

# Alfa Lipoik Asidin Diyabetli Sıçanlarda Egzersizle Oluşan Lipit Peroksidasyonu Üzerine Etkileri

## *Effects of Alpha Lipoic Acid on Exercise-Induced Lipid Peroxidation in Diabetic Rats*

<sup>1</sup>Rahime Çelik-Tav, <sup>1</sup>Nilsel Okudan, <sup>1</sup>Hakkı Gökbel, <sup>2</sup>Sadık Büyükbaş, <sup>1</sup>Muaz Belviranlı

<sup>1</sup>Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Konya  
<sup>2</sup>Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Konya

### Özet

Çalışmanın amacı, diyabetli sıçanlarda alfa lipoik asit (ALA) desteğinin egzersizle oluşan lipit peroksidasyonu ve antioksidan durum üzerine etkilerinin belirlenmesiydi. On iki sıçan kontrol grubu olarak ayrıldı. 48 sıçana i.p 50 mg/kg tek doz streptozotosin verildi. Bir hafta sonra kan glikoz düzeyleri ölçülerek kan glikozu 300 mg/dl'nin üzerinde olan sıçanlar çalışmaya alındı. Üç hafta sonra diyabetli sıçanlar Kontrol grubu, ALA grubu, diyabet egzersiz grubu, ALA egzersiz grubu olmak üzere 4 gruba ayrıldı. İki hafta süreyle ALA grubuna 100 mg/kg ALA i.p. olarak verildi. Egzersiz gruplarına dahil olan sıçanlara 15. gün akut egzersiz yaptırıldı. Anestezi altında sıçanlardan intrakardiyak kan alındı ve alınan örneklerde malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri ve süperoksit dismutaz (SOD) ve ksantin oksidaz (XO) aktiviteleri belirlendi. Egzersiz yapan ALA grubunun MDA düzeyi egzersiz yapan diyabetli gruptan düşüktü. ALA takviyesi alan egzersiz grubunda NO düzeyi, egzersiz yapan diyabetli kontrol grubundaki NO düzeyinden düşüktü. Diyabetli sıçanlarda egzersizle oluşan lipit peroksidasyonunu ALA desteğinin azalttığı, nitrik oksit artışını ALA desteğinin engellediği sonuçlarına varıldı.

**Anahtar kelimeler:** Diyabet, egzersiz, alfa lipoik asit, oksidatif stres

### Abstract

The aim of the study was to determine the effects of alpha lipoic acid (ALA) on the lipid peroxidation and antioxidant status. Twelve rats were included in the control group. 48 rats were given a single dose of 50 mg/kg i.p. streptozocin. Blood glucose levels were measured after one week and the rats whose blood glucose levels were over 300 mg/dl were included in the study. After 3 weeks diabetic rats were divided into four groups; diabetic control group, ALA group, diabetic exercise group, ALA exercise group. ALA groups received 100 mg/kg i.p. ALA for two weeks. The rats in the exercise group were exposed to exercise at 15th day. Intracardiac blood was taken under anesthesia and malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) levels and superoxide dismutase (SOD) and xanthine oxidase (XO) activities were determined in the blood samples. It was observed that ALA exercise group had lower level of MDA than diabetic exercise group. NO levels in the exercise groups supplemented with ALA were lower than in the diabetic groups performed exercise but not received this supplementation. We concluded that exercise induced lipid peroxidation is decreased by ALA supplementation and NO increase is attenuated by ALA supplementation in diabetic rats.

**Key words:** Diabetes, exercise, alpha lipoic acid, oxidative stress

### GİRİŞ

Serbest radikaller bir veya daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküllerdir. İnsan vücudunda doğal olarak üretilen reaktif bileşiklerdir, pozitif (immün sistem üzerine) ve negatif (lipit, protein ve DNA oksidasyonu üzerine) etkileri vardır. Serbest radikaller ve oksijenin radikal olmayan türevleri birlikte reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılır (1,2). Serbest radikal üretiminin antioksidan savunmanın kapasitesini aşması hücrel hasarla sonuçlanan oksidatif strese yol açar (3). Diabetes mellitus, hiperglisemiyle ve endojen insulinin yetersiz sekresyonu veya yetersiz etkisiyle karakterize kronik bir metabolik hastalıktır (4). Hem insülin bağımlı (Tip 1) hem de insülininden bağımsız (Tip 2) diyabette oksidatif stres artar (5). Artan oksidatif stresin, diyabet ve komplikasyonlarının gelişmesinde rol oynadığı yaygın olarak kabul edilmektedir (6). Ayrıca,

oksidatif stresin insülin sekresyonunda ve etkisinde anormalliklere neden olduğu ileri sürülmüştür (7). Egzersiz sırasında oluşan oksidatif stres performansı ve egzersiz sonrasındaki toparlanma dönemini etkiler. Egzersiz fizyolojisinde kabul gören düşünce, akut veya tüketici egzersizin serbest radikal üretimini artırdığıdır. Buna karşılık, düzenli egzersizler ise antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak ve oksidan üretimini azaltarak bu etkiyi tersine çevirebilir (8). Diyabet ve akut egzersizin neden olduğu oksidatif hasarın önlenmesi için uzun yıllardan beri çeşitli antioksidan tedaviler üzerinde çalışılmaktadır. Yağda ve suda çözünebilir özelliğiyle alfa lipoik asit (ALA) güçlü bir antioksidandır. Hem okside hem de indirgenmiş formu antioksidan aktivite göstermektedir (9). ALA takviyesinin diyabet ve komplikasyonları, iskemik reperfüzyon hasarı ve diğer birçok klinik endikasyon üzerine yararlı etkileri rapor edilmesine rağmen diyabetli sıçanlarda akut egzersizin neden olduğu oksidatif hasar

üzerine etkisini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (10,11). Bu çalışmanın amacı, diyabetli sıçanlarda alfa lipoik asit takviyesinin akut egzersizin neden olduğu lipid peroksidasyonu ve antioksidan durum üzerine etkilerini araştırmaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Deney Hayvanları

Çalışma protokolü Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylandı. Çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen ve ortalama ağırlığı 200 gram olan 10 haftalık olan 60 erkek Sprague Dawley sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Sıçanlar çalışma boyunca iklim kontrollü odalarda, 20±1 derece sıcaklıkta % 50 rölatif nem ve 12/12 saat ışık periyodunda barındırıldı. Sıçanlar polikarbonat kafeslerde ve her kafeste 5 sıçan olacak şekilde barındırıldı. Yem ve su ad libitum verildi.

### Deney Grupları ve Dizaynı

Oniki sıçan kontrol grubu olarak ayırdıktan sonra 48 sıçana tek doz 50 mg/kg streptozosin (STZ) intraperitoneal olarak verildi. STZ (S0130; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) pH'sı 4,5 sitrat tamponu içerisinde çözüldü. STZ enjeksiyonundan bir hafta sonra sıçanların kuyruk veninden alınan kan örneklerinde glikoz konsantrasyonu ölçüldü ve 300 mg/dl'nin üzerinde olan sıçanlar çalışmaya dahil edildi. Diyabetin etkilerinin tam olarak ortaya çıkabilmesi için 3 hafta beklendikten sonra sıçanlar randomize olarak 5 gruba ayrıldı ve gruplar şu şekilde oluşturuldu.

1. Kontrol grubu (K; n=12): Hiçbir işlem yapılmayan grup.
2. Diyabet kontrol grubu (DM; n=11): Yalnızca diyabet oluşturan grup.
3. Diyabet egzersiz grubu (DM+E; n=7): Koşu bandında 20 m/dk hızda 30 dk egzersiz yaptırılan grup.
4. Diyabet ALA grubu (DM+ALA; n=10): İki hafta boyunca günde 100 mg/kg i.p. ALA verilen grup.
5. Diyabet ALA egzersiz grubu (DM+ALA+E; n=10): İki hafta boyunca günde 100 mg/kg i.p. ALA verilen ve çalışma sonunda koşu bandında 20 m/dk hızda 30 dk egzersiz yaptırılan grup.

ALA serum fizyolojik içerisinde çözümleninceye kadar NaOH ilave edildi ve daha sonra pH'sı 7.4 oluncaya kadar HCl ilave edildi ve diyabet oluşumunun 3. haftasında itibaren iki hafta süreyle günde 100 mg/kg ALA i.p. olarak verildi.

Çalışma sonunda sıçanlardan anestezi altında intrakardiyak kan alındıktan sonra servikal dislokasyon yapıldı. Alınan kan örnekleri 3000 devirde 10 dakika santrifüje edildi ve plazma örnekleri analiz edilinceye kadar -80 °C'de saklandı.

## Biyokimyasal Analizler

### Malondialdehit (MDA) Seviyesinin Ölçümü

MDA seviyeleri tiobarbitürik asit (TBA) reaktivitesi yöntemi kullanılarak ölçüldü (12). Yağ asidi peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA, TBA ile reaksiyona girerek sıcak ve alkali ortamda, 532 nm'de maksimum absorbans veren renkli kompleks oluşturur. Oluşan kompleksin okunan absorbansından faydalanılarak MDA değerleri elde edilir. 1,1,3,3-tetramethoxypropane'nin değişik konsantrasyonları ile hazırlanan standart grafiğinden faydalanılarak MDA düzeyleri nmol/ ml olarak hesaplandı.

### Ksantin Oksidaz (XO) Aktivitesinin Ölçümü

XO aktivitesi Prajda ve Weber'in (13) metoduna göre çalışıldı. Bu metod numunede bulunduğu farz edilen XO'nun ortamdaki ksantinden ürik asit oluşturması esasına dayanır. Oluşan ürik asit miktarı % 100'lük TCA solüsyonu eklenmesi ile sabitlenir. XO aktivitesi U/ ml cinsinden ifade edildi.

### Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçümü

SOD aktivite analizi Sun ve arkadaşlarının (14) metoduna göre gerçekleştirildi. Yöntem ksantin / ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitro blue tetrazolumu (NBT) indirgenmesi esasına dayanır. Oluşan süperoksit radikalleri ortamdaki NBT'yi indirgeyerek renkli formazan oluşturur. SOD aktivitesi U/ml olarak verildi.

### Nitrik Oksit Seviyesinin (NO) Ölçümü

Vücutta endojen olarak üretilen nitrik oksitin doku ve vücut sıvılarındaki konsantrasyonu, pek çok çalışmada nitrit ve nitrat olarak belirtilmektedir. Çünkü nitrik oksit, üretildiği bölgede saniyeler içinde okside olarak önce nitrite (NO<sub>2</sub>) daha sonra da nitrate (NO<sub>3</sub>) dönüşebilmektedir. Total nitrit (nitrit + nitrat) konsantrasyonu modifiye kadmiyum redüksiyon metodu ile değerlendirildi ve sonuçlar mmol/L olarak verildi.

### İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistik analizi bilgisayarda SPSS 15.0 for Windows programı ile yapıldı. Bulgular ortalama±standart sapma (SS) şeklinde verildi. Grup verilerinin istatistiksel analizi ANOVA ile yapıldı. Grup verileri arasındaki farklar faktoriyel ANOVA kullanılarak elde edildi. P değerinin 0.05'den küçük olması anlamlı olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Tüm deney gruplarının plazma MDA ve NO seviyeleri ve SOD ve XO aktiviteleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Egzersiz yaptırılan diyabetli grupta (DM+E) MDA değerleri kontrol (K) ve egzersiz yapmayan diyabetli (DM) gruplara göre yüksekti ve en yüksek MDA seviyeleri bu grupta idi (P<0.05). Buna karşılık, DM+ALA+E grubunda MDA düzeyi egzersiz

**Tablo 1.** Grupların plazma MDA ve NO seviyeleri ve SOD ve XO aktiviteleri (Ort±SS)

	K	DM	DM+E	DM+ALA	DM+ALA+E
n	12	11	7	10	10
MDA	0.72±0.31	0.96±0.57	2.03±0.20 <sup>ab</sup>	1.21±0.60	1.12±0.51 <sup>c</sup>
NO	26.90±21.61	32.13±12.03	70.90±26.31 <sup>ab</sup>	33.00±18.92 <sup>c</sup>	28.02±14.20 <sup>c</sup>
SOD	7.32±1.97	5.54±2.99	12.78±8.03	10.90±11.20	5.90±2.75
XO	0.23±0.14	0.16±0.14	0.19±0.15	0.21±0.23	0.19±0.11

aP<0.05 compared to K, bP<0.05 compared to DM-K, cP<0.05 compared to DM-Ex

yapmayan kontrolünden farklı değildi ( $P>0.05$ ). Egzersiz yapan diyabetli grupta NO düzeyi egzersiz yapmayan gruba göre daha yüksek bulundu ( $P<0.05$ ). ALA takviyesi yapılan egzersiz grubundaki NO düzeyleri, sadece egzersiz yapan diyabetli gruptaki NO düzeyinden daha düşüktü ( $P<0.05$ ) (Tablo 1). SOD ve XO aktiviteleri açısından gruplar arasında herhangi bir fark yoktu ( $P>0.05$ ) (Tablo 1).

### TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı, diyabetli sıçanlarda 30 dakika süreli akut egzersizin neden olduğu lipid peroksidasyonu ve antioksidan savunmadaki değişiklikler üzerine ALA takviyesinin etkisinin belirlenmesiydi. Çalışmanın başlıca bulgusu, diyabetli sıçanlara 30 dakika koşu egzersizi yaptırıldığında ALA'nın lipid peroksidasyonu üzerine etkili olduğudur. Bu çalışmada, diyabetli sıçanlarda 30 dakikalık akut egzersizin lipid peroksidasyonuna ve oksidatif hasara sebep olduğu MDA seviyelerindeki artış ile gösterildi. ALA verilen ve egzersiz yaptırılan diyabetli gruptaki MDA düzeyinin diyabetli ve egzersiz yaptırılan gruptakinden düşük olduğu görüldü. Diyabetli sıçanlarda ALA takviyesi egzersiz grubunda lipid peroksidasyonunu azaltarak oksidatif strese karşı koruma sağladı. Benzer bir çalışmada (15) ALA takviyesinin kalp, karaciğer ve gastrocnemius kas dokusunu lipid peroksidasyonuna karşı korurken beyin dokusunu korumadığı (16) gösterilmiştir. Karnitin ve ALA takviyesinin sıçan beyindeki lipid peroksidasyonunu ve protein karbonil miktarını azalttığı, antioksidan enzim aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (17). Beta karoten ve ALA'nın diyabetik sıçanlarda oksidatif stresi azaltmada etkili olduğu bulunmuştur (18). Bu çalışmada, ALA verilen ve egzersiz yaptırılan ve yaptırılmayan diyabetli gruplardaki NO düzeyleri diyabetli ve egzersiz yaptırılan gruptakinden düşüktü. NO düşük konsantrasyonlarda antioksidan yüksek konsantrasyonlarda ise prooksidan etki gösterdiğinden ALA takviyesi yapılan gruplarda NO seviyelerinin azalması ALA'nın antioksidan etkisini desteklemektedir. Diyabetli sıçanlarda ALA takviyesi egzersiz grubunda prooksidan etkiyi azaltarak oksidatif strese karşı koruma sağladı. Mevcut çalışmada SOD ve XO aktiviteleri açısından gruplar arasında herhangi bir fark yoktu. ALA'nın böbrek, karaciğer ve kalpte Cu/Zn SOD aktivitesini azaltırken, glutatyon peroksidaz aktivitesini artırdığı bildirilmiştir (19). Bir başka çalışmada ise Oksala ve ark (20) sıçanlarda lipoik asit takviyesinin egzersizin neden olduğu oksidatif strese karşı antioksidan korumayı deneysel diyabetin varlığında veya yokluğunda artırdığını göstermişlerdir. Çalışmamızda, ALA takviyesinin egzersiz yaptırılan grupta SOD'un düzeyini istatistiksel açıdan önemli olmamasına rağmen belirgin derecede azalttığı görülmüştür. Sonuç olarak, ALA takviyesi diyabetli sıçanlarda egzersizle oluşan lipid peroksidasyonunu ve NO seviyelerini önemli ölçüde azaltarak güçlü bir antioksidan etki gösterir ve oksidatif hasarı azaltır.

### KAYNAKLAR

1. Urso ML and Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicol* 2003; 189: 41-54.
2. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York, 2000.
3. Jenkins RR. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sport Med* 1988, 5: 156-70.
4. Laakso M. Cardiovascular disease in type 2 diabetes challenge for treatment and prevention. *J Intern Med* 2001; 249: 225-35.
5. Rahimi R, Nikfar S, Larjani B, Abdollahi M. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother* 2005; 59: 365-73.
6. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17: 24-38.
7. Kuroki T, Isshiki K, King GL. Oxidative stress: the lead or supporting actor in the pathogenesis of diabetic complications. *J Am Soc Nephrol* 2003; 4: 216-20.
8. Vollaard NB, Shearman JP, Cooper CE. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Med* 2005; 35: 1045-62.
9. Goraca A, Huk-Kolega H, Piechota A, Kleniewska P, Ciejka E, Skibska B. Lipoic acid-biological activity and therapeutic potential. *Pharmacol Rep* 2011; 63: 849-58.
10. Golbidi S, Ebadi SA, Laher I. Antioxidants in the treatment of diabetes. *Curr Diabetes Rev* 2011; 7: 106-25.
11. Poh ZX, Goh KP. A current update on the use of alpha lipoic acid in the management of type 2 diabetes mellitus. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2009; 9: 392-8.
12. Hammouda A el-R, Khalil MM, Salem A. Lipid peroxidation products in pleural fluid for separation of transudates and exudates. *Clin Chem* 1995; 41: 1314-5.
13. Prajda N, Weber G. Malignant transformation-linked imbalance: decreased XO activity in hepatomas. *FEBS Lett* 1975; 59: 245-9.
14. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
15. Khanna S, Atalay M, David E, Laaksonen DE, Gül M, Roy S et al. Alpha-lipoic acid supplementation: tissue glutathione homeostasis at rest and after exercise. *J Appl Physiol* 1999; 86: 1191-6.
16. Lappalainen J, Lappalainen Z, Oksala NK, Laaksonen DE, Khanna S, Sen CK, Atalay M. Alpha-lipoic acid does not alter stress protein response to acute exercise in diabetic brain. *Cell Biochem Funct* 2010; 28: 644-50.
17. Muthuswamy AD, Vedagiri K, Ganesan M, Chinnakannu P. Oxidative stress-mediated macromolecular damage and dwindle in antioxidant status in aged rat brain regions: Role of L-carnitine and DL-  $\alpha$ -Lipoic Acid. *Clinica Chim Acta* 2006; 368: 84-92.
18. Berryman AM, Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Influence of treatment of diabetic rats with combinations of pycnogenol, beta-carotene, and alpha-lipoic acid on parameters of oxidative stress. *J Biochem Mol Toxicol* 2004; 18: 345-52.
19. Sahin M, Sağıdıç G, Elmas O, Akpınar D, Derin N, Aslan M, Agar A, Alicigüzel Y, Yargıçoğlu P. Effect of chronic restraint stress and alpha-lipoic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in rat peripheral organs. *Pharmacol Res* 2006; 54: 247-52.
20. Oksala NK, Laaksonen DE, Lappalainen J, Khanna S, Nakao C, Hanninen O et al. Heat shock protein 60 response to exercise in diabetes: effects of alpha lipoic acid supplementation. *J Diabetes Complications* 2006; 20: 257-61.