



**İNTRASEREBROVENTRİKÜLER MOTS-c  
İNÜZYONUNUN HİPOTALAMUS-HİPOFİZ-  
TİROİD AKSI VE ENERJİ KULLANIMI  
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

**Mehmet Refik BAHAR**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Suat TEKİN**

**Yüksek Lisans Tezi-2020**

T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNTRASEREBROVENTRİKÜLER MOTS-c  
İNfüZYONUNUN HİPOTALAMUS-HİPOFİZ-TİROİD AKSI  
VE ENERJİ KULANIMI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Mehmet Refik BAHAR

Fizyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Suat TEKİN

Bu araştırma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Kurumu (Proje no: 116S744)  
ve İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje no: TYL-2019-2026)  
tarafından desteklenmiştir.

MALATYA  
2020

# 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. MOTS-c.....	3
2.1.1. Keşfi ve Adlandırılması.....	3
2.1.2. Lokalizasyonu ve Biyokimyasal Yapısı.....	3
2.1.3. Etki Mekanizması.....	5
2.1.4. Fizyolojik Etkileri.....	8
2.2. Eşleşme Bozucu (Uncoupling) Proteinler.....	14
2.2.1. Lokalizasyonu ve Görevleri.....	14
2.2.2. Yapısal Özellikleri.....	16
2.2.3. UCP'lerin Fizyolojik Etkileri.....	18
2.3. Merkezi Sinir Sistemi Bölümleri ve Fizyolojik Önemi.....	21
2.3.1. Korteks.....	21
2.3.2. Hipotalamus.....	22
2.3.3. Hipofiz.....	23
2.3.4. Tiroid Hormonları ve Fizyolojik Önemi.....	25
2.3.5. HHT Aksı ve Düzenlenmesi.....	32
2.3.6. Tiroid Hormonlarının Enerji Metabolizmasındaki Etkileri.....	33
3. MATERYAL VE METOD.....	35
3.1. Araştırmanın Yapıldığı Merkez.....	35
3.2. Deney Hayvanlarının Temini.....	35
3.3. Deney Hayvanları ve Grupların Oluşturulması.....	35
3.4. Hayvanların Gruplara Ataması.....	36
3.5. Hazırlık.....	37
3.5.1. Yapay Beyin Omurilik Sıvısının Hazırlanması.....	37
3.5.2. Beyin İnfüzyon Kitinin Hazırlanması.....	38

3.5.3. Sıçanların Operasyona Hazırlanması.....	38
3.6. Hayvanların Stereotaksik Cihaza Yerleştirilmesi ve BİK İmplantasyonu.....	39
3.7. Ozmotik Mini Pompaların Yerleştirilmesi.....	42
3.8. Deneyin Sonlandırılması ve Dokuların Toplanması.....	43
3.9. Analizlerin Yapılması.....	44
3.9.1. Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR).....	44
3.9.2. Western Blot Analizi.....	48
3.9.3. Verilerin İstatistiksel Analizi.....	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. İcv MOTS-c Uygulanmasının Vücut Ağırlığı Üzerine Etkileri.....	51
4.2. İcv MOTS-c Uygulanmasının Yem Tüketimi Üzerine Etkileri.....	52
4.3. İcv MOTS-c Uygulamasının TRH mRNA Seviyeleri Üzerine Etkisi.....	53
4.4. İcv MOTS-c Uygulamasının Serum TSH Seviyeleri Üzerine Etkisi.....	54
4.5. İcv MOTS-c Uygulamasının Serum T3 ve T4 Seviyeleri Üzerine Etkisi.....	55
4.6. İcv MOTS-c Uygulamasının Periferel UCP'lerin mRNA Seviyeleri Üzerindeki Etkileri.....	57
4.6.1. Yağ Doku UCP1 mRNA Seviyeleri Üzerindeki Etkisi.....	57
4.6.2. Kas Doku UCP3 mRNA Seviyeleri Üzerindeki Etkisi.....	59
4.7. İcv MOTS-c Uygulamasının Periferel UCP'lerin Protein Seviyeleri Üzerindeki Etkileri.....	60
4.7.1. Yağ Doku UCP1 Protein Seviyeleri Üzerindeki Etkisi.....	60
4.7.2. Kas Doku UCP3 Protein Seviyeleri Üzerindeki Etkisi.....	62
5. TARTIŞMA.....	63
5.1. MOTS-c'nin Vücut Ağırlığı ve Gıda Alımı Üzerine Etkileri.....	63
5.2. MOTS-c'nin HHT Aksı Üzerindeki Etkisi.....	65
5.3. MOTS-c'nin UCP1 Ve UCP3 Üzerindeki Etkisi.....	66
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	68
KAYNAKLAR.....	69
EKLER.....	81
EK.1. ETİK KURUL KARARI.....	81
EK.2. ÖZGEÇMİŞ.....	82

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmama maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (Proje No: 116S744) ve İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje no: TYL-2019-2026),

Tez araştırmamı destekleyen, katkı ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Suat TEKİN ve ailesine, tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Süleyman SANDAL başta olmak üzere bölümümüzün tüm öğretim üyelerine, Western blot, RT-PZR ve ELISA analizlerinde katkı ve yardımlarını esirgemeyen Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Ebru ETEM ÖNALAN ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Fatma ÖZYALIN'a, tez araştırmamın istatistiksel analizlerinin yapımında katkı ve yardımlarını esirgemeyen İnönü Üniversitesi Tıp Bilişimi ve Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Cemil ÇOLAK'a, tez araştırmamın deneyleri ve yazımı sırasında katkılarından dolayı asistan arkadaşlarım Asiye BEYTUR, Merve DURMUŞ, Dilara ALTAY ÖZTÜRK, Güldeniz ŞEKERCİ, Tuba KESKİN ve Engin KORKMAZ'a,

Hayatım boyunca benden sevgisini ve sabrını esirgemeyen, tüm çabalarımı anlamlı kılan babam Orhan BAHAR başta olmak üzere aileme,

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

**Mehmet Refik BAHAR**

## ÖZET

### İntraserebroventriküler MOTS-c İnfüzyonunun Hipotalamus-Hipofiz-Tiroid Aksı ve Enerji Kullanımı Üzerindeki Etkileri

**Amaç:** MOTS-c 2015 yılında keşfedilmiş, 16 aminoasitli peptit yapılı bir hormondur. Yapılan çalışmalarla MOTS-c'nin obezite ve insülin direncini azalttığı ve hücre metabolizması arttırdığı rapor edilmiştir. Bu çalışma sıçanlara icv MOTS-c infüzyonunun HHT aksı ve enerji kullanımı üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla yapıldı.

**Materyal ve Metot:** 40 adet *Wistar-Albino* cinsi erkek sıçan 4 gruba ayrıldı (n=10). Kontrol grubu dışındaki sıçanların, lateral ventrikülerine 14 gün süresince 5µl/saat (Sham grubuna yBOS, uygulama gruplarına 10 ve 100 µM MOTS-c) infüzyon gerçekleştirildi. Deney süresince sıçanların günlük vücut ağırlığı ve yem tüketimi ölçüldü. Deney sonunda sıçanlar dekapite edilerek hipotalamus, kas, kan ile beyaz ve kahverengi yağ doku örnekleri toplandı. Hipotalamus dokusunda TRH, beyaz ve kahverengi yağ dokuda UCP1, kas (biceps) dokuda ise UCP3 mRNA seviyesi RT-PZR yöntemi ile belirlendi. Western blot analiz yöntemi ile de beyaz ve kahverengi yağ dokuda UCP1, kas dokuda ise UCP3 protein düzeyi belirlendi. Alınan kan örneklerinden ELISA yöntemi kullanılarak serum TSH, T3 ve T4 hormon seviyeleri belirlendi.

**Bulgular:** MOTS-c infüzyonunun sıçanlarda yem tüketimini arttırdığı (p<0.05) vücut ağırlığında ise değişikliğe neden olmadığı belirlendi. MOTS-c infüzyonu sıçanların TRH mRNA düzeyinde değişikliğe neden olmazken, serum TSH, T3 ve T4 hormon seviyesini azalttığı görüldü (p<0.05). Öte yandan MOTS-c'nin sıçanların beyaz ve kahverengi yağ dokularında UCP1, kas dokusunda ise UCP3 mRNA ve protein düzeyini arttırdığı tespit edildi (p<0.05).

**Sonuç:** Bu çalışmanın sonuçları MOTS-c'nin HHT aksında görev alan dokular ile kas ve yağ dokusunda (beyaz ve kahverengi) fizyolojik roller üstlendiğini göstermektedir. Özellikle HHT aksında baskılayıcı tarzda ortaya çıkan etki ile periferel enerji kullanımındaki aktive edici etkilerini hangi fizyolojik yollar üzerinden gösterdiği halen gizemini korumaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** MOTS-c, TRH, TSH, T3, T4, UCP1, UCP3

## ABSTRACT

### Effects of Intracerebroventricular MOTS-c Infusion on Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis and Energy Use

**Aim:** MOTS-c was discovered in 2015 and is a peptide hormone with 16 amino acids. Studies have shown that MOTS-c reduces obesity and insulin resistance and increases cell metabolism. This study was conducted to investigate the effects of icv MOTS-c infusion on HHT axis and energy use in rats.

**Material and Method:** Forty male Wistar-Albino rats were divided into 4 groups (n=10). The rats outside the control group were infused into the lateral ventricles for 5 days/hour (yBOS in the Sham group, 10 and 100  $\mu$ M MOTS-c in the sham group) for 14 days. During the experiment, daily body weight and food consumption of rats were measured. At the end of the experiment, rats were decapitated and hypothalamus, muscle, blood and white and brown fat tissue samples were collected. TRH in hypothalamus tissue, UCP1 in white and brown fat tissue and UCP3 mRNA in muscle (biceps) tissue were determined by RT-PCR method. UCP1 protein level was determined in white and brown fat tissue and UCP3 protein level in muscle tissue by Western blot analysis method. Serum TSH, T3 and T4 hormone levels were determined by ELISA method.

**Results:** It was determined that MOTS-c infusion increased food intake in rats ( $p < 0.05$ ) and did not cause any change in body weight. While MOTS-c infusion did not cause any change in TRH mRNA level, it was seen that it decreased serum TSH, T3 and T4 hormone levels ( $p < 0.05$ ). On the other hand, it was found that MOTS-c increased UCP1 and protein UCP3 mRNA and protein levels in white and brown fat tissues of rats ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The results of this study show that the MOTS-c plays a physiological role in the tissues involved in the HPT axis and muscle and adipose tissue (white and brown). In particular, the suppressive effect on the HPT axis and the physiological pathways it demonstrates its activating effects in the use of peripheral energy remain a mystery.

**Key Words:** MOTS-c, TRH, TSH, T3, T4, UCP1, UCP3

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ADP</b>	: Adenozin difosfat
<b>AMPK</b>	: Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>BCMP1</b>	: Beyin mitokondriyal taşıyıcı protein 1
<b>cDNA</b>	: Komplementer DNA
<b>DIT</b>	: Diiyodotirozin
<b>GABA</b>	: Gamma-aminobitürik asit
<b>GLUT4</b>	: Glukoz taşıyıcı tip 4
<b>HHT</b>	: Hipotalamus-hipofiz-tiroid
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>icv</b>	: İntraserebroventriküler
<b>ip</b>	: İnteraperitoneal
<b>LCFA</b>	: Uzun zincirli yağ asidi
<b>MDP</b>	: Mitokondriyal türevli peptit
<b>MIT</b>	: Monoiyodotirozin
<b>MOTS-c</b>	: Mitokondriyal açık okuma çerçevesi 12S rRNA
<b>mtDNA</b>	: Mitokondriyal DNA
<b>PVDF</b>	: Poliviniliden florür
<b>RT-PZR</b>	: Reel time polimeraz zincir reaksiyonu
<b>SF</b>	: Serum fizyolojik
<b>sORF</b>	: Kısa açık okuma çerçevesi
<b>SSY</b>	: Standart sıçan yemi
<b>T3</b>	: Triiodotironin
<b>T4</b>	: Tiroksin
<b>TGF-β</b>	: Transformik büyüme faktörü-β
<b>TR</b>	: Tiroit hormonu reseptörü
<b>TRH</b>	: Tirotropin salgılatıcı hormon
<b>TSH</b>	: Tirotropin düzenleyici hormon
<b>UCP'ler</b>	: Eşleşme bozucu proteinler
<b>UCP1</b>	: Eşleşme bozucu protein 1
<b>UCP2</b>	: Eşleşme bozucu protein 2



<b>UCP3</b>	: Eşleşme bozucu protein 3
<b>UCP4</b>	: Eşleşme bozucu protein 4
<b>UCP5</b>	: Eşleşme bozucu protein 5
<b>VC</b>	: Vasküler kalsifikasyon
<b>yBOS</b>	: Yapay beyin omurilik sıvısı
<b>YYD</b>	: Yüksek yağlı diyet



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. MOTS-c'nin mitokondriyal translasyonunun şematik gösterimi.....	3
Şekil 2.2. Çoklu peptit serisinin 14 farklı türde hizalanmasının şematik gösterimi (A) ve bu hizalanmadan türetilmiş filogenetik ağaç (B) .....	4
Şekil 2.3. Metiyonin folat döngüsü ve buna bağlı pürin biyosentezinin şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.4. MOTS-c'nin metabolik homeostaza etkisinin şematik gösterimi .....	10
Şekil 2.5. UCP'lerin genel etki mekanizması .....	15
Şekil 2.6. Yenidoğan ölümünün ve metabolik yetişkin hastalıklarının önlenme mekanizması.....	16
Şekil 2.7. UCP'lerin tekrarlı yapısının şematik gösterimi.....	17
Şekil 2.8. UCP3'ün yağ asidi metabolizmasını düzenlemesinin şematik gösterimi .....	19
Şekil 2.9. UCP2'nin insülin sekresyonunu düzenlemesinin şematik gösterimi .....	20
Şekil 2.10. İnsan serebral korteksinde brodman alanlarının şematik gösterimi .....	22
Şekil 2.11. Hipotalamusun organizasyonu. ....	23
Şekil 2.12. Tiroid bezinin konumu. ....	26
Şekil 2.13. Tiroid bezinin mikroskopik görünümü.....	27
Şekil 2.14. Tiroid bezi tarafından iyodür konsantrasyonunun mekanizması .....	28
Şekil 2.15. Tiroid hormon sentezinin biyokimyası.....	30
Şekil 2.16. Hipotalamus-hipofiz-tiroid aksının geribildirim ile düzenlenmesi .....	33
Şekil 3.1. Kanülün beyin infüzyon kitine takılması. ....	38
Şekil 3.2. Sıçanların stereotaksik cihaza sabitlenmesinden sonra kesi bölgesine povidon iyodin sürülmesi (A), kafa derisinin kesilerek (B), kemik dokuya ulaşılması (C) ve bregma noktasının belirlenmesi (D).....	39
Şekil 3.3. Sıçan beyin atlasına göre lateral ventrikül koordinatları.....	40
Şekil 3.4. Lateral ventrikül için delinecek bölgenin işaretlenmesi (A) ve matkapla delinmesi (B).....	41
Şekil 3.5. Beyin infüzyon kitinin delinen kısımdan lateral ventriküle indirilmesi (A), kanül etrafının dış yapıştırıcısıyla yapıştırılması (B) ve kanül başının kesilerek dış yapıştırıcısıyla kaplanması (C, D).....	41
Şekil 3.6. Sıçanların ense derisinde bulunan kanülün tespit edilmesi ve ense derisine açılan kesiden kanül ucunun çıkartılması (A), kanülün kontrolü (B), .....	43

<b>Şekil 3.7.</b> Dokularda RNA izolasyon basamakları .....	46
<b>Şekil 3.8</b> Western Blot analizine genel bakış. ....	49
<b>Şekil 3.9.</b> Western Blot için hazırlanan sandviçin yapısı .....	50
<b>Şekil 4.1.</b> Gruplardaki hayvanların deney süresince (1-28. Günler) ulaştıkları ortalama vücut ağırlıkları .....	51
<b>Şekil 4.2.</b> Gruplardaki hayvanların deney süresince (1-28. Günler) tükettikleri ortalama yem miktarı .....	52
<b>Şekil 4.3.</b> İcv MOTS-c uygulamasının hipotalamus dokularındaki TRH/ $\beta$ -Aktin mRNA oranına etkisi. ....	53
<b>Şekil 4.4.</b> İcv MOTS-c uygulamasının serum TSH seviyesi üzerine etkileri. ....	54
<b>Şekil 4.5.</b> İcv MOTS-c uygulamasının serum T3 seviyesi üzerine etkileri. ....	55
<b>Şekil 4.6.</b> İcv MOTS-c uygulamasının serum T4 seviyesi üzerine etkileri. ....	56
<b>Şekil 4.7.</b> İcv MOTS-c uygulamasının beyaz yağ dokudaki UCP1/ $\beta$ -Aktin mRNA oranına etkisi. ....	57
<b>Şekil 4.8.</b> İcv MOTS-c uygulamasının kahverengi yağ dokudaki UCP1/ $\beta$ -Aktin mRNA oranına etkisi. ....	58
<b>Şekil 4.9.</b> İcv MOTS-c uygulamasının kas dokudaki UCP3/ $\beta$ -Aktin mRNA oranına etkisi. ....	59
<b>Şekil 4.10.</b> İcv MOTS-c uygulamasının beyaz yağ dokusundaki UCP1 protein oranına etkisinin western blot jel görüntüsü (A) ve UCP1 bantlarının densimetrik analizinin gösterilmesi (B). ....	60
<b>Şekil 4.11.</b> İcv MOTS-c uygulamasının kahverengi yağ dokusundaki UCP1 protein oranına etkisinin western blot jel görüntüsü (A) ve UCP1 bantlarının densimetrik analizinin gösterilmesi (B). ....	61
<b>Şekil 4.12.</b> İcv MOTS-c uygulamasının kas dokusundaki UCP3 protein oranına etkisinin western blot jel görüntüsü (A) ve UCP3 bantlarının densimetrik analizinin gösterilmesi (B). ....	62

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b> MOTS-c'nin hücresel metabolitler üzerindeki etkileri.....	6
<b>Tablo 2.2.</b> UCP'lerin homolojisi.....	16
<b>Tablo 2.3.</b> Ön hipofizde yer alan hücre grupları ve salgıladıkları hormonlar.....	25
<b>Tablo 3.1.</b> Grupların bilgisayara dayalı algoritma kullanılarak oluşturulması. ....	37
<b>Tablo 3.2.</b> yBOS için kullanılan bileşikler ve miktarları .....	37
<b>Tablo 3.3.</b> cDNA karışım miktarı. ....	47
<b>Tablo 3.4.</b> cDNA sentezi için uygulanan PZR programı. ....	47
<b>Tablo 3.5.</b> RT-PZR için her bir kuyucuğa konan bileşikler. ....	48
<b>Tablo 3.6.</b> Uygulanan RT-PZR programı (RT-PZR X 40 Döngü). ....	48

## 1. GİRİŞ

Mitokondri hücrede enerji üretilmesinden sorumlu fonksiyonel organeldir. Bununla birlikte son zamanlarda mitokondrinin sinyalizasyon birimi olarak görev yaptığı ileri sürülmekte ve bu alanda yapılan araştırmalar giderek artmaktadır (1). Mitokondriyal DNA (mtDNA)'da kısa açık okuma çerçevesinin (sORF) tanımlanması ile birlikte mtDNA'nın şifrelediği sinyal oluşturan ilk peptit olarak "Humanin" keşfedilmiştir (1-4). Daha sonra Lee ve ark. tarafından 2015 yılında mtDNA'da sORF kaynaklı 16 aminoasitten oluşan bir başka mitokondriyal türevli peptit (MDP) olan mitokondriyal açık okuma çerçevesi 12S rRNA (MOTS-c)'nin keşfi gerçekleştirilmiştir (1).

İlk olarak iskelet kasında saptanan MOTS-c, folat zincirine bağlanıp inhibe eder ve pürin biyosentezini tekrar başlatıp adenosin monofosfat ile aktive olan protein kinaz (AMPK)'ın aktivasyonuna öncülük ederek hücrel aktivitesini gösterir (1). Yapılan çalışmalarda, MOTS-c'nin metabolik homeostazı düzenlerken obezite ve insülin direncini azalttığı rapor edilmiştir (1). Ayrıca yapılan diğer çalışmalar sonucu yaşlanmanın önlenmesindeki etkisi (1, 5-8), tip 2 diyabet tedavisinde kullanılabileceği (5), metabolizma düzenleyici etkileri (5, 6, 9) belirtilmiştir.

Eşleşme bozucu proteinler (UCP'ler), mitokondriyal zar proteinleri olup hücrel enerji üretiminde efektif rol oynamaktadırlar. Bunlardan UCP-1 kahverengi ve beyaz yağ dokuyla, UCP-2 dalak, akciğer ve pankreas ile UCP-3 de kas dokuyla karakterize proteinlerdir. Bu 3 tip UCP homologu, yapı ve işlev açısından ~%60 benzerlik göstermektedir (10). UCP'ler oksidatif fosforilasyon sırasında mitokondri iç zarına taşınarak mitokondriyal proton gradiyentini azaltarak adenosin tri fosfat (ATP) oluşumunu kısmen engellemektedirler (11, 12).

Hipotalamus-hipofiz-tiroid (HHT) aksı, enerji metabolizması üzerinde doğrudan etkili olan tiroid hormonu üretiminde kilit bir nokta özelliği taşımaktadır. Hipotalamik tirotropin salgılatıcı hormon (TRH), tiroid bezinde tiroid hormonunun biyosentezi ve salınımının tüm adımlarını kontrol eden hipofizeal tirotropin düzenleyici hormonun (TSH) sentezini ve salınımını düzenler (13). Tiroksin (T4) ve triiodotironin (T3), TRH ve TSH salınımını negatif geri bildirim aracılığıyla kontrol ederek fizyolojik seviyesini koruyan HHT aksının ana hormonlarıdır (13).

Bu bulgular MOTS-c'nin obezite ve insilün direncini azaltırken enerji metabolizması üzerindeki düzenleyici etkisi ile UCP'ler ve tiroid hormonlarının enerji metabolizmasına etkisi arasında ilişki bulunabileceğini dūřündürmektedir.

Bu alışma sıçanlara intraserebrovenriküler (icv) MOTS-c infüzyonunun HHT aksında görev alan endokrin faktörler ve enerji metabolizmasında önemli fizyolojik roller üstlenen UCP'ler üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla yapıldı.



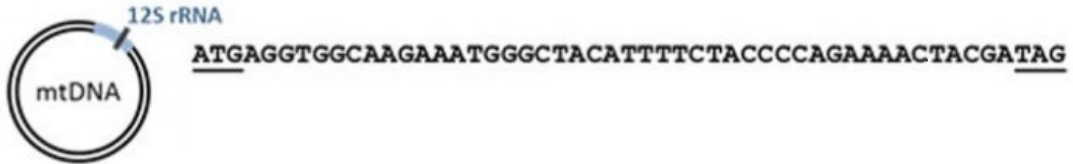
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. MOTS-c

#### 2.1.1. Keşfi ve Adlandırılması

Humanin, mtDNA'da şifrelenen ve sinyalizasyonu sağlayan mitokondriyal türevli peptit ailesinin ilk üyesidir (1-4). Humanin'in varlığı mtDNA'da başka kısa açık okuma çerçevelerinin de olabileceğini düşündürmüştür. mtDNA'da şifrelenen MOTS-c Lee ve ark. tarafından 2015 yılında keşfedilmiştir (1).

İnsan miyeloblastlarının 12S rRNA bölgesiyle eşlenen komplementer DNA (cDNA)'larının interferon ile uyarılması üzerine yapılan bir çalışmada sORF'lar kesin seriler halinde tespit edilmemiştir (14). İnsan 12S rRNA'sındaki potansiyel sORF'ların, bilgisayar ortamında olası modifikasyonlarına dönüştürülmesine bağlı olarak 16 aminoasitlik bir peptit ortaya çıkarılmış ve bu peptit MOTS-c olarak adlandırılmıştır. MOTS-c'nin mitokondriyal translasyonunun şematik gösterimi Şekil 2.1'de sunulmuştur (1).



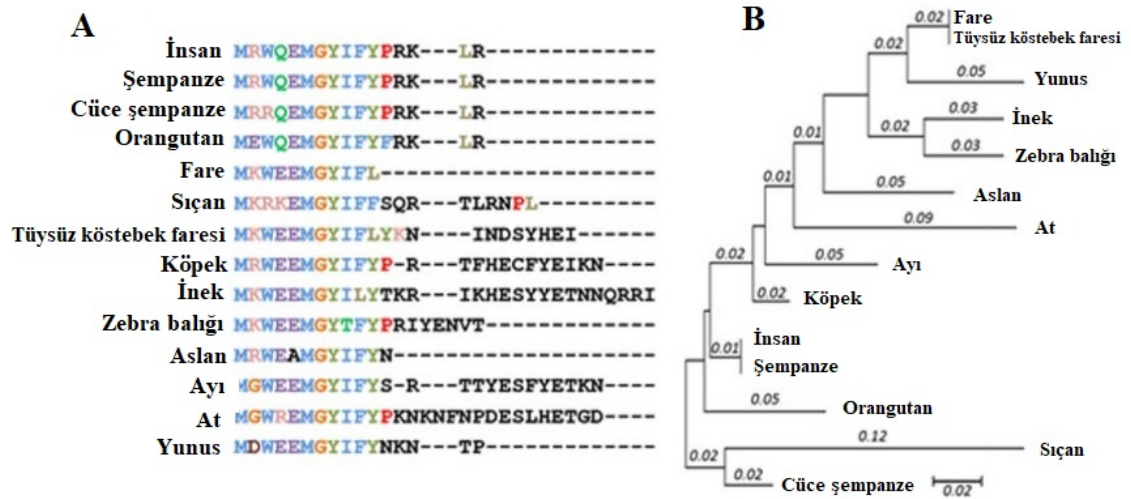
Şekil 2.1. MOTS-c'nin mitokondriyal translasyonunun şematik gösterimi (1).

#### 2.1.2. Lokalizasyonu ve Biyokimyasal Yapısı

MOTS-c'nin ilk olarak iskelet kasında varlığının gösterilmesiyle birlikte enerji duyarlılığı yüksek dokularda da (testis, kalp, beyin gibi) lokalize olabileceği aynı zamanda böbrek, karaciğer, dalak, ince ve kalın bağırsaktaki varlığı da tespit edilmiştir (1). Ayrıca serum ve plazmadaki MOTS-c seviyelerini tespit etmek için yapılan çalışmalarda MOTS-c seviyesinin fare plazmasında ~250 pg/ml, sıçan plazmasında ~310 pg/ml ve insan plazmasında da ~200 pg/ml olduğu rapor edilmiştir (1).

Peptidin translasyonu, standart genetik kod kullanılarak sitoplazmada gerçekleşmektedir. Çünkü mitokondriyal translasyon, mitokondriye özgü genetik kod olan başlatıcı ve durdurucu kodonlar kullanılarak yapılan poliadenilatlanmış transkriptin mitokondri dışına aktarıldığı bildirilmiştir (1). Hem tRNA hem de rRNA'da bulunan mitokondriyal RNA'lar, hala yeterince anlaşılmayan mekanizmalar aracılığıyla mitokondri dışına aktarılmaktadır (15-21).

MOTS-c, Met-Arg-Trp-Gln-Glu-Met-Gly-Tyr-Ile-Phe-Tyr-Pro-Arg-Lys-Leu-Arg'den oluşan moleküler bir yapıya sahip olduğu, pozitif seleksiyon ve rastgele etki olasılığı analizi kullanılarak yapılan çalışmada MOTS-c'nin özellikle ilk 11 aminoasitte yüksek düzeyde korunmuş olduğu (Şekil 2.2A) rapor edilmiştir. Ayrıca farklı canlı türlerine özgü türetilmiş filogenetik ağacın Şekil 2.2B'de sunulduğu gibi olduğu ileri sürülmektedir (1, 22).



**Şekil 2.2.** Çoklu peptit serisinin 14 farklı türde hizalanmasının şematik gösterimi (A) ve bu hizalanmadan türetilmiş filogenetik ağaç (B);(1)

MOTS-c'nin nükleer kaynaklı olabileceği düşünülerek çeşitli veri tabanları üzerinden yapılan çalışmalarda MOTS-c ile benzer sekans yapısına sahip farklı peptitler araştırılmış ancak varsayılan nükleer kaynaklı peptitlerin hiçbirinin, mitokondriyal olarak kodlanmış MOTS-c ile tam bir homoloji göstermediği tespit edilmiştir (1). Bir başka veri tabanının kullanıldığı bir çalışmada, mRNA dizilerinin tümünün mitokondriyal 12S rRNA lokusuna tamamen homolog olduğunu gösteren 101 sonuç tespit edilmiştir. *Rattus norvegicus* türü sıçanların MOTS-c için herhangi bir nükleer



kaynaklı serisinin bulunmaması mtDNA'nın MOTS-c'ye özel bir kaynak olduğunun ilk kanıtlarını ortaya koymaktadır (1). MOTS-c'nin mitokondriyal kökenli olduğunu doğrulamak amacıyla, serviks kanser hattı hücreleri ve insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293) üzerine çalışmalar yapılmış ve MOTS-c için DNA ve RNA düzeyinde mitokondriyal kökenli kanıtlar elde edilmiştir (1).

### 2.1.3. Etki Mekanizması

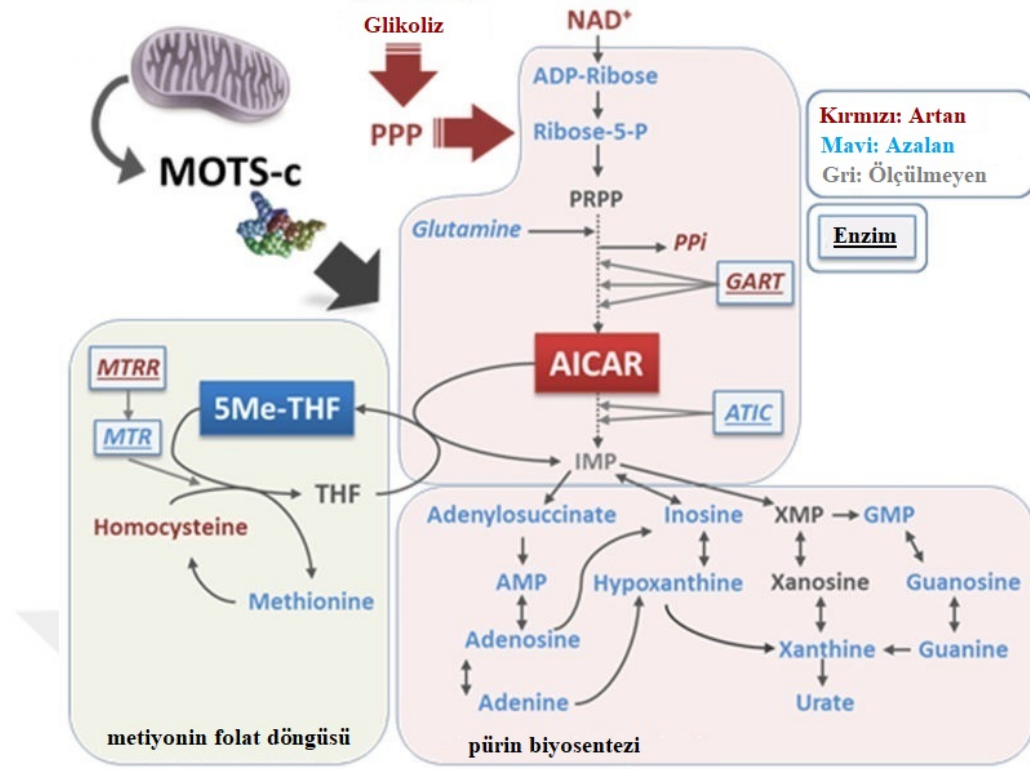
MOTS-c'nin biyolojik olarak aktif bir peptid olduğu, mikroarray analizleri kullanılarak 4 ve 72 saat boyunca MOTS-c uygulanmış HEK293 hücrelerinde yapılan bir çalışma ile ortaya konmuştur (1). MOTS-c uygulamasından 72 saat sonra açık bir gen profili değişimi meydana geldiği yine aynı çalışmada gösterilmiştir. MOTS-c tarafından modifiye edilen fonksiyonel yollar arasındaki farklılıkları belirleyebilmek amacıyla gen parametresi analizi kullanılmış ve 4. ile 72. saatlerde gen işaretleri arasında sadece az bir miktar örtüşme olduğu belirtilmiştir. Bu bulgular MOTS-c uygulamasına verilen hücresel cevabın zamana bağlı olarak ortaya çıktığı fikrini akla getirmektedir. MOTS-c'nin özellikle hücresel metabolizma ve inflamasyonla ilişkili genlerin ekspresyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (1).

MOTS-c'nin hücresel metabolizma üzerindeki etkisi, *in vitro* olarak 24 ve 72 saat boyunca ekzojen olarak sentetik MOTS-c uygulanan HEK293 hücreleri (MOTS-c-ST) kullanılarak incelenmiştir. Tanımlanan 356 metabolitin 194'ü MOTS-c uygulanan HEK293 hücrelerinde önemli ölçüde değişmiş, 49 metabolit 24 saat sonra ve 177 metabolit 72 saat sonra önemli ölçüde değişmiştir (1). Metabolitlerin düzeni de zamanla ilerlemiş ve çoğu metabolit, hem 24 hem de 72 saatte sürekli değişmeye devam etmiştir. MOTS-c-ST hücrelerinde değişen metabolitlerin çoğu, 72 saat boyunca MOTS-c uygulanan hücrelerde bulunan metabolitlerle çakıştığı görülmüştür (1). Her 3 grupta da sürekli değişen metabolitler gözlenmiş; pürin metabolizması ve dipeptid metabolizması ile ilgili olanlar sürekli azalırken, asilkarnitin metabolizması ve metiyonin döngüsü ile ilgili olanlar önemli ölçüde artmıştır (Tablo 2.1).

**Tablo 2.1.** MOTS-c'nin hücrel metabolitler üzerindeki etkileri (1).

	Yolak	Metabolitler
↑	Açilkarnitin	İzobütirikarnitin
		Asetilkarnitin
		Palmitoilkarnitin
		Miristoilkarnitin
	Metiyonin	Betain
	Üre döngüsü, TCA	Prolin
↓	Ketogenez	$\alpha$ -hidroksiizovalerat
	Pürin	İnozin
		2'-deoksinozin
		Fenilalanilserin
	Dipeptit	Valilglisin
		İzolösilglisin
Fenilalanilserin		

Mikroarray analizi metabolomik profillemeyle birleştirilince ve MOTS-c uygulamasının folat-metiyonin döngüsünde yer alan enzimlerin gen ekspresyonu ve pürin biyosentezini 4 saat kadar değiştirdiği tespit edilmiştir (1). MOTS-c-ST hücrelerinde en çok bulunan aktif folat formu olan 5-metil-tetrahidrofolat (5Me-THF), MOTS-c-ST hücrelerindeki metiyonin ve yüksek homosistein seviyelerinde ciddi bir düşüş gözlemlenmiştir (Şekil 2.3). Özellikle, 5Me-THF seviyeleri, MOTS-c-ST hücrelerinde metiyonin ve homosisteindeki değişikliklerden önce azalmıştır. Bu durum folat döngüsünün daha önce gerçekleşmesini öngörmektedir (1). Ayrıca beklendiği gibi, 5Me-THF tükenmesi pürin biyosentezinin blokajı ile birleştirilmiş, endojen 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotit (AICAR)'ın birikiminin, MOTS-c-ST hücrelerinde kontrol hücrelerine kıyasla 20 katın üzerinde olmasına ve pürinlerde beklenen bir düşüşe neden olmuştur (23). Bu aynı zamanda, ekzojen MOTS-c uygulamasından 72 saat sonra daha az oranda gözlenmiştir (1). Pürin biyosentezi, pürin ürünleri tarafından geri bildirim mekanizması ile kontrol edildiğinden, bu veriler öncül metabolitlerinin NAD<sup>+</sup>, glikoliz ve pentoz fosfat yolunun artan seviyeleri ile belirtilen MOTS-c-ST hücrelerinde hızlandırılmış pürin biyosentezini göstermektedir (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** Metiyonin folat döngüsü ve buna bağlı pürin biyosentezinin şematik gösterimi (1).

MOTS-c'nin glikoliz, mitokondriyal fonksiyon ve yağ asidi oksidasyonu dahil ilgili hücrel metabolizma üzerindeki etkisi üzerine yapılan bir araştırmada MOTS-c'nin kültür ortamında artan glukoz klirensi ve laktat birikimi ile hücre içi glukoz seviyeleri ile birlikte diğer glikolitik ara ürünler ile beraber glukoz kullanımını uyardığı gözlenmiştir (1). MOTS-c'nin aşırı eksprese edilmesi, AMPK aktivitesini arttırmakta ve AMPK aktivasyonunun MOTS-c'nin fonksiyonlarını yerine getirmede kısmen aracılık ettiği ileri sürülmektedir (1).

MOTS-c'nin kendi başına mitokondriyal metabolizmayı hedef alıp almadığını test etmek için MOTS-c-ST hücreleri, ana karbon kaynağı olarak glukoz ve galaktoz içeren kültür ortamlarına ayrı ayrı ekilmiştir (1). Memeli hücrelerinde galaktoz, büyük ölçüde mitokondri tarafından metabolize edildiği bilinmektedir (24). MOTS-c, bol glukoz koşulları altında hücrel proliferasyonu azaltmış, ancak galaktoz ortamında kültürlenmiş hücreleri etkilememiştir (1). Azalan oksidatif kapasite, MOTS-c-ST hücrelerinde trikarboksilik asit siklus düzensizliği ile ilişkilendirilmiştir. Bu veriler MOTS-c'nin indüklediği solunum baskılanmasının muhtemelen glukoz alımının artmasına ikinci dereceden etki ettiğini göstermektedir (1).

AICAR-AMPK yoluğı lipit metabolizmasını arttırdığından dolayı MOTS-c'nin yağ asidi metabolizması üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada MOTS-c-ST hücreleri, kontrol hücrelerine kıyasla daha yüksek seviyelerde karnitin mekiği, azaltılmış esansiyel yağ asidi seviyeleri ve artan  $\beta$ -oksidasyon ürünü mirisitol-CoA seviyeleri kontrol gruplarıyla karşılaştırılmıştır (1). Bu bulgular ayrıca ekzojen MOTS-c uygulanan hücrelerde de görülmüştür. Ayrıca diğer uzun zincirli yağ asitleri, yağ asidi kullanımının artmasına destek olarak önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (1).

#### **2.1.4. Fizyolojik Etkileri**

##### **Hücresel Metabolizmaya Etkisi**

MOTS-c'nin hücresel metabolizma üzerindeki etkisini araştırmak için yapılan bir çalışmada normal bir diyetle beslenmiş erkek farelere akut bir şekilde MOTS-c (5mg/kg/gün) 4 gün süreyle uygulanmıştır. MOTS-c uygulanan farelerde vücut ağırlığında, gıda alımında ve kan glukoz seviyelerinde mtevezadı bir azalma olduğu rapor edilmiştir (1). Obezite ve insülin direncinin patogenezinde rol oynayan dolaşımdaki IL-6 ve TNF $\alpha$  bazal seviyelerinin, MOTS-c uygulması ile önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir (1).

MOTS-c'nin mitokondriyal solunumu ve ATP üretimini iyileştirdiği bilinmektedir (7). MOTS-c'nin mitokondriyal disfonksiyon üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışma da ise ekzojen ve endojen MOTS-c uygulamasının ATP seviyesini ve mitokondriyal solunum düzeyini etkilemediği tespit edilmiştir (25).

##### **İnsülin Duyarlılığına Etkisi**

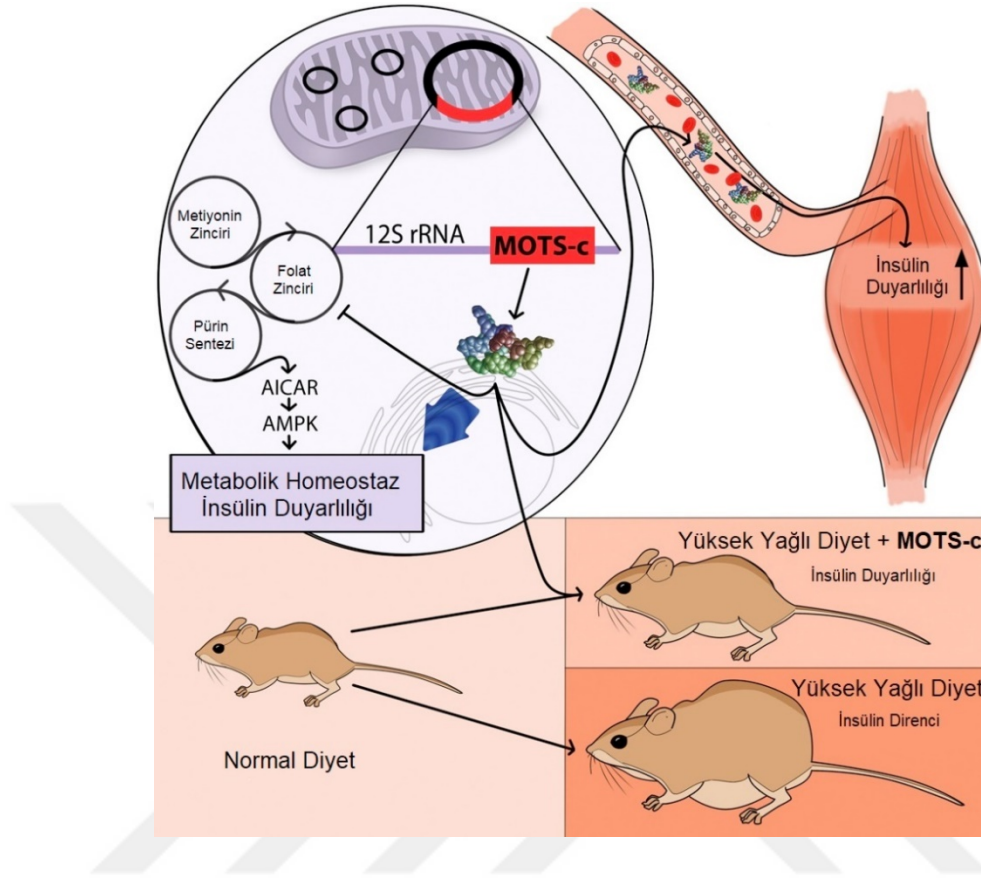
İnsülin, periferel dokulara glukoz alınmasını teşvik eder ve homeostazı korumak için hepatik glukoz üretimini baskılar (26). *In vitro* alışmalarda MOTS-c uygulamasına bağlı olarak hücre içi glukoz girişinin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca *in vivo* denemelerde akut MOTS-c uygulamasının kan glukoz seviyelerini düşürdüğü gösterilmiş ve MOTS-c'nin glukoz kullanımını ve insülin duyarlılığı ile ilgili olaylarda birtakım roller üstlendiği ortaya konmuştur. Fareler üzerinde yapılan bu çalışmada 7 gün süresince intraperitoneal (ip) olarak uygulanan MOTS-c'nin insülin duyarlılığını glukoz klirensini arttırdığı tespit edilmiştir (1).

İskelet kası ve dolaşımdaki MOTS-c seviyeleri, farelerde yaşlanma sırasında insülin direncinin gelişmesiyle birlikte azaldığı ve MOTS-c'nin insülin üzerine etkisinin yaşa bağlı bozuklukları tersine çevirebileceği ortaya konmuştur. İnsülin ile uyarılmış glukoz atılmasının %70-85'inin iskelet kası içinde olduğu göz önüne alındığında, insülin duyarlılığını ve glukoz homeostazını arttırmada MOTS-c'nin önemli fizyolojik roller üstlendiği açıktır (27). Yapılan bir çalışmada yaşlı farelerden alınan kas örneklerinin insüline olan direncinin genç hallerine göre insüline karşı daha fazla dirençli olduğu, dirençte meydana gelen bu artışın 7 günlük MOTS-c uygulaması ile önemli düzeyde ortadan kaldırılabildiği rapor edilmiştir (1).

### **Obezite ve İnsülin Direncine Etkisi**

MOTS-c'nin insülin duyarlılığını ve glukoz homeostazını arttırmadaki rolleri göz önüne alındığında peptidin obezite ile de ilişkili olabileceği düşünülmektedir. MOTS-c'nin obezite ve beslenme üzerindeki etkilerini araştırmak üzere fareler kullanılarak yapılan çalışmada ip olarak uygulanan MOTS-c'nin normal diyetle beslenen farelerde vücut ağırlığı üzerinde bir etkiye sahip olmamasına rağmen, yüksek yağlı diyet (YYD) yemi ile beslenen farelerde şişmanlığı belirgin şekilde önlediği tespit edilmiştir (1). Ayrıca MOTS-c tedavisinin YYD'nin neden olduğu hiperinsülinemiye önlediği, glukoz homeostazında iyileşmeye neden olduğu ve hepatik lipid birikimini büyük ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (1). MOTS-c'nin, YYD ile beslenen farelerin iskelet kaslarında AMPK aktivasyonunu ve glukoz taşıyıcı tip 4 (GLUT4) ekspresyonunu uyardığı belirlenmiş olup elde edilen bu veriler, MOTS-c'nin AMPK aktivasyonu ve GLUT4 ekspresyonu üzerindeki etkilerinin hem *in vivo* hem de *in vitro* denemelerde benzer düzeyde olduğunu göstermektedir. MOTS-c ile yapılan diğer denemelerde farelere ekzojen uygulanan MOTS-c'nin ısı üretimini arttırdığı ve enerji kullanımını artırarak obeziteyi engelleyebileceği ileri sürülmektedir (1).

YYD ile indüklenen fare obezite modelinde MOTS-c uygulamasının insülin duyarlılığını arttırdığı tespit edilmiştir. MOTS-c'nin insülin duyarlılığı üzerindeki etkilerini obez farelerin sfingolipid, monoasilgliserol ve dikarboksilat metabolizmaları üzerindeki negatif rolleri vasıtasıyla gerçekleştirdiği düşünülmektedir (28). Yapılan araştırmalar MOTS-c'nin, ısı üretiminde dahil olmak üzere enerji tüketimini artırarak, glukoz kullanımını ve insülin duyarlılığını iyileştirerek YYD kaynaklı obeziteyi önlediğini ileri sürmektedir (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.** MOTS-c'nin metabolik homeostaza etkisinin şematik gösterimi (1).

Ayrıca Tip 2 diyabetes mellitus hastalarında MDP seviyelerinin saptanmasına yönelik yapılan bir çalışmada sağlıklı, prediyabet ve diyabet gruplarına yapılan biyokimyasal testler sonucu diyabetli gruptaki bireylerin plazma MOTS-c seviyesinin sağlıklı gruptakilere kıyasla düşük olduğu tespit edilmiştir (29).

Polikistik over sendromlu hastalarda yapılan bir çalışmada akut lipit ve insülin uygulanmasının plazma MOTS-c seviyesi ile ilişkisi araştırılmıştır. Bu çalışma sonuçlarına göre lipit uygulaması plazma MOTS-c seviyesini artırırken insülin uygulamasının MOTS-c seviyesinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca lipit uygulaması sonrası artan MOTS-c seviyesinin artan serbest yağ asidinden kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (30).

## **Kemik, Kas ve Adipoz Metabolizmasına Etkisi**

MOTS-c'nin özellikle iskelet kasında lokalize olmasına bağlı olarak kemik dokuya da sinyal gönderebileceği düşünülmektedir. Kemik doku üzerindeki etkilerini belirlemeye yönelik yapılan *in vivo* bir çalışmada MOTS-c uygulamasının osteoklast aktivitesini inhibe ederek kemik kaybını azalttığı rapor edilmiştir (31). İmmün hücreler ve kemik metabolizması üzerindeki etkileri henüz kısmen bilinen MOTS-c'nin; ultra yüksek moleküler ağırlıklı polietilen partikül kaynaklı osteoliz fare modelinde, osteoklastogenezin inhibisyonuna yol açarak kemik erozyonu ve enflamasyonu hafiflettiği de ayrıca rapor edilmiştir (32).

Osteoporoz, birim başına kemik dokusunun azalması ile karakterize metabolik bir kemik lezyonudur. Kemik metabolizması düzenleyicileri arasında, transformik büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) osteojenik farklılaşma sürecinin tamamına katılır. Aynı zamanda bir sitokin olan TGF- $\beta$  çok fonksiyonlu bir proteindir ve hücre çoğalması, farklılaşması, apoptozis ve anjiyogenez ile yakından ilgilidir. Osteojenik farklılaşmanın neden olduğu osteoporoz üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir araştırmada, MOTS-c'nin TGF- $\beta$  yolağına etki ederek osteogenezi düzenlediği gösterilmiştir (33). Bununla birlikte MOTS-c'nin tip-I kollojenlerin sentezini düzenleyerek osteoblast hücrelerinde osteoporozu önlediği yapılan bir başka çalışmada rapor edilmiştir (34).

Bir başka araştırmada farelerde overektominin indüklediği metabolik hastalıklarda MOTS-c'nin olası etkileri araştırılmıştır. Overektomiye bağlı olarak gelişen düşük östrojen seviyeleri yağ birikimini arttırmakta, normal adipoz fonksiyonu bozulmakta ve insülin direncinin geliştiği bilinmektedir. MOTS-c'nin meydana gelen bu bozunmaları kısmen önleyebildiği ve kahverengi yağ doku aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Öte yandan overektominin neden olduğu yağ birikiminin ve beyaz yağ dokusunda enflamatuar invazyonun MOTS-c'ye bağlı olarak azaldığı; bunun da serum ve karaciğer dokularında yağ asidi seviyelerinde azalmayla sonuçlanabileceği bildirilmiştir (32).

Soğuk stres; hipotermiye, bilişsel bozulmaya, karaciğer yaralanmasına ve kardiyovasküler hastalıklara neden olarak morbidite ve mortaliteyi arttırdığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada MOTS-c'nin, soğuğa adaptasyonu kolaylaştırdığı gösterilmiştir. Bir hafta süresince MOTS-C enjeksiyonu yapılan ve soğuk strese maruz bırakılan farelerin serum MOTS-c seviyelerinin azaldığı ve soğuk toleransının arttığı

gözlenmiştir. Aynı çalışmada tüm bunlara ek olarak MOTS-c'nin, kahverengi yağ dokuda UCP1 mRNA seviyesini artırdığı, beyaz yağ dokuda kahverengileşmeyi sağladığı ve termojenik gen ekspresyonunu düzenlediği rapor edilmiştir (35).

### **Yaşlanmaya Etkisi**

Mitokondri, hücre sel yaşlanma sürecinde en önemli aktörlerden birisi olmakla beraber oksidatif hasarın ana hedefi konumunda yer almaktadır (36). Mitokondriyal disfonksiyon yaşlanmaya bağlı mtDNA hasarının birikmesi sonucu yaşlanmanın temel göstergesi olarak kabul edilmektedir (37). Yaşlanmaya bağlı mtDNA'nın hasarlanan bölgesiyle MOTS-c'nin kodlandığı mtDNA bölgesi arasında ilişki bulunduğu Fuku ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada gösterilmiş ve bu genin Kuzeydoğu Asya popülasyonu ile ilişkili olduğu ileri sürülerek Japonların uzun yaşam süresinin bu gen bölgesiyle ilişkili olabileceği belirtilmiştir (38).

Dokso rubisin ve hidrojenperoksit uygulaması sonucu yaşlanma modeli oluşturulan primer insan fibroblast hücrelerinde MDP'lerin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada mitokondriyal solunum seviyeleri, mitokondri sayıları ve MDP düzeyleri belirlenmiştir. Çalışma sonucunda mitokondriyal solunum seviyelerinde, mitokondri sayılarında, Humanin ve MOTS-c seviyelerinde artış tespit edilmiştir (7). Bir başka çalışmada ise MOTS-c ve Humanin'in yaşlanmaya bağlı sekretuar fenotipli yaşlı hücrelerde IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10 ve TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuar sitokinlerin salınımını uyararak sitoprotektif aktivite gösterdiği ileri sürülmektedir (8).

İnsanlarda yaşlanmaya bağlı plazma ve iskelet kasındaki MOTS-c seviyelerinin araştırıldığı bir çalışmada MOTS-c'nin plazmadaki seviyesinin azaldığı buna rağmen iskelet kasındaki seviyesinin arttığı tespit edilmiştir. Bu farklılığın ise plazma MOTS-c seviyesine iskelet kasının etki etmemesinden ya da yaşlanmaya bağlı MOTS-c'nin farmakokinetik etkilerinin değişiminden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (39).

Humaninin, insan retinal epitelyal hücrelerde oksidatif stresin neden olduğu hücre ölümünü engellemesi (40) sonucu yaşlanmaya bağlı sarı nokta hastalığında (Makula dejenerasyonu) mitokondriyal türevli peptitlerin mitokondriyal ve hücre sel aktivite üzerinde olumlu etkilerinin olabileceği ileri sürülmektedir (41).



## **Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi**

Koroner lezyon bulunmayan endotelial disfonksiyon hastalarında dolaşımdaki MOTS-c seviyesinin saptanmasına yönelik yapılan bir çalışmada endotelial disfonksiyonu görülen hastalarda serum MOTS-c seviyelerinin, normal endotelial fonksiyona sahip gruptaki bireylere kıyasla daha düşük olduğu gösterilmiştir. Buna rağmen MOTS-c'nin doğrudan vazoaaktif bir madde olmadığı ileri sürülmektedir (42).

Birçok hastalık oluşumunda yer alan ve henüz tedavisi bulunmayan vasküler kalsifikasyon (VC) üzerinde yapılan çalışmalarda; sıçanlara intraperitoneal olarak 4 hafta süreyle 5 mg/kg MOTS-c uygulamasının nikotin kaynaklı VC'yi anlamlı derecede azalttığı, fosforile edilmiş AMPK seviyesini artırdığı tespit edilmiştir (43). Ayrıca tip 2 diyabetli hastalarda 2 yıl süreyle plazma MOTS-c seviyesi takibinin yapıldığı bir araştırmada düşük MOTS-c seviyesinin koroner arter hastalığında belirleyici roller üstelenebileceği belirtilmiştir (44).

## **Boşaltım Sistemi Üzerine Etkisi**

Mitokondriyal türevli peptitlerden humanin ve MOTS-c'nin kronik böbrek hastalığında serumdaki ve iskelet kasındaki seviyelerinin araştırıldığı bir çalışmada humanin seviyesinin serumda artış gösterdiği buna rağmen iskelet kasındaki ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca MOTS-c'nin serumda ve iskelet kasında düşük seviyede olduğu bu durumun düşük mitokondriyal yoğunluğundan ve oksidatif stresten kaynaklı olabileceği ileri sürülmüştür (45).

## **Anti-inflamatuar Etkileri**

MOTS-c'nin metisiline dirençli *Stafilocok Aureus* bakterisinin farelere enjekte edilmesiyle oluşturulan sepsis modelinde olası etkileri araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda MOTS-c'nin anti-inflamatuar sitokinlerden IL-10 seviyesinde ciddi bir artış sağlayarak tedavi edici özelliği saptanmıştır (46).

Anti-inflamatuar ve antinosiseptif etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada farelere ip olarak uygulanan 50 mg/kg MOTS-c'nin AMPK sinyal aktivasyonunu artırdığı ve inflamatuvar sitokinleri baskılayarak serumda anti-inflamatuar sitokinlerin seviyesinde artışa neden olduğu rapor edilmiştir (47).

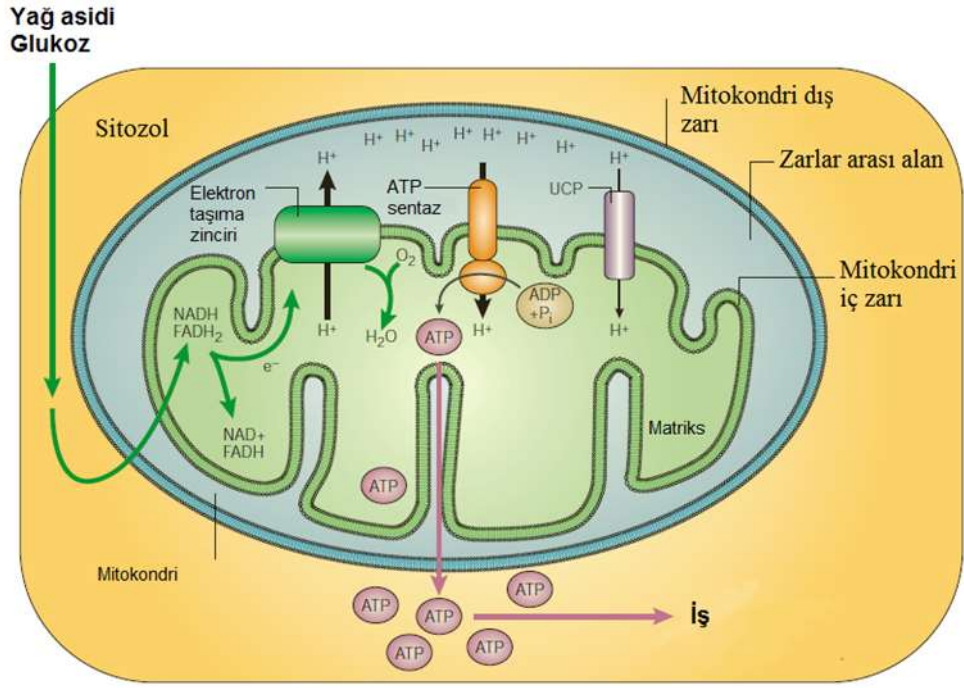
Lipopolisakkaritlerin indüklediği akut akciğer hasarı oluşturulan farelerde 6 gün süreyle ip uygulanan 5 mg/kg MOTS-c'nin anti-inflamatuar etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın sonunda MOTS-c uygulamasının anti-inflamatuar sitokinlerden IL-10 seviyesini artırdığı ayrıca SOD aktivitesini düzenleyerek serum MDA düzeyini azalttığı tespit edilmiştir (48).

## **2.2. Eşleşme Bozucu (Uncoupling) Proteinler**

Mitokondriyal zar proteinlerinden olan UCP'ler hücrel enerji oluşumunda kilit rol oynarlar. Bu protein grupları 5 üyeden (UCP1-5) oluşur ve her bir UCP türü vücudun farklı bölgelerine özgü olarak ifade edilir (11, 49).

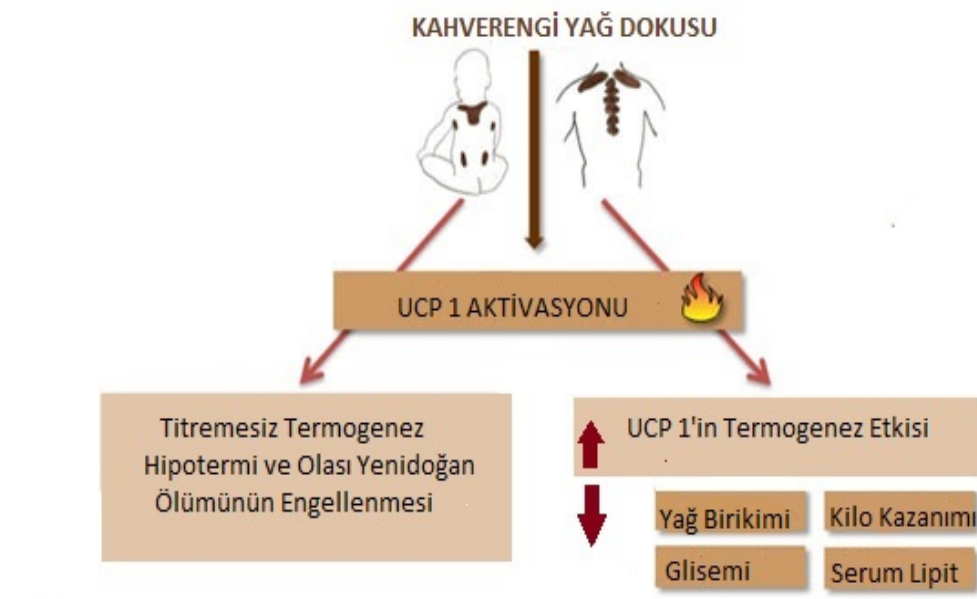
### **2.2.1. Lokalizasyonu ve Görevleri**

UCP'ler, mitokondrinin iç membranından salınırlar (50) ve bu proteinler mitokondriyal membranın fonksiyonu ile enerji metabolizmasının regülasyonunda görev alırlar. UCP'lerin aktivasyonu yağ asitlerinin ve glukozun oksidatif fosforilasyona katılmasıyla artarken pürin nükleotidleri aktivitesi ile inhibe edildikleri bilinmektedir (51, 52). Mitokondride membranlar arası alanda bulunan protonların UCP'ler tarafından mitokondriyal matrikse taşınmasıyla proton gradiyentinde azalma olur. ATPsentaz tarafından tüketilen proton gradyanının azalmasıyla ATP üretiminde kısmen azalma gerçekleşirken bu sırada okside substrattan elde edilen enerji ortama ısı olarak yayılır (Şekil 2.5) (11, 12).



**Şekil 2.5.** UCP'lerin genel etki mekanizması (10).

Vücudun farklı dokularında çeşitli görevleri yerine getirmek için dağılım gösteren UCP'lerin 5 üyesi bulunmaktadır. Eşleşme bozucu protein 1 (UCP1), beyaz ve kahverengi yağ dokudan salınarak başlıca etkilerini vücut ısısının korunmasında, depo edilen enerjinin kullanılmasında, yenidoğan muhtemel ölümünün engellenmesinde gösterir (53, 54) (Şekil 2.6). Eşleşme bozucu protein 2 (UCP2) vücudun farklı doku ve organlarından (dalak, pankreas adacık hücreleri, akciğer, mide) salınan bir UCP homologudur (53-57). Eşleşme bozucu protein 3 (UCP3) ise iskelet kasına karakterize olmakla birlikte az miktarda sinir hücrelerinden de eksprese edildiği bilinmektedir (54, 56, 58). Nöronal UCP'ler olarak bilinen eşleşme bozucu protein 4 (UCP4) ve eşleşme bozucu protein 5 (UCP5) merkezi alanda (beyin) yayılım gösterirken aynı zamanda yapılan çalışmalarda testislerde de UCP5'in varlığı tespit edilmiştir (59-61).



**Şekil 2.6.** Yenidoğan ölümünün ve metabolik yetişkin hastalıklarının önlenme mekanizması (62).

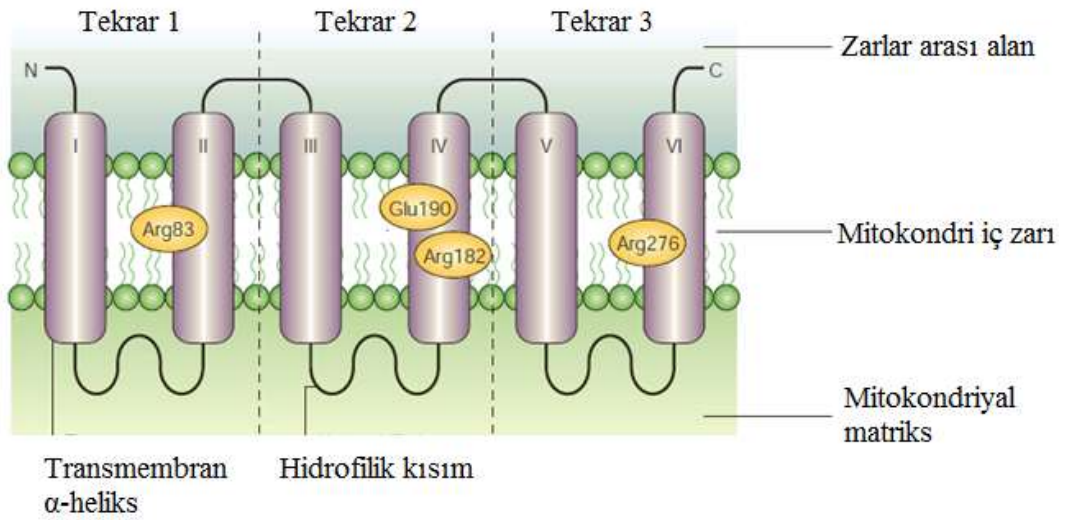
### 2.2.2.Yapısal Özellikleri

Orijinal eşleşme bozucu protein olarak kabul edilen UCP1 ile ilgili yapılan çalışmalar bu taşıyıcı protein ailesinin anlaşılmasında önemli yer tutmaktadır (63). UCP homologları olarak kabul edilen UCP2 ve UCP3, UCP1 ile yakından ilişkili olmakla birlikte yapısal olarak ~%60 benzerlik gösterdiklerirler. Nöronal UCP'ler olarak adlandırılan UCP4 ve UCP5 yapısal olarak farklılık göstermekle beraber UCP1 ile ~%30 benzerlik gösterirler (Tablo 2.2) (10).

**Tablo 2.2.** UCP'lerin homolojisi (10).

Eşleşme Bozucucu Proteinler	Benzerlik %'si
UCP1	100
UCP2	59
UCP3	57
UCP4	30
UCP5	33

UCP'lerin yapısal özelliklerini anlamaya yönelik literatürde yalnızca UCP2'ler üzerine yapılan araştırmalar bulunmasına rağmen (64), UCP'lerin genel yapı itibarıyla mitokondriyal taşıyıcı protein ailesinden olan ve ATP/ADP taşınmasını sağlayan adenin nükleoit taşıyıcı proteinlerle benzer olduğu ileri sürülmektedir (65, 66). Buna göre UCP'ler üç tekrardan oluşmaktadır ve her bir tekrar ~100 aminoasit içermektedir. Her bir tekrarda transmembran  $\alpha$ -heliks yapısı bulunmaktadır ve bu yapı iki hidrofobik bölge içermektedir. Bu  $\alpha$ -heliks yapısı mitokondri iç membranından matriks kısmına doğru yönelmiş hidrofilik bir döngü ile birbirine bağlanır (Şekil 2.7). Ayrıca yapılan başka bir çalışmada ise UCP'lerin iki özdeş alt birim içeren dimer bir yapıya sahip olduğu ifade edilmektedir (67). Yapılan çalışmalar sonucunda  $\alpha$ -heliks yapılarının UCP çekirdeğinde hidrofilik bir kanal oluşturarak bu çekirdeğe erişimin hidrofilik döngüler tarafından oluşturulan geçitler tarafından kontrol edilebileceği ileri sürülmektedir (68).



Şekil 2.7. UCP'lerin tekrarlı yapısının şematik gösterimi (69).

### 2.2.3. UCP'lerin Fizyolojik Etkileri

#### Enerji Metabolizması Üzerine Etkisi

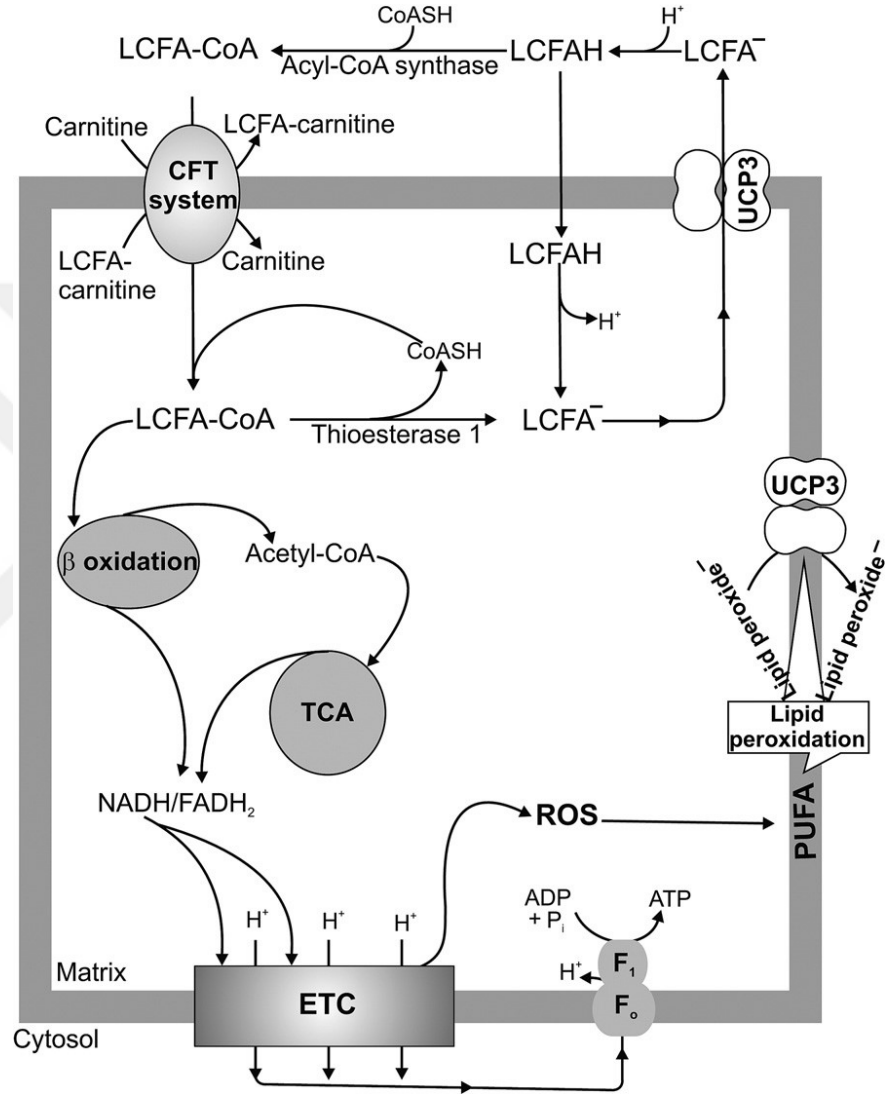
UCP1'in mitokondriyal iç membranın proton iletkenliğini büyük ölçüde artırarak memeli canlıların kahverengi yağ dokusunda termojenezi katalize ettiği bilinmektedir (70). Yapılan çalışmalar sonucunda iskelet kasının bilinmeyen mekanizmalar aracılığı ile termogeneze katkıda bulunabileceği ileri sürülmektedir (70, 71). UCP1 ile olan homologileri ve bazı dokulardaki dağılımları göz önüne alındığında UCP2 ve UCP3'ün de termojenik olduğu ve enerji harcamasının ve vücut ağırlığının düzenlenmesine dahil olduğu varsayılmıştır (11). Bu varsayım üzerine UCP homologlarının termogenez ile ilişkisine yönelik yapılan çalışmalarda UCP1 ve UCP3 geni mutasyona uğratılan farelere seçici bir  $\beta 3$  agonisti ve T3 uygulaması sonucu oksijen tüketim hızının ve vücut sıcaklığının arttığı belirlenmiştir (72). Ayrıca UCP3 geni mutasyona uğratılan hamsterlara soğuk maruziyetinin uygulandığı bir çalışmada UCP1 ve UCP2 mRNA seviyelerinin arttığı ve kahverengi yağ doku mitokondrisinde UCP3 aktivitesine rastlanmadığı belirlenmiştir(73) . UCP3'ün termogenez ile ilişkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise UCP3 geninde mutasyon olan farelere *ecstasy* uygulaması sonucunda iskelet kası ve rektal sıcaklık değişiminin kontrol grubuna göre daha az olduğu tespit edilmiştir (74).

#### Yağ Asidi Metabolizması Üzerine Etkisi

UCP3'ün enerji metabolizması dışındaki olası fonksiyonlarının araştırıldığı çalışmalarda yağ asidi döngü modeline (75) göre UCP3 yağ asitlerinin mitokondriden uzaklaştırılmasını sağlayarak yağ asidi anyonlarının veya peroksitlerin toksik etkisinden koruduğu ileri sürülmektedir (76). Buna göre UCP3 uzun zincirli yağ asitlerini (LCFA) mitokondriyal matriksten uzaklaştırmaktadır. Bu LCFA anyonları mitokondriyal inner membran boyunca ve mitokondriyal tiyoesteraz 1 tarafından yağ asidi esterlerinin hidrolizi ile mitokondriyal matrikse giren uzun zincirli esterleşmemiş yağ asitlerinin girişinden türetilmektedir (76). Diğer taraftan  $\beta$ -oksidasyon için sınırlayıcı bir koenzim olan ve trikarboksilik asit döngüsü sonucu koenzim A oluşur.

LCFA mitokondriyal membranlar arası boşlukta asilCoA sentaz ile yeniden reaksiyona girmek üzere UCP3 tarafından matriksten uzaklaştırılır. Böylece UCP3

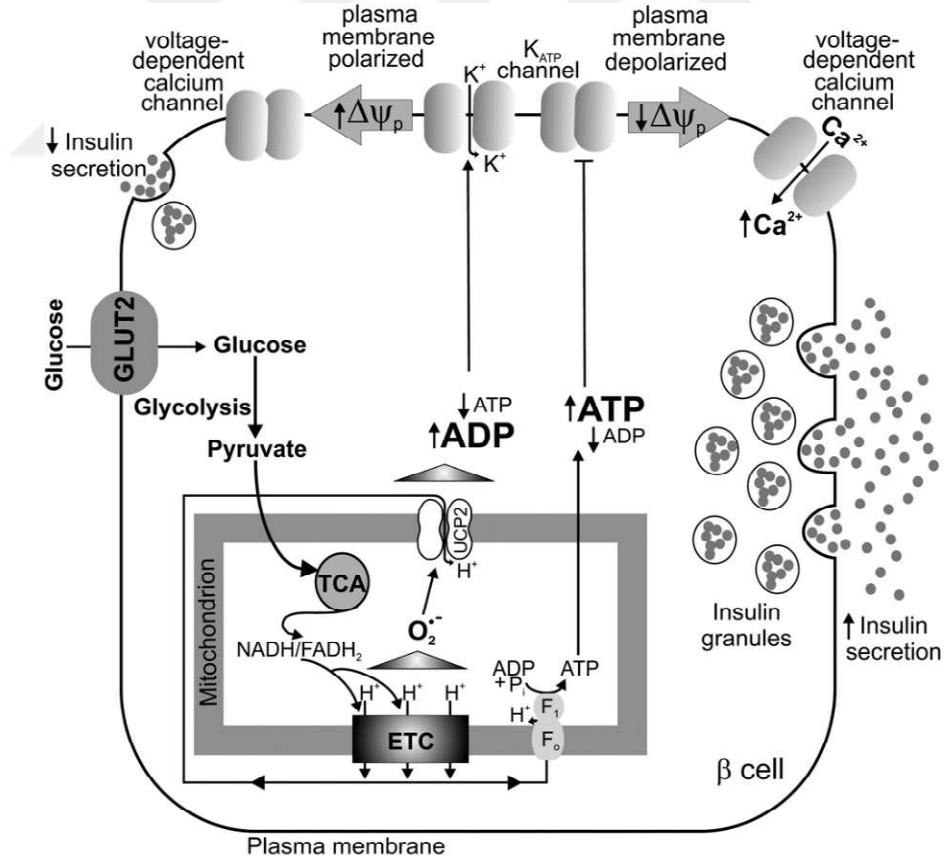
karnitin yağ asidi sisteminden bağımsız olarak matrikse giren fazla LCFA'yı azaltarak yağ oksidasyonunun düzenlenmesinde görev alır (Şekil 2.8). Ayrıca UCP3 elektron taşıma zinciri aktivitesi sonucu oluşan reaktif oksijen türlerinin mitokondriyal zarda bulunan çoklu doymamış yağ asitleri ile etkileşimi sonucu oluşan lipit peroksit anyonlarının uzaklaştırılmasını sağlar (76).



Şekil 2.8. UCP3'ün yağ asidi metabolizmasını düzenlemesinin şematik gösterimi (77).

## İnsülin Salınımı Üzerine Etkisi

UCP2 mRNA'sı pankreatik adacık hücrelerinde eksprese edilir ve  $\beta$  hücrelerinin mitokondrilerinde saptanabilir düzeyde UCP2 proteini tespit edilmiştir (78). Pankreas  $\beta$ -hücreleri tarafından glikoz algılama ve insülin sekresyonu arasındaki önemli bir bağlantı sinyali ATP/ADP oranındaki artıştır (79).  $\beta$ -hücreleri, mitokondriyal proton hareket kuvvetini artıran ve dolayısıyla ATP/ADP oranında bir artış ile glikozu algılar. ATP/ADP oranındaki artışlar ATP'ye duyarlı potasyum kanalını kapatır. Bu plazma-membran depolarizasyonuna, voltaja duyarlı kalsiyum kanallarının açılmasına ve  $\beta$ -hücrelerinin sitozolüne  $\text{Ca}^{2+}$  akmasına neden olur, bu da daha sonra insülin sekresyonunu tetikler (80). UCP2 aktivitesi sonucu pankreatik adacıklarda (81-83)glikoz metabolizmasından ATP üretimini azaltarak glukozla uyarılan insülin sekresyonunu bozar. Bu nedenle, UCP2 insülin sekresyonunun negatif regülatörü olarak görev alabileceği düşünülmektedir (84)(Şekil 2.9).



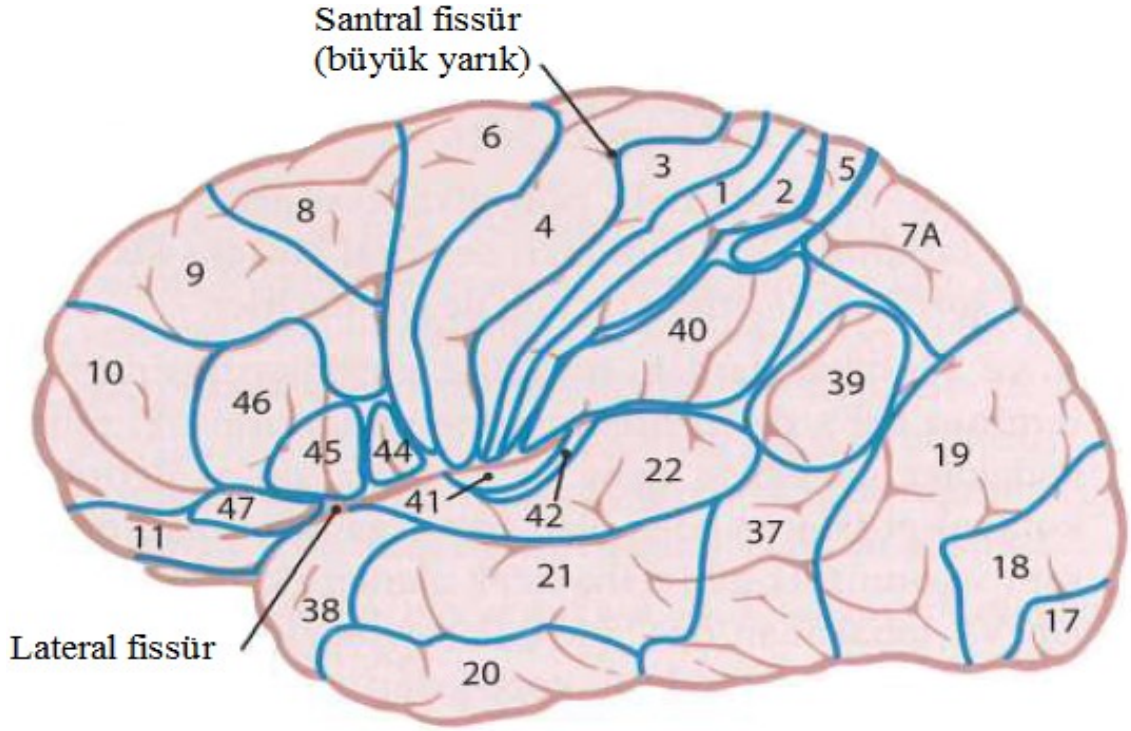
Şekil 2.9. UCP2'nin insülin sekresyonunu düzenlemesinin şematik gösterimi (85).



## 2.3. Merkezi sinir sistemi bölümleri ve fizyolojik önemi

### 2.3.1. Korteks

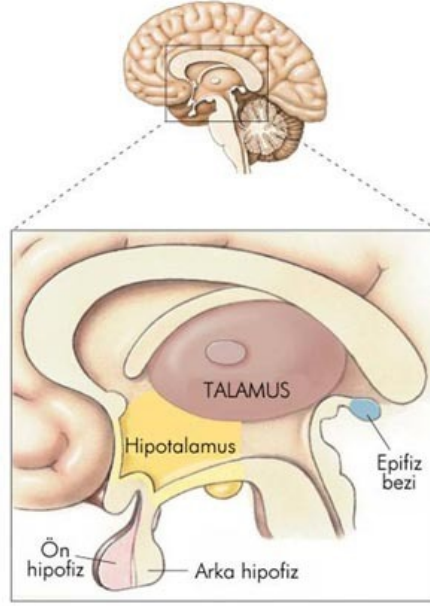
Beyin korteksi bir kontrol noktası olarak düşünülürse, bu kontrol; periferik ve içsel duyuların algılanması, duyular arasındaki koordinasyonun sağlanması ve değerlendirilmesi, öğrenme ve bellek oluşumu, hareketlerin gerçekleştirilmesi ve iç dengenin sağlanması gibi olayların gerçekleştirilmesiyle sağlanır. Serebral korteks içerdiği; nöronlar, astrositler, oligodendrositler, kan damarları ve ependim hücreleriyle serebral hemisferin (telensefalon) çatısını bilateral şekilde kaplamaktadır. Ependimal katman lateral ventrikülde bulunan beyin-omurilik sıvısı ile temas halindedir ve korteksin dış yüzeyi meninks ile kaplıdır (86). Korteksin sahip olduğu toplam alan 285 bin mm<sup>2</sup> olmakla birlikte hacmi ise 300 cm<sup>3</sup>'dür (87). Serebral korteksin büyük bölümünü oluşturan neokorteks, altı katman oluşturacak şekilde nöronların oluşturduğu bir yapıdır. Her katmanın korteks içinde ve subkortikal yapılarla ayrı ayrı bağlantıları vardır. İki ana kortikal nöron grubu bulunmakla birlikte bunlardan aksonları uzun sinaptik sonlanmalar gerçekleştiren projeksiyon nöronlar bu grubun ~%80'ini oluştururken ve ~%20'sini lokal devre nöronları (internöronlar) oluşturur. Uyarıcı olan ve büyük oranda glutamati nörotransmitter olarak kullanan projeksiyon nöronlardır. İternöronlar ise bunun tersine genellikle baskılayıcı nöronlar olarak görev yaparlar ve gamma-aminobütirik asit (GABA) ile diğer nörotransmitterleri kullanırlar (86). Korteks, yapısal farklılıklar gösterdiği gibi fonksiyonel olarak da birçok farklılık göstermektedir. Serebral kortekste temelde histolojik yapısal farklılıklara sahip olan elli iki farklı alandan oluşan Brodmann alanları yer alır ve bu alanlar kendilerine özgü hücre organizasyonlarına sahiptir. Bu alanda çalışmalarını sürdüren bilim insanları için birçok açıdan önemli olan bu sınıflandırma insan korteksinin farklı işlevsel alanlarını belirtmek kullanılan bir harita niteliğindedir (Şekil 2.10; (88)).



Şekil 2.10. İnsan serebral korteksinde Brodman alanlarının şematik gösterimi (88).

### 2.3.2. Hipotalamus

Anatomik olarak hipotalamus, anteriorde optik kiyazma, posteriorde mamiller cisimler, lateralde temporal lob ve superiorde talamus ile bağlantılıdır (Şekil 2.11) (89). Hipotalamus memeli beyninin çok küçük bir parçasını (insandaki 1400 gramlık beynin sadece 4 gramı) oluşturmasına rağmen, beyindeki en önemli kısımlardan bir tanesidir. Hipotalamustan çıkan sinyaller çevre dokular ve diğer beyin bölgelerinde uygun nöroendokrin cevabın oluşmasını uyarır.



**Şekil 2.11.** Hipotalamusun organizasyonu.

Gıda alımı, enerji harcama, vücut ağırlığı, sıvı alımı ve düzenlenmesi, kan basıncı, susama, üreme, vücut sıcaklığı ve uykunun düzenlenmesi gibi günlük yaşamsal faaliyetler hipotalamustan salınan salgıya uygun hipotalamik cevapların verilmesi ile kontrol edilir. Bu hipotalamik cevapların oluşmasına, hipotalamusta meydana gelen salgılar aracılık etmektedir (90). Hipotalamus, bu karmaşık süreçleri birleştirici bir düğüm gibi davranarak düzenleyebilir. Duyusal afferentlerden, dolaşımdaki çevresel sistemlerden çok çeşitli girdiler hipotalamusta bir araya getirilir (91). Hipotalamustan başlıca kortikotropin serbestleştirici hormon, gonadotropin serbestleştirici hormon, büyüme hormonu serbestleştirici hormon, TRH, prolaktin baskılayıcı hormon salgılanmaktadır (88). Hipotalamustan salınan hormonlara, uygun endokrin cevap hipofiz tarafından verilmektedir (92).

### 2.3.3. Hipofiz

Hipofiz bezi vücut homeostazının gelişim süreci, stres ve diğer fizyolojik süreçlerde anahtar rol oynayan bir düzenleyici, hipotalamus ve periferal organlar arasında fizyolojik sinyal alışverişinin gerçekleştiği bir aracı organdır. Yaklaşık 1 cm çapında ve 0.5-1 g ağırlığındaki hipofiz bezi beyin tabanında sella turcica adında kemik bir kovuk içine yerleşmiş, diaphragm sellae adındaki duranın kıvrımıyla kaplıdır.

Hipofizin hipotalamusa fonksiyonel ve anatomik bağlantısı infundibular sap üzerinden medyan eminens aracılığı ile gerçekleşir ve bu yapı hipotalamik faktörlerin hipofiz bezine ulaşımını sağlar (93). Anatomik ve fonksiyonel olarak hipofiz bezi iki loba ayrılır: adenohipofiz (ön hipofiz) ve nörohipofiz (arka hipofiz).

Adenohipofiz anatomik ve fizyolojik olarak üç bölgeye ayrılmıştır:

1. Pars tuberalis (aynı zamanda pars infundibular olarak da bilinir) alt hipofizyel sapsın dış bölgesini çevreleyen birkaç kat hücre tabakasından oluşan dış kısmıdır. Bu kısım tuberalin olarak isimlendirilen bir faktör aracılığıyla prolaktin sekresyonunu uyarır (94). Ayrıca pars tuberalis üzerinde lokalize olan melatonin reseptörlerinin varlığı bu alanın fotoperiyodik işlevselliğide düşündürmektedir (95).

2. Pars intermedia (aynı zamanda ara lob olarak da bilinir) arka hipofiz ve ön hipofiz arasındaki marjinal alanda lokalize olmuştur. İnsanlarda ara lob fazla gelişmemiştir ve Rathke kesesinin körelmiş arka uzantısı şeklindedir. Bu alan daha düşük omurgalılarda melanotrop hücreleri içerir ve endorfinlerde dahil olmak üzere melanosit stimüle edici hormon gibi birtakım biyoaktif peptidi salgılar, melanin üretimi ve dağılımını düzenlerler. Bazı türlerde pars intermedya ve melanotroplar hipotalamustan kaynaklanan sinir lifleri tarafından desteklenmektedir. Memeli türlerinde dopamin, nörepinefrin, GABA ve serotonin içeren farklı sinir sonlanmaları tanımlanmıştır.

3. Pars distalis, ön hipofizin yaklaşık %80'lik kısmını oluşturur ve ön lob olarak isimlendirilir. Fonksiyonel birim olarak farklı hücre grupları içeren bu bölüm sitokinler, büyüme faktörleri ve birçok hormon yapımını gerçekleştirir (Tablo 2.3; (93)). Hormon salgısı büyük ölçüde kandaki faktörler tarafından düzenlenir. Hipotalamus-hipofiz portal sistem aracılığıyla hipotalamustaki özel nöronlarda meydana getirilen hipotalamusun serbestleştirici ve baskılayıcı hormonları ön hipofize taşınır. Serbestleştirici ve baskılayıcı hormonların işlevi ön hipofiz hormonlarının salgısını kontrol etmektir (88). Bütün bu düzenleyici mekanizmalar hipofiz bezinin homeostatik süreçte dinamik rol üstlenmesini sağlar.

**Tablo 2.3.** Ön hipofizde yer alan hücre grupları ve salgıladıkları hormonlar.

Hücre grubu	Hormon	% Hücre miktarı
Laktotroplar	PIH	15
Gonadotroplar	LH, FSH	10
Tirotroplar	TSH	5
Somatotroplar	GH	40-50
Kortikotroplar	ACTH	15-20

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

Nörohipofiz olarak bilinen arka hipofiz bezi asıl olarak özelleşmiş glia hücreleri olan pituisit hücrelerden oluşmuştur. Bu hücreler esas olarak hipotalamusun supraoptik ve paraventriküler çekirdeklerinden (PVN) arka hipofize kadar uzanan terminal sinir sonlanmalarını (magnoselüler nöronlar) çevreleyerek destek doku görevi üstlenir ve aynı zamanda nörohipofiziyal hormon üretiminin düzenlenmesine katkıda bulunabilir (96). Hipotalamustaki magnoselüler nöronlarda sentezlenen antidiüretik hormon (vazopresin) ve oksitosin sinir yolağı boyunca taşınarak arka hipofize salgılanır.

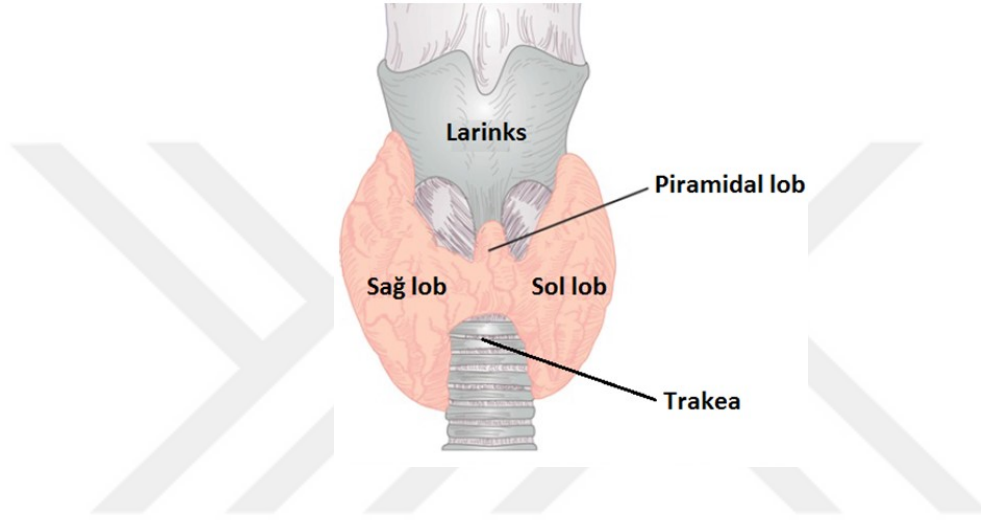
#### 2.3.4. Tiroid Hormonları ve Fizyolojik Önemi

##### Tiroid Uyarıcı Hormon

Tiroid bezinden T3 ve T4 salgılanmasını düzenleyen TSH, ön hipofizin tirotrop hücrelerinde sentezlenir ve 28-30 kDa ağırlığında glikoprotein yapısında bir hormondur. Diğer glikoproteinlerde (örneğin LH ve FSH) olduğu gibi TSH'da birer  $\alpha$  ve  $\beta$  alt ünitelerden oluşur ve bu yapılar hormonun özgün biyolojik özelliğini kazandıran yapılardır. İnsanlarda  $\alpha$ -alt ünite ve  $\beta$ -alt ünite sırasıyla 6. ve 1. kromozomlar üzerinde bulunan genler tarafından kodlanır (97). 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 (98).

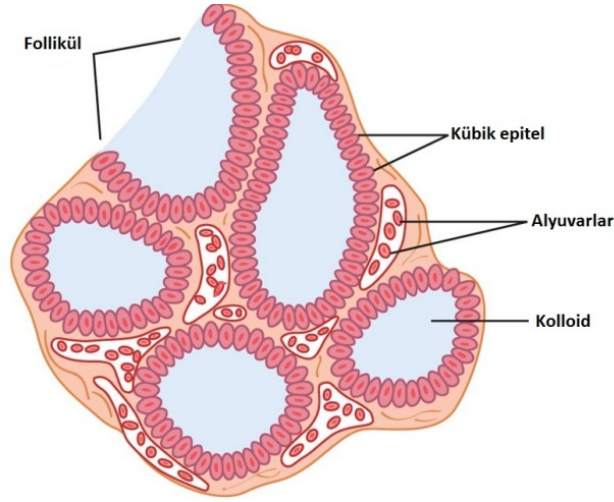
## Tiroid Bezi

Olgun insan ve kemirgenlerde tiroid bezi trakeanın yanlarında yer alan iki uzun oval lobdan oluşur ve yetişkin bir insandaki ağırlığı yaklaşık 15-20 gr kadardır. Bu loblar krikoid kıkırdağın hemen altında isthmusla orta hatta birleşir (Şekil 2.12). Tiroid bezi boyun bölgesi kaslarının altında gömülü haldedir ve zengin damarlanma yapısına sahiptir (99).



**Şekil 2.12.** Tiroid bezinin konumu.

Mikroskopik olarak tiroid bezi fibröz bağ doku kapsülü ile çevrili, zengin vasküler interfolliküler bağ dokuları tarafından desteklenen ve içerisi kolloid adı verilen sıvı ile dolu folliküllerden oluşur (Şekil 2.13; (99)). Kolloidin ana bileşeni, tiroid hormonlarını içeren ve 660.000 dalton ağırlığında büyük bir glikoprotein olan tiroglobulindir. Folliküller farklı hatlara sahip, büyük küresel çekirdekler içeren ve oldukça açık bir sitoplazması bulunan kübik hücrelerle döşelidir (100). Ayrıca tiroid bezi içerisinde, follikül hücreleri arasında yerleşim gösteren ve kalsitonin salgılayan parafolliküler hücrelerde bulunur (101). Memelilerdeki tiroid bezlerinin mikroskopik yapısı aynı olmasına rağmen, bezin konumu ve dokusu farklılık gösterebilir (99).



**Şekil 2.13.** Tiroid bezinin mikroskopik görünümü (88).

### **Tiroid Hormonları**

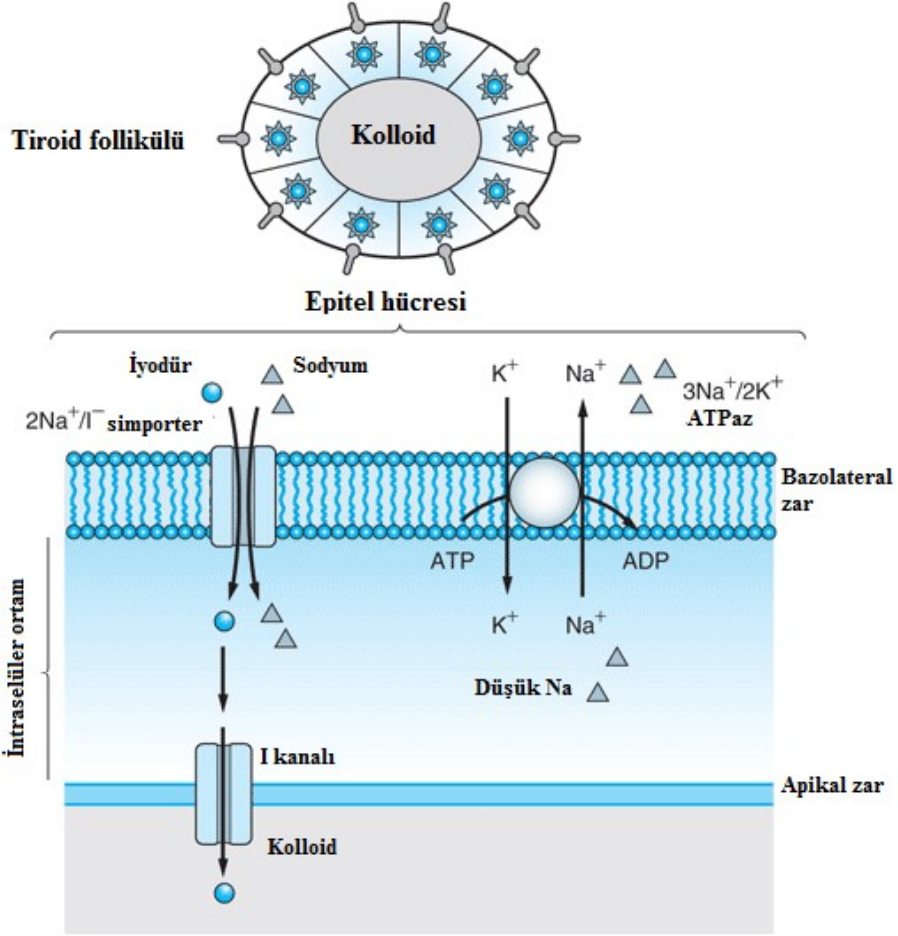
Tiroid bezindeki foliküler hücreler tirozin aminoasidin öncülüğünde T3 ve T4 hormonlarını sentezler. Tiroid bezinden sentezlenen bu hormonlar biyolojik olarak aktiftirler ve salgılanan tiroid hormonlarının yaklaşık %93'ü T4 ve geriye kalanı ise T3 formundadır (88). Bununla birlikte salgılanan T4'ün tamamına yakını 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), monoiyodotirozin (MIT) ve diiyodotirozin (DIT) salgılar (88, 100).

### **Tiroid Hormonlarının Biyosentezi**

#### **İyodür İyonlarının Tutulması ve Konsantre Edilmesi**

Tiroid hormonlarının yapımında ilk aşama, dolaşımdaki iyodürlerin tiroidin bez hücrelerine ve folliküllere taşınmasıdır. Kandaki bir iyodür iyonu ve iki sodyum iyonu bazolateral zardan  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  simporter yoluyla hücre içerisine aktif taşıma ile alınır. İyodürün hücredeki yoğunlaşmasını sağlayan bu olaya iyot tutulması denir (Şekil 2.14; (102). 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 (88, 102). TSH tiroid hücrelerindeki iyodür pompasının aktivitesini uyarırken, hipofizektomi önemli 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 (88).



**Şekil 2.14.** Tiroid bezi tarafından iyodür konsantrasyonunun mekanizması (103). (İyodür kimyasal ve elektriksel gradiente karşı aktif taşıma ile folliküler hücre sitozolüne taşınır. İki sodyum iyonu ve bir iyodür iyonunu simporter taşıma ile intraselüler alana geçer. Bu taşıma sürecinde enerji harcanır. Taşıma için gerekli enerji, sodyumu hücre dışına pompalayan, daha düşük hücre içi sodyum konsantrasyonuna neden olan ve sodyumun tekrardan hücre içine kolayca difüzyonunu sağlayan  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaz pompasından gelir. İyodür kolloid alana iyot kanalından geçerek ulaşır.)

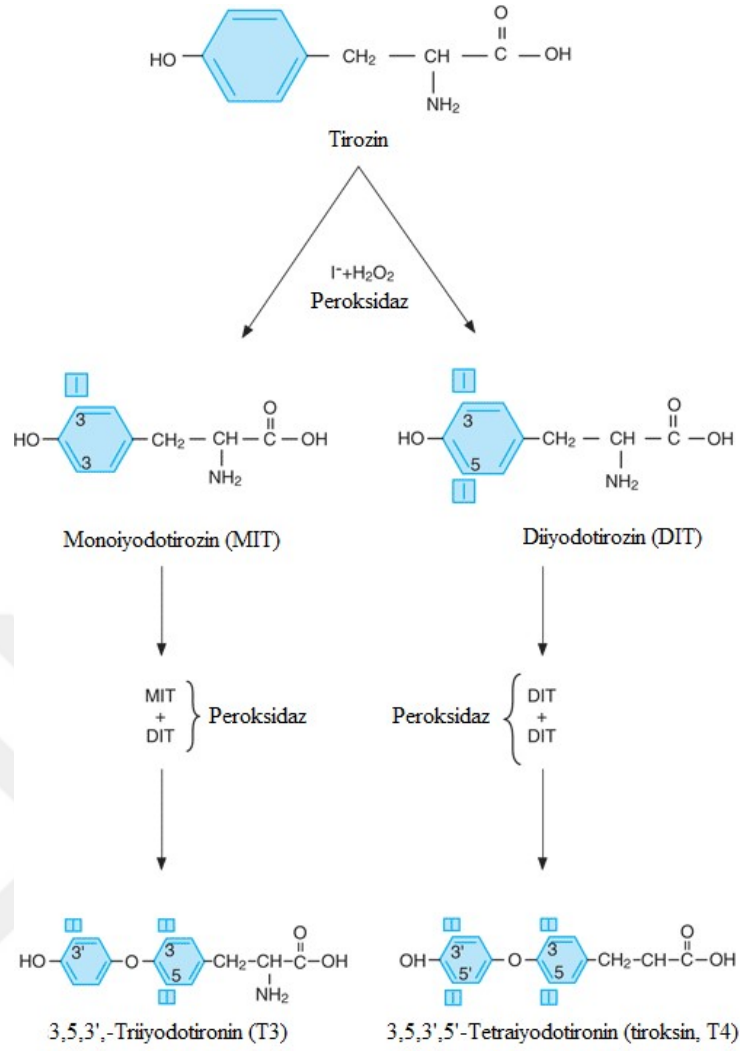


## **İyodürün İyoda Dönüşmesi ve Organifikasyon**

Hücre içindeki iyodür iyonları tirozin aminoasidiyle birleşebilme yeteneğine sahip olan okside iyoda ( $I^0$  veya  $I_3^-$ ) dönüşür. Bu dönüşüm tiroperoksidaz enzimi aracılığıyla ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) varlığında gerçekleşir. Bu olay için gerekli olan  $H_2O_2$ , nikotinamid adenin dinükleotid fosfata bağımlı sitokrom C redüktaz tarafından oluşturulur (104, 105). 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 sıfıra 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 denilmektedir (106).

## **Eşleşme Reaksiyonu ve Tiroglobulinin Depolanması**

Eşleşme reaksiyonunun ana ürünleri biyolojik olarak aktif T3 ve T4 molekülleridir. İki DIT molekülünün birleşmesiyle T4, bir MIT ve bir DIT moleküllerinin birleşmesiyle de T3 meydana gelir (Şekil 2.15). Ayrıca bir MIT ve bir DIT'ın birleşmesiyle az miktarda ve inaktif olduğu düşünülen RT3 oluşur (88).



**Şekil 2.15.** Tiroid hormon sentezinin biyokimyası (103).

Endokrin bezler içerisinde büyük miktarlarda hormon depo edebilme yeteneğinden dolayı tiroid bezi eşsizdir. Sentezlenen tiroid hormonları tiroglobuline bağlı halde follikül içerisinde depo edilir. Her bir tiroglobulin molekülü 30 kadar T4 molekülü ve az sayıda T3 molekülü bulundurur. Bu şekilde tiroid hormonları folikülde, vücudun normal tiroid hormonu ihtiyacını 2-3 ay boyunca karşılamaya yetecek düzeyde depo edilir. Bu yüzden tiroid hormonu sentezi durduğu zaman, yetersizlik belirtileri birkaç ay gözükmez (88).

## **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 (88).

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 (88).

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 (88, 100).

## **Tiroid Hormon Reseptörleri**

Tiroid hormon reseptör (TR) izoformları, nükleer reseptör süper ailesine ait ligand ile modüle edilmiş transkripsiyon faktörlerinin bir üyesidir (107). Bu reseptörler ya DNA iplikçiklerine bağlı olarak ya da onların hemen yakınında bulunur. Bilinen bütün TR izoformları (TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2 ve TR $\beta$ 3) iki gen ürününün transkripsiyonu ve alternatif birleştirilmesi ile meydana gelir. TR izoformlarının sentezi ve düzenlenmesi doku tiplerine göre değişiklik gösterebilir (108-110). Sıçanlardaki immunositokimyasal çalışmalar TR izoformlarının hipotalamus dahil beynin birçok bölgesinde ve periferik dokularda varlığını göstermiştir (111). TR olgun sıçanların PVN (TR $\beta$ 2 ifadesi yüksek seviyede), ARC ve medyan eminensinde yüksek düzeyde ifade edilmektedir (108, 112). TR $\beta$ 2 tirotroplar, PVN'deki TRH nöronları, gelişmekte olan

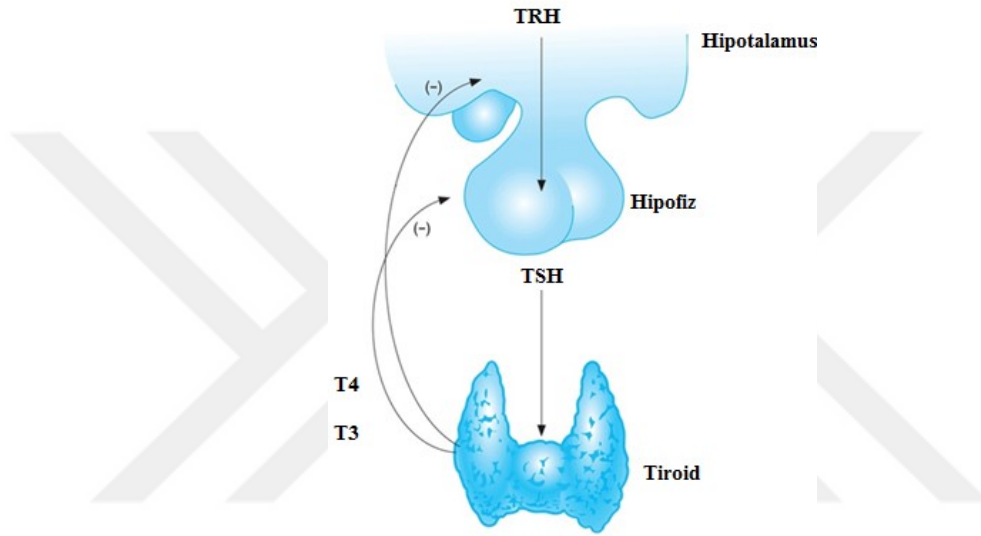
kulak ve retinada sınırlı düzeyde ifade edilmesine rağmen TR $\alpha$ 1 ve TR $\beta$ 1 izoformları daha geniş yayılım göstermektedir (107). Yapılan bir çalışmada fare hipotalamusunda direk olarak TR $\beta$ 1 siRNA'sının bloklanmasının hem T3 bağımlı hemde T3 bağımsız aktivasyonda TRH transkripsiyonunu düzenlediği gösterilmiştir. Bunun tersine TR $\beta$ 2 siRNA'sının bloklanması sadece T3'ün yokluğunda transkripsiyonu etkiler (113). Bir başka çalışmada ise TR $\beta$ 2 ifade etmeyen farelerdeki bazal pp-TRH düzeyinin hipotiroidli normal farelerdeki gibi oldukça yüksek olduğu, bu farelere uygulanan hipotiroidi veya T3 tedavisinin TRH düzeyinde önemli değişime neden olmadığı belirlenmiştir (114). Bunun tersine, TR $\beta$ 2 ifade etmeyen farelerde açlığa yanıt olarak pp-TRH mRNA ifadesinin inhibisyonu belirlenmiştir. Bu sonuçlar TRH ifadesinde T3 bağımlı negatif geri bildirim düzenlenmesinden sorumlu kilit reseptör formunun TR $\beta$ 2 olduğunu göstermektedir (114).

### 2.3.5. HHT 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 (115). Buna ek olarak TRH nöronları hipotalamusun diğer bölgelerinde (ön hipotalamusun preoptik alanı, SON, ARC, dorsomedial premmamilar çekirdek, bazolateral ve preforikal hipotalamus) de dağılım gösterir (116). Hipotalamustan TRH biyosentezi gerçekleştiikten 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 (117, 118). 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 (99). 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 (Şekil 2.16; (88)). 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 ihibe eder (103).



**Şekil 2.16.** Hipotalamus-hipofiz-tiroid aksının geribildirim ile düzenlenmesi (103).

### 2.3.6. Tiroid Hormonlarının Enerji Metabolizmasındaki Etkileri

HHT aksı enerji metabolizması başta olmak üzere, metabolizma hızı, büyüme ve gelişme gibi süreçlerin sağlıklı bir şekilde devam edebilmesinde kilit rol oynar (119, 120). Enerji metabolizmasının bozulması kişide obezite ve diyabet gibi önemli sağlık sorunlarını da beraberinde getirir. 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 görülür (121). Bunun aksine hipotiroidizmi hastalarda, metabolizma hızının azalması ve azaltılmış gıda alımına rağmen ağırlık artışı gerçekleşir (119). Tipik olarak, bu etkilerin çoğu başta beyaz ve

kahverengi yağ dokular olmak üzere karaciğer, kalp ve iskelet kası gibi metabolik olarak aktif dokularda tiroid hormonun doğrudan etkileri ile ilişkilendirilir (122, 123).



### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Araştırmanın Yapıldığı Merkez

Çalışma, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanlar Etik Kurulu'ndan alınan onay ile (03.12.2019 tarih, 2019/A-53 protokol numaralı), İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanlar Üretim ve Araştırma Merkezi, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarları ile Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi. Bu çalışmanın bütün deneysel protokolleri ARRIVE (Animal in Research: *In Vivo* Experiments) klavuzuna uygun olarak hazırlandı.

#### 3.2. Deneysel Hayvanlarının Temini

Deneysel kullanılacak hayvanların sayısı, hayvanların deneye başlama ağırlık ortalaması 396 gr, standart sapması 28 gr, %4 sapma, tip 1 hata ( $\alpha$ ) 0.05 ve tip 2 hata ( $\beta$ ) (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 deneysel hayvanının (Wistar Albino cinsi erkek sıçan) temini İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanlar Üretim ve Araştırma Merkezi (ÜNİTF-DEHÜM)'nden sağlandı. Hayvanların aynı gün doğumlu ve benzer vücut ağırlığına sahip olmalarına dikkat edildi.

#### 3.3. Deneysel Hayvanları ve Grupların Oluşturulması

Gruptaki hayvanların günlük tükettikleri yem miktarını belirleyebilmek için sıçanlar bireysel olarak tekli kafeslere yerleştirildi. Anneden ayrılma stresi ile birlikte tek tek barındırma, ortam ve beslenme hayvanlarda bir stres faktörü oluşturabileceğinden 1 hafta sıçanlar sadece gözlemlendi. Bu süre boyunca sıçanlar standart sıçan yemi (SSY) ile beslendi. Bu sürenin sonunda sıçanlar 4 gruba ayrıldı (n=10). Gruplar aşağıda belirtildiği şekilde oluşturuldu.

**1. Grup (Kontrol):** Deneysel süresince bu gruptaki sıçanlar sadece SSY ile beslendi ve hiçbir uygulama yapılmadı. Deneysel süresince günlük yem ve su tüketimi ile

vücut ağırlığı ölçümü yapıldı. Çalışma sonucunda sıçanlar dekapite edilerek analizler için hipotalamus, kan, beyaz ve kahverengi yağ doku ile kas doku (biceps) örnekleri toplandı.

**2. Grup (Sham):** Deney süresince bu gruptaki sıçanlar sadece SSY ile beslenip günlük yem ve su tüketimi ile vücut ağırlığı ölçümü yapıldı. 1.hafta sonunda sağ lateral ventrikül içerisine beyin infüzyon kiti yerleştirilip ozmotik mini pompaya bağlanarak ventrikül içerisine 14 gün süreyle günlük 120 µl (5 µl/saat) olacak şekilde yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS; MOTS-c çözücüsü) infüzyonu yapıldı. İnfüzyon süresince günlük yem ve su tüketimi ile vücut ağırlığı ölçümüne devam edildi. İnfüzyon sona erdiğinde sıçanlar dekapite edilerek analizler için hipotalamus, kan, beyaz ve kahverengi yağ doku ile kas doku (biceps) örnekleri toplandı.

**3. Grup (10 µM MOTS-c):** Deney süresince bu gruptaki sıçanlar sadece SSY ile beslenip günlük yem ve su tüketimi ile vücut ağırlığı ölçümü yapıldı. 1.hafta sonunda sağ lateral ventrikül içerisine beyin infüzyon kiti yerleştirilip ozmotik mini pompaya bağlanarak ventrikül içerisine 14 gün süreyle günlük 120 µl (5 µl/saat) olacak şekilde 10 µM MOTS-c infüzyonu yapıldı. İnfüzyon süresince günlük yem ve su tüketimi ile vücut ağırlığı ölçümüne devam edildi. İnfüzyon sona erdiğinde sıçanlar dekapite edilerek analizler için hipotalamus, kan, beyaz ve kahverengi yağ doku ile kas doku (biceps) örnekleri toplandı.

**4. Grup (100 µM MOTS-c):** Deney süresince bu gruptaki sıçanlar sadece SSY ile beslenip günlük yem ve su tüketimi ile vücut ağırlığı ölçümü yapıldı. 1.hafta sonunda sağ lateral ventrikül içerisine beyin infüzyon kiti yerleştirilip ozmotik mini pompaya bağlanarak ventrikül içerisine 14 gün süreyle günlük 120 µl (5 µl/saat) olacak şekilde 100 µM MOTS-c infüzyonu yapıldı. İnfüzyon süresince günlük yem ve su tüketimi ile vücut ağırlığı ölçümüne devam edildi. İnfüzyon sona erdiğinde sıçanlar dekapite edilerek analizler için hipotalamus, kan, beyaz ve kahverengi yağ doku ile kas doku (biceps) örnekleri toplandı.

### **3.4. 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 ( $p=0.197$ ).

**Tablo 3.1.** Grupların bilgisayara dayalı algoritma kullanılarak oluşturulması.

Gruplar	Ağırlık (g)				<i>p</i>
	Kontrol	Sham	10 $\mu$ M MOTS-c	100 $\mu$ M MOTS-c	
Hayvan sayısı (n)	10	10	10	10	0.197
Ortalama	398.12	397.22	395.26	394.81	
SD	27.81	29.33	26.22	30.29	
En küçük	365	367	370	371	
En büyük	452	455	459	460	

### 3.5. Hazırlık

#### 3.5.1. Yapay Beyin Omurilik Sıvısının Hazırlanması

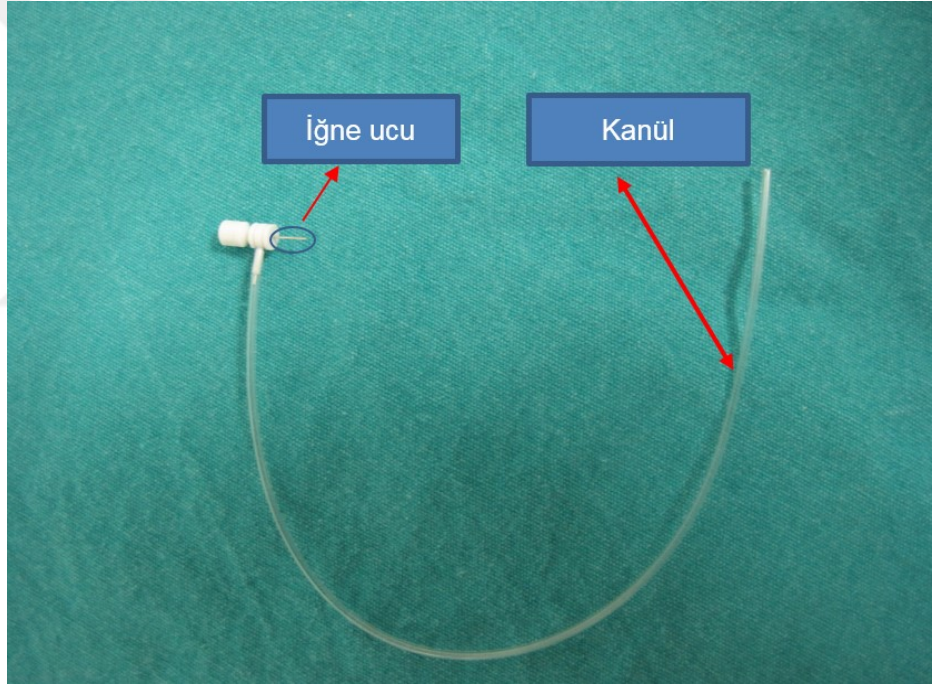
Tablo 3.2’de içerikleri gösterilen A ve B solüsyonları 500 ml steril distile su içerisinde iki farklı solüsyon olarak hazırlandı. A ve B solüsyonları 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak yBOS elde edildi. Hazırlanan çözelti 0.22  $\mu$ m por çapına sahip filtre kullanılarak süzüldü ve bu şekilde sterilizasyonu gerçekleştirildi.

**Tablo 3.2.** yBOS için kullanılan bileşikler ve miktarları (124).

A solüsyonu		B solüsyonu	
İçerik	Gram	İçerik	Gram
NaCl	8.66	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.214
KCl	0.224	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.027
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.206		
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.163		

### 3.5.2. Beyin İnfüzyon Kitinin Hazırlanması

Çalışma için sıçan sağ lateral ventrikülüne enjeksiyon yapacak şekilde dizayn edilen (vertikal eksen için iğne uzunluğu 4.8 mm) beyin infüzyon kiti (BİK) (Alzet brain infusion kit 1, ABD) kullanıldı. Kitlerle beraber gelen özel kanüller beyin infüzyon kitine takıldı ve içerisi infüze edilecek maddelerle (Sham gruplar için yBOS, deney grupları için 10 ve 100  $\mu$ M MOTS-c) 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 (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Kanülün beyin infüzyon kitine takılması.

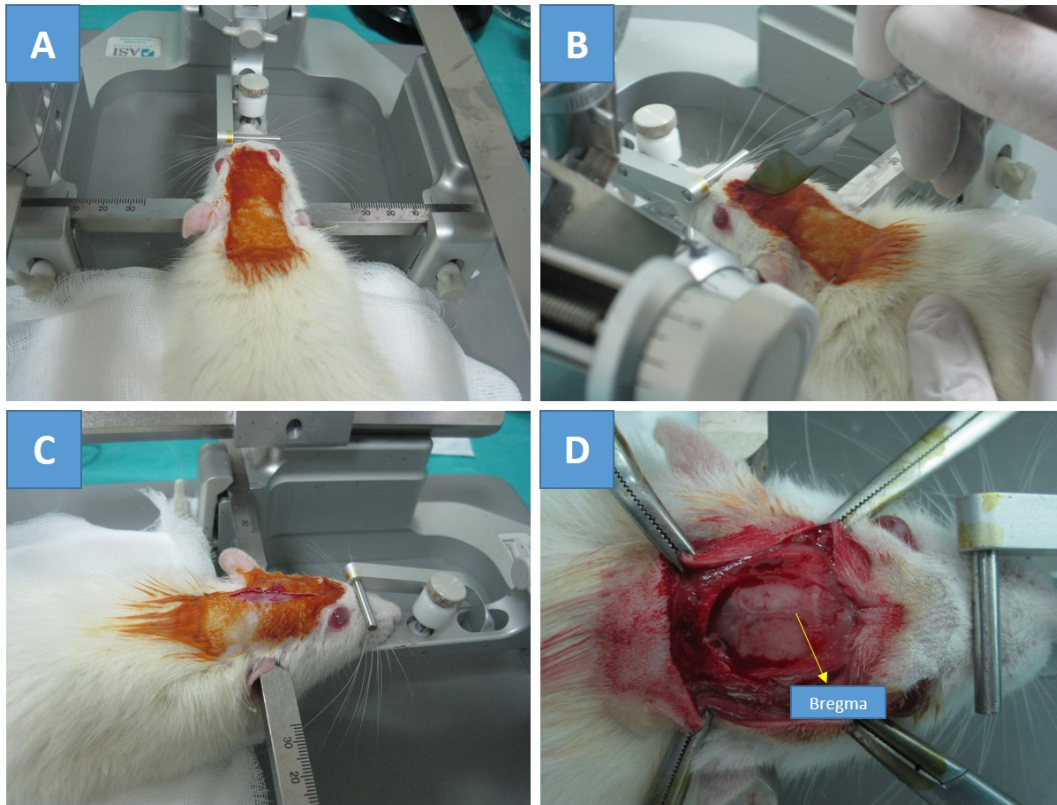
### 3.5.3. Sıçanların Operasyona Hazırlanması

Operasyon öncesi ameliyathane ortamında UV-C ışın kullanılarak sterilizasyon sağlandı. Her sıçan için ayrı cerrahi alet steril hale getirildi ve yeterli miktarda steril eldiven temini yapıldı. Sıçanlar, intramüsküler olarak 70 mg/kg ketamin (Richter Pharma AG, Avustralya) ve 8 mg/kg ksilazin (Alfazyne, Hollanda) ile anestezi altına

alındı. Sıçanların parmak kısırtma yanıtları ve fizyolojik yanıtın izlenmesi sonunda anestezi altına girdikleri belirlendi ve spontan hareketleri kaybolan sıçanların kafa derileri traş edilerek operasyona hazır hale getirildi.

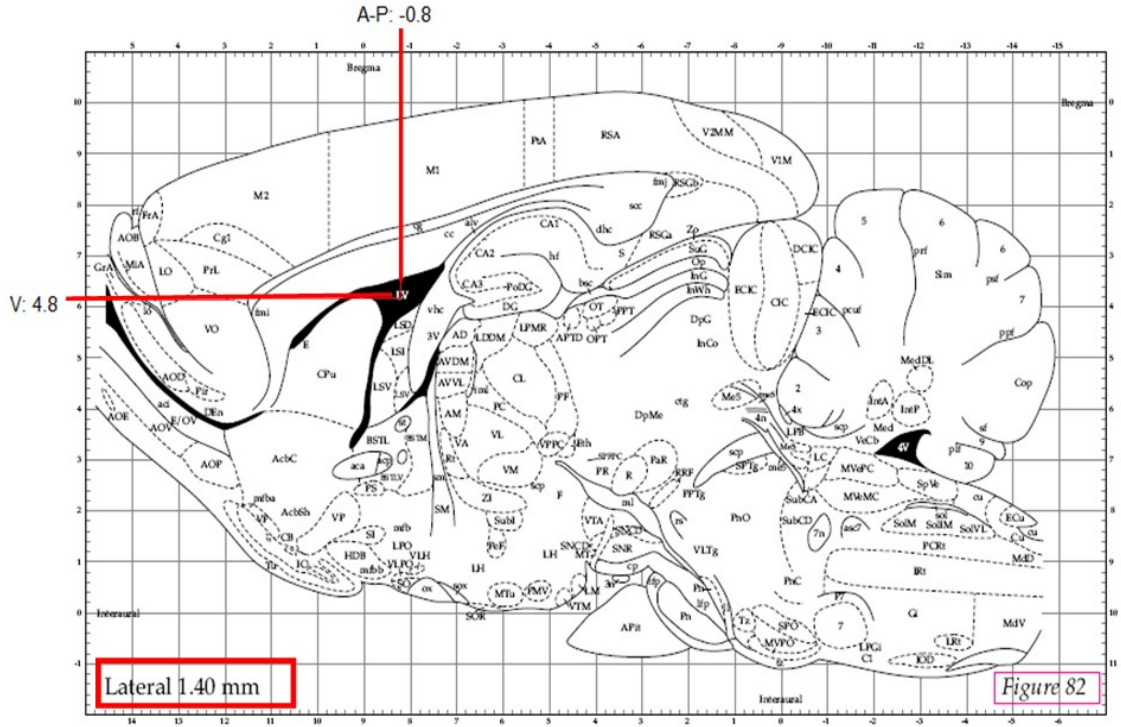
### 3.6. Hayvanların Stereotaksik Cihaza Yerleştirilmesi ve BİK İmplantasyonu

Hayvanlar stereotaksik cihaza (Rodent Stereotaxic Instruments, Harvard Apparatus, ABD) kulaklarından ve ağız kısmından kafasının yüzeyi yere tam paralel olacak şekilde sabitlendi. Traş edilen bölgeye %10 povidon iyodin sürülerek (Şekil 3.2A) kafatası derisi bir bistüri ile kesildi (Şekil 3.2B) ve kemik yapıya ulaşıldı (Şekil 3.2C). Kemik yüzeyi temizlenerek bregmanın açık bir şekilde görülmesi sağlandı (Şekil 3.2D).



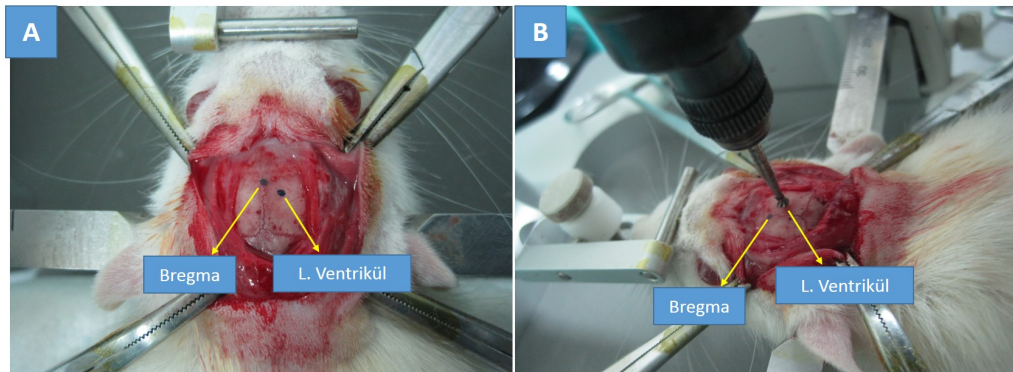
**Şekil 3.2.** Sıçanların stereotaksik cihaza sabitlenmesinden sonra kesi bölgesine povidon iyodin sürülmesi (A), kafa derisinin kesilerek (B), kemik dokuya ulaşılması (C) ve bregma noktasının belirlenmesi (D).

Lateral ventrikülün stereotaksik koordinatları Paxinos & Watson sıçan beyin atlasına göre belirlendi (125). 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 3.3).



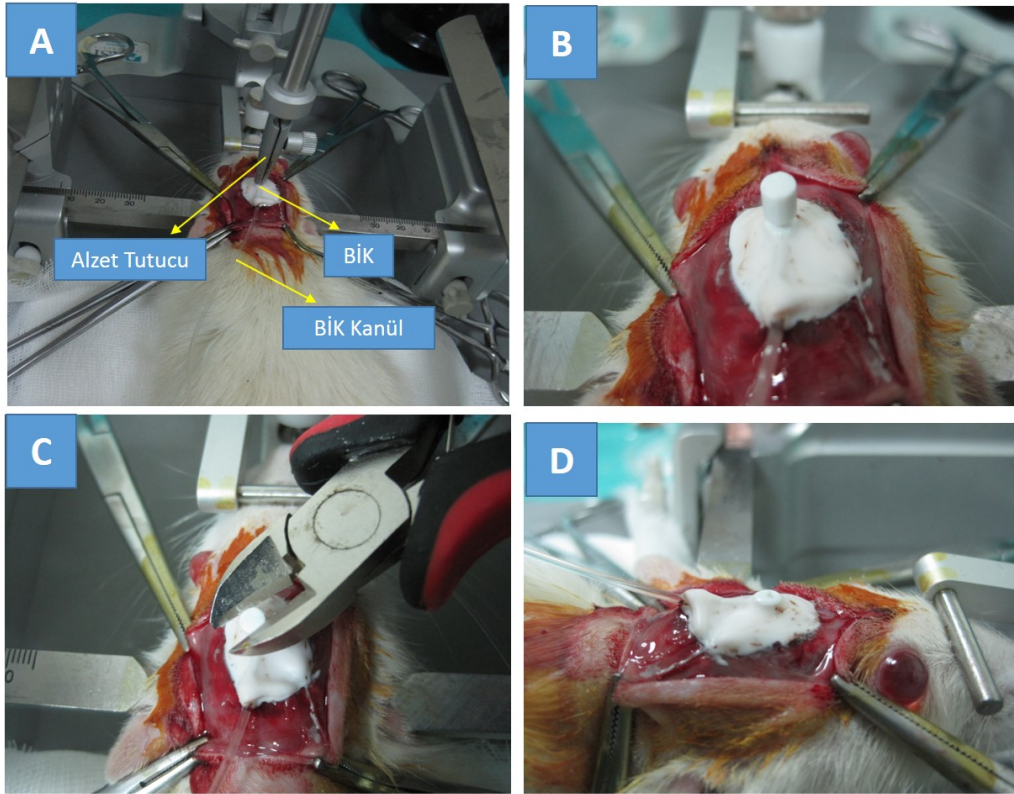
Şekil 3.3. Sıçan beyin atlasına göre lateral ventrikül koordinatları (125).

Referans noktası olarak kabul edilen bregmadan itibaren daha önceden Paxinos & Watson sıçan beyin atlasına belirlenen lateral ventrikülün koordinatlarına göre (lateral 1.40; posteriyor 0.8 mm) kafatasının delinecek kısmı belirlendi ve işaretlendi (Şekil 3.4A). İşaretlenen nokta matkap ile duraya zarar vermeden delindi (Şekil 3.4B).



**Şekil 3.4.** Lateral ventrikül için delinecek bölgenin işaretlenmesi (A) ve matkapla delinmesi (B).

Kalıcı kanül, BİK üzerindeki plastik tutma bölgesinden stereotaksik cihaza takılmış olan özel Alzet (ABD) tutacağına yerleştirildi ve açılan delikten lateral ventriküle indirildi (Şekil 3.5A). BİK'ler diş yapıştırıcısı (dental cement) yardımıyla kafatasına sabitlendi (Şekil 3.5B), mini yan keski yardımıyla BİK'in plastik başı kesildi (Şekil 3.5C) ve tekrardan dental cement ile kapatıldı (Şekil 3.5D).



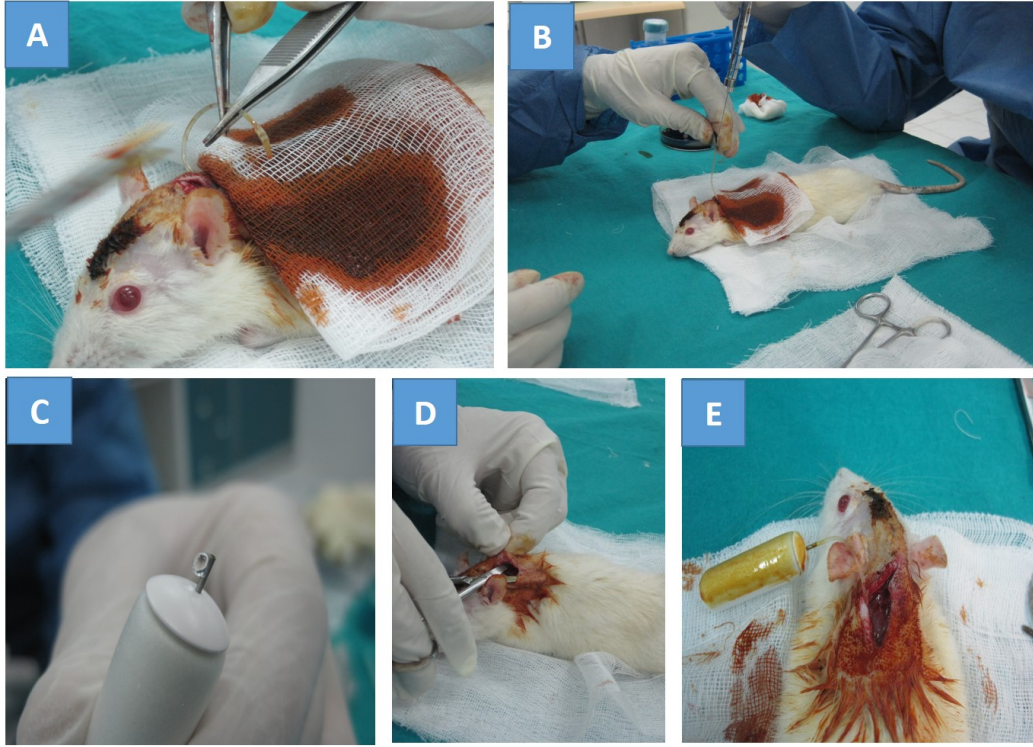
**Şekil 3.5.** Beyin infüzyon kitinin delinen kısımdan lateral ventriküle indirilmesi (A), kanül etrafının diş yapıştırıcısıyla yapıştırılması (B) ve kanül başının kesilerek diş yapıştırıcısıyla kaplanması (C, D).

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 operasyonun hayvanların yem tüketimi ve vücut ağırlıklarını

etkileyebileceği düşüncesi ve operasyona bağı olarak hayvanlarda ortaya çıkabilecek ağrı duygusunun çalışmayı önemli derecede etkileyebileceğinden ve yanlış sonuçlara ulaşmayı engellemek açısından 1 hafta hayvanların kafalarındaki kesinin 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 bağı 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**

7. günün sonunda sıçanlara spontan solunumları ve göz kırpma refleksleri 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 ve bu kısmı traş edilerek traş edilen ense kısmına küçük bir kesi açıldı. Kesi bölgesine dezenfektan sürülerek açılan kesiden daha önceden hayvanlara yerleştirilen beyin infüzyon kitinin kanülüne ulaşıldı (Şekil 3.6A). Hamilton enjektörü kullanılarak kanüde tıkanma olup olmadığı kontrol edildi (Şekil 3.6B) ve herhangi bir tıkanma ile karşılaşılmadı. Ozmotik mini pompalar infüze edilecek maddeler ile dolduruldu (Şekil 3.6C; Sham için yBOS, uygulama grupları için 10 ve 100 µM, MOTS-c). Ense derisi genişletilerek pompanın yerleştirilebileceği bir alan oluşturuldu (Şekil 3.6D) ve BİK ozmotik mini pompaya bağlanarak infüzyon başlatıldı (Şekil 3.6E).



**Şekil 3.6.** Sıçanların ense derisinde bulunan kanülün tespit edilmesi ve ense derisine açılan kesiden kanül ucunun çıkartılması (A), kanülün kontrolü (B), ozmotik mini pompanın doldurulması (C), ense derisi açılması (D) ve 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 gruptaki 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 beyin doku örnekleri de RT-PZR ve Western blot analizleri yapılmaya kadar -80°C'de muhafaza edilmeye başlandı.

### **3.9. Analizlerin Yapılması**

#### **3.9.1. Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)**

##### **Kullanılan Gereç ve Cihazlar**

Etüv (Gallenkamp, Economy Incubator Size, Ukranya), falkon tüp (Corning, Meksika), homojenizatör boncuğu (Next Advance, GB05-RNA 0.5 mm Dia, RNase-Free Glass Beads, ABD), homojenizatör (Next Advance, Averill Park NY, Bullet Blender Storm, ABD), mini plate spin (Labnet C1000, ABD), PZR ve kübit tüpleri (Neptune, Katalog: 3737.S.X, Biotix Laboratory Media, İngiltere), kübit (2.0 Fluormeter: Invitrogen by Life Teknotologies, Avusturalya), plate (AB Applied Biosystems, MicroAmp, Fast Optical 96-Well Reaction Plate With Barcode (0.1 mL), Singapur), plate yapıştırıcı (AB Applied Biosystems, MicroAmp, Optical Adhesive Film, ABD), polimeraz zincir reaksiyonu (Biometra, Almanya), santrifüj (Sigma, Almanya), spin (Labnet International, Katalog No: C1031B-230V, Kore), vorteks (Elektro-Mag, Türkiye), -20 °C derin dondurucu (Arçelik, Türkiye), -80 °C derin dondurucu (Nuair, Meksika), Real Time-PCR (AB Applied Biosystems, ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR Instrument, Foster City, ABD).

##### **Kullanılan Sarf Malzemeler**

Komplementer DNA sentez kiti (cDNA; AB Applied Biosystems, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Part No: 437522 REVB, Foster City, ABD), 2-merkaptoethanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS, Biotechnology Grade, AMRESCO, Katalog No: 36/37/39.15, ABD), Qubit RNA Kit (Invitrogen/Molecular Probes, Qubit RNA Assay Kit For Use With The Qubit 2.0 Fluorometer, ABD), Qubit RNA Reagent (Invitrogen/Molecular Probes, ABD), Qubit RNA buffer (Invitrogen/Molecular Probes, ABD), TaqMan gene expression master mix (AB Applied Biosystems, Katalog No: 4369016, ABD), RNA kiti (Invitrogen, Ambion by life technologies, PureLink RNA



Mini Kit, Katalog No: 12183018A, ABD), temizleme solüsyonu (Bioshop, Nuclease Removal Reagent, Kanada).

### **RT-PZR Yöntemi**

SSY ile beslenen sıçanların hipotalamuslarından TRH mRNA seviyeleri, yağ dokularından (beyaz ve kahverengi) UCP1 mRNA seviyeleri ve kas dokularından UCP3 mRNA seviyeleri RT-PZR analizi ile belirlendi.

### **Total RNA İzolasyonu**

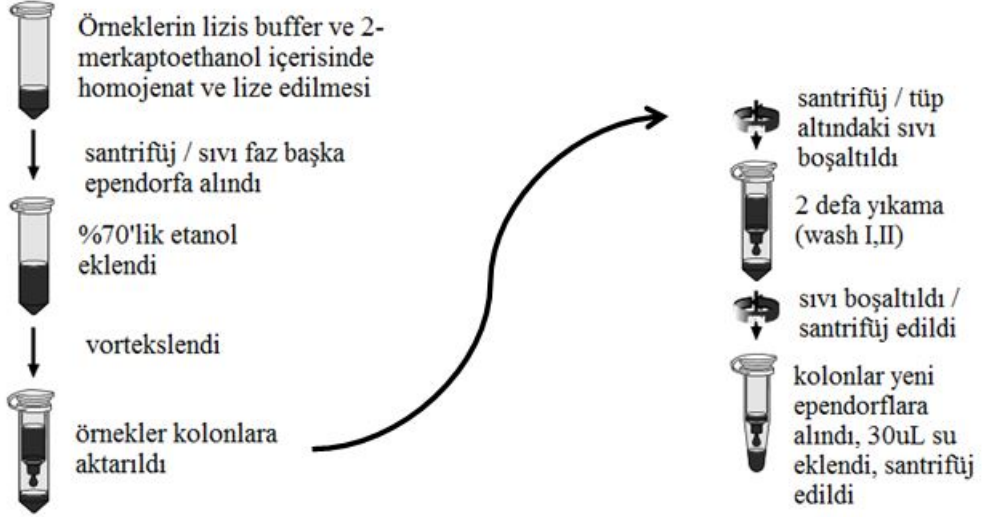
Beyin dokularında, yağ dokularında (beyaz ve kahverengi yağ doku) ve kas dokularında RNA izolasyonu için PureLink RNA mini kiti kullanıldı. Çalışma prosedürü aşağıdaki gibidir:

Kit içerisindeki lizis solüsyonundan 1 mL ve 2-merkaptoetanol'dan 10 µL falkon tüpüne alınıp karıştırılarak lizis tampon çözeltisi elde edildi. Beyin dokuları, yağ dokuları (beyaz ve kahverengi yağ doku) ve kas dokuları, doku ile eşit miktarda homojenizatör boncuğu ve hazırladığımız çözeltiden 600 µL alınarak kilitli ependorf tüplere bırakıldı. Homojenizatörde 3 dk 8. hızda parçalama işlemi yapıldı. Örnekler 12.000xg'de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi.

RNA içeren sıvı fazın hepsi yeni bir ependorfa alınarak üzerine 500 µL %70'lik etanol eklendi ve vortekslendi. Örneklerden 700 µL alınarak kit içerisindeki kolonlara aktarıldı ve 12.000xg'de 15 sn oda sıcaklığında santrifüj edildi. Kalan örnekler de kolonlara aktarılarak aynı şekilde santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası toplama tüpünün altında biriken sıvı boşaltıldı. Yıkama işlemleri kitin içindeki Wash I ve Wash II solüsyonları ile yapıldı. Örnekler 700 µL Wash I solüsyonu eklenerek 12.000xg'de 15 sn santrifüj edildi. Toplam tüpü değiştirildi. Örnekler 500 µL Wash II solüsyonu eklenerek 12.000xg'de 15 sn santrifüj edildi ve bu işlem iki defa tekrarlandı. Tüpün altındaki sıvı boşaltılarak hiçbir şey eklenmeden 12.000xg'de 2 dk santrifüj edildi.

Kolonlar alınarak yeni ependorf tüplere bırakıldı ve üstüne 30 µL RNase içermeyen su eklenerek oda sıcaklığında 1 dk bekletildi ve 12.000xg'de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Ependorf tüpün dibindeki sıvı kısım bu aşamadan sonra RNA içermektedir (Şekil 3.7). RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklandı.



Şekil 3.7. Dokularda RNA izolasyon basamakları (126).

### Spektrofotometrik RNA Ölçümü

RNA ölçümü için Qubit RNA Assay Kit kullanıldı. RNA miktarı  $\mu\text{g/mL}$  olarak ölçüldü. cDNA sentezi için RNA miktarlarının eşitlenmesi amacıyla okunan en düşük RNA değeri standart alındı. cDNA için her bir gruptaki örneklerden RNA havuzu hazırlandı.

### Komplementer DNA Sentezi

cDNA sentezi için High-Capacity cDNA Reverse Trancription Kit kullanıldı (kit içeriği; 10XRT Buffer, 25XdNTP mix, 10XRT Random Primers, MultiScribe Reverse Transcriptase). cDNA sentezi için havuz yapılan RNA örneklerinden 10  $\mu\text{L}$  kullanıldı. cDNA sentezi toplam 20  $\mu\text{L}$  hacimde gerçekleştirildi. Sentez için 10  $\mu\text{L}$  RNA örneği, 2  $\mu\text{L}$  10XRT random primer, 2  $\mu\text{L}$  10XRT buffer, 0.8  $\mu\text{L}$  25XdNTP mix, 4.2  $\mu\text{L}$  nükleaz içermeyen su ve en son olarak 1  $\mu\text{L}$  MultiScribe Reverse Transcriptase enzimi kullanıldı (Tablo 3.3). Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi. 25 °C'de 10 dk, 37 °C'de 120 dk, 85 °C'de 5 dk ve 4 °C'de  $\infty$  olacak şekilde cihazda bekletildi (Tablo 3.4). Oluşan cDNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

**Tablo 3.3.** cDNA karışım miktarı.

Bileşik	Hacim ( $\mu\text{L}$ )	Katalog No
10XRT Tamponu	2.0	4319981
25XdNTP karışımı (100 mM)	0.8	4367381
MultiScribe Revers Transkriptaz	1.0	4319983
10XRT Random Primer	2.0	4319979
Nükleaz içermeyen $\text{H}_2\text{O}$	4.2	
Reaksiyon toplamı	10.0	

**Tablo 3.4.** cDNA sentezi için uygulanan PZR programı.

PZR	1.Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zaman	10 dk	120 dk	5 dk	$\infty$

### RT-PZR ile cDNA Amplifikasyonu

Revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA'lar sekans spesifik primerlerin varlığında RT-PZR ile amplifiye edildi.  $\beta$ -aktin; UCP1 ve UCP3 genlerinin belirlenmesi için sıçan spesifik primerler kullanıldı. RT-PZR analizleri sonucunda gen ekspresyonundaki farklılıkların hesaplanmasında  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  metodu kullanıldı. RT-PZR üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. RT-PZR plate hazırlanırken cDNA örneklerinde her bir kuyucuğa 2  $\mu\text{L}$  kondu. Buz üzerinde her bir örnek için 5  $\mu\text{L}$  TaqMan Master Mix, 2.5  $\mu\text{L}$  nükleaz içermeyen su ve 0.5  $\mu\text{L}$  primer hibridizasyon probu olacak şekilde örnek sayısına göre hesaplanan bileşen miktarları ependorflara bırakıldı ve vortekslendi. Platedeki cDNA örneklerinin üzerine 8  $\mu\text{L}$  hazırlanan karışımdan (Tablo 3.5) bırakılarak platein üzeri optik yapıştırıcı filmle kapatıldı. Plate örneklerin tamamen dibe çökmesi ve oluşan kabarcıkların yok edilmesi amacıyla mini plate spin cihazında 1 dk santrifüj edildi.

**Tablo 3.5.** RT-PZR için her bir kuyucuğa konan bileşikler.

<b>Bileşik</b>	<b>Miktar (µL)</b>
cDNA	2.0
Primer	0.5
TaqMan Mix	5.0
Nükleaz içermeyen H <sub>2</sub> O	2.5
Toplam	10.0

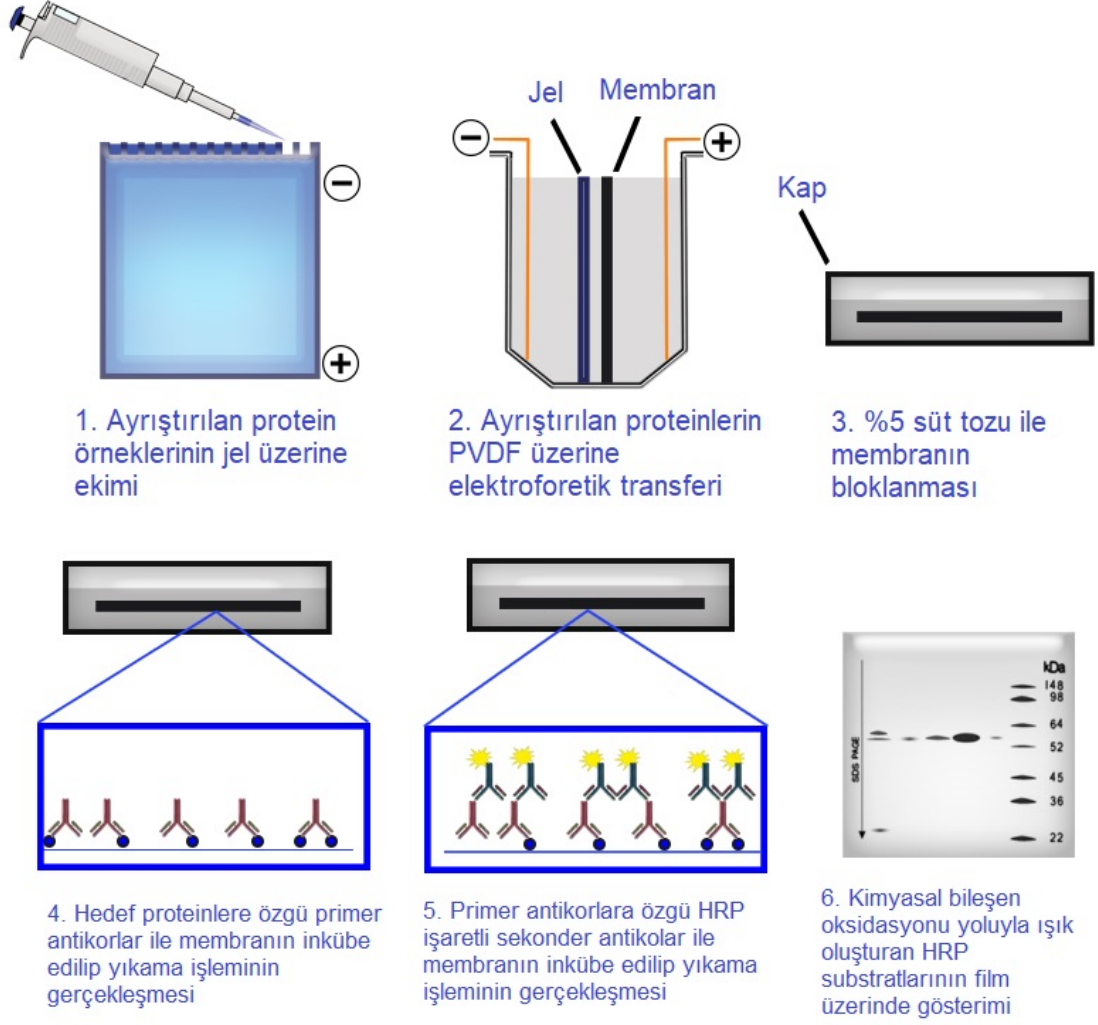
Gen ekspresyon seviyeleri, Applied Biosystems 7500 RT-PZR sistemi ile ölçüldü. Çalışmada β-aktin kontrol gen (housekeeping) olarak kullanıldı. Sıcaklık koşulları 50 °C’de 2 dk, 95 °C’de 10 dk X 40 siklüs, 95 °C’de 15 sn ve 60 °C’de 1 dk olacak şekilde ayarlandı (Tablo 3.6).

**Tablo 3.6.** Uygulanan RT-PZR programı (RT-PZR X 40 döngü).

	<b>1. Adım</b>	<b>2.Adım</b>	<b>3.Adım</b>	<b>4.Adım</b>
<b>Sıcaklık</b>	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
<b>Zaman</b>	2 dk	10 dk	15 sn	1 dk

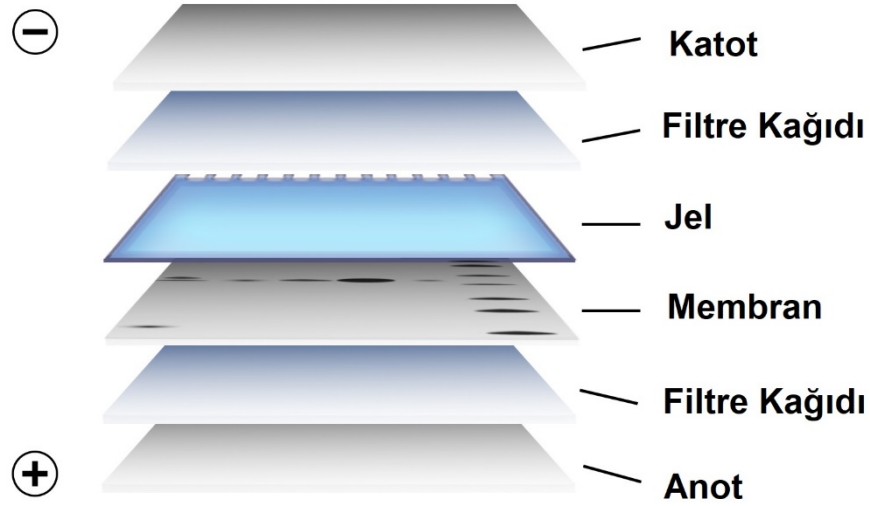
### **3.9.2. Western Blot Analizi**

Western blot analizleri Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı. SSY ile beslenen sıçanların yağ dokularından (beyaz ve kahverengi) UCP1 ve kas dokularından UCP3 protein seviyeleri western blot analizleri ile belirlendi. Yapılan Western Blot analizinin genel prosedürü Şekil 3.8’de gösterilmiştir.



**Şekil 3.8** Western blot analizine genel bakış.

Alınan bütün hücre lizatları, lizis tamponu kullanılarak elde edildi. Toplam protein konsantrasyonu, protein miktarı ölçüm kiti kullanılarak tespit edildi. Her bir örnekten toplam proteinin 30 µg'ı, %15'lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde yürütüldü ve Poliviniliden Florür (PVDF) membranlara transfer edildi (Şekil 3.9).



**Şekil 3.9.** Western Blot için hazırlanan sandviçin yapısı

Membranlar TBS tamponu ile hazırlanan %5 kuru süt ile bloke edildi, yıkama aşamalarından sonra %2.5 kuru süt içinde sıçan spesifik UCP1 ve UCP3 primer antikorları ile 4°C’de gece boyunca inkübe edildi. Membranlar TBS-T ile yıkandıktan sonra, HRP konjuge edilmiş anti-tavşan veya anti-fare sekonder antikorunu ile 1 saat inkübe edildi. Yükleme kontrolü olarak fare anti- $\beta$ -aktin antikorunu kullanıldı.

Kemilüminesan tarama, Chemi Glow tarama ajanları ile gerçekleştirildi. Blotlar UVP Chemi Doc-It 2 görüntüleyici ile görüntülendi ve Image J programı ile dansitometre ölçümleri yapıldı. (127, 128). Deneyde ölçülen doku protein seviyesi  $\beta$ -aktin’e oranlandı.

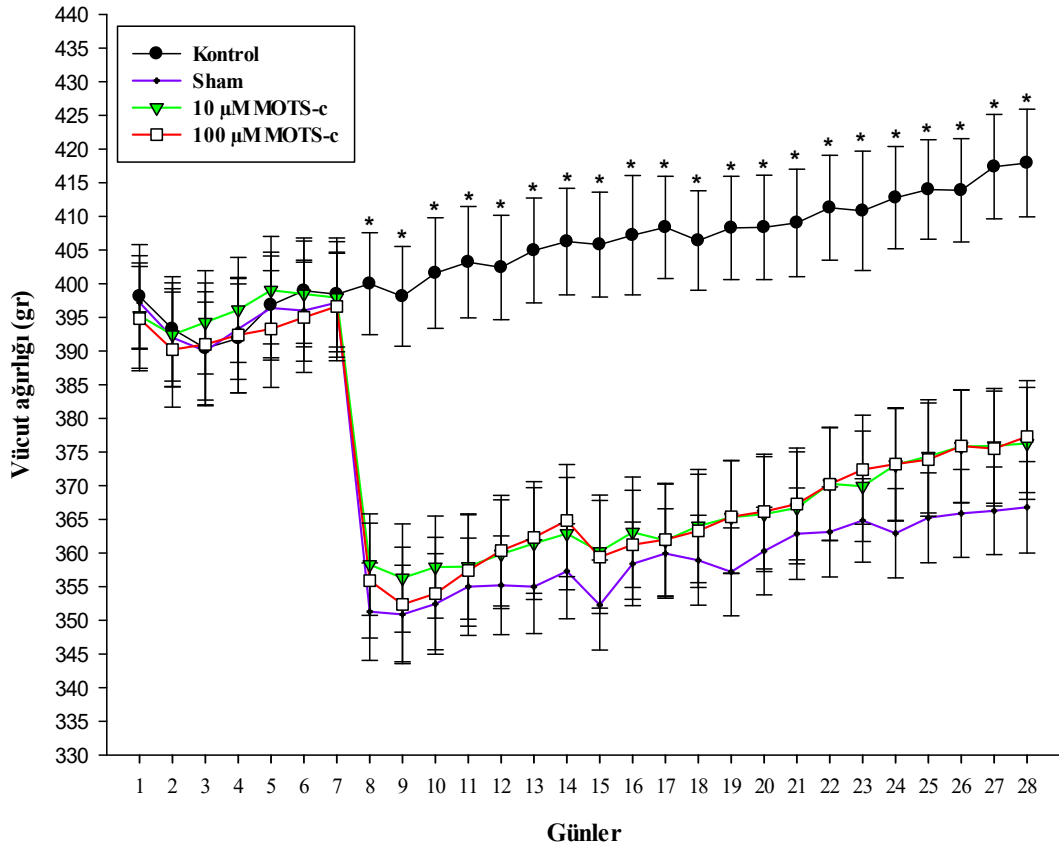
### 3.9.3. Verilerin İstatistiksel Analizi

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. İcv MOTS-c Uygulanmasının Vücut Ağırlığı Üzerine Etkileri

İcv MOTS-c uygulamasının deney süresince (1-28. günler) sıçanların vücut ağırlıkları üzerindeki etkisi Şekil 4.1’de sunulmuştur. Gruplardaki sıçanların deneyin 1.haftasında (1-7.gün) ortalama vücut ağırlıkları bakımından benzer olduğu görüldü. Deneyin 7.günün sonunda uygulama gruplarındaki (Sham, 10 ve 100  $\mu$ M MOTS-c) sıçanların kontrol grubundaki sıçanlara göre vücut ağırlıklarında azalma meydana geldiği ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ). İnfüzyon süresince (15-28.gün) MOTS-c uygulanan gruplardaki (10 ve 100  $\mu$ M MOTS-c) sıçanların ortalama vücut ağırlığı sham grubuna göre artış gösterse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0.05$ ).

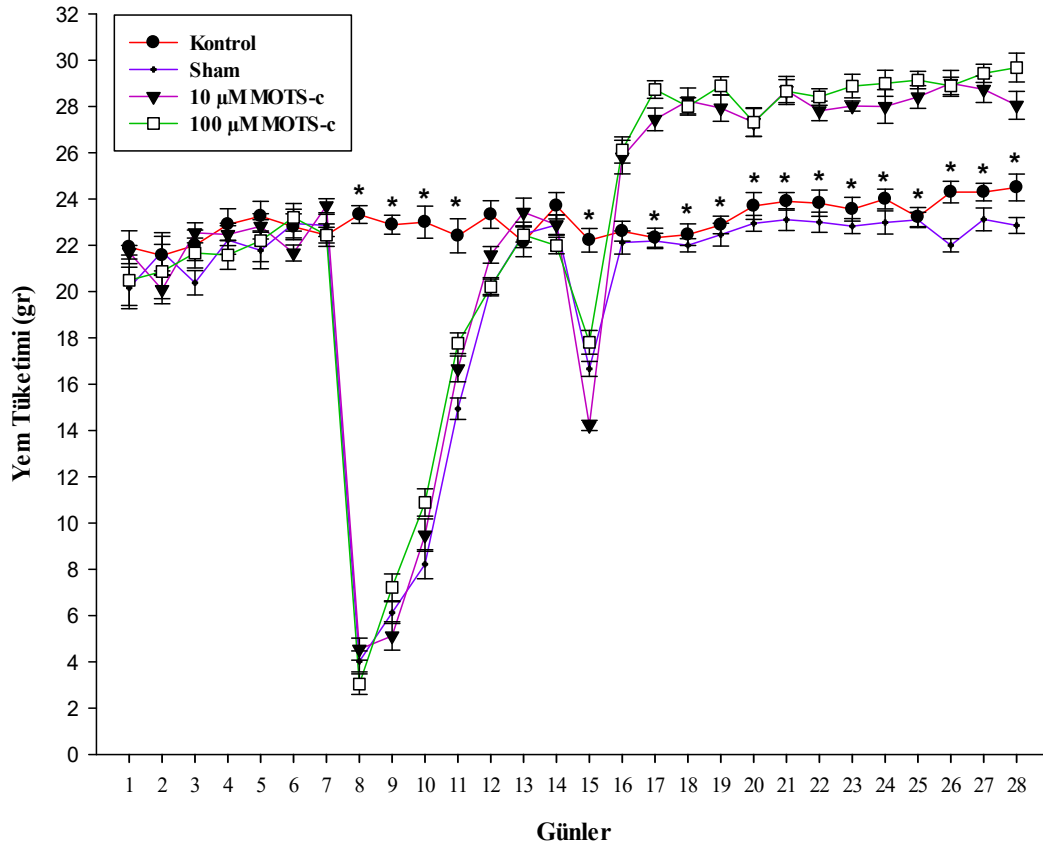


Şekil 4.1. Gruplardaki hayvanların deney süresince (1-28. günler) ulaştıkları ortalama vücut ağırlıkları (\* $p<0.05$ ). (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı).

Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama standart sapma olarak ifade edildi)

## 4.2. İcv MOTS-c Uygulanmasının Yem Tüketimi Üzerine Etkileri

İcv MOTS-c uygulamasının deney süresince (1-28.gün) sıçanların yem tüketimleri üzerindeki etkisi Şekil 4.1’de sunulmuştur. Gruplardaki sıçanların deneyin 1.haftasında (1-7.gün) ortalama yem tüketimleri bakımından benzer olduğu görüldü. Deneyin 7.günün sonunda uygulama gruplarındaki (Sham, 10 ve 100  $\mu$ M MOTS-c) sıçanların yem tüketimlerinin kontrol grubuna göre azalması istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). İnfüzyon süresince (15-28.gün) MOTS-c uygulanan gruplardaki (10 ve 100  $\mu$ M MOTS-c) sıçanların yem tüketimlerinin sham grubuna göre artış gösterdiği belirlendi.

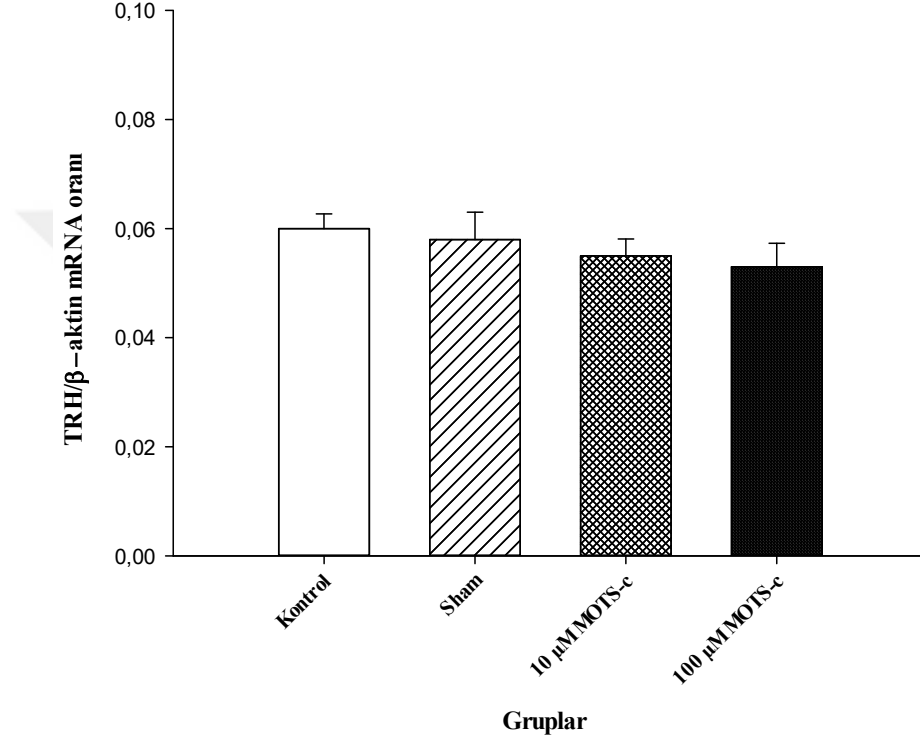


**Şekil 4.2.** Gruplardaki hayvanların deney süresince (1-28. günler) tükettikleri ortalama yem miktarı (\* $p<0.05$ ). (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama standart sapma olarak ifade edildi)



### 4.3. İcv MOTS-c Uygulamasının TRH mRNA Seviyeleri Üzerine Etkisi

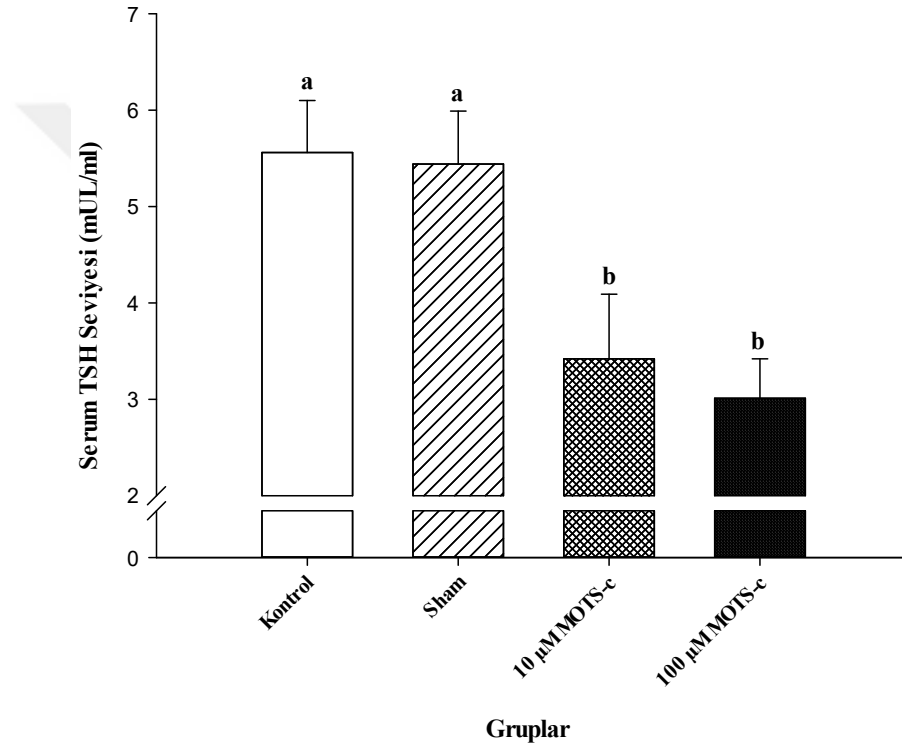
Sıçanlara icv olarak uygulanan MOTS-c'nin hipotalamustaki TRH mRNA seviyesi üzerine etkisi Şekil 4.3'de sunulmuştur. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda sıçanların hipotalamus dokularındaki TRH mRNA ifadesinin benzer olduğu tespit edildi ( $p>0.05$ ).



**Şekil 4.3.** İcv MOTS-c uygulamasının hipotalamus dokularındaki TRH/β-aktin mRNA oranına etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi.)

#### 4.4. İcv MOTS-c Uygulamasının Serum TSH Seviyeleri Üzerine Etkisi

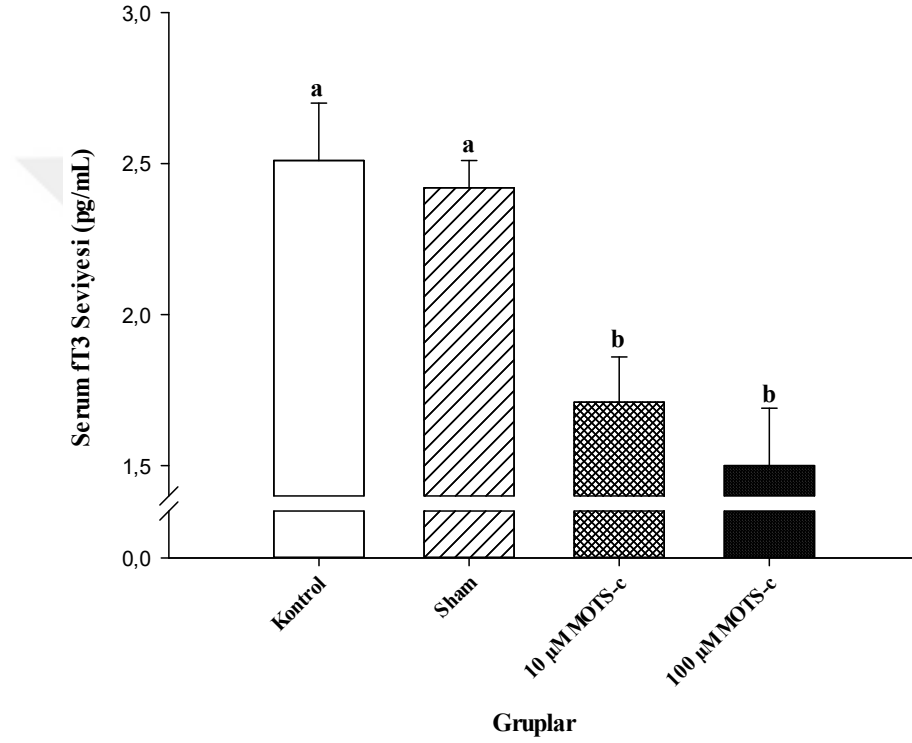
İcv olarak uygulanan MOTS-c'nin serum TSH seviyesi üzerine etkileri Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, serum TSH seviyeleri bakımından kontrol ve sham grupları arasında önemli bir farklılık olmadığı ( $p>0.05$ ) ancak MOTS-c'nin uygulanan her iki konsantrasyonunun da (10 ve 100  $\mu\text{M}$ ) kontrol ve sham gruplarına kıyasla serum TSH düzeyini azalttığı ( $p<0.05$ ), meydana gelen bu azlmanın ise doz bağımlı olmadığı tespit edildi.



**Şekil 4.4.** İcv MOTS-c uygulamasının serum TSH seviyesi üzerine etkileri. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmiş 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,  $p<0.05$ ).

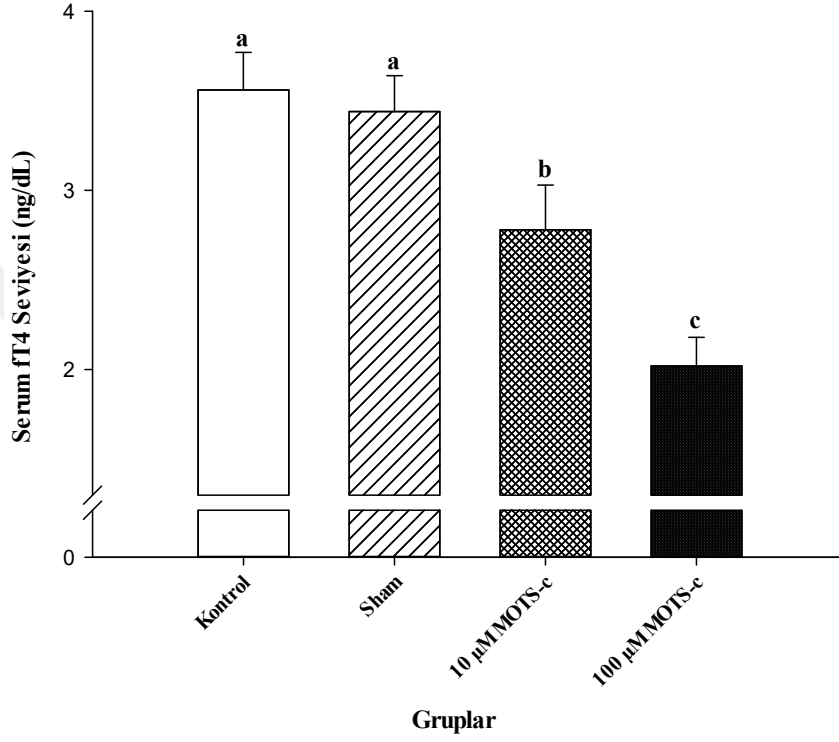
#### 4.5. İcv MOTS-c Uygulamasının Serum T3 ve T4 Seviyeleri Üzerine Etkisi

İcv olarak uygulanan MOTS-c'nin serum T3 seviyesi üzerine etkileri Şekil 4.5'de sunulmuştur. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, kontrol ve sham grupları arasında serum T3 seviyeleri bakımından herhangi bir farklılık olmadığı ( $p>0.05$ ) fakat 10 ve 100  $\mu\text{M}$  MOTS-c uygulamasının kontrol ve sham gruplarına kıyasla serum T3 seviyesini azalttığı belirlendi ( $p<0.05$ ).



**Şekil 4.5.** İcv MOTS-c uygulamasının serum T3 seviyesi üzerine etkileri. (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,  $p<0.05$ ).

İcv şeklinde uygulanan MOTS-c'nin serum T4 seviyesi üzerine etkileri Şekil 4.6'de 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  $\mu\text{M}$  uygulanan MOTS-c'nin kontrol ve sham gruplarına kıyasla serum T4 seviyesini azalttığı ve bu azalmanın doz bağımlı olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ).

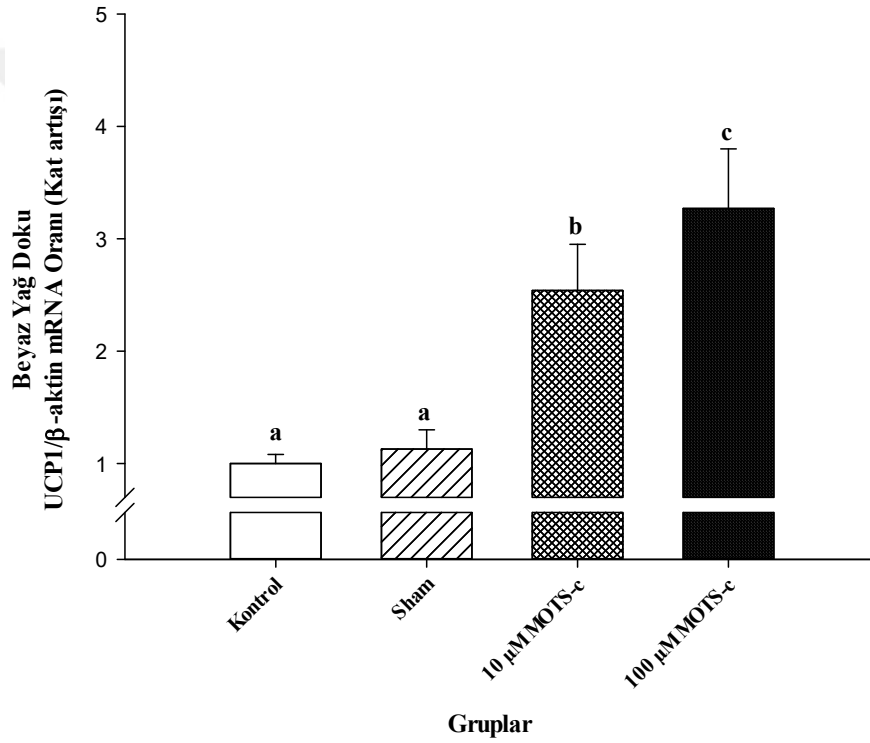


**Şekil 4.6.** İcv MOTS-c uygulamasının serum T4 seviyesi üzerine etkileri. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edildi. a, b ve c birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir,  $^{a,b,c}p<0.05$ ).

## 4.6. İcv MOTS-c Uygulamasının Periferel UCP'lerin mRNA Seviyeleri Üzerindeki Etkileri

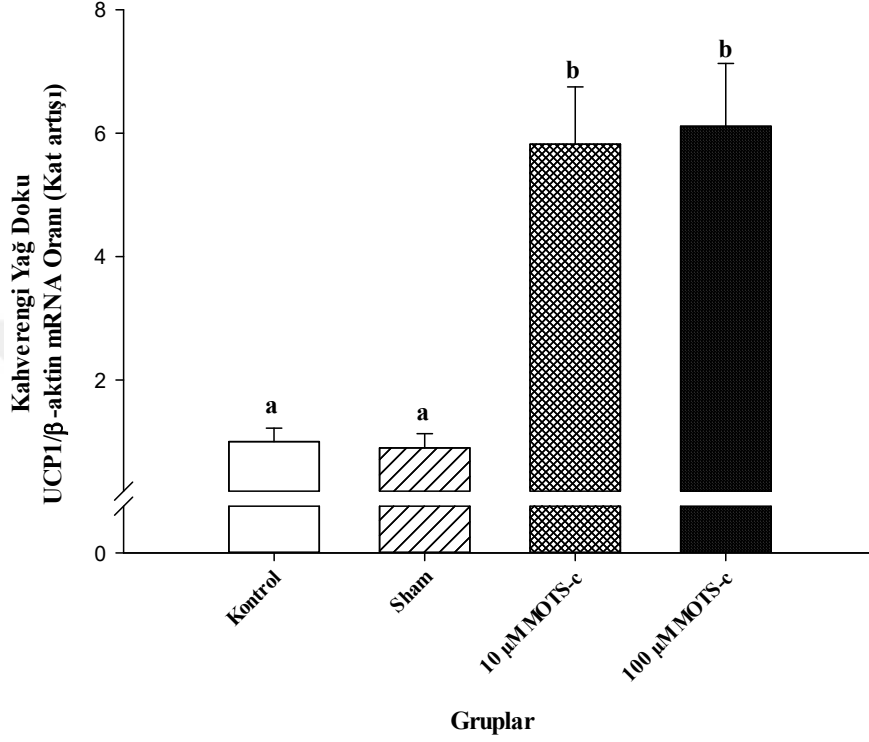
### 4.6.1. Yağ Doku UCP1 mRNA Seviyeleri Üzerindeki Etkisi

İcv MOTS-c infüzyonunun sıçanların beyaz yağ dokularındaki UCP1 mRNA ifade düzeyindeki etkileri Şekil 4.7'da verilmiştir. 10 ve 100  $\mu$ M MOTS-c infüzyonunun sıçanların beyaz yağ dokularındaki UCP1 mRNA ifadesini önemli düzeyde arttırdığı ve bu etkinin doz bağımlı olduğu görüldü ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 4.7.** İcv MOTS-c uygulamasının beyaz yağ dokudaki UCP1/β-aktin mRNA oranına 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, b, ve c birbirinden farklı; <sup>a,b,c</sup> $p < 0.05$ ).

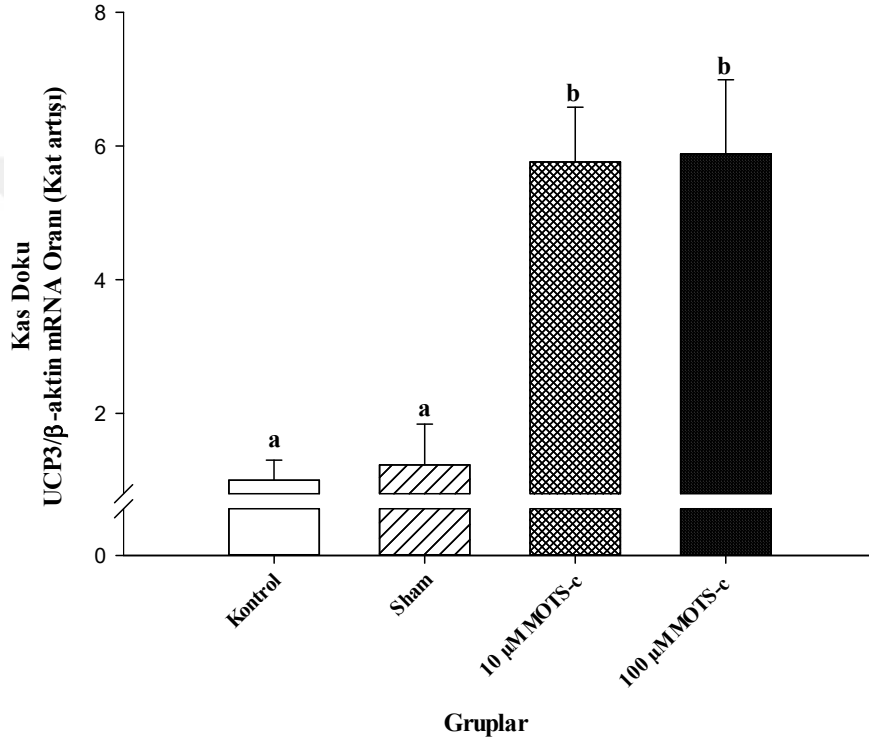
İcv MOTS-c infüzyonunun sıçanların kahverengi yağ dokularındaki UCP1 mRNA ifade düzeyindeki etkileri Şekil 4.8’de sunulmuştur. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu MOTS-c infüzyonunun her iki konsantrasyonunun (10 ve 100  $\mu$ M) sıçanların beyaz yağ dokularındaki UCP1 mRNA ifadesini arttırdığı tespit edildi ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 4.8.** İcv MOTS-c uygulamasının kahverengi yağ dokudaki UCP1/β-Aktin mRNA oranına 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;  $a,b p < 0.05$ )

#### 4.6.2. Kas Doku UCP3 mRNA Seviyeleri Üzerindeki Etkisi

İcv MOTS-c infüzyonunun sıçanların kas (biceps) dokularındaki UCP3 mRNA ifade düzeyindeki etkileri Şekil 4.9’da sunulmuştur. 10 ve 100 µM MOTS-c infüzyonunun sıçanların kas dokularındaki UCP3 mRNA ifadesini önemli düzeyde arttırdığı yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda belirlendi ( $p < 0.05$ ).

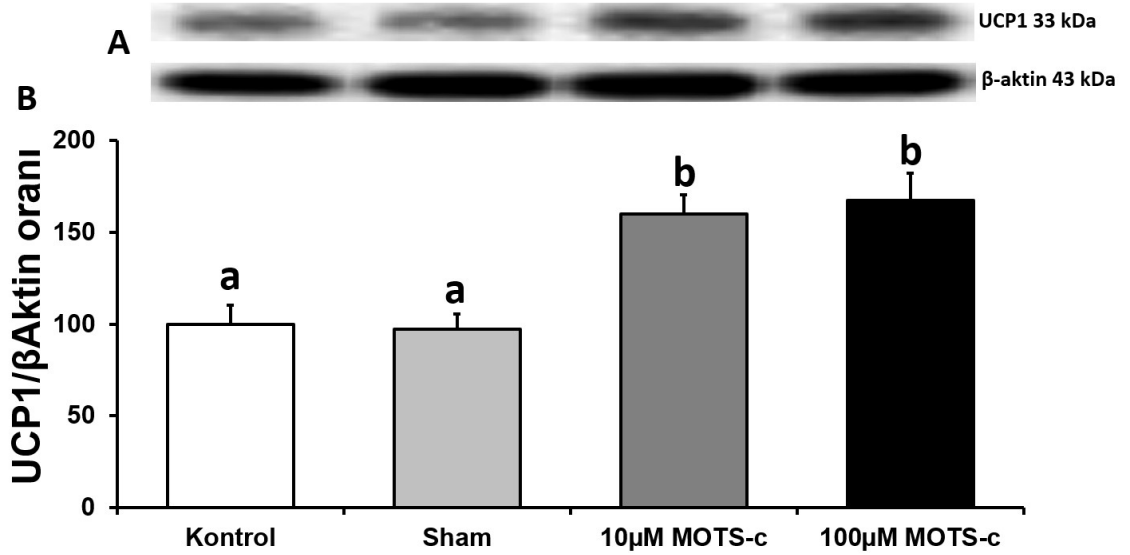


**Şekil 4.9.** İcv MOTS-c uygulamasının kas dokudaki UCP3/β-Aktin mRNA oranına etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. a ve b birbirinden farklı; <sup>a,b</sup> $p < 0.05$ ).

## 4.7. İcv MOTS-c Uygulamasının Periferel UCP'lerin Protein Seviyeleri Üzerindeki Etkileri

### 4.7.1. Yağ Doku UCP1 Protein Seviyeleri Üzerindeki Etkisi

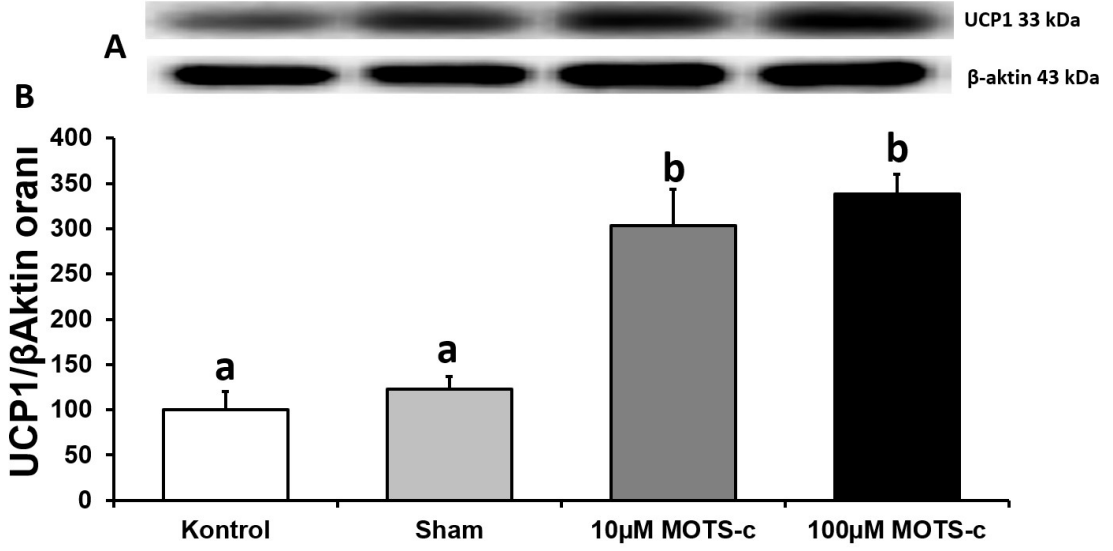
İcv MOTS-c uygulaması sonrasında sıçanların beyaz yağ dokularındaki UCP1 protein ifadesi düzeylerindeki değişiklikler Şekil 4.10'da verilmiştir. İcv MOTS-c uygulaması UCP1 protein ifadesini 10 ve 100 µM MOTS-c uygulanan gruplarda artırdığı ve meydana gelen bu artmanın istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde olduğu görüldü ( $p<0.05$ ).



**Şekil 4.10.** İcv MOTS-c uygulamasının beyaz yağ dokusundaki UCP1 protein oranına etkisinin western blot jel görüntüsü (A) ve UCP1 bantlarının densimetrik analizinin gösterilmesi (B). (a ve b birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir,  $a,b p<0.05$ ).



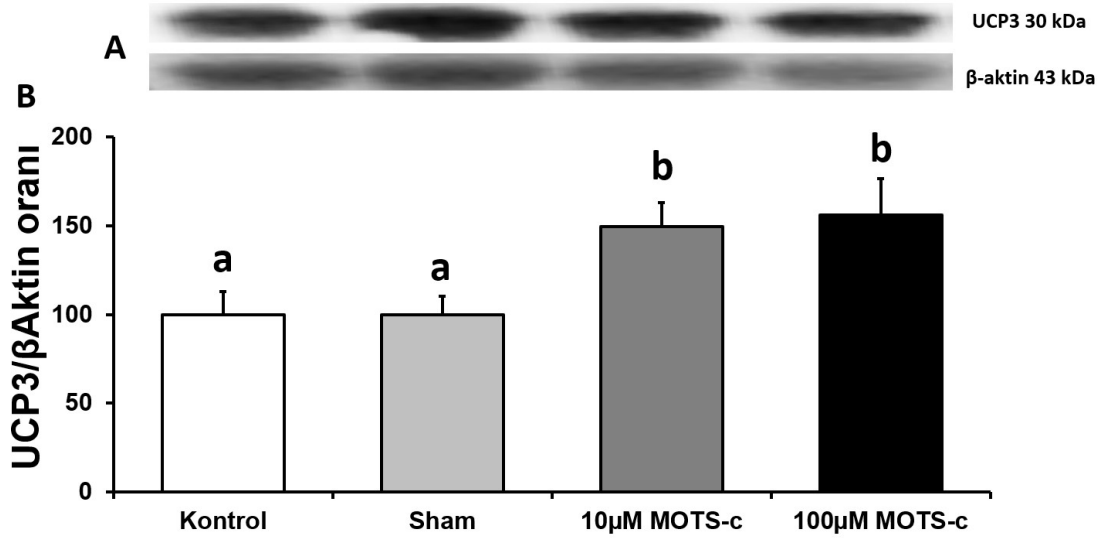
İcv MOTS-c uygulaması sonrasında kahverengi yağ dokusundaki UCP1 protein ifadesi düzeylerindeki değişiklikler Şekil 4.11’de sunulmuştur. İcv MOTS-c uygulamasının her iki konsantrasyonunun (10 ve 100  $\mu$ M) UCP1 protein ifadesini arttırdığı ve meydana gelen bu artmanın istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde olduğu belirlendi ( $p < 0.05$ ).



Şekil 4.11. İcv MOTS-c uygulamasının kahverengi yağ dokusundaki UCP1 protein oranına etkisinin western blot jel görüntüsü (A) ve UCP1 bantlarının densimetrik analizinin gösterilmesi (B). (a ve b birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir,  $a,b p < 0.05$ ).

#### 4.7.2. Kas Doku UCP3 Protein Seviyeleri Üzerindeki Etkisi

İcv MOTS-c uygulaması sonrasında sıçanların kas (biceps) dokularındaki UCP3 protein ifadesi düzeylerindeki değişiklikler Şekil 4.12’de gösterilmiştir. İcv MOTS-c uygulamasının her iki konsantrasyonunun (10 ve 100  $\mu$ M) UCP3 protein ifadesini arttırdığı ve meydana gelen bu artmanın istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde olduğu belirlendi ( $p < 0.05$ ).



Şekil 4.12. İcv MOTS-c uygulamasının kas dokusundaki UCP3 protein oranına etkisinin western blot jel görüntüsü (A) ve UCP3 bantlarının densimetrik analizinin gösterilmesi (B). (a, ve b birbirinden farklı olup farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir, a,b  $p < 0.05$ ).

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. MOTS-c'nin Vücut Ağırlığı ve Gıda Alımı Üzerine Etkileri

Hipotalamus, iştah mekanizması üzerinden gıda alımının kontrolünü sağlayan önemli bir merkezdir (129). Memelilerde lateral hipotalamusun açlık ventromedial hipotalamusun ise tokluk sinyallerinin değerlendirildiği alanlar olduğu bilinmektedir. PVN lezyonları obezite ile sonuçlanırken, lateral hipotalamik alan lezyonları anoreksi ile sonuçlanır (130). Vücut ağırlığında meydana gelen kayıba yanıt olarak lateral hipotalamik alandaki nöronlar aktive olup PVN nöronlarından anoreksijenik sinyal iletiminde meydana gelen azalmayla birlikte gıda alımı artar. Enerji dengesi arkuat çekirdekte yer alan iki nöron tipiyle düzenlenmektedir. Birinci tip nöronlar, preopiomelanokortin (POMC) ve kokain-amfetaminle düzenleyen transkript (CART) salgılayan nöronlar, besin alımını azaltırken enerji harcanmasını artırır. İkinci tip nöronlar ise NPY ve AgRP üretilen besin alımını arttırarak enerji harcanmasını azaltır (129).

Mevcut literatür MOTS-c'yi obeziteyi ve insülin direncini azaltan peptid yapılı bir hormon olarak tanımlamaktadır. Gıda alımı ve enerji harcanmasının hipotalamik kontrolü mekanizmaları göz önüne alındığında MOTS-c'nin merkezi alana bir takım sinyaller göndererek etkili olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda MOTS-c ile vücut ağırlığı kısmen ilişkilendirilmeye çalışılmış; ancak MOTS-c'nin yem tüketimi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı kapsamlı çalışmalar yok denecek kadar azdır. Literatürde MOTS-c hakkında bilinenler oldukça kısıtlı olmakla beraber yapılan çalışmalar genellikle farklı hastalık ve modellerde MOTS-c'nin seviyesini belirlemeye yöneliktir. Lee ve ark. tarafından yapılan *in vitro* bir çalışmada MOTS-c'nin hücre metabolizma üzerindeki etkisi araştırılmış ve sürekli değişen metabolitler gözlenmiş; pürin metabolizması ve dipeptid metabolizması ile ilgili olanlar sürekli azalırken, asilkarnitin metabolizması ve metiyonin döngüsü ile ilgili olanlar önemli ölçüde artmıştır (1). *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarda MOTS-c uygulamasına bağlı olarak hücre içi glukoz girişinin arttığı ayrıca akut MOTS-c uygulamasının kan glukoz seviyelerini düşürdüğü gösterilmiş ve MOTS-c'nin glukoz kullanımı ve insülin duyarlılığı üzerinde birtakım roller üstlendiği ortaya konmuştur (1). Yapılan bir başka çalışmada ise farelere 7 gün süresince ip olarak uygulanan MOTS-c'nin insülin

duyarlılığını ve glukoz klirensini arttırdığı tespit edilmiştir (1). MOTS-c'nin insülin duyarlılığını ve glukoz homeostazını artırması bu peptidin obezite ile de ilişkili olabileceği düşündürmüştür. Sonrasında bu düşünceyle SSY ve YYD ile beslenen farelere ip olarak uygulanan MOTS-c'nin SSY ile beslenen farelerin vücut ağırlığında etkili olmadığı, YYD ile beslenen farelerin ise vücut ağırlığında belirgin şekilde azalma olduğu rapor edilmiştir (1). Ayrıca MOTS-c tedavisinin YYD'nin neden olduğu hiperinsülinemi önlediği, glukoz homeostazında iyileşmeye neden olduğu ve hepatik lipid birikimini büyük ölçüde azalttığı ileri sürülmüştür (1). YYD ile indüklenen obezite modelinde yapılan bir başka çalışmada farelere uygulanan MOTS-c'nin insülin duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir (28). Yapılan bu araştırmalar MOTS-c'nin, ısı üretimi de dâhil olmak üzere enerji tüketimini artırarak, glukoz kullanımını ve insülin duyarlılığını iyileştirerek YYD kaynaklı obeziteyi önlediğini derlemektedir.

Bizim çalışmamızın ilk haftasında (1-7.günler) bireysel olarak tekli kafeslerde tutulan sıçanların günlük yem tüketimi ve vücut ağırlıklarının benzer olduğu görüldü ( $p>0.05$ ). 8. gün BİK yerleştirilen sıçanların kontrol grubuna kıyasla ortalama tükettikleri yem miktarları ile vücut ağırlıklarının azaldığı belirlendi ( $p<0.05$ ). Meydana gelen bu azalmanın yapılan cerrahi operasyona bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir. Tekin ve ark. tarafından yapılan icv irisün uygulamasının beslenme davranışı üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada BİK yerleştirilmesine bağlı olarak sıçanların yem tüketimi ve vücut ağırlıklarının azaldığı ve bu azalmanın yapılan cerrahiden kaynakladığı rapor edilmiştir (131). Zamana bağlı olarak cerrahi operasyondan kaynaklanan bu azalmaların ortadan kalkması sonucu 2.haftanın sonunda sıçanların yem tüketimleri 1.hafta (operasyon öncesi) ile benzerdi. Sıçanların ağırlıklarında artış olmasına rağmen operasyondan önceki ağırlıklarına ulaşamadığı görüldü. Bu durum ise sıçanların yapılan cerrahi operasyonu yaklaşık 1 hafta içerisinde büyük oranda tolere edebildiklerini ve iyileşme sürecine girerek yem tüketimlerinin tekrardan normal seviyesine döndüğünü akla getirmektedir. Sıçanların yem tüketiminde meydana gelen bu düzelmeye birlikte hayvanların iyileştiği düşünüldü ve 2.haftanın sonunda (kontrol grubu hariç) cerrahi girişimle beyin infüzyon kitine bağlı kanülün diğer ucuna ozmotik mini pompalar bağlandı. 14 gün süresince (3-4.haftalar) sham grubuna yBOS, uygulama gruplarına ise 10 ve 100  $\mu$ M MOTS-c infüzyonu (5  $\mu$ l/saat) gerçekleştirildi. İnfüzyon dönemi olarak adlandırılan 3-4. haftalar da sıçanların günlük yem tüketimleri ile vücut ağırlıklarının ölçümüne devam edildi. Gruplar birbirleriyle kıyaslandığında yapılan MOTS-c infüzyonunun yem tüketimini sham ve kontrol grubuna kıyasla arttırdığı

görüldü. MOTS-c uygulanan gruplar sham grubuyla kıyaslandığında ise vücut ağırlıklarının benzer düzeyde olduğu belirlendi. MOTS-c'nin yem tüketimi ile vücut ağırlığında meydana getirdiği etki daha detaylı incelendiğinde sıçanların tükettikleri yem miktarının 2. haftaya kıyasla istatistiksel olarak azaldığı görüldü. Meydana gelen bu azalmanın ozmotik mini pompanın beyin infüzyon kitinin kanülüne takılması için yapılan ikinci cerrahi girişimden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu karşılaştırma sıçanların infüzyondan önce tükettikleri yem miktarları ile vücut ağırlıkları açısından karşılaştırıldığında ise MOTS-c'nin yem tüketimini önemli ölçüde arttırdığı vücut ağırlığını ise etkilemediği belirlendi. İcv MOTS-c uygulanmasının sıçanlarda yem tüketimi ve vücut ağırlığı üzerine meydana getirdiği etki detaylı incelendiğinde, her iki MOTS-c dozu arasında (10 ve 100 µM) bir farklılığın olmadığı görüldü. Sonuçta merkezi olarak uyguladığımız MOTS-c'nin hem düşük hem de yüksek dozda sıçanların yem tüketimini arttırdığı, ancak artan yem tüketimine rağmen vücut ağırlığının bu artıştan etkilenmediği belirlendi. Araştırmamız bu bakımdan özgündür ve sonuçlarımız literatürde bu yönde elde edilen ilk bulgulardan biridir.

## **5.2. MOTS-c'nin HHT Aksı Üzerindeki Etkisi**

HHT aksı, tiroid hormonlarının sentezlenmesinden ve dolaşımdaki seviyesinin düzenlenmesinden sorumludur. Hipotalamik TRH nöronları esas olarak PVN'de bulunan nörosekretuar nöronlardan kaynaklanır (115). Buna ek olarak TRH nöronları hipotalamusun diğer bölgelerinde (ön hipotalamusun preoptik alanı, SON, ARC, dorsomedial premmamilar çekirdek, bazolateral ve preformikal hipotalamus) da dağılım gösterdiği bilinmektedir (116). 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 (117, 118). 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 (99). HHT aksının temel fonksiyonel birimleri olan tiroid hormonlarının enerji homeostazını sağlarken hipotalamusun da sempatik sinir aktivitesiyle kahverengi yağ dokuda ısı üretimini ve beyaz yağ dokuda kahverengileşmeyi uyarak termogenezi sağladığı bilinmektedir (132). Kemik

hücrelerinde osteokalsin sentezinin T3 hormonu tarafından sağlandığı ve T3 hormonunun AMPK aktivasyonunu inhibe ettiği ileri sürülmüştür (133). Soğuk stresin dolaşımdaki tiroid hormonlarını artırdığı, T3 hormonunun kahverengi ve beyaz yağ dokuda UCP1, T4 hormonun ise kas dokuda UCP3 seviyelerini arttırarak termogenezi sağladığı bilinmektedir (134).

Enerji homeostazı ve termogenez ilgili mevcut literatür bilgileriyle MOTS-c'nin enerji metabolizması düzenlemede üstlendiği fizyolojik roller düşünüldüğünde bu peptidin merkezi olarak uygulanması sonucunda HPT aksında birtakım etkiler meydana getireceğini düşündürmüştür. Mevcut literatürde MOTS-c'nin enerji metabolizmasındaki etkileri AICAR-AMPK aktivasyonu üzerinden pürin biyosentezinin gerçekleştirilmesi ile açıklanmaya çalışılmış ancak MOTS-c'nin HPT aksı üzerindeki etkileri ve özellikle tiroid hormonları ile ilişkisinin araştırıldığı detaylı bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Çalışma sonunda elde ettiğimiz bulgularda sıçanlara santral olarak uygulanan MOTS-c sonrası grupların TRH mRNA seviyesinin benzer olduğu fakat 10 ve 100 µM MOTS-c uygulanan grupların serum TSH, T3 ve T4 seviyelerinin azaldığı tespit edildi. Elde ettiğimiz bulgular ve mevcut literatür karşılaştırıldığında MOTS-c uygulamasının, AMPK aktivasyonunu artırıp tiroid hormonlarını baskılamış olabileceğini ya da uncoupling mekanizma üzerinden UCP1 ve UCP3 ifadelerini artırıp negatif geri bildirim aracılığıyla dolaşımdaki tiroid hormon seviyesini azaltmış olabileceğini düşündürmektedir.

### **5.3. MOTS-c'nin UCP1 ve UCP3 Üzerindeki Etkisi**

Periferik UCP'lerden UCP1 beyaz yağ dokuda kahverengileşmeyi sağlarken kahverengi yağ dokuda termogenezi sağladığı bilinmektedir. Ayrıca UCP1 in kas dokusundaki homoloğu UCP3 de enerji kullanımının bir ölçüsü olarak kabul edilmektedir. MOTS-c'nin enerji metabolizmasını düzenlenmesinde efektif roller üstlenmesi bu peptidin UCP'ler ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. UCP1 ve UCP3'ün MOTS-c ile arasındaki ilişkiye yönelik literatürde az sayıda çalışma olmakla beraber, bu çalışmalar genelde deneysel veya hastalık modeli MOTS-c uygulamasının olası sonuçlarını belirlemeye yöneliktir. Lu ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada akut (1 gün) ve kronik (6 gün) soğuk strese maruz bırakılan farelere 5mg/kg ip olarak uygulanan MOTS-c'nin, soğuğa adaptasyonu kolaylaştırdığı, serum MOTS-c

seviyelerini azalttığı ve soğuk toleransını arttığı gözlenmiştir. Akut gruptaki farelere uygulanan MOTS-c'nin UCP1 mRNA seviyesinde hızlı bir artış meydana getirdiği kronik gruptaki farelerde ise bir artış olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca MOTS-c uygulamasının her iki grupta da UCP1 protein seviyesini arttırdığı gösterilmiştir. Bu verilerin MOTS-c'nin kahverengi yağ doku aktivasyonunu, beyaz yağ dokuda ise kahverengileşmeyi sağladığı ve termojenik gen ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir (35).

Araştırma sonunda elde ettiğimiz bulgularda MOTS-c uygulaması sonrası beyaz yağ dokudaki UCP1 mRNA seviyesinin arttığı görüldü ve bu artışın doz bağımlı bir etki olduğu belirlendi. Kahverengi yağ dokudaki UCP1 ve kas dokudaki UCP3 mRNA seviyesinin MOTS-c'nin uygulanan her iki konsantrasyonunun (10 ve 100  $\mu$ M) da arttığı görüldü. Protein seviyesinde ise uygulanan MOTS-c'nin her iki konsantrasyonunun (10 ve 100  $\mu$ M) sıçanların beyaz ve kahverengi yağ dokularındaki UCP1 protein seviyesini aynı zamanda kas dokularındaki UCP3 protein seviyesini arttırdığı belirlendi. Elde edilen sonuçlar mevcut literatürle karşılaştırıldığında, periferik UCP'lerin MOTS-c uygulaması sonrası artması aynı zamanda MOTS-c uygulamasının yem tüketimini arttırırken vücut ağırlığını değiştirmemesi elde edilen enerjinin uncoupling mekanizma tarafından ısı enerjisine dönüşebileceğini düşündürmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

MOTS-c uygulamasının sıçanlarda gıda alımını arttırırken vücut ağırlığında değişim meydana getirmemesi, MOTS-c'nin enerji metabolizması ve iştah mekanizmasının düzenlenmesinde önemli bir aktör olabileceğini ortaya koymaktadır. MOTS-c'nin HHT aksı ve enerji kullanımının bir ölçüsü olarak kabul edilen UCP'ler üzerinde etkinlik göstermesi yapılan bu araştırma ile ortaya konmuştur. Elde edilen bu veriler mevcut literatürde MOTS-c'nin obeziteyi ve insülin direncini önlediği, glukoz kullanımını artırdığı, insülin duyarlılığını iyileştirdiği ve UCP'ler aracılığıyla termogenezi sağladığı gibi etkilerini desteklemektedir. İleriki çalışmalar ile MOTS-c'nin HHT aksı üzerindeki etkisinin moleküler düzeyde belirlenmesi ve hangi fizyolojik yollar üzerinden bu etkilerini ortaya koyduğunun açıklanması, bu eksen temelli hastalıkların tedavisine yönelik yeni bir bakış açısı kazandırmış olacaktır. Ayrıca MOTS-c'nin hangi mekanizmalar üzerinde periferik UCP'leri uyardığının açıklanmasına ihtiyaç vardır. Bu temelde planlanan araştırmalardan elde edilecek sonuçlar MOTS-c'nin HHT aksı üzerindeki etkilerini açıklamaya da yardımcı olacaktır. Yapılacak ek çalışmalar ile belki de obezite ve obeziteden kaynaklanan kronik hastalıkların tedavisine ışık tutulacağı düşünülmektedir. Sonuçlarımız literatürde bu alanda elde edilen ilk bulgulardan olup çalışmamız bu yönüyle ileride yapılacak araştırmalara temel oluşturmaktadır.



## KAYNAKLAR

1. Lee C, Zeng J, Drew BG, Sallam T, Martin-Montalvo A, Wan J, Kim S-J, Mehta H, Hevener AL, de Cabo R. The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. *Cell metabolism*. 2015, 21(3):443-54.
2. Guo B, Zhai D, Cabezas E, Welsh K, Nouraini S, Satterthwait AC, Reed JC. Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature*. 2003, 423(6938):456.
3. Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, Sudo H, Ito Y, Kita Y, Kawasumi M, Kouyama K, Doyu M. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and A $\beta$ . *PNAS*. 2001, 98(11):6336-41.
4. Ikonen M, Liu B, Hashimoto Y, Ma L, Lee K-W, Niikura T, Nishimoto I, Cohen P. Interaction between the Alzheimer's survival peptide humanin and insulin-like growth factor-binding protein 3 regulates cell survival and apoptosis. *PNAS*. 2003, 100(22):13042-7.
5. Zarse K, Ristow M. A mitochondrially encoded hormone ameliorates obesity and insulin resistance. *Cell metabolism*. 2015, 21(3):355-6.
6. Kim SJ, Xiao J, Wan J, Cohen P, Yen K. Mitochondrially derived peptides as novel regulators of metabolism. *The Journal of physiology*. 2017, 595(21):6613-21.
7. Kim S-J, Mehta HH, Wan J, Kuehnemann C, Chen J, Hu J-F, Hoffman AR, Cohen P. Mitochondrial peptides modulate mitochondrial function during cellular senescence. *Aging (Albany NY)*. 2018, 10(6):1239.
8. Mendelsohn AR, Larrick JW. Mitochondrial-Derived Peptides Exacerbate Senescence. *Rejuvenation research*. 2018, 21(4):369-73.
9. Lee C, Kim KH, Cohen P. MOTS-c: a novel mitochondrial-derived peptide regulating muscle and fat metabolism. *Free Radic. Biol. Med*. 2016, 100:182-7.
10. Krauss S, Zhang C-Y, Lowell BB. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2005, 6(3):248.

11. Echtay KS. Mitochondrial uncoupling proteins—what is their physiological role? *Free Radic. Biol. Med.* 2007, 43(10):1351-71.
12. Garlid K, Jaburek M, Jezek P. Mechanism of uncoupling protein action. *Portland Press Ltd.* 2001.
13. Ortiga-Carvalho TM, Chiamolera MI, Pazos-Moura CC, Wondisford FE. Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. *Comprehensive Physiology.* 2016, 6(3):1387-428.
14. Tsuzuki T, Nomiyama H, Setoyama C, Maeda S, Shimada K, Pestka S. The majority of cDNA clones with strong positive signals for the interferon-induction-specific sequences resemble mitochondrial ribosomal RNA genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983, 114(2):670-6.
15. Amikura R, Kashikawa M, Nakamura A, Kobayashi S. Presence of mitochondria-type ribosomes outside mitochondria in germ plasm of *Drosophila* embryos. *PNAS.* 2001, 98(16):9133-8.
16. Attardi G, Attardi B. Mitochondrial origin of membrane-associated heterogeneous RNA in HeLa cells. *PNAS USA.* 1968, 61(1):261.
17. Kashikawa M, Amikura R, Kobayashi S. Mitochondrial small ribosomal RNA is a component of germinal granules in *Xenopus* embryos. *Mechanisms of development.* 2001, 101(1-2):71-7.
18. Kobayashi S, Amikura R, Mukai M. Localization of mitochondrial large ribosomal RNA in germ plasm of *Xenopus* embryos. *Current biology.* 1998, 8(20):1117-20.
19. Kobayashi S, Amikura R, Okada M. Presence of mitochondrial large ribosomal RNA outside mitochondria in germ plasm of *Drosophila melanogaster*. *Science.* 1993, 260(5113):1521-4.
20. Maniataki E, Mourelatos Z. Human mitochondrial tRNA<sup>Met</sup> is exported to the cytoplasm and associates with the Argonaute 2 protein. *RNA.* 2005, 11(6):849-52.
21. Nakamura A, Amikura R, Mukai M, Kobayashi S, Lasko PF. Requirement for a noncoding RNA in *Drosophila* polar granules for germ cell establishment. *Science.* 1996, 274(5295):2075-9.
22. Kosakovsky Pond SL, Frost SD. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol Biol Evol.* 2005, 22(5):1208-22.

23. Chan ES, Cronstein BN. Methotrexate—how does it really work? *Nat Rev Rheumatol*. 2010, 6(3):175.
24. Marroquin LD, Hynes J, Dykens JA, Jamieson JD, Will Y. Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. *Toxicological Sciences*. 2007, 97(2):539-47.
25. Ahn CH, Choi EH, Kong BS, Cho YM. Effects of MOTS-c on the mitochondrial function of cells harboring 3243 A to G mutant mitochondrial DNA. *Mol Biol Rep*. 2020, 1-7.
26. Kahn CR. Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*. 1994, 43(8):1066-85.
27. Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinsky N, Swindell WR, Kamara D, Minor RK, Perez E. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell metabolism*. 2008, 8(2):157-68.
28. Kim SJ, Miller B, Mehta HH, Xiao J, Wan J, Arpawong TE, Yen K, Cohen P. The mitochondrial-derived peptide MOTS-c is a regulator of plasma metabolites and enhances insulin sensitivity. *Physiol Rep*. 2019, 7(13):e14171.
29. Ramanjaneya M, Bettahi I, Jerobin J, Chandra P, Khalil CA, Skarulis M, Atkin S, Abou-Samra A-B. Mitochondrial-Derived Peptides are down regulated in diabetes subjects. *Front Endocrinol*. 2019, 10:331.
30. Ramanjaneya M, Jerobin J, Bettahi I, Bensila M, Aye M, Siveen KS, Sathyapalan T, Skarulis M, Abou-Samra AB, Atkin SL. Lipids and insulin regulate mitochondrial-derived peptide (MOTS-c) in PCOS and healthy subjects. *Clinical endocrinology*. 2019, 91(2):278-87.
31. Ming W, Lu G, Xin S, Huanyu L, Yinghao J, Xiaoying L, Chengming X, Banjun R, Li W, Zifan L. Mitochondria related peptide MOTS-c suppresses ovariectomy-induced bone loss via AMPK activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2016, 476(4):412-9.
32. Yan Z, Zhu S, Wang H, Wang L, Du T, Ye Z, Zhai D, Zhu Z, Tian X, Lu Z. MOTS-c inhibits Osteolysis in the Mouse Calvaria by affecting osteocyte-osteoclast crosstalk and inhibiting inflammation. *Pharmacological research*. 2019, 147:104381.

33. Hu B, Chen W. MOTS-c improves osteoporosis by promoting osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via TGF- $\beta$ /Smad pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018, 22:7156-63.
34. Che N, Qiu W, Wang J, Sun X, Xu L, Liu R, Gu L. MOTS-c improves osteoporosis by promoting the synthesis of type I collagen in osteoblasts via TGF- $\beta$ /SMAD signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019, 23(8):3183-9.
35. Lu H, Tang S, Xue C, Liu Y, Wang J, Zhang W, Luo W, Chen J. Mitochondrial-Derived Peptide MOTS-c Increases Adipose Thermogenic Activation to Promote Cold Adaptation. *Int J Mol Sci*. 2019, 20(10):2456.
36. Gomez-Cabrera MC, Sanchis-Gomar F, Garcia-Valles R, Pareja-Galeano H, Gambini J, Borrás C, Viña J. Mitochondria as sources and targets of damage in cellular aging. *Clin Chem Lab Med*. 2012, 50(8):1287-95.
37. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013, 153(6):1194-217.
38. Fuku N, Pareja-Galeano H, Zempo H, Alis R, Arai Y, Lucia A, Hirose N. The mitochondrial-derived peptide MOTS-c: a player in exceptional longevity? *Aging Cell*. 2015, 14(6):921-3.
39. D'Souza RF, Woodhead JS, Hedges CP, Zeng N, Wan J, Kumagai H, Lee C, Cohen P, Cameron-Smith D, Mitchell CJ. Increased expression of the mitochondrial derived peptide, MOTS-c, in skeletal muscle of healthy aging men is associated with myofiber composition. *Aging (Albany NY)*. 2020, 12(6):5244.
40. Li Z, Sreekumar PG, Peddi S, Hinton DR, Kannan R, MacKay JA. The humanin peptide mediates ELP nanoassembly and protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Nanomedicine*. 2020, 24:102111.
41. Nashine S, Kenney MC. Effects of Mitochondrial-Derived Peptides (MDPs) on Mitochondrial and Cellular Health in AMD. *Cells*. 2020, 9(5):1102.
42. Qin Q, Delrio S, Wan J, Widmer RJ, Cohen P, Lerman LO, Lerman A. Downregulation of circulating MOTS-c levels in patients with coronary endothelial dysfunction. *Int J Cardiol*. 2018, 254:23-7.
43. Wei M, Gan L, Liu Z, Liu L, Chang J-R, Yin D-C, Cao H-L, Su X-L, Smith WW. Mitochondrial-Derived Peptide MOTS-c Attenuates Vascular Calcification

- and Secondary Myocardial Remodeling via Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Signaling Pathway. *Cardiorenal Medicine*. 2019, 1-9.
44. Ikonomidis I, Katogiannis K, Kyriakou E, Taichert M, Katsimaglis G, Tsoumani M, Andreadou I, Maratou E, Lambadiari V, Kousathana F.  $\beta$ -Amyloid and mitochondrial-derived peptide-c are additive predictors of adverse outcome to high-on-treatment platelet reactivity in type 2 diabetics with revascularized coronary artery disease. *J. Thromb. Thrombolysis*. 2020, 1-12.
  45. Liu C, Gidlund E-K, Witasp A, Qureshi AR, Söderberg M, Thorell A, Nader GA, Barany P, Stenvinkel P, von Walden F. Reduced skeletal muscle expression of mitochondrial-derived peptides humanin and MOTS-C and Nrf2 in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2019, 317(5):F1122-F31.
  46. Zhai D, Ye Z, Jiang Y, Xu C, Ruan B, Yang Y, Lei X, Xiang A, Lu H, Zhu Z. MOTS-c peptide increases survival and decreases bacterial load in mice infected with MRSA. *Molecular immunology*. 2017, 92:151-60.
  47. Yin X, Jing Y, Chen Q, Abbas AB, Hu J, Xu H. The intraperitoneal administration of MOTS-c produces antinociceptive and anti-inflammatory effects through the activation of AMPK pathway in the mouse formalin test. *Eur J Pharmacol*. 2020, 870:172909.
  48. Xinqiang Y, Quan C, Yuanyuan J, Hanmei X. Protective effect of MOTS-c on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. *Int Immunopharmacol*. 2020, 80:106174.
  49. Andrews ZB, Diano S, Horvath TL. Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival. *Nat. Rev. Neurol*. 2005, 6(11):829.
  50. Liu J, Li J, Li W-J, Wang C-M. The role of uncoupling proteins in diabetes mellitus. *J. Diabetes Res*. 2013, 2013.
  51. Brand MD, Esteves TC. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell metabolism*. 2005, 2(2):85-93.
  52. 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.
  53. Boss O, Muzzin P, Giacobino J-P. The uncoupling proteins, a review. *Eur J Endocrinol*. 1998, 139(1):1-9.

54. 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.
55. Budd SL, Tenneti L, Lishnak T, Lipton SA. Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons. *PNAS.* 2000, 97(11):6161-6.
56. Hong Y, Fink B, Dillon J, Sivitz W. Effects of adenoviral overexpression of uncoupling protein-2 and-3 on mitochondrial respiration in insulinoma cells. *Endocrinology.* 2001, 142(1):249-56.
57. 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.
58. Vincent AM, Brownlee M, Russell JW. *Ann N Y Acad Sci.* 2002, 959:368-83.
59. 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 letters.* 1999, 443(3):326-30.
60. Sanchis D, Fleury C, Chomiki N, Goubern M, Huang Q, Neverova M, Grégoire F, Easlick J, Raimbault S, Lévi-Meyrueis C. 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.
61. 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.
62. Argentato PP, de Cássia César H, Estadella D, Pisani LP. Programming mediated by fatty acids affects uncoupling protein 1 (UCP-1) in brown adipose tissue. *Br. J. Nutr.* 2018, 120(6):619-27.
63. Nicholls DG, Locke RM. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiological reviews.* 1984, 64(1):1-64.
64. Berardi MJ, Shih WM, Harrison SC, Chou JJ. Mitochondrial uncoupling protein 2 structure determined by NMR molecular fragment searching. *Nature.* 2011, 476(7358):109.

65. Miroux B, Frossard V, Raimbault S, Ricquier D, Bouillaud F. The topology of the brown adipose tissue mitochondrial uncoupling protein determined with antibodies against its antigenic sites revealed by a library of fusion proteins. *EMBO J.* 1993, 12(10):3739-45.
66. Pebay-Peyroula E, Dahout-Gonzalez C, Kahn R, Trézéguet V, Lauquin GJ-M, Brandolin G. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature.* 2003, 426(6962):39.
67. Klingenberg M, Appel M. The uncoupling protein dimer can form a disulfide cross-link between the mobile C-terminal SH groups. *Eur J Biochem.* 1989, 180(1):123-31.
68. Arechaga I, Ledesma A, Rial E. The mitochondrial uncoupling protein UCP1: a gated pore. *IUBMB life.* 2001, 52(3-5):165-73.
69. 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 Roller]. *Int Med J.* 2015, 4(2):2289.
70. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews.* 2004, 84(1):277-359.
71. Janský L. Humoral thermogenesis and its role in maintaining energy balance. *Physiological reviews.* 1995, 75(2):237-59.
72. Gong D-W, Monemdjou S, Gavrilova O, Leon LR, Marcus-Samuels B, Chou CJ, Everett C, Kozak LP, Li C, Deng C. Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem.* 2000, 275(21):16251-7.
73. Liebig M, Praun Cv, Heldmaier G, Klingenspor M. Absence of UCP3 in brown adipose tissue does not impair nonshivering thermogenesis. *Physiol Biochem Zool.* 2004, 77(1):116-26.
74. Mills EM, Banks ML, Sprague JE, Finkel T. Uncoupling the agony from ecstasy. *Nature.* 2003, 426(6965):403-4.
75. Skulachev VP. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS letters.* 1991, 294(3):158-62.
76. Schrauwen P. The role of uncoupling protein 3 in fatty acid metabolism: protection against lipotoxicity? *Proc Nutr Soc.* 2004, 63(2):287-92.

77. Bézaire V, Seifert EL, Harper M-E. Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery. *FASEB J.* 2007, 21(2):312-24.
78. Zhou Y-T, Shimabukuro M, Koyama K, Lee Y, Wang M-Y, Trieu F, Newgard CB, Unger RH. Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. *PNAS.* 1997, 94(12):6386-90.
79. Rutter GA. Nutrient–secretion coupling in the pancreatic islet  $\beta$ -cell: recent advances. *Mol Aspects Med.* 2001, 22(6):247-84.
80. Matschinsky FM, Glaser B, Magnuson MA. Pancreatic beta-cell glucokinase: closing the gap between theoretical concepts and experimental realities. *Diabetes.* 1998, 47(3):307-15.
81. Zhang C-Y, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic D, Hagen T, Vidal-Puig AJ, Boss O, Kim Y-B. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity,  $\beta$  cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell.* 2001;105(6):745-55.
82. Chan CB, De Leo D, Joseph JW, McQuaid TS, Ha XF, Xu F, Tsushima RG, Pennefather PS, Salapatek AMF, Wheeler MB. Increased uncoupling protein-2 levels in  $\beta$ -cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes.* 2001, 50(6):1302-10.
83. Krauss S, Zhang C-Y, Lowell BB. A significant portion of mitochondrial proton leak in intact thymocytes depends on expression of UCP2. *PNAS.* 2002, 99(1):118-22.
84. Chan CB, MacDonald PE, Saleh MC, Johns DC, Marbàn E, Wheeler MB. Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets. *Diabetes.* 1999, 48(7):1482-6.
85. Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes.* 2004, 53(1):S110-S8.
86. Rubenstein JL. Annual research review: development of the cerebral cortex: implications for neurodevelopmental disorders. *J Child Psychol Psychiatry.* 2011, 52(4):339-55.
87. Ziyilan T, Murshid KA. Korteksin anatomik yapisi ve fonksiyonel alanlari. *Genel Tip Derg.* 2000, 10(2):87-91.
88. Hall JE, Guyton AC. Guyton ve Hall tıbbi fizyoloji. Nobel Tıp Kitabevleri; 2013.
89. Arıncı K, Elhan A. Anatomi ders kitabı. Güneş kitapevi, Ankara. 2001.



90. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Hudspeth AJ. Principles of neural science: McGraw-hill New York; 2000.
91. Markakis EA. Development of the neuroendocrine hypothalamus. *Front Neuroendocrinol.* 2002, 23(3):257-91.
92. Rago R, Salacone P. Hypothalamus-hypophysis-testicle axis. *J Androl. Sci.* 2008, 15(1):13-7.
93. Perez-Castro C, Renner U, Haedo MR, Stalla GK, Arzt E. Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology. *Physiological reviews.* 2012, 92(1):1-38.
94. 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.
95. Morgan PJ, Williams LM. The pars tuberalis of the pituitary: a gateway for neuroendocrine output. *Rev. Reprod.* 1996, 1(3):153-61.
96. Rosso L, Mienville JM. Pituitary modulation of neurohormone output. *Glia.* 2009, 57(3):235-43.
97. 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. *PNAS.* 1986, 83(6):1822-6.
98. Rousseau-Merck M, 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.
99. Zoeller RT, Tan SW, Tyl RW. General background on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. *Crit. Rev. Toxicol.* 2007, 37(1-2):11-53.
100. Erdoğan G. Tiroid Hormonları, Taşınmaları ve Hücreye Girişleri. İstanbul: Kelebek Matbaacılık; 2001.
101. Parthemore JG, Deftos LJ. Calcitonin secretion in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1978, 47(1):184-8.
102. Dunn JT, Dunn AD. Update on intrathyroidal iodine metabolism. *Thyroid.* 2001, 11(5):407-14.
103. Molina PE. Endocrine Physiology. USA: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2004.

104. Pommier J, Tourniaire J, Rahmoun B, DĚME 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.
105. Bhagavan NV. Medical biochemistry. England: Bartlett; 1992.
106. 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.
107. Lazar MA. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocrine reviews.* 1993, 14(2):184-93.
108. Lechan RM, Qi Y, Jackson IM, Mahdavi V. Identification of thyroid hormone receptor isoforms in thyrotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology.* 1994, 135(1):92-100.
109. Bradley DJ, Towle HC, Young WS, 3rd. Alpha and beta thyroid hormone receptor (TR) gene expression during auditory neurogenesis: evidence for TR isoform-specific transcriptional regulation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994, 91(2):439-43.
110. Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, Moore DD, Chin WW. Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science.* 1989, 244(4900):76-9.
111. Puymirat J, Mieke M, Marchand R, Sarlieve L, Dussault JH. Immunocytochemical localization of thyroid hormone receptors in the adult rat brain. *Thyroid.* 1991, 1(2):173-84.
112. Alkemade A, Friesema EC, Unmehopa UA, Fabriek BO, Kuiper GG, Leonard JL, Wiersinga WM, Swaab DF, Visser TJ, Fliers E. Neuroanatomical pathways for thyroid hormone feedback in the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005, 90(7):4322-34.
113. Guissouma H, Froidevaux MS, Hassani Z, Demeneix BA. In vivo siRNA delivery to the mouse hypothalamus confirms distinct roles of TR beta isoforms in regulating TRH transcription. *Neuroscience letters.* 2006, 406(3):240-3.
114. Abel ED, Ahima RS, Boers ME, Elmquist JK, Wondisford FE. Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *J Clin Invest.* 2001, 107(8):1017-23.

115. Terry LC. Regulation of thyrotropin secretion by the central epinephrine system. Studies in the chronically cannulated rat. *Neuroendocrinology*. 1986, 42(2):102-8.
116. Nillni EA, Sevarino KA. The biology of pro-thyrotropin-releasing hormone-derived peptides. *Endocrine reviews*. 1999, 20(5):599-648.
117. Hall R, Amos J, Garry R, Buxton RL. Thyroid-stimulating hormone response to synthetic thyrotrophin releasing hormone in man. *BMJ*. 1970, 2(5704):274-7.
118. 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.
119. 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.
120. McAninch EA, Bianco AC. Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism. *Ann N Y Acad Sci*. 2014, 1311:77-87.
121. Silva JE. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev*. 2006, 86(2):435-64.
122. Bianco AC, Maia AL, da Silva WS, Christoffolete MA. Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure. *Bioscience reports*. 2005, 25(3-4):191-208.
123. 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.
124. 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. *Neuroscience letters*. 2018, 674:136-41.
125. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition: Elsevier; 2006.
126. Erden Y. Sıçanlarda intraserebroventriküler irisin uygulamasının beyindeki eşleşme bozucu (Uncoupling) protein ailesi üzerine etkileri/The effect of

- intracerebroventricular irisin application to the rats on the uncoupling protein family in brain. 2014.
127. 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.
  128. Tekedereli I, Alpay SN, Akar U, Yuca E, Ayugo-Rodriguez C, Han H-D, 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:e121.
  129. Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000, 404(6778):661.
  130. Sims JS, Lorden JF. Effect of paraventricular nucleus lesions on body weight, food intake and insulin levels. *Behav Brain Res*. 1986, 22(3):265-81.
  131. Tekin S, Erden Y, Ozyalin F, Cigremis Y, Colak C, Sandal S. The effects of intracerebroventricular infusion of irisin on feeding behaviour in rats. *Neuroscience letters*. 2017, 645:25-32.
  132. Contreras C, Nogueiras R, Dieguez C, Medina-Gomez G, Lopez M. Hypothalamus and thermogenesis: Heating the BAT, browning the WAT. *Mol Cell Endocrinol*. 2016, 438:107-15.
  133. Kondo A, Otsuka T, Kato K, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Mizutani J, Tokuda H, Kozawa O. AMP-activated protein kinase regulates thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Int J Mol Med*. 2013, 31(6):1457-62.
  134. Zhang Z, Boelen A, Kalsbeek A, Fliers E. TRH Neurons and Thyroid Hormone Coordinate the Hypothalamic Response to Cold. *Eur Thyroid J*. 2018, 7(6):279-88.

## EKLER







### EK.1. ETİK KURUL KARARI

**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI**

Toplantı Tarihi : 03.12.2019  
Toplantı Yeri : Tıp. Fak. Toplantı Salonu  
Araştırma Protokol no.su : 2019/A-53  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : *Sıçan*  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyü : *Wistar albino*  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 40  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı: 4 -6 aylık / 350 – 450 g

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'n da Doç. Dr. Suat TEKİN'in; sorumlu araştırmacı olduğu; "**İntraserebroventriküler MOTS-c İnfüzyonunun Hipotalamus-Hipofiz-Tiroid Aksı ve Enerji Kullanımı Üzerindeki Etkileri**" isimli 2019/A-53 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmesi şartıyla çalışmanın yapılmasının uygun olduğuna; oy birliği ile karar verildi.

Doç. Dr. Suat TEKİN Başkan KATILMADI	 Doç. Dr. Elif TAŞLIDERE Başkan Yardımcısı	 Dr. Öğr. Üyesi Onural ÖZHAN Üye
Prof. Dr. M. Çağatay TAŞKAPAN Üye KATILMADI	Prof. Dr. Başak KAYHAN Üye 	Prof. Dr. Şengül YÜKSEL Üye 
Vet.Hek. Engin KÖRKMAZ Üye 	Kaan Akın ÖZ Sivil Üye 	Av. M. Umut YALÇIN Sivil Üye KATILMADI

## **EK.2. ÖZGEÇMİŞ**

### **Kişisel Bilgiler**

**Adı Soyadı** : Mehmet Refik BAHAR

**Doğum Yeri** : Adana

**Doğum Tarihi** : 13.11.1990

**Adres** : İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D. 44280/Malatya

**İş Telefonu** : (0422) 341 0660 – 1330

**Cep Telefonu** : (0545) 285 0220

**E-mail** : mrbahar25@gmail.com

### **Eğitim Durumu**

**Lisans** :Hasan Kalyoncu Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Beslenme ve Diyetetik Bölümü (2013-2017)

**Yüksek Lisans** :İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D. (2018- 2020)

### **İlgi Alanları**

Nöroendokrinoloji, Beslenme, Sinirbilim, Hücre Kültürü, Kanser Araştırmaları...

### **SCI Kapsamındaki Dergilerde Yayımlanan Özet Türünden Yayınlar**

1. **Bahar MR.**, Aykora D., Öztürk D., Tekin S., Sandal S. (2019). “Effects of agomelatine on food intake and body weight in the rats” *Anatomy*, Volume 13/ Supplement 1, S56.
2. **Bahar MR.**, Tekin S., Beytur A., Özyalın F., Önalın E.E., Sandal S. (2019). “Intracerebroventricular MOTS-c infusion suppresses thyroid hormone secretion in rats”, *Acta Physiologica*, Volume 227/ Supplement 722, S30.
3. Aykora D., Öztürk A.D., Tanbek K., **Bahar MR.**, Tekin S., Sandal S. (2019). ” Administration of Acute Agomelatine Reduces Increased Oxidative Stress Due to Experimental Renal Ischemia / Reperfusion Damage in Rats”, *Acta Physiologica*, Volume 227/ Supplement 722, S51.
4. Dogan H., **Bahar MR.**, Caliskan E., Koran K., Tekin S., Sandal S., Görgülü AO. (2019). “In Vitro Cytotoxicity and Genotoxicity Properties of Hexa

Substituted New Organophosphazene Compounds”, *Acta Physiologica*, Volume 227/ Supplement 722, S66.

### **Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabına Basılan Bildiriler**

1. Tekin S, Aykora D., Öztürk A.D., **Bahar MR.**, Sandal S. (2019). “Sıçanlarda Oluşturulan Deneysel Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarında Akut Agomelatin Uygulaması Koruyucu Rol Üstlenir mi?” 2st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2019), 388, Ankara, Turkey.
2. Tekin S, Öztürk A.D., **Bahar MR.**, Sandal S. (2019). “Salusin- $\beta$  İnsan Over Kanseri Hücrelerinde Proliferasyona Neden Olur: In Vitro Bir Araştırma” 2st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2019), 390, Ankara, Turkey.

### **TÜBİTAK Destekli Araştırma Projeleri**

1. “Yeni Peptit Sübstitüentli Siklofosfazenlerin Sentezi, Karakterizasyonu, Sitotoksiste ve DNA Hasarı İncelenmesi”, TÜBİTAK 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırmaları Destekleme Programı, **TÜBİTAK- 118Z286, Bursiyer**, (2018- Devam ediyor).

### **TÜBİTAK Destekli Etkinlik Projeleri**

1. “Lisansüstü Öğrencilerin Sağlık Bilimleri Alanında TÜBİTAK için Araştırma Projesi Önerisi Hazırlama ve Yürütme Uygulama Eğitimi”, TÜBİTAK 2237-A Bilimsel Eğitim Etkinliklerini Destekleme Programı, **TÜBİTAK 1129B371800565, Yardımcı Personel** (18-21 Ekim 2018).
2. “Sağlık Bilimleri Alanında Lisans Eğitimi Gören Öğrenciler İçin Bilimsel Proje Hazırlama ve Araştırma Metodolojisi Eğitimi”, TÜBİTAK 2237-A Bilimsel Eğitim Etkinliklerini Destekleme Programı, **TÜBİTAK 1129B371800681, Yardımcı Personel** (22-25 Kasım 2018).
3. “Sağlık ve Doğa Bilimleri Alanında Lisans Eğitimi Gören Öğrenciler İçin Akademik Becerilere Giriş: Bilim Okulu” TÜBİTAK 2237-A Bilimsel Eğitim

Etkinliklerini Destekleme Programı, **TÜBİTAK 1129B371800977, Yardımcı Personel** (6-9 Aralık 2018).

4. “Sağlık Bilimleri Alanında TÜBİTAK için Ulusal ve Uluslararası Proje Hazırlama Süreci” TÜBİTAK 2237-B Proje Eğitimi Etkinliklerini Destekleme Programı, **TÜBİTAK 1129B371800977, Yardımcı Personel** (21-23 Haziran 2019).
5. “Sağlık Bilimleri Alanında TÜBİTAK için Ulusal ve Uluslararası Proje Hazırlama Süreci” 2237-A Bilimsel Eğitim Etkinliklerini Destekleme Programı, **TÜBİTAK 1129B371900871, Yardımcı Personel** (10-13 Ekim 2019).
6. “Sağlık Bilimleri Alanında Lisansüstü Öğrencilerine Yönelik Laboratuvar Hayvanlarında İleri Düzey Deneysel Araştırmalar Kursu” 2237-A Bilimsel Eğitim Etkinliklerini Destekleme Programı, **Katılımcı** (24-27 Ekim 2019).

#### **BAP Destekli Etkinlik Projeleri**

1. Tekin S., Öztürk D.A., **Bahar MR.**, Tekin Ç., Sandal S. “Farklı Tipteki İnsan Kanseri Hücre Hattı Serilerinde Salusin Alfa ve Beta uygulamasının Hücre Canlılığındaki Etkilerinin Araştırılması” **İÜBAP- TDP-2019-1742, Araştırmacı** (2019-Devam ediyor).

#### **Katıldığı Kurslar**

1. İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu “20.Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitim Programı” **Katılımcı**, Malatya-2018.
2. Karadeniz Teknik Üniversitesi 17. Ulusal Sinirbilim Kongresi “İnsan ve Sıçan Beyninin Karşılaştırmalı Nöroanatomi” **Katılımcı**, Trabzon-2019.

#### **Katıldığı Bilimsel Etkinlikler & Kongreler**

1. Karadeniz Teknik Üniversitesi 17. Ulusal Sinirbilim Kongresi, **Katılımcı**, Trabzon-2019.
2. 45. Ulusal Fizyoloji Kongresi, **Katılımcı**, Kuşadası-2019.