

157022

T.C.
OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

LEPTİN HORMONUNUN GLİA HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ OLASI ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÖKHAN KUŞ

TEZ YÖNETİCİSİ
Prof. Dr. RUHİ UYAR

EKİM, 2004

KABUL VE ONAY SAYFASI

Gökhan KUŞ'un YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırladığı '**Leptin hormonunun glia hücreleri üzerindeki olası etkileri**' başlıklı bu çalışma jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

12.11.2004

ÜYE

Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ

ÜYE

Prof. Dr. Ruhi UYAR

ÜYE

Prof. Dr. Kubilay UZUNER

ÜYE

Doç. Dr. Yasemin AYDIN

ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Nilüfer ERKASAP

Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun **12/11/2004** tarih ve **623/1.797** sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Yusuf ÖZYÜREK
Enstitü Müdürü

Yüksek lisans öğrenimim sırasında bana maddi-manevi her türlü desteği sağlayan danışman hocam Prof. Dr. Ruhi UYAR'a; yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren değerli bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, en önemlisi beni hep sevgiyle kucaklayan sayın hocalarım Prof. Dr. Ruhi Uyar'a, Prof.Dr. Ziya KAYGISIZ'a, Prof..Dr. Neşe Tuncel'e, Doç.Dr. Kubilay UZUNER'e, Doç.Dr. Yasemin Aydın'a ve Yrd.Doç.Dr. Nilüfer ERKASAP'a ve tez çalışmalarım sırasında her aşamada benimle olan, bilgisini ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen çok sevgili ablam ve hocam Araş.Gör.Dr. Selda KABADERE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Gerek ders aşamasında gerekse tez aşamasında sevgisini benden hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve beni her konuda destekleyen Fizyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi, nişanlım Esin PEKER'e ve ailesine sonsuz teşekkür ederim.

Bugünlere ulaşmamda en büyük pay sahibi olan çok sevgili anneme, babama ve ağabeyime de gönülden teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. GLİA HÜCRELERİ	7
4.2. LEPTİN HORMONU	9
4.2.1. Leptinin bulunuşu	9
4.2.2. Leptin yapısı	9
4.2.3. Leptin reseptörleri (OB-R)	10
4.2.4. Leptin tarafından düzenlenen iletişim yolları	12
4.2.4.1 JAK/STAT	12
4.2.4.2. MAPK	13
4.2.4.3. SOCS	13
4.2.4.4. Fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI 3 kinaz)	13
4.2.4.5. Diğer yollar	14
4.2.5. Leptinin etki ettiği diğer fizyolojik olaylar	14

4.3. OKSİDATİF STRES	15
4.4. HİDROJEN PEROKSİT	19
5. GEREÇ VE YÖNTEM	21
5.1. GLİA HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN YAPILMASI	21
5.1.2. Kültür öncesinde yapılan hazırlıklar	21
5.1.3. Karışık glia hücrelerinin elde edilmesi	22
5.1.4. Hücrelerin yaşatılması ve tanımlanması	23
5.1.5. Hücrelerin sayılması ve 96 kuyucuklu kaplara ekilmesi	24
5.2. Deney grupları	25
5.3. MTT yöntemi	26
6. BULGULAR	27
6.1. Leptinin etkisi	28
6.2. H ₂ O ₂ 'nin etkisi	28
6.3. H ₂ O ₂ ve GSH'ın eş zamanlı uygulanmasının etkisi	29
6.4. Leptin ve H ₂ O ₂ 'nin birlikte uygulanmasının etkisi	30
6.5. GSH'ın etkisi	31

7. TARTIŞMA	33
8. SONUÇ	36
9. SİMGE ve KISALTMALAR	37
10. ŞEKİLLER DİZİNİ	39
11. TABLOLAR DİZİNİ	40
12. KAYNAKLAR DİZİNİ	41
13. ÖZGEÇMİŞ	47

1. ÖZET

Ob gen ürünü polipeptid yapılı leptin hormonunun bilinen en temel fonksiyonu, hipotalamus aracılığıyla besin alınımını baskılaması ve bedende enerji kullanımını arttırmasıdır. Leptin yapısından ve hücre içinde etkilediği yolaklardan dolayı sitokin olarak kabul edilmektedir. Leptin reseptörleri bir çok dokuda bulunmakla birlikte son yapılan çalışmalarda beyindeki glia hücrelerinin de leptin reseptörleri içerdiği ortaya konmuştur. Günümüzde leptinin sadece besin alınımına ve enerji kullanımına etki etmediği; bu etkilerin yanı sıra apoptosize karşı hücreleri koruduğu, inflamasyonda rol aldığı ve çeşitli hücre tiplerinin çoğalmasını uyardığına dair yapılmış bir çok çalışma bulunmaktadır. Ayrıca leptin uygulamasının farelerde ve insanlarda antioksidan savunma sistem elemanlarını arttırdığı gösterilmiştir. Ancak, leptin uygulamasının çeşitli hücre kültürlerinde oksidatif stres yarattığına dair var olan çalışmalar, leptinin antioksidan mı yoksa oksidan mı olduğu sorusunu gündeme getirmiştir.

Çalışmamızda, 1-3 günlük yavru sıçan beyin ön lobundan elde edilen glia hücrelerinin 24 saatlik kültürleri başlangıcında 1, 10, 100 ve 1000 ng/ml leptin uygulamasının hücre çoğalmasına etkisini araştırdık. Hücre çoğalmasını belirlemek için canlı hücre yoğunluğunu saptayan 3-(4,5-D-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, thiazolyl blue (MTT) yöntemi uygulandı.

Leptinin hidrojen peroksit (H_2O_2) toksisitesi üzerinde koruyucu etkisinin olup olmadığını belirlemek için öncelikle hücrelere 10 ile 1000 μM arası dozlarda 3 saat süreyle uygulandı. Hücrelerin yaklaşık % 75'ini öldüren H_2O_2 dozu 100 μM olarak belirlendi. Bu dozdaki H_2O_2 ile birlikte leptin veya koruyucu olduğu bilinen glutatyon (GSH) 100 ile 8000 μM arası dozlarda 3 saat uygulandı. 24 saat sonra MTT yöntemi kullanılarak hücre canlılığına bakıldı.

Glia hücre kültürüne 24 saat süreyle uygulanan leptin dozlarının hücre çoğalmasına olumlu ya da olumsuz bir etkisi olmamıştır. Aynı şekilde leptin 100 μM

H₂O₂'in neden olduğu toksisiteyi ortadan kaldırmamıştır. Fakat GSH 100 µM'dan itibaren H₂O₂'in neden olduğu toksisiteye karşı koruyucu etki göstermeye başlamış ve 500 ile 8000 µM arası GSH, H₂O₂'in neden olduğu toksisiteyi tamamen ortadan kaldırmıştır (p<0.001).

Anahtar Kelimeler: Leptin, Glia, Oksidatif Stres, Hidrojen peroksit, Antioksidan, Çoğalma

2. SUMMARY

The most known function of the ob gene product leptin, a polipeptide, is to inhibit food intake and increase energy expenditure via hypothalamus. Leptin is accepted as a cytokine because of its structure and the signaling pathways that leptin influences within the cell. Many human tissues have leptin receptors. Leptin receptors are also found in the brain. Currently, there are numerous studies indicating that leptin has involved in not only energy expenditure and food intake, but also in protection against apoptosis, in inflammation and in stimulation of proliferation in many cell types. Antioxidant defense system elements in human and mouse are increased with the treatment of leptin. On the other hand, leptin treatment increases the oxidative stress in many cell culture studies. This contradiction evoked a question of whether leptin acts as an oxidant or antioxidant on glial cells.

We investigated the effects of 1, 10, 100 and 1000 ng/ml leptin doses on proliferation of glial cells that were obtained from 1-3 day old rat brain frontal lobe. We used 3-(4,5-D-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, thiazolyl blue (MTT) method for the determination of cell proliferation.

Glial cells were firstly treated with 10-1000 μM H_2O_2 for 3 hours to determine whether leptin is an antioxidant or oxidant. The dose of H_2O_2 that kills 75 % of cells is found to be 100 μM . Combined with 100 μM H_2O_2 , leptin or well known antioxidant GSH at 100-800 μM were applied to the cells for three hours. After 24 hours, we determined the survival of the cells by using MTT method.

The treatment of glial cells with respective leptin doses for 24 hours did not show any negative or positive effect on cell proliferation. Leptin could not also eliminate the toxicity of H_2O_2 . However, GSH from 100 μM started to show protective effect against toxicity of H_2O_2 and the GSH doses between 500-8000 μM completely eliminated toxicity of H_2O_2 ($p < 0.001$).

Key words : Leptin, Glia, Oxidative stress, Hydrogene peroxide, Antioxidant, Proliferation



3. GİRİŞ VE AMAÇ

Ob geni ürünü olan, 146 amino asitli leptin, 1994 yılında bulunmuş bir hormondur. Esas olarak yağ hücrelerinden salınmakla beraber, son yıllarda iskelet kasından, mide fundus mukozasından ve plasentadan da salındığı ortaya konmuştur. Son çalışmalarda, beyinden de salındığına dair önemli bilgiler vardır (17). Bilinen en temel fonksiyonu, hipotalamus aracılığıyla besin alınımını azaltması ve enerji kullanımını arttırmasıdır (39). Leptinin bazı hücre tiplerinde hücre çoğalmasını uyardığı ortaya konmuştur. Yapılan bir in vivo çalışmada pankreatik beta hücrelerinin çoğalmasını uyardığı ve 1-5 nM dozunda apoptozisi engellediği bulunmuştur (35). Yine, kültürdeki sıçan aorta düz kas hücrelerinin çoğalmasını uyardığı gösterilmiştir (27). Hematopoetik hücrelerin de leptinin etki alanına girdiği bilinmektedir. Kültüre edilmiş periferik kan monosit hücrelerinde apoptozise karşı monositlerin yaşam sürelerini arttırdığı ortaya konmuştur (33). Ancak bu hormonun glia hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızın amaçlarından birisi, leptinin yavru sıçanlardan elde edilen karışık glia hücrelerinin çoğalması üzerine bir etkisinin olup olmadığını ortaya koymaktır.

Leptinin hücre çoğalması üzerindeki etkilerinin yanı sıra, antioksidan etkilere sahip olduğu konusunda da veriler vardır. Midede etanol ile oluşturulan ülser modelinde koruyucu olduğu ve antioksidan enzim düzeylerini yükselttiği gösterilmiştir (6). Obez sıçanlarda, zayıf sıçanlara göre düşük olan antioksidan enzim düzeyleri leptinle muamele sonucu normal düzeylerine dönmüştür (28). Yapılan bir diğer çalışmada, tümör nekrosiz faktör alfanın (TNF α) neden olduğu apoptotik hücre ölümüne karşı koruyucu etki göstermektedir (38). Bu bulgulara zıt olarak, sistemik leptin artışının oksidatif strese yol açtığı ve antioksidan sistemin zayıflamasında rolü olabileceği düşünülmektedir (2). İnsan göbek kordonu endotel hücrelerinde (HUVEC) leptin reaktif oksijen türlerini (ROS) arttırmıştır. Yine aynı çalışmada leptinin bu etkisinin bir antioksidan olan N-asetilsisteinle engellendiği görülmüştür

(4). Leptinin antioksidan mı yoksa bir oksidan mı olduğu konusunda çelişkili yayınlar bulunmaktadır.

Bilindiği gibi, merkezi sinir sisteminde yoğun olarak bulunan glia hücrelerinin görevlerinden biri de nöronları korumak ve onlara destek olmaktır. Glia hücrelerinin oksidatif strese karşı glutasyon sentezini arttırarak nöronları koruduğu görülmüştür (42).

Kültürdeki glia hücreleri H_2O_2 'e maruz bırakılınca, hücrelerde nekroz veya apoptosiz şeklinde ölüm olmaktadır. Diğer amacımız, sıçanlardan elde ettiğimiz karışık glia hücre kültüründe H_2O_2 ile oluşturacağımız strese karşı leptinin etkisini, koruyucu özelliği iyi bilinen GSH ile karşılaştırmaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. GLİA HÜCRELERİ

Merkezi sinir sisteminde nöronların etrafını saran ve onları destekleyen hücre grubuna glia denmektedir. Glia hücreleri şekil olarak nöronlardan küçüktür ama sayı olarak nöronların 5-10 katıdır. Tüm beyin hacminin yaklaşık yarısını oluşturmaktadır (32). Genel olarak glia hücrelerinin fonksiyonları aşağıdaki gibi özetlenebilir (19,41):

- a) Beyin dokusunu oluşturacak şekilde destek elemanı olarak görev yaparlar ve nöron gruplarını birbirinden ayırırlar.
- b) Miyelin kılıf oluşturarak aksonları izole ederler ve elektriksel uyarıların daha hızlı iletilmesini sağlarlar.
- c) Doku hasarı ve nöron ölümü sonrasında doku artıklarını uzaklaştırırlar.
- d) Hücre dışı alanda K^+ iyon fazlalığını tamponlar, sinaptik ileti sırasında nöronlar tarafından salınan kimyasal transmitterleri ortamdaki uzaklaştırırlar.
- e) Gelişim evresinde nöron göçüne ve akson büyümesine rehberlik ederler.
- f) Beyin kılcal damar ve endotel hücreleriyle yakın bağlantılar kurarak kan beyin engeli oluşumuna katkıda bulunurlar.
- g) Nöronların beslenmesine yardımcı olurlar.

Glia hücrelerinin 3 tipi bulunmaktadır. 1. Astrositler 2. Oligodendrositler 3. Mikroglia

Astrositler glia hücre grubunun sayıca en fazla ve fonksiyonca da en fazla olduğu sanılanıdır. Genel olarak yuvarlak çekirdekleri ve geniş, düzensiz sitoplazmaları olan, parlak görüntülü hücreler olarak tanımlanmışlardır (41). Günümüzde kabul edilen ayırt edici özellikleri, sitoplazmalarında glikojen taneciklerinin bulunması ve çekirdekleri çevresinde ve uzantılarında filament demetlerinin bulunmasıdır. Bu filamentler glial fibril asidik protein (GFAP) adı verilen maddeden oluşmaktadır. Astrositlerin hücre gövdeleri çeşitli şekillerde bulunabilmektedir. Astrositlerin çoğunlukla uzun uzantıları vardır. Nöronlar üzerinde uç-ayaklar oluştururlar. Kan beyin engeliyle bu uç ayaklar aracılığı ile temasta bulunarak nöronların beslenmesini sağlarlar (19). Hasarlı dokuda oluşan atıkları mikrogliya hücreleri ile birlikte uzaklaştırarak doku iyileşmesine yardımcı olurlar. Astrositler morfolojik özelliklerine göre iki grupta toplanmaktadır (19):

1. Fibröz astrositler (Tip I) : Beyaz cevherde yaygın olarak bulunurlar. Morfolojik yapıları düzensizdir, genelde bir veya birkaç uzantısı diğerlerinden kalındır.

2. Protoplazmik astrositler (Tip II) : Gri cevherde daha yaygın olarak bulunurlar. Nöronal aktiviteyle ilgili süreçlerde yer alırlar. Uyarıcı amino asit ve gama aminobütirik asit (GABA) gibi nörotransmitterler için geri alım mekanizmalarına sahiptir.

Oligodendrositler astrositlere göre daha az sayıda ve daha küçük uzantıları olan hücrelerdir. Bu hücreler elektriksel uyarıların iletimini arttıran miyelin kılıfı oluşturarak aksonu çevresinden izole ederler. Oligodendrositler santral sinir sisteminde, Schwann hücreleri periferik sinir sisteminde bulunan aksonların çevresinde miyelin kılıf oluştururlar. Oligodendrositlerin sitoplazmaları astrositlere göre daha yoğundur, çekirdekleri daha koyudur ve uzantıları astrositler gibi parlaktır (32).

Mikroglia, glia hücreleri içinde en küçük olan ve enfeksiyon, travma gibi hastalıklar sırasında mobilize olan makrofajlardan köken alan fagositik hücrelerdir. Fizyolojik ve embriyolojik olarak sinir sisteminin diğer hücreleri ile ilişkili değildir. Mikroglialara inaktif hücreler de denmektedir. Merkezi sinir sisteminin inflamasyonu ya da hasarı durumunda hasarlı bölgeye giderek aktif duruma geçerler (32).

4.2. LEPTİN HORMONU

4.2.1. Leptinin bulunuşu

1950 yılında aşırı yeme ve enerji kullanım azlığına bağlı olarak gelişen obeziteye genetik bir hasarın yol açtığı belirlendi. Obeziteye yol açan gene ob geni, bu gende mutasyon taşıyan farelere de ob/ob adı verildi (10). Bu mutasyon erken yaşlarda ciddi obezite, hiperfaji, diyabet ve enerji tüketiminde azalmaya neden oluyordu. Kennedy ve arkadaşları 1953 yılında yağ dokusundan salınan ve beden yağ dokusu depolarının durumunu beyine bildirerek enerji kullanımını ayarlayan bir faktörün var olduğunu öne sürdüler. Harvey 1958 yılında kobayların dolaşımında doygunluk veren bir faktörün varlığını gösterdi. 1990'lı yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda, ob/ob sıçanların doymasını sağlayan faktörlerden yoksun oldukları gösterildi. 1994 yılında da Rockefeller Üniversitesinden Jeffrey Friedman ve ekibi ob genini klonladılar. Gen ürünü olan moleküle Latince zayıf anlamına gelen leptos kelimesinden gelen leptin adını verdiler (39).

4.2.2. Leptin yapısı

Ob gen ürünü olan leptin 146 amino asitlidir. Esas olarak yağ hücrelerinden salınmakla beraber, son yıllarda iskelet kasından, mide fundus mukozasından ve hamilelik sırasında plasentadan da salındığı ortaya konmuştur. Son çalışmalarda, beyinden de salındığına dair önemli bilgiler vardır (17). Leptin mRNA'sına beyinde serebral korteks, serebellum, hipotalamus ve pineal bezde rastlanmıştır (24). Sıçanlarda 6 nolu kromozomda bulunan ob geni insanlarda 7.

kromozomun uzun kolunun 31. (7q31) bölgesindedir. Bu genin DNA'sı 15000 baz çifti içerir ve protein sentezini yöneten ana kodlama bölgelerini kapsayan 3 ekzon ve 2 introna sahiptir. Leptin kodlayan baz dizisi ikinci ve üçüncü ekzonlarda bulunmaktadır (39). İnsan ile sıçan leptini %84 benzerlik göstermektedir (17).

Leptinin yapısı ve fonksiyonu uzun zincirli sarmal sitokinlerin (interlökin=IL; IL-6, IL-11, IL-12, granülosit koloni uyarıcı faktör gibi) üyeleriyle benzerlik gösterdiğinden leptinin bir sitokin olduğu kabul edilmektedir (10). Leptin, beden yağ kitlesine orantılı olarak esas olarak beyaz yağ dokudan salgınır. Leptin üretim oranı doğrudan bedendeki yağ hücresi oranına bağlıdır (17). Serum leptin düzeyi zayıflara göre obezlerde daha yüksektir. Normal ağırlıklı bireylerde serum leptin düzeyi ortalama 7,5 ng/ml iken obezlerde 31.3 ng/ml'dir. Serum leptin düzeyi öğleden sonra düşük olup, gece yarısından sonra en yüksek değere ulaşır. Leptin salınımı çeşitli faktörlerle düzenlenmektedir. Obezite, insülin, TNF- α , glikokortikoidler ve beslenme ile leptin sentezi ve salınımı artmaktadır. Yemek sonrasında insülin leptin salınımını uyarırken, açlık durumunda insülin düzeyinin düşmesine bağlı olarak leptin düzeyinin düştüğü düşünülmektedir. Leptin sentezi akut enfeksiyonda, sepsiste ve inflamatuvar ajanlarca (TNF- α ve IL-1) da artmaktadır (39). Leptin dolaşımında serbest ya da bağlı bulunur. Dolaşımında leptini bağlayan proteinlerin görevinin leptini hedef hücrelere götürmek olduğu düşünülmektedir. Obezlerde dolaşımdaki leptinin büyük çoğunluğu serbest formda iken normal bireylerde bağlı durumdadır (10). Leptinin plazmadan uzaklaştırılmasında ve yıkılmasında böbrekler önemli rol oynamaktadır. Böbrekler tüm leptinin % 80'ini plazmadan uzaklaştırmaktadır. Leptinin yarılanma süresi yaklaşık 25 dakikadır (17).

4.2.3. Leptin reseptörleri (OB-R)

Leptin reseptörü, büyüme hormonu (GH), prolaktin (PRL), eritropoietin (EPO), IL-3 ve IL-12 gibi sınıf I sitokin reseptör ailesine dahil edilmektedir (22). Leptin reseptörlerinin insanda, farede ve sıçanda hipotalamus böbrek, akciğer, karaciğer, hematopoietik hücreler, gonadlarda ve glia hücrelerinde (16) bulunduğu

gösterilmiştir (37). Leptin reseptörünün altı değişik izoformu bulunmaktadır (Ob-Ra,b,c,d,e,f). Bunlar kendi içlerinde kısa ve uzun formu olmak üzere ayrılmaktadırlar. Bunlardan Ob-Rb uzun formu reseptör formuna girerken diğerleri kısa formu reseptör sınıfına girer (20).

Reseptörlerin hücre dışında kalan parçaları birbirinin aynısıdır. 32-38 amino asitlik sitoplazmik parçaya sahip olan Ob-Ra,c,d,f kısa formu reseptörlerdir. Ob-Ra yoğun olarak böbrek, akciğer, bağırsaklar, kalp, testis, koroid pleksus, beyin kılcal damarlar ve yağ dokuda bulunurken, düşük yoğunlukta karaciğer, iskelet kası ve pankreatik β hücrelerinde bulunur (15). Kan beyin engelini geçemeyecek kadar büyük bir molekül olan leptinin beyne koroid pleksusda yoğun olarak sentezlenen Ob-Ra aracılığıyla taşındığı düşünülmektedir (10,24). Ob-Rb, 302 amino asitlik yapısıyla en uzun sitoplazmik parçaya sahiptir. Ob-Rb hipotalamusta, serebellumda (24) ve pankreatik β hücrelerinde yoğun olarak ama dalak, kalp, koroid pleksus, meme epitel hücrelerinde (3) ve böbrekte ise düşük yoğunlukta bulunur. Ob-Re ise soluble form olarak adlandırılır. Fonksiyonu tam olarak bilinmese de dolaşımdaki leptini kendisine bağlayan ve hücre zarlarındaki reseptörlerine taşıyan protein olarak görev yaptığı düşünülmektedir (22).

Leptin reseptörlerinin damar endotel hücrelerinde (5) ve glia hücrelerinde (16) de bulunduğu gösterilmiştir. Uzun formu leptin reseptörünün leptin aracılı hücresel olaylarda rol aldığı fakat kısa formu reseptörün leptinin kan beyin engelini endositoz ile aşmasında görev aldığı gösterilmiştir (13).

Farelerden elde edilen uzun formu reseptörün 1142 amino asitli olduğu belirlenmiştir. Zarı kateden bir glikoprotein olup; 817 amino asiti hücre dışında, 21-23 amino asiti zar içinde ve 302 amino asiti sitoplazmada bulunmaktadır. Hücre dışındaki kısım Trp-Ser-X-Trp-Ser içerir (34). Sitoplazmik parça janus kinaz-transkripsiyon sinyal dönüştürücüsü ve aktive edicisi (JAK-STAT) ile ilişki içindedir. Bütün leptin reseptörlerinin sitoplazmik kısımlarında motif 1 bulunurken,

motif 2 sadece uzun formulu reseptörde bulunur. Motif 2 ye sahip olmayan reseptörlerin STAT'ları aktive etme yeteneği yoktur. Motif 1 ve 2'ye sahip olan Ob-Rb'ye leptin bağlandığında oluşan kompleks JAK ve STAT proteinlerini aktive ederler. Motif 2'nin özellikle hücrelerin çoğalmasında önemli olduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda Motif 2'nin JAK2 tirozin kinazı aktive ettiği gösterilmiştir. Aktive olan JAK tirozin kinaz , STAT 1,3,5'e fosfor bağlayarak aktive eder (13). Aktive olan STAT 3 hedef genlerini (c-fos, c-jun, SOCS-3 ve nöropeptidlerin salınmasından sorumlu genler) uyarır (36). Leptinin reseptörüne bağlandığında merkezi ve periferik dokularda JAK-STAT, mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) (12) ve sitokin haberleşmesini baskılayıcılar-3 (SOCS-3)'ün transkripsiyonunu arttırdığı gösterilmiştir (9).

4.2.4. Leptin tarafından düzenlenen iletişim yolları

4.2.4.1 JAK/STAT

JAK/STAT haberleşmesi, bir çok sitokin ve büyüme faktörlerinin çeşitli hücrel olaylarda etkisini ortaya çıkaran haberleşme sistemidir (34). Leptin hücre zarındaki reseptörüne bağlandığında hem reseptörde hem de reseptörle ilişkili JAK' larda şekil değişikliklerini başlatır. Reseptörün sitoplazmik kısmında bulunan tirozin bölgelerine fosfat bağlar ve STAT proteinleri için fosfotirozin bağlanma yerleri oluşur. Bu şekilde STAT molekülleri hem reseptöre hem de dimer oluşturmak üzere başka bir STAT proteinine bağlanır ve STAT'lar fosforlanır. Aktive olan STAT'lar dimerize olur ve çekirdeğe geçerek gen transkripsiyonunu arttırlar. Hipotalamusta bulunan uzun formulu reseptörlerin STAT 3,5,6'yı aktive ettiği, kısa formulu reseptörlerin STAT yolunu aktive edemedikleri gösterilmiştir (39).

4.2.4.2. MAPK

Damar içi leptin uygulamasının sıçan yağ ve böbrek dokusunda (34) pankreatik β hücrelerinde, sıçan aortik düz kas hücrelerinde (27) ve fare embryonik hücrelerde (37) MAPK fosforilasyonunu aktive ettiği ve hücre çoğalmasına yol açtığı gösterilmiştir.

4.2.4.3. SOCS

SOCS proteinleri sitokin uyarımlı haberleşmeleri baskılar. Leptin, büyüme hormonu, eritropoietin ve interlökin 6 gibi bir çok sitokin SOCS oluşumunu uyarır (34). Leptinin hipotalamusta SOCS-3 oluşumunu uyardığında, besin alınımını uyarıcı moleküllerin etkisini baskılayarak, besin alınımını azalttığı gösterilmiştir (1).

4.2.4.4. Fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI 3 kinaz)

Fosfatidilinozitol 3 kinaz, fosfatidilinozitolün inozitol halkalarının 3. pozisyonuna bir fosfat ekleyen ve bunun sonucunda lipid bağımlı sinyal yollarını uyarıcı bir kinazdır. Leptinin sıçan aortik düz kas hücrelerinde PI-3 kinazı aktive ettiği gösterilmiştir (27). PI-3 kinazın, hücre yaşamının devamında ve karbohidrat metabolizmasında rolü olan protein kinaz B ile hücre çoğalmasıyla daima ilişkili olduğu düşünülen protein kinaz C'nin aktive edilmesindeki rolü bilinmektedir. Hücre içi sinyal mekanizmalarında anahtar enzimlerden biri olan protein kinaz C' nin aktive olabilmesi için Ca^{++} iyonlarına ve diaçilgliserole (DAG) ihtiyaç vardır. Bir çok büyüme faktörü ve sitokin, hücre zarındaki reseptörüne bağlandıktan sonra G protein aracılığıyla fosfolipaz C' yi aktive eder ve aktive olan fosfolipaz C hücre zarında bulunan polifosinozitol molekülünü parçalayarak DAG ve inozitol trifosfat (IP3) oluşturur. IP3 uyarımlı endoplazmik retikulumdan salınan Ca^{++} iyonları ve DAG etkisiyle protein kinaz C aktive olur. Aktive olan protein kinaz C' nin hücre büyümesini ve hücre bölünmesini uyardığı gösterilmiştir (26). Primer glia kültüründe çeşitli nörotransmitter ve büyüme faktör uyarımlı protein kinaz C aktivitesinin

yüksek olduğu belirtilmiştir (31). Leptinin fibroblastlarda da protein kinaz C' yi uyardığı gösterilmiştir. (34).

4.2.4.5. Diğer yollar

Leptin aracılığıyla gerçekleşen diğer yollar hücreler arası haberleşmede önemli olan döngüsel adenozin monofosfat (cAMP) , nitrik oksit (NO) ve reaktif oksijen türleri (ROS) dir. Leptin pankreatik β hücrelerinde cAMP'yi düşürürken tam tersi sıçan hepatositlerinde cAMP düzeyini arttırmıştır (34). İnsan endotel hücrelerinde ve kültürü yapılmış astrositlerde de leptin NO sentezini arttırmıştır (23). Yine Wistar türü sıçanlara leptinin damar içi uygulamasının serum NO düzeyini arttırdığı gösterilmiştir (34). Leptinin insan plasenta toplar damar endotel hücrelerinde ROS'u arttırdığı belirtilmiştir (4).

4.2.5. Leptinin etki ettiği diğer fizyolojik olaylar

Leptin, hipotalamusta uzun formu reseptörü aracılığıyla SOCS-3 düzeyini arttırarak sitokin haberleşmesini baskılamaktadır. Leptinin bu etkisi sonucu iştah merkezini baskılayarak besin alınımı azalmaktadır (1). Leptinin ayrıca hipotalamusta yoğun olarak bulunan ve besin alınımını arttıran nöropeptid Y salınımını da inhibe ettiği gösterilmiştir (39).

Sitokin üretimini arttırdığı, monositleri ve T lenfositleri aktive ettiği, yara iyileşmesinde rol aldığı ve inflamasyon sırasında salınımı arttığından leptin bir proinflamator ajan olarak da kabul edilmektedir (33). Leptin geninden yoksun veya leptin reseptör mutantlı farelerde immun yetersizlik ve lenfoid organ atrofi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca leptinin Leishmania majör ve Candida parapsilopsise karşı makrofajların fagositik aktivitelerini arttırdığı da gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, IL-2 ve interferon γ üretimini arttırırken, IL-4 üretimini baskıladığından leptinin, T helper 1 ile T helper 2 arasında bir denge oluşturduğu

düşünülmektedir (10). Leptinin T helper 1 düzeyini arttırırken, T helper 2 düzeyini düşürdüğü de gösterilmiştir (17).

4.3. OKSİDATİF STRES

Oksidatif stresin protein, nükleik asit ve diğer hücresele molekülere verdiği hasarın oldukça önemli yaşamsal bir risk oluşturduğu günümüzde bilinmektedir. Lipid peroksidasyonunun da serbest radikallerden kaynaklanan bir mekanizma ile başladığı ve “pozitif feed back” ile serbest radikallerin artışına neden olan bir döngü sonucu oluştuğu gösterilmiştir. Serbest radikallerin tahrip edici özelliklerinin ortaya koyduğu tablo canlı için oksidatif stres oluşturmaktadır. Oksidatif stresle mücadelede antioksidanların görevinin çok önemli olduğu açıktır. Serbest oksijen radikal düzeyinin artması yaşam riski oluştururken , antioksidanlar yaşam kaynağı olarak görev yaparlar (8). Serbest oksijen radikalleri, enerjilerini oksijenli solunum ile elde eden canlılar tarafından hem fizyolojik hem de patolojik koşullarda üretilmektedir. Bu radikaller mitokondride elektron taşıma zinciri ile oksijenin indirgenmesi sırasında oluşur. Canlılar oluşan bu radikallerin zararlı etkilerine oldukça duyarlıdır. Serbest oksijen radikalleri DNA, karbohidrat ya da proteinler gibi makromoleküllere hasar verme yeteneğine sahiptir (18). Bir çok hastalık, radikal oluşturan ve radikalleri ortadan kaldıran sistemler arasındaki dengenin bozulması sonucu meydana gelmektedir. Dengenin radikal oluşumu yönüne kaymasına oksidatif stres adı verilir. Dış orbitallerinde eşlenmemiş elektron bulunan kısa ömürlü ve oksidatif strese yol açan reaktif atom ve moleküller serbest oksijen radikali (Tablo I) ; radikallerin reaksiyonlarını önlemeye çalışan maddeler ise antioksidan olarak tanımlanır. Uzun yıllar yüksek enerji fizikçileri ve radyasyon biyologlarının ilgi alanı olarak algılanan serbest radikallerin normal metabolizmaya ait ürünler oldukları çok daha sonraları anlaşılmıştır. Bugün radikallerin hücrede moleküler değişimlere ve gen mutasyonlarına yol açtığı öne sürülmekte, yaşlanma, hücresele ölüm ve doku yıkımında rol aldığı kabul edilmektedir (8).

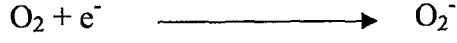
Tablo I : Sık karşılaşılan serbest radikaller.

Radikal adı	Simge	Tanımlanması
Hidrojen	H ⁺	Bilinen en basit radikal
Süperoksit	O ₂ ⁻	Oksijen metabolizması ilk ara ürünü
Hidroksil	OH ⁻	En toksik oksijen metaboliti radikali
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	Reaktivitesi çok düşük, hasar yeteneği az
Singlet oksijen	¹ O ₂ ⁻	Yarılma ömrü hızlı, güçlü bir oksidatif
Perhidroksi radikal	HO ₂	Lipidlerde hızla çözünerek peroksidasyonu artırır
Peroksil radikal	ROO ⁻	Lipidlere lokalize olur, etki yeteneği düşük
Triklorometil	CCl ₃	Karaciğerde üretilen CCl ₄ metabolizması ürünü
Nitrojen oksit	NO	L-arjininden in vivo üretilir
Nitrojen dioksit	NO ₂	NO'nın oksijenle reaksiyonundan üretilir

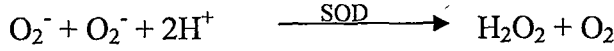
Canlılarda solunum zincirinde oksijenin bir elektron indirgenmesi sonucu, NADPH oksidaz enzimi veya ksantin oksidaz enzimleri aracılı sistemler aracılığıyla süperoksit radikali oluşmaktadır (8). Toplam oksijenin %1-2'sinin süperoksit radikaline dönüştüğü bilinmektedir. Süperoksit radikali H₂O₂'den daha toksiktir ve hızla yıkılması hücre için oldukça önemlidir. Süperoksit radikalının oluşumu diğer radikallerin oluşumuna öncülük etmektedir. Süperoksit radikalının yarılma ömrü çeşitli hücrel kompartmanlardaki süperoksit dismutaz (SOD) enziminin varlığına bağlıdır. Bu enzim ile süperoksit radikali H₂O₂'ye dönüşür.

OH⁻ radikali en reaktif serbest oksijen radikali ve bir hidrojen atomu verebilen her biyolojik makromolekül (lipid, protein, nükleik asit, karbohidrat) ile reaksiyona girerek daha kararlı bir radikale dönüşür (30). Oluşan bu ikinci radikaller de ikinci bir makromolekülle reaksiyona girerek bir zincir reaksiyonu oluşturur. Böylece makromoleküllerdeki hasar artmaktadır (7). Makromoleküller arasında en duyarlı hedef uzun zincirli doymamış yağ asitlerdir. Uzun zincirli doymamış yağ asitlerinden bir hidrojenin ayrılması lipid peroksidasyonunu başlatmaktadır (18).

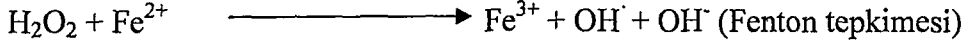
Solunum sonucu oksijenin indirgenmesiyle süperoksit radikali oluşur.



Süperoksit pH: 7.2'de daha kararlı bir metabolit olan H_2O_2 'ye dönüşür.



H_2O_2 demir iyonları katalizörlüğünde en reaktif tür olan hidroksile dönüşür.



Süperoksit Cu^{2+} gibi geçiş metalleri ve radikal türleriyle kolay reaksiyona girer ve hidroksil radikalini oluşturur.



Serbest oksijen radikalleri canlılarda bağışıklık sisteminin bir parçası olarak da üretilmektedir. Nötrofil ve makrofaj gibi fagositik hücreler süperoksit ve NO radikali oluşturarak yabancı canlılara karşı kendilerini savunmaktadırlar. Bu iki bileşik peroksinitrit (ONOO^-) radikali oluşturmak üzere birleşebilirler. Peroksinitritin de lipid peroksidasyonunu başlatma yeteneği bulunmaktadır (18). Memeli hücreleri serbest oksijen radikallerini yok etmek için savunma mekanizmalarına sahiptir. Radikal ürünlerini ve reaksiyonlarını baskılayan bu savunma sistemi, radikallerle reaksiyona girerek otooksidasyon ve peroksidasyonun ilerlemesini önleyen antioksidan savunma elemanlarına sahiptir. Oluşan radikallerin biyomoleküller ve hücresel yapılara saldırmasının önlenmesi antioksidan savunma elemanlarının görevidir (7). Antioksidan savunma sisteminin temel görevleri radikal metabolit üretiminin engellemek, üretilmiş radikalleri temizlemek (8), hücre ve doku hasarını onarmak, sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarını durdurmak ve endojen antioksidan kapasiteyi arttırmaktır (7).

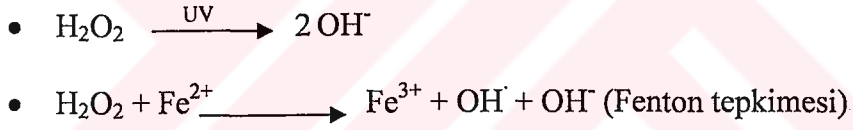
Antioksidan savunma elemanları enzimsel olup olmamalarına göre sınıflandırılmaktadır. Katalaz, SOD, glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimler enzimatik antioksidan savunma elemanları sınıfına girerken; tokoferol, askorbat, GSH, ürik asit gibi antioksidanlar da enzimsel olmayan antioksidanlar sınıfına girerler (21). Canlılarda bulunan serbest oksijen radikallerini yok etme mekanizmalarından ilki süperoksit anyonunun SOD ile $H_2O_2 + O_2$ 'ye dönüştürülmesi ve ardından H_2O_2 'nin GPx ile $2H_2O$ 'ya ya da katalaz ile $O_2 + H_2O$ 'ye çevrilmesidir. Reaksiyon GPx ile katalizlendiğinden substrat için GSH'a ihtiyaç vardır. GSH üç amino asitten (Glisin-Sistein-Glutamik asit) sentezlenen tiol içeren bir tripeptiddir (18). Enzimatik olmayan antioksidan elemanlardan feritin, transferin, laktoferin gibi depo ve taşıyıcı proteinler ile demir iyonlarının bağlanması sonucunda demir düzeyinin düşmesi ile de süperoksit radikalının oluşumu azaltılabilir. E vitamini de radikalleri yakalayarak zincir reaksiyonlarının oluşumunu engellemektedir (8). Tablo II'de önemli antioksidan savunma elemanları ve görevleri özetlenmiştir (8).

Tablo II : Antioksidan savunma elemanları.

Antioksidan	Yerleşme	Etki
Süperoksit dismutaz	Hücre içi	Süperoksitin giderilmesinde katalizör
Katalaz	Hücre içi	H_2O_2 'nin giderilmesinde katalizör
Glutatyon peroksidaz	Hücre içi	H_2O_2 'nin giderilmesinde katalizör
E vitamini	Hücre zarı	Zar lipid peroksidasyon zincirini kırar
β Karoten	Hücre zarı	Radikalleri toplar, 1O_2 oluşumunu engeller
Laktoferin	Hücre dışı	Düşük pH'da demir iyonunu bağlar
Albumin	Hücre dışı	HOCl radikalini toplar, bakır iyonunu bağlar
Ürik asit	Hücre dışı	Metal bağlayıcı olarak görev alır.
Bilirubin	Hücre dışı	Önemli bir radikal toplayıcısıdır.
Transferin	Hücre dışı	Demiri bağlayarak fenton reaksiyonunu durdurur
Askorbik asit	Hücre dışı	Hidroksil radikal toplayıcı vitamin

4.4. HİDROJEN PEROKSİT

H₂O₂ suda çözünen ve hücre zarlarından kolaylıkla geçebilen bir moleküldür. H₂O₂ serbest bir radikal olmamasına karşın reaktif oksijen türlerine dahil edilmektedir. Çünkü reaktif oksijen türleri tanımı sadece serbest oksijen radikalleri değil oksijen radikal üretiminde yer alan oksijen türevlerini de içerir (8). Kimyasal olarak da H₂O₂ güçlü bir oksidan değildir. Biyolojik moleküllerle kolaylıkla reaksiyona giremez. H₂O₂'nin tehlikesi onun hızlı bir şekilde güçlü bir oksidan olan OH⁻ radikaline dönüşmesinden kaynaklanmaktadır. H₂O₂ ultraviyole ışınları yada metal iyonları aracılığıyla OH⁻ radikaline dönüşmektedir (18).



Yapılan çalışmalarda yüksek konsantrasyondaki H₂O₂ hücrelerde sitotoksik etkiye sahiptir. H₂O₂'nin sitotoksik dozları genellikle 50 µM'ın üzerindedir (18). H₂O₂'nin yarattığı sitotoksik etki sonucunda hücreler nekroza ya da apoptoza uğrar. Hücrelerde nekroz lipid, nükleik asit ve proteinlerin yıkımı sonucu olurken (7,21); apoptozde H₂O₂ hücre içi sinyal molekülü gibi davranarak hücreyi ölüme götürür (11).

10-1000 μM H_2O_2 dozlarının yarattığı toksisiteye karşı astrositlerin nöronları koruduğu gösterilmiştir (14). H_2O_2 genel olarak üç mekanizmayla indirgenmektedir (18) :

1. Katalaz ve glutatyon peroksidaz ile H_2O ve O_2 'ye indirgenir (30)
2. H_2O_2 'nin nötrofillerde miyeloperoksidaz enzimi ile hipoklorik asite (HOCl) dönüştürülür. HOCl fagositik hücrelerde bakterisit etkisi olan güçlü bir oksidandır. HOCl ve H_2O_2 reaksiyona girerek singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) ve su oluşur (18,30).
3. H_2O_2 demirin katalizlediği spontan bir reaksiyon ile (Fenton reaksiyonu) güçlü bir radikal olan hidroksi (OH^\cdot) radikaline dönüşür (18).

Yaşa bağlı olarak antioksidan savunma sisteminin zayıflaması ve oksidatif stresin artmasından dolayı özellikle beyinde tamiri zor haraplanmaların ve hastalıkların oluştuğu düşünülmektedir. Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS), Alzheimer, Parkinson ve Huntington oksidatif stresten dolayı oluştuğu düşünülen hastalıklardandır (21).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. GLİA HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN YAPILMASI

Merkezi sinir sisteminde yoğun olarak bulunan glia hücrelerinin in vivo koşullarda çalışılması nöronlara göre çok daha zordur. Nöronlar için kullanılan elektrofizyolojik tekniklerin, lezyon çalışmalarının glia hücrelerine uygulanamaması araştırmacıları in vitro çalışmalara yönlendirmiş ve gliadan zengin hücre kültürü ortamları geliştirme yoluna itmiştir. 1980'li yıllarda glia hücre kültürlerinin saflaştırılması başarılabilmiştir. Karışık primer glia kültürü (astrozit, oligodendrosit ve mikroglıadan oluşan karışım) yeni doğan sıçan beyninden elde edilmiştir. Daha sonra geliştirilen yöntemlerle de astrozit ya da oligodendrositlerden oluşan saf glia kültürleri elde edilmiştir (41).

5.1.2. Kültür öncesinde yapılan hazırlıklar

Otoklavda (120 °C, 2 saat) steril edilmiş cerrahi malzeme, petri kapları (60 ve 35 mm), santrifüj tüpleri (10, 15 ml), besiyeri (37 °C lik su banyosunda bekletilen, 2 hayvan için filtre edilmiş 50ml), besiyeri koymak için şişe (100ml), pipetler (1, 5, 10 ml ve pastör pipeti), 37 °C'ye getirilmiş %25 Tripsin, % 1 penisilin-streptomisin karışımı, gazlı bez, enjektör, % 80 lik etanol ve buz kabı hazırlandı.

50 ml besiyerinin hazırlanması

Steril bir şişeye 5 ml % 10 fetal dana serumu (FCS, Sigma) ve 45 ml Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Sigma) kondu. Filtre edilerek başka bir steril şişeye aktarıldı.

5.1.3. Karışık glia hücrelerinin elde edilmesi

Çalışmada yeni doğan Sprague Dawley sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Hayvan Üretim ve Bakım Biriminden temin edildi. 1-3 günlük sıçanların baş kısımları % 80 lik alkolle temizlendi ve makas yardımıyla kesildi. Başlar buz kabının üzerinde ve içinde besiyeri bulunmayan petri içine aktarıldı. İki adet ince uçlu penset yardımıyla baş derisi çıkardıktan sonra kafatası penset yardımıyla ayrıldı. Beyin bütün olarak yine buz kabının üzerindeki DMEM + penisilin-streptomisinli besiyeri bulunduran petri kabına aktarıldı. Beyinlerin ön lobları besiyeri içinde ayrılıp, başka bir petriye aktarıldıktan sonra üzerine steril DMEM eklendi. DMEM içinde kan damarları ve zarlar temizlendikten sonra, dokular bir makas ya da iki ince uçlu penset yardımıyla ufak parçalara mümkün olduğunca ayrıldı. Ayrılan parçalar pastör pipeti ile 15 ml'lik santrifüj tüpü içerisine kondu. Santrifüj tüpü içinde yaklaşık olarak 2.5 ml'lik besiyeri bulunmalıdır. Pastör pipeti ile dokular 2-3 kez çekilip, bırakıldı. Üzerine yaklaşık 5.5 ml oluncaya kadar DMEM eklendikten sonra 25-30 kez tekrar pastör pipeti ile homojenizasyona devam edildi. Tüpün içine 5 ml için 0.5 ml % 0.25 tripsin eklendi. Santrifüj tüpü tripsinin etkisini gösterebilmesi için 37 °C'de 10 dakika su banyosunda bekletildi. 10 dakika sonra tripsin etkisini yok etmek için daha önceden su banyosunda bekletilen besiyerinden 3-4 ml kondu. Tüpler 1200 devir/dk, 4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra yeni bir pastör pipeti ile üst kısımda kalan sıvı uzaklaştırıldı. Üzerine 37 °C'ye getirilmiş besiyerinden 3 ml konduktan sonra pastör pipeti ile birbirine yapışan hücrelerin ayrışması için 25-30 kere homojenize edildi. Hücreler petri içerisinde 20-25 gün boyunca DMEM + F-12 (1:1 oranında) , % 1 penisilin+streptomisin ve %10 FCS içeren besiyeri içerisinde % 5 CO₂, 37 C⁰ ve % 100 nem içeren inkübatörde çoğaltıldı. Hücreler % 85-90 oranında petri tabanını kaplayınca tripsin kullanılarak 75 cm² flasklara aktarıldı. Flasklardaki hücreler, besiyerleri 3 günde bir değiştirilerek % 85-90 oranında flask tabanını kaplayacak şekilde çoğaltıldı ve deneye alındı.

5.1.4. Hücrelerin yaşatılması ve tanımlanması.

İnkübatörde bulunan petri kapları ilk 2 gün hariç (yerinden oynatmamak amacıyla) her gün inverted mikroskop (Olympus) ile kontrol edilerek hücrelerin büyümeleri gözlemlendi. Besiyerleri 2-3 günde bir yenilendi. 10-15 gün sonra ekilen hücrelerin glia hücreleri olup olmadıklarını GFAP antikoru (Sigma) kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyama ile belirlendi.

Boyama için gerekli malzemeler ve boyama.

Primer antikor : Tavşan anti-glial fibril asidik proteini (GFAP antikoru).

Sekonder antikor : Keçi anti-tavşan IgG.

Peroksidaz solüsyonu.

Asetat tamponu (2,5 mol/L , pH=5.0).

AEC Kromojen : N-dimetilformamid içinde 3-amino-9 ethylcarbozole (AEC).

%3'lük H₂O₂.

Bloklayıcı serum : Normal keçi serumu.

Saf soğuk etanol, Tris solüsyonu, deiyonize su ve hematoksilin.

Ekilen hücrelerin glia olduğunu belirlemek amacıyla üzerinde hücrelerin büyüyeceği lameller ve besiyeri bulunduran iki petri ayrıldı. Ayrılan bu petrileredeki hücreler saf soğuk etanol ile yıkanarak sabitlendi. Sabitlenen hücreler daha sonra 2 damla 10 dakika %3'lük H₂O₂ ile muamele edildi. Tris solüsyonu ile yıkanarak bloklayıcı serumla 10 dakika inkübe edildikten sonra lamel yüzeyini kaplayacak şekilde GFAP antikoru eklendi. Oda sıcaklığında 1 saat inkübasyondan sonra hücreler tekrar tris ile yıkanarak üzerine 2 damla sekonder antikor eklendi. 20 dakika inkübasyondan sonra tekrar Tris solüsyonu ile yıkanarak 20 dakika 2 damla peroksidaz ile inkübe edildi. Tris ile yıkanan lamel için şu karışım hazırlandı:

4 ml deiyonize su,
2 damla asetat tamponu,
1 damla %3'lük H₂O₂,
1 damla AEC kromojeni.

Bu karışım hücreler üzerine döküldükten sonra 10 dakika inkübe edildi ve 5 dakika deiyonize su ile yıkandı. Yıkamadan sonra hücreler hematoksilinle 10 saniye boyandı. Çeşme suyu ile yıkandıktan sonra inverted mikroskopta inceleme yapıldı. İnceleme sonucu kırmızı-kahverengi renkte görülen hücreler pozitif olarak değerlendirildi.

5.1.5. Hücrelerin sayılması ve 96 kuyucuklu kaplara ekilmesi :

75 cm²'lik flaskların tabanını kaplayan hücrelerin besiyeri pipet yardımıyla çekildi ve atıldı. Daha sonra flasklar Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma) ile yıkanarak flaskta kalan proteinler uzaklaştırıldı. Flasklarda üretilen hücreler 15 dakika % 25 tripsin ile yıkanarak tabandan uzaklaştırıldı ve 4 C⁰ de 1200 devir/dk da 5 dakika döndürüldü. İşlem sonrasında üstte kalan sıvı kısım atıldı ve altta kalan hücre çözeltilisinden bir damla pipet yardımı ile alınarak Coulter marka hücre sayım aletinde sayılarak 1 ml'de bulunan hücre sayısı belirlendi. Her bir kuyucuğa 2x10⁴ hücre gelecek şekilde 96 kuyucuklu kaplara ekildi. 24 saat kuluçka süresinin ardından hücreler deneye alındı.

Leptin, H₂O₂ ve glutatyon dozlarının hazırlanması :

Kullandığımız bütün çözeltiler her deneyden önce taze olarak hazırlandı. Toz halinde bulunan sıçan leptini (Sigma), fosfat tamponu (PBS,Sigma) içinde çözüldü. Hazırlanan depo çözeltiler seyreltilerek leptinin 1, 10, 100 veya 1000 ng/ml dozları elde edildi. % 30'luk H₂O₂ çözeltilisinden de DMEM kullanarak 10 ile 1000 µM arası dozlar hazırlandı. Glutatyon, DMEM içinde çözülerek 10 mM'lık depo

çözeltiler elde edildi. Daha sonra 1/10 oranında DMEM ile seyreltilerek 100-8000 μM arası dozlarda glutasyon elde edildi.

5.2. DENEY GRUPLARI

1. Kontrol grubu: Sadece besiyeri uygulandı. (n=24)
2. Leptin grubu: 1, 10, 100 veya 1000 ng/ml leptin dozları 24 saat uygulandı. (n=24)
3. H_2O_2 grubu: 10 ile 1000 μM arası dozlarında 3 saat uygulandı. (n=24)
4. H_2O_2 + glutasyon grubu: 100 μM H_2O_2 ile birlikte 100-8000 μM arası dozlarda GSH 3 saat uygulandı. (n=24)
5. H_2O_2 + leptin grubu: 100 μM H_2O_2 ile birlikte 1, 10, 100 veya 1000 ng/ml leptin 3 saat uygulandı. (n=24)
6. Glutasyon grubu: 100 ile 8000 μM arası dozlarda GSH 3 saat uygulandı. (n=24)

Öncelikle H_2O_2 'nin hücrelerde yaklaşık % 75 öldürücü dozu belirlendi. Bunun için hücrelerimize 10 ile 1000 μM arası dozlarında H_2O_2 3 saat uygulandı ve % 75 lik öldürücü dozu 100 μM olarak bulundu. Daha sonra leptinin koruyucu etkisi olup olmadığını anlamak için 100 μM H_2O_2 ile birlikte 1, 10, 100 veya 1000 ng/ml leptin eş zamanlı olarak 3 saat uygulandı. Aynı şekilde GSH'ın koruyucu etkisi olup olmadığını görmek için de 100 μM H_2O_2 ile birlikte 100-8000 μM arası dozlarda glutasyon 3 saat uygulandı. 3 saatin sonunda ilaçlar ortamdan uzaklaştırılarak yerine besiyeri eklendi. Tekrar 24 saat inkübasyondan sonra MTT spektrofotometrik yöntemi ile hücre yaşam oranı belirlendi.

5.3. MTT YÖNTEMİ

İlaçların hücreler üzerindeki sitotoksitesi Mossmann tarafından tanımlanan ve Alley tarafından geliştirilen MTT (Sigma) spektrofotometrik yöntemi ile belirlendi (25). MTT, PBS içinde çözünerek hazırlandı ve filtre edildi. Her 250 µl besiyeri için 25 µl MTT çözeltisi eklenerek 37 °C'de 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından her bir kuyucuktaki besiyeri çekilerek 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi. Kaplar 5–8 dakika çalkalanarak beklendi. 550 nm'de oluşan formazan boya absorbansı spektrofotometrede (Bio Tek) okundu. Canlı hücrelerin mitokondrisinde oluşan ve MTT ürünü olan formazan yaşayan hücre sayısı ile korelasyon gösterdiğinden, ilaç verilen kuyucuklarda okunan optik yoğunluk kontrole göre yaşayan hücrelerin yüzdesine çevrildi. Bu işlem için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\frac{\text{Her bir kuyucuktaki ilaç verilen hücre absorbansı} \times 100}{\text{Kontrol hücrelerinin ortalama absorbansı}}$$

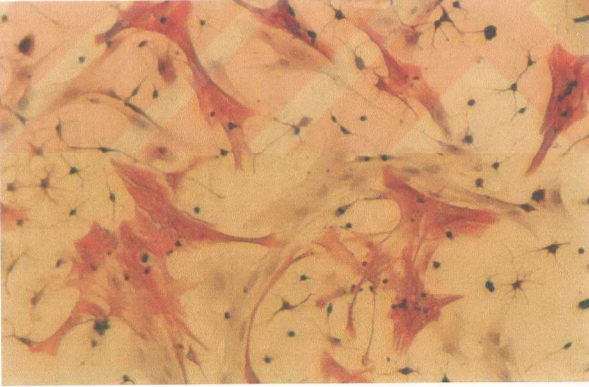
Elde edilen veriler kontrolün ortalama % fraksiyonu \pm standart hata şeklinde ifade edildi. İstatistiksel değerlendirme tek yönlü varyans analizi ve ardından Tukey'in çok yönlü karşılaştırma testi ile gerçekleştirildi.

6. BULGULAR

Kültürdeki glia hücrelerinin genel (şekil 1) ve GFAP pozitif (şekil 2) görüntüleri.



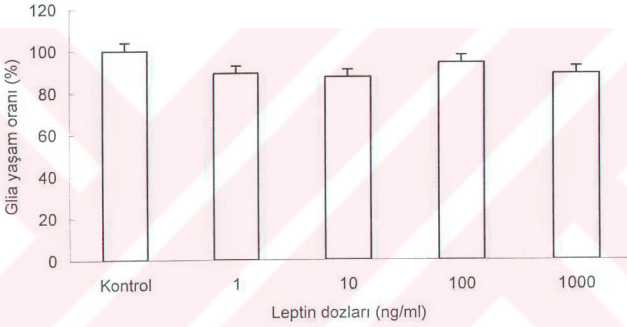
Şekil 1 : Glia hücrelerinin genel görüntüsü (200X).



Şekil 2 : GFAP (+) sıçan glia hücreleri (200X).

6.1. Leptinin etkisi :

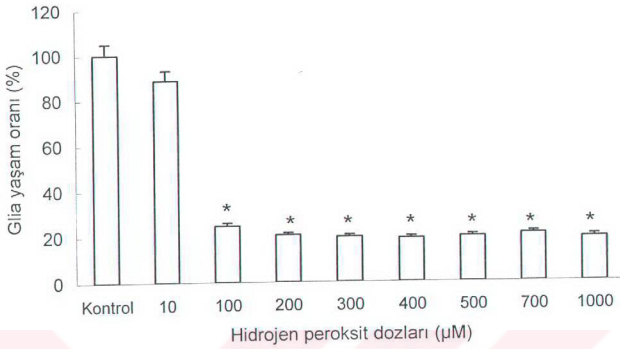
Tek başına 1, 10, 100 veya 1000 ng/ ml dozlarında uygulanan leptin, glia hücre yaşam oranında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya koyamadı. Kullandığımız dozlardaki leptin glia hücre çoğalmasını 24 saat içinde etkilememektedir (Şekil 3).



Şekil 3: Dört farklı dozdaki leptinin glia hücre çoğalması üzerine etkisi.

6.2. H₂O₂'nin etkisi ::

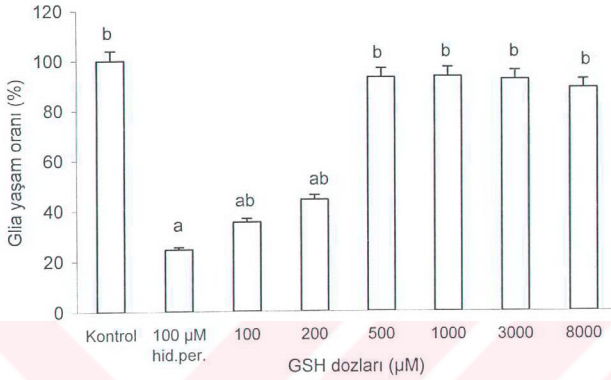
Tek başına uygulanan 10, 100, 200, 300, 400, 500, 700 ve 1000 μ M dozlardaki H₂O₂ glia hücre yaşam oranını sırasıyla % 11, 75, 79, 80, 81, 80, 79, ve 81 azalttı. 10 μ M dışındaki diğer H₂O₂ dozları kontrol ile kıyaslandığında aralarında anlamlı farklılıklar vardı ($p < 0.001$, Şekil 4). Sonraki deneylerde ortalama % 75 ölüme neden olan 100 μ M H₂O₂ dozu kullanıldı.



Şekil 4: Primer glia hücrelerine H₂O₂'nin doz bağımlı toksik etkisi. (*: p<0.001).

6.3. H₂O₂ ve GSH'in eş zamanlı uygulanmasının etkisi :

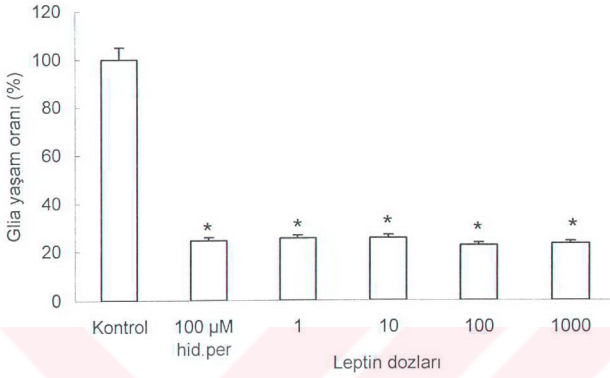
Karışık primer glia hücreleri 3 saat boyunca 100 µM H₂O₂ ile eş zamanlı olarak farklı GSH dozları ile birlikte uygulandı. GSH koruyucu etkisi iyi bilinen bir madde olduğu için seçildi. GSH 100 µM'dan itibaren koruyucu etki göstermeye başladı ve 500 ile 8000 µM arası GSH, H₂O₂'in neden olduğu toksisiteyi ortadan kaldırdı. 100 ve 200 µM GSH grupları hem H₂O₂ grubuna (p<0.05), hem de kontrole göre anlamlı farklılık gösterirken (p<0.001), diğer GSH grupları sadece H₂O₂ grubuna göre farklı idi (p<0.001, Şekil 5).



Şekil 5: 100 µM H₂O₂ ile birlikte uygulanan 100-8000 µM dozlarındaki GSH'nin glia hücre yaşamına etkisi. a: kontrole göre, b: 100 µM H₂O₂ grubuna göre anlamlı.

6.4. Leptin ve H₂O₂'nin birlikte uygulanmasının etkisi :

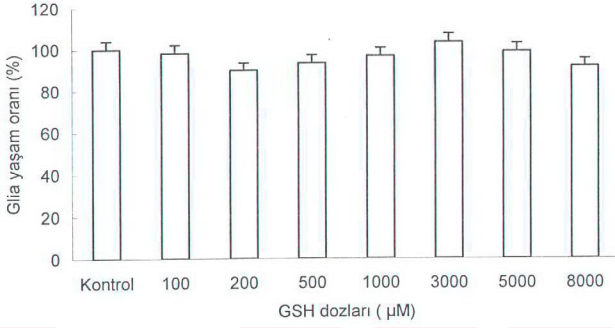
100 µM H₂O₂ ile birlikte 3 saat boyunca uygulanan leptin, kullanılan dört dozda da glia yaşam oranı üzerinde herhangi bir değişime neden olmadı. Leptin gruplarından elde edilen veriler, kontrol grubuna göre farklı iken ($p < 0.001$), H₂O₂ grubu ile anlamlı bir farklılık göstermiyordu ($p > 0.05$, Şekil 6).



Şekil 6: Toplam 3 saat 100 µM H₂O₂ ile birlikte uygulanan leptin dozlarının glia hücre yaşam oranı üzerindeki etkisi. *: kontrole göre anlamlı (p<0.001).

6.5. GSH'in etkisi :

Tek başına 100, 200,500, 1000, 3000, 5000, 8000 µM dozlarında uygulanan GSH, glia hücre yaşam oranında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya koymadı. Kullandığımız dozlardaki glutatyon glia hücre çoğalmasını 24 saat içinde etkilememektedir (p>0.05, Şekil 7).



Şekil 7: Farklı dozlardaki GSH'ın glia hücre çoğalması üzerine etkisi.

7. TARTIŞMA

Yaptığımız çalışmada tek başına 1, 10, 100 veya 1000 ng/ ml dozlarında uygulanan leptin glia hücre yaşam oranında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya koyamadı. Kullandığımız dozlardaki leptin glia hücre çoğalmasını 24 saat içinde etkilememektedir. Glia hücrelerinde yapılan bir çalışmada glia hücrelerinin hücre döngüsü 20,5 saat olarak bildirilmiştir (43). İlginç olarak, pankreas hücrelerinde 24 saat süreyle 1 ve 5 nM dozlarında uygulanan leptin bu hücrelerde mitotik etki göstermiştir (36). Leptin diğer hücre tiplerinde de hücre çoğalmasını uyarıcı etki göstermektedir. 0,1-1 nM leptin serumdan yoksun periferik kan mononükleer hücre kültüründe PI3 Kinaz ve p42/44 MAPK sinyal yolağını aktive ederek hücrelerin yaşam oranlarını artırmış ve çoğaltıcı etki göstermiştir. Yine 4 gün boyunca uygulanan 0,1-1 nM leptinin uyarı olmadığında programlanmış hücre ölümüne yani apoptoza giden periferik kan mononükleer hücrelerinin apoptoza uğramasını engellemiş, hücre sayısında % 80 koruma sağlamıştır. Leptin uygulanmayan kontrol grubunda ise bu oran % 30 larda kalmıştır (33). Yapılan bir in vivo çalışmada da leptinin pankreatik beta hücrelerinin çoğalmasını uyardığı ve 1-5 nM dozunda MAPK ve JAK-STAT aktivasyonu ile apoptozisi engellediği bulunurken, bu etki leptinin 75 nM dozunda gözlenmemiştir (36). 15-100 ng/ml dozlarındaki leptin, kültürdeki sıçan aort düz kas hücrelerinin çoğalmasını MAPK ve PI3 Kinaz aktivasyonu aracılığıyla uyardığı gösterilmiştir. Bu etki 100 ng/ml de maksimuma ulaşmıştır (27). Yapılan bir diğer çalışmada, leptin TNF α 'nın neden olduğu apoptotik hücre ölümüne karşı koruyucu etki göstermektedir (38). Kültür ortamındaki fare embriyonik hücrelerine (C3H10T1/2) 3 gün boyunca uygulanan 100 ng/ml leptinin hücre sayısını MAPK aracılığıyla kontrol grubuna göre 2,5 katına çıkardığı gösterilmiştir (37). 10 nM leptin faktör bağımlı hematopoietik hücre kültüründe (BaF3 hücreleri) (12), 1-5 nM leptin pankreatik β hücre dizisinde (MIN6) (35) ve 10 nM leptin sıçan preadiposit hücrelerinde hücre çoğalmasına yol açarken, leptinin yüksek dozları (1,5 ve 5M) fare meme epitel hücre kültüründe (HC11) (3) hücre çoğalmasını inhibe etmiştir. Hematopoietik hücrelerin de leptinin etki alanına girdiği bilinmektedir. Kültüre edilmiş periferik kan monosit hücrelerinde apoptoza

karşı monositlerin yaşam sürelerini arttırdığı ortaya konmuştur (33). Ob/ob farelerde beyin gelişiminde görülen anormallikler, leptinin normal nöronal ve glial olgunlaşmada ve gelişimde rol aldığını düşündürmektedir (10). Ancak leptinin glia hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Leptinin bizim glia hücrelerinde mitotik etki göstermemesinin nedeni ya uyguladığımız dozun az gelmesi veya uygulanan sürenin kısa olmasından ya da beynin ön lobunda leptin reseptörünün olmamasından kaynaklanıyor olabilir.

Toksisite deneylerinde ortalama % 75 ölüme neden olan 100 μM H_2O_2 dozu kullanıldı. Sıçan primer glia hücrelerinde pozitif kontrol amacıyla kullandığımız GSH, 100 μM H_2O_2 ile oluşturduğumuz % 75'lik hücre ölümünü 500 μM 'dan sonra tamamen geriye döndürürken, kullandığımız dozlardaki leptin ne olumlu ne de olumsuz herhangi bir etki oluşturmamıştır. Bir çalışmada, 7.5 ve 10 $\mu\text{g/ml}$ dozlarındaki leptin 6 saatte sıçan astrosit primer kültürlerinde nitrik oksit üretimini arttırmıştır (23).

Merkezi sinir sisteminde oksidatif strese bağlı olarak oluştuğu düşünülen Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS), Alzheimer, Parkinson, Huntington gibi hastalıklar dikkatleri nöron ve glia hücreleri üzerine yapılan çalışmalar çekmiştir (21). Bir çok hastalık bedende ya da hücrede oluşan serbest oksijen radikalleri ve radikalleri ortadan kaldıran sistemler arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanmaktadır. Beyinde de yaşa bağlı olarak antioksidan savunma sisteminin zayıflaması ve oksidatif stresin artmasından dolayı tamiri zor haraplanmalar ve hastalıklar oluşmaktadır (18). Glia hücreleri merkezi sinir sisteminde oksidatif strese karşı glutatyon sentezini artırarak nöronları korumaktadır (42). Yapılan çalışmalarda H_2O_2 'nin sitotoksik dozları genellikle 50 μM 'ın üzerinde olduğu gösterilmiştir (18). Leptinin çeşitli etkilerinin yanı sıra antioksidan etkilere sahip olduğu konusundaki veriler çelişkili olup leptinin antioksidan mı yoksa oksidan mı olduğu konusunda kesin bir karara varılamamıştır. Etanol uyarımlı ülser modelinde leptinin midede koruyucu olduğu ve antioksidan enzim düzeylerini yükselttiği gösterilmiştir (6). Ob/ob farelerde ve obez insanlarda yapılan çalışmalarda plazma ve çeşitli

dokulardaki antioksidan savunma sistem elemanlarının düzeyinin düşük olduğu gösterilmiştir. (29). Benzer bir çalışmada ob/ob farelere ve normal farelere leptin uygulamasının, normale göre ob/ob farelerde gözlenen % 26 glutatyon peroksidaz ve % 11 katalaz enzim düzeyi düşüklüğünü normal farelerdeki düzeyine çıkartmıştır. Ancak normal farelerde herhangi bir etkisi olmamıştır (40). Sistemik leptin artışı oksidatif strese yol açmakta; antioksidan sistemi zayıflatmaktadır (2). HUVEC hücrelerinde de leptin ROS'u arttırmıştır (4). Dört haftalık sağlıklı farelere 45 gün boyunca etanol uygulaması sonucu farelerde sistemik ve doku lipid peroksidasyonu artmıştır. Ayrıca katalaz, SOD, GSH, GPx enzimleri aktivitesi azalmıştır. 30. günden itibaren uygulanmaya başlayan leptin var olan stresi NO sentezini uyararak arttırış ve antioksidan sistemi zayıflatmıştır. NO kolaylıkla oksijen ile reaksiyona girerek NO₂, N₂O₃ gibi aktif nitrojen oksitlerine dönüşebilmektedir (2).

Glia hücrelerinde GSH, 100 µM H₂O₂ ile oluşturduğumuz % 75'lik hücre ölümünü 500 µM'dan sonra tamamen geriye döndürmesi GSH'ın H₂O₂'nin yarattığı strese karşı koruyucu olduğunu göstermektedir. Bu da merkezi sinir sisteminde yer alan nöronların ve glia hücrelerinin GSH seviyesini (diyetle ya da sentezini arttırarak) yükselterek koruma sağlanabileceğini göstermektedir. Ancak bizim çalışmalarımız sonucunda glia hücre çoğalmasına ve H₂O₂ ile oluşturduğumuz oksidatif strese karşı koruma sağlamayan leptinin antioksidan savunma süreçlerinde rol alıp almadığını, alıyorsa nasıl ve hangi aşamalarda rol aldığını belirlemek için daha detaylı deneylerin yapılması gerektiğini düşünmekteyiz. Araştırmamızın bundan sonraki aşaması, primer glia hücrelerine daha uzun süreli leptin ve uygulaması olacaktır.

8. SONUÇ

Oksidatif strese karşı hücrelerin kendilerini savunmaları ve yaşamlarını devam ettirebilmeleri, hücresel ölümlerin ve doku yıkımlarının önlenmesi için oldukça önemlidir. Bazı merkezi sinir sistemi hastalıklarının altında yatan neden olduğu düşünülen oksidatif stresin önlenmesi için var olan ve yaşa, beslenmeye, çevreye,... bağlı olarak azalan antioksidan savunma sistem elemanlarını düzeyinin artırılması gerekmektedir.

Çalışmada kullandığımız leptin dozlarının glia hücre çoğalmasına bir etkisi olmadığı ortaya konmuştur. H_2O_2 primer glia hücre kültüründe doza bağlı olarak toksik bir etki yaratmaktadır. Leptin, $100 \mu M H_2O_2$ ile oluşturulan % 75'lik hücre ölümüne karşı koruyucu bir etki göstermemiştir.

9. SİMGE ve KISALTMALAR

- **ob gen** Leptin sentezleyen gen.
- **ob-Rb** Leptin uzun formu reseptörü.
- **Ob-Ra,c,d,f** Leptin kısa formu reseptörleri.
- **Ob-Re** Leptin soluble form reseptörü.
- **ob/ob** Mutantlı leptin sentezleyen gen.
- **HUVEC** İnsan göbek kordonu ven endotel hücreleri.
- **C3H10T1/2** Fare embryonik hücre kültür hücreleri.
- **BaF3** Faktör bağımlı hematopoietik hücre kültürü.
- **MIN6** Pankreatik β hücre dizisi.
- **GFAB** Glial fibril asidik protein.
- **GH** Büyüme hormonu.
- **PRL** Prolaktin.
- **EPO** Eritropoietin.
- **IL** İnterlökin.
- **JAK-STAT** Janus kinaz-transkripsiyon sinyal dönüştürücüsü ve aktive edicisi.
- **MAPK** Mitojen aktive edici protein kinaz.
- **SOCS** Sitokin Haberleşmesini Baskılayıcılar.
- **PI 3 KiNAZ** Fosfatidilinozitol 3-Kinaz.
- **DAG** Diaçilgliserol.
- **IP3** İnozitol trifosfat.

- **cAMP** Döngüsel adenozin monofosfat.
- **NO** Nitrik oksit.
- **H⁺** Hidrojen.
- **O₂⁻** Süperoksit.
- **OH⁻** Hidroksil.
- **H₂O₂** Hidrojen peroksit.
- **¹O₂⁻** Singlet oksijen.
- **HO₂** Perhidroksi radikal.
- **ROO⁻** Peroksil radikal.
- **CCl₃** Triklorometil.
- **NO₂** Nitrojen dioksit.
- **SOD** Süperoksit dismutaz.
- **ONOO⁻** Peroksinitrit.
- **GPx** Glutatyon peroksidaz.
- **ALS** Amyotrofik Lateral Sklerosiz.
- **FCS** Fetal dana (calf) serumu.
- **DMEM** Dulbecco's Modified Eagle's Medium.
- **HBSS** Hank's Balanced Salt Solüsyonu.
- **DAB** Diaminobenzidin yıkama tamponu.
- **MTT** 3-(4,5-D,methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide;thiazolyl blue.

10. ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1:	Glia hücrelerinin genel görüntüsü.	27
Şekil 2:	GFAP (+) sıçan glia hücreleri.	27
Şekil 3:	Dört farklı dozdaki leptinin glia hücre çoğalması üzerine etkisi.	28
Şekil 4:	Primer glia hücrelerine H ₂ O ₂ 'nin doz bağımlı toksik etkisi.	29
Şekil 5:	100 μM H ₂ O ₂ ile birlikte uygulanan 100-8000 μM dozlarındaki GSH'ın glia hücre yaşamına etkisi.	30
Şekil 6:	Toplam 3 saat 100 μM H ₂ O ₂ ile birlikte uygulanan leptin dozlarının glia hücre yaşam oranı üzerindeki etkisi.	31
Şekil 7:	Farklı dozlardaki GSH'ın glia hücre çoğalması üzerine etkisi.	32

11. TABLOLAR DİZİNİ

Tablo I	Sık karşılaşılan serbest radikaller.	16
Tablo II	Antioksidan savunma elemanları.	18

12. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Attoub S, Noe V, Pirolo L, Bruyneel E, Chastre E, Mareel M, Wymann M, Gespach C. Leptin promotes invasiveness of kidney and colonic epithelial cells via phosphoinositide 3-kinase, rho and rac-dependent signalling pathways. *FASEB J* 14(14): 2329-2338 (2000).
2. Balasubramaniyan V, Kalaivani Sailaja J, Nalini N. Role of leptin on alcohol-induced oxidative stress in Swiss mice. *Pharmacological Research* 47(3): 211-216 (2003).
3. Baratta M, Grollib S, Tamannic C. Effect of leptin in proliferating and differentiated HC11 mouse mammary cells. *Regul Pept* 113(1-3): 101-117 (2003).
4. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Buse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J* 13(10): 1231-1238 (1999).
5. Bouloumie A, Hannes C, Drexler A, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of ob gene promotes angiogenesis. *Circ Res* 83(10): 1059-1066 (1998).
6. Brzozowski T, Konturek C P, Konturek JS, Pierzchalski P. Central leptin and cholecystokinin in gastroprotection against ethanol-induced damage. *Digestion* 62 (3): 126-142 (2000).
7. Byung PY. Cellular defenses against damage from reactive species. *Physiol Rev* 74 (1): 139-172 (1994).

8. Dündar Y, Aslan R. Hücre moleküler statüsünün anlaşılması ve fizyolojik önem açısından radikaller-antioksidanlar. *Cerrahi Tıp Bilimleri Dergisi* 2: 134-142 (1999).
9. Emilsson V, Arch JR, Groot RP, Lister CA, Cawthorne MA. Leptin treatment increases suppressors of cytokine signalling in central and peripheral tissues. *FEBS Lett* 455 (2): 170-174 (1999).
10. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J. Leukoc Biol* 68: 437-446 (2000).
11. Gebicke-Haerter PJ, Kitamura Y, Matsuoka Y, Tooyama I, Kimura H, Shimohama S, Taniguchi T. Hydrogen peroxide-induced apoptosis mediated by p53 protein in glial cells. *Glia* 15(2): 154-164 (1999).
12. Ghilardi N, Radek CS. The leptin receptor activates janus kinases 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. *Molecular Endocrinology* 11 (4): 393-399 (1997).
13. Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Nat Acad Sci* 93 (13): 6231-6235 (1996).
14. Glowinski J, Desagher S, Premont J. Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci* 16 (8): 2553-2562 (1996).
15. Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV, Moar K, Taryhum P, LM Williams. Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by PT-PCR and in situ hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 232 (2): 383-387 (1997).

16. Hosoi T, Okuma Y, Nomura Y. Expression of leptin receptors and induction of IL-1 beta transcript in glial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 273(1): 312-315 (2000).
17. Hytianti TK. Leptin in the perinatal period. Academic Dissertation, University of Helsinki. Faculty of Medicine, Institute of Clinical Medicine; Helsinki (2001).
18. Kabadere E. Dihidropiridin türevi kalsiyum kanal blokerleri ve glutatyonun hidrojen peroksit toksisitesi oluşturulmuş lens epitel hücre canlılığı üzerindeki etkileri. Uzmanlık Tezi, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Eskişehir (2003).
19. Kiernan JA. Barr's, the human nervous system. Seventh edition, Lippincott-Raven, U.S.A. 17-41 (1998).
20. Machinal-Quelin F, Dieudonne M.N, Leneuve M.C, Pecquery R, Guidicelli Y. Proadipogenic effect of leptin on rat preadipocytes in vitro: Activation of MAPK and STAT3 signalling pathways. *AJP Cell Physiol* 282: 853-856 (2002).
21. Marcoux F, Choi D. CNS Neuroprotection. Springer, Berlin 155: 245-280 (2002).
22. Matarese G, Sanna V, Fontana S, Zappacosta S. Leptin as a novel therapeutic target for immune intervention. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1(1): 13-22 (2002).
23. Moore JD, Francisco MH, Rothwell NJ, Giamal NL. Leptin induces nitric oxide production from rat astrocyte primary culture. *Journal of Physiology* 513-521 (1998).

24. Morash B, Leogoid C, Wilkinson M. Leptin and obesity: Is it all in the mind. *Neuroendocrinology* 77(1): 6-11 (1999).
25. Mossmann T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immun Method* 65: 55-63 (1983).
26. Noyan A. Yaşamda ve hekimlikte fizyoloji. 8. Baskı, Meteksan, Ankara : 144-167 (1993).
27. Oda A, Taniguchi T, Yokoyama M. Leptin stimulates rat aortic smooth muscle cell proliferation and migration. *Kobe J Med Sci* 47: 141-150. (2001).
28. Özata M, Uçkaya G, Aydın A, İsimer A, Özdemir IC. Defective antioxidant defense system in patients with a human leptin gene mutation. *Horm Metab Res* 32(7): 269-72 (2000).
29. Özata M, Mergen M, Öktenli C, Aydın A, Yavuz S, Bolu E, Yılmaz N, İsimer A, Özdemir I. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin Biochem* 35(8): 627-631 (2002).
30. Alho H, Leinonen J. Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods. *Methods Enzymol: Oxidants and antioxidants. Volume 299 (A):* 3-15 (1999).
31. Sawada M, Suzumura A, Yamamoto H, Marunuchi T. Activation and proliferation of the isolated microglia by colony stimulating factor-1 and possible involment of protein kinase C. *Brain Research* 509: 119-124 (1990).
32. Snell RS. *Clinical neuroanatomy for medical students.* 4th ed, Lippincott-Raven, U.S.A: 76-90 (1997).

33. Souad N, Sanchez-Margalet V. Human leptin promotes survival of human circulating blood monocytes prone to apoptosis by activation of P42/44 MAPK pathway. *Cellular Immunology* 220(2): 143-149 (2002).
34. Sweeney G. Leptin signalling. *Cellular Signalling* 14: 655-663 (2002).
35. Tanabe K, Okuya S, Tanizawa Y, Matsutani A. Leptin induces proliferation of pancreatic beta cell line MIN6 through activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 241 (3): 765-768 (1997).
36. Tanabe K, Okuya S, Tanizawa Y, Matsutani A. Leptin increases the viability of isolated rat pancreatic islets by suppressing apoptosis. *Endocrinology* 142 (11): 4827-4830 (2001).
37. Takahashi Y, Okimura Y, Mizuno I, Iida K, Takahashi T, Kaji H, Abe H, Chihara K. Leptin induces mitogen-activated protein kinase-dependent proliferation of C3H10T1/2 cells. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology* 272(20): 12897-12900 (1997).
38. Takashi N, Waelput Wim, Guisez Y. Leptin is an endogenous protective protein against the toxicity by TNF- α . *J Exp Med* 189(1): 207-212 (1999).
39. Teker Z, Özer G, Topaloğlu K, Mungan N, Yüksel B. Leptin yapı ve fizyolojisi. *Arşiv* 1: 30-41 (2002).
40. Watson A, Poloyac S, Blouin R. Effect of leptin on cytochrome p-450, conjugation and antioxidant enzymes in the ob/ob mouse. *Drug Metabolism and Disposition* 27(6): 695-700 (1999).

41. Yılmaz Ö. Primer mikst glia hücre kültüründe asit ortamının yarattığı toksisite. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, İzmir (1997).
42. Zwata E, Kondo Y, Miyazaki I, Asanuma M, Ogawa N. Glial cells protect neurons against oxidative stress via transcriptional up-regulation of glutathione synthesis. *J Neurochem* 72(6): 2334-2344 (1999).
43. Znapp PE. The cell cycle of glial cells in vitro: An immunocytochemical method of analysis. *Histochemistry&Cytochemistry* 40(9):1405-1411 (1992).

13. ÖZGEÇMİŞ

14.01.1980 tarihinde Mersin’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Mersin’de tamamladı. 2002 yılında Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden, 2004 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü’ne bağlı olarak Tezsiz Yüksek Lisans Biyoloji Öğretmenliğinden mezun oldu. Halen Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimini sürdürmektedir.