



ISSN:1306-3111
e-Journal of New World Sciences Academy
2009, Volume: 4, Number: 2, Article Number: 5A0012

ECOLOGICAL LIFE SCIENCES

Received: July 2008
Accepted: March 2009
Series : 5A
ISSN : 1308-7358
© 2009 www.newwsa.com

Muammer Bahşi
Ökkeş Yılmaz
Mehmet Tuzcu
Firat University
muammerbahsi@hotmail.com
Elazig-Turkiye

7,12-DMBA UYGULANAN YAŞLI RATLARIN KARACİĞER VE BÖBREK DOKULARINDAKİ YAĞ ASİDİ BİLEŞİMİNE RESVERATROL VE α -LİPOİK ASİDİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Bu çalışmada Resveratrol ve α -Lipoik asidin 7,12-DMBA uygulanan yaşlı ratların karaciğer ve böbrek dokularındaki yağ asidi kompozisyonu üzerine düzenleyici etkileri araştırıldı. Ratlar, kontrol, DMBA, DMBA+ α -LA ve DMBA+R olarak rastgele gruplara ayrıldı. GC kullanılarak yağ asidi içeriğine olan faydalı etkileri araştırıldı. Gaz kromatografi analiz sonuçlarına göre, palmitik asit (16:0) düzeyinin karaciğer dokusunda kontrol grubuna göre yüksek bulundu ($p<0.001$). Karaciğerde stearik asit düzeyinin DMBA ($p<0.01$) ve DMBA+ α -LA ($p<0.05$) gruplarında arttığı tespit edildi. Karaciğer dokusunda linoleik asidin (18:2 n-6) DMBA ve DMBA+R gruplarında ($p<0.05$) azaldığı belirlendi. Araşidonik asit (20:4 n-6) düzeyinin böbrek dokusunda DMBA grubunda arttığı ($p<0.05$) tespit edildi ($p<0.05$). Tüm dokularda dokosaheksaenoik asit (22:6 n-3) düzeyinin arttığı saptandı.

Anahtar Kelimeler: 7,12-DMBA, Resveratrol, α -Lipoik Asit, GC, Yaşlı Sıçanlar

THE EXAMINATION OF THE EFFECTS OF RESVERATROL AND α -LIPOIC ACID ON FATTY ACID COMPOUNDS IN LIVER AND KIDNEY TISSUES OF OLD RATS INDUCED BY 7,12-DMBA

ABSTRACT

In this study, the regulator effects of resveratrol and alpha-lipoic acid on fatty acid compositions on 7.12-DMBA-induced old male rat's liver and kidneys were investigated. The rats divided randomly groups as control, DMBA, DMBA+LA and DMBA+R. Fatty acid content were analyzed by using GC in order to determine the benefit effects of these antioxidant against by 7,12-DMBA-induced oxidative stress in wistar rats. According to gas chromatography results, it is found that rations of palmitic acid (16:0) in liver tissues of disease group were higher than control group ($p<0.001$). The ratio of stearic acid (18:0) was increased in liver DMBA ($p<0.01$). Also the ratio of linoleic acid (18:2 n-6) was decreased in liver DMBA and DMBA+R groups ($p<0.05$). However, for the ratio of arachidonic acid (20:4 n-6), in the DMBA group of the kidney tissue was increased ($p<0.05$). Consequently, the ratio of docosahexaenoic acid (22:6 n-3) was raised in all kinds of tissues.

Keywords: 7,12-DMBA, Resveratrol, α -Lipoic Acid, α -tocopherol, GC, Aged Rats



1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) çevrede yaygın olarak bulunan kimyasal bir gruptur. Karbon ve hidrojen içeren organik maddelerin pirolizi veya tam olmayan yanmalar sonucu oluşan 3 veya daha fazla aromatik halkalı bileşiklerdir. PAH'lar deney hayvanları ve insanlarda kuvvetli karsinojenik potansiyele sahip maddelerdir. Son yıllarda ileri moleküler biyoloji teknikleri ile PAH'ların karsinojenik mekanizmalarının anlaşılmasında büyük bir gelişim sağlanmıştır. PAH'lar tümör başlatıcı, geliştirici ve ilerletici özellikleri olan potent karsinojenlerdir. Aynı zamanda deney hayvanlarında yapılan çalışmalarla bu maddelerin immün sistemi baskılayıcı oldukları gösterilmiştir [1].

7,12-DMBA gibi polisiklik aromatik hidrokarbonların serbest radikalleri oluşturduğu ve karsinogenezde rol oynadığı görülmüştür. Bu rol, DNA bağlarının kırılması ve lipid peroksidasyonu yoluyla hücrel oksidatif hasarı meydana getiren peroksidler, hidroksi ve süperoksit anyon radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin meydana getirilmesiyle desteklenmektedir [2].

Deneyisel karsinojenlerdeki en sık kullanılan model bileşiklerden biri 7,12-DMBA'dır. DMBA potansiyel mutajenik ve karsinojenik özelliklere sahiptir. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda DMBA'ya maruz bırakılan kemirgen modellerde ya da belirtilen mutajenik cevaplarda tümörlü hücre sayılarında belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir [3].

Resveratrolün varlığı ilk kez 1976 yılında Langcake ve Pryce tarafından asmada (*Vitis vinifera*) fark edilmiştir. 1992 yılında Siemann ve Creasy şarapta resveratrol bulunduğunu saptamıştır. Geleneksel Çin tıbbında, arterosklerozu tedavi etmek için piceid (resveratrol 3-0-β glucoside) ihtiva eden *Polygonum cuspidatum* köklerinden yapılan bir ilaç kullanılmaktadır [4]. Resveratrol oligomerleri belli başlı *Dipterocarpaceae*, *Vitaceae*, *Cyperaceae*, *Gynetaeae*, *Welwitschiaceae*, *Umbelliferceae*, *Leguminaceae* bitki familyalarında bulunmaktadır [5]. Resveratrol: dutta, üzümde, yer fıstığında, çamda ve üzüm şarabında yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Asıl kaynağı *Vitis vinifera*, *Labrusca* ve *muscadine* üzümüdür. Resveratrolün üzüm kabuğunda 50-100 µg/gr kadar yüksek konsantrasyonda bulunduğu saptanmıştır.

Yapılan çeşitli *in vitro* çalışmalarda; resveratrolün antioksidatif, antiinflamatuvar, antikanserojen ve koruyucu etkileri ve östrojenik etkiler gibi çeşitli biyolojik etkileri tanımlanmaktadır [6].

2. ÇALIŞMANIN ÖNEMİ (RESEARCH SIGNIFICANCE)

Resveratrolün birçok biyolojik dokuda antikanserojen etkilerinin olduğu, etki mekanizmalarıyla birlikte aydınlatılmaya çalışılmıştır. Kemirgen lenfoblastik lösemi hücrelerinde resveratrolün (10^{-4} M), ribonükleotid redüktaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir [7].

Androjenler ve androjen reseptörleri prostat kanser etyolojisinde önemli rol oynamaktadır. Yapılan bir çalışmada resveratrolün (10^{-4} M) androjen 'upregulated' genleri olan siklin bağımlı kinaz inhibitörü p21, AR-spesifik koaktivatör ARA70, insan glandular kallikrein-2, prostat spesifik antijen proteini ve mRNA'sında inhibisyon yaptığı gösterilmiştir [8].

Resveratrolün insan meme kanseri hücrelerinde dioksin ve benzopirinlerin arilhidrokarbon aracılı kanserojen etkilerini inhibe ettiği gösterilmiştir [9]. Sitokrom P₄₅₀, arilhidrokarbon hidroksilaz olarak da bilinmekte olup polisiklik aromatik hidrokarbonların prokarsinojenik aktivasyonunda rol almaktadır. P₄₅₀ 1A₁'in inhibitörleri akciğer kanserinde oldukça etkili bulunmuştur. Resveratrol (10^{-4} M)



insan karaciğer mikrozomlarında sitokrom P450 1A₁'i selektif bir şekilde inhibe etmektedir [10]. İnsan hepatoma HepG₂ hücrelerinde resveratrolün derişim bağımlı bir şekilde P450 1A₁'i inhibe ettiği ortaya konmuştur. Ayrıca benzopirin ile uyarılmış sitokrom 1A₁ mRNA proteinindeki artışı ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. İnsan meme karsinoma hücre dizilerinde dimetilbenzantrazen ile uyarılan sitokrom 1A₁ aktivitesini doğrudan inhibe etmiştir [11]. Sitokrom P₄₅₀ 3A₄ ince barsakta en çok bulunan enzimlerden bir tanesi olup birçok ilacın barsaktan dolaşıma geçişini engellemektedir. Resveratrol zaman ve derişim bağımlı olarak bu enzimin aktivitesini de azaltmıştır [12].

Alfa lipoik fizyolojik sistemlerde bulunan, tiyol grubu içeren ve antioksidan aktiviteye sahip önemli bir moleküldür [13]. Yükseltgenmiş formunda intramoleküler disülfid bağı oluşturan, disülfid türevi bir oktanoik asittir. Alfa lipoik asitin okside olmuş ditiyolan halkası çevresel şartlara bağılı olarak moleküle yüksek indirgeme özelliği kazandırmaktadır. Alfa lipoik asit ve dihidrolipoik asitin kimyasal reaktivitesini sağlayan da ditiyolan halkasıdır. Bu yapı α-LA'yı bilinen tiyol içeren diğer biyomoleküler arasında özgün kılmaktadır [14]. α-LA mikroorganizmalardan insanlara kadar bütün organizmalara enerji metabolizmasında kofaktör olarak gerekli olan ve antioksidan özellikleri ortaya konulan bir moleküldür [15 ve 16].

Alfa lipoik asit insan diyetinde yeterli miktarda bulunmasına rağmen, de novo olarak mitokondride lipoik asit sentaz tarafından sentezlenmektedir. Hem lipid hem de sulu ortamda çözünür, kolayca emilir ve hücrelere taşınarak, dihidrolipoik aside (DHLA) indirgenir. Alfa lipoik asit hücreye girdikten sonra sitozolik enzimler olan GSH redüktaz ve tiyoredoksin redüktaz ve mitokondrial enzim E₃ tarafından indirgenmektedir. Alfa lipoik asit barsaktan emildikten sonra, çeşitli dokularda metabolik değişikliğe uğradıktan sonra salgılanır. Lipoat metabolizmasındaki katabolik süreçte pentanoik asit yan zincirinin β-oksidasyonu üzerinden gerçekleşmektedir. Alfa lipoik asit metaboliti olan 3 ketolipoat, serbest α-LA'nın β-oksidasyonla salgılandığını göstermektedir [13 ve 17].

Sitrik asit siklusundaki multienzim dehidrogenaz kompleksinin (piruvat dehidrogenaz ve α-ketoglutarat dehidrogenaz) kofaktörüdür. α-LA ekzojen verildiğinde serbest radikal temizleyici, metal şelasyon ve vitamin E, askorbik asit ve glutatyonun rejenerasyonu gibi antioksidan özellikler gösterir [18]. Dihidrolipoik asitin, α-LA'ya göre antioksidan etkisi daha fazladır [17]. Alfa lipoik asitin iki ayrı izometrik konfigürasyonu vardır. R formu doğal, S formu ise sentetiktir [18]. Redükte DHLA ve okside α-LA formlarının her ikisi de ·OH'i HOCl ve ¹O₂ doğrudan temizler, H₂O₂'i ise redükler. Alfa-lipoik asit ve DHLA doğal olarak fizyolojik sistemlerde bulduklarından ideal terapötik antioksidan olduğu düşünülebilir. Alfa lipoik asit, antioksidan etkiye ilaveten bazı metabolik yollarda enzim aktivitelerini de etkileyebilir. Hepatik mikrozomal enzimlerden sitokrom P₄₅₀ redüktaz ile disülfid-tiol değişimi yoluyla P₄₅₀ redüktazı inhibe edebilir. Nitrik oksit sentaz ile sitokrom P₄₅₀ redüktaz homologdur. Bu yüzden α-LA nitrik oksit sentazı da inhibe edebilir [13].

Bakterilerden insanlara kadar birçok organizmada lipoik asit sentezlenmektedir. İnsanlarda karaciğer ve diğer dokular tarafından sentezlenerek doğal bir kofaktör olarak görev yapmaktadır [19]. Lipoik asit predominant olarak beyin, böbrek, karaciğer, ince barsak ve iskelet kaslarında bulunmaktadır. Memeli dokuları 5-25 nmol/g lipoik asit içermekle birlikte, bunun hemen hemen tümü protein-bağılı formda bulunup, dışarıdan verilmediği sürece hücrede sadece çok az serbest lipoik asit bulunmaktadır [20]. Çeşitli sebze ve meyveler ile hayvansal dokular farklı düzeylerde *lipoillizin* formunda R-LA



içerirler. Ispanak başta olmak üzere brokoli, domates, bezelye, Brüksel lahanası ve pirinç α -LA içeren bitkisel kaynaklardır. Kalp, karaciğer ve böbrek gibi yüksek metabolik aktiviteye sahip hayvansal dokular da α -LA bakımından zengin kaynaklardır [21 ve 22].

Ho ve arkadaşlarının yaptıkları deneysel çalışmada fare derisinde DMBA (0.3 μ mol) başlangıçlı ve TPA (2 nmol) destekli tümör oluşumuna 300-4050 nmol aralıklarında bir doz DHLA'nın önleyici etkileri araştırılmıştır. Tümör oluşumu için DMBA uygulandıktan bir hafta sonra TPA uygulamasına başlanmış ve her iki ajan haftada iki defa uygulanmış ve deney 20 hafta boyunca devam etmiştir. Pozitif kontrol grubunda 20 hafta sonunda tümör oluşum sıklığının %70'e ulaştığı rapor edilmiştir. Buna zıt olarak aseton verilen grupta tümör oluşumu gözlenmediği tespit edilmiştir. DMBA uygulamasından önce DHLA (4050 nmol) ön tedavi uygulanan grupta tümör oluşumunun tamamen inhibe edildiği belirlenmiş ve diğer üç grupta da (TPA uygulamasından 30 dakika önce, 300, 900 ve 2700 nmol DHLA) tümör oluşumu %10-60 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmada diyetle verilen %0.2'lik lipoik asitin TPA'ya karşı antitümör aktivitesinde herhangi bir gelişme belirlenmemiştir ve dihidrolipoik asitin lipoik asitten daha güçlü bir antioksidan olduğu ileri sürülmüştür [23].

3. DENEYSEL ÇALIŞMA (EXPERIMENTAL STUDY)

Deneysel uygulama ağırlıkları birbirine yakın olan, yaşlı Wistar albino sıçanlarda gerçekleştirildi. Deneyde kullanılan sıçanlar aşağıdaki şekilde gruplandırıldı:

- **Kontrol Grubu:** Bu gruptaki sıçanlar deney süresince normal besin maddesi ve su ile beslendi. Bu gruba %25'i etanol olan susam yağı (çözücü solusyon) enjekte edildi.
- **DMBA Grubu:** Bu gruptaki sıçanlara 1g DMBA, 20 ml'de %25'i etanol olan susam yağında hazırlandıktan sonra intraperitoneal olarak enjekte edildi ve kanserli denekler elde edildi. Bunların kanserden önceki ilk ağırlıkları 380g ve 5 hafta sonrasındaki ağırlık ortalaması 393,58g olarak tespit edildi.
- **3.DMBA+R Grubu:** Bu gruptaki sıçanlara 300 mg resveratrole 4ml etil alkol ilave edilip 30ml'ye susam yağı ile tamamlandıktan sonra intraperitoneal olarak gün aşırı enjeksiyon yapıldı. Haftada bir kez olmak kaydıyla DMBA maddesi de bu gruptaki deneklere enjekte edildi. Bunların kanserden önceki ilk ağırlıkları 374g ve 5 hafta sonrasındaki ağırlık ortalaması 406,30g olarak tespit edildi.
- **DMBA+ α -LA Grubu:** Bu gruptaki sıçanlara 300 mg α -lipoik aside 4ml etil alkol ilave edilip 25ml'ye susam yağı ile tamamlandıktan sonra intraperitoneal olarak gün aşırı enjeksiyon yapıldı. Haftada bir kez olmak kaydıyla DMBA maddesi de bu gruptaki deneklere enjekte edildi. Bunların kanserden önceki ilk ağırlıkları 371,66g ve 5 hafta sonrasındaki ağırlık ortalaması 400,16g olarak tespit edildi.

Deneysel uygulamalar sonrasında etik kurulun aldığı kararlara uygun olarak dekapite edilen ratların karaciğer ve böbrek dokuları alınarak kuru buzda hemen donduruldu. Örnekler darası alınmış olan eppendorf tüplere aktarıldı. Ağırlıkları hassas terazide tartılarak belirlendi ve analizler yapılınca kadar -70°C'de saklamaya alındı.

3.1. Lipidlerin Ekstraksiyonu (Extraction of Lipids)

Doku örneklerinden lipidlerin ekstraksiyonu 3:2 (v/v) hekzan izopropanol (HIP) karışımının kullanıldığı Hara ve Radin metoduna göre yapıldı [24]. Bunun için: 0.5-1 g doku örneği 3:2 (v/v) oranında 5 ml HIP karışımı içinde 30 sn süreyle homojenize edildi. Homojenizasyon



kabı 2 ml HIP çözeltisi ile yıkandı ve santrifüj tüplerine alındı. Daha sonra 4500 rpm'de 10 dk süreyle santrifüj edilen doku örneklerinden üst supernatant kısım alınarak ağız kapaklı deney tüplerine konuldu.

3.2. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması (Preparation Of Fatty Acid Methyl Esters)

Lipidler içinde bulunan yağ asitlerinin gaz kromatografik analizinin yapılabilmesi için polar olmayan uçucu ve kararlı yapıya sahip olan metil esterleri gibi türevlerine dönüştürülmesi gerekir [25].

Metil esteri hazırlamak için hekzan/izopropanol fazı içindeki lipid ekstraktı 30 ml'lik sızdırma yapmayan deney tüplerine alındı. Üzerine %2'lik metanolik sülfirik asitten 5 ml ilave edildi, vorteks ile iyice karışmaları sağlandı. Bu karışım 50°C'lik etüvde 15 saat süre ile metilleşmeye bırakıldı. Tüpler etüvden çıkarıldı oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve 5 ml %5'lik sodyum klorür ilave edilerek iyice karıştırıldı. Tüpler içinde oluşan yağ asidi metil esterleri 5 ml hekzan ile ekstrakte edildi ve hekzan fazı pipetle alınarak, 5 ml %2 lik KHCO₃ ile muamele edildi ve fazların ayrılması için 4 saat bekletildi. Daha sonra metil esterlerini içeren karışımın, 45°C'de ve azot akımı altında çözücüsü uçuruldu, 1 ml hekzan ile çözülerek 2 ml'lik ağız kapaklı otosampler vialleri içine alınarak gaz kromatografisinde analiz edildi.

3.3. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Gaz Kromatografik Analizi (The Analysis Of Fatty Acid Methyl Esters With Gas Chromatography)

Lipid ekstraktı içindeki yağ asitleri metil esterlerine dönüştürüldükten sonra SHIMADZU GC 17 Ver. 3 gaz kromatografisi ile analiz edildi. Bu analiz için 25m uzunluğunda, 0,25 µm iç çapında ve PERMABOND 25 mikron film kalınlığına sahip Machery-Nagel (Germany) kapiller kolon kullanıldı. Analiz sırasında kolon sıcaklığı 120- 220°C arasında programlandı. Enjeksiyon sıcaklığı 240°C ve dedektör sıcaklığı 280°C olarak tutuldu. Kolon sıcaklık programı 120°C'den 220°C'ye kadar ayarlandı. Sıcaklık artışı 200°C'ye kadar 5°C/dk ve 200°C'den 220°C'ye kadar 4°C /dk olarak belirlendi. 220°C'de 8 dakika tutuldu ve toplam süre 35 dakika olarak belirlendi. Taşıyıcı gaz olarak azot gazı kullanıldı. Analiz sırasında örneklere ait yağ asidi metil esterlerinin analizinden önce, standart yağ asidi metil esterlerine ait karışımlar enjekte edilerek, her bir yağ asidinin alıkonma süreleri belirlendi. Bu işlemden sonra gerekli programlama yapılarak örneklere ait yağ asidi metil esterleri karışımlarının analizi yapıldı. Sonuçlar toplam yağ asitleri içinde her bir yağ asidi için % miktar olarak belirlendi. Hesaplamalar GC Solution 2.3 programı kullanılarak yapıldı.

3.4. İstatistiksel Analiz (Statistical Analysis)

İstatistiksel değerlendirmeler, SPSS for Windows 12.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar için One-way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) testi uygulandı ve LSD testi uygulaması ile gruplar arasındaki farklılıklar belirlendi. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi ve p<0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMALAR (FINDINGS AND DISCUSSION)
4.1. Karaciğer Dokusundaki Yağ Asidi Değişimleri
(Fatty Acid Changes in Liver Tissue)

Tablo 1. Karaciğer dokusunun yağ asidi bileşimi(%)
 (Table 1. The composition of fatty acid in liver tissue(%))

Yağ Asitleri	KONTROL	DMBA	DMBA+α-LA	DMBA+R
14:0	0,17±0,01	0,15±0,01	0,17±0,02	0,17±0,01
15:0	0,18±0,01	0,22±0,01 ^a	0,20±0,01	0,25±0,01 ^c
16:0	21,26±0,33	19,73±0,21 ^c	19,73±0,20 ^c	19,36±0,29 ^c
16:1 n-9	1,35±0,26	0,39±0,07 ^c	0,57±0,06 ^c	0,50±0,04 ^c
17:0	0,44±0,03	0,57±0,01 ^c	0,54±0,02 ^b	0,60±0,01 ^c
18:0	16,64±0,57	18,62±0,35 ^b	17,90±0,52 ^a	17,76±0,31
18:1 n-9	8,47±0,69	6,98±0,23 ^a	8,44±0,76	7,91±0,27
18:1 n-7	2,85±0,15	3,22±0,08 ^a	3,22±0,06	3,64±0,17 ^c
18:2 n-6	18,63±0,47	16,79±0,40 ^a	17,26±0,55	17,21±0,51 ^a
18:3 n-6	0,18±0,02	0,19±0,02	0,16±0,01	0,18±0,01
18:3 n-3	0,42±0,03	0,23±0,02 ^c	0,24±0,01 ^c	0,24±0,01 ^c
20:1 n-9	0,10±0,01	0,13±0,01	0,15±0,01 ^b	0,15±0,01 ^b
20:1:n-11	0,19±0,01	0,19±0,01	0,18±0,02	0,19±0,01
20:2:n-6	0,34±0,01	0,30±0,01	0,34±0,01	0,38±0,01
20:3 n-9	0,17±0,02	0,11±0,01 ^a	0,11±0,01 ^a	0,16±0,01
20:3:n-6	0,61±0,06	0,50±0,03 ^a	0,45±0,01 ^b	0,65±0,01
20:4 n-6	20,36±0,75	21,60±0,35	20,92±0,68	21,47±0,33
20:5:n-3	0,31±0,02	0,28±0,03	0,24±0,01 ^a	0,26±0,01
22:0	0,15±0,01	0,20±0,01 ^b	0,20±0,01 ^b	0,20±0,01 ^b
22:2	0,30±0,02	0,30±0,01	0,25±0,02	0,24±0,01 ^a
22:4	0,31±0,03	0,54±0,03 ^c	0,55±0,02 ^c	0,50±0,01 ^c
22:5:n-6	0,13±0,01	0,28±0,06 ^b	0,18±0,01	0,25±0,04 ^a
22:5:n-3	0,84±0,11	1,08±0,07 ^a	1,29±0,09 ^c	1,13±0,05 ^a
24:0	0,28±0,05	0,20±0,02 ^a	0,24±0,02	0,27±0,01
22:6:n-3	4,81±0,12	7,56±0,33 ^c	6,43±0,33 ^b	6,34±0,37 ^a
∑Doymuş	39,12±1,28	39,69±0,62	38,98±0,80	38,61±0,65
∑Doymamış	60,47±2,79	60,67±1,77	60,98±2,67	61,40±1,88 ^a
∑MUFA	12,96±1,12	10,91±0,40 ^b	12,56±0,91	12,39±0,50
∑PUFA	47,51±1,67	49,76±1,37 ^b	48,42±1,76 ^a	49,01±1,38 ^b
∑N3	6,38±0,28	9,15±0,45 ^c	8,20±0,44 ^b	7,97±0,44 ^b
∑N6	40,42±1,32	39,47±0,87	39,31±1,27 ^a	40,14±0,91

4.2. Böbrek Dokusundaki Yağ Asidi Değişimleri (Fatty Acid Changes in Kidney Tissue)

Tablo 2. Böbrek dokusunun yağ asidi bileşimi (%)
(Table 2. The composition of fatty acid in kidney tissue(%))

Yağ Asitleri	KONTROL	DMBA	DMBA+α-LA	DMBA+R
14:0	0,51±0,05	0,28±0,03 ^c	0,37±0,02 ^b	0,37±0,02 ^b
15:0	0,19±0,02	0,22±0,01	0,23±0,02	0,23±0,01
16:0	20,20±0,36	19,19±0,50	19,75±0,66	19,62±0,36
16:1 n-9	1,38±0,30	0,54±0,12 ^c	0,69±0,05 ^c	0,62±0,07 ^c
17:0	0,29±0,01	0,38±0,01 ^c	0,37±0,02 ^c	0,39±0,01 ^c
18:0	14,85±0,58	14,32±0,46	15,16±0,36	14,07±0,43
18:1 n-9	11,39±0,52	10,56±0,56	10,43±0,31	11,38±0,64
18:1 n-7	3,24±0,07	3,46±0,06	3,16±0,15	3,25±0,10
18:2 n-6	16,75±0,87	15,78±0,38	16,02±0,50	17,33±0,29
18:3 n-3	0,29±0,04	0,23±0,03	0,23±0,01	0,27±0,01
20:0	0,15±0,01	0,24±0,07 ^a	0,15±0,01	0,16±0,01
20:1 n-9	0,19±0,01	0,21±0,01	0,22±0,02	0,21±0,01
20:1 n-11	0,21±0,02	0,25±0,06	0,23±0,03	0,20±0,01
20:2 n-6	0,29±0,01	0,31±0,01	0,34±0,04	0,33±0,01
20:3 n-6	0,96±0,07	0,84±0,06	0,81±0,04	0,93±0,06
20:4 n-6	25,15±0,99	27,76±0,92 ^a	26,67±0,94	25,48±0,74
21:0	0,14±0,01	0,23±0,01	0,15±0,01	0,30±0,16
20:5 n-3	0,22±0,01	0,23±0,02	0,21±0,01	0,19±0,01
22:0	0,13±0,01	0,19±0,01	0,15±0,01	0,16±0,01
22:2	0,51±0,03	0,35±0,03 ^b	0,40±0,03 ^a	0,31±0,03 ^c
22:4	0,45±0,02	0,63±0,03 ^c	0,61±0,02 ^c	0,61±0,01 ^c
22:5 n-3	0,29±0,01	0,33±0,02	0,31±0,01	0,31±0,01
24:0	0,59±0,05	0,93±0,44 ^a	0,62±0,18	0,60±0,04
22:6 n-3	1,93±0,11	2,57±0,21 ^a	1,99±0,20	2,23±0,14
ΣDoymuş	48,17±1,60	46,12±2,08 ^a	47,08±1,58	46,82±1,52 ^a
ΣDoymamış	50,09±2,51	52,51±1,90 ^a	50,88±2,00	51,35±1,46 ^a
ΣMUFA	5,02±0,40	4,46±0,25 ^a	4,30±0,25 ^a	4,28±0,19 ^a
ΣPUFA	45,88±2,11	48,08±1,65 ^a	46,58±1,75	47,07±1,27
ΣN3	2,73±0,17	3,36±0,28 ^a	2,74±0,23	3,00±0,17
ΣN6	43,15±1,94	44,69±1,37 ^a	43,84±1,52	44,07±1,10

a-p<0.05

b-p<0.01

c-p<0.001

d-p<0.0001

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER (CONCLUSION AND SUGGESTIONS)

Gaz kromatografisi ile yaptığımız analizlerde serum, eritrosit, karaciğer ve böbrek dokularında miristik asit (14:0), pentadekanoik asit (15:0), palmitik asit (16:0), palmitoleik asit (16:1 n-9), heptadekanoik asit (17:0), stearik asit (18:0), oleik asit (18:1 n-9, n-11), linoleik asit (18:2 n-6), alfa-linolenik (18:3 n-3), eikosenoik asit (20:1 n-9), eikosatrienoik asit (20:3 n-9, 20:3 n-6), araşidonik asit (20:4 n-6), eikosapentaenoik asit (20:5 n-3), behinik asit (22:0), dokosadienoik asit (22:2), dokosatetraenoik asit (22:4), dokosapentaenoik asit (22:5 n-6, 22:5 n-3), lignoserik asit (24:0), dokosaheksaenoik asit (22:6 n-3) gibi yağ asidi çeşitleri saptanmıştır.

Mevcut olan bu yağ asitlerinden: 14:0, 16:0, 16:1 n-7, 18:0, 18:1 n-9 gibi yağ asitleri hayvansal dokularda endojen olarak sentezlenen yağ asitleridir. Bunlardan 16:0, lipogenez olayının (lipid biyosentezi) son ürünüdür. Bu yağ asidi, yağ asidi sentetaz (FAS) enzimi tarafından sentezlenir ve değişik enzimatik reaksiyonlarla serbest hale getirilir. Daha sonra, hücrenin ihtiyacına göre,



fosfolipid, sifingolipid, trigliseridler, kolesterol esterleri sentezi ve ayrıca Δ^9 desaturaz (stearoil CoA) enzimi tarafından palmitoleik aside (16:1, n-7-16:1 n-9) ya da elongaz enzimleri tarafından stearik asitin sentezinde kullanılır [26].

Yağ asitleri değişimleri incelendiğinde, palmitik asit (16:0) ve palmitoleik asit (16:1 n-7) miktarının karaciğer ve böbrek dokularında DMBA uygulaması yapılan hastalık ve antioksidan verilen gruplarında belirgin veya kısmen azalmıştır. Çelik ve Özkaya tarafından yapılan bir çalışmada kobay kas dokusunda lipoik asit verilen hayvanlarda palmitik asit miktarının kontrol grubuna (%34,46±2,90) göre lipoik asit grubunda (%32,39±1,87) düşük olduğu, buna karşın aynı çalışmada karaciğer dokusunda lipoik asitin palmitik asit miktarına etkisinin olmadığı rapor edilmiştir [27].

Bulgularımızda karaciğer dokusunda stearik asitin (18:0) artması ve oleik asitin (18:1 n-9) azalması, stearoil CoA desaturaz enzimi aktivitesinin azalmasıyla açıklanabilir. Bu etkinin temelini bakıldığında DNA'nın DMBA tarafından hasara uğratılması gözlenebilir ve bunun sonucunda SCD enzimini kodlayan genin inhibisyonu gerçekleşmiş olabilir. Resveratrol uygulanan grupta oleik asit miktarının kısmen artması; resveratrolün DMBA'nın toksik etkisine karşı az da olsa iyileştirici etkiye sahip olduğunun göstergesi olabilir. Bu sonuç resveratrolün antikanserojen ve diğer biyolojik etkileriyle açıklanabilir. Lipoik asit uygulanan grupta stearik asitin artması ve oleik asitin azalması bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarla uygunluk göstermektedir [28]. Yapılan bir çalışmada ise yaşlı sıçanlarda lipoik asitin karaciğer ve eritrositlerde stearik asit miktarını arttığı rapor edilirken aynı çalışmada karaciğer ve beyin dokularında oleik asit düzeyinin kontrol grubuna göre lipoik asit verilen grupta arttığı fakat eritrositlerde azaldığı belirtilmiştir [29]. Yaşlı dişi sıçanlarda resveratrolün etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise resveratrol verilen grupta stearik asit düzeylerinin kontrol grubuna göre akciğer, böbrek, serum ve karaciğer dokularında arttığı fakat eritrositlerde azaldığı saptanmıştır. Yine aynı çalışmada resveratrolün akciğer ve böbrek dokularında oleik asit düzeylerini kontrol grubuna göre azalttığı, serum ve eritrositlerde ise arttırdığı tespit edilmiştir [30].

Karaciğer dokusunda linoleik asit (18:2 n-6) düzeyleri kontrol gruplarına göre azalırken böbrek dokusunda önemli bir farklılık göstermemiştir. Araşidonik asit (20:4 n-6), linoleik asitten Δ^6 desaturasyon yoluyla sentezlenen bir yağ asididir. Bu metabolik yolda başlıca Δ^6 desaturaz ve Δ^5 desaturaz adlı iki enzim sistemi vardır. Yapılan bir çalışmada, H_2O_2 'in etkisine karşı verilen lipoik asitin, kobayların beyin dokusunda linoleik asit düzeyini azalttığı ve araşidonik asidi düzeyini yükselttiği saptanmıştır [28]. $KBrO_3$ uygulanan yaşlı dişi sıçanlarda resveratrolün etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada $KBrO_3$ ile birlikte verilen resveratrol grubunda akciğer, serum, böbrek ve karaciğer dokularında linoleik asit miktarının azaldığı ve araşidonik asit miktarının arttığı saptanmıştır [30].

Dokosaheksaenoik asit (DHA) (22:6 n-3) Δ^6 desaturasyonunun son ürünlerinden biridir. Yapılan çalışmalarda dokosaheksaenoik asitin hastalık şartlarında düzeyinin yükseldiği belirlenmiştir. Bunun nedeni olarak sentezde görev yapan enzimin hastalık faktörlerinden etkilendiği yönünde görüşler ileri sürülmüştür [31, 32 ve 33]. Bizim çalışmamızda da analizi yapılan karaciğer ve böbrek dokularında hastalık grubu olan DMBA gruplarında dokosaheksaenoik asitin düzeyinin yükseldiği gözlenmiştir. Karaciğer dokusunda hastalık gruplarıyla beraber DMBA+Antioksidan gruplarda da bu değer kontrol grubuna göre yüksek olduğu halde bu artışın DMBA grubundan daha düşük düzeyde



tutulmuş olması resveratrol ve lipoik asitin etkilerinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Karaciğerde DMBA grubunda MUFA düzeylerinin azaldığı gözlenirken tüm grupların PUFA düzeylerinin kontrole göre artmış olduğu saptandı. Böbrek dokusunda ise MUFA düzeyinin tüm gruplarda kontrolden düşük olduğu; PUFA, N3 ve N6 düzeylerinin DMBA grubunda yüksek olduğu saptandı.

Karaciğer dokusunda DMBA+R grubunda doymamış yağ asidi miktarının arttığı görüldü. Böbrekte ise doymamış yağ asidi miktarlarının kontrol grubuna göre tüm gruplarda arttığı belirlendi. Karaciğer dokusunda gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmezken böbrek dokusunda ise doymuş yağ asidi miktarının DMBA grubu ve DMBA+R grubunda azaldığı tespit edildi.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

1. Karakaya, A., (2003). Polisiklik aromatik hidrokarbonlara maruz kalan bir grup işçide hücrel immün fonksiyonların incelenmesi, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (98-03-00-07).
2. Batcıoğlu, K., Karagözler, A.A., Öztürk, I.C., Genç, M., Bay, A., Öztürk, F., and Aydoğdu, N., (2005). Comparison of chemopreventive effects of vitamin E plus selenium versus melatonin in 7,12- dimethylbenz(a)anthracene-induced mouse brain damage, *Cancer Detection and Prevention*, 29: 54-58.
3. Khaidakov, M., Bishop, M.E., Manjanatha, M.G., Lyn-Cook, L.E., Desai, V.G., Chen, J.J., and Aidoo, A., (2001). Influence of dietary antioxidants on the mutagenicity of 7,12- dimethylbenz(a)anthracene and bleomycin in female rats, *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 480-481: 163-70.
4. Langcake, P. and Pryce, R.J., (1977). The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation, *Phytochemistry*, 16(8): 1193-96.
5. Fremont, L., (2000). Mini review; Biological effects of resveratrol, *Life science*, 66: 663-73.
6. Wenzel, E., Soldo, T., Erbesdobler, H., and Somoza, V., (2005). Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats, *Mol. Nutr. Food Res.* 49: 482-94.
7. Fontacave, M., Lepoivre, M., Elleingand, E., Gerez, C. and Guittet O., (1998). Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Letters*. 421: 277-79.
8. Mitchell, S., Zhu W. and Young, F., (1999). Resveratrol inhibits the expression and function of the androjen reseptor in LNCaP prostate cancer cells, *Cancer Res.* 59: 5892-95.
9. Rabert, F.C., Quesne, M., Rogers, I.M., Shirota, T., Jolivet A., Milgrom, E. and Savouret, J.F., (1999). Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon reseptor: implication of dioxin toxicity, *Mol. Pharmacology*. 56: 784-90.
10. Chun, Y.J., Kim, M.Y. and Guengerich, F.P., (1999). Resveratrol is a selective human cytochrome P450 1A1 inhibitor. *Bipchem. and Biophys Res Commun*, 262: 20-24.
11. Hsieh, T., Juan, G., Darzynkiewicz, Z., and Wu, J.M., (1999). Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of P53 and P21WAF/CIP1 and suppresses cultured bovine pulmonary arter endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G₂, *Cancer Res*, 59: 2596-601.
12. Chan, W.K. and Delucchi, A.B., (2000). Resveratrol, a red wine constituent, is a mechanism-based inactivator of cytochrome P450 3A₄, *Life Science*, 67: 3103-12.



13. Liang, J.F. and Akaike, T., (2000). Inhibition of nitric oxide synthesis in primary cultured Mouse hepatocytes by α -lipoic acid, *Chem Biol Interact* 124 (1): 53-60.
14. Clair, D., Zhao, Y., Chaiwing, L. and Oberley, T., (2005). Modulation of skin tumorigenesis by SOD. *Biomed Pharmacother* 59: 209(4)-14.
15. Navari-Izzo, F., Quartacci, M.F., and Sgherri, C., (2002). Lipic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species, *Plant Physiol. Biochem.* 40: 463-70.
16. Packer, L., Witt, E.H. and Tritschler, H.J., (1995). Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant, *Free Radic Biol Med.* 19: 227-50.
17. Cakatay, U, (2006). Pro-oxidant action of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid, *Med Hypotheses* 66(1): 110-17.
18. Goralska, M., Dackar, R., Holley, B., and McGahan, M.C., (2003). Alpha lipoic acid changes iron uptake and storage in lens epithelial cells, *Exp Eye Res.* 76(2): 241-48.
19. Evans, J. and Goldfine I.D., (2000). α -lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensivity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technology&Therapeutics.* 2: 401-13.
20. Ptaffly, J.R., (2001). Lipoic acid : The antioxidant chamneleon.
21. Packer, L., Kraemer, K. and Rimbach, G., (2001). Molecular aspect of lipoic acid in the prevention of diabetes complications, *Nutrition* 17: 888-95.
22. Moini, H., Packer, L. and Saris, N.L., (2002). Antioxidant and prooxidant activities of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid, *Toxicology and Applied Pharmacology.* 182: 84-90.
23. Ho, Y.S., Lai, C.S., Liu, H., Ho, S.Y., Tai, C., Pan, M.H., and Wang, Y.J., (2007). Dihydrolipoic acid inhibits skin tumor promotion through anti-inflammation and anti-oxidation, *Biochemical Pharmacology,* 73: 1786-95.
24. Hara, A. and Radin, N.S., (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent, *Analitical Biochemistry* 90, 420-26.
25. Christie, W.W., (1992). Gas chromatography and lipids, *The Oil Pres Glaskow,* 302.
26. Ntambi J.M., (1999). Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *Journal of Lipid Research* 40(9): 1549-58.
27. Çelik, S. and Özkaya, A., (2002). Increased unsaturated fatty acid levels in liver and muscle of guinea pig induced by vitamin-E, ALA and linalool. *Pakistan Journal of Biological Sciences,* 5(8): 881-84.
28. Çelik, S. and Özkaya, A., (2002). Effects of intraperitoneally administered lipoic acid, vitamin E, and linalool on the level of total lipid and fatty acids in guinea pig brain with oxidative stres induced by H₂O₂. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology,* 35(6): 547-52.
29. Öz, M., (2003). α -Lipoik asit ve α -tokoferol asetat'ın yaşlı dişi sıçanların eritrosit, karaciğer ve beyin dokularındaki yağ asidi bileşimi, kolesterol ve glutatyon düzeyleri üzerindeki etkileri, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
30. Keser, S., (2006). Trans-3 ,5, 4'-trihidroksistilben'in, potasyum bromat etkisine maruz bırakılan yaşlı dişi sıçanların bazı dokularındaki biyokimyasal değişimler üzerine etkisi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
31. Jelinska, M., Tokarz, A., Oledzka ,R., and Alicja, C.S., (2003). Effects of dietary linseed, evening primrose or fish oils on



- fatty acid and prostaglandin E₂ contents in the rat liver and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced tumours, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- molecular Basis of Disease*, 1637: 193-99.
32. Brener, R.R., (2000). Effects of experimental diabetes on the fatty acids composition, molecular species of phosphatidylcholine and physical properties of hepatic microsomal membranes, prostaglandins leukotrienes and essential fatty acids, 63:167-76.
33. Güvenç, M., (2004). İnsülin uygulanmayan tip I diabetik albino sıçanların beyin, kas, testis ve akciğer dokularındaki araşidonik asit (20:4 n-6) ve dokosaheksaenoik asit (22:6 n-3) miktarlarının değişimi üzerine alfa lipoik asit ile vitamin C'nin etkileri: Yüksek Lisans Tezi Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.