



Leflunomid Akut Yüksek Fruktoz ile Beslenen Sıçanların Hipotalamusunda Lipid Profillerini ve Oksidatif Stresi İyileştirir

Leflunomide Improves Lipid Profiles and Oxidative Stress in the Hypothalamus of Acute High-Fructose-Fed Rats

Özgen KILIÇ ERKEK¹
Gülşah GÜNDOĞDU¹
Mehmet ALPUA²
Melek BOR KÜÇÜKATAY¹

¹Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye

²Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye

Received/Geliş Tarihi: 11.05.2022

Accepted/Kabul Tarihi: 07.08.2022

Publication Date/Yayın Tarihi: 12.10.2022

Corresponding author/Sorumlu Yazar:
Gülşah GÜNDOĞDU
E-mail: gdemirkaya81@gmail.com

Cite this article as: Kılıç Erkek Ö, Gündoğdu G, Alpua M, Bor Küçükatay M. Leflunomide improves lipid profiles and oxidative stress in the hypothalamus of acute high-fructose-fed rats. *Vet Sci Pract.* 2022; 17(2), 49-54.

Atıf: Kılıç Erkek Ö, Gündoğdu G, Alpua M, Bor Küçükatay M. Leflunomid akut yüksek fruktoz ile beslenen sıçanların hipotalamusunda lipid profillerini ve oksidatif stresi iyileştirir. *Vet Sci Pract.* 2022; 17(2), 49-54.

ÖZ

Bu çalışmada, akut yüksek doz fruktozla beslenen sıçanlarda oksidatif stres ve lipid profillerinin sıçan hipotalamusu üzerine etkileri ve bu etkilerinde Leflunomid'in olası katkısının incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya 12-16 haftalık, 250-300 g ağırlığındaki 48 Sprague Dawley erkek sıçanlar dahil edilmiş ve rastgele 6 gruba ayrılmıştır. (Grup 1 (Kontrol); Grup 2 karboximetil selüloz (CMC)+kontrol; Grup 3 (Leflunomid), Grup 4 (Akut yüksek doz fruktoz), Grup 5 (Akut yüksek doz fruktoz+CMC), Grup 6 (Akut yüksek doz fruktoz+Leflunomid). Akut yüksek doz fruktoz grupları sıçanların 48 saat açlığı takiben 24 saat boyunca %63'lük fruktoz çözeltisi ile beslenmeleri sağlanarak oluşturulmuştur. Leflunomid ise suda çözünmediği için %1'lik CMC çözeltisi içinde çözülmüştür ve 10 mg/kg/gün Leflunomid sabah akşam oral yolla uygulanmıştır. 72 saatin sonunda sıçanlar genel anestezi altında sakrifiye edilmiş ve hipotalamus dokusu çıkarılmıştır. Elde edilen hipotalamus dokusundan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), total kolesterol, total antioksidan-oksidan (TAS-TOS), oksidatif stres indeksi (OSİ) düzeyleri solid faz sandwich (ELISA) prensibine dayanan hazır ölçüm kiti kullanılarak belirlenmiştir. TAS düzeyinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. TOS ve OSİ düzeylerinde, 4. grupta 1. gruba göre anlamlı artış tespit edilmiştir ($P < .001$). Tedavi gruplarına bakıldığında leflunomid uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür ($P < .05$). LDL ve total kolesterol düzeylerinde ise 6. grupta 4. gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma tespit edilmiştir ($P < .05$). Bu çalışmada, yüksek fruktozla beslenen sıçanlarda, oksidatif stresin ve lipid profilinin azalmasında Leflunomid'in önemi belirlenmiştir. Sonuç olarak, Leflunomid oksidatif strese bağlı gelişen beyin hasarının azalmasında umut vaat edici olabilir.

Anahtar Kelimer: Fruktoz, LDL, leflunomid, oksidatif stres, total kolesterol

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effects of oxidative stress and lipid profiles on the hypothalamus of rats fed with acute high-dose fructose and the possible contribution of leflunomide to these effects. Totally 48 Sprague-Dawley male rats 12-16 weeks old, weighing 250-300 g were included and were randomly divided into 6 groups; group 1: control, group 2: carboxymethyl cellulose+control, group 3: leflunomide, group 4: acute high-dose fructose, group 5: acute high-dose fructose+carboxymethyl cellulose, and group 6: acute high-dose fructose+leflunomide. Acute high-dose fructose groups were given 63% fructose solution for 24 hours after 48 hours of fasting. Since leflunomide is not soluble in water, it was dissolved in 1% carboxymethyl cellulose solution and 10 mg/kg/day of leflunomide was administered orally in the morning and evening. After 72 hours, the rats were sacrificed under general anesthesia and the hypothalamus tissue was removed. The low-density lipoprotein (LDL), total cholesterol, total antioxidant-oxidant status (TAS-TOS), and oxidative stress index (OSI) levels were determined from the obtained hypothalamus tissue using commercial kits based on enzyme-linked immunosorbent assay method. There was no significant difference between the groups in total antioxidant level. A significant increase was found in the TOS and OSI levels in fourth group vs first group ($P < 0.001$). In the



treatment groups, a statistically significant decrease was observed with leflunomide ($P < .05$). A statistically significant decrease was detected in LDL and total cholesterol levels in sixth group versus fourth group ($P < .05$). In this study, the importance of Leflunomide in reducing oxidative stress and lipid profile in high fructose-fed rats was determined. In conclusion, Leflunomide may be promising in reducing brain damage due to oxidative stress.

Keywords: Fructose, LDL, Leflunomide, oxidative stress, total cholesterol

GİRİŞ

Fruktoz tüketimi son iki yüzyılda büyük ölçüde, endüstriyel yiyecek ve içeceklerde bulunan sakkaroz veya yüksek fruktozlu mısır şurubunun tüketimi nedeniyle artmıştır.¹ 1900 yılından önce fruktoz tüketimi esas olarak günde yaklaşık 15 g meyve ve sebze alımından geliyorken, bu değer günümüzde 55 gr/günü geçmiştir.² Fruktoz, glukozdan endojen olarak aldoz redüktaz (AR)-sorbitol dehidrojenaz (SDH) yolunun aktivasyonu ile üretilir ve serbest fruktoz tüketiminde oluşan artışa karşılık, sakkaroz tüketiminde azalma gerçekleşmektedir.³ Bununla birlikte fruktoz diğer besinlerle birlikte genel olarak aşırı enerji alımına katkıda bulunarak obezite gelişiminde rol oynayabilmektedir.⁴

Fruktozla beslenen sıçan, diyete bağlı metabolik bozuklukları incelemek için yaygın olarak kullanılan bir hayvan modelidir.⁵ Literatürde hayvan çalışmalarında uzun süreli yüksek fruktoz ile beslenmenin obezite, insülin direnci, hepatik steatosiz ve sistemik inflamasyona neden olabildiği gösterilmiştir.^{6,7} Ek olarak, yüksek fruktoz alımı, hepatik de novo lipogenezi, trigliserit sekresyonunu ve intrahepatik yağ konsantrasyonlarını arttırmaktadır.⁴ Bununla birlikte son yıllarda elde edilen veriler doğrultusunda literatürde, fruktoz alımının beyin üzerindeki zararlı etkilerine dikkat çekilmektedir.

Beyin vücuttaki kolesterolden en zengin organdır ve kolesterolün büyük bir kısmı beyinde sentezlenir. Lipid homeostazı özellikle nöronların fonksiyonlarında/fonksiyonlarının regülasyonunda, sinaptik çıktılarının düzenlenmesinde ve lipit türevli ikinci habercilerin salınımında önemli rol oynar.⁸ Lipid homeostazında meydana gelen bozukluklar ile Huntington hastalığı, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve duygudurum bozuklukları gibi çeşitli beyin hastalıklarının gelişebileceği önceki çalışmalarda gösterilmiştir.⁸ Alzheimer ve diğer nörodejeneratif hastalıklarda beyin kolesterol yıkımı artar ve bu hastalıkların patogeneğinde lipitlerin önemli rol oynadığı öne sürülmektedir.⁹ Hipotalamus, merkezi sinir sisteminde (MSS), periferik organlardan kaynaklanan beslenmeyle ilgili bilgileri entegre eden önemli bir alandır.¹⁰

Yüksek fruktozlu diyet, nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde rol oynayan hipotalamik astroglıyoza ve nöroinflamasyona neden olmaktadır.^{11,12} Hipotalamusta yüksek fruktoza bağlı olarak oksidatif stres gelişir ve hipotalamik nörojenez bozulur.¹³ Yapılan çalışmaların sonuçları doğrultusunda, bu alandaki inflamatuvar yanıtın nöral hasara neden olduğu ve nöropeptid iletimini etkilediği, böylece obezite ve obezite ilişkili metabolik bozukluklarla sonuçlandığı gösterilmiştir.^{14,15}

Leflunomid 1998'de FDA onayı almış bir ön ilaç olup, bağırsak submukozası ve karaciğerde aktif metaboliti olan malononit-riloamid'e dönüşür. Bu metabolit pirimidin sentezinde rol alan dihidrorotat dehidrojenaz'ı inhibe ederek T hücre proliferasyonunu engeller.¹⁶ Karaciğer hasarında gelişen inflamasyon ile oksidatif stres azaltıcı etkisi bulunmaktadır. İnflamasyon sırasında

sitokinler salınır ve oksidatif stresi aktive eder ve böylece bu iki sistem birbirini etkiler.¹⁷

Leflunomid'in çeşitli dokularda antiinflamatuvar ve antioksidan etkisi bilinmesine rağmen, hipotalamusta gelişen oksidatif stres ve inflamasyon üzerine etkinliği bilinmemektedir. Bu nedenle, bu çalışmada akut yüksek fruktozla beslenen sıçanlarda Leflunomid'in hipotalamusta gelişebilecek olası oksidatif stresin giderilmesi/azaltılması/iyileştirilmesi üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Kimyasallar

Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) Kolesterol ELİSA Kit ve Total kolesterol ELİSA Kit (Elabscience), Total Oksidant Status (TOS) Assay Kit ve Total Antioksidant Status (TAS) Assay Kit (REL ASSAY), CMC (Sigma Aldrich), Leflunomid (Arava) firmasından temin edildi.

Deney Gruplarının Oluşturulması ve Tedavi Uygulanması

Bu çalışma için gerekli etik izin için Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvan Etik Kuruluna başvurulmuş ve 10.02.2022 tarih ve PAU-HADYEK-2021/51 sayılı etik kurul onayı alınmıştır. Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan alınan 48 tane 12-16 haftalık 250-300 g ağırlığındaki Sprague Dawley erkek sıçan çalışma süresince standart şartlar altında havalandırılarak, sabit ısılı odalarda, %50 nem ortamında, 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusu bulunan laboratuvar koşullarında barındırılarak, özel hazırlanmış kafeslerde tutulmuş ve veteriner hekim kontrolü altında bakılmıştır. Sıçanlar rastgele seçilerek 6 eşit gruba ayrılmış ve deney prosedürü başlatılmıştır.

Deneyssel akut yüksek doz fruktoz modeli, sıçanların 48 saat açlığı takiben 24 saat boyunca içme suları yerine %63'lük fruktoz çözeltisi ile beslenmeleri sağlanarak oluşturulmuştur.¹⁸ Leflunomid ise suda çözünmediği için %1' lik karboksimetil selülöz (CMC) çözeltisi içinde çözülmüştür.

Grup 1 (Kontrol; n:8): Sıçanlara herhangi müdahale uygulanmamıştır.

Grup 2 (CMC kontrol; n:8): 48 saat normal beslenen sıçanlara 3mL/kg/gün %1 CMC çözeltisi sabah akşam oral yolla uygulanmıştır.

Grup 3 (Leflunomid; n:8): 48 saat normal beslenen sıçanlara 10 mg/kg/gün Leflunomid sabah akşam oral yolla uygulanmıştır.

Grup 4 (Akut yüksek doz fruktoz; n:8): Sıçanlar 48 saat açlığı takiben 24 saat boyunca içme suyu yerine %63'lük fruktoz çözeltisi ile beslenmiştir.

Grup 5 (Akut yüksek doz fruktoz + CMC; n:8): Sıçanlar 48 saat açlığı takiben, 24 saat boyunca içme suyu yerine %63'lük fruktoz çözeltisi ile beslenmiş ve 3mL/kg/gün %1 CMC çözeltisi sabah akşam oral yolla uygulanmıştır.

Grup 6 (Akut yüksek doz fruktoz+Leflunomid; n:8): Sıçanlar 48 saat açlığı takiben, 24 saat boyunca içme suyu yerine %63'lük fruktoz çözeltisi ile beslenmiş ve 10 mg/kg/gün Leflunomid sabah akşam oral yolla uygulanmıştır.

72 saatin sonunda tüm sıçanların ağırlıkları ve fruktoz tüketim miktarları ölçülerek sıçanlar 30 mg/kg ketamine hydrochloride (Ketalar, Parke-Davis, İstanbul, Türkiye) ve 6 mg/kg %2'lik xylazine hydrochloride (Rompun, Bayer, İstanbul, Türkiye) kombinasyonunun i.p. olarak uygulanmasıyla sağlanan genel anestezi altında dekapitasyon ile sakrifiye edilmiştir. Daha sonra sakrifiye edilen sıçanların hipotalamusları alınarak ELİSA çalışmaları için deney gününe kadar -80°C derin dondurucuda saklanmıştır.

Hipotalamus Doku Homojenizasyonu

100 mg hipotalamus dokusu phosphate buffer saline (pH 7,2) içerisinde homojenize edilerek, 4°C'de 10 000 rpm hızda 20 dk süresince santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant ELİSA ölçümleri için kullanılmıştır.

TOS, TAS ve OSİ düzeylerinin Ölçülmesi

TOS Ölçümü

Homojenize edilen hipotalamus dokusundan elde edilen süpernatantın TOS düzeyi Rel Assay Total Antioksidan Status ticari kiti kullanılarak ölçülmüştür.

Ölçüm örneğin içindeki oksidanların Fe²⁺ kompleksini Fe³⁺e dönüştürerek asidik bir ortamda kromojen ile reaksiyona girmesini sağlamasıyla absorbans artışına neden olması prensibine dayanır. Spektrofotometrik olarak izlenen absorbans artışı örnekteki oksidan moleküllerle doğru orantılıdır. Renk değişikliği 530 nm dalga boyunda ölçülerek değerlendirilmiştir. Ölçüm hidrojen peroksit ile kalibre edilmiş ve sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L olarak ifade edilmiştir.

TAS Ölçümü

Homojenize edilen hipotalamus dokusundan elde edilen süpernatantın TAS düzeyi Rel Assay Total Antioksidan Status ticari kiti kullanılarak ölçülmüştür.

Ölçüm örneğin içindeki tüm antioksidanların mavi-yeşil 2,2'-azino-bis (3-etilbenz-iazoline-6-sülfonik asid) (ABTS) radikalini renksiz redükte ABTS haline getirmesi prensibine dayanır. Örneğin içerdiği antioksidan düzeyi ile absorbans değeri orantılıdır. Renk değişikliği, 660 nm dalga boyunda ölçülerek değerlendirilmiş ve sonuçlar mmol Trolox equivalent/L olarak ifade edilmiştir.

OSİ Ölçümü

TOS'un TAS'a bölünmesiyle bulunan değerlerin 100 ile çarpılmasıyla elde edilen oksidatif stres indeksi, oksidatif stres derecesinin bir göstergesidir.

$OSI = \frac{TOS (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equiv. /L})}{TAS (\mu\text{mol Trolox equiv. /L})} \times 100$.

LDL Kolesterol ve Total Kolesterol Düzeylerinin Ölçümü

Homojenize edilen hipotalamus dokusundan elde edilen süpernatantın LDL kolesterol ve total kolesterol düzeyleri, solid faz sandwich enzim immunoassay (ELISA) yöntemine dayanan sıçan LDL kolesterol ve total kolesterol hazır ölçüm kiti kullanılarak belirlenmiştir. LDL kolesterol ve total kolesterol analizlerinden elde edilen sonuçları $\mu\text{g/mL}$ olarak rapor edilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada geniş etki büyüklüğü ($f = 0,7$) elde edileceği varsayılarak yapılan güç analizi sonucunda, en az 48 sıçan kullanıldığında (her

grup için en az 8 sıçan) %95 güvenle %80 güç elde edilebileceği hesaplanmıştır. Her grup için 8, toplamda 48 sıçanla çalışmaya başlanmasına karar verilmiştir.

Elde edilen veriler SPSS 21.0 (IBM SPSS Statistics 21 software (Armonk, NY: IBM Corp.)) paket programıyla analiz edilmiştir. Sürekli ve kategorik değişkenler sırasıyla "ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Gruplar arası TOS, TAS ve OSİ analizleri One-Way Anova post hoc Tukey testi ile incelenmiştir. Gruplar arası total ve LDL kolesterol analizleri için ise incelenen değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile belirlenmiş, parametrik test varsayımları sağlanmadığında bağımsız grup farklılıklarını karşılaştırmak için Kruskal Wallis Varyans Analizi (Post hoc olarak Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi) yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık $P < ,05$ olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

TOS, TAS ve OSİ Sonuçları

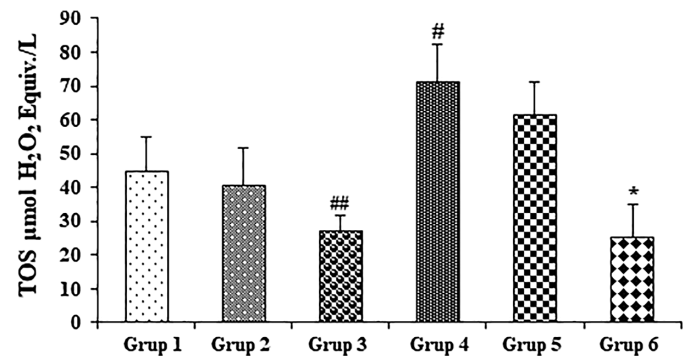
TOS sonuçları ortamdaki oksidan ve serbest radikal seviyelerini gösterir. TOS düzeyinde 4. grupta 1. gruba göre istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edilmiştir ($P = ,001$). Tedavi uygulanan gruplara bakıldığında TOS düzeyinde azalma tespit edilmiştir. Bu azalma 3. grupta 1. gruba göre, 6. grupta 4. gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmıştır (Sırasıyla $P = ,009$ ve $P = ,001$) (Şekil 1).

TAS düzeyine bakıldığında 4. grupta 1. gruba göre azalmış fakat istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşamamıştır ($P > ,05$). Tedavi uygulanan gruplara bakıldığında TAS düzeyinde artış tespit edilmiş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşamamıştır ($P > ,05$) (Şekil 2).

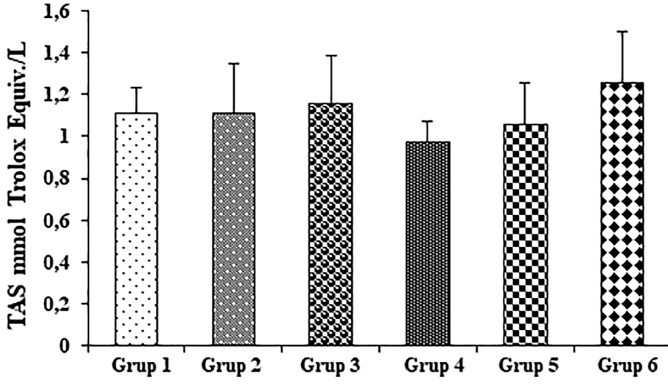
OSİ düzeyine bakıldığında 4. grupta 1. gruba göre istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edilmiştir ($P = ,001$). Tedavi uygulanan gruplarda OSİ düzeyinde azalma görülmüştür. Bu azalma 6. grupta 4. gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmıştır ($P = ,001$) (Şekil 3).

Total Kolesterol ve LDL Kolesterol Düzeyleri

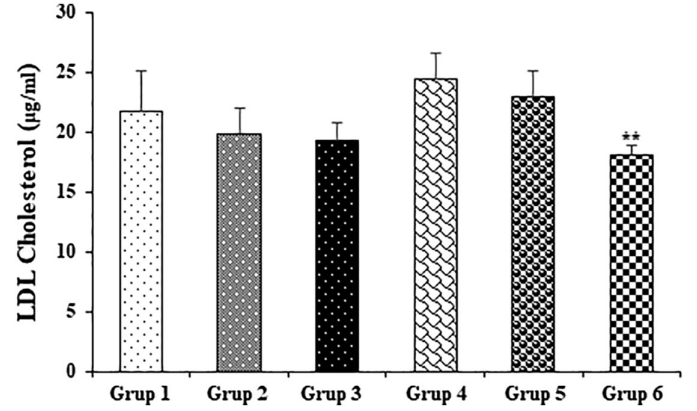
Total kolesterol düzeyine bakıldığında 4. grupta 1. gruba göre artmış fakat istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşamamıştır ($P = ,258$). Tedavi gruplarına bakıldığında, Total kolesterol düzeyinde azalma görülmüştür. Bu azalma 6. grupta 4. gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmıştır ($P = ,048$) (Şekil 4).



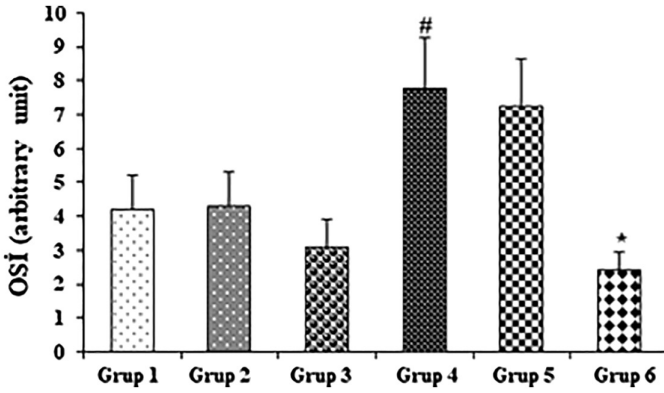
Şekil 1. Deney gruplarının TOS sonuçları. (Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir; n=8; *: $P < ,001$ düzeyinde 4. gruptan fark; #: $P < ,001$ düzeyinde 1. gruptan fark; ##: $P < ,01$ düzeyinde 1. gruptan fark).



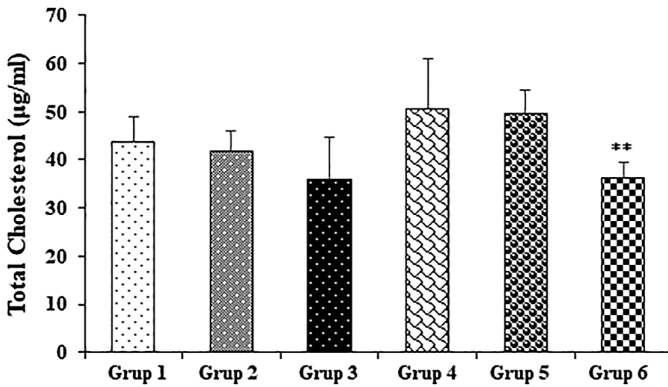
Şekil 2. Deney gruplarının TAS sonuçları. (Sonicular ortalama ± standard sapma olarak verilmiştir; n=8).



Şekil 5. Deney gruplarının LDL Kolesterol düzeyleri (Sonicular ortalama ± standard sapma olarak verilmiştir; n=8; **: P < ,05 düzeyinde 4. gruptan fark).



Şekil 3. Deney gruplarının OSI sonuçları. (Sonicular ortalama ± standard sapma olarak verilmiştir; n=8; *: P < ,001 düzeyinde 4. gruptan fark; #: P < ,001 düzeyinde 1. gruptan fark).



Şekil 4. Deney gruplarının Total Kolesterol düzeyleri (Sonicular ortalama ± standard sapma olarak verilmiştir; n=8; **: P < ,05 düzeyinde 4. gruptan fark).

LDL kolesterol düzeyine bakıldığında ise 4. grupta 1. gruba göre artmış fakat istatikselsel olarak anlamlı düzeye ulaşamamıştır ($P = ,196$). Tedavi gruplarına bakıldığında, Total kolesterol düzeyinde azalma görülmüştür. Bu azalma 6. grupta 4. gruba göre istatikselsel olarak anlamlı düzeye ulaşmıştır ($P = ,013$) (Şekil 5).

TARTIŞMA

Son yıllarda mısır nişastasının ekstraksiyonu ile elde edilen glikozun fruktoza enzimatik izomerizasyonunu gerçekleştiren tekniklerin geliştirilmesi ile früktoz tüketimi artmıştır. Artan früktoz tüketimi dislipidemi, kilo alımı, viseral yağlanma, insülin duyarlılığında ve oksidatif strese artma gibi çeşitli biyolojik etkilere neden olabildiği gösterilmiştir.¹⁹ Günümüzde romatizmal hastalıkların tedavisinde kullanılan leflunomidin; antioksidan, antiinflamatuvar gibi çeşitli farmakolojik etkilere sahip olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir.²⁰⁻²² Fakat leflunomidin yüksek doz fruktozla beslenmede hipotalamusta oluşturduğu oksidatif stres ve lipid profili üzerine etkisini inceleyen herhangi bir çalışma literatürde mevcut değildir. Bu çalışma, akut yüksek doz fruktozla beslenen sıçanların hipotalamusunda leflunomidin etkinliğinin incelenmesi bakımından literatürde bir ilktir. Çalışmamızda, akut yüksek doz fruktozla beslenmenin hipotalamus dokusunda oksidatif strese neden olduğu tespit edilmiştir. Bu etki TOS seviyesini artmasından kaynaklanmaktadır. Verilerimiz, periferik etkilerinin yanı sıra akut yüksek fruktoz tüketiminin santral olarak da metabolik hasara neden olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte akut fruktoz uygulanması ile kolesterol ve LDL düzeylerinde artış gözlenmiş, ancak bu değişim istatikselsel olarak önemli düzeye ulaşamamıştır. Ayrıca çalışmamızda tüm bu artışların leflunomid uygulanması ile ortadan kalktığı gözlemlenmiştir.

Günlük ihtiyacın üstünde -diğer bir deyişle- yüksek düzeyde beslenme enerji alımı ve harcanması arasındaki dengeyi bozar.²³ Gelişen bu dengesizlik sonucunda adipositlerde trigliserit sayısının arttığı ve buna bağlı olarak adipositlerde büyüme meydana geldiği bilinmektedir.^{23,24} Adipositlerde büyüme, hipoksi, makrofaj infiltrasyonu ve IL-6 ile TNF- α salınımının artması sonucunda sistemik inflamasyon gelişebilmektedir.²⁵ Yapılan bir çalışmada %60 fruktoz tüketen sıçanlarda %10 fruktoz tüketen sıçanlara kıyasla kolesterol, HDL, LDL, trigliserit ve insülin düzeylerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir.²⁶ Literatürden elde edilen veriler fruktozun lipid profillerini olumsuz olarak etkilediğini göstermektedir. Sistemik olarak artan serbest yağ asitleri ve proinflamatuvar sitokinler sadece periferik dokuları değil aynı zamanda hipotalamus dokusunun da lipid profillerini

etkilemektedir. Yapılan başka bir çalışmada ise 8 hafta boyunca kronik olarak %20 düzeyde fruktoz içeren sıvı ile beslenen sıçanlarda hiperinsülinemi, hiperleptinemi, dislipidemi ve steatozis gibi periferik etkiler görülürken, bunlara ek olarak hipotalamik inflamasyon ve hipotalamik glukoz, enerji homeostazisi ile besin alımında disregülasyon saptanmıştır.²⁷ Bu bulgular fruktozun hipotalamus üzerinde oluşturduğu hasar ve buna bağlı olarak besin alımının etkilenmesi üzerindeki önemine dikkatleri çekmiştir. Bu çalışmada da, literatürle uyumlu olarak %63 oranında uygulanan fruktozun hipotalamus dokusunda lipid profil düzeylerini arttırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4-5).

Artmış fruktoz tüketimine bağlı olarak yağ asitleri ile TNF- α seviyesi artar ve bunun sonucunda endoplazmik retikulum stresi indüklenerek mitokondriyal disfonksiyon ile reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasına neden olur.²⁸ Bu sonuçlar fruktoza bağlı olarak artmış ROS'un oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir.²⁹ Serbest yağ asitlerinin ve proinflamatuvar sitokinlerin sistemik artışları sadece periferik dokuları etkilemekle kalmayarak, aynı zamanda hipotalamusta da strese neden olabilmektedir. Serbest yağ asitlerinin ve proinflamatuvar sitokinlerin artışı, hipotalamik IKK β /NF- κ B yolağını aktive ederek oksidatif stres artışına neden olur.³⁰ Bu verilerle paralel olarak, %20'lik fruktoz içeren sıvı ile beslenen sıçanlarda hipotalamik IKK β /NF- κ B yolak aktivasyonu ile beyinde oksidatif stres markerlerinin arttığı gözlemlenmiştir.²⁷ Elden edilen literatür bilgileri ışığında, fruktoz tüketiminin sistemik oksidatif strese neden olarak oksidan seviyesini arttırılabildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada literatür bilgisine ek olarak, çok yüksek düzeyde (%63'lük) fruktozla beslenen sıçanların hipotalamus dokusunda TOS düzeyi ve OSİ arttığı ve fruktozun oksidatif stresi indüklediği gösterilmiştir.

Leflunomid, oral uygulamadan sonra tamamen farmakolojik olarak aktif α -siyanoenol, A77 1726'ya (teriflunomid) dönüştürülen bir ön ilaçtır.³¹ Latchoumycandane ve ark. tarafından yapılan çalışmada leflunomidin 30 μ M konsantrasyona kadar koruyucu etkiye sahip olduğu, bu konsantrasyonun hücreler için toksik olmadığı gösterilmiştir.²⁰ Leflunomid'in bifazik etkisi olup farklı stres koşullarında etkisi değişebilmektedir ve bu nedenle literatürde genel olarak bu farklı etkilerinin mekanizmaları araştırılmıştır.²² Bunlara ek olarak literatürde Leflunomid'in antioksidan etkisi hakkında sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada hayvanlara Leflunomid uygulanması ile artmış oksidatif stres seviyelerinde azalma, tükenmiş hepatik antioksidan enzimlerinde ve nötrofil aktivasyonunda artış gözlenmiştir.³² Manna ve ark. Leflunomid'in TNF ile indüklenen ROS oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu baskıladığını göstermişlerdir.²¹ Yao ve ark. ise karaciğerde Leflunomid'in proinflamatuvar sitokinleri azaltarak antioksidan kapasiteyi arttırdığını bulmuşlardır.³³ Leflunomid'in antioksidan aktiviteyi artırması ROS'a neden olan ürünleri inhibe etmesine bağlıdır. Son yıllarda Leflunomid'in antioksidan etkinliği araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir. Çalışmamızda da Leflunomid'in oksidatif stresi azalttığı akut yüksek doz fruktozla beslenen sıçanların hipotalamusunda gösterilmiştir. Aynı zamanda Leflunomid'in yüksek doz fruktozun hipotalamusta neden olduğu lipid profilindeki bozulmaya karşı düzenleyici rol oynadığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; Akut yüksek doz fruktoz ile beslenmenin hipotalamusta oksidatif stresi arttırdığı ve bu artışın Leflunomid uygulanması ile ortadan kalktığı gözlemlenmiştir. Ayrıca Leflunomid'in lipid profilleri üzerine de olumlu etkileri tespit edilmiştir. Verilerimiz, bir ön ilaç olan Leflunomid'in yüksek düzeyde fruktoza maruz

kalmaya bağlı gelişen hasarların tedavisinde umut vaat edici olduğunu göstermekte olup, bu konuda daha ileri çalışmalara gereksinim olduğu düşünülmüştür.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için gerekli etik izin Pamukkale Üniversitesi Deneysel Hayvan Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 10.02.2022, Karar No: PAUHADYEK-2021/51).

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir – G.G., Ö.K.E.; Tasarım – G.G., Ö.K.E.; Denetleme – G.G., Ö.K.E., M.B.K.; Kaynaklar – G.G., Ö.K.E., M.B.K., M.A.; Malzemeler – M.A.; Veri Toplanması ve/veya İşlenmesi – G.G., Ö.K.E.; Analiz ve/veya Yorum – G.G., M.B.K.; Literatür Taraması – G.G., Ö.K.E.; Yazıyı Yazan – G.G., Ö.K.E.; Eleştirel İnceleme – G.G., Ö.K.E., M.B.K., M.A.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Ethics Committee Approval: This study was approved by the ethical committee of Pamukkale University Medical Faculty (Date; 10.02.2022, Decision no: PAUHADYEK-2021/51).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception – G.G., O.K.E.; Design – G.G., O.K.E.; Supervision – G.G., O.K.E., M.B.K.; Fundings – G.G., O.K.E., M.B.K., M.A.; Materials – M.A.; Data and/or Processing – G.G., O.K.E.; Analysis and/or Interpretation – G.G., M.B.K.; Literature Review – G.G., O.K.E.; Writing – G.G., O.K.E.; Critical Review – G.G., O.K.E., M.B.K.

Declaration of Interests: The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding: The authors declared that this study has received no financial support.

KAYNAKLAR

1. Campos VC, Tappy L. Physiological handling of dietary fructose-containing sugars: implications for health. *Int J Obes (Lond)*. 2016;40(1): S6-S11. [CrossRef]
2. Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7(5):251-264. [CrossRef]
3. White PJ, McGarrah RW, Herman MA, Bain JR, Shah SH, Newgard CB. Insulin action, type 2 diabetes, and branched-chain amino acids: a two-way street. *Mol Metab*. 2021;52:101261. [CrossRef]
4. Stanhope KL. Sugar consumption, metabolic disease and obesity: the state of the controversy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2016;53(1):52-67. [CrossRef]
5. Omar NA, Frank J, Kruger J, et al. Effects of High Intakes of Fructose and Galactose, with or without Added Fructooligosaccharides, on Metabolic Factors, Inflammation, and Gut Integrity in a Rat Model. *Mol Nutr Food Res*. 2021;65(6):2001133.
6. Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Coppola P, Liverini G, Iossa S. Increased hepatic de novo lipogenesis and mitochondrial efficiency in a model of obesity induced by diets rich in fructose. *Eur J Nutr*. 2013;52(2):537-545. [CrossRef]
7. Crescenzo R, Bianco F, Coppola P, et al. Adipose tissue remodeling in rats exhibiting fructose-induced obesity. *Eur J Nutr*. 2014;53(2): 413-419. [CrossRef]
8. Müller CP, Reichel M, Mühle C, Rhein C, Gulbins E, Kornhuber J. Brain membrane lipids in major depression and anxiety disorders. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(8):1052-1065. [CrossRef]

9. Kao YC, Ho PC, Tu YK, Jou IM, Tsai KJ. Lipids and Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4):1505. [\[CrossRef\]](#)
10. López M, Varela L, Vázquez MJ, et al. Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med.* 2010;16(9):1001-1008. [\[CrossRef\]](#)
11. Li JM, Ge CX, Xu MX, et al. Betaine recovers hypothalamic neural injury by inhibiting astrogliosis and inflammation in fructose-fed rats. *Mol Nutr Food Res.* 2015;59(2):189-202. [\[CrossRef\]](#)
12. Mendes NF, Jara CP, Zanesco AM, de Araújo EP. Hypothalamic microglial heterogeneity and signature under high fat diet-induced inflammation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2256. [\[CrossRef\]](#)
13. Mastrocola R, Nigro D, Cento AS, Chiazza F, Collino M, Aragno M. High-fructose intake as risk factor for neurodegeneration: key role for carboxy methyllysine accumulation in mice hippocampal neurons. *Neurobiol Dis.* 2016;89:65-75. [\[CrossRef\]](#)
14. Cai D. Neuroinflammation and neurodegeneration in overnutrition-induced diseases. *Trends Endocrinol Metab.* 2013;24(1):40-47. [\[CrossRef\]](#)
15. Thaler JP, Yi CX, Schur EA, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest.* 2012;122(1):153-162. [\[CrossRef\]](#)
16. Fang CB, Zhou DX, Zhan SX, et al. Amelioration of experimental autoimmune uveitis by leflunomide in Lewis rats. *PLoS One.* 2013;8(4):e62071. [\[CrossRef\]](#)
17. Wan Z, Li H, Wu X, et al. Hepatoprotective effect of gentiopicoside in combination with leflunomide and/or methotrexate in arthritic rats. *Life Sci.* 2021;265:118689. [\[CrossRef\]](#)
18. DiStefano JK. Fructose-mediated effects on gene expression and epigenetic mechanisms associated with NAFLD pathogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(11):2079-2090. [\[CrossRef\]](#)
19. Fortino MA, Lombardo YB, Chicco A. The reduction of dietary sucrose improves dyslipidemia, adiposity, and insulin secretion in an insulin-resistant rat model. *Nutrition.* 2007;23(6):489-497. [\[CrossRef\]](#)
20. Latchoumycandane C, Seah QM, Tan RC, Sattabongkot J, Beerheide W, Boelsterli UA. Leflunomide or A77 1726 protect from aceta minophen-induced cell injury through inhibition of JNK-mediated mitochondrial permeability transition in immortalized human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;217(1):125-133. [\[CrossRef\]](#)
21. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Leflunomide suppresses TNF-induced cellular responses: effects on NF- κ B, activator protein-1, c-Jun N-terminal protein kinase, and apoptosis. *J Immunol.* 2000;165(10):5962-5969. [\[CrossRef\]](#)
22. Xuan J, Ren Z, Qing T, et al. Mitochondrial dysfunction induced by leflunomide and its active metabolite. *Toxicology.* 2018;396-397:33-45. [\[CrossRef\]](#)
23. Su X, Peng D. The exchangeable apolipoproteins in lipid metabolism and obesity. *Clin Chim Acta.* 2020;503:128-135. [\[CrossRef\]](#)
24. Ondřej Š. Parental overnutrition by carbohydrates in developmental origins of metabolic syndrome. *Physiol Res.* 2021;70(suppl 4):585.
25. Schwärzler J, Mayr L, Radlinger B, et al. Adipocyte GPX4 protects against inflammation, hepatic insulin resistance and metabolic dysregulation. *Int J Obes (Lond).* 2022;46(5):951-959. [\[CrossRef\]](#)
26. de Moura RF, Ribeiro C, de Oliveira JA, Stevanato E, de Mello MAR. Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. *Br J Nutr.* 2009;101(8):1178-1184. [\[CrossRef\]](#)
27. Nabil M, El Demellawy MA, Mahmoud MF, Mahmoud AAA. Prolonged overnutrition with fructose or fat induces metabolic derangements in rats by disrupting the crosstalk between the hypothalamus and periphery: possible amelioration with fenofibrate. *Eur J Pharmacol.* 2020;879:173136. [\[CrossRef\]](#)
28. Gentile CL, Frye MA, Pagliassotti MJ. Fatty acids and the endoplasmic reticulum in nonalcoholic fatty liver disease. *BioFactors.* 2011;37(1):8-16. [\[CrossRef\]](#)
29. Baramian N, Song J, Bailey CE, Papaconstantinou J, Evers BM, Chung DH. Tumor necrosis factor- α and apoptosis signal-regulating kinase 1 control reactive oxygen species release, mitochondrial autophagy and c-Jun N-terminal kinase/p38 phosphorylation during necrotizing enterocolitis. *Oxid Med Cell Longev.* 2009;2(5):297-306. [\[CrossRef\]](#)
30. Zhang Y, Reichel JM, Han C, Zuniga-Hertz JP, Cai D. Astrocytic process plasticity and IKK β /NF- κ B in central control of blood glucose, blood pressure, and body weight. *Cell Metab.* 2017;25(5):1091-1102.e4. [\[CrossRef\]](#)
31. Terekhova I, Kritskiy I, Agafonov M, Kumeev R, Martínez-Cortés C, Pérez-Sánchez H. Selective binding of cyclodextrins with leflunomide and its pharmacologically active metabolite teriflunomide. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):9102. [\[CrossRef\]](#)
32. Karaman A, Fadillioglu E, Turkmen E, Tas E, Yilmaz Z. Protective effects of leflunomide against ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Pediatr Surg Int.* 2006;22(5):428-434. [\[CrossRef\]](#)
33. Yao HW, Li J, Chen JQ, Xu SY. Inhibitory effect of leflunomide on hepatic fibrosis induced by CCl $_4$ in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2004;25(7):915-920.