

AFYONKARAHİSAR KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÖSTROJEN HORMONUNUN OVARIEKTOMİZE RATLARIN
KOLONUNDA LEPTİN RESEPTÖRÜ ÜZERİNE ETKİSİ

Mustafa YILDIZ

VETERİNER HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yad. Doç. Dr. Korhan ALTUNBAŞ

Tez No: 2008 - 001

2008 – AFYONKARAHİSAR

KABUL ve ONAY

Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunması Tarihi: 03 / 01 / 2008

Prof. Dr. Aytekin ÖZER

ÜYE

Doç. Dr. Berrin ZİK

ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Korhan ALTUNBAŞ

ÜYE

Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Mustafa YILDIZ'ın 'Östrojen Hormonunun Ovariectomize Ratların Kolonunda Leptin Reseptörü Üzerine Etkisi' başlıklı tezi 03.01.2008 günü saat 17:00'da lisansüstü eğitim ve öğretim sınav yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Yavuz DEMİR
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Ob geninin ürettiği yağ doku kaynaklı bir molekül olan leptin, 1994 yılında keşfedilmesinden bu yana üzerinde en fazla araştırma yapılan hormonlardan biri olmuştur. Yağ dokusu ve merkezi sinir sistemi arasındaki sinyalizasyonu sağlaması, gıda alımı ve enerji tüketimindeki rolü nedeniyle büyük ilgi uyandırmıştır.

Başlangıçta bir tokluk faktörü olarak tanımlanan leptinin vücuttaki bir çok organ ve dokuda reseptörlerinin gösterilmesiyle, sadece gıda alımı ve enerji tüketiminin düzenlenmesinde görev almadığı, büyüme, gelişme, üreme, immun, sempatik, endokrin ve gastrointestinal sistem gibi vücuttaki birçok sistemin fonksiyonlarının düzenlenmesinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple; farklı doku ve organlarda leptinin fizyolojik ve patolojik rolleri öğrenilmeye çalışılmaktadır.

Tezimin hazırlanması süresince danışmanlığımı yapan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda yardım ve desteğini yanımda hissettiğim değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Korhan ALTUNBAŞ'a; bir yıl boyunca çalışma imkanı bulduğum bilgi ve tecrübeleriyle gelişimime büyük katkısı olan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Artay YAĞCI'ya; tezimin istatistiksel analiz çalışmaları sırasında yardımları ile destek veren Yrd. Doç. Dr. Aziz BÜLBÜL'e; araştırmamın her aşamasında birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli arkadaşım Özlem ÖZDEN'e; iki yıl boyunca eğitimimi devam ettirebilmem için bana her türlü kolaylığı sağlayan Muğla İl Ambulans Sevisi Başhekimi Dr. Mehmet Ali KARAOSMANOĞLU ile sorumlu hemşire Selda Özer'e, çalışma arkadaşlarım Fahri ŞİMŞEK, Ömer CEYLAN, Serdar YAPAR, Hanife ÇIRAY, Sultan ARLI, Gülistan UYAR, Bilge Kağan UZUN, Özkan AKYOL, Müşerref KARPUZ ve Rukiye KARALAR'a; ev arkadaşlarım Ataman POYRAZ ve Harun YILMAZ ile bu günlere ulaşmamda her zaman manevi desteklerini hissettiğim sevgili aileme; sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mustafa YILDIZ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
Kabul ve onay	II
Önsöz	III
İçindekiler	IV
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	VI
Tablolar	VIII
Şekiller	IX
ÖZET	XI
SUMMARY	XII
1. GİRİŞ	1
1.1. Kolon Anatomisi	1
1.2. Kolon Histolojisi	1
1.2.1. Tunika Mukoza	1
1.2.2. Tunika Muskularis	2
1.2.3. Tunika Seroza	2
1.3. Kolon Fizyolojisi	3
1.3.1. Motilite	3
1.3.2. Salgılama	3
1.3.3. Emilim	4
1.3.4. Flora	5
1.3.5. Dışkı	5
1.4. Leptin	5
1.4.1. Leptin Reseptörleri	6
1.4.2. Leptin ve Obezite	7
1.4.3. Leptin ve Mide Bağırsak Kanalı	8
1.4.4. Leptin ve Östrojen	10
2. GEREÇ VE YÖNTEM	12
2.1. Gereç	12
2.1.1. Hayvan	12
2.1.2. Cihazlar	13

2.1.3. Tespit ve Doku Takibinde Kullanılan Kimyasallar	13
2.1.3.1. Tespit ve Doku Takibinde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanışı	14
2.1.4. İmmunohistokimyasal Yöntemde Kullanılan Gereçler	14
2.1.4.1. İmmunohistokimyasal Yöntemde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanışı	15
2.2. Yöntem	16
2.2.1. Dokuların Alınması	16
2.2.2. Tespit, Doku Takibi ve Kesit Alma	16
2.2.3. İmmunohistokimyasal Boyama	17
2.3. Değerlendirme	20
2.4. İstatistiksel Analiz	20
3. BULGULAR	21
3.1. Kolondaki Lep-R'nin İmmunohistokimyasal Skorlama Sonuçları	21
4. TARTIŞMA	35
5. SONUÇ	40
6. KAYNAKLAR	41

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%:	Yüzde
µg:	Mikrogram
<:	Küçük
°C:	Santigrat derece
BKI:	Beden kitle indeksi
Cl:	Klor
Cm:	Santimetre
DAB:	Substrat – kromojen (Diaminobenzidin)
Dk:	Dakika
DNA:	Deoksiribonükleik asit
ER:	Endoplazmik retikulum
GALT:	Bağırsak ile ilişkili lenfoid doku
Gr:	Gram
HCO₃⁻:	Karbonik asit
HRP:	Horse Raddish Peroksidaz
IgA:	Immunglobülin A
IU:	International Unit
İ.M.:	İntra muskuler
İ.P.:	İntraperitoneal
JAK-SAT:	Januz Kinaz 2
K⁺:	Potasyum
K162:	Kontrol 162. saat
K18:	Kontrol 18. saat
K90:	Kontrol 90. saat
KDa:	Kilo dalton
Kg:	Kilogram
Lep-R:	Leptin reseptörü
Lep-Ra:	Leptin reseptör a
Lep-Rb:	Leptin reseptör b
Lep-Rc:	Leptin reseptör c

Lep-Rd:	Leptin reseptör d
Lep-Re:	Leptin reseptör e
Lep-Rf:	Leptin reseptör f
Mean:	Ortalama
Mg:	Miligram
ml:	Mililitre
MUC2:	Mucin 2
MUC5AC:	Mucin 5 subtypes A and C
MUC5B:	Mucin 5B
MUC6:	Mucin 6
N:	Denek sayısı (hayvan sayısı)
Na⁺:	Sodyum
NPY:	Nöropeptid Y
Ob-gen:	Obez gen
Ob-R:	Obez reseptör
Ov:	Ovariyektomi
Ö162:	Östrojen 162. saat
Ö18:	Östrojen 18.saat
Ö90:	Östrojen 90. saat
PepT1:	H ⁺ /di-tripeptide transporter
PI3K:	Phosphoinositide kinase – 3
PKC:	Protein kinaz C
RNA:	Ribonükleik asit
SBP:	Streptavidin Biotin Peroksidaz
SE:	Standart Error
SPSS:	Statistical Package For Social Sciences
Vb:	Ve benzeri

TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Araştırmada kontrol ve östrojen grubu ratlara uygulanan deneysel prosedür	12
Tablo 3.1. Kontrol ve östrojen gruplarındaki ratlarda, 18.saatte; kolonun kript epiteli ve pleksüs miyenterikuslarında Lep-R'nin immunohistokimyasal skor değerlerinin ortalaması	22
Tablo 3.2. Kontrol ve östrojen gruplarındaki ratlarda, 90.saatte; kolonun kript epiteli ve pleksüs miyenterikuslarında Lep-R'nin immunohistokimyasal skor değerlerinin ortalaması	23
Tablo 3.3. Kontrol ve östrojen gruplarındaki ratlarda, 162.saatte; kolonun kript epiteli ve pleksüs miyenterikuslarında Lep-R'nin immunohistokimyasal skor değerlerinin ortalaması	23

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1. Kolonun kript epitellerinde leptin reseptör immunreaksiyonu	24
Şekil 3.2. Kolonun pleksüs miyenterikuslarında leptin reseptör immunreaksiyonu	24
Şekil 3.3. Kolon kript epitel ve bağ doku hücrelerinde orta şiddette Lep-R immunreaksiyonu (K18)	25
Şekil 3.4. Kolon kript epitel ve bağ doku hücrelerinde orta şiddette Lep-R immunreaksiyonu (K18)	25
Şekil 3.5. Kolon kript epitel hücrelerinde orta şiddette Lep-R immunreaksiyonu (Ö18)	26
Şekil 3.6. Kolon kript epitel hücrelerinde orta şiddette Lep-R immunreaksiyonu (Ö18)	26
Şekil 3.7. Kolon pleksüs miyenterikusunda negatif Lep-R immunreaksiyonu (K18)	27
Şekil 3.8. Kolon pleksüs miyenterikusunda orta şiddette Lep-R immunreaksiyonu (Ö18)	27
Şekil 3.9. Kolon kript epitel hücrelerinde orta şiddette Lep-R immunreaksiyonu (K90)	28
Şekil 3.10. Kolon kript epitel hücrelerinde orta şiddette Lep-R immunreaksiyonu (K90)	28
Şekil 3.11. Kolon kript epitel hücrelerinde şiddetli Lep-R immunreaksiyonu (Ö90)	29
Şekil 3.12. Kolon kript epitel hücrelerinde şiddetli Lep-R immunreaksiyonu (Ö90)	29
Şekil 3.13. Kolon pleksüs miyenterikusunda negatif Lep-R immunreaksiyonu (K90)	30
Şekil 3.14. Kolon pleksüs miyenterikusunda zayıf Lep-R immunreaksiyonu (Ö90)	30
Şekil 3.15. Kolon kript epitel hücrelerinde zayıf Lep-R immunreaksiyonu (K162)	31

Şekil 3.16. Kolon kript epitel ve bağ doku hücrelerinde zayıf Lep-R immunreaksiyonu (K162)	31
Şekil 3.17. Kolon kript epitel hücrelerinde orta şiddette Lep-R immunreaksiyonu (Ö162)	32
Şekil 3.18. Kolon kript epitel hücrelerinde orta şiddette Lep-R immunreaksiyonu (Ö162)	32
Şekil 3.19. Kolon pleksüs miyenterikusunda negatif Lep-R immunreaksiyonu (K162)	33
Şekil 3.20. Kolon pleksüs miyenterikusunda zayıf Lep-R immunreaksiyonu (Ö162)	33
Şekil 3.21. Negatif kontrol (kript epitel hücreleri)	34
Şekil 3.22. Negatif kontrol (pleksüs miyenterikus)	34

ÖZET

Leptin hormonu kolon fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynar. Ovaryum steroid hormonlarının seviyelerindeki azalmaya bağlı olarak bağırsak kanalı ile ilgili bazı rahatsızlıkların meydana geldiği bilinmektedir. Çalışmamızda ovariektomi ve östrojenin kolonda lokalize olan leptin reseptörlerine olan etkisi belirlenerek, meydana gelebilecek rahatsızlıkların patogenezi, leptinin ve reseptörünün rolünün saptanması amaçlanmıştır.

Ovariektomize ratlarda östrojenin süreye bağlı etkisini görebilmek için her biri altı hayvandan oluşan üç kontrol (K18, K90, K162), üç östrojen (Ö18, Ö90, Ö162) grubu olmak üzere toplam altı grup oluşturuldu. Kontrol grubundaki ratlara 0,2 ml susam yağı, östrojen grubundakilere ise 25 µg 17 β-östrodiol uygulandı. Ratlar 18., 90, ve 162. saatlerde servikal dislokasyon yöntemiyle öldürüldü. Kolon örnekleri alınarak immunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyandı.

Leptin reseptör ekspresyonu, kolon kript epiteli ve pleksüs miyenterikuslarda sitoplazmik olarak belirlendi. Östrojen hormonunun 18. saatte pleksüs miyenterikuslarda ($p<0.01$), 90. saatte kript epitelleri ($p<0.05$) ile pleksüs miyenterikuslarında ($p<0.01$), 162. saatte kript epitellerinde ($p<0.01$) leptin reseptör ekspresyonunu arttırdığı gözlemlendi.

Sonuç olarak; östrojen eksikliğine bağlı olarak gözlenen, konstipasyon, inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi rahatsızlıkların patogenezi, leptin reseptörlerinin rolü olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Leptin, Leptin Resptörü, Kolon, İmmunohistokimya

SUMMARY

The effect of leptin hormone on regulation of colon function is very important. Some disorders are known to occurring relation to decreasing ovarian steroid hormone levels. To determine the effects of ovariectomy and estrogen on leptine receptors localized in colon and the role of leptin and its receptor in the pathogenesis of these disorders was aimed.

Ovariectomized rats were divided into three control (C18, C90, C162) groups and estrogen (E18, E90, E162) groups. The control and estrogen groups were administrated 0.2 ml sesame oil and 25 μ g 17 β -estradiol respectively. Rats were killed by cervical dislocation at 18, 90 and 162 hours respectively. Colon samples were removed and stained using immunohistochemistry.

Leptin receptor intracytoplasmic expression was observed in crypt epithelium and plexus myentericus of colon. Estrogen increased in leptin receptor expression in plexus myentericus ($p < 0.01$) at 18 hours, in crypt epithelium ($p < 0.05$) and plexus myentericus ($p < 0.01$) at 90 hours, in crypt epithelium ($p < 0.01$) at 162 hours.

It was concluded that the effect of leptin receptor in pathagenesis of some disorders inspected in lack of estrogen such as constipation, inflammatuar bowel disease is important.

Key Words: Leptin, Leptin Receptor, Colon, Immunohistochemistry

1. GİRİŞ

1.1. KOLON ANATOMİSİ

Kolon, kalın bağırsağın en uzun kesimi olup, sekumdan rektuma kadar uzanan bölümü oluşturur. İçinden geçen dışkıının durumuna uygun olarak boğumlu bir yapıya sahiptir. Ters 'U' harfi şeklinde dizilmiş bölmelerden meydana gelir (1-5). İnsanda asendens, transversum, desendens ve sigmoideum olmak üzere dört kısımdan oluşur (6-8). Ratta ise, sekumdan mide seviyesine kadar yükselen kolon bölümü, asendens kolon olarak adlandırılır. Bu bölümden sonra kolon vücudun sol tarafına doğru ilerler. Daha sonra mide hizasından rektuma kadar alçalır ve bu bölüme de kolon desendens adı verilir. Kolon bir bağ ile (mezokolon) karın arka duvarına asılıdır. Ayrıca pelvis kanalında üreme organları ile komşuluk gösterir (9-11).

1.2. KOLON HİSTOLOJİSİ

Kolon tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika seroza olmak üzere 3 tabakadan oluşur (12).

1.2.1. Tunika Mukoza

Mukoza düzgündür, villus ve Paneth hücreleri bulunmamaktadır (12, 13). Lamina epitelyalite, mitokondriyalardan (14) zengin tek katlı prizmatik epitel hücreleri bulunur. Prizmatik hücreler kısa, düzensiz mikrovilluslara sahip olup, absorbtif özellik taşırlar. Bazı prizmatik hücrelerde salgı granülleri ve salgılarında mikroorganizma invazyonuna karşı koruyucu IgA bulunduğu saptanmıştır (12).

Lamina propria, hücrelerden zengin retiküler bağ dokusu yapısındadır, burada ince bağırsaktaki gibi lenfatik (GALT) nodüller bulunur (15). Bazıları submukozaya kadar girer. Toplam soliter nodül sayısı 2000 kadardır. Lenfatik nodüller ince bağırsaktakilerden daha büyük ve daha çok sayıdadır (12). Lenfoid dokunun oldukça fazla olmasının nedeni kalın bağırsakta aşırı derece yüksek bir bakteri popülasyonu bulunmasıdır (16).

Lamina propriyada yer alan Lieberkühn kripleri ince bağırsaktakilere kıyasla yüzeye dik seyirli (12), daha uzun (17), daha çok sayıda (12) ve daha derinde yer

alırlar (18). Lieberkühn kriptleri pirizmatik epitel hücrelerinden, ağırlıklı olarak goblet hücrelerinden, kök hücrelerden ve aralara serpiştirilmiş olan enteroendokrin hücrelerden oluşmaktadır (19). Kolondan rektuma doğru gittikçe goblet hücre sayısı artar. Bu durum, giderek suyunu kaybeden feçesinin ilerlemesini kolaylaştıran mukus yapımının artışı için gereklidir. Ayrıca bezlerin bazal bölümünde yer alan kök (indiferansiye) hücrelerde bulunan salgı granülleri yukarıya doğru olan göçleri sırasında boşalarak, glikokaliks oluşumuna katılır. Bunun yanında, enteroendokrin hücrelerden L hücreleri enteroglukagon ve entero-kromafin hücrelerde serotonin salgılama görevini yürütürler (12).

Lamina muskularis, lamina propriya ve submukozayı birbirinden ayırır. Bu katman ince bir düz kas dokusu tarafından oluşturulmuştur (20).

Kolonun submukozası, kan, lenf damarları ve sinirleri çepeçevre saran bağ dokusu yapısındadır (20). Damarları destekleme görevi üstlenir (7). İnce bağırsağın submukoza yapısına benzer niteliktedir (12). Submukozada bezler bulunmamasına karşın (21), yağ hücrelerinden zengin bir tabakadır (22).

1.2.2. Tunika Muskularis

Muskularis tabakası longitudinal ve sirküler düz kas demetlerinden oluşur. İnce bağırsaktan farklı olarak dış longitudinal tabaka tenia coli denilen üç adet kalın bant halindedir (16). Tenia kolilerin ve dairesel kas tabakasının kasılmaları, kolonda haustra olarak adlandırılan cecciklerin oluşmasına neden olur (19). Böylelikle kalın bağırsak duvarının dış yüzünün düzgün olmayıp, kabartılı görünmesine yol açar (22).

Bu tabakada yer alan bir diğer yapı ise, gangliyonik pleksuslardır. Miyenterik pleksüs adı verilen (Auerbach) bu yapılar; vagal parasempatik sinirden orijin alır, muskularis eksternanın sirküler ve longitudinal kas tabakaları arasında bulunurlar ve bağırsak motilitesi ile enzim salınımını kontrol ederler (23).

1.2.3. Tunika Seroza

Kolonu saran periton tabakasıdır (6, 21). Apendiks epiploika olarak adlandırılan ve seyrek olarak bulunan yağ dokusu ceccikleri vardır. Bu yapılar, haustra ile birlikte kolonun kendine has bir özelliğini oluşturmaktadır (19). Periton kolonu tümüyle

kuşatmaz, peritonun bulunmadığı alanlardaki en dış tabaka ise adventisya olarak adlandırılır (12).

1.3. KOLON FİZYOLOJİSİ

Besinlerin, ince bağırsaklarda sindirim ve emilimleri tamamlandıktan sonra kalan atıklar, ileumun peristaltik hareketleri yardımı ile ileosekal valvülden kolona geçer. Bu geçen kitle, sindirim atıkları, sindirilmemiş maddeler, sindirim salgıları atıkları ve sudan ibarettir (24). Kolonda, ince bağırsaktan gelen sindirim atıkları solid feçes haline getirilir, depo edilir ve kişi için uygun zaman da dışarı atılır (25).

1.3.1. Motilite

Kolonda su ve elektrolitlerin emilimi ile feçesin depolanması gibi işlevler için fazla harekete gerek olmadığından, ince bağırsağa göre az hareketli olmakla birlikte (26), karıştırıcı (haustrasyon) ve ilerletici hareketler görülür (25).

Karıştırıcı hareketler kolonun sirküler ve longitudinal kaslarının kombine kasılması ile oluşur (27). Bu hareketler haustral kasılma hareketlerinden ibaret olup (24), bazen kolon lümenini tamamen kapatacak kadar daraltır. Kontraksiyon sırasında hareketler anal yöne doğru ilerler. Birkaç dakika sonra da başka bir komşu alanda yeni haustral kasılmalar görülür. Böylece kolondaki fekal madde yavaş yavaş bölünür, yuvarlanır (27) ve kolon yüzeyi ile temasa geçerek su ve elektrolit emilimi sağlanır (28).

Kitle hareketleri (ilerletici), genellikle besinlerin mideye ve duodenuma gelmesi ile oluşan reflekslerle şekillenir (27). Önce kolonun gerilen noktasında bir kasılma halkası oluşur. Bu genellikle kolon transversumda başlar ve daha sonra kolon descendense yayılır (24). Böylelikle fekal materyal tümüyle anal yöne sevk edilir (27-29). Segmental kitlevi hareketlere en çok transvers ve inen kolonda rastlanır (24).

1.3.2. Salgılama

Kolonda fizyolojik olarak musin sekresyonu ile irritasyona karşı elektrolit ve su sekresyonu olmaktadır.

Kolonda bulunan Lieberkühn kriptleri musin salgılayan goblet hücreleriyle döşelidir. Çok sayıda goblet hücresi kript epitel hücrelerinin arasına dağılmıştır (27). Musin, aşağı yukarı izotonik bir salgıdır. Kolon çeperini tahrişlere karşı korur (29), fakat aynı zaman da fekal maddenin birbirine yapışarak şekillenmesini de sağlar (27). Kolonda fermentasyon sonucu oluşan asit ürünleri nötürleştirir (29). Ayrıca, dışkı parçalarının bir araya gelip yapışmasını da kolaylaştırır. Dışkının etrafında bir kat oluşturur. Böylece dışkının iç tarafındaki bakterilerin aktivasyonu ile meydana gelen asitlerin bağırsak duvarına temaslarına engel olur (24).

Kolonun bir segmenti yoğun olarak irrite edildiği zaman musine ek olarak, mukozadan çok miktarda su ve elektrolit salgılanır. Böylece irrite eden faktör sulandırılarak, feçesin hızla anüse hareket ettirilmesi sağlanır. Çok miktarda su ve elektrolit kaybıyla birlikte diyare gelişir ve kişi ortaya çıkabilecek olan hastalıklardan kurtarılır (27).

1.3.3. Emilim

Kolonda meydana gelen emilim, ince bağırsağa oranla daha azdır. İleosekal kapakçığı geçerek kolona gelen kimustaki vücut için gerekli maddelerin büyük bölümü ince bağırsaklarda geri emilmiş durumdadır. Kimusun geri kalan kısmı içindeki su, elektrolit (Na^+ , Cl^-), bazı vitaminler (A, D, E, K) ve safra tuzları da kolonda geri emilirler (28). Potasyum (K^+) ve karbonik asit (HCO_3^-) gibi elektrolitler ise kolon tarafından salgılanır (29, 30). Emilimin çoğu asendens kolonda görülür. Desendens kolon ise depolamadan sorumludur (27).

Su az oranda ince bağırsakta emilse de, asıl emilim yeri kolondur (8). İleumdan kolona günde 500-1500 ml sıvı geçer. Dışkıyla ise dışarı atılan su miktarı günlük 100-200 ml civarındadır. Geri kalan suyun tamamı kolonda emilmektedir (24).

Safra asitlerinin normalde %90-95'i terminal ileumdan emilir, %5-10'u ise kolona geçer ve pasif difüzyonla kolondan emilir (31). Bağırsağa dökülen safranın 1/8-1/9'u dışkıyla atılır. Geri kalan enterohepatik dolaşım ile tekrar karaciğere gelir. Bağırsakta bilirubin ürobilinojene dönüşür. Ürobilinojen, bakteri etkisi ile sterkobilinojene dönüşür ve dışkıyla atılır. Dışkıya rengini verir. Bir kısım ürobilinojen geri emilir ve böbreklerden atılır (26).

1.3.4. Flora

Kolonda çok sayıda bakteri, özellikle de kolon basilleri bulunur (26). Bunlar az miktarda selülozu sindirerek, bu yolla vücuda az da olsa günlük kalori sağlarlar. İnsanda önemli olmamakla beraber, ota beslenen hayvanlara bu enerji çok gereklidir (27).

Kolon bakterileri ince bağırsaklarda spesifik enzimlerinin bulunmaması nedeniyle sindirilmemiş lifli maddelere veya emilmeden kendilerine kadar gelen proteinlere ve karbonhidratlara tesir ederek onları putrefaksiyon (kokuşma, çürüme) ve fermantasyon yolu ile parçalarlar (24). Bakteri etkinliği sonucu oluşan maddeler D vitamini, K vitamini, B12 vitamini, tiyamin ve riboflavin ile karbondioksit, hidrojen ve metan gibi çeşitli kolon gazlarıdır (27). Bakteri sindirimi sonucu meydana gelen gazlar bağırsakları gererek peristaltizmi arttırırlar, bu suretle besin maddelerinin parçalanmasına ve ilerlemesine yardım etmiş olurlar (24).

1.3.5. Dışkı

İnsanda günde 100-150 gr dışkı meydana gelir. Bunun $\frac{3}{4}$ 'ü su, $\frac{1}{4}$ 'ü katı maddedir. Dışkının katı kısmını epitel hücre döküntüleri, yağ, protein, ölü bakteriler, inorganik maddeler, sindirim salgısı atıkları ve sindirilmeyen selüloz oluşturur (25, 32). Ayrıca açlık esnasında da dışkı meydana gelir. Bu durum dışkının sadece atıklardan ibaret olmadığını göstermektedir (28, 30).

1.4. LEPTİN

Leptin, yunanca "Leptos" (ince) kelimesinden türetilmiştir. Ob (obezite) geninin ürettiği, 16 kDa ağırlığında, yağ hücresi tarafından sentezlenen bir hormondur (33). Ob geni tarafından üretildiği için ob proteini de denilmektedir (34). İlk kez 1994 yılında Zhang ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (33).

Leptin geni 7. kromozomun uzun kolunun 3. bölgesinde bulunmaktadır. 15000 baz çifti içeren bir DNA yapısına sahiptir (35, 36). Leptin, 167 aminoasitten oluşan bir proteindir. Bunun 21 aminoasitlik kısmı sinyal zincirini oluşturur. Böylece leptin 146 aminoasitlik bir protein olarak aktif haliyle kanda dolaşır (33).

Organizmada böbrekler tarafından dolaşımdan alınarak idrarla atılır (37). Sağlıklı erişkinlerde plazma leptinin fizyolojik sınırları 5-20 ng/ml düzeyindedir (38-40).

Esas olarak beyaz yağ dokusu tarafından sentezlenen leptin hormonunun, son yıllarda çok düşük seviyelerde olsa da mide epiteli (41, 42), göbek kordonu, plasenta (43-46), kıl folikülü (37), testis, ovaryum (47), kemikiliği (48), iskelet kası ve insan meme epitel hücreleri tarafından da sentezlendiği bildirilmiştir (49, 50). Organizmada üretilen leptin hormonu kanda, serbest ve proteine bağlı olarak iki ayrı şekilde bulunur. Leptin hormonunun aktivasyonundan serbest formun sorumlu olduğu düşünülmektedir (51). Yapılan çalışmalarda obez bireylerde serumdaki leptinin büyük kısmının serbest formda olduğu tespit edilmiştir (51, 52).

Leptinin dolaşımdaki yarı ömrü yaklaşık 30 dakikadır ve pulsatif olarak yemeklerden 2-3 saat sonra salgılanır. Sabah erken saatlerde pik yaparken öğleden sonra en düşük düzeylere iner (53). Serum leptin düzeyi kadınlarda erkeklere oranla daha yüksektir. Bu durum kadınlarda yağ dokusu fazlalığı ve cilt altı yağ oranının daha fazla olması ile açıklanmaktadır (54).

1.4.1. Leptin Reseptörleri

Ob geninin klonlanmasından yaklaşık bir yıl sonra (1995) Tartaglia tarafından leptin reseptörü (obezite reseptörü) tanımlanmıştır. Leptin reseptörü (Lep-R), tip 1 sitokin reseptör ailesine aittir (55). Leptin reseptörlerinin Lep-Ra, Lep-Rb, Lep-Rc, Lep-Rd, Lep-Re ve Lep-Rf olarak adlandırılan altı izoformu bulunmaktadır (56). Bunlardan en uzun olan izoform Lep-Rb, eriyebilir/çözünür izoform Lep-Re, diğer Lep-Ra,c,d,f reseptörleri ise kısa izoformlardır (57). Leptin reseptörlerinin tüm izoformlarında ekstrasellüler leptin bağlama bölgesi vardır ama intrasellüler bölgeleri birbirinden farklıdır. Lep-Re'nin ise transsellüler ve intrasellüler kısımları bulunmaz (56).

Leptin reseptörünün sinyal iletim mekanizmasında, sitoplazmik bir protein kinaz olan Januz kinaz-2 (JAK-2) ile sinyal aktarıcı ve transkripsiyon aktive edici (STAT) proteinler önemli rol oynamaktadır (58, 59). Leptin reseptöre bağlandığında, reseptörün sitoplazmik kısmında bulunan tirozin Y bölgeleri, JAK-2 aracılığıyla fosforlanarak, STAT proteinleri için alanlar oluşturur (39). Bu şekilde STAT proteinleri hem reseptöre hem de dimer oluşturmak üzere başka bir STAT proteinine bağlanır. Fosforilizasyondan sonra bu STAT proteinlerindeki tirozin bölgeleri,

reseptörlerden ve dimerlerden ayrılır. Böylece transkripsiyonel düzenleyici STAT proteinleri aktive olur. Bunlar hücre çekirdeğine taşındıktan sonra, STAT'a yanıt veren duyarlı moleküller vasıtasıyla DNA'ya bağlanırlar ve hedef genlerin transkripsiyonunu uyarırlar (39, 60)

Leptin reseptörleri, başta hipotalamus (61) olmak üzere, kalp, plasenta, akciğerler, karaciğer, kas, böbrekler, pankreas, dalak timus, prostat, testisler, ovaryumlar, ince bağırsaklar ve kolonda (62) gösterilmiş olup, leptin hormonunun enerji regülasyonu (63, 64) üreme (65), anjiyogenezis (66), hematopoesis (67), endokrin sistem (68), beyin gelişimi (69), metabolizma hızının ayarlanması, termoregülasyon, büyüme ve gelişme (70) ile gastrointestinal sistem (71) gibi vücuttaki birçok sisteminin fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bildirilmektedir.

1.4.2. Leptin ve Obezite

Vücut yağ miktarı ile orantılı olarak dolaşımda bulunan leptin hormonu (72), kan beyin bariyerini geçerek hipotalamusa ulaşır ve hipotalamusun ventro-medial nükleusunda bulunan doyma merkezinde, hipotalamik nöropeptid-Y (NPY)'nin sentez ve sekresyonunu inhibe eder. NPY'nin inhibisyonu gıda tüketimini ve kilo alımını azaltırken sempatik sistemi aktive ederek enerji tüketimini artırır (73). Herhangi bir nedenle meydana gelen leptin yetersizliği veya duyarsızlığı, hipotalamusta NPY üretiminin ve salgılanmasının artmasına, aşırı gıda alımına ve obeziteye neden olur (70, 74). Leptin duyarsızlığının nedeni, leptin reseptörlerinde ve post-reseptör fonksiyonunda bir bozukluğun ve/veya leptin hormonunun kan-beyin bariyerini geçişini sağlayan taşıyıcı proteinlerin fonksiyonlarındaki bir aksaklığın şekillenmesidir (75, 76). Dolayısıyla obez insanların yağ doku kitlesi arttıkça, leptin sentezi yükselmekte; doyumluk merkezindeki leptin duyarsızlığına bağlı olarak ise, gıda alımı ve vücut yağ doku kitlesi artmaya devam etmektedir. (77, 78).

Vücut ağırlığında %10 azalma plazma leptin düzeyinde %53 azalmaya karşılık gelirken, vücut ağırlığında %10'luk artışın plazma leptinin de %300 artışa yol açtığı belirlenmiştir (40). Obezlerde plazma leptin düzeyinin artışından yağ dokusu dışında leptin sentezleyen diğer doku ve organların da sorumlu olabileceği düşünülmektedir (37).

1.4.3. Leptin ve Mide Bağırsak Kanalı

Lep-Rb izoformu, yetişkin insanda; mide (42, 79), ince bağırsak (80) ve kolon (62, 81) mukozalarında tanımlanmıştır. İnsan sindirim kanalının gelişim sürecinde mide mukozasından leptin salgılanması, fetusun amniyotik sıvıyı içmesiyle başlar ve salgılanan leptin hormonu sindirim sistemi epitel hücrelerinde lokalize olan lep-Rb'ye bağlanarak sindirim fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynar (82).

Midedeki leptin varlığı ilk kez rat midesinin fundus bölümünün mukoza katmanında gösterilmiş ve insanlarda yapılan sonraki çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Fundus mukozasında, özellikle prensipal hücrelerden olmak üzere (41, 42), az miktarda da pariyetal hücreler tarafından leptin hormonu salgılanmaktadır (79). Prensipal ve pariyetal hücreler tarafından salgılanan ve ekzokrin yolla mide lumenine verilen leptin, mide de gıda alımını ve miktarını kontrol eder (83). Fundus bezleri arasında bulunan endokrin karakterdeki hücrelerden salgılanan leptin ise, endokrin yolla kan dolaşımına geçer ve bağırsak epitel hücrelerinin bazolateral membranlarında lokalize olan leptin reseptörlerine bağlanarak parakrin etki gösterir. Bu durum beslenmeden sonra gözlenen dolaşımda leptin artışını açıklamaktadır (84).

Leptinin, mide üzerinde koruyucu etkisi bulunmaktadır. Sistemik leptin uygulaması, etanol, aspirin veya asetik asitle oluşturulan akut mide lezyonlarına karşı midenin mukozal bütünlüğünü korumaktadır (85). Bununla birlikte leptin hormonu, midenin asit, gastrin ve somatostatin sekresyonlarının kontrolünde görev alır (62, 86, 87). Doğrudan portal dolaşıma verildiğinde ise, mide ve karaciğer arasındaki haberleşmede rol oynadığı ileri sürülmektedir (88).

Mide içeriğinde leptin varlığı, mide bağırsak kanalı boyunca leptin reseptörünün lokalizasyonuna işaret etmektedir (79). Leptin reseptörü ince bağırsaklarda epitel hücrelerinin apikal ve bazal sitoplazması ile bazolateral membranında lokalize olmaktadır (80). Leptin bağırsaktaki leptin reseptörleri aracılığıyla yağ metabolizmasını ve gıdaların emilimini düzenler. Yağ ağırlıklı beslenmelerde leptin, jejunumdaki epitel hücrelerinde hızlı bir şekilde APO-AVI (Apolipoprotein AIV) mRNA transkripsiyonunu düşürerek, Lep-Rb ve STAT5 mekanizmaları aracılığıyla jejunumda yağların sindirimini azaltır (71). Bununla birlikte ekzokrin lipazın sentez ve sekresyonu (89) üzerine etkisiyle lipit sindirimi ve

emiliminini düzenler. Bu şekilde leptin kısa sürede enerji dengesinin korunmasına yardımcı olur. Leptin ayrıca ince bağırsaklarda sodyum-glukoz geçiş aktivitesini engelleyerek, glukozun emilimini hızlı bir şekilde inhibe eder (90). Leptin, proteinlerin emilimi üzerine de düzenleyici etkiye sahiptir. Bağırsak protein taşıyıcısı PepT1'in ve leptin reseptörlerinin, Caco-2 hücre hatlarında ve rat bağırsak mukoza hücrelerinde ekspresyonu bilinmektedir. Bu hücrelerde PepT1 aracılığıyla gerçekleşen bağırsak peptid geçişinin kontrolü apikal leptin ile (gastric leptin) ilişkilidir. Apikal leptin, PepT1 aracılığıyla oligopeptidlerin bağırsaktan emilim hızını artırır (87).

Leptin reseptör immunreaksiyonu, ratların (91), fetal ve yetişkin insanların kolon kript epitel hücrelerinin apikal (62, 82, 91) ve bazolateral membranları (82, 91) ile sitoplazmalarında (62, 82), kobayların ise pleksüs miyenterikuslarında belirlenmiştir (92). Yetişkin insan kolon kript epitel hücrelerinde gözlenen reaksiyonun kriptlerin üst bölümlerinden alt kısımlara kadar uzandığı saptanmıştır (82).

Leptin hormonu kolon fizyolojisi ve patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır. Kolon lumeninde bulunan ekzojen kaynaklı leptin, kolon epitel hücreleri için enerji kaynağı olan butiratın, kolon Caco-2 hücre hatlarında hücre içine alınımını artırır (93). Butirat karbonhidratların ve lifli gıdaların bakteriyel fermentasyonu sonucu kolon mukozasında üretilen, kısa zincirli bir yağ asididir (94) ve hücre siklusunu kontrol eden anahtar proteinleri düzenleyerek hücre çoğalmasını inhibe eder, apoptozisi indükler (95). Bu bulgulara benzer olarak leptinin normal kolon dokusunun özellikle distal bölümünde mitoz aktiviteyi azalttığı (96) azoxymetan ile oluşturulan ilk kanserojen lezyonların gelişimini baskıladığı bildirilmiştir (91). Yapılan diğer çalışmalarda ise aksine leptin hormonunun hem normal hem de kolon kanser hücrelerinde hücre çoğalmasını indüklediği (62), apoptozisi inhibe ettiği ifade edilmiştir (97).

Leptin kolonda mukus salınımını uyarır ve musin gen ekspresyonunu arttırarak goblet hücrelerinde tekrar intraselüler musin depolanmasına yardımcı olur. Böylelikle kolon epitel hücrelerinin yüzeyinde bir bariyer oluşturan mukusun fizyolojik savunma fonksiyonuna katkıda bulunur (98). Ayrıca leptin, anjiyogenesi uyarır (99) ve kolon anastomozlarının iyileşmesini hızlandırır bu yüzden de kolorektal cerrahide güvenli olarak kullanılabilir (100).

1.4.4. Leptin ve Östrojen

Östrojen ve leptin arasındaki ilişki beslenme ve kilo alımının kontrolünde önemli bir role sahiptir. Östrojen reseptörü yağ dokuda lokalize olarak östrojen hormonunun lipolitik etkilerine arabuluculuk etmekte (101) ve obez (ob) gen transkripsiyonunu etkileyerek leptin hormonunun üretimini artırır (102). Kadınlarda da menopoza birlikte, vücut ağırlığında (103) ve vücut yağ dağılımında bazı değişiklikler meydana gelmektedir (104). Benzer olarak ratlarda ovariektomiye takiben gıda alımının artması ve spontan fiziksel aktivitenin azalması sonucu, vücut ağırlığının özellikle de yağ doku miktarının arttığı ve vücut ağırlığındaki bu artışın östrojen verilmesiyle baskılanabileceği saptanmıştır (105-107). Östrojen yetersizliği sonucu oluşan bu kilo artışının, merkezi leptin duyarsızlığı ve aşırı NPY üretimine bağlı olarak ortaya çıktığı ifade edilmektedir (107). Kedi (108) ve köpeklerde (109) ise, ovariektomiye izleyen süreçte gıda alımının artmasına bağlı olarak vücut ağırlığında çoğunlukla da vücut yağında artış gözlenmiştir. Bu nedenle kedi ve köpeklerde ovariektomi obezitenin şekillenmesinde önemli bir faktör olarak görülmüş ve daha çok diyetle ayarlamalar yapılarak bu sorun ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır.

Kadınlarda menopoz sonrası dönemde serum leptin düzeyinde de bazı değişiklikler gözlenmektedir. Postmenopozal dönemdeki kadınlarda serum leptin konsantrasyonu, premenopozal dönem kadınlardan daha düşüktür (110, 111). Ayrıca premenopozal dönem kadınların, erkeklerden ve postmenopozal dönem kadınlardan; postmenopozal kadınların ise, erkeklerden daha yüksek serum leptin düzeyine sahip oldukları (110) ve östrojenin leptin üretiminde rolü olduğu bildirilmiştir (112).

Yapılan çeşitli çalışmalarda leptin ve reseptörünün kalın bağırsak fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir role sahip olduğu, menapoz sonrası dönemde bazı bayanlarda konstipasyon (113, 114), inflamatuvar bağırsak hastalığı (115) ve kolon kanserine yatkınlık (116-119) gibi gastrointestinal komplikasyonların gözlemlendiği bilinmektedir. Kolon fonksiyonlarının düzenlenmesinde östrojen hormonu ve leptin reseptörü arasındaki ilişki açık değildir. Bu sebeple, ovariektomi sonrası hayvanlarda ve postmenapozal dönemde bayanlarda steroid hormonlarının özellikle östrojen hormonunun seviyesindeki azalmaya bağlı olarak; kolonda lokalize olan leptin reseptörlerinin ekspresyon derecesinin değişeceğini, dolayısıyla reseptör sinyal iletiminde meydana gelen bu değişikliğin, kolonun histofizyolojik fonksiyonlarını

etkileyebileceğini ve kalın bağırsak rahatsızlıklarının şekillenmesine öncülük edebileceğini düşünmekteyiz.

2- GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Hayvan

Araştırmada Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Deney Hayvanları Ünitesinden elde edilen 6 aylık, 36 adet Sprague Dawley ırkı dişi rat kullanıldı. Araştırma öncesi ratlara genel anestezi (21,1 mg/kg ketamin ve 4,2 mg/kg ksilazinin i.p.) altında overiektomi yapıldı. Anestezi uygulandıktan sonra ratların alt abdomen bölgesi traş edilerek ensizyonla batına girildi. Fallop tüpleri ve ovaryumlar bulundu ve 2.0 ipek iplik ile bilateral tüpler bağlanarak ovaryumlar çıkarıldı. Ratlara operasyon sonrası beş gün 60 000 IU/gün Penisilin G (Pfizer) kas içi uygulandı.

Tablo 2.1. Araştırmada kontrol ve östrojen grubu ratlara uygulanan deneysel prosedür.

Grup	Alt grup	Uygulama	Deneyin Sonlandırılması
Kontrol	K18	0.2 ml/rat susam yağı	Uygulama sonrası 18. saat
	K90	0.2 ml/rat/gün susam yağı (3 gün)	Son uygulamadan 18 saat sonra
	K162	0.2 ml/rat/gün susam yağı (6 gün)	Son uygulamadan 18 saat sonra
Östrojen	Ö18	25 µg/rat/gün 17 β-östrodiol	Uygulama sonrası 18. saat
	Ö90	25 µg/rat/gün 17 β-östrodiol (3 gün)	Son uygulamadan 18 saat sonra
	Ö162	25 µg/rat/gün 17 β-östrodiol (6 gün)	Son uygulamadan 18 saat sonra

Ovariektomiden bir hafta sonra ratlar kontrol (n=18) ve östrojen (n=18) olmak üzere iki ana gruba ayrıldı. Östrojenin süreye bağımlı etkisini değerlendirmek için 18. saat östrojen grubu (Ö18), 90. saat östrojen grubu (Ö90), 162. saat östrojen grubu (Ö162); benzer şekilde kontrol grubu da 18. saat kontrol grubu (K18), 90. saat kontrol grubu (K90), 162. saat kontrol grubu (K162) olmak üzere 3'erli alt gruplara ayrıldı.

Gruplara uygulanan deney protokolü tablo 2.1'de özetlenmiştir. Buna göre; Birinci kontrol grubuna tek doz 0.2 ml/rat susam yağı i.m. uygulandı (K18).

İkinci kontrol grubuna üç doz 0.2 ml/rat/gün susam yağı i.m. uygulandı (K90).
 Üçüncü kontrol grubuna altı doz 0.2 ml/rat/gün susam yağı i.m. uygulandı (K162).
 Birinci östrojen grubuna tek doz 25 µg/rat/gün 17 β-östrodiol i.m. uygulandı (Ö18).
 İkinci östrojen grubuna üç doz 25 µg/rat/gün 17 β-östrodiol i.m. uygulandı (Ö90).
 Üçüncü östrojen grubuna altı doz 25 µg/rat/gün 17 β-östrodiol i.m. uygulandı (Ö162).

Gruplarda ratlar genel anesteziye alındıktan sonra etik kurallara uygun olarak boyun eklemlerinden disloke edilerek öldürüldü. Batın açılarak kolon dokusundan örnekler alındı

2.1.2. Cihazlar

Etüv	(Nüve EN 500)
Parafin tankı	(Lecia E61120)
Mikrotom	(Leica RM2155)
Su banyosu	(Lecia HI1210)
Mikrodalga fırın	(Arçelik İnterwire)
Buz dolabı	(Indesit S46)
Mikroskop	(Olympus CX41)
Fotoğraf makinesi	(Olympus L-5060)
Hassas terazi	(Precisa XB220A)
Ph metre	(inoLab WTW Series)

2.1.3. Tespit ve Doku Takibinde Kullanılan Kimyasallar

Kimyasallar %37'lik Formaldehit	Merck
Sodium dihidrojen fosfat	Merck
Disodium hidrojen fosfat	Merck
%100 Alkol	Merck
%96 Alkol	Tekel
%80 Alkol	Tekel
%70 Alkol	Tekel
%50 Alkol	Tekel
Xylene	Merck

Distile Su	
Parafin (56°C-58°C)	Merck
Poly lisine	Sigma

2.1.3.1. Tespit ve Doku Takibinde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanışı

Nötr Formol Tespit Solüsyonu

%37 Formaldehit	100 ml
Distile su	900 ml
Sodium dihidrojen fosfat	4 gr
Disodium hidrojen fosfat	4,5 gr

%80 Alkol

%96 Alkol	80 ml
Distile Su	16 ml

%70 Alkol

%96 Alkol	70 ml
Distile Su	26 ml

%50 Alkol

%96 Alkol	50 ml
Distile Su	46 ml

2.1.4. İmmunohistokimyasal Yöntemde Kullanılan Gereçler

İmmunohistokimyasal yöntem olarak İndirekt Streptavidin-Biotin Peroksidaz yöntemi uygulandı.

Antijen retrieval için (Zymed Laboratories Inc. 00-5000, 20x konsantre) sitrat buffer solüsyonu,

Endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için metanol ile hazırlanmış %35'lik hidrojen peroksid solüsyonu,

Antikor dilüent (Zymed 00-3118) solüsyonu,

Primer antikor (Ob-R) (Santa Cruz Biotechnology M-18, sc-1834 goat poliklonal antikor),

Sekonder antikor olarak ise biyotinlenmiş anti-rabbit, anti-mouse ve anti-goat immunglobulin; (LSAB + Kit, HRP) (Universal Dakocytomation LSAB[®] + Kit, Peroksidase K0690),

Enzim olarak taşıyıcı protein ve antimikrobiyel ajan içeren PBS'de streptavidin ile konjuge edilmiş Horseradish Peroxidase enzimi (LSAB + Kit, HRP) (Universal Dakocytomation LSAB[®] + Kit, Peroksidase K0690),

Substrat-kromojen (Zymed 00-2020 DAB 3-3 diaminobenzidin) solüsyonu,

Yıkama solüsyonu olarak PBS (Zymed 00-3002).

2.1.4.1. İmmunohistokimyasal Yöntemde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanışı

Sitrat Buffer Solüsyonu

Konsantre Sitrat Buffer solüsyonu distile su ile 20 kat sulandırıldı.

Hidrojen Peroksit - Metanol Solüsyonu

1 ml %35'lik hidrojen peroksit + 9ml metanol (best kimyasalları) karıştırıldı.

Primer Antikor (Ob-R)

1:25 oranında antikor dilüent solüsyonu ile dilue edildi

Substrat- Kromojen Solüsyonu

1 ml distile suya DAB (Zymed 00-2020) 3-3 diaminobenzidin'in 1, 2, 3 nolu solüsyonlarından birer damla damlatılarak hazırlandı.

Haris Hematoksilen

Hematoxylin crystals.....	5.0 gm
Alcohol, 100%.....	50.0 ml
Potasyum alum.....	100.0 gm
Distilled water	1000.0 ml
Mercuric oxide (red).....	2.5 gm

Hematoksilen alkol içinde; potasyum alum sıcak distile su içinde eritildi. Isıtma işlemi bırakılarak iki solusyon karıştırıldı ve bu karışımın hemen kaynama noktasına gelmesi sağlandı. Daha sonra karışım ateşten alınıp üzerine yavaşça civa oksit ilave edildi. Su içerisinde menekşe mor rengi alana kadar soğutularak boya hazır hale getirildi (120).

2.2. Yöntem

2.2.1. Dokuların Alınması

Hayvanlar genel anestezi altında servikal dislokasyon yöntemiyle öldürüldükten sonra, batin uygun şekilde açılarak kolondan 2-3 cm'lik örnekler alındı ve serum fizyolojik solüsyonu ile yıkandı.

2.2.2. Tespit, Doku Takibi ve Kesit Alma

Dokular %10'luk nötür formolde 72 saat tespit edildi. Dokular bir gece akarsuda yıkandıktan sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek, suyu giderildi (Dehidratasyon).

%50 Alkol X 1saat

%70 Alkol X 1saat

%80 Alkol X 1saat

%96 Alkol X 1saat

%100 Alkol X 1saat

%100 Alkol X 1saat

Xylol'de Parlatıldı

Xylol 1 X 1 Saat

Xylol 2 X 1 Saat

Xylol 3 X 1 Saat

56°C-58°C'de eriyen parafinin xylol ile yer değiştirerek dokuya nüfuz etmesi sağlandı.

Xylol/Parafin (1:1) X 1 saat

Parafin 1 X 1 saat

Parafin 2 X 1 saat

Dokular Parafine gömüldü

Mikrotom ile 4-5 µ kesitler alındı

Poly lisine kaplı lamlara çekildi

2.2.3. İmmunohistokimyasal Boyama

Xylol ile parafini giderilen ve dereceli alkollerden geçirilen doku kesitleri distile suda bekletildi.

İndirek streptavidin peroksidaz yöntemi kullanılarak immunohistokimya boyaması yapıldı.

Xylol 3x5 dk

%100 Alkol 2x3 dk

%96 Alkol 3 dk

%80 Alkol 3 dk

%70 Alkol 3 dk

%50 Alkol 3 dk

Distile Su 2x3 dk bekletildi.

1- Antijen retrieval (antijenlerin açığa çıkarılması)

Antijen retrieval için preparatlar, distile su ile 20 kat konsantre edilmiş sitrat buffer solüsyonuna alındı ve 700°C'lik mikrodalga fırında 5'er dakikalık sürelerde 5 kez (5 X 5) tutuldu.

2- Preperatların Soğutulması

Mikrodalga fırından çıkarılan preparatlar soğutulmak amacıyla oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi.

3- PBS ile Yıkama

Preparatlar PBS ile 3 X 5 dakika yıkandı.

4- Endojen peroksit aktivitesini giderilmesi

Endojen peroksit aktivitesini gidermek için, %10'luk H₂O₂ ile preparatlar 10 dakika inkübe edildi.

5- PBS ile Yıkama

Preparatlar PBS ile 3 X 5 dakika yıkandı.

6- Kesitlerin Etrafının Sınırlandırılması

Lamin üzerindeki kesitlerin etrafı pap pen ile çizildi.

7- Antikor Dilüsyonu

Anti-goat poliklonal Ob-R primer antikor, antibody dilüent (Zymed) ile 1/25 oranında dilüe edildi.

8- Preparatlara Antikor Uygulaması

Normal preparatlara 1/25 oranında sulandırılmış primer antikor (Santa Cruz) negatif kontrol preparatlarına ise PBS konuldu.

9- İnkübasyon

Prepatlar nemli ortamı sağlayan bir kap içerisine yerleştirilerek + 4 °C'de 1 gece (18 saat) inkübe edildi.

10- PBS ile Yıkama

Preparatlar PBS ile 3 X 5 dakika yıkandı.

11- Sekonder Antikor Uygulaması

Preparatlar biotinlenmiş sekonder antikor (DAKO kit) ile oda sıcaklığında 25 dakika inkübe edildi.

12- PBS ile Yıkama

Preparatlar PBS ile 3 X 5 dakika yıkandı.

13- Horseradish Peroxidase Enzim Uygulaması

Streptavidin-HRP (DAKO kit) ile preparatlar oda sıcaklığında 25 dakika inkübe edildi.

14- PBS ile Yıkama

Preparatlar PBS ile 3 X 5 dakika yıkandı.

15- Substrat-Kromojen Uygulaması

Preparatlar DAB substrat-kromojen solüsyonunda (Zymed) 3 dakika tutuldu.

16- Distile Su ile Yıkama

Distile su ile yıkandı.

17- Zıt boyama

Boyama öncesinde preparatlar distile su içinde 5 dakika tutuldu
Harris Hemotoksilen ile 25 saniye zıt boyama yapıldı.

18- Akarsu ile yıkama

5 dk akarsu altında yıkandı

19- Distile suda yıkandı

5 dk Distile su ile yıkandı

20- Alkol Serilerinden Geçirilmesi

% 96 Alkol 2 X 3 dk

%100 Alkol 2 X 3 dk

21- Ksilolde Parlatılma

Xylol 1 X 5 dk

Xylol 2 X 10 dk

Xylol 3 X 15 dk

22- Kapatma

Boyanan kesitler entellan ile kapatıldı.

2.3. Değerlendirme

İmmunohistokimyasal değerlendirme iki bağımsız gözlemci tarafından; hedef dokunun boyanıp boyanmamasına, boyamanın hedef dokudaki dağılımına, boyamanın karakterine (nükleer yada sitoplazmik) ve oluşan boyanma yoğunluğuna bakılarak yapıldı. Değerlendirme, iki bağımsız gözlemci tarafından; boyanmama (-), zayıf boyanma (+), orta şiddette boyanama (++) , şiddetli boyanma (+++) özelliklerine göre 0'dan 3'e kadar değerler verilerek yapıldı (62, 121).

2.4. İstatistiksel Analiz

İmmunohistokimyasal değerlendirme sonucu elde edilen verilerin ortalama ve standart hata değerleri bulunarak gruplar arasındaki farklılıkların istatistiki açıdan önem gösterip göstermediği belirlendi. Östrojen ve kontrol gruplarının verileri non-parametrik Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Güven düzeyini göstermede $p \leq 0.05$ için *, $p \leq 0.01$ için ** simgeleri kullanıldı. Çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 10.0 (Statiscal Package For Social Sciences) programı kullanılarak yapıldı.

3- BULGULAR

3.1. Kolondaki Lep-R'nin İmmunohistokimyasal Skorlama Sonuçları

Parafin bloklardan alınan 4-5 mikronluk kesitlerde, leptin reseptör ekspresyonu indirek Streptavidin-Biotin Peroksidaz yöntemi ile boyanarak gösterildi. Kontrol ile östrojen gruplarının kolon kesitleri incelendiğinde; kript epitel hücrelerinde ve pleksüs miyenterikuslarda sitoplazmik tarzda ekspresyon saptandı. Ayrıca lamina propria içerisindeki bağ doku hücrelerinde de leptin reseptör ekspresyonu gözlenmesine rağmen goblet hücrelerinde ekspresyon saptanmadı (Şekil 3.3, 3.4, 3.16).

Leptin reseptör ekspresyonu, kontrol gruplarında, sadece kriptlerin üst kısımlarındaki epitel hücrelerinde gözlenirken (Şekil 3.15), östrojen gruplarında kriptlerin üst bölümlerinden alt kısımlara kadar uzandığı belirlendi. Ayrıca reaksiyon şiddetinin, kriptlerin üst kısımlarından alt kesimlere doğru azaldığı gözlemlendi (Şekil 3.11).

18 saatlik kontrol ve östrojen gruplarının kolon kript epitel hücrelerinde orta şiddette bir immunreaksiyon belirlendi (Şekil 3.3, 3.4, 3.5, 3.6). İmmunreaksiyon şiddeti yönünden K18 ve Ö18 grupları arasında istatistiki bir fark saptanmadı (Tablo 3.1). K18 grubunda pleksüs miyenterikuslarda leptin reseptör ekspresyonu gözlenmezken, Ö18 grubunda zayıf ile orta şiddette değişen bir immunreaksiyon saptandı (Şekil 3.7, 3.8). Gruplar arasında $p<0.01$ düzeyinde istatistiki bir önem belirlendi (Tablo 3.1), (Şekil 3.2).

K90 grubunda, kolon kript epitel hücreleri zayıf ya da orta şiddette boyanırken (Şekil 3.9, 3.10), Ö90 grubunda kript epitel hücrelerinin orta ya da şiddetli boyandığı gözlemlendi (Şekil 3.11, 3.12). Kontrol ve östrojen grupları arasında immunreaksiyonun şiddeti bakımından $p<0.05$ düzeyinde istatistiki önem saptandı (Tablo 3.2), (Şekil 3.1). Kontrol grubundaki pleksüs miyenterikuslarda negatif immunreaksiyon gözlenirken (Şekil 3.13), östrojen grubundaki pleksüs miyenterikuslarda zayıf bir immunreaksiyon saptandı (Şekil 3.14). İmmunreaksiyon şiddeti yönünden K90 ve Ö90 grupları arasında $p<0.01$ düzeyinde önem belirlendi (Tablo 3.2), (Şekil 3.2).

K162 ile Ö162 grupları incelendiğinde; K162 grubu ratların kolon kript epitel hücrelerinde zayıf immunreaksiyon gözlenirken (Şekil 3.15, 3.16), Ö162 grubunda

kript epitel hücrelerinin, orta şiddette boyandığı belirlendi (Şekil 3.17, 3.18). Kontrol ve östrojen grupları arasında immunreaksiyonun şiddeti bakımından $p<0.01$ düzeyinde istatistiki önem saptandı (Tablo 3.3), (Şekil 3.1). Kolonların pleksüs miyenterikusları kontrol grubunda negatif olarak boyanırken (Şekil 3.19), Ö162 grubunda ise zayıf immunreaksiyon gözlemlendi (Şekil 3.20) ve gruplar arasında reaksiyonun şiddeti yönünden istatistiki bir fark saptanmadı (Tablo 3.3).

Tablo 3.1. Kontrol ve östrojen gruplarındaki ratlarda, 18.saatte; kolonun kript epiteli ve pleksüs miyenterikuslarında Lep-R'nin immunohistokimyasal skor değerlerinin ortalaması (Mean±SE)

	Kontrol 18. Saat (K18)	Östrojen 18. Saat (Ö18)	P-değeri
Kript Epiteli	1.67±0.21	2.17±0.17	0.092
Pleksüs Miyenterikus	0.00±0.00	1.33±0.21	0.002**

K18, Ov ratlara tek doz 0.2 ml susam yağı uygulandı.

Ö18, Ov ratlara 17 β -estrodol (25 μ g/rat/gün i.m) dozunda bir gün uygulandı.

** : Gruplar arasında $P<0.01$ oranında fark belirlendi (n=6).

Tablo 3.2. Kontrol ve östrojen gruplarındaki ratlarda, 90.saatte; kolonun kript epiteli ve pleksüs miyenterikuslarında Lep-R'nin immunohistokimyasal skor değerlerinin ortalaması (Mean±SE)

	Kontrol 90. Saat (K90)	Östrojen 90. Saat (Ö90)	P-değeri
Kript Epiteli	1,66±0,21	2,50±0,22	0.030*
Pleksüs Miyenterikus	0.00±0.00	0,66±0,21	0.019**

K90, Ov ratlara üç doz 0.2 ml susam yağı uygulandı.

Ö90, Ov ratlara 17 β-estrodol (25 µg/rat/gün i.m) dozunda üç gün uygulandı.

*:Gruplar arasında P<0.05 oranında fark belirlendi (n=6).

** : Gruplar arasında P<0.01 oranında fark belirlendi (n=6).

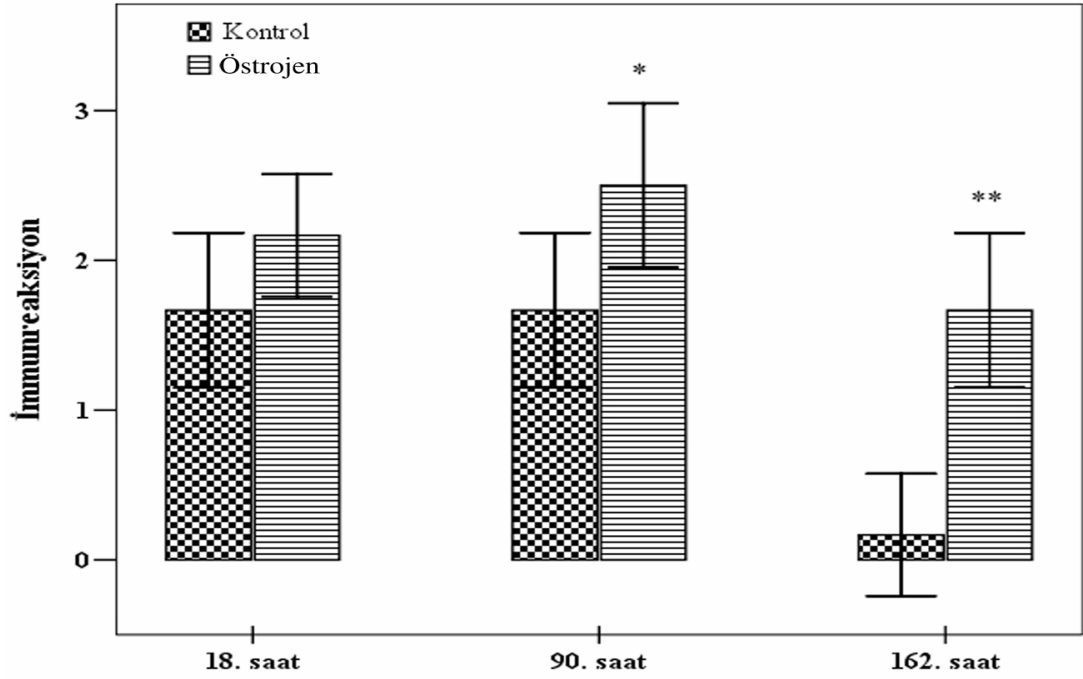
Tablo 3.3. Kontrol ve östrojen gruplarındaki ratlarda, 162.saatte; kolonun kript epiteli ve pleksüs miyenterikuslarında Lep-R'nin immunohistokimyasal skor değerlerinin ortalaması (Mean±SE)

	Kontrol 162. Saat (K162)	Östrojen162.Saat (Ö162)	P-değeri
Kript Epiteli	0,16 ± 0.16	1,66 ± 0.21	0.004**
Pleksüs Miyenterikus	0.00 ± 0.00	0.33 ± 0.21	0.138

K162, Ov ratlara üç doz 0.2 ml susam yağı uygulandı.

Ö162, Ov ratlara 17 β-estrodol (25 µg/rat/gün i.m) dozunda altı gün uygulandı.

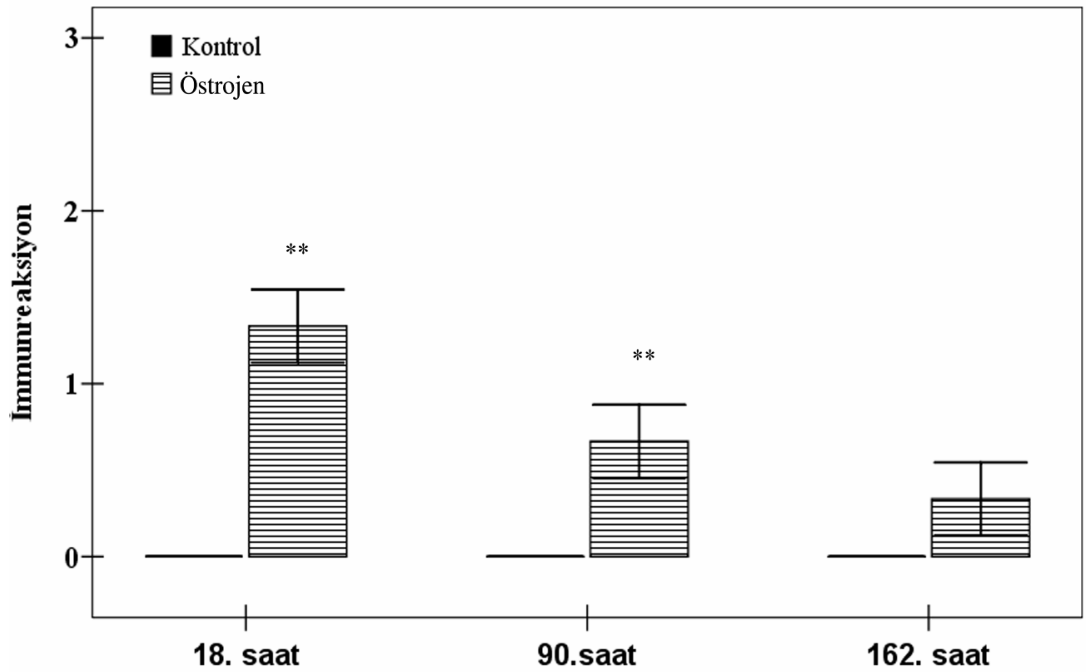
** : Gruplar arasında P<0.01 oranında fark belirlendi (n=6).



Şekil 3.1. Kolonun kript epitellerinde leptin reseptör immunreaksiyonu.

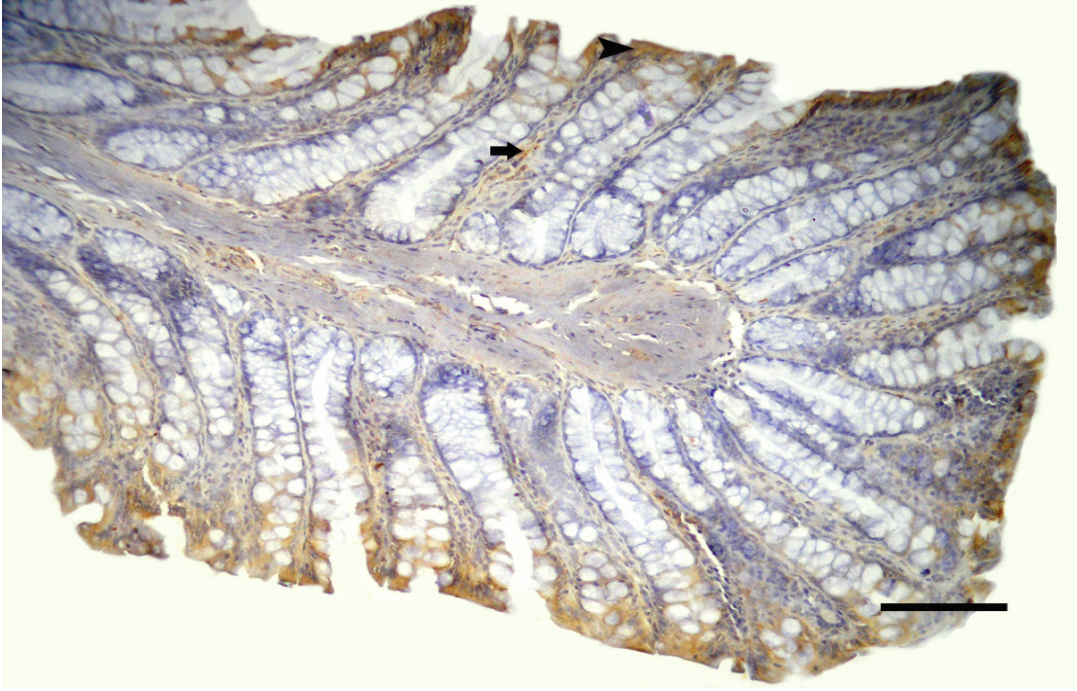
*: 90. saatte kontrol ve östrojen grupları arasında $P < 0.05$ oranında fark belirlendi.

** : 162. saatte kontrol ve östrojen grupları arasında $P < 0.01$ oranında fark belirlendi.

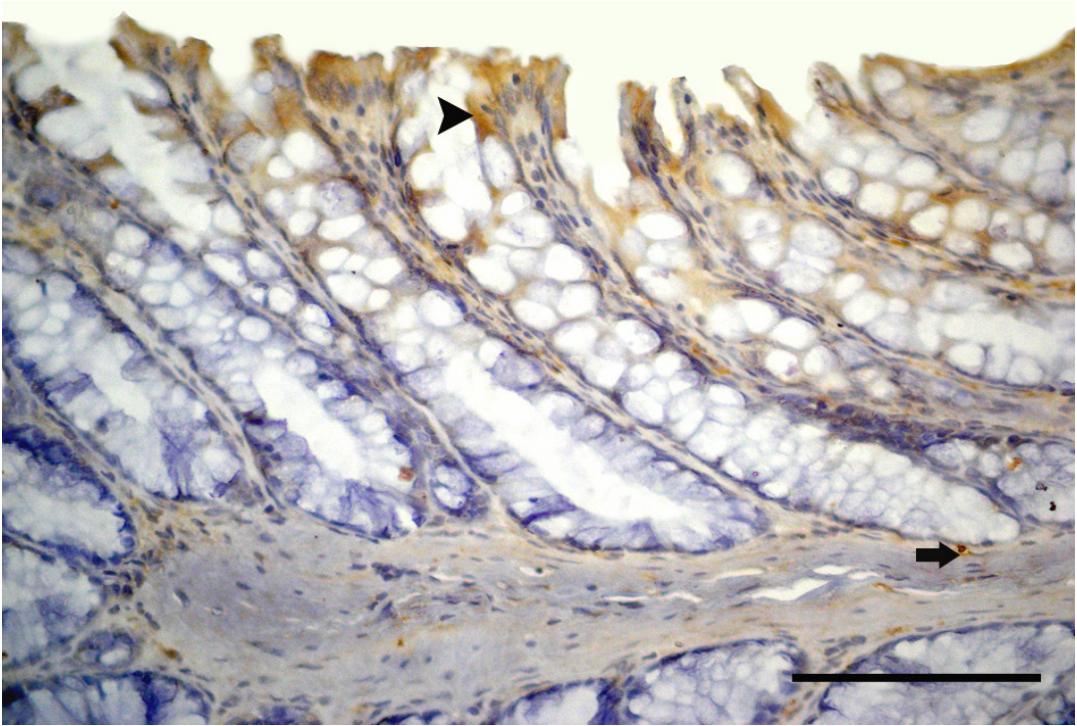


Şekil 3.2. Kolonun pleksüs miyenterikuslarında leptin reseptör immunreaksiyonu

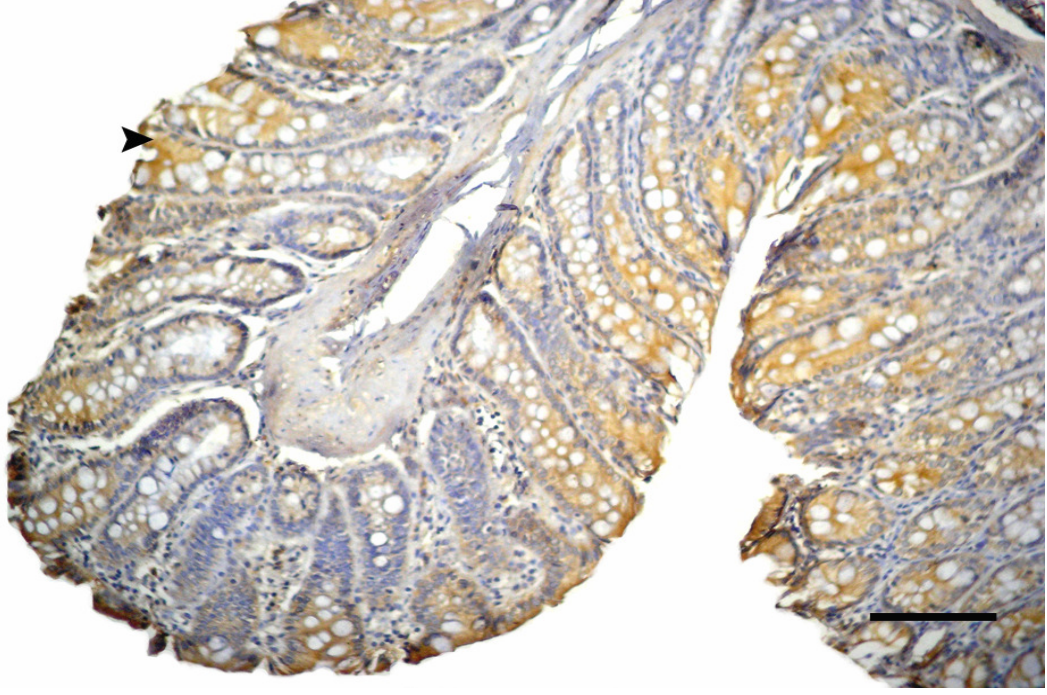
** : 18. ve 90. saatlerde kontrol ve östrojen grupları arasında $P < 0.01$ oranında fark belirlendi.



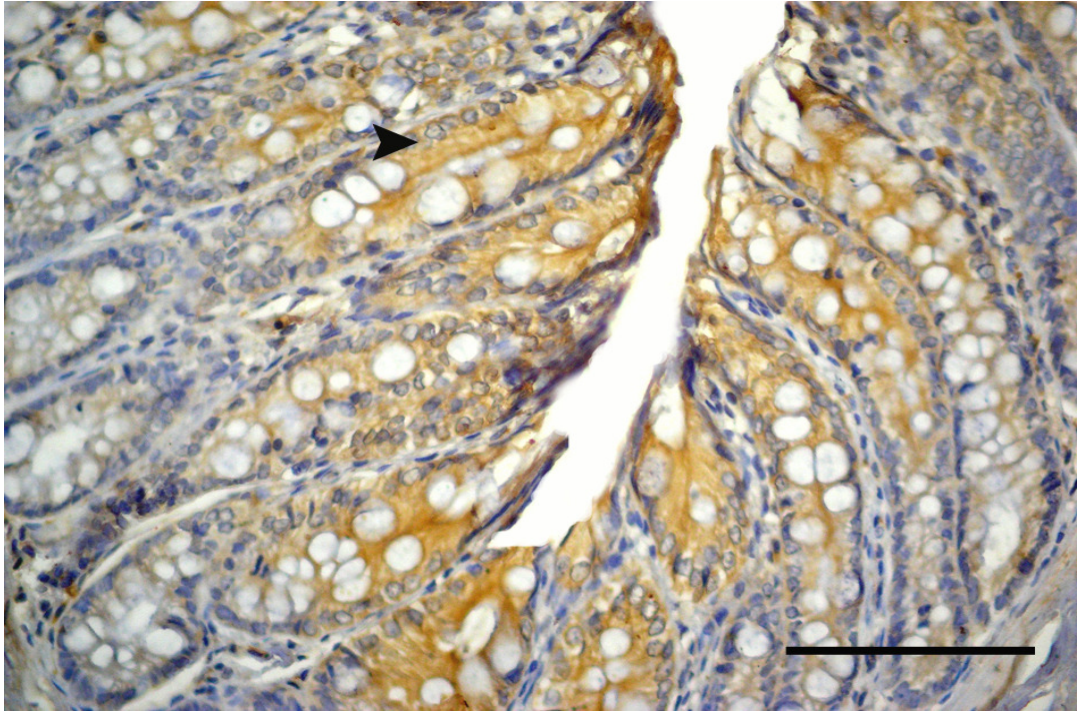
Şekil 3.3. Kolon kript epitel (ok başı) ve bağ doku (ok) hücrelerinde orta şiddette Lep-R immunreaksiyonu, (K18), SBP, 1 bar = 100 mikron.



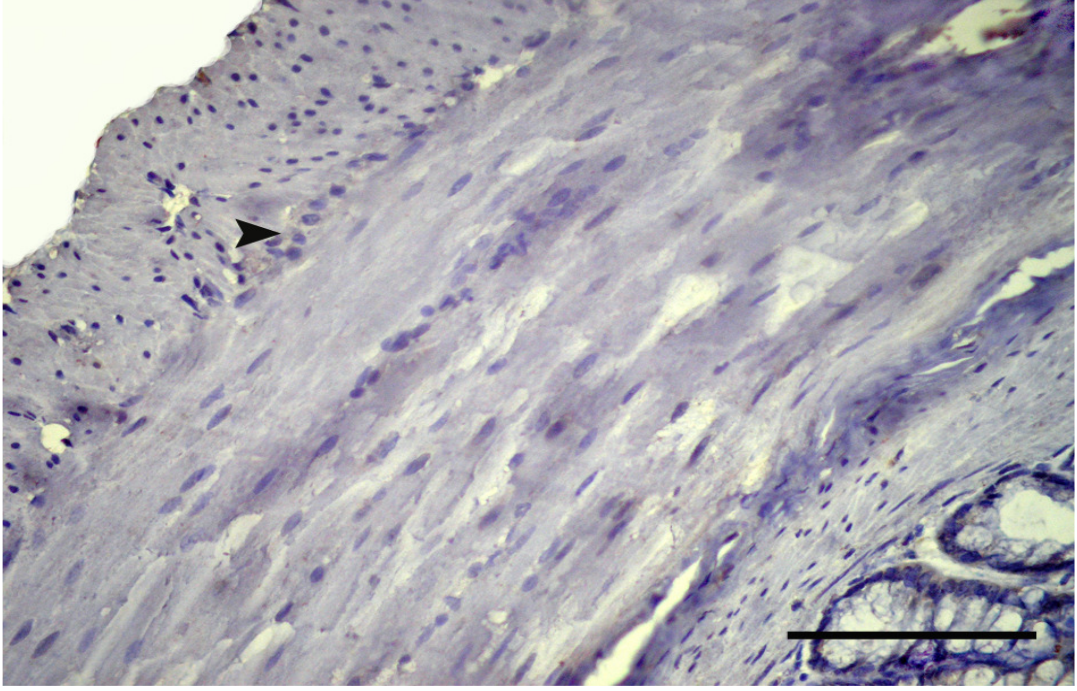
Şekil 3.4. Kolon kript epitel (ok başı) ve bağ doku (ok) hücrelerinde orta şiddette Lep-R immunreaksiyonu, (K18), SBP, 1 bar = 100 mikron.



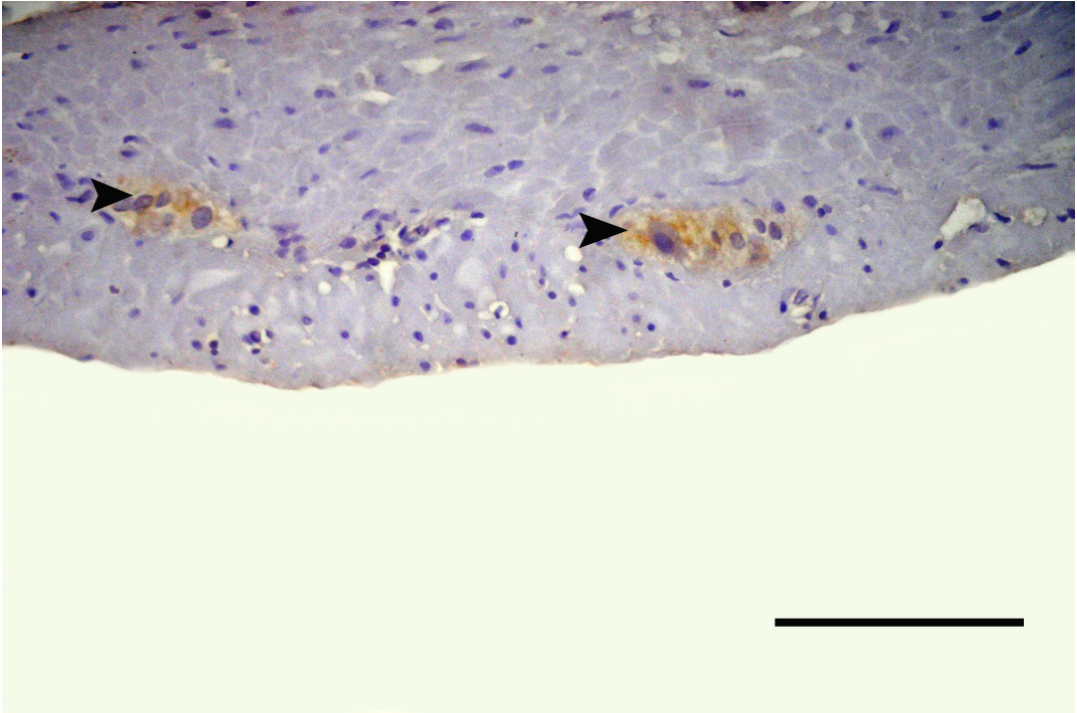
Şekil 3.5. Kolon kript epitel hücrelerinde (ok başı) orta şiddette Lep-R immunreaksiyonu, (Ö18), SBP, 1 bar = 100 mikron.



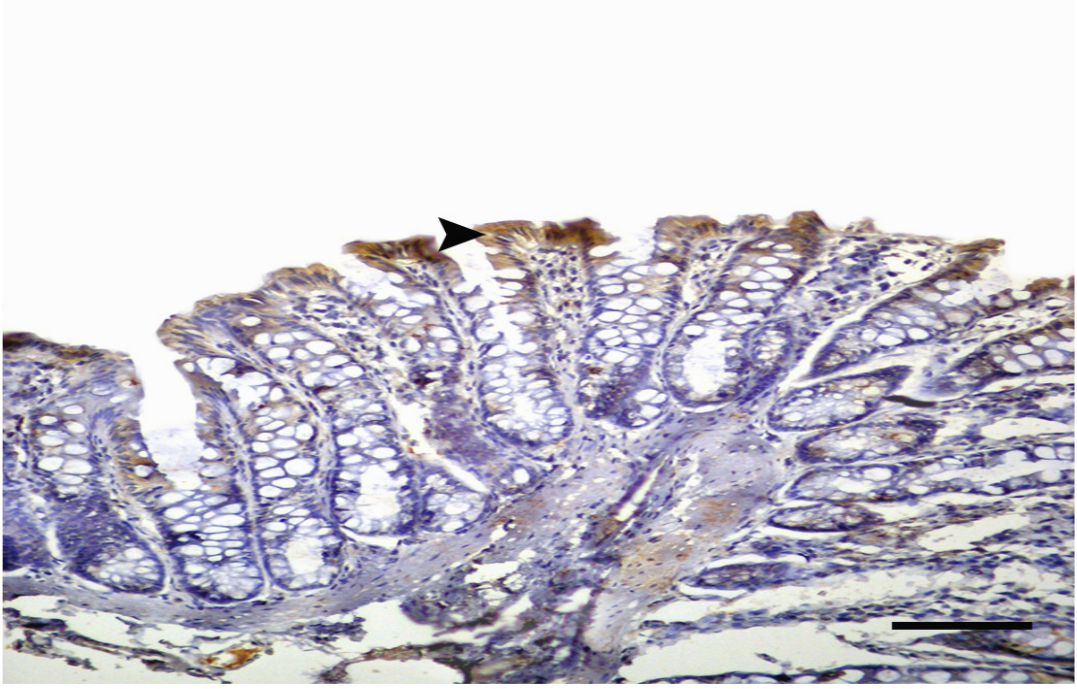
Şekil 3.6. Kolon kript epitel hücrelerinde (ok başı) orta şiddette Lep-R immunreaksiyonu, (Ö18), SBP, 1 bar = 100 mikron.



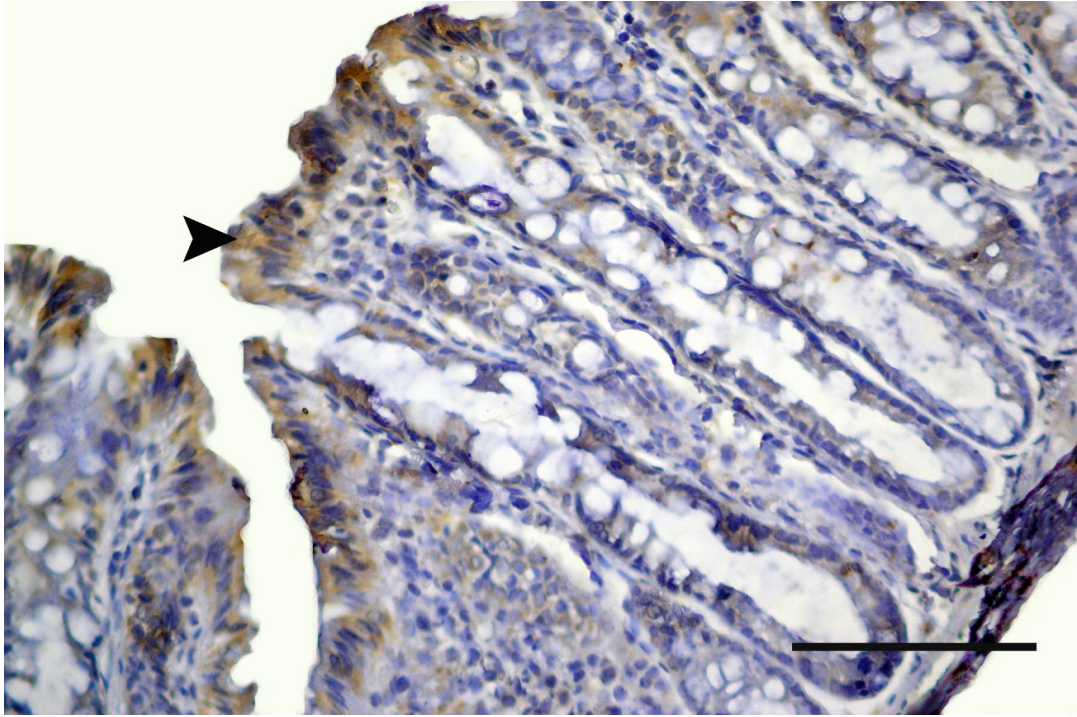
Şekil 3.7. Kolon pleksüs miyenterikusunda (ok başı) negatif Lep-R immunreaksiyonu, (K18), SBP, 1 bar = 100 mikron.



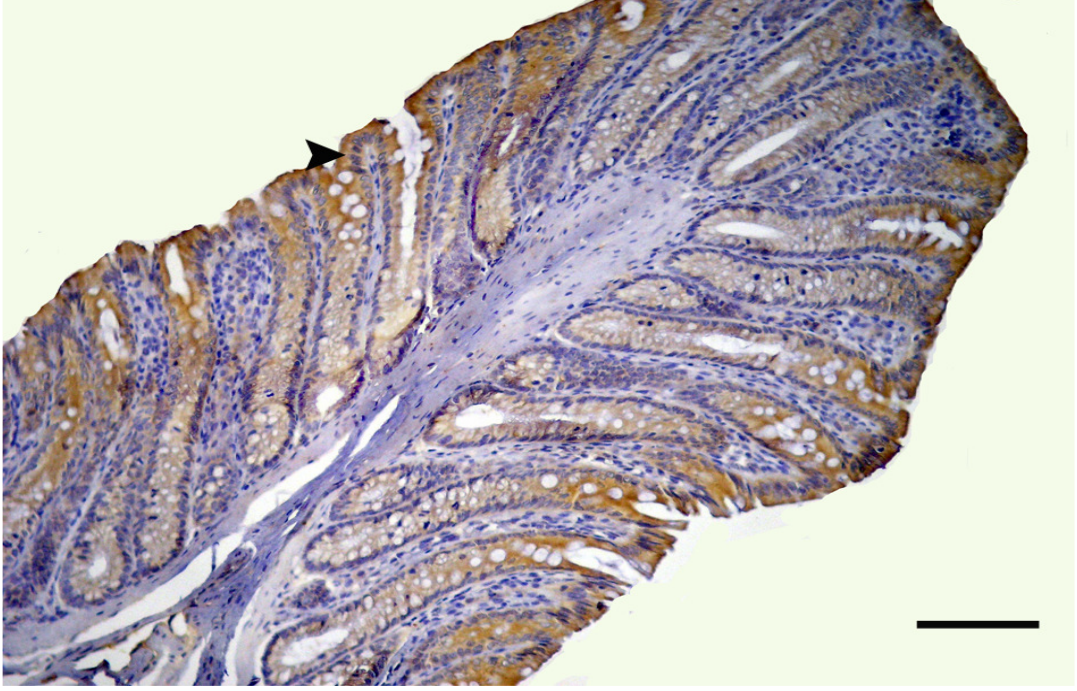
Şekil 3.8. Kolon pleksüs miyenterikusunda (ok başı) orta şiddette Lep-R immunreaksiyonu, (Ö18), SBP, 1 bar = 100 mikron.



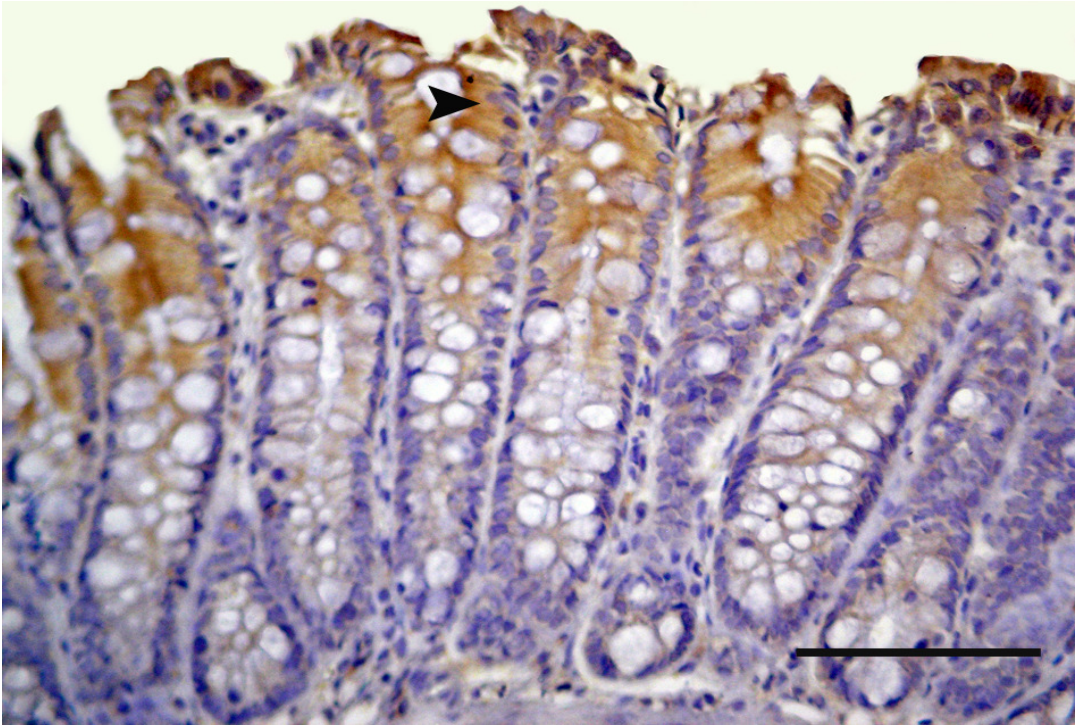
Şekil 3.9. Kolon kript epitel hücrelerinde (ok başı) orta şiddette Lep-R immunreaksiyonu, (K90), SBP, 1 bar = 100 mikron.



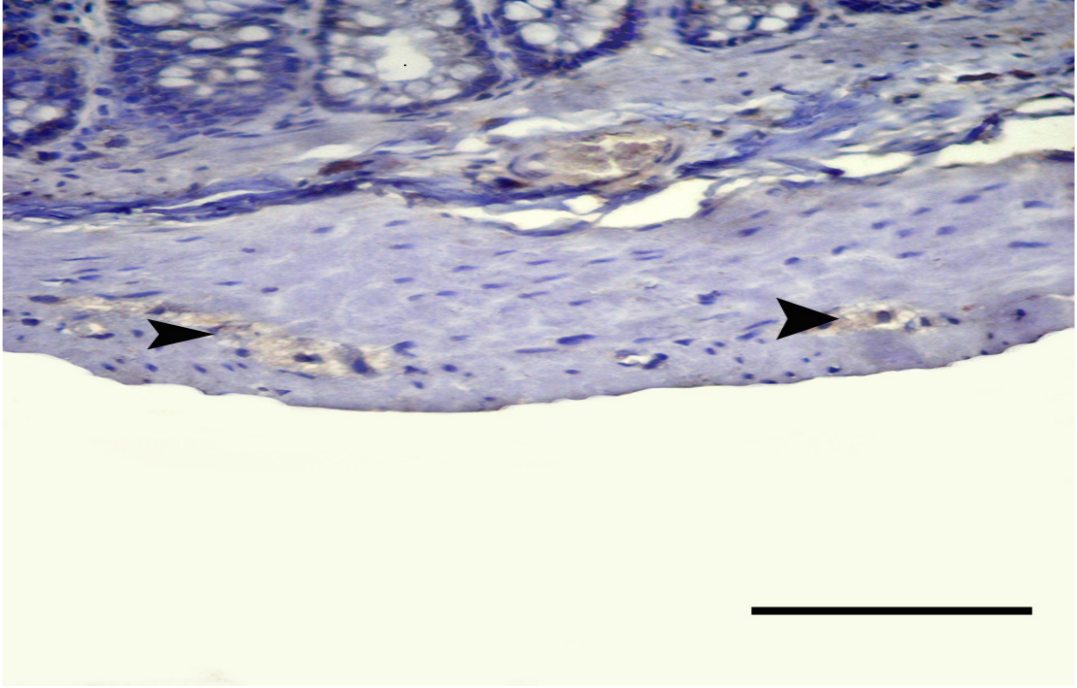
Şekil 3.10. Kolon kript epitel hücrelerinde (ok başı) orta şiddette Lep-R immunreaksiyonu, (K90), SBP, 1 bar = 100 mikron.



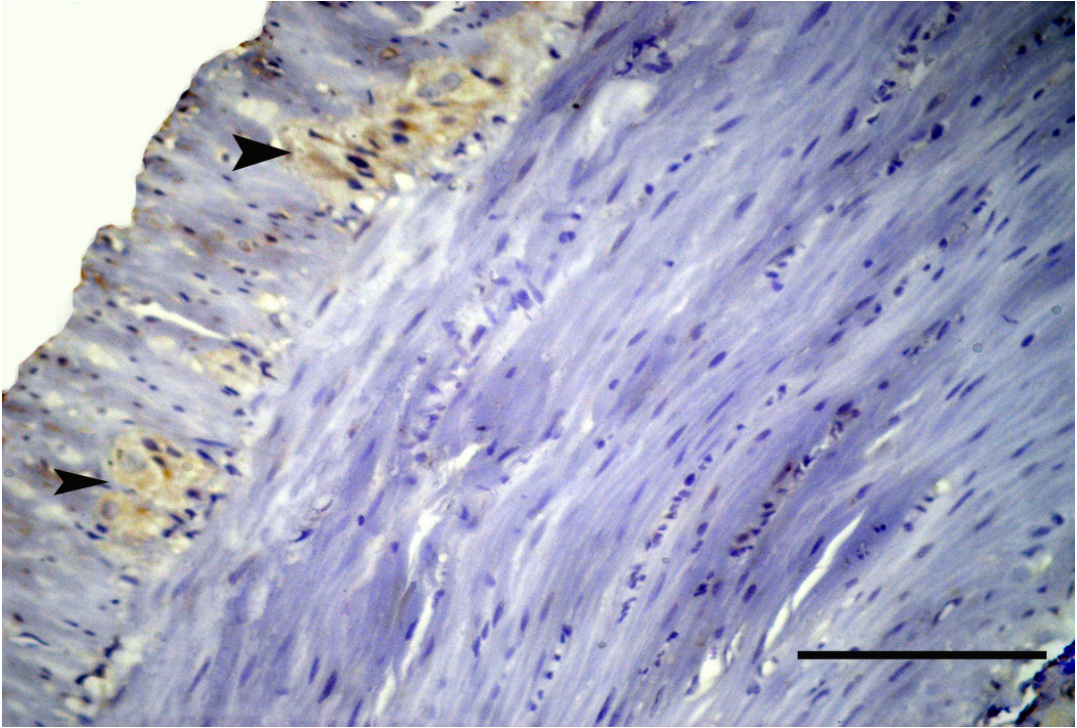
Şekil 3.11. Kolon kript epitel hücrelerinde (ok başı) şiddetli Lep-R immunreaksiyonu, (Ö90), SBP, 1 bar = 100 mikron.



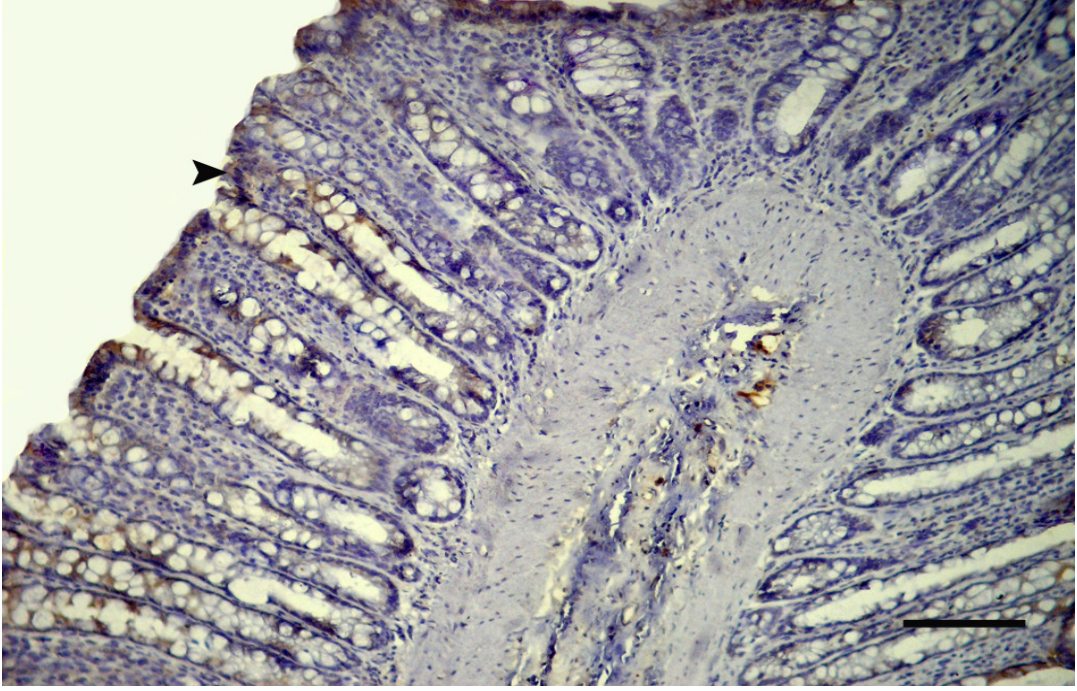
Şekil 3.12. Kolon kript epitel hücrelerinde (ok başı) şiddetli Lep-R immunreaksiyonu, (Ö90), SBP, 1 bar = 100 mikron.



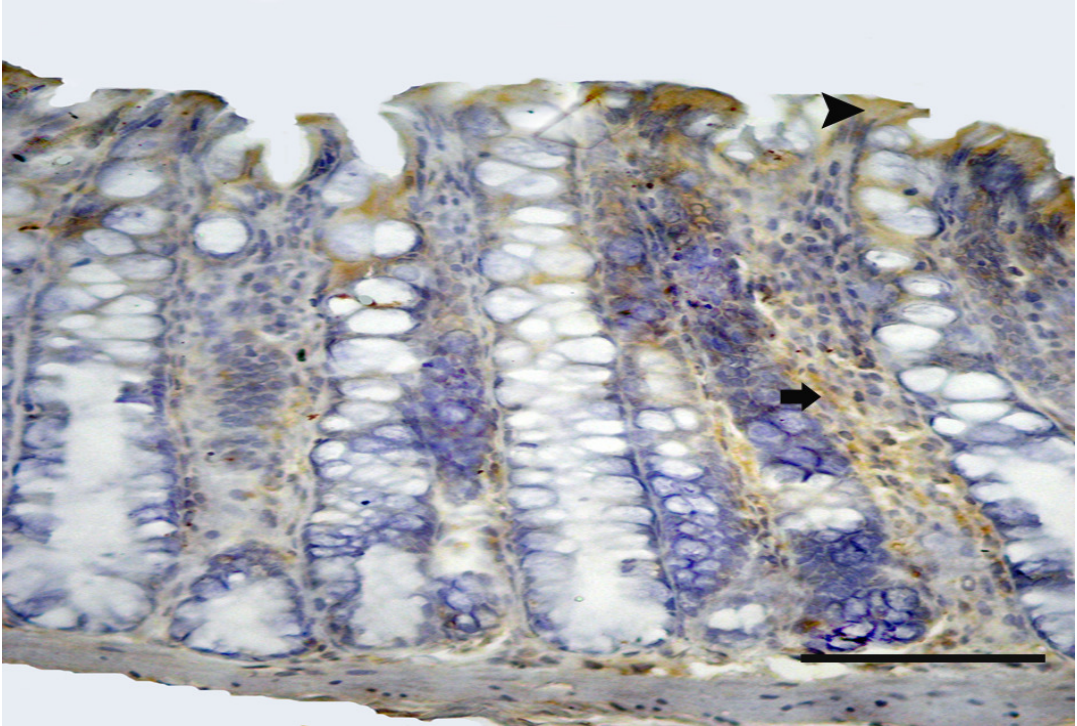
Şekil 3.13. Kolon pleksüs miyenterikusunda (ok başı) negatif Lep-R immunreaksiyonu, (K90), SBP, 1 bar = 100 mikron.



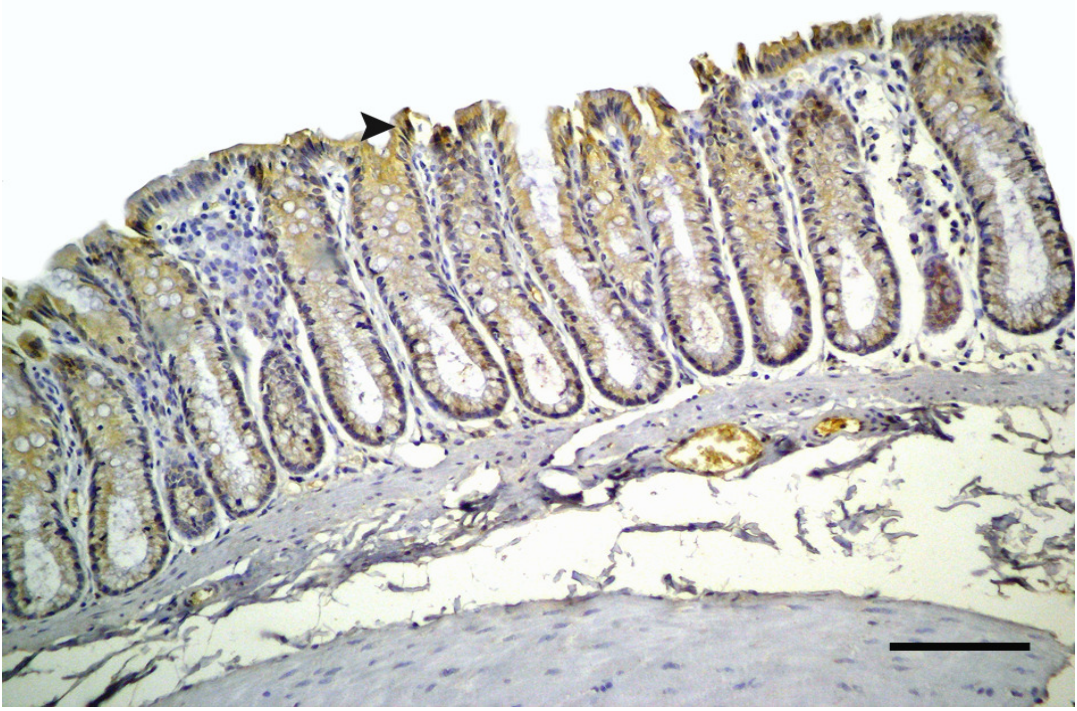
Şekil 3.14. Kolon pleksüs miyenterikusunda (ok başı) zayıf Lep-R immunreaksiyonu, (Ö90), SBP, 1 bar = 100 mikron.



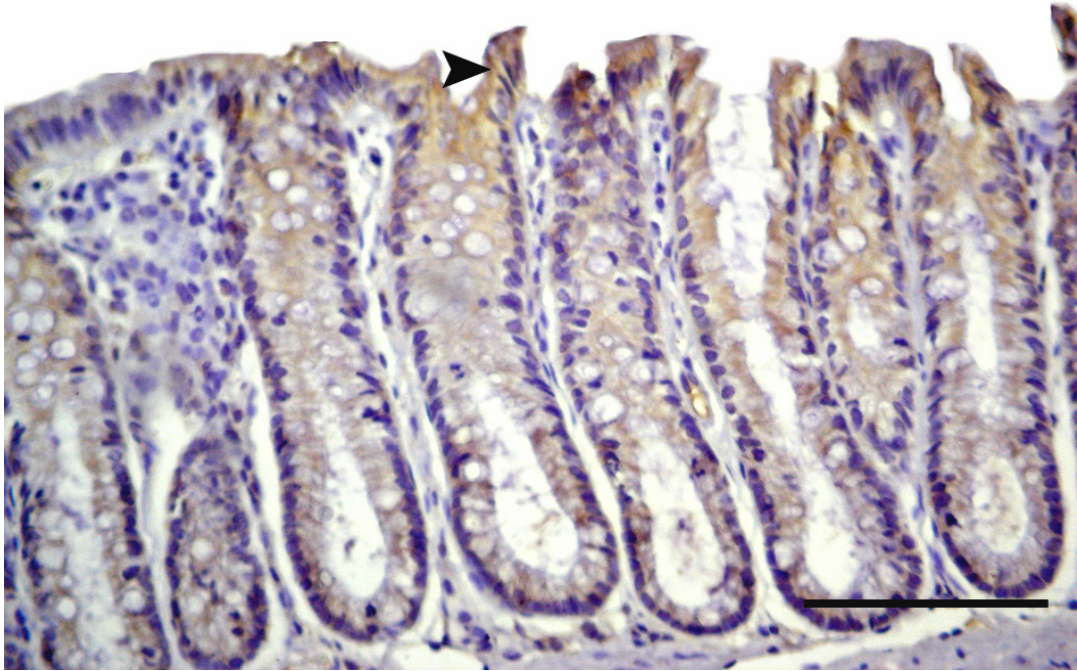
Şekil 3.15. Kolon kript epitel hücrelerinde (ok başı) zayıf Lep-R immunreaksiyonu, (K162), SBP, 1 bar = 100 mikron.



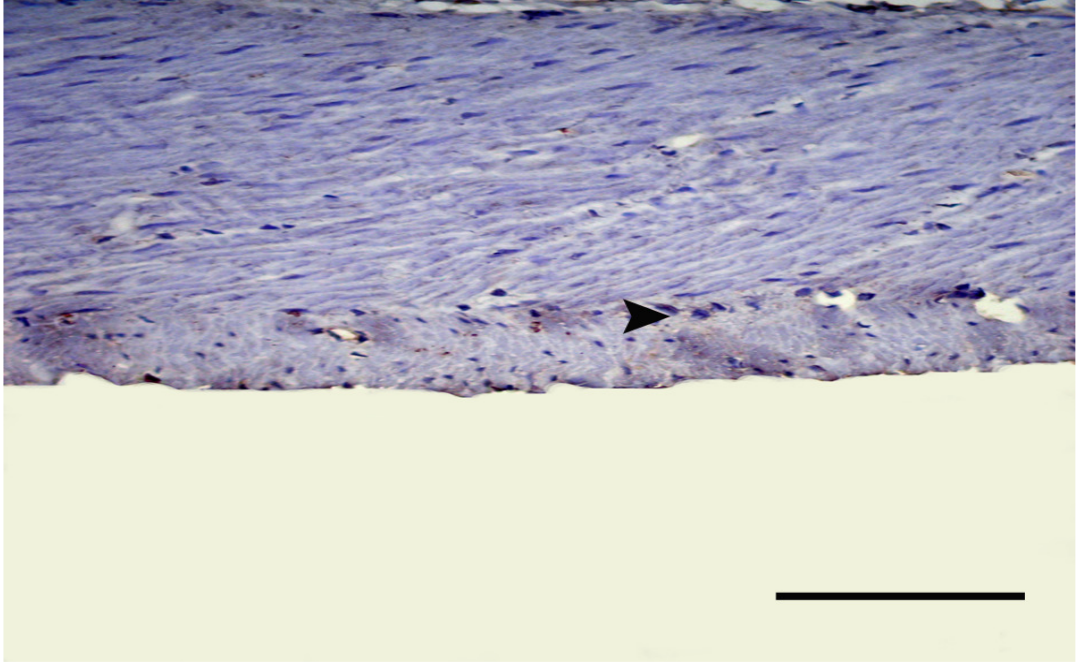
Şekil 3.16. Kolon kript epitel (ok başı) ve bağ doku hücrelerinde (ok) zayıf Lep-R immunreaksiyonu, (K162), SBP, 1 bar = 100 mikron.



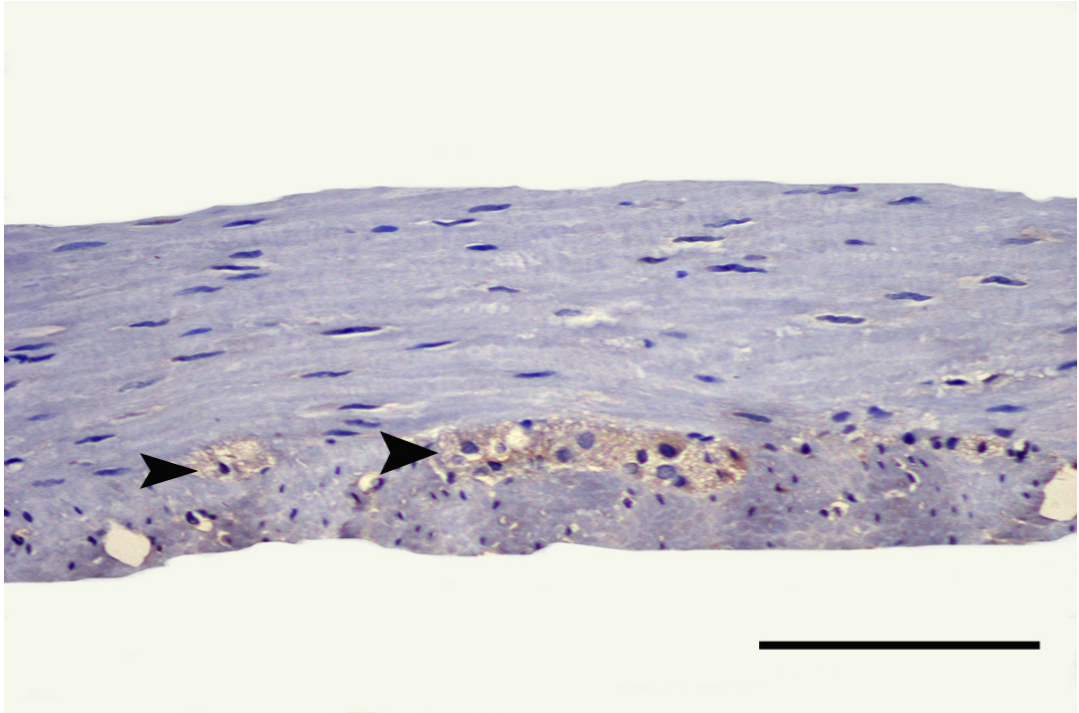
Şekil 3.17. Kolon kript epitel hücrelerinde (ok başı) orta şiddette Lep-R immunreaksiyonu, (Ö162), SBP, 1 bar = 100 mikron.



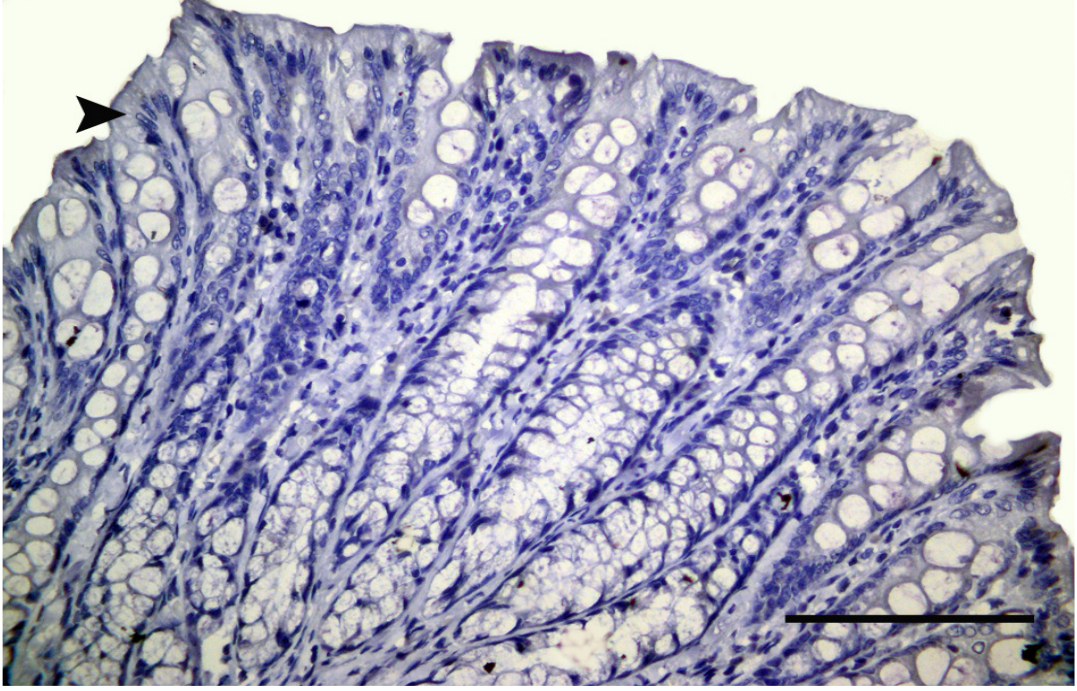
Şekil 3.18. Kolon kript epitel hücrelerinde (ok başı) orta şiddette Lep-R immunreaksiyonu, (Ö162), SBP, 1 bar = 100 mikron.



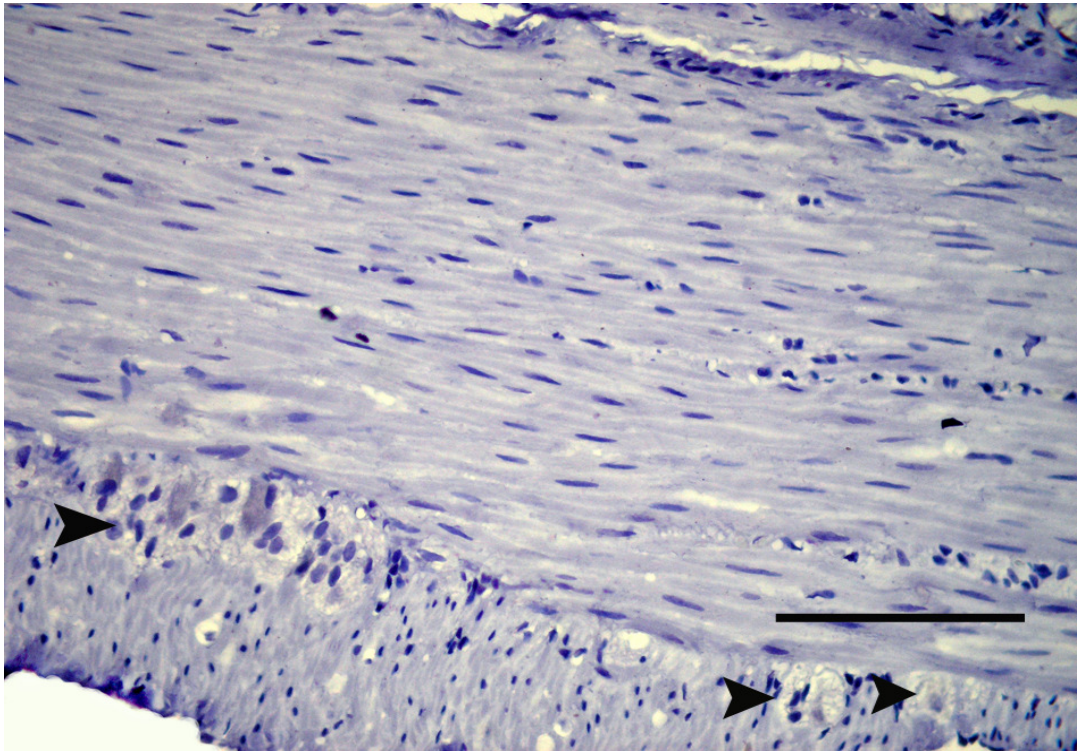
Şekil 3.19. Kolon pleksüs miyenterikusunda (ok başı) negatif Lep-R immunreaksiyonu, (K162), SBP, 1 bar = 100 mikron.



Şekil 3.20. Kolon pleksüs miyenterikusunda (ok başı) zayıf Lep-R immunreaksiyonu, (Ö162), SBP, 1 bar = 100 mikron.



Şekil 3.21. Negatif kontrol (kript epitel hücreleri), (ok başı), SBP, 1 bar = 100 mikron.



Şekil 3.22. Negatif kontrol (pleksüs miyenterikus), (ok başı), SBP, 1 bar = 100 mikron.

4. TARTIŞMA

Ob gen ürünü bir molekül olan leptin, 1994 yılında keşfedilmesinden bu yana son 10-12 yıldır üzerinde en fazla araştırma yapılan bir hormondur. Yağ dokusu ve merkezi sinir sistemi arasındaki sinyalizasyonu sağlaması, gıda alımı ve enerji tüketimindeki rolü nedeniyle büyük ilgi uyandırmıştır. 1995 yılında leptin reseptörünün (Lep-R) keşfi ile de bu alanda yapılan çalışmalar artarak devam etmiştir .

Leptin ve reseptörü ile ilgili olarak yapılan çalışmalar, genelde obezitenin etiolojisine odaklanmışken; kolon dokusunda daha ziyade proliferasyon (62, 91, 96) apoptozis (97), mukus sekresyonu (98, 122) ve butirat transportu gibi kolon fonksiyonlarına yöneliktir (93-95).

Dişi cinsiyet hormonları ile ilgili deneysel çalışmalarda ov rat modeli yaygın olarak kullanılmaktadır. Ov ratlarda gerek leptin hormonu gerekse diğer enzimlerle ilgili yapılmış çalışmalarda 17 β -östradiolün 10-50 $\mu\text{g}/\text{rat}/\text{gün}$ dozları kullanılmıştır (61, 123, 124). Ayrıca östrojenle ilgili yapılan çalışmalarda, östrojenin dokular üzerine olan etkisinin yaklaşık olarak 18. saate ortaya çıktığı belirlenmiştir (125). Bu bildirimler ışığında, çalışmamızda ov ratlara 17 β -östradiol 25 $\mu\text{g}/\text{rat}/\text{gün}$ dozunda uygulanmış ve östrojenin kolon üzerindeki etkisinin tam olarak saptanabilmesi amacıyla K18 ve Ö18 gruplarından 18. saatte (tek uygulama), K90 ve Ö90 gruplarından 90.saatte (üç uygulama + 18 saat), K162 ve Ö162 gruplarından ise 162. saatte (altı uygulama + 18 saat) doku örnekleri alınmış ve bu deney kurgusuna göre kolondaki leptin reseptör ekspresyonu belirlenmiştir.

Çalışmamızda, östrojen ile kontrol gruplarının kript epitel hücrelerinde ve pleksüs miyenterikuslarında sitoplazmik tarzda leptin reseptör ekspresyonu saptandı. Ayrıca lamina propria içerisindeki bağ doku hücrelerinde de leptin reseptör ekspresyonu gözlemlendi. Kontrol gruplarında sadece diferensiyel olmuş hücrelerin bulunduğu kriptlerin üst kısımlarında ekspresyon gözlenirken, östrojen gruplarında; ekspresyonun kriptlerin üst bölümlerinden alt kısımlarına kadar uzandığı belirlendi. Yapılan çalışmalarda leptin reseptör ekspresyonu, sıçanların (91), fetal ve yetişkin insanların kolon kript epitel hücrelerinin apikal (62, 82, 91), bazolateral membranları (82, 91) ve sitoplazmalarında (62, 82), kobayların (92) ise pleksüs

miyenterikuslarında gösterilmiştir. Çalışmamızda literatüre benzer olarak (82) ekspresyon şiddetinin kriptlerin alt kısımlarına doğru azaldığı gözlemlendi.

Çalışmamızda; kontrol gruplarının kript epitel hücrelerinde zayıf ve orta, östrojen gruplarında ise orta ve şiddetli immunreaksiyon belirlendi. Bu sonuçlar östrojen hormonunun ovariektomize rat kolon dokusunun kript epitelinde leptin reseptör ekspresyonunu arttırdığını göstermektedir.

Ovariektomize ratlarda yapılan çalışmalarda bizim bulgularımıza uyumlu olarak, yağ doku (61) beyin, hipotalamus (123), iskelet kası (126) ve dorsal kök gangliyonunda (124) Lep-R ekspresyonunun östrojenin etkisiyle arttığı tespit edilmiştir. Mitsuhiro Kimura ve ark. (123) ovariektomize ratlar üzerine yaptıkları çalışmada, 10 µg ve 50 µg olmak üzere iki ayrı doz östrojen verilmiş ve doz miktarı arttıkça beyin, hipotalamus ve yağ dokuda Lep-R ekspresyonunun da arttığı belirlenmiştir. Rosaria Meli ve ark. (61) ovariektomize ratlara haftada iki defa 25 µg östrojen uygulayarak, 7. ve 22. haftalarda doku örneklerini incelemişlerdir. Yağ dokudaki leptin reseptör ekspresyonunun 7. haftada ovariektomize grupta, 22. haftada ise östrojen grubunda daha fazla olduğunu gözleyerek, süreye ve doza bağlı olarak ekspresyon şiddetinin arttığını belirtmişlerdir. Ayrıca Chen H.P. ve ark. (124) çalışmalarında ovariektomize ratlara 24 saat ara ile iki defa 10µg östrojen uygulayarak, dorsal kök gangliyonda leptin reseptör ekspresyonunda artış gözlemişler ve sonuçta östrojenin leptin reseptör ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığını ifade etmişlerdir. Eretová V. ve ark. (127) kadınlar üzerine yaptıkları çalışmada, kan dokuda bulunan çözünen (soluble) Lep-R konsantrasyonunun kontrol grubuna göre ovariektomize grupta azalma eğiliminde olduğunu belirlemişlerdir. Thorn SR. ve ark. (128) ovariektomize düveler üzerine yaptıkları çalışmada bizim bulgularımızın aksine, östrojenin meme yağ dokusu ve uterus endometriyumunda Lep-R ekspresyonunu azalttığını; hipotalamus, karaciğer, kas ve subkutan yağ dokuda ise Lep-R ekspresyonunu etkilemediğini saptamışlardır. Yağ dokuda leptin reseptör ekspresyonu ile ilgili çalışmalarında elde edilen bulgular ise çelişkilidir. Ovariektominin etkisiyle ovaryum çevresi (123, 129), subkutan ve retroperitonal yağ dokuda (110) Lep-R ekspresyonunun azaldığı, östrojenin etkisi ile arttığı bildirilirken, bunun aksine Ana Alonso ve ark. (126) retroperitonal yağ dokuda ovariektominin etkisiyle Lep-R ekspresyonunun arttığını, östrojenin etkisiyle ise azaldığını

saptamışlardır. Mesenterik yağ dokuda ise östrojen grubuna göre ovariektomize grupta Lep-R ekspresyonunun daha fazla olduğu belirlenmiştir (110).

Kolon dokusunda sirküler ve longitudinal kas tabakaları arasında bulunan pleksüs miyenterikuslar bağırsak motilitesinin kontrolünde görev alırlar (23). Çalışmamızda; kontrol gruplarının pleksüs miyenterikuslarında negatif, östrojen gruplarında ise zayıf ile orta arası değişen şiddette immunreaksiyon belirlendi. Östrojenin etkisiyle pleksüs miyenterikuslarda Lep-R ekspresyonunun oluşması, leptinin bu gangliyonik yapıların fonksiyonları üzerine etkisi olabileceğini göstermektedir. Ovariektomiye bağlı olarak; pleksüs miyenterikuslarda Lep-R ekspresyonunun gözlenmemesi, postmenopozal kadınlarda kolon motilitesinde birtakım düzensizliklerin şekillenmesine yol açabilir.

Yapılan çalışmalarda leptin hormonunun hem normal hem de kolon kanser hücrelerinde hücre çoğalmasını indüklediği, kolon epitel hücreleri için bir büyüme faktörü olduğu (62) ve kript bölünme sürecinde önemli bir etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (130). Bunun aksine, leptinin kolon dokusunda hücre çoğalmasını indiklemediği (96, 130), distal kolonda mitoz aktiviteyi, kolonun tüm bölümlerinde ise kript alanlarını azalttığı (96), azoxymetan ile oluşturulan deneysel kanserde, lezyonların gelişimini baskıladığı ve dolayısıyla kanserleşme sürecinde önemli bir role sahip olmadığı ifade edilmektedir (91). Çalışmamızda leptin reseptör ekspresyonunun özellikle diferansiye olmuş hücrelerin bulunduğu kriptlerin üst ve orta kısımlarında gözlenmesi, leptin hormonunun hücre çoğalması üzerine bir etkiye sahip olmadığını, bununla birlikte metabolik fonksiyonlarda rol oynadığını göstermektedir.

Leptin hormonunun aynı zamanda, butiratın kolon Caco-2 hücrelerine alımını arttırdığı saptanmıştır (93). Butirat, kolon lümeninde bulunan bakteriler tarafından karbonhidrat ve lifli gıdaların fermantasyonu sonucu üretilen kısa zincirli bir yağ asididir (94). Kolonun proksimal bölümünde β -oksidan yoluyla solunum yakıtı olarak görev yapar. Kolon epitel hücreleri için enerji kaynağıdır. Kolonda hücre çoğalmasını baskılar (95, 131-133), hücre farklılaşmasını uyarır (132, 132, 134). Hücre siklusunun kontrolünde anahtar görev üstlenen proteinlerin düzenlenmesinde rol alarak apoptozise neden olur (95). Kolonda kan akımını artırır, motilitesini düzenler, sodyum ve su emilimini uyarır, ayrıca kolit oluşumunu önleyici rol oynar

(135). Çalışmamızda östrojenin etkisiyle kript epitelinde Lep-R ekspresyonunun artması, reseptörün epitel hücrelerine butirat transportunu etkileyebileceğini akla getirmektedir. Ayrıca çalışmamızda ovariektominin etkisine bağlı olarak kript epitelinde leptin reseptör ekspresyonu azlığının, butiratın epitel hücrelerine alınım sürecini olumsuz olarak etkileyebileceğini, kolon epitel hücrelerinin farklılaşma ve apoptosis mekanizmasını bozabileceğini düşünmekteyiz. Dolayısıyla butiratın hücre çoğalmasına yönelik baskılayıcı rolünün azalması, kolon kanserinin gelişmesine de yol açabilir.

Kolon dokusunda fizyolojik olarak devamlı mukus sekresyonu görülür. Bu sekresyon süreci sinirsel aktivasyon ve inflamasyon durumuna paralel olarak şekillenir (136-138). Kolonda salgısal ve hücre membranıyla birleşik musin olmak üzere iki farklı sınıf musin bulunur (122). Salgısal musinler MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 (139), hücre membranıyla birleşik olan musinler ise MUC1, MUC3, MUC4 olarak adlandırılır (140). Goblet hücreleri tarafından salgılanan musin MUC2 olup, kolon mukus salgısının büyük çoğunluğunu oluşturur (141-143). Hücre membranıyla birleşik olan musinler ise hem goblet hem de epitel hücrelerinde bulunur (144).

Mukus kolonda bir jel katmanı oluşturur ve mukoza yüzeyini sarar. Böylece epitel doku ile lümen arasında yarı geçirgen bir bariyer meydana gelir. Bu bariyer kolon epitelinin bütünlüğünün sağlanması (145, 146) ve savunma mekanizmasıyla ilişkili olup (98), kolon mukozasını patojen bakteri ve toksinlerden korur (139). Kolon dokusunda etki gösteren luminal ve sistemik leptin, mukus sekresyonunu uyarır ve musin gen ekspresyonunu artırarak goblet hücrelerinde tekrar intrasellüler musin depolanmasına yardımcı olur (98). Leptin bu etkisini; kolon epitel hücrelerini (122) ve epitel hücrelerinin apikal ve bazolateral membranlarında lokalize olan leptin reseptörlerini uarması (86), Lep-R'nin de PKC ve PI3K yollarını aktive etmesiyle gerçekleştirir (56). Bu verilere dayanarak, östrojenin etkisiyle kript epitelinde Lep-R ekspresyonunun artması, mukus salgılama işlevinin uyarılmasında leptin ve reseptörünün rolünün olduğunu göstermektedir. Ovariektominin etkisiyle kript epitelinde leptin reseptör ekspresyonunun azalması ise, leptinin Lep-R'leri aracılığıyla mukus salgılanmasına yönelik indükleyici rolünü yavaşlatabilir. Böylelikle bağırsak mukozasından yeterince mukus salgılanamamasına bağlı olarak,

mukusun kolon mukozasındaki koruyucu etkisi azalabilir ve dışkının lümendeki ilerleme hızı yavaşlayarak kolonda daha uzun kalma durumu ortaya çıkabilir. Böylelikle de östrojen eksikliğine bağlı olarak gelişen inflamatuvar barsak hastalığı ve konstipasyon gibi rahatsızlıkların oluşma riskinin artabileceği düşünülebilir.

5. SONUÇ

Östrojen eksikliğine bağlı olarak gözlenen konstipasyon, inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi rahatsızlıkların patogenezisinde, kolonda lokalize olan leptin reseptörlerinin rolü olabileceği ve bu rahatsızlıkların tedavisine yönelik farklı yaklaşımların ortaya konulabileceği sonucuna varıldı.

6. KAYNAKLAR

1. Dursun N. (2001) Veteriner Anatomi II (7.Baskı). Medisan Yayınevi, Ankara.
2. Yıldırım M. (2000) İnsan Anatomi (5.Baskı). Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
3. Bahadır A., Yıldız H. (2005) Veteriner Anatomi II İç Organlar (1.Baskı). Ezgi Yayınevi, Bursa.
4. Başaran A. (2003) Deney Hayvanları Laboratuar Teknikleri Ders Kitabı (1.Baskı). Nisan Kitabevi, Eskişehir.
5. Sarsılmaz M. (2000) Anatomi, Nobel Kitabevi, Ankara.
6. Arıcı K., Elhan A. (1997) Anatomi 1. Cilt (2.Baskı). Güneş Kitabevi, Ankara.
7. Dere F. (1999) Anatomi Atlası ve Ders Kitabı (5.Baskı). Nobel Kitabevi, Adana.
8. Hatiboğlu M.T. (1987) Anatomi ve Fizyoloji (6.Baskı). Hatiboğlu Yayınevi, Ankara.
9. Walker W.F., Humberger D.G. (1998) Anatomy & Dissection of the Rat (3rd ed). W.H. Freeman and Company, NewYork.
10. Chiasson R.B. (1988) Laboratory Anatomy of the White Rat (5th ed). Wm. C. Brown Publishers, U.S.A.
11. Özden M. (2005) Sağlık İnsan Gücü Eğitimi İçin Anatomi Ders Kitabı (1.Baskı). Prestij Matbaası, Ankara.
12. Paker Ş. (1990) Histoloji, Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa.
13. Özer A., Yakışık M., Özfiliz N., Erdost H., Zık B. (2006) Hitoloji Kılavuzu (2.Baskı). T.C. Uludağ Üniversitesi Yayınları, Bursa.
14. Tekelioğlu M. (1999) Sobotta Histoloji (5.Baskı). Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş., İstanbul.
15. Dellman H.D., Eurell J.A. (1998) Textbook of Veterinary Histology (5th ed.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
16. Aytekin Y., Solakoğlu S. (1998) Temel Histoloji (8.Baskı). Barış Yayınevi, İstanbul.
17. Terzioğlu N., Artan M.E. (1998) Histoloji, T.C. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, İstanbul.
18. Tanyoloç A. (1999) Özel Histoloji, Yorum Basın Yayın Sanayi Ltd. Şti., Ankara.

19. Demir R. (2006) Histoloji ve Hücre Biyolojisi (1.Baskı). Palme Yayıncılık, Ankara.
20. Fiore M.S.H.D. (1974) Atlas Of Human Histology (4th ed.). Lea & Febiger, Philadelphia.
21. Aughey E., Frye F.L. (2001) Comparative Veterinary Histology (1th ed.). Iowa University Press, U.S.A.
22. Erbenli T. (1990) Histoloji 2, Güneş Kitabevi, Ankara.
23. Gershon MD, Erde SM. (1981) The nervous system of the gut. Gastroenterology 80:1571.
24. Akgün N. (1994) Fizyoloji (9.Baskı). Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir.
25. Yakar K. (1999) Fizyoloji, Nobel Kitabevi, Ankara.
26. Erbaş D., Dinçer S., Öz E. (1997) Fizyoloji Ders Kitabı (1.Baskı), Hatioğlu Yayınları, Ankara.
27. Gökhan N., Çavuşoğlu H., (1986) Tıbbi Fizyoloji (7.Baskı). Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
28. Noyan A. (1993) Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji (8.Baskı). Meteksan Yayınevi, Ankara.
29. Banks W.J. (1993) Applied Veterinary Histology (3rd ed.). Mosby Year Book, U.S.A.
30. Ganory W.F. (1999) Tıbbi Fizyoloji (5. Baskı). Barış Yayınları, İstanbul.
31. Aktan H. (1988) Gastroentoloji (1.Baskı). Makro Yayıncılık, Ankara.
32. Kaymak K. (1997) İnsan Fizyolojisi (6.Baskı). Bilimsel ve Teknik Vakıf Çeviri Yayınları, İstanbul.
33. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Freidman J. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372, 425-432.
34. Campfield L.A., Smith F.J., Guisez Y., Devos R., Bum P., (1995) Recombinant mouse ob protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. Science 269, 546-9.
35. Banks W.A. Is obesity a disease of the blood-brain barrier? (2003) Physiological, pathological, and evolutionary considerations. Curr Pharm Des 9, 801-809.
36. Yan G.T., Hao X.H., Xue H. and Lu Y.P. (2002) Establishment of a highly

sensitive leptin RIA and detection of increased leptin levels in hyperlipidemia and pregnancy. *J immunoassay Immunochem*; 23, 317.

37. Esler M., Vaz M., Collier G., Nestel P., Jennings G., Kaye D., Seals D., Lambert G. (1998) Leptin in human plazma is derived in part from the brain and cleared by the kidneys. *The Lancet* 351, 879.

38. Caro J.F., Sinha M.K., Kolaczynski J.W., Zhang P.L., Considine R.V. (1996) Leptin: The tale of an obesity gene. *Diabetes* 45, 1455-62.

39. Auwerx J., Staels B. (1998) Leptin. *Lancet* 351, 737-42.

40. Caro J.F., (1998) Leptin : From 1958 to the present. *Canadian Journal of Diabetes Care* 22, 18-23.

41. Bado A., Levasseur S., Attoub S., et al. (1998) The stomach is a source of leptin. *Nature* 394, 790–3.

42. Sobhani I., Bado A., Vissuzaine C., et al. (2000) Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut* 47, 178–83.

43. Akerman F., Lei Z.M., Rao C.V. (2002) Human umbilical cord and fetal membranes co-express leptin and its receptor genes. *Gynecol Endocrinol* 16, 299–306.

44. Hassink S.G., de Lancey E., Sheslow D.V., Smith-Kirwin S.M., O'Connor D.M., Considine R.V., Opentanova .I., Dostal K., Spear M.L., Leef K., Ash M., Spitzer A.R., Funanage V.L. (1997) Placental leptin: an important new growth factor in intrauterine and neonatal development? *Pediatrics* 100, E1.

45. Masuzaki H., Ogawa Y., Sagawa N., Hosoda K., Matsumoto T., Mise H., Nishimura H., Yoshimasa Y., Tanaka I., Mori T., Nakao K. (1997) Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3, 1029–1033.

46. Senaris R., Garcia-Caballero T., Casabiell X., Gallego R., Castro R., Considine R.V., Dieguez C., Casanueva F.F. (1997) Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology* 138, 4501- 4504.

47. Hoggard N., Hunter L., Duncan J.S., Williams L.M., Trayhurn P., Mercer J.G. (1997) Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 94, 11073-11078.

48. Considine R.V. (2001) Regulation of leptin production. *Rev Endocr Metab Disord* 2, 357-363.
49. Wang J., Lie R., Hawkins M., Barzalai N., Rosetti L. (1998) A nutrient – sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393, 684-688.
50. Casabielle X., Hawkins M., Tome M.A., Peino R., Dieguez C., Casanueva F.F. (1997) Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab.* 82,4270-4273.
51. Brabant G., Horn R., Mayr M., Wurster U., Schnabel D., Heidenreich F. (2000) Free and protein bound leptin are distinct and independently controlled factors in energy regulation. *Diabetologia* 43, 438-42.
52. Sinha M.K., Opentanova I., Ohannesian J.P. et al. (1996) Evidence of free and bound leptin in human circulation. *J Clin Invest* 98, 1277-82.
53. Boden G., Chen X., Mozzoli M. et al. (1996) Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 3419-23.
54. Ostlund R.E., Yang J.W., Klein S. et al. (1996) Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 3909-13.
55. Tartaglia L.A., Dembski M., Weng X., et al. (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83:1263–1271.
56. Tartaglia L.A. (1997) The leptin receptor. *J Biol Chem* 272, 6093-6.
57. Ahima R.S., Osei S.Y. (2004) Leptin signaling. *Phys Behav* 81, 223-241.
58. Hamann A., Matthaei S. (1996) Regulation of energy balance by leptin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104, 293-300.
59. Lord G.M., Matarese G., Howard J.K. (1998) Leptin modulates the T-cell immune response and reserves starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394, 897-900.
60. Henson M.C., Swan K.F., O'neil J.S. (1998) Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstet Gynecol* 92, 1020-1028.

61. Meli R., Pacilio M., Mattace G. et al. (2004) Estrogen and raloxifene modulates leptin and its receptor in hypothalamus and adipose tissue from ovariectomized rats. *Endocrinology* 145, 3115-3121.
62. Hardwick J.C.H., Van Den Brink G.R., Offerhaus G.J. et al. (2001) Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 121, 79-90.
63. Emilson V., Liu Y.L., Cawthorne M.A. et al. (1997) Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islet and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes* 46, 313.
64. Kamohara S., Burceline R., Halas J.L. et al. (1997) Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 389, 374.
65. Cunningham M.J., Clifton D.K., Steiner R.A. (1999) Leptin's actions on the reproductive axis: Perspectives and mechanisms. *Biol Reprod* 60, 216–222.
66. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A., Sessa W.C., Madge L.A. et al. (1998) Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281, 1683–686.
67. Bennett B.D., Solar GP, Yuan J.Q. et al. (1996) A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr Biol* 6, 1170–1180.
68. Ozata M, Ozdemir IC, Licinio J (1999) Human leptin deficiency caused by a missense mutation: Multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 3686–3695.
69. Stepan C.M., Swick A.G. (1999) A role for leptin in brain development. *Biochem Biophys Res Commun* 256, 600–602.
70. Ergün A. (1998) Leptin (Ob Protein). *T Klin J Med Sci* 19, 130-136.
71. Morton M.N., Emilson V., Liu Y.L. (1998) Leptin Action in Intestinal cells. 273, 26194-26201.
72. Iwaniec U.T., Heaney R.P., Cullen D.M. (1998) Leptin increases the number of mineralized bone nodules in vitro. *J Bone Miner Res* 13, 2-12.
73. Collins S., Kuhn C.M., Petro A.E. (1996) Role of leptin in fat regulation. *Nature* 380, 677.
74. Tritos N.A. Mantzoros C. (1999) Leptin, its role in obesity and beyond.

Diabetologia 40,1371-1379.

75. Meier A.C., Bobbioni E., Gabay C. Et al. (2002) IL-1 Receptor antagonist serum levels are increased in human obesity: A possible link to the resistance to leptin? J Clin Endocrinol Metab 87, 1184.

76. Ziylan Z. (2003) Merkezi Sinir Sistemindeki Leptin Transportu, Genel Tıp Dergisi 2003, 13.

77. Friedman J.M., Halaas J.L. (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature 395, 763-770.

78. Kirel B. Doğruel N. (1998) Yeni bir hormon: Leptin. Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi 7, 421.

79. Mix H., Widjaja A., Jandl O. Et al. (2000) Expression of leptin and leptin receptor isoforms in the human stomach. Gut 47, 481-486.

80. Barrenetxe J., Villaro A.C., Guembe L. et al. (2002) Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and cytoplasm of enterocytes. Gut 50, 797-802.

81. Attoub S., Noe V., Pirola L. et al. (2000) Leptin promotes invasiveness of kidney and colonic epithelial cells via phosphoinositide 3-kinase-, rho-, and rac-dependent signaling pathways. FASEB J 14, 2329-2338.

82. Aparicio T., Kermorgant S., Darmoul D. Et al. (2005) Leptin and Ob-Rb Receptor Isoform in the Human Digestive Tract during Fetal Development. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 90, 6177-6184.

83. Brzozowski T., Konturek P.C., Konturek S.J. et al. (1999) Leptin in gastroprotection induced by cholecystokinin or by a meal. Role of vagal and sensory nerves and nitric oxide. Eur J Pharmacol 374, 263-276.

84. Cammisotto P.G., Renaud C., Gingras D. et al. (2005) Endocrine and Exocrine Secretion of Leptin by the Gastric Mucosa. Journal of Histochemistry & Cytochemistry Volume 53, 851-860.

85. Lewin M.J.M., Bado A. (2001) Leptin. 53, 372-376.

86. Aparicio T., Guilmeau S., Goyot H. Et al. (2004) Leptin reduces the development of the initial precancerous lesions induced by azoxymethane in the rat colonic mucosa. Gastroenterology 126, 499-510.

87. Buyse M., Berlioz F., Guilmeau S., (2001) PepT1-mediated epithelial transport of dipeptides and cephalixin is enhanced by luminal leptin in the small intestine. *J Clin Invest* 108,1483–1494.
88. Kaplan L.M. (1998) Leptin, obesity and liver disease. 115, 997-1001.
89. Elinson N., Amichay D., Birk R.Z. (2006) Leptin directly regulates exocrine pancreas lipase and two related proteins in the rat. *British Journal of Nutrition* 96:691-696.
90. Ducroc R., Guilmeau S., Akashi K. (2005) Luminal leptin induces rapid inhibition of active intestinal absorption of glucose mediated by sodium-glucose cotransporter. *Diabetes* 54, 348-354.
91. Aparicio T., Guilmeau S., Goiot H. (2004) Leptin reduces the development of the initial precancerous lesions induced by azoxymethane in the rat colonic mukosa. *Gastroenterology* 127, 1866-1867.
92. Lui M., Seino S., Kirchgessner A.L. (1999) Identification and characterization of glucoreponsive neurons in the enteric nervous system. *The journal of Neuroscience* 19, 10305-10317.
93. Buyse M., Sitaraman S.V., Liu X. et al. (2002) Luminal leptin enhances CD147/MCT-1-mediated uptake of butyrate in the human intestinal cell line caco23-BBE. *The journal of Biological Chemistry* 277, 28182-28190.
94. David L. Topping and Peter M. Clifton (2001) Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews* 81, 1031-1064.
95. Coradini D., Pellizzora C., Marimpietri D. et al. (2000) Sodium butyrate modulates cell cycle-related proteins in HT29 human colonic adenocarcinoma cell. *Cell Prolif.* 33, 139-146.
96. Chaudhary M., Mandir N., Fitzgerald A.J. (2000) Starvation, leptin and epithelial cell proliferation in the gastrointestinal tract of the mouse. *Digestion* 61, 223-229.
97. Rouet-Benzineb P., Aparicio T., Guilmeaus S. et al. (2004) Leptin counteracts sodium butyrate-induced apoptosis in human colon cancer HT-29 cell via NF- κ B signaling. *The journal of Biological Chemistry* 279, 16495-16502.

98. Pascale Plaisancie, Robert Ducroc, Mahmoud El Homsiet al. (2006) Luminal leptin activates mucin-secreting goblet cell in the large bowel. *Am J Physiol Gastroinvest Liver Physiol* 290,805-812.
99. Bouloumie A., Drexler H.C., Lafontan M. et al. (1998) Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Cric Res*, 83, 1059-1066.
100. Tasdelen A., Algin C., Ates E. et al. (2004) Effect of leptin on healing of colonic anastomoses in rats. *Hepato-Gastroenterology* 51, 994-997.
101. Mueller S.O., Korach K.S. (2001) Estrogen receptor and endocrine disease: lessons from estrogen receptor knock out mice. *Curr Opin Pharmacol* 1, 613–619.
102. Machinal F, Dieudonne M-N, Leneuve M-C and et al. (1999) *In Vivo* and *in Vitro* ob Gene Expression and Leptin Secretion in Rat Adipocytes: Evidence for a Regional Specific Regulation by Sex Steroid Hormones. *Endocrinology* 140, 1567-1574.
103. Burger H.G., Dudley E.C., Hopper J.L. (1995) The endocrinology of the menopausal transition: A cross-sectional study of the a population – based sample. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 3537-3540.
104. Hassager C., Christiansen C. (1989) Estragen / Gestagen therapy changes soft tissue body composition in postmenopausal women. *Metabolism* 38, 662-665.
105. Wade GN. (1975) Some effects of ovarian hormones on food intake and body weight in female rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 88, 183–193.
106. Machinal F, Dieudonne M-N, Leneuve M-C and et al. (1999) *In Vivo* and *in Vitro* ob Gene Expression and Leptin Secretion in Rat Adipocytes: Evidence for a Regional Specific Regulation by Sex Steroid Hormones. *Endocrinology* 140, 1567-1574.
107. Ainslie DA, Morris MJ, Wittert G, et al. (2001) Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. *International Journal of Obesity* 25,1680–1688.
108. Martin L, Siliart B, Dumon H, et al. (2001) Leptin, body fat content and energy expenditure in intact and gonadectomized adult cats: a preliminary study. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 85, 195–199.

109. Houpt K.A.; Coren B.; Hintz H.F., Hilderbrant J.E. (1979) Effect of sex and reproductive status on sucrose preference, food intake, and body weight of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 174:1083–1085.
110. Shimizu H., Shimomura Y., Nakanishi Y. et al. (1997) Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *J Endocrinol* 154, 285.
111. Rosenbaum M., Nicolas M. Hirsch J. et al. (1996) Effect of gender, body composition, and menopause on plasma leptin concentrations. *Nat Med* 29, 3424-3427.
112. Messinis I.E. Milligos S.D., Alexandris E. et al. (1999) Leptin concentrations in normal women following bilateral ovariectomy. *Hum Reprod* 14, 913.
113. Caetano S., Oliveria M.D., Pinto-Neto A.M. et al. (2005) Prevalence and factors associated with intestinal constipation in postmenopausal women. *Arq. Gastroenterol.* 42, 24-9.
114. Caetano S., Oliveria M.D., Pinto-Neto A.M. et al. (2005) Constipation in postmenopausal women. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 51, 334-41.
115. Triadofilopoulos G., Finlayson M, Grellet C. (1998) Bowel dysfunction in postmenopausal women. 27, 55-66.
116. Franceschi S., Gallus S, Talamini R. et al. (2000) Menopause and colorectal cancer. *Br J Cancer* 82, 1860-2.
117. Prihartono N., Palmer J.R., Louik C. et al. (2000) A case-control study of use of postmenopausal female hormone supplements in relation to the risk of large bowel cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9, 443-7.
118. Newcomb P.A., Storer B.E. (1995) Postmenopausal hormone use and risk of large-bowel cancer. *J Natl Cancer Inst.* 87, 1067-71.
119. Grodstein F., Newcomb P.A., Stampfer M.J. (1999) Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis. *Am J Med.* 106, 574-82.
120. Luna L.G. (1968) *Manual of Histologic Staining Methods Of the Armed Forces Institute of Pathology* (3rd ed.). McGraw – Hill Company, New York.
121. Fromowitz F.B., Viola M.V., Chao S. et al. (1987) Ras 21 expression in the progression of breast cancer. *Human Pathology* 18, 1268-1275.

122. Homsí E. M., Ducroc R., Claustre J. et al. (2007) Leptin modulates the expression of secreted and membrane-associated mucins in colonic epithelial cell by targeting PKC, PI3K and MAPK pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293, G365-G373.
123. Kimura M., Irahana M., Yasui T. et al. (2002) The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to a decrease in expression of leptin receptor in the brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290, 1349-1353.
124. Chen H.P., Fan J., Cui S. (2006) Detection and estrogen regulation of leptin receptor expression in rat dorsal root ganglion. *Histochem Cell Biol* 126, 363-369.
125. McNeill A.M., Zhang C., Stanczyk F.Z. et al. (2002) Estrogen increases endothelial nitric oxide synthase via estrogen receptors in rat cerebral blood vessels. *Stroke* 33, 1685-1691.
126. Alonso A., Fernandez R., Moreno M. et al. (2007) Leptin and its receptor are controlled by 17 β -estradiol in peripheral tissue of ovariectomized rats. *Exp Biol Med* 232, 542-9.
127. Eretova V., Haluzik M., Svobodova J. et al. (2002) Serum levels of leptin and soluble leptin receptors in women after bilateral ovariectomy. *Ceska Gynekol.* 67, 20-3.
128. Thorn S.R., Meyer M.J., Van Amburgh M.E. et al. (2007) Effect of estrogen on leptin and expression of leptin receptor transcripts in prepubertal dairy heifers. 90, 3742-50.
129. Tanaka M., Nakaya S., Kumai T. et al. (2000) Effect of estrogen on serum leptin levels and leptin mRNA expression in adipose tissue in rats. *Horm Res* 56, 98-104.
130. Fitzgerald A.J., Mandir N., Goodlad R.A. (2005) Leptin, cell proliferation and crypt fission in the gastrointestinal tract of intravenously fed rats. *Cell Prolif.* 38, 25-33.
131. McIntyre A., Gibson P.R., Young G.P. (1993) Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gut* 34, 386-391.
132. Hague A., Butt A.J., Paraskeva C. (1996) The role of butyrate in human colonic epithelial cell: an energy source or inducer of differentiation and apoptosis?. *Proc. Nutr. Soc.* 55, 937-943.

133. Kien Lawrence C., Schmitz-Brown M., Solley T. et al. (2005) Increased colonic luminal synthesis of butyric acid is associated with lowered colonic cell proliferation in piglets. *The Journal of Nutrition* 136, 64-69.
134. Scheppach W. (1994) Effect of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Supplement 1*, S35-S38.
135. Velazquez O.C., Lederer H.M., Rombeau J.L. (1997) Butyrate and the colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications. *Adv Exo Med Biol* 427, 123-34.
136. Branka J.E., Vallette G., Jarry A. et al. (1997) Stimulation of musin exocytosis from human epithelial cells by nitric oxide: evidence for a cGMP-dependent and a cGMP-independent pathway. *Biochem J* 323, 521-524.
137. Neutra M.R., O'Malley L.J., Specian R.D. (1982) Regulation of intestinal goblet cells secretion. II. A survey of potential secretagogues. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 242, G380-G387.
138. Plaisancie P, Barcelo A., Moro F. (1998) Effect of neurotransmitters, gut hormones and inflammatory mediators on mucus discharge in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 275, G1073-G1084.
139. Porchet N., Aubert J.P., (2004) MUC genes mucin or not mucin? That is the question. *J Med Sci* 20, 569-574.
140. Jass J.R., Walsh M.D. (2001) Altered mucin expression in the gastrointestinal tract: a review. *J cell Mol Med* 5, 327-351.
141. Byrd J.C., Bresalier R.S. (2004) Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23, 77-99.
142. Pullan R.D., Thomas G.A., Rhodes M. et al. (1994) Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut* 35, 353-359.
143. Shaoul R., Okada Y., Cutz E. et al. (2004) Colonic expression of MUC2, MUC5AC and TFF1 in inflammatory bowel disease in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 38, 488-493.
144. Shekels L.L., Anway R.E., Lin J. et al. (2001) Coordinated Muc2 and Muc3 mucin gene expression in *Trichinella spiralis* infection in wild-type and cytokine-deficient mice. *Dig Dis Sci* 46, 1757-1764.

145. Bozkurt A., Cakır B., Ercan F. et al. (2003) Anti-inflammatory effects of leptin and cholecystokinin on acetic acid-induced colitis in rats: role of capsaicin-sensitive vagal afferent fibers. *Regul Pept* 116, 109-118.

146. Cakır B.,Bozkurt A., Ercan F. et al. (2004) Anti-inflammatory effects of leptin on experimental colitis: involvement of endogenous glucocorticoids. *Peptides* 25, 95-104.