

**T.C.**  
**FIRAT ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNSÜLİN DİRENCİ OLUŞTURULMUŞ FARELERDE**  
**BETATROPHİN HORMON SEVİYELERİNİN**  
**KARBONHİDRAT VE LİPİT METABOLİZMASINA**  
**ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**Funda BULUT ARIKAN**

**2017**

## ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Sinan CANPOLAT

Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Mustafa ULAŞ



Danışman

### Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

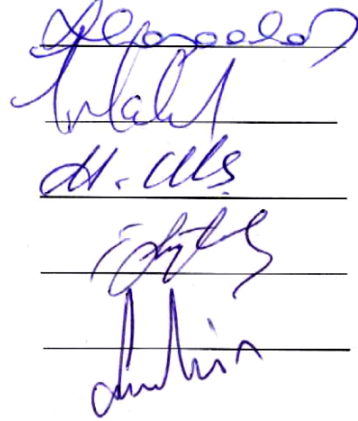
Prof. Dr. Sinan CANPOLAT

Prof. Dr. Süleyman SANDAL

Yrd. Doç. Dr. Mustafa ULAŞ

Yrd. Doç. Dr. İhsan SERHATLIOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Suat TEKİN



## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve bu tezin gerçekleştirilmesinde benden hiçbir konuda destek ve yardımlarını esirgemeyen, başta danışman hocalarım Yrd. Doç. Dr. Mustafa ULAŞ ve Prof. Dr. Hakan BOYUNAĞA olmak üzere çok kıymetli bütün hocalarıma,

Tezimin deneysel çalışmalarındaki değerli katkıları için Yasemin ÜSTÜNDAĞ'a ve Boğaziçi Üniversitesi deney hayvanları merkezi çalışanlarına,

Bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan, her zaman her konuda beni destekleyip, maddi ve manevi olarak yanımda olan bütün aileme,

Hayatıma anlam ve değer katan, tez çalışmalarım boyunca tüm zorlukları benimle birlikte göğüsleyen, hayatımın her evresinde bana destek olan, fedakâr eşim Volkan ARIKAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>BAŞLIK SAYFASI</b>	<b>i</b>
<b>ONAY SAYFASI</b>	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>iv</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b>	<b>vii</b>
<b>TABLolar LİSTESİ</b>	<b>viii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	<b>ix</b>
<b>1. ÖZET</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>3. GİRİŞ</b>	<b>5</b>
3.1. Betatrophin Hormonu	5
3.2. Metabolizma	8
3.2.1. Karbonhidrat Metabolizması	9
3.2.1.1. Glikoliz	11
3.2.1.1.1. Aerobik Glikoliz	12
3.2.1.1.2. Anaerobik Glikoliz	12
3.2.1.1.2.1. Laktat Dehidrogenaz Enzimi	13
3.2.1.2. Pentoz Fosfat Yolu	15
3.2.1.3. Oksidatif Dekarboksilasyon Reaksiyonu	15
3.2.1.4. Trikarboksilik Asit Döngüsü	15
3.2.1.4.1. Sitrat Sentaz Enzimi	18
3.2.1.5. Elektron Taşıma Sistemi	19
3.2.2. Lipit Metabolizması	21

3.2.2.1. Yağ Asidi Sentezi	24
3.2.2.1.1. Asetil KoA Karboksilaz Enzimi	27
3.3. İnsülin Hormon Biyosentezi, Salgılanması ve Glukoz Taşıyıcıları	28
3.3.1. İnsülin Hormon Biyosentezi	28
3.3.2. İnsülin Salgı Mekanizması	29
3.3.3. İnsülin Aktivasyonu	30
3.3.4. Glukoz Taşıyıcıları	32
3.4. İnsülinin Metabolik Etkileri	34
3.4.1. İnsülinin Karbonhidrat Metabolizması Üzerindeki Etkileri	34
3.4.2. Lipit Metabolizması Üzerindeki Etkileri	37
3.4.3. Protein Metabolizması Üzerine Etkileri	38
3.4.4. Mineral Metabolizması Üzerindeki Etkileri	39
3.5. İnsülin Direnci ve Mekanizmaları	40
3.6. Çalışmanın Amacı	46
<b>4. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>48</b>
4.1. Deney Hayvanları	48
4.2. Deney Hayvanlarında İnsülin Direnci Modeli Oluşturulması	48
4.3. Glukoz ve İnsülin Tolerans Testlerinin Yapılması	49
4.4. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması	49
4.5. Enzime Bağlı İmmunosorbent Analizlerinin (ELISA) Yapılması	50
4.5.1. Betatrophin Hormon Seviyelerinin ELISA ile Belirlenmesi	50
4.5.2. İnsülin Hormon Seviyelerinin ELISA ile Belirlenmesi	52
4.6. RT - PCR Analizlerinin Yapılması	54
4.6.1. Dokudan RNA İzolasyonu	54

4.6.2. Qubit ile RNA Miktarının Tayini	55
4.6.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	56
4.6.4. RT-PCR Analizi	57
4.7. Spektrofotometre Analizlerinin Yapılması	59
4.7.1. HDL ve LDL Seviyelerinin Tayini	59
4.7.2. Trigliserit Seviyesinin Tayini	59
4.7.3. Total Kolesterol Seviyesinin Tayini	60
4.8. İstatistiksel Analizler	60
<b>5. BULGULAR</b>	<b>62</b>
5.1. Glukoz ve İnsülin Tolerans Testlerinin Değerlendirilmesi	62
5.2. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi	66
5.3. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi	73
5.3.1. Betatrophin Gen Ekspresyonu	73
5.3.2. LDH5 Gen Ekspresyonu	74
5.3.3. Sitrat Sentaz Gen Ekspresyonu	74
5.3.4. ACC1 Gen Ekspresyonu	75
5.4. Hayvan Ağırlıklarındaki Değişimin Değerlendirilmesi	75
<b>6. TARTIŞMA</b>	<b>76</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>87</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>95</b>

## ŞEKİLLER LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b> Triglicerit Metabolizmasının Düzenlenmesinde Lipasin'in Rolü	7
<b>Şekil 2.</b> Karaciğer Parankim Hücresinde Temel Metabolik Yolaklar	19
<b>Şekil 3.</b> Lipitle İndüklenen İnsülin Direnci Mekanizmaları	45
<b>Şekil 4.</b> 22 Haftalık Farelerde İnsülin AUC Değişim Grafiği	62
<b>Şekil 5.</b> 22 Haftalık Farelerde Glukoz AUC Değişim Grafiği	63
<b>Şekil 6.</b> 8 Haftalık Farelerde Glukoz AUC Değişim Grafiği	64
<b>Şekil 7.</b> 8 Haftalık Farelerde İnsülin AUC Değişim Grafiği	64
<b>Şekil 8.</b> Glukoz Tolerans Testi Eğrisi	65
<b>Şekil 9.</b> İnsülin Tolerans Testi Eğrisi	65
<b>Şekil 10.</b> 8 Haftalık Farelerde Kan Glukoz Düzeyleri	66
<b>Şekil 11.</b> Serum İnsülin Düzeyleri	67
<b>Şekil 12.</b> Serum Betatrophin Seviyeleri	67
<b>Şekil 13.</b> Serum Lipit Seviyeleri	68
<b>Şekil 14 a.</b> Serum Triglicerit ile Betatrophin Gen Ekspresyonu Arasındaki Korelasyon Eğrisi	71
<b>Şekil 14 b.</b> Serum Betatrophin ile Triglicerit Arasındaki Korelasyon Eğrisi	71
<b>Şekil 15.</b> Betatrophin Gen Ekspresyon Grafiği	73
<b>Şekil 16.</b> LDH5 Gen Ekspresyon Grafiği	74
<b>Şekil 17.</b> Sitrat Sentaz Gen Ekspresyon Grafiği	74
<b>Şekil 18.</b> ACC1 Gen Ekspresyon Grafiği	75

## TABLÖLAR LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Çalışılan Genler ve Üretici Firma Kodları	58
<b>Tablo 2.</b> 8 Haftalık Kontrol ve Deney Gruplarında Biyokimyasal Parametrelerin Karşılaştırılması	69
<b>Tablo 3.</b> 8 Haftalık Kontrol ve Deney Gruplarında Betatrophin Gen Ekspresyonu Temel Alınarak Belirlenen Korelasyon Analizi Sonuçları	70
<b>Tablo 4.</b> 8 Haftalık Deney ve Kontrol Gruplarında Betatrophin Serum Seviyesi Temel Alınarak Belirlenen Korelasyon Analizi Sonuçları	72

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b><math>\alpha</math></b>	: Alfa
<b>ACC</b>	: Asetil KoA karboksilaz
<b>ANGPTL8</b>	: Anjiyopietin benzeri protein 8
<b>APS</b>	: Pleckstrin homoloji ve Src homoloji 2 bölgelerine sahip etki adaptör proteini
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b><math>\beta</math></b>	: Beta
<b>CAP</b>	: Cbl-ilişkili protein
<b>Cbl</b>	: Casitas blineage lenfoma gen proteini
<b>cDNA</b>	: Komplementer DNA
<b>dl</b>	: Desilitre
<b>DNA</b>	: Deoksiribonukleik asit
<b>ER</b>	: Endoplazmik retikulum
<b>ERK</b>	: Hücre dışı düzenleyici kinaz
<b>ETS</b>	: Elektron taşıma sistemi
<b>FADH</b>	: Flavin adenine dinukleotid
<b>FFA</b>	: Serbest yağ asidi
<b>Gab-1</b>	: Grb2 bağlayıcı protein 1
<b>GLUT</b>	: Glukoz taşıyıcı
<b>GPIHBP1</b>	: Glukozil fosfotidilinositol bağlı yüksek dansiteli lipoprotein bağlayıcı protein 1
<b>Grb2</b>	: Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2
<b>HDL</b>	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
<b>HSPG</b>	: Heparan sülfat proteoglikan
<b>IDL</b>	: Ara yoğunluklu lipoprotein
<b>IL1</b>	: İnterlökin 1

<b>IL-6</b>	: İnterlökin 6
<b>IRS</b>	: İnsülin reseptör substratı
<b>LDH</b>	: Laktat dehidrogenaz enzimi
<b>LDL</b>	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
<b>LIRKO</b>	: Karaciğer insülin reseptörü knockout fare
<b>LPL</b>	: Lipoprotein lipaz
<b>mg</b>	: Milligram
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>NADH</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotid
<b>NF-Kb</b>	: Nükleer faktör kappa B
<b>PI3</b>	: Fosfatidilinositol 3
<b>RIFL</b>	: Karaciğer ve yağda beslenmeyle indüklenen faktör
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>RT-PCR</b>	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
<b>SGLT</b>	: Sodyum-bağımlı glukoz taşıyıcısı
<b>SH2</b>	: Src homolog 2
<b>SIRP</b>	: Sinyal düzenleyici protein
<b>T2DM</b>	: Tip 2 diabetes mellitus
<b>TCA</b>	: Trikarboksilik asit siklusu
<b>TNF-α</b>	: Tümör nekrozis faktör alfa
<b>UPR</b>	: Katlanmamış protein yanıtı
<b>VLDL</b>	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

## 1. ÖZET

Betatrophin (ANGPTL8), karaciğer ve adipoz dokuda üretilen yeni tanımlanmış bir hormon olup, karbonhidrat ve lipit metabolizması üzerindeki etki ve ilişkisi henüz açıklığa kavuşmamıştır. Bu nedenle yapılan bu çalışmada betatrophin hormonunun karbonhidrat ve lipit metabolizması üzerindeki etki ve ilişkisinin ilk defa metabolik yollardaki kilit enzimler kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada 8 ve 22 haftalık C57BL6/J cinsi toplam 40 tane erkek fare kullanılmıştır. 8 ve 22 haftalık farelerden her grupta 10 tane denek olacak şekilde, 2 adet deney ve 2 adet kontrol grubu oluşturulmuştur. Deney gruplarına S961 insülin reseptör antagonisti ozmotik pompa ile subkutan olarak verilmiştir. Kontrol gruplarına ise aynı şekilde fosfat buffer salin verilmiştir. Uygulama sonunda tüm farelere glukoz ve insülin tolerans testleri yapılmıştır. Sekiz haftalık deney grubunda insülin direnci oluşmasına rağmen, 22 haftalık farelerde insülin direnci oluşmadığı tespit edilmiştir. Testler sonrasında 8 haftalık farelerden kan ve karaciğer doku örnekleri genel anestezi altında alınmıştır. Alınan kanlardan elde edilen serumlar kullanılarak, enzime bağlı immunosorbent analiz (ELISA) ve spektrofotometre yöntemleriyle serum betatrophin, açlık glukoz, tokluk glukoz, insülin, trigliserit, total kolesterol, HDL ve LDL kolesterol gibi biyokimyasal parametreler değerlendirilmiştir. Alınan dokular kullanılarak yapılan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile; betatrophin, laktat dehidrogenaz 5 (LDH5), sitrat sentaz ve asetil Koa karboksilaz 1 (ACC1) enzimlerinin karaciğerden ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir.

Çalışma sonucunda, 8 haftalık deney grubunda betatrophin ekspresyon, serum betatrophin, açlık ve tokluk glukoz, insülin, total kolesterol ve trigliserit seviyelerinde istatistiksel olarak önemli derecede artış görülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sitrat sentaz ekspresyonunun deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiştir. Betatrophin hormonunun ekspresyon ve serum seviyeleri ile serum trigliserit düzeyleri arasında yüksek korelasyon tespit edilirken, betatrophin ekspresyon düzeyleri ile LDH5, ACC1 ve sitrat sentaz ekspresyon düzeyleri arasında bir korelasyon görülmemiştir.

Sonuç olarak; betatrophin hormon seviyelerinin trigliserit metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynayabileceği belirlenmiştir. Betatrophin hormonunun karbonhidrat ve lipit metabolizmalarını, önemli kilit enzimler olan ACC1, LDH5 ve sitrat sentaz enzimleri aracılığıyla düzenlemediği sonucuna varılabilir. Ancak daha fazla çalışmanın bu sonuçları desteklemesine ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca bu çalışma ile betatrophin hormon seviyelerinin aerobik ve anaerobik solunum yollarıyla olan ilişkisi hakkında bir ön bilgi elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Betatrophin, Metabolizma, Karbonhidrat, Lipit.

## 2. ABSTRACT

### **INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF BETATROPHIN HORMONE LEVELS ON CARBOHYDRATE AND LIPID METABOLISM IN MICE WITH INDUCED INSULIN RESISTANCE**

Betatrophin (ANGPTL8) is a recently identified hormone that is produced in the liver and adipose tissue and its effects and association with carbohydrate and lipid metabolisms are yet undefined. Therefore the aim of this study was to investigate the effects and relationship of this hormone with carbohydrate and lipid metabolisms by using key enzymes in the metabolic pathways for the first time.

Forty C57BL6/J type male mice that were 8 and 22 weeks old were used in the study. For each age group, 2 experimental and 2 healthy groups each including 10 test subjects were formed. In the experimental groups, S961 as an insulin antagonist was administrated subcutaneously via osmotic pump while control groups received phosphate buffered saline using the same technique. Insulin tolerance tests were performed subsequently. Although insulin resistance was detected in the 8 week old experimental group, no resistance was observed in the 22 week old group. Following the tests, blood and liver tissue samples were collected in the 8 week old group under general anesthesia. Serum samples that were obtained from collected blood were used for enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and spectrophotometer tests to identify biochemical parameters such as serum betatrophin, fasting blood glucose, postprandial blood glucose, insulin, triglyceride, total cholesterol, HDL and LDL cholesterol. With the real time polymerase chain reaction (RT-PCR) that was performed using tissue

samples, hepatic expression levels of betatrophin, lactate dehydrogenase 5 (LDH5), citrate synthase and acetyl CoA carboxylase 1 (ACC1) were identified.

Statistically significant increases were observed in the betatrophin expression, serum betatrophin, fasting and postprandial blood glucose, total cholesterol and triglyceride levels in the 8 week old experimental group. When compared to control group, citrate synthase levels were significantly lower in the experimental group. High correlation was found between betatrophin hormone expression and serum levels and serum triglyceride levels however there was no statistically significant relationship between fasting blood glucose, postprandial blood glucose, insulin, total cholesterol, HDL, LDL cholesterol. No correlations were observed between betatrophin expression levels and LDH5, ACC1 and citrate synthase enzyme expressions.

It was concluded that betatrophin hormone levels may have an important role in the regulation of triglyceride metabolism. Also it may be inferred that betatrophin hormone does not regulate carbohydrate and lipid metabolisms via ACC1, LDH5 and citrate synthase. However further studies are needed to support this conclusion. Additionally, a foreknowledge was obtained regarding the relationship between betatrophin hormone levels and aerobic and anaerobic respiration pathways with this study.

**Key Words:** Betatrophin, Metabolism, Carbohydrate, Lipid.

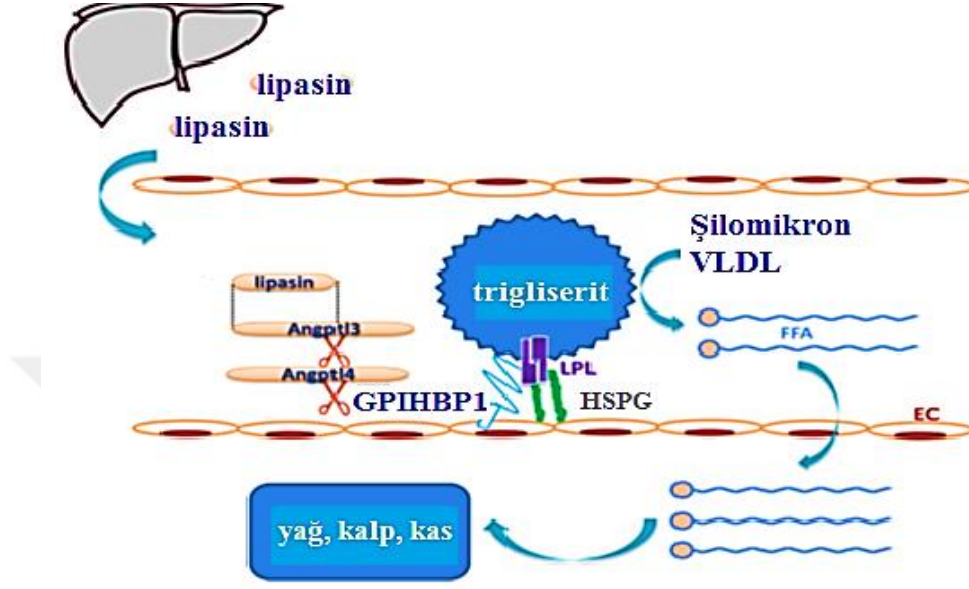
### 3. GİRİŞ

#### 3.1. Betatrophin Hormonu

Beta hücreleri; yetişkin insan ve ratlarda, embriyonik ve neonatal aşamalarda hızlı bir artış gösterirken, bu dönemlerin ardından son derece düşük bir oranda çoğalmaktadır (1-3). Bununla birlikte, pankreatik beta hücreleri; gebelik gibi fizyolojik durumlar ile yüksek kan şekeri, insülin direnci ve pankreatik hasar gibi bazı koşullara cevaben replikasyon oranını artırmaktadırlar (2-5). Ayrıca çeşitli hormon (glukagon benzeri peptid-1 gibi) ve faktörlerin (siklin D2 ve çeşitli transkripsiyon faktörleri gibi) beta hücre profilerasyonunda etkili olduğu belirtilmektedir (6-8). El Ouaamari ve arkadaşları ise transplantasyon ve in vitro hücre kültürü tekniklerini kullanarak humoral özellik gösteren ve hücre otonom faktörü özelliği olmayan bir maddenin, karaciğer insülin reseptörü inaktive (LIRKO) farelerde beta hücresi çoğalmasımı uyardığını göstermişlerdir. Ayrıca, bir hepatosit türevi faktör ya da faktörlerin fare ve insan beta hücre çoğalmasımı uyardığını yapılan deneylerde ortaya koymuşlardır (9). Başka bir çalışmada ise hücre dışı düzenleyici kinaz (ERK)'in hepatik aktivasyon sinyalinin pankreas beta hücresi çoğalmasımı sağladığı rapor edilmiştir (10). Harvard Üniversitesinden Yi ve arkadaşları ise insülin reseptör antagonisti S961 kullanarak insülin direnci oluşturdukları fare modelinde, metabolik regülasyonda rol alan (karaciğer, yağ dokusu ve iskelet kası) dokularda yaptıkları mikroarray analizleri sonucunda "Betatrophin" olarak adlandırdıkları bir geni ortaya koymuşlardır. Betatrophin ekspresyonunun S961'e cevaben en fazla karaciğer ve yağ dokusunda arttığını, iskelet kası ve pankreatik beta hücrelerinde ise artış

olmadığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca betatrophinin insan plazmasında da mevcut olduğunu belirtmişlerdir (5). Bazı araştırmacılar Yi ve arkadaşlarının betatrophin olarak adlandırdığı bu faktörü daha önce farklı isimlerle tanımlamışlardır. Bu faktöre lipasin, karaciğer ve yağda beslenmeyle indüklenen faktör (RIFL) ve ANGPTL8 (anjyopietin benzeri protein 8) gibi isimler vermişlerdir (11-13). Betatrophin hormonunun resmi sembolü insan için C19ORF80 ve fare için ise Gm6484 olarak tanımlanmıştır (14). Ren ve arkadaşları Gm6484'ü RIFL olarak tanımlamışlardır ve RIFL null fareler kullanılarak RIFL'in en fazla adiposit farklılaşması sırasında uyarıldığını, lipid metabolizmasının önemli bir yeni düzenleyicisi olduğunu belirtmişlerdir (12). İnsülin ve soğuk ortamın ise adipoz dokuda RIFL artışını sağladığını, lipolizisi stimüle eden ajanların ise RIFL'in azalmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Beslenme sonrası ise karaciğer ve adipoz dokuda RIFL miktarının arttığını rapor etmişlerdir (12,15,16). Quagliarini ve arkadaşları ise Gm6484'ü ANGPTL8 olarak tanımlamışlardır ve ANGPTL8'in lipoprotein lipaz (LPL) enzimini inhibe ettiğini, plazma trigliserit seviyesini düzenlediğini ve bu nedenle beslenme sonrası yağ asitlerinin adipoz dokuya trafiğinde anahtar rol oynadığını rapor etmişlerdir. Bununla beraber ANGPTL8'in anjyopietin-benzeri protein 3 (ANGPTL3) ile etkileşime girerek ANGPTL3'ün parçalanmasını sağladığını ve ANGPTL8 inhibisyonunun plazma lipoprotein seviyelerini azaltmak için yeni bir terapötik strateji sağlayabileceğini belirtmişlerdir (11). ANGPTL3; ANGPTL8 gibi anjyopietin benzeri protein ailesinin bir üyesi olup, LPL'yi geri dönüşümlü inhibe ederek lipid metabolizmasında görev almaktadır. N terminal bölgesi serum trigliserit seviyesinin düzenlenmesinde önemli role sahiptir. ANGPTL4'de benzer bir

yapıya sahiptir ve LPL'yi geri dönüşümsüz inhibe ederek lipit metabolizmasının düzenlenmesinde yer almaktadır (17).



**Şekil 1.** Triglicerit Metabolizmasının Düzenlenmesinde Lipasin'in Rolü. Bu şekil Zhang ve Abou-Samra tarafından yayınlanmış olan orijinal makaleden alınmıştır (18). Orijinal makale kullanımına, dağıtımına ve çoğaltılmasına izin veren Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>) şartları altındaki açık erişim bir makedir.

Zhang ve arkadaşları da benzer şekilde karaciğerden salgılanan ANGPTL8 (Lipasin)'in dolaşım sistemine geçerek ANGPTL3 üzerinden LPL enzimini inhibe edip, triglicerit metabolizmasını düzenlediğini belirtmişlerdir (13,18).

Dimer durumunda iken aktif olan LPL enzimi kapiler endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan heparan sülfat proteoglikan (HSPG) ve glukozil fosfotidilinositol bağlı yüksek dansiteli lipoprotein bağlayıcı protein 1 (GPIHBP1)'e bağlanır. Bağlanma sonrası şilomikron ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL)'nin yapısında bulunan trigliceritleri hidroliz ederek, serbest yağ asitlerinin (FFA) açığa çıkmasını sağlar. Açığa çıkan FFA'lar kas, adipoz ve

kalp gibi periferik dokular tarafından alınır. ANGPTL3 ve ANGPTL4'ün her ikisi de LPL'nin dimer yapısını bozarak, LPL'yi inhibe edebilmektedir. Bu inhibisyon için ANGPTL3 ve ANGPTL4'ün fonksiyonel N terminallerinin ayrıştırılarak serbest kalması gerekmektedir (Şekil 1). Lipasin büyük olasılıkla ANGPTL3 ayrışmasını doğrudan veya dolaylı olarak gerçekleştirip, LPL'yi inhibe etmektedir (11,18).

Yapılan çalışmalarda betatrophin hormonunun lipit ve karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynayabileceği rapor edilmiştir. Bu nedenle betatrophinin, diyabet ve metabolik sendrom gibi hastalıklar için gelecekte hedeflenen olası tedavilere yeni kapılar açarak, patofizyolojilerinin aydınlatılmasına katkıda bulunabileceği belirtilmektedir (16,18,19).

### **3.2. Metabolizma**

Metabolizma; organizmadaki kimyasal bileşiklerin birbirlerine dönüşümlerini, belirli moleküller tarafından oluşturulan yolları ve bu yollar üzerinde metabolitlerin akışını düzenleyen mekanizmaları tanımlamak için kullanılan bir terimdir (20).

Metabolizma; anabolizma ve katabolizma reaksiyonlarından meydana gelmektedir. Katabolizma metabolizmanın yıkım reaksiyonlarını oluşturmaktadır. Katabolik reaksiyonlarla karbonhidrat, yağ ve protein gibi organik moleküller daha küçük molekülü olan, karbondioksit, laktik asit vb. son ürünlerine kadar yıkılmaktadır. Bu yıkım reaksiyonları sonucu enerji açığa çıkmaktadır (21,22). Açığa çıkan enerjinin bir kısmı adenzin trifosfat (ATP) şeklinde korunurken bir kısmı; nikotinamid adenin dinükleotid (NADH), nikotinamid adenin dinükleotit

fosfat (NADPH) ve flavin adenine dinukleotid (FADH) gibi elektron taşıyıcılarına indirgenmekte geri kalan ise ısı olarak serbest kalmaktadır (23,24).

Anabolizma ise küçük öncül moleküllerden daha büyük ve daha kompleks moleküllerin sentezlendiği biyosentez reaksiyonları olup, katabolik reaksiyonların aksine anabolik reaksiyonlar için enerji gerekmektedir. Gerekli enerji ATP'nin fosforil grubunun transfer edilmesi ve NADH, NADPH ve FADH<sub>2</sub>'ın indirgenmesiyle elde edilmektedir (21,23,24). Tüm canlılar, hücresel fonksiyonlarını sürdürüp, hayatta kalabilmek için ATP'den sağlanan sürekli bir enerjiye ihtiyaç duymaktadırlar. Canlılar için gerekli olan enerji katabolik reaksiyonlardan elde edilmektedir. Öncelikle diyetle alınan karbonhidrat, protein ve lipitler sindirime uğrayarak katabolik reaksiyonlarla monomerlerine çevrilmektedirler. Bu monomerler daha sonra ortak metabolik ürün olan asetil koenzim A'ya (asetil KoA) dönüştürülüp, trikarboksilik asit (TCA) siklusu, elektron taşıma sistemi ve oksidatif fosforilasyonla ATP elde edilmektedir (10,20,22).

### **3.2.1. Karbonhidrat Metabolizması**

Karbonhidratlar metabolizmada en merkezi rol oynayan organik moleküllerdir. Birçok organizma için diyetteki kalorinin önemli bir kısmını oluşturma, hücre zarının yapısına katılarak hücreler arası iletişime aracılık etme, plazma membranının dış yüzeyinde bulunan glikokaliksin yapısına katılma gibi birçok işlevleri bulunmaktadır (20,22,25). Bütün bu işlevlerinin yanı sıra özellikle katabolik reaksiyonlar aracılığı ile hızlı ATP elde edilmesinde kullanılmaktadırlar. Karbonhidrat katabolizması, karbonhidratların sindirimi ile başlamaktadır ve sindirim sonucu oluşan monosakkaritlerin enterositler tarafından absorpsiyonu bu

süreci takip etmektedir. Monosakkaritler, aerobik ve anaerobik solunum yolları olan glikoliz, TCA döngüsü ve elektron taşıma sistemi yoluyla hücrelere ATP sağlamaktadırlar. Toklukta ise iskelet kası ve karaciğer hücreleri monosakaritleri glikojen şeklinde depo etmektedir (26,27). Ayrıca karaciğer ve yağ dokusu toklukta monosakkaritleri kullanarak yağ asitlerini sentezlemektedirler (23).

Metabolizmada birçok karbonhidrat çeşidi bulunmaktadır. Bunların en önemlilerinden biri glukozdur çünkü memelilerin temel metabolik yakıtı ve fetusun ana enerji kaynağı olarak işlev görmektedir (20). Bununla beraber iskelet kası ve karaciğerde depolanan glikojen, nükleik asitlerin yapısına katılan riboz ve deoksiriboz, süt karbonhidratı olan laktozu oluşturan galaktoz, glikolipidler, proteinlerle birleşerek glikoproteinler ve proteoglikanları oluşturan diğer bütün karbonhidratların sentezi için glukoz öncü moleküldür. Bununla beraber glukoz ve glukoz ara ürünleri birçok metabolik süreçte rol almaktadırlar. Örneğin piruvat ve TCA döngüsü ara ürünleri amino asitlerin sentezi için karbon iskeleti sağlarken, asetil KoA yağ asitleri ve kolesterol sentezinde öncül moleküldür (20,28).

Hücrelerin ana metabolik yakıtı olan glukozdan enerji elde etmek için oksidatif ve oksidatif olmayan yollar kullanılmaktadır. Bu yollar başlıca sitozolde meydana gelen glikoliz ve pentoz fosfat yolu ile mitokondride meydana gelen oksidatif dekarboksilasyon reaksiyonu, TCA siklusu ve elektron taşıma sistemi (ETS) dir (10,26,29). Oksidatif dekarboksilasyon reaksiyonu; glikoliz ile TCA siklusu ve ETS arasında bağlayıcı bir reaksiyon oluşturmaktadır (26).

Yukarıda bahsedildiği gibi glukozun sitozolde parçalanması iki ana yolak üzerinden olmaktadır. Bunlardan glikoliz sonucunda NADH ve adenzin trifosfat

(ATP) üretilmektedir. Pentoz fosfat yoluyla ise nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve riboz 5-fosfat üretilmektedir (29).

### **3.2.1.1. Glikoliz**

Bütün dokularda meydana gelen ve bütün hücrelerin sitoplazmalarında gerçekleşen, glukozun enerji (ATP) ve diğer metabolik yolların ara ürünlerini sağlamak için yıkıldığı yolağa glikoliz (glikolitik yol) denir (25). Glikoliz, oksijen ve ETS'nin varlığına bağlı olarak hem oksijen varlığında (aerobik) hem de oksijen yokluğunda (anaerobik) gerçekleşebilen eşsiz bir reaksiyondur (20). Glukozun kullanımı için temel yolak olan glikoliz sonucunda glukoz, laktat ve piruvata kadar parçalanmaktadır (22,27,28). Üretilen piruvatın akıbeti ise hücrelerin ihtiyaçları ve kapasiteleri tarafından belirlenmektedir. Ortam anaerobik veya mitokondri yoksa pirüvat laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi ile laktata çevrilir. Ortam aerobik ise pirüvat mitokondriye geçerek asetil KoA'ya dönüştürülüp, aerobik ortamda TCA döngüsüyle tamamen okside edilmektedir (22,23). Yağ asitlerine ihtiyaç varsa, üretilen pirüvat karaciğer ve adipoz dokularında yağ asitlerinin biyosentezi için öncü molekül olarak kullanılmaktadır. Bunlarla beraber glikoliz ile nükleotidlerin sentezinde kullanılan amino asitler ve riboz fosfat gibi moleküllerin sentezi için öncü moleküller de sağlanmaktadır (20,22).

Glikoliz; tüm dokulardan farklı olarak nöronal dokular ve mitokondrisi olmayan eritrositlerin enerji elde etmek için kullandıkları temel yolaktır (20,28). Bu yolak başlıca heksokinaz, fosfofruktokinaz ve pirüvat kinaz enzimleri tarafından kontrol edilmekte olup, aerobik ve aneorobik glikoliz olmak üzere başlıca iki grupta incelenebilmektedir (20,25).

### **3.2.1.1.1. Aerobik Glikoliz**

Aerobik glikoliz, piruvatın TCA döngüsünün ana yakıtı olan asetil KoA'ya oksidatif dekarboksilasyonu için hazırlandığı aşamadır. Mitokondrisi olan ve yeterli miktarda oksijen bulunan hücrelerde meydana gelir ve son ürünü pirüvattır. ATP'nin doğrudan tüketimi ve oluşumu anaerobik glikolizde olduğu gibi her bir glukoz molekülü başına net iki ATP'dir. Ancak bir molekül NADH'ın kullanıldığı anaerobik glikolizden farklı olarak her bir glukoz molekülü başına iki molekül NADH üretilmektedir (22,23,25).

### **3.2.1.1.2. Anaerobik Glikoliz**

Anaerobik glikoliz, oksijenin mutlak veya kısmen olmadığı koşullarda (örneğin egzersiz sırasında kaslarda) ve piruvatın daha sonraki oksidasyon aşamaları için gerekli metabolik mekanizmanın bulunmadığı (mitokondrileri olmayan eritrositler gibi) hücrelerde meydana gelmektedir (20,28).

Anaerobik glikolizde, glukoz piruvata kadar parçalanır ve oluşan pirüvat bir molekül redükte NADH molekülü kullanılarak LDH tarafından laktata çevrilir. Laktat daha sonra tekrar glikoliz yolağında kullanılmak üzere glukoneogenez ve glukoz üretimi için karaciğere gönderilir (26). Anaerobik glikoliz sonucunda iki molekül laktata çevrilen her bir glukoz molekülü için iki ATP molekülü elde edilmektedir (25,30). Anaerobik glikoliz yapan hücrelerden salınan laktat başlıca karaciğer, kalp ve iskelet kası gibi dokular tarafından alınıp, geri piruvata okside edilmektedir. Karaciğerde piruvat glukoz sentezi için kullanılır ve sentezlenen glukoz tekrar kana verilir. Periferik dokular ve karaciğer arasındaki bu laktat ve glukoz döngüsüne Cori döngüsü denmektedir.

Bu döngü sonucunda periferik dokular tarafından açığa çıkan laktat karaciğerde tekrar glukozaya çevrilmiş olur. Örneğin eritrositlerden ve egzersiz sırasında iskelet kaslarından kana laktat salınmaktadır. Beyinde ise glial hücreler ve astrositler tarafından üretilen laktat ya nöronlar tarafından kullanılır ya da kana salınır. Büyük mitokondriyal içeriğe ve oksidatif kapasiteye sahip olan kalp için ise diğer dokular tarafından salınan laktat bir yakıt olarak kullanılabilir (22,29). Beyin, böbrek medullası, gastrointestinal sistem, retina ve deri gibi dokular çoğunlukla enerjilerini glikolizden elde ettikleri için laktat üretimine yol açmaktadırlar. Karaciğer, böbrekler ve kalp ise hipoksik koşullarda genellikle laktatı okside ederek enerji üretmek zorunda kalırlar (20). Laktat üretimi ağır egzersiz, septik şok, karaciğer hastalıkları, astım, kalp krizi ve birçok kanser türünde artmaktadır (20,29,31). Kanser ve diabetes mellitus gibi yaygın hastalıkların değişikliğe uğramış laktat metabolizması ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (32-34).

Laktat metabolizması, metabolik yolları laktik asidozla sonuçlanan birçok durumu, iskelet kası fizyolojisini ve fiziksel egzersize karşı cevabı anlamak için oldukça önemlidir. Ayrıca hücre zarları boyunca laktat geçişini sağlayan monokarboksilat taşıyıcıları ise immün cevabın potansiyel düzenleyicileri ve kanser tanı ve tedavisi için potansiyel hedefler olarak araştırılmaktadırlar (29,35,36).

#### **3.2.1.1.2.1. Laktat Dehidrogenaz Enzimi**

LDH enzimi anaerobik glikoliz için önemli bir kontrol noktasını oluşturmaktadır ve anaerobik glikoliz için yürütülmesi için büyük öneme sahiptir (35,37). LDH'nin başlıca görevi redükte NADH molekülünü kofaktör olarak

kullanıp, pirüvatı laktata geri dönüşümlü olarak dönüştürmektir. Bu işlemin gerçekleşmesi için enzimde NAD<sup>+</sup> bağlayıcı N-terminal bölgesi ve piruvatı bağlayan C-terminal bölgesi olmak üzere iki bağlayıcı bölge bulunmaktadır (20). LDH farklı enzimatik aktivite ve bileşime sahip 5 izoenzimden oluşmaktadır. Tüm LDH izozimleri dört polipeptit zincirinden (molekül ağırlığı; 33.500) oluşan tetramerik bir yapıya sahiptirler. Her tip (her izoenzim) farklı oranlarda iki çeşit polipeptitten (alt üniteden) oluşmaktadır. Bunlar iskelet kasında baskın olarak bulunan A (M) ve kalp kasında baskın olarak bulunan B (H) temel alt üniteleridir. Bu altünitelerin farklı oranlarda birleşmesiyle A4 (LDH5), A3B1 (LDH4), A2B2 (LDH3), A1B3 (LDH2), ve B4 (LDH1) olmak üzere beş izoenzimden oluşmaktadır (24,37-39). Bu izoenzimlerin buldukları dokular farklılık göstermektedir. LDH1 ve LDH2 kalp ve eritrositlerde baskın olarak bulunurken, LDH3 beyin ve böbreklerde, LDH4 ve LDH5 ise karaciğer ve iskelet kasında baskın olarak bulunmaktadır (24,33,38). Bu farklılıktan dolayı doku yaralanmalarında LDH izozimlerinin karakteristik örnekleri ortaya çıkmaktadır ve bu durum klinik açıdan önemlidir. Örneğin kalp krizlerinde LDH1 biyolojik marker olarak kullanılmaktadır (20).

İnsülin sekresyonu, glukoz metabolizması ve kanser patofizyolojisinde ise LDH5'in rol oynadığına dair önemli çalışmalar bulunmaktadır (40,41). Karsinomatozis, akciğer kanseri, granülositik lösemi, akut lösemi, mesane kanseri, böbrek nekrozu ve kas hastalıkları gibi bazı hastalıklarda serum LDH5 seviyeleri artmaktadır (35,37,39).

### **3.2.1.2. Pentoz Fosfat Yolu**

Sitoplazmada gerçekleşen pentoz fosfat yolu ile glukozdan NADPH ve riboz 5-fosfat üretilmektedir. Üretilen NADPH, yağ asitlerinin ve steroidlerin sentezi için kullanılmaktadır. NADPH, hücrelerin oksidatif hasardan korunması için indirgenmiş glutatyonun elde edilmesinde gerekli olan bir moleküldür. Riboz 5-fosfat ise ribonükleik asit (RNA) ve deoksiribonükleik asit (DNA) gibi nükleotidlerin sentezinde kullanılan bir pentozdur (23,29).

### **3.2.1.3. Oksidatif Dekarboksilasyon Reaksiyonu**

Bu reaksiyon, piruvat dekarboksilasyonu olarak da isimlendirilmekte olup, özellikle kardiyak kası gibi yüksek oksidatif kapasiteli dokular için oldukça önem taşıyan, glikoliz ve Krebs döngüsü arasındaki bağlayıcı bir reaksiyondur. Piruvat dekarboksilasyonu piruvat dehidrogenaz kompleksi (PDC) tarafından katalize edilmektedir (25,26).

PDC'de piruvat dehidrogenaz, dihidrolipol transasetilaz ve dihidrolipol dehidrogenaz olmak üzere başlıca üç enzim görev almaktadır. Bu yolakta PDC glikolizin son ürünü olan piruvatı geri dönüşümsüz olarak asetil KoA'ya çevirmektedir. PDC piruvatın karboksil grubunu bir molekül CO<sub>2</sub> olarak çıkartarak, geriye kalan iki karbonla asetil KoA'nın asetil grubunu oluşturmaktadır. Asetil KoA, yağ asidi sentezi için yapı taşı ve TCA siklusunun temel yakıtı olduğu için önemli bir moleküldür (20,24-26).

### **3.2.1.4. Trikarboksilik Asit Döngüsü**

Bu döngü trikarboksilik asit döngüsü (TCA döngüsü) veya Krebs döngüsü olarak da isimlendirilmektedir. TCA döngüsü için gerekli olan enzimler

mitokondri matriksinde bulunduğundan dolayı döngünün reaksiyonları mitokondri matriksinde gerçekleşmektedir (28,42). Ayrıca mitokondride yağ asitlerinin ve bazı amino asitlerin TCA döngüsünün ara ürünleri olan asetil KoA'ya, oksaloasetata, süksinil KoA ve alfa ketoglutarata oksidasyonu için de enzimler bulunmaktadır (24).

TCA döngüsü karbonhidratlar, proteinler ve yağların katabolizmalarının son ortak yolu olan aerobik bir reaksiyondur. Oksijen son elektron tutucusu olarak görev aldığı için aerobik özellik taşımaktadır (25,27,42). Bu döngü piruvatın PDC tarafından oksidatif dekarboksilasyonundan, yağ asitlerinin beta oksidasyonundan ve belirli amino asitlerin oksidasyonundan elde edilen iki karbonlu asetil KoA üzerinden yürütülmektedir (20,42). Asetil KoA'nın karbondioksit ve suya kadar okside edilmesiyle ATP açığa çıkmaktadır. Sitrat sentaz enzimi tarafından asetil KoA'nın asetil grubu ile dört karbonlu oksaloasetik asidin (OAA) birleşmesi sağlanarak altı karbonlu sitratın oluşturulması TCA döngüsünün ilk reaksiyonunu oluşturmaktadır. Aşama aşama gerçekleşen dehidrogenasyon ve iki molekül karbondioksitin kaybı ile sitrat tekrar OAA'a dönüşerek ve asetil-KoA'dan başka bir asetil grubu alınarak döngü yeniden başlamaktadır (28,43). Bu döngünün sekiz basamağının dördü oksidasyon basamağıdır. Oksidasyon sonucu açığa çıkan enerji çok etkin bir şekilde indirgenmiş koenzimler olan elektron taşıyıcı NADH ve FADH<sub>2</sub> tarafından geçici olarak tutulmaktadır. Bir sonraki basamak olan ETS basamaklarında ise NADH ve FADH<sub>2</sub>'ler tarafından tutulan bu elektronlar oksijene transfer edilecektir ve bu transfer sırasında açığa çıkan elektron akışı enerjisi ATP olarak tutulacaktır (24,27,44). Her bir TCA döngüsünde iki karbonlu asetil grubunun iki CO<sub>2</sub> molekülüne oksidasyonu sonucu üç NADH, bir FADH<sub>2</sub>

ve bir guanozin trifosfat (GTP) üretilmektedir. TCA döngüsü ve oksidatif fosforilasyondan elde edilen net enerji miktarı ise okside edilen her asetil grubu için yaklaşık 10 (on) yüksek enerjili fosfat bağı olarak belirtilmektedir. Bir sonraki aşama olan ETS'de NADH ve FADH<sub>2</sub> tekrar okside edilerek her NADH molekülünden 2.5 ATP, her FADH<sub>2</sub> molekülünden ise 1.5 ATP elde edilecektir. Birçok reaksiyondan oluşan bu döngü sitrat sentaz, izositrat ve  $\alpha$  ketoglutarat dehidrogenaz enzimleri tarafından kontrol edilmektedir (22,25).

TCA döngüsünde asetil KoA'nın oksidasyonundan elde edilen enerjinin NADH ve FADH<sub>2</sub> olarak saklanması hemen hemen tüm dokularda ATP üretimi için gereklidir (22). TCA döngüsü enerji eldesinde merkezi rol oynasa da, bu rol enerji tutumu ile sınırlı değildir. Çünkü TCA döngüsünde katabolik ve anabolik süreçler birlikte yer aldığı için amfibolik özellik taşımaktadır. Amfibolik özelliği sayesinde ise sadece karbonhidrat, yağ asitleri ve amino asitlerden elde edilen iki karbonlu metabolik ürünlerin oksidasyonu için işlev gören bir yolak olmaktan çıkmaktadır. TCA döngüsünde birçok biyosentetik yolak için öncü moleküller sağlanmakta olup, amino asitlerin deaminasyon ve transaminasyonundan kaynaklanan metabolitlerin birbirine dönüşümü, açlık durumunda karaciğerde glikoneogenez, toklukta ise yağ asidi sentezi ve transaminasyon ile amino asit sentezi için substratlar (döngü ara ürünlerinden elde edilen karbon iskeletleri) sağlanmaktadır (20,24,42,45).

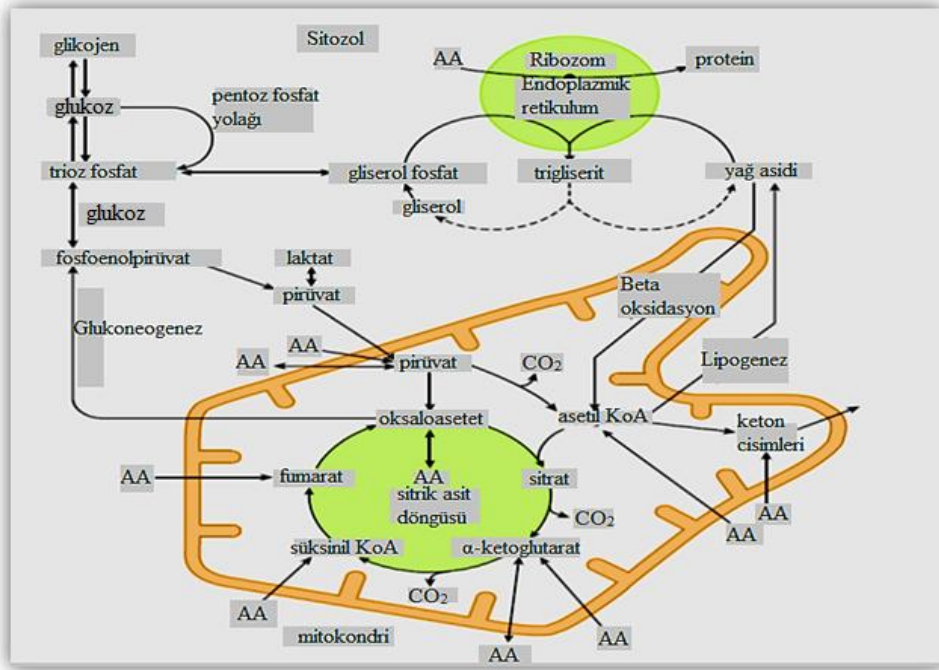
Örneğin oksaloasetat glukoneogenez yoluyla glukozaya dönüştürülmektedir. Ayrıca oksaloasetat ve alfa ketoglutarat, aspartat ve glutamat amino asitlerinin öncül molekülü olarak işlev yapabilmektedirler. Aspartat ve glutamat ile, oksaloasetat ve alfa ketoglutaratın karbonları da daha sonra diğer amino asitler ile

pürin ve pirimidin nükleotidlerinin sentezi için kullanılmaktadır. Suksinil-KoA sitokromlardaki elektron taşıyıcılarının ve oksijen taşıyıcıları olan hemoglobin ve miyoglobindeki hem gruplarının porfirin halkasının sentezinde merkezi bir ara moleküldür (23,24,45).

#### **3.2.1.4.1. Sitrat Sentaz Enzimi**

Sitraz sentaz; TCA döngüsünün ilk enzimi olup, döngünün birinci reaksiyonu olan oksaloasetat ile asetil KoA'nın birleşmesini sağlayarak sitrat molekülünü oluşturmaktadır (22,43,45). Bu reaksiyon asetil KoA'nın metil karbonu ve oksaloasetatın karbonil karbonu arasında karbon-karbon bağı kurularak gerçekleşmektedir (20,43). Homodimerik bir yapıya sahip olan sitrat sentaz enziminin her bir alt birimi iki bölgeli tek polipeptitten oluşmaktadır (24).

Bu bölgelerden biri büyük ve sert, diğeri ise daha küçük ve daha esnektir. Bu bölgelerin arasında ise aktif bölge bulunmaktadır. Oksaloasetat, enzime bağlanan ilk substrattır ve enzime bağlandığında enzimin esnek bölgesinde büyük bir yapısal değişiklik oluşturmaktadır. Bu yapısal değişiklikle ikinci substrat olan asetil KoA'nın bağlanma bölgesi oluşturulmaktadır (24). Sitrat sentaz hiçbir allosterik regülatöre sahip değildir. Enzimin hızı substratı oksaloasetatın konsantrasyonu ve oksaloasetat ile yarışan ürün inhibitörü olan sitrat konsantrasyonu ile kontrol edilmektedir (22). Sitrat sentaz, enerji üretiminin sağlandığı metabolik yollardan biri olan TCA döngüsünde anahtar düzenleyici enzimlerden biridir. Günümüzde deoksifatif ve solunum kapasitesinin değerlendirilmesinde metabolik bir belirteç olarak sıklıkla kullanılmaktadır (42,46).



**Şekil 2.** Karaciğer Parankim Hücresinde Temel Metabolik Yolaklar. (AA → esansiyal amino asitlerin metabolizması, AA↔ nonesansiyel amino asitlerin metabolizması). Telif hakkı McGraw-Hill Education'a ait olan bu şekil ilgili kurumun izni ile kullanılmıştır (20).

### 3.2.1.5. Elektron Taşıma Sistemi

ETS; elektronların NADH ve FADH<sub>2</sub>'den oksijene aktarılarak ATP'nin üretildiği bir dizi elektron taşıyıcısından oluşan sistemdir (45). ETS'de ardışık şekilde hareket eden bu elektron taşıyıcılarının çoğu bir veya iki elektron alan ya da verebilen prostetik gruplardan oluşmaktadır ve bir elektron çiftini sırayla özelleşmiş bir dizi elektron taşıyıcısına vermektedirler. Bu yolakta üç çeşit elektron transferi meydana gelmektedir: Birincisi hidrojen atomu halinde elektronların transferidir, ikincisi Fe<sup>3+</sup>'ün Fe<sup>2+</sup>'ye indirgenmesinde olduğu gibi elektronların doğrudan transferidir. Üçüncü elektron aktarımı ise iki elektron taşıyan hidrid (:H) iyonu şeklindedir. Özellikle ETS'de kullanılan indirgenmiş eşdeğeri indirgenme-yükseltgenme reaksiyonunda tek elektron transferini tanımlamak için kullanılmaktadır. ETS'de NAD ve flavoproteinlerin flavin adenin

dinükleotit (FAD) ile flavin mononükleotitin (FMN) yanı sıra hidrofobik kinon (ubiquinone; koenzim Q ve sadece Q olarak da adlandırılır), sitokromlar ve demir-sülfür proteinleri de başlıca elektron taşıyan moleküllerdir (24,25).

ETS, birçok moleküle geçirgen olmayan mitokondrinin iç zarında meydana gelmektedir. Çünkü gerekli bileşenler ve ATP sentaz enzimi mitokondrinin iç zarında bulunmaktadır (24,47). ETS, mitokondrinin iç zarına yerleşmiş olan dört ayrı protein kompleksinden oluşmaktadır. Bunlar, farklı elektron taşıyıcılarından oluşan kompleks I, II, III ve IV' tür. Bu kompleksler mitokondri iç membranına sabitlenmiş olmalarına rağmen elektron taşıyıcılarından olan koenzim Q ve sitokrom c hareketlidirler. Kompleks I ve II, elektron vericileri NADH dehidrogenaz (kompleks I) ve süksinat dehidrogenaz (kompleks II)'dan ubikinona (koenzim Q) elektron transferini katalizlerken; kompleks III, elektronları indirgenmiş ubikinondan sitokrom b-c1'e; kompleks IV, elektronları sitokrom-c'den oksijene aktararak zinciri tamamlamaktadır (25,47,48). Daha önce anlatıldığı gibi karbonhidrat, yağ ve proteinlerin oksidasyonu ile açığa çıkan enerji oksidatif fosforilasyonla yüksek enerjili fosfat bağlarına (ATP) dönüştürülür. Oksidatif yollardan TCA döngüsünden ve diğer yollardan sağlanan enerji indirgenmiş elektron tutucu koenzimler NADH ve FADH<sub>2</sub> formunda korunmaktadır (20,44). ETS'de ise NADH ve FADH<sub>2</sub> oksitlenerek elektronları oksijene aktarılıp, daha sonra elektron alan oksijen suya dönüştürülmektedir. Oksijenin indirgenmesiyle elde edilen enerji ATP sentaz tarafından, adenosin difosfatın (ADP) ATP'ye fosforilasyonu için kullanılmaktadır (22,26).

### 3.2.2. Lipit Metabolizması

Lipitler organik bileşiklerin heterojen bir grubu olup; enerji depolama (trigliserit), ısı yalıtımı (deri altı ve organların çevresini saran adipoz doku), hücre membran bileşenlerini oluşturma (fosfolipitler ve kolesterol), hücredeki sinyal yollarında yer alma, hormonların yapısına katılma ve metabolik yakıt olarak kullanılma gibi birçok önemli biyolojik işlevi yürütmektedirler (23,49). Lipitlerin biyolojik işlevlerindeki bozukluklar diyabet, obezite, kalp hastalığı ve inflamasyon gibi çeşitli hastalıkların patogeneğinde etkilidir (50).

Lipitler hidrofobik özelliklerinden dolayı vücutta genellikle adipoz hücrelerinde trigliserit damlaları olarak veya amfipatik özelliklerinden dolayı membran yapısına katılan lipitler olarak bulunurlar ya da lipoprotein olarak kandan dokulara taşınmaktadırlar (25).

Suda çözünmeyen lipitlerin kandan dokulara taşınması suyla karışabilen lipoproteinlerle sağlanmaktadır. Lipoproteinler: özel taşıyıcı proteinler olan apolipoproteinler ile trigliserit, fosfolipit, kolesterol ve kolesterol esterleri gibi çeşitli lipit türevlerinden oluşan makromoleküler komplekslerdir. Lipoproteinlerin suya bakan dış kısımlarında hidrofilik fosfolipit molekülleri, apolipoproteinler ve serbest kolesterol molekülleri bulunurken, iç kısmında hidrofobik yapıli trigliseritler ile kolesterol esterleri bulunmaktadır. Lipoproteinlerin apolipoprotein kısımlarında dokulardaki hücre yüzey reseptörlerine özgü tanıma bölgeleri bulunduğu için dokulardaki lipoprotein reseptörleri için ligand görevi yapmaktadırlar. Ayrıca lipoprotein metabolizmasında görev alan enzimlerin koenzimi, inhibitörü veya aktivatörü olarak işlev görebilirler (20,25,51). Lipoproteinler; işlevlerinin, yoğunluklarının, büyüklüklerinin, protein ve lipit

içeriklerinin farklı olmasından dolayı başlıca; şilomikronlar, VLDL, ara dansiteli lipoprotein (IDL), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) gibi farklı gruplara ayrılmaktadır (22,25,52). Karaciğerde sentezlenen ve trigliserit oranı çok yüksek olup, en düşük yoğunluğa sahip olan VLDL; endojen triaçilgliserol ve kolesterolü karaciğerden ekstrahepatik dokulara taşıyan lipoproteinlerdir (51). Diyetle alınan karbonhidrat molekülleri karaciğerde trigliseritlere dönüştürülerek VLDL içinde paketlenmektedirler. Apolipoproteinlerden B100 ise karaciğerde sentezlenip, VLDL membranına integral olarak yerleştirilip lenfatik kanalla kana geçmektedir. Kana geçen VLDL'ler damar endoteline heparan sülfat ile bağlı olan LPL enzimiyle parçalanırlar. LPL enzimi büyük oranda adiposit, kalp ve iskelet kası hücreleri ile makrofajlar tarafından sentezlenen ekstraselüler bir enzimdir.

Bu enzim VLDL ve şilomikronların yapısında yer alan apo C-II tarafından aktive edilerek trigliseritleri yağ asitleri ve gliserole parçalamaktadır (20,22,53). VLDL'nin yapısındaki trigliseritler yıkılarak IDL haline getirilmektedirler. IDL'lerin çok az bir kısmı HDL'den aldıkları apo E aracılığıyla karaciğer tarafından metabolize edilirken büyük kısmı dolaşımında yoluna devam ederek, karaciğere gelmektedir ve karaciğer kan dolaşımında LPL enziminin muadili olan hepatik triaçilgliserol lipaz enzimi tarafından parçalanarak LDL'ye çevrilmektedir (20,52). Sentezlenen LDL molekülleri trigliserit içerikleri çok az, kolesterol ve kolesterol esterlerinden zengin lipoproteinlerdir. Birincil görevi karaciğerden periferik dokulara kolesterol taşımaktır. Taşınan kolesterol steroid yapılı bileşiklerin sentezi için ve hücre zarlarının bütünlüğünün sağlanmasında kullanılmaktadır (25,50). Dokulardaki fazla kolesterol ise dokulardan karaciğere

HDL tarafından taşınmaktadır. HDL ise karaciğerde ve ince bağırsaktan sentezlenen protein miktarı ve yoğunluğu yüksek küçük bir lipoproteindir (24,51).

Diğer bir lipoprotein çeşiti olan şilomikronlar ise en büyük boyutlu ve en düşük yoğunluğa sahip olan ve yapısında yaklaşık % 85 oranında trigliserit bulunan lipoprotein türüdür (22). Diyetle alınan trigliseritlerin ağızda başlayıp, mide ve ince bağırsak lümeninde devam eden sindirim işlemleriyle monomerlerine parçalanmaları gerekmektedir (23). İnce bağırsak lümenine sekrete edilen safra sıvısı, pankreatik enzimler ve ince bağırsağın kendisinden salgılanan enzimler tarafından trigliseritler serbest yağ asitleri (FFA) ve 2-monoaçilgliserole çevrilmektedir. Bu sindirim ürünleri daha sonra bağırsak epitel hücreleri tarafından emilip, endoplazmik retikulumlarda yeniden trigliserit sentezi için kullanılmaktadır. Sentezlenen trigliseritler suda çözünmedikleri için bağırsakta şilomikronlar içinde paketlenmektedir (22,52,54). Şilomikronlarda diğer lipoproteinler gibi fosfolipit, apolipoprotein, kolesterol, kolesterol esterleri ve trigliseritlerden oluşmaktadır. Şilomikronların suya bakan dış kısımlarında fosfolipid molekülleri ve B-48, C-III, C-II apolipoproteinleri bulunurken, iç kısmında hidrofobik yapılı trigliseritler ile kolesterol esterleri bulunmaktadır. Bağırsak epitel hücrelerinden salgılanan şilomikronlar önce lenf sıvısına ve daha sonra kana geçerek kolesterol esterleri ve trigliseritlerin yağ ve kas gibi dokulara taşınmasını sağlamaktadır (25,51). Şilomikronların yapısındaki trigliseritler taşıdıkları dokuların damar endoteline bağlı LPL enzimi tarafından parçalanmaktadır ve trigliseritlerini kaybeden şilomikronlar kolesterol bakımından zengin şilomikron kalıntıları haline gelmektedirler (52,53).

Bu kalıntılar karaciğerdeki reseptörlerine bağlanarak endositozla karaciğere alınıp, bileşenlerine hidroliz edilmektedirler. Hidroliz sonucu açığa çıkan trigliseritler enerji amaçlı yıkılırlar ya da keton cisimlerinin sentezinde kullanılırken, diğer ara ürünler yeni bileşiklerin sentezi için tekrar kullanılabilirler. Trigliseritlerin hidrolizi sonucu ise yağ asitleri ve gliserol oluşmaktadır (24,51). Gliserol karaciğerde metabolize edilerek glycerol 3- fosfata dönüştürülüp, çeşitli metabolik yollarda ara ürün olarak kullanılmaktadır (25). Yağ asitleri ise kas, kalp ve karaciğer dokusunda enerji için kullanılırken, adipoz doku yağ asitlerini depo yağlar olan trigliserit sentezi için kullanmaktadır (20). Metabolizmada enerjiye ihtiyaç duyulduğu zaman, epinefrin ve glukagon gibi çeşitli hormonların etkisiyle hormona duyarlı lipaz enzimi aktifleştirilerek, adipoz dokudaki depo trigliseritler parçalanmakta ve açığa çıkan yağ asitleri iskelet kası, kalp ve renal kortekse taşınarak burada oksidasyon sonucu enerji üretimi sağlanmaktadır (24). Ancak vücuda aşırı karbonhidrat alındığı zaman, okside edilen yağ asitleri karaciğerde yeniden sentezlenmektedir (22).

### **3.2.2.1. Yağ Asidi Sentezi**

Plazma lipitlerinin metabolik açıdan en aktifi olan yağ asitleri vücutta esterleşmemiş halde serbest olarak yada lipoproteinler gibi daha kompleks moleküllerde yağ asidi esterleri olarak bulunmaktadır (20,25). Metabolik açıdan büyük öneme sahip olan yağ asitleri hücrel yapılar katılmanın yanı sıra düzenleyici moleküller olarak işlev görerek hücrel aktivitelerin bütün evrelerinde rol almaktadır (55). Hücrel işlevlerinden dolayı yağ asitleri gibi çeşitli lipitlerin sentezlenmesi organizmalar için elzem bir durumdur (24). Vücuttaki yağ asitlerinin büyük kısmı diyetle alınan besinler tarafından

sağlanmaktadır (25). Ancak diyetle alınan aşırı karbonhidrat ve daha az miktarlarda proteinler de asetil KoA'ya dönüştürülerek yağ asitlerinin de novo sentezi için kullanılmaktadır. Yağ asitleri insanlarda başlıca karaciğer ve meme bezlerinde olmak üzere böbrek, beyin, yağ dokusu ve akciğer gibi dokularda da sentezlenmektedir (20,22,56). Yağ asidi sentezi, asetil KoA karboksilaz (ACC) kontrol enzimi aracılığı ile yağ asidi sentaz enzimlerinden oluşan bir yağ asidi sentaz kompleksinde gerçekleşmektedir (22). Yağ asidi sentezi ACC enzimi tarafından anahtar öncül molekül olan malonil-KoA'nın sentezlenmesi ve yağ asidi sentaz enzimi tarafından iki karbonlu artışlarla yağ asidi zincirinin uzatılması olmak üzere başlıca iki aşamadan oluşmaktadır (56).

Yağ asidi biyosentezi için başlıca asetil KoA, ATP, indirgenmiş NADPH,  $\text{HCO}_3^-$  ( $\text{CO}_2$ 'nin kaynağı),  $\text{Mn}^{2+}$  ve biyotin gerekmektedir.

Hücrelerin sitoplazmasında gerçekleşen bu biyosentezde asetil KoA birincil substrat iken serbest palmitat ise son üründür (20,45). Yağ asidi sentezi için gerekli asetil KoA'lar, glukozun indirgenmesiyle oluşan pirüvatın mitokondride oksidasyonundan, keton cisimlerinin, amino asitlerin ve yağ asitlerinin yıkımından elde edilmektedir (25). Yağ asidi sentezi ile ilgili enzimler sitoplazmada bulunmaktadır ve mitokondride oluşan asetil KoA'nın yağ asidi sentezine katılabilmesi için sitozole geçmesi gerekmektedir. Ancak asetil KoA mitokondriyal iç membranı geçemez ve bir mekik mekanizmasıyla dolaylı olarak geçer. Bunun için asetil KoA, oksaloasetat ile reaksiyona girerek sitratı oluşturur ve daha sonra sitrat mitokondriden sitoplazmaya geçer. Sitozole geçen sitrat, yağ asidi sentezi için tekrar asetil KoA ve oksaloasetata parçalanmaktadır (24,25,45). Sitoplazmadaki yağ asidi sentezinin ilk basamağı, asetil KoA'nın bikarbonat ya da

CO<sub>2</sub>'den gelen karbon ve ATP kullanılarak ACC enzimiyle irreversibl olarak malonil KoA'ya dönüştürülmesidir. Asetil KoA'nın koenzimi biyotin ve Mn'dır (20). ACC; biyotin taşıyıcı protein bölgesi, biyotin karboksilaz bölgesi ve transkarboksilaz bölgesi olmak üzere üç fonksiyonel bölgeye ve birde düzenleyici allosterik bölgeye sahiptir. Enzim reaksiyonu ise iki aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşamada biyotin karboksilaz bölgesi; ATP bağımlı bir reaksiyonla biyotin halkası içindeki bir azotu CO<sub>2</sub>'ye bağlayarak CO<sub>2</sub>'yi aktive eder, ikinci aşamada ise transkarboksilaz bölgesi; biyotindeki aktive olmuş CO<sub>2</sub>'yi asetil KoA'ya aktararak malonil-KoA'nın sentezini sağlamaktadır (20,24).

Sentezlenen malonil KoA, yağ asitlerinin betaoksidasyon denen bir metabolik yolda yıkılmak üzere mitokondriye girişinden sorumlu enzim olan karnitin açiltransferaz I'i inhibe eder. Böylece yağ asitlerinin beta oksidasyonu engellenmiş olur ve bu nedenle yağ asit sentezi malonil-KoA oluşum aşamasında düzenlenebilmektedir (24,25). Yağ asidi sentezinin düzenlenmesinde önemli rolü olan malonil KoA'nın sitoplazmada üretiminden sonra yağ asitlerinin sentezi yağ asidi sentaz olarak adlandırılan özel bir multienzim kompleksinde ilerlemektedir (22,23,45). Bu enzim kompleksindeki en önemli enzimlerden biri olan yağ asidi sentaz, çok fonksiyonlu dimerik bir enzimdir ve her bir monomeri yedi farklı enzimatik aktiviteye sahip multikatalitik bir polipeptidir (25,56). Yağ asidi sentaz kompleksindeki bu enzimler yardımıyla, malonil-KoA'dan elde edilen iki karbonlu birimler uzayan yağ açil zincirine eklenmektedir. Bu ekleme ve indirgeme basamakları palmitat üretilene kadar devam etmektedir. Palmitat 16 karbon atomunda oluşan bir yağ asidi zinciridir ve palmitatın yağ asidi zinciri uzatılıp, desature edilerek çeşitli yağ asitleri üretilmektedir. Karaciğerde palmitat

ve diğeri yeni sentezlenen yağ asitleri trigliseritlere çevrilerek VLDL içinde paketlenmektedir (22,56).

### **3.2.2.1.1. Asetil KoA Karboksilaz Enzimi**

ACC; yağ asidi sentezini sağlayan hız sınırlayıcı enzimdir. Yağ asidi sentezinin ilk basamağını oluşturan, asetil KoA'dan malonil KoA sentezini ACC gerçekleştirmektedir. Malonil KoA ise uzun zincirli yağ asitlerinin sentezi için iki karbonlu birimleri sağlamaktadır (23,45,57).

İnsanlar dahil olmak üzere hayvanlarda ACC enziminin farklı genler tarafından kodlanan, farklı doku ve hücrelerde dağılım gösteren ACC1 veya alfa (Molekül ağırlığı: 265,000) ve ACC2 veya beta (Molekül ağırlığı: 280,000) olmak üzere iki büyük izoformu vardır (58,59).

Bu izoformlar yapısal ve işlevsel açıdan farklılık göstermektedirler. On yedinci kromozomda yer alan ACC1 uzun zincirli yağ asitlerinin sentezinde hız sınırlayıcı enzim olarak görev yaparken, 12. kromozomda yer alan ACC2 mitokondriyal yağ asidi oksidasyonunu kontrol etmektedir. Ancak ACC2 izoformunun katatlitik bölgesi 150 amino asitlik fazladan ek bir peptid dışında ACC1 ile aynıdır (55). Bununla beraber sitozolde yerleşim gösteren ACC1 enzimi en fazla beyaz adipoz doku ve meme bezleri gibi lipogenik dokularda bulunurken, mitokondriyal membrana yerleşik bulunan ve ACC1'den farklı olarak hidrofobik N-terminal peptidine sahip olan ACC2 ise kalp ve iskelet kası gibi oksidatif dokularda bulunmaktadır. Karaciğerde ise hem yağ asidi sentezi hem de yağ oksidasyonunun her ikisi de gerçekleştiği için ACC enziminin iki izoformu da sentezlenmektedir (57-59).

ACC enziminin aktivitesi, sentezinin uyarılması veya baskılanması, fosforilasyon ve allosterik modifikasyon gibi faktörlerle düzenlenmektedir (22). ACC enziminin defosforilasyonu aktivasyonuna, fosforilasyonu ise deaktivasyonuna yol açmaktadır. İnsülin; ACC enzimini aktive ederken, glukagon ve epinefrin enzimin fosforilasyonunu sağlayarak inhibe etmektedir (20,24,56). Sitrat allosterik olarak ACC' yi aktive ederken, palmitatın ürettiği palmitol KoA ve uzun zincirli yağ açıl koenzim A ise inhibe etmektedir (22,59).

### **3.3. İnsülin Hormon Biyosentezi, Salgılanması ve Glukoz Taşıyıcıları**

#### **3.3.1. İnsülin Hormon Biyosentezi**

İnsülin hormonu, pankreasın Langerhans adacıklarının beta hücreleri tarafından sentezlenmektedir. Bu hormon 1922 yılında ilk defa araştırmacılar Frederick Banting ve Charles Best tarafından izole edilmiş olup, biyokimya alanında en çok çalışılan moleküllerden biri haline gelmiştir (54,60). İnsülin; 51 amino asitten oluşan, 5.8 kilodalton molekül ağırlığına sahip bir polipeptiddir. Bu polipeptid alfa ( $\alpha$ ) ve beta ( $\beta$ ) olarak adlandırılan birbirine disülfid bağlarıyla bağlı iki aminoasit zincirinden oluşmaktadır (60,61).

İnsülin hormonu, başlangıçta amino (N) terminalinde bir sinyal dizisi bulunan inaktif tek zincirli preproinsülin olarak beta hücrelerinin ribozomlarında sentezlenip (24), daha sonra granüllü endoplazmik retikuluma taşınmaktadır. Preprohormonun N-terminal ucunda kısa hidrofobik bir sinyal dizisi olan pre dizisi granüllü endoplazmik retikulum lümenine girerken parçalanarak proinsülin oluşmaktadır. Proinsülin endoplazmik retikulum lümeninde uygun şekilde katlanıp, sistein bölgeleri arasında disülfid bağları oluşuktan sonra

mikroveziküllerin içinde golgi kompleksine taşınmaktadır. Golgi kompleksindeki depo veziküllerinde bulunan bir proteaz ise biyolojik olarak inaktif olan proinsülinin C-peptidini ayırarak biyolojik olarak aktif olan insülini oluşturmaktadır (22). İnsülin, golgi aygıtının depo veziküllerine taşınan çinko iyonları ile birlikte depo edilmektedir. İnsülinin C-peptidini ayırması insülinin çözünürlüğünü azaltarak veziküllere taşınan çinko iyonları ile birlikte çökmesini ve çinko kristalleri şeklinde salgılanmasını sağlamaktadır. Ayrıca çinko iyonları insülinin sentezi, depolanması ve salgılanmasında görev almaktadır (22,62).

Depo veziküllerindeki insülinin beta hücre sitozolünden kana ekzositozu kan glukoz seviyesinin yükselmesiyle uyarılmaktadır (22). Ekzositozla serbestlenen insülin kan dolaşımına ulaşmak için beta hücresi ve komşu kapillerin bazal zarları ile kapiller endoteline geçmektedir (63).

İnsülin sekresyonu temel olarak glukoz tarafından düzenlenmekle birlikte aminoasitler, ketonlar, çeşitli besinler, gastrointestinal peptitler ve nörotransmitterler de insülin sekresyonunu etkilemektedir (61,64). 70 mg/dl üzerindeki glukoz seviyeleri insülin sentezini protein translasyonunu vb. süreçleri indükleyerek uyarmaktadır (64).

### **3.3.2. İnsülin Salgı Mekanizması**

Beta hücre membranlarında potasyum ( $K^+$ ) ve kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) iyonlarının geçişini sağlayan iyon kanalları bulunmaktadır. Bu hücrelerden insülin salgılanması elektriksel aktivite ve hücre içine kalsiyum  $Ca^{+2}$  girişine bağlıdır. Beta hücrelerine glukozun alınıp, yıkılması sonucu ATP elde edilmesiyle bu hücrelerde elektriksel aktivite başlamaktadır (65). Glukoz, beta hücrelerine glukoz taşıyıcı protein 2 (GLUT-2) aracılığıyla kolaylaştırılmış difüzyonla alınmaktadır

ve GLUT-2 çoğunlukla beta hücreleri arasındaki kanalcıkların mikrovilüslerinde bulunmaktadır (66). Beta hücrelerine alınan glukoz öncelikle sitoplazmada glukokinaz enzimi tarafından fosforile edilir. Glukozun fosforilasyonu adacıklardaki glukoz kullanımının ilk ve sınırlayıcı basamağını oluşturmaktadır. Daha sonra fosforile edilen glukoz sitoplazmada glikoliz sonucu piruvata parçalanır. Oluşan piruvat mitokondriye girerek, burada oksidatif fosforilasyona uğramaktadır. Pirüvatın oksidatif fosforilasyonu; hücre içi ATP miktarı, ATP/ADP oranı ve NADH-NADPH konsantrasyonunda hızlı bir atışa yol açmaktadır. Oksidatif fosforilasyon sonucu oluşan ATP sitoplazmaya geçerek ATP'ye duyarlı  $K^+$  kanalını kapatmaktadır.  $K^+$  kanalının kapatılması beta hücresinden  $K^+$  çıkışını baskılayarak hücrenin depolarize olmasını sağlamaktadır. Depolarizasyon sonucunda voltaja duyarlı  $Ca^{+2}$  kanalı açılmakta ve hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu hızla artmaktadır. Artan  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu ise insülin içeren salgı granüllerinin hareketi için gerekli olan mekanizmayı aktive etmektedir. İnsülin salgı granülüne bağlı bulunan bir monomerik G protein bazal plazma membran proteinleriyle etkileşir. Bu etkileşim salgı granülünün membranla birleşmesini ve ekzositozla insülinin salınmasını sağlamaktadır. İnsülin sekresyonu başlıca glukoz tarafından düzenlenmektedir. Glukoz miktarının düşük olduğu koşullarda ATP'ye duyarlı  $K^+$  kanalları açıktır ve dışarı  $K^+$  çıkışına izin verilerek hücrenin depolarize olması baskılanmaktadır (63,65,66).

### **3.3.3. İnsülin Aktivasyonu**

Birçok dokuda farklı türde glukoz taşıyıcıları (GLUT) bulunmaktadır. Kas ve adipoz dokularında glukoz taşıyıcısı olarak en fazla insülin ile uyarılan GLUT-4 bulunmaktadır (67). İnsüline duyarlı hücrelerin sitoplazmasında veziküller

içinde GLUT-4 depo edilmektedir. GLUT-4 deposu bulunan hücrelerin insülin reseptörlerinin aktivasyonu fosfatidilinositol 3 kinaz (PI(3) K) aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu aktivasyon GLUT-4 içeren veziküllerin hızla hücre zarına hareket ederek membranla kaynaşmasını sağlamaktadır. Membrana taşınan GLUT-4'ler daha sonra hücre içine glukoz alımında işlev görmektedir (63).

İnsülin reseptörünün  $\alpha$  alt birimleri hücre membranının dışında yerleşik bulunur ve bu alt birime insülin bağlanır.  $\beta$  alt birimleri ise hücre zarı boyunca uzanmaktadır.  $\beta$  alt birimlerinin hücre içinde kalan bölümlerinin tirozin kinaz aktivitesi vardır. Alfa alt birimine insülin bağlanması konformasyonel bir değişikliğe yol açarak  $\beta$  alt birimlerinin tirozin kinaz aktivitesini tetikler ve tirozin bölgeleri üzerinden  $\beta$  alt birimlerinin otofosforilasyonu sağlar (63,68). Otofosforilasyon tirozin kinaz aktivitesini oluşturur ve tirozin kinaz insülinin reseptör substratları (IRS) 1,2,3 ve 4'ü, Src homolog 2 (SH2) içeren sitoplazmik adaptör protein izoformlarını, sinyal düzenleyici protein (SIRP) ailesinin üyelerini, Grb2 bağlayıcı protein 1 (Gab-1), Casitas Blineage Lenfoma (Cbl) geniyle ilişkili proteini ve pleckstrin homoloji ve Src homoloji 2 bölgelerine sahip etki adaptör proteini (APS) fosforile eder (68). Proteinlerin fosforilasyonu sinyal moleküllerinin SH2 bölgeleri için tanıma alanları oluşturarak, fosforile olmuş proteinlerin sinyal molekülleriyle SH2 bölgeleri aracılığıyla etkileşime girmelerini sağlamaktadır. Bu etkileşim ile glukoz metabolizmasının aktive ve deaktive edici hedef enzimleri olan serin ve treonin fosforilasyon kaskadı başlamaktadır. Bu kaskad; GLUT-4 vb. glukoz taşıyıcılarını içeren veziküllerin hücre zarına kaynaşmasını sağlayan PI(3) K'nın aktivasyonu ile başlayıp, fosfatidilinositol 3,5-bifosfat (PtdIns (3,5) P2), P3-bağlı protein kinazların, Ras ve MAP kinaz

kaskadının, Cbl/CAP (Cbl-ilişkili protein) ve TC10'nun aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (63,68,69). Bu yollar enzim aktivasyonu ve inaktivasyonunu, vezikül trafiğini, gen ekspresyonunu ve protein sentezini düzenlenleyerek; glukoz, lipit ve protein metabolizmasını organize etmektedirler (69).

### 3.3.4. Glukoz Taşıyıcıları

Glukoz hidrofilik bir bileşiktir. Bu nedenle hücre membranlarının çift lipit tabakasından basit difüzyonla geçemez ve glukozun hücre membranından sitozole geçmesi için özel taşıyıcı proteinler gerekmektedir. Glukoz hücre içine heksoz taşıyıcılarının iki grubu aracılığı ile taşınır. Bunlar; sodyum-bağımlı glukoz taşıyıcı (simportları), SGLT ailesi ve GLUT ailesidir. İnsanlarda toplam 12 SGLT üyesi bulunmaktadır. SGLT'ler, Na<sup>+</sup> kotransportu yolu ile şeker, iyodür, kısa zincirli yağ asitleri ve kolin taşımaktadırlar (70). SGLT taşıyıcıları; 580 – 718 amino asitten oluşan, 14 transmembran bölgeye (hidrofobik N ve C terminalleri membranın hücre dışında bulunan) sahip sarmal proteinlerdir (70,71). Bu taşıyıcılar glukozu ve galaktozu farklı afinitelerde sekonder aktif taşıma mekanizmasıyla taşımaktadırlar. SGLT taşıyıcıları; Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPaz pompası tarafından sağlanan Na<sup>+</sup> elektrokimyasal gradiyentini kullanarak, hücre içindeki glukoz konsantrasyon gradiyentine karşı glukozu hücre içine taşımaktadırlar. Glukoz taşınmasının bu formu ince bağırsağı döşeyen lümenal membran hücreleri boyunca, böbrek proksimal tübüllerinde ve kalpte gerçekleşmektedir (67,71).

Kolaylaştırılmış glukoz taşıyıcıları (GLUT'lar) ise, glukozun konsantrasyon (difüzyon) gradiyentini kullanarak enerji harcamadan glukozu hidrofobik hücre zarından taşımaktadırlar (67,70). GLUT'lar 500'den fazla amino asitten oluşan proteinlerdir. Alfa heliks ve tek bir N- bağlı oligosakkaritten oluşan

12 transmembran bölgeye sahip oldukları belirtilmektedir. Memelilerde on dört GLUT üyesi (GLUT1-GLUT12, GLUT14 ve H<sup>+</sup>/miyo-inositol taşıyıcısı; HMIT) belirlenmiştir. Glukoz taşıyıcı proteinlerin her biri glukoz ve fruktoz gibi diğer heksozlar için farklı afinitelere sahiptirler (70).

GLUT ailesinin 14 üyesi ise dizi benzerlikleri ve karakteristik unsurlara göre 3 alt sınıfa ayrılmaktadır. Birinci alt sınıfı GLUT-1, 2, 3, 4 ve yakın zamanda tanımlanmış olan GLUT-14 oluşturmaktadır; ikinci alt sınıfı GLUT-5, 7, 9, 11; üçüncü alt sınıfı GLUT-6, 8, 10, 12 ve HMIT oluşturmaktadır (71).

Sınıf 1 üyesi olan GLUT-1; adipoz, kas ve karaciğer dokularından eksprese olmakla beraber, esas olarak eritrosit ve beyin endotelial hücrelerinde (kan - beyin bariyeri de dahil) en yüksek ekspresyon seviyelerine sahiptir ve hücrelerin temel enerji kaynağı olan glukozun taşınmasını sağlamaktadır. GLUT-1, glukoz dışında galaktoz ve mannozu da taşımaktadır (72). GLUT-2 düşük afiniteli bir glukoz taşıyıcısı olup; pankreasın beta hücrelerinde, karaciğer, böbrek ve ince bağırsakta en fazla eksprese olmaktadır. GLUT-2 glukozun yanı sıra fruktoz ve glukozamini de taşıyabilmektedir. GLUT-2, beta hücrelerinde glukoz algılama mekanizmasında rol oynadığı düşünülmektedir (67,71).

GLUT-3 diğer GLUT-1 sınıfına ait üyelere göre glukozu daha yüksek afinite göstermektedir (72). Özellikle beyin gibi glukoz gereksinimi yüksek dokularda, testislerde ve çok yüksek miktarda beyaz kan hücrelerinden eksprese olmaktadır (67,72).

GLUT-4 ise ilk defa rat adipositlerinde tespit edilmiştir ve glukozu yüksek afinite gösteren bir taşıyıcıdır. Adipoz doku, iskelet kası ve kardiyomiyositler gibi insüline duyarlı dokularda belirgin olarak eksprese edildiği için insüline duyarlı

glukoz taşıyıcısı denilmektedir. GLUT-4 yemek sonrası yükselen plazma glukoz seviyesinin düşürülmesinden sorumludur. İnsülin artışı GLUT-4 içeren veziküllerin hücre içi depolardan plazma zarına translokasyonunu sağlayarak hücre içine glukoz taşınmasında yaklaşık 10-20 katlık bir artış sağlamaktadır (67,72). GLUT-4'ün insülin aracılı olan bu plazma membranına translokasyonundaki herhangi bir hasar periferik insülin direnci olarak bilinen duruma yol açmaktadır. Bu nedenle GLUT-4 tüm vücudun glukoz dengesinin düzenlenmesinde önemli rol almaktadır (72).

Sınıf 2 ailesi kolaylaştırılmış glukoz taşıyıcıları ise fruktoza affinitesi yüksek olan taşıyıcılardan oluşmaktadır. Özellikle GLUT-5 glukoz affinite göstermeyip, sadece fruktoza karşı yüksek affiniteye sahiptir (71). Sınıf 1 ve sınıf 2 ailelerinin aksine sınıf 3 ailesinin bütün üyelerinde ise dokuzuncu halkada üzerinde bir glikolizasyon bölgesi bulunmaktadır (67).

### **3.4. İnsülinin Metabolik Etkileri**

İnsülinin fizyolojik etkileri kapsamlı ve karmaşıktır. Bu etkiler hızlı, orta ve gecikmiş etkiler olarak sınıflandırılabilir. Kan glukozunu insülin hormonu düzenlemektedir. Bu nedenle insülinin en iyi bilinen etkisi hipoglisemik etkisi olmasına rağmen elektrolit taşınması, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizması ile birçok enzim ve büyüme üzerinde ek etkileri bulunmaktadır (61,63).

#### **3.4.1. İnsülinin Karbonhidrat Metabolizması Üzerindeki Etkileri**

İnsülin; kas, yağ ve karaciğer dokuları başta olmak üzere, vücudun hemen hemen bütün dokuları tarafından glukozun hızlı alımını, depolanmasını ve

kullanılmasını sağlamaktadır (54). İnsülinin karbonhidrat metabolizması üzerindeki başlıca etkileri şunlardır:

- **Glukoz alımını artırır:** İnsülin, glukozun hücre dışı sıvıdan başta karaciğer, kas ve adipoz dokusu olmak üzere vücudun bütün dokularına alımını artırmaktadır (28,61). Çünkü insülin glukozun kandan hücrelere taşınmasını hücre membranlarının glukoz geçirgenliğini arttırarak kolaylaştırmaktadır. Ancak beyin (hipotalamus hariç), böbrek tübülleri, bağırsağın mukoza membranı ve eritrositler gibi bazı dokularda glukoz alımı için insülin gerekli değildir (61,73). İnsülin adipoz doku ve ekstrahepatik dokularda glukoz taşıyıcılarının golgi sisternalarındaki hücre içi havuzlarından plazma membranına translokasyonunu uyarır. Bu taşıyıcılar plazma membranı boyunca D-glukoz ve D-galaktozun taşınmasını sağlarlar. Ayrıca hepatositlerde, insülin glukozun hepatik alımını artırır. İnsülinin glukoz fosforilasyonuna neden olan glukokinaz enziminin sentezini uyarması hepatik glukoz alımını artırmasına eş zamanlı olarak glukozun hücre içi konsantrasyonunu azaltmaktadır (28,66).
- **Glikolizi artırır:** İnsülin yağ dokusu ve kaslarda enerji eldesi için glukoz kullanımını artırır. Özellikle bu dokularda anahtar enzimler olan 6-fosfofruktokinaz, hekzokinaz ve pirüvat kinazın sentezlerini artırdığı için glikolizi de artırmaktadır (73,74).
- **Piruvatın asetil-KoA'ya dönüşümünü artırır:** İnsülin PDC'nin defosforilasyonunu sağlayarak pirüvatın asetil KoA'ya aerobik oksidatif dekarboksilasyonunu artırır (28).

- **Glikojen sentezini (Glikojenezisi) uyarır:** İnsülin glikojen sentezini karaciğer ve kaslarda anahtar ve hız sınırlayıcı enzim olan glikojen sentazın defosforilasyonunu artırıp, enzimi aktifleştirerek göstermektedir. İnsülin, glikojen sentazın defosforilasyona neden olan protein fosfataz- lenzimini doğrudan uyararak enzimi aktif formuna dönüştürmektedir (22,28). Böylece karaciğer, kas ve yağ dokusunda glikojen sentezi artırılmaktadır (28,74).
- **Glukoneogenezi azaltır:** İnsülin hız sınırlayıcı anahtar enzim PEP- karboksikinaz (PEPCK)'ı sentezleyen genin transkripsiyonunu azaltarak, glukoneogenez için diğer bir anahtar enzim olan fruktoz-1, 6-bi-fosfatazı allosterik şekilde inhibe ederek, fruktoz-2, 6-bi-fosfatazı defosforile edip inaktif formuna çevirerek karaciğerde glukoz sentezini baskılamaktadır (28,73).
- **Glikojen yıkımını (Glikojenolizi) azaltır:** İnsülin hız sınırlayıcı ve anahtar enzim glikojen fosforilazı defosforile ederek inaktif formuna dönüştürmektedir. Ayrıca, glukoz-6-fosfataz enzimini de baskılamaktadır (28). Böylece kas ve karaciğerde glikojenin glukozu yıkımını engellemektedir (28,61,74).
- **Heksoz monofosfat (HMP) yolak şantı artırır:** İnsülin, yağ asitlerinin sentezi için gerekli olan NADPH'ın daha fazla üretilmesini sağlayan ve glukoz oksidasyonu için alternatif bir yol olan HMP-şantı uyarmaktadır. Bunu glukoz-6-fosfat-dehidrogenaz sentezi (G-6-PD) ve 6-fosfoglukonat dehidrogenazın sentezini uyararak gerçekleştirmektedir (28).

- **3.4.2. Lipit Metabolizması Üzerindeki Etkileri**

İnsülinin lipit metabolizması üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Özellikle uzun süreli insülin eksikliğinin ciddi ateroskleroza, sıklıkla kalp krizine, serebral inme ve diğer vasküler hasarlara yol açması bunun birer göstergesidir (54).

İnsülin özellikle karaciğer hücrelerine fazla miktarda glukoz girişini sağlamaktadır. Karaciğere alınan glukoz trigliseritlerin ve yağ asitlerinin sentezinde kullanılmaktadır (61,66). İnsülinin lipit metabolizmasındaki net etkileri ise FFA seviyesini düşürmek ve trigliserit depolarını artırmaktır. Bu etkilerini aşağıdaki yollarla sağlamaktadır (28).

- **Lipolizisi azaltır:** İnsülin adipoz dokusu hücrelerinde lipit metabolizmasında etkili enzimler üzerinden lipolizisi azaltır ve bunun sonucu olarak, plazma FFA seviyesini düşürmektedir (74).
- **Yağ asidi sentezini artırır:** İnsülin daha fazla asetil KoA substratı sağlayıp, ACC'nin etkinliğini artırarak sitoplazmada de novo yağ asidi sentezini artırmaktadır (28,66). Karaciğer içinde sentezlenen yağ asitlerinin çoğu daha sonra yağların depo formu olan trigliseritlerin yapımında kullanılır. Trigliseritler ise lipoproteinlerin içinde karaciğer hücrelerinden kana salınmaktadır (54). İnsülin PDC defosforilasyonunu sağlayarak aktif formuna dönüştürmektedir böylece pirüvattan yağ asitlerinin sentezi için öncü molekül olan asetil KoA daha fazla elde edilebilir. İnsülin plazma FFA seviyesini düşürerek uzun zincirli açil-KoA'nın, asetil KoA karboksilazı inhibe etmesini engellemektedir ve asetil KoA karboksilaz enzimini defosforile ederek aktif hale getirmektedir. Böylece İnsülin asetil KoA karboksilaz ve yağ asit

sentezini uyarmaktadır (22,28). Karaciğer ve kas dokusunda ise, yağ asitlerinin oksidasyonunu azaltmaktadır (73).

- **Trigliserit sentezini artırır:** İnsülin adipoz dokuda trigliserit sentezini aşağıda belirtilen yollarla artırmaktadır:
  - Trigliserit sentezi için gerekli olan yağ asidi miktarını artırmaktadır (28),
  - Kandan yağ dokusu ve kas içine trigliserit alımını arttırarak, kan trigliserit seviyesini düşürmektedir (74).
  - LPL enzimini aktive etmektedir. Adipoz dokunun kapiller duvarlarında bulunan LPL dolaşımdaki şilomikronlar ve VLDL'den trigliseritleri hidroliz ederek FFA açığa çıkarır. Açığa çıkan FFA'lar adipositlerce alınarak, trigliserit sentezi için kullanılmaktadır (28,54).
  - Karaciğerde VLDL oluşum hızını artırmaktadır (74).
  - Karaciğerde kolesterol sentezini, 3-hidroksi-3-metil-glutaril-KoA (HMG-KoA) redüktaz enzimini defosforile ederek arttırmaktadır (74).
  - Yağ hücrelerinde depo trigliseritlerin hidrolizine yol açan hormona duyarlı lipaz enzimini inhibe etmektedir. Böylece adipoz dokudan kana yağ asitlerinin salınımı engellenmektedir (54).
- **Ketogenezi Azaltır:** İnsülin plazma FFA seviyesini azalttığı için yağ asitlerinin oksidasyonu ve keton cisimlerinin oluşumu da azalmaktadır (20,28).

### 3.4.3. Protein Metabolizması Üzerine Etkileri

İnsülinin protein metabolizması üzerindeki net etkisi protein sentezini teşvik ediyor olmasıdır. İnsülin proteinlerin sentezini ve depolanmasını

kolaylaştırıp, proteinlerin hücresel kullanımını engellemektedir (61,66). Bu etkilerini aşağıda belirtilen yollarla sağlamaktadır.

- İnsülin amino asitler için membran "taşıyıcılarının" sentez hızını arttırarak dokulara amino asitlerin taşınmasını ve alımını arttırmaktadır (28,54,73).

- Kas ve diğer dokularda protein yıkımını engellemektedir. Hücrelere daha fazla amino asit girişini sağlayarak; başta kas, karaciğer ve yağ dokusu olmak üzere birçok dokuda protein sentezini arttırmaktadır (54,66,73).

- Protein sentezini ise gen transkripsiyonuna (nükleer seviyede) etki ederek yani mesajcı ribonükleik asit (mRNA) sentezini düzenleyerekve mRNA parçalanmasını azaltarak yapmaktadır (28,66).

- Protein sentezinin ribozomal translasyon aşamasını iki yolla düzenlemektedir. Birinci yol; anahtar ve hız sınırlayıcı enzim ornitin dekarboksilazın sentezini artırarak ribozomal RNA sentezi için gerekli olan poliamin sentezini artırmasıdır. İkinci yol ise; 6S ribozomların fosforilasyonuna neden olarak ribozomal aktivitesiyi düzenlemesidir (28).

#### **3.4.4. Mineral Metabolizması Üzerindeki Etkileri**

İnsülin hücre içine  $K^+$  ve inorganik fosfat girişini artırarak kanda bu iyonların konsantrasyonunda azalmaya neden olmaktadır (28,63). İnsülinin çeşitli dokular üzerindeki metabolik etkileri özetlenecek olursa: Yağ dokusunda; glukoz girişini, yağ asidi sentezini, gliserol fosfat sentezini, trigliserit deposunu, LPL aktivasyonunu ve potasyum alımını arttırmaktadır. Hormona duyarlı lipazı ise inhibe etmektedir (63,73).

Kaslarda; glukoz girişini, glikojen sentezini, amino asit alımını ve ribozomlarda protein sentezini arttırmakta, protein katabolizmasını ve

glukoneojenik amino asitlerin serbestlenmesini azaltmakta, potasyum ve keton alımını artırmaktadır (54,74). Karaciğerde; ketogenezi azaltmakta, protein, yağ asidi ve trigliserit sentezini artırmaktadır. Azalmış glukoneogenez, artan glikojen sentezi ve artan glikoliz nedeniyle hücrelerden glukoz çıkışını azaltmaktadır (63,73,74).

İnsülin, insüline duyarlı hücrelere glukoz, amino asit ve  $K^+$  alınmasında artışı saniyeler içinde (hızlı); protein sentezinin uyarılması, glikolitik enzimler ve glikojen sentezinin etkinleştirilmesi, protein yıkımının inhibisyonu ve fosforilaz ve glukoneojenik enzimlerin inhibisyonunu dakikalar içinde (orta); Lipojenik ve diğer enzimler için mRNA'larda artış sağlanmasını ise saatler (gecikmiş) içinde gerçekleştirmektedir (63).

### **3.5. İnsülin Direnci ve Mekanizmaları**

İnsülin direnci; insülinin dolaşımdaki normal seviyelerine hedef dokuların (özellikle kas, yağ ve karaciğer) duyarlılığının azalması ile karakterize bir durumdur ve vücutta insülin direncinin birçok metabolik etkisi bulunmaktadır (64,75). İnsülin direncinin hücrelerdeki en önemli metabolik etkisi dokuların glukoz alımını inhibe etmesi ve bunun sonucu olarak hepatik glukoz çıkışını artırıp, plazma glukoz seviyesini yükseltmesidir. Dolayısıyla plazma glukoz seviyesini normal düzeyine düşürmek için dolaşımdaki insülin miktarı çok yükselmiştir. Dokuların insüline duyarlılığı, insüline cevabı ve maksimum glukoz kullanımı ise (normal kişilere göre % 30-60 daha düşük) oldukça azalmıştır (64). Hücrelere glukoz girişi azaldığı için karaciğerde glikojen sentezini baskılayıp, glukoneogenezi artırmaktadır. Adipoz dokuda lipolizisi tetikleyerek, lipidlerin

parçalanmasına ve dolaşımında FFA miktarının yükselmesine yol açmaktadır (76). İnsülin direnci bu metabolik etkileri ile tip 2 diabetes mellitus (T2DM) başta olmak üzere obezite, metabolik sendrom, glukoz intoleransı, dislipidemi ve hipertansiyon gibi çok sayıda hastalığın gelişiminde rol almaktadır (75).

İnsülin direnci kompleks metabolik bir durumdur ve patofizyolojisinde birçok mekanizma bulunmaktadır. İnsülin direncinin oluşmasında; Özellikle iskelet kaslarında insülin reseptör miktarı ve tirozin kinaz aktivitesinin azalmasına yol açan mekanizmaların ve insülinle düzenlenen fosforilasyon/defosforilasyon mekanizmalarındaki “post reseptör” defektlerinin insülin direncinin oluşmasında etkin rol oynadıkları belirtilmektedir (64).

İnsülin direncine yol açan bu mekanizmaların başlıca nedenleri; ektopik lipit metabolitlerinin birikmesi, endoplazmik retikulum stresi ile katlanmamış protein yanıtı (UPR) yolağının aktivasyonu, sistemik inflamasyon ve mitokondriyal strestir (77,78).

Visseral depo ve adipoz dokuda lipit birikiminin insülin direncinin gelişmesinde ve insülin direncinin şiddetinde önemli etkileri bulunmaktadır (79). Randle ve arkadaşları deneysel glukoz - yağ asidi döngüsü çalışmalarında yağ asidi artışının intramitokondriyal asetil KoA/KoA ve NADH/NAD<sup>+</sup> oranında artışa neden olarak kasta piruvat dehidrogenazı inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Bunun sonucunda ise hücre içi sitrat miktarında artış olmaktadır. Bu artış glikolizin anahtar kontrol enzimlerinden fosfofruktokinazı inhibe ederek, glukoz-6-fosfatın birikmesine ve heksokinaz II aktivitesinin baskılanmasına yol açıp, hücre içi glukoz miktarında artışa neden olmaktadır. Hücre içi glukoz artışı sonucunda ise hücre içine insülin aracılı glukoz alımında azalmaya neden

olduğunu öne sürmüşlerdir. Ayrıca izole edilmiş rat kalp ve diyafram kasında yağ asitlerinin substrat oksidasyonu için glukozla yarıştığı gözlemlenmiştir. Yağ asidi oksidasyonunun artmasının ise insülin direncine neden olduğunu belirtmişlerdir (80,81).

Yapılan bazı çalışmalarda ise yağ asitlerinin kas hücrelerine alınmasındaki artışın veya yağ asitlerinin hücre içi metabolizmasında bir azalmanın hücre içinde yağ açıl KoA, diaçilgliserol ve seramidler gibi yağ asit metabolitlerinde artışa yol açtığı gösterilmiştir. Bu metabolitlerin de IRS-1 ve IRS-2 serin/treonin bölgelerinin fosforilasyonuna yol açan bir serin/treonin kinaz kaskadını (protein kinaz C teta tarafından başlatılabilen) etkinleştirdiği belirlenmiştir. Bu kaskadın etkinleşmesi PI-3 kinaz aktivasyonunu gerçekleştiren IRS-1/IRS-2 tirozin fosforilasyonunu azaltarak, PI-3 kinazın aktivasyonunu baskılamaktadır. Hücre içine glukoz alımını sağlayan GLUT-4'ün translokasyonunu düzenleyen PI-3 kinaz aktivitesinin baskılanması sonucu glukoz taşınım aktivitesi ve insülin reseptörlerinin sinyal akışının bozulduğu belirtilmiştir (82,83).

İnsülin direncine neden olduğu düşünülen diğer bir mekanizma inflamasyondur. İnflamatuar moleküllerin lipidlerin ara ürünlerinin yaptığı gibi IRS-1'in serin fosforilasyonundan sorumlu bir dizi farklı serin kinazı uyararak insülin sinyallerini inhibe ettiği öne sürülmektedir (75). Anti inflammatuar ilaçların insülin direncini ciddi derecede azaltmasından dolayı inflamasyonun insülin direnci patogenezinde doğrudan rol oynayabileceği düşünülmektedir (79). Örneğin insülin direncinin görüldüğü durumlarda inflammatör sitokinler olan tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin (IL)-6'nın plazmadaki miktarında artış görülmektedir. Bu artışa karşın, IL-6 nötralizasyonunun insülin duyarlılığını

normale yakın düzeylere yaklaştırarak iyileştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca hepatik inflamasyon sonucu üretilen fibrinojen, IL-6 ve IL-1 beta gibi çeşitli pro-inflamatuar sitokinlerin hem hepatik hem de sistemik insülin direncine neden olduğu belirlenmiştir (79,84). Bütün bunların yanı sıra yağ miktarındaki artış karaciğer ve adipoz dokusunda sitokinler ve kemokinlerin üretimini tetikleyen inflamatuvar cevabı artırmaktadır. Bunun sonucunda monositler ve makrofajları da kapsayan immün sistem hücreleri aktifleştirilerek hep birlikte lokal insülin direncine neden olmaktadır (85). Abdominal lipit kaynaklı sitokinlerin portal taşınımı özellikle nükleer faktör kappa B (NF-Kb) aracılı hepatik inflamasyon ve insülin direnci oluşumunda rol almaktadır (79,85).

İnsülin direnci oluşumunda görev alan mekanizmalardan bir diğerisi ise endoplazmik retikulum (ER) stresi ile katlanmamış protein yanıtı (UPR) yolağının aktivasyonudur. ER; protein, lipit ve sterol sentezlerinin yapıldığı önemli bir hücre organelidir. ER membranına tutunan ribozomlardaki yeni sentezlenen peptidler ER lümenine gönderilir. ER lümeninde protein aperonları tarafından bu peptidlere çeşitli translasyon sonrası değişiklikler yapılır ve peptidlerde katlanmalar gerçekleştirir. Katlanmış proteinler daha sonra golgi kompleksine gönderilir burada proteinler sekrete edilmeden önce son değişiklikler yapılmaktadır. Yanlış katlanmış veya katlanmamış peptid miktarı ER'nin katlama ve işleme kapasitesini aşıyorsa, ER stresi ortaya çıkar (86,87).

ER stresi ER homeostazisinin bozulduğunu göstermektedir (86,87). Hücrede gelişen ER stresini baskılamak için UPR adı verilen sinyal yolakları devreye girmektedir. UPR protein sentezini yavaşlatarak, düzgün katlanmalar için gerekli aperonların sentezini artırarak, ER'nin protein katlanma kapasitesini

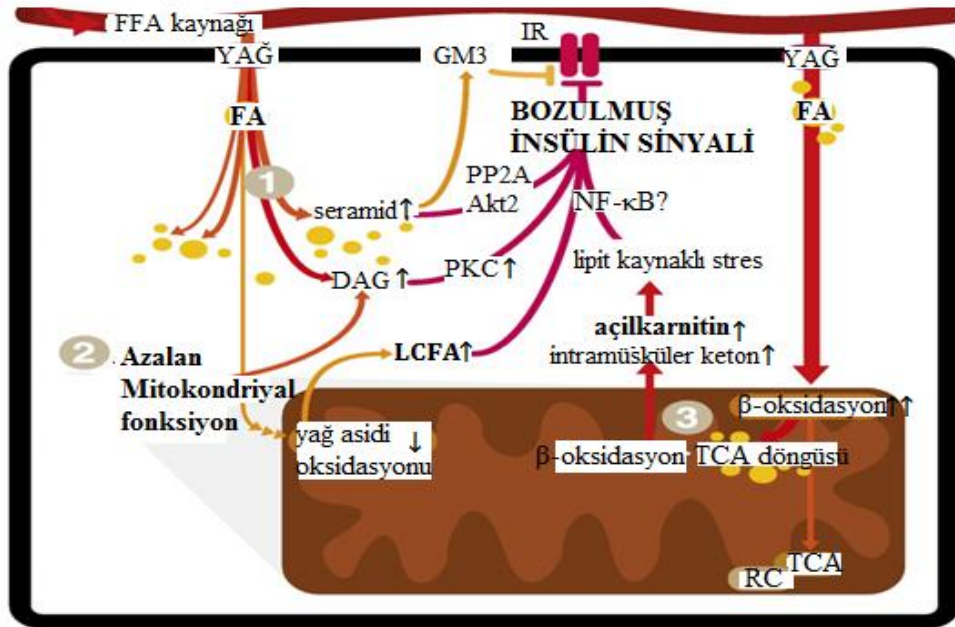
artırmaya ve katlanmamış protein yükünü azaltmaya çalışmaktadır. Eğer bunlarla yeterli katlanmalar sağlanamazsa katlanmamış proteinlerin yıkımını gerçekleştirmektedir (76,86). ER stresinin oluşturduğu UPR; hücre lipid dengesini değiştirip, lipid ara ürünlerinin birikimine yol açarak insülin sinyalizasyonunu bozmaktadır (78). Buna ilaveten insülin biyosentezi, beta hücresi apoptozisi ve inflamasyon gibi çeşitli yollarla insülin direnci ve T2DM'nin patofizyolojisinde rol almaktadır. ER stresi ise insülin sinyal yolağının negatif düzenleyicisi olarak görev yaparak insülin direnciyle doğrudan ilişkilidir (76,87). ER stresinin özellikle c-Jun N-terminal kinazın (JNK) hiperaktivasyonu ve daha sonra IRS-1'in serin fosforilasyonu yollarıyla insülin sinyallerini inhibe ettiği gösterilmiştir (88). Yapılan son çalışmalarda da ER stresinin insülin sinyal yolağının düzenlenmesinde önemli görevleri olduğu belirtilmektedir (76,86,87).

Beta hücrelerinde glukozla uyarılan insülin sekresyonunun gerçekleşmesi için mitokondriyal fonksiyonlar gerekmektedir. Mitokondri fonksiyonlarındaki hasarların  $\beta$  hücrelerinde işlevsel bozukluklara ve insülin direnci yol açtığı belirtilmektedir (89). Mitokondri fonksiyonlarında kalıtsal veya sonradan oluşan defektlerin de hücre içinde yağ asidi metabolitlerinin birikmesine neden olarak insülin sinyal mekanizmasında ve aktivasyonunda bozukluklara yol açtığı gösterilmiştir (77,83). Hareketsizlik ve aşırı besin alımıyla yağ asidi girişinin fazla olduğu durumlarda peroksizom proliferatör-aktive reseptör alfa ve delta (PPAR  $\alpha/\delta$ ) aracılı hedef genlerin aktivasyonu, beta oksidasyonunda TCA döngüsüyle koordineli olmayan bir artışa neden olmaktadır. Bunun sonucunda ise tamamlanmamış yağ oksidasyonu sonucu metabolik yan ürünler (açilkarnitinler, diaçilgliserol, seramid ve reaktif oksijen türleri) mitokondrilerde birikir.

Mitokondrilerde metabolik yan ürünlerin birikmesi mitokondriyal strese yol açarak, Ser kinazları aktive etmektedir.

Bu aktivasyon insülin sinyalizasyonunu ve GLUT-4 translokasyonu baskılayarak insülin direncini indüklemektedir (77,89).

Lipitler başlıca; TCA ve solunum zincirinde gerçekleşen aşırı yağ asidi oksidasyonu sonucu mitokondri içinde açilkarnitinler gibi yağ asidi oksidasyon ara ürünlerinin birikmesine neden olmaktadır. Bu ara ürünler ise daha sonra insülin sinyalizasyonunu bozarak insülin direncine yol açmaktadır (90).



**Şekil 3.** Lipitle İndüklenen İnsülin Direnci Mekanizmaları. (Copyright © 2013 American Diabetes Association, Amerikan Diyabet Derneği izni ile kullanılmıştır (90). RC: solunum zinciri, IR: insülin reseptörü, LCFA: uzun zincirli yağ asidi, DAG: diaçilgliserol, GM3: gangliozidler, PPA2: fosfataz A2, Akt: protein kinaz B, PKC: protein kinaz C

Lipitlerin neden olduğu insülin direnci mekanizmaları şekil 3'te özetlenmiştir. Şekil 3'te belirtilen birinci mekanizma (1), hücre içi artan lipit içeriğinin; seramitler, diaçilgliserol ve gangliozidler (GM3) gibi lipit ara ürünleri aracılığıyla insülin sinyallerinin inhibe edildiğini göstermektedir (bu lipit ara

ürünleri; protein fosfataz A2 (PPA2), protein kinaz B (Akt), protein kinaz C (PKC) enzimlerini veya hücre zarındaki insülin reseptörünü etkileyerek insülin sinyalini inhibe eder). İkinci mekanizma (2) fonksiyonel mitokondri sayısındaki azalmanın yağ asidi oksidasyonunda azalmaya ve sitozolik lipit birikmesinde artışa yol açarak tekrar insülin duyarlılığında bozulmaya neden olduğunu göstermektedir. Üçüncü mekanizma ise (3), mitokondrideki aşırı metabolik yük sonucu beta oksidasyonundaki azalmanın, açilkarnitin gibi yağ asidi oksidasyon ara ürünlerinin mitokondri içinde birikmesini ve insülin sinyallerini bozmasını göstermektedir (90).

### **3.6. Çalışmanın Amacı**

Betatrophin; başlıca karaciğer ve adipoz doku tarafından salgılanan yeni tanımlanmış bir hormondur (11-13). Daha önce yayınlanan deney hayvanı ve insan çalışmalarında betatrophin hormon seviyelerinin insülin direncine bağlı olarak arttığı belirlenmiştir (5,91-95). Yapılan çeşitli çalışmalarda betatrophin hormon seviyeleri ile glukoz, insülin ve çeşitli lipit türleri (trigliserit, HDL, LDL, total kolesterol vb.) arasında çeşitlilik gösteren korelasyonlar bulunmuştur (96,97,100-103). Bazı araştırmacılar ise betatrophinin glukoz metabolizması yerine, daha çok lipit metabolizması ile bağlantılı olabileceğini bildirmişlerdir (12,19,96-99).

Günümüze kadar yapılan çalışmalar göz önüne alındığında betatrophin hormonunun karbonhidrat ve lipit metabolizmasındaki rolünün henüz açıklığa kavuşmadığı görülmektedir. Bu konunun aydınlatılmasına katkı sağlamak için, betatrophin hormon seviyelerinin karbonhidrat ve lipit metabolizması üzerindeki

etkilerinin ilk defa metabolik yollardaki kilit enzimler kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır. Böylece betatrophin hormonunun karbonhidrat ve lipit metabolizması üzerindeki rolü, etkileri, bağlantısı ve işleyiş yolağının aydınlatmasına katkıda bulunulması hedeflenmiştir.



## 4. GEREÇ VE YÖNTEM

### 4.1. Deney Hayvanları

Çalışma için 8 ve 22 haftalık C57BL6/J cinsi toplam 40 tane erkek fare kullanıldı. Boğaziçi Üniversitesi Deneysel Hayvan Üretim ve Bakım Biriminden (VIVARIUM) temin edilen deney hayvanlarına, bu merkezde 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyotlarda,  $21 \pm 4$  °C sıcaklıkta, pellet halinde standart beslenme diyeti ve su verilerek bakıldı. 8 ve 22 haftalık fareler her grupta 10 tane denek olacak şekilde; 8 haftalık deney ( $21.2 \pm 2.1$  gr), 8 haftalık kontrol ( $21 \pm 1.4$  gr), 22 haftalık deney ( $27.2 \pm 1.3$  gr) ve 22 haftalık kontrol ( $27.1 \pm 1.9$  gr) olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Çalışma öncesinde hayvan deneyleri için gerekli bütün etik kurul izinleri Boğaziçi Üniversitesi Kurumsal Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (BÜHADYEK, toplantı tarihi: 23.10.2015) alındı.

### 4.2. Deney Hayvanlarında İnsülin Direnci Modeli Oluşturulması

Deney grubunda daha önce detaylı olarak protokolü belirtilmiş olan bir yöntem kullanılarak insülin direnci oluşturuldu (5,19,94). İnsülin direnci oluşturmak için; insülin reseptörlerine bağlanarak, insülin direncine neden olan bir insülin reseptör antagonisti olan S961 peptidi (Phoenix Pharmaceuticals, INC. Burlingame, CA. A.B.D.) fosfat buffer salin (PBS)'de (Life Technologies Co. Waltham, MA. A.B.D.) çözdürülerek 10 nmol/hafta olacak şekilde Alzet 2001 ozmotik pompa (Alzet Osmotic Pumps Co. Cupertino, California. A.B.D.) kullanılarak farelere subkutan olarak verildi (104). Kontrol grubuna ise aynı şekilde sadece taşıyıcı PBS verildi. 7 gün boyunca kuyruk veninden glukometre (Roche Company, Basel, İsviçre) stripine emdirilen bir damla (yaklaşık 20

mikrolitre ( $\mu$ l) kan ile elektrokimyasal yöntem kullanılarak glukoz düzeyleri belirlendi.

### **4.3. Glukoz ve İnsülin Tolerans Testlerinin Yapılması**

S961 uygulamasının yapıldığı 7 günün sonunda daha önce detaylı olarak protokolü belirtilen metot modifiye edilerek deney hayvanlarına glukoz tolerans testi yapıldı (5,105,106). Bunun için fareler 6 saat aç kaldıktan sonra 1 mg/g vücut ağırlığı D-glukoz (Merck Co. Darmstadt, Almanya) intraperitoneal olarak enjekte edildi. Enjeksiyon sonrası kuyruk veninden alınan kanla 0, 30, 60 ve 120. dakikalarda kan glukoz seviyeleri ölçülerek kaydedildi. Glukoz eğrisi altındaki alan (AUC), Graphpad Prism 3 programı (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA. A.B.D.) kullanılarak hesaplandı. Glukoz tolerans testi uygulamasından bir gün sonra ise daha önce protokolü belirtilmiş olan metot modifiye edilerek insülin tolerans testi yapıldı (96,106). İnsülin tolerans testi için farelere 6 saat açlıktan sonra 0.75 U/kg insülin hormonu (Eli Lilly and Company, Indianapolis, A.B.D.) intraperitoneal olarak verildi. Enjeksiyon sonrası kan glukoz seviyeleri 0, 30, 60 ve 120. dakikalarda kuyruk veninden alınan kanın glukometre stripine emdirilmesiyle, elektrokimyasal yöntem kullanılarak ölçüldü.

### **4.4. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması**

Deney hayvanlarından doku ve kan örneklerinin alınma işlemleri Isoflurane genel anestezisi (Doz: % 1-3) altında yapılmıştır. Öncelikle genel anestezi altında kardiyak punktur yöntemi ile insülin enjektörleri kullanılarak farelerin bütün kanları biyokimya tüplerine alındı. Biyokimyasal analizler için alınan kanlar yaklaşık 30 dk dik pozisyonda bekletildikten sonra +4 °C, 3000 g'de

15 dk santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Elde edilen serumlar enzime bağlı immunosorbent analizi ve spektrofotometre ölçümleri yapılana kadar -20 °C’de saklandı. Daha sonra farelerin karaciğer dokuları RNAaz free ependorf tüplere alınarak sıvı nitrojen içinde dondurulup, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu RT- PCR yapılana kadar -80 derecede muhafaza edildi.

#### **4.5. Enzime Bağlı İmmunosorbentAnalizlerinin (ELISA) Yapılması**

##### **4.5.1. Betatrophin Hormon Seviyelerinin ELISA ile Belirlenmesi**

Çalışmaya başlamadan yaklaşık 40 dk. önce bütün kit komponentleri ve örnekler oda sıcaklığına getirilerek kit protokollerine göre ELISA yapıldı. Serum betatrophin hormon seviyeleri fareye özgün betatrophin ELISA kiti (Phoenix Pharmaceuticals, INC. Burlingame, CA. A.B.D.) ile tespit edildi. Kitin çalışma protokolü aşağıda verilmiştir:

- 1- Bu çalışmada kullanılacak olan immünoplateler üretici firma tarafından sekonder antikorlarla kaplanmış ve nonspesifik bağlanma bölgeleri bloke edilmiştir.
- 2- 20x assay buffer 1x olacak şekilde 950 ml distile su ile sulandırıldı. Seyreltik hale getirilen 1x assay buffer kullanılarak primer antikor, biyotinle işaretlenmiş peptit, streptavidin horse radish peroksidaz (SA-HRP) ve pozitif kontrol sulandırılarak, çalışma boyunca seyreltilmiş reaktifler kullanıldı.
- 3- 1x assay buffer kullanılarak farklı derişimlerde standart peptit solüsyonları hazırlandı.
- 4- A-1 ve A-2 kuyucukları blank olarak ayrıldı.

- 5- Çift tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara 50 µl peptit standartları eklendi.
- 6- Çift tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara 50 µl pozitif kontrol eklendi.
- 7- Belirlenen kuyucuklara 50 µl deney ve kontrol serum örneklerinden eklendi.
- 8- Blank dışındaki bütün kuyucuklara 25 µl primer antikor eklendi.
- 9- Blank dışındaki bütün kuyucuklara 25 µl biyotinle işaretlenmiş peptit eklendi.
- 10- Asetat plate kapatıcı ile immünoplatin üzeri kapatılarak 2 saat boyunca oda sıcaklığında (20 - 23°C), manyetik karıştırıcı kullanılarak (300 - 400) rpm'de inkübasyon yapıldı.
- 11- 2 saat inkübasyon sonunda immünoplate kuyucuklarındaki sıvılar atılarak, 350 µl 1x assay buffer ile herbir kuyucuk 4 kez yıkandı.
- 12- Yıkama sonrası bütün kuyucuklara 100 µl SA-HRP solüsyonu eklendi. immünoplatin üzeri asetat plate kapatıcı ile kapatılarak oda sıcaklığında (20 – 23 °C), manyetik karıştırıcı kullanılarak (300 – 400 rpm hızında) 1 saat inkübasyon yapıldı.
- 13- Bir saatlik inkübasyon sonunda immünoplate kuyucuklarındaki sıvılar atılarak, 350 µl 1x assay buffer ile herbir kuyucuk tekrar 4 kez yıkandı.
- 14- Bütün kuyucuklara 100 µl tetrametilbenzen (TMB) substrat çözeltisi eklenerek, immünoplatin üzeri asetat plate kapatıcı ile kapatılıp, oda sıcaklığında (20 – 23 °C), manyetik karıştırıcı kullanılarak (400 rpm hızında) 1 saat inkübasyon yapıldı. TMB substrat çözeltisi eklendikten sonra platin ışık görmemesine dikkat edildi.

- 15- Daha sonra reaksiyonu durdurmak için bütün kuyucuklara 100 µl 2N hidroklorik asit (HCl) eklendi ve kuyucuklarda maviden sarıya doğru bir renk değişimi meydana geldi.
- 16- Renk değişiminden sonraki 20 dk içinde immünoplate, mikroplate okuyucusuna yerleştirilerek absorban optik dansiteleri 450 nm dalga boyunda belirlendi.

#### **4.5.2. İnsülin Hormon Seviyelerinin ELISA ile Belirlenmesi**

Serum insülin hormon seviyeleri Merck Millipore fare insülin ELISA kiti (Merck Co. Darmstadt, Almanya) kullanılarak belirlendi. Kiti protokolü aşağıda verilmiştir.

- 1- 10x assay buffer 1x olacak şekilde, 10 ml assay buffer üzerine 450 ml deiyonize su eklenerek seyreltildi. Seyreltik hale getirilen 1x assay buffer kullanılarak primer antikor, biyotinle işaretlenmiş peptit, SA-HRP ve pozitif kontrol sulandırılarak, çalışma boyunca sulandırılmış reaktifler kullanıldı.
- 2- Çalışmaya başlamadan önce kullanılacak olan immünoplate kuyucukları 300 µl 1x assay buffer ile 3 kez yıkandı.
- 3- Yıkama işleminden sonra blank ve örneklerin ekleneceği kuyucuklara 10 µl assay buffer eklendi.
- 4- Blank, standart ve kontrol kuyucuklarına 10 µl matriks solüsyonu eklendi.
- 5- Çift tekrarlı olacak şekilde standartları oluşturacak kuyucuklara artan konsantrasyonlarda (0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 ng/mL) 10 µl insülin standartları eklendi.

- 6- Belirlenen plate kuyucuklarına 10 µl QC1 ve 10 µl QC2 eklendi.
- 7- Belirlenen kuyucuklara çift tekrarlı olacak şekilde 10µl serum örneklerinden konuldu.
- 8- Bütün kuyucuklara 80 µl detection antikoru eklenerek platin üzeri plate kapaticısı ile örtülüp, oda sıcaklığında (20 - 23°C), manyetik karıştırıcı kullanılarak 405 rpm hızında 2 saat inkübasyon yapıldı.
- 9- İki saatlik inkübasyon sonunda plate kuyucuklarındaki sıvılar atılarak, herbir kuyucuk 300 µl 1x assay buffer ile 3 kez yıkandı.

Bütün kuyucuklara 100 µl enzim solüsyonu eklenerek, platin yüzeyi kapatılıp, oda sıcaklığında (20 – 23 °C) manyetik karıştırıcı kullanılarak (400 rpm hızında) 30 dakika inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonunda plate kuyucuklarındaki sıvılar atılarak, herbir kuyucuk 300 µl 1x assay buffer ile 6 kez yıkandı.

Yıkama sonrası bütün kuyucuklara 100 µl substratçözeltisieklenerek kuyucuklarda mavi renk oluşumu gözlenene kadar (5 - 20 dk arası) plate manyetik karıştırıcıda bekletildi.

- 10- Reaksiyonu durdurmak için bütün kuyucuklara 100 µl stop solüsyonu eklendi ve kuyucuklarda maviden sarıya doğru bir renkdeğişimi meydana geldi. Renk değişiminden sonra plate, mikroplate okuyucusuna (BioTek Instruments, Winooski, VT, A.B.D.) yerleştirilerek absorbans optik dansiteleri 450 nm ve 590 nm dalga boyunda okutularak belirlendi.

## 4.6. RT - PCR Analizlerinin Yapılması

### 4.6.1. Dokudan RNA İzolasyonu

RT-PCR analizlerinin yapılabilmesi için öncelikle karaciğer dokularından total RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon, dokudan RNA izolasyon kiti, PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies Co. Waltham, MA.A.B.D.) kullanılarak gerçekleştirildi. RNA izolasyonuna başlamadan önce dokular oda sıcaklığına alındı. Eriyen doku örneklerinden 200 mg alınarak 10 ml'lik steril cam beherlere aktarıldı. Dokuların bozulmaması için beherler buz dolu kaplar içinde tutuldu ve aşağıdaki protokole göre izolasyon yapıldı.

- 1- Öncelikle % 1 oranında 2-  $\beta$ -merkaptoetanol içeren 130 ml lizis tampon solüsyonu hazırlandı (130 ml lizis tamponu içine 1300  $\mu$ l 2- $\beta$ -merkaptoetanol eklendi).
- 2- Tüplere aktarılan doku örneklerinin her birine 2- $\beta$ -merkaptoetanol ile hazırlanmış lizis tampon solüsyonundan 4 ml eklendi ve dokular tamamen parçalanana kadar homojenizatör yardımıyla (Sonics & Materials, Inc. Newtown, A.B.D.) buz içinde homojenize edildi.
- 3- Homojenize edilen dokular 2,600x g hızda 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj yapılarak elde edilen süpernatant dikkatli bir şekilde yeni bir RNAaz free tüpe alındı.
- 4- Süpernatantların üzerine 1/1 oranında % 70'lik etanol eklenip, vorteks ile karıştırıldı.
- 5- Bu karışım  $\leq 700 \mu$ l' den az olacak şekilde spin kolon tüpüne aktarıldı.

- 6- RNA'nın spin kolon tüpündeki membrana tutunması için  $12,000 \times g$  hızda 15 dakika oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Tüpün altında kalan sıvı atıldı.
- 7- Spin kolon tüpüne 700 µl yıkama tamponu I (wash buffer I) eklenerek  $12,000 \times g$  hızda 15 dakika oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Tüpün altındaki sıvı ve toplama tüpü atılarak, spin kolonu yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- 8- Yıkama tamponu II'ye (wash buffer II) 300 ml % 96'lık etanol eklendi ve spin kolonuna % 96'lık etanol eklenmiş Wash Buffer II'den 500 µl konuldu.
- 9-  $12,000 \times g$  hızda 15 dakika oda sıcaklığında santrifüj yapıldı ve tüpün altındaki sıvı atıldı. 8. ve 9. maddeler aynı şekilde tekrarlandı.
- 10- RNA içeren spin kolon tüpü oda sıcaklığında  $12,000 \times g$  hızda 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atılarak, spin kolonu RNAaz free ependorf tüpüne aktarıldı.
- 11- Spin kolonundaki filtrenin ortasına 70 µl RNAaz free su eklenerek, oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi.
- 12- Spin kolonu bulunan RNAaz free ependorf tüpler oda sıcaklığında  $12,000 \times g$  hızda 2 dakika santrifüj yapılarak saf RNA elde edildi. Çalışılncaya kadar RNA örneklerimiz  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  derin dondurucuda saklandı.

#### **4.6.2. Qubit ile RNA Miktarının Tayini**

RNA İzolasyonu yaptığımız örneklerdeki total RNA miktarı, Qubit® RNA HS assay ölçüm kiti (Life Technology. Waltham, MA. A.B.D.)

kullanılarak, Qubit 2.0 Fluorometre cihazı (Invitrogen Co. Waltham, MA A.B.D.) ile ölçülmüştür. Ölçüm kitinin protokolünde belirtildiği gibi; her bir örnek başına 1 µl Qubit Reagent, 199 µl Qubit Buffer ile karıştırılarak ölçüm solüsyonu hazırlandı. Son hacim 200 µl olacak şekilde bu karışımdan 199 µl alınarak, karışıma 1 µl örnek eklendi. Hazırlanan örnekler 2-3 saniye vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dakika beklendikten sonra cihazda okutuldu. Bütün tüplerdeki RNA miktarı ng/µl cinsinden hesaplandı.

#### **4.6.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi**

cDNA sentezi için High-Capacity RNA to cDNA™ kiti kullanıldı (Life Technologies Co. Waltham, MA A.B.D.) ve bu kitin standart protokolü takip edilerek cDNA sentezi yapıldı. Aşağıda kullanılan kitin reaksiyon ve inkübasyon protokolü verilmiştir.

<b>Reaksiyon Bileşenleri</b>	<b>Miktar</b>
10x Revers Transkripsiyon Buffer	2 µl
25x dNTP mix (100 mM)	0.8 µl
10x RT Random Primer	2 µl
MultiScribe Revers Transkriptaz	1 µl
RNA + nükleaz free su	14.2 µl
Toplam hacim :	20 µl

cDNA sentezi için her bir örnekten eşit miktarda RNA (300 ng) kullanıldı. RNA ve su miktarı toplamda 14.2 µl olacak şekilde reaksiyon karışımına eklendi. Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra tüpler, termal cyclus PCR cihazına (Bibby Scientific Limited, OSA, İngiltere) yerleştirilerek aşağıdaki revers transkripsiyon koşullarında reaksiyon gerçekleştirildi:

Aşağıda sıcaklık ve inkübasyon süresi verilen reaksiyon sonucunda yaklaşık olarak 20 µl cDNA sentezlendi. Pipetaj hatasını en aza indirmek için cDNA örnekleri bire bir oranında sulandırıldı.

<b>Sıcaklık</b>	<b>İnkübasyon süresi</b>
25 °C'de	10 dakika Primer bağlanması
37 °C'de	120 dakika cDNA sentezi
85 °C'de	5 dakika
4 °C'de	∞

#### **4.6.4. RT-PCR Analizi**

RT-PCR analizi sentezlenen cDNA örnekleri (her bir örnekte yaklaşık 80 ng olacak şekilde) kullanılarak, TaqMan® Universal PCR master miks (Applied Biosystems, Waltham, MA. A.B.D.) protokolünde belirtildiği şekilde yapılmıştır. Hazırlanan reaksiyon karışımı ve koşulları aşağıda verilmiştir.

<b>Reaksiyon Bileşenleri</b>	<b>Miktar</b>
2X Taqman Universal PCR master miks	10 µl
20X Taqman gen ekspresyon assay	1 µl
cDNA + nükleaz free su	9 µl
Toplam hacim	20 µl

Reaksiyon karışımında kullanılan 2X TaqMan universal PCR Master miks; ultra saf DNA polimeraz, urasil-N glukozilaz (UNG), dNTP, passiv ROX referans boyası ve optimize edilmiş buffer bileşenleri içermektedir. 20X Taqman gen ekspresyon assay (Life Technology. Waltham, MA. A.B.D.) ise; betatrophin, sitrat sentaz, LDH5 ve ACC1 genlerinin fareye özgü sentezlettirilen primerleri ile VIC ve FAM floresan boyalarıyla işaretli problemlerden oluşmaktadır. İlgili genler ve

referans kontrol (housekeeping gen) olarak kullanılan betaaktine ait ekspresyon assaylerin üretici firma kodları tablo 1 de verilmiştir.

**Tablo 1.** Çalışılan Genler ve Üretici Firma Kodları

<b>GEN</b>	<b>KODU</b>
Betatrophin	Mm01175863-g1
Sitrat sentaz	Mm00466043-m1
LDH5	Mm01612132-g1
ACC1	Mm01304257-m1
Betaaktin	Mm00607939-s1

Belirtilen miktarlarda reaksiyon bileşenleri ile hazırlanan karışım 96 kuyucuklu RT-PCR platelerindeki (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO. A.B.D.) kuyucuklara konuldu. Plate'in üzeri MicroAmp optical adhesive film (Life Technology. Waltham, MA. A.B.D.) ile kapatıldıktan sonra plate Roche Lightcycler 480 II (Roche Co. Basel, İsviçre) RT-PCR cihazına yerleştirildi. Hangi kuyucuklarda hangi grupların ve hangi genin olduğu işaretlendikten sonra 45 döngüden oluşan RT-PCR programı ayarlandı.

#### **RT-PCR Koşulları**

95°C'de 10 dk. Polimeraz aktivasyonu

95°C'de 15 sn. Denatürasyon

60°C'de 1 dk Primer bağlanması ve uzama

Real Time PCR için kullanılan tüm cDNA örnekleri aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde 3'er kez çalışılarak bu üç ölçümün ortalaması analizlerde kullanıldı. Bunun amacı, deneysel hataları ve farkları azaltmaktır. Seçilen zaman noktalarında eksprese olan *housekeeping* gen miktarı, 8 haftalık deney ve kontrol örnekleri arasında ifade düzeyleri karşılaştırılarak analiz edildi.

## **4.7. Spektrofotometre Analizlerinin Yapılması**

Bütün spektrofotometre analizleri kalorimetrik enzimatik kitler (ERBA Diagnostics GmbH. Mannheim, Germany) kullanılarak, deney ve kontrol grubundaki hayvanların serum örnekleri ile yapılmıştır. Çalışmaya başlanılmadan önce kullanılacak olan spektrofotometrik biyokimya analizörüne (Roche Company. Basel, İsviçre) uygun olacak şekilde bütün kitler kalibrasyon kitleri kullanılarak (Roche Company. Basel, İsviçre) kalibre edilmişlerdir.

### **4.7.1. HDL ve LDL Seviyelerinin Tayini**

Serum HDL ve LDL seviyeleri, ilgili kalorimetrik enzimatik kitlerin çalışma prensibine göre belirlendi. Kitlerin çalışma prensibi modifiye edilmiş polivinilsulfonik asit (PVS) ve polietilen-glikol-metil eterin (PEGME) klasik çöktürme yöntemine dayanmaktadır. Çöktürme işlemi optimize miktarlarda PVS/PEGME ve belirli deterjanlar kullanılarak gerçekleştirildi. Daha sonra spektrofotometrik biyokimya analizöründe 600 nm dalga boyunda Serum örneklerinden ölçüm yapılarak, HDL ve LDL kolesterol miktarları hesaplandı.

### **4.7.2. Trigliserit Seviyesinin Tayini**

Serum trigliserit miktarı tayini için kullanılan kitin çalışma prensibine göre; trigliseritler lipaz enzimiyle serbest yağ asitleri ve gliserole parçalandı. Oluşan gliserol, ATP ile fosforile edilip gliserol kinaz enzimi tarafından gliserol-3-fosfat ve adenosindifosfata (ADP) dönüştürüldü. Gliserol-3-fosfat ise; gliserol fosfatoksidaz enzimi tarafından dihidroksi aseton fosfata oksitlendi ve hidrojen peroksit üretildi. Hidrojen peroksit, peroksidaz (POD) enziminin katalizlediği bir reaksiyon ile 4-aminoantipirin (4AAP) ve 4-klorofenolla birleşerek kırmızı renkli

bir molekül olan kinonimine dönüştürüldü. Bu renkli maddenin absorbanısı örneklerdeki mevcut konsantrasyonile orantılı olarak spektrofotometrik biyokimya analizöründe 505 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak trigliserit miktarı hesaplandı.

#### **4.7.3. Total Kolesterol Seviyesinin Tayini**

Serum total kolesterol seviyesi kalorimetrik enzimatik ölçüm kiti ile belirlendi. Kitin çalışma prensibine göre; kolesterol esterleri kolesterol esteraz tarafından kolesterol ve serbest yağ asitlerine hidrolize edildi. Daha sonra, serbest kolesterol kolesterol oksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonla oksijen ile birleşerek 4- aminoantipirin ile hidrojen peroksit oluşumu sağlandı. Meydana gelen hidrojen peroksit, peroksidaz (POD) enziminin katalizlediği bir reaksiyon ile 4-aminoantipirin (4AAP) ve fenolla birleşerek kırmızı renkli bir molekül olan kinonimine dönüştürüldü. Bu renkli maddenin absorbanısı örneklerdeki mevcut konsantrasyon ile orantılı olarak olan spektrofotometrik biyokimya analizöründe 505 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak total kolesterol miktarı hesaplandı.

#### **4.8. İstatistiksel Analizler**

Bütün istatistiksel analizler SPSS 20 Windows programı (SPSS Inc. Chicago IL A.B.D.) ile gerçekleştirildi. AUC hesaplamaları GraphPad Prism 3 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA. A.B.D.) programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analizler sonucu elde edilen veriler  $\pm$  standart sapma (SS) şeklinde gösterildi. Çalışmada kullanılan deney hayvanı sayısı güç analizi yapılarak belirlendi. Deney ve kontrol gruplarına ait bütün verilere normallik analizi uygulandı. Normallik analizinin sonucuna uygun olarak deney ve kontrol

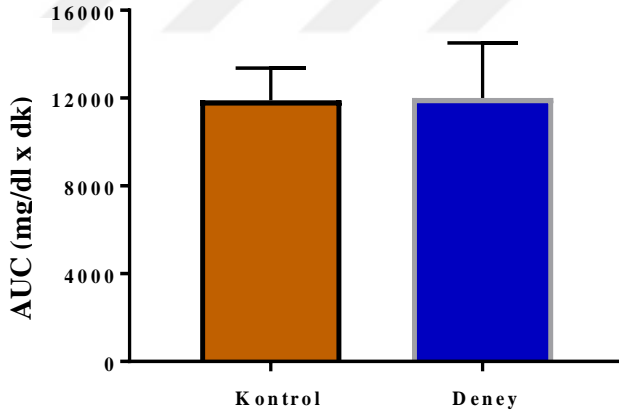
grubunda ortalamalar arasındaki farklılıklar bağımsız iki örnek T testi (Independent Samples T Test) ve Mann-Whitney U testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Betatrophin hormon seviyeleri ile gen ekspresyonları ve biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyonun değerlendirilmesi ise Pearson ve Spearman çift yönlü korelasyon testleri kullanılarak yapıldı.  $p < 0.05$  istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.



## 5. BULGULAR

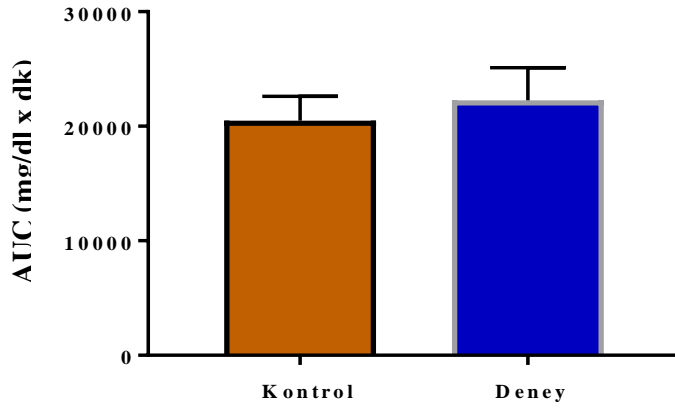
### 5.1. Glukoz ve İnsülin Tolerans Testlerinin Değerlendirilmesi

22 haftalık farelere intraperitoneal olarak glukoz ve insülin tolerans testleri uygulandı. Uygulama sonrası glukoz ve insülin eğrisi altındaki alan (AUC) trapezoid yöntemi temel alınarak GraphPad Prism 3 programı ile hesaplandı. Hesaplamalar sonucunda deney ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılığın olmadığı tespit edildi. 22 haftalık deney grubunda insülin tolerans testi için  $AUC=12000 \pm 2518$ , kontrol grubunda insülin tolerans testi için  $AUC=11900 \pm 1462$ ,  $p=0.91$  olarak hesaplandı (Şekil 4). 22 haftalık deney grubunda glukoz tolerans testi için  $AUC=22271 \pm 2844$ , kontrol grubunda glukoz tolerans testi için  $AUC=20490 \pm 2123$ ,  $p=0.13$  olarak hesaplandı (Şekil 5).



Şekil 4. 22 Haftalık Farelerde İnsülin AUC Değişim Grafiği ( $p>0.05$ ).

Tolerans testleri sonucunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 22 haftalık deney grubunda insülin direnci oluşmadığı belirlendi. Bu nedenle 22 haftalık yaş grubunda biyokimyasal ve moleküler analizler yapılamamıştır.



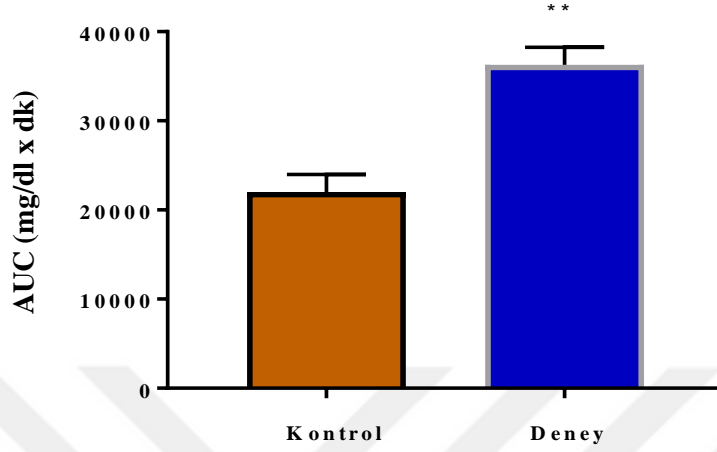
**Şekil 5.** 22 Haftalık Farelerde Glukoz AUC Değişim Grafiği ( $p>0.05$ ).

8 haftalık farelere yapılan glukoz ve insülin tolerans testleri sonucunda ise, deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, glukoz ve insülin AUC'lerin deney grubunda artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlam arz ettiği görüldü. Deney grubunda glukoz tolerans testi için  $AUC= 36278 \pm 1970$ , kontrol grubunda glukoz tolerans testi için  $AUC= 22020 \pm 1954$  olarak hesaplandı.

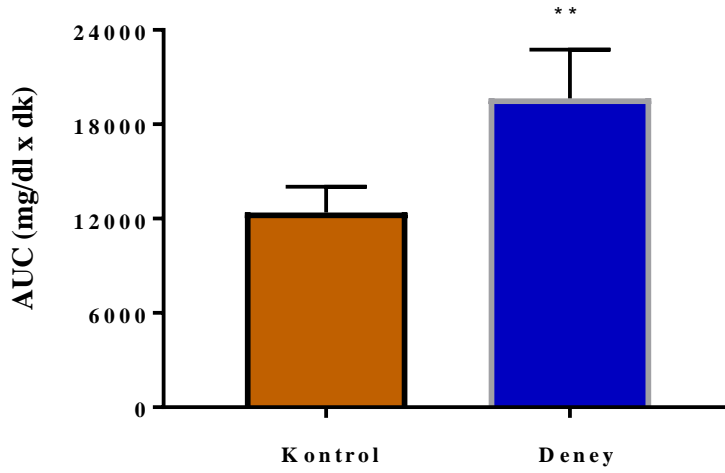
Deney grubunda insülin tolerans testi için  $AUC= 19645 \pm 3095$ , kontrol grubunda insülin tolerans testi için  $AUC= 12385 \pm 1635$  olarak hesaplandı.

Glukoz ve insülin tolerans testleri için yapılan AUC analizleri sonucunda, 8 haftalık deney grubunda glukoz ve insülin intoleransının gelişerek, insülin direncinin oluştuğu belirlendi.

8 haftalık farelere ait glukoz ve insülin AUC değışim grafikleri Şekil 6 ve Şekil 7 de gōsterilmiřtir.

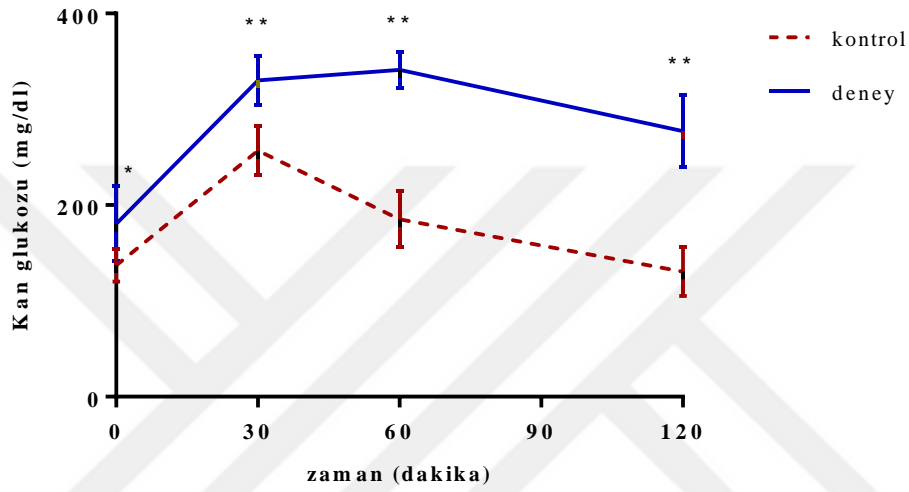


Şekil 6. 8 Haftalık Farelerde Glukoz AUC Değişim Grafiği (\*\*p<0.0001).

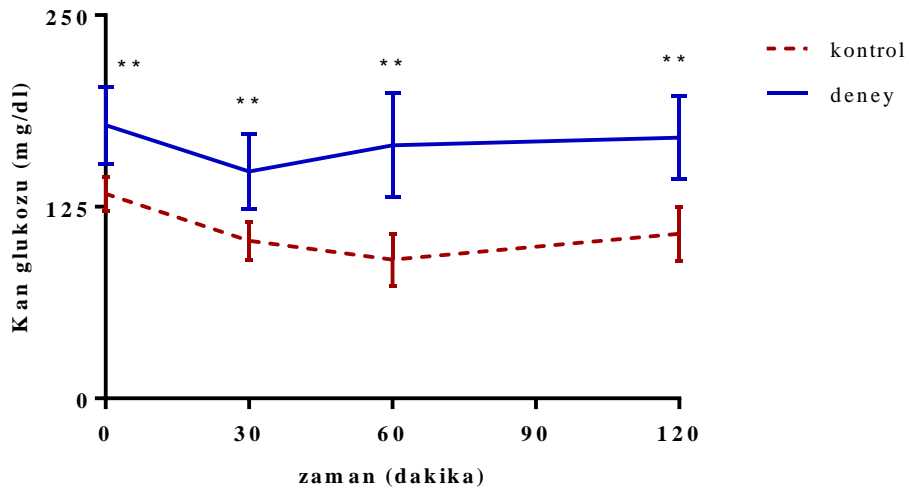


Şekil 7. 8 Haftalık Farelerde İnsülin AUC Değişim Grafiği (\*\*p<0.0001).

8 haftalık deney ve kontrol gruplarında glukoz ve insülin tolerans testleri için 0, 30, 60 ve 120. dakikalarda ölçülen glukoz seviyelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında deney grubunda zamana bağlı olarak anlamlı farklılık görülmüştür (Şekil 8 ve 9).



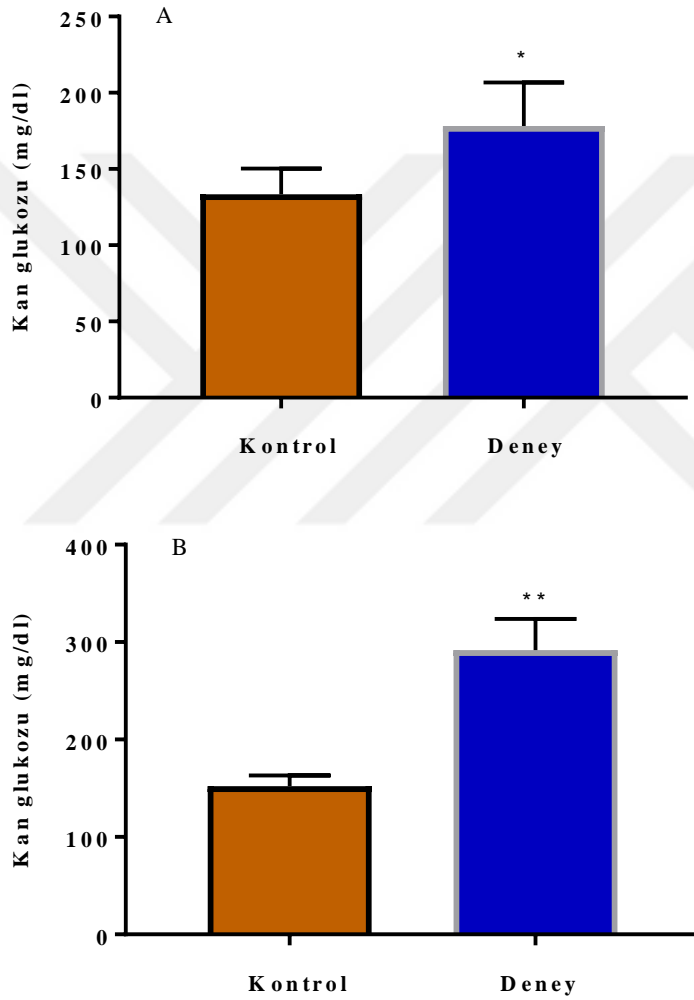
Şekil 8. Glukoz Tolerans Testi Eğrisi (\*p<0.05, \*\*p<0.001).



Şekil 9. İnsülin Tolerans Testi Eğrisi (\*\*p<0.001).

## 5.2. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi

İnsülin direnci oluşturulan 8 haftalık deney grubunda serum açlık ve tokluk glukoz düzeylerinin kontrol grubuna göre oldukça yüksek oranda arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 10 A ve B).

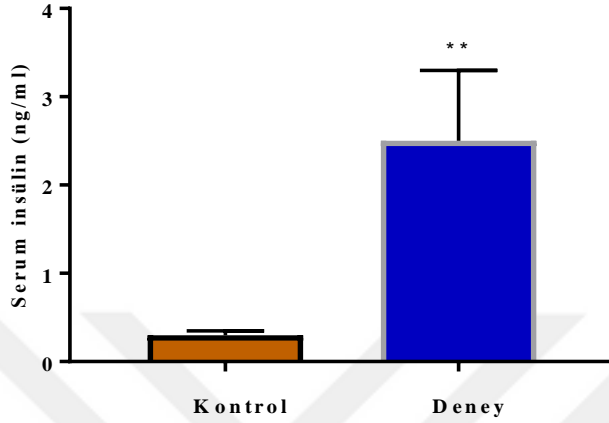


**Şekil 10.** 8 Haftalık Farelerde Kan Glukoz Düzeyleri.

(A): Açlık kan glukoz düzeyleri (\*p=0.001)

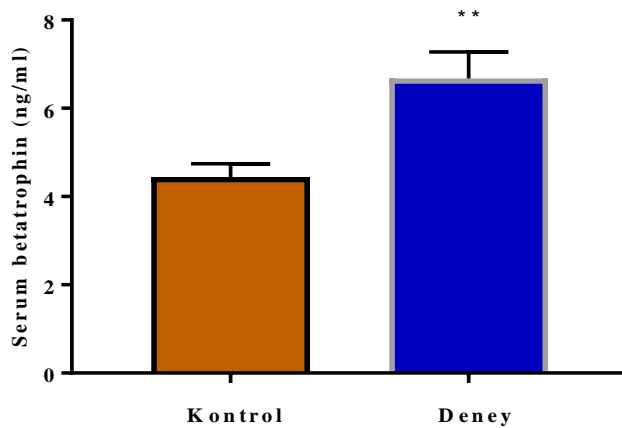
(B): Tokluk kan glukoz düzeyleri (\*\*p<0.00)

8 haftalık deney grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında insülin seviyelerinde de yüksek düzeyde artış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 11).



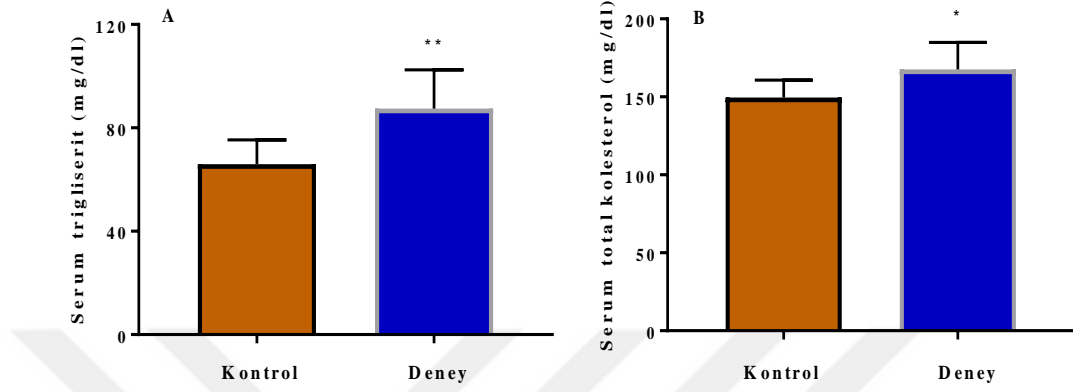
Şekil 11. Serum İnsülin Düzeyleri (\*\*p<0.001).

Kontrol ve insülin direnci oluşturulan 8 haftalık deney gruplarının serum örnekleri kullanılarak elde edilen betatrophin hormon seviyelerinin deney grubunda artış gösterdiği ve bu artışın yapılan istatistiksel analizler sonucunda anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 12).

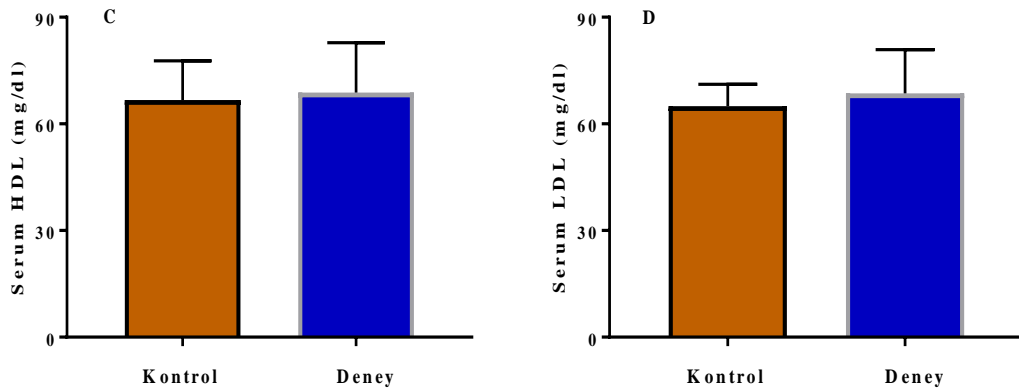


Şekil 12. Serum Betatrophin Seviyeleri (\*\*p<0.001).

8 haftalık deney grubunda serum trigliserit ve total kolesterol düzeylerinin kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi (Şekil 13 A ve B).



Deney grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum HDL ve LDL kolesterol seviyelerinde artış olmasına rağmen, bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 13 C ve D).



**Şekil 13.** Serum Lipit Seviyeleri

- (A): Serum Trigliserit Seviyeleri (\*\*p= 0.001)
- (B): Serum Total Kolesterol Seviyeleri (\*p<0.05)
- (C): Serum HDL Seviyeleri (p>0.05)
- (D): Serum LDL Seviyeleri (p>0.05)

8 haftalık kontrol ve deney gruplarına ait bütün biyokimyasal verilerin ortalamalarının istatistiksel olarak karşılaştırılması ile elde edilen sonuçlar tablo 2’de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

**Tablo 2.** 8 Haftalık Kontrol ve Deney Gruplarında Biyokimyasal Parametrelerin Karşılaştırılması

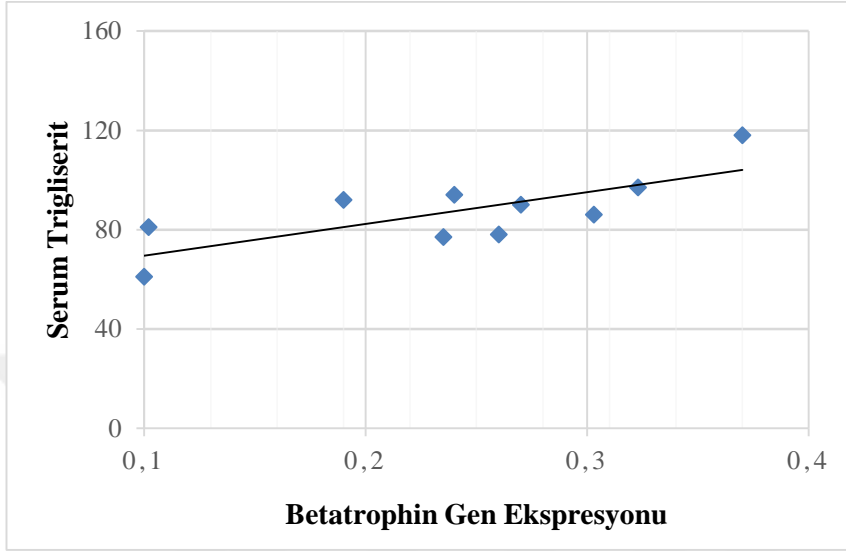
<b>Biyokimyasal Parametreler</b>	<b>Kontrol Grubu Ortalama ± SS (n=10)</b>	<b>Deney Grubu Ortalama ± SS (n=10)</b>	<b>p</b>
<b>Serum betatrophin (ng/ml)</b>	4.44 ± 0.3	6.68 ± 0.6	0.000
<b>Açlık glukoz (mg/dl)</b>	133.5 ± 16.9	178.2 ± 28.5	0.001
<b>Tokluk glukoz (mg/dl)</b>	152.3 ± 10.9	291.7 ± 32.2	0.000
<b>İnsülin (ng/ml)</b>	0.30 ± 0.04	2.5 ± 0.8	0.000
<b>HDL (mg/dl)</b>	66.7 ± 11	68.8 ± 14	0.704
<b>LDL (mg/dl)</b>	65.02 ± 6.1	68.56 ± 12.3	0.427
<b>Total kolesterol (mg/dl)</b>	149.5 ± 11.2	167.5 ± 17.4	0.013
<b>Trigliserit (mg/dl)</b>	65.9 ± 9.4	87.4 ± 15	0.001

8 haftalık kontrol ve deney grupları arasında yapılan korelasyon analizi sonucunda, deney grubunda betatrophin gen ekspresyonu ile serum trigliserit seviyesi arasında pozitif yönde ve istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı bir korelasyon ( $r= 0.751$ ,  $p= 0.012$ ) tespit edildi (Tablo 3).

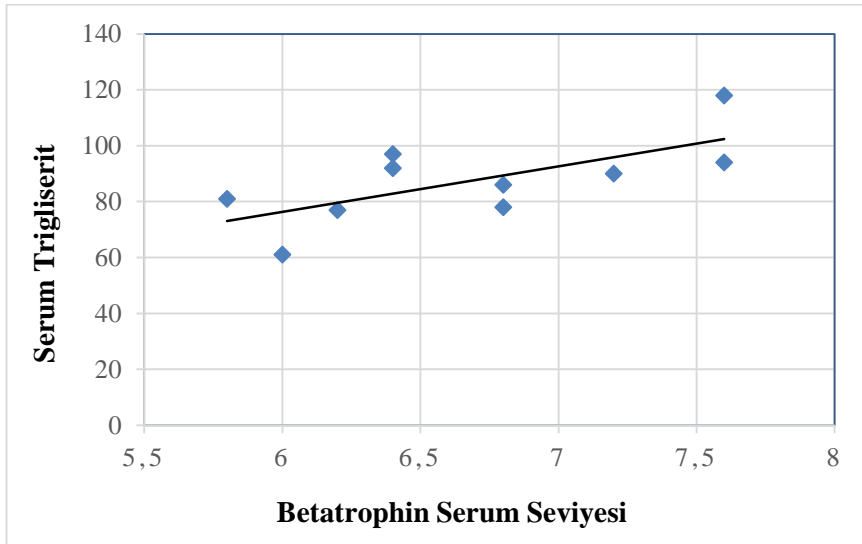
**Tablo 3.** 8 Haftalık Kontrol ve Deney Gruplarında Betatrophin Gen Ekspresyonu Temel Alınarak Belirlenen Korelasyon Analizi Sonuçları

	<b>Betatrophin Gen Ekspresyonu</b>			
	<b>Kontrol Grubu</b>		<b>Deney Grubu</b>	
	<b>r</b>	<b>p</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
<b>LDH 5 gen ekspresyonu</b>	-0.398	0.25	-0.493	0.14
<b>Sitrat sentaz gen ekspresyonu</b>	-0.030	0.93	0.446	0.19
<b>ACC1 gen ekspresyonu</b>	-0.195	0.59	-0.329	0.35
<b>Açlık glukoz (mg/dl)</b>	0.328	0.27	-0.228	0.52
<b>Tokluk glukoz (mg/dl)</b>	0.202	0.57	0.207	0.56
<b>İnsülin (ng/ml)</b>	0.454	0.18	0.460	0.18
<b>HDL kolesterol (mg/dl)</b>	-0.006	0.98	-0.313	0.38
<b>Total kolesterol (mg/dl)</b>	0.409	0.24	0.329	0.35
<b>LDL kolesterol (mg/dl)</b>	-0.315	0.37	0.314	0.37
<b>Trigliserit (mg/dl)</b>	0.555	0.09	0.751	0.012

8 haftalık deney grubunda betatrophin hormon seviyeleri ile serum trigliserit seviyesi arasındaki korelasyon eğrileri Şekil 14 a ve 14 b’de gösterilmiştir.



Şekil 14 a. Serum Trigliserit ile Betatrophin Gen Ekspresyonu Arasındaki Korelasyon Eğrisi



Şekil 14 b. Serum Betatrophin ile Trigliserit Arasındaki Korelasyon Eğrisi

Yapılan korelasyon analizleri sonucunda, deney grubunda betatrophin serum seviyesi ile trigliserit seviyesi arasında da pozitif yönde ve istatistiksel olarak anlamlı ( $r= 0.686$ ,  $p= 0.028$ ) bir korelasyon tespit edildi (Tablo 4).

Deney ve kontrol grupları arasında yapılan korelasyon analizi değerlendirildiğinde ise, deney grubunda betatrophin ekspresyon ve serum seviyeleri ile LDH5, ACC1, sitrat sentaz gen ekspresyonları, serum insülin, HDL kolesterol, LDL kolesterol, total kolesterol, trigliserit, açlık ve tokluk glukoz seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı seviyede korelasyon bulunmamıştır (Tablo 3 ve 4).

**Tablo 4.** 8 Haftalık Deney ve Kontrol Gruplarında Betatrophin Serum Seviyesi Temel Alınarak Belirlenen Korelasyon Analizi Sonuçları

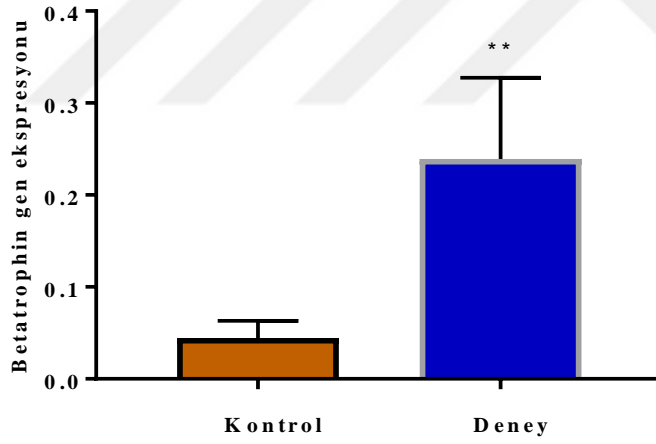
	<b>Betatrophin Serum seviyesi</b>			
	<b>Kontrol Grubu</b>		<b>Deney Grubu</b>	
	<b>r</b>	<b>p</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
<b>LDH5 gen ekspresyonu</b>	-0.408	0.24	-0.515	0.12
<b>Sitrat sentaz gen ekspresyonu</b>	-0.097	0.79	0.328	0.35
<b>ACC1 gen ekspresyonu</b>	-0.433	0.21	-0.317	0.37
<b>Açlık glukoz (mg/dl)</b>	0.051	0.88	-0.308	0.38
<b>Tokluk glukoz (mg/dl)</b>	0.338	0.34	0.120	0.74
<b>İnsülin (ng/ml)</b>	0.575	0.08	0.277	0.43
<b>HDL kolesterol (mg/dl)</b>	-0.293	0.41	-0.003	0.99
<b>LDL kolesterol (mg/dl)</b>	0.097	0.79	0.478	0.16
<b>Total kolesterol (mg/dl)</b>	0.607	0.063	0.117	0.74
<b>Trigliserit (mg/dl)</b>	0.044	0.90	0.686	0.028

### 5.3. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Çalışmadaki RT-PCR sonuçları Roche Light Cycler 480 II yazılımı ile kantite edildi. Betatrophin, LDH5, ACC1 ve sitrat sentaz genlerinin verileri beta-aktin geniyle normalize edilip,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülünden çıkan verilerle istatistiksel analiz gerçekleştirildi.

#### 5.3.1. Betatrophin Gen Ekspresyonu

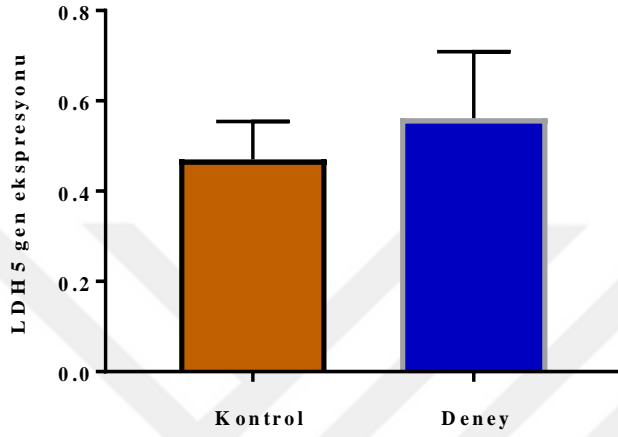
İnsülin direnci oluşturulan 8 haftalık deney grubunda betatrophin gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre 5.4 kat arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 15).



Şekil 15. Betatrophin Gen Ekspresyon Grafiği (\*\*p<0.001).

### 5.3.2. LDH5 Gen Ekspresyonu

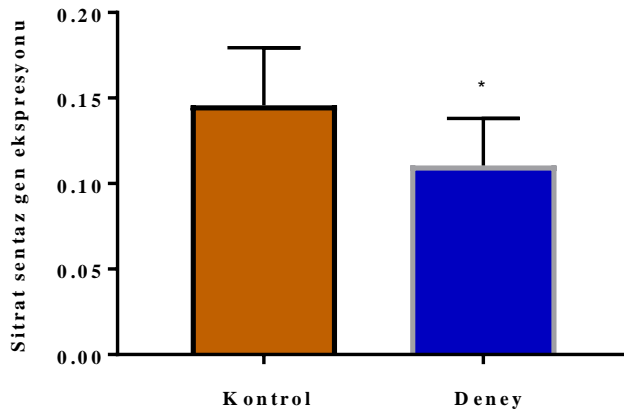
İnsülin direnci oluşturulan 8 haftalık deney grubunda LDH5 gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre arttığı tespit edilmiştir. Ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (Şekil 16)



Şekil 16. LDH5 Gen Ekspresyon Grafiği (p=0.010).

### 5.3.3. Sitrat Sentaz Gen Ekspresyonu

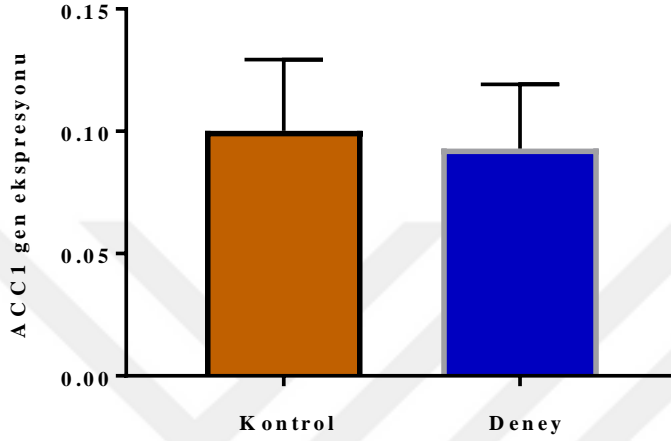
8 haftalık kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sitrat sentaz gen ekspresyonunun deney grubunda azalmış olduğu ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 17).



Şekil 17. Sitrat Sentaz Gen Ekspresyon Grafiği (\*p=0.019).

#### 5.3.4. ACC1 Gen Ekspresyonu

8 haftalık deney grubunda ACC1 gen ekspresyonunda artış görülmesine rağmen, kontrol grubu ile kıyaslandığında bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 18)



Şekil 18. ACC1 Gen Ekspresyon Grafiği (p=0.056).

#### 5.4. Hayvan Ağırlıklarındaki Değişimin Değerlendirilmesi

8 haftalık kontrol grubunun ağırlık ortalamasında 1 hafta sonra % 7.6 artış görülürken, 8 haftalık deney grubunun ağırlık ortalaması % 4.2 oranında artmıştır. 22 haftalık kontrol grubunun ağırlık ortalamasında 1 hafta sonra % 3.3 artış görülürken, 22 haftalık deney grubunun ağırlık ortalamasında % 2.2 artış belirlenmiştir. 8 ve 22 haftalık deney ve kontrol gruplarındaki haftalık ağırlık değişimleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilmemiştir (p>0.05).

## 6. TARTIŞMA

Betatrophin; büyük oranda karaciğer ve adipoz doku tarafından salgılanan (12,13) ve insülin direnci koşullarında artış gösteren bir hormondur (91-94). Bu hormonun hem glukoz hem de lipit metabolizmasının düzenlenmesinde görev aldığı belirtilmektedir (11,12,18,107). Ancak betatrophin hormonunun beta hücreleri, glukoz ve lipit metabolizmaları üzerindeki etkileri tam olarak netlik kazanmamıştır. Obezite ve T2DM gibi metabolik hastalıklarla yapılmış olan insan çalışmalarında da betatrophin konsantrasyonlarında farklılıklar görülmektedir. T2DM'li hastalarla yapılan bir çalışmada betatrophin seviyelerinde azalma tespit edilirken (108), bazı çalışmalarda deney ve kontrol grubu arasında bir farklılık bulunmamıştır (97,109), bir kısım çalışmada ise artış kaydedilmiştir (92,93,101,110-112).

Jiao ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, betatrophin hormonunun fare beta hücrelerinde transkripsiyonu indüklemesine rağmen insan beta hücrelerinde etkili olmadığını göstermişlerdir (94). Yapılan başka bir çalışmada ise betatrophin overekspresyonunun sağlandığı farelerde betatrophin miktarı yaklaşık 26 kat artmasına karşın, beta hücre replikasyonunda, kütlelerinde ve glukoz homeostazisinde anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. Fakat kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hasta grubunda serum trigliserit seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür (96). Gusarova ve arkadaşları da betatrophin overekspresyonunun trigliserit seviyesini yükselttiğini ancak glukoz toleransında bir değişiklik oluşturmadığını ve betatrophin inhibisyonunun hipertrigliseridemi için bir tedavi yöntemi olabileceğini belirtmişlerdir (19).

Yapılan benzer çalışmalarda da betatrophin hormonunun lipit metabolizmasıyla daha çok bağlantılı olabileceği belirtilmektedir (12,96-98). Betatrophin hormonunun karbonhidrat ve lipit metabolizmasındaki etkileri henüz açıklığa kavuşmamış tartışmalı bir konu olduğundan, bu konunun aydınlatılması bilimsel açıdan oldukça önemli görülmektedir. Bu konunun aydınlatılmasına katkı sağlamak amacıyla, farelerde insülin direnci oluşturarak yapılmış olan bu çalışmada, betatrophin hormonunun hem karaciğerden ekspresyonu hem de serum düzeyleri ile ACC1, sitrat sentaz ve LDH5 enzimlerini kodlayan genlerin ekspresyonları arasındaki ilişki literatürde ilk defa incelenmiştir. Çalışma analizi sonucunda ise betatrophin ekspresyon ve betatrophin serum seviyeleri ile ACC1, LDH5 ve sitrat sentaz arasında bir bağlantının olmadığı tespit edilmiştir.

LDH5 enzimi anaerobik solunumda görev alan anahtar enzimlerden biridir ve pirüvatın laktata dönüşümünü sağlamaktadır (20). İnsülin direncinde oksidatif kapasitesinin azaldığı ve bu nedenle laktat oluşumunda artış olduğu ortaya konmuştur. Oksidatif kapasitede azalma ve laktat/pirüvat mekanizmasındaki bozulmanın doğal sonucu olarak ise laktat miktarında artış meydana gelmektedir (32). Yapılan çalışmalarda da laktat miktarının, insülin direnci, obezite ve T2DM koşullarında artış gösterdiği belirtilmektedir (34,41,113,114). Ayrıca T2DM'li hastalarda oksidatif kapasitesinin azalması ile artmış olan plazma laktat seviyesi arasında bağlantı olduğu ve plazma laktat konsantrasyonları ile açlık plazma glukozu arasında ilişki olduğu belirtilmektedir (34,113). Ratlarda yapılan başka bir çalışmada ise laktat infüzyonunun glukoz oksidasyonunu önemli derecede azalttığı gösterilmiştir (114). Crawford ve arkadaşları tarafından yüksek sayıda örnekten oluşan retrospektif bir çalışmada da plazma laktat seviyesi ile T2DM

arasında çok güçlü ve bağımsız bir ilişkili olduğunu göstermiştir (113). Kan laktat düzeylerinin bağımsız bir şekilde diyabet gelişiminde bir belirteç olabileceği ve yağ dokusu ve iskelet kasında artan laktat üretiminin farelerde insülin direnci ve diyabet için sorumlu olabileceği de rapor edilmiştir (41). Beta adacık hücrelerinde adenoviral vektör aracılığıyla oluşturulan aşırı LDHA (5) aktivitesinin bu hücrelerde insülin sekresyonunu azalttığı, normal glukoz metabolizmasını, insülin sekresyonunu bozduğu ve mitokondri metabolizmasında değişikliğe yol açtığı belirlenmiştir. Bu nedenle LDHA enziminin aşırı üretiminin T2DM'nin bazı formlarında insülin sekresyon defektlerinden doğrudan sorumlu olabileceği düşünülmektedir (40). Diyabetik farelerde ise LDHA'nın direkt olarak inhibisyonu ile yapılan bir çalışmada açlık glukoz ve HA1C seviyeleri azalırken, insülin sekresyonu ve pankreas adacıklarının morfolojisinde belirgin şekilde iyileşme tespit edilmiştir (41). İnsülin direnci, obezite ve T2DM çalışmalarında LDH enziminin önemini göz önüne alarak yaptığımız bu çalışmada da benzer şekilde insülin direnci oluşan farelerde LDH5 enziminde artış olduğu görülmüştür. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. İstatistiksel olarak anlamlı farklılığın olmamasının, yapılan çalışmalarda kullanılan denek türlerinin ve hastalık modellerinin bu çalışmadakinden farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

LDH enziminin insülin direnci, obezite ve T2DM gibi metabolik hastalıklar dışında son zamanlarda yapılan çalışmalarda kanser patofizyolojisinde de rol oynadığı belirtilmektedir. Bu enziminin kanser tanısında biyomarker olarak ve LDHA inhibisyonunun ise çeşitli kanser türleri için önemli bir tedavi yöntemi olabileceği öne sürülmektedir (37-39,115-117).

Kanser hücrelerinde normal hücrelerden farklı olarak, enerji metabolizması değişim göstermektedir (30,118,119). Normal olarak farklılaşmış hücreler enerji üretmek için temel olarak mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu kullanırken, kanser hücrelerinin çoğu, normal hücrelerin aksine enerji elde etmek için "Warburg etkisi" olarak adlandırılan aerobik glikoliz yolunu kullanmaktadır (30). Warburg kanser hücrelerinin ortamda oksijenin olup, olmamasını dikkate almadan glukozu en çok laktata dönüştürme eğiliminde olduklarını ortaya koymuştur. Kanser hücrelerinin mitokondrilerinin işlevsel kaldığını ve oksidatif fosforilasyonun kısmen devam ettiğini de rapor etmiştir. Ancak oksidatif fosforilasyon için yeterli oksijen olmasına rağmen glukozun büyük çoğunluğu laktata çevrilerek enerji elde edilmektedir (30,120). Pirüvatı laktata çeviren LDH5 enzimi ise Warburg etkisi için hız sınırlayıcı olan önemli bir enzimdir (121). Kanser hücrelerinin enerji elde etmek için glukozu fazla eğilimi ve çoğunlukla laktat üzerinden enerji üretmesinden dolayı pek çok kanser türünde laktat miktarında ve LDH enzimi ekspresyonunda artış görülmektedir (37,38,117). Yapılan çalışmalarda pankreas kanseri (117), hepatoselüler karsinomlu hücrelerde (115) ve oral skuamöz hücre karsinomu gibi çeşitli kanser türlerinde ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (116). Yeni bir çalışmada ise LDHA'nın mesane kanserinde tümör hücrelerinin çoğalmasını, invazyon ve göçünü teşvik ettiği belirlenmiştir. Kanser kök hücre markırları ile LDHA arasında ise pozitif yönlü bir ilişki tespit edilmiştir (121). LDH5 ile tümör gelişimi ve tümör nüksü arasında da ilişkili bulunmuştur (116).

Betatrophin hormonu ise daha önce yapılmış olan bir çalışmada hepatoselüler karsinomla ilişkili yeni bir gen (TD26 veya TTH26) olarak

tanımlanmıştır. Bu çalışmada TD26'nın (betatrophin) hepatoselüler karsinomlu dokularda (HCC) çok yüksek ekspresyon gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca TD26'nın küçük hücreli akciğer kanserli, gastrik kanserli ve kolon kanserli dokularda da yüksek ekspresyonunun olduğu görülmüştür ve HCC'li dokularda anjiyogenez ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (122). Başka bir çalışmada ise pankreatik duktal adenokarsinomlu hastalarda betatrophin ekspresyonunun arttığı ve bu hastalarda tümör aşamaları için betatrophinin belirteç olarak kullanılabilmesi öne sürülmüştür (123).

Yapılan bu çalışmada ise betatrophin ekspresyon ve serum seviyeleri ile LDH5 gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmemesine rağmen, her iki genin de kanser patofizyolojisinde tam olarak açıklığa kavuşmamış rolleri bulunmaktadır. Betatrophinin anjiyogenesisde rol oynayabileceği ve LDH5 enziminin ise tümör gelişim ve metastazında rolü olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle betatrophin hormonu ile LDH5 arasındaki ilişkinin açıklığa kavuşması için gelecekte fare veya farklı türlerde yeni çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada incelenen diğer enzim sitrat sentazdır. İnsülin reseptör mutasyonu nedeniyle genetik olarak insülin direnci bulunan hastalarda sitrat sentaz aktivitesi ve yedek solunum kapasitesindeki azalmayla birlikte mitokondriyal oksidatif fonksiyonun bozulduğu rapor edilmiştir (124). Yapılan çalışmalarda insülin direncinin temel rol oynadığı T2DM hastalarında sitrat sentaz ekspresyonunda ve sitrat sentaz aktivitesinde azalmanın tespit edilmesinden dolayı, sitrat sentaz aktivitesindeki yapısal defektlerin T2DM patogenezinde rol oynayabileceği belirtilmiştir (125,126). Yaptığımız bu çalışmada da benzer

şekilde insülin direnci oluşturulan deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sitrat sentaz seviyesinin deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Bu azalmanın sebebinin insülin direnci sonucu mitokondri boyutu, oksidatif aktivite ve enerji üretimindeki azalma ile mitokondriyal işlev bozukluğundan kaynaklandığı belirtilmektedir. Mitokondrideki fonksiyonel ve oksidatif defektler ise, yalnızca enerji homeostazını bozmakla kalmayıp, oksidatif stresi de artırmaktadır. İnsülin direnci sonucu azalan mitokondriyal oksidatif aktivite ile anaerobik metabolizmaya yönelim ve bağımlılık artmaktadır (124,125,127). Bu çalışma sonucunda betatrophin hormon seviyeleri ile sitrat sentaz gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmamıştır.

Bu çalışmada incelenen bir diğer enzim ise ACC1 dir. ACC1 yağ asidi sentezinin hız sınırlayıcı en önemli kilit enzimlerinden biri olup, yağ asidi sentezini uyararak lipogenezi kolaylaştırmaktadır. ACC1 knockout farelerde hepatik trigliserit birikiminin azaldığının tespit edilmesi ACC1'in lipogenezin düzenlenmesinde çok önemli rol oynadığını göstermektedir (128,129). Obez ratlar ve diyabetik farelerde ACC dimerizasyonunu önleyerek, enzimatik aktiviteyi inhibe eden bir ajanla yapılan çalışmada da, ACC1 ve ACC2 inhibisyonunun glukoz ile uyarılmış insülin salgısını artırdığı, karaciğer yağlanmasını azalttığı, insülin duyarlılığını artırdığı, kilo alımını azalttığı gözlemlenmiştir (130).

Ayrıca çalışmalarda ACC inhibisyonunun insülin direncinin de olduğu metabolik hastalıkların tedavisinde faydalı olabileceği belirtilmiştir (57,130-132). Yapılan diğer bir çalışmada da ACC1 aktivitesinin baskılanması sonucu hepatik malonil-CoA seviyesinin azalması ile tokluk durumunda yağ oksidasyonu artarak,

lipid birikimi azalmıştır. Bunun sonucunda ise hepatik insülin duyarlılığının arttığı belirlenmiştir (133).

Betatrophin hormonunun lipit metabolizmasında düzenleyici etkisinin olduğu ve yağ asidi trafiğinde rol aldığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (11,12,16). Bununla beraber betatrophin hormonunun LPL enzimini baskılayarak trigliserit seviyesini artırdığı belirtilmektedir (11). ACC1 enzimindeki artışın ise yağ asidi sentezini ve dolayısıyla trigliserit seviyesini artırdığı bilinmektedir (130,131,134). Ancak bu çalışmada ACC1 ile betatrophin hormonu arasındaki ilişki incelenmiş olup, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Bu çalışma sonucunda betatrophin hormonunun özellikle lipit metabolizmasının düzenlenmesini ACC1 ile koordineli olarak yürütmediği sonucuna varılabilir. Ancak daha fazla çalışmanın bu sonuçları desteklemesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmadaki biyokimyasal parametreler değerlendirildiğinde ise; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında insülin direnci oluşturulan 8 haftalık deney grubunda serum betatrophin seviyeleri, trigliserit, açlık ve tokluk glukoz, total kolesterol ve insülin seviyelerinde istatistiksel olarak önemli derecede artış görülmüştür.

8 haftalık deney grubunda biyokimyasal parametreler ile betatrophin ekspresyon ve betatrophin serum seviyelerini karşılaştırdığımızda betatrophin hormon seviyeleri ile deney grubunda artmış olan trigliserit düzeyleri arasında önemli derecede ilişki olduğu belirlenmiştir. Ancak deney ve kontrol gruplarında yapılan istatistiksel analiz sonucunda betatrophin ekspresyon ve betatrophin serum seviyeleri ile açlık glukoz, tokluk glukoz, insülin, total kolesterol, HDLve LDL kolesterol seviyeleri arasında bir ilişki bulunmamıştır.

Benzer şekilde Gusarova ve arkadaşları betatrophin overekspresyonunun trigliserit seviyesini yükselttiğini ancak glukoz toleransında bir değişiklik oluşturmadığını ve betatrophin inhibisyonunun hipertrigliseridemi için bir tedavi yöntemi olabileceğini belirtmişlerdir (19).

Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise betatrophin knockout fareler ile wild type fareler karşılaştırıldığında, knockout farelerde ilginç bir şekilde trigliserit seviyesi yaklaşık olarak % 70 oranında azalmıştır. Düşük trigliserit seviyesinin hem VLDL salgılanmasında azalış ile hem de LPL aktivitesinde bir artış ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu durumun betatrophin'in farelerde besin alımına cevaben periferik dokulara trigliserit akışında önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür. Ancak plazma kolesterol seviyeleri açısından knockout ve wild tip fareler arasında anlamlı farklılık tespit edilmemiştir (99).

Zhang ve arkadaşları da betatrophin hormonunun adenovirüslerle overekspresyonunun trigliserit seviyesini yükselttiğini ve LPL aktivitesini inhibe ettiğini belirtmişlerdir (13).

Ren ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise betatrophin null farelerde trigliserit seviyesinin wild tip farelerin yaklaşık üçte biri düzeyinde olduğunu göstermişlerdir. Betatrophin hormonunun en fazla adiposit farklılaşması sırasında uyarıldığını ve lipid metabolizmasının önemli bir yeni düzenleyicisi olduğunu belirtmişlerdir (12). Betatrophin overekspresyonunun oluşturulduğu farelerde yapılan başka bir çalışmada kontrol grubuyla karşılaştırıldığında serum trigliserit seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış görülürken, total kolesterol seviyesinde artış görülmemiştir (96). Fenzl ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada ise kontrol ile morbid obez ve T2DM hastaları arasında betatrophin

konsantrasyonları açısından bir farklılık görülmediği rapor edilmiştir. Ayrıca hem T2DM hem de obez hastalarda betatrophin konsantrasyonu ile total kolesterol, LDL ve HDL kolesterol arasında anlamlı korelasyon bulunmuştur ancak bu çalışmaya benzer şekilde betatrophin ile plazma glukoz ve insülini arasında ilişki tespit edilmemiş olup, betatrophin ile glukoz homestazisi ve beta hücre fonksiyonu arasında da anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (97). T2DM'li hastalarda yapılan başka bir çalışmada plazma betatrophin hormon seviyesi ile hem trigliserit hem de açlık glukoz ve insülin seviyeleri arasında yüksek korelasyon bulunmuştur (135). Gao ve arkadaşlarının T2DM hastalarıyla yaptıkları çalışmada ise serum betatrophin düzeyinin T2DM'li hastalarda yüksek düzeyde arttığı ve bu çalışmaya benzer şekilde serum betatrophin seviyesi ile trigliserit arasında güçlü bir ilişki olduğu belirlenmiştir (102).

Espes ve arkadaşlarının da T2DM li hastalarla yaptıkları bir çalışmada plazma betatrophin düzeyi hasta grubunda % 40 artış göstermiştir. Bu çalışmaya benzer şekilde betatrophin ile kan lipid düzeyleri (total kolesterol HDL ve LDL) ve açlık glukozu arasında bağlantı bulunmazken, bu çalışmanın aksine plazma betatrophin ile trigliserit seviyesi arasında da bir ilişki tespit edilmemiştir (92).

Wang ve arkadaşlarının metabolik sendromlu hastalarla yapmış oldukları güncel bir çalışmada ise bu çalışmaya benzer şekilde, betatrophin ile açlık glukozu, açlık insülini, total kolesterol arasında bir korelasyon bulunmadığı, bu çalışmanın aksine trigliserit ile de korelasyonun belirlenemediği, HDL kolesterol ile de negatif bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte betatrophin hormonunun metabolik sendromun başlangıcında hastaların tanı ve klinik ilerlemesinde faydalı bir belirteç olabileceği öne sürülmüştür (103). Abu-Farha ve

arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada da betatrophin seviyesinin obez bireylerde artış gösterdiği ve hem obez hem de nonobez bireylerde betatrophin ile açlık glukozu arasında yüksek düzeyde korelasyon olduğu belirlenmiştir. Obez bireylere uygulanan egzersiz sonrası ise betatrophin miktarının azaldığı ve bu durumun betatrophin'in potansiyel terapötik etkisini destekler nitelikte olabileceği kaydedilmiştir (110). Aynı çalışma grubunun T2DM'li hastalarla yapmış olduğu çalışmada ise, bu çalışma sonuçlarına benzer şekilde deney grubunda betatrophin seviyesinin yükseldiği ancak betatrophin ile açlık kan şekeri arasında korelasyon bulunmadığı tespit edilmiştir (100).

Sonuç olarak; yapılan çalışmalarda betatrophin hormonunun karbonhidrat ve lipit metabolizmaları üzerindeki etkileri ve bu metabolizmalara ait biyokimyasal parametrelerle olan bağlantısı birbirinden farklılık göstermekte olup, henüz açıklığa kavuşmamış bir konudur. Bu çalışmada elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak, betatrophin hormonunun karbonhidrat metabolizması üzerindeki etkilerini, aerobik solunumun kilit enzimlerden olan sitrat sentaz aracılığı ile göstermediği sonucuna varılabilir. Ayrıca betatrophin hormonunun karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde, anaerobik solunum enzimlerinden olan LDH5 ile bağlantısının olmadığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada betatrophin hormonu ile ACC1 enzimi arasından bir korelasyon bulunmaması, bu hormonun lipit metabolizmasını ACC1 enzimi üzerinden düzenlemediğini işaret ediyor olabilir. Bununla beraber, betatrophin hormon seviyelerinin plazma trigliserit seviyesi ile yüksek korelasyon gösterdiği ve trigliserit metabolizmasında önemli rolü olabileceği de belirlenmiştir. Bu nedenle yapılan bu çalışmanın betatrophin hormonunun karbonhidrat ve lipit

metabolizması üzerindeki etkileri ile ilişkisinin tespitine katkıda bulunabileceğini ve aerobik ve anaerobik solunum yollarıyla korelasyonu hakkında ise bir ön bilgi sunabileceği ortaya konmuştur. Betatrophin hormonunun karbonhidrat ve lipit metabolizması üzerindeki etkilerinin tam olarak açıklığa kavuşması için daha fazla çalışmanın gerekli olduğu düşünülmektedir.



## 7. KAYNAKLAR

- 1- Meier JJ, Butler AE, Saisho Y, et al.  $\beta$ -cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of  $\beta$ -cell mass in humans. *Diabetes* 2008; 57: 1584-94.
- 2- Salas E, Rabhi N, Froguel P, Annicotte JS. Role of Ink4a/Arf locus in beta cell mass expansion under physiological and pathological conditions. *J Diabetes Res* 2014; 873-679.
- 3- Teta M, Long SY, Wartschow LM, Rankin MM, Kushner JA. Very slow turnover of  $\beta$ -cells in aged adult mice. *Diabetes* 2005; 54: 2557-67.
- 4- Alonso LC, Yokoe T, Zhang P, et al. Glucose Infusion in Mice. A New Model to Induce  $\beta$ -Cell Replication. *Diabetes* 2007; 56: 1792-801.
- 5- Yi P, Park JS, Melton DA. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic beta cell proliferation. *Cell* 2013; 153: 747-58.
- 6- Buteau J, Spatz ML, Accili D. Transcription Factor FoxO1 Mediates Glucagon-Like Peptide-1 Effects on Pancreatic  $\beta$ -Cell Mass. *Diabetes* 2006; 55: 1190-6.
- 7- Georgia S, Bhushan A.  $\beta$  cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal  $\beta$  cell mass. *The J Clin Invest* 2004; 114: 963-8.
- 8- Joao AL, Reis F, Fernandes R. The incretin system ABCs in obesity and diabetes - novel therapeutic strategies for weight loss and beyond. *Obes Rev* 2016; 17: 553-72.
- 9- El Ouaamari A, Kawamori D, Dirice E, et al. Liver-derived systemic factors drive beta cell hyperplasia in insulin-resistant states. *Cell Rep* 2013; 3: 401-10.
- 10- Imai J, Katagiri H, Yamada T, et al. Regulation of pancreatic  $\beta$  cell mass by neuronal signals from the liver. *Science* 2008; 322: 1250-4.
- 11- Quagliarini F, Wang Y, Kozlitina J, et al. Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 19751-6.
- 12- Ren G, Kim JY, Smas CM. Identification of RIFL, a novel adipocyte-enriched insulin target gene with a role in lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 303: E334-51.
- 13- Zhang R. Lipasin, a novel nutritionally-regulated liver-enriched factor that regulates serum triglyceride levels. *Biochem Bioph Res Co* 2012; 424: 786-92.
- 14- Gray KA, Daugherty LC, Gordon SM, et al. Genenames.org: the HGNC resources in 2013. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: 545-52.
- 15- Fu Z, Yao F, Abou-Samra AB, Zhang R. Lipasin, thermoregulated in brown fat, is a novel but atypical member of the angiopoietin-like protein family. *Biochem Bioph Res Co* 2013; 430: 1126-31.
- 16- Santulli G. Angiopoietin-like proteins: a comprehensive look. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014; 5: 4.
- 17- Mattijssen F, Kersten S. Regulation of triglyceride metabolism by Angiopoietin-like proteins. *Biochimica Bioph Acta* 2012; 1821: 782-9.

- 18- Zhang R, Abou-Samra AB. A dual role of lipasin (betatrophin) in lipid metabolism and glucose homeostasis: consensus and controversy. *Cardiovasc Diabetol* 2014; 13: 133.
- 19- Gusarova V, Alexa CA, Na E, et al. ANGPTL8/betatrophin does not control pancreatic beta cell expansion. *Cell* 2014; 159: 691-6.
- 20- Murray R, Rodwell V, Bender D, et al. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 28th Edition, New York: Mcgraw-Hill, 2009.
- 21- DeBerardinis RJ, Thompson CB. Cellular Metabolism and Disease: What Do Metabolic Outliers Teach Us? *Cell* 2012; 148: 1132-44.
- 22- Lieberman MA, Marks A, Peet A. *Marks' Basic Medical Biochemistry*. 4th Edition, Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2012.
- 23- Bhagavan NV. *Medical Biochemistry*. 4th Edition, Florida: Harcourt Academic Press, 2002.
- 24- Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th Edition, New York: W. H. Freeman, 2008.
- 25- Ferrier DR. *Lippincott's Illustrated Reviews Series: Biochemistry*. 6th Edition, Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2014.
- 26- Dashty M. A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism. *Clin Biochem* 2013; 46: 1339-52.
- 27- Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr Opin Plant Biol* 2004; 7: 254-61.
- 28- Chatterjea N, Shinde R. *Textbook of Medical Biochemistry*. 9th Edition, London: Jaypee Brothers Medical Publications (P) Limited, 2012.
- 29- Adeva AM, López OM, Funcasta-CR, et al. Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion* 2014; 17: 76-100.
- 30- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324: 1029-33.
- 31- Revelly J-P, Tappy L, Martinez A, et al. Lactate and glucose metabolism in severe sepsis and cardiogenic shock. *Crit Care Med* 2005; 33: 2235-40.
- 32- Avogaro A, Toffolo G, Miola M, et al. Intracellular lactate- and pyruvate-interconversion rates are increased in muscle tissue of non-insulin-dependent diabetic individuals. *J Clin Invest* 1996; 98: 108-15.
- 33- Bar J, Spencer S, Morgan S, et al. Correlation of lactate dehydrogenase isoenzyme profile with outcome in patients with advanced colorectal cancer treated with chemotherapy and bevacizumab or cediranib: retrospective analysis of the HORIZON I study. *Clin Colorectal Cancer* 2014; 13: 46-53.
- 34- Chen Y, Varasteh B, Reaven G. Plasma lactate concentration in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 1992; 19: 348-54.
- 35- Granchi C, Bertini S, Macchia M, Minutolo F. Inhibitors of lactate dehydrogenase isoforms and their therapeutic potentials. *Curr Med Chem* 2010; 17: 672-97.

- 36- Juraschek SP, Shantha GPS, Chu AY, et al. Lactate and risk of incident diabetes in a case-cohort of the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *PLoS one* 2013; 8: 55113.
- 37- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Simopoulos C, Polychronidis A, Sivridis E. Lactate dehydrogenase 5 (LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer. *Clin Exp Metastas* 2005; 22: 25-30.
- 38- Le A, Cooper CR, Gouw AM, et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proceedings of the Nat Acad of Sci* 2010; 107: 2037-42.
- 39- Rani R, Kumar V. Recent Update on Human Lactate Dehydrogenase Enzyme 5 (hLDH5) Inhibitors: A Promising Approach for Cancer Chemotherapy. *J Med Chem* 2016; 59: 487-96.
- 40- Ainscow EK, Zhao C, Rutter GA. Acute overexpression of lactate dehydrogenase-A perturbs beta-cell mitochondrial metabolism and insulin secretion. *Diabetes* 2000; 49: 1149-55.
- 41- Ye W, Zheng Y, Zhang S, et al. Oxamate Improves Glycemic Control and Insulin Sensitivity via Inhibition of Tissue Lactate Production in db/dbMice. *PLoS One* 2016; 11: 0150303.
- 42- Akram M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. *Cell Biochem Biophys* 2014; 68: 475-8.
- 43- Siu PM, Donley DA, Bryner RW, Alway SE. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *J Appl Physiol* 2003; 94: 555-60.
- 44- Tong W-H, Rouault TA. Metabolic regulation of citrate and iron by aconitases: role of iron–sulfur cluster biogenesis. *Biometals* 2007; 20: 549-64.
- 45- Yıldırımka M. *ProspektUS Biyokimya*. 3. Baskı, Ankara: Klinisyen Tıp Kitabevleri, 2008.
- 46- Spina RJ, Chi MM, Hopkins MG, et al. Mitochondrial enzymes increase in muscle in response to 7-10 days of cycle exercise. *J Appl Physiol* 1996; 80: 2250-4.
- 47- Boekema EJ, Braun H-P. Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem* 2007; 282: 1-4.
- 48- Bratic I, Trifunovic A. Mitochondrial energy metabolism and ageing. *BBA-Bioenergetic* 2010; 1797: 961-7.
- 49- Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S. Lipid classification, structures and tools. *BBA* 2011; 1811: 637-47.
- 50- Lee CH, Olson P, Evans RM. Minireview: Lipid Metabolism, Metabolic Diseases, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Endocrinology* 2003; 144: 2201-7.
- 51- Feingold KR, Grunfeld C. “Introduction to Lipids and Lipoproteins”. <http://www.endotext.org/01.03.2016>.
- 52- Griffin BA. *Lipid metabolism*. Surgery (Oxford) 2013; 31: 267-72.
- 53- Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *American Journal of Physiology – Endocrinol Metab* 2009; 297: 271-88.

- 54- Hall JE. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 12th Edition, Mississippi: Elsevier Health Sciences, 2010.
- 55- Kim K-H. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annu Rev Nutr* 1997; 17: 77-99.
- 56- Baynes J, Dominiczak MH. Medical Biochemistry. 4th Edition, Colombia: Elsevier Health Sciences, 2014.
- 57- Tong L. Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 1784-803.
- 58- Abu-Elheiga L, Oh W, Kordari P, Wakil SJ. Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/high-carbohydrate diets. *P Natl Acad Sci* 2003; 100: 10207-12.
- 59- Munday MR. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soci Transact* 2002; 30: 1059-64.
- 60- Pearlman R, Wang YJ. Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs: Case Histories. First Edition, Berlin: Springer, 1993.
- 61- Sembulingam K, Sembulingam P. Essentials of Medical Physiology. 6th Edition, New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2012.
- 62- Zalewski PD, Millard SH, Forbes IJ, et al. Video image analysis of labile zinc in viable pancreatic islet cells using a specific fluorescent probe for zinc. *J Histochem Cytochem* 1994; 42: 877-84.
- 63- Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks H. Ganong's Review of Medical Physiology. 24th Edition, New York: McGraw-Hill, 2012.
- 64- Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal Medicine. 19 th Edition, New York: McGraw-Hill Education, 2015.
- 65- MacDonald PE, Rorsman P. Oscillations, Intercellular Coupling, and Insulin Secretion in Pancreatic [beta] Cells. *PLoS Biol* 2006; 4.
- 66- BERNE RM. Berne Levy Fizyoloji. Beşinci Baskı, Ankara: Güneş Tıp Kitabevi, 2008.
- 67- Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Brit J Nutr* 2003; 89: 3-9.
- 68- Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *The J Clin Invest* 2000; 106: 165-9.
- 69- Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414: 799-806.
- 70- Szablewski L. Expression of glucose transporters in cancers. *BBA* 2013; 1835: 164-9.
- 71- Scheepers A, Joost H-G, Schurmann A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN Parenter Enter* 2004; 28: 364-71.
- 72- Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspect Med* 2013; 34: 121-38.
- 73- Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pr* 2011; 93: 52-9.

- 74- Newsholme E, Dimitriadis G. Integration of biochemical and physiologic effects of insulin on glucose metabolism. *Exp Clin Endocrinol Diab* 2001; 109: 122-34.
- 75- Sesti G. Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006; 20: 665-79.
- 76- Flamment M, Hajduch E, Ferré P, Foufelle F. New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trend Endocr Metab* 2012; 23: 381-90.
- 77- Muoio DM, Newgard CB. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Molecul Cell Biol* 2008; 9: 193-205.
- 78- Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 2012; 148: 852-71.
- 79- Cai D, Yuan M, Frantz DF, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- $\beta$  and NF- $\kappa$ B. *Nat Med* 2005; 11: 183-90.
- 80- Randle P, Garland P, Newsholme E, Hales C. The glucose fatty acid cycle in obesity and maturity onset diabetes mellitus. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1965; 131: 324-33.
- 81- Randle P, Garland P, Hales C, Newsholme E. The glucose fatty-acid cycle its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *The Lancet* 1963; 281: 785-9.
- 82- Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C  $\theta$  and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 1999; 48: 1270-4.
- 83- Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *The J Clin Invest* 2000; 106: 171-6.
- 84- Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trend Immunol* 2004; 25: 4-7.
- 85- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *The J Clin Invest*; 116: 1793-801.
- 86- Boden G, Duan X, Homko C, et al. Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes* 2008; 57: 2438-44.
- 87- Salvadó L, Palomer X, Barroso E, Vázquez-Carrera M. Targeting endoplasmic reticulum stress in insulin resistance. *Trend Endocr Metab* 2015; 26: 438-48.
- 88- Özcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A-H, Iwakoshi NN, Özdelen E, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. *Science* 2004; 306: 457-61.
- 89- Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 2005; 307: 384-7.
- 90- Schooneman MG, Vaz FM, Houten SM, Soeters MR. Acylcarnitines Reflecting or Inflicting Insulin Resistance? *Diabetes* 2013; 62: 1-8.
- 91- Chen X, Lu P, He W, et al. Circulating betatrophin levels are increased in patients with type 2 diabetes and associated with insulin resistance. *The J Clin Endocr Metab* 2014; 100: E96-E100.

- 92- Espes D, Martinell M, Carlsson PO. Increased circulating betatrophin concentrations in patients with type 2 diabetes. *Int J Endocrinol* 2014; 2014: 323407.
- 93- Fu Z, Berhane F, Fite A, Seyoum B, Abou-Samra AB, Zhang R. Elevated circulating lipasin/betatrophin in human type 2 diabetes and obesity. *Sci Rep* 2014; 4: 5013.
- 94- Jiao Y, Le Lay J, Yu M, Naji A, Kaestner KH. Elevated mouse hepatic betatrophin expression does not increase human beta-cell replication in the transplant setting. *Diabetes* 2014; 63: 1283-8.
- 95- Li E, Nakata M, Shinozaki A, et al. Betatrophin expression is promoted in obese hyperinsulinemic type 2 but not type 1 diabetic mice. *Endocrine J* 2016; 30: 611-9.
- 96- Cox AR, Lam CJ, Bonnyman CW, et al. Angiopoietin-like protein 8 (ANGPTL8)/betatrophin overexpression does not increase beta cell proliferation in mice. *Diabetologia* 2015; 58: 1523-31.
- 97- Fenzl A, Itariu BK, Kosi L, et al. Circulating betatrophin correlates with atherogenic lipid profiles but not with glucose and insulin levels in insulin-resistant individuals. *Diabetologia* 2014; 57: 1204-8.
- 98- Gómez-Ambrosi J, Pascual-Corrales E, Catalán V, et al. Altered Concentrations in Dyslipidemia Evidence a Role for ANGPTL8/Betatrophin in Lipid Metabolism in Humans. *The J Clin Endocr Metab* 2016; 101: 3803-381.
- 99- Wang Y, Quagliarini F, Gusarova V, et al. Mice lacking ANGPTL8 (Betatrophin) manifest disrupted triglyceride metabolism without impaired glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 16109-14.
- 100- Abu-Farha M, Abubaker J, Al-Khairi I, et al. Higher plasma betatrophin/ANGPTL8 level in Type 2 Diabetes subjects does not correlate with blood glucose or insulin resistance. *Sci Rep* 2015; 16: 5.
- 101- Al-Daghri NM, Rahman S, Sabico Set al. Circulating Betatrophin in Healthy Control and Type 2 Diabetic Subjects and its Association with Metabolic Parameters. *J Diabetes Complicat* 2016; 30: 1321-5.
- 102- Gao T, Jin K, Chen P, Jin H, Yang L, Xie X, et al. Circulating betatrophin correlates with triglycerides and postprandial glucose among different glucose tolerance statuses—a case-control study. *PloS one* 2015; 10: e0133640.
- 103- Wang H, Lai Y, Han Cet al. The Effects of Serum ANGPTL8/betatrophin on the Risk of Developing the Metabolic Syndrome—A Prospective Study. *Sci Rep* 2016; 27: 6.
- 104- Schäffer L, Brand CL, Hansen BF, et al. A novel high-affinity peptide antagonist to the insulin receptor. *Biochem Bioph Res Co* 2008; 376: 380-3.
- 105- Terauchi Y, Tsuji Y, Satoh S, et al. Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 $\alpha$  subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nat Genet* 1999; 21: 230.
- 106- Ayala JE, Samuel VT, Morton G, et al. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Dis Model Mech* 2010; 3: 525-34.
- 107- Yamada H, Saito T, Aoki A, et al. Circulating betatrophin is elevated in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Endocr J* 2015; 62 : 417-21.

- 108- Gomez-Ambrosi J, Pascual E, Catalan V, et al. Circulating betatrophin concentrations are decreased in human obesity and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: 2004-9.
- 109- Guo K, Lu J, Yu H et al. Serum betatrophin concentrations are significantly increased in overweight but not in obese or type 2 diabetic individuals. *Obesity* 2015; 23: 793-7.
- 110- Abu-Farha M, Sriraman D, Cherian P, et al. Circulating ANGPTL8/betatrophin is increased in obesity and reduced after exercise training. *PLoS one* 2016; 11: 0147367.
- 111- Chen X, Lu P, He W, et al. Circulating betatrophin levels are increased in patients with type 2 diabetes and associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100: 96-100.
- 112- Tseng Y-H, Ke P-Y, Liao C-J, et al. Chromosome 19 open reading frame 80 is upregulated by thyroid hormone and modulates autophagy and lipid metabolism. *Autophagy* 2014; 10: 20-31.
- 113- Crawford SO, Hoogeveen RC, Brancati F L, et al. Association of blood lactate with type 2 diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities Carotid MRI Study. *Int J Ep* 2010; 39: 1647-1655.
- 114- Vettor R, Lombardi AM, Fabris R et al. Lactate infusion in anesthetized rats produces insulin resistance in heart and skeletal muscles. *Metabolism* 1997; 46: 684-90.
- 115- Billiard J, Annan R, Ariazi J, et al. Rapid LDH5 inhibition reverses malignant metabolic phenotype and impairs survival of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 2013; 73: 5418.
- 116- Grimm M, Alexander D, Munz A, Hoffmann J, Reinert S. Increased LDH5 expression is associated with lymph node metastasis and outcome in oral squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metast* 2013; 30: 529-40.
- 117- Mohammad GH, Olde Damink SWM, Malago M, Dhar DK, Pereira SP. Pyruvate Kinase M2 and Lactate Dehydrogenase A Are Overexpressed in Pancreatic Cancer and Correlate with Poor Outcome. *PLoS One* 2016; 11: 0151635.
- 118- Butler EB, Zhao Y, Muñoz-Pinedo C, Lu J, Tan M. Stalling the engine of resistance: targeting cancer metabolism to overcome therapeutic resistance. *Cancer Res* 2013; 73: 2709-17.
- 119- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123: 309-14.
- 120- Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science (New York, NY)* 1956; 124: 269-70.
- 121- Jiang F, Ma S, Xue Y, Hou J, Zhang Y. LDH-A promotes malignant progression via activation of epithelial-to-mesenchymal transition and conferring stemness in muscle-invasive bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 469: 985-92.
- 122- Dong X-Y, Pang X-W, Yu S-T, et al. Identification of genes differentially expressed in human hepatocellular carcinoma by a modified suppression subtractive hybridization method. *Int J Cancer* 2004; 112: 239-48.
- 123- Susanto H, Liu T, Chen C, et al. Increased serum levels of betatrophin in pancreatic cancer-associated diabetes. *Oncotarget* 2016; 3.
- 124- Burkart AM, Tan K, Warren L, et al. Insulin Resistance in Human iPS Cells Reduces Mitochondrial Size and Function. *Sci Rep* 2016; 6: 22788.

- 125-** Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of Mitochondria in Human Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 2944-50.
- 126-** Ørtenblad N, Mogensen M, Petersen I, et al. Reduced insulin-mediated citrate synthase activity in cultured skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes: evidence for an intrinsic oxidative enzyme defect. *BBA* 2005; 1741: 206-14.
- 127-** Sleight A, Raymond-Barker P, Thackray K, et al. Mitochondrial dysfunction in patients with primary congenital insulin resistance. *J Clin Invest* 2011; 121: 2457-61.
- 128-** Mao J, DeMayo FJ, Li H, et al. Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis. *P Natl Acad Sci* 2006; 103: 8552-7.
- 129-** Zhao LF, Iwasaki Y, Zhe W, et al. Hormonal regulation of acetyl-CoA carboxylase isoenzyme gene transcription. *Endocr J* 2010; 57: 317-24.
- 130-** Harriman G, Greenwood J, Bhat S, et al. Acetyl-CoA carboxylase inhibition by ND-630 reduces hepatic steatosis, improves insulin sensitivity, and modulates dyslipidemia in rats. *P Natl Acad Sci* 2016; 113: 1796-805.
- 131-** Harwood HJ, Petras SF, Shelly LD, et al. Isozyme-nonselective N-substituted bipiperidylcarboxamide acetyl-CoA carboxylase inhibitors reduce tissue malonyl-CoA concentrations, inhibit fatty acid synthesis, and increase fatty acid oxidation in cultured cells and in experimental animals. *J Biol Chem* 2003; 278: 37099-111.
- 132-** Harwood Jr HJ. Treating the metabolic syndrome: acetyl-CoA carboxylase inhibition. *Expert Opin Ther Targ* 2005; 9: 267-81.
- 133-** Savage DB, Choi CS, Samuel VT, et al. Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *J Clin Invest* 2006; 116: 817-24
- 134-** Atkinson LL, Kelly SE, Russell JC, Bar-Tana J, Lopaschuk GD. MEDICA 16 Inhibits Hepatic Acetyl-CoA Carboxylase and Reduces Plasma Triacylglycerol Levels in Insulin-Resistant JCR. *Diabetes* 2002; 51: 1548-55.
- 135-** Yi M, Chen R, Yang R, et al. Betatrophin Acts as a Diagnostic Biomarker in Type 2 Diabetes Mellitus and Is Negatively Associated with HDL-Cholesterol. *Int J Endocrinol* 2015; 2015: 479157.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

01.05.1987 tarihinde Elazığ Sivrice'de doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Elazığ'da tamamladım. 2009 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek lisans eğitimine başlayıp, 2011 yılında mezun oldum. Aynı yıl Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimine başladım. 2012 yılından beri Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

