

YAVUZ ERDEN

YÜKSEK LİSANS 2015

TFİZ Y-12

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIÇANLARDA
İNTRASEREBROVENTRİKÜLER
APELİN-13 UYGULAMASININ
HİPOTALAMUS-HİPOFİZ-TİROİD
AKSI ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Yavuz ERDEN
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Süleyman SANDAL**

MALATYA- 2015

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIÇANLARDA
İNTRASEREBROVENTRİKÜLER APELİN-
13 UYGULAMASININ HİPOTALAMUS-
HİPOFİZ-TİROİD AKSI ÜZERİNE ETKİSİ**

Yavuz ERDEN

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Süleyman SANDAL

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2013/180 proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA-2015

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Fizyoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Jüri Başkanı

Prof. Dr. M. Hanifi EMRE

Danışman

Doç. Dr. Süleyman SANDAL

Üye

Yrd. Doç. Dr. Ebru ÖNALAN

ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu...../...../..... tarih ve/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜRLER

2013/180 nolu yüksek lisans tez projeme maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Tez araştırmamı destekleyen, katkı ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Süleyman SANDAL'a, yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve desteklerini benden esirgemeyen bölümümün tüm öğretim üyelerine, tez araştırmamın yapımı ve yazımı sırasında katkı ve yardımlarını esirgemeyen İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi ve İnönü Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Birimi sorumlusu Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'e, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Bilişimleri ve Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Cemil ÇOLAK'a ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yard. Doç. Dr. Ebru ÖNALAN'a, tez araştırmamın deneyleri sırasında katkı ve yardımlarını esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı Arş. Gör. Suat TEKİN ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında görev yapan Dr. Fatma ÖZYALIN'a ve hayatımın her alanında benden desteğini esirgemeyen aileme sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Yavuz ERDEN

ÖZET

Apelin, G-protein kenetli APJ reseptörü için ligand olarak bilinen peptit yapılı bir hormondur. Apelin ve APJ, merkezi sinir sistemi (hipotalamusda dahil) ve birçok periferel dokuda sentezlenmektedir. APJ'nin özellikle hipotalamus ve tiroid bezinde yoğun olarak ifade ediliyor olması, apelinin hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı ve enerji metabolizması üzerine rollerinin olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada, kronik intraserebroventriküler (icv) farklı iki doz apelin-13 uygulamasının hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı ve enerji metabolizması üzerine etkilerini belirlemek amacıyla tasarlanmıştır.

Çalışmada 40 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı ve sıçanlar 4 gruba ayrıldı (n=10). Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmadı. Uygulama grubundaki sıçanlara 7 gün süreyle 1 ve 10 nmol apelin-13 (10 µl/saat), sham grubundakilere ise apelin çözücüsü intraserebroventriküler (icv) olarak infüze edildi. 7. gün sonunda hayvanlar dekapite edilerek beyin, kan, beyaz ve kahverengi yağ dokuları toplandı. Hipotalamus dokusundan TRH, beyaz ve kahverengi yağ dokularadan eşleşme bozucu protein 1 (UCP1), kas dokudan UCP3 mRNA düzeyleri RT-PZR ile, serum örneklerinden TSH, T3 ve T4 düzeyleri ELISA ile belirlendi.

Hipotalamus TRH mRNA seviyelerinde gruplar arasında farklılık belirlenmedi. Serum TSH seviyesi kontrol grubuna kıyasla diğer gruplarda anlamlı seviyede artarken ($p<0.05$, $p<0.01$), sham ve apelin grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Kontrol grubuna kıyasla sham ve apelin uygulanan gruplarda serum T3, T4 seviyeleri düşük bulundu ($p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$). Sham grubuna göre sadece yüksek doz apelin-13 uygulaması T3 ve T4 seviyelerini anlamlı şekilde azalttı ($p<0.05$). Apelin-13 uygulaması doz bağımlı olarak beyaz ve kahverengi yağ doku UCP1 ve kas doku UCP3 mRNA ifadesini azalttı ($p<0.05$).

Sonuçlarımız merkezi yüksek doz apelin-13 uygulamasının serum T3 ve T4 seviyesini baskıladığını ve doz bağımlı olarak yağ doku UCP1 ve kas doku UCP3 mRNA ifadelerini azalttığını göstermektedir. Bu sonuçlar apelin-13'ün hipotalamus-hipofiz-tiroid aksını kısmen inhibe ederek enerji kullanımını azaltıcı etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Apelin, tiroid hormonları, eşleşme bozucu protein, enerji metabolizması

ABSTRACT

The Effects of Intracerebroventricularly Administered Apelin-13 on Hypothalamus-Hypophysis-Thyroid Axis in Rats

Apelin is a peptide hormone called as the ligand for the G protein-coupled APJ receptor. Apelins and their receptors are expressed in the central nervous system, including the hypothalamus and numerous other peripheral tissues. Since APJ is expressed particularly intense in the hypothalamus and thyroid gland, Apelin is thought to play many roles on hypothalamus-pituitary-thyroid axis and energy metabolism. The present study was designed to investigate the effects of chronic intracerebroventricular (icv) administration of two different doses of apelin-13 on hypothalamus-hypophysis-thyroid axis and energy metabolism.

In this study, forty Sprague Dawley male rats were used, and were divided randomly into 4 groups (n=10 in each). No operation was applied to the rats in the control group. Rats in the experimental groups, apelin-13 at 1 and 10 nmol doses, and rats in sham group, the same amount of artificial cerebrospinal fluid was injected icv for seven days (10 μ l/h). After seven days, animals were decapitated and their brain, blood, white and brown adipose tissues were taken. TRH mRNA levels in hypothalamus, uncoupling protein 1 (UCP1) mRNA levels in white and brown adipose tissues, UCP3 mRNA levels in muscle tissue of the groups were determined by RT-PCR method. Serum T3 and T4 levels were measured by using ELISA method.

The levels of hypothalamic TRH mRNA were not different between the groups. While serum TSH levels significantly increased compared to control group ($p<0.05$, $p<0.01$) levels, no difference was observed between sham and apelin groups. Serum T3 and T4 levels were significantly lower in sham and apelin treated groups compared with the control group ($p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$). According to the sham group, only high dose apelin-13 administration was significantly decreased in serum T3 and T4 levels. Apelin-13 administration dose-dependently reduced UCP1 mRNA expression in white and brown adipose tissue and UCP3 mRNA expression in muscle tissue.

Our results showed that the infusion of high doses of apelin-13 caused decreases serum T3 and T4 levels in the rats. In addition to, the UCP3 mRNA levels

in the muscle tissue and UCP1 mRNA levels in the adipose tissues were significantly decreased by both doses of apelin-13. These results suggested that apelin-13 caused a decrease of energy expenditure by partially inhibiting hypothalamus-hypophysis-thyroid axis.

Keywords: Apelin, thyroid hormone, uncoupling protein, energy metabolism

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜRLER	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
TABLOLAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Apelin	2
2.1.1. Apelin reseptörü; APJ	3
2.1.2. Apelinin etkileri.....	4
2.1.2.1. Kardiyovasküler sistem üzerine etkileri	5
2.1.2.2. Anjiyogenez üzerine etkileri.....	6
2.1.2.3. Gıda alımı üzerine etkileri	7
2.1.2.4. Sıvı homeostazı üzerine etkileri	7
2.1.2.5. Metabolizma üzerine etkileri	8
2.1.2.6. Diğer etkileri.....	9
2.2. Hipotalamus.....	11
2.2.1. Hipotalamus çekirdekleri.....	11
2.2.2. Hipotalamusun serbestletici ve baskılayıcı hormonları.....	12
2.2.3. Hipotalamik TRH nöronları.....	13
2.2.4. Tirotropin serbestleştirici hormon	14
2.3. Hipofiz	14
2.3.1. Adenohipofiz	15
2.3.2. Nörohipofiz.....	16
2.3.3. Tiroid uyarıcı hormon.....	17
2.4. Tiroid bezi.....	17
2.4.1. Tiroid hormonları	19

2.4.2.	Tiroid hormonlarının biyosentezi	19
2.4.2.1.	İyodür iyonlarının tutulması ve konsantre edilmesi	19
2.4.2.2.	İyodürün iyoda dönüşmesi ve organifikasyon	21
2.4.2.3.	Eşleşme reaksiyonu ve tiroglobulinin depolanması	21
2.4.2.4.	Tiroid hormonlarının serbestlenmesi ve kanda taşınması	23
2.4.3.	Tiroid hormon reseptörleri.....	23
2.4.4.	Hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı ve düzenlenmesi.....	24
2.4.5.	Tiroid hormonlarının enerji metabolizmasındaki etkileri.....	26
2.5.	Eşleşme bozucu proteinler ve tiroid hormonları ile ilişkisi.....	26
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1.	Deney hayvanları	29
3.2.	Hazırlık	29
3.2.1.	Yapay beyin omurilik sıvısının hazırlanması	29
3.2.2.	Ozmotik pompaların hazırlanması.....	30
3.2.3.	Beyin infüzyon kitinin hazırlanması.....	31
3.2.4.	Stereotaksi	32
3.2.4.1.	Koordinatların belirlenmesi.....	32
3.2.4.2.	Hayvanların hazırlanması	32
3.2.4.3.	Hayvanların stereotaksik cihaza yerleştirilmesi ve ozmotik pompaların yerleştirilmesi	33
3.3.	Deneyin sonlandırılması ve dokuların toplanması	34
3.4.	Analizlerin yapılması.....	35
3.4.1.	Serum TSH düzeyinin belirlenmesi.....	35
3.4.2.	Serum T3 ve T4 düzeylerinin belirlenmesi	36
3.4.3.	RT-PZR ile hipotalamik TRH mRNA düzeyinin belirlenmesi	37
3.4.3.1.	Beyin dokusu homejenizasyonu ve total RNA saflaştırılması	37
3.4.3.2.	cDNA sentez protokolü	39
3.4.3.3.	RT-PZR protokolü	39
3.4.4.	RT-PZR ile yağ ve kas dokularındaki UCP1 ve UCP3 mRNA düzeyinin belirlenmesi	41
3.4.4.1.	Dokuların homejenizasyonu ve total RNA saflaştırılması	41
3.4.4.2.	cDNA sentez protokolü	42

3.4.4.3.	RT-PZR ile cDNA amplifikasyonu	43
3.5.	İstatistiksel analizler	45
4.	BULGULAR	46
4.1.	İcv apelin-13 uygulanmasının hipotalamik TRH mRNA seviyesi üzerine etkileri	46
4.2.	İcv apelin-13 uygulanmasının serum TSH seviyesi üzerine etkileri	47
4.3.	İcv apelin-13 uygulanmasının serum T3 ve T4 seviyeleri üzerine etkileri	48
4.4.	İcv apelin-13 uygulanmasının yağ doku UCP1 ve kas doku UCP3 mRNA seviyeleri üzerine etkileri	50
5.	TARTIŞMA	53
5.1.	Merkezi apelin-13 uygulamasının hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı üzerine etkisi	53
5.2.	Merkezi apelin-13 uygulamasının yağ doku UCP1 ve kas doku UCP3 mRNA ifadeleri üzerine etkileri	55
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	58
	KAYNAKLAR	59
	Ek. Etik Kurul Onay Belgesi	82
	ÖZGEÇMİŞ	83

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μ l	: Mikrolitre
ACTH	: Adenokortikotropik hormon
APJ	: Apelin reseptörü
ARC	: Arkuat çekirdek
cAMP	: Siklik adenzin monofosfat
cDNA	: Komplementer DNA
CRH	: Kortikotropin serbestleştirici hormon
DIT	: Diiyodotirozin
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
GHRH	: Büyüme hormonu serbestleştirici hormon
GnIH	: Gonotropin inhibe edici hormon
GnRH	: Gonotropin serbestleştirici hormon
gr	: Gram
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HIV	: İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
İcv	: İntraserebroventriküler enjeksiyon
ip	: İntraperitoneal enjeksiyon
iv	: İntravenöz enjeksiyon
kg	: Kilogram
LH	: Luteinleştirici hormon
mg	: Miligram
MIT	: Monoiyodotirozin
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
ng	: Nanogram
pg	: Pikogram
PIH	: Prolaktin baskılayıcı hormon
ppTRH	: prepro-TRH
PVN	: Paraventriküler çekirdek
RT3	: Revers T3

SD	: Standart sapma
SON	: Supraoptik çekirdek
T3	: Triiyodotironin
T4	: Tiroksin
TR	: Tiroid hormon reseptörü
TRH	: Tirotropin serbestleştirici hormon
TSH	: Tiroid uyarıcı hormon
TSHR	: Tiroid uyarıcı hormon reseptörü
UCP	: Eşleşme bozucu (uncoupling) protein
yBOS	: Yapay beyin omulik sıvısı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Olgun sıçanlarda apelin izoformlarının aminoasit dizisi.	3
Şekil 2.2. Hipotalamik nükleusların yerleşimi	12
Şekil 2.3. Hipotalamus ve hipofiz arasındaki anatomik ve fonksiyonel ilişki	15
Şekil 2.4. Tiroid bezinin konumu.....	18
Şekil 2.5. Tiroid bezinin mikroskopik görünümü	18
Şekil 2.6. Tiroid bezi tarafından iyodür konsantrasyonunun mekanizması	20
Şekil 2.7. Tiroid hormon sentezinin biyokimyası	22
Şekil 2.8. Hipotalamus-hipofiz-tiroid aksının geribildirim düzenlenmesi.....	25
Şekil 2.9. Mitokondriyal enerji düzenlenmesi ve UCP'lerin rolü.....	27
Şekil 2.10. Tiroid hormonlarının kahverengi yağ doku ısı oluşumundaki rolü	28
Şekil 3.1. Ozmotik mini pompaların doldurulması.....	31
Şekil 3.2. Beyin infüzyon kitinin görünüşü	31
Şekil 3.3. Sıçan beyin atlasına göre lateral ventrikül koordinatları	32
Şekil 3.4. Bregma referans noktasının belirlenmesi.....	33
Şekil 3.5. Deneysel uygulama ve basamakları.....	34
Şekil 3.6. TSH kit standartının seri dilüsyonları	35
Şekil 3.7. T3 ve T4 standartlarının dilüte serilerinin hazırlanması	36
Şekil 3.8. Beyin doku örneklerinden saflaştırılan RNA'ların agaroz jel (%1) elektroforez görüntüsü	38
Şekil 3.9. Hidroliz prob kimyası kullanılarak β -aktin ve TRH mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların gerçek zamanlı PZR ile çoğaltımı sırasındaki oluşan çoğaltım eğrileri	40
Şekil 3.10. β -aktin ve TRH cDNA'larının PZR'deki çoğaltımının agaroz jel (%2) elektroforez görüntüsü	41
Şekil 4.1. Apelin-13 infüzyonundan sonra grupların TRH mRNA ifadelerindeki değişimler	47
Şekil 4.2. Apelin-13 infüzyonunun grupların serum TSH seviyesi üzerine etkileri ..	48
Şekil 4.3. Apelin-13 infüzyonunun grupların serum T3 seviyesi üzerine etkileri	49
Şekil 4.4. Apelin-13 infüzyonunun grupların serum T4 seviyesi üzerine etkileri	50

Şekil 4.5. Apelin-13 infüzyonunun grupların beyaz yağ doku UCP1 mRNA ifadesi üzerine etkileri	51
Şekil 4.6. Apelin-13 infüzyonunun grupların kahverengi yağ doku UCP1 mRNA ifadesi üzerine etkileri	52
Şekil 4.7. Apelin-13 infüzyonunun grupların kas yağ doku UCP3 mRNA ifadesi üzerine etkileri	52

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Ön hipofiz bezinin salgısını kontrol eden serbestletici ve baskılayıcı hipotalamus hormonları	13
Tablo 2.2. Ön hipofizde yer alan hücre grupları ve salgıladıkları hormonlar	16
Tablo 3.1. Yapay beyin omurilik sıvısının içeriği.....	30
Tablo 3.2. Primer dizilimleri	40
Tablo 3.3. cDNA karışım miktarı	43
Tablo 3.4. cDNA sentezi için uygulanan PZR programı	43
Tablo 3.5. RT-PZR’de kullanılan primerler.....	44
Tablo 3.6. RT-PZR için her bir kuyucuğa konan bileşikler	44
Tablo 3.7. Uygulanan RT-PZR programı (RT-PZR X 40 döngü)	44
Tablo 4.1. Merkezi apelin-13 infüzyonunun hipotalamik TRH mRNA ifadesi, serum TSH, T3 ve T4 hormon düzeyleri üzerine etkisi	46

1. GİRİŞ

Yağ doku organizmanın en büyük enerji kaynağı olarak isimlendirilir ve enerjinin bu dokuda depo edilmesi ve serbestlenmesi farklı hormonal sinyaller ile kontrol edilir. Yağ doku hücrelerinden sentezlenen ve salgılanan proteinlerin (adipokinler) otokrin, parakrin ve endokrin etkileri olduğu gösterilmiştir (1,2). Bu nedenle yağ doku sadece enerji depo etmekle kalmayıp, aynı zamanda önemli bir endokrin organ gibi birçok hormonun sentezini gerçekleştiren özel bir dokudur (3).

Apelin, adipoz doku ailesinin bir üyesidir ve etkilerini reseptörü APJ üzerinden ortaya koymaktadır (4). Yapılan çalışmalar, apelinin kalp-damar sistemi (5), gıda alımı (6), sıvı homeostazı (7), enerji metabolizması (8,9) ve nöroendokrin fonksiyonlar (7,10) üzerine etkilerinin olduğunu, ayrıca apoptozun baskılanmasında görev aldığını (11,12) ve bağışıklık sistemi üzerinde olumlu etkiler gösterdiğini (13,14) belirtmektedir.

Apelin reseptörünün kalp, damar, yağ doku ve tiroid bezi gibi periferik dokuların yanı sıra özellikle enerji metabolizması ve beslenme davranışından sorumlu paraventricüler çekirdek (PVN) ve supraoptik çekirdek (SON) gibi hipotalamus bölgelerinde ve hipofiz bezinde dağılım gösterdiği rapor edilmiştir (15,16). Bütün bu bilgiler enerji metabolizmasında kilit rol oynayan hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı üzerine apelinin birtakım roller üstlenebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca yağ ve kas dokularında APJ'nin varlığının bildiriliyor olması, apelinin enerji metabolizması üzerine etkilerini bu dokular aracılığı ile gerçekleştirebileceğini akla getirmektedir. Mevcut çalışmalar apelinin bu dokularda yer alan ve enerji kullanımının birer göstergesi olarak kabul edilen eşleşme bozucu proteinler (uncoupling protein; UCP) üzerine birtakım etkilere sahip olduğunu bildirmektedir (17,18).

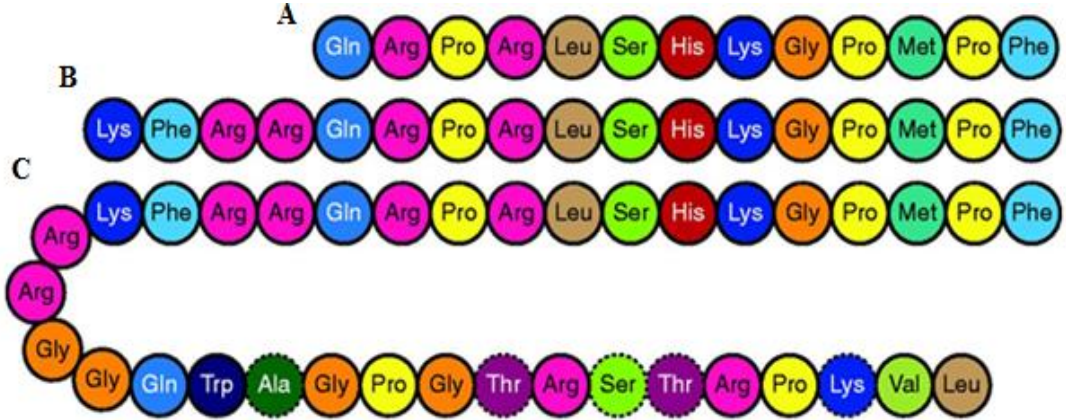
Bu çalışma enerji dengesinin düzenlenmesinde rol aldığı ileri sürülen apelin-13'ün, erkek sıçanlarda intraserebroventriküler (icv) uygulama sonrası hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı ve enerji kullanımının göstergesi olarak kabul edilen yağ doku UCP1 ve kas doku UCP3 mRNA ifadeleri üzerine muhtemel etkilerini belirlemek amacıyla yapıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Apelin

Tatemoto ve ark. tarafından keşfedilen apelin, APJ reseptörüne bağlanarak etkilerini gösterir (4). Beyaz yağ doku, böbrek, akciğer ve kalp gibi birçok periferik dokunun yanı sıra, özellikle hipotalamus, talamus, frontal korteks, hipokampus ve spinal kord gibi merkezi sinir sistemi bölgelerinde apelinin varlığı gösterilmiştir (15,16). Farelerde preproapelin sentezinin beyinde yüksek, kalpte orta dereceli, böbrek, akciğer, testis, dalak, yumurtalık ve kasta ise düşük düzeyde gerçekleştiğini rapor edilmiştir (15).

İnsanda apelin kodlayan APLN geni, kromozomun Xq25-26.1 lokusu üzerinde bulunur ve ~6 kb açık okuma çerçevesi içinde bir introna sahiptir. Sıçan ve fare de apelin kodlayan gen Apln olarak adlandırılır ve sırasıyla kromozom üzerindeki yerleri Xq35 ve XA3.2'dir (19). İnsan ve sığır APLN komplementer DNA (cDNA) dizileri, bir hidrofobik N-terminal bölgesi ihtiva eder ve 77 amino asite sahip preproprotein olarak kodlanır (4). Sığır, insan, sıçan ve fare apelin preproprotein yapısı %76-95 birbirlerinin homologudur (5,20). Bu öncü protein daha sonra bazı bölümlerinden parçalanarak farklı aminoasit sayısına sahip apelin fragmanlarını (apelin-10, apelin-11, apelin-12, apelin-13, apelin-15, apelin-17, apelin-19 ve apelin-36 gibi) oluşturur (Şekil 2.1) (21,22). Apelin fragmanları farklı etkinliklere sahiptir ve kısa aminoasit dizilimine sahip fragmanlar uzun formlara kıyasla APJ için daha güçlü bir aktivatördür. Apelin reseptörünün aktivasyonunu sağlayan apelin formları en az 12 C uç kalıntısı içerir (15,23,24). Son 12 C uç aminoasit formu en kısa aktif sıradır, bundan daha kısa peptidler (apelin-10 ve apelin-11) ise inaktiftir (24,25).



Şekil 2.1. Olgun sıçanlarda apelin izoformlarının aminoasit dizisi. (A: Apelin-13, B: Apelin-17, C: Apelin-36 izoformu) (22)

Apelinin biyolojik aktivitesi ve reseptöre bağlanmasında preproapelinin C ucu büyük önem taşımaktadır. Apelin formlarının N uç kısmı ise, peptidin reseptöre bağlanmasında anahtar rol oynamaktadır (4,25). Apelin-13 N-terminali piroglutamat rezidülerine sahip olduğundan, biyolojik aktivitesi diğer apelin formlarına oranla daha yüksektir. Apelin-36 bu özelliğe sahip olmadığından Apelin-13'e göre daha kısıtlı bir biyolojik aktiviteye sahiptir (4,26).

2.1.1. Apelin reseptörü; APJ

APJ ilk olarak anjiyotensin II tip I reseptörüne yakın kimliğiyle, G-protein kenetli reseptör olarak tespit edildi (27). 1998 yılında endojen ligandı olan apelinin sığır mide öz suyunda tanımlanmasına kadar olan sürede orfam reseptör olarak anıldı (4).

APJ'nin protein yapısı yedi hidrofobik geçirgen zar bölgesi ihtiva eder ve tipik bir G-protein kenetli reseptör yapısındadır (27). APJ'yi kodlayan APLNR geni intronsuzdur. İnsanlarda APLNR geni kromozomun 11q12 bölgesinde yer alır ve 380 aminoasitten oluşan APJ'yi kodlar. Fare ve sıçan da ise bu gen (Aplnr olarak adlandırılır) sırasıyla kromozomun 2E1 ve 3q24 bölgelerinde lokalizedir ve 377 aminoasitli bir protein kodlar. APJ'nin aminoasit sekans homolojisi insan ve farede %92, insan ve sıçanda %90, fare ve sıçan arasında ise %96 benzerlik gösterir (28,29).

Apelinin, APJ ifade eden hücrelerde forskolinle indüklenmiş siklik adenozin monofosfat (cAMP) yapımını inhibitör G proteinlerine bağlanarak inhibe ettiği gösterilmiştir (20). Pertusis toksininin apelinin etkilerini bloke etmesi de bu görüşü desteklemektedir (25,30).

Yapılan çalışmalar APJ'nin merkezi sinir sisteminin birçok yerinde (kaudat çekirdek, korpus kolozum, hipokampus, substantia nigra, subtalamik nükleus, medulla ve spinal kord) varlığını bildirmektedir (15,31,32). Ayrıca insanda APJ mRNA'sının hipotalamusun PVN ve SON'da dahil olmak üzere diğer merkezi alanlarda yaygın olarak ifade edildiği bildirilmiştir (22). Bu çalışmaların belirgin özelliği APJ'nin yaygın bir merkezi dağılıma sahip olduğunu göstermiş olmasıdır. Beyin bölgelerinin çoğunda APJ'nin fizyolojik fonksiyonu tam anlamıyla bilinmemektedir.

İnsanlarda APJ'nin periferal dağılımını inceleyen Edinger ve ark. ince bağırsak, kolon mukozası ve yumurtalıkta düşük, dalakta ise yüksek düzeyde APJ mRNA'sının bulunduğunu rapor etmektedir (32). Medhurst ve ark. dalak ve plasentada APJ mRNA ifadesinin yüksek düzeyde olduğunu, buna karşın akciğer, mide ve bağırsakta ise daha düşük düzeyde APJ mRNA'sının gözlemlendiğini bildirmiştir (15). Ayrıca APJ'nin varlığı ventriküler kardiyomiyositlerde, intramiyokardiyal endotelial ve vasküler düz kas hücrelerinde gösterilmiştir (23).

Sıçan ve fareler üzerinde yapılan araştırmalarda, merkezi ve periferal birçok dokuda APJ'nin varlığı belirlenmiştir (10,33). Sıçanların hipotalamus (özellikle PVN ve SON alanları) ve hipofiz bezinde apelin/APJ varlığı bildirilmektedir (22). Lee ve ark. böbrek, kal ve testis gibi periferal dokuların yanı sıra korteks, striatum ve hipokampus gibi merkezi dokularda APJ mRNA'sının ifade edildiğini bildirmektedir (16). Cayabyap ve ark. sıçanların böbrek, hipofiz bezi, over dokusu ve iskelet kaslarında APJ mRNA'sının varlığını göstermiştir (14).

2.1.2. Apelinin etkileri

Son zamanlarda apelin/APJ birlikteliğinin fizyolojik önemi açıklanmaya çalışılmış olmasına karşın, apelinergic sistemin çok sayıda fizyolojik fonksiyonu tam olarak nasıl etkilediği keşfedilmeyi beklemektedir (22). APJ ve apelinin keşfinden bu

yana homeostatik süreçlerde merkezi ve periferel roller üstlenebileceği yapılan çalışmalar ile vurgulanmaktadır. Bu çalışmalarda apelinin sistemin özellikle kardiyovasküler fonksiyonların düzenlenmesi başta olmak üzere anjiyogenez, sıvı homeostasisi, enerji metabolizması ile stres duyarlı hipotalamus-hipofiz eksen üzerine nöroendokrin modülatör olarak görevler üstlenebileceği gösterilmiştir (25). Bu bulgular apelinin sistemin bahsi geçen düzenleyici sistemler içerisinde bir patofizyolojik faktör olabileceğini akla getirmektedir.

2.1.2.1. Kardiyovasküler sistem üzerine etkileri

İnsan, sıçan ve farelerin kalp ve damar yapılarında apelin ve APJ'nin varlığı gösterilmiş ve apelinin merkezi ve periferel kardiyovasküler etkileri açıklığa kavuşturulmuştur. İnsanlarda periferel apelinin safen venlerde vazodilatör, endotelyumu çıkartılan arter ve venlerde ise vazokonstriksiyon yaptığı rapor edilmiştir (34,35). Hayvan modellerinde gerçekleştirilen deneyler, damar tonusu düzenlenmesinde apelinin çevresel rolü hakkında çelişkili sonuçlar ortaya koymaktadır (5). Yapılan çalışmalarda periferel apelin uygulaması sonrasında ortalama arter basıncının düştüğü gözlenmiştir (24,36,37). Lee ve ark. intravenöz (iv) apelin uygulamasının hem sistolik hemde diyastolik kan basıncını düşürdüğünü rapor etmektedir (16). Ortaya çıkan bu hipotansif etkinin nitrik oksit aracılığıyla gerçekleştiği bildirilmektedir (24). Buna karşın normal sıçanlarda iv uygulanan apelin-13'ün doz bağımlı olarak kan basıncını arttırdığı belirtilmektedir (38). Bu sonuçlar arasındaki farklılıklar deneysel çalışmada kullanılan hayvan veya farklı apelin formlarının fizyolojik rollerindeki durumu ortaya koymaktadır.

Merkezi uygulanan apelin-13 ortalama kan basıncını arttırmıştır (38,39). Anestezi altındaki sıçanlara icv apelin-13 enjeksiyonu ortalama kan basıncı veya kalp hızı üzerine bir etki göstermezken (36), bilinci açık sıçanlara yapılan aynı uygulama kan basıncını ve kalp hızını arttırmıştır (40). Apelin-13'ün merkezi uygulaması sonrası PVN'de c-Fos düzeyinin artması, bu etkinin PVN kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir (22). Buna ek olarak sıçanlarda rostral ventrolateral medulla ve soliter nükleusa direk olarak uygulanan apelin-13'ün arter kan basıncını arttırdığı gösterilmiştir (39).

Apelinerjik sistem kalp fonksiyonunda da önemli birtakım rollere sahiptir. Apelin infüzyonunun insan ve sıçan kalplerinde doz bağımlı inotropik etki gösterdiği belirtilmiştir (35,41). Farelerde, apelin verilmesinin hipertrofiye neden olmadan miyokard kasılmasını arttırdığı ve kalp yükünü azalttığı gösterilmiştir (42). Kuba ve ark. apelin nakavt farelerde kalp basıncının aşırı derecede bozulduğunu ve kalbin sağlıklı bir şekilde işleyişinde apelin ve APJ'nin önemli rollere sahip olduğunu vurgulamaktadır (43). Ayrıca temel olarak hipertansif hastalarda dolaşımdaki apelin-12 düzeyinin azaldığı belirlenmiştir (44). Bütün bu çalışmalar apelin/APJ sisteminin kalp fizyolojisinde önemli roller üstlendiğinin birer kanıtı niteliğindedir.

2.1.2.2. Anjiyogenez üzerine etkileri

Apelin anjiyojenik bir faktör (45,46) ve endotel hücrelerinin mitojenik bir elemanıdır (47). Apelin kemirgenlerde kan damarlarının oluşumunda (48) ve kurbağa kalbinin normal gelişimi için oldukça önemlidir (49,50). Yapılan çalışmalar ile farelerde retinal damar gelişimi (51) ve hipoksinin neden olduğu retinal anjiyogenez için apelinin gerekli olduğu gösterilmiştir (52). Ayrıca apelinerjik sistemin tümör anjiyogenezinde rol oynadığı bildirilmiştir. Beyin tümörlerinde, apelin ve APJ'nin mikrovasküler proliferasyonda düzenleyici roller üstlendiği (45) ve apelinin aşırı ifadesi sonrası kanser hücre serilerinde çoğalmanın uyarıldığı bildirilmektedir (53).

Anjiyogenezde apelinin patofizyolojik rolü karaciğer dokusunda rapor edilmiştir. Buna göre apelinerjik sistem portal hipertansif sıçanlarda porto kollateralizasyonu ve splanknik neovaskülarizasyonda rol oynar (54). Bununla birlikte apelinin, damar yenilenmesi, endotel proliferasyon ve damar çapı düzenlemesinde görev alması, apelinin iskemi sonrası tedavilerde yararlı olabileceğini düşündürmektedir (55,56). Bu bulgular apelinin anjiyogenez için çok önemli bir faktör olduğunu ve apelin/APJ ifadesinin uyarılmasıyla tümör veya iskemi sonrası iyileşmede tedavi edici potansiyelinin olabileceğini göstermektedir.

2.1.2.3. Gıda alımı üzerine etkileri

İnsan ve kemirgenlerde hipotalamusun PVN ve SON'larında APJ mRNA ifadesinin gerçekleştiği gösterilmiştir (22,57,58). Bu çekirdeklerde APJ'nin varlığı gıda alımında apelinin bir takım roller üstlenebileceğini düşündürmektedir.

Sunter ve ark. iv apelin uygulamasının gıda alımını etkilemediğini, buna karşın merkezi apelin uygulamasının gıda alımını azalttığını belirtmektedir (6). Taheri ve ark. sıçanlarda icv apelin-13 uygulamasının gıda tüketimini değiştirmedeğini göstermiştir (59). Higuchi ve ark. ise uzun süreli periferik apelin-13 uygulamasının gıda alımını etkilemediğini, fakat buna rağmen vücut ağırlığının azaldığını rapor etmişlerdir (17). Lv ve ark. apelin-13'ün, beyinde APJ reseptörü ve kortikotropin reseptör aktivasyonu ile yiyecek alımını düzenlediğini bildirmektedir (60). Yapılan çalışmalar ile apelinin gıda alımı üzerindeki muhtemel etkisi aydınlatılmaya çalışılmış olursa da, mevcut literatürlerde ekzojen apelin uygulaması sonrası elde edilen sonuçlar birbiri ile tam olarak örtüşmemektedir.

2.1.2.4. Sıvı homeostazi üzerine etkileri

Sıvı homeostasisin kontrolünde görevli beyin bölgelerinde APJ mRNA'sının tespiti, apelinin vücut sıvı dengesi düzenlenmesinde bir takım roller oynayabileceği hipotezine yol açmıştır. Hipotalamusun PVN ve SON alanlarında sentezlenen vazopresin arka hipofize taşınarak buradan sistemik dolaşıma geçer. Vazopresinin baskın endokrin fonksiyonu renal toplayıcı kanal hücrelerinde geçirgenliği artırarak bu şekilde vücutta su tutulmasını sağlamaktır (7).

Yapılan çok sayıda çalışma apelinin içme davranışı üzerine etkili bir peptid olduğunu belirtmektedir. Susuz bırakılmayan hayvanlarda apelinin iv ve icv enjeksiyonu sonrası su tüketimi önemli düzeyde artmıştır (59). Fakat bu verilerin tersine Clarke ve ark. icv apelin enjeksiyonu sonrası hayvanların su tüketiminde azalma belirlemiş (61), farklı birkaç çalışmada ise aynı uygulama sonrası su tüketiminde herhangi bir farklılığın olmadığını rapor edilmiştir (36,40). Reaux-Le ve ark. 24 ve 48 saatlik dehidrasyondan sonra magnoselüler hücrelerdeki apelin yoğunluğunun arttığını, buna karşın aynı hücrelerdeki vazopresin seviyesinde ise

önemli düşüş gözlemlendiğini göstermiştir (62). Ayrıca aynı çalışmada dehidrasyondaki hayvanlara vazopresin-1 reseptör antagonistinin merkezi uygulanması apelin düzeyinin azalmasına neden olmuştur (62). Tobin ve ark. dişi sıçanlarda apelinin doğrudan magnoselüler SON nöronlarına uygulanmasının vazopresin hücre gövdelerini aktive ettiğini, izole SON nöronlarına apelin uygulamasının ise somatodendritik vazopresin salınımını inhibe ettiğini bildirmektedir (10). Bu veriler aksonal ve dendritik vazopresin serbestleşmesinde apelinin rolü olduğunu göstermektedir. Diğer bir çalışmada ise emzirme dönemindeki sıçanlara uygulanan icv apelin enjeksiyonunun vazopresinerjik nöron aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir (63). Azizi ve ark. insanda plazma ozmolalite artışına paralel olarak, plazma apelin konsantrasyonundaki azalmaya vazopresin seviyesindeki artışın eşlik ettiğini belirtmişlerdir (64). Ayrıca iv apelin uygulamasının plazma vazopresin düzeyini arttırdığı rapor edilmiştir (65). Bu nedenle, bugüne kadarki veriler apelin/APJ ikilisinin sıvı homeostazının düzenlenmesinde aktif fizyolojik roller oynadığını göstermesine karşın bu tepkilerin niteliği kesin değildir.

2.1.2.5. Metabolizma üzerine etkileri

Yapılan bir dizi çalışma apelinin enerji metabolizmasında önemli bir yere sahip olabileceğini ve özellikle obezitenin patofizyolojisinde adiposit kökenli bu peptidin rol oynayabileceğini belirtmektedir. Apelin ve APJ insan, fare ve sıçan yağ dokularında tespit edilmiş olup, hem apelinin hem de APJ'nin obezite ile birlikte adipoz dokuda ve plazmada artış gösterdiği rapor edilmiştir (8,23,66). Krist ve ark. obezite tedavisi görmüş insanlarda subkutan adipoz doku ve dolaşımdaki apelin düzeyinin düştüğünü bildirmiştir (67). Ancak plazma apelin düzeyinin sadece obez insanlarda ve insülin direncinin de olduğu hayvan modellerinde arttığı bildirilmektedir (8,9). Kotanidou ve ark. diyabetli obez bireylerde serum apelin düzeyinin düşük olduğunu göstermiştir (68). Diğer bir çalışmada insülinin adipositlerdeki apelin üretimini teşvik ettiği *in vitro* olarak belirlenmiştir (69). Wei ve ark. fare 3T3-L1 adiposit kültürüne uyguladıkları insülinin doz bağımlı olarak apelin sentezini arttırdığını ortaya koymuştur (70). Farelerde açlık durumunda plazma apelin seviyesinin düşüşü ve beslenme sonrası tekrardan apelin seviyesinin

düzenlenmesi (8,66), insülinin apelin gen ifadesini ve apelin salgılanmasını düzenleyen bir faktör olduğu düşüncesini güçlendirmektedir.

Apelinin metabolik sendrom hastalıklarında bir takım olumlu etkilere sahip olabileceği düşünülmektedir. Periferal apelin uygulamasının iskelet kasında ve adipoz dokuda glikoz kullanımını arttırdığı ve buna bağlı olarak plazma glikoz düzeyini düşürdüğü bildirilmiştir (71). Yue ve ark. apelin nakavt farelerde insülin duyarlılığının azaldığını, glikoz intoleransı ve hiperinsülineminin geliştiğini gözlemiş ve bu hayvanlara apelin uygulamasının insülin duyarlılığını arttırdığını rapor etmişlerdir (72). Attane ve ark. obez ve insülin direnci olan farelerde, uzun süreli periferal apelin uygulamasının yağ kitlesi ve kan trigliserid düzeyini azalttığını, ayrıca hiperinsülemi gelişimini önlediğini bildirmiştir (73). Diğer bir çalışmada ise apelin uygulamasının insüline dirençli 3T3-L1 adiposit hücrelerinde glikoz kullanımında artışa neden olduğu gösterilmiştir (74). Yapılan çalışmalar apelinin glikoz kullanımını teşvik ettiğini göstermiş olsa da apelin ve tip 2 diyabet arasındaki ilişki hala tam olarak aydınlatılmamıştır. İnsülin dirençli, tip 2 diyabetik ve morbit obez bireyler ile yapılan birçok çalışmada plazma apelin seviyesi yüksek bulunmuştur (75-77). Buna karşın yapılan bir çalışmada tanısı yeni konulan tip 2 diyabet hastalarındaki plazma apelin düzeyi düşük bulunmuştur (78). Tip 2 diyabetli hastalarda ve obez kişilerdeki yüksek apelin düzeyinin ancak düşük kalorili beslenme ile tersine çevrilebileceği düşünülmektedir (9).

2.1.2.6. Diğer etkileri

Apelinin ilk olarak mide öz suyundan izole edilmesi bu peptidin gastrointestinal sistemde birtakım roller üstlenebileceğini düşündürmektedir (79-81). Wang ve ark. *in vitro* bir çalışma ile apelinin gastrik hücre çoğalmasını arttırdığını ve kolesistokininin salgılanmasını uyardığını göstermişlerdir (79). Ohno ve ark. apelin-12'nin sıçanlarda gastrik asit sekresyonunu doz bağımlı olarak arttırdığını rapor etmişlerdir (82). Farelere icv apelin-13 uygulanmasının doz bağımlı mide boşalması ve bağırsak geçişi üzerinde inhibitör etki yaptığı, intraperitoneal (ip) uygulanmasının ise mide boşalmasına etki etmediği gösterilmiştir (60).

Apelinerjik sistemin damar düz kası üzerinde etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Hus-Citharel ve ark. sıçan böbrek glomerüllerinde yüksek düzeyde APJ mRNA ifadesinin olduğunu bildirmişlerdir (83). Aynı çalışmada APJ, glomerüler filtrasyon endotel ve vasküler düz kas hücrelerinde tespit edilmiş ve apelinin vasküler düz kas üzerinde doğrudan reseptör aracılı vazokonstriksiyon etki gösterdiği bildirilmiştir (83). Bu sonuçlar apelinin böbrekteki glomerular damar ağı üzerine kompleks etkilere sahip olduğunu göstermektedir.

Apelinin anne sütünde tespit edilmiş olması ve dalaktaki sitokin üretimini azaltması nedeniyle bu peptidin immün sistemde birtakım roller üstlenebileceği akıllara getirmektedir (20,84,85). Yapılan birkaç çalışma insan bağışıklık yetmezliği virüsünün (HIV) hücre içerisine girmesinde APJ'nin bir ko-reseptör olarak görev yaptığını (13,32,86) ve bu eylemin apelin tarafından engellendiğini bildirmektedir (87). Puffer ve ark. merkezi sinir sisteminin bazı hücrelerindeki (CD4 pozitif/CD4 negatif, CD4; yardımcı T hücreleri, monositler, makrofajlar ve dentritik hücreler gibi bağışıklıkta önemli hücre gruplarının yüzeyinde bulunan bir glikoprotein) HIV-1 enfeksiyonu ve patogenezinde APJ'nin belirleyici olabileceğini belirtmektedir (88). Buna karşın Zhou ve ark. ise CD4 varlığına bakılmaksızın HIV'in merkezi sinir sistemindeki hücreleri enfekte edebildiğini rapor etmiştir (89). Kemirgenlerde yapılan diğer çalışmalarda apelin ve APJ'nin merkezi sinir sisteminde antinosisepsiyon (ağrıya düşük hassasiyet) (90,91), depresif davranış geliştirme (92), nöron koruyucu (93) ve pasif kaçınmanın öğrenilmesinde kolaylık (94) gibi süreçlerde olası roller üstlenebileceğini belirtilmektedir.

Apelin ve APJ'nin osteoblast hücrelerinde hücre canlılığının devamında ve hücre çoğalmasında rol aldığı rapor edilmiştir (11,12,95). Wattanachanya ve ark. apelinin fare primer osteoblast hücrelerinde çoğalmayı ve apoptoz baskılanmasını doz bağımlı olarak etkilediğini göstermişlerdir (96). Yine aynı çalışmada apelin nakavt farelerde kemik kütlede bir artışın gözlenebileceği dile getirilmektedir (96). Ayrıca diğer bir çalışmada ise osteoartrik hastaların sinovyal sıvılarında apelinin tespit edilmesi ve bu hastaların plazmasındaki apelin seviyesinin yüksek olması nedeniyle, apelinin osteoartritin patofizyolojisinde potansiyel bir role sahip olduğu bildirilmiştir (97).

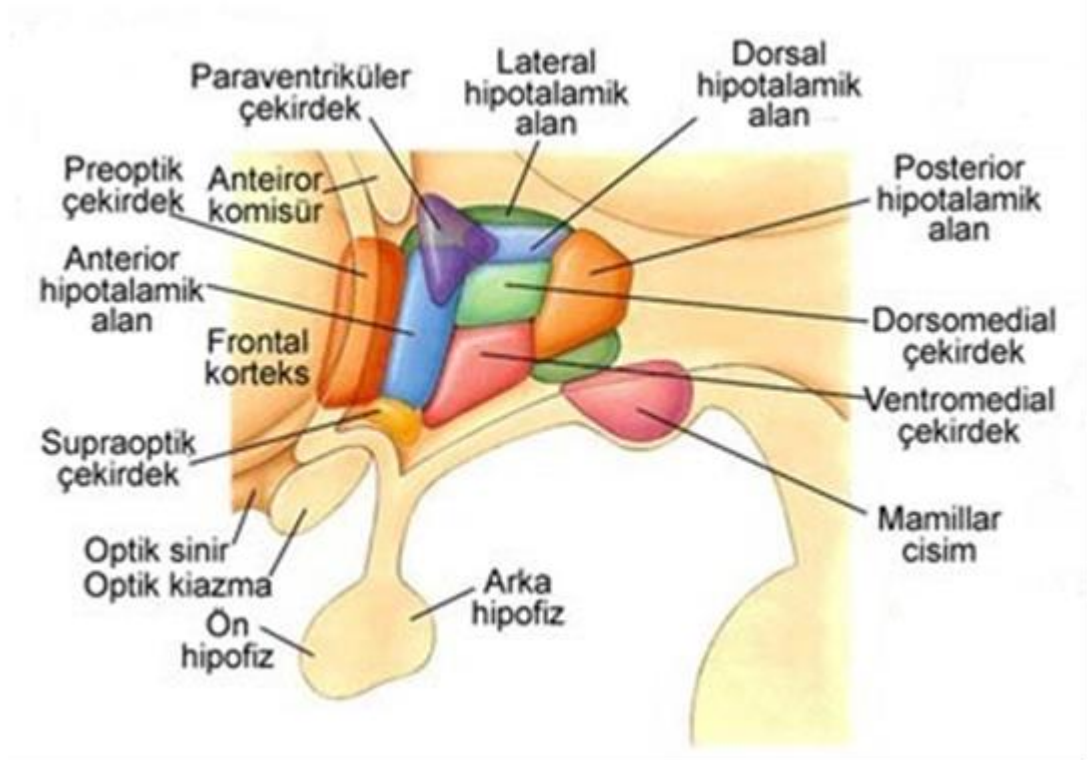
2.2. Hipotalamus

Merkezi sinir sisteminin mediobasal bölgesinde, hipofiz bezinin dorsalinde ve talamusun ventralinde yer alan hipotalamus, memelilerde beyinin çok küçük bir parçasını oluşturmaya rağmen (insanda 1400 gr olan beyin yaklaşık 4 gr'ını) merkezi sinir sistemi içerisinde önemli fizyolojik rollere sahiptir.

Hipotalamustan çıkan sinyaller periferel dokular ve diğer beyin bölgelerinde uygun nöroendokrin cevabın oluşmasını sağlar. Yem tüketimi, sıvı alımı ve düzenlenmesi, enerji harcanması, kan basıncı, üreme, vücut sıcaklığı ve uyğunun düzenlenmesi gibi birçok yaşamsal süreç hipotalamus tarafından kontrol edilir. Hipotalamustan çıkan sinyaller çevre dokular ve diğer beyin bölgelerinde uygun nöroendokrin cevabın oluşmasını uyarır (98).

2.2.1. Hipotalamus çekirdekleri

Hipotalamus periventriküler alan, medial alan ve lateral alan olmak üzere üç bölgeye ayrılmıştır. Periventriküler alan; PVN, arkuat çekirdek (ARC), suprakiazmatik çekirdek ve periventriküler çekirdek olarak isimlendirilen dört farklı hücre kümesi içerir. Medial hipotalamik alan; medial preoptik çekirdek, anterior hipotalamus, dorsomedial çekirdek, ventromedial çekirdek ve mamiler çekirdekten oluşur. Lateral hipotalamik alan ise preoptik alanı içerir (Şekil 2.2). Magnoselüler ve parvoselüler nörosekretuar sistemler hipotalamik nörosekretuar hücre gruplarını oluştururlar ve bunlar hipotalamus boyunca dağılım gösterir (99).



Şekil 2.2. Hipotalamik nükleusların yerleşimi (100)

2.2.2. Hipotalamusun serbestletici ve baskılayıcı hormonları

Hipotalamustan; tiotropin serbestleştirici hormon (TRH; PVN'nin medial parvoselüler alt ünitesinin medyalinde), kortikotropin serbestleştirici hormon (CRH; medial parvoselüler alt ünitesinin lateralinde), büyüme hormonu serbestleştirici hormon (GHRH; ARC'nin lateral bölgesinde), somatostatin (PVN'de), gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH; preoptik alanın medyalinde), dopamin (ARC'nin medyalinde) ve gonadotropin inhibe edici hormon (GnIH, dorsomedial çekirdeklerin içinde) salgılanmaktadır. Bu hormonlar ön hipofiz bezindeki hormon salgısını düzenler (Tablo 2.1). Magnoselüler nörosekretuar sistemin nöronal hücreleri ise vazopressin ve oksitosin salgılar ve bu hormonlar arka hipofize taşındıktan sonra sistemik dolaşıma geçer (99,101).

Tablo 2.1. Ön hipofiz bezinin salgısını kontrol eden serbestletici ve baskılayıcı hipotalamus hormonları (7)

Hormon	Ön hipofiz bezindeki birincil etkisi
Tirotropin Serbestleştirici Hormon (TRH)	Tirotroplardan TSH salgılanmasını uyarır
Gonadotropin Serbestleştirici Hormon (GnRH)	Gonadotroplardan LH ve FSH salgılanmasını uyarır
Kortikotropin Serbestleştirici Hormon (CRH)	Kortikotroplardan ACTH salgılanmasını uyarır
Büyüme Hormonu Serbestleştirici Hormon (GHRH)	Somatotroplardan büyüme hormonu salgılanmasını uyarır
Büyüme Hormonu Baskılayıcı Hormon (Somatostatin)	Somatotroplardan büyüme hormonu salgılanmasını baskılar
Prolaktin Baskılayıcı Hormon (PIH)	Laktotroplardan prolaktin salgılanmasını baskılar

(TSH: Tiroid uyarıcı hormon, LH: Luteinleştirici hormon, FSH: Folikül uyarıcı hormon, ACTH: Adrenokortikotropik hormon)

2.2.3. Hipotalamik TRH nöronları

Hipotalamik TRH nöronları PVN'de bulunan nöronal perikaryadan (nörosekretuar nöronlar) kaynaklanır ve medyan eminensin dış tabakasında yüksek yoğunluklu akson terminalleri mevcuttur (102). Medyan eminensin dış tabakasındaki bu aksonal yoğunluğun tahribatı, ön hipofizden tiroid uyarıcı hormon (TSH) salınımının azalmasına neden olur. Hipotalamustan TRH biyosentezi gerçekleştikten sonra, sentezlenen peptid hipofizden TSH sentezini ve salınımını uyarmak üzere akson terminalleri boyunca medyan eminense taşınır ve buradan da hipofizyal portal sistem kapilleri içerisine serbestlenir (103,104). TSH dolaşımdaki tiroid hormon düzeyinin önemli bir düzenleyicisidir (105).

TRH nöronları hem dolaşımdan hem de beynin diğer bölgelerinden gelen sinyalleri alan "tirotropik alan" içerisinde yer alır. PVN içerisinde TRH nöronlarına

en önemli afferent bağlantıları beyin sapından katekolamin nöronları ve hipotalamusun ARC nöronları sağlar. ARC’de üretilen nöropeptitler açlık, hastalık ve tiroid ekseninde rol oynarken, katekolaminler soğuk maruziyeti sırasında TRH gen ifadesinin düzenlenmesinde önemlidir (106). PVN’ye ek olarak TRH nöronları hipotalamusun diğer bölgelerinde (ön hipotalamusun preoptik alanı, SON, ARC, dorsomedial premmamilar çekirdek, bazolateral ve preforikal hipotalamus) de bulunur (107).

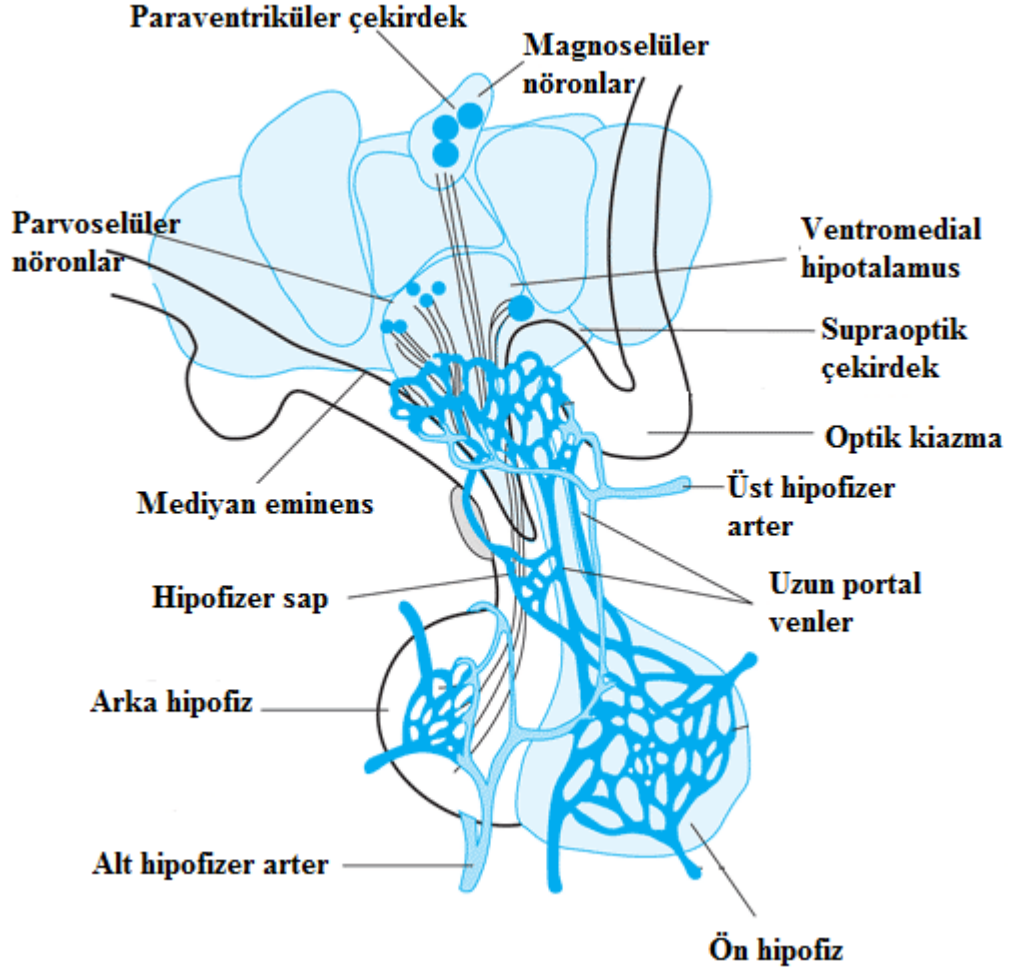
2.2.4. Tirotropin serbestleştirici hormon

TRH büyük bir öncü protein olan prepro-TRH’nın (ppTRH) konvertaz enzimleri (prohormon dönüştürücü enzimler 1, 2 ve 3; PC1-3) ile dönüştürülmesi sonrası türetilen tripeptid amid (pro-Glu-His-Pro-NH₂) yapısında bir peptittir (108). İnsan ppTRH 242 aminoasitten meydana gelir ve TRH için projenitör dizisinin altı kopyasını oluşturur. Sıçan ppTRH 255, fare ppTRH ise 256 aminoasitten oluşur ve her ikisi de insandan farklı olarak TRH için beş projenitör diziye sahiptir. Sıçan, fare ve insan proTRH salgısını tetikleyen sinyallere yanıt olarak TRH moleküllerin yeterli üretimini sağlamak için projenitör sekansın (Gln-His-Pro-Gly) birden çok kopyası bulunur (109,110). TRH direkt olarak ön hipofiz bezindeki hücreleri etkileyerek, TSH sekresyonunu artırır. Serumdaki tiroid hormon düzeyindeki azalma PVN’de TRH ve prohormon dönüştürücü enzim sentezini uyarır (111,112).

2.3. Hipofiz

Hipofiz bezi büyüme, enerji metabolizması, üreme, stres ve diğer fizyolojik süreçlerde anahtar rol oynayan bir düzenleyici, hipotalamus ve periferik organlar arasında fizyolojik sinyal alışverişinin gerçekleştiği bir aracı organdır. İnsanlarda yaklaşık 1 cm çapında ve 0.5-1 gr ağırlığındaki hipofiz bezi, beyin tabanında bulunan ve *sella turcica* adı verilen kemik bir kovuk içine yerleşmiş, *diaphragma sellae* adındaki duranın kıvrımıyla kaplıdır. Hipofiz ve hipotalamus arasındaki fonksiyonel ve anatomik bağlantı infundibular sap üzerinden medyan eminens aracılığı ile gerçekleşir. Bu yapı hipotalamik faktörlerin hipofiz bezine ulaşımını sağlar (113).

Hipofiz bezi anatomik ve fonksiyonel olarak iki loba ayrılır: adenohipofiz (ön hipofiz) ve nörohipofiz (arka hipofiz) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Hipotalamus ve hipofiz arasındaki anatomik ve fonksiyonel ilişki (114)

2.3.1. Adenohipofiz

Adenohipofiz anatomik ve fizyolojik olarak üç bölgeye ayrılmıştır:

1. Pars tuberalis (pars infundibular olarak da bilinir) alt hipofizyal sapın dış bölgesini çevreleyen ve birkaç kat hücre tabakasından oluşan dış kısımdır. Bu kısım tuberalin olarak adlandırılan bir faktör aracılığıyla prolaktin salgılanmasını uyarır (115). Pars tuberalis üzerinde bulunan melatonin reseptörleri, bu alanın fotoperiyodik işlevsellikte etkili olabileceğini düşündürmektedir (116).

2. Pars intermedia (ara lob olarak da bilinir) arka hipofiz ve ön hipofiz arasındaki alanda lokalize olmuştur. İnsanlarda bu alan fazla gelişmemiştir ve Rathke kesesinin körelmiş arka uzantısı şeklindedir. Bunun aksine ara lob daha düşük omurgalılarda melanotrop hücreleri içerir ve endorfinlerde dahil olmak üzere melanosit stimüle edici hormon gibi birtakım biyoaktif molekülleri salgılar, melanin üretimini ve dağılımını düzenlerler (117).

3. Pars distalis, adenohipofizin %80'lik kısmını oluşturur ve ön lob olarak adlandırılır. Bu alan fonksiyonel olarak farklı hücre gruplarını bünyesinde bulundurur. Ön lob içerisindeki bu hücre grupları sitokinler ve büyüme faktörlerinde içerisine alan birçok hormonun yapımını gerçekleştirir (Tablo 2.2). Hormon salgısı büyük ölçüde kandaki faktörler tarafından düzenlenir (113). Hipotalamustaki özel nöronlarda meydana getirilen hipotalamusun serbestleştirici ve baskılayıcı hormonları hipotalamus-hipofiz portal sistem aracılığıyla ön hipofize taşınır. Hipotalamustan salgılanan bu hormonların işlevi ön hipofiz bezindeki hormonların yapımını ve salgısını kontrol etmektir (7). Bütün bu düzenleyici mekanizmalar hipofiz bezinin homeostatik süreçlerde aktif roller üstlenmesini sağlar.

Tablo 2.2. Ön hipofizde yer alan hücre grupları ve salgıladıkları hormonlar (7)

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 inhibe edici hormon, LH: Luteinleştirici hormon, TSH: Tiroid uyarıcı hormon, GH: Büyüme hormonu, ACTH: Adrenokortikotropik hormon)

2.3.2. Nörohipofiz

Nörohipofiz olarak bilinen arka hipofiz bezi, asıl olarak özelleşmiş glia hücreleri olan pitüisit hücrelerden meydana gelir. Bu hücreler hipotalamusun SON ve

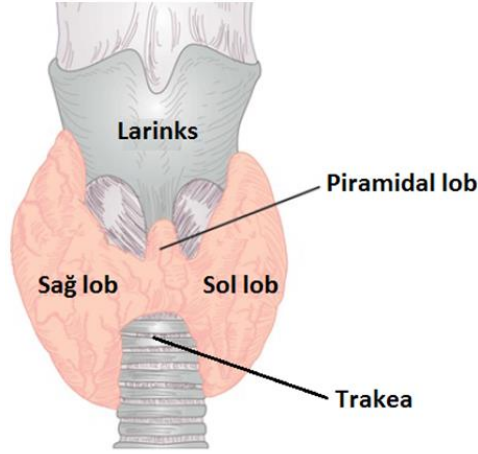
PVN bölgelerinden arka hipofize kadar uzanan terminal sinir sonlanmalarını (magnoselüler nöronlar) çevreleyerek bu yapılara destek doku görevi üstlenir ve ayrıca nörohipofiziyal hormon üretiminin düzenlenmesine katkı sağlar (118). Hipotalamustaki magnoselüler nöronlarda sentezlenen antidiüretik hormon (vazopressin) ve oksitosin sinir yolağı boyunca taşınarak arka hipofize ulaşır.

2.3.3. Tiroid uyarıcı hormon

Tiroid bezinden triiyodotironin (T3) ve tiroksin (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 α ve β alt üniteden oluşur ve bu yapılar hormonun özgün biyolojik özelliğini kazandıran yapılardır. İnsanlarda α -alt ünite ve β -alt ünite sırasıyla 6. ve 1. kromozomlar üzerinde bulunan genler tarafından kodlanır (119). 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 (120).

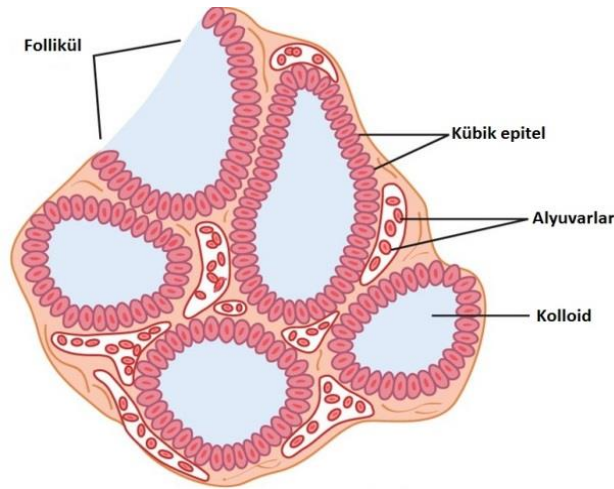
2.4. Tiroid bezi

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 2.4). Tiroid bezi boyun bölgesi kaslarının altında gömülü haldedir ve zengin damarlanma yapısına sahiptir (121).



Şekil 2.4. Tiroid bezinin konumu

Mikroskopik olarak tiroid bezi fibröz bağ doku kapsülü ile çevrili, zengin vasküler interfolliküler bağ dokuları tarafından desteklenen ve içerişi kolloid adı verilen sıvı ile dolu folliküllerden oluşur (Şekil 2.5) (121). 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 (122). Ayrıca tiroid bezi içerisinde, follikül hücreleri arasında yerleşim gösteren ve kalsitonin salgılayan parafolliküler hücrelerde bulunur (123). Memelilerdeki tiroid bezlerinin mikroskopik yapısı aynı olmasına rağmen, bezin konumu ve dokusu farklılık gösterebilir (121).



Şekil 2.5. Tiroid bezinin mikroskopik görünümü (7)

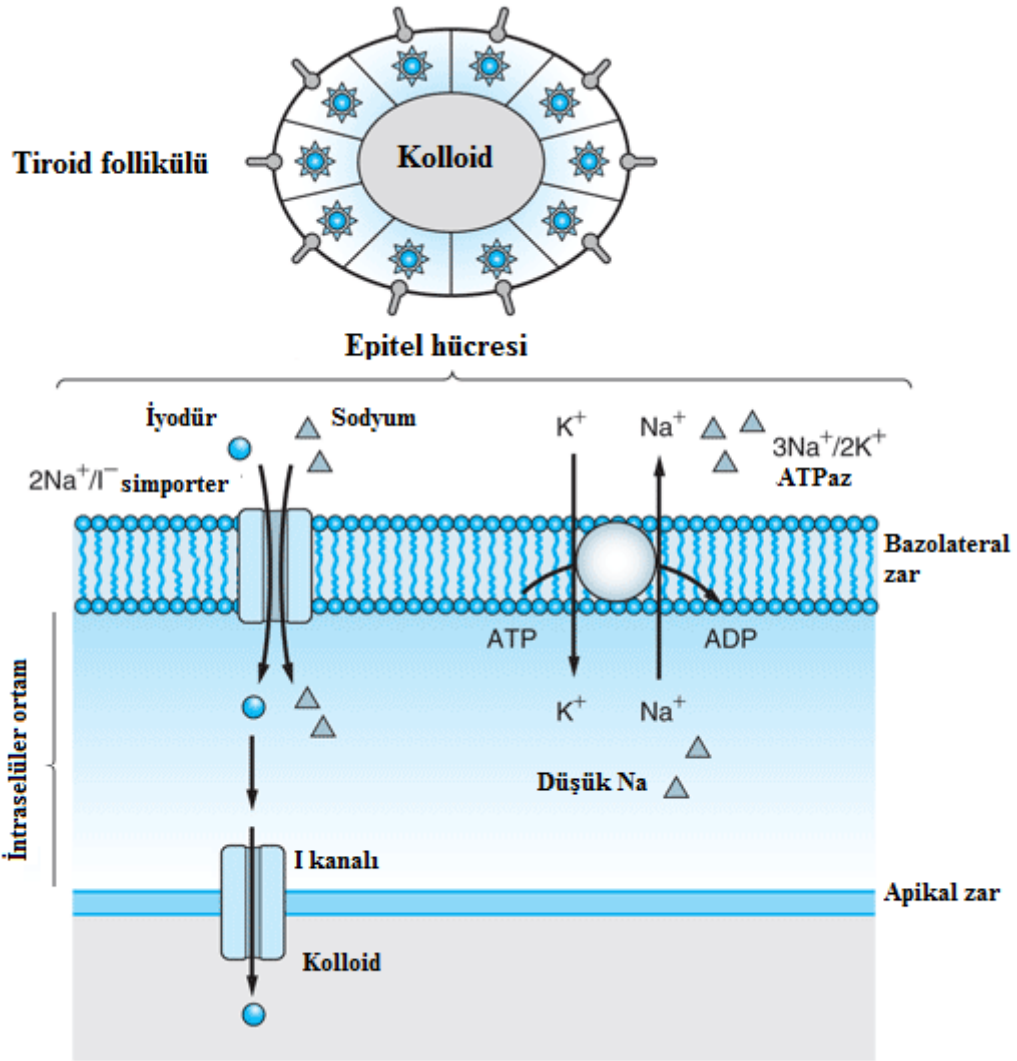
2.4.1. Tiroid hormonları

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 (7). 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 (7,122).

2.4.2. Tiroid hormonlarının biyosentezi

2.4.2.1. İyodür iyonlarının 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 zarıdan Na^+/I simporter yoluyla hücre içerisine aktif taşıma ile alınır. İyodürün hücredeki yoğunlaşmasını sağlayan bu olaya iyot tutulması denir (Şekil 2.6) (124). 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 (7,124). 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 (7).



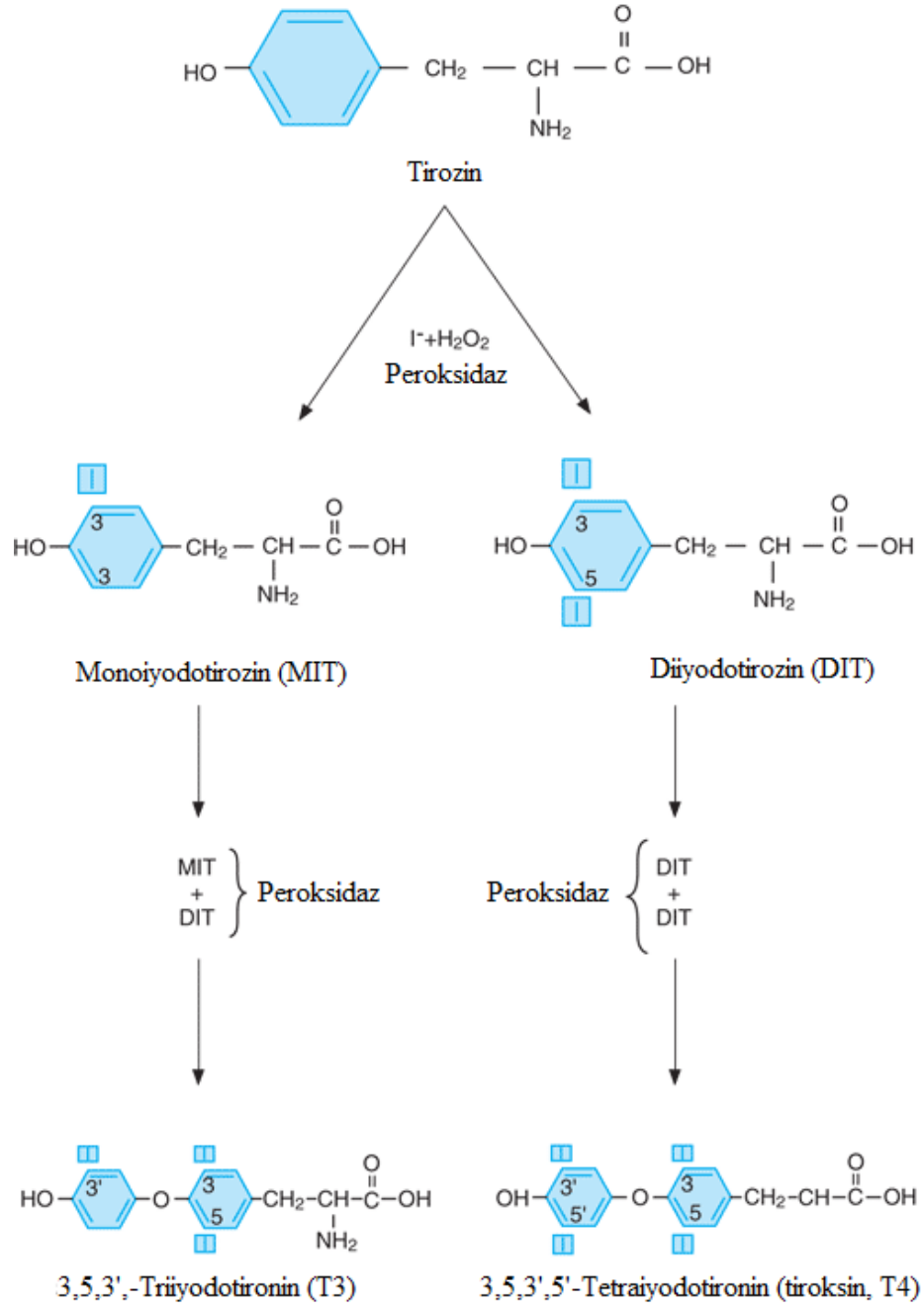
Şekil 2.6. Tiroid bezi tarafından iyodür konsantrasyonunun mekanizması (114) (İyodür kimyasal ve elektriksel gradiente karşı aktif taşıma ile folliküler hücre sitozolüne taşınır. İki sodyum iyonu ve bir iyodür iyonunu simporter taşıma ile intraselüler alana geçer. Bu taşıma sürecinde enerji harcanır. Taşıma için gerekli enerji, sodyumu hücre dışına pompalayan, daha düşük hücre içi sodyum konsantrasyonuna neden olan ve sodyumun tekrardan hücre içine kolayca difüzyonunu sağlayan Na^+/K^+ ATPaz pompasından gelir. İyodür kolloid alana iyot kanalından geçerek ulaşır.)

2.4.2.2. İyodürün iyoda 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 (125,126). Peroksidaz ya hücrenin apikal zarına yerleşik haldedir yada 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 (127).

2.4.2.3. 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 2.7). Ayrıca bir MIT ve bir DIT'ın birleşmesiyle az miktarda ve inaktif olduğu düşünülen RT3 oluşur (7).



Şekil 2.7. Tiroid hormon sentezinin biyokimyası (114)

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 hormon sentezi durduğu zaman, yetersizlik belirtileri birkaç ay gözükmez (7).

2.4.2.4. 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 (7).

Kana serbestlenen tiroid hormonlarının %99'undan fazlası karaciğerde yapılan proteinlere bağlanarak dolaşımında 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 (7,122).

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 (7).

2.4.3. Tiroid hormon reseptörleri

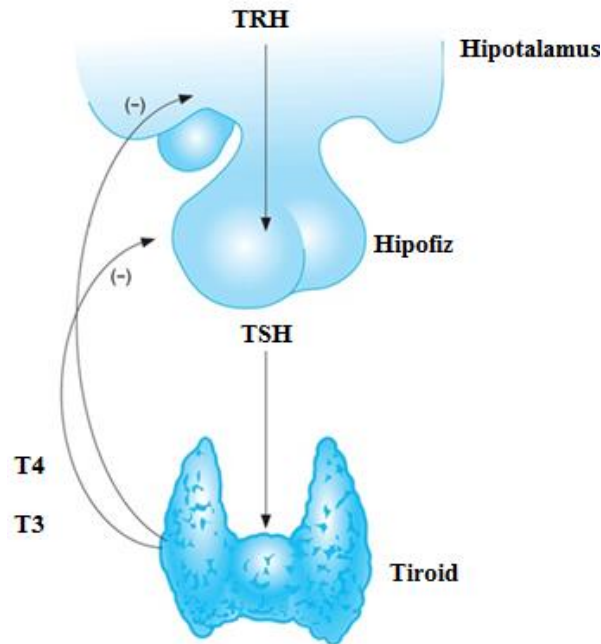
Tiroid hormon reseptör (TR) izoformları, nükleer reseptör süper ailesine ait ligand ile modüle edilmiş transkripsiyon faktörlerinin bir üyesidir (128). Bu reseptörler ya DNA iplikçiklerine bağlı olarak ya da onların hemen yakınında bulunur. Bilinen bütün TR izoformları (TR α 1, TR β 1, TR β 2 ve TR β 3) iki gen

ürününün transkripsiyonu ve alternatif birleştirilmesi ile meydana gelir. TR izoformlarının sentezi ve düzenlenmesi doku tiplerine göre değişiklik gösterebilir (129-131). Sıçanlardaki immunositokimyasal çalışmalar TR izoformlarının hipotalamus dahil beynin birçok bölgesinde ve periferik dokularda varlığını göstermiştir (132). TR olgun sıçanların PVN (TR β 2 ifadesi yüksek seviyede), ARC ve medyan eminensinde yüksek düzeyde ifade edilmektedir (129,133). TR β 2 tirotroplar, PVN'deki TRH nöronları, gelişmekte olan kulak ve retinada sınırlı düzeyde ifade edilmesine rağmen TR α 1 ve TR β 1 izoformları daha geniş yayılım göstermektedir (128). Yapılan bir çalışmada fare hipotalamusunda direk olarak TR β 1 siRNA'sının bloklanmasının hem T3 bağımlı hemde T3 bağımsız aktivasyonda TRH transkripsiyonunu düzenlediği gösterilmiştir. Bunun tersine TR β 2 siRNA'sının bloklanması sadece T3'ün yokluğunda transkripsiyonu etkiler (134). Bir başka çalışmada ise TR β 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 (135). Bunun tersine, TR β 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 β 2 olduğunu göstermektedir (135).

2.4.4. Hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı ve düzenlenmesi

Tiroid hormonlarının sentezlenmesi ve dolaşımdaki seviyesi hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı tarafından düzenlenir. Hipotalamik TRH nöronları esas olarak PVN'de bulunan nöronal perikaryadan (nörosekretuar nöronlar) kaynaklanır ve medyan eminensin dış tabakasında yüksek yoğunluklu akson terminalleri mevcuttur (102). Buna ek olarak TRH nöronları hipotalamusun diğer bölgelerinde (ön hipotalamusun preoptik alanı, SON, ARC, dorsomedial premmamilar çekirdek, bazolateral ve preforikal hipotalamus) de dağılım gösterir (107). Hipotalamustan TRH biyosentezi gerçekleştikten sonra, sentezlenen peptid hipofizden TSH sentezini ve salınımını uyarmak üzere akson terminalleri boyunca medyan eminense taşınır ve buradan da hipofizyal portal sistem kapilleri içerisine serbestlenir (103,104). 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 (121). 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. Hipotalamus-hipofiz-tiroid aksının düzenlenmesi dolaşımdaki tiroid hormon miktarına bağlıdır ve klasik geri bildirim mekanizması ile çalışır (Şekil 2.8) (7). 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 (114).



Şekil 2.8. Hipotalamus-hipofiz-tiroid aksının geribildirim düzenlenmesi (114)

2.4.5. Tiroid hormonlarının enerji metabolizmasındaki etkileri

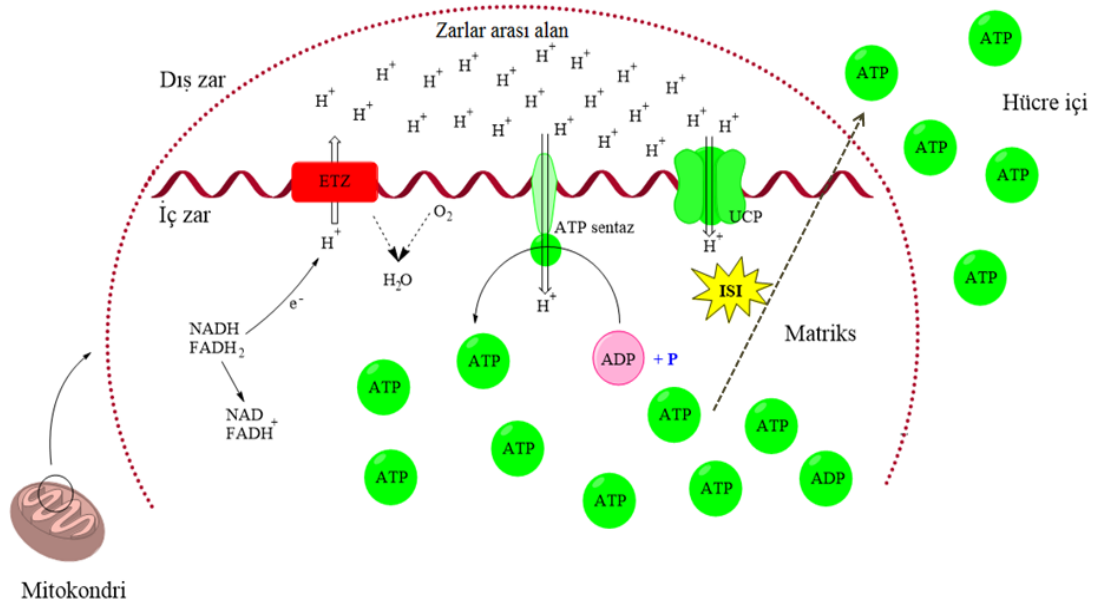
Hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı enerji metabolizması başta olmak üzere, metabolizma hızı, büyüme ve gelişme gibi süreçlerin sağlıklı bir şekilde devam edebilmesinde kilit rol oynar (136,137). Enerji metabolizmasının bozulması kişide obezite ve diyabet gibi önemli sağlık sorunlarını da beraberinde getirir. 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 (138). Bunun aksine hipotiroidizmi hastalarda, metabolizma hızının azalması ve azaltılmış gıda alımına rağmen ağırlık artışı gerçekleşir (136). 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 (139,140).

2.5. Eşleşme bozucu proteinler ve tiroid hormonları ile ilişkisi

Mitokondriyal taşıyıcı proteinler ailesinden olan UCP'ler mitokondrinin iç zarında sentezlenir (141). Bu proteinler mitokondriyal zarın fonksiyonunda ve hücresel enerji düzenlenmesinde rol alır (142,143). Yağ asitleri ve glukoz tarafından aktivitesi artan UCP'ler, pürin nükleotidleri tarafından inhibe edilir (144,145). UCP'ler mitokondrinin zarlar arası alanındaki protonları mitokondri matriksi içerisine taşıyarak, mitokondriyal proton gradiyentini azaltır ve sonuç olarak oksidatif fosforilasyon aracılığı ile ATP üretimini kısmen engellemiş olur (146,147). Protonlar UCP'ler üzerinden matriks içerisine geçerken depolanan enerji ısı olarak açığa çıkar (Şekil 2.9).

Farklı vücut dokularında dağılım gösteren bu protein grubunun 5 üyesi vardır. Kahverengi yağ dokuya özgü UCP1, vücut sıcaklığının korunmasında (titremesiz termogenez) ve yağ dokusu içerisinde depolanmış enerjinin kullanılmasında görev alır (148,149). UCP2; dalak, pankreas adacık hücreleri, akciğer, mide, beyaz yağ doku, beyin ve periferik nöronların arka kök gangliyonlarında ifade edilir (148-152).

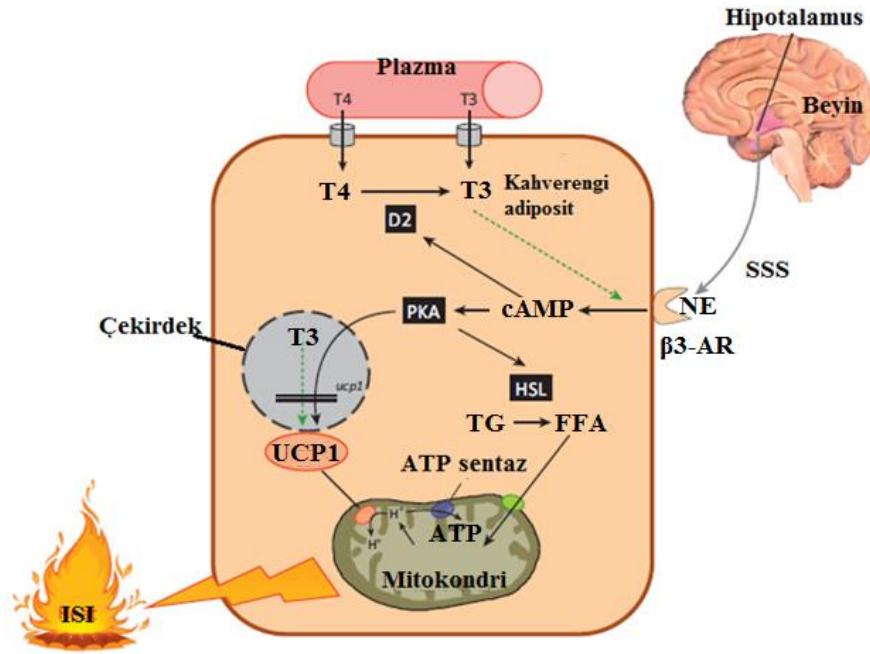
UCP3 öncelikle iskelet kasında olmak üzere az miktarda sinir hücrelerinde tespit edilmiştir (149,152,153). Yapılan çalışmalar ile UCP4 ve UCP5'in merkezi sinir sisteminde yüksek düzeyde bulunduğu, ayrıca UCP5'in testis dokusunda varlığı belirtilmiştir (154-156).



Şekil 2.9. Mitokondriyal enerji düzenlenmesi ve UCP'lerin rolü (157) (UCP'ler zarlar arası alandaki protonları kendi üzerlerinden mitokondriyal matrikse taşıyarak proton gradyanını azaltır. Bu süreçte proton gradyanı içerisinde biriken enerji ısı olarak açığa çıkar. ETZ: Elektron taşıma zinciri)

Tiroid hormonları dokularda enerji kullanımını artırırken, aynı zamanda titremesiz termogenez ile vücut sıcaklığının düzenlenmesinde de rol oynar (158). Memelilerin kahverengi yağ dokularında tiroid hormon reseptörlerinin (TRα1 ve TRβ1) bol miktarda bulunması, tiroid hormonlarının kahverengi yağ dokusunu doğrudan hedef aldığını göstermektedir (140,159). Dolaşımdaki T3 kahverengi yağ dokuda TRβ1 reseptörüne bağlanarak UCP1 düzeyini artırır (140,160). Lee ve ark. insan adiposit kültürüne T3 uygulamasının UCP1 mRNA ifadesini doz bağımlı olarak arttırdığı göstermiştir (161). Bir diğer çalışmada, insülin geninde mutasyon olan hastalarda tiroidektomi sonrası L-T4 tedavisinin abdominal ve supraskapular kahverengi yağ dokudaki UCP1 mRNA ifadesinde artışa neden olduğu rapor

edilmektedir (162). Buna ek olarak tiroid hormonları ile UCP3 arasındaki muhtemel ilişki de aydınlatılmaya çalışılmıştır. Sprague ve ark. hipertroidili sıçanlardaki kas UCP3 düzeyinin normal ve hipotroidili sıçanlara kıyasla daha yüksek olduğunu rapor etmiştir (163). UCP1 ve UCP3 ifadelerindeki artış enerji kullanımının bir göstergesi olarak kabul edilir (142,164). Bütün bu sonuçlar tiroid hormonlarının UCP1 ve UCP3 üzerinden enerji kullanımını gerçekleştirdiğini gösterir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Tiroid hormonlarının kahverengi yağ doku ısı oluşumundaki rolü (136) (Nörepinefrinin (NE) β 3-adrenoreseptöre (β 3-AR) bağlanmasıyla cAMP seviyesinde artış meydana gelir ve bu protein kinaz A (PKA) ve hormon duyarlı lipaz (HSL) aracılıklı lipolizi hızlıca aktive eder. Serbest yağ asitlerinden (FFA) aktive olan asetil-CoA'lar karnitin palmitoiltransferaz 1a (CPT1a) aracılığı ile mitokondriye alınır, yağ asitlerinin β -oksidasyonu sitrik asit döngüsü ile sağlanır. Oksidatif fosforilasyon süresince iç mitokondriyal zarın üzerinde bir proton gradyanı meydana gelir. İç zar üzerinde bulunan UCP1 zarlar arası alandaki protonları kendi üzerinden matriks içerisine taşır ve proton gradyanı içerisinde biriken enerji bu süreçte ısı olarak açığa çıkar. Tiroid hormonları cAMP aracılığıyla NE'nin etkinliğini artırır ve ayrıca UCP1 transkripsiyonunu ve protein ömrümü arttırarak ısı oluşumuna katkıda bulunur. SSS: Sempatik sinir sistemi, D2: Deiyodinaz 2)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi (İNÜ-DETAM), İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, İnönü Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Birimi, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirildi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafınca onaylanan (Protokol no: 2013/A-57; Ek.) çalışmadaki bütün uygulamalar etik kurul protokolünde belirtildiği şekilde yapıldı.

3.1. Deney hayvanları

Çalışmada, ortalama ağırlıkları 200-250 gr olan Sprague Dawley cinsi toplam 40 adet erkek sıçan kullanıldı. Hayvanların en yüksek ağırlık ortalaması farkı 4.6 gr, standart sapması 3.2 gr, tip 1 hata (α) 0.05 ve tip 2 hata (β) (Güç=0.81) olduğunda her bir grupta en az 10 hayvanın olması gerektiği güç analizi ile belirlendi.

Deneye başlamadan önce bütün hayvanların ağırlıkları belirlendi. Hayvanlar vücut ağırlık ortalamaları birbirlerine en yakın olacak şekilde; kontrol grubu, sham kontrol grubu, düşük doz apelin-13 uygulanan grup (APLN-1 nmol) ve yüksek doz apelin-13 uygulanan grubu (APLN-10 nmol) olmak üzere dört gruba ayrıldı (n=10). Deney süresince hayvanlar 21 ± 1 °C sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık/karanlık ortamda tutuldu. Sıçanlar *ad libitum* olarak standart sıçan yemi ile beslendiler ve normal musluk suyu içtiler.

3.2. Hazırlık

3.2.1. Yapay beyin omurilik sıvısının hazırlanması

Yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS) hazırlamak amacıyla içeriği Tablo 3.1'de belirtilen bileşikler tartıldı ve 500 ml steril distile su içerisinde iki farklı solüsyon (A

ve B solüsyonu) hazırlandı. A ve B solüsyonları 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak yBOS elde edildi (165).

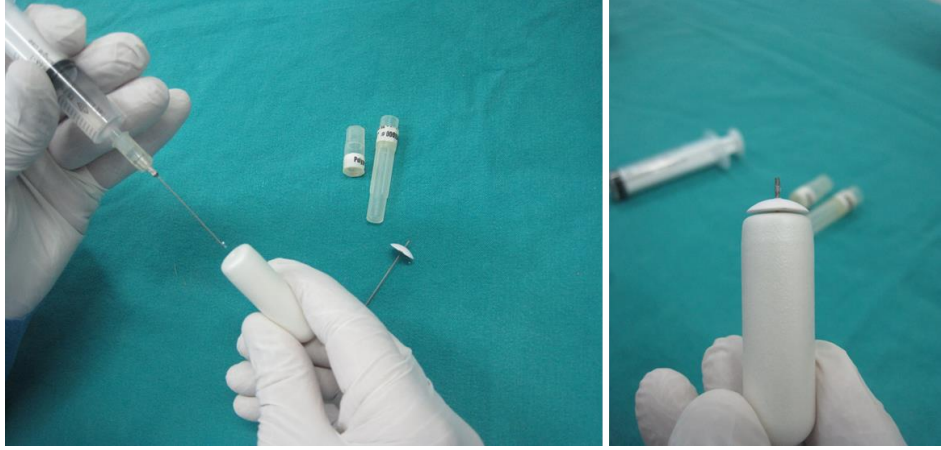
Tablo 3.1. Yapay beyin omurilik sıvısının içeriği (165)

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

Deneyde kullanılan apelin-13 Sigma-Aldrich Inc.'den (ABD, Katalog No: A6469) temin edildi. Apelin-13, hazırlanan yBOS içerisinde çözüldü ve deneysel çalışmada kullanılacak olan iki farklı konsantrasyonu (düşük doz; 1 nmol ve yüksek doz; 10 nmol) hazırlandı.

3.2.2. Ozmotik pompaların hazırlanması

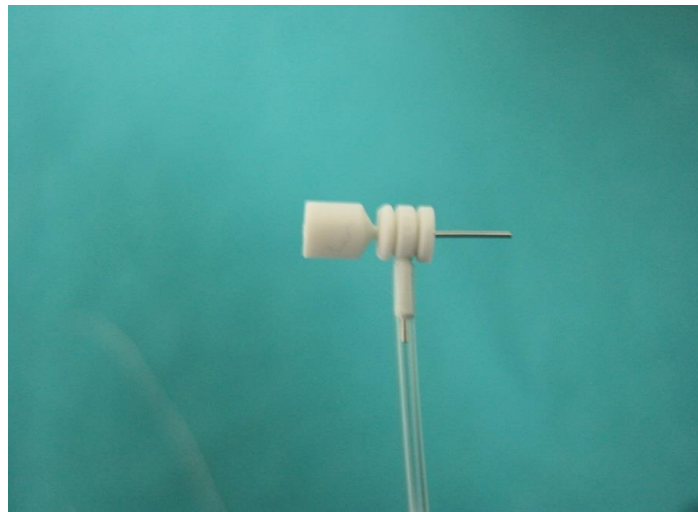
Çalışmada 10 µl/saat/hafta icv infüzyon yapma özelliğine sahip mini ozmotik pompalar (Alzet 2ML1, ABD) kullanıldı. Ozmotik pompalar, pompa seti içerisinde bulunan ucu küt iğne yardımıyla (sham kontrol grubu için yBOS, deney grupları için ise 1 ve 10 nmol apelin-13) dolduruldu ve infüzyon kitine bağlanacak olan metal kanüllü kapak parçası yerleştirildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Ozmotik mini pompaların doldurulması

3.2.3. Beyin infüzyon kitinin hazırlanması

Çalışmada sıçan lateral ventrikülüne infüzyon yapacak şekilde tasarlanan beyin infüzyon kitleri (Alzet Brain Infusion Kit-1, ABD) kullanıldı (Şekil 3.2). Kit üzerindeki kanül hava kabarcığı kalmayacak biçimde infüze edilecek madde (sham kontrol için yBOS, deney grupları için 1 ve 10 nmol apelin-13) ile dolduruldu. İçerisi sıvı ile doldurulmuş olan kit ve kanül, kanülün serbest ucundan ozmotik pompaya bağlandı ve kullanıma hazır hale getirildi.

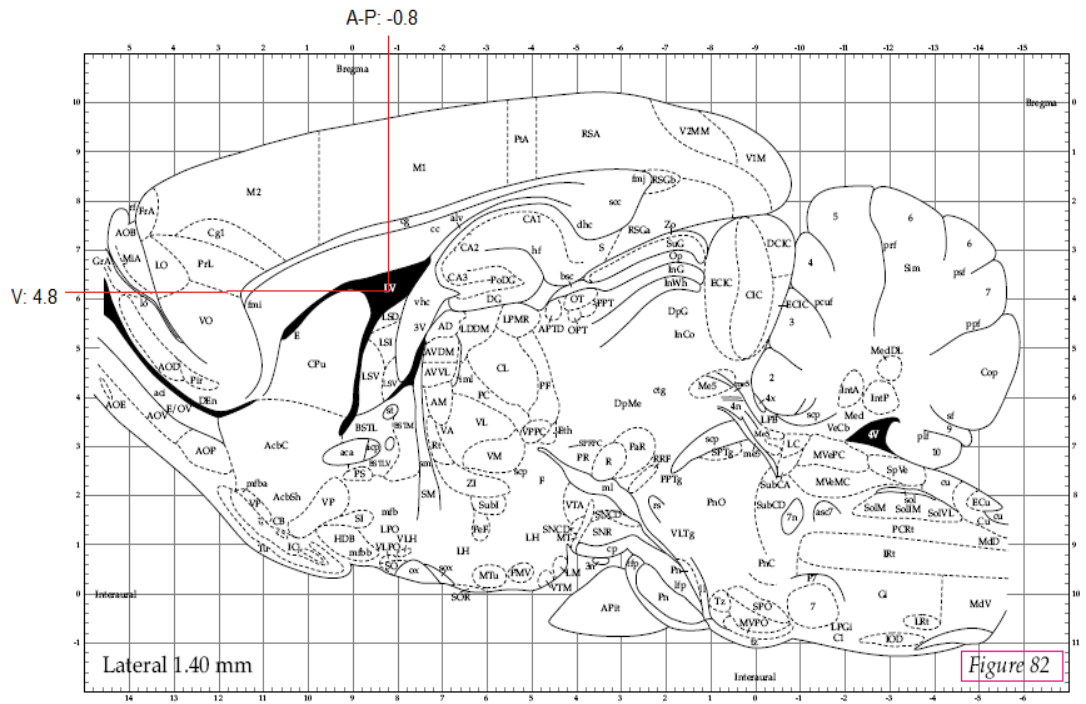


Şekil 3.2. Beyin infüzyon kitinin görünüşü

3.2.4. Stereotaksi

3.2.4.1. Koordinatların belirlenmesi

Lateral ventrikülün stereotaksik koordinatları Paxinos & Watson sıçan beyin atlasına göre belirlendi (166). Lateral ventrikül giriş noktası, referans nokta olarak seçilen bregmadan 1.40 mm lateral ve 0.8 mm posteriyor (kaudal) gidilerek tespit edildi (Şekil 3.3).



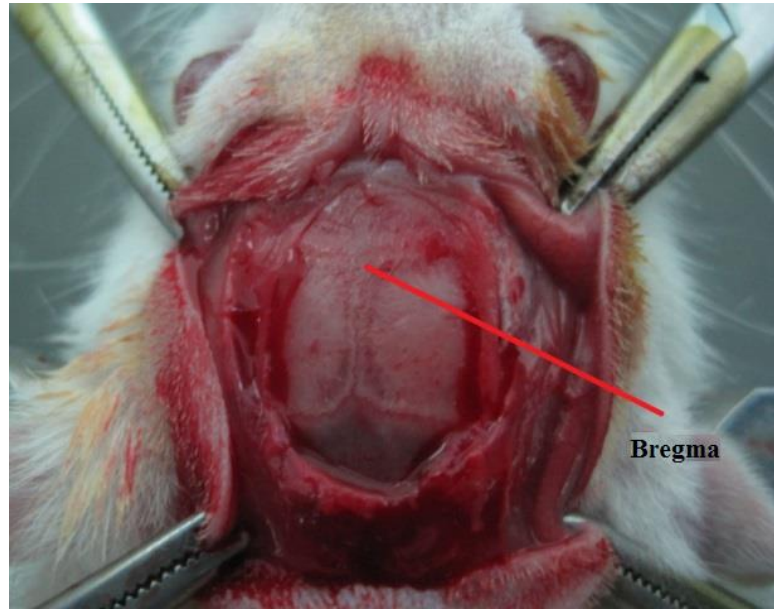
Şekil 3.3. Sıçan beyin atlasına göre lateral ventrikül koordinatları (166)

3.2.4.2. Hayvanların hazırlanması

Sıçanlar intramüsküler olarak 70 mg/kg ketamin (Richter Pharma AG, Avustralya), 8 mg/kg ksilazin (Bioveta PLC, Çek Cumhuriyeti) ile anestezi altına alındı (167). Sıçanların anestezi altına girişleri parmak kıstırma yanıtları ve fizyolojik yanıtın izlenmesi sonunda saptandı ve spontan hareketleri kaybolan sıçanların kafa derileri tıraş edilerek operasyona hazır hale getirildi.

3.2.4.3. Hayvanların stereotaksik cihaza yerleştirilmesi ve ozmotik pompaların yerleştirilmesi

Hayvanlar stereotaksik cihaza kulaklarından ve ağız kısmından kafasının yüzeyi yere paralel olacak şekilde sabitlendi (Small Animal Stereotaxic System, ASI Instruments, ABD). Kafa derisi %10 povidon iyodin sürülerek dezenfekte edildi ve deri bir bistüri ile kesilerek kemik yapıya ulaşıldı. Kemik yüzey temizlenerek bregmanın açık bir şekilde görülmesi sağlandı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Bregma referans noktasının belirlenmesi

Referans noktası olarak kabul edilen bregmadan itibaren sıçan beyin atlasında önceden belirlenen koordinatlara göre (lateral 1.40, posteriyor 0.8 mm) kafatasının delinecek kısmı belirlendi. Belirlenen nokta matkap ile duraya zarar vermeden delindi. Kalıcı kanül, beyin infüzyon kiti üzerindeki plastik tutma bölgesinden stereotaksik cihaza takılmış olan özel tutacağına yerleştirildi ve açılan delikten lateral ventriküle indirildi. Kanül dış yapıştırıcısı kullanılarak hayvanın kafatasına sabitlendi. Beyin infüzyon kitine bağlı olan ozmotik pompa sıçanların ense derisinin altına yerleştirildi. İşlem sonrası insizyon bölgesi 3.0 ipek (Doğsan Tıbbi Malzeme

Sanayi A.Ş. Trabzon/Türkiye) ile dikildi ve insizyon bölgesine %10 povidon iyodin sürüldü (Şekil 3.5). Hayvanlar deneysel işlem sonrasında kafeslere alındı.



Şekil 3.5. Deneysel uygulama ve basamakları (A; Stereotaksik cihaza hayvanların yerleştirilmesi ve kafa tasımın açılması, B; beyin infüzyon kitinin kafa tasına sabitlenmesi, C; ozmotik mini popmpaların ense derisi altına yerleştirilmesi ve D; insizyon bölgesinin dikilerek dezenfekte edilmesi)

3.3. Deneyin sonlandırılması ve dokuların toplanması

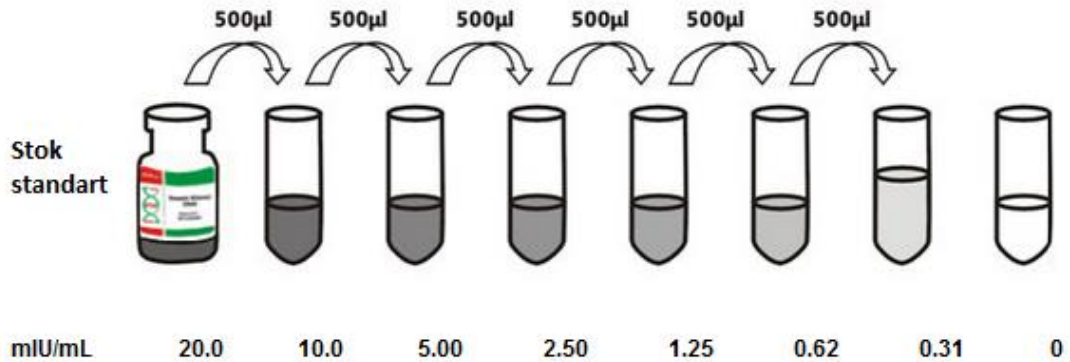
Uygulamadan yedi gün sonra hayvanlar dekapite edilerek; kan, hipotalamus, kas (biceps kası), interskapular beyaz ve kahverengi yağ dokuları toplandı. Toplanan kan örnekleri 4500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Hipotalamus, kas ve yağ doku örnekleri, içerisinde RNA koruyucu solüsyon bulunan ependorf tüpler içerisine konuldu. Bütün dokular analizler yapıncaya kadar -80 °C'de saklandı.

Dekapitasyon sonrası sıçanların ense derisi altına yerleştirilen ozmotik pompalar çıkartıldı, pompa içerisinde kalan çözelti miktarı ölçülerek ozmotik pompaların düzgün bir şekilde çalışıp çalışmadığı kontrol edildi.

3.4. Analizlerin yapılması

3.4.1. Serum TSH düzeyinin belirlenmesi

Serum TSH seviyesini belirlemek için TSH ELISA kiti (USCN Life, Çin; Katalog no: E0463r) kullanıldı. Deneye başlamadan önce kit içinde bulunan 20 mIU/ml konsantrasyona sahip standart Şekil 3.6'da belirtildiği gibi seyreltilerek hazırlandı. Referans standartın seyreltildiği distile su sıfır (pg/ml veya ng/ml) olarak kullanıldı.



Şekil 3.6. TSH kit standartının seri dilüsyonları

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

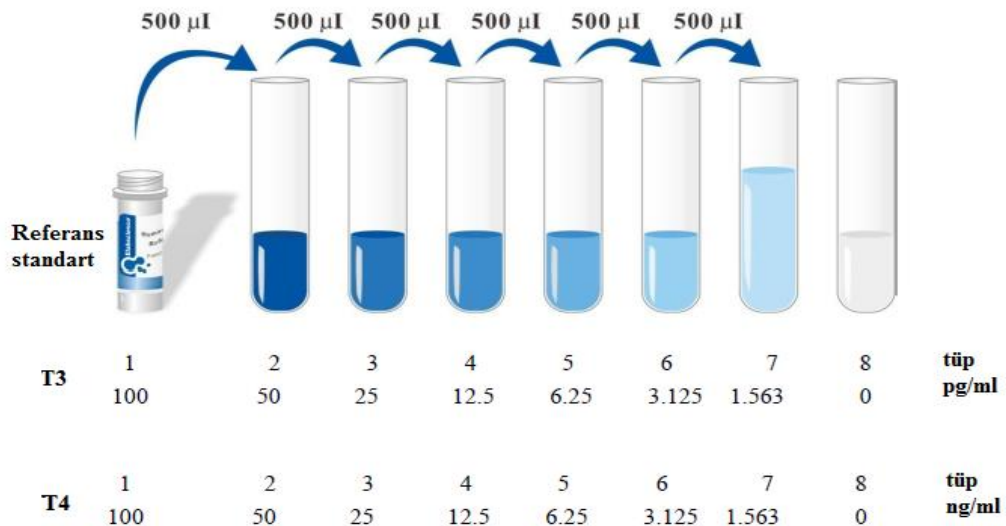
- 50 µl standart, kör veya örnek kuyucuklarına eklendi.
- Bütün kuyucuklara 50 µl Ayıraç-1 reaktif eklendi ve plakanın kapağı kapatılarak 37 °C'de karıştırıcıya yerleştirilerek 1 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası otomatik plaka yıkayıcı kullanılarak her bir kuyucuk yaklaşık 400 µl yıkama solüsyonu konularak 3 defa yıkandı. Her yıkama

sonrası kuyucuklar içerisindeki yıkama solüsyonu tamamen boşaltıldı ve son yıkama sonrası plaka temiz bir kağıt havlu üzerine ters çevrilerek kurutuldu.

- Bütün kuyucuklara 100 µl Ayıraç-2 reaktifi eklendi ve plakanın kapağı kapatılarak 37 °C’de karıştırıcıya yerleştirilerek 45 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası 3. basamaktaki gibi her bir kuyucuk 5 defa yıkandı.
- Her kuyucuğa 90 µl substrat çözeltisi eklendi ve plaka kapağı kapatılarak karanlık bir ortamda inkübe edildi (37 °C’de 15-30 dakika).
- İnkübasyon sonrası her bir kuyucuğa 50 µl durdurma çözeltisi eklendi ve plaka hafifçe çalkalandı.
- Son olarak plaka 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında okundu. Sonuçlar mIU/ml olarak ifade edildi.

3.4.2. Serum T3 ve T4 düzeylerinin belirlenmesi

Serum örneklerindeki serbest T3 ve T4 seviyeleri, T3 ve T4 ELISA kitleri (Elabscience, Çin; Katalog no: E-EL-R1097 ve E-EL-R0390) kullanılarak belirlendi. Her iki kit içerisindeki stok solüsyonlar Şekil 3.7’de gösterildiği gibi distile su ile seyreltilerek hazırlandı. Referans standartın seyreltildiği distile su sıfır (pg/ml veya ng/ml) olarak kullanıldı.



Şekil 3.7. T3 ve T4 standartlarının dilüte serilerinin hazırlanması

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

- 50 µl standart, kör veya örnek kuyucuklarına eklendi. Kör kuyucuğuna standartın seyreltildiği distile su ilave edildi. Sonrasında bütün kuyucuklara 50 µl biyotinile edilmiş algılama reaktifi eklendi ve plakanın kapağı kapatılarak 37 °C’de karıştırıcıya yerleştirilerek 45 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası otomatik plaka yıkayıcı kullanılarak her bir kuyucuk yaklaşık 350 µl yıkama solüsyonu konularak 3 defa yıkandı. Her yıkama sonrası kuyucuklar içerisindeki yıkama solüsyonu tamamen boşaltıldı ve son yıkama sonrası plaka temiz bir kağıt havlu üzerine ters çevrilerek kurutuldu.
- Bütün kuyucuklara 100 µl HRP konjugat çalışma solüsyonu eklendi ve plakanın kapağı kapatılarak 37 °C’de karıştırıcıya yerleştirilerek 30 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası 2. basamaktaki gibi her bir kuyucuk 5 defa yıkandı.
- Her kuyucuğa 90 µl substrat çözeltisi eklendi ve plaka kapağı kapatılarak 37 °C’de 15 dakika etüv içerisinde inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası her bir kuyucuğa 50 µl durdurma çözeltisi eklendi ve plaka hafifçe çalkalandı.
- Son olarak plaka 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında okundu.

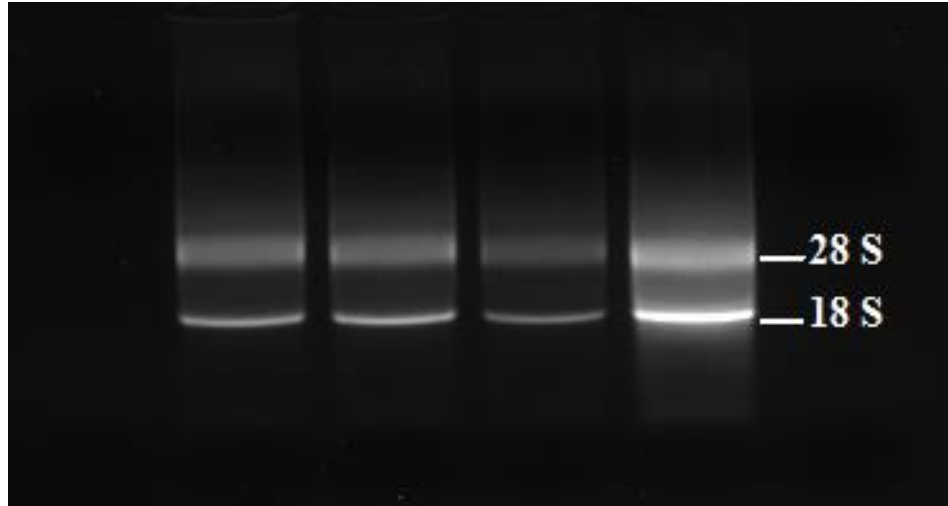
3.4.3. RT-PZR ile hipotalamik TRH mRNA düzeyinin belirlenmesi

3.4.3.1. Beyin dokusu homejenizasyonu ve total RNA saflaştırılması

Beyin dokusu TRH mRNA seviyelerinin tespiti için gruptan alınan doku örnekleri steril şartlarda buz üzerinde küçük parçalar halinde kesilerek RNA saklama çözeltisi içine konuldu ve bu dokulardan High Pure RNA Tissue kiti (Roche, ABD; Lot no: 10156400) kullanılarak toplam RNA saflaştırılması yapıldı. Protokole göre önce 25 mg doku tartıldı, üzerine 350 µl lysis buffer eklendi ve homojenizatörde 13.500 rpm hızda yaklaşık 1 dakika homojenize edildi. Daha sonra homojenatın üzerine hacminin yarısı kadar etanol eklendi, vortekslendi ve sonra 13.000xg’de

santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında kolonun altındaki koleksiyon tüpü döklüdü ve tekrar takılarak işleme devam edildi. Bundan sonra kolona 100 µl DNase eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 500 µl Wash buffer I eklendi ve 8.000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Sonrasında tüplere 500 µl Wash buffer II eklendi ve tekrardan 8.000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası karışımın üzerine 300 µl Wash buffer II eklendi ve 13.000xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Bu aşamdan sonra koleksiyon tüpü atıldı ve kolon steril bir ependorf tüpe alındı. Son olarak kolona 100 µl Elüsyon buffer eklendi ve 8.000xg'de 1 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonrası tüpte toplanan sıvı total RNA olarak elde edildi.

High Pure RNA Kit protokolü ile hipotalamus dokusundan saflaştırılan toplam RNA'larda herhangi bir yıkımın olup olmadığını belirlemek amacıyla örnekler, % 1 agaroz jelinde ve 1 X TBE (tris-borik asit-EDTA) tamponu ile 100 mV'de elektroforez işlemine tabi tutuldu. RNA görüntülemesi UVP marka ChemiDoc-It2 sistemi ile ultraviyole ışık altında gerçekleştirildi. Saflaştırılan RNA'larda 28S ve 18S ribozomal bantlarının varlığı ve herhangi bir yıkımın olmadığı görüldü (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Beyin doku örneklerinden saflaştırılan RNA'ların agaroz jel (%1) elektroforez görüntüsü

Ayrıca dokulardan saflaştırılan RNA örneklerinin spektrofotometrik analizleri yapılarak, örneklerin saf RNA içerdiği tespit edildi. Örneklerin RNA'ları miktar ve

saflık tayini için spektrofotometre cihazı (BioTek, ABD) ile Gen5 programları kullanılarak 260 ve 280 nm UV spektrumunda ölçüldü. RNA miktarı ng/µl cinsinden hesaplandı ve 260/280 oranları yaklaşık 2 olan saf RNA örnekleri cDNA sentezinde kullanıldı.

3.4.3.2. cDNA sentez protokolü

cDNA sentezi için Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kiti (Roche, ABD; Lot no:14585924) kullanıldı. cDNA sentezi kit protokolüne göre yapıldı. Kısaca 100 µl'lik PZR tüpüne 220 ng toplam RNA, 1 µl OligodT18 (50 pmol/µl), 1 µl Random Hexamer Primer (600 pmol/µl) ve toplam hacim 13 µl olacak şekilde bidistile su eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra 65 °C'de 10 dakika PZR makinesinde ısıtıldı. Bu karışımın üzerine 4 µl Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 0,5 µl Protector RNase Inhibitor, 2 µl Deoxynucleotide Mix (her nükleotid için 10 mM konsantrasyonda), 0,5 µl Transcriptor Reverse Transcriptase enzimi eklendi ve böylece toplam hacim 20 µl oldu. Karıştırılan numuneler PZR makinesinde 25 °C'de 10 dakika, 55 °C'de 60 dakika ve 85 °C'de 5 dakika ısıtıldı daha sonra -20 °C'de analize kadar saklandı.

3.4.3.3. RT-PZR protokolü

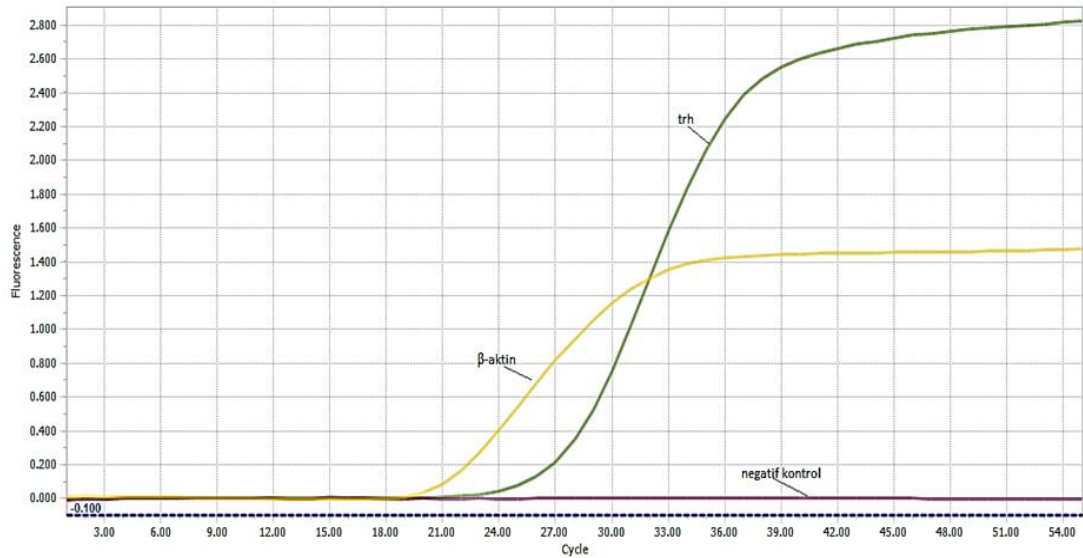
Örneklerin mRNA analizleri Roche Light Cycler 96 RT-PZR cihazı, Fast Start Essential DNA Probes Master Kit (Roche, ABD; Lot no: 10048800) ve Real Time Ready Assay (β -Actin; Lot no: 90015222, TRH; Lot no: 90015384) hidroliz problu primerler kullanılarak yapıldı. Reaksiyonlar 10 µl toplam hacimde hazırlandı. Bunun için 5 µl Master Mix, 0,5 µl Real Time Ready Mix, 2 µl PCR kalitesinde su ve 2,5 µl cDNA olacak şekilde hazırlandı. Çalışmada her örnek için 3 tekrar yapıldı. PZR şartları firmanın önerdiği şekilde yapıldı; ilk denaturasyon 95°C'de 10 dakika, ikinci denaturasyon 95°C'de 10 saniye, bağlanma 60°C'de 30 saniye ve polimerizasyon 72°C'de 1 saniye olarak oluşturuldu ve 55 döngü tekrarlandı. Tablo 3.2'de dizilimleri ve büyüklükleri verilen primerler TRH gen ifadelerinin analizinde kullanıldı.

Tablo 3.2. Primer dizilimleri

Gen adı	Gen dizisi (Forward, reverse)	Sekans no*	Ürün büyüklüğü**
β -Aktin	F: CTGGCTCCTAGCACCATGA R: TAGAGCCACCAATCCACACA	NM_031144.3	76 bp
TRH	F: AGCTCAGCATCTTGAAAGC R: CCAGCAGCAACCAAGGTC	NM_013046.3	76 bp

(* NCBI Referans sekans numarası, ** Beklenen Primer PCR ürün (amplifikasyon ürünü) büyüklüğü)

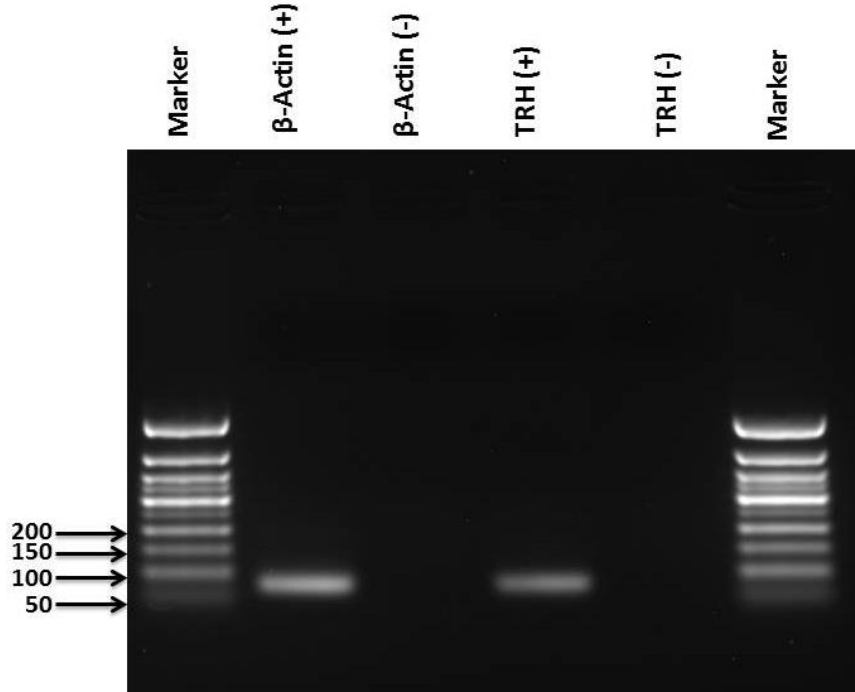
Her bir örnekten saflaştırılan RNA'lardan elde edilen cDNA'lar, β -aktin ve TRH genlerine özgü primerler kullanılarak gerçek zamanlı PZR ile çoğaltıldı (Şekil 3.9) ve TRH gen ifadesindeki değişimler β -aktin genine oranla belirlendi.



Şekil 3.9. Hidroliz prob kimyası kullanılarak β -aktin ve TRH mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların gerçek zamanlı PZR ile çoğaltımı sırasındaki oluşan çoğalım eğrileri

β -aktin ve TRH cDNA'ları kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PZR sonrası agaroz jelinde örnekler koşturularak primer bağlanmasının özgüllüğü kontrol edildi.

Analiz sonucunda her iki gen için de tek ve istenilen boyda bir DNA bandı oluştuğu görüldü (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. β -aktin ve TRH cDNA'larının PZR'deki çoğalımının agaroz jel (%2) elektroforez görüntüsü (DNA standartı olarak 50 bp DNA Marker kullanıldı. Bioron, Almanya; Katalog no: 304007)

3.4.4. RT-PZR ile yağ ve kas dokularındaki UCP1 ve UCP3 mRNA düzeyinin belirlenmesi

3.4.4.1. Dokuların homojenizasyonu ve total RNA saflaştırılması

Kas ve yağ dokularından RNA izolasyonu için PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, ABD; Katalog no: 12183018A) kullanıldı.

Kit içerisindeki lizis solüsyonundan 1 ml ve 2-merkaptoetanol'dan 10 μ l falkon tüpüne alınıp karıştırılarak lizis tampon çözeltisi elde edildi. Kas ve yağ dokuları, doku ile eşit miktarda homojenizatör boncuğu ve hazırladığımız çözeltiden 600 μ l alınarak kilitli ependorf tüplere bırakıldı. Homojenizatörde 3 dakika 8. hızda

parçalama işlemi yapıldı. Örnekler 12.000xg'de 2 dakika 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 saniye santrifüj edildi. Kalan örneklerde kolonlara aktararak aynı şekilde santrifüj işlemi tekrarlandı. 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 saniye santrifüj edildi. Toplam tüpü değiştirildi. Örnekler 500 µl Wash II solüsyonu eklenerek 12.000xg'de 15 saniye santrifüj edildi ve bu işlem iki defa tekrarlandı. Tüpün altındaki sıvı boşaltılarak hiçbir şey eklenmeden 12.000xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolonlar alınarak yeni ependorf tüplere bırakıldı, üzerine 30 µl RNase içermeyen su eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi ve 12.000xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Bu işlemler sonrası dokulardaki toplam RNA izolasyonu tamamlanmış oldu.

Dokulardaki RNA miktarı Qubit RNA Assay Kit (Invitrogen, ABD) kullanılarak belirlendi. RNA miktarı µg/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.

3.4.4.2. cDNA sentez protokolü

cDNA sentezi High-Capacity cDNA Reverse Transcription kiti (AB Applied Biosystems, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi cDNA sentezi için havuz yapılan RNA örneklerinden 10 µl kullanıldı. Sentez için 10 µl RNA örneği, 2 µl 10XRT Random Primer, 2 µl 10XRT buffer, 0.8 µl 25XdNTP mix, 4.2 µl nükleaz içermeyen su ve en son olarak 1 µl MultiScribe Reverse Transcriptase enzimi kullanıldı (Tablo 3.3). Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi. 25 °C'de 10 dakika, 37 °C'de 120 dakika, 85 °C'de 5 dakika ve 4 °C'de ∞ olacak şekilde cihazda bekletildi (Tablo 3.4). Oluşan cDNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

Tablo 3.3. cDNA karışım miktarı

Bileşik	Hacim (µl)	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 H ₂ O	4.2	
RNA örneği	10	
Reaksiyon toplamı	20.0	

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 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

3.4.4.3. RT-PZR ile cDNA amplifikasyonu

Revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA'lar sekans spesifik primerlerin varlığında RT-PZR ile amplifiye edildi. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), UCP 2-5 genlerinin belirlenmesi için aşağıdaki Tablo 3.5'de verilen primerler kullanıldı. RT-PZR analizleri sonucunda gen ifadelerindeki farklılıkların hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanıldı. RT-PZR üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. RT-PZR plate hazırlanırken cDNA örneklerinde her bir kuyucuğa 2 µl kondu. Buz üzerinde her bir örnek için 5 µl TaqMan Master Mix, 2.5 µl nükleaz içermeyen su ve 0.5 µl primer hibridizasyon probu olacak şekilde örnek sayısına göre hesaplanan bileşen miktarları ependorflara bırakıldı ve vortekslendi. Platedeki cDNA örneklerinin üzerine 8 µl hazırlanan karışımdan bırakılarak plate üzeri optik yapıştırıcı filmle kapatıldı (Tablo 3.6). Plate örneklerin tamamen dibe çökmesi ve

oluşan kabarcıkların yok edilmesi amacıyla mini plate spin cihazında 1 dakika santrifüj edildi.

Tablo 3.5. RT-PZR’de kullanılan primerler

Primerler	Katalog numarası*
GAPDH	Rn01775763_g1
UCP1	Rn-00562126-m1
UCP3	Rn00565874_m1

(*TaqMan Gene Expression Assay Gex: AB Applied Biosystems, ABD)

Tablo 3.6. RT-PZR için her bir kuyucuğa konan bileşikler

Bileşik	Miktar (µl)
cDNA	2.0
Primer	0.5
TaqMan Mix	5.0
Nükleaz içermeyen H ₂ O	2.5
Toplam	10.0

Gen ifade seviyeleri, Applied Biosystems 7500 RT-PZR sistemi ile ölçüldü. Çalışmada GAPDH kontrol gen (housekeeping) olarak kullanıldı. Sıcaklık koşulları 50 °C’de 2 dakika, 95 °C’de 10 dakika X 40 siklüs, 95 °C’de 15 saniye ve 60 °C’de 1 dakika olacak şekilde ayarlandı (Tablo 3.7).

Tablo 3.7. Uygulanan RT-PZR programı (RT-PZR X 40 döngü)

PZR	1. Adım	2.Adım	3.Adım	4.Adım
Sıcaklık	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Zaman	2 dakika	10 dakika	15 saniye	1 dakika

3.5. İstatistiksel analizler

Verilerin istatistiksel analizleri IBM SPSS statistics version 22.0 for Windows paket programı kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirildi. Beyin dokusundaki gen ifadesi değişimi ve kan doku hormon seviyeleri Kruskal Wallis H testi ve çoklu karşılaştırmalarda Dunn testi, yağ ve kas doku örneklerindeki mRNA değişim düzeylerinin belirlenmesinde ise bağımsız örneklerde Student's t testi kullanıldı. Beyin dokusu gen ifade düzeyi, kan doku TSH, T3 ve T4 düzeyleri ortanca (en küçük-en büyük), yağ ve kas dokularındaki mRNA değişim düzeyleri ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verildi. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Merkezi apelin-13 infüzyonu sonrası grupların hipotalamik TRH mRNA ifade miktarı, serum TSH, T3 ve T4 hormon düzeyleri Tablo 4.1’de verilmiştir.

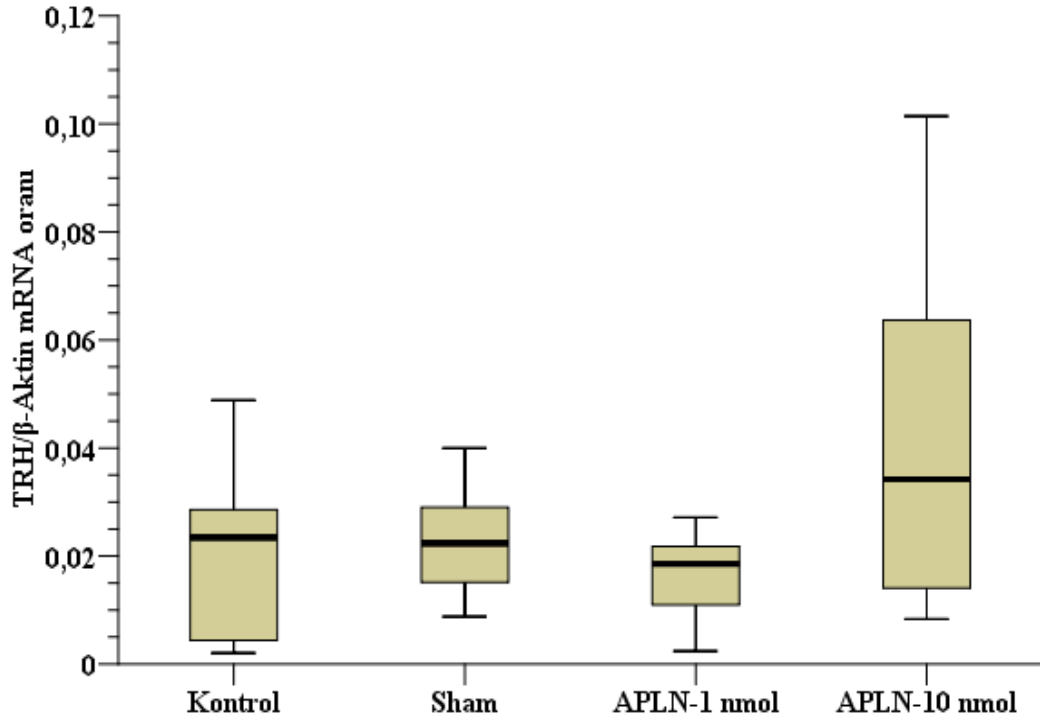
Tablo 4.1. Merkezi apelin-13 infüzyonunun hipotalamik TRH mRNA ifadesi, serum TSH, T3 ve T4 hormon düzeyleri üzerine etkisi

	Kontrol	Sham	APLN-1 nmol	APLN-10 nmol	Sig. (p)
TRH/ β -aktin mRNA oranı	0,02 (0,002-0,049)	0,022 (0,009-0,04)	0,019 (0,0024-0,027)	0,034 (0,0084-0,10)	0,399
TSH (mIU/ml)	3,5 (1,48-4,4)	4,49 (2,22-8,98) ^a	5,68 (3,23-19,07) ^b	5,17 (3,76-7,69) ^b	0,01
Serbest T3 (pg/ml)	4,03 (3,3-4,18)	2,97 (2,46-3,96) ^a	3,05 (2,23-3,44) ^b	2,5 (2,35-2,77) ^{c,d}	<0,001
Serbest T4 (ng/ml)	2,92 (2,71-3,22)	2,53 (2,3-2,8) ^a	2,29 (1,94-2,88) ^c	2,21 (1,88-2,72) ^{c,d}	<0,001

(Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verildi. ^a p<0.05, ^b p<0.01 ve ^c p<0.001 kontrol grubuna kıyasla diğer gruplar, ^d p<0.05 sham grubuna kıyasla diğer gruplar. Sham grubu n=8, diğer gruplar n=10)

4.1. İcv apelin-13 uygulanmasının hipotalamik TRH mRNA seviyesi üzerine etkileri

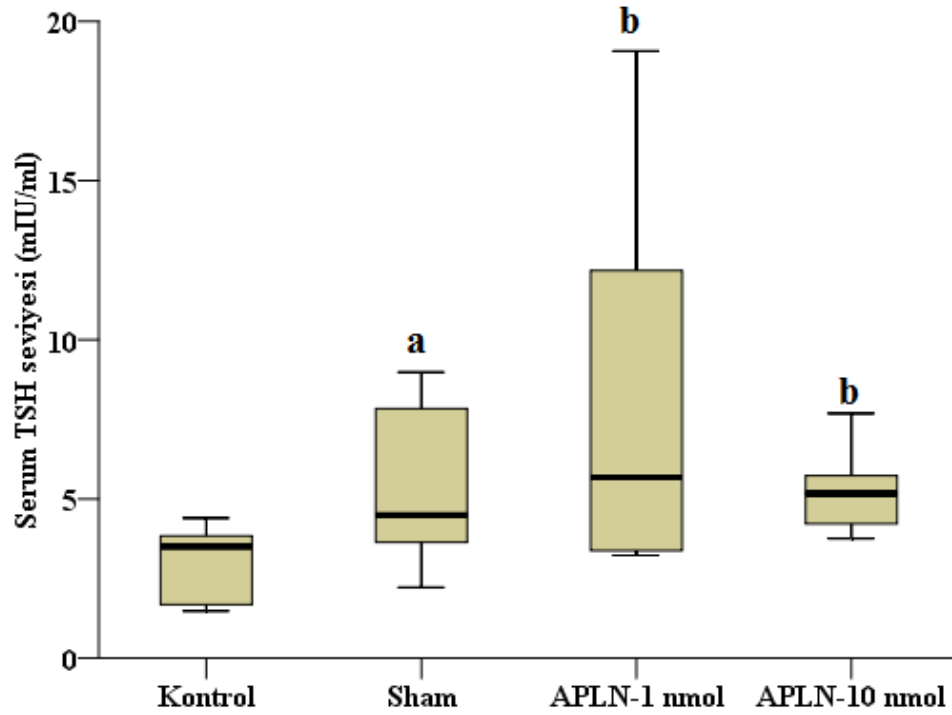
Apelin-13’ün farklı iki dozunun (1 ve 10 nmol) uygulaması sonrasında hayvanların hipotalamus dokusundaki TRH mRNA ifadelerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla sham grubunda bulunan hayvanların hipotalamik TRH mRNA ifadeleri arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı belirlendi. Apelin-13 uygulanan gruplar hem kontrol hemde sham grubuna kıyasla hipotalamustaki TRH mRNA ifadesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık oluşturmadı. Özellikle yüksek doz apelin-13 uygulanan hayvanlardaki TRH mRNA düzeyi gözle görülür bir şekilde artış sergilese de bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi.



Şekil 4.1. Apelin-13 infüzyonundan sonra grupların TRH mRNA ifadelerindeki değişimler (Verilerin analizi Kruskal Wallis H testi ve çoklu karşılaştırmalarda Dunn testi kullanılarak yapıldı. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak ifade edildi. Sham grubu n=8, diğer gruplar n=10)

4.2. İcv apelin-13 uygulanmasının serum TSH seviyesi üzerine etkileri

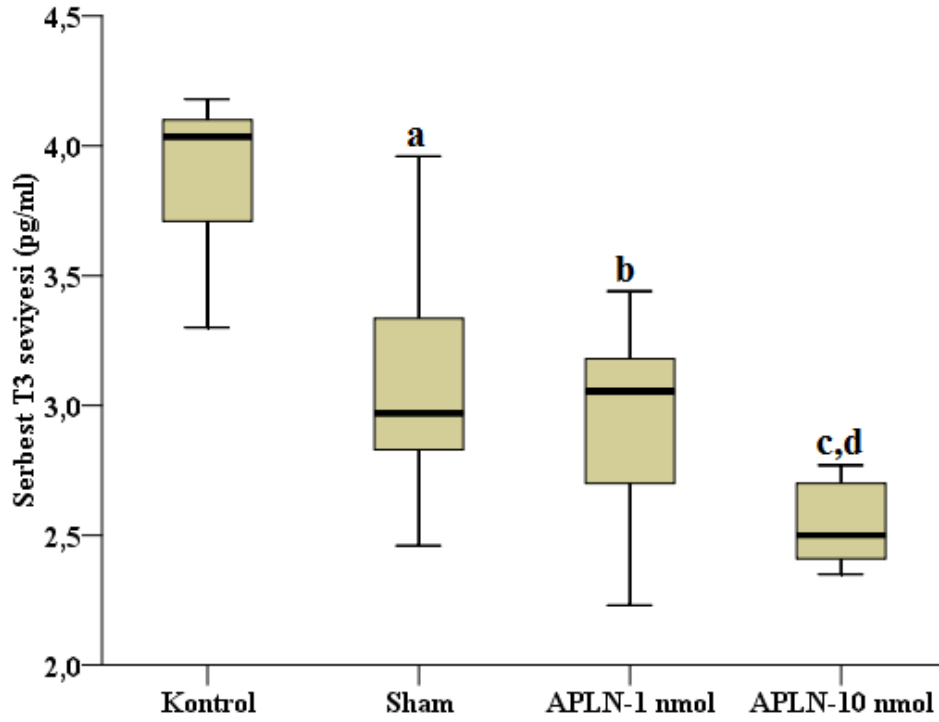
İcv apelin-13 uygulaması sonrasında grupların serum TSH düzeyleri Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Buna göre kontrol grubuna kıyasla sham ve apelin-13 gruplarında yer alan hayvanların serum TSH seviyeleri önemli düzeyde arttı ($p < 0.05$ ve $p < 0.01$). Sham grubuna kıyasla apelin-13'ün uygulanan iki farklı konsantrasyonu grupların serum TSH düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık meydana getirmedi.



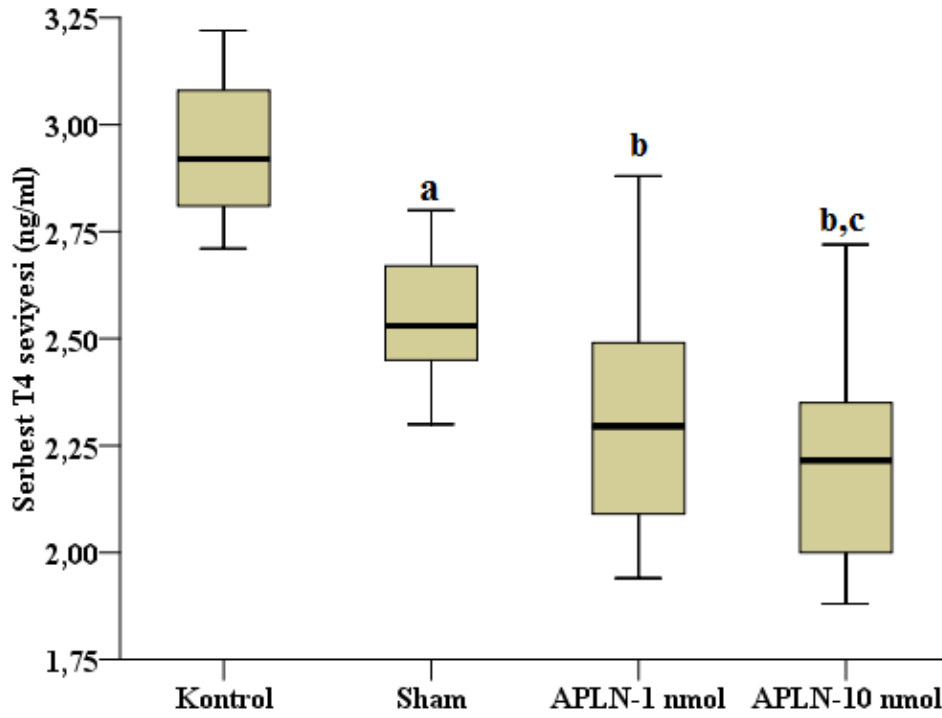
Şekil 4.2. Apelin-13 infüzyonunun grupların serum TSH seviyesi üzerine etkileri (Verilerin analizi Kruskal Wallis H testi ve çoklu karşılaştırmalarda Dunn testi kullanılarak yapıldı. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak ifade edildi. ^a $p < 0.05$ ve ^b $p < 0.01$ kontrole göre diğer gruplar. Sham grubu $n=8$, diğer gruplar $n=10$)

4.3. İcv apelin-13 uygulanmasının serum T3 ve T4 seviyeleri üzerine etkileri

Yüksek doz apelin-13 ve düşük doz apelin-13 uygulanan hayvanların serum T3 ve T4 seviyelerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de verilmiştir. Sham ve apelin-13 gruplarında serum T3 ve T4 seviyeleri kontrol grubuna göre önemli düzeyde düşük bulundu ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) ve bu azalma apelin-13 uygulanan gruplarda doz bağımlı olarak artış gösterdi. Sham grubuna kıyasla 1 nmol apelin-13 uygulanan grupta serum T3 ve T4 seviyelerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken, 10 nmol apelin-13 uygulamasının serum T3 ve T4 düzeylerini anlamlı düzeyde azalttığı belirlendi ($p < 0.05$).



Şekil 4.3. Apelin-13 infüzyonunun grupların serum T3 seviyesi üzerine etkileri (Verilerin analizi Kruskal Wallis H testi ve çoklu karşılaştırmalarda Dunn testi kullanılarak yapıldı. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak ifade edildi. ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$ ve ^c $p < 0.001$ kontrole göre diğer gruplar, ^d $p < 0.05$ sham grubuna göre diğer gruplar. Sham grubu $n=8$, diğer gruplar $n=10$)

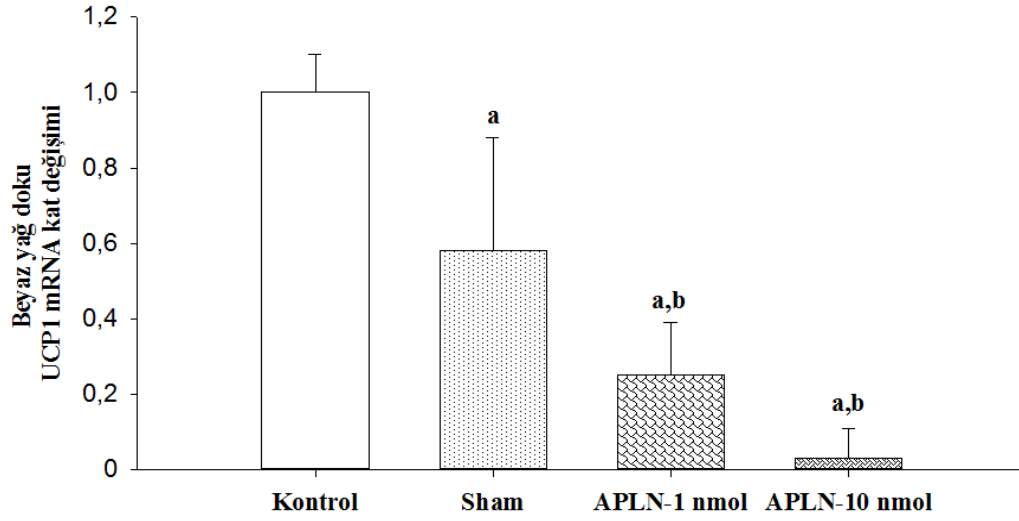


Şekil 4.4. Apelin-13 infüzyonunun grupların serum T4 seviyesi üzerine etkileri (Verilerin analizi Kruskal Wallis H testi ve çoklu karşılaştırmalarda Dunn testi kullanılarak yapıldı. Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak ifade edildi. ^a $p < 0.05$ ve ^b $p < 0.001$ kontrole göre diğer gruplar, ^c $p < 0.05$ sham grubuna göre diğer gruplar. Sham grubu $n=8$, diğer gruplar $n=10$)

4.4. İcv apelin-13 uygulanmasının yağ doku UCP1 ve kas doku UCP3 mRNA seviyeleri üzerine etkileri

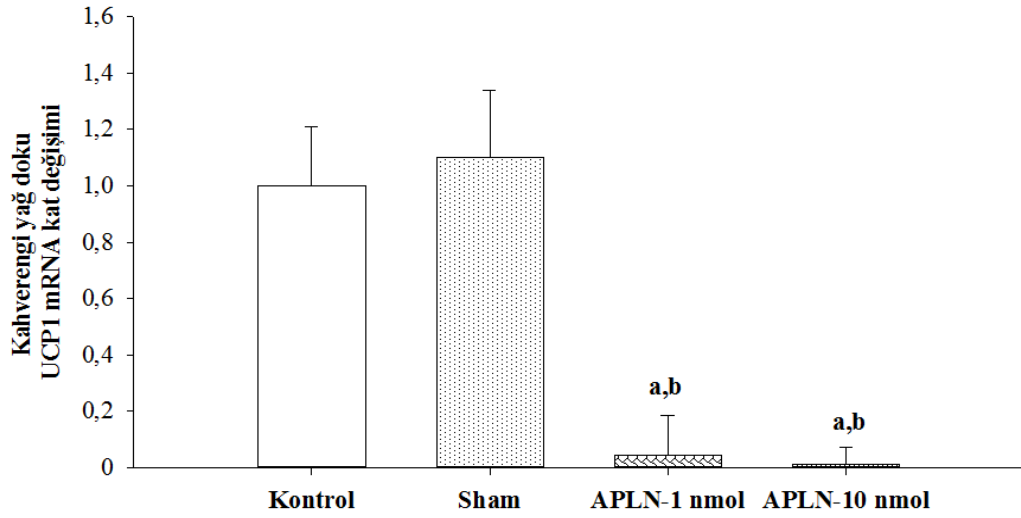
Apelin-13 uygulamasının beyaz ve kahverengi yağ dokulardaki UCP1 mRNA seviyeleri üzerine etkileri Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da, kas dokusundaki UCP3 mRNA seviyesi üzerine etkileri ise Şekil 4.7'de verilmiştir.

Beyaz yağ dokusundaki UCP1 mRNA seviyesi kontrol grubuna kıyasla sham ve apelin-13 gruplarında anlamlı şekilde azaldı ($p < 0.05$). Ayrıca sham grubuna kıyasla apelin-13 uygulanan gruplardaki UCP1 mRNA seviyesi Şekil 4.5'de görüldüğü üzere doz bağımlı olarak anlamlı düzeyde baskılandı ($p < 0.05$).

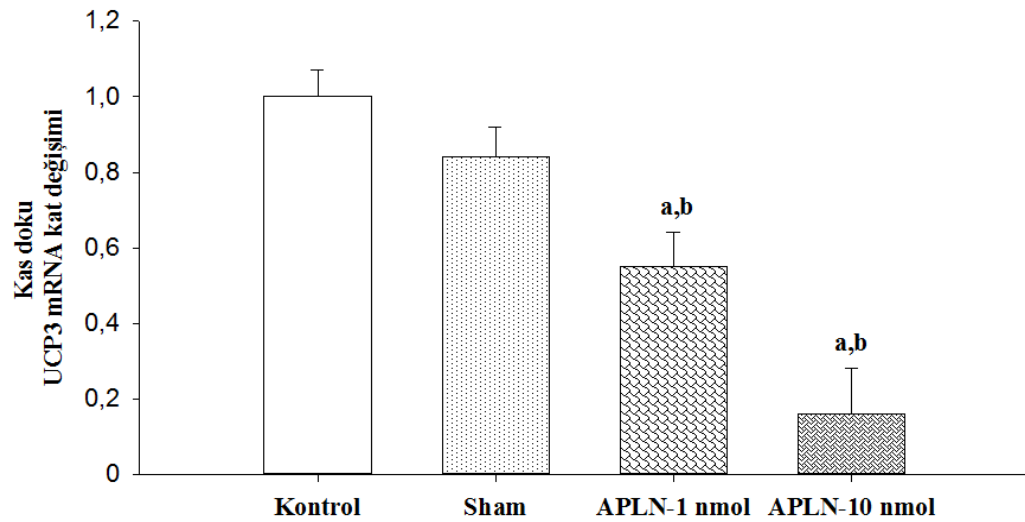


Şekil 4.5. Apelin-13 infüzyonunun grupların beyaz yağ doku UCP1 mRNA ifadesi üzerine etkileri (Verilerin analizi Student't testi kullanılarak yapıldı. Değerler ortalama \pm SD olarak ifade edildi. ^a $p < 0.05$ kontrole göre diğer gruplar, ^b $p < 0.05$ sham grubuna göre diğer gruplar. Sham grubu $n=8$, diğer gruplar $n=10$)

Yapılan istatistiksel analizler sonucu, kontrol ve sham gruplarındaki hayvanların kahverengi yağ doku UCP1 ve kas doku UCP3 mRNA seviyelerindeki meydana gelen değişimler anlamlı olarak bulunmadı (Şekil 4.6, Şekil 4.7). Ancak kontrol ve sham grupları ile apelin-13 uygulanan gruplar kıyaslandığında, apelin-13 uygulamasının doz bağımlı olarak hem kahverengi yağ doku UCP1 hemde kas doku UCP3 mRNA seviyelerini önemli düzeyde azalttığı belirlendi ($p < 0.05$).



Şekil 4.6. Apelin-13 infüzyonunun grupların kahverengi yağ doku UCP1 mRNA ifadesi üzerine etkileri (Verilerin analizi Student't testi kullanılarak yapıldı. Değerler ortalama \pm SD olarak ifade edildi. ^a $p < 0.05$ kontrole göre diğer gruplar, ^b $p < 0.05$ sham grubuna göre diğer gruplar. Sham grubu $n=8$, diğer gruplar $n=10$)



Şekil 4.7. Apelin-13 infüzyonunun grupların kas yağ doku UCP3 mRNA ifadesi üzerine etkileri (Verilerin analizi Student't testi kullanılarak yapıldı. Değerler ortalama \pm SD olarak ifade edildi. ^a $p < 0.05$ kontrole göre diğer gruplar, ^b $p < 0.05$ sham grubuna göre diğer gruplar. Sham grubu $n=8$, diğer gruplar $n=10$)

5. TARTIŞMA

5.1. Merkezi apelin-13 uygulamasının hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı üzerine etkisi

Besin alımı ve enerji kullanımı beyindeki (hipotalamusun benzer nükleusları) merkezi efektörler tarafından kontrol edilmekte ve çevreden gelen endokrin ve sinirsel sinyaller ile metabolik bir süreç içinde düzenlenmektedir (168). Apelin ve APJ'nin merkezi olarak hipotalamusun SON, PVN ve ARC gibi alanlarda ve hipofiz bezinde sekresyonu gösterilmiştir (169). Beynin bu bölümleri enerji kullanımı ve beslenme davranışının merkezi kontrol noktalarıdır (170-172). Apelinin bu alanlarda varlığının gösterilmesi gıda alımı, enerjinin düzenlenmesi ve endokrinolojik sinyallerin oluşmasında apelinin rollerinin olduğunu düşündürmektedir (1,76). Ayrıca peptidin periferde yağ doku, kas doku ve tiroid bezindeki lokalizasyonu (23), apelinin beslenme ve enerji kullanımı üzerinde etkili olabileceği düşüncesini daha güçlü kılmaktadır. Yapılan çalışmalar obezlerde ve insülin direnci olan hastalarda serum apelin düzeyinin yüksek olduğunu bildirmektedir (1,67). Baskılanmış apelin sentezi ve düşük serum apelin konsantrasyonu, ağırlık kaybı ve gelişmiş insülin hassaslığı ile ilişkilendirilmektedir (67). Daha önce yapmış olduğumuz farklı çalışmalarda, sıçanlara uzun sürelin icv ve ip apelin-13 uygulamasının yem tüketimini arttırarak kilo artışına neden olduğunu göstermiştik (173,174). Başka bir çalışmada ise kronik icv apelin-13 infüzyonunun gıda alımını arttırarak kilo artışına neden olduğunu rapor etmişlerdir (26). Fiyolojik yolak çok açık olmasa da çalışmalardan elde edilen veriler apelinin, obezite gelişimine (beslenme güdüsü ve vücut ağırlığını arttırarak) katkı sağladığını işaret etmektedir. Günlük alınan enerjinin harcanan enerjiden fazla olması durumunda, harcanamayan enerji vücutta yağ olarak depolanmakta ve obezite başta olmak üzere birçok metabolik hastalığa neden olmaktadır (175,176). Bu yüzden alınan ve yakılan enerjinin homeostazı çok önemlidir. Mevcut çalışmaların sonuçları dikkate alındığı zaman, apelinin enerji metabolizmasının bozulmasından kaynaklanan obezite ve diğer metabolik hastalıkların gelişim süreçlerinde etkili olabileceği ileri sürülmektedir (1,8).

Apelin reseptörünün hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı üzerinde yer alan dokularda yüksek düzeyde ifade ediliyor olması, bir adipokin olan apelinin enerji dengesi üzerinde roller üstlendiği görüşünü destekler niteliktedir. Ancak şimdiye kadar apelinin tiroid aksı üzerine etkisini belirlemeye yönelik kapsamlı bir çalışmaya rastlanamamıştır. Yapılan bir çalışmada, sağlıklı bireyler ile hipotiroidi olan kişilerdeki serum apelin seviyeleri karşılaştırılmış ve sonuç olarak iki grup arasında anlamlı bir farklılığın bulunmadığı belirlenmiştir (177). Ayrıca aynı çalışma vücut kitle indeksi ile apelin seviyesinin pozitif korelasyon gösterdiği bildirmektedir (177).

Çalışmamıza benzer şekilde uygulanan birçok hormonun tiroid aksı üzerine etkileri belirlenmiştir. Cusin ve ark. icv leptin uygulamasının serum TSH ve T4 seviyelerinde azalmaya neden olduğunu, T3 seviyesinde ise herhangi anlamlı bir değişimin gözlenmediğini rapor etmişlerdir (178). Mahmoudi ve ark. kronik merkezi ghrelin enjeksiyonu sonrası plazma TSH, T3 ve T4 seviyelerinin doz bağımlı olarak azaldığını göstermişlerdir (179). Bir başka çalışmada ise icv ghrelin uygulamasının T3 ve T4 seviyesini azaltmasına karşın leptin uygulamasının bu hormon düzeylerini anlamlı şekilde arttırdığı tespit edilmiştir (180). Çalışmamız sonucunda yüksek doz apelin-13 uygulamasının hipotalamustaki TRH mRNA ifadesini arttırdığını ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirledik. Serum TSH seviyesi kontrol grubuna kıyasla diğer gruplarda anlamlı düzeyde artış gösterirken, sham grubuna kıyasla apelin-13 uygulanan gruplardaki serum TSH seviyesinde kısmen artmasına rağmen bu artış istatistiksel açıdan anlamlı değildi. Merkezi apelin-13 uygulamasının tiroid hormonları (T3 ve T4) üzerine baskılayıcı yönde etki gösterdiğini, ancak bu etkinin yüksek doz apelin-13 uygulanan grupta anlamlı düzeyde gerçekleştiğini saptadık. Bu çalışmadan elde ettiğimiz veriler, icv apelin-13 uygulamasının hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı üzerine merkezi düzeyde etki göstermediğini, periferal etkisinin ise uygulanan doza bağlı olarak ortaya koyduğunu göstermektedir. Mevcut literatür bilgileride dikkate alındığında, apelinin tiroid hormon düzeyini dolaylı yollardan baskılayarak enerji kullanımını azaltıcı etki gösterebileceğini bizlere göstermektedir.

5.2. Merkezi apelin-13 uygulamasının yağ doku UCP1 ve kas doku UCP3 mRNA ifadeleri üzerine etkileri

Apelin, mitokondriyal fonksiyonu etkileyerek enerji kullanımını teşvik eder (181). Attane ve ark. uzun süreli apelin-13 uygulamasının kas dokusunda mitokondriyal biyogenezi ve oksidatif kapasiteyi arttırdığını rapor etmişlerdir (73). Higuchi ve ark. kronik ip apelin-13 uygulamasının gıda alımını etkilemeden vücut ağırlığı, beyaz yağ doku, serum trigliserid ve insülin düzeylerini azalttığını bildirmiştir (17). Ayrıca aynı çalışmada apelin uygulamasının periferik enerji harcanmasının belirteci olarak kabul edilen kahverengi yağ doku UCP1 ve kas doku UCP3 mRNA ifade düzeylerinde artışa neden olduğu rapor edilmiştir (17). Bir başka çalışmada apelin-13'ün hipotalamik alana mikroenjeksiyonu sonrası kahverengi yağ doku UCP1 mRNA ifadesinin arttığı tespit edilmiştir (18). Buna karşın Yamamoto ve ark. normal farelere kıyasla apelin geni transfer edilen farelerde iskelet kası UCP3 mRNA ifadesinin anlamlı şekilde baskılandığını göstermişlerdir (182). Mevcut az sayıdaki literatür apelinin UCP1 ve UCP3 üzerine etkisini açıklamada yetersizdir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçların farklı olması, deneysel çalışmada kullanılan yöntemlerden kaynaklanıyor olabilir.

Tiroid hormonları enerji dengesi, lipid metabolizması ve kardiyovasküler fonksiyonlar üzerine birtakım etkilere sahiptir (183). Tiroid hormonları beyaz ve kahverengi yağ doku, iskelet kası ve kalp gibi periferik dokulardaki bu etkinliğini adrenerjik sinir sistemini modüle ederek veya doğrudan bu dokularda ilgili genlerin ifadelerini düzenleyerek gerçekleştirir (184). Yapılan çalışmalar hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı içerisinde yer alan hormonların mitokondriyal DNA transkripsiyonunu, mitokondriyal biyogenezi ve dolayısıyla ATP üretimini düzenlediğini göstermektedir (185,186). Mutvei ve ark. sıçanlara T3 uygulamasının mitokondriyal RNA miktarını yaklaşık 8 kat arttırdığını rapor etmişlerdir (187). Lee ve ark. insan adiposit kültürüne T3 uygulamasının UCP1 mRNA düzeyini doz bağımlı olarak arttırdığı bildirmişlerdir (161). Diğer bir çalışmada ise insülin geninde mutasyon olan hastalarda tiroidektomi sonrası L-T4 tedavisinin abdominal ve supraskapular kahverengi yağ dokulardaki UCP1 mRNA seviyesinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (162). Bianco ve ark. tiroidektomi edilen sıçanlara T3

uygulamasının kahverengi yağ dokuda UCP1 mRNA seviyesini arttırdığını ortaya koymuşlardır (188). Wang ve ark. 3T3-L1 adiposit hücrelerine uyguladıkları T3'ün özellikle TR β reseptörüne bağlı olarak UCP1 mRNA seviyesini arttırdığını bildirmişleridir (189). Mevcut bilgiler yağ dokudaki UCP1 ifadesinin tiroid hormonları aracılığıyla düzenlendiğini göstermektedir.

Tiroid hormonlarının yağ dokudaki işlevine benzer şekilde kas dokudaki UCP3 ifadesini düzenleyebildiğini ortaya koymaktadır (190). Lanni ve ark. sıçanlardaki hipotiroidi durumum hipertiroidiye geçişte kastaki UCP3 mRNA ifadesinin güçlü bir şekilde artış gösterdiğini rapor etmişlerdir (191). de Lange ve ark. iv T3 uygulamasının kas dokudaki UCP3 mRNA düzeyinde artışa neden olduğunu göstermişlerdir (192). Barbe ve ark. T3'ün insan iskelet kası ve yağ dokularında UCP2 ve UCP3 mRNA ifadelerini arttırdığını *in vitro* ve *in vivo* olarak göstermiştir (193). Ayrıca kemirgenlere T3 uygulamasının kalp ve iskelet kasında UCP2 ve UCP3 mRNA seviyelerinde artışa neden olduğuda bildirilmektedir (194-196). Bütün bu sonuçlar dolaşımdaki tiroid hormon düzeyinin yağ doku UCP1 ve kas doku UCP3 ifadeleri ile güçlü bir ilişki içinde olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu çalışmayla, icv apelin-13 uygulamasının doz bağımlı olarak beyaz ve kahverengi yağ doku UCP1 ve kas doku UCP3 mRNA ifadelerini baskıladığını ortaya koyduk. Beyaz yağ dokudaki UCP1 düzeyinin artması kahverengi yağ gelişiminin bir göstergesi olarak kabul edilir. Kahverengi yağ dokudaki UCP1 düzeyindeki artış ise yağ dokuda depo edilen enerjinin harcanmasını gösteren önemli bir belirteçtir. Aynı şekilde bu iki yağ dokudaki UCP1 düzeylerindeki azalma enerji kullanımının engellendiğini gösterir. Ayrıca kas doku UCP3 düzeyindeki artış, kas doku tarafından kullanılan glikoz miktarındaki artış ile ilişkilidir. Daha önce yapmış olduğumuz çalışmalarda hem merkezi hemde periferal apelin-13 uygulamasının doz bağımlı olarak hayvanların yem tüketimini ve vücut ağırlığını arttırdığını belirlemiştik (173,174). Ayrıca periferal uygulanan apelin-13'ün beyaz ve kahverengi yağ doku UCP1 ve kas doku UCP3 mRNA ifadelerini anlamlı şekilde baskıladığını tespit etmiştik (173). Bütün bu sonuçlar apelin-13 uygulamasının hayvanlardaki yağ doku UCP1 ve kas doku UCP3 düzeylerini baskılayarak enerji kullanımını azaltabileceğini, ayrıca hayvanlardaki yem tüketimini arttırarak kilo artışına neden olabileceğini göstermektedir. Çalışma sonuçlarımız dikkate

alındığında, merkezi apelin-13 uygulamasının yağ doku UCP1 ve kas doku UCP3 mRNA ifadelerini baskılayarak hayvanların enerji kullanımını azaltabileceğini ve bununla T3 ve T4 düzeylerinde azalmaya neden olabileceğini düşünmekteyiz. Merkezi uygulanan apelin-13'ün yağ ve kas doku üzerine olan bu etkisi iki farklı şekilde gerçekleşmiş olabilir. Birinci olarak icv uygulanan apelin-13'ün hipotalamusun gıda alımında ve enerji homeostazında görevli bölgeleri uyararak veya baskılayarak ortaya koyabileceğidir. İkinci olarak ise merkezi uygulanan apelin-13'ün kan beyin bariyerini geçerek etkisini doğrudan yağ ve kas dokular üzerine gerçekleştirmiş olabileceğidir. Ancak önceki yapmış olduğumuz çalışma sonuçlarımızı dikkate aldığımızda (173,174), icv apelin-13 uygulamasının gıda alımını arttırarak enerji metabolizması üzerine etki gösterdiğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Merkezi apelin uygulamasının TRH mRNA ve TSH seviyeleri üzerine anlamlı etki göstermemesi, serum T3 ve T4 seviyelerinde ise doz bağımlı olarak azalmaya neden olması, apelinin tiroid aksı üzerine merkezi bir etkisinin olmadığını ve tiroid hormon sentezini kısmen etkileyebileceğini göstermektedir. Ayrıca apelin-13'ün doz bağımlı olarak yağ doku UCP1 ve kas doku UCP3 mRNA ifadelerini baskılıyor olması, apelinin enerji kullanımını azaltabileceğini ortaya koymaktadır. Yapmış olduğumuz bu çalışmada apelin-13 uygulamasının yağ ve kas dokudaki UCP'ler aracılığı ile kullanılan enerji miktarını azaltarak tiroid hormon düzeyleri üzerine etki gösterdiğini düşünmekteyiz.

Yapmış olduğumuz bu çalışma ile apelinin hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı ve enerji kullanımı üzerine etkilerini kısmen aydınlatmış olduk. Apelin ve enerji metabolizması üzerine yapılacak olan yeni araştırmalar, hala çok az bir kısmı aydınlatılmış olan bu alana önemli katkılar sağlayacaktır. Ayrıca yeni çalışmaların kliniğe uyarlanabilir olması insan sağlığı için oldukça önemli bir husustur.

KAYNAKLAR

1. Castan-Laurell, I., Dray, C., Attane, C., Duparc, T., Knauf, C., Valet, P. (2011). Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine*, *40* (1), 1-9.
2. Blüher, M., Mantzoros, C. S. (2015). From leptin to other adipokines in health and disease: Facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism: clinical and experimental*, *64* (1), 131-145.
3. Vázquez-Vela, M. E. F., Torres, N., Tovar, A. R. (2008). White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. *Archives of Medical Research*, *39* (8), 715-728.
4. Tatemoto, K., Hosoya, M., Habata, Y., Fujii, R., Kakegawa, T., Zou, M. X., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Hinuma, S., Kitada, C., Kurokawa, T., Onda, H., Fujino, M. (1998). Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, *251* (2), 471-476.
5. Lee, D. K., Saldivia, V. R., Nguyen, T., Cheng, R., George, S. R., O'Dowd, B. F. (2005). Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology*, *146* (1), 231-236.
6. Sunter, D., Hewson, A. K., Dickson, S. L. (2003). Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neuroscience letters*, *353* (1), 1-4.
7. Hall, J. E. (2013). *Guyton ve Hall Tibbi Fizyoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevler.
8. Boucher, J., Masri, B., Daviaud, D., Gesta, S., Guigne, C., Mazzucotelli, A., Castan-Laurell, I., Tack, I., Knibiehler, B., Carpene, C., Audigier, Y., Saulnier-Blache, J. S., Valet, P. (2005). Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology*, *146* (4), 1764-1771.
9. Castan-Laurell, I., Vítková, M., Daviaud, D., Dray, C., Kováčiková, M., Kovacova, Z., Hejnova, J., Stich, V., Valet, P. (2008). Effect of hypocaloric diet-induced weight loss in obese women on plasma apelin and adipose tissue expression of apelin and APJ. *European Journal of Endocrinology*, *158* (6), 905-910.

10. Tobin, V. A., Bull, P. M., Arunachalam, S., O'Carroll, A.-M., Ueta, Y., Ludwig, M. (2008). The Effects of Apelin on the Electrical Activity of Hypothalamic Magnocellular Vasopressin and Oxytocin Neurons and Somatodendritic Peptide Release. *Endocrinology*, 149 (12), 6136-6145.
11. Xie, H., Yuan, L.-Q., Luo, X.-H., Huang, J., Cui, R.-R., Guo, L.-J., Zhou, H.-D., Wu, X.-P., Liao, E.-Y. (2007). Apelin suppresses apoptosis of human osteoblasts. *Apoptosis*, 12 (1), 247-254.
12. Tang, S.-Y., Xie, H., Yuan, L.-Q., Luo, X.-H., Huang, J., Cui, R.-R., Zhou, H.-D., Wu, X.-P., Liao, E.-Y. (2007). Apelin stimulates proliferation and suppresses apoptosis of mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1 via JNK and PI3-K/Akt signaling pathways. *Peptides*, 28 (3), 708-718.
13. Choe, H., Farzan, M., Konkkel, M., Martin, K., Sun, Y., Marcon, L., Cayabyab, M., Berman, M., Dorf, M. E., Gerard, N., Gerard, C., Sodroski, J. (1998). The Orphan Seven-Transmembrane Receptor Apj Supports the Entry of Primary T-Cell-Line-Tropic and Dualtropic Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology*, 72 (7), 6113-6118.
14. Cayabyab, M., Hinuma, S., Farzan, M., Choe, H., Fukusumi, S., Kitada, C., Nishizawa, N., Hosoya, M., Nishimura, O., Messele, T., Pollakis, G., Goudsmit, J., Fujino, M., Sodroski, J. (2000). Apelin, the natural ligand of the orphan seven-transmembrane receptor APJ, inhibits human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol*, 74 (24), 11972-11976.
15. Medhurst, A. D., Jennings, C. A., Robbins, M. J., Davis, R. P., Ellis, C., Winborn, K. Y., Lawrie, K. W., Hervieu, G., Riley, G., Bolaky, J. E., Herrity, N. C., Murdock, P., Darker, J. G. (2003). Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *Journal of neurochemistry*, 84 (5), 1162-1172.
16. Lee, D. K., Cheng, R., Nguyen, T., Fan, T., Kariyawasam, A. P., Liu, Y., Osmond, D. H., George, S. R., O'Dowd, B. F. (2000). Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *Journal of neurochemistry*, 74 (1), 34-41.
17. Higuchi, K., Masaki, T., Gotoh, K., Chiba, S., Katsuragi, I., Tanaka, K., Kakuma, T., Yoshimatsu, H. (2007). Apelin, an APJ receptor ligand, regulates

- body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology*, 148 (6), 2690-2697.
18. Masaki, T., Yasuda, T., Yoshimatsu, H. (2012). Apelin-13 microinjection into the paraventricular nucleus increased sympathetic nerve activity innervating brown adipose tissue in rats. *Brain research bulletin*, 87 (6), 540-543.
 19. Wang, G., Qi, X., Wei, W., Englander, E. W., Greeley, G. H., Jr. (2006). Characterization of the 5'-regulatory regions of the rat and human apelin genes and regulation of breast apelin by USF. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20 (14), 2639-2641.
 20. Habata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kawamata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Nishizawa, N., Murosaki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Tatemoto, K., Fujino, M. (1999). Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1452 (1), 25-35.
 21. Kawamata, Y., Habata, Y., Fukusumi, S., Hosoya, M., Fujii, R., Hinuma, S., Nishizawa, N., Kitada, C., Onda, H., Nishimura, O., Fujino, M. (2001). Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochimica et biophysica acta*, 1538 (2-3), 162-171.
 22. O'Carroll, A. M., Lolait, S. J., Harris, L. E., Pope, G. R. (2013). The apelin receptor APJ: journey from an orphan to a multifaceted regulator of homeostasis. *The Journal of endocrinology*, 219 (1), R13-35.
 23. Kleinz, M. J., Davenport, A. P. (2005). Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacology & therapeutics*, 107 (2), 198-211.
 24. Tatemoto, K., Takayama, K., Zou, M. X., Kumaki, I., Zhang, W., Kumano, K., Fujimiya, M. (2001). The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regulatory peptides*, 99 (2-3), 87-92.
 25. Sandal, S., Tekin, S. (2013). Adipoz Dokudan Salgılanan Bir Hormon: Apelin. *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1, 55-62.
 26. Valle, A., Hoggard, N., Adams, A. C., Roca, P., Speakman, J. R. (2008). Chronic central administration of apelin-13 over 10 days increases food intake,

- body weight, locomotor activity and body temperature in C57BL/6 mice. *Journal of neuroendocrinology*, 20 (1), 79-84.
27. O'Dowd, B. F., Heiber, M., Chan, A., Heng, H. H., Tsui, L.-C., Kennedy, J. L., Shi, X., Petronis, A., George, S. R., Nguyen, T. (1993). A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene*, 136 (1), 355-360.
 28. Devic, E., Rizzoti, K., Bodin, S., Knibiehler, B., Audigier, Y. (1999). Amino acid sequence and embryonic expression of msr/apj, the mouse homolog of Xenopus X-msr and human APJ. *Mechanisms of Development*, 84 (1-2), 199-203.
 29. O'Carroll, A. M., Selby, T. L., Palkovits, M., Lolait, S. J. (2000). Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochimica et biophysica acta*, 1492 (1), 72-80.
 30. Hosoya, M., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Fujii, R., Habata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Honda, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., Fujino, M. (2000). Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *The Journal of biological chemistry*, 275 (28), 21061-21067.
 31. Matsumoto, M., Hidaka, K., Akiho, H., Tada, S., Okada, M., Yamaguchi, T. (1996). Low stringency hybridization study of the dopamine D4 receptor revealed D4-like mRNA distribution of the orphan seven-transmembrane receptor, APJ, in human brain. *Neuroscience letters*, 219 (2), 119-122.
 32. Edinger, A. L., Hoffman, T. L., Sharron, M., Lee, B., Yi, Y., Choe, W., Kolson, D. L., Mitrovic, B., Zhou, Y., Faulds, D., Collman, R. G., Hesselgesser, J., Horuk, R., Doms, R. W. (1998). An Orphan Seven-Transmembrane Domain Receptor Expressed Widely in the Brain Functions as a Coreceptor for Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Simian Immunodeficiency Virus. *Journal of Virology*, 72 (10), 7934-7940.
 33. Xia, Y., Krukoff, T. L. (2003). Differential neuronal activation in the hypothalamic paraventricular nucleus and autonomic/neuroendocrine responses to I.C.V. endotoxin. *Neuroscience*, 121 (1), 219-231.

34. Katugampola, S., Davenport, A. (2003). Emerging roles for orphan G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Trends in pharmacological sciences*, 24 (1), 30-35.
35. Maguire, J. J., Kleinz, M. J., Pitkin, S. L., Davenport, A. P. (2009). [Pyr1]Apelin-13 Identified as the Predominant Apelin Isoform in the Human Heart: Vasoactive Mechanisms and Inotropic Action in Disease. *Hypertension*, 54 (3), 598-604.
36. Reaux, A., De Mota, N., Skultetyova, I., Lenkei, Z., El Messari, S., Gallatz, K., Corvol, P., Palkovits, M., Llorens-Cortes, C. (2001). Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *Journal of neurochemistry*, 77 (4), 1085-1096.
37. Cheng, X., Cheng, X. S., Pang, C. C. Y. (2003). Venous dilator effect of apelin, an endogenous peptide ligand for the orphan APJ receptor, in conscious rats. *European Journal of Pharmacology*, 470 (3), 171-175.
38. Kagiya, S., Fukuhara, M., Matsumura, K., Lin, Y., Fujii, K., Iida, M. (2005). Central and peripheral cardiovascular actions of apelin in conscious rats. *Regulatory peptides*, 125 (1-3), 55-59.
39. Seyedabadi, M., Goodchild, A. K., Pilowsky, P. M. Site-specific effects of apelin-13 in the rat medulla oblongata on arterial pressure and respiration. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 101 (1), 32-38.
40. Mitra, A., Katovich, M. J., Mecca, A., Rowland, N. E. (2006). Effects of central and peripheral injections of apelin on fluid intake and cardiovascular parameters in rats. *Physiology & Behavior*, 89 (2), 221-225.
41. Szokodi, I., Tavi, P., Földes, G., Voutilainen-Myllylä, S., Ilves, M., Tokola, H., Pikkarainen, S., Piuholta, J., Rysä, J., Tóth, M., Ruskoaho, H. (2002). Apelin, the Novel Endogenous Ligand of the Orphan Receptor APJ, Regulates Cardiac Contractility. *Circulation Research*, 91 (5), 434-440.
42. Ashley, E. A., Powers, J., Chen, M., Kundu, R., Finsterbach, T., Caffarelli, A., Deng, A., Eichhorn, J., Mahajan, R., Agrawal, R., Greve, J., Robbins, R., Patterson, A. J., Bernstein, D., Quertermous, T. (2005). The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovascular Research*, 65 (1), 73-82.

43. Kuba, K., Zhang, L., Imai, Y., Arab, S., Chen, M., Maekawa, Y., Leschnik, M., Leibbrandt, A., Markovic, M., Schwaighofer, J., Beetz, N., Musialek, R., Neely, G. G., Komnenovic, V., Kolm, U., Metzler, B., Ricci, R., Hara, H., Meixner, A., Nghiem, M., Chen, X., Dawood, F., Wong, K. M., Sarao, R., Cukerman, E., Kimura, A., Hein, L., Thalhammer, J., Liu, P. P., Penninger, J. M. (2007). Impaired Heart Contractility in Apelin Gene-Deficient Mice Associated With Aging and Pressure Overload. *Circulation Research*, *101* (4), e32-e42.
44. Sonmez, A., Celebi, G., Erdem, G., Tapan, S., Genc, H., Tasci, I., Ercin, C. N., Dogru, T., Kilic, S., Uckaya, G., Yilmaz, M. I., Erbil, M. K., Kutlu, M. (2010). Plasma Apelin and ADMA Levels in Patients with Essential Hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension*, *32* (3), 179-183.
45. Kälin, R. E., Kretz, M. P., Meyer, A. M., Kispert, A., Heppner, F. L., Brändli, A. W. (2007). Paracrine and autocrine mechanisms of apelin signaling govern embryonic and tumor angiogenesis. *Developmental Biology*, *305* (2), 599-614.
46. Kasai, A., Shintani, N., Oda, M., Kakuda, M., Hashimoto, H., Matsuda, T., Hinuma, S., Baba, A. (2004). Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, *325* (2), 395-400.
47. Masri, B., Morin, N., Cornu, M., Knibiehler, B., Audigier, Y. (2004). Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *The FASEB Journal*.
48. Kidoya, H., Takakura, N. (2012). Biology of the apelin-APJ axis in vascular formation. *Journal of Biochemistry*, *152* (2), 125-131.
49. Cox, C. M., D'Agostino, S. L., Miller, M. K., Heimark, R. L., Krieg, P. A. (2006). Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Developmental Biology*, *296* (1), 177-189.
50. Inui, M., Fukui, A., Ito, Y., Asashima, M. (2006). Xapelin and Xmsr are required for cardiovascular development in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, *298* (1), 188-200.

51. Kasai, A., Shintani, N., Kato, H., Matsuda, S., Gomi, F., Haba, R., Hashimoto, H., Kakuda, M., Tano, Y., Baba, A. (2008). Retardation of Retinal Vascular Development in Apelin-Deficient Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28 (10), 1717-1722.
52. Kasai, A., Ishimaru, Y., Kinjo, T., Satooka, T., Matsumoto, N., Yoshioka, Y., Yamamuro, A., Gomi, F., Shintani, N., Baba, A., Maeda, S. (2010). Apelin Is a Crucial Factor for Hypoxia-Induced Retinal Angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30 (11), 2182-2187.
53. Sorli, S. C., Le Gonidec, S., Knibiehler, B., Audigier, Y. (2007). Apelin is a potent activator of tumour neoangiogenesis. *Oncogene*, 26 (55), 7692-7699.
54. Tiani, C., Garcia-Pras, E., Mejias, M., de Gottardi, A., Berzigotti, A., Bosch, J., Fernandez, M. (2009). Apelin signaling modulates splanchnic angiogenesis and portosystemic collateral vessel formation in rats with portal hypertension. *Journal of Hepatology*, 50 (2), 296-305.
55. Eyries, M., Siegfried, G., Ciumas, M., Montagne, K., Agrapart, M., Lebrin, F., Soubrier, F. (2008). Hypoxia-Induced Apelin Expression Regulates Endothelial Cell Proliferation and Regenerative Angiogenesis. *Circulation Research*, 103 (4), 432-440.
56. Kidoya, H., Naito, H., Takakura, N. (2010). Apelin induces enlarged and nonleaky blood vessels for functional recovery from ischemia. *115 (15)*, 3166-3174.
57. Reaux, A., Gallatz, K., Palkovits, M., Llorens-Cortes, C. (2002). Distribution of apelin-synthesizing neurons in the adult rat brain. *Neuroscience*, 113 (3), 653-662.
58. Brailoiu, G. C., Dun, S. L., Yang, J., Ohsawa, M., Chang, J. K., Dun, N. J. (2002). Apelin-immunoreactivity in the rat hypothalamus and pituitary. *Neuroscience letters*, 327 (3), 193-197.
59. Taheri, S., Murphy, K., Cohen, M., Sujkovic, E., Kennedy, A., Dhillo, W., Dakin, C., Sajedi, A., Ghatei, M., Bloom, S. (2002). The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochemical and biophysical research communications*, 291 (5), 1208-1212.

60. Lv, S. Y., Yang, Y. J., Qin, Y. J., Mo, J. R., Wang, N. B., Wang, Y. J., Chen, Q. (2012). Central apelin-13 inhibits food intake via the CRF receptor in mice. *Peptides*, *33* (1), 132-138.
61. Clarke, K. J., Whitaker, K. W., Reyes, T. M. (2009). Diminished Metabolic Responses to Centrally-Administered Apelin-13 in Diet-Induced Obese Rats Fed a High-Fat Diet. *Journal of neuroendocrinology*, *21* (2), 83-89.
62. Reaux-Le Goazigo, A., Morinville, A., Bulet, A., Llorens-Cortes, C., Beaudet, A. (2004). Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons. *Endocrinology*, *145* (9), 4392-4400.
63. De Mota, N., Reaux-Le Goazigo, A., El Messari, S., Chartrel, N., Roesch, D., Dujardin, C., Kordon, C., Vaudry, H., Moos, F., Llorens-Cortes, C. (2004). Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101* (28), 10464-10469.
64. Azizi, M., Iturrioz, X., Blanchard, A., Peyrard, S., De Mota, N., Chartrel, N., Vaudry, H., Corvol, P., Llorens-Cortes, C. (2008). Reciprocal Regulation of Plasma Apelin and Vasopressin by Osmotic Stimuli. *Journal of the American Society of Nephrology*, *19* (5), 1015-1024.
65. Sato, K., Takahashi, T., Kobayashi, Y., Hagino, A., Roh, S. G., Katoh, K. (2012). Apelin is involved in postprandial responses and stimulates secretion of arginine-vasopressin, adrenocorticotrophic hormone, and growth hormone in the ruminant. *Domestic Animal Endocrinology*, *42* (3), 165-172.
66. Dray, C., Debard, C., Jager, J., Disse, E., Daviaud, D., Martin, P., Attane, C., Wanecq, E., Guigne, C., Bost, F., Tanti, J. F., Laville, M., Vidal, H., Valet, P., Castan-Laurell, I. (2010). Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*, *298* (6), E1161-1169.
67. Krist, J., Wieder, K., Kloting, N., Oberbach, A., Kralisch, S., Wiesner, T., Schon, M. R., Gartner, D., Dietrich, A., Shang, E., Lohmann, T., Dressler, M., Fasshauer, M., Stumvoll, M., Bluher, M. (2013). Effects of weight loss and

- exercise on apelin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity. *Obesity facts*, 6 (1), 57-69.
68. Kotanidou, E. P., Kalinderi, K., Kyrgios, I., Efraimidou, S., Fidani, L., Papadopoulou-Alataki, E., Eboriadou-Petikopoulou, M., Galli-Tsinopoulou, A. (2014). Apelin and G212A apelin receptor gene polymorphism in obese and diabese youth. *Pediatric obesity*.
 69. Sörhede Winzell, M., Magnusson, C., Ahrén, B. (2005). The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice. *Regulatory peptides*, 131 (1-3), 12-17.
 70. Wei, L., Hou, X., Tatemoto, K. (2005). Regulation of apelin mRNA expression by insulin and glucocorticoids in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Regulatory peptides*, 132 (1-3), 27-32.
 71. Dray, C., Knauf, C., Daviaud, D., Waget, A., Boucher, J., Buleon, M., Cani, P. D., Attane, C., Guigne, C., Carpenne, C., Burcelin, R., Castan-Laurell, I., Valet, P. (2008). Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab*, 8 (5), 437-445.
 72. Yue, P., Jin, H., Aillaud, M., Deng, A. C., Azuma, J., Asagami, T., Kundu, R. K., Reaven, G. M., Quertermous, T., Tsao, P. S. (2010). Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*, 298 (1), E59-67.
 73. Attane, C., Foussal, C., Le Gonidec, S., Benani, A., Daviaud, D., Wanecq, E., Guzman-Ruiz, R., Dray, C., Bezaire, V., Rancoule, C., Kuba, K., Ruiz-Gayo, M., Levade, T., Penninger, J., Burcelin, R., Penicaud, L., Valet, P., Castan-Laurell, I. (2012). Apelin treatment increases complete Fatty Acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity, and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice. *Diabetes*, 61 (2), 310-320.
 74. Zhu, S., Sun, F., Li, W., Cao, Y., Wang, C., Wang, Y., Liang, D., Zhang, R., Zhang, S., Wang, H., Cao, F. (2011). Apelin stimulates glucose uptake through the PI3K/Akt pathway and improves insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biochem*, 353 (1-2), 305-313.
 75. Li, L., Yang, G., Li, Q., Tang, Y., Yang, M., Yang, H., Li, K. (2006). Changes and relations of circulating visfatin, apelin, and resistin levels in normal,

- impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 114 (10), 544-548.
76. Cavallo, M. G., Sentinelli, F., Barchetta, I., Costantino, C., Incani, M., Perra, L., Capoccia, D., Romeo, S., Cossu, E., Leonetti, F., Agati, L., Baroni, M. G. (2012). Altered glucose homeostasis is associated with increased serum apelin levels in type 2 diabetes mellitus. *PloS one*, 7 (12), e51236.
 77. Soriguer, F., Garrido-Sanchez, L., Garcia-Serrano, S., Garcia-Almeida, J., Garcia-Arnes, J., Tinahones, F., Garcia-Fuentes, E. (2009). Apelin Levels Are Increased in Morbidly Obese Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus. *OBES SURG*, 19 (11), 1574-1580.
 78. Erdem, G., Dogru, T., Tasci, I., Sonmez, A., Tapan, S. (2008). Low plasma apelin levels in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 116 (5), 289-292.
 79. Wang, G., Anini, Y., Wei, W., Qi, X., O'Carroll, A.-M., Mochizuki, T., Wang, H.-Q., Hellmich, M. R., Englander, E. W., Greeley, G. H. (2004). Apelin, a New Enteric Peptide: Localization in the Gastrointestinal Tract, Ontogeny, and Stimulation of Gastric Cell Proliferation and of Cholecystokinin Secretion. *Endocrinology*, 145 (3), 1342-1348.
 80. Susaki, E., Wang, G., Cao, G., Wang, H.-Q., Englander, E. W., Greeley Jr, G. H. (2005). Apelin cells in the rat stomach. *Regulatory peptides*, 129 (1-3), 37-41.
 81. Han, S., Wang, G., Qiu, S., de la Motte, C., Wang, H.-Q., Gomez, G., Englander, E. W., Greeley Jr, G. H. (2007). Increased colonic apelin production in rodents with experimental colitis and in humans with IBD. *Regulatory peptides*, 142 (3), 131-137.
 82. Ohno, S., Yakabi, K., Ro, S., Ochiai, M., Onouchi, T., Sakurada, T., Takabayashi, H., Ishida, S., Takayama, K. (2012). Apelin-12 stimulates acid secretion through an increase of histamine release in rat stomachs. *Regulatory peptides*, 174 (1-3), 71-78.

83. Hus-Citharel, A., Bouby, N., Frugiere, A., Bodineau, L., Gasc, J.-M., Llorens-Cortes, C. (2008). Effect of apelin on glomerular hemodynamic function in the rat kidney. *Kidney Int*, 74 (4), 486-494.
84. Horiuchi, Y., Fujii, T., Kamimura, Y., Kawashima, K. (2003). The endogenous, immunologically active peptide apelin inhibits lymphocytic cholinergic activity during immunological responses. *J Neuroimmunol*, 144 (1-2), 46-52.
85. Leeper, N. J., Tedesco, M. M., Kojima, Y., Schultz, G. M., Kundu, R. K., Ashley, E. A., Tsao, P. S., Dalman, R. L., Quertermous, T. (2009). Apelin prevents aortic aneurysm formation by inhibiting macrophage inflammation. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 296 (5), H1329-H1335.
86. Zhang, Y.-j., Dragic, T., Cao, Y., Kostrikis, L., Kwon, D. S., Littman, D. R., KewalRamani, V. N., Moore, J. P. (1998). Use of Coreceptors Other Than CCR5 by Non-Syncytium-Inducing Adult and Pediatric Isolates of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Rare In Vitro. *Journal of Virology*, 72 (11), 9337-9344.
87. Zou, M. X., Liu, H. Y., Haraguchi, Y., Soda, Y., Tatemoto, K., Hoshino, H. (2000). Apelin peptides block the entry of human immunodeficiency virus (HIV). *FEBS letters*, 473 (1), 15-18.
88. Puffer, B. A., Sharron, M., Coughlan, C. M., Baribaud, F., McManus, C. M., Lee, B., David, J., Price, K., Horuk, R., Tsang, M., Doms, R. W. (2000). Expression and Coreceptor Function of APJ for Primate Immunodeficiency Viruses. *Virology*, 276 (2), 435-444.
89. Zhou, N., Fan, X., Mukhtar, M., Fang, J., Patel, C. A., DuBois, G. C., Pomerantz, R. J. (2003). Cell-cell fusion and internalization of the CNS-based, HIV-1 co-receptor, APJ. *Virology*, 307 (1), 22-36.
90. Xu, N., Wang, H., Fan, L., Chen, Q. (2009). Supraspinal administration of apelin-13 induces antinociception via the opioid receptor in mice. *Peptides*, 30 (6), 1153-1157.

91. Lv, S.-Y., Qin, Y.-J., Wang, N.-B., Yang, Y.-J., Chen, Q. (2012). Supraspinal antinociceptive effect of apelin-13 in a mouse visceral pain model. *Peptides*, 37 (1), 165-170.
92. Lv, S.-Y., Qin, Y.-J., Wang, H.-T., Xu, N., Yang, Y.-J., Chen, Q. (2012). Centrally administered apelin-13 induces depression-like behavior in mice. *Brain research bulletin*, 88 (6), 574-580.
93. O'Donnell, L. A., Agrawal, A., Sabnekar, P., Dichter, M. A., Lynch, D. R., Kolson, D. L. (2007). Apelin, an endogenous neuronal peptide, protects hippocampal neurons against excitotoxic injury. *Journal of neurochemistry*, 102 (6), 1905-1917.
94. Telegdy, G., Adamik, A., Jászberényi, M. (2013). Involvement of neurotransmitters in the action of apelin-13 on passive avoidance learning in mice. *Peptides*, 39 (0), 171-174.
95. Xie, H., Tang, S.-y., Cui, R.-r., Huang, J., Ren, X.-h., Yuan, L.-q., Lu, Y., Yang, M., Zhou, H.-d., Wu, X.-p., Luo, X.-h., Liao, E.-y. (2006). Apelin and its receptor are expressed in human osteoblasts. *Regulatory peptides*, 134 (2-3), 118-125.
96. Wattanachanya, L., Lu, W.-D., Kundu, R. K., Wang, L., Abbott, M. J., O'Carroll, D., Quertermous, T., Nissenson, R. A. (2013). Increased Bone Mass in Mice Lacking the Adipokine Apelin. *Endocrinology*, 154 (6), 2069-2080.
97. Hu, P., Tang, J., Chen, W., Bao, J., Wu, L. (2011). Increased apelin serum levels and expression in human chondrocytes in osteoarthritic patients. *International Orthopaedics (SICOT)*, 35 (9), 1421-1426.
98. Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M. (2000). *Principles of Neural Science*. USA: McGraw-Hill Companies, Inc.
99. Szarek, E., Cheah, P. S., Schwartz, J., Thomas, P. (2010). Molecular genetics of the developing neuroendocrine hypothalamus. *Molecular and cellular endocrinology*, 323 (1), 115-123.
100. Tekin, S. (2011). Erkek sıçanlarda intraserebroventriküler apelin uygulamasının hipotalamus-hipofiz-gonadal eksen üzerindeki etkileri. Yüksek Lisans, İnönü Üniversitesi, Malatya.

101. Caqueret, A., Boucher, F., Michaud, J. L. (2006). Laminar organization of the early developing anterior hypothalamus. *Developmental biology*, 298 (1), 95-106.
102. Terry, L. C. (1986). Regulation of thyrotropin secretion by the central epinephrine system. Studies in the chronically cannulated rat. *Neuroendocrinology*, 42 (2), 102-108.
103. Hall, R., Amos, J., Garry, R., Buxton, R. L. (1970). Thyroid-stimulating hormone response to synthetic thyrotrophin releasing hormone in man. *British medical journal*, 2 (5704), 274-277.
104. Harris, A. R., Christianson, D., Smith, M. S., Fang, S. L., Braverman, L. E., Vagenakis, A. G. (1978). The physiological role of thyrotropin-releasing hormone in the regulation of thyroid-stimulating hormone and prolactin secretion in the rat. *The Journal of clinical investigation*, 61 (2), 441-448.
105. Boelen, A., Wiersinga, W. M., Fliers, E. (2008). Fasting-induced changes in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 18 (2), 123-129.
106. Arancibia, S., Rage, F., Astier, H., Tapia-Arancibia, L. (1996). Neuroendocrine and autonomous mechanisms underlying thermoregulation in cold environment. *Neuroendocrinology*, 64 (4), 257-267.
107. Nillni, E. A., Sevarino, K. A. (1999). The biology of pro-thyrotropin-releasing hormone-derived peptides. *Endocrine reviews*, 20 (5), 599-648.
108. Lechan, R. M., Wu, P., Jackson, I. M., Wolf, H., Cooperman, S., Mandel, G., Goodman, R. H. (1986). Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science*, 231 (4734), 159-161.
109. Fekete, C., Lechan, R. M. (2007). Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons: role of neuronal afferents and type 2 deiodinase. *Frontiers in neuroendocrinology*, 28 (2-3), 97-114.
110. Lechan, R. M., Wu, P., Jackson, I. M. D. (1986). Immunolocalization of the Thyrotropin-Releasing Hormone Prohormone in the Rat Central Nervous System. *Endocrinology*, 119 (3), 1210-1216.

111. Perello, M., Friedman, T., Paez-Espinosa, V., Shen, X., Stuart, R. C., Nillni, E. A. (2006). Thyroid hormones selectively regulate the posttranslational processing of prothyrotropin-releasing hormone in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology*, 147 (6), 2705-2716.
112. Espinosa, V. P., Ferrini, M., Shen, X., Lutfy, K., Nillni, E. A., Friedman, T. C. (2007). Cellular colocalization and coregulation between hypothalamic pro-TRH and prohormone convertases in hypothyroidism. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 292 (1), E175-E186.
113. Perez-Castro, C., Renner, U., Haedo, M. R., Stalla, G. K., Arzt, E. (2012). Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology. *Physiological reviews*, 92 (1), 1-38.
114. Molina, P. E. (2004). *Endocrine Physiology*. USA: McGraw-Hill Companies, Inc.
115. Morgan, P. J., Webster, C. A., Mercer, J. G., Ross, A. W., Hazlerigg, D. G., MacLean, A., Barrett, P. (1996). The ovine pars tuberalis secretes a factor(s) that regulates gene expression in both lactotropic and nonlactotropic pituitary cells. *Endocrinology*, 137 (9), 4018-4026.
116. Morgan, P. J., Williams, L. M. (1996). The pars tuberalis of the pituitary: a gateway for neuroendocrine output. *Reviews of reproduction*, 1 (3), 153-161.
117. Lamacz, M., Tonon, M. C., Louiset, E., Cazin, L., Vaudry, H. (1991). The intermediate lobe of the pituitary, model of neuroendocrine communication. *Archives internationales de physiologie, de biochimie et de biophysique*, 99 (3), 205-219.
118. Rosso, L., Mienville, J. M. (2009). Pituicyte modulation of neurohormone output. *Glia*, 57 (3), 235-243.
119. Dracopoli, N. C., Rettig, W. J., Whitfield, G. K., Darlington, G. J., Spengler, B. A., Biedler, J. L., Old, L. J., Kourides, I. A. (1986). Assignment of the gene for the beta subunit of thyroid-stimulating hormone to the short arm of human chromosome 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83 (6), 1822-1826.

120. Rousseau-Merck, M. F., Misrahi, M., Loosfelt, H., Atger, M., Milgrom, E., Berger, R. (1990). Assignment of the human thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) gene to chromosome 14q31. *Genomics*, 8 (2), 233-236.
121. Zoeller, R. T., Tan, S. W., Tyl, R. W. (2007). General background on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. *Critical reviews in toxicology*, 37 (1-2), 11-53.
122. Erdoğan, G. (2001). *Tiroid Hormonları, Taşınmaları ve Hücreye Girişleri*. İstanbul: Kelebek Matbaacılık.
123. Parthemore, J. G., Deftos, L. J. (1978). Calcitonin Secretion in Normal Human Subjects*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 47 (1), 184-188.
124. Dunn, J. T., Dunn, A. D. (2001). Update on intrathyroidal iodine metabolism. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 11 (5), 407-414.
125. Pommier, J., Tourniaire, J., Rahmoun, B., DĚME, D., Pallo, D., Bornet, H., Nunez, J. (1976). Thyroid iodine organification defects: a case with lack of thyroglobulin iodination and a case without any peroxidase activity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 42 (2), 319-329.
126. Bhagavan, N. V. (1992). *Medical biochemistry*. England: Bartlett.
127. Field, J. B., Dekker, A., Titus, G., Kerins, M. E., Worden, W., Frumess, R. (1979). In vitro and in vivo refractoriness to thyrotropin stimulation of iodine organification and thyroid hormone secretion. *Journal of Clinical Investigation*, 64 (1), 265.
128. Lazar, M. A. (1993). Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocrine reviews*, 14 (2), 184-193.
129. Lechan, R. M., Qi, Y., Jackson, I. M., Mahdavi, V. (1994). Identification of thyroid hormone receptor isoforms in thyrotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, 135 (1), 92-100.
130. Bradley, D. J., Towle, H. C., Young, W. S., 3rd. (1994). Alpha and beta thyroid hormone receptor (TR) gene expression during auditory neurogenesis: evidence for TR isoform-specific transcriptional regulation in vivo.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91 (2), 439-443.

131. Hodin, R. A., Lazar, M. A., Wintman, B. I., Darling, D. S., Koenig, R. J., Larsen, P. R., Moore, D. D., Chin, W. W. (1989). Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science*, 244 (4900), 76-79.
132. Puymirat, J., Miehe, M., Marchand, R., Sarlieve, L., Dussault, J. H. (1991). Immunocytochemical localization of thyroid hormone receptors in the adult rat brain. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 1 (2), 173-184.
133. Alkemade, A., Friesema, E. C., Unmehopa, U. A., Fabriek, B. O., Kuiper, G. G., Leonard, J. L., Wiersinga, W. M., Swaab, D. F., Visser, T. J., Fliers, E. (2005). Neuroanatomical pathways for thyroid hormone feedback in the human hypothalamus. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 90 (7), 4322-4334.
134. Guissouma, H., Froidevaux, M. S., Hassani, Z., Demeneix, B. A. (2006). In vivo siRNA delivery to the mouse hypothalamus confirms distinct roles of TR beta isoforms in regulating TRH transcription. *Neuroscience letters*, 406 (3), 240-243.
135. Abel, E. D., Ahima, R. S., Boers, M. E., Elmquist, J. K., Wondisford, F. E. (2001). Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *The Journal of clinical investigation*, 107 (8), 1017-1023.
136. Sainsbury, A., Zhang, L. (2012). Role of the hypothalamus in the neuroendocrine regulation of body weight and composition during energy deficit. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 13 (3), 234-257.
137. McAninch, E. A., Bianco, A. C. (2014). Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1311, 77-87.
138. Silva, J. E. (2006). Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiological reviews*, 86 (2), 435-464.

139. Bianco, A. C., Maia, A. L., da Silva, W. S., Christoffolete, M. A. (2005). Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure. *Bioscience reports*, 25 (3-4), 191-208.
140. Ribeiro, M. O., Bianco, S. D., Kaneshige, M., Schultz, J. J., Cheng, S. Y., Bianco, A. C., Brent, G. A. (2010). Expression of uncoupling protein 1 in mouse brown adipose tissue is thyroid hormone receptor-beta isoform specific and required for adaptive thermogenesis. *Endocrinology*, 151 (1), 432-440.
141. Rousset, S., Alves-Guerra, M. C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulcier, A. M., Bouillaud, F., Ricquier, D. (2004). The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes*, 53 Suppl 1, S130-135.
142. Krauss, S., Zhang, C. Y., Lowell, B. B. (2005). The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6 (3), 248-261.
143. Liu, J., Li, J., Li, W. J., Wang, C. M. (2013). The role of uncoupling proteins in diabetes mellitus. *Journal of diabetes research*, 2013, 585897.
144. Brand, M. D., Esteves, T. C. (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell metabolism*, 2 (2), 85-93.
145. Modrianský, M., Murdza-Inglis, D. L., Patel, H. V., Freeman, K. B., Garlid, K. D. (1997). Identification by Site-directed Mutagenesis of Three Arginines in Uncoupling Protein That Are Essential for Nucleotide Binding and Inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (40), 24759-24762.
146. Garlid, K. D., Jaburek, M., Jezek, P. (2001). Mechanism of uncoupling protein action. *Biochemical Society transactions*, 29 (Pt 6), 803-806.
147. Echtay, K. S. (2007). Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free radical biology & medicine*, 43 (10), 1351-1371.
148. Boss, O., Muzzin, P., Giacobino, J. P. (1998). The uncoupling proteins, a review. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 139 (1), 1-9.
149. Kim-Han, J. S., Reichert, S. A., Quick, K. L., Dugan, L. L. (2001). BMCP1: a mitochondrial uncoupling protein in neurons which regulates mitochondrial function and oxidant production. *Journal of neurochemistry*, 79 (3), 658-668.

150. Budd, S. L., Tenneti, L., Lishnak, T., Lipton, S. A. (2000). Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (11), 6161-6166.
151. Yamasaki, H., Sasaki, H., Ogawa, K., Shono, T., Tamura, S., Doi, A., Sasahara, M., Kawashima, H., Nakao, T., Furuta, H., Nishi, M., Nanjo, K. (2006). Uncoupling protein 2 promoter polymorphism -866G/A affects peripheral nerve dysfunction in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes care*, 29 (4), 888-894.
152. Hong, Y., Fink, B. D., Dillon, J. S., Sivitz, W. I. (2001). Effects of adenoviral overexpression of uncoupling protein-2 and -3 on mitochondrial respiration in insulinoma cells. *Endocrinology*, 142 (1), 249-256.
153. Vincent, A. M., Brownlee, M., Russell, J. W. (2002). Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959, 368-383.
154. Sanchis, D., Fleury, C., Chomiki, N., Gubern, M., Huang, Q., Neverova, M., Gregoire, F., Easlick, J., Raimbault, S., Levi-Meyrueis, C., Miroux, B., Collins, S., Seldin, M., Richard, D., Warden, C., Bouillaud, F., Ricquier, D. (1998). BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *The Journal of biological chemistry*, 273 (51), 34611-34615.
155. Mao, W., Yu, X. X., Zhong, A., Li, W., Brush, J., Sherwood, S. W., Adams, S. H., Pan, G. (1999). UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS letters*, 443 (3), 326-330.
156. Yu, X. X., Mao, W., Zhong, A., Schow, P., Brush, J., Sherwood, S. W., Adams, S. H., Pan, G. (2000). Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14 (11), 1611-1618.

157. Erden, Y., Tekin, S., Kirbag, S., Sandal, S. (2014). Mitochondrial Uncoupling Proteins in the Brain: Their Structure, Function and Physiological Roles. *Medicine Science/ International Medical Journal*, DOI: 10.5455/medscience.2014.03.8216.
158. Warner, A., Rahman, A., Solsjo, P., Gottschling, K., Davis, B., Vennstrom, B., Arner, A., Mittag, J. (2013). Inappropriate heat dissipation ignites brown fat thermogenesis in mice with a mutant thyroid hormone receptor alpha1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (40), 16241-16246.
159. Pelletier, P., Gauthier, K., Sideleva, O., Samarut, J., Silva, J. E. (2008). Mice lacking the thyroid hormone receptor-alpha gene spend more energy in thermogenesis, burn more fat, and are less sensitive to high-fat diet-induced obesity. *Endocrinology*, 149 (12), 6471-6486.
160. Martinez de Mena, R., Scanlan, T. S., Obregon, M.-J. (2010). The T3 receptor β 1 isoform regulates UCP1 and D2 deiodinase in rat brown adipocytes. *Endocrinology*, 151 (10), 5074-5083.
161. Lee, J. Y., Takahashi, N., Yasubuchi, M., Kim, Y. I., Hashizaki, H., Kim, M. J., Sakamoto, T., Goto, T., Kawada, T. (2012). Triiodothyronine induces UCP-1 expression and mitochondrial biogenesis in human adipocytes. *American journal of physiology Cell physiology*, 302 (2), C463-472.
162. Skarulis, M. C., Celi, F. S., Mueller, E., Zemskova, M., Malek, R., Hugendubler, L., Cochran, C., Solomon, J., Chen, C., Gorden, P. (2010). Thyroid hormone induced brown adipose tissue and amelioration of diabetes in a patient with extreme insulin resistance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 95 (1), 256-262.
163. Sprague, J. E., Yang, X., Sommers, J., Gilman, T. L., Mills, E. M. (2007). Roles of Norepinephrine, Free Fatty Acids, Thyroid Status, and Skeletal Muscle Uncoupling Protein 3 Expression in Sympathomimetic-Induced Thermogenesis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 320 (1), 274-280.
164. Echtay, K. S. (2007). Mitochondrial uncoupling proteins—What is their physiological role? *Free Radical Biology and Medicine*, 43 (10), 1351-1371.

165. Alzet. Erişim: 10.09.2014,
http://www.alzet.com/products/guide_to_use/cfs_preparation.html
166. Paxinos, G., Watson, C. (2013). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 7th Edition. London, UK: Academic Press.
167. Altintas, R., Parlakpınar, H., Beytur, A., Vardi, N., Polat, A., Sagir, M., Odabas, G. P. (2012). Protective effect of dexpanthenol on ischemia-reperfusion-induced renal injury in rats. *Kidney & blood pressure research*, 36 (1), 220-230.
168. Park, A. J., Bloom, S. R. (2005). Neuroendocrine control of food intake. *Current opinion in gastroenterology*, 21 (2), 228-233.
169. Pope, G. R., Roberts, E. M., Lolait, S. J., O'Carroll, A. M. (2012). Central and peripheral apelin receptor distribution in the mouse: species differences with rat. *Peptides*, 33 (1), 139-148.
170. Joly-Amado, A., Cansell, C., Denis, R. G., Delbes, A. S., Castel, J., Martinez, S., Luquet, S. (2014). The hypothalamic arcuate nucleus and the control of peripheral substrates. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 28 (5), 725-737.
171. Malagon, M. M., Vaudry, H. (2013). Hypothalamic control of energy homeostasis. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*, 45 (13), 917-918.
172. Jin, J. M., Yang, W. X. (2014). Molecular regulation of hypothalamus-pituitary-gonads axis in males. *Gene*, 551 (1), 15-25.
173. Tekin, S., Erden, Y., Etem, E., Sandal, S., Colak, C. (2014). Can Apelin-13 be a new actor in control of obesity? *Acta Physiol*, 211, 137-138.
174. Sandal, S., Tekin, S., Yilmaz, B. (2014). Chronic intracerebroventricular apelin-13 infusion in rats increases daily food intake and body weight by reducing leptin levels. *Acta Physiol*, 211, 138-139.
175. Neymotin, F., Nemzer, L. R. (2014). Locus of control and obesity. *Frontiers in endocrinology*, 5, 159.
176. Golia, E., Limongelli, G., Natale, F., Fimiani, F., Maddaloni, V., Russo, P. E., Riegler, L., Bianchi, R., Crisci, M., Palma, G. D., Golino, P., Russo, M. G.,

- Calabro, R., Calabro, P. (2014). Adipose tissue and vascular inflammation in coronary artery disease. *World journal of cardiology*, 6 (7), 539-554.
177. Zorlu, M., Kiskac, M., Karatoprak, C., Kesgin, S., Cakirca, M., Yildiz, K., Ardic, C., Cikrikcioglu, M. A., Erkoc, R. (2014). Assessment of serum apelin and lipocalin-2 levels in patients with subclinical hypothyroidism. *Annales d'endocrinologie*, 75 (1), 10-14.
178. Cusin, I., Rouru, J., Visser, T., Burger, A. G., Rohner-Jeanrenaud, F. (2000). Involvement of thyroid hormones in the effect of intracerebroventricular leptin infusion on uncoupling protein-3 expression in rat muscle. *Diabetes*, 49 (7), 1101-1105.
179. Mahmoudi, F., Mohsennezhad, F., Khazali, H., Ehtesham, H. (2011). The effect of central injection of ghrelin and bombesin on mean plasma thyroid hormones concentration. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 10 (3), 627-632.
180. Amoo-Rajabi, O., Moghimi, A., Khazali, H. (2012). Effect of ICV injection of ghrelin and leptin on T3 and T4 plasma levels in Rat. *Physiology and Pharmacology*, 16 (1), 70-78.
181. Frier, B. C., Williams, D. B., Wright, D. C. (2009). The effects of apelin treatment on skeletal muscle mitochondrial content. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*, 297 (6), R1761-1768.
182. Yamamoto, T., Habata, Y., Matsumoto, Y., Yasuhara, Y., Hashimoto, T., Hamajyo, H., Anayama, H., Fujii, R., Fuse, H., Shintani, Y., Mori, M. (2011). Apelin-transgenic mice exhibit a resistance against diet-induced obesity by increasing vascular mass and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Biochimica et biophysica acta*, 1810 (9), 853-862.
183. Brent, G. A. (2012). Mechanisms of thyroid hormone action. *The Journal of clinical investigation*, 122 (9), 3035-3043.
184. Lanni, A., Moreno, M., Lombardi, A., Goglia, F. (2003). Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS letters*, 543 (1-3), 5-10.

185. Cioffi, F., Senese, R., Lanni, A., Goglia, F. (2013). Thyroid hormones and mitochondria: with a brief look at derivatives and analogues. *Molecular and cellular endocrinology*, 379 (1-2), 51-61.
186. Vidali, S., Knuever, J., Lerchner, J., Giesen, M., Biro, T., Klinger, M., Kofler, B., Funk, W., Poeggeler, B., Paus, R. (2014). Hypothalamic-pituitary-thyroid axis hormones stimulate mitochondrial function and biogenesis in human hair follicles. *The Journal of investigative dermatology*, 134 (1), 33-42.
187. Mutvei, A., Kuzela, S., Nelson, B. D. (1989). Control of mitochondrial transcription by thyroid hormone. *European journal of biochemistry / FEBS*, 180 (1), 235-240.
188. Bianco, A. C., Silva, J. E. (1987). Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of brown adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, 79 (1), 295-300.
189. Wang, C. Z., Wei, D., Guan, M. P., Xue, Y. M. (2014). Triiodothyronine regulates distribution of thyroid hormone receptors by activating AMP-activated protein kinase in 3T3-L1 adipocytes and induces uncoupling protein-1 expression. *Mol Cell Biochem*, 393 (1-2), 247-254.
190. Queiroz, M. S., Shao, Y., Ismail-Beigi, F. (2004). Effect of thyroid hormone on uncoupling protein-3 mRNA expression in rat heart and skeletal muscle. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 14 (3), 177-185.
191. Lanni, A., Beneduce, L., Lombardi, A., Moreno, M., Boss, O., Muzzin, P., Giacobino, J. P., Goglia, F. (1999). Expression of uncoupling protein-3 and mitochondrial activity in the transition from hypothyroid to hyperthyroid state in rat skeletal muscle. *FEBS letters*, 444 (2-3), 250-254.
192. de Lange, P., Feola, A., Ragni, M., Senese, R., Moreno, M., Lombardi, A., Silvestri, E., Amat, R., Villarroya, F., Goglia, F., Lanni, A. (2007). Differential 3,5,3'-triiodothyronine-mediated regulation of uncoupling protein 3 transcription: role of Fatty acids. *Endocrinology*, 148 (8), 4064-4072.
193. Barbe, P., Larrouy, D., Boulanger, C., Chevillotte, E., Viguerie, N., Thalamas, C., Oliva Trastoy, M., Roques, M., Vidal, H., Langin, D. (2001). Triiodothyronine-mediated up-regulation of UCP2 and UCP3 mRNA

- expression in human skeletal muscle without coordinated induction of mitochondrial respiratory chain genes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15 (1), 13-15.
194. Gong, D.-W., He, Y., Karas, M., Reitman, M. (1997). Uncoupling Protein-3 Is a Mediator of Thermogenesis Regulated by Thyroid Hormone, β 3-Adrenergic Agonists, and Leptin. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (39), 24129-24132.
195. Lanni, A., De Felice, M., Lombardi, A., Moreno, M., Fleury, C., Ricquier, D., Goglia, F. (1997). Induction of UCP2 mRNA by thyroid hormones in rat heart. *FEBS letters*, 418 (1-2), 171-174.
196. Jekabsons, M. B., Gregoire, F. M., Schonfeld-Warden, N. A., Warden, C. H., Horwitz, B. A. (1999). T3 stimulates resting metabolism and UCP-2 and UCP-3 mRNA but not nonphosphorylating mitochondrial respiration in mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 277 (2), 380-389.

Ek. Etik Kurul Onay Belgesi



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 20-06-2013
 Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
 Araştırma Protokol no.su : 2013/A-57
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Türü : Sıçan
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Soyı : Wistar Albino veya Sprague-Dawley)
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 40 Adet
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 2-4 aylık/ 200-250 gr

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Süleyman SANDAL'ın yürütücüsü olduğu "Sıçanlarda İntraserebroventriküler Apelin-13 Uygulamasının Hipotalamus-Hipofiz-Tiroid Aksı Üzerine Etkisi" isimli 2013/A-57 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılar a ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ Başkan	Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ Üye	Doç. Dr. Abdurrahman KARAMAN Üye
Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ Üye	Yrd.Doç.Dr.Mehmet KARATAŞ Üye Katılmadı	Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN Üye Katılmadı
Salih AVCI Sivil Üye	Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU Sivil Üye	

ÖZGEÇMİŞ

15.04.1987 yılında Malatya’da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Malatya’da tamamladım. 2005 yılında başladığım Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2009 yılında mezun oldum. 2009 yılında başladığım Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimimi 2011 yılında tamamladım. Sonrasında 2011 yılında aynı enstitüde başladığım doktora eğitimimi 2014 yılında bitirdim. 2012 yılında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı’nda başladığım yüksek lisans eğitimimi 2015 yılında tamamlayarak mezun oldum.