

Dietilnitrozamin Verilen Ratlarda Alfa Lipoik Asidin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

Investigation of the Protective Role of α -Lipoic Acid on Rats Given Diethylnitrosamine

E.Gülçin KARACA¹, Nalan BAYŞU SÖZBİLİR²

¹ Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyonkarahisar

² Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya A.D, Afyonkarahisar

ÖZET: Amaç: Çalışmada, dietilnitrozaminin karaciğer üzerindeki toksik etkilerinin belirlenmesi ve bu toksik etkilere bağlı olarak meydana gelebilecek oksidatif strese karşı α -lipoik asidin koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Materyal olarak yaklaşık 3 aylık ve 260±10.5 gr olan 49 adet Sprague- Dawley cinsi erkek rat kullanılmıştır. Ratlar; grup 1 (kontrol), grup 2 (periton içi tek doz 150 mg/kg dietilnitrozamin verilmiş), grup 3 (periton içi tek doz 150 mg/kg dietilnitrozamin ile oral gavajla 14 gün 2 cc/gün zeytinyağı verilmiş), grup 4 (periton içi tek doz 150 mg/kg dietilnitrozamin ile oral gavajla 7 gün 100 mg/kg/gün α -lipoik asit 2 cc zeytinyağında çözdürülerek verilmiş), grup 5 (periton içi tek doz 150 mg/kg dietilnitrozamin ile oral gavajla 14 gün 100 mg/kg/gün α - lipoik asit 2 cc zeytinyağında çözdürülerek verilmiş), grup 6 (oral gavajla 14 gün 100 mg/kg/gün α -lipoik asit 2 cc zeytinyağında çözdürülerek verilmiş) ve grup 7 (oral gavajla 14 gün 2 cc/gün zeytinyağı verilmiş) olmak üzere yedi eşit gruba ayrılmıştır. Onbeş gün süren uygulamanın sonunda anestezi altında kalplerinden heparinli tüplere kan örnekleri alınmıştır. Alınan kan örneklerinden bir miktarı tam kan olarak ayrılmıştır. Geriye kalan kanlar santrifüj yapılarak plazmaları elde edilmiştir. Tam kanlarda GSH ve MDA tayinleri, plazmalarda AST, ALT, GGT, ALP ve ADA tayinleri yapılmıştır.

Bulgular: Dietilnitrozamin verilen gruplarda kontrol grubuna göre GSH düzeylerinde belirgin düşme, MDA, AST, ALT, GGT, ALP ve ADA düzeylerinde belirgin yükselme tespit edilmiştir. Dietilnitrozamin ile beraber α -lipoik asit verilen gruplarda GSH düzeylerinde yükselme, MDA, AST, ALT, GGT, ALP ve ADA düzeylerinde düşme tespit edilmiştir.

Sonuç: Alfa lipoik asidin hem 7 gün hem de 14 gün verilmesinin koruyucu olduğu, ancak 14 gün kullanımının 7 gün kullanımına göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: α -Lipoik asit, Dietilnitrozamin, Karaciğer fonksiyon testleri, Malondialdehit, Redükte glutatyon .

ABSTRACT: Intention: This study aimed to determine toxic effects of diethylnitrosamine on liver and to investigate the protective effect of α -lipoic acid to oxidative stress related with the toxic effects of diethylnitrosamine.

Material and method: As material, nearly 3 month old 260±10.5 gr, 49 Sprague-Dawley kind male rats have been used. The rats were equally divided into seven groups, group 1 (control), group 2 (intraperitoneally one dose of 150 mg/kg diethylnitrosamine has been given), group 3 (intraperitoneally one dose of 150 mg/kg diethylnitrosamine and 2 cc. olive oil with oral gavaj from 14 days has been given), group 4 (intraperitoneally one dose of 150 mg/kg diethylnitrosamine and with oral gavaj 100 mg/kg/day α -lipoic acid by solving it in 2 cc. olive oil for 7 days has been given), group 5 (intraperitoneally one dose of 150 mg/kg diethylnitrosamine and with oral gavaj 100 mg/kg/day α -lipoic acid by solving it in 2 cc. olive oil for 14 days has been given), group 6 (with oral gavaj 100 mg/kg/day α -lipoic acid by solving it in 2 cc. olive oil for 14 days has been given)and group 7 (with oral gavaj 2 cc. olive oil for 14 days has been given each day). At the end of the 15 days study under anesthesia, blood samples were taken from their hearts which anesthesia to the heparin tubes. Some quantity of the blood samples were kept as whole blood. The rest of the whole bloods were centrifugal, and their plasmas were gained. In the whole blood, GSH and MDA classifications, in the plasmas AST, ALT, GGT, ALP and ADA classifications have been conducted.

Findings: Compared to the control group, in the group given diethylnitrosamine a considerable decrease has been identified in the GSH level and the considerable increase in MDA, AST, ALT, GGT, ALP and ADA levels have been identified.

Result: It is identified that giving α - lipoic acid for both 7 and 14 days are protective, but 14 days of usage is more effective than 7 days of usage.

Key Words: α -Lipoic acid, Diethylnitrosamine, Liver function tests, Malondialdehyde, Reduced glutathione.

GİRİŞ

Alfa lipoik asit bazı yiyeceklerde bulunan ve aynı zamanda vücutta sentezlenen doğal bir maddedir. İnsanlarda lipoik asit enerji oluşumunu içeren çeşitli 2-oksoasit dehidrogenazların bir parçasıdır (1). Okside lipoik asit ve redükte lipoik asit olarak 2 formu bulunmaktadır. Redükte lipoik aside dihidrolipoik asit de denmektedir (2). Dihidrolipoik asit biyolojik olarak daha aktiftir (3). Lipoik asit mitokondride oktanoik asit ve bir sülfür kaynağından sentez edilmektedir (4). Lipoik asit oral verildiğinde %93'den fazlası barsaktan emilir, karaciğerde metabolizmayla %20-30 ilk geçiş etkisine uğrar (5). α - Lipoik asidin insanlardaki primer metabolik yolu S-metilasyon β -oksidasyondur (6). Lipoik asit açıl taşıyıcı olup iki elektron taşımakla görevlidir. α - ketoglutarat dehidrogenaz ile pirüvat dehidrogenaz enzim kompleksleri içinde bulunur (7). Lipoik asit pirüvatın oksidatif dekarboksilasyonunda koenzim olarak görev yapmaktadır (8). Lipoik asidin serbest radikal hasarını uzaklaştıran vitamin E ve vitamin C'nin rejenerasyonunu sağladığı gösterilmiştir (9). Lipoik asidin etkileri; **1)** Serbest radikalleri uzaklaştırmak, **2)** Metal şalazyon, **3)** Antioksidan rejenerasyon, **4)** Moleküler hasar onarımı, **5)** Glikasyon yolu ile yaşlanmayı azaltır, **6)** Doğal enerji verici olarak özetlenebilir.

Nitrozaminler oldukça tanınmış karsinojenik bileşiklerdir. Dietilnitrozamin (DEN) hepatik karsinomaya neden olan bir nitrozamin bileşimidir. DEN ile tümör gelişimi ve erken aşamalarda serbest radikal oluşumu arasındaki klinik belirginlik dikkat çekicidir (10).

Bu bilgilerin ışığında DEN'in yarattığı toksik etkilerin güçlü bir antioksidan olan α -lipoik asitle engellenebileceği düşünülmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Grupları: Çalışmada ortalama 3 aylık ve 260 ± 10.5 gr olan 49 adet Sprague- Dawley cinsi erkek rat kullanılmıştır. Ratlar, oda ısısı $20-22$ °C olan, havalandırılmalı, nem ve ışık kontrollü (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık) bir odada barındırılmıştır. Tüm hayvanlara ticari rat yemi ve su kısıtlama yapılmadan verilmiştir.

Deneye başlamadan önce ratların genel muayeneleri yapılmış ve her grupta 7 rat olacak şekilde 7 gruba ayrılmıştır. Bir hafta adaptasyon süresi bekledikten sonra deneye başlanmıştır. Deney çalışmaları her gün saat 17.⁰⁰ ile 18.⁰⁰ saatleri arasında yapılmıştır. Dietilnitrozaminin toksik etkileri 3-24 saat

içinde başladığı için lipoik asit uygulamaları DEN uygulanmasından 24 saat sonra yapılmıştır.

Grup 1 kontrol grubu olarak düzenlenmiştir.

Grup 2'deki ratlara tek doz 150 mg/kg DEN intraperitoneal verilmiştir.

Grup 3'deki ratlara tek doz 150 mg/kg DEN intraperitoneal ve DEN verilmesinden 24 saat sonra başlamak üzere, 14 gün, 2 cc/gün zeytinyağı oral gavaj yoluyla verilmiştir.

Grup 4'deki ratlara tek doz 150 mg/kg DEN intraperitoneal ve DEN verilmesinden 24 saat sonra başlamak üzere, 7 gün, α - Lipoik asit 100 mg/kg/gün dozunda 2 cc zeytinyağında çözülürerek oral gavaj yoluyla verilmiştir.

Grup 5'deki ratlara tek doz 150 mg/kg DEN intraperitoneal ve DEN verilmesinden 24 saat sonra başlamak üzere, 14 gün, α - Lipoik asit 100 mg/kg/gün dozunda 2 cc zeytinyağında çözülürerek oral gavaj yoluyla verilmiştir.

Grup 6'daki ratlara, grup 3,4 ve 5'deki ratlara yapılan uygulamayla aynı zamanda başlanarak 14 gün, α - Lipoik asit 100 mg/kg/gün dozunda 2 cc zeytinyağında çözülürerek oral gavaj yoluyla verilmiştir.

Grup 7'deki ratlara, grup 3,4,5 ve 6'daki ratlara yapılan uygulamayla aynı zamanda başlanarak 14 gün, 2 cc/gün zeytinyağı oral gavaj yoluyla verilmiştir.

On beş gün süren uygulama sonunda 50 mg/kg Ketamin HCl+10 mg/kg Ksilazin HCl enjeksiyonu ile anestezi altında enjektörle deneklerin kalplerine girilerek heparinli tüplere kan örnekleri alınmıştır. Alınan kan örneklerinden bir kısmı redükte glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA) düzeylerinin saptanması amacıyla hiçbir işleme tabi tutulmadan tam kan olarak ayrılmıştır. Geriye kalan kan örneklerinden aspartataminotransferaz (AST), alaninaminotransferaz (ALT), alkalenfosfataz (ALP), gama glutamiltransferaz (GGT) ve adenozeaminaz (ADA) parametrelerinin ölçülmesi için santrifüjleme işlemiyle plazma elde edilmiş, numuneler ölçümleri yapılmaya kadar -20 °C' de derin dondurucuda saklanmıştır. GSH ve MDA analizleri Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya laboratuvarında; AST, ALT, ALP, GGT ve ADA analizleri Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarında çalışılmıştır.

GSH Analizi: Beutler ve ark.'nın bildirdiği yöntemle yapılmıştır. Bu yöntemde etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)'li kanın distile su ile hazırlanan hemolizinde, sülfidril (SH) taşımayan tüm proteinler çöktürülmekte elde edilen berrak sıvıda sülfidril gruplarının 5-5'-(2-ditiobis)nitrobenzoik

asit (DTNB) ile reaksiyonu sonucu oluşan sarı renkli kompleks, 412 nm dalga boyunda kolorimetrik olarak ölçülmektedir. EDTA'lı tam kandan 200 μ l alındı. Üzerine 1,8 ml distile su eklendi, hemoliz gerçekleştirildi. 3 ml çöktürücü çözelti ile hemolizat karıştırıldı. 5 dakika bekleme sonrası, karışım watman süzgeç kağıdından (N.42) süzüldü. Örnek numuneden elde edilen süpernatantın 2 ml'si başka tüpe aktarıldı. Üzerine 8 ml fosfat çözeltisi, 1 ml DTNB ayırıcı eklendi. Blank için 2 ml çöktürücü çözelti (3 kısım çöktürücü çözelti+ 2 kısım distile su), 8 ml fosfat çözeltisi ve 1 ml DTNB ayırıcı tüpe alınarak hazırlandı. Standart için, 40 mg GSH çözeltisi taze olarak hazırlandı. Spektrofotometrede 412 nm'de blanka karşı standart numunelerin optik dansiteleri okundu. Sonuçlar mg/dl tam kan olarak hesaplandı. Eritrositte GSH miktarı tayini için; hematokrit değeri ölçüldü ve tam kandaki GSH miktarı, hematokrit değere bölünerek bulundu (11).

MDA Analizi: Draper ve Hadley'in çift kaynatma yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Metot, yağ asitlerinin peroksidasyonunda bir son ürün olan MDA'nın, tribarbitirik asit (TBA) ile reaksiyona girerek 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümde maksimum absorbans vermesi prensibine dayanmaktadır. Tam kan örneklerinden alınan 0,5 ml numune, 2,5 ml. %10'luk trikarboksilik asit (TCA) ile temiz vida kapaklı deney tüpünde karıştırılarak 95°C'de 15 dakika kaynatılmıştır. Daha sonra hemen soğutulurak 4°C'de 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatandan 1 ml alınmış ve üzerine %67'lik TBA'dan 0,5 ml eklenerek 15 dakika kaynatılmış ve hemen soğutulmuştur. Soğutmaya takiben en geç 45 dakika içerisinde, Shimadzu UV-1601 marka spektrofotometrede, 532 nm dalga boyunda distile suya karşı absorbans değeri okunarak,

elde edilen değerler dilüsyon katsayısı ile çarpılmış ve nanomol/ml biriminde MDA miktarı belirlenmiştir (12).

AST, ALT, GGT ve ALP Analizi: Roche firmasına ait Cobas Integra 400 otoanalizöründe Roche firmasına ait kitler kullanılarak çalışılmıştır.

ADA Analizi: Roche firmasına ait Modular P otoanalizöründe Diazyme firmasına ait kit adapte edilerek çalışılmıştır.

İstatistiksel Analizler: Bu çalışmada istatistiksel analizler olarak 'SPSS 13.0 istatistik paket programı' kullanılarak ANOVA ve DUNCAN testleri uygulanmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel metodlar; ortalama, standart hata, minimum ve maksimum değerler kullanılmıştır.

BULGULAR

Grupların ağırlık parametresine göre değerlendirilmesinde; kontrol grubuna göre grup 2,3,4 ve 5'de azalma olmuştur, grup 2'deki azalma grup 3,4 ve 5'den daha belirgindir.

Grupların MDA parametresine göre değerlendirilmesinde; kontrol grubuna göre grup 2,3,4 ve 5'de yükselme olmuştur, grup 2'deki yükselme grup 3,4 ve 5'den daha fazladır.

Grupların GSH parametresine göre değerlendirilmesinde; kontrol grubuna göre grup 2,3,4 ve 5'de azalma olmuştur, grup 2'deki azalma grup 3,4 ve 5'den daha fazladır.

Grupların AST, ALT, GGT, ALP ve ADA parametrelerine göre değerlendirilmesinde; kontrol grubuna göre grup 2,3,4 ve 5'de artış olmuştur, grup 2'deki artış grup 3,4 ve 5'den daha belirgindir.

Tüm parametrelerin gruplara ait ortalama değerleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: Parametrelerin gruplara ait ortalama değerleri.

	KONTROL $\bar{X} \pm SE$	DEN $\bar{X} \pm SE$	DEN+Yağ $\bar{X} \pm SE$	DEN+LA7 $\bar{X} \pm SE$	DEN+LA14 $\bar{X} \pm SE$	LA $\bar{X} \pm SE$	Yağ $\bar{X} \pm SE$
Ağırlık(gr)	308 \pm 1,25 ef*	186,14 \pm 3,11 a	214,42 \pm 6,72 b	246,14 \pm 4,43 c	282,14 \pm 4,86d	317,57 \pm 2,90 f	299,7 \pm 2,25e
GSH (mg/dl)	38,12 \pm 0,47 d	27,25 \pm 0,74 a	32,37 \pm 0,61 b	34,06 \pm 0,50 bc	35,74 \pm 0,28 cd	43,36 \pm 2,19 e	37,21 \pm 0,46d
MDA (nmol/dl)	3,24 \pm 0,07 b	6,48 \pm 0,12 g	5,45 \pm 0,05 f	4,68 \pm 0,06 e	4,24 \pm 0,10 d	2,64 \pm 0,06 a	3,72 \pm 0,05 c

	KONTROL $\bar{X} \pm SE$	DEN $\bar{X} \pm SE$	DEN+Yağ $\bar{X} \pm SE$	DEN+LA7 $\bar{X} \pm SE$	DEN+LA14 $\bar{X} \pm SE$	LA $\bar{X} \pm SE$	Yağ $\bar{X} \pm SE$
AST (IU/l)	106,89±2,30 a	310,30±20,28 e	215,43±3,86 d	177,80±2,62 c	148,41±3,07 b	125,89±2,65 ab	136,9±1,81 b
ALT (IU/l)	45,98±2,11 a	116,96±2,36 g	100,18±2,41 f	86,05±0,67 e	73,07±1,34 d	57,56±0,50 b	64,51±0,56 c
GGT (IU/l)	1,45±0,04 a	8,78±0,52 f	6,39±0,50 e	3,97±0,1 d	3,40±0,07 cd	2,18±0,07 ab	2,79±0,06 bc
ALP (IU/l)	146,45±5,46 a	404,06±24,74 f	307,33±1,28 e	260,39±6,41 d	215,83±3,14 c	177,81±4,88 b	208,9±6,99 c
ADA (U/l)	0,41±0,08 a	19,06±2,45 f	8,89±0,15 e	7,09±0,21 de	5,62±0,12 cd	2,76±0,30 ab	4,03±0,12 bc

*a,b,c,d,e,f,g: Aynı satırda farklı harfler arasında anlamlı farklılık vardır.
P değeri tüm gruplarda 0,000 bulunmuştur (P< 0,001).

TARTIŞMA

Çalışmamızda α - lipoik asit verilen gruplarda, DEN verilen gruba göre karaciğer enzimleri olan AST, ALT, GGT, ALP ve ADA parametrelerinde belirgin azalmalar meydana gelmiştir. Ratta karaciğer tümörü oluşumunda, karsinogen metabolizma süresince oksidatif stresin etkili olduğu bilinmektedir. Lipid peroksidasyon düzeyleri DEN verilmesinden 3 ile 24 saat sonra yükselmektedir (13). Lipoik asit, antioksidan özellikleri ile kanser gelişiminin hızını azaltan bir rol oynayabilir. Lipoik asit aynı zamanda, kanser meydana getirebilecek genetik programa sahip hücreleri durdurma kapasitesine de sahiptir (14). Atakişi ve Özcan (2005), Jia-Liu ve ark. (2005) DEN vererek ratlarda hepatotoksiste oluşturmuşlar, Atakişi ve Özcan omega-3'ün ADA'daki değişiklikleri düzeltmediğini (15), Jia-Liu ve ark. ALT, ALP ve GGT' de meydana gelen yükselmenin antioksidan olan selenyumla zenginleştirilmiş arpa verildiğinde düzeldiğini bildirmişlerdir (16). Malarkodi ve ark.(2004) adriamisinin meydana getirdiği AST ve ALT' daki artışları α - Lipoik asidin 35 mg/kg/gün dozunda düzelttiğini (17), Pari ve Murugavel (2004) klorokinin meydana getirdiği karaciğer toksitesinde α - Lipoik asidin 10, 30 ve 100 mg/kg/gün verilmesiyle, artmış olan AST, ALT ve ALP düzeylerinde azalmalar olduğunu, α - Lipoik asidin 100 mg/kg/gün dozunda 10 ve 30 mg/kg/gün dozuna göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir

(18). Amudha ve ark. (2006) siklosporin verdikleri ratlarda α - Lipoik asidi oral yolla 21 gün vermişler, yüksek olan ALP parametresinde belirgin azalma görmüşlerdir (19). A.C.Maritim ve ark. (2003) streptozotosinle diyabet oluşturulan ratlarda 10 ve 50 mg/kg/gün dozunda α -Lipoik asidi ip. olarak 14 gün vermişler, AST düzeylerinde 10 mg/kg/gün dozunun etkisi olmadığını, buna karşın 50 mg/kg/gün dozunda belirgin azalma olduğunu tespit etmişlerdir (20). Kumar ve ark. (2005) aterosklerotik diyetle besledikleri ratlarda meydana gelen AST, ALT ve ALP' deki anormal yükselmelerin, α -Lipoik asidin 20 mg/kg/gün dozunda oral gavaj yoluyla 16 gün verilmesiyle düzeldiğini bildirmişlerdir (21). E. S. Zacharias ve ark. (2003) ratlarda lipopolisakkaritin meydana getirdiği karaciğer hasarını, α - Lipoik asidin 50 ve 100 mg/kg/gün dozunda ip. yoluyla 3 hafta boyunca verilmesinin önlediğini bulmuşlardır (22).

Çalışmamızda α - Lipoik asit verilen gruplarda DEN verilen gruba göre, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA parametresinde anlamlı azalmalar meydana gelmiştir. Normal fizyolojik durumlarda lipid peroksidasyonu çok küçük miktarlarda bulunur. Serbest radikaller lipidler ile reaksiyona girer ve lipid peroksidasyonuna neden olur. α - Lipoik asit Fenton tip reaksiyon ile oluşan hidroksil radikallerin miktarını azaltmada etkilidir ve aynı zamanda benzer şekilde peroksit ve süperoksit radikallerini de uzaklaştırır (23). Sanchez- Perez ve ark. (2004), Chakraborty ve ark. (2000) tek doz 200 mg/kg ip. ve

Atakişi ve Özcan (2005) tek doz 150 mg/kg ip. DEN vermişler, Atakişi ve Özcan (2005) antioksidan olan omega-3, Chakraborty ve ark. (2000) ise vanadyum vererek MDA seviyelerinde düzelme kaydetmişlerdir (13,15,24) Elangovan S. ve ark.(2006) siklofosfamidin, Amudha ve ark. (2000) siklosporin-A' nın meydana getirdiği değişikliklerde, α - Lipoik asidin 35 mg/kg/gün dozunda ip. ve 20 mg/kg/gün dozunda oral yolla verilmesinin serum MDA düzeylerini azalttığını bulmuşlar, α - Lipoik asidin lipid peroksitde meydana gelen artmayı önemli oranda tersine çevirdiğini tespit etmişlerdir (25,19). Şahin ve ark.(2006) yaptıkları çalışmada rat periferel organlarında kronik stres durumunda, α - Lipoik asidin 100 mg/kg/gün dozunda lipid peroksidasyonunu önlemede etkili olduğunu bildirmişlerdir(26). Arivazhagan ve ark.(1999) yaşlı ratlarda antioksidanlar ve lipid peroksidasyonu üzerinde α - Lipoik asidi 100 mg/kg/gün dozunda ip. olarak 7 ve 14 gün vermişler, lipid peroksit düzeylerinin yaşla birlikte arttığını ve α - Lipoik asit verilmesiyle azaldığını tespit etmişlerdir (23).

Çalışmamızda α - Lipoik asit verilen gruplarda antioksidan kapasitenin göstergesi olan GSH parametresinde anlamlı yükselmeler tespit edilmiştir. Enzimatik antioksidan koruyucu sistemler lipid peroksidasyonuna karşı doğal koruyucudur. Glutasyon peroksidaz lipid hidroperoksidin taşınmasında önemli bir rol oynar. Redükte glutasyon ve tüm tiyoller peroksidatif hasarı önler (23). Atakişi ve Özcan (2005) ratlara tek doz 150 mg/kg ip. DEN ve Chakraborty ve ark. (2000) 200 mg/kg ip. DEN vererek yaptıkları çalışmalarda GSH seviyelerinde düşme gözlemlenmişler. Atakişi ve Özcan koruyucu olarak antioksidan omega-3, Chakraborty ve ark. vanadyum vererek GSH seviyelerinde yükselme tespit etmişlerdir (15,24). Malarkodi ve ark. (2004) α -Lipoik asidi 35 mg/kg/gün, Pari ve Murugavel (2004) α - Lipoik asidi 10,30 ve 100 mg/kg/gün kullanmışlar. α - Lipoik asidin, bütün dozlarda meydana gelen toksisitetleri minime indirdiğini, fakat 100 mg/kg/gün dozunun diğerlerine göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (17,18). Elangovan S. ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada, siklofosfamidin rat spermelerinde meydana getirdiği değişikliklerde α -Lipoik asidin 35 mg/kg/gün dozunda ip. verildiğinde GSH düzeylerini yükselttiğini, sperm karakteristiklerinde düzelme meydana getirdiğini bulmuşlardır (25). Sivaprasad ve ark. (2003) ise kurşun toksisitesinde α - Lipoik asit ve dimerkaptosüksinik asit (DMSA)'in kullanımının koruyucu etkileri olduğunu bildirmişlerdir (27). Vedagiri K. ve ark. (2005), S.Shila ve ark.(2006) α - Lipoik asidi 70

mg/kg/gün dozunda vermişler. S.Shila ve ark. α -Lipoik asidin beyin bölgelerinde arsenik düzeylerini düşürdüğünü, Vedagiri K. ve ark. α - Lipoik asidin hem yalnız verildiğinde hem de DMSA ile birlikte verildiğinde arsenik toksikasyonunu hem böbrek hem de karaciğerde azalttığını bulmuşlardır. α -Lipoik asidin bu etkisini redükte formda sülfidril gruplarını koruyabilmesine ve böylece arseniğin proteine bağlanmasını engellemesine dayandırmışlardır. α - Lipoik asidin hidroksil radikallerine karşı oluşan antioksidan aktivitesinin onun şalazyon kapasitesine bağlı olduğu düşünülmektedir (28,29). Şahin ve ark. (2006) kronik stres durumunda rat periferel organlarında α - Lipoik asidin 100 mg/kg/gün dozunda antioksidan enzim aktivitesinde etkili olduğunu bulmuşlardır (26). Amudha ve ark. (2006) ratlarda siklosporin A ile oluşturdukları oksidatif strete α - Lipoik asidin 20 mg/kg/gün dozunda oral yolla 21 günde GSH seviyelerini yükselttiğini bildirmişlerdir (19). A.C. Maritim ve ark. (2003) streptozotosinle diyabet oluşturdukları ratlarda ip. olarak ve 14 gün verdikleri α - Lipoik asidin 10 mg/kg/gün dozunda GSH seviyelerini değiştiremediğini, 50 mg/kg/gün dozunda ise GSH seviyelerini düşürdüğünü göstermişlerdir (20).

Çalışmamızda, α - Lipoik asit verilen gruplarda DEN verilen gruplara göre ratların ağırlıklarında belirgin artış tespit edilmiştir. Yaptığımız bu çalışmada, DEN verilmesinin ardından vücut ağırlığındaki azalmalar, Atakişi ve Özcan'ın (15) çalışmasıyla benzerlik göstermektedir. Bu durumun verilen maddenin toksik etkisinden dolayı meydana gelen iştahsızlık nedeniyle gıda alımının azalmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. D.R.Cremer ve ark. (2006) 2 yıl süren çalışmalarında ratlara oral yolla 20, 60, 180 mg/kg/gün α - Lipoik asit vermişler, 20 veya 60 mg/kg/gün α - Lipoik asit verdikleri ratlarla kontrol grubundaki ratlar arasında vücut ağırlığı, yiyecek alımı, davranışlar, hematolojik ve biyokimyasal parametreler ve histolojik bulgular arasında farklılık olmadığı halde, 180 mg/kg/gün dozunda α -Lipoik asit verilen ratlarda yiyecek alımında azalma ve vücut ağırlıklarında düşme bulmuşlardır. Araştırmacılar α - Lipoik asidin hipotalamik ATP'nin aktive ettiği protein kinazı (AMPK) baskıladığını göstermişlerdir. AMPK, hücresel enerji tükendiği zaman aktifleşir ve hücrede bir yakıt algılayıcı gibi hareket eder. Hipotalamik AMPK enerji harcanması ve yiyecek alımının düzenlenmesinde önemlidir. Onun baskılanması yiyecek alımını azaltır ve aynı zamanda enerji harcanmasını artırır. Uzmanlar bu çalışmada leptin sinyal yolundan bağımsız etki gözlediklerini belirtmişlerdir (5). α - Lipoik asidin 180

mg/kg/gün gibi yüksek dozda verilmesinin prooksidan aktivite meydana getirebileceği, bu nedenle vücut ağırlığında azalmalar meydana gelebileceği düşünülmüştür. Yapılan bu çalışmada kullandığımız 100 mg/kg/gün dozunda böyle bir etki görülmemiştir.

Yapılan bu çalışmada, tek doz 150 mg/kg ip. DEN verilerek ratlarda oksidatif stres ve hepatotoksisite oluşturmak amaçlanmıştır; DEN verilen ratlarda karaciğer enzimleri olan AST, ALT, ALP, GGT ve ADA parametrelerinde artma; lipid peroksidasyon ürünü olan MDA parametresinde artma; antioksidan kapasitenin göstergesi olan GSH parametresinde ve vücut ağırlıklarında azalma tespit edilmiştir. Bu verilere dayanarak DEN'in oksidatif stresi arttırdığı ve hepatotoksisite meydana getirdiği teyit edilmiştir. α - Lipoik asit 100 mg/kg/gün dozunda 7 ve 14 gün oral gavaj yoluyla verilmiş, DEN'in meydana getirdiği toksik değişikliklere etkisine bakılmış, yükselmiş olan MDA, AST, ALT, GGT, ALP ve ADA parametrelerinde belirgin azalma, azalmış olan GSH parametresinde belirgin artma tespit edilmiştir. α - Lipoik asit verilen ratların vücut ağırlıklarında da artma görülmüştür. α - Lipoik asidin 14 gün verilmesinin 7 gün verilmesinden daha etkili olduğu anlaşılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 06.VF.02 proje numarası ile desteklenmiş olup aynı adlı doktora tezinden özetlenmiştir. Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu'nun 20-06- referans no ve 040 sayılı izni ile yapılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Kramer K. Nutra ceutials in Heath and Disease Prevention. Marcel Dekker Incorporated. New York, 2001; 8: 113.
2. Yasuno R, Wada H. The biosynthetic pathway for lipoic acid is present in plastids and mitochondria in arabidopsis Thaliana. FEBS Lett, 2002; 517: 110-114.
3. Bullock M.W, Brockmann J.A, Patterson E.L, Pierce J.V, Macchi M.E. Proposed structures for protogen-A and protogen-B.J. Am. Chem Soc, 1954; 76: 1827-1828.
4. Perham R.N. Domains, motifs and linkers in 2-oxo-acid dehydrogenase multienzyme complexes: a paradigm in the desing of a multifunctional protein. Biochemistry, 1991; 30: 8501-8512.
5. Cremer D.R, Rabeler R, Roberts A, Lynch B. Safety evaluation of α -lipoic acid (ALA). Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2006; 46(1): 29-41.
6. Teichert J, Hermann R, Ruus P, Preiss R. Plasma kinetics, metabolism and urinary excretion of alpha-lipoic acid following oral administration in healthy volunteers. J. Clin Pharmacol. Nov, 2003; 43(11): 1257-67.
7. Ersoy E, Bayşu N. Biyokimya. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, Ankara, 1986: 454.
8. Gözükara E.M. Biyokimya. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi yayınları, Malatya, 1989: 55,56,705,845-848.
9. Liu J, Atamna H, Kuratsune H, Ames B.N. Delaying brain mitochondrial decay and aging with mitochondrial antioxidants and metabolites. Ann NY Acad. Sci, 2002; 959: 133-166.
10. Ken-ichi Y, Ikvo Y, Hideo U. Invivo detection of free radicals induced by diethylnitrosamine in rat liver tissue. Free Radic Biol Med, 2006; 40(11): 2040-2046.
11. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. J. Lab. Clin. Med, 1963: 61,882-888.
12. Draper H.H, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol, 1990; 186: 421-30.
13. Yesennia S, Claudia C.L, Claudia G.C, Julio P.C, Sergio H.G, Martha S.N, Leticia A.L, Saul V.T. Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. Cancer letters, 2005; 217: 25-32.
14. Shih J.C.H. Atherosclerosis in Japonese quail and the effect of lipoic acid. Fed. Proc, 1983; 42: 2494-2497.
15. Atakişi E, Özcan A. Dietilnitrozamin verilen ratlarda omega-3 yağ asitlerinden zengin balık yağının koruyucu etkilerinin araştırılması. Türk Biyokimya Dergisi, 2005; 30(4): 279-284.
16. Jia-Guo L, Hong-Jin Z, Yan- Juan L, Xiao- Long W. Effect of selenium-enriched malt on hepatocarcinogenesis, paraneoplastic syndrome and the hormones regulating blood glucose in rats treated by diethylnitrosamine. Life Sciences, 2005; 78(20): 2315-2321.
17. Malarkodi KP, Sivaprasad R, Varalakshmi P. Effect of lipoic acid on the oxidoreductive status of red blood cells in rats subject to oxidative stress by chronic administration of adriamycin. Hum. Exp. Toxicol, 2004; 23(3): 129-135.
18. Pari L, Murugavel P. Protective effect of alpha-lipoic acid against chloroquine -induced hepatotoxicity in rats. J. Appl.Toxicol, 2004; 24(1): 21-26.

19. Amudha G, Josephine A, Varalakshmi P. Role of lipoic acid in reducing the oxidative stress induced by cyclosporine A. *Clinica Chimica Acta*, 2006; 372(1,2): 134-139.
20. Maritim A.C, Sanders R.A, Watkins J.B. Effects of α -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2003; 14: 288-294.
21. Kumar S.A, Sudhakar V, Varalakshmi P. Protective role of eicosapentaenoate-lipoate (EPA-LA) derivative in combating oxidative hepatocellular injury in hypercholesterolemic atherogenesis. *Atherosclerosis*, 2006; 189(1): 115-122.
22. Zacharias E.S. Prophylaxis against lipopolysaccharide-induced liver injuries by lipoic acid in rats. *Pharmacological Research*, 2003; 48(6): 585-591.
23. Arivazhagan P, Juliet P, Panneerselvam C. Effect of DL- α -lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidants in aged rats. *Pharmacological Research*, 1999; 41:3.
24. Chakraborty A, Selvaraj S, Sudarshan M, Dutta R.K, Ghugre S.S, Chintalapudi S.N. Modulatory role of vanadium on trace element profile in diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 2000; 170(1-2): 156-162.
25. Elangovan S, Chidambaram P, Periyasamy T.S, Palaninathan V. Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm. *Toxicology*, 2006; 217(1): 71-78.
26. Şahin M, Sağdıç G, Elmas O, Akpınar D, Derin N, Aslan M, Ağar A, Alıcıgüzel Y, Yargıçoğlu P. Effect of chronic restraint stress and alpha-lipoic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in rat peripheral organs. *Pharmacological Research*, 2006; 54(3): 247-252.
27. Sivaprasad R, Nagaraj M, Varalakshmi P. Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2003; 31.
28. Vedagiri K, Muthuswamy A.D, Kumarasamy S, Chinnakkannu P. Combined efficacies of DL- α -lipoic acid and meso 2,3 dimercaptosuccinic acid against arsenic induced toxicity in antioxidant systems of rats. *Toxicology Letters*, 2005; 160(1): 1-7.
29. Shila S, Kokilavani V, Subathra M, Panneerselvam C. Brain regional responses in antioxidant system to alpha-lipoic acid in arsenic intoxicated rat. *Toxicology*, 2005; 210(1): 25-36..

