



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**LEPTİNİN SIÇAN İSKELET KASI KAN AKIMI VE NİTRİK  
OKSİT SENTAZ (NOS) ENZİMİ DAĞILIMI ÜZERİNE  
ETKİLERİ**

**Savaş ÜSTÜNOVA  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Zooloji Programı**

**Danışman  
Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ**

**Haziran, 2007**

**İSTANBUL**



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**LEPTİNİN SIÇAN İSKELET KASI KAN AKIMI VE NİTRİK  
OKSİT SENTAZ (NOS) ENZİMİ DAĞILIMI ÜZERİNE  
ETKİLERİ**

**Savaş ÜSTÜNOVA  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Zooloji Programı**

**Danışman  
Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ**

**Haziran, 2007**

**İSTANBUL**

Bu çalışma 10/07/2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Danışman: Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Hüsniye DOĞRUMAN  
İstanbul Üniversitesi  
Veterinerlik Fakültesi

Doç. Dr. Kadriye AKGÜN DAR  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Sönmez UYDEŞ DOĞAN  
İstanbul Üniversitesi  
Eczacılık Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin T-744/13092005 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca değerli bilgilerinden ve deneyimlerinden yararlandığım ve hiçbir konuda desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ'ye en içten dileklerle teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında bilgileriyle bana ışık tutan, desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, değerli hocam Doç. Dr. Kadriye AKGÜN-DAR'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca her zaman yanımda olan, yardımlarını ve dostluğunu hiç esirgemeyen Biyolog Ayşegül KAPUCU'ya teşekkür ederim.

En zor anlarımda desteklerini esirgemeyen değerli dostlarım Biyolog Sevan GÜRÜN'e, Biyolog Bülent ERGİN'e, Biyolog Faruk TAMTÜRK'e, Biyolog Murat MARAŞ'a ve Biyolog Halil BİLİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin tamamlanması sürecinde, her türlü yardım ve desteklerini gördüğüm Dr. Nadim YILMAZER'e, Dr. Huriye BALCI'ya, Biyolog. Dilek AKTAN'a, Araş. Gör. Uğur AKSU'ya, Araş.Gör. Ebru GÜREL'e, Araş. Gör. Aslı KANDİL'e, Biyolog İlhan UYANER'e ve çalışmamın uygulama kısmını destekleyen İstanbul Üniversitesi'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak, tüm eğitim hayatım boyunca daima yanımda olan, benden sevgilerini, desteklerini esirgemeyen ve verdiğim kararları destekleyen aileme sonsuz teşekkürler ederim.

**Haziran, 2007**

**Savaş ÜSTÜNOVA**

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİL LİSTESİ .....	iv
TABLO LİSTESİ .....	vi
SEMBOL LİSTESİ .....	vii
ÖZET .....	ix
SUMMARY .....	xi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL KISIMLAR .....	3
3. MALZEME VE YÖNTEM .....	14
3.1. HİSTOLOJİK YÖNTEMLER .....	17
3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER .....	17
3.3. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER .....	18
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER .....	18
4. BULGULAR .....	19
4.1. HEMODİNAMİK BULGULAR .....	19
4.2. HİSTOLOJİK BULGULAR .....	25
4.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR .....	34
4.4. BİYOKİMYASAL BULGULAR .....	40

<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>41</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>55</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>62</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	:L-arjinin-NO yolu .....	8
Şekil 3.1	:Kontrol, Leptin ve L-NAME gruplarında deney protokolü .....	15
Şekil 3.2	:L-NAME+Leptin grubunda deney protokolü .....	15
Şekil 3.3	:Deney hayvanı ve laboratuvardan görüntüler .....	16
Şekil 4.1.1	:Leptin, L-NAME ve L-NAME+Leptin gruplarında sistolik basınç değerlerinin, başlangıç değerine ve aynı zaman aralıklarındaki kontrol grubu değerlerine göre karşılaştırılması (Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir).....	20
Şekil 4.1.2	:Leptin, L-NAME ve L-NAME+Leptin gruplarında diyastolik basınç değerlerinin, başlangıç değerine ve aynı zaman aralıklarındaki kontrol grubu değerlerine göre karşılaştırılması (Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir).....	21
Şekil 4.1.3	:Leptin, L-NAME ve L-NAME+Leptin gruplarında ortalama arteriyal basınç değerlerinin, başlangıç değerine ve aynı zaman aralıklarındaki kontrol grubu değerlerine göre karşılaştırılması (Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir).....	22
Şekil 4.1.4	:Leptin, L-NAME ve L-NAME+Leptin gruplarında nabız değerlerinin, başlangıç değerine ve aynı zaman aralıklarındaki kontrol grubu değerlerine göre karşılaştırılması (Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir).....	23
Şekil 4.1.5	:Leptin, L-NAME ve L-NAME + Leptin gruplarında perfüzyon basıncı değerlerinin, başlangıç değerine ve aynı zaman aralıklarındaki kontrol grubu değerlerine göre karşılaştırılması (Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir) .....	24
Şekil 4.2.1 a-b	:Kontrol grubu hayvanlardan alınan enine kas kesitlerinde, endomisyum (➤), perimisyum (↑), periferik konumlu nukleuslar (↑). H. Azan. a) Bar=50 $\mu$ m, b) Bar=20 $\mu$ m .....	26
Şekil 4.2.2 a-b	:Kontrol grubu hayvanlardan alınan boyuna kas kesitlerinde, endomisyum (➤), periferik konumlu nukleuslar (↑), enine çizgilenmeler (}). H. Azan. a) Bar=50 $\mu$ m, b) Bar=20 $\mu$ m .....	27
Şekil 4.2.3 a-b	:Leptin uygulanan hayvanlardan alınan enine kas kesitlerinde, endomisyum (➤), perimisyum (↑), periferik konumlu nukleuslar (↑). H. Azan. a) Bar=50 $\mu$ m, b) Bar=20 $\mu$ m .....	28
Şekil 4.2.4 a-b	:Leptin uygulanan hayvanlardan alınan boyuna kas kesitlerinde, endomisyum (➤), periferik konumlu nukleuslar (↑), enine çizgilenmeler (}). H. Azan. a) Bar=50 $\mu$ m, b) Bar=20 $\mu$ m .....	29
Şekil 4.2.5 a-b	:L-NAME uygulanan hayvanlardan alınan enine kas kesitlerinde, endomisyum (➤), perimisyum (↑), periferik konumlu nukleuslar (↑), eritrosit kümelenmeleri (<). H. Azan. a) Bar=50 $\mu$ m, b) Bar=20 $\mu$ m .....	30



<b>Şekil 4.2.6 a-b</b>	:L-NAME uygulanan hayvanlardan alınan boyuna kas kesitlerinde, endomisyum (➤), periferel konumlu nukleuslar (↑), enine çizgilenmeler (}). H. Azan. a) Bar=50 µm, b) Bar=20 µm ..... 31
<b>Şekil 4.2.7 a-b</b>	:L-NAME+Leptin uygulanan hayvanlardan alınan enine kas kesitlerinde, endomisyum (➤), periferel konumlu nukleuslar (↑). H. Azan. a) Bar=50 µm, b) Bar=20 µm ..... 32
<b>Şekil 4.2.8 a-b</b>	:L-NAME+Leptin uygulanan hayvanlardan alınan boyuna kas kesitlerinde, endomisyum (➤), periferel konumlu nukleuslar (↑), enine çizgilenmeler (}). H. Azan. a) Bar=50 µm, b) Bar=20 µm . 33
<b>Şekil 4.3.1</b>	:Negatif kontrol olarak incelenen kesitlerde sarkolemma (➤), periferel konumlu nukleuslar (↑), perimisyum (↑) (Bar=50 µm).. 35
<b>Şekil 4.3.2</b>	:Kontrol hayvanların kaslarında, sarkolemmada (➤), periferel konumlu nukleusların çevresinde (↑), perimisyumda (↑) eNOS reaksiyonları (Bar=50 µm) ..... 36
<b>Şekil 4.3.3</b>	:Kontrol hayvanların kaslarında sarkolemmada (➤), perimisyumda (↑) nNOS reaksiyonu (Bar=50 µm) ..... 36
<b>Şekil 4.3.4</b>	:Leptin uygulanan hayvanların kaslarında sarkolemmada (➤), periferel konumlu nukleusların çevresinde (↑), perimisyumda (↑) eNOS reaksiyonları (Bar=50 µm) ..... 37
<b>Şekil 4.3.5</b>	:Leptin uygulanan hayvanların kaslarında, sarkolemmada (➤), periferel konumlu nukleusların çevresinde (↑), perimisyumda (↑) nNOS reaksiyonu (Bar=50 µm) ..... 37
<b>Şekil 4.3.6</b>	:L-NAME uygulanan hayvanların kaslarında sarkolemmada (➤), periferel konumlu nukleusların çevresinde (↑) eNOS reaksiyonları. (Bar=50 µm)..... 38
<b>Şekil 4.3.7</b>	:L-NAME uygulanan hayvanların kaslarında nNOS reaksiyonun olmadığı gözlemlendi (Bar: 50 µm)..... 38
<b>Şekil 4.3.8</b>	:L-NAME+Leptin uygulanan hayvanların kaslarında sarkolemmada (➤), periferel konumlu nukleusların çevresinde (↑) eNOS reaksiyonları (Bar=50 µm)..... 39
<b>Şekil 4.3.9</b>	:L-NAME+Leptin uygulanan hayvanların kaslarında sarkolemmada (➤), periferel konumlu nukleusların çevresinde (↑) nNOS reaksiyonu (Bar=50 µm) ..... 39
<b>Şekil 4.4.1</b>	:Deney gruplarının serum leptin ve nitrit/nitrat düzeyleri (Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterilmiştir) ..... 40

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 4.3.1</b>	:eNOS ve nNOS reaksiyonlarının gruplara göre dağılımı (Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir) .....	<b>34</b>
--------------------	--	-----------

## SEMBOL LİSTESİ

<b>AEC</b>	: 3-Amino-9-Etilkarbazol
<b>A/D</b>	: analog/dijital
<b>AgRP</b>	: Agouti-ilişkili peptid
<b>AMPK</b>	: adenosin monofosfat ile aktive olan protein kinaz
<b>cAMP</b>	: siklik adenosin monofosfat
<b>cGMP</b>	: siklik guanozin monofosfat
<b>cNOS</b>	: konstitütif nitrik oksit sentaz
<b>db/db</b>	: homozigot obezite geni reseptörü mutant
<b>eNOS</b>	: endotelial nitrik oksit sentaz
<b>EDRF</b>	: endotel kaynaklı gevşetici faktör
<b>EDHF</b>	: endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör
<b>ELISA</b>	: enzime bağlı immün analiz
<b>fa/fa</b>	: leptin reseptöründen yoksun
<b>FTS</b>	: fizyolojik tuzlu su
<b>GTP</b>	: guanozin trifosfat
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: hidrojen peroksit
<b>H. Azan</b>	: Heidenhain'ın Azan boyası
<b>HR</b>	: kalp vurumu
<b>iNOS</b>	: uyarılabilir nitrik oksit sentaz
<b>icv</b>	: beyin ventrikül içi (intracerebroventriküler)
<b>ip</b>	: intraperitoneal
<b>iv</b>	: intravenöz
<b>JAK</b>	: janus kinaz
<b>L-CPA</b>	: L-2-kloropropiyonik asit
<b>L-NAME</b>	: L-N <sup>G</sup> -nitroarjinin metil ester
<b>L-NIO</b>	: N-(1-iminoetil)-L-lizin, eNOS inhibitörü
<b>L-NNA</b>	: L-N-nitroarjinin
<b>L-NMA</b>	: N <sup>G</sup> -Metil-L-arjinin
<b>LPS</b>	: lipopolisakkarid
<b>MAP</b>	: ortalama arteriyal basınç
<b>mdx</b>	: distrofin geni mutant olan , distrofin proteini olmayan
<b>MCH</b>	: melanin konsantre edici (yoğunlaştırıcı) hormon
<b>MSH</b>	: melanosit stimulan hormon
<b>MSS</b>	: merkezi sinir sistemi
<b>NADP</b>	: nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
<b>NADPH</b>	: indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
<b>nNOS</b>	: nöronal nitrik oksit sentaz
<b>NO</b>	: nitrik oksit
<b>NOS</b>	: nitrik oksit sentaz
<b>NPY</b>	: nöropeptid Y
<b>Ob</b>	: obezite (geni)

<b><i>ob/ob</i></b>	: homozigot ob geni mutant
<b>OBR</b>	: obezite geni reseptörü
<b>PE</b>	: polietilen
<b>PI3K</b>	: fosfotidilinositol-3-kinaz
<b>PBS</b>	: fosfat tamponu
<b>RNA</b>	: ribonukleik asit
<b>RT-PCR</b>	: eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
<b>sGC</b>	: çözülebilir guanilat siklaz
<b>SHP2</b>	: SH2 bölgesi içeren fosfataz 2
<b>SNP</b>	: sodyum nitroprusid
<b>STAT</b>	: transkripsiyonu iletilici ve aktive edici sinyal
<b>TNF</b>	: tümör nekroz faktör

## ÖZET

### LEPTİNİN SIÇAN İSKELET KASI KAN AKIMI VE NİTRİK OKSİT SENTAZ (NOS) ENZİMİ DAĞILIMI ÜZERİNE ETKİLERİ

Leptin, obezite (*Ob*) geni tarafından şifrelenen, esas olarak yağ dokudan salınan 16 kDa ağırlığında, sitokin ailesine ait, polipeptit tabiatlı bir hormondur. Leptinin en iyi bilinen fonksiyonu, besin alınımını ve enerji kullanımını düzenlemesidir. Buna ek olarak, angiogenez, hematopoiez, lipit ve karbohidrat metabolizması gibi pek çok periferik metabolik olayda da fonksiyonel olduğu bilinmektedir. Ayrıca üreme, kalp-damar sistemi ve bağışıklık sistemi üzerine de etkilidir. Son zamanlarda leptinin, vücut sıvılarının akımı ve basıncı üzerine de etkili olduğunu gösteren çalışmalar yapılmaktadır.

Nitrik oksit (NO), biyolojik sistemlerde son derece önemli, çok yönlü mesajcı bir moleküldür. NO, beyinde nöronal iletim, kan basıncı ve sindirim sisteminin düzenlenmesi, kalp-damar sistemi, platelet kümelenmesi, sitotoksite, hipertansiyon, diyabet, ateroskleroz gibi fizyolojik ve patolojik olaylarda önemli rol oynamaktadır. NO, lokal ve sistemik damar direncinin, kan akımının, oksijen dağılımının, sodyum dengesinin ve arteriyel basıncın düzenlenmesine yardımcı olur.

Leptin ve NO ile ilgili çalışmalar yapılmış, ancak fizyolojik olayların düzenlenmesinde NO ile leptin arasındaki ilişki tam olarak açıklanamamıştır. Bu çalışmada, leptin ve özgül olmayan NO inhibitörü L-N<sup>G</sup>-nitroarjinin metil ester (L-NAME) uygulamalarıyla, leptin ve NO arasındaki ilişki ortaya konmaya çalışıldı. Bu ilişkinin sıçan iskelet kasındaki kan akımı ile kan basıncını nasıl etkilediği, nitrik oksit sentaz (NOS) dağılımları da göz önüne alınarak belirlenmeye çalışıldı.

Bu amaçla çalışmada, 3 aylık 24 adet erkek *Wistar albino* (250-300 g) sıçan kullanıldı. Hayvanlar, her biri 6 bireyden oluşan 4 gruba ayrıldı. Anestezi altındaki hayvanlara tek doz fizyolojik tuzlu su (FTS), L-NAME (10 mg/kg), Leptin (50 µg/kg) ve L-NAME (10 mg/kg)+Leptin (50 µg/kg) intravenöz (iv) olarak uygulandı. Deney süresince hayvanların kan akımı, arteriyel kan basıncı ve kalp vurumları kaydedildi. Deney sonunda hayvanlardan alınan kan örneklerinde, serum nitrit/nitrat ve leptin miktarları biyokimyasal olarak incelendi. Ayrıca bacak kasında endotelial NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) dağılımları immünohistokimyasal olarak değerlendirildi.

Sadece leptin uygulanan hayvanlarda, kan akımında belirgin bir değişiklik gözlenmezken, L-NAME uygulananlarda kan akımı azaldı. L-NAME'den 20 dakika sonra leptin uygulanan hayvanlarda ise leptin, L-NAME'nin düşürdüğü kan akımında anlamlı bir değişiklik meydana getirmede. Ortalama arteriyel kan basıncı, L-NAME ve

L-NAME+Leptin uygulanan hayvanlarda, hem kendi kontrol değerlerine hem de kontrol grubundaki hayvanların aynı zaman noktalarındaki değerlerine göre anlamlı olarak yüksekti. Ancak sadece leptin uygulanan hayvanların ortalama arteriyal kan basıncı değerleri ise, kontrol grubu hayvanların değerlerine yakın olmakla beraber daha düşüktü. Leptin uygulanmasından sonra kalp vurumunda bir artış olduğu, ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. L-NAME+Leptin uyguladığımız grupta ise, kalp vurumu L-NAME'den sonra anlamlı olarak azalırken, leptin uygulamasından sonra kontrole yaklaştı, ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Leptin, L-NAME ve her ikisinin birlikte uygulandığı gruplar karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre bağ doku artışı görüldü. Leptin uygulanan grupta, hem eNOS hem de nNOS reaksiyonları diğer gruplara göre daha yoğundu. Sadece L-NAME uygulanan grupta nNOS reaksiyonu gözlenmezken, eNOS reaksiyonu kontrole benzerdi. L-NAME+Leptin grubunda ise, eNOS reaksiyonunun L-NAME ve kontrole göre arttığı, nNOS reaksiyonunun ise kontrole benzer olduğu görüldü.

Serum leptin düzeyleri, Leptin, L-NAME ve L-NAME+Leptin gruplarında anlamlı olarak artarken, en fazla artış L-NAME+Leptin grubunda görüldü. Serum nitrit/nitrat düzeyleri ise sadece L-NAME uygulanan grupta anlamlı olarak azaldı.

Sonuç olarak çalışmamızda, leptinin kan akımı, kan basıncı ve kalp vurumuna etkisi, NO varlığında ve yokluğunda araştırılmış olup, L-NAME ile NO sentezi inhibe edilmesine rağmen, leptinin kısmen NO üretimine etki ettiği ve leptinin fizyolojik etkilerinde NO' i aracı olarak kullandığı görülmüştür.

## SUMMARY

### THE EFFECTS OF LEPTIN ON RAT SKELETAL MUSCLE BLOOD FLOW AND DISTRIBUTION OF NITRIC OXIDE SYNTHASE (NOS) ENZYME

Leptin encoded by obesity gene (*Ob*) and released by adipose tissue is a 16 kDa polypeptide hormone, and belongs to cytokine family. The well known function of leptin is to regulate nutrient intake and energy expenditure. In addition, it plays an important role in several periferal metabolic processes such as angiogenesis, hematopoiesis, and lipid and carbohydrate metabolism. It affects also reproductive, cardiovascular and immune systems. Recent reports are available stating that leptin influences also flow and pressure of body fluids.

Nitric oxide (NO) is an important protean signaling molecule in biological systems. It acts on a diverse range of physiological and pathological processes involving neuronal transmission in brain, regulation of blood pressure and digestive system, cardiovascular system, platelet aggregation, cytotoxicity, hypertension, diabetes, atherosclerosis. Moreover, NO helps to regulate local and systemic vascular resistance, blood flow, oxygen dispersion, sodium balance and arterial pressure.

In spite of studies on leptin and NO, but relationship between NO and leptin in regulating physiological processes has not been well understood. In this study employing leptin and L-N<sup>G</sup>-nitroarginine methyl ester (L-NAME), a non-specific inhibitor of NO, tried to reveal relationship between NO and leptin, based on nitric oxide synthase (NOS) distribution to find out how this relationship affects blood flow and pressure in rat skeletal muscle.

For this aim, 24 male *Wistar albino* (weighing 250-300 g) rats of 3 months old were used in the study. They were divided in 4 groups including 6 individuals. Single dose of saline, L-NAME (10 mg/kg), Leptin (50 µg/kg) and L-NAME (10 mg/kg)+Leptin (50 µg/kg) was intravenously administered into the animals under anesthesia. Blood flow, arterial blood pressure and heart rate of the animals were recorded during the experiment. Serum nitrite/nitrate and leptin levels were biochemically measured in blood samples taken from the animals at the end of the experiment. In addition, distribution of endothelial NOS (eNOS) and neuronal NOS (nNOS) in hindlimb muscle was examined immunohistochemically.

While a marked change was not observed in blood flow of the animals receiving only leptin, L-NAME group showed a decreased blood flow. 20 min after L-NAME, leptin did not result in a significant change in blood flow lowered by L-NAME. Mean arterial blood pressure was significantly higher in L-NAME and L-NAME+Leptin groups, compared to both their control values and values of the same time points in the control group animals. However, mean arterial blood pressure values of the group administered

only leptin were lower, being close to values of the control. An increment in heart rate was observed following leptin administration, but it was not statistically significant. Concerning L-NAME+Leptin group, heart rate were significantly lowered after L-NAME, but they came close to the control following leptin application, but it is not statistically significant.

When compared to the control, increased connective tissue was seen in Leptin, L-NAME and combined Leptin and L-NAME groups. Both eNOS and nNOS reactions were more intense in Leptin group in comparison with other groups. Whereas nNOS reaction was not observed in the group receiving only L-NAME, eNOS reaction was similar to the control. However, reaction of eNOS was increased in L-NAME+Leptin group compared to L-NAME and the control while nNOS reaction resembled the control.

Serum leptin levels were significantly high in Leptin, L-NAME and L-NAME+Leptin groups, the latter showed the highest level. On the other hand, serum nitrite/nitrate levels were decreased in only L-NAME group significantly.

As a result, although NO synthesis was inhibited by L-NAME, leptin was shown to affect NO production partly, and to employ NO as a mediator in its physiological actions in this study where effect of leptin on blood flow and pressure, and heart rate was studied in the presence and absence of NO.



## 1. GİRİŞ

Bu çalışma, leptinin iskelet kası kan akımı ve NOS dağılımları üzerine etkilerini inceleyerek, kalp-damar sisteminde leptin ile NO arasındaki ilişkinin belirlenmesine katkıda bulunmak amacıyla yapılmıştır.

Tezin “Genel Kısımlar” bölümünde, leptinin genel yapısı, fonksiyonları, besin alınımını ve enerji kullanımını düzenlemesi (Sweeney, 2002; Ahima ve Osei, 2004; Kokta ve diğ., 2004), anjiyogenez, hematopoiez, lipit ve karbohidrat metabolizması (Gardiner ve diğ., 2000; Ceddia ve diğ., 2001; Carlyle ve diğ., 2002; Guha ve diğ., 2003; Solinas ve diğ., 2004) ve kalp-damar sistemi üzerine olan merkezi ve periferik etkilerinden bahsedilmiştir (Huang ve Li, 2000; Kimura ve diğ., 2000; Ahima ve Osei, 2004). Ayrıca, son zamanlarda leptinin, vücut sıvılarının akımı ve basıncı üzerine de etkili olduğunu gösteren çalışmalar da belirtilmiştir (Dunbar ve diğ., 1997; Gardiner ve diğ., 2000; Mitchell ve diğ., 2001; Brevetti ve diğ., 2003; Guha ve diğ., 2003). Hücre içi haberci bir gaz molekülü olan NO'nun yapısından, NOS enziminden ve çeşitlerinden (Furchgott ve diğ., 1984; Torreilles, 2001), kastaki NOS dağılımlarından bahsedilmiştir (Stamler ve Meissner, 2001; Buchwalow ve diğ., 2005). NO ile leptin arasındaki ilişki ve bu ilişkinin ortalama arteriyel kan basıncı, kan akımı ve kalp vurumu üzerine etkileri, genel NOS inhibitörü olan L-NAME'in kullanıldığı çalışmalar (Fruhbeck, G., 1999; Winters ve diğ., 2000; Rahmouni ve diğ., 2005) ile ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

“Malzeme ve Yöntem” bölümünde, çalışmada kullanılan hayvan sayısı, deney grupları ile laboratuvar ortamında yapılan işlemler ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır. Bu işlemlerin yapılmasının ardından, deney süresince alınan sistolik basınç, diyastolik basınç, ortalama arteriyel kan basıncı, nabız ve iskelet kasındaki kan akımı verileri, hazırlanan preparatlara histolojik, immünohistokimyasal yöntemler uygulanarak elde edilen bulgular ve biyokimyasal sonuçlar, tezin “Bulgular” kısmında ayrıntılı olarak verilmiştir.

“Tartışma ve Sonuç” bölümünde ise, çalışmadan elde edilen sonuçlar değerlendirilerek, bu konu ile ilgili literatür bilgileri karşılaştırılıp yorumlanmış ve bir sonuca varılmıştır.

Leptin ve NO ile ilgili çalışmalar yapılmış, ancak fizyolojik olayların düzenlenmesinde NO ile leptin arasındaki ilişki tam olarak açıklanamamıştır. Çalışmamızda, leptinin kalp-damar sistemine olan etkilerini ve bu etkilerinin NO ile ilişkili olup olmadığını göstermeyi amaçladık. Bu amaçla, leptin ve/veya genel NOS inhibitörü olan L-NAME uygulayarak, leptinin hem hemodinamik parametreler hem de iskelet kasındaki NOS dağılımları üzerine etkilerinin değerlendirilmesi ile kalp-damar sisteminde leptin ve NO arasındaki ilişkinin açıklığa kavuşturulması hedeflenmiştir.

## 2. GENEL KISIMLAR

Leptin, obezite (*Ob*) geni tarafından şifrelenen, esas olarak yağ dokudan salınan 16 kDa ağırlığında, sitokin ailesine ait, polipeptit tabiatlı bir hormondur. Leptinin en iyi bilinen fonksiyonu, besin alınımını ve enerji kullanımını düzenlemesidir (Sweeney, 2002; Ahima ve Osei, 2004; Kokta ve diğ., 2004). Buna ek olarak, anjiyogenez, hematopoiez, lipit ve karbohidrat metabolizması gibi pek çok periferik metabolik olayda da fonksiyonel olduğu bilinmektedir (Gardiner ve diğ., 2000; Ceddia ve diğ., 2001; Carlyle ve diğ., 2002; Muoio ve Dohm, 2002; Guha ve diğ., 2003; Solinas ve diğ., 2004). Ayrıca üreme, kalp-damar sistemi ve bağışıklık sistemi üzerine de etkilidir (Huang ve Li, 2000; Kimura ve diğ., 2000; Ahima ve Osei, 2004). Son zamanlarda leptinin, vücut sıvılarının akımı ve basıncı üzerine de etkili olduğunu gösteren çalışmalar yapılmaktadır (Dunbar ve diğ., 1997; Gardiner ve diğ., 2000; Mitchell ve diğ., 2001; Sweeney, 2002; Brevetti ve diğ., 2003; Guha ve diğ., 2003).

Leptinin, esas olarak beyaz yağ dokusunda adipositler tarafından sentezlenip salındığı bilinmekle birlikte (Zhang ve diğ., 2005), kahverengi yağ dokusundan da salındığını gösteren kanıtlar ortaya konmuştur (Cinti ve diğ., 1997; Auwerx ve Staels, 1998). Leptinin, yağ hücrelerinin yanı sıra sindirim sistemi epitelinde, kemik iliğinde, meme epitelinde, hipofizde, fetusda (Kokta ve diğ., 2004), plasentada, ovaryumlarda, testislerde, iskelet kasında (Sweeney, 2002), fibroblastlarda (Kokta ve diğ., 2004) da anlatımı yapılmaktadır (Moran ve Philip, 2003; Ahima ve Osei, 2004).

Leptin sentezi ve salınması obezite, insülin, Tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), noradrenalin (Zhang ve diğ., 2005) ve glikokortikoidler tarafından uyarılırken; açlık, melatonin hormonu,  $\beta$ -adrenerjik reseptör agonistleri, adenilat siklaz uyarıcıları (forskalin ve isoproterenol gibi) (Zhang ve diğ., 2005) tarafından baskılanır. Bu hormon etkisini, leptin reseptörleri (OBR) olan zar geçişli proteinler aracılığıyla gösterir (Sweeney, 2002).

OBR'nin gen anlatımı, merkezi sinir sisteminde (MSS) ve birçok periferel dokuda yapılmaktadır. OBR, sitokin reseptör ailesinin bir üyesidir ve altı farklı izoformunun olduğu kabul edilmektedir. Bunlar; OBRA, OBRb, OBRc, OBRd, OBRe ve OBRf'dir (Villareal ve diğ., 1998; Kokta ve diğ., 2004). Bu reseptörlerin N-uçları aynıdır, fakat C-uçları farklılık gösterir (Zhang ve diğ., 2005). OBRA, OBRb, OBRc, OBRd tek zar geçişli bölgeye sahipken, OBRe zara bağlanabilen bir bölgeye sahip değildir. OBRe, leptin bağlayıcı protein olarak dolaşımda çözülmüş halde bulunur. Zar geçişli bölgeye sahip olan OBRler, zar geçiş bölgelerinin büyüklüğüne göre kısa ve uzun OBRler olarak da ayırt edilmektedirler. OBRA, OBRc, OBRd kısa, OBRb ise uzun sitoplazmik zar geçiş bölgesine sahiptir ve bu reseptörler birçok dokuda sentezlenmektedirler (Sweeney, 2002; Ahima ve Osei, 2004; Zhang ve diğ., 2005). ObRa formu, leptinin kan-beyin bariyerini geçmesini sağlar (Muio ve diğ., 1997; Shek ve diğ., 1998; Solinas ve diğ., 2004). OBRc ve OBRd, dolaşımdaki leptinin tasfiyesinde görevlidir. Uzun OBRb, genellikle sinyal izoformu olarak gösterilmektedir, ancak kısa izoformların da sinyal oluşturabildiğine dair çalışmalar vardır. OBRb anlatımı en fazla hipotalamusta gerçekleşmesine rağmen, adrenal bez ve böbrekler gibi (Villareal ve diğ., 1998) diğer periferel dokularda da düşük düzeylerde anlatımının yapıldığı gösterilmiştir (Sweeney, 2002). Son olarak tanımlanan OBRf formunun fonksiyonu henüz tam olarak anlaşılammıştır (Villareal ve diğ., 1998; Kokta ve diğ., 2004).

OBR'nin leptine bağlanması Janus kinaz 2 (JAK2)'nin aktivasyonu ile sonuçlanır. JAK2'nin aktivasyonu ile OBRb'nin sitoplazmik zar geçiş bölgesinde birçok tirozin bakiyesi fosforile edilir. Her bir fosforile edilen tirozin bakiyesi ayrı bir sinyal yoluna aracılık eder. Leptin; JAK2/iletici ve aktive edici transkripsiyon sinyali (STAT3), SH2 içeren fosfataz 2 (SHP2) ve mitojenle-aktive olan protein kinaz, fosfotidilinositol-3 kinaz (PI3K) ve adenosin monofosfat ile aktive olan kinaz (AMPK) sinyal yollarını başlatabilir (Ahima ve Osei, 2004; Zhang ve diğ., 2005).

OBR'nin gen anlatımının akciğerlerde en yüksek, böbreklerde orta seviyede, kalp, beyin, dalak, karaciğer ve kasta ise en düşük seviyelerde gerçekleştiği eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve Southern Blot yöntemleri ile gösterilmiştir (Villareal ve diğ., 1998).

İskelet kasında OBRb izoformunun anlatımı yapılmaktadır. Glikoz harcanması, AMPK'ya bağlı lipit oksidasyonu, PI3K yoluna bağlı termogenez gibi olaylar, OBRb izoformu aracılığıyla gerçekleşmektedir. İskelet kasında, yağ oksidasyonunun moleküler mekanizmaları açıklanmaktadır ancak, leptinin doğrudan etkisine cevaben termogenezle ilgili olan glikoz ve lipit metabolizmasının nasıl çalıştığı tam olarak bilinmemektedir. Leptin, iskelet kasında, PI3K ve AMPK sinyal yolları aracılığıyla termogenezini uyararak, glikoz ve yağ asidi metabolizmasını artırır. Yağ asidi oksidasyonunu artırırken, triaçilgliserol oluşumunu azaltır böylece yağ depolarının azalmasını sağlayarak lipotoksisteyi önler (Muoio ve diğ., 1997; Unger ve Zhou, 2001; Muoio ve Dohm, 2002; Kokta ve diğ., 2004; Solinas ve diğ., 2004).

Dolaşımdaki leptinin, kan-beyin bariyerini geçip hipotalamusa etki ederek iştahın azalmasını, kahverengi yağ dokuda sempatik sinir aktivitesinin ve buna bağlı olarak da termogenezin artmasını sağlayarak (Haynes ve diğ., 1997) enerji dengesini düzenlediği çok iyi bilinmektedir. Leptin bu etkisini, hipotalamusun lateral ve medial bölgelerindeki nukleuslar aracılığıyla gösterir (Guha ve diğ., 2003). Leptin infüzyonunun, hipotalamus üzerindeki merkezi etkisinin yanısıra, sempatik sinir sistemini aktive ederek periferel dokularda da etkili olduğu saptanmıştır. Bu dokular genellikle termogenik olarak kabul edilmeyen böbrek, arka bacak ve böbrek üstü bezidir (Haynes ve diğ., 1997). Aynı zamanda leptin, birçok sinir fonksiyonu düzenleyicisinin salgılanmasını da etkilemektedir. Bunlar; Nöropeptid-Y (NPY),  $\alpha$ -melanosit stimulan hormon ( $\alpha$ -MSH), melanin yoğunlaştırıcı hormon (MCH) ve Agouti geninin bir ürünü olan ve MSH ile birlikte çalışan Agouti-ilişkili peptid (AgRP)'dir. Sempatik aktivasyon ve bunun şiddetinde düzenleyici etkileri vardır. Leptin uygulanması, hipotalamusta NPY anlatımını azaltır ve dolaylı olarak kan basıncında yükselmeye neden olur (Guha ve diğ., 2003). Bu da leptinin sadece enerji dengesinin düzenlenmesinde değil, aynı zamanda kalp-damar sistemi fonksiyonlarında da rol oynadığını göstermektedir (Rahmouni ve diğ., 2005).

Obez insanlarda ve hayvan modellerinde, plazma leptin düzeyinde belirgin artış olduğu bilinmektedir. Plazma leptin düzeyindeki bu artış leptine veya OBR'ye karşı oluşan dirençle ilgili olarak ortaya çıkmaktadır (Castracane ve Henson, 2006). Obezitenin belirgin özelliklerinden biri de yükselmiş arteriyel kan basıncıdır (Villareal ve diğ.,

1998). Obezitenin, artan hipertansiyon sıklığı ve kalp-damar sistemi rahatsızlıklarından kaynaklanan ölümlerle ilişkilendirilmesine rağmen, obezite ile renal fonksiyonlardaki değişiklikler ve yüksek kan basıncı arasındaki ilişkinin mekanizmaları tam olarak açıklanamamıştır (Fruhbeck, 1999). Burada etkili olduğu düşünülen mekanizmalar; artmış plazma hacmi ve kardiyak kan atılımı, hiperinsülinemi ve insülin direnci, artmış sempatik sinir sistemi aktivitesi ve sodyum alıkonulması ile tuz düzenleyici hormonların işlevsiz olmasıdır. Ayrıca, sürekli hipertansiyonda da leptin seviyesinin arttığı rapor edilmiştir (Villareal ve diğ., 1998). Bunlara ek olarak leptin, sempatik sinir sistemini uyararak arteriyal kan basıncını artırır (Villareal ve diğ., 1998). Beyin ventrikülü içine (icv) ve damar içine kronik leptin uygulanmalarının, hem ortalama arteriyal basıncı (MAP) hem de kalp vurumunu (HR) artırdığı gösterilmiştir (Dunbar ve diğ., 1997). Bununla birlikte bazı çalışmalar, akut leptin uygulanmasının MAP ve HR'de bir değişiklik meydana getirmediğini rapor etmişlerdir (Jackson ve Li, 1997). Beyinde leptinin bağlanma bölgeleri tespit edilmiştir. Bu bölgeler aynı zamanda kalp-damar sisteminin kontrolünde de önemli olan bölgelerdir. Bu da leptinin, merkezi sinir sistemi (MSS) üzerindeki etkileri ile kalp-damar sistemi fonksiyonlarını etkileyebileceğini düşündürmektedir. Bu görüş, leptin uygulanmasının böbrekler, adrenal bezler ve kahverengi yağ dokusunda sempatik sinir aktivitesini artırdığının tespit edilmesiyle de desteklenmektedir (Dunbar ve diğ., 1997; Haynes, 1997). Bununla birlikte, damar içi leptin uygulanmasının idrarla su ve sodyum kaybına neden olduğu da gösterilmiştir (Jackson ve Li, 1997). Böylelikle, leptin farklı düzenleyici mekanizmaları etkileyerek, kan basıncı üzerinde zıt etkiler göstermektedir (Fruhbeck, 1999).

Son zamanlarda birçok çalışmada leptinin doğrudan damarlarda etkili olduğu ve bunun da arteriyal basıncı düşürme eğiliminde olduğu ileri sürülmektedir. İşlevsel olarak etkin OBRler endotelial hücrelerde mevcuttur. (Fruhbeck, 1999; Winters ve diğ., 2000; Rahmouni ve diğ., 2005). Bu da endotelin, leptin etkisinin görüldüğü hedef bir yapı olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda, kan basıncının düzenlenmesinde damar endotelinin önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. NO endotel tarafından salınan damar gevşemesine neden olan ve kan basıncını düzenleyen faktörlerden biridir (Fruhbeck, 1999). Leptinin endotelial hücrelerden nitrik oksit (NO) salınımını artırdığı da gösterilmiştir (Fruhbeck, 1999; Winters ve diğ., 2000; Rahmouni ve diğ., 2005).

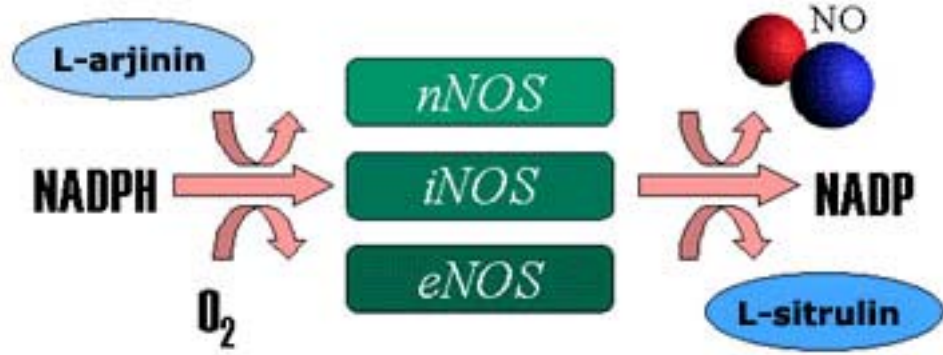
Yirmi yıl öncesine kadar NO'nun basit bir atmosfer atığı olduğu düşünülmekteydi. 1987 yılında, damar endotelinden endotel kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) olarak bilinen yapının izole edilmesi sırasında NOS keşfedilmiş ve daha sonraki yıllarda EDRF'nin NO olduğu tespit edilmiştir (Ignarro ve diğ., 1987; Palmer ve diğ., 1988). İnsan ve hayvanların da NO üretebildiklerinin ortaya konması ile 1987 yılına kadar insan vücudunda bulunuş nedeni ve metabolizması hakkında çok az şey bilinen NO'nun fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolü anlaşılmış ve 1992'de yılın molekülü seçilmiştir (Nussler ve Billiar, 1993). Furchgott, Ignarro ve Ferid Murad, NO'nun kalp ve damar sisteminde sinyal molekülü olduğunu göstererek, 1998 yılında Fizyoloji ve Tıp alanında nobel ödülü almışlardır (Furchgott, Ignarro ve Murad, 1998).

NO, biyolojik sistemlerde çok yönlü hücre içi haberci olan bir gaz molekülüdür (Furchgott ve diğ., 1984; Torreilles, 2001). Önce damar sistemlerinde EDRF olarak (Furchgott ve diğ., 1984), daha sonraları ise sinir sisteminde nörotransmitter ve immün sistemde sitotoksik faktör olarak tanımlanmıştır (Furchgott ve diğ., 1987; Ignarro ve diğ., 1987). Hücre içi NO üretimi, NOS enzimi tarafından, L-arginin amino asidinin L-sitruiline çevrilmesiyle gerçekleştirilir (Rapoport ve Murad, 1983; Marletta, 1994; Alderton ve diğ., 2001). NO, beyinde nöronal iletim, kan basıncı ve sindirim sisteminin düzenlenmesi, kalp-damar sistemi, platelet kümelenmesi, sitotoksosite, hipertansiyon, diyabet, ateroskleroz, öğrenme ve hafıza, erkek eşeyssel fonksiyonun düzenlenmesi gibi fizyolojik ve patolojik değişikliklerde önemli rol oynar (Bredt ve Synder, 1994; Gross ve Wolin, 1995).

NO, renksiz bir gazdır. Yüksek yoğunluktaki NO oksijensiz ortamda oldukça kararlı olup suda erime özelliği gösterirken, düşük yoğunluktaki NO, oksijen varlığında dahi kararlıdır. NO'nun, yüksüz olması ve eşleşmemiş elektron bulundurması, hücreden hücreye hiçbir engelle karşılaşmadan kolaylıkla geçmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda NO, taşıdığı eşleşmemiş elektron nedeniyle bir radikal molekül olarak da adlandırılır. Diğer serbest radikaller her yoğunlukta hücreler için zararlı iken, NO düşük yoğunluklarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır. Ancak aşırı ve kontrolsüz NO sentezi hücreler için zararlı olmaktadır. NO, bu özellikleri ile çok ideal bir fizyolojik haberci molekülü olarak kabul edilmektedir (Lowenstein ve diğ., 1994).

Düşük yoğunluktaki NO, O<sub>2</sub>'ye nazaran hemoglobine 3000 kat daha fazla bağlanabilir. Hemoglobin oksijen formunda ise NO'yi kısa sürede nitrate oksitleyerek etkisizleştirir. Özellikle dolaşımdaki oksihemoglobin, NO için kuvvetli bir inhibitördür. NO, nitrite de okside olabilir ancak nitrit oksitlenerek kısa sürede nitrate dönüşür (Moncada ve diğ., 1991). NO, diğer serbest radikaller gibi çok kısa yarılanma ömrüne sahip olup 6-9 saniye içinde daha kararlı bir yapı olan nitrate oksitlenir (Star, 1993).

NOS vücudun çok değişik dokularından (damar endoteli, beyin, makrofaj, üriner sistem dokuları gibi) izole edilerek fizyokimyasal ve kinetik özellikleri incelenmiştir (Ignarro, 1990; Moncada, 1992; Andersson ve Persson, 1994; Knowles ve Moncada, 1994). NOS'un katalize ettiği biyokimyasal reaksiyon Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Bu reaksiyon aynı zamanda L-arjinin-NO yolu olarak da bilinmektedir.



**Şekil 2.1:** L-arjinin-NO yolu

NO sentezini katalizleyen NOS enzimlerinin konstitütif (cNOS) ve uyarılabilir (iNOS) olmak üzere iki temel izoformu bulunur. Konstitütif formun ayrıca iki formu vardır. Bunlardan birisi endotelial NOS (eNOS) olup, ağırlıklı olarak zara ait bir enzimdir ve EDRF'nin sentezinden sorumludur. Konstitütif enzimin ikinci formu ise, MSS ve nöronlarda haberci molekül olarak kullanılan NO'nin üretiminden sorumlu olup, nöronal NOS (nNOS) olarak adlandırılır (Kılınç ve Kılınç, 2003).



nNOS, moleküler ağırlığı 155 kDa olan, aktivasyonu için kalsiyuma gereksinim duyan bir enzimdir. Sinir hücrelerinde bulunmakla birlikte, testis, ovaryum (Moran ve Philip, 2003), böbrek, nötrofiller, pankreas hücreleri, endometriyum, solunum epiteli (Nathan ve Xie, 1994) ve iskelet kası fibrilleri gibi pek çok yapıda da varlığı gösterilmiştir. Adrenerjik olmayan sinir fibrillerinde NO'nun nNOS aracılığı ile oluştuğu ve düz kas içine yayılabildiği saptanmıştır (Smutzer, 2001). Yetişkin iskelet kası ve kalbinde, alternatif kesimlerle oluşturulan 34 aminoasitlik nNOS preRNA'sı 16. ve 17. ekzonlar arasına girerek kasa özel bir izoform olan 164 kDa ağırlığında nNOS'un anlatımını gerçekleştirir (Capanni ve diğ. 1998; Stamler ve Meissner, 2001).

eNOS, kalsiyuma bağımlı ve moleküler ağırlığı 135 kDa olan bir enzimdir. Bu izoform mast hücrelerinde, plateletlerde, pankreasın  $\beta$  hücrelerinde (Kılınç ve Kılınç, 2003), endotel hücrelerinde, kalp kası, bağırsak hücreleri ve çizgili kas hücrelerinde üretilir. eNOS aracılığı ile sentezlenen NO, platelet kümelenmesini ve endotel hücrelerinde lökosit yapışmasını önler. Damar gevşemesi ve damar düz kas hücrelerinin çoğalmasında rol oynar (Smutzer, 2001).

iNOS, diğer iki enzimden farklı olarak kalsiyumdan bağımsız olarak çalışır. İlk kez fare makrofajlarında tanımlanmıştır. Moleküler ağırlığı 131 kDa'dur. iNOS'un uyarılması çeşitli bakteriyel ürünlere (LPS gibi) ve iltihap öncüsü sitokinlere bağımlıdır (Kılınç ve Kılınç, 2003). Testiste, endotel hücrelerinde, düz kas hücrelerinde, hepatositlerde, kondrositlerde, kerotinositlerde (Nathan ve Xie, 1994), ayrıca, mast hücreleri ile monosit, makrofaj, mikroglia, Kupffer hücreleri, eozinofil ve nötrofilleri de içeren fagositik hücrelerde de üretilmektedir (Bogdan, 2001).

Birçok hormon ve ilaçlar hücre içi etkilerini, hücre yüzeyinde spesifik reseptörlere bağlanarak ve hücre içi siklik adenosin monofosfat (cAMP) yoğunluğunu artırarak gösterirken, NO hücre zarını geçerek demir ve/veya sülfür içeren proteinlere bağlanarak etkisini göstermektedir (Ignarro, 1990). NO özellikle nöronlar ve damar düz kaslarının hücre zarlarında bulunan guanilat siklazı aktive eder. Guanilat siklaz ise, guanozin trifosfat (GTP)'tan bir ikincil haberci olan siklik guanozin monofosfat (cGMP) oluşumunu artırır. cGMP; kas gevşemesi, sinapstan uyarı geçişi gibi hücre içi olayları

düzenler. Böylece NO, guanilat siklaz aktivitesini etkileyerek damar gevşemesini ve sınırlardan uyarı geçişi gibi işlevleri gerçekleştirmektedir (Snyder ve Dawson, 2000).

NO, MSS'de hafıza oluşumu, denge, uyarı geçişi, koku alma gibi pek çok fonksiyonu destekleyen bir nörotansmitter olarak iş görmektedir. (Dawson ve diğ., 1992). Periferik sinir siteminde ise, adrenerjik ve kolinerjik olmayan sinirleri etkileyerek gevşemeye ve buna bağlı olarak solunuma, genital ve üriner yollar ile mide-bağırsak işlevlerinin düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır (Tottrup ve diğ., 1992).

Dolaşım sisteminde platelet kümelenmesinin ve adezyonunun engellenmesi, kalp kasılmasının düzenlenmesi gibi olaylara da katılmaktadır. NO'in bu işlevleri guanilat siklazın aktivasyonu, hücre içi cGMP yoğunluğunun artışı şeklinde gerçekleşmektedir (Lowenstein ve diğ., 1994; Loscalzo, 1995).

Özellikle L-arjinin analogları (N<sup>G</sup>-Metil-L-arjinin, L-NMA; L-N-nitroarjinin, L-NNA; L-N<sup>G</sup>-nitroarjinin metil ester, L-NAME; L-2-kloropropiyonik asit, L-CPA; N-(1-iminoetil)-L-lizin, L-NIO) ve diğer NOS inhibitörleri ile değişik oranlarda inhibe edilmektedir (Calver ve diğ., 1992; Snyder ve Dawson, 2000). Bu inhibitörlerin insan ve hayvanlara verilmesi, NO sentezini durdurarak veya azaltarak NO'in etkili olduğu bütün fonksiyonları tersine çevirmektedir. Bu durumda, insan ve hayvanlarda endotel kaynaklı gevşeme olmadığı için hipertansiyon meydana gelmektedir. NO sadece sistemik dolaşımın düzenlenmesini sağlamakla kalmaz, aynı zamanda kalp, karaciğer, beyin gibi organlarda lokal dolaşımı da düzenlemektedir (Calver ve diğ., 1992; Loscalzo, 1995). Kolinerjik ve adrenerjik olmayan sinir uçlarından salınan NO, gevşetici etkiyle kan basıncı ve akışını düzenlemektedir (Ignarro, 1990; Lowenstein ve diğ., 1994).

Bu gevşeme mekanizması, dahili bir gevşeme sisteminin varlığını göstermektedir. Bu nedenle nitrogliserin ve sodyum nitroprussid (SNP) gibi nitrobileşikler uzun yıllar hipertansiyonun tedavisinde kullanılmıştır. Vücuda verilen bu maddeler NO'e dönüşerek etkilerini göstermektedirler (Ignarro, 1990).

Damar endotelinden salınan NO'nun etkisi, damar düz kas hücrelerinde guanilat siklazın aktivasyonu ile başlar, hücre içi siklik cGMP yoğunluğunun artışı ve düz kasların gevşemesi ile sonuçlanır (Lowenstein ve diğ., 1994; Snyder ve Dawson, 2000).

Endotel kaynaklı gevşeme, gerçek hipertansiyonlu hastalarda azalmaktadır (Higashi ve Chayama, 2002). Çünkü bu hastalarda NO sentezinin aksaması hipertansiyona sebep olmaktadır (Panza ve diğ., 1993; Higashi ve Chayama, 2002). Deneysel çalışmalarda hayvana NOS inhibitörü (L-NMA, L-NAME ve diğerleri) verilmesi hipertansif cevabı artırmaktadır. Bu durumda, glomerular hasar ve sodyum atılımında azalma meydana gelmektedir (Beltowski ve diğ., 2004). Hipertansiyona meyilli hayvanlara L-arjinin verilmesi, hipertansiyon oluşumunu engellemektedir. Çünkü gerçek hipertansiyonlu ve sağlıklı insanlara L-arjinin infüzyonu, sistolik ve diyastolik basıncı kısa sürede düşürmektedir (Higashi ve Chayama, 2002).

Düşük yoğunluklardaki (nanomolar) endojen NO, vasküler dengenin düzenlenmesinde kritik rol oynar. Endotelial hücreler tarafından üretilen düşük düzeylerdeki NO, vasküler düz kas hücrelerinde gevşemeye neden olur. Bu nanomolar düzeydeki NO salınımı, bazal damar tonusunun düzenlenmesinde önemlidir. Damar sisteminde NO sentezinin inhibisyonu, kan basıncının yükselmesine neden olmaktadır. NO üretiminin olmaması hipertansiyona yol açar. Bunun aksine NO düzeyinin septik şok ve hipotansiyonda yüksek olduğu tespit edilmiştir (Walford ve Loscalzo, 2003).

Endotel hücrelerinin sitosolünde üretilen NO, komşu kas hücrelerine yayılır ve hem grubu içeren bir enzim olan çözünebilir guanilat siklaza (sGC) bağlanır ve onu aktive eder. Aktive olan sGC, sitosolik cGMP düzeyinde artışa ve hücre içi  $Ca^{+2}$  akışında azalmaya neden olur.  $Ca^{+2}$  akışındaki bu azalma, damar düz kas hücrelerinde kalsiyum-kalmodulin miyozin hafif zincir kinaz kompleksinin oluşumunu azaltır ve miyozin hafif zincirleri düzenleyicilerinin fosforilasyonundaki artış ile gevşeme sağlanır (Walford ve Loscalzo, 2003).

Tüm memelilerin iskelet kaslarında NOS izoformlarının, kasa özel bir tip olan nNOS da dahil olmak üzere anlatımlarının yapıldığı gösterilmiştir (Kapur ve diğ., 1997; Stamler ve Meissner, 2001). NOS izoformlarının anlatımı ve yerleşimi yaşa, gelişim evresine,

sinir donanımı ve aktivitesine, sitokinlere ve büyüme faktörlerine maruz kalma durumuna, kas fibril tipine ve türüne bağlıdır (Punkt ve diğ.,2002; Stamler ve Meissner, 2001). Sadece kas hücrelerinde değil aynı zamanda kapillerde ve arteriyollerde de bulunduğu gösterilmiştir. Damar düz kasında lokal NOS anlatımıyla damar fonksiyonları otokrin olarak düzenlenmektedir. NO'in, iskelet kasında kan akımını düzenlediği gösterilmiştir (Buchwalow ve diğ., 2005). NOS izoformları, sarkoplazmik bölmelerin iç kısımlarında, mitokondri, sarkoplazmik retikulum ve sitoplazmada bulunur (Buchwalow ve diğ., 2005).

İmmünohistokimyasal yöntemlerle nNOS'un kas fibrillerinin sarkolemmalarında, eNOS'un mikrovasküler endotelde, iNOS'un ise kas fibrillerinin ve bazı endotel hücrelerinin yakınındaki lökositlerde bulunduğu gösterilmiştir (Yan ve diğ., 2000; Punkt ve diğ., 2001; Vranic ve diğ., 2002; Brevetti ve diğ., 2003; Buchwalow ve diğ., 2005). Sıçan iskelet kasında nNOS, tip I ve tip II fibrillerin sarkolemmalarında bulunur. Nöromuskular plak sonlanmalarında nNOS miktarı daha fazladır. nNOS'un, özellikle  $\alpha 1$  ve  $\beta 1$  sintrofin gibi distrofin ile ilgili proteinlerle ilişkili olduğu bilinmektedir (Grozdanovic, 2001; Vranic ve diğ., 2002; Chaubourt ve diğ., 2002). Muskular distrofiler, distrofin yokluğunda veya artışında (Duchenne ve Becker tipleri) ve distrofinden yoksun farelerde (mdx mice) görülür, ayrıca bunlarda sarkolemmal nNOS azdır veya yoktur (Capanni ve diğ. 1998; Stamler ve Meissner, 2001). İskelet kasında yaşlanmayla birlikte nNOS'un hem çözünebilir hem de mikrozomal fraksiyonları artmakta, buna bağlı olarak sitoplazma içindeki dağılımında da artış gözlenmektedir (Capanni ve diğ. 1998). Yapılan çalışmalar sonucunda, nNOS'un kan damarlarının media ve adventisya tabakalarında gösterilmesine rağmen, endojen eNOS ve iNOS'un damar biyolojisinde daha büyük bir öneme sahip olduğu anlaşılmıştır (Walford ve Loscalzo, 2003).

NO, iskelet kasında pek çok fonksiyonu yerine getirir. Bunlar; uyarılma ve kasılma oluşumu, mitokondriyal enerji üretimi, glikoz metabolizması ve kan akımının otoregülasyonudur (Grozdanovic, 2001; Stamler ve Meissner, 2001; Buchwalow ve diğ., 2005). NO, endotel hücrelerinde üretilen ve damar tonusunu parakrin olarak düzenleyen bir araçtır. Endoteliyal hücrelerde OBRlerin anlatımı yapılmasına rağmen, NO üretimi üzerine olan etkisi tartışmalıdır. *In-vitro* çalışmalarda leptin, endoteliyal NO

üretimini uyararak, NO aracılı damar gevşemesine neden olmaktadır. Bu sonuçlar, *in vivo* çalışmalarda yeteri kadar açık değildir (Beltowski ve diğ., 2004). Bazı araştırmacılar, leptinin teşvik ettiği damar gevşemesinde NO varlığını saptamışlardır. Birkaç çalışma *in vivo* NO üretiminde direkt olarak leptinin etkisine işaret etmektedir (Fruhbeck, 1999; Beltowski ve diğ., 2004). Fruhbeck (1999) ve Fruhbeck ve Gomez-Ambrosi (2001), leptin uygulamasından sonra plazma NO metabolitlerinin, nitrit ve nitrat yoğunluklarının arttığını gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte NO kaynağı tam olarak tanımlanamamıştır.

Leptin ve NO ile ilgili çalışmalar yapılmış, ancak fizyolojik olayların düzenlenmesinde NO ile leptin arasındaki ilişki tam olarak açıklanamamıştır. Biz de bu çalışmada, leptinin sıçan iskelet kası kan akımı ve NOS dağılımı üzerine etkilerini inceleyerek, leptin ve NO arasındaki ilişkinin belirlenmesine katkıda bulunmayı hedeflemekteyiz.

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada, deney hayvanı olarak yetişkin 3 aylık, ağırlıkları 250-300 g arasında değişen 24 adet erkek *Wistar albino* sıçan kullanıldı. Hayvanların her biri deney öncesinde ve deney süresince plastik kafeslerde tutularak, standart pelet yem ve musluk suyu ile beslendiler. Hayvanlar, operasyondan bir hafta önce deneyin yapıldığı laboratuvara alınarak ortam koşullarına uyumları sağlandı.

Çalışmada kullanılan hayvanlar aşağıda belirtildiği şekilde gruplandırılarak, serum fizyolojik su (FTS), L-N<sup>G</sup>-nitroarjinin metil ester (L-NAME) ve Leptin intravenöz (iv) olarak uygulandı. Kontrol grubuna sadece 0,5 ml FTS verilirken, diğer gruplara 0,5 ml FTS'de çözülen maddeler, infüzyon pompası aracılığı ile 3 dakikada verildi.

**I.Grup:** Kontrol (n=6); FTS iv olarak,

**II.Grup:** Leptin (n=6); 50 µg/kg iv olarak,

**III.Grup:** L-NAME (özgül olmayan NOS inhibitörü) (n=6); 10 mg/kg iv olarak,

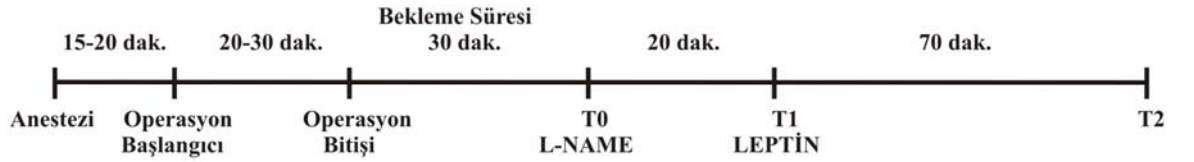
**IV:Grup:** L-NAME+Leptin (n=6); 10 mg/kg + 50 µg/kg iv olarak uygulandı.

Deney öncesi bir gece aç bırakılan hayvanlara, intraperitoneal (ip) olarak 90 mg/kg sodyum pentotal anestezisi uygulandı. Anestezi altındaki hayvanların boyun bölgesi ve Laser Doppler Flow-Meter'in takılacağı sağ arka ekstremitede gastrokinemus kasının bulunduğu bölge traş edildi. Hayvanlar, deney süresince vücut ısılarının korunması için ısıtma tablası üzerine sırt üstü alındı ve rektal prob aracılığı ile ısı kontrol edildi. Trakeostemi yapılarak spontan nefes almaları sağlandı. Operasyonla sağ karotid artere ve sağ jugular vene polietilen (PE 50) kanül yerleştirildi. Sağ karotid artere yerleştirilen kanül basınç transdüsrüne bağlanarak bir analog/dijital (A/D) çeviriciye takıldı ve arteriyal kan basıncı verileri, deney süresince bilgisayar yardımıyla kaydedildi. Uygulanacak olan maddeler infüzyon pompası aracılığıyla sağ jugular vene yerleştirilen kanül aracılığı ile iv olarak verildi. Ön ekstremitelere ve arka sağ ekstremiteye bağlı elektrotlar ile elektrokardiyogram sinyalleri bilgisayara aktarıldı. Sol arka ekstremitede

gastrokinemus kası üzerindeki deride, makas yardımı ile kanamaya neden olmaksızın küçük bir açıklık oluşturuldu. Kas içi kan akımını belirlemek amacıyla da, Laser Doppler Flow-Meter iğne probu kasa yüzeyel olarak yerleştirildi. Açılan bölgelere, dokuların kurummasını önlemek amacıyla FTS ile nemlendirilmiş gazlı bezler yerleştirildi. Hayvanlar, operasyonun ardından 30 dakika dinlendirildikten, birinci madde infüzyonu (T0 anı), 20 dakika sonra da ikinci madde infüzyonu (T1 anı) gerçekleştirildi (Şekil 3.1, 3.2). Tüm veriler 120 dakika süresince eş zamanlı olarak PowerLab programı ile kaydedildi (Şekil 3.3).

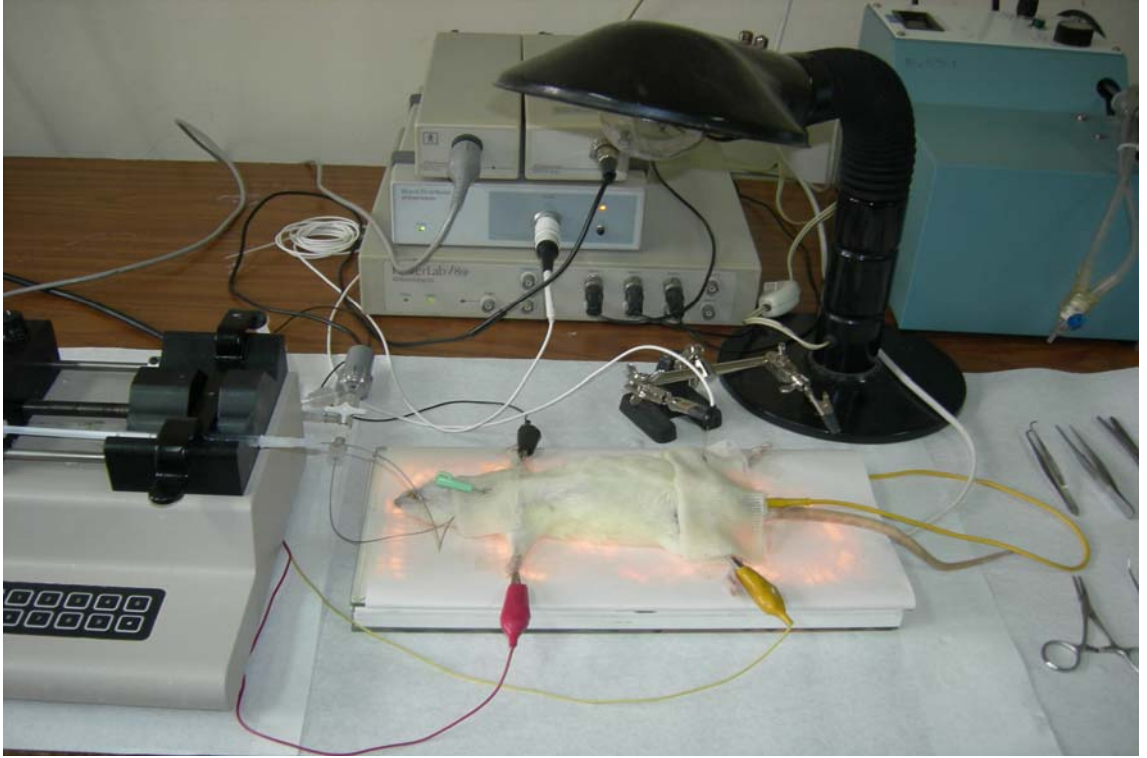


**Şekil 3.1:** Kontrol, Leptin ve L-NAME gruplarında deney protokolü



**Şekil 3.2:** L-NAME+Leptin grubunda deney protokolü

Deney sonunda hayvanlardan, histolojik değişikliklerin ve ayrıca dokudaki NOS enziminin dağılımının immünohistokimyasal olarak belirlenmesi için, herhangi bir işlem uygulanmayan sağ arka bacak kas dokuları ve biyokimyasal analizler için de sağ karotid artere bağlı bulunan kanül aracılığıyla kan örnekleri alınmıştır.



Şekil 3.3: Deneş hayvanı ve laboratuvarдан görüntüler



### 3.1. HİSTOLOJİK YÖNTEMLER

Işık mikroskobu incelemeleri için, kas dokuları %10'luk nötral formalinde tespit edildikten 24 saat sonra, % 70 alkole alındı ve alkol birkaç defa değiştirilerek fiksatifin dokulardan çıkması sağlandı. Daha sonra, yükselen alkol serilerinden geçirilerek ksilolde saydamlaştırılan parçalar, 58 °C'lik parafine gömüldü. Parafin bloklardan Leica RM 2125 RT mikrotomu aracılığı ile 4 µm kalınlığında alınan kesitlere, Heidenhain'ın Azan boyama yöntemi uygulandı. Hazırlanan preparatlar Leica ışık mikroskobu ile incelenerek, Image Pro-Plus sistemi aracılığı ile fotoğraflandı.

### 3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER

Bacak kasından alınan kesitlerde, eNOS ve nNOS'un dağılımlarına immünohistokimyasal yöntem ile bakıldı. Bu amaçla, parafin bloklardan 4 µm kalınlığında alınan kesitler, bir gece 56 °C'de tutulduktan sonra, ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek suya kadar getirildi. Kesitler, sitrat tamponu (pH 6.0) içerisinde mikrodalgada 700 watt'da 10 dakika tutulduktan sonra, 20 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Soğuma işlemini takiben distile suya alınan kesitlerin etrafı, pap pen ile işaretlendi. Endojen peroksidaz aktivitesi, % 0,3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lab vision, TA-060-HP) ile 10 dakika oda sıcaklığında tutuldu. Kesitler, distile sudan geçirildikten sonra her basamakta üç defa olacak şekilde fosfat tamponu (PBS)'nda 10 dakika yıkandı. Yıkamadan sonra kesitlere, oda sıcaklığında 5 dakika Ultra V Blok (Lab vision, TA-60-UB) uygulandı. Daha sonra kas kesitleri, rabbit anti eNOS (1:100) (eNOS rabbit Pab Neomarker, RB-1711-P) ve nNOS (1:100) (Rabbit Anti-Nitric Oxide Synthase I Polyclonal Antibody, KAP-NO003) antikoları ile bir gece buzdolabında +4 °C'de inkübe edildiler (Antikolar, antikor sulandırıcısında (Lab vision, TA-125-UD) 1:100 oranında sulandırıldı). Kesitler, PBS'de yıkandıktan sonra biotinlenmiş goat anti-rabbit (Lab vision, TR-060-BN) ile oda sıcaklığında 30 dakika bırakıldı. PBS ile yıkanan kesitlere, 30 dakika streptavidin peroxidase label reagent (Lab vision, TS-060-HR) uygulandı ve ardından kesitler PBS ile yıkandı. Beş dakika AEC (Lab vision, TA-004-HAC) inkübasyonu ile renkli reaksiyon ürünü sağlandı. Kontrol olarak kabul edilen kesitlere PBS uygulandı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra, Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapıldı ve gliserol jelatin ile kapatıldı (McNaughton ve diğ., 2002).

### 3.3. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

Deney sonunda hayvanların kalplerinden alınan kan örneklerinde, leptin ve nitrit/nitrat değerlerine bakıldı. Serumda leptin düzeyleri, Rat Leptin ELISA kit (DRG Instruments GmbH, Germany, REF EIA-2395) aracılığıyla enzime bağlı immün analiz (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) yöntemi ile çalışıldı. Serumda nitrit/nitrat, Griess yöntemi ile belirlendi (Arneith ve Herold, 1988). Bu reaksiyona göre nitrat, nitrat redüktaz enziminin varlığında nitrite redüklenir. Daha sonra nitrite, Griess reaktifi olarak adlandırılan sülfanilamid ile N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorür bileşiklerini içeren karışım katılarak renkli diazo ürünü elde edilir. Oluşan renkli ürün 540 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür.

### 3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

İstatistiksel analiz için Instat İstatistiksel Paket Programı (Instat Graphad Software, San Diago, CA, USA.) kullanıldı. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi. Grupların dağılımının, normal dağılıma uygunluğunun test edilmesini takiben farklı zaman noktalarındaki değerler (T1 ve T2), FTS, L-NAME, Leptin ve L-NAME+Leptin uygulanmaları öncesindeki kontrol değerlerine (T0)ve aynı zaman noktalarındaki kontrol grubu değerlerine (T1 ve T2) göre tek yönlü varyans analizi uygulanarak Tukey’in çoklu karşılaştırma testi (Tukey’s Multiple Comparison Test) ile değerlendirildi.  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

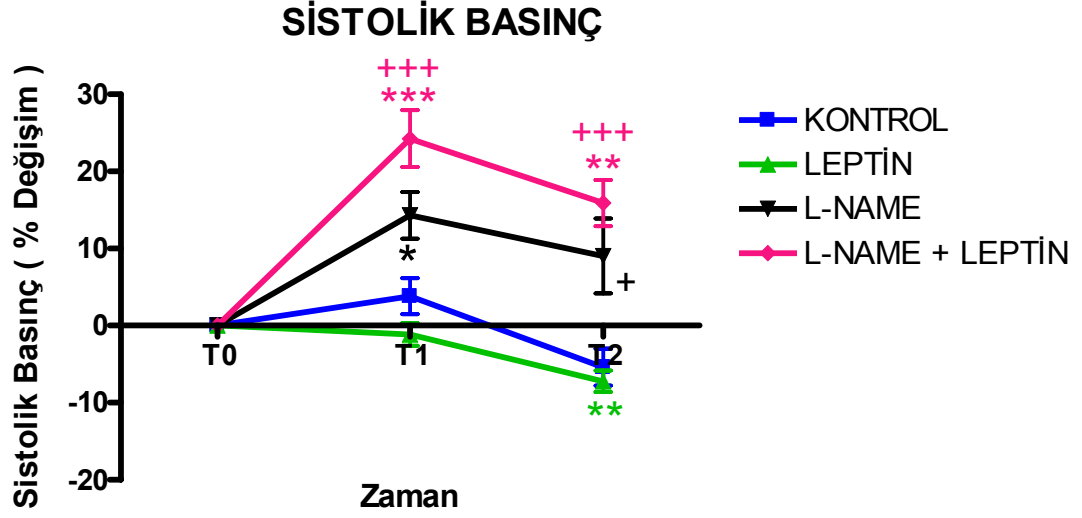
### 4.1. HEMODİNAMİK BULGULAR

Leptin, L-NAME ve her ikisinin birlikte uygulandığı hayvanların sistolik ve diyastolik basınçları ile ortalama arteriyal kan basıncı, kan akımı ve nabız değerlerini karşılaştırdığımız zaman, hem deneyin başlangıcına göre hem de kontrol grubuna göre meydana gelen değişikliklerin anlamlılığı değerlendirildi. Buna göre;

Leptin uygulanmasından sonra, sistolik basınçta T1 anında T0'a göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlenmezken, T2 anında T0'a göre anlamlı bir azalma belirlendi (\*\*  $p<0.01$ ). Bu değerler, aynı zaman aralıklarındaki kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler gözlenmedi (Şekil 4.1.1).

L-NAME uygulanmasından sonra, sistolik basınçta T1 anında T0'a göre anlamlı bir artış (\*  $p<0.05$ ) tespit edilirken, T2 anında T0'a göre anlamlı bir artış saptanmadı. T2 anındaki sistolik basınç değeri kontrol grubu değerine göre anlamlı bir artış (+  $p<0.05$ ) gösterdi (Şekil 4.1.1).

L-NAME uygulanmasından 20 dakika sonra leptin uygulanan grupta ise, sistolik basınçta L-NAME uygulanmasından sonra veri alınan T1 anında T0'a göre (\*\*\*)  $p<0.001$ ) ve leptin uygulanmasından sonra veri alınan T2 anında T0'a göre (\*\*  $p<0.01$ ) anlamlı bir artış belirlendi. Ayrıca bu değerler, aynı zaman aralıklarındaki kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında da anlamlı bir artış olduğu (+++  $p<0.001$ ) saptandı (Şekil 4.1.1).



\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , Grupların T0' a göre karşılaştırılması

+  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$ , +++  $p < 0,001$ , Grupların aynı zaman noktasındaki kontrol grubuna göre karşılaştırılması

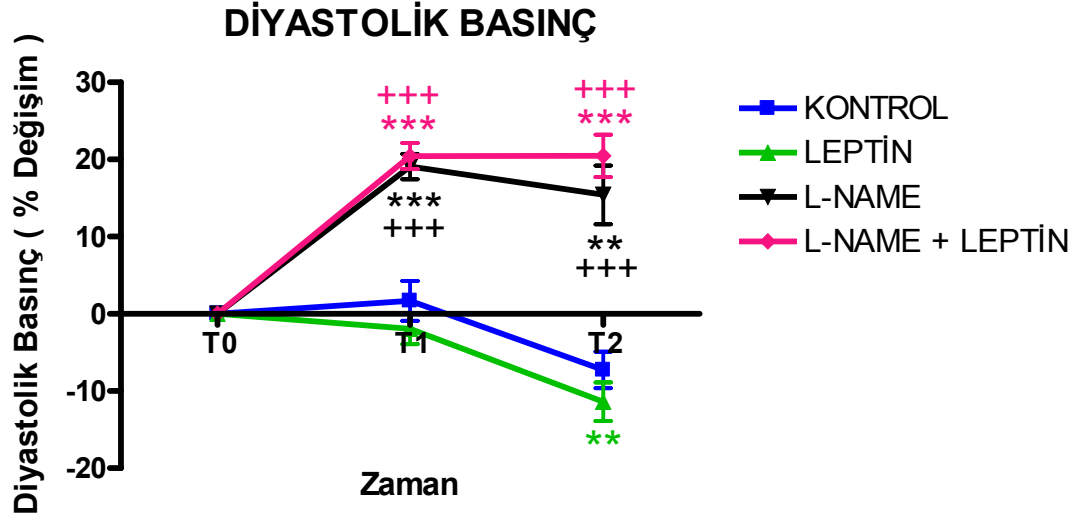
**Şekil 4.1.1:** Leptin, L-NAME ve L-NAME+Leptin gruplarında sistolik basınç değerlerinin, başlangıç değerine ve aynı zaman aralıklarındaki kontrol grubu değerlerine göre karşılaştırılması (Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterilmiştir).

Leptin uygulanmasından sonra, diyastolik basınçta T1 anında T0'a göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlenmezken, T2 anında T0'a göre anlamlı bir azalma görüldü (\*\*  $p < 0.01$ ). Bu değerler, aynı zaman aralıklarındaki kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.1.2).

L-NAME uygulanmasından sonra, diyastolik basınçta T1 anında T0'a göre. (\*\*\*)  $p < 0.001$ ), T2 anında T0'a göre (\*\*  $p < 0.01$ ) anlamlı bir yükseliş tespit edildi. Bu değerler, aynı zaman aralıklarındaki kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında oldukça anlamlı bir artış (+++  $p < 0.001$ ) görüldü (Şekil 4.1.2).

L-NAME+Leptin grubunda ise diyastolik basınçta L-NAME uygulanmasından sonra veri alınan T1 anında T0'a göre ve leptin uygulanmasından sonra veri alınan T2 anında T0'a göre anlamlı bir artış (\*\*\*)  $p < 0.001$ ) görüldü. Bu değerler, aynı zaman

aralıklarındaki kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında da artış oldukça anlamlı (+++ p<0.001) bulundu (Şekil 4.1.2).



\*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, Grupların T0' a göre karşılaştırılması

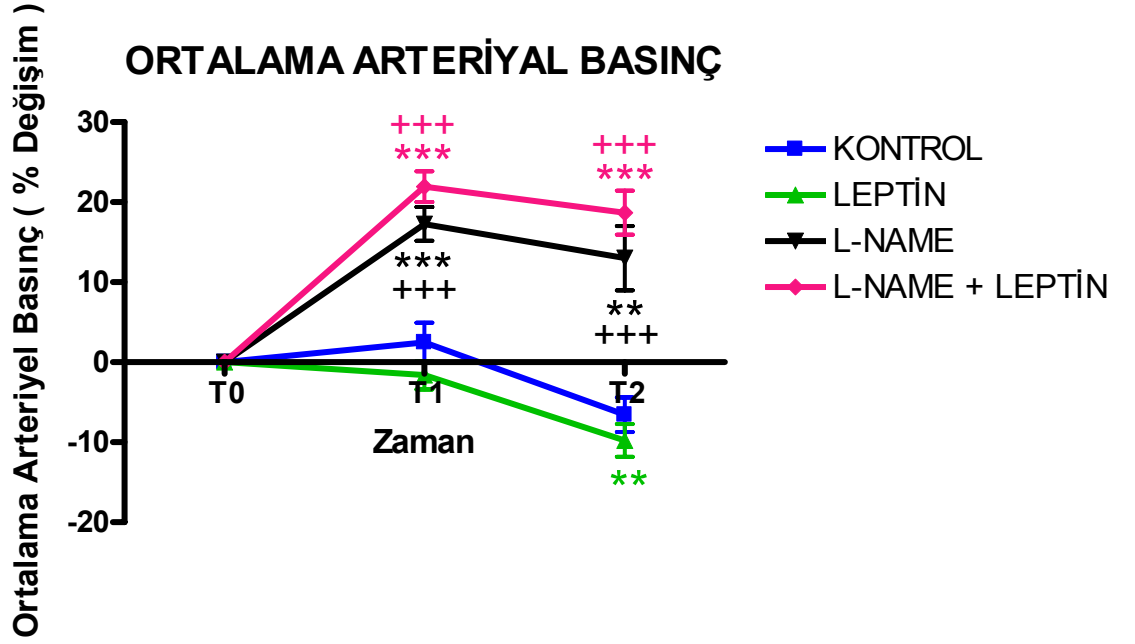
+++ p<0,001, Grupların aynı zaman noktasındaki kontrol grubuna göre karşılaştırılması

**Şekil 4.1.2:** Leptin, L-NAME ve L-NAME+Leptin gruplarında diyastolik basınç değerlerinin, başlangıç değerine ve aynı zaman aralıklarındaki kontrol grubu değerlerine göre karşılaştırılması (Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterilmiştir).

Leptin uygulanmasından sonra, ortalama arteriyal basınçta T1 anında T0'a göre anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, T2 anında T0'a göre anlamlı bir azalma belirlendi (\*\* p<0.01). Bu değerler, aynı zaman aralıklarındaki kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.1.3).

L-NAME uygulanmasından sonra, ortalama arteriyal basınçta hem T1 anında T0'a göre (\*\*\*) p<0.001) hem de T2 anında T0'a göre (\*\* p<0.01) anlamlı bir yükseliş tespit edildi. Bu değerler, aynı zaman aralıklarındaki kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında da kan basıncının belirgin olarak arttığı (+++ p<0.001) görüldü (Şekil 4.1.3).

L-NAME+Leptin grubunda ise ortalama arteriyel basınç, diyastolik basınçta olduğu gibi L-NAME uygulanmasından sonra veri alınan T1 anında T0'a göre ve leptin uygulanmasından sonra veri alınan T2 anında T0'a göre anlamlı bir artış (\*\*\*) gösterdi. Bu değerler, aynı zaman aralıklarındaki kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında da anlamlı olarak yükseldiği (+++ p<0.001) görüldü (Şekil 4.1.3).



\*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, Grupların T0' a göre karşılaştırılması

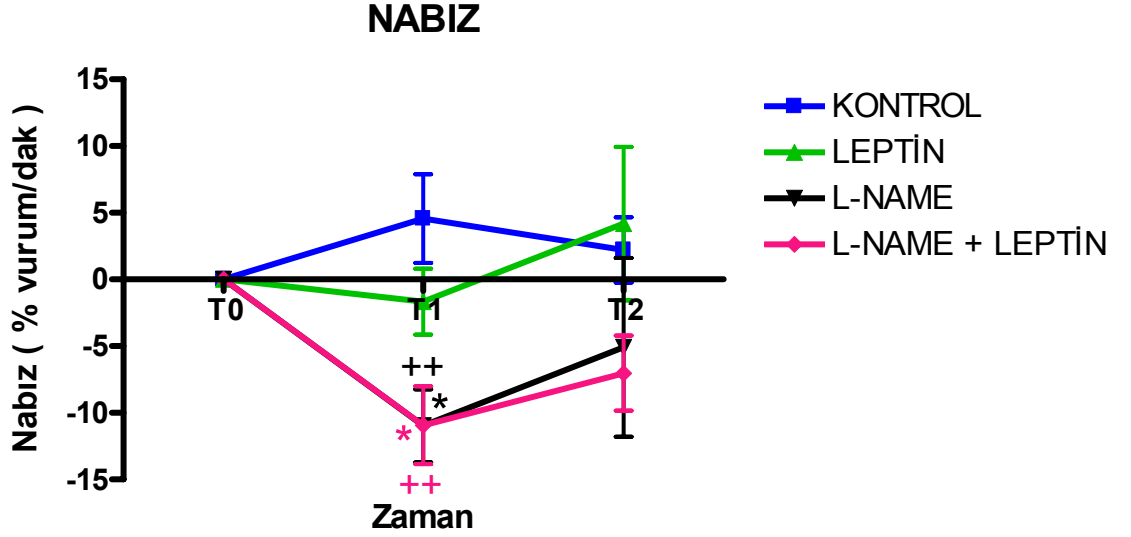
+++ p<0,001, Grupların aynı zaman noktasındaki kontrol grubuna göre karşılaştırılması

**Şekil 4.1.3:** Leptin, L-NAME ve L-NAME+Leptin gruplarında ortalama arteriyel basınç değerlerinin, başlangıç değerine ve aynı zaman aralıklarındaki kontrol grubu değerlerine göre karşılaştırılması (Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterilmiştir).

Leptin uygulanmasından sonra nabızda, T0'a göre T1 anında bir azalma, T2 anında ise bir artma görüldü; ancak bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.1.4).

L-NAME, L-NAME+Leptin gruplarında T0'a göre T1 anında nabızda anlamlı bir azalma (\* p<0.05) görülürken, T2 anında bu değer T0 değerine yaklaştı ancak, bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Ayrıca her iki grubun değerleri aynı

zaman aralıklarındaki kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında ise, sadece T1 anında T0' a göre anlamlı bir azalma ( $++ p<0.01$ ) olduğu tespit edildi (Şekil 4.1.4).



\*  $p<0,05$ , Grupların T0' a göre karşılaştırılması

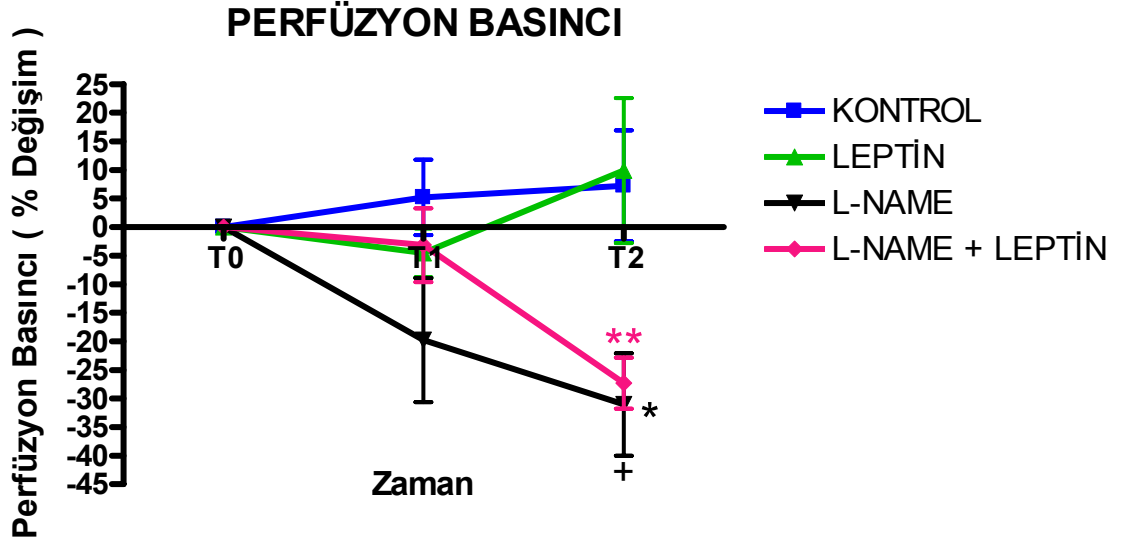
++  $p<0,01$ , Grupların aynı zaman noktasındaki kontrol grubuna göre karşılaştırılması

**Şekil 4.1.4:** Leptin, L-NAME ve L-NAME+Leptin gruplarında nabız değerlerinin, başlangıç değerine ve aynı zaman aralıklarındaki kontrol grubu değerlerine göre karşılaştırılması (Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterilmiştir).

Leptin uygulanmasından sonra kan akımı (perfüzyon basıncı), T0' a göre T1 anında bir azalma, T2 anında ise bir artış gösterdi; ancak bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Kontrol grubu değerlerine göre yapılan karşılaştırmada da sonuçlar anlamlı değildi (Şekil 4.1.5).

L-NAME ve L-NAME+Leptin gruplarında kan akımı T0' a göre T1 anında anlamlı olmayan bir azalma gösterdi. Bu değerler kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında da azalma anlamlı değildi. L-NAME grubunda T2 anında T0' a göre anlamlı bir azalma ( $* p<0.05$ ) belirlendi. Bu değer aynı zamanda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında da anlamlıydı ( $+ p<0.05$ ). L-NAME+Leptin grubunda ise T2 anında T0' a göre daha

anamlı bir azalma (\*\*  $p<0.01$ ) belirlendi. Buna karşın, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında perfüzyon basıncı anlamlı bir değişiklik göstermedi (şekil 4.1.5).



\*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , Grupların T0' a göre karşılaştırılması

+  $p<0,05$ , Grupların aynı zaman noktasındaki kontrol grubuna göre karşılaştırılması

**şekil 4.1.5:** Leptin, L-NAME ve L-NAME + Leptin gruplarında perfüzyon basıncı değerlerinin, başlangıç değerine ve aynı zaman aralıklarındaki kontrol grubu değerlerine göre karşılaştırılması (Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterilmiştir).



## 4.2. HİSTOLOJİK BULGULAR

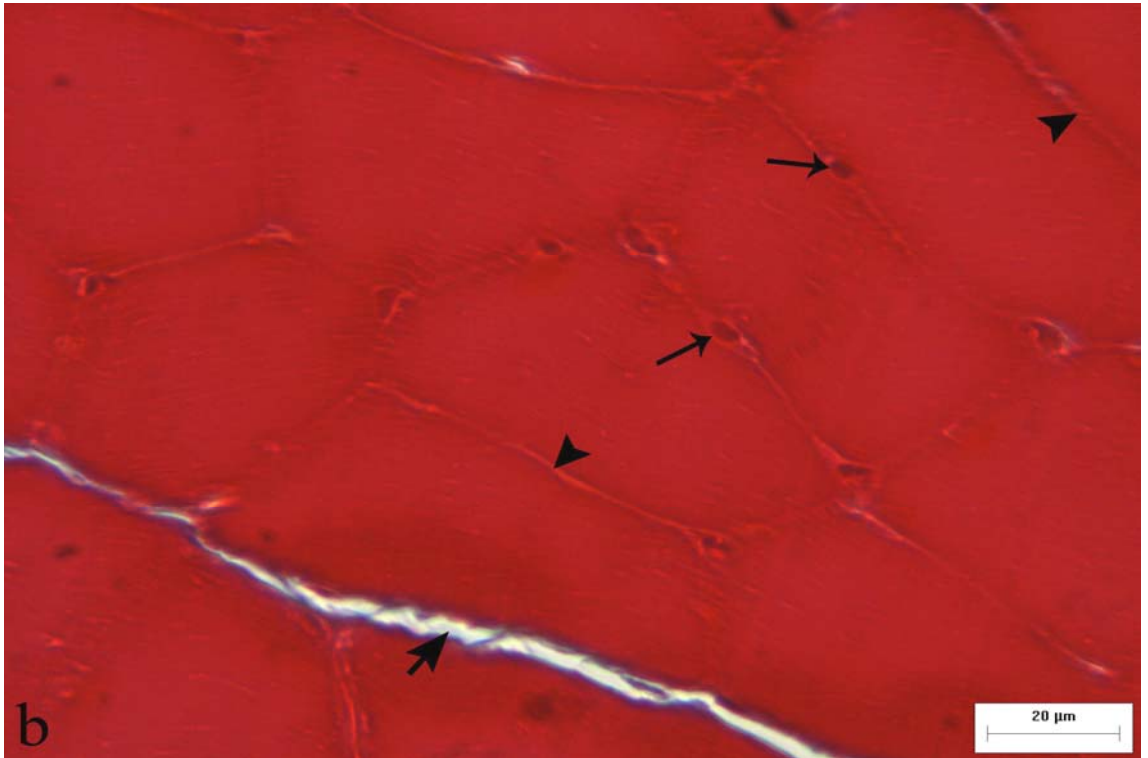
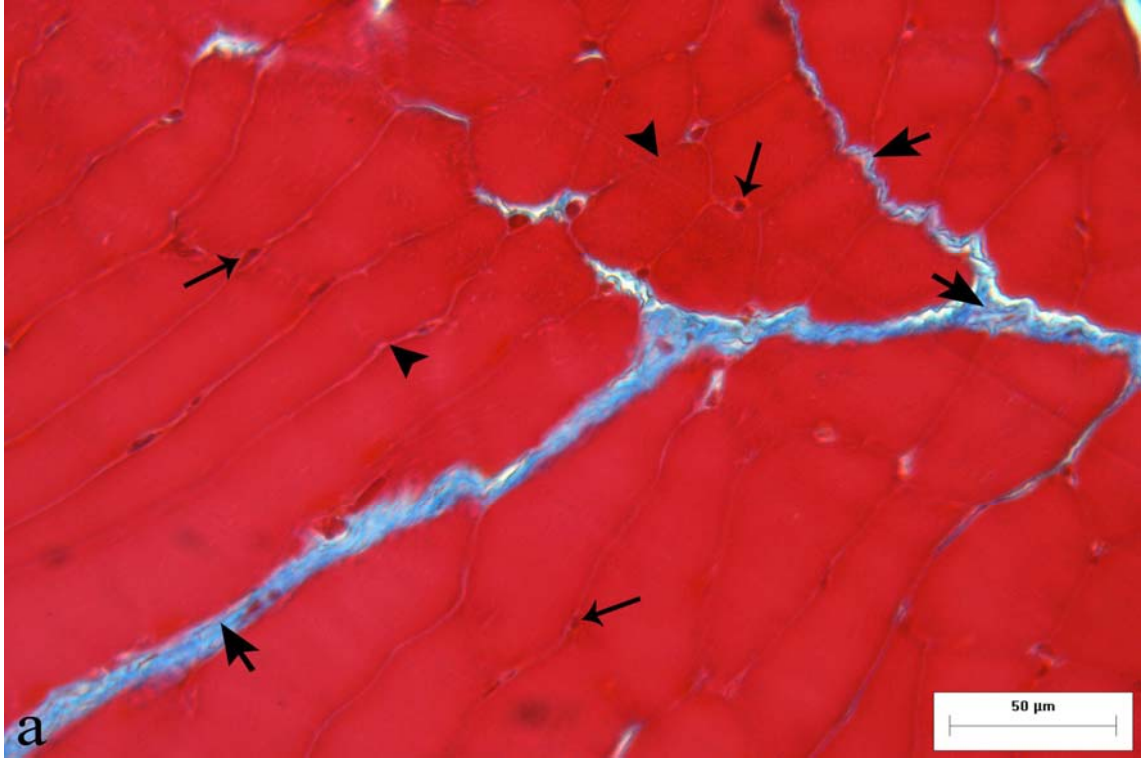
Deney sonunda bu fizyolojik değişiklikleri tespit ettiğimiz hayvanların, işlem yapılmayan sadece Leptin, L-NAME ve Leptin+L-NAME'nin etkilerini görebileceğimiz bacak kaslarından alınan dokulardaki histolojik çalışmalar sonucunda;

Kontrol grubunda, kas dokusunun normal yapısı gözlemlendi. Bu grupta, endomisyumların düzenli yapısını koruduğu ve periferik konumlu nukleusların belirgin olduğu tespit edildi. Perimisyum da yine belirgin ve devamlılığını koruyan bir yapıdaydı (Şekil 4.2.1 a-b). Kontrol grubunun boyuna kesitlerinde ise, endomisyumların devamlı olduğu ve çizgilenmelerin belli belirsiz olduğu saptandı (Şekil 4.2.2 a-b).

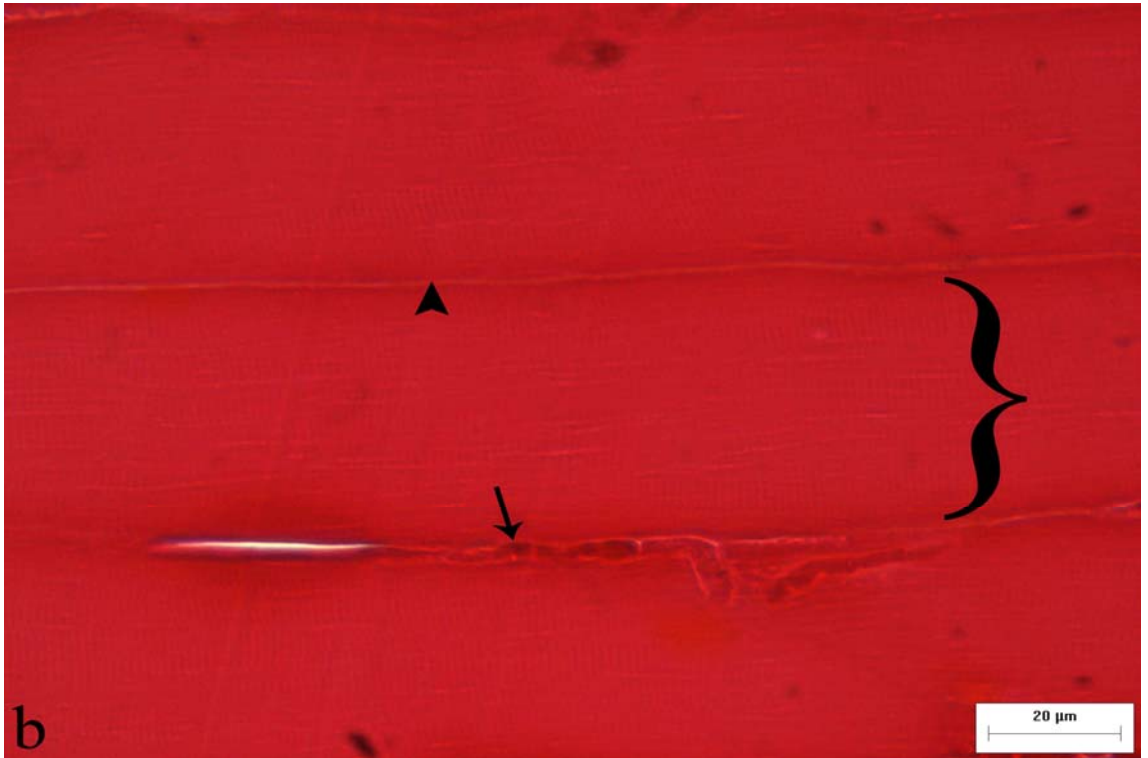
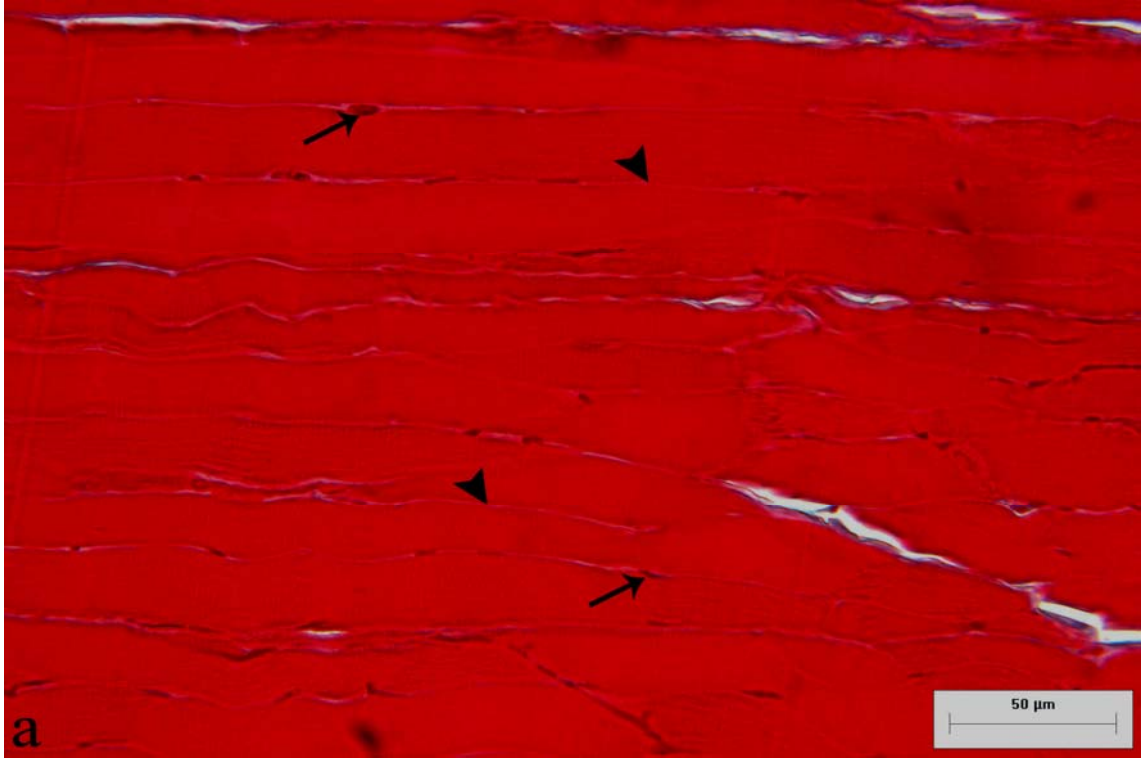
Leptin uygulanan grubun enine kesitleri incelendiğinde, genel olarak bağ dokusunda artış ve buna bağlı olarak endomisyumların ve perimisyumların daha belirgin olduğu gözlemlendi. Ayrıca bu grupta, nukleuslar da belirgindi (Şekil 4.2.3 a-b). Boyuna kesitler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, çizgilenmelerin daha belirgin olduğu saptandı (Şekil 4.2.4 a-b).

L-NAME grubunda, leptin grubundaki kadar olmamakla birlikte, fibriller arası bağ dokusunda artış gözlemlendi. Fibrillerin boyanma özelliklerinde de farklılıklar görüldü. Nukleusların büyük bir kısmının yuvarlak olduğu ve nukleolusların merkezi olarak konumlandığı görüldü. Ayrıca, kas fibrillerinin yapısında da bozukluk ve yer yer kanama odaklarının olduğu tespit edildi (Şekil 4.2.5 a-b). Bu grubun boyuna kesitlerindeki çizgilenmelerin leptin grubuna oranla daha az belirgin olduğu saptandı (Şekil 4.2.6 a-b).

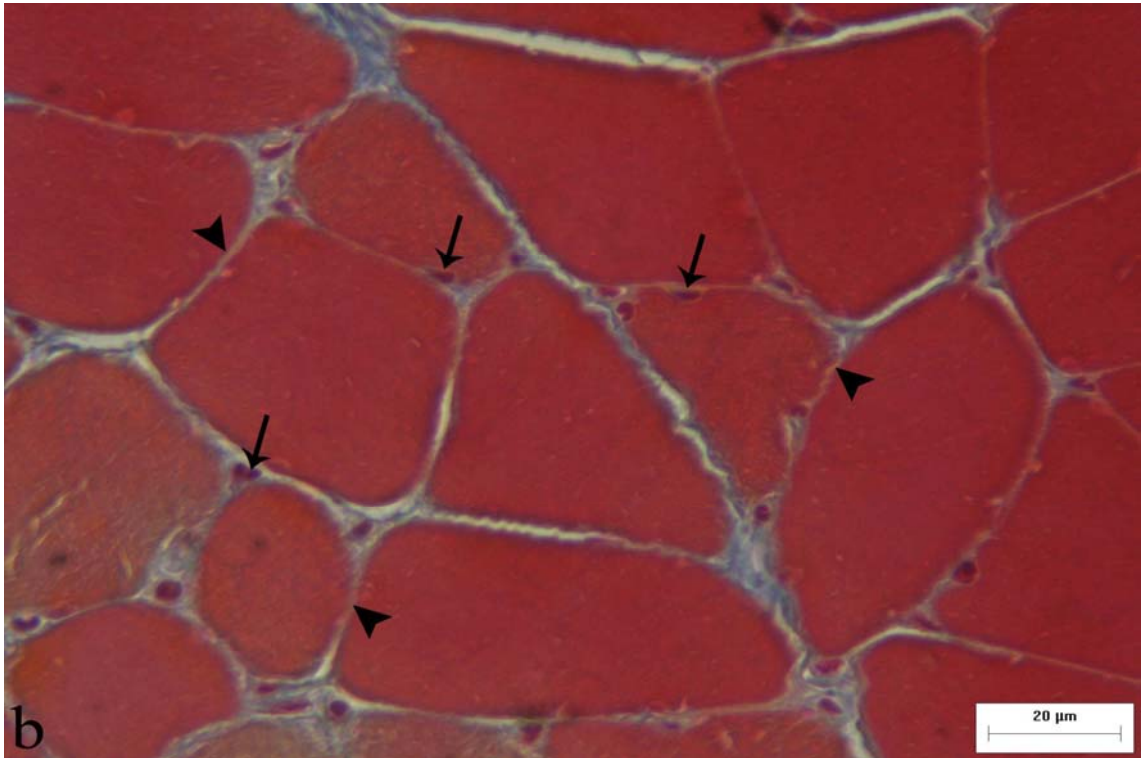
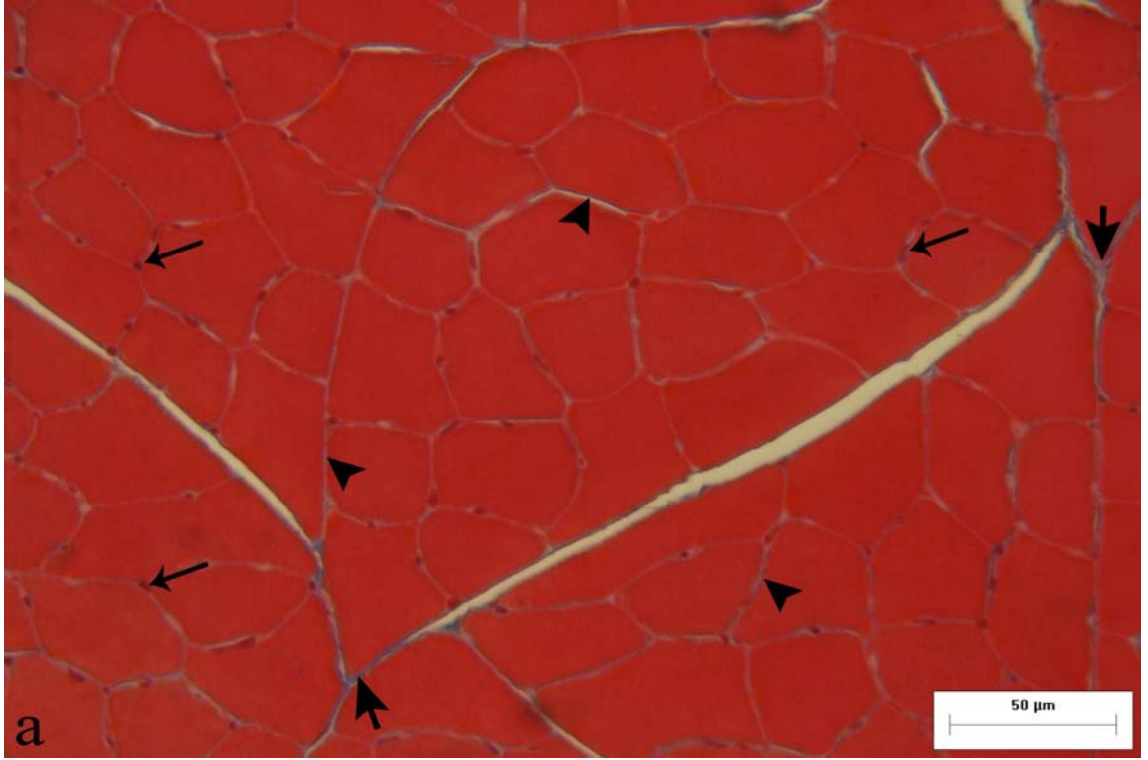
L-NAME'den sonra leptin uygulanan grupta, L-NAME ve leptinin yalnız başına uygulandığı gruplara nazaran daha fazla bağ dokusu gözlemlendi. L-NAME grubunda gördüğümüz boyanma özelliğindeki farklılığın, L-NAME+Leptin uygulanan grupta kontrol grubuna yakın olduğu saptandı. Fibrillerdeki yapısal bozukluklarda da azalma gözlemlendi (Şekil 4.2.7 a-b). Boyuna kesitlerde ise, çizgilenmeler leptin grubuna benzer olmakla birlikte, L-NAME grubuna göre daha belirgindi (Şekil 4.2.8 a-b).



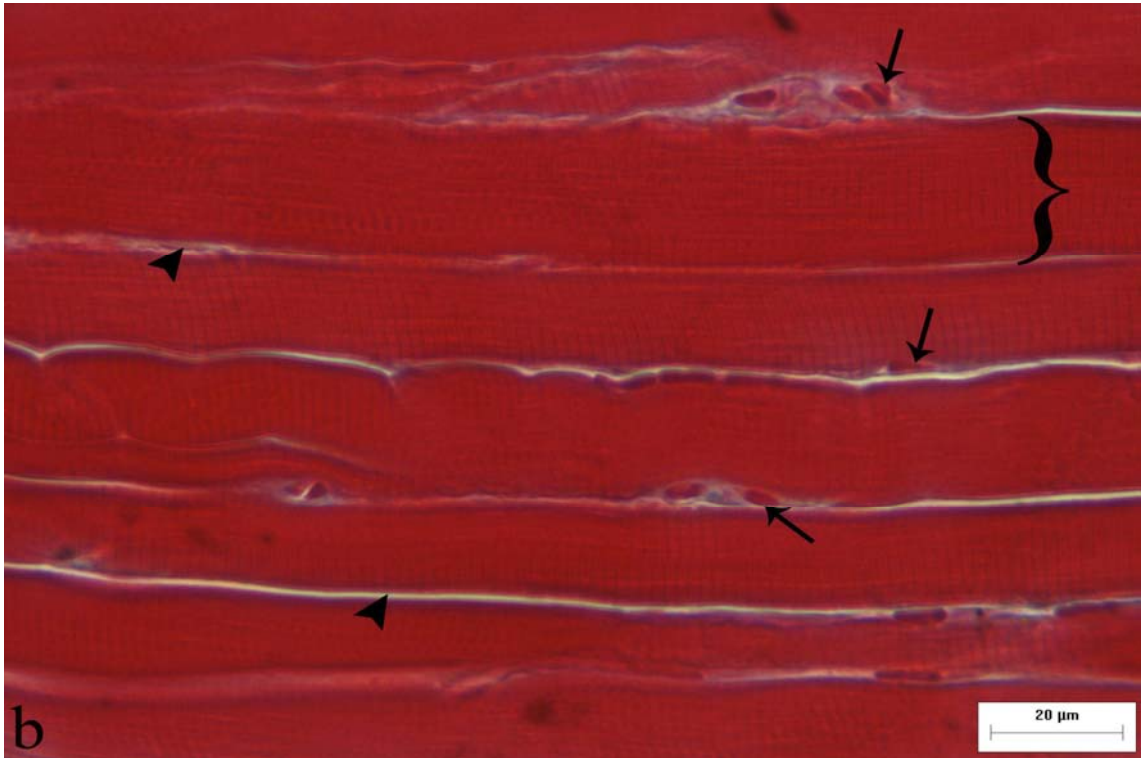
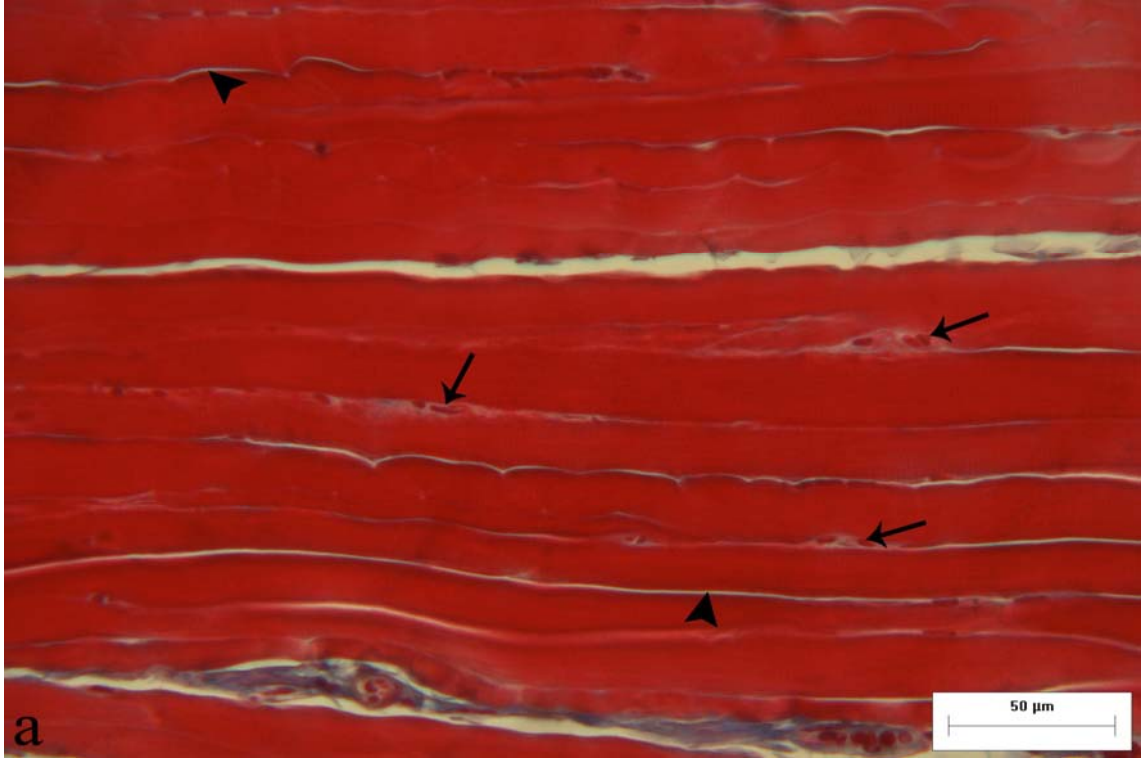
**Şekil 4.2.1 a-b:** Kontrol grubu hayvanlardan alınan enine kas kesitlerinde, endomisyum ( $\blacktriangleright$ ), perimisyum ( $\blacktriangle$ ), periferel konumlu nukleuslar ( $\blacktriangle$ ). H. Azan. a) Bar=50  $\mu\text{m}$ , b) Bar=20  $\mu\text{m}$ .



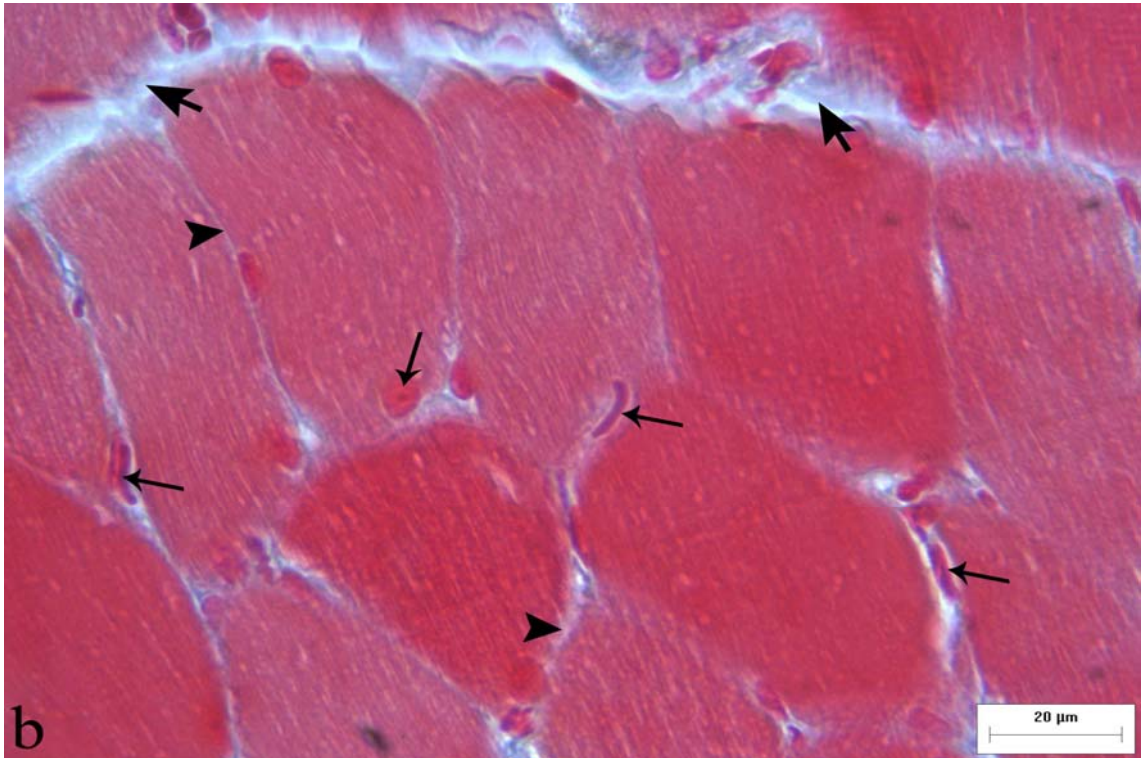
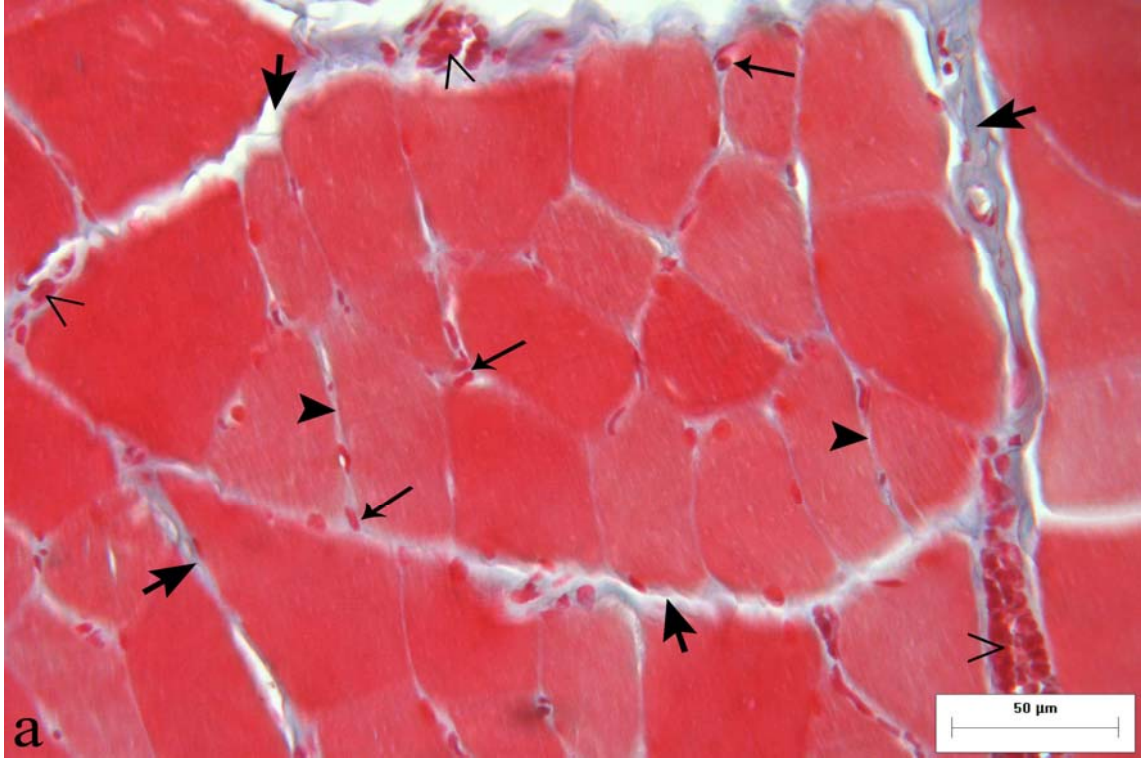
**Şekil 4.2.2 a-b:** Kontrol grubu hayvanlardan alınan boyuna kas kesitlerinde, endomiyum (➤), periferel konumlu nukleuslar (↑), enine çizgilenmeler (}). H. Azan. a) Bar=50 µm, b) Bar=20 µm.



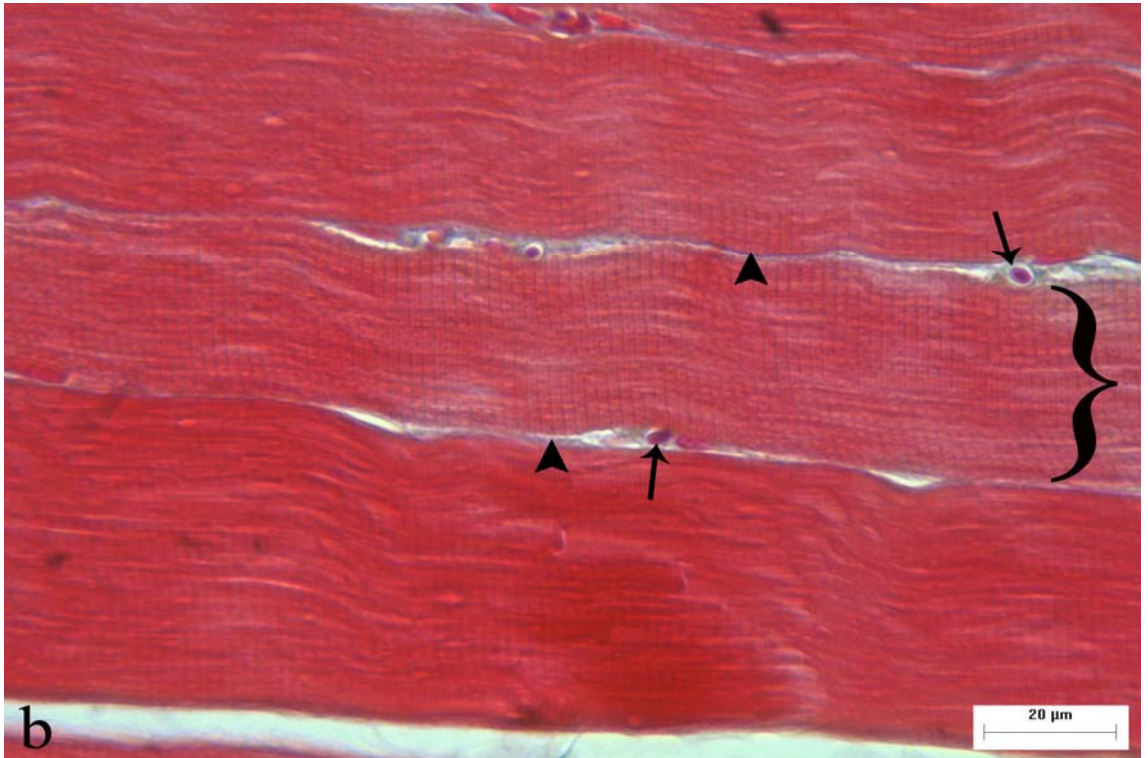
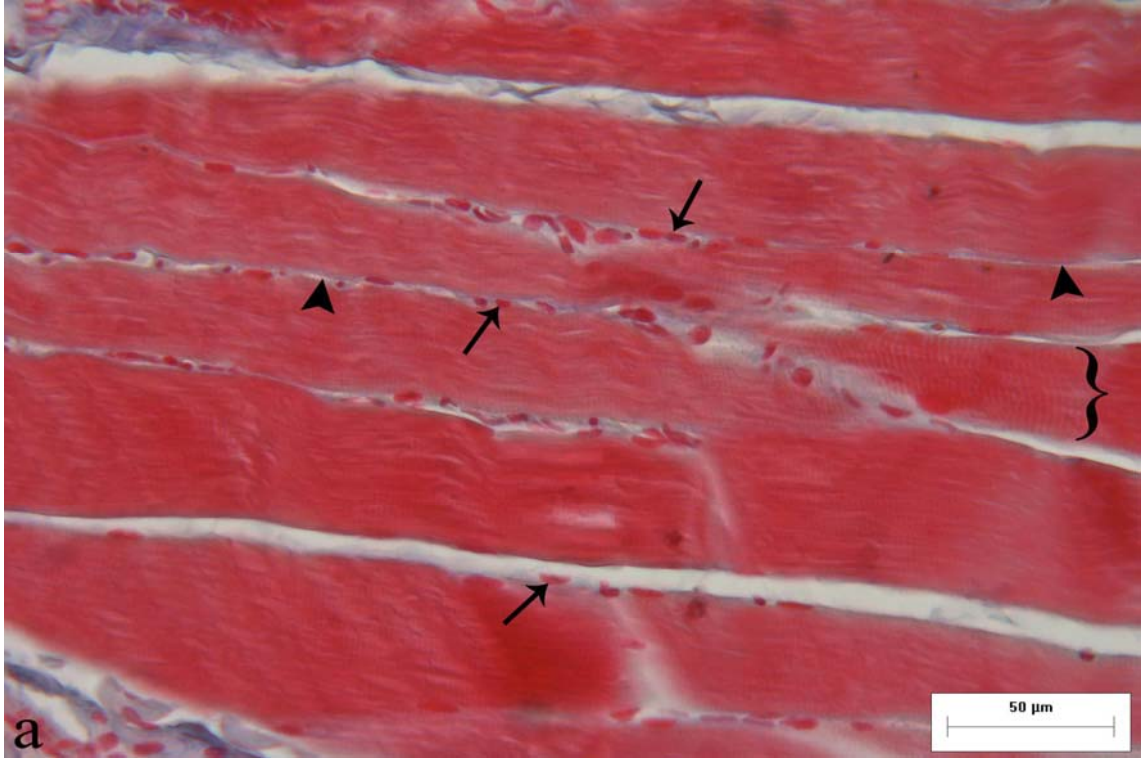
**Şekil 4.2.3 a-b:** Leptin uygulanan hayvanlardan alınan enine kas kesitlerinde, endomisyum (▶), perimisyum (↑), periferel konumlu nukleuslar (↑). H. Azan. a) Bar=50 µm, b) Bar=20 µm.



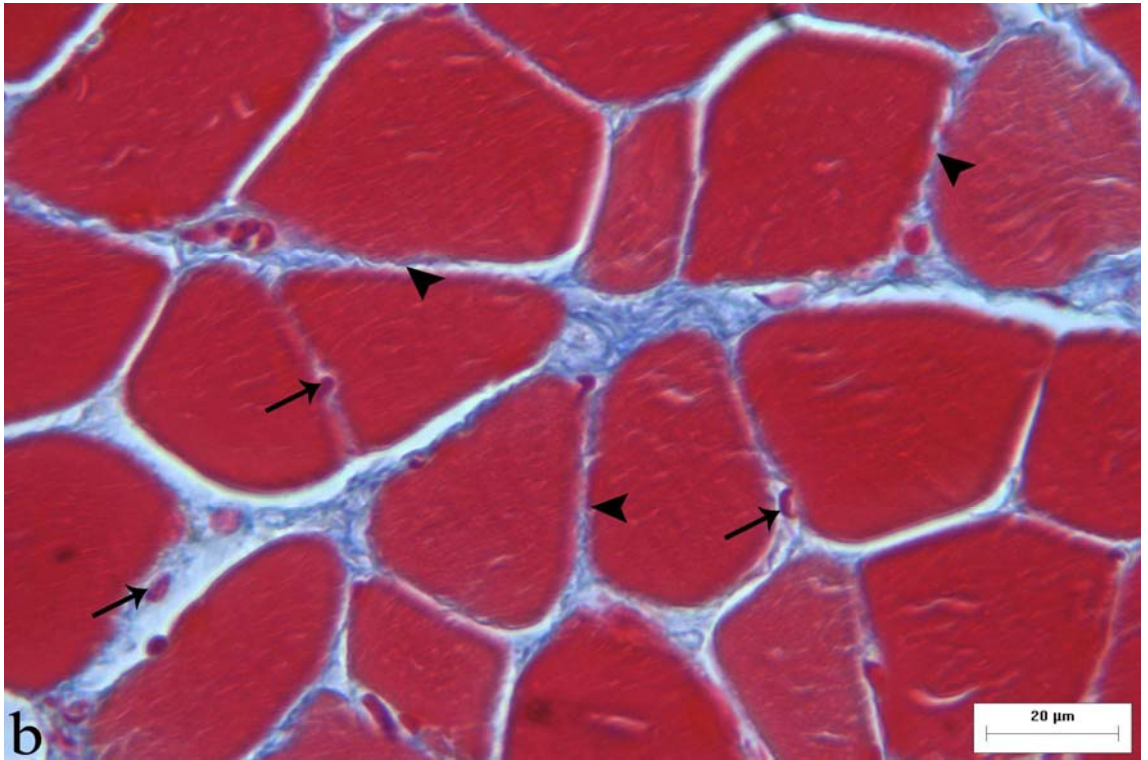
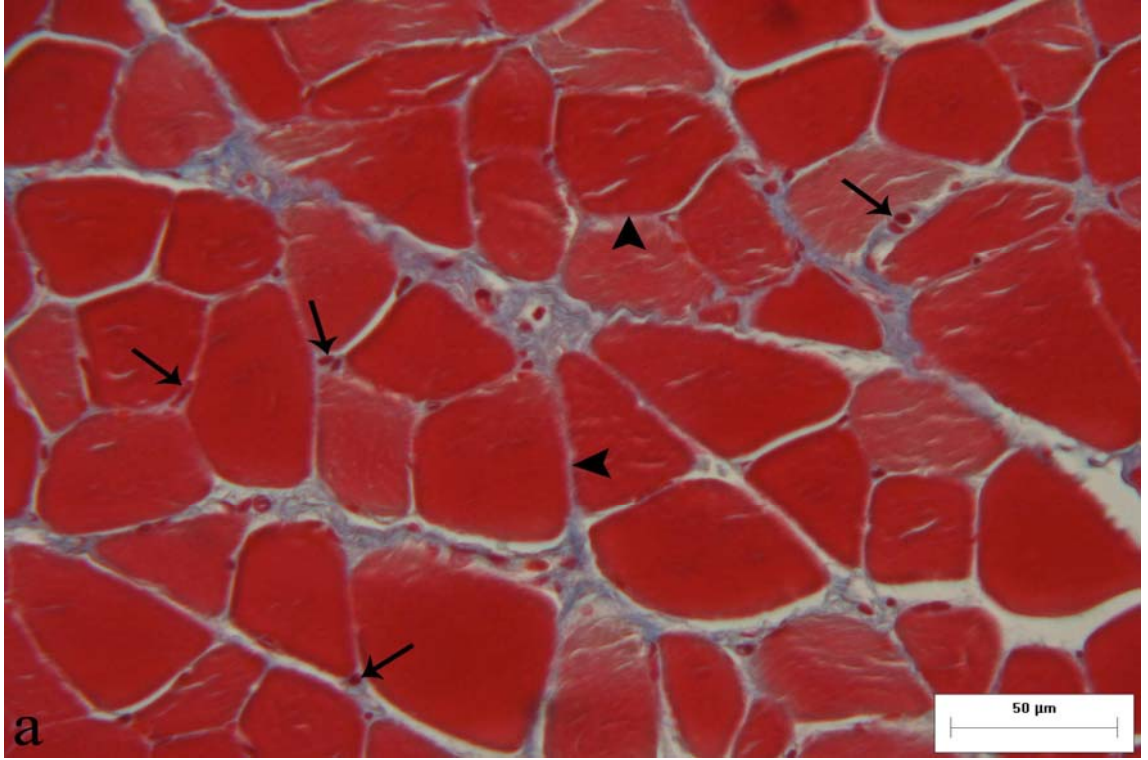
**Şekil 4.2.4 a-b:** Leptin uygulanan hayvanlardan alınan boyuna kas kesitlerinde, endomisyum (▶), periferel konumlu nukleuslar (↑), enine çizgilenmeler (}). H. Azan. a) Bar=50 μm, b) Bar=20 μm.



**Şekil 4.2.5 a-b:** L-NAME uygulanan hayvanlardan alınan enine kas kesitlerinde, endomisyum (▶), perimisyum (↑), periferal konumlu nukleuslar (↑), eritrosit kümelenmeleri (<). H. Azan. a) Bar=50 µm, b) Bar=20 µm.

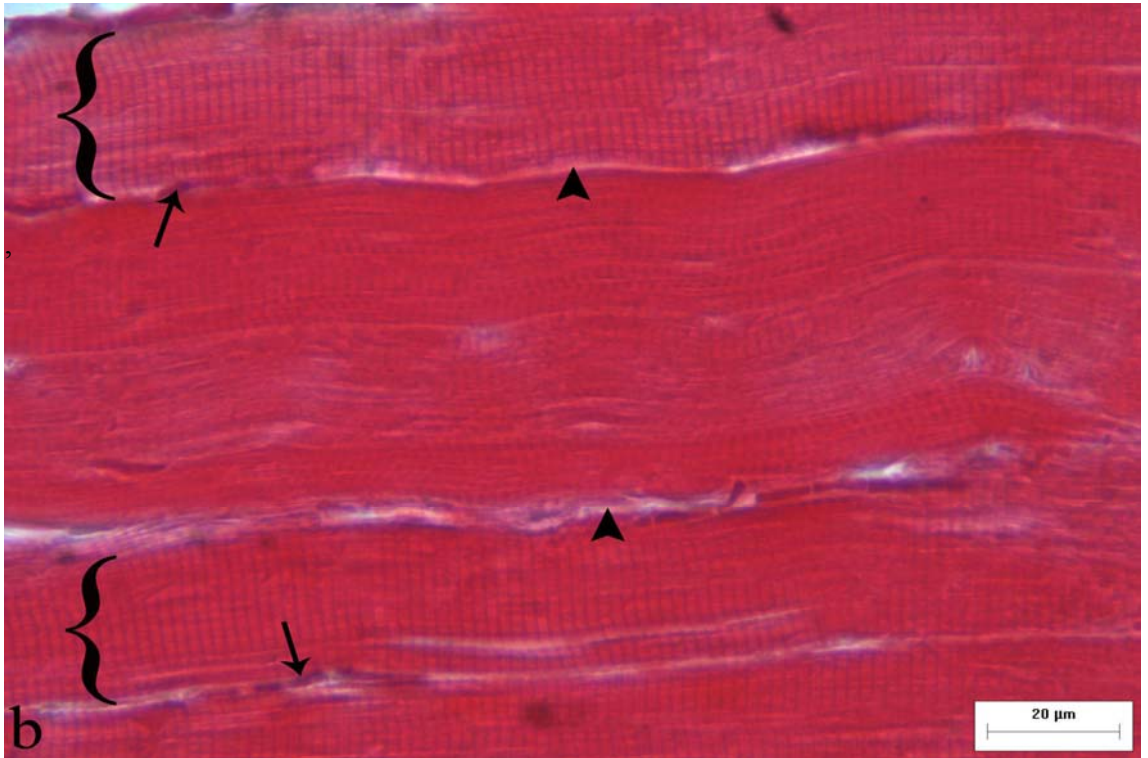
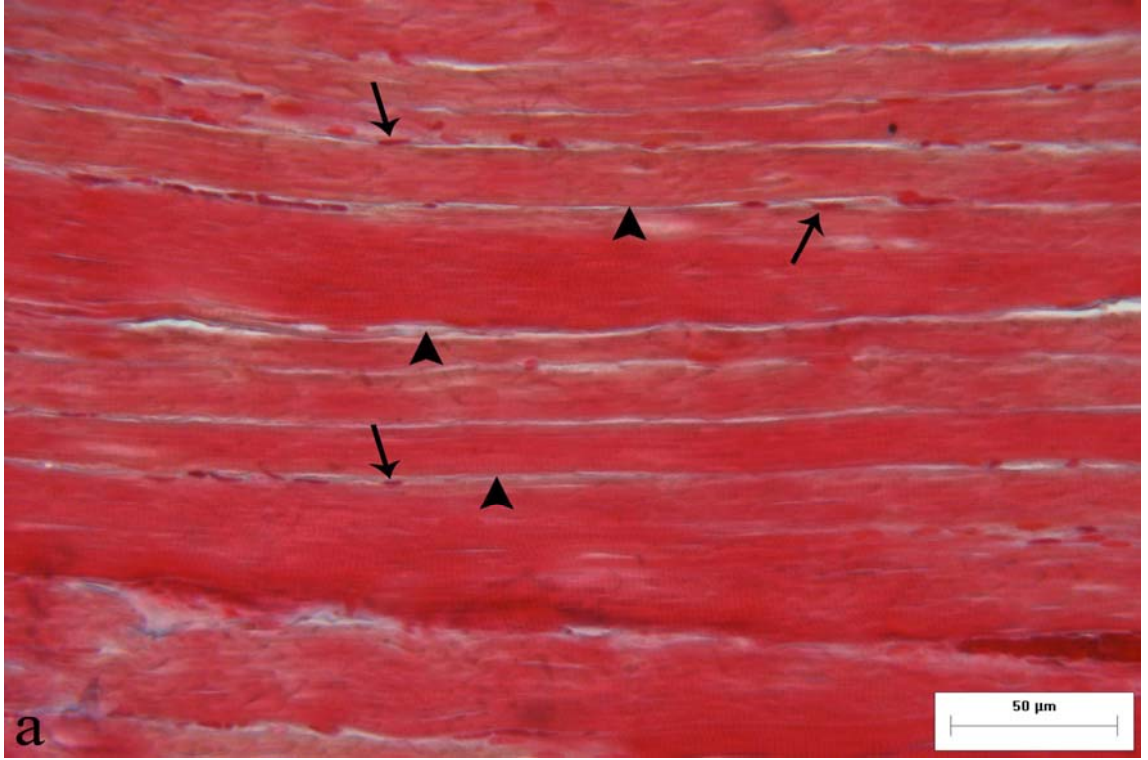


**Şekil 4.2.6 a-b:** L-NAME uygulanan hayvanlardan alınan boyuna kas kesitlerinde, endomisyum (►), periferel konumlu nukleuslar (↑), enine çizgilenmeler (}). H. Azan. a) Bar=50 μm, b) Bar=20 μm.



**Şekil 4.2.7 a-b:** L-NAME+Leptin uygulanan hayvanlardan alınan enine kas kesitlerinde, endomisyum ( $\blacktriangleright$ ), periferel konumlu nukleuslar ( $\blacktriangledown$ ). H. Azan. a) Bar=50  $\mu\text{m}$ , b) Bar=20  $\mu\text{m}$ .





**Şekil 4.2.8 a-b:** L-NAME+Leptin uygulanan hayvanlardan alınan boyuna kas kesitlerinde, endomisyum (▶), periferal konumlu nukleuslar (↑), enine çizgilenmeler (}). H. Azan. a) Bar=50 μm, b) Bar=20 μm.

### 4.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Kontrol ve deney hayvanlarının kas dokularından hazırlanan parafin kesitlerde immünohistokimyasal yöntemle eNOS ve nNOS dağılımları araştırıldı. Bu kesitler incelendiğinde kontrol ve deney grupları arasında farklar olduğu tespit edildi (Tablo 4.3.1).

Hayvanların kas dokusu kesitlerinde negatif kontrollerde hiç reaksiyon gözlenmezken (Şekil 4.3.1), kontrol gruba ait kesitlerde sarkolemmada ve düzensiz bağ dokudan oluşan perimisyumda çok az yoğunlukta eNOS (Şekil 4.3.2) ve nNOS (Şekil 4.3.3) reaksiyonu belirlendi.

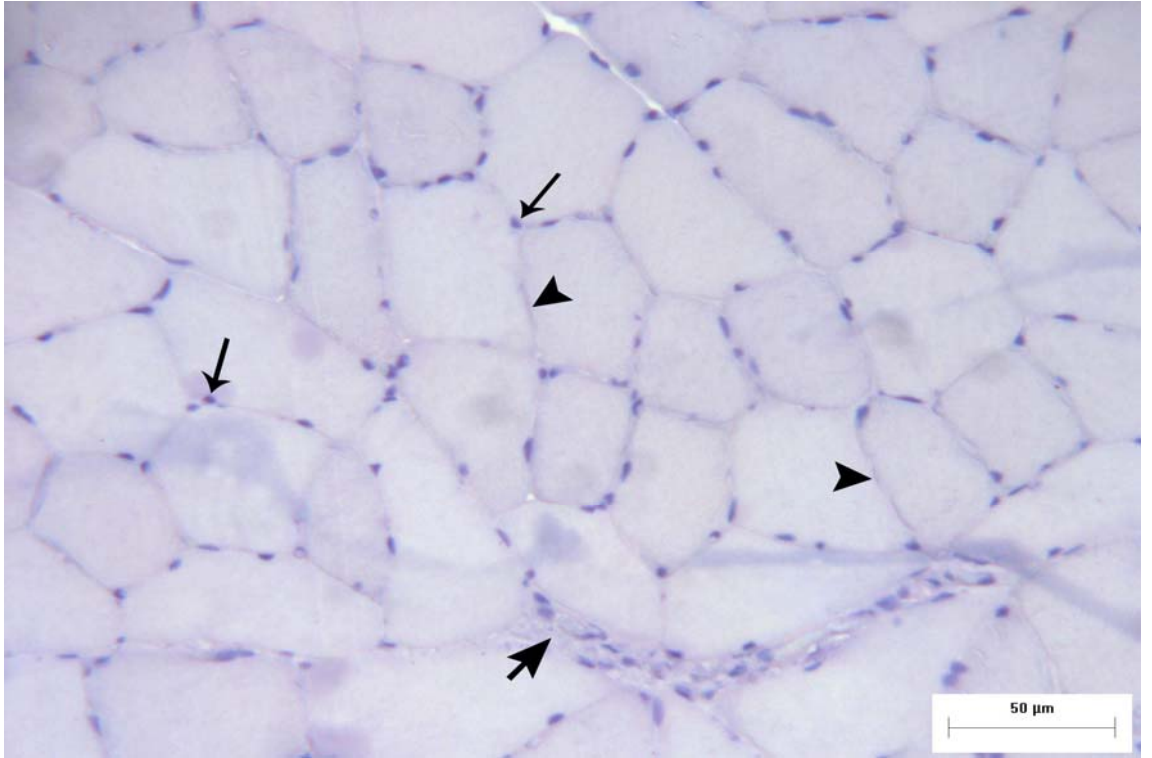
Leptin uygulanan grupta, eNOS reaksiyonu sarkolemmada hafif yoğunlukta, perimisyumda ise çok daha yoğun olarak gözlenmekle birlikte, periferik konumlu nukleusların çevrelerinde reaksiyon daha belirgindi (Şekil 4.3.4). nNOS reaksiyonunun ise, eNOS reaksiyonu ile benzer bölgelerde fakat daha az yoğunlukta olduğu görüldü (Şekil 4.3.5).

L-NAME grubunda her iki reaksiyon da baskılanmakla birlikte; eNOS reaksiyonu, sarkolemmada kontrole göre daha yoğunken (Şekil 4.3.6), nNOS reaksiyonu ise negatif kontrole benzemektedir (Şekil 4.3.7).

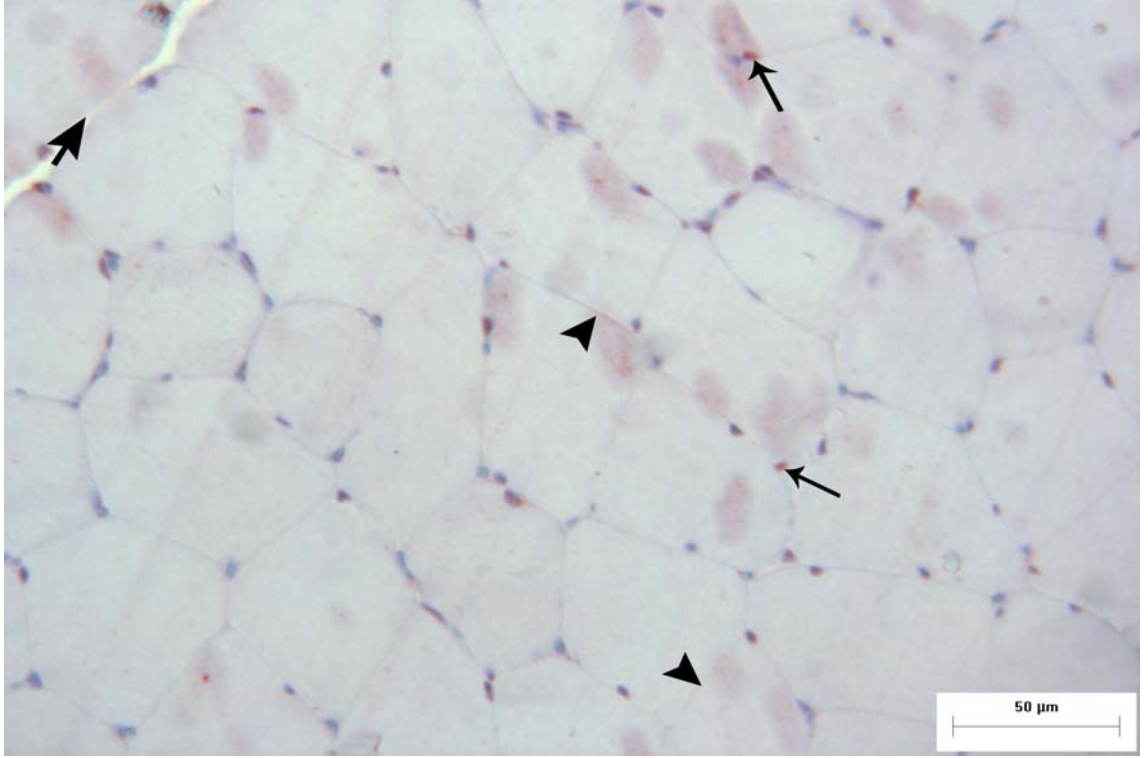
L-NAME'den sonra leptin uygulanan grupta eNOS reaksiyonunun sarkolemmada hafif yoğunlukta, nukleusların çevresinde ise daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3.8). eNOS reaksiyonunun leptin grubuna göre daha az, kontrol ve L-NAME grubuna göre ise daha fazla olduğu görüldü. nNOS reaksiyonu ise kontrole benzemektedir (Şekil 4.3.9).

**Tablo 4.3.1:** eNOS ve nNOS reaksiyonlarının gruplara göre dağılımı

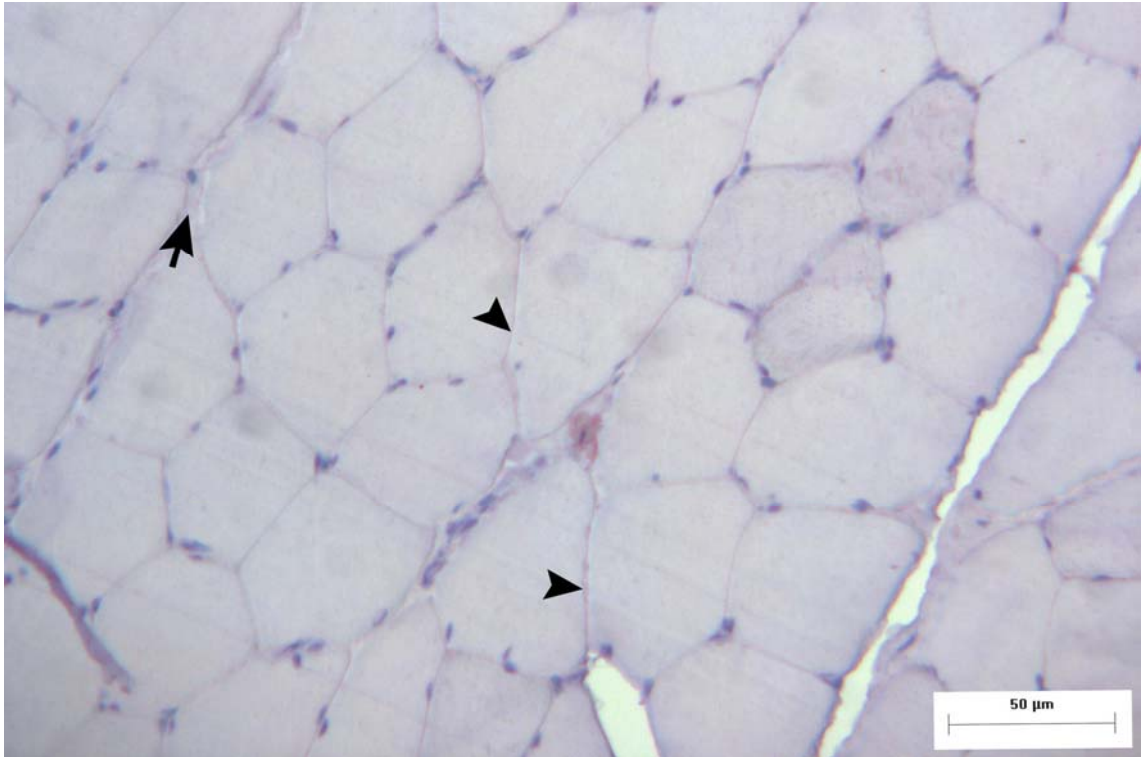
	eNOS	nNOS
<b>KONTROL</b>	+	+
<b>LEPTİN</b>	+++	+++
<b>L-NAME</b>	+	-
<b>L-NAME+LEPTİN</b>	++	+



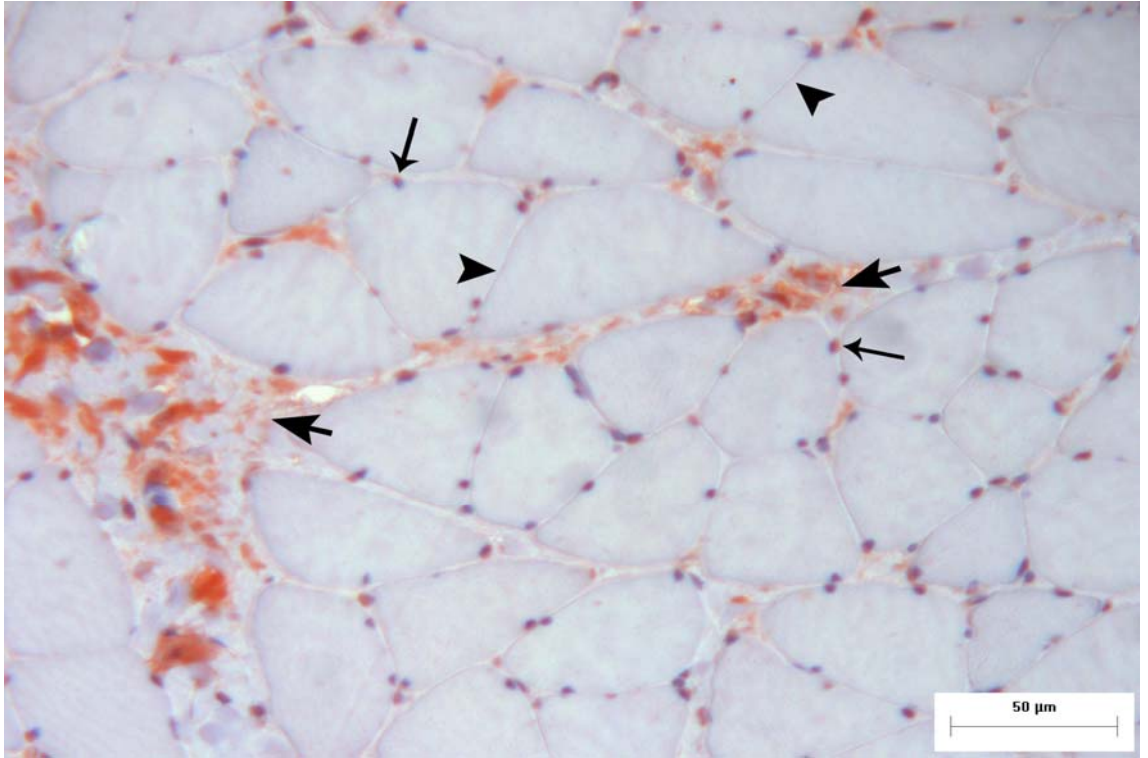
**Şekil 4.3.1:** Negatif kontrol olarak incelenen kesitlerde sarkolemma (➤), periferal konumlu nukleuslar (↑), perimisyum (†) (Bar=50 µm).



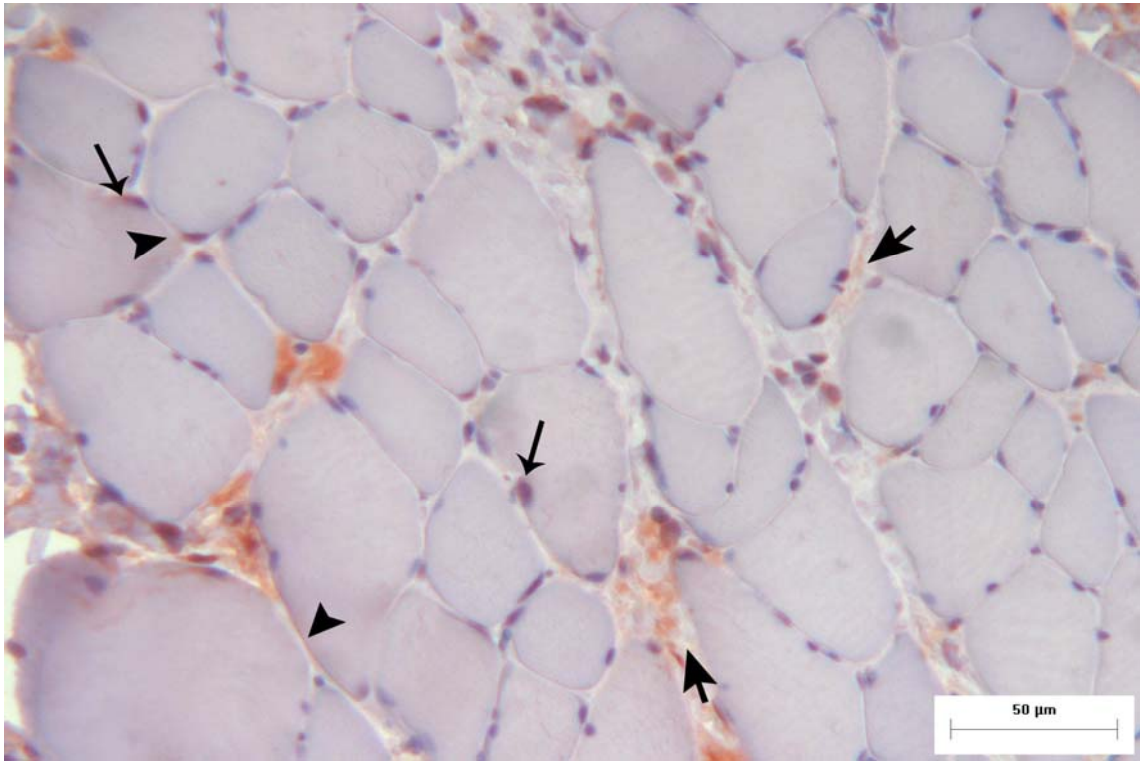
**Şekil 4.3.2:** Kontrol hayvanların kaslarında, sarkolemmada (➤), periferel konumlu nukleusların çevresinde (↑), perimisyumda (↑) eNOS reaksiyonları (Bar=50 μm).



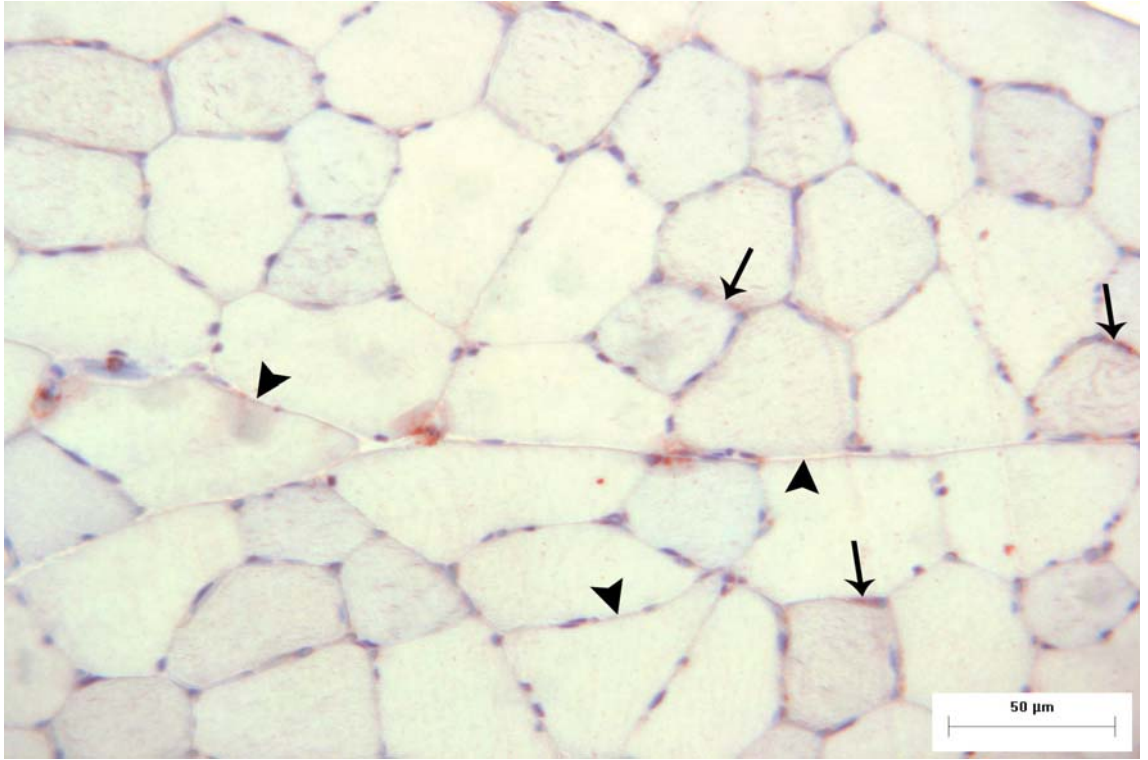
**Şekil 4.3.3:** Kontrol hayvanların kaslarında sarkolemmada (➤), perimisyumda (↑) nNOS reaksiyonu (Bar=50 μm).



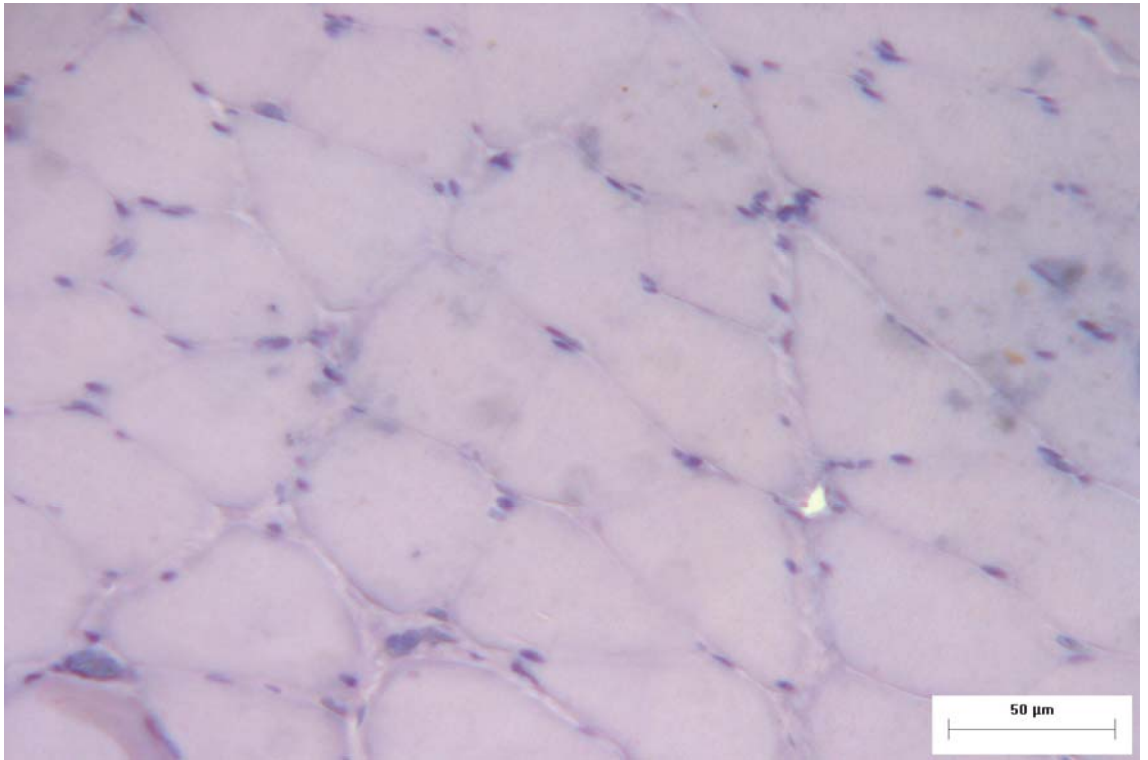
**Şekil 4.3.4:** Leptin uygulanan hayvanların kaslarında sarkolemmada (➤), periferel konumlu nukleusların çevresinde (↑), perimisyumda (↑) eNOS reaksiyonları (Bar=50 µm).



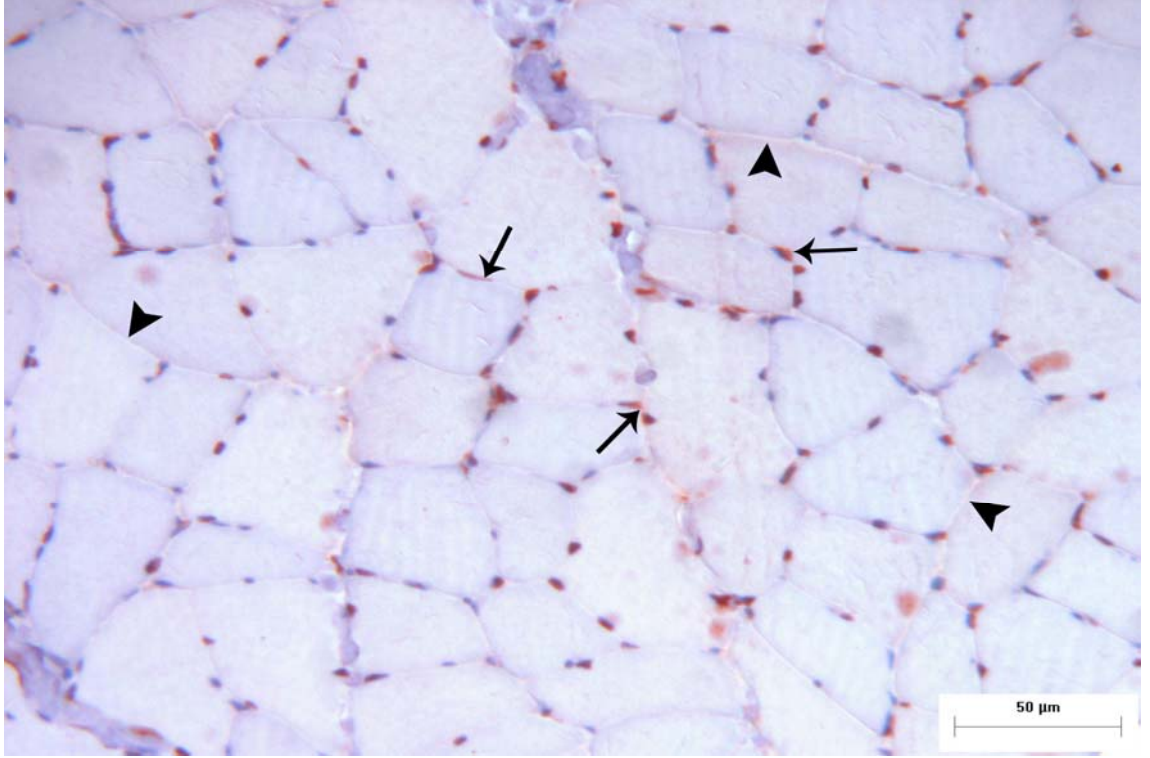
**Şekil 4.3.5:** Leptin uygulanan hayvanların kaslarında, sarkolemmada (➤), periferel konumlu nukleusların çevresinde (↑), perimisyumda (↑) nNOS reaksiyonu (Bar=50 µm).



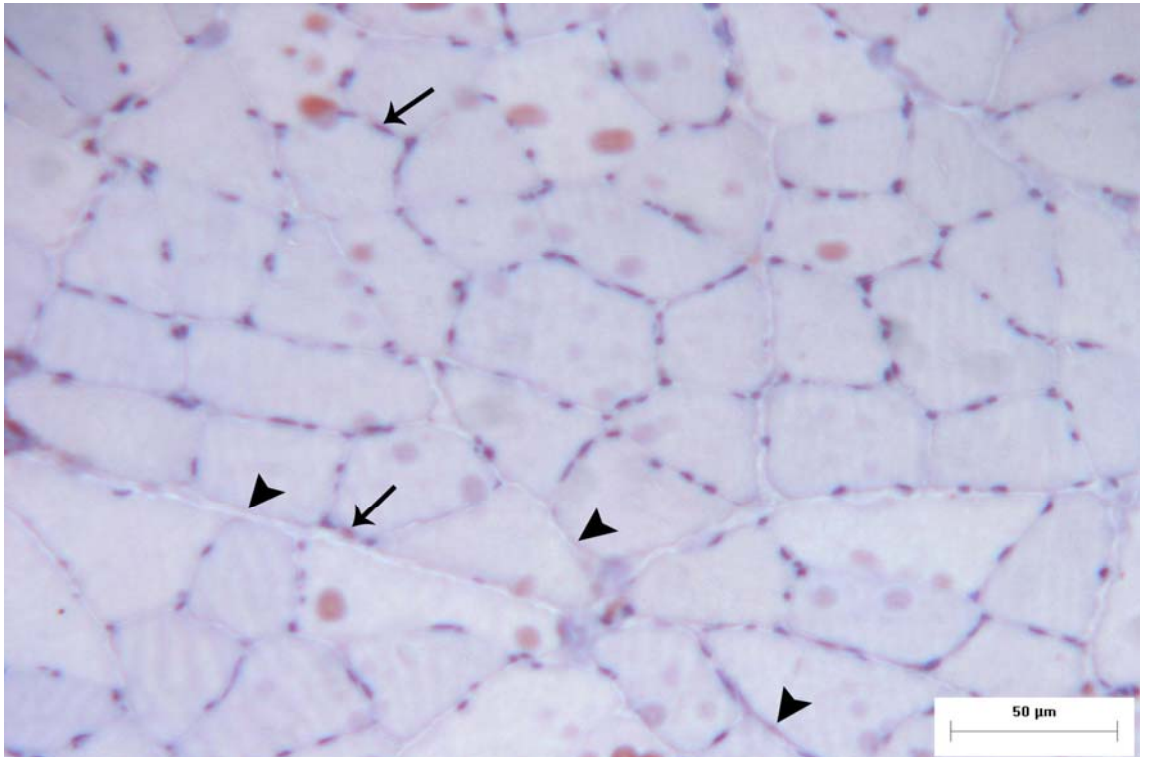
**Şekil 4.3.6:** L-NAME uygulanan hayvanların kaslarında sarkolemmada (➤), periferel konumlu nukleusların çevresinde (↑) eNOS reaksiyonları. (Bar=50 µm).



**Şekil 4.3.7:** L-NAME uygulanan hayvanların kaslarında nNOS reaksiyonunun olmadığı gözlemlendi (Bar: 50 µm).



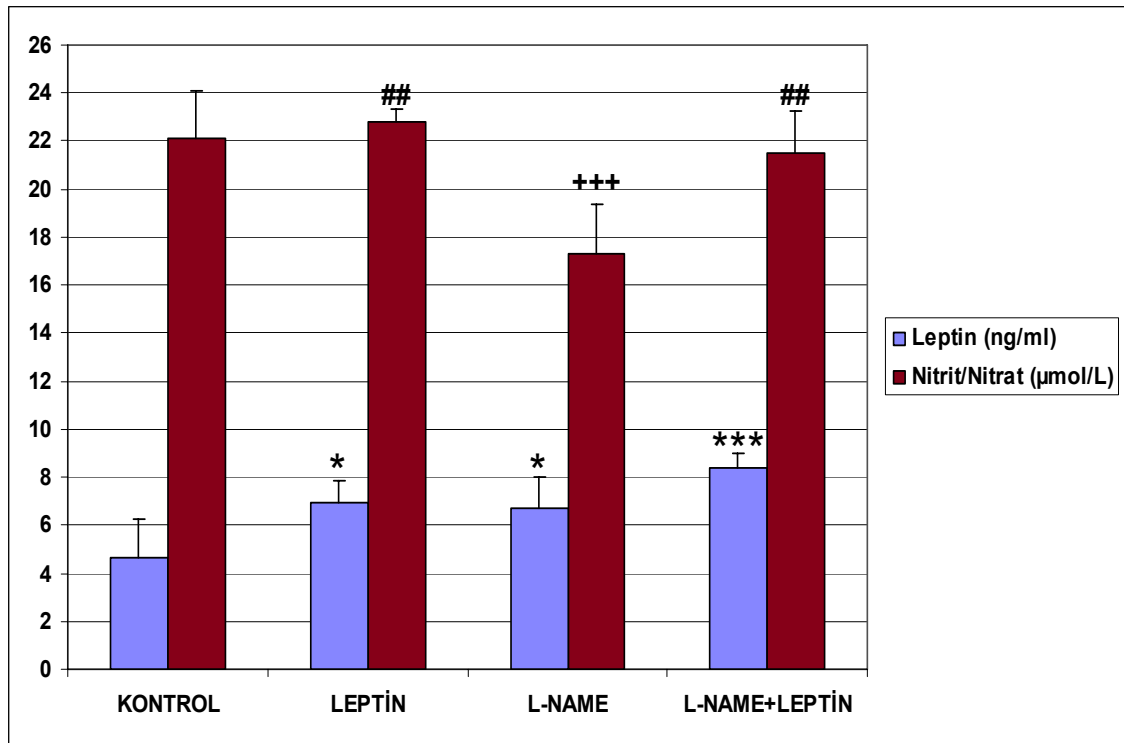
**Şekil 4.3.8:** L-NAME+Leptin uygulanan hayvanların kaslarında sarkolemmada (➤), periferel konumlu nukleusların çevresinde (⤴) eNOS reaksiyonları (Bar=50 µm).



**Şekil 4.3.9:** L-NAME+Leptin uygulanan hayvanların kaslarında sarkolemmada (➤), periferel konumlu nukleusların çevresinde (⤴) nNOS reaksiyonu (Bar=50 µm).

#### 4.4 BİYOKİMYASAL BULGULAR

Deney sonunda hayvanlardan alınan kan örneklerinde, serum leptin ve nitrit/nitrat düzeyleri ölçüldü. Buna göre, Leptin ve L-NAME gruplarında leptin düzeyleri kontrol grubuna oranla artmıştı (\*  $p<0.05$ ), L-NAME+Leptin grubunda ise kontrol grubuna göre daha belirgin bir artış vardı (\*\* $p<0.001$ ). Nitrit/nitrat düzeyleri karşılaştırıldığında, leptin grubundaki artış anlamlı değilken, L-NAME grubunda kontrole göre anlamlı bir azalma mevcuttu (+++  $p<0.001$ ). L-NAME+Leptin grubunda ise nitrit/nitrat düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, leptin grubundan az, L-NAME grubundan daha fazlaydı ve kontrole yakın bir değerdedi. Ayrıca leptin ve L-NAME+Leptin gruplarının nitrit/nitrat düzeyleri, L-NAME grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış olduğu görüldü (##  $p<0.01$ ). (Şekil 4.4.1).



Şekil 4.4.1: Deney gruplarının serum leptin ve nitrit/nitrat düzeyleri (Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterilmiştir).

\*  $p<0.05$ , \*\*\*  $p<0.001$ , Leptin düzeylerinin kontrol grubuna göre karşılaştırılması.  
 +++  $p<0.001$ , Nitrit/nitrat düzeylerinin kontrol grubuna göre karşılaştırılması.  
 ##  $p<0.01$ , Nitrit/nitrat düzeylerinin L-NAME grubuna göre karşılaştırılması.



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Leptin, *Ob* geni tarafından kodlanan, esas olarak yağ dokudan salınan 16 kDa ağırlığında bir hormondur. Leptinin en iyi bilinen fonksiyonu, besin alınımını ve enerji kullanımını düzenlemesidir (Sweeney, 2002; Kokta ve diğ., 2004; Ahima ve Osei, 2004) Bunun yanında, anjiyogenez, kalp-damar sistemi, hematopoiez, lipit ve karbohidrat metabolizması, üreme ve bağışıklık sistemi gibi pek çok periferel metabolik olayda da fonksiyonel olduğu bilinmektedir (Gardiner ve diğ., 2000; Huang ve Li, 2000; Ceddia ve diğ., 2001; Carlyle ve diğ., 2002; Muoio ve Dohm, 2002; Guha ve diğ., 2003; Ahima ve Osei, 2004; Solinas ve diğ., 2004). Son zamanlarda leptinin, vücut sıvılarının akımı ve basıncı üzerine de etkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Dunbar ve diğ., 1997; Gardiner ve diğ., 2000; Mitchell ve diğ., 2001; Sweeney, 2002; Brevetti ve diğ., 2003; Guha ve diğ., 2003).

Leptinin, MSS ve periferel sistemler üzerine etkilerinin anlaşılmasıyla birlikte, leptin ile obezite-hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklar arasında bağlantılar olabileceği düşünülmüştür. Leptin, etkilerini başta MSS olmak üzere birçok periferel dokuda da bulunan reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirir (Castracane ve Henson, 2006). Leptin anlatımının iskelet kasında (Sweeney, 2002), fibroblastlarda (Kokta ve diğ., 2004) yapıldığı, OBR anlatımının ise, damar endotelinde (Winters ve diğ., 2000), kalp kası hücrelerinde (Ren, 2004) yapıldığı gösterilmiştir. Bununla birlikte *ob/ob* farelerde leptinin olmayışı, damarların endotelinde ve damarların kasılıp-gevşeme fonksiyonlarında anormalliklere neden olmaktadır. Bu durumun, leptin uygulanması ile düzeltildiği belirtilmiştir. Bu da leptinin, damar fonksiyonlarında önemli bir role sahip olduğunu düşündürmektedir (Winters ve diğ., 2000). Yine bir başka çalışmada, OBR mutant olan obez *Zucker* sıçanlarda, iskelet kasında mikrovasküler fonksiyonun azaldığı rapor edilmektedir (Xiang ve diğ., 2005). Ayrıca, OBR bulunan kalp kası hücrelerinde leptinin NOS aktivitesini artırdığı bildirilmiştir (Ren, 2004). Leptin anlatımının fibroblastlarda yapılması ve yine OBRlerin damar endotelinde ve kalp kası hücrelerinde bulunması, leptinin kardiyovasküler etkilerinin olduğunu ve bu etkiyi de NO aracılığıyla

gerçekleştirdiğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, leptinin kardiyovasküler etkileri ile ilgili yapılan son çalışmalar, leptinin yağ kitlesi ve kardiyovasküler hastalıklar arasındaki bağlantının açıklanmasına yardımcı olabileceğini göstermektedir (Castracane ve Henson, 2006). Obezite ve kardiyovasküler bozukluklar arasındaki sıkı ilişki oldukça iyi bilinmektedir, ancak bu ilişkinin mekanizması açık değildir. Bu durum, sempatik aktivasyon ve renal sodyum geri emilimini içeren çeşitli mekanizmalarla ilişkilendirilmektedir. Leptinin kalp-damar sistemi üzerine olan etkileri hem artırıcı hem de baskılayıcı yönde olabilir. Leptinin sempatik aktiviteyi ve adrenerjik cevabın artması, artırıcı etkiler arasında yer alırken; böbreklerden sodyum atılımı, endotelial NO artışı ve anjiyogenez ise baskılayıcı etkiler arasında değerlendirilmektedir (Castracane ve Henson, 2006).

Kronik olarak periferik veya merkezi leptin uygulanması sempatik sinir sistemini uyarır ve kan basıncını artırır. Akut olarak uygulandığında ise, sadece kan basıncının artışına neden olur, bu da leptinin MSS dışında başka baskılayıcı mekanizmaları da indükleyerek sempatik uyarıyı dengelediğini düşündürür (Beltowski ve diğ., 2004).

NO, endotel hücrelerinden salınan damar tonusunu ayarlayan parakrin bir düzenleyicidir. Endotel hücrelerinde OBRnin varlığı gösterilmesine rağmen, bunun NO üretimiyle olan ilişkisi tartışmalıdır. *In vitro* çalışmalarda, leptinin endotelden NO üretimini uyardığı ve NO aracılı damar gevşemesine neden olduğu bildirilmiştir (Winters ve diğ., 2000). Bununla beraber *in vivo* çalışmalardaki sonuçlar bu kadar kesin değildir. Bazı araştırmacılar, leptinin uyardığı damar gevşemesinde NO'nin varlığını rapor ederken (Fruhbeck, 1999), bazı araştırmacılar ise, aksi yönde bulgular elde etmişlerdir (Lembo ve diğ., 2000, Mitchell ve diğ., 2001). Buna ek olarak leptin, NO'ten bağımsız damar gevşemesini uyarabilir (Lembo ve diğ., 2000). Sadece birkaç çalışma, leptinin *in vivo*da NO üretimini uyardığını göstermektedir. Fruhbeck ve Gomez-Ambrossi (2001) ile Mastronardi ve diğ. (2002), leptin uygulanmasından sonra NO metabolitleri olan nitrit/nitrat'ın plazma yoğunluklarında artış gözlemişlerdir. Ancak NO'nin kaynağı tam olarak belirlenememiştir. Leptin, endotel hücreleri dışında adipositler, makrofajlar ve MSS gibi diğer dokularda da NO sentezini uyarabilir. Buna ek olarak, plazma nitrit/nitrat seviyesi, NO üretimi dışında, besinlerdeki ve böbrek salgısındaki nitrat düzeylerinden de etkilenir. Leptinin bir defa uygulanmasının, plazma ve idrardaki

nitrit/nitrat ve NO'in ikincil habercisi olan cGMP düzeyini artırdığı gösterilmiştir (Beltowski ve diğ., 2004). Bizim çalışmamızda da, leptin uygulanmasından sonra serum nitrit/nitrat düzeylerinin kontrol hayvanlara oranla artışı görüldü, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Son yıllarda, leptinin NO üretimini ve NOS anlatımını ve bunun etkilerini göstermeye çalışan araştırmalar artmıştır. Farklı çalışmalar, leptinin NO üretimini artırdığını desteklemektedir. *Wistar albino* sıçanlara iv leptin uygulanmasının, serum NO düzeyini %90 oranında artırdığı gösterilmiştir. OBR'den yoksun *fa/fa* sıçanlarda ise bu durum gözlenmemiştir (Fruhbeck, 1999). Daha sonra ise endotelial hücrelerin leptin ile preinkübasyonunda nitrit/nitrat konsantrasyonuna bakılarak, NO'in arttığı, 4,5 diaminoflorescein-2 diasetat boyama tekniği ile gösterilmiştir (Winters ve diğ., 2000). Ayrıca leptinin endotel hücrelerinden NO salınmasına neden olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (Kimura ve diğ., 2000). Epinefrin ile kasılması sağlanmış arteriyal halkaların leptin uygulanması ile gevşediği ancak, endotelin çıkarılması ve L-NAME ve/veya L-arginin kullanılarak NOS' in bloke edilmesinden sonra leptin etkili olmamıştır (Kimura ve diğ., 2000). L-NAME kullanılan çalışmalarda, L-NAME, hiperleptineminin neden olduğu taşikardiyi amplifiye eder ve leptinin kronik renal hemodinamik etkisini artırır. Bu da, leptin ve NO arasındaki ilişkiyi ortaya koyar (Kuo ve diğ., 2001). L-NAME kullanılarak yapılan farklı birçok çalışmada leptinin ventrikül hücrelerinde NO üretimini artırdığı ve bunun da kardiyak kontraksiyonu düzenlediği ileri sürülmüştür (Sweeney, 2002). Böylelikle, leptinin NO üretimini pozitif olarak etkilediğini ileri süren pek çok çalışma vardır. Leptinin periferel dokularda sempatik sinir aktivitesini ve kan basıncını artırması önemli bir fizyolojik sonuç olabilir (Dunbar ve diğ., 1997). Bunların yanı sıra, leptinin NO üretimini artırarak sempatik olarak uyarılan damar kasılmasını önlediğini savunan çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmalarda leptin uygulanması, renal ve bacak kan akımında bir değişiklik gerçekleştirilmemiştir, sempatik uyarı ile indüklenmiştir (Sweeney, 2002).

Sıçanlarda leptin uygulanması ile dozdan bağımsız olarak, serum NO yoğunluğu artmış, NO sentezinin inhibe edildiği durumda ise, leptin infüzyonu arteriyal basıncı artırmıştır (Fruhbeck, 1999). Buna karşın sempatik aktivitenin, gangliyonik inhibitörler veya kimyasallarla baskılanmasının ardından, leptin uygulanması arteriyal basıncı azaltmıştır

(Lembo ve diğ., 2000). Ayrıca leptinin *in vitro* çalışmalarda, aort halkalarında endotele bağımlı bir gevşeme sağladığı gösterilmiştir (Lembo ve diğ., 2000; Kimura ve diğ., 2000). Winters ve diğerleri (2000), leptin geninden yoksun (*ob/ob*) farelerde aort aktivitesini incelemişlerdir. Asetilkolin uygulanması ile oluşan damar gevşemesi, norepinefrin ve fenilnefrin gibi agonistlerin uygulanması ile bozulurken, damar kasılmasında da belirgin bir artış göstermiştir. Leptin uygulanması ise bu etkiyi düzeltmiştir. Leptinin damar gevşetici etkilerini, leptinin nörojenik baskılayıcı etkilerine zıt olarak gerçekleştirdiği tartışılmaktadır (Rahmouni ve diğ., 2005).

Beyin ventrikül içi (intraserebroventriküler; icv) yüksek doz leptin uygulanmasının, arteriyel basıncı ve kalp vurumunu, merkezi nöral mekanizmalarla artırdığı rapor edilmiştir (Correia ve diğ., 2001). Kronik yüksek doz iv veya intrakarotid leptin uygulanmasının, uyanık sıçanlarda arteriyel basıncı ve kalp vurumunu artırdığı (Correia ve diğ., 2001) ve benzer şekilde kronik olarak düşük doz leptin uygulanmasının da ortalama arteriyel basınçta ve kalp vurumunda artışa neden olduğu bildirilmiştir (Villareal, 1998). Dunbar ve diğ. (1997) ile Casto ve diğ (1998), lateral ventriküle yüksek doz leptin uygulanmasının hem anestezi altındaki hem de uyanık hayvanlardaki arteriyel basıncı artırdığını rapor etmişlerdir. Benzer bulgular insanlarda da rapor gözlenmiştir (Correia ve diğ., 2001). Başka bir çalışmada Beltowski ve diğ. (2004), FTS ve leptin uygulanan sıçanlarda, uygulamadan önce gruplar arasında sistemik ve renal hemodinamik parametreler arasında hiçbir fark olmadığını, leptin ya da FTS uygulanmasının da deney süresi sonunda arteriyel basınçta, kalp vurumunda, renal kan akımında ve renal kortikal kan akımında anlamlı bir değişiklik oluşturmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada, leptinin sistemik kan basıncı ve arteriyel kan akımına etkisinin olmadığı ileri sürülmüştür.

Fruhbeck (1999), tek doz iv FTS ve 10, 100, 1000 µg/kg'lık dozlarda leptin uygulanmasından 90 dakika sonra, kan basıncında bir değişiklik olmadığını, kalp vurumunda bir artış olduğunu, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını rapor etmiştir. Bizim çalışmamızda, tek doz iv 50 µg/kg leptin uygulanmasından sonra, sistolik ve diyastolik basınçta yalnız bu grubun T0 değerine göre anlamlı bir azalma ( $p < 0.01$ ) olduğu görüldü. Buna paralel olarak ortalama arteriyel basınçta da yine benzer şekilde leptin uygulanmasından sonra alınan T2 değerinin T0 değerine göre anlamlı

olarak azaldığı ( $p<0.01$ ) saptandı. Kalp vurumunda ise, bir artış olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi.

Fruhbeck (1999) yine aynı çalışmada, L-NAME (30 mg/kg) ile NOS inhibisyonu gerçekleştirildiğinde ilk 10 dakikadan sonra ortalama arteriyal basınçta yükselişin olduğunu ve kalp vurumunun ise kontrol değerlere göre azaldığını bildirmiştir. Bu hayvanlara leptin (100 µg/kg) uygulandığında, ortalama kan basıncının ve kalp vurumunun anlamlı olarak arttığını gözlemlemiştir. Biz de çalışmamızda, NOS'u inhibe etmek amacıyla 10 mg/kg L-NAME kullandığımızda, bu grupta L-NAME uygulanmasından sonra ortalama arteriyal basıncın T1 ( $p<0.001$ ) ve T2 ( $p<0.01$ ) anındaki değerlerinin T0'a ve aynı zaman aralıklarındaki kontrol değerlerine göre anlamlı olarak yükseldiğini ( $p<0.001$ ), kalp vurumunun ise T1 anındaki değerlerinin T0'a ( $p<0.05$ ) ve aynı zaman aralığındaki kontrol değerlerine ( $p<0.01$ ) göre anlamlı bir şekilde azaldığını saptadık. T2 anında ise, kalp vurumu kontrole yaklaşmıştı, ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildi. L-NAME'nin yarılanma süresine bağlı olarak hemodinamik parametreler değişkenlik göstermiş olabilir. L-NAME'den sonra leptin uyguladığımız grupta ise, ortalama arteriyal basınç değerleri kontrole göre ve kendi kontrolüne göre anlamlı olarak yüksekti ve kalp vurumu da L-NAME'den sonra anlamlı olarak azalırken, leptin uygulanmasından sonra kontrole yaklaşmıştı, ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi. Beltowski ve diğ. (2006) yaptıkları çalışmada, L-NAME uygulanmasıyla meydana gelen kan basıncındaki artışın leptin verilmesiyle önlendiğini ve leptinin bu etkisinin, EDHF (endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör) inhibitörleri kullanıldığında baskılandığını ileri sürmüşlerdir. Ayrıca leptin, L-NAME ve EDHF inhibitörleri kullanılan gruplarda kan basıncının, sadece L-NAME uygulanan gruplara nazaran daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Leptinin bu hipertansif etkisine, sempatik sinir sisteminin uyarılmasının aracılık etmiş olabileceği bildirilirken, EDHF inhibitörlerinin ve leptinin, L-NAME olmaksızın birlikte uygulanmasının, kan basıncı üzerine bir etkisinin olmadığı rapor edilmiştir. Leptinin, NOS inhibe edilmeyen bireylerde EDHF üzerine az etki ettiği gösterilirken, NOS inhibe edilen bireylerde ise EDHF'yi uyardığı ileri sürülmüştür. Bizim çalışmamızda da, L-NAME uygulanmasından sonra sistolik ve diyastolik kan basınçlarındaki artışa paralel olarak, ortalama arteriyal kan basıncının arttığı gözlemlendi. Kan basınçlarındaki bu artışlar T1 anından sonra düşme eğilimi göstermekle birlikte, T2 anında da anlamlı olarak yüksekti.

L-NAME'den sonra leptin uygulanan hayvanlarda ise, kan basınçlarındaki değişiklikler L-NAME grubuna benzerdi, ancak T1 anından sonra görülen düşme eğilimi, L-NAME grubuna kıyasla daha azdı. Leptin L-NAME'nin hipertansif etkisinde anlamlı bir değişiklik oluşturmamasına karşın, kan basıncının düşme eğilimini azaltmış ve hipertansif etki süresini uzatmıştır. L-NAME, kalp vurumunda (nabız) ise anlamlı bir düşüş gerçekleştirmiştir. Bu düşüş, T1 anından itibaren gerileyerek kontrol değerlere yaklaşmıştır. L-NAME'den sonra leptin uygulanması, L-NAME'nin etkisini kan basıncında olduğu gibi anlamlı bir şekilde değiştirmedir. Leptin tek başına uygulandığında sistolik, diyastolik ve ortalama arteriyel kan basınçlarında, kalp vurumunda kontrole oranla anlamlı bir değişiklik oluşturmaz. Bizim bulgularımız da, Beltowski ve diğ. (2006) tarafından yapılan çalışma ile uyumludur. Birçok çalışmadaki kanıtlar NO ve EDHF'nin, leptin uygulanmasından sonra birbirlerini tamamlayan mekanizmalar olduğunu ileri sürmektedir. Bu bulguların ışığında leptinin, NOS' ın inhibe edildiği bireylerde EDHF'yi uyararak kardiyovasküler etkilerini gerçekleştirdiğini düşündürmektedir.

Kan basıncının kontrolünde rol alan, damar kasılmasına neden olan en önemli faktörlerden biri sempatik sinir aktivitesidir. Leptin uygulanmasının renal, adrenal ve lomber sempatik sinir aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (Dumbar ve diğ., 1997). Bununla birlikte bu sempatik uyarılma, her zaman arteriyel basınçta bir artışa neden olmamaktadır. Leptinin iv olarak 1000 µg/kg uygulanmasından 90 dakika sonra, serum nitrit/nitrat düzeylerinin %89.5±12.5 oranında artışı gösterilmiştir. Benzer şekilde, düşük dozlarda leptin uygulandığında da serum nitrit/nitrat düzeylerinin anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir (Fruhbeck, 1999). Leptinin bu etkisini gerçekleştirebilmesi için, fonksiyonel olarak aktif OBRine gereksinim vardır. Çünkü, OBR bulunmayan mutant, obez Zucker sıçanlara leptin uygulanması, nitrit/nitrat düzeylerinde herhangi bir artışa neden olmamaktadır. L-NAME uygulanmış sıçanlarda leptin, ortalama arteriyel basıncı artırırken, gangliyonik blokaj oluşturulanlarda azaltmıştır (Fruhbeck, G., 1999). Bu da göstermektedir ki, leptin hem sempatik sinir aktivitesini hem de NO üretimini etkileyerek, kan basıncı dengesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

Leptin aracılı NO artışı, leptin aracılı sempatik aktivasyona cevap olarak hemodinamik dengelerin düzenlenmesinde kritik rol oynayabilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda

leptinin, izole aort halkalarında endotelial NO üretimini artırdığı gösterilmektedir. Bu etki, endoteli ayrılan ve L-NAME uygulanan aort halkalarında görülmemektedir (Fruhbeck, 1999). OBR geni mutasyona uğramış olan Zucker sıçanlara leptin uygulandığında, ne sistolik ne de diyastolik kan basıncı artmamaktadır (Fruhbeck 1999). Haynes ve diğ. (1997), obez Zucker sıçanlara leptin uyguladığında kan basıncında değişiklik olmadığını saptamıştır. Bu bulgular, leptinin kısa dönemde kardiyovasküler düzenlemede fizyolojik bir role sahip olabileceği görüşünü desteklemektedir.

Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada, leptinin doğrudan damarlara etkili olduğu ve bunun da arteriyal basıncı düşürme yönünde olduğu ileri sürülmektedir. İşlevsel olarak etkin OBRlerin varlığı, endotelial hücrelerde gösterilmiştir. Endotelde OBRlerin varlığı, damar tonusunun düzenlenmesinde leptinin de önemli bir rolü olduğu görüşünü desteklemektedir. Leptin ayrıca, endotel bağımlı damar oluşumunu uyarıcı bir etkiye sahiptir (Lembo ve diğ., 2000). Leptinin endotelial hücrelerden NO salınımını artırdığı da gösterilmiştir (Fruhbeck, G., 1999; Winters ve diğ., 2000; Rahmouni ve diğ., 2005). Bu da endotelin, leptin etkisinin görüldüğü hedef bir yapı olduğunu desteklemektedir. Aynı zamanda damar endotelinin, kan basıncının düzenlenmesinde önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir (Fruhbeck, 1999).

Sempatik sinir aktivitesi 6-hidroksidopamin uygulanarak engellenen sıçanlarda leptin uygulanması, akut bir hipotansif etki oluşturmaktadır (maksimum leptin dozunda, ortalama arteriyal basınç  $92 \pm 4$ 'den  $78 \pm 2$  mmHg' ya inmektedir,  $p < 0.001$ ) (Lembo ve diğ., 2000). Bu hemodinamik etki, leptinin damar tonusu üzerine olan direkt etkisinden kaynaklanmaktadır. Leptin, aynı zamanda aortik ve mezenterik halkalarda doza bağlı olmayan bir gevşemeye neden olur. Bu gevşeme endotelin izole edilmesi ile engellenir. Ayrıca NO'nin inhibisyonu ile aortik halkalardaki gevşeme azalmaktadır. Benzer şekilde EDHF'nin inhibisyonu da, mezenterik arterde aynı etkiyi göstermektedir (Lembo ve diğ., 2000). L-NAME ile NOS inhibe edildiğinde, leptinin kan basıncında değişikliğe neden olmadığı ileri sürülmektedir ve bu nedenle leptinin hipotansif etkisini EDHF'yi kullanarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Lembo ve diğ., 2000). Ayrıca leptin endotel aracılı gevşemeyi uyarmanın yanı sıra, kalp vurumunu ve bölgesel sempatik sinir aktivitesini de artırmaktadır (Lembo ve diğ., 2000). Daha sonra yapılan

çalışmalarla leptinin, sempatik aktiviteyi uyararak kan basıncının artmasını sağlarken, endotelial NO ve EDHF aracılığıyla da hipotansif etki göstererek kan basıncı dengesinin düzenlenmesinde rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Beltowski ve diğ., 2004, 2006). Bu da göstermektedir ki; NO leptinin etkisini ortaya koymasında potansiyel bir araçtır, ancak tek aracı değildir (Sweeney, 2002).

Beltowski ve diğ. (2004) tarafından yapılan çalışmada, tek doz iv FTS ve leptin (1000 µg/kg 0.5 ml) uygulanmıştır. Leptin infüzyonundan sonra 15, 45, 75 ve 105. dakikalarda plazma nitrit/nitrat seviyelerinin sırasıyla %27.7, %178.1, %156.4 ve %58.7 olduğu, ancak 105. dakikadan sonra plazma nitrit/nitrat seviyesinin kontrol değere yaklaştığı bildirilmiştir. FTS uygulanan grupta ise, nitrit/nitrat düzeylerinin 15. dakikada leptin grubuna benzer şekilde % 34.2 oranında arttığı gösterilirken, bu zaman aralığından sonra normal değerlere indiği ve anlamlı bir değişiklik olmadığı saptanmıştır. Ayrıca, leptin uygulanmasından sonra idrarda nitrit/nitrat seviyelerinin, 0-30. dakikalar arasında %241.6, 31-60. dakikalar arasında %552.6, 61-90. dakikalar arasında %430.7, 91-120. dakikalar arasında %88,9 oranında arttığı görülmüştür. Çalışmamızda, deney sonunda hayvanlardan aldığımız kan örneklerinde serum nitrit/nitrat düzeylerine bakıldığında, kontrol hayvanlara kıyasla yalnız L-NAME verilen grupta anlamlı olarak azaldığı saptandı ( $p < 0.001$ ). Leptin uygulanan grupta beklenen artışın gözlenememesi, kan örneklerinin alındığı süreye (90. dakikadan sonra) ve uygulanan leptin dozuna bağlı olabilir. Beltowski ve diğ. (2004) tarafından yapılan çalışmada, leptin (1000 µg/kg) uygulanmasından sonra en yüksek nitrit/nitrat düzeyleri sırasıyla 45. ve 75. dakikalarda elde edilmiştir. 105. dakikada ise bu oran yaklaşık üçte birine düşmektedir. Ayrıca normal koşullarda FTS uygulanması ile de serum nitrit/nitrat düzeylerinin artması, kontrol değerlerin yüksek olmasına neden olmuş olabilir. Beltowski ve diğ. (2006) tarafından yapılan çalışmada ip olarak leptin uygulanan grupta 2 saat sonunda üriner ve plazma nitrit/nitrat düzeylerinin arttığı, L-NAME'den sonra leptin uygulanan grupta ise, leptinin uyarıcı etkisinin baskılandığı vurgulanmaktadır (Beltowski ve diğ., 2006). L-NAME uyguladığımız hayvanların serum nitrit/nitrat düzeylerinde bu inhibitöre bağlı olarak kontrole göre anlamlı bir azalma, leptin ve L-NAME+Leptin uygulanan gruplarda nitrit/nitrat düzeyinde artış gözlenmiştir, ancak bu artış yalnızca L-NAME grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.01$ ). Bu veriler kısmen yukarıdaki bilgilerle desteklenmektedir.



Beltowski ve diğ. (2004) çalışmalarında, FTS ve leptin uygulanan gruplarda plazma leptin yoğunluklarını (tek doz, iv, 1000 µg/kg 0.5 ml) aynı zaman aralıklarında ölçerek karşılaştırmışlardır. En yüksek plazma leptin düzeyi, leptin uygulanan grupta 15. dakikada elde edilmiş, bu dakikadan sonra değerler kontrole yaklaşıma eğilimi gösterecek şekilde azalmaya başlamıştır ve 195. dakikada kontrol değere ulaşmıştır. 15., 45. ve 75. dakikalarda kontrole göre  $p<0.001$ ; 105. dakikada  $p<0.01$  olacak şekilde kontrolden yüksektir. Bizim örneklerimiz de 90. dakikadan sonra alınmıştır ve bu veriye paralel olarak leptin ve L-NAME gruplarındaki hayvanların serum leptin düzeyleri anlamlı olarak yüksektir ( $p<0.05$ ). Bununla birlikte, L-NAME+Leptin uygulanan grupta ise serum leptin düzeylerindeki artış diğer gruplara nazaran daha anlamlıdır ( $p<0.001$ ).

Beltowski ve diğ. (2006) tarafından yapılan çalışmada, NOS ve EDHF inhibitörleri kullanılarak leptinin hemodinamik etkilerinin NO ve EDHF ile olan ilişkisi araştırılmıştır. Bu amaçla 1000 µg/kg leptin ip olarak normal ve obez sıçanlara uygulanmış ve sistolik basınçtaki değişiklikler incelenmiştir. Leptin uygulanması sonucunda NO ürünlerinin arttığı, leptin veya EDHF inhibitörleri uygulanan gruplarda kan basıncının değişmediği gözlenmiştir. L-NAME uygulanmasının kan basıncını artırdığı ve L-NAME' den sonra leptin uygulanan gruplarda kan basıncının kontrole benzer olduğu rapor edilmiştir. Ekzojen leptin uygulanmasından iki saat sonra artış olduğu gözlenmiş, ancak grupların leptin değerlerinin birbirine yakın olduğu ileri sürülmüştür. Yalnız L-NAME uygulanan grupta, plazma leptin düzeyinde değişiklik saptanmadığı belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda bunun aksine L-NAME ve L-NAME+Leptin grubunda serum leptin düzeylerinin kontrole göre anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu farklılık, bizim kullandığımız dozun, Beltowski ve diğ. (2006) tarafından yapılan çalışmada kullanılan dozdan ve uygulanma şeklinden farklı olmasına bağlı olabilir. Ayrıca, leptin oldukça hidrofobik bir peptid olduğu için doku lipitlerine ve proteinlerine bağlanabilme özelliğine sahiptir. Yağ doku gibi dokularda lokal konsantrasyonu, plazmadan daha fazladır (Beltowski ve diğ., 2004). İv olarak tek doz L-NAME ve L-NAME+Leptin uygulamalarından sonra, serum leptin düzeylerinin ölçülmesi ilk defa bizim çalışmamızda yapılmıştır ve NO sentezinin inhibe edilmesinin leptin artışına neden olduğu görülmüştür. L-NAME+Leptin grubunda ise, diğerlerine nazaran leptin düzeyinin yüksek olması da beklenen bir durumdur.

Dunbar ve diğ. (1997), icv leptin uygulanmasının, ortalama arteriyal basınç, kalp vurumu, vasküler kan akımları üzerine ve renal sempatik sinir aktivitesine etkilerini çalışmışlardır. Leptin uygulanmasıyla ortalama arteriyal basıncın yavaş, fakat düzenli olarak yükseldiğini, iliyak ve mezenterik arterlerde kan akımının azaldığını, ancak renal arterde değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, lumbar ve renal sempatik sinir aktivitesinin arttığını rapor etmişlerdir. Dunbar ve diğ. (1997) bu çalışmada, icv olarak uygulanan leptinin, splanknik damar yataklarında ve iskelet kasında kan akımını azaltarak ortalama arteriyal basıncı artırdığını ileri sürmüşlerdir. Bir başka çalışmada Mitchell ve diğ. (2001), hayvanlara 0.5 mg/kg/5 dakika leptin uyguladıktan sonra, 0.167 mg/kg/saat olacak şekilde 3 saat boyunca toplam 1 mg/kg leptin infüzyonu yapmışlar ve tek doz iv FTS uygulamışlardır. Leptin uygulanan ve uygulanmayan hayvanların arasında ortalama arteriyal basınçta ve kalp vurumunda anlamlı bir değişiklik olmadığı ve her iki grupta da deney süresince kan basıncının düzenli olarak azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca leptinin; mezenterik, bacak ve renal kan akımında anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı rapor edilmiştir. Rahmouni ve diğ. (2005) tarafından yapılan çalışmada da, ekzojen olarak uygulanan leptinin kan akımında bir değişikliğe neden olmadığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda, leptin uygulanmasından sonra kan akımında T1 anında hem T0 hem de aynı zaman aralığındaki kontrol grubuna göre azalma olmuştur, ancak T2 anında alınan değerler hem T0 hem de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yükseliş söz konusudur, ancak bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir, yani leptin, Mitchell ve diğ. (2001) ile Rahmouni ve diğ. (2005) tarafından yapılan çalışmalarda belirtildiği gibi, iskelet kasında kan akımında anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Dunbar ve diğ. (1997) tarafından yapılan çalışmada ise aksi yönde bir bulgu bildirilmiştir. Bu farklılık leptinin uygulanma şekline ve dozuna bağlı olabilir. İcv ekzojen leptin uygulanması, sempatik sinir sistemini uyararak kan akımında değişikliğe neden olabilir.

Mitchell ve diğ. (2001) aynı çalışmalarında, hayvanlara 30 µg/kg L-NAME'yi 3 saat boyunca uygulamışlardır. L-NAME'nin arteriyal basıncı artırdığı, nabızı azalttığı ve bölgesel kan akımını anlamlı şekilde artırdığı bildirilmiştir. L-NAME ile NO blokajı sağlandıktan sonra leptin uygulanan hayvanlarda ise nabız ve arteriyal basıncın değişmediği ve mezenterik kan akımının düzenli olarak azaldığı rapor edilmiştir, fakat L-NAME uygulanan grup ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik olmadığı

belirtilmiştir. Buna ilaveten, renal ve bacak kan akımında anlamlı bir değişiklik olmadığı da belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda, L-NAME uygulandıktan sonra kan akımında düzenli olarak azalış söz konusuydu, ancak bu azalış yalnız T2 anında hem T0 hem de aynı zaman aralığındaki kontrole göre anlamlıydı. L-NAME'den 20 dakika sonra leptin uygulanan hayvanlarda ise, bacak kan akımı azalmasına rağmen, sadece T2 anında T0'a göre anlamlı bir azalma söz konusudur. Çalışmamızda kan akımındaki bu farklılıklar, yine uygulanan maddelerin uygulanış şekline ve dozuna bağlı olabilir.

NO, endotel hücrelerinde üretilen ve damar tonusunu parakrin olarak düzenleyen bir araçtır. NO, iskelet kasında uyarılma ve kasılma oluşumu, mitokondriyal enerji üretimi, glikoz metabolizması ve kan akımının otheregülasyonu gibi pek çok fonksiyonu yerine getirir (Grozdanovic, 2001; Stamler ve Meissner, 2001; Buchwalow ve diğ., 2005). Endotelial hücrelerde OBRlerin anlatımının yapılmasına rağmen, NO üretimi üzerine olan etkisi hala tartışmalıdır. *İn vitro* çalışmalarda ise leptinin, endotelial NO üretimini uyardığı ve NO aracılı damar gevşemesine neden olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, *in vivo* çalışmalarda yeteri kadar açık değildir (Beltowski ve diğ., 2004). Bazı araştırmacılar, *in vivo* leptin aracılı damar gevşemesinde NO varlığına ve leptinin NO üretiminde direkt etkisine işaret etmektedirler (Fruhbeck, 1999; Beltowski ve diğ., 2004). Fruhbeck (1999) ile Fruhbeck ve Gomez-Ambrosi (2001), leptin uygulamasından sonra plazma NO metabolitlerinin, nitrit ve nitrat yoğunluklarının arttığını gözlemişler, ancak NO kaynağını tam olarak tanımlayamamışlardır.

Tüm memelilerin iskelet kaslarında, kasa özel bir tip olan nNOS da dahil olmak üzere NOS izoformlarının anlatımlarının yapıldığı gösterilmiştir. NOS izoformlarının anlatımı ve yerleşimi yaşa, gelişim evresine, sinir donanımı ve aktivitesine, sitokinlere ve büyüme faktörlerine maruz kalma durumuna, kas fibril tipine ve türüne bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Stamler ve Meissner, 2001). NOS izoformları, sıçan iskelet kasında hem kas hücrelerinde hem de arteriyollerin endotellerinde bulunmaktadır. Damar düz kasında lokal NOS anlatımıyla damar fonksiyonlarının otokrin olarak düzenlendiği ve bununla birlikte NO'in, iskelet kasında kan akımını düzenlediği gösterilmiştir (Buchwalow ve diğ., 2005). NOS izoformlarının, sarkoplazmik bölmelerin iç kısımlarında, mitokondri, sarkoplazmik retikulum ve miyositlerin sitosolünde bulunduğu gösterilmiştir (Buchwalow ve diğ., 2005).

İmmünohistokimyasal yöntemlerle nNOS'un kas fibrillerinin sarkolemmalarında, eNOS'un mikrovasküler endotelde, iNOS'un ise kas fibrillerinin ve bazı endotel hücrelerinin yakınındaki lökositlerde bulunduğu gösterilmiştir (Yan ve diğ., 2000; Punkt ve diğ., 2001; Vranic ve diğ., 2002; Brevetti ve diğ., 2003; Buchwalow ve diğ., 2005). Sıçan iskelet kasında nNOS, tip I ve tip II fibrillerin sarkolemmalarında bulunur (Walford ve Loscalzo, 2003). Bizim çalışmamızda da nNOS ve eNOS, fibrillerin sarkolemmalarında gözlenmiştir, ancak dağılım oranları gruplar arasında değişkenlik göstermektedir. Sadece leptin ve L-NAME+Leptin uygulanan hayvanlarda eNOS reaksiyonlarındaki artış, ekzojen leptin uygulanmasının NO üretimi üzerindeki uyarıcı etkilerine bağlı olabilir.

Çalışmamızda leptin uygulanan grupta bağ dokusundaki artışa paralel olarak endomiyum ve perimiyumların ve aynı zamanda enine çizgilenmelerin kontrole göre daha belirgin olduğu görüldü. Warmington ve diğ. (2000) tarafından yapılan çalışmada, leptin uygulanan normal sıçanlardan izole edilen iskelet kaslarında izometrik kasılmalar karşılaştırılmış ve kasın uzunluğunda anlamlı bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda böyle bir ölçüm yapılmamıştır ancak, enine çizgilenmeler kontrole göre daha belirgindir. Ayrıca leptin grubundaki hayvanların dokularında eNOS ve nNOS dağılımları immünohistokimyasal olarak değerlendirildiğinde, diğer tüm gruplara nazaran en güçlü reaksiyon bu grupta görülmüştür ve bu gruptaki kesitler incelendiğinde, hücrelerin nukleuslarının etrafında da her iki reaksiyonun varlığı gözlenmiştir. Bu durum, leptinin NO üretimini uyardığını belirten çalışmalarla uyumludur. Reaksiyonların nukleusların etrafında yoğun olması, NO'in hücresel transkripsiyon olaylarında rol aldığını düşündürmektedir. Carbo ve diğ. (2000) çalışmalarında, 100 µg/kg iv leptin uygulanmasından 3.5 saat sonra izole ettikleri iskelet kasında, protein sentezinin uyarıldığını ve bunun leptin tarafından bilinmeyen bir aracı ile gerçekleştirildiğini ileri sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda da, leptin uygulanan gruplardan sonra nukleusun çevresinde eNOS ve nNOS reaksiyonlarının görülmesi, yukarıda belirtilen çalışmadaki kesin olarak bilinmeyen olası aracılardan eNOS ve nNOS olabileceği ihtimalini güçlendirmektedir. Bununla birlikte leptin ve L-NAME+Leptin uygulanan gruplarda bağ dokusundaki artış, bağ doku elemanlarının sentezi ile ilgili olabilir.

Genel NOS inhibitörü olan L-NAME uygulanan grupta ise, kas dokusunun genel yapısında ve bütünlüğünde hasar meydana geldiği ve yaygın kanama odaklarının olduğu görüldü. Oluşan bu hasar ve kanama odakları, L-NAME'nin hipertansif etkisinin yanı sıra, NO'nun aracılık ettiği bir çok hücrel fonksiyonun baskılanmasıyla ilişkili olabilir. Ayrıca L-NAME uygulanan hayvanların dokularında eNOS reaksiyonun görülmesi, L-NAME'nin her üç tip NOS'u baskılayan genel bir inhibitör olup olmadığını tartışan çalışmalarla uyumludur (Pacher ve diğ., 2007). Ancak halen genel inhibitör olarak kullanılabilecek başka bir kimyasal saptanamamıştır .

L-NAME'den sonra leptin uygulanan grupta ise, leptin grubundaki kadar olmamakla beraber bağ dokusu artışı söz konusudur. Bu grupta leptin, L-NAME'nin oluşturduğu hasarı azaltmış, ancak tamamen geri döndürememiştir. Yalnız L-NAME uygulanan gruba kıyasla, kas dokusunun genel yapısı daha iyi durumdadır. L-NAME, uygulandıktan sonra ilk 10-20 dakika içinde etkisini göstererek hipertansiyon oluşturmaktadır. Oluşan hipertansiyonla birlikte ortalama arteriyel basınçta, sistolik ve diyastolik basınçlarda artış, kalp vurumunda ve kan akımında ise azalma görülmüştür. Bu hemodinamik parametrelere bağlı olarak, kas dokusunun genel yapısında meydana gelen hasarın dokuya taşınan oksijen miktarındaki azalmayla ilişkili olabileceği de düşünülmektedir. Tüm bu durumlara bağlı olarak, L-NAME dokulara hasar vermektedir. Uygulanan leptinin, oluşan hasarı geri çevirememesi ise, leptin dozunun ve uygulanma süresinin yeterli olmayışı ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Oluşan hipertansiyonla birlikte, bu etki mekanizmaları arasındaki denge bozulmuş olabilir. Yalnız L-NAME uygulanan grupta gördüğümüz boyanma özelliğindeki farklılık, L-NAME+Leptin uygulanan grupta çok daha az yaygındır. Bu durum, L-NAME tarafından NO üretiminin baskılanması sonucu, NO aracılı hücrel olayların (protein fosforilasyonu ve sentezi, hücre matriksi sentezi gibi) gerçekleşmemesine bağlı olabilir. Leptin uygulanması ile birlikte ise kısmen NO sentezi gerçekleşmiş olabilir. Çünkü yalnız L-NAME uygulanan grup doku düzeyinde incelendiği zaman, nNOS'un olmadığını, çok az eNOS'un var olduğunu gözlemledik. L-NAME'den sonra leptin uygulanmasıyla dokudaki eNOS dağılımının arttığını ve nNOS'un da kontrole benzer olarak dağılım gösterdiğini tespit ettik. L-NAME, inhibisyon etkisini ağırlıklı olarak MSS üzerinden, yani nNOS üzerinden gösteriyor olabilir. Ayrıca leptin uygulanmasından sonra nNOS'un dokuda bulunması, leptinin bir kısım etkilerini

sempatik sinir sistemini uyararak gerçekleştirdiğini göstermektedir. L-NAME+Leptin grubunda yine leptin grubuna benzer olarak nukleusların çevresinde eNOS reaksiyonu görülmesi ise leptinin, eNOS'u uyararak çeşitli hücrel olaylarda etkisini devam ettirdiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda, leptin uygulanması sistolik, diyastolik ve ortalama arteriyal basınçta azalmaya neden olurken, L-NAME ve L-NAME+Leptin uygulamaları ise artışa neden olmuştur. Leptin, nabız ve kan akımında anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. L-NAME ve L-NAME+Leptin uygulamaları ise hem nabızda hem kan akımında azalmaya neden olmuştur. Leptin ve L-NAME+Leptin gruplarında hem eNOS hem de nNOS reaksiyonlarında artış görüldü.

Sonuç olarak, leptinin kan akımı, kan basıncı ve kalp vurumuna etkisi, NO varlığında ve yokluğunda araştırılmış olup, L-NAME ile NO sentezi inhibe edilmesine rağmen, leptinin kısmen NO üretimine etki ettiği ve leptinin fizyolojik etkilerinde NO' i aracı olarak kullandığı gösterilmiştir.

## KAYNAKLAR

AHIMA, R. S., and OSEI, S.Y., 2004, Leptin signaling. *Physiology and Behavior*, 81: 223-241.

ALDERTON, W.K., COOPER, C.E., and KNOWLES, R. G., 2001, Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, 1; 357(Pt3): 593-615.

ANDERSSON, K. E., and PERSSON, K., 1994, Nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated effects in lower urinary Tract smooth muscle. *World J Urol (Germany)*, 12(5): 274-280.

AUWERX, J., and STAELS, B., 1998, Leptin. *The Lancet*, 351(9104): 737-742.

BELTOWSKI, J., JOCHEM, J., WOJCICKA, G., and ZWIRSKA-KORCZALA, K., 2004, Influence of intravenously administered leptin on nitric oxide production, renal hemodynamics and renal function in the rat. *Regulatory Peptides*, 120: 59-67.

BELTOWSKI, J., WOJCICKA, G., and JAMROZ- WISNIEWSKA, A., 2006, Role of nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in the regulation of blood pressure by leptin in lean and obese rats. *Life Sciences*, 79: 63-71.

BOGDAN, C., 2001, Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.*, 2(10): 907-916.

BREDT, D. S., and SYNDER, S. H., 1994, Nitric oxide: a physiologic messenger molecule, *Ann. Rev. Physiol.*, 63:174-195.

BREVETTI, L. S., CHANG, D. S., TANG, G. L., SARKAR, R., and MESSINA, L.M., 2003, Overexpression of endothelial nitric oxide synthase increases skeletal muscle blood flow and oxygenation in severe rat hind limb ischemia. *J. Vasc. Surg.*, 38(4): 820-826.

BUCHWALOW, I. B., MININ, E. A., SAMOILOVA, V. E., BOECKER, W., WELLNER, M., SCHMITZ, W., NEUMANN, J., and PUNKT, K., 2005, Compartmentalization of NO signaling cascade in skeletal muscles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 30: 615-621.

CALVER, A., COLLIER, J., MONCADA, S., and VALLANCE, P., 1992, Effect of local intra-arterial N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine in patients with hypertension: the nitric oxide dilator mechanism appears abnormal. *J. Hypertens*, 10: 1025-1031.

CAPANNI, C., SQUARZONI, S., PETRINI, S., VILLANOVA, M., MUSCARI, C., MARALDI, N.M., GUARNIERI, C., CALDARERA, C.M., 1998, Increase of neuronal nitric oxide synthase in rat skeletal muscle during ageing. *Biochem Biophys Res Commun.*, Apr 7;245(1):216-9.

CARBO, N., RIBAS, V., BUSQUETS, S., ALVAREZ, B., LOPEZ-SORIANO, F.J., ARGILES, J.M., 2000, Short-term effects of leptin on skeletal muscle protein metabolism in the rat. *J Nutr Biochem.*, Sep;11(9):431-5.

CARLYLE, M., JONES, O. B., KUO, J. J., and HALL, J. E., 2002, Chronic cardiovascular and renal actions of leptin: role of adrenergic activity. *Hypertension*, 39 (2 Pt 2): 496-501.

CASTO, R.M., VANNESS, J.M., OVERTON, J.M., 1998, Effects of central leptin administration on blood pressure in normotensive rats. *Neurosci Lett.*, Apr 17; 246(1):29-32.

CASTRACANE, V. D. and HENSON, M. C., 2006, *Leptin*, Springer Science+Business Media, LLC, USA, ISBN-10: 0-387-34115-6.

CEDDIA, R. B., WILLIAM, W. N., and CURI, R., 2001, The response of skeletal muscle to leptin. *Front Biosci.*, 1; 6: D90-97.

CHAUBOURT, E., VOISIN, V., FOSSIER, P., BAUX, G., ISRAEL, M., and DE LA PORTE, S., 2002, Muscular nitric oxide synthase (muNOS) and utrophin. *J. Physiol. Paris.*, 96 (1-2): 43-52.

CINTI, S., FREDERICH, R. C., ZINGARETTI, M. C., DE MATTEIS, R., FLIER, J. S., and LOWELL, B. B., 1997, Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. *Endocrinology Printed in U.S.A.*, 138, (2): 798-804.

CORREIA, M. L. G., MORGAN, D. A., SIVITZ, W. I., MARK, A. L., and HAYNES, W. G., 2001, Leptin acts in the central nervous system to produce dose-dependent changes in arterial pressure. *Hypertension*. 37: 936-942.

DAWSON, T. M., DAWSON, V. L., and SNYDER, S. H., 1992, A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol.*, 32 (3): 297-311.

DUNBAR, J. C., HU, Y., and LU, H., 1997, Intracerebroventricular leptin increases lumbar and renal sympathetic nerve activity and blood pressure in normal rats. *Diabetes*, 46 (12): 2040-2043.

FRUHBECK, G., 1999, Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration, *Diabetes*, 48 (4):903-908.

FRUHBECK, G., and GOMEZ-AMBROSI, J., 2001, Modulation of the leptin-induced white adipose tissue lipolysis by nitric oxide, *Cellular Signalling*, 13: 827– 833.



FURCHGOTT, R. F., CHERRY, P. D., ZAWADZKI, J. V., and JOTHIANANDAN, D., 1984, Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 6 (2): 336-343.

FURCHGOTT, R. F., CARVALHO, M. H., KHAN, M. T., and MATSUNAGA, K., 1987, Evidence for endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels by acetylcholine. *Blood Vessel*, 24 (3):145-149.

FURCHGOTT, R. F., IGNARRO, L. J., MURAD, F., 1998, *The Nobel Prize in Physiology or Medicine, "for their discoveries concerning nitric oxide as a signalling molecule in the cardiovascular system"* [online], [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1998/index.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1998/index.html) [Ziyaret Tarihi: 09 Şubat 2007].

GARDINER, S. M., KEMP, P. A., MARCH, J. E., BENNETT, T., 2000, Regional hemodynamic effects of recombinant murine or human leptin in conscious rats, *British Journal of Pharmacology*, 130, 805 – 810.

GROSS, S. S., and WOLIN, M. S., 1995, Nitric oxide: pathophysiologic mechanism. *Ann. Rev. Physiol.*, 57: 737-769.

GROZDANOVIC, Z., 2001, NO message from muscle, *Microsc. Res. Tech.*, 1; 55 (3): 148-153.

GUHA, P. K., VILLARREAL, D., REAMS, G. P., and FREEMAN, R. H., 2003, Role of leptin in the body fluid volume and pressure. *American Journal of Therapeutics*, 10: 211-218.

HAYNES, W. G., MORGAN, D. A., WALSH, S. A., MARK, A. L., and SIVITZ, W. I., 1997, Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin, *The Journal of Clinical Investigation*, 100 (2): 270-278.

HIGASHI, Y., and CHAYAMA, K., 2002, Renal endothelial dysfunction and hypertension, *Journal of Diabetes and Its Complications*, 16: 103–107.

HUANG, L., and LI, C., 2000, Leptin: a multifunctional hormone, *Cell Research*, 10: 81–92.

IGNARRO, L. J., 1990, Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication, *Hypertension (USA)*, 16 (5): 477-483.

IGNARRO, L. J., BUGA, G. M., WOOD, K. S., BYRNS, R. E., and CHAUDHURI, G., 1987, Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84 (24): 9265-9269.

JACKSON, E. K., and LI, P., 1997, Human leptin has natriuretic activity in the rat, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 272: F333-F338.

KAPUR, S., BEDARD, S., MARCOTTE, B., COTE, C. H., and MARETTE, A., 1997, Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action, *Diabetes*, 46 (11): 1691-1700.

KILINÇ, A., ve KILINÇ, K., 2003, *Nitrik Oksit*. Palme Yayıncılık, Ankara, 975-8624-56-3.

KIMURA, K., TSUDA, K., BABA, A., KAWABE, T., BOH-OKA, S., IBATA, M., MORIWAKI, C., HANO, T., and NISHIO, I., 2000, Involvement of nitric oxide in endothelium-dependent arterial relaxation by leptin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273, 745-749.

KNOWLES, R. G., and MONCADA, S., 1994, Nitric oxide synthases in mammals, *Biochem. J.*, 298: 249-258.

KOKTA, T. A., DODSON, M. V., GERTLER, A., and HILL, R. A., 2004, Intercellular signaling between adipose tissue and muscle tissue. *Domestic Animal Endocrinology*, 27: 303-331.

KUO, J. J., JONES, O. B., and HALL, J. E., 2001, Inhibition of NO synthesis enhances chronic cardiovascular and renal actions of leptin. *Hypertension*, 37 (2): 670-676.

LEMBO, G., VECCHIONE, C., FRATTA, L., MARINO, G., TRIMARCO, V., d'AMATI, G., and TRIMARCO, B., 2000, Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms. *Diabetes*. 49: 293-297.

LOSCALZO, J., 1995, Endothelial injury, vasoconstriction, and its prevention, *Tex. Heart Inst. J.*, 22 (2):180-184.

LOWENSTEIN, C. J., DINERMAN, J. L., and SNYDER, S. H., 1994, Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann. Intern. Med.*, 120: 227-237.

MARLETTA, M. A., 1994, Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, 23; 78 (6): 927-930.

MASTRONARDI, C.A., YU, W.H., MCCANN, S.M., 2002, Resting and circadian release of nitric oxide is controlled by leptin in male rats, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Apr 16;99(8):5721-6.

McNAUGHTON, L., PUTTAGUNTA, L., MARTINEZ-CUESTA, M.A., KNETEMAN, N., MAYERS, I., MOQBEL, R., HAMİD, Q. ve RADOMSKİ, M.W., 2002, Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *Proc Natl Acad Sci USA*. 24;99(26), 17161-6.

MITCHELL, J. L., MORGAN, D. A., CORREIA, M. L. G., MARK, A. L., SIVITZ, W. I., and HAYNES, W. G., 2001, Does leptin stimulate nitric oxide to oppose the effects of sympathetic activation. *Hypertension*, 38: 1081-1086.

MONCADA, S., 1992, The L-arginine: Nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand*, 145 (3): 201-227.

MONCADA, S., PALMER, R. M. J., and HIGGS, A., 1991 Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacol. Rev.*, 43(2): 109-142.

MORAN, O., and PHILIP, M., 2003, Leptin: obesity, diabetes and other peripheral effects-a review. *Pediatric Diabetes*, 4: 101-109.

MUOIO, D. M., DOHM, G. L., FIEDOREK, F. T., TAPSCOTT, E. B., and COLEMAN, R. A., 1997, Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes*, 46 (8): 1660-1663.

MUOIO, D. M. and DOHM, G. L., 2002, Peripheral metabolic actions of leptin. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 16 (4), 653-666.

NATHAN, C., and XIE, Q. W., 1994, Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 269 (19):13725-13728.

NUSSLER, A. K., and BILLIAR, T. R., 1993, Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase, *J. Leukoc. Biol. (USA)*, 54 (2):171-178.

PACHER, P., BECKMAN, J. S., and LIAUDET, L., 2007, Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.*, 87: 315-424.

PALMER R. M. J., ASHTON D. S., and MONCADA, S., 1988, Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333: 664-666.

PANZA, J. A., CASINO, P. R., KILCOYNE, C. M., and QUYYUMI, A. A., 1993, Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation*, 87(5): 1468-1474.

PUNKT, K., NAUPERT, A., WELLNER, M., ASMUSSEN, G., SCHMIDT, C., and BUCHWALOW, I. B., 2002, Nitric oxide synthase II in rat skeletal muscles. *Histochem. Cell Biol.*, 118 (5): 371-379.

PUNKT, K., SAITSEV, S., PARK, J. K., WELLNER, M., and BUCHWALOW, I. B., 2001, Nitric oxide synthase isoforms I, III and protein kinase-C $\theta$  in skeletal muscle fibres of normal and streptozotocin-induced diabetic rats with and without Ginkgo biloba extract treatment. *Histochem. J.*, 33 (4): 213-219.

RAHMOUNI, K., JALALI, A., MORGAN, D. A., and HAYNES, W. G., 2005, Lack of dilator effect of leptin in hindlimb vascular bed of conscious rats. *European Journal of Pharmacology*, 518: 175-181.

RAPOPORT, R. M., and MURAD, F., 1983, Agonist induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. *Circ. Res.*, 52: 352-357.

REN, J., 2004, Leptin and hyperleptinemia-from friend to foe for cardiovascular function. *Journal of Endocrinology*, 181: 1-10.

SHEK, E. W., BRANDS, M. W., and HALL, J. E., 1998, Chronic leptin infusion increases arterial pressure. *Hypertension*, 31 (2): 409-414.

SMUTZER, G., 2001, Research tools for nitric oxide. A wide variety of reagent are available for nitric oxide research. *The Scientist*, 15 (6):23-29.

SNYDER, S. H., and DAWSON, T. M., 2000, *Nitric oxide and related substances as neural messengers* [online], [www.acnp.org/g4/GN401000060/CH060.html](http://www.acnp.org/g4/GN401000060/CH060.html) [Ziyaret Tarihi: 09 Şubat 2007].

SOLINAS, G., SUMMERMATTER, S., MAINIERI, D., GUBLER, M., PIROLA, L., WYMAN, M. P., RUSCONI, S., MONTANI, J. P., SEYDOUX, J., and DULLOO, A. G., 2004, The direct effect of leptin on skeletal muscle thermogenesis is mediated by substrate cycling between de novo lipogenesis and lipid oxidation. *FEBS Letters*, 19; 577 (3): 539-544.

STAMLER, J. S., and MEISSNER, G., 2001, Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiological Reviews*, 81 (1): 209-237.

STAR, R. A., 1993, Nitric oxide. *Am. J. Med. Sci. (USA)*, 306 (5):348-358.

SWEENEY, G., 2002, Leptin signaling, *Cellular Signalling*, 14, 655-663.

TORREILLES, J., 2001, Nitric oxide: one of the more conserved and widespread signaling molecules. *Frontiers in Bioscience*, 6: 1161-1172.

TOTTRUP, A., GLAVIND, E. B., and SVANE, D., 1992, Involvement of the L-arginine-nitric oxide pathway in internal anal sphincter relaxation. *Gastroenterology*, 102 (2): 409-415.

UNGER, R. H., and ZHOU, Y. T., 2001, Lipotoxicity of beta cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. *Diabetes*, 50 (1): 118-121.

VILLAREAL, D., REAMS, G., FREEMAN, R. H., and TARABEN, A., 1998, Renal effects of leptin in normotensive, hypertensive, and obese rats. *The American Journal Physiology*, 275 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 44): R2056-R2060.

VRANIC, T. S., BOBINAC, D., JURISIC-ERZEN, D., MUHVIC, D., SANDRI, M., and JERKOVIC, R., 2002, Expression of neuronal nitric oxide synthase in fast rat skeletal muscle. *Coll Antropol*, 26 (1): 183-188.

WALFORD, G., and LASCALZO, J., 2003, Nitric oxide in vascular biology. *Journal of Trombosis and Haemostasis*, 1: 2112-2118.

WARMINGTON, S. S., TOLAN, R., McBENNETT, S., 2000, Functional and histological characteristics of skeletal muscle and the effects of leptin in the genetically obese (*ob/ob*) mouse. *International Journal of Obesity*, 24, 1040-1050.

WINTERS, B, MO, Z, BROOKS-ASPLUND, E, KIM, S, SHOUKAS, A., LI, D., NYHAN, D., and BERKOWITZ, D. E., 2000, Reduction of obesity, as induced by leptin, reverses endothelial dysfunction in obese (*Lepob*) mice. *J Appl Physiol*, 89: 2382-2390.

XIANG, L., NAIK, J. and HESTER, A. R. L., 2005, Exercise-induced increase in skeletal muscle vasodilatory responses in obese Zucker rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 288 (4): R987-991.

YAN, Z., CHEN, Z., and CHEN, Z., 2000, Modulation of nitric oxide synthase isoenzymes in reperfused skeletal muscle. *Chin. J. Traumatol.*, 15; 3 (2): 76-80.

ZHANG, F., CHEN, Y., HEIMAN, M., and DIMARCHI, R., 2005, Leptin: structure, function and biology. *Vitamins and Hormones*, 71: 345-372.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1981 yılında Van'da doğdum. İlkokulu 100. Yıl İlköğretim Okulu'nda (1992), ortaokulu Dr. Hulusi Behçet İlköğretim Okulu'nda (1995), lise öğrenimimi Orhan Cemal Fersoy Lisesi'nde (1999) tamamladım. 2000 yılında İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'ne girdim ve 2004 yılında mezun oldum. Aynı yıl, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün açmış olduğu yüksek lisans sınavını kazanarak, Biyoloji Anabilim Dalı, Zooloji Programı'na devam etmeye hak kazandım.