

Sıçan karaciğerinde leptinin antioksidan sistemlere etkisi

[Effects of leptin in rat liver antioxidant systems]

Güliz Zeybekoğlu¹,
Nedret Kılıç¹,
Zuhal Yıldırım¹,
Çiğdem Özer²,
Aydan Babül²

Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, ¹Tıbbi Biyokimya
²Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Prof. Dr. Nedret Kılıç

Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya
Anabilim Dalı,
06510, Ankara
Tel. 0312 2026934
Faks. 0312 2203238
E-posta. nedretkilig73@gmail.com

Kayıt tarihi: 1 Haziran 2012; Kabul tarihi: 14 Ekim 2012
[Registered: 1 June 2012; Accepted: 14 October 2012]

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, soğuk hareketsizlik stresine maruz kalan sıçanların karaciğerinde, antioksidan sistem aktivitelerinin incelenmesi ve leptinin bu sistemlerin aktivitesine olan etkisinin araştırılması amaçlandı.

Yöntemler: Çalışmada 31 adet Wistar-Albino erkek sıçan (200±20 g) 4 gruba ayrıldı. 1. kontrol, 2. stres, 3. leptin (i.p., 10µg/kg/gün), 4. leptin+stres. Stres ve leptin gruplarında 7 gün süre ile günde iki doz intraperitoneal leptin/PBS verildikten sonra 8. gün bütün deneklere +4°C' de 4 saat soğuk hareketsizlik stresi uygulandı. Uygulama sonrasında, denekler sodyum tiopental anestezisi altında sakrifiye edildi. Karaciğer dokularında, glutatyon peroksidaz, tiyoredoksin redüktaz ve süperoksit dismutaz aktiviteleri spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü.

Bulgular: Karaciğerde, glutatyon peroksidaz aktivitesinde stres ve leptin gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma saptandı (sırasıyla, p<0.001 ve p<0.004). Stres grubu ile leptin grubu karşılaştırıldığında, leptin grubunun glutatyon peroksidaz aktivitesinde anlamlı bir artış saptandı (p<0.021). Leptin ile leptin+stres grubu karşılaştırıldığında, leptin+stres grubunda anlamlı bir artış bulundu (p<0.004). Tiyoredoksin redüktaz aktivitesinde kontrol grubuna göre leptin grubunda anlamlı bir azalma gözlenirken (p<0.005), stres grubunda anlamlı bir fark saptanmadı (p>0.05). Bununla birlikte leptin+stres grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma saptandı (p<0.002). Süperoksit dismutaz aktivitesinde, leptin+stres grubunda stres grubuna göre anlamlı bir artış gözlenirken (p<0.001), diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (p>0.05).
Sonuç: Bu çalışmada stresin karaciğerde oksidan ve antioksidan dengesi bozduğu, leptinin ise antioksidan etki oluşturarak, karaciğer enzim sistemleri üzerine koruyucu etki gösterdiği gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Soğuk hareketsizlik stresi, leptin, glutatyon peroksidaz, tiyoredoksin redüktaz, süperoksit dismutaz

Çıkar Çatışması: Yazarların herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to investigate the effects of exogenous leptin administration on liver tissue antioxidant system activities in cold-restraint stress and the effect of leptin against the activities of these systems.

Methods: In this study; 31 Wistar albino male rats (200±20 g) were divided into 4 groups: 1. control, 2. stress, 3. leptin, 4. leptin+stress. Stress and leptin groups were injected PBS/leptin (i.p., 10µg/kg/day) twice for 7 days followed by an additional 4 hours cold-restraint stress at +4°C. After the sodium-thiopental administration, animals were immediately sacrificed. The liver glutathione peroxidase (GPx), thioredoxin reductase (TR) and superoxide dismutase (SOD) activities were determined.

Results: GPx activities in the stress group and the leptin group were significantly reduced (p<0.001 and p<0.004, respectively) when compared to the control group. GPx activity in the leptin group was significantly increased (p<0.021) in comparison with the stress group. A significant GPx activity increase (p<0.004) was observed in the leptin+stress group when compared to the leptin group. TR activities in the leptin and leptin+stress groups were significantly reduced (p<0.005 and p<0.002, respectively) in comparison with the control group. However, leptin group TR activity was not significantly different (p>0.05) than the stress group. SOD activity was increased significantly (p<0.001) in the leptin+stress group when compared to the stress group, whereas there was no significant difference (p>0.05) among the other groups.

Conclusion: In this study, it was observed that stress damages oxidative balance in liver. Leptin may protect liver antioxidant enzymes.

Key Words: Cold-restraint stress, leptin, glutathione peroxidase, thioredoxin reductase, superoxide dismutase

Conflict of Interest: The authors do not have any conflict of interest.

Giriş

Leptin, adipoz dokudan salgılanan 167 amino asitten oluşan polipeptit yapısında, hipotalamus merkezli etkileri sonucu vücut ağırlığının düzenlenmesinde görev yapan ve bir çeşit tokluk faktörü olarak tanımlanan, bir anti-obezite hormonudur. En iyi bilinen işlevleri besin alımı, enerji dengesi ve vücut yağ dağılımı üzerindeki etkileridir. Günümüzde yapılan çalışmalar leptinin vücut enerji dengesi rolü dışında immunité, hematopoez, osteogenezis, üreme ve kemik dansitesi gibi pek çok fizyolojik olayda da yeri olduğunu göstermektedir [1, 2]. Organizmada normal fizyolojik şartlarda veya herhangi bir patolojik olay sonucunda oluşan serbest radikaller ile bunların koruyucusu olan antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin serbest radikaller lehine kayması oksidatif stresi gösterir. Canlılar oksidatif hasara karşı enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistemler ve moleküllerle korunur [3].

Son yıllarda yapılan çalışmalar çeşitli stres modellerinin, serbest radikal üretiminde etkili olduğunu göstermektedir [4]. Akut soğuk hareketsizlik ve immobilizasyon gibi deneysel stres modelleri hayvan organizmasının antioksidan kapasitesinde oldukça büyük azalışa neden olmaktadır. Soğuk stres, kanda glukoz konsantrasyonunu ve karaciğer glikojenini düşürdüğü halde, plazma insülin düzeylerinde herhangi bir değişikliğe neden olmamaktadır. Ayrıca akut soğuk hareketsizlik stresi tarafından uyarılan termogenezis, iskelet kasının artmış glukoz kullanımı ile orantılıdır [5].

Literatürde, antioksidan savunma sistemlerindeki değişikliklerin dokuya spesifik olduğu ve soğuk hareketsizlik stresinin de prooksidan/antioksidan dengesini prooksidanlar yönüne kaydırarak oksidatif strese neden olduğu bildirilmektedir [6]. Sempatik adrenal sistemin aktivasyonu, çeşitli stres modellerinde oluşan en erken yanıtlardan biridir. Stres, sempatik adrenal sistemini stimüle eder ve hipokampusta süperoksit anyonu (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2)'in oranını yükseltir. Bu nedenle organizmada, oksidatif stres ve sempatik adrenal stres birbiri ile paralel ilişkilidir [7].

Literatürde leptinin bir antioksidan olduğunu savunan çalışmalar bulunmaktadır. Brzozowski ve ark. [8] leptinin, midede iskemi-reperfüzyona karşı koruyucu olduğunu ve ülser iyileşmesini de hızlandırdığını göstermiştir. Sailaja ve ark. [9] leptinin karaciğer, kalp ve böbrekte TBARS (tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri) düzeylerini düşürdüğünü, kontrol grubuna göre yüksek yağ diyetiyle beslenen farelerde glutatyon (GSH) düzeylerini değiştirmedığını bulmuştur.

Literatürdeki bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızda soğuk hareketsizlik stresi uygulanan deneklerin karaciğerinde antioksidan sistemlerin (glutatyon peroksidaz (GPx), tiyoredoksin redüktaz (TR) ve süperoksit dismutaz (SOD)) aktivitelerinin incelenmesini ve leptinin de bu sistemlere olan etkisini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntemler

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarında, 12.12.2003 tarihli ve G.Ü ET-03.023 nolu kararı ile etik kurul onayı alındıktan sonra gerçekleştirildi.

Çalışmada, Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinden temin edilen ortalama 200 ± 20 g ağırlığında 28 adet Wistar-Albino erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar özel kafeslerde üç veya dörtlü gruplar halinde bir arada olacak şekilde standart yem ve normal musluk suyu ile serbest olarak beslendi ve 12 saat aydınlık/karanlık (08^{00} - 20^{00}) döngüsünde tutuldu. Bir hafta süre ile adaptasyon koşullarında bekletilen denekler 4 gruba ayrıldı.

Kontrol grubu: 7 gün süre ile günde iki doz, intraperitoneal fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) verildi.

Stres grubu: 7 gün süre ile günde iki doz, intraperitoneal PBS verilir, 8. gün $+4^\circ C$ 'de 4 saat soğuk hareketsizlik stresi [10] uygulandı. Soğuk hareketsizlik stresi uygulanırken sıçanlar tel kafese yerleştirildi ve tel kafes hareketi engellemek amacıyla sıkıştırıldı. Kafesler $+4^\circ C$ 'de buzdolabında 4 saat süreyle bekletildi.

Leptin grubu: 7 gün süre ile günde iki doz, intraperitoneal $10 \mu g/kg/gün$ rat rekombinant leptin (CALBIOCHEM, Biomol prod. No: 57274) [11] pH 7.4 olan PBS içinde çözülerek verildi.

Leptin+stres grubu: 7 gün süre ile günde iki doz, intraperitoneal $10 \mu g/kg/gün$ leptin verildikten sonra 8. gün soğuk hareketsizlik stresi uygulandı.

Tüm denekler 8. gün sodyum tiopental ($50 mg/kg$) anestezisi ile sakrifiye edildi. Karaciğer dokuları bekletmeden soğutulmuş izotonik çözelti ile yıkandı. Kan ürünlerinden temizlenen karaciğer dokusu örnekleri sıvı azotta dondurularak, biyokimyasal analizlerin yapılacağı zamana kadar $-80^\circ C$ 'de saklandı.

Karaciğer dokusu GPx, TR ve SOD aktivitesi Shimadzu UV 1601 Spectrophotometer, Shimadzu, Tokyo, Japan spektrofotometre ile ölçüldü.

Karaciğer dokusu glutatyon peroksidaz aktivitesi ölçümü

$0.5 mM$ EDTA içeren $50 mM$ potasyum fosfat tamponu (pH 7.4) ile %10 (w/v) homojenize edilen karaciğer dokusu $2.000 \times g$, $+4^\circ C$ 'de 15 dakika santrifüj edilip, süpernatant alındı. Süpernatantlarda GPx aktivitesi Paglia ve Valentine [12] yöntemine göre spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bu yöntemde GPx H_2O_2 varlığında redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG) yükseltgenmesini katalizler. H_2O_2 'in bulunduğu ortamda GPx'in oluşturduğu GSSG, glutatyon redüktaz (GSSG-R) ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. GPx aktivitesi NADPH'ın NADP⁺'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının $340 nm$ 'de okunmasıyla hesaplandı. Bu reaksiyon NADPH'ın NADP⁺'ye dönüşüm esasına dayanması nedeniyle NADPH için molar absorpsiyon katsayısı olan $6.22 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$ kullanılarak, dakika başına okside olan NADPH nmol olarak hesaplandı ve GPx aktivitesi nmol okside NADPH/dakika/mg protein olarak ifade edildi.

Karaciğer dokusu tiyoredoksin redüktaz aktivitesi ölçümü

1mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) ile % 10 (w/v) homojenize edilen karaciğer dokusu 13.000xg, +4°C'de 30 dakika santrifüj edilip, süpernatant alındı. Süpernatantlarda TR aktivitesi Holmgren [13] ve Hill ve ark.'nın [14] yöntemlerine göre spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bu yöntemde memeli TR, NADPH varlığında 5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB)'i redükler. Reaksiyon ürünü TNB (5'- tiyonitrobenzoik asit) sarıdır ve 13,600 M⁻¹ cm⁻¹ molar absorpsiyon katsayısıyla 412 nm'de en yüksek absorbanza sahiptir. Sabit sıcaklık (25°C), ve pH'da 1 dakikada 1µmol TNB açığa çıkaran TR 1 IU'dir. TNB için molar absorpsiyon katsayısı 13.600 M⁻¹ cm⁻¹ kullanılarak, dakika başına oluşan µmol TNB hesaplandı ve TR aktivitesi Ü/mg protein olarak ifade edildi.

Karaciğer dokusu süperoksit dismutaz aktivitesi ölçümü

Distile su ile % 10 (w/v) homojenize edilen karaciğer dokusu 5.000xg, +4°C'de 30 dakika santrifüj edilip süpernatant alındı. 500 µl kloroform-etanol çözeltisi üzerine süpernatandan 500 µl eklenip vortekslendi. Daha sonra 5.000xg, +4°C'de 2 saat santrifüj edilip süpernatant alındı. Süpernatantlarda SOD aktivitesi Sun ve ark.'nın [15] modifiye ettiği spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Bu yöntemde nitroblue tetrazolium (NBT) süperoksit üreticisi olan ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından indirgenmektedir. SOD aktivitesi %50 inhibisyonu IU aktivitenin sağladığı düşünülerek hesaplandı ve SOD aktivitesi ünite/mg protein olarak ifade edildi. Doku protein düzeyleri sığır serum albumini (BSA)'nın standart olarak kullanıldığı Lowry yöntemiyle ölçüldü [16].

İstatistiksel Analiz

Veriler, *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, version 10.0, Chicago, IL, USA) programı kullanılarak değerlendirildi. Gruplar arasındaki fark Kruskal Wallis Varyans analizi ile incelendi, ikişerli karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U-testi ile yapıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 1'de verilmiştir.

Karaciğerde, GPx aktivitesinde stres ve leptin gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma saptandı (sırasıyla, $p < 0.001$ ve $p < 0.004$). Stres grubu ile leptin grubu karşılaştırıldığında, leptin grubunun karaciğer GPx aktivitesinde anlamlı bir artış saptandı ($p < 0.021$). Leptin ve leptin+stres grubu karşılaştırıldığında, leptin+stres grubunda karaciğer GPx aktivitesinde anlamlı bir artış bulundu ($p < 0.004$). Karaciğerde, TR aktivitesinde kontrol grubuna göre leptin grubunda anlamlı bir azalma gözlenirken ($p < 0.005$), stres grubunda anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$). Bununla birlikte, karaciğer TR aktivitesinde leptin+stres grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma saptandı. ($p < 0.002$). Karaciğerde, SOD aktivitesinde leptin+stres grubunda stres grubuna göre anlamlı bir artış gözlenirken ($p < 0.001$), diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$).

Tartışma

Leptinin, farklı dokulardaki prooksidan veya antioksidan rolü hala tartışılmaktadır. Balasubramaniyan ve ark. [17], leptinin; alkol yüklemesi yapılan deneklerin karaciğerinde lipit peroksidasyonunu artırdığını bulmuş; bunu enzimatik ve non-enzimatik antioksidanların aktivitelerini azaltarak gerçekleştirdiğini savunmuşlardır. Bunu destekleyen başka bir çalışmada ise leptinin fare

Tablo 1. Tüm grupların glutatyon peroksidaz, tiyoredoksin redüktaz ve süperoksit dismutaz aktiviteleri (Ortalama±SD)

	Kontrol (n=7)	Stres (n=7)	Leptin (n=7)	Leptin+stres (n=7)
GPx (nmol okside NADPH/dak/mg protein)	51.23±11.15 ^{a,b}	17.57±4.99 ^{a,c}	27.29±9.11 ^{b,c,f}	60.47±24.25 ^f
TR (Ü/ mg protein)	0.0432±0.0049 ^{b,d}	0.0417±0.0175	0.0324±0.0049 ^b	0.0287±0.0054 ^d
SOD (Ü/ mg protein)	0.232±0.036	0.176± 0.062 ^e	0.231±0.062	0.264±0.050 ^e

Anlamlılık düzeyi : $p < 0.05$

^a Stres grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark.

^b Leptin grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark.

^c Leptin grubu ile stres grubu arasında anlamlı fark.

^d Leptin+stres grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark.

^e Leptin+stres grubu ile stres grubu arasında anlamlı fark.

^f Leptin+stres grubu ile leptin grubu arasında anlamlı fark.

beyninde lipid peroksidasyonu artırdığı ve antioksidan sistemleri inhibe ettiği gösterilmiştir [18].

Soğuk hareketsizlik stresi uygulamasının, GSH düzeyleri ve GPx aktivitesini azalttığı saptanmıştır. Bunun olası sebebi streste artan radikal oluşumunu önlemede GSH'un, GPx'a substrat teşkil etmesi ve bu nedenle tükenmesidir. Stres sonucunda artan serbest radikal ürünlerinin detoksifikasyonu, GSH'un indirgenmiş formunun, oksitlenmiş dimer formuna dönüşümü ile sağlanmaktadır. Bu reaksiyonu, GPx katalizlemektedir. GPx aktivitesinde ve enzim miktarında azalmanın görüldüğü şartlarda, örneğin selenyum eksikliğinde detoksifikasyonun azaldığı görülür. Heksozmonofosfat yolu, NADPH'nin başlıca kaynağıdır. Hücrede oksidatif stresle, NADPH oluşumunun inhibisyonu gerçekleşirse NADPH'nin kofaktörü olduğu glutatyon redüktaz (GR) aktivitesinde de azalma görülür [6].

Pentoz fosfat yolu, riboz 5-fosfatların ana kaynağıdır. Riboz 5-fosfat, NADPH ve nükleotit sentezinde kullanılır. NADPH hücrelerde yağ asidi, kolesterol sentezi gibi birçok biyosentez olaylarında görev alır. NADPH'ı indirgeyici güç olarak sitokrom p450 sistemi, GPx, GR kullanmaktadır. GPx, bir selenoproteindir. Katalitik aktivitesi selenyum düzeyi ile ilişkilidir. Serbest radikaller, peroksidaz aktivitesini oksidatif olarak inaktive etmektedir [19]. Shustanova soğuk stresinin beyin, karaciğer ve eritrositlerde, GR enzim aktivitelerini inhibe ettiğini göstermiştir [20].

Çalışmamızda leptin grubunda GPx ve TR aktivitelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. TR, FAD içeren bir enzimdir. H₂O₂'den kaynaklanan oksidatif stresin sebep olduğu hasarın önlenmesi ve onarımından sorumludur. Tiyoredoksin, H₂O₂'nin redüklenmesini katalizleyen tiyoredoksin peroksidazlar ailesi için elektron verir. GPx ve katalaz (CAT)'ın H₂O₂'yi redüklemesine rağmen, hücre içerisinde aşırı H₂O₂ oluşumunun devam ettiği şartlarda; tiyoredoksinin peroksidazların H₂O₂ seviyesini azaltarak, apoptozisin indüklenmesini engelleyebildiği gösterilmiştir [21, 22]. İnsan TR'nin, lipid hidroperoksitleri H₂O₂ ile aynı hızda redüklediği ve tepkime hızının selenosistein varlığı ile sekiz kat arttığı gösterilmiştir [23]. TR'nin esansiyel bir komponenti olan selenosistein, tiyoredoksinin redüklenmesinden sorumlu bir flavoenzimdir. Kültür ortamına selenyum ilavesi TR aktivitesini artırır [24]. Berggren ve ark. [25] TR aktivitesinde selenyumun etkilerini göstermek üzere selenyumdan eksik diyetle beslenen sıçanlarla, normal selenyumlu diyetle beslenen sıçanların TR aktivitesini karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar bu deneylerde; karaciğer, böbrek ve akciğerde azalan TR aktivitesi gözlemlenmişlerdir. Yüksek selenyumlu diyet ile beslenen sıçanların böbreğinde 1.5, akciğerinde 2.0 ve karaciğerinde 2.1 kat TR aktivitesi artışı gözlenmiştir. TR aktivitesindeki azalma, enzimin azalmış özgül aktivitesi ve azalmış protein sentezi ile ilişkilendirilmiştir. Bizim deneylerimizde de uygulanan stresin buna benzer bir etki ile TR aktivitesini azaltması beklenebilir. Leptin verilen deneklerde TR aktivitesinin daha düşük bu-

lunması bu polipeptidin enzim düzeyi üzerinde olumlu etkisi olmadığını göstermektedir. Soğuk hareketsizlik stresine maruz kalan sıçanlarda leptinin karaciğer ve plazmada bir antioksidan gibi etki ederek, malondialdehit (MDA) artışını ve GSH'ın azalışını engellediği ifade edilmektedir [26-28].

Leptin grubu deneklerimizde GPx aktivitesi, stres grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir. Bulgularımız literatürle uyumlu görülmektedir

Zaidi ve ark. [4] sıçanların immobilizasyonunun beyinde oksidatif strese neden olduğunu, bunun da SOD aktivitesindeki ve GSH düzeylerindeki azalış ve lipid peroksidasyonundaki artış ile gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Burada olasılıkla SOD aktivitesi doğrudan O₂ anyonlarının ve H₂O₂'in üretiminden dolayı inaktive olmaktadır. Bizim deneylerimizdeki stres grubunda ise kontrole göre, SOD ve TR aktivitelerindeki azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Yüksel ve Asma [29], soğuk stresin oksidan/antioksidan sisteminin dengesini bozarak oksidatif hasara neden olduğunu böylece enzimatik ve non enzimatik antioksidanların durumunu değiştirdiğini bildirmiştir. Çalışmamızdaki sonuçlar da bu bulguyla uyum göstermektedir.

Stres boyunca sempatik sinir sistemi, β_3 adrenerjik reseptörler aracılığı ile leptin düzeylerini regüle eder. Hayvanlarda bulunan β_3 adrenerjik reseptörler, insanlardakine oranla daha azdır. Bu nedenle transgenik farelerde leptin düzeyi %52'lik bir azalma gösterir [30]. Çalışmamızın stres grubunda azalan leptin düzeyleri olasılıkla hücreyi oksidatif strese karşı korumada yetersiz kalmış ve ayrıca artan serbest radikallere karşı antioksidan sistem de yeterli bir savunma mekanizması oluşturamamıştır. Bunu destekler şekilde dışarıdan leptin verilen stres grubunda GPx ve SOD aktivitelerinde anlamlı artışlar görülmüştür.

Sempatik sinir sistemi ve hipotalamus hipofiz (pituitary) adrenal aksı (HPA), leptin sekresyonunu düzenleyen iki sistemdir. Bu iki sistem, strese aktive olmaktadır. Sempatik sinir sistemi leptin sekresyonunu inhibe ederken, hipotalamus hipofiz adrenal aksı (HPA) leptin sekresyonunu aktive etmektedir. Strete glukoz kullanımının artışına bağlı olarak aktive olan elektron transport zinciri, süperoksit radikalinin başlıca kaynağıdır [31]. Bizim deneylerimizde leptin+stres uygulanan grupta dışarıdan verilen leptinin artan süperoksit radikallerine karşı oluşan yanıtta SOD aktivitesini artırdığı gözlenmiştir.

Leptin+stres grubunda, TR aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma saptanmıştır. Bu çalışmada, GPX'in, selenyum kullanması sonucunda TR için yeterli selenyum kalmayarak, enzim aktivasyonunun azalmış olabileceği düşünülmektedir. Substrat konsantrasyonunun azalması nedeniyle de enzim aktivitesinde azalmalar gözlenebilmektedir. Redükte tiyoredoksin olasılıkla, çok hızlı bir şekilde antioksidan cevaba katılmakta ve çok fazla miktarda okside tiyoredoksin açığa çıkmasıyla da, TR inhibisyonuna uğramaktadır. GPx aktivitesinde ise leptin grubuna göre anlamlı bir artış

saptanmıştır. Deneylerimizde, leptinin oksidoredüktazlardan GPx'i artırıcı yönde, TR'ı ise azaltıcı yönde etkili olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak; bulgularımız stresin, oksidan ve antioksidan dengeyi etkilediğini gösteren çalışmaları desteklemektedir. Ancak, leptinin antioksidan etki oluşturarak, karaciğer enzim sistemleri üzerine koruyucu etkisi olabileceğini gösterebilmek amacıyla daha ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Çıkar Çatışması: Yazarların herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Kaynaklar

- [1] Gaja A, Chury Z, Pecan L, Frakova H, Jandakova E, *et al.* Bone marrow and peripheral blood leptin levels in lymphoproliferative diseases-relation to the bone marrow fat and infiltration. *Neoplasma* 2000; 47(5):307-12.
- [2] Thomas T, Burguera B, Melton LJ, Atkinson EJ, O'Fallon WM, *et al.* Role of serum leptin, insulin and estrogen levels as potential mediators of the relationship between fat mass bone mineral density in men versus women. *Bone* 2001; 29(2):114-20.
- [3] Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1990; 68(7-8):989-98.
- [4] Zaidi SM, Al-Qirim TM, Banu N. Effects of antioxidant vitamins on glutathione depletion and lipid peroxidation induced by restraint stress in the rat liver. *Drugs R D* 2005; 6(3):157-65.
- [5] Mileva M, Bakalova R, Tancheva L, Galabov AS. Effect of immobilization, cold and cold-restraint stress on liver monooxygenase activity and lipid peroxidation of influenza virus-infected mice. *Arch Toxicol* 2002; 76(2):96-103.
- [6] Kaushik S, Kaur J. Chronic cold exposure affects the antioxidant defense system in various rat tissues. *Clin Chim Acta* 2003; 333(1):69-77.
- [7] Micutkova L, Kiss A, Filipenko M, Rychkova N, Krizanova O, *et al.* Gene expression of catecholamine synthesizing enzymes in A5 cell group and modulation of tyrosine hydroxylase mRNA by immobilization stress. *Endocr Regul* 2001; 35(4):195-200.
- [8] Brzozowski T, Konturek PC, Pajdo R, Kwiecien S, Ptak A, *et al.* Brain-dut axis in gastroprotection by leptin and cholecystokinin ischemia-reperfusion induced gastric lesions. *J Physiol Pharmacol* 2001; 52(4):583-602.
- [9] Sailaja JB, Balasubramaniyan V, Nalini N. Effect of exogenous leptin administration on high fat diet induced oxidative stress. *Pharmazie* 2004; 59 (6):475-9.
- [10] Ercan S, Özer C, Taş M, Erdoğan D, Babül A. Effects of leptin on stress-induced changes of caspases in rat gastric mucosa. *J Gastroenterol* 2007; 42(6):461-68.
- [11] Konturek PC, Brzozowski T, Sulekova Z, Brzozowska I, Duda A, *et al.* Role of leptin in ulcer healing. *Eur J Pharmacol* 2001; 414(1):87-97.
- [12] Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70(1):158-69.
- [13] Holmgren A. Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* 1995; 3(3):239-43.
- [14] Hill KE, Mc Collum GW, Boeglin ME, Burk RF. Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234(2):293-5.
- [15] Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34(3):497-500.
- [16] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1):265-75.
- [17] Balasubramaniyan V, Kalaivani Sailaja J, Nalini N. Role of leptin on alcohol-induced oxidative stress in Swiss mice. *Pharmacol Res* 2003; 47(3):211-6.
- [18] Kutlu S, Canpolat S, Aydın M, Yaşar A, Tuzcu M, *et al.* Exogenous leptin increases lipid peroxidation in the mouse brain. *Tohoku J Exp Med* 2005; 206(3):233-6.
- [19] Cabesaz H, Raposo RR, Melendez-Hevia E. Activity and metabolic roles of the pentose phosphate cycle in several rat tissues. *Mol Cell Biochem* 1999; 201(1-2):57-63.
- [20] Shustanova TA, Bondarenko TI, Miliutina NP. Free radical mechanism of the cold stress development in rats. *Russ Fiziol Zh Im IM Sechenova* 2004; 90(1):73-82
- [21] Becker K, Gromer S, Schirmer RH, Müller S. Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. *Eur J Biochem* 2000; 267(20):6118-25.
- [22] Arner ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 2000; 267(20):6102-9.
- [23] Bjornstedt M, Hamberg M, Kumar S, Holmgren A. Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocysteine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. *J Biol Chem* 1995; 270(20):11761-64.
- [24] Fujiwara N, Fujii T, Fujii J, Taniguchi N. Functional expression of rat thioredoxin reductase: selenocysteine insertion sequence element is essential for the active enzyme. *Biochem J* 1999; 340(2):439-44.
- [25] Berggren MM, Mangin JF, Gasdaka JR, Powis G. Effect of selenium on rat thioredoxin reductase activity. *Biochem Pharmacol* 1999; 57(2):187-93.
- [26] Akhlaya MY, Platonov AG, Baizhumano AA. Short-term cold exposure improves antioxidant status and general resistance of animals. *Bull Exp Biol Med* 2006; 141(1):26-9.
- [27] Şahin E, Gümüşlü S. Stress dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant in peripheral tissues of rats: comparison of three stress models (immobilization-cold). *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34(5-6):425-31.
- [28] Özer Ç, Ercan S, Babül A, Ercan ZS. Effects of systemic leptin administration on liver and plasma lipid peroxidation in cold restraint stress. *Turk J Biochem* 2009; 34(1):32-8.
- [29] Yüksel S, Asma D. Effects of extended cold exposure on antioxidant defense system of rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Therm Biol* 2006; 31:313-7.
- [30] Svititz WI, Fink BD, Morgan DA, Fox JM, Donohoue PA, *et al.* Sympathetic inhibition, leptin and uncoupling protein subtype expression in normal fasting rats. *Am J Physiol* 1999; 277(4):E668-E677.
- [31] Sandoval DA, Davis SN. Leptin: metabolic control and regulation. *J Diabetes Complications* 2003; 17(2):108-13.