



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KURBAĞA (*Pelophylax ridibundus*) KARACİĞERİNDE
LEPTİN VE LEPTİN RESEPTÖRÜNÜN SAPTANMASI:
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BİR ÇALIŞMA**

Tuğba DUZLA

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

Danışman

Doç. Dr. Meliha ŞENGİZER İNCELİ

Mart, 2015

İSTANBUL

Bu çalışma 27/03/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:

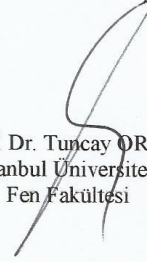


Doç. Dr. Meliha ŞENGEZER İNCELİ (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Tülay İREZ
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Tıp Fakültesi



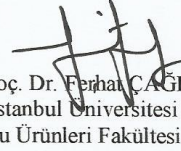
Prof. Dr. Tuncay ORTA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Uğur AKSU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Yard. Doç. Dr. Ferhat CAĞILTAY
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 31037 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışma *Pelophylax ridibundus* kurbağa karaciğerinde leptin ve leptin reseptörünün varlığını göstermek ve bu dokudaki olası etkilerini ortaya çıkarmak amacı ile yapılmıştır.

Bu çalışmanın hazırlanmasında değerli bilgi ve deneyimleriyle yolumu aydınlatan ve her konuda desteğini gördüğüm, hoşgörüsünü, güler yüzünü benden hiç esirgemeyen, tanıdığım en özel insanlardan biri olan tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Meliha ŞENGEZER-İNCELİ'ye candan ve saygıyla dolu teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince çeşitli konularda yardımlarını gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım sayın hocalarım Doç. Dr. Uğur AKSU, Araş. Gör. Dr. Yasemin TUNALI ve Uzman Biyolog Özay ŞAHİNGÖZ'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde büyük katkıları olan İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca benden hiçbir fedakârlığı esirgemeyen, bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan, her türlü desteklerinden ve sabırlarından dolayı canım ailem kıymetlilerim, babam Çetin DUZLA, annem Hayriye DUZLA ve kardeşim Tolga DUZLA'ya yürekten teşekkür ederim. Ayrıca dostluğunu hiçbir şeye değişmeyeceğim, kardeşten öte olduğum değerli Şeyda DORUK'a teşekkür ederim.

Her zaman desteği ve varlığı ile güç kaynağım olan nişanlım Emrah ŞAKİROĞLU'na gönül dolusu teşekkür ederim.

Mart, 2015

Tuğba DUZLA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	ix
ÖZET.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. AMFİBİ KARACİĞERİ	4
2.2. LEPTİN VE LEPTİN RESEPTÖRÜ.....	9
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	14
3.1. HİSTOLOJİK YÖNTEMLER.....	15
3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER	16
3.2.1. Leptinin İmmünohistokimyasal Olarak Belirlenmesi	16
3.2.2. Leptin Reseptörünün İmmünohistokimyasal Olarak Belirlenmesi	17
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	17
4. BULGULAR.....	18
4.1. HİSTOLOJİK BULGULAR	18
4.1.1. Birinci ve İkinci Deneyin PBS Enjeksiyonlu ve Dokunulmamış Kontrol Bireylerinin Histolojik Bulguları	18
4.1.2. Birinci Deneyin Bir Gün Leptin Enjeksiyonu Yapılan Bireylerinin Histolojik Bulguları	23
4.1.3. İkinci Deneyin Beş Gün Leptin Enjeksiyonu Yapılan Bireylerinin Histolojik Bulguları	28
4.1.4. Histolojik Ölçümler	33
4.1.4.1. Hepatosit Sayısı	33
4.1.4.2. Pigmentli alan sayısı	34
4.1.4.3. Pigmentli Yüzey Alanı	35

4.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR	36
4.2.1. Leptin İmmünohistokimyasına Ait Bulgular	36
4.2.2. Leptin Reseptörü İmmünohistokimyasına Ait Bulgular.....	43
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	50
KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ	93

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.2.1:** Leptin reseptörünün altı farklı izoformu ve reseptörlerin kısımları (Marroquí ve diğ., 2012'den değiştirilerek). 10
- Şekil 2.2.2:** Leptin reseptörü sinyal iletiminde JAK-STAT yolağı (Bethanis ve Theocharis, 2006).....11
- Şekil 4.1.1.1:** Kontrol bireyi karaciğerinin genel histolojik görünümü. HE, (km: küçük melanomakrofaj, bm: büyük melanomakrofaj, Pv: portal ven, Ha: hepatik arter, S: safra kanalı, →: sinüzoid). 20
- Şekil 4.1.1.2:** Kontrol bireyi karaciğerinin daha büyük büyütmedeki görünümü. HE, (km: küçük melanomakrofaj, →: safra kanalikülü, ►: hepatosit, →: sinüzoid).....20
- Şekil 4.1.1.3:** Kontrol bireyi karaciğerinde belli bir düzende olmayacak şekilde dağılmış, ince bir bağ dokusu ile kuşatılmış halde hepatik arter, portal ven ve safra kanallarının kolları (→). Masson. 21
- Şekil 4.1.1.4:** Kontrol bireyi karaciğerinde daha büyük büyütmede hepatik arter (Ha), portal ven (Pv) ve safra kanalının (S) kollarının görünümü. Masson. 21
- Şekil 4.1.1.5a-b:** Kontrol bireyine ait karaciğerde, hepatositlerde (→), büyük (bm) ve küçük (km) melanomakrofajlarda (►) PAS(+) reaksiyon.....22
- Şekil 4.1.1.6a-b:** Kontrol bireyine ait karaciğerde, a) hepatositler (*) ve b) safra kanalı (S) epitelinin protein içeriği. BPB, (Ha: Hepatik arter, →: Safra kanalikülü).....22
- Şekil 4.1.2.1:** Lep1 grubuna ait karaciğerin genel histolojik görünümü. HE, (km: küçük melanomakrofaj, bm: büyük melanomakrofaj, mk: küçük melanomakrofaj kümesi, →: sinüzoid genişlemesi). 24
- Şekil 4.1.2.2:** Lep1 grubuna ait karaciğerin daha büyük büyütmedeki görünümü. HE, (km: küçük melanomakrofaj, bm: büyük melanomakrofaj, mk: küçük melanomakrofaj kümesi, →: sinüzoid genişlemesi).....24
- Şekil 4.1.2.3:** Lep1 grubuna ait bireylerin karaciğerinde portal venin (Pv) etrafındaki dejenere olmuş hücrelerin (→) görünümü. HE, (*: damar etrafındaki artmış bağ dokusu). 25
- Şekil 4.1.2.4:** Lep1 grubuna ait bireylerin karaciğerinde damarlar ve safra kanalının etrafındaki bağ dokusunda artış (→). Masson. 25
- Şekil 4.1.2.5:** Lep1 grubuna ait karaciğerde daha büyük büyütmede damarlar ve safra kanalının etrafındaki bağ dokusunda artış (→). Masson, Ha: hepatik arter, Pv: portal ven, S: safra kanalı, km: küçük melanomakrofaj, bm: büyük melanomakrofaj). 26

Şekil 4.1.2.6a-b: Lep1 grubuna ait karaciğerde hepatosit (→), küçük (km), büyük (bm) ve küçük kümeli (mk) melanomakrofajlarda (►) PAS (+) reaksiyon.....	26
Şekil 4.1.2.7a-b: Lep1 grubuna ait bireylerin karaciğerinde a) hepatositler (*) ve b) safra kanalının (S) protein içeriği. BPB, (Ha: hepatik arter).	27
Şekil 4.1.3.1: Lep5 grubuna ait bireylerde yaygın eozinofilik (*) hepatositlerin genel görünüşü. HE, (MK: melanomakrofaj kümesi, →: sinüzoid genişlemesi).	29
Şekil 4.1.3.2: Lep5 grubuna ait bireylerin karaciğerinin daha büyük büyütmede görünümü. HE, (MK: melanomakrofaj kümesi).	29
Şekil 4.1.3.3: Lep5 grubuna ait bireylerin karaciğerinde melanomakrofajlar (►) tarafından kuşatılmış bozulmuş hücre kitlesi. HE.	30
Şekil 4.1.3.4: Lep5 grubuna ait bireylerin karaciğerinde melanomakrofajların (►) oluşturduğu bir fagositoz alanı. HE.	30
Şekil 4.1.3.5: Lep5 grubuna ait bireylerin karaciğerinde damarlar ve safra kanalının etrafındaki artmış bağ dokusu (→). Masson.	31
Şekil 4.1.3.6: Lep5 grubuna ait karaciğer dokusunda damarlar ve safra kanalının (S) etrafındaki bağ dokusunda artış (→). Masson, (MK: melanomakrofaj kümesi, Pv: portal ven, Ha: hepatik arter).	31
Şekil 4.1.3.7a-b: Lep5 grubuna ait bireylerin karaciğerinde, hepatosit (→) ve melanomakrofaj kümelerinde (►) PAS(+) reaksiyon.....	32
Şekil 4.1.3.8a-b: Lep5 grubuna ait bireylerde hepatositlerde (*) ve safra kanalı (S) epitelinde protein içeriği. BPB, (MK: melanomakrofaj kümesi, Ha: hepatik arter).	32
Şekil 4.1.4.1.1: Kontrol ve deneyli gruplarda hepatosit sayısı (**p<0.001). Her bir grup için elde edilen değerler ‘ortalama±standart hata’ olarak gösterilmiştir. Dkm Kon1: 2371±20.37, PBS Kont1: 2376±13.98, Lep1: 3984±42.64, Dkm Kont5: 2361±13.03, PBS Kont5: 2435±11.59, Lep5: 5673±80.65.	33
Şekil 4.1.4.2.1: Kontrol ve deneyli gruplarda pigmentli alan sayısı (**p<0.01, ***p<0.001). Her bir grup için elde edilen değerler ‘ortalama±standart hata’ olarak gösterilmiştir. Dkm Kon1: 88.85±9.617, PBS Kont1: 83.52±11.00, Lep1:161.6±8.930, Dkm Kont5: 92.41±9.331, PBS Kont5: 87.08±10.23, Lep5: 315.9±22.24.	34
Şekil 4.1.4.3.1: Kontrol ve deneyli gruplarda pigmentli yüzey alanı (**p<0.001). Her bir grup için elde edilen değerler ‘ortalama±standart hata’ olarak gösterilmiştir. Dkm Kon1: 0.9299±0,07406, PBS Kont1: 0.9308±0.07802, Lep1: 3.456±0.09064, Dkm Kont5: 0.9853±0.07336, PBS Kont5: 0.9961±0.08045, Lep5: 26.44±0.4668.	35
Şekil 4.2.1.1: Periferik hepatositlerdeki leptin (L) HSCORE değeri (**p<0.001). Her bir grup için elde edilen değerler ‘ortalama±standart hata’ olarak gösterilmiştir. Dkm Kon1: 337.0±4.259, PBS Kont1: 348.5±7.069, Lep1: 196.5±3.845, Dkm Kont5: 341.5±8.139, PBS Kont5: 349.5±5.179, Lep5: 304.0±3.546.	37
Şekil: 4.2.1.2: Merkezi hepatositlerdeki leptin (L) HSCORE değeri (**p<0.001). Her bir grup için elde edilen değerler ‘ortalama±standart hata’ olarak gösterilmiştir. Dkm	

Kon1: 252.8±3.195, PBS Kont1: 257.6±4.516, Lep1: 90.75±2.136, Dkm Kont5: 252.4±6.324, PBS Kont5: 258.0±5.837, Lep5: 154.8±1.306.....	37
Şekil 4.2.1.3: Kontrol grubuna ait bireylerin periferel (Pe) ve merkezi (Me) hepatositlerinde leptin pozitif reaksiyon (→). (km: küçük melanomakrofaj, bm: büyük melanomakrofaj).	38
Şekil 4.2.1.4a-b: a) Kontrol bireyin periferel hepatositlerinde (→) ve safra kanalında (S) leptin pozitif a-b) küçük (km) ve büyük (bm) melanomakrofajda leptin negatif reaksiyon. (Şekil b'de kromojen olarak AEC kullanılmıştır).	38
Şekil 4.2.1.5: Kontrol grubuna ait bireylerin merkezi hepatositlerinde leptin pozitif reaksiyon (→). (km: küçük melanomakrofaj).	39
Şekil 4.2.1.6: Lep1 grubuna ait periferel (Pe) ve merkezi (Me) hepatositlerde leptin immünoreaktivitesi (→). (km: küçük melanomakrofaj, bm: büyük melanomakrofaj, MK: melanomakrofaj kümesi).	39
Şekil 4.2.1.7a-b: Lep1 grubuna ait periferel hepatositlerde (→) leptin pozitif, küçük (km), büyük (bm) melanomakrofajlarda ve melanomakrofaj kümesinde (MK) negatif reaksiyon. (Şekil b'de kromojen olarak AEC kullanılmıştır).	40
Şekil 4.2.1.8a-b: Lep1 grubu bireylerde a) merkezi hepatositlerde (→), b) safra kanalında (S) leptin immünoreaktivitesi. (km: küçük melanomakrofaj, MK: melanomakrofaj kümesi).	40
Şekil 4.2.1.9: Lep5 grubuna ait bireylerde periferel (Pe) ve merkezi (Me) hepatositlerdeki leptin immünoreaktivitesi (→). (MK: melanomakrofaj kümesi).	41
Şekil 4.2.1.10a-b: a) Lep5 grubuna ait periferel hepatositlerde (→) leptin pozitif, a-b) melanomakrofaj kümelerinde (MK) leptin negatif reaksiyon. (Şekil b'de kromojen olarak AEC kullanılmıştır).	41
Şekil 4.2.1.11a-b: a) Lep5 grubuna ait bireylerin merkezi hepatositlerindeki leptin immünoreaktivitesi (→) b) Safra kanalında (S) leptin negatif reaksiyon. (MK: melanomakrofaj kümesi)	42
Şekil 4.2.2.1: Periferel hepatositlerdeki leptin reseptörü (LR) HSCORE değeri (**p<0.001). Her bir grup için elde edilen değerler 'ortalama±standart hata' olarak gösterilmiştir. Dkm Kon1: 338.0±3.780, PBS Kont1: 324.0±3.780, Lep1: 388.0±1.512, Dkm Kont5: 331.0±3.836, PBS Kont5: 332.5±5.628, Lep5: 211.1±6.683.	44
Şekil 4.2.2.2: Merkezi hepatositlerdeki leptin reseptörü (LR) HSCORE değeri (**p<0.001). Her bir grup için elde edilen değerler 'ortalama±standart hata' olarak gösterilmiştir. Dkm Kon1: 232.1±1.959, PBS Kont1: 229.9±2.943, Lep1: 261.0±1.793, Dkm Kont5: 230.3±3.040, PBS Kont5: 228.8±2.704, Lep5: 132.5±4.532.	44
Şekil 4.2.2.3: Kontrol bireylerde periferel (Pe) ve merkezi (Me) hepatositler ile safra kanalında (S) leptin reseptör immünoreaktivitesi (km: küçük melanomakrofaj, bm: büyük melanomakrofaj).	45
Şekil 4.2.2.4: Kontrol bireye ait periferel hepatositlerde (*), küçük melanomakrofajda (►) ve eritrositlerde (→) leptin reseptör immünoreaktivitesi.	45

- Şekil 4.2.2.5a-b:** a) Kontrol bireye ait merkezi hepatositlerde (*) ve büyük melanomakrofajda (►), b) arter duvarında (→) pozitif leptin reseptör reaksiyonu. 46
- Şekil 4.2.2.6:** Lep1 grubuna ait bireylerde leptin reseptör immünoreaktivitesinin genel görünüşü. (Pe: periferel hepatositler, Me: merkezi hepatositler)..... 46
- Şekil 4.2.2.7a-b:** Lep1 grubuna ait bireylerin a) periferel hepatositlerde (*), eritrositte (→) ve büyük melanomakrofajda (►), b) safra kanalında (S) pozitif leptin reseptör reaksiyonu. 47
- Şekil 4.2.2.8a-b:** Lep1 grubuna ait a) merkezi hepatositlerde (*) büyük melanomakrofajlarda (►) ve küçük melanomakrofaj kümesinde (►►) b) arter duvarında pozitif leptin reseptör reaksiyonu..... 47
- Şekil 4.2.2.9:** Lep5 grubuna ait bireylerde periferel (Pe) ve merkezi (Me) hepatositlerde leptin reseptör immünoreaktivitesinin genel görünümü. 48
- Şekil 4.2.2.10:** Lep5 grubuna ait bireylerin periferel hepatositlerde (*), melanomakrofaj kümesinde (→) ve eritrositlerde (→) pozitif leptin reseptör immünoreaktivitesi..... 48
- Şekil 4.2.2.11a-b:** Lep5 grubuna ait bireylerin a) merkezi hepatositlerde (*) ve melanomakrofaj kümelerinde (→) b) Arter duvarı düz kas hücrelerinde (►) ve safra kanalı (S) epitel hücrelerinde pozitif leptin reseptör immünoreaktivitesi.....49

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Deney grupları.....	14
---------------------------------------	----

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
α-MSH	: Alfa melanosit uyarıcı hormon
AEC	: 3-amino-9-etilkarbazol
AU	: Arbitrary unit
bm	: Büyük melanomakrofaj
BPB	: Bromphenol blue
CYP1A	: Sitokrom-P450
DAB	: Diaminobenzidin
db/db	: Leptin reseptörünü kodlayan gende mutasyon taşıyan fare
Dbh^{-/-}	: Dopamin beta hidroksilaz enzimini kodlayan genden yoksun
DKM Kont1	: Birinci deneye ait dokunulmamış kontrol kurbağalar
DKM Kon5	: İkinci deneye ait dokunulmamış kontrol kurbağalar
fa/fa	: Leptin reseptörünü kodlayan gende mutasyon taşıyan sıçan
FITC	: Flurorescein isothiocyanate
GVA	: Su bazlı kapatma solüsyonu
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
Ha	: Hepatik arter
HE	: Hematoksilin-eosin
HSC	: Hepatik stellat hücresi
HSCORE	: Histolojik skor
i	: İmmünohistokimyasal reaksiyon şiddeti
JAK-STAT	: Janus protein kinaz-sinyal iletili ve transkripsiyon aktive edici faktör
KC	: Kupffer hücresi
km	: Küçük melanomakrofaj
Lep1	: Birinci deneye ait bir gün leptin enjeksiyonu yapılan kurbağalar
Lep5	: İkinci deneye ait beş gün leptin enjeksiyonu yapılan kurbağalar
MAPK	: Mitojen aktive protein kinaz
Masson	: Masson'un üçlü boyası
Me	: Merkezi hepatositler
mk	: Küçük melanomakrofaj kümesi
MK	: Melanomakrofaj kümesi
MS-222	: Tricaine methane sulfonate
NPY	: Nöropeptid Y
ob	: Leptini kodlayan gen
ob/ob	: Leptini kodlayan gende mutasyon taşıyan fare
OB-Ra	: Leptin reseptörünün kısa izoformlarından biri
OB-Rb	: Leptin reseptörünün uzun izoformu
OB-Rc	: Leptin reseptörünün kısa izoformlarından biri
OB-Rd	: Leptin reseptörünün kısa izoformlarından biri
OB-Re	: Leptin reseptörünün çözünür izoformu
OB-Rf	: Leptin reseptörünün kısa izoformlarından biri

PAS	: Periyodik asit Schiff
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PBS Kont1	: Birinci deneye ait bir gün PBS enjeksiyonu yapılan kontrol kurbağalar
PBS Kont5	: İkinci deneye ait beş gün PBS enjeksiyonu yapılan kontrol kurbağalar
Pe	: Periferel hepatositler
PH	: Kısmi hepatektomi
PI3K	: Fosfoditil inositol 3 kinaz
Pi	: Fotoğraf alandaki pozitif reaksiyon gösteren hücrelerin yüzdesi
Pv	: Portal ven
RT-PCR	: Reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
S	: Safra kanalı

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KURBAĞA (*Pelophylax ridibundus*) KARACİĞERİNDE LEPTİN VE LEPTİN RESEPTÖRÜNÜN SAPTANMASI: İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BİR ÇALIŞMA

Tuğba DUZLA

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Meliha ŞENGEZER İNCELİ

Bu çalışmanın amacı bir Anura örneği olan *Pelophylax ridibundus*'un karaciğerinde leptin ve leptin reseptörünün varlığını ve leptin enjeksiyonu ile leptinin bu dokuda meydana getirebileceği etkileri histolojik ve immünohistokimyasal olarak belirleyerek leptinin olası fonksiyon/fonksiyonları ile ilgili temel bilgiyi oluşturmaktır.

Protein yapıda bir hormon olan leptin, besin alımını ve vücut ağırlığının dengelenmesini düzenleyen, bunun yanı sıra üreme, immün cevap, hematopoiez gibi farklı fonksiyonları da etkileyen *obez* (ob) geninin bir ürünüdür. Leptin esas olarak adipositler tarafından sentezlenir ve kana salınır. Fakat son yıllarda leptinin plasenta, meme bezi, beyin, hipofiz ve mide gibi farklı doku ve organlarda da üretildiği tespit edilmiştir. Leptin reseptörü ise sitokin reseptör ailesinin bir üyesi olarak tanımlanmıştır ve çeşitli izoformları vardır. Aşağı omurgalılarda ve özellikle ergin amfibilerde leptin ve leptin reseptör ekspresyonu ve fonksiyonu hakkında kısıtlı bilgi mevcuttur.

Çalışmamızda *Pelophylax ridibundus* cinsi 24 adet ergin dişi kurbağa kullanıldı. Bir gün ve beş gün süren iki ayrı deney grubu oluşturuldu. Her bir grup, kontrol bireyleri ve leptin enjeksiyonlu bireylerinden oluşmaktadır. Karaciğerden alınan doku örnekleri histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için Bouin ile fikse edildi. Parafin

bloklardan alınan kesitlere hematoksilin-eosin, bromphenol blue, Masson'un üçlü boyası ile periyodik asit Schiff reaksiyonu, immünohistokimyasal olarak ise leptin ve leptin reseptör antikoru uygulandı. Bireylerin karaciğer kesitlerindeki hepatosit sayısı, pigment hücrelerinin oluşturduğu pigmentli alan sayısı ve pigmentli yüzey alanı belirlendi. Ayrıca hepatositlerdeki leptin ve leptin reseptörü immünoreaktivitesi semikantitatif olarak hesaplandı.

Çalışmamızda *Pelophylax ridibundus*'un hepatositlerinde ve safra kanalı epitel hücrelerinde leptin immünoreaktivitesi; hepatositler, safra kanalı epitel hücreleri, bazı melanomakrofajlar, eritrositler ve arter duvarı düz kas hücrelerinde leptin reseptör immünoreaktivitesi saptadık. Leptin enjeksiyonunun, uygulama süresine bağlı olarak leptin reseptörü taşıyan hücreleri etkileyebildiğini gözledik. Bu etkileri karaciğerde, hepatosit ve pigmentli alan sayısı ile pigmentli yüzey alanında artış, safra kanalı epitel hücrelerinin yüksekliğinin azalması, hepatositlerde glikojen ve lipid içeriğinin azalması ile protein içeriğinin artması şeklinde gözledik. Safra kanalı epitelinin yüksekliğinin ve protein içeriğinin azalması, fibrozis ve eozinofilik hepatositlerin gözlenmesi leptin uygulamasının doz/süresine bağlı olarak meydana gelen olumsuz etkilerdir. Bir gün leptin enjeksiyonu hepatositlerdeki leptini baskımlarken, leptin reseptöründe artışa neden olmuştur. Beş gün leptin enjeksiyonunun ise hepatositlerdeki leptini bir gün leptin enjeksiyonuna göre daha az baskılayabildiğini, leptin reseptöründe ise azalmaya neden olduğunu saptadık. Ayrıca leptin uygulaması, safra kanalı epitelinde leptini baskımlarken, leptin reseptöründe artışa sebep olmuştur.

Sonuç olarak, ergin *Pelophylax ridibundus* karaciğerinde yaygın olarak leptinin varlığını saptamamız, bu organın Anura amfibilerinde önemli bir leptin sentez yeri olabileceğini göstermektedir. Leptin, reseptörü aracılığıyla hepatositler ve melanomakrofajlar üzerinde belirgin proliferatif etkiye sahiptir. Ayrıca hepatositlerdeki karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasını düzenler. Leptinin kurbağa karaciğeri üzerindeki bu etkilerinin dokunun bütünlüğünü ve fonksiyonunu düzenlemeye yönelik olabileceğini düşünmekteyiz.

Mart, 2015, 107 sayfa.

Anahtar kelimeler: Leptin, leptin reseptörü, karaciğer, kurbağa, immünohistokimya.

SUMMARY

M. Sc. THESIS

DETECTION OF LEPTIN AND LEPTIN RECEPTOR IN THE FROG (*Pelophylax ridibundus*) LIVER: AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

Tuğba DUZLA

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Meliha ŞENGEZER İNCELİ

The purpose of this study is to constitute the basic information about the possible function/functions of leptin by determining histologically and immunohistochemically the existence of leptin and leptin receptor in the liver of *Pelophylax ridibundus*, which belongs to the order of Anura, and the possible effects of leptin in this tissue by leptin injection.

Leptin, originally a protein hormone, is a product of *obese* (*ob*) gene which also affects different functions such as reproduction, immune response, hematopoiesis as well as regulating food intake and body weight balance. Leptin is mainly synthesized by adipocytes and released into the bloodstream. However, it has been recently identified that leptin is also produced in different tissues and organs like placenta, mammary gland, brain, pituitary gland and stomach. Leptin receptor is identified as a member of cytokine receptor family and has several isoforms. Limited information is available about leptin and leptin receptor expression and function in lower vertebrates and especially in adult amphibians.

In our study, 24 adult female *Pelophylax ridibundus* frogs were used. Two different experimental groups, one for one-day and the other for five-day period, were formed. Each group consists of control individuals and leptin injected individuals. The tissue samples taken from the liver were fixed with Bouin for histological and immunohistochemical examinations. Hematoxylin eosin, bromphenol blue, Masson's trichrome stain and periodic acid Schiff reaction and also immunohistochemically leptin and leptin receptor antibody were applied to the sections obtained from paraffin-

embedded blocks. The number of hepatocytes, the number of pigmented areas and pigmented surface area constituted by pigment cells in the liver section of individuals were measured. Additionally, immunoreactivity of leptin and leptin receptors in hepatocytes were calculated semiquantitatively.

In our study, we detected leptin immunoreactivity in hepatocytes of *Pelophylax ridibundus*, epithelial cells of bile duct; leptin receptor immunoreactivity in hepatocytes, epithelial cells of the bile duct, some melanomacrophages, erythrocytes and smooth muscle cells of artery wall. We observed that leptin injection, depending on the application time, could affect the cells that have leptin receptor. We observed these effects as an increase in the number of hepatocytes, in pigmented areas and in pigmented surface area and a decrease in height of the bile duct epithelial cells. In hepatocytes, decrease in glycogen and lipid content and increase in protein content were observed. Fibrosis and eosinophilic hepatocytes and decrease in protein and height of the bile duct epithelial cells are negative effects of leptin administration depending on dose/duration. While one-day leptin injection suppressed the leptin in hepatocytes, it caused an increase in leptin receptor. On the other hand, five-day leptin injection suppressed the leptin in hepatocytes less than it was in one-day leptin injection, and caused a decrease in leptin receptor. Additionally, while leptin administration suppressed the leptin in bile duct epithelial cell, it caused an increase in leptin receptor.

As a result, detecting the wide presence of leptin in the liver of adult *Pelophylax ridibundus* shows that this organ could be an important place for leptin synthesis in Anura amphibians. Leptin has significant proliferative effect through its receptor on hepatocytes and melanomacrophages. Moreover, it regulates carbohydrate, lipid and protein metabolism in hepatocytes. We think that these effects on frog liver of leptin might be for regulating integrity and function of tissue.

March, 2015, 107 pages.

Keywords: Leptin, leptin receptor, liver, frog, immunohistochemistry.

1. GİRİŞ

Amfibiler hem su hem de kara ortamında yaşayabilen omurgalı hayvanlardır. Bu canlılar tatlı sularda ve nemli yerlerde yaşarlar. Larva ile ergin olmak üzere iki evreden oluşan bir yaşam döngüsüne sahiptirler. Gelişmelerinde genellikle metamorfoz görülür. Sıcak bölgelerde aşırı sıcaklık ve kuraklıktan, soğuk bölgelerde ise soğuktan korunmak için yaz ya da kış uykusuna yatarlar (Demirsoy, 1993). Bu sırada metabolizmalarını en aza indirirler (Storey ve Storey, 1990; Michaelidis ve diğ., 2008), vücutlarında depo edilmiş lipid ve glikojeni kullanırlar (Loumbourdis ve Kyriakopoulou-Sklavounou, 1991; Demirsoy, 1993; Crawshaw ve Weinkle, 2000; Wells, 2007).

Amfibilerde karaciğer, hepatik dokunun düzenlenişi yönünden türler arasında farklılık gösterir (Franco-Belussi ve diğ., 2012). Kuyruksuz kurbağalarda (Anura) karaciğer, vücut şekline uygun olarak geniş ve büyük loplara ayrılmış haldedir. Karaciğer, histolojik olarak, kan ve lenf kılcalları içeren, genel olarak ağsı düzende dizilmiş hücrelerden (parankima) oluşur (Demirsoy, 1993). Anura karaciğerinde melanomakrofaj olarak isimlendirilen ve fagositoz yapan pigmentli hücreler de bulunmaktadır (Barni ve diğ., 1999; Loumbourdis ve Danscher, 2004; Franco-Belussi ve diğ., 2012). Melanomakrofajlar melanin, lipofuskin ve hemosiderin gibi çeşitli maddeler içerir (Fournie ve diğ., 2001; Agius ve Roberts, 2003; Franco-Belussi ve diğ., 2012).

obez (ob) genin bir ürünü olan leptin protein yapıda bir hormondur. Besin alımını ve vücut ağırlığının dengelenmesini düzenler, ayrıca immün cevap, üreme ve hematopoiez gibi farklı fonksiyonları da etkiler (Zhang ve diğ., 1994; Cioffi ve diğ., 1996; Loffreda ve diğ., 1998). Leptin esas olarak adipositler tarafından sentezlenir ve kana salınır (Zhang ve diğ., 1994; Bornstein ve diğ., 2000; Fantuzzi, 2005; Blüher ve Mantzoros, 2007; Lago ve diğ., 2009). Fakat son yıllarda leptinin plasenta, meme bezi, mide, beyin ve hipofiz gibi farklı doku ve organlarda da üretildiği tespit edilmiştir (Masuzaki ve diğ., 1997; Bado ve diğ., 1998; Smith-Kirwin ve diğ., 1998; Morash ve diğ., 1999;

Muruzábal ve diğ., 2002). Leptin reseptörü ise sitokin reseptör ailesinin bir üyesi olarak tanımlanmıştır (Tartaglia ve diğ., 1995) ve çeşitli izoformları vardır (Lee ve diğ., 1996).

Leptinin varlığı ve fonksiyonu ile ilgili çalışmaların çoğu memelilere aittir. Aşağı omurgalılarda leptin ile ilgili ilk çalışma Johnson ve diğ. (2000) tarafından balıkta yapılmıştır. Leptin balığın kan, beyin, kalp ve karaciğer ekstrelerinde Western blot yöntemi ile saptanmıştır. Kurbağalarda da bu konuda yapılmış bazı çalışmalar mevcuttur. *Triturus cristatus carnifex* (Urodela)'in larvalarında mide, karaciğer, bağırsaktaki bazı hücrelerde ve pankreasta leptin ile leptin reseptör immünoreaktivitesi saptanmıştır (Buono ve Putti, 2004). *Xenopus laevis* (Afrika pençeli kurbağası-Anura) midesinde leptin immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir (Muruzábal ve diğ., 2002). Bir kuyruklu kurbağa türü olan *Ambystoma mexicanum* ile yapılmış bir çalışmada genç bireylerinin karaciğerinde RT-PCR yöntemi ile leptin ve leptin reseptörü bulunurken ergin bireylerinde sadece leptin saptanmıştır (Gackowska, 2011). Ancak kuyruksuz ergin kurbağalarda karaciğer dokusunda leptin ve leptin reseptörünün varlığı ve leptin enjeksiyonunun bu dokudaki etkileri ile ilgili çalışma bulunmamaktadır.

Tezin “Genel Kısımlar” bölümünde, amfibi karaciğeri morfolojik ve histolojik olarak tanımlanıp, leptin ve leptin reseptörü ile ilgili bilgi verilmiştir. Çeşitli omurgalı türlerinde leptin enjeksiyonu sonucu çeşitli dokularda meydana gelen etkiler hakkında da bilgiler sunulmuştur.

“Malzeme ve Yöntem” bölümünde, çalışmada kullanılan hayvan sayısı, özellikleri ve oluşturulan gruplar ile laboratuvar ortamında yapılan işlemler ayrıntılı bir biçimde belirtilmiştir. Yapılan bu işlemler sonucu elde edilen preparatlardan, histolojik ve immünohistokimyasal düzeyde veriler toplanmış ve bu veriler tezin “Bulgular” kısmında ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

“Tartışma ve Sonuç” bölümünde ise çalışmadan elde edilen veriler değerlendirilmiş ve bu veriler şimdiye kadar konumuzla ilgili yapılmış çalışmalardan elde edilen sonuçlarla karşılaştırılıp yorumlanmış ve bir sonuca varılmıştır.

Bir Anura örneği olan *Pelophylax ridibundus*'un kontrol ve leptin enjeksiyonlu bireylerinin karaciğerinde leptin ve leptin reseptörünü immünohistokimyasal olarak saptayarak, immünoreaktivitenin yoğunluk ve dağılımı semikantitatif olarak (HSCORE-

histolojik skor) değerlendirildi. Hematoksilin-eosin, bromphenol blue, Masson'un üçlü boyası ve periyodik asit Schiff reaksiyonu uygulanan doku kesitleri incelenerek gruplar arası farklılıklar saptandı. Ayrıca histolojik kesitlerde hepatosit sayısı ile pigmentli alan sayısı ve pigmentli yüzey alanı belirlendi. Bu çalışmanın amacı ergin Anura amfibilerinden *Pelophylax ridibundus*'ta leptin ve leptin reseptörünün karaciğer dokusundaki varlığını saptamak ve leptinin dokudaki olası fonksiyon/fonksiyonları ile ilgili temel bilgiyi oluşturmaktır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. AMFİBİ KARACİĞERİ

Amfibiler hem su hem de kara ortamında yaşayabilen omurgalı hayvanlardır. Larva ve ergin olmak üzere iki evreden oluşan bir yaşam döngüsüne sahiptirler. Gelişmelerinde genellikle metamorfoz görülür. Bu sayede, sadece suda yaşayan ve solungaçlarıyla soluyan kuyruklu bir larvadan, akciğerleri ile solunum yapan ergin bir hayvan meydana gelir. Metamorfoz sırasında larval evreye özgü kuyruk, solungaç gibi bazı organların yıkılması, bunun yerine ergine özgü akciğer, ekstremiteler gibi organların oluşumu ile beslenme tipine bağlı olarak ince bağırsakların kısalması gibi belirli organlarda yapısal değişimlerin olduğu görülürken, larval ammonotelik karaciğerden ergin üreotelik karaciğere geçiş gibi çeşitli biyokimyasal değişiklikler de gerçekleşmektedir (Demirsoy, 1993; Shi, 2000). Kurbağalar sıcak bölgelerde aşırı sıcaklık ve kuraklıktan, soğuk bölgelerde ise soğuktan korunmak için yaz ya da kış uykusuna yatarlar. Bunun için, toprak ya da çamur içine, taş ve ağaç kabuklarının altına ya da donmayan göl ve nehirlerin kenarına sığınır. Bu sırada metabolizmalarını en aza indirirler, beslenmez ve hareket etmezler (Storey ve Storey, 1990; Michaelidis ve diğ., 2008). Bu süre içerisinde enerji kaynağı olarak vücutlarında depo edilmiş yağ ve glikojeni kullanırlar (Loumbourdis ve Kyriakopoulou-Sklavounou, 1991; Demirsoy, 1993; Crawshaw ve Weinkle, 2000; Wells, 2007).

Omurgalılarıdaki en büyük bez olan karaciğer, abdominal boşlukta yer alır ve diğer organlarla yakın ilişki içindedir. Şekli ve boyutu değişkenlik gösterir (Franco-Belussi ve diğ., 2012). Kuyruksuz kurbağalarda karaciğer, vücut şekline uygun olarak geniş ve büyük loplara ayrılmış haldedir (Demirsoy, 1993) ve karaciğer genellikle sol ve sağ lop olmak üzere birbirinden tamamen ayrılmış iki loptan oluşur (Crawshaw ve Weinkle, 2000). İki loptan biri, genellikle sol lob daha küçük loplara ayrılmış haldedir. Bazı türlerde ise üçüncü lob (ara lob) da bulunmaktadır (Crawshaw ve Weinkle, 2000). Kuyruksuz kurbağa türlerinden *Hoplobatrachus rugulosus*, *Lithobates catesbeianus* ve *Eupemphix nattereri*'de karaciğer sağ, sol ve orta olmak üzere 3 loptan oluşmuştur (Chen diğ., 2003; Fenerick, 2008; Franco-Belussi ve diğ., 2012). Semenderlerde

(Urodela) bu loplar merkezi bir karaciğer kütlesinden kökenlenerek üç uzamış loba ayrılır (Francis, 1934). *Cynops orientalis* (Kırmızı karınlı japon semenderi, Urodela) karaciğeri ise 5 lopludur (Xie diğ., 2011). Apoda ordosuna ait türlerde (bacaksız kurbağa) karaciğer son derece uzamış ve kenarları hafifçe dişli haldedir (Duellman ve Trueb, 1994; Crawshaw ve Weinkle, 2000). *Rana ridibunda* (*Pelophylax ridibundus*)‘da ise karaciğer iki loblu olmakla beraber sol lob iki parçalıdır (De luliis ve Pulerà, 2007).

Memelilerdeki lobüler karaciğer yapısı *Cynops orientalis*’da görülürken *Eupemphix nattereri* ve *Lissotriton italicus* kurbağalarında görülmemektedir (Xie ve diğ., 2011; Franco-Belussi ve diğ., 2012; Bernabò ve diğ., 2014). Kurbağalarda karaciğer kordonlarında hepatositler farklı şekillerde düzenlenmiştir. *Hynobius nebulosus* (Urodela) türünde hepatositler çok tabakalı, *Hynobius stejnegeri* (Urodela) ile *Eupemphix nattereri* türünde çift tabakalı ve *Rana ornativentris* (Anura) türünde ise tek sıra halinde dizili olarak görülmektedirler. Ancak hepatositlerin bu sıralanma şekilleri bazı cinslerde bir arada da bulunabilmektedir. (Akiyoshi ve Inoue, 2012; Franco-Belussi ve diğ., 2012). Hepatik kordonlar ile yakından ilişkili sinüzoidler bulunur. Hepatik kordonlar arasında melanomakrofajlar ve safra kanalikülleri gözlenmektedir (Franco-Belussi ve diğ., 2012). Spornitz (1975) tarafından Anura ordosuna ait türlerde hepatositlerin tübüller halinde düzenlendiği ve sinüzoidlerle kuşatıldığı belirtilmiştir. *Lithobates catesbeianus* (Anura) hepatositleri de sinüzoidlerle çevrili tübüller şeklinde düzenlenmiştir (Fenerick, 2008). *Rana ridibunda* karaciğer enine kesitlerinde 4-8 hepatositin bir safra kanalikülü etrafında dizilerek tübüller yapıları oluşturduğu ve bu tübüller yapıların da dallanmış olduğu belirtilmiştir (Loumbourdis ve Danscher, 2004).

Cynops orientalis semenderinde poligonal şekilli olan hepatositte nukleus; büyük ve yuvarlak olup, hücrenin periferinde yer almaktadır (Xie ve diğ., 2011). *Eupemphix nattereri*’de ise hepatositler polihedral şekillidir ve bol sitoplazmaya sahiptir. Nukleus küreseldir, ökromatin yönünden zengindir ve hücrenin merkezinde yer alır. Hepatosit sitoplazmasında fazla miktarda mitokondri ve iyi gelişmiş Golgi aygıtı, düz yüzölçümlü endoplazmik retikulum gibi organeller ve bol miktarda glikojen bulunur (Franco-Belussi ve diğ., 2012).

Karaciğerde portal ven, hepatik arter ve safra kanalı portal triadı oluşturur (Michalopoulos ve DeFrances, 1997; Dooley ve diğ., 2011). Portal triad *Xenopus laevis*

karaciğerinde görülürken (Wiechmann ve Wirsig, 2003), *Eupemphix nattereri* (Franco-Belussi ve diğ., 2012) ve *Rana ridibunda*'da (Azanza ve diğ., 1989) bulunmadığı belirtilmiştir.

Kupffer hücreleri (KC) hepatik sinüzoidlerin endoteliyal duvarlarında yer alır ve doğrudan kan akışı ile ilişki içerisinde. Amfibi karaciğeri ile yapılan bazı çalışmalarda bu hücreler çoğunlukla melanin içerikleri ile morfolojilerine göre küçük ve büyük Kupffer hücreleri olarak sınıflandırılmıştır (Corsaro ve diğ., 2000; Barni ve diğ., 2002; Sichel ve diğ., 2002). Küçük KC'ler az miktarda melanozom içerirler ya da tamamen melanozomlardan yoksunlardır ve endotel duvarında yaygın olarak bulunurlar. Büyük KC'ler çok miktarda melanozom, bol miktarda fagosite edilmiş maddelerle doludur ve genelde portal alanlarda kümeler oluşturmak üzere birikirler (Corsaro ve diğ., 2000; Sichel ve diğ., 2002). İnce yapısal incelemelerde her iki hücre tipinin de eliptik ya da yarımay şeklinde bir tane nukleus içerdiği, küçük KC'lerde nukleus merkezi konumlu iken, büyük KC'lerde periferde konumlandığı belirtilmiştir (Corsaro ve diğ., 2000; Sichel ve diğ., 2002). *Rana esculenta* karaciğerinde yapılan çalışmalar Kupffer hücre farklılaşması ve melanin birikimi arasında direkt bir ilişki olduğunu ve küçük KC'lerin kısmi olarak farklılaşmış hücreler olduğu, bol miktarlarda melanin bulunan büyük KC'lerin ise son farklılaşma evresinde olduğu düşünülmektedir (Corsaro ve diğ., 2000; Purrello ve diğ., 2001; Barni ve diğ., 2002). Soğukkanlı omurgalıların karaciğerinde, sitoplazmalarında melanin pigmenti içeren Kupffer hücreleri, melanomakrofaj olarak da isimlendirilir (Loumbourdis ve Vogiatzis, 2002; Agius ve Roberts, 2003; Loumbourdis ve Danscher, 2004; Fenoglio ve diğ., 2005; Oliveira ve Franco-Belussi, 2012). Melanomakrofajlar bireysel olarak ya da biraraya gelerek kümeler şeklinde bulunabilirler (Sichel, 1988; Passantino ve diğ., 2014). Ayrıca melanomakrofajların mitoz geçirmelerinin melanomakrofaj kümesi oluşumuna katkı sağlayabildiği de belirtilmiştir (Agius, 1985). Barni ve diğ. (2002)'ne göre melanomakrofaj proliferasyonunun farklılaşma aşamalarından bağımsız olacak şekilde, var olan melanomakrofajların hücre bölünmesine uğrayarak sayılarını arttırabileceği belirtilmiştir. Ancak melanomakrofaj bölünmesinde her zaman nukleus bölünmesinin sitoplazma bölünmesini izlemediği ve bunun sonucunda iki nukleuslu melanomakrofajların da görülebildiği tespit edilmiştir. Rund ve diğ. (1998)'nin kaplumbağanın karaciğer ve dalağındaki melanomakrofajlar üzerine yaptıkları *in vitro*

bir çalışmada bu hücrelerin küme oluşturmaya meyilli olduklarını ve küme içindeki bireysel melanomakrofajların morfolojileriyle çalışmanın zor olduğunu belirtmişlerdir. Bu fagositik hücrelerin *in vitro* koşullarda çok nadir mitoz geçirdikleri ve yaklaşık 40 dakikada bölünmeyi tamamladıkları saptanmıştır.

Melanomakrofajların fagositoz kapasitelerinden ve yerleşimlerinden dolayı Kupffer hücrelerinden kökenlendikleri, bundan dolayı mononükleer fagositik sisteme dahil oldukları kabul edilir (Rund ve diğ., 1998; Barni diğ., 1999). Melanomakrofajların ana görevi yabancı maddeleri ve hücre degradasyonundan dolayı oluşan ürünleri fagosite etmektir (Herraez ve Zapata, 1991; Meseguer ve diğ., 1994; Ravaglia ve Maggese, 1995). Bu hücrelerin iyonlar ve serbest radikaller gibi sitotoksik maddeleri etkisiz hale getirmede önemli bir rol oynadıkları düşünülmektedir (Sichel, 1988; Frangioni diğ., 2005). Melanomakrofajlar sitoplazmalarında üç tip pigment içerirler; melanin, lipofuskin ve hemosiderin (Fournie ve diğ., 2001; Agius ve Roberts, 2003). Bu hücrelerde bulunan pigmentlerden melanin; serbest radikalleri, katyonları ve fagosite edilmiş hücre materyallerin parçalanması sonucu oluşan toksik ajanları nötralize eden ve absorblayabilen karmaşık polimerlerdir (Sichel, 1988; Rozanowska ve diğ., 1999). Melaninin hücre koruyucu etkisini radikal tutucu ya da metal iyon şelatörü özellikleriyle ilgili olduğu düşünülmektedir (Scalia ve diğ., 1990; Corsaro ve diğ., 1995). Geremia ve diğ. (1989) kurbağaların melanomakrofajlarında melaninin önemli bir hidrojen peroksit indirgeni olduğunu bildirmişlerdir. Melaninin yapısında bulunan negatif yüklü karboksil fonksiyonel grubu, şelat olarak görev yapmaktadır (Riley, 1997). Şelatörler, belli metal iyonları ile suda çözünür kompleksler oluşturan kimyasallardır. Bu sayede iyonu etkisizleştirerek onun başka elementler veya iyonlarla tepkimeye girmesini engelleyerek, çökelek veya tortu oluşmasını önlerler (Acton, 2013). Böylelikle melanin pigmentlerine, seçici olarak pozitif yüklü partiküller bağlanarak melanomakrofajlar koruyucu bir rol üstlenmektedir. Loumbourdis ve Danscher (2004), melanomakrofajların bu metal bağlama özelliklerinin metal toksisitesine karşı meydana gelen birincil savunma mekanizmalarından biri olabileceğini belirtmişlerdir. Melanomakrofajlardaki hemosiderin ise, eritrosit yıkımı işlemleri sırasında meydana gelen bir ara metabolik üründür (Kranz, 1989). Hemosiderinin hemolitik anemi (Roberts, 2001) ve uzun süren açlık (Agius, 1981) sonucunda arttığı gözlenmiştir. Lipofuksin, lizozomların oksidatif aktivite sonucu yapısı değişikliğe uğramış protein ve

lipit degradasyon artıklarını tamamen parçalayamaması sonucunda ortaya çıkan lizozom içi polimerik materyali ifade eder (Brunk ve Terman, 2002; Terman ve Brunk, 2004).

Amfibi KC'leri (melanomakrofajlar) memeli KC'leri ile karşılaştırıldığında çoğu özellikleri ortaktır. Filopodya, lamellipodya ve mikrovillus benzeri yapılar, pinositik ve fagositik aktivite hem amfibi hem de memeli KC'lerinde mevcuttur. Ancak birbirinden farklı özellikleri de bulunmaktadır. Amfibi KC'leri fagosite edilmiş eritrositler ve onun türevleri, demir protein kompleksleri ve lipofuskin taneciklerini bulundurur. Amfibi KC'lerinde yüksek miktarlarda demirin bulunması kendine has ayrıcalıklı bir özelliğidir. Çünkü benzer miktarlarda demirin memeli KC'lerinde bulunması patolojik bir durumda veya farmakolojik olarak yüksek dozda demir yüklemesi durumunda görülebilir. KC'lerin endojen peroksidaz aktivitesi memelilerle kıyaslandığında amfibilerde daha zayıftır (Sichel ve diğ., 2002). Amfibi KC'lerini memeli KC'lerinden farklı kılan en önemli özelliği ise, tirozinaz gen ekspresyonu sonucu otonom olarak melanin sentezleyebilmeleridir (Hearing ve Jimenez., 1987; Guida ve diğ., 2000; Purrello ve diğ., 2001; Sichel ve diğ., 2002). Memeli KC'leri ise tirozinaz gen ekspresyonu yapmazlar (Purrello ve diğ., 2001).

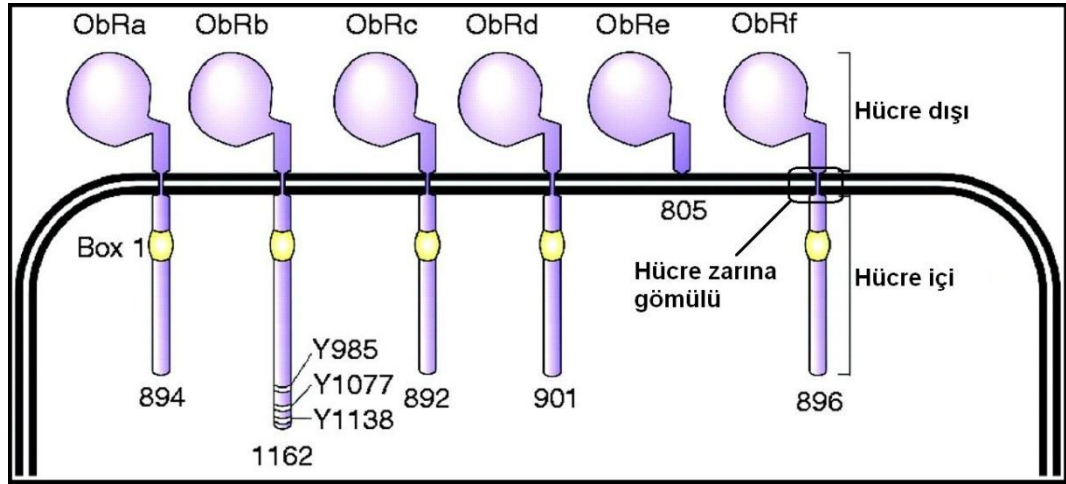
Hepatik dokudaki diğer hücre tipleri ise endotel hücreleri ve safra kanalı epitel hücreleridir (Loumbourdis ve Danscher, 2004). *Eupemphix nattereri*'de hepatik kordonlar arasında duvarı hepatosit plazma zarından oluşan safra kanalikülleri bulunur. Safra kanaliküllerinin apikalinde lümene doğru çıkıntı yapan kısa mikrovililer vardır (Franco-Belussi ve diğ. 2012). *Rana ridibunda*'da tübülleri oluşturan ışınsal dizilmiş hepatositlerin apikal zarları safra kanaliküllerini oluşturur (Loumbourdis ve Danscher, 2004). Safra, hepatositler arasındaki safra kanalikülleri aracılığıyla tek tabakalı kübik epitel ile döşeli safra kanallarına, oradan da depo yeri olan safra kesesine taşınır (Champe ve Harvey, 1994).

2.2. LEPTİN VE LEPTİN RESEPTÖRÜ

İlk olarak farede keşfedilen leptin, yunancada ince manasına gelen leptos kelimesinden kökenlenen, 16 kDa'luk protein yapıda bir hormondur (Zhang ve diğ., 1994). Leptin, besin alımını ve vücut ağırlığının dengelenmesini düzenleyen, bunun yanı sıra immün cevap, üreme ve hematopoiez gibi farklı fonksiyonları da etkileyen *ob* geninin bir ürünüdür (Zhang ve diğ., 1994; Cioffi ve diğ., 1996; Loffreda ve diğ., 1998). Leptin esas olarak adipositler tarafından sentezlenir ve kana salınır (Zhang ve diğ., 1994; Bornstein ve diğ., 2000; Fantuzzi, 2005; Blüher ve Mantzoros, 2007; Lago ve diğ., 2009). Fakat son yıllarda leptinin plasenta, meme bezi, mide, beyin ve hipofiz gibi farklı doku ve organlarda da üretildiği tespit edilmiştir (Masuzaki ve diğ., 1997; Bado ve diğ., 1998; Smith-Kirwin ve diğ., 1998; Morash ve diğ., 1999; Muruzábal ve diğ., 2002).

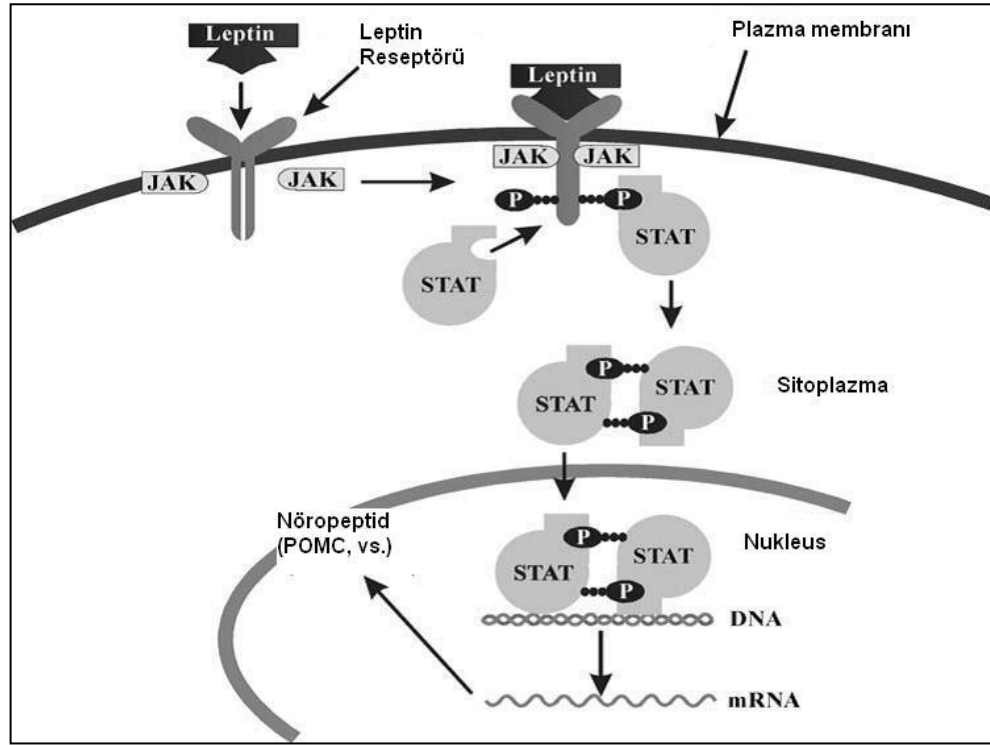
Leptin reseptörü sitokin reseptör ailesinin bir üyesi olarak tanımlanmıştır (Tartaglia ve diğ., 1995) ve hücre yüzey reseptörüdür (Otte ve diğ., 2004). *db* geni tarafından kodlanan leptin reseptörünün çeşitli izoformları vardır (Lee ve diğ., 1996). Bu izoformların hücre dışı ve hücre zarında gömülü kısımları birbirleriyle benzer iken hücre içi kısımları birbirinden farklılık gösterir (Sweeney, 2002). Reseptörün hücre içi kısmının uzunluğuna göre bir tane uzun izoform (OB-Rb) ve dört tane kısa izoform (OB-Ra, c, d, f) reseptör bulunmaktadır (Lee ve diğ., 1996; Wang ve diğ., 1996). Reseptörün hücre zarına gömülü kısmından yoksun olan bir tane çözünür izoformu (OB-Re) da vardır (Wang ve diğ., 1996) (Şekil 2.2.1).

OB-Re, taşıyıcı protein olarak leptine bağlanıp leptinin hücre yüzey reseptörlerine taşınmasını sağlar (Li ve diğ., 1998). Böylece leptinin dolaşımdan uzaklaştırılmasını geciktirip, serumda bulunabilirliğini artırır. (Lahlou ve diğ., 2000; Huang ve diğ., 2001). *In vitro* çalışmalar leptinin OB-Re'ye bağlandığında bağlı leptinin Ob-Rb'yi aktive etme yeteneğini engellediğini göstermiştir (Zastrow ve diğ., 2003; Yang ve diğ., 2004a). Ayrıca bu reseptörün plazmada serbest leptin düzeyini belli bir aralıkta tutmak için tampon sistem vazifesi görebileceği de düşünülmektedir (Cohen ve diğ., 2005). Bağlı leptin ile serbest leptinin farklı görevlerinin olabileceği de ileri sürülmektedir. Çünkü protein yapıdaki hormonlar plazmada taşıyıcı proteinlerine bağlanmazlar (Ockenga ve diğ., 2007).



Şekil 2.2.1: Leptin reseptörünün altı farklı izoformu ve reseptörlerin kısımları (Marroquí ve diğ., 2012'den değiştirilerek).

Uzun izoform olarak adlandırılan OB-Rb'nin sinyal ileten reseptör olduğuna inanılır (Bauman ve diğ., 1996; Bjørbæk ve diğ., 1997; White ve Tartaglia, 1996) ve leptinin çoğu biyolojik etkisine aracılık eder (Chen ve diğ., 1996; Lee ve diğ., 1996). Ob-Rb'nin aktivasyonu ile janus protein kinaz-sinyal iletici ve transkripsiyon aktive edici faktörleri (JAK/STAT) içeren sinyal kaskadı başlatılır (Bauman ve diğ., 1996; Sweeney, 2002; Ahima ve Osei, 2004) (Şekil 2.2.2). Ob-Rb hipotalamik nukleuslarda üretilmesine rağmen periferel organ ve dokularda da üretildiği gösterilmiştir (Chen ve diğ., 1996; Fei ve diğ., 1997; Hoggard ve diğ., 1997; Mercer ve diğ., 1997; Sierra-Honigmann ve diğ., 1998; Lord ve diğ., 1998; Unger ve diğ., 1999). Bu durum leptinin etkisinin hipotalamusla kısıtlı olmadığını göstermektedir. Ob-Ra ise çoğunlukla beyinde, koroid pleksusta eksprese edilir ve görevi kan beyin bariyeri boyunca leptinin taşınımıdır (Kastin ve diğ., 1999, Kastin ve diğ., 2000). Ob-Ra'nın diğer pek çok dokuda baskın olarak eksprese edildiği ve kısıtlanmış sinyal kapasitesinin olduğu belirtilmesine rağmen bu sinyalin fizyolojik önemi bilinmemektedir (Bjørbæk ve diğ., 1997; Yamashita ve diğ., 1998; Faggioni ve diğ., 2001; Eisenberg ve diğ., 2004; Aleffi ve diğ., 2005; Castracane ve Henson, 2006). Sonuç olarak leptinin biyolojik aktivitesini Ob-Rb aracılı meydana getirdiği ve Ob-Ra'nın sinyal iletimi için kısıtlı bir reseptör olduğu, Ob-Ra ile birlikte diğer reseptör izoformlarının ise (Ob-Rc-f) hormon bağlama ve transportunda görev yaptığı bilinmektedir (Bartha ve diğ., 2005).



Şekil 2.2.2: Leptin reseptörü sinyal iletiminde JAK-STAT yolağı (Bethanis ve Theocharis, 2006).

Leptin hipotalamusta bulunan reseptörleri aracılığı ile besin alımını ve vücut enerji dengesini etkilemektedir (Ghilardi ve diğ., 1996; Vaisse ve diğ., 1996). Adipoz dokuda sentezlenen leptin, hipotalamusu negatif geribildirim ile etkileyerek iştah azaltıcı ve enerji kullanımını arttırıcı (sempatik sinir sistemi aktivasyonu, termogenezis, artmış oksijen tüketimi) etki gösterir (Ahima ve Osei, 2004).

Leptin, besin alımını uyaran nöropeptid Y (NPY) içeren nöronların inhibisyonunu sağlayarak hipotalamusta gıda alımını azaltan etkisini göstermektedir. Leptin uygulaması obez farelerde NPY seviyesini düşürmektedir (Stephens ve diğ., 1995; Schwartz ve diğ., 1996). Ayrıca leptin melanosit uyarıcı hormon seviyesini arttırarak bir başka yoldan da iştahın azalması yönünde etki gösterebilmektedir (Harvey ve diğ., 1997). Aynı zamanda paraventriküler nukleustan kortikotropin salgılatıcı hormon salımını uyarak da yine gıda alımına engel olur (Schwartz ve diğ., 1997).

Teorik olarak, iştahı azaltan ve enerji harcanmasını arttıran leptin hormonunun obez kişilerde daha az olması beklenirken obezlerin %90-95'inde hiperleptinemi olduğu

bilinmektedir (Considine ve diğ., 1996; Seufert ve diğ., 1999). Ancak obezlerde yüksek leptin seviyesine rağmen leptin etkisini gösterememektedir. Bu durum leptine karşı meydana gelen bir direnç mekanizmasının olduğunu göstermektedir. Obezlerde serebrospinal sıvıdaki leptin düzeyinin plazmaya göre düşük seviyede olması leptinin kan beyin bariyerini geçmesini sağlayan taşıyıcı sistemde bir bozukluğun olabileceğini düşündürmektedir (Caro ve diğ., 1996; Banks, 2001). Diğer bir olasılıkla da merkezi sinir sisteminde leptin reseptörlerine karşı duyarsızlığın gelişmiş olmasıdır (Considine ve diğ., 1996; Ergün, 1998; Ergün, 1999 ; Seufert ve diğ., 1999). Sonuç olarak hem kan beyin bariyerindeki taşıyıcı sistemde hem de merkezi sinir sistemindeki reseptörlerde bozuklukların bulunmasının leptin direncine yol açtığı bilinmektedir (Banks, 2001).

Omurgalılarda leptinin varlığı ve fonksiyonuna dair araştırmaların çoğu memelilere aittir. Filogenetik olarak aşağı omurgalılarda leptinin varlığı ve rolü ile ilgili az bilgi bulunmaktadır (Pfundt ve diğ., 2009) ve ilk çalışma Johnson ve diğ. (2000) tarafından balıkta (*Lepomis cyanellus*, *Micropterus salmoides*, *Lepomis macrochirus*, *Pomoxis annularis*) yapılmıştır. Leptin immünoreaktivitesinin varlığı balığın kan, beyin, kalp ve karaciğer ekstrelerinde saptanmıştır. Kurbağalarda da bu konuda yapılmış bazı çalışmalar mevcuttur. Muruzabal ve diğ. (2002) kurbağa (*Xenopus laevis*) midesinde immünohistokimyasal olarak leptini tespit etmişlerdir. Genç *Xenopus laevis* leptin mRNA'sı karaciğer, adipoz doku, mide, hipofiz bezi, gonad, akciğer ve böbrekte gösterilmiştir (Crespi ve Denver., 2006). *Triturus cristatus carnifex*'in larvalarında mide, karaciğer, bağırsaktaki bazı hücrelerde ve pankreasta leptin ve leptin reseptörü immünoreaktivitesi gösterilmiştir (Buono ve Putti, 2004). Bir kuyruklu kurbağa olan *Ambystoma mexicanum* ile yapılmış bir çalışmada genç bireylerinin karaciğerinde ve diğer pek çok dokusunda RT-PCR yöntemi ile leptin ve leptin reseptörü saptanmıştır. Ergin bireylerin dokularında ise leptin ve leptin reseptörünün bulunabilirliği değişkenlik göstermektedir. Ergin *Ambystoma*'ların karaciğer dokusunda leptin saptanırken leptin reseptörü yoktur. (Gackowska, 2011). Ancak ergin kuyruksuz kurbağalarda karaciğer dokusunda leptin ve leptin reseptörünün varlığı ve leptin enjeksiyonunun bu dokudaki etkileri ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Bu araştırmalara ek olarak aşağı omurgalılarda da leptinin iştah kesici özelliğine dair çalışmalar vardır. Leptinin balıkta besin alımını inhibe ettiği tespit edilmiştir (Volkoff ve diğ., 2003). Crespi ve Denver

(2006) leptinin midprometamorfik larvada ve genç kurbağalarda güçlü bir iştah kesici etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Leptinin biyolojik aktiviteleri iştah ve enerji homeostatisi üzerine sınırlı değildir. Sıçan, balık, kertenkele gibi çeşitli canlılar ile yapılmış araştırmalarda, leptin enjeksiyonunun karaciğerde karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasını etkilediği saptanmıştır (de Pedro ve diğ., 2006; Paolucci ve diğ., 2006; Trevenzoli ve diğ., 2010). Ayrıca leptin uygulamasının çeşitli dokularda proliferasyonu uyardığı da gösterilmiştir (Frank ve diğ., 2000; Lamošova ve Zeman, 2001; Saxena ve diğ., 2004; Crespi ve Denver, 2006; Dinçer ve Gülen, 2010).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada, 2013 yılı Haziran ayında Edirne'den toplanan *Pelophylax ridibundus* (*Rana ridibunda*) türü (Amfibi, Anura) ortalama 35-40 gr ağırlığındaki 24 adet dişi ergin kurbağa kullanıldı. Kurbağalar laboratuvarında doğal yaşam koşullarına uygun olarak hazırlanmış 30x22x13 cm ölçülerinde içinde dinlendirilmiş şehir şebeke suyu bulunan plastik akvaryumlarda haftada iki gün dana ciğeri ile beslenerek 20 gün uyum sürecini geçirdiler. Deney sırasında kurbağalar beslenmedi ve enjeksiyonlar (Kutlu ve diğ., 2005) dorsal lenf kesesine uygulandı. Leptinin kısa ve uzun süreli etkisini görmek için bir gün ve beş gün süre ile günde bir kere leptin enjeksiyonunun yapıldığı iki ayrı deney grubu oluşturuldu (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Deney grupları.

1.DENEY GRUBU	
Dkm Kont1	Hiçbir uygulamanın yapılmadığı dokunulmamış kurbağalar (n=4)
PBS Kont1	Bir gün PBS (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi, 100 µl, pH:7,4) enjeksiyonu yapılan kurbağalar (n=3)
Lep1	Bir gün leptin (Sigma L4146, 40 µg/100 µl PBS/kurbağa) enjeksiyonu yapılan kurbağalar (n=5)
2.DENEY GRUBU	
Dkm Kont5	Hiçbir uygulamanın yapılmadığı dokunulmamış kurbağalar (n=4)
PBS Kont5	Beş gün PBS (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi, 100µl, pH:7,4) enjeksiyonu yapılan kurbağalar (n=3)
Lep5	Beş gün leptin (Sigma L4146, 40 µg/100 µl PBS/kurbağa) enjeksiyonu yapılan kurbağalar (n=5)

Son enjeksiyondan 24 saat sonra tüm bireyler immersiyon ile % 0,1'lik MS-222 (Tricaine methane sulfonate, Sigma A5040) ile anestezi yapıldıktan sonra karaciğer dokuları alınarak Bouin'de fikse edildi. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (31037).

3.1. HİSTOLOJİK YÖNTEMLER

Alınan karaciğer dokuları Bouin fiksatif ile 24 saat muamele edildikten sonra %70 alkole alındılar. Dokular, fiksatifin sarı rengi gidinceye kadar %70 alkolde yıkandı. Yükselen alkol serilerinden geçirildikten sonra ksilolde saydamlaştırılan dokular, parafine gömülerek bloklandı. Leica RM 2125RT mikrotomu ile 4 µm kalınlığında alınan kesitler albumin-Mayer kaplı lamlara yapıştırıldı. Dokudaki morfolojik değişiklikleri saptamak için kesitlere hematoksilin-eosin (HE), bromphenol blue (BPB) (Mazia ve diğ.,1953), Masson'un üçlü boyası (Masson) ile periyodik asit Schiff (PAS) (Humanson, 1972) reaksiyonu uygulandı. Karaciğer dokularına ait preparatlar Olympus CX-31 ışık mikroskobu ile incelendi ve LC20 fotomikroskobu ile fotoğraflar çekildi.

Hepatosit sayımı için, her bir bireye ait preparatlardan rastgele 30 alan seçildi. X40'lık objektifte HE boyalı kesitlerden fotoğraf çekilen alanlarda (37514,46 µm²) LC20 fotomikroskobuna ait LC micro Imaging Software programı kullanılarak manuel işaretleme ile hepatosit sayısı hesaplandı ve 1mm²'deki değere çevrildi.

Pigmentli hücrelerin oluşturdukları pigmentli yüzey alanının hesaplanması için, her bir bireye ait preparatlardan rastgele 30 alan seçildi. X40'lık objektifte boya uygulanmamış kesitlerden fotoğraf çekilen alanlarda (37514,46 µm²) LC20 fotomikroskobuna ait LC micro Imaging Software programı kullanılarak manuel işaretleme ile pigmentli yüzey alanı ölçüldü ve yüzde değere çevrildi (Barni ve diğ., 1999'den değiştirilerek).

Pigmentli alan (tek ya da kümeler oluşturmuş melanomakrofajlar) sayısının hesaplanması için, her bir bireye ait preparatlardan rastgele 30 alan seçildi. X40'lık objektifte boya uygulanmamış kesitlerden fotoğraf çekilen alanlarda (37514,46 µm²) LC20 fotomikroskobuna ait LC micro Imaging Software programı kullanılarak manuel işaretleme ile pigmentli alan sayısı hesaplandı ve 1mm²'deki değere çevrildi.

3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER

4 µm kalınlığındaki kesitler Poly-L-Lysin ile kaplı lamlara yapıştırıldı ve karaciğer dokusundaki leptin ve leptin reseptörünü belirlemek üzere ‘Streptavidin-Biyotin-Peroksidaz’ immünohistokimyasal yöntemi uygulandı. Leptin ve leptin reseptörü immünohistokimyasal reaksiyonunun dağılımı ve şiddeti (Arbitrary Unit-AU) HSCORE ile hesaplandı. Her deney grubu için karaciğer kesitinin periferik ve merkezi kısımlarından rastgele 30 farklı alanda, X40 objektifte değerlendirildi. [HSCORE= $\sum_{i=1}^n P_i(i+1)$]. P_i alandaki pozitif reaksiyon gösteren hücrelerin yüzdesini ve i reaksiyon şiddetini (0=boyanma yok, 1=az şiddetli, 2=orta şiddetli, 3=çok şiddetli) ifade eder (Aksu ve diğ., 2012).

3.2.1. Leptinin İmmünohistokimyasal Olarak Belirlenmesi

Uygulanan yöntemde, kesitler bir gece 37°C etüvde bekletildikten sonra ksilol ile deparafinizasyon ve alçalan alkol serisi kullanılarak rehidratasyon yapıldı. Saf suyu takiben kesitlere pH’sı 6 olan sitrat tamponu ile mikrodalga fırında (700 W) 10 dakika kaynatılarak antijen iyileştirilmesi yapıldı. Oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakılan kesitlere endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için nemli ortamda metanol ile seyreltilmiş %3’lük hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisi 15 dakika uygulandı. Bundan sonraki aşamalar Histostain-plus kit (Invitrogen, 85-9043) ile gerçekleştirildi. Spesifik olmayan antijen-antikor etkileşimlerini engellemek için kesitlere 10 dakika blok solüsyon uygulandı. Kesitlere, kullanıma hazır antikor sulandırıcı (Thermo Scientific, TA-125-UD) ile 1:300 oranında sulandırılarak hazırlanan leptin için spesifik olan primer antikor [Santa Cruz, Leptin, Ob(A-20) (Rabbit PAb)] ile +4 °C de 22 saat inkübe edildi. Kesitlere biyotinlenmiş sekonder antikor 15 dakika, sonrasında streptavidin-peroksidaz enzim konjugatı 20 dakika uygulandı. Renk reaksiyonu gerçekleştirmek için DAB (diaminobenzidin) (Thermo Scientific, DAB substrate system) kromojeni ile 10 dakika inkübe edildi. Spesifik immün reaksiyon gözledikten sonra kesitler PBS ile yıkanarak reaksiyon durduruldu. Kesitler, blok solüsyondan sonraki basamak hariç, diğer tüm basamaklar arasında PBS ile 6 dakika (3 kez 2’şer dakika) yıkandılar. Takiben saf suya alınan kesitlere hematoksin ile 30 saniye zıt boya (Thermo Scientific-TA-125-MH) yapıldı. Çeşme suyu ile çalkalandıktan sonra yükselen alkol serilerinden geçirilerek dokudaki suyu tamamen uzaklaştırmak için kesitler ksilole alındı. Entellan

ile kaplanan kesitler lamel ile kapatıldı. Negatif kontrol kesitler antikor yerine PBS ile inkübe edildi. Pozitif kontrol olarak göğüs kanseri dokusundan alınan kesitler kullanıldı.

3.2.2. Leptin Reseptörünün İmmünohistokimyasal Olarak Belirlenmesi

Uygulanan yöntem, leptinin immünohistokimyasal olarak belirlenmesinde kullanılan yöntemle aynıdır. Kullanıma hazır antikor sulandırıcı ile 1:100 oranında sulandırılarak hazırlanan leptin reseptörünün hücre dışı kısmı için spesifik olan primer antikor [(Santa Cruz, Ob-R (Rabbit PAb)] ile kesitler +4 °C' de 22 saat inkübe edildi. Kromojen olarak 20 dakika AEC (3-Amino-9-Etilkarbazol) (Thermo Scientific-TA-125-HA) uygulandı. Spesifik immün reaksiyon gözledikten sonra kesitler distile su ile yıkanarak reaksiyon durduruldu. Su bazlı kapatma solüsyonu (GVA- Thermo Scientific-TA-125-UG) ile kaplanan kesitler lamel ile kapatıldı. Pozitif kontrol olarak göğüs kanseri dokusundan alınan kesitler kullanıldı.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Deney gruplarında; hepatosit sayısı, pigmentli alan sayısı, pigmentli yüzey alanı, leptin ve leptin reseptörünün dağılımı ve şiddeti saptandı. Elde edilen histolojik ve immünohistokimyasal verilere GraphPad istatistik programının ANOVA tek yönlü varyans analizinde posthoc test olarak Tukey testi uygulandı. Sonuçlar “ortalama $\pm$ standart hata ($\pm$ SEM)” olarak verildi. Sonuçların değerlendirilmesinde $p < 0.001$ ve $p < 0.01$ anlamlılık seviyeleri temel alındı.

4. BULGULAR

4.1. HİSTOLOJİK BULGULAR

4.1.1. Birinci ve İkinci Deneyin PBS Enjeksiyonlu ve Dokunulmamış Kontrol Bireylerinin Histolojik Bulguları

Birinci ve ikinci deneye ait dokunulmamış kurbağalar (Dkm Kont1, Dkm Kont5) ile PBS enjeksiyonu yapılan kurbağaların (PBS Kont1, PBS Kont5) karaciğer kesitlerinde HE, BPB, Masson boyaları ve PAS reaksiyonu sonucunda yaptığımız incelemelerde bu gruplar arasında herhangi bir farklılık gözlemedik. Bu gruplara ait ortak bulgu:

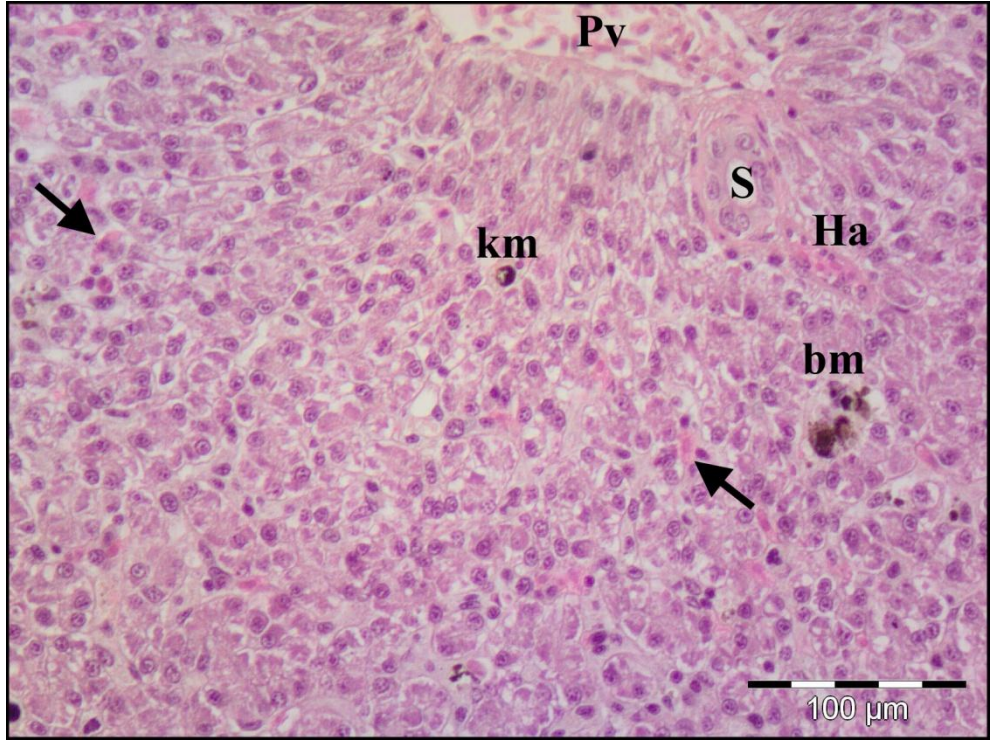
HE ile boyanmış *Pelophylax ridibundus* karaciğerinin kesitlerinde hepatositler poligonal şekilli ve nukleus hücrenin periferine yakın olarak görülmektedir. Hepatositlerde lipid damlacıklarını içeren bölgelerin preperasyon sırasında kullanılan çözücüler nedeniyle erimesinden dolayı boşluklar halinde ve sitoplazmanın önemli bir bölümünü işgal ettiği görülmektedir. Hepatositler, dallanmış tübüller oluşturacak şekilde dizilmişlerdir ve tübüllerin enine kesitlerinde 4-5 hepatositin bir safra kanalikülü etrafında ışınsal dizilerek bu tübüller yapıları oluşturduğu görülmektedir. Safra kanalikülleri hepatositlerin apikal plazma zarlarından oluşmaktadır. Tübüller arasında sinüzoidler bulunmaktadır. Sinüzoidlerin lümeninde yer yer az sayıda eritrosit görülmektedir (Şekil 4.1.1.1, Şekil 4.1.1.2).

Bu türün karaciğerinde hepatik lobül düzeni ve portal triad bulunmamaktadır. Hepatik doku içinde belli bir düzende olmayacak şekilde dağılmış, ince bir bağ dokusu ile kuşatılmış halde ve genellikle birlikte hepatik arter, portal ven ve safra kanallarının kolları gözlenmektedir. Safra kanalı tek tabakalı kübik epitelden oluşmaktadır (Şekil 4.1.1.3, Şekil 4.1.1.4).

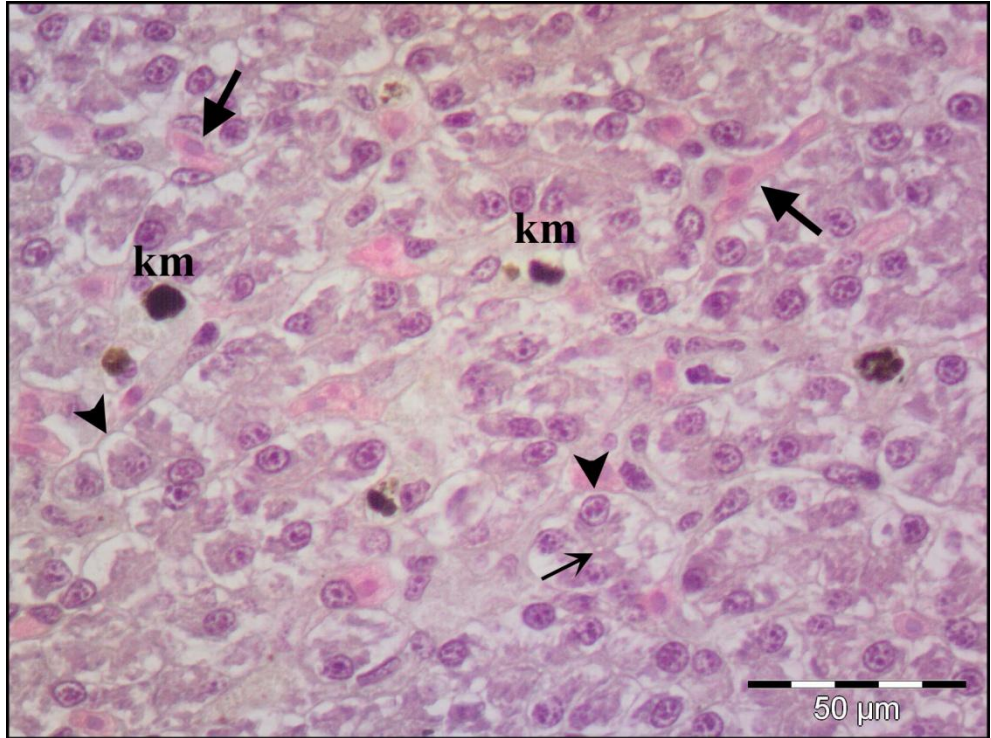
Sinüzoidal döşeyici tabakada az sayıda bireysel melanomakrofajlar görülmektedir. Bu melanomakrofajların çoğu az miktarda kahve-siyah renkli pigment içeren küçük melanomakrofajlardır. Daha seyrek olarak pigment içeriği biraz daha fazla olan büyük melanomakrofajlar da görülmektedir (Şekil 4.1.1.1- Şekil 4.1.1.4).

PAS uygulanmış preparatlarda hepatosit sitoplazmasında çok miktarda küçük tanecikler halinde PAS pozitif reaksiyon görülmektedir. PAS pozitif reaksiyon büyük melanomakrofajlarda daha fazla bulunmakla beraber bazı küçük melanomakrofajlarda da az miktarda görülmektedir (Şekil 4.1.1.5a-b).

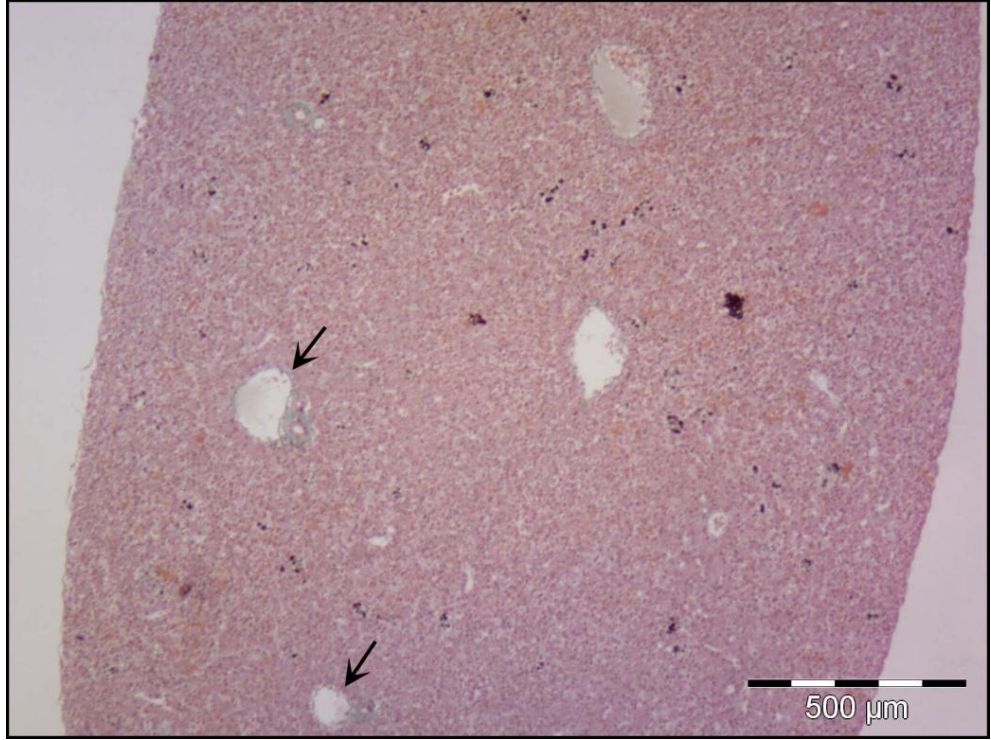
BPB ile boyanmış kesitlerde hepatositlerin ve safra kanalı epitelinin protein içeriği açık mavi renk reaksiyonu şeklinde görülmektedir (Şekil 4.1.1.6a-b).



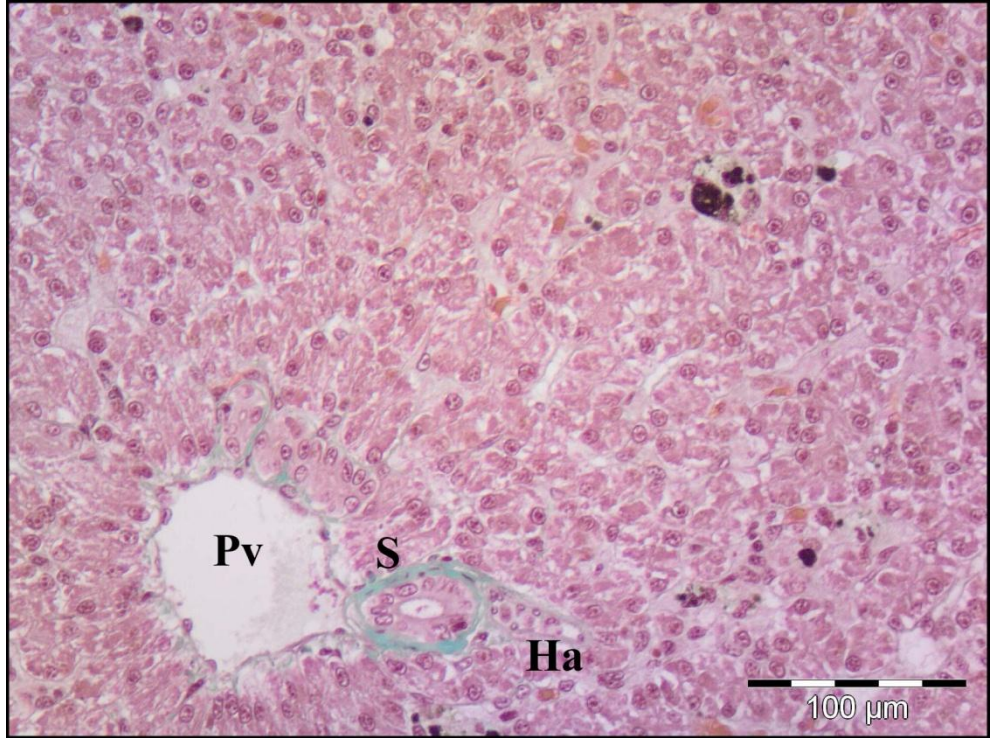
Şekil 4.1.1.1: Kontrol bireyi karaciğerinin genel histolojik görünümü. HE, (km: küçük melanomakrofaj, bm: büyük melanomakrofaj, Pv: portal ven, Ha: hepatik arter, S: safra kanalı, → : sinüzoid).



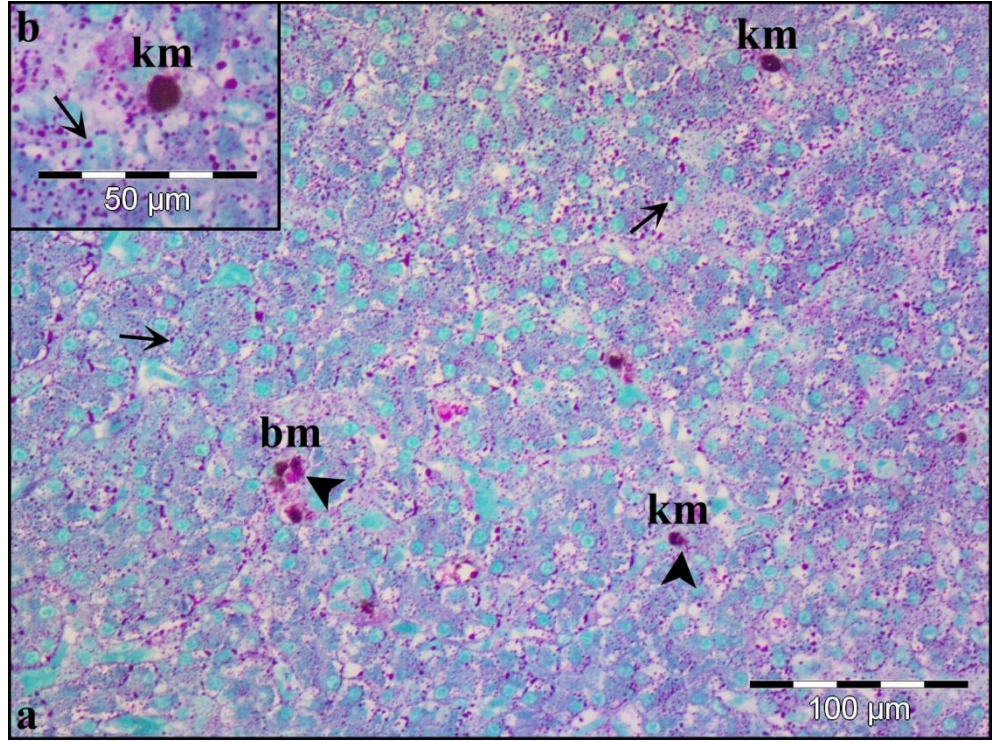
Şekil 4.1.1.2: Kontrol bireyi karaciğerinin daha büyük büyütmedeki görünümü. HE, (km: küçük melanomakrofaj, →: safra kanalikülü, ▶: hepatosit, →: sinüzoid).



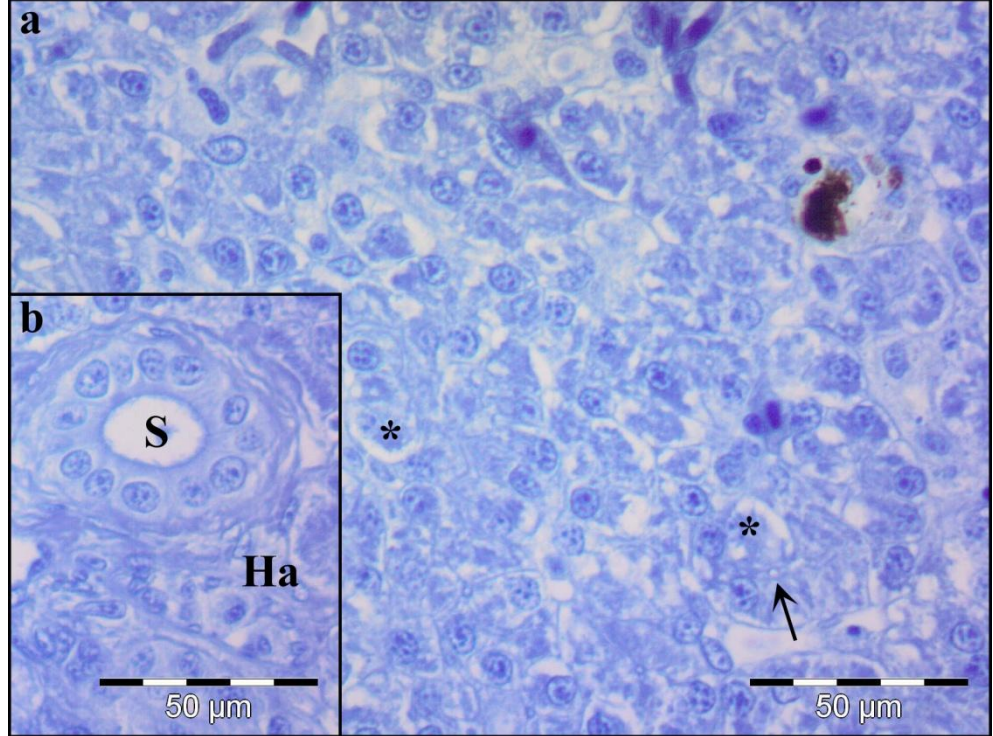
Şekil 4.1.1.3: Kontrol bireyi karaciğerinde belli bir düzende olmayacak şekilde dağılmış, ince bir bağ dokusu ile kuşatılmış halde hepatik arter, portal ven ve safra kanallarının kolları (→). Masson.



Şekil 4.1.1.4: Kontrol bireyi karaciğerinde daha büyük büyütmede hepatik arter (Ha), portal ven (Pv) ve safra kanalının (S) kollarının görünümü. Masson.



Şekil 4.1.1.5a-b: Kontrol bireyine ait karaciğerde, hepatositlerde (→), büyük (bm) ve küçük (km) melanomakrofajlarda (►) PAS(+) reaksiyon.



Şekil 4.1.1.6a-b: Kontrol bireyine ait karaciğerde, a) hepatositler (*) ve b) safra kanalı (S) epitelinin protein içeriği. BPB, (Ha: Hepatik arter, →: Safra kanalikülü).

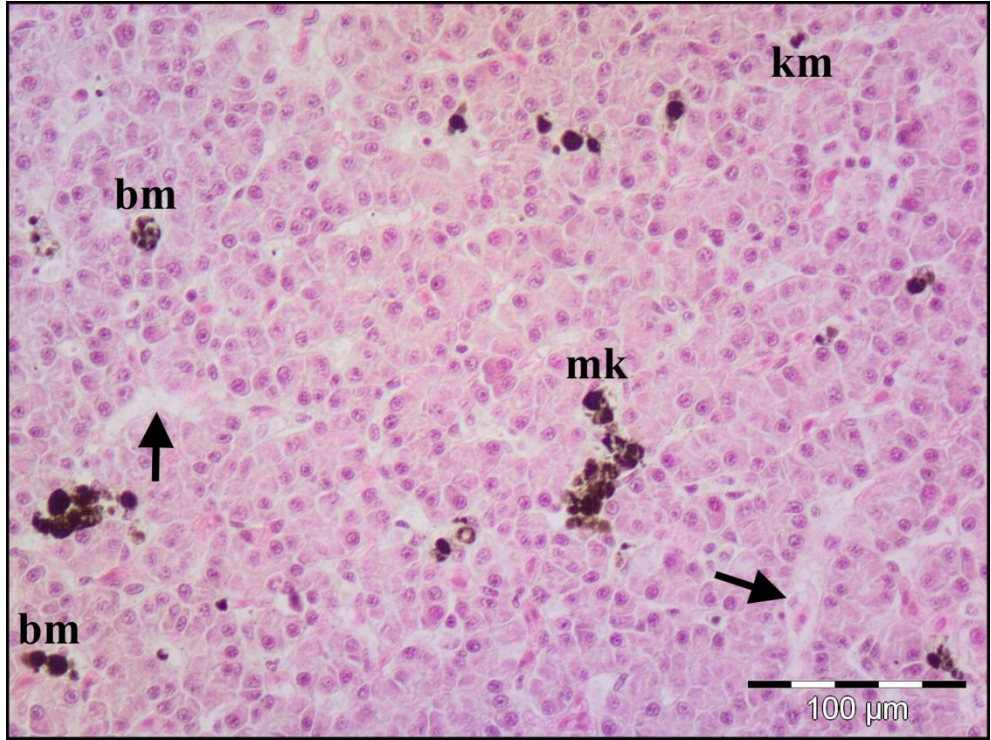
4.1.2. Birinci Deneyin Bir Gün Leptin Enjeksiyonu Yapılan Bireylerinin Histolojik Bulguları

Bu gruba ait HE ile boyanmış preparatlarda hepatositlerin kontrol bireylerine göre lipid içerikleri azalmıştır. Yer yer sinüzoid genişlemesi vardır (Şekil 4.1.2.1, Şekil 4.1.2.2). Seyrek de olsa bazı hepatositlerde dejeneratif değişiklikler saptanmıştır. Genellikle bu hücreler, bazı damarların çevresinde bulunmaktadır (Şekil 4.1.2.3). Ayrıca kontrol bireylerine göre pigmentli alan sayısı ve pigmentli hücrelerin kapladıkları yüzey alanının artmış olduğu gözlenmektedir. Melanomakrofajlar çoğunlukla, daha fazla pigment içeriğine sahip büyük melanomakrofajlar şeklinde görülürken, küçük gruplar halinde melanomakrofaj kümelerinin de oluşmaya başladığı gözlenmektedir. Ayrıca az pigment içeriğine sahip küçük melanomakrofajlar da vardır (Şekil 4.1.2.1, Şekil 4.1.2.2, 4.1.2.4, Şekil 4.1.2.5).

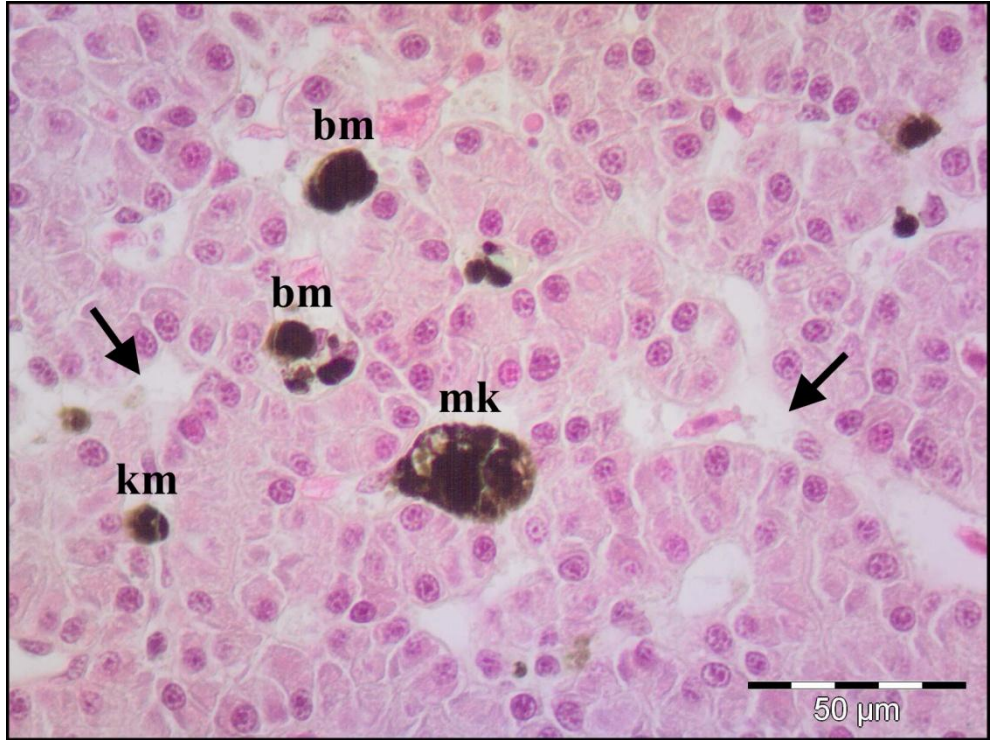
Masson ile boyanmış preparatların incelenmesi sonucunda damarlar ve safra kanalının kollarını çevreleyen bağ dokusu içeriğinde kontrol bireylerine göre artış gözlenmiştir (Şekil 4.1.2.4, Şekil 4.1.2.5). Ayrıca safra kanallarını döşeyen epitelin yüksekliğinin de azalmış olduğu görülmektedir (Şekil 4.1.2.5).

Hepatositlerdeki PAS pozitif reaksiyonun kontrol bireylerine göre azalmış olduğu görülmektedir. PAS pozitif reaksiyon büyük melanomakrofajlarda ve kümeleşmiş olanlarda küçük melanomakrofajlardan fazla gözlenmektedir (Şekil 4.1.2.6a-b).

Bir gün leptin enjeksiyonlu bireylerin BPB ile boyanmış preparatlarında hepatositlerde protein içeriğinin artmış, safra kanalı epitel hücrelerinde ise azalmış olduğu görülmektedir (Şekil 4.1.2.7a-b).



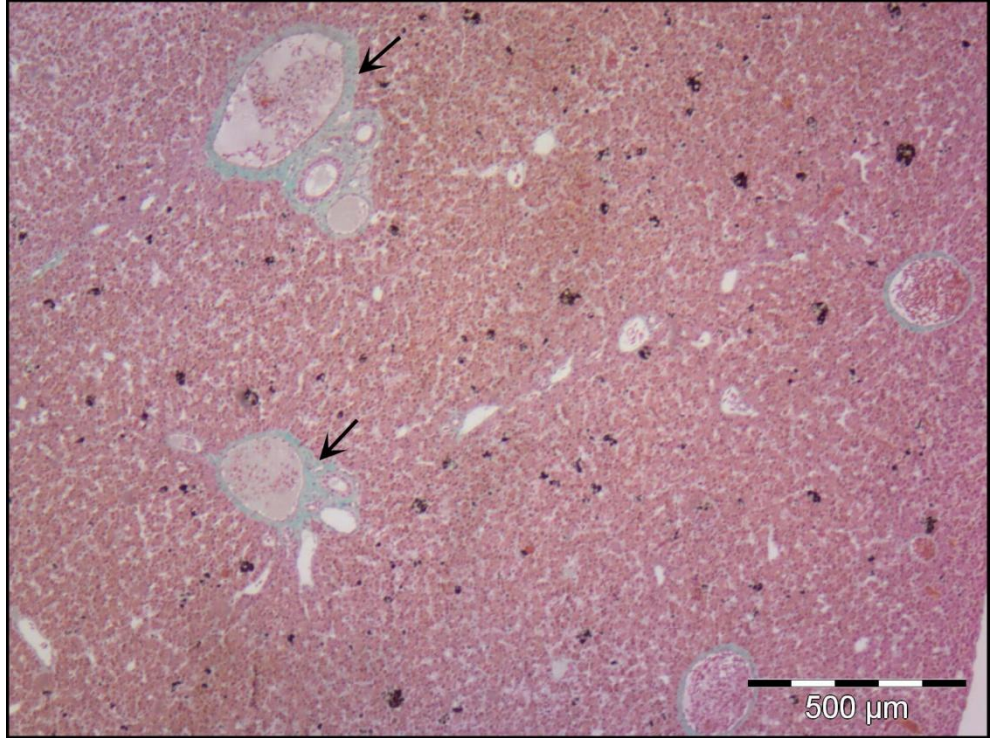
Şekil 4.1.2.1: Lep1 grubuna ait karaciğerin genel histolojik görünümü. HE, (km: küçük melanomakrofaj, bm: büyük melanomakrofaj, mk: küçük melanomakrofaj kümesi, →: sinüzoid genişlemesi).



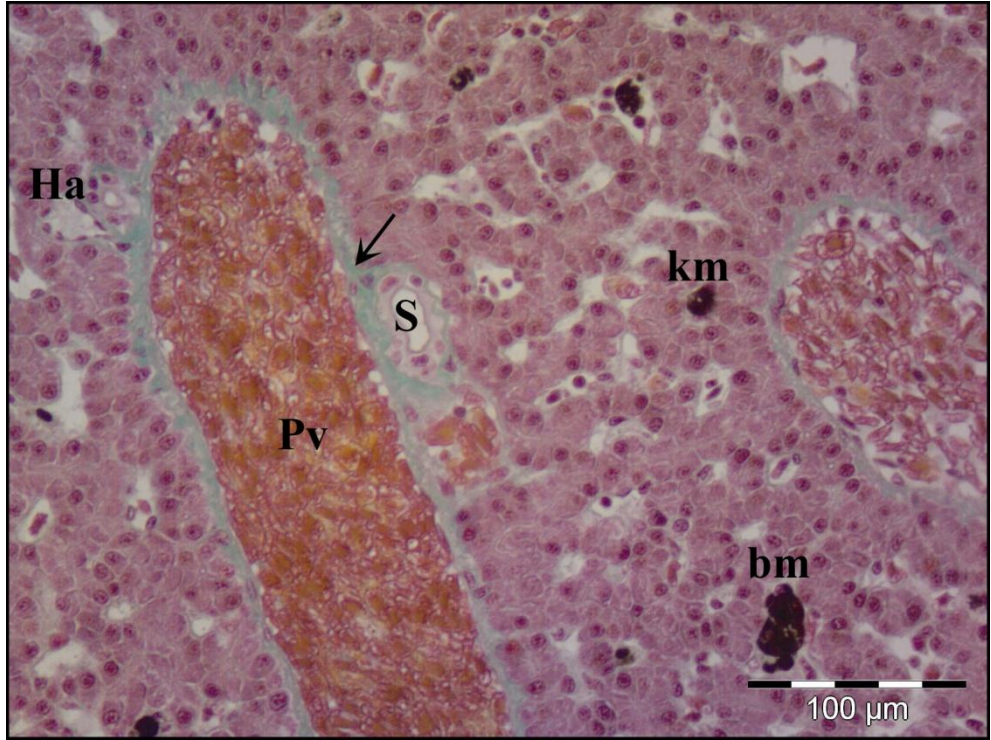
Şekil 4.1.2.2: Lep1 grubuna ait karaciğerin daha büyük büyütmedeki görünümü. HE, (km: küçük melanomakrofaj, bm: büyük melanomakrofaj, mk: küçük melanomakrofaj kümesi, →: sinüzoid genişlemesi).



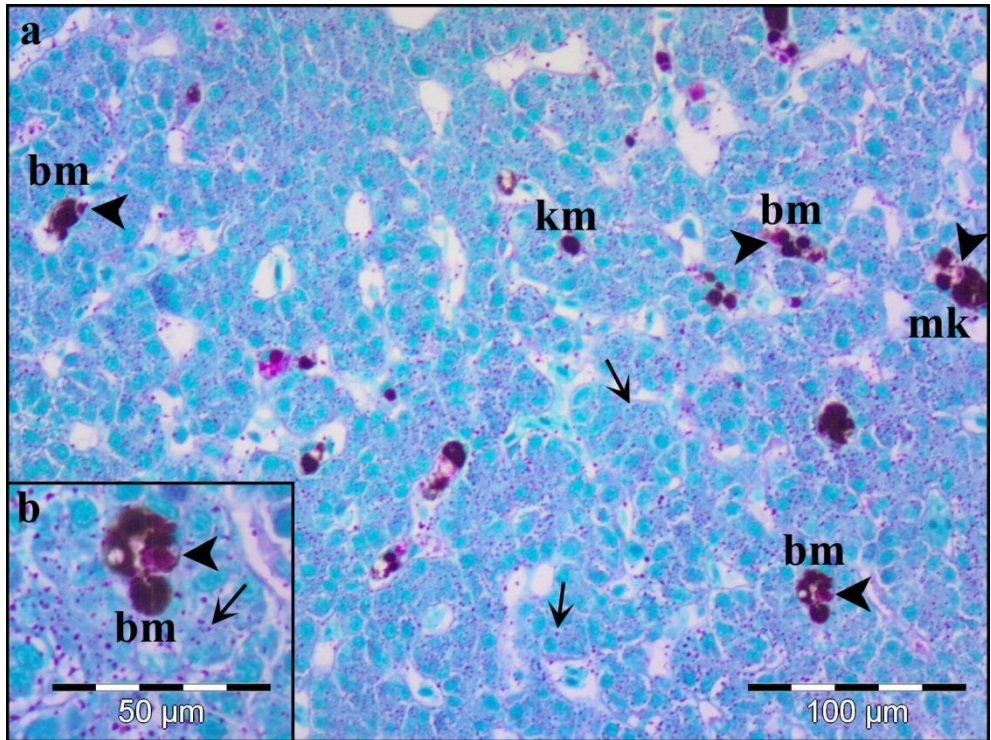
Şekil 4.1.2.3: Lep1 grubuna ait bireylerin karaciğerinde portal venin (Pv) etrafındaki dejenere olmuş hücrelerin (→) görünümü. HE, (*: damar etrafındaki artmış bağ dokusu).



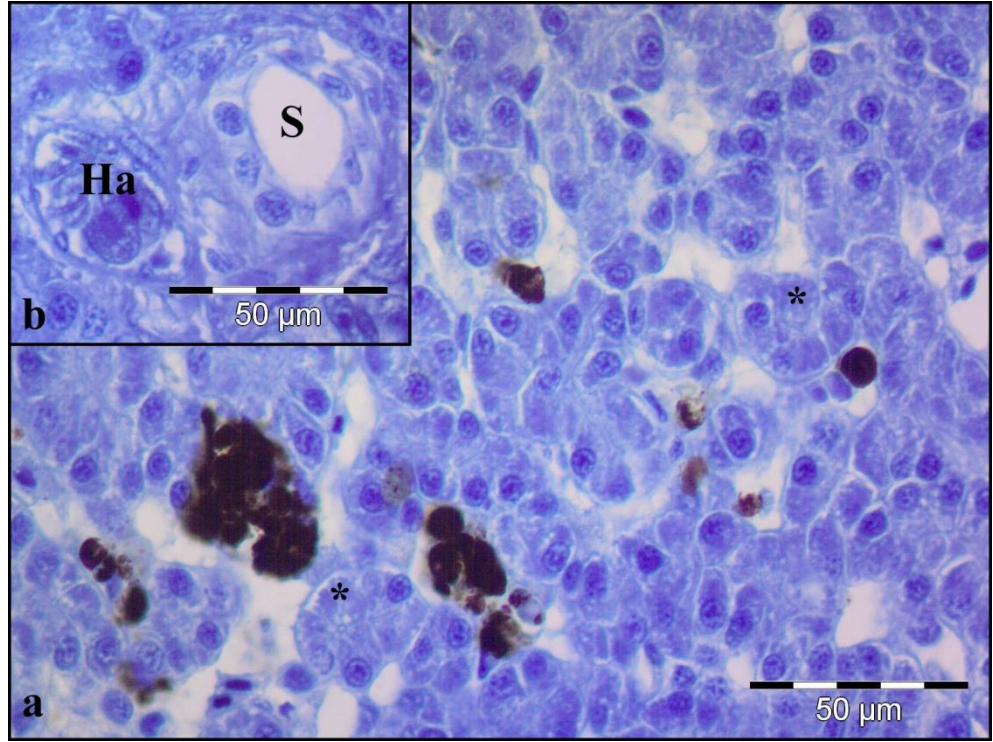
Şekil 4.1.2.4: Lep1 grubuna ait bireylerin karaciğerinde damarlar ve safra kanalının etrafındaki bağ dokusunda artış (→). Masson.



Şekil 4.1.2.5: Lep1 grubuna ait karaciğerde daha büyük büyütmede damarlar ve safra kanalının etrafındaki bağ dokusunda artış (→). Masson, Ha: hepatik arter, Pv: portal ven, S: safra kanalı, km: küçük melanomakrofaj, bm: büyük melanomakrofaj).



Şekil 4.1.2.6a-b: Lep1 grubuna ait karaciğerde hepatosit (→), küçük (km), büyük (bm) ve küçük kümeli (mk) melanomakrofajlarda (▶) PAS (+) reaksiyon.



Şekil 4.1.2.7a-b: Lep1 grubuna ait bireylerin karaciğerinde a) hepatositler (*) ve b) safra kanalının (S) protein içeriği. BPB, (Ha: hepatik arter).

4.1.3. İkinci Deneyin Beş Gün Leptin Enjeksiyonu Yapılan Bireylerinin Histolojik Bulguları

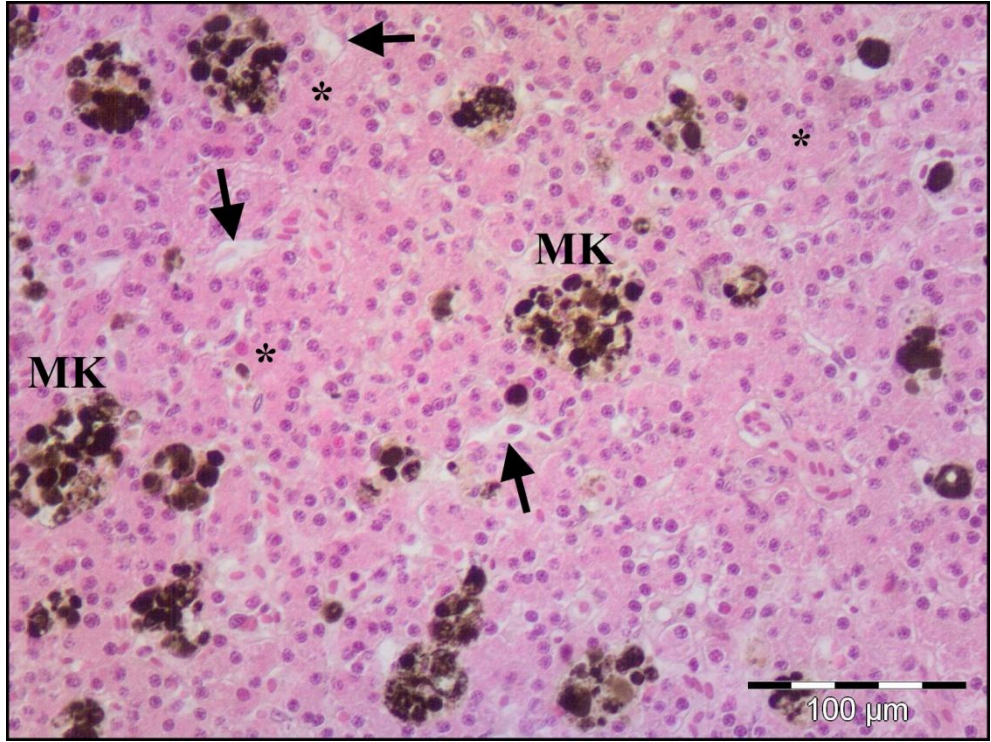
Hepatosit nukleusları kontrol ve bir gün leptin enjeksiyonu yapılan bireylere göre daha küçük ve daha yoğun kromatinlidir. Hepatositlerin lipid içerikleri bir gün leptin enjeksiyonlu gruba göre benzerdir. Yaygın olarak sitoplazmik eozinofilisi artmış hepatositler gözlenmektedir (Şekil 4.1.3.1, Şekil 4.1.3.2). Seyrek olarak fagositoz alanlarına rastladık. Bu alanlarda yoğun bozulmuş hücre topluluğunun melanomakrofajlar tarafından kuşatıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.1.3.3, Şekil 4.1.3.4). Ayrıca bu grubun bireylerinde bazı yerlerde sinüzoid genişlemesi saptanmıştır (Şekil 4.1.3.1).

Melanomakrofajlar büyük kümeler oluşturup kontrole ve bir gün leptin enjeksiyonlu gruba göre hem sayıca hem de boyutça artmışlardır. Bu hücrelerde siyah, koyu-açık kahve renkli bol miktarda pigment materyali görülmektedir (Şekil 4.1.3.1- Şekil 4.1.3.6).

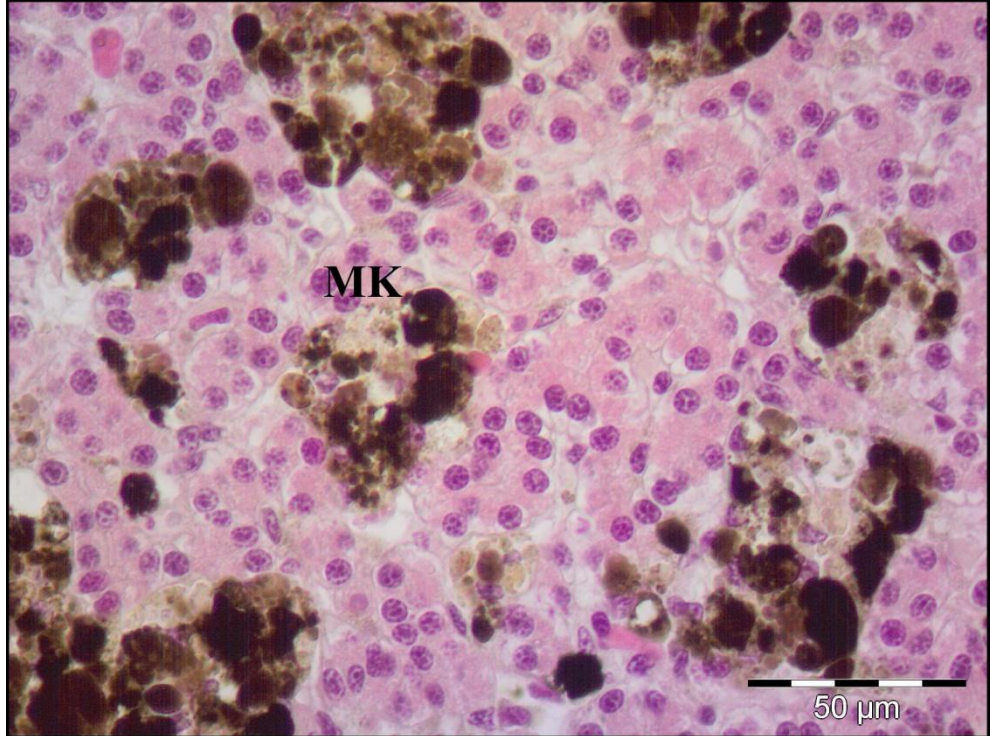
Masson ile boyanmış preparatlarda damarlar ve safra kanalını çevreleyen bağ dokusunda kontrole göre artış gözlenirken safra kanallarını döşeyen epitelin yüksekliğinde azalma saptanmıştır. Bu bulgular bir gün leptin enjeksiyonlu bireylere benzer görülmektedir (Şekil 4.1.3.5, Şekil 4.1.3.6).

Hepatositlerdeki PAS pozitif reaksiyon kontrole ve bir gün leptin enjeksiyonu yapılan gruba göre azalmıştır. Melanomakrofaj kümelerinde fazla miktarda PAS pozitif reaksiyon vardır (Şekil 4.1.3.7a-b).

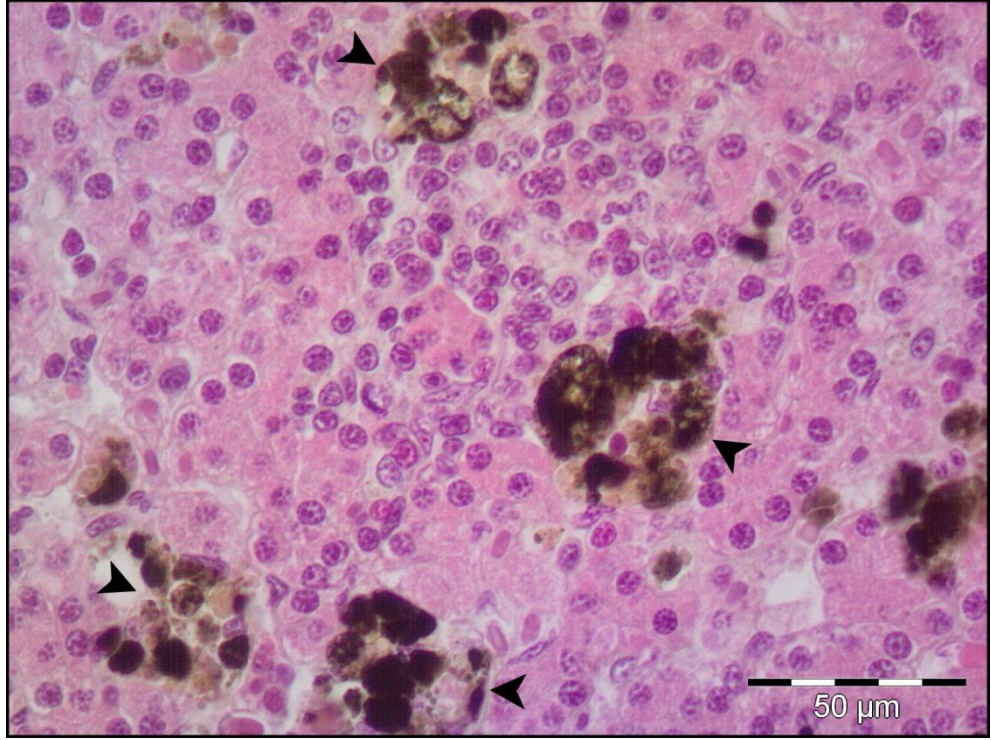
Beş gün leptin enjeksiyonlu bireylerin BPB ile boyanmış karaciğer kesitlerinde hepatositlerin verdiği reaksiyon kontrolden fazladır, ancak bir gün leptin enjeksiyonlu bireylerin hepatositlerine göre daha soluktur. Safra kanalı epitelinin sitoplazmasının BPB ile verdiği reaksiyon kontrole göre negatiftir (Şekil 4.1.3.8a-b).



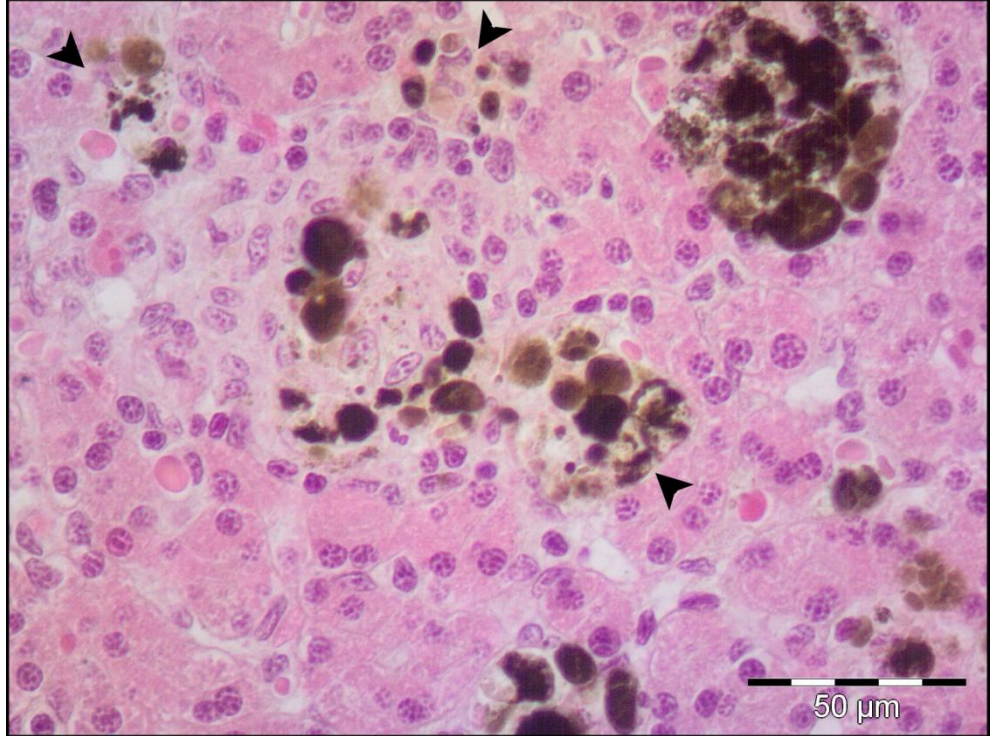
Şekil 4.1.3.1: Lep5 grubuna ait bireylerde yaygın eozinofilik (*) hepatositlerin genel görünüşü. HE, (MK: melanomakrofaj kümesi, →: sinüzoid genişlemesi).



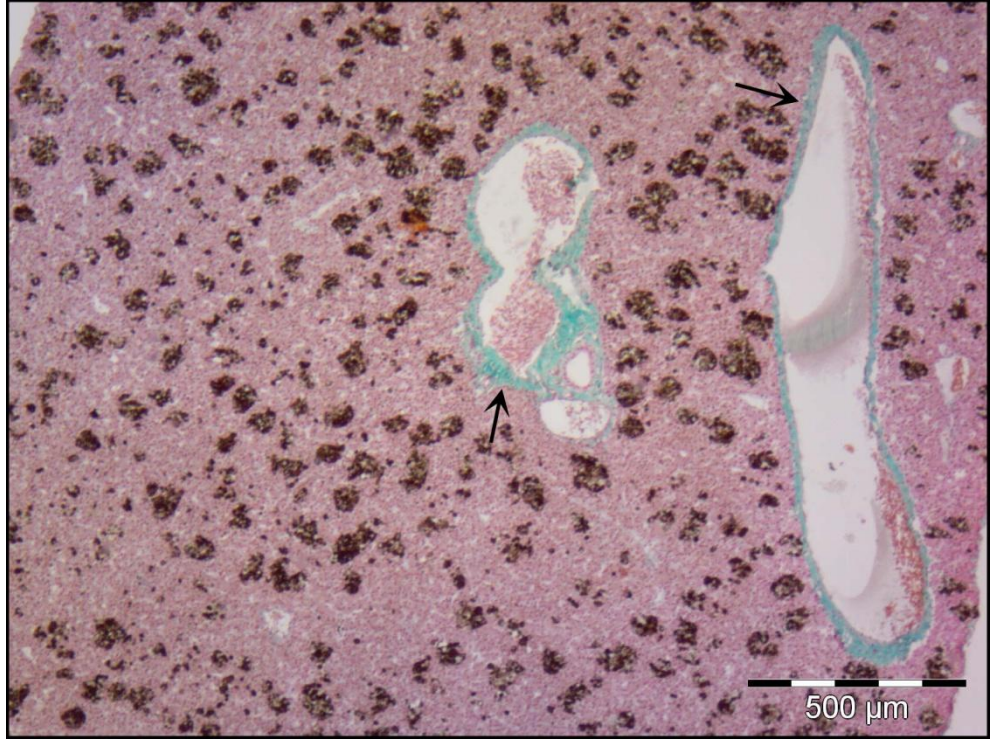
Şekil 4.1.3.2: Lep5 grubuna ait bireylerin karaciğerinin daha büyük büyütmede görünümü. HE, (MK: melanomakrofaj kümesi).



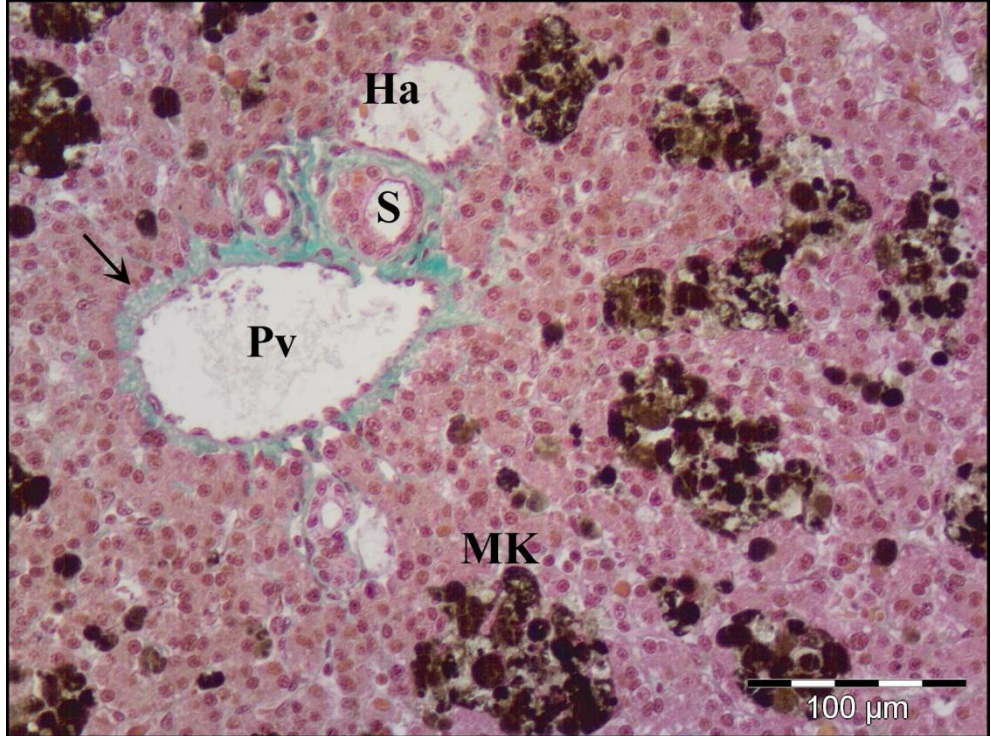
Şekil 4.1.3.3: Lep5 grubuna ait bireylerin karaciğerinde melanomakrofajlar (►) tarafından kuşatılmış bozulmuş hücre kitlesi. HE.



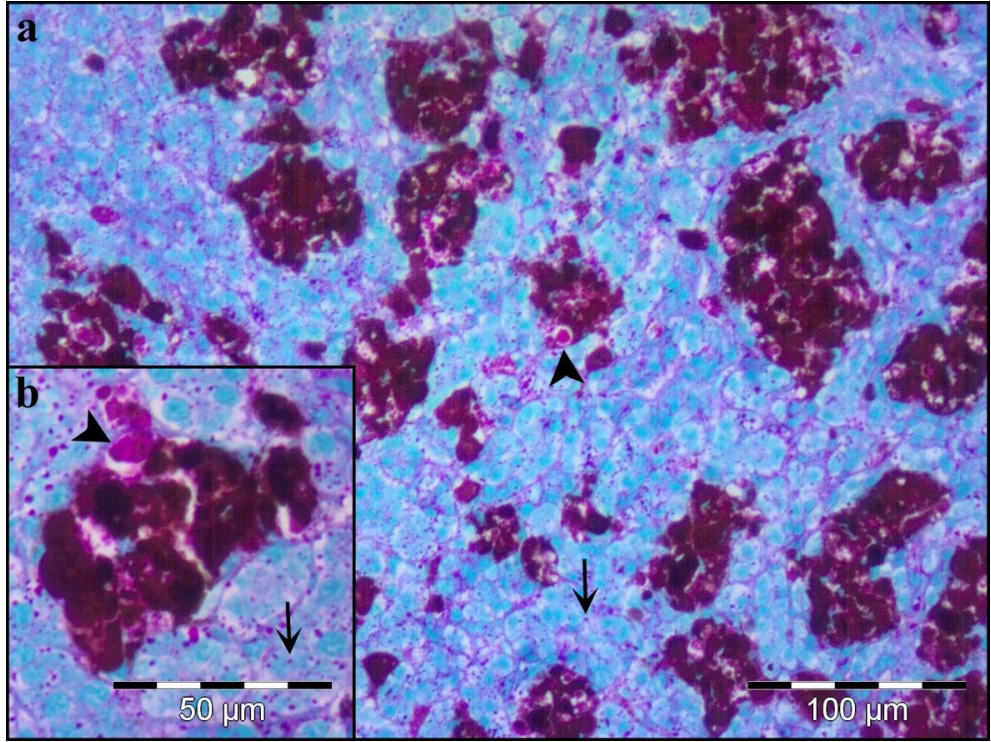
Şekil 4.1.3.4: Lep5 grubuna ait bireylerin karaciğerinde melanomakrofajların (►) oluşturduğu bir fagositoz alanı. HE.



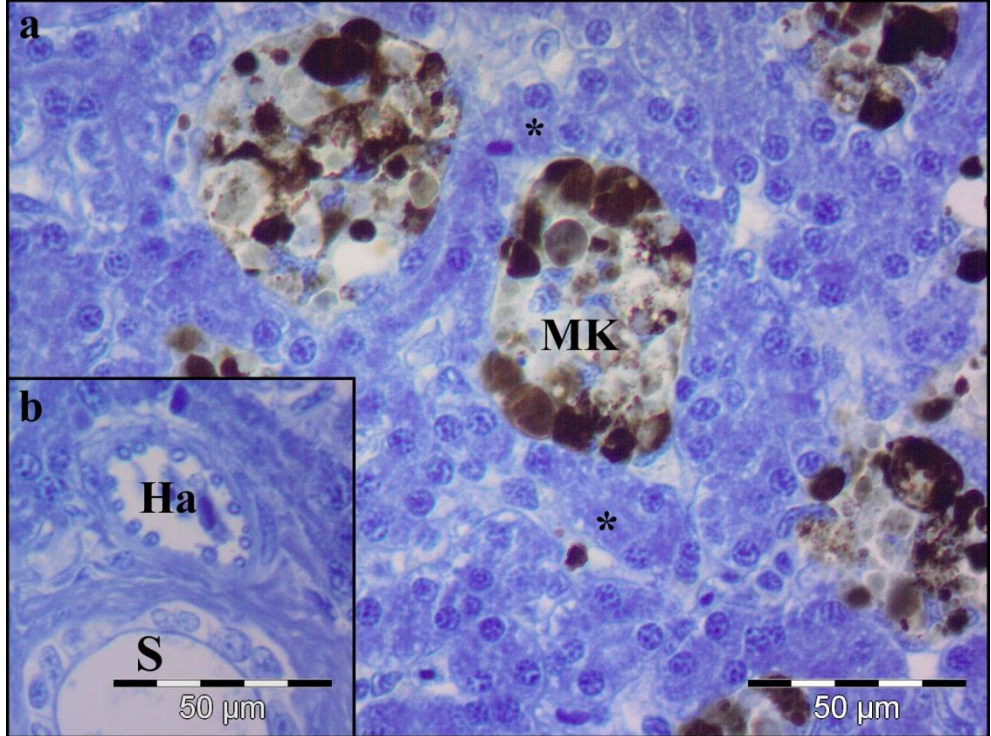
Şekil 4.1.3.5: Lep5 grubuna ait bireylerin karaciğerinde damarlar ve safra kanalının etrafındaki artmış bağ dokusu (→). Masson.



Şekil 4.1.3.6: Lep5 grubuna ait karaciğer dokusunda damarlar ve safra kanalının (S) etrafındaki bağ dokusunda artış (→). Masson, (MK: melanomakrofaj kümesi, Pv: portal ven, Ha: hepatik arter).



Şekil 4.1.3.7a-b: Lep5 grubuna ait bireylerin karaciğerinde, hepatosit (→) ve melanomakrofaj kümelerinde (►) PAS(+) reaksiyon.



Şekil 4.1.3.8a-b: Lep5 grubuna ait bireylerde hepatositlerde (*) ve safra kanalı (S) epitelinde protein içeriği. BPB, (MK: melanomakrofaj kümesi, Ha: hepatik arter).

4.1.4. Histolojik Ölçümler

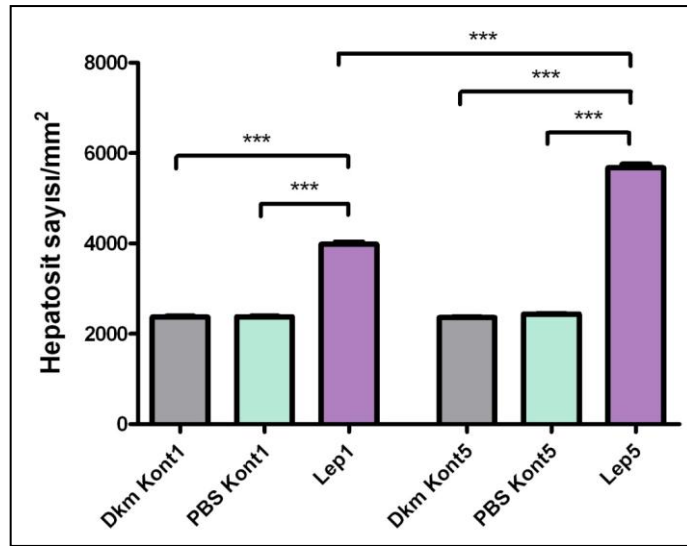
4.1.4.1. Hepatosit Sayısı

Leptin enjeksiyonunun hepatosit sayısı üzerine etkisi Şekil 4.1.4.1.1’de gösterilmiştir.

Birinci deneyde; PBS uygulaması yapılan grup, dokunulmamış kontrole göre hepatosit sayısı açısından anlamlı bir fark oluşturmamıştır ($P>0.05$). Buna rağmen bir gün leptin enjeksiyonu yapılan grupta hem PBS hem de dokunulmamış kontrol gruplarına göre hepatosit sayısı anlamlı bir şekilde artmıştır ($P<0.001$).

İkinci deneyde; PBS uygulaması dokunulmamış kontrole göre hepatosit sayısı açısından anlamlı bir fark oluşturmamıştır ($P>0.05$). Beş gün leptin enjeksiyonu yapılan grupta ise hem PBS hem de dokunulmamış kontrol gruplarına göre hepatosit sayısı açısından anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır ($P<0.001$).

Bir gün ve beş gün leptin enjeksiyonu yapılan gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında hepatosit sayısı bakımından beş gün leptin enjeksiyonlu grupta anlamlı bir artış saptanmıştır ($P<0.001$).



Şekil 4.1.4.1.1: Kontrol ve deneyli gruplarda hepatosit sayısı (***) $p<0.001$). Her bir grup için elde edilen değerler ‘ortalama±standart hata’ olarak gösterilmiştir.

Dkm Kont1: 2371±20.37, PBS Kont1: 2376±13.98, Lep1: 3984±42.64, Dkm Kont5: 2361±13.03, PBS Kont5: 2435±11.59, Lep5: 5673±80.65.

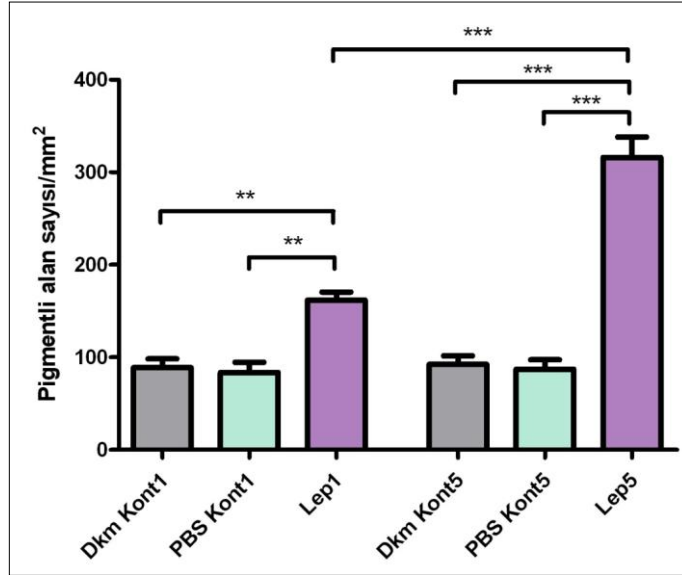
4.1.4.2. Pigmentli alan sayısı

Leptin enjeksiyonunun pigmentli alan sayısı üzerine etkisi Şekil 4.1.4.2.1'de gösterilmiştir.

Birinci deneyde; PBS uygulaması yapılan grup, dokunulmamış kontrole göre pigmentli alan sayısı açısından anlamlı bir fark oluşturmamıştır ($P>0.05$). Buna rağmen bir gün leptin enjeksiyonu yapılan grupta hem PBS hem de dokunulmamış kontrol gruplarına göre pigmentli alan sayısının anlamlı bir şekilde arttığı saptanmıştır ($P<0.01$).

İkinci deneyde; PBS uygulaması yapılan grup, dokunulmamış kontrole göre pigmentli alan sayısı açısından anlamlı bir fark oluşturmamıştır ($P>0.05$). Beş gün leptin enjeksiyonu yapılan grupta ise hem PBS hem de kontrol gruplarına göre pigmentli alan sayısı açısından anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir ($P<0.001$).

Bir günlük ve beş günlük leptin enjeksiyonlu gruplar pigmentli alan sayısı bakımından birbirleriyle karşılaştırıldığında beş gün leptin enjeksiyonlu grupta anlamlı bir artış bulunmuştur ($P<0.001$).



Şekil 4.1.4.2.1: Kontrol ve deneyli gruplarda pigmentli alan sayısı (** $p<0.01$, *** $p<0.001$). Her bir grup için elde edilen değerler 'ortalama±standart hata' olarak gösterilmiştir. Dkm Kont1: 88.85±9.617, PBS Kont1: 83.52±11.00, Lep1:161.6±8.930, Dkm Kont5: 92.41±9.331, PBS Kont5: 87.08±10.23, Lep5: 315.9±22.24.

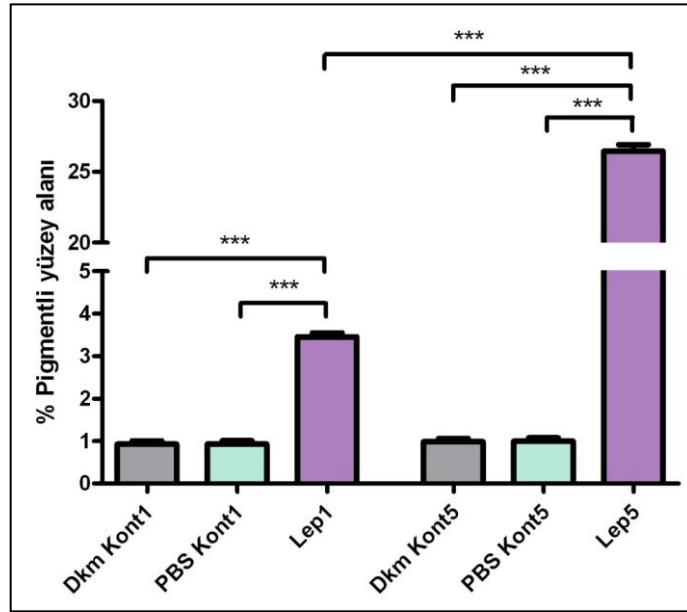
4.1.4.3. Pigmentli Yüzey Alanı

Leptin enjeksiyonunun pigmentli yüzey alanı üzerine etkisi Şekil 4.1.4.3.1’da gösterilmiştir.

Birinci deneyde; PBS uygulaması yapılan grup, dokunulmamış kontrole göre pigmentli yüzey alanı açısından anlamlı bir fark oluşturmamıştır ($P>0.05$). Buna rağmen bir gün leptin enjeksiyonu yapılan grupta hem PBS hem de dokunulmamış kontrol gruplarına göre pigmentli yüzey alanının anlamlı bir şekilde arttığı saptanmıştır ($P<0.001$).

İkinci deneyde; PBS uygulaması yapılan grupta, kontrole göre pigmentli yüzey alanı açısından anlamlı bir fark oluşturmamıştır ($P>0.05$). Beş gün leptin enjeksiyonu yapılan grupta ise hem PBS hem de dokunulmamış kontrol gruplarına göre pigmentli yüzey alanı açısından anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır ($P<0.001$).

Bir gün ve beş gün leptin enjeksiyonu yapılan gruplar birbirleriyle pigmentli yüzey alanı açısından karşılaştırıldığında beş gün leptin enjeksiyonlu grupta anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($P<0.001$).



Şekil 4.1.4.3.1: Kontrol ve deneyli gruplarda pigmentli yüzey alanı (***) $p<0.001$). Her bir grup için elde edilen değerler ‘ortalama±standart hata’ olarak gösterilmiştir. Dkm Kon1: 0.9299±0.07406, PBS Kont1: 0.9308±0.07802, Lep1: 3.456±0.09064, Dkm Kont5: 0.9853±0.07336, PBS Kont5: 0.9961±0.08045, Lep5: 26.44±0.4668.

4.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

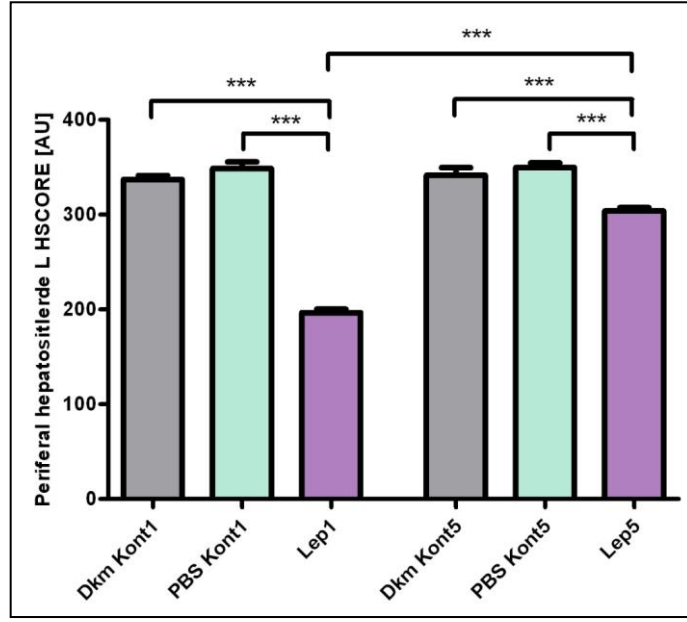
4.2.1. Leptin İmmünohistokimyasına Ait Bulgular

Birinci ve ikinci deneyde, yapılan HSCORE semikantitatif ölçümler sonucunda PBS enjeksiyonlu grup, dokunulmamış kontrole göre hepatositlerde leptin immünoreaktivitesi açısından anlamlı bir fark oluşturmamıştır ($P>0.05$) (Şekil 4.2.1.1, Şekil 4.2.1.2). Bu gruplara ait ortak bulgu: Hepatositlerde yoğun, granüler leptin pozitif reaksiyon gözledik. Karaciğer kesitlerinde lobun periferindeki hepatositlerde merkezindekilerine göre leptin pozitif reaksiyon daha fazladır (Şekil 4.2.1.3-Şekil 4.2.1.5). Melanomakrofajlar leptin negatif reaksiyon vermektedir. Safra kanalını döşeyen epitelde leptin reaksiyonu hafif pozitif ve granüllü değildir (Şekil 4.2.1.4a-b).

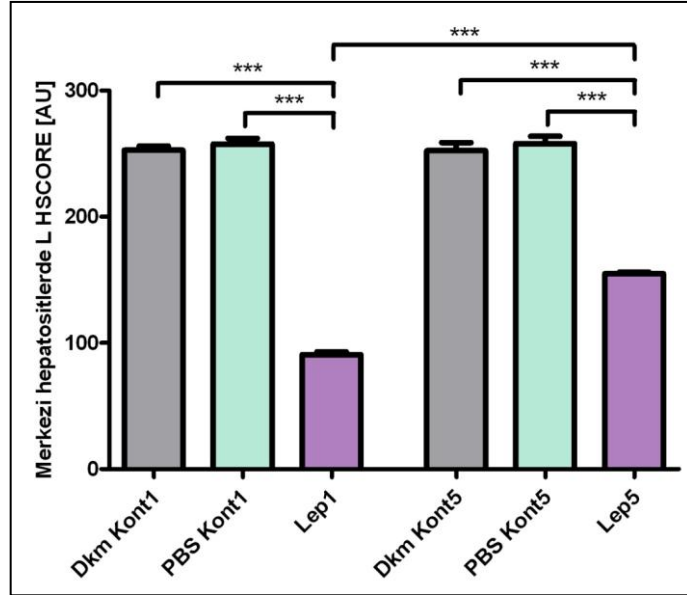
Bir gün leptin enjeksiyonu yapılan grupta hem PBS hem de dokunulmamış kontrol gruplarına göre hepatositlerdeki leptin immünoreaktivitesi perifer ($P<0.001$) ve merkezde ($P<0.001$) anlamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.2.1.1, Şekil 4.2.1.2, Şekil 4.2.1.6, Şekil 4.2.1.7a, Şekil 4.2.1.8a). Safra kanalı epiteli ve melanomakrofajlar leptin negatif reaksiyon vermektedir (Şekil 4.2.1.7a-b, Şekil 4.2.1.8a-b).

Beş gün leptin enjeksiyonu yapılan grupta, hem PBS hem de dokunulmamış kontrol gruplarına göre hepatositlerdeki leptin immünoreaktivitesi perifer ($P<0.001$) ve merkezde ($P<0.001$) anlamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.2.1.9-10a, Şekil 4.2.1.11a). Safra kanalı epiteli ve melanomakrofaj kümeleri leptin negatif reaksiyon vermektedir (Şekil 4.2.1.9, Şekil 4.2.1.10a-b, Şekil 4.2.1.11a).

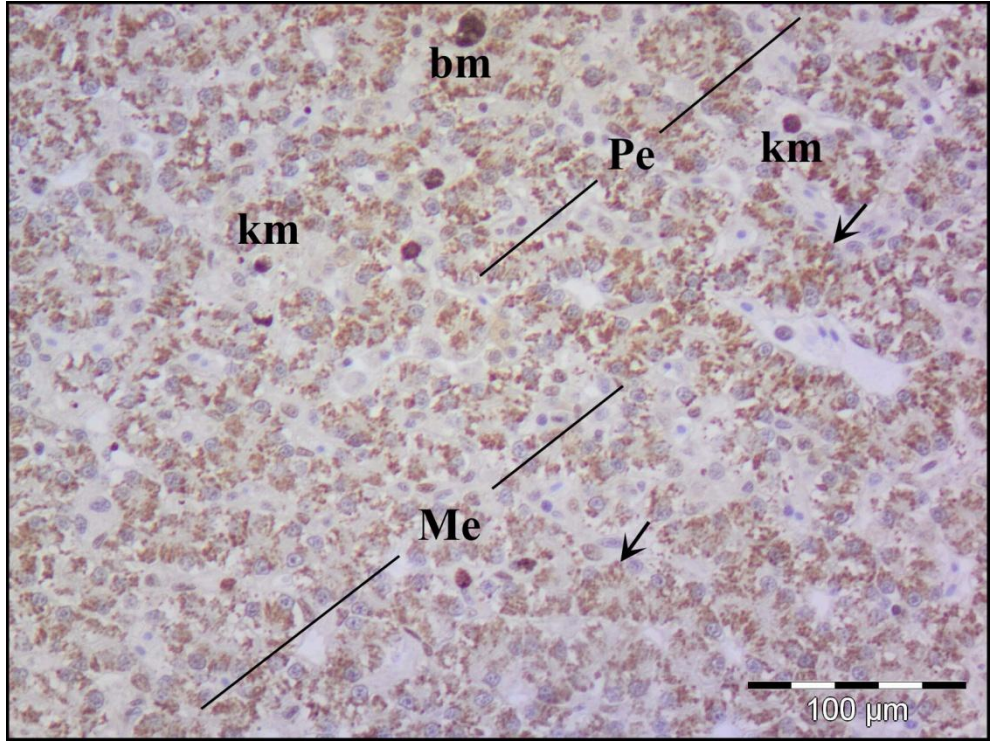
Bir günlük ve beş günlük leptin enjeksiyonu yapılan gruplarda perifer ve merkezi kısımlardaki hepatositler kendi aralarında birbirleri ile karşılaştırıldıklarında leptin immünoreaktivitesi açısından beş gün leptin enjeksiyonu yapılan grupta anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($P<0.001$) (Şekil 4.2.1.1, Şekil 4.2.1.2).



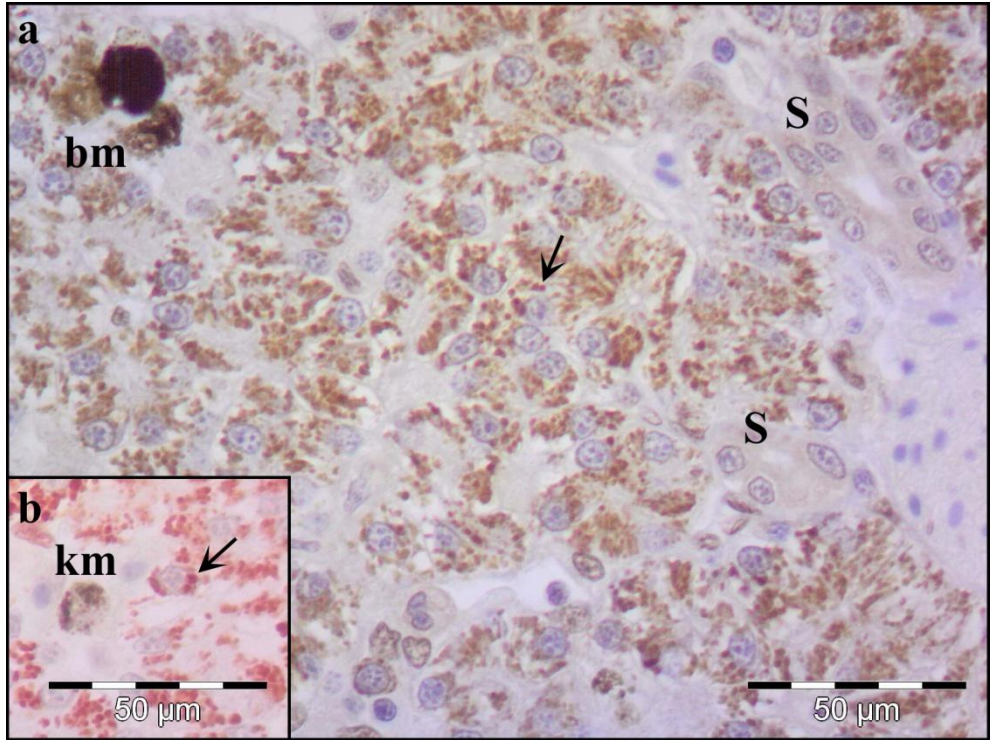
Şekil 4.2.1.1: Periferik hepatositlerdeki leptin (L) HSCORE değeri (**p<0.001). Her bir grup için elde edilen değerler 'ortalama±standart hata' olarak gösterilmiştir. Dkm Kont1: 337.0±4.259, PBS Kont1: 348.5±7.069, Lep1: 196.5±3.845, Dkm Kont5: 341.5±8.139, PBS Kont5: 349.5±5.179, Lep5: 304.0±3.546.



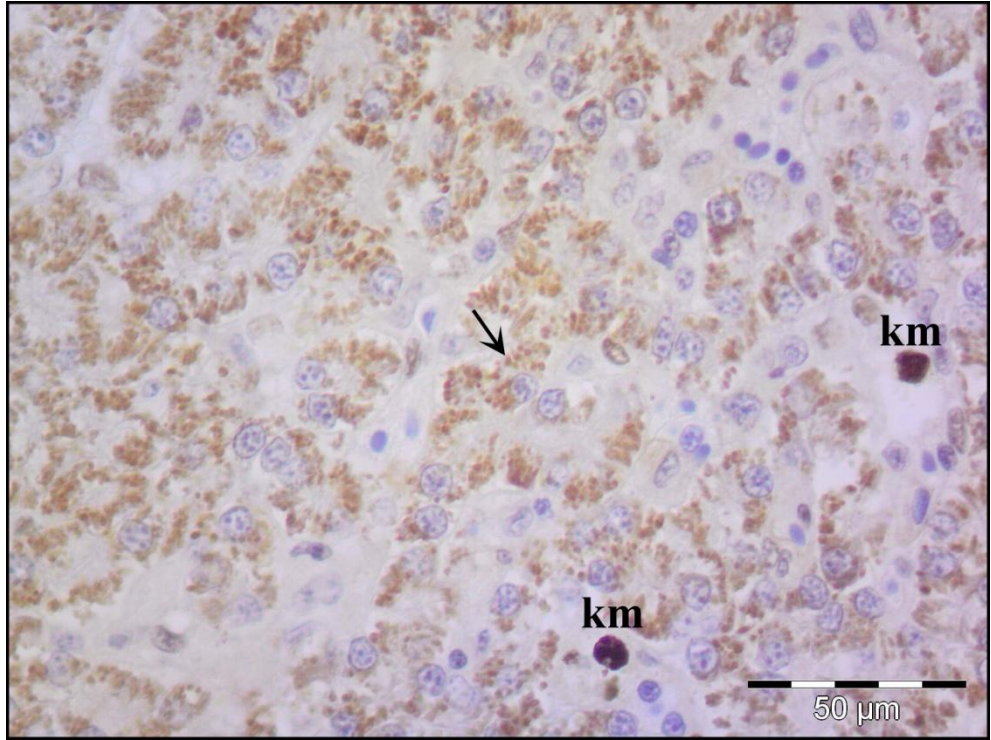
Şekil: 4.2.1.2: Merkezi hepatositlerdeki leptin (L) HSCORE değeri (**p<0.001). Her bir grup için elde edilen değerler 'ortalama±standart hata' olarak gösterilmiştir. Dkm Kont1: 252.8±3.195, PBS Kont1: 257.6±4.516, Lep1: 90.75±2.136, Dkm Kont5: 252.4±6.324, PBS Kont5: 258.0±5.837, Lep5: 154.8±1.306.



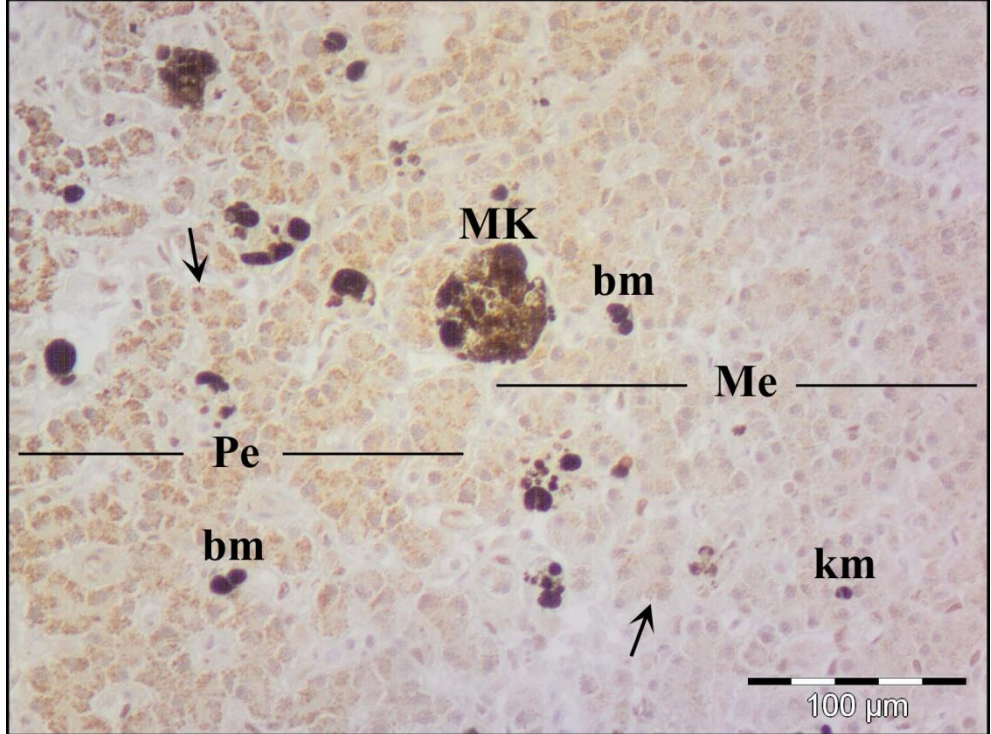
Şekil 4.2.1.3: Kontrol grubuna ait bireylerin periferel (Pe) ve merkezi (Me) hepatositlerinde leptin pozitif reaksiyon (→). (km: küçük melanomakrofaj, bm: büyük melanomakrofaj).



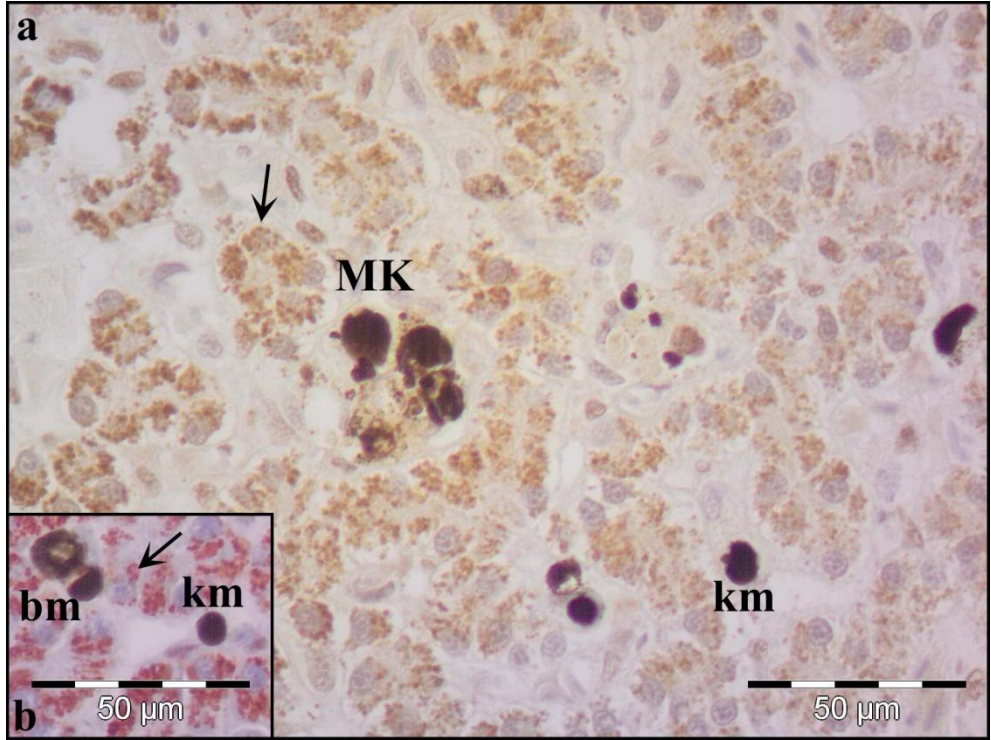
Şekil 4.2.1.4a-b: a) Kontrol bireyin periferel hepatositlerinde (→) ve safra kanalında (S) leptin pozitif a-b) küçük (km) ve büyük (bm) melanomakrofajda leptin negatif reaksiyon. (Şekil b’de kromojen olarak AEC kullanılmıştır).



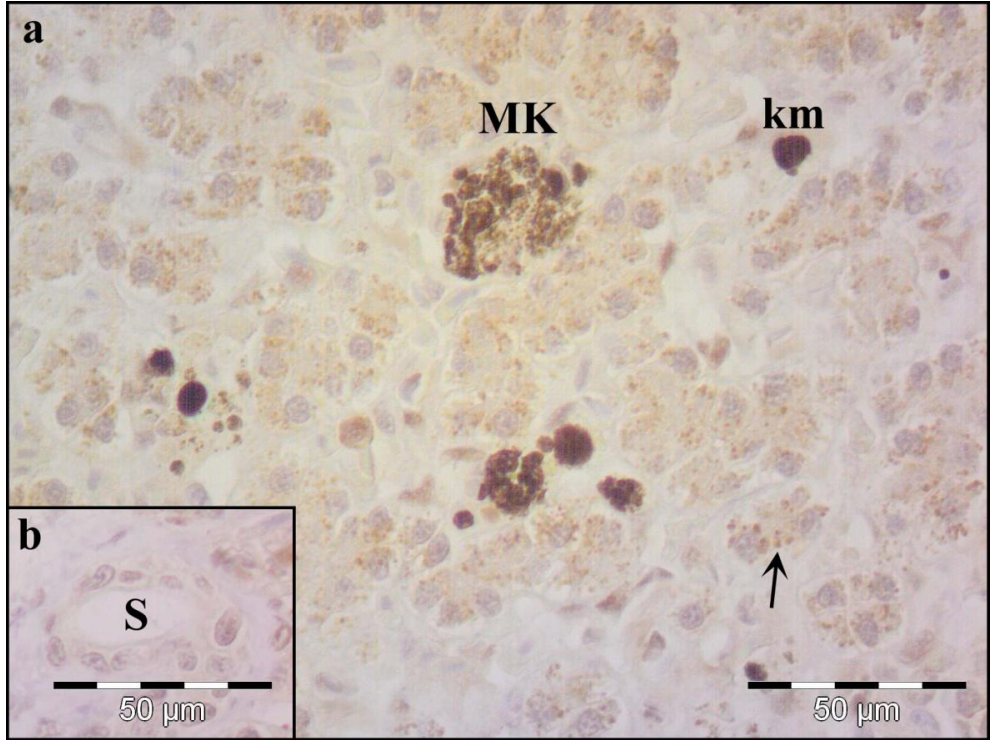
Şekil 4.2.1.5: Kontrol grubuna ait bireylerin merkezi hepatositlerinde leptin pozitif reaksiyon (→). (km: küçük melanomakrofaj).



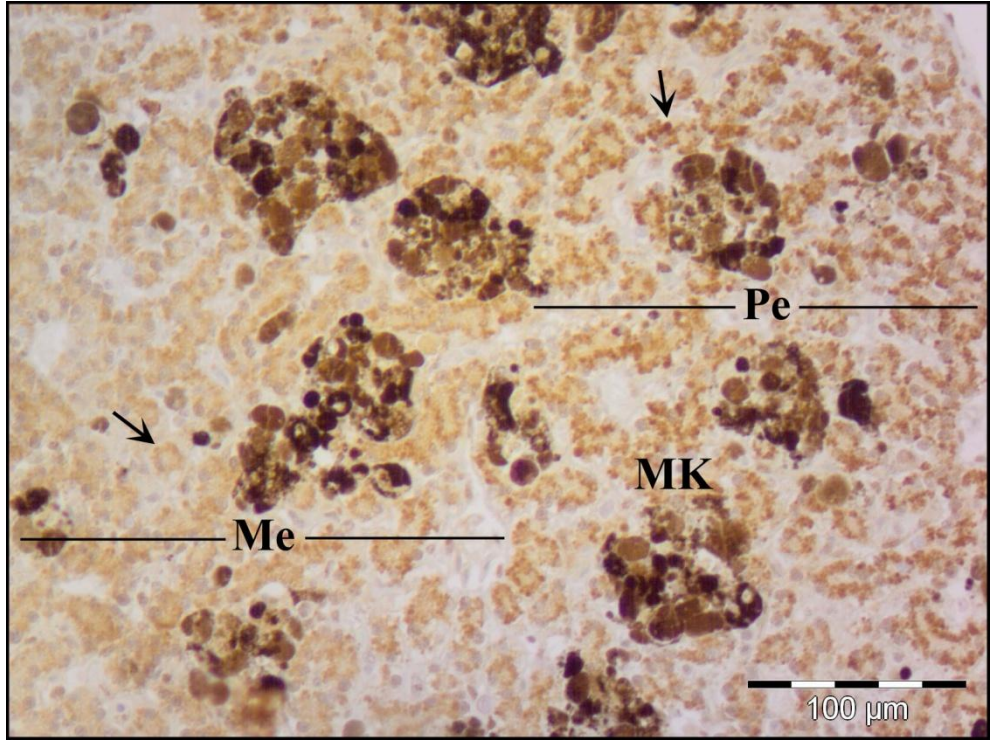
Şekil 4.2.1.6: Lep1 grubuna ait perifer (Pe) ve merkezi (Me) hepatositlerde leptin immünoaktivitesi (→). (km: küçük melanomakrofaj, bm: büyük melanomakrofaj, MK: melanomakrofaj kümesi).



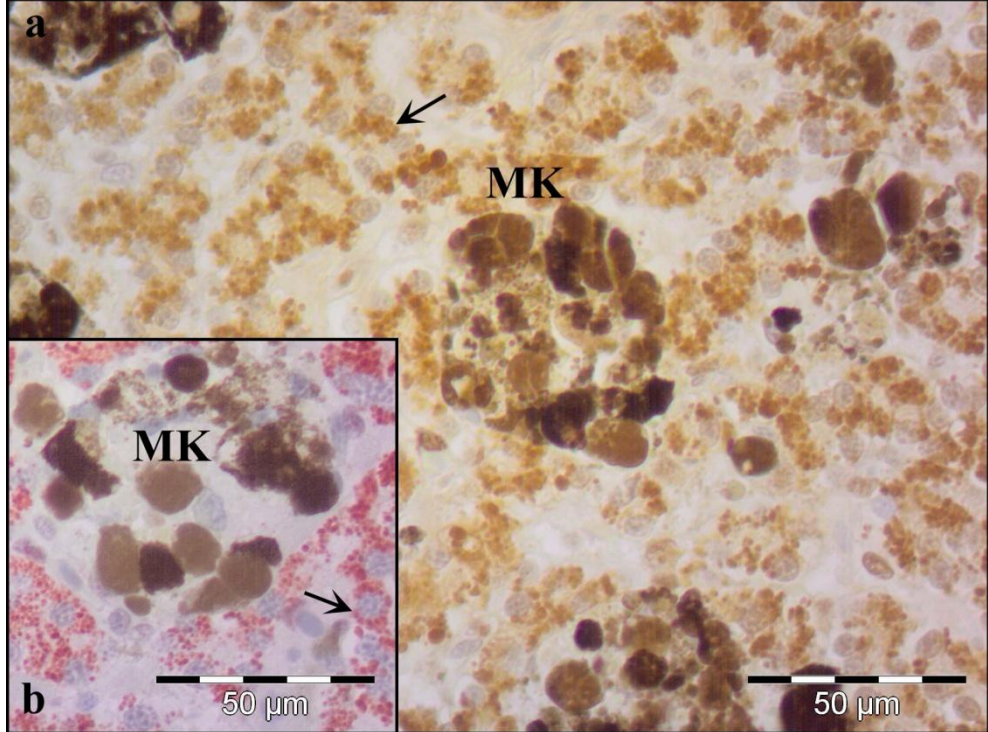
Şekil 4.2.1.7a-b: Lep1 grubuna ait periferai hepatositlerde (→) leptin pozitif, küçük (km), büyük (bm) melanomakrofajlarda ve melanomakrofaj kümesinde (MK) negatif reaksiyon. (Şekil b’de kromojen olarak AEC kullanılmıştır).



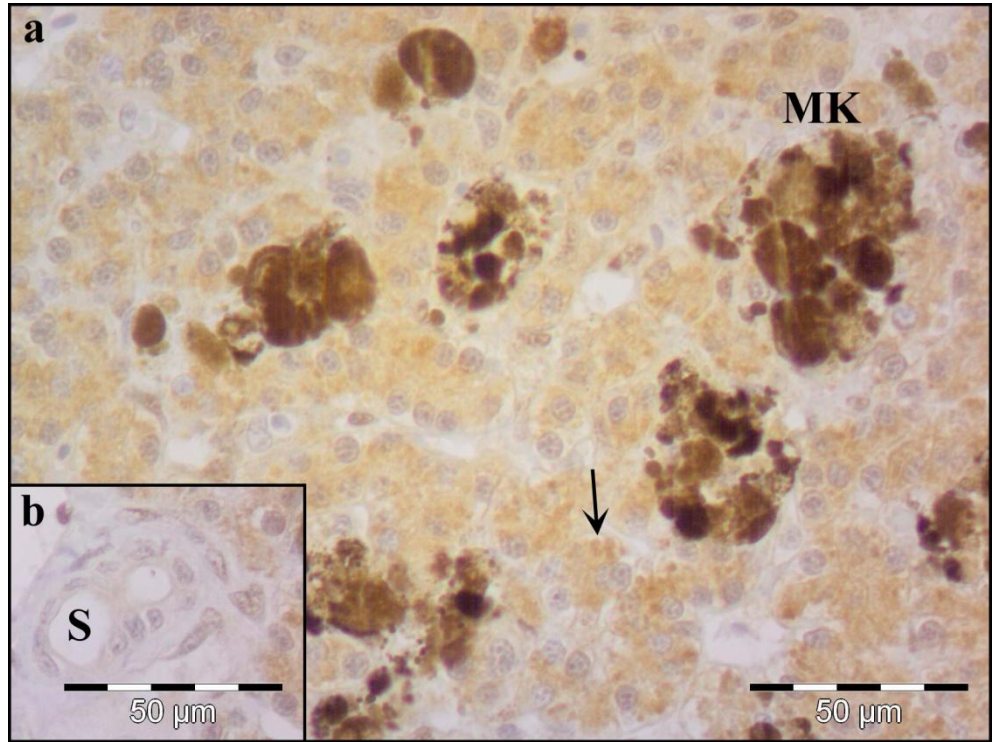
Şekil 4.2.1.8a-b: Lep1 grubu bireylerde a) merkezi hepatositlerde (→), b) safrai kanalı (S) leptin immünoreaktivitesi. (km: küçük melanomakrofaj, MK: melanomakrofaj kümesi).



Şekil 4.2.1.9: Lep5 grubuna ait bireylerde periferal (Pe) ve merkezi (Me) hepatositlerde leptin immünoreaktivitesi (→). (MK: melanomakrofaj kümesi).



Şekil 4.2.1.10a-b: a) Lep5 grubuna ait periferal hepatositlerde (→) leptin pozitif, a-b) melanomakrofaj kümelerinde (MK) leptin negatif reaksiyon. (Şekil b'de kromojen olarak AEC kullanılmıştır).



Şekil 4.2.1.11a-b: a) Lep5 grubuna ait bireylerin merkezi hepatositlerindeki leptin immünoreaktivitesi (→) b) Safra kanalında (S) leptin negatif reaksiyon. (MK: melanomakrofaj kümesi)

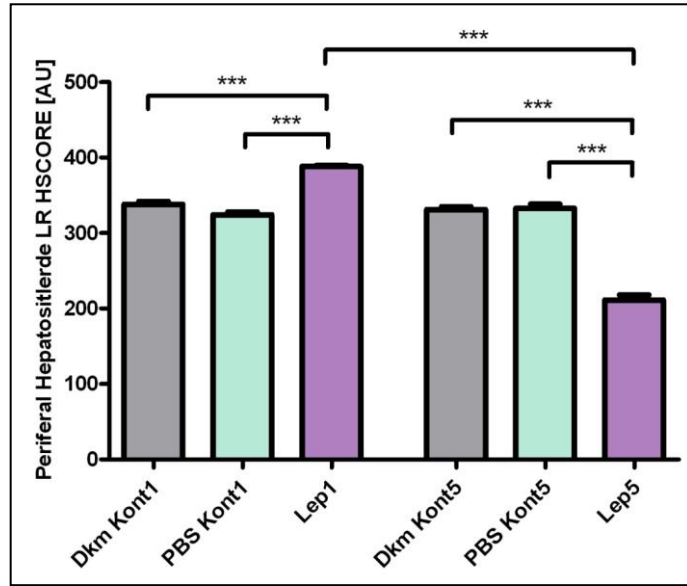
4.2.2. Leptin Reseptörü İmmünohistokimyasına Ait Bulgular

Birinci ve ikinci deneyde, yapılan HSCORE semikantitatif ölçümler sonucunda PBS enjeksiyonlu grup, dokunulmamış kontrole göre hepatositlerde leptin reseptör immünoreaktivitesi açısından anlamlı bir fark meydana getirmemiştir ($P>0.05$) (Şekil 4.2.2.1, Şekil 4.2.2.2). Bu gruplara ait ortak bulgu: Hepatositlerde, bazı melanomakrofajlarda, safra kanalı epitelinde, eritrositlerde ve arter duvarındaki düz kas hücrelerinde leptin reseptör pozitif reaksiyon saptadık (Şekil 4.2.2.3, Şekil 4.2.2.4, Şekil 4.2.2.5a-b). Karaciğer kesitlerinde lobun periferindeki hepatositlerde merkezdekilerine göre immünohistokimyasal leptin reseptör pozitif reaksiyon daha fazladır (Şekil 4.2.2.3, Şekil 4.2.2.4, Şekil 4.2.2.5a).

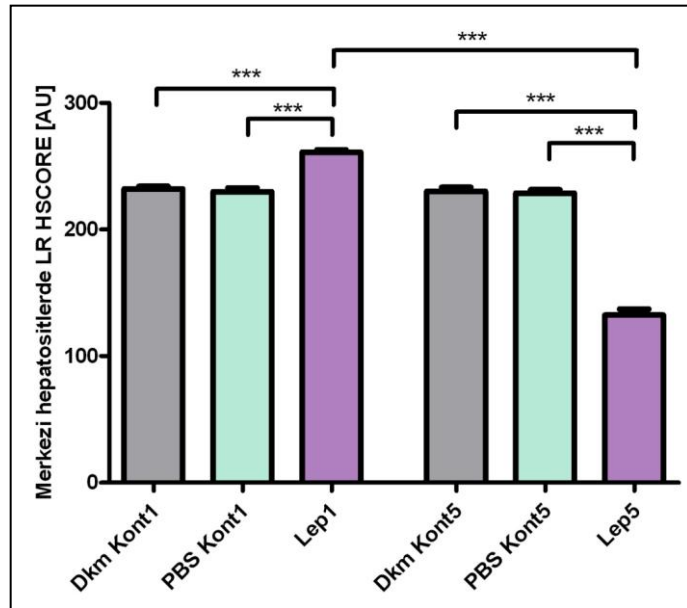
Bir gün leptin enjeksiyonlu grupta hem PBS hem de dokunulmamış kontrol gruplarına göre hepatositlerde leptin reseptör immünoreaktivitesinin perifer ve merkezde anlamlı bir şekilde arttığı saptanmıştır ($P<0.001$) (Şekil 4.2.2.1, Şekil 4.2.2.2, Şekil 4.2.2.6-Şekil 4.2.2.8). Eritrositler ve safra kanalı epitelindeki reaksiyon kontrole göre biraz fazla gözükmetedir (Şekil 4.2.2.6, Şekil 4.2.2.7b). Bazı melanomakrofajlarda ve küçük melanomakrofaj kümelerinde leptin reseptör pozitif reaksiyon saptadık (Şekil 4.2.2.7a, Şekil 4.2.2.8a). Arter duvarındaki reaksiyon kontrole benzerdir (Şekil 4.2.2.8b).

Beş günlük leptin enjeksiyonlu grupta hem PBS hem de dokunulmamış kontrol gruplarına göre hepatositlerde leptin reseptör immünoreaktivitesi perifer ve merkezde anlamlı bir şekilde azalmıştır ($P<0.001$) (Şekil 4.2.2.1, Şekil 4.2.2.2, Şekil 4.2.2.9-Şekil 4.2.2.11). Eritrositler ve safra kanalı epitelindeki reaksiyon kontrole göre biraz fazladır ve bir gün leptin enjeksiyonu yapılan gruba benzer gözükmetedir. Bazı melanomakrofaj kümelerinde leptin reseptör pozitif reaksiyon saptadık. Arter duvarındaki reaksiyon kontrole benzerdir (Şekil 4.2.2.9, Şekil 4.2.2.10, Şekil 4.2.2.11a-b).

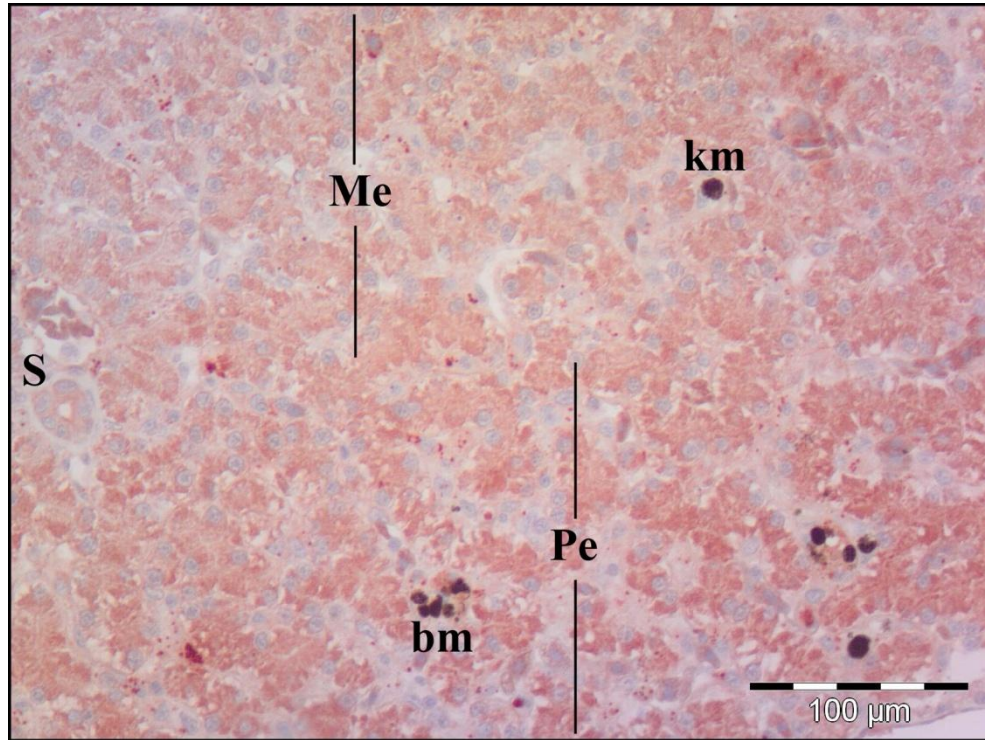
Bir günlük ve beş günlük leptin enjeksiyonlu gruplar perifer ve merkezi kısımlardaki hepatositler kendi aralarında leptin reseptör immünoreaktivitesi bakımından birbirleri ile karşılaştırıldıklarında beş günlük leptin enjeksiyonlu grupta anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($P<0.001$) (Şekil 4.2.2.1, Şekil 4.2.2.2).



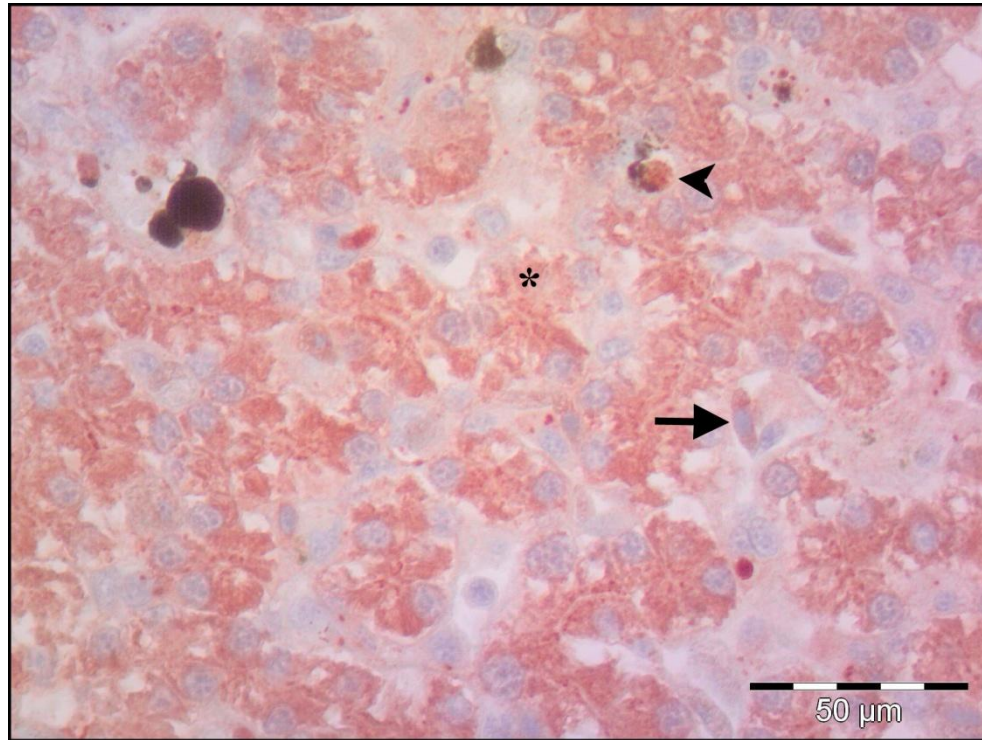
Şekil 4.2.2.1: Periferik hepatositlerdeki leptin reseptörü (LR) HSCORE değeri (***) $p < 0.001$). Her bir grup için elde edilen değerler ‘ortalama±standart hata’ olarak gösterilmiştir. Dkm Kont1: 338.0±3.780, PBS Kont1: 324.0±3.780, Lep1: 388.0±1.512, Dkm Kont5: 331.0±3.836, PBS Kont5: 332.5±5.628, Lep5: 211.1±6.683.



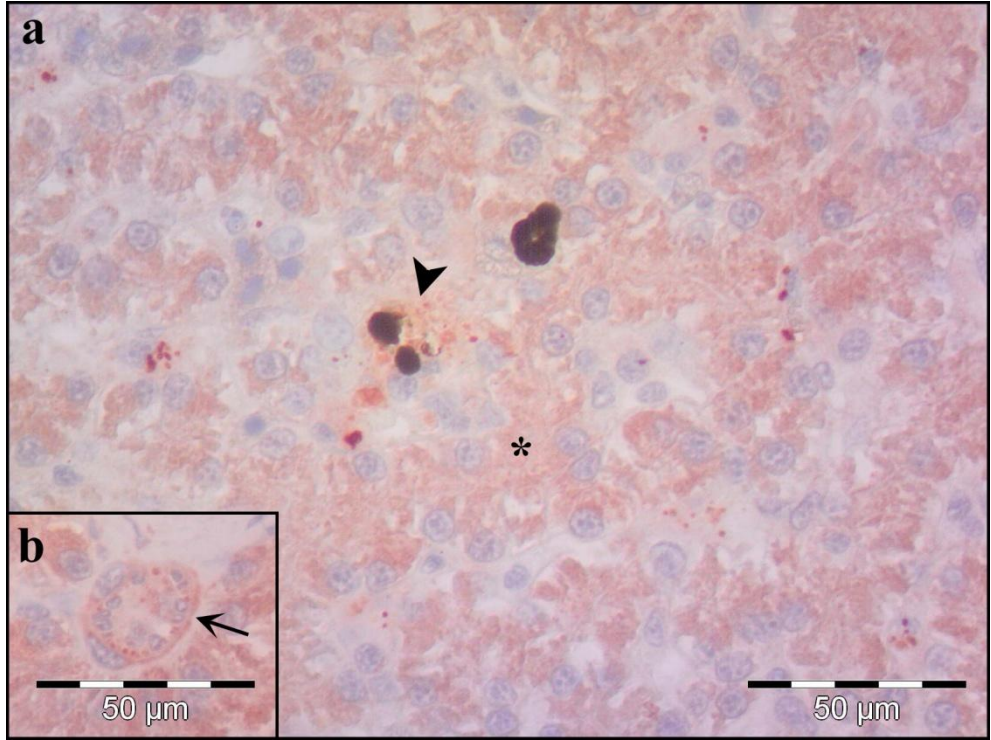
Şekil 4.2.2.2: Merkezi hepatositlerdeki leptin reseptörü (LR) HSCORE değeri (***) $p < 0.001$). Her bir grup için elde edilen değerler ‘ortalama±standart hata’ olarak gösterilmiştir. Dkm Kont1: 232.1±1.959, PBS Kont1: 229.9±2.943, Lep1: 261.0±1.793, Dkm Kont5: 230.3±3.040, PBS Kont5: 228.8±2.704, Lep5: 132.5±4.532.



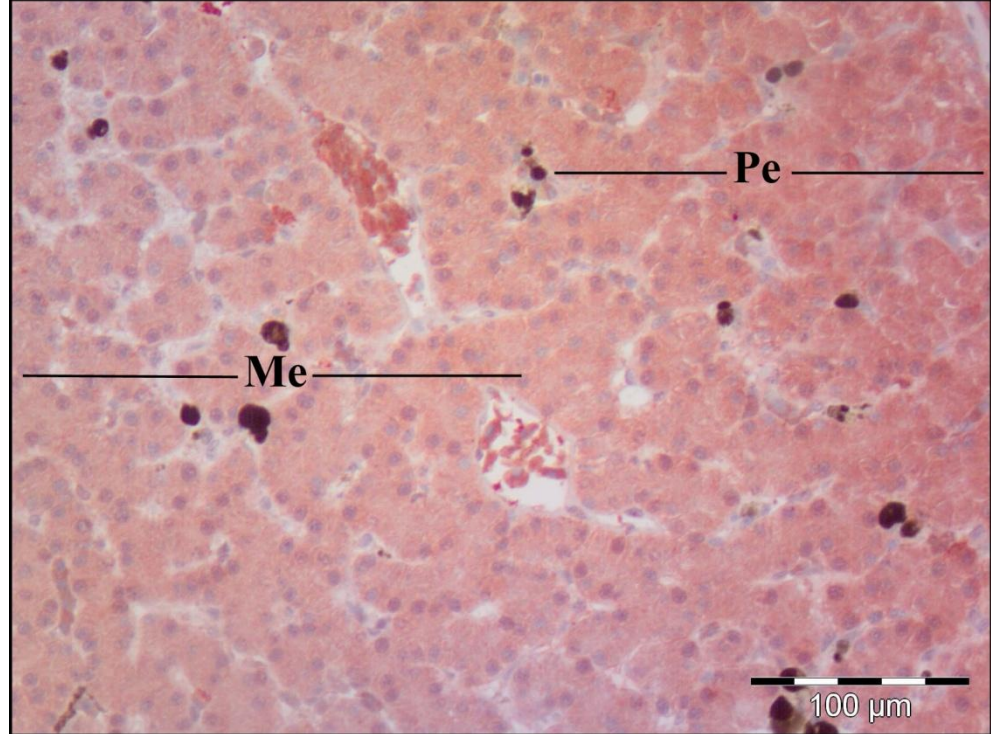
Şekil 4.2.2.3: Kontrol bireylerde periferel (Pe) ve merkezi (Me) hepatositler ile safra kanalında (S) leptin reseptör immünoreaktivitesi (km: küçük melanomakrofaj, bm: büyük melanomakrofaj).



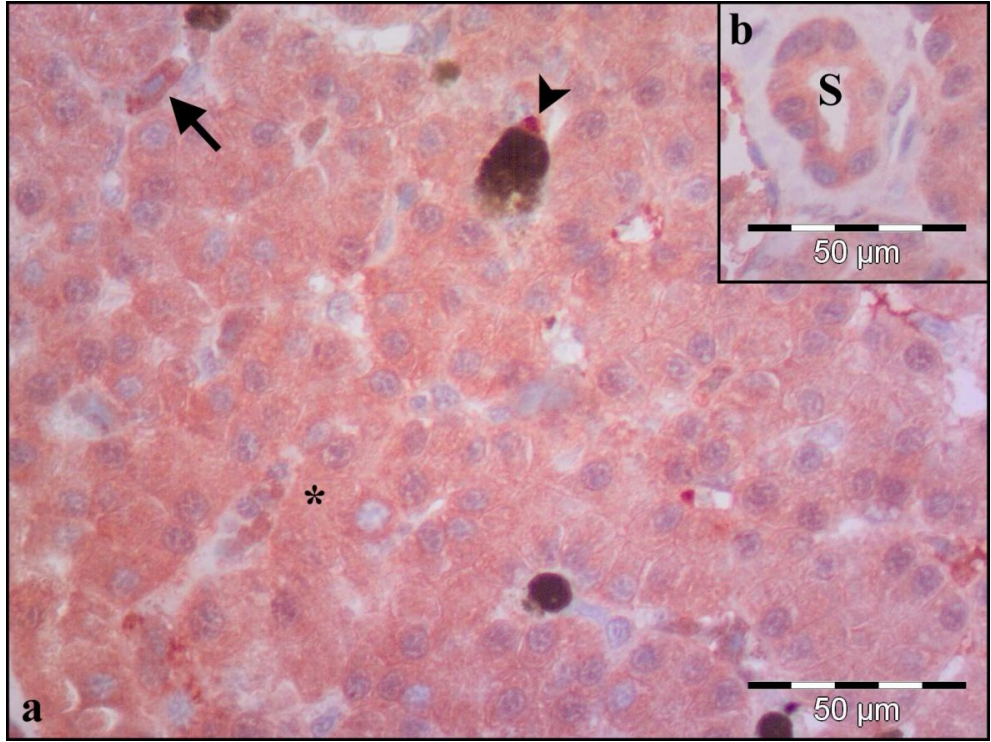
Şekil 4.2.2.4: Kontrol bireye ait periferel hepatositlerde (*), küçük melanomakrofajda (►) ve eritrositlerde (↔) leptin reseptör immünoreaktivitesi.



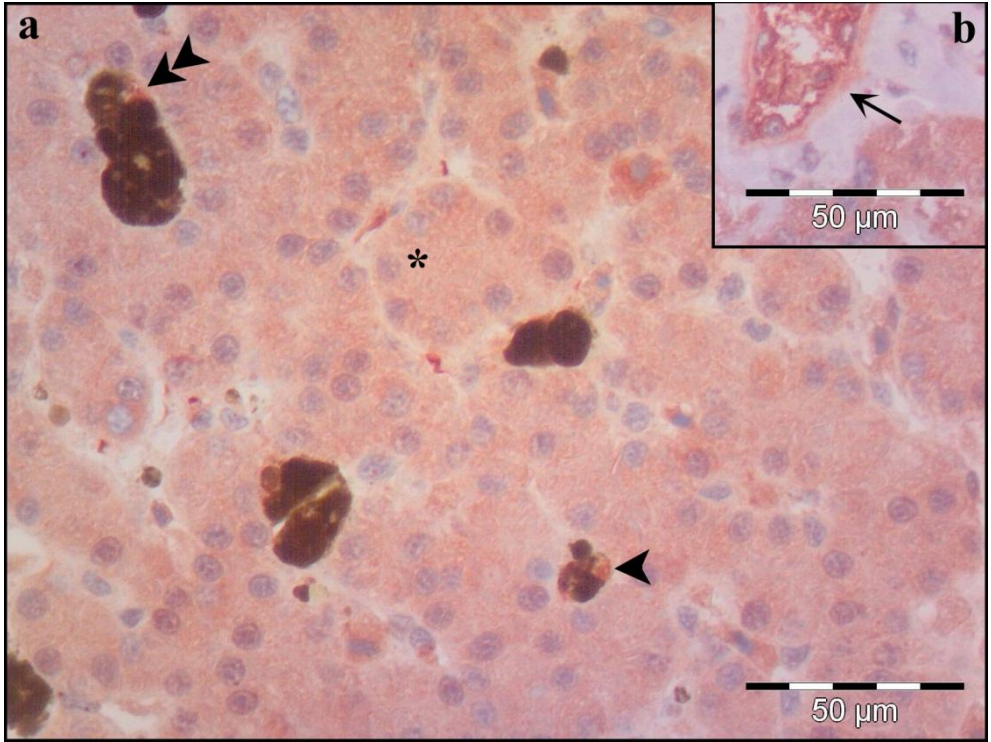
Şekil 4.2.2.5a-b: a) Kontrol bireye ait merkezi hepatositlerde (*) ve büyük melanomakrofajda (►), b) arter duvarında (→) pozitif leptin reseptör reaksiyonu.



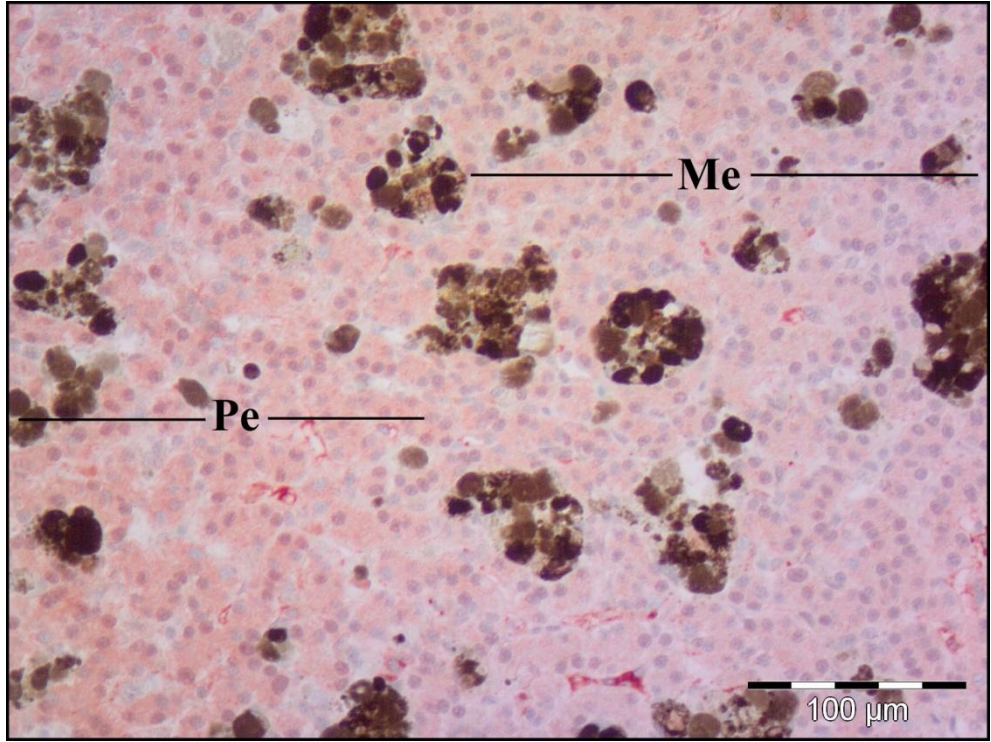
Şekil 4.2.2.6: Lep1 grubuna ait bireylerde leptin reseptör immünoreaktivitesinin genel görünüşü. (Pe: perifer hepatositler, Me: merkezi hepatositler).



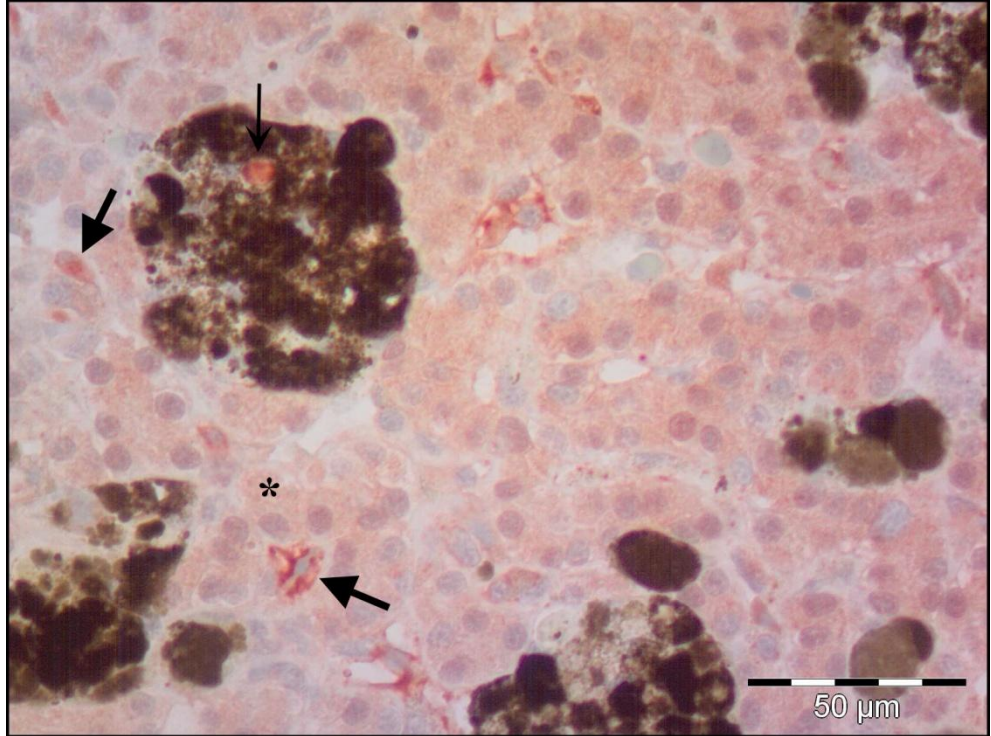
Şekil 4.2.2.7a-b: Lep1 grubuna ait bireylerin a) periferik hepatositlerde (*), eritrositte (→) ve büyük melanomakrofajda (►), b) safra kanalında (S) pozitif leptin reseptör reaksiyonu.



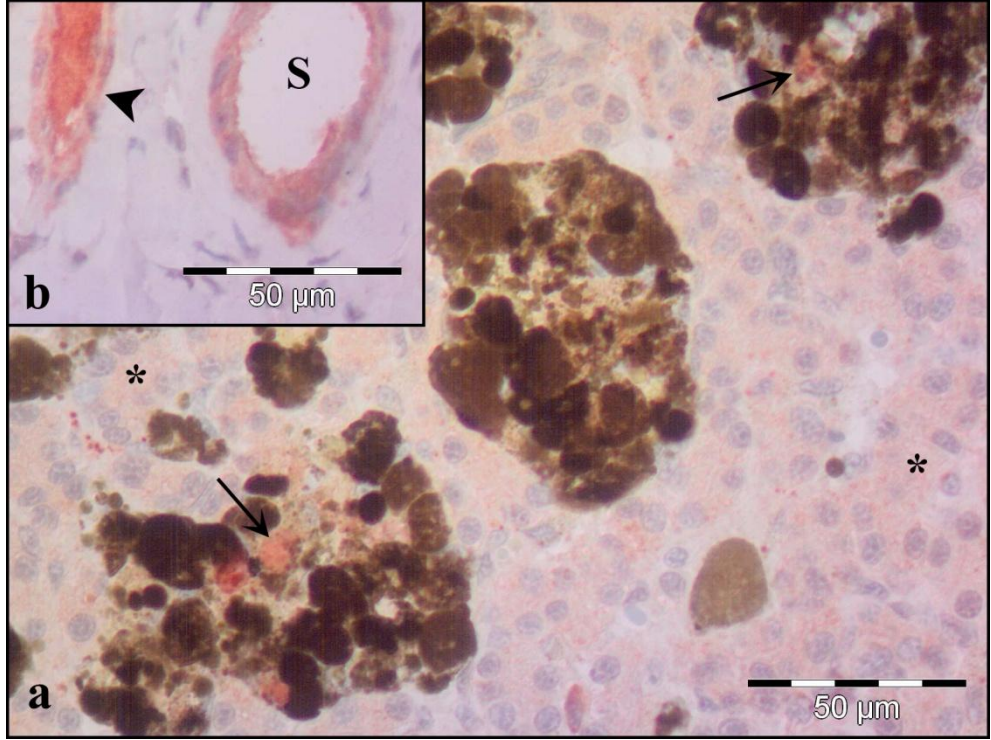
Şekil 4.2.2.8a-b: Lep1 grubuna ait a) merkezi hepatositlerde (*) büyük melanomakrofajlarda (►) ve küçük melanomakrofaj kümesinde (►►) b) arter duvarında pozitif leptin reseptör reaksiyonu.



Şekil 4.2.2.9: Lep5 grubuna ait bireylerde periferal (Pe) ve merkezi (Me) hepatositlerde leptin reseptör immünoreaktivitesinin genel görünümü.



Şekil 4.2.2.10: Lep5 grubuna ait bireylerin periferal hepatositlerde (*), melanomakrofaj kümesinde (→) ve eritrositlerde (→→) pozitif leptin reseptör immünoreaktivitesi.



Şekil 4.2.2.11a-b: Lep5 grubuna ait bireylerin a) merkezi hepatositlerde (*) ve melanomakrofaj kümelerinde (→) b) Arter duvarı düz kas hücrelerinde (▶) ve safra kanalı (S) epitel hücrelerinde pozitif leptin reseptör immünoreaktivitesi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Memelilerin karaciğerinde görülen hepatik lobüler yapı amfibilerden *Cynops orientalis*'da bulunurken, *Eupemphix nattereri* ve *Lissotriton italicus* kurbağalarında görülmemektedir (Xie ve diğ., 2011; Franco-Belussi ve diğ., 2012; Bernabò ve diğ., 2014). Biz de *Pelophylax ridibundus*'da hepatik lobüler yapı gözlemedik. Kurbağa karaciğerinde hepatosit kordonlarının düzenlenişi türden türe farklılık göstermektedir. Hepatositlerin çok tabakalı (*Hynobius nebulosus*), çift tabakalı (*Hynobius stejnegeri*, *Eupemphix nattereri*), tek tabakalı (*Rana ornativentris*) kordonlar şeklinde ya da bu yapıların kombinasyonu şeklinde dizilebildiği belirtilmiştir (Akiyoshi ve Inoue, 2012; Franco-Belussi ve diğ., 2012). Ayrıca genel olarak Anura ordosuna ait türlerde hepatositlerin düzenlenişinin hepatik sinüzoidlerle çevrilmiş tübüler kordonlar şeklinde olduğu rapor edilmiştir (Spornitz, 1975; Fenerick, 2008). *Rana ridibunda*'da ise safra kanaliküllerini çevreleyen 4-8 hepatositin oluşturduğu tübüllerin, dallanmış kıvrıntılı kordonlar şeklinde dizildiği belirtilmektedir (Loumbourdis ve Danscher, 2004). Histolojik gözlemlerimize göre biz de *Pelophylax ridibundus*'da hepatositlerin tübüler kordonlar oluşturduğu ve bu kordonların da yer yer dallandıklarını gördük.

Hepatik arter, portal ven ve safra kanalının kolları portal triadı (portal alan) oluşturur (Michalopoulos ve DeFrances, 1997; Dooley ve diğ., 2011). Portal triad, genellikle Anura karaciğerinde (*Xenopus*, *Bombina* cinsleri haricinde) görülmemektedir (Akiyoshi ve Inoue, 2012). Anura sınıfına dahil olan *Rana ridibunda*'da da portal triadın olmadığı belirtilmektedir (Azanza ve diğ., 1989). *Pelophylax ridibundus*'un Masson ile boyanmış karaciğer kesitlerinde hepatik doku içinde belli bir düzende olmayacak şekilde dağılmış ince bir bağ dokusu ile kuşatılmış halde ve genellikle birlikte hepatik arter, portal ven ve safra kanallarının kolları gözlenmektedir.

Kontrol kurbağa karaciğer kesitlerinde sinüzoidal dōşeyici tabakada, kahve-siyah renkli, az sayıda melanomakrofaj gözledik. Soğukkanlı omurgalılarda bulunan, mononükleer fagositik hücrelere dahil olduğu düşünölen bu hücreler, kahve-siyah renkli melanin içermelerinden dolayı melanomakrofaj olarak isimlendirilmiştir (Couillard ve Hodson,

1996; Rund diğ., 1998; Barni diğ., 1999; Loumbourdis ve Vogiatzis, 2002; Agius ve Roberts, 2003; Loumbourdis ve Danscher, 2004; Fenoglio ve diğ., 2005; Oliveira ve Franco-Belussi, 2012). Bu hücreler melaninden başka hemosiderin ve lipofuskin de içerirler (Rund diğ., 1998; Barni diğ., 1999). Lipofuskin lizozomlarda sindirilmemiş materyali ifade eder ve oksidatif aktivite sonucu yapısı değişikliğe uğramış protein ve lipidlerden oluşturulur (Brunk ve Terman, 2002; Terman ve Brunk, 2004). Amfibilerde elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda lipofuskinin genellikle büyük Kupffer hücrelerinde önemli miktarlarda bulunduğu küçük Kupffer hücrelerinde ise hemen hemen hiç bulunmadığı belirtilmiştir (Corsaro ve diğ., 2000; Sichel ve diğ., 2002). Lipofuskin PAS pozitif reaksiyon verir (Ravaglia ve Maggese, 1995; Bruslé ve diğ., 1996; Terman ve Brunk, 2004). Fenoglio ve diğ. (2005) yaptıkları bir çalışmada *Rana esculenta* karaciğer kesitlerinde melanomakrofajlarda PAS pozitif reaksiyon saptanmamıştır. Çalışmamızda ise kontrol grubu bireylerinin karaciğer kesitlerinde PAS pozitif reaksiyon büyük melanomakrofajlarda daha fazla bulunmakla beraber, bazı küçük melanomakrofajlarda da az miktarda görülmektedir. Ayrıca hepatositlerin sitoplazmasında çok miktarda küçük tanecikler halinde PAS pozitif materyal de saptadık. Benzer olarak *Eupemphix nattereri* ve *Rana esculenta* hepatosit sitoplazmasında PAS pozitif reaksiyon veren bol miktarda glikojenin bulunduğu rapor edilmiştir (Fenoglio ve diğ., 2005; Franco-Belussi ve diğ., 2012). Hepatositlerde büyük miktarlarda glikojenin bulunması amfibilerin karakteristik bir özelliğidir (Spornitz, 1975; Hadley, 1985; Fenoglio ve diğ., 1992). Ayrıca amfibi hepatositleri bol miktarda yağ da içerir (Crawshaw ve Weinkle, 2000). Çalışmamızda kontrol bireylerin hepatositlerinde lipid damlacıklarını içeren bölgeler boşluklar halinde gözükmemektedir ve sitoplazmada önemli bir yer tutarlar. Karaciğerdeki protein içeriğini ise BPB ile açık mavi renk reaksiyonu halinde saptadık.

Kontrol grubu kurbağaların karaciğerinde leptin ve leptin reseptör antikoru ile yaptığımız immünohistokimyasal boyama sonucunda hepatositlerde ve safra kanalı epitel hücrelerinde leptin immünoreaktivitesi; hepatositler, safra kanalı epitel hücreleri, bazı melanomakrofajlarda, arter duvarı düz kas hücrelerinde ve eritrositlerde ise leptin reseptör immünoreaktivitesi saptadık.

Peptid yapıda bir hormon olan leptin, genelde memelilerde esas olarak yağ dokusunda sentez edilir (Zhang ve diğ., 1994; Bornstein ve diğ., 2000; Fantuzzi, 2005; Blüher ve Mantzoros, 2007; Lago ve diğ., 2009). Ancak diğer dokularda da örneğin; plasenta beyin, meme dokusu, hipofiz bezi ve midede de leptin eksprese edilir (Masuzaki ve diğ., 1997; Bado ve diğ., 1998; Smith-Kirwin ve diğ., 1998; Morash ve diğ., 1999; Muruzábal ve diğ., 2002). Memelilerden sadece deve karaciğerinde leptin ve leptin reseptörü ekspresyonu immünohistokimyasal ve in situ hibridizasyon yöntemi ile gösterilmiştir (Bartha ve diğ., 2005; Sayed-Ahmed ve Bartha, 2005). Develer karaciğerlerinde büyük miktarlarda yağ depolayan çöl hayatına uyum sağlamış özelleşmiş hayvanlardır. Diğer ruminantlara göre develerin karaciğerinde lipogenik enzim aktivitesinin fazla olması ile (Mirgani ve diğ., 1987) bu dokuda leptinin bulunması arasında bir ilişkinin olabileceği ileri sürülmüştür (Bartha ve diğ., 2005; Sayed-Ahmed ve Bartha, 2005). Normal insan karaciğerinde leptin ekspresyonu yoktur. Ancak leptin reseptör ekspresyonu saptanmıştır (Briscoe ve diğ., 2001; Ikejima ve diğ., 2002). Sıçanlarda da normal karaciğer leptin sentezleyemezken leptin reseptörü hepatositlerde sentez edilmektedir (Wang ve diğ., 1998; Otte ve diğ., 2004).

Memelilere göre aşağı omurgalılarda farklı leptin kaynaklarının bulunduğu düşünülmektedir. Bununla ilgili olarak karaciğerde leptin ekspresyonu ile ilgili ilk veri tavuk karaciğerinden elde edilmiştir (Taouis ve diğ., 1998). Kuş türlerinde, adipoz dokuda olduğu kadar karaciğerde de leptin sentez edilmektedir (Taouis ve diğ., 1998; Ashwell ve diğ., 1999; Richards ve diğ., 2000). Kuşlarda ve balıklarda karaciğerin lipogenezin ana yeri olabileceği ileri sürülmektedir (Lin ve diğ., 1977; Simon ve diğ., 1991; Taouis ve ark., 2001). Johnson ve diğ. (2000) aşağı omurgalılarda leptinin asıl üretim yerinin karaciğer olabileceğini balık (*Lepomis cyanellus*, *Lepomis macrochirus*, *Micropterus salmoides*, *Pomoxis annularis*) karaciğerinde Western blot analizi ile leptin proteininin varlığını göstererek saptamışlardır. Ancak balıklarda adipoz dokuda, memelilerdekinin aksine leptin tespit edilememiştir. Balıklarda (*Rainbow trout* ve *Takifugu rubripes*) yapılan diğer çalışmalarda da karaciğerde leptin ekspresyonu reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile tespit edilmiştir (Kurokawa ve diğ., 2005; Murashita ve diğ., 2008). Ayrıca Pfundt ve diğ. (2009), balık (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğerinde hepatositlerde leptin ve leptin reseptörünü immünohistokimyasal olarak göstermişlerdir.

Bir Urodel örneği olan *Triturus cristatus carnifex*'in larval gelişimi sırasında leptin ve leptin reseptörü immünohistokimyasal olarak gastrointestinal kanal ve nöral tüpte tespit edilmiştir. Larval gelişimin 41. evresinde nöral tüpte, 42/43 evrelerinde mide, karaciğer, bağırsaktaki çok sayıda hücrede; 45/46 evrelerinde pankreasta leptin ve leptin reseptör immünoaktivitesine sahip hücreler saptanmıştır (Buono ve Putti, 2004). Diğer bir çalışmada Boswell ve diğ. (2006) *Ambystoma tigrinum* (Urodela)'un genç bireylerinde leptinin ekspresyon yeri ve dağılımının daha geniş olduğunu (deri, beyin, mide, bağırsak, iskelet kası, dil ve yağ cismi), ergin bireylerde ise dişilerde herhangi bir ekspresyon gözlenmezken erkek bireylerde sadece testiste leptin ekspresyonu RT-PCR yöntemi ile tespit edilmiştir. *Xenopus laevis* genç bireylerinin beyin, hipotalamus, testis, kalp, akciğer, mide, bağırsak, karaciğer, böbrek, adipoz doku ve ovaryumunda leptin ekspresyonu; aynı organ ve dokulara ilaveten deri, kas, pankreas ve dalakta leptin reseptörü ekspresyonu RT-PCR yöntemi ile tespit edilmiştir (Crespi ve Denver, 2006). *Rana dybowskii*'nin üreme ve prehibernasyon dönemlerinde yumurta kanalı (ovidukt) epitel hücreleri leptin; sadece stromal hücrelerde ise leptin reseptörü immünohistokimyasal olarak saptanmıştır (Liu ve diğ., 2014). Ayrıca *Xenopus laevis* midesinde de immünohistokimyasal olarak leptin tespit edilmiştir (Muruzábal ve diğ., 2002). *Ambystoma mexicanum* (Urodela) ile yapılmış bir çalışmada ergin bireylerin karaciğerinde RT-PCR yöntemi ile sadece leptin ekspresyonu saptanırken genç bireylerinin karaciğerinde ise hem leptin ve hem de leptin reseptörü saptanmıştır (Gackowska, 2011). Ancak ergin kuyruksuz kurbağalarda karaciğer dokusunda leptin ve leptin reseptörünün varlığı ile ilgili literatür bilgisi bulunmamaktadır.

Larval ve genç amfibilerde yapılan çalışmalar leptin ve leptin reseptörü ekspresyon yeri çeşitliliğinin fazla olduğunu göstermektedir (Buono ve Putti, 2004; Boswell ve diğ., 2006; Crespi ve Denver, 2006; Gackowska, 2011). Amfibilerdeki bu ekspresyon yeri çeşitliliği leptinin çeşitli fonksiyonlarının olduğunu düşündürmektedir (Crespi ve Denver, 2006; Gackowska, 2011). Ayrıca amfibilerde leptin ve leptin ekspresyon yerlerinin gelişim aşamasına (larva, genç, ergin birey) cinsiyete, türe ve farklı yaşam dönemlerine (prehibernasyon, üreme) göre değiştiği görülmektedir (Buono ve Putti, 2004; Boswell ve diğ., 2006; Crespi ve Denver, 2006; Gackowska, 2011; Liu ve diğ., 2014). İmmünohistokimyasal olarak ergin *Pelophylax ridibundus* (Anura) hepatositlerinde yaygın olarak leptinin varlığını saptamamız, bu organın önemli bir

leptin sentez yeri olabileceğini göstermektedir. Amfibilerde adipoz doku daha az gelişmiştir ve bu nedenle karaciğerleri yağ depolanmasında diğer omurgalılara göre daha önemli bir yer tutar (Hadley, 1985). Memelilerde primer olarak yağ dokuda sentezlenen leptin hormonuna amfibilerde karaciğerde rastlamamız bu nedenle şaşırtıcı olmayabilir. Ayrıca adipoz doku oluşumundan önce fetal fare karaciğerinde leptin ekspresyonu yapılırken ergin fare karaciğerinde ise leptin ekspresyonu yoktur. Bu ekspresyon farklılığı leptininin adipoz dokudan (besin alımının düzenlenmesi) bağımsız fonksiyonlarının olabileceğini düşündürmektedir (Hoggard ve diğ., 2000).

Karaciğer kesitlerinde leptin ve leptin reseptörü için lobun periferindeki hepatositlerde, merkezindekilerine göre immünohistokimyasal pozitif reaksiyon daha fazladır. Bu nedenle leptin ve leptin reseptörünün ekspresyonu açısından periferdeki hepatositlerin daha aktif olduğunu düşünmekteyiz. Diğer aşağı omurgalıların karaciğerleri ile yapılmış çalışmalarda böyle bir bulguya rastlamadık.

Leptin endokrin olduğu kadar otokrin ve parakrin olarak da etkisini gösterebilir (Ren, 2004). Buono ve Putti (2004), *Triturus cristatus carnifex* larvalarında leptin ve leptin reseptörünün aynı hücrede bulunması ile leptinin otokrin fonksiyon yapabileceğini, komşu hücrelerdeki leptin reseptörü aracılığı ile etkisini meydana getirdiği takdirde ise parakrin fonksiyonundan söz edilebileceğini belirtmişlerdir. Üreme dönemine göre prehibernasyon döneminde *Rana dybowsky*'nin yumurta kanalındaki stromal hücrelerde leptin reseptörünün, epitel hücrelerinde ise leptin ekspresyonunun artmış olduğu immünohistokimyasal olarak tespit edilmiştir. Böylece yumurta kanalında meydana gelen hipertrofinin, leptinin parakrin etkisi sonucu olduğu düşünülmüştür (Liu ve diğ., 2014). Genç *Xenopus laevis* kurbağasında leptin ve leptin reseptör ekspresyonunun mide, bağırsak gibi organlarda saptanması leptinin parakrin fonksiyonuyla, bu organlarda sadece leptin reseptörünün bulunmasının ise endokrin fonksiyonuyla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Crespi ve Denver, 2006). Çalışmamızda hepatositler ve safra kanalı epitel hücrelerinde hem leptin hem de leptin reseptörünü saptamamız bu hücrelerde leptinin, otokrin/parakrin etkisinin olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca sadece leptin reseptörünü saptadığımız melanomakrofaj, eritrosit ve arter duvarı düz kas hücrelerinde ise leptinin parakrin /endokrin etkisi söz konusudur.

Leptin etkisini hedef organ/dokudaki reseptörü aracılığı ile gerçekleştirir ve çeşitli hücre tiplerinde proliferatif etkiler gösterdiği saptanmıştır (Fantuzzi ve Faggioni, 2000). Leptinin *in vitro*'da gastrik mukoza hücrelerinde, normal kolorektal hücrelerde, akciğer epitel hücrelerinde, embriyonik hücrelerde, pankreatik hücrelerde ve karaciğer hücrelerinde proliferasyonu uyardığı gösterilmiştir (Takahashi ve diğ., 1997; Tanabe ve diğ., 1997; Tsuchiya ve diğ., 1999; Briscoe ve diğ., 2001; Hardwick ve diğ., 2001; Schneider ve diğ., 2001).

Leptinin *in vivo*'da proliferasyon etkisi ilk olarak yara dokusunda çalışılmıştır. Leptinin STAT3'ü aktive ederek keratinosit proliferasyonuna aracılık yaptığı saptanmıştır (Frank ve diğ., 2000). Fare keratinositleri leptin ve leptin reseptörü ekspresyonu yapmaktadır (Stallmeyer ve diğ., 2001; Murad ve diğ., 2003). İnsan epidermal keratinositleri kullanılarak yapılan *in vitro* çalışmalar leptinin, keratinositlerde mitojenik bir uyarı meydana getirdiğini göstermektedir (Frank ve diğ., 2000; Saxena ve diğ., 2004). *ob/ob* (leptini kodlayan gende mutasyon taşıyan) farelere sistemik (0.1, 1 ve 10 mg/kg/gün, intraperitoneal) ve topikal (1, 10 ve 30 µg/gün) olarak uygulanan leptinin, deride yara iyileşmesini hızlandırdığı görülürken *db/db* (reseptörü kodlayan gende mutasyon taşıyan) farede bu etki görülmemiştir. Bu çalışma leptinin etkisini reseptörü aracılığıyla yaptığının göstergesi olmuştur (Ring ve diğ., 2000). Benzer olarak diğer bir çalışmada Frank ve diğ. (2000) *ob/ob* farede sistemik (5µg/g vücut ağırlığı, günde 1) ve topikal (1µg/ yara/günde 2) uygulanan leptinin yarada yeniden epitelleşmeyi sağladığı rapor edilmiştir. Ayrıca kontrol farede de yara yerine az miktarda leptinin topikal olarak uygulanması da yara iyileşmesini hızlandırmıştır. Dinçer ve Gülen (2010), diyabetik sıçanlara sistemik ve topikal olarak leptin uygulamasının yara iyileşmesi üzerine olumlu etkisi olduğunu rapor etmişlerdir. Murad ve diğ. (2003) *in situ* hibridizasyon ve RT-PCR tekniği aracılığı ile farede iskemik yara dokusunda hipoksik koşullarda leptin mRNA ekspresyonunun hızlı bir şekilde arttığını ve iyileşme süresince artmış leptin gen ekspresyonunun sürdüğünü saptamışlardır. Yara yerinde leptinin nötralize edilmesiyle iyileşmenin belirgin bir şekilde engellendiği de saptanmıştır. Bu çalışma ile hasarlı deride leptinin lokal sentezinin yara iyileşmesinde otokrin/parakrin düzenleyici olarak önemli bir görev yaptığı ortaya çıkarılmıştır.

Hepatositler hücre siklusunun G₀ fazındadır (Overturf ve diğ., 1997; Farrell ve Fracp, 2004; Fausto ve Weber, 1994). Ancak karaciğer kütlesi kaybı ve hepatosellüler hasara karşı adaptif bir yanıt olarak karaciğer hücreleri çoğalabilirler (Michalopoulos ve DeFrances, 1997). Leptinin karaciğer rejenerasyonu üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Leclercq ve diğ. (2003) toksik karaciğer hasarı modelinde *ob/ob* farede yaptıkları çalışmada bozulmuş karaciğer rejenerasyonunun leptin eksikliğinden kaynaklı olduğu görülmüştür. *Ob/ob* farede görülen siklin D1 ekspresyonunun indirgenmesi, sitokin üretiminde değişim ve proliferatif yanıtın oluşmaması etkilerinin leptin enjeksiyonu (100 µg/kg vücut ağırlığı/ gün) sonucunda düzeldiği tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda toksik karaciğer hasar modelinde leptinin DNA sentezi ve hepatosit proliferasyonu için gerekli olduğu sonucuna varılmıştır. Fakat Leclercq ve diğ. (2006) *ob/ob* ve kontrol farelerde kısmi hepatektomi (PH %55) öncesi leptin uygulamasının (100 ve 250 µg/kg vücut ağırlığı, intraperitoneal) hepatosit proliferasyonunu uyarmadığını saptamışlardır. Bu bulguya benzer bir şekilde Shteyer ve diğ. (2004) PH öncesi yüksek doz leptin uygulaması (1mg/kg) yapılmış normal farelerde karaciğer rejenerasyonunun engellendiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu bireylerde leptinin hepatik yağ oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Hepatik yağ damlacıkları yapı materyali ve enerji olarak hızlı hücre bölünmesini desteklemek için gereklidir. Leptinin PH sonrası meydana gelen rejenerasyonda, karaciğer rejenerasyonunun anahtar faktörlerinden biri olan yağ oluşumunu engelleyerek proliferasyonu sekteye uğrattığı düşünülmektedir (Farrel ve Fracp, 2004).

Ayrıca *in vitro*'da insan karaciğer hücrelerinin 24 saat leptinin 0.01, 0.1 ve 0.3 nM dozlarına maruz kalmasının bu hücrelerde proliferasyonu uyardığı, 1 ve 10 nM leptin uygulamasının ise kontrole göre bir değişiklik meydana getirmediği belirtilmiştir (Briscoe ve diğ., 2001). Yapılan başka *in vitro* bir çalışmada ise *ob/ob* farelerden edinilmiş hepatositlerde 24 ve 48 saat boyunca leptin uygulamasının (100 ve 500 ng/ml) DNA sentezinde bir uyarılma meydana getirmediği saptanmıştır (Yang ve diğ., 2004b).

Yaptığımız hücre sayımı sonucu, bir gün ve beş gün leptin enjeksiyonu yapılan grupta, hem PBS hem de dokunulmamış kontrol gruplarına göre hepatosit sayısı anlamlı bir şekilde artmıştır. Bir gün ve beş gün leptin enjeksiyonu yapılan gruplar hepatosit sayısı bakımından birbirleriyle karşılaştırıldığında, beş gün leptin enjeksiyonu yapılan grupta

anlamli bir artiş saptanmıştır. *Pelophylax ridibundus* 'un hepatositleri leptin reseptörü taşıdığı için leptin hormonunun hedef yapılarıdır. Uyguladığımız doz (40 µg/100 µl/kurbağa) leptinin hepatositlerde proliferatif etki meydana getirdiğini ve bu etkinin hormonun uygulama süresi ile arttığını saptadık. Amfibilerde leptin uygulamasının yapıldığı bir çalışmada leptinin, erken prometamorfik *Xenopus laevis* larvalarında *in vivo* (2µg/50ml-7 gün, intraperitoneal) ve kültüre edilmiş arka bacaklarda yapılan (1 ve 10 ng/ml-2 gün) alışmada leptinin hücre proliferasyonunu uyararak, büyüme ve farklılaşmayı etkilediği saptanmıştır. Bu bulguya dayanarak erken gelişimde leptinin büyüme faktörü olarak iř gördüğu ileri sürölmektedir (Crespi ve Denver, 2006).

Melanomakrofajlar amfibi karaciğer parankimasında bulunan ve mononökleer fagositik sisteme dahil olduğu varsayılan önemli bir hücre popölasyonudur. Melanomakrofajların ana görevi yabancı maddeleri ve hücre degradasyonundan dolayı oluşan ürünleri fagositoz etmektir (Herraez ve Zapata, 1991; Meseguer ve diğ., 1994; Ravaglia ve Maggese, 1995). Kontrol ve leptin enjeksiyonu yapılan gruplarda sitoplazmalarındaki pigment içeriğinin yoğunluğundan dolayı bazı melanomakrofajlarda ve melanomakrofaj kümelerinde leptin reseptörünü saptayabildik. Melanomakrofajlardaki immünohistokimyasal boyanmanın görüntölenmesinin sitoplazmalarındaki pigment yoğunluğuna bağlı olduğu, fazla miktardaki melaninin immünohistokimyasal reaksiyonun görölebilirliğini engelleyebileceği belirtilmiştir (Vigliano ve diğ., 2006). Çalışmamız, melanomakrofajlarda leptin reseptörünün varlığına dair ilk veriyi oluşturmaktadır. Çeşitli canlı gruplarında mononökleer sisteme dahil olan diğer bazı hücrelerde leptin reseptörünün varlığı gösterilmiştir. İnsan alveolar makrofajlarında ve sıçan Kupffer hücrelerinde RT-PCR yöntemi ile leptin reseptörü tespit edilmiştir (İkejima ve diğ., 2002; Lugogo ve diğ., 2012). Lenfosit, doğal öldürücü (natural killer) hücreler, mast hücreleri, monosit/makrofajlar ve nötrofillerde leptin reseptörü tanımlanmıştır (Caldefie-Chezet ve diğ., 2001; Gabay ve diğ., 2001; Busso ve diğ., 2002; Tian ve diğ., 2002; Taideman ve diğ., 2009; Fernández-Riejos ve diğ., 2010). Ayrıca sıçan astrositleri de leptin reseptörü eksprese ederler (Hsuchou ve diğ., 2009).

Leptin immün sistem üzerinde çok çeşitli etkileri olan düzenleyici bir sitokindir. Leptin akut olarak enfeksiyonlarda ve inflamatuvar olaylarda artar (Fantuzzi ve Faggioni, 2000) ve konağı bu tür etkilerden korumayı hedefler. Leptin ve leptin eksikliği immün ve

inflamatuvar cevaplarda değişikliğe yol açar. Malnütrisyonlu sıçanlarda leptin seviyesi ve lenfoproliferatif cevapta azalma saptanmıştır (Siegmond ve diğ., 2002). Leptin eksikliği olan farelerde ise lenfoid organ atrofisi ve immün sistem bozukluklarının ortaya çıkabildiği belirtilmektedir. Beslenmesi bozulmuş deney hayvanlarına leptin uygulanması ile immün cevaptaki yetersizliğin ortadan kalktığı saptanmıştır (Howard ve diğ., 1999).

Leptinin, monosit/makrofajların ve lenfositlerin proliferasyonunu uyardığı tespit edilmiştir (Santoz-Alvarez ve diğ. 1999; Martın-Romero ve diğ., 2000). Leptin mononükleer hücreler üzerinde MAPK (mitojen-aktivite protein kinaz) ve PI3K (Fosfoditil inositol 3 kinaz) yolaklarını aktive etmektedir (Kellerer ve diğ., 1997). Her iki yol da bu hücrelerin proliferasyonunda rol oynamaktadır (Özbalcı ve Şahin, 2007). *In vitro*'da insan monositlerinde yapılan bir çalışmada leptin doza bağlı olarak proliferasyon meydana getirmiştir ve en yüksek etki 48 saat boyunca uygulanan 10 nM leptin dozunda görölmüştür (Santos-Alvarez ve diğ., 1999). Mürin makrofajların 24 saat leptin (10 nm/l) ile inkübasyonu sonucunda NADPH oksidaz aracılı bir proliferatif etki meydana geldiği saptanmıştır (Fortuño ve diğ., 2010).

Melanomakrofaj proliferasyonunun yaşılanma, açlık, hibernasyon ve bulaşıcı hastalıklar gibi doğal koşullarda meydana geldiği belirtilmiştir (Wolke, 1992; Barni ve diğ., 2002). Ayrıca çevresel kirliliğin melanomakrofajların sayısını ve melanin miktarını arttırması nedeniyle bazı araştırmacılar melanomakrofajları kirliliğin biyolojik bir göstergesi olarak da kabul etmektedirler (Wolke, 1992; Couillard ve Hodson, 1996; Stentiford ve diğ., 2003; Fenoglio ve diğ., 2005; Loumbourdis, 2007). Ayrıca balıkta kirlilik ile yapılmış bir çalışmada melanomakrofaj proliferasyonunun detoksifikasyon enzimlerinden olan sitokrom-P450 (CYP1A) uyarılması ile ilişkili olduğu da ileri sürölmektedir (Couillard ve Hodson, 1996).

Bir gün ve beş gün leptin enjeksiyonu yapılan grupta hem PBS hem de dokunulmamış kontrol gruplarına göre karaciğer kesitlerindeki pigmentli alan sayısının anlamlı bir şekilde arttığını saptadık. Melanomakrofajlar leptin reseptörü taşıyabilen hedef hücreler olmasından dolayı leptin enjeksiyonundan etkilenecek sayılarını arttırdığını düşünmekteyiz. Bir gün ve beş gün leptin enjeksiyonu yapılan gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında ise pigmentli alan sayısı bakımından beş gün leptin enjeksiyonlu

grupta anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Bu durum leptinin uygulama süresinin uzamasıyla pigmentli alan olarak adlandırdığımız tek ya da kümeler oluşturmuş melanomakrofajların artışı arasında belirgin bir ilişkinin olduğunu göstermektedir.

Bir gün ve beş gün leptin enjeksiyonu yapılan gruplarda hem PBS hem de dokunulmamış kontrol gruplarına göre karaciğer kesitlerindeki pigmentli yüzey alanı açısından anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır. Yapılmış çalışmalarda düşük sıcaklıkta, düşük oksijen düzeyinde ve ağır metal uygulamalarına maruz bırakılmış kurbağalarda melanomakrofaj alanı artışı gözlemlenmiştir (Barni ve diğ., 1999; Frangioni ve diğ., 2000; Loumbourdis ve Vogiatzis, 2002; Fenoglio ve diğ., 2005). Loumbourdis (2005) yaptığı bir çalışmada kurbağaların (*Rana ridibunda*) yaşadığı suya (4,10 ve 30 gün) 200 mg/L dozunda kadmiyum uygulaması sonucunda karaciğer kesitlerinde 4 günlük grupta bir değişiklik gözlenmezken 10 günlük grupta melanomakrofajların kapladığı alanın arttığı ve 30 günlük grupta ise diğer gruplara göre en fazla olduğu görülmüştür. Çalışmamızda, bir gün ve beş gün leptin enjeksiyonu yapılan gruplar birbirleriyle pigmentli yüzey alanı açısından karşılaştırıldığında ise beş gün leptin enjeksiyonlu grupta anlamlı bir artış saptadık. Hibernasyon periyodunda kurbağa karaciğerinde pigmentli yüzey alanı artışının melanogenez, hipertrofi ve hiperplazi gibi farklı mekanizmalar ile meydana geldiği belirtilmiştir (Barni ve diğ., 1997). Hem pigmentli yüzey alanı hem de pigmentli alan sayısı artışı gördüğümüz beş günlük deney grubumuzda melanomakrofajların hem mitozla hem de biraraya gelerek melanomakrofaj kümelerini oluşturduğunu düşünmekteyiz. Bu durumun melanomakrofajları uyaran etkene (soğuk, çevresel kirleticiler v.b.) maruz kalma süresi ile ilişkili olduğu görülmektedir.

Histolojik incelemelerimiz sonunda beş gün leptin enjeksiyonu yapılan grubun bireylerinde baskın olarak melanomakrofaj kümelerini gözledik. Melanomakrofajların küme oluşturmaya meyilli hücreler olduğu belirtilmiştir (Rund ve diğ., 1998). Ancak melanomakrofaj kümelerinin önemi tam olarak bilinmemektedir. Bazı yazarlar melanomakrofaj kümelerinin aktif makrofaj agregatlarından oluştuğunu düşünmektedirler. Ayrıca bireysel makrofajların yuttukları materyalleri yıkım, detoksifikasyon ve geri dönüşüm işlemleri için melanomakrofaj kümelerine taşıdıklarını da öne sürmektedirler (Zapata ve Amemiya, 2000). Herraiez ve Zapata (1986) tarafından

Carassius auratus balığının dalak ve böbreğindeki bireysel melanomakrofajların atretik hücrelere göç ederek fagositoz ve rezorbsiyona katkı sağladıktan sonra fagositoz artıklarını biriktirerek melanomakrofaj kümelerini oluşturdıkları belirtilmiştir. Rabitto ve diğ. (2005) ise melanomakrofaj kümeleşmesinin artışının yoğun fagositoz aktivitesini yansıttığı belirtilmektedir. Leptinin fagositozu düzenlediğine dair çalışmalar vardır. Kemik iliği kökenli makrofajlarda leptin fagositik fonksiyonu kuvvetlendirirken, *fa/fa* (reseptörü kodlayan gende mutasyon taşıyan) sıçanlarda Kupffer hücrelerinin fagositik fonksiyonlarının bozuk olduğu tespit edilmiştir (Gainsford ve diğ., 1996; Yang ve diğ., 1997). *Ob/ob* farelerde yapılan bir çalışmada makrofajların tam olarak fagositoz yapamadıkları ve leptin uygulaması ile bu durumun normale döndüğü gösterilmiştir (Loffreda ve diğ., 1998).

Oksidatif aktivite sonucu yapısı değişikliğe uğramış protein ve lipit degradasyon artıkları lipofuskini oluşturur (Terman ve Brunk, 2004). Balık karaciğerinin melanomakrofaj kümelerinde bol miktarda lipofuskin bulunur ve bu onun yüksek fagositik aktivitesini gösterir (Bruslé ve diğ., 1996; Ribeiro ve diğ., 2011). Lipofuskin çoğu araştırmacı tarafından lipit peroksidasyonu indikatörü olarak kullanılır (Cotran ve diğ., 1994) ve PAS ile pozitif reaksiyon verir (Ravaglia ve Maggese, 1995; Bruslé ve diğ., 1996; Terman ve Brunk, 2004). Çalışmamızda bir gün leptin enjeksiyonu yapılan grubun melanomakrofajlarında kontrole göre daha sık PAS pozitif reaksiyon gözledik. Fakat beş gün leptin enjeksiyonu yapılan grubun melanomakrofaj kümelerindeki PAS pozitif yaygınlığı, kontrol gruplarına ve bir gün leptin enjeksiyonlu gruba göre daha fazladır. *Hoplias malabaricus* balığının karaciğer ve böbreği ile *Carassius auratus* (Japon balığı) balığının dalak ve böbreğindeki melanomakrofaj kümelerinde PAS pozitif reaksiyon tespit edilmiştir (Herraez ve Zapata, 1986; Rabitto ve diğ., 2005). Benzer olarak *Lyciasalamandra arikani* (Urodela) melanomakrofaj kümelerinin de PAS pozitif reaksiyon verdiği gösterilmiştir (Akat ve Göçmen, 2014). Leptinin nötrofil, monosit, endotel ve keratinositlerde oksidatif strese neden olduğu belirtilmektedir (Bouloumié ve diğ., 1999; Caldefie-Chezet ve diğ., 2001; Yamagishi ve diğ., 2001; Maingrette ve Renier, 2003; Savini ve diğ., 2003). Fareye 5 gün boyunca intraperitoneal leptin (40 µg/fare) enjeksiyonu sonucunda leptinin beyinde glutatyon seviyesini azalttığı lipid peroksidasyonu göstergesi olan lipid hidroperoksit seviyesinin ise artmış olduğu tespit edilmiştir. Bu durumunun altındaki mekanizma bilinmemekle beraber leptinin

oksidatif stresi arttırarak bu sonucu oluşturduğu ileri sürülmüştür (Kutlu ve diğ., 2005). Couillard ve Hodson (1996) balıkta yaptıkları çalışmada toksisiteye cevap olarak karaciğer, dalak ve böbrekteki melanomakrofaj kümelerindeki lipofuskinin arttığını ve CYP1A indüksiyonunun meydana geldiğini saptamışlardır. Araştırmacılar CYP1A uyarılmasının hücrel membranlarda oksidatif hasar meydana getirdiği ve bununla birlikte hücre ölümünün artmasıyla bağlantılı olarak melanomakrofajlarda lipofuskininin arttığına dair bir hipotez öne sürmüşlerdir. CYP1A çoğu ekzojen ve endojen kimyasalların biyotransformasyonunda görevli olan detoksifikasyon enzimlerindendir (Passantino ve diğ., 2014). CYP1A uyarılmasının serbest radikal oluşumuna neden olarak oksidatif hasar meydana getirdiği saptanmıştır (Stegeman ve Hahn, 1994). Sıçan ve fareye 15 gün boyunca uygulanan leptin (100 µg)'in karaciğer mikrozomlarında CYP1A aktivitesini arttırdığına dair çalışmalar bulunmaktadır (Watson ve diğ., 1999; Hebeishy ve Mazen, 2008). Bir gün leptin enjeksiyonlu bireylerde bazı damarların etrafındaki az sayıda hepatositin dejenere olduğunu gördük. Beş gün leptin enjeksiyonlu grubun bireylerinde ise çok sayıda eozinofilik sitoplazmalı hepatositlerin bulunduğunu saptadık. Hasarlı hücreler eozinofilik boyanma özelliği gösterebilmektedir (Kumar ve diğ., 2013). Ayrıca seyrek olarak bu gruba ait karaciğer kesitlerinin bazı alanlarında melanomakrofajların, bozulmuş görünüme sahip, hücrel bütünlüğünü kaybetmiş hücre topluluğunu çevrelediği fagositoz alanlarına rastladık. Çalışmamızda, bir gün leptin enjeksiyonu yapılan gruba göre beş gün leptin enjeksiyonu yapılan grubun melanomakrofaj kümelerinde saptadığımız artmış PAS pozitif reaksiyonun, bu hücrelerdeki yüksek artmış fagositik aktiviteyi yansıttığını düşünmekteyiz. Leptinin uygulama süresinin uzamasının, oksidatif strese neden olarak lipid peroksidasyonunu arttırması ile bu grubun melanomakrofajlarının fagositik aktivitesi artmış olabilir. Ayrıca leptin enjeksiyonlu gruplarımızda melaninin arttığını da belirledik. Yapılan çalışmalarda melanin içeriğinin mevsimsel değişikliğe, oksijen düzeyine ve ksenobiyotik uygulanmasına göre değiştiği de görülmüştür (Barni ve diğ., 1999; Frangioni ve diğ., 2000; Barni ve diğ., 2002; Loumbourdis ve Vogiatzis, 2002; Fenoglio ve diğ., 2005). Ayrıca melaninin önemli bir radikal kovucu olduğu (Bustamante ve diğ., 1993) ve spontan ya da indüklenmiş lipoperoksidasyona karşı karaciğer dokusunu koruyabildiği rapor edilmiştir (Geremia ve diğ., 1989; Scalia ve diğ., 1990; Barni ve diğ., 2002; Fenoglio ve diğ., 2005). Pigmentli melanomakrofaj içeren *Xenopus* karaciğerinin, pigmentless albino karaciğerine göre lipid

peroksidasyonuna karşı daha dirençli olduğu tespit edilmiştir (Corsaro ve diğ., 1995). Melanomakrofajlardaki melanin artışının bu hücreleri oksidatif strese karşı koruyabileceği de öne sürülmüştür (Loumbourdis, 2007). Endoterm canlılarda, ektoterm canlılara göre glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin daha aktif olduğu Venditti ve diğ. (1999) tarafından saptanmıştır. Bu nedenle amfibilerdeki antioksidan işlevi olan melanin pigmentinin endotermik canlılardaki antioksidan koruma sistemine alternatif olarak görüldüğü belirtilmektedir (Fenoglio ve diğ., 2005). α -MSH (alfa-melanosit uyarıcı hormon) ektoterm omurgalılarda pigmentasyonu düzenleyen bir hormondur (Bagnara ve Matsumoto, 2006). Guida ve diğ. (2004) *Rana esculenta* karaciğerinin melanomakrofajlarıyla *in vitro*'da yapılan bir çalışmada α -MSH'nin bu hücrelerde tirozinaz aktivitesini arttırdığı saptanmıştır. İştah ile ilgili yapılmış bir çalışmada ise sıçan ve fare hipotalamusunda leptinin α -MSH'yi arttırdığı tespit edilmiştir (Kim ve diğ., 2000; Guo ve diğ., 2004). Aşağı omurgalılarda ise leptinin α -MSH'yi veya tirozinaz aktivitesini arttırdığına dair bir çalışma bulunmamaktadır. Kontrole göre leptin enjeksiyonlu gruplardaki melanin artışının bu hücrelerdeki koruyucu fonksiyona hizmet ettiğini düşünmekteyiz.

Leptin enjeksiyonu yapılan her iki deney grubunda kontrol grubuna kıyasla hepatositlerin lipit ve glikojen içerikleri azalmıştır. Leptin, yağ ve karbonhidrat metabolizmasında kuvvetli etkilere sahiptir. Leptinin adipoz dokuda otokrin/parakrin olarak lipolitik etkisini gösterdiği *in vitro* çalışmalar vardır (Frühbeck ve diğ., 1997; Siegrist-Kaiser ve diğ., 1997). Fare adipositlerinde yapılan bir çalışmada üç farklı leptin dozunun (0.1, 1 ve 10 mg/kg vücut ağırlığı) kontrol, *ob/ob* ve *db/db* farelere enjeksiyonundan sonra izole edilen adipositlerin lipolitik hızları ölçülmüştür. Leptin uygulamasının *db/db* farede hiçbir değişikliğe neden olmadığı *ob/ob* ve kontrol farelerde ise doza bağlı olarak bazal lipolitik aktivitede artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak obez farelerde leptin reseptörünün kuvvetli artan düzenlenmesinden (up regülasyon) dolayı leptine karşı daha duyarlı oldukları belirtilmiştir (Frühbeck ve diğ., 1998). Ayrıca *Ctenopharyngodon idellus* balığında yağlı dejenerasyona uğramış hepatositlerde leptinin lipoliz ile ilgili genleri uyararak ve adipogenez genlerini ise azalan düzenlenme(down regülasyon) şeklinde etkilediği tespit edilmiştir (Lu ve diğ., 2012). de Pedro ve diğ. (2006) *Carassius auratus* (Japon balığı)'a 10 gün 1µg/g leptinin intraperitoneal enjeksiyonunun hepatik ve kas glikojenini

arttırdığını saptamışlardır. Ayrıca plazma glikoz ve trigliserit düzeyleri düşmüş, karaciğerde lipit miktarı azalırken kasta değişiklik gözlenmemiştir. Benzer olarak *Lepomis cyanellus* balığında leptin enjeksiyonuna cevap olarak lipolizde artış gözlemlenmiştir (Londrville ve Duval, 2002). Cohen ve diğ. (1998) *ob/ob* ve kontrol farelere günde iki kere 5 gün boyunca 0,5 mg/kg deri altına leptin enjeksiyonu (kronik uygulama) yapılması sonucunda karaciğerde glukoneogenez aracılığıyla glikoz sentezinin arttığını yağ asidi sentezinin de azaldığını saptamışlardır. Aynı zamanda akut olarak *in vitro*'da da çalışılmış ve benzer sonuçlar alınmıştır. Ancak kronik uygulamanın daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Burcelin ve diğ. (1999) *ob/ob* farelere 40 ng/g leptinin femoral vene 6 saat infüzyonu sonucunda glukoz-6-fosfataz aktivitesinin artarak hepatik glikoz üretimini uyardığını saptamışlardır. Fakat hepatik lipit metabolizmasında bir değişiklik gözlenmemiştir. Hem obez hem kontrol farelerin periton boşluğuna 7 gün leptin uygulanması sonucu *ob/ob* farelerde karaciğerde glikojen ve lipit miktarlarında azalma görülürken kontrol farelerde bir değişiklik gözlenmemiştir (Harris ve diğ., 1998). Farede ven (1 µg/h) ve beyine (5 ng/h) leptin infüzyonu sonucunda plazma glikoz seviyesinin değişmemesine rağmen iskelet kası ve kahverengi yağ dokusunda glikoz alımı ve oksidasyonunun arttığı saptanmıştır. Karaciğer glikojen içeriğinde de periferel dokulara glikoz sağlamak için önemli miktarda azalma bulunmuştur (Kamohara ve diğ., 1997). Yukarıda bahsedilen çalışmalar, leptinin karaciğer glikojen metabolizması üzerindeki *in vivo* etkilerinin tam olarak anlaşılamadığını göstermektedir. Çünkü hem uyarıcı (glikojenin tükenmesi) hem de inhibe edici (glikojenin artması) etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur (O'doherty ve diğ., 1999). Çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla bir gün leptin enjeksiyonlu grupta daha az, beş gün leptin enjeksiyonlu grupta daha fazla olmak üzere hepatositlerdeki PAS pozitifliğinin azaldığını saptadık. Benzer olarak *Podarcis sicula*'ya 0,1 µg/100µl leptinin intraperitoneal enjeksiyonu sonucunda hepatositlerdeki depo glikojenin azaldığı PAS reaksiyonu ile saptanmıştır (Paolucci ve diğ., 2006). Yapılan diğer bir çalışmada *Rainbow trout* balığına intraserebroventriküler leptin enjeksiyonunun (0,3 µg/ml-30 µg/ml) doza bağlı olarak (30 µg/ml) hepatik glikojen düzeyinde bir azalmaya ve plazma glikoz seviyesinde ise bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Deneyin sonunda hepatik glikogenolitik yolun uyarılmasının artmış sempatik aktiviteyle ilgili olduğu düşünülmüştür (Aguilar ve diğ., 2010).

Leptinin protein sentezini etkilediği çalışmalar da bulunmaktadır. Sıçan glomerüler mezengial hücrelerinde *in vitro*'da yapılmış bir çalışmada leptinin (60 nM) 24 saat boyunca uygulanması sonucunda protein sentezinin arttığı saptanmıştır (Lee ve diğ., 2005). *In vitro*'da trofoblast hücre soyu ve plasenta eksplantlarında da leptinin 4 saat uygulanması protein sentezini arttırmıştır (Pérez-Pérez ve diğ., 2009; Pérez-Pérez ve diğ., 2010). *In vitro* yapılan başka bir çalışmada vasküler düz kas hücrelerine leptin (3.1 nM) uygulamasının bu hücrelerde protein sentezini arttırdığı tespit edilmiştir (Zeidan ve diğ., 2005). Ayrıca tavuk embriyonik kas ve karaciğer hücrelerinde yapılan bir çalışmada leptin kasta protein sentezini ve proliferasyonu uyarıcı etki yaparken, hepatositlerde protein sentezini inhibe edici bir etki oluşturmuştur (Lamošová ve Zeman, 2001). Bir gün ve beş gün leptin enjeksiyonu yapılan gruplarda kontrol grubuna göre hepatositler artmış protein içeriği nedeniyle BPB ile daha koyu bir reaksiyon vermektedirler. Mitoz sonrası hücrelerde normal hacim ve boyutlarına ulaşabilmek için protein sentez edilir (Gartner ve diğ., 2011). Bu nedenle leptin enjeksiyonlu gruplarımızdaki artmış hepatosit sayısı ile artmış protein miktarı uyumlu görülmektedir.

Bir gün leptin enjeksiyonu yapılan grubun karaciğer dokusunda yer yer sinüzoidlerde genişleme görülmektedir. Beş gün enjeksiyonlu grubun bireylerinde ise bazı alanlarda sinüzoid genişlemesi vardır. Fareye leptin (230 µg/kg vücut ağırlığı) enjeksiyonu ile karaciğerde sinüzoidal genişleme ve bazı alanlarda dejenere olmuş hepatositler görülürken, merkezi ven etrafındaki hepatositlerin normal olduğu tespit edilmiştir. (Balasubramaniyan ve diğ., 2006a, b). Ancak leptin uygulanması ile sinüzoid genişlemesi arasındaki ilişki için bir yorum yapılmamıştır. Yapılan başka bir çalışmada ise fareye intraperitoneal leptin enjeksiyonunun (1 µg/g vücut ağırlığı) karaciğer histolojisinde herhangi bir değişiklik meydana getirmediği görülmüştür (İkejima ve diğ., 2001).

Kontrol grubu kurbağaların karaciğerinde leptin ve leptin reseptör antikoru ile yaptığımız immünohistokimyasal boyama sonucunda safra kanalı epitel hücrelerinde leptin ve leptin reseptör immünoreaktivitesi saptadık. Pfundt ve diğ. (2009), balık (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğerinde safra kanalı epitel hücrelerinde immünohistokimyasal olarak leptin ve leptin reseptörü immünoreaktivitesini göstermişlerdir. Diğer bir çalışmada deve (Camelus dromedarius) safra kanalında

leptin ve leptin reseptörü ekspresyonu in situ hibridizasyon yöntemi ve immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir (Sayed-Ahmed ve Bartha, 2005). *In vitro* olarak normal ve malignant insan safra kanalı epitel hücrelerinde leptin ve leptin reseptörü ekspresyonu, RT-PCR yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Leptinin malignant safra kanalı hücrelerinin proliferasyonunu, büyümesini ve migrasyonunu uyardığı tespit edilmiştir (Fava ve diğ., 2008). Bir gün ve beş gün leptin enjeksiyonu yapılan grubun bireylerinde safra kanallarını döşeyen epitelde leptin reseptörü immünoaktivitesinin kontrole göre fazla olduğunu, fakat leptin immünoaktivitesinin bulunmadığını saptadık. Çalışmamızda dışarıdan verilen leptinin kanal epitel hücrelerinde leptin ekspresyonunu baskıladığını, leptin reseptör ekspresyonunda ise artış meydana getirdiğini saptadık. Yapılan histolojik gözlemler sonucunda ise bir gün ve beş gün leptin enjeksiyonu yapılan deney gruplarında safra kanalı epitel yüksekliğinin azaldığını belirledik. Ayrıca BPB ile boyanmış kesitlerde leptinin safra kanalı epitel hücrelerinin protein içeriği üzerine negatif etkisi olduğu görülmektedir. Bir gün leptin enjeksiyonu safra kanal epitelinin protein içeriğini azaltırken, beş gün leptin enjeksiyonlu grupta BFB ile reaksiyon görülmemektedir. Safra kanal epitelinde meydana gelen bu değişiklikler leptin reseptörü taşıyan bu hücrelerde doz ve uygulama süresine bağlı olarak leptinin negatif etkisini göstermektedir ve safra kanallarının yapısal bütünlüğünü olumsuz etkilemektedir.

Çalışmamızda arter duvarındaki düz kas hücrelerinde leptin reseptör pozitif reaksiyon saptadık. Ancak leptin enjeksiyonlu bireylerde immünohistokimyasal reaksiyon şiddetinde ya da morfolojik açıdan bir değişiklik gözlemedik. Oda ve diğ. (2001) sıçan vasküler düz kas hücrelerinde immünoiblot analizi ile ilk defa leptin reseptörünü tespit etmişlerdir. İnsanlarda da leptinin venlerde ve arterlerdeki düz kasta vazodilatör etki meydana getirdiği tespit edilmiştir. Bu etkinin düz kas hiperpolarizasyonu ile meydana geldiği bildirilmiştir (Momin ve diğ., 2006). Ayrıca leptinin vasküler düz kas hücrelerinde angiotensin II uyarımlı sitozolik kalsiyum artışını inhibe ettiği tespit edilmiştir (Fortuño ve diğ., 2002; Rodríguez ve diğ., 2006). Diğer bir çalışmada sıçan vasküler düz kas hücrelerine 30 dakika boyunca leptin (10 nmol/litre) uygulanması sonucunda, leptinin angiotensin II uyarımlı kontraktıl etkiyi baskılamasının nitrik oksit bağımlı bir mekanizma ile meydana getirdiği saptanmıştır (Rodríguez ve diğ., 2007).

Çalışmamızda kontrol karaciğerinde leptin reseptör pozitif reaksiyon gösteren eritrositler tespit ettik. Reaksiyonun şiddeti leptin enjeksiyonlu gruplarda kontrole göre biraz fazla gözükmetedir. Yapılmış bir çalışmada insan eritrositlerinde FITC (Fluorescein isothiocyanate) ile işaretlenmiş olan leptinin eritrosit yüzeyine bağlandığı tespit edilmiştir. Ancak bu yöntem ile eritrositlerin leptin reseptörünü içerip içermediği kesinlik kazanmamıştır (Konstantinou-Tegou ve diğ., 2001). Leptinin eritrositler üzerinde etkisini gösteren çalışmalar vardır. İnsan eritrositlerinde leptinin (18 ng/ml) hücre içi pH'sını ve $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ değiştiricisi aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir (Konstantinou-Tegou ve diğ., 2001). Ayrıca leptinin eritrositlerde membran akıcılığını arttırarak eritrositlerin şekil değiştirme yeteneğini düzenlediği saptanmıştır (Tsuda 2002).

Leptin karaciğer fibrozisinin gelişiminde bir aracı olarak tespit edilmiştir ve profibrojenik hormon olarak bilinir. Hepatik fibrozis kronik karaciğer hasarına karşı bir cevap olarak görülür ve ekstrasellüler matriks bileşenlerinin aşırı birikimi ile karakterize edilir (Friedman, 1993). Leclercq ve diğ. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada steatohepatitis (yağlı karaciğer) sırasında meydana gelen fibrozis gelişiminde leptinin karaciğer üzerinde profibrojenik etkisinin olduğu ortaya çıkarılmıştır. Diyetle steatohepatitis oluşturulmuş *ob/ob* fare karaciğerinde hepatik fibrozis gelişimi başarısız olmuştur. Diyetle steatohepatitis oluşturulmuş ve leptin uygulaması yapılan *ob/ob* farelerde ise fibrozis gelişimi meydana gelmiştir. Kontrol bireylerde yağlı diyetli grupta meydana gelen fibrozis leptin enjeksiyonu ile daha da artmıştır

Hepatik stellat hücreleri (HSC) fibrozis gelişimi sırasında ekstrasellüler matriksin üretiminin yapıldığı ana yerdir (Friedman ve diğ., 1985). HSC'ler disse alanında bulunur. Bu hücreler multifonksiyoneldir. Hepatositler ile birlikte vitamin A'nın metabolizması ve depolanmasında görev alır. Ayrıca bu hücreler perisinüzoidal ekstrasellüler matriks bileşenlerinin sentezi, salınması ve yıkımından sorumludur (Arias ve diğ., 2009). İnsan HSC'leri leptin reseptörü eksprese etmektedirler (Aleffi ve diğ., 2005). Bu hücreler alkolik siroz gibi karaciğer hasarını takiben retinoid deposunu kaybederek miyofibroblast benzeri hücelere farklılaşırlar ve leptin ekspresyonu yapabilirler. Uyarılmamış stellat hücreleri ise leptin ekspresyonu yapmazlar (Potter ve diğ., 1998). Leptinin in vitroda aktive edilmiş hepatik stellat hücrelerinde kollagen

sentezini ve oksidatif stresi arttırdığı tespit edilmiştir Cao ve diğ., 2006). Diğer bazı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda da leptinin doza bağlı olarak oksidatif stres artışı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bouloumié ve diğ., 1999; Maingrette ve Renier, 2003; Beltowski ve diğ., 2004). Oksidatif stresin HSC'leri ve fibroblastları uyarak kollagen sentezini arttırdığı rapor edilmiştir (Lee ve diğ., 1995; Montosi ve diğ., 1998). *İn vitro*' da sıçan HSC'lerinde yapılan bir çalışmada, leptinin profibrogenik etkisini Kupffer hücresi aracılı bir mekanizma ile meydana getirdiği saptanmıştır. HSC'lerin sadece leptin ile inkübasyonu ise HSC aktivasyonunu sağlamamıştır (Wang ve diğ., 2009). Çalışmamızda bir gün ve beş gün leptin enjeksiyonu yapılan grubun damarlar ve safra kanalını çevreleyen bağ dokusu içeriğinde artış gözlenmiştir. Bu artış hormonun uygulama süresinin uzaması ile değişmemiştir. *Pelophyplax ridibundus* karaciğerinde leptinin oksidatif stresi artırarak ya da melanomakrofaj aracılı fibrozis oluşturmuş olabileceğini söyleyebiliriz.

Leptinin sentez ve sekresyonunun nasıl düzenlendiği yeteri kadar bilinmemektedir. Ancak memelilerde vücut yağ miktarı ve vücut kitle indeksi (Frederich ve diğ., 1995; Maffei ve diğ., 1995; Considine ve diğ., 1996; Sinha ve diğ., 1996), leptinin plazmadaki düzeyinden sorumlu ana faktör iken yaş, cinsiyet, diurnal varyasyon, hormonlar ve sitokinlerin de etkili olduğuna dair çalışmalar vardır (Castracane ve Henson., 2006; Gültürk ve İmir, 2006). İnsülin, glukokortikoidler, östrojen yağ dokusundan leptin üretimini arttırırken, androjenler, noadrenalin, somatotropin ise azaltan hormonlardır (Blum ve diğ., 1997; Ergün, 1999; Machinal ve diğ., 1999). Aşağı omurgalılarda karaciğerde leptinin sentez ve sekresyonunun düzenlenmesi ile ilgili az sayıda çalışma vardır. Sazan balığının (*Cyprinus carpio*) 6 haftalık açlık sonunda ya da beslenmesi ile hepatik leptin mRNA ekspresyonunda bir değişiklik meydana gelmediği saptanmıştır (Huisin ve diğ., 2006). *Salverinus alpinus* (alabalık) türü balığında ise açlık, hepatik leptin ekspresyonunu arttırmıştır (Frøiland ve diğ., 2012).

Çalışmamızda bir gün ve beş gün leptin enjeksiyonu yapılan grupta hem PBS hem de dokunulmamış kontrol gruplarına göre leptin immünoreaktivitesi perifer ve merkezde anlamlı bir şekilde azalmıştır. Leptinin kendi ekspresyonunu negatif geri bildirim mekanizması ile düzenlediğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Wang ve diğ., 1999; Zhang ve diğ., 1997; Dunn ve diğ., 2005). Sıçanda intraserebroventriküler leptin

infüzyonu (1.5 µg/4saat) ile plazma leptin seviyesinin artması sonucunda leptinin adipoz dokuda negatif geri bildirim ile kendi mRNA ekspresyonunu baskıladığını, oysa normalde *ob* gen ekspresyonu yapmayan iskelet kasında ise leptin ekspresyonunu uyardığını RT-PCR yöntemi ile saptamışlardır. *fa/fa* sıçanlarda ise bu geri bildirimin gerçekleşmediği görülmüştür. Bu çalışma ile leptinin reseptör aracılı ve dokuya spesifik otoregülasyon gösterdiği belirtilmektedir (Wang ve diğ., 1999). Diğer bir çalışmada farede leptinin geri bildirim mekanizmasında norepinefrinin rolü araştırılmıştır. Norepinefrin sentezinde görev yapan dopamin beta hidroksilaz enzimini kodlayan genden yoksun (*Dbh*^{-/-}) bireylere ve kontrol bireylere iki gün leptin (7.5 mg/g bw/gün) enjeksiyonu sonucunda kontrol bireylerde epididimal beyaz yağ dokusunda leptin mRNA miktarında indirgenme meydana gelirken, *Dbh*^{-/-} bireylerde ekzojen leptin uygulamasının leptin mRNA miktarında bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Deney sonunda leptinin norepinefrin ile leptin reseptörünü içeren ortak bir mekanizma ile kendi ekspresyonunu düzenlediğini saptamışlardır (Commins ve diğ., 1999). Bir gün ve beş gün leptin enjeksiyonu yapılan gruplarda leptin immünoreaktivitesi açısından perifer ve merkezi kısımlar kendi aralarında birbirleri ile karşılaştırıldıklarında, beş gün leptin enjeksiyonu yapılan grupta leptin baskılamasının bir gün leptin enjeksiyonu yapılan gruba göre daha az olduğunu saptadık. Bu durumun hormonun uygulama süresinin uzamasına rağmen (reseptör aracılı meydana gelen) leptin düzenlenmesinin leptin reseptörünün düzeyi ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Bir gün leptin enjeksiyonu yapılan grupta hem PBS hem de dokunulmamış kontrol gruplarına göre leptin reseptör immünoreaktivitesinin perifer ve merkezde anlamlı bir şekilde arttığını saptadık. Beş gün leptin enjeksiyonu yapılan grupta ise hem PBS hem de dokunulmamış kontrol gruplarına göre leptin reseptör immünoreaktivitesinde perifer ve merkezde anlamlı bir azalma tespit ettik. Leptinin reseptör ekspresyonu üzerine etkisi artan düzenlenme veya azalan düzenlenme şeklinde olabilmektedir. Yorio ve diğ. (2008) sıçanlara kısa süreli (5 µg-5 gün) ve uzun süreli (3 µg-22 gün) leptin enjeksiyonu ile çeşitli dokulardaki leptin reseptör ekspresyonunu Western blot analizi ile saptamışlardır. Uzun süreli leptin enjeksiyonunun ovaryum, hipotalamus ve hipofiz dokularında leptin reseptör ekspresyonunda bir değişiklik meydana getirmediğini, kısa süreli leptin enjeksiyonunun ise ovaryumda leptin reseptör ekspresyonunu arttırdığı, hipotalamus ve hipofizde ise bir değişiklik olmadığını belirtmektedirler. Cohen ve diğ.

(2005) fareye leptin uygulanmasının (60 µg/2 gün boyunca) karaciğer leptin reseptör mRNA'sı ile plazma çözünür leptin reseptörünü arttırdığı görülmüştür. Uzun süre ile yüksek doz hormon uygulanmasının reseptör yapımını baskıladığına dair bilgiler bulunmaktadır. Baskin ve diğ. (1998)'nin *ob/ob* farede yapmış oldukları bir çalışmada sistemik olarak (intraperitoneal) leptin uygulanmasının (150 µg/5 gün enjeksiyon) arkuat nukleusta reseptör ekspresyonunu azalttığı görülmüştür. Obez fare arkuat nukleusunda yapılan başka bir çalışmada intraperitoneal olarak 7 gün boyunca günde iki kez (1,25 µg/g vücut ağırlığı) ve beş gün boyunca günde bir kez leptin enjeksiyonu (2 µg/g vücut ağırlığı) sonucunda leptin reseptörü ekspresyonunda bir azalma meydana geldiği saptanmıştır. Bu indirgenmenin 7 günlük enjeksiyonda daha fazla olduğu gözlenmiştir. Tek doz leptin enjeksiyonunun (1,25 µg/g vücut ağırlığı) uygulamasından 5 saat sonra ise leptin reseptör ekspresyonunda bir değişiklik meydana gelmediği belirtilmiştir (Mercer ve diğ., 1997). Uzun süreli (28 gün) leptin infüzyonu (subkutan olarak pompa ile) (düşük (0,1 mg/kg/gün) ve yüksek doz (0,5 mg/kg/gün) leptin) uygulanması sonucunda sıçanlarda leptine karşı bir direnç geliştiği ve hipotalamik leptin reseptör mRNA ekspresyonunun her iki grupta da azalan düzenlenme şeklinde olduğu saptanmıştır. Leptin direncinin reseptörün azalan düzenlenmesi ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (Martín-Romero ve diğ., 2000). Hikita ve diğ. (2000) de hiperleptinemi durumunun reseptör mRNA ekspresyonunu baskıladığını bildirmişlerdir. Leptinin kendi reseptör ekspresyonu üzerinde regülatör etkisinin uygulama süresi, doz ve dokuya bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Ayrıca hayvanların fizyolojik durumlarının da bu olayda etkili olduğu belirtilmiştir (Smolinska ve diğ., 2007).

Çalışmamızda *Pelophylax ridibundus*'un hepatositlerinde ve safra kanalı epitelinde leptin immünoreaktivitesi, hepatositler, bazı melanomakrofajlar, safra kanalı epitel hücreleri, eritrositler ve arter duvarındaki düz kasta leptin reseptör immünoreaktivitesi saptadık. Dışarıdan uygulanan leptinin, leptin reseptörü taşıyan hücreleri etkileyebildiğini, hepatosit ve pigmentli alan sayısı ile pigmentli yüzey alanında artış, safra kanalı epitel hücrelerinin yüksekliğinin azalması, hepatositlerde glikojen ve lipid içeriğinin azalması ile protein içeriğinin artması şeklinde gözledik. Safra kanalı epitelinin yüksekliğinin ve protein içeriğinin azalması, fibrozis ve eozinofilik hepatositlerin gözlenmesi leptin uygulamasının doz/süresine bağlı olarak meydana gelen olumsuz etkilerdir. Bir gün leptin enjeksiyonu hepatositlerdeki leptini baskımlarken,

leptin reseptöründe artışa neden olmuştur. Beş gün leptin enjeksiyonunun ise hepatositlerdeki leptini bir gün leptin enjeksiyonuna göre daha az baskılayabildiğini, leptin reseptöründe ise azalmaya neden olduğunu saptadık. Leptin uygulaması, safra kanalı epitelinde ise leptini baskılarken, leptin reseptöründe artışa sebep olmuştur.

Sonuç olarak, ergin *Pelophylax ridibundus* karaciğerinde yaygın olarak leptinin varlığını saptamamız, bu organın Anura amfibilerinde önemli bir leptin sentez yeri olabileceğini göstermektedir. Leptin, reseptörü aracılığıyla hepatositler ve melanomakrofajlar üzerinde belirgin proliferatif etkiye sahiptir. Ayrıca hepatositlerdeki karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasını düzenler. Leptinin kurbağa karaciğeri üzerindeki bu etkilerinin dokunun bütünlüğünü ve fonksiyonunu korumaya yönelik olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Acton, Q.A., 2013, *Pyrethrins-Advances in Research and Application*, Scholarly Editions, Atlanta, ISBN: 978-1-481-67972-5.
- Agius, C., 1981, The effects of splenectomy and subsequent starvation on the storage of haemosiderin by the melanomacrophages of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, *Journal of fish biology*, 18, 41-44.
- Agius, C., 1985, *The Melano-macrophage Centres of Fish: A Review*, *Fish Immunology*, In: Manning, M.J. and Tatner, F.M. (eds.), Academic Press, London, 85-105.
- Agius, C. and Roberts, R.J., 2003, Melano-macrophage centres and their role in fish pathology, *Journal of fish diseases*, 26, 499-509.
- Aguilar, A.J., Conde-Sieira, M., Polakof, S., Míguez, J.M. and Soengas, J.L., 2010, Central leptin treatment modulates brain glucosensing function and peripheral energy metabolism of rainbow trout, *Peptides*, 31, 1044-11054.
- Ahima, R.S. and Osei, S.Y., 2004, Leptin signaling, *Physiology and behavior*, 81, 223-241.
- Akat, E. and Göçmen, B., 2014, A histological study on hepatic structure of *Lyciasalamandra arikani* (Urodela: Salamandridae), *Russian journal of herpetology*, 21 (3), 201-204.
- Akiyoshi, H. and Inoue, A.M., 2012, Comparative histological study of hepatic architecture in the three orders amphibian livers, *Comparative hepatology*, 11, 2-8.
- Aksu, U., Bezemer, R., Yavuz, B., Kandil, A., Demirci, C, and Ince, C., 2012, Balanced vs unbalanced crystalloid resuscitation in a near-fatal model of hemorrhagic shock and the effects on renal oxygenation, oxidative stres, and inflammation, *Resuscitation*, 83, 767-773.
- Aleffi, S., Petrai, I., Bertolani, C., Parola, M., Colombatto, S., Novo, E., Vizzutti, F., Anania, F.A., Milani, S., Rombouts, K., Laffi, G., Pinzani, M. and Marra, F., 2005, Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells, *Hepatology*, 42, 1339-1348.
- Arias, I.M., Alter, H.J., Boyer, J.L., Cohen, D.E., Fausto, N., Shafritz, D.A. and Wolkoff, A.W., 2009, *The Liver Biology And Pathobiology*, Wiley-Blackwell, Singapore, ISBN: 978-0-470-72313-5.

- Ashwell, C.M., Czerwinski, S.M., Brocht, D.M. and McMurtry, J.P., 1999, Hormonal regulation of leptin expression in broiler chickens, *Regulatory integrative comparative physiology*, 45-R226-R232.
- Azanza, M.J., Aisa, J., Junquera, C. and Castiella, T., 1989, The autonomic innervation of the liver and gallbladder of *Rana ridibunda*, *Histology and Histopathology*, 4, 405-410.
- Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J-P., Bortoluzzi, M-N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Marchand-Brustel, Y.L. and Lewin, M.J.M., 1998, The stomach is a source of leptin, *Nature*, 394, 790-793.
- Bagnara, J.T. and Matsumoto, J., 2006, *Comparative Anatomy and Physiology of pigment cells in nonmammalian tissues*, The pigmentary System: Physiology and Pathophysiology, In: Nordlund, J.J., Boissy, R.E., Hearing, V.J., King, R.A., Ortonne, J-P. (eds.), Oxford University Press, New York, 9-40.
- Balasubramaniyan, V., Viswanathan, P. and Nalini, N., 2006a, Effect of leptin administration on membrane-bound adenosine triphosphatase activity in ethanol-induced experimental liver toxicity, *Journal of pharmacy and pharmacology*, 58, 1113-1119.
- Balasubramaniyan, V. and Nalini, N., 2006b, Effect of hyperleptinaemia on chronic ethanol-induced hepatotoxicity in mice, *Fundamental and clinical pharmacology*, 20, 129-136.
- Banks, W.A., 2001, Enhanced leptin transport across the blood-brain barrier by α 1-adrenergic agents, *Brain research*, 899, 209-217.
- Barni, S., Paroni, G., Vaccarone, R., Bernini, F., Fenoglio, C. and Fraschini, A., 1997, Mechanisms of the liver pigmentation increase during the pre-hibernation of amphibians, *European journal of histochemistry*, 41,19.
- Barni, S., Bertone, V., Croce, A.C., Bottiroli, G., Bernini, F. and Gerzeli, G., 1999, Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians, *Journal of anatomy*, 195, 19-25.
- Barni, S., Vaccarone, R., Bertone, V., Fraschini, A., Bernini, F. and Fenoglio, C., 2002, Mechanisms of changes to the liver pigmentary component during the annual cycle (activity and hibernation) of *Rana esculenta* L., *Journal of anatomy*, 200, 185-194.
- Bartha, T., Sayed-Ahmed, A. and Rudas, P., 2005, Expression of leptin and its receptors in various tissues of ruminants, *Domestic animal endocrinology*, 29, 193-202.
- Baskin, D.G., Seeley, R.J., Kuijper, J.L., Lok, S., Weigle, D.S., Erickson, J.C., Palmiter, R.D. and Schwartz, M.W., 1998, Increased expression of mRNA for the long form of the leptin receptor in the hypothalamus is associated with leptin hypersensitivity and fasting, *Diabetes*, 47, 538-543.

- Bauman, H., Morella, K.K., White, D.W., Dembski, M., Bailon, P.S., Kim, H., Lai, C-F. and Tartaglia, L.A., 1996, The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors, *Proceeding of the national academy of sciences of the USA*, 93, 8374-8378.
- Beltowski, J., Wójcicka, G., Marciniak, A. and Jamroz, A., 2004, Oxidative stress, nitric oxide production, and renal sodium handling in leptin-induced hypertension, *Life sciences*, 74, 2987-3000.
- Bernabò, I., Biasone, P., Macirella, R., Tripepi, S. and Brunelli, E., 2014, Liver histology and ultrastructure of the Italian newt (*Lissotriton italicus*): normal structure and modifications after acute exposure to nonylphenol ethoxylates, *Experimental and toxicologic patholog*, 66, 455-468.
- Bethanis, S.K. and Theocharis, S.E., 2006. Leptin in the field of hepatic fibrosis: a pivota lor an incidental player?, *Digestive diseases sciences*, 51, 1685-1696.
- Bjørnbæk, C., Uotani, S., da Silva, B. and Flier, J.S., 1997, Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor, *Journal of biologica chemistry*, 272 (51), 32686-32695.
- Blum, W.F., Englaro, P., Hanitsch, S., Juul, A., Hertel, N.T., Müller, J., Shakkebæk N.E., Heiman, M.L., Birkett, M., Attanasio, A.M., Kiess, W. and Rascher, W., 1997, Plasma leptin levels in healty children andadolescents: depence on body mass index, body fat mass, gender, pubertal stage, and testosterone, *The journal of clinical endocrinology and metabolism.*, 82, 2904-2910.
- Blüher, S. and Mantzoros, C.S., 2007, Leptin in reproduction, *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and obesity*, 14, 458-464.
- Bornstein, S.R., Abu-Asab, M., Glasow, A., Páth, G., Hauner, H., Tsokos, M., Chrousos, G.P. and Scherbaum, W.A., 2000, Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture, *Diabetes*, 49, 532-538.
- Boswell, T., Dunn, I.C., Wilson, P.W., Joseph, N., Burt, D.W. and Sharp, P.J., 2006, Identification of a non-mammalian leptin-like gene: characterization and expression in the tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*), *General and comparative endocrinology*, 146, 157-166.
- Bouloumié, A., Maruma, T., Lafonten, M. and Busse, R., 1999, Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells, *The journal of the federation of american societies for experimental biology*, 13, 1231-1238.
- Briscoe, C.P., Hanif, S., Arch, J.R.S. and Tadayyon, M., 2001, Leptin receptor long-form signalling in a human liver cell line, *Cytokine*, 14 (4), 225-229.

- Brunk, U.T. and Terman, A., 2002. Lipofuscin: Mechanisms of age-related accumulation and influence on cell functions. *Free radical biology and medicine*, 33 (5), 611–619.
- Bruslé, J., González, I. and Anadon, G., 1996, *The structure and function of fish liver*, Fish Morphology, In: Munshi, J.S.D and Dutta, H.M. (eds.), Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, 77-93.
- Buono, S. and Putti, R., 2004, Leptin, leptin receptors and ACTH immunoreactivities are present in the gastrointestinal tract and the neural tube of tadpoles of the newt *Triturus*, *Journal of molecular histology*, 35, 103-109.
- Burcelin, R., Kamohara, S., Li, J., Tannenbaum, G.S., Charron, M.J. and Friedman, J.M., 1999, Acute intravenous leptin infusion increases glucose turnover but not skeletal muscle glucose uptake in *ob/ob* mice, *Diabetes*, 48, 1264-1269.
- Busso, N., So, A., Chobaz-Péclat, V., Morard, C., Martinez-Soria, E., Talabot-Ayer, D. and Gabay, C., 2002, Leptin signaling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis, *The journal of immunology*, 168, 875-882.
- Bustamante, J., Bredeston, L., Malanga, G. and Mordoh, J., 1993, Role of melanin as a scavenger of active oxygen species, *Pigment cell research*, 6 (5), 348-353.
- Caldefie-Chezet, F., Poulin, A., Tridon, A., Sion, B. and Vasson, M-P., 2001, Leptin: a potential regulator of polymorphonuclear neutrophil bactericidal action?, *Journal of leukocyte biology*, 69, 414-418.
- Cao, Q., Mak, K.M. and Lieber, C.S., 2006, Leptin enhances $\alpha 1(I)$ collagen gene expression in LX-2 human hepatic stellate cells through JAK-mediated H_2O_2 -dependent MAPK pathways, *Journal of cellular biochemistry*, 97 (1), 188-197.
- Caro, J.F., Kolaczynski, J.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Opentanova, I., Goldman, W.H., Lynn, R.B., Zhang, P-L., Sinha, M.K. and Considine, R.V., 1996, Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance, *The lancet*, 348 (9021), 159-161.
- Castracane, V.D. and Henson, M.C., 2006, *Leptin*, Springer, United States of America.
- Champe, P.C. and Harvey R.A., 1994, *Lippincott's Biochemistry*, J.B. Lippincott Co., Philadelphia.
- Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L.A., Woolf, E.A., Weng, X., Ellis, S.J., Lakey, N.D., Culpepper, J., More, K.J., Breitbart, R.E., Duyk, G.M., Tepper, R.I. and Morgenstern, J.P., 1996, Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: Identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice, *Cell*, 84, 491-495.

- Chen, X., Jianping, J. and Wei, L., 2003, Histology of the digestive gland in *Hoplobatrachus rugulosus*, *Journal of fujian normal university (Natural science)*, 19 (2), 117-120.
- Cioffi, J.A., Shafer, A.W., Zupancic, T.J., Smith-Gbur, J., Mikhail, A., Platika, D. and Snodgrass, H.R., 1996, Novel B219/OB receptor isoforms: Possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction, *Nature medicine*, 2, 585-589.
- Cohen, S.M., Werrmann, J.G. and Tota, M.R., 1998, ^{13}C NMR study of the effects of leptin treatment on kinetics of hepatic intermediary metabolism, *Proceeding of the national academy of sciences of the USA*, 95, 7385-7390.
- Cohen, P., Yang, G., Yu, X., Soukas, A.A., Wolfish, C.S., Friedman, J.M. and Li, C., 2005, Induction of leptin receptor expression in the liver by leptin and food deprivation, *Journal of biological chemistry*, 280 (11), 10034-10039.
- Commins, S.P., Marsh, D.J., Thomas, S.A., Watson, P.M., Padgett, M.A., Pamiter, R. and Gettys, T.W., 1999, Norepinephrine is required for leptin effects on gene expression in brown and white adipose tissue, *Endocrinology*, 140 (10), 4772-4778.
- Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L. and Caro, J.F., 1996, Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans, *New england journal of medicine*, 334, 292-295.
- Corsaro, C., Scalia, M., Blanco, A.R., Aiello, I. and Sichel, G., 1995, Melanins in physiological conditions protect against lipoperoxidation. A study on albino and pigmented *Xenopus*, *Pigment cell research*, 8, 279-282.
- Corsaro, C., Scalia, M., Leotta, N., Mondio, F. and Sichel, G., 2000, Characterisation of Kupffer cells in some Amphibia, *Journal of anatomy*, 196, 249-261.
- Cotran, R.S., Kumar, V. and Robbin, S.L., 1994. *Pathologic Basis of Disease*, W.B. Saunders, Philadelphia, PA, USA.
- Couillard, C.M. and Hodson, P.V., 1996, Pigmented macrophage aggregates: a toxic response in fish exposed to bleached-kraft mill effluent, *Environmental toxicology and chemistry*, 15 (10), 1844-1854.
- Crawshaw, G.J. and Weinkle, T.K., 2000, Clinical and pathological aspects of the amphibian liver, *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 9 (3), 165-173.
- Crespi, E.J. and Denver, R.J., 2006, Leptin (*ob* gene) of the south african clawed frog *Xenopus laevis*, *Proceeding of the national academy of sciences of the USA*, 103 (26), 10092-10097.
- De luliis, G. and Pulerà, D., 2007, *The Dissection of Vertebrates- A laboratory Manual*. Elsevier, Amsterdam.

- De Pedro, N., Martínez-Álvarez, R. and Delgado, M.J., 2006, Acute and chronic leptin reduces food intake and body weight in goldfish (*Carassius auratus*), *Journal of endocrinology*, 188, 513–520.
- Demirsoy, A., 1993, *Yaşamın Temel Kuralları*, Meteksan A.Ş., Ankara, ISBN: 9757746134.
- Dinçer, S. ve Gülen, Ş., 2010, Leptin uygulanan sağlıklı ve diyabetik sıçnlarda yara dokusu malondialdehit ve glutatyon düzeyleri, *Erciyes tıp dergisi*, 32 (3), 161-166.
- Dooley, J.S., Lok, A.S.F., Burroughs, A.K. and Heathcote, E.J., 2011, *Sherlock's Diseases of the Liver and Biliary System*, 12nd ed., Wiley-Blackwell, Oxford, ISBN: 978-1-4051-3489-7.
- Duellman, W.E. and Trueb, L., 1994, *Biology of Amphibians*, McGraw-Hill Book Company, New York.
- Dunn, S.L., Björnholm, M., Bates, S.H., Chen, Z., Seifert, M. and Myers, M.G., 2005, Feedback inhibition of leptin receptor/Jak2 signalling via Tyr₁₁₃₈ of the leptin receptor and suppressor of cytokine signalling 3, *Molecular endocrinology*, 19, 925-938.
- Eisenberg, A., Biener, E., Charlier, M., Krishnan, R.V., Djiane, J., Herman, B. and Gertler, A., 2004, Transactivation of erbB2 by short and long isoforms of leptin receptors, *Federation of european biochemical societies letters*, 565, 139-142.
- Ergün, A., 1998, Obezite, besin alımı ve vücut ağırlığının kontrolünde leptin, *Türkiye klinikleri tıp bilimleri dergisi*, 18, 220-225.
- Ergün, A., 1999, Leptin (Ob Protein), *Türkiye klinikleri tıp bilimleri dergisi*, 19, 130-136.
- Faggioni, R., Feingold, K.R. and Grunfeld, C., 2001, Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition, *The journal of the federation of american societies for experimental biology*, 15, 2565-2571.
- Fantuzzi, G. and Faggioni, R., 2000, Leptin in the regulation of immunity, inflammation and hematopoiesis. *Journal of leukocyte biology*, 68, 437-446.
- Fantuzzi, G., 2005, Adipose tissue, adipokines, and inflammation, *Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology*, 115 (5), 911-919.
- Farrell, G.C. and Fracp, M.D., 2004, Probing prometheus: fat fueling the fire?, *Hepatology*, 40 (6), 1252-1255.
- Fausto, N. and Webber, E.M., 1994, *Liver regeneration*, The liver Biology and Pathobiology, In: Arias, I., Boyer, J., Fausto, N., Jakoby, W., Schachter, D., Shafritz, D. (eds.), Raven Press, New York, 1059–1084.
- Fava, G., Alpini, G., Rychlicki, C., Saccomanno, S., DeMorrow, S., Trozzi, L., Candelaresi, C., Venter, J., Sario, A.D., Marzioni, M., Bearzi, I., Glaser, S.,

- Alvaro, D., Marucci, L., Francis, H., Svegliati-Baroni, G. and Benedetti, A., 2008, Leptin enhances cholangiocarcinoma cell growth, *Cancer research.*, 68 (16), 6752-6761.
- Fei, H., Okano, H.J., Li, C., Lee, G-H., Zhao, C., Darnell, R. and Friedman, J.M., 1997, Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 94, 7001-7005.
- Fenerick, J., 2008, Desempenho Produtivo, Hematologia E Morfologia Do Tecido Hepatico De Ra-Touro, *Lithobates catesbeianus*, Alimentada Com Raçao, Contendo Diferentes Niveis De Carboidratos E Lipidios, Thesis (PhD), Universidade Estadual Paulista.
- Fenoglio, C., Bernocchi, G. and Barni, S., 1992, Frog hepatocyte modifications induced by seasonal variations: a morphological and cytochemical study, *Tissue and cell*, 24 (1), 17-29.
- Fenoglio, C., Boncompagni, E., Fasola, M., Gandini, C., Comizzoli, S., Milanese, G. and Barni, S., 2005, Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*, *Ecotoxicology and environmental safety*, 60, 259-268.
- Fernández-Riejos, P., Najib, S., Santos-Alvarez, J., Martín-Romero, C., Pérez-Pérez, A., González-Yanes, C. and Sánchez-Margalet, V., 2010, Role of leptin in the activation of immune cells, *Mediators of inflammation*, 2010, 1-8.
- Fortuño, A., Rodríguez, A., Gómez-Ambrosi, J., Muñiz, P., Salvador, J., Díez, J. and Frühbeck, G., 2002, Leptin inhibits angiotensin II-induced intracellular calcium increase and vasoconstriction in the rat aorta, *Endocrinology*, 143 (9), 3555-3560.
- Fortuño, A., Bidegaina, J., Baltanás, A., Morena, M.U., Monterob, L., Landecho, M.F., Belouqui, O., Díez, J. and Zalba, G., 2010, Is leptin involved in phagocytic NADPH oxidase overactivity in obesity? Potential clinical implications, *Journal of hypertension*, 28, 1944-1950.
- Fournie, J.W., Summers, J.K., Courtney, L.A. and Engle, V.D., 2001, Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments, *Journal of aquatic animal health*, 13, 105-116.
- Francis, E.T.B., 1934, *The Anatomy of the Salamander*, Clarendon Press, Oxford.
- Franco-Belussi, L., Santos, L.R.S., Zieri, R., Vicentini, C.A., Taboga, S.R. and Oliveira, C., 2012, Histochemistry, and ultrastructure of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) during the breeding season, *Zoological science*, 29 (12), 844-848.
- Frangioni, G., Borgioli, G., Bianchi, S. and Pillozzi, S., 2000, Relationships between hepatic melanogenesis and respiratory conditions in the newt, *Triturus carnifex*, *Journal of experimental zoology*, 287, 120-127.

- Frangioni, G., Santoni, M., Bianchi, S., Franchi, M., Fuzzi, G., Marcaccini, S., Varlani, C. and Borgioli, G., 2005, Function of the hepatic melanogenesis in the newt, *Triturus carnifex*, *Journal of experimental zoology*, 303A: 123-131.
- Frank, S., Stallmeyer, B., Kämpfer, H., Kolb, N. and Pfeilschifter, J., 2000, Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair, *Journal of clinical investigation*, 106, 501-509.
- Frederich, R.C., Hamann, A., Anderson, S., Löllmann, B., Lowell, B.B., and Flier, J.S., 1995, Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action, *Nature medicine*, 1, 1311-1314.
- Friedman, S.L., Roll, F.J., Boyles, J., and Bissell, D.M., 1985, Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 82, 8681-8685.
- Friedman, S.L., 1993, The cellular basis of hepatic fibrosis, *The new england journal of medicine*, 328, 1828-1835.
- Frøiland, E., Jobling, M., Björnsson, B.T., Kling, P., Ravuri, C.S. and Jørgensen, E.H., 2012, Seasonal appetite regulation in the anadromous Arctic charr: Evidence for a role of adiposity in the regulation of appetite but not for leptin in signalling adiposity, *General and comparative endocrinology*, 178, 330-337.
- Frühbeck, G., Aguado, M. and Martínez, J.A., 1997, In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: Evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin, *Biochemical and biophysical research communications*, 240, 590-594.
- Frühbeck, G., Aguado, M., Gómez-Ambrosi, J., and Martínez, A., 1998, Lipolytic effect of *in vivo* leptin administration on adipocytes of lean and *ob/ob* mice, but not *db/db* mice, *Biochemical and biophysical research communications*, 250, 99-102.
- Gabay, C., Dreyer, M.G., Pellegrinelli, N., Chicheportiche, R. and Meier, C.A., 2001, Leptin directly induces the secretion of interleukin 1 receptor antagonist in human monocytes, *The journal of clinical endocrinology and metabolism*, 86, 783-791.
- Gackowska, A., 2011, *Cloning and expression analysis of leptin and its receptor in the axolotl (Ambystoma mexicanum)*, Thesis (PhD), Newcastle University.
- Gainsford, T., Willson, T.A., Metcalf, D., Handman, E., McFarlane, C., Ng, A., Nicola, N.A., Alexander, W.S. and Hilton, D.J., 1996, Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 93, 14564-14568.
- Gartner, L.P., Hiatt, J.L. and Strum, J.M., 2011, *Cell Biology and Histology*, 6nd ed., Lippincott Williams and Wilkins, London, ISBN: 978-1-60831-321-1.
- Geremia, E., Corsaro, C., Baratta, D., Santoro, C., Scalia, M. and Sichel, G., 1989, Antioxidant enzymatic systems in pigment tissue of Amphibia, *Pigment cell research*, 2 (3), 208-212.

- Ghilardi, N., Ziegler, S., Wiestner, A., Stoffel, R., Heim, M.H. and Skoda, R.C., 1996, Detective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 93, 6231–6235.
- Guida, G., Gallone, A., Maida, I., Boffoli, D. and Cicero, R., 2000, Tyrosinase gene expression in the Kupffer cells of *Rana esculenta* L., *Pigment cell research*, 13, 431-435.
- Guida, G., Zanna, P., Gallone, A., Argenzio, E. and Cicero, R., 2004, Melanogenic response of the Kupffer cells of *Rana Esculenta* L. to melanocyte stimulating hormone, *Pigment cell research*, 17, 128-134.
- Guo, L., Münzberg, H., Stuart, R.C., Nillni, E.A. and Bjørbæk, C., 2004, N-acetylation of hypothalamic α -melanocyte-stimulating hormone and regulation by leptin, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 101 (32), 11797-11802.
- Gültürk, S. and İmir, G., 2006, Leptin ve nöroendokrin düzenleme, *Adnan menderes üniversitesi tıp fakültesi dergisi*, 7 (3), 49-54.
- Hadley, N.F., 1985. *The Adaptive Role of Lipids in Biological Systems*, Wiley, New York.
- Hardwick, J.C.H., Van Den Brink, G.R., Offerhaus, G.J., Van Deventer, S.J.H. and Peppelenbosch, M.P., 2001, Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells, *Gastroenterology*, 121 (1), 79–90.
- Harris, R.B.S., Zhou, J., Redmann, S.M., Smagin, G.N., Smith, S.R., Rodgers, E. and Zachwieja, J.J., 1998, A leptin dose-response study in obese (*ob/ob*) and lean (+/?) Mice, 1998, *Endocrinology*, 139 (1), 8-19.
- Harvey, J., Mc Kenna, F., Henson P.S., Spanswick, D. and Ashford, L.J., 1997, Leptin activates ATP-sensitive potassium channels in the rat insulin-secreting cell line, CRI-G1, *The journal of physiology*, 504, 527-535.
- Hearing, V.J. and Jiménez M., 1987, Mammalian tyrosinase—the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *International journal of biochemistry*, 19, 1141–1147.
- Hebeishy, M.I.A. and Mazen, G.M.A., 2008, Role of leptin on cytochrome P-450 and some liver microsomal enzymes activities in the obese and lean mice, *Isotope and radiation research*, 40, 1567-1580.
- Herraez, M. P. and Zapata, A.G., 1986, Structure and function of melano-macrophage centres (MMC) of the goldfish *Carassius auratus*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 12, 117–126.
- Herraez, M. P. and Zapata, A.G., 1991, Structural characterization of the melano-macrophage centres (MMC) of goldfish *Carassius auratus*, *European journal of morphology*, 29, 89–102.

- Hikita, M., Bujo, H., Hirayama, S., Takahashi, K., Morisaki, N. and Saito, Y., 2000, Differential regulation of leptin receptor expression by insulin and leptin in neuroblastoma cells, *Biochemical and biophysical research communications*, 271, 703-709.
- Hoggard, N., Hunter, L., Duncan, J.S., Williams, L.M., Trayhurn, P. and Mercer, J.G., 1997, Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 94, 11073-11078.
- Hoggard, N., Hunter, L., Lea, R.G., Trayhurn, P. and Mercer, J.G., 2000, Ontogeny of the expression of leptin and its receptor in the murine fetus and placenta, *British journal of nutrition*, 83, 317-326.
- Howard, J.k., Lord, G.M., Matarese, G., Vendetti, S., Ghatei, M.A., Ritter, M.A., Lechler, R.I. and Bloom, S.R., 1999, Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in *ob/ob* mice, *The journal of clinical investigation*, 104, 1051-1059.
- Hsueh, H., Pan, W., Barnes, M.J. and Kastin, A.J., 2009, Leptin receptor mRNA in rat brain astrocytes, *Peptides*, 30, 2275-2280.
- Huang, L., Wang, Z. and Li, C., 2001, Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor, *Journal of biological chemistry*, 276 (9), 6343-6349.
- Huising, M.O., Geven, E.J.W., Kruiswijk, C.P., Nabuurs, S.B., Stolte, E.H., Spanings, F.A.T., Verburg-Van Kemenade, B.M.L. and Flik, G., 2006, Increased leptin expression in common carp (*Cyprinus carpio*) after food intake but not after fasting or feeding to satiation, *Endocrinology*, 147 (12), 5786-5797.
- Humanson, G.L., 1972, *Animal tissue techniques*, H.W. Freeman and Company, San Francisco, ISBN: 61-17383.
- Ikejima, K., Honda, H., Yoshikawa, M., Hirose, M., Kitamura, T., Takei, Y. and Sato, N., 2001, Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals, *Hepatology*, 34, 288-297.
- Ikejima, K., Takei, Y., Honda, H., Hirose, M., Yoshikawa, M., Zhang, Y-J., Lang, T., Fukuda, T., Yamashina, S., Kitamura, T. and Sato, N., 2002, Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat, *Gastroenterology*, 122, 1399-1410.
- Johnson, R.M., Johnson, T.M. and Londraville, R.L., 2000, Evidence for leptin expression in fishes, *Journal of experimental zoology*, 286 (7), 718-724.
- Kamohara, S., Burcelin, R., Halaas, J.L., Friedman, J.M. and Charron, M.J., 1997, Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment, *Nature*, 389, 374-377.

- Kastin, A.J., Pan, W., Maness, L.M., Koletsky, R.J. and Ernsberger, P., 1999, Decreased transport of leptin across the blood– brain barrier in rats lacking the short form of the leptin receptor, *Peptides*, 20, 1449-1453.
- Kastin, A.J. and Pan, W., 2000, Dynamic regulation of leptin entry into brain by the blood–brain barrier, *Regulatory peptides*, 92, 37-43.
- Kellerer, M., Koch, M., Metzinger, E., Mushack, J., Capp, E. and Häring, H.U., 1997, Leptin activates PI-3 kinase in C₂C₁₂ myotubes via janus kinase-2 (JAK-2) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathways, *Diabetologia*, 40, 1358-1362.
- Kim, M.S., Small, C.J., Stanley, S.A., Morgan, D.G.A., Seal, L.J., Kong, W.M., Edwards, C.M.B., Abusnana, S., Sunter, D., Ghatei, M.A. and Bloom, S.R., 2000, The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin, *The journal of clinical investigation.*, 105 (7), 1005-1011.
- Konstantinou-Tegou, A., Kaloyianni, M., Bourikas, D. and Koliakos, G., 2001, The effect of leptin on Na⁺-H⁺ antiport (NHE 1) activity of obese and normal subjects erythrocytes, *Molecular and cellular endocrinology*, 183, 11-18.
- Kranz, H. 1989, Changes in splenic melano-macrophages centres of dab, *Limanda limanda* during and after infection with ulcer disease, *Diseases of aquatic organisms*, 6, 167–173.
- Kumar, V., Abbas, A.K. and Aster, J.C., 2013, *Robbins basic pathology*, Elsevier saunders, Canada, ISBN: 978-1-4377-1781-5.
- Kurokawa, T., Uji, S. and Suzuki, T., 2005, Identification of cDNA coding for a homologue to mammalian leptin from pufferfish, *Takifugu rubripes*, *Peptides*, 26, 745-750.
- Kutlu, S., Canpolat, S., Aydın, M., Yasar, A., Tuzcu, M. and Baydas, G., 2005, Exogenous leptin increases lipid peroxidation in the mouse brain, *Tohoku journal of experimental medicine*, 206, 233-236.
- Lago, F., Gómez, R., Gómez-Reino, J.J., Dieguez, C. and Gualillo, O., 2009, Adipokines as novel modulators of lipid metabolism, *Trends in biochemical sciences*, 34 (10), 500-510.
- Lahlou, N., Clement, K., Carel, J-C., Vaisse, C., Lotton, C., Le Bihan, Y., Basdevant, A., Lebouc, Y., Froguel, P., Roger, M. and Guy-Grand, B., 2000, Soluble leptin receptor in serum of subjects with complete resistance to leptin: relation to fat mass, *Diabetes*, 49, 1347-1352.
- Lamošova, D. and Zeman, M., 2001, Effect of leptin and insulin in chick embryonic muscle cells and hepatocytes, *Physiological research*, 50, 183-189.

- Leclercq, I.A., Farrell, G.C., Schriemer, R. and Robertson, G.R., 2002, Leptin is essential for hepatic fibrogenic response to chronic liver injury, *Journal of hepatology*, 37, 206–213.
- Leclercq, I.A., Field, J. and Farrell, G.C., 2003, Leptin-specific mechanisms for impaired liver regeneration in *ob/ob* mice after toxic injury, *Gastroenterology*, 124, 1451-1464.
- Leclercq, I.A., Vansteenbergh, M., Lebrun, V.B., VanHul, N.K., Abarca-Quinones, J., Sempoux, C., Picard, C., Stärkel, P. and Horsmans, Y.L., 2006, Defective hepatic regeneration after partial hepatectomy in leptin-deficient mice is not rescued by exogenous leptin, *Laboratory investigation*, 86, 1161-1171.
- Lee, K.S., Buck, M., Houglum, K. and Chojkier, M., 1995, Activation of hepatic stellate cells by TGF α and collagen type I is mediated by oxidative stress through *c-myb* expression, *Journal of clinical investigation*, 96, 2461-2468.
- Lee, G-H., Proenca, R., Montez, J.M., Carroll, K.M., Darvishzadeh, J.G., Lee, J.I. and Friedman, J.M., 1996, Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice, *Nature*, 379, 632-635.
- Lee, M.P-S., Orlov, D. and Sweeney, G., 2005, Leptin induces rat glomerular mesangial cell hypertrophy, but does not regulate hyperplasia or apoptosis, *International journal of obesity*, 29, 1395-1401.
- Li, C., Ioffe, E., Fidahusein, N., Connolly, E. and Friedman, J.M., 1998, Absence of soluble leptin receptor in plasma from *db^{pas}/db^{pas}* and other *db/db* Mice, *Journal of biological chemistry*, 273 (16), 10078-10082.
- Lin, H., Romsos, D.R., Tack, P.I. and Leveille, G.A., 1977, Effects of fasting and feeding various diets on hepatic lipogenic enzyme activities in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* (Walbaum)), *The journal of nutrition*, 107, 1477–1483.
- Liu, Y., Weng, J., Huang, S., Shen, Y., Sheng, X., Han, Y., Xu, M. and Weng, Q., 2014, Immunoreactivities of PPAR γ 2, leptin and leptin receptor in oviduct of Chinese brown frog during the breeding period and pre-hibernation, *European journal of histochemistry*, 58, 227-232.
- Loffreda, S., Yang, S.Q., Lin, H.Z., Karp, C.L., Brengman, M.L., Wang, D.J., Klein, A.S., Bulkley G.B., Bao, C., Noble, P.W., Lane, M.D. and Diehl, A.M., 1998, Leptin regulates proinflammatory immune responses, *The journal of the federation of american societies for experimental biology*, 12, 57-65.
- Londraville, R.L. and Duvall, C.S., 2002, Murine leptin injections increase intracellular fatty acid-binding protein in green sunfish (*Lepomis cyanellus*), *General and comparative endocrinology*, 129, 56-62.
- Lord, G.M., Matarese, G., Howard, J.K., Baker, R.J., Bloom, S.R. and Lechler, R.I., 1998, Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression, *Nature*, 394, 897-901.

- Loumbourdis, N.S. and Kyriakopoulou-Sklavounou, P., 1991, Reproductive and lipid cycles in the male frog *Rana ridibunda* in northern greece, *Comparative biochemistry and physiology Part A: physiology*, 99(4), 577-583.
- Loumbourdis, N.S. and Vogiatzis, A.K., 2002, Impact of cadmium on liver pigmentary system of the frog *Rana ridibunda*, *Ecotoxicology and environmental safety*, 53, 52-58.
- Loumbourdis, N.S. and Danscher, G., 2004, Autometallographic tracing of mercury in frog liver, *Environmental pollution*, 129, 299-304.
- Loumbourdis, N.S., 2005, Hepatotoxic and nephrotoxic effects of cadmium in the frog *Rana ridibunda*, *Archives of toxicology*, 79, 434-440.
- Loumbourdis, N.S., 2007, Liver histopathologic alterations in the frog *Rana ridibunda* from a small river of Northern Greece, *Archives of environmental contamination and toxicology*, 53, 418-425.
- Lu, R-H., Liang, X-F., Wang, M., Zhou, Y., Bai, X-L. and He, Y., 2012, The role of leptin in lipid metabolism in fatty degenerated hepatocytes of the grass carp *Ctenopharyngodon idellus*, *Fish physiology biochemistry*, 38, 1759-1774.
- Lugogo, N.L., Hollingsworth, J.W., Howell, D.L., Que, L.G., Francisco, D., Church, T.D., Potts-Kant, E.N., Ingram, J.L., Wang, Y., Yung, S-H. and Kraft, M., 2012, Alveolar macrophages from overweight/obese subjects with asthma demonstrate a proinflammatory phenotype, *American journal of respiratory and critical care medicine*, 186 (5), 404-411.
- Machinal, F., Dieudonne, M-N., Leneuve, M-C., Pecquery, R. and Giudicelli, Y., 1999, In vivo and in vitro *ob* gene expression and leptin secretion in rat adipocytes: evidence for a regional specific regulation by sex steroid hormones, *Endocrinology*, 140, 1567-1574.
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., Kern, P. A. and Friedman, J. M., 1995, Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and *ob* RNA in obese and weight-reduced subjects, *Nature medicine.*, 1, 1155-1161.
- Maingrette, F. and Renier, G., 2003, Leptin increases lipoprotein lipase secretion by macrophages: involvement of oxidative stress and protein kinase C, *Diabetes*, 52, 2121-2128.
- Marroquí, L., Gonzalez, A., Neco, P., Caballero-Garrido, E., Vieira, E., Ripoll, C., Nadal, A. and Quesada, I., 2012, Role of leptin in the pancreatic β -cell: effects and signalling pathways, *Journal of endocrinology*, 49, R9-R17.
- Martín-Romero, C., Santos-Alvarez, J., Goberna, R. and Sánchez-Margalet, V., 2000, Human leptin enhances activation and proliferation of human circulation T lymphocytes, *Cellular immunology*, 199, 15-24.

- Masuzaki, H., Ogawa, Y., Sagawa, N., Hosoda, K., Matsumoto, T., Mise, H., Nishimura, H., Yoshimasa, Y., Tanaka, I., Mori, T. and Nakao, K., 1997, Nonadipose tissue production of leptin: Leptin as a novel placenta-derived hormone in humans, *Nature medicine*, 3, 1029-1033.
- Mazia, D., Brewer, P. A. and Alfert, M., 1953, The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromphenol blue, *Biological bulletin*, 104, 57-67.
- Mercer, J.G., Moar, K.M, Rayner, D.V., Trayhurn, P. and Hoggard, N., 1997, Regulation of leptin receptor and NPY gene expression in hypothalamus of leptin-treated obese (*ob/ob*) and cold-exposed lean mice, *Federation of european biochemical societies*, 402, 185-188.
- Meseguer, J., López-Ruiz, A. and Esteban, M.A., 1994, Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function, *Cell tissue Research*, 277, 1-10.
- Michaelidis, B., Kyriakopoulou-Sklavounou, P., Staikou, A., Papathanasiou, I. and Konstantinou, K., 2008, Glycolytic adjustments in tissues of frog *Rana ridibunda* and land snail *Helix lucorum* during seasonal hibernation, *Comparative biochemistry and physiology, Part A*, 151, 582-589.
- Michalopoulos, G.K. and DeFrances, M.C., 1997, Liver regeneration, *Science*, 276, 60-66.
- Mirgani, T., Uro, A.B.O. and Sallmann, H.B., 1987, Studies on lipogenic enzymes in camel tissues. *1th Enzymes of citrate cleavage pathway*. Scientific Report, 1983–1987. University of Khartoum, Sudan, 71–77.
- Momin, A.U., Melikian, N., Shah, A.M., Grieve, D.J., Wheatcroft, S.B., John, L., Gamel, A.E., Desai, J.B., Nelson, T., Driver, C., Sherwood, R.A. and Kearney, M.T., 2006, Leptin is an endothelial-independent vasodilator in humans with coronary artery disease: evidence for tissue specificity of leptin resistance, *European heart journal*, 27, 2294-2299.
- Montosi, G., Garuti, C., Iannone, A. and Pietrangelo, A., 1998, Spatial and temporal dynamics of hepatic stellate cell activation during oxidant-stress-induced fibrogenesis, *American journal of pathology*, 152 (5), 1319-1326.
- Morash, B., Li, A., Murphy, P.R., Wilkinson, M. and Ur, E., 1999, Leptin gene expression in the brain and pituitary gland, *Endocrinology*, 140 (12), 5995-5998.
- Murad, A., Nath, A.K., Cha, S-T., Demir, E., Flores-Riveros, J. and Sierra-Honigmann, M.R., 2003, Leptin is an autocrine/paracrine regulator of wound healing, *The journal of the federation of american societies for experimental biology*, 17, 1895-1897.

- Murashita, K., Uji, S., Yamamoto, T., Rønnestad, I. and Kurokawa, T., 2008, Production of recombinant leptin and its effects on food intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Comparative biochemistry and physiology, Part B*, 150, 377-384.
- Muruzábal, F.J., Frühbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., Archanco, M. and Burrell, M.A., 2002, Immunocytochemical detection of leptin in non-mammalian vertebrate stomach, *General and comparative endocrinology*, 128, 149-152.
- Ockenga, J., Tietge, U.J.F., Böker, K.H.W., Manns, M.P., Brabant, G. and Bahr, M.J., 2007, Distinct roles of free leptin, bound leptin and soluble leptin receptor during the metabolic-inflammatory response in patients, with liver cirrhosis, *Alimentary pharmacology and therapeutics*, 25, 1301-1309.
- Oda, A., Taniguchi, T. and Yokoyama, M., 2001, Leptin stimulates rat aortic smooth muscle cell proliferation and migration, *Kobe journal of medical science*, 47, 141-150.
- O'doherty, R.M., Anderson, P.R., Zhao, A.Z., Bornfeldt, K.E. and Newgard, C.B., 1999, Sparing effect of leptin on liver glycogen stores in rats during the fed-to-fasted transition, *American physiological society*, 277, E544-E550.
- Oliveira, C. and Franco-Belussi, L., 2012, *Melanin Pigmentation in Ectothermic Vertebrates: Occurrence and Function*, In: Melanin: Biosynthesis, Functions and Health Effects, Ma, X-P. and Sun, X-X. (eds.), Chapter 7, Nova Science Publishers Inc, New York, 213-226.
- Otte, C., Otte, J-M., Strodthoff, D., Bornstein, S.R., Fölsch, U.R., Mönig, H. and Kloehn, S., 2004, Expression of leptin and leptin receptor during the development of liver fibrosis and cirrhosis, *Experimental and clinical endocrinology and Diabetes*, 112, 10-17.
- Overturf, K., Al-Dhalimy, M., Ou, C-N., Finegold, M. and Grompe, M., 1997, Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes, *American journal of pathology*, 151 (5), 1273-1280.
- Özbalcı, D. And Şahin, M., 2007, Leptin ve immün sistem, *Süleyman Demirel üniversitesi tıp fakültesi dergisi*, 14 (2), 51-55.
- Paolucci, M., Buono, S., Sciarrillo, R. and Putti, R., 2006, Effects of leptin administration on the endocrine pancreas and liver in the lizard *Podarcis sicula*, *Journal of experimental zoology*, 305A, 383-395.
- Passantino, L., Santamaria, N., Zupa, R., Pousis, C., Garofalo, R., Cianciotta, A., Jirillo, E., Acone, F. and Corriero, A., 2014, Liver melanomacrophage centres as indicators of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L. well-being, *Journal of fish diseases*, 37, 241-250.
- Pérez-Pérez, A., Maymó, J., Gambino, Y., Dueñas, Y.L., Goberna, R., Varone, C. and Sánchez-Margalet, V., 2009, Leptin stimulates protein synthesis-activating

- translation machinery in human trophoblastic cells, *Biology of reproduction*, 81, 826-832.
- Pérez-Pérez, A., Gambino, Y., Maymó, J., Goberna, R., Fabiani, F., Varone, C. and Sánchez-Margalet, V., 2010, MAPK and PI3K activities are required for leptin stimulation of protein synthesis in human trophoblastic cells, *Biochemical and biophysical research communications*, 396, 956-960.
- Pfundt, B., Sauerwein, H. and Mielenz, M., 2009, Leptin mRNA and protein immunoreactivity in adipose tissue and liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and immunohistochemical localization in liver, *Anatomia histologia embryologia*, 38, 406-410.
- Potter, J.J., Womack, L., Mezey, E. and Anania, F.A., 1998, Transdifferentiation of rat hepatic stellate cells results in leptin expression, *Biochemical and biophysical research communications*, 244, 178-182.
- Purrello, M., Scalia, M., Corsaro, C., Pietro, C.D., Piro, S. and Sichel, G., 2001, Melanosynthesis, differentiation, and apoptosis in Kupffer Cells from *Rana esculenta*, *Pigment cell research*, 14, 126-131.
- Rabitto, I.S., Alves-Costa, J.R.M., Assis, H.C.S., Pelletier, É., Akaishi, F.M., Anjos, A. Randi, M.A.F. and Ribeiro, C.A.O., 2005, Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings, *Ecotoxicology and environmental safety*, 60, 147-156.
- Ravaglia, M.A. and Maggese, M.C., 1995, Melano-macrophage centres in the gonads of the swamp eel, *Synbranchus marmoratus* Bloch, (Pisces, Synbranchidae): histological and histological and histochemical characterization, *Journal of fish diseases*, 18, 117-125.
- Ren, J., 2004, Leptin and hyperleptinemia – from friend to foe for cardiovascular function, *Journal of endocrinology*, 181, 1-10.
- Ribeiro, H.J., Procópio, M.S., Gomes, J.M.M., Vieira, F.O., Russo, R. C., Balzuweit, K., Chiarini-Garcia, H., Castro, A.C.S., Rizzo, E. and Correa, J.D., 2011, Functional dissimilarity of melanomacrophage centres in the liver and spleen from females of the teleost fish *Prochilodus argenteus*, *Cell tissue research*, 346, 417-425.
- Richards, M.P., Caperna, T.J., Elasser, T.H., Ashwell, C.M. and McMurtry, J.P., 2000, Design and application of a polyclonal peptide antiserum for the universal detection of leptin protein, *Journal of biochemical biophysical Methods*, 45, 147-156.
- Riley, P.A., 1997, Melanin, *The international journal of biochemistry and cell biology*, 29 (11), 1235-1239.
- Ring, B.D., Scully, S., Davis, C.R., Baker, M.B., Cullen, M.J., Pellemounter, M.A. and Danilenko, D.M., 2000, Systemically and topically administered leptin both

- accelerate wound healing in diabetic *ob/ob* mice, *Endocrinology*, 141 (1), 446-449.
- Roberts R.J., 2001, *Fish pathology*, 3rd ed., Saunders, W.B. (ed.), Philadelphia, PA.
- Rodríguez, A., Frühbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., Catalán, V., Sainz, N., Díez, J., Zalba, G. and Fortuño, A., 2006, The inhibitory effect of leptin on angiotensin II-induced vasoconstriction is blunted in spontaneously hypertensive rats, *Journal of hypertension*, 24, 1589–1597.
- Rodríguez, A., Fortuño, A., Gómez-Ambrosi, J., Zalba, G., Díez, J. and Frühbeck, G., 2007, The inhibitory effect of leptin on angiotensin II induced vasoconstriction in vascular smooth muscle cells is mediated via a nitric oxide-dependent mechanism, *Endocrinology*, 148 (1), 324-331.
- Rózanowska, M., Sarna, T., Land, E.J. and Truscott, G., 1999, Free radical scavenging properties of melanin interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals, *Free radical biology and medicine*, 26, (5/6), 518-525.
- Rund, C.R., Christiansen, J.L. and Johnson, J.C., 1998, In vitro culture of melanomacrophages from the spleen and liver of turtles: comments on melanomacrophage morphology, *Pigment cell research*, 11, 114-119.
- Santos-Alvarez, J., Goberna, R. and Sánchez-Margalet, V., 1999, Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes, *Cellular immunology*, 194, 6-11.
- Savini, I., Catani, M.V., Rossi, A., Duranti, G., Ranalli, M., Melino, G., Sabatini, S. and Avigliano, L., 2003, Vitamin C recycling is enhanced in the adaptive response to leptin-induced oxidative stress in keratinocytes, *Journal of investigative dermatology*, 121, 786-793.
- Saxena, N.K., Titus, M.A., Ding, X., Floyd, J., Srinivasan, S., Sitaraman, S.V. and Anania, F.A., 2004, Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation, *The journal of the federation of american societies for experimental biology*, 18, 1612-1614.
- Sayed-Ahmed, A., Rudas, P. and Bartha, T., 2005, Partial cloning and localisation of leptin and its receptor in the one-humped camel (*Camelus dromedarius*), *The veterinary journal*, 170, 264-269.
- Scalia, M., Geremia, E., Corsaro, C., Santoro, C., Baratta, D. and Sichel, G., 1990, Lipid peroxidation in pigmented and unpigmented liver tissues: protective role of melanin, *Pigment cell research*, 3 (2), 115-119.
- Schneider, R., Bornstein, S.R., Chrousos, G.P., Boxberger, S., Ehninger, G. and Breidert, M., 2001, Leptin mediates a proliferative response in human gastric mucosa cells with functional receptor, *Hormone and metabolic research*, 33(1), 1-6.

- Schwartz, M.W., Baskin, D.G., Bukowski, T.R., Kuijper, J.L., Foster, D., Lasser, G., Prunkard, D.E., Porte, D., Woods, S.C., Seeley, R.J. and Weigle, D.S., 1996, Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in *ob/ob* Mice, *Diabetes*, 45, 531-535.
- Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Woods, S.C., Weigle, D.S., Campfield, L.A., Burn, P. and Baskin, D.G., 1997, Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus, *Diabetes*, 46, 2119-2123.
- Seufert, J., Kieffer, T.J., Leech, C.A., Holz, G.G., Moritz, W., Ricordi, C. and Habener, J.F., 1999, Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus, *the journal of clinical endocrinology and metabolism*, 84 (2), 670-676.
- Shi, Y-B., 2000, *Amphibian Metamorphosis, From Morphology to Molecular Biology*, Wiley-liss, New york.
- Shteyer, E., Liao, Y., Muglia, L.J., Hruz, P.W. and Rudnick, D.A., 2004, Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice, *Hepatology*, 40 (6), 1322-1332.
- Sichel, G., 1988, Biosynthesis and function of melanins in hepatic pigmentary system. *Pigment cell research*, 1 (4), 250-258.
- Sichel, G., Scalia, M. and Corsaro, C., 2002, Amphibia Kupffer cells, *Microscopy research and technique*, 57, 477-490.
- Siegmund, B., Lehr, H.A. and Fantuzzi, G., 2002, Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice, *Gastroenterology*, 122, 2011-2025.
- Siegrist-Kaiser, C.A., Pauli, V., Juge-Aubry, C.E., Boss, O., Pernin, A., Chin, W.W., Cusin, I., Rohner-Jeanrenaud, F., Burger, A.G., Zapf, J. and Meier, C.A., 1997, Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue, *Journal of clinical. investigation*, 100, 2858-2864.
- Sierra-Honigsmann, M.R., Nath, A.K., Murakami, C., Garcia-Cardena, G., Papapetropoulos, A., Sessa, W.C., Madge, L.A., Schechner, J.S., Schwabb, M.B., Polverini, P.J. and Flores-Riveros, J.R., 1998, Biological action of leptin as angiogenic factor, *Science*, 281, 1683-1686.
- Simon, J., Chevalier, B., Derouet, M., Leclercq, B., 1991, Normal adipose tissue. number and kinase activity of insulin receptors in liver of genetically fat chickens, *The journal of nutrition*, 121, 379-38.
- Sinha, M.K., Ohannesian, J.P., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Magosin, S., Marco, C. and Caro, J.F., 1996, Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects, *The journal of clinical investigation*, 97, 1344-1347.

- Smith-Kirwin, S.M., O'Conner, D.M., Johnston, J., Lancey, E.D., Hassink, S.G. and Funanage, V.L., 1998, Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk, *Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 83 (5), 1810-1813.
- Smolinska, N., Siawrys, G. and Kaminski, T. and Przala, J., 2007, Leptin gene and protein expression in the trophoblast and uterine tissues during early pregnancy and the oestrous cycle of pigs, *Journal of physiology pharmacology*, 58, 563-581.
- Spornitz, U.M., 1975, Studies on the liver of *Xenopus laevis*, *Anatomy and embryology*, 146 (3), 245-264.
- Stallmeyer, B., KaÈmpfer, H., Podda, M., Kaufmann, R., Pfeilschifter, J. and Frank, S., 2001, A novel keratinocyte mitogen: regulation of leptin and its functional receptor in skin repair, *Journal of investigative dermatology*, 117, 98-105.
- Stegeman, J.J. and Hahn, M.E., 1994. *Biochemistry and Molecular Biology of Monooxygenases, Current Perspectives on Forms, Functions, and Regulation of Cytochrome P450 in Aquatic Species*, In: Malins, D.C. and Ostrander, G.K. (eds.), *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. CRC, Boca Raton, FL, USA, 87-206.
- Stentiford, G.D., Longshaw, M., Lyons, B.P., Jones, G., Green, M. and Feist, S.W., 2003, Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine environmental research*, 55, 137-159.
- Stephens, T.W., Basinski, M., Bristow, P.K., Bue-Valleskey, J.M., Burgett, S.G., Craft, L., Hale, J., Hoffman, J., Hsiung, H.M., Kriauciunas, A., MacKellar, W., Rosteck, P.R., Schoner, B., Smith, D., Tinsley, F.C., Zhang, X-Y. and Heiman, M., 1995, The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the *obese* gene product, *Nature*, 377, 530-532.
- Storey K.B. and Storey J.M., 1990, Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation, *The quarterly review of biology*, 65(2), 145-174.
- Sweeney, G., 2002, Leptin signalling, *Cellular signalling*, 14, 655-663.
- Taïldeman, J., Pérez-Novo, C.A., Rottiers, I., Ferdinande, L., Waeytens, A., Colvener, V.D., Bachert, C., Demetter, P., Waelput, W., Braet, K. and Cuvelier, C.A., 2009, Human mast cells express leptin and leptin receptors, *Histochemistry and cell biology*, 131, 703-711.
- Takahashi, Y., Okimura, Y., Mizuno, I., Iida, K., Takahashi, T., Kaji, H., Abe, H. and Chihara, K., 1997, Leptin induces mitogen-activated protein kinase-dependent proliferation of C3H10T1/2 cells, *Journal of biological chemistry*, 272 (20), 12897,12900.
- Tanabe, K., Okuya, S., Tanizawa, Y., Matsutani, A. and Oka, Y., 1997, Leptin induces proliferation of pancreatic β cell line MIN6 through activation of mitogen-

- activated protein kinase, *Biochemical and biophysical research communications*, 241, 765-768.
- Taouis, M., Chen, J.W., Daviaud, C., Dupont, J., Derouet, M. and Simon, J., 1998, Cloning the chicken leptin gene, *Gene*, 208, 239-242.
- Taouis, M., Dridi, S., Cassy, S., Benomari, Y., Raver, N., Rideau, N., Picard, M., Williams, J. and Gertler, A., 2001, Chicken leptin: properties and actions, *domestic animal endocrinology*, 21, 319-327.
- Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.Y., Campfield, L.A., Clack, F.T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K.J., Smutko, J.S., Mays, G.G., Woolf, E.A., Monroe, C.A. and Tepper, R.I., 1995, Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R, *Cell*, 83, 1263-1271.
- Terman, A. and Brunk, U.T., 2004, Lipofuscin, *The international journal of biochemistry and cell biology*, 36, 1400-1404.
- Tian, Z., Sun, R., Wei, H. and Gao, B., 2002, Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation, *Biochemical and biophysical research communications*, 298, 297-302.
- Trevenzoli, I.H., Rodrigues, A.L., Oliveira, E., Thole, A.A., Carvalho, L., Figueiredo, M.S., Toste, F.P., Neto, J.F.N., Passos, M.C.F., Lisboa, P.C. and Moura, E.G., 2010, Leptin treatment during lactation programs leptin synthesis, intermediate metabolism, and liver microsteatosis in adult rats, *Hormone and metabolic research*, 42, 483-490.
- Tsuchiya, T., Shimizu, H. Horie, T. and Mori, M., 1999, Expression of leptin receptor in lung: leptin as a growth factor, *European journal of pharmacology*, 365, 273-279.
- Tsuda, K., Kimura, K. and Nishio, I., 2002, Leptin improves membrane fluidity of erythrocytes in humans via a nitric oxide-dependent mechanism—an electron paramagnetic resonance investigation, *Biochemical and biophysical research communications*, 297 (3), 672-681.
- Unger, R.H., Zhou, Y-T. and Orci, L., 1999, Regulation of fatty acid homeostasis in cells: Novel role of leptin, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 96, 2327-2332.
- Vaisse, C., Halaas, J.L., Horvath, C.M., Darnell, J.E., Stoffel, M. and Friedman, J.M., 1996, Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and *ob/ob* mice but not *db/db* mice, *Nature genetics*, 14, 95-97.
- Venditti, P., Daniele, C.M., Balestrieri, M. and Meo, S.D., 1999, Protection against oxidative stress in liver of four different vertebrates, *Journal of experimental zoology*, 284, 610-616.

- Vigliano, F.A., Bermúdez, R., Quiroga, M.I. and Nieto, J.M., 2006, Evidence for melano-macrophage centres of teleost as evolutionary precursors of germinal centres of higher vertebrates: an immunohistochemical study, *Fish and shellfish immunology*, 21, 467-471.
- Volkoff, H., Eykelbosh, A.J. and Peter, R.E., 2003, Role of leptin in the control of feeding of goldfish *Carassius auratus*: interactions with cholecystokinin, neuropeptide Y and orexin A, and modulation by fasting, *Brain research*, 972, 90-109.
- Wang, M-Y., Zhou, Y.T., Newgard, C.B. and Unger, R.H., 1996, A novel leptin receptor isoform in rat, *Federation of european biochemical societies*, 392, 87-90.
- Wang, J., Liu, R., Hawkins, M., Barzilai, N. and Rossetti, L., 1998, A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat, *Nature*, 393, 684-688.
- Wang, J., Liu, R., Liu, L., Chowdhury, R., Barzilai, N., Tan, J. and Rossetti, L., 1999, The effect of leptin on *lep* expression is tissue-specific and nutritionally regulated, *Nature medicine*, 5 (8), 895-899.
- Wang, J., Leclercq, I., Brymora, J.M., Xu, N., Ramezani-Moghadam, M., London, R.M., Brigstock, D. and George, J., 2009, Kupffer cells mediate leptin-induced liver fibrosis, *Gastroenterology*, 2009, 137, 713-723.
- Watson, A.M., Poloyac, S.M., Howard, G. and Blouin, R.A., 1999, Effects of leptin on cytochrome P-450, conjugation, and antioxidant enzymes in the *ob/ob* mouse, *Drug metabolism and disposition*, 27 (6), 695-700.
- White, D.W. and Tartaglia, L.A., 1996, Leptin and OB-R: Body weight regulation by a cytokine receptor, *Cytokine and growth factor reviews*, 7 (4), 303-309.
- Wiechmann, A.F. and Wirsig, C., 2003, *Color atlas of Xenopus laevis histology*, Kluwer Academic Publishers, Norwell.
- Wolke, R.E., 1992, Piscine macrophage aggregates: a review. *Annual review of fish diseases*, 2, 91-108.
- Xie, Z.H., Zhong, H.B., Li, H.J. and Hou, Y.J., 2011, The structural organization of the liver in the Chinese Fire-bellied Newt (*Cynops orientalis*), the *international journal of morphology*, 29 (4), 1317-1320.
- Wells, K.D., 2007, *The Ecology and Behavior of Amphibians*, University of Chicago Press., Chicago.
- Yamagishi, S., Edelstein, D., Du, X., Kaneda, Y., Guzmán, M. and Brownlee, M., 2001, Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A, *Journal of biological chemistry*, 276 (27), 25096-25100.

- Yamashita, T., Murakami, T., Otani, S., Kuwajima, M. and Shima, K., 1998, Leptin receptor signal transduction: OBRa and OBRb of *fa* Type, *Biochemical and biophysical research communications*, 246, 752-759.
- Yang, S.Q., Lin, H.Z., Lane, M.D., Clemens, M. and Diehl, A.M., 1997, Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 94, 2557–2562.
- Yang, G., Ge, H., Boucher, A., Yu, X. and Li, C., 2004a, Modulation of direct leptin signaling by soluble leptin receptor, *Molecular endocrinology*, 18 (6), 1354-1362.
- Yang, S., Koteish, A., Lin, H., Huang, J., Roskams, T., Dawson, V. and Diehl, A.M., 2004b, Oval cells compensate for damage and replicative senescence of mature hepatocytes in mice with fatty liver disease, *Hepatology*, 39 (2), 403-411.
- Yorio, M.P.D., Bilbao, M.G., Pustovrh, M.C., Prestifilippo, J.P. and Faletti, A.G., 2008, Leptin modulates the expression of its receptors in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis in a differential way, *Journal of endocrinology*, 198, 355-366.
- Zapata, A.G. and Amemiya, C.T., 2000, *Phylogeny of lower vertebrates and their immunological structures*, Origin of evolution of the vertebrate immune system, In: Du Pasquier, L., Litman, G.W. (eds.), Springer, Berlin, 67-107.
- Zastrow, O., Seidel, B., Kiess, W., Thiery, J., Keller, E., Böttner, A. and Kratzsch, J., 2003, The soluble leptin receptor is crucial for leptin action: evidence from clinical and experimental data, *International Journal of obesity*, 27, 1472-1478.
- Zeidan, A., Purdham, D.M., Rajapurohitam, V., Javadov, S., Chakrabarti, S. and Karmazyn, M., 2005, Leptin induces vascular smooth muscle cell hypertrophy through angiotensin II -and endothelin-1 dependent mechanisms and mediates stretch-induced hypertrophy, *Journal of pharmacology experimental therapeutics*, 315, 1075-1084.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J.M., 1994, Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue, *Nature*, 372, 425-432.
- Zhang, Y., Olbort, M., Schwarzer, K., Nusslein-Hildesheim, B., Nicolson, M., Murphy, E., Kovalski, T.J., Schmidt, I. and Leibel, R.L., 1997, The leptin receptor mediates apparent autocrine regulation of leptin gene expression, *Biochemical and biophysical research communications*, 240, 492-495.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Tuğba Duzla
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	14.06.1989, Zonguldak
Telefon	0537 606 46 24
E-mail	tugba_duzla@hotmail.com

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoloji/Zooloji	2015
Lisans	İ.Ü. Fen Fakültesi/Biyoloji	2011
Lise	Yeşilköy 50.Yıl Lisesi	2006