



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## LEPTİN HORMONUNUN FOLLİKÜL GELİŞİMİNE VE APOPTOZİSİNE ETKİSİ

HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Muhammed Mekki KOCABAŞ

Temmuz 2018  
DENİZLİ

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LEPTİN HORMONUNUN FOLLİKÜL GELİŞİMİNE VE  
APOPTOZİSİNE ETKİSİ

HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Muhammed Mekki KOCBAŞ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE

Denizli, 2018

## YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Muhammed Melki KARADAĞ tarafından Prof. Dr. Gülşin METE yönetiminde hazırlanan  
Leptin Hormonunun Gelişimi, Gelişimi ve Akutlukta Etkisi" başlıklı tez tarafımızdan  
okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. ABUJLAN GÖKÇİMEN

Pamukkale Üniversitesi  
Aydın Adnan Menderes

Danışman:

Prof. Dr. Gülşin ABBAN METE

Pamukkale Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. E. Oguzhan OĞUZ

Pamukkale Üniversitesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
11.07.2018 tarih ve 2018/17-21 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hakan AKÇA  
Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öđrenci Adı Soyadı: Muhammed Mekki KOCABAŞ

İmza :

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuda yanımda olan, manevi yönden desteğini hissettiren; tezimin planlanmasında, içeriğinin düzenlenmesinde, tez sonuçlarının yorumlanmasında, tez çalışması için ortamın sağlanmasında ve tezin her aşamasında özverilerini, bilgilerini ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE' ye sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerimin yürütülmesi esnasında, tüm laboratuvar imkânlarından faydalanmamı sağlayan ve laboratuvar çalışmalarımnda önerileri ile bana yol gösterici olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE' ye, Sayın Prof. Dr. E. Oğuzhan OĞUZ' a, Sayın Prof. Dr. Hülya ÇETİN' e, Sayın Prof. Dr. SAİM ÖZDAMAR' a, Sayın Doç. Dr. Nazan KESKİN' e ve Sayın Dr. Öğr. Ü. Nazlı ÇİL' e tezimin histolojik preparasyon aşamalarında tecrübelerinden yararlandığım Teknisyen Sayın Erdinç KARATAŞ' a, deney aşamasında her türlü imkânı sağlayan Veteriner Hekim Barbaros ŞAHİN' e, tez yazım aşamasında yardımlarını benden esirgemeyen GürkanTURHAN' a ve Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda çalışan ve tezimin yapılmasında emeği geçen herkese ayrıca tez projemi destekleyen Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi' ne teşekkür ederim.

Varlıkları ile kendimi şanslı ve güvende hissetmemi sağlayan, her türlü konuda yanımda olarak beni cesaretlendiren, hayatımdaki en önemli insanlar babam Ahmet KOCABAŞ, annem Raziye KOCABAŞ ve kardeşlerim Fatma DEMİR, Osman Nuri KOCABAŞ, Bilal KOCABAŞ, İbrahim KOCABAŞ ve Hatice KARATAŞ' a; ayrıca hayatıma renk katan ve beni mutlu kılan tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

## ÖZET

### LEPTİN HORMONUNUN FOLLİKÜL GELİŞİMİNE VE APOPTOZİSİNE ETKİSİ

KOCABAŞ, Muhammed Mekki  
Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE

Temmuz 2018, 58 sayfa

Leptin ağırlıklı olarak adipoz dokudaki adipositler tarafından sentezlenek kana salınan, dolayısıyla kişinin yağ dokusu ile orantılı olarak serum düzeyleri yükselen bir hormondur. Leptin hem kadın hemde erkek üreme sisteminin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Leptin seviyesi dişi ve erkek te puberte başlangıcından önce artar. Bu artışın puberte başlangıcını tetiklediğine inanılmaktadır. Leptin seviyesi ve etkisi pubertal dönemden sonra dişi ve erkeklerde farklılık göstermektedir. Kadınlarda estrogen leptin salınmasını artırırken testosteron azaltmaktadır. Biz leptinin yeni doğandan olgun döneme kadar ovaryum follüküllerinde oluşturduğu yapısal değişimleri ve ovaryum apoptozisine etkisini incelemeyi amaçladık.

Bu çalışmada 36 adet Wistar tipi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar kontrol ve leptin uygulanan deney grubu olmak üzere ikiye ayrıldı. Çalışmamızda yeni doğan dişi sıçanlara doğumun birinci gününden başlayarak 14 gün süreyle leptin uygulandı. Deney grubu yavrulara doğdukları günden itibaren (doğduğu gün = 0) 1-5 gün boyunca sabah 0,1 ml/gün, 6-10 gün 0,15 ml /gün, 11-15.gün 0,25ml/gün leptin enjeksiyonu subkutan olarak gerçekleştirildi.

Ovaryumlar doğumu izleyen 21 (3 hafta, kontrol; n=6, deney; n=6), 35 (5 hafta kontrol; n=6, deney; n=6) ve 84 (12. Hafta kontrol; n=6, deney; n=6) günlerde çıkarılarak ışık mikroskobu düzeyinde incelendi. Ovaryum dokuları tespit için, %10'luk formaldehit solüsyonunda 72 saat bekledikten sonra rutin ışık mikroskopi takibine alındı. Hazırlanan parafin bloklardan, Leica RM-2125 rotary mikrotom kullanılarak 5 µ kalınlığında kesitler alındı. Kesitlere, Bcl/2, kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 9, p-53 ve Bax ifadelerini belirlemek amacıyla immunohistokimyasal ve histolojik inceleme için hematoksilen-eosin (H-E) boyama işlemi yapıldı. Kesitler Olympus BX51 marka ışık mikroskobunda incelendi ve Olympus DP72 dijital kamera ile resimlendi.

Kontrol ve leptin uygulanan gruplarda kaspaz-8, kaspaz-9, bax, p-53, bcl-2 ve kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyonları aynı idi. Hematoksilen-eosin boyamada ise follüküler gelişim açısından yeni doğan deney grubunun kontrole göre daha gelişmiş olduğu saptandı.

Kontrol ve leptin uygulanan gruplardan elde ettiğimiz immunohistokimyasal bulgularımız bize leptinin ovaryum apoptozisini etkilemediği düşündürdü. Bunun nedeni uygulanan doz miktarı ya da uygulama süresi olabilir. Ancak histolojik bulgularımız yenidoğan dokusunda leptinin follükül gelişimi uyardığını gösterdi.

**Anahtar Kelimeler:** Leptin, Apoptozis, Ovaryum

**Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2012SBE001).**

## ABSTRACT

### THE EFFECTS OF LEPTIN HORMONE ON DEVELOPMENT OF FOLLICLES AND APOPTOSIS

KOCABAŞ, Muhammed Mekki  
Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE

July 2018, 58 pages

Females an the reproductive system. Leptin levels rise in girls and boys before the onset of puberty. It has been sussegted that levels of the leptin rise may trigger the onset of puberty effected. Levels of leptin different from male and female after puberty. Whereas eastrogen accelarates secretion of leptin, testosteron reduces, nevertheless the precise mechanism how leptin effects puberty is completely unknown. In this study, we investigated the effect of leptin on the ovarian apoptosis and maturation.

For this purpose, thity-six Wistar type rats were used in the study. Rats were divided as control, and leptin-treated groups. Leptin (3 micgram/kg) subcutaneously injected to newborn rats for 15 days starting from the first day of the birth. Beginning of the first day of their born (birth day=0) 0,1 ml/a day in mornings for 1-5 days, 0,15 ml/a day for 6-10 days, 0,25 ml for 11-15 days. Ovaries were removed after birth in the third (Newborn), fifth (pubertal) and twelveth week (Adult) Ovarien tissue samples of taken from each of the rats were fixed in 10% neutral-buffered formalin for 72 h, and then embedded in paraffin. Sections (5 µm) were taken from the paraffin blocks on slides with polylysine and these were then deparaffinized in xylene and rehydrated through a graded ethanol series (100%, 96%, 80%.) and they were used in immunohistochemical examination for analyzing Bcl/2, caspase 3, caspase 8, caspase 9, p-53 and bax expression.and hematoxylne and eosin. Afterwards cuts were evaluated under the light microscop by Olympus BX51 light microscope and Olympus DP72 digital camera.

The expression of caspase-3, caspase-8, caspase -9, p53, Bcl-2, Bax was evaluated by immunohistochemistry. No remarkable differences were observed between the two groups regarding the expression of Bcl-2, bax, p53, caspase-3, caspase-8 and caspase-9. But three week old newborn rat ovaries were mature compare to control groups. In control ovary, primordial, primary and scondary follicles were seen whereas stages of follicular development from early primary follicle to mature (Graafian) follicles were observed in ovary-treated with leptin.

Leptin was found not to be effective in ovarian apoptosis but effective in developing ovarian follicles in rat.

**Key Words:** Leptin, Apoptosis, Ovary

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through project numbers 2012SBE001.**

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
<b>Özet</b> .....	i
<b>Abstract</b> .....	ii
<b>İçindekiler</b> .....	iii
<b>Şekiller Dizini</b> .....	v
<b>Tablolar Dizini</b> .....	vi
<b>Simge ve Kısaltmalar Dizini</b> .....	vii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Amaç .....	1
<b>2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI</b> .....	<b>3</b>
2.1. Gonadların Gelişimi .....	3
2.1.1 Farklanmamış Gonadlar.....	3
2.1.2 Cinsiyet Belirlenmesi.....	3
2.2. Ovaryumların Gelişmesi.....	4
2.2.1. Ovaryumlar .....	5
2.2.2. Oogenezis .....	6
2.2.2.1. Doğum Öncesi Olgunlaşma (Prenatal Maturasyon) .....	6
2.2.2.2. Doğum Sonrası Olgunlaşma (Postnatal Maturasyon) .....	6
2.2.3. Menstual Siklus .....	7
2.2.4. Ovaryum Siklusu .....	8
2.2.5. Ovaryum Folikülleri .....	8
2.2.6. Ovulasyon .....	10
2.2.7. Korpus Luteumun Gelişmesi .....	10
2.3. Leptin .....	11
2.4. Apoptozis .....	18
2.4.1. Apoptozisin Morfolojisi .....	19
2.4.2. İnsan Organizmasında Apoptozun İzlendiği Durumlar .....	22
2.4.3. Apoptotik Hücre Ölümünün Aşamaları .....	24
2.4.4. Apoptozisin Mekanizmaları .....	24
2.4.5. Apoptozis sinyalinin oluşumu .....	26



2.4.5.1. Ekstresek sinyal yolu .....	26
2.4.5.1.1 Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (Reseptör- Ligand etkileşmesi) .....	26
2.4.5.1.2. Fas-Fas Ligand Aracılı Apoptoz .....	26
4.4.5.1.2.Tumor Necrosis Factor (TNF) Aracılı Apoptoz .....	27
4.4.5.1.3. Sitotoksik T lenfosit Aracılı Apoptoz .....	27
4.4.5.1.4.Hücrelerin maruz kaldığı dış etkenler .....	27
2.4.5.2. İntresek Sinyal Yolu .....	28
2.4.5.2.1. Mitokondriyal Yolak Yoluyla Apoptozis Oluşturulması .....	28
2.4.5.2.2. Endoplazmik Retikulum (ER) Aracılı Apoptozis Oluşturulması .....	29
2.5. Apoptoz' un Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler .....	29
2.6. Hipotez .....	30
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>32</b>
3.1. Hayvanlar ve Bakım Şartları .....	32
3.2. Deneysel Uygulama .....	32
3.3. Histolojik Boyalar ve Solüsyonlar .....	33
3.4. Uygulanan Teknikler .....	33
3.4.1. Doku takip yöntemi .....	33
3.4.2. İmmünohistokimyasal boyama .....	34
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>36</b>
4.1. Hematoksilen Eozin Boyama Sonuçları .....	36
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular .....	36
4.3. Üç Haftalık (Yenidoğan) Grubu .....	36
4.4. Beş Haftalık (Pubertal) Grup .....	37
4.1. On İki Haftalık (Olgun) Grup .....	37
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>43</b>
<b>6. SONUÇLAR .....</b>	<b>48</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>49</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>58</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 2.1</b> Leptin sentezinin düzenlenmesi .....	13
<b>Şekil 2.2</b> Nekroz ve apoptozis arasındaki farklar. ....	21
<b>Şekil 2.3</b> Apoptoz basamakları .....	24
<b>Şekil 2.4</b> Bax/ Bcl-2'nin etki mekanizması.....	29
<b>Şekil 4.1</b> Yenidoğan, beş haftalık ve on iki haftalık kontrol ve ovaryum dokuları .....	38
<b>Şekil 4.2</b> Yenidoğan, kontrol ve ovaryum dokuları .....	38
<b>Şekil 4.3</b> Yenidoğan deneklerden alınan ovaryum dokusunun kaspaz-8, kaspaz -9, p53, bax, bcl-2 ve kaspaz-3 ekspresyonu ve yerleşimi .....	39
<b>Şekil 4.4</b> Yenidoğan deneklerden alınan ovaryum dokusunun kaspaz-3 ekspresyonu ve yerleşimi .....	39
<b>Şekil 4.5</b> Beş haftalık deneklerden alınan ovaryum dokusunun kaspaz-8, kaspaz-9, p53, bax, bcl-2 ve kaspaz-3, ekspresyonu ve yerleşimi .....	40
<b>Şekil 4.6</b> Beş haftalık deneklerden alınan ovaryum dokusunun kaspaz-8 ekspresyonu ve yerleşimi .....	40
<b>Şekil 4.7</b> Beş haftalık deneklerden alınan ovaryum dokusunun kaspaz-9 ekspresyonu ve yerleşimi .....	40
<b>Şekil 4.8</b> On iki haftalık deneklerden alınan ovaryum dokusunun kaspaz-8, kaspaz-9, p53, bax ve bcl-2, kaspaz-3 ekspresyonu ve yerleşimi .....	41
<b>Şekil 4.9.</b> On iki haftalık deneklerden alınan ovaryum dokusunun kaspaz-3 ekspresyonu ve yerleşimi.....	42

**TABLolar DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 2.1</b> Leptin sentezini etkileyen faktörler .....	13
<b>Tablo 2.2</b> Nekrozis ve apoptozis arasındaki farklılıklar .....	21
<b>Tablo 2.3</b> Apoptozis ve Genler .....	25
<b>Tablo 2.4</b> Bcl-2 ailesi.....	28

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIF	.....	Apoptozis İnhibe Edici Faktör
Apaf-1	.....	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
APO-1	.....	Apoptozisi Tetikleyen Reseptör-1
bp	.....	Baz Çifti
cAMP	.....	Siklik Adenozin Monofosfat
CTL	.....	Sitotoksik T lenfositler
Db	.....	Diabet
db/db	.....	Diyabetik obez
DNA	.....	Deoksiribonükleik Asit
fa/fa	.....	Hipotalamik obez
FADD	.....	Fas İlişkili Ölüm Birimi
FasR	.....	Ölüm Reseptörü
FSH	.....	Folikül Stimüle Eden Hormon
GnRH	.....	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	.....	Hidrojen Peroksit
H-E	.....	Hematoksilen-Eozin
IL	.....	İnterlökin
kDa	.....	Kilo Dalton
LH	.....	Luteinizan Hormonu
NPY	.....	Neuropeptide Y
Ob	.....	Obez
ob/ob	.....	Genetik obez
Ob-gen	.....	Obez gen
Ob-R	.....	Leptin Reseptörü
OB-RL	.....	Leptin uzun reseptörü
OB-Rs	.....	Leptin kısa reseptörü
PBS	.....	Phosphate Buffered Saline
TNF	.....	Tümör Nekrozis Faktör
TNFR	.....	Tumor Necrosis Factor Receptor
VKİ	.....	Vücut kitle indeksi

## 1. GİRİŞ

Leptin, obese (Ob) geni tarafından kodlanan, 16 kDa'luk 167 aminoasitli peptid yapısında bir hormondur (Zhang vd 1994). Üreme sisteminin matürasyonunun düzenlenmesinde görev alan leptinin ilk belirtisi, dişi ob/ob farelerin kısır olduğunun bulunmasıdır ki, bunlar leptin muamelesiyle fertil hale getirilebilmiştir (Bray 1979). Doğunluk ve enerji dengesi ile ilgili olduğu tanımlanan leptin yağ hücrelerinden salgılanmaktadır. Araştırmalar sonucunda leptinin hipotalamusa geri bildirim yolu ile etki eden antiobezite bir faktör olduğu ortaya çıkmıştır. Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular, hem hayvanlarda hem de insanlarda vücut ağırlığı ve yiyecek alışının düzenlenmesinde leptinin önemini vurgulamaktadır (Zhang vd 1994). İnsanlarda yiyecek alımı, obezite, enerji dengesinin düzenlenmesinde etkili olduğu gibi, pubertenin başlamasında, hipotalamik pituiter işlevlerin düzenlenmesinde ve insülin direncinde de önemli rol oynamaktadır (Kirel vd 1998, Christos vd 1999).

Son yıllarda leptinin hem kadın hemde erkek üreme sisteminin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı ortaya çıkmıştır. Leptinden yoksun olan dişi ob/ob farelerin kısır olması ve bu farelerin sürekli pubertal dönemde bulunması leptin üreme üzerindeki etkisinin ne denli önemli olduğunu göstermektedir. Özellikle bu kısır farelere leptin uygulanması sonucunda pubertal dönem geçebilmeleri ve fertil hale gelmeleri çalışmaların bu yöne kaymasına neden olmuştur. Serumda leptin seviyesinin oranı cinse bağlı farklılık göstermektedir (Kirel vd 1998, Christos vd 1999). Leptin seviyesi dişi ve erkek te puberte başlangıcından önce artar ki bu artışın puberte başlangıcını tetikleyebileceğine inanılmaktadır (Garcia Mayor vd 1997, Mantzoros vd 1997). Leptin seviyesi ve etkisi pubertal dönemden sonra dişi ve erkeklerde farklılık göstermektedir. Kadınlarda östrojen leptin salınmasını artırırken testosteron azaltmaktadır. Bununla birlikte leptinin pubertal dönemdeki etki mekanizmasının nasıl olduğu tam olarak açıklanamamıştır (Almog vd 2001).

### 1.1. Amaç

Yapılan kaynak taramalarında leptinin ovaryum üzerine olan etkilerinin daha çok işlevsel yönden değerlendirildiği saptanmıştır. Follikül hücrelerinin gelişimine olan etkilerini inceleyen yayınların çok az olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda da bu

Çalışmalardan birbirleriyle çelişen sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bu nedenle bizde dişi üreme sistemindeki etkilerini incelemeyi amaçladık.

Bu çalışmada leptinin yeni doğandan olgun dönem olan 12. haftaya kadar olan follikül gelişimine ve apoptozisine etkisinin hem immunohistokimyasal hem de histolojik olarak ayrıntılı araştırılması amaçlandı.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1. Gonadların Gelişimi

Kromozomal ve genetik cinsiyet, sekonder oositi dölleyen sperm türüne göre fertilizasyonda belirlenir. Gonadal cinsiyet 7. haftada belli olur.

Gonadlar (testisler ve overler) üç kaynaktan köken alırlar;

- Posterior karın duvarını döşeyen sölom epiteli (mezodermal epitel)
- Sölom epiteli altındaki mezenşim
- Primordial germ hücreleri (ilkel cinsiyet hücreleri)

Gonad gelişmesi, ilk kez gelişmenin 5. haftasında, mezonefrozun medialinde, sağ ve solda, sölom epitelinin çoğalması ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşan, uzunluğuna iki adet gonadal ya da genital kabartı'yla (genital ridge) dikkati çeker. Gelişmenin 4. haftasında büyük yuvarlak ilkel cinsiyet hücreleri, allantois kesesine yakın vitellüs kesesi (yolk kesesi) endoderm hücreleri arasında görülmeye başlarlar. Embriyonun kıvrılması sırasında, vitellüs kesesinin dorsal kısmı embriyon içine alınır. Bu katılma olaylanırken ilkel cins hücreleri, son bağırsağın dorsal mezenteri yoluyla 6. haftada ameboid hareketlerle gonad kabartılarına göç ederler (Şeftalioğlu 1998).

#### 2.1.1. Farklanmamış Gonadlar

İlkel cins hücrelerinin göçlerinden az önce ya da göçleri sırasında gonad kabartısının sölom epiteli tekrar çoğalır ve altındaki mezenşime yayılarak düzensiz ilkel cinsiyet kordonları (primitif seks kordonlarını) oluştururlar. Hem erkek hem dişi embriyonlarda bu kordonlar, yüzey epiteli ile devam ederler. 7. haftadan önce, her iki cinsin gonadları birbirine benzer ve farklanmamış gonad'lar olarak adlandırılırlar.

İlkel cinsiyet hücrelerinin gonadlar üzerinde indüktif etkileri vardır. İlkel cinsiyet hücreleri gonadlara ulaşmadıklarında ne testisler ne de ovaryumlar gelişir. (Şeftalioğlu 2003).

#### 2.1.2 Cinsiyet Belirlenmesi

Kromozomal ve genetik cinsiyet, fertilizasyonda ve sekonder oositi dölleyen spermin

X ya da Y cinsiyet kromozomu tarafından belirlenir. Y kromozom'u farklanmamış gonadın medullası üzerine, testis-belirleyici etkiye sahiptir. Testis-belirleyen faktör (*Testis determining factor = TDF*) geni, Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki cinsiyet belirleyen bölgede (*Sex-determining Region of the Y kromozom = SRY*) yerleşiktir. Bu faktör, farklanmamış gonadın ilkel cinsiyet kordonlarındaki hücrelerde sentezlendiğinde, taslak gonadlar, testislere farklırlar. İnsan Y kromozomunun TDF yöresinde, 223 amino asit düzeni, Sinclair ve arkadaşları tarafından 1990 yılında bulunmuştur.

Y kromozom'u yokluğunda, ovaryumlar meydana gelir.

Mevcut gonadların tipi ise, genital boşaltma yolları ve dış genital organların cinslere göre farklılanmasını belirlemektedir. Testislerden üretilen androjenik testosteron, erkeklği oluşturur.

Anormal cinsiyet kromozom kompleksli embriyonlarda (XXY veya XXY), X kromozom sayısı cinsiyet belirlemede önemli değildir. Eğer bir Y kromozomu mevcut ise embriyon erkek olarak gelişir. Eğer Y kromozomu yoksa veya Y kromozomunun testis belirleyici yöresi yok ise dişi gelişmesi olur. Bir X kromozomunun kaybolması gonad kabartılarına ilkel cinsiyet hücrelerinin göçünü etkilemez. (Şeftalioğlu 1998).

## 2.2. Ovaryumların Gelişmesi

Dişi embriyolarında gonadal gelişim daha yavaş gerçekleşir. X kromozomları ovaryum gelişmesi için genler taşımaktadır. Ancak otozomal bir gen de ovaryumun şekillenmesi için önemli işleve sahiptir (DiGeorge 1992, Quingley vd. 1994). Tam bir ovaryumun gelişmesi için iki adet X kromozomuna ihtiyaç vardır. İki X kromozomu, oositlerin mayoz evresinde uzun süre kalmaları için gereklidir. Turner sendromlu dişilerde (44+X0) ovaryumlar gelişir ancak ovaryumlarında vaktinden önce dejenere olmuş cinsiyet hücreleri oluşmamış folüküller bulundurulur.

Ovaryumlar 10. haftaya kadar histolojik olarak ayırt edilemezler. Primitif seks kordonları dişi embriyonlarda, erkek embriyonlarındaki kadar belirgin değildirler ancak gonadın medullasına kadar ve rudimenter bir yapı olan rete ovarii'yi oluştururlar. Normalde rete ovariler ve primitif cinsiyet kordonları dejenere olurlar ve daha sonra kaybolurlar.

Erken fetal dönemde kortikal kordonlar denilen ikinci cinsiyet kordonları, gelişmekte olan gonadın yüzey sölom epitelinden başlayarak altındaki mezenşime doğru gelişmeye başlarlar. Sölom epitelinin çoğalmasıyla kortikal kordonlar kalınlaşırken, ilkel



cinsiyet hücreleri kordonlar içine karışırlar. Yaklaşık 16. Haftada bu kordonlar, primordial folikül denilen ayrı hücre gruplarına bölünürler. Her bir grup, ortada, ilkel cinsiyet hücrelerinden köken almış oogonium ve onun çevresinde kortikal kordon sölom epiteli kaynaklı tek sıra follikül hücrelerinden meydana gelir. Fötal dönemde, milyonlarca oogonium aktif mitozla oluşurken doğum öncesinde oogoniumların bir kısmı dejenere olur, bir kısmı da büyüyerek primer oosit'leri yaparlar. Doğum sonrası dönemde oogonium meydana gelmez. Her ne kadar doğumdan önce pek çoğu dejenere olsa da, doğumdan sonra iki milyon civarında primer oosit kalmaktadır.

Gelişmekte olan bir ovaryumun histolojik tanısı, 10.-11. haftalarda kalın tunica albugineanın olmaması ve mayoz evresine girmekte olan cinsiyet hücrelerinin varlığıyla konur (Persaud 1992).

Doğumdan sonra ovaryum epiteli tek katlı yassı olur ve hillusta peritonun mezotelyumu ile devam eder. Ovaryumun yüzey epiteli eskiden 'germinal epitel' olarak isimlendirilirdi. Bugün yüzey epitel yöresinin insan embriyonlarında, cinsiyet hücrelerinin kaynağı olmadığı saptandı. Yüzey epitel hücreleri cinsiyet hücrelerinin kökeni olmadığı belirlendi. Germ hücrelerinin, primordial germ hücrelerinden köken aldıkları kesin olarak bilinmektedir. Ovaryum follikülleri oluşurken yüzey epiteliyle olan bağlantılarını kaybederler. Tunica albuginea denilen ince fibröz bir kapsül, yüzey epiteliyle ovaryum korteksi arasında gelişir. Mezonefroz gerilerken, ovaryum ondan ayrılır ve mezovaryum denilen kendi mezenteriyale vücut duvarına asılır (Şeftalioğlu 1998).

### **2.2.1. Ovaryumlar**

Ovaryumlar; pelvis kavitenin lateralinde uterusun her iki tarafında birer tane olacak şekilde oval şekilli organlardır. Ovaryumların birbiri ile ilişkili iki işlevi vardır. Dişi cins hücrelerini üretirler (oogenezis) ve steroid hormonları (östrojen ve progesteron) salgırlarlar. Ovaryumlardan salgılanan steroidler, cins hücrelerinin gelişip olgunlaşmasını, sekonder cins organları ve meme bezlerinin gelişme ve büyümesini kontrol ederken gebeliğin kontrolünden de sorumludurlar.

Ovaryumun yüzeyi germinal epitel olarak adlandırılan tek katlı kübik veya yassı epitel ile döşelidir. Germinal epitel altında ovaryuma beyazımsı rengini veren tunika albuginea yer alır. Tunika albuginea yaş ilerledikçe kalınlaşır ve sertleşir. Ovaryumlar, içte medulla, dışta korteksten oluşur. Korteks ile medulla bölgeleri arasında kesin bir sınır yoktur. Medulla, zengin kan ve lenf damarları ve sinirleri içeren gevşek bağ dokusu yapısındadır. Korteks, ovaryumun dış ve işlevsel bölümüdür. Korteks periferde medullayı sarar ve farklılaşma yeteneğine sahip ovaryum folliküllerini bol

miktarda bulundurur. Korteks hillusta sona erer ve mesovaryum medulla ile devam eder. Stroma ovaryumun temel ve destek dokusudur. Korteks stroması, iğ biçimli fibroblast benzeri hücreleri ve retiküler lif ağını içerir. Medulla stroması ise fibroblastlardan, elastik liflerden ve düz kas hücrelerinden oluşmuştur. İnterstisyel hücreler ovaryum stromasına dağılmış olarak bulunur. İntertisyel hücre gruplarının sayısı atretik foliküllerin fazla olduğu dönemde fazlalaşırken, menstruasyonun başladığı pubertede sayıları azalmaktadır. Erginde bu hücreler, ovaryum stromasına az sayıda dağılmışlardır. Ovaryum hilusunda ve mesovaryuma yakın yörede büyük epiteloid hücre grupları (hilus hücreleri veya sempatikotropik hilus bezi olarak adlandırılırlar) gözlenir, bunlar kan damarları ve miyelinsiz sinir telleri ile sıkı ilişkidedirler. Bu hücreler, leyding hücrelerine daha çok benzerler. Bünyelerinde kolesterol esterlerini, lipokrom pigmentlerini ve reinke kristallerine benzeyen kristalleri içerirler. Aktif olarak iç salgı bezinin tüm histokimyasal ve sitolojik özelliklerine sahip olan bu hücreler, gebelik ve menopoza dönemlerinde fazla sayıdadırlar. (Şeftalioğlu 1998).

### **2.2.2. Oogenezis**

İlkel dişi eşey hücrelerinin gelişip olgunlaşarak olgun oositleri oluşturmaya oogenezis denir. Hücrelerdeki bu olgunlaşma süreci doğumdan önce başlar, cinsel olgunluğa (puberte: ergenlik) erişildiğinde tamamlanır. Oogenezisi doğum öncesi ve doğum sonrası olgunlaşma olarak ikiye ayırmak mümkündür.

#### **2.2.2.1. Doğum Öncesi Olgunlaşma (Prenatal Maturasyon)**

İlkel cins (eşey) hücreleri, genetik olarak dişi gonadlara gelince oogoniumlara farklılaşırlar. Oogoniumlar bir dizi mitoz bölünme geçirirler. Üçüncü ayın sonunda tek katlı epitel ile sarılırlar. Her bir hücre grubunda ortada oogoniumlar çevrede sölom epiteli kökenli tek sıra follikül epitel hücreleri yer alır. Oogoniumların büyük bir kısmı mitozla bölünürken bir kısmı da büyüyerek primer oositleri oluştururlar. Primer oositlerin hemen DNA'ları replike olur ve birinci mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler. Sonraki aylarda, oogoniumlar mitoz bölünmeyle sayıca artmaya devam ederler ve gelişmenin beşinci ayında, ovaryumda gelişen dişi cins hücrelerinin (gamet) sayısı 7.000.000'dur. Bu dönemde hem primer oositlerde hem de oogoniumlarda atrezi (gerileme) gözlenir. Sekizinci ayda oogoniumların hemen hepsi dejenere olur, sağlam kalan primer oositlerin tümü birinci mayoz bölünmeye girerler ve tek katlı epitel ile sarılarak primordial folikülleri meydana getirirler.

### 2.2.2.2. Doğum Sonrası Olgunlaşma (Postnatal Maturasyon)

Doğuma yakın tüm primer oositler, mayoz bölünmenin profaz I safhasını bitirirler, metafaz'a gireceklerine dinlenme (dictyotone) safhasına geçerler. Primer oositler, bu safhada uzun süre kalırlar. Birinci mayoz bölünmeyi pubertede ovulasyondan az önce bitirirler. Primordial foliküllerdeki folikül hücreleri, oosit olgunlaşmasını baskılayıcı (OMI) bir madde salgılayarak primer oositlerin birinci mayoz bölünmeyi puberteden önce bitirmesini engeller. Primer oositlerdeki bu birinci mayoz bölünme gecikmesi 40 ya da daha ileri yaşlara kadar sürebilir. Böyle durumlarda, mayoz bölünme hatalarına, yani anne yaşı ile artan kromozom çiflerinin ayrılmamasına rastlanır. Doğumda, primer oositlerin tüm sayısı 700.000-2.000.000 arasındadır. Doğumdan sonra artık primer oosit meydana gelmez. Çocukluk döneminde, oositlerin çoğu atretik olur. Puberteye geldiğinde bir genç kızın ovaryumunda toplam 40.000 adet (primordial folikül içinde olmak üzere) primer oosit bulunur (Şeftalioğlu 1998).

### 2.2.3. Menstual Siklus

Pubertenin başlaması ile hipotalamustaki nörosekretuar hücreler, gonadotropin salgılayıcı hormon (GnRH) sentezlerler. Bu hormon, hipofiz bezinin ön lobundan FSH ve LH gibi gonadotropik hormonların salgılanmasını uyarır. Bu gonadotropinler; foliküllerin gelişip olgunlaşması, ovulasyon ve korpus luteum oluşmasını da içine alan ovaryum siklusuna neden olurlar. Ovaryum siklusuyla beraber uterus, uterusun tüpleri, vajina ve meme bezlerinde bir dizi değişimler olur. Bu değişimlere menstrual siklus ya da endometrium siklusu denir.

Menstual Siklus 12-15 yaşları arasında başlar 45-50 yaşlarına kadar devam eder. Menstual siklusun başlangıcı menstrual kanamanın görüldüğü gün olarak anılır. Menstual akıntı, yırtılan kan damarlarından gelen kanın dejenerasyon olan endometrium karışımından ibarettir. Menstual faz siklusun ilk dört günü olarak tanımlanır. (Lange 1998)

- Folikül stimule eden hormon (FSH): ovaryum folikülünün gelişimini ve folikül hücrelerinden östrojen salınımını uyarır.
- Luteinizan hormon (LH): ovulasyonu (sekonder oositin atılması) uyarır, folikül hücreleri ve korpus luteumu uyararak progesteron üretimine neden olur.

#### 2.2.4. Ovaryum Siklusu

Her siklusta, FSH etkisi ile 5-15 adet primordial folikül gelişip büyür. Ancak bunlardan bir tanesi, özellikle LH etkisiyle olgun folikül olur, bu olgun folikül ovaryum yüzeyi ile birlikte yırtılır ve içindeki sekonder oosit dışarı atılır. Geriye kalan 4-14 adet antral foliküller folikül atrezisi denilen doğal dejenerasyona uğrarlar ve hiçbir zaman olgunlaşmazlar. Bu dejenere foliküllere atretik folikül denir. Genç bir kadının ovaryumlarında 400.000 adet primordial ve primer folikül bulunmaktadır. Kadının üreme hayatı boyunca 500 den azı olgunlaşır ve ovulasyona girer. Geri kalanların tümü farklı gelişme evrelerinde atrezi olur (Şeftalioğlu 1991).

#### 2.2.5. Ovaryum Folikülleri

Ovaryum folikülleri korteksin stroması içerisinde yer alır. Bir folikül, bir ya da daha fazla tabaka oluşturmuş folikül hücreleriyle (garnuloza hücreleri) çevrili oositin meydana gelir. Erişkin normal genç bir kadının iki ovaryumundaki toplam folikül sayısı tahminen 400 000 kadardır. Bu foliküllerin çoğu kadının doğurganlık süreci boyunca atreziye uğrayarak yok olacaktır. Foliküllerdeki bu gerileme doğum öncesinde başlar ve doğurganlık süresi boyunca devam eder. Menepozdan sonra, foliküllerden sadece küçük bir miktarı kalır. Her menstrual siklusta ovaryumlar tarafından genellikle sadece bir ovum serbest kalır. Bir kadının doğurganlık süreci 30-40 yıl kadar devam eder. Bu süre içerisinde sadece 450 kadar yumurta hücresi serbest kalır. Geriye kalan foliküllerin tümü oositle birlikte olgunlaşmadan atreziye uğrayarak dejenere (Junqueira vd 1998).

Promordial foliküller, ovaryumda hemen tunika albugenea altında yer alır. Her bir promordial folikül tek sıra yassı folikül hücreleriyle çevrili primer oositin oluşur. Primordial foliküllerin en çok sayıda bulunduğu dönem doğum öncesidir. Primordial foliküldeki oosit yaklaşık 25 mikrometre çapındadır. Bir ya da birden fazla çekirdekçikleri içeren veziküler çekirdekleri merkezden uzakta yer alır. Stoplazmada çok sayıda mitokondri, birkaç golgi kompleksi ve endoplazmik retikulum sisternası bulunur. Yassı folikül hücreleri birbirine dezmozomlarla bağlanır. Folikül hücrelerinin altında bazal lamina bulunur (Junqueira vd 1998).

Foliküllerin esas büyümesi folikül hücrelerinin ve bununla birlikte primer oositin ve folikülü çevreleyen stromanın büyümesiyle olur. Folikül hücreleri tek tabakalı kübik hücreler haline geldiğinde foliküle unilaminer (tek tabakalı) primer folikül ismi verilir. Folikül hücreleri mitozla çoğalırlar ve çok katlı foliküler epiteli ya da granuloza tabakasını oluştururlar. Garnuloza hücreleri çok katlı folikül epitel hücreleridir.

Folikülün bu haline multilaminar (çok tabakalı) primer folikül denir. Folikül hücrelerinin arasında gap junctionlara rastlanır. Oositi çevreleyen kalın bir örtü olan zona pellisuda en az 3 farklı glikoprotein içerir. Zona pellisuda sentezinin, hem oositler hem de folikül hücreleri tarafından yapıldığı düşünülmektedir. Folikül hücrelerinin uzantıları (filodopia) ile oosit mikrovillusları zona pellisuda içine uzanırlar ve gap junctionlarla birbirine temas kurarlar (Junqueira vd 1998).

Folikülün bitişğinde folikülün etrafını saran stroma farklılaşma göstererek teka folliküli' yi oluşturur. Daha sonra bu tabaka teka interna ve teka eksterna olarak farklılanır. Endokrin fonksiyona sahip tüm organlar gibi teka interna da kan damarlarınca zengindir. Teka eksterna sıkı bağ dokusu yapısındadır.

Folikülün büyümesi esas olarak granuloza hücrelerinin büyüklüğünün ve sayısının artmasıyla olur. Bu hücrelere folikül sıvısı toplanmaya başlar sıvı içeren boşluklar birleşerek tek bir boşluk olan antrum oluşturur. Bu yapıya sekonder folikül denir.

Granuloza tabakasının hücreleri folikül duvarı üzerinde belli bir yerde daha fazla yoğunlaşır. Burada hücrelerden oluşan küçük bir tepelik oluşur. Oositi de içeren bu yapıya yumurta tümseği (kumulus ooforus) adı verilir (Junqueira vd 1998).

Ovaryum foliküllerinin çoğu atreziye uğrar, folikül hücreleriyle oosit ölür ve fagositik hücreler tarafından ortadan kaldırılır. Bu süreç granuloza hücrelerinde mitozun durması granuloza hücrelerinin bazal laminadan ayrılması ve oositin ölümü ile karakterizedir. Foliküler atrezi doğum öncesinden menapozun birkaç yıl sonrasına kadar sürer.

Folikül atrezisi esnasından granuloza hücreleri ile oosit dejenerasyona uğramasına rağmen teka interna hücreleri çoğu kez durumlarını korurlar aktif olarak steroid salgısı yaparlar. Bu aktif teka hücrelerine intertisyel hücreler denir.

Teka interna hücreleri, önceleri fibroblast benzeri hücrelerdir. Daha sonraki gelişim basamaklarında hormon stimülasyonu ile hormon depolarlar ve steroid hormon salgılayan endokrin hücrelerinin ince yapısal özelliklerini kazanırlar (Şeftalioğlu 2003).

Teka interna hücreleri lipid yüklü çok köşeli olurlar. Steroid yapıda östrojen salgırlar. Ovaryumun intertisyel hücreleri ile teka interna hücreleri östrojen hormonlarını salgırlarken; granuloza hücreleri progesteron, östrojen ve gonadostatin salgırlar. Östrojenin esas kaynağı granuloza hücreleridir. Bu hücrelerde kolesterolün 17 $\beta$ -estradiol'e dönüşmesi için tüm enzimle bulunur. Estradiol 3, östrojen bileşiğinin en önemli güçlü olanıdır. (Şeftalioğlu 1991).

Teka eksterna hücreleri ise hormon stimülasyonu ile değişmezler ve fibroblast benzer özelliklerini korurlar. (Şeftalioğlu 2003).

### 2.2.6. Ovulasyon

Genital siklusun ortasında (14. Gün) FSH ve özellikle LH'nin etkisiyle olgun folikülün folikül sıvısı aniden artar. Folikül duvarının bir yerinde ovaryum yüzeyine doğru bir çıkıntı oluşur. Bu çıkıntıya stigma denir. Stigma teka interna kapillerindeki kan akımının yerel kaybı nedeniyle oluşur.

Ovulasyon LH üretiminin yükselmesiyle başlar. LH yükselmesi östrojen hormonlarının kanda artmasıyla olaylanır. LH yükselmesi en yüksek düzeye vardığında, primer oosit 1. Mayoz bölünmesini ya ovulasyondan az önce ya da ovulasyon sırasında bitirir. Eşit büyüklükte olmayan 23 kromozom taşıyan 2n DNA miktarına sahip iki cins hücresi meydana gelir. Birinci hücre büyüktür ve stoplazmaca zengindir. Sekonder oosit adını alır. Sekonder oosit hemen 2. Mayoz bölünmeye girer. İkinci hücre çok küçük ve stoplazmadan yoksundur. İşlev görmez. 1. Polar cisim adını alır. 2. mayoz bölünme fertilizasyonda biter.

Ovulasyon puberteden menopoza kadar olan dönemde 28 günde bir yenilenen periyodik bir olaydır. Olgun folikülün yırtılmasıyla sekonder oositin uterus tüplerine alınması olayına ovulasyon denir. Genellikle iki ovaryum dönüşümlü olarak ovulasyon gösterir. Sekonder oosit bir miktar granuloza hücreleri ve folikül sıvısıyla birlikte yırtılan yerden periton boşluğuna atılırken, sekonder oosit fibmria ovarikalari tarafında tüpler içine alınır. Ovulasyon sırasında ara ağrı denilen bir ağrı karnın iç kısımlarında hissedilir. Ovulasyonun bir belirtisi olarak kabul edilebilir. Esas belirtisi vücut ısısının biraza düşmesi sonra yavaş yavaş artmasıdır.

Gonadotropinler yetersizliği nedeniyle bazı kişiler hamile kalamazlar. Çünkü ovulasyon olmaz böyle kişilere gonadotropinler ya da ovulasyon indükleyici ajan verilerek hamile kalmaları sağlanır. Klomifen sitrat, hipofizden FSH ve LH' nin salınımını uyararak ovaryum foliküllerinin gelişip olgunlaşmasını ovulasyonu ve korpus luteumun oluşmasını sağlamaktadır. (Şeftalioğlu 2003).

### 2.2.7. Korpus Luteumun Gelişmesi

Ovulasyondan sonra, ovaryum içinde kalan granuloza ve teka interna hücreleri korpus luteum denilen geçici bir endokrin bezi oluşturur. Korpus luteum progesteron ve östrojen salgılar. Progesteron yeniden ovaryum folüküllerinin gelişmesini engelleyerek ovulasyonu engeller yani gebeliğin devamını sağlarlar (Junqueira vd 1998).

Teka interna damarlarının yırtılmasıyla oluşan kan çöken folikül boşluğuna dolar bu yapıya korpus hemarrajikum denir. Folikülün merkezinde kan pıhtısı kalıntılarını görmek mümkündür.

Eğer döllenme ve gömülme olmuşsa yani gebelik söz konusu ise korpus luteum büyür ve gebelik korpus luteum adını alır. Gebelik korpus luteumu gebeliğin 9-10. Haftalara kadar trofoblastlar tarafından salgılanan Human Chorionic Gonadotropic Hormone (HCGH) ile işlevini sürdürür. HCGH gebelik korpus luteumun dejenere olmasını engeller. 9-10 haftadan sonra gebelik korpus luteumun işlevini plasantta üstlenince hacim olarak küçülür. Ancak gebelik boyunca kalarak progesteron ve östrojen salgılamaya devam eder. Ayrıca gebelik korpus luteum relaxin salgılar, bu hormon miyometrium kontraksiyonlarını engelleyerek gebeliğin devamını sağlar.

### 2.3. Leptin

Leptin sözcüğü, Yunanca 'leptos' dan köken alır ve ince ya da zayıf anlamına gelmektedir (Halaas 1995). Kökeni yağ doku olup, ob geninin bir ürünüdür. Zhang ve ark. Tarafından 1994 yılında tanımlanmış bir moleküldür (Zhang 1994). Leptin 167 aminoasit içeren, 16 kDa molekül ağırlığında olup birçok dokudan salgılandığı saptanan, plazmada belirli bir kan düzeyi oluşturan, kanda serbest veya proteine bağlı olarak taşınan bir polipeptiddir (Zhang 1994).

Leptin geni insanda 7. kromozomun uzun kolunun 3. bölgesinde bulunmaktadır. 15000 baz çifti içeren bir DNA yapısına sahiptir (Banks 2003, Yan vd 2002).

İnsan fizyolojisinde leptinin rolü gittikçe daha fazla açıklık kazanmaktadır. İnsanlarda yiyecek alımı ve obezitede, enerji dengesinin düzenlenmesinde, pubertenin başlangıcının kontrolünde, hipotalamik – pituiter fonksiyonların regülasyonunda ve insülin direncinde önemli roller oynamaktadır (Kirel 1998, Christos 1999).

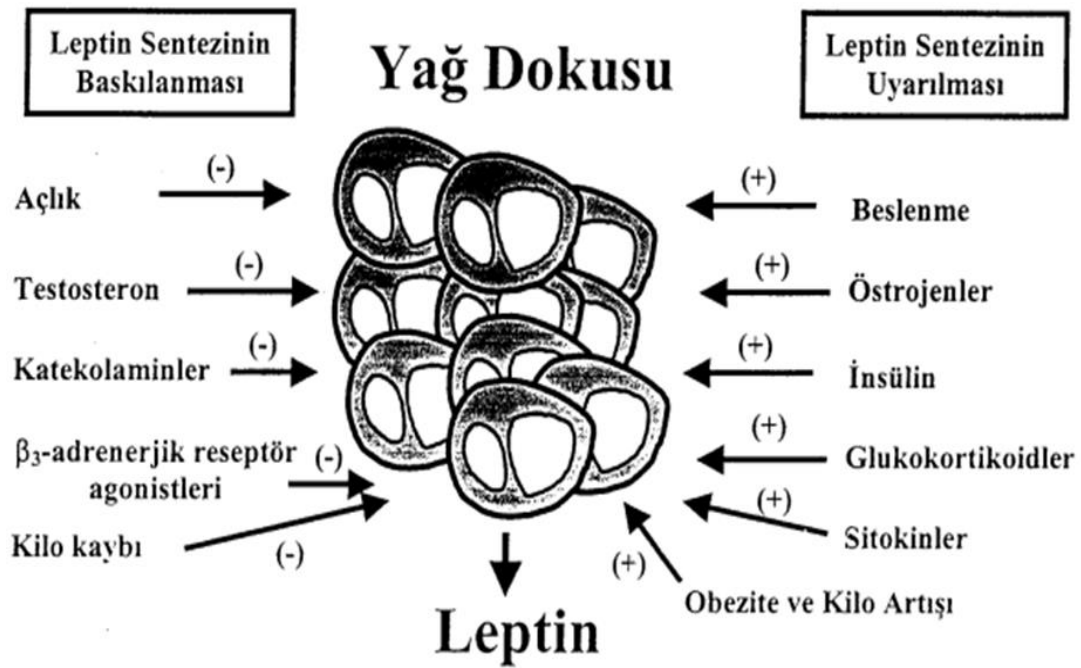
Jackson laboratuvarı 1950'de, önce ob/ob olarak adlandırılan otozomal resesif bir mutasyon keşfetti. Bu mutasyon; erken yaşlarda ciddi obezite, hiperfaji, diyabet ve enerji tüketiminde azalmaya sebep olmaktadır. Kennedy ve arkadaşları 1953 yılında, vücut yağ dokusu depolarının durumunu beyine bildirerek enerji alımını ayarlayan, yağ dokusunda yapılan ve dolaşıma verilen bir faktörün var olduğunu ileri sürdüler. Hervey, 1958 yılında kobayların dolaşımında doygunluk veren bir faktörün varlığını gösterdi. Daha sonra 1990 yıllarına kadar genetik açıdan şişman sıçanlarda, özellikle otozomal resesif kalıtımla geçen ob (obese) ve db (diabetes) genlerindeki mutasyonlar üzerinde çalışmalar yapıldı. Bu çalışmaların yapıldığı ob/ob ve db/db sıçan modelleri tek gen (monogenik) kaynaklıdır. Söz konusu mutasyonlar birbirinden farklıdır. Bu mutant genler otozomal resesif geçer. Bu iki hayvan soyunun fenotipleri birbirine çok

benzer. Erken yaşta major obezite görülür ve polifaji vardır. Enerji tüketimi azalmıştır. Hiperglisemi ve hiper insülinemi dikkat çekicidir. Fizyolojik deneylerden alınan sonuçlar, ob/ob sıçanlarının doyma sağlayan faktörlerden yoksun olduklarını göstermiştir. db/db sıçanlarda ise doyma sağlayan faktör bol miktarda olduğu halde bu faktörün etkisine direnç vardır. Bu doyma sinyali veren faktör 1994 yılında 'leptin' olarak adlandırılmıştır. Rockefeller üniversitesinden Jeffrey Freedman'ın ekibi 1994'de ob genini ve ob geninin ürünü leptini kodlayan geni klonladılar (Hatemi 1997, Kirel 1998).

Leptin vücutta başlıca adipoz dokudan sentezlenir ancak mide fundusu, iskelet kası, karaciğer ve plasentadan üretimi de gösterilmiştir. Kanda serbest ve proteine bağlı olmak üzere iki formda bulunur. Leptinin aktivitesinden serbest formun sorumlu olduğu düşünülmektedir. Obez bireylerde serumdaki leptinin büyük kısmının serbest formda olduğu belirlenmiştir. Leptinin dolasımdaki yarı ömrü yaklaşık olarak 30 dakikadır ve pulsatif olarak yemeklerden 2-3 saat sonra salgılanır (Aslan vd 2004).

Serum leptin düzeyleri kadınlarda erkeklere oranla daha yüksektir (Emral 2006). Bu durum kadınlarda yağ dokusu fazlalığı ve deri altı/viseral yağ oranının daha fazla olması ile açıklanmaktadır (Aslan vd 2004). Leptin düzeyinin en önemli belirleyicisi vücut yağ kitlesi ve vücut kitle indeksi (VKİ) olsa da birçok faktör leptin düzeyinin kontrolünde rol oynar. Obezite, gıda alımı, glukoz, hiperinsülinemi, glukokortikoidler ve prolaktin leptin sentezini artırırken, açlık, tiroid hormonları, büyüme hormonu, serbest yağ asitleri, soğuğa maruz kalma ve katekolaminler leptin salınımı ve ekspresyonunu azaltır (Aslan vd 2004). Yağ dokusunda leptin sentezini artıran ve azaltan faktörler şekil 2.1.' de gösterilmiştir.





**Şekil 2.1.** Leptin sentezinin düzenlenmesi (Kocabaş, 2003)

Serum leptin düzeyi kadınlarda erkeklere oranla daha yüksektir. Bu durum kadınlarda yağ dokusu fazlalığı ve cilt altı yağ oranının daha fazla olması ile açıklanmaktadır (Ostlund 1996).

Leptin düzeyinin ana belirleyicisi vücut yağ kitlesi ve vücut kitle indeksi (VKİ) olsa da birçok faktör leptinin regülasyonunda rol almaktadır (Frederich vd 1995). Yemek esnasındaki insülin sekresyon piki sonrası leptin ekspresyonu artar. Bununla beraber insülin adiposit kültürlerinde leptin ekspresyonunu direkt olarak stimüle eder. İnsülin eksikliğinde leptin düzeyi düşük olup insülin tedavisiyle leptin düzeyi yükselir (MacDougald 1995, Saladin 1995). (Tablo 2.1).

**Tablo 2.1.** Leptin sentezini etkileyen faktörler (MacDougald 1995, Saladin 1995)

Uyaranlar	Baskılayanlar
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Besin alınımı</li> <li>• İnsülin</li> <li>• Glukokortikoidler</li> <li>• Prolaktin</li> <li>• Östrojenik hormonlar</li> <li>• TNF alfa (akut)</li> <li>• Ateş</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tiroid hormonları</li> <li>• Büyüme hormonu</li> <li>• Somatostatin</li> <li>• Yağ asitleri</li> <li>• Katekolaminler</li> <li>• Androjenik hormonlar</li> <li>• TNF alfa kronik</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endotoksemi</li> <li>• Metil p tirozin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Açlık Egzersiz</li> <li>• Uzun süre soğuğa maruz kalma</li> </ul>
--	--

Plazma insülin seviyesiyle leptin konsantrasyonu arasında bir korelasyon vardır. Yapılan çalışmalarda uzun süreli hiperinsülinemide plazma leptininin arttığı bulunmuştur. İnsülinin leptin üretimini yağ hücresinde ob-genini stimüle ederek indirekt yolla arttırdığı söylenebilir (Kolaczynski 1996, Segal 1996). Leptin yokluğunda hayvanlarda ve insanda obezite ve tip-II diyabet geliştiği bilinmektedir. Leptinin tip-II diabetes mellitusta insüline direnç gelişiminde rolü vardır (Cusin 1995).

Uzun süreli insülin infüzyonu veya suprafizyolojik insülin düzeyleri dolaşan leptin düzeyini artırmaktadır. Ancak akut insülin enjeksiyonu leptin düzeyinde değişiklik yapmaz (Christos 1999, Hatemi 1997).

Leptin sekresyonu menstrual siklus süresince değişikliğe uğrar. Folliküler fazda düşük iken ovulasyonda pik yapar ve luteal faz boyunca yüksek seyrederek ve menstruasyonun başlamasıyla birden plazma düzeyleri düşer (Hardie 1999, Mantzoros 1999).

Leptin, yağ asidi sentezinde hız sınırlayıcı enzim olan Asetil Ko-A karboksilaz aktivitesini inhibe ederek yağ asidi ve trigliserid sentezini azaltıp lipid oksidasyonunu artırır (Auwerx 2000). Yüksek doz leptin pankreasın  $\beta$  hücrelerinden insülin salınımı üzerine inhibitör etki göstermektedir (Huang 2000). Leptin, tiroid hormonlarının seviyesini ve sempatik sinir sisteminin aktivasyonunu artırarak kenetlenmeyi bozucu protein (UCP) oluşumunu ve sonuçta termogenezi (ATP sentezi yerine ısı açığa çıkmasını) artırır (Rocío Sierra-Honigmann 1998).

Leptinin yarı ömrü insanlarda yaklaşık 25 dakika, sıçanda 3 ile 10 dakika arası (Harris 1997) farelerde ise 1-3 saat arasındadır (Harris vd 1997).

Organizmada böbrekler tarafından dolaşımdan alınarak idrarla atılır (Esler 1998). Sağlıklı erişkinlerde plazma leptininin fizyolojik sınırları 5-20 ng/ml düzeyindedir (Caro vd 1996).

Leptin seviyesi öğleden sonra yükselmeye başlar ve gece yarısından sonra pik yaparak gün doğumuna doğru en alt seviyelere iner (Van Aggel-Leijssen 1999). Sıçan ve insanlarda leptin büyük ölçüde böbrekler ve karaciğer tarafından itrah edilir (Zeng 1997).

Steroid hormonların, insülinin ve noradrenalinin leptin salınmasında uyarıcı etkiye sahip olduğu, melatonin hormonunun ise, leptin üretimini azaltıcı etkisi olduğu tespit edilmiştir (Ahima vd 2004, Zhang vd 2005). Ancak bunun üzerine çelişkili sonuçlar

vardır. Glukokortikosteroidler, beyaz yağ dokusuna etki ederek leptin sentez ve salgılanmasını doğrudan uyarırken, prostaglandin E2 ve araşidonik asit de leptin salgılanmasını dolaylı olarak arttırmaktadır. Siklik Adenozin Monofosfat (cAMP) düzeyinin artması, leptin salgınımını inhibe ederken, adenilat siklaz uyarıcıları (forskalin ve isoproterenol gibi) leptin salgılanmasını baskılamaktadır (Zhang vd 2005).

Leptin, sadece adipoz doku ile orantılı olarak salgılanan ve santral etkisiyle kilo alımını düzenleyen bir hormon değil, aynı zamanda immün sistem üzerine çok çeşitli etkileri bulunan düzenleyici bir sitokindir (Özbalcı vd 2007).

Leptin ve leptin reseptör defekti olan farelerde immün fonksiyonların bozulduğu tespit edilmiştir. Bu bozukluklar başlıca hücre aracılı immün yanıtta olmaktadır ve özellikle viral ve bakteriyel infeksiyonlara karşı yanıtta azalma ve azalmış makrofaj fonksiyonları şeklinde kendini göstermektedir (Aslan vd 2004, Emral 2006, Hekioğlu 2006). Leptin, monosit ve makrofajların proliferasyonunu uyarır (Santos-Alvarez 1999).

Leptin düzeyinin düşük olduğu durumlarda veya doğuştan leptin düzeyi düşük olan deney hayvanlarında ve insanlarda timusun hacimce küçüldüğü, lenfosit sayısının azaldığı ve lipopolisakkaritlerle oluşan sepsisin daha ölümcül seyrettiği gösterilmiştir (Özbalcı vd 2007).

Leptinin ana etki mekanizması birçok hipofizer hormonun regülasyonunda görev alan ve asıl etkisi iştah artırmak olan nöropeptit-Y'nin arkuat nükleusdan salgınımı ve ekspresyonunu inhibe etmektir. Başlıca tokluk faktörü olarak tanımlanmış olan leptinin sadece enerji regülasyonunda rol almadığı cinsel gelişim, üreme, hematopoez, immünite, gastrointestinal fonksiyonların düzenlenmesi, sempatik sinir sistemi aktivasyonu, anjiogenez ve osteogenezisde de önemli rolleri olduğu saptanmıştır (Aslan vd 2004).

İnsanda serum leptin seviyesinin konsantrasyonu cinse bağlı farklılık göstermektedir. Kadınlarda daha yüksek olan serum leptin düzeyi için, farklı üreme hormonları ve kadınların daha fazla subkutan yağ dokusu içermeleri sorumlu tutulabilir. Subkutan leptin ekspresyonunun omental leptin ekspresyonundan anlamlı olarak yüksek olması ve kadınlarda da subkutan yağın omental yağa oranla daha fazla olması bu görüşü desteklemektedir (Kirel 1998, Christos vd 1999).

Androjenler, kültürdeki adipozitlerde leptin sekresyonu ve leptin mRNA üretimini inhibe ederek erkeklerde serum leptin konsantrasyonlarının pubertedeki düşüklüğüne kısmen aracılık etmektedir. Gecikmiş pubertesi olanlarda testosteron tedavisi ile serum leptin konsantrasyonlarında ve orantılı olarak vücut yağ içeriğinde azalma oluşmaktadır (Garcia Mayor vd 1997, Blum vd 1997, Roemmich vd 1999, Ahmed vd ).

Üreme sisteminin matürasyonunun düzenlenmesinde görev alan leptinin ilk belirtisi dişi ob/ob farelerin kısır olduğunun bulunmasıdır ki, bunlar leptin muamelesiyle fertil hale getirilebilmiştir (Bray 1979).

Leptin seviyesi dişi ve erkek de pubertenin başlangıcından önce artar ve bu artışın puberte başlangıcını tetikleyebileceğine inanılmıştır (Garcia Mayor vd 1997, Mantzoros vd 1997). Ayrıca serum leptin seviyesinin dişi pubertal gelişim boyunca artışı, FSH – LH – östradiol hormonlar gibi puberteyle ilişkili diğer üreme hormonları artışından önce gelmektedir. (Garcia Mayor vd 1997, Blum vd 1997, Carlsson vd 1997, Palment vd 1998). Yine de leptinin pubertedeki etki mekanizmasının nasıl olduğu tam olarak bilinmemektedir (Almog vd 2001).

Leptin enjekte edilmiş hayvanlarla kontrol hayvanlarının karşılaştırılması sonucunda, leptin enjekte edilmiş hayvanlardaki serum leptininin 2 ila 5 katı bir artma olmuştur (Almog vd 2001).

Leptin başlıca beyaz adipoz doku olmak üzere plasental trofoblast hücreleri tarafından da üretilmektedir (Zhang vd 1994).

Fetüsteki leptin plasenta ve fetal dokular tarafından üretilir. Leptin fetal kord kanında gestasyonunun 18'nci haftasından itibaren saptanır. Otuz dört haftaya kadar konsantrasyonu çok düşüktür. 34. üncü haftadan itibaren leptin konsantrasyonu dramatik olarak artmaya başlamaktadır (% 500 veya daha fazla). Bu yükseliş yağ kütlesi ve vücut ağırlığında aynı zaman periyodu içinde meydana gelen büyük artışla açıklanabilir. Kord kanındaki leptin, konsantrasyonu ile düzenlenmektedir. Enerji rezervlerini beyine iletmenin dışında yenidoğan infantlarda hematopoez ve lenfopoezi yükseltir (Christos vd 1999, Roemmich vd 1999).

Erişkin ve ergenlik dönemlerinde kadınlarda leptin düzeylerinin erkeklere kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu bulgu kadınların daha fazla vücut yağ dokusu kitlesine sahip olmaları ile açıklanmıştır. Post menopozal kadınlarda, premenopozal kadınlara göre daha düşük leptin düzeyleri saptanması, leptin metabolizmasının östrojen ve progesteron ile ilgili olduğunu akla getirmiştir. Ancak postmenopozal kadınlarda yağ dokusu kitleleri aynı olan erkeklerden daha yüksek leptin düzeyleri saptanmıştır. Hipogonadizmli erkeklerde benzer vücut kitle indeksine sahip erkeklere göre 3 kat daha yüksek leptin düzeyleri ölçülmüştür. Aynı erkeklere testosteron verildiğinde leptin düzeylerinin normale dönmesi androjenlerin leptin sentezi üzerine baskılayıcı etkileri olduğunu akla getirmiştir (Kirel 1998)

Leptin tüm fizyolojik etkilerini reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirir. Leptin reseptörü (OBR), sitokin reseptör ailesinin bir üyesidir ve farklı kesimler sonucu en az beş farklı

izoformunun olduğu kabul edilmektedir. Bunlar; OB-Ra, OB-Rb, OB-Rc, OB-Rd, OB-Re'dir (Moran ve Phillip 2003; Ahima ve Osei 2004; Zhang vd 2005). Bu reseptörlerin N terminalleri aynıdır fakat C terminal bölgeleri farklılık gösterir (Zhang vd 2005). Leptin, dolaşımında hem serbest hem proteine bağlı olarak bulunmaktadır. Leptin hormonunun aktivasyonundan serbest formun sorumlu olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda obez bireylerde serumdaki leptinin büyük kısmının serbest formda olduğu tespit edilmiştir (Sinha vd 1996, Brabant vd 2000). Dolaşımında çözülmüş olarak bulunan OBRe, plazmada leptin bağlayıcı protein olarak görev yapar ve aktif leptinin plazmadaki konsantrasyonunun düzenlenmesinde görev alır. Leptin ve OBRe anlatımı negatif-geri bildirim mekanizması ile düzenlenir. Plazma OBRe konsantrasyonu fizyolojik ve patofizyolojik koşullarda leptinden bağımsız olarak kontrol edilir (Moran ve Phillip 2003, Smith vd 2005, Zhang vd 2005).

Leptin ve reseptörlerinin birçok periferel dokuda ve sinir sisteminde gen anlatımının olması, leptinin çok fazla fizyolojik etkiye sahip olduğunu gösterir. Leptinin etkileri, merkezi ve periferel olmak üzere iki kısma ayrılabilir. Leptinin merkezi etkilerinde, genel olarak açlık ve tokluk ile üremenin düzenlenmesi ele alınmaktadır. Periferel etkileri arasında otonom sinir sistemi metabolizması, linear büyüme, hematopoez, diyabet, transplantasyon ve onkolojik hastalıklar sayılmaktadır (Moran ve Phillip 2003).

Leptin reseptörleri sitokin ailesine aşırı benzerliği nedeniyle klas I reseptör ailesinden sayılmaktadır. Leptin, IL-6 ve IL-11 ile yüksek oranda benzerlik gösterirken, leptin reseptörleri de IL-6 ile homoloji göstermektedir (Aslan vd 2004, Hekimoğlu 2006). Leptin reseptörleri OB-Rb (uzun reseptörler) ve OB-Ra (kısa reseptörler) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. OB-Rb reseptörleri sinyal transdüksiyonu kapasitesine sahiptir ve en çok hipotalamusta bulunmalarına rağmen vücudun diğer dokularında da (akciğer, böbrek, karaciğer, hematopoetik hücreler, CD4+ ve CD8+ lenfositler, endotel hücreleri, plateletler, yağ dokusu) saptanmıştır. OB-Ra reseptörler intraselüler sinyal üretimi için gerekli olan segmentlerin tümünü taşımazlar ve bu nedenle sinyal iletiminde rolleri çok az veya yoktur. OB-Ra reseptörlerin başlıca bulunduğu dokular ise böbrek, akciğer, koroid pleksus ve beyin kapilleridir. OB-Ra reseptörlerin leptinin merkezi sinir sistemine transportunda önemli görevleri olduğu düşünülür (Aslan 2004, Fantuzzi 2000).

Leptin reseptörleri damar endotel hücrelerinde mevcuttur ve anjiogenezisi artırır. Leptin, normal rat korneasında yeni damar oluşumuna neden olurken leptin reseptörü yetersiz olan Zucker fa/fa rat korneası için etkisiz olmuştur (Rocío Sierra-Honigmann 1998). Hem in vitro hem in vivo çalışmalar, leptinin anjiyogenezis ilerletici aktivitesi olduğunu göstermiştir. Bununla beraber ob/ob farelere sistemik veya topikal olarak

leptin verilmesi anjiyogenezi etkilemeden yara iyileşmesini hızlandırmaktadır (Bouloumié 1998). Endotelial hücrelerde leptin reseptörlerinin olduğu ve leptinin anjiyogenezi indüklediği belirtilmiştir (Aslan vd 2004). Ayrıca leptin endotelial hücrelerde kendi spesifik reseptörleri ile nitrik oksit üretimini indükler (Aslan vd 2004).

## 2.4. Apoptozis

Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (Akşit vd 2008, Tomatır 2003, Öztürk 2002). Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır. Köken olarak "apo-TOE-sis" 'den gelmektedir ve eski Yunanca'da "sonbaharda yaprak dökümü" anlamına gelmektedir (Touchette vd 1993). Hücrelerin doğru yer, zaman ve sayıda olmasını sağlayan apoptozis mitoz ile dokuda sürekli bir denge halindedir (Cummings vd 1997). Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir (Majno vd 1995, Schwartzman vd 1993).

Apoptoz, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. İnsanlarda ve pek çok canlıda normal intrauterin gelişme ve erişkin yaşamı için hayati önem taşımaktadır. Apoptoz hücre içinden veya dışından gelen ölüm sinyalleri ile başlar. Bu sinyaller iki ana apoptotik yolu; hücre dışı/ hücre ölüm reseptörü ve hücre içi/mitokondrial yolu harekete geçirirler. Apoptoz sırasında bir grup proteaz harekete geçerek, DNA kırılmasına, hücre büzüşmesine ve hücre yüzeyinde çıkıntılar oluşmasına neden olur. Apoptotik hücreler, apoptotik cisimlere ayrılarak fagositler ve çevre hücreler tarafından dokudan uzaklaştırılırlar. İnsanlarda apoptotik mekanizmanın bozulması kanser, otoimmün ve nörodejeneratif hastalıkların gelişmesine neden olabilir. Bu hastalıklarda apoptozu kontrol eden mekanizmaların anlaşılması yeni tedavi çabalarına kapı açabileceği için önemli görünmektedir (Öztürk 2002).

Hücrenin yaşam süresi tipine göre değişmektedir. Örneğin; bağırsak hücreleri 3–5 günlük bir yaşam süresini takiben ölürken, derinin epidermal hücreleri 20–25 günlük bir süre sonunda ölmektedir. Kalp kası hücreleri veya nöronlar ise ömür boyu yaşarlar. Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için, fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılır (Ulukaya 2003). Apoptozla hücre ölümü; enerji kullanılarak hücresel yaralanma ve enflamasyon olmaksızın, ustaca gerçekleştirilir (Guimaraes vd 2004).

Programlı hücre ölümünün, bütün çok hücreli organizmalarda, gelişmede ve homeostazın sürdürülmesinde vazgeçilmez bir rolü vardır (Tomatır 2003).

Bir dokuda hücre proliferasyonu mitoz bölünme, hücre sayısının olması gerektiği sayıda dengede kalması durumu ise apoptozis ile sağlanır. Apoptozis ve mitoz bölünme dokuda sürekli bir denge halindedir. Ancak apoptozis süreci, mitoz bölünmeye oranla 20 kat daha hızlı gerçekleşmektedir. Normal apoptotik hücre ölümü ile ortadan kalkan hücreler ile bu hücrelerin yerine şekillenen yeni hücrelerin toplam sayısının günde yaklaşık  $1 \times 10^{11}$  hücreyi bulduğu hesaplanmıştır. Bu hızda bir hücre ölümü ve yeniden yapımı bir insanın vücut ağırlığının her 24 ayda bir yenilenmesi anlamına gelmektedir (Kroemer vd 2009).

#### **2.4.1. Apoptozisin Morfolojisi**

Apoptozisde ana morfolojik olay, çekirdek yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır (Galle 1997). İmmun elektroforez yapıldığında 'ladder pattern' olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşur (Walker vd 1999). Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılmazken, apoptoziste yaklaşık 300.000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz (Öktem vd 2001, Zhang vd 2002). Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, bir kaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler. Bu görünüm muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlıdır (Wijsman vd 1993). Apoptotik hücrelerin bulunduğu dokulardan elde edilen kesitler ışık mikroskopunda incelendiğinde, hücreler etrafında açık bir parlama şeklinde görülmektedir (Öktem vd 2001). Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Apoptotik hücreler komşu hücreler ile makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir (Dayan vd 2003). Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma membranındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yaprağına göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidilserin ile bağlanır ve fagositozu uyarır (Öktem vd 2001). Apoptozis, tek bir hücrede, büzülme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Hücresel büzülmenin nedeni Na, K, Cl taşıyıcı sistemin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptotik uyarımı alan hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur. Elektron mikroskopunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklaşmalar oluşur

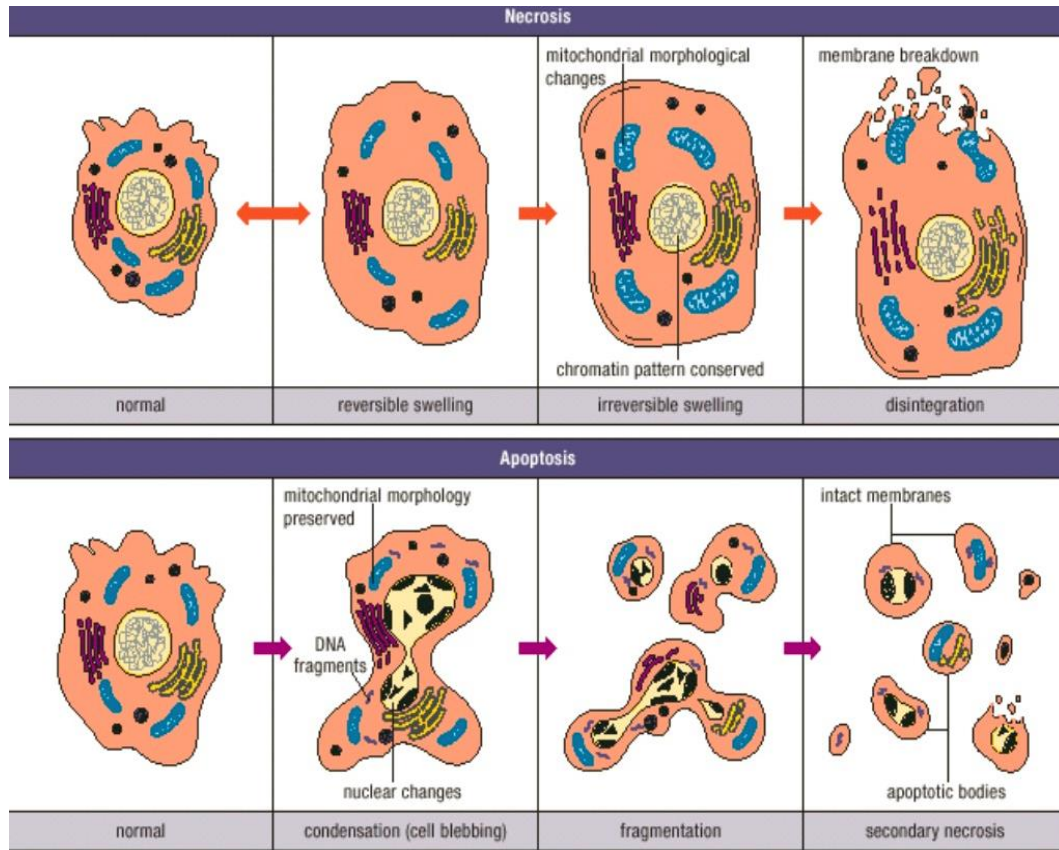
ki bu yapı 'zeiozis' olarak tanımlanır. Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır (Tomatır 2003). Fosfolipitler, yani iç tabakada bulunan fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin ile dış tabakada bulunan fosfatidilkolin asimetrik olarak dağılmışlardır. Normal hücrelerde bu asimetri ATP'ye bağlı translokaz ile aktif olarak korunmaktadır. Apoptoz sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu sonucu fosfatidilserin dış yüzey tabakaya yerleşir. Bu durum apoptotik cisimciğin fagositozu için bir uyarıdır. Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyardıktan, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler. Hücre iskeleti apoptozda önemli bir role sahiptir (Saraste vd 2000). Elektron mikroskopunda apoptozis esnasında, kromatinin yoğunlaşması, sitoplazmanın büzülmesi, plazma membranının kabarması, mitokondri dış membranında şişme, mitokondrial membran aralığında sitokrom c ve bir oksidoredüktaz ile ilişkili flavoprotein olan Apoptozis İndükleyici Faktör (AIF) salınımı, olduğu bildirilen morfolojik değişikliklerdendir (Roshal vd 2001)

Apoptotik süreçte meydana gelen en önemli morfolojik değişiklikler çekirdekte gözlenir. Apoptozisin en belirgin karakteristik özelliği; kromatininin çok yoğun hale gelip parçalar halinde bir araya toplanarak nükleus zarının çevresinde kondanse (yoğunlaşmasıdır) olmasıdır. Kromatin çekirdek zarına yakın kısımlarda yoğunlaşarak, değişik şekil ve büyüklüklerde çöker. Elektron mikroskop ile bakıldığında kromatinin yoğun granüler, yarım ay, hilal veya yüzük şeklinde çekirdek membranının iç yüzünde yerleştiği izlenir (Kerr vd 1972).

Apoptoziste süperkondens bir hal alarak çekirdek zarı altında kresentik görünüm oluşur. Floresan boyamada DNA boncuklanmalar şeklinde görülür, bunun nedeni DNA'nın endonükleaz ile oldukça özgül şekilde internükleozomal bölgelerden 180-200 bp (baz çifti) büyüklüğünde parçalara ayrılmasıdır (Narula vd 1997). İmmün elektroforez yapıldığında "ladder patern" olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşur (Gavrieli vd 1992).

Diğer bir hücre ölüm şekli olan nekroz ise hipoksi, fiziksel hasar, hipertermi, kompleman aktivasyonu, UV ışık gibi zararlı hücre dışı uyaranlar sonucu oluşan istenmeyen bir süreçtir. Hücre plazma membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu hücre içeriği ortama dökülür, inflamatuvar yanıt oluşur ve komşu hücreler de etkilenir (Searle vd 1982). (Şekil 2.2) (Tablo 2.2).





**Şekil 2.2.** Nekroz ve apoptozis arasındaki farklar (Hamarat 2008).

**Tablo 2.2.** Nekrozis ve apoptozis arasındaki farklılıklar

ÖZELLİK	APOPTOZ	NEKROZ
Yol Açan Nedenler	Büyüme faktörü eksikliği, Hücre yaşlanması , HIV, Kanser ilaçları, Radyasyon, Sitotoksik T lenfositler	İskemi, Hipotermi, Hipoksi, Litik viral enfeksiyon, Toksik maddeler, Ağır metaller, Şiddetli oksidatif stress

Morfolojik Özellikleri	Hücre membranı sağlamdır. Hücre küçülür. Kromatin kondensasyonu gerçekleşir. Organeller sağlamdır. Apoptotik cisimcikler oluşur. Erken evrede fosfatidil serin translokasyonu gözlenir.	Hücre membranı bütünlüğü kaybolur. Hücre şişer. Büyük vakuoller oluşur. Organellerin parçalanır. Hücre lizisi gerçekleşir. Fosfatidilserin Translokasyonu yoktur.
Biyokimyasal özellikleri	Programlıdır. ATP gerektirir. DNA kırıkları merdiven şeklini alır (jel elektroforezinde ladder apoptozisin en önemli belirteci) DNA internukleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonukleozomlara ayrılır	İyon dengesi bozulur. ATP gerekmez. DNA rastgele parçalanır (Jel elektroforezinde smear).
Diğer özellikleri	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür. Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir. Makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Enflamasyon görülmez.	Hücreler gruplar halinde ölür. Patolojik etkiler sonucu gerçekleşir. Lizozomal enzimler salınır. Enflamasyona neden olur.

#### 2.4.2. İnsan Organizmasında Apoptozun İzlendiği Durumlar

Embriyogenez ve fütogenez sırasında normal gelişimin sağlanabilmesi amacıyla, oluşmuş olan hücrelerin bir kısmı apoptoza gitmektedir. Sinir sistemi gelişirken çok fazla sayıda nöron ve sinaps oluşur. Apoptoz ile nöronal havuz hedef olan miktara indirilmekte, aksonları hedeflerine ulaşmayan nöronlar ortadan kaldırılarak nöronlarla hedef organlar arasında oluşan bağlantı hataları onarılmaktadır (Fox vd 2001). İmmun sistemde ise, oluşan fazla ve otreaktif hücreler ortadan kaldırılarak, bunların embriyo veya fütusa zarar vermesi engellenmektedir. (Mountz vd 2001, Afford vd 2000)

İntrauterin gelişim sırasında el ve ayak parmaklarının arası başlangıçta kapalı iken parmaklar arasındaki hücrelerin apoptoz ile yıkılması ile parmaklar birbirlerinden ayrılmaktadır (Fox vd 2001, Cotran vd 1999). Embriyonun gelişmekte olan epidermisinin en üst sırasındaki bazı hücreler (periderm) de apoptoza giderek amnion sıvısına atılırlar (Fox vd 2001). Apoptoz embriyonal gelişmenin erken dönemlerinde de izlenmekte, ayrıca böbrek taslaklarının dejenerasyonunda da önemli rol üstlenmektedir (Carlson 1999, Lodish vd 2000).

Yapılan çalışmalar apoptozun, embriyonun maternal desidua tarafından reddinin engellenmesinde de önemli olduğunu göstermektedir (Sanders vd 1997).

Erişkinlerde hormon yetmezliğine bağlı olarak gelişen organ gerilemelerinde apoptoz rol almaktadır. Örneğin menstrasyonda endometrial hücre yıkımı, menapozda ovaryum folliküllerinin atrezisi, laktasyon sonrasında meme bezi gerilemesi, orşiektomi sonrasında prostat atrofisi gelişmesi gibi. (Wyllie vd 1992, Mountz vd 2001, Pole vd 2002).

Proliferasyona uğrayan hücre topluluklarında (barsak kript epiteli) apoptoz sık oluşur.

Pankreas, parotis ve böbrek gibi organlarda kanal obstrüksiyonlarına bağlı olarak gelişen atrofilerde apoptoz izlenir.

Çeşitli viral hastalıklarda apoptoz görülür. Örn: Viral hepatitte karaciğerde oluşan apoptotik hücreler (Concilman cisimcikleri ) gibi.

Apoptozis, organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Örneğin virüsle enfekte hücreler bu yolla ortadan kaldırılır. Hasarlı DNA da apoptozis yolu ile ortadan kaldırılır (Cooper 1994, Nagata 1997). Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır (Perkins 1997).

Hücrel immun red ve graft vs host reaksiyonlarında sitotoksik T lenfositler (CTL) aracılığı ile apoptoz oluşur.

T ve B lenfositler sitokin yetersizliğine bağlı olarak apoptoza gidebilirler.

Tümörlerde, özellikle regresyona gittikleri dönemlerde apoptoz görülür.

Hücrelerde hasar oluşturan çeşitli etkenler normalde nekroza neden olurken düşük dozlarda apoptosis oluşturabilmektedir. Örn: Isı, radyasyon, antikanser ilaçlar, hipoksi vb (Mountz vd 2001, Pole vd 2002).

### 2.4.3. Apoptotik Hücre Ölümünün Aşamaları

Apoptoz hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden bir olaylar zinciri olarak seyreder. Sonuçta hücrenin fagositozu ile sona erer. Bu aşamalar;

- I) Apoptozun başlatılması,
- II) Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu,
- III) Hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması,
- IV) Fagositoz, olarak özetlenebilir (Thompson vd 1999).



Şekil 2.3. Apoptoz basamakları (Thompson vd 1999)

### 2.4.4. Apoptozisin Mekanizmaları

Hücrenin kendi otomatik saati olan genlerin aktivasyonu veya çevreden gelen sinyallerle apoptozis başlamaktadır (Erdoğan 2003). Apoptozis önceden hazır olan hücrelerde primer başlatılabilir ya da bir uyarı sonucu sekonder olarak gelişir. Hücre dışı uyaranlar arasında; tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) (Gürbilek vd 2004), IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler önemli yere sahiptir. Otoimmün hastalık gelişiminde rolü olduğu belirtilen Fas/FasL (Bender vd 2005), sFas proteinleri, virüsler de (HIV gp120 proteini, influenza virüsü TNF reseptörü üzerinden; adenovirüs hücre genetik yapısını bozarak) hücreyi apoptozise götürmektedir (Erdoğan 2003). Organizmada apoptozisi uyaran ve engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır (Öktem vd 2001). (Tablo 2.3)

**Tablo 2.3.** Apoptozis ve Genler (Öktem vd 2001)

Apoptozisi baskılayan genler	Apoptozisi indükleyen genler
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bcl-2 grubundan; BHRL-1, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1, A1</li> <li>• c-abl geni</li> <li>• p35</li> <li>• A20</li> <li>• Çözünebilir fas</li> <li>• ras onkogeni</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bcl-2 grubundan; Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, bid, bik, Hrk1</li> <li>• c-myc</li> <li>• p53, p21</li> <li>• fas (CD95/APO1) FADD/MORT, RIP, FAST</li> <li>• interlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE)</li> <li>• interlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE)</li> <li>• LOH (MTS1/CDK41)</li> </ul>

Apoptozisi etkileyen hücre içi uyaranlar arasında sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarında artış, tümör nekroz faktör, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpressör gen olan p-53'ün aktive olması, viral-bakteriyel enfeksiyonlar, glukokortikoidler ve onkojenlerin (cmyc gibi) yer aldığı bilinmektedir. Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler hafif dozlarda apoptoz meydana getirirler. Apoptozda hücre ölümü çevreye rahatsızlık vermeksizin gelişse de bazen apoptozis dolaylı olarak çevre dokuda nekrozu başlatabilir ya da tam tersi nekroz apoptozis gelişmesine yol açabilir (Öktem vd 2001).

Hücrede iç veya dış nedenlerle DNA hasarı oluştuğunda aktive olan bazı genler, hücrenin apoptozuna neden olabilir. Bu genlerden en önemlisi p-53 genidir. İnsan tümörlerinin %50' den fazlasında mutasyona uğradığı tespit edilen p-53 geninin, kanser oluşumunu önlemede kritik rol oynadığı kabul edilmektedir. Normalde inaktif durumda bulunan p-53 geni, DNA hasarı oluştuğunda aktifleşerek p-21 genini harekete geçirir. p-21 geni hücrenin geç G1 fazında kalarak, S fazına geçmesini engeller. Böylece hücre siklusu durdurularak oluşmuş olan DNA hasarlı hücrenin çoğalması engellenir. P-53 geni DNA tamiri yapan proteinlerin transkripsiyonunu sağlar. Bu proteinler DNA hasarını tamir edebilirse, hücre siklusundaki blok kalkar. Hücre hasarının tamiri başarılı olmazsa p-53 geni bax proteinini (bcl-2 grubu proteinlerden, proapoptotik) aktive ederek mitokondri aracılığı ile hücrenin apoptoza giderek ölmesini sağlar. Böylece

DNA hasarlı hücre ortadan kaldırılmış olur.( Mountz vd 2001, Ferri vd 2001, Hatton 2001).

#### **2.4.5. Apoptosis sinyalinin oluşumu**

Apoptosisin indüklenmesinde iki majör sinyal yolunun rol aldığı bilinmektedir. Bunlar “ekstresek” hücre dışı ve “intresek” hücre içi sinyal yollarıdır

1-Ekstresek sinyal yolu

Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanma ile tetiklenme

2- İntresek sinyal yolu

a) Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptosis oluşturulması

b) Endoplazmik Retikulum aracılı apoptosis oluşturulması

##### **2.4.5.1. Ekstresek sinyal yolu (Öztürk 2002)**

Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanma ile tetiklenme ile gerçekleşir. Ekstresek sinyal yolunu dört grupta özetleyebiliriz.

##### **2.4.5.1.1. Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (Reseptör- Ligand etkileşmesi)**

Bazı sitokinler hücre membranında bulunan reseptörlere bağlanarak ölüm programını harekete geçiren sinyaller üretebilirler (Mountz vd 2001, Jersak vd 2002). Apoptozda rol alan membran reseptörleri içinde en önemli grup “tumor necrosis factor receptor (TNFR)” ailesidir. Bu reseptör grubunun en az 19 üyesi vardır. Bu reseptörlerin biyolojik etkileri çeşitlidir ve apoptoz ile sınırlı değildir. Bir kısmı apoptoz oluştururken, bir kısmı proliferasyona neden olur. Bir kısmı ise her ikisini de oluşturur. TNFR içinde apoptoz oluşturan reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNFR1'dir. Bu reseptörler uyarıldıklarında, hücrenin sitoplazmasında bulunan parçaları, “adaptör proteinlere” bağlanır. Adaptör proteinlerin ölüm efektör parçaları vardır. Bunlar da apoptoz için başlatıcı olan kaspazlara (örn: prokaspaz 8) bağlanırlar. (Mountz vd 2001, Jersak vd 2002)

##### **2.4.5.1.2. Fas-Fas Ligand Aracılı Apoptoz**

Bu tip apoptoz hücre yüzey reseptörü Fas (CD95, APO-1) aracılığı ile oluşur. Fas ligandın Fas reseptörüne bağlanması ile Fas reseptörünün hücre içinde bulunan parçası, Fas adaptör proteinle (FADD- Fas adapter protein with a death domain)

birleşerek ölüm başlatan sinyal kompleksini ( death inducing signal complex - DISC) oluşturur. Bu da prokaspaz 8 in aktiveleşmesini sağlar. Fas ligand membrana bağlı veya solubl olabilir. Solubl fas ligand (FasL, CD95L) immun sistem hücreleri tarafından oluşturulur. Bu ligandın T hücreleri membranında bulunan Fas reseptörüne bağlanmasıyla, immün reaksiyonla aktive olmuş ve görevlerini tamamlamış olan lenfositlerin apoptoz ile yok edilmeleri sağlanmış olur(Jones vd 1997, Mountz vd 2001).

#### **2.4.5.1.3. Tumor Necrosis Factor (TNF) Aracılı Apoptoz**

Bir sitokin olan TNF' nin TNF reseptörleri ile birleşmesi (örneğin TNRF1) sonucunda reseptörün hücre içinde bulunan parçası, TNFR adaptör protein (TRADD- TNFR adapter protein with a death domain) ile etkileşir. TRADD daha sonra FADD ile birleşerek prokaspaz 8' i aktiveleştirerek apoptoza neden olur. Fas reseptörünün aksine, TNFR1' in TRADD' la etkileşmesi her zaman apoptoz ile sonuçlanmaz. TRADD, FADD yerine başka adaptör proteinlere bağlanabilir. Bunun sonucunda önemli bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör- kB (NFkB) harekete geçebilir. Bu durumda hücre canlı kalır. Hücrede hangi yolun, nasıl seçildiği açık değildir. Ancak, hücrede aktif NFkB (bazı tümörlerde bulunur) bulunduğu zaman, hücrenin canlı kaldığı düşünülmektedir (Mountz vd 2001).

#### **2.4.5.1.4. Sitotoksik T lenfosit Aracılı Apoptoz**

Sitotoksik T lenfositler (CTL) infekte olmuş olan konakçı hücrelerin yüzeyinde bulunan yabancı antijenleri tanırlar. CTL'lerin ana görevi malign ve/veya virus ile infekte olmuş olan hücrelerin öldürülmesidir (Mountz vd 2001, Budd 2002). Yabancı antijenleri tanıdıklarında yüzeylerinde Fas ligand oluşur. Hedef hücrelerin Fas reseptörlerine tutunurlar. CTL' ler sitoplazmalarında granzyme B (serin proteaz) ve perforin adı verilen ve apoptoz oluşmasını sağlayan proteinler içeren sitoplazmik granüllere sahiptirler (Budd 2002). Perforin, transmembran por oluşturucu bir proteindir. CTL'ler hedef hücrelerin membranlarında perforin ile porlar oluşturarak, sitoplazmalarına granzyme B salgırlar. Granzyme B hedef hücrelere girerek kaspazları aktive eder (Mountz vd 2001).

#### **2.4.5.1.5. Hücrelerin Maruz Kaldığı Dış Etkenler**

Hipoksi, ısı, antikanser ilaçlar, radyasyon, gamma ve ultraviyole ışınlar gibi etkenler apoptoza neden olabilirler. Bu etkenler DNA hasarı oluşturarak apoptoz meydana getirirler (Afford vd 2000, Mountz vd 2001).

#### **2.4.5.2. İntrensek Sinyal Yolu**

##### **2.4.5.2.1. Mitokondriyal Yolak Yoluyla Apoptozis Oluşturulması**

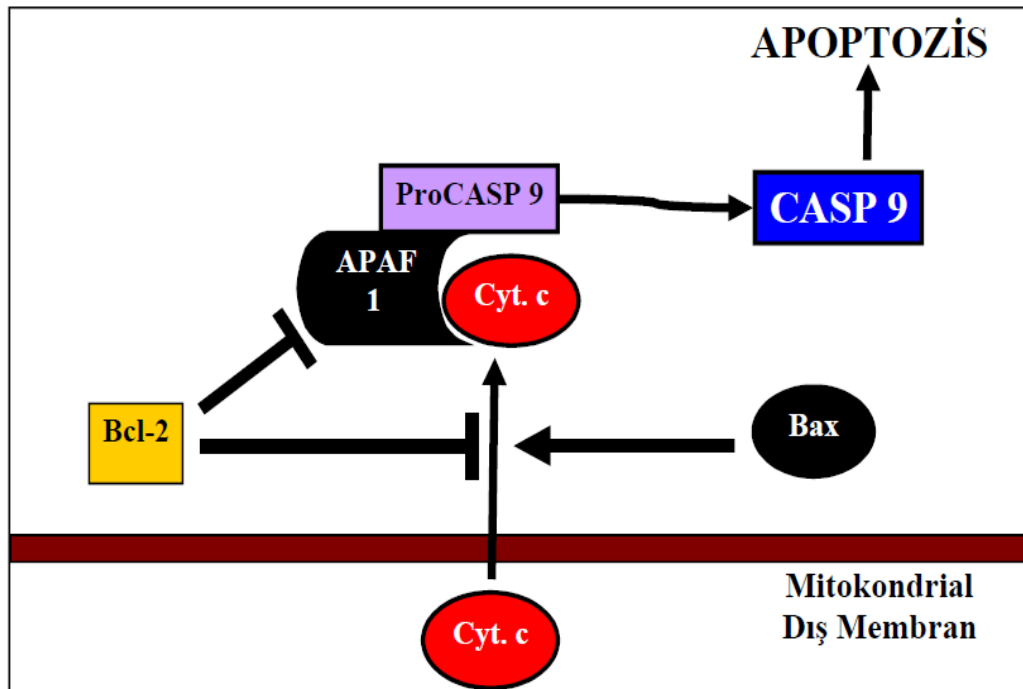
Sitokrom-C mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteinidir. Sitokrom-C'nin mitokondriden sitoplazmaya saliverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede irreversibl bir döneme girildiğini işaret eder. Sitokrom-C mitokondriden apoptozis-indükleyici faktör (AIF, apoptosis-inducing factor) ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom-C sitoplazmik protein olan Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1)'e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz 3'ü aktive eder. Aktif kaspaz-3, kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD, inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease) inaktifleştirir, böylece ICAD'ünün bağladığı kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD, caspaseactivated deoxyribonuclease) serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur (Khosravi vd 2004).

Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri pro-apoptotik yani apoptozisi indükleyici (Bax, Bad, Bid, v.b.), etkiye sahiptir. Diğeri ise anti-apoptotik, apoptozisi baskılayıcı (Bcl-2, Bcl-X1) etkiye sahiptir (Tablo 2.4). Pro-apoptotik olanlar, sitokrom-C'nin mitokondriden sitoplazmaya saliverilmesini indüklerler. Anti-apoptotikler ise sitokrom-C saliverilmesini baskırlarlar. Bcl-2 özellikle mitokondri dış membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir. Bax sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır, burada küçük delikçikler "pore" oluşumunu indükler, böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur, sonuçta sitokrom-C ve apoptozis indükleyici faktör olarak bilinen AIF'ün mitokondriden sitozole çıkmasını sağlar (Ulukaya 2003). (Şekil 2.4).



**Tablo 2.4.** Bcl-2 ailesi. (Hamarat 2008)

Bcl-2 Ailesi	
Apoptozisi Baskılayanlar	Apoptozisi İndükleyenler
1.Bcl-2	1.Bad
2.Bcl-xL	2.Bax
3.BHRL-1	3.Bak
4.Bcl-w	4.Bcl-xs
5.Bfl-1	5.Bik
6.Brag-1	6.Hrk-1
7.Mcl 1	

**Şekil 2.4.** Bax/ Bcl-2'nin etki mekanizması (Hamarat 2008)

#### 2.4.5.2.2. Endoplazmik Retikulum (ER) Aracılı Apoptozis Oluşturulması

Bu yol mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptör aracılı apoptozisten farklı bir yoldur. Kaspaz-12, ER membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptozis için esas teşkil eden bir kaspazdır.  $Ca^{++}$  seviyesinin yükselmesi ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile prokaspaz-12 aktiflenir. Ayrıca kaspaz-7 salınımı ile de prokaspaz-12 salınımı arasında bir bağlantı bulunur. Aktiflenmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir.

Kaspaz-9 ile karşılıklı olarak etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder. Son çalışmalar, in vivo ve in vitro olarak kaspaz-12'nin kaspaz-9'u aktive ettiğini göstermiştir (Rao vd 2001).

## 2.5. Apoptoz' un Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler (Galluzi vd 2006)

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri
  - a. Işık Mikroskobu
    - I. Hematoksilen Boyama
    - II. Giemsa Boyama
  - b. Floresan Mikroskobu / Lazerli Konfokal Mikroskop
    - I. Propidium İyodür (PI)
    - II. Hoechst Dye
  - c. Elektron Mikroskobu
  - d. Faz Kontrast Mikroskobu
2. İmmunohistokimyasal yöntemler
  - a. Anneksin V Yöntemi
  - b. TUNEL Yöntemi
  - c. M30 Yöntemi
  - d. Kaspaz-3 Yöntemi
3. Biyokimyasal yöntemler
  - a. Agaroz Jel Elektroforezi
    - I. DNA fragmentasyonu
  - b. Western Blotting
    - I. Substrat kırılmaları
    - II. Aktif kaspaz'ın belirlenmesi
    - III. Sitokrom c saliverilmesi
  - c. Flow" Sitometri
4. İmmunolojik yöntemler
  - a. ELISA
    - I. DNA Fragmentasyonu
    - II. M30 Düzeyi
  - b. Fluorimetrik Yöntem
    - I. Kaspaz Aktivasyonu
5. Moleküler biyoloji yöntemleri
  - a. DNA Microarrays

## **2.6. Hipotez**

H1: Leptin yeni doğan ovaryum dokusunda gelişimi artırır ve apoptozisi azaltır.

H2: Leptin yeni doğan ovaryum dokusunda gelişimi azaltır ve apoptozisi artırır.

H3: Leptin yeni doğan ovaryum dokusunda gelişime ve apoptozise etki etmez.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Hayvanlar ve Bakım Şartları

Bu araştırma Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Çalışmamızda, Pamukkale Üniversitesi Deneyleti Hayvanları Araştırma Birimi'nden alınan 36 adet Wistar Albino türü dişi sıçan kullanılmıştır. Tüm denekler için önerilen optimum çevresel koşullar aynı merkez tarafından sağlanmış ve sıçanlar, ışıklandırması (12 saat aydınlık/karanlık siklusunda, 07:00-19:00 saatleri arası aydınlık), havalandırılması (%60-70 nem) ve oda ısısı (20-24 °C) kontrol edilen bir odaya yerleştirilmiştir. Denekler, günlük içme suyu ve %21 ham protein içeren pelet yemlerle (purina) beslenmiştir.

#### 3.2. Deneyleti Uygulama

Bu çalışmada yeni doğan 36 adet dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar deney (n=18)ve kontrol(n=18) olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Deneyleti grubundaki 18 adet sıçanın doğdukları günden itibaren (doğduğu gün = 0) 14 gün boyunca leptin enjeksiyonu subkutan olarak uygulandı. 1-5 gün arası 0,1 ml/gün leptin, 6-10. Günler arası 0,15 ml/gün leptin, 11.-15. Gün arası 0,25 ml/gün leptin enjeksiyonu subkutan olarak uygulandı.

Doğumlarından itibaren 3. Haftada, 5 haftada, 12 haftada hem kontrol hem de leptin uygulanan deneklerden anestezi altında ovaryum dokuları alındı. Alınan dokular tespit için, %10'luk formaldehit solüsyonunda 72 saat bekledikten sonra rutin ışık mikroskopi takibine alındı. Hazırlanan parafin bloklardan, Leica RM-2125 rotary mikrotom kullanılarak 5 µ kalınlığında kesitler alındı ve kesitlere, Bcl/2, Bax, kaspaz 8, kaspaz 9, p-53 ve kaspaz 3 ifadelerini belirlemek amacıyla immunohistokimyasal boyama işlemi yapıldı. Kesitler daha sonra Olympus BX51 marka ışık mikroskobu ve Olympus DP72 dijital kamera ile resimlendi.

### 3.3. Histolojik Boyalar ve Solüsyonlar

- **Fiksatif Solüsyonu Hazırlama:**

% 37' lik formaldehitden 10 ml, distile sudan 90 ml alınarak % 10' luk fiksatif solüsyonu hazırlanmıştır.

- **Leptin Solüsyonunun Hazırlanması:**

Sigma' dan temin edilen 1mg\_L-3772 (OB) mouse recombinant leptin , 100 ml PBS içine leptin vorteks yapıldıktan sonra ilave edildi. Hazırlanan solüsyon +4 °C de muhafaza edildi.

- **Hematoksilen Boya Hazırlanması:**

- 2 gr hematoksilen,
- 20 cc %96'lık etil alkol,
- 40 gr alüminyum amonyum sülfat,
- 500 ml distile su,
- 0,5 gr merkürük oksit,
- 1,6 ml asetik asit kullanılarak gerekli olan hemetoksilen boyası hazırlanmıştır.

- **Eosin Boya Hazırlanması:**

- 2 gr eosin
- 350 ml %96'lık etil alkol
- 150 ml distile su
- 2 cc asetik asit kullanılarak gerekli olan eosin boyası hazırlanmıştır.

### 3.4. Uygulanan Teknikler

#### 3.4.1. Doku takip yöntemi

- a. Alınan dokular formaldehitde 72 saat bekletildi.
- b. Akarsuda 30 dakika yıkandı.
- c. %70' lik etil alkolde 1 saat bekletildi.

- d. %80' lık etil alkolde 1 saat bekletildi.
- e. %90' lık etil alkolde 1 saat bekletildi.
- f. %100' lık etil alkolde 1 saat bekletildi.
- g. Ksilende 1 saat bekletildi.
- h. Ksilende 1 saat bekletildi.
- i. Parafinde 1 saat bekletildi.
- j. Parafinde 1 saat bekletildi.
- k. Dokulara parafine gömme ve etiketlenme işlemi yapıldı.

#### **3.4.2. İmmunohistokimyasal boyama**

Doku takip yöntemi tamamlanan ovaryum bloklarından, mikrotom cihazıyla 5 µluk kesitler alınıp, kesitler benmariye bırakıldı. Ardından uygulanan protokol sırası aşağıdaki gibidir: (Reaktifler için İnvitrogen, MD 21704, USA, Lot: 948867A Histostain-Plus kit kullanılmıştır.)

- a. Kesitler, benmariden lamlara alınıp lam taşıma sepetine yerleştirildi.
- b. Lam taşıma sepeti etüvde 60 °C'de 1 saat bekletildi.
- c. Ksilende, deparafinizasyon işlemi için 1 saat bekletildi.
- d. Kesitler sırasıyla %100, %96, %70, %50'lik etil alkol serilerinde 2' şer dakika bekletildi.
- e. Alkolden çıkan preparatlar akarsuda yıkanarak 10 dakika PBS'de bırakıldı. Bu aşamada kesitler PAP pen kullanılarak işaretlendi.
- f. Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi, % 30' luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Metanol (1: 9) karışımı ile 30 dakikalık uygulamayla ortadan kaldırıldı.
- g. Phosphate Buffered Saline (PBS) ile yıkanan kesitler, üzerlerine ilave edilen serum bloklama solüsyonu ile 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

- h.** Kesitler üzerine uygun primer antikolar ilave edilerek 1 gece over night yapıldı. Bu çalışmada kullanılan primer antikolar ve kullanıldıkları dilüsyonlar şu şekildedir: Capase-3 (1: 500, Bioss, Lot: 980799W), Caspase-9 (1: 500, Bioss, Lot: 980704W), Caspase-8 (1: 200, Neomarkers, Lot: 120OP708DE), Bax (1: 200), p-53 (1:100), Bcl-2 (1:200) Bütün primer antikolar PBS ile dilüe edilmiştir.
- i.** Kesitler, PBS ile yıkandıktan sonra primer antikolarla reaksiyon veren, biotinlenmiş afiniteye sahip sekonder antikolarla 20 dakika muamele edilmiştir.
- j.** Tekrar PBS ile yıkanması yapılan kesitlere, biotinlenmiş- sekonder antikolarla kolayca bağlanabilen horseradish peroksidaz konjugatı streptavidin (HRP-SA) 10 dakika kadar muamele edilmiştir.
- k.** Kesitler son kez PBS ile yıkandıktan sonra kromojen boyası DAB ile 3- 10 dakika kadar muamele edilmiştir.
- l.** Antijenin lokalizasyonunun daha iyi gözlenmesi için kesitlere hematoksilin (Merk Harris' hematoksilin) ile zıt boyama yapılmıştır.
- m.** Kesitler akarsu da yıkanmış ve sırasıyla %50, %70, %96, %100' lük etil alkol serilerinde 2' şer dakika bekletilmiştir.
- n.** Dokuların üzeri entellan ile kapatılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Sonuçları

Yenidoğan (3 haftalık), Pupertal (beş haftalık) ve olgun (on iki haftalık) grupların ovaryum dokusu hematoksilen ve eozinle boyanan kesitlerde incelendi.

Üç haftalık kontrol grubunda ovaryum dokusunun da genel olarak primer ve sekonder folliküllerin bulunduğu sadece 2 deneğin ovaryum dokusunda primer ve sekonder folliküllerin yanısıra tersiyer folliküllerin de bulunduğu belirlendi. Leptin uygulanan tüm deneklerin ovaryum dokularında ise primer, sekonder ve tersiyer folliküllerin varlığı dikkati çekiciydi (Şekil 4.1, 4.2). Ovaryum dokusu olgun ovaryumuna benzer görünümdeydi.

Pupertal (beş haftalık) ve olgun (on iki haftalık) gruplarda kontrol ve leptin uygulanan ovaryum dokusunun hemen hemen birbirine benzediği izlendi. Gelişim aşamasındaki folliküller ve korpus luteum her iki grupta normal görünümdeydi (Şekil 4.1).

### 4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

Bütün gruplarda ovaryum dokuları bax, bcl-2, kaspaz-8, kaspaz -9, kaspaz-3 ve p-53 antikorları kullanılarak immunohistokimyasal yöntemle boyanmıştır.

#### 4.2.1. Üç Haftalık (Yenidoğan) Grubu

Bu grupta kaspaz-8, kaspaz-9, p-53, bax ve bcl-2 ve ekspresyonları kontrol ve leptin uygulanan gruplar arasında farklılık göstermiyordu (Şekil 4.3). Kontrol ve leptin uygulanan gruplarda kaspaz-8, kaspaz-9, bax ve bcl-2 pozitif boyanma gösterirken p-53 her iki grupta da negatif boyanmıştı. Kaspaz-9, bax ve bcl-2 ekspresyonu oositlerde ve granuloza hücrelerinde izlenirken kaspaz-8 yalnızca oositlerde pozitif boyanmıştı (Şekil 4.3). Kaspaz-3 ekspresyonu diğerlerinden farklılık gösteriyordu (Şekil 4.4). Kontrol grubunda oositlerde, granuloza hücrelerinde kaspaz-3 reaksiyonu pozitif izlenirken leptin uygulanan grupta özellikle primordial,



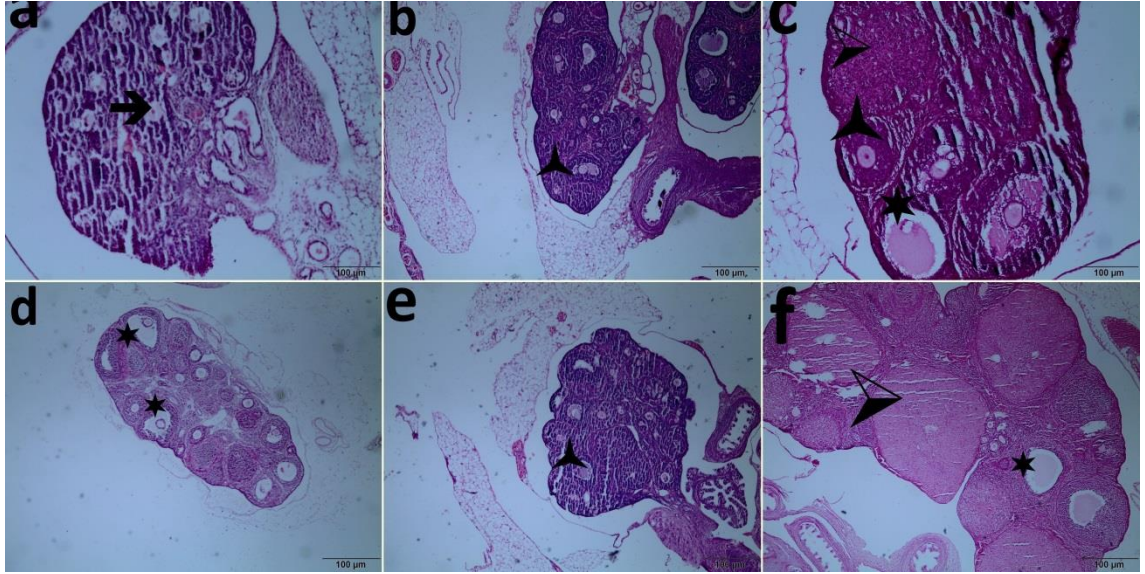
primer ve gelişen folliküllerde granuloza hücrelerinin negatif ekspresyon göstermesi dikkat çekiciydi. Bu grupta da oositlerde reaksiyon kuvvetli pozitif (Şekil 4.4).

#### 4.2.2. Beş Haftalık (Pubertal) Grup

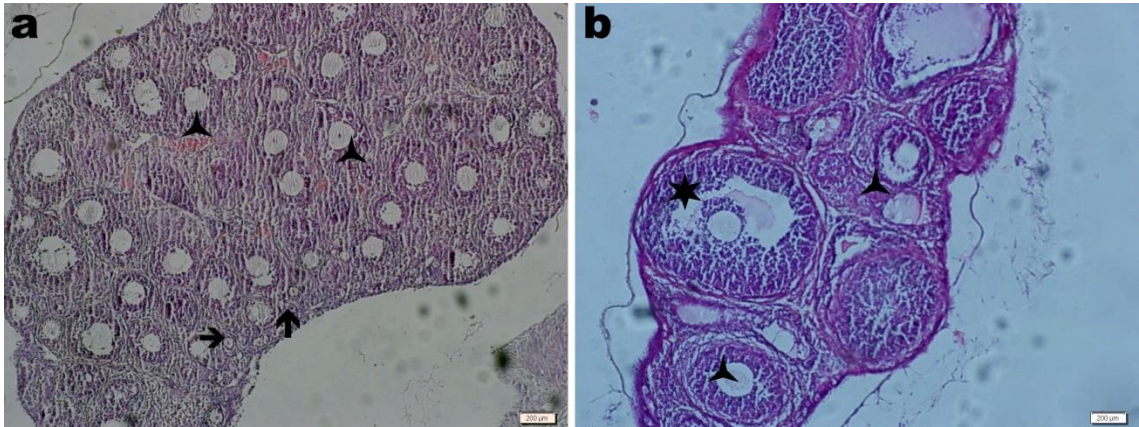
Beş haftalık (pubertal grup) grupta kaspaz-8 ekspresyonu kontrol grubu oositlerinde granuloza hücrelerinde, teka tabakasında kuvvetli pozitif izlenirken leptin uygulanan grupta pozitif ekspresyonun sadece bağ dokusunda izlenmesi diğer yapıların negatif olması oldukça ilginçti. Bununla birlikte bazı folliküllerin oositlerinin zayıf pozitif boyanma gösterdiği belirlendi (Şekil 4.5, 4.6). Kaspaz-9 hem kontrol hem de leptin uygulanan grupta oositler dışında negatifti. Oositler her iki grupta da zayıf pozitif boyanma gösterdi (Şekil 4.5, 4.7). P-53 her iki grupta da kan damarları dışında negatif ekspresyon gösterdi. Her iki grupta bax ekspresyonu açısından kuvvetli pozitif. Ancak granuloza hücrelerindeki reaksiyon leptin uygulanan grupta daha zayıf izlendi. Bcl-2 ekspresyonu her iki grupta da benzer şekildeydi. Granuloza hücrelerinde negatif boyanma izlenirken, oositler leptin uygulanan gruptakiler kontroldekilere karşın daha yoğun pozitif reaksiyon göstermişti. (Şekil 4.5)

#### 4.2.3. On İki Haftalık (Olgun) Grup

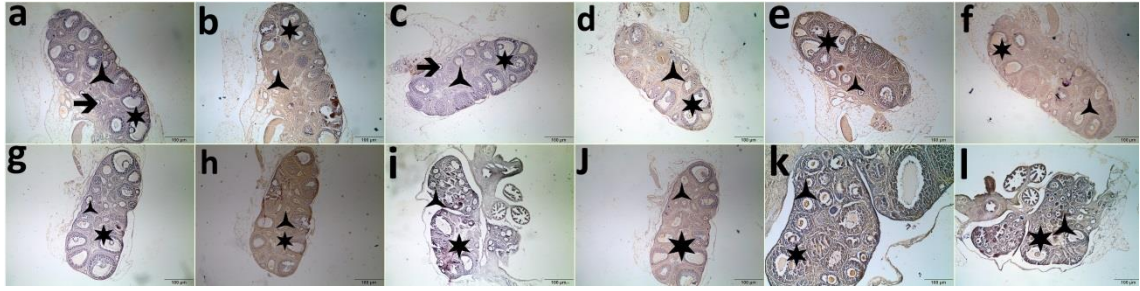
Bu grupta kaspaz-9, kaspaz-3, bax, bcl-2 ve p-53 hem kontrol grubunda hem de leptin uygulanan grupta boyanma birbirine benzerdi (Şekil 4.8). Kaspaz-9, kaspaz-3, bcl-2 ve bax her iki grupta da oositlerde, granuloza hücrelerinde kuvvetli ekspresyon gösterirken p-53 ise her iki grupta negatif olarak izlendi. Kaspaz-3 ekspresyonunun kontrol ve deney grupları arasında farklılık gösterdiği izlendi. Kontrol grubunda granuloza hücreleri negatif boyanırken leptin uygulanan grupta kuvvetli pozitif olması oldukça ilginçti (Şekil 4.9).



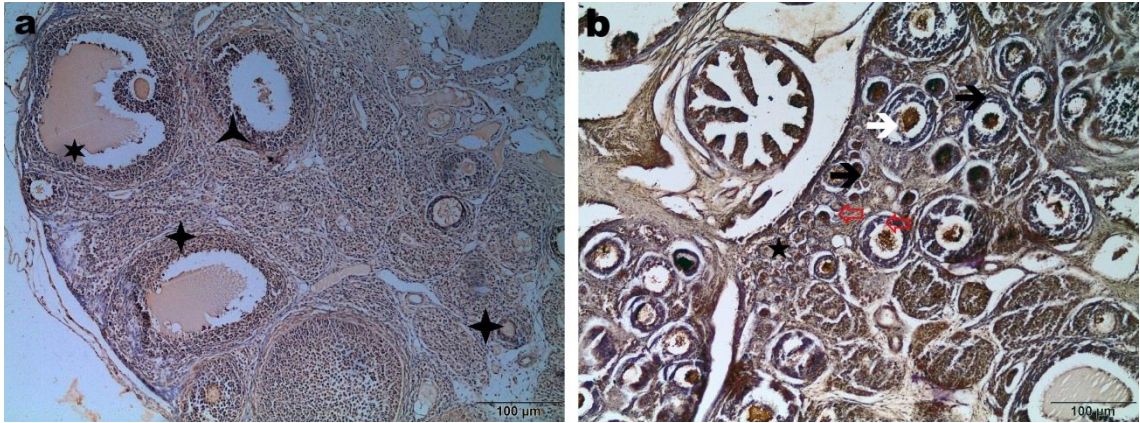
**Şekil 4.1.** Yenidoğan, beş haftalık ve on iki haftalık kontrol ve deney grubu ovaryum dokuları. a; yenidoğan deneklerden alınan kontrol ovaryum dokusu, b; Beş haftalık deneklerden alınan kontrol ovaryum dokusu c; on iki haftalık deneklerden alınan kontrol ovaryum dokusu, d; Leptin uygulanan yenidoğan deneklerden alınan ovaryum dokusu, e; Leptin uygulanan beş haftalık deneklerden alınan ovaryum dokusu, f; Leptin uygulanan on iki haftalık deneklerden alınan ovaryum dokusu. Tersiyer follikül; (asteriks), sekonder follikül; (üçgen), primer follikül; (ok), korpus luteum;(okbaşı). Hematoksilen-eozin. X100µm.



**Şekil 4.2** Yenidoğan, kontrol ve deney grubu ovaryum dokuları a; yenidoğan kontrol ovaryum dokusu, b; Leptin uygulanan yenidoğan ovaryum dokusu. Tersiyer follikül; (asteriks), sekonder follikül; (üçgen), primer follikül; (ok). Hematoksilen-eozin. X200µm.

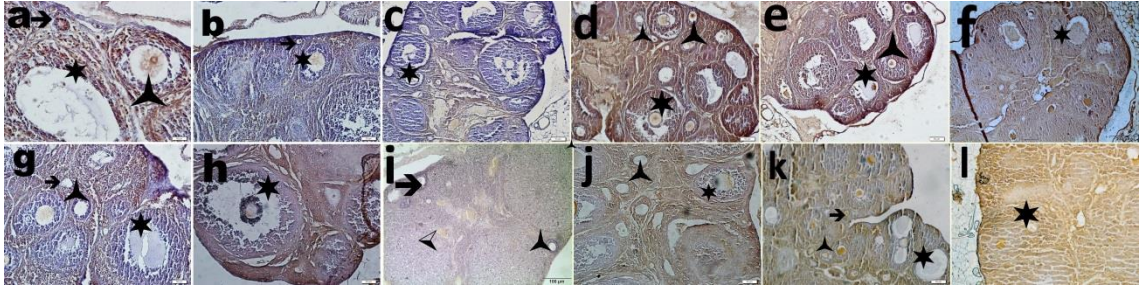


**Şekil 4.3.** Yenidoğan ovaryum dokusunun kaspaz-8, kaspaz -9, p53, bax, bcl-2 ve kaspaz-3 ekspresyonu ve yerleşimi. Kontrol grubu; a,b,c,d,e,f, leptin uygulanan grup; g,h,i,j,k,l. Kaspaz-8; a, g, kaspaz-9; b,h, p53; c,i, bax; d,j, bcl-2; e,k, kaspaz-3; f,l. Tersiyer follikül; (asteriks), sekonder follikül; (üçgen), primer follikül; (ok). İmmunoperoksidaz. X100µm.

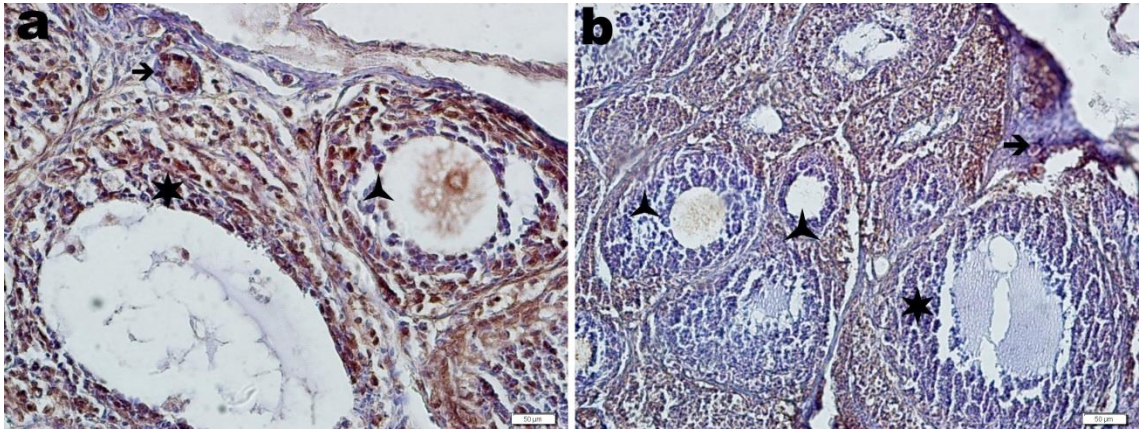


**Şekil 4.4.** Yenidoğan ovaryum dokusunun kaspaz-3 ekspresyonu ve yerleşimi. Kontrol grubu; a, leptin uygulanan grup; b. Tersiyer follikül; (asteriks), sekonder follikül; (üçgen), primer follikül; (ok), Negatif ekspresyon gösteren granuloza hücreler, (kırmızı ok). İmmunoperoksidaz. X100µm.

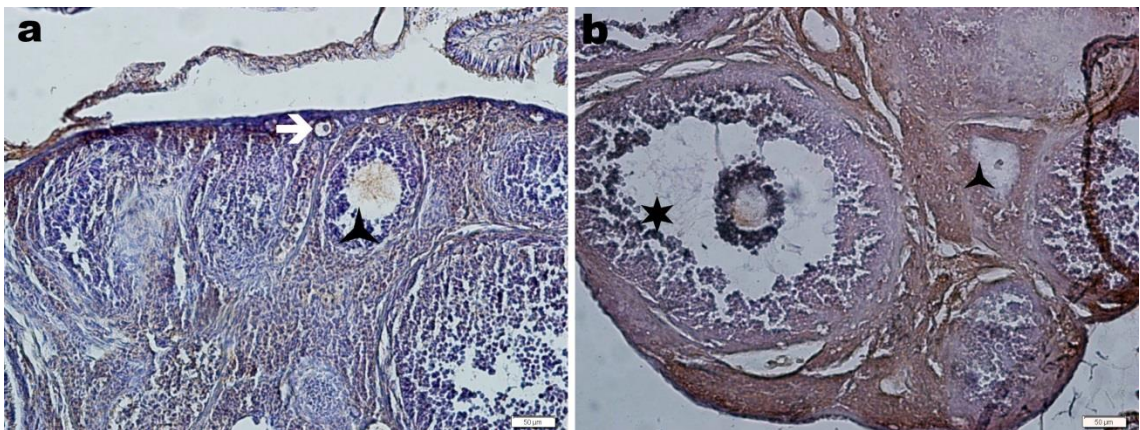




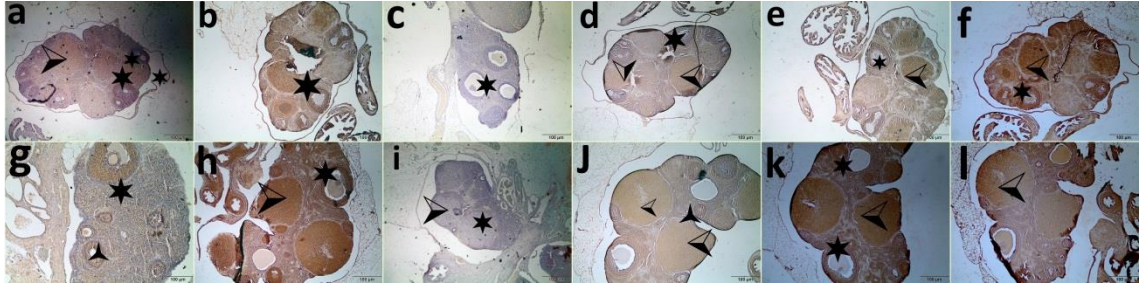
**Şekil 4.5.** Beş haftalık ovaryum dokusunun kaspaz-8, kaspaz-9, p53, bax, bcl-2 ve kaspaz-3, ekspresyonu ve yerleşimi. Kontrol grubu; a,b,c,d,e,f, leptin uygulanan grup; g,h,i,j,k,l. Kaspaz-8; a,g, kaspaz-9; b,h, p53; c,i, bax; d,j, bcl-2; e,k, kaspaz-3; f,l. Tersiyer follikül; (asteriks), sekonder follikül; (üçgen), primer follikül; (ok). İmmunoperoksidaz. X100µm



**Şekil 4.6.** Beş haftalık ovaryum dokusunun kaspaz-8 ekspresyonu ve yerleşimi. Kontrol grubu; a, leptin uygulanan grup; b. Tersiyer follikül; (asteriks), sekonder follikül; (üçgen), primer follikül; (ok), İmmunoperoksidaz. X50µm

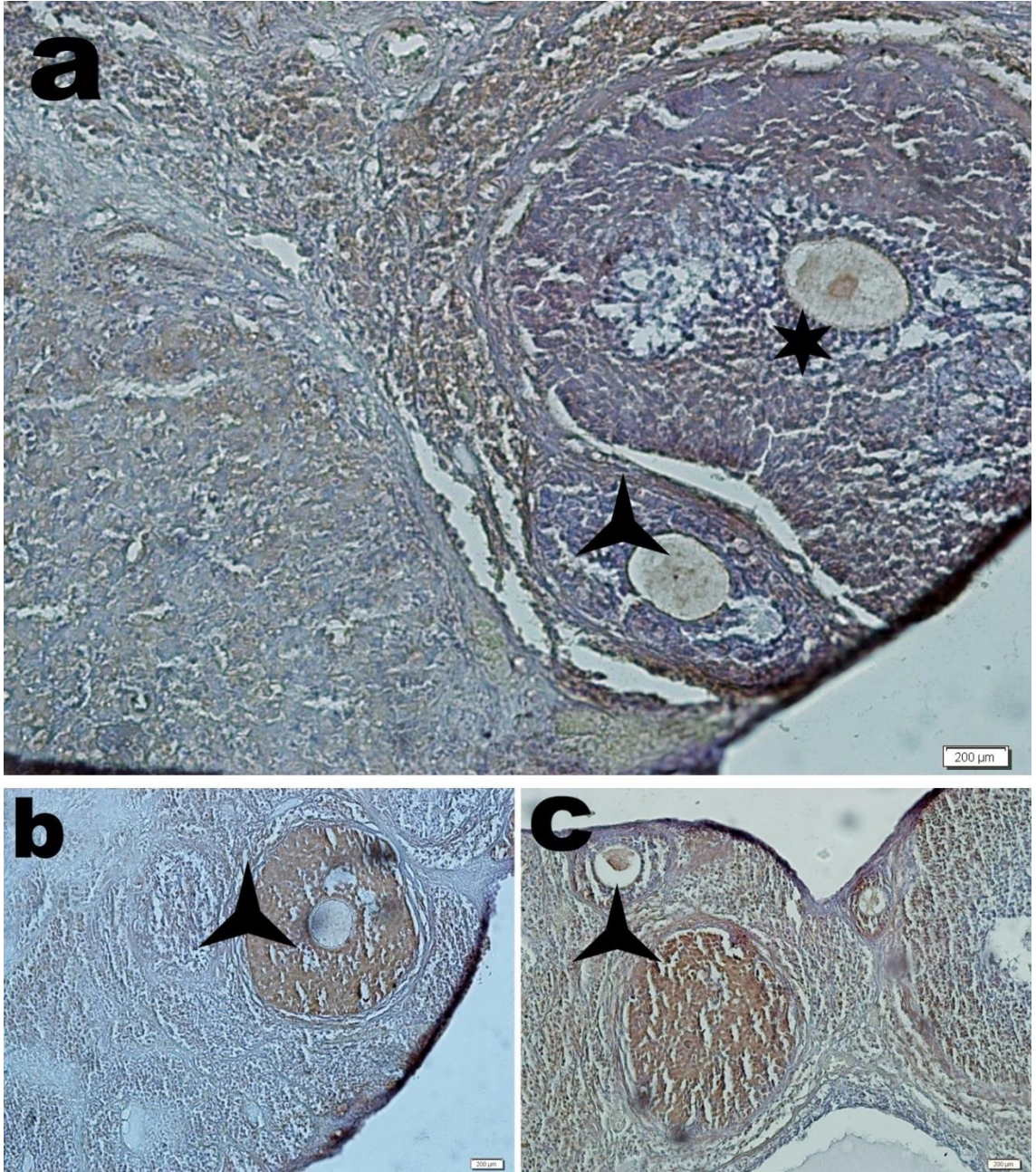


**Şekil 4.7.** Beş haftalık ovaryum dokusunun kaspaz-9 ekspresyonu ve yerleşimi. Kontrol grubu; a, leptin uygulanan grup; b. Tersiyer follikül; (asteriks), sekonder follikül; (üçgen), primer follikül; (ok), İmmunoperoksidaz. X50µm



**Şekil 4.8.** On iki haftalık ovaryum dokusunun kaspaz-8, kaspaz-9, p53, bax ve bcl-2, kaspaz-3 ekspresyonu ve yerleşimi. Kontrol grubu; a,b,c,d,e,f, leptin uygulanan grup; g,h,i,j,k,l. Kaspaz-8; a,g, kaspaz-9; b,h, p53; c,i, bax; d,j, bcl-2; e,k, kaspaz-3; f,l. Tersiyer follikül; (asteriks), sekonder follikül; (üçgen), primer follikül; (ok), İmmunoperoksidaz. X100µm.





**Şekil 4.9.** On iki haftalık ovaryum dokusunun kaspaz-3 ekspresyonu ve yerleşimi. Kontrol grubu; a, leptin uygulanan grup; b,c. Tersiyer follükül; (asteriks), sekonder follükül; (üçgen). İmmunoperoksidaz. X200μm

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada leptinin yeni doğandan olgun dönem olan 12. haftaya kadar olan follikül gelişimine ve apoptozisine etkisinin hem immunohistokimyasal hem de histolojik olarak ayrıntılı araştırılması amaçlandı.

Leptin 16 kDa ağırlığında protein yapısında bir hormon olup temel olarak yağ dokudan üretilir. Leptin hipotalamusa etki ederek çeşitli metabolik olaylarda ve yağ depolanmasında rol oynar (Tataranni vd 1997). Leptin, leptin reseptörlerine bağlanarak işlev görür. Leptin Reseptörleri IL-6 ile homoloji gösterir ve Leptin IL-6 ve IL-11 gibi sitokin ailesine çok benzediği için 1. grup sitokin reseptör ailesinden kabul edilir (Mantzoros vd 1998). Reseptörler kısa form reseptörler (Ob-Ra) ve uzun form reseptörler olmak üzere iki tiptedir. Kısa form reseptörler hücre içi sinyal iletiminde zayıftırlar. Kısa form reseptörlerinin bulunduğu organlar böbrek, akciğer, pleksus koroideus ve beyin kapillerleridir (Mantzoros vd 1998).

Hipotalamusta (nukleus arkuatus) bulunan reseptörler uzun form reseptörlerdir (Ob-Rb), primer olarak hipotalamustan salgılanır. Bu reseptörleri sinyal transdüksiyonu kapasitesine sahiptirler (Mantzoros vd 1998).

Üreme organizmanın çok fazla enerjiye ihtiyaç duyduğu fizyolojik bir olaydır. Üreme organlarının sağlıklı çalışabilmesi ve canlıların üreyebilmesi için yeterli beslenmesi gerekir. Yetersiz, tek yönlü ve sağlıksız beslenme enerji açığına ya da enerji fazlalığına neden olabilir. Bu gibi durumlarda follikulogenezis, gebelik ve laktasyon gibi üreme işlevlerinde bozulma gerçekleşir (Craves vd 1995).

Çalışmalar beslenme ile üreme işlevi arasında bir ilişkinin olduğunu bildirilmektedir.

Yapılan araştırmalarda ortaya çıkan sonuçlar birçok sistem üzerinde etkisi olan leptin hormonunun üreme sisteminde de etkili olduğudur.

Leptin eksikliği olan ob/ob farelerindeki çalışmalar üreme sistemiyle leptin arasındaki ilişkiyi inceleyen ilk çalışmalardır. Çalışmada bu farelerin seksüel

olgunluğa ulaşamadıkları infertil oldukları, gonadotropin hormon seviyelerinin de oldukça düşük olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Leptin tedavisi uygulandığında infertilitenin ve diğer patolojik bulguların düzeldiği bildirilmiştir (Hillier vd 1979). Hamilelik ve laktasyon döneminde leptin plasenta ve meme bezlerindeki salgı epiteli tarafından da üretilen sütün yağında da bulunur ve buradaki metabolik olaylarda rol oynar (Hillier vd 1979, Blum vd 1997).

Dolaşımdaki leptin düzeyi çeşitli türlerde ölçülmüş ve dişi farelerde en yüksek düzeye menstruel siklusun ikinci haftasında ulaştığı bulunmuştur. Bu haftada farelerin kilosunda değişiklikler olduğu ve leptinin kiloyla direkt ilişkili olabileceği bildirilmiştir. İnsanlarda leptin düzeyi kızlarda pubertede artma eğilimi gösterirken (Clayton vd 1997, Mantzoros vd 1997), erkeklerde 2. Tanner evresinde pik yapmaktadır (Clayton vd 1997, Moschos vd 2002). Bu sonuçlar insanlarda da leptinin puberteyle ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Özellikle leptin hipotalamus-hipofizer ve organ aksı üzerine etki ederek puberteyi başlatıyor olabilir (Rene-Gonzalez vd 2000, Agarwal vd 1999). Leptin reseptörleri teka ve granuloza hücrelerinde, kumulus hücrelerinde ve embriyoda bulunmaktadır (Karlsson vd 1997, Kawamura vd 2002). Ovaryumlardan leptin mRNA' sının izole edilmesi bu hormonun üremede önemli rol oynayabileceğinin göstergesi olarak görülmektedir (Cioffi vd 1997, Matsuoka vd 1999, Kawamura vd 2002). Leptin foliküler hücrelerde üretilir ve oosite verilir (Masuzaki vd 1997). Folliküler ve uterinal sıvılarda da leptin bulunmaktadır (Butzow vd 1999, Karlsson vd 1997, Kawamura vd 2002). İzole edilen granuloza ve teka hücrelerinde leptinin gonadotropin veya büyüme faktörlerini uyarak steroid sentezini artırması steroid üretimi üzerinde direkt etkisi olduğunun göstermektedir. Aynı zaman da leptin memeli ovaryumlarında, oositlerde ve preimplantasyon dönemi embriyo gelişiminde direkt rol oynamaktadır (Karlsson vd 1997, Matsuoka vd 1999, Chehab vd 1997).

Leptin uygulamasının puberteyi başlattığını bildiren Chehab ve arkadaşları doğumdan sonra 21 günlük farelere 4 gün hergün boyunca 4µg/ vücut ağırlığı leptini İ.P olarak vermişlerdir. Kontrol grubuna ise aynı koşullarda PBS verilmiştir. Deneyin sonucunda leptin uygulanan farelerle kontrol grubu fareleri karşılaştırıldığında deney grubu farelerde vajinal açıklığın ve üreme organlarının ağırlığının daha fazla olduğu bulunmuştur (Chehab vd 1997). Benzer bir çalışmada Ahima ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Ahima ve arkadaşları aynı dozda leptini dişi farelere uyguladıklarında onlarda deney grubu farelerde vajinal açıklığın ve vajinal siklusun kontrol grubuna karşın daha önce olduğunu bulmuşlardır (Ahima vd 1998). Diğer bir



çalışmada da leptin uygulamasının puberteyi öne çektiği bildirilmiştir (Grauz vd 1998). Yukarıda bahsedilen bu çalışmalara zıt olarak Cheung ve arkadaşları farelere 12µg/kg leptin uygulamasının seksüel olgunlaşmaya negatif etki ettiği bildirilmiştir (Cheung vd 1997).

Bizim çalışmamızda yeni doğan sıçanlara doğumun 1. gününden itibaren leptin uygulaması yapıldı ve leptinin etkisi yeni doğan, beş haftalık ve olgun sıçanların ovaryumlarında histolojik olarak incelendi. Beş haftalık ve olgun sıçanların ovaryum dokusunda folliküllerin gelişimi kontrol ve deney grupları arasında farklılık göstermedi. Ancak yeni doğan kontrol grubu deneklerin bir kısmında ovaryum dokusunda tersiyer folliküller izlenmezken leptin uygulanan gruplardaki ovaryum dokusunun görünümü olgundakilerden farksızdı. Gelişimin tüm aşamasındaki folliküller bu grubun tüm deneklerinde izlendi.

Deneyisel çalışmalarda leptin dozunun üreme işlevinde etkili olabileceği gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada infertil ve doğuştan leptin eksikliği olan obez farelerde leptinin üreme üzerine etkileri incelenmiştir. Erkek ve dişi farelere günde iki defa 50 mikrogram leptin 14 gün süreyle uygulanmıştır. Leptin uygulanan dişi farelerde kontrol grubuna göre serum LH seviyelerinde, ovaryum ve uterus ağırlıklarında artış tespit edilmiştir. Leptin verilen erkek farelerde ise kontrol grubuna göre serum FSH düzeyleri artmış, testis ve seminal vezikül ağırlıkları, daha fazla vezikül epitel hücreleri ve sperm sayısında da artış görülmüştür (Barash vd 2013).

Kadınlardaki leptin seviyeleri menstrüel siklus esnasında değişim göstermektedir. Leptin düzeylerinin en yüksek olduğu dönem ovulasyondur. Luteal fazda yüksekliği devam etmektedir ancak menstruasyondan önce düşmeye başlar (Hardie vd 1997, Quinton vd 1999).

Yaşlanmayla birlikte erkeklerde testosteron azaldığı için leptin seviyesinde artma olurken (Baumgartner vd 1999) buna zıt olarak kadınlarda menapoz sonrasında azalma olur. Erkeklerde ise leptinin plazmadaki seviyesi ile kandaki testosteron seviyeleri arasında ters orantı vardır. Bu da testosteronun leptin ekspresyonuna negatif etkisi olduğunu düşündürmektedir (Paolisso vd 1998, Nyström vd 1997).

Leptinin çok düşük dozlarda hipotalamustan GnRH salımını artırabileceği bildirilmektedir. Araştırmacılar aynı zamanda Leptinin FSH ve LH reseptörlerini de artırıyor olabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmalardan çıkan sonuçlar dışarıdan uygulanan leptinin dozunun ve uygulama süresinin fizyolojik olaylardaki etkilerinin farklı olabileceğini bildirmektedir. 10ng/ml leptin uygulaması granuloza hücrelerinde

östrojen ve progesteron üretimini arttırmaktadır (Kitawaki vd 1999). Fizyolojik dozlarının progesteron ve testosteron üretimini uyardığıda bildirilmektedir (Ruiz-Cortez vd 2003). Leptinin testosteron üretiminde artırması hiperandrojenizmle ilişkili PKOS'un patafizyolojisinde de etkili olabilir sorusunu düşündürmektedir. Bununla birlikte bazı çalışmalarda insülin ve büyüme hormonları üzerine inhibitör etki gösterebileceği bildirilmiştir. In vitro fare kültürlerinde yapılan çalışmalarda leptinin östrojen üretimini uyardığı ancak FSH-IGF-1 ve FSH-GH hormonlarını inhibe ettiği rapor edilmiştir (Kikuchi vd 2001). Duggale ve arkadaşları 3 saat aralıklarla ve 6x30µg dozlarde uyguladığı leptinin dişi sıçanlarda dışarıdan östrojen uygulamasına rağmen ovulasyonu inhibe ettiğini raporlamışlardır (Duggal vd 1976).

Leptin hormonunun puberteyi başlattığını gösteren çalışmaların yanı sıra steroid sentezini artırmalarına karşın folliküler gelişimi inhibe ettiğini ileri süren bir çalışmada isole edilen preantral folliküllerde leptinin cAMP düzeyini bloke ederek folliküler gelişimi durduğu ileri sürülmüştür (Kikuchi vd 2001).

Almog ve arkadaşları da leptinin pubertenin başlamasını hızlandırdığı ve Bcl-2/bax oranını artırarak apoptozisi azalttığı bildirilmiştir (Almog vd 2001).

Biz bu çalışmanın aksine leptinin ovaryum apoptozisini çok etkilemediğini gördük. Biz çalışmamızda apoptotik belirteçlerden kaspaz-8, kaspaz-9, bax, bcl-2, p-53 ve kaspaz-3 ekspresyonlarını her iki grupta da immunohistokimyasal olarak inceledik. P-53 ekspresyonunu tüm gruplarda negatif ekspresyon gösterdi. Kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-3, bax ve bcl-2 ekspresyonu hemen hemen tüm gruplarda pozitif. Genellikle p-53 antikoru dışındaki antikorumların boyanma derecesinde ve yerleşimde kontrol ve deney grupları arasında çok farklılık yoktu. Bununla birlikte kaspaz-3 yenidoğan grubunda granuloza hücrelerinde pozitifken leptin uygulana grupta negatif. Beş haftalık deneklerde kaspaz-8, bax ve bcl-2 ekspresyonlarında farklılık izlendi. Bu grupta kaspaz-8 kontrol grubunda pozitif leptin uygulana grupta negatif idi. Bax kontrol grubunda granuloza hücrelerinde daha yoğun boyanma gösterirken leptin uygulanan grupta daha zayıftı. Bcl-2 ekspresyonunda özellikle leptin uygulanan grupta oositlerde daha yoğun izlendi.

Apotosis programlanmış hücre olark bilinen apoptozisde ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere iki temel yolak vardır. Ekstrinsik yolakta kendi içinde tipl ve tiplI olarak ikiye ayrılır. Tip I ekstrinsik yolağında kaspaz-8 ölüm reseptörleri [TNF-R, FAS, DR3, DR4, DR5, DR6] aracılığı ile direk hücre ölümüne neden olur. Aktive olan kaspaz-8 kaspaz kaskadını başlatarak kaspaz-3' ün, kaspaz-6' nın ve kaspaz-7' nin klavejna

neden olur. Sonuçta hücre apoptozise uğrayarak ölür. Tip II de aktive olmuş ölüm reseptörlerinden gelen sinyal mitokondri bağımlı apoptotik yolağı aktifler. Bu yolakta kaspaz-8 aktive olur sonra kaspaz-8 aktivasyonu ile Bid kalavajı gerçekleşir ve Bid mitokondriyona geçerek proapoptotik bax proteini aktive eder ve sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasına neden olur. Sitokrom-c monomerik Apaf-1 in aktive olmasına neden olur. Apaf-1 de kaspaz-9' u uyararak ölüm kaskadını başlatır. Sonuçta hücre apoptozise uğrayarak ölür. İntrinsik ya da mitokondrial yolda bcl-2 proteini mitokondrial permeabiliteyi kontrol ederek ya pro ya da antiapoptotik bcl-2'nin aktive olmasına neden olur. Anti apoptotik proteinler Bcl-2 ve bcl-xl mitokondriyonun dış membranında bulunur. Stres ya da hücre hasarında apoptotik Bcl-2-ilişkili X protein (Bax) ya da Bcl-2 antagonist/killer-1 (Bak) proteini aktive olur. Sonuçta sitokrom-c sitoplazma salınır. Sitokrom-c'nin Apaf-1 ile birlikteliği prokaspaz 9, kaspaz-9 ve kaspaz-3'un aktive olmasına sonuçta da hücrenin ölmesine neden olur (Ashkenazi vd 1998, Scaffidi vd 1998).

Bizim çalışmamızda diğer çalışmalardan farklı olarak leptin ovaryum apoptozisini etki etmedi. Bunun nedeni uygulanan doz miktarı ya da uygulama süresi olabilir. Bazı çalışmalarda leptinin yüksek dozlarının ovaryum apoptozisini arttırdığı gösterilmiştir. Bunlardan biri 2017 yılında in vitro hücre kültürlerinde yapılan çalışmadır. Bu çalışmada yüksek düzeyde leptinin granuloza hücrelerinde çoğalmayı inhibe ettiği kaspaz-3 regulasyonunu artırarak bcl-2' yi azalttığı ve apoptozisi indüklediği bulunmuştur (Lin vd 2017).

Ovaryumun apoptozise uğramasında Bcl-2 proteini önemli rol oynar (Hsu vd 2000). Çünkü yüksek düzeyde leptinin GnRH salınımına, hipofizden salınan gonadotropin üretimine etkisi olabileceği bildirilmektedir. Jacobs ve ark tarafından yapılan çalışmada leptinin GnRH salımında etkili olan nöropeptid Y' yi süprese ederek GnRH ve LH salınımını arttırdığı bildirilmiştir (Jacobs 1997). Yüksek leptin seviyelerinin PKOS patofizyolojisinde de rol oynayabileceği düşünülmektedir (Wee vd 2018)

Bizim çalışmamızda sadece beş haftalık grupta bcl-2 ekspresyonu leptin uygulanan grupta daha yoğundu. Bax ekspresyonu ise kontrol grubunda daha yoğun olarak izlendi.

## 6. SONUÇLAR

Leptin yeni doğan ovaryum dokusunda gelişimi artırmaktadır.

Kaspaz-8, Kaspaz-9, bax, p-53, bcl-2 ve kaspaz-3 proteinlerinin immunohistokimyasal sonuçlarımız leptinin ovaryum apoptozisine etkisinin olmadığını göstermektedir. Kontrol ve leptin uygulanan grupta ekstrinsik tip-II apoptotik yolağın etkili olduğu belirlendi.

Leptin ve folliküler apotozis ile ilgili çalışmalardan elde edilen sonuçlar tartışmalıdır. Bunun için ileri düzeyde ve doza bağlı çalışmaların yapılması gerekir.

## 7. KAYNAKLAR

Afford S, Randhawa S. Demystified: Apoptosis. *Mol Pathol* 2000; 53(2):55-63.

Agarwal SK, Vogel K, Weitsman SR, Magoffin DA. Leptin antagonizes the insulin like growth factor I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J Clin Endo Metab* 1999; 84:1072–1076.

Ahima RS, Osei SY. Leptin Signaling, *Physiology & Behavior*. 2004; 81: 223-241.

Ahima, R.S., Prabakaran, D., Flier, J.S., 1998. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J. Clin. Invest.* 101, 1020–1027.

Ahmed ML, Onog KKL, Morrell DJ, Cox L, Drayer N: Longitudinal Study of leptin concentrations during puberty: Sex differences and relationship to changes in body composition. *J., Clin Endocrinol Metab.*

Akşit H., Bildik A. Derleme 55 Apoptozis, *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2008 19(1): 55- 63

Almog B, Gold R, Tajima K, Dantes A, Salim K, Rubinstein M, Barkon D, Hamburg R, Lessing JB, Nevo N, Getrler A, Amsterdam A. Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the onset of puberty in immature rats. *Molecular and cellular Endocrinology*. 2001: 183: 179–191.

Ashkenazi A and Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281,1305-1308.

Aslan K, Serdar Z, Tokullugil AH. Multifonksiyonel hormon: leptin. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2004; 30: 113-8

Auwerx J, Staels B. Leptin. *Lancet*. 1998; 351:737–42.

B. Almog a,b, R. Gold a,b, K. Tajima a,d, A. Dantes a, K. Salim f, M. Rubinstein e, D. Barkan e, R. Homburg b, J.B. Lessing b, N. Nevo a, A. Gertler c, A. Amsterdam a,\* Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the onset of puberty in immature rats *Molecular and Cellular Endocrinology* 183 (2001) 179–191

Banks W.A. Is obesity a disease of the blood-brain barrier? (2003) Physiological, pathological, and evolutionary considerations. *Curr Pharm Des* 9, 801-809.

Barash IA, Cheung C C, Weigle D S, Ren H, Kabigting E B, Kujiper J L, Clifton D K, Steiner R A. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*. 2013; 1. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/endo.137.7.8770941>.

Baumgartner RN, Waters DL, Morley JE, et al. Age-related changes in sex hormones affect the sex difference in serum leptin independently of changes in body fat. *Metabolism* 1999; 48: 378–384.

Bender L M, Morgan M J, Thomas L R, Liu Z G, Thorburn A (2005): The adaptor protein TRADD activates distinct mechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm. *Cell Death and Differentiation*, 12: 473–481.

Billig H, Furuta I, Hsueh JW. Estrogens inhibit and androgens enhance granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 1993; 133:2204–2212.

Blum WF, Englaro P, Hanitsch S, Juul A, Hertel NT: Plasma Leptin levels in healthy children and adolescents: Dependence on body mass index, body fat mass, gender, pubertal stage and testosterone. *J., Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82:2904–2910.

Blum, W.F., Englaro, P., Hanitsch, S, Juul, A., Hertel, N.T., Muller, J., Skakkebaek, N.E., Heiman, M.L., Birkett, M., Attanasio, A.M., Kiess, W., Rascher, W., 1997. Plasma leptin levels in healthy children and adolescents, dependence on body mass index, body fat mass, gender, pubertal stage, and testosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 2904–2910.

Bouloumié A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res.* 1998; 83:1059–66

Brabant G, Horn R, Mayr M, Wurster U, Schnabel D, Heidenreich F. Free and protein bound leptin are distinct and independently controlled factors in energy regulation. *Diabetologia.* 2000; 43: 438-442.

Bray GA York, DA: Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals, an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol. Rev.* 1979; 59: 719–809.

Budd RC. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J Clin Invest* 2002;109:437-42.

Butzow TL, Moilanen JM, Lehtovirta M, Tuomi T, Hovatta O, Siegbert R, Nilsson CG, Apter D. Serum and follicular fluid leptin during in vitro fertilization: relationship among leptin increase, body fat mass, and reduced ovarian response. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3135–3139.

Carlson BM. Human Embryology & Developmental Biology. 2nd ed. *St. Louis: Mosby Inc* 1999:148, 190, 222.

Carlsson B, Ankarberg C, Rosbmerg S, Norjavaara E, Albertsson–Wikland K, Carlsson LM.: Serum leptin concentrations in relation to pubertal development. *Arch. Dis. Child.* 1997; 77: 396–400.

Chehab, F.F., Mounzih, K., Lu, R., Lim, M.E., 1997. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* 275, 88–90.

Cheung, C.C., Thornton, J.E., Kuijper, J.L., Weigle, D.S., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 1997. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 138, 855–858.

Christos S, Mantzoros MD: The role of Leptin in Human Obesity and Disease: A Review of Current Evidence. *Ann Intern, Med* 1999; 130:671.

Cioffi JA, Van Blerkom J, Antczak M, Shafer A, Wittner S, Snidgrass HR. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:467–472.

Clayton, P.E., Gill, M.S., Hall, C.M., Tillmann, V., Whatmore, A.J., Price, D.A., 1997. Serum leptin through childhood and adolescence. *Clin. Endocrinol.* 46, 727–733.

Cooper GM. Programmed cell death. The cell. In: Cooper GM ed. Washington: *ASM Pres*; 1994; 14:592–596.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Cell Injury and Cell Death. In: Robbins Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: **WB Saunders** 1999: 18-25.

Craves JC, Fimbel S, Lejeune H, Cugnardey N, Dechaud H, Pugeat M. Effects of diet and metformin administration on sex-hormonebinding globulin, androgens, and insulin in hirsute and obese women. **J Clin Endocrinol Metab** 1995; 80:2057–2062.

Cummings M C, Winterford C M, Walker N I. Apoptosis. **Am J Surg Pathol.** , 1997, 21: 88-101

Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. The ob gene and insulin, a relationship leading to clues to the understanding of obesity. **Diabetes.** 1995;44: 1467–70.

Dayan Y B, Kaveri S V, Kazatchkine M D, Shoenfeld Y (2000): Is cancer an autoimmune process dependent on anti-apoptotic autoantibodies?. **Medical Hypotheses**, 55 (2): 103–108.

Di George, A. M. (1992) Hermaphroditism, In Behrman RE ed. Nelson Textbook of Pediatrics, 14th edition, Philadelphia, **WB Saunders**, s1465.

Duggal, P.S., Van Der Hoek, K.H., Milner, C.R., Ryan, N.K., Armstrong, D.T., Magoffin, D.A., Norman, R.J., 2000. The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. **Endocrinol.** 141, 1971–1976.

Emral D. Adiponektin ve diger sitokinler. **T Klin J Med Sci** 2006; 26: 409-20.

Erdoğan B B (2003): Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-fasl bağımlı apoptozis. **Akciğer Arşivi**, 4: 165-174.

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

Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. **J Leukoc Biol** 2000; 68: 437-46.

Ferri KF, Kroemer G. Mitochondria-the suicide organelles. **Bio Essays** 2001;23: 111-15.

Fox CK, Furtwaengler A, Nepomuceno RR, et al. Apoptotic pathways in primary biliary cirrhosis and autoimmun hepatitis. **Liver** 2001;21(4):272-279.

Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Löllmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. **Nat Med.** 1995; 1:1311–1314

Galle P R (1997): Apoptosis in liver disease. **Journal of Hepatology**, 27: 405-412.

Galluzi L, Aaronson SA, Abrams J. et al: Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. **Cell Death Differ** 16: 1093-1107; 2006

Garcia Mayor RV, Andrade MA, Rios M, Lage M, Riequez C, Casanueva FF: Serum leptin levels in normal children: Relationship to age, gender, body mass index, pituitary – gonadal hormones, and pubertal stage. **J., Clin Endocrinol Metab.** 1997: 82:2849–2855.

Gavrieli Y, Sherman Y, Sasson SAB. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **The Journal of Cell Biology** 1992;119:493-501

Grauz-Gumowski, N.M., Lalaoui, M., Pierroz, D.D., Englaro, P., Sizoneko, P.C., Blum, W.F., Aubert, M.L., 1998. Chronic administration of leptin into the lateral ventricle induces sexual maturation in severely food-restricted female rats. **J. Neuroendocrinol.** 10, 627–633.

Guimaraes C A, Linden R (2004): Programmed cell death; apoptosis and alternative deathstyles. **Eur. J. Biochem.**, 271: 1638–1650.

Hamarat M. mesanede iskemi / reperfüzyon oluşturulan ratlarda leptin' in apoptozis üzerine etkisi, uzmanlık tezi, **Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi**, Eskişehir, 2008, s.87.

Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D, Fowler P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. **Clin Endocrinol.** 1997; 47:101–106.

Harris RBS, Zhou J, Weigle DS, et al. Recombinant leptin exchanges between parabiosed mice but does not reach equilibrium. **Am J Physiol.** 1997; 272: 1800–1808.

Hatemi H: Leptin ve Vücut Ağırlığı Kontrolü, **Endokrinolojide Yönelişler** 1997; 6:169.

Hatemi H: Leptin: Obesitenin Genetik Çözümü mü? **Endokrinolojide yönelişler** 1997; 8: 168.

Hatton J. Pharmacological treatment of traumatic brain injury: A review of agents in Development CNS Drugs 2001;15(7):553-81.

Hekimoğlu A. Leptin ve fizyopatolojik olaylardaki rolü. **Dicle Tıp Dergisi** 2006; 33: 259-67.

Hillier SG, Ross GT. Effects of exogenous testosterone on ovarian weight, follicular morphology and intraovarian progesterone concentration in estrogen primed hypohysectomized immature female rats. **Biol Reprod** 1979; 20:261–268.

Hsu, S.Y., Hsueh, A.J., 2000. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis, An ovarian paradigm. **Physiol. Rev.** 80, 593–614.

Huang L, Li C. Leptin: a multifunctional hormone. **Cell Res.** 2000; 10:81–92.

Jacobs HS. Polycystic ovary syndrome. In: seibel MM, ed: Infertility: a comprehensive text. 2nd ed. Stamford., **C.T: Appleton & Lange**, 1997

Jersak M, Bischof P. Apoptosis in the first trimester human placenta: the role in maintaining immun privilege at the maternal-foetal interface and in the trophoblast remodelling. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 2002;100(2):138-42.

Jones BA, Gores GJ. Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine. **Am J Physiol** 1997;273 (Gastrointest Liver Physiol 36):G1174-88.

Junqueira L.C., Carneiro J., Kelley R.O., a LANGE medical book, Çeviri Editörleri: Yener Aytekin, Seyhun Solakoğlu, Bülent Ahışalı, **Barış Kitapevi**, İstanbul, 1998, 503



- Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LMS, Carlsson B. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:4144–4148.
- Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, Nakamura A, Tanaka T. Leptin promotes the development of Mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology* 2002; 143:1922–1931.
- Kerr, J.F., Willie, A.H., Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26:239–257
- Khosravi-Far R, Esposti MD. Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther*. 2004;3(11):1051–7.
- Kirel B, Doğrusal N: Yeni Bir Hormon: Leptin, *Surekli Tıp Eğitimi Dergisi* 1998; 7: 421.
- Kikuchi N, Andohg K, Abe Y, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y. Inhibitory action of leptin on early follicular growth differs in immature and adult female mice. *Biol Reprod* 2001; 65:66–71.
- Kitawaki J, Kusiuki I, Koshiha H, Tsukamoto K, Honjo H. Leptin directly stimulates aromatase activity in human luteinized granulosa cells. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:708–713.
- KOCABAŞ R. Tip 2 Diyabetes Mellitus' lu Hastalarda Serum Leptin Düzeyleri. Uzmanlık Tezi, Gaziantep Üniversitesi / *Tıp Fakültesi / Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı*, Gaziantep, 2003, s.13.
- Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, Boden G, Nolan JJ, Henry R, Mudaliar SR, Olefsky J, Caro JF. Acute and Chronic effect of insulin on leptin production in humans. *Diabetes*. 1996; 45: 699–701.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., GREEN, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell Death Differ*, 16(1):3–11. *Surg*, 111(4):1481–1496
- Kucuk C, Sozuer E, Gursoy S, Canoz O, Artis T, Akcan A, et al. Treatment with MET-RANTES decreases bacterial translocation in experimental colitis. *Am J Surg* 2006; 191, 77–83.
- Lin XH, Wang H, Wu DD, Ullah K, Yu TT, Ur Rahman T, Huang HF. High Leptin Level Attenuates Embryo Development in Overweight/Obese Infertile Women by Inhibiting Proliferation and Promotes Apoptosis in Granule Cell. *Horm Metab Res*. 2017 Jul;49(7):534–541. doi: 10.1055/s-0043-107617. Epub 2017 May 30. *Pub Med* PMID: 28561185.
- Lodish H, Berk A, Ziporsky SL et al. The Dynamic Cell. In: Molecular Cell Biology. 4th ed. New York, *WH Freeman & Co.* c2000.
- Loffler S, August G, Kohler U, Spanel-Borowski K. Evidence of leptin expression in normal and polycystic human ovaries. *Mol Hum Reprod* 2001; 7:1143–1149.
- Luukkaa V, Pesonen U, Huhtaniemi I, et al. Inverse correlation between serum testosterone and leptin in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3243–3246.

- M. Rocío Sierra-Honigmann, Anjali K. Nath, Chiaki Murakami, Guillermo García-Cardeña, Andreas Papapetropoulos, William C. Sessa, Lisa A. Madge, Jeffrey S. Schechner, Michael B. Schwabb, Peter J. Polverini, and Jaime R. Flores-Riveros. Biological Action of Leptin as an Angiogenic Factor. **Science**. 1998; 281:1683–1686.
- MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1995; 92: 9034–7.
- Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis, **Am J Pathol** . , 1995,46: 3- 15
- Mantzoros CS, Flier JS, Ragol AD: A longitudinal assesment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boysa: V. Rising leptin levels may signal the onset of puberty, **Journal of clinical Endocrinology and Metabolism**. 1997: 82:1065–1070.
- Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. **Ann Intern Med**. 1999; 130:671–80.
- Mantzoros, C.S., Flier, J.S., Rogol, A.D., 1997. A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. V. Rising leptin levels may signal the onset of puberty. **J. Clin. Endocrinol. Metab**. 82, 1066–1070.
- MantzorosCS, Prasad AS, Beck FWJ, Grabowski, S, Kaplan J, Adair C,Brewer GJ. Zinc may regulate serum leptin concentrations in humans. **Journal of the American College of Nutrition**. 1998; 17, 270-275.
- Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, et al. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. **Nat Med** 1997; 3:1029–1033.
- Matsuoka T, Tahara M, Yokoi T, Masumotoa N, Takeda T, Yamaguchi M, Tasaka K, Kurachi H, Murata Y. Tyrosine phosphorylation of STAT3 by leptin though leptin receptor in mouse metaphase 2 stage oocyte. **Biochem Biophys Res Comm** 1999; 256:480–484.
- Messinis IE, Milingos S, ZikopoulosK, et al. Leptin concentrations in the follicular phase of spontaneous cycles and cycles superovulated with follicle stimulating hormone. **Hum Reprod** 1998; 13: 1152–1156.
- Messinis IE, Milingos SD, Alexandris E, et al. Leptin concentrations in normal women following bilateral ovariectomy. **Hum Reprod** 1999; 14: 913–918.
- Moran O, Phillip M. Leptin: obesity, diabetes, and other peripheral effects. **Pediatric Diabetes**. 2003; 4: 101-109.
- Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. Leptin and reproduction: a review. **Fertil Steril** 2002; 77:433–444.
- Mountz JD, Zhou T. Apoptosis and Autoimmunity. In: Koopman WJ ed. A Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions. **Lippincott Williams & Wilkins** 2001
- Nagata S. Apoptosis by death factor. **Cell**. 1997;88: 355–65.
- Narula J, Kharbanda S, Khaw BA. Apoptosis and the Heart. **Chest** 1997;112:1358-62.
- Nyström F, Ekman B, Österlund M, et al. Serum leptin concentrations in a normal population and in GH deficiency: negative correlation with testosterone in men and effects of GH treatment. **Clin Endocrinol** 1997; 47:191–198.

- Ostlund R.E., Yang J.W., Klein S. et al. (1996) Relation between plazma leptin concentration and body fat, gender, diet, age and metabolic covariates. **J Clin Endocrinol Metab** 81, 3909-13.
- Öktem S, Özhan M H, Özol D (2001): Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, 2 (1): 91-95.
- Özbalcı D, Şahin M. Leptin ve immün sistem. **S.D.Ü. Tıp Fak Derg** 2007; 14; 51-5.
- Öztürk F. Apopitoz. **İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi**, 2002, 9 (2): 143- 148
- Palment MR, Radovick S, Boepple PA. The impact of reversilole gonadal sex steroid suppression on serum leptin concentrations in children with central precocious puberty. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998;83: 1091–1096.
- Paolisso G, Rizzo MR, Mone CM, et al. Plasma sex hormones are significantly associated with plasma leptin concentration in healthy subjects. **Clin Endocrinol** 1998; 48: 291–297.
- Perkins AS, Stern DF. Apoptosis. In: Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA eds. *Cancer Principle and Practice of Oncology*. Philadelphia: **Lippincott-Raven**. 1997:96–100.
- Persaud, T. V. N. (1992) Embryology of the female genital tract and gonads, In Copeland LJ, Jarrell J, McGregor J (eds), **Textbook of Gynecology**, Philadelphia, WB Saunders, 481s.
- Pole RJ, Qi BQ, Beasley SW. Patterns of apoptosis during degeneration of the pronephros and mesonephros. **J Urol** 2002;167(1):269-71.
- Quinton ND, Laird SM, Okon MA, et al. Serum leptin levels during the menstrual cycle of healthy fertile women. **Br J Biomed Sci** 1999; 56: 16–19.
- Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation. **J Biol Chem**. 2001;276: 869–874.
- Rene-Gonzalez R, Simon C, Caballero Campo-P, Norman R, Chardonnens D, Devoto L, Bischof P. Leptin and reproduction. **Hum Reprod Update** 2000; 6:290–300.
- Riad-Gabriel MG, Jinagouda SD, Sharma A, et al. Changes in plasma leptin during the menstrual cycle. **Eur J Endocrinol** 1998; 139: 528–531.
- Roemmich JN, Rogol AD : Role of leptin during childhood growth and development **Endocrinol Metab Clin North AM**. 1999: 28:749.
- Roshal M, Zhu Y, Planelles V (2001): Apoptosis in AIDS. **Apoptosis**, 6: 103–116.
- Ruiz-Cortez AT, Martel-Kennes Y, Gevery NY, Downey BR, Palin MF, Murphy BD. Biphasic effects of leptin in porcine granulosa cells. **Biol Reprod** 2003; 68:789–796.
- Ryan NK, Woodhouse CM, Van der Hoek KH, Gilchrist RB, Armstrong DT, Norman RJ. Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation. **Biol Reprod** 2002; 66:1548–1554.
- Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. **Nature**. 1995; 377:527–529.

- Sanders EJ, Torkkeli PH, French AS. Patterns of cell death during gastrulation in chick and mouse embryos. *Anat Embryol* 1997; 195: 147-154.
- Santos-Alvarez J, Goberna R, Sánchez-Margalet V. Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell Immunol* 1999; 194: 6-11.
- Saraste A, Pulkki K (2000): Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45: 528-537.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998; 17, 1675-1687.
- Schwartzman R A, Cidloski J A. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death, *Endocrine Reviews*, 1993,14:133- 144
- Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis. *Pathology Annual*. 1982;17:229-59.
- Segal RK, Landt M, Klein S. Relationship between insulin sensitivity and plasma leptin concentration in lean and obese men. *Diabetes*. 1996;45: 988–91.
- Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J, Becker GW, Bowsher RR, Stephens TW, Caro JF. Evidence of free and bound leptin in human circulation. *J Clin Invest*. 1996; 98: 1277-1282.
- Smith GD, Jackson LM, Foster DL. Leptin regulation of reproductive function and fertility. *Theriogenology* 2002; 57:73–86.
- Spicer LJ. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domest Anim Endocrinol* 1991; 21:251–270.
- Şeftalioğlu, A. (1991) Genel İnsan Embriyolojisi, Ankara, 159s.
- Şeftalioğlu, A. (1998) Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi, 3. Baskı, **Feryal Matbaası** Ankara, 620s.
- Şeftalioğlu, A. (2003) Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi, 4. Baskı, **Alp Ofset Matbaacılık** Ankara, 653s.
- Tataranni PA, Monroe MB, Dueck CA. Adiposity, plasma leptin concentration and reproductive function in active and sedentary females. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997; 21:818–821.
- Thompson CB. Apoptosis. In: Paul WE, ed. Fundamental Immunology. **Lippincott-Raven Publishers**. 1999
- Tomatır A. G. Apoptoz; programlı hücre ölümü, *T. Klin. J. Med. Sci.* , 2003, 23: 499-508
- Touchette N, Fogle S. Apoptosis: it chimes with mitosis. *JNIH Res.* , 1991, 3: 75
- Ulukaya E. 11/04/2003. Apoptozis Ders Notları.  
[http://www20.uludag.edu.tr/~biokimya/apoptozis\\_ders\\_notu.pdf](http://www20.uludag.edu.tr/~biokimya/apoptozis_ders_notu.pdf) (11.06.2018)
- Van Aggel-Leijssen DPC, van Baak MA, Tenenbaum R, et al. Regulation of average 24h human plasma leptin level; the influence of exercise and physiological changes in energy balance. *Int J Obesity*. 1999; 23: 151–158.

- Walker P R, Leblanc J, Smith B, Pandey S, Sikorska M (1999): Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis. **Enzymology**, 17: 329-338.
- Wee NKY(1), Enriquez RF(1), Nguyen AD(2), Horsnell H(1), Kulkarni R(1), Khor EC(1), Herzog H(2), Baldock PA(3). Diet-induced obesity suppresses cortical bone accrual by a neuropeptide Y-dependent mechanism. **Int J Obes** (Lond). 2018 Mar 9. doi: 10.1038/s41366-018-0028-y. [Epub ahead of print]
- Wijsman J H, Jonker R R, Keijzer R, Velde C J H, Cornelisse C J, Dierendonck J H V (1993): A new method to detect apoptosis in paraffin sections; in situ endlabeling of fragmented DNA. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 41 (1): 7-12.
- Wyllie AH, Duvall E. Cell death. In: McGee JO'D, Issacson PG, Wright N, eds. Oxford Textbook of Pathology, vol 1. USA, **Oxford University Press** 1992: 142-147.
- Yan G.T., Hao X.H., Xue H. and Lu Y.P. (2002) Establishment of a highly sensitive leptin RIA and detection of increased leptin levels in hyperlipidemia and pregnancy. **J immunoassay Immunochem**; 23, 317.
- Zeng J, Patterson BW, Klein S, et al. Whole body leptin kinetics and renal metabolism in vivo. **Am J Physiol**. 1997; 273: 1102–1106.
- Zhang F, Chen Y, Heiman M, Dimarchi R. Leptin: Structure, **Function and Biology. Vitamins and Hormones**. 2005; 71: 345-372.
- Zhang J, Xu M (2002): Apoptotic DNA fragmentation and tissue homeostasis. **Trends in Cell Biology**, 12 (2): 84- 89.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L and Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**. 372(6505);425-32, 1994.

## 7. ÖZGEÇMİŞ