

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi  
Yrd. Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK

**ALFA LİPOİK ASİDİN RAT KARACİĞER  
HOMOJENATLARINDA İNDÜKLENMİŞ LİPİD  
PEROKSİDASYONUNA ETKİSİ**

(Uzmanlık Tezi)

**Dr. Süleyman B. YAPAR**

EDİRNE-2006

## **TEŐEKKÖR**

Uzmanlık eğitimimde ve tez çalıőmalarımnda değerli katkıları olan sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK başta olmak üzere Prof. Dr. Erol ÇAKIR'a, Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN'e ve Yrd. Doç. Dr. Hakan ERBAŐ'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma teőekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
SERBEST RADİKALLER.....	3
REAKTİF OKSİJEN BİLEŞİKLERİ.....	4
SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN KAYNAKLARI.....	7
SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ.....	9
ANTİOKSİDANLAR.....	13
ALFA LİPOİK ASİD.....	22
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	24
BULGULAR.....	30
TARTIŞMA.....	51
SONUÇLAR.....	57
ÖZET.....	59
SUMMARY.....	61
KAYNAKLAR.....	63
EKLER	

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>BHT</b>	: Butilhidroksitoluen
<b>DHLA</b>	: Dihidrolipoik asid
<b>FAS</b>	: Ferröz amonyum sülfat
<b>GSH</b>	: Glutasyon (indirgenmiş)
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>GSSG</b>	: Glutasyon (yükseltgenmiş)
<b>4-HA</b>	: 4-Hidroksialkinler
<b>L<sup>•</sup></b>	: Lipid radikali
<b><math>\alpha</math>-LA</b>	: Alfa lipoik asid
<b>LDL</b>	: Düşük dansiteli lipoprotein
<b>LOO<sup>•</sup></b>	: Lipid peroksit radikali
<b>LOOH</b>	: Lipid hidrperoksit
<b>MDA</b>	: Malondialdehid
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş)
<b>O<sub>2</sub><sup>-•</sup></b>	: Süperoksit radikali
<b><sup>•</sup>OH</b>	: Hidroksil radikali
<b>ROB</b>	: Reaktif oksijen bileşikleri
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>SOR</b>	: Serbest oksijen radikalleri
<b>TBA</b>	: Tiobarbitürik asid

## GİRİŞ VE AMAÇ

Oksidan ürünlerin, diabetes mellitus, ateroskleroz, katarakt ve karaciğer sirozu gibi hastalıkların patogenezinde rol aldığı bilinmektedir. Bu nedenle son yıllarda antioksidan moleküllerin terapötik amaçlı kullanımı artmıştır.

Oksijen, yiyeceklerde bulunan karbonhidrat, yağ ve proteinlerin enerji kaynağı olarak kullanılabilmesi için aerobik dokularda genel elektron alıcısı görevini üstlenir. Katabolik süreçte süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ) gibi serbest oksijen radikalleri (SOR) üretilir. Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren, kimyasal reaktiviteleri yüksek, yarı ömürleri kısa olan molekül veya atomlardır (1).

Normal fizyolojik durumlarda SOR'nin büyük bir kısmı mitokondrial elektron transport zincirinde üretilir. Çünkü vücut tarafından kullanılan oksijenin %95-98'i mitokondride suya indirgenir. SOR aynı zamanda endoplazmik retikulum ve çekirdek membranı, sitozol, plazma membranı ve peroksizomlar gibi diğer hücre organellerinde de üretilirler(2).

Reaktif oksijen ürünleri kimyasal olarak daha stabil bir yapıya ulaşmak için elektron aktarmaya meyillidirler. Başka moleküller ile çok kolay elektron alış verişine girip onların yapılarını bozarlar. Çeşitli hücrel bileşiklere elektron aktarımı hücrel hasara yol açmaktadır. Serbest oksijen radikalleri, doymamış yağ asitleri içeren membran lipidlerini protein, karbonhidrat, nükleik asitler, enzimler ve kofaktörler gibi diğer biyomoleküllere nazaran daha fazla etkilemektedir. Membran lipidleri ile etkileşim membran yapısının bozulmasına, permeabilite artışına ve hücre hasarına yol açmaktadır(1).

Aerobik dokularda üretilen SOR'ye karşı çeşitli savunma mekanizmaları vardır. Katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, süperoksit dismutaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz gibi enzimlerin yanında; beta karoten, melatonin, alfa tokoferol, askorbik asid, ürat, bilirubin, sistein, seruloplazmin, albümin, transferrin, ferritin, haptoglobin, hemopeksin gibi enzim olmayan moleküller de antioksidan savunmada rol alırlar. Oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin oksidan sistemler lehine bozulmasıyla hücre hasarı oluşmaktadır (1,2).

Alfa lipoik asid ( $\alpha$ -LA) tiyol grubu içeren, antioksidan özelliği olan bir moleküldür. Ditiyolan halkası sayesinde yüksek bir indirgeme özelliğine sahiptir. Diyetle yeterli miktarda bulunmasına rağmen; fizyolojik sistemlerde mitokondride bulunan lipoik asid sentaz tarafından sentezlenebilmektedir. Vücutta dihidrolipoik asid (DHLA)'ya indirgenir. DHLA antioksidan etkisinin yanında özellikle demir varlığında prooksidan etki gösterebilir (3).

Lee ve ark.(4), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ile lipid peroksidasyonunu uyararak *invitro*  $\alpha$ -LA'nın, lipid peroksidasyonuna inhibe edici etkisini araştırmışlardır. Ancak bu çalışmada lipid peroksidasyonu sabit bir süre sonunda bir kez ölçülmüş ve lipid peroksidasyon fazları ayrıntılı olarak değerlendirilmemiştir. Bu nedenle  $\alpha$ -LA'nın lipid peroksidasyonunu engelleme mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır.

Çalışmamızda;  $\alpha$ -LA'nın farklı dozlarının *invitro* kullanımının, rat karaciğer homojenatlarında indüklenmiş lipid peroksidasyonu ve doku glutatyon (GSH) düzeyine etkilerini araştırmak amaçlanmıştır. Ayrıca  $\alpha$ -LA'nın lipid peroksidasyonunu hangi aşamada etkilediğine, SOR üretici sistemlerinden hangisinde daha etkili olduğuna ve etki mekanizmasına açıklık getirmek amaçlanmıştır. Bu amaçla; serbest oksijen radikalleri üreten ve iyi bilinen iki sistem kullanılmıştır. Bunlar  $H_2O_2$  ve ferröz iyonların kullanıldığı lipid peroksidasyon aktivasyon sistemleridir. Hidrojen peroksit stabil ve hücre membranından kolayca difüze olabilen bir moleküldür. Reaktif değildir, ancak Fenton ve Haber-Weiss (1) reaksiyonu ile  $\cdot OH$  oluşumunda öncül moleküldür. Ferröz iyonlar da Fenton reaksiyonu ile  $\cdot OH$  radikali oluştururlar. Hidroksil radikali çok reaktiftir (1,2). Bu nedenle çalışmamızda lipid peroksidasyonunun aktivasyonu için,  $H_2O_2$  ve ferröz amonyum sülfat (FAS) tercih edilmiştir.

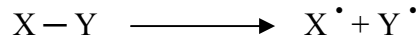
## GENEL BİLGİLER

### SERBEST RADİKALLER

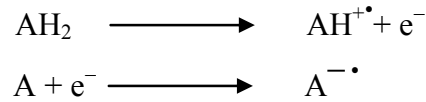
Stabil moleküllerin dış yörüngesinde biri diğerine zıt yönde dönen elektron çiftleri vardır. Dış yörüngelerinde en az bir adet eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküle serbest radikal denir. Serbest radikaller oldukça reaktiftir, elektron çiftlemek için diğer moleküller ile reaksiyona girme eğilimindedirler (5).

Radikaller başlıca 2 yolla oluşur;

**1)Homolitik bölünme:** Kovalent bağlı bir molekülün, her bir parçasındaki ortak elektronlardan birisinin homolitik bölünmesi sonucunda ortaklanmamış elektronlar taşıyan molekül veya atomlar meydana gelir:



**2)Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi:** Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en çok bu yolla meydana gelir (6,7):



Radikaller diğer moleküller ile çeşitli şekillerde reaksiyona girerler. İki radikal karşılaştığında paylaşılmamış elektronlarını birleştirirler ve kovalent bir bağ oluştururlar. Paylaşılmamış bir elektronu bulunan hidrojen atomu da radikaldir ve iki hidrojen atomu kolayca birleşerek diatomik hidrojen molekülünü oluştururlar.

Bir radikal paylaşılmamış elektronunu radikal olmayan bir moleküle verebilir, diğer bir molekülden alabilir veya radikal olmayan bir moleküle bağlanabilir. Bu reaksiyonlardan hangisi olursa olsun radikal olmayan bir molekül sonuçta radikale dönüşür.

Serbest radikaller aerobik hücre metabolizmasının bir ürünü olarak sürekli üretilir ve antioksidan savunma mekanizmaları ile dengede tutulurlar. Oksidatif stres, oksidan-antioksidan dengesinin oksidan lehine bozulması olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikallerin ömürleri çok kısa olmasına rağmen protein, lipid ve nükleik asid gibi makro moleküller ile etkileşmeleri sonucu, hücre yapı ve fonksiyonlarında önemli değişikliklere neden olmaktadır. Homeostazisin sürdürülebilmesi, antioksidan kapasitede sürekli yenilenmeyi gerektirmektedir (5,8).

### Serbest Radikal Türleri

Serbest radikalleri, oksijen merkezli ve oksijen merkezli olmayan serbest radikaller olarak sınıflandırmak mümkündür. Oksijen merkezli serbest radikallerin başlıcaları  $O_2^{\cdot-}$  ve  $\cdot OH$ 'dir. Ayrıca  $H_2O_2$  gibi radikal olmayan fakat etkileri ve sonuçları sebebiyle kimyasal aktiviteleri yüksek reaktif oksijen bileşikleri (ROB) de vardır (Tablo 1) (8).

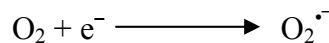
**Tablo 1. Reaktif oksijen bileşikleri (11)**

Radikaller	Radikal olmayanlar
Hidroksil ( $\cdot OH$ )	Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )
Alkoksil ( $RO\cdot$ )	Singlet oksijen ( $^1O_2$ )
Peroksil ( $ROO\cdot$ )	Ozon ( $O_3$ )
Superoksit ( $O_2^{\cdot-}$ )	Hipokloröz asid ( $HOCl$ )
Nitrik oksit ( $NO\cdot$ )	Lipid hidroperoksit ( $LOOH$ )
Azot dioksit ( $NO_2\cdot$ )	Peroksinitrit ( $ONOO\cdot$ )

### REAKTİF OKSİJEN BİLEŞİKLERİ

#### Süperoksit Radikali ( $O_2^{\cdot-}$ )

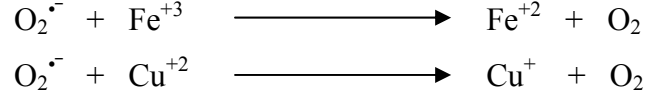
Biyolojik sistemlerde en fazla bulunan radikal öncülü moleküler oksijendir. Oksijenin tek bir elektronla indirgenmesi ile süperoksit radikali oluşur.



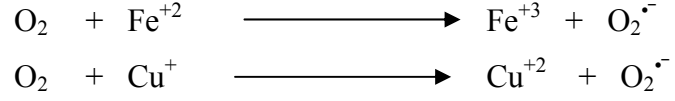


Serbest radikal olmakla beraber  $O_2^{\bullet-}$ 'in belirgin toksik etkisi yoktur. Başlıca kaynağı sitoplazmadaki P<sub>450</sub> sistemidir. Dismutasyon yolu ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarını indirgemesi sebebiyle önemli bir radikaldir (9,10).

Süperoksit radikali okside haldeki demir veya bakır ile reaksiyona girebilir:



İndirgen geçiş metallerinin otooksidasyonu sonucu  $O_2^{\bullet-}$  radikali oluşur:

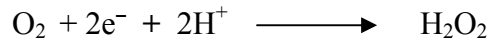


Geçiş metal iyonlarının oksijenle reaksiyonları geri dönüşümlü redoks reaksiyonlarının ve serbest radikal reaksiyonlarının ilerlemesinde çok önemlidir (6,11).

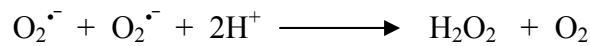
Süperoksit radikali,  $\bullet OH$ 'nden daha az reaktiftir. Bununla beraber ortaya çıktığı hücreden daha uzak yerlere rahatlıkla geçerek başka radikallerin oluşmasına ve doku hasarına neden olur (8,12).

### **Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Hidrojen peroksitin eşlenmemiş elektronu yoktur. Bu nedenle serbest radikal değildir. Moleküler oksijenin iki elektron indirgenmesi ile oluşur:



Biyolojik sistemlerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in asıl kaynağı  $O_2^{\bullet-}$ 'in dismutasyonudur. Bu reaksiyon spontan veya süperoksit dismutaz (SOD) ile enzimatik olarak gerçekleşir:

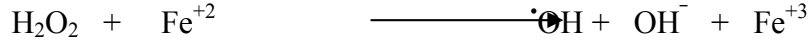


Hidrojen peroksit biyolojik membranları geçebilir ve uzun ömürlüdür. Reaktif geçiş metal iyonlarının varlığında  $\bullet OH$ 'nin kaynağı olması nedeniyle önemlidir (6,12,13).

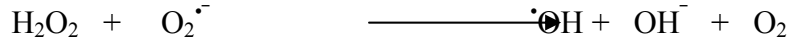
### Hidroksil Radikali ( $\cdot\text{OH}$ )

Süperoksit radikali ve  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ten meydana gelen en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikalidir. Hidroksil radikalının reaktivitesi o derece yüksektir ki, yapıldığı hücre bölümünden daha uzağa difüzyonuna gerek kalmadan derhal reaksiyona girer. Yarı ömrü çok kısadır. Önemli iki kaynağı Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonudur (14,15):

Fenton reaksiyonu;



Haber-Weiss reaksiyonu;

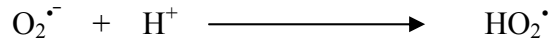


### Singlet Oksijen ( $^1\text{O}_2$ )

Singlet oksijen, ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal değildir. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi, radikal reaksiyonların başlamasına da sebep olur. Yarılanma ömrü kısadır. Singlet oksijen, oksijen molekülünün daha reaktif bir türü olup, moleküler oksijenin enerji alması ile oluşur. Delta ( $^1\Delta_g \text{O}_2$ ) ve sigma ( $^1\Sigma_g \text{O}_2$ ) olmak üzere iki tipi vardır. Sigma formunun enerjisi çok yüksektir ve hızla  $^1\Delta_g \text{O}_2$ 'e dönüşür. Singlet oksijenin uyarılmış elektronlarının daha düşük enerji seviyesine inmesi, ışık yayılımına yol açar (7,16,17).

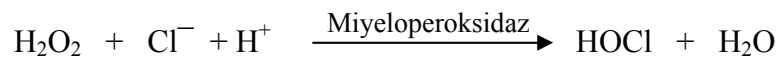
### Hidroperoksit Radikali ( $\text{HO}_2\cdot$ )

Süperoksit radikalının protonlanmasıyla oluşur. Süperoksitten daha reaktiftir (7):

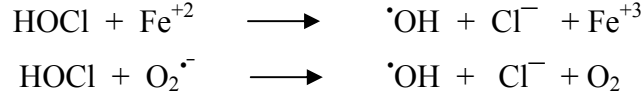


### Hipokloröz Asid ( $\text{HOCl}$ )

Nötrofil ve makrofajlar tarafından enzimatik olarak üretilir ve bakterisit etkisi için salınır:



Hipokloröz asid, demire bağımlı olan ve bağımlı olmayan reaksiyonlarla  $\cdot\text{OH}$  oluşumunda yer alır (18,19):



### **Oksijen Merkezli Olmayan Serbest Radikaller**

Çoğu serbest radikal oksijen merkezli olmasına rağmen organizmada karbon, kükürt, hidrojen ve demir merkezli radikaller de oluşmaktadır (Tablo 2 ) (8).

**Tablo 2. Oksijen Merkezli Olmayan Serbest Radikaller**

<b>Karbon merkezli olanlar</b>	
Lipid Radikalleri	$\text{L}\cdot$
Aloksi Radikalleri	$\text{R}\cdot$
<b>Kükürt Merkezli Olanlar</b>	
Thiyl	$\text{R-S}\cdot$
<b>Hidrojen Merkezli Olanlar</b>	
Hidrojen Atomu	$\text{H}\cdot$
<b>Demir Merkezli Olanlar</b>	
Perferri Radikali	$\text{Fe}^{+++}\text{-O}_2\text{-Fe}^{+++}$

### **SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİNİN KAYNAKLARI**

Serbest oksijen radikallerinin kaynakları, endojen ve eksojen kaynaklar olmak üzere iki başlık altında toplanır.

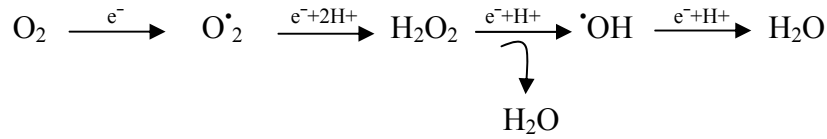
Hava kirliliği, kimyasallara maruz kalma ve iyonize edici radyasyon, sigara toksinleri, doksorubisin, karbontetraklorür gibi ilaç oksidanları eksojen kaynakları oluştururlar. Endojen kaynaklar ise sekiz başlık altında toplanabilir (8,12),

1. Mitokondrial elektron taşıma sistemi,
2. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda elektron transport sistemi,
3. Peroksizomlar,
4. Plazma membranları,
5. Oksidan enzimler,
6. Araşidonik asid yolu,

7. Otoksidasyon reaksiyonları,
8. Fagositik hücreler.

### **Mitokondrial Elektron Taşıma Sistemi**

Oksidatif fosforilasyonla adozin trifosfat (ATP) oluşurken, ara ürün olarak  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  ve  $\cdot OH$  salınır. Hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağı, elektron transport zincirinden oluşan elektron sızıntısıdır. Radikal oluşturan esas bölge mitokondrinin iç membranına lokalizedir. Moleküler oksijenin %98'i, mitokondrial bir enzim olan sitokrom C oksidaz tarafından katalizlenerek suya indirgenir. Süperoksit ve  $H_2O_2$  üretimi mitokondrial oksijen tüketiminin %1-2'si kadardır. Hidrojen peroksit mitokondriden sitoplazmaya salındığı halde  $O_2^{\cdot-}$  salınmaz. İnamitokondrial SOD,  $O_2^{\cdot-}$ 'i  $H_2O_2$ 'e dönüştürerek hücreleri oksidatif hasardan korur (20,21). Moleküler oksijenden reaktif ara ürünlerin oluşumu:



### **Endoplazmik Retikulum ve Nükleer Membranda Elektron Transport Sistemi**

Özellikle nükleer membrandan kaynaklanan radikaller, deoksiribonükleik asid (DNA)'ya ilgi gösterirler. Endoplazmik retikulum ve nükleusun iç membranları, sitokrom  $P_{450}$  yönünden zengindir. Bu sistem doymamış yağ asidlerinin, ksenobiyotiklerin ve redükte oksijenin oksidasyonundan sorumludur (22,23).

### **Peroksizom**

Çok uzun zincirli yağ asidlerinin yıkılmasından sorumlu organeller olan peroksizomlar, amino asid oksidaz, urat oksidaz gibi oksidan enzimlerce zengindirler ve güçlü  $H_2O_2$  kaynağı olarak kabul edilirler (8).

### **Plazma Membranı**

Membranlarda bulunan doymamış yağ asidleri ve proteinler serbest radikal hasarına açıktır. Serbest radikallerin başlattığı lipid peroksidasyonu; transmembran iyon gradientinin bozulmasına, sekretuar fonksiyon kayıplarına ve hücresele metabolik olayların inhibisyonuna yol açar (8,24).

### **Oksidan Enzimler**

Ksantin oksidaz gibi oksidan enzimler süperoksit radikali üretimine neden olurlar. *Invivo* iskemi ve hipoksi, ksantin oksidazı, dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüştürerek, süperoksit radikali oluşumuna yol açar (25,26).

### **Araşidonik Asid Yolu**

Bazı hücrelerinin uyarılması, araşidonik asid salınımına neden olur. Bu yolla ara peroksi bileşikleri ve hidroksil radikalleri meydana gelir. Bu lipid peroksidasyonunun ilk ürünleri olan hidro ve endoperoksidler, daha sonra yeni zincirleme reaksiyonları başlatabilecek radikal ürünleri meydana getirebilir (27,28).

### **Otoksidasyon**

Tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidropterinlerin otooksidasyonu sonucunda radikal oluşabilir (29).

### **Fagositik Hücreler**

Çeşitli uyarılar ile duyarlı hale gelen nötrofil ve makrofajlar,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$  ve  $HOCl$  salınımına neden olurlar. Nötrofillerin hücre membranındaki nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'a bağımlı myeloperoksidaz sistemi,  $O_2^{\cdot-}$  radikali oluşturan önemli bir kaynaktır. Fagositoz olduktan sonra, lökosit hücre membranında yerleşmiş olan NADPH oksidaz sistemi, çevre dokulardaki moleküler oksijeni  $O_2^{\cdot-}$ 'e, ardından  $H_2O_2$ 'e dönüştürür. Süperoksit radikali oluşumuna eşlik eden moleküler oksijenin hızlı tüketimi; solunum patlaması olarak adlandırılır. Fagozomda bulunan ve lizozomal bir enzim olan mieloperoksidaz enzimi varlığında  $H_2O_2$  ve klorür iyonları bakteriyi öldüren  $HOCl$ 'e dönüştürülür. Fagozom SOD içermediğinden, fagozom içinde kaçınılmaz olarak  $H_2O_2$  ve  $O_2^{\cdot-}$  birikir. Süperoksit dismutaz ve katalaz bulunan bir ortamda hücre fagozom oluştursa bile fagosite ettiği bakteriyi parçalayamaz ve öldüremez (1,27,30,31).

### **SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ**

Normal metabolizma sırasında ya da patolojik yolla ortaya çıkan serbest radikaller, hücre ve dokularda birçok zarara yol açmaktadır (32). Bu zararlar şöyle sıralanabilir;

- a)Deoksiribonükleik asidin tahrip olması,
- b)Nükleotid yapılı koenzimlerin yıkımı,

- c)Tiyollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının tiyol/disülfid oranının değişmesi,
- d)Protein ve lipidlerle kovalan bağlantılar yapması,
- e)Enzim aktivitelerinde ve lipid metabolizmasındaki değişiklikler,
- f)Mukopolisakkaritlerin yıkımı,
- g)Proteinlerin tahrip olması ve protein “turnover”nin artması,
- h)Lipid peroksidasyonu, zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesi,
- ı)Zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması,
- j)Steroid ve yaşlılık pigmenti denilen bazı maddelerin birikimi,
- k)Kollajen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozularak kapillerlerde aterofibrotik değişikliklerin oluşması.

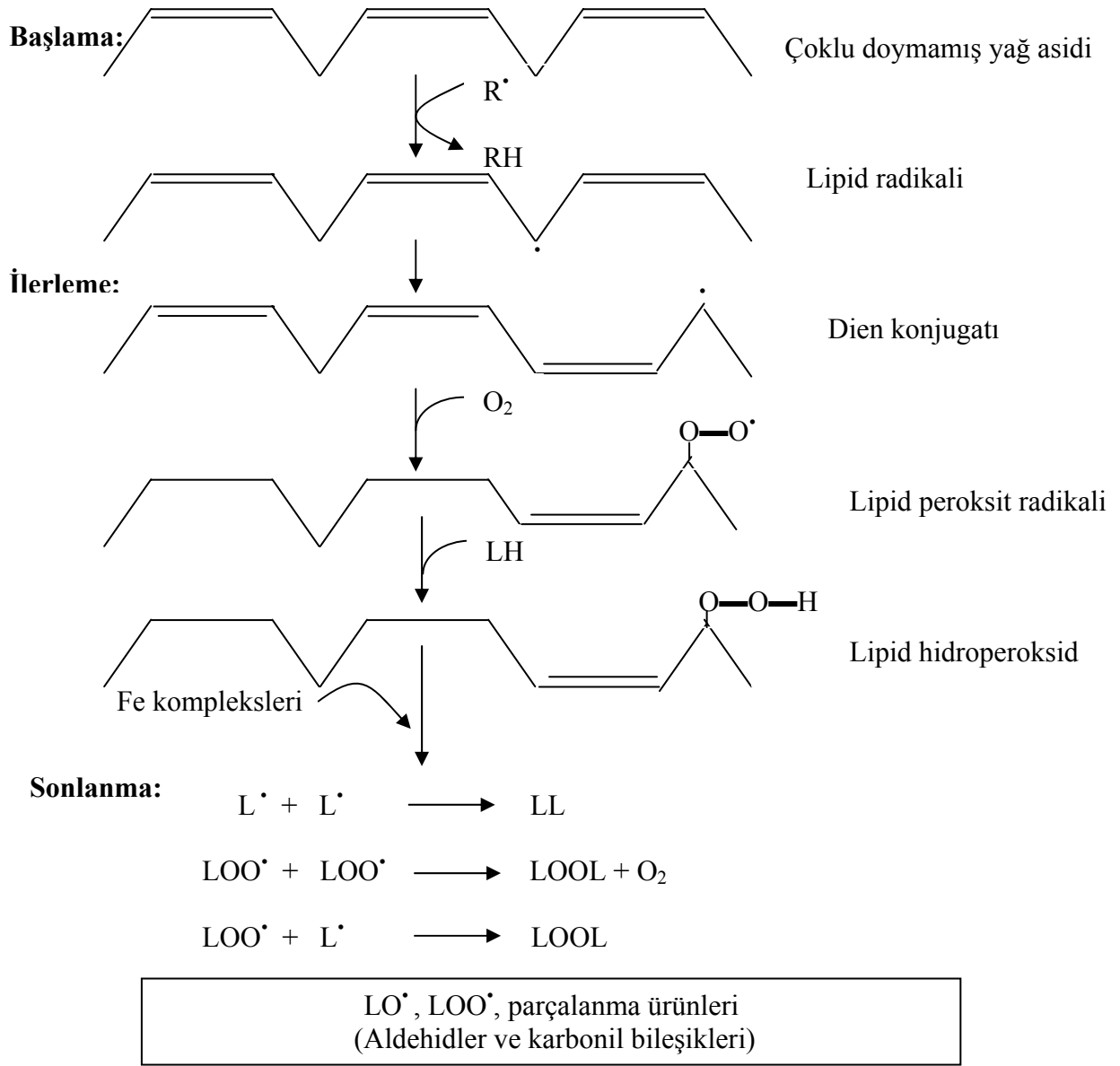
### **Lipidlere Etkisi**

Serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asidlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal olay, lipid peroksidasyonu olarak tanımlanmaktadır. Bu kimyasal olay, organizmada oluşan kuvvetli oksitleyici bir radikalın zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki  $\alpha$ -metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır (Şekil 1).

Biyolojik sistemlerde serbest radikal  $O_2^{\cdot-}$  ve  $\cdot OH$  olup, bununla birlikte lipid peroksidasyonunun uyarılmasında asıl etkili radikalın  $\cdot OH$  olduğu benimsenmektedir.

Serbest radikal etkisiyle yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidi zincirinin radikal niteliği kazanmasına neden olmaktadır. Böylece oluşan lipid radikali ( $L\cdot$ ) dayanıksız bir bileşik olup, bir dizi değişikliğe uğramaktadır. Öncelikle, molekül içi çift bağ aktarılması ile dien konjugatları oluşmaktadır. Daha sonra, lipid radikalın moleküler oksijenle reaksiyona girmesi ile lipid peroksid radikali ( $LOO\cdot$ ) meydana gelmektedir. Bu lipid peroksid radikalleri de zar yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asidlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumunu sağlamakta, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksidlerine ( $LOOH$ ) dönüşmektedir. Böylece reaksiyonun oto-katalitik bir biçimde yürümesi sağlanmaktadır (7,33). Lipid peroksidasyonu,  $LOOH$ 'ın aldehid ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile sona ermektedir.

Lipidlerin peroksidasyonu, enzimatik ve non enzimatik olarak meydana gelebilir. Enzimatik olmayan lipid peroksidasyonda,  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ , azo bileşikleri ve  $LOOH$ 'ı hiçbir enzimatik aktiviteye gerek duymadan peroksidasyonu başlatabilirler.

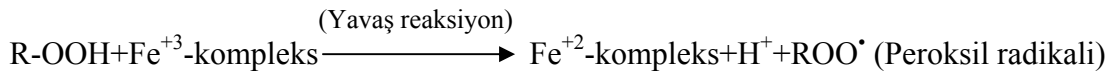
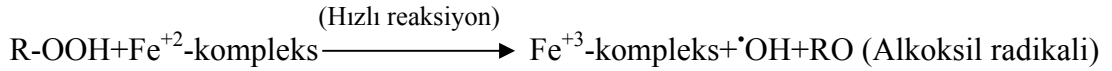


**Şekil 1. Çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu (7,33,34).**

Hücre içi demir konsantrasyonu 1-10 mikromolar arasında olup, bu miktar lipid peroksidasyonunu başlatmak için yeterlidir. Lipid peroksidasyonu; demir bağlayan şelatörler, hidroksil temizleyicileri, katalaz, selenyum, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimlerle önlenabilir.

Enzimatik lipid peroksidasyonunda ise; siklooksijenaz ve lipooksijenaz kendi substratları olan yağ asitlerinde belirli oranda lipid peroksidasyonu oluşturur ve hidroperoksitlerle, endoperoksitleri meydana getirir. Ayrıca, ksantin-ksantin oksidaz

sisteminden de  $O_2^{\cdot-}$  oluşur ve bu radikal ferri-demir ( $Fe^{+3}$ )'ü ferröz-demir ( $Fe^{+2}$ )'e indirgeyerek lipid peroksidasyonunu başlatır. Oluşan lipid peroksidler, fizyolojik sıcaklıkta son derece dayanıksızdır. Ancak, demir ve bakır gibi geçiş metalleriyle yaptıkları kompleksler ile dekompozisyonları uzar. İndirgenmiş demir kompleksi, aynen  $H_2O_2$  ile verdiği reaksiyon gibi,  $LOO^{\cdot}$  ile reaksiyona girerek, O-O bağının ayrışması sonucu alkoksil radikalini oluşturur:



Ortaya çıkan bu lipid peroksid ürünleri organizmada;

1. Membranların yapı ve fonksiyonlarında bozukluklara yol açarlar. Bu etkiler gerek membran fosfolipidlerindeki yağ asidlerinin oksidasyonu, gerekse biriken hidroperoksidlerin duyarlı amino asid kalıntılarında yaptıkları oksidan etkilerinin kombinasyonu sonucu ortaya çıkar. Membrandaki yağ asidi oksidasyonu, aldehid ve pentan gibi hidrokarbonları üreterek membran bütünlüğünün bozulmasına neden olur. Bunun sonucunda lizozomal membranlar yırtılır, hidrolitik enzimler hücre içine boşalır ve hücre hasarına yol açarlar.

2. Lipid peroksidler ve alkoksil radikaller, triptofan ve sistein gibi amino asidlere ataklar yaparak protein yapısını bozar ve hasar meydana getirirler. Genel olarak aldehidler, sülfidril (-SH) grubu ile reaksiyona girerken, malondialdehid (MDA) ise proteinlerin amino gruplarına ataklar yaparak molekül içi ya da proteinler arası halkalar ile protein yapısını bozar. Bu moleküllerin oluşturdukları hasarlar, bazı hücrelerde permeabiliteyi artırarak hücrenin ölümüne yol açar.

3. Lipid peroksidasyonu sırasında, aktiviteleri için sülfidril ve amino grubuna gereksinim duyan, özellikle hormonal uyarılara hücrenin cevap verme imkanını sağlayan yüzey reseptörleri inhibe olur.

4. Hücre membranına yakın yerleşimdeki DNA molekülleri de lipid peroksidasyonundan hasar görürler ve bazen DNA'nın replikasyonu yapılamaz.

5. Bazı aldehidler biyolojik sıvılarda kemotaktik etki gösterirler.

6. Malondialdehid gibi aldehidler, düşük dansiteli lipoprotein (LDL)'i modifiye ederek metabolik yolu değiştirebilirler (6,7,32,35,36).



### **Proteinlere Etkisi**

Proteinlerin içerdikleri amino asitlerin oksidasyona duyarlılıkları farklı olmakla birlikte sistin, sistein, tirozin, triptofan, histidin, metionin ve lizin kalıntılarının hassasiyetinin yüksek olduğu kabul edilmektedir. Süperoksit radikalının bu amino asitlerle daha yavaş bir reaksiyon verdiği ancak  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hipokloröz asitlerin daha hızlı oksidan etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu nedenle, mikrosirkülasyonda oluşan ROB, ataklar sırasında proteinlerin, enzimlerin modifikasyonuna ve hücre fonksiyonlarının değişmesine neden olur. Sonuçta,  $\text{Ca}^{++}$  ATP-az,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-az inaktivasyonuna ve glutamin sentetaz, piruvat kinaz, kreatin kinaz, laktat dehidrogenaz, alkol dehidrogenaz ve  $\alpha_1$  proteinaz inhibitörlerinin inhibisyonuna yol açar (32,37).

### **Karbonhidratlara Etkisi**

Geçiş metalleri tarafından katalizlenen bir reaksiyon ile serbest glikoz oksidasyona maruz kalır. Bunun sonucunda reaktif oksidanlar ve protein reaktif dikarbonil bileşikleri üretilir. Sinoviyal sıvının viskozitesinde önemli role sahip aminoglikan yapıdaki hyalüronik asit, serbest radikallerle etkileşerek bağ dokusunun stabilitesinin bozulmasına ve sıvının viskozitesinin kaybına neden olur (32).

### **ANTIOKSİDANLAR**

Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasındaki hassas denge korunamadığı takdirde, hücre hasarına kadar giden bir çok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır.

Antioksidanların ilk belirlenen etkileri, zar yapısında bulunan lipidlerin peroksidasyona karşı korunması olmuştur. Bunun sonucu olarak, başlangıçta antioksidanlar lipid peroksidasyonunu engelleyen moleküller olarak tanımlanmışlardır. Günümüzde ise antioksidanların tanımı lipidlerin yanı sıra proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi diğer hedef molekülleri koruyucu etkilerini de içerecek şekilde genişletilmiştir. Böylece, antioksidanlar hedef moleküllerdeki oksidan hasarı engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanmakta ve bu tanımla bağlantılı olarak antioksidanların etkileri farklı şekillerde olabilmektedir (38,39).

Başlıca antioksidan etki çeşitleri şunlardır:

- 1.Reaktif oksijen türlerinin enzim reaksiyonları aracılığıyla veya doğrudan temizlenmesi,
- 2.Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun baskılama yoluyla engellenmesi,
- 3.Metal iyonların bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi,
- 4.Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesi.

Antioksidanlar çeşitli kriterlere göre gruplanabilirler (Tablo 3 ve 4):

Yapılarına göre;

- a)Enzimler
- b)Enzim olmayan proteinler, küçük moleküller

Kaynaklarına göre;

- a)Organizmaya ait olanlar (endojen antioksidanlar)
- b)Dışarıdan alınanlar (eksojen antioksidanlar)

Çözünürlüklerine göre;

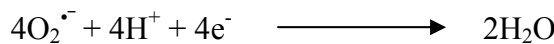
- a)Suda çözünenler
- b)Lipidlerde çözünenler

Yerleşimlerine göre;

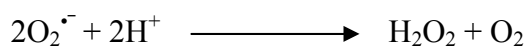
- a)Hücre içinde bulunanlar
- b)Plazma ve diğer ekstrasellüler sıvılarda bulunanlar

## Enzimler

**Sitokrom oksidaz:** Mitokondrilerde solunum zincirinin en son basamağında yer alan, bakır içeren bir enzimdir. Solunum zincirindeki görevini sürdürürken, süperoksit radikalının suya dönüşümünü de sağlar. (38,40):



**Süperoksit dismutaz:** Bu enzim aşağıdaki reaksiyonu katalizleyerek süperoksit radikalının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar. Böylece hücre içindeki  $\text{O}_2^{\cdot-}$  düzeylerini azaltır (Tablo 3):



**Tablo 3. Endojen antioksidanlar (5, 8,12)**

Antioksidan	Etki Mekanizması
1. Enzimler	
Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)	Hidrojen peroksit detoksifikasyonu
Katalaz	Hidrojen peroksit detoksifikasyonu
Sitokrom oksidaz istemi	Hücre O <sub>2</sub> 'nin %95-98'nin detoksifikasyonu
Süperoksit dismutaz (SOD)	Süperoksit anyonlarının detoksifikasyonu
2. Enzim olmayanlar	
• Lipid fazda bulunanlar	
α-tokoferol	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ve <sup>•</sup> OH toplayıcı etki
β-karoten	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ve <sup>•</sup> OH toplayıcı etki
α-lipoik asid	HOCl, <sup>•</sup> OH ve <sup>1</sup> O <sub>2</sub> toplayıcı
• Sıvı fazda (hücre sitoplazmasında veya kan plazmasında) bulunanlar	
Albumin	LOOH ve HOCl toplayıcı etki
Askorbik asid	LOOH ve HOCl toplayıcı etki
Bilirubin	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ve <sup>•</sup> OH toplayıcı etki
Ferritin	Doku demirinin bağlanması
Glutatyon	GSH-Px aktivitesinin desteklenmesi, O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ve <sup>•</sup> OH ile direkt reaksiyona girmesi
Laktoferrin	Dolaşımdaki serbest demirin bağlanması
Melatonin	SOD ve GSH-Px aktivitesini artırarak
Seruloplazmin	Dolaşımdaki demirin bağlanması
Sistein	SOD benzeri aktivite
Transferrin	Dolaşımdaki serbest demirin bağlanması
Ürat	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ve <sup>•</sup> OH toplayıcı etki

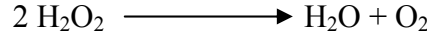
Süperoksit dismutazın insanlarda iki izoenzimi vardır. Bunlar sitozolde bulunan dimerik yapıdaki bakır ve çinko içeren Cu.Zn-SOD ile mitokondrilerde bulunan tetramerik yapıdaki 2 Mn içeren Mn-SOD'dır. Bu iki enzimden Cu.Zn-SOD siyanürle inhibe olurken, Mn-SOD siyanürden etkilenmez.

**Tablo 4. Eksojen antioksidanlar (5,8,12)**

<b>Antioksidan</b>	<b>Etki Mekanizması</b>
Ksantin Oksidaz İnhibitörleri Allopurinol Oksipurinol Pterin aldehid Tungsten	Ksantin oksidazla süperoksit üretiminin inhibisyonu
NADPH Oksidaz İnhibitörleri Adonezin Kalsiyum kanal blokerleri Lokal anestezipler NADPH oksidaz monoklonal antikor Non-steroid antiinflatuar ilaçlar	Nötrofil ve makrofajlarda NADPH ile süperoksit üretiminin inhibisyonu
Süperoksit Dismutaz (SOD) Doğal SOD IgA'ya bağlı SOD Lipozom kapsüllü SOD Polietilen glikol SOD (PEG-SOD)	$O_2^{\bullet -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$ Reaksiyonunun katalizlenmesi
Katalaz Doğal katalaz Lipozom kapsüllü katalaz Polietilen glikol katalaz (PEG-katalaz)	$2 H_2O_2 \longrightarrow H_2O + O_2$ Reaksiyonunun katalizlenmesi
Nonenzimatik Serbest Radikal Toplayıcılar Albumin 17-Aminosteroidler (Lazoroidler) Bilirubin Glutasyon Mannitol Ürat	LOOH, HOCl toplayıcı etki LOOH ve $O_2^{\bullet -}$ toplayıcı etki $O_2^{\bullet -}$ ve $\bullet OH$ tutucusu $O_2^{\bullet -}$ ve $\bullet OH$ toplayıcı etki $\bullet OH$ toplayıcı etki $O_2^{\bullet -}$ ve $\bullet OH$ toplayıcı etki
Demir Redoks Döngüsünün İnhibitörleri Desferoksamin Seruloplazmin	Serbest demir bağlama
Glutasyon Peroksidaz Aktivitesini Artıranlar Glutasyon Melatonin N-Asetil sistein	GSH-Px aktivitesinin artırılması

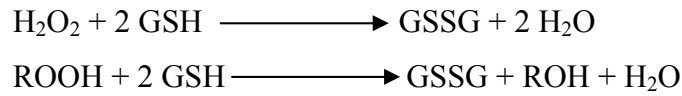
Süperoksit dismutazın fizyolojik görevi, hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Oksijen kullanımı yüksek olan dokularda SOD aktivitesi fazladır. Buna karşılık ekstrasellüler sıvılarda SOD aktivitesi çok düşüktür (12,35,41,42,43).

**Katalaz:** Katalaz enzimi  $H_2O_2$ 'yi, oksijen ve suya parçalayan reaksiyonu katalizler:

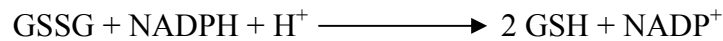


Enzim peroksizomlarda yerleşmiştir. Yapısında dört tane hem grubu bulunur. Peroksidaz aktivitesi de vardır ve hidrojen peroksit, metil hidroperoksit gibi küçük moleküllere etki eder. Lipid hidroperoksidlerine ise etkisi yoktur (8, 12, 44).

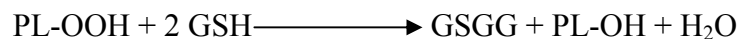
**Glutasyon peroksidaz:** Sitozolde yerleşik bir enzim olan GSH-Px tetramer yapıdadır. Dört selenyum atomu içerir. GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizleyerek, hidrojen peroksidin ve organik hidroperoksitlerin (ROOH) indirgenmesini sağlar:



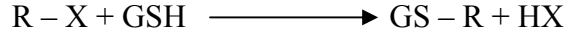
Glutasyon peroksidazın iki substratı vardır. Substratlarından biri olan peroksitler alkole indirgenirken, diğer substrat olan GSH yükseltgenir. Oluşan yükseltgenmiş glutasyon (GSSG), glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği bir başka reaksiyon ile tekrar indirgenmiş glutatyona dönüşür:



Yapısı ve fonksiyonları çok yakın zamanda aydınlatılabilmemiş olan bir diğer GSH-Px, “fosfolipid-hidroperoksit glutasyon peroksidaz” enzimidir. Bu enzim de selenyum içerir. Ancak monomerik yapıdadır. Zar yapısındaki fosfolipid hidroperoksitlerini, alkollere indirgeyerek, özellikle E vitamininin yetersiz olduğu durumlarda peroksidasyona karşı korunma sağlar (38,45,46):



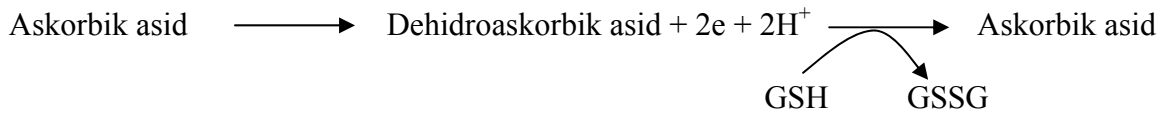
**Glutasyon transferaz:** Dimerik yapıdadır. Esas olarak sitozolde bulunur. Çok sayıda izoenzimi vardır. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda önemli rolleri olan GSH-transferazlar çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin glutasyon ile konjugasyonunu katalizler (12,38):



### **Küçük Moleküller**

**Askorbik asid (C vitamini): Askorbik asid, suda çözünür vitaminlerdendir. İnsanlarda sentezlenemediğinden diyetle alınması gerekir. Özellikle yeşil yapraklı taze sebze, meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunur. İnce barsaklardan kolayca emilir. Isıtılmaya dayanıksız, dondurulmaya dayanıklıdır. Dokularda ve plazmada askorbat iyonu şeklinde bulunur. En yüksek askorbat içeren dokular timus, adrenal bez ve korpus luteumdur.**

Askorbik asidin organizma için önemi, indirgeyici gücünün yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Bu özelliği ile hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Kollajen sentezinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir. Askorbik asid, semidehidroaskorbat radikali üzerinden dehidroaskorbik aside yükseltgenir. Dehidroaskorbat da fizyolojik şartlarda glutasyon ile doğrudan veya enzimatik olarak etkileşir ve askorbata indirgenir:



Askorbik asid aynı zamanda güçlü bir antioksidandır,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$  ve  $^1O_2$  ile kolayca reaksiyona girerek onları etkisizleştirir. Sulu fazda bulunmasına karşın lipid peroksidasyonunu başlatıcı radikalleri temizleyerek, lipidleri ve zarları da oksidan hasara karşı korur. E vitamininin geri dönüşümünde görev alır, tokoferoksil radikalının alfa-tokoferole indirgenmesini sağlar. Böylece E vitamini ile birlikte etkin bir şekilde LDL'yi

oksidasyona karşı korur. Ayrıca, antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller.

Askorbik asid,  $Fe^{+3}$ 'i  $Fe^{+2}$ 'e indirgeyen süperoksit radikali dışındaki tek hücre içi moleküldür. Bu etkisiyle, ferri-demiri indirger, Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye uygun olan ferro-demire dönüştürür ve süperoksit radikalının üretimine neden olur. Bu özelliği C vitamininin pro-oksidan etkili olmasına neden olmaktadır (12,38,47,48,49).

**Glutasyon:** Glutasyon, başta karaciğer olmak üzere pek çok dokuda yüksek düzeylerde bulunan glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir tripeptittir. Önemli bir suda çözünür antioksidan ve indirgeyici ajandır. Glutasyonun pek çok metabolik görevi vardır. Glutasyon peroksidaz, GSH redüktaz ve GSH transferaz gibi enzimlerin substrat veya ko-substratıdır. Glutasyon, serbest radikaller ve peroksidlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidan hasara karşı korur. Ayrıca protein yapısındaki -SH gruplarını indirgenmiş halde tutarak pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu engeller. Amino asidlerin membrandan transportunu sağlar. Hemoglobinin methemoglobine dönüşmesini önler. İndirgenmiş glutasyon çeşitli reaksiyonlarda yükseltgenerek, GSSG'ye dönüşür. Yükseltgenmiş glutasyonun tekrar indirgenmesi NADPH'ın da kullanıldığı bir reaksiyonla olur. Bu şekilde dokularda GSSG/GSH oranı düşük tutulur (<1/1000) (38).

**E Vitamini:** E vitamini tokoferol ve tokotrienol türevlerini kapsayan bir vitamindir. Doğal olarak alfa, beta, gama, delta, eta ve zeta gibi çeşitli şekilleri bulunmaktadır. Bunların hepsi, izoprenoid takısı içeren bileşiklerdir. Antioksidan aktivitesi en yüksek olanı alfa-tokoferoldür. Yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip olan aromatik halka, aktif kısmını oluşturur ve molekülün antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır. Bitkisel yağlar ve tohumlar, E vitamininden zengin kaynaklardır. Yer fıstığı, badem, pamuk yağı ve keten tohumunda bulunur. Diyetle alınan E vitamini yağda çözünmüş haldedir. Yağ sindirimi sırasında açığa çıkar ve emilir. Emilebilmesi için safra asid düzeylerinin de normal sınırlarda olması gerekir. E vitamini herhangi bir taşıyıcı protein olmadan pasif difüzyonla emilir. Dokularda, mitokondri ve mikrozoimler gibi membrandan zengin hücre fraksiyonlarında bulunur. Çok güçlü bir antioksidan olarak, zarda bulunan fosfolipidlerin yapısındaki çoklu doymamış yağ asidlerini serbest radikallerin etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. E vitamini,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$ ,  $^1O_2$ , LOOH ve diğer radikalleri indirger. E vitamini ile GSH-Px serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Glutasyon peroksidaz, oluşan

peroksitleri ortadan kaldırırken, E vitamini peroksitlerin yapımını engeller. E vitamini ve selenyum birbirlerinin metabolizmasında önemli rol oynarlar. Selenyum hem E vitamininin, hem de lipidlerin emilimi için gereklidir. Ayrıca, E vitamininin lipoproteinler içinde tutulmasına yardımcı olur. E vitamini ise selenyum kaybını önleyerek veya onu aktif şekilde tutarak organizmanın selenyum ihtiyacını azaltır. E vitamininin zincir kırıcı antioksidan olarak başlıca fonksiyonu, lipid peroksidlerini etkisizleştirerek peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır. Bu sırada oluşan tokoferoksil radikali stabil bir moleküldür. Glukronik asid ile konjuge olur ve safra yolu ile atılır (49,50,51).

**Karotenoidler ve retinoidler:** Karotenoidler havuç, domates, fasulye, portakal ve diğer narenciyelerde bulunan bitki pigmentleridir. A vitamininin metabolik ön maddesi olan beta-keroten bu karotenoidlerden başlıcasıdır. Retinoidler plazmada lipoproteinler ve retinol-bağlayıcı protein aracılığıyla taşınırlar. Beta-karoten ve likopen gibi retinoidler LDL yapısında yer alır ve LDL'yi oksidasyona karşı korurlar. Karotenoidler, hücreleri oksidan strese karşı üç farklı şekilde korurlar:

- a)Flavinler ve porfirinler gibi triplet uyarıcıların zararlı etkilerini baskılama,
- b)Singlet oksijeni baskılama,
- c)Peroksil radikallerini temizlenme,

Karotenoidlerin antikarsinojen oldukları bilinmektedir. Ancak bu etki ve diğer biyolojik etkileri antioksidan özelliklerinden bağımsızdır.

**Ubikinonlar:** Ubikinonlar lipidlerde çözünen ve izoprenoid takı içeren kinon türevleridir. Soya yağı, et, balık gibi besinlerde ve bazı sebzelerde bulunurlar. İndirgenmiş şekilleri olan übikinoller, übikinonlara kıyasla antioksidan olarak çok daha etkilidirler. İnsanlarda bulunan temel übikinon koenzim Q'dur. Esas görevi olan solunum zincirindeki redoks taşıyıcılığının yanında, oksijen kaynaklı radikaller ve singlet oksijen ile etkileşerek lipid peroksidasyonunun başlamasını ve biyomoleküllerin hasar görmesini engeller.

**Flavonoidler:** Lipidlerde çözünen antioksidanlar sınıfından olan flavonoidler bitkilerdeki kırmızı, mavi ve sarı renk pigmentlerini oluşturan polifenollerdir. Başlıca besinsel kaynakları elma, portakal, limon gibi meyveler ile patates, karnabahar gibi sebzelerdir. Şarap ve çay gibi bitkisel kaynaklı içeceklerde de bulunurlar. Flavonoidlerin farklı yollarla lipid peroksidasyonunu engellediği belirlenmiştir:

- a)Peroksidasyonu başlatan radikalleri tutması,



- b)Metal iyonlarını bağlaması,
- c)Radikal oluşturuvcu enzimleri inhibe etmesi.

Ancak, bazı flavonoidlerin metal iyonlarıyla etkileşerek pro-oksidan etki yaptığı da saptanmıştır (24,38).

**Melatonin:** En zararlı radikallerden  $\cdot\text{OH}$ 'ini ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Melatoninin bir diğer önemli özelliği lipofilik olmasıdır. Böylece hücrenin bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan-beyin engelini de kolayca geçer. Bu nedenlerle çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir. Melatoninin çok yüksek dozlarda ve uzun süre kullanımında bile toksik etkisi gözlenmemiştir. Ayrıca, bazı antioksidanlar gibi pro-oksidan aktivitesi de yoktur. Deoksiribonükleik asid hasarının melatonin tarafından çok etkili bir şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir. Yaşlanma ile birlikte melatonin üretimi azalır. Bu durumun yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogenezinde önemli olabileceği düşünülmektedir (52,53,54).

**Ürik asid:** Normal plazma konsantrasyonlarında antioksidan etki gösteren bir moleküldür. Antioksidan etkiyi çeşitli yollarla gösterir:

- a)Demir ve bakır iyonlarını bağlayarak etkisizleştirir.
- b)Singlet oksijen, HOCl,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^-$  ve  $\text{LOO}\cdot$  gibi reaktif oksijen türlerini temizler

**Albumin:** Yapısında bulunan çok sayıdaki sülfidril grubu aracılığıyla bakır iyonlarını bağlar ve lipid peroksidasyonunun başlamasını engeller. Bakır iyonlarının bağlanmasıyla protein yapısında hasar ortaya çıkar. Ancak albumin yarı ömrü oldukça kısa bir protein olduğundan kolaylıkla yenilenebilmektedir. Böylece bakır iyonlarının diğer proteinlerdeki sülfidril gruplarına bağlanması ve bu proteinleri hasara uğratması engellenmiş olur. Albumin kanda serbest yağ asidlerinin ve bilirubinin taşıyıcısıdır. Bilirubinin lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve süperoksit ve hidroksil radikallerinin toplayıcısı olduğu bildirilmiştir (12,38).

### **Diğer Antioksidanlar**

Yukarıda sözü edilen antioksidanların dışında, çok sayıda endojen molekülün antioksidan etkisi olduğu ileri sürülmüştür. Bu moleküller arasında sistein, histidin gibi amino asidler ile safra asidleri, bilirubin gibi bileşikler ve sitokinler gibi yapıları ve işlevleri çok farklı olan moleküller vardır. Ayrıca çeşitli eksojen moleküllerin de antioksidan etkisi bildirilmiştir. Başlıcaları; ksantin oksidaz, NADPH oksidaz gibi radikal kaynağı enzimlerin inhibitörleri, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, steroid yapıda olmayan anti-

enflamatuvarlar, r-SOD gibi rekombinant antioksidan enzimler, GSH-Px aktivitesini artıran veya asetilsistein gibi benzer etki gösteren moleküller, dimetilsülfoksid, mannitol gibi serbest radikal toplayıcıları, desferroksamin gibi demir tutucuları, sodyum benzoat, propil galat gibi besinlere eklenen koruyucular (38).

### **$\alpha$ -LİPOİK ASİD**

Alfa lipoik asid fizyolojik sistemlerde bulunan, tiyol grubu içeren ve antioksidan aktivitesi olan önemli bir moleküldür (55). Nispeten küçük bir moleküldür (MA: 206). Yükseltgenmiş formunda intramoleküler disülfid bağı oluşturan, disülfid türevi bir oktanoik asittir. Alfa lipoik asid'in okside olmuş ditiyolan halkası çevresel şartlara bağlı olarak moleküle yüksek bir indirgeme özelliği kazandırmaktadır. Alfa lipoik asid ve DHLA'nın kimyasal reaktivitesini sağlayan da ditiyolan halkasıdır. Bu yapı  $\alpha$ -LA'yı bilinen tiyol içeren diğer biyomoleküller arasında özgün kılmaktadır (42).

Alfa lipoik asid insan diyetinde yeterli miktarda bulunmasına rağmen, *de novo* olarak mitokondride lipoik asid sentaz tarafından sentezlenmektedir. Hem lipid hem de sulu ortamda çözünür, kolayca emilir ve hücrelere taşınarak, DHLA'ya indirgenir. Alfa lipoik asid hücreye girdikten sonra sitozolik enzimler olan GSH redüktaz ve tiyoredoksin redüktaz ve mitokondrial enzim E<sub>3</sub> tarafından indirgenmektedir. Alfa lipoik asid barsaktan emildikten sonra, çeşitli dokularda metabolik değişikliğe uğradıktan sonra salgılanır. Lipoat metabolizmasındaki katabolik süreç pentanoik asid yan zincirinin  $\beta$ -oksidasyonu üzerinden gerçekleşmektedir. Alfa lipoik asid metaboliti olan 3 ketolipoat, serbest  $\alpha$ -LA'nın  $\beta$ -oksidasyonla salgılandığını göstermektedir (3,55).

Sitrik asid siklusundaki multienzim dehidrogenaz kompleksinin (piruvat dehidrogenaz ve  $\alpha$  ketoglutarat dehidrogenaz) kofaktörüdür. Alfa lipoik asid ekzojen verildiğinde serbest radikal temizleyici, metal şelasyon ve vitamin E, askorbik asid ve glutatyonun rejenerasyonu gibi antioksidan özellikler gösterir (56). Dihidrolipoik asidin,  $\alpha$ -LA'ya göre antioksidan etkisi daha fazladır (3). Alfa lipoik asidin iki ayrı izomerik konfigürasyonu vardır. R formu doğal, S formu ise sentetiktir (56). Redükte DHLA ve okside  $\alpha$ -LA formlarının her ikisi de  $\cdot$ OH'i, HOCl ve  $^1$ O<sub>2</sub> doğrudan temizler, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ise redükler. Alfa lipoik asid ve DHLA doğal olarak fizyolojik sistemlerde bulduklarından ideal terapötik antioksidan olduğu düşünülebilir. Alfa lipoik asid, antioksidan etkiye ilaveten bazı metabolik yollarda enzim aktivitelerini de etkileyebilir. Hepatik mikrozomal enzimlerden sitokrom P<sub>450</sub> redüktaz ile disülfid-tiol değişimi yoluyla P<sub>450</sub> redüktazı inhibe edebilir. Nitrik oksit sentaz ile sitokrom P<sub>450</sub> redüktaz homologdur. Bu yüzden  $\alpha$ -LA nitrik oksit sentazı da inhibe edebilir (55).

Dihidrolipoik asidin antioksidan etkisi kanıtlanmış olmasına rağmen özellikle demirin varlığında prooksidan etki gösterebilir. Dihidrolipoik asid *invitro* hem ferrik hem ferröz demir ile şelat oluşturur. Bu nedenle demirin oksidatif hasarını önler. Ancak ferritinden demirin ayrılmasını ve Fe<sup>+3</sup>'ün Fe<sup>+2</sup>'ye dönüşümünü azaltarak oksidatif hasarı arttırabilir (56).

Alfa lipoik asid ve DHLA'in antioksidan ve prooksidan olarak fonksiyon gösterme yeteneği oksidan stresin tipi ve fizyolojik şartlar tarafından belirlenmektedir. Tiyol bileşikleri tarafından oluşturulan prooksidan etkilerin çoğu O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve <sup>•</sup>OH oluşmasına bağlanmaktadır (3).

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma; T.Ü. Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul onayı alınarak Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi (Ek 1).

### Deney Hayvanları

Ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen 8-10 haftalık 20 adet dişi Spraque-Dawley rat Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nden temin edildi. Ratlar bazal diyet ile beslendiler.  $22 \pm 2$  °C oda sıcaklığı, % 60 nem oranı, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ritim sağlandı. Ratlar rompun (0.01 ml/100 mg vücut ağırlığı) ve ketalar (0.05 ml/100 mg vücut ağırlığı) anesteziikleri uygulanarak sakrifiye edildiler. Karaciğer doku örnekleri alınarak % 0.9'luk serum fizyolojik ile yıkandı ve lipid peroksidasyonu ve glutasyon ölçümleri için analiz gününe kadar  $-70$  °C'de saklandılar.

### Kullanılan Malzemeler

#### Kimyasal maddeler:

Asetik asid ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze-Almanya)
Butillenmiş hidroksitoluen ( $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ )	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze-Almanya)
Bakır sülfat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	(Merck KgaA, Darmstadt-Almanya)
2,2'-Dinitro-5,5'ditiobenzoik asid ( $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$ )	(Merck KgaA, Darmstadt-Almanya)
Etanol (mutlak) ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ )	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze-Almanya)
Ferröz amonyum sülfat ( $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$ )	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze-Almanya)
Folin ayıracı	(Merck KgaA, Darmstadt-Almanya)

Glutatyon (indirgenmiş form) (C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S)	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze-Almanya)
Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	(Merck KgaA, Darmstadt-Almanya)
α-Lipoik asid (C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> )	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze-Almanya)
n-Butanol (CH <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O)	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze-Almanya)
Sodyum dodesil sülfat (C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S)	(Merck KgaA, Darmstadt-Almanya)
Sodyum fosfat (monobazik) (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	(Pancreac Madrid-İspanya)
Sodyum fosfat (dibazik) (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze-Almanya)
Sodyum hidroksit (NaOH)	(Merck KgaA, Darmstadt-Almanya)
Sodyum karbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	(Merck KgaA, Darmstadt-Almanya)
Sodyum-potasyum tartarat (NaKC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> .4H <sub>2</sub> O)	(Pancreac Madrid-İspanya)
Sodyum sitrat (tribazik) (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> .2H <sub>2</sub> O)	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze-Almanya)
Perklorik asid (%70) (HClO <sub>4</sub> )	(Merck KgaA, Darmstadt-Almanya)
Piridin (C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N)	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze-Almanya)
Tiyobarbitürik asid (C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S)	(Merck KgaA, Darmstadt-Almanya)

#### **Diğer aletler ve cam malzemeler:**

Cam malzemeler	: Deneysel tüpleri, balon jöjeler, beherler, v.d.
Distile su cihazı	: Nüve, Almanya
Elektronik tartı	: Sartorius AG, Almanya
Etüv	: Memmert 400, Almanya
Homojenizatör	: Glas-Col, Amerika
Manyetik karıştırıcı	: Ikamag RH- Staufen, Almanya
Otomatik pipetler	: Eppendorf, Socarex, Microlit
pH-metre	: Inolab pH level 1 WTW, Almanya
Soğutmalı santrifüj	: Hettich Universal 30 RF, Almanya
Spektrofotometre	: Shimadzu UV-160A, Japonya
Spektrofotometre	: Shimadzu UV-1700A, Japonya
Su banyosu	: GFL 1083, Almanya
Vorteks	: Velp Scientifica, Almanya

#### **Doku Örneklerinin Hazırlanması**

Ratlardan elde edilen karaciğer dokuları 1/10 oranında 0.1 M, pH 7.4 fosfat tamponu ile homojenize edilerek homojenat havuzu hazırlandı. Homojenatlar 1700xg'de santrifüj edildikten sonra süpernatantlar deney için kullanıldı.

### Doku Çalışma Grupları

Hidrojen peroksit (15 mM) ve FAS (2 mM) kullanılarak 2 farklı yöntemle lipid peroksidasyon indüksiyonu yapıldı. Lipid peroksidasyonu indüklenen deney düzenekleri 4 alt gruba ayrıldı ve bu gruplara sırasıyla 0, 2, 4 ve 8 mM  $\alpha$ -LA eklendi. Deney süresince oluşan otooksidasyonu değerlendirmek üzere kontrol grubu oluşturuldu (Tablo 5).

**Tablo 5. Doku çalışma grupları**

<b>Hidrojen Peroksit Grubu</b>	<b>Ferröz Amonyum Sülfat Grubu</b>
Grup 1: 15 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Grup 1: 2 mM FAS
Grup 2: 15 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 2 mM lipoik asid	Grup 2: 2 mM FAS + 2 mM lipoik asid
Grup 3: 15 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 4 mM lipoik asid	Grup 3: 2 mM FAS + 4 mM lipoik asid
Grup 4: 15 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 8 mM lipoik asid	Grup 4: 2 mM FAS + 8 mM lipoik asid
Grup 5: Kontrol	Grup 5: Kontrol

### Biyokimyasal Ölçümler

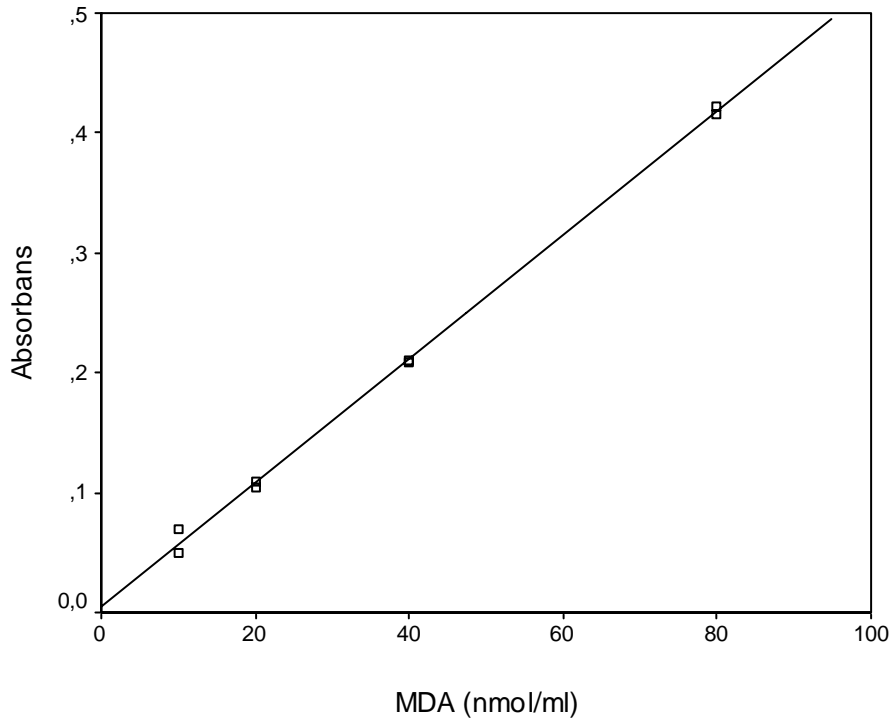
Lipid peroksidasyonu indüklenmeden önce ve indükledikten sonra belirlenen zamanlarda inkübasyondan alınan örneklerde MDA, GSH ve protein analizleri 10'ar kez tekrarlanarak yapıldı.

### Malondialdehid Tayini

**Prensip:** Deneyin prensibi poliinsatüre yağ asidlerinin peroksidasyonu ile oluşan son ürünlerden biri olan MDA'nın sıcak ortamda TBA ile oluşturduğu bileşiğin pembe-kırmızı renginin 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (57).

**Deney:** 50  $\mu$ l süpernatant üzerine, %8 sodyum dodesil sülfat, %20'lik asetik asid ve %0.8'lik TBA eklendi. Kaynama esnasında otooksidasyonu engellemek için final konsantrasyonu 0.1 mM olacak şekilde BHT eklendi. Tüpler kaynar su banyosunda 60 dakika bekletildikten sonra soğutularak üzerlerine n-butanol/piridin (15:1) karışımı eklendi. Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 1700xg'de 10 dakika santrifüj edilerek, butanol/piridin fazı ayrıldıktan sonra renk derişimleri butanol/piridin körüne karşı 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü.

**Malondialdehid bis standart olarak kullanıldı. Her bir standart 2'şer kez çalışılarak, yoğunluk-absorbans grafiği çizildi (Şekil 2). Regresyon analizi ile saptanan formül kullanılarak örneklerdeki MDA yoğunlukları hesaplandı. Bulunan değerler dokuda protein miktarı ile oranlanarak nmol/mg protein şeklinde ifade edildi.**



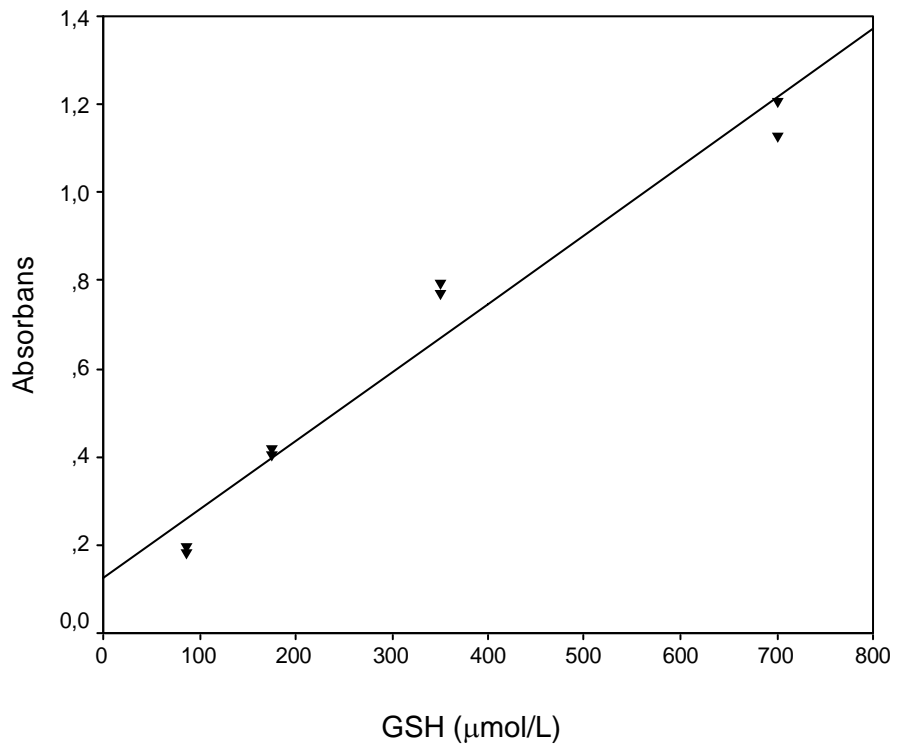
**Şekil 2. Malondialdehid bis standart grafiği.**

### **Glutasyon Tayini**

**Prensip:** Deneyin prensibi indirgenmiş glutasyonun sülfidril grupları bazik ortamda 2,2'-Dinitro-5,5'ditiodibenzoik asid ile sarı renkli bir bileşik oluşturması ve bu bileşiğin renginin 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (58).

**Homojenatta proteinler çöktürüldükten sonra, berrak süpernatantlarda Ellman reaktifi ile meydana gelen reaksiyon ürünü 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Standart eğrinin hazırlanması için; 87.5, 175, 350 ve 700 µM**

yoğunluklarında GSH çözeltileri hazırlandı. Yukarıdaki yöntemle göre 2'şer kez çalışılarak yoğunluk-absorbans grafikleri çizildi (Şekil 3). Regresyon analizi ile saptanan formül kullanılarak örneklerdeki GSH yoğunlukları hesaplandı. Bulunan değerler dokuda protein miktarı ile oranlanarak nmol/mg protein olarak ifade edildi.



Şekil 3. Glutatyon standart grafiği.

#### Total Protein Tayini

**Prensip:** Alkali ortamda bakır iyonları peptid bağları ile kompleks oluşturur. Bakır-peptid kompleksleriyle Folin ayırıcı reaksiyona girerek mavi-mor renk oluşur (59).

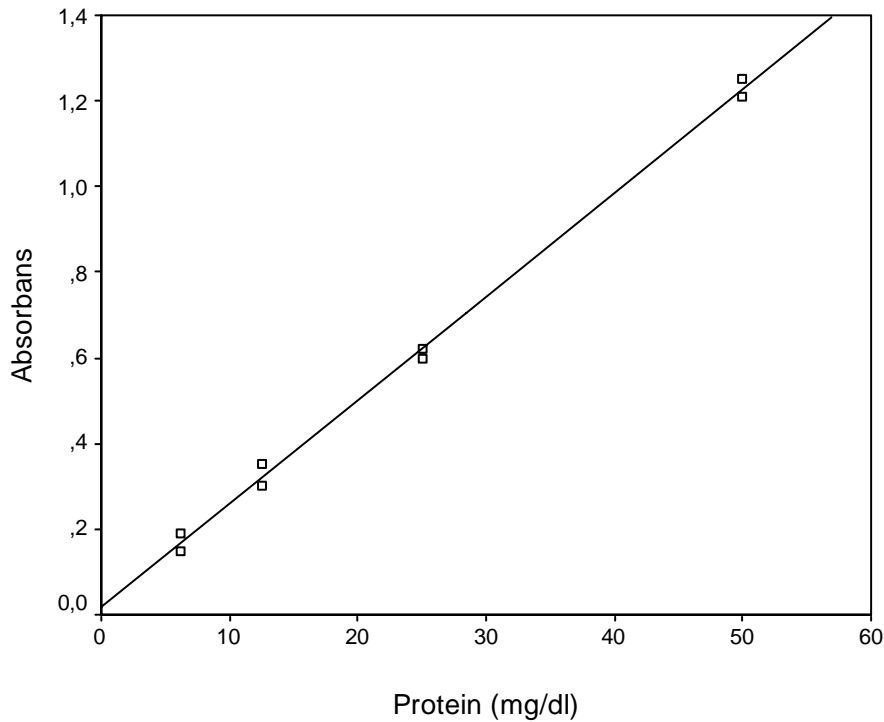
**Alkalin bakır ayırıcı:** 10 gr  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,25 gr Na-K tartarat, 0,05 gr  $\text{CuSO}_4$ , bir miktar 0,5 N NaOH içinde çözüldü ve çözelti 0,5 N NaOH ile 100 ml'ye tamamlandı.



**Folin ayıracı:** 2 N Folin ayıracı 1/18 oranında sulandırıldı ve deney öncesi taze hazırlandı.

**Deney:** Doku süpernatantları 1/4 oranında serum fizyolojik ile sulandırıldı ve vorteks karıştırıcı ile iyice karıştırıldı. 20 µl sulandırılmış homojenat üzerine 180 µl serum fizyolojik ve 200 µl alkalin bakır eklendi. İyice karıştırıp 10 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 800 µl sulandırılmış folin ayıracı eklendi. Örnekler 30 dakika sonra 660 nm dalga boyunda reaktif körüne karşı spektrofotometrede ölçüldü.

**Human albumin standart olarak kullanılarak, yoğunluk-absorbans grafiği çizildi (Şekil 4). Regresyon analizi ile saptanan formül kullanılarak örneklerdeki protein yoğunlukları hesaplandı.**



Şekil 4: Protein standart eğrisi.

## İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi için Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilgi İşlem Dairesi'nde bulunan S0064 Minitab Release 13 (Lisans no:WCP 1331.00197) paket programı kullanıldı. Her bir grupta verilerin parametrik varsayımları yerine getirip

getirmediğini incelemek için normal dağılıma uygunluk ve varyansların homojenliği testleri yapıldı. Grupların arasındaki farklılıklar; normal dağılıma uyan ve homojen olan veriler Varyans Analizi (ANOVA) Tukey düzeltmesi ile, normal dağılıma uymayan veya homojen olmayan veriler ise Kruskal Wallis Varyans Analizi ve arkasından anlamlı bulunan parametreler Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Her bir grubun kendi içinde farklı zamanlardaki değişimlerini değerlendirmek için Friedman Varyans Analizi testi ve arkasından anlamlı bulunan parametrelere Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi uygulandı. Korelasyon analizi için Spearman testi kullanıldı. Elde edilen değerler ortalama±standart sapma (Ort.±SD) olarak ifade edildi ve  $p<0.05$ ' in altındaki farklılıklar anlamlı olarak değerlendirildi.

## BULGULAR

### **Hidrojen Preoksitle Uyarılan Oksidan Streste Alfa Lipoik Asidin Çeşitli Yoğunluklarının Malondialdehid Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi**

**Malondialdehid düzeyinin zamana göre değişmesinin incelenmesi:** Hidrojen peroksit ile oksidan stres uyarılmış deney düzeneğinde  $\alpha$ -LA kullanımının MDA düzeylerine etkisi Şekil 5'te görülmektedir.

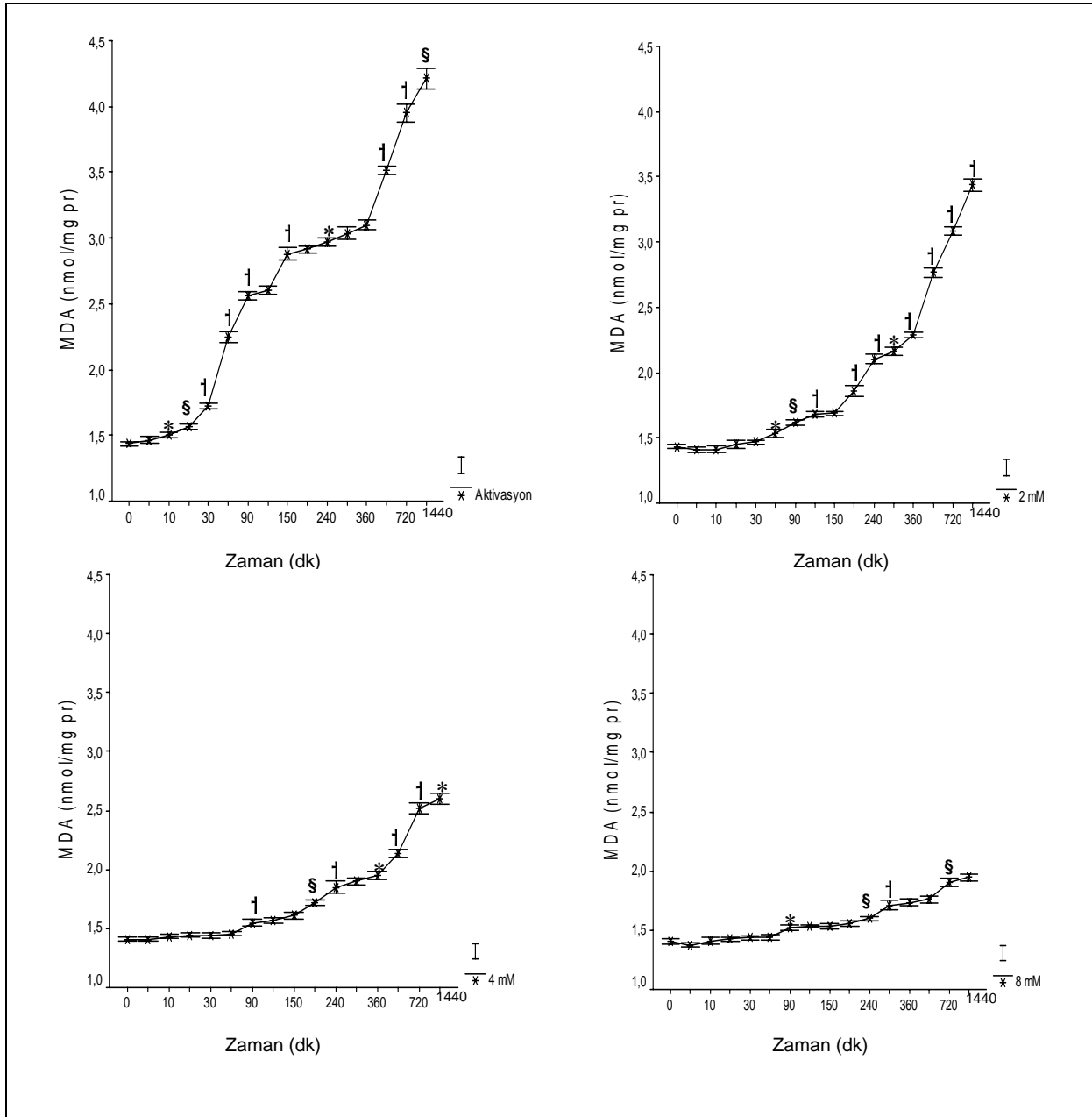
Aktivasyon grubunda; MDA düzeylerinin 10. dakikadan itibaren anlamlı olarak artmaya başladığı, 90-120, 150-180, 300-360. dakikalarda yükselişin durduğu ve sonra 1440. dakikaya dek artışın devam ettiği gözlemlendi. Duraklamaların olduğu zamanlar haricinde diğer ölçümlerin herbiri kendinden önceki değerden anlamlı olarak yüksekti (10 ve 240. dakikalarda  $p<0.05$ , 15 ve 1440. dakikalarda  $p<0.01$ , diğer dakikalarda  $p<0.001$ ).

2 mM  $\alpha$ -LA grubunda; MDA düzeylerinin 60. dakikadan itibaren anlamlı olarak artmaya başladığı, 120-150. dakikalar arasında yükselişin durakladığı ve sonra 1440. dakikaya kadar artışın devam ettiği gözlemlendi. Duraklamanın olduğu zamanlar haricinde diğer ölçümlerin her biri kendinden önceki değerden anlamlı olarak yüksekti (60 ve 300. dakikalarda  $p<0.05$ , 90. dakikada  $p<0.01$ , diğer dakikalarda  $p<0.001$ ).

4 mM  $\alpha$ -LA grubunda; MDA düzeylerinin 90. dakikadan itibaren anlamlı olarak artmaya başladığı, 120-150 ve 240-300. dakikalar arasında yükselişin durakladığı ve sonra 1440. dakikaya kadar artışın devam ettiği gözlemlendi. Duraklamaların olduğu zamanlar haricinde diğer ölçümlerin her kendinden önceki değerden anlamlı olarak yüksekti (360 ve 1440. dakikalarda  $p<0.05$ , 180. dakikada  $p<0.01$ , diğer dakikalarda  $p<0.001$ ).

8 mM  $\alpha$ -LA grubunda; 90, 240, 300 ve 720. dakikalardaki MDA düzeylerinin her biri kendinden önceki değerden anlamlı olarak arttığı gözlemlendi (sırasıyla  $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.001$  ve  $p<0.01$ ).

Kontrol Grubunda; MDA düzeylerinde 120, 180, 240, 300, 360. ve 720. dakikalarda anlamlı artışlar olduğu gözlemlendi (300 ve 720. dakikalarda  $p<0.05$ , diğer dakikalarda  $p<0.001$ ).



**Şekil 5. Hidrojen peroksitle uyarılan oksidan stres durumunda ve çeşitli yoğunluklarda  $\alpha$ -LA kullanımının zamana bağlı olarak MDA oluşumuna etkisi. (Karşılaştırmalar bir önceki ölçüme göre Wilcoxon İki Örnek testi kullanılarak yapılmıştır \* $p<0.05$ , § $p<0.01$  ve † $p<0.001$ ).**

**Gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi:** Hidrojen peroksit ile oksidan stres uyarılmış deney düzeneğinde çeşitli dozlarda  $\alpha$ -LA kullanımının MDA düzeylerine etkisi Tablo 6’te görülmektedir.

**Tablo 6. Rat karaciğer homojenatlarında hidrojen peroksit ile uyarılan oksidan streste alfa lipoik asid kullanımının malondialdehid düzeylerine etkisi**

Zaman (dk)	MDA Düzeyleri (nmol/mg protein)				
	Aktivasyon	2 mM	4 mM	8 mM	Kontrol
0 <sup>†</sup>	1.44±0.02	1.43±0.02	1.41±0.03	1.41±0.03	1.40±0.04
5 <sup>†</sup>	1.47±0.05	1.41±0.04 b*	1.41±0.02 b*	1.38±0.03 b***	1.42±0.03
10 <sup>†</sup>	1.50±0.03 a**	1.41±0.04 b***	1.43±0.03 b***	1.41±0.04 b***	1.44±0.04
15 <sup>†</sup>	1.57±0.04 a***	1.45±0.05 b***	1.45±0.02 b***	1.43±0.02 b***	1.44±0.03
30 <sup>§</sup>	1.72±0.03 a***	1.47±0.02 b***	1.44±0.03 b***	1.44±0.03 b***	1.49±0.06
60 <sup>§</sup>	2.24±0.06 a***	1.54±0.05 b***	1.45±0.03 b*** c**	1.44±0.03 b*** c**	1.52±0.03
90 <sup>§</sup>	2.56±0.05 a***	1.62±0.03 b***	1.55±0.04 b*** c*	1.52±0.04 b*** c***	1.54±0.03
120 <sup>†</sup>	2.61±0.06 a***	1.68±0.04 b***	1.57±0.04 b*** c***	1.53±0.02 b*** c***	1.61±0.04
150 <sup>§</sup>	2.88±0.08 a***	1.69±0.03 b***	1.61±0.04 b*** c**	1.54±0.04 b*** c*** d**	1.57±0.03
180 <sup>§</sup>	2.92±0.04 a***	1.86±0.06 b***	1.72±0.04 b*** c**	1.55±0.04 b*** c***, d***	1.70±0.04
240 <sup>§</sup>	2.97±0.05 a***	2.10±0.06 b***	1.85±0.09 b*** c***	1.60±0.02 b*** c***, d***	1.80±0.07
300 <sup>§</sup>	3.04±0.07 a***	2.17±0.05 b***	1.90±0.05 b*** c***	1.71±0.06 b*** c***, d***	1.88±0.05
360 <sup>§</sup>	3.10±0.06 a***	2.29±0.03 b***	1.95±0.05 b*** c***	1.73±0.05 b*** c***, d***	1.96±0.04
540 <sup>§</sup>	3.52±0.05 a***	2.77±0.06 b***	2.14±0.05 b*** c***	1.76±0.05 b*** c***, d***	1.97±0.03
720 <sup>§</sup>	3.95±0.11 a***	3.09±0.05 b***	2.52±0.07 b*** c***	1.90±0.06 b*** c***, d***	2.02±0.02
1440 <sup>§</sup>	4.21±0.13 a***	3.44±0.07 b***	2.60±0.07 b*** c***	1.95±0.05 b*** c***, d***	2.03±0.05

†: Varyans Analizi (ANOVA) Tukey düzeltmesi ile, §: Mann-Whitney U testi ile karşılaştırmalar yapılmıştır.

a: Kontrol ile, b: Aktivasyon grubu ile, c: 2 mM  $\alpha$ -LA grubu ile, d: 4 mM  $\alpha$ -LA grubu ile.

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

Aktivasyon grubunda; 0 ve 5. dakikalardaki MDA düzeyleri kontrol grubundakinden farklı değilken, 10. dakikada ( $p<0.01$ ) ve sonraki zamanların tümünde kontrol grubunun değerlerinden ileri derecede yüksekti (hepsi için  $p<0.001$ ).

2 mM  $\alpha$ -LA grubunun 0. dakikadaki MDA düzeyi aktivasyon grubundan farklı değildi. 5. dakikadaki ( $p<0.05$ ) ve sonraki tüm ölçümlerdeki (hepsi için  $p<0.001$ ) MDA düzeyleri aktivasyon grubununkilerden düşüktü.

4 mM  $\alpha$ -LA grubunun 0. dakikadaki MDA düzeyi, aktivasyon gruplarından farklı değildi. 5. dakikadaki ( $p<0.05$ ) ve sonraki tüm ölçümlerdeki (hepsi için  $p<0.001$ ) MDA seviyeleri aktivasyon grubununkilerden düşüktü. 2 mM  $\alpha$ -LA grubu ile kıyaslandığında 60. dakikaya kadar fark olmadığı gözlemlendi. 60. dakikadan 1440. dakikaya kadar olan ölçümlerdeki MDA seviyeleri anlamlı derecede yüksekti (hepsi için  $p<0.001$ ).

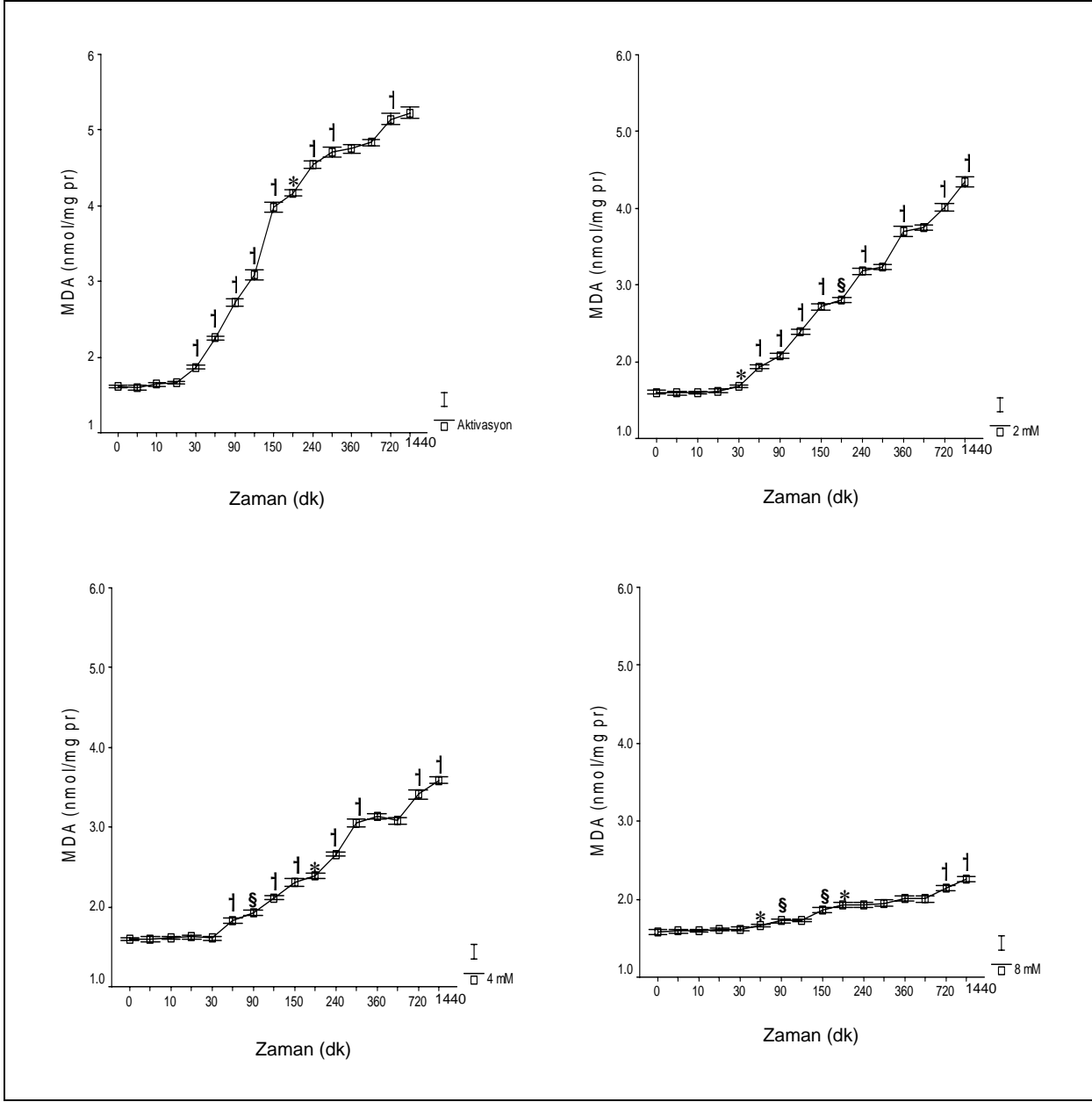
8 mM  $\alpha$ -LA grubunun 0. dakikadaki MDA düzeyi aktivasyon, 2 ve 4 mM  $\alpha$ -LA gruplarından farklı değildi. 5. dakikadan itibaren aktivasyon grubunun değerlerinden ileri derecede düşüktü (hepsi için  $p<0.001$ ). Bu gruptaki MDA seviyeleri; 2 mM grubundan 60. dakika ( $p<0.01$ ) ve sonrasında (hepsi için  $p<0.001$ ), 4 mM grubundan da 150. dakika ( $p<0.01$ ) ve sonrasında (hepsi için  $p<0.001$ ) düşüktü.

Malondialdehid değerleri 2 mM grubunda 60. dakika, 4 mM grubunda 360. dakika ve 8 mM grubunda da 150. dakikaya kadar kontrol grubu ile paralel seyretti. 2 ve 4 mM gruplarında daha sonraki dakikalarda kontrol grubuna göre anlamlı yükselişler olurken (hepsi için  $p<0.001$ ), 8 mM grubunda ise düşüş vardı ( $p<0.05$ ).

### **Ferröz Amonyum Sülfat İle Uyarılan Oksidan Streste Alfa Lipoik Asidin Çeşitli Yoğunluklarının Malondialdehid Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi**

**Malondialdehid düzeyinin zamana göre değişmesinin incelenmesi:** Ferröz amonyum sülfat ile oksidan stres uyarılmış deney düzeneğinde  $\alpha$ -LA kullanımının MDA düzeylerine etkisi Şekil 6'da görülmektedir.

Aktivasyon grubunda; MDA düzeylerinin 30. dakikadan itibaren anlamlı olarak artmaya başladığı, 300-540 ve 720-1440. dakikalar arasında yükselişin durduğu gözlemlendi. Duraklamaların olduğu zamanlar haricindeki MDA değerlerinin her biri kendinden öncekinden anlamlı olarak yüksekti (180. dakikada  $p<0.05$ , diğer dakikalarda  $p<0.001$ ).



**Şekil 6. Ferröz amonyum sülfatla uyarılan oksidan stres durumunda ve çeşitli yoğunluklarda  $\alpha$ -LA kullanımının zamana bağlı olarak MDA oluşumuna etkisi (Karşılaştırmalar bir önceki ölçüme göre Wilcoxon İki Örnek testi kullanılarak yapılmıştır \* $p < 0.05$ , § $p < 0.01$  ve † $p < 0.001$ ).**

2 mM  $\alpha$ -LA grubunda; MDA düzeylerinin 30. dakikadan itibaren anlamlı olarak artmaya başladığı, 300-360 ve 540-720. dakikalar arasında durakladığı ve artışın 1440. dakikaya kadar devam ettiği gözlemlendi. Artışın gözlemlendiği ölçümlerin her biri kendinden önceki değerden anlamlı olarak yüksekti (30. dakika  $p < 0.05$ , 180. dakika  $p < 0.01$ , diğer dakikalarda  $p < 0.001$ ).

4 mM  $\alpha$ -LA grubunda; MDA düzeylerinin 60. dakikadan itibaren anlamlı olarak artmaya başladığı, 360-540. dakikalar arasında durakladığı ve sonra artışın 1440. dakikaya dek devam ettiği gözlemlendi. Artışın gözlemlendiği ölçümlerin her biri kendinden önceki değerden anlamlı olarak yüksekti (90. dakika  $p<0.01$ , 180. dakika  $p<0.05$ , diğer dakikalarda  $p<0.001$ ).

8 mM  $\alpha$ -LA grubunda; MDA düzeylerinin 60. dakikadan itibaren anlamlı olarak artmaya başladığı, 90-120 ve 240-540. dakikalar arasında durakladığı, daha sonra artışın 1440. dakikaya kadar devam ettiği gözlemlendi (60 ve 180. dakikalar  $p<0.05$ , 90. ve 150. dakikalar  $p<0.01$ , 720 ve 1440. dakikalar  $p<0.001$ ).

Kontrol grubunda; MDA düzeylerinin 60. dakikadan itibaren anlamlı olarak artmaya başladığı, 120-150 ve 360-720. dakikalar arasında durakladığı, daha sonra artışın 1440. dakikaya kadar devam ettiği gözlemlendi (hepsi için  $p<0.05$ ).

**Gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi:** Ferröz amonyum sülfat ile oksidan stres uyarılmış deney düzeneğinde çeşitli dozlarda  $\alpha$ -LA kullanımının MDA düzeylerine etkisi (Tablo 7)'de görülmektedir.

Aktivasyon grubunda; başlangıçtan 1440. dakikaya kadar her bir zaman birimindeki MDA düzeyleri kontrol grubundakinden anlamlı derecede yüksek bulundu (hepsi için  $p<0.001$ ).

2 mM  $\alpha$ -LA grubunun 0 ve 5. dakikalardaki MDA düzeyi aktivasyon grubundan farklı değildi. 10 ve 15. dakikalar (her ikisi için  $p<0.05$ ) ve sonraki tüm ölçümlerde (hepsi için  $p<0.001$ ) MDA seviyeleri aktivasyon grubunkilere göre anlamlı derecede düşüktü.

4 mM  $\alpha$ -LA grubunun MDA seviyeleri 10. dakikaya kadar, aktivasyon ve 2 mM  $\alpha$ -LA gruplarından farklı değildi. 15. dakika ve sonraki tüm ölçümlerde MDA seviyeleri aktivasyon ve 2 mM  $\alpha$ -LA gruplarınınkinden düşüktü (hepsi için  $p<0.05$ ).

8 mM  $\alpha$ -LA grubunun MDA seviyeleri 10. dakikaya kadar aktivasyon, 15. dakikaya kadar 2 mM  $\alpha$ -LA ve 30. dakikaya kadar 4 mM  $\alpha$ -LA gruplarından farklı değildi. 8 mM  $\alpha$ -LA grubunda bu dakikalardan sonraki tüm ölçümlerde MDA seviyeleri aktivasyon, 2 mM ve 4 mM  $\alpha$ -LA gruplarına göre düşüktü (hepsi için  $p<0.05$ ).

Malondialdehid değerleri tüm  $\alpha$ -LA gruplarında deneyin başından sonuna kadar kontrol grubu değerlerinden yüksek seyretti.



**Tablo 7. Rat karaciğer homojenatlarında ferröz amonyum sülfat ile uyarılan oksidan streste alfa lipoik asid kullanımının malondialdehid düzeylerine etkisi**

Zaman (dk)	$\alpha$ -Lipoik Asid Konsantrasyonu (mM)				
	0 mM	2 mM	4 mM	8 mM	Kontrol
0 <sup>†</sup>	1.61±0.03 a***	1.60±0.04	1.60±0.03	1.58±0.05	1.46±0.05
5 <sup>†</sup>	1.60±0.05 a***	1.59±0.04	1.59±0.05	1.59±0.03	1.45±0.05
10 <sup>†</sup>	1.64±0.03 a***	1.59±0.02 b* c*	1.62±0.02	1.60±0.03	1.46±0.04
15 <sup>†</sup>	1.67±0.03 a***	1.62±0.03 b*	1.62±0.03 b*	1.61±0.03 b*	1.48±0.02
30 <sup>§</sup>	1.87±0.05 a***	1.68±0.03 b***	1.61±0.04 b*** c*	1.62±0.03 b*** c**	1.49±0.03
60 <sup>†</sup>	2.25±0.05 a***	1.93±0.04 b***	1.82±0.05 b*** c***	1.66±0.02 b*** c*** d***	1.54±0.04
90 <sup>†</sup>	2.72±0.08 a***	2.08±0.05 b***	1.93±0.06 b*** c***	1.72±0.03 b*** c*** d***	1.56±0.05
120 <sup>§</sup>	3.08±0.10 a***	2.39±0.06 b***	2.11±0.04 b*** c***	1.73±0.03 b*** c*** d***	1.66±0.04
150 <sup>§</sup>	3.99±0.11 a***	2.72±0.06 b***	2.31±0.08 b*** c***	1.86±0.06 b*** c*** d***	1.67±0.03
180 <sup>†</sup>	4.17±0.06 a***	2.80±0.05 b***	2.39±0.05 b*** c***	1.93±0.04 b*** c*** d***	1.72±0.04
240 <sup>†</sup>	4.55±0.08 a***	3.19±0.07 b***	2.66±0.04 b*** c***	1.93±0.05 b*** c*** d***	1.78±0.04
300 <sup>§</sup>	4.71±0.10 a***	3.24±0.05 b***	3.05±0.08 b*** c***	1.95±0.06 b*** c*** d***	1.81±0.04
360 <sup>§</sup>	4.75±0.09 a***	3.70±0.09 b***	3.14±0.06 b*** c***	2.01±0.05 b*** c*** d***	1.86±0.03
540 <sup>§</sup>	4.84±0.07 a***	3.74±0.05 b***	3.08±0.07 b*** c***	2.00±0.06 b*** c*** d***	1.85±0.05
720 <sup>§</sup>	5.15±0.11 a***	4.02±0.07 b***	3.41±0.10 b*** c***	2.15±0.05 b*** c*** d***	1.88±0.03
1440 <sup>§</sup>	5.23±0.11 a***	4.34±0.10 b***	3.59±0.08 b*** c***	2.26±0.05 b*** c*** d***	1.96±0.05

†: Varyans Analizi (ANOVA) Tukey düzeltmesi ile, §: Mann-Whitney U testi ile karşılaştırmalar yapılmıştır.

a: Kontrol ile, b: Aktivasyon grubu ile, c: 2 mM  $\alpha$ -LA grubu ile, d: 4 mM  $\alpha$ -LA grubu ile.

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

## **Hidrojen Peroksit İle Oluşturulan Oksidan Streste Çeşitli Yoğunluklarda Alfa Lipoik Asid Kullanımının Glutasyon Değişimine Etkisi**

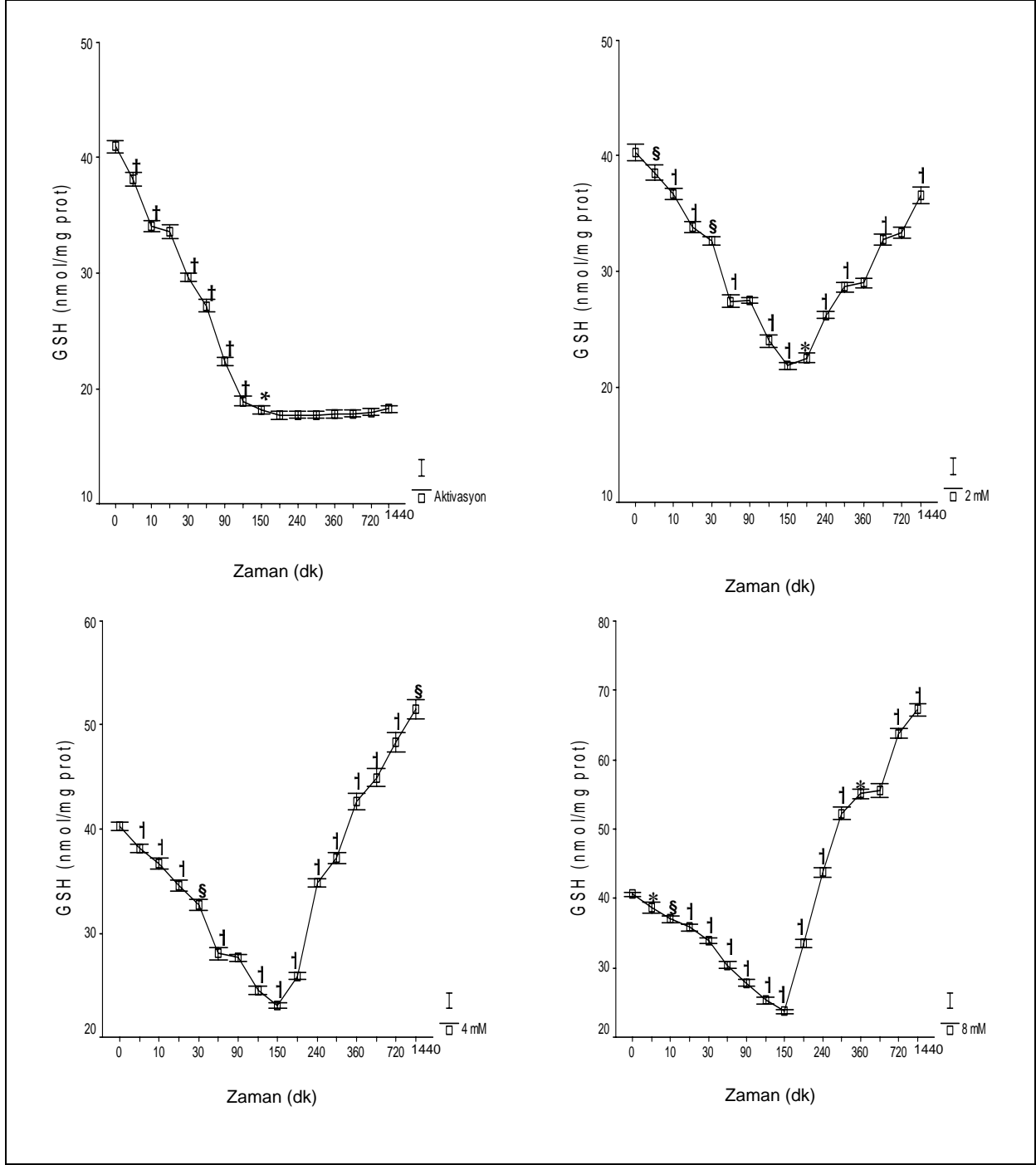
**Glutasyon düzeyinin zamana göre değişiminin incelenmesi:** Hidrojen peroksit ile oksidan stres uyarılmış deney düzeneğinde  $\alpha$ -LA kullanımının GSH düzeylerine etkisi Şekil 7'de görülmektedir.

Aktivasyon grubunda; GSH düzeylerinin başlangıçtan itibaren 150. dakikaya kadar gittikçe azaldığı, 150. dakikadan sonra anlamlı bir değişikliğin olmadığı gözlemlendi. 120. dakikaya kadar tespit edilen GSH seviyelerinin her biri bir önceki ölçüm zamanından anlamlı derecede düşüktü (hepsi için  $p<0.001$ ). 150. dakikadaki GSH düzeyi de 120. dakikadakinin düşüktü ( $p<0.05$ ).

2 mM  $\alpha$ -LA grubunda; GSH düzeylerinin başlangıçtan itibaren 150. dakikaya kadar gittikçe azaldığı, 150. dakikadan itibaren yükselişe geçtiği gözlemlendi. Glutasyon düzeyinin giderek azaldığı ilk 150 dakikada 90. dakika hariç her bir ölçüm zamanındaki GSH düzeyi bir önceki düzeyden anlamlı derecede düşüktü (5 ve 30. dakikalarda  $p<0.01$ , diğer dakikalarda  $p<0.001$ ). Glutasyon düzeyinin giderek arttığı dönemde ise 360 ve 720. dakikalar haricinde her bir ölçüm zamanındaki GSH düzeyi bir önceki düzeyden anlamlı derecede yüksekti (180. dakikada  $p<0.05$ , diğer dakikalarda  $p<0.001$ ).

4 mM  $\alpha$ -LA grubunda; GSH düzeylerinin başlangıçtan itibaren 150. dakikaya kadar gittikçe azaldığı, 150. dakikadan itibaren yükselişe geçtiği gözlemlendi. Glutasyon düzeyinin giderek azaldığı ilk 150 dakikada 90. dakika hariç her bir ölçüm zamanındaki GSH düzeyi bir önceki düzeyden anlamlı derecede düşüktü (30. dakikada  $p<0.01$ , diğer dakikalarda  $p<0.001$ ). 180. dakikadan deneyin sonlandırıldığı 1440 dakikaya kadar GSH düzeyleri bir önceki ölçüm zamanından anlamlı derecede yüksekti (1440. dakikada  $p<0.01$ , diğer dakikalarda  $p<0.001$ ).

8 mM  $\alpha$ -LA grubunda, GSH düzeylerinin başlangıçtan itibaren 150. dakikaya kadar gittikçe azaldığı, 150. dakikadan itibaren yükselişe geçtiği gözlemlendi. 150. dakikaya kadar tespit edilen GSH düzeylerinin her biri bir önceki ölçüm zamanından anlamlı derecede düşüktü (5. dakikada  $p<0.05$ , 10. dakikada  $p<0.01$ , diğer dakikalarda  $p<0.001$ ). Glutasyon düzeyinin giderek arttığı dönemde ise 720. dakika haricinde her bir ölçüm zamanındaki GSH düzeyi bir önceki düzeyden anlamlı derecede yüksekti (360. dakikada  $p<0.05$ , diğer dakikalarda  $p<0.001$ ).



**Şekil 7. Hidrojen peroksitle uyarılan oksidan stres durumunda ve çeşitli yoğunluklarda  $\alpha$ -LA kullanımının zamana GSH değişimine etkisi (Karşılaştırmalar bir önceki ölçüme göre Wilcoxon İki Örnek testi kullanılarak yapılmıştır \* $p < 0.05$ ,  $\$p < 0.01$  ve  $\dagger p < 0.001$ ).**

Kontrol grubunda; GSH düzeylerinin başlangıçtan itibaren 240. dakikaya kadar gittikçe azaldığı, 240. dakikadan 1440. dakikaya kadar anlamlı bir değişikliğin olmadığı gözlemlendi. 15 ve 180. dakikalar dışında 240. dakikaya kadar tespit edilen GSH düzeylerinin her

biri bir önceki ölçüm zamanından anlamlı derecede düşüktü (5. dakikada  $p<0.05$ , 240. dakikada  $p<0.01$ , diğer dakikalarda  $p<0.001$ ).

İlk 150 dakika içindeki GSH tüketim hızı  $\alpha$ -LA kullanılan gruplarda aktivasyon ve kontrol gruplarına göre anlamlı olarak daha yavaştı (hepsi için  $p<0.001$ ). 150. dakikadan sonra GSH rejenerasyon hızı ise  $\alpha$ -LA kullanılan gruplarda aktivasyon ve kontrol gruplarına göre anlamlı olarak daha hızlıydı (hepsi için  $p<0.001$ ) ve bu durum doza bağımlıydı (Tablo 8).

**Tablo 8. Hidrojen peroksit ile uyarılan oksidan streste alfa lipoik asid kullanımının glutatyon tüketim ve rejenerasyon hızlarına etkisi**

Gruplar	GSH tüketim hızı (nmol.mg pr <sup>-1</sup> .dak <sup>-1</sup> )	GSH rejenerasyon hızı (nmol.mg pr <sup>-1</sup> .dak <sup>-1</sup> )
<b>Aktivasyon</b>	0.152±0.007 a*	0.0001±0.001
<b>2 mM</b>	0.123±0.007 a*** b***	0.012±0.001 a*** b***
<b>4 mM</b>	0.115±0.005 a*** b***	0.022±0.001 a*** b*** c***
<b>8 mM</b>	0.113±0.006 a*** b*** c*	0.034±0.001 a*** b*** c*** d***
<b>Kontrol</b>	0.164±0.007	-0.001±0.001

Varyans Analizi (ANOVA) Tukey düzeltmesi ile analiz edilmiştir.

a: Kontrol ile, b: Aktivasyon grubu ile, c: 2 mM  $\alpha$ -LA grubu ile, d: 4 mM  $\alpha$ -LA grubu ile.

\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

**Gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi:** Hidrojen peroksit ile oksidan stres uyarılmış deney düzeneğinde çeşitli dozlarda  $\alpha$ -LA kullanımının MDA düzeylerine etkisi Tablo 9'da görülmektedir.

Aktivasyon grubunda; başlangıçtan itibaren 1440. dakikaya kadar her bir zaman birimindeki GSH düzeyleri kontrol grubundakinden anlamlı derecede düşük bulundu (hepsi için  $p<0.001$ ).

2 mM  $\alpha$ -LA grubunun 0, 5, 15 ve 60. dakikalardaki GSH düzeyleri aktivasyon grubununkinden farklı değildi. Farklılığın olmadığı zamanlar haricinde bu gruptaki GSH düzeyleri, aktivasyon grubununkilerden 10. dakikadan itibaren yükseldi. Glutatyon düzeyleri, kontrol grubuna göre 60. dakikaya dek düşük, (hepsi için  $p<0.001$ ), 90. dakikadan 150. dakikaya kadar benzer, 180. dakikadan sonra yüksek (hepsi için  $p<0.001$ ) seyretti.

**Tablo 9. Rat karaciğer homojenatlarında hidrojen peroksit ile uyarılan oksidan streste alfa lipoik asid kullanımının glutatyon düzeylerine etkisi**

Zaman (dk)	$\alpha$ -Lipoik Asid Konsantrasyonu (mM)				
	0 mM	2 mM	4 mM	8 mM	Kontrol
0†	40.96±0.88 a***	40.28±1.07	40.32±0.62	40.57±0.60	45.60±0.96
5†	38.13±0.93 a***	38.53±1.00	38.13±0.62	38.61±1.20	43.96±0.91
10†	34.10±0.75 a***	36.73±0.76 b***	36.64±0.82 b***	36.99±0.82 b***	40.46±0.80
15†	33.61±0.98 a***	33.82±0.69	34.56±0.91	35.83±0.83 b*** c*** d*	39.90±0.67
30†	29.67±0.60 a***	32.62±0.61 b***	32.75±0.83 b***	33.86±0.64 b*** c** d*	34.13±0.75
60†	27.17±0.89 a***	27.42±0.80	28.04±0.89	30.39±0.80 b*** c*** d***	30.68±0.72
90 <sup>§</sup>	22.35±0.55 a***	27.51±0.42 b***	27.66±0.56 b***	27.78±0.76 b***	26.94±0.76
120†	18.90±0.66 a***	23.98±0.82 b***	24.51±0.54 b***	25.31±0.70 b*** c*	23.62±0.51
150 <sup>§</sup>	18.10±0.57 a***	21.81±0.47 b***	23.05±0.38 b*** c***	23.69±0.40 b*** c*** d*	21.04±0.69
180 <sup>§</sup>	17.67±0.62 a***	22.51±0.63 b***	25.88±0.55 b*** c***	33.48±0.86 b*** c*** d***	20.41±0.39
240 <sup>§</sup>	17.69±0.49 a***	26.18±0.47 b***	34.79±0.65 b*** c***	43.77±1.09 b*** c*** d***	19.81±0.43
300 <sup>§</sup>	17.71±0.47 a***	28.63±0.66 b***	37.22±0.83 b*** c***	52.23±1.36 b*** c*** d***	19.60±0.40
360 <sup>§</sup>	17.75±0.60 a***	29.01±0.65 b***	42.65±1.20 b*** c***	55.11±1.13 b*** c*** d***	19.61±0.53
540 <sup>§</sup>	17.83±0.50 a***	32.73±0.72 b***	44.95±1.32 b*** c***	55.57±1.59 b*** c*** d***	19.53±0.47
720 <sup>§</sup>	17.94±0.45 a***	33.33±0.78 b***	48.29±1.47 b*** c***	63.79±1.23 b*** c*** d***	19.49±0.63
1440 <sup>§</sup>	18.24±0.47 a**	36.59±1.21 b***	51.53±1.39 b*** c***	67.22±1.47 b*** c*** d***	19.36±0.60

†: Varyans Analizi (ANOVA) Tukey düzeltmesi ile, §: Mann-Whitney U testi ile karşılaştırmalar yapılmıştır.

a: Kontrol ile, b: Aktivasyon grubu ile, c: 2 mM  $\alpha$ -LA grubu ile, d: 4 mM  $\alpha$ -LA grubu ile.

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

4 mM  $\alpha$ -LA grubunun 0, 5, 15 ve 60. dakikalardaki GSH düzeyleri aktivasyon ve 2 mM gruplarınıninkilerden farklı değildi. Farklılığın olmadığı zamanlar haricinde bu gruptaki GSH düzeyleri, aktivasyon grubununkinden 10. dakikadan itibaren, 2 mM grubununkinden 150. dakikadan itibaren (hepsi için  $p<0.001$ ) yüksekti. Glutasyon düzeyleri, kontrol grubuna göre 60. dakikaya dek düşük, (hepsi için  $p<0.001$ ), 90. dakikadan 120. dakikaya kadar benzer, 150. dakikadan itibaren yüksek (hepsi için  $p<0.001$ ) seyretti.

8 mM  $\alpha$ -LA grubunun GSH düzeyleri 10. dakikaya kadar aktivasyon, 15. dakikaya kadar 2 ve 4 mM  $\alpha$ -LA gruplarınınkinden farklı değildi. 8 mM  $\alpha$ -LA grubunda bu dakikalardan sonraki tüm ölçümlerde GSH düzeyleri aktivasyon, 2 mM ve 4 mM  $\alpha$ -LA gruplarınınkinden yüksekti (hepsi için  $p<0.05$ ).

### **Ferröz Amonyum Sülfat İle Oluşturulan Oksidan Streste Çeşitli Yoğunluklarda Alfa Lipoik Asid Kullanımının Glutasyon Değişimine Etkisi**

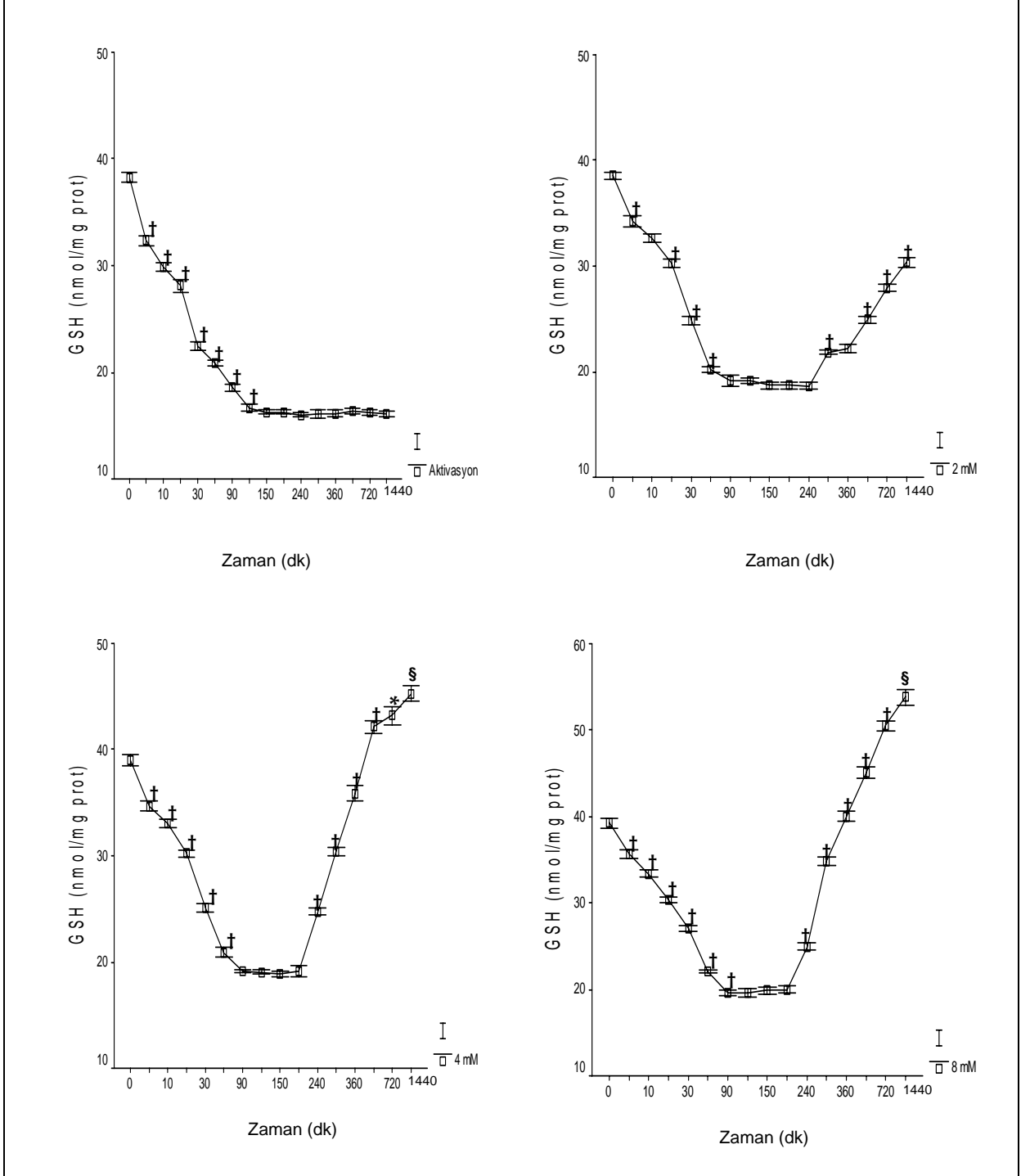
**Glutasyon düzeyinin zamana göre değişmesinin incelenmesi:** Ferröz amonyum sülfat ile oksidan stres uyarılmış deney düzeneğinde  $\alpha$ -LA kullanımının GSH düzeylerine etkisi Şekil 8'de görülmektedir.

Aktivasyon grubunda; GSH düzeylerinin başlangıçtan itibaren 120. dakikaya kadar gittikçe azaldığı, 120. dakikadan sonra anlamlı bir değişikliğin olmadığı gözlemlendi. 120. dakikaya kadar tespit edilen GSH düzeylerinin her biri bir önceki değerden anlamlı derecede düşüktü (hepsi için  $p<0.001$ ).

2 mM  $\alpha$ -LA grubunda; GSH düzeylerinin başlangıçtan itibaren 90. dakikaya kadar gittikçe azaldığı, 90. dakikadan 240. dakikaya kadar plato çizdiği ve anlamlı bir değişikliğin olmadığı, 240. dakikadan itibaren yükselişe geçtiği gözlemlendi. 90. dakikaya dek tespit edilen GSH düzeylerinin her biri bir önceki ölçüm zamanından anlamlı derecede düşüktü (10 ve 90. dakikalarda  $p<0.01$ , diğer dakikalarda  $p<0.001$ ). 360. dakika dışında, 300. dakikadan 1440. dakikaya kadar tespit edilen GSH düzeylerinin her biri bir önceki ölçüm zamanından anlamlı derecede yüksekti (hepsi için  $p<0.001$ ).

4 mM  $\alpha$ -LA grubunda; GSH düzeylerinin başlangıçtan itibaren 90. dakikaya kadar gittikçe azaldığı, 90. dakikadan 180. dakikaya kadar plato çizdiği ve anlamlı bir değişikliğin olmadığı, 180. dakikadan itibaren yükselişe geçtiği gözlemlendi. 90. dakikaya dek tespit edilen GSH düzeylerinin her biri bir önceki ölçüm zamanından anlamlı derecede düşüktü (hepsi için  $p<0.001$ ). 240. dakikadan deneyin sonlandırıldığı 1440 dakikaya kadar GSH düzeyleri bir

önceki ölçüm zamanından anlamlı derecede yüksekti (720. dakikada  $p<0.05$ , 1440. dakikada  $p<0.01$ , diğer dakikalarda  $p<0.001$ ).



**Şekil 8.** Ferröz amonyum sülfat ile uyarılan oksidan stres durumunda ve çeşitli yoğunluklarda  $\alpha$ -LA kullanımının zamana GSH değişimine etkisi. (Karşılaştırmalar bir önceki ölçüme göre Wilcoxon İki Örnek testi kullanılarak yapılmıştır \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  ve \*\*\* $p<0.001$ ).

8 mM  $\alpha$ -LA grubunda; GSH düzeylerinin başlangıçtan itibaren 90. dakikaya kadar gittikçe azaldığı, 90. dakikadan 180. dakikaya kadar plato çizdiği ve anlamlı bir değişikliğin olmadığı, 180. dakikadan itibaren yükselişe geçtiği gözlemlendi. 90. dakikaya dek tespit edilen GSH düzeylerinin her biri bir önceki ölçüm zamanından anlamlı derecede düşüktü (hepsi için  $p<0.001$ ). 240. dakikadan deneyin sonlandırıldığı 1440 dakikaya kadar GSH düzeyleri bir önceki ölçüm zamanından anlamlı derecede yüksekti (1440. dakikada  $p<0.01$ , diğer dakikalarda  $p<0.001$ ).

Kontrol grubunda; GSH düzeylerinin başlangıçtan itibaren deneyin sonlandırıldığı 1440 dakikaya kadar gittikçe azaldığı, ancak bu azalmanın 15 ile 120. dakikalar arasında (hepsi için  $p<0.001$ ) ve 240. dakikada ( $p<0.05$ ) anlamlı olduğu, diğer zamanlarda anlamlı olmadığı gözlemlendi.

**Tablo 10. Ferröz amonyum sülfat ile uyarılan oksidan strese alfa lipoik asid kullanımının Glutatyon tüketim ve rejenerasyon hızlarına etkisi**

Gruplar	GSH tüketim hızı (nmol.mg pr <sup>-1</sup> .dak <sup>-1</sup> )	GSH rejenerasyon hızı (nmol.mg pr <sup>-1</sup> .dak <sup>-1</sup> )
Aktivasyon	0.219±0.011 a***	0.0001±0.001
2 mM	0.216±0.009 a***	0.009±0.001 a*** b***
4 mM	0.221±0.011 a***	0.017±0.001 a*** b*** c***
8 mM	0.219±0.009 a***	0.024±0.001 a*** b*** c*** d***
Kontrol	0.174±0.010	0.0001±0.001

Varyans Analizi (ANOVA) Tukey düzeltmesi ile analiz edilmiştir. Karşılaştırmalar;  
a: Kontrol ile, b: Aktivasyon grubu ile, c: 2 mM  $\alpha$ -LA grubu ile, d: 4 mM  $\alpha$ -LA grubu ile.  
\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

İlk 90 dakika içindeki GSH tüketim hızı aktivasyon ve  $\alpha$ -LA kullanılan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha hızlıydı (hepsi için  $p<0.001$ ). 240. dakikadan sonra GSH rejenerasyon hızı ise  $\alpha$ -LA kullanılan gruplarda aktivasyon ve kontrol gruplarına göre anlamlı olarak daha hızlıydı (hepsi için  $p<0.001$ ) ve bu durum doza bağımlıydı (Tablo 10).



**Gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi:** Ferröz amonyum sülfat ile oksidan stres uyarılmış deney düzeneğinde çeşitli dozlarda  $\alpha$ -LA kullanımının GSH düzeylerine etkisi Tablo 11’de görülmektedir.

Aktivasyon grubunda; başlangıçtan itibaren 1440. dakikaya kadar her bir zaman birimindeki GSH düzeyleri kontrol grubundakinden anlamlı derecede düşük bulundu (başlangıçta  $p<0.05$ , diğer zamanlarda  $p<0.001$ ).

2 mM  $\alpha$ -LA grubunun GSH düzeyleri, 0 ve 90. dakikalar haricinde 5. dakikadan itibaren aktivasyon grubununkilerden (15. dakikada  $p<0.01$ , 60. dakikada  $p<0.05$ , diğer zamanlarda  $p<0.001$ ) yüksekti. Glutasyon düzeyleri, kontrol grubuna göre ise 5. dakikadan 90. dakikaya dek (hepsi için  $p<0.001$ ) ve 150. dakikada ( $p<0.05$ ) düşük, 120 ,180 ve 240. dakikalarda benzer, 300. dakikadan itibaren yüksek (hepsi için  $p<0.001$ ) seyretti.

4 mM  $\alpha$ -LA grubunun 0. ve 90. dakikalar haricinde 5. dakikadan itibaren aktivasyon grubununkilerden (15. dakikada  $p<0.01$ , diğer zamanlarda  $p<0.001$ ) yüksekti. Aynı zamanda 240. dakika ve sonrasında (hepsi için  $p<0.001$ ) 2 mM grubununkilerden de yüksekti. Glutasyon düzeyleri, kontrol grubuna göre ise 5. dakikadan 90. dakikaya dek (hepsi için  $p<0.001$ ) düşük, 120. ile 180. dakikalar arasında benzer, 180. dakikadan itibaren yüksek (hepsi için  $p<0.001$ ) seyretti.

8 mM  $\alpha$ -LA grubunun başlangıçtan itibaren aktivasyon grubununkilerden (0. ve 90. dakikalarda  $p<0.05$ , diğer zamanlarda  $p<0.001$ ) yüksekti. 5, 30, 60. dakikalar ve 150. dakika sonrasında (5. dakikada  $p<0.01$ , diğer zamanlarda  $p<0.001$ ) 2 mM grubununkilerden yüksekti. 5, 30, 60, 150 dakikalar ve 300. dakika sonrasında (5. dakikada  $p<0.05$ , 60. ve 150. dakikalarda  $p<0.01$ , diğer zamanlarda  $p<0.001$ ) 4 mM grubununkilerden yüksekti. Glutasyon düzeyleri, kontrol grubuna göre ise 5. dakikadan 90. dakikaya dek (hepsi için  $p<0.001$ ) düşük, 120 ile 180. dakikalar arasında benzer, 180. dakikadan itibaren yüksek (hepsi için  $p<0.001$ ) seyretti.

**Tablo 11. Rat karaciğer homojenatlarında ferröz amonyum sülfat ile uyarılan oksidan streste alfa lipoik asid kullanımının glutatyon düzeylerine etkisi**

Zaman (dk)	$\alpha$ -Lipoik Asid Konsantrasyonu (mM)				
	0 mM	2 mM	4 mM	8 mM	Kontrol
0 <sup>†</sup>	38.27±0.72 a*	38.55±0.45	39.02±0.92	39.22±0.81 b*	39.34±0.51
5 <sup>†</sup>	32.34±0.70 a***	34.24±0.77 b***	34.66±0,70 b***	35.68±0.74 b*** c** d*	39.41±0.71
10 <sup>†</sup>	29.84±0.62 a***	32.69±0.65 b***	33.09±0.60 b***	33.35±0.66 b***	39.40±0.55
15 <sup>§</sup>	28.11±0.99 a***	30.27±0.71 b**	30.21±0.59 b**	30.35±0.60 b***	37.18±0.67
30 <sup>†</sup>	22.43±0.61 a***	24.81±0.64 b***	25.13±0.63 b***	27.09±0.53 b*** c*** d***	32.94±0.69
60 <sup>§</sup>	20.90±0.46 a***	20.14±0.42 b*	20.92±0.71	22.16±0.28 b*** c*** d**	28.00±0.74
90 <sup>§</sup>	18.58±0.57 a***	19.13±0.77	19.12±0.22	19.55±0.54 b*	23.72±0.66
120 <sup>†</sup>	16.64±0.50 a***	19.14±0.36 b***	19.07±0.33 b***	19.57±0.71 b***	19.66±0.35
150 <sup>§</sup>	16.25±0.33 a***	18.68±0.48 b***	18.88±0.38 b***	19.88±0.58 b*** c*** d**	19.52±0.57
180 <sup>§</sup>	16.25±0.27 a***	18.68±0.58 b***	19.12±0.81 b***	20.02±0.65 b*** c**	19.29±0.31
240 <sup>§</sup>	16.02±0.30 a***	18.68±0.50 b***	24.76±0.46 b*** c***	24.94±0.69 b*** c***	18.82±0.47
300 <sup>†</sup>	16.13±0.58 a***	21.85±0.33 b***	30.45±0.65 b*** c***	34.88±0.83 b*** c*** d***	19.00±0.53
360 <sup>§</sup>	16.16±0.61 a***	22.16±0.68 b***	35.87±1.11 b*** c***	39.99±0.90 b*** c*** d***	18.95±0.42
540 <sup>§</sup>	16.39±0.38 a***	24.91±0.52 b***	42.16±0.99 b*** c***	45.05±1.08 b*** c*** d***	18.84±0.38
720 <sup>§</sup>	16.25±0.37 a***	27.93±0.58 b***	43.18±1.27 b*** c***	50.50±0.98 b*** c*** d***	18.95±0.56
1440 <sup>§</sup>	16.09±0.41 a***	30.35±0.69 b***	45.28±1.12 b*** c***	53.84±1.41 b*** c*** d***	18.63±0.35

†: Varyans Analizi (ANOVA) Tukey düzeltmesi ile, §: Mann-Whitney U testi ile karşılaştırmalar yapılmıştır.

a: Kontrol ile, b: Aktivasyon grubu ile, c: 2 mM  $\alpha$ -LA grubu ile, d: 4 mM  $\alpha$ -LA grubu ile.

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

### KORELASYON BULGULARI

Hem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve hem FAS ile oluşturulan oksidan strese kullanılan  $\alpha$ -LA dozu ile üretilen MDA düzeyleri arasında 30. dakikadan itibaren negatif korelasyon vardı (30. dakikada p<0.01, diğer dakikalarda p<0.001). Glutatyon tüketim hızı, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oluşturulan oksidan strese GSH azalmasının gözlemlendiği 30. dakika ile 150. dakikalar arasında MDA düzeyleri ile pozitif korelasyon (sırasıyla r=0.379, p<0.05, r=0.528, p<0.01, r=0.482, p<0.01,

$r=0.652$ ,  $p<0.001$ ,  $r=0.403$ ,  $p<0.05$ ) ve  $\alpha$ -LA dozu ile negatif korelasyon ( $r=-0.588$ ,  $p<0.01$ ) gösterirken, FAS ile oluşturulan oksidan streste GSH tüketim hızı ile üretilen MDA düzeyi ve  $\alpha$ -LA dozu arasında ilişki yoktu. Glutasyon rejenerasyon hızı  $H_2O_2$  deneyinde GSH'ın yükselmeye başladığı 150. dakikadan sonuna kadar, FAS deneyinde de yine GSH'ın yükselmeye başladığı 240. dakikadan sonuna kadar MDA düzeyleri ile negatif korelasyon gösteriyordu (hepsi için  $p<0.001$ ).

Rat karaciğer homojenatında  $H_2O_2$  ile oluşturulan oksidan stres koşullarında çeşitli yoğunluklarda *invitro*  $\alpha$ -LA kullanımının MDA oluşumuna ve GSH değişimine etkisi Tablo 12 ve 13'de gösterilmiştir.

Ferröz amonyum sülfat ile rat karaciğer homojenatında oluşturulan oksidan stres koşullarında çeşitli yoğunluklarda *invitro*  $\alpha$ -LA kullanımının MDA oluşumuna ve GSH değişimine etkisi Tablo 14 ve 15'te gösterilmiştir.









## TARTIŞMA

Serbest oksijen radikalleri fizyolojik sistemlerde hücrel metabolizma sonucu üretilirler. Oksidatif atakla SOR artar. Serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerinin yanında yararlı etkileri de vardır. Bakteri, virus ve kanser hücrelerinin öldürülmesine katkıda bulunurlar. Bununla birlikte organizmanın normal hücrelerini de etkileyerek hücre hasarına, ölümüne ve kanser hücrelerinin açığa çıkmasına neden olabilmektedir (7).

Serbest oksijen radikallerinin membranda bol miktarda bulunan lipidleri etkilemesi ile lipid peroksidasyonu başlar ve tüm radikalik reaksiyonlar gibi bir zincir reaksiyonudur. Zincir kırıcı bir etki veya iki lipid peroksidinin birbiriyle etkileşmesi olmadıkça giderek artan bir şekilde devam etmektedir. Lipid peroksidasyonunun ilk basamakta konjuge dien, zincirin ilerleme safhasında lipid hidroperoksit ve sonlanma basamağında da MDA gibi reaktif aldehydler açığa çıkmaktadır. Lipid peroksidasyonu, direkt hasarını membran yapısında değişikliklere sebep olarak, indirekt hasarını da reaktif aldehydler oluşumuna yol açarak göstermektedir. Membran yapısındaki değişiklikler; membran permeabilitesinde artış, transmembran iyonik gradient ve membran sekretuar fonksiyonlarında bozukluklara neden olmaktadır. Reaktif aldehydler membran bileşenlerinde çapraz bağlanmalar ve polimerizasyona neden olur. Bu durum membran yapısının bozulmasına, iyon transportu ve enzim aktivitesi gibi membran işlevlerinde değişikliklere yol açmaktadır. Reaktif aldehydler kolay difüze olduklarından dolayı, hasarı geniş bir alana yayabildikleri bildirilmiştir (35,60). Serbest radikallerin ve lipid peroksitlerin çeşitli hastalıkların oluşumunda rol oynadıkları kabul edilmektedir. Diabetes mellitus, ateroskleroz, romatoid artrit, kanser, ülseratif kolit ve karaciğer sirozu gibi hastalıkların patogenezinde sorumlu tutulmaktadır (35).



Erkek rat germ hücre kültürlerinde  $H_2O_2$ 'nin MDA düzeylerini artırdığı bulunmuştur. Bu çalışmada  $H_2O_2$  ile lipid peroksidasyonunun 10 dakikada çok erken dönemde gerçekleştiği gözlenmiş ve germ hücreleri membranlarında lipid peroksidasyonuna duyarlı çoklu doymamış yağ asitlerinin bol miktarda bulunmasıyla açıklanmıştır. Hidrojen peroksidin farklı hücrelerde apoptozisi uyardığı bilinmektedir. Metal iyonları varlığında Fenton reaksiyonu ile  $H_2O_2$  sperm DNA'sında hasara yol açtığı bildirilmiştir (61).

Rat karaciğer homojenatlarında *invitro* uygulanan  $Fe^{+2}$  iyonların lipid peroksidasyonunu aktive ederek, MDA ve 4 hidroksialkinler (4-HA)'in düzeylerini artırdığı bulunmuştur (62). Rat beyin homojenatlarında *invitro* uygulanan  $H_2O_2$ 'nin de MDA ve 4-HA düzeylerini artırdığı bildirilmiştir (63,64). Kaptanoğlu ve ark. (65) tarafından yapılan bir çalışmada;  $H_2O_2$  ve ferröz iyonların merkezi sinir sisteminde hem tek başlarına hem de birlikte *invitro* lipid peroksidasyonunu uyardığı bildirilmiştir. Rat hepatosit kültürlerinde  $H_2O_2$  uygulamasının MDA düzeylerini artırdığı (66), T lenfosit hücre kültürlerinde  $Fe^{+2}$  uygulanmasının MDA düzeylerini artırdığı bildirilmiştir (67). Bununla beraber; Baeza-Squiban ve ark. (68) tarafından yapılan bir çalışmada tavşan trakea epitel hücre kültürlerinde  $H_2O_2$  ve  $Fe^{+2}$  iyonları ayrı ayrı uygulandığında MDA düzeylerinde anlamlı bir değişikliğin olmadığı, ancak her ikisi aynı zamanda uygulandığında MDA düzeylerinde anlamlı artışa yol açtığı bulunmuştur.

Çalışmamızdaki her iki deney düzeneğinin kontrol gruplarında lipid peroksidasyonu uyarılmadığı halde, MDA düzeylerinde anlamlı yükselişlerin görülmesi deney süresinde lipidlerin otooksidasyona uğradığını göstermektedir.

Çalışmamızda; hem  $H_2O_2$  ve hem FAS uygulanan deney düzeneklerinde aktivasyon gruplarında MDA düzeyleri kontrol gruplarına göre yüksek bulundu. Bu bulgumuz aktivasyon gruplarında gözlenen lipid peroksidasyonunun otooksidasyona bağlı olmadığını rat karaciğer homojenatlarına uyguladığımız  $H_2O_2$  ve FAS'ın lipid peroksidasyonunu uyardığını göstermektedir. Çalışmamızda aktivasyon grubunda elde edilen bulgular ve  $Fe^{+2}$  iyonlarının *invitro* tek başlarına uygulandıklarında lipid peroksidasyonuna yol açtığını işaret eden çalışmalarla uyumludur.

Çalışmamızda SOR üretici olarak kullandığımız bileşiklerden  $H_2O_2$ , aslında çok yüksek derişimde bulunmadığı sürece toksik değildir. Ancak hızla biyolojik membranları geçebilir ve üretildiği yerden daha uzaklara gidip etki edebilir. Hidrojen peroksidin asıl zararlı etkisi Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu ile  $\cdot OH$  radikaline dönüşümü ile olur. Hidroksil radikalinin yarı ömrü kısa olmasına rağmen reaktivitesi çok yüksektir. Üretildiği yerden daha uzağa difüzyonuna gerek kalmadan biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek toksik etki

gösterir. Hidrojen peroksitin zararlı etkisinin ortaya çıkmasında ferröz iyonları ile etkileşimi önemli yer tutmaktadır. Hidrojen peroksit serbest oksijen radikali üretici olarak tek başına kullanıldığında; doku homojenatında bulunan ferröz iyonların Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları yoluyla  $\cdot\text{OH}$  radikali üretimine katkıda bulduklarını düşündürmektedir.

Serbest oksijen radikali üretici olarak kullandığımız ferröz iyonlar da Fenton reaksiyonu ile  $\cdot\text{OH}$  radikali oluştururlar. Haber-Weiss reaksiyonu özellikle ferröz iyonları gibi metallerin varlığında  $\cdot\text{OH}$  radikali üretir (69,70). Ayrıca Ferröz iyonlar  $\text{O}_2$  ile reaksiyona girerek süperoksit oluştururlar. Süperoksit anyonu  $\text{H}^+$  ile reaksiyona girerek  $\text{HO}_2\cdot$  oluşturur. Hidroperoksil radikali lipid peroksidasyonunun başlama aşamasından sorumlu tutulmakta ve lipid peroksidasyonuna katkıda bulunmaktadır. Ancak ferröz iyonları lipid peroksidasyonunu asıl uyarıcı etkilerini ilerleme aşamasında lipid hidroperoksitleri ile doğrudan reaksiyona girerek gösterirler. Bu reaksiyon sonunda  $\text{Fe}^{+2}$  iyonu  $\text{Fe}^{+3}$  iyonuna dönüşür ve  $\text{LO}\cdot$  oluşur (64). Hidrojen peroksit ve  $\text{Fe}^{+2}$  iyonlarının tek tek kullanılmasının lipid peroksidasyonunun uyardığını bildirilen bir araştırmada (64) hücre kültüründe çalışıldığı dikkati çekmekte; bu çalışmada intakt hücre kullanıldığı için ferröz iyonlarının serbest olmadığı ve SOR üretimine katkıda bulunamadığını düşünülmektedir.

Çeşitli çalışmalarda serbest oksijen radikallerinin oluşumunu engellemek veya oksidan/antioksidan dengeyi sağlamak için antioksidan molekül olarak nitelendirilen birçok farmakolojik madde kullanılmıştır. Çalışmamızda antioksidan molekül olarak  $\alpha$ -LA kullanılmıştır.

Lee ve ark. (4) tarafından yapılan bir çalışmada, gerbil beyin homojenatlarında *invitro*  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve FAS uygulanmasıyla lipid peroksidasyonu sağlanmış ve  $\alpha$ -LA'in doza bağımlı olarak lipid peroksidasyonunu azalttığı bulunmuştur. Aynı çalışmada  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve ferröz iyonların oksidasyon yapıcı etkilerinden dolayı biyolojik hasara yol açtıkları bildirilmiştir.

Hagen ve ark. (71) diyetle  $\alpha$ -LA uygulamasının ratların karaciğerinde yaşlanmaya bağlı olarak artan MDA düzeylerinde azalmaya yol açtığını bildirmişlerdir. Serebrovasküler bölgeye streptozotosin enjekte edilmiş ratlarda diyetle verilen  $\alpha$ -LA'in, merkezi sinir sistemindeki oksidatif hasarı ve MDA düzeylerini azalttığı bulunmuştur (72). Arsenik toksisitesi geliştirilmiş ratlarda da  $\alpha$ -LA uygulamasının karaciğer ve böbrekte MDA oluşumunu azalttığı bildirilmiştir (73). Doksorubisin ile miyokard toksisitesi geliştirilmiş ratlarda  $\alpha$ -LA uygulamasının kalp dokusundaki MDA oluşumunu azalttığı bulunmuştur (74). Doksorubisin metabolitlerinin  $\text{Fe}^{+2}$ 'i ferritinden ayırdığı ve ferröz iyonların elektron transferi ile  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve  $\cdot\text{OH}$  oluşturarak lipid peroksidasyonuna yol açtığı bildirilmiştir (74).  $\alpha$ -Lipoik

asidin metal şelasyonu yapma ve  $\cdot\text{OH}$  radikali gibi serbest radikalleri temizleme yeteneğine sahip güçlü bir antioksidant olduğu ileri sürülmektedir (74).

Çalışmamızda hem  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve hem de FAS kullanılan deneylerde en düşük doz olan 2 mM  $\alpha$ -LA uygulamasında bile MDA düzeylerinin aktivasyon gruplarındaki düzeylere göre düşük olması,  $\alpha$ -LA'nın her iki indüksiyon yönteminde de lipid peroksidasyonunu engellediğine işaret etmektedir.  $\alpha$ -Lipoik asidin dozu arttıkça lipid peroksidasyonunu engelleme etkisinin artması ve  $\alpha$ -LA dozu ile MDA düzeyi arasında 30. dakikadan deneylerin sonuna dek negatif korelasyon bulunması bu etkinin doza bağımlı olduğunu düşündürmektedir.

Hidrojen peroksitle uyarılan deneyde aktivasyon grubunda 10. dakikada lipid peroksidasyonu başlarken; 2 mM  $\alpha$ -LA uygulamasının başlama zamanını 50 dakika, 4 ve 8 mM uygulamasının ise 80 dakika geciktirmesi; lipid peroksidasyonunun başlangıç safhasında antioksidan etkisinin güçlü olduğuna işaret etmektedir. Lipid peroksidasyonu başlasa bile sonraki zamanlarda MDA düzeyinin aktivasyon grubundan düşük seyretmesi ve  $\alpha$ -LA dozu arttıkça baskılanmanın daha da bariz olması  $\alpha$ -LA'nın lipid peroksidasyonun ilerleme safhasında da etkili bir antioksidan olduğunu düşündürmektedir.

Ferröz iyon ile uyarılan deneyde aktivasyon grubunda 30. dakikada lipid peroksidasyonu başlarken; 2 mM  $\alpha$ -LA uygulamasının başlama zamanını değiştirmemesi, 4 ve 8 mM uygulamasının ise sadece 30 dakika geciktirmesi;  $\text{Fe}^{+2}$ 'nin oluşturduğu lipid peroksidasyonunun başlangıç safhasında ancak yüksek dozda  $\alpha$ -LA'nın antioksidan etkisinin olabileceğini ve bu etkinin çok da güçlü olmadığına işaret etmektedir. Lipid peroksidasyonu başladıktan sonra MDA düzeyinin aktivasyon grubundan düşük seyretmesi ve  $\alpha$ -LA dozu arttıkça baskılanmanın daha da bariz olması  $\text{Fe}^{+2}$ 'nin oluşturduğu oksidan strese  $\alpha$ -LA'nın asıl etkisinin lipid peroksidasyonunun ilerleme safhasında olduğunu düşündürmektedir.

Alfa lipoik asid fizyolojik sistemlerde bulunan, tiyol grubu içeren ve antioksidan aktiviteleri olan önemli bir moleküldür. Bu nedenle ideal terapötik antioksidan olduğu düşünülmektedir (3).  $\alpha$  Lipoik asidin okside olmuş ditiyolan halkası moleküle çevresel şartlara bağlı olarak yüksek bir indirgeme özelliği kazandırmaktadır. Alfa lipoik aside kimyasal reaktivitesini sağlayan ditiyolan halkası,  $\alpha$  LA'yı glutatyon, sistein gibi diğer tiyol içeren biyomoleküller arasında özgün kılmaktadır (42).

Alfa lipoik asid ekzojen uygulandığında serbest radikal temizleme, metal şelasyonu yapma ve glutatyon gibi endojen antioksidanların rejenerasyonunu arttırma gibi antioksidan

özellikler gösterir. Alfa lipoik asidin reaktif oksijen bileşiklerinden  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{HOCl}$  ve  $^1\text{O}_2$ 'i doğrudan temizlediği,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ' i ise indirgediği bildirilmektedir (4).

Sisplatin ile ototoksisite geliştirilmiş ratlarda SOR ve lipid peroksidasyonunun arttığı, kohlear GSH düzeylerinin azaldığı bulunmuştur. İntraperitoneal uygulanan  $\alpha$ -LA'nın sisplatinin aktive ettiği lipid peroksidasyonuna bağlı GSH' un tüketilmesini azalttığı bildirilmiştir (75). Andriamisin ile testiküler mitokondriopati geliştirilmiş ratlarda intraperitoneal verilen  $\alpha$ -LA'nın mitokondrial GSH düzeylerini artırdığı bulunmuştur (76). Rat epididimal spermelerde siklofosfamidin aktive ettiği lipid peroksidasyonuna karşı intraperitoneal verilen  $\alpha$ -LA'nın GSH düzeylerini artırdığı bildirilmiştir (77). Alfa lipoik asidin bu etkiyi antioksidan savunma sistemini güçlendirerek gösterdiği ileri sürülmüştür.

Glutasyon vücutta redükte ve okside olmak üzere iki formda bulunur. Bütün dokularda bulunmasına rağmen karaciğerde oldukça aktif bir şekilde sentezlenmektedir. Hücrelerde -SH grubu içeren ana moleküldür. Sülfidril grubu SOR ile direk etkileşime girerek enzimatik olmayan antioksidan sistemin önemli bir parçasını oluşturur. Serbest oksijen radikalleri ve yabancı maddelerin enzimatik detoksifikasyonunda da kofaktör olarak görev alabilir. Böylece hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Detoksifikasyon sırasında yükseltgenmiş endojen antioksidanları indirgeyerek rejenerasyonlarını sağlar. Bu esnada kendisinde yükseltgenmiş olur. Glutasyon redüktaz NADPH varlığında GSSG' yi GSH'a dönüştürür (38,45).

Çalışmamızda; kontrol gruplarında gözlenen GSH azalması lipidlerin veya GSH'ın otooksidasyonuna bağlı olabilir. Bununla beraber, hem  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve hem FAS uygulanan aktivasyon gruplarında GSH düzeylerinin kontrol gruplarına göre düşük olması ve GSH tüketim hızının fazla olması GSH'un oksidan stresin uyarımına bağlı olarak bağlı tüketildiğini düşündürmektedir. Ferröz iyonlarının oluşturduğu oksidan streste GSH tüketim hızının  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'inkine göre daha hızlı olduğu ve GSH'ın daha erken zamanda tükendiği görülmüştür. Alfa lipoik asidin *invitro* uygulandığında her iki SOR üretici sisteme göre GSH düzeyleri yüksek seyretmiştir. Bu sonuç  $\alpha$ -LA'nın lipid peroksidasyonunun sebep olduğu GSH tüketimi azalttığını düşündürmektedir.  $\alpha$ -Lipoik asidin bu etkisi  $\alpha$ -LA'nın tiyol grubu içermesinden kaynaklanıyor olabilir. Uygulanan  $\alpha$ -LA'nın dozu arttıkça GSH'un düzeyinin artması bu görüşü desteklemektedir. Ancak  $\alpha$ -LA'nın,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in arttırdığı GSH tüketim hızını yavaşlatırken;  $\text{Fe}^{+2}$ 'nin arttırdığı GSH tüketim hızını etkilemediği görülmüştür. Bu bulgu  $\alpha$ -LA'nın lipid peroksidasyonunun başlamasında  $\text{Fe}^{+2}$ 'nin oluşturduğu oksidan streste zayıf etkili kalması,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in oluşturduğu oksidan streste ise güçlü etkili olması ile ilişkili olabilir. Hidrojen peroksit ile oluşturulan oksidan streste GSH tüketim hızı, MDA düzeyleri ile pozitif

korelasyonda ve  $\alpha$ -LA dozu ile de negatif korelasyonda iken, FAS ile oluşturulan oksidan strese GSH tüketim hızının MDA düzeyi ve  $\alpha$ -LA dozu ile korelasyon göstermemesi bu bulguyu desteklemektedir.

Aktivasyon ve kontrol gruplarında GSH tükendikten sonra deney sonuna kadar hep aynı düzeyde kalırken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in uygulanan homojenatlarda tüm  $\alpha$ -LA gruplarında 150. dakikadan itibaren, FAS uygulanan homojenatlarda ise tüm  $\alpha$ -LA gruplarında 240. dakikadan itibaren GSH düzeylerinin yükselişe geçmesi  $\alpha$ -LA'nın sadece GSH'ın tüketilmesini azaltmadığını aynı zamanda rejenerasyonunu da artırdığını düşündürmektedir. Glutasyonun rejenerasyon hızının da doza bağımlı olduğu görülmektedir. Metal şelasyonu, radikal toplayıcı etkilerinin yanı sıra lipid peroksidasyonunun ilerleme safhasında  $\alpha$ -LA'nın güçlü baskılayıcı etkiye sahip olmasında GSH rejenerasyonunu sağlamanın önemli rolü olabileceğini düşünmekteyiz. Glutasyon rejenerasyon hızının her iki deney düzeneğinde de MDA düzeyleri ile negatif korelasyonda olması bu düşüncüyü desteklemektedir. Alfa lipoik asid, GSH rejenerasyonunu sahip olduğu ditiyolan halkasının indirigeme özelliği ile okside GSH'ların indirgenmesini sağlayarak veya GSH-Px ve/veya GSH sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan  $\gamma$ -glutamilsistein sentetaz aktivitesini arttırarak yapmış olabilir. Bu mekanizmalardan hangisinin etkili olduğunu tespit etmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

## SONUÇLAR

Oksidan moleküller SOR üreterek birçok patolojik süreci başlatırlar. Oksidan ve antioksidan sistemler denge halinde tutularak bu süreç engellenmeye çalışılır. Bu çalışmada rat karaciğer homojenatlarına uygulanan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve FAS'nin uyardığı lipid peroksidasyonu ve  $\alpha$ -LA'nın buna etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Hidrojen peroksit ve FAS'nin uygulandığı iki deney düzeneğine farklı konsantrasyonlarda  $\alpha$ -LA eklendi. Malondialdehid ve GSH' un ölçüldüğü bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

Hem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve hem FAS uygulanan deney düzeneklerinde:

1-Kontrol gruplarında 1440. dakikadaki MDA düzeyleri, başlangıç düzeylerine göre anlamlı yüksek bulundu.

2-Aktivasyon gruplarındaki MDA düzeyleri, kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

3-Alfa lipoik asid uygulanan tüm gruplardaki MDA düzeyleri, aktivasyon gruplarındaki düzeylere göre anlamlı olarak düşük bulundu.

4-Alfa lipoik asid dozu artıkça MDA düzeyindeki azalmanın daha bariz olduğu, her iki deney düzeneğinde  $\alpha$ -LA dozu ile üretilen MDA düzeyleri arasında 30. dakikadan itibaren negatif korelasyon olduğu gözlemlendi.

5-*Invitro*  $\alpha$ -LA kullanımının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oluşturulan oksidan strese lipid peroksidasyonunun başlamasını FAS ile oluşturulan oksidan strese göre daha fazla geciktirdiği gözlemlendi.

6-Kontrol gruplarında 1440. dakikalardaki GSH düzeyleri başlangıç düzeylere göre anlamlı olarak düşük bulundu.

7-Aktivasyon gruplarındaki GSH düzeyleri, kontrol gruplarına göre anlamlı olarak düşük bulundu.

8-Alfa lipoik asid uygulanan tüm gruplardaki GSH düzeyleri, aktivasyon gruplarındaki düzeylere göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

9-Hidrojen peroksit deneyinde GSH tüketim hızının  $\alpha$ -LA kullanılan gruplarda aktivasyon grubundan daha yavaş ve  $\alpha$ -LA dozuna bağımlı olduğu gözlemlendi.

10-Ferröz amonyum sülfat deneyinde GSH tüketim hızının  $\alpha$ -LA kullanılan gruplarda aktivasyon grubundan farklı olmadığı gözlemlendi.

11-Glutatyon düzeyinin 2, 4 ve 8 mM gruplarında,  $H_2O_2$  deneyinde 150. dakikadan, FAS deneyinde de 240. dakikadan itibaren arttığı gözlemlendi.

12-Her iki deneyde de GSH rejenerasyon hızının MDA düzeyleri ile negatif korelasyon gösterdiği bulundu.

Sonuç olarak bulgularımız  $H_2O_2$  ve FAS uygulanan deney düzeneklerinde lipid peroksidasyonunun uyarıldığını göstermektedir. Alfa lipoik asid uygulanan gruplardaki MDA düzeylerinin, aktivasyon gruplarındaki düzeylere göre anlamlı düşük olmasının nedeni,  $\alpha$ -LA'nın antioksidan özelliklerinden kaynaklandığını, özellikle de lipid peroksidasyonunun ilerleme safhasını baskıladığını söyleyebiliriz. Bu etkisini de gerek metal şelasyonu ve gerekse radikal toplayıcı etkileri ile yapmış olabileceği gibi, GSH tüketimini yavaşlatarak ve GSH rejenerasyonunu sağlayarak yapmış olabileceğini söyleyebiliriz.

## ÖZET

Oksidan ürünlerin, diabetes mellitus, ateroskleroz, katarakt ve karaciğer sirozu gibi hastalıkların patogeneğinde rol aldığı bilinmektedir. Bu nedenle son yıllarda antioksidan moleküllerin terapötik amaçlı kullanımı artmıştır.

Çalışmamızda; alfa lipoik asidin farklı dozlarının *invitro* kullanımının, rat karaciğer homojenatlarında indüklenmiş lipid peroksidasyonu ve doku glutatyon düzeyine etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

Rat karaciğer homojenatlarında hidrojen peroksit (15 mM) ve ferröz amonyum sülfat (2 mM) kullanılarak 2 farklı yöntemle lipid peroksidasyon indüksiyonu yapıldı. Lipid peroksidasyonu indüklenen deney düzenekleri 4 alt gruba ayrıldı ve bu gruplara sırasıyla 0, 2, 4 ve 8 mM alfa lipoik asid eklendi. Doku glutatyon düzeyleri ve lipid peroksidasyon son ürünü olan malondialdehid düzeyleri incelendi.

Hem hidrojen peroksit ve hem ferröz amonyum sülfat uygulanan deney düzeneklerinde; aktivasyon gruplarındaki malondialdehid düzeyleri kontrol gruplarına göre anlamlı yüksek bulundu. Alfa lipoik asid uygulanan gruplardaki malondialdehid düzeyleri aktivasyon gruplarındaki düzeylere göre anlamlı düşük bulundu. Aktivasyon gruplarındaki glutatyon düzeyleri kontrol gruplarına göre anlamlı düşük bulundu. Alfa lipoik asid uygulanan gruplardaki glutatyon düzeyleri aktivasyon gruplarındaki düzeylere göre anlamlı yüksek bulundu. Glutatyon düzeyinin zamana bağlı değişimi incelendiğinde önce dereceli olarak azaldığı, daha sonra arttığı, 4 ve 8 mM gruplarında başlangıç düzeyini de aştığı gözlemlendi.

Sonuç olarak bulgularımız, hidrojen peroksit ve ferröz amonyum sülfat uygulanan deney düzeneklerinde lipid peroksidasyonunun uyarıldığını göstermektedir. Alfa lipoik asid



uygulanan gruptaki malondialdehid düzeylerinin aktivasyon gruplarındaki düzeylere göre anlamlı düşük, glutatyon düzeylerinin ise anlamlı yüksek olmasının nedeninin, alfa lipoik asid'in antioksidan özelliklerinden kaynaklandığını söyleyebiliriz.

**Anahtar kelimeler:** alfa lipoik asid, malondialdehid, glutatyon, hidrojen peroksit, ferröz amonyum sülfat.

## **THE EFFECT OF ALPHA LIPOIC ACID ON INDUCED LIPID PEROXIDATION IN RAT LIVER HOMOGENATES**

### **SUMMARY**

It is known that oxidant species play a role in the pathogenesis of certain diseases such as diabetes mellitus, atherosclerosis, cataract and hepatic cirrhosis. Therefore, the use of antioxidant species for therapeutic purposes has risen up in the recent years.

The aim of the study was to investigate the different concentrations of alpha lipoic acid on the induced lipid peroxidation and tissue glutathione level in rat liver homogenates.

Two different methods have been used for lipid peroxidation using hydrogen peroxide (15 mM) and ferrous ammonium sulphate (2 mM). The experimental setups induced by lipid peroxidation have been divided into four sub-groups. Alpha lipoic acid was added in 0, 2, 4 and 8 mM concentrations into those groups, respectively. The malondialdehyde levels which is the end product of lipid peroxidation and the levels of tissue glutathione have been determined.

In the experimental setups where both hydrogen peroxide and ferrous ammonium sulphate have been applied, the levels of malondialdehyde in the activation groups have been found to be significantly higher than to the control groups. The levels of malondialdehyde in the groups that alpha lipoic acid has been applied has been found to be significantly lower than the activation groups. The levels of glutathione in the activation groups have been detected significantly lower when it was compared to the control groups. The levels of glutathione in the groups where alpha lipoic acid has been applied has been found to be significantly higher from the activation groups. When the time-dependent change in the level of glutathione was investigated it was observed that this initially decrease

and then started to increase. In the groups of 4 and 8 mM, this level was even over from the starting point.

In conclusion, our findings suggest that lipid peroxidation is induced in the experimental setups where hydrogen peroxide and ferrous ammonium sulphate are applied. The reason of significantly lower malondialdehyde and higher glutathione levels in alpha lipoic acid group than activation groups may be a result of the antioxidant property of alpha lipoic acid.

**Key words:** alpha lipoic acid, malondialdehyde, glutathione, hydrogen peroxide, ferrous ammonium sulphate.

## KAYNAKLAR

1. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82(1):47-95.
2. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003;552(2):335-44.
3. Çakatay U. Pro-oxidant actions of  $\alpha$ -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Med Hypotheses* 2006;66(1):110-7.
4. Lee SR, Im KJ, Suh S, Jung JG. Protective effect of green tea polyphenol (-) epigallocatechin gallate and other antioxidants on lipid peroxidation in gebril brain homogenates. *Phytother Res* 2003;17(3):206-9.
5. Bekerecioğlu M, Uğraş S, Dilek ON, Tercan M, Özyazgan İ. Serbest Radikaller. *Sendrom* 1998;10(3):85-94.
6. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993;49(3):481-93.
7. Southorn PA, Powis O. Free radical in medicine I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988;63(4):381-9.
8. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991;161(4):488-503.
9. Bachschmid M, Schildknecht S, Ullrich V. Redox regulation of vascular prostanoid synthesis by the nitric oxide-superoxide system. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338(1):536-42.

10. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990;186:1-85.
11. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991;91(Supp 3C):14-22.
12. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994;74(1):139-62.
13. Shimokawa H, Morikawa K. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39(5):725-32.
14. Zhang Q, Huang X. Induction of interleukin-6 by coal containing bioavailable iron is through both hydroxyl radical and ferryl species. *J Biosci* 2003;28(1):95-100.
15. Kruszewski M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat Res* 2003;531(1-2):81-92.
16. Belfield KD, Corredor CC, Morales AR, Dessources MA, Hernandez FE. Synthesis and characterization of new fluorene-based singlet oxygen sensitizers. *J Fluoresc* 2006;16(1):105-10.
17. Xia Q, Yin JJ, Cherg SH, Wamer WG, Boudreau M, Howard PC et al. UVA photoirradiation of retinyl palmitate-formation of singlet oxygen and superoxide, and their role in induction of lipid peroxidation. *Toxicol Lett* 2005;163(1):30-43.
18. Ximenes VF, Paino IM, Faria-Oliveira OM, daFonseca LM, Brunetti IL. Indole ring oxidation by activated leukocytes prevents the production of hypochlorous acid. *Braz J Med Biol Res* 2005;38(11):1575-83.
19. Van Antwerpen P, Boudjeltia KZ, Babar S, Legssyer I, Moreau P, Mognilevsky N et al. Thiol-containing molecules interact with the myeloperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/chloride system to inhibit LDL oxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;337(1):82-8.
20. Mansouri A, Muller FL, Liu Y, Ng R, Faulkner J, Hamilton M et al. Alterations in mitochondrial function, hydrogen peroxide release and oxidative damage in mouse hind-limb skeletal muscle during aging. *Mech Ageing Dev* 2006;127(3):298-306.
21. Peng TI, Yu PR, Chen JY, Wang HL, Wu HY, Wei YH et al. Visualizing common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis upon oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762(2):241-55.
22. Davies KJ, Goldberg AL. Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *J Biol Chem* 1987;262(17):8227-34.
23. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F<sub>2</sub>-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med* 1995;332(18):1198-203.

24. Niki E. Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 1987;44(2-4):227-53.
25. Varga Z, Seres I, Nagy E, Ujhelyi L, Balla G, Balla J et al. Structure prerequisite for antioxidant activity of silybin in different biochemical systems in vitro. *Phytomedicine* 2006;13(1-2):85-93.
26. Bulkley GB. Reactive oxygen metabolites and reperfusion injury: Aberrant triggering of reticuloendothelial function. *Lancet* 1994;344(8927):934-6.
27. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000;109(1):33-44.
28. Chen ZH, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N, Niki E. Adaptive response induced by lipid peroxidation products in cell cultures. *FEBS Let* 2006;580(2):479-83.
29. Lorente L, Aller MA, Arias JL, Alonso MS, Arias J. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg* 1996;83(7):1010-1.
30. Decoursey TE, Ligeti E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life Sci* 2005;62(19-20):2173-93.
31. Halliwell B, Hoult JR, Blake DR. Oxidants, inflammation, and anti-inflammatory drugs. *FASEB J* 1988;(2)13:2867-73.
32. Baykal Y, Kocabalkan F. Serbest radikaller ve hücre hasarı. *Sendrom* 2000;9:31-9.
33. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim* 1998;11:336-41.
34. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995;41(12 Pt2):1819-28.
35. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 1993;57(5 supp): 715-24.
36. Porter NA. Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1984;105:273-82.
37. Hunt JV, Bottoms MA, Mitchinson MJ. Oxidative alterations in the experimental glycation model of diabetes mellitus are due to protein-glucose adduct oxidation. *Biochem J* 1993;291(Pt 2):529-35.
38. Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim II* 1998;342-6.
39. Rangan U, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br Med Bull* 1993;49(3):700-18.
40. Speers-Roesch B, Ballantyne JS. Activities of antioxidant enzymes and cytochrome c oxidase in liver of arctic and temperate teleosts. *Comp Biochem Physiol* 2005;140(4):487-94.

41. Nozik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA. Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(12):2466-71.
42. St. Clair D, Zhao Y, Chaiswing L, Oberley T. Modulation of skin tumorigenesis by SOD. *Biomed Pharmacother* 2005;59:209(4)-14.
43. McCord JM, Edeas MA. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed Pharmacother* 2005; 59(4): 139-42.
44. Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 2005;38(7):995-1014.
45. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160(1):1-40.
46. Drevet JR. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. *Mol Cell Endocrinol* 2006; Baskıda.
47. Rinne T, Mutschler E, Wimmer-Greinecker G, Moritz A, Olbrich HG. Vitamin C and E protect isolated cardiomyocytes against oxidative damage. *Int J Cardiol* 2000;75(2,3):275-81.
48. Duarte TL, Lunec J. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radic Res* 2005;39(7):671-86.
49. Hathcock JN, Azzi A, Blumberg J, Bray T, Dickinson A, Frei B et al. Vitamins E and C are safe across a broad range of intakes. *Am J Clin Nutr* 2005;81(4):736-45.
50. Gupta S, Gupta HK, Soni J. Effect of Vitamin E and selenium supplementation on concentrations of plasma cortisol and erythrocyte lipid peroxides and the incidence of retained fetal membranes in crossbred dairy cattle. *Theriogenology* 2005;64(6):1273-86.
51. Akin ML, Erenoğlu C, Batkın A. Akut pankreatit patogenezinde serbest oksijen radikallerinin rolü, E vitamininin olası terapötik etkisi. *Çağdaş Cerrahi Dergisi* 1997;11:132-6.
52. Leon J, Acuna-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* 2004;75(7):765-90.
53. Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997;336(3):186-95.
54. Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 1993;17(3):347-57.
55. Liang JF, Akaike T. Inhibition of nitric oxide synthesis in primary cultured mouse hepatocytes by  $\alpha$ -lipoic acid. *Chem Biol Interact* 2000;124(1):53-60.

56. Goralska M, Dackor R, Holley B, McGahan MC. Alpha lipoic acid changes iron uptake and storage in lens epithelial cells. *Exp Eye Res* 2003;76(2):241-8.
- 57. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8.**
- 58. Beutler E, Duron O, Kelly B.M. Improved Method for the Determination of Blood Glutathione. *J Lab Clin Med* 1963;61(5):882-8.**
- 59. Lowry O.H, Rosenburgh R, Randall J. Protein Measurement with the Folin Reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.**
60. Pacifici RE, Davies KJ. Protein, Lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free radical theory of aging revisited. *Gerontology* 1991;37(1-3):166-80.
61. Rao AV, Shaha C. Role of glutathione S-transferases in oxidative stress-induced male germ cell apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2000;29(10):1015-27.
62. Karbownik M, Reiter RJ, Garcia JJ, Tan D. Melatonin reduces phenylhydrazine-induced oxidative damage to cellular membranes: evidence for the involvement of iron. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32(10):1045-54.
63. Ortega-Gutierrez S, Garcia JJ, Martinez-Ballarín E, Reiter RJ, Millan-Plano S, Robinson M, et al. Melatonin improves deferoxamine antioxidant activity in protecting against lipid peroxidation caused by hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *Neurosci Lett* 2002;323(1):55-9.
64. Hermida-Ameijeiras A, Mendez-Alvarez E, Sanchez-Iglesias S, Sanmartin-Suarez C, Soto-Otero R. Autoxidation and MAO-mediated metabolism of dopamine as a potential cause of oxidative stress: role of ferrous and ferric ions. *Neurochem Int* 2004;45(1):103-16.
65. Kaptanoglu E, Palaoglu S, Demirpence E, Akbıyık F, Solaroglu I, Kılınç A. Different responsiveness of central nervous system tissues to oxidative condition and to the antioxidant effect of melatonin. *J Pineal Res* 2003;34(1):23-5.
66. Qin C, Huang K, Xu H. Protective effect of polysaccharide from the loach on the in vitro and in vivo peroxidative damage of hepatocyte. *J Nutr Biochem* 2002;13(10):592-7.
67. Erba D, Riso P, Criscuoli F, Testolin G. Malondialdehyde production in Jurkat T cells subjected to oxidative stress. *Nutrition* 2003;19(6):545-8.



68. Baeza-Squiban A, Delcher L, Kukreti R, Joly AC, Guennou C, Houcine O, et al. Responses of the rabbit tracheal epithelium in vitro to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress. *Toxicol In Vitro* 2000;14(2):159-67.
69. Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Pro neurobiol* 1998;56(3):359-84.
70. Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1989;68(7-8):989-98.
71. Hagen TM, Ingersoll RT, Lykkesfeldt J, Liu J, Wehr CM, Vinarsky V et al. (R)- $\alpha$ -Lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *FASEB J* 1999;13(2):411-18.
72. Sharma M, Gupta YK. Effect of alpha lipoic acid on intracerebroventricular streptozotocin model of cognitive impairment in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 2003;13(4):241-47.
73. Kokilavani V, Devi MA, Sivarajan K, Panneerselvam C. Combined efficacies of DL- $\alpha$ -lipoic acid and meso 2,3 dimercaptosuccinic acid against arsenic induced toxicity in antioxidant systems of rats. *Toxicol Lett* 2005;160(1):1-7.
74. Al-Majed AA, Gado AM, Al-Shabanah OA, Mansour MA. Alpha-Lipoic acid ameliorates myocardial toxicity induced by doxorubicin. *Pharmacol Res* 2002;46(6):499-503.
75. Rybak LP, Husain K, Whitworth C, Somani SM. Dose dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced ototoxicity in rats: antioxidant defense system. *Toxicol Sci* 1999;47(2):195-202.
76. Prahalthan C, Selvakumar E, Varalakshmi P. Lipoic acid ameliorates adriamycin-induced testicular mitochondriopathy. *Reprod Toxicol* 2005;20(1):111-16.
77. Selvakumar E, Prahalthan C, Sudharsan PT, Varalakshmi P. Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm. *Toxicology* 2006;217(1):71-8.

EKLER



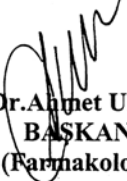
T.C  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ETİK KURUL KARARLARI

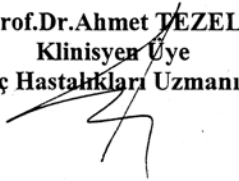
Oturum Sayısı :

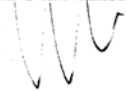
Karar Tarihi : 13.05.2004

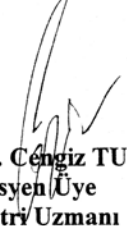
4-Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu 13.05.2004 tarihinde “Rat Karaciğer Homojenatlarında İndüklenmiş Lipid Peroksidasyonuna İnvitro – lipoik asit kullanımının etkisi” adlı TÜTFEK-2004/ 059 protokol no.lu Araştırma Görevlisi Dr. Süleyman B. YAPAR’ın tez çalışmasını incelemek üzere toplandı. Toplantıya Ecz.İmran OĞUZ mazereti nedeniyle ,Yrd.Doç.Dr. Sevgi ESKİOCAK çalışmacılardan birisi olması nedeniyle katılmadı. Diğer üyelerin katılımıyla çalışmanın incelenmesine geçildi.

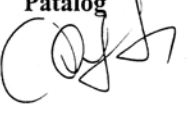
Yapılan inceleme sonucunda çalışmanın Fakültemiz Biyokimya Anabilim Dalında yapılacağı ve sorumlusunun Yrd.Doç.Dr.Sevgi ESKİOCAK olduğu; Araştırma protokolünün amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler ile gönüllü bilgilendirme metni dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Helsinki Deklerasyonu Kararlarına, Hasta Hakları Yönetmeliğine ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve yapılabileceğine mevcudun oybirliği ile karar verildi.

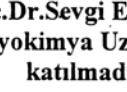
  
Prof.Dr.Ahmet ULUGÖL  
BAŞKAN  
(Farmakolog)

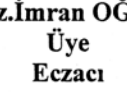
  
Prof.Dr.Ahmet TEZEL  
Klinisyen Üye  
İç Hastalıkları Uzmanı

  
Yrd.Doç.Dr.Ümit N. BAŞARAN  
Klinisyen Üye  
Çocuk Cerrahisi Uzmanı

  
Yrd. Doç. Dr. Cengiz TUĞLU  
Klinisyen Üye  
Psikiyatri Uzmanı

  
Yrd. Doç. Dr. Semsî ALTANER  
Üye  
Patalog

  
Yrd.Doç.Dr.Sevgi ESKİOCAK  
Biyokimya Uzmanı  
katılmadı

  
Ecz.İmran OĞUZ  
Üye  
Eczacı  
Katılmadı

Posta Adresi :  
Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı  
Güllapoğlu Yerleşkesi  
22030 EDİRNE

Tel ( 0-284) 235 76 41 (9 Hat) Fax: ( 0-284)2357652