

Yüksek Yağ İçerikli Diyet ile Beslenen Sıçanların Arka Bacak Kasında Dehidroepiandrosteron Sülfatın Oksidan Durum Belirteçleri ile Bakır ve Çinko Düzeylerine Etkisi

[The Effect of Dehydroepiandrosterone Sulfate on Oxidant Status, Copper and Zinc Levels in Hind Leg Muscle of the Rats Fed with High-Fat Diet]

¹Zeki Arı,

¹Cevval Ulman,

¹Fatma Taneli,

²Banu İşbilen,

³B. Sami Uyanık,

¹Huri Aldırmaz,

⁴H. Tuğrul Çelik,

¹Özlem Günay

¹Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

²Çanakkale Devlet Hastanesi, Demircioğlu Ek Birimi, Biyokimya Laboratuvarı, Çanakkale, Türkiye

³Hisar Intercontinental Hospital, Biyokimya Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

⁴Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

Yazışma Adresi

[Correspondence Address]

Prof. Dr. Zeki ARI

Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

Tlf: 0236-232 31 33/416

Fax: 0236-237 02 13

E-mail: zekiari@yahoo.com

ÖZET

Obezite oluşumundaki önemli nedenlerden birisi yüksek yağlı diyetle beslenmedir. Dehidroepiandrosteron sülfatın vücutta yağ kitlesini azaltarak antiobeziter etki gösterdiği, lipid metabolizması üzerine olumlu etkileri olduğu ve anti-aterosklerotik etki gösterdiği bildirilmektedir. Bu çalışmada yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda dehidroepiandrosteron sülfatın sıçan bacak kasında oksidan durum belirteçleri ile bakır ve çinko düzeylerine olası etkilerini incelemeyi amaçladık. Çalışmada 37 adet Sprague-Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Grup 1'e (n=11) standart pellet verilirken diğer gruplarda yüksek yağ içerikli (% 65) diyet uygulandı. Beş aylık beslenme sonrasında sıçanlar 4 gruba ayrıldı. Grup 1 (kontrol, n=11) ve Grup 2'ye (n=9) serum fizyolojik, Grup 3'e (n=9) 1 mg/kg dehidroepiandrosteron sülfat, Grup 4'e (n=8) 10 mg/kg dehidroepiandrosteron sülfat 7 gün süre ile uygulandı. Dekapitasyon sonrası sıçanların sağ arka bacaklarından alınan kas dokusu örneklerinde nitrotirozin, miyeloperoksidaz, bakır ve çinko tayinleri yapıldı. Sonuç olarak; dehidroepiandrosteron sülfatın kas metabolizması üzerinde, oksidan durum belirteçlerinden nitrotirozin miktarını ve miyeloperoksidaz aktivitesini azaltarak olumlu etki yaptığını, ancak kas dokusunda çinko ve bakır düzeylerini etkilemediğini söyleyebiliriz. Dehidroepiandrosteron sülfatın kas metabolizması üzerindeki bu yararlı etkiyi gösterme mekanizmasının açıklığa kavuşturulabilmesi için de daha detaylı araştırmaların yapılması gerektiği kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Yağlı diyet, dehidroepiandrosteron sülfat, nitrotirozin, miyeloperoksidaz, iz elementler.

ABSTRACT

Obesity can be induced by a high fat diet. Dehydroepiandrosterone sulfate decreases body fat mass and have an antiatherogenic effect. The objective of our study was to investigate the high fat diet changes and the effect of dehydroepiandrosterone sulfate on the antioxidant status, zinc and copper levels in the rat hind leg muscle tissue. Thirty-seven female rats were divided into 4 groups. Group 1 (control, n=11) were fed with standard rat chow, Group 2, 3 and 4 with high fat diet (65 %) for five months. Dehydroepiandrosterone sulfate was administered as 1 mg/kg for group 3 (n=9) and as 10 mg/kg for group 4 (n=8) daily for seven days. The same amount of saline was injected to group 1 and 2 (n=9). After decapitation, right hind leg of the rat was collected and kept frozen. Muscle tissues were used for the determination of nitrotyrosine, myeloperoxidase activity, copper and zinc levels. As a conclusion, dehydroepiandrosterone sulfate significantly decreases the oxidant status parameters, tissue nitrotyrosine levels and myeloperoxidase activity in the rat hind leg muscle tissue on high fat diet, but did not have any effect on copper and zinc tissue levels. We believe that, further research is needed for investigation of the positive effects of DHEA-S on muscle metabolism.

Key Words: High lipid diet, dehydroepiandrosterone sulfate, nitrotyrosine, myeloperoxidase, trace elements.

Kayıt tarihi : 08 Mayıs 2007, Kabul tarihi: 18 Aralık 2007

[Received: 08 May 2007, Accepted: 18 December 2007]

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü tarafından "Sağlığı bozacak ölçüde yağ dokularında anormal veya aşırı miktarda yağ birikmesidir" şeklinde tanımlanan obezite; vücut yağ oranının artması, davranış, endokrin ve metabolik değişikliklerle karakterize karmaşık, çok etkenli bir hastalıktır. Obezite dünyadaki en önemli sağlık problemlerinden birisi olup pandemi halini almıştır ve prevalansı da giderek artmaktadır (1). Obezlerde mortalite ve morbiditenin yüksek olması ve kilo vermekle bu risklerin azalması mutlaka tedavi edilmesi gerektirdiğini göstermektedir.

Dehidroepiandrosteron (DHEA) adrenal bezlerden salgılanır ve salgılanma hızı insan ömrü boyunca değişiklikler gösterir (2). Zayıf etkili bir androjen olan dehidroepiandrosteron sülfat (DHEA-S)'in fizyolojik etkileri bilinmemekle birlikte anti-obeziter, anti-diyabetik ve aterosklerozu önleyici etkileri olduğu bildirilmektedir. Obezlerde DHEA-S kullanımı ile bu etkilerin oluşumu hakkında çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Özellikle DHEA-S'nin bu yararlı etkilerinin ortaya çıkmasında aracılığı yapan hormon veya maddeler bilinmemektedir.

Peroksinitrit oluşumunu içeren değişik yollar, biyolojik sistemlerde kararlı bir nitrotirozin ürünü oluşturmaktadır (3). Nitrotirozinasyonun; miyokardiyal disfonksiyon, respiratuvar distress sendromu, inflamatuvar barsak hastalığı, akciğer hasarı, astım, aterosklerotik plaklar, romatoid artritler, kronik böbrek yetmezliği, septik şok vb. çok sayıda inflamatuvar hastalığın patolojisinde rolü bulunmaktadır (4,5). Biyolojik örneklerdeki (doku, plazma ve idrar) nitrotirozinin gösterilmesi, bu nedenle, peroksinitrit veya ilişkili azot merkezli oksidanların varlığına işaret etmektedir.

Miyeloperoksidaz, nötrofillerin azurofil granüllerinde yerleşmiş olan bir enzimdir. Normal nötrofil fonksiyonu için gerekli olduğu gibi bakterilerin fagositozunda önemli rol oynamaktadır. Nötrofiller inflamasyon alanında süperoksit ve hidrojen peroksit üretmektedirler (6). Miyeloperoksidaz pek çok farmakolojik ajanın ve ksenobiyotiklerin de dahil olduğu çok çeşitli substratları radikal ara ürünlere okside etmek için hidrojen peroksiti kullanmaktadır (7). Miyeloperoksidazın, düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonu ile ilgili olduğu ve dolayısıyla aterojenezde rolü olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda miyeloperoksidazın nitrik oksit (NO) metabolizması ile sıkı şekilde bağlantılı olduğu kanıtlanmıştır. NO'nun oksidasyon ürünü olan nitrit, miyeloperoksidazın oluşturduğu reaktif oksijen türlerinin substratı olarak görev yapmaktadır (8,9).

Canlılarda hücrelerin proliferasyon, replikasyon ve farklılaşması için amino asitler, glukoz, yağ asitleri ve vitaminlerin yanında minerallere de ihtiyaç vardır. Çinko, organizma için esansiyel bir mineral olup, optimal sağlık için her gün belirli bir miktarda alınması gerekmektedir (10). Çinkonun serbest radikal oluşumu ve oksidatif stresten koruyucu rolü bulunmaktadır. Oksidatif hasarın neden olduğu kutanöz ve romatolojik inflama-

tuar hastalıklar; alkolizm, karaciğer sirozu ve kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır. Çinko, antioksidan etkili bir enzim olan süperoksit dismutazın (SOD) ve dokuları serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyan metallothioneinlerin yapısında yer almaktadır (11).

Bakır, çok sayıda metalloproteinle ilişkili olan önemli bir eser elementtir. İnsanda bakır düşüklüğünün kalp ritmi düzensizliği ve hiperlipidemi yoluyla koroner kalp hastalığı riskini artırdığı düşünülmektedir. Bakırdan fakir diyetle beslenen deney hayvanlarında ve insanlarda koroner kalp hastalığı ile yakından ilgili belirtiler görülebilmektedir. Bunlar arasında anormal elektrokardiogramlar, hiperkolesterolemi, glukoz intoleransı ve hipertansiyon sayılabilir (12).

Ölümcül komplikasyonları olan obezitede mekanizmaların anlaşılması ve klinik uygulamalarda yeni ufukların açılabilmesi için son zamanlarda yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bu nedenle biz de çalışmamızda yüksek yağ içerikli diyet ile beslenerek obez yapılan sıçanlarda DHEA-S'nin bacak kas dokusunda oksidan durum belirteçlerinden nitrotirozin ve miyeloperoksidaz aktiviteleri ile bakır ve çinko düzeylerine olası etkilerini incelemeyi amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada, başlangıç ağırlıkları 129.8 ± 30 gram olan 42 adet Sprague-Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Çalışma başında sıçanlar iki gruba ayrıldı. Grup 1: Standart pelletle beslenenler (Kontrol grubu, n=12, Grup 1). Grup 2: Yüksek yağ içerikli diyetle beslenenler (Deney grubu, n=30, Grup 2a, 2b ve 2c). Tüm sıçanlar, gruplar arası homojenizasyonu sağlamak amacıyla bir hafta süreyle standart diyetle beslendiler. Standart diyet Tariş'den (İzmir, Türkiye) temin edildi. Diyet içeriğinde, % 15 protein, % 2.5 yağ, % 15 sellüloz, % 14 kil, % 13 su bulunuyordu (13). Bir haftanın sonunda deney hayvanları rastgele gruplanarak ayrı kafeslere alındı. Yüksek yağ içeriği ile beslenen gruba 100 gram standart diyete 25 gram hayvansal bir yağ türü olan tereyağı eklendi. Böylece toplam enerjinin % 65'i yağdan kaynaklanan bir diyet sağlandı (14). Yağlı diyetin hazırlanmasında; 100 gram standart pellet'e 25 gram tereyağı oranından yola çıkılarak günlük olarak yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanların ihtiyacı kadar (1 kg) yiyecek tahmin edilerek standart pellet alındı. Uygun oranda tereyağı eritilerek standart pelletlere eklendi. Karıştırıcı yardımıyla iyice karıştırılarak pelletlerin yağı çekmesi sağlandı. Pelletler oldukça kuru olduğundan yağı kolayca çektiği gözlemlendi. Sonrasında bu haliyle soğumaya bırakıldı. Yüksek yağlı diyet her gün taze olarak hazırlandı. Deney başlangıcından sonuna kadar sıçanların yağlı diyete uyum sağladığı gözlemlendi. Deneysel süreç 20 hafta sürdü. Deney süresince her grup ayrı kafeslerde barındırıldı. Her iki grup da bu süreç boyunca yiyebildikleri kadar uygun diyet ve su ile beslendiler. Yine deney süresince 12 saat

sürekli aydınlık, 12 saat sürekli karanlık ortamda tutuldular. Deney başlangıcında tüm sıçanlar tartıldı. Tartım işlemi, deney süresince haftada bir yapılarak kaydedildi. Deneysel periyodun 19. haftasının tamamlanmasının ardından Grup 2 sıçanlar tartıldı. Grup 1'de 1, Grup 2'de 4 adet sıçanın ölmesi nedeniyle toplam 37 sıçan çalışma grubunu oluşturdu ve Grup 2 sıçan sayısı 26 üzerinden değerlendirildi.

Yağlı diyetle beslenen deney hayvanları gruplar arası ağırlıklar eşit dağılımlı olacak şekilde 3 alt grup oluşturuldu: **Grup 1:** Standart diyetle beslenen ve Serum Fizyolojik (SF) uygulanan grup (n=11). **Grup 2a:** Yüksek yağ içerikli diyetle beslenen ve SF uygulanan grup (n=9). **Grup 2b:** Yüksek yağ içerikli diyetle beslenen ve düşük doz (1 mg/kg) DHEA-S uygulanan grup (n=9). **Grup 2c:** Yüksek yağ içerikli diyetle beslenen ve yüksek doz (10 mg/kg) DHEA-S uygulanan grup (n=8). Çalışmanın 20. haftası boyunca her gün 12.00-13.00 saatleri arasında SF ve DHEA-S enjeksiyonları uygulandı. Enjeksiyonlar öncesi her bir sıçan tartılarak ağırlığı başına gereken SF veya DHEA-S çözeltisi miktarı hesaplandı. Grup 1 ve Grup 2a'ya intraperitoneal (IP) olarak steril SF uygulandı. Kristalize DHEA-S (Sigma, D5297, Crystalline, Germany), steril deiyonize suda çözüldü (15). Grup 2b'ye 1 mg/kg ve Grup 2c'ye 10 mg/kg olmak üzere, bir hafta boyunca her gün steril şartlarda taze olarak hazırlanan DHEA-S çözeltisi IP yol ile sıçanlara verildi. Deneysel sürenin sonunda eter anestezisi sonrası sıçanlar dekapite edildi. Dekapitasyon sonrası sıçanların sağ arka bacaklarından yaklaşık 10-15 gram kadar kas dokusu örnekleri alındı. Dokular bekletilmeden soğutulmuş izotonik solüsyon ile yıkandı. Kan ve diğer dokulardan temizlenen kas dokusu örnekleri buz banyosu içinde laboratuvara ulaştırıldı ve biyokimyasal analizlerin yapılacağı zamana kadar -70 °C'de saklandı. Kas örneklerinin alımı sürecinde metal olmayan pensler kullanıldı.

Doku Homojenizasyonu

Nitrotirozin için; pH 7.5, 0.2 mM Tris-HCl tamponu kullanıldı. Miyeloperoksidaz için ise tampon olarak % 0.5'lik heksadesil trimetil amonyum bromid kullanıldı. Yaş ağırlıkları 1.0 gram olarak ayarlanan dokular, soğukluğu muhafaza edilerek temiz cerrahi makasla parçalara ayrıldı. Cam tüpe aktarılan doku üstüne 2.0 ml tampon çözelti eklendi. Buz doldurulmuş plastik kap içerisine yerleştirilen cam tüpteki doku 16000 devir/dakika hızda homojenize edildi. Homojenatlar 1500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlardan nitrotirozin ve miyeloperoksidaz aktivite tayinleri yapıldı. Dokularda protein tayini Lowry metodu (16) ile, nitrotirozin tayini, sandwich ELISA yöntemi ile çalışan BIOXYTECH® Nitrotyrosine-EIA (OXIS International Inc., Portland, USA) ticari test kiti ile, miyeloperoksidaz enzim aktivitesi tayini enzimatik yöntemle kinetik olarak Shimadzu UV 1601 (Japan) spektrofotometre ile ölçüldü. Bir ünite MPO aktivitesi, bir dakikada 1 µmol peroksidi indirgeyen enzim aktivitesi olarak tanımlanmıştır (17). İz element tayinleri, Perkin Elmer Analyst

700 döteryum arka plan düzeltmeli atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Bulguların istatistiksel analizinde SPSS for Windows 13.0 istatistik paket programı (Lisans No: 9579546) kullanılarak tanımlayıcı istatistikler belirlendi. Veriler normal dağılım göstermediği için hesaplamalarda medyan ve alt-üst sınırlar kullanıldı. Gruplardaki veri dağılımını, medyan ve uç değerleri ortaya koymak için saplı kutu grafiklerinden (box plots) yararlanıldı.

Gruplar arası farklılıklar Kruskal-Wallis varyans analizi sonucuna göre Mann-Whitney U testi ile bulunarak değerlendirildi. Nonparametrik korelasyon hesapları ise Spearman's rho prosedürüne uygun olarak yapıldı. Gerek gruplar arası farklılıklar ve gerekse nonparametrik korelasyon sonuçları için p<0.05 olan değerler, istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

Çalışmamız Üniversitemiz etik kurulundan onay alındıktan sonra başlatılmış ve Celal Bayar Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından (TIP-2004/043) nolu proje olarak desteklenmiştir.

BULGULAR

Çalışma başlangıcında kontrol grubu sıçanların (Grup 1) ortalama ağırlığı 115.9 ± 13.1 gram, deney grubu (Grup 2) sıçanların ortalama ağırlığı 136.1 ± 10.0 gram idi. 5 ay beslenmenin ardından kontrol grubunun ortalama ağırlığı 188.1 ± 26.7 gram, deney grubu sıçanların ortalama ağırlığı ise 194.4 ± 23.4 gram olarak bulundu. Beslenme süreci bitiminde gruplar arasında ağırlık yönünden istatistiksel anlamda önemli bir fark bulunamadı (p>0.05). Deney gruplarına ait nitrotirozin, miyeloperoksidaz, bakır ve çinko değerleri (medyan ve min.-maks. olarak) ile gruplar arası varyans analizi (Mann-Whitney U testi) sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir.

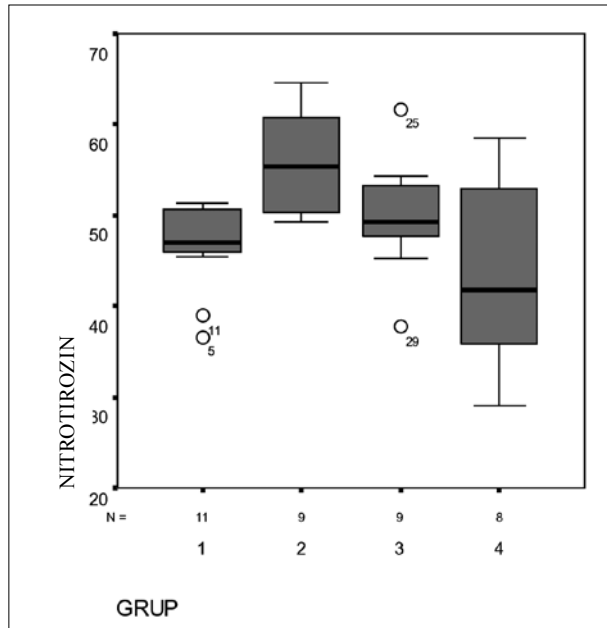
Nitrotirozin için kontrol grubu (Grup 1) ile yağlı diyet grubu (Grup 2a) arasında ve ayrıca 2a-2b ile 2a-2c grupları arasında istatistiksel olarak önemli fark bulundu (sırasıyla p<0.01, p<0.05 ve p<0.05). Miyeloperoksidaz için de Kontrol 2a ve 2a-2c gruplar arasında istatistiksel yönden çok önemli (her ikisi için de p<0.001) fark bulunurken, 2a-2b grupları arasındaki fark daha az anlamlı idi (p<0.01). Bakır ve çinko için gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli fark bulunamadı (p>0.05) (Tablo 1). Yapılan nonparametrik korelasyon (Spearman's rho testi) hesaplarında sadece çinko ile bakır parametreleri arasında istatistiksel olarak önemli pozitif bir korelasyon gözlenirken (r=0.428, p<0.01), diğer çalışma parametreleri arasında ve ayrıca yapılan grup içi parametreler arası korelasyon hesaplarında da önemli ilişki bulunamadı (p>0.05).

İstatistiksel açıdan önemli fark bulunan Nitrotirozin ve Miyeloperoksidaz parametreleri için çalışma gruplarına ait veri dağılımı, medyan ve uç değerleri gösteren saplı kutu grafikleri (box plots), Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir.

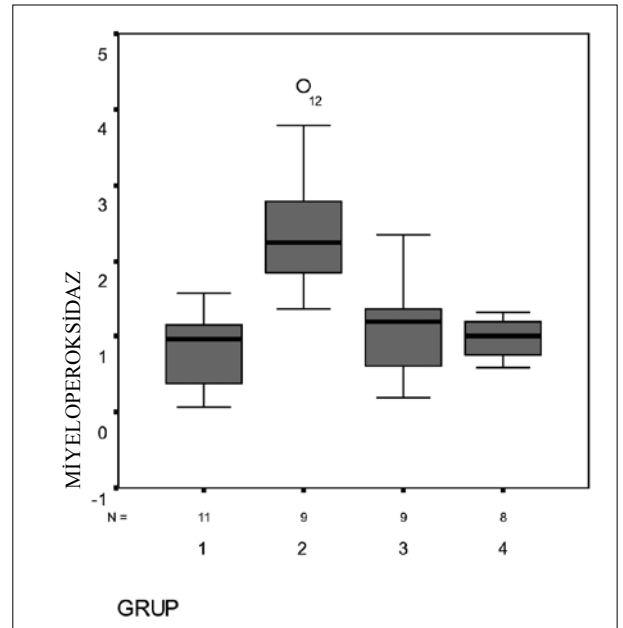
Tablo 1. Gruplara ait parametre ve gruplar arası varyans analiz (V.A.) sonuçları

GRUPLAR	Sayı (n)	Nitrotirozin (nmol/g yaş doku)	Miyeloperoksidaz (U/g yaş doku)	Bakır (Cu) (µg/g yaş doku)	Çinko (Zn) (µg/g yaş doku)
		Medyan (min.-maks.)	Medyan (min.-maks.)	Medyan (min.-maks.)	Medyan (min.-maks.)
Grup 1 (Kontrol)	11	46.99 (36.63-51.43)	0.96 (0.06-1.57)	2.14 (1.09-4.31)	10.62 (5.87-12.79)
Grup 2a (yağlı diyet)	9	55.37 (49.32-64.60)	2.25 (1.36-4.31)	2.09 (1.82-2.76)	10.82 (7.24-18.31)
V.A. (1-2a)		.004**	.000***	önemsiz	önemsiz
Grup 2b (yağlı diyet + DHEA-S 1 mg/kg)	9	49.32 (37.74-61.66)	1.20 (0.2-2.34)	2.15 (1.95-2.47)	10.19 (8.92-15.73)
V.A. (2a-2b)		.022*	.004**	önemsiz	önemsiz
Grup 2c (yağlı diyet + DHEA-S 10 mg/kg)	8	41.79 (29.10-58.45)	1.00 (0.58-1.32)	2.28 (1.94-2.62)	12.55 (8.61-16.60)
V.A. (2a-2c)		.016*	.001***	önemsiz	önemsiz
Toplam	37	49.88 (29.10-64.60)	1.20 (0.06-4.31)	2.15 (1.09-4.31)	10.62 (5.87-18.31)

*p<0.05 düzeyinde önemli
**p<0.01 düzeyinde önemli
***p<0.001 düzeyinde önemli.



Şekil 1. Nitrotirozin düzeyleri (nmol/g yaş doku)



Şekil 2. Miyeloperoksidaz aktivitesi düzeyleri (U/g yaş doku)

TARTIŞMA

Obezite; vücut yağ oranının artması ve davranış, endokrin ve metabolik değişikliklerle karakterize karmaşık, çok etkenli bir hastalıktır (18). Etiyolojisi tam olarak açıklığa kavuşturulamamış olmakla beraber, genetik ve çevresel etkenlerin büyük rol oynadığı bilinmektedir.

Obezite gelişiminde kalıtımın % 35 ve modifiye edici genlerin % 15 rol oynadığı düşünüldüğünde, geri kalan % 50 olguda çevresel faktörler ve yaşam biçiminin etkili olduğu ortaya çıkmaktadır (19). Amerikalı yetişkinlerde yapılan bir çalışmada obeziteye bağlı hastalıktan ölümlerin % 80'inin, vücut kütle indeksi 30 ve üzeri olanlar

da meydana geldiği ve bu ölümlerin yıllık 280000 kişiye ulaştığı gösterilmiştir (20).

Diyetteki dengenin obezite etiolojisi üzerindeki önemi hakkında farklı görüşler olsa da yüksek yağlı diyetle beslenmenin obezite ile çok yakından ilişkili olduğu bildirilmektedir (21). Kamara ve ark. (22) tarafından yapılan çalışmada yüksek yağ içeriği (soya ve mısır yağı) ile beslenen Sprague-Dawley cinsi sıçanlarda, obezite gelişmesinin yanı sıra artmış glukoz toleransı varlığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise 7 ay süre ile yüksek yağ içeriği ile beslenen dişi sıçanlarda beslenme döneminin sonunda bir grup sıçanda obezite gelişmesine rağmen, bir grubunda da gelişmediği bildirilmektedir (23).

Literatürde yağlı diyetle beslenen sıçanlarda kilo alımı bildiren çalışmaların yanında (24), yağlı diyetle beslenmeye rağmen kilo alımı bildirilmeyen çalışmalar da vardır (25). Çalışmamızda 5 ay süresince yüksek yağ içerikli diyetle beslenen sıçanlarla (Grup 2a, 2b, 2c) kontrol grubu (Grup 1) arasında, beslenme periyodu süresince ağırlık kazanımı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$). Bununla birlikte, HDL-K hariç diğer lipid parametrelerinde (TG, TK) ve DHEA-S düzeylerinde istatistiksel olarak önemli fark (TG için $p<0.01$, TK ve DHEA-S için $p<0.001$) bulunması, uyguladığımız yağlı diyet modelinin oturduğunu ve doğru işlediğini göstermektedir (13). Ayrıca literatürde Sprague-Dawley cinsi sıçanların bir kısmında diyetle obezite oluşturulmasına direnç olduğu bildirilmektedir (23). Araştırmamızda kullandığımız sıçanların Sprague-Dawley türünden olması yeterince ağırlık artışı elde edememizin bir sebebi olabilir. Literatürde yüksek yağlı diyet ile beslenen Sprague-Dawley cinsi sıçanların bir kısmında artmış duodonal ve intestinal alkalen fosfataz ve alfa-glukozidaz aktivitesi ile beraber jejunal mukoza hipertrofisi, (artmış protein/DNA oranı) bulunmuş, bu grup yüksek yağlı diyet sonucu kilo almaya yatkın grup olarak belirlenmiştir. Oysa aynı şekilde beslendiği halde istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek intestinal alkalen fosfataz ve alfa-glukozidaz aktivitesi gösteren grup, obesiteye dirençli bulunmuştur. Dört haftalık yüksek yağlı diyet alan sıçanların jejunal DNA miktarı belirgin olarak yatkın grupta % 17, dirençli grupta % 26 düşmüş, fakat protein içeriği değişmemiştir. Bu nedenle jejunal protein/DNA oranı yüksek yağlı diyet alan grupta yükselerek yatkın grupta % 34, dirençli grupta % 46 oranında düşük bulunmuştur. Yine dirençli grupta, belirgin azalmış enerji alımı belirlenmiştir. Bu nedenle sıçan cinsi aynı olsa da artmış enzim aktivitesi ve besin emiliminin azalmış veriminin obeziteye yatkınlıkla ilişkili olabileceği yorumu yapılmıştır (26).

DHEA-S adrenal korteksten sentezlenen zayıf etkili bir androjendir (2). DHEA-S'nin immün sistem stimülasyonu, anti-diyabetik, anti-aterosklerotik, anti-demansif, anti-osteoporotik ve karsinogenezi engelleyici etkileri olduğu bildirilmiştir (27,28). Yen ve ark. (29) oral DHEA'nın genetik olarak obez farelerde yedikleri

miktarlarda değişiklik olmaksızın kilo alımında azalma sağladığını göstermişlerdir. Son yıllarda yapılan birçok çalışmada DHEA'nın antiobeziter etkisi kanıtlanmıştır. Örneğin, Nawata ve arkadaşlarınınca, (28) obez Zucker sıçanlarda yapılan çalışmada kastrasyon yapılan erkek sıçanlarda 3 ay süre ile % 0.3 DHEA içeren diyet sonrasında DHEA alan grupta DHEA almayan ve kastrasyon yapılmayan sıçanlara göre kilo alımında dramatik bir azalma olduğu bildirilmiştir. Bir diğer çalışmada da dişi obez Zucker sıçanlarda diyetle DHEA eklenmesi ile kilo alımında azalma olduğu ve bu azalmanın DHEA'nın enerji metabolizmasını azaltması sebebi ile meydana gelmiş olabileceği bildirilmektedir (30).

DHEA'nın anti-obeziter etkisini kalori alımını azaltma yolu ile gerçekleştirdiğine dair yayınlar mevcuttur. Ancak gıda alımı üzerine etki göstermediğine dair yayınlar da bulunmaktadır (28). Diğer bir görüş, DHEA'nın lipaz aktivitesinde ve beta3-adrenoreseptör [(beta)₃-AR] yoğunluğunda değişiklik yaparak hayvanın overial durumu ile bağlantılı olarak etki gösterdiği şeklindedir (31). DHEA-S'nin yağ metabolizması üzerine etkileri olduğu bildirilmektedir. DHEA-S verilen overektomize sıçanlarda karaciğer ve kalp L-karnitin asetil transferaz aktivitelerinin arttığı rapor edilmiştir (32). DHEA'nın; gerek karbontetraklorür, akut hiperglisemi, streptozotocin ve vitamin-E eksikliği ve gerekse stresin neden olduğu, lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan etkilerinin olduğu bilinmektedir (33). Öte yandan DHEA, tartışmalı etkilerine rağmen halen insanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (2). Ancak in vivo çalışmaların aksine in vitro deneyler DHEA'nın direkt olarak etkili olmadığını (34), fakat organlarda etkili olan metabolitlerine dönüştüğünü göstermektedir (35). DHEA, karaciğer ve diğer dokularda, antiglukokortikoid etkisiyle immün süreci başlatan 7-hidroksi-DHEA'ya yoğun şekilde çevrilmekte ve çeşitli hücreleri oksidatif hasardan korumaktadır (33). Ayrıca DHEA'nın in vitro olarak anti-proliferatif ve pıhtılaşma önleyici, hayvan çalışmalarında da anti-aterosklerotik etkileri olduğu bildirilmektedir (36,37). Kuvvetli bir oksidan ajan olan peroksinitrit, diğer reaktif oksijen bileşiklerine parçalanmakta (38) ve proteinlerin tirozil kalıntılarına nitro grubu (-NO₂) ekleyerek nitrotirozin oluşumuna neden olmaktadır (39). Tirozin nitrozlanmasının proteinlerin in vivo fonksiyonu üzerine olan etkileri hakkında yeterli bilgi olmamakla birlikte peroksinitrit ve parçalanma ürünleri; membran lipidlerinin peroksidasyonuna sebep olmakta ve vasküler geçirgenlikte artışa ve böylece endotel hasarına yol açarak insanda LDL peroksidasyonunu başlatmaktadır (38). Yapılan bir çok çalışma, vasküler relaksasyondaki endotel kaynaklı eksikliğin, peroksinitrit oluşumuna dayanan nitrik oksit inaktivasyonu ile birlikte olduğunu göstermiştir (39).

Biz bu çalışmamızda; deney grubu sıçanların sağ arka bacak kas dokusundaki nitrotirozin miktarları ile miyeloperoksidaz aktivitelerinin tümünü (2c grubun nitrotirozin değeri hariç) kontrol grubuna göre daha yüksek

bulduk (Tablo 1). Nitrotirozin’de kontrol grubu ile yağlı diyetle beslenen gruplar (1. ve 2a gruplar) arasındaki fark artış yönünde olup istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.01$). Yağlı diyetle beslenen grupla (2a grup) farklı dozda DHEA-S verilen gruplar (2b ve 2c gruplar) arasındaki fark ise azalma yönünde ve istatistiksel bakımdan önemli idi (her ikisi için de $p<0.05$). Bu bulgular bize uzun süre yüksek yağlı diyetle beslenerek obez yapılan sıçanlarda meydana gelen oksidatif değişimler üzerinde DHEA-S’nin belirgin antioksidatif etkisi olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu olumlu etkinin, DHEA-S’nin artan miktarına paralel olarak artış gösterdiğini de belirledik. Örneğin; 1 mg/kg DHEA-S verilen 2b grubuna göre, 10 mg/kg DHEA-S verilen 2c grubunda nitrotirozindeki düşüş, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha fazla idi (nitrotirozin değerleri sırasıyla 49.32 nmol/g yaş doku ve 41.79 nmol/g yaş doku, $p>0.05$).

Miyeloperoksidaz için de kontrol grubu ile yağlı diyetle beslenen gruplar (1 ve 2a) arasındaki fark artış yönünde olup istatistiksel olarak çok anlamlı idi ($p<0.001$). Yağlı diyetle beslenen grupla (2a) farklı dozda DHEA-S verilen gruplar (2b ve 2c) arasındaki fark ise azalma yönünde ve istatistiksel bakımdan önemli idi (2a-2b grup için $p<0.01$, 2a-2c grup içinse $p<0.001$). Özellikle 2c grubundaki miyeloperoksidaz ve nitrotirozin ölçümleri geniş bir dağılım göstermektedir. Bu geniş dağılımın kullandığımız manuel ölçüm yönteminden kaynaklanmış olabileceği düşünülebilir. Bu sonuçlara bakarak, nitrotirozinde olduğu gibi miyeloperoksidaz açısından da DHEA-S’nin benzer antioksidatif etkiyi gösterdiğini söyleyebiliriz.

Diğer parametreler (çinko ve bakır) açısından çalışma grupları arasında istatistiksel anlamda önemli fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Ancak yağlı diyetle beslenen sıçanlarda (Grup 2a) kontrol grubuna (Grup 1) göre bakır değerleri azalmış (sırasıyla, 2.09 $\mu\text{g/g}$ yaş doku ve 2.14 $\mu\text{g/g}$ yaş doku), ancak verilen DHEA-S miktarına bağlı olarak 2b ve 2c gruplarında da bakır miktarları tekrar artış göstermiştir (sırasıyla, 2.15 $\mu\text{g/g}$ yaş doku ve 2.28 $\mu\text{g/g}$ yaş doku) (Tablo 1). Ayrıca bu çalışma; DHEA-S’nin kas dokusunda, oksidatif stresten koruyucu rolü olan (10) çinko düzeylerini olumsuz anlamda etkilediğini de göstermektedir. Çörtelekoğlu ve ark. (40)’larının yaptığı bir çalışmada da lipid peroksidasyonuna karşı bir korunma mekanizması olan antioksidan savunma sisteminin yapısında yer alan çinkonun serbest oksijen radikallerinin detoksifikasyonunda, bakır ve demirin ise peroksidatif süreçte yer aldığı belirtilmektedir.

Dong ve ark. (41)’lerinin kalp kası üzerinde yaptıkları bir çalışmada diyetsel demir eksikliğinde western blot yöntemi ile sitokrom c’nin mitokondri dışına çıkışının, eNOS ve iNOS ekspresyonunun arttığı ve ELISA ile ölçülen nitrotirozin düzeylerinin anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir. Biz de çalışmamızda nitrotirozin düzeyindeki azalmanın bakır ve çinko düzeyleri ilişkili olabileceğini düşünerek bakır ve çinko düzeylerini de karşılaştırdık. Ancak anlamlı bir değişiklik gözlemedik.

Kayalı ve ark. (42)’lerinin streptozotosin ile geliştirilmiş diyabetik sıçanlarda, karaciğer mitokondrilerinde nitrotirozin ve lipid hidroperoksit düzeylerinde azalma, pankreas mitokondrilerinde protein karbonil, nitrotirozin ve lipid hidroperoksit düzeylerinde azalma, kas mitokondrilerinde ise aynı parametrelerde bir değişiklik bulamamışlardır. Diyabetik sıçanlarda mitokondriyel nitrotirozin düzeylerinin değişmemesi buradaki metabolizmanın farklı olduğunun kanıtıdır.

Scumpia ve ark. (43)’lerinin kalp kası çalışmasında ise endotoksemi yaratılan sıçanlarda hipotermimin etkisi araştırılmıştır. Hipotermimin western blot analizi ile endotoksemi ile artmış nitrik oksid sentaz mRNA ve iNOS proteinini azalttığı gösterilmiştir. Yine hipotermimin nitrik oksit yolu ile oluşan miyokardial protein hasarını azalttığı nitrotirozin ELISA yöntemi ile gösterilmiştir. Kalp kası nitrotirozin düzeyleri endotoksemide 32 ± 5 pg/g yaş doku iken, sham grubunda 11 ± 2 pg/g yaş doku ($p<0.05$) olarak bulunmuş, hipotermik grupta ise 16 ± 1 pg/g yaş doku ($p<0.05$) olarak azalmıştır. Aynı gruplarda kalp kası miyeloperoksidaz aktivitesi endotoksemide 70 kat artarak sham grubunda 0.02 ± 0.0004 U/g yaş doku’dan endotoksemide 1.43 ± 0.24 U/g yaş doku’ya yükselmiştir ($p<0.003$). Hipotermide ise 0.15 ± 0.11 U/g yaş doku olarak sham grubundan farklı ($p>0.05$) bulunmamıştır.

Literatürde kas dokusu ve nitrotirozin düzeyleri çalışmaları yukarıda bahsedilen çalışmalarla sınırlıdır. DHEA-S ve kas dokusu ile yapılmış bir araştırma olarak da çalışmamız bir ilk olma niteliğindedir.

Bu çalışmamızda DHEA-S’nin antioksidatif etkisini, uzun süre yüksek yağ içeren diyetle beslenen sıçanların bacak kas dokularında gerek nitrotirozin miktarını azaltarak ve gerekse miyeloperoksidaz aktivitesini düşürerek gösterdiğini belirledik (Tablo 1). DHEA-S’nin antioksidatif etkisini kas dışı dokularda gösteren ve dolayısı ile bizim bulgularımızı destekleyen yayınlar literatürde mevcuttur (33,41). Bunların arasında bizce en önemli çalışma DHEA-S’nin immunostimülasyon yapılmış sıçan C6 glioma hücre kültürü ile Shin ve ark. (44)’lerinin çalışmasıdır. Shin ve ark. 5 saatlik glukoz yokluğunda glioma hücrelerinin öldüğünü ancak 12 saat önceki DHEA tedavisinin immunostimülasyon ile oluşan ölümü engellediği, ancak glukoz yokluğunda oluşan ölümü engelleyemediğini göstermişlerdir. Araştırmacılar DHEA-S’nin etkisinin immunohistokimyasal boyama yolu ile peroksinitrit belirteci olarak artmış nitrotirozin immunoreaktivitesinde bir azalma yolu olduğunu, ancak DHEA’nın glukoz yokluğu durumundaki immunostimule edilmiş C6 glioma hücrelerindeki ekzojen oluşan peroksinitritten koruyamadığını belirtmişlerdir. Yine DHEA’nın total reaktif oksijen metabolitlerini ve nitrik oksit oluşumunu engelleyemediğini göstermişlerdir.

Sonuç olarak; DHEA-S’nin yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanların kas dokusunda, oksidan durum belirteçlerinden nitrotirozin miktarını ve miyeloperoksidaz aktivitesini azaltarak olumlu etki yaptığını, ancak kas

dokusunda çinko ve bakır düzeylerini etkilemediğini söyleyebiliriz. DHEA-S'nin kas metabolizması üzerindeki bu yararlı antioksidan etkiyi gösterme mekanizmalarının açıklığa kavuşturulabilmesi için de daha detaylı ve ileri araştırmaların yapılması gerektiği kanaatindeyiz.

Kaynaklar

- [1] World Health Organization. (2000) Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Technical Report 894, Geneva: WHO.
- [2] Genazzani AD, Lanzoni C, Genazzani AR. (2007) Might DHEA be Considered a Beneficial Replacement Therapy in the Elderly? *Drugs Aging*. 24 (3): 173-85.
- [3] van der Vliet A, Eiserich JP, Cross CE. (2000) Nitric oxide: a proinflammatory mediator in lung disease? *Respir Res*. 1 (2): 67-72.
- [4] Sittipunt C, Steinberg KP, Ruzinski JT, Myles C, Zhu S, Goodman RB, Hudson LD, Matalon S, Martin TR. (2001) Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 163 (2): 503-10.
- [5] Chang L-Y, Crapo JD. (2002) Inhibition of airway inflammation and hyper-reactivity by an antioxidant mimetic. *Free Radic Biol Med*. 33 (3): 379-86.
- [6] Winterbourn CC. (2002) Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology*. 181-182; 223-7.
- [7] Panasencko OM, Spalteholz H, Schiller J, Arnhold J. (2003) Myeloperoxidase-induced formation of chlorohydrins and lysophospholipids from unsaturated phosphatidylcholines. *Free Radical Biology and Medicine*. 34 (5): 553-62.
- [8] Kostyuk VA, Kraemer T, Sies H, Schewe T. (2003) Myeloperoxidase/nitrite-mediated lipid peroxidation of low-density lipoprotein as modulated by flavanoids. *FEBS Letters*. 537 (1-3): 146-50.
- [9] Carr AC, McCall MR, Frei B. (2000) Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20 (7): 1716-23.
- [10] Belgemen T, Akar N. (2004) Çinkonun yaşamsal fonksiyonları ve çinko metabolizması ile ilişkili genler, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 57 (3): 161-6.
- [11] Rostan EF, DeBuys HV, Madey DL, Pinnel SR. (2002) Evidence supporting zinc as an important antioxidant for skin. *Int J Dermatol*. 41 (9): 606-11.
- [12] Demir S. Eser Elementler. In: Aslan D (Çeviri Editörü). (2005) Klinik Kimyada Temel İlkeler, (Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry'nin 5. Baskı Çevirisi), Ankara, Palme Yayıncılık, 568-83.
- [13] İşbilen B, Arı Z, Var A, Onur E, Uyanık BS. (2007) Yüksek Yağ İçeren Diyet İle Beslenen Ratlarda DHEAS'ın Leptin, Lipid Profili ve Endotel Fonksiyonu Üzerine Etkileri: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Dergisi. 21 (3): 109-16.
- [14] X Zhou, J De Schepper, D De Craemer, M Delhase, G Gys, J Smitz and E L Hooghe-Peters. (1998) Pituitary growth hormone release and gene expression in cafeteria-diet-induced obese rats. *Journal of Endocrinology*. 159: 165-72.
- [15] Süzek H. (1999) Dehydroepiandrosterone-Sülfat (DHEA-S)'ın Erkek Sıçanlarda (*Rattus norvegicus albinus*) Serum Lipid, Lipoprotein (a) ve HDL Subfraksiyonlarına Etkisi (Doktora Tezi). Van:100. Yıl Üniversitesi.
- [16] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*. 193 (1): 265-75.
- [17] Shi, Han Ping; Deitch, Edwin A.; Xu, Da Zhong; Lu, Qi; Hauser, Carl J. (2002) Hypertonic Saline Improves Intestinal Mucosa Barrier Function and Lung Injury After Trauma-Hemorrhagic Shock Shock: Volume 17 (6): 496-501.
- [18] Özata M. (2003) Obezite tanı ve tedavisi. Ankara:GATA Basımevi.
- [19] American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology (AAACE/ACE) (1998) Obesity Task Force. Position statement on the prevention, diagnosis and treatment of obesity. *Endocrine Practice*. 4: 297-329.
- [20] Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, Stevens J, VanItallie TB. (1999) Annual deaths attributable to obesity in the United States. *JAMA*. 282 (16): 1530-8.
- [21] Dyck DJ. (2000) Dietary fat intake, supplements and weight loss. *Can J Appl Physiol*. 25 (6): 495-523.
- [22] Kamara K, Eskay R, Castonguay T. (1998) High-Fat Diets and Stress Responsivity. *Physiol Behav*. 64 (1): 1-6.
- [23] Cattaneo L, De Gennaro Colonna V, Zoli M, Muller EE, Cocchi D. (1997) Hypothalamo-pituitary-IGF-I axis in female rats made obese by overfeeding. *Life Sci*. 61 (9): 881-9.
- [24] Cha MC, Chou CJ, Boozer CN. (2000) High-fat diet feeding reduces the diurnal variation of plasma leptin concentration in rats. *Metabolism*. 49 (4): 503-7.
- [25] Gao J, Ghibaudi L, van Heek M, Hwa JJ. (2002) Characterization of diet-induced obese rats that develop persistent obesity after 6 months of high-fat followed by 1 month of low-fat diet. *Brain Research*. 936 (1-2): 87-90.
- [26] Sefčíková Z, Hájek T, Lenhardt L, Raček L, Mozes S. (2007) Different functional responsibility of the small intestine to high-fat/high-energy diet determined the expression of obesity-prone and obesity-resistant phenotypes in rats. *Physiol Res*. May 30 (Epub ahead of print).
- [27] Sabaktarashvili MA, Bregvadze LP, Pkhaladze LK, Gulbani TG. (2005) Adrenal hyperandrogenia and lipid metabolism, *Georgian Med News*. 120: 33-6.
- [28] Nawata H, Yanase T, Goto K, Okabe T, Ashida K. (2002) Mechanism of action of anti-aging DHEA-S and the replacement of DHEA-S. *Mech Ageing Dev*. 123 (8): 1101-6.
- [29] Yen TT, Allan JA, Pearson DV, Acton JM, Greenberg MM. (1977) Prevention of obesity in Avo/a mice by dehydroepiandrosterone. *Lipids*. 12 (5): 409-13.
- [30] Svec F, Abadie J, Browne ES, Porter JR. (1995) Dehydroepiandrosterone and macronutrient selection by obese Zucker rats (fa/fa). *Appetite*. 25 (2): 143-54.
- [31] Mauriege P, Martel C, Langin D, Lacaille M, Despres JP, Belanger A, Labrie F, Deshaies Y. (2003) Chronic effects of dehydroepiandrosterone on rat adipose tissue metabolism. *Metabolism*, 52 (3): 264-72.
- [32] Chiu KM, Schmidt MJ, Shug AL, Binkley N, Gravenstein S. (1997) Effect of dehydroepiandrosterone sulfate on carnitine acetyl transferase activity and L-carnitine levels in oophorectomized rats. *Biochim Biophys Acta*. 1344 (3): 201-9.
- [33] Pelissier MA, Trap C, Malewiak MI, Morfin R. (2004) Antioxidant effects of dehydroepiandrosterone and 7alpha-hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat colon, intestine and liver. *Steroids*. 69 (2): 137-44.
- [34] Tamagno E, Aragno M, Boccuzzi G, Gallo M, Parola S, Fubini B, Poli G, Danni O. (1998) Oxygen free radical scavenger properties of dehydroepiandrosterone. *Cell Biochem Funct*. 16 (1): 57-63.
- [35] Kalimi M, Shafagoj Y, Loria R, Padgett D, Regelson W. (1994) Anti-glucocorticoid effects of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Mol Cell Biochem*. 131 (2): 99-104.

- [36] Li Z, Zhou R, Cui S, Xie G, Cai W, Sokabe M, Chen L. (2006) Dehydroepiandrosterone sulfate prevents ischemia-induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 by up-regulating tyrosine phosphorylation of NMDA receptor. *Neuropharmacology*. 51 (5): 958-66.
- [37] Nawata H, Yanase T, Goto K, Okabe T, Ashida K. (2002) Mechanism of action of anti-aging DHEA-S and the replacement of DHEA-S. *Mech Ageing Dev*. 123 (8): 1101-6.
- [38] Lancaster JR. (1996) *Nitric Oxide: Principles and Actions*. Academic Press, Inc.
- [39] Pereira IR, Bertolami MC, Faludi AA, Campos MF, Ferderbar S, Lima ES, Aldrighi JM, Abdalla DS. (2003) Lipid peroxidation and nitric oxide inactivation in postmenopausal women. *Arq Bras Cardiol*. 80 (4): 406-23.
- [40] Çörtekeoğlu AT, Köksal C, Ercan M, Bozkurt AK, Beşirli K, Tüzün H, Sayın AG. (2003) Abdominal aort anevrizma etiyolojisinde eser elementlerinin rolü. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi*. 11 (3): 185-7.
- [41] Dong F, Zhang X, Culver B, Chew HG, Kelley RO, Ren J. (2005) Dietary iron deficiency induces ventricular dilation, mitochondrial ultrastructural aberrations and cytochrome c release: involvement of nitric oxide synthase and protein tyrosine nitration. *Clin Sci (Lond)*. 109 (3): 277-86.
- [42] Kayali R, Cakatay U, Telci A, Akcay T, Sivas A, Altug T. (2004) Decrease in mitochondrial oxidative protein damage parameters in the streptozotocin-diabetic rat. *Diyabetes Metab Res Rev*. 20 (4): 315-21.
- [43] Scumpia PO, Sarcia PJ, Kelly KM, DeMarco VG, (2004) Skimming JW. Hypothermia induces anti-inflammatory cytokines and inhibits nitric oxide and myeloperoxidase-mediated damage in the hearts of endotoxemic rats. *Chest*. 125 (4): 1483-91.
- [44] Shin CY, Choi JW, Jang ES, Ju C, Kim WK, Kim HC, Choi CR, Ko KH. (2001) Dehydroepiandrosterone inhibits the death of immunostimulated rat C6 glioma cells deprived of glucose. *Brain Res*. 922 (2): 267-75.