süreçlerde anahtar rol üstlenen bir düzenleyici, hipotalamus ve periferal organlar arasında fizyolojik sinyal alışverişinin gerçekleştiği bir aracı organdır. Hipofiz ve hipotalamus arasındaki fonksiyonel ve anatomik bağlantı infundibular sap tarafından medyan eminens aracılığı ile gerçekleşir. Bu yapı hipotalamik salgıların hipofiz bezine ulaşımını sağlar (45, 59). Hipofiz bezi anatomik olarak ön hipofiz (adenohipofiz) ve arka hipofiz (nörohipofiz) olmak üzere iki bölüme ayrılır. Şekil 2.9’da hipotalamus ve hipofiz arasındaki anatomik-fonksiyonel ilişki gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Ön hipofizde yer alan hücre grupları ve salgıladıkları hormonlar (49).

Hücre grubu	Hormon
Laktotroplar	PIH
Gonadotroplar	LH, FSH
Tirotroplar	TSH
Somatotroplar	GH
Kortikotroplar	ACTH

(PIH, Prolaktin; LH, Luteinleştirici hormon; FSH, Folikül uyarıcı hormon; TSH, Tiroid uyarıcı hormon; GH, Büyüme hormonu; ACTH, Adrenokortikotropik hormon).

Hipofiz bezi küçük bir yapı olmasına karşın önemli hormonlar salgılar. Bu hormonlar süt salgılanması, tiroid fonksiyonu ve üremenin kontrolünü gibi önemli görevler üstlenmektedirler. Şekil 2.10'da ön hipofizde bulunan hücre gruplarının konumu ve yaklaşık oranları verilmiştir (45).



Şekil 2.10. Ön hipofizde yer alan hücre gruplarının dağılımı (45).

Hormon salgısı büyük ölçüde kandaki faktörler tarafından düzenlenir (59). Hipotalamustaki özel nöronlarda meydana getirilen hipotalamusun serbestleştirici ve baskılayıcı hormonları hipotalamus-hipofiz portal sistem aracılığıyla ön hipofize taşınır.

Hipotalamustan salgılanan bu hormonların işlevi ön hipofiz bezindeki hormonların yapımını ve salgısını kontrol etmektir (49). Bütün bu düzenleyici mekanizmalar hipofiz bezinin homeostatik mekanizmalarda aktif fizyolojik roller üstlenmesini sağlar.

2.3.2. Arka Hipofiz (Nörohipofiz)

Nörohipofiz olarak bilinen arka hipofiz bezi, asıl olarak özelleşmiş glia hücreleri olan pituisit hücrelerden meydana gelir. Bu hücreler hipotalamusun SON ve PVN bölgelerinden arka hipofize kadar uzanan terminal sinir sonlanmalarını (magnoselüler nöronlar) çevreleyerek bu yapılara destek doku görevi üstlenir ve ayrıca nörohipofiziyal hormon üretiminin düzenlenmesine katkı sağlar (64). Hipotalamustaki magnoselüler nöronlarda sentezlenen antidiüretik hormon (vazopressin) ve oksitosin sinir yolağı boyunca taşınarak arka hipofize ulaşır. Arka hipofizde hormonlar üretilmez ancak hipotalamustan nöronal ağlar ile bu bölgeye taşınan hormonlar sistemik kan dolaşımına salınır (45).

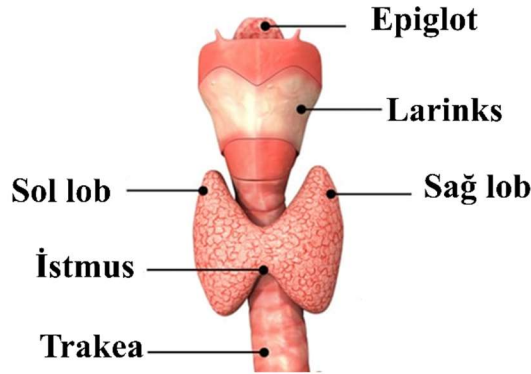
2.4. Tiroid Uyarıcı Hormon

TRH'nin portal dolaşıma karışmasıyla birlikte ön hipofizden salınan TSH, T3 ve T4 salgılanmasını düzenler. TSH, ön hipofizin tirotrop hücrelerinde sentezlenir, glikoprotein yapısında 28-30 kDa ağırlığında bir hormondur. Diğer glikoproteinlerde (örneğin LH ve FSH) olduğu gibi TSH'da birer α ve β alt ünitelerden oluşur ve bu yapılar hormonun özgün biyolojik özelliğini kazandıran yapılardır. İnsanlarda α -alt ünite ve β -alt ünite sırasıyla 6. ve 1. kromozomlar üzerindeki genler tarafından kodlanır (65). TSH, tiroid bezinin endokrin fonksiyonunu G-protein kenetli TSHR reseptörü üzerinden kontrol eder. İnsanlardaki TSHR geni kromozomun 14q31 bölgesi üzerinde bulunur ve tiroid bezinin yanı sıra lenfositler, adipositler, fibroblastlar, nöronal hücreler ve astrositler de dahil olmak üzere birçok alanda TSHR ifadesi tespit edilmiştir (66).

2.5. Tiroid Bezi

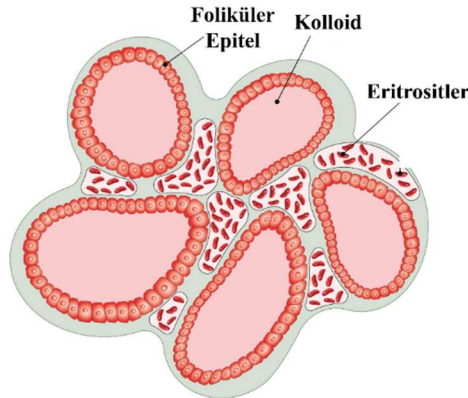
Tiroid bezi larinksin altında trakeanın her iki yanında bulunan iki uzun oval lobdan oluşur ve yetişkin bir insandaki ağırlığı yaklaşık 20-30 gr kadardır (45). Bu loblar krikoid kıkırdağın hemen altında isthmusla orta hatta birleşir (Şekil 2.11). Tiroid bezi boyun

bölgesi kaslarının altında gömülü haldedir ve zengin damarlanma yapısına sahiptir (11)71. Tiroid bezi vücuttaki primer endokrin bezler arasında en büyüğüdür (45).



Şekil 2.11. Tiroid bezinin konumu.

Tiroid bezi sinir ağı bakımında oldukça zengindir. Mikroskopik olarak fibröz bağ doku kapsülü ile kaplı, zengin vasküler interfolliküler bağ dokuları tarafından desteklenen ve içerisi kolloid adı verilen sıvı ile dolu folliküllerden oluşur (Şekil 2.12) (11). Kolloidin ana bileşeni, tiroid hormonlarını içeren ve 660.000 dalton ağırlığında büyük bir glikoprotein olan tiroglobulindir. Folliküller farklı hatlara sahip, tiroid bezinin fonksiyonel birimleri olarak kabul edilen, büyük küresel çekirdekler içeren ve oldukça açık bir sitoplazması bulunan kübik hücrelerle döşelidir (67). Ayrıca tiroid bezi içerisinde, follikül hücreleri arasında yerleşim gösteren ve kalsitonin salgılayan parafolliküler hücrelerde bulunur (68). Memelilerdeki tiroid bezlerinin mikroskopik yapısı aynı olmasına rağmen, bezin konumu ve dokusu farklılık gösterebilir (11).



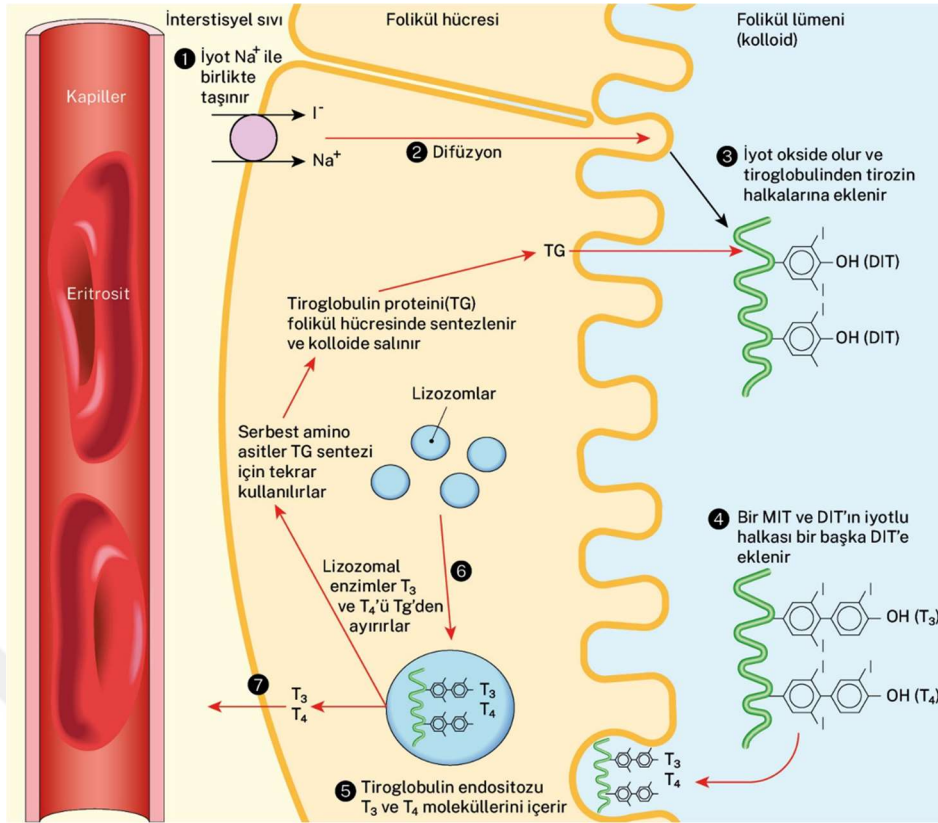
Şekil 2.12. Tiroid bezinin fonksiyonel birimleri (45).

2.5.1. Tiroid Hormonları

Tiroid bezindeki foliküler hücreler tirozin ve iyot aminoasidinin öncülüğünde T3 ve T4 hormonlarını sentezler (49). Tiroid hormonları, lipid ve glikoz metabolizmasını kolaylaştırıp, metabolik adaptasyonları düzenleyerek, enerji alımındaki değişikliklere yanıt vererek ve termojenezi kontrol ederek vücut homeostazında önemli bir rol oynar (69). Tiroid bezinden sentezlenen bu hormonlar biyolojik olarak aktiftir ve salgılanan tiroid hormonlarının yaklaşık %93'ü T4 ve geriye kalanı ise T3'tür (49). Bununla birlikte salgılanan T4'ün neredeyse tamamı dokularda T3'e dönüşmektedir. Bu iki hormonun işlevleri nitelik olarak aynı olmasına rağmen T4'e kıyasla T3 dört kat daha güçlüdür. Ayrıca tiroid bezi az miktarda ve biyolojik olarak inaktif olan revers-T3 (RT3), monoiodotirozin (MIT) ve diiodotirozin (DIT) salgılar (49, 67).

2.5.2. İyodür İyonlarının Tutulması ve Konsantre Edilmesi

Tiroid hormonlarının yapımında ilk aşama, dolaşımdaki iyodürlerin ekstraselüler sıvıdan tiroidin bez hücrelerine ve oradan da folliküllere taşınmasıdır. Kandaki bir iyodür iyonu ve iki sodyum iyonu bazolateral zarıdan Na^+/I doğal sodyum taşınımı yoluyla hücre içerisine aktif taşıma ile alınır. İyodürün hücredeki miktarının artışı sağlayan bu olaya iyot tutulması denir (Şekil 2.13) (70). Normal şartlarda tiroid bezindeki iyot miktarı kandakine kıyasla 30 kat daha fazladır. Tiroid bezinin en aktif olduğu durumlarda bu oran 250 kata kadar yükselebilir. İyodür tutulmasının hızını etkileyen en önemli faktör TSH düzeyidir (49, 70). TSH tiroid hücrelerindeki iyodür pompasının aktivitesini uyarırken, hipofizektomi büyük ölçüde azalır. Buna ek olarak follikül hücresi içindeki iyot ve iyodür düzeyi azaldığında iyot tutulmasının hızı artar, iyot düzeyi arttığında ise tutulma hızı azalır. İyodür, pendrin adı verilen klorür-iyodür iyonu zıt taşıyıcı molekülü tarafından tiroid hücrelerinin apikal zarından follikül içine doğru taşınır. Tiroidin epitel hücreleri ayrıca, iyodür iyonunu bağlayıcı tirozin aminoasidini içeren tiroglobulinide follikül içine salgılar (49).



Şekil 2.13. Tiroid bezi tarafından iyodür konsantrasyonunun mekanizması (45). (İyodür kimyasal ve elektriksel gradiente karşı aktif taşıma ile folliküler hücre sitozolüne taşınır. İki sodyum iyonu ve bir iyodür iyonunu simporter taşıma ile hücre içi alana geçer. Enerji harcamasını görülür. Taşıma için gerekli enerji, sodyumu hücre dışına pompalayan, daha düşük hücre içi sodyum konsantrasyonuna neden olan ve sodyumun tekrardan hücre içine kolayca difüzyonunu sağlayan Na^+/K^+ ATPaz pompasından gelir. İyodür kolloid bölgeye iyot kanalından geçerek ulaşır.).

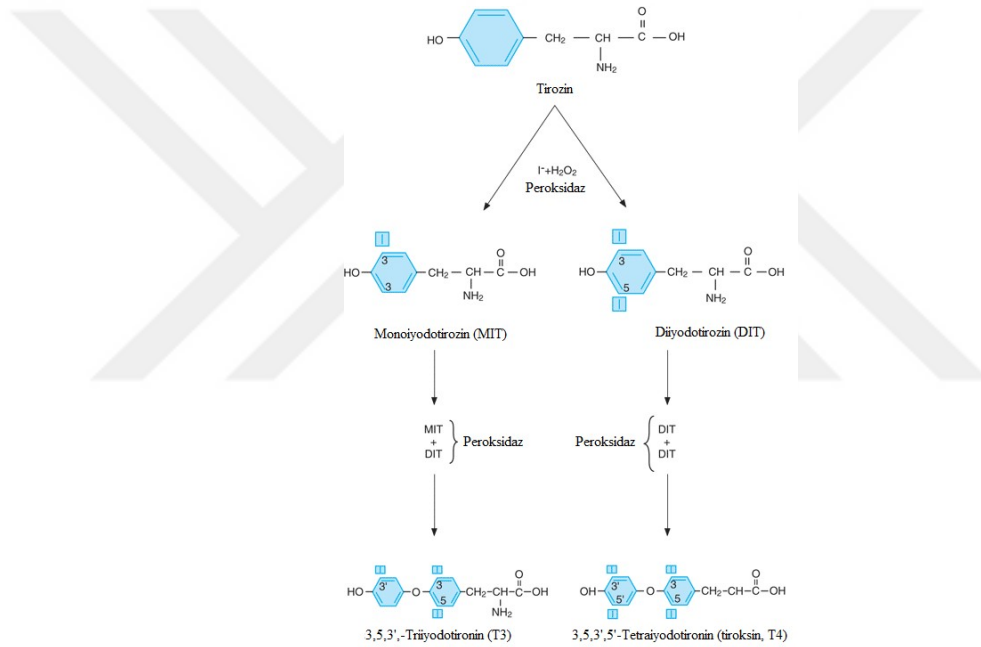
2.5.3. İyodürün İyoda Dönüşmesi ve Organifikasyon

Negatif yüklü olan hücre içindeki iyodür iyonları tirozin aminoasidiyle birleşebilen okside iyoda (I^0 veya I_3^-) dönüşür. Bu dönüşüm tiroperoksidaz enzimi aracılığıyla ve hidrojen peroksit (H_2O_2) bulunmasıyla gerçekleşir. Bu olay için gerekli olan H_2O_2 , nikotinamid adenin dinükleotid fosfata bağımlı sitokrom C redüktaz tarafından oluşturulur (71, 72). Peroksidaz ya hücrenin apikal zarına yerleşik haldedir ya da ona bağlı olarak bulunur. Peroksidaz sistemi bloke edilirse veya kalıtsal yokluğunun olduğu durumlarda tiroid hormonlarının sentezi hızı sifıra düşer.

Aktif forma dönüşen iyot tiroglobulin molekülleri içerisindeki tirozinler ile bağ kurar. Tirozin önce MIT'a ve daha sonra DIT'a iyotlanır. Bu işleme organifikasyon olarak adlandırılmaktadır (73).

2.5.4. Eşleşme Reaksiyonu ve Tiroglobulinin Depolanması

Biyolojik olarak aktif T3 ve T4 hormonları eşleşme reaksiyonunun ana ürünleridir. İki DIT molekülünün birleşmesiyle T4, bir MIT ve bir DIT moleküllerinin birleşmesiyle de T3 meydana gelir (Şekil 2.14). Ayrıca bir MIT ve bir DIT'ın birleşmesiyle az miktarda ve inaktif olduğu düşünülen RT3 oluşur (49).



Şekil 2.14. Tiroid hormon sentezinin biyokimyası (74).

Endokrin bezler arasında büyük miktarlarda hormon depo edebilme özelliğinden dolayı tiroid bezi benzersizdir. Sentezlenen tiroid hormonları tiroglobuline bağlı halde follikül içerisinde depo edilir. Her bir tiroglobulin molekülü 30 kadar T4 molekülü ve az sayıda T3 molekülüne sahiptir. Bu şekilde tiroid hormonları folikülde, vücudun normal tiroid hormonu ihtiyacını 2-3 ay boyunca karşılamaya yetecek seviyede depo edilir. Bu yüzden tiroid hormon sentezi durduğu zaman, yetersizlik belirtileri birkaç ay görülmez (49).

2.6. Tiroid Hormonlarının Serbestlenmesi ve Kanda Taşınması

Tiroid bezinde depo edilen T3 ve T4 molekülleri öncelikle tiroglobulinden ayrılır ve sonra kana serbestlenir. Bu olay şu şekilde gerçekleşir: Tiroid hücrelerinin apikal yüzeyi kolloidin ufak bir bölümünü içine alan yalancı ayaklar uzatır. Bunlar tiroid hücrelerinin apeksinden içeri doğru pinositotik vezikülleri oluşturur. Sonrasında hücre sitoplazması içerisindeki lizozomlar pinositotik veziküller ile birleşir ve kolloidle karışmış lizozomal sindirim enzimlerini içeren sindirim veziküllerini meydana getirir. Bu enzimlerden proteazlar tiroglobulin molekülünü sindirir ve tiroglobulinden T3 ile T4'ün serbestlenmesini sağlar. Serbest kalan bu moleküller tiroid hücrelerinin tabanından kapiller ağa difüzyonla geçer. Böylece tiroid hormonları kana serbestlenmiş olur (49).

Kana serbestlenen tiroid hormonlarının %99'undan fazlası karaciğerde yapılan proteinlere bağlanarak dolaşımda taşınır. Serbestleşen tiroid hormonlarının yaklaşık 2/3'ün tiroksin bağlayıcı globülin tarafından taşınır ve bu proteinin T4'e afinitesi oldukça yüksektir. Geriye kalan kısım ise tiroksin bağlayıcı prealbümin (transtretin) ve albümin tarafından dokulara taşınır (49, 67).

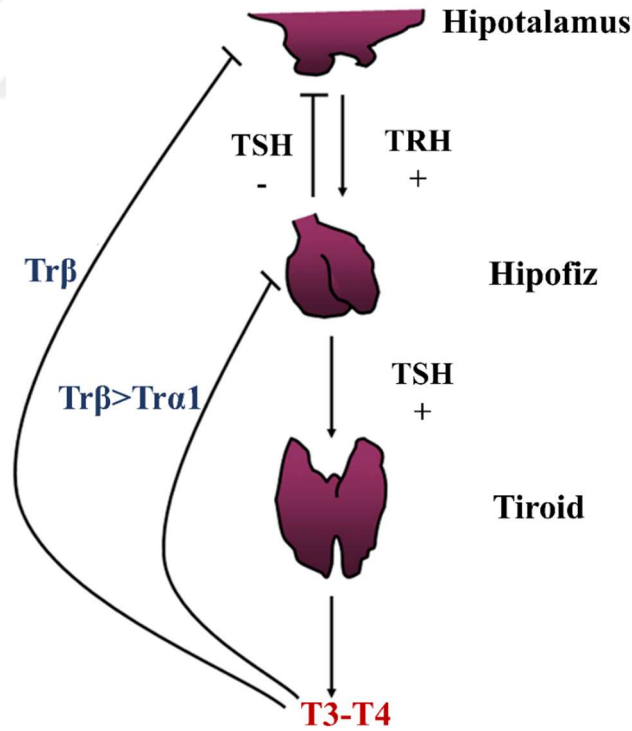
Plazma proteinlerinin tiroid hormonlarına (özellikle T4'e) afinitesi oldukça yüksektir. Bu nedenle plazma proteinlerince bağlanan tiroid hormonları doku hücrelerine oldukça yavaş bir şekilde geçer. Kandaki T4'ün yarısı yaklaşık 6 günde bir hücrelere serbestlenirken, taşıyıcı proteinlerin T3'e olan afinitesinin azlığı nedeniyle T3'ün yarısı yaklaşık bir gün içinde hücrelere serbestlenir (49).

2.7. Hipotalamus-Hipofiz-Tiroid Aksı ve Düzenlenmesi

Tiroid hormonlarının sentezlenmesi ve dolaşımdaki seviyesi HHT aksı tarafından düzenlenir. Hipotalamik TRH nöronları esas olarak PVN'de bulunan nöronal perikaryadan (nörosekretuar nöronlar) kaynaklanır ve medyen eminensin dış tabakasında yüksek yoğunluklu akson terminalleri mevcuttur (75). Buna ek olarak TRH nöronları hipotalamusun diğer bölgelerinde (ön hipotalamusun preoptik alanı, SON, ARC, dorsomedial premmamilar çekirdek, bazolateral ve preformikal hipotalamus) da dağılım gösterir (76). Hipotalamustan TRH biyosentezi gerçekleştikten sonra, sentezlenen peptid hipofizden TSH sentezini ve salınımını uyarmak üzere akson terminalleri boyunca medyen eminense taşınır ve buradan da hipofizyal portal sistem kapilleri içerisine serbestlenir (9, 10). Ön hipofize ulaşan TRH hipofiz hücre zarındaki TRH reseptörlerine

bağlanarak fosfolipaz ikinci haberci sistemini aktive eder. Tirotrop hücrelerinde sentezlenen TSH bu aktivasyonla birlikte dolaşıma katılır ve dolaşımdaki TSH tiroid bezindeki TSHR reseptörüne bağlanarak tiroid hormonlarının (T3 ve T4) yapımını ve salgılanmasını düzenler (11). TSH'nın tiroid hücrelerindeki sinyal iletimine cAMP aracılık eder. TSH tiroid fonksiyonlarının uyarılmasının yanı sıra iyot alımı, organifikasyon, iyodotironin metabolizması ve tiroid büyümesi gibi rollere sahiptir.

HHT aksının düzenlenmesi dolaşımdaki tiroid hormon miktarına bağlıdır ve klasik geri bildirim mekanizması ile çalışır (49). HHT aksının geri bildirim mekanizması Şekil 2.15'te gösterilmiştir. Vücut sıvılarında tiroid hormonlarının artması, ön hipofizden TSH salgısını azaltır. Tiroid hormonlarının salgı hızı normalin yaklaşık iki katı kadar arttığı zaman, ön hipofizdeki TSH salgısı hemen hemen sıfıra düşer. Ön hipofiz ile hipotalamus arasındaki bağlantı engellense bile, bu oluşan baskılayıcı geribildirim etkinliğini devam ettirir. Bu durum dolaşımda artan tiroid hormon miktarının doğrudan ön hipofizden TSH salınımını baskıladığını gösterir. Ayrıca ön hipofizdeki TSH salgısını hipotalamusta sentezlenen somatostatin ve dopaminde inhibe eder (74).



Şekil 2.15. Hipotalamus-hipofiz-tiroid aksının geribildirim düzenlenmesi (77).

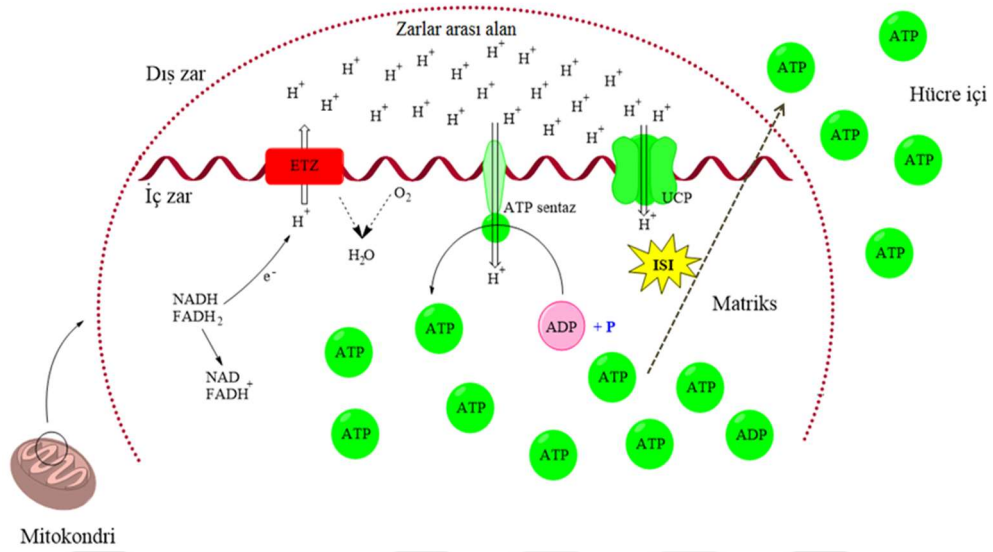
2.8. Tiroid Hormonlarının Enerji Metabolizmasındaki Etkileri

HHT aksı enerji metabolizması başta olmak üzere, metabolizma hızı, büyüme ve gelişme gibi süreçlerin sağlıklı bir şekilde devam edebilmesinde anahtar rol oynar (78, 79). Enerji metabolizmasının bozulması kişide obezite ve diyabet gibi önemli metabolik hastalıkların oluşumuna neden olur. Tiroid hormonlarının enerji homeostazındaki önemini tiroid disfonksiyonu olan hastalarda özetlemek mümkündür. Hipertiroidi hastalarda tiroid bezi aşırı miktarlarda tiroid hormonu üretir ve dolaşımda artan tiroid hormon miktarı kişideki metabolizma hızının artmasına neden olur. Hipertiroidi hastalarının yaklaşık %85'inde artan gıda alımına rağmen kilo kaybı gözlenir (80). Bunun aksine hipotiroidizmi hastalarda, metabolizma hızının azalması ve azaltılmış gıda alımına rağmen ağırlık artışı gerçekleşir (78). Bu etkilerin birçoğu başta beyaz ve kahverengi yağ dokular olmak üzere karaciğer, kalp ve iskelet kası gibi metabolik olarak aktif dokularda tiroid hormonun doğrudan aktivasyonu ile ilişkilendirilir (81, 82).

2.9. Eşleşme Bozucu Proteinler (UCP'ler)

Mitokondriyal taşıyıcı protein ailesinden olan UCP'ler mitokondrinin iç zarında sentezlenir (83). Bu proteinler mitokondriyal zarın fonksiyonunda ve hücresel enerji düzenlenmesinde görev alır (84, 85). Yağ asitleri ve glukoz tarafından aktivitesi artan UCP'ler, pürin nükleotidleri tarafından inhibe edilir (86, 87). UCP'ler mitokondrinin zarlar arası alanındaki protonları mitokondri matriksi içerisine taşıyarak, mitokondriyal proton gradiyentini azaltır ve sonuç olarak oksidatif fosforilasyon aracılığı ile ATP üretimini kısmen engellemiş olur (88, 89). Protonlar UCP'ler üzerinden matriks içerisine geçerken depolanan enerji ısı olarak açığa çıkar (Şekil 2.16).

Farklı vücut dokularında yayılım gösteren bu protein grubunun 5 üyesi vardır. KYD'ye özgü UCP1, vücut sıcaklığının korunmasında (titremesiz termojenez) ve yağ dokusu içerisinde depolanmış enerjinin kullanılmasında görev alır (90, 91). Eşleşme bozucu protein 2 (UCP2); dalak, pankreas adacık hücreleri, akciğer, mide, beyaz yağ doku, beyin ve periferik nöronların arka kök gangliyonlarında ifade edilir (90-94). Eşleşme bozucu protein 3 (UCP3) öncelikle iskelet kasında olmak üzere az miktarda sinir hücrelerinde tespit edilmiştir (91, 94, 95). Yapılan çalışmalar ile eşleşme bozucu protein 4 (UCP4) ve eşleşme bozucu protein 5 (UCP5)'in merkezi sinir sisteminde yüksek düzeyde bulunduğu, ayrıca UCP5'in testis dokusunda varlığı belirtilmiştir (96-98).



Şekil 2.16. Mitokondriyal enerji düzenlenmesi ve UCP'lerin rolü (18). (UCP'ler zarlar arası alandaki protonları kendi üzerlerinden mitokondriyal matrikse taşıyarak proton gradyanını azaltır. Bu süreçte proton gradyanı içerisinde biriken enerji ısı olarak açığa çıkar. ETZ: Elektron taşıma zinciri).

2.9.1. UCP'lerin Enerji Metabolizması Üzerindeki Etkisi

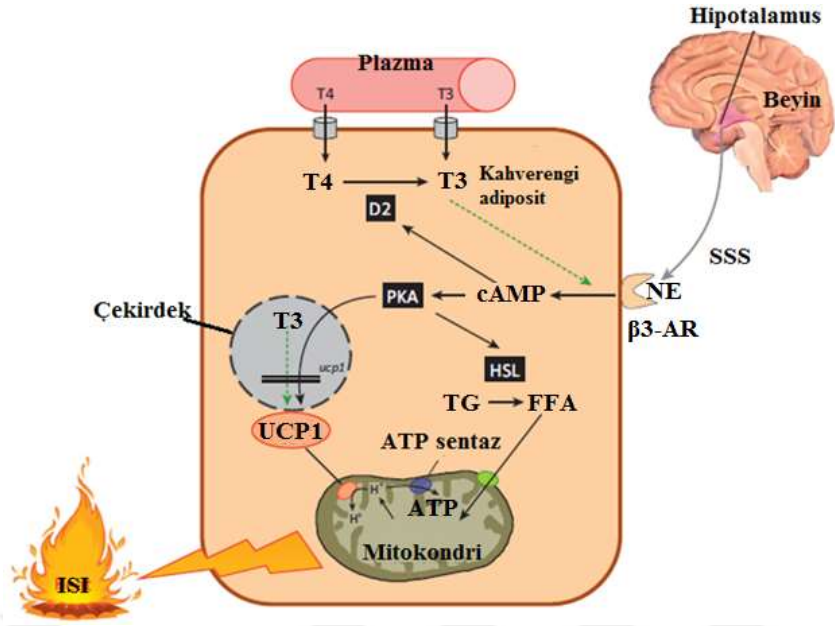
UCP'lerin mitokondriyal proton sızıntısını katalize etmesi nedeniyle ilk keşfinden bugüne kadar enerji metabolizmasında fizyolojik rol aldığı bilinmektedir (99). Kemirgenlerde aşırı yeme, enerji dengesini korunmasını engelleyerek obeziteye neden olur ve BYD termojenezi sağlayarak kilo alımını engeller. BYD'deki UCP1'in aşırı ifadesi de KYD'de termojeneze neden olarak obezitenin gelişmesini önlediği gösterilmiştir (84, 100). Böylelikle BYD'de ifade edilen UCP1'in enerji harcamasını artırıcı etkiye sahip olduğu kesin olarak kanıtlanmıştır (101). İnsanlarda doğumdan sonra KYD'nin hızla azalarak kaybolduğu düşünülüyordu. Son yapılan çalışmalarla UCP1'in adipoz doku içinde dağıldığı ve bu dokuların KYD'ye eş değer olup olmadığı ve enerji metabolizmasına katkısının olup olmadığı henüz kesin değildir (102).

UCP1'in kastaki homoloğu olan UCP3 ilk olarak UCP1 gibi termoregülasyona dahil olduğu belirtilmiştir. İskelete kasındaki mitokondriyal yağ asidi oksidasyonunun bozulması obezite ve T2DM gibi metabolik hastalıkların patofizyolojisinde çok önemlidir (103). UCP3'ün eşleşme bozucu özelliğinden ayrı olarak mitokondriyal yağ asidi oksidasyonunda ve mitokondriyal ROS kaynaklı oksidatif hasarı önlemede anahtar düzenleyici roller oynadığı düşünülmektedir (86).

2.9.2. UCP'lerin Tiroid Hormonları ile İlişkisi

Tiroid hormonları dokularda enerji kullanımını arttırırken, aynı zamanda titremesiz termojenez ile vücut sıcaklığının düzenlenmesinde de rol oynar (16). Memelilerin kahverengi yağ dokularında tiroid hormon reseptörlerinin (TR α 1 ve TR β 1) bol miktarda bulunması, tiroid hormonlarının kahverengi yağ dokusunu doğrudan hedef aldığını göstermektedir (82, 104).

Tiroid hormonları, gen transkripsiyonunu tiroid hormon reseptörleri aracılığıyla etkileyerek enerji metabolizması üzerindeki etkilerini gösterir (105). Dolaşımdaki T3 KYD'de TR β 1 reseptörüne bağlanarak UCP1 düzeyini arttırır (82, 106). Lee ve ark insan adiposit kültürüne T3 uygulamasının UCP1 mRNA ifadesini doz bağımlı olarak arttırdığı göstermiştir (107). T3'ün, KYD UCP düzeyini güçlü bir şekilde etkilediği gösterilmiştir (108). Bir diğer çalışmada, insülin geninde mutasyon olan hastalarda tiroidektomi sonrası L-T4 tedavisinin abdominal ve supraskapular kahverengi yağ dokudaki UCP1 mRNA ifadesinde artışa neden olduğu rapor edilmektedir (109). Buna ek olarak tiroid hormonları ile UCP3 arasındaki muhtemel ilişki de aydınlatılmaya çalışılmıştır. Sprague ve ark hipertroidili sıçanlardaki kas UCP3 düzeyinin normal ve hipotroidili sıçanlara kıyasla daha yüksek olduğunu rapor etmiştir (110). Bununla birlikte hipotroidili sıçanların soğuk stres uygulaması ardından hayatta kalmadıkları bir başka çalışmada rapor edilmiştir (108). Hipertiroidizmle ilgili mitokondriyal yağ asidi oksidasyonundaki artışın UCP3'ün mitokondri üzerindeki işlevselleğini etkileyebileceği de bildirilmiştir (111) UCP1 ve UCP3 ifadelerindeki artış enerji kullanımının bir göstergesi olarak kabul edilir (84, 89). Tüm bu sonuçlar tiroid hormonlarının UCP1 ve UCP3 üzerinden enerji harcanımını gerçekleştirdiğini gösterir (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. Tiroid hormonlarının kahverengi yağ doku ısı oluşumundaki rolü (78).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Araştırmanın Yapıldığı Merkez

Çalışma, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'undan alınan onay ile (02.06.2020 tarih, 2020/8-8 protokol numaralı), İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarları ile Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.2. Deney Hayvanlarının Temini

Deneyde kullanılacak hayvanların sayısı, hayvanların deneye başlama ağırlık ortalaması 432.45 gr, standart sapması 35.33 gr, %4 sapma, tip 1 hata (α) 0.05 ve tip 2 hata (β) (Güç=0.80) ve hayvanlar 4 gruba ayrılması durumunda her bir grupta en az 10 hayvanın olması gerektiği güç analizi (Power Analiz) ile belirlendi. Araştırma kapsamında ihtiyaç duyulan 40 adet deney hayvanının (*Sprague Dawley* cinsi erkek sıçan) temini İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi (ÜNİTF-DEHÜM)'nden sağlandı.

3.3. Hayvanların Gruplara Ataması

Deneye başlamadan önce hayvanlar tartılarak vücut ağırlıkları kaydedildi. Belirlenen vücut ağırlıklarına göre hayvanların gruplara ataması, bilgisayar algoritmasına dayalı basit rastgele atama yöntemi ile yapıldı (MedCalc 12.7.0 for Windows) ve tek yönlü varyans analizi bulgularına göre gruplar arasında hayvanların ağırlıkları açısından fark olmadığı tespit edildi (Tablo 3.1; $p=0.983$).

Tablo 3.1. Hayvanların bilgisayara dayalı algoritma kullanılarak gruplara ataması.

Gruplar	Ağırlık				p
	Kontrol	Sham	10 nM Metrnl	100 nM Metrnl	
Hayvan sayısı (n)	10	10	10	10	
Ortalama	431.9	433.2	433.4	432.2	
SD	45.07	40.8	30.46	33.16	0.983
En küçük	337	352	387	382	
En büyük	510	476	469	480	

3.4. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deneyde ağırlıkları 337-510 gr arasında olan 40 adet erkek *Sprague Dawley* cinsi sıçan kullanıldı. Gruplardaki hayvanlar tekli kafeslerde barındırıldı yerleştirildi. Tek barındırma ortamı hayvanlarda stres oluşturabileceğinden 7 gün sıçanlar sadece izlendi ve tekli yaşam koşullarına adapte olmaları sağlandı. Bu sürenin sonunda sıçanlar 4 gruba ayrıldı (n=10). Deney süresince tüm gruplar, 20-22°C sıcaklık ve 12 saat ışık/karanlık koşullarının sağlandığı ortamda barındırıldı ve tüm gruplar standart sıçan yemi (SSY) ile beslendi. Gruplar aşağıda belirtildiği gibi oluşturuldu.

1. Grup (Kontrol): Bu gruptaki sıçanlara deney süresince herhangi bir cerrahi işlem ya da uygulama yapılmadı. 28 gün sonra (deneyin son günü) dekapite edilerek kan, hipotalamus, kas, beyaz ve kahverengi yağ doku örnekleri toplandı. Alınan kan dokuda ELISA yöntemi kullanılarak serum TSH, T3 ve T4 hormon düzeyleri belirlendi. Toplanan hipotalamus dokusundan Western Blot analiz yöntemi kullanılarak TRH, beyaz ve kahverengi yağ dokuda UCP1, kas dokuda ise UCP3 protein düzeyleri belirlendi.

2. Grup (Sham): Bu gruptaki sıçanlara uygulama yapılmadan 7 gün önce bireysel tekli kafeslere yerleştirildi, kafes ve tekli barınma stresine sıçanların alışması sağlandı. 8. gün anestezi altında sıçanların sağ lateral ventriküllerine beyin infüzyon kiti 1 (BİK) yerleştirilerek 7 gün süresince beklenecek sıçanların iyileşmeleri sağlandı. Bu süre zarfında günlük intramüsküler analjezik (180 mg/kg Parasetamol) ve antibiyotik (70 mg/kg penisilin) uygulaması yapıldı. 15. gün sıçanlar yeniden anesteziye alınarak BİK'in kanülüne Alzet 2ML2 model ozmotik mini pompa (OMP) bağlanarak sağ lateral ventrikül

içerisine 14 gün süresince 5µl/saat olacak şekilde yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS; Metrnl çözücüsü) infüzyonu gerçekleştirildi. 28 gün sonra (deneyin son günü) dekapite edilerek kan, hipotalamus, kas, beyaz ve kahverengi yağ doku örnekleri toplandı. Alınan kan dokuda ELISA yöntemi kullanılarak serum TSH, T3 ve T4 hormon düzeyleri belirlendi. Toplanan hipotalamus dokusundan Western Blot analiz yöntemi kullanılarak TRH, beyaz ve kahverengi yağ dokuda UCP1, kas dokuda ise UCP3 protein düzeyleri belirlendi.

3. Grup (10 nM Metrnl): Bu gruptaki sıçanlara uygulama yapılmadan 7 gün önce bireysel tekli kafeslere yerleştirildi, kafes ve tekli barınma stresine sıçanların alışması sağlandı. 8. gün anestezi altında sıçanların sağ lateral ventriküllerine BİK yerleştirilerek 7 gün süresince beklenerek sıçanların iyileşmeleri sağlandı. Bu süre zarfında günlük intramüsküler analjezik (180 mg/kg Parasetamol) ve antibiyotik (70 mg/kg penisilin) uygulaması yapıldı. 15. gün sıçanlar yeniden anesteziye alınarak beyin infüzyon kitinin kanülüne Alzet 2ML2 model OMP bağlanarak sağ lateral ventrikül içerisine 14 gün süresince 5µl/saat olacak şekilde 10 nM Metrnl infüzyonu gerçekleştirildi. 28 gün sonra (deneyin son günü) dekapite edilerek kan, hipotalamus, kas, beyaz ve kahverengi yağ doku örnekleri toplandı. Alınan kan dokuda ELISA yöntemi kullanılarak serum TSH, T3 ve T4 hormon düzeyleri belirlendi. Toplanan hipotalamus dokusundan Western Blot analiz yöntemi kullanılarak TRH, beyaz ve kahverengi yağ dokuda UCP1, kas dokuda ise UCP3 protein düzeyleri belirlendi.

4. Grup (100 nM Metrnl): Bu gruptaki sıçanlara uygulama yapılmadan 7 gün önce bireysel tekli kafeslere yerleştirildi, kafes ve tekli barınma stresine sıçanların alışması sağlandı. 8. gün anestezi altında sıçanların sağ lateral ventriküllerine BİK yerleştirilerek 7 gün süresince beklenerek sıçanların iyileşmeleri sağlandı. Bu süre zarfında günlük intramüsküler analjezik (180 mg/kg Parasetamol) ve antibiyotik (70 mg/kg penisilin) uygulaması yapıldı. 15. gün sıçanlar yeniden anesteziye alınarak beyin infüzyon kitinin kanülüne Alzet 2ML2 model OMP bağlanarak sağ lateral ventrikül içerisine 14 gün süresince 5µl/saat olacak şekilde 100 nM Metrnl infüzyonu gerçekleştirildi. 28 gün sonra (deneyin son günü) dekapite edilerek kan, hipotalamus, kas, beyaz ve kahverengi yağ doku örnekleri toplandı. Alınan kan dokuda ELISA yöntemi kullanılarak serum TSH, T3 ve T4 hormon düzeyleri belirlendi. Toplanan hipotalamus dokusundan Western Blot analiz yöntemi kullanılarak TRH, beyaz ve kahverengi yağ dokuda UCP1, kas dokuda ise UCP3 protein düzeyleri belirlendi.

3.5. Deney Hazırlıkları

3.5.1. Yapay Beyin Omurilik Sıvısının Hazırlanması

Tablo 3.2’de içerikleri verilen A ve B solüsyonları 500 ml steril distile su ile iki farklı solüsyon olarak hazırlandı. Solüsyonlar 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak yBOS elde edildi. Hazırlanan çözelti 0.22 µm por çapına sahip filtreden geçirilerek sterilizasyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3.2. yBOS için kullanılan bileşikler ve miktarları (112).

A Solüsyonu		B Solüsyonu	
Bileşik	Miktar (gr)	Bileşik	Miktar (gr)
NaCl	8.66	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	0.214
KCl	0.224	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0.027
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.206		
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.163		

3.5.2. Metrinl Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Metrnl konsantrasyonları biyolojik emniyet kabini içerisinde, 0.22 µm por çapındaki filtreden geçirilen yBOS içerisinde çözülerek hazırlandı. Konsantrasyonlar 10 ve 100 nM olacak şekilde steril şartlarda hazırlandı.

3.5.3. Beyin İnfüzyon Kitinin Hazırlanması

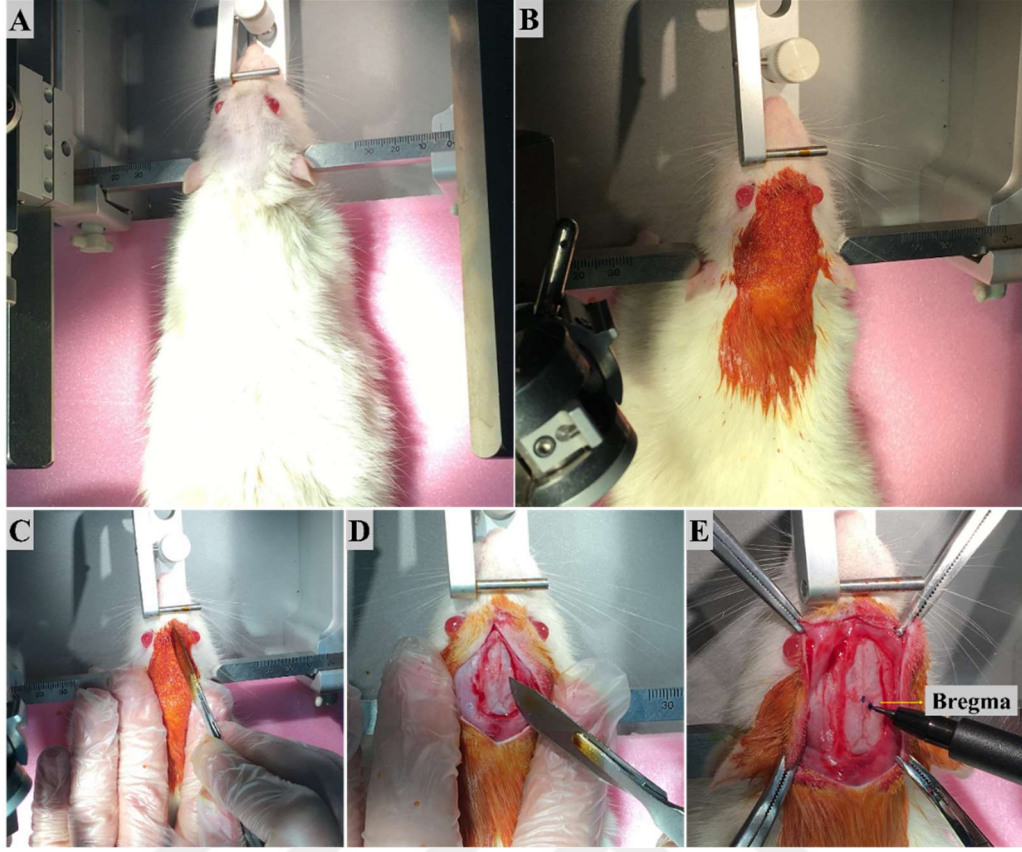
Çalışma için sıçan sağ lateral ventrikülüne infüzyon yapacak şekilde tasarlanan (vertikal eksen için iğne uzunluğu 4.8 mm) BİK (Alzet brain infusion kit 1, ABD) kullanıldı (Şekil 3.1). Kitlerle birlikte gelen özel kanüller BİK’e takıldı ve içerisi yBOS ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde dolduruldu. İçerisi sıvı ile doldurulmuş olan kanülün kite bağlı olmayan serbest ucu hava almaması ve kanüldeki sıvının boşalmaması için ısıtılarak bir pens yardımıyla kapatıldı.

3.5.5. Sıçanların Operasyona Hazırlanması

Operasyonun gerçekleştirileceği ameliyathane ortamı UV-C ışın kullanılarak sterilize edildi. Her sıçan için ayrı cerrahi aletlerin sterilizasyonu yapıldı ve yeterli miktarda steril eldiven temini sağlandı. Sıçanlar, intramüsküler olarak 70 mg/kg ketamin (Richter Pharma AG, Avustralya) ve 8 mg/kg ksilazin (Alfazyne, Hollanda) ile anestezi altına alındı. Sıçanların parmak kıstırma yanıtları ve fizyolojik yanıtının izlenmesinin ardından anestezi altında oldukları tespit edildi ve spontan hareketleri kaybolan sıçanların kafa derileri traş edilerek operasyona hazır hale getirildi.

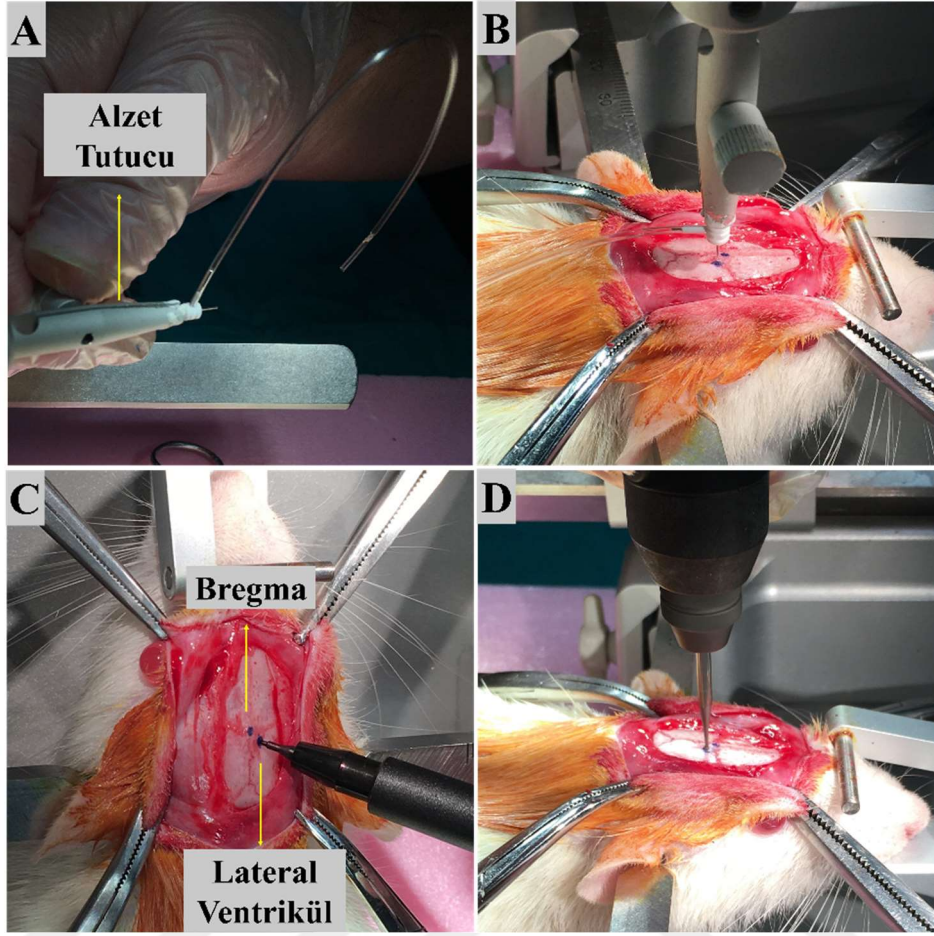
3.6. Hayvanların Stereotaksik Cihaza Yerleştirilmesi ve BİK İmplantasyonu

Deneye başlamadan önce stereotaksik cihaz (Rodent Stereotaxic Instruments, Harvard Apparatus, ABD) ve hayvanın yerleştirileceği yüzey ayarlandı. Hayvanlar stereotaksik cihaza kulaklarından ve ağız kısmından kafatası yere tam paralel olacak şekilde sabitlendi (Şekil 3.3A). Traş edilen bölgeye %10 povidon iyodin sürülerek (Şekil 3.3B) kafatası derisi bir bistüri ile kesildi (Şekil 3.3C) ve kemik yapıya ulaşıldı (Şekil 3.3D). Kemik yüzeyi temizlenerek bregmanın açık bir şekilde görülmesi sağlandı (Şekil 3.3E).



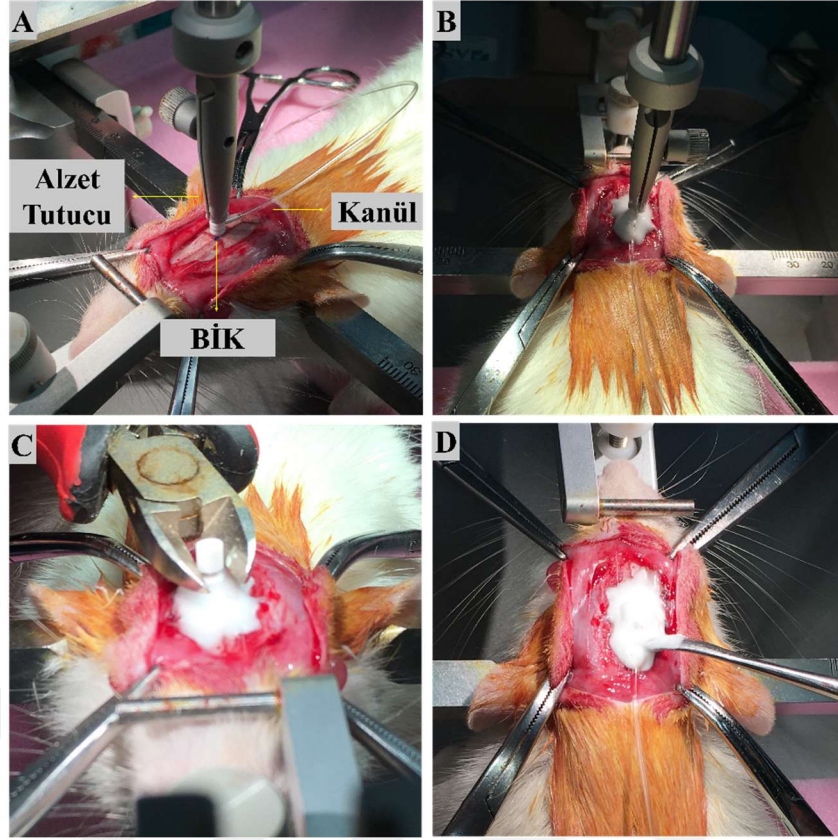
Şekil 3.3. Sıçanların stereotaksik cihaza sabitlenmesi (A), sıçanların stereotaksik cihaza sabitlenmesinin ardından kesi bölgesine povidon iyodin sürülmesi (B), kafa derisinin kesilip (C), kemik dokunun görünür hale getirilmesi (D) ve bregma noktasının belirlenmesi (E).

Lateral ventrikülün stereotaksik koordinatları Paxinos & Watson sıçan beyin atlasına göre belirlendi (113). Lateral ventrikül giriş noktası, referans noktası olarak seçilen bregmadan 1.40 mm lateral, 0.8 mm posteriyor (kaudal) ve 4.8 mm vertikal gidilerek tespit edildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.5. Kanülün alzet tutucuya takılması (A), lateral ventrikül için delinecek bölgenin iğnenin ucuyla tespit edilmesi (B), lateral ventrikülün bregmaya göre konumunun belirlenmesi (C) ve matkapla delinmesi (D).

Kalıcı kanül, BİK üzerindeki plastik tutma bölgesinden stereotaksik cihaza takılmış olan özel Alzet (ABD) tutacağına yerleştirildi ve açılan delikten lateral ventriküle indirildi (Şekil 3.6A). BİK'ler diş yapıştırıcısı (dental cement) yardımıyla kafatasına sabitlendi (Şekil 3.6B), mini yan keski yardımıyla BİK'in plastik başı kesildi (Şekil 3.6C) ve tekrardan dental cement ile kapatıldı (Şekil 3.6D).

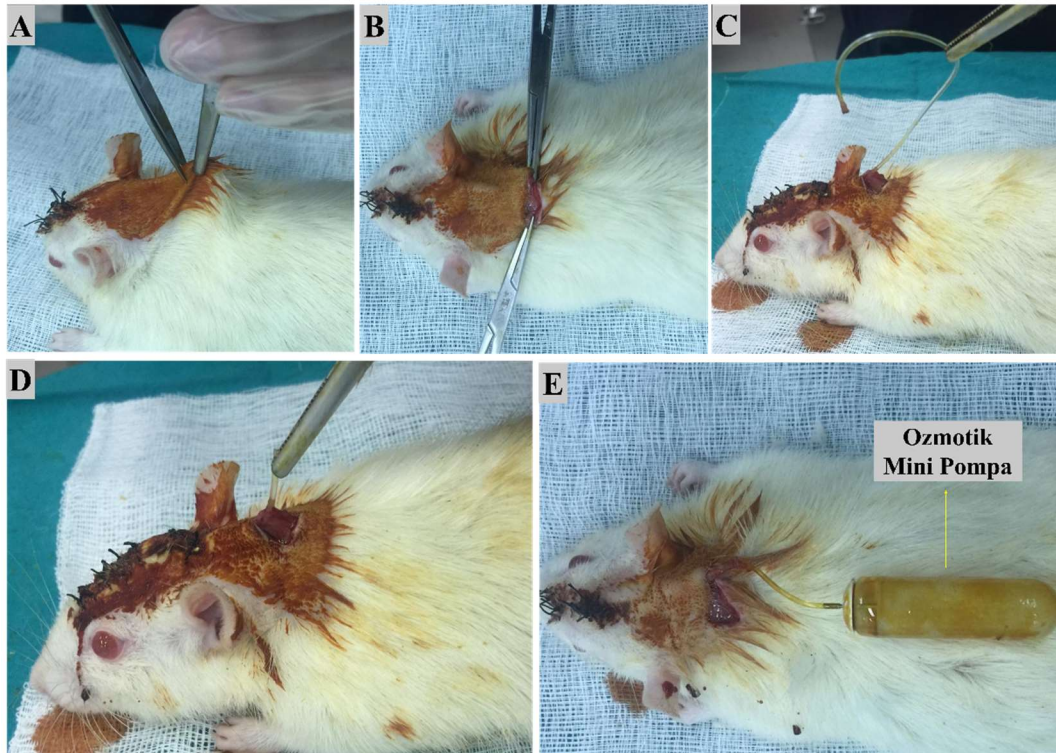


Şekil 3.6. Beyin infüzyon kitinin delinen kısımdan lateral ventriküle indirilmesi (A), kanül etrafının diş yapıştırıcısıyla yapıştırılması (B), kanül başının kesilmesi (C) ve kanülün üstünün diş yapıştırıcısıyla kapatılarak kafatasına sabitlenmesi (D).

BİK'in kanülü hayvanların ense derisi altına yerleştirildi ve insizyon bölgesi 3.0 ipek (Doğsan Tıbbi Malzeme Sanayi A.Ş., Trabzon/Türkiye) ile dikildi ve insizyon bölgesine %10 povidon iyodin sürüldü. Ayrıca sıçanlardaki kanamaya bağlı olarak meydana gelen sıvı kaybını önlemek amacıyla 500 µl serum fizyolojik (SF) ip olarak uygulandı. Cerrahi operasyona bağlı olarak hayvanlarda ortaya çıkabilecek ağrı duyusunun çalışmayı olumsuz etkileyebileceğinden 1 hafta süresince hayvanların kafalarındaki yaranın iyileşmesi ve hayvanların lateral ventriküllerine yerleştirilen beyin infüzyon kitlerine alışması için peptid infüzyonu gerçekleştirilmedi. Operasyondan sonraki ilk hafta sıçanların kesi bölgesine düzenli olarak pansumanları yapıldı. Ayrıca operasyona bağlı gelişebilecek ağrı ve enfeksiyonlara karşı hayvanları korumak amacıyla ilk 3 gün intramüsküler olarak analjezik (Parasetamol; 180 mg/kg) ve antibiyotik (Penisilin; 50 mg/kg) uygulamasına devam edildi.

3.7. Ozmotik Mini Pompaların Yerleştirilmesi

14. günün sonunda sıçanlara spontan solunumları ve göz kırpmaya refleksi korunacak şekilde intramüsküler olarak 70 mg/kg ketamin, 8 mg/kg ksilazin ile anestezi uygulandı. Spontan hareketleri kaybolan sıçanların ense kısmında kanülün yeri palpe edilerek belirlendi (Şekil 3.7A) ve bu kısmı traş edilerek traş edilen ense kısmına küçük bir kesi açıldı (Şekil 3.7B). Kesi bölgesine dezenfektan sürülerek açılan kesiden daha önceden hayvanlara yerleştirilen beyin infüzyon kitinin kanülüne ulaşıldı (Şekil 3.7C) Hamilton enjektörü kullanılarak kanüde tıkanma olup olmadığı kontrol edildi ve herhangi bir tıkanma ile karşılaşılmadı. Ozmotik mini pompalar infüze edilecek maddeler ile dolduruldu (Sham grubu için yBOS, uygulama grupları için 10 ve 100 nM, Metrn1). Kanülün fazla kısmı kesildi ve ozmotik mini pompanın takılabileceği uzunlukta bırakıldı (Şekil 3.7D). Ense derisi genişletilerek pompanın yerleştirilebileceği bir alan oluşturuldu ve BİK ozmotik mini pompaya bağlanarak infüzyon başlatıldı (Şekil 3.7E).



Şekil 3.7. Sıçanların ense derisinde bulunan kanülün tespit edilmesi (A) ve ense derisine kesi açılması (B) kanül ucunun çıkartılarak kontrol edilmesi (C), kanülün fazla kısmının kesilmesi (D) ve ozmotik mini pompanın takılarak infüzyonun başlatılması (E).

İnsizyon bölgesi 3.0 ipek iplik (Doğsan Tıbbi Malzeme Sanayi A.Ş., Trabzon/Türkiye) ile dikildi ve insizyon bölgesine %10 povidon iyodin sürüldü. Operasyona bağlı olarak hayvanların ağrılarını azaltmak amacıyla sıçanlar anesteziden uyanmak üzere olduklarında analjezik ilaç (Parasetamol, 180 mg/kg) ip olarak uygulandı. Ayrıca operasyona bağlı meydana gelebilecek sıvı kaybını tolere etmek amacıyla sıçanlara 500 µl SF ip olarak uygulandı.

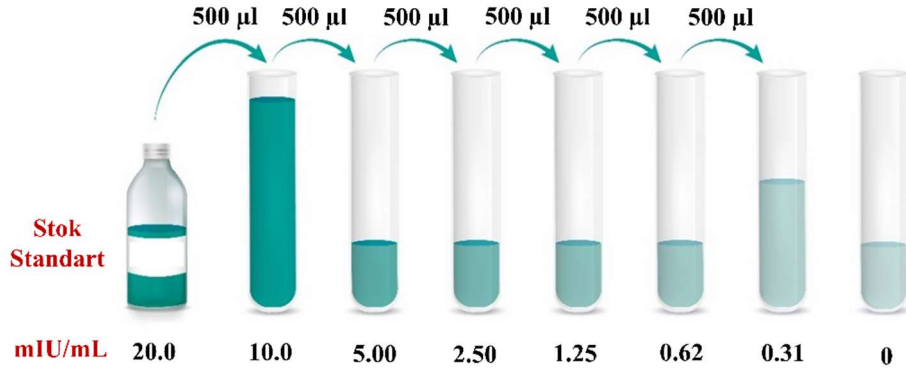
3.8. Deneyin Sonlandırılması ve Dokuların Toplanması

İnfüzyon süresi sona ermeden 10 saat önce tüm gruplardaki hayvanların yemleri kafeslerinden alınarak sıçanlar aç bırakıldı. Sonrasında hayvanlar anestezi/trankilizan altında dekapite edildi. Kan, yağ (beyaz ve kahverengi yağ doku intraskapular bölgeden), kas (biceps) ve beyin (hipotalamus) dokuları alındı. Kan örnekleri 3500 rpm'de 10 dk santrifüj (Hettich, Almanya) edilerek serumları ayrıldı. Serumlar hormon ve biyokimyasal analizler yapılncaya kadar derin dondurucuda (-80°C) saklandı. Kas, yağ ve hipotalamus dokuları da Western Blot analizleri yapılncaya kadar -80°C'de muhafaza edilmeye başlandı.

3.9. Analizlerin Yapılması

3.9.1. Serum TSH Düzeyinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi

Serum TSH seviyesini belirlemek için Rat TSH ELISA kiti (USCN Life, Çin; Katalog no: E0463r) kullanıldı. Deneye başlamadan önce kit içinde bulunan 20,0 mIU/ml konsantrasyona sahip standart Şekil 3.8'de belirtildiği gibi seyreltilerek hazırlandı. Referans standartın seyreltildiği distile su sıfır olarak kullanıldı.



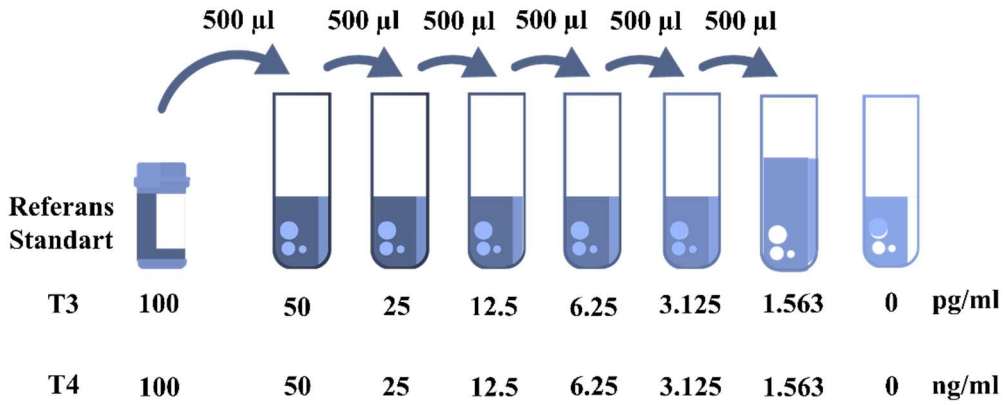
Şekil 3.8. Serum TSH ELISA standart solüsyonunun dilüe edilmesi.

Kit içerisindeki solüsyonlar ve örnekler oda sıcaklığına gelinceye kadar beklendi. Tüm reaktifler pipetlenmeden önce iyice vortekslendi ve serum örneklerindeki TSH düzeyi aşağıdaki basamaklar takip edilerek belirlendi.

- 50 µl standart, kör veya örnek kuyucuklarına eklendi.
- Bütün kuyucuklara 50 µl Ayıraç-1 reaktifi eklendi ve plakanın kapağı kapatılarak 37 °C’de karıştırıcıya yerleştirilerek 1 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası otomatik plaka yıkayıcı kullanılarak her bir kuyucuk yaklaşık 400 µl yıkama solüsyonu konularak 3 defa yıkandı. Her yıkama sonrası kuyucuklar içerisindeki yıkama solüsyonu tamamen boşaltıldı ve son yıkama sonrası plaka temiz bir kağıt havlu üzerine ters çevrilerek kurutuldu.
- Bütün kuyucuklara 100 µl Ayıraç-2 reaktifi eklendi ve plakanın kapağı kapatılarak 37 °C’de karıştırıcıya yerleştirilerek 45 dk inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası 3. basamaktaki gibi her bir kuyucuk 5 defa yıkandı.
- Her kuyucuğa 90 µl substrat çözeltisi eklendi ve plaka kapağı kapatılarak karanlık bir ortamda inkübe edildi (37 °C’de 15-30 dk).
- İnkübasyon sonrası her bir kuyucuğa 50 µl durdurma çözeltisi eklendi ve plaka hafifçe çalkalandı.
- Son olarak plaka 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında okundu. Sonuçlar mIU/ml olarak ifade edildi.

3.9.2. Serum T3 ve T4 Seviyelerinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi

Serum örneklerindeki serbest T3 ve T4 seviyeleri, T3 ve T4 ELISA kitleri (Elabscience, Çin; Katalog no: E-EL-R1097 ve E-EL-R0390) kullanılarak belirlendi. Her iki kit içerisindeki stok solüsyonlar Şekil 3.9’de gösterildiği gibi distile su ile seyreltilerek hazırlandı. Referans standardın seyreltildiği distile su sıfır olarak kullanıldı.



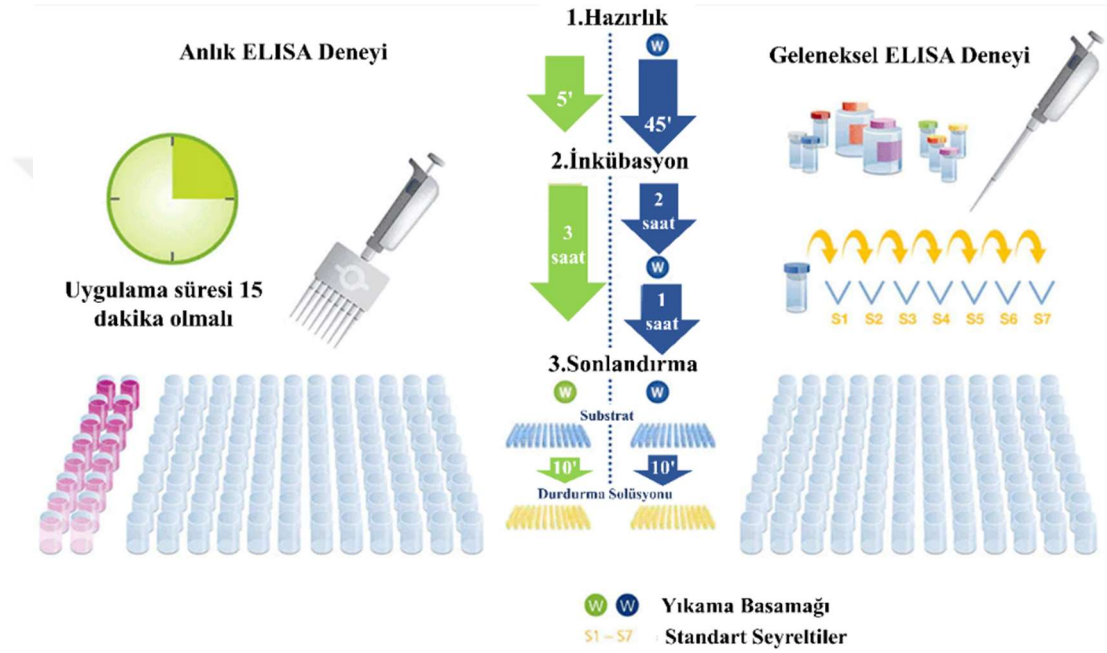
Şekil 3.9. Serum T3 ve T4 ELISA kit standardının dilüe edilmesi.

Örnekler ve reaktifler oda sıcaklığına gelinceye kadar beklendi. Tüm reaktifler pipetlenmeden önce iyice karıştırıldı ve serum örnekleri vortekslendi. Örneklerdeki T3 ve T4 düzeyi aşağıdaki basamaklar takip edilerek belirlendi.

- 50 µl standart, kör veya örnek kuyucuklarına eklendi. Kör kuyucuğuna standardın seyreltildiği distile su ilave edildi. Sonrasında bütün kuyucuklara 50 µl biyotinize edilmiş algılama reaktifi eklendi ve plakanın kapağı kapatılarak 37 °C’de karıştırıcıya yerleştirilerek 45 dk inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası otomatik plaka yıkayıcı kullanılarak her bir kuyucuk yaklaşık 350 µl yıkama solüsyonu konularak 3 defa yıkandı. Her yıkama sonrası kuyucuklar içerisindeki yıkama solüsyonu tamamen boşaltıldı ve son yıkama sonrası plaka temiz bir kağıt havlu üzerine ters çevrilerek kurutuldu.
- Bütün kuyucuklara 100 µl HRP konjugat çalışma solüsyonu eklendi ve plakanın kapağı kapatılarak 37 °C’de karıştırıcıya yerleştirilerek 30 dk inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası 2. basamaktaki gibi her bir kuyucuk 5 defa yıkandı.

- Her kuyucuğa 90 µl substrat çözeltisi eklendi ve plaka kapağı kapatılarak 37 °C’de 15 dk etüv içerisinde inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası her bir kuyucuğa 50 µl durdurma çözeltisi eklendi ve plaka hafifçe çalkalandı.
- Son olarak plaka 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında okundu.

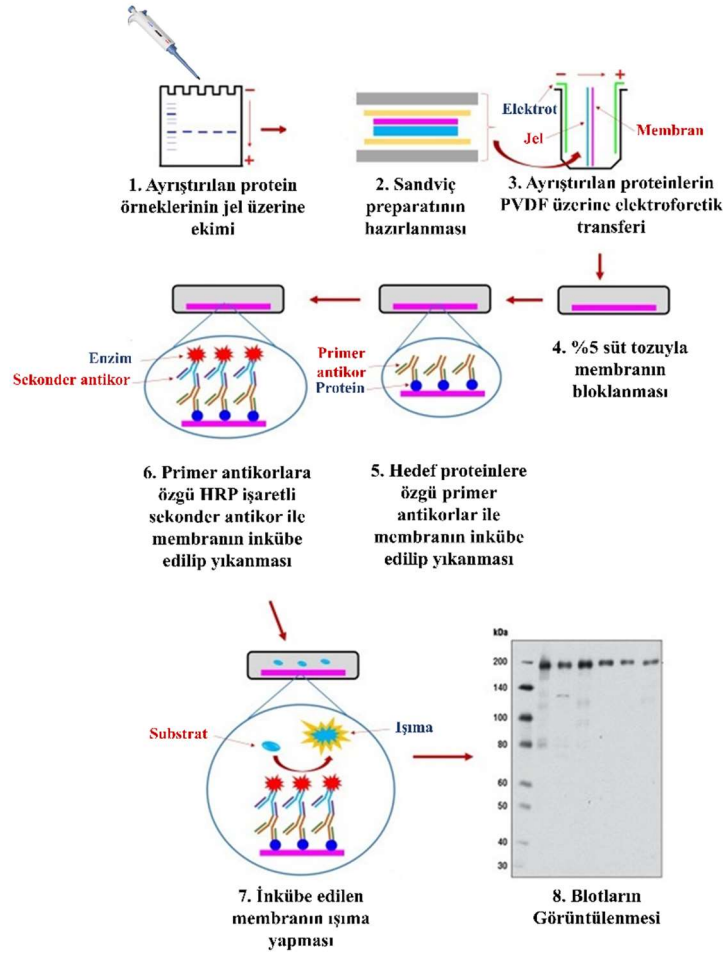
ELISA analizlerinin genel deney protokolü Şekil 3.10’da gösterilmiştir.



Şekil 3.10. Genel ELISA protokolü.

3.9.3. Western Blot Analizi

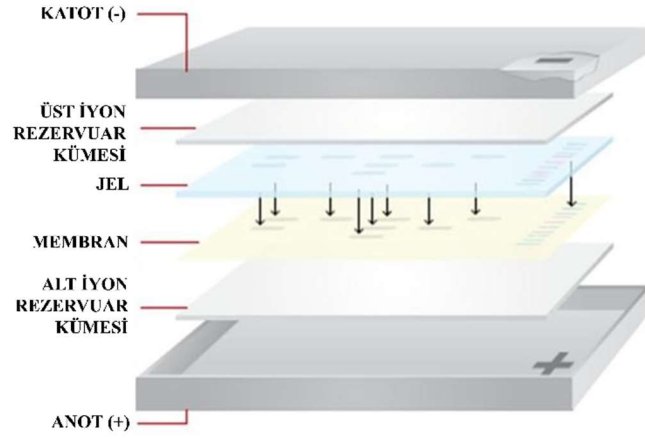
Western Blot analizleri Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı. Sıçanların hipotalamus dokularından TRH, beyaz ve kahverengi yağ dokularında UCP1 ile UCP3, kas dokularında ise UCP3 protein seviyeleri Western Blot analizleri ile belirlendi. Yapılan Western Blot analizinin genel prosedürü Şekil 3.11’de gösterilmiştir.



Şekil 3.11. Western Blot analizine genel bakış.

Alınan doku örnekleri RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, %0.1 Triton X-100, %0.5 Sodyum deoksikolat, %0.1 SDS, 1 mM Sodyum ortovanadat, 1 mM NaF, cOmplete™ Proteaz inhibitör tablet; Roche) içerisinde homojenatörde (QIAGEN TissueLyser LT, Almanya) parçalandı ve buz üzerinde 30 dk inkübe edildi. Lizis sonrası 3 defa 10 sn sonikasyon yapıldı (Q125, QSonica, USA). Tüpler 4°C sıcaklıkta 15000 rpm'de 30 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant yeni tüplere alındı ve örneklerin protein düzeyleri BCA Protein ölçüm kiti (Biorbyt, İngiltere) kullanılarak belirlendi.

Çalışmada %15 SDS jeller kullanıldı ve her kuyucuğa eşit miktarda protein örneği (20 µg) yükledi. Jeller 10 dk 100 V'da daha sonra 70 dk 200 V'da yürütüldü. Elektroforez sonrası Trans-Blot Turbo RTA transfer kiti (Katalog No: 1704272, BioRad, ABD) kullanılarak 0.22 µm PVDF membranlara proteinler transfer edildi (TransBlot Turbo, BioRad, ABD) (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Western Blot için hazırlanan sandviçin yapısı.

Membran oda sıcaklığında 1 saat %5'lik süt tozuyla bloklandı ve sonra geceboyu 4 °C'de primer antikorla (UCP3, NBP2-24608, Novus Biologicals; UCP2, sc-390189, Santa-Cruz Biotechnology; UCP1, sc-293418, Santa-Cruz Biotechnology; β -actin, sc-81178 Santa-Cruz Biotechnology) inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, membranlar TBS-T ile yıkandı ve oda sıcaklığında 1 saat HRP ile konjüge edilmiş ikincil antikor (anti-mouse seconder antibody; sc-516102, Santa-Cruz Biotechnology; anti-rabbit seconder antibody; 7074, Cell Signaling) uygulandı. Son olarak, ECL solüsyonu (Clarity ECL Western Blotting Substrate, BioRad, ABD) ile muamele edilen membranlar, Fusion FX-7 (Vilber, Almanya) sisteminde görüntülendi. Blotların analizi Image J programında analiz edildi. Yükleme kontrolü olarak insan anti- β -aktin antikorunu kullanıldı (114, 115).

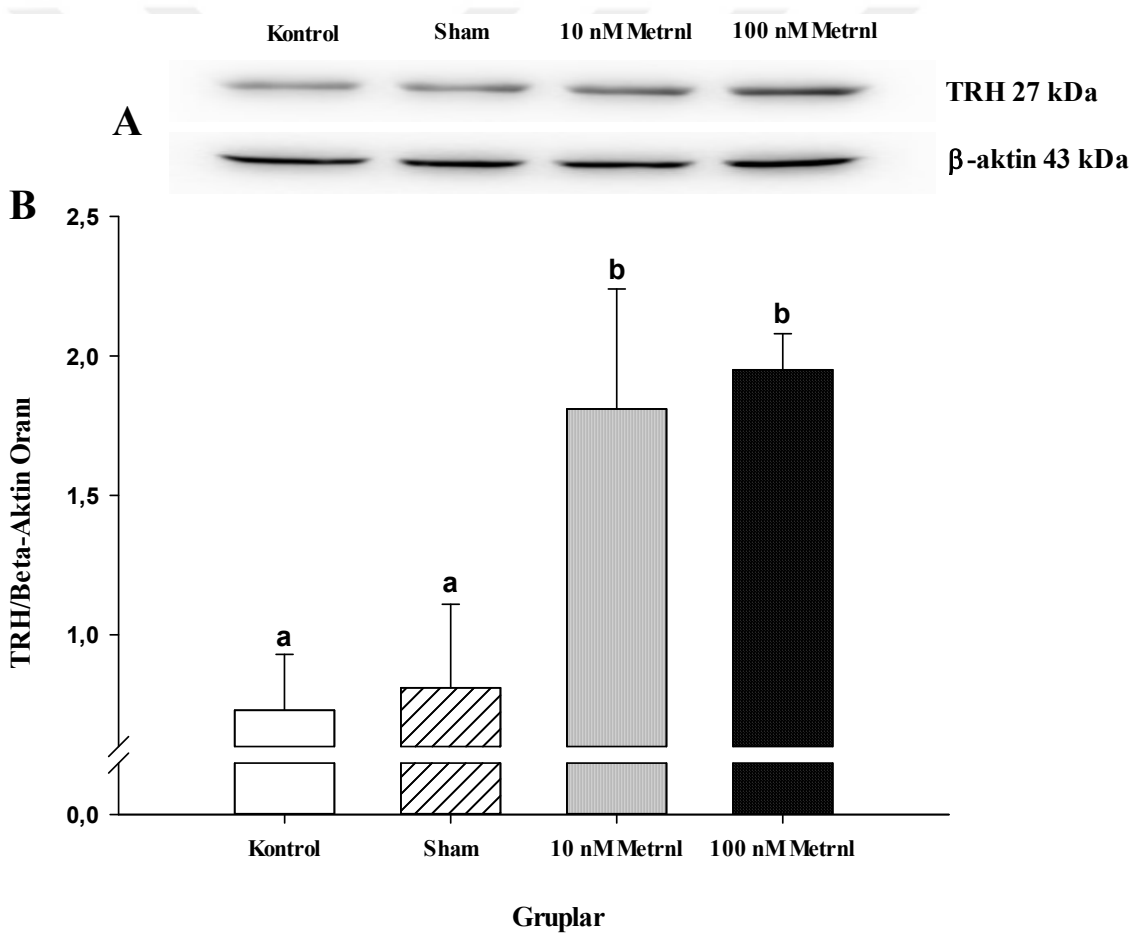
3.10. Verilerin İstatistiksel Analizi

Analizlerde IBM SPSS Statistics 24.0 for Windows paket programı kullanıldı. Normal dağılıma uygunluk Shapiro Wilk testi ile incelendi. Nicel değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılmalarında Kruskal Wallis H testi kullanıldı. Önemli farklılık belirlendiğinde çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile gerçekleştirildi. Nicel veriler ortamala değer \pm standart sapma ile özetlendi. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Metrnl'nin TRH Protein İfade Düzeyi Üzerine Etkisi

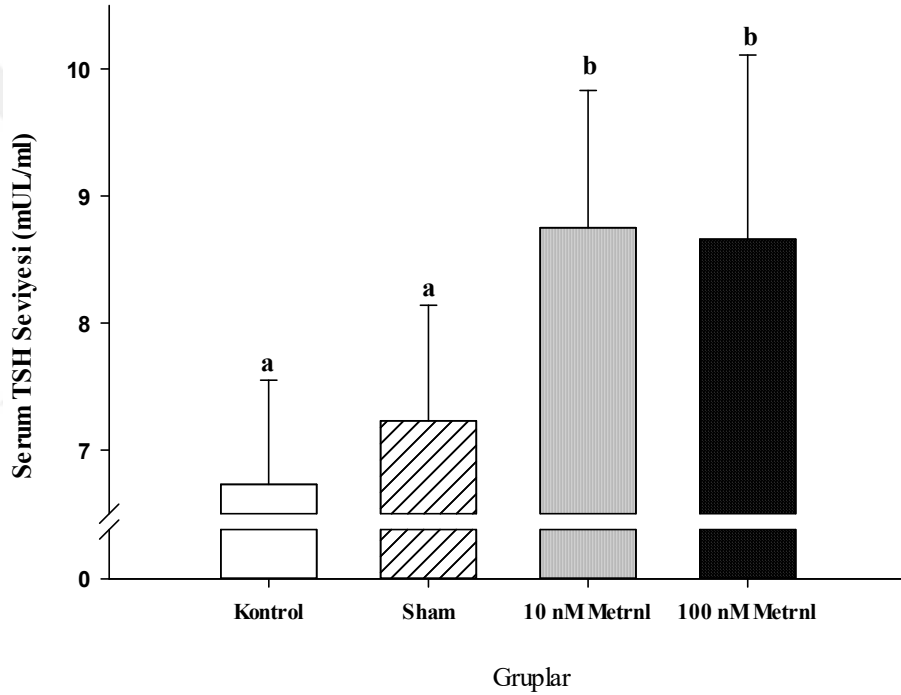
İcv olarak uygulanan Metrnl'nin hipotalamustaki TRH protein seviyesi üzerine etkileri Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, TRH protein seviyeleri bakımından kontrol ve sham grupları arasında önemli bir farklılık olmadığı ($p>0.05$) ancak Metrnl uygulanan her iki grubun (10 ve 100 nM) kontrol ve sham gruplarına kıyasla TRH protein düzeyini artırdığı ($p<0.05$), meydana gelen bu artışın ise doz bağımlı olmadığı belirlendi.



Şekil 4.1. Metrnl'nin hipotalamus TRH protein düzeyi üzerine etkisinin Western Blot jel görüntüsü (A) ve TRH bantlarının densimetrik analizinin gösterilmesi (B). (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. a ve b birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir, $a,bp<0.05$).

4.2. Metrnl'nin Serum TSH İfade Düzeyi Üzerine Etkisi

Şıçanlara İcv olarak uygulanan Metrnl'nin serum TSH seviyesi üzerine etkileri Şekil 4.2'de sunulmuştur. Serum TSH seviyeleri açısından gruplar karşılaştırıldığında kontrol ve sham gruplarının serum TSH seviyelerinin benzer olduğu ($p>0.05$) öte yandan Metrnl (10 ve 100 nM) uygulanan gruplarda serum TSH seviyelerinin kontrol ve sham gruplarına kıyasla yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$). Ayrıca yapılan istatistiksel analizler sonucu, serum TSH düzeyi bakımından, Metrnl infüzyonu yapılan gruplar arasında farklılık olmadığı tespit edildi ($p>0.05$).

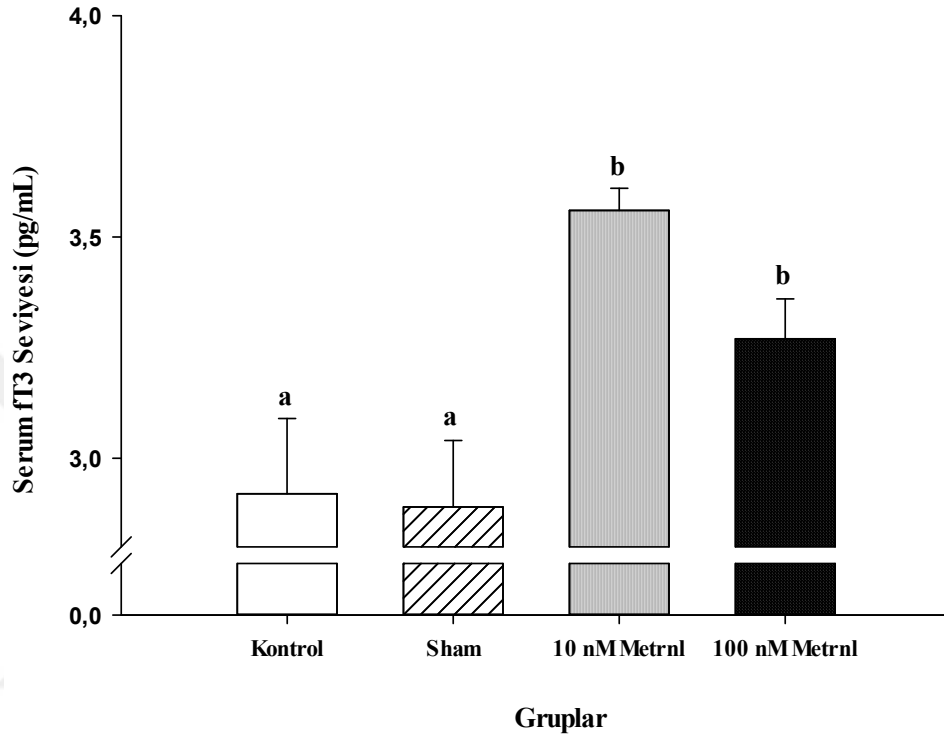


Şekil 4.2. Metrnl'nin serum TSH ifade düzeyi üzerine etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. a ve b birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir, $a,bp<0.05$).

4.3. Metrnl'nin Serum T3 ve T4 İfade Düzeyleri Üzerine Etkisi

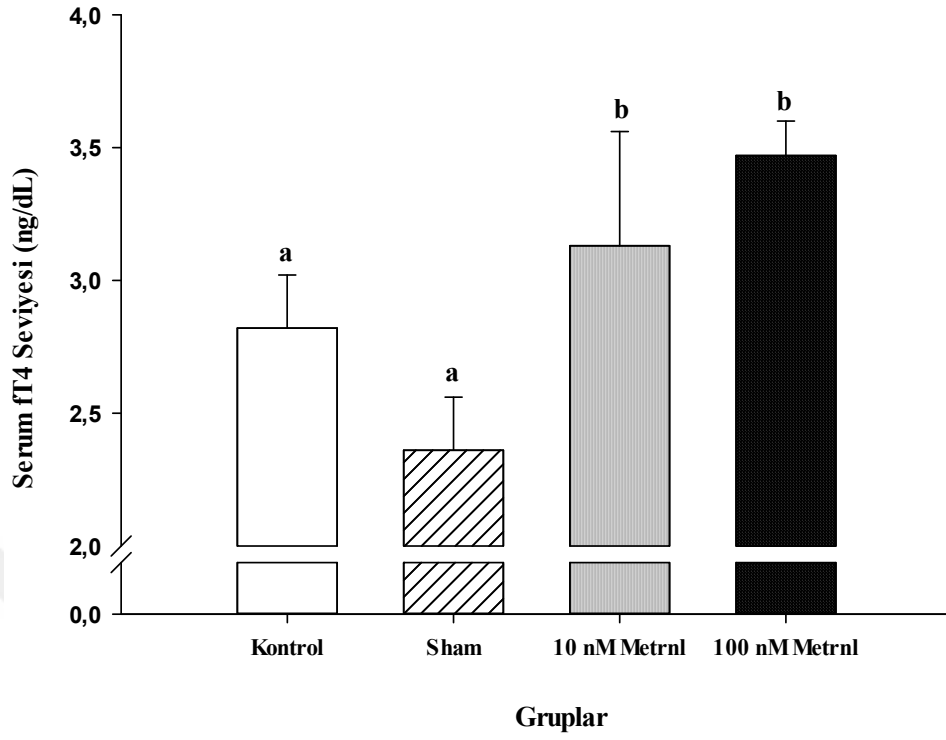
Metrnl'nin icv olarak uygulanması sonucunda serum T3 seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4.3'te verilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, kontrol ve sham grupları arasında serum T3 seviyeleri bakımından herhangi bir farklılık

olmadığı ($p>0.05$) fakat 10 ve 100 nM Metrnl uygulamasının kontrol ve sham gruplarına kıyasla serum T3 seviyesini artırdığı ($p<0.05$), 10 nM Metrnl uygulanan grupta 100nM Metrnl uygulanan gruba kıyasla serum T3 düzeyi yüksek olarak tespit edilmesine rağmen, bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$)



Şekil 4.3. Metrnl'nin serum T3 ifade düzeyi üzerine etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. a ve b birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir, $a,bp<0.05$)

İcv şeklinde uygulanan Metrnl'nin serum T4 seviyesi üzerine etkileri Şekil 4.4'te sunulmuştur. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, kontrol ve sham grupları arasında serum T4 seviyeleri bakımından herhangi bir farklılık olmadığı ($p>0.05$) tespit edilirken 10 ve 100 nM uygulanan Metrnl'nin kontrol ve sham gruplarına kıyasla serum T4 seviyesini artırdığı ($p<0.05$), Serum T4 düzeyi açısından Metrnl uygulanan gruplar kıyaslandığında ise 100 nM Metrnl uygulanan grupta 10 nM Metrnl uygulanan gruba kıyasla serum T4 seviyesinde kısmi artış meydana geldiği ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$).

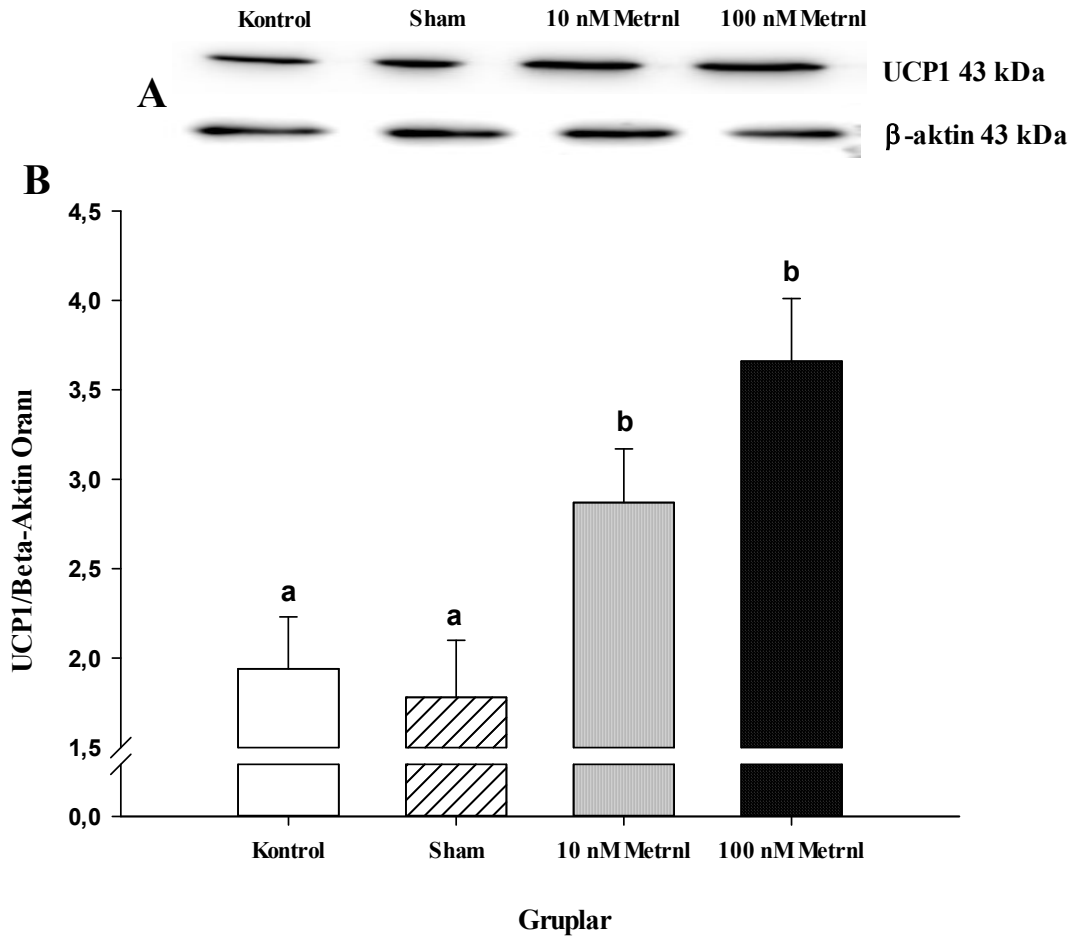


Şekil 4.4. Metrnl'nin serum T4 ifade düzeyi üzerine etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. a ve b birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir, $a,bp<0.05$).

4.4. Metrnl'nin Periferel UCP'lerin Protein İfade Düzeyi Üzerine Etkileri

4.4.1. Metrnl'nin Beyaz Yağ UCP1 Protein İfade Düzeyi Üzerine Etkisi

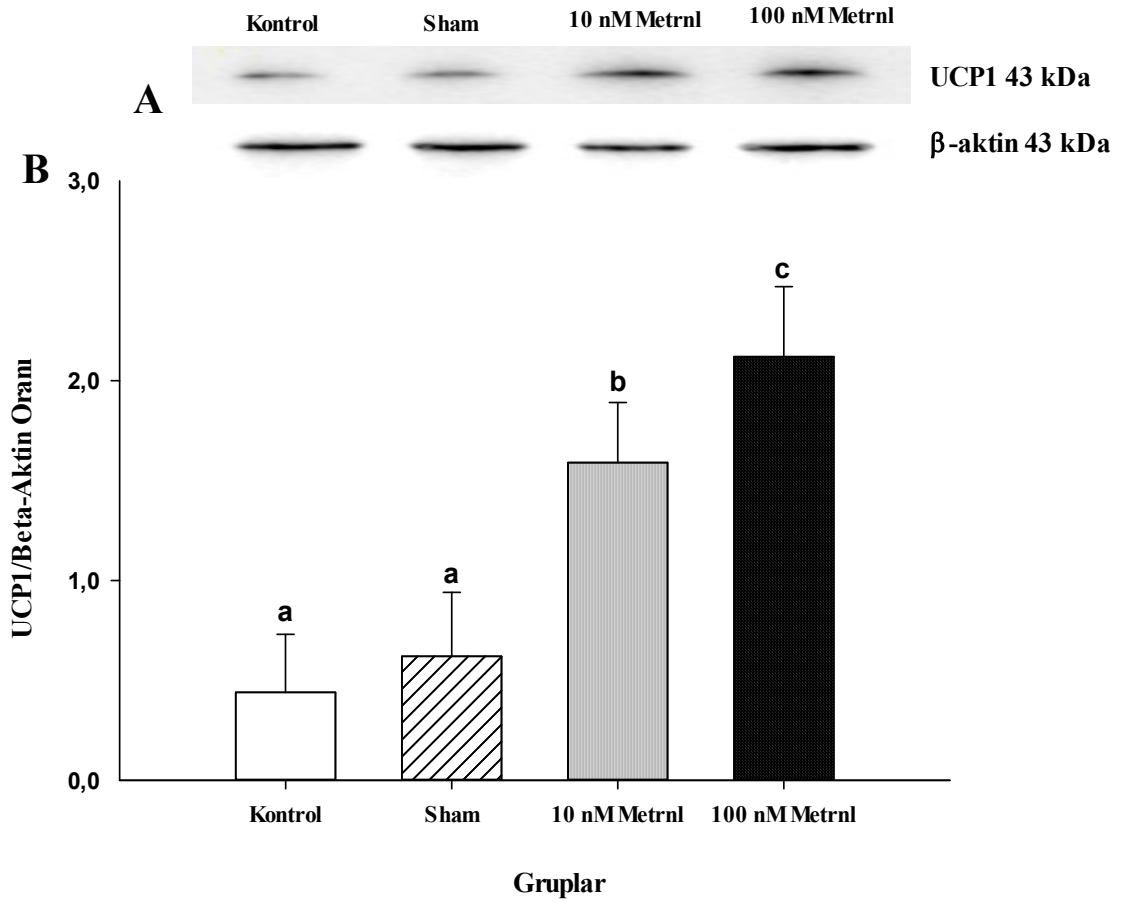
İcv Metrnl infüzyonu sonrasında sıçanların beyaz yağ dokularındaki UCP1 protein ifadesi düzeylerindeki değişiklikler Şekil 4.5'te gösterilmiştir. İcv Metrnl uygulaması UCP1 protein ifadesini 10 ve 100 nM uygulanan gruplarda artırdığı ($p < 0.05$) tespit edilirken 100 nM Metrnl uygulanan gruptaki UCP1 protein seviyesinde 10 nM Metrnl uygulanan gruba kıyasla kısmi bir artışa neden olduğu fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı görüldü ($p > 0.05$).



Şekil 4.5. Metrnl'nin beyaz yağ UCP1 protein ifade düzeyi üzerine etkisinin Western Blot jel görüntüsü (A) ve UCP1 bantlarının densimetrik analizinin gösterilmesi (B). (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. a ve b birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir, $^{a,b}p < 0.05$)

4.4.2. Metrnl'nin Kahverengi Yağ UCP1 Protein İfade Düzeyi Üzerine Etkisi

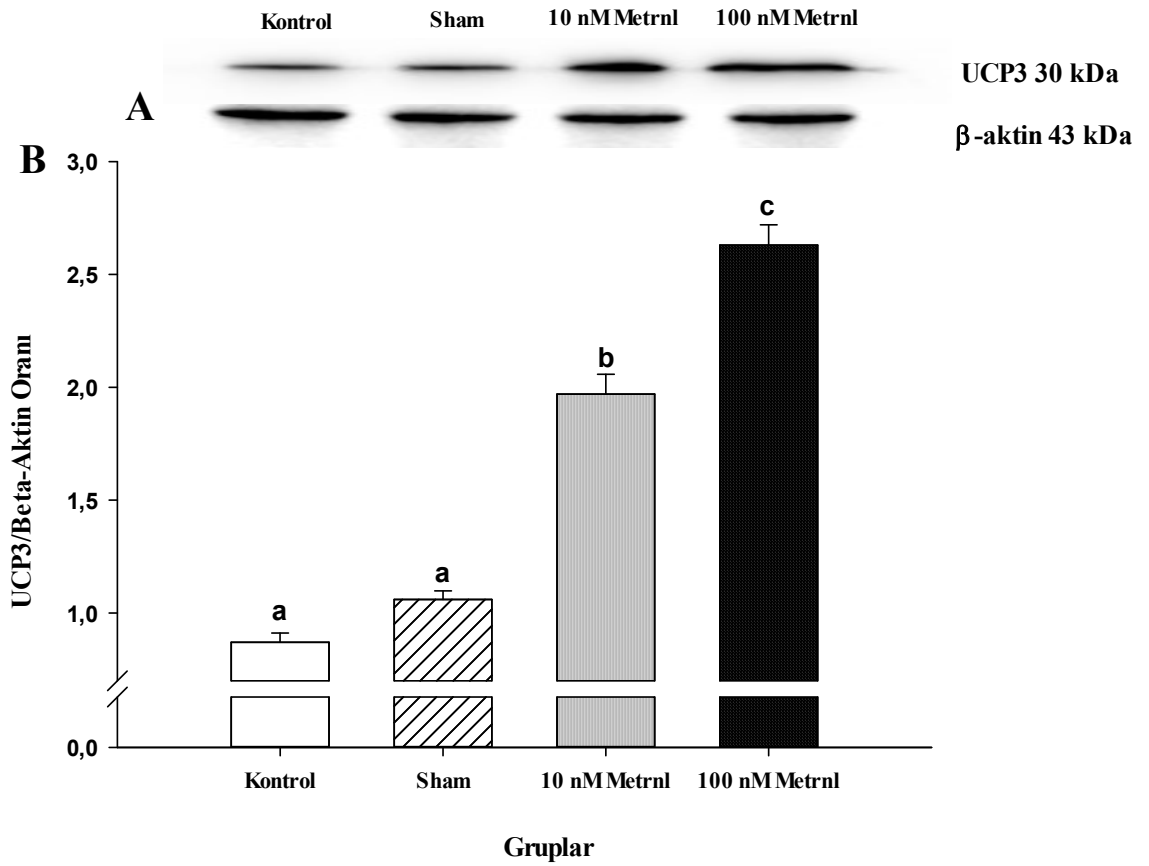
Sıçanlara İcv Metrnl uygulaması sonrasında kahverengi yağ dokusundaki UCP1 protein ifadesi düzeylerindeki değişiklikler Şekil 4.6'da sunulmuştur. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda İcv Metrnl uygulamasının kontrol ve sham grubuna kıyasla 10 ve 100 nM Metrnl uygulanan gruplarda UCP1 protein ifadesini arttırdığı ($p < 0.05$) aynı zamanda 100 nM Metrnl uygulanan grupta UCP1 protein ifadesinin 10 nM Metrnl uygulanan gruba kıyasla doz bağımlı bir artış gösterdiği belirlendi ($p < 0.05$).



Şekil 4.6. Metrnl'nin kahverengi yağ UCP1 protein ifade düzeyi üzerine etkisinin Western Blot jel görüntüsü (A) ve UCP1 bantlarının densimetrik analizinin gösterilmesi (B). (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. a, b ve c birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir, $a,b,c,p < 0.05$).

4.4.3. Metrnl'nin Kas UCP3 Protein İfade Düzeyi Üzerine Etkisi

Metrnl'in santral uygulanması sonrasında sıçanların kas (biceps) dokularındaki UCP3 protein ifadesi düzeylerindeki değişiklikler Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Kas doku UCP3 protein ifade düzeyleri bakımından gruplar karşılaştırıldığında Metrnl uygulanan (10 ve 100 nM) gruplarda kontrol ve sham grubuna kıyasla UCP3 protein ifadesinin artış gösterdiği ($p<0.05$) belirlendi. Ayrıca yapılan istatistiksel analizler sonucunda 100 nM Metrnl uygulanan grupta UCP3 protein seviyesinin 10 nM Metrnl uygulanan gruba kıyasla doz bağımlı bir artış gösterdiği tespit edildi ($p<0.05$).



Şekil 4.7. Metrnl'nin kas UCP3 protein ifade düzeyi üzerine etkisinin Western Blot jel görüntüsü (A) ve UCP3 bantlarının densimetrik analizinin gösterilmesi (B). (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. a,b ve c birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir, $a,b,c,p<0.05$).

5. TARTIŞMA

Hipotalamus, metabolik homeostazis üzerindeki etkilerini büyük ölçekte HHT aksında yer alan hormonlar üzerinden ortaya koymaktadır (8). Bu akstaki endokrin fonksiyonlar TRH, TSH, T3 ve T4 hormonları tarafından yerine getirilmektedir. Hipotalamustan TRH biyosentezi gerçekleştikten sonra, sentezlenen peptid hipofizden TSH sentezini ve salınımını uyarmak üzere akson terminalleri boyunca medyan eminense taşınır ve buradan da hipofizyal portal sistem kapilleri içerisine serbestlenir (9, 10). Ön hipofize ulaşan TRH, hipofiz tirotrop hücre zarındaki reseptörlerine bağlanarak fosfolipaz ikinci haberci sistemini aktive eder ve bu aktivasyonla tirotrop hücrelerde sentezlenen TSH dolaşıma katılır. Dolaşımdaki TSH tiroid bezindeki TSH-R reseptörüne bağlanarak tiroid hormonlarının (T3 ve T4) yapımını ve salgılanmasını düzenler (11). HHT aksının son basamağında salgılanan T3 ve T4 hormonları, vücudun enerji tüketimini, ısı üretimini, vücut ağırlığını ve lipid metabolizmasını düzenlemektedir (12-15). T3 ve T4 hormonları hemen hemen tüm hücrelerdeki kimyasal reaksiyonları hızlandırarak enerji harcanmasını arttırmakta ve aynı zamanda ısı oluşumuna neden olmaktadır. Artmış kimyasal reaksiyonlar alınan enerjinin daha fazla kullanılmasına, yağ olarak depo edilmesinin engellenmesine eşlik etmekte birlikte obezite gelişimini de sınırlandırmaktadır. Özellikle uzun süreli soğuğa maruziyet durumunda metabolizma hızı ile vücut ısısında meydana gelen azalmanın, tiroid hormon salgısındaki artışa bağlı olarak bozulan homeostatik dengenin yeniden kurulduğu bilinmektedir. Tiroid hormonları dokularda enerji kullanımını arttırırken, titremesiz termojenez ile de vücut sıcaklığının düzenlenmesini sağlamaktadır (16). Tiroid hormonları bu titremesiz termojenez üzerindeki aktive edici tarzdaki etkisini büyük ölçekte UCP1 üzerinden ortaya koymaktadır (105).

Tiroid hormonlarının soğuğa adaptasyonda rol aldığını ortaya koyan birçok çalışma mevcuttur. Yapılan çalışmalarla tiroid hormonlarının soğuk iklime uyum sağlamada adrenerjik sistemden sonra en önemli ikinci rolü aldığı belirlenmiştir (116). 52 gün süreyle 6°C sıcaklığa maruz kalmanın kadınlarda tiroid ağırlığı artışına sebep olduğu ve hatta 28. günde en üst seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir (117). Başka bir çalışmada ise erkeklere ip TRH uygulamasının ardından soğuk stres uygulanmasıyla birlikte KYD aktivitesinin artabileceği ortaya çıkarılmıştır (118). Soğuğa maruziyetin tiroid hormonları üzerine etkisinin değerlendirildiği bir başka çalışmada ise 22 ve 7 aylık

sıçanlar soğuk strese maruz bırakılmış ve her iki grupta da serum T3 ve T4 seviyelerinde artış görülmüştür. Bununla birlikte 22 aylık sıçanlardaki artışın 7 aylık sıçanlardaki artışa oranla daha az olduğu tespit edilmiştir (119).

Mevcut literatürde Metrnl'nin de soğukla ilişkilendirildiği çalışmalar bulunmaktadır. Rao ve ark. tarafından Metrnl'nin soğuğa adaptasyondaki rolünün incelendiği çalışmada farelere soğuk stres uygulanmasının ardından dolaşımdaki Metrnl seviyesinin arttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada uzun süreli (24 saat) ve kısa süreli (6 saat) soğuğa maruziyetle birlikte her iki uygulama grubunda da kahverengi, subkutan ve epididimal yağ dokudaki Metrnl mRNA seviyesinin arttığı hatta 6 saat soğuğa maruz bırakılan farelerde önemli bir artış görüldüğü rapor edilmiştir (4). Soğuğa maruziyetle beraber Metrnl ve tiroid hormonlarının dolaşımdaki seviyelerinin artması, soğukla birlikte azalan metabolizma hızının tiroid hormonları ile kompanse edilmesi, tiroidin PGC-1 α ekspresyonunu (120) uyarması, Metrnl'nin ise hem PPAR- γ hem de PGC-1 α ekspresyonunu uyarması (33, 35) Metrnl'nin tiroid hormonları ile enerji metabolizması üzerinde roller üstlenebileceğini akla getirmektedir. Bizim çalışmamızda icv olarak infüzyon şeklinde uygulanan Metrnl'nin HHT aksında görev alan TRH, TSH, T3 ve T4 hormon düzeylerini arttırdığı belirlendi. Bu bulgular; Metrnl'nin henüz bilinmeyen bir fizyolojik yolak üzerinden HHT aksında görev alan hormon salgısını uyarabildiğini göstermektedir. Metrnl uygulamasının bu hormon düzeylerini arttırması, bu peptidin enerji metabolizmasında halen gizemini koruduğu, fizyolojik rollere sahip olabileceğini bizlere düşündürmektedir. Metrnl'nin tiroid hormonları üzerinden tüm vücutta enerji harcanmasında artış meydana getirebileceği düşünülmektedir.

Tiroid hormonları hücresel düzeyde mitokondri ve hücre zarı üzerinden enerji kullanımını ve metabolizma hızını arttırmaktadır. Elektron taşıma zincirini ATP'den ayıran tiroid hormonları mitokondriyal düzeyde metabolik hızı uyarmaktadır (121). Bu fizyolojik süreçte ayırıcı proteinler olan UCP'ler görev almaktadır (99).

UCP'ler mitokondri iç membranında bulunan ve mitokondriyal anyon taşıyıcı ailesinden olan bütünleyici zar proteinleridir. Farklı vücut dokularında dağılım gösteren bu proteinlerin 5 üyesi mevcuttur (122). Protein ailesinin tanımlanan ilk üyesi olan UCP1'in KYD'de; UCP2'nin akciğer, mide, dalak gibi farklı dokularda (123, 124); UCP3'ün iskelet kasında (91, 94), UCP4 ve UCP5'in ise merkezi sinir sisteminde varlığı bilinmektedir (94, 96, 97). UCP1 ve kastaki homologu olan UCP3'ün termojenezde aktif rol aldığı rapor edilmiştir (99). KYD ve kas dokudaki UCP1 ve UCP3 ekspresyonundaki artış alınan enerjinin yakılması olarak kabul edilmektedir (84, 89, 125). Öte yandan

BYD'de bulunan UCP1 de kahverengileşmenin (beyaz yağ dokunun yanması, kahverengi/bej yağ dokuya dönüşmesi) bir ölçüsü olarak kabul edilmektedir (17). Metrn1'nin enerji metabolizmasının düzenlenmesinde efektif roller üstlenmesi bu peptidin UCP'ler ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Tiroid hormonları ve UCP'lerin enerji metabolizmasında ortak hareket ettiğini ortaya koyan çalışmalar mevcut literatürde yer almaktadır. 3T3L1 preadiposit hücre hattındaki termojenezin T3 tarafından düzenlenen tiroid hormon reseptörlerinin çeşitli varyasyonlarıyla AMPK'nın ilişkisini değerlendirmek için yapılan bir çalışmada AMPK ve UCP1 mRNA seviyesinin T3 uygulamasıyla arttığı tespit edilmiş (126). Tiroid hormonlarının enerji metabolizmasındaki etkisi ne kadar karmaşık bir sisteme sahip olsa da UCP1 ve UCP3 ile aracılı mekanizmalarla hareket ettiği bilinmektedir (105). Beyaz yağ dokuda bulunan UCP1 seviyesi ve aktivasyonunun T3 tarafından artırıldığı bildirilmektedir (108). T3 aynı zamanda iskelet kasındaki UCP3 ekspresyonu ve aktivitesini de artırmaktadır (111). Metrn1'nin, HHT aksı hormonları ve periferik UCP'lerle birlikte enerji metabolizmasındaki etkisinin araştırıldığı mevcut bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda icv infüzyon olarak uygulanan Metrn1'nin BYD'de doz bağımlı olmaksızın KYD'de ise doz bağımlı olarak UCP1, kas dokuda ise UCP3 düzeyini yine doz bağımlı olarak artırdığını belirledik. BYD'de UCP1 düzeyindeki artış kahverengi yağ kütleindeki artışa, KYD'deki UCP1 seviyesinde görülen artış ise yağ dokunun depo edilen enerjisinin yakılmasına bir işarettir. Kas dokuda UCP3 düzeyindeki artışla birlikte kas dokudaki glukoz kullanımının artacağını bilmekteyiz. Elde ettiğimiz sonuçta icv infüzyon yoluyla uygulanan Metrn1'nin, BYD ve KYD'de meydana gelen UCP1 düzeyindeki artış ve kas dokuda meydana gelen UCP3 düzeyindeki artışın tüm vücut enerji kullanımının arttıracağını sinyalini vermektedir. Hatta periferik UCP'lerin bu dokulardaki protein seviyesinde görülen artışın temel sebebinin Metrn1'nin, doğrudan veya dolaylı yoldan (HHT aksı hormonlarının seviyelerini artırarak) UCP1 ve UCP3 seviyesini artırmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

KYD'nin enerji denkleminde, enerji harcama tarafını kuvvetlendiren bir mekanizma olan titremeyen termojenezi sağladığı ve bunu da soğuk aracılı termojenezin düzenleyicisi olan periferik UCP'lerle gerçekleştirdiği bilinmektedir (127). Mevcut literatürde periferik UCP'lerin soğuk stres uygulamasıyla birlikte termojenezi indüklendiğini ortaya koyan birçok çalışma vardır. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada 7 gün süresince soğuk stres uygulamasının BYD ve KYD'de UCP1 düzeyini arttırdığı rapor edilmiştir (127). Metrn1'nin de soğuk stres uygulamasıyla birlikte dokulardaki UCP1

düzeşini artırdığına ilişkin çalışmalar bulunmaktadır. Rao ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada Metrnl izotip ve antikorunun ip enjeksiyonunun ardından soğuk stres uygulanmasıyla birlikte her iki grupta da subkutan yağ dokuda UCP1 seviyesi artış gözlenmiş ve özellikle Metrnl izotipi uygulanan gruptaki artışın daha fazla olduğu tespit edilmiştir (4). Mevcut literatür değerlendirildiğinde Metrnl'nin soğuk stres uygulamasıyla birlikte UCP1 seviyesini artırarak enerji homeostazına katkı sağlayabileceğı söylenebilir. Bizim çalışmamızda ise soğuk stres uygulaması olmaksızın icv infüzyon şeklinde uygulanan Metrnl'nin BYD ve KYD'de UCP1; kas dokuda UCP3 protein seviyesinde artış görölmektedir. Sonuçlarımızı var olan çalışmalarla birlikte değerlendirdiğimizde, Metrnl'nin periferal UCP'leri indükleyerek henüz bilinmeyen bir mekanizmayı kullanıp soğuğa maruziyet olmadan da tüm vücut enerji harcanmasını gerçekleştirebileceğini düşünmekteyiz.

Metrnl enerji homeostazı yoluyla metabolik hastalıklar için terapötik potansiyellere sahiptir. Metrnl'nin metabolik hastalıkların tedavisinde kullanılıp kullanılmayacağını araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada subkutan kaynaklı insan adiposit hücrelerine 0, 20, 50, 100 ve 1000 ng/ml olmak üzere 5 doz Metrnl kısa süreli uygulanmış ve UCP1 mRNA seviyesi ölçölmüştür. Uygulama gruplarının hepsinde kontrole kıyasla UCP1 mRNA seviyesinde artış görölmüş ancak yüksek düzeyde bir artış görölmemiştir (128). Bizim çalışmamızda 14 gün süresince icv infüzyon şeklinde uygulanan Metrnl'nin, BYD ve KYD'de UCP1 protein seviyesinde yüksek düzeyde artışa neden olduğu göröldü. Metrnl'in UCP1 seviyesinde meydana getireceğı artışın daha açık bir şekilde görölebilmesi için çalışmamızda olduğu gibi daha uzun süreli uygulanması gerektiğı düşünölmektedir.

Metabolik homeostazda görev alan birçok adipokin ve adipomiyokin yapıllı (129) peptid bulunmaktadır. Metrnl gibi adipomiyokin yapıda olan irisin seviyesindeki orta dereceli artışın BYD kahverengileşmesini, UCP1 ekspresyonu sağlayan PGC-1 α gen ifadesini artırarak destek sağladığı bilinmektedir (17, 130). Tüp mide ameliyatının termojenez sırasında görev alan adipomiyokinler olan Metrnl ve irisin ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada operasyon sonrasında sıçanlarda ağırlıkta azalma ve glukoz homeostazında iyileşme belirtilerinin bu adipomiyokinlerin dolaşımdaki seviyesiyle ilişkili olduğu; Metrnl ve irisinin doku ekspresyonundaki artışın da obezite ve insülin direncini engelleyebileceğı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada mitokondriyal enerji homeostazının düzenlenmesinden sorumlu periferal UCP'ler aracılığıyla da termojenezi iyileştirilebileceğı belirtilmiştir (131). T2DM ve obezitede, Metrnl ve irisinin plazma

seviyesi arasında güçlü bir pozitif korelasyon gösterdiği ortaya konmuştur (132). Mevcut literatür Metrn1 ve metabolik hastalıklarla yakından ilişkili olan irisin arasında olası bir etkileşimin olabileceğini işaret etmektedir.

Çalışma sonuçlarımız mevcut literatürle birlikte ele alındığında Metrn1'nin HHT aksında görev alan hormonların (TRH, TSH, T3 ve T4) seviyesini ve periferik enerji tüketiminin göstergesi olarak kabul edilen yağ doku (beyaz ve kahverengi) UCP1 ve kas doku UCP3 protein ifadelerini artırarak ve enerji metabolizmasını düzenleyebileceğini ortaya koymaktadır. Ancak bu etkileri hangi fizyolojik mekanizmalar üzerinden gösterdiği henüz bilinmemektedir. İlave ve kapsamlı çalışmalar ile Metrn1'nin hücrel etki mekanizmalarının aydınlatılması oldukça önemlidir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız sonucunda sıçanlara uygulanan Metrn1 hormonunun, HHT aksı üzerinde yer alan hormonların ve periferal UCP'lerin düzeylerinde artışa neden olduğunu belirledik. Bulgularımız Metrn1'nin enerji metabolizmasında önemli fizyolojik roller üstlenebilecek bir hormon olduğunu göstermektedir. Metrn1'nin bu fizyolojik rolleri hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleştirdiği henüz aydınlatılmamıştır. İleri düzey ve kapsamlı araştırmalarla birlikte bu mekanizmaların aydınlatılması Metrn1'nin enerji metabolizmasındaki etkilerinin açıklanması açısından büyük önem arz etmektedir. Elde edilen bu bulgular mevcut literatürde yer alan Metrn1'nin insülin direncini ve adipoz inflamasyonunu azaltıcı; lipid metabolizmasını artırıcı etkilerinin olduğunu destekleyici niteliktedir.

Günlük alınan enerjinin harcanandan fazla olduğu durumlarda, bu fazla enerji vücutta yağ olarak depo edilmekte ve artan yağ kitlesine bağlı olarak obezite gelişmektedir. Alınan enerjiyi belirleyen en önemli faktörlerden biri hipotalamusun iştah merkezidir. Metrn1'nin hipotalamik nöronlar (NPY/AgRP, POMC/CART) üzerindeki etkisi ile günlük besin ve kilo değişimi üzerindeki etkileri merak konusudur. Bu alanda literatürde yeterince bilgi yer almamak ile birlikte, bu alanda yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır. Metrn1'nin beslenme ve iştah üzerindeki etkilerinin açıklanması ile birlikte bir sonraki basamakta obezite üzerindeki rolleri araştırılabileceği gibi, bu patofizyolojik süreçteki rollerin tanımlanması obezite ile mücadeleye belki de yeni bir bakış açısı kazandıracaktır.

KAYNAKLAR

1. Jørgensen JR, Fransson A, Fjord-Larsen L, Thompson LH, Houchins JP, Andrade N, Torp M, Kalkkinen N, Andersson E, Lindvall O, Ulfendahl M, Brunak S, Johansen TE, Wahlberg LU. Cometin is a novel neurotrophic factor that promotes neurite outgrowth and neuroblast migration in vitro and supports survival of spiral ganglion neurons in vivo. *Exp Neurol*. 2012, 233(1): 172-81.
2. Zheng SL, Li ZY, Song J, Liu JM, Miao CY. Metrnl: a secreted protein with new emerging functions. *Acta Pharmacol Sin*. 2016, 37(5): 571-9.
3. Kim MS, Pinto SM, Getnet D, Nirujogi RS, Manda SS, Chaerkady R, Madugundu AK, Kelkar DS, Isserlin R, Jain S, Thomas JK, Muthusamy B, Leal-Rojas P, Kumar P, Sahasrabudhe NA, Balakrishnan L, Advani J, George B, Renuse S, Selvan LD, Patil AH, Nanjappa V, Radhakrishnan A, Prasad S, Subbannayya T, Raju R, Kumar M, Sreenivasamurthy SK, Marimuthu A, Sathe GJ, Chavan S, Datta KK, Subbannayya Y, Sahu A, Yelamanchi SD, Jayaram S, Rajagopalan P, Sharma J, Murthy KR, Syed N, Goel R, Khan AA, Ahmad S, Dey G, Mudgal K, Chatterjee A, Huang TC, Zhong J, Wu X, Shaw PG, Freed D, Zahari MS, Mukherjee KK, Shankar S, Mahadevan A, Lam H, Mitchell CJ, Shankar SK, Satishchandra P, Schroeder JT, Sirdeshmukh R, Maitra A, Leach SD, Drake CG, Halushka MK, Prasad TS, Hruban RH, Kerr CL, Bader GD, Iacobuzio-Donahue CA, Gowda H, Pandey A. A draft map of the human proteome. *Nature*. 2014, 509(7502): 575-81.
4. Rao RR, Long JZ, White JP, Svensson KJ, Lou J, Lokurkar I, Jedrychowski MP, Ruas JL, Wrann CD, Lo JC, Camera DM, Lachey J, Gygi S, Seehra J, Hawley JA, Spiegelman BM. Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell*. 2014, 157(6): 1279-91.
5. Li ZY, Song J, Zheng SL, Fan MB, Guan YF, Qu Y, Xu J, Wang P, Miao CY. Adipocyte Metrnl Antagonizes Insulin Resistance Through PPAR γ Signaling. *Diabetes*. 2015, 64(12): 4011-22.
6. Townsend LK, Knuth CM, Wright DC. Cycling our way to fit fat. *Physiol Rep*. 2017, 5(7): e13247.
7. Lee JO, Byun WS, Kang MJ, Han JA, Moon J, Shin MJ, Lee HJ, Chung JH, Lee JS, Son CG, Song KH, Kim TW, Lee ES, Kim HM, Chung CH, Ngoei KRW,

- Ling NXY, Oakhill JS, Galic S, Murray-Segal L, Kemp BE, Kim KM, Lim S, Kim HS. The myokine meteorin-like (metrnl) improves glucose tolerance in both skeletal muscle cells and mice by targeting AMPK α 2. *Febs j.* 2020, 287(10): 2087-104.
8. Joseph-Bravo P, Jaimes-Hoy L, Charli JL. Advances in TRH signaling. *Rev Endocr Metab Disord.* 2016, 17(4): 545-58.
 9. Hall R, Amos J, Garry R, Buxton RL. Thyroid-stimulating hormone response to synthetic thyrotrophin releasing hormone in man. *Br Med J.* 1970, 2(5704): 274-7.
 10. Harris AR, Christianson D, Smith MS, Fang SL, Braverman LE, Vagenakis AG. The physiological role of thyrotropin-releasing hormone in the regulation of thyroid-stimulating hormone and prolactin secretion in the rat. *J Clin Invest.* 1978, 61(2): 441-8.
 11. Zoeller RT, Tan SW, Tyl RW. General background on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. *Crit Rev Toxicol.* 2007, 37(1-2): 11-53.
 12. Zhang J, Lazar MA. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu Rev Physiol.* 2000, 62: 439-66.
 13. Monfared A, Gorti G, Kim D. Microsurgical anatomy of the laryngeal nerves as related to thyroid surgery. *Laryngoscope.* 2002, 112(2): 386-92.
 14. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* 2001, 81(3): 1097-142.
 15. Wrutniak-Cabello C, Casas F, Cabello G. Thyroid hormone action in mitochondria. *J Mol Endocrinol.* 2001, 26(1): 67-77.
 16. Warner A, Rahman A, Solsjö P, Gottschling K, Davis B, Vennström B, Arner A, Mittag J. Inappropriate heat dissipation ignites brown fat thermogenesis in mice with a mutant thyroid hormone receptor α 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013, 110(40): 16241-6.
 17. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Boström EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Højlund K, Gygi SP, Spiegelman BM. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature.* 2012, 481(7382): 463-8.
 18. Erden Y, Tekin S, Kirbag S, Sandal S. Mitochondrial Uncoupling Proteins in the Brain: Their Structure, Function and Physiological Roles [Beyindeki

Mitokondriyal Eşleşme Bozucu Proteinler: Yapısı, İşlevi Ve Fizyolojik Rollerini] *Med Science*. 2015, 4(2): 2289.

19. Sharma BK, Patil M, Satyanarayana A. Negative regulators of brown adipose tissue (BAT)-mediated thermogenesis. *J Cell Physiol*. 2014, 229(12): 1901-7.
20. Ramialison M, Bajoghli B, Aghaallaei N, Ettwiller L, Gaudan S, Wittbrodt B, Czerny T, Wittbrodt J. Rapid identification of PAX2/5/8 direct downstream targets in the otic vesicle by combinatorial use of bioinformatics tools. *Genome Biol*. 2008, 9(10): R145.
21. Surace C, Piazzolla S, Sirleto P, Digilio MC, Roberti MC, Lombardo A, D'Elia G, Tomaiuolo AC, Petrocchi S, Capolino R, El Hachem M, Claps Sepulveda D, Sgura A, Angioni A. Mild ring 17 syndrome shares common phenotypic features irrespective of the chromosomal breakpoints location. *Clin Genet*. 2009, 76(3): 256-62.
22. Chung J, Kubota H, Ozaki Y, Uda S, Kuroda S. Timing-dependent actions of NGF required for cell differentiation. *PLoS One*. 2010, 5(2): e9011.
23. Nishino J, Yamashita K, Hashiguchi H, Fujii H, Shimazaki T, Hamada H. Meteorin: a secreted protein that regulates glial cell differentiation and promotes axonal extension. *Embo j*. 2004, 23(9): 1998-2008.
24. Jørgensen JR, Thompson L, Fjord-Larsen L, Krabbe C, Torp M, Kalkkinen N, Hansen C, Wahlberg L. Characterization of Meteorin--an evolutionary conserved neurotrophic factor. *J Mol Neurosci*. 2009, 39(1-2): 104-16.
25. Bridgewood C, Russell T, Weedon H, Baboolal T, Watad A, Sharif K, Cuthbert R, Wittmann M, Wechalekar M, McGonagle D. The novel cytokine Metrn/IL-41 is elevated in Psoriatic Arthritis synovium and inducible from both entheses and synovial fibroblasts. *Clin Immunol*. 2019, 208: 108253.
26. Ushach I, Arrevillaga-Boni G, Heller GN, Pone E, Hernandez-Ruiz M, Catalan-Dibene J, Hevezi P, Zlotnik A. Meteorin-like/Meteorin- β Is a Novel Immunoregulatory Cytokine Associated with Inflammation. *J Immunol*. 2018, 201(12): 3669-76.
27. Ushach I, Burkhardt AM, Martinez C, Hevezi PA, Gerber PA, Buhren BA, Schrupf H, Valle-Rios R, Vazquez MI, Homey B, Zlotnik A. METEORIN-LIKE is a cytokine associated with barrier tissues and alternatively activated macrophages. *Clin Immunol*. 2015, 156(2): 119-27.

28. Bridgewood C, Alase A, Watad A, Wittmann M, Cuthbert R, McGonagle D. The IL-23p19/EBI3 heterodimeric cytokine termed IL-39 remains a theoretical cytokine in man. *Inflamm Res*. 2019, 68(6): 423-26.
29. Meteorin Like, Glial Cell Differentiation Regulator. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=METRNL>. Son Erişim Tarihi: 20 Aralık 2020.
30. Qi Q, Hu WJ, Zheng SL, Zhang SL, Le YY, Li ZY, Miao CY. Metrnl deficiency decreases blood HDL cholesterol and increases blood triglyceride. *Acta Pharmacol Sin*. 2020, 41(12): 1568-75.
31. Zheng SL, Li ZY, Zhang Z, Wang DS, Xu J, Miao CY. Evaluation of Two Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits for the Detection of Human Circulating Metrnl. *Chem Pharm Bull*. 2018, 66(4): 391-8.
32. Watanabe K, Akimoto Y, Yugi K, Uda S, Chung J, Nakamuta S, Kaibuchi K, Kuroda S. Latent process genes for cell differentiation are common decoders of neurite extension length. *J Cell Sci*. 2012, 125(Pt 9): 2198-211.
33. Jung TW, Lee SH, Kim HC, Bang JS, Abd El-Aty AM, Hacımüftüoğlu A, Shin YK, Jeong JH. METRNL attenuates lipid-induced inflammation and insulin resistance via AMPK or PPAR δ -dependent pathways in skeletal muscle of mice. *Exp Mol Med*. 2018, 50(9): 122.
34. Yao Z, Lin P, Wang C, Wang K, Sun Y. Administration of metrnl delays the onset of diabetes in non-obese diabetic mice. *Endocr J*. 2020.
35. Bae JY. Aerobic Exercise Increases Meteorin-Like Protein in Muscle and Adipose Tissue of Chronic High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Biomed Res Int*. 2018, 2018: 6283932.
36. Wang C, Pan Y, Song J, Sun Y, Li H, Chen L, Hou X. Serum Metrnl Level is Correlated with Insulin Resistance, But Not with β -Cell Function in Type 2 Diabetics. *Med Sci Monit*. 2019, 25: 8968-74.
37. McGee SL, van Denderen BJ, Howlett KF, Mollica J, Schertzer JD, Kemp BE, Hargreaves M. AMP-activated protein kinase regulates GLUT4 transcription by phosphorylating histone deacetylase 5. *Diabetes*. 2008, 57(4): 860-7.
38. Gong W, Liu Y, Wu Z, Wang S, Qiu G, Lin S. Meteorin-Like Shows Unique Expression Pattern in Bone and Its Overexpression Inhibits Osteoblast Differentiation. *PLoS One*. 2016, 11(10): e0164446.

39. Wang W, Liu Y, Hao J, Zheng S, Wen Y, Xiao X, He A, Fan Q, Zhang F, Liu R. Comparative analysis of gene expression profiles of hip articular cartilage between non-traumatic necrosis and osteoarthritis. *Gene*. 2016, 591(1): 43-7.
40. Dadmanesh M, Aghajani H, Fadaei R, Ghorban K. Lower serum levels of Meteorin-like/Subfatin in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus are negatively associated with insulin resistance and inflammatory cytokines. *PLoS One*. 2018, 13(9): e0204180.
41. Chung HS, Hwang SY, Choi JH, Lee HJ, Kim NH, Yoo HJ, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Baik SH, Choi KM. Implications of circulating Meteorin-like (Metrl) level in human subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018, 136: 100-7.
42. Wang R, Hu D, Zhao X, Hu W. Correlation of serum meteorin-like concentrations with diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2020, 169: 108443.
43. Löffler D, Landgraf K, Rockstroh D, Schwartze JT, Dunzendorfer H, Kiess W, Körner A. METRNL decreases during adipogenesis and inhibits adipocyte differentiation leading to adipocyte hypertrophy in humans. *Int J Obes (Lond)*. 2017, 41(1): 112-9.
44. Ganong W, Barrett K, Barman S, Boitano S, Brooks H. *Ganong Medical Physiology*, 24th ed. USA, McGraw-Hill Medical, 2009: 274-86.
45. Ağar E. *İnsan Fizyolojisi*, 1. Baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevleri, 2021: 885-932.
46. Gao Y, Sun T. Molecular regulation of hypothalamic development and physiological functions. *Mol Neurobiol*. 2016, 53(7): 4275-85.
47. Burbidge S, Stewart I, Placzek M. Development of the Neuroendocrine Hypothalamus. *Compr Physiol*. 2016, 6(2): 623-43.
48. Elizondo-Vega R, Cortes-Campos C, Barahona MJ, Oyarce KA, Carril CA, García-Robles MA. The role of tanycytes in hypothalamic glucosensing. *J Cell Mol Med*. 2015, 19(7): 1471-82.
49. Erdem A, Doğan A, Tunalı H. Endokrin. İçinde: *Tıbbi Fizyoloji*, Çavuşoğlu H, Yeğen BÇ, (Çeviri editörleri). Textbook of Medical Physiology, Guyton AC, Hall JE. 13. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2013: 925-63.
50. Joseph-Bravo P, Jaimes-Hoy L, Uribe RM, Charli JL. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: TRH, the first hypophysiotropic releasing

- hormone isolated: control of the pituitary-thyroid axis. *J Endocrinol.* 2015, 226(2): T85-100.
51. Wittmann G, Füzesi T, Singru PS, Liposits Z, Lechan RM, Fekete C. Efferent projections of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons residing in the anterior parvocellular subdivision of the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Comp Neurol.* 2009, 515(3): 313-30.
 52. Lechan RM, Fekete C. The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog Brain Res.* 2006, 153: 209-35.
 53. Boelen A, Wiersinga WM, Fliers E. Fasting-induced changes in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Thyroid.* 2008, 18(2): 123-9.
 54. Lechan RM, Wu P, Jackson IM, Wolf H, Cooperman S, Mandel G, Goodman RH. Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science.* 1986, 231(4734): 159-61.
 55. Fekete C, Lechan RM. Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons: role of neuronal afferents and type 2 deiodinase. *Front Neuroendocrinol.* 2007, 28(2-3): 97-114.
 56. Lechan RM, Wu P, Jackson IM. Immunolocalization of the thyrotropin-releasing hormone prohormone in the rat central nervous system. *Endocrinology.* 1986, 119(3): 1210-6.
 57. Perello M, Friedman T, Paez-Espinosa V, Shen X, Stuart RC, Nillni EA. Thyroid hormones selectively regulate the posttranslational processing of prothyrotropin-releasing hormone in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology.* 2006, 147(6): 2705-16.
 58. Espinosa VP, Ferrini M, Shen X, Lutfy K, Nillni EA, Friedman TC. Cellular colocalization and coregulation between hypothalamic pro-TRH and prohormone convertases in hypothyroidism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007, 292(1): E175-86.
 59. Perez-Castro C, Renner U, Haedo MR, Stalla GK, Arzt E. Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology. *Physiol Rev.* 2012, 92(1): 1-38.
 60. Pituitary Hormones. <https://quizlet.com/215743115/ch-76-pituitary-hormones-flash-cards/>. Son Erişim Tarihi: 26 Ocak 2021.
 61. Morgan PJ, Webster CA, Mercer JG, Ross AW, Hazlerigg DG, MacLean A, Barrett P. The ovine pars tuberalis secretes a factor(s) that regulates gene

- expression in both lactotropic and nonlactotropic pituitary cells. *Endocrinology*. 1996, 137(9): 4018-26.
62. Morgan PJ, Williams LM. The pars tuberalis of the pituitary: a gateway for neuroendocrine output. *Rev Reprod*. 1996, 1(3): 153-61.
63. Lamacz M, Tonon MC, Louiset E, Cazin L, Vaudry H. The intermediate lobe of the pituitary, model of neuroendocrine communication. *Arch Int Physiol Biochim Biophys*. 1991, 99(3): 205-19.
64. Rosso L, Mienville JM. Pituitary modulation of neurohormone output. *Glia*. 2009, 57(3): 235-43.
65. Dracopoli NC, Rettig WJ, Whitfield GK, Darlington GJ, Spengler BA, Biedler JL, Old LJ, Kourides IA. Assignment of the gene for the beta subunit of thyroid-stimulating hormone to the short arm of human chromosome 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986, 83(6): 1822-6.
66. Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Loosfelt H, Atger M, Milgrom E, Berger R. Assignment of the human thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) gene to chromosome 14q31. *Genomics*. 1990, 8(2): 233-6.
67. Erdoğan G. *Tiroid Hormonları, Taşınmaları ve Hücreye Girişleri*, 1. Baskı. İstanbul, Kelebek Matbaacılık, 2001: 150-90.
68. Parthemore JG, Deftos LJ. Calcitonin secretion in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 1978, 47(1): 184-8.
69. Severo JS, Morais JBS, de Freitas TEC, Andrade ALP, Feitosa MM, Fontenelle LC, de Oliveira ARS, Cruz KJC, do Nascimento Marreiro D. The Role of Zinc in Thyroid Hormones Metabolism. *Int J Vitam Nutr Res*. 2019, 89(1-2): 80-8.
70. Dunn JT, Dunn AD. Update on intrathyroidal iodine metabolism. *Thyroid*. 2001, 11(5): 407-14.
71. Pommier J, Tourniaire J, Rahmoun B, Dème D, Pallo D, Bornet H, Nunez J. Thyroid iodine organification defects: a case with lack of thyroglobulin iodination and a case without any peroxidase activity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1976, 42(2): 319-29.
72. Bhagavan N, Ha CE. *Medical Biochemistry*, 2th ed. Boston, Jones and Bartlett, 1992: 450-89 .
73. Field JB, Dekker A, Titus G, Kerins ME, Worden W, Frumess R. In vitro and in vivo refractoriness to thyrotropin stimulation of iodine organification and thyroid hormone secretion. *J Clin Invest*. 1979, 64(1): 265-71.

74. Molina EP. *Endocrine Physiology*, 5th ed. USA, McGraw-Hill Companies, 2004: 88-300.
75. Terry LC. Regulation of thyrotropin secretion by the central epinephrine system. Studies in the chronically cannulated rat. *Neuroendocrinology*. 1986, 42(2): 102-8.
76. Nillni EA, Sevarino KA. The biology of pro-thyrotropin-releasing hormone-derived peptides. *Endocr Rev*. 1999, 20(5): 599-648.
77. O'Shea PJ, Bassett JH, Cheng SY, Williams GR. Characterization of skeletal phenotypes of TRalpha1 and TRbeta mutant mice: implications for tissue thyroid status and T3 target gene expression. *Nucl Recept Signal*. 2006, 4: e011.
78. Sainsbury A, Zhang L. Role of the hypothalamus in the neuroendocrine regulation of body weight and composition during energy deficit. *Obes Rev*. 2012, 13(3): 234-57.
79. McAninch EA, Bianco AC. Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism. *Ann N Y Acad Sci*. 2014, 1311: 77-87.
80. Silva JE. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev*. 2006, 86(2): 435-64.
81. Bianco AC, Maia AL, da Silva WS, Christoffolete MA. Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure. *Biosci Rep*. 2005, 25(3-4): 191-208.
82. Ribeiro MO, Bianco SD, Kaneshige M, Schultz JJ, Cheng SY, Bianco AC, Brent GA. Expression of uncoupling protein 1 in mouse brown adipose tissue is thyroid hormone receptor-beta isoform specific and required for adaptive thermogenesis. *Endocrinology*. 2010, 151(1): 432-40.
83. Rousset S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulicier AM, Bouillaud F, Ricquier D. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes*. 2004, 53: S130-5.
84. Krauss S, Zhang CY, Lowell BB. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005, 6(3): 248-61.
85. Liu J, Li J, Li WJ, Wang CM. The role of uncoupling proteins in diabetes mellitus. *J Diabetes Res*. 2013, 2013: 585897.
86. Brand MD, Esteves TC. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab*. 2005, 2(2): 85-93.
87. Modrianský M, Murdza-Inglis DL, Patel HV, Freeman KB, Garlid KD. Identification by site-directed mutagenesis of three arginines in uncoupling

- protein that are essential for nucleotide binding and inhibition. *J Biol Chem.* 1997, 272(40): 24759-62.
88. Garlid KD, Jaburek M, Jezek P. Mechanism of uncoupling protein action. *Biochem Soc Trans.* 2001, 29(Pt 6): 803-6.
 89. Echtay KS. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic Biol Med.* 2007, 43(10): 1351-71.
 90. Boss O, Muzzin P, Giacobino JP. The uncoupling proteins, a review. *Eur J Endocrinol.* 1998, 139(1): 1-9.
 91. Kim-Han JS, Reichert SA, Quick KL, Dugan LL. BMCP1: a mitochondrial uncoupling protein in neurons which regulates mitochondrial function and oxidant production. *J Neurochem.* 2001, 79(3): 658-68.
 92. Budd SL, Tenneti L, Lishnak T, Lipton SA. Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, 97(11): 6161-6.
 93. Yamasaki H, Sasaki H, Ogawa K, Shono T, Tamura S, Doi A, Sasahara M, Kawashima H, Nakao T, Furuta H, Nishi M, Nanjo K. Uncoupling protein 2 promoter polymorphism -866G/A affects peripheral nerve dysfunction in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2006, 29(4): 888-94.
 94. Hong Y, Fink BD, Dillon JS, Sivitz WI. Effects of adenoviral overexpression of uncoupling protein-2 and -3 on mitochondrial respiration in insulinoma cells. *Endocrinology.* 2001, 142(1): 249-56.
 95. Vincent AM, Brownlee M, Russell JW. Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci.* 2002, 959: 368-83.
 96. Sanchis D, Fleury C, Chomiki N, Gubern M, Huang Q, Neverova M, Grégoire F, Easlick J, Raimbault S, Lévi-Meyrueis C, Miroux B, Collins S, Seldin M, Richard D, Warden C, Bouillaud F, Ricquier D. BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J Biol Chem.* 1998, 273(51): 34611-5.
 97. Mao W, Yu XX, Zhong A, Li W, Brush J, Sherwood SW, Adams SH, Pan G. UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett.* 1999, 443(3): 326-30.
 98. Yu XX, Mao W, Zhong A, Schow P, Brush J, Sherwood SW, Adams SH, Pan G. Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation

- of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation. *Faseb j.* 2000, 14(11): 1611-8.
99. Busiello RA, Savarese S, Lombardi A. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Front Physiol.* 2015, 6: 36.
 100. Cannon B, Shabalina IG, Kramarova TV, Petrovic N, Nedergaard J. Uncoupling proteins: a role in protection against reactive oxygen species--or not? *Biochim Biophys Acta.* 2006, 1757(5-6): 449-58.
 101. Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JM, Kalinovich AV, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep.* 2013, 5(5): 1196-203.
 102. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007, 293(2): E444-52.
 103. Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001, 86(12): 5755-61.
 104. Pelletier P, Gauthier K, Sideleva O, Samarut J, Silva JE. Mice lacking the thyroid hormone receptor-alpha gene spend more energy in thermogenesis, burn more fat, and are less sensitive to high-fat diet-induced obesity. *Endocrinology.* 2008, 149(12): 6471-86.
 105. Lanni A, Moreno M, Lombardi A, Goglia F. Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS Lett.* 2003, 543(1-3): 5-10.
 106. Martinez de Mena R, Scanlan TS, Obregon MJ. The T3 receptor beta1 isoform regulates UCP1 and D2 deiodinase in rat brown adipocytes. *Endocrinology.* 2010, 151(10): 5074-83.
 107. Lee JY, Takahashi N, Yasubuchi M, Kim YI, Hashizaki H, Kim MJ, Sakamoto T, Goto T, Kawada T. Triiodothyronine induces UCP-1 expression and mitochondrial biogenesis in human adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012, 302(2): C463-72.
 108. Silva JE, Rabelo R. Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur J Endocrinol.* 1997, 136(3): 251-64.
 109. Skarulis MC, Celi FS, Mueller E, Zemsanova M, Malek R, Hugendubler L, Cochran C, Solomon J, Chen C, Gorden P. Thyroid hormone induced brown

- adipose tissue and amelioration of diabetes in a patient with extreme insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010, 95(1): 256-62.
110. Sprague JE, Yang X, Sommers J, Gilman TL, Mills EM. Roles of norepinephrine, free Fatty acids, thyroid status, and skeletal muscle uncoupling protein 3 expression in sympathomimetic-induced thermogenesis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007, 320(1): 274-80.
 111. Lanni A, Beneduce L, Lombardi A, Moreno M, Boss O, Muzzin P, Giacobino JP, Goglia F. Expression of uncoupling protein-3 and mitochondrial activity in the transition from hypothyroid to hyperthyroid state in rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* 1999, 444(2-3): 250-4.
 112. Tekin S, Erden Y, Ozyalin F, Onalan EE, Cigremis Y, Colak C, Tekedereli I, Sandal S. Central irisin administration suppresses thyroid hormone production but increases energy consumption in rats. *Neurosci Lett.* 2018, 674: 136-41.
 113. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*, 6th ed. USA, Academic Press, 2007: 25-39.
 114. Tekedereli I, Alpay SN, Tavares CD, Cobanoglu ZE, Kaoud TS, Sahin I, Sood AK, Lopez-Berestein G, Dalby KN, Ozpolat B. Targeted silencing of elongation factor 2 kinase suppresses growth and sensitizes tumors to doxorubicin in an orthotopic model of breast cancer. *PLoS One.* 2012, 7(7): e41171.
 115. Tekedereli I, Alpay SN, Akar U, Yuca E, Ayugo-Rodriguez C, Han HD, Sood AK, Lopez-Berestein G, Ozpolat B. Therapeutic Silencing of Bcl-2 by Systemically Administered siRNA Nanotherapeutics Inhibits Tumor Growth by Autophagy and Apoptosis and Enhances the Efficacy of Chemotherapy in Orthotopic Xenograft Models of ER (-) and ER (+) Breast Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2013, 2(9): e121.
 116. Leblanc J, Pouliot M. Importance of Noradrenaline in Cold Adaptation. *Am J Physiol.* 1964, 207: 853-6.
 117. Maksimov AL, Gorbachev AL. Effect of cold weather training on the thyroid gland and parameters of lipid metabolism in long-term residents of the northeast of Russia. *Fiziol Cheloveka.* 2003, 29(2): 62-6.
 118. Heinen CA, Zhang Z, Klieverik LP, de Wit TC, Poel E, Yaqub M, Boelen A, Kalsbeek A, Bisschop PH, van Trotsenburg ASP, Verberne HJ, Booij J, Fliers E. Effects of intravenous thyrotropin-releasing hormone on (18)F-

- fluorodeoxyglucose uptake in human brown adipose tissue: a randomized controlled trial. *Eur J Endocrinol*. 2018, 179(1): 31-8.
119. Park GC, Kim JM, Park HY, Han JM, Shin SC, Jang JY, Jung D, Kim IJ, Lee JC, Lee BJ. TSH-independent release of thyroid hormones through cold exposure in aging rats. *Oncotarget*. 2017, 8(52): 89431-38.
120. Zhang Y, Ma K, Song S, Elam MB, Cook GA, Park EA. Peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha (PGC-1 alpha) enhances the thyroid hormone induction of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I alpha). *J Biol Chem*. 2004, 279(52): 53963-71.
121. Cioffi F, Senese R, Lanni A, Goglia F. Thyroid hormones and mitochondria: with a brief look at derivatives and analogues. *Mol Cell Endocrinol*. 2013, 379(1-2): 51-61.
122. Slocinska M, Barylski J, Jarmuszkiewicz W. Uncoupling proteins of invertebrates: A review. *IUBMB Life*. 2016, 68(9): 691-9.
123. Nedergaard J, Cannon B. The 'novel' 'uncoupling' proteins UCP2 and UCP3: what do they really do? Pros and cons for suggested functions. *Exp Physiol*. 2003, 88(1): 65-84.
124. Mattiasson G, Sullivan PG. The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics. *Antioxid Redox Signal*. 2006, 8(1-2): 1-38.
125. Gong DW, He Y, Karas M, Reitman M. Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. *J Biol Chem*. 1997, 272(39): 24129-32.
126. Wang CZ, Wei D, Guan MP, Xue YM. Triiodothyronine regulates distribution of thyroid hormone receptors by activating AMP-activated protein kinase in 3T3-L1 adipocytes and induces uncoupling protein-1 expression. *Mol Cell Biochem*. 2014, 393(1-2): 247-54.
127. Roesler A, Kazak L. UCP1-independent thermogenesis. *Biochem J*. 2020, 477(3): 709-25.
128. Tarnopolsky M, Safdar A (patent sahibi). Therapeutic method of treating metabolic disorders patent, US20160151459A1, 2016.
129. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*. 2007, 131(2): 242-56.
130. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt

- WD, Hoeks J, Enerbäck S, Schrauwen P, Spiegelman BM. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012, 150(2): 366-76.
131. Jamal MH, Abu-Farha M, Al-Khaledi G, Al-Sabah S, Ali H, Cherian P, Al-Khairi I, AlOtaibi F, Al-Ali W, Bosso M, Dsouza C, Abubaker J, Al-Mulla F. Effect of sleeve gastrectomy on the expression of meteorin-like (METRNL) and Irisin (FNDC5) in muscle and brown adipose tissue and its impact on uncoupling proteins in diet-induced obesity rats. *Surg Obes Relat Dis*. 2020, 16(12): 1910-8.
132. AlKhairi I, Cherian P, Abu-Farha M, Madhoun AA, Nizam R, Melhem M, Jamal M, Al-Sabah S, Ali H, Tuomilehto J, Al-Mulla F, Abubaker J. Increased Expression of Meteorin-Like Hormone in Type 2 Diabetes and Obesity and Its Association with Irisin. *Cells*. 2019, 8(10): 1283.