

## Ratların böbrek dokusu üzerine leptin etkisinin araştırılması

An investigation on the effect of leptin on rat kidney tissue

### Öz

**Amaç:** Günümüzde gittikçe artan obezite, önlenabilir sağlık sorunlarından biridir. Obez bireylerde böbrek hastalığı riski obez olmayan bireylere göre yaklaşık 1.5 kat artmaktadır. Leptin yağ dokusu miktarıyla orantılı olarak yağ dokusu hücrelerinden salgılanan bir adipokindir ve dokuda serbest oksijen radikallerinin artışına yol açtığı bilinmektedir. Bu çalışmada ratlara leptin vererek, hiperleptineminin böbrek dokusu üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı. **Gereç ve Yöntem:** Çalışmamızda ağırlıkları 250 gr ile 350 gr arasında değişen 16 adet Wistar albino cinsi rat kullanıldı. Ratlar 2 gruba (n=8) ayrıldı. 1. Grup; Kontrol [intraperitoneal (i.p.) Serum Fizyolojik (SF)] 7 gün, 2. Grup Leptin (i.p. 0,1 mg/kg leptin) 7 gün, olacak şekilde planlandı. 7 gün boyunca i.p. olarak leptin verilen hayvanlar ve aynı stresi oluşturmak amacıyla SF verilen kontrol grubundaki hayvanlar deney sonunda, anestezisi altında sakrifiye edildi ve tüm ratların her iki böbreği de incelenmek üzere çıkarıldı. %10 nötral formalinde fikse edilen böbreklere rutin histolojik prosedür uygulandı. Hematoksilen-Eozin = H-E ile boyanan kesitler ışık mikroskopisi altında değerlendirildi. **Bulgular:** Kontrol grubuna ait kesitlerde böbrek dokularının normal histolojik yapıda olduğu gözlemlendi. Leptin grubuna ait böbrek dokusu örneklerinde ise, kortekste mononükleer hücre infiltrasyonu, medullada tübüler dilatasyon, dejenerasyon ve hemorajik alanlar, glomerüllerde vakuoler dejenerasyon, proksimal ve distal tübülerde dilatasyon izlendi. **Tartışma:** Leptin ve böbrek hasarı arasındaki ilişkinin gösterilmesi, hormonal ve davranışsal düzenlemelerle obezitenin zararlı etkilerinden korunmak için önemlidir. Bu araştırmanın sonucunda; leptinin böbrek dokusunu olumsuz etkilediğini ve böbrek dokusunda hasar meydana getirdiğini söyleyebiliriz. Obez bireylerde görülen böbrek hasarı etyolojisi açıklanırken leptin faktörünün de gözönünde bulundurulması gerektiğini düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** Leptin, böbrek, obezite, böbrek hasarı, adipokin

### Abstract

**Aim:** increasing day by day obesity, one of the preventable health problems. Obese individual increases the risk of renal disease one and a half times more compared to the non-obese individuals. Leptin is a type of adipokin hormone which is released from adipose tissue cells in proportion to the amount of adipose tissue. It is known that leptin leads to a rise in reactive oxygen radicals in the tissue. This study aimed at investigating if leptin affects renal tissue by giving leptin to the rats. **Material–Method:** The total of 16 Wistar albino rats (weights ranged from 250g-300g) in the study were randomly divided into groups of eight in two different cages. The first group was the Control group (intraperitoneally = i.p. 0.9% normal saline) and the second group was the leptin group (ip 0,1 mg/kg leptin). The subjects, which were given leptin i.p. for 7 days, and the ones in the control group, which were given 0.9% normal saline to trigger the same stress, were sacrificed and their kidneys were taken out for examination. The kidneys were fixed with 10% neutral form was formaldehyde to routine histological procedure. The sections stained with hematoxylin-eosin = H-E were analyzed under light microscopy. **Results:** The sections

\* Cennet Ak  
\*\* Dilek Bayram  
\*\* İlkay Armağan  
\*\*\* A. Cihangir Uğuz

\* Süleyman Demirel  
Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Fizyoloji A.D. Isparta, Türkiye  
\*\* Süleyman Demirel  
Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Histoloji ve Embriyoloji A.D.  
Isparta, Türkiye  
\*\*\* Süleyman Demirel  
Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Biyofizik A.D. Isparta, Türkiye

Yazışma Adresi:  
Uzm. Dr. Cennet Ak  
Süleyman Demirel Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi, Fizyoloji A.D.  
Morfoloji Binası Çünür, Isparta  
Tel: +90 246 211 36 12  
Fax: +90 246 237 11 65  
Email:cennetak32@gmail.com

9-12 Eylül 2014 tarihinde 5. Uluslararası Hücre Zarları ve Oksidatif Stres Kongresinde (Kalsiyum Sinyali ve TRP Kanalları) poster sunumu olarak değerlendirilmiştir.

in the control group were found to be normal histologically. Compared to these, the renal tissue samples in the leptin group were determined to have mononuclear cell infiltration in the cortex, tubular dilatation in the medulla, degeneration and hemorrhagic areas, vacuolar degeneration in glomeruli and dilation in proximal and distal tubular. Discussion: Revealing the effects of leptin on renal damage is important for avoiding harmful effects of obesity through hormonal and behavioral arrangements. This study suggested that leptin could cause renal pathologies by damaging renal tissue. We are of the opinion that being able to explain renal damage etiology exactly will be useful to differential diagnosis and treatments.

**Keywords:** Leptin, kidney, obesity, renal damage, adipokines

## Giriş

Vücut ağırlığı, besinlerle alınan kalori değeri ve kullanılan enerji arasındaki dengeyle sağlanır. Besinlerden sağlanan enerji, harcanan enerjiye eşitse vücut ağırlığı dengede kalır ve değişmez. Alınan her fazla 9.3 kalori 1 gr yağ olarak depolanır (1). Obezite, sigara kullanımı gibi önlenemez sağlık sorunu nedenlerinden biridir; önlenemediğinde depolanan yağ dokusundan adipokinler olarak adlandırılan, metabolik, proinflatuar ve immünolojik etkileri olan bazı proteinler salgılanır. Bu adipokinlerden leptin, sitokinlere benzeyen ve 167 aminoasit (aa) den oluşan protein yapıda bir hormondur (2). Leptin yağ dokusundan, yağ dokusu miktarı ile orantılı olarak salgılanır (3). Obezlerin normal kilolu kişilere göre serum leptin düzeyleri belirgin oranda yüksektir. Çünkü obezlerde leptine karşı hipotalamik reseptör duyarsızlığı sonucu oluşan leptin rezistansı vardır (4,5). Leptin rezistansı sonucu hiperleptinemi meydana gelir (6,7). Leptin rezistansı ve hiperleptinemi obez hastaların hemen hemen tümünde gözlenir (8). Böbrek hastalığı görülme sıklığı obezlerde, obez olmayanlara göre 1,5 kat yüksek bulunmuştur (9). Bu çalışmada ratlara leptin infüzyonu ile hiperleptinemi oluşturularak leptinin böbrek dokusuna etkisinin histolojik açıdan araştırılması amaçlandı.

## Gereç ve Yöntem

### Deney Hayvanları

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Tıp Fakültesi Fizyoloji Laboratuvarı ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ağırlıkları 250–350g arasında değişen Wistar Albino cinsi toplam 16 adet dişi sıçan kullanıldı. Deneyde kullanılan sıçanlar, Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Laboratuvarından temin edildi. Sıçanlar standart ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat aydınlık), 22-24°C sıcaklıkta, %60 nemlilikte, sınırsız (ad libitum) su ve yem (Yem Kurumu Standart Sıçan Yemi) ile uyum süreci amacıyla 1 hafta süreyle beslendi.

## Kullanılan İlaçlar

### Leptin (ratlar için üretilmiş)

**Leptin temini:** Leptin from rat Sigma-Aldrich, Germany  
**Leptin hazırlanması:** -20 °C de korunan liofilize steril toz haldeki (soğuk zinciri korunarak) 1mg'lık 1 flakon Leptin, steril 20 ml fosfat tampon sıvısı içinde çözdürüldü. 2 ml çözelti içinde 0,1 mg Leptin olacak şekilde hazırlandı.  
**Steril fosfat tampon hazırlanması:** Biyokimya laboratuvarında pH:7 ve 50 mMol konsantrasyonda hazırlanan fosfat tampon çözeltisi, mikrobiyoloji laboratuvarında steril edilerek hazırlandı.  
 2. %10 Ketamin-HCl (90 mg/kg), Ketamin %10 - Brema  
 3. %2 Xylazine-HCl (10 mg/kg), Alfazyne %2 – Ege Vet

### Deney Protokolü

Wistar albino cinsi 16 adet rat, 2 gruba ayrıldı. 1.Grup; Kontrol (i.p. 0.9% normal saline) 7 gün, 2. Grup Leptin (ip 0,1 mg / kg leptin) 7 gün, olacak şekilde planlandı. 7 gün boyunca i.p. olarak leptin verilen ratlar ve aynı stresi oluşturmak amacıyla i.p. SF verilen kontrol grubundaki ratlar deney sonunda, anestezi altında [%10 Ketamin-HCl (90 mg/kg) + %2 Xylazine-HCl (10 mg/kg)] sakrifiye edildi. Daha sonra ratların sağ ve sol böbrekleri çıkartılarak fiksasyon için %10 nötral formalin solüsyonuna alındı.

### Histokimyasal Prosedür

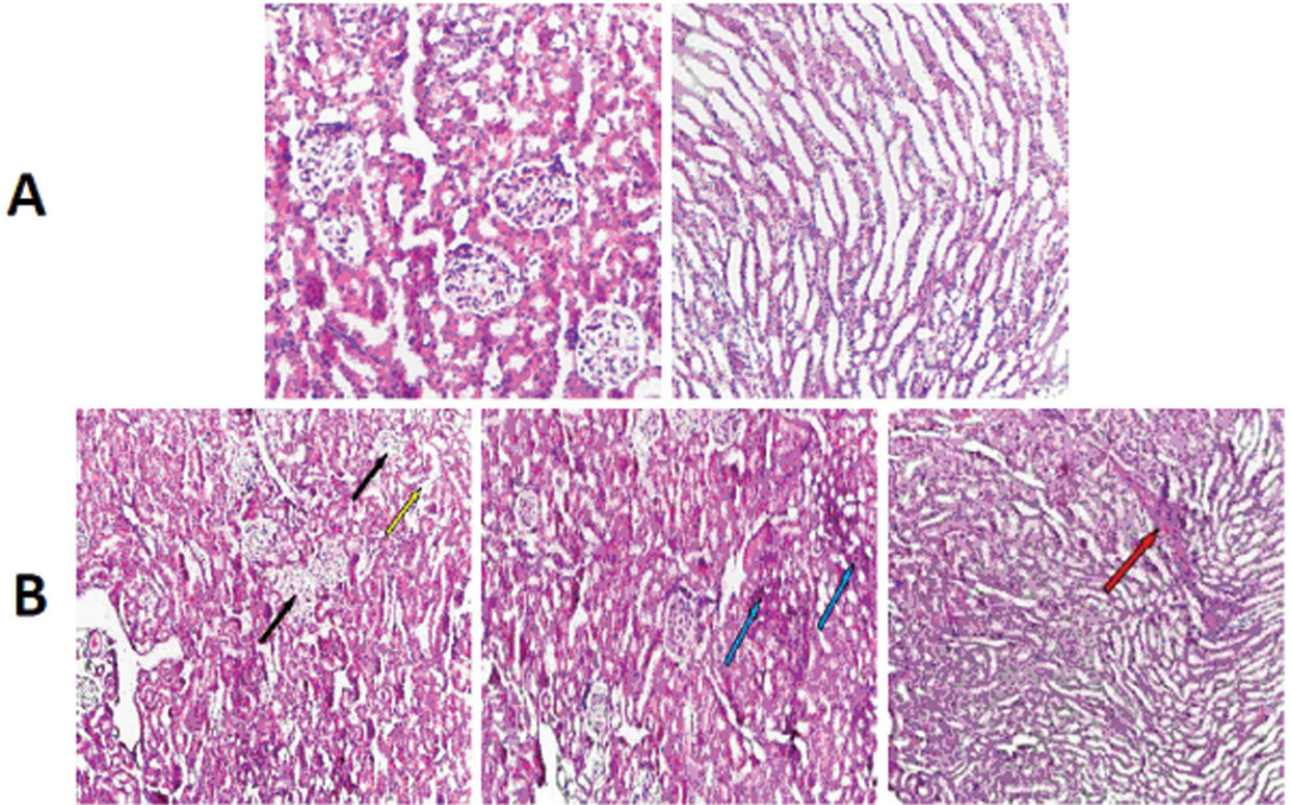
% 10 nötral formalin solüsyonunda 24 saatte fiksasyonu sağlanan böbrek dokuları akarsuda yıkandıktan sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek dokuların dehidratasyonu sağlandı. Daha sonra ksilolde şeffaflaşması sağlanan dokular parafine gömülerek bloklar oluşturuldu. Oluşturulan bloklardan Leica marka kızaklı mikrotomla lam üzerine 3-4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler rutin H-E boyası ile boyandı ve entellan yardımıyla lamelle dokular kapatıldı. Daha sonra Olympus marka binoküler mikroskopta değerlendirildi ve görüntüler alındı. Histolojik bulguların değerlendirilmesi Abdel Wahhab ve arkadaşlarının kullandığı skorlamaya göre yapıldı (10).

## Bulgular

Histolojik değerlendirmelerde kontrol grubuna ait böbrek dokuları normal görünümdeydi. Korteks ve medullar bölge normal histolojik görünümde, bowman mesafesi bilinen genişlikte, glomerüller normal histolojik görünümde, tübül epiteli düzenli yapıdaydı. (Şekil 1-A). Leptin grubundaki dokularda ise belirgin değişiklikler gözlemlendi. Kortekste, glomerüler vakuoler dejenerasyonla birlikte, tübüllerin normal yapıları bozulmuş olup yer yer tübüller dilatasyon bulguları ve mononükleer hücre infiltrasyonu gözlenirken, medullada tübüller dilatasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu ve belirgin hemorajik alanlar izlendi (Şekil 1-B).

## Tartışma ve Sonuç

Leptinin santral etkileriyle birlikte çok sayıda periferik etkileri bulunmaktadır (11). Bu nedenle diabet, romatolojik hastalıklar ve maligniteler başta olmak üzere birçok hastalığın etyopatogenezinde leptinin rolü gittikçe önem kazanmakta ve araştırılmaktadır. Obezite varlığında böbrek hasarına bağlı böbrek hastalıklarının görülme sıklığı artar. Proinflamatuvar sitokinlerden olan leptinin, renal hasara neden olduğunu gösteren çalışmalar vardır (12,13). Leptin dokuda serbest oksijen radikallerinin artışına neden olur (14). Obezite, insulin direnci, dislipidemi, aterosklerozis ve hipertansiyon gibi hastalıkların riskini artıran pek çok hastalığın başlangıcıdır.



**Şekil 1.** Kontrol grubuna ait ve leptin grubuna ait böbrek dokuları arasındaki farklılıklar . (1-A) Kontrol grup, normal böbrek histolojisi gözlenmekte; (1-B) Leptin grubu, glomerüler vakuoler dejenerasyon (siyah ok), kortikal tübüller dilatasyon (sarı ok), mononükleer hücre infiltrasyonu (mavi ok), meduller hemoraji (kırmızı ok).

Obezite tedavi edilmediğinde, diabetes mellitus, hiperlipidemi, hipertansiyon gibi çeşitli hastalıklar gelişmektedir. Son dönem böbrek yetmezliğinin % 70 sorumlusu obezite nedeniyle ortaya çıkan hipertansiyon ve tip II diabetir. Henüz diabet teşhisi konmamış obezlerde bile araştırıldığında böbrek hasarı bulguları saptanabilir (15). Ayrıca, obezite nedeniyle kardiyak fonksiyon bozukluğu, arteroskleroz ve diğer damar komplikasyonlarını içeren hastalıklar gelişmektedir. Obezite ve leptin fazlalığının yol açtığı, artmış sempatik sistem aktivasyonu ve kardiyovasküler bozuklukların mekanizmaları henüz tam olarak bilinmemektedir (16,17). Obezitede sempatik sistem aktivasyon nedenleri arasında hiperinsülinemi, hiperleptinemi, dislipidemi ve yetersiz barorefleks sensitivitesi sayılmaktadır (18). Bazı çalışmalara göre sempatik sistem aktivasyonu sonucu surrenal bezlerden artmış noradrenalin salgısı olur. Noradrenalin taşikardi, periferik vazokonstriksiyon ve kan basıncı artışı oluşturur. Böbreklerde afferent arteriollerin vazokonstriksiyonuna bağlı olarak böbrek kan akımı azalır. Sempatik sistemin artmış aktivasyonu böbreklerin renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi aracılığıyla tübüllerden su ve sodyum tutulumuna neden olur (19,20). Ratlara leptin infüzyonu, fokal glomerülosklerozis ve proteinüri oluşturur (21). Leptin azlığı olan farelerde, böbrek hastalığı görülmesi nadirken, leptin fazlalığı olan farelerde diabetik nefropati benzeri mezengial kalınlaşma görülmektedir (22,23). Sonuç olarak, obezitede görülen leptin fazlalığı, böbrek dokusunu olumsuz etkileyerek renal hasara neden olmaktadır. Ayrıca obeziteyle mücedelenin önemini vurgulamak açısından bu ve benzeri çalışmaların yararlı olacağını düşünmekteyiz.

## Kaynaklar

1. Guyton AC, Hall JE. Human Physiology and mechanisms of disease, 16th ed. WB Saunders, 1997: 486-584.
2. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 1994; 372: 425-432.
3. Güllü K, Karagöz E. Leptinler, Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri 2000 20: 112-121.
4. Ruige JB, Dekker JM, Blum WF, et al. Leptin and variables of body adiposity, energy balance and insulin resistance in a population based study. Diabetes Care 1999; 22: 1097-1104.
5. Mantzoros CS, Flier JS, Lesem MD, et al. Cerebrospinal fluid leptin in anorexia nervosa: correlation with nutritional status and potential role in resistance to weight gain. J Clin Endocrinol 1997; 82: 1845-1851.
6. Tanner C.J., Barakat H.A., Dohm G.L., Pories W.J., MacDonald K.G., Cunningham P.R.G., Swanson M.S., Houmard J.A. Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. AJP-Endocrinol Metab. 2002; 282: 1191-1196.
7. Hekimoglu A. Leptin ve fizyopatolojik olaylardaki rolü. Dicle Tıp Derg. 2006; 33: 259-267.
8. Özata M. Obezite tanı ve tedavisi. Gata Basımevi, Ankara. 2003; 1-19.
9. Süleymanlar G, Utaş C, Arınsoy T, et al. A population based survey of chronic renal disease in Turkey – The CREDIT study. Nephrol Dial Transplant 2011; 26: 1862-1871.
10. Abdel-Wahhab MA, Nada SA, Arbid MS. Ochratoxicosis: prevention of developmental toxicity by L-methionine in rats. Journal of applied toxicology. JAT. 1999; 19(1):7-12.
11. Peter G. Kopelman & Michael J. Stock. Klinik Obezite. Blackwell Science, Tekin yayınevi, Ankara, 1998; 120-556.
12. Obesity and Obesity-Initiated Metabolic Syndrome: Mechanistic Links to Chronic Kidney Disease 2007; May 2(3): 550-562.
13. Rutkowski P, Klassen A, Sebekova K, et al: Renal disease in obesity: The need for greater attention. 2006; 16: 216-223.
14. Macrea M, Martin T, Jia Z, Misra H, Leptin's Activity on the Hydroxyl Radical: A Possible Link to the Oxidative Stress-Related Endothelial Vasodilation in Patients with Obstructive Sleep Apnea Lung 2013; 191: 391-395
15. Hall J E, Henegar JR, Dwyer TM, Liu J et al. Is obesity a major cause of chronic kidney disease. Adv Renal Replac 2004; 11: 41-54.
16. Pellemounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. Science 1995; 269: 540-543.
17. J. Ren. Leptin and hyperleptinemia from friend to foe for

- cardiovascular function. *Endocrinol* 2004; 181: 1-10.
18. Hall JE, Crook ED, Jones DW, Wofford MR and Dubbert PM. Mechanisms of obesity-associated cardiovascular and renal disease. *Am J Med Sci*, 2002; 324: 127-137.
  19. Kayaalp O. Antihipertansif ilaçlar. *Tıbbi Farmakoloji*. 9. Baskı 2000; 421-459.
  20. Adamopoulos S, Rosano GM, Ponikowski P, Cerquetani E, Piepoli M, Panagiota F, Collins P, Poole-Wilson P, Kremastinos D, Coats AJ. Impaired baroreflex sensitivity and sympathovagal balance in syndrome X. *Am J Cardiol*. 1998; 82(7): 862- 868.
  21. Friedmen JM. The function of leptin in nutrition, weight and physiology, 2002; 60:51-514.
  22. Wolf G, Chen Sheldon, Han DC, Ziyadeh N. Leptin and Renal Disease. *AJKD*, 2002; 39 (1): 1-11.
  23. Praga M, Obesity a neglected culprit in renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2002; 17: 1157-1159.