

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PRENATAL VE POSTNATAL DOKULARINDA
LEPTİN EKSPRESYONU**

SERCAN ÖZBEK

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yrd.Doç. Meltem ÖZGÜNER

Tez No: 22

2004-İSPARTA

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PRENATAL VE POSTNATAL DOKULARINDA
LEPTİN EKSPRESYONU**

SERCAN ÖZBEK

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yrd.Doç. Meltem ÖZGÜNER

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu
tarafından 604 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 22

2004-İSPARTA

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve yüksek lisans tez çalışmam süresince her zaman desteği, yardımları ve yönlendirmeleri ile yanımda olan tez danışmanım sayın Yrd.Doç.Dr. Meltem ÖZGÜNER'e

Çalışmamın laboratuvar aşamasında ve sonrasında yardımlarını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. Osman SULAK'a , Anabilim Dalı Başkanımız sayın Doç.Dr. Alparslan GÖKÇİMEN'e,

Tez çalışmam süresince bana destek olan S.D.Ü. Burdur Sağlık Yüksekokulu'ndaki öğretim elemanları arkadaşlarıma ve hocalarıma, teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
Resimler Listesi	i
1- GİRİŞ ve AMAÇ	1
2- GENEL BİLGİLER	4
2.1. Leptin Molekülü	5
2.1.1. Ob Geni	5
2.1.2. Leptin Reseptörleri ve işlevleri	6
2.2. Obezitede Leptin	7
2.3. Leptin ve Plasenta	7
2.4. Leptin ve Gebelik	9
2.4.1. Kemirgenlerde Gebelik ve Leptin	10
2.4.2. Leptin ve Abortus	11
2.4.3. Leptin ve Preeklampsi	11
2.4.4. Leptin ve Diyabetik	12
2.4.5. Leptin ve Laktasyon	13
2.5. Leptin ve Fetüs	13
2.5.1. Fetal Leptinin Kaynağı	13
2.5.2. Leptin ve Normal Fetal Gelişim	14
2.5.3. Leptin ve Anormal Fetal Büyüme	14
2.6. Çocuklukta ve Pubertede Leptin	16
3. MATERYAL ve METOT	18
3.1. Materyal	18
3.1.1. Deney Hayvanları	18
3.1.2. Fetüslerin Elde Edilmesi	18
3.2. Metot	18
3.2.1. Histolojik Çalışmalar	18
3.2.2. İmmünohistokimyasal Çalışmalar	19
3.3. Değerlendirme	24
4- BULGULAR	25
5- TARTIŞMA ve SONUÇ	43
Özet (Türkçe)	47
Özet (İngilizce)	48
Kaynaklar	

RESİMLER LİSTESİ**Sayfa No**

Resim-1 (a,b): Prenatal 15. Gün Leptin İçin İmmün Boyanma Uygulanmış Torakal Bölge Kesitine Ait Bir Görünüm.....	28
Resim - 2 : Prenatal 15. Gün Leptin İçin İmmün Boyanma Uygulanmış Torakal Bölge Kesitine Ait Bir Görünüm.....	29
Resim - 3 : Prenatal 17. Gün Leptin İçin İmmün Boyanma Uygulanmış Torakal Bölge Kesitine Ait Bir Görünüm.....	29
Resim- (a,b) : Prenatal 17. Gün Leptin İçin İmmün Boyanma Uygulanmış Torakal Bölge Kesitin Kalp dokusuna Ait Bir Görünüm.....	30
Resim - 5 : Prenatal 17. Gün Leptin İçin İmmün Boyanma Uygulanmış Akciğer Kesitine Ait Bir Görünüm.....	31
Resim – 6 : Prenatal 17. Gün Leptin İçin İmmün Boyanma Uygulanmış Hiyalin Kıkırdak Taslağına Ait Bir Görünüm.....	31
Resim7 (a,b): Prenatal 17. Gün Leptin İçin İmmün Boyanma Uygulanmış Torakal Bölge Medulla Spinalis Kesitine Ait Bir Görünüm.....	32
Resim7 (c): Prenatal 17. Gün Leptin İçin İmmün Boyanma Uygulanmış Torakal Bölge Medulla Spinalis Kesitine Ait Bir Görünüm.....	33
Resim – 8 : Prenatal 19. Gün Leptin İçin İmmün Boyanma Uygulanmış Torakal Aortaya ve Özafagus Kesitine Ait Bir Görünüm.....	34
Resim – 9 : Prenatal 19. Gün Leptin İçin İmmün Boyanma Uygulanmış Akciğer Doku Kesitine Ait Bir Görünüm.....	34
Resim10 (a,b): Prenatal 19. Gün Leptin İçin İmmün Boyanma Uygulanmış Kıkırdak Doku Kesitine Ait Bir Görünüm.....	35
Resim11 (a,b): Prenatal 15. Gün Leptin İçin İmmün Boyanma Uygulanmış Deri Doku Kesitine Ait Bir Görünüm.....	36
Resim12 (a,b): Postnatal 2. Gün Leptin İçin İmmün Boyanma Uygulanmış Kıkırdak Doku Kesitine Ait Bir Görünüm.....	37
Resim – 13: Postnatal 2. Gün Leptin İçin İmmün Boyanma Uygulanmış Karaciğer Doku Kesitine Ait Bir Görünüm.....	38
Resim14 (a,b): Postnatal 2. Gün Leptin İçin İmmün Boyanma Uygulanmış Deri Doku Kesitine Ait Bir Görünüm.....	39
Resim 15 (a,b): Postnatal 4. Gün Leptin İçin İmmün Boyanma Uygulanmış Kalp Doku Kesitine Ait Bir Görünüm.....	40
Resim 16 (a,b): Postnatal 4. Gün Leptin İçin İmmün Boyanma Uygulanmış Kıkırdak Doku Kesitine Ait Bir Görünüm.....	41
Resim 17 : Postnatal 4. Gün Leptin İçin İmmün Boyanma Uygulanmış Deri Doku Kesitine Ait Bir Görünüm.....	42

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Enerji alımı (yiyecek tüketimi) ve harcanması arasındaki karmaşık denge vücut ağırlığının sürekliliğini sağlar. Bu enerji dengesi beyinde hipotalamus tarafından yürütülür. Lateral hipotalamik alanın (LHA) lezyonları hipofaji ve kilo kaybına, ventral medial hipotalamus (VMH) lezyonları ise hiperfajik obeziteye yol açtığı bilinmektedir (1).

Alınan ve tüketilen enerji dengesinin bozulması sonucunda artan enerji fazlasının yağ dokusunda birikmesi sonucu obezite meydana gelir. Obezite, tehlikeli sağlık problemlerine yol açan kronik bir hastalıktır (2).

Hipotalamik peptitlerin moleküler genetik çalışmaları ve leptin sinyalizasyon yolunun bulunması enerji dengesi ve beslenme davranışlarında moleküler mekanizmaların anlaşılmasında obezite hakkında yeni bilgiler edinmemizi sağlamıştır. İlk olarak 1994'te Friedman ve arkadaşları tarafından leptin tanımlanmıştır (23). Leptin: Yunanca da ince zayıf anlamına gelen "*leptos*" kelimesinden türetilmiştir. *ob* geninin bir ürünü olan leptin hipotalamik-hipofiz eksenleri düzenleyen bir hormon olarak kabul edilmektedir (3).

Leptinin fizyolojik fonksiyonları, leptin kaybı olan *ob/ob* farelerde çok geniş bir şekilde çalışılmıştır. Bu hayvanlarda ekzojen leptin tedavisi vücut sıcaklığını, fiziksel aktiviteyi ve enerji kaybını artırırken hiperfajilerini azaltır ve kilo kaybına neden olur (2).

Diğer bir etkisi ise dişi farelerde ovaryum ağırlığını , erkek farelerde ise testis ağırlığının arttırmasıdır. Ayrıca histolojik incelemelerinde gonadal stimülasyon bulguları gözlenmiştir. Bir başka çalışmada ise normal dişi farelere leptin verilmesinin üreme fonksiyonlarının erken olgunlaşmasına yol açtığı görülmüştür (2,5,6,7).

Leptinin pubertenin başlaması, büyüme gibi diğer hormonal düzenlemeler üzerine de etkili olduğu gösterilmiştir (7). Leptinin regüle ettiği LH sekresyonunun ve hipotalamik hipofiz gonadal aksın kesin mekanizması bilinmemesine karşın puberte öncesi farelere leptin verildiğinde pubertenin hızlandığı görülmüştür. Normal çocuklarda ise vücut yağ kitlesinin artması ile puberteden önce leptin düzeyleri yükselir ve pubertenin başlangıcında pik yapar. Buna göre insanlarda puberteyi leptinin başlatabileceği ileri sürülmüştür (7). Paris'teki Pasteur Enstitüsü'nde genetik ve beslenme profesörü olan Philippe Frauguel'e göre "leptinin gerçek adı pubertin" gibi bir şey olmalıdır (4).

Gebelik; fizyolojik, psikolojik, anatomik ve biyokimyasal değişimlerin meydana geldiği bir süreç olarak kabul edilmektedir. Gebelik sırasındaki temel amaçlardan birisi; anne ve çocuk sağlığının en iyi şekilde devamının sağlanması olarak tanımlanmaktadır (8). Leptin konsantrasyonları gebelerde gebe olmayanlara göre daha yüksektir. Düşük yapan kadınlarda leptin konsantrasyonunda azalmayı, preeklampsi ve diyabetik gebelerde ise artışı gösteren çalışmaların ışığında leptinin gebeliğin devamı için önemli olduğu sonucuna varılmaktadır. Gebelikte leptin için ileri sürülen roller, fetoplasental ünite, hormon biosentezi, embriyonik hematopoezis, fetal/plasental anjiyogenezis ve fetüsün gelişimi ve büyümesinin düzenlenmesini içermektedir (9). Ayrıca sitotrofoblastik hücre kordonlarında leptin ve reseptörünün ekspresyonu trofoblast invazyonu düzenleyen moleküllerin sentezinde veya aktivitesinin artırılmasında yardımcı olabileceği fikrini vermektedir (10).

Ayrıca gebe sıçanlarda , serum leptini gebelik esnasında artar (11), doğumdan önce azalır (12). Leptin mRNA transkriptleri maternal adipoz doku, plasenta ve uterusu içeren çeşitli dokularda eksprese edilmektedir (13). Gebe sıçanlarda maternal serum seviyelerinin 18. gün civarında en yükseğe ulaştığı ve sonra 21. güne kadar azaldığı gözlemlendi (9). Sezaryanla alınan prematür bebeklerin serum leptin seviyesi düşüktür. Doğum sonrası laktasyon döneminde serum leptin düzeylerinin azalışı, laktasyon dönemine ait metabolik ihtiyaç artışı ile açıklanmaktadır (14).

Fetal gelişimin düzenlenmesi genetik, hormonal, beslenme ve çevresel bir çok faktörün etkilediği kompleks bir olaydır. Fetal gelişimin mekanizması tam olarak anlaşılmamış olsa da maternal, fetal ve çevresel faktörlerin birbirleriyle etkileşiminin fetal hücre büyümesi ve olgunlaşmasını düzenlemesi muhtemeldir (15).

6-10. gebelik haftalarında insan embriyolarında gelişen subkutan dokuların immünohistokimyasal boyanmasında leptin, lipidogenez ve farklılaşmanın başlamasından itibaren gelişen yağ hücreleri tarafından üretildiğini göstermektedir (16). Fetal koyunlarda yapılan tüm çalışmalar, geç dönemdeki gebeliklerde leptin transkriptlerin çokluğu ve fetal vücut ağırlığı arasında pozitif bir korelasyon olduğunu ileri sürmektedir (17). Fetüste ki leptinin temel kaynakları plasenta ve fetal dokulardır (18,19).

Leptin fetal kordon kanında gebeliğin 18.'inci haftasından itibaren saptanır. Düşük gebelik yaşı olan veya intrauterin büyüme geriliği olan bebeklerde gibi düşük vücut yağ içeriği olan yenidoğan bebeklerde kordon kanında leptin konsantrasyonu düşüktür. Normal ve anormal fetüs gelişimlerinde leptin değerleri arasındaki farklar fetal gelişimde leptine ilgiyi artırmıştır (20,21).

Yapılan çalışmalar leptin hakkında oldukça karmaşık bilgiler içermektedir. Bulmacanın parçaları çözüldükçe daha fazla bilinmeyen ortaya çıkmaktadır ve leptin hakkında daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır. Başlangıçta kronik obezite ile ilişkili bir anahtar olduğu düşünülen leptinin günümüzde çeşitli hormonal süreçlerle seksüel gelişim, üreme, hematopoezis, angiyojenezis, immünite ve iskelet gelişimi üzerine etkili olduğuna dair bilgiler çeşitli çalışmalarla ileri sürülmektedir (4).

Bu çalışmada prenatal ve postnatal fetal dokularda leptinin ekspresyonunu histolojik olarak immünohistokimyasal yöntemlerle belirlenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

1950'de Jackson laboratuvarı, önce *ob/ob* olarak adlandırılan otozomal resesif bir mutasyonu keşfetti. Bu mutasyonun, erken yaşlarda ciddi obezite, hiperfaji, diyabet ve enerji tüketiminde azalmaya neden olduğu bulundu. Kennedy ve arkadaşları 1953 yılında, vücut yağ depolarının durumunu beyine bildirerek enerji alımını ayarlayan, yağ dokusunda yapılan ve dolaşıma verilen bir faktörün var olduğunu ileri sürdüler. Hervey, 1958 yılında kobayların dolaşımında doygunluk veren bir faktörün varlığını gösterdi. Daha sonra 1953 yıllarına kadar genetik şişman sıçanlarda, özellikle otozomal resesif kalıtımla geçen *ob* ve *db* genlerindeki mutasyonlar üzerine çalışmalar yapıldı. Bu çalışmaların yapıldığı *ob/ob* ve *db/db* sıçan modelleri tek gen (monogenik) kaynaklıdır. Söz konusu mutasyonlar birbirinden farklıdır. Bu mutant genler otozomal resesif geçer (5,6,22). Bu iki hayvan soyunun fenotipleri birbirine çok benzer. Erken yaşta major obezite görülür ve polifaji vardır. Enerji tüketimi azaltılmış. Hiperglisemi ve hiperinsülinemi dikkati çeker. Fizyolojik deneylerden alınan sonuçlar, *ob/ob* sıçanların doymayı sağlayan faktörlerden yoksun olduklarını göstermiştir. *db/db* farelerde ise doymayı sağlayan faktör bol miktarda olduğu halde bu faktörün etkisine direnç vardır. Bu doyma sinyali veren faktörü 1994 yılında leptin olarak adlandırılmıştır. 1994'de Rockefeller Üniversitesi'nden Jeffery Friedman'ın ekibi *ob* genini ve *ob* geninin ürünü leptini kodlayan geni klonladılar (23).

16 kDa ağırlığında bir molekül olan leptin yağ depo miktarı ile ilişkili olarak yağ dokusundan sentezlenen ve salgılanan bir proteindir (23). Leptinin kaynağı beyaz yağ dokusudur. Ancak son çalışmalar yağ dokusu dışında beyin dahil bir çok kaynağın leptin üretme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (6).

Yağ depoları hakkında beyni bilgilendirdiği ve böylece enerji dengesini düzenlendiği bilinmektedir (23,24). Leptin spesifik etkilerini merkezi sinir sisteminde ve periferik dokularda (akciğer, böbrek, karaciğer, pankreas, overler, hematopoetik hücreler) bulunan spesifik reseptörlerle etkileşerek gösterir (3,6).

Serum leptin düzeylerini obezite, besin alınımı, glikoz, insülin, kortizol, endotoksinler sitokinler artırırken; ağırlık kaybı, açlık, insüline bağımlı diyabet, soğuğa maruz kalma, β_3 -adrenoreseptör agonistleri azaltır (25).

Metabolik sisteme ve obezitenin kontrolünde leptinin rolü yetişkinlerde anlaşılmıştır. Son çalışmalar feto-maternal plasental hormon olarak leptinin

fonksiyonel rolünü doğrulamaktadır. Leptin enerji dengesi, metabolizma, büyüme ve gelişimi düzenleyen anahtar bir hormondur. Önemli bir fetal gelişim faktörüdür ve fetal yağ gelişimini etkiler. Yine de leptin hakkında bilinmeyenler bilinenlerden fazladır (26).

Leptin özellikle insülin, glikokortikoid ve büyüme faktör ile yakın bir ilişki içindedir. Leptin otokrin ve parakrin mekanizmalar aracılığı ile gebeliğin devamı için önemlidir. Trofoblast invazyonu, plasental büyüme ve anjiyogenezisi düzenler ve preeklampsi, diyabetik gebelik ve tekrarlayan düşüklerin patogenezi ile ilişkilidir. Gelecekte bu patolojik durumların saptanması ve giderilmesinde rol oynayabilir (26).

Tablo 1. Leptin ekspresyonunu indükleyen ve baskılayan maddeler (88).

	ETKİ*	TÜR
Beslenme	+	Kemirgen+insan
Açlık	-	Kemirgen+insan
Glukokortikoidler	+	Kemirgen+insan
İnsülin	+	İnsan
Boğmaca toksini	c veya +	İnsan
cAMP	-	Kemirgen
Beta reseptör	-	Kemirgen
Agonistleri	-	Kemirgen
Tiyazolidinediyonlar	-	Kemirgen
Sitokinler	+	Kemirgen

* + = indüksiyon, - = baskılama, c= değişiklik yok

2.1. Leptin Molekülü

2.1.1. *ob* Geni:

Leptin 167 amino asitlik bir peptittir. 21 amino asitlik sinyal zinciri hücreden leptin salınmadan önce uzaklaştırılır. Dolaşımdaki leptin 14-16 kDa ağırlığında 146 amino asitten oluşan bir peptittir. İnsan leptininin %84 farelerle, %83 ratlarla homologtur (23).

ob geninin *ob/ob* sıçanlarda 6. kromozomda yerleşik olduğu tespit edilmiştir. İnsanlarda ise 7. kromozomun uzun kolunun 7q31.3 lokusunda lokalizedir ve kemirgen hayvanlarla benzerdir. Bu genin DNA'sı 1500 baz çifti

içerir ve protein sentezini yöneten ana kodlama bölgelerini kapsayan 3 ekzona ve 2 introna sahiptir. Leptini kodlayan baz dizisi 2. ve 3. ekzonlarda bulunur. İnsan *ob* geni büyük çoğunlukla yağ dokuda eksprese edilen yaklaşık 3,5 kb'lik bir mRNA kodlar (27).

2.1.2. Leptin reseptörleri ve işlevleri:

Leptin (*ob*) geninin klonlanmasından yaklaşık bir yıl sonra (1995) leptin reseptörü (*ob-R*) tanımlanmıştır (28). Leptin, metabolik etkilerinin çoğunu merkezi sinir sisteminde ve periferik dokularda (akciğer, böbrek, karaciğer, pankreas, overler, hematopoetik hücreler) bulunan spesifik reseptörlerle etkileşerek gösterir. Leptin reseptörü sınıf I sitokin reseptörüdür (3,6). Reseptör, leptin sinyalini janus protein tirozin kinaz 2 (JAK proteinleri) ile 3,5,6 sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörlerine (Signal transducer and activators of transcription 3,5,6=STAT 3,5,6) iletir. Bu STAT alt grubuna 'yağ-STAT'ları' denir (3, 6,29).

Leptin spesifik leptin reseptör izoformlarını aktive ederek etkisini gösterir. İki ayrı formda leptin reseptörü izole edilmiştir. Uzun formda leptin reseptörlerinin (*ob-Rb*) yiyecek alımını ve enerji metabolizmasını düzenleyen hipotalamusta yerleştiği ve bu reseptörün birincil olarak leptin sinyalizasyonunda etkili olduğu düşünülmektedir. Uzun reseptör izoformu, büyük bir ekstrasellüler kısım , kısa bir hidrofobik transmembran kısım ve oldukça kısa intrasellüler kısım olmak üzere üç farklı yapıya sahiptir (2,6).

Kısa reseptör izoformunda reseptörün (*ob-Ra, ob-Rc, ob-Re, ob-Rd*) hidrofobik transmembran kısmı bulunmaz. Bu izoform olasılıkla leptin reseptörünün çözülebilir bir formudur. Ekspresyonu beyin koroit pleksus ve leptomeninks gibi alanlarda çok fazladır. Burada, leptinin kan-beyin veya kan-serebrospinal sıvı bariyerinden alınmasına yardımcı oldukları yada *ob-Rb*'nin bir antagonisti olduğu düşünülmektedir (5,6,30,31).

Leptin reseptör ,ekspresyonu sıçanların santral sinir sisteminin bir çok alanında özellikle hipotalamusta olmasına rağmen aynı zamanda akciğer, böbrekler, karaciğer, iskelet kas dokusu, kalp, testis, hematopoetik hücreler ve adipoz dokusu gibi periferik hücrelerde de mevcuttur (27,32). Sınıf I sitokin reseptör ailesinden olan uzun leptin reseptör izoformu daha önce açıklandığı gibi JAK'ı aktive ederek JAK-STAT sinyali ile transkripsiyonu aktive eder ve bazı

nöropeptitlerin ekspresyonunu değiştirir. Hipotalamik-hipofizer-gonadal eksenini etkileyen arkuat nükleustaki nöropeptit Y ile hipotalamik-hipofizer-tiroidal eksenini etkileyen tirotropin serbestleştirici hormon (TRH) ve hipotalamik-hipofizer-adrenal eksenini etkileyen kortikotropin serbestleştirici hormon (CRH) bu konuda en iyi çalışılan ve JAK-STAT sinyali ile ekspresyonu değişen nöropeptitlerdir (2).

Leptin reseptörünün aktivasyonunun ve transkripsiyon faktörlerinin enerji metabolizmasını düzenleyici etkilerine aracılık eden genler bilinmemektedir. Etkili faktörlerden birisi besin alımını potansiyel olarak uyaran ve sentezi leptin tarafından inhibe olan hipotalamik nöropeptit Y'dir (NPY). NPY 36 amino asitli, pankreatik polipeptit ailesinden bir polipeptittir ve besin alımını artırır (3). NPY memelilerin beyin dokusunda; hipotalamus, hipokampus ve korteksinde yüksek konsantrasyonda bulunur. NPY'nin beslenme davranışı üzerinde güçlü bir uyarıcı etkisi vardır. Şişman hayvan modellerinin çoğunda NPY konsantrasyonları artmıştır. İntraserebroventriküler NPY infüzyonlarının normal hayvanlarda şişmanlığa neden olduğu gösterilmiştir. Leptinin eksik olduğu *ob/ob* sıçanlarda NPY ve NPY mRNA konsantrasyonları yüksek bulunmuştur. Bu hayvanlara leptin verildiği zaman yiyecek alımı ile birlikte NPY konsantrasyonları da azalmaktadır. Böylece NPY'nin leptinin etkili olması için kritik bir rol oynadığı kanısına varılmıştır (5,33).

2.2. Obezitede Leptin

Genetik olarak leptin eksikliği bulunan ve şişman olan *ob/ob* farelere leptin verildiğinde; fizik aktivitelerinin arttığı, yiyecek alımlarının azalarak kilo kaybettikleri, glikoz intoleransının kaybolduğu ve diyabetlerinin düzeldiği saptanmıştır. Bu çalışmalar, yağ dokusunda sentezlenerek dolaşıma verilen leptinin beyindeki doyma merkezini etkilediğini, vücut yağ dokusu kitlesini ve vücut ağırlığını düzenlediğini düşündürmüştür. Ancak bazı şişman insanlarda, şişman olan *ob/ob* farelerin tersine leptin düzeylerinin yüksek olarak saptanması, şişmanlarda leptin etkisinin yetersiz olduğunu ya da bir direncin var olabileceğini akla getirmiştir. Böylece şişman insanlarda yağ dokusu kitlesi arttıkça leptin sentezi artmakta ancak doyumluk merkezi leptine duyarsız olduğu için artmış yiyecek alımı sürmekte ve yine yağ dokusu kitlesi ve leptin sentezi artmaktadır. Nitekim genetik olarak şişman ve diyabetik olan *db/db* farelerde leptin

reseptöründe mutasyon olduğu ve bu farelerin leptin tedavisine yanıt vermedikleri saptanmıştır (1,2,5,34).

2.3. Leptin ve Plasenta

Leptin adipoz doku tarafından salgılanır. Daha sonraki çalışmalarda plasental trofoblastik ve amniyotik hücreler gibi adipoz olmayan dokularda da üretildiği gösterilmiştir (35). Plasenta leptin hareketleri için bir hedef olduğu kadar aynı zamanda kaynaktır (36,37). İnsan plasental leptini büyüklük ve immünreaktivitesi bakımından adipoz doku leptinine benzediği ve insan leptin mRNA ve proteinlerinin maternal yüzde sinsityotrofoblastlarda yerleştiği gösterilmiştir (36). Leptin geni fetal kan ile direkt temas eden villus vasküler endotel hücrelerinde de eksprese olmaktadır. Plasental içerikleri gebelik yaşı ile artar, östradiol ve β -HCG konsantrasyonları ile pozitif ilişkilidir (38). İlk trimester plasental villusları term villusları ile karşılaştırıldığında 50 kat daha yüksek leptin salgılar ve IL-1 α , östradiol ve IL-6 tarafından desteklenmektedir. Plasental leptin konsantrasyonları karsinoma mol hidatiformlu hastalarda dikkat çekici şekilde artar ancak cerrahi yada ilaç tedavisini takiben hemen azalır. İlk amniyon hücre kültüründe de leptin üretilmesi amniyotik sıvının da leptinin bir kaynağı olabileceği fikrini vermektedir (35).

Leptin reseptörleri maternal birleşimde sinsityotrofoblastlarda birlikte yerleşiktir. *Ob-Rb* (sinyalleşme formu), *Ob-Ra* (transport formu) ve *Ob-Re* (çözünür formu) içeren leptin reseptör *Ob-R* geni fare plasentasında mevcuttur (39). Son bilgiler ise, leptinin kısa (*Ob-S*) ve *Ob-RL* uzun reseptör izoformlarının gebelik esnasında insan apikal sinsityotrofoblastlarında ekspresyonunu ileri sürmektedir (40). Hem leptin hem de *Ob-Rs*'nin varlığı leptinin beyaz yağ doku gibi insan plasentasında da parakrin şekilde olduğu kadar otokrin şekilde de hareket edebildiği fikrini verir (26).

İnsan plasentasında leptin ve *Ob-R*'nin fonksiyonu henüz açık değildir. Bununla birlikte leptin spiral arterlerin trofoblast invazyonunda önemli bir role sahip olabilir. Sitotrofoblastik hücre kordonlarında leptin ve reseptörünün ekspresyonu trofoblast invazyonu düzenleyen moleküllerin sentezinde veya aktivitesinin arttırılmasında yardımcı olabileceğini düşündürür (10).

Trofoblast invazyonu uterus duvarına sitotrofoblastik hücrelerin göçünü kolaylaştıran fetal fibronektin ve hücre dışı matriksin bozulması için özgün

proteazların kullanımını gerektirir. *In vitro* bilgiler, leptinin ilk trimester sitotrofoblast kültüründe leptin sekresyonunu artıran IL-1, östradiol 17 β 'yi içeren düzenleyici çeşitli trofoblastik büyüme faktörleri tarafından trofoblast invazyonunu uyarır. Leptin MMPs'nin bir uyarıcı olarak bilinen IL-1'e benzer bir mekanizma tarafından fFN, MMP-2 ve MMP-9 sentezini de uyarır (41,42). Böylece trofoblastik leptin, invaziv metalloproteazların bir indükleyicisi ve integrin ekspresyonunun bir düzenleyicisi gibi fonksiyona sahip olabilir (20).

2.3.1. Leptin ve Plasental Gelişim:

Doğumda insan kordon kanında leptin konsantrasyonları plasental büyüklük ile pozitif ilişkilidir (43,44). Bu mekanizmanın oluşumu açık değildir. Leptinin, domuz aort endotel hücrelerinde ve insan ven endotel hücre kültürlerinde gösterildiği gibi plasental anjiyogenezisi uyarması olasıdır (45,46). Leptin *Ob-R*, gebeliğin ilk trimesteri esnasında koryonik villusların çeşitli fetal kan damarlarında vasküler endotel hücrelerde tanımlanmış olması trombosit kökenli büyüme faktörü B, bazik trofoblastik büyüme faktörü ve vasküler endotel büyüme faktörünü içeren büyüme faktörleri ile sinerjik hareketi ile plasental anjiyogenezisi uyarabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte plasental anjiyogeneziste leptinin rolünün belirlenmesi daha ileri çalışmaları gerektirmektedir (47).

2.4. Leptin ve Gebelik:

Gebelik, fizyolojik ve metabolik değişimlerin yaşandığı bir süreçtir. Gebelikte kilo artışı olmaktadır fakat kilo değişiklikleri için tek bir değer yoktur. Chesley'e (48) göre gebelikte ortalama toplam alınan kilo 11 kilogramdır. Parker ve Abrams'a (49) göre gebelikte kilo alımında azalma olması düşük doğum ağırlıklı çocuklara neden olmaktadır.

Leptin konsantrasyonları gebe olmayanlara göre gebelikte daha yüksektir (50). Leptin konsantrasyonunun 2. trimesterde pik yaptığını ve doğuma kadar aynı kaldığını ileri sürülmektedir. Ancak başka bir çalışma da ise 2. trimesteri takiben doğuma kadar leptin konsantrasyonlarının azaldığını ileri sürülmüştür (51). Bu bilgiler çelişkilidir. Ancak leptin seviyesindeki artışa hem serbest leptin düzeylerindeki artış hem de leptin bağlayan proteinlerdeki değişimlerin neden olduğu ileri sürülmüştür (31).

Gebelik esnasında artan leptin salınımının fonksiyonel rolleri ve nedenleri açık değildir. Gebelikte dolaşımdaki leptin düzeyindeki artış, plasental üretim,

adipoz doku sekresyonunun artması veya bağlayıcı proteinlerin (*Ob-Re*) azalması yüzünden olabilir (52). Kemirgenlerde yapılan çalışmalar gebelik esnasında maternal hiperleptineminin nedeninin , östrediol ve glikokortikoidlerdeki artış sonucu adipoz leptin mRNA'nın artması yüzünden olabileceğini düşündürmektedir (53). İnsan gebeliğinde artan maternal leptin konsantrasyonlarının 3 nedenden dolayı plasental kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Bunlardan ilki, maternal leptinin plasentanın atımını takiben hemen gebelik öncesi seviyesine dönmesidir. İkincisi ise maternal BMI (Body Mass Index: Vücut Kitle İndeksi) ve leptin arasında bir korelasyon olmamasıdır. Son neden ise leptin konsantrasyonlarındaki artış adipoz dokunun artmasından önce olmasıdır. β -HCG ve östrojen gibi gebelik hormonları maternal hiperleptinemide rol oynar (54).

Gebelik esnasında maternal leptinin fizyolojik rolü hala gizemlidir. Gebelik, maternal vücut yağı, ağırlığındaki artış ve nöroendokrin sistemdeki değişiklikler ile hipermetabolik bir durumdur. Gebelikte maternal enerji depolarının korunmasını amaçlayan besin alınımındaki artış ile pozitif bir enerji dengesi vardır. Paradoksal olarak yüksek maternal leptin seviyesi hipotalamik seviyede leptin direncini gösterir. Bu fizyolojik leptin direncinden uzun ve kısa hipotalamik leptin reseptörleri sorumlu olabilir. Hoggard ve arkadaşları (55) hipotalamusta kısa formda herhangi bir değişme olmaksızın leptin reseptörünün uzun formunu kodlayan (*ob-Rb*) mRNA da önemli derecedeki azalmayı gebe sıçanlarda göstermişlerdir. Hipotalamusta *ob-Rb*'nin bu spesifik azalması kısmen leptin direncini açıklamaktadır. Alternatif olarak, *Ob-Rs*'nin kısa inaktif formlarının artan ekspresyonu ile birlikte leptin reseptör *Ob-Re*'nin çözünür bağlayıcı proteinindeki artış gebe farelerde leptin reseptör gen ekspresyonunun gebe olmayanlardan farklı bir mekanizma ile düzenlendiğini göstermiştir. Çünkü, maternal dolaşımdaki peptitte önemli bir artış yoktur. Onun yerine gebeliğin 20-30. haftalarında çözünür maternal leptin konsantrasyonunda azalma vardır (31).

2.4.1. Kemirgenlerde Gebelik ve Leptin

Gebe farelerde serum leptin düzeyleri gebeliğin 17. gününde en yüksektir ve gebe olmayanlara kıyasla çok daha fazladır. Leptin plasenta , desidua , uterus ve adipoz dokuda bulunmuştur. Adipoz dokuda leptin mRNA'sı gebe olmayan farelere göre birkaç kat artar (56,57). Michael ve arkadaşları (9) gebe sıçanlarda

maternal serum seviyelerini 18. gün civarında en yükseğe ulaştığını ve sonra 21. güne kadar azaldığını bulmuşlardır . Leptin ve reseptörünün ekspresyonu RT-PCR (Reserve transcription and polimerase chain reaction) ve in situ hibridizasyon kullanarak geç gebelikte fare fetus ve plasentasında tanımlanmıştır. Saç follikülleri, kemik, fetal kıkırdak ve plasentada leptin reseptörünün uzun formları ve leptin gen ekspresyon seviyeleri önemli derecede saptanmıştır. Reseptör ekspresyonu , fetal beyin koroit pleksusu ve leptomeninksler kadar akciğerde de elde edilmiştir (58). Leptin, fare gebeliği süresince plaseenta tarafından üretilmektedir, fakat gebeliğin sürdürülmesinde leptinin önemi anlaşılmamıştır.

Laktasyondaki sıçanlarda leptin seviyesindeki azalma olduğu ve bu mekanizma doğum sonrası laktasyonun metabolik gereklerinin karşılanmasına olanak sağladığı düşünülmüştür (60).

2.4.2. Leptin ve Abortus:

Düşük yapan kadınlarda leptin konsantrasyonunda azalmayı, preeklampsi ve diyabetik gebelerde ise artışı gösteren çalışmaların ışığında leptinin gebeliğin devamı için önemli olduğunu söylenebilir (anormal fetoplental ünitenin gelişimi ile ilişkilidir). Spontan abortus yapan kadınlarda ilk trimesterde maternal leptin konsantrasyonu normal gebelere göre %38 daha azdır (61). Bununla beraber, bu çalışmada leptin fetal kaybı takiben ölçülmüştür. Bundan dolayı, azalan leptin konsantrasyonunun düşük sonucu görülmesi olasıdır. Bu olasılığı ortadan kaldırmak için yapılan , son bir çalışmada tekrarlayan düşük hikayesine sahip kadınlarda leptin seviyeleri ölçüldü ve son gebelik sonucu ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmanın ışığında leptin konsantrasyonlarının düşük yapan kadınlarda canlı doğum yapan kadınlara oranla daha düşük olduğu yönünde bir sonuca varılmıştır (62).

2.4.3. Leptin ve Preeklampsi:

Maternal sirkülasyonda leptin konsantrasyonunun kontrol gruplarına göre preeklampsili gebeliklerde önemli derecede yüksek oluşu maternal leptin konsantrasyonunun preeklampside bir marker olarak kullanılabileceği fikrini vermiştir (63). Dahası, preeklampside maternal leptin konsantrasyonlarındaki değişimler ürik asit ve kan basıncı ile de ilişkilidir ve maternal leptin

konsantrasyonu kan basıncında artış gösteren preeklempitik hastalarda antihipertansif tedavi ile belirgin şekilde azalmaktadır (64).

Ayrıca preeklempitik annelerin preterm bebeklerinde postpartum leptin konsantrasyonları preeklempisi olmayanlardan daha yüksektir. Preeklempitik grupta bulunan daha yüksek leptin seviyesi hipoksi yüzünden olabilir (65).

Preeklempside artan leptin seviyesi artan plasental üretime de bağlı olabilir. Bu TNF- α , IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinlere cevap olarak preeklempside plasental mRNA leptinin yüksek seviyesi ile kanıtlanmıştır. Sarraf ve arkadaşları (66) farelerde proinflamatuvar sitokinlerin leptin konsantrasyonunu artırdığını göstermişlerdir. Preeklempside hiperleptineminin başka bir nedeni de iskemi olabilir. Bu görüşü Mise ve arkadaşları (67) hipoksik şartlarda (%5 O₂) BeWo hücre kültüründe normal şartlara göre daha yüksek leptin seviyesi bularak kanıtlamıştır.

2.4.4. Leptin ve Diyabetik Gebelik:

Leptin seviyelerinde önemli bir fark olmamasına rağmen, tip I diyabetli kadınlar normal kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 3. trimesterde daha da artan önemli derecede yükselmiş leptin reseptörüne sahip oldukları gözlenmiştir (31). Diyabetik grupta çözünür leptin seviyeleri ve BMI arasında lineer (doğrusal) bir ilişki vardır. Çözünür leptin reseptörlerinin leptine yüksek bir bağlanma affinitesine sahip olduğu ve bunun leptinin bir membran reseptörüne bağlanmasını baskıladığı göz önünde bulundurulursa, tip I diyabette daha yüksek çözünür leptin reseptör seviyesi leptinin hareketine bir direnç mekanizması oluşturur böylece ağırlık kazancının değişimlerinde rol oynadığı varsayılabilir (50). Diyabetik gebeliklerde maternal ve plasental leptin arasında ilişki bulunmaması, plasental leptinin maternal sirkülasyona salınmadığını gösterir ve böylece tip I diyabetik gebelerdeki plasental ve maternal leptin konsantrasyonlarındaki uyumsuzluk açıklanabilir (68).

Çalışmalar, gebelik diyabet olan (anormal glikoz toleranslı) kadınlarda maternal leptin konsantrasyonları normal ve tip I diyabetli kadınlardan daha yüksek olduğunu göstermiştir (69).

İnsülin tedavisi uygulanan diyabetik annelerin yenidoğanlarında, kordon kanında leptin düzeyleri normal gebelikte olduğu gibi doğum ağırlığı ve cinsiyetle ilgili değildir. Çalışmalar maternal diyabet ve yeni doğanın leptin düzeyi

arasındaki ilişkiyi göstermiştir (70). Bu çalışmalar, özellikle insülin tedavisi uygulanan diyabetik annelerin bebeklerinde kordon kanında yüksek leptin düzeyi göstermektedir. Bu artan yağ kitlesinin kanıtı olabilir (68). Fetal insülin *ob* gen ekspresyonu ve adipositler tarafından leptin üretimi indüklenir. Leptin merkezi aynı zamanda düzenleyici hormon olarak fonksiyon görür, pankreatik beta hücrelerinde ATP K kanallarını aktive ederek insülin üretimini inhibe eder. İnsülin ve leptin arasındaki bu negatif geri bildirim mekanizması yetişkin insanlar kadar kemiricilerde de iyi tarif edilmiştir. Ayrıca diyabetik kadınların bebeklerinde dolaşımdaki leptin düzeyi ve maternal HbA1c arasında belirgin bir ilişki vardır (71).

2.4.5. Leptin ve Laktasyon:

Erken laktasyon periyodu esnasında maternal leptin ve prolaktin seviyeleri arasında güçlü negatif bir ilişki vardır (54). Leptin konsantrasyonları laktasyondaki annelerde olmayanlara göre daha yüksektir. Bu da leptinin esas rolünün laktasyonda ekstra taleplerin karşılanması için enerji depolarının mobilize ettiği fikrini verir (72). İnsan meme epitel hücrelerinde leptin reseptör mRNA'nın varlığı meme bezinin büyümesi ve gelişiminde leptinin rolüne işaret etmektedir (73). Leptin maternal adipositle ilişkili yüksek konsantrasyonlarda sütte vardır. Süt leptini yeni doğanların ince barsaklarında leptin reseptör izoformlarının varlığı bebeklerin büyüme ve gelişmesinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir (74).

2.5. Leptin ve Fetüs:

2.5.1. Fetal Leptinin Kaynağı:

Fetal sirkülasyondaki leptinin kaynağı tartışmalıdır. Esas kaynaklar plasenta ve fetal adipoz dokudur (19). Postpartum dönemde leptinin azalması fetal leptinin plasental kaynaklı olduğu fikrini vermiştir (75). Plasental perfüzyondan elde edilen in vitro deney bilgileri 32 kat daha yüksek olan plasental leptinin %98'i maternal sirkülasyona ve %1.6'sı fetal sirkülasyona salınır ve diğer plasental hormonlardan (β -hCG ve hPL) 32 kat daha fazladır. İlk ve 3. trimester plasentasında leptin mRNA transkriptlerinin varlığı da plasantanın fetal leptinin önemli bir kaynağı olduğu hipotezini desteklemektedir (35). Ayrıca 6-10 haftalık

insan embriyonlarının subkutan dokularının immünohistokimyasal boyaması leptin lipidogenezis ve henüz farklanmamış yağ hücreleri tarafından üretildiğini göstermiştir (16). Fetal koyunlarda tamamlanan çalışmalar geç gebelikte fetal ağırlık ve leptin transkriptlerinin çokluğu arasında pozitif bir ilişki olduğunu ileri sürmektedir (17). Normal ve patolojik gebeliklerde bebeklerin fetal doğum ağırlığı ve fetal leptin düzeyleri arasındaki ilişki olması fetal leptin sentezine fetal yağ kitlesinin yardım edebileceğini göstermiştir. Daha sonra ki çalışmalar, kordon kanındaki leptin düzeylerinin plasental leptin seviyesinden bağımsız olduğunu ve böylece insan fetüslerinde yağ kitlesinin bir marker gibi olabileceğini ileri sürmektedir. Leptin mRNA ve proteini 28-30 haftalık insan fetüslerinin adipoz doku biyopsilerinde bulunmuştur fakat yetişkin yağ dokusundan 2 kat daha düşük seviyededir. Gelişim geriliği olan fetüsler gebelik yaşına göre büyük bebeklerle karşılaştırıldığında daha düşük leptin konsantrasyonuna sahip olması ile birlikte daha yüksek plasental seviyeler göstermesi dolaşımdaki leptinin ana kaynağının fetal adipoz doku olduğuna işaret eder (68). Fetal leptinin 2 kaynağa sahip olması mümkündür, plasentanın fetal adipoz dokunun olmadığı erken dönemde anahtar bir rol oynaması ve adipoz dokunun ise geç dönemde baskın bir rol oynaması mümkündür. Ancak 3. trimesterde fetal leptinin kaynağı tam olarak açıklanamamıştır (26).

2.5.2. Leptin ve Normal Fetal Gelişim:

Leptin fetal gelişim düzenlenmesinde önemli olduğu düşünülmektedir (76). Leptin, gebeliğin 18 haftasında insan fetal kanında anne ile karşılaştırıldığında daha düşük konsantrasyonda bulunmuştur. Maternal ve kordon leptin seviyeleri arasında korelasyonun yokluğu, leptinin fetoplasental düzenlenmesinde 2 kompartman arasında iletişim olmadığı fikrini vermiştir (21).

Fetal leptin konsantrasyonları, gebeliğe bağlı fetal adipoz doku gelişimi ve yağ kitle birikimi ile uyumlu ve gebelik yaşı ile ilişkilidir (77). Bazı çalışmalar, fetal plazma leptin konsantrasyonunun dişilerde erkeklerden daha yüksek olduğunu ileri sürmüştür (36,43). Ancak zıt görüşte çalışmalarda mevcuttur (21,78). Fetal leptin konsantrasyonu ve cinsiyet arasındaki ilişkinin mekanizmaları ve önemi tam olarak anlaşılamamıştır. Doğumda erkek ve dişi bebekler arasında doğum ağırlığında ,vücut ağırlığı/uzunluğu, içerik ve vücut yağ dağılımı, E₂ nin serum

konsantrasyonu ve testosteron hormonu arasında fark olmayışı leptin konsantrasyonlarındaki farkın genetik nedenlerden olduğu fikrini vermiştir (43).

Term bebeklerde umbilikal kordon leptin konsantrasyonunun, plasental ağırlık, fetal insülin, doğum ağırlığı, uzunluğu, baş çevresi ile olan bağıntısı plasental leptin ve fetal büyüme arasında ki potansiyel bir ilişkiyi göstermiştir (21,43,44,50). Fakat, fetal leptin ve plasental ağırlık arasındaki ilişki diğer araştırmacılar tarafından desteklenmemiştir (18,78).

Umbilikal kordon leptin konsantrasyonunun vajinal doğum yapanlarda sezaryan doğumlara göre daha yüksek olması doğum şeklinin de etkilediğini gösterir. Vajinal yolla doğan bebeklerde leptin düzeyinin umbilikal ven arter farklarının varlığı ve sezaryan doğum yapanlarda böyle bir farkın olmayışı doğum esnasında hipoksik uterus konsantrasyonu veya yüksek kortizol düzeylerine yanıt olarak plasental leptin salınımının artmış olduğuna dair kanıt olmuştur (79).

2.5.3. Leptin ve Anormal Fetal Büyüme:

Gebelik yaşına göre büyük bebeklerde leptin konsantrasyonu, gebelik yaşına göre küçük bebeklere kıyasla 12 kat ve normal bebeklere göre 3 kat daha yüksektir (71,78). Bir çok çalışma gebelik yaşına göre büyük doğan bebekler ve intrauterin gelişme geriliği olan fetüslerin doğum ağırlığı ve kord leptin düzeyleri arasında güçlü bir ilişki göstermişlerdir ancak gebelik yaşına göre normal doğan fetüsler de zayıf bir ilişki olduğu bulunmuştur (18,44). Gebelik yaşına göre büyük doğan ve intrauterin gelişme geriliği olan bebekler arasında leptin düzeylerindeki farklar yağ kitlesi ile ilişkili olabileceği gibi, hem fetal leptini hem de vücut yağını düzenleyen insülinin de etkisi olabilir (20,68). Aile hikayelerinde obezite olan bebekler yüksek leptin düzeyine sahiptir. Bu da leptin ve obez hikaye arasındaki ilişkiyi verir (51). Leptin ve anormal fetal ağırlık arasındaki ilişki maternal ve intrauterin çevreden bağımsız olarak ikiz gebeliklerde değerlendirilebilir.

Bir ikiz çalışmasından elde edilen veriler, zigot oluşumundan bağımsız olarak (monozigot veya dizigot), intrauterin gelişim geriliği olan ikizlerde kordon leptin konsantrasyonlarının onlarla eş zamanlı doğan ama normal ağırlıkta olan ikizlerden daha düşük olduğunu ileri sürmüştür (80). Başka bir çalışma da ikiz bebeklerin kordon leptin düzeyleri ve doğum ağırlığı arasında güçlü bir pozitif ilişki bulunmuştur (81). Bu bilgiler, ya adipoz doku ile basit bir ilişkiyi

yansıtabilir ve böylece gelişim problemleri olan ikizlerdeki yağ birikimindeki varyasyonlarla uyumludur veya fetal gelişimin önemli bir düzenleyicisi olarak leptinin önemli bir role sahip olduğunu gösterebilir (82).

Kötü beslenme insülin üretimini bozabilir. Hayvan çalışmaları da fetal leptin konsantrasyonunun direkt olarak fetüsün kötü beslenmesi, büyüme hormonu, insülin ve IGF-I ve IGFI/IGFBP-3 oranlarından etkilendiğini göstermektedir. Plasental ağırlık, kordon leptin düzeyi ve fetal doğum ağırlığı arasındaki yakınlık bazı faktörler ile açıklanabilmektedir; a) Anne ve fetüs arasındaki beslenme sinyallerin sağlanması, b) Plasental gelişim ve anjiyogenezde leptinin direk rolü, c) Fetal insülin, tiroit hormonu ve kortizol aracılığı ile etkisi. Alternatif olarak, kemiricilerde düşük leptin seviyesi azalan GH (growth hormon) ile ilişkilidir ve leptin uygulanması hipotalamusta GH-releasing hormonunun sentezini artırarak GH sekresyonunu normale döndürebileceği ileri sürülmüştür (83). Leptin reseptör mRNA insan fetüslerinde ön hipofizde tanımlanmıştır ve leptin uygulamasının özellikle diğer hipofiz hormonlarının etkilemeden insan fetal hipofiz kültüründeki GH sekresyonunu stimüle edeceği gösterilmiştir (84).

BMI ve intrauterin büyüme durumundan bağımsız olarak, doğumdan sonraki birkaç günde leptin konsantrasyonu oldukça azalır (21,85). Postnatal dönemde plazma leptin konsantrasyonlarındaki azalma ekstrauterin hayat esnasında fetal hemostazisinde değişimler için fizyolojik adaptasyonun bir parçası olabilir. BMI ve cinsiyeti dikkate almadan ilk bir yılın sonunda intrauterin gelişme geriliği olan çocuklar normal bebeklere göre önemli derecede daha yüksek leptin değerlerine sahiptir. Bu fark 2 yılın sonunda kaybolur. İnrauterin gelişme geriliği olan çocuklardaki daha yüksek leptin konsantrasyonunun önemi açık değildir, fakat bu çocukların gelişimlerinin artması için yararlı bir adapte leptin direnci geliştiğini yada bu intrauterin gelişim geriliğinin bir sonucu olarak adipoz dokudaki bir bozukluğu yansıtıyor olabilir. Her iki hipotezi de test etmek gerekir (85).

2.6. Çocuklukta ve Pubertede Leptin

Leptin pubertenin başlangıcı, menstruel siklus ve üreme yeteneği için gerekli olan yağ depolarının kritik miktarını beyne iletir. Leptinin regüle ettiği LH sekresyonunun ve hipotalamik hipofiz gonadal aksın kesin mekanizması bilinmediği halde puberte öncesi farelere leptin verildiğinde pubertenin hızlandığı

görülmüştür. Normal çocuklarda vücut yağ kitlesinin artması ile puberteden önce leptin düzeyleri yükselir ve pubertenin başlangıcında pik yapar. Buna göre insanlarda puberteyi leptinin başlatabileceği ileri sürülmüştür. Bunun tersine inaktive leptin reseptör mutasyonları olan kişilerde ise morbid obezite ve hipogonadotropik hipogonadizm vardır (7, 2).

Erişkin ve ergenlik dönemlerinde kadınlarda leptin düzeyinin erkeklere kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu bulgu kadınların daha fazla vücut yağ kütlelerine sahip olmaları ile açıklanmıştır. Postmenopozal kadınlarda, premenopozal kadınlara göre daha düşük leptin düzeyi saptanması, leptin metabolizmasının östrojen ve progesteron ile ilgili olduğunu akla getirmiştir. Ancak post menopozal kadınlarda yağ dokusu kitleleri aynı olan erkeklerden, daha yüksek leptin düzeyleri saptanmıştır. Ayrıca hipogonadizimli erkeklerde benzer BMI'ye sahip erkeklere göre 3 kat daha yüksek leptin düzeyleri saptanmıştır. Aynı erkeklere testosteron verildiğinde leptin düzeylerinin normale dönmesi androjenlerin leptin sentezi üzerine baskılayıcı etkileri olduğunu akla getirmiştir (5).

Pubertenin başlaması için vücutta yeterli yağ dokusu depolarının bulunması gereklidir. Orta derecede şişman kızlarda puberte erken başlamaktadır. Patolojik şişmanlık durumlarında, malnütrasyonlularda, kronik hastalığı olanlarda, anoreksia nevrozalı kızlarda pubertenin başlaması gecikmektedir. Puberte uyku sırasında hipotalamik-hipofizer gonadotropinlerin ve büyüme hormonunun pulsatif olarak salınması ile başlamaktadır. Ayrıca yağ dokusu ile ilişkili bilinen leptinin, pubertenin başlamasını sağlayan metabolik sinyal rolü oynadığı ileri sürülmüştür. Genetik olarak leptin eksikliği ve infertilitesi bulunan *ob/ob* farelerin leptin ile tedavisi sonucunda ; dişi farelerde ovaryum ağırlığı , erkek farelerde ise testis ağırlığı artmış ve ayrıca histolojik incelemelerinde gonadal stimülasyon bulguları gözlenmiştir. Bir başka çalışmada ise normal dişi farelere leptin verilmesi üreme fonksiyonlarının erken olgunlaşmasına yol açmıştır. Bu bulgular leptinin hipotalamus-hipofizer-gonadal eksenin düzenlenmesinde rol oynadığına işaret etmektedir (5, 2).

Bir çalışmada leptin düzeyinin erkeklerde on yaşına kadar yükseldiği, pubertenin başlaması ile serum FSH ve LH düzeyleri yükselirken leptin düzeylerinin ani olarak azaldığı saptanmıştır. Kızlarda ise pubertede FSH, LH ve östradiol yükselmesine paralel olarak serum leptin düzeyi artmıştır. Diğer bir

çalışmada ise leptin, erkeklerde pubertenin başlamasından hemen önce yükselmiş daha sonra testosteron yükselirken azalarak iki yıl boyunca sabit olarak kalmıştır. Kızlarda ise pubertede serum leptin düzeyinde her 1 ng/ml artışın , menarşın bir ay erken başlamasına neden olduğu ve yağ dokusu kitlesindeki artış oranının , menarş yaşı ile benzer biçimde ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar; leptinin başlaması, üreme fonksiyonlarının olgunlaşması ve seks steroidleri ile ilişkili olduğuna işaret etmektedir (2,5,7,34,86) .

3. MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada, sıçanların prenatal 15.,17.ve 19. günlerdeki fetüsler ve postnatal 2. ve 4.gün yavrularının çeşitli dokularında leptin (*Ob proteini*) tespit etmek için, immüno histokimyasal boyama yöntemi uygulandı. Bu amaçla elde edilen 4-5 µm kalınlıktaki parafin blok doku kesitlerine uygulanan primer antikorlar antijenlere (*Ob proteini*) bağlandı, daha sonra ABC kompleksi ile konjuge edilmiş sekonder antikorlar bu komplekse bağlandı. Bundan sonra da ortama substrat AEC; 3-amino-9-ethyl carbonde eklenerek gözle görülebilir ürün ortaya çıktı.

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada, her kafeste ağırlıkları 153-210 gram arasında değişen 3 adet dişi, 1 adet erkek olmak üzere toplam 3 kafeste 9 dişi, 3 erkek Wistar albino cinsi sıçanlar kullanılmıştır (n=8). Deney süresince hayvanlara yeteri kadar beslenmesi için su ve yem (Yem Kurumu Standart Sıçan Yemi) verildi.

3.1.2. Fetüslerin Elde Edilmesi

Erkek ve dişi sıçanlar ortalama 24 saat aynı kafeste bırakıldı. Erkek sıçan 24 saattin sonunda dişi kafesinden çıkarılarak gebeliğin ilk günü kabul edildi. Ultrasonografi yöntemi ile gebe olduğu tespit edilen dişi sıçanlar, eter ile anestezi altına alınarak abdominal kesi yapılarak uteruslarından 15, 17 ve 19. günlerde fetüsleri alındı. Postnatal olarak ise doğumdan sonra 2. ve 4. günde her gün bir yavru eter ile öldürüldü.

3.2. Metot

3.2.1. Histolojik Çalışmalar

Elde edilen fetüs ve yavrular fiksasyon için hemen % 10'luk nötral formalin içine konmuşlardır. Yıkama işleminden sonra alkol serileri, şeffaflandırma, infiltrasyon ve parafine gömme gibi klasik histolojik yöntemler uygulandı.

Elde edilen tüm fetüs ve yavrular % 4'lük nötral formalin solüsyonuna alınıp tespit edildi.

Fiksatif içeriği:

- | | |
|--|--------------|
| - Formalin % 40'luk | 1 hacim |
| - Su | 9 hacim |
| - Kalsiyum karbonat (CaCO ₃) | 2 çay kaşığı |

A- Dehidratasyon:

<u>Alkol derecesi</u>	<u>Süre</u>
% 70	1 gece
% 80	1 saat
% 53	1 saat
% 96	1 saat
%96	1 saat
% 100	1 saat

B- Şeffaflandırma :

<u>Ksilol</u>	<u>30 dakika</u>
<u>Ksilol</u>	<u>30 dakika</u>

C- İnfiltrasyon:

<u>Yumuşak parafin (60°C etüvde)</u>	<u>1 saat</u>
<u>Yumuşak + Sert parafin 1:1 (60°C etüvde)</u>	<u>2 saat</u>
<u>Sert parafin</u>	<u>3 saat</u>

D- Gömme:

Sert parafin

3.2.2 İmmünohistokimyasal Çalışmalar**a) Kesitlerin elde edilmesi:**

Elde edilen tüm sıçan fetüs ve yavrularından yukarıdaki rutin histolojik yöntemler ile parafin bloklar oluşturuldu. Bunlardan mikrotom (lipshaw tipi kızaklı mikrotom) ile alınan 4-5 µm kalınlığında seri kesitler, önceden poly-l-lizin ile kaplanmış lamlara alındı.

b) Lamların Poly-L-Lizin ile kaplanması:

- 72 ml distile su
- 8 ml poly-l-lizin

Lamlar önce zembile dizildi ve lamları temizlemek amacıyla asit alkolden geçirilip, % 50'lik alkolde bir süre bekletildi. Asit alkol; saf alkole (% 100'lük) 2-3 damla asit ilave edilmesiyle hazırlandı. Zembildeki lamlar asit alkol içerisinde

bir süre bekletilip, % 50'lik alkolle muamele edildi. Daha sonra lamlar distile su içine alınıp yıkandı. Yıkama sonrası lamlar poly-l-lizin içine alınıp etüvde bir müddet kurutulduktan sonra kullanıma hazır hale getirildi.

c) Lamların jelatinle kaplanması:

❖	Gelatin	5.0 gr
❖	Chromium kalium sulphate($KCr(SO_4)2.12H_2O$;K.N:1036,Merck)	0.5 gr
❖	Distile su	1000 ml
❖	Diethyl ether (C_4H_{10} ;K.N:921,Merck)	250 ml
❖	%70'lik alkol	250 ml

Asit alkol ve % 50'lik alkolde temizlenmiş lamlar, 250 ml %70'lik alkol ve 250 ml dietil eter karışımına birkaç kez daldırılıp çıkartıldıktan sonra, iyice kurutulup 5 gr jelatin ve 0, 5 gr chromium kalium sülfatın 1 lt distile sudaki (kaynatıldıktan sonra) çözeltisine daldırılıp çıkartıldı.

İmmünohistokimyasal boyamaya geçilmeden önce kesitlerin çevreleri 'dakopen' kalem (hidrofobik kalem; medium point marker; No: 754) ile sınırlandırıldı. Burdaki amaç, hem aynı lam üzerindeki birden fazla kesitin farklı monoklonal ve/veya poliklonal antikorlar ile boyanmasını sağlamak, hem de kimyasalların (antikor, AEC gibi) ekonomik kullanımını sağlamaktır.

İmmün boyamada kullanılan kimyasal maddeler:

Primer antikorlar:

- Rabbit poliklonal IgG (A-20) (Santa Cruz. Cat; sc-848)

Dilüsyon solüsyonu olarak *fosfat tampon solüsyonu* (PBS; Phosphate Buffer Soluation) kullanılmıştır. Bu solüsyonun hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

Sekonder antikor:

Biotinle işaretlenmiş olarak;

- ❖ Goat anti-rabbit IgG sc-2040

Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS; Phosphate Buffer Solutaion)

❖ Sodiumdi hydrogen phosphatemonohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; K.N:3053, Merck)	1,37 gr
❖ Sodiumdi hydrogen phosphatedihydrat($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; K.N: 6345, Merck)	1,56 gr
❖ Sodium chloride (NaCl; K.N: 6048, Merck)	8,76 gr
❖ Distile Su	100ml

Sitrik asit solüsyonu:

❖ Sitrik asit	2,1 gr
❖ Distile su	1,0 lt
❖ Sitrik asit distile su içinde eritilir ve karıştırılır. PH: 6 olacak şekilde 2M NaOH ilave edilir.	

Hidrojen peroksit solüsyonu:

❖ Methanol	50ml
❖ Hidrojen peroksit	168ul
❖ Methanol ve hidrojen peroksit karıştırılır.	

Kromojen:

- ❖ AEC (3-amino-ethyl carbone)

Zıt Boyama için Hematoksilen Hazırlanması:

Zıt boyamada amaç dokudaki antijenik olmayan hücre ve hücre yapılarını boyamaktır.

Mayer's haemalum:

- | | |
|---|---------|
| ❖ Aluminium potassium sulphate (K.N: 7167, Sigma) | 50 gr |
| ❖ Haemotoxylin (K.N: H 9627, Sigma) | 1,0 gr |
| ❖ Sodium iodate (NaIO_3 ; K.N: S 407, Sigma) | 0,2 gr |
| ❖ Chloral hydrate ($\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3\text{O}_2$; K.N: C 8383, Sigma) | 50 gr |
| ❖ Distile su | 1000 ml |
| ❖ Sitrik asit (monohydrate) (K.N: C 7129, Sigma) | 1,0 gr |
| ❖ 1,0 gr hematoksilen 1000 ml distile suda eritildi. 0,2 gr Sodyum iyodit | |

ilave edildi. Bu karışım, 50 gr Alüminyum potasyum sülfat ile manyetik karıştırıcıda tamamen eriyinceye kadar karıştırıldı. Daha sonra, kloral hidrat ve sitrik asit ilave edildi.

İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi:

❖ 4-5 µm kalınlığında elde edilen kesitler etüvde 60°C' de 30-60dakika bekletildi.

❖ Daha sonra sırasıyla ksilol ve alçalan alkol serilerinden geçirildi ve distile su ile yıkandı.

❖ Sitrik asit içerisindeki dokulara 5 dakika mikro dalga (Med High) uygulandı.

❖ 15 dakika derin dondurucuda, 15 dakika oda ısısında soğutulan dokular soğutuldu.

❖ Dakopen ile çevrelenen dokulara %01' lik H₂O₂ ve metanol uygulandı.

❖ PBS' de 3x5 dakika yıkandı.

❖ Dokular bir gece buzdolabında +4°C primer antikolar ile nemli ortamda inkübe edildi.

❖ PBS' de 3x5 dakika yıkama.

❖ Biotin ile işaretlenmiş antikolar ile dokular 30 dakika inkübe edildi.

❖ PBS' de 3x5 dakika yıkama.

❖ Streptavidin biotin peroksidaz damlatılarak 30 dakika inkübe edildi.

❖ PBS' de 3x5 dakika yıkama.

❖ AEC ile reaksiyon verinceye kadar muamele edildi.

❖ Distile su ile yıkandı.

❖ Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

❖ 3 dakika çeşme suyu ile yıkandı.

❖ 30 saniye kadar PBS' de tutuldu. Gliserol jelatin kullanarak kapatıldı.

.3 Değerlendirme:

3.3.1. Prenatal ve postnatal doku değerlendirmesi

- a) Prenatal 15. gün fetal dokular blok olarak gömüldü ve torakal bölge dokularının transvers kesitleri incelendi.
- b) Prenatal 17. gün fetal dokular blok olarak gömüldü ve torakal bölge dokularının transvers kesitleri incelendi.
- c) Prenatal 19. gün fetal dokular blok olarak gömüldü ve torakal bölge dokularının transvers kesitleri incelendi.
- d) Postnatal 2. gün yenidoğan organları ayrı ayrı bloklandı. Solit organlar ayrı ayrı değerlendirildi.
- e) Postnatal 4. gün yenidoğan organları ayrı ayrı bloklandı. Solit organlar ayrı ayrı değerlendirildi.

4. BULGULAR

Prenatal döneme (15., 17., 19 gün) ait dokularda ve postnatal döneme (2. ve 4. gün) ait organlarda leptin (*ob protein*) dağılımı immünohistokimyasal yöntemlerle ışık mikroskobu düzeyinde incelendi.

4.1. Prenatal 15. gün:

Torakal bölgelerden geçen transvers kesitlerde özellikle vasküler duvarda leptin(*ob protein*) için orta şiddetten kuvvetliye kadar pozitif immün reaksiyon gözlemlendi (Resim 1a (Kontrol), 1b (Pozitif reaksiyon)).

Kalpde endokart ve miyokart hücrelerinde herhangi bir immün reaksiyon gözlenmedi. Ancak perikartta özellikle mezotel hücrelerinde kuvvetli pozitif immün reaksiyon gözlemlendi (Resim 2).

Akciğerlerde parankim ve stromaya ait hücrelerde herhangi bir immün reaksiyon gözlenmedi. Ancak plevrada kuvvetli pozitif immün reaksiyon ve stromaya ait damar duvarlarında özellikle adventisya tabakasında pozitif immün reaksiyon gözlemlendi.

Özafagusun toraksa ait kısmında tüm tabakalarında immün reaksiyon gözlenmedi.

4.2. Prenatal 17. gün:

Trokal bölgelerden geçen tarsvers kesitlerde özellikle trokal aortta adventisyada bulunan hücrelerde leptin (*ob protein*) için kuvvetli pozitif immün reaksiyon gözlemlendi (Resim 3).

Kalp endokart ve miyokarta ait hücrelerde herhangi bir immün reaksiyon gözlenmedi. Perikart bölgesinde ise 15. güne oranla immün reaktivitenin arttığı gözlemlendi (Resim 4a , b).

Akciğerlerde ise özellikle orta çaplı ve büyük çaplı arterlerin ve venlerin adventisyalarda kuvvetli pozitif immün reaksiyon gözlenirken, parankime ait bronş, bronşiol ve alveol yapılarında herhangi bir immün reaksiyon gözlenmedi (Resim 5).

Özofagusta tunika mukoza, tunika submukoza ve tunika muskularis tabakalarında herhangi bir immün reaksiyon gözlenmedi. Ancak tunika adventisya tabakasında orta şiddette immün reaksiyon gözlemlendi (Resim 3).

Gelişmekte olan kemiklere ait hiyalin kıkırdak taslaklarında özellikle perikondriyal bölgede pozitif immün reaksiyon gözlenirken, kıkırdak merkezlerinde teritoryal ve interteritoryal alanda ve kondrositlerde negatif boyanma gözlemlendi (Resim 6).

Trokal bölge medulla spinalis tarsvers kesitlerinde kanalis sentralis etrafında yer alan glial hücrelerde ve medulla spinalis arka boynuza ait glial hücrelerde pozitif reaksiyon gözlemlendi. Ön boynuz motor nöronlara ve diğer nöron gövdelerine ait immün reaksiyon gözlenmedi (Resim 7a (Kontrol), 7b, c).

4.3. Prenatal 19. gün:

Torakal bölgelerden geçen kesitlerde özellikle özofagus ve torakal aortayı içine alan kesitlerde tunika adventisya tabakalarında bağ dokusuna ait hücrelerde ve liflerde leptin (*ob protein*) için kuvvetli pozitif immün reaksiyon gözlemlendi (Resim 8).

Akciğer kesitlerinde bronş, bronşiol ve alveol yapılarında immün reaksiyon gözlenmemesine rağmen plevrada kuvvetli immün reaksiyon gözlemlendi (Resim 9).

19. güne ait torakal kesitlerde özellikle kalp ve kıkırdak dokusunda perikart ve perikondrium tabakalarında leptin (*ob protein*) için kuvvetli pozitif

immün reaksiyonun devam ettiği gözlemlendi (Resim 10a (Kontrol), b (Perikondriyum dokusu pozitif immün reaksiyon)).

19. güne ait deri kesitlerinde epidermis tabakasında leptin (*ob protein*) için pozitif immün reaksiyon gözlemlenmedi. Ancak dermis tabakasında bulunan bağ dokusu hücreleri ve liflerinin kuvvetli pozitif immün reaksiyon gözlemlendi (Resim 11a (Kontrol), b (Deri dokusu Pozitif immün reaksiyon)).

4.4. Postnatal 2. gün:

Torakal bölgede akciğer dokusuna ait kesitlerde leptin (*ob protein*) için kuvvetli pozitif immün reaksiyonun plevra ve damar çevresindeki tunika adventisya tabakası ile sınırlı kaldığı gözlemlendi (Resim 12a (Kontrol), b (Pozitif immün reaksiyon)). Akciğer parankimine ait bronş, bronşiol ve alveoller yapılarında pozitif immün reaksiyon gözlemlenmedi.

Karaciğer kesitlerinde sinizoit duvarlarında orta şiddette pozitif immün reaksiyon gözlenmesine rağmen immün reaktivite gösteren hücrelerin veya dokuların detayları seçilemedi (Resim 13).

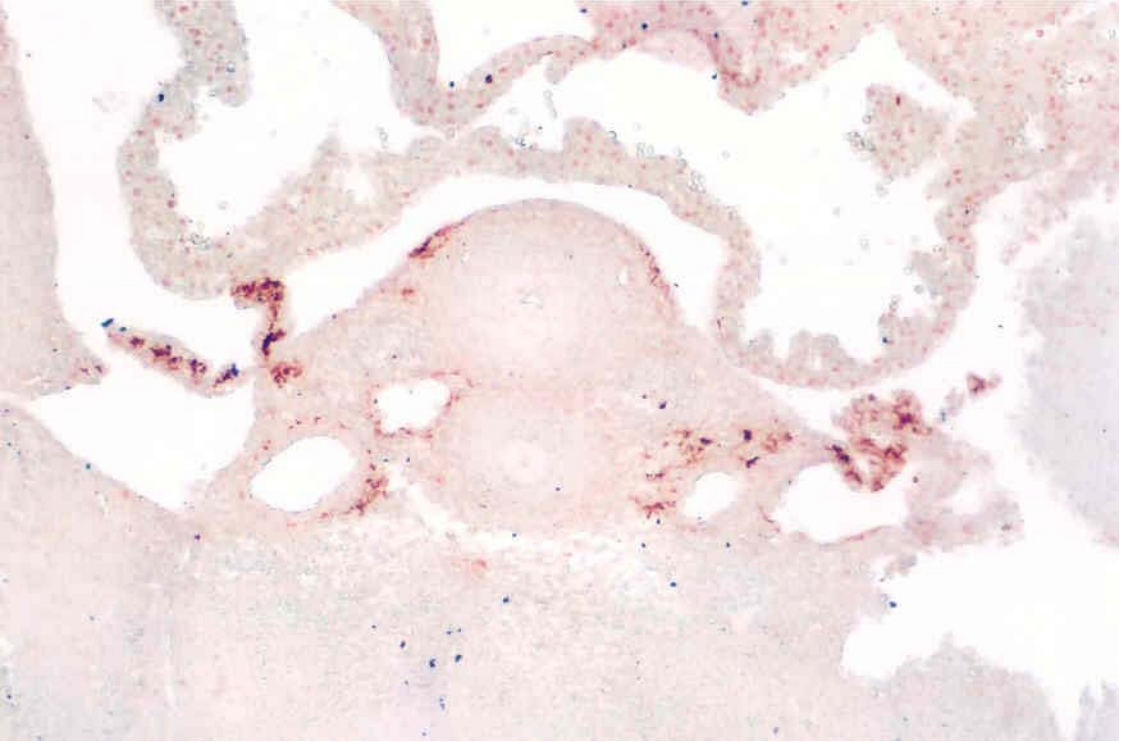
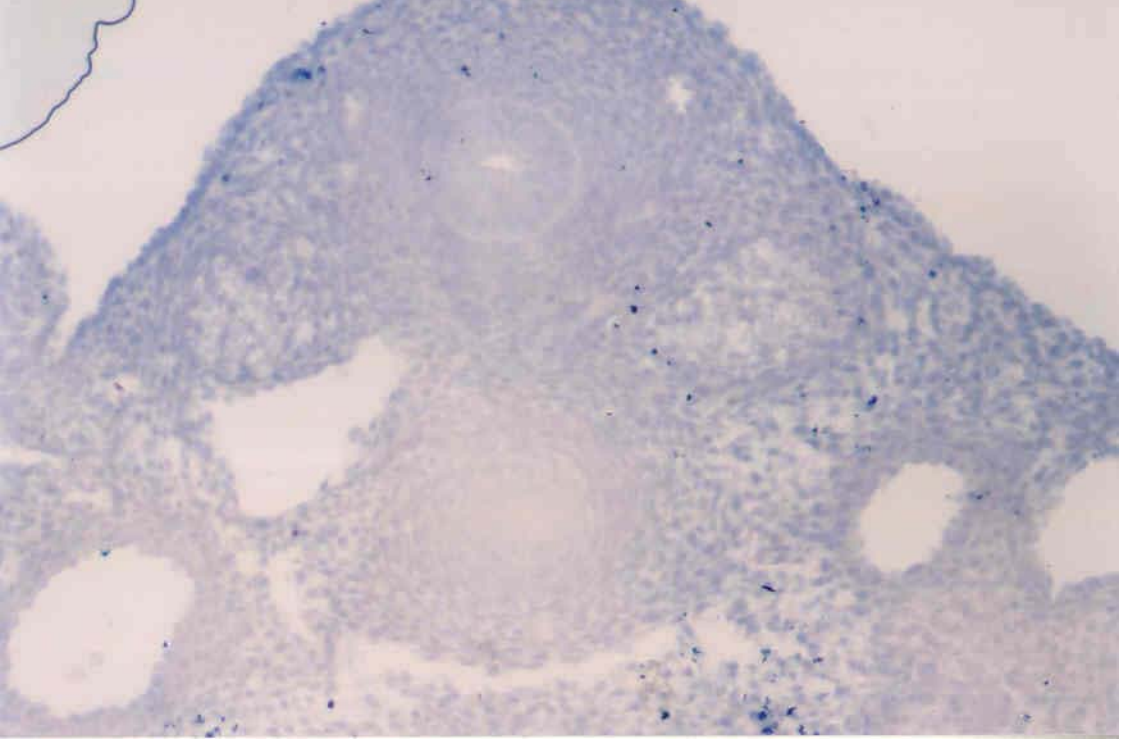
Bu döneme ait deri kesitlerinde epidermis tabakasında leptin (*ob protein*) için pozitif immün reaksiyon gözlemlenmedi. Papiller dermiste hafif şiddette, retiküler dermiste ise şiddetli immün reaksiyon gözlemlendi. Kıl folikülleri etrafında pozitif immün reaksiyon gözlemlendi (Resim 14a (Kontrol), b (Pozitif immün reaksiyon)).

4.5. Postnatal 4. gün:

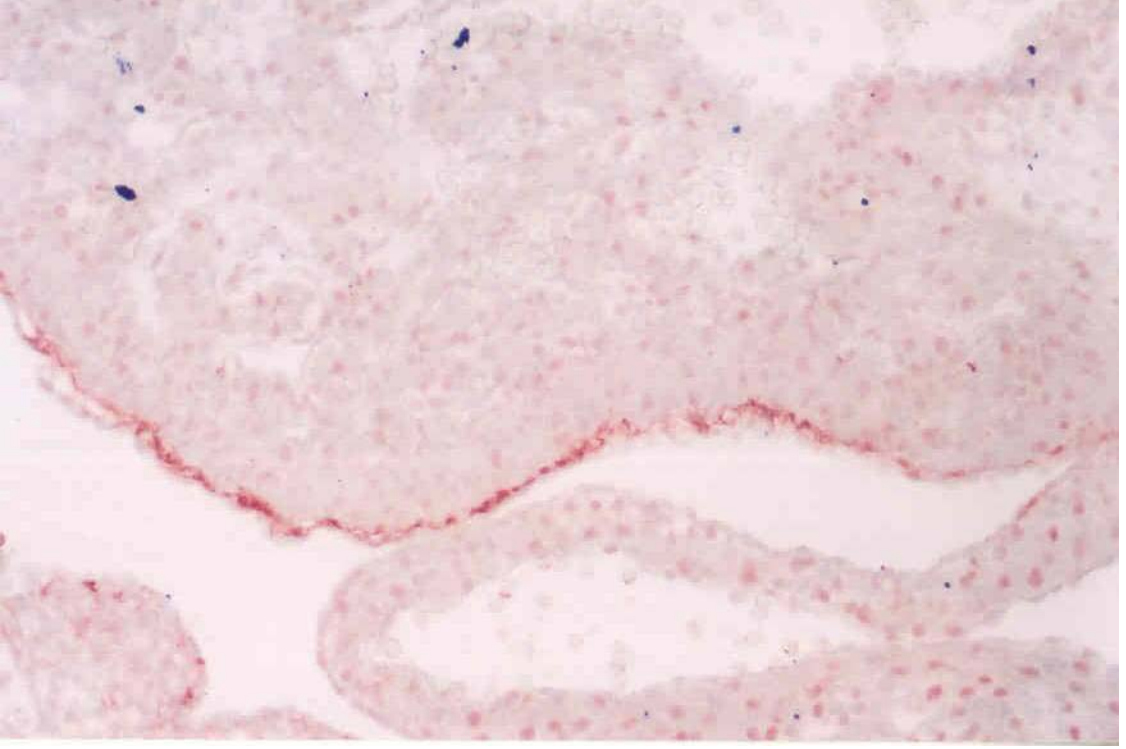
Torakal bölgeye ait akciğer dokusuna ait kesitlerde intraalveoller septumda leptin (*ob protein*) için kuvvetli pozitif immün reaksiyon gözlemlendi ve stromaya ait vasküler yapılarında tunika adventisyalarda kuvvetli immün reaksiyon gözlemlendi (Resim 16a (Kontrol), b (Pozitif immün reaksiyon)).

Kalp dokusu kesitlerinde miyokart hücrelerinde orta şiddette pozitif immün reaksiyon gözlemlendi. Ayrıca perikart tabakasında da immün reaksiyonun devam ettiği gözlemlendi (Resim 15a (Kontrol), b (Pozitif immün reaksiyon)).

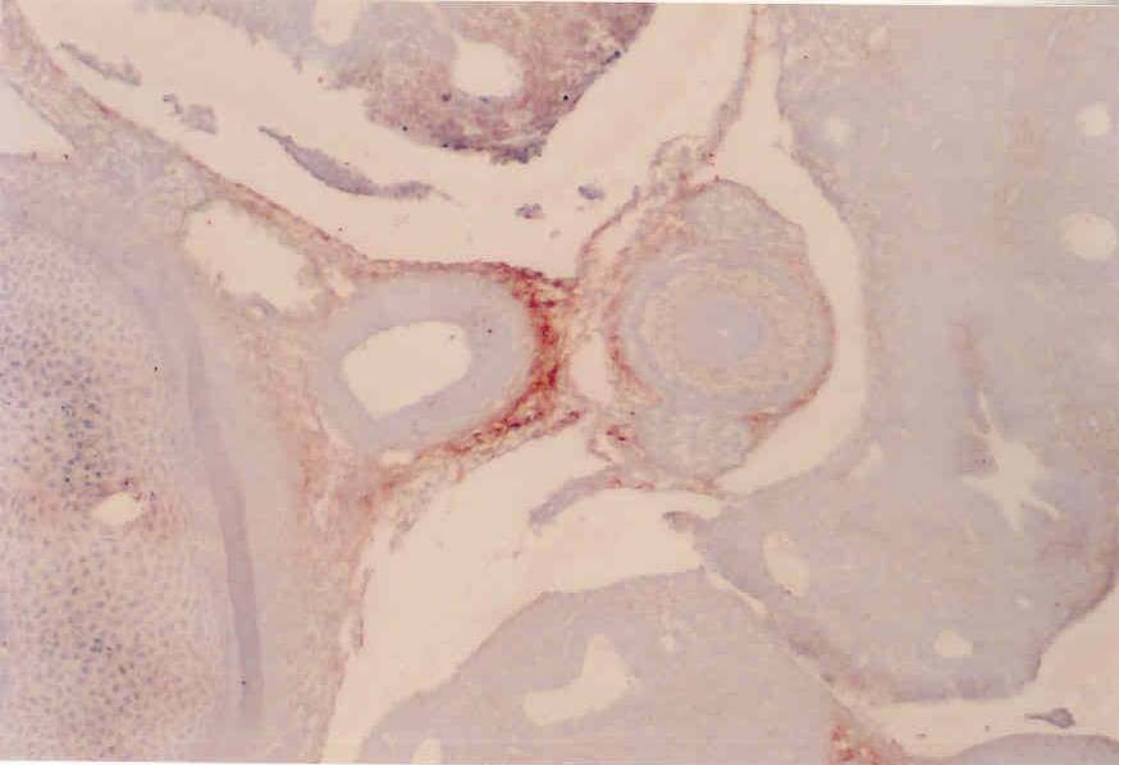
Deri kesitlerinde ise dermis tabakasında kuvvetli pozitif immün reaksiyon gözlemlendi. Özellikle papiller dermis tabakasına ait bağ dokusu hücreleri ve liflerinde kuvvetli immün reaksiyon gözlemlendi (Resim 17).



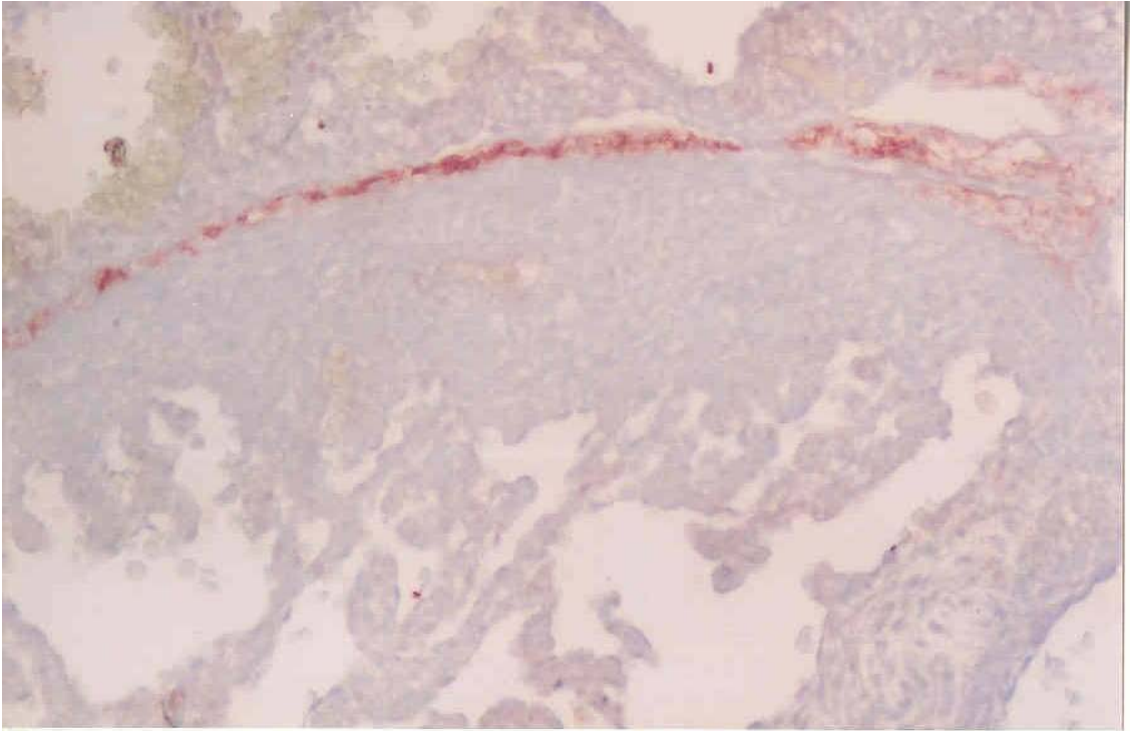
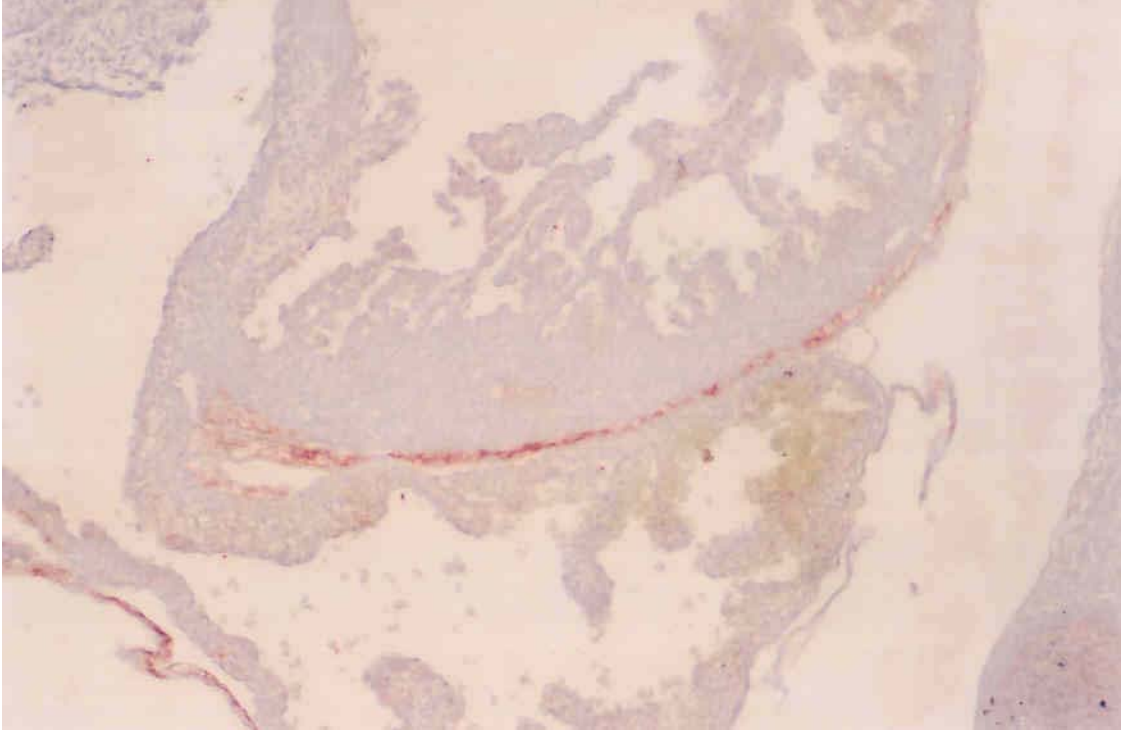
Resim 1: a) Prenatal 15. gün: Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış sıçan fetüsü torakal kesitinden bir görünüm izlenmekte. Negatif immün boyanma gözleniyor. **b) Leptin (*ob* protein) için immün boya uygulanmış sıçan fetüsü torakal kesitine ait bir görünüm.** Damar duvarı ve bağ dokusu hücrelerinde pozitif reaksiyon gözleniyor. (ABC-immünperoksidaz; (a) x 20, (b) x 10).



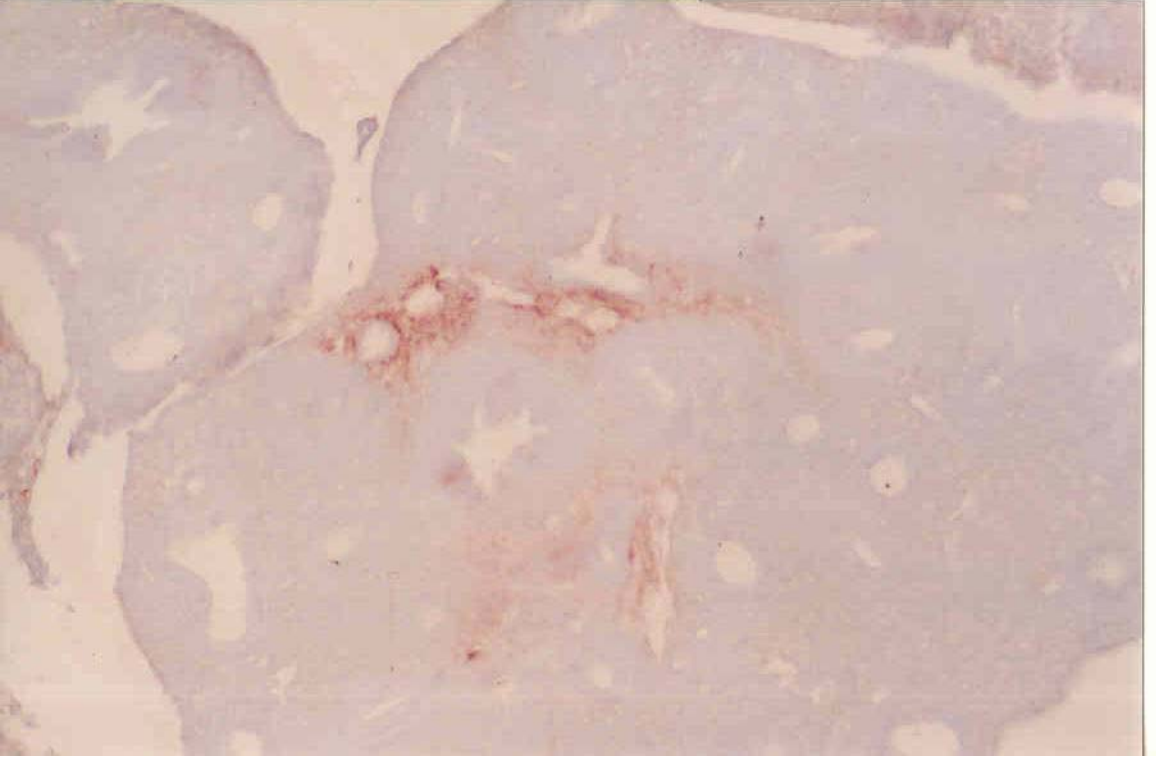
Resim 2: Prenatal 15. gün: Leptin (*ob* protein) için immün boya uygulanmış sıçan fetüsü torakal kesitine ait bir görünüm. Kuvvetli pozitif reaksiyon gösteren perikart tabakası izleniyor. (ABC-immünperoksidaz; x 20).



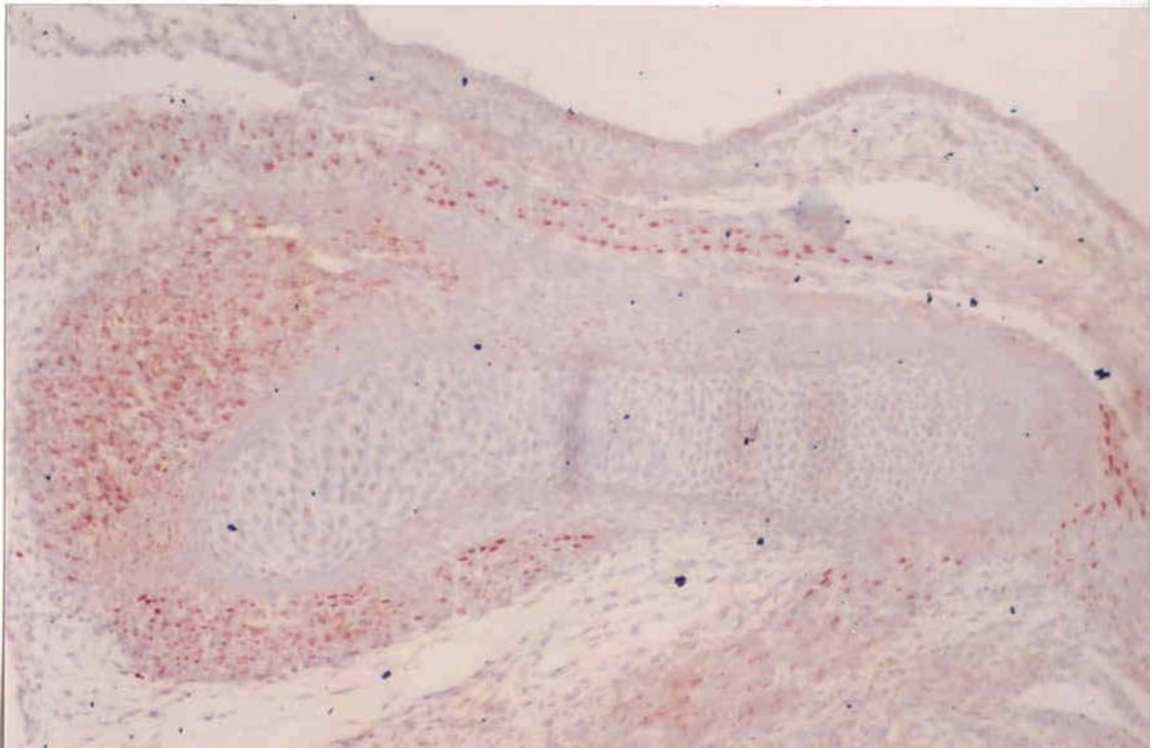
Resim 3: Prenatal 17. gün: Leptin (*ob* protein) için immün boya uygulanmış sıçan fetüsü torakal kesitine ait bir görünüm. Özellikle torakal aortta adventisya tabakasında kuvvetli pozitif reaksiyon dikkat çekiyor. Özafagus çevresinde tunika adventisya da orta şiddette immün reaksiyon gözleniyor. (ABC-immünperoksidaz; x 10).



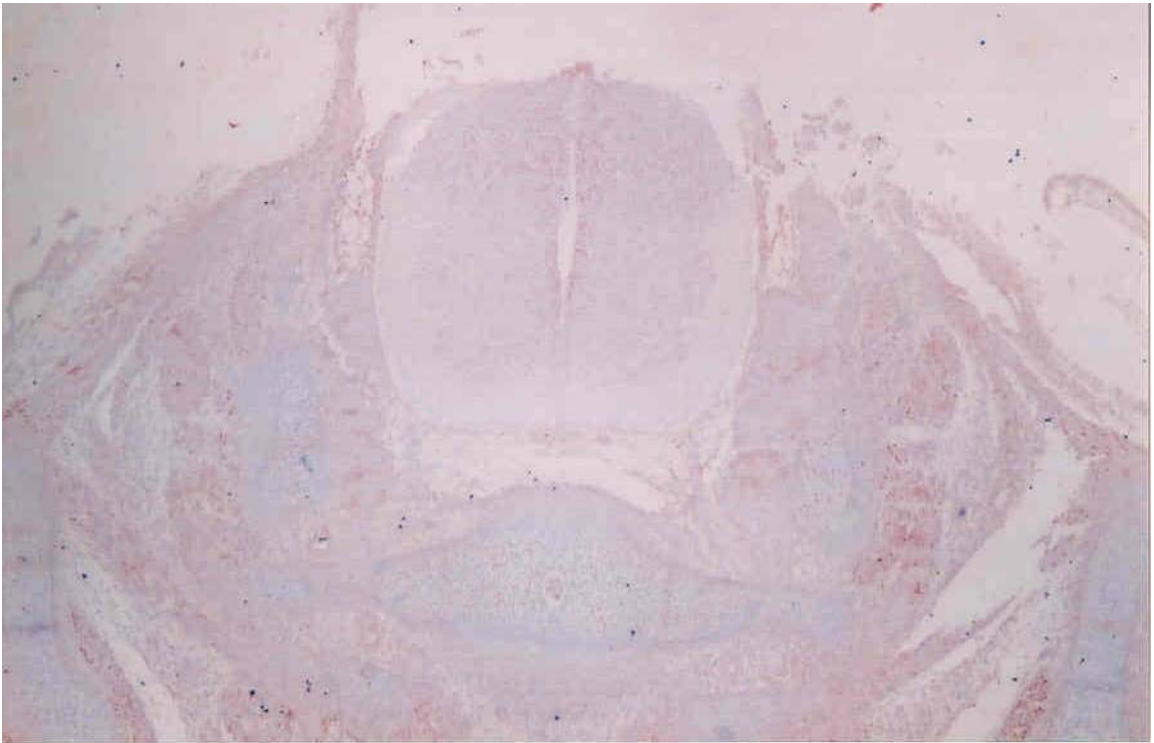
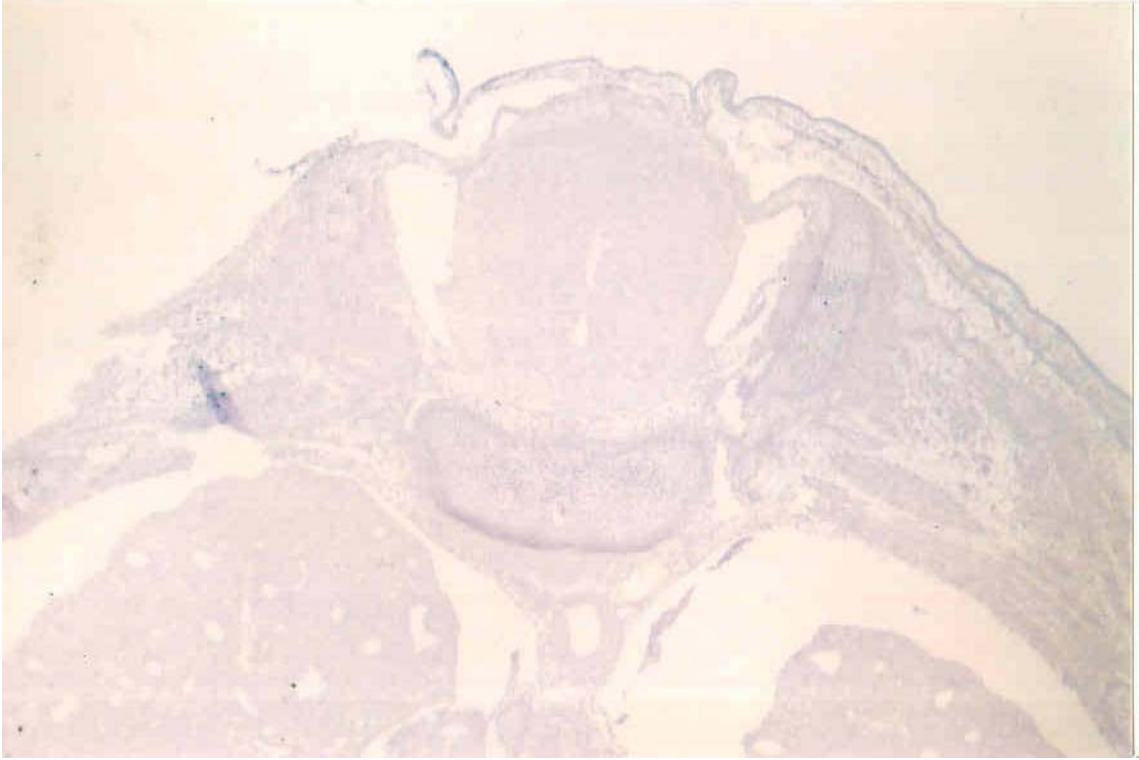
Resim 4: a) Prenatal 17. gün: Leptin (*ob* protein) için immün boya uygulanmış sıçan fetüsü torakal kesiten kalp dokusuna ait bir görünüm. Kuvvetli pozitif reaksiyon gösteren perikart tabakası izleniyor. **b) Leptin (*ob* protein) için immün boya uygulanmış sıçan fetüsü torakal kesiten kalp dokusuna ait bir görünüm. Kuvvetli pozitif reaksiyon gösteren perikart tabakası izleniyor. (ABC-immünperoksidaz; (a) x 10, (b) x 20).**



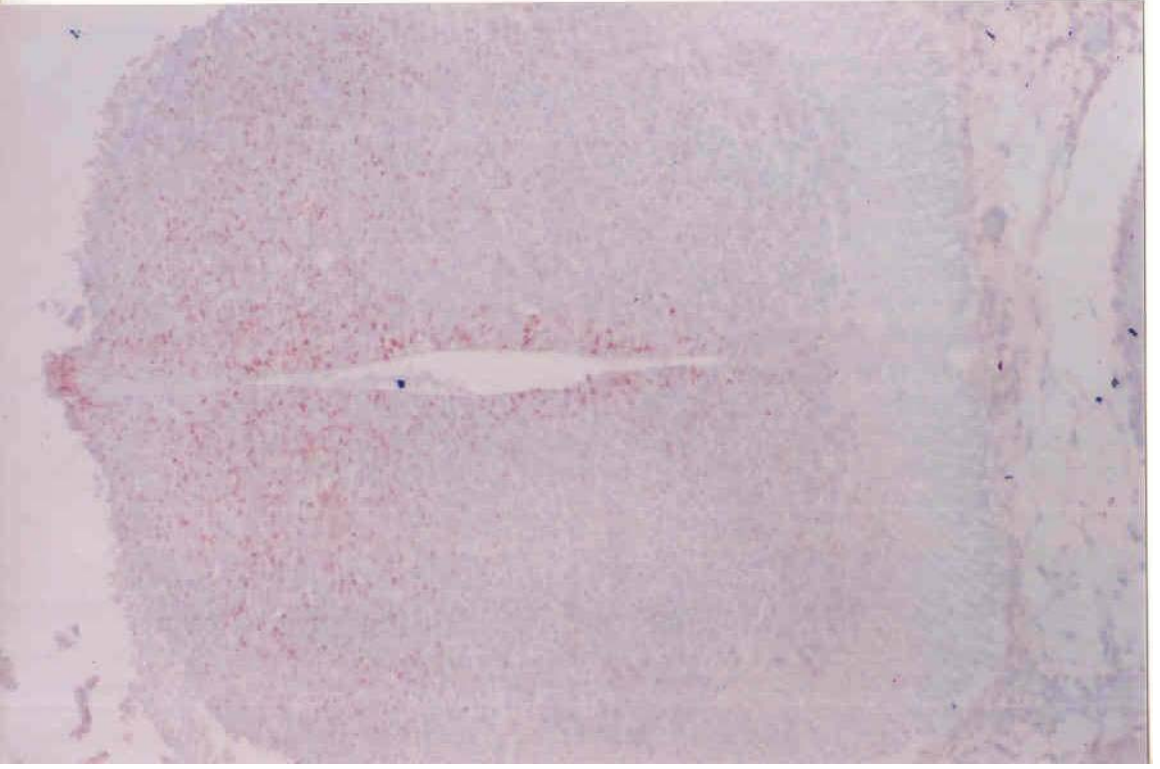
Resim 5: Prenatal 17. gün: Leptin (*ob* protein)için immün boya uygulanmış akciğer kesitten bir görünüm. Parankime ait bronş, bronşiol ve alveollerde negatif bir immün reaksiyon gözleniyor. Ancak arter ve venlere ait adventisya tabakalarında kuvvetli pozitif immün reaksiyon gözleniyor. (ABC-immünperoksidaz; x 10).



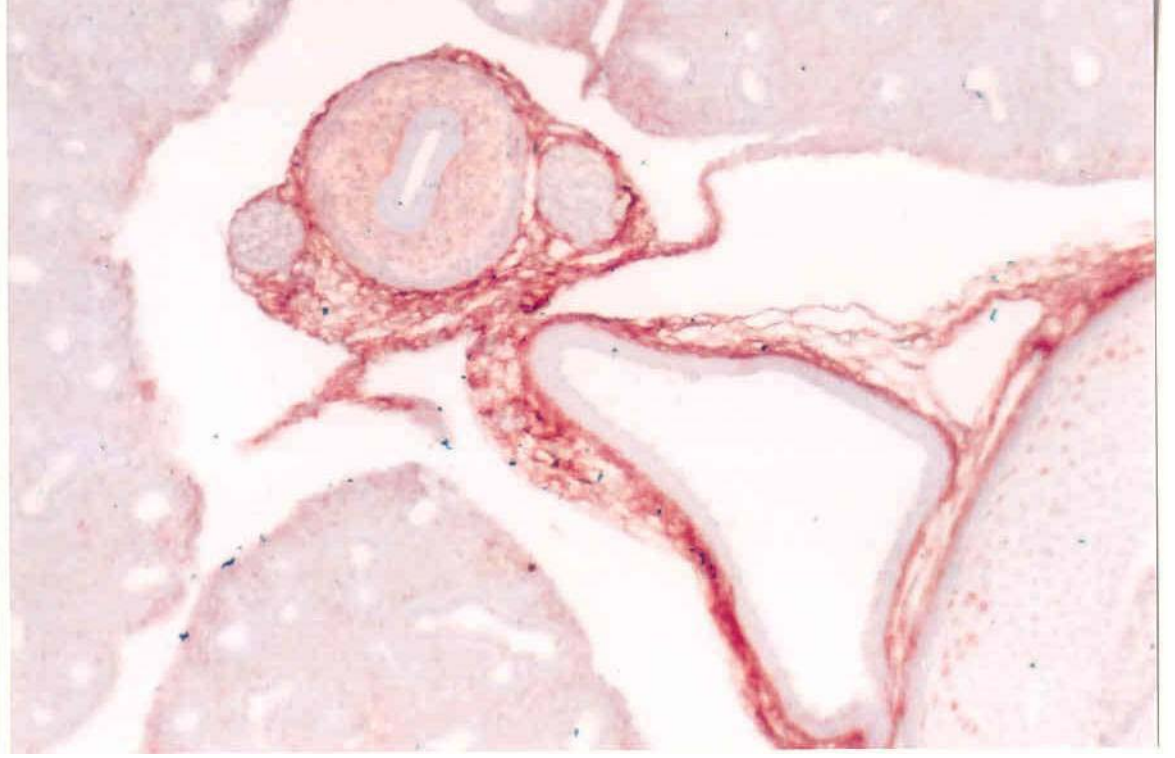
Resim 6: Prenatal 17. gün: Leptin (*ob* protein)için gelişmekte olan kemiğe ait hiyalin kıkırdak taslağına ait bir görünüm. Perikondriyal bölgede kuvvetli pozitif immün reaksiyon dikkat çekmekte. (ABC-immünperoksidaz; x 10).



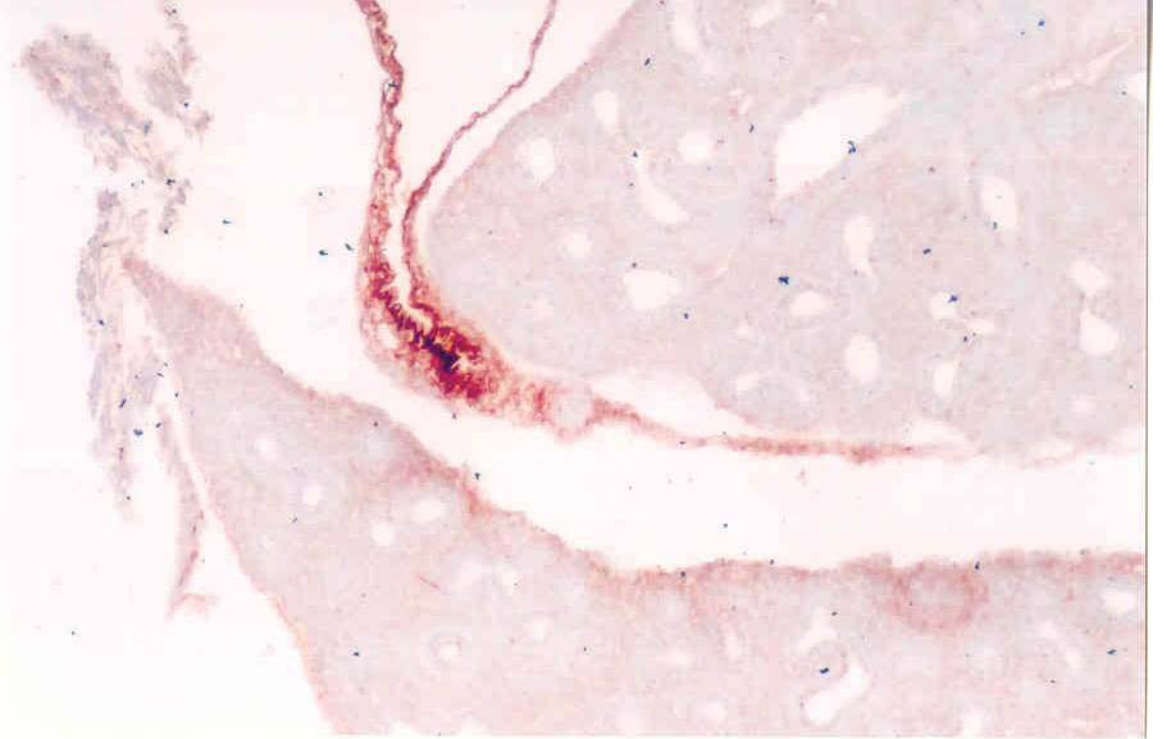
Resim 7: a) Prenatal 17. gün: Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış torakal bölgede medulla spinalis kesitinden bir görünümü. Negatif immün boyanma gözleniyor. **b) Leptin (ob protein) için immün boya uygulanmış sıçan fetüsü torakal bölgede medulla spinalise ait görünüm.** Kanalis sentralis etrafında ve arka boynuz bölgesinde pozitif reaksiyon gözleniyor. (ABC-immünperoksidaz; (a) x 4, (b) x 4).



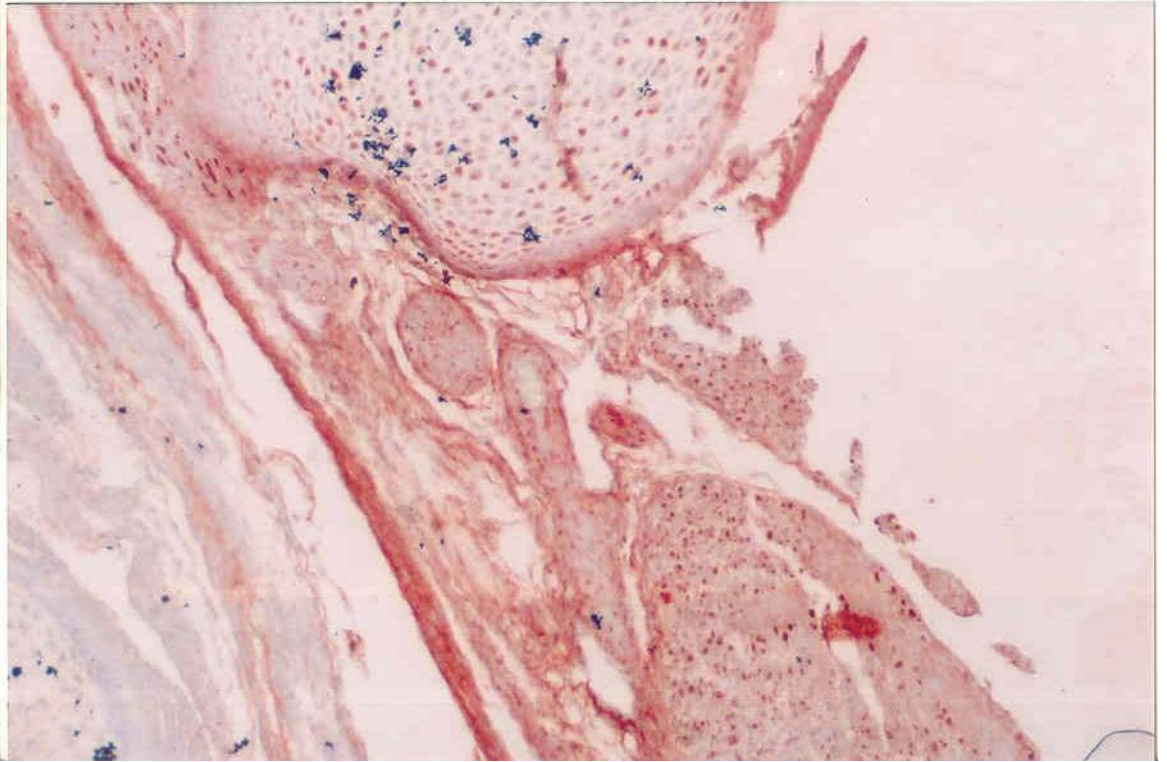
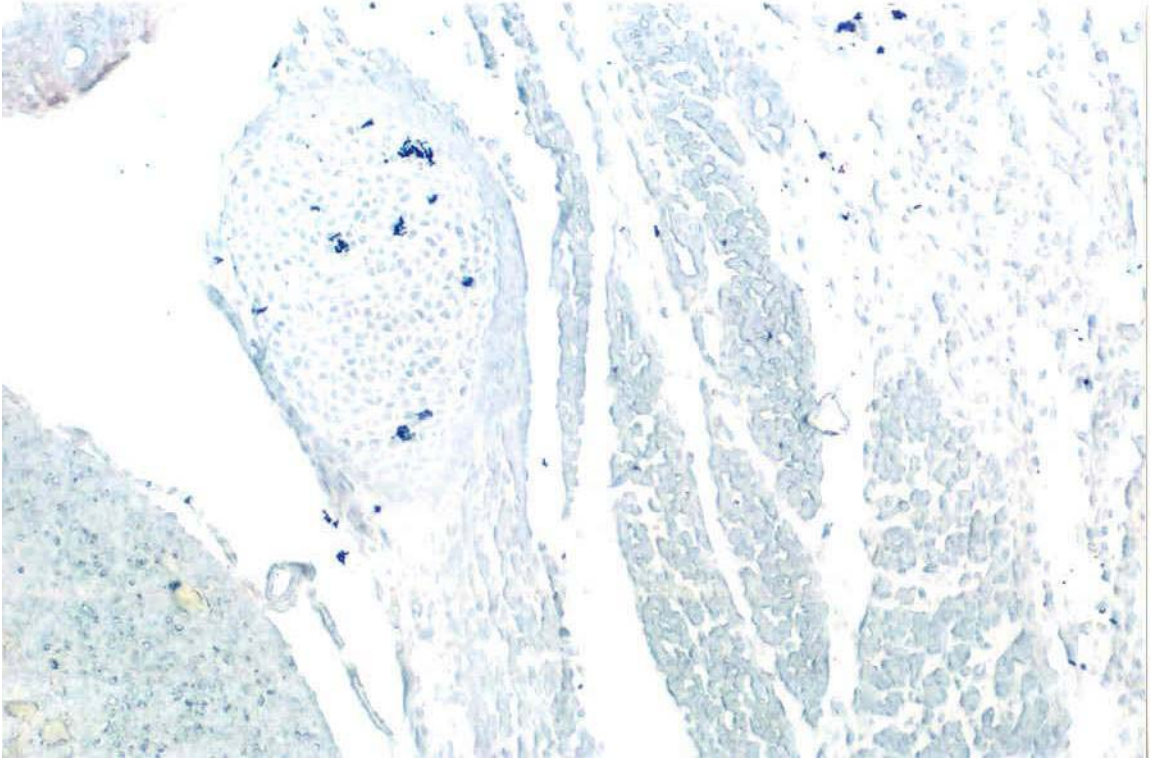
Resim 7: c) Prenatal 17. gün: Medulla spinalisten geçen kesite ait leptin (*ob* protein) için pozitif reaksiyon gösteren glial hücrelerin büyük büyütmede görünümü. (ABC-immünperoksidaz; x 10).



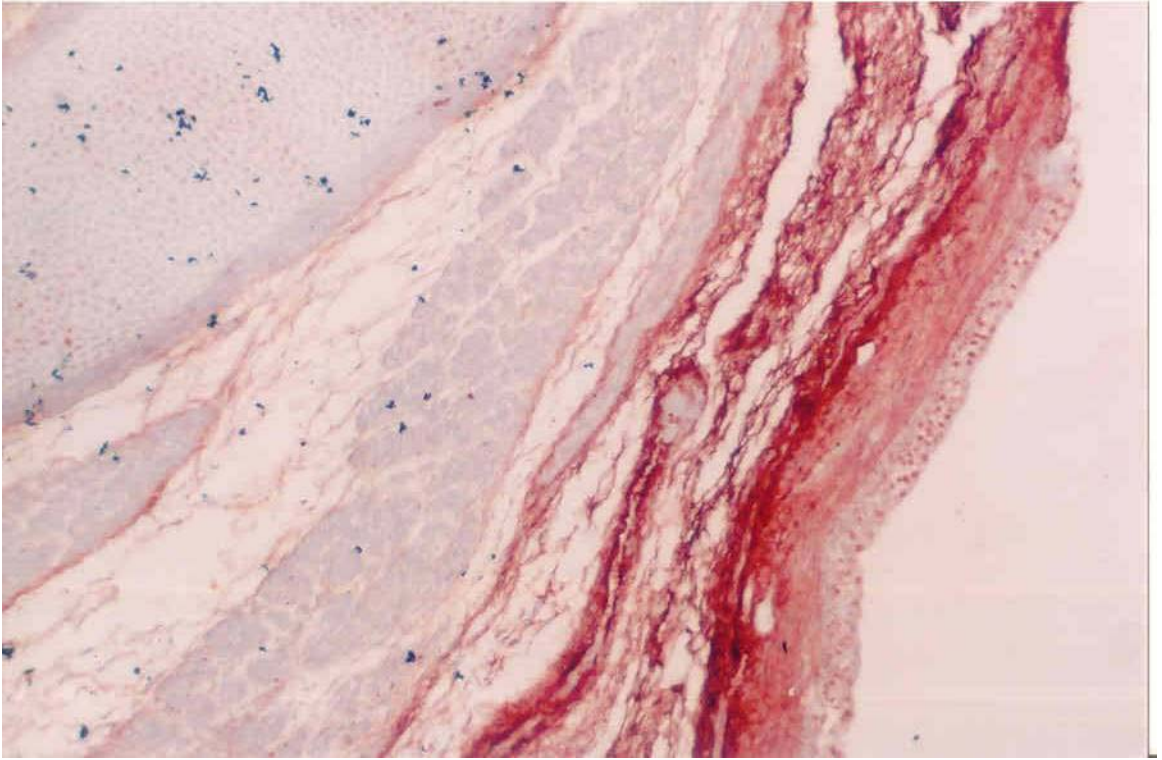
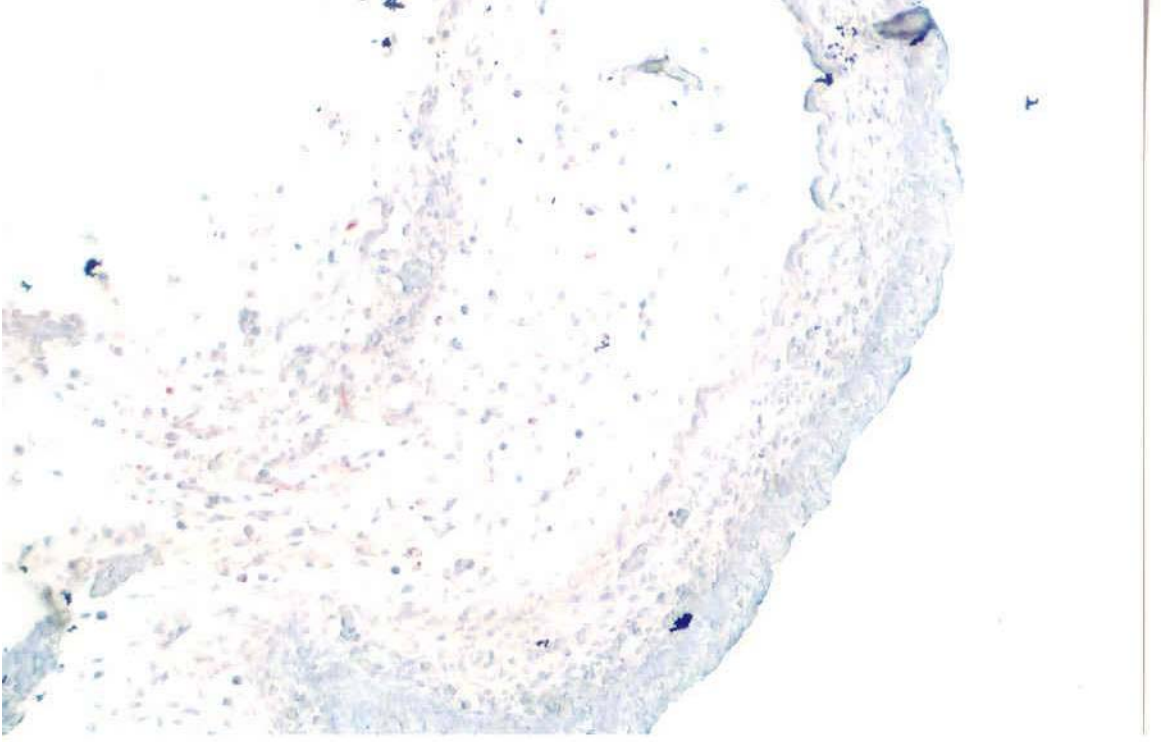
Resim 8: Prenatal 19. gün: Leptin (*ob* protein) için boyanmış özafagus ve torakal aortaya ait kesitlere ait görünüm. Her iki organında tunika adventisyasında kuvvetli pozitif immün reaksiyon gözleniyor. (ABC-immünperoksidaz; x 10).



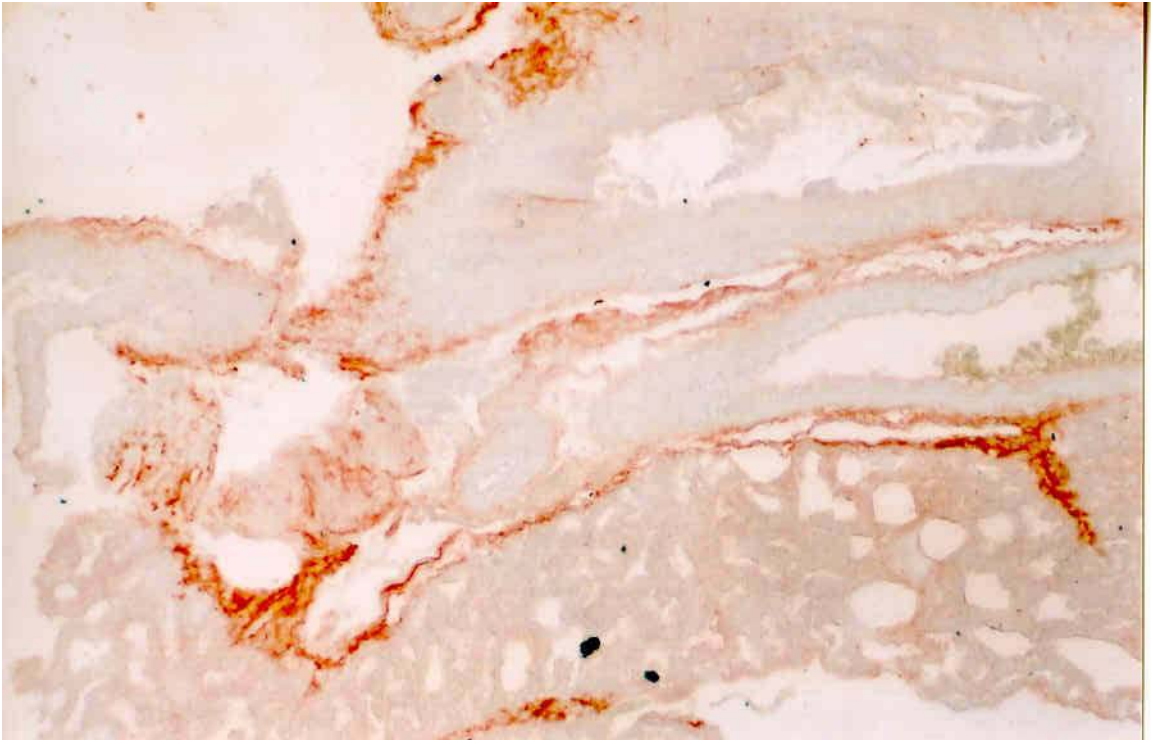
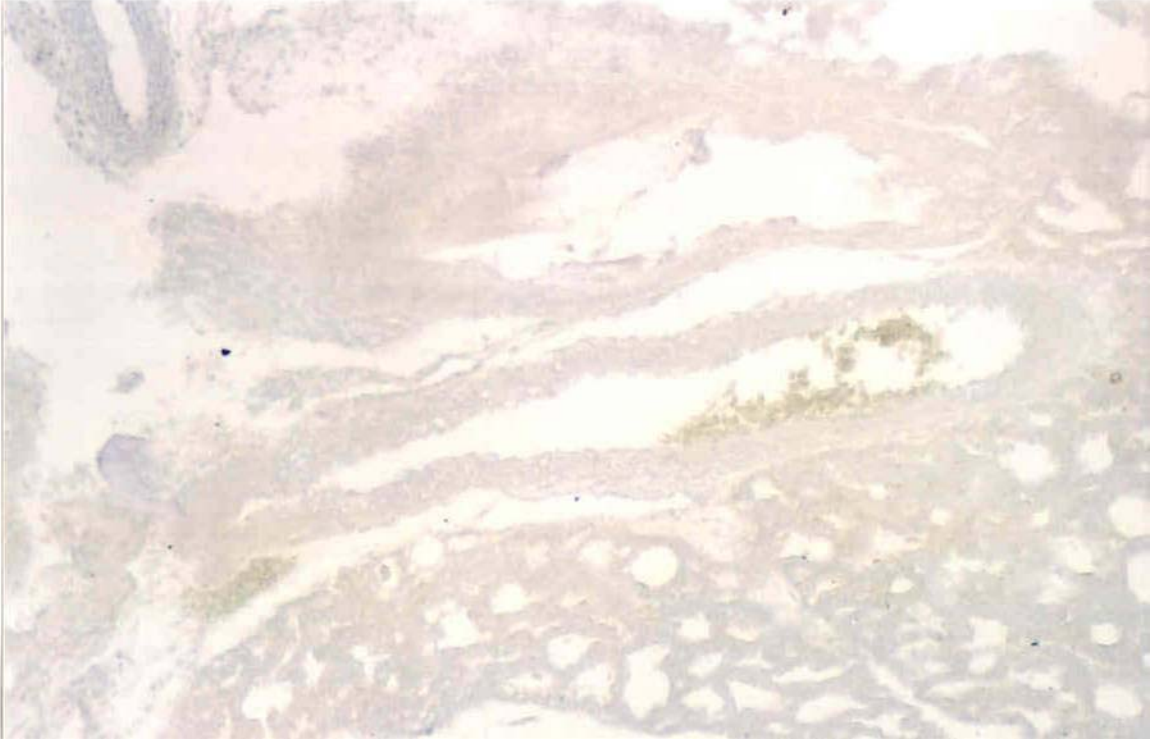
Resim 9: Prenatal 19. gün: Leptin (*ob* protein) için boyanmış akciğer dokusuna ait kesitten görünüm. Plevra bölgesinde kuvvetli pozitif immün reaksiyon gözleniyor. (ABC-immünperoksidaz; x 10).



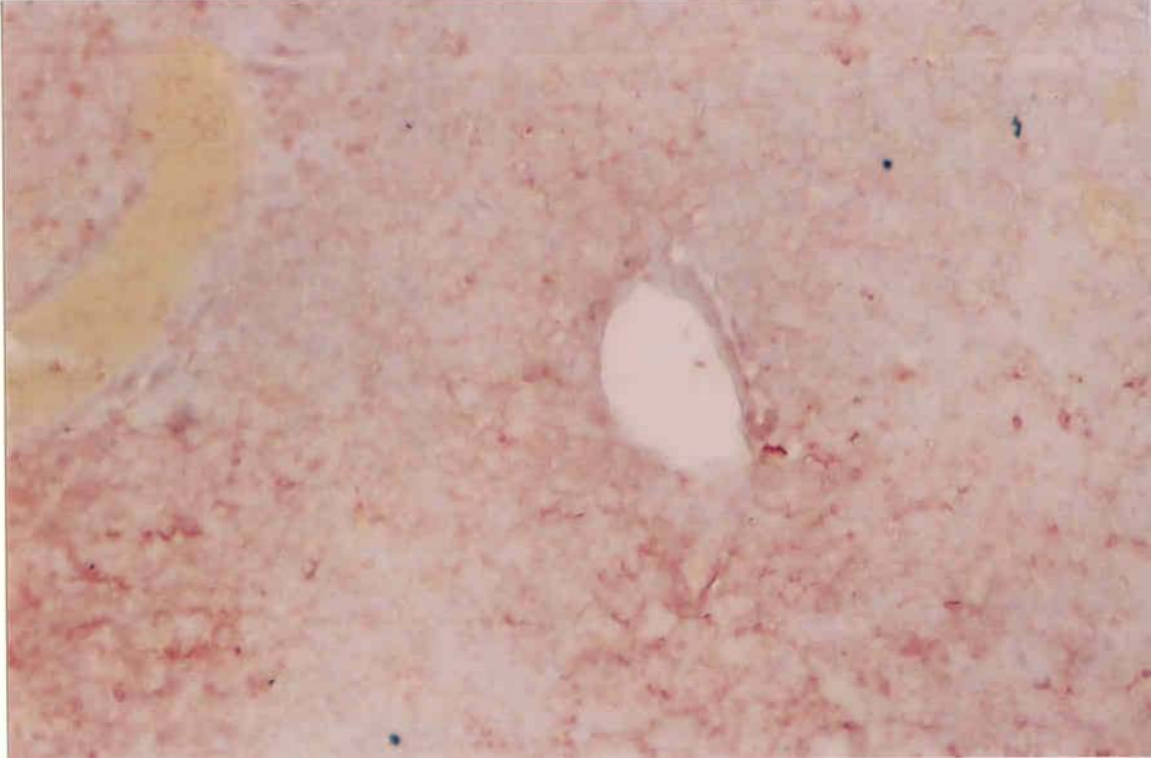
Resim 10: a) Prenatal 19. gün: Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış kıkırdak dokusu izlenmekte. Negatif immün boyanma gözleniyor. **b) Leptin (ob protein) için** boyanmış kıkırdak dokusuna ait kesiten bir görünüm. Perikondrium tabakasında kuvvetli pozitif immün reaksiyon gözleniyor. (ABC-immünperoksidaz; (a) x 10, (b) x 10).



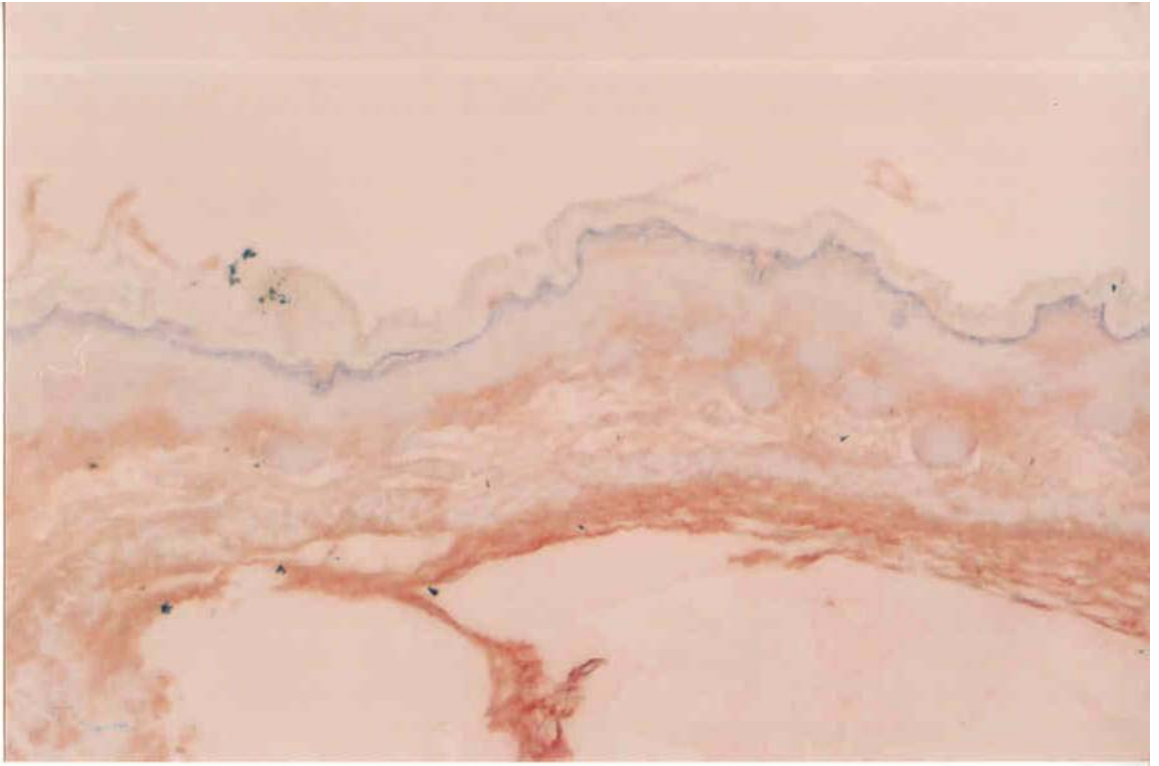
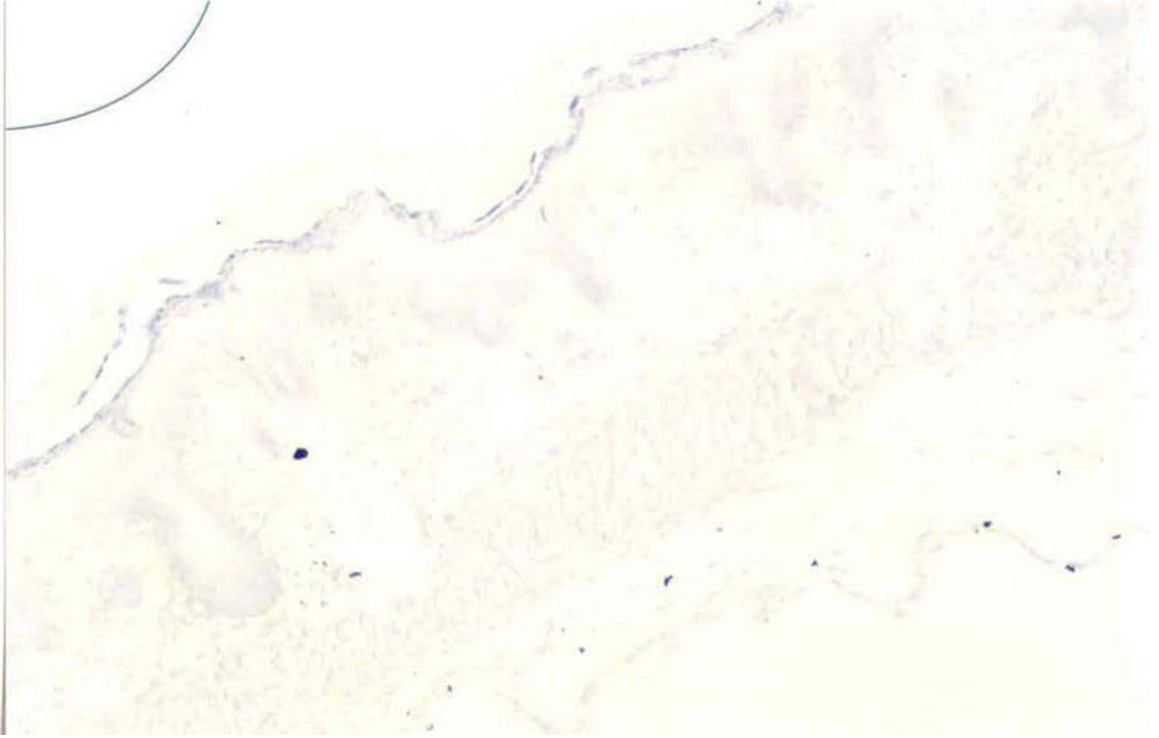
Resim 11: a) Prenatal 19. gün: Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış deri dokusu izlenmekte. Negatif immün boyanma gözleniyor. **b) Leptin (ob protein) için boyanmış deri dokusunda** dermis tabakasında pozitif immün reaksiyon gözleniyor. (ABC-immünperoksidaz; (a) x 10, (b) x 10).



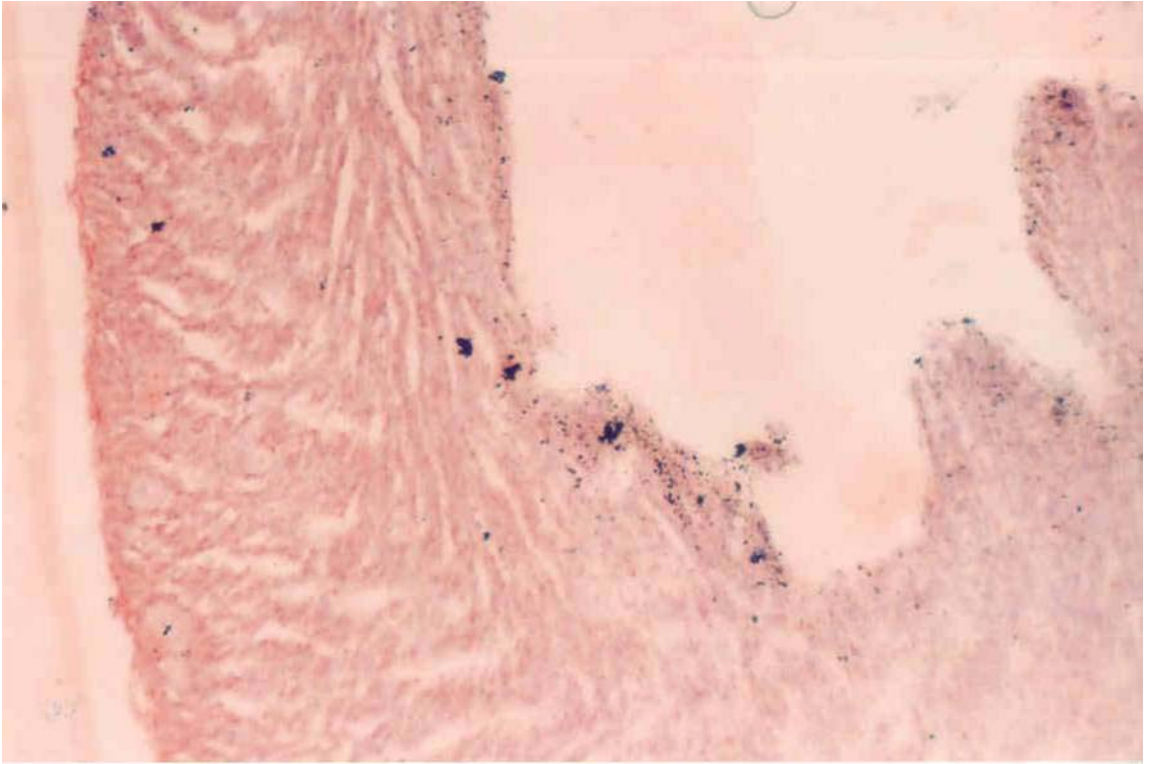
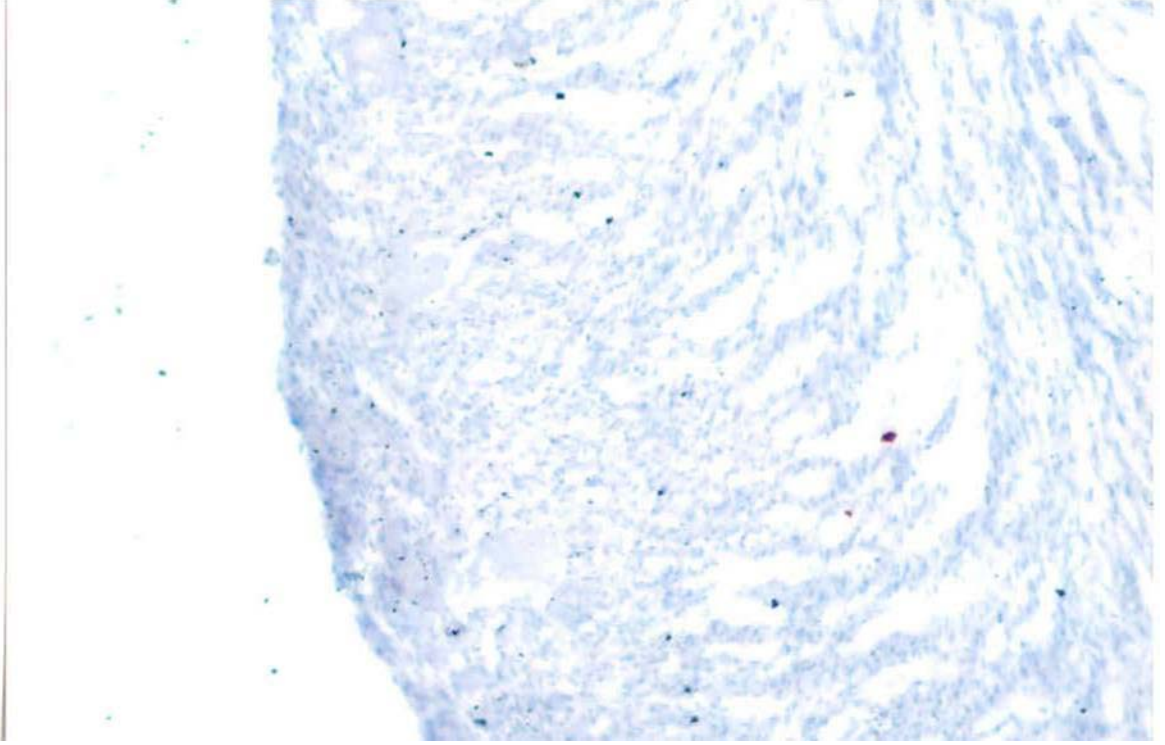
Resim 12: a) Postnatal 2. gün: Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış akciğer dokusu izlenmekte. Negatif immün boyanma gözleniyor. **b) Leptin (ob protein) için boyanmış akciğer dokusunda** plevra ve damar etrafında pozitif immün reaksiyon gözleniyor. (ABC-immünperoksidaz; (a) x 10, (b) x 10).



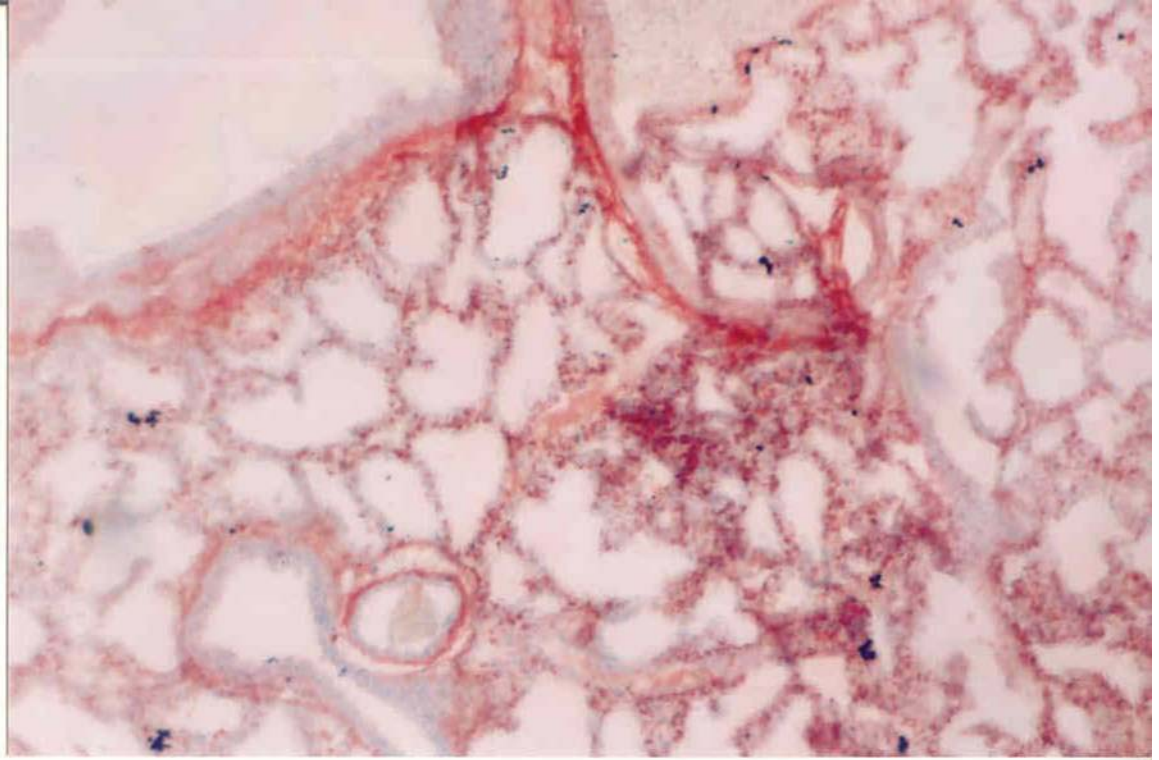
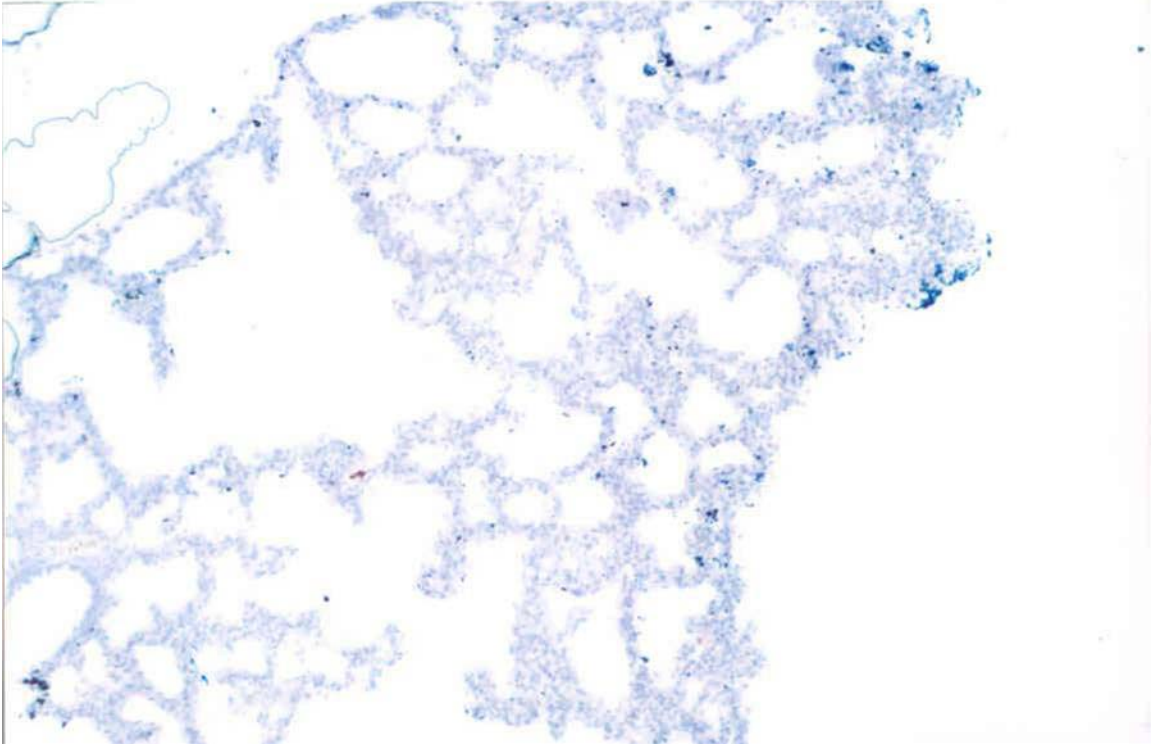
Resim 13: Postnatal 2. gün: Leptin (*ob* protein) için boyanmış karaciğer dokusuna ait kesitten bir görünüm. Sinazoit duvarında orta şiddette pozitif immün reaksiyon gözleniyor. (ABC-immünperoksidaz; x 20).



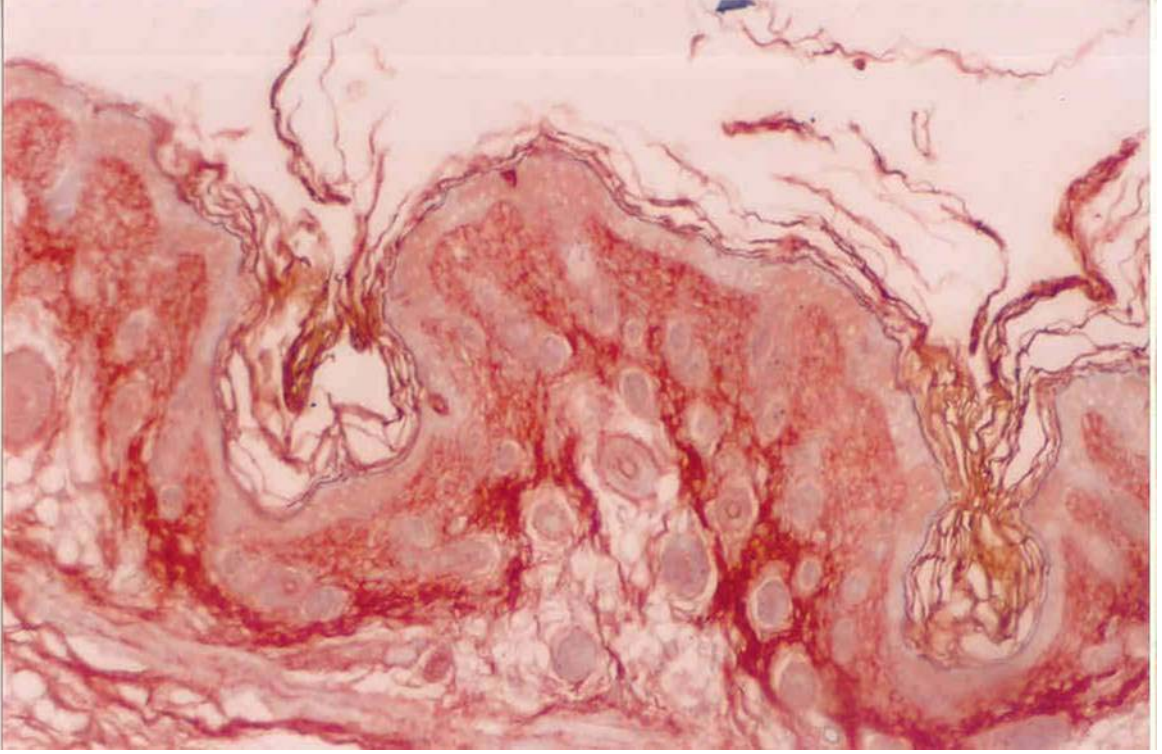
Resim 14: a) Postnatal 2. gün: Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış deri dokusu izlenmekte. Negatif immün boyanma gözleniyor. **b) Leptin (ob protein) için** boyanmış deri dokusuna ait kesiten bir görünüm. Papiller dermiste hafif şiddette, retiküler dermiste ise kuvvetli pozitif immün reaksiyon gözleniyor. (ABC-immünperoksidaz; (a) x 10, (b) x 10).



Resim 15: a) Postnatal 4. gün: Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış kalp dokusu izlenmekte. Negatif immün boyanma gözleniyor. **b) Leptin (ob protein) için boyanmış kalp dokusuna** ait kesitte miyokart hücrelerinde orta şiddette pozitif immün reaksiyon gözleniyor. (ABC-immünperoksidaz; (a) x 10, (b) x 10).



Resim 16: a) Postnatal 4. gün: Kontrol amacıyla yalnızca sekonder antikor uygulanmış akciğer dokusu izlenmekte. Negatif immün boyanma gözleniyor. **b) Leptin (ob protein) için boyanmış akciğer dokusuna ait kesitten bir görünüm.** İnteralveoller septumda ve stromaya ait vasküler yapılarda kuvvetli pozitif immün reaksiyon gözleniyor. (ABC-immünperoksidaz; (a) x 10, (b) x 10).



Resim 17: Postnatal 4. gün: Leptin (*ob* protein) için boyanmış deri dokusuna ait kesitten bir görünüm. Dermis tabakasında kuvvetli pozitif immün reaksiyon gözleniyor. (ABC-immünperoksidaz; (a) x 10, (b) x 10).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Leptin ilk kez 1994 yılının sonunda adiposit kökenli sinyal faktörü olarak tanımlandı ve bu faktörün reseptörleri ile etkileştikten sonra vücut ağırlığı ve enerji tüketiminin kontrolü gibi karmaşık bir yanıtı uyardığı, ayrıca üreme ve nöro-endokrin sinyal oluşumunda önemli fonksiyon gördüğü bildirilmiştir (2,3,54).

Günümüz bilgileri ile leptinin hipotalamik hipofizer eksenleri düzenleyen bir hormon olduğu kabul edilmektedir. Ancak insülin fizyolojisinde leptinin rolü hakkında edinilen bilgiler henüz çok azdır. İnsanda yiyecek alımı ve obezitede enerji dengesinin düzenlenmesinde, pubertenin başlangıcının kontrolünde, infertilitede, insülin direncinde önemli roller oynamaktadır (2,5,59).

Fetüsteki leptinin plasenta ve fetal dokular tarafından üretildiği öne sürülmüştür (18,19). Leptin insan fetal kordon kanında 18. haftadan itibaren saptanır (20,21) ve 34. haftaya kadar düşük konsantrasyonda bulunur, 34. haftadan sonra belirgin şekilde artar (2,7). Yura ve arkadaşları (75) postpartum dönemde leptinin ani düşüşünden gözlemleyerek fetal leptinin esas kaynağının plasenta olduğunu ileri sürmüşlerdir. Masuzaki ve arkadaşlarının (35) yaptığı çalışmada ilk ve üçüncü trimester plasentasında leptin mRNA transkriptlerinin varlığı plasentanın fetal leptin için önemli bir kaynak olduğu görüşünü güçlendirir. Atanasova ve Popova'nın yaptığı çalışmada ise 6-10 haftalık insan embriyosunun subkutan dokusunda immünohistokimyasal olarak leptin üretimini gösterilmiştir. Lepercq ve arkadaşları (68) gebelik yaşına göre büyük fetüslerde intrauterin gelişim geriliği olan fetüslere göre kordon kanındaki leptin düzeyinin daha yüksek olduğunu bulmuşlardır, bu da leptinin esas kaynağının fetal adipoz doku olduğunu göstermektedir.

Hoggard ve arkadaşlarının (39) murine fetüs ve plasentasında yaptığı çalışmalar sonucunda leptin ve reseptörü plasenta, fetal kıkırdak/kemik ve kıl foliküllerinde saptanmıştır. Aynı zamanda leptin reseptörünün fetal akciğerlerde, fetal beynin leptomeninks ve koroit pleksus bölgelerinde de bulunduğunu immünohistokimyasal yöntemlerle göstermişlerdir. Ayrıca başka bir çalışmada kalp, karaciğer, yağ dokusu gibi fetal dokulardaki leptin üretiminin fetal dolaşımdaki leptin düzeyine katkıda bulunabileceği saptanmıştır (55,57). Bu çalışmaların sonucunda leptinin multifonksiyonel olabileceği hem parakrin hem de otokrin etkilerinin olabileceği sonucuna varılmıştır.

Yapılan çalışmalarda maternal leptin düzeyleri ile fetal ağırlık arasında korelasyon olmadığı ancak umbilikal kordon kanındaki leptin düzeyleri ile fetal insülin, doğum ağırlığı, uzunluk ve baş çevresi arasında pozitif bir korelasyon olduğunu gözlenmiştir (21,58).

Lea ve arkadaşlarının (60) yaptığı bir incelemede, 33 haftalık ikiz gebelikte gelişme geriliği olan fetüste plasental ve kordon kanı leptin düzeylerinde normal gelişim gösteren fetüse göre düştüğü saptanmıştır. Bu bulgular, leptinin fetal gelişimdeki potansiyel rolüne ait bulguları güçlendirir.

Yapılan bir çalışmada insanlarda ve kemiricilerde gebeliğin sonuna doğru maternal dolaşımdaki leptin düzeyinin arttığı ancak insan (38) ve sıçanlardaki (11) üç kat artışı ile karşılaştırıldığında farelerde (53) 25 kat arttığı gözlenmiştir. Bu bulgu sıçanların leptin çalışmaları için uygun bir model olabileceği fikrini vermektedir.

Prenatal dönemde leptinin fizyolojik etkilerini ve kaynaklarını araştırmaya yönelik çalışmaların çoğu biyokimyasal düzeydedir. Doku düzeyindeki kaynaklarının ve leptin reseptörlerinin lokalizasyonuna yönelik çalışmalar sınırlıdır.

Yaptığımız çalışmada prenatal 15., 17., ve 19. günlerdeki sıçan fetüslerinde özellikle angiyogenetik hücrelerde ve seröz zarların yapısına katılan hücrelerde ayrıntılı bir şekilde leptin dağılımı saptandı ve fetal dokularda leptinin rolünün netleştirilmesine katkı sağlamak amaçlandı.

İnsan endotel hücrelerinin kültürlerinde leptin plasental anjiyogenezisi uyardığı saptanmıştır (51). İnsan plasenta kesitlerinde endotel hücrelerinde leptin reseptörü saptanmamıştır ancak leptinin indirekt rolü olabileceği ve diğer anjiyogenik faktörleri örneğin plasentayı indükleyen growth faktör ve vasküler endotelial growth faktörü uyarabileceği üzerinde durulmuştur. Çalışmamızdaki bulgular damar endotelinde leptinin bulunmadığını ancak damarın tunika adventisyalarındaki fibroblastların leptini salgılayabildiğini göstermektedir. Bu bulgu prenatal 15. günde pozitif immün reaksiyonun gözlenmesi ve ardından prenatal 17. ve 19.'de damarsal alanlarda immün reaksiyonun şiddetlenmesi ile desteklendi. Çalışmamız, leptinin vasküler endotel growth faktör aracılığı ile fetal anjiyogeneziste etkili olduğu hipotezini de desteklemektedir.

Plevra ve perikart gibi seröz zarlarda pozitif immün reaksiyon göstermesi literatür bilgilerimiz ışığında yapılan çalışmalarda saptanmamış bir bulgudur.

Gainsford ve arkadaşlarının(52) yaptıkları çalışmalarda leptinin insanlarda endotel hücre ve fibroblast hücre serilerine ve hemapoetik hücre serileri üzerine proliferatif etkileri olduğunu saptamışlardır. Sierra ve Honigmann'ın (51) yaptığı çalışma ise değişik hayvan modellerinde leptinin yeni damar oluşumunu indüklediğini göstermişlerdir.

Akciğerlerde parankime ait bronş, bronşiol ve alveol yapılarında leptin ekspresyonuna rastlanmadığı gibi stromada sadece damarsal yapıların etrafında leptin ekspresyonunun saptanması leptinin mezenşimal kaynaklı hücrelerde yoğun bulunduğu ancak endodermal kaynaklı hücrelerin ve dokuların gelişiminde parakrin etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir. Aynı şekilde kalpte de endokart ve miyokart tabakalarında (Resim 15)leptin ekspresyonunun gözlenmemesi endodermal hücrelerde leptinin eksprese olmamasına ve miyokart tabakasında ekstraselüler matriks oranının düşük olmasına bağlanabilir.

Fetal leptin konsantrasyonları ile adipoz doku gelişimi ve yağ kitlesindeki artış ile kemik ve yağ kitlesi arasında pozitif bir ilişki vardır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda fetal fare kemik-kıkırdaklarında yüksek oranda leptin ve leptin reseptör ekspresyonunun gözlenmesi leptinin fetal kemik metabolizmasında rolü olabileceğini göstermektedir (39).

Bu çalışmamızda özellikle hiyalin kıkırdak yapısındaki kemik taslaklarının perikondriyumlarında kuvvetli immün reaksiyon saptandı. Yine perikondriyumun mezenşimal kaynaklı fibroblastlar ve kollogen liflerden oluştuğunu göz önünde bulundurarak leptinin salgılanmasına fetal dokuda mezenşimal hücrelerinde katkıda bulunduğu söylenebilir.

Leptin plasenta ve belirli fetal dokularda ekspresyonunun gözlenmesine rağmen bu hormonun bu dokulardaki fonksiyonları hakkında çok az bilgi mevcuttur.

Mezenşimal hücrelerde leptin ekspresyonunun gebelik yaşı ile birlikte artışı leptinin fetal gelişim üzerinde direkt etkileri olabileceği gibi endodermal ve ektodermal hücreler üzerine growth faktörler aracılığı ile etki edebileceği fikrini vermektedir.

Prenatal dönemde özellikle medulla spinaliste kanalis sentralis etrafında bulunan glial hücrelerin ve medulla spinalis arka boynuzunda bulunan glial hücrelerin pozitif immün reaksiyon göstermeleri leptinin glial hücre gelişiminde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Prenatal dönemde yapılan bir çalışmada *ob-R*'nin immünohistokimyasal yöntemlerle gebeliğin 14. gününde sıçan beyinde leptin reseptörünün bir izoformunu saptamıştır (87). Yaptığımız çalışmada özellikle medulla spinalisteki glial hücrelerin immün reaktivite göstermesi leptinin beyin dışında diğer sinir sistemi organlarında da eksprese edildiğini göstermektedir.

Çalışmamızda torakal bölgeye ait organlar değerlendirildi. Ancak abdominal bölge kesitleri değerlendirmeye alınamadı.

Prenatal dönemdeki önemi kadar postnatal dönemdeki dönemde ki önemi de vurgulanan leptin 16 kD ağırlığında bir hormondur ve *ob* geninin bir ürünüdür. Erişkinlerde yapılan çalışmalarda esas sentez ve sekresyonun kaynağının beyaz yağ dokusu olduğu gösterilmiştir. Ancak leptin sekresyonunun erişkin kişilerde düşünülenenden daha fazla dokuda olduğu bulunmuştur (23,24,25). Her ne kadar leptinin vücut enerji dengesinin düzenlenmesinde yer alan ve beyne etki eden bir sinyal molekülü olduğu düşünülse de leptinin pek çok sayıda başka fonksiyonu olduğu da giderek artan oranda fark edilmiştir. Örneğin, üremede rolü olduğu puberteye etki ettiği, gebelikte rolü olduğu gösterilmiştir (39,44,54).

Düşük gebelik yaşı olan veya intrauterin büyüme geriliği olan bebekler gibi düşük yağ içeriği olan yenidoğanlarda kordon kanındaki leptin konsantrasyonları daha düşüktür. Düşük leptin konsantrasyonu bu bebeklerde fizyolojik bir avantaj olabilir (78).

Leptin enerji rezervlerinin beyne iletilmesi dışında neonatal beslenmeyi ve büyümeyi düzenlediği düşünülmektedir (7,2).

Bu çalışmamızda mezenşimal dokularda ekspresyonun fazla olduğunu gözledik. Bunun da büyüme üzerine direkt etkili olduğunu düşündük.

Postnatal dönemde akciğer dokusunda alveoler septumdaki hücrelerin leptin ekspresyonu göstermesi organ gelişiminde ve hücrelerin diferansiyasyonunda leptinin etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca artan yaşla birlikte leptin ekspresyonunun dokularda artışı maturasyon için gerekli bir hormon olduğunu göstermektedir.

Bu çalışma ve yapılan diğer çalışmalar leptinin endokrin, parakrin ve otokrin etkilerinin olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, leptinin gerek hipotalamusu, hipofizi ve beyin korteksini etkileyerek, gerekse dokular üzerinde direkt etki göstererek, özellikle büyümenin hızlı olduğu prenatal, postnatal ve pubertal dönemde etkili olduğu düşünülmüştür. Leptinin doku düzeyinde etkileri

hakkında yapılacak ileri çalışmalar leptinin fizyolojik ve histolojik etkilerinin ortaya çıkmasında yol gösterici olacaktır.

ÖZET

Yaklaşık 20 yıl önce kanda besin alınımını ve vücut ağırlığını düzenleyen bir faktör olduğu ileri sürüldü. 1994 yılında Friedman ve arkadaşları bu faktörü tanımladılar. Bu faktörün yokluğunda yada etkisiz olduğu durumlarda obezite, hiperfaji, insülin direnci ve enerji harcamadaki azalma görülmektedir ve ob/ob mutant farelerde saptanmıştır.

Leptinin metabolik sistemde ve obesitenin kontrolündeki rolü yetişkinlerde iyi tanımlanmıştır. Bunun yanında, son literatürler leptini fetoplental bir hormon olarak fonksiyonlarını doğrulamaktadır. Leptin, intauterin ve ekstrauterin hayatta normal fetal gelişim kadar gelişim geriliği olan fetüslerde de enerji dengesi, metabolizma, büyüme ve gelişimin düzenlenmesinde anahtar bir hormondur. Fetal dolaşımdaki leptinin kaynağı tam olarak anlaşılmamıştır. Kaynakların plasenta ve fetal dokudu olduğu genel kanıdır.

Bu araştırmada, immünohistokimyasal yöntemi ile prenatal ve postnatal sıçan fetus dokularında leptinin histolojik dağılımını saptamak amacıyla yapılmıştır.

Yaptığımız çalışmada, prenatal 15., 17., 19. günlerdeki sıçan fetüslerinde anjiyogenetik hücrelerde ve seröz zarların yapısına katılan hücrelerde leptin (ob protein) ekspresyonu gösterildi.

Sonuçta leptinin prenatal ve postnatal sıçan fetus dokularındaki dağılımlarının belirli özellikler gösterdiği saptandı.

Anahtar kelimeler: İmmünohistokimya, Leptin, Sıçan, Fetüs,

SUMMARY

Nearly 20 years ago, a blood born factor regulating food intake and balance of body weight has been suggested. However, it was only in 1994 that Friedman and co-worker identified and sequenced this factor. Its absence or ineffectiveness has been shown to be responsible for the marked obesity, hyperphagia, insulin resistance, and low expenditure seen in a particular mutant type of mice, *ob/ob* mice.

The role of leptin in the metabolic system and its control of obesity is well established in adults. Recent literature confirms the functional role of leptin as a feto-maternal placental hormone. Leptin is a key hormone which regulates energy balance, metabolism, growth and development of normal as well as growth restricted fetuses in intrauterine and extrauterine life. The source of leptin in the fetal circulation remains controversial. The predominant source are the placenta and fetal adipose tissue.

This investigation has focused on the histologic distribution of leptin prenatal and postnatal rat fetus by using immunohistochemistry .

In this study, leptin was shown in prenatal 15, 17 and 19. days rat fetus. Distribution of leptin was shown angiogenetic cells and serosa cells.

In conclusion; the distribution of leptin prenatal and postnatal rat feus tissues are of special interest.

Key words: Immunohistochemistry, Leptin, Rat Fetus

KAYNAKLAR

1. **Paul DL, Towbin KE, Leckman JF, Zahner GE, Cohen DJ:** Gilles de la Tourette's syndrome and obsessive compulsive disorder. Arch Gen Psychiatry 1986; 43: 1180-2.
2. **Christos S, Mantzoras MD:** The role of leptin in human obesity and disease; A review of current evidence. Ann Intern Med 1999; 130-671.
3. **Auwerx J, Staels B:** Leptin . Lancet 1998; 351-737.
4. **Russe E.** Leptin or Pubertin. Scientist. 2000; 14 (14): 15.
5. **Kirel B, Doğruel N:** Yeni bir hormon; leptin. Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi 1998; 7: 421.
6. **Hatemi H:** Leptin ve vücut ağırlığının kontrolü. Endokrinolojiye Yönelişler 1997; 6: 169.
7. **Roemmich JN, Rogol AD:** Role of leptin during childhood growth and development. Endocrinol Metab Clin North Am 1999; 28: 749.
8. **Mohamed Shaarawy, PhD, FRcPath, and Samira Youssef El-Mallah, MD.** Leptin and gestational weight gain: Relation of maternal and cord blood leptin to birth weight. J Soc Gynecol Invest 1999; 6: 70-73.
9. **Michael C. Henson, V. Daniel Casracane:** Leptin Pregnancy Biologyof Reproduction 2000; 63: 1219-1228.
10. **Koufman P, Castellucci M:** Ekstravillus trofoblast in the human placenta. Trofoblast Res 1997; 10: 21-65
11. **Garcia M dC, Casanueva FF, Diaquez C, Senaris RM:** Gestastional profile of leptin mRNA content in the placenta and adipoz tissue in the rat. Biol Reprod 2000; 62: 698-703
12. **Chien EK, Hara M, Rouard M, Yano H, Phillippe M, Polonsky KS:** İncree in serum leptin and uterine leptin receptor mRNA levels during pregnancy rat. Biochem Biophys Res Comm 1997; 237: 476-480
13. **Amico JA, Thomas A, Crowley RS, Burmeister I A:** Contents rations of leptin in serum of pregnant, lactating and cying rats and of leptin mRNA in rat placental tissue. Life Sci 1998; 63: 1387-1395
14. **Woodsid B, Abizaid A, Jefferali S:** Effect of acute food deprivation on lactational in fertility in rats is reduce by leptin administration. Am J Physiol 1998; 274: R1653-R1658
15. **Hui-Chen Lo, PhD, Lon-Yen Tsao,MS,Wen-Yin Hsu, MS, Hsi-Nan Chen,MD, Wai-Kit Yu, MD, and Chiu-Yen Chi,BS:** Relation of cord serum levels of growth hormone, insuline-like growth factors, leptin and IL-6 with birth weight, birth lenght, and head circumference in term and preterm neonates. Nutrition 2002;18: 604-608.
16. **Atanosava P, Popova L:** Leptin expression during the differentiation of subcutaneous adipose cell of human embryos in situ. Cell Tissues Organ S. 2000; 166: 15-19

17. **Yuen BSJ, Mc Millen IC, Symond ME, Owens PC:** Abundance of leptin mRNA in fetal adipose tissue is related to fetal body weight. *J Endocrinol* 1999; 163: R1-R4
18. **Clapp III JF, Kiess W:** Cord blood leptin effects fetal fat mass. *J Soc. Gynecol Invest* 1998; 5: 300-303
19. **Chen X, lin J, Hausman DB, Martin RJ, Dean RG, Hausman GJ:** Alterations in fetal adipose tissue leptin expression correlate with in development of adipose tissue. *Biol Neonate* 2000; 78: 41-47
20. **Geary M, Pringle PJ, Persdud M, Wilshin J, Hindmarsh PC, Rodeck CH, Brook CG:** Leptin concentrations in maternal serum and cord blood: relationship to maternal anthropometry and fetal growth. *Brj Obstet Gynaecol* 1999; 106: 1054-1060
21. **Schubring C, Kies W, Englaro P, Rascher W, Dotsch J, Hanitsch S, Attanasio A, Blum WF:** Levels of leptin in maternal serum, amniotik fluid, and arterial and venous cord blood: relation to neonatal and placental weight. *J Clin Endocrinol metab* 1997; 82: 1480-1483
22. **Hatemi H. Leptin:** Obezitenin genetik çözümü mü? *Endokrinolojide Yönelişler* 1997; 8: 168
23. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopoid L, Friedman JM:** Positional cloning of mause obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-432
24. **Cora JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PI, Considine RV:** Leptin: the tale of an obsty gene. *Diabetes* 1996; 45: 1455-1462
25. **Janeckova R:** The role leptin in human physiology and pathophysiology. *Physiol Res* 2001; 50: 443-459
26. **Bajoria R, Saoranna SR, Ward BS, Chatterjee R:** Prospective function of placental leptin at maternal fetal interface. *Placenta* 2002; 23: 108-115
27. **Prolo P, Wong ML, Licinio J:** Molcules in focus: Leptin. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 1285-1253.
28. **Tartoglia LA, Dembski M, Wang X, Deng N, Culpepper J, Devas R:** Identification and expression cloning of a leptin receptor ob-R. *Cell* 1995; 83: 1263-1271
29. **Licinio J, Negrao AB, Mantzoros C, Kaklamani V, Wpug ML, Bangiorno PB, Mulla A, Cearnal L, Veldhuis JD, Flier JS, Mc Cann SM, Gold PW:** Synchronicity of frequently-sampled 24 hour- concentrations of circulating leptin, luteinizing hormone, and estradiol in healthy woman. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 2541-2546
30. **Reichlin S:** Is leptin a secretion of the brain. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2267
31. **Lewansdowski K, Horn R, O'Callaghon CJ, Dunlop D, Medley GF, O'Hare P, Brabant G:** Free leptin, bound leptin and souble leptin receptor in normal and diabetic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999; 84: 300-306
32. **Lee GH, Proenca R, Mantez SM, Carroll KM, Friedman JM:** Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 1996; 379: 632
33. **Hatemi H:** Nöropeptit Y merkezsel ve çevresel anlamı. *Endokrinolojide yönelişler*, 1997; 6: 167

34. **Tritos NA, Mantzoros CS:** The role leptin in the obesity. *Diabetologia* 1997; 40: 1371
35. **Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K:** Non-adipose tissue production of leptin: Leptin as a novel placental derived hormone in humans. *Nat Med* 1997; 3: 1029-1033
36. **Hassink SG, de Lancey E, Sheslow DV, Simith-Kirwin SM, O'Connor OM, Dostal K, Leef K, Funanage VL:** Placental leptin: an important new growth factor in intrauterine and neonatal development? *Pediatrics* 1997; 100 (1/e1): 1-6
37. **Henson MC, Swan KF, O'Neil JS:** Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstet Gynecol* 1998; 92: 1020-1028
38. **Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D, Fowler P:** Circulating leptin in women; a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol* 1997; 47: 101-106
39. **Hoggard N, Hunter L, Trayhurn P, Williams LM, Mercer JG:** Leptin and leptin receptor mRNA protein expression in the murine and placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 11073-11078
40. **Bodher J, Ebenhiehler CF, Wolf HJ, Muller-Holzner E, Stanzyl D, Gancler R, Huter O, Patsch JR:** Leptin receptor in human term placenta. *Placenta* 1999; 20: 677-682
41. **Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P:** Immunohistochemistry of matrix MMP, their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tiss Res* 1998; 291: 133-148
42. **Castellucci M, De Matteis R, Meisse A, Canello R, Monsurro V, Islami D, Sarzani R, Marzioni D, Cinti S, Bischof P:** Leptin modulates extracellular matrix molecule and MMP; possible implications for trophoblast invasion. *Mol Hum reprod* 2000; 6: 951-958
43. **Matsuda J, Yokota I, Iida M, Murakami T, Natio E, Ito M, Shami K, Kuroda Y:** Serum leptin concentration in cord blood: relationship to birth weight and gender. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1642-1644
44. **Ong KKL, Ahmed ML, Sheriff A, Wood KA, Watts A, Golding J, Dunger DB:** Cord blood leptin is associated with size at birth and predicts infancy weight gain humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1145-1148
45. **Bouloumie A, Derexler HCA, Lafontan M, Bursse R:** Leptin, the product of ob gene, promotes angiogenesis *Circ Res* 1998; 83: 1059-1066
46. **Sieera-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB:** Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 1998; 281: 1683-1686
47. **Muhihauser j, Marzioni D, Mrroni M, Vuckovic M, Crescimanna C, Castellucci M:** Codistribution of basic fibroblast growth factor and heparan sulfate proteoglycan in growth zones of the human placenta. *Cell Tissue Res* 1996; 285: 101-107
48. **Chesley IC:** Weight changes and water balance in normal and toxic pregnancy. *Am J obstet Gynecol* 1944; 48: 565-8

49. **Parker JD, Abrams B:** Prenatal weight gain advice: An examination of the recent prenatal weight gain recommendations of the institute of medicine. *Obstet Gynecol* 1992; 79: 664-8
50. **Lin KC:** Increase of maternal plazma leptin concentrations during pregnancy: Comparision with nonpregnant women. *Kao Hsiung I Hsuech HO Hsuech Ts Chih* 1999; 15: 640-645.
51. **Siere-Honigman MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardeno G, Papapetrapoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverine PJ:** Biolojical action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 1998; 281: 1683-1686.
52. **Gansfard T, Alessander WS:** A role leptin in hemotopoeses. *Mol Biotechol* 1991; 11: 149-58.
53. **Tomimatsu T, Yamaguchi M, Murakami T, Ogura K, Sakata M, Mitsuda N, Kanzaki T, Kurachi H, Irahara M, Miyake A, Shima K, Murata Y:** Increase mause leptin production by adipoz tissue after midpregnancy: gestation profile of serum leptin concentration. *Biochem biophys Res Commun* 1997; 240: 213-245
54. **Butte NF, Hopkinson JM, Nicolson MA:** Leptin in human reproduction: serum leptin levels in pregnant and loctating women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 585-589
55. **Hoggard N, Hunter L, Lea RG, Trayhurn P, Mercer JG:** Ontogeny of the expression of leptin its receptor in the murine fetus and placenta. *Br J Nutr* 2000; 83: 317-326
56. **Bajoria R, Ward S, Hancock M, Sorama SR:** Placenta as a link beetwen aminoasid, insulin-IGF axis and low birth weight: evidence from studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 308-315.
57. **Bernard SJ, Yuen I, Mc Millen, C Symands ME, Quens PC:** Abudence of leptin mRNA in fetal adipoz tissue is related to fetal body weight. 1999; 118: RI-R4
58. **Lepercq J, Lahlou N, Timsit J, Girard J, Mouzon SH:** Macrosomia revisited : ponderal index and leptin delineate subtybes of fetal overgrowth. 1999; 181: 621-625.
59. **Mounzih K, Qiu J, Ewart-Toland A, Chehab FF:** Leptin is not necessary for gestation and parturition but regulates maternal nutrition via a leptin resistance state. *Endocrinology* 1998; 139:5359–5362
60. **Lea RG, Howe D, Hannah LT, Bonneau O, Hunter L, Hoggard N:** Placental leptin in normal ,diabetic and fetal-growth-retarded pregnancies. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 763-769.
61. **Lage M, Garcia-Mayo RV, Tome MA, Cordida F, Valle-Incian F, Considine RV, Caro JF, Dieguez C, Casanueva FF:** Serum leptin levels in women throuhout pregnancy and the postpartum period and in women suffering spontaneous abortion. *Clin Endocrinol* 1999; 50: 211-216
62. **Laird SM, Quinton ND, Anstie B, Li TC, Blakemore AI:** Leptin and leptin-binding activity in women with recurrent miscarriage; correlation with pregnancy outcome. *Hum Reprod* 2001; 16: 2008-2013
63. **Teppa RJ, Ness RB, Crombleholme WR, Robert JM:** Free leptin is increaes in normal pregnancy and furher increased preeclamsia. *Metabolism* 2000; 49: 1043-1048

64. **Anim-Nyame N, Sooranna SR, Steer PJ, Johnson MR:** Longitudinal analysis of maternal plasma leptin concentrations during normal pregnancy and preeclampsia. *Hum Reprod* 2000; 15: 2033-2036
65. **Hytinanti T, Koistinen HA, Koivisto VA, Karonen SL, Rutanen EM, Anderson S:** Increased leptin concentration in preterm infants of preeclamptic mothers. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000; 83: F13-16
66. **Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, Ma G, Jaskowiak NT, Rivet DJ 3rd, Flier JS, Lowell BB, Fraker DL., Alexander HR:** Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels. *J Exp med* 1997; 185: 171-175.
67. **Mise H, Sagawa N, Matsumoto T, Yura S, Nanno H, Itah H, Mori T, Masuzaki H, Hosada K, Ogawa Y, Nakao K:** Augmented placental production of leptin in preeclampsia: possible involvement of placental hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3225-3229.
68. **Leperca J, Cauzac M, Lahiov N, Timsit J, Girara J, Auwerx J, Haugei-d Mouzon SC:** Overexpression of placental leptin in diabetic pregnancy: a critical role for insulin. *Diabetes* 1998; 47: 847-850.
69. **Kautzky-Willer A, Pacini G, Tura A, Bregimayer C, Schneider B, Ludvik B, Prager R, Waidhausi W:** Increased plasma leptin in gestational diabetes. *Diabetologia* 2001; 44: 164-172.
70. **Persson B, Westgren M, Celsi G, Nord E, Ortquiste E:** Leptin concentrations in cord blood in normal newborn infants and offspring of diabetic mothers. *Horm Metab Res* 1999; 31: 761-771.
71. **Ng. PC, Lam CW, Lee CH, Wong GW, Ok TF, Wang E, Ma KC, Chan:** Leptin and metabolic hormones in infants of diabetic mothers. *Arch Dis Child fetal Neonatal Ed* 2000; 83: F193-197.
72. **Mukerjea R, Castonguay TW, Douglass LW, Maser-veillon P:** Elevated leptin concentrations in pregnancy and lactation: possible role as a modulator of substrate utilization. *Life Sci* 1999; 65: 1183-1193.
73. **Laud K, Gourdou I, Belair L, Keisher DH, Digiane J:** Detection and regulation of leptin receptor mRNA in ovine mammary epithelial cell during pregnancy and lactation. *FEBS Lett* 1999; 463.
74. **Sobhani I, Bado A, Vissuzaine C, Buyse M, Kermorgant S, Laigneau JP, Attaub S, Lehy T, Henn D, Mignon M, Lewin MJ:** Leptin secretion and leptin receptor in human stomach. *Gut* 2000; 47: 178-183.
75. **Yuro S, Sagawa N, Mise H, Mori T, Masuzaki H, Ogawa Y, Nakao K:** A positive umbilical venous-arterial difference of leptin level and its rapid decline after birth. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178: 926-930.
76. **Kiess W, Siebler T, Inglaro P, Kratzsch J, Deutscher J, Mey K, Blum WF:** Leptin as a metabolic regulator during fetal and neonatal life and in childhood and adolescence. *J. Pediatr Clin Endocrinol Metab* 1998; 11: 433-496.

77. **Ogueh O, Sooranna S, Nicolaides KH, Johnson MR:** The relationship between leptin concentration and bone metabolism in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85: 1997-1999.
78. **Harigaya A, Nagashima K, Nako Y, Morikawa A:** Relationship between concentrations of serum leptin and fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82: 3281-3284.
79. **Yashimitsu N, Douchi T, Kamio M, Nogata Y:** Differences in umbilical venous and arterial leptin levels by mode of delivery. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 342-345.
80. **Bennett BD, Solar GP, Yuan IQ, Mathias J, Thomas GR, Matthews W:** A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr Biol* 1996; 6: 1170-1180.
81. **Sooranna SR, Ward S, Bajoria R:** Fetal leptin influences birth weight in twins with discordant growth. *Pediatr Res.* 2001; 49: 667-672.
82. **Bajoria R, Hancock M, Ward S, D'Souza SW, Sooranna SR:** Discordant amino acid profiles in monochorionic twins with twin-twin transfusion syndrome. *Pediatr Res* 2000; 48: 821-828.
83. **Carro E, Senaris RM, Seoane LM, Frohman LA, Arimura A, Cas-Anueva FF, Dieguez C:** Regulation of growth hormone-releasing hormone and somatostatin on leptin-induced GH secretion. *Neuroendocrinology* 1999; 69: 3-10.
84. **Shiman I, Yan X, Magoffin DA, Friedman TC, Meimed S:** Intact leptin receptor is selectively expressed in human fetal pituitary and pituitary adenomas and signals human fetal growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 4059-4064.
85. **Jaquet D, Leger J, Tabone MD, Czernichow P, Levy-Marchal C:** High serum leptin concentrations during catch-up growth of children born with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84: 1949-1953.
86. **Garcia Mayor RV, Anarade MA, Rios M, Lage , Dieguez C, Casanueva FF:** Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones and pubertal stage. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82: 2849.
87. **Matsuda J, Yokata I, Tsurus Y, Morakami T, Ishimura K, Kurada Y:** Development changes in long-form leptin receptor expression and localization in rat brain. *Endocrinology* 1999; 140: 5333-5338.
88. **Zeker Z, Özer G, Topaloğlu K, Mungan NÖ, Yüksel B:** Leptin yapı ve fizyolojisi. *Arşiv* 2002; 11: 30.