

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İMMORTALİZE rHypoE-7
HÜCRELERİNDE RFRP-3
SALGILANMASININ LEPTİN
TARAFINDAN KONTROLÜ ÜZERİNE
İN VİTRO ÇALIŞMALAR**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Tuğrul SAATÇI
2014**

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.


Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR
Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak
kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR



Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

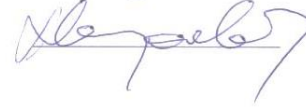
Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR



Doç. Dr. Mete ÖZCAN



Doç. Dr. Sinan CANPOLAT



Kardeřim H.Seda
Annem Yasemin ve
Babam Mehmet Zeki SAATÇI'ya ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime bilgi ve tecrübeleri ile büyük katkıda bulunan, tezimin hazırlanmasında maddi-manevi her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı, danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR'a şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince her türlü yardım ve ilgilerini benden esirgemeyen Fizyoloji ve Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri, Sayın Doç. Dr. Mete ÖZCAN, Doç. Dr. Oğuz Özçelik, Yrd. Doç. Dr. Emine KAÇAR, Doç. Dr. Sinan CANPOLAT ve Yrd. Doç. Dr. Mustafa ULAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Anabilim dalımız öğrencileri Zübeyde ERCAN, Sermin ALGÜL, Ahmet YARDIMCI ve Nazife ÜLKER'e teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasında bana katkılarından dolayı Y. Müh. İhsan DEMİRUS'a ayrıca teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	4
3.1. Hipotalamus-Hipofiz-Gonadal Aks	4
3.2. RF amid peptidler	5
3.3. Voltaj – kapılı kalsiyum kanalları (VKKK)	6
3.3.1. VKKK'nın sınıflandırılması	7
3.3.2. Kalsiyum kanal tipleri	9
3.3.2.1. L tipi kalsiyum kanalları	9
3.3.2.2. Nöronal tip kalsiyum kanalları	9
3.3.2.3. T tipi kalsiyum kanalları	10
3.4. Leptin	11
4. GEREÇ VE YÖNTEM	15
4.1. Hücre kültürü	15
4.1.1. Kültür için kullanılan solüsyonlar ve kimyasal ajanlar	15
4.1.2. Kültür için kullanılan ekipman ve sarf malzemeleri	16
4.1.3. Diğer ekipmanlar	16
4.2. Hücre içi kalsiyum görüntüleme	17
4.3. Leptin uygulaması	19
4.4. İstatistiki analiz	19
5. BULGULAR	20
5.1. Leptinin rHypoE-7 hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ üzerine etkileri	20
5.2. Leptinin rHypoE-7 hücrelerinde GnIH sekresyonuna etkileri	23

6. TARTIŞMA	25
6.1. İleride yapılması planlanan çalışmalar	27
7. KAYNAKLAR	29
8. ÖZGEÇMİŞ	37

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 Voltaja duyarlı kalsiyum kanallar ve alt birimleri	6
Şekil 2 Floresan kalsiyum görüntüleme sisteminin fotoğrafik görünümü	17
Şekil 3 rHypoE-7 nöronlarına uygulanan 0.1, 1 ve 10 μ M leptinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkileri	20
Şekil 4 rHypoE-7 nöronlarına uygulanan 1 ve 10 μ M leptinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkileri	20
Şekil 5 rHypoE-7 nöronlarında hücre dışından kalsiyum uzaklaştırıldığında 10 μ M leptinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkileri	21
Şekil 6 rHypoE-7 nöronlarına uygulanan PKC inhibitörü şeletrin klorit ve 10 μ M leptinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkileri	22
Şekil 7: GnIH sekresyonu üzerine leptinin etkisi.....	23

KISALTMALAR LİSTESİ

GnIH	Gonadotropin inhibitör hormon
RFRP	RF amide-related peptide
HHG	Hipotalamus-hipofiz-gonadal
rHypoE-7	Rat HypoE-7
$[Ca^{+2}]_i$	Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu
GnRH	Gonadotropin serbestleştirici hormon
FSH	Follükül uyarıcı hormon
LH	Lüteinizan hormon
GPR54	G protein-coupled receptor 54
GnRH	Gonadotropin serbestleştirici hormon
OB-R	Leptin reseptörü
POMC	pro-opiomelanokortin
AGRP	Aguti ilişkili protein
NPY	Nöropeptit Y
ob/ob	Leptin eksiklik modeli oluşturulmuş olan
OB-Rb,	Leptinin reseptörünün uzun izoformu
OB-Ra	Leptinin reseptörünün kısa izoformu
sOB-R	Leptinin reseptörünün çözünebilir izoformu
PKC	Protein kinaz C
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medyum
ChCl	chelerythrine chloride
DMSO	Dimetilsulfooksit
VKKK	Voltaj-kapılı kalsiyum kanalları

YVA	Yüksek voltaj aktivasyonu
DVA	Düşük voltaj aktivasyonu
JAK	Janus family kinases
STAT	Transkripsiyon sinyali dönüştürücüsü ve aktivatörü

1. ÖZET

Hipotalamik RFamid peptidler, gonadotropin-inhibe edici hormon (GnIH) ve ortolog peptitler, ilk olarak memelilerde keşfedilmiş olup RFamide peptit süperailesine (RFRP-3) aittir ve bu peptitler, hipotalamus-hipofiz-gonadal (HHG) üreme aksının önemli düzenleyicileri arasında gösterilmektedir. GnIH sadece üreme fonksiyonlarıyla ilişkili olmayıp aynı zamanda gıda alımının düzenlenmesinde de rol oynadığından yağ hücrelerinde üretilen leptinin RFRP-3 nöronları üzerinde bir etkiye sahip olduğu ileri sürülmüştür. Sıçan rHypoE-7 hücre hattı, nöroendokrin faktörlerin RFRP-3 nöronları üzerindeki etkisini ortaya çıkarmak için geliştirilmiş bir modeldir. Leptinin besin alımı ve üreme üzerindeki etkisini RFRP-3 aracılığıyla gösterip göstermediğini belirlemek için leptin ile muamele görmüş rHypoE-7 hücrelerinde hücre içi serbest kalsiyum ($[Ca^{+2}]_i$) değişiklikleri incelenmiştir.

Bu çalışmanın amacı, leptinin immortalize rHypoE-7 hücrelerindeki RFRP-3 üzerine etkisini *in vitro* olarak incelemektir.

Çalışmada RFRP-3 salgılayan rHypoE-7 hücreleri kullanıldı. Leptinin rHypoE-7 hücrelerinde RFRP-3 salgılanması ve $[Ca^{+2}]_i$ sinyalleşmesi üzerindeki etkileri incelendi. rHypoE-7 hücreleri Ca^{+2} duyarlı floresan boya ile yüklendi ve $[Ca^{+2}]_i$ cevapları floresan görüntüleme sistemi kullanılarak 340/380 nm oranındaki değişikliklerle belirlendi. Medyumdaki GnIH konsantrasyonunu belirlemek için ELISA yöntemi kullanıldı.

Bu çalışma sonunda leptinin, immortalize RFRP-3 nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ değiştirdiği gösterilmiştir. Bu da leptinin, gonadotropin serbestleştirici hormon

(GnRH) aktivitesini RFRP-3 nöronları aracılı düzenleyebileceğini açıkça göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: GnIH, leptin, rHypoE-7, RFRP-3, kalsiyum görüntüleme.

2. ABSTRACT

IN VITRO STUDIES ON SECRETION OF RFRP-3

CONTROLLING BY LEPTIN IN IMMORTALIZED rHypoE-7 NEURONS

Hypothalamic RFamide peptides, gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and orthologous peptides, which were discovered in mammals belonging to the RFamide peptide superfamily (RFRP-3), seem to be important regulators of hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) reproductive axis. Since GnIH is not only involved in reproductive function but also in the regulation of food intake, leptin produced by adipose cells has been suggested to have effects on RFRP-3 neurons. rHypoE-7 cell line was developed as a model to explore the effects of neuroendocrine factors on RFRP-3 neurons. To investigate whether leptin exerts its effects on food intake as well as reproduction by means of RFRP-3 neurons, changes in intracellular free Ca^{2+} levels ($[Ca^{2+}]_i$) were observed in rHypoE-7 cells treated by leptin. The main aim of the present study is to examine the effects of leptin on RFRP-3 in immortalized rHypoE-7 cells as *in vitro*.

In the present study rHypoE-7 cells releasing RFRP-3 were used. The effects of leptin on RFRP-3 release and calcium signaling in rHypoE-7 cells were investigated. In rHypoE-7 cells loaded with calcium sensitive dye and $[Ca^{2+}]_i$ responses were quantified by the changes in 340/380nm ratio using fluorescence imaging system. The ELISA kit was used to determine GnIH concentrations from the media. In conclusion, leptin changes $[Ca^{2+}]_i$ level in immortalized RFRP-3 neurons. This indicates that leptin may modulate GnRH activity via RFRP-3 neurones.

Key words: GnIH, leptin, rHypoE-7, RFRP-3, calcium imaging.

3.GİRİŞ

3.1. Hipotalamus-Hipofiz-Gonadal (HHG) Aks

Hipotalamusta salgılanan GnRH, hipotalamo-hipofizeyal portal sistem yoluyla ön hipofize taşınmaktadır. GnRH'nin etkisiyle ön hipofiz bezinde bulunan gonadotrop hücrelerden follikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) salgılanmaktadır. Salgılanan bu gonadotropik hormonlar gonadlar üzerine etki ederek gametogenez ve steroidogenez olaylarını başlatırlar. Gonadlarda meydana gelen bu endokrin olaylar 'gonadarş' olarak adlandırılır. Çocukluk döneminde östrojen ve testosteron az miktarda salgılanmaya devam etmekle birlikte sekonder cinsiyet karakterlerinin ortaya çıkması için bu hormonların plazma konsantrasyonlarının yeterli düzeyde olması gerekmektedir (1, 2).

Pubertenin başlaması için GnRH'nin pulsatil tarzda salgılanması gerekmektedir (3). İnsanda GnRH nöronları fetal hayatta (4) ve neonatal dönemde aktif olup, puberteye kadar nispeten sessiz kalmaktadır (3, 5). GnRH salgılanmasının puberteye kadar düşük seviyede kalmasının inhibitör bir nöronal sistem ile mümkün olabileceği düşünülmektedir. Hipotalamusun olgunlaşması ve bu sistem etkisinin kaybedilmesi ile beraber GnRH nöron aktivitelerinde artış meydana gelmektedir. Bu artışın pubertenin başlamasına yol açtığı ileri sürülmektedir. Peripubertel dönemde, GnRH nöronlarında GABA ve opioidler ile inhibitör sinyallerde azalma meydana gelirken, nöron ve glia hücrelerinden gelen glutamat ve kisspeptin gibi uyarıcı sinyallerin etkilerinde artış gözlenmektedir (6).

Son yıllarda pubertenin nöroendokrinolojik düzenlenmesi ile ilgili yeni gelişmeler kaydedilmiştir. GnRH nöronları üzerinde güçlü uyarıcı etki gösteren

kisspeptin hormonunun yanı sıra inhibitör etkiye sahip olan GnIH keşfedilmiştir (7).

3.2. RFamid peptidler

RFamidler, karboksil ucunda arginin-fenilalanin bulunan nöropeptidler olup ilk olarak omurgasız hayvanlarda ve daha sonra memeli türlerinde keşfedilmiştir (8, 9). Memelilerde, enerji dengesi, davranış ve üreme gibi fonksiyonlarda görev alan en az beş RFamid ailesi mevcuttur (10, 11). Bunlar; nöropeptid FF (NPFF), GnIH, 26RFa, kisspeptin/metastin ve prolaktin serbestleştirici (PrPP) hormon ailesidir (12).

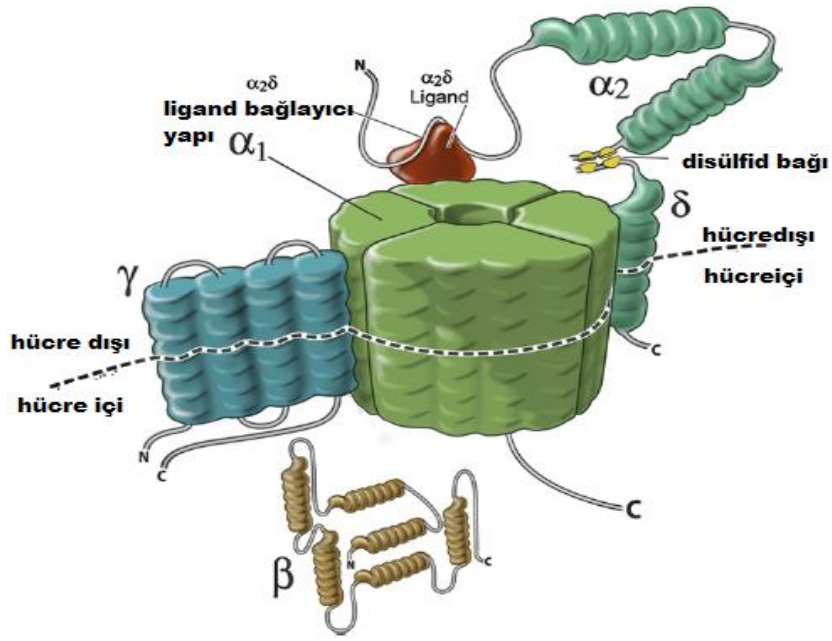
GnIH ilk defa 2000 yılında bildircin türü kuşlarda tespit edilen bir peptittir (13). Böylelikle, omurgalı canlılarda ilk defa gonadotropin salgılanmasını inhibe eden hipotalamik bir nöropeptid bulunmuştur. Memeli türlerinde de GnIH benzeri peptidler bulunmuş olup, bunlar da gonadotropin salgılanmasını baskılamak suretiyle üremeyi inhibe etmektedirler. Bu peptidler genel olarak RFamide-related peptidler (RFRP) olarak adlandırılmışlardır. Bu peptidlerden RFRP-1, 2 ve 3 kuşlardaki GnIH'ya benzer fonksiyonlara sahiptirler (14). GnIH'nın keşfi ile birlikte üreme nöroendokrinolojisinde yeni bir çalışma alanı oluşmuştur. GnIH nöronlarının hücre gövdeleri hipotalamusta dorsomedial nükleusta bulunur. Uzantıları medyan emineste ve preoptik alandaki GnRH nöronlarında sonlanmaktadır. Hipofizde bulunan gonadotropinlerde ve preoptik alandaki GnRH nöronlarında GnIH reseptörleri belirlenmiştir. GnIH, GnIH reseptörleri aracılığıyla hipofizdeki gonadotropinler üzerinde doğrudan etki göstererek gonadotropin sentez ve salgılanmasını inhibe etmektedir. Ayrıca, preoptik alandaki GnRH nöronları üzerine de etki ederek GnRH salgılanmasını

baskılamaktadır. *In vitro* çalışmalarda RFRP'nin GnRH tarafından uyarılmış olan gonadotropin gen transkripsiyonlarını ve LH salgılanmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (15).

3.3. Voltaj-Kapılı Kalsiyum Kanalları (VKKK)

Kalsiyum iyonu; kas kasılmasının başlatılması, sinir sonlanmalarından nörotransmitterlerin ve sekretuar hücrelerden hormonların salıverilmesinin tetiklenmesi, hücre döngüsü, gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve hücre ölümü gibi birçok hücre fonksiyonunun gerçekleştirilmesinde önemli rol oynamaktadır (16). $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonu hücre dışına göre oldukça düşüktür. $[Ca^{+2}]_i$ 'nin kısa süreli artması birçok hücrede 2. haberci reseptör çiftini aktive etmektedir. $[Ca^{+2}]_i$; voltaj veya ligand kapılı kalsiyum kanalları aracılığıyla hücre dışından Ca^{+2} girişi ya da hücre içi depolardan Ca^{+2} salıverilmesi ile artar (17).

VKKK ilk olarak Fatt ve Katz tarafından 1953 yılında tanımlanmıştır (16, 17). İlerleyen yıllarda yapılan çalışmalarda bu kanalların farklı alt tiplerinin olduğu tespit edilmiştir (18). Kalsiyum kanal proteinleri izole edilerek çeşitli alt birimlere ayrılmıştır. VKKK'nın ana alt birimi α_1 , yardımcı alt birimleri ise β , α_2 , δ ve γ olarak belirlenmiştir (19, 20). (Şekil 1).



Şekil 1: VKKK 4 alt birimden oluşmuştur. α_1 alt birimi birbirine benzer 4 parçadan oluşmuş olup her biri 6 transmembran segment içerir. Gözenek biçimlendirici alt birimdir. β alt birimi intraselülerdir. γ alt biriminin 4 transmembran segmenti vardır. δ alt biriminin 1 tane transmembran segmenti vardır ve disülfid bağ ile ekstraselüler α_2 alt birimine bağlıdır (Kaynak 21'den değiştirilerek alınmıştır).

3.3.1. VKKK'nın Sınıflandırılması

VKKK, ilk olarak farmakolojik ve elektrofizyolojik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Yapılan çalışmalarda bazı kalsiyum kanallarının aktivasyonu için sadece küçük bir depolarizasyona ihtiyaç duyulurken, diğer bir kısmının ise daha yüksek depolarizasyonla açıldığı görülmüştür (22, 23). Bu bilgilere göre kalsiyum kanalları yüksek voltaj aktivasyonlu (YVA) kalsiyum kanalları ve düşük voltaj aktivasyonlu (DVA) kalsiyum kanalları olmak üzere iki gruba ayrılmıştır.

1980'li yıllarda VKKK'nın aktivasyon ve inaktivasyon kinetikleri, iletimleri, iyon özellikleri, ilaç ve toksin duyarlılıklarına göre sınıflandırması yapılmıştır. Tablo 1'de kalsiyum kanallarının, α_1 temel alt biriminin yanı sıra β , α_2 , δ , ve γ gibi yardımcı alt birimleri de gösterilmektedir. α_1 alt birimi kanalın

temel elektrofizyolojik ve farmakolojik özelliklerden sorumludur. L tipi kalsiyum kanallarında çeşitli α_1 alt birimleri tanımlanmıştır. İlk olarak α_1 alt birimi iskelet kaslarında tespit edilmiş, klonlanmış ve α_{1S} olarak adlandırılmıştır (24, 25). Daha sonra kalpte (α_{1C-a}) ve düz kasta (α_{1C-b}) α_1 alt birimi klonlanmıştır (26, 27). Bunları takiben L tipi kanalların alt ailesini temsil eden diğer iki üye α_{1D} ve α_{1F} tanımlanmıştır (28-31).

Kalsiyum kanallarının 3 nöronal tipini temsil eden 3 α_1 alt birimi vardır. P/Q-tip kanallar α_{1A} alt birimi N tip kanallar ise α_{1B} alt birimini temsil eder (32-35). α_{1E} alt biriminin başlangıçta DVA T-tip kanallara ait olduğu düşünülmüş fakat daha sonra yapılan çalışmalar R tipi kanalın özelliklerini taşıdığı görülmüştür (36, 37). Şu ana kadar α_{1G} , α_{1H} , ve α_{1I} olmak üzere DVA T-tip kanallarının 3 üyesi tanımlanmıştır (38-40).

Kalsiyum kanallarının α_1 alt birimi sayısının gün geçtikçe artması sistematik bir sınıflandırmanın gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu gereklilikten hareketle α_1 alt birimleri Ca_vxy şemasına göre isimlendirilmiştir (41). Ca_v voltaj aktivasyonlu kalsiyum kanallarını, x sayısı kanal alt ailesini (L-tip, N-tip ve T-tip) ve y sayısı ise alt ailelerin üyelerini simgeler (Tablo 1).

Tablo 1: VKKK'nın sınıflandırılması

Aktivasyon Özelliği	Biyofiziksel veya Farmakolojik tanımlama ^a	α_1 Alt Birimine Göre Sınıflama ^{b,c}	Yapısal Sınıflama ^d
YVA	L-Tip	α_{1S}	Ca _v 1.1
		α_{1C}	Ca _v 1.2
		α_{1D}	Ca _v 1.3
		α_{1F}	Ca _v 1.4
	P/Q-Tip	α_{1A}	Ca _v 2.1
	Nöronal	N-Tip	α_{1B}
	R-Tip	α_{1E}	Ca _v 2.3
DVA	T-Tip	α_{1G}	Ca _v 3.1
		α_{1H}	Ca _v 3.2
		α_{1I}	Ca _v 3.3

Kaynak; ^a(42), ^b(43), ^c(44), ^d(41).

3.3.2. Kalsiyum Kanal Tipleri

3.3.2.1. L tipi kalsiyum kanalları

YVA sahip olan bu kanal grubu özellikle iskelet kasında yoğun olmak üzere kalp ve düz kas dokularında tanımlanmıştır (45, 46). İletkenliklerin büyük olması ve akımın uzun süreli olması nedeniyle bu kanallara L (long lasting) tipi kalsiyum kanalları adı verilmiştir. L-tip kanal ailesinin bugüne kadar 4 alt üyesi (Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3, Cav1.4) tespit edilmiştir. Dihidropiridin, fenilalkilaminler ve benzodiazepinler gibi ilaçların büyük çoğunluğu L tipi kalsiyum kanallarının organik kanal blokörleridir (47- 49).

3.3.2.2. Nöronal Tip Kalsiyum Kanalları

Bu kanallar memelilerin merkezi ve periferik sinir sisteminde fazla miktarda bulduklarından dolayı nöronal tip kalsiyum kanalları olarak adlandırılmıştır. Bu kanallar, örümcek ve yılandan izole edilen peptit toksinlerine karşı olan duyarlılıklarına göre alt birimlere (N, P/Q, R) ayrılmıştır. ω -conotoxin GVIA'ya duyarlı olan kanallar, N-tipi kalsiyum kanalları olarak isimlendirilirken (29, 50), ω -Aga IVA toksinine duyarlı kanallar ise P/Q-tip kalsiyum kanalları olarak adlandırılmıştır (P harfi purkinje hücrelerinden gelir) (51). Bu iki toksine dirençli kanallar ise resistant tipi (R-tipi) kalsiyum kanallar olarak adlandırılmıştır (52, 53).

3.3.2.3. T tipi kalsiyum kanalları

DVA kalsiyum kanal grubundandır. T-Tipi kalsiyum kanalları L-tipi kalsiyum kanallarından çok farklı elektrofizyolojik özelliklere sahiptir (54). Voltaja bağımlı olarak hızlı bir şekilde inaktivasyon gösterirler. Küçük ve kısa süreli akıma sahip olduklarından dolayı T (Transient) tipi kalsiyum kanalları olarak adlandırılırlar.

T-tipi kalsiyum kanalları sinir sistemi, kalp, böbrek, düz kas ve pek çok endokrin organ dahil olmak üzere vücudun bir çok bölgesinden eksprese edilmektedir (55). Beyindeki T-tip kalsiyum kanalları tekrarlayan düşük eşikli ateşlemeler ve ağrı ile ilişkilidir (56). Kalpte T-Tip kalsiyum kanalları sinoatriyal düğümde eksprese edilir ve sinoatriyal düğümden çıkan uyarılara katkıda bulunur, fakat kalp kasılmasına bir etkisi yoktur (57).

T-Tip kalsiyum kanallarının bronş, ileum, kolon, mesane ve uterus düz kaslarında da eksprese edildiği gösterilmiştir. T-Tip kalsiyum kanallarının

aldosteron, renin, atrial natriüretik peptit (ANP) ve insülin gibi hormonların salıverilmesinde rol oynadığı tespit edilmiştir. Bütün bunlar göz önüne alındığında T-Tip kalsiyum kanalları kalp krizi, aritmi ve hipertansiyon gibi kardiyovasküler hastalıklar ile epilepsi ve ağrı gibi nöronal hastalıkların tedavisinde kullanılan yeni ajanların etkilerine aracılık edebilirler (57-59).

3.4. Leptin

Leptin 1994 yılında Zhang ve ekibi tarafından keşfedilen 16 kDa molekül ağırlığına sahip bir hormondur (60). Adını yunanca leptos (ince) kelimesinden alan leptin, 167 aminoasitten oluşan bir peptittir. Vücutta birçok bölgede fonksiyon gösteren leptin, vücut ağırlığı ile metabolizmanın düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (60- 62). Esas olarak beyaz adipoz dokuda sentezlenen leptinin aynı zamanda plasenta, iskelet kası, gastrik epitel, meme bezi ve ön hipofiz hücrelerinde de az miktarda sentezlendiği bulunmuştur (63, 64). Leptinin kanda serbest ve proteine bağlı olmak üzere iki farklı formu bulunmaktadır (65, 66). Leptinin dolaşımdaki yarı ömrü yaklaşık olarak yarım saattir ve yemeklerden 2-3 saat sonra pulsatil olarak salgılanır. Diüurnal bir ritme sahiptir ve sabahın erken saatlerinde pik yaparak öğlen en düşük seviyesine iner (67). Leptin düzeyini başta vücut yağ kitlesi olmak üzere birçok faktör etkilemektedir (68, 69). İnsülin, glukokortikoidler ve prolaktin, leptin sentezini stimüle ederken, tiroit hormonları, büyüme hormonu, somatostatin, serbest yağ asitleri ve uzun süre soğuğa maruz kalma leptin üzerinde inhibitör etki göstermektedir (70-78). Leptin hormonu, esas olarak hipotalamustaki reseptörleri (OB-R) aracılığı ile negatif feedback sağlayarak vücuttaki gıda alımını ve enerji metabolizmasını düzenlemektedir (79). Bununla birlikte cinsel gelişim, üreme, immünite, gastrointestinal fonksiyonlar,

sempatik sinir sistemi aktivasyonu, vücut ağırlığının homeostazisinde de önemli rolleri bulunmaktadır (79-85).

OB-R genel olarak uzun ve kısa olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. OB-R'nin başlıca kısa formları OB-Ra, Rc, Rd, Re ve Rf 'dir. OB-R'nin uzun formu OB-Rb primer olarak hipotalamusun dorsamedial, lateral ve ventromedial bölgeleri başta olmak üzere, arkuat ve paraventriküler nükleuslarda bulunmaktadır. Ayrıca trombositlerde de bulunduğu gösterilmiştir. Proopiomelanokortin (POMC), nöropeptid Y(NPY), galanin, galanin-like peptide, gonadotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase ve neuropeptide W gibi nöropeptit nöronlarında OB-Rb eksprese edilir (86). Her iki reseptör de Janus family kinases (JAK) ve Transkripsiyon sinyali dönüştürücüsü ve aktivatörü (STAT) aracılı etki göstermektedir (87).

Leptin hormonunun keşfi ile birlikte adipoz dokunun bir endokrin organ olduğu fikri ortaya çıkmış ve yetersiz beslenme ile seksüel maturasyon arasındaki en önemli bağ kurulmuştur. Adipoz dokunun kütesinin artmasıyla birlikte serum leptin seviyeleri de doğru orantılı olarak artmaktadır (88-90). Kan beyin bariyerini kolaylaştırılmış difüzyonla geçen leptin, hipotalamusun ilgili bölgeleri tarafından algılanır ve gerekli feedbackler sağlanır. Hipotalamik çekirdeklerde OB-R'nin uyarılması yağ depolanmasını azaltan etkileri başlatır. NPY ve agouti related peptit (AGRP) gibi iştah uyarıcılarının yapımının azalması, α -melanosit uyarıcı hormonun salıverilmesi, melanokortin reseptörlerinin aktifleşmesine yol açan POMC nöronlarının aktive edilmesi, hipotalamusta kortikotropin-serbestleştirici hormon yapımının artması, metabolizma hızını ve enerji tüketimini arttıran sempatik sinir aktivitesinin artması, pankreas hücrelerinden insülin

salgılanmasının azalması serum leptin seviyesine göre hipotalamus tarafından düzenlenir (91, 92).

Leptin; üreme, metabolizma ve beslenme üzerine etkisini hipotalamus aracılığıyla göstermektedir. Leptinin beyindeki hücrel ve moleküler mekanizmaları henüz tam olarak açıklanmamıştır (93). Leptin, fare ve insanlarda normal pubertal maturasyon için gereklidir. İnsan vücudu üreme fonksiyonları için büyük enerji kaynaklarına ihtiyaç duymaktadır. Vücut ağırlığı ve yağlanma insanlarda ve kemirgenlerde pubertenin başlangıcında önemli rol oynar. Bu nedenle leptin, pubertenin başlangıcı ile enerji depolarını ilişkilendiren önemli bir metabolik habercidir. Leptin seviyesi artan yağlanma ile birlikte yükselir. Leptin arkuat nükleusta kisspeptin nöronları ile hareket etmektedir. Kisspeptin hücrelerinden leptin reseptörlerinin silinmesi üremede probleme veya pubertenin başlamamasına neden olur. Leptin enjekte edilmiş farelerde pubertenin erken başladığı görülmüştür. Leptin normal kemirgenlerde üreme aksının maturasyonunu hızlandırıcı ilk periferal moleküldür (94, 95). Ayrıca leptin sirkadiyen ritme sahiptir (96). Leptinin dolaşımdaki düzeyi, yağ kitlesiyle yakın ilişki gösterir (97).

Leptinin vücut enerji depoları ve üreme fonksiyonu arasındaki moleküler bağıntıyı açıklayabilmek için ilk önce GnRH üzerinden doğrudan etkiye sahip olduğu ileri sürülmüştür (98-102). Daha sonra yapılan çalışmalarda OB-R GnRH nöronlarında tespit edilemediği ve GnRH hücrelerinde OB-R genlerinin olmamasının üremede bir eksiklik meydana getirmediği tespit edilmiştir (103-105). Kisspeptinler ise HHG aksını aktive eden en önemli faktörler olarak gösterilmektedir (105). Leptinin kisspeptin hücrelerine olan etkisi üreme

fonksiyonundaki rolü için tek başına yeterli değildir (106). GnRH'nin memelilerdeki analogu olan RFRP-3 de HHG aksının önemli düzenleyicileri arasındadır. RFRP-3, GnRH nöron aktivasyonunda ve sinyalleşmesinde inhibitör olarak görev yapar (107, 108). RFRP-3 nöronları üzerinde leptinin etkisini inceleyen çalışmalardan birinde, aktive edilen RFRP-3 hücre sayısının yiyecek kısıtlaması durumunda arttığı gösterilmiştir (109). Diğer bir çalışmada ise leptinin RFRP-3 nöronları üzerinde az bir etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir (110).

rHypoE-7 hücresi, RFRP-3 nöronları üzerinde nöroendokrin faktörlerin etkilerinin gösterildiği bir model olarak geliştirilmiştir. GnRH sentezi ve leptin arasındaki ilişkiyi çözmek için leptinin bu hücreler üzerindeki etkisinin bilinmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada; immortalize rHypoE-7 hücrelerinde RFRP-3 sekresyonunun leptin tarafından kontrolü *in vitro* olarak incelendi. Leptinin üreme fonksiyonları üzerindeki etkilerini anlayabilmek için RFRP-3 sekrete eden rHypoE-7 hücrelerine leptin uygulanarak $[Ca^{+2}]_i$ seviyelerine bakıldı. Hücrede ekzositoz yapıldığını gösteren $[Ca^{+2}]_i$ sinyalleri, GnRH salınımında leptinin düzenleyici etkiye sahip olup olmadığının belirlenmesi ve olası etkiye aracılık eden hücresel mekanizmaların sorgulanması son derece önemlidir.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1 Hücre Kültürü

Bu çalışmada rHypoE-7 hücre kültürü Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ortamında hazırlandı ve hücre içi kalsiyum görüntüleme sistemiyle $[Ca^{+2}]_i$ miktarında meydana gelen değişimler incelendi (Şekil-2).

rHypoE-7 hücreleri, içerisine % 10 fetal buzağı serumu (FCS), 550 mg/L L-glutamine, 100 U/ml penicillin, ve 100 µg/ml streptomycin ilave edilmiş DMEM ortamı ile birlikte 37⁰C sıcaklıkta, % 95 hava ve %5 CO₂ ihtiva eden nemlendirilmiş inkübatörde (*Heracell, Kendro Lab GmbH, Germany*) inkübasyona bırakıldı. rHypoE-7 hücreleri 8 dakika süre ile 37⁰C sıcaklıkta % 0.125 tripsin (sigma) ile çözdürüldü. Daha sonra hücreler 5 dakika süreyle 1600 devir/dakika'da santrifüj edildi ve dibe çöken hücrelerin üzerindeki medyum uzaklaştırılarak yeni kültür ortamına ekildi.

4.1.1. Kültür İçin Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasal Ajanlar

A) Steril Su: Çift distile suyun laminar hava akımlı güvenlik kabini içerisinde 0.2 µm filtrelerden geçirilmesiyle elde edildi ve daha önceden otoklavda steril edilmiş cam şişelerde saklandı.

B) Etil Alkol: % 99.7 - % 100 saflıktaki etil alkol iki defa distile edilmiş suyla dilüe edilerek % 70'lik oranda hazırlandı ve püskürtmeli ağızlığı bulunan şişede tutuldu.

C) Steril Dulbeco'nun Tamponlanmış Fosfat Tuzu (PBS): 1 tablet PBS, 100 ml (Amresco, Solon, Ohio, ABD; kalsiyum ve magnezyum içermeyen) bidistile suyun içerisinde çözdürüldükten sonra 0.22 µm kalınlıktaki filtreden

geçirilerek steril bir şişeye kondu. Hazırlanan PBS +4 °C'de 2 hafta boyunca saklandı ve çalışma esnasında kullanıldı.

D) Penisilin/Streptomisin (Sigma; Steinheim, Almanya): 5000 IU/ml penisilin ve 5000 µg/ml streptomisin olacak şekilde 1 ml'lik stoklar hazırlandı ve kültür medyumu hazırlamada kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

E) Tripsin (Tip I) (Sigma; Steinheim, Almanya): Steril PBS içerisinde % 0.125 olacak şekilde dilüe edildi ve 1 ml'lik kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.

4.1.2. Kültür İçin Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri

Sterilizasyon amacıyla 0.22 µm porlara sahip filtre

Steril 50 ml polipropilen koni tüp

Steril 15 ml polipropilen koni tüp

Steril 5 ml polipropilen koni tüp

Steril 12mm ebata sahip poly-D-lizin ve laminin kaplı lameller

Cam Pastör pipeti, 150 mm uzunlukta

Hücre Kültürü Flaskı

4.1.3. Diğer Ekipmanlar

Laminar hava akımlı güvenlik kabini (Bilser, Ankara),

Otomatik CO₂ inkübatörü, model: HeraCell (Heraeus, Hanau, Almanya),

Otomatik pipetler (2-20 µl, 20-200 µl ve 100-1000 µl),

Cam şırınga (1-10 µl)

Şarjlı pipet

4.2. Hücre İçi Kalsiyum Görüntüleme

Hücreler çözdürüldükten sonra 12 mm kalınlıkta poly-D-lysine /Laminin lamel üzerine ekildi. rHypoE-7 hücreleri 37⁰C sıcaklıkta 45 dakika süre ile 1µM fura-2/AM ester (Molecular probes Inc, 1 mM stok dimethylsulphoxide, DMSO) ile boya yüklemesi yapıldı. Yüklemeden sonra hücreler, 20 dakika süre ile 3-4 kere hücre dışı kayıt solüsyonunda yıkanarak hücre dışı ortamdaki boya uzaklaştırıldı. Hücre dışı kayıt solüsyonu, mM cinsinden 130.0 NaCl, 3.0 KCl, 0.6 MgCl₂, 2.0 CaCl₂, 3 NaHCO₃, 5.0 glikoz, ve 10.0 HEPES kullanılarak hazırlandı. Hücre dışı kayıt solüsyonunun pH seviyesi NaOH kullanılarak 7.4'e, ozmolaritesi ise sükröz kullanılarak 310-320 mOsm'ye ayarlandı. Bütün görüntüleme deneyleri oda sıcaklığındaki karanlık ortamda gerçekleştirildi.

Kalsiyum duyarlı floresan boya ile yüklenen hücreler, mikroinkübasyon kayıt çemberine (Warner Instruments, ABD) aktarılarak, floresan ataşmanlı Nikon TE 2000S ters mikroskop altına yerleştirildi. Hücreler floresan ışık kaynağı ve filtre sürücü aracılığı ile 340-380 nm UV dalga boyunda uyarıldıktan sonra (uyarı 340-380 nm, emisyon 510 nm) dijital CCD kamera (Hamamatsu Orca 285, Japonya) ile kayıt altına alındı. Elde edilen görüntüler bir bilgisayar yazılımı (Simple PCI, C-Imaging) aracılığı ile analiz edildi (Şekil 2).

Hücrelerin floresan görüntü değişimleri dijital kamera ile kayıt altına alındıktan sonra çekilen kayıtlardaki hücrelerde "ilgi alanı" seçimleri yapılarak yazılım programı (sPCI, ComPix) aracılığı ile analizleri gerçekleştirildi. [Ca⁺²]_i hesaplanması ve analizi veri analiz yazılımına sahip bir bilgisayar vasıtası ile off-line olarak yapıldı. Bazal ve leptin muamelesi sonrasında meydana gelen [Ca⁺²]_i'deki değişiklikler aynı hücrelerden kayıt alınarak belirlendi. Chelerythrine

chloride'nin (ChCl) farklı konsantrasyon tepkileri farklı hücrelerden elde edildi ve Fura-2 AM, DMSO içerisinde çözdürüldü. Banyo solüsyonu içerisindeki DMSO'nun son konsantrasyonu %0,2 'yi aşmadı ve kullanılan dozdaki DMSO'nun $[Ca^{+2}]_i$ değerlerinde bir değişiklik meydana getirmediği belirlendi.

Fura-2 AM Invitrogen (İsviçre) firmasından alındı. Her solüsyon kayıt çemberinden önce gerekli konsantrasyon dakikalarına kadar dilüte edildi.



Şekil 2: Floresan kalsiyum görüntüleme sisteminin fotoğrafik görünümü. İlaç uygulama/mikroinkübasyon sistemi (sol üst kısım), CCD kamera (sol alt), ters mikroskop ve filtre sürücüsü kontrol ünitesi (sağ).

4.3. Leptin Uygulaması

Leptin, 0,5 mL (20 mM) HCl ve 0,3 mL (7,5 mM) NaOH'da çözülerek hazırlandı. Son konsantrasyonlar ekstrasellüler kayıt solüsyonu içinde sulandırılarak 0.1 µM, 1 µM ve 10 µM konsantrasyonlarda leptin, kayıt çemberi içinde bulunan hücrelere uygulandı. İlk olarak kayıt çemberi içindeki hücreleri içeren lameller yerleştirildikten sonra perfüzyon sisteminin ince hortumu kayıt çemberi üzerine sabitlendi ve kayıt çemberi 600 µl hücre dışı kayıt solüsyonuyla dolduruldu. Öncelikli olarak bazal seviyeyi belirlemek için en az 5'er dakika kayıtlar alındı. Daha sonra farklı hücrelere 3 farklı konsantrasyondaki (0.1 µM, 1 µM, ve 10 µM) leptin, PKC inhibitörü ChCl ile birlikte uygulandı.

4.4. İstatistiksel Analiz

Bütün veriler ortalama \pm SS olarak ifade edilmiştir. Leptinin (0.1 µM, 1 µM ve 10 µM) konsantrasyonlarının $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi üzerine olan doz bağımlı etkisini değerlendirmek amacıyla tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Leptinin gruplar arasındaki farklılığı ortaya koyabilmek amacıyla post hoc test olarak Tukey HSD testi kullanıldı. Kalsiyumsuz ortamda ve PKC inhibitörü ChCl etkileri altında leptin uygulanması sonucu oluşan $[Ca^{+2}]_i$ seviyeleri Student's t testi ile değerlendirilmiştir. Bütün analizler için $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

5. BULGULAR

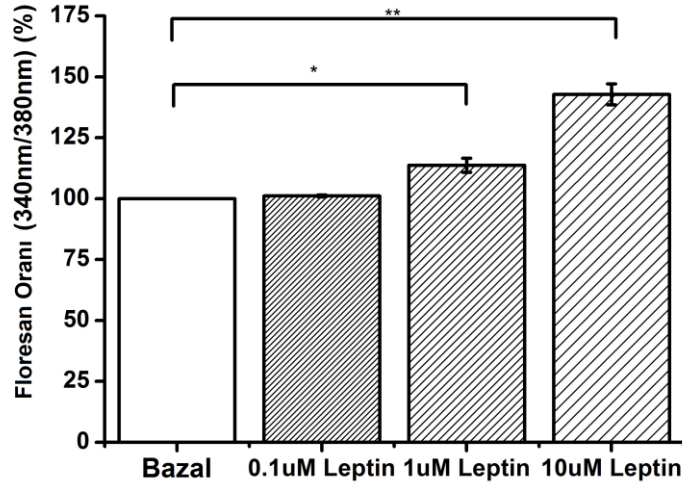
Bu çalışmada ilk kez, leptinin rHypoE-7 hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ miktarı üzerindeki etkisi incelendi. Leptinin bu hücreler üzerine etkinliğini test etmeden önce, leptinin çözdürüleceği solüsyonun etkilerine bakarak solüsyonun kendi başına etki etmediğinden emin olundu. Daha sonra yapılan deneyde leptinin $[Ca^{+2}]_i$ üzerinde etkili olduğu tespit edildi.

5.1. Leptinin rHypoE-7 hücrelerinde $[Ca^{+2}]_i$ Üzerine Etkileri

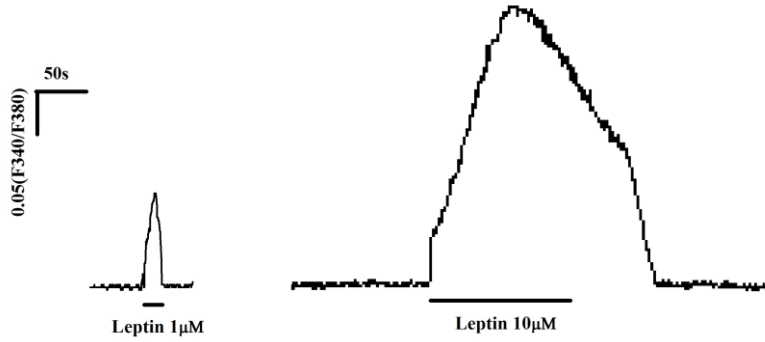
Leptin; rHypoE-7 nöronlarında $[Ca^{+2}]_i$ üzerinde doz bağımlı bir artışa yol açtı. Bu çalışmada, en düşük doz olan 0.1 μ M leptinin rHypoE-7 hücrelerine uygulanması $[Ca^{+2}]_i$ seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmedir (Şekil 3).

1 μ M leptin uygulandığında ise $[Ca^{+2}]_i$ miktarı %113.7 \pm 2.9 seviyesine yükseldi. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlıydı. (n=28, p<0.01), (Şekil 3-4).

Bu çalışmada kullanılan en yüksek doz olan 10 μ M'lık leptinin uygulamasında ise $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi %142.8 \pm 4.3 değerine yükseldi. Bu sonuç benzer şekilde istatistiksel olarak anlamlıydı (n=49, p<0.001) (Şekil 3-4).



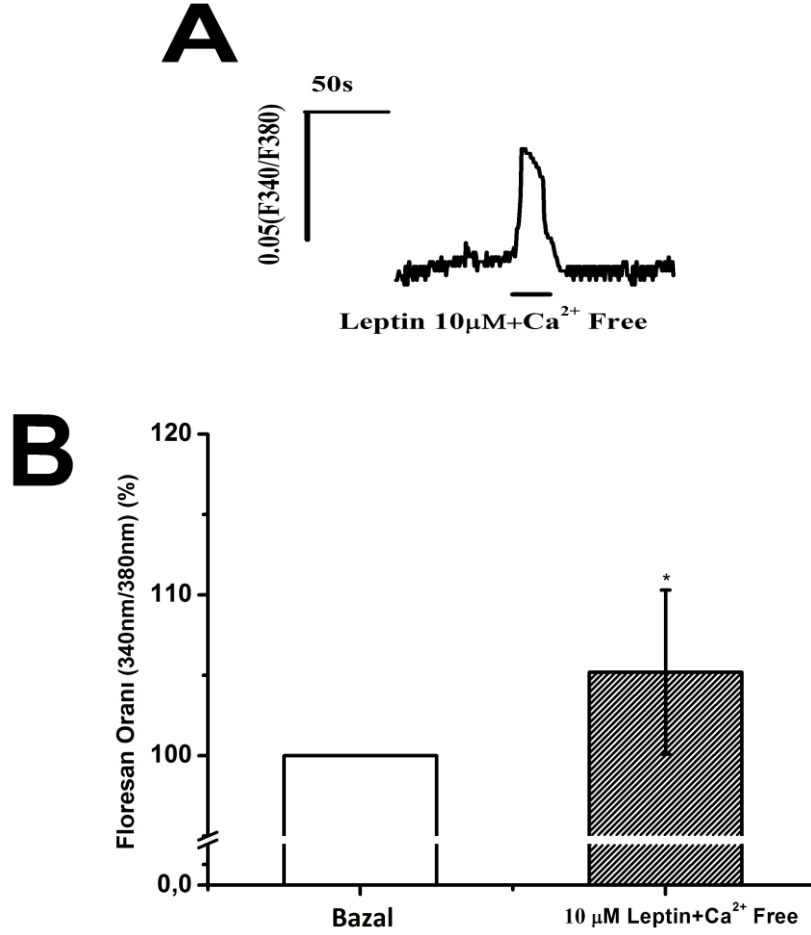
Şekil 3: rHypoE-7 nöronlarına uygulanan 0.1, 1 ve 10 μM leptinin $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyine etkileri. 0.1, 1 ve 10 μM leptin uygulamasının en az 3 farklı rHypoE-7 kültür ortamında $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyine etkisi (Ortalama \pm S.S) * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.



Şekil 4: rHypoE-7 nöronlarına uygulanan 1 μM ve 10 μM leptinin $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyine etkileri. 1 μM ve 10 μM leptin uygulaması $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyini gösteren orijinal resim.

Leptinin $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyinde meydana getirdiği artışın, hücre içi Ca^{+2} depolarından mı yoksa hücre dışından mı geldiği tespit edilmek istendi. Bu amaçla kalsiyumsuz hücre dışı kayıt solusyonu (0.5mM EGTA) eklenerek leptin muamelesi yapıldı. Bazal seviye %100 kabul edildiğinde, kalsiyumsuz hücre dışı

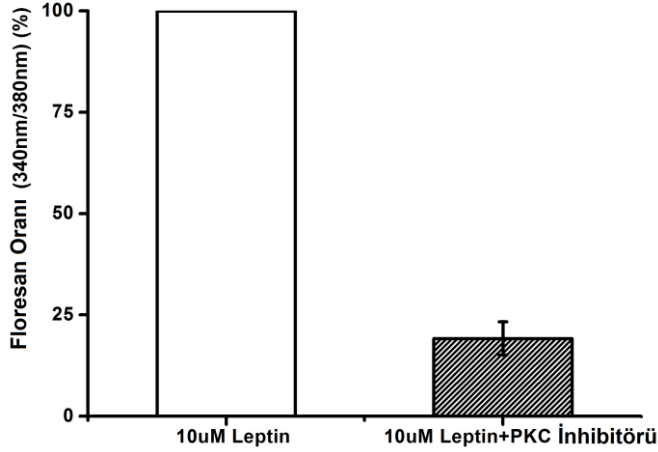
kayıt solüsyonuna leptin (10 μM) uygulaması $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyinde artışa yol açtı ($p<0.001$) (Şekil 5).



Şekil 5: rHypoE-7 nöronlarında hücre dışından kalsiyum uzaklaştırıldığında 10 μM leptin $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyine etkileri. **A.** Kalsiyumsuz hücre dışı kayıt solüsyonu (0.5mM EGTA) uygulamasını takiben uygulanan 10 μM leptinin, $[\text{Ca}^{+2}]_i$ üzerine etkilerini gösteren orijinal resim. **B.** Bazal ve 10 μM leptinin uygulamasının, en az 3 farklı rHypoE-7 kültür ortamında $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyine etkisi (Ortalama \pm S.S) * $p<0.01$.

Leptinin $[\text{Ca}^{+2}]_i$ miktarında meydana getirdiği artışın PKC yolağı aracılı olup olmadığını belirlemek amacıyla leptin uygulamasından önce PKC inhibitörü ChCl kullanıldı. Leptinin meydana getirdiği artış %100 kabul edildiğinde PKC inhibitörü ChCl, 10 μM leptinin meydana getirdiği $[\text{Ca}^{+2}]_i$ düzeyindeki artışı

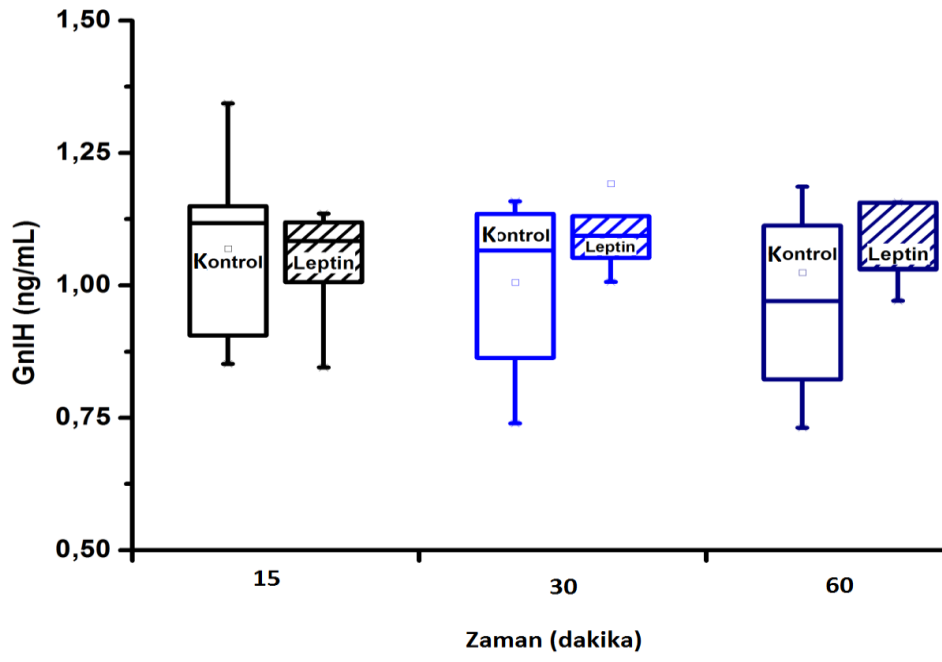
önemli ölçüde baskıladı. Meydana gelen bu inhibisyon 19.2 ± 4.1 seviyesindeydi (n=30, $p < 0.0001$) (Şekil 6).



Şekil 6: rHypoE-7 nöronlarına uygulanan PKC inhibitörü ChCl ve 10 μ M leptinin $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkileri. 10 μ M leptin + PKC inhibitörü ChCl uygulamasının en az 3 farklı rHypoE-7 kültür ortamında $[Ca^{+2}]_i$ düzeyine etkisi (Ortalama \pm S.S) $**p < 0.0001$.

5.2. Leptinin rHypoE-7 Hücrelerinde GnIH Sekresyonuna Etkileri

15 dakikalık (1.06 ± 0.10 ng/mL), 30 dakikalık (1.19 ± 0.30 ng/mL) ve 60 dakikalık (1.06 ± 0.08 ng/mL) leptin muamelesi sonuçları (1.07 ± 0.14 ng/mL, 1.01 ± 0.15 ng/mL ve 1.01 ± 0.20 ng/mL) (n=7 her grup için) kontrol değerleri ile kıyaslandığında GnIH seviyelerinde önemli bir değişiklik olmamıştır. Bununla birlikte GnIH sekresyonu leptin uygulandıktan sonra 30 dakika içerisinde artmıştır. Fakat leptinin bu etkisi istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 7).



Şekil 7: GnIH sekresyonu üzerine leptinin etkisi

6. TARTIŞMA

Hipotalamik GnRH nöronları üzerine leptinin etkisiyle ilgili pek çok çalışma yapılmasına rağmen, GnRH nöronlarında leptinin etkisine aracılık eden hücresel mekanizmalar iyi bilinmemektedir. Sinyal iletiminden sorumlu olan OB-Rb, GnRH salınımının kontrolünde önemli bir alan olan arkuat nükleusta yoğun olarak eksprese edilmesine ve in vitro izole hipotalamik eksplantlarda GnRH salınımını uyarmasına rağmen bugüne kadar leptin reseptörleri GnRH nöronlarında tanımlanmamıştır. GnRH salıverilmesinde leptinin etkisinin nöronal aracılı olduğu fikri kabul görmüştür (111). İmmortalize RFRP-3 nöronları olan rHypoE-7 hücrelerinin leptin reseptörünü içerdiği bilindiğinden, RFRP-3 sekrete eden bu in vitro hücre modeli; leptin indüklü GnRH sekresyonunda hücresel sinyal yolağının araştırılması için çok kullanışlı bir modeldir (112).

Kalsiyum, hücre tipine bağlı olarak çok çeşitli fonksiyonlarla ilişkili bir ikinci habercidir. Bundan dolayı leptinin $[Ca^{+2}]_i$ üzerine etkisinin araştırılması leptin aracılı hormonal düzenleme için önemli bilgiler sağlar. Hücre içi kalsiyum akışı hormon sekresyon mekanizmasında kritik bileşen olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada kalsiyuma duyarlı boya ile yüklenmiş rHypoE-7 hücrelerine yapılan leptin muamelesi $[Ca^{+2}]_i$ 'de önemli ölçüde artışa neden oldu. rHypoE-7 hücrelerine PKC inhibitörü ile muamele edilmesinden sonra leptinin $[Ca^{+2}]_i$ üzerindeki etkisi ortadan kalktı ve 100 nM leptinin $[Ca^{+2}]_i$ cevabı anlamlı düzeyde düşerek % 19.2 ± 4.1 olarak tespit edildi. Bu nedenle leptin, $[Ca^{+2}]_i$ üzerindeki etkisini rHypoE-7 hücrelerde PKC sinyal yolağı aracılı olarak gösterebilir. rHypoE-7 hücrelerde PKC sinyalleşmesi, RFRP-3 ekspresyon ve sekresyonunun düzenlenmesi ile ilişkili görünmektedir. Böylece bizim

sonuçlarımıza göre leptin, rHypoE-7 hücrelerde RFRP-3 sekresyonunu PKC sinyal yolağı aracılı olarak $[Ca^{+2}]_i$ 'yi modüle ederek gerçekleştirir.

Ca^{+2} içermeyen ekstraselüler kayıt solüsyonuna leptin uygulandığında hücre içi kalsiyum konsantrasyonu zayıf bir etki gösterdi. Bu bulgulara göre leptinin tüm etkisi için hem intrasellüler hem de ekstraselüler Ca^{+2} gereklidir.

Rat dorsomedial hipotalamusta bulunan GnIH nöronlarının Ni^{+2} duyarlı T-tip kalsiyum kanal iletkenliğine sahip olduğu rapor edilmiştir (113). Yani, leptine $[Ca^{+2}]_i$ 'nin cevabı bu tip kanaldan kaynaklanıyor olabilir.

RFRP nöronlarının leptin reseptörü eksprese etmediği öne sürülse de son yapılan çalışmalarda RFRP nöronlarının her iki cinsiyette de leptin reseptörü eksprese ettiği rapor edilmiştir (103, 114). Mevcut çalışmada immortalize rHypoE-7 hücrelerinde leptin ile $[Ca^{+2}]_i$ 'nin değişmesi bu hücrelerde leptin reseptörlerinin varlığını dolaylı olarak göstermektedir. Buna karşılık bu çalışma, leptinin RFRP-3 nöronları üzerinde çok az etki gösterdiği ya da hiç göstermediği şeklindeki konsepti doğrulamadı ve leptin ile fertilitenin metabolik düzenlenmesinde bu nöronların önemli nöronal yollar olduğu görünmemektedir (110). İmmortalize RFRP-3 nöronlarında leptin ile $[Ca^{+2}]_i$ 'da meydana gelen değişiklikler bu nöronlarında leptinin etkisini açıkça göstermiştir. Bu nedenle, leptin RFRP-3 nöronları aracılığıyla GnRH aktivitesini güçlü bir şekilde modüle eder.

rHypoE-7 hücrelerinin leptin ile statik inkübasyonu 15. 30. ve 60. dakikalarda GnIH sekresyonunda önemli bir değişikliğe sebep olmamıştır. Bu sonuçlar hücrelerde leptinin GnIH sekresyonu üzerinde akut etkilere sahip olmadığını göstermektedir. Statik inkübasyonda GnIH'ın devam eden

sekresyonunun, ortamda GnIH artışına yol açacağı beklenmiş fakat ilk 60 dakikada herhangi bir değişiklik olmamıştır. Leptin ortamda GnIH birikmesini onun sekresyonunu azaltarak önleyebilir. Bu kısa sürede leptinin önleyici etkisi ve otonöregülasyon mekanizmaları ilişkili olabilir. Otonöregülasyon mekanizmalarının muhtemel etkisini yok etmek için rHypoE-7 hücrelerinin leptin ile dinamik inkübasyonu en az 24 saat sürmelidir.

İn vivo immortalize hücre hattı kompleks nöronal yapı göstermediğinden immortal RFRP-3 nöronlarında leptine cevaben $[Ca^{2+}]_i$ 'de meydana gelen değişiklikler in vivo hipotalamik dilimler kullanılarak doğrulanmalıdır.

6.1. İleride Yapılması Planlanan Çalışmalar:

Bu çalışmada elde edilen bulgular, rHypoE-7 hücrelerinde leptinin doz bağımlı olarak $[Ca^{+2}]_i$ düzeyini artırdığını göstermektedir. Bu çalışmanın devamında leptinin kalsiyum kanalları üzerine olan etki mekanizmasının açığa çıkarılması ve GnRH üzerine etkinliğinin daha iyi bir şekilde aydınlatılması amacıyla aşağıdaki yaklaşımlara gerek olduğu düşünülmektedir:

a) Leptinin rHypoE-7 hücrelerinde patch clamp tekniği çalışmaları ile membran potansiyeli ve AP parametreleri üzerine olan etkileri belirlenerek leptinin bu hücrelerde olası fizyolojik önemi hakkında bilgi elde etmek,

b) Leptinin rHypoE-7 hücrelerinde membran akımları üzerine etkileri incelenerek $[Ca^{+2}]_i$ depoları ve kalsiyum tetiklemeli kalsiyum salıverilmesi ile etkileşimini belirlemek,

c) PLC, diaçilgliserol gibi hücre içi ikincil habercilerin leptinin etkisinde olası rollerini direk yaklaşımlarla belirlemeye çalışmak,

d) Leptinin spesifik kalsiyum kanal blokörleri kullanarak hangi tip kalsiyum kanalları üzerine etkisinin olduğunu belirlemek.

7. KAYNAKLAR

1. Mitamura R, Yano K, Suzuki N, et al. Diurnal rhythms of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and testosterone secretion before the onset of male puberty. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999; 84 (1): 29-37.
2. Mitamura R, Yano K, Suzuki N, et al. Diurnal rhythms of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, testosterone, and estradiol secretion before the onset of female puberty in short children. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000; 85 (3): 1074-80.
3. Terasawa E, Fernandez DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocrine Reviews*, 2001; 22: 111-51.
4. Kaplan SL, Grumbach MM, Aubert ML. The ontogenesis of pituitary hormones and hypothalamic factors in the human fetus: maturation of central nervous system regulation of anterior pituitary function. *Recent Progress in Hormone Research*, 1976; 32: 161-243.
5. Winter JS, Faiman C, Hobson WC, et al. Pituitarygonadal relations in infancy. I. Patterns of serum gonadotropin concentrations from birth to four years in man and simpanzee. *J Clin Endocrinol Metab*, 1975; 40: 545-51.
6. Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, et al. The Neuroendocrine Regulation of Puberty: Is the Time Ripe for a Systems Biology Approach? *Endocrinology*, 2006; 147: 1166-74.
7. Dungan HM, Clifton DK, Steiner RA. Minireview: Kisspeptin Neurons as Central Processors in the Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion. *Endocrinology* 2006; 147: 1154-8.
8. Price DA, Greenberg MJ. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science*, 1977; 197: 670-71.
9. Yang HY, Fratta W, Majane EA, et al. Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985; 82: 7757-61.
10. Bechtold DA, Luckman SM. The role of RFamide peptides in feeding. *J Endocrinol*, 2007; 192: 3-15.
11. Osugi T, Ukena K, Sower SA, et al. Evolutionary origin and divergence of PQRamide peptides and LPXRamide peptides in the RFamide peptide family. Insights from novel lamprey RFamide peptides. *FEBS J*, 2006; 273: 1731-43.
12. Findeisen M, Rathmann D, Beck-Sickinger AG. RFamide Peptides: Structure, Function, Mechanisms and Pharmaceutical Potential *Pharmaceuticals*, 2011; 4: 1248-80.
13. Tsutsi K, Saigoh E, Ukena K, et al. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000; 275: 661-7.
14. Smith JT, Clarke IJ. Gonadotropin inhibitory hormone function in mammals. *Trends Endocrinol Metab*, 2010; 21: 255-60.
15. Son YL, Ubuka T, Millar RP, et al. Gonadotropin-Inhibitory Hormone Inhibits GnRH-Induced Gonadotropin Subunit Gene Transcriptions by Inhibiting AC/cAMP/PKA-Dependent ERK Pathway in L β T2 Cells. *Endocrinology*, 2012; 153: 2332-43.

16. Borsotto M, Barhanin J, Fosset M, et al. The 1,4-dihydropyridine receptor associated with the skeletal muscle voltage-dependent Ca^{2+} channel. Purification and subunit composition. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 14255-14263
17. Flockerzi V, Oeken HJ, Hofmann F. Purification of a functional receptor for calcium-channel blockers from rabbit skeletal-muscle microsomes. *Eur. J. Biochem.* 1986; 161: 217-224
18. Sieber M, Nastainczyk W, Zubor V, et al. The 165-kDa peptide of the purified skeletal muscle dihydropyridine receptor contains the known regulatory sites of the calcium channel. *Eur. J. Biochem.* 1987; 167: 117-122
19. Takahashi M, Seagar MJ, Jones JF, et al. Catterall W. A. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987; 84: 5478-5482
20. Vaghy PL, Striessnig J, Miwa K, et al. Glossmann H., Schwartz A. Identification of a novel 1,4-dihydropyridine- and phenylalkylamine-binding polypeptide in calcium channel preparations. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 14337-14342
21. Lisa Doan MD. Voltage-gated calcium channels and pain. *Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management* 2010; 14: 42-47
22. Hagiwara S, Ozawa S, Sand O. Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J. Gen. Physiol.* 1975; 65: 617-644
23. Llinas R, Yarom Y. Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J. Physiol.* 1981; 315: 549-567
24. Curtis BM, Catterall WA. Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* 1984; 23: 2113-2118
25. Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, et al. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 1987; 328: 313-318
26. Mikami A, Imoto K, Tanabe T, et al. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 1989; 340: 230-233
27. Biel M, Ruth P, Bosse E, et al. Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FEBS Lett.* 1990; 269: 409-412
28. Seino S, Chen L, Seino M, et al. Cloning of the α_1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic β cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992; 89: 584-588
29. Williams ME, Feldman DH, Mcue AF, et al. Structure and functional expression of α_1 , α_2 , and β subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* 1992a; 8: 71-84
30. Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, et al. Loss-of-function mutations in a calcium-channel α_1 -subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night

- blindness. *Nat. Genet.* 1998; 19: 264-267
31. Strom TM, Nyakatura G, Apfelstedt-Sylla E, et al. An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat. Genet.* 1998; 19: 260-263
 32. Mori Y, Friedrich T, Kim MS, et al. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* 1991; 350: 398-402
 33. Starr TV, Prystay W, Snutch TP. Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991; 88: 5621-5625
 34. Williams ME, Brust PF, Feldman DH, et al. Structure and functional expression of an ω -conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science* 1992b; 257: 389-395
 35. Dubel SJ, Starr TV, Hell J, et al. Molecular cloning of the α_1 subunit of an ω -conotoxin-sensitive calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992; 89: 5058-5062
 36. Niidome T, Kim MS, Friedrich T, et al. Molecular cloning and characterization of a novel calcium channel from rabbit brain. *FEBS Lett.* 1992; 308, 7-13
 37. Soong TW, Stea A, Hodson CD, et al. Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* 1993; 260: 1133-1136
 38. Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, et al. Molecular characterization of a neuronal lowvoltage-activated T-type calcium channel. *Nature*(1998): 391: 896-900
 39. Cribbs LL, Lee JH, Yang J, et al. Cloning and characterization of α_{1H} from human heart, a member of the T-type Ca^{2+} channel gene family. *Circ. Res.* 1998; 83: 103-109
 40. Lee A, Wong ST, Gallagher D, et al. Ca^{2+} /calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels. *Nature* 1999; 399: 155-159
 41. Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, et al. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 2000; 25: 533-535
 42. Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, et al. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.* 1988; 11: 431-438
 43. Snutch TP, Leonard JP, Gilbert MM, et al. Rat brain expresses a heterogeneous family of calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990; 87: 3391-3395
 44. Birnbaumer L, Campbell KP, Catterall WA, et al. The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 1994; 13: 505-506
 45. Gielow ML, Gu GG, Singh S. Resolution and Pharmacological analysis of the voltage-dependent calcium channels of *Drosophila* larval muscles. *J Neurosci* 1995; 15: 6085-93.
 46. Fleckenstein A. History of calcium antagonists. *Circ Res* 1983; 52 (1) :3-16.

47. Regulla S, Schneider T, Nastainczyk W, et al. Identification of the site of interaction of the dihydropyridine channel blockers nitrendipine and azidopine with the calcium-channel α_1 subunit. *EMBO J.* 1991; 10: 45-49
48. Catterall WA, Striessnig J. Receptor sites for Ca^{2+} channel antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* 1992; 13: 256-262
49. Kuniyasu A, Itagaki K, Shibano T, et al. Photochemical identification of transmembrane segment IVS6 as the binding region of semotiadil a new modulator for the L-type voltage-dependent Ca^{2+} channel. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 4635-4641
50. Fujita Y, Mynlieff M, Dirksen RT, et al. Primary structure and functional expression of the ω -conotoxin-sensitive N-type calcium channel from rabbit brain. *Neuron* 1993; 10: 585-598
51. Stea A, Tomlinson WJ, Soong TW, et al. Localization and functional properties of a rat brain α_{1A} calcium channel reflect similarities to neuronal Q- and P-type channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994; 91: 10576-10580
52. Ellinor P. T, Zhang JF, Randall AD, et al. Functional expression of a rapidly inactivating neuronal calcium channel. *Nature* 1993; 363: 455-458
53. Randall AD, Tsien RW. Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology* 1997; 36: 879-893
54. Forti L, Tottene A, Maretti A, et al. Three novel types of voltage-dependent calcium channels in rat cerebellar neurons. *J Neurosci* 1994; 14: 5243-56
55. Kitchens SA, Burch J, Creazzo TL. T-type Ca^{2+} current contribution to Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in developing myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2003; 35: 515-523
56. Huguenard JR. Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 1996; 58: 329-348
57. Sen L, Smith TW. T-type Ca^{2+} channels are abnormal in genetically determined cardiomyopathic hamster hearts. *Circ. Res.* 1994; 75: 149-155
58. Tsakiridou E, Bertollini L, Curtis M, et al. Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy. *J. Neurosci.* 1995; 15: 3110-3117
59. Talley EM, Solorzano G, Depaulis A, et al. Lowvoltage-activated calcium channel subunit expression in a genetic model of absence epilepsy in the rat. *Brain Res., Mol. Brain Res.* 2000; 75: 159-165
60. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of a mouse obese gene and its human homolog. *Nature* 1994; 372: 425-432.
61. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, et al. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 1995; 269: 546-549.

62. Pellemounter MA, Cullen MJ, Baker MB, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995; 269: 540-543.
63. Sinha MK. Human leptin: the hormone of adipose tissue. *Eur J Endocrinol* 1997;136:461-4.
64. Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, et al. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:11073-8.
65. Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, et al. Evidence of free and bound leptin in human circulation. *J Clin Invest* 1996; 98:1277-82.
66. Brabant G, Horn R, Mayr M, et al. Free and protein bound leptin are distinct and independently controlled factors in energy regulation. *Diabetologia* 2000; 43: 438-42.
67. Boden G, Chen X, Mozzoli M, et al. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3419- 23.
68. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, et al. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1995; 1: 1311- 4.
69. Ma Z, Gingerich RL, Santiago JV, et al. Radioimmunoassay of leptin in human plasma. *Clin Chem* 1996; 42: 942- 6.
70. Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, et al. The ob gene and insulin, a relationship leading to clues to the understanding of obesity. *Diabetes* 1995; 44: 1467-70.
71. Sliker LJ, Sloop KW, Surface PL, et al. Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem* 1996; 271: 5301-4.
72. Gualillo O, Lago F, García M, et al. Prolactin stimulates leptin secretion by rat white adipose tissue. *Endocrinology* 1999; 140: 5149- 53.
73. Escobar-Morreale HF, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G. Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat. *Endocrinology* 1997;138: 4485- 8.
74. Florkowski CM, Collier GR, Zimmet PZ, et al. Low-dose growth hormone replacement lowers plasma leptin and fat stores without affecting body mass index in adults with growth hormone deficiency. *Clin Endocrinol* 1996; 45: 769- 73.
75. Donahoo WT, Jensen DR, Yost TJ, et al. Isoproterenol and somatostatin decrease plasma leptin in humans: a novel mechanism regulating leptin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4139- 43.
76. Rentsch J, Chiesi M. Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett* 1996; 379: 55-9.
77. Trayhurn P, Duncan JS, Rayner DV. Acute cold-induced suppression of ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. *Biochem J* 1995; 311: 729- 33.

78. Scriba D, Aprath-Husmann I, Blum WF, et al. Catecholamines suppress leptin release from in vitro differentiated subcutaneous human adipocytes in primary culture via β 1- and β 2-adrenergic receptors. *Eur J Endocrinol* 2000; 143: 439- 45.
79. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995; 269: 540-3.
80. Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, et al. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 1997; 389: 374- 77.
81. Magni P, Vettor R, Pagano C, Calcagno A, Beretta E, Messi E, Zanisi M, Martini L, Motta M et al. Expression of a leptin receptor in immortalized gonadotropin-releasing hormone secreting neurons. *Endocrinology* 1999; 140: 1581- 5.
82. Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 1996;12: 318- 20.
83. Bennet BD, Solar GP, Yuan JO, et al. A role for leptin and its cognate receptor in haematopoiesis. *Curr Biol* 1996; 6: 1170- 80.
84. Lord GM, Matarese G, Howard JK, et al.. Leptin modulates the T cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 1998; 394: 897-901.
85. Bado A, Lévassieur S, Le Marchand-Brustel Y, et al. The stomach is a source of leptin. *Nature* 1998; 394: 790-3
86. Nobuhiro W, Satoshi H, Fumiko T, et al. Leptin and its receptors. *J. Chemical N.* abstract 2014
87. Considine RV, Caro JF. Leptin and regulation of bodyweight. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 1255-1272
88. Frisch R, Revelle R. Height and weight at menarche and a hypothesis of critical body weights and adolescent events. *Science* 1970; 169: 397-399.
89. Frisch R, McArthur J. Menstrual cycles: fatness as determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset. *Science* 1974; 185: 949-951.
90. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-432.
91. Spitzweg C, Heufelder AE. More clues from fat mice: leptin acts as an opponent of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Eur J Endocrinol* 1997;136:590-1.
92. Daniel P, Denis G, Baskin D, et al. Leptin and Insulin Action in the Central Nervous System. *Nutr Rev* 2002; 60: 20-9.
93. Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, et al. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J. Neuroendocrinol*, 2006; 18: 298-303.

94. Cravo RM, Frazao R, Perello M, et al. Leptin signaling in Kiss1 neurons arises after pubertal development. *PLoS ONE* 2013; 8: e58698.
95. Ahima RS, Dushay J, Flier SN, et al. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest* 1997; 99: 391-5.
96. Canpolat S, Sandal S, Yilmaz B, et al. Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on serum leptin levels in male rat. *Eur J Pharmacol.* 2001; 428(1):145-148.
97. Ozcelik O, Dogan H, Kelestimur H. Effects of a weight-reduction program with orlistat on serum leptin levels in obese women: A 12-week, randomized, placebo-controlled study. *Curr Ther Res Clin Exp.* 2004; 65(2): 127-37.
98. Cheung CC, Thornton JE, Kuijper JL, et al. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 1997; 138: 855-8.
99. Yu WH, Walczewska A, Karanth S, et al. Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin-induced LH release from the pituitary gland. *Endocrinology* 1997; 138: 5055-5058.
100. Lebrethon MC, Vandersmissen E, Gerard A, et al. In vitro stimulation of the prepubertal rat gonadotropin-releasing hormone pulse generator by leptin and neuropeptide Y through distinct mechanisms. *Endocrinology* 2000; 141: 1464-1469.
101. Parent AS, Lebrethon MC, Gerard A, et al. Leptin effects on pulsatile gonadotropin releasing hormone secretion from the adult rat hypothalamus and interaction with cocaine and amphetamine regulated transcript peptide and neuropeptide Y. *Regul. Pept.* 2000; 92: 17-24.
102. Wojcik-Gladysz A, Wankowska M, Misztal T, et al. Effect of intracerebroventricular infusion of leptin on the secretory activity of the GnRH/LH axis in fasted prepubertal lambs. *Anim. Reprod. Sci.* 2009; 114: 370-383.
103. Quennell JH, Mulligan AC, Tups A, et al. Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. *Endocrinology* 2009; 150: 2805-2812.
104. Donato Jr, Cravo RM, Frazao R, et al. Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. *J. Clin. Invest.* 2011; 121: 355-368.
105. Louis GW, Greenwald-Yarnell M, Phillips R, et al. Molecular mapping of the neural pathways linking leptin to the neuroendocrine reproductive axis. *Endocrinology* 2011; 152: 2302-2310.
106. S Han, ML Gottsch, KJ Lee, et al. Activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J. Neurosci.* 2005; 25: 11349-11356.
107. Ducret E, Anderson GM, Herbison AE. RFamide-related peptide-3, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, regulates gonadotropin-releasing hormone neuron firing in the mouse. *Endocrinology* 2009; 150: 2799-2804.
108. Wu M, Dumalska I, Morozova E, et al. Gonadotropin inhibitory hormone inhibits basal forebrain vGluT2- gonadotropin-releasing hormone neurons via a direct postsynaptic mechanism. *J. Physiol.* 2009; 587: 1401-1411.

109. Klingerman CM, Williams WP, Simberlund J, et al. Food restriction-induced changes in gonadotropin-inhibiting hormone cells are associated with changes in sexual motivation and food hoarding, but not sexual performance and food intake. *Front Endocrinol* 2011; 2: 101.
110. MZ Rizwan, AA Harbid, MA Inglis et al. Evidence That Hypothalamic RFamide Related Peptide-3 Neurons are not Leptin-Responsive in Mice and Rats *Journal of Neuroendocrinology*, 2014; 26: 247-257
111. Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, et al. Distribution of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain *J Comp Neurol*, 1998; 395: 535-547
112. Gingerich S, Wang X, Lee PK, et al. The generation of an array of clonal, immortalized cell models from the rat hypothalamus: analysis of melatonin effects on kisspeptin and gonadotropin-inhibitory hormone neurons. *Neuroscience*. 2009; 15: 1134-40
113. Pryor JT, Parhar IS, Spanswick DC, et al. Electrophysiological and pharmacological profile of Gonadotropin Inhibitory Hormone-expressing neurons in the rat., *ICN abstracts*, 2014.
114. Poling MC and Kauffman AS. The influence of Leptin on RFRP-3 neurons of mice in development and adulthood, *ICN abstracts*, 2014.

8. ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi aynı şehirde tamamladıktan sonra 2006-2010 yılları arasında Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Bölümü'nde lisans eğitimimi tamamladım. 2011 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek lisans öğrenimime başladım. 2012 yılından beri Aile ve Sosyal Politikalar Bakanlığı'na bağlı Hazarbaba Bakım ve Rehabilitasyon Merkezinde Fizyoterapist olarak görev yapmaktayım.