

T.C
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

118 277

ÇEŞİTLİ SIÇAN DOKULARINDA *Ob*- PROTEİN (LEPTİN)'İN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK TANIMLANMASI

Kanat GÜLLE

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

118277

DANIŞMAN
Doç. Dr. Erdal KARAÖZ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

2002-İSPARTA

TEŞEKKÜR

Akademik kariyerimin başlangıcında bilgi ve deneyimlerinden yararlanmaktan onur duyduğum, yüksek lisans eğitimim ve yüksek lisans tez çalışmam süresince her zaman desteği, yardımları ve yönlendirmeleri ile yanımda olan sayın danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanımız Doç.Dr. Erdal KARAÖZ'e

Çalışmamda laboratuvar imkanlarını sağlayan Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Ramazan DEMİR'e, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Ümit Ali KAYIŐLI'ya ve tüm Akdeniz Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına,

Tez çalışmam süresince gösterdikleri anlayış için tüm bölüm arkadaşlarım ve hocalarıma, teşekkür ederim.

KABUL VE ONAY

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 16/05/2002

Tez Danışmanı : DOÇ. DR. FAHAL KARAOZ SÜ
(Ünvanı, Adı, Soyadı) (Üniversite)

Üye : DR. DOÇ. DR. ALPASLAN GÖKÇİMEN SÜ
(Ünvanı, Adı, Soyadı) (Üniversite)

Üye : DR. DOÇ. DR. OSMAN SURAL SÜ
(Ünvanı, Adı, Soyadı) (Üniversite)

Üye :
(Ünvanı, Adı, Soyadı) (Üniversite)

Üye :
(Ünvanı, Adı, Soyadı) (Üniversite)

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Prof. Dr. Ahmet Rifat ÖRMECİ

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa No</u> |
|---|-----------------|
| Tablolar Listesi | i |
| Resimler Listesi | ii |
| Kısaltmalar | iii |
| 1-GİRİŞ ve AMAÇ | 1 |
| 2-GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. Ob Geni | 5 |
| 2.2. Obeziteye Neden Olan Diğer Genler | 5 |
| 2.3. Leptin | 6 |
| 2.3.1. Leptinin yapısı | 6 |
| 2.4. Leptin Reseptörü | 7 |
| 2.5. Leptinin Faaliyet Bölgeleri | 8 |
| 2.6. Leptinin Biyolojik İşlevleri | 10 |
| 2.6.1. Leptinin Kilo Düzenlemedeki Rolü | 11 |
| 2.6.2. Leptinin Metabolizma Üzerine Olan Etkileri | 11 |
| 2.6.3. Leptinin Glukoz Metabolizması Üzerine Olan Etkileri | 12 |
| 2.6.4. Leptinin İnsülin Metabolizması Üzerine Olan Etkileri | 12 |
| 2.6.5. Leptinin İnfertilite Üzerine Olan Etkileri | 15 |
| 2.6.6. Leptin ve Diğer Fonksiyonları | 15 |
| 2.7. Yağ Dokusu | 16 |
| 2.8. Nöropeptit Y | 17 |
| 3 – MATERYAL VE METOT | 19 |
| 3.1. Materyal | 19 |
| 3.1.1. Deney Hayvanları | 19 |
| 3.1.2. Dokuların Elde Edilmesi | 19 |
| 3.2. Metot | 19 |
| 3.2.1. Histolojik Çalışmalar | 19 |
| 3.2.2. Kullanılan Solüsyonlar | 21 |
| 3.2.3. İmmünohistokimyasal Çalışmalar | 21 |
| 3.3. Değerlendirme | 26 |
| 4 – BULGULAR | 28 |
| 5 – TARTIŞMA VE SONUÇ | 43 |
| ÖZET | 50 |
| SUMMARY | 51 |
| KAYNAKLAR | 52 |

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa No

| | |
|---|----|
| Tablo.2.1 : Besin Alımının Hipotalamik Modülatörleri..... | 8 |
| Tablo.3.1 : Böbrek Dokusunun İnceleme Kapsamına Alınan Bölümleri..... | 26 |
| Tablo.3.2 : Beyin Dokusunun İnceleme Kapsamına Alınan Bölümleri..... | 27 |
| Tablo.3.3 : Mide Dokusunun İnceleme Kapsamına Alınan Bölümleri..... | 27 |
| Tablo.4.1 : Normal Sıçan Mide Dokusunda Mikrofotografik Alanlara Özgü Farklı Bölgelerde Leptinin Dağılımı..... | 29 |
| Tablo. 4.2 : Normal Sıçan Böbrek Dokusunda Mikrofotografik Alanlara Özgü Farklı Bölgelerde Leptinin Dağılımı..... | 30 |
| Tablo.4.3 : Normal Sıçan Beyin Dokusunda Mikrofotografik Alanlara Özgü Farklı Bölgelerde Leptinin Dağılımı..... | 31 |

RESİMLER LİSTESİ

Sayfa No

- Resim –1 (a,b) :** Leptinin Sıçan Midesindeki Dağılımı.....32
- Resim – 2 :** Leptin İçin İmmün Boyama Uygulanmış Mide Kesitlerine Ait Görünüm....33
- Resim – 3 :** Leptin İçin İmmün Boyanmış Sıçan Mide Mukozasına Ait Görünüm..... 34
- Resim – 4 :** Myenterik Pleksusun Görünümü..... 35
- Resim – 5 (a,b) :** Leptinin Sıçan Böbreğindeki Dağılımı.....36
- Resim – 6 (a,b) :** Leptinin Sıçan Böbreğindeki Dağılımının Görünümü.....37
- Resim – 7 (a,b) :** Leptin İçin Boyanmış Sıçan Böbrek Korteksinden Geçen Kesit.....38
- Resim – 8 :** Leptin İçin İmmün Boyama Yapılmış Sıçan Böbrek Medullası.....39
- Resim – 9 (a,b) :** Sıçan Frontal Kortesten Geçen Görünüm.....40
- Resim –10 :** Leptinin Sıçan Koroit Pleksusdaki Dağılımı.....41
- Resim –11 :** Leptin İçin İmmün Boyama Yapılmış Sıçan Beyin Dokusuna Ait Bir
Görünüm.....42
- Resim –12 :** Sıçan Beyin Korteksinde Leptinin Dağılımı.....42

KISALTMALAR

| | |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| A.B.D | : Amerika Birleşik Devletleri. |
| CCK | : Kolesistokinin. |
| Cpe | : Karboksipeptidaz E. |
| CRH | : Kortikotropin salgılatıcı hormon. |
| db | : Diyabet. |
| DMH | : Dorsomediyal hipotalamik çekirdek. |
| FSH | : Folikül uyarıcı hormon. |
| GHRH | : Büyüme hormonu salgılatıcı hormon. |
| GnRH | : Gonadotropin salgılatıcı hormon. |
| IGF-I | : İnsülin benzeri büyüme etkeni. |
| LH | : Lateral hipotalamik çekirdek. |
| MC | : Melanokortin. |
| MSH | : Melanosit uyarıcı hormon. |
| α-MSH | : α -Melanofor uyarıcı hormon. |
| MSS | : Merkezi sinir sistemi. |
| NPY | : Nöropeptit Y. |
| Ob | : Obez. |
| Ob protein | : Leptin. |
| Ob-R | : Leptin reseptörü. |
| PVN | : Paraventriküler çekirdek. |
| Tub | : Tuppy (fiçi gibi). |
| VMH | : Ventromediyal hipotalamik çekirdek. |

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Obezite (şişmanlık), bugün tüm dünyada yaygın olan bir halk sağlığı problemidir. Obezitenin görülme sıklığı hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde ciddi boyutlardadır (1). Bu nedenle şişmanlık, giderek çağımıza damgasını vuran bir olgu olarak karşımıza çıkmaktadır ve farkında olmadan vücudumuzu ele geçiren, tehlikesini çoğumuzun yeterince kavrayamadığı bir hastalıktır. Bugün 1.2 milyar insan, yani toplam dünya nüfusunun altıda birinden fazlası bu hastalığın pençesindedir (2). Obezitenin yıllar boyu, beslenme alışkanlıklarındaki yanlışlıklar ve fiziksel aktivitenin yetersizliğinden kaynaklanan bir estetik sorun olduğu düşünülmekteydi. Ancak son dönemlerde yapılan araştırmalar obezitenin sadece estetik bir sorun değil aynı zamanda çok ciddi bir hastalık olduğunu göstermiştir. Çünkü obezite, bir takım metabolik problemlerle beraber kronik hastalıkları da beraberinde getirmektedir. Obezite ile beraber görülme sıklığı artan hastalıkların başında; tip 2 diyabet, kalp damar hastalıkları, yüksek tansiyon, kalp krizi, safra kesesi hastalıkları, kadınlarda hormonal bozukluklar (aşırı tüylenme), eklem hastalıkları, solunum problemleri ve depresyon görülmektedir. Aynı zamanda obezitenin belli kanser tiplerinin oluşumunda da önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir (örneğin; meme, endometriyum, prostat ve kolon kanserleri) (3,4,5).

Tüm ülkelerde son yıllarda obezite prevalansı artmıştır. Obezite gelişmiş ülkelerde sigara kullanımından sonra önlenebilir ölüm nedenlerinin başta gelen ikinci nedenidir. A.B.D'de obezite görülme sıklığı erişkin popülasyonun % 22'sinde, Avrupa'da %10-25 arasındadır. Bu oran İsviçre'de en düşük, Litvanya'da ise en yüksektir. Tüm dünyada ise Çin en düşük orana sahiptir (1).

Ülkemizdeki durum da pek farklı değildir. Türkiye Obezite Vakfı tarafından 1999 yılında gerçekleştirilen bir araştırma, Türk vatandaşlarının altıda birini şişmanlık sınırının üzerine yerleştiriyor. Ayrıca nüfusumuzun beşte birinin de aşırı kilolu olduğu anlaşılıyor (2).

Birçok araştırmacıya göre obezite, kişinin genlerinin ve çevrenin etkileşiminden kaynaklanan çok faktörlü kronik bir hastalıktır. Obeziteye en sık neden olan faktörler sedanter yaşam biçimi ve yüksek oranda yağ içeren besinlerin alımıdır (1).

Şişmanlık ideal kilonun üzerinde olmak demektir. İdeal kilo ise, hayatı maksimum uzatan kilo demektir ve vücut ağırlığı indeksi (BMI; Body Mass Index) ile tanımlanır. Şişmanlık vücut ağırlığı indeksinin %30'dan yüksek olması demektir. Vücut ağırlığı indeksi; vücut ağırlığının kilogram (kg) cinsinden, metre kare (m²) cinsinden boy uzunluğuna oranıyla hesaplanmaktadır (2,3).

Şişmanlık için iki ayrı görüş bulunmaktadır. Bunlardan ilki şişman kişiyi iradesiz olmakla suçlar. İkinci ve bilimsel olan görüş ise vücutta ağırlığımızı (daha doğrusu vücut yağ depolarını) kontrol eden duyarlı fizyolojik ve genetik mekanizmaların bulunduğudır. Bunların görevi beden ağırlığını aynı düzeyde tutmaktır (2,5).

İşte 1994 yılında obezite geni olarak adlandırılan bir gen ve bu genin ürünü olarak keşfedilen leptin (*ob* protein) bu fizyolojik ve genetik mekanizmanın temel faktörü olarak değerlendirilmiştir. 1995 mayısında A.B.D'de ki Amgen firması, 20 milyon dolar ödeyerek 6 ay önce keşfedilmiş leptinin ticari haklarını satın aldı. Leptin eksikliği olan ileri derecede şişman farelere bir ay leptin enjekte edilmesi bu farelerin ağırlıklarını hiçbir yan etki olmadan %50 azaltmıştı. Tüm bu bulgular şişmanlığın mucize ilacı olarak leptinin gösterilmesine yol açtı. Yapılan son çalışmalarda obezitenin artmış plazma leptin mRNA'sı ile doğru orantılı olduğunu göstermiştir (2,6).

Genellikle şişmanlık genleri vücutta bir takım hormonları etkileyerek şişmanlığa sebebiyet verirler. Bu hormonların başında leptin gelir. Leptin yağ dokusunda yapılır ve beynin hipotalamus bölgesindeki kilo düzenleyici merkezlere bilgi verir. Yağ depolarının azalışı, leptini azaltarak besin alımını artırır. Yağ depolarının artışı ise ters etki göstererek leptinin artmasına, iştahın kesilmesine ve bu yolla besin alımının azaltılmasına yol açar. Bu şekilde beden ağırlığı belli bir düzeyde tutulur. Leptin eksikliğine neden olan mutasyonlar, gerek kemiricilerde, gerekse insanlarda ileri derecede şişmanlık yapar. Leptin aynı zamanda enerji harcanmasını da etkiler; bu, besin almından bağımsız olarak düzenlenir. Ancak yine de neden bazı kişiler şişman, bazıları değil sorusunu sormaktan kendimizi alamayabiliriz.

Leptine duyarlılık değişkendir; şişmanlar leptine dirençlidirler. Genetik, çevresel ve hatta psikolojik nedenler leptin oluşumunu ve leptine direnci etkiler (2).

Ob (obezite) geninin ürünü olan ve dolaşımda bulunan leptin (*ob* protein), besin alımını, enerji harcanmasını ve vücut ağırlığının homeostazisini kontrol eden, daha çok adipositler olmak üzere mide, plasenta ve diğer birçok dokuda eksprese edilen peptit yapısında bir hormon olduğu saptanmış ve leptin düzeyindeki değişimlerin üreme, bağışıklık ve kemik oluşması gibi olaylarla yakından ilgili olduğu saptanmıştır (2,5-23).

Bu nedenle, bu çalışmada leptinin özellikle mide, beyin ve böbrek dokusundaki dağılımlarının tam olarak belirlenmesinin önemli olacağı düşünöldü. Çalışmamızda immünohistokimyasal yöntemler kullanarak leptinin bu dokulardaki dağılımlarını belirlemeyi ve yapı-fonksiyon ilişkilerini saptamayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

20. yüzyılın son dönemlerinde istatistiksel veriler sonucunda vücut ağırlığı indeksinin (BMI; Body Mass Index) idealin %30'u veya daha yukarısında ise ömür uzunluğunun azaldığı saptanmıştır. Epidemiyoloji çalışmaları göstermiştir ki; şişmanlık 26 yıllık bir süre göz önüne alındığında, 30 ile 42 yaş arasında alınan her yarım kilo ölüm riskini %1, 50 ile 62 yaş arasında %2 arttırdığı görülmüştür (2).

Omurgalılarda, enerjice yoğun trigliseritlerin yeterli miktarını adipoz dokuda depolama yeteneği, evrim sırasında hayatta kalmayı sağlar. Ancak, aşırı adipoz doku varlığı da uyumsuzluk getirebilir. Yağ depolarını ve enerji dengesinin optimum seviyede düzenlenmesi için kompleks bir fizyolojik sistem gelişmiştir. Adipoz doku tarafından salınan leptin ve reseptörü, bu sistemin en önemli komponentleridir.

Farede obez (*ob*) ve diyabet (*db*) genlerinde resesif mutasyonlar, obezite ile sonuçlanır. *ob/ob* ve *db/db* fareler benzer fenotiplere sahiptir; aynı diyetle beslendiklerinde bile normal fareden 3 kat daha ağırdır ve vücut yağ içeriğinde beş kat artış gösterir. Yapılan çalışmalar sonucunda *ob* geninin, enerji dengesini düzenleyen ve dolaşımda bulunan bir faktörün oluşumundan sorumlu olduğunu veya bu faktörü kodladığını göstermektedir. Ancak, bu sonuçlar *ob* ve *db* genlerinin tanımlanmasıyla onaylanmıştır (5).

1950'lerin başlarından bu yana (obez (*ob*) fare o zaman tanımlanmıştı) tek genli obezite sendromları kemirgenlerde biliniyordu. 1970'lerde ikinci bir model (diyabetik (*db*) fare) belirlendi. Bu iki hayvan grubu hiperfaji, düşük düzeyde enerji tüketimi, erken yaşta gelişen obezite, insülin direnci ve diyabete yatkınlık ile karakterize olan bir fenotipe sahipti. Coleman ve arkadaşları (24), normal farenin dolaşımını *ob* farelere aktarınca; normal hayvanın kanındaki bir şeyin *ob* faresinin kilo kaybederek daha sağlıklı görünmesini sağladığını tespit ettiler.

ob ve *db* mutasyonlarını klonlama çalışmaları 1986 yılında başladı. *ob* geni 1994'te, *db* geni de bir sonraki yıl belirlendi. Normal alleller tarafından kodlanan proteinler de böylelikle incelenebilirdi. Nitekim *ob* geninin ürünü olan leptin ile ilgili çalışmalar bu genlerin tanımlanmasıyla hız kazanmıştır (24,25).

2.1. *Ob* Geni :

Ob geni ilk olarak Jeffrey Friedman ve arkadaşları tarafından Rockefeller Üniversitesinde 8 yıl süren araştırmalar sonrası 1994 yılında klonlanıp dizi analizi yapılmıştır (26).

Ob farelerinde mutasyona uğrayan gen farenin 6. kromozomunda bulunur. İnsandaki karşılığı 7. kromozomun uzun kolunda, 20 kilobaz uzunluğundaki 3 eksondur. *ob* geninin demonstrasyonu bu genin hem kemiricilerde hem de insanlarda 2 intron 3 ekson bölgesi içerdiğinin anlaşılmasını sağlanmıştır. *ob* geninin kodlanan bölgesi 501 nükleotit uzunluğundadır. *ob* geni insanlarda 7. kromozomun uzun kolunun 31.3 lokusunda ve farelerde 6. kromozom üzerinde lokalize olduğu bildirilmiştir (24,26).

2.2. Obeziteye Neden Olan Diğer Genler :

Ob ve *db* mutasyonlarını belirleme çabaları devam ederken, farelerde obeziteye neden olan başka 3 mutasyon daha araştırıldı. Bu farelere tıknaz, şişman ve sarı fareler adı verildi. Hepsinde artmış besin alımı ve azalmış otonom aktivasyon ile ilişkili olarak kilo artışı sendromları görülür. Bu beş genin hepsi klonlanmış ve beşinin de insanlarda homologu saptanmıştır (5).

Tıknaz farede mutasyona uğrayan gen, farenin 7. kromozomundadır. *Tub* olarak adlandırılan bu gen hipotalamustaki nöronal devrelerin gelişmesinde rol oynayan bir proteini kodlar, mutantlarda ileri yaşta, yavaş yavaş gelişen obezite görülür. İnsanlardaki *tub* homologunun 11. kromozomun kısa kolunda olduğu bildirilmiştir (24).

şişman farede mutasyona uğrayan gen farenin 8. kromozomundadır. *Cpe* olarak adlandırılan bu gen insülin ve melanokortin gibi hormonların ve nöropeptit Y gibi nöropeptitlerin biyosentezine katılan bir enzim olan karboksipeptidaz E'yi kodlar. Orta derecede, geç yaşta başlayan obezitede hayvanda hipoadrenalizm ve kısırlık gibi çok sayıda endokrin anormallik görülür. İnsandaki *Cpe* homologu 4. kromozomun uzun kolunda yer alır (27,28).

Faredeki beş obezite sendromundan sarı fare dominant olmayan bir mutasyona sahip olması açısından zgndr. Bu ad hayvanın tüylerine bakılarak verilmiştir; geç dönemde başlayan obezitede mutant hayvanın tüyleri sararır.

Obezite geliştikçe farenin 2. kromozomundaki *agouti* geni sadece deride eksprese edilir. İnsanda *agouti* geninin karşılığı 20. kromozomun uzun kolunda bulunur (29,30).

2.3. Leptin :

Leptin, öncelikle genetik olarak şışman farelerde inaktif olan *ob* genetik lokusunun bir ürünü olarak tanımlanmıştır (5). 167 aminoasitten oluşan (21'i salınmadan önce kesilerek atılır) ve 16kD'luk bir protein olan gen ürününe leptin adı verilir; leptin Yunanca'da ince anlamına gelir (leptos=ince; greek) ve gene sembolü kazandıran da leptindir: fare ve sıçanlarda *Lep*, insanlarda *LEP* (31). Bu peptit adipositler tarafından salınır ve daha düşük seviyelerde gastrik epitelde, plasentada, karaciğerde, kasda ve diğer birçok dokuda eksprese edilir (5). Ayrıca leptin kanda dolaşır ve serebrospinal sıvıda bulunur; bu, leptinin beyine girdiğini gösterir. Peptidin kan beyin bariyerinden geğerken aktif taşınmaya ihtiyaç duyup duymadığı ya da bariyerin olmadığı yerlerdeki giriş noktalarını kullanıp kullanmadığı bilinmemektedir. *Lep*'den yoksun farelerde leptinin sistemik veya intraserebroventriküler yolla uygulanması besin alımını azaltır ve insüline duyarlı glikozu aynı düzeyde tutar. Ayrıca enerji tüketimi de artar. Obez olmayan, genetik açıdan yaban tip hayvanlarda çok yüksek dozlarda leptin benzer etkiler göstermektedir (32).

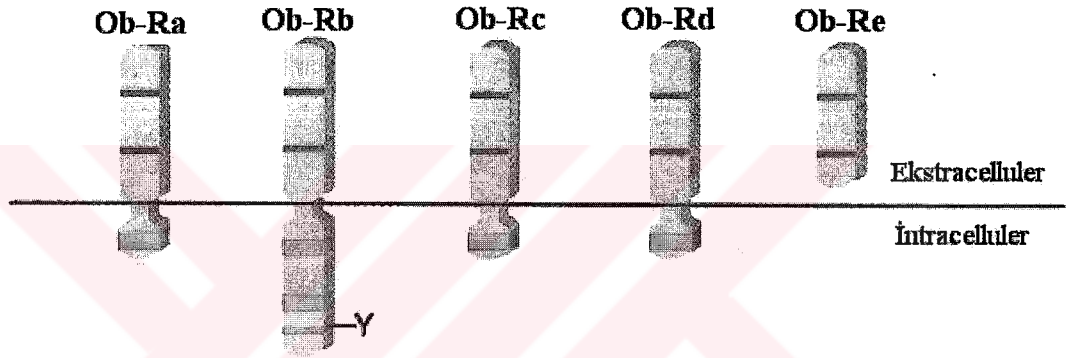
Leptin mRNA'sı, in situ hibridizasyon, hücre fraksinasyonu ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak adipositlerde eksprese edilmiştir. Fare ve insan plazmasında 16.000 moleküler ağırlıklı bir protein olarak bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca kemirici mide ekstrelerinde, bir 19K formu da tanımlanmış, ancak bu formun şimdiye kadar fonksiyonel önemi saptanamamıştır (33).

2.3.1. Leptinin Yapısı :

Önceleri leptinin bir 4 α -heliks sitokin yapısına sahip olduğu bilinmiyordu, fakat diyabetik şışman farelerin *db/db* lokusunda mutant gen olarak leptin reseptörünün klonlanması ve diğer tip 1 sitokin reseptörlerine net bir homoloji göstermesi (özellikle gp 130) leptinin bir 4 α -helikal yapısına sahip olduğunun öne sürülmesine yol açmıştır (34).

2.4. Leptin Reseptörü :

Leptin reseptörü (*ob-R*), ilk defa fare koroit pleksusundan ekspresyon kloning ile izole edilmiştir. Sitokin reseptör ailesinin bir üyesi olarak tanımlanmıştır ve leptini nanomolar afinite ile bağlar. *Ob-R* geni, *db*'nin pozisyonel klonlanması, bu genin alternatif olarak 5 tane izoformu kodladığını gösterdi. *Ob-Rb* (*Ob-R1* olarak da bilinir), sinyal transdüksiyonu için gerekli çeşitli motifleri içeren bir sitoplazmik bölgeye sahiptir. Diğer formlar bu motiflerin bir kısmını veya hiçbirini bulundurmaz (Şekil 1) (5,35).



Şekil 1. Leptin reseptörünün çeşitli izoformları (5).

Leptin reseptörünün, immünohistokimya, RT-PCR, ve Western blot yöntemleri kullanılarak, genelde hipotalamusta bulunduğu bildirilmiştir (36, 37, 38, 39, 40).

Leptinin vücudun yağ durumu hakkında sinyal vermesi ile ilişkili fizyolojik işlevi adipositler tarafından salınmasıyla başlar. Kemiricilerde sinyal, leptin reseptörünün Re izoformu tarafından taşınabilir. Son bulgular da uzun Rb izoformunu otokrin feedback'te aracı rol oynarak leptin'in kendi biyosentezini (adipoz dokuda) düzenlenmesini sağlar. Kan-beyin bariyerine ulaşan leptin aktif taşıma ile taşınır (Ra izoformu yoluyla); Ra izoformu beyindeki koroit pleksusta eksprese edilir. Beyinde bariyerin olmadığı bölgeler de vardır. Hipotalamusta leptin reseptörünün başlıca formu Rb'dir ve bu form JAK/STAT sinyal basamağını aktive eder. Bunun bir sonucu Nöropeptit Y'yi kodlayan NPY geninin baskılanması gerçekleşebilir (41).

2.5. Leptinin Faaliyet Bölgeleri :

Ob-Rb normalde hipotalamik nöronlarda ve diğer hücre tiplerinde örneğin T hücreleri ve vasküler endotel hücrelerinde yüksek düzeylerde eksprese edilir. Merkezi sinir sisteminde hipotalamik arkuat çekirdek, dorsamediyal hipotalamik çekirdek (DMH), paraventriküler çekirdek(PVN), ventromediyal hipotalamik çekirdek (VMH), ve lateral hipotalamik çekirdek (LH) *ob-Rb* ifadesinin temel bölgeleri olarak tanımlanmıştır. Bu çekirdeklerin herbiri, vücut ağırlığının regülasyonunda oldukça önemlidir (5,37).

Bu hipotalamik nükleuslarda, besin alımını ve/veya vücut ağırlığını düzenleyen bir ya da daha fazla nöropeptit ve nörotransmitter ifade eder (5)(tablo 1).

Tablo 1. Besin Alımının Hipotalamik Modülatörleri

| Besin Alımını Arttıranlar | Besin Alımını Azaltanlar |
|---------------------------|--------------------------|
| <i>NPY</i> | <i>CART</i> |
| <i>MCH</i> | <i>CCK</i> |
| <i>Galanin</i> | <i>CRH</i> |
| <i>Orexin a ve b</i> | <i>α-MSH</i> |
| <i>Peptide YY</i> | <i>İnsülin</i> |
| <i>Noradrenalin</i> | <i>GLP-1</i> |
| | <i>Bombesin</i> |
| | <i>Serotonin</i> |

Genetik veriler, nöropeptit Y (NPY) ve reseptörlerinden bir ya da daha fazlasının leptin yokluğunda (ve olasılıkla düşük olduğunda) tepki verdiğini göstermiştir. Bununla birlikte melanokortin-4 (MC-4) reseptörü ve onun ligandları (MSH ve ART) artmış leptin düzeylerine biyolojik yanıt için olasılıkla gereklidir. Ağırlık kazancına (kilo alımına) bağlı olarak artmış leptin düzeylerine yanıt olarak hipotalamustan MSH salınımını artırır. MSH, MC-4 reseptörleri üzerinden etki göstererek obeziteye yanıt olarak besin alımını azaltır (5).

NPY, intratekal (omurilik zarları içine; dura mater-araknoid veya araknoid ile pia mater arasına) uygulandığında bilinen en güçlü oreksijenik (iştah arttırıcı) ajandır. Yani NPY mRNA'sının *ob/ob* farelerinde arttığı, buna karşın leptin

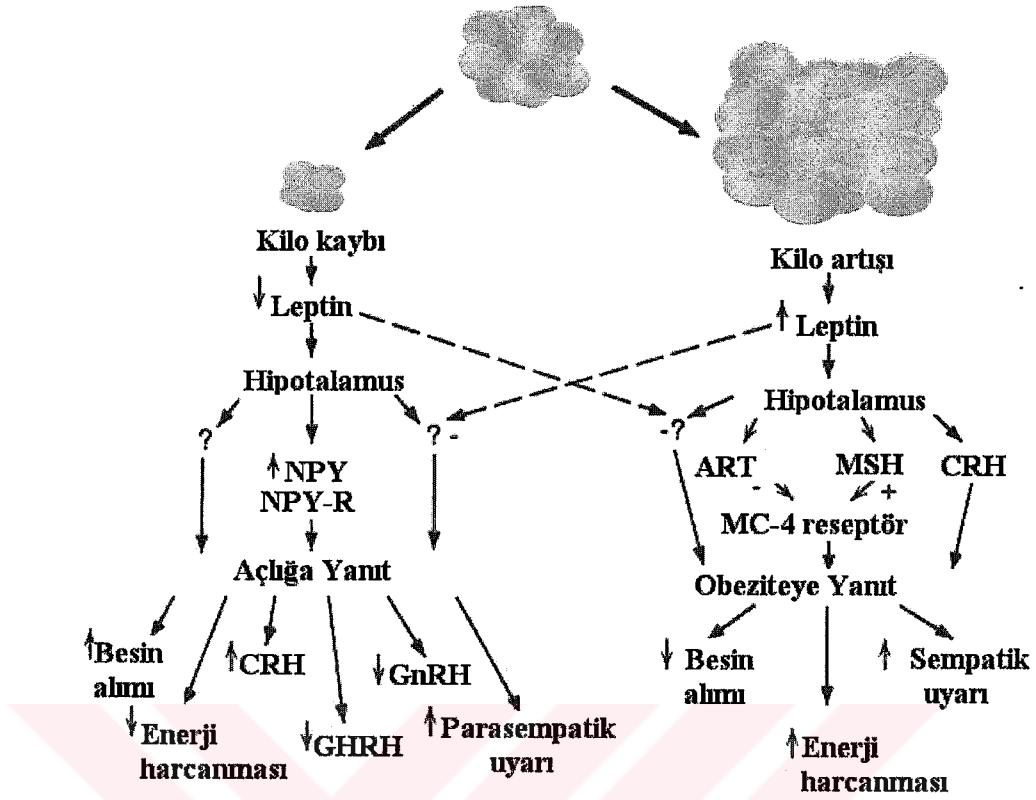
uygulanmasından sonra ise azaldığı tespit edilmiştir. Melanokortin-4-knockout (bu reseptörün bulunmaması durumu) hayvanlarda leptin direnci ve obezite geliştiği bildirilmiştir. Çünkü, MC-4 reseptör noksanlığında, artmış leptin düzeylerine yanıt oluşmaz (leptin direnci) dolayısıyla artmış kilo ve yağ kitlesi sonucunda leptin ne kadar artarsa artsın besin alımı üzerinde etki edemeyecektir.

α -MSH ve MSH agonistleri besin alımını azaltır. Hayvanların bir α -MSH antagonisti ile önceden muamele edilmesi, enjekte edilen leptinin anorektik etkisini köreltir. Normalde, leptin enjeksiyonu MSH üzerinden etki göstererek besin alımını azaltır. Ancak, MSH antagonisti leptinin bu etkisini (anorektik etkisi) göstermesine engel olarak iştahsızlığın ortadan kalkmasına neden olmaktadır (42).

Melanokortin sinyal mekanizmasında endojen bir antagonist olan ART (Agouti-related transcript=agouti ilişkili transkript; bir başka melanokortin reseptörü) kilonun düzenlenmesinde işlev görür. Yüksek düzeyde ART eksprese eden transgenik farelerin belirgin olarak obez oldukları tespit edilmiştir (43). Normalde, obezite artmış leptin düzeylerine yanıt olarak hipotalamustan salgılanan ART azalır. Bu durumda besin alımında bir azalma söz konusudur. Ancak transgenik olarak ART'nin yüksek ekspresyonunda tersi etki göstererek besin alımında artışa dolayısıyla obeziteye neden olur (Şekil 2) (5).

Kolesistokinin (CCK), leptinin anorektik etkisini kuvvetlendirir. Ayrıca, CCK-8 midede leptin depolarını azaltır (44). Bir hipotalamik peptit olan kokain ve amfetamin-düzenleyici transkript (CART; kokain-amfetamin regulated transcript) besin alımını azaltır. Anti-CART antikoru besin alımını artırır ve CART mRNA'sının düzeyinin *ob/ob* farelerde arttığı tespit edilmiştir.

Bombesin besin alımını azaltır ve bombesin-3'te oluşturulan mutasyonlar hafif obezite ile sonuçlanır. İnsülin, besin alımını azaltmak için hipotalamus üzerine etkir. Lateral hipotalamusta eksprese edilen bir nöropeptit olan melanin concentrating hormone (MCH) seviyeleri, *ob/ob* farelerde artar, ve enjeksiyonları farelerde besin alımını artırır. Oreksin-a ve oreksin-b'de lateral hipotalamusta ifade edilir ve besin alımını artırır. Leptin, paraventriküler çekirdekte (PVN; paraventriküler nukleus)'de kortikotropin- salgılayıcı hormon (CRH; corticotropin releasing hormone) mRNA'sının seviyelerini yükseltir, ve amigdala ve PVN'den CRH salınımını stimüle eder (5).



Şekil 2. Yüksek ve Düşük Leptin Seviyelerine Biyolojik Yanıt (5).

Özetle leptin konsantrasyonları, hipotalamustaki nöron gruplarınınca algılanır. Açlık süresince, leptin seviyeleri düşer ve böylece besin olmadığında adaptif bir durum olan; davranışsal, hormonal ve metabolik cevabı aktive eder. Kilo alımı plazma leptin konsantrasyonunu artırır ve farklı bir tepki ortaya çıkarır, bu da bir negatif enerji dengesine yol açar. Bu durum, besin alımında azalma ve enerji harcanmasında artışla karakterizedir. Artan ve azalan leptin seviyelerine, benzer ya da farklı nöronların mı yanıt verdiği henüz bilinmiyor.

2.6. Leptinin Biyolojik İşlevleri:

Leptinin biyolojik işlevleri arasında metabolik hızın artması, kemiricilerde güçlü bir besin alımı supresörü ve enerji harcama stimülatörü, ve adrenal stres hormonlarının üretimini azaltması yer almaktadır (45). Bunun yanı sıra leptin dişi farelerde puberteye ulaşma hızını artırır ve hayvanlarda bir lipostat gibi hareket eder ve buna bağlı olarak yağ seviyelerini düşürmek için gerçekleşen davranışları aktive eder (46).

2.6.1. Leptinin Kilo Düzenlemedeki Rolü:

Leptin beslenme davranışını düzenleyen ve enerji dengesinin kontrolü için kısa ve uzun dönem sistemin bir komponenti olarak görülmektedir (47, 48).

Besin alımını kantitatif olarak düzenleyen faktörlerden olan uzun süreli regülasyon (enerji regülasyonu); başlıca vücuttaki enerji depolarının normal miktarının uzun süreli korunması ile ilgilidir. Kısa süreli regülasyon (beslenme regülasyonu) ise başlıca  g nlerde aşırı yemeyi önlemekle ilgilidir.

Kısa süreli regülasyon ;

a) **Gastrointestinal dolgunluk:** Gastrointestinal sistemde özellikle mide ve duodenum gerildiği zaman, inhibitör gerim sinyalleri beslenme merkezini geçici olarak baskılamak için vagus yoluyla taşınır ve böylece besin isteği azalır.

b) **Beslenmeyi durduran humoral ve hormonal faktörler:** Gastrointestinal hormonlardan kolesistokinin, başlıca yağın duodenuma girmesine yanıt olarak salgılanır ve aşırı yemeyi azaltmak için beslenme merkezleri üzerinde güçlü bir direkt etkiye sahiptir. Besin maddesinin mide ve duodenumda bulunmasının pankreastan önemli miktarlarda glukagon ve insülin salgılanmasına yol açmasının nedenleri tam olarak bilinmemekle birlikte, her iki hormonda beyinde nörojenik beslenme sinyallerini durdurur (49).

2.6.2. Leptinin Metabolizma  zerine Olan Etkileri

Leptinin kiloyu azaltmak için merkezi olarak faaliyet gösterdiği kanıtı merkezi sinir sisteminin (MSS) leptin konsantrasyonundaki farklılıklara cevap olarak periferel metabolizmayı nasıl regüle ettiği sorusunu ortaya çıkarmaktadır. Artan leptin düzeyi yağ oksidasyonuna yol açar ve adipoz doku kütlesinin kaybına yol açarken, leptin yetersizliği ise (*ob/ob* farelerde veya leptin antagonisti verilen farelerde), yağ depolarında artış ile ilişkilidir. *Ob* farelerin metabolik bozukluklarının tamamen besin alımının artışının bir sonucu mu? olduğu belli değildir (50,51); yapılan çalışmalarda besin alımı engellenen *ob* farelerin yağ depolarındaki fazlalık göze çarpmaktadır. Bu da *ob* farelerdeki metabolik bozuklukların sadece besin alımı ile ilgili olmayıp diğer faktörlerin de önemli olduğunu göstermektedir (5).

Leptine metabolik tepki, besin alımının azalmasına verilen tepkiden çok farklıdır. Besin kısıtlanması (diyet) adipoz doku kütesinin kaybına yol açarken, leptin kaynaklı kilo kaybı adipoz doku kütesi için spesifiktir (44).

2.6.3. Leptinin Glikoz Metabolizması Üzerine Olan Etkileri :

Plazma glikoz konsantrasyonu, vücut sıcaklığı, plazma aminoasitleri, kolesistokin ve diğer hormonlar yemek yeme şeklini (açlık ve tokluk) değiştirebilir, ve kısa süreli regülasyonun componentleridir. Leptin bir yemekten sonra önemli derecede artış göstermez ve kendi başına yemeğin sonlanmasını sağlamaz. Bu nedenle, leptinin çoğunlukla uzun süreli regülasyonun içinde fonksiyon gördüğü düşünülmektedir ve leptin harcanan enerjiye göre alınan besinin miktarını etkiler. Bununla birlikte, fare midelerinde yemekten sonra veya CCK uygulamasından sonra leptin depolarının azaldığı bildirilmiştir, bu da kısa süreli regülasyonda da veya lokal olarak gastrointestinal kanalda da fonksiyon gösterebileceği anlamına gelmektedir (5).

Zayıf hayvanlara leptin uygulaması, insülin düzeylerini değiştirmeden serum glikoz seviyelerinde azalmaya yol açar. Leptin, insanlarda periferel dokularda glikoz alımını kilo kaybından bağımsız olarak artırıyor, diabetes mellitus hastalarının bazılarında yararlı olabilir. Ancak yine de leptinin MSS (merkezi sinir sistemi) ile yağ ve glikoz metabolizmasını regüle etmesinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır.

2.6.4. Leptinin İnsülin Metabolizması Üzerine Olan Etkileri:

Norepinefrin aracılığıyla β_3 adrenerjik stimülasyonu leptin salınımını inhibe eder, fakat bu durum artmış lipolizis ile de meydana gelmiş olabilir. Ayrıca bazı çalışmalarda leptin ekspresyonunun beslenme sonrası arttığı, diyet ve diyabette ise azaldığı bildirilmiştir. İnsülin ve glukokortikoidlerin de leptin ekspresyonunu arttırdığı rapor edilmiştir (5, 51). İn vitro denemeler de göstermiştir ki, insülin hem leptin mRNA ekspresyonunu hem de adipositlerden leptin sekresyonunu arttırmaktadır (52,53).

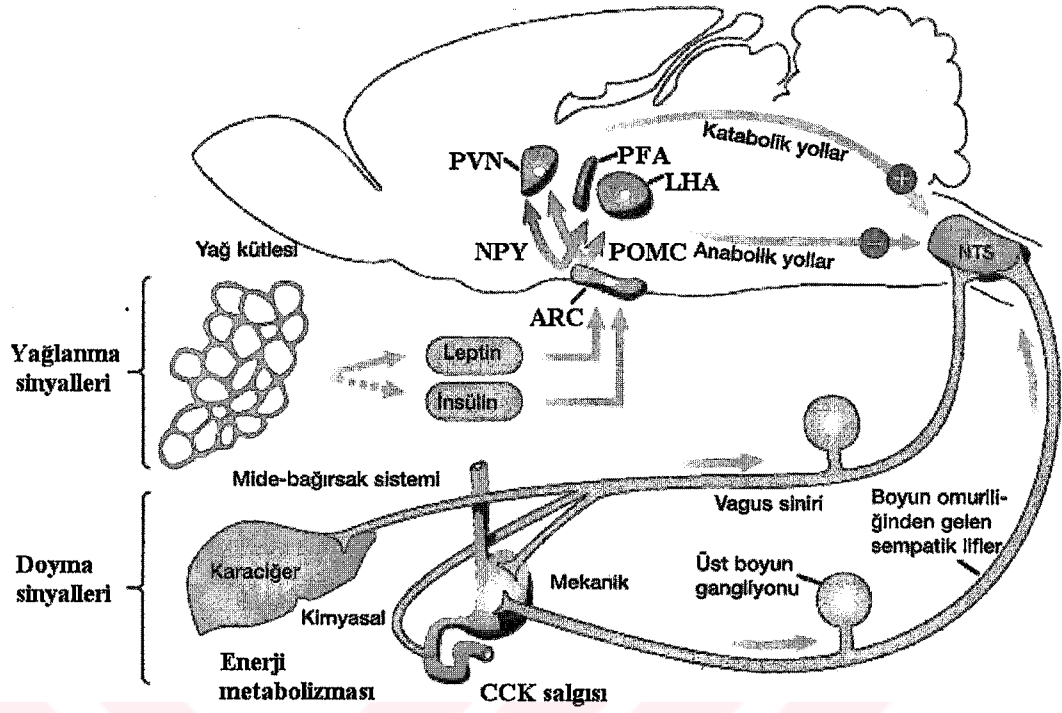
Leptin, kemiricilerde insülin salgılanmasını baskılamak üzere pankreatik β - hücrelerindeki reseptörlere direk olarak etkilidir. Leptin, izole edilmiş Langerhans

adacıklarında, perfüze edilmiş fare ve kemirici pankreasında ve in vivo çalışmalar yapılan sıçanlarda, insülin salgılanmasını, insülin mRNA düzeylerini ve sıçan insülin promotorundan transkripsiyonu baskıladığı bildirilmiştir (52).

Enerji homeostazında, leptin insülinden çok daha önemlidir. Örneğin insülin eksikliği şişmanlık yapmaz; fakat leptin eksikliği, insülin düzeyi yüksek olsa da, aşırı yeme ve ileri derecede şişmanlığa neden olur. Olay aslında daha karmaşıktır. İnsülin bir yandan yağ depolarını, bir yandan da iştah azaltıcı leptin sentezini artırır. Yağın depolanması insülin gerektirdiğinden, insülin yokluğunda, aşırı besin alınsa bile kilo alınmaz. Örneğin, kontrolsüz şeker hastalığında (insülin azlığı) hem sıçanlarda, hem de insanlarda yağ depoları ve leptin azalır. Alınan aşırı kaloriler yağ yerine glikoza çevrilir ve bu glikoz idrarla dışarı atılır. Bu çeşit insülini ve leptini azalmış şeker hastalarında “şeker hastalarının aşırı yemesi” (diyabetik hiperfaji) oluşur; bu, insülin ve leptinin beyin üzerindeki iştah azaltıcı etkisinin kaybolmasına bağlıdır. İnsülin eksikliğine bağlı şeker hastalığı olan sıçanlarda, leptin enjekte edilmesi, kan leptin düzeyini artırarak (insülini arttırmadan) aşırı yemeyi önler.

Bazı şişman insanlarda plazma leptin düzeyinin artmış bulunması, bu kişilerde leptine direnç olduğu varsayımını doğurmuştur. Bu gibi şişman hastaların beyni leptine duyarsızdı ve leptin tedavisi sonuç vermiyordu. Leptin reseptörleri mutasyona uğramış sıçan ve fareler ile, şişman farelerde leptine direnç olduğu gösterildi.

Kan-beyin bariyerinin endotel hücreleri leptine geçirgen değilse, leptin, beynin hücrelerarası sıvısına girerek nöronlar üzerindeki leptin reseptörlerine bağlanamaz; leptine direncin bir nedeni budur. Kan-beyin bariyerinde bulunan endotel hücrelerinde leptin reseptörleri vardır; bunlar leptini kandan beyine naklederler. Bu olayın aksamasının şişmanlık yapıp yapmadığı bilinmiyor; fakat BOS'da (beyin-omurilik sıvısı= beyni ve omuriliği çevreleyen sıvı) kana göre daha az leptin bulunması bu görüşü desteklemektedir.



Şekil 3. Leptin ve insülinin merkezi sinir sistemindeki etkileri (2).

Yağ hücrelerince salgılanan leptinin ve pankreasın endokrin salgısı olan (ve yağ depolarıyla orantılı olarak salgılanan) insülinin merkezi sinir sistemindeki besin alma ve enerji sarfetme alanlarını etkileyişine baktığımızda; leptin ve insülin arkuat çekirdekte (ARC) katabolik POMC/CART nöronlarını uyarır ve anabolik NPY/AGRP nöronlarını baskılar. Bu nöronlar PVN, PFA, ve LHA'ya akson gönderirler. Hipotalamustan çıkan anabolik ve katabolik uyarılar arka beyindeki NTS'e (nucleus tractus solitarius) gelirler. NTS'e aynı zamanda karaciğer ve mide-bağırsak sisteminden doyma sinyalleri (örneğin; CCK=kolesistokinin) erişir. Bu sinyaller vagus siniri ve sempatik sinirlerle NTS'e ulaşır. Doyma sınırında beyindeki anabolik yollar baskılanır ve katabolik yollar uyarılır. Böylece doyulur ve yemek sona erer. Zayıflama diyetlerinde beyin sapındaki NTS'e gelen doyma sinyalleri zayıflar ve vücut besin alımını arttırmak ister. NTS'den beyin yarım kürelerine de yollar gider (Şekil 3)(2).

2.6.5. Leptinin İnfertilite Üzerine Olan Etkileri:

Leptin reseptörünün uzun ve kısa formları insan overinde gösterilmiş ve leptinin, in vitro fertilizasyon işleminden elde edilen granuloza luteal hücrelerinde LH-stimüle estradiol üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (54).

Leptinin overde insülin fonksiyonu üzerinde etkileri kesin olarak tanımlanamamıştır, ancak leptinin overdeki insülin fonksiyonu üzerinde, IGF-I fonksiyonu üzerine olduğu gibi bir negatif etkisi olma potansiyeli mevcuttur. Elde edilen verilere göre, obez kadınlarda yüksek leptin konsantrasyonları bunları infertiliteye daha yatkın hale getirmektedir. Şişman kadınlarda yüksek leptin konsantrasyonları, lokal olarak üretilen büyüme faktörlerinin duyarlılık etkilerine zıt yönde çalışabilir. Dominant folliküllerinden, IGF-I gibi moleküllerin üretiminin FSH'ın stimülatör etkilerini arttırdığı, ve böylece dominant folliküllere büyüme ve gelişme avantajı sağladığı düşünülür. FSH konsantrasyonu, menstrüel döngünün orta folliküler fazından geç folliküler fazına gittikçe düştüğünden, dominant follikül büyüme ve gelişmeye devam edebilir, diğer folliküller ise yetersiz trofik uyarı alır ve atreziye gider. Yüksek leptin konsantrasyonlarının dominant follikül gelişimi üzerinde etkidiği ve estradiol üretimini baskıladığı ihtimali mevcuttur (55).

Leptin aynı zamanda puberte başlangıcının düzenlenmesinde de önemlidir. Çok zayıf kadınlarda genelde ovulasyon durur, ve anormal derecede zayıf yetişkin kadınlar, daha ağır olan benzerlerinden daha geç puberteye girer, bu da yağ dokusunun üremeyi düzenleyen bir sinyal üretebileceğini göstermektedir. Bu faktör leptin olabilir. Farelerde leptin uygulaması, dişi üreme yolunun olgunlaşmasını hızlandırır ve üreme faaliyetinin daha önce başlamasına yol açar (56).

2.6.6. Leptin ve Diğer Fonksiyonları:

ob/ob fareler, aç kalan hayvanlarda görülen anormalliklerin bir çoğunu gösterirler. Bu anormallikler; düşük vücut sıcaklığı, hiperfaji, düşük aktivasyona bağlı düşük enerji harcama, immün fonksiyonların azalması ve infertilite. Dışarıdan leptin verilmesi bu anormalliklerin hepsini düzelttiği gösterilmiştir (5). Sonuçta düşük plazma leptin seviyelerinin besin yokluğunun sinyalini verdiği fikri, ekzojen leptinin besin kısıtlamasına karşı nöroendokrin tepkileri zayıflattığının gözlenmesi ile destek bulunmaktadır.

Aç bırakılmış ve dışarıdan leptin alan yaban tip farelerin ovulasyonunun sürdüğü; salın verilen aç kontrollerin ise birkaç günlük ovulasyon gecikmesi yaşadığı rapor edilmiştir. Bu leptinin üreme ile ilişkisini destekleyen bir görüştür.

Leptin uygulaması normalde besin yokluğu ile ilişkili, dolaşımdaki tiroit hormonu ve kortikosteroid düzeylerindeki değişiklikleri baskılar. İleri derecede açlık aynı zamanda immün fonksiyonun azalması ile de ilgilidir ve leptin bu anormallikleri düzeltir. Leptinin CD4⁺ T hücrelerinin proliferasyonunu stimüle ettiği ve T-yardımcı hücreleri tarafından sitokin üretimini arttırdığı bildirilmiştir (57). Tüm bu sonuçlar, leptinin aynı zamanda beslenme ile immün sistem arasında anahtar bağlantı olabileceğini göstermektedir.

Leptinin fazla kilo alımını önlemedeki rolünün, fizyolojik olarak önemli olduğu gösterilmiştir. Kronik leptin infüzyonu uygulanan zayıf fareler, fizyolojik aralık içindeki leptin düzeylerinde doza bağımlı bir şekilde adipoz doku kaybına uğramaktadır (5).

Aynı zamanda leptin in vivo olarak pankreatik β hücre fonksiyonunu modüle ettiği ve endotelial hücrelerini de direkt olarak etkilediği ve yüksek dozlarda anjiyogenezisi arttırdığı gösterilmiştir (58).

2.7. Yağ Dokusu :

Yağ dokusu, bağ dokusunun özel bir tipidir ve hücre çoğunluğunu adipositler (yağ hücreleri) oluşturur. Adipositler bağ dokusu içinde tek başına olabilecekleri gibi küçük gruplar halinde de bulunabilir. Yağ dokusu normal ağırlıktaki insanda, erkeklerde vücut ağırlığının %15-20'si, kadınlarda ise vücut ağırlığının %20-25'ini oluşturur.

Yağ dokusu vücudun en büyük enerji deposudur (trigliserit halinde). Devamlı olarak değişim halinde olan yağ dokusu, gerek sinir gerekse hormon uyarılarına hassastır.

Yağ dokusu farklı yerleşim, yapı, renk ve patoloji gösterir;

- a) Ünilocüler (genel veya sarı yağ dokusu)
- b) Multilocüler (kahverengi yağ dokusu).

Uniloküler yağ dokusu hücrelerinin, sitoplazmalarında bir tek sarı yağ damlacığı içerir. Multiloküler yağ dokusu hücrelerinin sitoplazmalarında ise çok sayıda lipid damlacığı ve kahverengi mitokondriyumlar bulunur.

Yetişkinlerdeki şişmanlık, uniloküler yağ dokusu hücrelerinin normalden daha fazla biriktirmesi ile meydana gelebilir (hipertrofik obezite). Sayısal adiposit artışı hiperplastik obeziteyi meydana getirir. Büyüme hormonu ile glukokortikoidler, prolaktin, kortikotropin, insülin ve tiroid hormonlarının da yağ dokusu metabolizmasının farklı kademelerinde rolleri vardır.

Leptin enjekte edilmiş *ob/ob* farelerde kahverengi yağ dokusunda sempatik aktivitede artış gözlenmiştir. Bu durum UCP-1 (uncoupling protein 1)'in mRNA seviyesindeki artışla ilgilidir (59).

11. kromozom üzerinde UCP-2 (uncoupling protein 2) denilen bir genin proteini bulundu. Bir insanın çok yemesine rağmen kilo almayışını ya da az yemesine rağmen şişmanlanmasını bu protein belirliyor. Bu protein hücrelerde fazla miktarda bulunursa, alınan besinlerdeki enerjiyi ATP olarak depolamak yerine ısıya dönüştür (2).

Yaban tip hayvanlara leptin uygulamasının UCP-1 aktivitesini arttırdığına dair herhangi bir kanıt yoktur. Leptin uygulanan farelerde UCP-2 RNA seviyeleri artabilir, ancak bu değişikliğin implikasyonları bilinmiyor. 24 saat enerji harcanmasında net bir artışa yol açmaz, ancak bunun yerine genelde besin kısıtlanması ile birlikte enerji harcanmasını artırır (5).

2.8. Nöropeptit Y:

Nöropeptit Y pankreatik peptid ailesinin 36 aminoasitlik bir proteindir ve sinir sisteminde bir nörotransmitter olarak rol oynar (26). Beyindeki kısa aminoasit zincirlerinden biri olan NPY (nöropeptit Y) besin alımını artırır. Sıçanlarda beyin yan karıncıkları içine ya da hipotalamusa direkt olarak NPY verilmesi, besin alımını çok artırırken, enerji harcanmasını azaltır ve aynı zamanda karaciğerin ve beyaz yağ depolarının yağ yapıcı enzimlerini etkinleştirir. Bunların sonucu olarak beyne sürekli ya da sık aralıklarla NPY verilmesi, kolayca şişmanlığa neden olur. Ayrıca leptinin, arkuat çekirdekte NPY genini baskılaması ya da NPY'nin genetik olarak etkisizleştirilmesi, leptin eksikliği olan farelerde aşırı yeme ve şişmanlığı azaltır.

Buradan çıkan sonuç, leptin eksikliğinin etkin olabilmesi için NPY sinyalinin gerektiğidir. İnsülin eksikliği olan şeker hastalarında görölen aşırı yeme, hipotalamusta NPY sentezinin ve salgılanmasının artışına paralel seyrederek ve bu cevap beyne veya deri altına insülin vermekle bloke olur. Nöropeptit düşük leptin düzeylerine ve ağırlık artışına yanıtın önemli bir komponentidir. Leptin düzeyindeki bir azalma NPY mRNA miktarında artışa ve dolayısıyla besin alınımında bir artışa neden olur. Özetle iştahı arttıran bir nörotransmitter olarak görev yapmaktadır (1).



3. MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada erişkin sıçan beyin, mide ve böbrek doku örneklerinde *ob* proteini (leptini)'i tespit etmek için, immün boyama yöntemi uygulandı. Bu amaçla elde edilen 4-6 µm kalınlıktaki parafin blok doku kesitlerine uygulanan primer antikor antijenlere (*ob* proteini) bağlandı, daha sonra peroksidaz enzimiyle konjuge edilmiş sekonder antikor bu komplekse bağlandı. Bundan sonra da ortama substrat DAB; 3,3', diaminobenzidin tetraklorid eklenerek gözle görülebilir ürün ortaya çıktı.

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları :

Bu çalışmada ağırlıkları 190-210 gram arasında değişen, 5 adet Wistar albino cinsi sıçanlar kullanılmıştır (n=5). Deney süresince hayvanlara yeteri kadar beslenmesi için (*ad libitum*) su ve yem (Yem Kurumu Standart Sıçan Yemi) verildi.

3.1.2. Dokuların Elde Edilmesi :

Bu araştırmada, Süleyman Demirel Üniversitesi Ethem Mumcu Hayvan laboratuvarındaki Wistar albino cinsi ratlardan elde edilen sağlıklı dokular kullanıldı.

3.2. Metot

3.2.1. Histolojik Çalışmalar :

Vasküler perfüzyon yöntemi ile tespit edilen doku örnekleri yıkama işleminden sonra alkol serileri, şeffaflandırma, infiltrasyon ve parafine gömme gibi histolojik yöntemler uygulandı. Yapılan klasik histolojik çalışmalar aşağıda tablo şeklinde gösterilmiştir.

Vasküler Perfüzyon Yöntemi :

Bu yöntemde, sıçanlar önce sodium pentobarbital ile derin anestezi altına alındılar. Beşbin ünite sodium heparin, 1ml %0.9'luk serum fizyolojik içinde eritilerek sol ventrikülden dolaşıma verildi. Sonra sağ atriuma makasla bir kesi yapılarak, kanın dışarı akışı gözlemlendi. Kalp kontraksiyona devam ederken, bir kanül ile apeks tarafından sol ventrikül içine girildi. Bu kanül vasıtasıyla, kan vücuttan tamamen uzaklaşınca kadar, yani sağ atriümden akan sıvı renksiz olana kadar, sol ventriküle %0.9'luk serum fizyolojik solüsyonu verildi (yaklaşık 100ml).

Ardından aynı şekilde, 0.1M'lık sodyum fosfat tamponu (pH : 2) için %4'lük paraformaldehit tespit solüsyonu ventrikülden dolaşıma verildi. Perfüzyona, bütün vücut sertleşinceye ve özellikle organlar (karaciğer, akciğer v.s.) beyazlaşınca kadar devam edildi (60).

Tespit sonrası çıkartılan böbrek dokuları aynı tespit solüsyonunda 24 saat bekletildikten sonra, dokulara rutin ışık mikroskopi takip yöntemleri uygulandı.

A- Dehidratasyon :

| Alkol Derecesi | Süre |
|----------------|--------|
| %70 | 1 gece |
| %80 | 1 saat |
| %90 | 1 saat |
| %96 | 1 saat |
| %96 | 1 saat |
| %100 | 1 saat |

B- Şeffaflandırma :

| | |
|--------|-----------|
| Ksilol | 30 dakika |
| Ksilol | 30 dakika |

C- İnfiltrasyon :

| | |
|--|--------|
| Yumuşak Parafin (60 ⁰ C etüvde) | 1 saat |
| Yumuşak + Sert Parafin 1:1(60 ⁰ C etüvde) | 2 saat |
| Sert Parafin | 3 saat |

D- Gömme:

Sert parafin

3.2.2. Kullanılan solüsyonlar :

Dokuları Tespit Solüsyonu:

- Hayvandan elde edilen tüm dokular %10'luk nötral formalin solüsyonuna alınıp tespit edildi.
- **Fiksatif İçeriği:**
- Formaldehit %40'lık 1 hacim
- Su 9 hacim
- Kalsiyum Karbonat(CaCO₃) 2 çay kaşığı

3.2.3. İmmünohistokimyasal çalışmalar :

a) Kesitlerin elde edilmesi:

Elde edilen tüm doku örnekleri, %10 'luk formalin solusyonuna alındı. Dokular en fazla 24 saat formalin solüsyonunda bekletildi. Daha sonra yukarıda sayılan rutin histolojik yöntemler kullanılarak dokular parafine gömüldü. Mikrotom (lipshaw tipi kızaklı mikrotom) ile alınan 4-6 µm kalınlığında seri kesitler, önceden poly-l-lizin ile kaplanmış lamlara alındı.

b) Lamaların Poly-L-Lizin ile kaplanması:

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

Lamlar önce zembile dizildi ve lamaları 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 lamaları, asit alkol içerisinde bir süre bekletip, %50'lik alkolle muamele edildi. Daha sonra lamalar distile su içine alınıp yıkandı. Yıkama sonrası lamalar poly-l-lizin içine alınıp etüvde bir müddet kurutulduktan sonra kullanıma hazır hale getirildi.

c) Lamların jelatinle kaplanması :

| | |
|---|---------|
| • Gelatin (K.N:4072,Merck) | 5.0 gr. |
| • Chromium kalium sulphate ($KCr(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$; K.N:1036,Merck) | 0.5 gr. |
| • Distile su | 1000ml. |
| • Diethyl ether (C_4H_{10} ; K.N:921, Merck) | 250ml. |
| • %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 sulfatın 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, hemde kimyasalların (antikor, DAB gibi) ekonomik kullanımını sağlamaktır.

İmmün boyamada kullanılan kimyasal maddeler:**Primer (poliklonal) antikor:**

- Rabbit poliklonal IgG (A-20) (Santa Cruz. Cat; sc-842).

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

Sekonder antikor:

- Biotinle işaretlenmiş anti- rabbit IgG.

Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS; Phosphate Buffer Solutaion):

- | | |
|---|--------|
| • Sodiumdihydrogen phosphatemonohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;K.N:3090,Merck) | |
| 1,37gr. | |
| • Sodiumdihydrogen phosphatedihydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;K.N: 6345,Merck) | |
| 1,56gr. | |
| • Sodium chloride (Nacl;K.N: 6048,Merck) | 8,76g |
| • Distile su | 1000ml |

Sitrik Asit Solüsyonu :

- | | |
|--|---------|
| • Sitrik asit | 2,1 gr. |
| • Distile Su | 1,0 lt. |
| • Hazırlanışı: | |
| • Sitrik asit distile su içinde eritilir ve karıştırılır. PH: 6 olacak şekilde 2M Naoh ilave edilir. | |

Hidrojen Peroksit Solüsyonu (%3) :

- | | |
|---|---------|
| • Methanol | 5.4 ml. |
| • Hidrojen Peroksit | 0,6 ml. |
| • Hazırlanışı : | |
| • Methanol ve Hidrojen Peroksit karıştırılır. | |

Kromojen :

- DAB (3,3'- diaminobenzidine tetrachloride (K.N: D 5637, Sigma)
- Bu madde, sekonder antikor olarak kullanılan Horseradish-peroksidaz enziminin substratı olarak kullanıldı.

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 (NaIO₃; K.N:S 407, Sigma) 0,2 gr.
- Chloral hydrate (C₂H₃Cl₃O₂; K.N :C 8383, Sigma) 50 gr.
- Distile su 1000 ml.
- Sitirik asit (monohydrate) (K.N:C 7129,Sigma) 1,0 gr.
- 1,0 gr. Hematoksilen 1000 ml.distile suda eritildi suda eritildi. 0,2 gr. Sodyum iyodit ilave edildi. Bu karışım, 50 gr. Aluminyum potasyum sülfat ile manyetik karıştırıcıda tamamen eriyinceye kadar karıştırıldı. Daha sonra, kloral hidrat ve sitrik asit ilave edildi.

İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi :

- 4-6µm kalınlığında ede edilen parafin kesitler etüvde 45 °C' de etüvde 24 saat bekletildi.
- Ertesi gün etüvde 55 °C' de etüvde 1 saat bekletildi.
- Daha sonra sırasıyla ksilol ve alçalan alkol seviyelerinden geçirildi ve distile su ile yıkandı.
- Sitrik asit içerisindeki dokulara 5 dakika mikro dalga (Med High) uygulandı.
- 20 dakika derin dondurucuda soğutulan dokular, tekrar mikrodalga da kaynatılır ve 20 dakika dışarıda soğutulmaya bırakıldı.
- Dakopen ile çevrelenen dokulara nemli ortamda %3'lük H₂O₂ uygulandı.
- PBS' de 3x5 dakika yıkandı.
- Blocking Serum (Non immün serum) 15 dakika süreyle uygulandı.
- Dokular 1 saat süreyle oda ısısında primer antikor ile nemli ortamda inkübe edildi.
- PBS' de 3x5 dakika yıkama.
- Biotinile işaretlenmiş antikor ile dokular 30dk. inkübe edildi.
- PBS 3x5 dakika yıkama.
- Sreptavidin damlatılır. Daha sonra dokuların üzerine DAB damlatılır, ve hematoksilin ile zıt boyama yapılır.
- Boyanan preparatlar musluk suyu ile yıkandı.
- Distile su ile yıkandı.
- Dehidratasyon için, sırasıyla; %80, %96, %100'lük alkollerde 5' er dakika bekletildi.
- 2x5 dakika ksilolde şeffanlandırıldı.
- Entellan ya da gliserol jelatin kullanılarak kapatma işlemi gerçekleştirildi.
- Kontrol amacıyla, her poliklonal antikor için birkaç kesit primer antikor basamağı atlanarak (dokulara PBS damlatıldı), izleyen basamaklara geçildi.

3.3. Değerlendirme :

İmmünohistokimyasal boya uygulanmış sıçan beyin, böbrek ve mide parafin kesitlerinde *ob* protein (leptin) dağılımını (ya da tanımlanmasını) saptamak için iki basamaklı işlem gerçekleştirildi. Öncelikle, mevcut benzer çalışmalar örnek alınarak, incelenen tüm dokular aşağıdaki tablolarda belirtildiği gibi çeşitli bölgelere ayrıldı. Daha sonra, yarı kantitatif değerlendirme sistemi kullanıldı. Bu amaçla, aşağıdaki skala kullanıldı.

- (-) : Boyanma yok
- (-/+) : Çok zayıf boyanma
- (+) : Zayıf boyanma
- (++) : Orta derecede boyanma
- (+++) : Kuvvetli boyanma

Tablo.3.1. Böbrek Dokusunun İnceleme Kapsamına Alınan Bölümleri

| Korteks | Medulla | Vasküler yapılar |
|--|--|---|
| Glomerül <ul style="list-style-type: none"> • Mezengiyal hücre • Endotelial hücre | <ul style="list-style-type: none"> • Proksimal D.T.** • Henle kulpu • Distal D.T.** • Toplayıcı kanallar | <ul style="list-style-type: none"> • Afferent arteriol |
| Bowman kapsülü <ul style="list-style-type: none"> • Paryetal Yaprak • Visseral Yaprak | | <ul style="list-style-type: none"> • Efferent arteriol • Peritübüler kapiller |
| Kollektor Tübüller <ul style="list-style-type: none"> • Proksimal K.T. • Distal K.T. • Kollektor kanal • Makula Densa | | |

* : Kıvrımlı Tübül

** : Düz Tübül

Tablo.3.2. Beyin Dokusunun İnceleme Kapsamına Alınan Bölümleri

| Korteks | Medulla |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Pia mater • Moleküler Tabaka • Damarlar • Horizontal hücre • Dış Granüler Tabaka • Piramidal hücre • İç Granüler Tabaka • Dorsal hipokampus Nöronları • Multiiform Tabaka | <ul style="list-style-type: none"> • Akson • Pleksus Chroidesus |

Tablo.3.3. Mide Dokusunun İnceleme Kapsamına Alınan Bölümleri

| Mukoza | Submukoza | Muskularis Eksterna | Seroza |
|---|-------------------|---------------------|----------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> • Yüzey epitel • Paryetal hücre • İsas hücre <p>Lamina Propria</p> <p>Muskularis Mukoza</p> | Meissner pleksusu | Myenterik pleksus | Bağ Dokusu Hücreleri |

4. BULGULAR

Elde edilen mide, böbrek ve beyin dokularında leptin (*ob* protein) dağılımı immünohistokimyasal yöntemlerle ışık mikroskobu düzeyinde incelendi.

4.1. MİDE :

Midenin fundus bölgesinden geçen kesitte özellikle mukoza bölgesinde leptin için orta şiddetten kuvvetliye kadar değişen pozitif immün reaksiyon gözleniyor (Resim 1b).

Yüzey epitelinde kuvvetli lineer, paryetal hücre ve esas hücrelerde orta şiddette sitoplazmik, mukoza bezlerinde yine kuvvetli pozitif immün reaksiyon gözlendi. Ancak lamina propriada herhangi bir boyanma gözlenmedi (Resim 1b, 2a, 2b, 3).

Sıçan mide duvarından geçen kesitte, iç sirküler ve dış longitudinal düz kas tabakaları arasında bulunan Myenterik (Auerbach) sinir pleksusu leptin (*ob* protein) için kuvvetli pozitif boyanma gözlenmektedir (Resim 4).

Normal sıçan mide dokusunda dağılımı incelenen *ob* proteini (leptin) için özet bilgiler Tablo-4.1'de gösterilmiştir.

4.2. BÖBREK :

Korteks bölgesinden geçen kesitte özellikle proksimal tübüllerde hücrelerin apikal membranlarında lineer ve sitoplazmik pozitif immün reaksiyonlar gözlendi. Distal tübüllerde nispeten daha zayıf (orta şiddette) immün reaksiyon gözleniyor (Şekil 5b, 6a, 6b,).

Daha büyük büyütmelerde Makula Densa da kuvvetli glomerulusta bazı intraglomeruler mezengiyal hücrelerde hafif şiddette boyanma gözleniyor. Glomerulusta kapiller endotelinde ise immün reaksiyon gözlenmedi (Resim 6b, 7a, 7b). Normal sıçan böbrek dokusunun medullasından geçen kesitte, distal ve kollektör tübüllerde pozitif immün reaksiyon gözlenirken, henle kulpunun ince parçasında negatif boyanma gözlendi (Resim 8).

Normal sıçan böbrek dokusu parafin kesitlerindeki *ob* proteini (leptin)'in dağılımı Tablo-4.2' de verilmiştir.

Tablo 4.1. Normal sıçan mide dokusunda mikrofotografik alanlara özgü farklı bölgelerde leptinin dağılımı.

| İncelenen Bölüm | Reaksiyon şiddeti | Boyama Özelliği |
|----------------------------|-------------------|-----------------|
| MUKOZA | | |
| • Yüzey epiteli | +++ | Lineer |
| • Lamina Propria | - | |
| • Paryetal hücre | + / ++ | Sitoplazmik |
| • Esas hücre | + / ++ | Sitoplazmik |
| • Muskularis mukoza | - | |
| • Gastrik bezler | +++ | Sitoplazmik |
| • Kripta bezleri | +++ | Sitoplazmik |
| SUBMUKOZA | | |
| • Meissner Pleksusu | - | |
| MUSKULARİS EKSTERNA | | |
| • Myenterik Pleksus | +++ | Sitoplazmik |
| SEROZA | | |
| • Bağ Dokusu Hücreleri* | +++ | Sitoplazmik |

-: Boyama yok, -/+: Çok zayıf boyanma, +: Zayıf boyanma, ++: Orta derecede boyanma, +++: Kuvvetli boyanma.

*** Bağ dokusu hücreleri:**

Fibroblast : +++

Lökositler : +++

Lenfositler : +++

Polimorfonükleer hücreler: +++

Tablo.4.2. Normal sıçan böbrek dokusunda mikrofotografik alanlara özgü farklı bölgelerde leptinin dağılımı.

| İncelenen Bölüm | Reaksiyon şiddeti | Boyanma Özelliği |
|---------------------------------|-------------------|---------------------|
| KORTEKS | | |
| Glomerul | | |
| • Mezengial hücreler | + | Sitoplazmik |
| • Endotel hücreler | - | |
| Bowman Kapsülü | | |
| • Paryetal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • Visseral Tabaka | - | |
| Toplayıcı Tübüller | | |
| • Proksimal Kıvrıntılı Tübüller | +++ | Sitoplazmik, lineer |
| • Distal Kıvrıntılı Tübüller | + / ++ | Sitoplazmik |
| • Toplayıcı kanal | + / ++ | Sitoplazmik |
| • Makula Densa | +++ | Sitoplazmik |
| MEDULLA | | |
| • Proksimal düz tübüller | ++ | Sitoplazmik |
| • Henle Kulpunun ince parçası | - | |
| • Distal düz tübüller | + | Sitoplazmik |
| • Toplayıcı kanallar | + / ++ | Sitoplazmik |
| VASKÜLER YAPILAR | | |
| • Afferent arteriol | - | |
| • Efferent arteriol | - | |
| • Peritübüler Kapiller | - | |

-: Boyanma yok, -/+: Çok zayıf boyanma, +: Zayıf boyanma, ++: Orta derecede boyanma, +++: Kuvvetli boyanma.

4.3. BEYİN :

Mevcut çalışmada, incelenen tüm sıçan beyin dokularında koroit pleksus epitel hücreleri için leptin (*ob* protein) kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ayrıca ventrikül boşluğunu döşeyen vasküler endotel ve dorsal hipokampus sinir hücreleri kuvvetli pozitif reaksiyon göstermektedir (Resim 10).

Normal sıçan beyin dokusunda *ob* proteini (leptin) frontal kortekste pia mater, dış granüler tabaka nöronları ve dış piramidal tabaka nöronları kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ancak pleksiform ya da moleküler tabakadaki nöronlarda boyanma gözlenmedi (Resim 9b, 12).

Yine *ob* proteini (leptin) için beyin dokusundaki sinir hücrelerinin nöronların gövdelerinde (perikaryon) ve uzantılarında kuvvetli sitoplazmik pozitif immün reaksiyon görülmektedir (Resim 11).

Normal sıçan beyin dokusunda tanımlanan *ob* proteini (leptin)'e ait özet bilgiler Tablo.4.3' de verilmiştir.

Tablo.4.3. Normal sıçan beyin dokusunda mikrofotografik alanlara özgü farklı bölgelerde leptinin dağılımı.

| İncelenen Bölüm | Reaksiyon şiddeti | Boyanma Özelliği |
|-------------------------------|-------------------|------------------|
| KORTEKS | | |
| • Pia mater | +++ | Sitoplazmik |
| • Dış Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • İç Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • Multiform Tabaka | - | |
| • Dorsal Hipokampus Nöronları | +++ | Sitoplazmik |
| MEDULLA | | |
| • Akson | - | |
| • Pleksus Chroidesus | +++ | Sitoplazmik |

-: Boyanma yok, -/+: Çok zayıf boyanma, +: Zayıf boyanma, ++: Orta derecede boyanma, +++: Kuvvetli boyanma.

4.3. BEYİN :

Mevcut çalışmada, incelenen tüm sıçan beyin dokularında koroit pleksus epitel hücreleri için leptin (*ob* protein) kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ayrıca ventrikül boşluğunu döşeyen vasküler endotel ve dorsal hipokampus sinir hücreleri kuvvetli pozitif reaksiyon göstermektedir (Resim 10).

Normal sıçan beyin dokusunda *ob* proteini (leptin) frontal kortekste pia mater, dış granüler tabaka nöronları ve dış piramidal tabaka nöronları kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ancak pleksiform ya da moleküler tabakadaki nöronlarda boyanma gözlenmedi (Resim 9b, 12).

Yine *ob* proteini (leptin) için beyin dokusundaki sinir hücrelerinin nöronların gövdelerinde (perikaryon) ve uzantılarında kuvvetli sitoplazmik pozitif immün reaksiyon görülmektedir (Resim 11).

Normal sıçan beyin dokusunda tanımlanan *ob* proteini (leptin)'e ait özet bilgiler Tablo.4.3' de verilmiştir.

Tablo.4.3. Normal sıçan beyin dokusunda mikrofotografik alanlara özgü farklı bölgelerde leptinin dağılımı.

| İncelenen Bölüm | Reaksiyon şiddeti | Boyanma Özelliği |
|-------------------------------|-------------------|------------------|
| KORTEKS | | |
| • Pia mater | +++ | Sitoplazmik |
| • Dış Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • İç Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • Multiform Tabaka | - | |
| • Dorsal Hipokampus Nöronları | +++ | Sitoplazmik |
| MEDULLA | | |
| • Akson | - | |
| • Pleksus Chroidesus | +++ | Sitoplazmik |

-: Boyanma yok, -/+: Çok zayıf boyanma, +: Zayıf boyanma, ++: Orta derecede boyanma, +++: Kuvvetli boyanma.

4.3. BEYİN :

Mevcut çalışmada, incelenen tüm sıçan beyin dokularında koroit pleksus epitel hücreleri için leptin (*ob* protein) kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ayrıca ventrikül boşluğunu döşeyen vasküler endotel ve dorsal hipokampus sinir hücreleri kuvvetli pozitif reaksiyon göstermektedir (Resim 10).

Normal sıçan beyin dokusunda *ob* proteini (leptin) frontal kortekste pia mater, dış granüler tabaka nöronları ve dış piramidal tabaka nöronları kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ancak pleksiform ya da moleküler tabakadaki nöronlarda boyanma gözlenmedi (Resim 9b, 12).

Yine *ob* proteini (leptin) için beyin dokusundaki sinir hücrelerinin nöronların gövdelerinde (perikaryon) ve uzantılarında kuvvetli sitoplazmik pozitif immün reaksiyon görülmektedir (Resim 11).

Normal sıçan beyin dokusunda tanımlanan *ob* proteini (leptin)'e ait özet bilgiler Tablo.4.3' de verilmiştir.

Tablo.4.3. Normal sıçan beyin dokusunda mikrofotografik alanlara özgü farklı bölgelerde leptinin dağılımı.

| İncelenen Bölüm | Reaksiyon şiddeti | Boyanma Özelliği |
|-------------------------------|-------------------|------------------|
| KORTEKS | | |
| • Pia mater | +++ | Sitoplazmik |
| • Dış Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • İç Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • Multiform Tabaka | - | |
| • Dorsal Hipokampus Nöronları | +++ | Sitoplazmik |
| MEDULLA | | |
| • Akson | - | |
| • Pleksus Chroidesus | +++ | Sitoplazmik |

-: Boyanma yok, -/+: Çok zayıf boyanma, +: Zayıf boyanma, ++: Orta derecede boyanma, +++: Kuvvetli boyanma.

4.3. BEYİN :

Mevcut çalışmada, incelenen tüm sıçan beyin dokularında koroit pleksus epitel hücreleri için leptin (*ob* protein) kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ayrıca ventrikül boşluğunu döşeyen vasküler endotel ve dorsal hipokampus sinir hücreleri kuvvetli pozitif reaksiyon göstermektedir (Resim 10).

Normal sıçan beyin dokusunda *ob* proteini (leptin) frontal kortekste pia mater, dış granüler tabaka nöronları ve dış piramidal tabaka nöronları kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ancak pleksiform ya da moleküler tabakadaki nöronlarda boyanma gözlenmedi (Resim 9b, 12).

Yine *ob* proteini (leptin) için beyin dokusundaki sinir hücrelerinin nöronların gövdelerinde (perikaryon) ve uzantılarında kuvvetli sitoplazmik pozitif immün reaksiyon görülmektedir (Resim 11).

Normal sıçan beyin dokusunda tanımlanan *ob* proteini (leptin)'e ait özet bilgiler Tablo.4.3' de verilmiştir.

Tablo.4.3. Normal sıçan beyin dokusunda mikrofotografik alanlara özgü farklı bölgelerde leptinin dağılımı.

| İncelenen Bölüm | Reaksiyon şiddeti | Boyanma Özelliği |
|-------------------------------|-------------------|------------------|
| KORTEKS | | |
| • Pia mater | +++ | Sitoplazmik |
| • Dış Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • İç Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • Multiform Tabaka | - | |
| • Dorsal Hipokampus Nöronları | +++ | Sitoplazmik |
| MEDULLA | | |
| • Akson | - | |
| • Pleksus Chroidesus | +++ | Sitoplazmik |

-: Boyanma yok, -/+: Çok zayıf boyanma, +: Zayıf boyanma, ++: Orta derecede boyanma, +++: Kuvvetli boyanma.

4.3. BEYİN :

Mevcut çalışmada, incelenen tüm sıçan beyin dokularında koroit pleksus epitel hücreleri için leptin (*ob* protein) kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ayrıca ventrikül boşluğunu döşeyen vasküler endotel ve dorsal hipokampus sinir hücreleri kuvvetli pozitif reaksiyon göstermektedir (Resim 10).

Normal sıçan beyin dokusunda *ob* proteini (leptin) frontal kortekste pia mater, dış granüler tabaka nöronları ve dış piramidal tabaka nöronları kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ancak pleksiform ya da moleküler tabakadaki nöronlarda boyanma gözlenmedi (Resim 9b, 12).

Yine *ob* proteini (leptin) için beyin dokusundaki sinir hücrelerinin nöronların gövdelerinde (perikaryon) ve uzantılarında kuvvetli sitoplazmik pozitif immün reaksiyon görülmektedir (Resim 11).

Normal sıçan beyin dokusunda tanımlanan *ob* proteini (leptin)'e ait özet bilgiler Tablo.4.3' de verilmiştir.

Tablo.4.3. Normal sıçan beyin dokusunda mikrofotografik alanlara özgü farklı bölgelerde leptinin dağılımı.

| İncelenen Bölüm | Reaksiyon şiddeti | Boyanma Özelliği |
|-------------------------------|-------------------|------------------|
| KORTEKS | | |
| • Pia mater | +++ | Sitoplazmik |
| • Dış Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • İç Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • Multiform Tabaka | - | |
| • Dorsal Hipokampus Nöronları | +++ | Sitoplazmik |
| MEDULLA | | |
| • Akson | - | |
| • Pleksus Chroidesus | +++ | Sitoplazmik |

-: Boyanma yok, -/+: Çok zayıf boyanma, +: Zayıf boyanma, ++: Orta derecede boyanma, +++: Kuvvetli boyanma.

4.3. BEYİN :

Mevcut çalışmada, incelenen tüm sıçan beyin dokularında koroit pleksus epitel hücreleri için leptin (*ob* protein) kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ayrıca ventrikül boşluğunu döşeyen vasküler endotel ve dorsal hipokampus sinir hücreleri kuvvetli pozitif reaksiyon göstermektedir (Resim 10).

Normal sıçan beyin dokusunda *ob* proteini (leptin) frontal kortekste pia mater, dış granüler tabaka nöronları ve dış piramidal tabaka nöronları kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ancak pleksiform ya da moleküler tabakadaki nöronlarda boyanma gözlenmedi (Resim 9b, 12).

Yine *ob* proteini (leptin) için beyin dokusundaki sinir hücrelerinin nöronların gövdelerinde (perikaryon) ve uzantılarında kuvvetli sitoplazmik pozitif immün reaksiyon görülmektedir (Resim 11).

Normal sıçan beyin dokusunda tanımlanan *ob* proteini (leptin)'e ait özet bilgiler Tablo.4.3' de verilmiştir.

Tablo.4.3. Normal sıçan beyin dokusunda mikrofotografik alanlara özgü farklı bölgelerde leptinin dağılımı.

| İncelenen Bölüm | Reaksiyon şiddeti | Boyanma Özelliği |
|-------------------------------|-------------------|------------------|
| KORTEKS | | |
| • Pia mater | +++ | Sitoplazmik |
| • Dış Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • İç Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • Multiform Tabaka | - | |
| • Dorsal Hipokampus Nöronları | +++ | Sitoplazmik |
| MEDULLA | | |
| • Akson | - | |
| • Pleksus Chroidesus | +++ | Sitoplazmik |

-: Boyanma yok, -/+: Çok zayıf boyanma, +: Zayıf boyanma, ++: Orta derecede boyanma, +++: Kuvvetli boyanma.

4.3. BEYİN :

Mevcut çalışmada, incelenen tüm sıçan beyin dokularında koroit pleksus epitel hücreleri için leptin (*ob* protein) kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ayrıca ventrikül boşluğunu döşeyen vasküler endotel ve dorsal hipokampus sinir hücreleri kuvvetli pozitif reaksiyon göstermektedir (Resim 10).

Normal sıçan beyin dokusunda *ob* proteini (leptin) frontal kortekste pia mater, dış granüler tabaka nöronları ve dış piramidal tabaka nöronları kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ancak pleksiform ya da moleküler tabakadaki nöronlarda boyanma gözlenmedi (Resim 9b, 12).

Yine *ob* proteini (leptin) için beyin dokusundaki sinir hücrelerinin nöronların gövdelerinde (perikaryon) ve uzantılarında kuvvetli sitoplazmik pozitif immün reaksiyon görülmektedir (Resim 11).

Normal sıçan beyin dokusunda tanımlanan *ob* proteini (leptin)'e ait özet bilgiler Tablo.4.3' de verilmiştir.

Tablo.4.3. Normal sıçan beyin dokusunda mikrofotografik alanlara özgü farklı bölgelerde leptinin dağılımı.

| İncelenen Bölüm | Reaksiyon şiddeti | Boyanma Özelliği |
|-------------------------------|-------------------|------------------|
| KORTEKS | | |
| • Pia mater | +++ | Sitoplazmik |
| • Dış Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • İç Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • Multiform Tabaka | - | |
| • Dorsal Hipokampus Nöronları | +++ | Sitoplazmik |
| MEDULLA | | |
| • Akson | - | |
| • Pleksus Chroidesus | +++ | Sitoplazmik |

-: Boyanma yok, -/+: Çok zayıf boyanma, +: Zayıf boyanma, ++: Orta derecede boyanma, +++: Kuvvetli boyanma.

4.3. BEYİN :

Mevcut çalışmada, incelenen tüm sıçan beyin dokularında koroit pleksus epitel hücreleri için leptin (*ob* protein) kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ayrıca ventrikül boşluğunu döşeyen vasküler endotel ve dorsal hipokampus sinir hücreleri kuvvetli pozitif reaksiyon göstermektedir (Resim 10).

Normal sıçan beyin dokusunda *ob* proteini (leptin) frontal kortekste pia mater, dış granüler tabaka nöronları ve dış piramidal tabaka nöronları kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ancak pleksiform ya da moleküler tabakadaki nöronlarda boyanma gözlenmedi (Resim 9b, 12).

Yine *ob* proteini (leptin) için beyin dokusundaki sinir hücrelerinin nöronların gövdelerinde (perikaryon) ve uzantılarında kuvvetli sitoplazmik pozitif immün reaksiyon görülmektedir (Resim 11).

Normal sıçan beyin dokusunda tanımlanan *ob* proteini (leptin)'e ait özet bilgiler Tablo.4.3' de verilmiştir.

Tablo.4.3. Normal sıçan beyin dokusunda mikrofotografik alanlara özgü farklı bölgelerde leptinin dağılımı.

| İncelenen Bölüm | Reaksiyon şiddeti | Boyanma Özelliği |
|-------------------------------|-------------------|------------------|
| KORTEKS | | |
| • Pia mater | +++ | Sitoplazmik |
| • Dış Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • İç Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • Multiform Tabaka | - | |
| • Dorsal Hipokampus Nöronları | +++ | Sitoplazmik |
| MEDULLA | | |
| • Akson | - | |
| • Pleksus Chroidesus | +++ | Sitoplazmik |

-: Boyanma yok, -/+: Çok zayıf boyanma, +: Zayıf boyanma, ++: Orta derecede boyanma, +++: Kuvvetli boyanma.

4.3. BEYİN :

Mevcut çalışmada, incelenen tüm sıçan beyin dokularında koroit pleksus epitel hücreleri için leptin (*ob* protein) kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ayrıca ventrikül boşluğunu döşeyen vasküler endotel ve dorsal hipokampus sinir hücreleri kuvvetli pozitif reaksiyon göstermektedir (Resim 10).

Normal sıçan beyin dokusunda *ob* proteini (leptin) frontal kortekste pia mater, dış granüler tabaka nöronları ve dış piramidal tabaka nöronları kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ancak pleksiform ya da moleküler tabakadaki nöronlarda boyanma gözlenmedi (Resim 9b, 12).

Yine *ob* proteini (leptin) için beyin dokusundaki sinir hücrelerinin nöronların gövdelerinde (perikaryon) ve uzantılarında kuvvetli sitoplazmik pozitif immün reaksiyon görülmektedir (Resim 11).

Normal sıçan beyin dokusunda tanımlanan *ob* proteini (leptin)'e ait özet bilgiler Tablo.4.3' de verilmiştir.

Tablo.4.3. Normal sıçan beyin dokusunda mikrofotografik alanlara özgü farklı bölgelerde leptinin dağılımı.

| İncelenen Bölüm | Reaksiyon şiddeti | Boyanma Özelliği |
|-------------------------------|-------------------|------------------|
| KORTEKS | | |
| • Pia mater | +++ | Sitoplazmik |
| • Dış Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • İç Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • Multiform Tabaka | - | |
| • Dorsal Hipokampus Nöronları | +++ | Sitoplazmik |
| MEDULLA | | |
| • Akson | - | |
| • Pleksus Chroidesus | +++ | Sitoplazmik |

-: Boyanma yok, -/+: Çok zayıf boyanma, +: Zayıf boyanma, ++: Orta derecede boyanma, +++: Kuvvetli boyanma.

4.3. BEYİN :

Mevcut çalışmada, incelenen tüm sıçan beyin dokularında koroit pleksus epitel hücreleri için leptin (*ob* protein) kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ayrıca ventrikül boşluğunu döşeyen vasküler endotel ve dorsal hipokampus sinir hücreleri kuvvetli pozitif reaksiyon göstermektedir (Resim 10).

Normal sıçan beyin dokusunda *ob* proteini (leptin) frontal kortekste pia mater, dış granüler tabaka nöronları ve dış piramidal tabaka nöronları kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ancak pleksiform ya da moleküler tabakadaki nöronlarda boyanma gözlenmedi (Resim 9b, 12).

Yine *ob* proteini (leptin) için beyin dokusundaki sinir hücrelerinin nöronların gövdelerinde (perikaryon) ve uzantılarında kuvvetli sitoplazmik pozitif immün reaksiyon görülmektedir (Resim 11).

Normal sıçan beyin dokusunda tanımlanan *ob* proteini (leptin)'e ait özet bilgiler Tablo.4.3' de verilmiştir.

Tablo.4.3. Normal sıçan beyin dokusunda mikrofotografik alanlara özgü farklı bölgelerde leptinin dağılımı.

| İncelenen Bölüm | Reaksiyon şiddeti | Boyanma Özelliği |
|-------------------------------|-------------------|------------------|
| KORTEKS | | |
| • Pia mater | +++ | Sitoplazmik |
| • Dış Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • İç Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • Multiform Tabaka | - | |
| • Dorsal Hipokampus Nöronları | +++ | Sitoplazmik |
| MEDULLA | | |
| • Akson | - | |
| • Pleksus Chroidesus | +++ | Sitoplazmik |

-: Boyanma yok, -/+: Çok zayıf boyanma, +: Zayıf boyanma, ++: Orta derecede boyanma, +++: Kuvvetli boyanma.

4.3. BEYİN :

Mevcut çalışmada, incelenen tüm sıçan beyin dokularında koroit pleksus epitel hücreleri için leptin (*ob* protein) kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ayrıca ventrikül boşluğunu döşeyen vasküler endotel ve dorsal hipokampus sinir hücreleri kuvvetli pozitif reaksiyon göstermektedir (Resim 10).

Normal sıçan beyin dokusunda *ob* proteini (leptin) frontal kortekste pia mater, dış granüler tabaka nöronları ve dış piramidal tabaka nöronları kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ancak pleksiform ya da moleküler tabakadaki nöronlarda boyanma gözlenmedi (Resim 9b, 12).

Yine *ob* proteini (leptin) için beyin dokusundaki sinir hücrelerinin nöronların gövdelerinde (perikaryon) ve uzantılarında kuvvetli sitoplazmik pozitif immün reaksiyon görülmektedir (Resim 11).

Normal sıçan beyin dokusunda tanımlanan *ob* proteini (leptin)'e ait özet bilgiler Tablo.4.3' de verilmiştir.

Tablo.4.3. Normal sıçan beyin dokusunda mikrofotografik alanlara özgü farklı bölgelerde leptinin dağılımı.

| İncelenen Bölüm | Reaksiyon şiddeti | Boyanma Özelliği |
|-------------------------------|-------------------|------------------|
| KORTEKS | | |
| • Pia mater | +++ | Sitoplazmik |
| • Dış Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • İç Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • Multiform Tabaka | - | |
| • Dorsal Hipokampus Nöronları | +++ | Sitoplazmik |
| MEDULLA | | |
| • Akson | - | |
| • Pleksus Chroidesus | +++ | Sitoplazmik |

-: Boyanma yok, -/+: Çok zayıf boyanma, +: Zayıf boyanma, ++: Orta derecede boyanma, +++: Kuvvetli boyanma.

4.3. BEYİN :

Mevcut çalışmada, incelenen tüm sıçan beyin dokularında koroit pleksus epitel hücreleri için leptin (*ob* protein) kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ayrıca ventrikül boşluğunu döşeyen vasküler endotel ve dorsal hipokampus sinir hücreleri kuvvetli pozitif reaksiyon göstermektedir (Resim 10).

Normal sıçan beyin dokusunda *ob* proteini (leptin) frontal kortekste pia mater, dış granüler tabaka nöronları ve dış piramidal tabaka nöronları kuvvetli pozitif immün reaksiyon gösterdi. Ancak pleksiform ya da moleküler tabakadaki nöronlarda boyanma gözlenmedi (Resim 9b, 12).

Yine *ob* proteini (leptin) için beyin dokusundaki sinir hücrelerinin nöronların gövdelerinde (perikaryon) ve uzantılarında kuvvetli sitoplazmik pozitif immün reaksiyon görülmektedir (Resim 11).

Normal sıçan beyin dokusunda tanımlanan *ob* proteini (leptin)'e ait özet bilgiler Tablo.4.3' de verilmiştir.

Tablo.4.3. Normal sıçan beyin dokusunda mikrofotografik alanlara özgü farklı bölgelerde leptinin dağılımı.

| İncelenen Bölüm | Reaksiyon şiddeti | Boyanma Özelliği |
|-------------------------------|-------------------|------------------|
| KORTEKS | | |
| • Pia mater | +++ | Sitoplazmik |
| • Dış Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • İç Piramidal Tabaka | +++ | Sitoplazmik |
| • Multiform Tabaka | - | |
| • Dorsal Hipokampus Nöronları | +++ | Sitoplazmik |
| MEDULLA | | |
| • Akson | - | |
| • Pleksus Chroidesus | +++ | Sitoplazmik |

-: Boyanma yok, -/+: Çok zayıf boyanma, +: Zayıf boyanma, ++: Orta derecede boyanma, +++: Kuvvetli boyanma.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Leptinin biyolojik etkileri arasında tokluk hissi vermek, metabolik hızı ve seks dürtüsünü arttırmak ve adrenal stres hormonlarının üretimini azaltılmasını sağlamak yer almaktadır. Ayrıca leptin, dişi farelerin puberteye daha çabuk ulaşmasını sağladığı gibi, bir lipostat gibi hareket ederek, vücuttaki yağ seviyelerini düşürmek için gereken davranışları aktive etmektedir. Leptinin sayılan bu fonksiyonları yerine getirebilmesi için beynin merkezine ulaşması gerekmektedir ki, bunu koroit pleksusda tanımlanmış bir leptin reseptörü aracılığı ile yapmaktadır. Leptin hipotalamusa koroit pleksusda ki reseptörü sayesinde serebrospinal sıvı ile girmektedir.

Leptin, beslenmenin azaltılması için hipotalamusta melanokortin-4 reseptörü üzerinde etki göstererek melanokortinlerin üretimine sebep olmaktadır. Böylece bir nörotransmitter stimüle edici rolünde hipotalamusta nöropeptit Y (NPY; appetite-stimulating neurotransmitter, iştah stimüle edici nörotransmitter) üretimini baskılar.

Bununla beraber leptin tiroit bezinde tiroksin üretiminin artmasına bağlı olarak metabolik hızda artmaya, adrenal bezlerde streoidlerin üretiminin baskılanması ve gonadlarda seks streoidlerinin üretiminin artmasına neden olmaktadır (62, 63).

Leptin reseptörünün primitif hematopoietik hücrelerden bağımsız olarak klonlanması ve hematopoietik hücre soylarında ektopik olarak ifade edilmesi proliferatif ve diferansiyatif hücre sinyalizasyonu gerçekleştirmeleri, leptinin hematopoietik hücre fonksiyonunda görev aldığını göstermektedir. Bu ayrıca erken hematopoietik hücre progenitörlerinin proliferasyonu ve aktive olmuş makrofajların parazitlere yapışması için sinerjistik bir stimülasyon olduğuna işaretir (64, 65). Bununla beraber periferik kandaki ve kemik iliğindeki lenfositlerin bir hasarı db/db farelerde temel hematopoietik bir defekte yol açar ki bu durum; fonksiyonel leptin reseptörünün eksikliğinde meydana gelmektedir (66).

Ob geninin ürünü olan leptin esas olarak insan adiposit hücre kültürlerinde çeşitli yöntemlerle (immünohistokimya ve RT-PCR) eksprese edilmiştir (67, 68).

Son yıllarda yapılan birçok çalışma ile *ob* proteinin (leptin) adipositler dışında, koroit pleksusda (69), olgun insan oositinde, kumulus ve granüloza hücrelerinde (70), insan plasentasında (71-75), sitotrofoblastik hücrelerde, sekretuar

kolonda (80), mide epitel hücrelerinde (77, 79), C6 glioblastoma hücrelerinde (81), RT-PCR yöntemiyle beyin ve hipofizde (82), kasda (73), meme epiteli sekreter hücrelerde (83), hipofizde (37, 38, 39, 40, 83) immünohistokimyasal ve RT-PCR yöntemleriyle tanımlanmıştır.

ob protein (leptin)'in fonksiyonları arasında besin alımı ve enerji harcanmasını düzenlemesinin yanında (15,84), seks dürtüsünün artması, adrenal stress hormonlarının üretimini azaltılması, insülin salgılanmasını inhibe etmesi, infertilite ve immün sistem üzerindeki etkileri sayılabilir (7,52,85,86) .

Leptin bu etkilerini koroit pleksusta (10, 23,52, 87), hipotalamusta (18,21,52), karaciğerde (17, 52), kalp de , iskelet kasında (52) ve endokrin pankreas da (52, 88) tanımlanan leptin reseptörünün değişik izoformları aracılığıyla gerçekleştirmektedir.

Son yıllarda leptinin adipositler dışında daha birçok organ ve dokuda tanımlandığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, leptinin yalnızca besin alımı ve enerji harcanması üzerinden etki ederek negatif ve pozitif enerji dengelerinde etkin olmadığı, daha birçok fizyolojik işlevde ve çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynadığı ve/veya oynayabileceğini bildiren raporlar mevcuttur. Bu nedenle, bu molekülün dağılımının özellikle metabolik aktivitesi yüksek sıçan beyin, böbrek ve mide dokularında tam olarak belirlenmesinin önemli olacağı düşünülmüştür. Yapılan kaynak taramasında, bu organ ve dokularda leptin ekspresyonuna ilişkin sunulan veriler son derece yüzeysel ve nadirdir. Mevcut çalışmada, metabolik aktivitesi yüksek üç organda (beyin, mide ve böbrek) ayrıntılı bir şekilde leptin dağılımı saptandı ve yapı-fonksiyon ilişkileri mevcut literatür bilgileri ışığında kurulması amaçlandı.

Mevcut çalışmada, incelenen tüm sıçan beyin dokularında koroit pleksus epitel hücreleri leptin için kuvvetli (+++) pozitif immün reaksiyon gözlemlendi. Fare koroit pleksusunda yüksek konsantrasyonlarda leptinin varlığı Mannes ve ark. (16) tarafından bildirilmiştir. Ancak, bu daha çok leptin reseptörlerinin orta serebral arterler lümeninde ve kan serebrospinal sıvı bariyerinin beyin tarafındaki varlığının ortaya konmasıyla çıkan bir sonuç olarak bildirildi. İlaveten, sıçan (89) ve insan (11) koroit pleksus epitelinde *ob-R* immünoaktivitesini bildiren araştırma sonuçları mevcuttur. Önceki çalışmalarda leptin reseptörünün, bu çalışmada ise leptinin koroit

pleksus epitelinde tanımlanmış olması, leptinin merkezi sinir sisteminde işlev görebilmesi için koroit pleksusdaki reseptörlerini kullandığını göstermektedir.

Sıçan merkezi sinir sisteminde leptin immünoreaktivitesini bildiren yalnızca bir çalışma mevcuttur. Jin L ve ark. (36), hipotalamusta (paraventriküler çekirdek) ve beyin sapındaki (soliter traktus çekirdekleri) nöronların perikaryon ve uzantılarında leptin immünoreaktivitesini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada ise, leptin için kortekste ve hipokampustaki nöronların perikaryonlarında ve uzantılarında sitoplazmik pozitif immün reaksiyon gözlemlendi.

Ob protein (leptin)'in beyin dokusundaki immünohistokimyasal dağılımına ilişkin elimizde çok fazla veri olmamasına karşın, leptin reseptörünün (*ob-R*) sıçan (11,14) ve insan (89-92) merkezi sinir sistemindeki immünoreaktivitesini bildiren raporlar mevcuttur.

Couce ve ark., insan beyinde *ob-R*'nin immünoreaktif dağılımını çalışmışlardır. Ependim hücrelerinde, arkuat, suprakiazmatik, mamillar, paraventriküler, dorsomedial, supraoptik ve posteriyor çekirdekleri içeren hipotalamik çekirdeklerin nöronlarında, kuvvetli olarak gözlemlenmiştir. İlâveten, inferiyor oliver çekirdeklerde ve serebellar Purkinje hücrelerinde *ob-R* immünreaksiyonu saptanmıştır (93).

Burguera ve ark. ise yakın zamanda gerçekleştirdikleri çalışmada, yukarıdaki bölgelerin dışında insitu hibridizasyon yöntemleriyle neokorteks, entorhinal korteks, amygdala ve rostral medulladaki nöronların proksimal aksonları ve perikaryon sitoplazmasında pozitif sinyallerin varlığını bildirmişlerdir (78).

Son zamanlarda, sıçan beyin dokularında leptin ya da leptin reseptörünün lokalizasyonu ve ekspresyonunu immünohistokimyasal olarak bildiren birkaç çalışma daha yapılmıştır (89,94, 95, 96).

Hakkanson ve ark., leptin reseptör immünoreaktivitesinin hipotalamusta supraoptik, paraventriküler ve arkuat çekirdek nöronlarında ve lateral hipotalamusta kuvvetli olarak saptamışlardır. Bununla birlikte, lateral ve medial preoptik çekirdekler, suprakiazmatik çekirdek, ventromedial ve dorsomedial çekirdekler ve tuberomamillar çekirdekte zayıf olarak saptamışlardır. Bundan başka, hipokampus nöronlarında kuvvetli immün reaksiyonu rapor etmişlerdir (97).

Bir başka çalışmada, sıçan hipotalamusunun arkuat, paraventriküler ve ventromediyal çekirdeklerinde ve lateral hipotalamik alanlarda kuvvetli leptin reseptör immünoreaktivitesi saptanmıştır. Ayrıca, olfaktor bulbus, neokorteks, serebellar korteks, dorsal rafe çekirdek, inferiyor olive çekirdek, soliter traktusun çekirdeği, vagus sinirinin dorsal motor çekirdeğinin kuvvetli immünoreaktivite gösterdiği bildirilmiştir (25).

Hay-schmidt ve ark., kortikal alanlar, amigdala, birkaç hipotalamik ve talamik çekirdek, rafe sistemi, pontin çekirdekler, parabrakial çekirdek, soliter trakt ve medullar retiküler formasyonu içeren sıçan merkezi sinir sisteminde leptin reseptör immünoreaktivitesini bildirmişlerdir (99).

Funahashi ve ark., ise sıçan hipotalamusunda leptin reseptörünün ince yapı lokalizasyonunu çalışmışlar, lateral hipotalamik alan ve hipotalamusun arkuat, paraventriküler ve ventromediyal çekirdeklerinde kuvvetli leptin reseptör immünoreaktivitesinin daha çok nöronların perikaryon ve dendritlerinde yoğunlaştığı belirlenmiştir. Leptin reseptörü için kuvvetli immün işaretleme plazma membranında, granüllü endoplazmik retikulumda, golgi kompleksinde ve sitoplazmik matrikste tespit edilmiş (100). Son olarak, şaşırtıcı bir şekilde özellikle obes insanların beyin dokularından net bir şekilde leptin salınımı olduğu rapor edilmiştir (84).

Mevcut çalışmanın ve diğer araştırmaların sonuçları, leptin reseptörünün ligandı olan leptinin, bazı beyin bölgelerinde bazı hipotalamik çekirdekler için serotonerjik, dopaminerjik, adrenerjik, olduğunu göstermektedir. Ayrıca, bu veriler leptinin enerji balansının düzenlenmesi, otonomik homeostaz ve nöroendokrin durumlarda ilişkili nöropeptitleri içeren beyin işlevlerinin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir.

Gao ve ark., I^{125} işaretli *ob*-proteinin fragmentlerini sıçanlara intravenöz olarak enjekte ettikten sonra sıçan dokularında *ob* proteinin doku dağılımını saptamışlardır. Bu çalışmanın sonucunda *ob* protein miktarının en fazla beyin dokusunda olduğunu, iskelet kasında ve karaciğer dokularında ise olmadığını bildirmişlerdir. Buna ilaveten böbrek dokusunda da leptin varlığını saptamışlardır (101). Son yıllardaki çeşitli çalışmalar kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda belirgin bir oranda serum

leptin seviyelerinin yüksek olduğunu ve bu hastalarda hiperleptinemiye bağlı olarak kilo kaybı olacağı belirtilmektedir (102-108).

Diğer birkaç çalışmada da hemodiyaliz ve peritoneal diyaliz hastalarında serum leptin seviyelerinin yüksek olduğu bildirilmiştir (104,109-112).

Arteriyal hipertansiyonlu ve kronik böbrek yetmezliği olan insan ve hayvanlarda serum leptin düzeylerindeki bu artışın leptinin böbreklerden atılımının yetersizliğinin yanında, yağ dokusundan leptin sekresyonun artmasına bağlı olarakta gerçekleşebileceği önerilmektedir (106-108).

Kokot ve ark, başarılı böbrek transplantasyonunun erken dönemlerinde, önemli bir oranda leptineminin azaldığını tespit etmişlerdir ki, bu durumun, ne grafitin eksretuar işleviyle ne de immunosupresantların dozu ve çeşidiyle ilişkili olmadığını tespit etmişlerdir. Öte yandan , başarılı böbrek transplantasyonunu takiben hastaların çoğunda iştah artışı gözlemlenmiştir (113,114).

Tüm bu bulgular bize, temel olarak leptinin böbreklerden atıldığını göstermektedir.

Bizim çalışmamızda, temel olarak böbrek tübül epitel hücrelerinde ve Bowman kapsülünün paryetal yaprağında leptinin eksprese edildiğini gösterdik. Daha önce yapılan bir çalışmada da medulladaki toplayıcı kanal hücrelerinde leptinin sitoplazmik ve apikal membranda bir reaksiyon verdiğini saptamışlardır (105). Bu çalışmaya ek olarak Meyer ve ark., böbrek dokusunda leptinin indirgenliğini bildirmişlerdir (115).

Başka bir çalışmada, Hileman ve ark., leptin transportunu gerçekleştiren *ob-Ra*'nın Madin Darby Canine böbrek hücrelerinin apikal hücre membranlarında varlığını rapor etmişler ve leptinin dolaşımdan beyne reseptör aracılıklı transportunda *ob-Ra*'nın rolü olduğunu saptamışlardır (116). Mevcut çalışmada da, leptin, proksimal kıvrımlı tübül hücrelerinin apikal kısımlarında kuvvetli bir reaksiyon göstermiştir. Tüm bu bulgular sonucunda leptinin böbrek proksimal tübül hücrelerinin apikal membranlarından reseptör aracılıklı transport edilebileceğini söyleyebiliriz.

Önceki birkaç çalışma kan basıncının regülasyonunda leptinin rol oynayabileceğini önermektedir (114,117). Kuo ve ark, leptinin vasküler endotelde NO salınımını arttırdığını ve hiperleptineminin taşikardiya neden olduğunu

bulmuşlardır (117). Villarreal ve ark, ekzojen leptinin önemli bir natriüretik (sodyum atılımında artış) etkisi olduğunu göstermişler, bunun sonucunda da leptinin normal sıçanlarda potansiyel bir tuz atılım faktörü olabileceği fikrini ortaya atmışlardır (118).

Makula densanın fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir, daha çok böbrek distal tübüldeki sodyum konsantrasyonunda ki tüm değişimleri, renin üretiminin artış ve azalışına bağlı olarak jukstaglomerüler hücrelere ileten bir osmoreseptör olarak fonksiyon gördüğü düşünülmektedir (119).

Bu çalışmada, makula densa hücreleri leptin için pozitif immün reaksiyon verdi. Bu sonuca ve eldeki diğer literatür bilgileri ışığında leptinin makula densa hücreleri üzerinden afferent arteriyol endotel hücrelerini etkileyerek kan basıncının düzenlenmesinde ya da glomerüler filtrasyon oranı üzerinde bir rol oynayabileceği düşünülebilir.

Proksimal kıvrımlı tübüller glomerular filtrattaki glukoz ve amino asitlerin tümünü suyun ve sodyum klorürün %85'ini ve ayrıca fosfat ve kalsiyumu emer. Distal kıvrımlı tübüller ise, aldesteronun kontrolünde sodyumun emildiği, potasyum iyonlarının dışarı verildiği bölgedir. Bu bölge, filtrattaki suyun yaklaşık %8'ini emer. Toplayıcı kanallarda ADH'in kontrolünde filtrattaki suyun yaklaşık %4'ünü emer.

Bu çalışmada, leptin, proksimal kıvrımlı tübüllerin apikal membranlarında ve sitoplazmalarında kuvvetli pozitif olarak saptandı. Diğer tüm hücre ve kanal hücrelerinde ise, sitoplazmik ve orta şiddette reaksiyon gözlemlendi.

Son olarak, bu çalışmada gözlenen proksimal kıvrımlı tübülde, apikal membran ve sitoplazmik leptin immün reaksiyonu, leptinin bilinen diüretik-natriüretik etkileriyle uyumlu görünmektedir. Filtrattaki su ve tuzun yaklaşık %85'inin emilmesinden sorumlu olan proksimal kıvrımlı tübül epitel hücrelerinin apikal membranında leptin varlığı, leptinin bu hücrelerde su ve tuz emilimiyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Leptin, bu hücrelere reseptörü vasıtasıyla bağlanarak su ve tuz dengesi üzerinde etki edebilir.

Son çalışmalar ve mevcut çalışmanın sonuçları leptinin besin alımının ve enerji harcanmasının düzenlenmesinin yanısıra böbrek dokusunda çeşitli fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Bado ve ark., mide epitelindeki hücrelerin immünoreaktif olduğunu bulmuşlardır. Bu alan mide mukoza bezlerinin altında pepsinojen salgılayan esas hücrelerin lokalize olduğu alana benzerlik göstermekte olduğunu ve CCK-8'in intraperitoneal uygulamasından sonra leptin immünoreaktivitesinin aniden düştüğünü, buna paralel olarak da mide epitelinin leptin içeriğinde önemli bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Radioimmünoassay (RIA) çalışmaları sonucunda midede ki leptin miktarının açlıkla hafif bir düşme gösterdiğini rapor etmişlerdir (44).

Lastao ve ark., anti-leptin monoklonal antikoları kullanarak immünohistokimyasal yöntemlerle lamina propria lokalize immün hücrelerin plazma membranında leptin reseptörünü tanımlamışlardır (20).

Başka bir çalışmada da, leptin reseptörünü insan gastrik mukoza hücrelerinde immünohistokimyasal yöntemlerle ekspres etmişlerdir. Leptinin korpus epitelial bezlerin alt parçasında immünoreaktif olduğunu ve leptinin fonksiyonel tüm izoformlarının mide mukozasında bulunduğunu rapor etmişlerdir (120).

Mix H ve ark., insan mide mukozasında leptin ve reseptörünü immünohistokimyasal yöntemlerle tanımlamışlardır. Leptin ve reseptörünün mRNA'sının, mide mukoza biopsilerinde, kültüre insan mide epitel hücrelerinde ve mide kanser hücrelerinde varlığını rapor etmişlerdir. Ayrıca esas ve paryetal hücrelerinde leptin ve reseptörü için reaktif olduğunu bildirmişlerdir (77).

Sobhani ve ark., normal kişilerin mide biopsilerinde, leptinin mide bezlerinin altındaki hücrelerin immünoreaktif olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, pentagastrin veya sekretinin intravenöz infüzyonu dolaşımdaki leptin seviyelerini arttırdığını, buna paralel olarak da mide içeriğine leptin salınımını arttırdığını rapor etmişlerdir (120).

Mevcut çalışmanın ve diğer araştırmaların sonuçları leptin ve reseptörünün mide dokusunda bulunduğunu ve mide epitel hücrelerin leptin için direkt hedef olabileceğini göstermektedir. Buna bağlı olarak mide epitel hücre fonksiyonunda leptinin parakrin ve otokrin etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca intestinal I hücrelerinin beslenmeye karşı saldıği CCK ile leptinin sinerjistik etki gösterip beslenmenin düzenlenmesinde kısa süreli regülasyon ve/veya uzun süreli regülasyonda rol oynayabileceğini göstermektedir.

ÖZET

Çeşitli sıçan dokularında ob protein (leptin)'in immünohistokimyasal olarak tanımlanması.

Plazmada dolaşan 16-kDa'luk bir peptit olan leptin, besin alınımını azaltıp enerji harcanmasını arttırarak yağ kütleini düzenleyen bir geribildirim döngüsünün parçasıdır. Leptin, adipositler, plasenta, ve mide tarafından salgılanır. Dolaşımdaki düzeyi, yağ derecesine, cinsiyete, enerji dengesindeki akut değişikliklere (adipositlerdeki değişikliklerden bağımsız olarak), insülin ve glukokortikoidler gibi çeşitli hormonların etkisine bağılı olarak değişir.

Bu araştırma, poliklonal antikor kullanılarak indirekt immünoperoksidaz yöntemiyle beyin, mide ve böbrek gibi çeşitli sıçan dokularında ob proteinin histolojik dağılımını saptamak amacıyla yapılmıştır.

Beyinde; pia mater, dış piramidal tabaka, iç piramidal tabaka, dorsal hipokampus nöronları ve koroit pleksusda, böbrekte; proksimal kıvrıntılı tübül, distal kıvrıntılı tübül, makula densa, bowman kapsülünün paryetal yaprağında, düz proksimal tübül, düz distal tübül, henle kulpu ve kollektör tübülde, midede; yüzey epitelinde, paryetal ve esas hücrelerde, mukoza bezlerinde ve myenterik pleksus da leptin tanımlandı.

Sonuçta leptinin çeşitli sıçan dokularındaki (beyin, mide ve böbrek) dağılımlarının belirli özellikler gösterdiği saptandı.

Anahtar kelimeler ; Immünohistokimya, Leptin, Dağılım, Obesite, Sıçan

SUMMARY

Immunohistochemical determination of ob protein (leptin) in various rat tissues.

Leptin, a 16-kDa peptid that circulates in plasma, is a part of a feedback loop that regulates fat mass by decreasing food intake and increasing energy expenditure. Leptin is secreted by adipocytes, placenta, and stomach. Circulating levels of it is influenced by the degree of adiposity, gender; acute changes in energy balance (independent of changes in adiposity), and various hormones, such as insulin and glucocorticoids.

This investigation has focused on the histologic distribution of leptin within various rat tissues including brain, stomach, and kidney by using polyclonal antibody in an indirect immunoperoxidase method.

Ob protein was shown in pia mater, external pyramidal layer, internal pyramidal layer, dorsal hippocampus neurons and plexus chroidesus of brain, proximal convulated tubul, distal convulated tubul, macula densa, parietal layer of the Bowman's capsule , proximal straight tubul, distal straight tubul, henle loop and collecting tubul of kidney, and surface epithelium, parietal and chief cells, gastric glands and myenteric plexus of stomach of the rats.

In conclusion; the distribution of leptin in various rat tissues (brain, stomach, and kidney) are of special interest.

Key words; Immunohistochemistry, Leptin, Expression, Obesity, Rat

KAYNAKLAR

1. **John P. Foreyt** : Obezite nedir? Literatür 185 : 1-2, 1999.
2. **Alsan Selçuk** : Çağın hastalığı. Bilim ve Teknik 394 : 34-51, 2000.
3. **Korugan Ü., Güven Ş** : Obezite estetik bir sorun değil, hastalıktır. Literatür 62 : 1,1999.
4. **Özer E** : Şişmanlık alışkanlık değil hastalıktır. Diabetle Yaşam. Mart, 1999.
5. **Friedman JM., Halaas JL** : Leptin and the regulation of body weight in animals. Nature: 392, 763-71, 1998.
6. **Meinders AE, Toornvliet AC, Pijl H** : Leptin. Neth J Med, 49(6): 247-52, 1996.
7. **O'brien SN., Welter BH., Price TM** : Presence of leptin in breast cell lines and breast tumors. Biochem Biophys Res Commun, 259:695-8,1999.
8. **Glasow A., Haidan A., Hilbers U., Brediert M., Gillespie J., Scherbaum WA., Chrousos GP., Bornstein SR** : Expression of ob receptor in normal human adrenals: differential regulation of adrenocortical and adrenomedullary function by leptin. J Clin Endocrinol Metab, 83:4459-66.1999.
9. **Butzow TL., Moilanen JM., Lehtovirta M., Tuomi T., Hovatta O., Sieberg R., Nilsson CG., Apter D.,J** : Serum and follicular fluid leptin during in vitro fertilization: relationship among leptin increase, body fat mass, and reduced ovarian response. Clin Endocrinol Metab, 84:3135-9.1999.
10. **Iida M., Murakami T., Ishida K., Mizuno A., Kuwajima M., Shima K Tokushima** : Phenotype-linked amino acid alteration in leptin receptor cDNA from Zucker Fatty (fa/fa) rat. Biochem Biophys Res Commun, 222:19-26,1996.
11. **Pelleymounter MA., Cullen MJ., Healy D., Heacht R., Winters D., McCaleb M** : Efficacy of exogenous recombinant murine leptin in lean and obese 10-to 12-mo-old female CD-1 mice. Am J Physiol ,275:R950-9,1998.
12. **Qian H., Azain Mj., Hartzell DL., Baile CA** : Increased leptin resistance as rats grow to maturity. Proc Soc Exp Biol Med, 219:160-5,1998.
13. **Carro E., Seoane LM., Senaris R., Considine RV., Casanueva FF., Dieguez C** : Interaction between leptin and neuropeptide Y on vivo growth hormone secretion. Neuroendocrinology, 68:187-91,1998.
14. **Harvey J., Ashford ML** : Insulin occludes leptin activation of ATP-sensitive K⁺ channels in rat CR1-G1 insulin secreting cells. J Physiol, 511 (Pt3):695-706,1998.
15. **Morton NM., Emilsson V., Liu YL., Cawthorne MA** : Leptin action in intestinal cells. J Biol Chem, 273:26194-201,1998.

16. **Maness LM., Kastin AJ., Farrell CL., Banks WA** : Fate of leptin intracerebroventricular injection into the mouse brain. *Endocrinology*, 139:4556-62,1998.
17. **McCowen KC., Chow JC., Smith RJ** : Leptin signaling in the hypothalamus of normal rats in vivo. *Endocrinology*, 139:4442-7,1998.
18. **Hotta K., Gustafson TA., Ortmeier Hk., Bodkin NL., Hansen BC** : Monkey leptin receptor mRNA. Sequence tissue distribution, and mRNA expression in the adipose tissue of normal, hyperinsulinemic, and type 2 diabetic rhesus monkeys. *Obes Res*, 6:353-60,1998.
19. **Gruaz NM., Lalaoui M., Pierroz ., Englaro P., Sizonenko PC., Blum WF., Aubert ML** : Chronic administration of leptin into the lateral ventricle induces sexual maturation in severely food-restricted female rats. *J Neuroendocrinol*, 10:627-33,1998.
20. **Lostao MP., Urdaneta E., Martinez-Ans'o E., Barber A., Öartinez JA** : Presence of leptin receptors in rat small intestine and leptin effect on sugar absorption. *FEBS Lett*, 423:302-6,1998.
21. **Bennett PA., Lindell K., Karlsson C., Robinson IC., Carlsson Lm., Carlsson B** : Differential expression and regulation of leptin receptor isoforms in the rat brain:effects of fasting and oestrogen. *Neuroendocrinology*, 67:29-36,1998.
22. **Ookuma M., Ookuma K., York DA** : Effects of leptin on insulin secretion from isolated rat pancreatic islets. *Diabetes*, 47:219-23,1998.
23. **Fong TM., Huang RR., Tota MR., Mao C., Smith T., Varnerin J., Karpitskiy VV., krause JE., Van der ploeg LH** : Localization of leptin binding domain in the leptin receptor. *Mol Pharmacol*, 53:234-40,1998.
24. **Coleman DL** : Two mutant genes causing diabetes obesity syndromes in mice. *Diabetologia*, 14:141, 1978.
25. **Liebel RL., Chung WK., Chua SC Jr** : The molecular genetics of rodent single gene obesities. *J Biol Chem* 272:31937, 1997.
26. **Potter JJ., Womack L., Mezey E., Anania FA** : Transdifferentiation of rat hepatic cells results in leptin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 244: 178-82, 1998 (süpheli).
27. **Cool DR et al** : Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: Genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe (Fat) mice. *Cell* 88: 73, 1997.
28. **Fricke LD et al** : Carboxypeptidase E activity is deficient in mice with the fat mutation: Effect on peptide processing. *J Biol Chem* 271:30619, 1996.
29. **Militerberger RJ et al** : The role of the agouti gene in the yellow obese syndrome. *J Nutr* 127: 19025, 1997.

30. **Ollmann MM et al:** Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and vivo by agouti-related protein. *Science* 278: 135, 1997.
31. **Montague CT et al :** Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387: 903, 1997.
32. **Hirsch J:** Understanding obesity: The unfinished business. *J paranteral Enteral Nutr* 21:192, 1997.
33. **Wang J et al:** A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature*, 393: 384-8, 1998.
34. **Nicola NA., Hilton DJ:** *Advances in protein chemistry* 52:13-14, 1999.
35. **Lewandowski K., Horn R., Dunlop D., Medley G :** Free leptin, bound leptin, and soluble leptin receptor in normal and diabetic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(1) : 300-306, 1999.
36. **Jin L, Burguera BG, Couce ME, ScHeithauer BW, Lamsan J, Eberhardt NL, Kulig E, Lloyd RV :** Leptin and leptin receptor expression in normal and neoplastic human pituitary: evidence of a regulatory role for leptin on pituitary cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2903-11,1999.
37. **Baskin D., Schwartz M., Seeley R., Woods S., Porte D :** Leptin receptor long-form splice variant protein expression in neuron cell bodies of the brain and co-localization with NPY mRNA in the arcuat nucleus. *J Histochemistry and cytochemistry* 47: 353-362, 1999.
38. **Jin L., Zhang S., Burguera B., Couce M., Osamura R :** leptin and leptin Lreceptor expression in rat mouse pituitary cell. *Endocrinology*, 141: 333-339, 2000.
39. **Sanz Paris A., Guallar Labrador AM., Albero Gamboa R :** Leptin in the endocrinology of obesity. *An Med Interna*, 16 (10): 530-40, 1999.
40. **Iqbal J., Pompolo S., Considine R., Clarke I :** Localization of leptin receptor-like immunoreactivity in the corticotropes, somatotropes, and gonadotropes in the ovine anterior pituitary. *Endocrinology*, 141 (4): 1515-20, 2000.
41. **Tartaglia LA et al :** Identification and expression cloning of a leptin receptor, ob-R. *Cell* 83: 1263, 1995.
42. **Satoh N et al :** Satiety effect and sympathetic activation of leptin are media melanocortin systems. *Neurosci Lett*, 249: 107-110, 1998.
43. **Seufert et al :** Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: Implications for the development of adipogenic diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 84:670-76,1999.
44. **Bado A., Levassaur S., Attoub S., Kermorgant S :** The stomach is a source of leptin. *Nature*, 394, 1998.

45. **Gura et al** : Obesity sheds its secrets. *Science*, 275 : 751-3, 1997.
46. **Rojo-Martinez G, Soriguer FJ., Gonzales- Romero S., garcia-Almeida JM** : Serum leptin and habitual fatty acid dietary intake in patients with type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 142 (3) : 263-8, 2000.
47. **Barrachina M., Martinez V., Wang L., Wei Yu J., Tache Y**: Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice. *Proc Natl Acad Sci*, 94:10455-10460, 1997.
48. **Kalra S** : Circumventing leptin resistance for weight control. *Proc Natl Acad Sci*,98(8) : 4279-4281, 2001.
49. **Guyton and Hall** : *Tibbi fizyoloji*, 892-893.
50. **Halaas J et al** : Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci*, 94: 8878-8883, 1997.
51. **Halaas J et al** : Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 269: 543-546, 1995.
52. **Girarg J** : Is leptin the link between obesity and insulin resistance? *Diabetes Metab*, 23 Supple 3: 16-24, 1997.
53. **Janssen SW., Martens GJ., Sweep CG., Ross HA., Hermus AR** : In zucker diabetic fatty rats plasma leptin levels are correlated with plasma insulin levels rather than with body weight. *Horm Metab Res*, 31 (11): 610-5, 1999.
54. **Jin L., Zhang S., Burguera B., Couce M., Osamura R** : Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology*, 141:333-339, 2000.
55. **Quinton ND., Smith RF** : Leptin binding activity changes with age : The link between leptin and puberty. *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 2336-2340, 1999.
56. **Levine JA et al** : Leptin responses to overfeeding : Relationship with body fat and nonexercise activity thermogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 2751-2754, 1999.
57. **Lord GM et al** : Leptin modulates the T-cell immun response and reverses starvation in induced immunosuppression. *Nature*, 394: 897-91, 1998.
58. **Sierra-Honigman MR et al** : Biologic action of leptin as an angiogenic factor. *Science*, 281: 1683-1685, 1998.
59. **Junquera C., Carneiro J., Kelley R** : *Temel histoloji*, 150-153, 1993 Barış kitabevi.
60. **Daçık H., Irmak MK., Öztaş E., Özcan O., Kırışlı E** : Doku tespitinde vasküler perfüzyon. *Yeni Tıp Dergisi*, 12(4) : 277-280, 1995.
61. **Volpes R., Vanden Cord JJ., Desmet VJ** : Distribution of the VLA family of integrins in normal and pathological human liver tissue. *Gastroenterology*, 101:200-206, 1991.

62. **Barash I et al** : Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*, 137: 3144-3147, 1996.
63. **Gettys TW., Harkness PJ** : The beta 3-adrenergic receptor inhibits insulin-stimulated leptin secretion from isolated rat adipocytes. *Endocrinology*, 137: 4054-4057, 1996.
64. **Bennett BD., Solar GP., Yuan JQ** : A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr Biol*, 6: 1170-1180, 1996.
65. **Cioffi JA et al** : Novel B219/ob receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med*, 2: 585-589, 1996.
66. **Mandel MA et al** : Impairment of cell-mediated immunity in mutation diabetic mice (*db/db*). *J Immunol*, 120: 1375-1377, 1978.
67. **Bornstein SR., Abu-Asab M., Glasow A., Path G., Hauner H., Tsokos M., Chrousos GP., Scherbaum WA** : Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes*, 9(4): 532-8, 2000.
68. **Fain JN., Bahouth SW** : Effect of tri-iodothyronine on leptin release and leptin mRNA accumulation in rat adipose tissue. *Biochem J*, 332 (pt2): 361-6, 1998.
69. **Maness LM., Kastin AJ., Farrell CL., Banks WA** : Fate of leptin intracerebroventricular injection into the mouse brain. *Endocrinology*, 139: 4556-62, 1998.
70. **Cai XJ, Widdowson PS, Harold J, Wilson S, Buckingham RE, Arch JR, Tadayyon M, Clapham JC, Wilding J, Williams G** : Hypothalamic Orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes* 48(11):2132-7,1999.
71. **Castellucci M, De Matteis R, Mwisser A, Canello R, Monsurro V, Islami D, Sarzani R, Marzioni D, Cinti S, Bischof P** : Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. *Mol Hum Reprod*, 6 (10): 951-8, 2000.
72. **Hoggard N, Hunter L, Lea Rg, Trayhurn P, Mercer JG** : Ontogeny of the expression of leptin and its receptor in the murine fetus and placenta. *Br J Nutr*, 83 (3) :: 317-26, 2000.
73. **Vickers MH, Reddy S, Ikenasio BA, Breier BH** : Dysregulation of the adipoinular axis a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming. *J Endocrinol*, 170 (2): 323-332, 2001.
74. **Flier J** : Leptin expression and action : New experimental paradigms. *Proc Natl Acad sci*, 94: 4242-4245, 1997.
75. **Dötsch J, Nüsken KD, Kneer I, Kirschbaum M, Repp R, Rascher W** : Leptin and Neuropeptide Y gene expression in human placenta: ontogeny and evidence for similarities to hypothalamic regulation. *J Clin Endocrinol Metab*, 84 : 2755-2758, 1999.

76. **Gonzales RR, caballero-Compo P, Jasper M, Mercader A, Devoto L, Pellicer A, Simon C**: Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab*, 85 (12) : 4883-8, 2000.
77. **Mix H, Widjaja A, Jandl O, Cornberg M, Kaul A, Goke M, Beil W, Kuske M, Brabant G, Manns MP, Wagner S** : Expression of leptin and leptin receptor isoforms in the human stomach. *Gut*, 47 (4): 481-6, 2000.
78. **Burguera B, Couce ME, Long J, Lamsam J, Jensen MD** : The long form of the leptin receptor (ob-Rb) is widely Expressed in the human brain. *Neuroendocrinology* 71 (3) : 187-195, 2000.
79. **Schneider R et al** : Leptin mediates a proliferative response in human gastric mucosa cells with functional receptor. *Horm Metab Res*, 33 (1) : 1-6, 2001
80. **Hardwick JC, Van den Brink GR, Offerhaus GJ, Van Deventer SJ, Peppelenbosch MP** : Leptin is a growth factor for clonic epithelial cells. *Gastroenterology*, 121 (1) : 79-90,2001.
81. **Morash B, Johnstone J, Leopold C, Li A, Murphy P, Ur E, Wilkinson M** : The regulation of leptin gene expression in the C6 glioblastoma cell line. *Mol Cell Endocrinol*, 165 (1-2) : 97-105, 2000.
82. **Morash B, Li A, Murphy P, Wilkinson M, Ur E** : Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology*, 140 (12) : 5995-8, 1999.
83. **Jin L et al** : Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology*, 141 (1) : 333-339, 2000.
84. **Wiesner G, Vaz M, Collier G, Seals D, Kaye D, Jennings G, Lambert G, Wilkinson D, Esler M** : Leptin is released from the human brain : Influence of adiposity and gender. *J Clin Endocrinol Metab*, 84 (7):2270-2274, 1999.
85. **Machinal F., Dieudonne MN., Leneuve MC., Pecquery R., Giudicelli Y** : In vivo and in vitro ob gene expression and leptin secretion in rat adipocytes:evidence for a regional spesific regulation by sex streoid hormones. *Endocrinology*, 140:1567-74, 1999.
86. **Laharrague P., Larrouy D., Fontanilles AM., Truel N., Camfield A., Tenenbaum R., Galitzky J., Corberand JX., P'enicaud L., Casteilla L** : High expression of leptin by human bone marrow adipocytes in primary culture. *FASEB J*, 12:747-52,1998.
87. **Bjorbaek C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, van Bueren A, McCall AL, Flier JS** : Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 139:3485-91,1998.

88. **Kieffer TJ, habener JF** : Leptin receptors expressed on pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 16;224 (2): 522-7, 1996.
89. **Papaspyrou-rao S., Schneider SH., Petersen RN., Fried SK** : Dexamethasone increases leptin expression in humans in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 82:1635-7,1997.
90. **Poiyout V., Rouault C., Guerre-Millo M., Briaud I., Reach G** : Inhibition of insulin secretion by leptin in normal rodent islets of langerhans. *Endocrinology*.139:822-6,1998.
91. **Spicer LJ., Francisco CC** : Adipose obese gene product, leptin,inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis. *Biol Reprod*,58:207-12,1998.
92. **Nevalainen PI, Lahtela JT, Mustonen J, Pasternack A** : Intraperitoneal insulin reduces plasma leptin concentration in diabeticpatients on CAPD. *Perit Dial Int*, 20(1): 27-32, 2000.
93. **Couce ME, Burguera B, Parisi JE, jensen MD, Lloyd RV** : Localization of leptin receptor in the human brain. *Neuroendocrinology*, 66 (3) : 145-50, 1999.
94. **Poiyout V., Rouault C., Guerre-Millo M., Briaud I., Reach G** : Inhibition of insulin secretion by leptin in normal rodent islets of langerhans. *Endocrinology*.139:822-6,1998.
95. **Spicer LJ., Francisco CC** : Adipose obese gene product, leptin,inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis. *Biol Reprod*,58:207-12,1998.
96. **Diamond F, Eichler D, mayes D, Jorgensen V, Duckett G, Hu C, Cuthbertson D, Root A** : Leptin binding activity (LBA) in plasma of nondiabetic and diabetic. *J. Peidatr Endocrinol Metab*, 13(2):141-8,2000.
97. **Hakkanson EH, SharkeyJ, Racine M,Ahn D,Mace JW,Saad MF** : Changes in plasma leptin during the treatment of diabetic ketoacidosis. *J Clin endocrinol metab* 84(12):4545-8,1999.
98. **Fain JN., Bahouth SW** : Effect of tri-iodothyronine on leptin release and leptin mRNA accumulation in rat adipose tissue. *Biochem J*,332 (pt 2):361-6,1998.
99. **Hay-Schmidt, Knight DS, Hamilton Karbondioksit, Tulp O, Tso P** : Localization of leptin receptor immunoreactivity in the lean and obese Zucker rat brain. *Brain Res* 785:80-90,1998.
100. **Funashi ET., Mathers JC, Daly ME** : Dietary carbohydrates and insulin sensitivty. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1(6):553-7,1998.
101. **Gao RJ., Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB** : Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 395:535-47,1998.
102. **Sharma K., Considine V. R** : The ob protein (leptin) and the kidney. *Kidney Int*. 53:1483-87, 1998.

103. **Stenvinkel P** : Leptin and its clinical implications in chronic renal failure. *Miner Electrolyte Metab*, 25(4-6):298-302, 1999.
104. **Odamaki M., Furuya R., Yoneyama T., Nishikino M., Hibi I., Miyaji K., Kumagai H** : Association of the serum leptin concentration with weight loss in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*, 33(2): 361-368, 1999.
105. **Martinez-Anso E., Lostao Mp., Martinez JA** : Immunohistochemical localization of leptin in rat kidney. *Kidnet Int*, 53(6):1483-1487, 1999.
106. **Nodfords L et al** : Low leptin gene expression and hyperleptinemi in chronic renal failure. *Kidney Int*, 54(4):1267-1275, 1998.
107. **Henriksen JH., Holst JJ., Moller S., Andersen UB., Bendtsen F., Jensen G** : Elevated circulating leptin levels in arterial hypertension: relationship to arteriovenous overflow and extraction of leptin. *Clin Sci*, 99(6):527-534, 2000.
108. **Swierczynski J., Korczynska J., Szolkiewicz M., Karbowska J., Kochan Z., Nieweglowski T., Kusiak E., Rutkowski B** : Low leptin mRNA level im adipose tissue and normoleptinemia in experimental chronic renal failure. *Exp Nephrol*, 9(1): 54-59, 2001.
109. **Kagan A., Haran N., Leschinsky L., Shuali N., Rapoport J** : Leptin in CAPD patients:serum concentrations and peritoneal loss. *Nephrol Dial Transplant*, 14(2):400-405, 1999.
110. **Coyne DW., Dagogo-Jack S., Klein S., Merabet E., Audrain J., Landt M** : High-flux dialysis lowers plasma leptin concentration in chronic dialysis patients. *Am J Kidney Dis*, 32(6): 1031-1035, 1998.
111. **Nishikawa M et al**: Measurement of serum leptin in patients with chronic renal failure on hemodialysis. *Clin Nephrol*, 51(5):296-303, 1999.
112. **Howard J., Lord G., Clutterbuck E., Ghatei M., Pusey C., Bloom S** : Plasma immunoreactive leptin concentration in end-stage renal disease. *Clin Sci*, 93:119-126, 1997.
113. **Kokot F., Adamczak M., Wiecek A., Spiechowicz U., Mesjasz J** : Plasma immunoreactive leptin and neuropeptide Y levels in kidney transplant patients. *Am J Nephrol*, 19(1):28-33, 1999.
114. **Kokot F., Wiecek A., Adamczak M., Ulamn I., Spiechowicz U., Cieplok J., Mesjasz J** : Pathophysiological role of leptin in patients with chronic renal failure, in kidney transplant patients, in patients with essential hypertension, and in pregnant women with preeclapmsia. *Artif Organs*, 23(1):70-74, 1999.
115. **Meyer C., Robsob D., Rackovsky N., Nadkarni V., Gerich J** : Role of the kidney in human leptin metaabolism. *Am J Physiol*, 273:903-907, 1997.

116. **Hileman SM., Tornoe J., Flier JS., Bjorbaek C** : Transcellular transport of leptin by the short leptin receptor isoform *ob-Ra* in Madin-Darby Canine Kidney cells. *Endocrinology*, 141(6): 1955-1961, 2000.
117. **Kuo JJ., Jones OB., Hall JE** : Inhibition of NO synthesis enhances chronic cardiovascular and renal actions of leptin. *Hypertension*, 37(2):670-676, 2001.
118. **Villarreal D., Reams G., Freeman RH** : Effects of renal denervation on the sodium excretory actions of leptin in hypertensive rats. *Kidney Int*, 58(3):989-994, 2000.
119. **Krstic R.V** : *Human Microscopic Anatomy*. 310-312, 1995.
120. **Sobhani I., Bado., Vissuzine C., Buyse M., Kermorgant S., Laigneau JP., Leyh T., Henin D., Mignon M., Lewin MJ** : Leptin secretion and leptin receptor in human stomach. *Gut*, 47(2): 178-83, 2000.

