

Alfa lipoik asidin rat karaciğer homojenatlarında hidrojen peroksit ile indüklenmiş lipid peroksidasyonuna etkisi

[The effect of alpha lipoic acid on hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation in rat liver homogenates]

Süleyman Bedir Yapar,
Sevgi Eskiocak

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi
Biyokimya Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Dr. Sevgi Eskiocak

Adres: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye
Telefon: +90 284 236 09 09
E-posta: drsekiocak@hotmail.com

Kayıt Tarihi: 06 Temmuz 2013; Kabul Tarihi: 19 Nisan 2014
[Registered: 06 July 2013; Accepted: 19 April 2014]

ÖZET

Amaç: 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.

Metod: Rat karaciğer homojenatlarında 15 mM hidrojen peroksit kullanılarak lipid peroksidasyonu induksiyonu yapıldı. Lipid peroksidasyonu indüklenen deney düzenekleri 4 alt gruba ayrıldı ve bu gruplara sırasıyla 0, 2, 4 ve 8 mM alfa lipoik asit eklendi. Doku glutatyon düzeyleri ve lipid peroksidasyon son ürünü olan malondialdehid düzeyleri incelendi.

Bulgular: Aktivasyon grubundaki malondialdehid düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu. Tüm Alfa lipoik asit gruplarındaki malondialdehid düzeyleri aktivasyon grubunun düzeyine göre anlamlı düşük bulundu. Aktivasyon grubunun glutatyon düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulundu. Alfa lipoik asit gruplarındaki glutatyon düzeyleri aktivasyon grubundaki düzeye 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: Sonuç olarak bulgularımız, sadece hidrojen peroksit uygulanan aktivasyon grubunda lipid peroksidasyonunun uyarıldığını göstermektedir. Alfa lipoik asit uygulanan gruplardaki malondialdehid düzeylerinin aktivasyon gruplarındaki düzeylere göre anlamlı düşük, glutatyon düzeylerinin ise anlamlı yüksek olmasının nedeninin, alfa lipoik asit'in antioksidan özelliklerinden kaynaklandığını söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Alfa lipoik asit, malondialdehid, glutatyon, hidrojen peroksit.

Çıkar Çatışması: Yazarların çıkar çatışması yoktur.

ABSTRACT

Objective: 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.

Methods: Hydrogen peroxide (15 mM) has been used for induction of lipid peroxidation at liver homogenates. 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.

Results: The level of malondialdehyde in the activation groups has been found to be significantly higher than to the control group. The levels of malondialdehyde in the all alpha lipoic acid groups have been found to be significantly lower than the activation group. The level of glutathione in the activation group has been detected significantly lower when it was compared to the control group. The levels of glutathione in the all alpha lipoic acid groups have been found to be significantly higher from the activation group. When the time-dependent change in the level of glutathione was investigated it was observed that these initially decrease and then started to increase. In the groups of 4 and 8 mM, this level was even over from the starting point.

Conclusion: In conclusion, our findings suggest that lipid peroxidation is induced in the experimental setups where hydrogen peroxide 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.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Giriş

Serbest oksijen radikalleri (SOR) fizyolojik sistemlerde hücrel metabolizma sonucu üretilirler. Oksidatif atakla SOR artar. SOR'nin zararlı etkilerinin yanında yararlı etkileri de vardır. Bakteri, virüs ve kanser hücrelerinin öldürülmesine katkıda bulunurlar. Bununla birlikte, organizmanın normal hücrelerini de etkileyerek hücre hasarına, ölümüne ve kanser hücrelerinin açığa çıkmasına neden olabilmektedirler [1].

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. Alfa lipoik asit (α -LA) bitki ve hayvan dokularında yaygın bulunan, tiyol grubu içeren bir bileşiktir. Ditiyolan halkası sayesinde yüksek bir indirgeme özelliğine sahiptir. α -LA lipid ve sulu ortamda çözünür; bağırsaklardan kolaylıkla emilir; hücrelerde dihidrolipoik aside (DHLLA) indirgenir. Diyetle yeterli miktarda bulunmasına rağmen, mitokondride bulunan lipoik asit sentaz tarafından sentezlenebilmektedir [2]. α -LA'nın en iyi bilinen fizyolojik rolü oksidatif dekarboksilasyon reaksiyonlarını katalizleyen multienzim komplekslerindeki kofaktör işlevidir. Bununla beraber son yıllarda antioksidan etkisi konusunda çalışmalar artmaktadır. α -LA ekzojen verildiğinde serbest metal şelasyonu, askorbik asit, vitamin E ve glutatyonun (GSH) rejenerasyonu, radikal temizleyici gibi antioksidan etkinliklere sahiptir [3]. DHLLA'nın antioksidan etkinliği, α -LA'den daha fazladır [4]. α -LA'nın iki tane izomerik konfigürasyonu vardır. Bunlardan R formu doğal iken S formu sentetiktir [3]. Hem redükte DHLLA hem de okside α -LA formları hipokloröz asidi (HOCl), hidroksil radikalini (\bullet OH), ve singlet oksijeni ($^1\text{O}_2$) doğrudan temizler, hidrojen peroksiti (H_2O_2) ise redükler. α -LA ve DHLLA gıdalarda bulundukları ve endojen sentez edildikleri için ideal bir terapötik antioksidan ajan olarak değerlendirilebilir [2].

Lipid peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin zincirleme bir radikal reaksiyonudur ve başlama, ilerleme, sonlanma olmak üzere üç aşamadan oluşur. \bullet OH, alkoksil, peroksil radikalleri ve $^1\text{O}_2$ molekülü lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonlarını başlatabilir. Oluşan lipid peroksil radikalleri hücre membranındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek, yeni lipid radikallerinin oluşumunu sağlamakta ve reaksiyon oto-katalitik olarak ilerlemektedir [5,6]. Lipid peroksidasyonu, LOOH'nın malondialdehid (MDA) gibi aldehid ve diğer karbonil yapıları bileşiklere dönüşmesi ile sonlanmaktadır.

Lee ve ark. [7] H_2O_2 ile lipid peroksidasyonunu uyarak *in vitro* α -LA uygulamasının lipid peroksidasyonunu 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 α -LA'nın lipid peroksidasyonunu engelleme mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır.

Çalışmamızda, α -LA'nın farklı dozlarının *in vitro* kulla-

Tablo 1. Doku çalışma grupları ve deney düzeneği

Gruplar	Lipoik asit	Sodyum bikarbonat	İndüksiyon
Aktivasyon	-	1 M	15 mM H_2O_2
2 mM	2 mM	-	15 mM H_2O_2
4 mM	4 mM	-	15 mM H_2O_2
8 mM	8 mM	-	15 mM H_2O_2
Kontrol	-	1 M	-

nımının, rat karaciğer homojenatlarında H_2O_2 ile indüklenmiş lipid peroksidasyonu ve doku GSH düzeyine etkilerini araştırmak amaçlanmıştır. Ayrıca α -LA'nın lipid peroksidasyonunu hangi aşamada etkilediğine ve etki mekanizmasına açıklık getirmek amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma; Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul onayı alınarak Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi. Ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen 8-10 haftalık 10 adet dişi Sprague-Dawley rat çalışmaya alındı. Bazal diyet ile beslenen, 22 ± 2 °C oda sıcaklığı, %60 nem oranı, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ritimde tutulan 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 GSH ölçümleri için analiz gününe kadar -70 °C'de saklandılar. Analizler 1 ay içinde gerçekleştirildi.

Doku örneklerinin hazırlanması

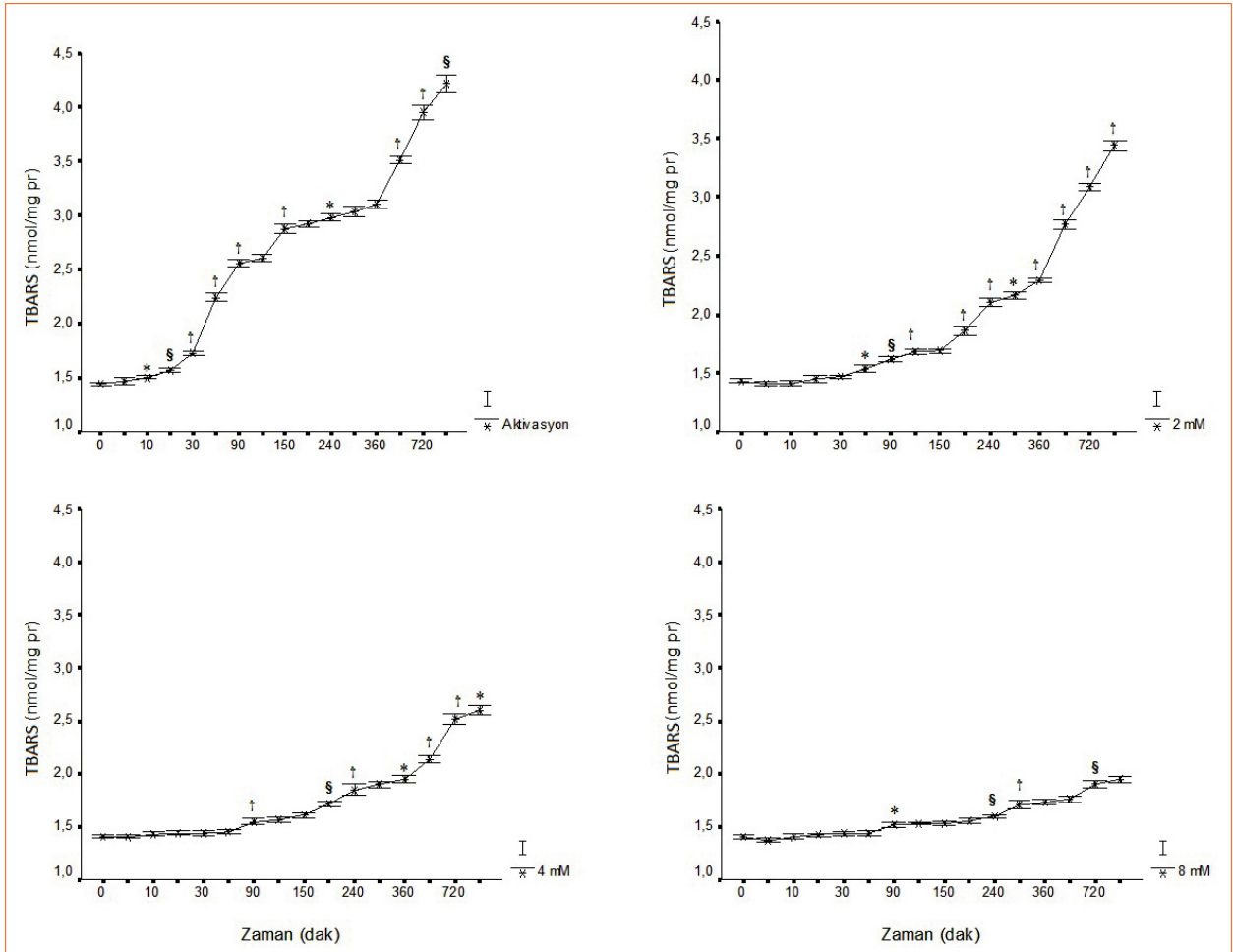
Ratlardan elde edilen karaciğer dokuları 1/10 oranında 0.1 M, pH 7.4 fosfat tamponu ile homojenize edilerek homojenat havuzu hazırlandı. Homojenatlar 1700xg'de santrifüj edildikten sonra süpernatantlar deney için kullanıldı.

Doku çalışma grupları

Tablo 1'de doku çalışma grupları ve deney düzeneği görülmektedir. Hazırlanan süpernatantlar aktivasyon, 2 mM α -LA, 4 mM α -LA 8 mM α -LA ve kontrol olmak üzere 5 alt gruba ayrıldı. α -LA (Sigma Aldrich GmbH, Seelze-Almanya) 1 M sodyum bikarbonat (NaHCO_3) içinde çözül-
dü, α -LA gruplarına her biri eş hacimde olmak üzere sırasıyla 2, 4 ve 8 mM α -LA eklendi. Aktivasyon grubuna ise eş hacimde 1 M NaHCO_3 eklendi. Aktivasyon ve α -LA gruplarına 15 mM H_2O_2 eklenerek lipid peroksidasyon indüksiyonu yapıldı. Deney süresince oluşan otooksidasyonu değerlendirmek üzere oluşturulan kontrol grubuna ise sadece 1 M NaHCO_3 eklendi. Her çalışma grubunda, belirlenen 16 farklı inkübasyon zamanının her biri için 10 örnek olmak üzere toplam 160 tüp hazırlandı. Hazırlanan tüm tüpler 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

Biyokimyasal ölçümler

Lipid peroksidasyonu indüklenmeden önce (0. dakika) ve



Şekil 1. Hidrojen peroksitle uyarılan oksidan stres durumunda ve çeşitli yoğunluklarda α -LA kullanımının zamana bağlı olarak TBARS oluşumuna etkisi. (Karşılaştırmalar bir önceki ölçüme göre Wilcoxon İki Örnek testi kullanılarak yapılmıştır * $p<0.05$, § $p<0.01$ ve † $p<0.001$).

indüklendikten sonra belirlenen zamanlarda (5., 10., 15., 30., 60., 90., 120., 150., 180., 240., 300., 360., 540., 720. ve 1440. dakikalar) her grup için hazırlanan 10'ar örnek inkübasyondan alındı ve bu örneklerde MDA'nın tiyobarbitürik asitle verdiği reaksiyon (TBARS), GSH ve protein analizleri sırasıyla Ohkawa ve ark [8], Beutler ve ark [9] Lowry ve ark [10] tanımladıkları yöntemlere göre yapıldı. Bulunan değerler dokuda protein miktarı ile oranlanarak nmol/mg protein olarak ifade edildi.

İstatistiksel değerlendirme

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 zamana göre değişimlerini değerlendirmek için Friedman Varyans Analizi testi ve arkasından anlamlı bulunan parametrelere Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi uygu-

landı. 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.

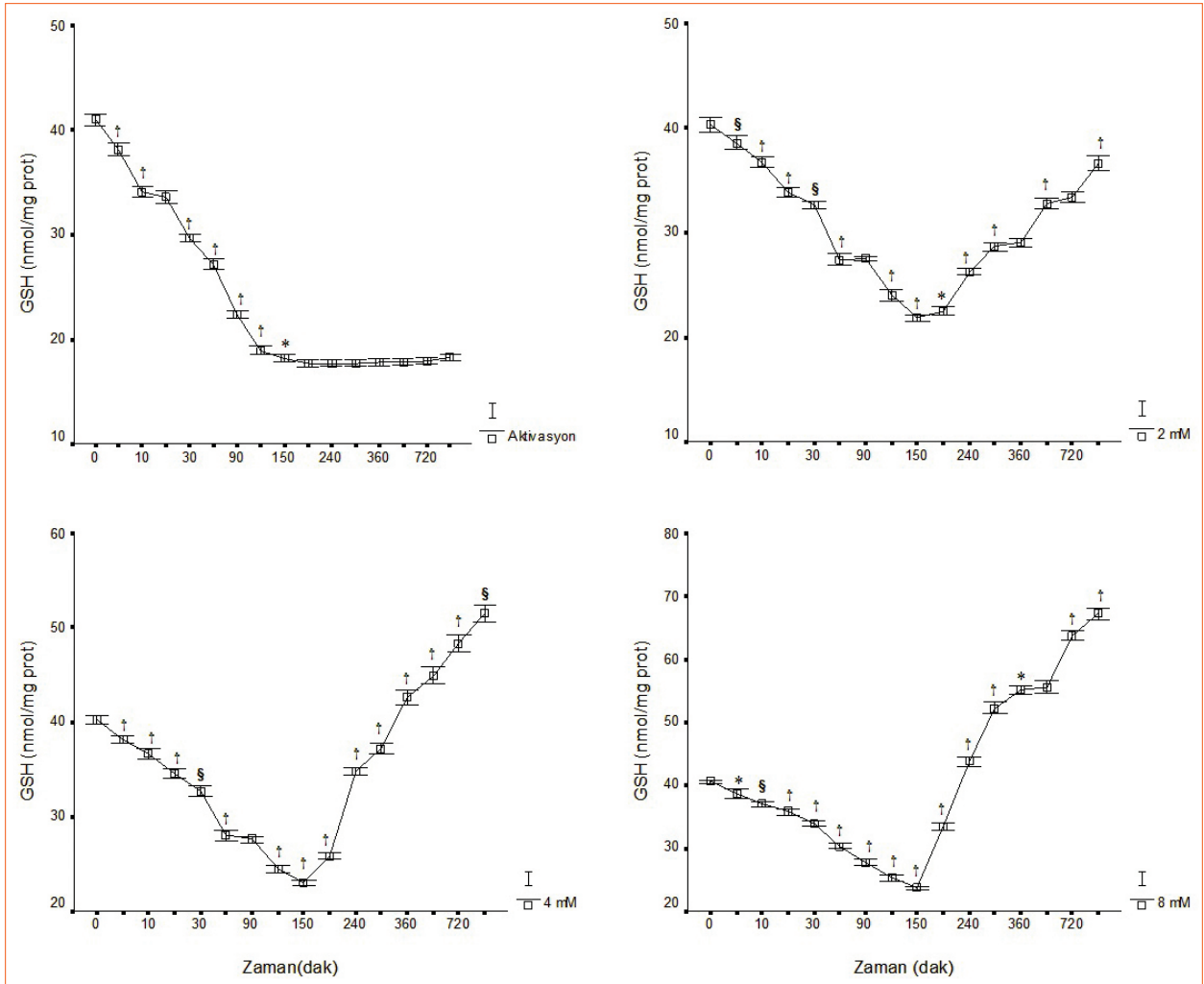
Bulgular

Tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddeler (TBARS) düzeyinde zamana göre değişimin incelenmesi

H_2O_2 ile oksidan stres uyarılmış deney düzeneğinde α -LA kullanımının TBARS düzeylerine zamana bağlı etkisi Şekil 1'de görülmektedir.

Aktivasyon grubunda TBARS düzeylerinin 10. dakikadan itibaren anlamlı olarak artmaya başladığı, 90-120., 150-180. ve 240-360. dakikalar arasında yükselişin durakladığı ve sonra 1440. dakikaya dek artışın devam ettiği gözlemlendi. Duraklamaların olduğu zamanlar haricinde diğer ölçümlerin her biri kendinden önceki değerden anlamlı olarak yükseldi (10 ve 240. dakikalarda $p<0.05$, 15 ve 1440. dakikalarda $p<0.01$, diğer dakikalarda $p<0.001$).

2 mM α -LA grubunda TBARS düzeylerinin 60. dakikadan itibaren anlamlı olarak artmaya başladığı, 120-150.



Şekil 2. Hidrojen peroksitle uyarılan oksidan stres durumunda ve çeşitli yoğunluklarda α -LA kullanımının zamana bağlı olarak GSH değişimine etkisi (Karşılaştırmalar bir önceki ölçüme göre Wilcoxon İki Örnek testi kullanılarak yapılmıştır *p<0.05, §p<0.01 ve †p<0.001).

dakikalar arasında yükselişin durakladığı ve sonra 1440. dakikaya kadar artışın devam ettiği gözlemlendi. İlk 60 dakika ve duraklamanın olduğu zaman aralığı haricinde diğer ölçümlerin her biri kendinden önceki zamanda ölçülen değerden anlamlı olarak yüksekti (60 ve 300. dakikalarda p<0.05, 90. dakikada p<0.01, diğer dakikalarda p<0.001). 4 mM α -LA grubunda; TBARS 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 α -LA grubunda; 90, 240, 300 ve 720. dakikalardaki TBARS 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; TBARS düzeylerinde 120, 180, 240, 300, 360. ve 720. dakikalarda anlamlı artışlar olduğu göz-

lemlendi (300 ve 720. dakikalarda p<0.05, diğer dakikalarda p<0.001) (Şekil 1).

Glutasyon düzeyinde zamana bağlı değişimin incelenmesi

H₂O₂ ile oksidan stres uyarılmış deney düzeneğinde α -LA kullanımının GSH düzeylerine zamana bağlı etkisi Şekil 2’de görülmektedir.

Aktivasyon grubunda; GSH düzeylerinin başlangıçtan itibaren 150. dakikaya kadar gittikçe azaldığı, 150. dakikadan sonra anlamlı bir değişikliğin olmadığı gözlemlendi. 150. dakikaya kadar tespit edilen GSH seviyelerinin her biri bir önceki ölçüm zamanından anlamlı derecede düşüktü (150.dakikada p<0.05, diğer tümü için p<0.001).

2 mM α -LA grubunda; GSH düzeylerinin başlangıçtan itibaren 150. dakikaya kadar gittikçe azaldığı, 150. dakikadan itibaren yükselişe geçtiği gözlemlendi. GSH 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, diğerler dakikalarda p<0.001). GSH düzeyinin giderek

Tablo 2. Hidrojen peroksit ile uyarılan oksidan strese alfa lipoik asid kullanımının glutatyon tüketim ve rejenerasyon hızlarına etkisi

Gruplar	GSH tüketim hızı (nmol.mg pr ⁻¹ .dak ⁻¹)	GSH rejenerasyon hızı (nmol.mg pr ⁻¹ .dak ⁻¹)
Aktivasyon	0.152±0.007	a*
2 mM	0.123±0.007	a*** b***
4 mM	0.115±0.005	a*** b*** c***
8 mM	0.113±0.006	a*** b*** c*** d***
Kontrol	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 α-LA grubu ile; d: 4 mM α-LA grubu ile; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

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 α-LA grubunda; GSH düzeylerinin başlangıçtan itibaren 150. dakikaya kadar gittikçe azaldığı, 150. dakikadan itibaren yükselişe geçtiği gözlemlendi. GSH 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 α-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 değerden anlamlı derecede düşüktü (5. dakikada p<0.05, 10. dakikada p<0.01, diğer dakikalarda p<0.001). GSH 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).

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) (Şekil 2).

Glutatyon tüketim ve rejenerasyon hızı

İlk 150 dakika içindeki GSH tüketim hızı α-LA kullanılan

gruplarda aktivasyon ve kontrol gruplarına göre anlamlı olarak daha yavaştı (hepsi için p<0.001). 8 mM α-LA grubundaki GSH tüketim hızı 2 mM grubundan anlamlı olarak daha yavaştı (p<0.05) 150. dakikadan sonra GSH rejenerasyon hızı ise α-LA kullanılan gruplarda aktivasyon ve kontrol gruplarına göre anlamlı olarak daha hızlıydı (hepsi için p<0.001). α-LA grupları birbiriyle karşılaştırıldığında α-LA dozu arttıkça GSH rejenerasyon hızının da arttığı görüldü (hepsi için p<0.001) (Tablo 2).

Tiyobarbiturik asit ile reaksiyona giren maddeler düzeyi açısından grupların karşılaştırılması

H₂O₂ ile oksidan stres uyarılmış deney düzeneğinde çeşitli dozlarda α-LA kullanımının TBARS düzeylerine etkisi Tablo 3’de görülmektedir.

Aktivasyon grubunda; 0 ve 5. dakikalardaki TBARS 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 α-LA grubunun 0. dakikadaki TBARS düzeyi aktivasyon grubundan farklı değildi. 5. dakikadaki (p<0.05) ve sonraki tüm ölçümlerdeki (hepsi için p<0.001) TBARS düzeyleri aktivasyon grubunkilerden düşüktü.

4 mM α-LA grubunun 0. dakikadaki TBARS düzeyi, aktivasyon gruplarından farklı değildi. 5. dakikadaki (p<0.05) ve sonraki tüm ölçümlerdeki (hepsi için p<0.001) TBARS seviyeleri aktivasyon grubunkilerden düşüktü. 2 mM α-LA grubu ile kıyaslandığında 60. dakikaya kadar fark olmadığı gözlemlendi. 60. dakikadan 1440. dakikaya dek yapılan tüm ölçümlerdeki TBARS seviyeleri anlamlı derecede düşüktü (60., 150. ve 180. dakikalarda p<0.01, 90. dakikada p<0.05, diğer tüm zamanlarda p<0.001).

8 mM α-LA grubunun 0. dakikadaki TBARS düzeyi aktivasyon, 2 ve 4 mM α-LA gruplarından farklı değildi. 5.

Tablo 3. Rat karaciğer homojenatlarında hidrojen peroksit ile uyarılan oksidan strese alfa lipoik asid kullanımının TBARS düzeylerine (nmol/mg protein) etkisi

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

[†]: Varyans Analizi (ANOVA) Tukey düzeltmesi ile; [§]: Mann-Whitney U testi ile karşılaştırmalar yapılmıştır; a: Kontrol ile; b: Aktivasyon grubu ile; c: 2 mM α-LA grubu ile; d: 4 mM α-LA grubu ile karşılaştırma sonucu; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Tablo 4. Rat karaciğer homojenatlarında hidrojen peroksit ile uyarılan oksidan strese alfa lipoik asid kullanımının glutatyon düzeylerine (nmol/mg protein) etkisi

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

[†]: Varyans Analizi (ANOVA) Tukey düzeltmesi ile; [§]: Mann-Whitney U testi ile karşılaştırmalar yapılmıştır; a: Kontrol ile; b: Aktivasyon grubu ile; c: 2 mM α-LA grubu ile; d: 4 mM α-LA grubu ile; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

dakikadan itibaren sonuna dek aktivasyon grubunun değerlerinden ileri derecede düşüktü (hepsi için $p<0.001$). Bu gruptaki TBARS 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.

TBARS değerleri α -LA uygulanan 2 mM grubunda 60. dakikaya, 4 mM grubunda 360. dakikaya 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 ($p<0.05$).

Gruplar arasında glutatyon (GSH) düzeyi açısından farklılıkların incelenmesi

H_2O_2 ile oksidan stres uyarılmış deney düzenekinde çeşitli dozlarda α -LA kullanımının GSH düzeylerine etkisi Tablo 4’de görülmektedir.

Aktivasyon grubunda başlangıçtan itibaren 1440. dakikaya kadar her bir zaman birimindeki GSH düzeyleri kontrol grubundakinden anlamlı derecede düşük bulundu (1440. dakikada $p<0.01$, diğer tümü için $p<0.001$).

2 mM α -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 yüksekti (hepsi için $p<0.001$). GSH 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.

4 mM α -LA grubunun 0, 5, 15 ve 60. dakikalardaki GSH düzeyleri aktivasyon ve 2 mM gruplarıninkilerden 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. GSH 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 α -LA grubunun GSH düzeyleri 10. dakikaya kadar aktivasyon grubundan, 15. dakikaya kadar ve 90. dakikada 2 mM α -LA grubundan, ilk 10 dakika, 90. ve 120. dakikalarda 4 mM α -LA grubundan farklı değildi. 8 mM α -LA grubunda bu dakikalar dışındaki tüm ölçümlerde GSH düzeyleri aktivasyon (hepsi için $p<0.001$), 2 mM (30. dakikada $p<0.01$, 120. dakikada $p<0.05$ ve diğer tümünde $p<0.001$) ve 4 mM (15. ve 30. dakikalarda $p<0.05$, diğer tümü için $p<0.001$) α -LA gruplarıninkinden yüksekti (hepsi için $p<0.05$). GSH düzeyleri, kontrol grubuna göre 15. dakikaya dek düşük, (hepsi için $p<0.001$), 30. ve 60 dakikalarda benzer, 90. dakikadan itibaren yüksek (90. dakikada $p<0.05$, diğer tümü için $p<0.001$) seyretti.

Korelasyon bulguları

α -LA dozu ile üretilen TBARS düzeyleri arasında 30. dakikadan itibaren negatif korelasyon vardı (30. dakikada

$p<0.01$, diğer dakikalarda $p<0.001$). GSH tüketim hızı, GSH azalmasının gözlemlendiği 30. dakika ile 150. dakikalar arasında TBARS 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 α -LA dozu ile negatif korelasyon ($r=-0.588$, $p<0.01$) gösterirken, GSH rejenerasyon hızı GSH’nin yükselmeye başladığı 150. dakikadan sonuna kadar, TBARS düzeyleri ile negatif korelasyon (hepsi için $p<0.001$) ve α -LA dozu ile pozitif korelasyon ($r=-0.947$, $p<0.001$) gösteriyordu.

Tartışma

SOR’nin membranda bol miktarda bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini etkilemesi ile lipid peroksidasyonu başlar ve tüm radikalik reaksiyonlar gibi bir zincir reaksiyonudur. Lipid peroksidasyonunun ilk basamakta konjuge dien, zincirin ilerleme safhasında LOOH ve sonlanma basamağında da TBARS gibi reaktif aldehydler açığa çıkmaktadır. Lipid peroksidasyonu, direkt hasarını membran yapısında değişikliklere sebep olarak, indirekt hasarını da reaktif aldehydler oluşumuna yol açarak göstermektedir. 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 [5,11,12,13]. Serbest radikallerin ve lipid peroksidlerin çeşitli hastalıkların oluşumunda rol oynadıkları kabul edilmektedir. Diabetes mellitus, ateroskleroz, romatoid artrit, kanser, ülseratif kolit ve karaciğer sirozu gibi hastalıkların patogenezinin sorumlu tutulmaktadır [11].

Literatürde *in vitro* çalışmalardan indüksiyon ortamı olarak homojenat kullananlarda 10 mM, 5 mM [14,15] hücre kültürü kullananlarda ise 3 mM, 500 μ M, 200 μ M H_2O_2 [16-18] konsantrasyonları ile oksidatif stresin indüklendiği görülmektedir. Homogenatlarda oksidatif stres indüklenmesi bile otooksidasyon oluşmaktadır [19]. Oksidatif stresin indüklendiğini söyleyebilmek için otooksidasyona bırakılan gruptan anlamlı olarak daha yüksek lipid peroksidasyon oluşturulması gerekmektedir. Biz kullandığımız 15 mM H_2O_2 konsantrasyonunda ancak inkübasyonun 10. dakikasından sonra lipid peroksidasyonunu indükleyebildik; denediğimiz daha düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında ise oluşan lipid peroksidasyonu uzun süre otooksidasyon grubundan farklı olmadı. Daha düşük H_2O_2 konsantrasyonları oksidatif stresi oluşturmada yetersiz kaldığı için çalışmada 15 mM H_2O_2 konsantrasyonu seçildi.

Erkek rat germ hücre kültürlerinde H_2O_2 ’nin TBARS 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 [20].

Rat karaciğer homojenatlarında *in vitro* uygulanan Fe^{+2} iyonların lipid peroksidasyonunu aktive ederek, TBARS

ve 4 hidroksialkinler (4-HA)'in düzeylerini artırdığı bulunmuştur [21]. Rat beyin homojenatlarında *in vitro* uygulanan H_2O_2 'nin de TBARS ve 4-HA düzeylerini artırdığı bildirilmiştir [14,22]. Kaptanoğlu ve ark. [23] tarafından yapılan bir çalışmada H_2O_2 ve ferröz iyonların merkezi sinir sisteminde hem tek başlarına hem de birlikte *in vitro* lipid peroksidasyonunu uyardığı bildirilmiştir. Rat hepatosit kültürlerinde H_2O_2 uygulamasının TBARS düzeylerini artırdığı bildirilmiştir [24]. Bununla beraber, Baeza-Squiban ve ark. [25] tarafından yapılan bir çalışmada tavşan trakea epitel hücre kültürlerinde H_2O_2 ve Fe^{+2} iyonları ayrı ayrı uygulandığında TBARS düzeylerinde anlamlı bir değişikliğin olmadığı, ancak her ikisi aynı zamanda uygulandığında TBARS düzeylerinde anlamlı artışa yol açtığı bulunmuştur.

Çalışmamızdaki kontrol grubunda lipid peroksidasyonu uyarılmadığı halde, TBARS düzeylerinde anlamlı yükselişlerin görülmesi deney süresinde lipidlerin otooksidasyona uğradığını göstermektedir. Bu bulgumuz Pothiwong ve arkadaşlarının [19] beyin homojenatları ile yaptıkları çalışma ile uyumludur.

Çalışmamızda aktivasyon grubunda TBARS düzeyleri kontrol gruplarına göre yüksek bulundu. Bu bulgumuz aktivasyon grubunda gözlenen lipid peroksidasyonunun otooksidasyona bağlı olmadığını rat karaciğer homojenatlarına uyguladığımız H_2O_2 'in lipid peroksidasyonunu uyardığını göstermektedir. Çalışmamızda aktivasyon grubunda elde edilen bulgular H_2O_2 'in lipid peroksidasyonuna yol açtığını işaret eden çalışmalarla uyumludur.

Çalışmamızda SOR üretici olarak kullandığımız 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 $\bullet OH$ radikaline dönüşümü ile olur. $\bullet OH$ 'nin yarı ömrü kısa olmasına rağmen reaktivitesi çok yüksektir. Üretildiği yerden daha uzağa difüzyonuna gerek kalmadan biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek toksik etki gösterir. H_2O_2 'in 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 $\bullet OH$ radikali üretimine katkıda bulunduklarını düşündürmektedir.

Çeşitli çalışmalarda SOR'nin oluşumunu engellemek veya oksidan/antioksidan dengelyi sağlamak için antioksidan molekül olarak nitelendirilen birçok farmakolojik madde kullanılmıştır [26,27]. Çalışmamızda antioksidan molekül olarak α -LA kullanılmıştır.

Lee ve ark. [7] tarafından yapılan bir çalışmada, gerbil beyin homojenatlarında *in vitro* H_2O_2 ve ferröz amonyum sülfat uygulanmasıyla lipid peroksidasyonu sağlanmış ve α -LA'in doza bağımlı olarak lipid peroksidasyonunu azalttığı bulunmuştur. Aynı çalışmada H_2O_2 ve ferröz

iyonların oksidasyon yapıcı etkilerinden dolayı biyolojik hasara yol açtıkları bildirilmiştir.

Hagen ve ark. [28] diyetle α -LA uygulamasının ratların karaciğerinde yaşlanmaya bağılı olarak artan TBARS düzeylerinde azalmaya yol açtığını bildirmişlerdir. Serebrovasküler bölgeye streptozotosin enjekte edilmiş ratlarda diyetle verilen α -LA'in, merkezi sinir sistemindeki oksidatif hasarı ve TBARS düzeylerini azalttığı bulunmuştur [29]. Kadmiyum toksisitesi oluşturulan çalışmada GSH ve α -LA uygulamasının böbrek dokusunda lipid peroksidasyon oluşumunu önlediği bulunmuştur [30] Lipopolisakkarit ile akut akciğer hasarı oluşturmada önce veya sonrasında α -LA kullanımının, hasarın yol açtığı inflamatuvar yanıt belirteçlerinde ve histolojik değişimde azalmayı sağladığı bildirilmiştir [31]. Çiçek ve ark [32] diyabetik olgularda anjiyografik tetkiklerde kullanılan kontrast maddenin yol açtığı nefropatiyi önlemek açısından α -LA kullanımının etkili olmadığını bildirmişlerdir. H_2O_2 ile oluşturulan katarakt modelinde 0.5 mM α -LA uygulamasının lipid peroksidasyonunu engelleyemediğini 1 mM α -LA ise lipid peroksidasyonunu azalttığı bildirilmiştir [33].

Çalışmamızda H_2O_2 ile indüklenen lipid peroksidasyonunda α -LA uygulamasının tüm dozlarında TBARS oluşumunun azaldığını gözledik. En düşük doz olan 2 mM α -LA uygulamasında bile TBARS düzeylerinin aktivasyon gruplarındaki düzeylere göre düşük olması, α -LA'nın lipid peroksidasyonunu engellediğine işaret etmektedir. α -Lipoik asidin dozu arttıkça lipid peroksidasyonunu engelleme etkisinin artması ve α -LA dozu ile TBARS düzeyi arasında 30. dakikadan deneylerin sonuna dek negatif korelasyon bulunması bu etkinin doza bağımlı olduğunu düşündürmektedir.

Aktivasyon grubunda 10. dakikada lipid peroksidasyonu başlarken; lipid peroksidasyonu başlama zamanını 2 mM α -LA uygulamasının 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 TBARS düzeyinin aktivasyon grubundan düşük seyretmesi ve α -LA dozu arttıkça baskılanmanın daha da bariz olması α -LA'nın lipid peroksidasyonun ilerleme safhasında da etkili bir antioksidan olduğunu düşündürmektedir.

α -LA fizyolojik sistemlerde bulunan, tiyol grubu içeren ve antioksidan aktiviteleri olan önemli bir moleküldür. Bu nedenle ideal terapötik antioksidan olduğu düşünülmektedir [4]. α -LA'in kimyasal reaktivitesini sağlayan ditiyol halkası, moleküle yüksek bir indirgeme özelliği kazandırmakta ve α -LA'yı GSH, sistein gibi diğer tiyol içeren biyomoleküller arasında özgün kılmaktadır [34].

GSH bütün dokularda bulunmasına rağmen karaciğerde oldukça aktif bir şekilde sentezlenmektedir. Hücrelerde -SH grubu içeren ana moleküldür. SOR ve yabancı maddelerin enzimatik detoksifikasyonunda kofaktör olarak görev alabilir. [35].

Çalışmamızda; kontrol grubunda gözlenen GSH azalması lipidlerin veya GSH'ın otooksidasyonuna bağlı olabilir. Bununla beraber, H₂O₂ uygulanan aktivasyon grubunda GSH düzeylerinin kontrol gruplarına göre düşük olması ve GSH tüketim hızının fazla olması GSH'ın oksidan stresin uyarımına bağlı olarak tüketildiğini düşündürmektedir. α -LA'nın *in vitro* uygulandığı gruplarda ise aktivasyon grubuna göre GSH düzeyleri yüksek seyretmiştir. Bu sonuç α -LA'nın lipid peroksidasyonunun sebep olduğu GSH tüketimi azalttığını düşündürmektedir. α -Lipoik asidin bu etkisi α -LA'nın tiyol grubu içermesinden kaynaklanıyor olabilir. Uygulanan α -LA'nın dozu arttıkça GSH düzeyi artarken, tüketim hızının azalması bu görüşü desteklemektedir. H₂O₂ ile oluşturulan oksidan strese GSH tüketim hızının, TBARS düzeyleri ile pozitif korelasyonda ve α -LA dozu ile de negatif korelasyonda olması da bu bulgumuzu desteklemektedir.

Aktivasyon ve kontrol gruplarında GSH tükendikten sonra deney sonuna kadar hep aynı düzeyde kalırken, tüm α -LA gruplarında 150. dakikadan itibaren, GSH düzeylerinin yükselişe geçmesi α -LA'nın sadece GSH'ın tüketilmesini azaltmadığını aynı zamanda rejenerasyonunu da artırdığını düşündürmektedir. GSH'un rejenerasyon hızının da doza bağımlı olduğu görülmektedir. Metal şelasyonu, radikal toplayıcı etkilerinin yanı sıra lipid peroksidasyonunun ilerleme safhasında α -LA'nın güçlü baskılayıcı etkiye sahip olmasında GSH rejenerasyonunu sağlamasının önemli rolü olabileceğini düşünmekteyiz. GSH rejenerasyon hızının TBARS düzeyleri ile negatif korelasyonda olması bu düşüncüyü desteklemektedir. α -LA'nın kimyasal reaktivitesi temel olarak ditiyolan halkasından kaynaklanmaktadır. α -LA'nın okside ve redükte formu güçlü bir redoks çifti (-320 mV) oluşturmaktadır. LA/DHLA redoks çiftinin diğer tiyol-disülfid çiftleri üzerinde etkili olduğu bildirilmektedir [36,37]. Suh ve ark [38] yaşlanmaya bağlı olarak beyin ve miyokardiyal doku GSH ve redoks durumunda görülen azalmanın α -LA uygulaması ile önlenemediğini tespit etmişlerdir. Yılan balıklarının solungaç hücrelerinde *in vitro* demir oksit ile uyarılan oksidatif strese 72. saatte glutatyon reduktaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon sulfotransferaz enzimlerinin aktivitesinin başlangıç değerlerine göre yükseldiği bildirilmiştir [39]. Rat serebral korteksinde *in vitro* piprekolik asit ile oluşturulan oksidatif strese glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz enzim aktiviteilerinin azaldığı, lipoik asit varlığında ise bu azalmanın önlenildiği bildirilmiştir [40]. *In vivo* çalışmalarda lipoik asidin tiyol/disülfid reaksiyonlarını modüle ettiği, glutatyon sentezini artırdığı, glutatyon sentaz ve γ -glutamilsistein sentetaz enzimlerinin indüklenmesine yol açtığı bildirilmiştir [41,42]. Çalışmamızda saptadığımız GSH rejenerasyonu bulgusu; α -LA'nın sahip olduğu ditiyolan halkasının indirgeme özelliği ile okside GSH'ların indirgenmesini sağlaması veya okside GSH'ı indirgeyen glutatyon reduktaz ve/veya GSH sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan γ -glutamilsistein sentetaz aktivitesini artırması nedeniyle ortaya çıkmış olabilir. Bu

mekanizmalardan hangisinin etkili olduğunu tespit etmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, bulgularımız H₂O₂ uygulanan deney düzeneğinde lipid peroksidasyonunun uyarıldığını göstermektedir. α -LA uygulanan gruplardaki TBARS düzeylerinin, aktivasyon gruplarındaki düzeylere göre anlamlı düşük olmasının nedeni, α -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/veya GSH rejenerasyonunu sağlayarak yapmış olabileceğini söyleyebiliriz. Lipoik asidin *in vitro* ortamda doku homojenatında enzim aktivitesi üzerine etkisinin daha ileri çalışmalarla incelenmesine gerek vardır.

Bilgi ve Teşekkür

Çalışma için Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulunun 13.05.2004 karar tarihi ile etik izin alınmıştır. Bu çalışma Trakya Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (TÜBAP-675).

Tarafsızlık Beyanı

Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

Kaynaklar

- [1] Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006; 141(2):312-22.
- [2] Yakir MB, Katzhendler Y, Sasson S. The Search for Potent Alpha-Lipoic Acid Derivatives: Chemical and Pharmacological Aspects. In (Eds Patel MS, Packer L) *Lipoic Acid: Energy Production, Antioxidant Activity and Health Effects*. 2008;pp. 57-84, CRC Press, New York.
- [3] 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.
- [4] Kakatay U. Pro-oxidant actions of alpha-lipoic acid and dihydro-lipoic acid. *Med Hypotheses* 2006; 66(1):110-7.
- [5] Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*. 2007; 55-79, Oxford University Press Inc, New York.
- [6] Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging* 2007; 2(2):219-36.
- [7] 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.
- [8] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2):351-8.
- [9] Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61:882-8.
- [10] Lowry OH, Rosenburgh NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1):265-75.
- [11] Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57(5 Suppl):715-725.
- [12] Cutler RG, Plummer J, Chowdhury K, Heward C. Oxidative stress

- profiling: part II. Theory, technology, and practice. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1055:136-58.
- [13] Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005; 15(4):316-28.
 - [14] Ortega-Gutiérrez S, García JJ, Martínez-Ballarín E, Reiter RJ, Millán-Plano S, 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.
 - [15] García JJ, Martínez-Ballarín E, Robinson M, Allué JL, Reiter RJ, et al. Protective effect of beta-carbolines and other antioxidants on lipid peroxidation due to hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *Neurosci Lett* 2000; 294(1):1-4.
 - [16] Al-Qenaei A, Yiakouvakis A, Reelfs O, Santambrogio P, Levi S, et al. Role of intracellular labile iron, ferritin, and antioxidant defence in resistance of chronically adapted Jurkat T cells to hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 2014; 68:87-100.
 - [17] Ramalingam M, Kim SJ. Insulin on hydrogen peroxide-induced oxidative stress involves ROS/Ca²⁺ and Akt/Bcl-2 signaling pathways. *Free Radic Res* 2014; 48(3):347-56.
 - [18] Sim MK, Wong YC, Xu XG, Loke WK. Des-aspartate-angiotensin I attenuates ICAM-1 formation in hydrogen peroxide-treated L6 skeletal muscle cells and soleus muscle of mice subjected to eccentric exercise. *Regul Pept* 2014; 188:40-5.
 - [19] Pothiwong W, Laorpaksa A, Pirarat N, Sirisawadi S, Intarapanya J, et al. Autoxidation of brain homogenates from various animals as measured by thiobarbituric acid assay. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2007; 56(3):336-8.
 - [20] 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.
 - [21] 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.
 - [22] Hermida-Ameijeiras A, Méndez-Alvarez E, Sánchez-Iglesias S, Sanmartín-Suárez 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.
 - [23] Kaptanoglu E, Palaoglu S, Demirpence E, Akbiyik F, Solaroglu I, et al. Different responsiveness of central nervous system tissues to oxidative conditions and to the antioxidant effect of melatonin. *J Pineal Res* 2003; 34(1):32-5.
 - [24] 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.
 - [25] Baeza-Squiban A, Delcher L, Kukreti R, Joly AC, Guennou C, et al. Responses of the rabbit tracheal epithelium *in vitro* to H₂O₂-induced oxidative stress. *Toxicol In Vitro* 2000; 14(2):159-67.
 - [26] Arguelles S, Cano M, Machado A, Ayala A. Comparative study of the *in vitro* protective effects of several antioxidants on elongation factor 2 under oxidative stress conditions. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; 74(7):1373-9.
 - [27] Lee H, Jang YH, Lee SR. Protective effect of propofol against kainic acid-induced lipid peroxidation in mouse brain homogenates: comparison with trolox and melatonin. *J Neurosurg Anesthesiol* 2005; 17(3):144-8.
 - [28] Hagen TM, Ingersoll RT, Lykkesfeldt J, Liu J, Wehr CM, 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):411-8.
 - [29] Sharma M, Gupta YK. Effect of alpha lipoic acid on intracerebroventricular streptozotocin model of cognitive impairment in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 2003; 13(4):241-7.
 - [30] Veljkovic AR, Nikolic RS, Kocic GM, Pavlovic DD, Cvetkovic TP, et al. Protective effects of glutathione and lipoic acid against cadmium-induced oxidative stress in rat's kidney. *Ren Fail* 2012; 34(10):1281-7.
 - [31] Lin YC, Lai YS, Chou TC. The protective effect of alpha-lipoic Acid in lipopolysaccharide-induced acute lung injury is mediated by heme oxygenase-1. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013:590363.
 - [32] Cicek M, Yıldırım A, Okyay K, Yazici AC, Aydinap A, et al. Use of alpha-lipoic acid in prevention of contrast-induced nephropathy in diabetic patients. *Ren Fail* 2013; 35(5):748-53.
 - [33] Li Y, Liu YZ, Shi JM, Jia SB. Alpha lipoic acid protects lens from H₂O₂-induced cataract by inhibiting apoptosis of lens epithelial cells and inducing activation of anti-oxidative enzymes. *Asian Pac J Trop Med* 2013; 6(7):548-51.
 - [34] Packer L, Cadenas E. Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. *J Clin Biochem Nutr* 2011; 48(1):26-32.
 - [35] 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.
 - [35] Rochette L, Ghibu S, Richard C, Zeller M, Cottin Y, et al. Direct and indirect antioxidant properties of α-lipoic acid and therapeutic potential. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57(1):114-25.
 - [37] Han D, Hamilton RT, Lam PY, Packer L. Modulation of Cellular Redox and Metabolic Status by Lipoic Acid. In (Eds Patel MS, Packer L) *Lipoic Acid: Energy Production, Antioxidant Activity and Health Effects*. New York: CRC Press; 2008. pp. 293-314.
 - [38] Suh JH, Wang H, Liu RM, Liu J, Hagen TM. (R)-alpha-lipoic acid reverses the age-related loss in GSH redox status in post-mitotic tissues: evidence for increased cysteine requirement for GSH synthesis. *Arch Biochem Biophys* 2004; 423(1):126-35.
 - [39] Srikanth K, Ahmad I, Rao JV, Trindade T, Duarte AC, et al. Modulation of glutathione and its dependent enzymes in gill cells of *Anguilla anguilla* exposed to silica coated iron oxide nanoparticles with or without mercury co-exposure under *in vitro* conditions. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2014; 162:7-14.
 - [40] Dalazen GR, Terra M, Jacques CE, Coelho JG, Freitas R, et al. Pipecolic acid induces oxidative stress *in vitro* in cerebral cortex of young rats and the protective role of lipoic acid. *Metab Brain Dis* 2014; 29(1):175-83.
 - [41] Packer L, Cadenas E. Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. *J Clin Biochem Nutr* 2011; 48(1):26-32.
 - [42] Shay KP, Shenvi S, Hagen TM. Lipoic acid as an inducer of Phase II detoxification enzymes through activation of Nrf2-dependent gene expression. *Alpha-Lipoic Acid: Energy Production, Antioxidant Activity and Health Effects*, Publisher: CRC Press, Taylor & Francis Group, pp. 349-71.