

**AFYONKARAHİSAR KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DIETİLNİTROZAMİN VERİLEN RATLARDA ALFA LİPOİK ASİDİN
KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. E. Gülçin KARACA

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nalan BAYŞU SÖZBİLİR**

Bu tez Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 06.VF.02
Proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 2007-002

2007-AFYONKARAHİSAR

KABUL ve ONAY

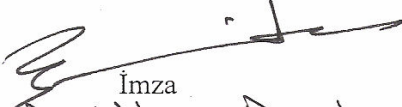
Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Biyokimya Doktora Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunması Tarihi: 12 /03 / 2007


İmza

Prof. Dr. Mehmet Bayazıt

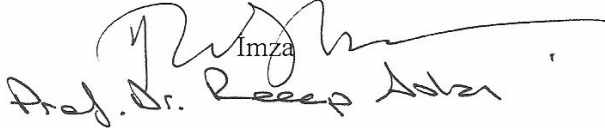
Jüri Başkanı


İmza

Prof. Dr. İlman Dander


İmza

Prof. Dr. Nalan Bayazıt Sözbilir


İmza

Prof. Dr. Recep Akar


İmza

Yrd. Doç. Dr. Gülsan Boz

Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Emine Gülçin KARACA'nın
"Dietilnitrozamin Verilen Ratlarda Alfa Lipoik Asidin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması"
başlıklı tezi 12./03/2007 günü saat 17⁰⁰ da Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Sınav
Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Fevzi Sefa DEREKÖY

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

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

Doktora eğitimim boyunca deneyim ve birikimlerini aktararak eğitimime büyük katkıları olan sayın hocam Prof. Dr. Nalan BAYŞU SÖZBİLİR' e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunuyorum.

Doktora eğitimime başlamada beni yüreklendiren ve her konuda yardımcı olan sayın hocalarım Prof. Dr. Yılmaz DÜNDAR' a ve Prof. Dr. Recep ASLAN' a saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora eğitimimiz boyunca engin bilgi ve tecrübelerini bize aktaran sayın hocam Prof. Dr. Nihat BAYŞU' ya saygı ve şükranlarımı sunuyorum.

Tez deneyleri sırasında bana yardımcı olan doktora arkadaşlarım öğretim görevlisi veteriner hekim İsmail KÜÇÜKKURT ve araştırma görevlisi veteriner hekim Dr. Fatih FİDAN'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Hayatım boyunca desteklerini her zaman yanımda hissettiğim annem ve babam Müjgan ve Hüsnü ORAN' a; her zaman yanımda olan ve onsuz başarılı olamayacağıma inandığım eşim Dr. Hüseyin KARACA' ya; varlıklarıyla bana güç veren çocuklarım Anıl ve Işıl KARACA' ya sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	II
Önsöz.....	III
İçindekiler.....	IV
Kısaltmalar.....	VIII
Şekiller Listesi.....	IX
Tablolar Listesi.....	X
Grafikler Listesi.....	XI
ÖZET	1
SUMMARY	2
1. GİRİŞ	3
1.1. Lipoik Asit Hakkında Genel Bilgiler.....	4
1.1.1. Lipoik Asidin Tarihçesi.....	4
1.1.2. Lipoik Asidin Bulunduğu Yerler.....	4
1.1.3. Lipoik Asidin Yapısı.....	5
1.1.4. Lipoik Asidin Formları.....	5
1.1.5. Lipoik Asidin Biyosentezi.....	8
1.1.6. Lipoik Asidin Taşınması.....	9
1.1.7. Lipoik Asidin Metabolizması.....	9
1.1.8. Lipoik Asidin Görevi.....	11
1.1.9. Lipoik Asidin Etki Mekanizması.....	14
1.1.9.1. Mitokondri.....	15
1.1.9.2. Serbest radikaller.....	16
1.1.9.3. Antioksidanlar.....	17
1.1.9.4. Glutatyon.....	18
1.1.10. Lipoik Asidin Antioksidan Aktivitesi.....	19
1.1.11. Lipoik Asidin Etkileri.....	23
1.1.11.1. Serbest Radikalleri Uzaklaştırmak.....	23
1.1.11.2. Metal Kelasyon.....	23
1.1.11.3. Antioksidan Rejenerasyon.....	23
1.1.11.4. Moleküler Hasar Onarımı.....	24
1.1.11.5. Lipoik Asit ile Glikasyondan Yaşlanmanın Azalması.....	24
1.1.11.6. Lipoik Asit Doğal Enerji Verici.....	24
1.1.12. Lipoik Asidin Klinikte Kullanımı.....	24
1.1.12.1. Ateroskleroza Karşı Koruyucu Etkisi.....	24

1.1.12.2. Katarakta Karşı Koruyucu Etkisi.....	25
1.1.12.3. Radyasyona Karşı Koruyucu Etkisi.....	25
1.1.12.4. AIDS Tedavisindeki Etkisi.....	25
1.1.12.5. Hafıza ve Beyin Fonksiyonlarına Etkisi.....	26
1.1.12.6. İnme ve Kalp Krizinde Etkileri.....	27
1.1.12.7. Diyabet ve Diyabetik Nöropatinin Tedavisindeki Etkileri.....	27
1.1.12.8. Kansere Karşı Koruyucu Etkileri.....	30
1.1.13. Lipoik Asidin Analizi.....	31
1.1.14. Lipoik Asidin Dozu.....	31
1.1.15. Lipoik Asidin Yan Etkileri.....	32
1.1.16. Lipoik Asidin Yararları.....	32
1.2. Toksik Maddeler.....	33
1.2.1. Toksik Maddelerin Metabolizması.....	33
1.2.1.1. Biyolojik Oksidasyon.....	33
1.2.2. Toksik Etki Mekanizmaları.....	34
1.2.2.1. Kimyasal Karsinogenez.....	34
1.2.2.2. Karsinogenez Mekanizması.....	34
1.2.2.3. Hepatokarsinogenezis.....	35
1.2.2.4. Hepatotoksiklerin Karaciğer Fonksiyonlarına Etkisi.....	35
1.3. Dietilnitrozamin(DEN).....	36
1.4. Adenozindeaminaz(ADA).....	38
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler.....	39
2.2. Deney Grupları.....	39
2.3. GSH Analizi.....	41
2.3.1. Prensiptir.....	41
2.3.2. Ayıraçlar.....	41
2.3.3. Deneyin Yapılışı.....	41
2.4. MDA Analizi.....	42
2.4.1. Prensiptir.....	42
2.4.2. Reaktifler.....	42
2.4.3. Yöntemin Uygulanışı.....	42
2.5. AST, ALT, GGT, ALP Analizi.....	42
2.6. ADA Analizi.....	42
2.7. İstatistiksel Analizler.....	43
3. BULGULAR.....	44

3.1. Ağırlık Parametresi.....	46
3.2. GSH Parametresi.....	47
3.3. MDA Parametresi.....	48
3.4. AST Parametresi.....	49
3.5. ALT Parametresi.....	50
3.6. GGT Parametresi.....	51
3.7. ALP Parametresi.....	52
3.8. ADA Parametresi.....	53
4. TARTIŞMA.....	54
5. SONUÇ.....	60
KAYNAKLAR.....	62

KISALTMALAR

ADA	: Adenozindeaminaz
AGES	: Glikasyon son ürünleri
AİDS	: Kazanılmış immün yetmezlik sendromu
ALA	: Alfa lipoik asit
ALP	: Alkale fosfataz
ALT	: Alanin amino transferaz
AMP	: Adenozinmonofosfat
AMPK	: Adenozinmonofosfat protein kinaz
AST	: Aspartat amino transferaz
ATP	: Adenozintrifosfat
Cd	: Kadmiyum
CO ₂	: Karbondioksit
CRLA	: Kontrollü salınan lipoik asit
Cu	: Bakır
DEN	: Dietilnitrozamin
DHLA	: Dihidrolipoik asit
DM	: Diyabetes mellitus
DMSA	: Dimerkaptosüksinik asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DTNB	: 5,5'- (2-ditiobisnitrobenzoik asit)
EDTA	: Disodyum etilen diamin tetraasetik asit
FAD	: Flavin adenin dinükleotid (okside)
FADH ₂	: Flavin adenin dinükleotid (indirgenmiş)
Fe	: Demir
GC	: Gaz kromatografisi
GC-MS	: Gaz kromatografisi kütle spektrometresi
GGT	: Gamaglutamiltransferaz
GSH	: Redükte glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutatyon
H ₂ O	: Su
HIV	: İnsan immün yetmezlik virüsü
HPLC	: Yüksek performans sıvı kromatografisi

VIII

İp	: İntraperitoneal
LA	: Lipoik asit
LAP	: Alfa lipoik asit plus
LDL	: Düşük dansiteli lipoproteinler
LM	: Alfa lipoamid
MDA	: Malondialdehit
NAD ⁺	: Nikotinamiddinükleotid (okside)
NADH	: Nikotinamiddinükleotid (redükte)
NADPH	: Nikotinamiddinükleotid fosfat (redükte)
NSAI	: Nonsteroid antienflamatuar
O ₂	: Oksijen
ORLA	: Hızlı salınan lipoik asit
PDH	: Pirüvatdehidrogenaz
ROS	: Serbest oksijen ürünleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TCA	: Trikarboksilik asit
UDP	: Üridindifosfat
UV	: Ultraviyole
8-OHdG	: 8 hidroksi 2' deoksiguanozin

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Alfa lipoik asit.....	5
Şekil 2: Lipoik asit ve dihidrolipoik asidin kimyasal yapısı.....	5
Şekil 3: Okside lipoik asit ve dihidrolipoik asit.....	6
Şekil 4: Alfa lipoik asidin R ve S formları.....	7
Şekil 5: Lipoik asit biyosentezi.....	9
Şekil 6: Antioksidan rejenerasyon yolu.....	14
Şekil 7: Mitokondri.....	15
Şekil 8: Lipoik asit hücresele glutatyon düzeylerini yükseltir.....	19
Şekil 9: R-lipoik asit ve dihidrolipoik asidin antioksidan etkisi.....	20
Şekil 10: Lipid peroksit serbest radikallerinin uzaklaştırılmasında vitamin E, vitamin C ve dihidrolipoik asidin etkileşimi.....	21
Şekil 11: Sistein biyoyararlanımında artma ile hücresele glutatyon biyosentezinin lipoata bağılı düzenlenmesinde ve α -lipoik asidin dihidrolipoik aside biyoredüksiyonu için hücresele yollar.....	21
Şekil 12: Dihidrolipoik asit- lipoik asit redoks çiftinin birçok alandaki etkileri.....	23
Şekil 13: Diyabet ve prediyabetik durumlarda oksidatif stresin etkisinin potansiyel alanları.....	28
Şekil 14: Diyabetin geç komplikasyonlarının gelişim mekanizması.....	29
Şekil 15: Oksidatif stresin indüklediği insülin direncine karşı lipoik asidin koruyucu etkileri.....	30

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1: Çeşitli kaynakların lipoillisin içerikleri.....	4
Tablo 2: Sık karşılaşılan radikaller, simgeler ve kimlikleri.....	17
Tablo 3: Antioksidanlar ve reaksiyonları.....	18
Tablo 4: Parametrelerin gruplara ait ortalama değerleri.....	45

GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 1: Grupların ağırlık grafiklendirilmesi.....	46
Grafik 2: Grupların GSH grafiklendirilmesi.....	47
Grafik 3: Grupların MDA grafiklendirilmesi.....	48
Grafik 4: Grupların AST grafiklendirilmesi.....	49
Grafik 5: Grupların ALT grafiklendirilmesi.....	50
Grafik 6: Grupların GGT grafiklendirilmesi.....	51
Grafik 7: Grupların ALP grafiklendirilmesi.....	52
Grafik 8: Grupların ADA grafiklendirilmesi.....	53

ÖZET

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.

Materyal olarak yaklaşık 3 aylık ve 260 ± 10.5 gr olan 49 adet Sprague- Dawley cinsi erkek rat kullanılmıştır. Ratlar; grup1(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 serumları elde edilmiştir. Tam kanlarda GSH ve MDA tayinleri, serumlarda AST, ALT, GGT, ALP ve ADA tayinleri yapılmıştır.

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. α - 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.

Sonuç olarak dietilnitrozaminin toksik etkilerine bağlı olarak oksidatif stresi arttırabileceği, α -lipoik asidin ise meydana gelen bu strese karşı lipid peroksidasyonunu önleyerek, redükte glutatyon gibi antioksidan moleküllerin miktarını arttırarak ve bir serbest radikal temizleyicisi gibi rol oynayarak koruyucu etki yapabileceği kanaatine varılmıştır. Buna dayanarak alkol, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, ağır metal zehirlenmeleri, viral hepatitler ve kanser gibi nedenlerle meydana gelmiş olan karaciğer hasarlarında tedavi amacıyla kullanılabilirliği düşünülmektedir. Ayrıca, ilaçların pek çoğu karaciğerden metabolize olduğundan uzun süre ilaç kullanılması gereken kronik hastalıklarda da koruyucu amaçlı olarak verilmesinin uygun olabileceği kanaatine varılmıştır.

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

SUMMARY

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.

As material, nearly 3 month old 260 ± 10.5 gr, 49 Spraque-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 gavage from 14 days has been given), group 4 (intraperitoneally one dose of 150 mg/kg diethylnitrosamine and with oral gavage 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 gavage 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 gavage 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 gavage 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 blood were centrifugal, and their serums were gained. In the whole blood, GSH and MDA classifications, in the serums AST, ALT, GGT, ALP and ADA classifications have been conducted.

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. 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.

As a result it has been deduced that diethylnitrosamine depending on the toxic effects can enhance the oxidative stress, but α -lipoic acid prevents the lipid peroxidation occurred against the stress and increases the levels of antioxidant molecules, such as reduced glutathione and it can make a protective effect and playing role like scavenging of free radicals. In terms of this it is thought that it can be used to cure liver injuries because of alcohol, NSAID medicines, heavy metal poisoning, viral hepatitis and cancer. Besides as most of the medicines are metabolised from the liver, it is believed that it can be given as protector to the chronic illnesses that long-term medicines must be used.

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

1. 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 oktanioik 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'yi geri dönüştürdüğü gösterilmiştir(9).

Lipoik asidin etkileri:

- 1- Serbest radikalleri uzaklaştırmak,
- 2- Metal kelasyon,
- 3- Antioksidan rejenerasyon,
- 4- Moleküler hasar onarımı,
- 5- Glikasyondan yaşlanmanın azalması,
- 6- Doğal enerji verici.

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.

1.1. LİPOİK ASİT HAKKINDA GENEL BİLGİLER

1.1.1. Lipoik Asidin Tarihçesi

Lipoik asit(LA) vücutta doğal olarak üretilmesine rağmen araştırmacılar 1930 yılına kadar varlığının farkında değillerdi. 1937 yılında lactobasillusun gelişimi için gerekli olan, growth faktör denen patates ekstratının bir komponenti olarak bulunmuştur(11). 1951 yılında Reed ve arkadaşları karaciğer rezidüsünün 100 kilogramından 30 miligram lipoik asit pürifiye etmişlerdir(12). Takip eden yıllarda moleküler yapı açığa kavuşmuş ve 1,2 ditiyolen-3 pantotenik asit olarak adlandırılmıştır(13,14).

1.1.2. Lipoik Asidin Bulunduğu Yerler

α - lipoik asit(ALA) bazı yiyeceklerde bulunan ve aynı zamanda vücutta sentezlenen doğal bir maddedir. Mitokondriyal kompleksleri bol olan hayvan ve bitki dokularında bol miktarda bulunur.

Bitkiler içinde en fazla lipoik asit içerenler sırasıyla ıspanak,brokoli ve domatesdir. Hayvan dokuları içerisinde en fazla böbrek, kalp ve karaciğerde bulunur(1).

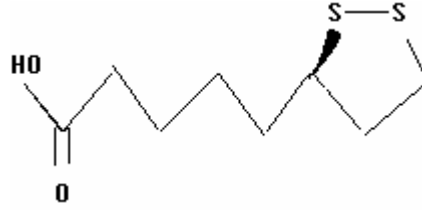
Tablo 1. Çeşitli kaynakların lipoillisin* içerikleri(1).

Kaynak	$\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık
Bezelye	0.39 ± 0.07
Brüksel lahanası	0.39 ± 0.21
Pirinç	0.16 ± 0.02
Yumurta	0.05 ± 0.07
Bira mayası	0.27 ± 0.05
E. coli	8.07
Böbrek	2.64 ± 1.23
Kalp	1.51 ± 0.75
Karaciğer	0.86 ± 0.33
Dalak	0.36 ± 0.08
Beyin	0.27 ± 0.08
Pankreas	0.12 ± 0.05
Akciğer	0.12 ± 0.08
Ispanak	3.15 ± 1.11
Brokoli	0.94 ± 0.25
Domates	0.56 ± 0.23

*Lipoillisin x 0,62 = Lipoik asit.

1.1.3.Lipoik Asidin Yapısı

Lipoik asit; enerji üretimi ve metabolizmada yer alan mitokondriyal enzimlerde bir kofaktör olarak görev yapan, doğal olarak meydana gelen bir bileşiktir(15). Pek çok prokaryotik ve ökaryotik hücre tiplerinde bulunur. İnsanlarda lipoik asit enerji oluşumunu içeren çeşitli 2-oksoasit dehidrogenazların parçasıdır(1). Sekiz karbonlu bir bileşiktir ve ditiyolen halka yapısında iki sülfür atomu içerir(15).



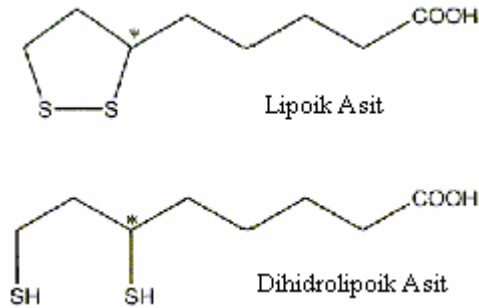
Şekil 1. Alfa Lipoik Asit(5).

1.1.4.Lipoik Asidin Formları

İki formu bulunmaktadır:

1-Okside lipoik asitte 6. ve 8. pozisyonlarda bulunan kükürtler kapalı bir halka meydana getirir.

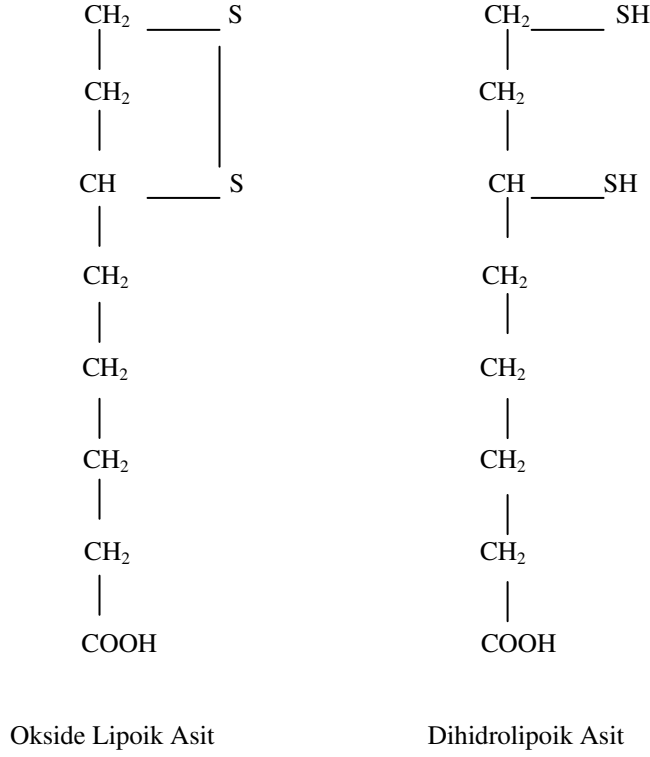
2-Lipoik asidin redükte şekli açık zincir şeklinde olup 6. ve 8. pozisyonunda bulunan kükürtler sülfidril grubu halinde bulunmaktadır. Lipoik asidin redükte şekline dihidrolipoik asit(DHLA) adı verilmektedir(8).



Şekil 2. Lipoik Asit ve Dihidrolipoik Asidin Kimyasal Yapıları(1).

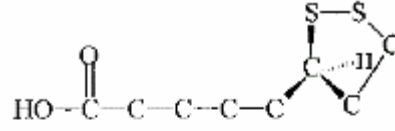
Lipoik asidin bu iki formu oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları ile birbirine dönüşebilmektedir(8). Hem redükte hem de okside formlar biyolojik aktivite

göstermesine rağmen dihidrolipoik asit biyolojik olarak daha aktif form olarak kabul edilmektedir(3).

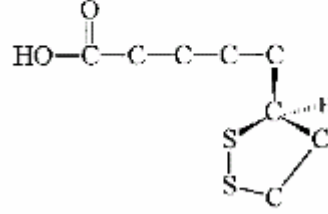


Şekil 3. Okside Lipoik Asit ve Dihidrolipoik Asidin Kimyasal Yapıları(8).

Alfa lipoik asidin R- α lipoik asit ve S- α - lipoik asit olarak iki enantiyomeri vardır. Bu iki form aynı sayı ve pozisyonda atom içerir, fakat moleküllerinde atomlarının farklı düzenlenmelerine sahiptirler. Hem R hem de S formları izomerdir(16). R-enantiyomer S-enantiyomerden 28 defa daha hızlıdır(17). A.B.D. ve Avrupa'daki araştırmacılar sentetik lipoik asit ile çalışırlar, çünkü doğal lipoik asidi elde etmek çok zordur. Sentetik lipoik asit bu iki enantiyomerin yarı yarıya karışımından oluşur(16).



R- Lipoik Asit



S- Lipoik Asit

Şekil 4. Alfa Lipoik Asidin R ve S formlarının Kimyasal Yapıları(15).

Canlı hücrelerde, LA'in potent antioksidan form olan DHLA'e redüksiyonu enzimatik işlemlerle meydana gelir, bu nedenle LA'in stereokimyası belirgin önemli bir rol oynar. LA'i DHLA'e indirgeyen birkaç enzim bildirilmiştir. Bu enzimler LA'in R- enantiyomerine çok spesifik bir enzim olan lipoamid dehidrogenaz; S- enantiyomeri için çok spesifik olan glutasyon redüktaz ve tiyoredoksin redüktazdır. Çeşitli dokularda LA'in DHLA'e redüksiyonu onun antioksidan aktivitesi için kritik işlemdir. Mitokondride NADPH bağımlı glutasyon redüktaz S(-) lipoat stereoizomerine karşı biraz daha fazla afinite gösterirken NADH bağımlı dihidrolipoamid dehidrogenaz R(+) lipoat için göze çarpan bir üstünlük göstermektedir. Rat karaciğer sitozolünde NADPH bağımlı redüksiyon NADH' dan daha çoktur. Rat karaciğer ekstratlarında NADH ve NADPH redüksiyonu eşit iken rat kalp, böbrek ve beyin hücrelerinden hazırlanan çözeltilerde NADH bağımlı redüksiyonun NADPH bağımlı redüksiyondan % 70-90 kadar daha fazla olduğu bildirilmiştir. Bir sağlam organ çalışması izole perfüze rat kalbinde R-LA'in redüksiyonunun S-LA' inkinden 6-8 kez daha fazla olduğunu göstermektedir. Bu bilgi izole kalp mitokondrilerinde yüksek mitokondriyal dihidrolipoamid dehidrogenaz aktivitesiyle uyum halindedir. Diğer taraftan mitokondriden yoksun olan eritrositlerde S indirgenme R-LA' den daha aktiftir. Bu sonuçlar çeşitli doku ve hücrelerde redüksiyon hızında stereospesifik değişiklikler göstermektedir. α - lipoatın indirgenme mekanizmaları doku spesifiktir ve α -lipoatın eksojen olarak verilmesinin

etkileri dihidrolipoamid dehidrogenaz aktivitesi ve doku glutatyon redüktazı ile saptanmaktadır(18).

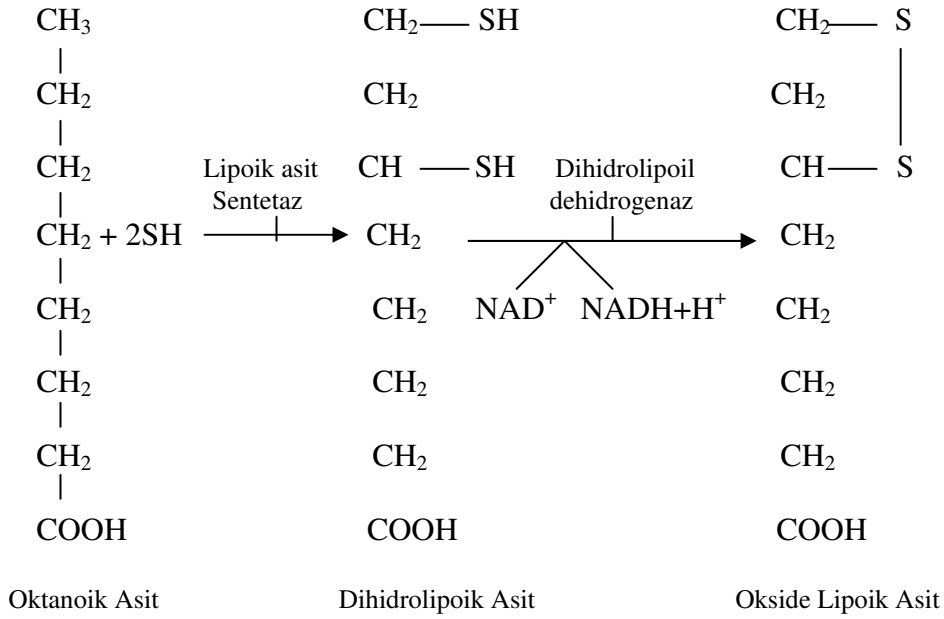
Alfa lipoik asidin her iki formu vücuda verildiği zaman R formunun daha aktif olduğu bulunmuştur. Örneğin Almanya'daki araştırmacılar S formunun izole hücrelerde ATP üretmediğini bildirmişlerdir. Ayrıca R formu membran akıcılığı ve transportunu artırırken S formu akıcılığı azaltma eğilimindedir(19).

LAP (LA'in amin analogu= α -lipoik asit-plus) LM (α -lipoamid) ve LA'den yaklaşık 1000 ve 3000 kez daha etkilidir(20).LA CRLA (controlled-release LA) olarak verildiğinde $T_{max}=1,25$ saattir ve yaklaşık ORLA (quick-release LA) ile karşılaştırıldığında 2,5 kat daha uzundur. CRLA verilmesinden sonra ne karaciğer ne de böbrek fonksiyonlarında ve kan profillerinde değişiklikler veya ciddi yan etki bildirilmiştir(21).

1.1.5. Lipoik Asidin Biyosentezi

Lipoik asit yaygın olarak birçok bitki ve hayvan dokularında olduğu gibi pek çok prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmalarda da meydana gelir(22,23). Lipoik asit bakteriden insana kadar olan tüm organizmalarda sentezlenir. İnsanlarda sentez yeri karaciğer ve diğer dokulardır(24). Ökaryotlarda lipoik asitin biyosentez yolu mitokondride bulunur. Bununla beraber bitkilerde biyosentez yolunun plastidlerde de bulunduğu hipotezi vardır(2).

Lipoik asit mitokondride oktanoik asit ve bir sülfür kaynağından sentezlenmektedir. Lipoik asitteki sekiz karbon birimi oktanoik asitten sağlanmaktadır ve iki karbon sülfür bandlarının oluşumu lipoik aside yol açar. Mitokondriyal β -oksidasyon reaksiyonunun lipoik asit metabolizmasında major rol oynadığı bulunmuş ve 12 metaboliti saptanmıştır. Lipoik aside bağlı dehidrogenazlar hakkında elde edilebilir geniş bilgiler olmasına rağmen bu koenzim biyosentezinde yer alan enzimler hakkında çok az şey bilinmektedir(4).



Şekil 5. Lipoik Asit Biyosentezi(2).

1.1.6. Lipoik Asidin Taşınması

Lipoik asit oral alındığında veya intravenöz kullanıldığında hızla absorbe edilir ve hücre içine girerek burada daha aktif formu olan dihidrolipoik aside indirgenir. Lipoik asidin reuptake'i perfüze rat karaciğeri ve izole hepatositlerde çalışılmıştır. İki ayrı transport mekanizması bildirilmiştir:

1-Taşıyıcılı uptake: 75' µm den daha küçük bir taşıyıcıdır.

2-Pasif difüzyon: Daha yüksek konsantrasyondan geçiş olur(25).

1.1.7. Lipoik Asidin Metabolizması

Lipoik asit oral verildiğinde % 93' den fazlası barsaktan emilir, karaciğerde metabolizmayla % 20-30 ilk geçiş etkisine uğrar. ALA emilmesini takiben 1,2 ditiyolen halkasının indirgenmesiyle DHLA formuna indirgenir, sonradan S-metilasyona uğrayabilir. ALA ve DHLA her ikisi de aynı zamanda β- oksidasyona uğrarlar. Hem ratlarda hem de insanlarda ALA idrarla atılır, ana metaboliti 4,6 bismetilmerkaptoteksoanoik asittir. Ratlarda oral verilen radyoaktif ALA'nın yaklaşık % 80'i idrarda bulunmuştur(5).

İnsanlarda tek kullanımında rasemik lipoik asidin biyoyararlanımı oldukça yüksek bulunmuştur. Lipoik asit 50-600 mg arasında kullanıldığında doz orantılı olarak

Tmax'a 0,5-1 saatte ulaşır. 200 mg lipoik asidin aköz solusyonda absolu biyoyararlanımı tahminen R- lipoik asit için % 38 ve S-lipoik asit için % 28' dir. Lipoik asidin nispeten düşük biyoyararlanımı yüksek ilk geçiş etkisine bağlanabilir. Bulgular lipoik asidin karaciğerde metabolizmasının oldukça geniş olduğunu göstermektedir(1).

Radyoaktif lipoik asit 0,5mg/100gr vücut ağırlığı düzeyinde intraperitoneal enjeksiyonla rata verilmiştir. Radyoaktivitenin yaklaşık % 56' sı idrarda bulunmuştur. Benzenle asidifiye ve ekstrakte edildiğinde aköz fazda radyoaktivitenin % 92' si kalmıştır. Jel filtrasyon ve kağıt kromatografisi kullanılarak benzen ekstratında lipoik, bisnorlipoik ve tetranorlipoik asit olarak 3 bileşik ayırt edilmiştir. Aynı zamanda bir keto bileşik de var gibi gözükmektedir(26). Bu formlar lipoik asidin β -oksidasyonu sonucu meydana gelir. Lipoik asidin β -oksidasyonu aynı zamanda insanlarda da meydana gelir. Gönüllülerde tek doz 1 gr R-lipoik asit kullanılmasından sonra 3-ketolipoik asit ve bisnorlipoik asit plazmada tespit edilmiştir(1). α -lipoik asidin insanlardaki primer metabolik yolu S-metilasyon β -oksidasyondur. Major sirkülasyon metabolitleri S- metilasyon β - oksidasyon ürünleri 4,6-bismetiltiyohexanoik asit ve 2,4-bismetiltiyobutanoik asit iken onun konjuge formları idrarda major atılım ürünü olarak tanımlanmaktadır. Endojen metabolizmada bir primer sustrat olan α - lipoik asidin komplike kullanımı, safra salınımı ve ayrıca elektrokimyasal inaktif bozunma ürünleri dikkate alınmalıdır(6).

Plazma yarı ömrünün kısa olması ve presistemik eliminasyonunun geniş olması nedeniyle bu etkiler meydana gelmektedir. Böylece lipoik asit tekrarlanan oral dozlarında maksimum plazma düzeyine hızla ulaşmaktadır. LA' in 600 mg oral dozunu takiben plazma konsantrasyonu tipik olarak 10-24 μ M arasında olmaktadır. LA' in yararlı etkileri 10 μ M konsantrasyonda tespit edilmiş ve maksimal etki 300 μ M' de gözlenmiştir(1).

1.1.8. Lipoik Asidin Görevi

Lipoik asit açıl taşıyıcı olup iki elektron taşımakla görevlidir. α -ketoglutarat dehidrogenaz ile pirüvat dehidrogenaz olarak bilinen iki multienzim kompleksi içinde bulunur(7).

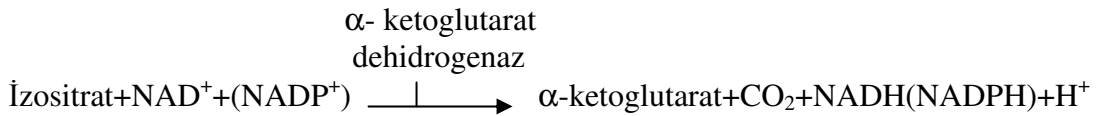
Lipoik asit pirüvatın oksidatif dekarboksilasyonunda koenzim olarak görev almaktadır. Pirüvat önce karboksil grubunu kaybeder ve hidroksietil türevi halinde enzime bağlı tiyamin pirofosfata bağlanır. Daha sonra elektronlar ve asetil grubu dihidrolipoil transasetilaz enzimine bağlı olan lipoik aside transfer edilmekte ve 6-asetildihidrolipoik asit meydana gelmektedir. Daha sonra lipoik asit üzerinde bulunan asetil grubunu koenzim A'ya transfer etmekte ve redükte dihidrolipoik asit meydana gelmektedir. Lipoik asidin okside şekle dönüşmesi dihidrolipoil dehidrogenaz tarafından sentezlenmektedir. Lipoik asit karboksil grubundan dihidrolipoil dehidrogenaz enzimidaki lizin aminoasidinin ϵ -amino grubuna bir amid bağı ile bağlanmaktadır. Bu bağlanma ATP bağımlı sentetaz tarafından başarılmakta, koparıma ise bir hidrolaz tarafından gerçekleştirilmektedir(8).

Lipoik asit açıl gruplarını bağlar ve onları diğer enzim kompleksinin bir parçasına transfer eder. Bu işlem boyunca lipoik asit dihidrolipoik aside indirgenir ki bu sonradan NADH' ın oluşumu altında lipoamid dehidrogenaz ile reokside olur. Böylece lipoik asit ve dihidrolipoik asit bir redoks çifti gibi davranabilir, NAD' ye dehidrogenazın substratından elektron taşır(1). İnsan hücrelerinde R-LA oksidatif metabolizmada ana bir rol oynayan mitokondriyal proteinlerde lipoillisin formunda bağlı olarak bulunur.

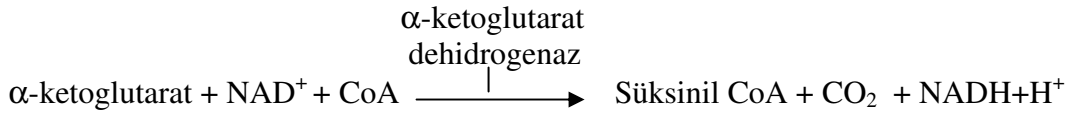
R-LA doğal olarak 5 mitokondriyal proteinde kofaktör olarak bulunur:

1-Pirüvat kompleksinin açıl transferaz bileşimi

2- α - ketoglutarat



3-Bağlı zincirli α -ketoglutarat dehidrogenaz kompleksleri



4-Pirüvat dehidrogenaz kompleksinde protein X

5-Glisin bölünme sisteminde H protein(27).

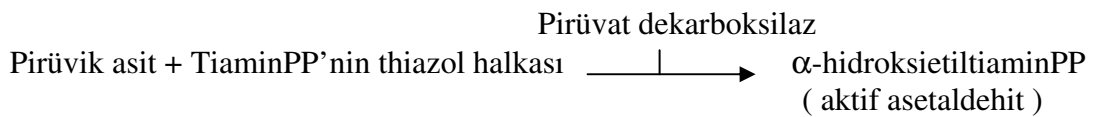
Lipoik asit sitrik asit döngüsünde kullanılan asetil CoA' nın sentezinden sorumlu olan pirüvat dehidrogenaz(PDH) enzim komplekslerinin aktivitesinde çok önemlidir(4).

Pirüvat dehidrogenaz (PDH) kompleksi 3 enzimden oluşur:

1. Pirüvat dekarboksilaz(E1)
2. Dihidrolipoil transasetilaz(E2)
3. Dihidrolipoil dehidrogenaz(E3)

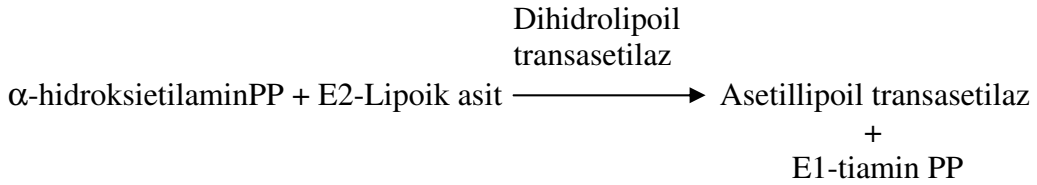
Pirüvat dehidrogenaz enzim sistemi anaerobik ve aerobik solunum sistemi arasında hem aracı hem de regülasyon sağlayıcı bir enzim olarak görev yapmaktadır. Pirüvik asidin asetil-S-CoA' ya dönüşmesi esnasında sıra ile aşağıdaki reaksiyon basamakları oluşmaktadır.

Reaksiyonun ilk basamağında pirüvatın karboksil grubu CO_2 halinde molekülden ayrılır.Geriye kalan hidroksietil türevi ise tiyaminin thiazol halkasına bağlanır ve alfa hidroksietil tiyamin pirofosfat enzim kompleksi oluşur. Bu enzim pirüvat dekarboksilazdır.

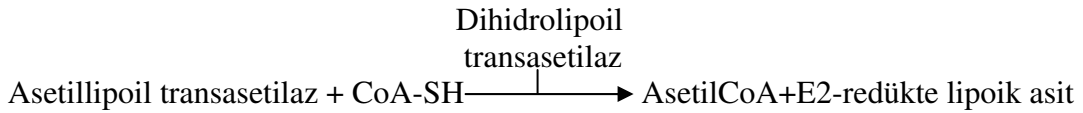


İkinci basamakta E1-tiyamin PP' nin aktif asetaldehit kompleksi, dihidrolipoil transasetilaz enziminin prostetik grubu olan okside lipoik aside taşınmaktadır. Bu reaksiyon ile lipoik asitteki disülfid bağı açılır ve hidroksietil türevi 2 hidrojenini kaybederek asetil grubu ($\text{CH}_3\text{-C=O}$) haline gelir. Bu asetil grubu ise lipoik asidin bir koluna bağlanır. Böylece asetillipoil transasetilaz kompleksi oluşmaktadır. Lipoik asidin diğer kolundaki kükürt ise redüklenerek serbest $-\text{SH}$

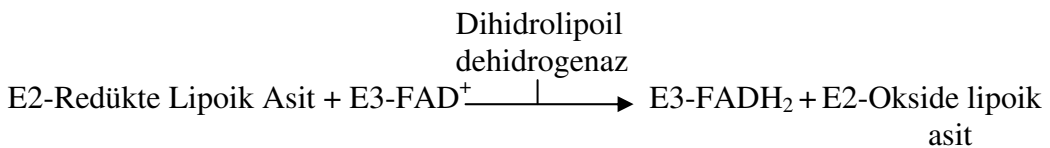
grubu haline dönüşür. E1-tiyamin PP grubu ise bu reaksiyon sonucunda tekrar serbest hale dönüşür.



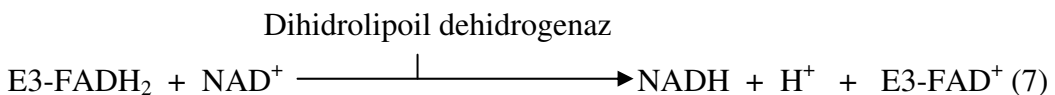
Üçüncü basamakta asetillipoil transasetilaz kompleksi serbest CoA-SH ile reaksiyona girerek lipoik asidin bir kolundaki asetil grubu CoA'nın 3-merkaptometilamin kısmının serbest -SH grubuna transfer edilir ve asetil CoA oluşur. E2-lipoik asit kompleksi redükte durumda serbest hale geçer.



Dördüncü basamakta E2-redükte lipoik asit kompleksi üçüncü enzim olan dihidrolipoil dehidrogenazın sıkıca bağlı olan koenzim E3-FAD ile reaksiyona girer. Burada okside FAD+ elektron akseptörü olarak rol oynar ve redükte lipoik asit kollarındaki hidrojen ve elektronları kendi üzerine alır. Reaksiyon sonunda E2-okside lipoik asit haline dönüşürken okside-FAD+ de E3-FADH₂ haline dönüşmektedir.

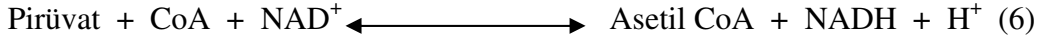


Son basamak olan beşinci basamakta ise E3-FADH₂ kompleksi redükte halden tekrar okside hale dönüşürken okside durumda bulunan NAD⁺ de redükte NADH+H⁺ haline dönüşmektedir(8).



Pirüvat dehidrogenaz (PDH), pek çok yüksek ökaryotlarda fosforilasyon-defosforilasyon döngüsünün taşıdığı spesifik regülatör enzimlerle düzenlenmektedir.

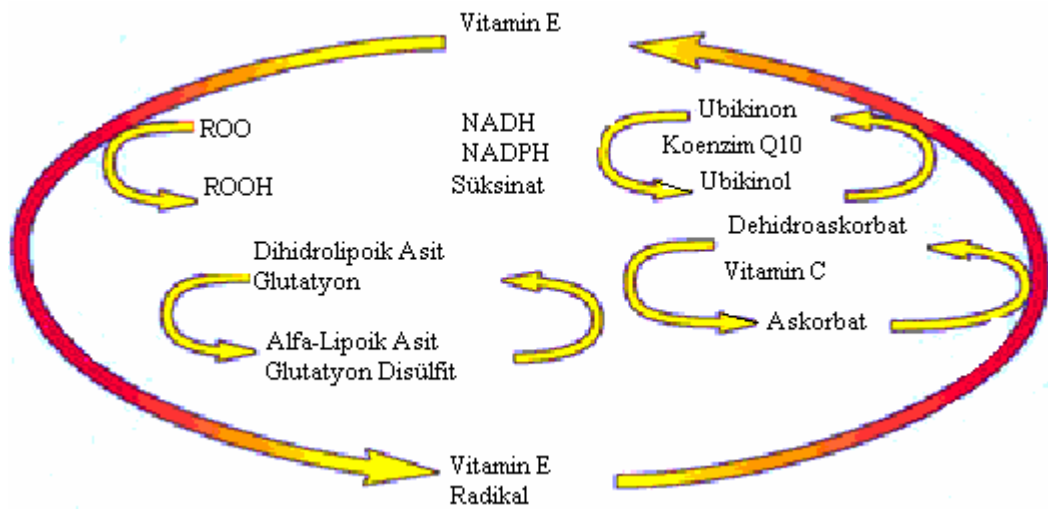
Lipoik asit *invivo* olarak ditiyol formuna indirgenir, bu bileşik aynı zamanda biyolojik olarak aktiftir(28).



Pirüvat dehidrogenaz ve α -ketoglutarat dehidrogenaz gibi multienzim dehidrogenaz kompleksinde doğal kofaktör olarak fonksiyon görür(24). Pirüvat dehidrogenaz, oksidatif glukoz metabolizmasında kritik bir adım olan pirüvatın asetil CoA'ya oksidatif dekarboksilasyonunu katalize eden yer olan mitokondride yerleşmiştir(2).

1.1.9. Lipoik Asidin Etki Mekanizması

Araştırmacılar son yıllarda lipoik asidin serbest radikal hasarını uzaklaştıran vitamin E ve vitamin C'yi geri dönüştürdüğünü göstermişlerdir. Antioksidan döngüsünün ana bileşenlerinden biri vitamin E'dir. Bu vitamin membranlar ve yağ dokusundaki yüksek serbest radikal reaktivasyonunu durdurmak için çalışır(9).

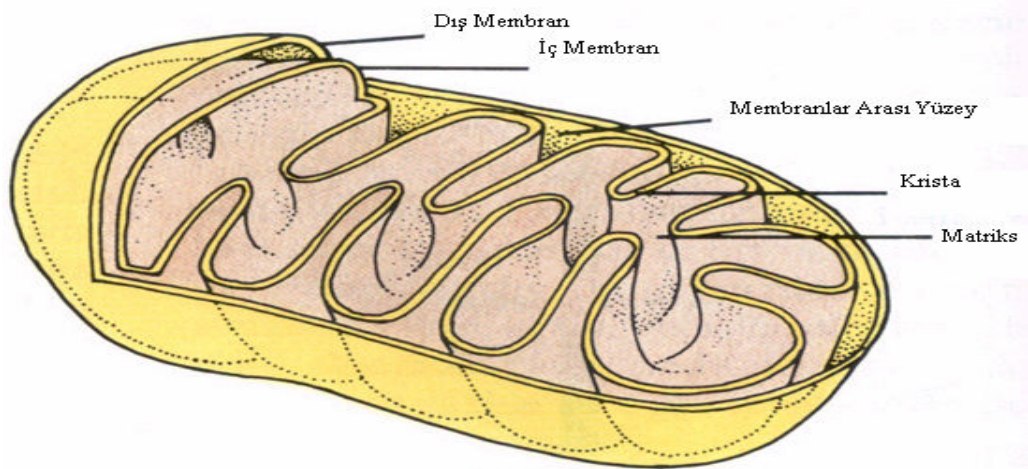


Şekil 6. Antioksidan rejenerasyon yolu. R-lipoik asit vitamin E, vitamin C ve onun redükte formlarında geri dönüşüm yaparken dihidrolipoik asit mitokondri içinde güçlü antioksidan olarak aktivite gösterir(1).

Lipid peroksit ve lipid alkoksil gibi yağlı serbest radikalleri yok etme işlemi sırasında vitamin E'nin kendisi de serbest radikal haline gelir. Vitamin E radikali vitamin C ile rejenerer olur. Bu ise bir radikalden tekrar bir antioksidan meydana

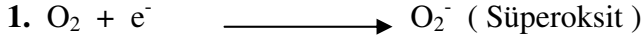
gelmesiyle sonuçlanır. Fakat bu işlemin sonunda vitamin C' nin stabil olmayan formu olan yeni bir semikarbon radikali meydana gelir. Vitamin C tekrar glutatyon ile çevrilebilir. Bu noktada vitamin E, vitamin C ve glutatyon hücre hasarı önleme ve serbest radikal kontrolü için birlikte uyum içinde çalışırlar. Bu aynı zamanda, antioksidan rejenerasyon döngüsünde sınırlandırıcı bir faktör olarak kaydedilen glutatyonun elde edilmesinde önemli bir basamaktır(9).

1.1.9.1. Mitokondri: Mitokondriye hücrenin enerji jeneratörü adı verilir. Mitokondri yoğunluğu, hücrenin enerji metabolizmasında katkısı büyük bölümlerinde daha fazladır(29). Mitokondriler hücrenin enerji merkezi olarak görev yaparlar. Alınan besinler oksijenli solunum ile CO_2 ve H_2O ' ya yıkılır. Bu sırada oluşan $\text{NADH}+\text{H}^+$, $\text{NADPH}+\text{H}^+$ ve FADH_2 gibi redükte moleküllerin elektronları elektron transport sisteminde taşınmakta ve bol miktarda enerji üretilmektedir. Bu enerjinin büyük kısmı oksidatif fosforilasyon sistemi tarafından ATP halinde tutulmaktadır. ATP' de depolanan bu enerji daha sonra hareket, aktif transport ve muhtelif enerji gerektiren metabolik olaylarda kullanılmaktadır(8). Hücre içinde reaktif oksijen moleküllerinin açığa çıkışının en fazla olduğu organel mitokondrilerdir ve başlıca serbest radikal kaynağı mitokondri membranındaki elektron transport zinciridir. Bu zincir ya NADH , rotenon, antimisin A gibi maddelerle inhibe edilir ya da oluşan radikal ürünler indirgenmiş koenzim Q tarafından toplanırlar. Faaliyetleri durdurulamayan metabolitler de öncelikle peroksidasyonlar olmak üzere radikal reaksiyonlarının oluşumuna yol açarlar(30).



Şekil 7. Mitokondri (16).

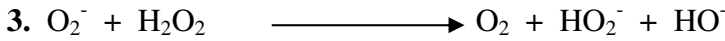
1.1.9.2. Serbest Radikaller: Serbest radikaller yaşlanma, hastalıklar ve normal metabolizma sonucunda üretilen yüksek reaktif moleküler ürünlerdir. Serbest radikaller kirli hava, sigara içme, işlenmiş yiyecekler, fakir diyet ve stresle meydana gelen, vücuda hasar verici maddelerdir. Aynı zamanda metabolizmanın normal ürünleridir.



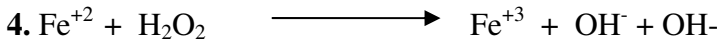
Moleküler oksijen yüklü bir elektronla birleştiğinde süperoksit adını alır.



Süperoksit, Cu^{+2} gibi geçiş metalleri ve radikal türleriyle kolay reaksiyona girer ve H_2O_2 ile “Haber-Weis” tepkimesini vererek oldukça toksik hidroksil radikalini oluşturur.



Demir iyonları katalizörlüğünde “Fenton tepkimesi” gerçekleşir ve reaksiyon ortalama 4000 kez hızlanır.



Aerobik organizmalar kolay okside olabilen bileşiklerin süperoksitle reaksiyona girmesini önlemek için süperoksit dismutaz(SOD)enzimini , hidrojen peroksiti yok etmek amacıyla da katalaz ve glutatyon peroksidaz(GSH-Px) enzimlerini kullanırlar(30).

Hidroksil radikalleri başka süperoksit anyonlardan veya hidrojen peroksitten meydana gelebilir. Hücresel metabolizmada belirgin rolleri olduğundan serbest radikal üretiminin ana kaynağı mitokondrilerdir. Serbest radikallerin aşırı üretimi veya yetersiz nötralizasyonu proteinler, lipidler ve DNA’ da hasara yol açar. Serbest radikal üretiminin kaynağına yakınlığından dolayı mitokondri içeriği serbest radikal hasarının birincil hedefi haline gelir. Örneğin her yıl yaklaşık 1 kg oksijen radikali üreten bir bireyin her gün mitokondriyal DNA’ sında yaklaşık yüzbin oksidatif hasar ile karşılaştığı tahmin edilmektedir. Mitokondriyal DNA’daki bu kümülatif ve kaçınılmaz ataklar mutasyonların sıklığını artırır, bozuk fonksiyonlu proteinlerin üretimiyle sonuçlanır. Fizyolojik enerji ihtiyacını karşılamak mitokondrinin temel görevi olduğu için bu fonksiyonda aksamalar olduğunda patolojik olaylar meydana gelir(31).

Tablo 2 : Sık karşılaşılan radikaller, simgeler ve kimlikleri(30).

Radikal	Simge	Tanımlama
Hidrojen	H ⁺	Bilinen en basit radikal
Süperoksit	O ₂ ⁺	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil	OH ⁺	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti radikal
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	O ₂	Yarılma ömrü hızlı,güçlü oksidatif oksijen formu
Perhidroksi radikal	HO ₂ ⁺	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikal	ROO ⁻	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olur
Triklorometil	CCl ₃	CCl ₄ metabolizması ürünü karaciğerde üretilen bir radikal
Thyl radikali	RS ⁺	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil	RO ⁺	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Nitrojen oksit	NO	L-arjinin amino asitinden in vivo üretilir
Nitrojen dioksit	NO ₂	NO'in oksijen ile reaksiyonundan üretilir

Biyolojik ortamların basamakları en iyi bilinen ve en çok çalışılan radikal reaksiyon zinciri lipid peroksidasyonudur. Radikaller, organik ortamlardaki biyomoleküllerin tümünü etkilese de, hedefler başta membran lipidleri olmak üzere diğer lipidler, proteinler ve DNA'dır. Bu çekici hedefler radikal üretiminin artması ve reaksiyonlarının yoğunlaşması halinde, peroksidasyon, defragmantasyon ve modifikasyonlara uğrama riski altındadır. Bu nedenle özellikle lipidlerin oksidasyonu, her sektörün en büyük sorunudur. Zira bu; yem ve gıda sektöründe bayatlama, kokuşma ve kalite kaybı anlamına gelirken, spermada infertilite, kan hücrelerinde yetersiz fonksiyon ve çabuk parçalanma, tüm organik ürünlerde daha az ekonomik ömür, canlılarda erken yaşlanma ve direnç azalması gibi spektrumları olumsuz etkileyebilme yeteneği demektir(30).

1.1.9.3. Antioksidanlar: Hücre ve dokular, radikal ürünleri ve reaksiyonları inhibe eden bir sisteme sahiptir. Radikallerle oldukça hızlı reaksiyonlara girerek otooksidasyon/peroksidasyon ilerlemesini önleyen maddeler antioksidan olarak tanımlanır(32).

Bir şekilde oluşturulan herhangi bir ilk radikal ürünün reaktif karakterine bağlı olarak biyomoleküller ve hücrel yapılar saldırmasının önlenmesi antioksidan savunma sisteminin bir parçasıdır(33). Zincir kırma reaksiyonlarının her basamağında az da olsa hidroperoksit oluşması, ortamdaki ürünler ve haraplanmanın sınırlanamaması nedeniyle oksidasyon reaksiyonları ve radikaller tamamen yok edilemez(30).

Antioksidan savunma:

- 1-Radikal metabolit üretiminin önlenmesi,
- 2-Üretilmiş radikallerin temizlenmesi,
- 3-Oluşan hücre haraplanmasının onarılması,
- 4-Sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması,
- 5-Endojen antioksidan kapasitenin artırılması olarak ayrımlanan beş değişik blokta yürür(34).

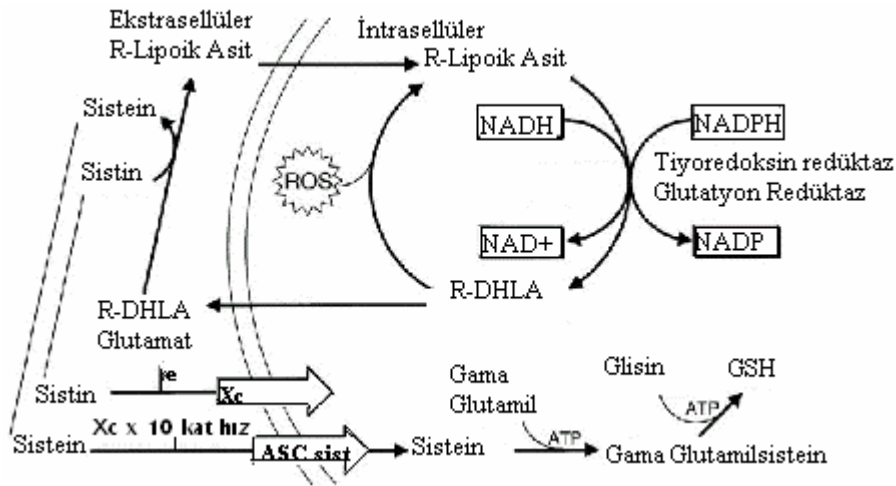
Bazı otörler antioksidan savunmayı, komponentlerin enzimsel olup olmamasına bakarak, katalaz, SOD(süperoksitdismutaz) ve GSH-Px(glutasyon peroksidaz) 'ın rol aldığı antioksidan aktiviteleri "enzimatik antioksidan savunma", tokoferol, askorbat, glutasyon, ürik asit, glikoz gibi maddelerle gerçekleştirilen deoksidasyon işlemlerini "nonenzimatik savunma" olarak tanımlar. Öte yandan, antioksidanlara daha spesifik rollerin yüklendiği çalışmalarda, antioksidan savunmanın; sellüler, membransel ve ekstrasellüler olarak sınıflandığı görülmektedir(30). Oksidanların arttığı veya antioksidanların yetersiz kaldığı durumlarda organizmanın maruz kaldığı oksidatif stres sonucunda bozulan hücre metabolizma, moleküler yıkılma ve doku hasarını getirir(13).

Tablo 3: Antioksidanlar ve reaksiyonları(30).

Antioksidan	Reaksiyonu
SOD	Süperoksidin giderilmesi reaksiyonlarında katalizör
Katalaz	H ₂ O ₂ nin yüksek konsantrasyonlarının giderilmesini katalizler
GSH-P _x	H ₂ O ₂ nin düşük konsantrasyonlarının giderilmesinde kullanılır
Vitamin E	Membran lipidlerinde çözünerek peroksidasyon zincirini kırar
β karoten	Radikal türleri toplar, ayrıca singlet oksijen oluşumunu inhibe eder
Askorbik asit	Hidroksil radikal giderici ve tokoferolüindirgeyici vitamin
Transferin	Serbest demir iyonlarını bağlayarak fenton reaksiyonunu inhibe eder
Laktoferrin	Düşük pH'lı ortamlardaki demir iyonlarını bağlar
Haptoglobinler	Hemoglobin bağlayarak 'hem'in salınmasını önler
Hemopeksin	Ortamdaki hem proteinlerini bağlayarak oksidasyonu inhibe eder
Albumin	HOCL radikalini toplar, hem proteini ve bakır metal iyonlarını bağlar
Serüloplazmin	Süperoksit radikalini nötralize eder, bakır iyonlarını bağlar
Bilirubin	Önemli bir peroksil radikali toplayıcısıdır
Mukus	Hidroksil radikali toplayıcı olarak işlev yapar

1.1.9.4. Glutasyon: Glutasyon, tiyol grubunun önemli bir üyesidir ve primer hücre içi antioksidandır. Ayrıca önemli bir serbest radikal deaktivatörüdür. Ağır metalleri ayırmada, katarakt oluşumuna karşı korumada, kanserin başlamasını yavaşlatmada,

karaciğer hasarını önlemede ve bağışıklık fonksiyonunu arttırmada glutasyon hayati bir rol oynar. Vücutta hastalık, enfeksiyon, travma, ilaç tedavisi ve ameliyat gibi nedenlerden dolayı oksidatif stresin yüksek düzeylerde seyrettiği zamanlarda glutasyon hızla tükendiğinden dolayı eksikliği ortaya çıkar. Bu eksiklik aynı zamanda düşük protein alımı, diyabetes mellitus, karaciğer hastalıkları, katarakt, HIV(insan immün yetmezlik virüsü) enfeksiyonu, respiratuar distres sendromu, kanser ve idiyopatik pulmoner fibrozis ile birlikte dir. Glutasyon ağızdan alındığında kan dolaşımına ulaşmadan midede yıkılır, lipoik asit ise ağızdan alındığında kolayca emilip ilk olarak hücre içine girer ve hızla en potent forma dönüşerek glutasyon düzeylerini arttırır(35).

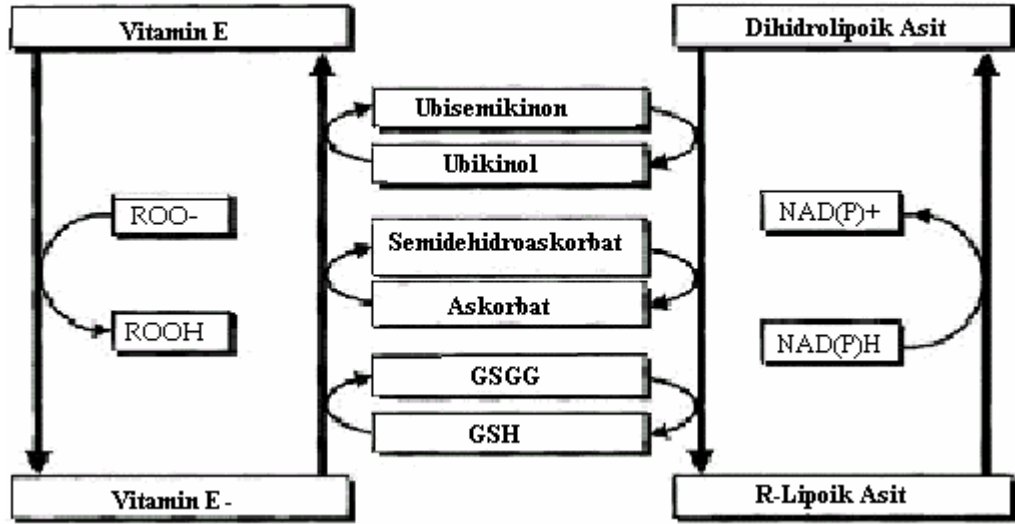


Şekil 8. Lipoik asit hücrel glutasyon (GSH) düzeylerini yükseltir(1).

1.1.10. Lipoik Asidin Antioksidan Aktivitesi

Mitokondriyal dehidrogenaz reaksiyonlarında önemli bir rol oynayan lipoik asit son zamanlarda önemli bir antioksidan olarak dikkat çekmektedir. Lipoat veya onun redükte formu dihidrolipoat; süperoksit radikalleri, hidroksil radikalleri, peroksil radikalleri ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen bileşikleriyle reaktif olur. Lipoik asit aynı zamanda vitamin E'yi rejenere eden vitamin C ve glutasyon ile birbirlerini etkileyerek membranları korur. Diyabet, iskemi-reperfüzyon hasarı, katarakt oluşumu, HIV aktivasyonu, sinir dejenerasyonu ve radyasyon hasarı gibi oksidatif stres modellerinin bir kısmında lipoik asit verilmesinin yararlı olabileceği gösterilmiştir. Ayrıca lipoat miyoglobin, prolaktin, tioredoksin ve NF kappa B transkripsiyon faktörü gibi proteinlerin indirgeyici düzenleyicisi olarak fonksiyon

görebilir(36). Lipoik asit antioksidan moleküller arasında tektir, çünkü hem redükte hem de okside formlarında koruyucu etkilere sahiptir. Bununla beraber DHLA antioksidan fonksiyonları yerine getirmekte daha etkindir.

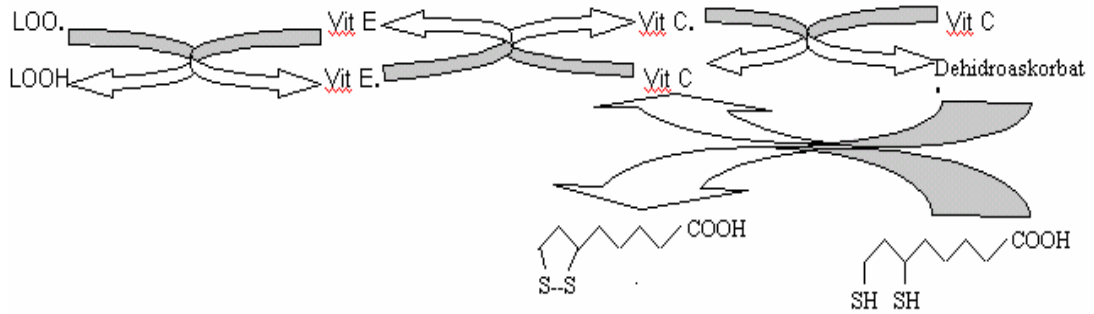


Şekil 9. R-Lipoik asit ve dihidrolipoik asidin antioksidan etkisi(1).

Antioksidan aktivitesi rölatif olarak genel bir kavramdır, oksidatif substratın ve oksidatif stresin tipine bağlıdır. Packer ve arkadaşlarına göre bir maddenin antioksidan potansiyelini değerlendirirken şu kriterler göz önünde tutulmalıdır:

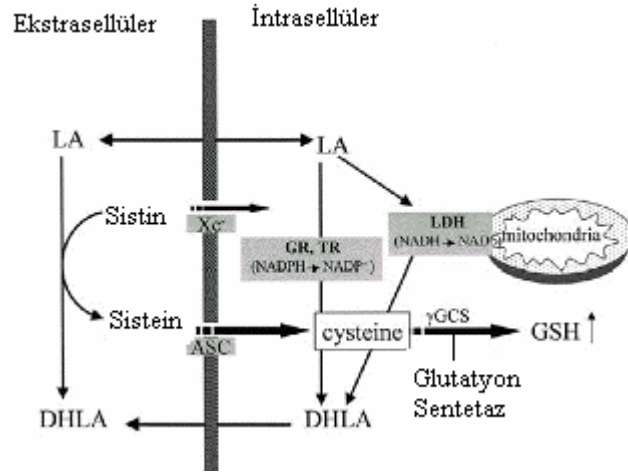
- 1- Serbest radikalleri uzaklaştırmadaki spesifikliği,
- 2- Diğer antioksidanlarla etkileşimi,
- 3- Metal kelasyon aktivitesi,
- 4- Gen ekspresyonundaki etkileri,
- 5- Biyoyararlanımı,
- 6- Lokalizasyonu,
- 7- Oksidatif hasarı tamir edebilmesi.

İdeal bir antioksidan bu kriterlerin hepsini yerine getirmelidir. LA/DHLA redoks çifti ideale yaklaşmaktadır, evrensel antioksidan sayılabilir(37). Lipoik asit ve onun redükte formu DHLA dokularda serbest halde bulunur. DHLA güçlü bir redüktandır ve böylece okside antioksidanları rejenere edebilir. Antioksidanlar, radikalleri uzaklaştırdıkları zaman kendileri radikal hale gelirler. DHLA direkt ve indirekt olarak askorbat, glutatyon, koenzim Q10 ve vitamin E' yi rejenere edebilir(1).



Şekil 10. Lipid hidroperoksit serbest radikallerinin uzaklaştırılmasında vitamin E, vitamin C ve dihidrolipoik asidin etkileşimi(1).

DHLA bütün antioksidanları redükte edebilir ve lipoamid redüktaz, glutatyon redüktaz ve tiyoredoksin redüktaz enzimlerini rejenere edebilir. Böylece lipoik asit ve DHLA antioksidan ağda merkezi bir görev alır. Lipoik asit suda çözünen ve membranda çözünen özelliklerin ikisine de sahip olduğundan lipid/su fazları arasındaki okside antioksidanların indirgenmesini olanaklı kılar. Üstelik lipoik asitle tedavi *invivo* ve *invitro* glutatyon (GSH) düzeylerini yükseltir(38,39,40,41,42).



Şekil 11. Sistein biyoyararlanımında artma ile hücresel glutatyon biyosentezinin lipoata bağlı düzenlenmesinde ve α -lipoik asidin dihidrolipoik aside biyoredüksiyonu için hücresel yollar(15).

Sistein kullanılabilirliği glutatyon sentezinde hız kısıtlayıcı faktör olarak bilinmektedir. Lipoik asit hücreye hızla alınır ve ortamda serbest olarak bulunan DHLA'e redükte olur. Daha sonra DHLA sistini sisteine indirger. Hücre sisteini sistinden on kat hızlı alır, GSH' nun biyosentezi hızla meydana gelir(43). Bu yolda

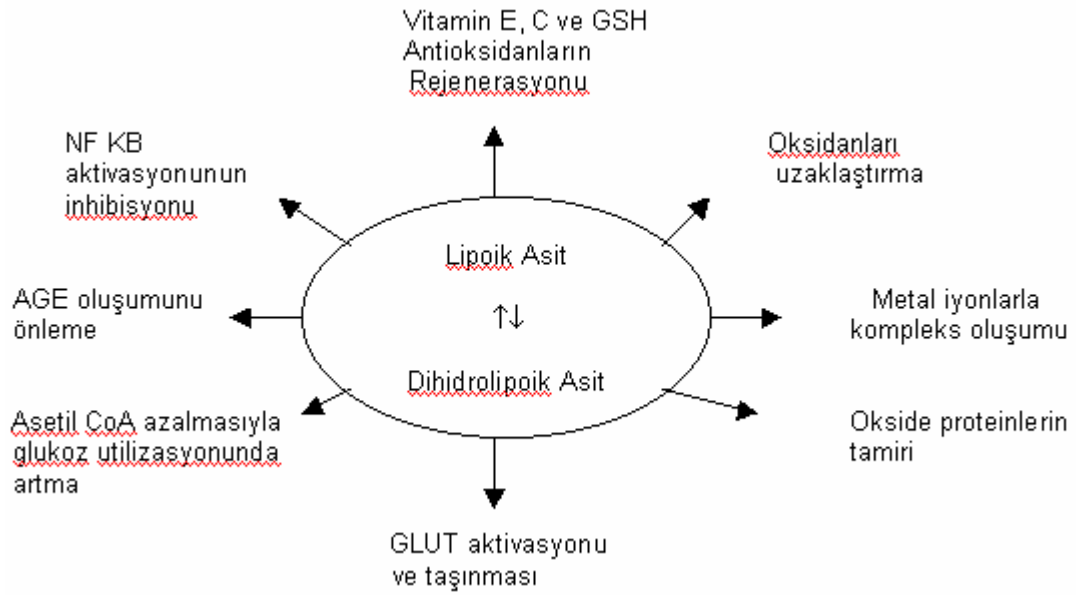
dihidrolipoik asidin indirekt antioksidan aktivitesi gözlenmiştir. Bu durum rat karaciğer mikrozomları kullanılarak açıklanmıştır(44).

LA' in redüksiyonu ile oluşan DHLA, LA' den daha çok antioksidan özelliğe sahiptir. Yalnız DHLA endojen antioksidanları rejenere eder ve oksidatif hasarı tamir ederken hem DHLA hem de LA metal kelasyonu ve ROS(serbest oksijen ürünleri)' ni uzaklaştırabilme kapasitesine sahiptir. LA Fe^{+2} ve Cu^{+2} kelasyonu ile antioksidan aktivite gösterirken, DHLA Cd^{+2} kelasyonu da yapabilir(24).

DHLA aynı zamanda tokoferolun bulunduğu mikrozomal lipid peroksidasyonuna karşı koruyucudur. Bu sistemde DHLA direk olarak tokoperoksil radikallerini indirgeyebilir. UV(ultraviyole) ışımına maruz kalan lipozomlarda tokoperoksil radikalinin DHLA' in varlığında indirgendiği bulunmuştur(45).

Dihidrolipoik asidin antioksidan aktivitesinin yanında aynı zamanda prooksidan özelliği de vardır. Vitamin E ve vitamin C'ye benzer şekilde lipoik asidin prooksidan aktivitesi muhtemelen transizyon metallerin redüksiyonu ile aracılık etmektedir. Diğer antioksidanlarla kombinasyonunda dihidrolipoik asidin ubisemiquinonu ubiquinale, semidehidroaskorbata askorbata ve GSSG(okside glutatyon)'u GSH(redükte glutatyon)'a rejenere ettiği gösterilmiştir(17).

Dihidrolipoik asit protein tamir sürecinde rol oynar. Bu α_1 -antiproteazın tamiri ile gösterilmektedir. α_1 -antiproteaz gibi proteaz inhibitörlerinin inaktivasyonu protein bağlı enzimler üzerindeki proteaz-antiproteaz dengelerini değiştirir. Bu nötrofil ve makrofajların fonksiyonlarında önemlidir. Bu hücreler enflamasyon boyunca oksidanlar salgırlar. Bu nedenle proteinlerdeki metiyonin kalıntıları metiyonin sülfoksite okside olabilirler. α_1 -antiproteazdaki metiyonin oksidasyonu onun fonksiyonunu inhibe eder. Sonraki artmış proteaz aktivasyonu fagositoza yardım eder. Oksidasyon ile α_1 -antiproteazın inaktivasyonu elastinin bozulması ve akciğer amfizemine neden olan elastaz aktivitesinde artmaya neden olur. Metiyonin sülfoksite redüktaz enziminin protein yapısındaki okside metiyonini azalttığı bildirilmiştir. Tiyoredoksin sistem karşılıklı indirgenme ile enzimi korur. Dihidrolipoik asidin analogu dihidrolipoamid tiyoredoksini indirgeyebilir. Böylece okside α_1 -antiproteazı indirger ve aktive eder(1).



Şekil 12. Dihidrolipoik Asit-Lipoik Asit redoks çiftinin etkileri(1).

1.1.11. Lipoik Asidin Etkileri

1.1.11.1. Serbest Radikalleri Uzaklaştırmak: Lipoik asit bilinen çok yönlü antioksidanlardan biridir. Yağ ve suda fonksiyon gösterebilen lipoik asit serbest oksijen, süperoksit, peroksit ve hidroksil radikalleri, hipoklorit ve peroksinitrit gibi geniş bir yelpazedeki serbest radikallerin nötralizasyonunu başarabilir. Bu tip radikallerin ateroskleroz, kanser, diyabet ve katarakt gibi hastalıkların oluşumunda önemli bir rol oynadığına inanılır(24).

1.1.11.2. Metal Kelasyon: Vücudumuz için en tehlikeli şeylerden biri toksik metallerdir. Toksik metaller yıllar boyunca dokularımıza yerleşir ve sürekli vücudumuza zarar verir. Bir saç analizi kadmiyum, bakır ve alüminyum gibi toksik metallerin yüksek düzeylerine sahip olduğumuzu gösterir. Lipoik asit toksik metalleri yakalar, bağlar, onları nötralize eder ve vücuttan kolayca atılabilecekleri bir yere taşır(46).

Hayvan çalışmaları lipoik asidin bu metallerle zehirlenmeleri etkili bir şekilde önleyebildiğini göstermektedir. Örneğin Hindistan'da Madras Üniversitesi'nden R.Sumathi ve ekibi bir rat çalışmasında kadmiyuma maruz bırakılan kontrol grubuyla karşılaştırıldığında lipoik asit verilmesiyle karaciğer hasarının anlamlı derecede azaldığını göstermişlerdir(47).

1.1.11.3. Antioksidan Rejenerasyon: Serbest radikal ile nötralize edilen bir antioksidan özelliğini yitirir. Bununla beraber canlı sistemlerde antioksidanlar

sıklıkla diğer antioksidanların yardımıyla rejenere olabilirler. Örneğin glutatyon vitamin C'yi rejenere edebilir. Vitamin C vitamin E'yi rejenere hale döndürebilir. Çok yönlü yapısı sayesinde lipoik asit glutatyonu, vitamin C, E ve mitokondriyal antioksidan koenzim Q'yu rejenere edebilir(36).

1.1.11.4. Moleküler Hasar Onarımı: Serbest radikal aktivite DNA, lipid ve proteinler gibi fizyolojik maddelerde hasar meydana getirir. Canlı organizmalar bu hasarların bazılarını tamir edecek bir kaç mekanizma geliştirmiştir. Lipoik asit okside olmuş moleküler hasarın tamirinde rol oynar(48).

1.1.11.5. Lipoik Asit ile Glikasyondan Yaşlanmanın Azalması: Glikasyon protein molekülleri ve glukoz arasında kimyasal bağların oluşumudur .Bu işlem yaşlanmanın ve özellikle diyabet ile birlikte olan bir çok hastalığın etkilerine katkıda bulunur ve proteinlerin fizyolojik fonksiyonlarını bozar. Bu glukozla hasarlanan proteinler glikasyon son ürünlerini (AGES) artmış gibi yorumlar, AGES hipergliseminin uzamasıyla artar ve böbrek hasarında ve diyabette görülen aterosklerozun ilerlemesinden sorumlu olabilir. Araştırmacılar albümine nonkovalent bağlarla bağlanan lipoik asidin glikasyona karşı proteinleri koruduğunu bulmuşlardır. Böylece lipoik asit hem antioksidan özellikler hem de antiglikasyon özellikleri ile bir antiaging gibi davranır(49).

1.1.11.6. Lipoik Asit Doğal Enerji Verici: Lipoik asit hücrenin enerji yapım yeri olan mitokondri için yakıt hazırlamaya yardım eder. Vücut lipoik asit olmaksızın enerji için şekeri kullanamaz ve lipoik asit vücudun ilk doğal enerji yoludur. Lipoik asit aynı zamanda yorgunluğun ana nedeni olan serbest radikallerin nötralizasyonu ile vücuda enerji verir. Pek çok insan lipoik asit almaya başladıkları zaman enerjilerinde bir artış hissederler(50).

1.1.12 Lipoik Asidin Klinikte Kullanımı

Lipoik asidin antioksidan etkilerinin geniş olması onu tedavi edici uygulamalar için güçlü bir aday yapar. Hayvan ve insan çalışmaları klinik kullanımları önermektedir (51).

1.1.12.1. Ateroskleroza Karşı Koruyucu Etkisi: Ateroskleroz; hayvanlarda arterlerde plakların oluşumu ile karakterizedir. Serbest radikaller arteriyel kolesterol plaklarında LDL(düşük dansiteli lipoproteinler) birikiminin oksidasyonu ile ateroskleroz meydana getirir. Lipoik asit vitamin E' nin rejenarasyon döngüsünü

destekler ve böylece vitamin E daha yüksek konsantrasyonlarda LDL' de etki gösterir(36). Caroline Üniversitesi'nin yaptığı bir çalışmada bıldırcınların iki grubunda aterojenik diyet ile beslenerek aterosklerotik lezyonlar oluşturulmuştur. Bu gruplardan birisine lipoik asit verilmiş ve kontrol grubuna göre aterojenik lezyonlar % 75 gerileme göstermiştir. Araştırmacılar lipoik asidin vitamin E' nin rejenarasyonu ve LDL kolesterolun oksidasyonunun önlenmesi ile ateroskleroza karşı koruyucu olduğu sonucuna varmışlardır(51).

1.1.12.2. Katarakta Karşı Koruyucu Etkisi: Gözün içi aköz bir ortamdır, vitamin E, betakaroten gibi yağda çözünen antioksidanlar fazla koruyucu değildir(36). Hayvan çalışmaları lipoik asidin katarakt oluşumuna karşı da güçlü bir koruyucu olduğunu göstermiştir. Katarakt gözün lensinde antioksidan aktivitenin azalmasıyla beraberdir ve lipoik asidin en önemli lens oksidantı olan glutatyonu rejenere ettiği bilinmektedir(52). Bilim adamları hem yağda hem de suda çözünen özellikleri olan lipoik asit vererek katarakta etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar katarakt ve komplikasyonlarının önlenmesinde lipoik asidin potansiyel tedavi edici olduğunu bulmuşlardır. Lenste ana koruyucu enzimler olan vitamin E, askorbat ve glutatyon düzeylerinde büyük artışlar kaydedilmiştir(36). California Üniversitesi'nin bir rat çalışmasının sonuçları lipoik asidin 5 mg/kg dozda % 60 katarakt oluşumundan koruduğunu göstermiştir(52). Lipoik asidin glutatyonun bazı koruyucu fonksiyonlarını düzelttiği sonucunu çıkarmışlardır(24). İnsanlarda yararlarının onaylanması için başka çalışmalara da ihtiyaç vardır(52).

1.1.12.3. Radyasyona Karşı Koruyucu Etkisi: Lipoik asidin radyasyona maruz kalma ile meydana gelen serbest radikal hasarı azalttığını gösteren Çernobil radyasyon kurbanlarını içeren Rus çalışması çok ilginçtir. 16 çocuklu bir gruba 28 gün boyunca günde 400 mg lipoik asit verilmiş, 12 çocuklu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında radyoaktif izotopların idrarla atılması ve beyaz kan hücrelerinde serbest radikal aktivitesinde azalmalar görülmüştür(53).

1.1.12.4. AIDS Tedavisindeki Etkisi: Bilim adamları lipoik asidin HIV-1' in ve DNA' ya direk bağlanan diğer virüslerin replikasyonunu engelleyebildiğini bulmuşlardır(36). Lipoik asidin HIV ile enfekte 11 hastalı bir grupta antioksidan durumunu düzelttiği gösterilmiştir, temelde lipoik asidin antioksidanları rejenere etme özelliği yatmaktadır(54). Dr.Lester Packer ve Chandan K. Sen (1995) lipoik

asidin, immün sistem görünümünü özellikle T lenfositleri düzelttiğini tespit etmişlerdir. Dr. Packer test tüp deneylerinde lipoik asidin AIDS(kazanılmış immün yetmezlik sendromu) virüsünün replikasyonunu sağlayan genin aktivasyonunu tamamen engellediğini bulmuştur(36).

Almanya'da yürütülen bir çalışmada araştırmacılar vitamin C ve glutatyon düzeylerinde önemli azalmalar olan hastalara 14 gün günde 450 mg lipoik asit vermişlerdir. Bu gözlemler kan peroksidasyon ürünlerinde artma ve beyaz kan hücre sayılarında düzelme ile aynı zamana rastlamaktadır(54). Son bir çalışmada AIDS' li 12 kişiye lipoik asit verilmiş, glutatyon düzeyleri % 100, vitamin C düzeyleri % 90, T₄ hücreleri % 66 artmıştır ve oksidatif stres katılanların % 70' inde azalmıştır (36).

1.1.12.5. Hafıza ve Beyin Fonksiyonlarına Etkisi: Alman araştırmacılar lipoik asidin yaşlı farelerde uzun dönemli hafızada pozitif etkileri olduğunu bulmuşlardır. Henüz daha genç farelerde benzer yararları gösterilmemiştir. Araştırmacılar lipoik asidin genel hafızayı düzeltmekten ziyade uzun dönem hafıza bozukluklarını telafi ettiğini göstermişlerdir. Diğer araştırmacılar lipoik asidin beyin dokularını oksidatif hasardan koruduğuna dair benzer kanıtlar bulmuşlardır. Rochester Üniversitesi medikal merkezindeki araştırmacılar Parkinson ve Huntington hastalığı gibi kronik ve akut nörolojik bozuklukların tedavisinde olası bir role sahip olduğunu bildirmişlerdir (36).

Parkinson Hastalığı ; amaçlı hareketlerin yavaşlaması ve yetersiz kalması,kaslarda rijidite ve tremor gibi özelliklerle kendini gösteren kronik,ilerleyici bir merkezi sinir sistemi hastalığıdır. Parkinson Hastalığının oluşum ve ilerleme sürecinde; mitokondriler, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarında yer alan serbest radikaller ile meydana gelen oksidatif stres önemli bir rol oynamaktadır. Dopaminerjik nöronlarda; monoamino oksidaz aracılığı ile dopaminin oksidatif deaminasyonu ve otooksidasyonu sonucunda hidrojen peroksit ve diğer oksijen radikalleri oluşur. Güçlü antioksidanlar ve bunlardan biri olan α - lipoik asit dopa toksisitesinin etkili blokerlerindedir.

Huntington Hastalığı; otozomal dominant olarak geçen, semptomların en çok 30-50 yaşlarında ortaya çıktığı, kişilik değişiklikleri,psikoz,şiddetli bunamaya yol açan entellektüel bozukluk ve istem dışı anormal hareketlerle kendini gösteren bir hastalıktır(54). Huntington Hastalığının patogenezinde oksidatif hasarı suçlayan

güçlü kanıtlar bulunmaktadır. Lipoik asit, Huntington hastalıklı transgenik fare modellerinde yaşam süresini düzeltir. Bu bulgular Huntington hastalarında lipoik asidin yararlı etkilere sahip olabileceğini öne sürmektedir(56).

1.1.12.6. İnme ve Kalp Krizinde Etkileri: Serbest radikallerin fazla miktarları iskemi veya travma ile yaralanan dokular yaratır. Kan pıhtısı, düşük oksijen seviyeleri ile iskemi meydana gelir(49). Lipoik asidin; inme ve kalp krizlerinde yetersiz oksijen sağlanmasına bağlı hasardan dokuları koruduğu gösterilmiştir. Kan akımından yoksun kalan dokuların meydana getirdiği serbest radikallerin aşırı üretimi orjinal travmadan daha çok hasar vericidir. Bilim adamları lipoik asit ile tedavi edilen hayvanlarda ölüm hızının lipoik asit ile tedavi edilmeyenlerin yalnızca 1/3 kadar olduğunu bulmuşlardır. Benzer çalışmalar kalp krizinden sonra ölüm ve doku hasarının önlenmesinde lipoik asidin rolü olduğunu bulmuşlardır(36).

1.1.12.7. Diyabet ve Diyabetik Nöropatinin Tedavisindeki Etkileri: Diyabetes mellitus(DM), kronik bir hiperglisemi durumudur. Bu kronik hiperglisemi durumunun temelinde çevresel ve genetik etkenler bulunmaktadır. Hiperglisemi, pankreasın beta hücrelerinin salgıladığı insülinin yokluğuna veya insülin etkisine zıt etkenlerin fazlalığına bağlı olarak ortaya çıkar. İnsülin etkisiyle karşı etkenlerin arasındaki dengesizliğin sonucu olarak karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasında bozukluklar belirir.

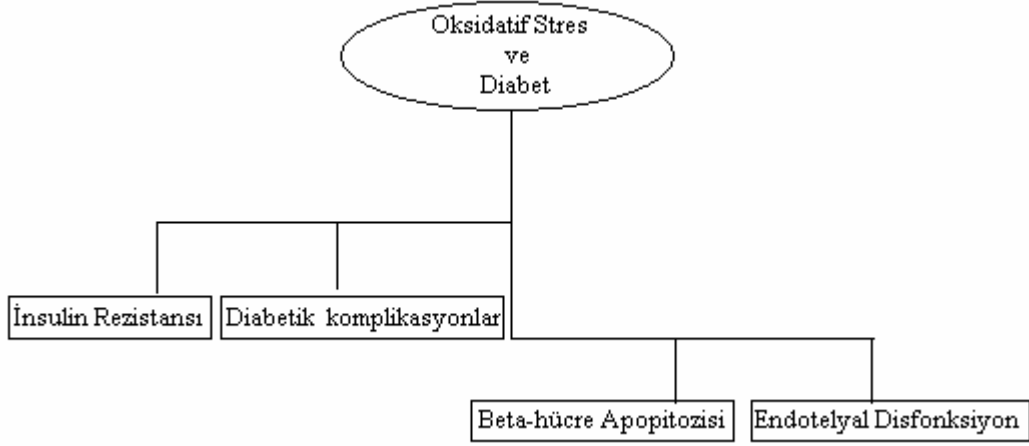
Diyabetes mellitusun üç tipi vardır:

1-Tip I DM: İnsüline bağımlı diyabet, total insülin yetmezliği vardır, ketoza eğilimlidir, daha çok gençlerde görülür.

2-Tip II DM: İnsüline bağımlı olmayan diyabet, erişkin tip diyabet de denir. Başladığı sırada şahısta obezite olasılığı fazladır.

3-MODY: Gençlerde erişkin tip DM görülmesidir, kalıtımla ilgisi fazladır(57).

Belki de lipoik asidin en geniş klinik uygulamaları diyabetin ve onun komplikasyonlarının tedavisinde kaydedilmiştir(58). Lipoik asit son zamanlarda diyabetin tedavisi ve katarakt, makular dejenerasyon ve ağrılı periferik sinir dejenerasyonu olan nöropatiyi içeren diyabet komplikasyonlarını önlemede Avrupa'da kullanılmaktadır(36).



Şekil 13. Diyabet ve prediyabetik durumlarda oksidatif stresin etkisinin potansiyel alanları(1).

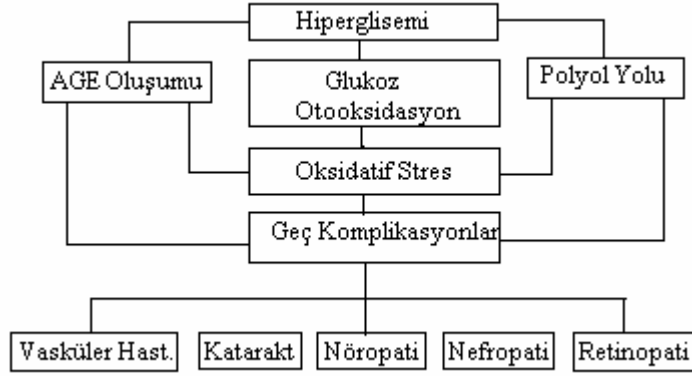
Diyabetikler sıklıkla uyuşukluk, çınılama bazen ekstremitelerinde yanıcı bir ağrıyı içeren bir dejeneratif sinir durumu olan periferel nöropati yüzünden acı çekerler. Çalışmalar lipoik asidin bu sinir disfonksiyon semptomlarının azalmasına yardım edebildiğini göstermektedir(58). Araştırmacılar gerçekten lipoik asidin nöropatiyi geri döndürebildiğini, glukoz kullanımında yardımcı olduğunu bulmuşlardır(36). Ağrının ferahlamasının ardındaki kesin mekanizma açık değildir. Bununla beraber lipoik asidin sinir hücrelerindeki serbest radikal hasarını önlediğine inanılmaktadır(58).

Almanya’da yürütülen çift kör, plasebo kontrollü, randomize, çok merkezli bir çalışmada 63 periferel nöropatili Tip II diyabet hastasının % 85’ inde intravenöz günlük 600 mg lipoik asit infüze edildikten 3 hafta sonra semptomlarında belirgin azalma olmuştur. Plasebo grubuna göre lipoik asit grubunda çok az yan etki görülmüştür. Lipoik asidin gastrointestinal sistemde iyi absorbe edildiği göz önünde tutulursa oral dozdan da benzer sonuçlar beklenebilir(58).

Almanya’daki araştırmacılar Tip II DM’ li, glukozun uyardığı insülinin azaldığı hastalarda lipoik asit verilmesinin % 50 artma ile sonuçlandığını rapor etmişlerdir. Bir Mayo kuruluşunun çalışmasında lipoik asit verilen hastaların bir ay sonra normal kan akımı gösterdiği, aynı zaman da sinir iletimini geliştirdiği bulunmuştur(36).

Nöropatinin rahatlamasının ardında, hücre düzeylerinde etkin glukoz geri alınımını sağlayan insülin reseptörlerinin yetersizliği olan insülin direncinin azalmasında yararı olan lipoik asidin diyabetiklere verilmesi yatmaktadır. İnsülin direnci Tip II diyabetli pek çok kişinin altta yatan probleminin nedenidir. Telafi etmek için pankreas daha çok insülin salgılar ve hiperglisemi ile sonuçlanır.

Vücutun bu tamamlayıcı yolu kalp hastalıklarının gelişmesini ve hipertansiyon riskini artırır. Çalışmalar lipoik asidin hiperglisemiye düşürebildiğini ve oral hipoglisemik ajanlara alternatif olabileceğini göstermektedir(59,60).

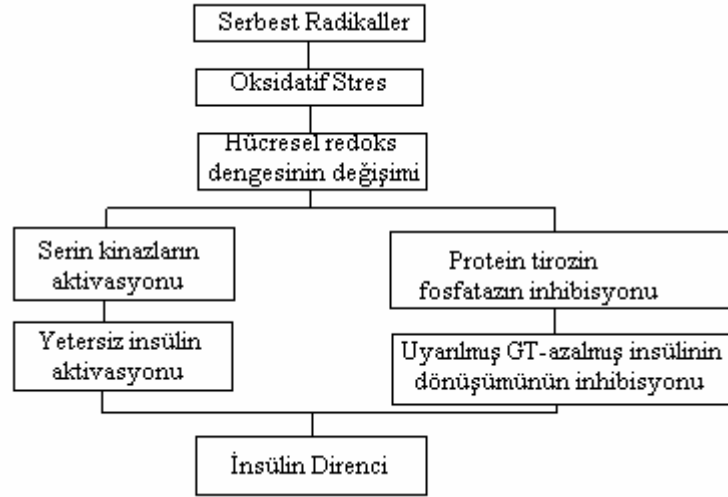


Şekil 14. Diyabetin geç komplikasyonlarının gelişim mekanizması(1).

İnvitro ve invivo pekçok çalışmada α - lipoik asidin antihiperglisemik etkileri araştırılmıştır. α - lipoik asit kas hücreleri içine glukoz girişini artırır, glikolizis hızını azaltır ve genel glukoz kullanımını artırır. Ayrıca karaciğerden kana glukoz serbestlenmesini sağlayan glukoneogenezi baskılar. Tip II diyabetli insanlarda α - lipoik asit tüketiminin fruktozamin düzeylerini azalttığı ve insülin seviyesini arttırdığı kanıtlanmıştır(5).

Dört gün boyunca günde 10 mg/kg ip. verilen lipoik asit, normal ve diyabetik dişi Sprague-Dawley ratlarda karaciğer, böbrek ve kalpte oksidatif stres parametrelerinde diyabetin meydana getirdiği değişiklikleri önlemiştir. α -lipoik asit tedavisinin yan etkileri bildirilmemiştir, ratlarda LD 50 yaklaşık 400-500 mg/kg' dır(61).

Almanya'da plasebo kontrollü üçlü çalışmada Tip II diyabetli 74 hastaya 600, 1200 veya 1800 mg lipoik asit veya plasebo verilmiştir. Dört hafta sonra tedavi olan bütün gruplarda plaseboya göre glukozda düzelme görülmüştür. Lipoik asit grupları arasında belirgin fark yoktur. Tedavi gruplarının ortak sonuçlarında, plasebo grubuna göre glukoz geri alınımını insülin uyarımında % 27 artış görülmüştür. Ayrıca hiçbir tedavi grubunda ciddi yan etki yoktur(24).



Şekil 15. Oksidatif stresin indüklediği insülin direncine karşı lipoik asidin koruyucu etkileri(1).

Lipoik asidin normal dozu günde 50-150 mg iken Almanya’da diyabetik komplikasyonlar ve diyabetin başlangıcındaki bireylerde tedavi için daha yüksek dozlarda kullanılması onaylanmıştır. Rostrochsudstat klinikteki doktorlar özellikle diyabetik nöropatinin semptomlarını azaltmak için günde 600 mg lipoik asit kullandıklarını bildirmişlerdir(36).

Lipoik asit diyabetikler için gerekli bir maddedir. Diyabetikler lipoik asitten büyük oranda yararlanırlar. İlk olarak lipoik asit vücut hücrelerinde insülin reseptörlerinin fonksiyonunu optimize etmeye yardım için kritiktir. Vücutta serbest radikal aktivite yüksek olduğu zaman insülin reseptörleri iyi çalışamaz, lipoik asit bu problemi düzeltir. İkinci olarak lipoik asit arterlerde plakların oluşumu ve yüksek kan şekere düzeylerinin meydana getirdiği doku hasarı, katarakt, diyabetik nöropatiyi içeren diyabetin komplikasyonlarını geri döndürebilir ve önlemeye yardım eder(62,63,64). Lipoik asit, Tip II diyabetli hastalarda insülin duyarlılığını iyileştiren multifonksiyonel bir antioksidandır. Lipoik asit Almanya’ da 30 yıldan fazla zamandır diyabete bağlı nöropatinin tedavisi için kullanılmaktadır(65).

Diyabetik grupta intrauterin gelişme geriliği, kraniofasiyal malformasyonlar, parmak ve iskelet hipoplazileri insidansı fazladır. Lipoik asit özellikle bu anormallikleri azaltmıştır(66).

1.1.12.8. Kansere Karşı Koruyucu Etkileri: Yaşlanan insanda vitamin E, vitamin C, koenzim Q10 ve glutatyon gibi ana antioksidanların sentez, geri dönüşüm ve konsantrasyonlarında azalma kaydedilir. Bu antioksidan fonksiyon kaybı vücudun

serbest radikalleri kontrol edebilmesinde ciddi bozukluk yapar. Kontrolsüz serbest radikaller vücut boyunca çoğalır, hücre membranlarını, organlarını ve bağışıklık fonksiyonunu bozar. DNA'nın kenarlarını etkiler, kanser ve diğer dejeneratif hastalıkların gelişimine katkıda bulunur(67). Serbest radikaller hücre membranlarını bozduğu için hücrenin fonksiyonel içeriğinin hasarlı membrandan sızmasına izin verir. Serbest radikaller ile hasarlanan DNA hücrenin normal yapısını değiştirir. Serbest radikallere maruz kalan hücreler mutasyona uğrar, kontrolsüz çoğalır ve kanser meydana gelir. Lipoik asit antioksidan özellikleri ile kanser gelişiminin hızını azaltan bir rol oynayabilir. Lipoik asit aynı zamanda kanser başlamadan önce bir gün kanser meydana getirecek genetik programa sahip hücreleri durdurma potansiyeline de sahiptir(50).

Ratta karaciğer tümör oluşumunda karsinojen metabolizma boyunca oksidatif stresin etkili olduğu bilinmektedir. Lipid peroksidasyon düzeyleri N-dietilnitrozamin verilmesinden 3 ile 24 saat sonra yükselmektedir(68).

1.1.13. Lipoik Asidin Analizi

Gaz kromatografisi (GC), gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GC-MS) ve yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) yiyeceklerdeki ve biyolojik lipoik asidin tespit edilmesinde oldukça çok kullanılmaktadır. Bunlardan GC ve GC-MS metodları yüksek derecede spesifiktir. Bununla beraber pahalı ekipman gerektirirler. HPLC metodu rutin analizler için oldukça pratiktir. Yeni bir HPLC metodu lipoillisin için spesifiktir, dokulardaki ve yiyecek maddelerindeki lipoik asidin tespit edilmesine olanak sağlar. Bu metod proteaz sindirimi gibi basit preparasyonu içermektedir. HPLC aynı zamanda elektrokimyasal veya floresans ortaya çıkarma ile insan plazmasında lipoik asidin tespit edilmesinde de kullanılmaktadır. Bu durumda R ve S enantiyomerlerinin ayırıcı analizleri, okside ve redükte lipoik asit tespit edilmektedir(1).

1.1.14. Lipoik Asidin Dozu

Lester Packer' in 'Mucize Antioksidan' adlı lipoik asit hakkındaki kitabında, insanlar için düzenli olarak 100 mg/gün lipoik asit alınması önerilmektedir. Genellikle günde 50- 100 mg dozlarda beslenmeye ilave edilmesi tavsiye edilmektedir. Tedavi edici

ajan olarak daha yüksek dozlarda kullanılabilir. Bazıları sağlık problemlerinde lipoik asit miktarının günlük 400-600 mg'a kadar çıkılabileceğini tespit etmiştir(68). Almanya'da diyabette hipergliseminin hasar verici etkilerini önlemek için günlük 600 mg reçete edilmektedir. Aminita muscorum zehirlenmesi tedavisinde kullanılan 1200 mg gibi yüksek dozlar intravenöz verilir(49).

Sonuç olarak genel sağlık , yaşlanma etkilerini yavaşlatmak ve optimal antioksidan etkiler için günlük 100-200 mg dozda alınır. Diyabet, hepatitler ve ağır metal zehirlenmelerinde günlük 300-600 mg gereklidir(70).

1.1.15. Lipoik Asidin Yan Etkileri

Klinik araştırmalar lipoik asidin kullanılması ile karsinojenik etkilerin olmadığını göstermiştir. Yüksek dozlarda bile ciddi yan etkiler gözlenmemiştir. Minör yan etkiler deri reaksiyonlarını ve bulantı–kusma gibi gastrointestinal etkileri içerir. Bununla beraber bu etkiler yalnız intravenöz infüzyonla hergün 1200 mg veya daha yüksek dozda alanların küçük bir yüzdesinde gözlenmiştir.

Gebelik boyunca lipoik asit kullanımıyla ilgili zararlı yan etki bilgileri elde edilememiştir. Bilimsel araştırmalar ve klinik kullanımlar 30 yılı aşkın bir zaman boyunca lipoik asit kullanılmasıyla ilgili ciddi yan etkiler bildirmemiştir. LD 50 köpeklerde yaklaşık olarak 400-500 mg/kg oral dozdan sonradır(69). Ratlarda LD 50 yaklaşık 400-500 mg/kg' dır(61).

Lipoik asidin yüksek dozları tiyamin eşliğinde kullanılabilir. Lipoik asit alındığı sürece diyetle B kompleks vitamin desteği olmasının yararlı olacağı muhtemeldir (70).

1.1.16. Lipoik Asidin Yararları

1. Yaşlanma sürecini yavaşlatır.
2. Doğal olarak enerjiyi artırır.
3. Diğer besin maddelerinin hepsinden daha güçlü serbest radikal önleyicidir.
4. Hidrofilik ve lipofilik özellikleri sayesinde beyinde, kanda, yağ depolarında, kalpte, pankreasta, böbreklerde, kemiklerde, kıkırdakta, karaciğer ve bütün organların bütün hücrelerinde serbest radikal hasarını önler.
5. Derideki koruyucu kollajen ile kırışıklıkları önler.

6. Vitamin C, E ve glutatyon gibi diğerk antioksidanları tekrar aktifleştirir.
7. Vücudun kan şeker metabolizmasının daha iyi olmasına yardım eder, böylece diyabetiklere ve hipoglisemiklere yardım eder.
8. Civa, arsenik, bakır, demir, kadmiyum, fazla kalsiyum ve kurşun gibi toksik metallerin vücuttan uzaklaştırılmasına yardım eder
9. DNA ve RNA'yı hasardan korur(70).
10. Lipoik asit aynı zamanda ilaçların içerdiği toksinlerden vücudu korur. Lipoik asit ayrıca alkol, temizleyici maddeler, endüstriyel kimyasallar ve mantar toksinlerinin zarar verici etkilerine karşı koruyucudur(71).

1.2. TOKSİK MADDELER

1.2.1. Toksik Maddelerin Metabolizması

Çeşitli yollarla organizmaya giren lipofilik kimyasal maddeler enzimlerin katabolik etkisi ile kimyasal reaksiyonlara girerler ve böylece 'hidrofilik metabolitlere' dönüşürler. İşte bir ksenobiyotiğin canlı organizmada uğradığı kimyasal değişmelerin tümüne biyotransformasyon denir. Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu organizma için birçok açıdan önem taşımaktadır. Lipidde çözünen apolar kimyasal maddelerin enzimatik reaksiyonlarla daha polar metabolitlere dönüşmeleri ile atılımları kolaylaşır. Diğer taraftan yabancı kimyasal bir madde ancak organizmada enzimatik reaksiyonlar sonucu aktif metabolite dönüşerek toksik etki gösterebilir.

Ksenobiyotiklerin biyotransformasyon mekanizmaları 2 fazda toplanabilir:

- 1.Faz-1 reaksiyonları: Yükseltgenme(oksidasyon), indirgenme(redüksüyon), hidroliz.
- 2.Faz-2 reaksiyonları: Çeşitli konjugasyon ve sentez olaylarını içerir.

1.2.1.2. Biyolojik oksidasyon: Özellikle oksidasyon-redüksiyon(redoks) reaksiyonları ve bunları kataliz eden enzim sistemleri yabancı kimyasal maddelerin biyotransformasyonunda geniş yer alırlar. Bu sistemde rol oynayan en önemli enzim sistemleri ise sitokrom P-450 sistemidir. Sitokrom P-450 demirli bir pigment olup indirgenmiş şeklinin karbonmonoksit(CO) verdiği kompleks spektrofotometrede 450 nm' de maksimum absorban(Sonet bandı) verir. Bu nedenle de sitokrom P-450 adı verilmiştir. Sitokrom P-450' ler, 'b-sitokrom' tipinde hemoproteinlerdir.

Sitokrom P-450 monooksijenaz sistemi ile oluşan oksidasyonlar:

- 1- Alifatik hidroksilasyon,
- 2- Alifatik epoksidasyon,
- 3- Aromatik epoksidasyon ve hidroksilasyon,
- 4- N-, O- veya S- oksidasyon,
- 5- N-hidroksilasyon,
- 6- Deaminasyon(oksidatif),
- 7- S-oksidasyon(sülfoksit ve sülfon oluşumu),
- 8- P-oksidasyon,
- 9- Desülfürasyon ve ester kırılması,
- 10- Oksidatif dekolojenasyon.

1.2.2. Toksik Etki Mekanizmaları

Genel olarak kimyasal maddeler canlılarda fizikokimyasal veya kimyasal yolla normal hücre biyokimyasını ve fizyolojisini bozarak toksik etkilerini gösterirler.

- 1-Reseptörlerle etkileşme,
- 2-Enzimlerle birleşme,
- 3-Diğer biyomoleküllere bağlanma,
- 4-Küçük molekül veya iyonla birleşme(kelasyon),
- 5-Hücre enerjisi oluşumunun engellenmesi.

1.2.2.1. Kimyasal Karsinogenezis: Genel olarak karsinojen terimi, biyolojik sistemlerde kanser oluşturan herhangi bir etken için kullanılmaktadır. Bu etkenler kimyasal maddeler, fiziksel etkenler veya virüsler olabilir. Kimyasal karsinojenler ise spesifik toksik etkilerini insan ve hayvanlarda kanser oluşturarak gösterirler. Bu olaya 'kimyasal karsinogenezis' denir.

Kanser, 'hücrelerin, fenotipik veya genetik kodlarındaki değişme sonucu anormalleşerek baskısız büyümeleri ve yayılması prosesi' olarak tanımlanabilir. Karsinojen deyimini sözlük anlamı olarak malign tümör oluşturan herhangi bir maddeyi ifade etmektedir.

1.2.2.2. Karsinogenezis Mekanizması: Kimyasal maddelerle oluşan kanser, çevresel ve endojen faktörler arasındaki etkileşimleri içeren çok basamaklı kompleks

bir prosestir. Bu mekanizmanın başlıca özelliği, somatik hücrelerin düzenli çoğalmasını sağlayan karmaşık kontrol sisteminin bozulmasıdır. Kimyasal karsinogenezisin neden olduğu malign neoplazma oluşumunda en az 3 önemli basamak bilinmektedir:

- 1- Başlangıç(imitation),
- 2-Gelişme(promation),
- 3-İlerleme(progresyon).

Nitrozaminler çok etkin karsinojenler olup, özellikle mide asiditesinde sekonder aminlerle nitritlerin etkileşmesinden oluşmaları ile dikkati çekmektedirler. N-nitrozonornikotin gibi sigara dumanında da bulunan bu maddeler hidroksilasyondan sonra alkilendirici maddelere dönüşerek karsinojenik aktivite gösterirler. Sıçanlarda hepatotoksik ve karaciğer kanserine neden olan alkilnitrozaminler ve nitrozopiperidin gibi nitrozaminler, primer veya sekonder amin yapısı içeren besin maddelerinin etkileşmesinden oluşmaları nedeni ile son 25 yılda önemli çevre karsinojenleri arasına girmişlerdir.

1.2.2.3. Hepatokarsinogenezis: Hepatokarsinogenezis deney hayvanlarında geniş olarak araştırılmıştır. Doğal kaynaklı maddelerden aflatoksin-B1 ve diğer mikotoksinler, bazı pirolizidin alkaloidleri, cycasin ve safrol hayvanlarda karaciğer kanserine neden olurlar. Sentetik maddelerden dialkilnitrozaminler, bazı organik klorlu pestisitler ve poliklorobifeniller, karbontetraklorür, kloroform, vinilklorür, dimetilaminoazobenzen, asetilaminofloran, tiyoasetamid, uretan, etiyonin, dimetilbenzantrosen ve galaktoziminin hayvanlarda hepatokarsinojenik etkileri saptanmıştır.

Hepatokarsinogenezis başlama, gelişme ve ilerleme olmak üzere çok basamaklı bir proses olarak düşünülmektedir. Beslenme, hormonlar, ilaçlar ve diğer kimyasal maddeler gibi değişik faktörlerin karaciğer kanseri insidansı ve başlama süresi üzerinde etkili olduğu bilinmektedir.

1.2.2.4. Hepatotoksiklerin Karaciğer Fonksiyonlarına Etkisi: Karaciğer zehirleri, karaciğerin biyokimyasal mekanizmaları gibi normal metabolik fonksiyonlarını da bozabilirler. Bazı maddeler karaciğer mikrozomal elektron taşıma sistemini etkileyebilirler. Bu konuda en çok karbontetraklorürün etkisi araştırılmıştır. Bu maddenin hepatic mikrozomlarda lipid peroksidasyonunu stimüle ederek sitokrom P-

450 ve 'hem' miktarının azalmasına; glukoz-6-fosfataz ve pirofosfataz enzim aktivitelerinin önemli derecede azalmasına; UDP-glukuronil transferaz ve monoesteraz enzimlerinin ise stimülasyonuna neden olduğu gösterilmiştir.

Bazı hepatotoksik maddeler ise endoplazmik retikulumdan çok mitokondriler, lizozomlar ve çekirdekler gibi subsellüler organelleri etkileyerek buradaki enzimlerin aktivitelerini artırır veya azaltırlar. Böylece zehirlenmelerde, asit fosfataz, β -glukuronidaz ve lizozomlardaki diğer hidrolazların; mitokondrilerdeki trikarboksilik asit siklusu enzimlerinin salındıkları gösterilmiştir.

Gerek sitozollerden ve gerekse subsellüler organellerden salınan enzimler, difüzyon veya filtrasyonla kana geçerler. Bu nedenle serum enzim düzeylerinin tayini hepatotoksisitenin gösterilmesinde duyarlı bir göstergedir. Böylece alkalin fosfataz, 5-nükleidaz, glutamil transpeptidaz, izositratdehidrogenaz, alanin aminotransferaz(ALT) ve aspartat aminotransferaz(AST) gibi enzimlerden bir veya birkaçının serum tayinleri karaciğer zehirlenmelerinde teşhis amacı ile kullanılırlar.

LD 50(median letal doz): Deney hayvanlarına belirli koşullarda ve doğrudan uygulanan toksik maddenin, bu hayvan popülasyonunun % 50' sini öldüren dozu olarak tanımlanır(72).

1.3. DİETİLNİTROZAMİN (DEN)

Gelişen gıda teknolojisi ile beraber gıdaların uzun süre muhafazası amacıyla fazla miktarda kullanılan nitrat, nitrit gibi katkı maddelerinin nitrozaminlere dönüşmesi ve doymuş yağ ile kolesterol oranı yüksek diyetlerden oluşan beslenme şekilleri organizmada geri dönüşümsüz hasarlar meydana getirmekte, metabolik olayların çoğunun meydana geldiği karaciğer ise bu durumdan en çok etkilenen organ olmaktadır.

Karsinojen bir madde olan dietilnitrozaminin(DEN) insektisitlerden, tarımda kullanılan kimyasallardan ve nitrattan şekillendiği, sigara dumanında bulunduğu ve aynı zamanda besinlerde bulunan nitratın midede sekonder ve tersiyer aminlerle reaksiyonu sonucu da meydana geldiği bildirilmektedir. DEN karsinojenik bileşiklerden birisi olup, kauçuk endüstrisi gibi iş sahalarında, sigara dumanı, alkollü içkiler ve işlenmiş et ürünlerinde bulunmakta, bazı terapötik ilaçların karaciğerde metabolize edilmesi sırasında da ortaya çıkabilmektedir(73).

Nitrozaminler oldukça tanınmış karsinojenik bileşiklerdir, fakat onların sitotoksik ve karsinojenik aktiviteleri metabolik aktivasyonlarını kullanmaları için gereklidir. Dietilnitrozamin hepatik karsinomaya neden olan bir nitrozamin bileşimidir. Özellikle karaciğer DNA' sında DEN' in doz bağımlı davranışı ile yükselen 8-OH 2' deoksiguanozin (8-OHdG) düzeylerinin DNA'nın oksidatif hasarını belirttiği rapor edilmiştir. 8-OHdG miktarı erken dönemde DEN verilmesinden 6 saat sonra yükselmektedir. Tümör oluşumundan sorumlu olan lipid peroksidasyonu ile DEN aktivasyonu ile çevresel serbest radikaller arasında ilişki gösterilmektedir. Bununla beraber antioksidanların DEN' in meydana getirdiği hepatik karsinomaya karşı koruyucu etkileri için kullanıldığı gösterilmektedir. Bu olay DEN ile başlayan hepatik karsinogeneziste serbest radikallerin önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir. DEN'den türeyen serbest radikaller invitro deneyler sırasında mikrozomal metabolizma yoluyla oluşmaktadır, bununla beraber invivo serbest radikallerin yükselmesinin doku hasarıyla ilgili olduğu daha kesin değildir. Bu sonuçlar DEN' in metabolizmasının sitokrom P-450 ile olduğu ve oluşan serbest radikallerin göze çarpan biçimde artmasının DEN' in sitokrom P-450 yoluyla metabolizmasına ve serbest radikallerine bağlanabileceğini göstermektedir(10). DEN sitokrom P-450'ye bağlı monooksijenaz sisteminin enzimleri tarafından uzaklaştırılmakta, bu sırada meydana gelen reaktif ara ürünler, bağlayıcı enzimlerin katalitik bölgelerine ilgileri az olduğu için idrarla atılamayıp önemli hücre bileşenleriyle kovalent bağlar oluşturarak nekroz, mutasyon ve kansere neden olmaktadır(74).

Son yıllarda DEN' in yalnız karaciğerde değil aynı zamanda böbrek dokusunda da oksidatif strese neden olduğu rapor edilmiştir. Sonuç olarak DEN ile tümör gelişimi ve erken aşamalarda serbest radikal oluşumu arasındaki klinik belirginlik dikkat çekicidir. DEN gibi nitrozaminler başlıca sitokrom P-450 monooksijenazlar ile metabolize olmaktadır ve lipid radikaller invivo mikrozomal metabolizma yoluyla oluşmaktadır. Bu sonuçlar karaciğerde lipid bağı serbest radikallerin DEN verilmesinden 1-24 saat içinde oluştuğunu belirtmektedir(10).

Morfolojik ve biyokimyasal yöntemler ile DEN' in rat karaciğerinde oluşturduğu dejeneratif ve rejeneratif değişiklikler incelenmiştir. Rat karaciğerinde apoptotik değişikliklerin gözlemlendiği 10 mg/kg doz subnekrojenik, 100 mg/kg doz nekrojenik

doz olarak kabul edilmiştir. Sadece 2. grupta zonal sentrilobuler nekrozlar gözlenmiştir. Yüksek dozda hayvanlarda mitotik aktivite ve DNA sentezinde artma gibi rejeneratif değişiklikler meydana gelmektedir(75).

1.4. ADENOZİNDEAMİNAZ(ADA)

Adenozindeaminaz(ADA) pürin nükleotid katabolizmasında, inozin ve deoksiinozini irrevesibl olarak adenozin ve deoksiadenozine çeviren bir enzimdir. ADA, özellikle lenfositlerin proliferasyonu ve diferansiyasyonunda rol oynamaktadır. ADA aktivitesi lenfositik hücrelerde eritrositlere oranla 10 kat daha fazla bulunmaktadır. T lenfositlerde B lenfositlere göre daha yüksek oranda bulunur ve T hücre farklılaşması sırasında belirgin derecede artış göstermektedir. Bu nedenle, ADA hücresel immünitinin bir göstergesi olarak da kabul edilmektedir. Vücut sıvılarında ve serumda ADA aktivitesinin çeşitli hastalıklarda arttığına yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Bu hastalıklar; tifo, enfeksiyöz mononükleoz, sarkoidozis, karaciğer hastalıkları, akut lösemi, brusella, akut pnömoni, romatoid artrit ve çeşitli malignitelerdir(76).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi ve Tıp Fakültesi Biyokimya araştırma laboratuvarları ile Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinde gerçekleştirilmiştir. Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu'nun 20-06- referans no ve 040 sayılı izni ile hayvan denemelerine başlanmıştır.

2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

- 1- Vorteks: Heidoldh.
- 2-Magnetik karıştırıcı: Velp science the fica.
- 3-Spektrofotometre: Shimadzu UV-1601.
- 4-Derin dondurucu: Siemens.
- 5-Hassas terazi: Precisa, 205 ASC. 0.0001 g.a duyarlı.
- 6-Değişik hacimlerde otomatik pipet: Epanendorf, Scorex.
- 7-Taşınabilir terazi: Nüve.
- 8-Otoanalizör: Roche firmasına ait Cobas Integra 400.
- 9-Otoanalizör: Roche firmasına ait Modular P.
- 10- Soğutmalı santrifüj: Nüve, NF 1000R.
- 11- Tioctic Acid(Alfa Lipoik Asit): Sigma.
- 12- N-Nitroso diethylamine(DEN):Sigma.
- 13- Metafosforik asit: Merck.
- 14- EDTA (Etilen diamin tetraasetik asit): Merck.
- 15- NaCl (Sodyum klorür): Merck.
- 16- Disodyum hidrojen fosfat: Merck.
- 17- DTNB: Sigma.

2.2. 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 ad libitum olarak verilmiştir.

Deneye başlamadan önce ratların genel muayeneleri yapılmış ve her grupta 7 rat olacak şekilde 7 gruba ayrılmıştır. Bir hafta adaptasyon süresi beklendikten sonra deneye başlanmıştır. Deney çalışmaları hergün saat 17.⁰⁰ ile 18.⁰⁰ saatleri arasında 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 çözdürülerek 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 çözdürülerek 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 çözdürülerek 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.

Onbeş 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 GSH (redükte glutatyon) ve MDA (malondialdehit) düzeylerinin saptanması amacıyla hiçbir işleme tabi tutulmadan tam kan olarak ayrılmıştır. Geriye kalan kan örneklerinden AST (aspartataminotransferaz), ALT (alaninaminotransferaz), ALP (alkalenfosfataz), GGT (gamaglutamiltransferaz) ve ADA (adenozindeaminaz) parametrelerinin ölçülmesi için santrifüjleme işlemiyle plazma elde edilmiş, numuneler ölçümleri yapıncaya 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.

2.3. GSH Analizi

2.3.1. Prensip: EDTA' lı kanın distile su ile hazırlanan hemolizinde, sülfidril (SH) taşımayan tüm proteinler çöktürücü (presipitasyon) çözelti ile çöktürüldü. GSH, elde edilen berrak sıvıda sülfidril gruplarının DTNB (5,5'-(2-ditiobis nitrobenzoik asit)) ile reaksiyonu sonucu sarı rengin oluşumu ile ölçüldü. EDTA'lı kanlarda GSH konsantrasyonunun tayini, 24 saat içerisinde, spektrofotometrede 412 nm'de gerçekleştirildi.

2.3.2. Ayıraçlar

Çalışmada kullanılan ayıraçlar şunlardır:

1. Çöktürücü çözelti: 1,67 g metafosforik asit, 0,2 g EDTA (disodyum etilen diamin tetraasetik asit), 30 g NaCl 100 ml'ye distile suda eritilerek tamamlandı.
2. Fosfat çözeltisi: 0,3 M disodyum fosfat distile su ile hazırlandı.
3. DTNB (Ellman's ayıracı): 40 mg DTNB(5,5'ditiobis-(2-nitrobenzoik asit)) % 1 sodyum sitrat, 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

2.3.3. Deneyin yapılışı

EDTA'lı tüm kandan 200 µl 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 ayıracı eklendi. Blank için 2 ml çöktürücü çözelti (3 kısım çöktürücü çözelti+ 2 kısım distile su), 8 ml fosfat çözeltisi ve 1 ml DTNB ayıracı 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 tüm kan olarak hesaplandı. Eritrositte GSH miktarı tayini için; hemotokrit değer ölçüldü ve tüm kandaki GSH miktarı, hemotokrit değere bölünerek bulundu(77).

2.4. MDA Analizi:

2.4.1. Prensiip

Serbest radikaller sonucu oluşan peroksidasyon ürünlerinden MDA tayini, Draper ve Hadley'in çift kaynatma yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Metot, yağ asitlerinin peroksidasyonunda bir son ürün olan MDA (malondialdehit)'in, TBA ile reaksiyona girerek 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümde maksimum absorbans vermesi prensibine dayanmaktadır.

2.4.2. Reaktifler

Kullanılan reaktifler şunlardır:

1. % 10'luk TCA çözeltisi: 10 gr TCA distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanır.
2. % 67'lik TBA çözeltisi: 100 ml 0,05 N NaOH çözeltisinde 0,67 gr TBA çözdürülerek hazırlanır.

2.4.3. Yöntemin uygulanışı

Tam kan örneklerinden alınan 0,5 ml. numune, 2,5 ml. % 10'luk TCA ile temiz vida kapaklı deney tüpünde karıştırılarak 95°C'de 15 dakika kaynatılmıştır. Daha sonra hemen soğutularak 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. Soğutmayı 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(78).

2.5. AST, ALT, GGT ve ALP Analizi

Roche firmasına ait Cobas Integra 400 otoanalizöründe Roche firmasına ait kitler kullanılarak çalışılmıştır.

2.6. ADA Analizi

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

2.7. 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 sapma, minimum ve maksimum değerler kullanılmıştır.

3. BULGULAR

Çalışmaya her grupta 7 rat olmak üzere 49 rat dahil edilmiştir.

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 çözdürülerek 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 çözdürülerek 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 çözdürülerek 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.

Tüm parametrelerin gruplara ait ortalama değerleri Tablo 4’de verilmiştir.

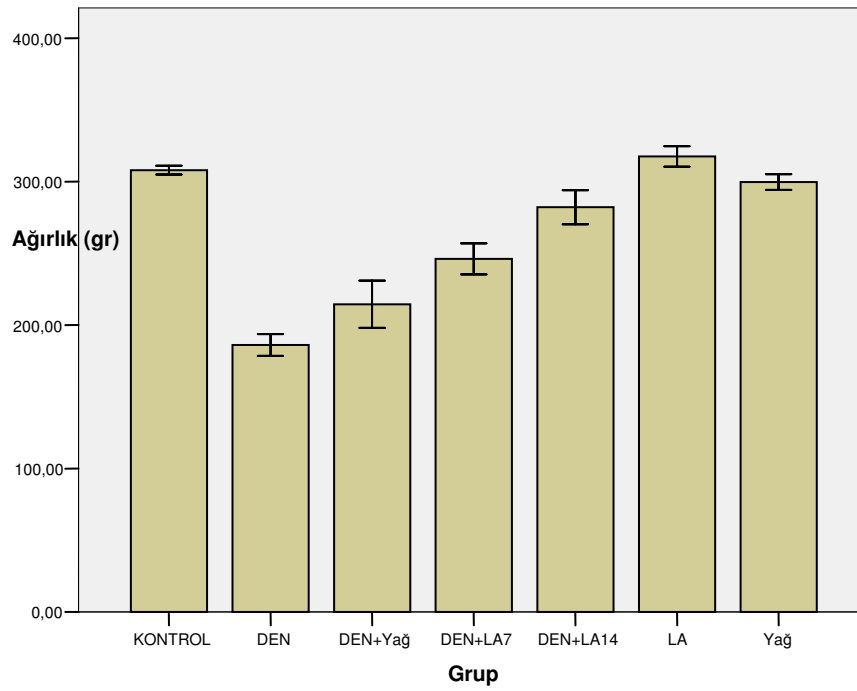
Tablo 4: Parametrelerin gruplara ait ortalama değerleri.

	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	308±1,25ef*	186,14±3,11a	214,42±6,72 b	246,14±4,43 c	282,14±4,86 d	317,57±2,90f	299,7±2,25 e
GSH	38,12±0,47d	27,25±0,74a	32,37±0,61b	34,06±0,50b c	35,74±0,28c d	43,36±2,19e	37,21±0,46 d
MDA	3,24±0,07b	6,48±0,12g	5,45±0,05f	4,68±0,06e	4,24±0,10d	2,64±0,06a	3,72±0,05c
AST	106,89±2,30 a	310,30±20,28e	215,43±3,86 d	177,80±2,62 c	148,41±3,07 b	125,89±2,65ab	136,9±1,81 b
ALT	45,98±2,11a	116,96±2,36g	100,18±2,41f	86,05±0,67e	73,07±1,34d	57,56±0,50b	64,51±0,56 c
GGT	1,45±0,04a	8,78±0,52f	6,39±0,50e	3,97±0,13d	3,40±0,07cd	2,18±0,07ab	2,79±0,06b c
ALP	146,45±5,46 a	404,06±24,74f	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	0,41±0,08a	19,06±2,45f	8,89±0,15e	7,09±0,21de	5,62±0,12cd	2,76±0,30ab	4,03±0,12b c

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

Ağırlık Parametresi

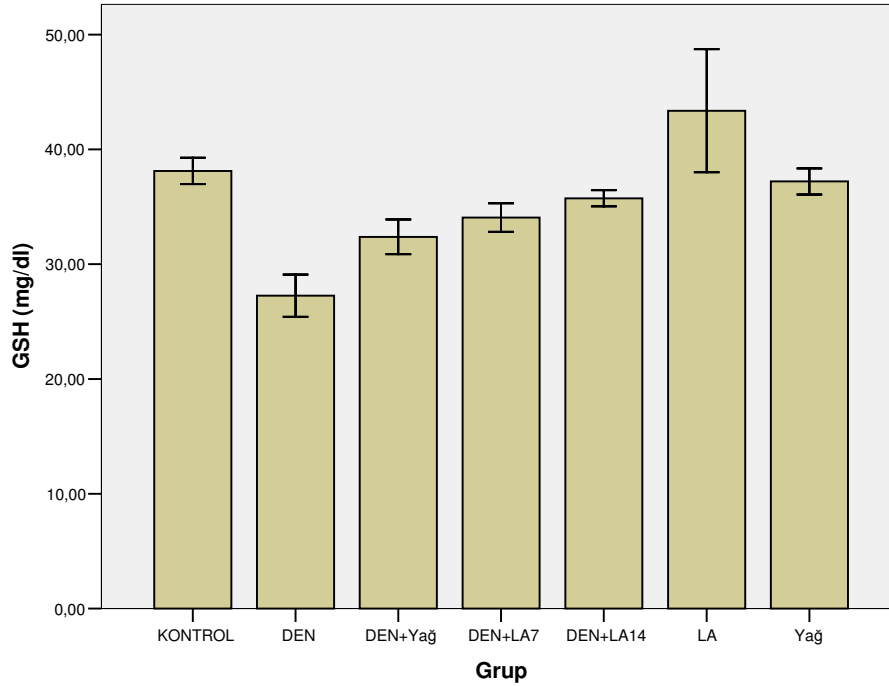
Grupların ağırlık parametresine göre değerlendirilmesinde; Tablo 4 ve Grafik 1’de görüldüğü gibi, sadece DEN verilen grup 2’de ağırlık kaybı kontrol grubuna göre çok fazla olmuştur. DEN ile beraber 14 gün α -Lipoik asit verilen grup 5’de grup 2’e göre belirgin yükselme olmuştur. Grup 5’deki artma DEN ile beraber 7 gün α -Lipoik asit verilen grup 4’den daha belirgindir. Kontrol grubu, sadece zeytinyağı verilen grup 7 ve sadece α -Lipoik asit verilen grup 6 arasında yakın değerler elde edilmiştir.



Grafik 1 : Grupların ağırlık grafiklendirilmesi

3.2. GSH Parametresi

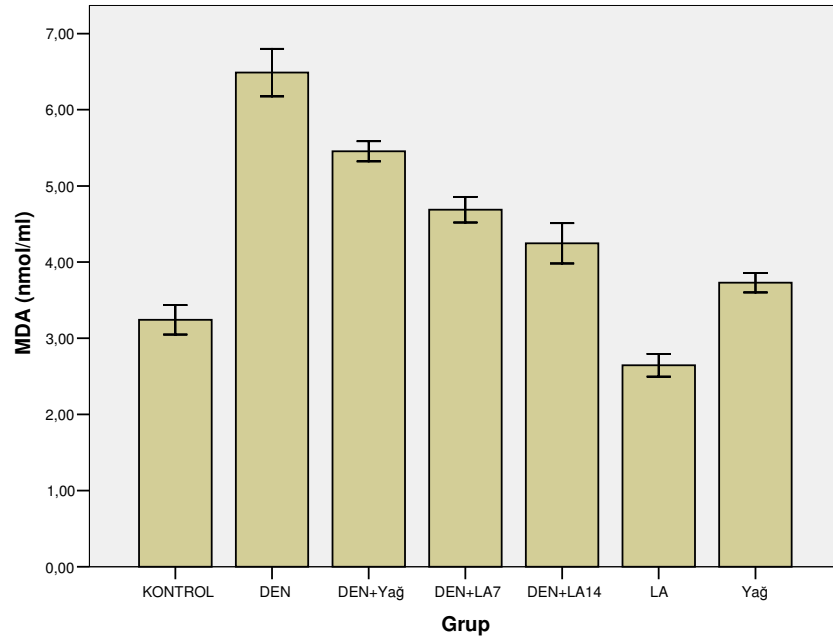
Grupların GSH parametresine göre değerlendirilmesinde; Tablo 4 ve Grafik 2’de görüldüğü gibi, sadece DEN verilen grup 2’de kontrol grubuna göre önemli azalma izlenmiştir. Sadece α -Lipoik asit verilen grup 6’ da kontrol grubuna göre artma vardır. DEN ile beraber zeytinyağı verilen grup 3 ve DEN ile beraber 7 gün α -Lipoik asit verilen grup 4 arasında benzerlik vardır. Grup 4 ve DEN ile beraber 14 gün α -Lipoik asit verilen grup 5 arasında benzerlik vardır. Sadece zeytinyağı verilen grup 7, DEN ile beraber 14 gün α -Lipoik asit verilen grup 5 ve kontrol grubu arasında benzerlik vardır.



Grafik 2: Grupların GSH grafiklendirilmesi

3.3. MDA Parametresi

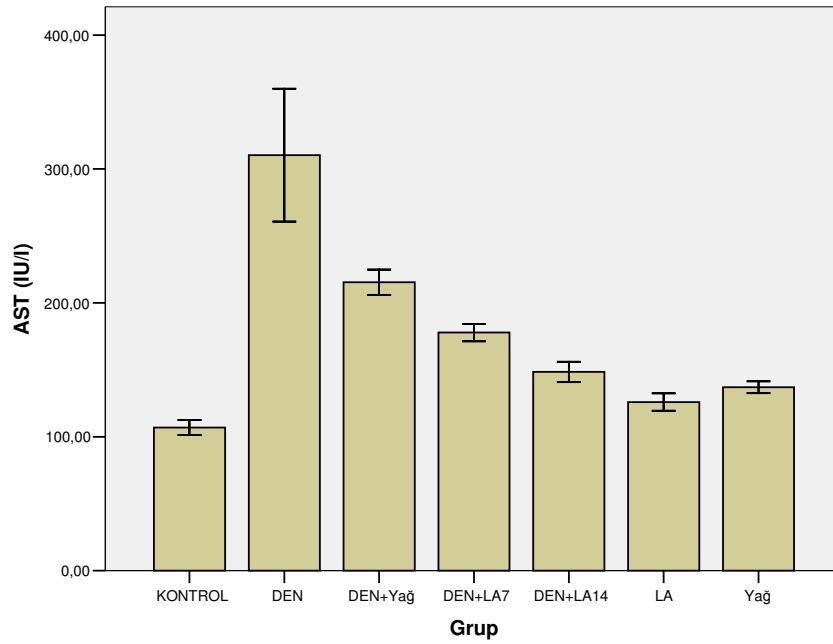
Grupların MDA parametresine göre değerlendirilmesinde; Tablo 4 ve Grafik 3’de görüldüğü gibi, sadece DEN verilen grup 2’de kontrol grubuna göre artış çok belirgin bulunmuştur. Hem zeytinyağı hem de α - Lipoik asit verilen gruplarda MDA seviyelerinde belirgin azalma olmuştur. Sadece α - Lipoik asit verilen grup 6’daki değerler kontrol grubuna göre daha düşüktür. DEN ile beraber 14 gün α - Lipoik asit verilen grup 5’deki değerler DEN ile beraber 7 gün α - Lipoik asit verilen grup 4’deki değerlerden daha düşüktür.



Grafik 3: Grupların MDA grafiklendirilmesi

3.4. AST Parametresi

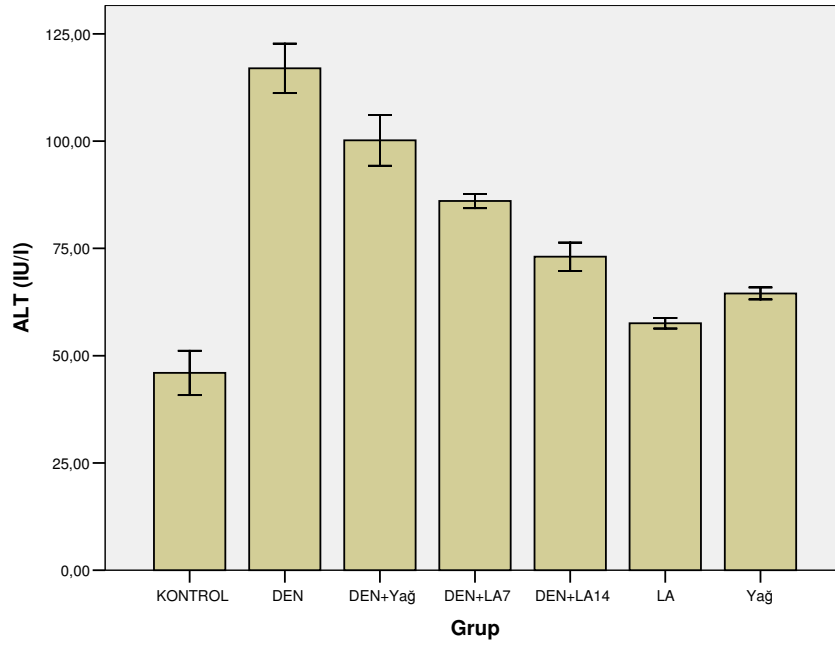
Grupların AST parametresine göre değerlendirilmesinde; Tablo 4 ve Grafik 4’de görüldüğü gibi, sadece DEN verilen grup 2’de kontrol grubuna göre belirgin yükselme tespit edilmiştir. Hem DEN ile beraber 7 gün α - Lipoik asit verilen grup 4’de hem de DEN ile beraber 14 gün α - Lipoik asit verilen grup 5’ de belirgin düzelme kaydedilmiştir. Sadece α - Lipoik asit verilen grup 6, sadece zeytinyağı verilen grup 7 ve DEN ile beraber 14 gün α - Lipoik asit verilen grup 5 arasında benzerlik bulunmuştur. Sadece α - Lipoik asit verilen grup 6 ile kontrol grubu arasında benzerlik bulunmuştur.



Grafik 4: Grupların AST grafiklendirilmesi.

3.5. ALT Parametresi

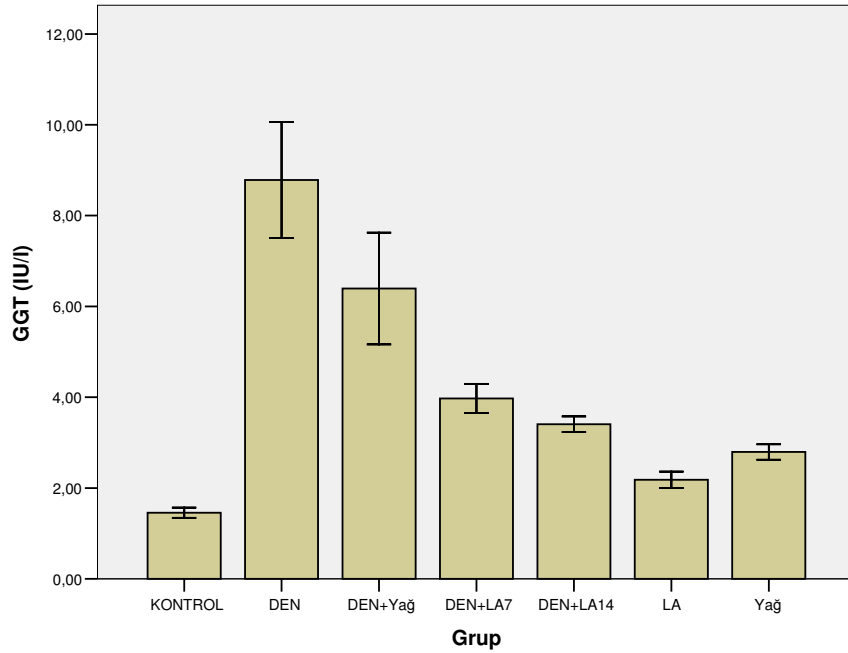
Grupların ALT parametresine göre değerlendirilmesinde; Tablo 4 ve Grafik 5’de görüldüğü gibi, sadece DEN verilen grup 2’de kontrol grubuna göre belirgin yükselme tespit edilmiştir. DEN ile beraber α - Lipoik asit verilen gruplardan α - Lipoik asidin 14 gün verildiği grup 5’de α - Lipoik asidin 7 gün verildiği grup 4’e göre daha fazla azalma olmuştur.



Grafik 5: Grupların ALT grafikleştirilmesi

3.6. GGT Parametresi

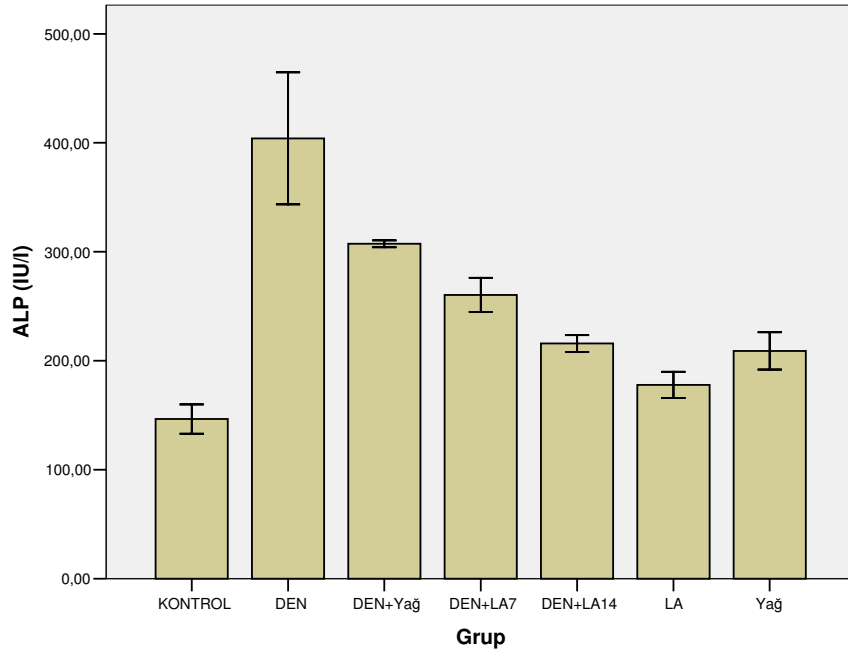
Grupların GGT parametresine göre değerlendirilmesinde; Tablo 4 ve Grafik 6'da görüldüğü gibi, sadece DEN verilen grup 2'de kontrol grubuna göre belirgin yükselme tespit edilmiştir. Sadece α - Lipoik asit verilen grup 6 ile sadece zeytinyağı verilen grup 7 arasında benzerlik vardır. Sadece zeytin yağı verilen grup 7 ve DEN ile beraber 14 gün α - Lipoik asit verilen grup 5 arasında benzerlik bulunmuştur. DEN ile beraber 7 ve 14 gün α - Lipoik asit verilen grup 4 ve grup 5 arasında benzerlik bulunmuştur.



Grafik 6: Grupların GGT grafiklendirilmesi

3.7. ALP Parametresi

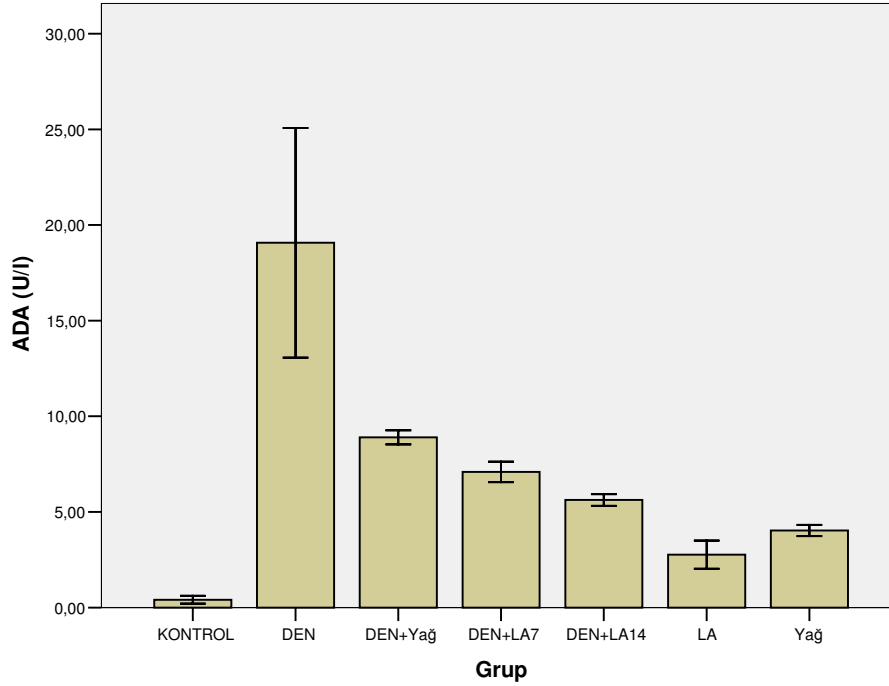
Grupların ALP parametresine göre değerlendirilmesinde; Tablo 4 ve Grafik 7’de görüldüğü gibi, sadece DEN verilen grup 2’de kontrol grubuna göre belirgin yükselme tespit edilmiştir. Sadece zeytinyağı verilen grup 7 ve DEN ile beraber 14 gün α -Lipoik asit verilen grup 5 arasında benzerlik bulunmuştur. DEN ile beraber α -Lipoik asidin 14 gün verilmesi 7 gün verilmesine göre DEN’in meydana getirdiği değişiklikleri daha fazla düzeltmiştir.



Grafik 7: Grupların ALP grafiklendirilmesi

3.8. ADA Parametresi

Grupların ADA parametresine göre değerlendirilmesinde; Tablo 4 ve Grafik 8’de görüldüğü gibi, sadece DEN verilen grup 2’de kontrol grubuna göre belirgin yükselme tespit edilmiştir. Sadece α - Lipoik asit verilen grup 6, kontrol grubu ve sadece zeytinyağı verilen grup 7 arasında benzerlik tespit edilmiştir. Sadece zeytinyağı verilen grup 7 ve DEN ile beraber 14 gün α - Lipoik asit verilen grup 5 arasında benzerlik vardır. DEN ile beraber 7 gün α - Lipoik asit verilen grup 4 ve DEN ile beraber zeytinyağı verilen grup 3 arasında benzerlik vardır.



Grafik 8: Grupların ADA grafiklendirilmesi

4.TARTIŞMA

Çalışmamızda Tablo 4 ve Grafik 4,5,6,7,8 de görüldüğü gibi, 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, karsinojen metabolizma süresince oksidatif stresin etkili olduğu bilinmektedir. Lipid peroksidasyon düzeyleri DEN verilmesinden 3 ile 24 saat sonra yükselmektedir(68). Serbest radikaller hücre membranını bozar ve hücrenin fonksiyonel içeriğinin hasarlı membrandan sızmasına izin verir. Serbest radikaller ile hasarlanan DNA, hücrenin normal yapısını değiştirir. Serbest radikallere maruz kalan hücreler mutasyona uğrar, kontrolsüz çoğalır ve kanser meydana gelir. 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(50).

Atakişi ve Özcan (2005) yaptıkları çalışmada DEN verdikleri ratlarda antioksidan olan omega-3'ün ADA'da meydana gelen değişiklikleri düzeltmediğini bildirmişlerdir(73). Yapılan bu çalışmada ise Tablo 4 ve Grafik 8'de görüldüğü gibi α - Lipoik asidin, diğer karaciğer enzimleri gibi ADA'da da meydana gelen değişiklikleri düzelttiği görülmüştür.

Jia-Liu ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada, ratların içme sularına 16 hafta boyunca haftada iki defa 100 mg/kg DEN koyarak hepatotoksisite oluşturmuşlar, ALT, ALP ve GGT' de meydana gelen yükselmenin antioksidan olan selenyumla zenginleştirilmiş arpa verildiğinde düzeldiğini bildirmişlerdir(79). Yapılan bu çalışmada da tek doz 150 mg/kg ip. DEN verilerek oluşturulan hepatotoksisite sonucunda meydana gelen ALT, ALP ve GGT' deki yükselmeler, Tablo 4 ve Grafik 5,7 ve 6' da görüldüğü gibi α - Lipoik asit verilmesiyle düzelmiştir.

Malarkodi ve ark.(2004) yaptıkları çalışmada adriamisin'in meydana getirdiği AST ve ALT' daki artışları α - Lipoik asidin 35 mg/kg/gün dozunda düzelttiğini tespit etmişlerdir(80). Pari ve Murugavel (2004) yaptıkları çalışmada klorokin'in meydana getirdiği karaciğer toksisitesinde 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(81). Amudha ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada siklosporin verdikleri ratlarda α - Lipoik asidi oral yolla 21 gün vermişler, yüksek olan ALP parametresinde belirgin azalma görmüşlerdir(82). 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(83). Kumar ve ark. (2005) aterojenik 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(84). 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(85). Yapılan bu çalışmada da, toksik bir madde olan DEN'in, karaciğer enzimleri olan AST, ALT, GGT, ALP ve ADA' da meydana getirdiği yükselmelerin, güçlü bir antioksidan olan α - Lipoik asidin 100 mg/kg/gün dozunda oral yolla 7 ve 14 gün verilmesiyle önemli ölçüde düzeldiği, 14 gün verilmesinin 7 gün verilmesinden daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda Tablo 4 ve Grafik 3'de görüldüğü gibi, 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. Bu serbest radikal parçaları proteinlerin okside sülfidril kısımlarına meyilli olacak şekildedir, böylece protein fragmentasyonuna neden olur ve hücre yaşama kabiliyetini kaybeder. α - Lipoik asit Fenton tip reaksiyon ile oluşan hidroksil radikallerin miktarını azaltmada etkilidir ve aynı zamanda benzer şekilde peroksit ve süperoksit radikallerini de uzaklaştırır(86).

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, DEN verilmesinden 3-24 saat içinde lipid peroksidasyon düzeylerinde artma tespit etmişlerdir. Karaciğer karsinogenezinde oksidatif stresin önemli bir role sahip olduğunu ve hepatokarsinogenez ile lipid peroksidasyonu arasında korelasyon

olduğunu göstermişlerdir(87). Atakişi ve Özcan (2005) antioksidan olan omega-3, Chakraborty ve ark. (2000) ise vanadyum vererek MDA seviyelerinde düzelmeye kaydetmişlerdir. Yapılan bu çalışmada da DEN'in MDA parametresinde meydana getirdiği artmayı α - Lipoik asidin önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir.

Elangovan 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(88,82). 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(89). 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(86). Yapılan bu çalışmada da güçlü bir antioksidan olan α - Lipoik asidin 100 mg/kg/gün dozunda oral yolla 7 ve 14 gün verilmesinin, yüksek olan MDA seviyelerinde azalma meydana getirdiği, 14 gün verilmesinin 7 gün verilmesine göre daha etkili olduğu anlaşılmıştır.

Çalışmamızda Tablo 4 ve Grafik 2'de görüldüğü gibi, 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(86). Glutasyon, tiyol grubunun önemli bir üyesidir ve primer hücre içi antioksidanıdır, ayrıca önemli bir serbest radikal deaktivatörüdür. Vücutta hastalık, enfeksiyon, travma, ilaç tedavisi ve ameliyat gibi nedenlerden dolayı oksidatif stresin yüksek seyrettiği zamanlarda glutasyon hızla tükendiğinden dolayı eksikliği ortaya çıkar. Bu eksiklik aynı zamanda düşük protein alımı, diyabetes mellitus, karaciğer hastalıkları, katarakt, HIV enfeksiyonu, respiratuar distress sendromu, kanser ve idiyopatik pulmoner fibrozis ile birlikte. Glutasyon ağızdan alındığında kan dolaşımına ulaşmadan midede yıkılır. Sistein kullanılabilirliği glutasyon sentezinde hız kısıtlayıcı faktör olarak

bilinmektedir. α - Lipoik asit ağızdan alındığında hızla emilir, hücreye alınır ve ortamda serbest olarak bulunan DHLA' e redükte olur. Daha sonra DHLA sistini sisteine indirger, hücre sisteini sistinden 10 kat hızlı alır ve GSH'ın biyosentezi hızla meydana gelir(35,43). Bu yolda DHLA'in indirekt antioksidan aktivitesi gözlenmiştir. Bu durum rat karaciğer mikrozomları kullanılarak açıklanmıştır. Diğer antioksidanlarla kombinasyonunda DHLA'in ubisemiquinonu ubiquinale, semidehidro askorbatı askorbata ve GSSG'u GSH'a rejenere ettiği gösterilmiştir(17). 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(72,90). Yapılan bu çalışmada da DEN'in meydana getirdiği GSH azalmasını güçlü bir antioksidan olan α - Lipoik asidin düzelttiği görülmüştür.

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 toksisiteyi minime indirdiğini, fakat 100 mg/kg/gün dozunun diğerlerine göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir(80,81). Yapılan bu çalışmada da α - Lipoik asidin 100 mg/kg/gün dozunda GSH seviyelerinde düzelme meydana getirdiği saptanmıştır.

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(88). Sivaprasad ve ark.(2003) ise kurşun toksisitesinde α - Lipoik asit ve DMSA(dimerkaptosüksinik asit)'in kullanımının koruyucu etkileri olduğunu bildirmişlerdir(91). 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 kelasyon

kapasitesine bağılı olduğu düşünölmektedir(92,93). Şahin ve ark.(2006) kronik stres durumunda rat periferal organlarında α - Lipoik asidin 100 mg/kg/gün dozunda antioksidan enzim aktivitesinde etkili olduğunu bulmuşlardır(89). Amudha ve ark. (2006) ratlarda siklosporin A ile oluşturdukları oksidatif streste α - Lipoik asidin 20 mg/kg/gün dozunda oral yolla 21 günde GSH seviyelerini yükselttiğini bildirmişlerdir(82). 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(83). Yapılan bu çalışmada da α - Lipoik asidin 100 mg/kg/gün dozunda, 7 ve 14 gün verilmesinin, DEN'in meydana getirdiğı GSH seviyelerindeki azalmayı önemli ölçüde düzelittiğı, 14 gün verilmesinin 7 gün verilmesine göre daha etkili olduğu anlaşılmıştır.

Çalışmamızda, Tablo 4 ve Grafik 1'de görüldüğü gibi 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(72) çalışmasıyla benzerlik göstermektedir. Bu durumun verilen maddenin toksik etkisinden dolayı meydana gelen iştahsızlık nedeniyle gıda alımının azalmasından kaynaklanabileceğı düşünölmüştür. 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, hücresele enerji tükendiğı 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(78). 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. DEN ile beraber α - Lipoik asit verdiğimiz ratlarda kilo kaybı kontrol grubuna göre çok az olmuştur. Bunun nedeni olarak, α - Lipoik asidin DEN'e bağlı oluşan toksik etkileri azalttığı, fakat ratlara hergün oral gavaj yapılmasının tahriş edici etkisinden dolayı gıda alımında bir miktar azalma meydana geldiği düşünülmüştür.

Yapılan bu çalışmada, tek doz 150 mg/kg ip. DEN verilerek ratlarda oksidatif stres ve hepatotoksisite oluşturmak amaçlanmış; 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 bakılmıştır. Tablo 4 ve Grafik 3,4,5,6,7,8' de görüldüğü gibi yükselmiş olan MDA,AST, ALT, GGT, ALP ve ADA parametrelerinde belirgin azalma, Tablo 4 ve Grafik 2' de görüldüğü gibi azalmış olan GSH parametresinde belirgin artma tespit edilmiştir. Tablo 4 ve Grafik 1' de görüldüğü gibi α - Lipoik asit verilen ratların vücut ağırlıklarında da artma görülmüştür. α - Lipoik asidin 14 gün verilmesinin 7 gün verilmesinden daha etkili olduğu anlaşılmıştır.

Bu çalışmada güçlü bir antioksidan olan α - Lipoik asidin, toksik bir madde olan DEN'in meydana getirdiği zararlı etkilere karşı koruyucu olup olmadığının anlaşılması amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen bilgiler ışığında α - Lipoik asidin, toksik bir maddeyle meydana gelen oksidatif stres ve karaciğer hasarında koruyucu etkisinin olduğu anlaşılmıştır. Buna dayanarak alkol, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, ağır metal zehirlenmeleri, viral hepatitler ve kanser gibi nedenlerle meydana gelmiş olan karaciğer hasarlarında tedavi amacıyla kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır. Ayrıca, ilaçların pek çoğunun karaciğerden metabolize olmasından dolayı uzun süre ilaç kullanılması gereken kronik hastalıklarda da koruyucu amaçla verilmesinin uygun olabileceği düşünülmektedir.

5.SONUÇ

Yapılan bu çalışmada, ratlara tek doz 150 mg/kg ip. DEN vererek oksidatif stres ve hepatotoksisite meydana getirmek ve bu etkiler üzerine α - Lipoik asidin 100 mg/kg/gün dozunda 7 ve 14 gün verilmesinin koruyucu olup olmadığını göstermek amaçlanmıştır.

DEN verilen grupta kontrol grubuna göre lipid peroksidasyon ürünü olan MDA miktarının arttığı, antioksidan kapasite göstergesi olan GSH miktarının azaldığı, karaciğer enzimleri olan AST, ALT, GGT, ALP ve ADA düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir. Böylece DEN'in oksidatif stres yarattığı ve hepatotoksisite meydana getirdiği teyit edilmiştir.

DEN verilen ratlarda karaciğer enzimleri olan AST, ALT, GGT, ALP ve ADA parametrelerinde kontrol grubuna göre belirgin yükselmeler gözlemlenmiştir. Bu durumun DEN' in hepatotoksik etkisi nedeniyle karaciğer hücrelerinde harabiyet meydana getirdiği ve bu enzimlerin hücre dışına çıkarak serum seviyelerinin artmasına bağlı olduğu düşünülmüştür. DEN ile beraber α - Lipoik asit verdiğimiz gruplarda Tablo 4 ve Grafik 4,5,6,7,8' de görüldüğü gibi bu parametrelerde belirgin düzelmeler tespit edilmiştir, bunun α - Lipoik asidin hücre koruyucu etkisi sayesinde meydana geldiği kanısına varılmıştır.

DEN verilen ratlarda kontrol grubuna göre GSH parametresinde belirgin azalma, MDA parametresinde belirgin artma tespit edilmiştir. Bu durum DEN' in oksidatif stresi arttırdığı ve antioksidan kapasiteyi azalttığı şeklinde yorumlanmıştır. DEN ile beraber α - Lipoik asit verilen gruplarda Tablo 4 ve Grafik 2,3'de görüldüğü gibi GSH parametresinde önemli ölçüde yükselme, MDA parametresinde önemli ölçüde azalma tespit edilmiştir. Buna dayanarak α - Lipoik asidin oksidatif stresi azalttığı, antioksidan kapasiteyi arttırdığı düşünülmüştür.

DEN verilen ratlarda kontrol grubuna göre kilo kaybının çok fazla olduğunu gözlemlenmiştir. Bu durumun DEN' in toksik etkisinden dolayı meydana gelen gıda alımının azalmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür. DEN ile beraber α - Lipoik asit verilen ratlarda Tablo 4 ve Grafik 1'de görüldüğü gibi kilo kaybı kontrol grubuna göre çok az olmuştur. Bunun nedeni olarak, α - Lipoik asidin DEN'e bağlı oluşan

toksik etkileri azalttığı, fakat bu ratlara her gün oral gavaj yapılmasının tahriş edici etkisinden dolayı gıda alımında bir miktar azalma meydana geldiği düşünülmüştür.

DEN ile beraber 14 gün 100 mg/kg/gün dozunda α - Lipoik asit verilen grupta tüm parametrelerdeki düzelmelerin 7 gün α - Lipoik asit verdiğimiz gruba göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

DEN ile beraber zeytinyağı verilen grupta da tüm parametrelerde bir miktar düzelme olduğu, fakat α - Lipoik asit verdiğimiz gruplara göre daha az olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, zeytinyağının da antioksidan özelliklerinin olduğu ama α - Lipoik asidin daha etkili bir antioksidan olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Bu verilere dayanarak; α - Lipoik asidin 100 mg/kg/gün dozunda hem 7 gün hem de 14 günde bozulmuş olan karaciğer enzimlerinde düzelmeler meydana getirdiği, oksidatif stresi azalttığı, antioksidan kapasiteyi arttırdığı ve kilo kaybını geriye döndürdüğü, ancak 14 gün verilmesinin 7 gün verilmesine göre daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Kramer K.(2001) Nutra ceutials in Heath and Disease Prevention. Marcel Dekker Incorporated, New York; 8:113.
2. Yasuno R., Wada H. (2002). The biosynthetic pathway for lipoic acid is present in plastids and mitochondria in arabidopsis Thaliana. FEBS Lett.; 517:110-114.
3. Bullock M.W., Brockamann J.A., Patterson E.L.,Pierce J.V.,Macchi M.E.(1954) Proposed structures for protogen-A and protogen-B.J.Am.Chem Soc; 76:1827-1828.
4. Perham R.N.(1991). Domains, motifs and linkers in 2-oxo-acid dehydrogenase multienzyme complexes: a paradigm in the desing of a multifunctional protein. Biochemistry; 30: 8501-8512.
5. Cremer D.R., Rabeler R., Roberts A., Lynch B. (2006). Safety evaluation of α -lipoic acid (ALA). Regulatory Toxicology and Pharmacology. Volume 46, Issue 1, October 2006, Pages 29-41.
6. Teichert J,Hermann R,Ruus P, Preiss R.(2003) Plasma kinetics,metabolism and urinary excretion of alpha-lipoic acid following oral administration in healty volunters. J. Clin Pharmacol. Nov ; 43(11): 1257-67.
7. Ersoy E., Bayşu N. (1986). Biyokimya. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, Ankara.: 454.
8. Gözükara E.M. (1989). Biyokimya. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi yayınları, Malatya; 55,56,705,845-848.
9. Liu J., Atamna H., Kuratsune H., Ames B.N. (2002). Delaying brain mitochondrial decay and aging with mitochondrial antioxidants and metabolites. Ann NY Acad. Sci.; 959: 133-166.
10. Ken-ichi Yamada, Ikvo Yanamiya, Hideo Utsumi.(2005). İnvivo detection of free radicals induced by diethylnitrosamine in rat liver tissue. 12 July 2005; revised 10 January 2006; accepted 26 January 2006.
11. Snell E.E.,Strong F.M.,Peterson W.H.(1937). Growth factors for bacteria. Biochem J; 31:1789-1799.

12. Reed L.J., Busk B.G., Gunsalus I.C., Schnakenberg G.H.F.(1950). Crystalline a lipoic-acid: a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science*; 114:93.
13. Bullock M.W., Brockmann J.A., Patterson E.L.,Pierce J.V.,Macchi M.E.(1954) Proposed structures for protogen-A and protogen-B.*J.Am.Chem Soc*; 76:1827-1828.
14. Morris T.W., Reed K.E., Cronan J.E. (1995). Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: the *IpIA* and *libB* genes define redundant pathways for ligation of lipoyl groups to apoprotein. *J.Bacteriol*; 177:1-10.
15. Cadenas E. (2001). *Handbook of antioxidants* (2nd ed). Marcel Dekker Incorporated, Newyork; 23:473.
16. Streeper R:S., Henriksen E.J., Jacob S., Hokama J.Y., Donovan L.F., Tritschler H.J. (1997). Differential effects of lipoic acid stereoisomers on glucose metabolism in insulin-resistant skeletal muscle. *Am. J. Physiol*; 273:E185-E191.
17. Aalt Bast and Guido R.M.M. Haenen. (2002). The toxicity of antioxidants and their metabolites. *Environmental toxicology and Pharmacology*. Volume 11, Issues 3-4, July 2002, Pages 251-258.
18. Cadenas, Enrique (Author). *Handbook of Antioxidants*, Second Edition, Revised and Expanded. New York,NY,USA: Marcel Dekker Incorporated, 2001. p 477-478.
19. Kagan V.E., Shvedova A., Serbinova E. (1992). Dihidrolipoic acid-a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochem pharmacol*; 44:1637-1649.
20. L.H.Persson,U.T. Brunk. A lysomotropic form of alpha-lipoic acid: a possible therapy of diabetic complications?. Div.of Pathology H, University Hospital, Linkoping, Sweden.
21. Evans JL, Haymann CS, Goldfire ID , Gavin LA. *Endocr Pract.* (2002). Pharmacokinetics, tolerability and fructosamine lowering effect of a novel, controlled-relese formulation of alpha-lipoic acid; Jan-Feb; 8(1): 29-35.

22. Herbert A.A., Guest J.R.(1975). Lipoic acid content of Escherichia coli and other microorganisms. Arch Microbiol; 106:259-266.
23. Busby R:W, Schelvis J.P.M., Yu D.S., Babcock G.t., Marletta M.a.(1999). Lipoic acid biosynthesis: Lip A is an Iron- Sulfur protein. J. Am.Chem. Soc.; 121: 4706-4707.
24. Biewenga G., Haenen G.R., Bast A. (1997). The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. Gen Pharmac.; 29: 315-331.
25. Peinado J., Sies H., Akerboom T.P.(1989). Hepatic lipoate uptake. Arch. Biochem. Biophys.; 273: 389-395.
26. Josephv T.Spence AND Donald B. Mc Cormick.(Received 21 February 1975). Lipoic acid metabolism in the rat. Available on line 24 November 2004.
27. Ersoy E., Bayşu N. (1986). Biyokimya. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, Ankara.: 454.
28. Wolz P., Krieglstain J. (1996). Neuroprotective effects of alpha- lipoic and its enantiomers demonstrated in rodent models of focal cerebral ischemia. Neuropharmacology; 35: 369-375.
29. Guyton A.C. (1986). Textbook of Medical Physiology (7th ed). W.B.Saunders Company, Mississippi; 2: 23.
30. Dündar Y., Aslan R. (2000). Hekimlikte oksidatif stres ve antiokasidanlar. Afyon Kocatepe Üniversiresi Yayınları, Ankara; Yayın No: 29 (1): 5,6,9-11,30,52.
31. Betteridge D.C. (2000). What is oxidative stres? Metabolism; 49: 3-8.
32. Aslan R., Şekeroğlu M.R., Bayıroğlu F. (1995). Serbest radikal türlerin membran lipid peroksidasyonuna etkileri ve hücrel antioksidan savunma. Sağlık Bil. Derg.; 2: 137-142.
33. Byung P.Y. (1994). Cellular defenses against damage from reactive species. Aphysiological Reviews; 74(1): 139-172.
34. Gutteridge J.M: (1995).Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin. Chem.; 41(12): 1819-1828.

35. Arivazhagan P., Shila S., Kumaran S., Panneerselvam C.(2002). Effects of DL-alpha-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in various brain regions of aged rats. *Exp.Gerintol*; 37: 803.
36. Packer L., Witt E., Tritschler H.J. (1995). α -Lipoic acid as a biological antioxidant. *Science Direct-Free Radical Biology & Medicine*; 19(2): 227-250.
37. Navari-Izzo F., Quartacci M.F., Sgherri C. (2002). Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiol. Biochem*; 40: 463-470.
38. Busse E., Zimmer G., Schopohl B., Kornhuber B. (1992). Influence of α -lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo. *Arzneim-Forsch/Drug Res.*; 42: 829-832.
39. Han D., Handelman G., Marcocci L., Sen C.K., Roy S., Kobuchi H., Flohe L., Packer L. (1997). Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cysteine utilization. *Biofactors*; 6: 321-338.
40. Podda M., Tritschler H.J., Ulrich H., Packer L. (1994). α -Lipoic acid supplementation prevents symptoms of vitamin E deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 204: 98-104.
41. Sen C.K., Roy S., Han D., Packer L. (1997). Regulation of cellular thiols on human lymphocytes by alpha-lipoic acid: a flow cytometric analysis. *Free Rad. Biol. Med.*; 22: 1241-1257.
42. Sen C.K., Roy S., Packer L. (1999). α -Lipoic acid: cell regulatory function and potential therapeutic implications. San Diego; Academic Press: 111-119.
43. Haenen G.R.M.M., Bast A. (1983). Protection against lipid peroxidation by a microsomal glutathione-dependent labile factor. *FEBS Lett.*; 159: 24-28.
44. Mike frank Quartacci, Cristina Sgherri. (2002) Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiol. Biochem*; 40: 463-470.
45. Ou P., Tritschler H.J., Wolff S.P. (1995). Thiocctic (lipoic) acid : a therapeutic metal-chelating antioxidant? *Biochem Pharmacol*; 50(1): 123-126.
46. Sumathi R., et al. (1996). Relationship between glutathion and DL alpha-

lipoic acid against cadmium-induced hepatotoxicity. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*; 49(2): 39-48.

47. Spector A., et al. (1988). Thioredoxin fragment 31-36 is reduced by dihydrolipoamide and reduces oxidized protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 150: 156-162.
48. Kok A., Berkel W.J.H. (1996). Lipoamid dehydrogenase. In: Patel M., Roche T.E., Harris R.A. *Alpha-keto acid dehydrogenase complexes*. Birkhauser: 53-67.
49. Packer L. (1998). Alpha Lipoic acid : a metabolic antioxidant which regulates NF-kappa B signal transduction and protects against oxidative injury. *Drug. Metab. Rev.*; 30(2): 245-275.
50. Shih J.C.H. (1983). Atherosclerosis in Japanese quail and the effect of lipoic acid. *Fed. Proc.*; 42: 2494-2497.
51. Maitro J. Et al. (1995). Alpha Lipoic acid prevents buthionine sulfoximine-induced cataract formation in newborn rats. *Free Rad. Biol. Med.*; 18: 823-829.
52. Korkina L. et al. (1993). Antioxidant therapy in children affected by irradiation from the Chernobyl nuclear accident. *Biochem. Soc. Trans.*; 21: 314.
53. Fuchs J. Et al. (1993). Studies on lipoate effects on blood redox state in human immunodeficiency virus infected patients. *Arzneim-Forsch.*; 43(2): 1359-1362.
54. Berkow R.(1982). *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*. Merck&Co. Inc.Rahway,N.J.;II(11):1024-1026 .
55. Andreassen O.A., FerranteR.J., Dedeoğlu A., Beal M.F. (2001). Lipoic acid improves survival in transgenic Mouse models of Huntington's disease. *Neuroreport*; 12(15): 3371-3373.
56. Kazancıgil A., Gedikoğlu G., Bayraktar K. (1996). *Klinik Bilimler* ; 2: 1551-1552.
57. Ziegler D. Et al. (1995). Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a 3 week multicentre randomized controlled trial (ALADİN study). *Diabetologia*; 38: 1425-1433.

58. Jacob S. et al. (1996). Improvement of insulin-stimulated glucose disposal in type 2 diabetes after repeated parenteral administration of thioctic acid. *Exp. Clin. Endocrinol Diabetes*; 104: 284-288
59. Konrad T. et al. Alpha Lipoic acid treatment decreasey serum lactate and pyruvate concantrations and improves glucose effectiveness in lean and obese patients with type 2 diabetes. *Diab. Care*; 22: 280-287.
60. A.C.Maritim, R.A.Sanders; J.B.Watkins. (2002) Effects of α -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 14. 288-294.
61. Packer L. (1994). Antioxidant properties of lipoic acid and its therapeutic effects in prevention of diabetes complications and cataracts. *Am. NY. Acad. Sci.*; 738: 257-264.
62. Jacob S., Henriksen E.J., Schiemann A.L. et al. (1995). Enhancement of glucose disposal in patients with type 2 diabetes by alpha-Lipoic acid. *Arzneimittelforschung*; 45(8): 872-874.
63. Mateo M.C., Bustamante J.B., Cantalopiedra M.A. (1978). Serum, zinc, copper and insulin in diabetes mellitus. *Biomedicine*; 29(2): 56-58.
64. Evans J.L., Goldfine I.D. (2000). Alpha-Lipoic acid : a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technol. Ther.*; 2(3): 401-413.
65. Al Grafli MH, Padmarabbon R, Kataya HH, Berg B.,(2004) Effect of alpha-lipoic acid supplementation on maternal diabetes-induced growth retardation and congenital anomalies in rat fetuses. *Mol Cell Biochem. Jun*; 261(1-2):123-35.
66. Haramaki N., Assadnazari H., Zimmer G., Schepkin V., Packer L.,(1995). The influence of vitamin E and dihydrolipoic acid on cardiac energy and glutathione status under hypoxireoxygenation. *Biochem Mol Biol Int*;37(3):591-597.
67. Yesennia Sanchez-Perez, Claudia-Carrasco-Legleu, Claudia Garcia-Cuellar, Julio Perez - Carreon, Sergio Hernandez – Garcia, Martha Salcido -

- Neyoy, Leticia Aleman-Lozarini, Saul Villa-Trevino., (2005) Oxidative stres In carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of Preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. Cancer letters 217:25-32.
- 68.** David Wolfson N.D. (2000). Lipoic acid: The universal antioxidant. Nutrition Science News.
- 69.** Kim M.S., Park J.Y., Namkoong C., et al. (2004). Anti-obesity effects of a-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. Nature Med.; 13:1-7.
- 70.** Bustamante J., Lodge J.K., Marcocci L., Tritscler H.J., Packer L., Rinn B.H.(1998). Alpha lipoic acid in liver metabolism and disease. Free Radic. Biol.Med.; 24(6):1023-1039.
- 71.** Prof. Dr. Nevin Kural. Toksikoloji Ankara 1996. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:73;42-43,129-131,180-182.
- 72.** Emine Atakişi, Ayla Özcan (2005) Diethylnitrozamin verilen ratlarda omega-3 yağ asitlerinden zengin balık yağının koruyucu etkilerinin araştırılması. Türk Biyokimya Dergisi 2005;30(4);279-284.
- 73.** Chiarello PG,İglesias AC,Zucoloto S, Moreno F,Jordao AA Vennucchi H. (1998). Effects of a necrogenic dose of diethylnitrosamine on vitamin E-deficient and vitamin E- supplemented rats. Food Chem. Toxicol.,36:929-935.).
- 74.** Daoust R., Morais R. (1986). Degenerative changes, DNA synthesis and mitotic activity in rat liver following single exposure to diethylnitrosamine. Chemico-Biological Interactions. Volume 57, Issue 1, January 1986, Pages 55-64.
- 75.** Okutan O., Kartaloğlu Z., Kunter E., Apaydın M., İlvan A.(2005). Akciğer tüberkülozlu hastalarda serum adenozin deaminaz (ADA) düzeylerinin balgam yayma negatifleşmesi ile ilişkisi. Orijinal Araştırma. 6: 69-73.
- 76.** Beutler E, Duron O, Kelly BM. (1963) Improved method for the determination of blood glutathione.J.Lab:Clin.Med.61,882-888)
- 77.** Draper H.H., Hadley M., (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol 186:421-30.)

78. Cremer D.R., Rabeler R., Roberts A., Lynch B.(2006). Long-term safety of α -lipoic acid (ALA) consumption: A 2-year study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* article in Press. Corrected Prof.
79. Jia-Guo Liu, hong-Jin Zhao, Yan- Juan Liu and Xiao- Long Wang((2005). Effect of selenium-enriched malt on hepatocarcinogenesis, paraneoplastic syndrome and the hormones regulating blood glucose in rats treated by diethylnitrosamine. *Life Sciences*. 78(20): 2315-2321.
80. Malarkodi KP., Sivaprasad R., Varalakshmi P.(2004). 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*. 23(3): 129-135.
81. Pari L., Murugavel P.(2004). Protective effect of alpha-lipoic acid against chloroquine –induced hepatotoxicity in rats. *J. Appl.Toxicol*. 24(1):21-26.
82. Amudha G., Josephine A., Varalakshmi P.(2006). Role of lipoic acid in reducing the oxidative stress induced by cyclosporine A. *Clinica Chimica Acta*. Volume 372, Issues 1-2, October 2006, Pages 134-139.
83. Maritim A.C., Sanders R.A., Watkins J.B. (2003). Effects of α -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 14(2003): 288-294.
84. Kumar S.A., Sudhahar V., Varalakshmi P. (2006). Protective role of eicosapentaenoate-lipoate (EPA-LA) derivative in combating oxidative hepatocellular injury in hypercholesterolemic atherogenesis. *Atherosclerosis*. Volume 189, Issue 1, November 2006, Pages 115-122.
85. Zacharias E.S.(2003). Prophylaxis against lipopolysaccharide-induced liver injuries by lipoic acid in rats. *Pharmacological Research*. Volume 48, Issue 6, December 2003, Pages 585-591.
86. Arivazhagan P., Juliet P., Panneerselvam C.(1999). Effect of DL- α -lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidants in aged rats. *Pharmacological Research*. 41:3.
87. Yesennia S.P., Claudia C.L., Claudia G.C., Julio P.C., Sergio H.G., Martha S.N., Leticia A.L., Saul V.T.(2004). Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Letters*. 217(2005): 25-32.

88. Elangovan S., Chidambaram P., Periyasamy T.S., Palaninathan V.(2006). Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm. *Toxicology*. Volume 217, Issue 1, 5 January 2006, Pages 71-78.
89. Şahin M., Sağdıç G., Elmas O., Akpınar D., Derin N., Aslan M., Ağar A., Alıcıgüzel Y., Yargıçoğlu P. (2006). Effect of chronic restraint stress and alpha-lipoic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in rat peripheral organs. *Pharmacological Research*. Volume 54, Issue 3, September 2006, Pages 247-252.
90. Chakraborty A., Selvaraj S., Sudarshan M., Dutta R.K., Ghugre S.S., Chintalapudi S.N.(2000). 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*. 170(1-2):156-162.
91. Sivaprasad R., Nagaraj M., Varalakshmi P.(2003). Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. *The Journal of Nutritional Biochemistry*.
92. Vedagiri K., Muthuswamy A.D., Kumarasamy S., Chinnakkannu P.(2005). Combined efficacies of DL- α -lipoic acid and meso 2,3 dimercaptosuccinic acid against arsenic induced toxicity in antioxidant systems of rats. *Toxicology Letters*. Volume 160, Issue 1, 30 December 2005, Pages 1-7.
93. Shila S., Kokilavani V., Subathra M., Panneerselvam C. (2005). Brain regional responses in antioxidant system to alpha-lipoic acid in arsenic intoxicated rat. *Toxicology*. Volume 210, Issue 1, 15 May 2005, Pages 25-36.