

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

138021

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

SIÇAN YAĞ HÜCRELERİNDE LEPTİN HORMONU İLE KARBONİK
ANHİDRAZ III İZOENZİMİ ARASINDAKİ ETKİLEŞMENİN İN VITRO
İNCELENMESİ

138021

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

DOKTORA TEZİ

AHMET ALVER

TRABZON 2003

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

•

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

SIÇAN YAĞ HÜCRELERİNDE LEPTİN HORMONU İLE KARBONİK
ANHİDRAZ III İZOENZİMİ ARASINDAKİ ETKİLEŞMENİN İN VİTRO
İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

AHMET ALVER

Ocak, 2003

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

SIĞAN YAĞ HÜCRELERİNDE LEPTİN HORMONU İLE KARBONİK
ANHİDRAZ III İZOENZİMİ ARASINDAKİ ETKİLEŞMENİN İN VITRO
İNCELENMESİ

Ahmet ALVER

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :16. 1. 2003

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 5. 3. 2003

Tez Danışmanı

: Prof. Dr. E. Edip KEHA

Jüri Üyesi

: Prof. Dr. Kaya EMERK

Jüri Üyesi

: Prof. Dr. Orhan DEĞER

Jüri Üyesi

: Prof. Dr. Ekin ÖNDER

Jüri Üyesi

: Doç. Dr. Haluk TESTERECİ

Enstitü Müdürü

: Doç.Dr. Abdulkadir REİS

Ocak, 2003

TRABZON

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER	I
ÖNSÖZ	III
TABLolar DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karbonik Anhidraz enzimi	3
2.1.1. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri	4
2.1.2. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Metabolik Roller	6
2.1.3. Karbonik Anhidraz III izoenzimi	7
2.1.4. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	10
2.2. Yağ Dokusu ve metabolik özellikleri	10
2.3. Leptin Hormonu	12
2.3.1. Leptin Geni ve Protein Yapısı	12
2.3.2. Leptin Reseptörleri	13
2.3.3. Leptinin Etki Mekanizması ve Metabolik Rolü	15
2.3.4. Leptin Üretimi ve Salgılanmasının Kontrolü	20
3. MATERYAL VE METOD	22
3.1. Deneyde Kullanılan cihazlar	22
3.2. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
3.3. Doku Explantları ve Hücre Kültürü İçin Besi Yeri Hazırlanması	23
3.4. Doku Eksplantlarının Hazırlanması ve Deney Gruplarının Oluşturulması	24
3.5. Leptin Tayini	25
3.6. Doku Explantlarında Dorzolamidin Karbonik Anhidraz İnhibisyonu	27

3.6.1 Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini	27
3.6.2 Doku Explantlarında Protein Tayini	28
3.7 Yağ Hücre Kültürünün Hazırlanması ve Deney gruplarının Oluşturulması	30
3.8. RNA İzolasyonu	32
3.9. Reverse Transcriptase-PCR ile CA III mRNAsı Tayini	33
3.10. Agaroz Jel Elektroforezi	34
3.11. Elektroforez Sonuçlarının Değerlendirilmesi	34
3.12. İstatistiksel Analiz	35
4. BULGULAR	36
4.1. Doku Eksplantlarından Elde Sonuçlar ve İstatistiksel Bulgular	36
4.1.1 Leptin Salgılanması ile İlgili Sonuçlar	36
4.1.2. Dorzolamid İnhibisyonu ile İlgili Sonuçlar	38
4.2. Yağ Hücre Kültürlerinden Elde Edilen Sonuçlar	39
4.2.1 Agaroz Jel Elektroforezi Sonuçları	39
5. TARTIŞMA.	43
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	49
7. ÖZET	50
8. SUMMARY	51
9. KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	57

ÖNSÖZ

Bu çalışma K.T.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve Hematoloji Bilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Doktora eğitimimde değerli katkılarından dolayı, başta danışman hocam Prof. Dr. E. Edip KEHA, Yrd.Doç.Dr. Fahri UÇAR ve Prof. Dr. Ercüment OVALI olmak üzere, Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Ekin ÖNDER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Doç.Dr. Haluk TESTERECİ ve Doç. Dr. S. Caner KARAHAN'a ve tüm Biyokimya Anabilim Dalı görevlilerine teşekkür ederim. Ayrıca, daima yakın ilgilerini gördüğüm K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü yönetici ve idari personeline de şükranlarımı ifade etmeyi bir borç bilirim.

Trabzon, Ocak 2003

Ahmet ALVER

Bu proje TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir
Kod no: SBAG-AYD-366 (101S242)

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Karbonik anhidraz izoenzimleri, hidrataz aktiviteleri ve hücre içi yerleşimleri	4
Tablo 2. CA aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımı	28
Tablo 3. Protein ölçümü için reaksiyon karışımı	29
Tablo 4. RT-PCR da kullanılan primer dizileri	33
Tablo 5. Deney gruplarındaki leptin değerleri	36
Tablo 6. Deney gruplarındaki CA III mRNA / β -aktin mRNA oranı	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Karbonik anhidraz tarafından katalizlenen CO ₂ hidrasyonu reaksiyonu mekanizması	3
Şekil 2. Leptin reseptörleri	14
Şekil 3. Leptin sinyal iletim sistemi	16
Şekil 4. Leptinin lipid metabolizması, enerji sarfıyatı ve enerji alınımına etkisi	17
Şekil 5. Leptinin anti-lipogenik etkisi	19
Şekil 6. Leptin ölçümünde kullanılan standart grafiği	26
Şekil 7. Protein tayininde kullanılan standart grafiği	30
Şekil 8. Deney gruplarındaki leptin seviyeleri	37
Şekil 9. Deney gruplarındaki ortalama CA aktiviteleri	38
Şekil 10. Agaroz jelin fotoğrafı	39
Şekil 11. Jel dökümantasyon sisteminde seçilen bantlar.	40
Şekil 12. Deney gruplarındaki ortalama CA III mRNA / β -aktin mRNA oranları	41

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Obezite kronik olarak enerji sarfıyatı ve besin alınımı arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak aşırı enerjinin yağ kitlesi olarak depolanmasıdır. Obezitenin biyokimyasal temelini anlayabilmek için zayıf ve şişman hayvanların yağ dokularını mukayese eden in vivo ve in vitro birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda şişman ve zayıf hayvanların yağ dokusu arasında çeşitli fonksiyonel farklar ortaya konulmuştur (örneğin şişmanlarda yağ dokusunun insulin duyarlılığının azaldığı, yağ asidi sentez hızının arttığı gibi)(1). 1994 yılında, yağ dokusu tarafından sentezlenen ve hipotalamusu etkileyerek gıda alınımını ve enerji dengesini düzenleyen leptin hormonun keşfedilmesinden sonra, bu hormonun çeşitli dokulara ve bu dokularda bulunan moleküllere olan etkisi in vivo ve in vitro olarak araştırılmıştır.

Ob geni ürünü olan leptin, 146 amino asitten oluşan peptit yapısında bir hormondur. Başlıca sentezlendiği yer yağ dokusudur. Ancak plasenta ve kemik iliği gibi organlardan da az miktarda leptin salgılanmaktadır. Leptinin salgılanma hızı ve plazmadaki miktarı vücuttaki toplam yağ kitlesi ile doğru orantılıdır. Yiyecek alınımının ve enerji dengesinin düzenlenmesinde leptinin önemli rolü vardır. Leptin hipotalamusta nöropeptid Y ekspresyonunu baskılayarak sistemik etkisini gösterir. Leptin otokrin olarak da yağ dokusunu etkilemekte ve yağ asitleriyle triaçilgliserollerin sentezini azaltmaktadır. Böylece, hücre içi lipid konsantrasyonu düşürmektedir. Leptin, yine, yağ dokusunda lipid oksidasyonunu artırmaktadır. Yağ dokusu üzerine olan bu etkisini bazı enzimlerin ekspresyonunu etkileyerek yerine getirmektedir(2,3).

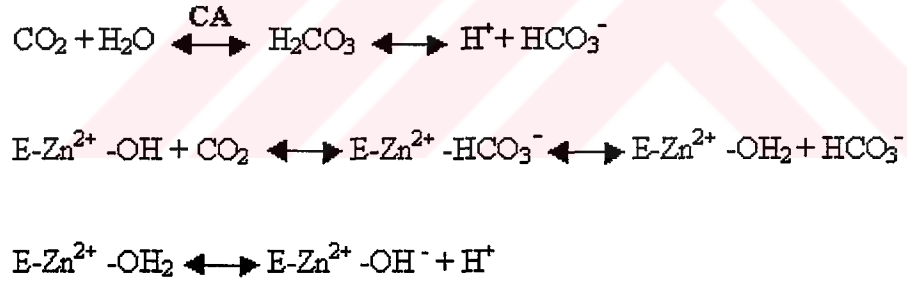
Karbonik anhidraz(CA) şimdiye kadar 14 izoenzimi bulunan bir metalloenzimdir. Bu izoenzimler insan ve sıçanlarda farklı doku dağılımına sahiptir. Bu izoenzimlerden karbonik anhidraz III (CA III) sıçanların yağ dokusunda bol olarak sentezlenir(4). Sıçanların yağ hücrelerinin, hücre içi proteinlerinin %24'ü,

toplam protein içeriğinin de %11'i CA III'tür. Yapılan çalışmalarda, obez sıçanlarda bu proteinin miktarında azalma olduğu gösterilmiştir. Bu azalma hakkında çeşitli fikirler ileri sürülmüş, ancak, sebebi tam olarak aydınlatılamamıştır(4,5). Bu çalışmada, sıçanlardan elde edilecek yağ dokusu hücre kültürlerinde leptin hormonunun CA III ekspresyonuna olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, karbonik anhidraz inhibitörlerinin üzerine yapılan çalışmalarda, pankreasda karbonik anhidraz inhibisyonunun insulin salgılanmasını inhibe ettiği gösterilmiştir(6). Benzer şekilde, karbonik anhidraz inhibisyonun leptin salgılanması üzerine olan etkisinin de araştırılması hedeflenmiştir. Ayrıca bu çalışmada deksametazon ve insulinin CA III mRNA seviyeleri olan etkisi leptinin etkisiyle karşılaştırılmak üzere incelenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik anhidraz adı verilen enzimler (CA, E.C.4.2.1.1), on dört farklı izoenzimi ve CA aktivitesi olmayan bazı CA ilişkili proteinleri kodlayan bir gen ailesinin ürünleridir. Memeli CA'ları aktif bölgelerinde katalitik aktivite için gerekli olan bir adet Zn^{2+} iyonu ihtiva ederler. Karbonik anhidraz karbondioksitin(CO_2) hidrasyonunu veya bikarbonatın (HCO_3^-) dehidrasyonunu dönüştürümlü olarak katalizler (Şekil 1)(4,7).



Şekil 1. Karbonik anhidraz tarafından katalizlenen CO_2 hidrasyonu reaksiyonunun mekanizması

Karbonik anhidraz yukarıdaki reaksiyonun yanında karboksilik, sülfonik, karbonik ve fosforik esterlerin, aldehitlerin ve piruvatın hirolizini de katalizler. Ancak, bunların fizyolojik önemi henüz gösterilememiştir(8).

Bilinen enzimler arasında katalitik aktivitesi en yüksek olan enzim karbonik anhidraz II'dir. CA izoenzimlerinin aktif bölgelerindeki amino asit rezidülerinin farklılığından dolayı katalitik aktiviteleri birbirinden farklıdır. Katalitik aktivite

sırası; CA II > CA IV > CA I > CA III şeklindedir. Örneğin: insan CAII maksimal CO₂ hidrasyonu turnoveri; $1,4 \times 10^6 \text{ sn}^{-1}$, insan CAIII için; $1 \times 10^4 \text{ sn}^{-1}$ dir(9).

2.1.1. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

Karbonik anhidraz canlılarda en yaygın metalloenzimlerden biridir. Memelilerde doku dağılımı, hücre içi yerleşimleri, kinetik özellikleri ve inhibitörlere karşı duyarlılıkları birbirinden farklı on dört ayrı (CA I-XIV) karbonik anhidraz izoenzimi tarif edilmiştir(Tablo 1).

Tablo 1. Karbonik anhidraz izoenzimleri, hidrataz aktiviteleri ve hücre içi yerleşimleri

İzoenzim	Katalitik Aktivite (hidrataz)	Hücre yerleşimi
CA I	Düşük	Sitozolik
CA II	Yüksek	Sitozolik
CA III	Çok Düşük	Sitozolik
CA IV	Yüksek	Membrana Bağlı
CA V	Hafif Yüksek	Mitokondri Matriksi
CA VI	Orta Dereceli	Tükürük İçinde
CA VII	Yüksek	Sitozolik
CA VIII	Yok	Muhtemelen Sitozolik
CA IX ^a	Yüksek	Membrana Bağlı
CA X	Yok	Bilinmiyor
CA XI	Yok	Membrana Bağlı
CA XII ^a	Düşük	Membrana Bağlı
CA XIII ^b	Muhtemelen yüksek	Bilinmiyor
CA XIV	Düşük	Membrana Bağlı

^aCA IX ve CA XII tümör hücrelerinde sentez edilir. ^bCA XIII bir protein olarak izole edilmemiştir. cDNA'sı fare meme dokusunda gösterilmiştir.

CA I eritrositlerde hemoglobinden sonra miktarı en fazla olan sitozolik yerleşimli proteindir. Eritrositlerde CA I, CA II ye oranla yaklaşık olarak 5-6 kat daha fazla bulunmasına rağmen toplam eritrosit CA aktivitesinin %50 sinden sorumludur. CA I eritrositler dışında kalın bağırsak ve kornea epitellerinde, lenste, ter bezlerinde, yağ dokusunda, miyoepitelyal hücrelerde, nötrofillerde ve adrenal bezin zona glomerulosa hücrelerinde sentez edilir(12,14).

CA II yüksek aktiviteli, sitozolik yerleşimli bir izoenzimdir. Geniş bir doku dağılımına sahiptir ve hemen hemen tüm dokularda sentez edilir. Şimdiye kadar bilinen CA eksikliğinin neden olduğu hastalık “CA II eksikliği sendromu”dur ve bu hastalık renal tubuler asidoz, osteopetrozis ve cerebral kalsifikasyonla karakterizedir(4,10).

CA III esas olarak yavaş kasılan iskelet kaslarında bulunur. Düşük aktiviteli bir izoenzimdir. CO₂ hidrasyon aktivitesi CA II'nin sadece %1 kadardır. Bu izoenzim sülfonamidlerle inhibisyona en dirençli olanıdır.

CA IV membrana bağlı izoenzimdir(4). CA IV mebrana glikozilfosfotidilinositol(GPI) ile tutunmuştur ve SDS'a karşı dirençlidir. İnsan hariç şimdiye kadar çalışılan tüm memeli CA IV'leri glikoprotein yapısındadır. CA IV memelilerde başlıca akciğerlerde, böbreklerde, gözde, mide-bağırsak kanalında ve bazı kapillar damarlarda bulunur(4).

CA V mitokondri matriksinde bulunan bir izoenzimdir. Çekirdek DNAsı tarafından kodlanır. İnsandaki doku dağılımı tam olarak belirlenememesine rağmen ratlarda başlıca karaciğer, kalp, akciğer, dalak, pankreas ve bağırsaklarda sentez edilir. CA V mitokondride glukoneogenez ve üre devri için gerekli olan HCO₃⁻ iyonunun sağlanmasında rol alır. Ayrıca, yapılan çalışmalar CA V'in pankreastan insülin salgılanması için gerekli olduğunu göstermiştir(6).

CA VI tükürük bezinde bulunur ve tükürükle birlikte salgılanır. Glikoprotein yapısındadır ve disülfid bağları ile yapısı kararlı hale getirilmiştir. CA VII, cDNAsı ve mRNAsı in situ hibridizasyon ile tükürük bezinde gösterilmiştir, ancak, protein olarak izole edilmemiştir. Kimyasal yapısı,biyolojik özellikleri ve fonksiyonları hakkında kesin bir bilgi yoktur(4,10).

CA VIII, CA X, CA XI akatalitik formlardır. Bu izoenzimlerde Zn^{2+} 'nin aktif bilgeye bağlanması için gerekli bir veya daha fazla histidin rezidüsü eksiktir. CA IX bir transmembran proteinidir. Normal olarak mide-bağırsak kanalında sentez edilir. Bunun dışında normalde sentez edilmediği dokuların tümörlerinde de görülür. CA XII ve CA XIV membrana bağlı izoenzimlerdir. Bağırsak hücreleri ve tümör hücrelerinde sentez edilirler(4,10-13).

2.1.2. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Metabolik Roller

Karbonik anhidrazların fizyolojik rolü CO_2 hidrasyonunu dönüşümlü olarak katalizlemelerinden ileri gelmektedir. Bu reaksiyon ile oluşan HCO_3^- , H^+ ve CO_2 çeşitli dokularda fizyolojik ve metabolik olaylarda kullanılır. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katıldığı bazı fizyolojik ve metabolik olaylar şunlardır:

Eritrositlerde hemoglobinden sonra en bol bulunan protein CA I' dir. Eritrositlerde yüksek miktarda oluşan bu reaksiyon, anyon kanalıyla birlikte asit- baz dengesine katkı yapılmaktadır ve ayrıca CO_2 de taşınabilmektedir. Yine akciğerlerde ve böbreklerde CO_2 atılımı ve asit- baz dengesi CA II ve CA IV tarafından düzenlenmektedir(14).

Kemiklerde remodeling fazının bir bölümünde osteoklastlar ihtiva ettikleri CA II'nin oluşturduğu asidik ortam sayesinde kemik rezorbsiyonunu gerçekleştirirler. Ayrıca bu yolla kemikten kalsiyum ve fosfat mobilizasyonu sağlanır(15).

Sinir sistemi dokuları için CA esansiyeldir ve burada CA II ve IV bol miktarda bulunur. Santral sinir sisteminde asit- baz dengesini kontrolünde, miyelin sentezinde, beyin omurilik sıvısının sentezi, salgısı ve rezorbsiyonunda, ayrıca nöronal aktivitenin kontrolünde bu izoenzimlerin rol oynadığı ifade edilmiştir(4).

Gastrik mukoza pariyetal hücrelerinden HCl salgılanması CA aracılığıyla olmaktadır. Tükürüğe salgılanan CA VI ve sindirim sisteminin üst dokularında bulunan CA II'nin tükürüğün proton ve tamponlama kapasitesini sağladıkları ve sindirim sisteminin üst kısımlarının asidik ortama karşı korunmasında rol aldıkları ifade edilmiştir(16).

Lens ve cornea dokusunda CA II ve IV bulunduğu ve ön kamera sıvısının sekresyonu ve rezorbsiyonunda etkili olduğu bilinmektedir. Glokom tedavisinde uzun zamandan beri CA inhibitörleri kullanılmaktadır(17).

Yağ asitlerinin ve primidin nükleotidlerin sentezi ile üre devri için gerekli olan HCO_3^- substratı da CA'larca temin edilir. Ayrıca, piruvatın piruvat karboksilaz katalizörlüğünde oksaloasetata dönüşerek glukoneogenezde kullanılması da CA'larca temin edilen HCO_3^- varlığında olmaktadır(18)

2.1.3. Karbonik Anhidraz III İzoenzimi

Karbonik anhidraz III, 28 kDa molekül ağırlığında ve 259-260 amino asit rezidüsünden ibaret sitozolik yerleşimli monomerik bir proteindir(19). CA III çok düşük aktiviteli bir izoenzimdir. CA III'ün CO_2 hidrasyonu aktivitesi CA II'nin sadece %1 i kadardır. Bu düşük aktivite kısmen proton mekiğı görevi yapan His 64'ün olmamasından, kısmen de, CA II'dekinin aksine Leu 198'in yerine CA III'de Phe198'in bulunmasındandır. Bu yapı farklılığından dolayı CA III'ün aktif bölgesi diğer izoenzimlere göre daha dar bir kavite(oyuk) oluşturmaya meyillidir. Aktif bölgenin bu özellikleri CA III'ün CO_2 hidrasyonu aktivitesini ve CA inhibitörlerine ilgisini sınırlamaktadır(4,20).

CA III 'ün diğer CA izoenzimlerinde farklı bir takım özellikleri vardır. CA III, hidrataz aktivitesinin yanı sıra, esteraz, ve diğer izoenzimlerde olmayan, asit fosfataz aktivitelere sahiptir. Yakın zamanda bu aktivitenin rat(sıçan) karaciğerinde oksidan stres altında CA III ile glutatyon arasında oluşan disülfid bağları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir(20,21). Asit fosfataz aktivitesinin diğer izoenzimlerde bulunmayan Arg-67 den kaynaklandığı sanılmaktadır(1). Normal şartlar altında CA III sentez etmeyen NIH-3T3 hücrelerine rat CA III cDNA sı yerleştirildiğinde bu hücrelerin hidrojen peroksit ile indüklenmiş apoptoza karşı direnci artmıştır ve CA III'ün bir oksiradikal toplayıcı olarak hücreleri oksidatif yıkımlardan koruduğu ileri sürülmüştür(21,22).

Memelilerde CA III'ün başlıca sentez yeri iskelet kasıdır. Özellikle, yavaş kasılan kasların (tip I lifleri) sitozolik proteinlerinin yaklaşık %8 kadarı karbonik

anhidrazdır. CA III'ün kesin fizyolojik rolü bilinmemektedir. Çelişkili sonuçlar olmasına rağmen CA III'ün iskelet kasında CO₂'nin sarkolemmal membrandan diffüzyonunu kolaylaştırdığı tahmin edilmektedir. Son dönemlerde yapılan çalışmalarda, tip 1 kaslarda CA III'ün karbohidrat kullanım hızını etkilediği ve glukoz-yağ asidi devrinin bir parçası olabileceği ileri sürülmüştür(4,23,24).

CA III'ün yüksek iskelet kası spesifikliği nedeniyle çeşitli nöromusküler hastalıklarda ve iskelet kası hasarına neden olan hadiselerde AST (aspartat aminotransferaz) ve CK (kreatin kinaz)'dan daha spesifik bir markör olduğu, ayrıca, serum CK yüksekliklerinin ayırıcı tanısında önemli bir markör olarak kullanılabileceği yapılan birçok çalışma ile ortaya konulmuştur(25).

Rat beyaz yağ dokusunda da CA III bol olarak sentez edilmektedir. Rat beyaz yağ dokusunda sitozolik proteinlerin %24'ünü, total protein içeriğinin de %11'ini CA III oluşturur. Ratlarda CA III'ün bol olarak bulunduğu bir diğer doku da karaciğerdir. Rat karaciğerinde CA III cinsiyet bağımlı tarzda sentez edilir(1). Erkek rat karaciğerinde en bol bulunan proteinlerden biri CA III tür, ancak dişi ratların karaciğerinde CA III çok daha az miktarda (5-15 kat daha az) sentez edilmektedir. Bu farklılığın testosterondan kaynaklandığı gösterilmiştir. Cinsiyete bağımlı ekspresyon iskelet kasında veya diğer tür farelerde gözlenmez(1). Bunların dışında tükürük bezleri, uterusun düz kas hücreleri, eritrositler, prostat, akciğerler, böbrek, kolon ve testisler gibi dokularda da düşük miktarda CA III sentez edilmektedir(4). Bu dokularda CA III'ün sentezi hormonal ve sinirsel olarak kontrol edilmektedir(20).

Ratlarda CA III obezite ile birlikte beyaz yağ dokusunda ve karaciğerde azalmaktadır. İskelet kasında bu azalma gözlenmemektedir. Zayıf ratlarda beyaz yağ dokusunda CA III ekspresyonu yaklaşık olarak obezlere göre 10 kat daha fazladır. Obez ratların zayıflaması ile birlikte CA III mRNA seviyeleri artmaktadır. Bu hayvanlar tekrar kilo aldıklarında da CA III mRNA seviyeleri azalmaktadır. Açlıktada benzer durumlar gözlemlenmektedir. Beyaz yağ dokusunda meydana gelen CA III seviyelerindeki bu değişikliklerle ilgili çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Streptozotocin verilerek diabetes mellitus yapılan obez ratlarda baskılanmış olan CA III seviyelerinin arttığı gözlemlenmiş ve beyaz yağ dokusunda CA III seviyelerinin ya hormonal, ya da

metabolik olarak insulin seviyelerindeki değişmeye bağlı olarak düzenlendiği ileri sürülmüştür. Buna bağlı olarak da yağ dokusunda CA III'ün fosfoenolpiruvat (PEP)karboksikinaz, fruktoz 1,6-bisfosfataz ve glukoz 6-fosfataz enzimlerinde olduğu gibi yüksek insulin/glukagon oranınca baskılanabileceği belirtilmiştir. Karaciğerde gözlenen değişiklikler ise, obeziteye bağlı olarak plazma testosteron seviyelerindeki ve karaciğer androjen reseptörleri konsantrasyonundaki azalmaya bağlanmıştır(1,5).

CA III'ün yağ dokusundaki rolü hakkında kesin bir bilgi yoktur. Malonil-CoA yağ asitlerinin sentezinde yapı taşı olarak kullanılır. CA asetil-CoA'nın malonil-CoA'ya dönüşmesi için gerekli olan bikarbonatı sağlar. CA inhibitörleri yağ asidi sentezini inhibe ederler. CA III'ün bu yolla yağ dokusunda yağ asidi sentezine katıldığı ileri sürülmüştür. Ancak bu görüş obez hayvanlarda CA III seviyesinin azalması ile ters düşmektedir, çünkü, bu hayvanlarda de novo yağ asidi sentezi artmaktadır(5).

CA III hidrataz aktivitesinin yanı sıra esteraz ve diğer izoenzimlerde olmayan asit fosfataz aktivitesine sahiptir. Bu aktivite diğer fosfataz aktivitesine sahip enzimlerle kıyaslandığında, çok düşük olmasına rağmen, yağ dokusunda çok yüksek seviyedeki CA III'ün azalmış olan bir fosfataz aktivitesini dengeleyebileceği bildirilmiştir. Böylece CA III beyaz yağ dokusunda şimdiye kadar bilinmeyen bir fonksiyonu yerine getirebileceği ileri sürülmüştür(1,5)

Şimdiye kadar obez ve zayıf hayvanlarda hücre içi pH düzenlenmesi ile ilgili bir çalışma yapılmadığı için, obezite ile birlikte değişen lipoliz, glikoliz, de nova lipogenez gibi olayların çok küçük pH değişimlerinden etkilenip etkilenmeyeceği hakkında bir bilgi yoktur. Ancak yağ asidi sentezi ciddi biçimde asit ürettiği için CA III'ün yağ hücresinde pH düzenlenmesinde rolü olacağı da ifade edilmiştir(1).

2.1.4. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Karbonik anhidrazlar aktif bölgelerinde bulunan Zn^{2+} iyonuna bağlanan birçok iyon ve bileşik tarafından inhibe edilirler. Tek yüklü anyonlar (halojenürler, N_3^- , NCO^- , SCN^- , CN^- gibi) ve bazı nötral organik bileşikler (sülfonamidler) enzime sıkıca

bağlanarak “dönüşümsüz” inhibisyona neden olurlar. Alkoller, organik solventler ve amid bileşikleri gibi diğer nötral inhibitörler ise enzime gevşek bağlanarak zayıf bir inhibisyon meydana getirirler(26).

Sülfonamid türevleri (asetazolamid, etokzolamid, metazolamid, dorzolamid gibi) CA’nın spesifik ve güçlü inhibitörleridir. İnhibisyon etkilerini ya enzimin aktif bölgesindeki Zn^{2+} iyonuna bağlı su molekülü ile yer değiştirerek ya da Zn^{2+} iyonuna ilave bir ligand bağıyla bağlanarak gösterirler ve dönüşümsüz inhibisyona sebep olurlar. Bunlar daha çok deneysel inhibisyon için kullanılır. Ancak, bunlardan en çok bilineni ve kullanılanı asetazolamiddir. Asetazolamid, farmakokinetik ve metabolik özelliklerinin uygunluğundan dolayı yaklaşık 40 yıldan beri glokom, epilepsi, irtifa hastalığında ve diüretik tedavide kullanılmaktadır. Asetazolamid oral yolla kullanılan güçlü bir CA inhibitörüdür. Asetazolamidin topikal uygulaması aynı sonuçları vermez, çünkü, asetazolamidin membranlardan diffüzyonu zordur(26). Bu yüzden, topikal uygulamada hücre membranını daha iyi geçen dorzolamid kullanılmaktadır(17).

2.2. Yağ Dokusu ve Metabolik Özellikleri

Yağ dokusu, etrafı kan damarları, fibroblastlar, immun hücreler ve kollajen lifleriyle çevrilmiş, içleri lipidlerle dolu hücrelerin oluşturduğu bir tür gevşek bağ dokusudur. Yağ dokusunun esas hücreleri adipositlerdir. Adipositler bağ dokusunda tek başına bulunabildikleri gibi küçük gruplar halinde de bulunabilirler. Çoğunlukla vücudun çeşitli yerlerinde büyük kümeler halinde dağılmıştır. Özellikle deri altı ve mesenterial bölgelerde yağ dokusu geniş lobüler tarzda yayılmıştır. Farklı yerleşim, yapı, renk ve patoloji gösteren “üniloküler”(beyaz yağ dokusu) ve “multiloküler”(kahverengi yağ dokusu) olmak üzere iki tip yağ dokusu vardır. Olgun üniloküler yağ dokusu hücreleri sitoplazmalarının ortasında tek bir sarı yağ damlacığı içerirler. Multiloküler yağ dokusunda ise sitoplazmada çok sayıda lipid damlacığı ve kahve rengi mitokondriler bulunur(27).

Yağ dokusu vücudun en büyük enerji deposudur. Enerjiyi depolayan (glikojen halinde) diğer organlar ise karaciğer ve kastır. Beslenmenin aralıklı ve glikojen

temininin de sınırlı olması yemekler arasında serbest hale getirilecek büyük bir kalori deposuna ihtiyaç göstermektedir. Bu kalori deposu da yağ dokusudur. Yağ miktarı devamlı olarak değişim içinde olan yağ dokusu besinsel, hormonal ve sinirsel olarak düzenlenir(27-28).

Enerji deposu olmasının yanı sıra yağ dokusunun vücutta başka görevleri de vardır. Özellikle deri altı yağ dokusu vücut yüzeyinin şekillenmesinde rol oynar. Ellerde avuç içine ve ayaklarda taban altına yastık gibi yayılarak travmaları emer. Isı geçirgenliği az olduğu için vücudun ısı yalıtımını sağlar. Dokular arasındaki boşlukları doldurarak böbrek gibi bazı organların yerinin korunmasını sağlar. Yağ dokusu bir endokrin doku gibi davranarak enerji dengesinin ayarlanmasında, nöroendokrin ve immun fonksiyonların düzenlenmesinde aktif olarak rol olan proteinleri salgılar. Yağ dokusunun endokrin fonksiyonu en iyi leptin tarafından karakterize edilmiştir. Total leptin eksikliği veya duyarsızlığı çeşitli nöroendokrin anormalliklerine ve otomik ve immun fonksiyon bozukluklarına, diabet, morbid obezite ve hiperfajiye neden olur. Yağ dokusu steroid hormonların dönüşümlerini gerçekleştirir. Seks steroidlerinin lokal üretimi yağ dağılımının önemli bir belirleyicisi olabilir. Üretilen östrojenle meme dokusunda ve deri altı dokusunda yağ birikimi sağlanır. Androjen üretimi ise abdominal yağlanmayı artırır. Yağ dokusu TNF- α ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinleri üretir ve salgılar. Sitokinlerin üretimi ve plazma seviyeleri yağlanma oranına ve enerji dengesine bağlı olarak değişir. TNF- α yağ metabolizmasının anahtar bileşenlerini düzenler ve yağ hücrelerinin apoptozisle ölmesini kolaylaştırır. Lipolizin artması ve lipogenezin inhibisyonu vasıtasıyla obezitenin engellenmesi üzerine doğrudan etkisi vardır. Bunların dışında yağ dokusundan glukokortikoidler, peptid hormon prekürsörleri (anjiotensin gibi), komplement faktörler(C₃), transforming growth faktör α , doku faktörü, plazminojen aktivatör inhibitörü, AdipoQ, adiponektin ve resistin gibi moleküller de sentez edilirler. Bu ürünlerin çoğu parakrin ve otokrin olarak etki gösterirken leptin ve PAI-1 (plazminojen aktivatör inhibitörü)gibileri uzak hedeflere de etki eder(28).

2.3. Leptin Hormonu

Bir feedback mekanizması ile vücut yağlarının vücut ağırlığının düzenlenmesinde rol oynadığı ilk kez Kennedy tarafından yaklaşık 40 yıl önce ileri sürülmüştü ve buna bağlı olarak da lipostat hipotezi ortaya atılmıştı. Parabios deneyleri tokluk sinyali olarak etki gösteren bir hormonal faktörün kanıtlarını ortaya koymuştur. Yine bu deneyler homozigot ob/ob mutasyonlu farelerde bu sinyalin yetersiz olduğunu göstermiştir(2).

1994 yılında Zhang ve arkadaşlarının ob genin klonlanmasına ve bu genin ürünü olan proteinin keşfine kadar bu tokluk faktörü belirlenemedi. Bu yeni bulunan proteine yunanca da zayıf anlamına gelen *leptos*'dan türetilen leptin adı verildi(2,29). Leptin başlıca beyaz yağ dokusunda üretilmektedir ve merkezi sinir sisteminde hipotalamusu etkileyerek yiyecek alımını ve enerji tüketimini düzenlemektedir(30).

2.3.1. Leptin Geni ve Protein Yapısı

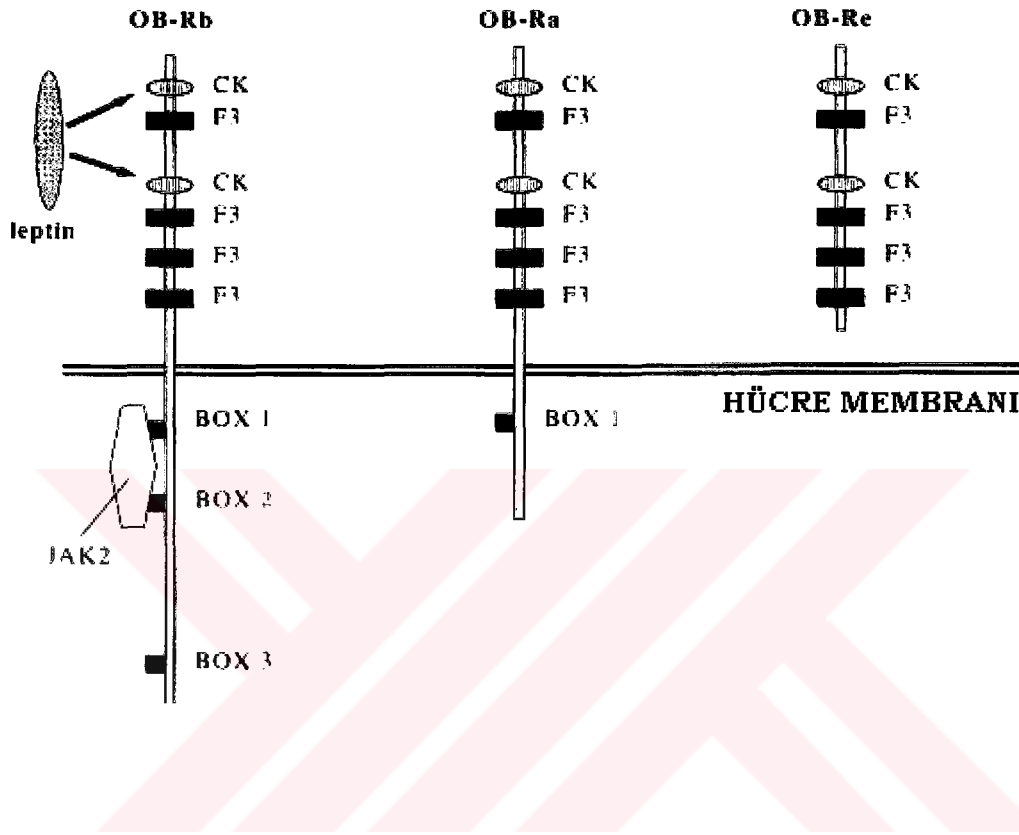
Ob gen ilk olarak pozisyonel klonlama tekniği ile farelerde belirlenmiştir. İnsanda ob geni kromozom 7q31.3'de yer alır ve 3 exon ve 2 introndan ibarettir. Exon1 sadece kodlanmayan 26 baz çiftinden oluşur. Promoter bölge yaklaşık 3kb lık bir bölge ile sınırlandırılmıştır ve çeşitli CCAAT/enhancer binding protein(C/EBP) ve SP-1 motiflerini, glukokortikoid cevap elementi ve muhtelif cAMP'ye cevap veren element bağlayıcı protein bölgelerini içerir. Gen 4,5 kb lık bir mRNA kodlar ve bu da bilinen diğer proteinlerle homolojisi olmayan 167 amino asitlik bir protein kalıplık eder. Sinyal peptidinin ayrılmasından sonra 16 kDa'luk 146 amino asit içeren olgun protein kalır. Bu protein stabilitesi ve aktivitesi için gerekli olan karboksil ucundaki bir disülfid bağına sahip tek zincirli bir proteindir. Primer yapısı itibariyle homoloji olmamasına rağmen, leptin sekonder ve tersiyer yapısı itibariyle haematopoietik sitokinlere benzemektedir(29).

Leptin esas olarak beyaz yağ dokusundan sentez edilmesine rağmen az miktarda da kahverengi yağ dokusu, plasenta, iskelet kası, mide ve meme epitelyumunda ve beyinde de yapılmaktadır(28,3). Leptinin salgılanma hızı ve plazma konsantrasyonu toplam yağ kitlesi ile orantılıdır. Bu yüzden leptin vücut yağ kitlesinin büyüklüğünü gösteren bir sinyal olarak kabul edilir. Şimdiye kadar timsah, amfibian, sinek ve balıklarda leptin hormonu bulunamamıştır. Bu yüzden leptinin sadece sıcak kanlı(endotermik) hayvanlara ait bir hormon olduğu kabul edilmektedir(3).

2.3.2. Leptin Reseptörleri

Tek membran geçişli bir protein olan leptin reseptörü (OB-R) ilk defa fare choroid plexus'unda bulunmuştur ve bu reseptörün db geni tarafından sentez edildiği gösterilmiştir(3). Homozigot db/db mutasyonlu rodent ve insanlarda aşırı iştah ve obezite, hiperinsulinemi, tip II diabete benzer bozukluklar, oksijen tüketiminde ve bazal metabolizmada azalma, insuline direnç, hiperglisemi gibi leptin eksikliğinin tipik belirtileri gözlenir. Ancak bu hayvanlara dışarıdan leptin uygulanması ile bozukluklar giderilememektedir (31,32).

Leptin reseptörü sitokin Sınıf I ailesindendir ve IL 6 reseptörünün glikoprotein-130 alt birimi ile ciddi homolojisi vardır. Leptin reseptörünün iki temel formu vardır. Kısa form ve uzun form(Şekil 2). Bunların da en az beş farklı izoformu vardır(3,31). Kısa form, hücre içi domaini kesilmiştir. Uzun form, hücre içi domaini tamdır. OB-R bir JAK (janus kinase) ve STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) motifi taşır. Reseptörün kısa formunda STAT eksiktir ki bu reseptörün esas olarak leptin taşıyıcısı olarak çalıştığı kabul edilir (choroid plexusda leptinin kan-beyin engelini geçmesine yarar). Ancak son dönemlerde bazı hücre kültürlerinde kısa formunda sinyal üretme yeteneği gösterilmiştir.(2,31). Bu iki formun dışında hücre içi domainini ve transmembran parçası olmayan bir çözünür(soluble) leptin reseptörünün olduğu ve bu reseptörün leptinin dolaşımında taşınmasından sorumlu olduğu ileri sürülmüştür(33).



Şekil 2. Leptin reseptörleri. OB-Rb: Uzun form, OB-Ra: kısa form, OB-Re: soluble form. CK: Sitokin reseptör domain, F3: fibronektin domain, BOX 1, BOX 2: JAK (jaunus kinase) bağlanma bölgesi. BOX 3: STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) bağlanma bölgesi.

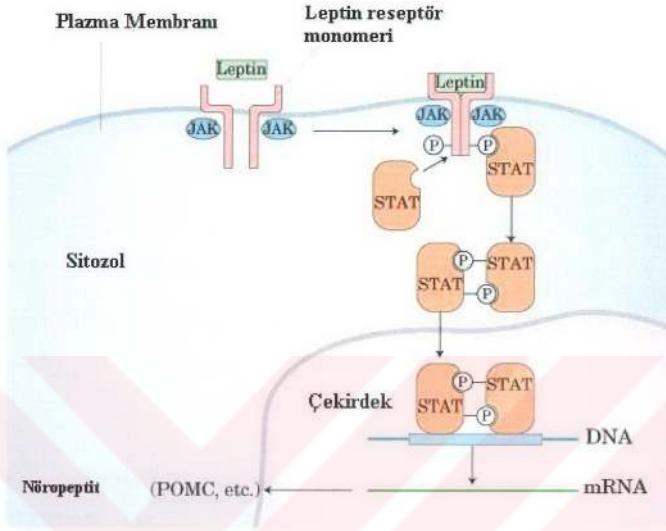
Leptin sistemik etkisini hipotalamusu etkileyerek gösterir. Hipotalamus ve merkezi sinir sistemi dışındaki dokularda da leptin reseptörü sentez edilmektedir. İskelet kası, akciğer, karaciğer, kalp, testisler, böbrek, pankreas ve yağ dokusunda da hem kısa hem de uzun form reseptörler yapılmaktadır. Bu dokularda leptin reseptörünün varlığı bu hormonun parakrin ve otokrin olarak da etki gösterebileceğinin bir kanıtı olarak kabul edilmiştir. Gerçekten de leptin merkezi sinir

sisteminden bağımsız olarak bu dokulara etki etmektedir. Bu bahsedilen dokularda kısa form mRNA'sı uzun form mRNA'sından yaklaşık 10-30 kez daha fazla miktarda sentezlenmektedir. Sadece hipotalamusta uzun form kısa formdan daha fazla yapılır. Bu dokularda leptin reseptörünün kısa formunun fonksiyonu hakkında bir bilgi yoktur(31).

Leptin reseptörü plazma membranı üzerinde monomer halde bulunur. Reseptörün COOH ucu hücre içi kısımda, NH₂ ucu ise hücre dışı kısmında bulunur. Leptinin bağlanması ile reseptörün dimerleşmesi sağlanır ve reseptöre bağlı olan janus kinazlar(JAK) reseptörün stoplazmik domaininde yer alan tirozini fosforiller. Bu fosfotirozinler STAT (yağ STATları olarak bilinen STAT 3,5 ve 6) proteini için bağlanma yerleri oluşturur. STAT proteinlerinin fosforilasyonundan sonra bu proteinler birbirleri ile dimer yaparak çekirdeğe taşınırlar ve hedef genlerin transkripsiyonunu sağlarlar(Şekil 3)(30).

2.3.3. Leptinin Etki Mekanizması ve Metabolik Rolü

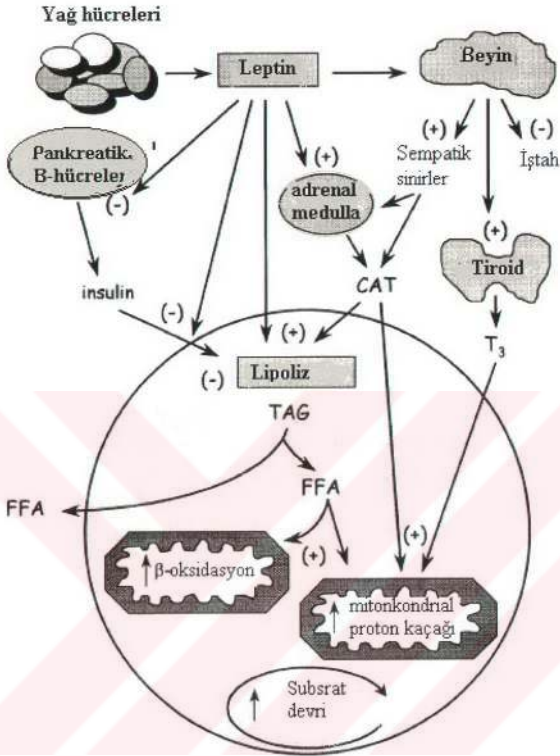
Leptinin sistemik etkisini göstermesinde en kritik hedef doku hipotalamustur. Leptin hipotalamusu etkileyerek iştahın azalmasını ve enerji tüketimini artırır. Leptin doyurulabilir bir transport sistemi ile kan-beyin bariyerini aşar(4,7). İştah azaltıcı etki NPY(neuropeptide Y) gibi iştah artırıcı (orexigenic) molekülleri baskılayarak ve α -MSH (α -melanosit-stimüle edici hormon), CRH (kortikotropin-salgılayıcı hormon), CART (kokain- and amfetamin- regule transkript) gibi iştah azaltıcı (anorexigenic) molekülleri artırarak yerine getirilmektedir(28-34).



Şekil 3. Leptin sinyal iletim sistemi. STAT: signal transducers and activators of transcription, JAK: janus kinaz, POMC: proopiomelanokortin.

Hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde leptin uygulanmasının beslenen ve uyanık olan hayvanlarda metabolik hızda bir artışa sebep olmadığı ancak uyku ve yemeklerin sindirilmesi gibi metabolik hızın düşük olduğu fizyolojik durumlarda metabolik hızı artırdığı tespit edilmiştir(3)

Leptin enerji sarfiyatındaki artışı çeşitli dokulardaki mitokondrilerden proton kaçağını artırarak yapar. Leptin proton kaçağını dokulardaki UCP(uncoupling protein) sentezini artırarak yerine getirir(Şekil 4).



Şekil 4. Leptinin lipid metabolizması, enerji sarfiyat ve enerji alınımına etkisi. CAT: katekolaminler, TAG: triaçilgliserol, FFA: serbest yağ asitleri, T₃: triiodothironin

Sadece kahve rengi yağ dokusunda sentez edilen UCP1 miktarının leptin uygulanması ile in vivo olarak arttığı gösterilmiştir. Ancak kahverengi yağ dokusu kültürlerinde ve siniri alınmış kahverengi yağ dokusunda leptinin bu etkisi

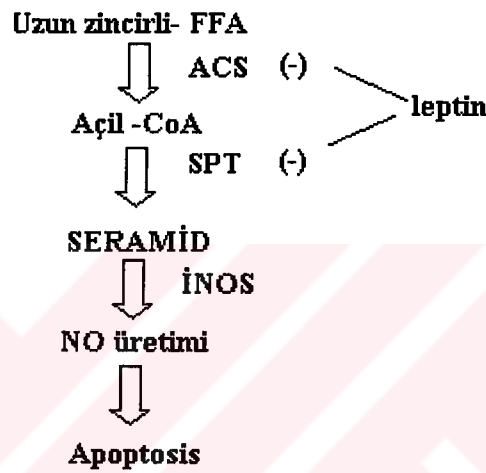
gözlenmemiştir. Leptin bu dokudaki UCP1 seviyelerini sempatik sinir sistemi aracılığıyla düzenlemektedir. İskelet kası ve yağ dokusunda bulunan UCP3 miktarı, leptinin hipotalamus-hipofiz-tiroid eksenini etkileyerek, T_3 üretimini kontrol etmesi ile düzenlenir. Leptin T_3 hormonunun sentezini artırır ve buna bağlı olarak UCP3 miktarı artar. Artan UCP miktarları mitokondride ATP sentezi için gerekli olan protonların bu proteinlerce kullanılmasına, dolayısıyla, ATP üretiminin azalmasına ve ısı oluşumuna neden olur(3,31).

Leptin merkezi sinir sistemi üzerinden iştahın azalması ve metabolik hızdaki artış gibi görevleri yerine getirirken diğer dokularda bulunan reseptörleri ile etkileşerek bu dokularda meydana gelen metabolik olayları da düzenler.

Vücuttaki yağ kitlesinin miktarını lipit sentezi ile yıkımı arasındaki denge belirler. Enerjinin %90 dan fazlası yağ dokusunda yağ asidi salgılanmasını sebep olan bir hormonal uyarı ile hidrolizlenebilen triaçilgliserol(TG) olarak depolanmıştır. Serbest kalan yağ asidi iki metabolik yolda kullanılır; ya ATP üretimi için β -oksidasyona uğrar ya da reesterifiye olur. Yapılan bir çok çalışmada leptinin yağ dokusunda lipolizi artırdığı gösterilmiştir. Bu dokuda leptin asetil-CoA karboksilaz enziminin sentezini baskılamaktadır. Bu enzim uzun zincirli yağ asitlerinin sentezinde hız belirleyici enzimdir ve ayrıca bu enzim korbohidratlardan yağ asitlerine geçişte ve TG olarak enerjinin depolanmasında esansiyeldir. Yine, leptin eksikliği ile karakterize ob/ob farelerde bu enzim miktarı çok yüksektir. Uzun dönem yüksek miktarda leptin uygulanan deney hayvanlarında hormona duyarlı lipaz mRNA'sı miktarında artma, yağ asidi sentetaz enzimi mRNA'sı miktarında da azalma meydana geldiği gösterilmiştir. Leptin hormonu tarafından lipolizin düzenlenmesi moleküler seviyede tamamen aydınlatılmamış olmasına rağmen ilk elde edilen sonuçlar leptinin glukagon ve katekolaminler gibi cAMP miktarını artırarak bu olayı gerçekleştirdiğini göstermektedir. Leptin yağ dokusunda TG içeriğini azalttığı gibi yağ hücrelerinin apoptozis ile ölümünü de artırmaktadır(3).

Leptin yağ dokusu dışında pankreas, karaciğer, iskelet kası gibi TG depolayan dokularda da lipolizi artırırken lipogenezi baskılar. Bu dokularda özellikle pankreasta TG içeriğinin düşük seviyede tutulması önemlidir. Bu dokuda

biriken TG serin-palmitoil transferaz enziminin aktivitesini artırır. Böylece, dokuda seramid sentezi artar. Seramid iNOS ekspresyonunu artırır ve aşırı nitrikoksit(NO) oluşmasına sebep olur. Bu da hücreyi apoptozise götürür ve sonuç olarak diabetes ve diğer hastalıklar gelişir(Şekil 5)(3,35).



Şekil 5. Leptinin anti-lipogenik etkisi. ACS: açıl CoA sentetaz, SPT:serin palmitoil transferaz, İNOS: indüklenebilir nitrik oksit sentetaz, NO: nitrik oksit

Leptinin periferik dokularda, özellikle de, iskelet kasında glukoz kullanımını artırdığı, hem in vivo, hem de in vitro olarak gösterilmiştir. Bu dokuda leptin glukoz taşıyıcılarının hem sayısını, hem de translokasyonunu artırır. Bu mekanizma tam aydınlatılmamış olmasına rağmen fosfatidilinositol-3 kinaz(PI3-kinaz) seviyesinde insulin ve leptin hücre içi sinyal yollarının bir çarpaz iletişimi(cross-talk) olduğu sanılmaktadır. Leptin glukozun hücre içine girişini artırdığı gibi, glukozun glikojen sentezi için kullanımını da artırmaktadır(30,31,36). Soleus kasında leptinin piruvat kullanımı ile PDH(piruvat dehidrogenaz) aktivitesini ve Krebs devrini ayarladığı gösterilmiştir. Bu etki PDH ve Krebs devrinin doğrudan leptinle uyarılması ile olabileceği gibi, mitokondrial uncoupling işlemini etkileyen bu hormonun dolaylı

etkisinin de bir sonucu olabilir. Mitokondrial uncoupling ATP/ADP oranını azaltır ve bu da Krebs devri enzimlerini ve PDH'ı aktive eder(31).

Leptinin protein metabolizması üzerine etkilerini araştıran az sayıda çalışma yapılmış ve leptinin MSS (merkezi sinir sistemi) vasıtasıyla protein sentezini iskelet kasında kontrol ettiği ileri sürülmüştür(37).

2.3.4. Leptin Üretimi ve Salgılanmasının Kontrolü

Yağ hücrelerinde leptin üretilmesi ve salgılanması leptinin doğrudan otokrin veya parakrin olarak negatif feedback sinyalleri ve birçoğu leptin tarafından düzenlenen diğer hormonlarca düzenlenir. Bu hormonların çoğu ya lipolitik uyarıcılardır ya da inhibitörlerdir(3).

Etkisi kandaki glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişmekle beraber, leptin gen ekspresyonu insulince hem in vivo hem de in vitro olarak artırılır(30). Bir lipoliz uyarıcısı olan glukagon ile leptin arasında bir feedback sinyalinin var olup olmadığı halen gösterilememiştir. Ancak ratlar üzerinde yapılan çalışmalarda insuline benzer şekilde glukagon salgılanmasının leptin tarafından glukoz durumuna ve sempatik uyarılmaya bağlı olarak arttığı gösterilmiştir. Glukagonun leptin üretimine bir etkisi olup olmadığı bilinmemekle birlikte, glukagonun ikinci habercisi ve lipoliz için gerekli olan cAMP leptin üretimini inhibe etmektedir. cAMP üretimi, aynı zamanda, adrenoreseptörler tarafından da uyarılır ve dolayısıyla, katekolaminler leptin üretiminin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Bu hormonlar hücre içi cAMP miktarını artırarak leptin üretimini azaltırlar. Adrenal medullada leptin reseptörünün varlığı gösterilmiştir ve leptin epinefrin ve norepinefrin üretimini ve salgılanmasını artırmaktadır. Daha önceden bahsedildiği gibi, leptin T_3 salgılanmasını da artırır. Yüksek T_3 seviyeleri plazma leptin seviyesinde azalmaya sebep olur. Diğer bir lipolitik ajan olan TNF- α 'nın leptin düzenleyici etkisi olduğu bulunmuştur. Leptin ve TNF- α yağ dokusunda sentezlenirler ve lipolizin kontrolünde önemli rol oynarlar. TNF- α in vitro leptin salgılanmasını ve üretimini azaltırken in vivo olarak artırır. Bu zıt ilişkinin sebebi henüz aydınlatılmamıştır. Seks hormonlarının leptin üretim ve

salgılanması üzerine olan etkileri ile ilgili in vivo ve in vitro çalışmalar arasında çelişkili sonuçlar olmasına rağmen leptin plazma konsantrasyonu ile testosteron arasında negatif, östrojen arasında pozitif korelasyon bulunmuştur(2,3).

Glukokortikoidler in vivo ve in vitro olarak leptin seviyelerini artırır. Bu artış insulinle meydana gelen artıştan çok daha fazladır. Sağlıklı geç erkeklere oral deksametazon verilmesi dokuz saat sonra leptin seviyelerinde ortalama 3 katlık bir artışa sebep olmuştur. Bu artışın, kısmen, deksametazonla indüklenmiş insulin seviyesindeki artışlardan olabileceği akla gelse de rat ve insan yağ hücre kültürlerinde deksametazonun leptin ekspresyonunu ve salgılanmasını artırdığı bildirilmiştir(2,38).



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Spektrofotometere (LKB Ultrospec K)

Kuartz küvet (Sigma)

Santrifüj (Hettich EBA 21, RETİNA 35 R)

pH metre (Hanna Instruments 8 416)

Karıştırıcı (Autovortex Mixer SA2)

Hassas terazi (Mp-300 Electronic Balance, Chyo)

CO₂'li etüv (jouan IG-150)

Laminar air flow (Powtech, Class II Safety Cabinet)

İnvert mikroskop (Olympus CK-2)

Etüv (Elektro-mag M 420B)

0,20 µm filtre (Schleicher & Schuell)

Kültür pleytleri (Orange)

Floresans mikroskopu (Olympus BH-2)

Elektroforez sistemi (EC250-90, E-C apparatus Corporation)

Transilluminatör (Vilber Lourmant)

Hood (Polaroid)

Manyetik karıştırıcı (Ikamag RH, IKA labortechnik)

Çalkalayıcı (Nüve)

Homojenizatör (Ultraturrax T 25, IKA labortechnik)

ELISA okuyucu (Spektraflour plus, TECAN)

ELISA yıkayıcı (Diagnostik Pasteur)

Jel analiz sistemi (BioDocAnalyze BDA U-192, Biometra)

Termocycle (Teche, Genius UK)

3.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sodyum klorür, sodyum hidroksit, sodyum dodesil sülfat, sülfürik asit, hidroklorik asit, trihidroksimetilamino metan (Tris), asetik asit, sodyum karbonat, bakır sülfat, sodyum potasyum tartarat, potasyum klorür, potasyum dihidrojen fosfat, sodyum dihidrojen fosfat, magnezyum sülfat, sodyum karbonat, etanol, sodyum bikarbonat E. Merck AG'den; tip II kollajenaz, sığır serum albumin, dekzametazon, Iscove's modified Dulbecc's medium(IMDM), etilen diamin tetraasetik asit(EDTA), agaroz, Folin Ciocalteu's fenol reaktifi, etidium bromür, penisilin, streptomisin SİGMA-ALDRICH Chemie GmbH'den; dorzolamide(Trusopt) Merck Sharp & Dohme'den; rekombinant rat leptin Biosource International'dan, RT-PCR primerleri, loading tampon, 100 bp leader Promega ve İontek'den; rat leptin ELISA kiti DRG International'dan; RNA izolasyon kiti Macherey-nagel GmbH'dan; RT-PCR kiti Life Technolgy'den; CO₂ gazı piyasadan temin edildi.

3.3. Doku Eksplantları ve Hücre Kültürü İçin Besi Yeri Hazırlanması

Doku eksplantlarında yapılacak olan çalışmalar için, öncelikle, uygun besi yeri hazırlandı. Laminar air flow 15-20 dakika UV ışığa maruz bırakılarak ortamın sterilizasyonu sağlandı ve daha sonra UV lamba kapatıldı. Çalışmada kullanılacak cam ve plastik malzemelerin sterilitesi kontrol edildi. Iscove's modified Dulbecco's medium(IMDM)'dan 8,7 g tartıldı. 1 L temiz, steril bir behere aktarıldı. Son hacmin yarısı kadar (250 mL) ddH₂O(didestile su) ilave edilerek cam baget ile karıştırılarak çözüldü. Üzerine 1µg/mL streptomisin, 10.000 U/mL penisilin ilave edildi. 2,4 mM konsantrasyonda olacak şekilde %7.5 NaHCO₃ solüsyonundan ilave edildi. Besi yerine %1(w/v) oranında BSA(sığır serum albumin) ilave edildi ve pH ölçümü yapıldı. pH yüksekliği durumunda pH 7.2 olacak şekilde ortama 0.15 N HCl ilave edildi. pH düşük ise düzeltme NaHCO₃ eklenerek gerçekleştirildi. pH ayarlamasından sonra son hacim 500 mL' ye tamamlandı. Laminar air flowda 50 mL enjektör

yardımıyla 0,20 μm filtreden steril silindirik şişeye filtrasyon yapıldı. 5 mL örnek alınıp etüvde inkübe edilerek sterilitte 7 gün sonra kontrol edildi. Kontaminasyon yoksa besi yeri kullanıma hazır olarak kabul edildi. Besi yeri şişesinin ağzı kapatılıp parafilm ile sarıldı. Besi yeri şişesinin üzerine bir etiket yapıştırıldı; besi yerinin içeriği, hazırlanış tarihi, hazırlayıcının ismi yazıldı ve $+4^{\circ}\text{C}$ ' de saklandı. Laminar air flow iyotlu etanolla silinerek ortam temizlenip steril edildi. Laminar air flow 5-10 dakika UV ışığa maruz bırakılarak ortamın sterilizasyonu sağlandı ve cihaz kapatıldı. Hücre kültürleri için yukarıda anlatılandan farklı olarak, steril cam pipet ile 50 mL serumsuz besi yeri uzaklaştırılıp yerine 50 mL fötal calf serum (FCS) ilavesi yapıldı. Ayrıca, % 1 oranında BSA ortama ilave edilmedi.(39,40) .

3.4. Doku Eksplantlarının Hazırlanması ve Deney Gruplarının Oluşturulması

Öncelikle deneyde kullanılacak hormon çözeltileri hazırlandı.

Stok deksametazon çözeltisi, 5 mg deksametazonun 1 mL etanolde çözülüp, besi yeri ile 10 mL'ye tamamlanması ve bu çözeltinin 1/1000 oranında seyreltilmesi ile hazırlandı. 80 μL besi yeri ile 1 mL'ye tamamlandığında 100 nM konsantrasyon

11 1111

UV lamba kapatıldıktan sonra laminar air flowda steril bir petriye alınan bu dokular bir bistüri yardımıyla ortalama 2-4mm³ lük parçalara ayrıldı ve görünen kan damarları ve genital organ kalıntıları uzaklaştırıldı. Bu parçalar mililitresinde 100 mg doku olacak şekilde 21 adet plastik hücre kültürü tüplerine konuldu. Bu tüplerden her bir grupta üç tüp bulunacak şekilde toplam yedi grup oluşturuldu.

Birinci grup bazal leptin salgılanma hızının tespit edilmesinde kullanıldı ve besi yeri ortamına hiçbir şey katılmadı(n =3).

İkinci grupta, CA III inhibisyonunun bazal seviyede leptin salgılanmasına olan etkisini incelemek için 1mM konsantrasyonda olacak şekilde(1mL besi yeri için 20µL Trusopt) besi yerine dorzolamid ilave edildi(n =3).

Üçüncü grupta, deksametazonun leptin salgılanmasına etkisini incelemek için 100nM konsantrasyonda olacak şekilde besi yerine deksametazon ilave edildi.(n =3)

Dördüncü grupta, insulinin leptin salgılanmasına etkisini incelemek için 100nM konsantrasyonda olacak şekilde besi yerine insulin ilave edildi(n =3).

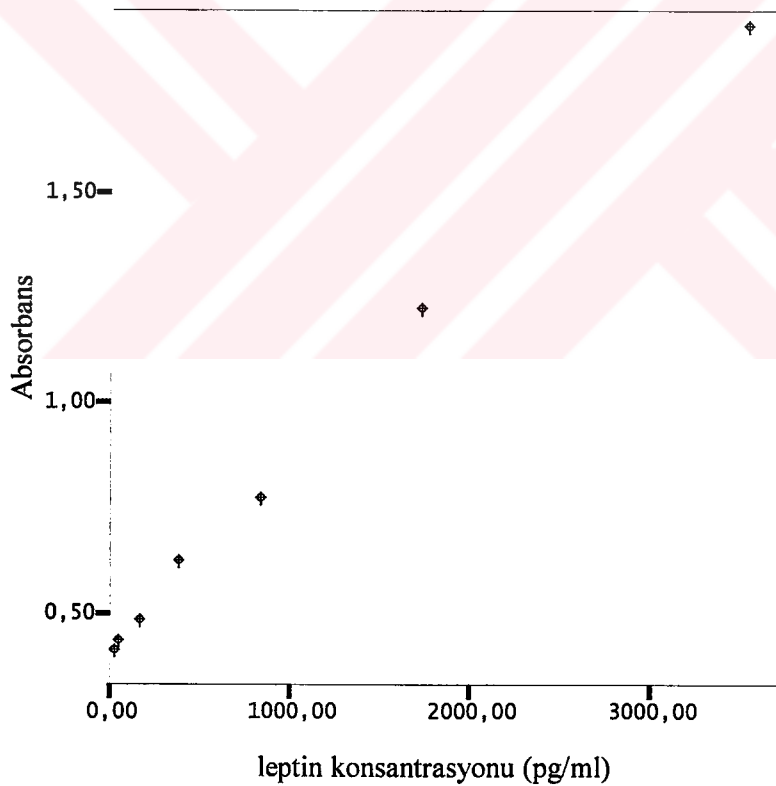
Beşinci grupta, deksametazon ve insulinin birlikte leptin salgılanmasına etkisini incelemek için 100nM konsantrasyonlarda olacak şekilde besi yerine deksametazon ve insulin ilave edildi(n =3).

Altıncı ve **yedinci** grupta sırasıyla üçüncü ve dördüncü gruplardaki deney ortamlarına CA-III inhibisyonunun etkisini incelemek amacıyla ikinci grupta belirtilen konsantrasyonda dorzolamid ilave edildi(n =3). Bu ilavelerden sonra tüplerin son hacimleri 4 mL'ye tamamlandı ve 37 °C 24 saat inkübe edildi(39). İnkübasyonun sonunda besi yerinden 100µL alındı ve leptin tayini yapıldı.

3.5. Leptin Tayini

Doku eksplantlarından ortama salgılanan leptin miktarı Enzim Immunometric Assay Kit'le(DRG International Inc.U.S.A) ölçüldü. Poliklonal antikorla(rat leptinine spesifik rabbit antikor) kaplanmış mikropleytlere örnekler ve standartlar yüklendi. Kısa bir inkübasyondan sonra yıkama işlemi ile fazlalık örnekler uzaklaştırıldı.

Horseradish peroksidazla işaretlenmiş ikici bir poliklonal antikor (rat leptinine spesifik rabbit antikor) mikropleytlere ilave edildi ve inkübasyondan sonra yıkama işlemi ile fazlalık antikor uzaklaştırıldı. Substrat çözeltisinin (%0,01'lik H_2O_2) ilavesinden sonra 30 dakikalık inkübasyondan sonra stop çözeltisi ilave edildi (1 N H_2SO_4) ve mikropleyt ELİSA okuyucusunda 405 nm'de okundu. Standartların absorbansı ve konsantrasyonlarından faydalanılarak standart grafiği çizildi ve bu grafik kullanılarak örneklerdeki leptin konsantrasyonu hesaplandı (şekil 6).



şekil 6. Leptin ölçümünde kullanılan standart grafiği

3.6. Doku Eksplantlarında Dorzolamidin Karbonik Anhidraz İnhibisyonu

3.6.1. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini

Yağ dokusu eksplantlarında dorzolamidin CA inhibisyonu yapıp yapmadığını tespit etmek için karbonik anhidraz aktivitesi ölçüldü. Bu amaçla aşağıdaki çözeltiler hazırlandı.

0.05 M tris-SO₄ tamponu (pH=7.00): 0,6 g tris yaklaşık 90 mL deiyonize suda çözüldü ve 1N H₂SO₄ ile pH=7.00 oluncaya kadar titre edildi. Sonra toplam hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti eksplantlardan homojenat hazırlanmasında kullanıldı.

Reaksiyon tamponu: 0,8 g Na₂CO₃ ve 0,42 g NaHCO₃ bir miktar deiyonize suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

5mM NaHCO₃ çözeltisi: 0,04 g NaHCO₃ bir miktar deiyonize suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti indikatör çözeltisinin hazırlanmasında kullanıldı.

İndikatör çözeltisi: 2,5 mg fenol red 100 mL 5mM NaHCO₃ çözeltisinde çözüldü.

Bazal ve dorzolamid grubundaki doku eksplantları üç defa serum fizyolojik ile yıkandı. Her bir eksplant 1,5 mL tris-SO₄ tamponu içinde homojenize edildi. Aktivite tayini Maren ve arkadaşları tarafından geliştirilen fenol red tekniği ile yapıldı (41). Renk dönüşümü ve geçen süreyi daha iyi gözlemek için doku homojenatları 1/3 oranında dilüe edildi. Ayrıca orjinal metotta 200 µL olan CO₂ miktarı 600 µL ye çıkarıldı. İndikatörün kırmızı renkten sarı renke dönmesi için gerekli süre enzimli(Tc) ve enzimsiz(To) olarak kaydedildi. Reaksiyon karışımı Tablo 2'de verildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 2. CA aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımı

	Numune (T _C)	T ₀
Reaksiyon Tamponu	50 µL	50 µL
İndikatör çözeltisi	100 µL	100 µL
Numune	50 µL	-
Tris-SO ₄ (pH 7,0)	-	50 µL
	Karıştırılır	Karıştırılır
Doygun CO ₂ çözeltisi	600 µL	600 µL

Bu yöntemle göre CA aktivitesi için, **bir enzim ünitesi(EU)**, enzim olarak meydana gelen CO₂ hidrasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlandığından

$$EU = (T_0 - T_C) / T_C$$

formülü ile hesaplandı

3.6. 2. Doku Eksplantlarında Protein Tayini

Doku eksplantlarında protein tayini Lowry metoduna göre yapıldı(42). Bu metoda göre protein çözeltisine alkali bakır çözeltisi ilavesiyle ortaya çıkan bakır ve protein yapısındaki peptit bağı kompleksinin üzerine Folin-Ciocalteu fenol reaktifi eklenmesiyle meydana gelen molibden ve tungsten mavisi rengin 750 nm’de verdiği absorbansın ölçülmesi prensibine göre protein miktarları belirlendi.

Lowry reaktifinin hazırlanması: 20 g NaCO₃ 260 mL deiyonize suda, 0,4 g CuSO₄ . 5H₂O 20 mL deiyonize suda, 0,2 g sodyum potasyum tartarat 20 mL deiyonize suda çözüldü. Daha sonra, bu üç çözelti karıştırılarak bakır reaktifi elde edildi. 10 g SDS 100 mL deiyonize suda ve 4 g NaOH 100 mL deiyonize suda çözüldü. bu üç çözelti kullanılmadan hemen önce 3:1:1 oranında karıştırıldı ve Lowry

reaktifi elde edildi.

0.2 N Folin reaktifi: 2 mL 2N Folin reaktifi 20 mL deiyonize suyla karıştırılır. Bu çözelti oda sıcaklığında ve karanlıkta birkaç ay stabildir.

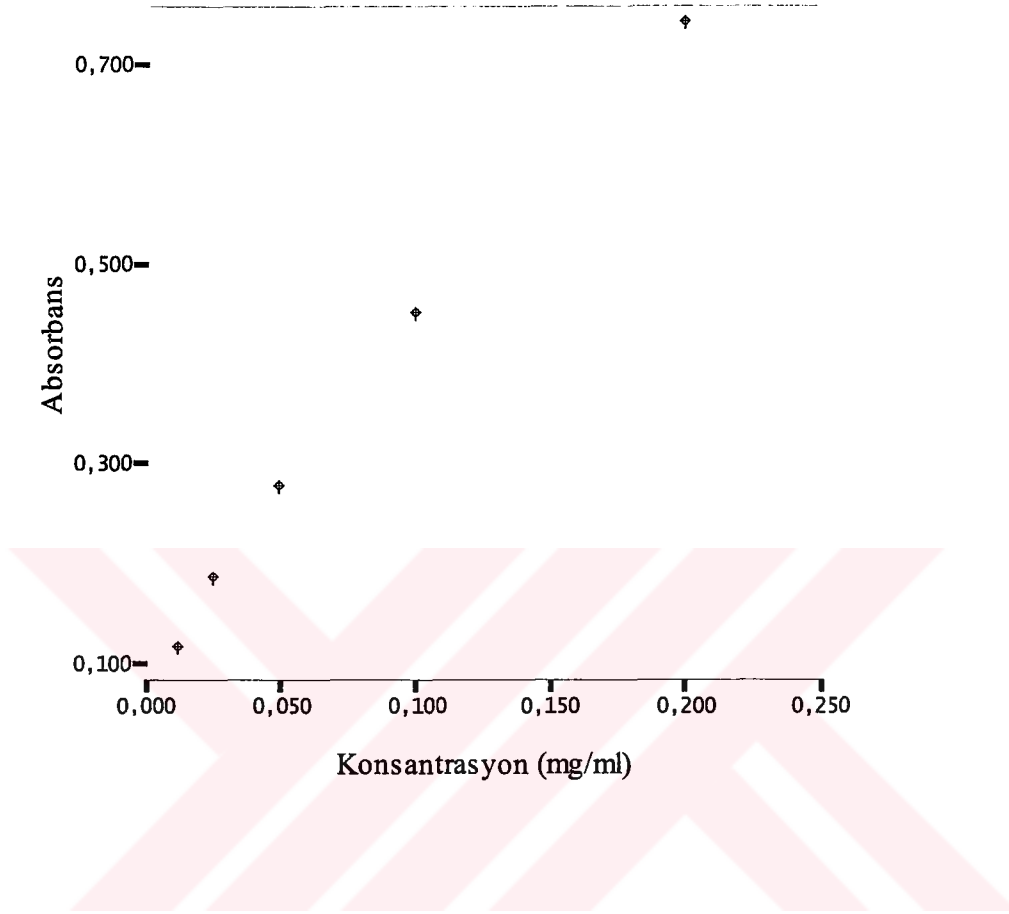
Ölçümler Tablo 3’de anlatıldığı gibi yapıldı.

Albumin standartları: 10 mg albumin 50 mL deiyonize suda çözülerek 0,2 mg/mL albumin standardı hazırlandı. Bu çözeltiden 0.1, 0.5, 0.025, 0,012 mg/mL’lik örnekler hazırlandı. Elde edilen değerlere göre protein standart grafiği çizildi(Şekil 7).

Tablo 3. Protein ölçümü için reaksiyon karışımı.

	Kör	Standart	Numune
Distile Su	400 μ L	-	-
Standart	-	400 μ L	-
Numune	-	-	400 μ L
Lowry	400 μ L	400 μ L	400 μ L
Karıştırılıp 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.			
0,2 N Folin reaktifi	200 μ L	200 μ L	200 μ L

Folin reaktifi eklenen numuneler hemen vorteksle karıştırıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 750 nm’de absorpsiyonlar spektrofotometrede okundu ve standart grafikten faydalanılarak konsantrasyonlar hesaplandı.



Şekil 7. Protein tayininde kullanılan standart grafiği

3.7. Yağ Hücre Kültürünün Hazırlanması ve Deney Gruplarının Oluşturulması

Çeşitli hormonların erkek ratların yağ dokusunda CA III mRNA sentezine olan etkisini incelemek için yağ hücre kültürü yapıldı. Çalışmada 3.3’de anlatılan besi yeri kullanıldı. Deneyde kullanılan diğer çözeltiler ise aşağıda anlatıldığı gibi hazırlandı.

Hank’s balanced salt çözeltisi: 0,20 g KCl, 0,03g KH₂PO₄, 8 g NaCl ve 0,024 g Na₂HPO₄ 500 mL distile suda çözöldü ve pH’sı 7,4’e ayarlandı. Bu çözelti tip II kollajenazı çözmek için kullanıldı. Bu çözeltiden 10 mL alınarak 100 mg tip II kollajenaz çözüldü(10mg/ mL).

0,055M Glukoz çözeltisi: 0,5 g glukoz tartıldı ve son hacim distile su ile 50

mL'ye tamamlandı. Bu çözelti parçalama tamponunun hazırlanmasında kullanıldı.

Parçalama tamponu: 0,350 g BSA tartıldı ve bir miktar destile suda çözüldü. Stok kollajenaz çözeltisinden 1 mL, 0,055 M glukoz çözeltisinden 100 μ L alınarak bu çözeltiye ilave edildi ve son hacim 10 mL ye tamamlandı.

Krebs-ringer bikarbonat çözeltisi: 7,3 g NaCl, 0,26 g KCl, 0,123 g MgSO₄, 0,1 g KH₂PO₄, 0,21 g NaHCO₃ ve 0,594 g glukoz bir miktar destile suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra son hacim 1 L' ye tamamlandı. Bu çözelti dokunun parçalanma işleminden sonra hücrelerin yıkanmasında kullanıldı.

Stok leptin çözeltisi: 1 mg rekombinat rat leptin 1 mL 10 mM sodyum sitrat çözeltisinde (pH = 4) çözüldü. Hazırlanan bu çözelti pH=7,2 olan % 1 BSA içeren Tris-HCl tamponu ile 1/10 dilüsyon yapıldı. Bu çözeltiden 100 μ L alınıp besi yeri ile 10 mL ye tamamlandı(1/100 dilüsyon). 1 mL besi yeri için 25 μ L kullanıldı(25ng/mL).

Deneyde yer alan diğer hormonlar 3.4' de bahsedildiği miktarlarda kullanıldı.

150-250 g ağırlığındaki erkek Sprague- Dawley ırkı ratlar saat 9-10 arası yapılan eter anestezisi ile öldürüldü ve takiben steril şartlar altında çıkarılan epididimal yağ dokusu 10 mL besi yerine konuldu. Laminar air flowda steril bir petriye alınan bu dokular bir bistüri yardımıyla ortalama 2-4mm³ lük parçalara ayrıldı ve görünen kan damarları ve genital organ kalıntıları uzaklaştırıldı. Bu parçalar 37°C de içinde tip II kollajenaz (1mg/mL), (%3,5) albumin ve (0,55 mM) glukoz bulunan 10 mL steril çözeltide 2-3 saat 37 °C'de etüvde bekletildi. İnkübasyon sırasında her 30 dakikada bir tüp alt-üst edilerek karıştırıldı. Doku parçaları kollajenaz tarafından tamamen parçalandıktan sonra(doku parçaları kaybolup, çözelti bulanık bir hal aldıktan sonra) tüp 800 rpm de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldı. Dipte kalan hücreler 5mL % 5 albumin içeren Krebs-Ringer çözeltisi ile yeniden çözüldü. Tüp hafifçe karıştırıldıktan sonra 800 rpm de 5 dakikada tekrar santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Bu şekilde hücreler üç defa yıkandı. Son yıkamadan sonra hücreler 2-3 mL besi yeri ile karıştırıldı ve ekime hazır hale getirildi(43). Bu hücreler 24 kuyucuklu hücre kültürü pileytinin 15 kuyucuğuna eşit hacimde dağıtıldı ve her bir

grupta üç kuyucuk bulunun toplam 5 grup oluşturuldu.

Birinci grup bazal CA III mRNA seviyesinin tespit edilmesinde kullanıldı ve besi yeri ortamına hiçbir şey katılmadı.

İkinci grupta, leptin hormonunu CA-III mRNA sentezine olan etkisini incelemek için 25 ng/mL konsantrasyonda olacak şekilde(1mL besi yeri için 25 µL rekombinant rat leptin) besi yerine ilave edildi.

Üçüncü grupta, insulinin CA-III mRNA sentezine olan etkisini incelemek için 100nM konsantrasyonda olacak şekilde besi yerine insulin ilave edildi.

Dördüncü grupta, deksametazonun CA-III mRNA sentezine olan etkisini incelemek için 100nM konsantrasyonda olacak şekilde besi yerine deksametazon ilave edildi.

Beşinci grupta, leptin ve insulinin birlikte CA-III mRNA sentezine olan etkisini incelemek için 100 nM konsantrasyonlarda olacak şekilde insulin ve 25 ng/mL konsantrasyonda leptin besi yerine ilave edildi.

Daha sonra tüm kuyucuklara son hacim 3 mL olacak şekilde besi yeri eklendi ve 37°C de % 5'lik CO₂'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücre kültürü revers mikroskopla incelendi.

3.8. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu Macherey-Nagel GmbH'dan alınan NucleospinRNAII kiti ile yapıldı. Laminar air flowda hücre kültürü pleytlerindeki besi yeri dibinde yaklaşık 1 mL kalacak şekilde bir pipet yardımıyla alındı ve atıldı. Geride kalan sıvı kısım pipetle karıştırılarak pleytlerin dibine tutulmuş olan hücrelerin ayrılması sağlandı. Hücreler ayrıldıktan sonra her bir örnekten 200 µL alındı ve kit prosedürüne uygun olarak β-merkapttoetanol ve guanidyum izotiyosiyonat ile muamele edildi. Bu karışım Nucleospin filtreden geçirildi ve %96'lık etanolle karıştırıldı. Bu karışım da içinde silika membran bulunan kolona uygulandı. Ortamda bulunan DNA 'yı uzaklaştırmak için kolona DNase eklendi. Çeşitli yıkama işlemlerinden sonra total RNA kolondan

elue edildi. Elde edilen RNA'nın bir kısmı hemen Reverse Transcriptase-PCR da kullanıldı, bir kısmı da -80°C 'da saklandı.

3.9. Reverse Transcriptase-PCR ile CA III mRNA'sının Tayini

Reverse Transcriptase-PCR, Life Technology'den alınan "Superscript II tek basamaklı RT-PCR" kiti ile yapıldı. İçinde dNTP ve MgCl_2 bulunan $25\ \mu\text{L}$ reaksiyon tamponu steril PCR tüpüne konuldu. Üzerinde $10\ \text{pmol}/\mu\text{L}$ konsantrasyonda, $1\ \mu\text{L}$ sense, $1\ \mu\text{L}$ antisense rat β -aktin, $2\ \mu\text{L}$ sense ve $2\ \mu\text{L}$ antisens rat CA III mRNA'sına spesifik primerler ilave edildi (Tablo 4). Daha sonra $1\ \mu\text{L}$ RT-Taq polimeraz karışımı eklendi. Son olarak da son hacim $50\ \mu\text{L}$ olacak şekilde $18\ \mu\text{L}$ izole edilmiş RNA konuldu. Her grup için bu reaksiyon ortamı hazırlandı. Reaksiyon karışımı 'termocycle'a konuldu ve 60 dakika 45°C 'da inkübe edildi. Daha sonra reaksiyon karışımının 70°C 'da 15 dakika bekletilmesi ile de revers transcriptase reaksiyonuna son verildi. Her bir hücre kültürlerinden ayrı olarak elde edilen cDNA lar aynı reaksiyon ortamında revers trascriptase reaksiyonunda kullanılan primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. PCR şartları; 94°C 'da 5 dakika 1 cycle, 94°C 'da 30 saniye, 53°C 'da 60 saniye, 72°C 'da 30 saniye olacak şekilde 35 cycle, ve son olarakta 72°C 'da 10 dakika 1 cycle olacak şekilde programlandı.

Tablo 4. RT-PCR da kullanılan primer dizileri

Primer sırası			Ürün
β -aktin	sense	5'-TTGTAACCAACTGGGACGATATGG-3'	764(bp)
	Antisense	5'-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG-3'	
CA III	Sense	5'- CGCTGTGGTTGGCATTTC-3'	264(bp)
	Antisense	5'-AGGCTGCGCACGTTGGCCAT-3'	

3.10. Agaroj jel Elektroforezi

RT-PCR ürünlerinin değerlendirilmesinde % 2'lik agaroj jel elektroforezi kullanıldı. Jel hazırlanmasında kullanılan çözeltiler şöyle yapıldı:

1N NaOH çözeltisi: 4 g NaOH 70-80 mL deiyonize suda çözüldü ve hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı. TAE elektroforez tamponunun pH ayarlanmasında kullanıldı.

Stok TAE (tris-asetikasit-EDTA) elektroforez tamponu: 242 g tris, 37,2 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bir miktar deiyonize suda çözüldü ve üzerine 57,1 mL asetik asit ilave edildi. 1N NaOH ile pH 8,5'a ayarlandı ve son hacim 1L'ye tamamlandı. Bu çözelti 50 kat dilüe edilerek, hem elektroforez tamponu olarak, hem de agaroj jelin hazırlanmasında kullanıldı.

Etidium Bromür çözeltisi: 100 mg etidium bromür 10 mL deiyonize suda çözüldü (10mg/mL). Işıktan korunarak buzdolabında saklandı.

0,8 g agaroj 40 mL TAE(tris-asetikasit-EDTA) tamponunda kaynatılarak çözüldü. Elde edilen jel biraz soğuduktan sonra yaklaşık 10 μL etidium bromür eklendi ve tarak yerleştirilmiş jel kabına döküldü. Jel tamamen donduktan sonra jel kabı elektroforez tankına yerleştirildi.

Numunelerin Jele Yüklenmesi: 15 μL numune 2,5 μL loading tampon ile karıştırıldı ve elektroforez tankındaki jele kuyucuklara zarar vermeden yüklendi. Jelin ilk kuyucuğuna elde edilen ürünlerin baz büyüklüğünü görmek için 100 bp' lik markır 20 μL hacimde yüklendi.

Numunelerin jele yüklendikten sonra 100 voltta 1 saat yürütüldü. Jel transilluminatöre alınarak oluşan bantlar incelendi. Hood ile fotoğrafları çekildi.

3.11. Elektroforez Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Elektroforez sonuçlarının değerlendirilmesinde BioDocAnalyze(Biometra) jel analiz sistemi kullanıldı. UV kamara ile çekilen fotoğraf bilgisayar ortamına aktarıldı ve değerlendirilmek istenen bantlar işaretlendi. Bu bantların alan ve ışık yoğunlukları(volume)hesaplandı. Her bir bant için ışık yoğunluğu alana bölünerek birim alana düşen ışık yoğunluğu hesaplandı. Her gruptaki CA III bant yoğunluğu aynı gruptaki β -aktin bant yoğunluğuna bölündü ve elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı

3.12. İstatistiksel Analizler

Deney gruplarının aritmetik ortalama(X), standart sapma(SD), alt ve üst değerleri hesaplandı. Doku eksplantlarında ve hücre kültürlerinde gruplar arasındaki istatistiksel farkların hesaplanmasında “paired-samples T” testi kullanıldı.

4.BULGULAR

4.1 Doku Eksplantlarından Elde Edilen Sonuçlar ve İstatistiksel Bulgular

4.1.1 Leptin Salgılanması ile İlgili Sonuçlar

CA III inhibisyonunun doku eksplantlarından leptin salgılanmasına olan etkisini incelemek için yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Deney gruplarındaki leptin değerleri(ng leptin/100mg doku/24 saat)

Gruplar	n	X $\pm$ SD	Alt-Üst değerler
Bazal	3	4,13 $\pm$ 0,67 ^a	3,64 - 4,90
Dorzolamid (inh)	3	4,14 $\pm$ 0,68 ^b	3,56 - 4,90
Deksametazon (Dex)	3	10,75 $\pm$ 2,96 ^{a,c}	10,0 - 13,93
İnsulin (İns)	3	5,42 $\pm$ 1,39 ^d	3,90 - 6,63
Dex + İns	3	8,19 $\pm$ 1,50 ^b	6,93 - 9,86
Dex + inh	3	1,82 $\pm$ 0,32 ^{a,b,c}	1,58 - 2,20
İns + inh	3	1,75 $\pm$ 0,24 ^{a,b,d}	1,52 - 2,00

^a bazal grup diğer gruplar arasında p<0,05 düzeyinde fark vardır.

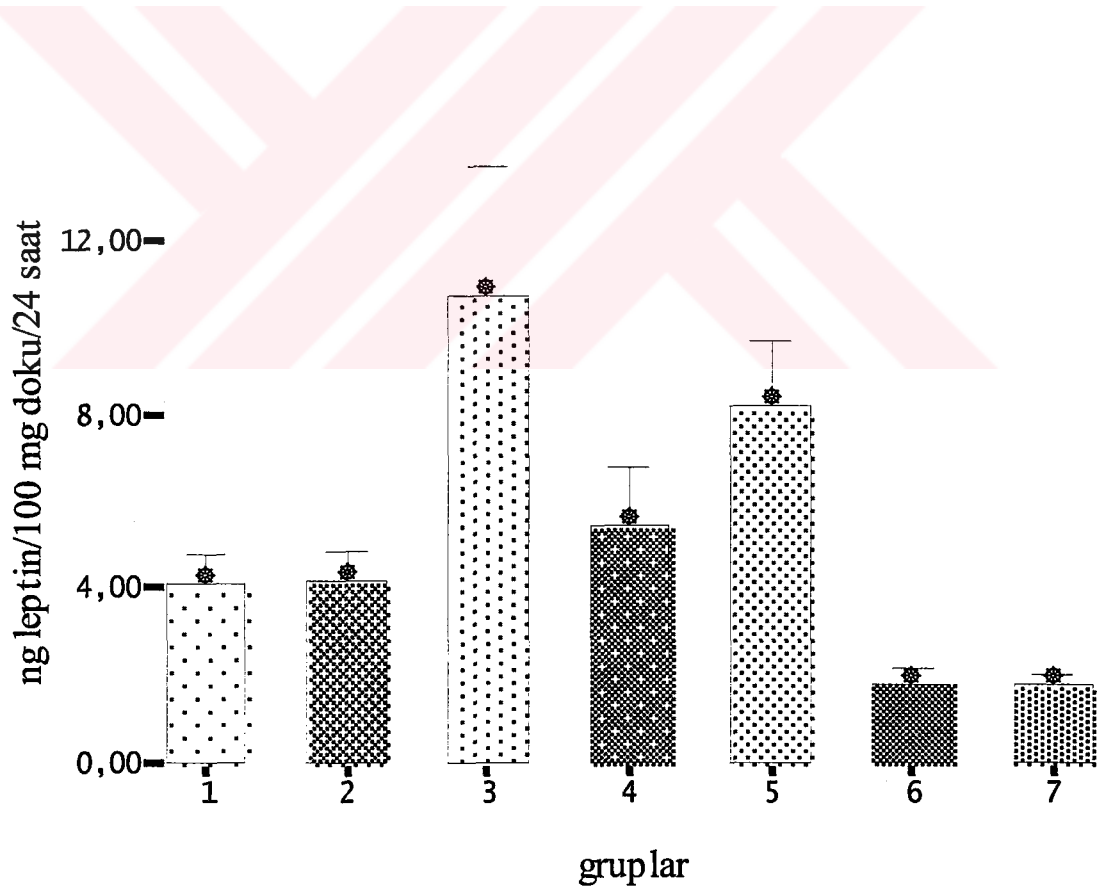
^b inhibitör grubu ile diğer gruplar arasında p<0,05 düzeyinde fark vardır.

^c deksametazon grubu diğer gruplar arasında p<0,05 düzeyinde fark vardır.

^d insulin grubu ile İns+inh grubu arasında p<0,05 düzeyinde fark vardır.

Kültür ortamına deksametazon ve deksametazon ile insulinin birlikte uygulanmasının leptin salgılanmasını bazal seviyeye göre artırdığı gözlemlendi($p<0,05$). Sadece inhibitör(dorzolamid) uygulanan gruptaki leptin seviyesi ile bazal grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. İnhibitör ve deksametazonun birlikte uygulandığı grupta leptin seviyeleri deksametazon uygulanmış gruptaki leptin seviyelerine göre daha düşük bulundu($p<0,05$). İnhibitör ve insulin birlikte uygulandığı grupta leptin seviyeleri insulin uygulanmış gruptaki leptin seviyelerinde daha düşük idi($p<0,05$).

Deney gruplarındaki ortalama leptin miktarları, standart sapmalarıyla (SD) birlikte, Şekil 8’da verilmiştir.

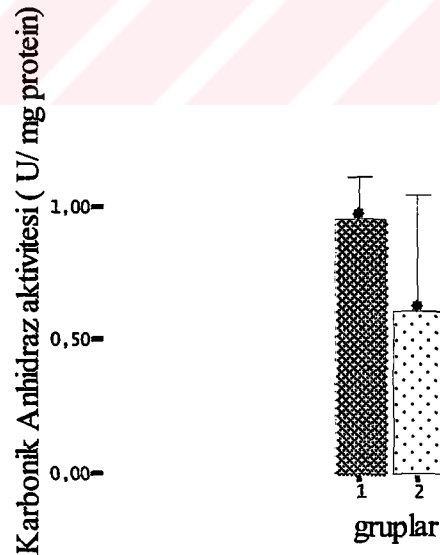


Şekil 8. Deney gruplarındaki leptin seviyeleri. 1:bazal grup, 2:inhibitör grubu, 3:deksametazon grubu, 4:insulin grubu, 5:dex+İns grubu, 6:dex+inh grubu, 7:İns+inh grubu.

Bazal grup ile inhibitör grubu arasında ortalama leptin miktarı yönünden fark bulunamadı. Dekametazon grubunda bazal gruba göre ortalama leptin miktarında %160 artış gözlemlendi. İnsulin ilavesinin bazal gruba göre ortalama leptin miktarını %30 artırdığı belirlendi. Dekametazon ve inhibitörün birlikte uygulandığı gruptaki ortalama leptin miktarları deksametazon grubuna göre %83, bazal gruba göre %56 daha düşük bulundu. İnsulin ve inhibitörün birlikte uygulandığı gruptaki ortalama leptin seviyesinin insulin grubuna göre %68, bazal gruba göre %58 daha düşük olduğu gözlemlendi.

4.1.2 Dorzolamid İnhibisyonu İle İlgili Sonuçlar

Doku eksplantlarından hazırlanan homojenatlarda ölçülen CA hidrataz aktivitesi homojenatlardan elde edilen protein miktarına bölünerek spesifik aktiviter hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 9’da verilmiştir.



Şekil 9. Deney gruplarındaki ortalama karbonik anhidraz aktiviteri.

1: bazal grup, 2: inhibitör grubu.

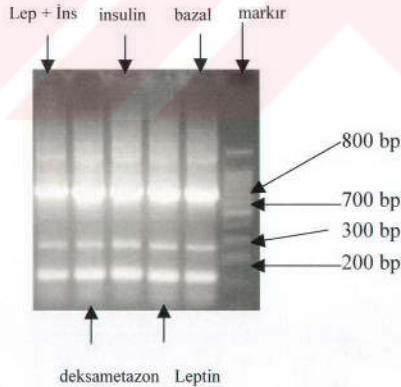
Bu şekilden, bazal gruba göre ortalama karbonik anhidraz aktivitelerinin, inhibitör grupta %27 daha düşük olduğu ve dorzolamidin eksplantlarda inhibisyon yaptığı anlaşılmaktadır.

4.2 Yağ Hücre Kültürlerinden Elde edilen Sonuçlar

Yağ hücre kültürleri invert mikroskopta incelendi ve canlılıklarını muhafaza ettikleri belirlendi.

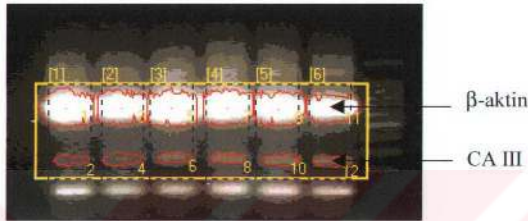
4.2.1 Agarozelektroforezi Sonuçları

RT-PCR sonuçlarının değerlendirilmesinde, elde edilen cDNA'lar agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Transilluminatöre konulan jelin fotoğrafı çekildi. Fotoğraf şekil 10'de verilmiştir.



Şekil 10. Agarozelektroforezi fotoğrafı

Fotoğrafi çekilen jel daha sonra bantların kantitatif olarak değerlendirilmesi için jel analiz sistemine yerleştirildi. UV kamara ile çekilen fotoğraf bilgisayar ortamına aktarıldı ve değerlendirilmek istenen bantlar işaretlendi(şekil 11).



Şekil 11. Jel analiz sisteminde seçilen bantlar.

Jellerin kantitatif değerlendirilmesinden elde edilen sonuçlar Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Deney gruplarındaki CA III mRNA/ β -aktin mRNA oranı

Gruplar	n	X $\pm$ SD	Alt-Üst değerler
Bazal	3	0,32 $\pm$ 0,00 ^{a,b}	0,32 - 0,32
Leptin	3	0,28 $\pm$ 0,012 ^{a,c}	0,28 - 0,3
İnsulin	3	0,37 $\pm$ 0,010 ^{a,d}	0,36 - 0,38
Deksametazon	3	0,30 $\pm$ 0,012 ^d	0,29 - 0,30
Lep + İns	3	0,22 $\pm$ 0,010 ^{b,c,d}	0,21 - 0,23

^a bazal grup ile diğer gruplar arasında p<0,05 düzeyinde fark vardır.

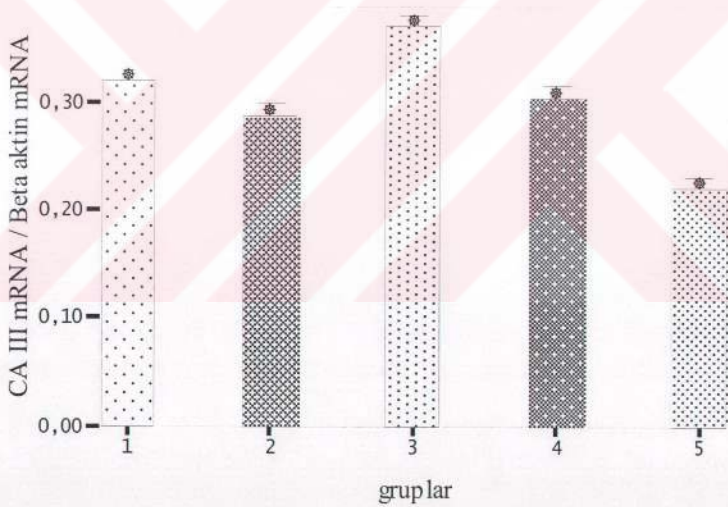
^b bazal grup ile Lep + İns grubu arasında p<0,01 düzeyinde fark vardır.

^c leptin grubu ile diğer gruplar arasında p<0,05 düzeyinde fark vardır

^d insulin grubu ile Lep + İns grubu arasında p<0,01 düzeyinde fark vardır.

Leptin uygulanan grupta CA III mRNA/ β -aktin mRNA oranı bazal gruba göre daha düşük olduğu gözlemlendi($p<0,05$). İnsulin uygulanan grupta ise CA III mRNA/ β -aktin mRNA oranı bazal gruba göre da yüksek bulundu($p<0,05$). Deksmetazon grubu ile bazal grup arasında önemli bir fark bulunamadı. Leptin ve insulinin birlikte uygulandığı grupta CA III mRNA/ β -aktin mRNA oranı hem leptinin hem de insulin tek başına uygulandığı gruptan daha düşük olduğu görüldü. ($p<0,05$, $p<0,01$).

Deney gruplarındaki ortalama CA III mRNA / β -aktin mRNA miktarları, standart sapmaları ile birlikte Şekil 12’de verilmiştir.



Şekil 12. Deney gruplarındaki ortalama CA III mRNA/ β -aktin mRNA oranları.1: bazal grup, 2:leptin grubu, 3:insulin grubu, 4:deksametazon grubu, 5:ins+lep grubu.

Leptin uygulanan gruptaki ortalama CA III mRNA/ β -aktin mRNA oranı bazal gruba göre % 12 daha düşük olduğu gözlemlendi. Dekametazon grubunda da bazal gruba göre % 7'lik bir düşüş görüldü. İnsulin uygulanan grupta ise CA III mRNA/ β -aktin mRNA oranı bazal gruba göre % 16 oranında daha yüksek bulundu. Leptin ve insulin birlikte uygulandığı grupta bulunan oranın Leptin uygulanan gruba göre %22 daha düşük olduğu belirlendi.



5. TARTIŞMA

Obezitenin biyokimyasal temelini anlayabilmek için zayıf ve şişman hayvanların yağ dokularını mukayese eden in vivo ve in vitro birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda şişman ve zayıf hayvanların yağ dokusu arasında, yağ dokusunun insulin duyarlılığının azalması ve yağ asidi sentez hızının artması gibi çeşitli fonksiyonel farklar ortaya konulmuştur(1,44).

İlk defa 1960'lı yıllarda, Kennedy yağ dokusundan salgılanan bir faktörün yağ dokusu ile beyin arasında irtibat sağladığını ve yağ dokusu kitlesinin vücut ağırlığının regülasyonunda rol aldığını ileri sürmüştür. 1994 yılında Zhang ve arkadaşları bu faktörü keşfederek, leptin adını vermişlerdir. Leptinin keşfinden sonra, obezitenin oluşumundaki rolü ve tedavideki yeri ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır(2,30,45).

Leptin başlıca beyaz yağ dokusundan salgılanan bir peptit hormondur. Hipotalamusta nöropeptit Y(NPY) sentezini baskılayarak yiyecek alımını ve enerji sarfiyatını düzenlemektedir(30). Obez (ob/ob) farelere düşük dozda rekombinant leptin verilmesi ile yiyecek alımında bir azalma olmaksızın kan glukoz seviyesinin ve vücut ısısının normale dönmesi gibi tamamen sistemik etkiyle açıklanamayan sonuçlar ve Leptin reseptörünün merkezi sinir sistemi dokusu dışında yağ dokusu, iskelet kası, akciğer, karaciğer, kalp, testisler, böbrek, pankreas gibi dokularda da bulunması, leptinin otokrin ve parakrin etkilerinin de olduğunu göstermiştir(36). Leptinin iskelet kası, yağ dokusu ve karaciğer gibi organlarda glukoz ve lipid metabolizmasında rolü olan bazı enzimlerin ekspresyonunu regüle ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Leptin yağ dokusunda, yine, bazı enzimlerin ekspresyonunu etkileyerek lipid oksidasyonunu artırmakta ve yağ asitleriyle triaçilgliserollerin sentezini azaltmaktadır. Böylece, hücre içi lipid konsantrasyonu düşürmektedir(2,3,46,47).

Karbonik anhidraz(CA) şimdiye kadar 14 izoenzimi bulunan bir metalloenzimdir. Bu izoenzimlerin canlılardaki doku dağılımları ve hücre içi yerleşimleri farklıdır. Bu izoenzimlerden CA III ratların yağ dokusunda bol olarak sentezlenir(4). Ratlardaki yağ hücrelerinin hücre içi proteinlerinin %24'ü, toplam protein içeriğinin de %11'i CA-III'tür. Yapılan çalışmalarda, obez ratlarda bu proteinin miktarında azalma olduğu gösterilmiştir. Bu azalma hakkında çeşitli fikirler ileri sürülmüş, ancak, sebebi tam olarak aydınlatılamamıştır(4,5). Yine rat pankreas hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda CA V inhibisyonunun glukozla uyarılmış insulin salgılanmasını büyük miktarda azalttığı gösterilmiştir(6).

Bu çalışmada; rat yağ hücre kültürlerinde ve doku eksplantlarında leptinin CA III ekspresyonuna ve CA inhibitörü dorzolamidin leptin salgılanmasına olan etkisinin incelenmesi amaçlandı. Ratlardaki yağ dokusundan leptin salgılanmasına insulin ve deksametazonun etkisi daha önceden çalışıldığı için, bu hormonları da hem yöntemlerimizi doğrulama, hem de, enerji metabolizmasıyla yakın ilişkilerinden dolayı araştırmamıza dahil ettik(38,39).

İnsulin, deksametazon ve CA inhibitörü dorzolamidin leptin salgılanmasına olan etkilerini incelemeye kullanılan doku eksplantları ile leptin, insulin ve deksametazonun CA III mRNA seviyelerine etkilerini araştırmak için gerekli olan hücre kültürleri Sprague-Dawley ırkı ratların epididimal yağ dokularından hazırlandı. Literatürlerde yağ dokusu kültürü hazırlamak için subkutan, omental ve prerenal gibi çeşitli yağ dokuları kullanılmaktadır(38). Ancak, leptin hormonu ile ilgili yapılan hücre kültürü çalışmalarında en çok epididimal yağ dokusu kullanıldığı için çalışmamızda bu yağ dokusu tercih edildi. Yağ dokusu metabolik olarak oldukça aktif bir doku olduğu için, besi yeri seçiminde glukoz konsantrasyonu fazla olan(4.5 g/L) Iscove's modified Dulbecco's mediumu kullanıldı(48).

Yukarıda belirtildiği gibi amacımız leptin-CA etkileşmesini incelemektir. Ancak, bölümümüzde ilk defa yağ dokusu hücreleri eksplant ve kültür olarak çalışıldığından, yapılan işlemlerin ve sonuçların doğruluğunu kontrol etmek amacıyla, daha önceden başka araştırmacılar tarafından bir çok defa çalışılmış olan

insulin ve deksametazon da çalışmalara dahil edilmiştir. Leptin gibi tüm vücudun enerji metabolizması ile ilişkili olan bu hormonlarla çalışılması ayrıca anlam taşımaktadır.

Hücre kültürü hazırlanırken, proteaz inhibitörlerini, hücre için elzem olan temel besinleri, farklılaşma faktörlerini ve mekanik hasara karşı non-spesifik koruma faktörlerini içeren fetal calf serum(FCS) besi yerine eklenmektedir(40,48). Çalışmamızda kullandığımız rat leptin ELİSA kitini (DRG International Inc.U.S.A) FCS interfere ettiği için, CA inhibitörü, insulin ve deksametazonunu leptin salgılanması üzerine olan etkisinin incelenmesinde yağ hücre kültürü yerine yağ dokusu eksplantları zorunlu olarak tercih edilmiştir.

Karbonik anhidrazlarla ilgili yapılan çalışmalarda en çok kullanılan karbonik anhidraz inhibitörü asetazolamittir. Ancak asetazolamidin hücre membranlarından geçişi zordur. Yapılan bir çalışmada asetazolamid methazolamid ve dorzolamidin % 0,1'lik çözeltilerinin bir saatlik zaman içinde hücre membranlarından geçişi incelenmiştir. Bir saatlik inkübasyon sonunda, asetazolamidin % 26'lık, methazolamidin % 12'lik dorzolamidin ise, karbonik anhidraz aktivitesini tamamen inhibe ettiği bulunmuş ve dorzolamidin diğer CA inhibitörlerine göre hücre membranını daha çabuk geçtiği gösterilmiştir(17). Bu yüzden çalışmamızda CA inhibitörü olarak dorzolamid kullanılmıştır. Literatürlerde daha önceden dorzolamidin CA III inhibisyonuyla ilgili bir çalışma bulunamadığı için asetazolamidin CA III ve tüm CA izenzimlerini inhibe ettiği doz referans alınarak CA inhibisyonunun leptin salgılanmasındaki etkisi incelenirken kültür ortamlarına 1 mM konsantrasyonda dorzolamid ilave edilmiştir(26).

Doku eksplantlarında dorzolamidin CA inhibisyonunu sağlayıp, sağlamadığını ortaya koymak için yapılan CA aktivitesi tayini Maren tarafından geliştirilen fenol red yöntemi ile gerçekleştirildi(41). Burada kullanılan indikatör ile besi yerinde kullanılan indikatörün aynı olması ve besi yerinin çeşitli tampon sistemleri içermesinin kullanılan metodu interfere etmesi ihtimaline karşı doku eksplantları homojenize edilmeden önce üç defa serum fizyolojik ile yıkanmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında gen ekspresyonun incelenmesinde en çok

kullanılan yöntem Reverse Transcriptase-PCR dir. mRNA'nın Rnase ve dış etkenlere karşı çok hassas olmasından dolayı RNA izolasyonundan sonra mRNA revers transkripsiyon işlemi ile cDNA'ya çevrilir. cDNA'nın stabilitesi mRNA'ya oranla çok daha fazladır. Elde edilen cDNA kantitatif PCR veya kompetitif PCR ile çoğaltılarak başlangıçtaki mRNA miktarı kantitatif olarak hesaplanır. Yine elde edilen cDNA bir housekeeping gen (constitutive gen) ürünü ile ya birlikte, ya da, aynı şartlar altında farklı PCR ortamlarında çoğaltılarak oranlanır ve oransal olarak mRNA miktarı hakkında bilgi edinilir. Yapılan çalışmalarda en çok kullanılan housekeeping gen ürünü β -aktindir. β -aktin aynı zamanda RNA izolasyonu sonucu elde edilen mRNA'nın kalitesinin bir ölçüsüdür. Bundan dolayı, çalışmamızda housekeeping gen ürünü olarak β -aktin kullanılmıştır(43).

Doku eksplantlarında elde edilen değerleri istatistiksel değerlendirilmesi sonucunda deksametazon ve insulinin leptin salgılanmasını artırdığı gözlenmiştir(Tablo 5). Dekametazonun bu etkisi in vivo ve in vitro olarak birçok çalışmada gösterilmiştir(2,38,39,49,50). Bu çalışmalarda kültür ortamına 100 nm deksametazon ilave edilmesi ile leptin salgılanmasında ortalama 3,5-4 katlık bir artış meydana gelmiştir. Çalışmamızda kullanılan besi ortamı ve kültür şartlarının aynı olmasına rağmen, deksametazon grubundaki leptin artışı bazal grubun 2,5 katı olarak gerçekleşmiştir. Bu farklılık kullanılan leptin ölçüm kitinden kaynaklanmış olabilir. Çünkü, bu çalışmalarda leptin tayini RIA ile, bizim çalışmamızda ise, leptin ölçümünü ELİSA ile yapılmıştır.

İnsulinin leptin salgılanmasını bazal seviyeye göre %30 arttırdığını gözlenmiştir(Tablo 5). Bu artış istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen, daha sonra yapılacak hücre kültürü çalışmalarına ışık tutması amacıyla çalışıldığından, literatürde bildirilen bazı verilere uygunluğu müşahade edilmiştir. İnsulin, aynı zamanda, deksametazonla uyarılmış leptin salgılanmasını azaltmaktadır. Bu sonuçlar rat yağ dokusundan leptin salgılanması ile ilgili bazı çalışmalarla uyumlu bulunmuştur(3,51). Ancak, insulinin yağ dokusundan leptin salgılanmasına olan etkisi ile ilgili bir çok çalışma yapılmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu farklılıklar deney yaklaşımlarının farklı olmasından kaynaklanabilir.

Farklı cins, yaş ve ırkta hayvanların kullanılması, yağ hücresi kültürü yapımında epididimal, subkutan, omental, prerenal yağ dokusu gibi yerleşimleri ve metabolizmaları farklı yağ depolarının kullanılması, kullanılan besi yeri ve kültür zamanı gibi kültür şartlarının farklılığı bu farklı sonuçların ortaya çıkmasında önemlidir(31,38,39).

Rat yağ dokusunda sitozolik protein içeriğinin %24 CA III'tür. Bu dokuda CA III fonksiyonu hakkında kesin bir bilgi yoktur. Çalışmamızda CA III'ün leptin salgılanmasına bir etkisi olup olmadığını incelenmiş ve bu amaçla karbonik anhidraz inhibitörü olan dorzolamid kullanılmıştır. Dorzolamid ilave edilen grupta inhibisyona bağlı olarak CA aktivitesi bazal gruba göre %27 daha düşük bulundu. Bu inhibitörün doku eksplantlarında inhibisyon yaptığının bir göstergesi olarak kabul edildi(Şekil 9). CA III inhibisyonun rat yağ dokusu eksplantlarında bazal seviyede leptin salgılanmasını etkilemediğini, ancak, deksametazon ve insulin ile uyarılmış leptin salgılanmasını baskıladığı gözlenmiştir(Şekil 8). Benzer şekilde, pankreas hücre kültürlerinde yapılmış bir çalışmada asetazolamid ile CA V'in inhibisyonunu glukozla uyarılmış insulin salgılanmasını inhibe ettiği bildirilmiş ve bu dokuda CA V'in mitokondri içi Ca^{2+} konsantrasyonunu ve sitozolik NADPH/NADP oranını etkileyerek, insulin salgılanmasında rol oynadığı ileri sürülmüştür(6). Yağ dokusundan leptin salgılanma mekanizması ve bu mekanizmaya katılan bileşenler henüz bilinmediği için, CAIII inhibisyonunun leptin salgılanmasına olan bu etkisi için kesin bir şey söylemek zordur. Ancak, CA III'ün ürünü olan HCO_3^- ve H^+ iyonlarının bir şekilde leptin salgılanmasında rolü olabileceği düşünülebilir. Ayrıca, CAIII'ün diğer izoenzimlerde bulunmayan fosfataz aktivitesinin de bu olayda rolü olabilir.

Yağ hücresi kültürlerinde yaptığımız çalışmada, insulinin CA III mRNA seviyelerini artırdığı gözlenmiş, leptin hormonunun da, hem bazal seviyede, hem de, insulince artırılmış olan CA III mRNA seviyelerinde azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir(Tablo 6). Her ne kadar bir enzimin mRNA miktarının artması mutlak anlamda aktivitesinde artacağı anlamına gelmese de çoğu kez enzim aktivitesi mRNA miktarı ile orantılı olarak artar. Daha önceden, in vivo yapılmış çalışmalarda

obezite ile birlikte rat beyaz yağ dokusunda CA III aktivitesinde ve mRNA miktarında bir azalma bildirilmiştir(1,5). Bu çalışmalarda açlık ve zayıflama ile birlikte azalmış CA aktivitesi ve mRNA seviyelerinin yükseldiği gösterilmiştir. Yine, bu çalışmalarda bu azalmanın obezite ile birlikte gelen insulin miktarındaki artmaya bağlı olabileceğinden bahsedilmiş ve bu hayvanlarda artmış olan de novo yağ asiti sentezi ile asetil Co-A karboksilaza HCO_3^- sağlayan CA III enzimidaki azalmanın bir çelişki teşkil ettiği bildirilmiştir. Bu çalışmaların yapıldığı yıllarda henüz leptin hormonu keşfedilmemişti. Elde ettiğimiz sonuçlar ile yukarıda anlatılan çalışmalarda bildirilen bulgular birleştirildiği zaman, rat beyaz yağ dokusunda obezite ile birlikte artan leptinin CA III miktarını azalttığı görülmektedir. Leptin ve insulin birlikteliğinde bu azalış daha fazla olmaktadır. Bu, insulinin yağ dokusuna olan lipogenik etkisinin leptin tarafından baskılanmasının bir sonucu olabilir(3). Ayrıca, yine yukarıda bahsedilen obezite ile birlikte gelişen CA III miktarındaki azalma ile yağ asiti sentezi arasındaki çelişki, lipogenik bir hormon olan ve obezite ile birlikte dolaşımdaki miktarı artan insulinin yağ asiti sentezini arttırırken antilipogenik bir hormon olan leptinin bu sentezi azaltmak için asetilCo-A karboksilazın substratı olan HCO_3^- üreten CA III 'ün sentezini baskılaması ile açıklanabilir.

Obez ratlara streptozotozin verilmesi ile oluşturulan diabette CA III miktarında artma gözlenmiştir(1,5). Streptozotozin pankreasta β hücrelerini harabiyete uğratarak dolaşımdaki insulin miktarını azaltmaktadır. Azalan insulin miktarı yağ dokusundan leptin salgılanmasını da azaltmaktadır(3). Bunun bir sonucu olarak da rat yağ dokusunda CA III miktarı artmış olabilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Yağ dokusu eksplantlarında deksametazonun leptin salgılanmasını % 160 insulinin ise % 30 arttırdığı gözlenmiştir
2. CA inhibitörü dorzolamid deksametazon ve insulin tarafından uyarılmış leptin salgılanmasını yağ dokusu eksplantlarında azaltmaktadır.
3. Yağ hücresi kültürlerinde leptin CA III mRNA miktarını % 12 oranında azaltırken, insulin ise CA III mRNA miktarını % 16 oranında artırmaktadır.
4. Deksametazonun yağ hücre kültürlerinde CA III mRNA miktarını önemli bir etkisi bulunamamıştır.
5. Rat karaciğer ve iskelet kası gibi CA III'ün fazla miktarda bulunduğu dokularda da bahsedilen hormonların bu enzime etkileri incelenebilir
6. Leptin hormonunun CA III seviyelerine olan etkisi in vivo olarak obez ve normal ratlarda araştırılarak sonuçlar bu çalışma ile karşılaştırılabilir.

7. ÖZET

Leptin yağ dokusunda sentezlenen endokrin, parakrin ve otokrin etkileri olan peptid yapısında bir hormondur. Antilipogenik bir hormon olan leptin, hücrelerdeki bazı enzimlerin ekspresyonunu düzenleyerek, hücre içi lipid konsantrasyonunu azaltmaktadır.

Karbonik anhidraz III rat yağ dokusunda en bol bulunun hücre içi proteindir. Bu dokudaki fonksiyonu tam olarak belirlenememiştir. Obezite ile birlikte rat yağ dokusunda CA III miktarının azaldığı belirlenmiş ve bu azalışın insulinden kaynaklanabileceği ifade edilmiştir. Rat pankreas hücre kültürlerinde yapılan bir çalışmada in vitro olarak CA V'in insulin salgılanmasında rol oynadığı gösterilmiştir.

Bu çalışmada; rat yağ hücre kültürlerinde ve doku eksplantlarında leptinin CA III ekspresyonuna ve CA inhibitörü dorzolamidin leptin salgılanmasına olan etkisinin incelenmesi amaçlandı. Ratlardaki yağ dokusundan leptin salgılanmasına insulin ve deksametazonun etkisi daha önceden çalışıldığı için, bu hormonları da hem yöntemlerimizi doğrulama, hem de, enerji metabolizmasıyla yakı ilişkilerinden dolayı araştırmamıza dahil ettik.

Doku eksplantlarında, deksametazon ve insulinin leptin salgılanmasını ve CA aktivitesini artırdığı, CA inhibisyonun ise leptin salgılanmasını azalttığı tespit edildi. Hücre kültürlerinde ise, leptinin CA ekspresyonunu azalttığı, insulinin artırdığı deksametazonun ise ekspresyona önemli bir etkisi olmadığı görüldü.

Sonuç olarak rat yağ dokusunda CA III'ün leptin salgılamasında rol aldığı ve obezite ile birlikte bu dokuda gözlenen CA III azalmasının leptinden kaynaklandığı kanaatine varıldı.

8. SUMMARY

In vitro Investigation of Relationships Between Leptin and Carbonic Anhydrase III in Rat Adipose Tissue.

Leptin, a peptide hormone with endocrine, paracrine and autocrine characteristics, is synthesized by adipose tissue. It has antilipogenic properties and decreases intracellular lipid content by regulating the expression of some enzymes.

Carbonic anhydrase III is the most abundant intracellular protein of rat adipose tissue. Its function in this tissue is unclear, but, it has been shown that its amount decreased together with obesity and this decrease might be caused by insulin. CA V has been reported to have a role in insulin secretion after an in vitro study on rat pancreas cell culture.

In this research it was intended to show the effects of leptin on expression of CA III and of CA inhibitor dorzolamide on leptin secretion in rat fat tissue explants and cultured cells. Since, the influence of insulin and dexamethasone on leptin secretion from rat fat tissues has been investigated by many researchers previously, these hormones were included just for the confirmation of the procedures involved, and, also for their roles in energy metabolism.

The experiments made have shown that insulin and dexamethasone increased leptin secretion and CA activity, and CA inhibition caused a decrease in leptin secretion. According to the results of fat cell culture experiments, it was found that CA expression has been decreased by the action of leptin, increased by insulin and caused no significant change by dexamethasone.

It was concluded that CA III had a role in the mechanism of leptin secretion and that the decrease in CA III observed in obesity has been caused by leptin.

9. KAYNAKLAR

1. Lynch, C. J., Brennan, W. A., Vary, JR. T. C., Carter, N., Dodgson, S. J.: Carbonic anhydrase III in obese Zucker rats. *American Journal of Physiology*. 264: 621-630,1993.
2. Blum, W. F.: Leptin: The voice of the adipose tissue. *Hormone Research*, 48(suppl 4): 2-8, 1997.
3. Reidy, S. P., Weber, J. M.: Leptin: an essential regulator of lipid metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 125: 285-297, 2000.
4. Sly, W. S., Hu, P. Y.: Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annual Review Biochemistry*. 64: 375-401, 1995.
5. Stanton, L.W., Ponte, P.A., Coleman, R.T. and Synder, M.A.: Expression of CA III in rodent models of obesity. *Molecular Endocrinology*. 5: 860-66, 1991.
6. Parkilla, A-K., Scarim, A.L., Parkilla, S., Waheed, A., Corbett, J.A. and Sly, W. S.: Expression of carbonic anhydrase V in pancreatic beta cells suggests role for mitochondrial carbonic anhydrase in insulin secretion. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 24620-23,1998.
7. Mori, K., Ogawa, Y., Ebihara, K., Tamura, N., Tashiro, K., Kuwahara, T., Mikoyama, M., Suguwara, A., Ozaki, S., Tanaka, I., and Nakao, K.: Isolation and Characterisation of CA XIV, a novel membrane-bound carbonic anhydrase from mouse kidney. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 15701-15705, 1999.
8. Pocker, Y. : Molecular Control of Carbonic Anhydrase Activity: Ionic Effectors, Differential Modifiers and Novel Inhibitors. In *The Carbonic*

- Anhydrase from Biochemistry and Physiology and Clinical Medicine. Botré F. Storey, B. T. Gros, G. (Eds.) Wienheim, VCH Publishers, 1991, pp 75-85.
9. Paranawithana, S.R. , Tu, C. , Jevll, A.D. , Laipis, P.J. , Silverman, .N.:Catalytic Enhancement of Carbonic Anhydrase III by Introduction of Histidine 64 as A Proton Shuttle. In The Carbonic Anhydrase from Biochemistry and Physiology and Clinical Medicine. Botré F. Storey, B. T. Gros, G. (Eds) VCH Publishers, Wienheim, 1991 pp. 14- 21
 10. Nogradi, A.: The role of Carbonic Anhydrase in Tumors. American journals of Pathology. 153: 1-4, 1998.
 11. Supuran, C. T., Briganti, F., Tilli, S., Chegwidden, W. R., Scozzafava, A.: Carbonic anhydrase inhibitors: sulfonamides as antitumor agents? Bioorganic & Medicinal Chemistry. 9: 703-714, 2001.
 12. Kivela, A., Parkilla, S., Saarnio, J., Karttunen, T. J., Kivela, J., Parkilla, A., Waheed, A., Sly, W. S., Gruub, J. H., Türeci, Ö., Rajaniemi, H.: Expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase isoenzyme XII normal human gut and colorectal tumors. American Journal of Pathology. 156: 577-584, 2000.
 13. Supuran, C. T., Scozzafava, A.:Carbonic anhydrase inhibitors-Part94. 1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide derivates as antitumor agents? European Journal Medical Chemistry. 35: 867-874, 2000.
 14. Chiang, W-L., Chu, S-C., Lai, J-C., Yang S-F., Chiou, H-L., Hsieh, Y-S.: Alterations in quantitatives and activities of erythrocyte cytosolic carbonic anhydrase isoenzymes in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient individuals. Clinica Chimica Acta. 314: 195-201, 2001.
 15. Scriver, C.R. , Beaudet, A.L. , Sly, S.W. , Valle, D. :The metabolic Basis of Inherited Disease. Sixth Edition. McGraw-Hill Information Services Company, New York, 1989 pp.2857 - 2866
 16. Parkkila, S. , Parkkila, A-K. , Vierjoki, T. , Stahlberg, T. , Rajaniemi, H. : Competitive Time-Resolved Immunofluorometric assay for quantifying carbonic anhydrase VI in saliva. Clinical Chemistry. 39 (10): 2154-57,1993.

17. Sugrue, M., F.: Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Progress in Retinal and Eye Research*. 19: 87-112, 2000.
18. Foster, E. R. : Carbonic Anhydrase: The Unwithered Enzyme or The Divine Discrepancies. In *The Carbonic Anhydrase from Biochemistry and Physiology and Clinical Medicine*. Botré F. Storey, B. T. Gros, G. (Eds) VCH Publishers, Wienheim, 1991 p.p. 443 – 457
19. Carter, N., Jeffry, S., Shiels, A., Edward, Y., Tipler, T., Hopkinsaon, D. A.: Characterisation of human carbonic anhydrase III from skeletal muscle. *Biochemichal Genetics*. 17: 837-853, 1979.
20. Shelton, J. B., Chegwiddden, W. R.: Modification of carbonic anhydrase III activity by phosphate and phosphorylated metabolites. *Comperative Biochemical Physiology*. 114A: 283-289, 1996.
21. Mallis, R.J., Poland, B.W., Chatterjee, T.K., Fisher, R.A., Darmawan, S., Honzatko, R.B., Thomas, J.A.: Crystal structure of S- glutathiolated carbonic anhydrase III. *FEBS Letters*. 482: 237-241, 2000.
22. Raisenen, S.R., Lehenkari, P., Tasanen, M., Rahkila, P., Harkonen, P.L., Vaananen, H.K.: Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide induced apoptosis. *FASEB J*. 13: 513-522, 1999.
23. Cote, C.H., Ambrosio, F., Perreault, G.: Metabolic and contractile influence of carbonic anhydrase III in skeletal muscle is age dependent. *American journal of Physiology*. 276: R559-R565, 1999.
24. Cote, C.H., Perreault, G., Frenette, J.: Carbohydrate utilization in rat soleus muscle is influenced by carbonic anhydrase III activity. *American journal of Physiology*. 273: R1211-R1218, 1997.
25. Beuerle, J., Azzazy, H. M. E., Styba, G., Duh, S. H., Christenson, R. H.: Characteristic of myoglobin, carbonic anhydrase III and the myoglobin/carbonic anhydrase III ratio in trauma, exercise, and myocardial infarction patients. *Clinica Chemica Acta*. 294: 115-128, 2000.
26. Lindskog, S.: Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacology and Therapeutics*. 74: 1-20, 1997.
27. Junqueira, L. C, Carneiro, J., Kelley, O. R: *Temel Histoloji* (Çev. Y. Aytekin). Bariş kitapevi. 150-158. 1993.

28. Ahima. R. S. and Flier, J.S.: Adipose Tissue as an endocrine organ. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 11: 327-332, 2000.
29. Meinders, A .E., Toornvliet, A.C., Pijl, H.: Leptin, *Netherlands Journal of Medicine*, 49: 247-252, 1996.
30. Auwerx, J., Staels, B.: Leptin. *The Lancet*, 351: 737-742, 1998.
31. Ceddia, R. B., Jr William, W. N., Curi, R.: The response of skeletal muscle to leptin. *Frontiers in Bioscience*, 6: 90-97, 2001.
32. Loftus, T. M., Maggs, D. G., Lane, M. D.: The adipose tissue/central nervous system axis. *Diabetology*, 40: B16-B20, 1997.
33. Heshka, J. T., Jones, J. H.: A role dietary fat in leptin receptor. OB-Rb function. *Life Sciences*, 69: 987-1003, 2001.
34. Caro, J. F., Kolaczynski, J.W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Opentanova, I., Goldman, W. H., Lynn, R. B., Zhang, P., Sinha, M. K., Considine, R. V.: Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *The Lancet*, 348: 159-161, 1996.
35. Unger, R. H.: Leptin physiology: a second look. *Regulatory Peptides* 92: 87-95, 2000.
36. Ceddia, R. B., William Jr. W. N., Curi, R.: Leptin increases glucose transport and utilisation in skeletal muscle in vitro. *General Pharmacology* 31: 799-801, 1998.
37. Carbo, N., Ribas, V., Busquets, S., Alvarez, B., Lopez-Sarriano, F. J., Argiles, J. M.: Short-term effects of leptin on skeletal muscle protein metabolism in the rat. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 11: 431-435, 2000.
38. Russel, C. D, Petersen, R.N, Rao, S.P, Ricci, M.R, Prasad, A., Zhang, Y, Brolin, R.E, Fried, S.K: Leptin expression in adipose tissue from obese humans: depot-specific regulation by insulin and dexamethasone. *American Journal of Physiology*, 275: E507-E515, 1998
39. Mick, J.G., Wang, X., Fu, C., L., McCormick, K.: Inhibition of leptin secretion by insulin and metformin in cultured rat adipose tissue. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1502: 426-432, 2000.

40. Walker, J.M: Basic cell culture protocols. Humana Pres. New Jersey,1997.
41. Sapirstein, V.S., Lees, M. B.: purification of myelin carbonic anhydrase. *Journal of Neurochemistry*. 31:505-511,1978.
42. Stoschek, C.M.: Quantitation of protein, In Deutscher Mp(ed), Guide to protein purification, Acad press Inc., San diego, 1990, pp. 50-68.
43. Wong, M-Y., Lee, Y., Unger, R.,H.: Novel from of lipolysis induced by leptin. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 17541-17544,1999.
44. Lin, S, Storlien, H.L, Huang, X-F.: Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in diet-induced obese mouse brain. *Brain Research*. 875: 89-95,2000.
45. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M.: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372: 425-431,1994.
46. Siegrist-Kaiser, C.A., Pauli, Veronique, et al: Direct effects of leptin on Brown and white adipose tissue. *Journal Clinic Investigation*. 100: 2858-2864,1997.
47. Bai, Y., Zhang, S., Kim, K-S, Lee, J-K., Kim, K-H.: obese gen expression alters the ability of 30A5 preadipocytes to respond to lipogenic hormones. *The Journal of Biological Chemistry*. 271: 13939-13942,1996.
48. Uçar, F.: Hücre kültüründe temel ilkeler, Hematolojide Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kurs Kitabı. Ovalı E.(Ed)2003,s.10-20.
49. Fain, J.N., Leffler, C.W., Bahouth, S., W., Rice, A. M., Rivkees;S.A.: Regulation of leptin release and lipolysis by PGE₂ in rat adipose tissue. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*. 62: 343-350,2000.
50. Fain, J.N. and Bahouth, S., W.: Stimulation of leptin release by actinomycin D in rat adipocytes. *Biochemical Pharmacology*. 55: 1309-1314,1998.
51. Mueller,W.M., Gregoire, F.M., Stanhope, K.L., Mobbs, C.V., Mizuno, T.,M., Warden, C.H., Stern, J.S., Haverl,P.J.: Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology*. 139: 551-558,1998.

ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Giresun-Eynesil’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Trabzon’da tamamladı. 1988 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandı ve 1993 yılında bu fakülteden mezun oldu. 1994 yılında K.T.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı ve 1997 yılında Yüksek Lisansını tamamladı. 1997 yılında yine aynı Anabilim Dalında Doktora programını kazandı. Halen K.T.Ü. Biyokimya Anabilim Dalı’nda çalışmalarını sürdürmektedir.

