

DMBA İle İndüklenmiş Kobayların Beyin Dokusundaki Bazı Elementler Üzerine Alfa Lipoik Asidin Etkisi

Harun ÇİFTÇİ *✍ Ahmet ÖZKAYA ** Alpaslan DAYANGAÇ *** Ali ÖLÇÜCÜ ****
Sait ÇELİK ***** Zafer ŞAHİN **** Sema ATEŞ ****

* Department of Chemistry Faculty of Science Ahi Evran University, Kirsehir - TURKEY

** Department of Chemistry Faculty of Science Adiyaman University, Adiyaman - TURKEY

*** Department of Biology Faculty of Science Ahi Evran University, Kirsehir - TURKEY

**** Department of Chemistry, Faculty of Science Firat University, Elazig - TURKEY

***** Department of Chemistry, Faculty of Science Bingol University, Bingol - TURKEY

Makale Kodu (Article Code): 2009/067-A

Özet

Birçok faktöre bağlı olarak gelişen kanserin etiyolojisinde reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif stres önemli yer tutmaktadır. Çalışmamızda parakarsinojen 7,12-dimetilbenz-[a]antrasen (DMBA) uygulanan kobaylarda (Guinea Pig) antioksidan özelliklere sahip alfa-lipoik asit'in (α -LA) makro ve eser element değişikliklerine karşı beyinde koruyucu rolü araştırıldı. Deneylerde; kontrol, DMBA, α -LA ve DMBA+ α -LA gruplarında eşit sayıda toplam 24 erkek kobay kullanıldı. Kobayların beyinlerinde ICP-AES ile yapılan analiz neticesinde, makro elementlerden kalsiyum'un kontrol grubuna göre DMBA grubunda arttığı ($P<0.01$) ve DMBA+ α -LA grubunda ise azalarak ($P<0.01$) kontrol grubu ile aynı düzeylere indiği tespit edildi. Magnezyum düzeyi; DMBA grubunda kontrol grubuna göre azaldığı ($P<0.01$), DMBA+ α -LA grubunda kontrol grubu seviyesine yakın yükseldiği görüldü. Eser elementlerle ilgili olarak ise, bakır seviyesinin kontrol grubuyla kıyasla DMBA grubunda azaldığı ($P<0.01$), DMBA+ α -LA grubunda ise kontrol grubu ile aynı seviyede olduğu belirlendi. Çinko düzeyleri incelendiğinde, DMBA grubunda kontrole göre azaldığı ($P<0.01$) ve DMBA+ α -LA grubunda arttığı ($P<0.01$) gözlemlendi. Ayrıca demir ve mangan düzeyleri arasında anlamsal farkların olmadığı tespit edildi ($P>0.05$). Sonuç olarak, Beyin gibi önemli organları oksidatif stresten korumak için makro ve eser element yönünden α -LA'nın nöroprotektif etki gösterdiği söylenebilir.

Anahtar sözcükler: DMBA, 7,12-dimetilbenz-[a]antrasen, α -Lipoik asit, Eser Element, ICP-AES, Beyin, Kobay

Effect of Lipoic Acid on the Some Elements in Brain Tissue of DMBA-Induced Guinea Pigs

Summary

The oxidative stress, depending on many factors in the etiology of developing cancer caused by reactive oxygen species, plays an important role. In our study, 7, 12-dimethylbenz-[a]anthracene (DMBA) was applied in Guinea Pigs, the alpha lipoic acid (α -LA) has antioxidant properties was investigated protective role against to levels of macro and trace elements in brain. In experiments; totally 24 adult male Guinea Pigs were randomly divided into 4 equal groups (control, DMBA, α -LA and DMBA+ α -LA) containing same numbers. As a result of the analysis in Guinea Pigs brain with the aid of ICP-AES; it was found that the level of calcium from macro elements in DMBA group increased according to control group ($P<0.01$) and decreased in DMBA+ α -LA group ($P<0.01$), that was in the same levels with control group. Magnesium decreased in DMBA group according to control group ($P<0.01$) and DMBA+ α -LA group and increased in close level of control group. Regarding trace elements, it was seemed that copper levels compared with the control group decreased in DMBA group ($P<0.01$) and DMBA+ α -LA group, it was same level with control group. It was observed that the level zinc decreased according to control group in DMBA group ($P<0.01$) and increased in DMBA+ α -LA group ($P<0.01$). In addition, it was obtained that levels of iron and manganese in between groups were not significant ($P>0.05$). As a result, it can be said that from the point of macro and trace elements, the lipoic acid (α -LA) was indicated neuroprotective effect for protection of important organs such as brain from the oxidative stress.

Keywords: DMBA, 7,12-dimetilbenz-[a]antrasen, α -Lipoic acid, Trace Element, ICP-AES, Brain, Guinea pig



İletişim (Correspondence)



+90 386 2114552



harunciftci@yahoo.com

GİRİŞ

Deneyssel olarak uygulanan ve polisiklik aromatik hid-rokarbonlar olarak tanınan DMBA çeşitli dokularda güçlü oksidatif hasar oluşturmaktadır ¹. Son yıllarda yapılan bir çok araştırmada yüksek dozda uygulanan DMBA'nın bazı dokularda tümör oluşumunu da indüklediği ileri sürülmektedir ². DMBA'nın rat karaciğerinde serbest radikallerin seviyesini önemli ölçüde yükselttiği ³, kısa ve uzun süreli olarak ratlara verildiğinde karaciğerde hidroperoksitleri artırdığı bildirilmiştir ⁴. Serbest radikaller, kanserin başlangıç, ilerleme ve gelişme safhalarında etkili olmakla beraber bu etki ilerleme safhasında daha belirgindir ⁵. α -LA ise antioksidan özellikleri olan ve bu yönüyle serbest radikallere karşı metabolizmada koruyucu etkilere sahip önemli bir reaktiftir. Metabolizmada vitamin E ve glutasyonu rejenere ederek aktif hale getirir. α -LA antioksidan olarak suda ve yağda çözüldüğü için önem arz etmektedir. Bu yönüyle suda çözünen vitamin C ve yağda çözünen vitamin E gibi hem hücre dışında hem de hücre membranında koruyucu etkileri olduğu belirtilmektedir ⁶. Oksidatif metabolizmadaki α -LA; lipoamid gibi mitokondrideki α -ketoasid dehydrogenase komplekslerinin temel kofaktörü olarak bilinir ⁷. Yapılan çalışmalarda α -LA türevi olan lipoatin; serbest radikallere karşı koruyucu etkilere sahip olduğu bildirilmektedir ^{8,9}. Benzer şekilde, oksidatif hasarın oluşturduğu karaciğer patolojisinde ¹⁰, ağır metal toksiditesinde ¹¹ ve diyabetik polinöropatide ¹² oluşan hasarlara karşı α -LA koruyucu rol üstlenmektedir.

Enzimatik reaksiyonların aktivasyonu veya inhibisyonu kapsayan biyolojik süreçlerde eser elementlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenlerle eser elementlerin oksidatif stres ve kanser hastalıklarıyla ilişkileri yapılan çalışmalarda bildirilmiştir ¹².

Hücrede oksidatif hasar sonucu bozulan eser element dengesi, yaşa bağlı oluşan patolojik durumlara da sebep olmaktadır. Ayrıca, metal dengesinin bozulması ile oluşan serbest radikaller DNA baz modifikasyonuna, lipid peroksidasyonunun artmasına ve protein oksidasyonuna sebep olmaktadır ^{13,14}.

Merkezi sinir sisteminin yapısında bulunan antioksidan sistemlerin diğer dokulara göre daha zayıf olmasından dolayı serbest radikallerin indüklediği oksidatif hasardan etkilenmesi muhtemel önemli organlardan biri beyindir. Çalışmamızda DMBA'ya maruz kalma sonucunda beyinde oluşacak patofizyolojik sürecin; α -LA uygulanmasıyla makro ve eser elementler açısından nasıl etkilendiğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

METARYAL ve METOT

Hayvanlar, Bakım ve Besleme

Çalışmada ortalama 460-640 gr ağırlığında olan 24 adet, sağlıklı, ergin 12 aylık beyaz renkli kobaylar (Guinea Pig) kullanıldı. Kobaylar denemelere başlamadan 7 gün önce her biri 6'şar hayvan içeren kafeslere ayrılarak grupların günlük ortalama yem ve su tüketimleri belirlendi. Kobaylara verilen yem kompozisyonu *Tablo 1*'de gösterilmiştir. Hayvanların laboratuvar şartlarında 12 saat aydınlık/karanlık periyodunda ve oda sıcaklığında ($20\pm 3^\circ\text{C}$) barınmaları sağlandı. Çalışmada kullanılan hayvanlar; Fırat Üniversitesi Araştırma Fonu (FÜNAF-395) kapsamında Elazığ Hayvan Sağlığı ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi. Deney süresince hayvan hakları ile ilgili olarak NIH (National Institutes of Health) tarafından belirlenen kriterlere özenle uyuldu.

Tablo 1. Diyet Kompozisyonu

Table 1. Diet Compositions

İçerik	Bileşim (%) (w/w)
Melaslı şeker pancarı posası	65.0
Kuru yonca	16.2
Saman	16.1
Nişasta	1.0
Sodyum sülfat	0.1
Vitamin mineral karışımı ^a	0.6

^a Vit. A, B₃, E, K₃, B₁, B₂, B₆, B₁₂, nicotinamide, folic acid, biotin, Calpan, Niasin, Mn, Fe, Zn, Cu, I, Co, Se, antioxidant ve Ca

Çalışma Prosedürü

Deneyde, kontrol grubu, DMBA grubu, α -LA grubu ve DMBA+ α -LA grubu olmak üzere 4 grup oluşturuldu. DMBA ve α -LA mısırözü yağında çözüldü. Enjeksiyonlar kobaylara intraperitoneal olarak gün aşırı uygulandı. Kontrol grubuna sadece mısırözü yağı, DMBA grubuna 6 mg/kg/gün DMBA, α -LA grubuna 6 mg/kg/gün α -LA, DMBA+ α -LA grubuna (6 mg/kg/gün DMBA+6 mg/kg/gün α -LA) olacak şekilde uygulandı. 30 günlük süre sonunda kobaylar dekapite edildi ve total beyinleri cerrahi işlemlerle çıkarıldı. Kobayların ön beyinlerden (forebrain) 1'er gram alınarak izotonik tuz çözeltisi (0.9% v/w) ile yıkandı ve homojenleştirildi. 0.30 gram homojenleştirilmiş örnek alınarak üzerine 1,5 mL HNO₃ (%65 w, Merck, Darmstadt), 1.5 mL HClO₄ (%60 w, Merck, Darmstadt) ve 2 mL H₂O₂ (%30 w, Merck, Darmstadt) ilave edilerek mikrodalga fırında, kapalı sistem PTFE (politetrafloretillen) kaplarda çözünürleştirme işlemleri gerçekleştirildi. Mikro dalga fırında parçalama programı 250 W, 5 dak; 800 W, 10 dak ve 450 W, 5 dak olacak şekilde uygulandı.

Elde edilen berrak karışımın hacmi 0.1 mol L⁻¹ HNO₃ çözeltisi ile 10 ml'ye tamamlandı. Beyin örneği içermeyen blank çözeltisinde aynı işlemler uygulandı. Metal tayinlerinde atomik emisyon spektrometrisi (Perkin Elmer 3100 ICP-AES) kullanıldı. Standart metal çözeltileri analitik saflıkta (Merck) 1000 mg L⁻¹ konsantrasyonlarındaki atomik absorpsiyon spektrometrisinin standart çözeltilerinden hazırlandı.

Verilerdeki istatistiksel analiz, gruplar arasında triplicate ANOVA (SPSS) kullanılarak varyans analizi ile değerlendirildi. Gruplara ait veri ortalamaları arasındaki farklılıklar Duncan testi ile karşılaştırıldı. Karşılaştırma gruplarına ait veriler 0.01 güvenlik eşiğine göre istatistiksel analize tabi tutuldu. Ortalama değerler $\bar{x} \pm SD$ olarak verilmiştir.

BULGULAR

Kalibrasyon eğrileri, farklı konsantrasyonlarda çalışılan metallerin çözeltileri kullanılarak belirlendi. Elde edilen grafiklerde konsantrasyon değerlerinin lineer olduğu aralıklar tespit edildi. Elementlere ait doğru denklemleri ve konsantrasyon aralıkları

Ca için $Y=32.3X-5.3$, $R^2=0.999$ (1.0-5.0 mg L⁻¹)

Cu için $Y=44.6X+1.4$, $R^2=0.998$ (1.0-5.0 mg L⁻¹)

Mg için $Y=164.91X+50.07$, $R^2=0.999$ (0.25-3.0 mg L⁻¹)

Fe için $Y=9.6X-1.4$, $R^2=0.997$ (1.0-5.0 mg L⁻¹)

Mn için $Y=64.6X-5.3$, $R^2=1$ (0.5-2.5 mg L⁻¹)

ve Zn için $Y=161.5X-5.3$, $R^2=0.999$ (0.2-1.0 mg L⁻¹)

olarak bulundu.

Analiz edilen örneklerdeki metal düzeyleri *Tablo 2*'de verilmiştir.

Tablo 2. Beyin dokusu eser element düzeyleri ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (n=6)

Table 2. The levels of trace element in brain ($\mu\text{g.g}^{-1}$) (n=6)

Gruplar	Ca	Mg	Cu	Zn	Fe	Mn
Kontrol	99.27±16.30 ^a	27.68±5.54 ^b	5.80±0.93 ^b	15.98±1.60 ^c	8.50±2.02 ^a	0.27±0.10 ^a
α -LA	92.80±14.42 ^a	28.02±7.55 ^b	4.80±1.37 ^a	12.50±1.52 ^b	9.24±1.30 ^a	0.30±0.11 ^a
DMBA	131.77±18.73 ^d	20.35±4.40 ^a	3.65±1.03 ^a	8.93±2.20 ^a	8.14±1.20 ^a	0.30±0.11 ^a
α -LA+DMBA	116.67±20.02 ^b	24.56±3.33 ^a	5.67±1.78 ^b	13.20±1.80 ^b	7.72±1.04 ^a	0.30±0.10 ^a

a,b,c,d: Aynı sütun içerisinde farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel önemi göstermektedir (P<0.01)

α -LA: Alfa-lipoik asit grubu, **DMBA:** 7,12-dimetilbenz-[a]antrasen grubu,

α -LA+DMBA: Kombinasyonlu grup

parçalama işlemi uygulandı. Analizlerden sonra geri kazanım (recovery) değerleri %93.8 ile %102.7 arasında bulundu. Bu geri kazanım değerleri, çalışılan yöntemin kabul edilebilen sınırlarda sonuçlar verdiğini göstermektedir.

Kontrol grubu kalsiyum düzeyi ile α -LA grubu Ca düzeyi arasında istatistiksel fark olmadığı saptandı (P>0.05). Kontrol grubuna göre DMBA grubunda kalsiyum düzeyinin yükseldiği tespit edildi (P<0.01). α -LA etkisiyle α -LA+DMBA grubunda kalsiyum düzeyinin DMBA grubuna göre düştüğü saptandı (P<0.01).

DMBA grubundaki magnezyum düzeyi kontrol ve α -LA gruplarına göre anlamlı bir fark oluşturacak şekilde azalmıştır (P<0.01). Gruplar arasında demir ve manganez düzeyleri arasında istatistiksel farkların olmadığı tespit edildi (P>0.05). Bakır ve çinko düzeylerinin kontrol grubuna göre DMBA grubunda azaldığı bulundu (P<0.01). Kombinasyonlu grupta bakır düzeyi kontrol grubu bakır düzeyiyle anlamlı bir fark oluşturmadığı bulundu (P>0.05). DMBA grubunda düşük olan çinko düzeyinin α -LA+DMBA grubunda yüksek olduğu görüldü (P<0.01).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Eser elementler, organizmada katalitik, enzimatik ve yapısal faaliyetlere katılan, besin ve su ile dışarıdan alınması gereken anorganik maddelerdir. Organizmaya alınan eser elementler çeşitli kan proteinlerine bağlanarak bütün dokulara dağılırlar. Eser element miktarları beslenme, yaş, hastalık, çevre gibi çeşitli faktörlerle yakından ilgilidir. Özellikle Zn, Cu ve Mn

Yöntemin doğruluğunu test etmek amacıyla geri kazanım deneyleri uygulandı. Bu deneylerde, her birinde 0.30 g kobay beyin örneği bulunan numunelere, çalışılan metallerin standartlarından farklı miktarlarda (50 μg Ca, 20 μg Mg, 3 μg Cu, 5 μg Zn, 10 μg Fe ve 0.3 μg Mn) eklenerek mikrodalga

enfeksiyon hastalıklarında immünite faktörü olmalarının yanında, oksidatif stres ve kansere karşı koruyucu özellik gösterirler. Eser elementlerin dokulardaki normal değerlerinden eksik olması çeşitli hastalıklara yol açtığı gibi yüksek konsantrasyonda bulunmaları ise toksik reaksiyonlara sebep olmaktadır¹⁵. Örneğin,

Alzheimer hastalığında beyin dokusunda metal konsantrasyonunda anormal artışın gözlenmesi¹⁶, Parkinson hastalığında demir birikiminin dopaminerjik bozukluklara sebep olması¹⁷ ve Menkes ve Wilson hastalığında¹⁸ bakır bağlı proteinlerin seviyesinin azalması gibi patofizyolojik durumlar oluşmaktadır.

Çalışmamızdaki beyin örneklerinde Cu ve Zn düzeylerinin DMBA'nın etkisiyle azalması ile ilgili olarak, Donma ve arkadaşları¹⁹ kanserli çocukların saç örneklerinde yaptıkları çalışmada; Cu ve Zn düzeylerinin kanser olmayanlara göre oldukça düşük olduğunu bildirmişlerdir. Aynı şekilde, Piccinini ve arkadaşları²⁰ akciğer kanserli hastalarda, Yao ve arkadaşları²¹ ise osteomalı hastalarda Cu ve Zn seviyelerinin sağlıklı bireylere göre düşük olduğunu rapor etmişlerdir. Bunlarla birlikte, Zn; merkezi sinir sisteminde özellikle beyinde antioksidan olarak davrandığı literatürde belirtilmektedir. Diğer yumuşak dokulara göre, beyin anlamlı olarak daha fazla çinkoya ihtiyaç duymaktadır. Sinir sistemi hastalıkları, ruhsal bozukluklar, keskin duyu kayıpları, bilişsel engellilik durumlarında Zn eksikliğinin olduğu tespit edilmiştir²². Noceworthy ve Bray²³'in ratlar üzerinde yaptığı çalışmada, Zn'nun oksidatif strese karşı kan beyin bariyer sistemini koruduğu, nörolojik rahatsızlıkların gelişimini önlediği rapor edilmiştir.

Literatürdeki bu veriler ve çalışmamızda kontrol grubuna göre DMBA grubunda Cu ve Zn düzeylerindeki azalmalarla elde ettiğimiz bulgular; oksidatif strese ve kansere neden olan DMBA'nın beyin üzerindeki olumsuz etkilerini önlemek için organizmanın Cu ve Zn'ya ihtiyacı olduğunu göstermektedir.

Kobay beyin örneklerinin analizinde Ca seviyesi DMBA grubunda artış göstermiş ve α -LA+DMBA uygulanan grupta α -LA'nın etkisiyle azalarak kontrol grubu değerine yaklaşmıştır. Ca ve oksidatif stres ilişkisini hedef alan çalışmalarda bu elementin seviyesinin normal organlara kıyasla hasar görmüş doku veya organlarda daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Bu durumun DMBA'nın serbest radikal üretimini artırarak oluşturduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde Orrenius ve ark.nın²⁴ yaptığı çalışmalarda hücrede serbest kalsiyum miktarının artmasıyla kalsiyuma bağlı savunma sistemi enzimlerinin aktive olduğu ve serbest radikal üretiminin ile birlikte de kalsiyumun hücre içinde arttığı ifade edilmektedir. Ayrıca multiple myeloma hastalarında da Ca seviyesinde artış olduğu bildirilmektedir²⁵. Kanserli dokudaki aşırı Ca artışının beyinde homeostatik dengeyi bozarak fizyolojik seviyenin üzerine çık-

tığı ve böylece bu organı da etkilediği görülmektedir. Beyin için önemli fonksiyonlar üstlenen bu elementin yüksek seviyelerinin toksik olduğu bilinmektedir²⁶. DMBA'nın neden olduğu aşırı Ca artışının α -LA uygulamasıyla azalarak normal sınırlara yaklaşmış olması α -LA'nın patofizyolojik durumlarda nöroprotektif özelliğe sahip olabileceğini teyit etmektedir²⁷.

Araştırmamızda Fe ile ilgili olarak grupların hiçbirinde anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir. Ancak konuyla ilgili olarak yapılmış çalışmalarda malign endometrium, kanserli boyun dokularında, malign prostat ve kolorektal polipler gibi durumlarda Fe seviyesi sağlıklı kontrol gruplarına göre daha yüksek bulunmuştur^{28,29}. Bunlara ilave olarak DMBA ile oluşturulmuş deri tumorigenesis örneklerinde demir oldukça fazla miktarda bulunmuştur³⁰. Aynı şekilde, ratlarda DMBA ile oluşturulmuş meme tümörlerinin demir eksikliğinde daha yavaş geliştiği bildirilmiştir³¹. Bütün bu çalışmalardan elde edilen veriler Fe'nin tumorigenesis ve oksidatif stresi artırıcı role sahip olabileceğini göstermektedir. Epidemiyolojik insan çalışmalarından elde edilen sonuçlar da Fe'nin kanser gelişiminde risk faktörü olabileceğine işaret etmektedir^{32,33}. Çalışmamızda Fe ile ilgili olarak beyinde anlamlı bir değişiklik elde edemememizin nedeni DMBA'nın neden olduğu oksidatif stres neticesinde Fe artışının hasar gören organ veya dokularda olmasından kaynaklanabilir.

Çalışmamızda, DMBA uygulamasının, beyinde Mg seviyesini kontrole göre düşürdüğü ve bu azalmanın α -LA+DMBA uygulanan grupta kontrol grubu değerine yaklaşacak şekilde yükseldiği görülmüştür. Mg'nin in vivo şartlarda kansere karşı koruyucu özelliğinin olduğu bildirilmektedir^{34,35}. DMBA uygulaması neticesinde azalan Mg düzeyinin α -LA uygulamasıyla artış göstermesi bu maddenin anti kanserojen etkinlik bakımından önemli potansiyele sahip olduğunu gösteren delillerden birisidir.

Sonuç olarak, oksidatif strese neden olan DMBA'nın Guinea pig'lerde uygulanmasıyla, beyinde makro ve eser element düzeylerinin Mn ve Fe hariç, olumsuz etkilendiği görülmüştür. α -LA uygulanmasıyla beyinde makro ve eser element düzeyinin DMBA'nın olumsuz etkilerinden korunabildiği belirlenerek, α -LA'nın nöroprotektif özellikleri teyit edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Irfana M, Naheed B: Enhancement of pro-oxidant effect of 7,12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) in rats by pre-exposure to restraint stress. *Cancer Lett*, 240 (2): 213-220, 2006.

2. **Bowden GT, Slaga TJ, Shapes BG, Boutwell RK:** The Role of aryl hydrocarbon hydroxylase in skin tumor initiation by 7,12-Diethyl [a] benzantrasene and 1,2,5,6-dibenzanthracene using DNA binding and thymidine 3H incorporation into DNA as criteria. *Cancer Res*, 34, 2634-2642, 1974.
3. **Lesko SA, Ts'o P, Yang S, Zheng R:** Benzo(a)pyrene radical and oxygen radical involvement in DNA damage, cellular toxicity and carcinogenesis. In, McBrien DCH, Slater TF (Eds): *Free Radicals Lipid, Peroxidation and Cancer*. pp 401-420, Academic Press, New York, 1982.
4. **Maruyama H, Watanabe K, Yamamoto I:** Effect of dietary kelp on lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity in livers of rats given breast carcinogen DMBA. *Nutr Cancer*, 15, 221-228, 1991.
5. **Babs CF:** Free radicals and etiology of cancer. *Free Radical Bio Med*, 8, 191-200, 1990.
6. **Biewenga GP, Haenen GR, Bast A:** The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol*, 29 (3): 315-317, 1997.
7. **Packer L:** α -Lipoic acid; metabolic antioxidant which regulates NF-KB signal transduction and protects against oxidative injury. *Drug Metab Rev*, 30 (2): 245-275, 1998.
8. **Cameron NE, Cotter MA, Horrobin DH, Tritschler HJ:** Effects of α -lipoic acid on neurovascular function in diabetic rats: interaction with essential fatty acids. *Diabetologia*, 41, 390-399, 1998.
9. **Kozlov AV, Gille L, Stanick K, Nohl H:** Dihydrolipoic acid maintains ubiquinone in the antioxidant active form, by two electron reduction of ubiquinone and one electron reduction of ubisemiquinone. *Arch Biochem Biophys*, 363, 148-154, 1999.
10. **Bustamante J, Lodge JK, Marcocci L, Tritschler HJ, Packer L, Rihn BH:** α -Lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radic Biol Med*, 24, 1023-1039, 1998.
11. **Pande M, Flora SJS:** Lead-induced oxidative damage and its response to combined administration of alpha-lipoic acid and succimers in rats. *Toxicology*, 177, 187-196, 2002.
12. **Naveed S, Hazel HR, McMillan DC, Talwar D, O'Reilly DSJ:** Acute-phase reactants and plasma trace element concentrations in non-small cell lung cancer patients and controls. *Nutr Cancer*, 28, 308-312, 1997.
13. **Kayali R, Çakatay U, Kiziler AR and Aydemir B:** Effect of Alpha lipoic acid supplementation on trace element levels in serum and in postmitotic tissue in aged rats. *Med Chem*, 3, 1-4, 2007.
14. **Valko M, Morris H, Cronin MTD:** Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*, 12 (10): 1161-208, 2005.
15. **Williams RPJ:** Zinc: What is its role in biology? *Endeavour New Series*, 8, 65-70, 1984.
16. **Yokel RA:** The toxicology of aluminum in the brain: A review. *Neurotoxicology*, 21 (5): 813-828, 2000.
17. **Gutteridge JMC:** Hydroxyl radicals, iron, oxidative stress and neurodegeneration. *Ann NY Acad Sci*, 738, 201-213, 1994.
18. **Andrews NC:** Mining copper transport genes. *Proc Natl Acad Sci*, 98, 6543-6545, 2001.
19. **Donma MM, Donma O, Tas MA:** Hair zinc and copper concentrations and zinc: Copper ratios in pediatric malignancies and healthy children from southeastern Turkey. *Biol Trace Elem Res*, 36 (1): 51-63, 1993.
20. **Piccinini L, Borella P, Bargellini A, Medici CI, Zoboli A:** A case-control study on selenium, zinc, and copper in plasma and hair of subjects affected by breast and lung cancer. *Biol Trace Elem Res*, 51 (1): 23-30, 1996.
21. **Yao HY, Zeng XZ, Lu CR, Wang XD, Che JM, Mu MY, Yang J, Wang ZX, Zhang HS, Yie YQ, Chung HC, Liu TC:** Particle induced X-ray emission for trace element analysis of hairs from patients with cancer. *Chung Hua Chung Liu Tsa Chih*, 10 (2): 92-94, 1998.
22. **Kocaturk S, Kocaturk PA, Kavas GO, Mutluer N:** Antioxidant defence system in a patient with cerebrovascular accident. *J Int Med Res*, 24, 376-380, 1996.
23. **Zoriy MV, Dehnhardt M, Matusch A, Becker JS:** Comparative imaging of P, S, Fe, Cu, Zn and C in thin sections of rat brain tumor as well as control tissues by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim Acta B*, 63, 375-382, 2008.
24. **Orrenius S, McCabe MJ, Nicotera P:** Ca^{2+} dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. *Toxicol Lett*, 64-65, 357-364, 1992.
25. **Oyajobi BO:** Multiple myeloma/hypercalcemia. *Arthritis Res Ther*, 9 (1): 1-6, 2007.
26. **Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL:** Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 4, 517-529, 2003.
27. **Greenamyre JT, Garcia-Osuna M, Greene JG:** The endogenous cofactors, thioctic acid and dihydrolipoic acid, are neuroprotective against NMDA and malonic acid lesions of striatum. *Neurosci Lett*, 171, 17-20, 1994.
28. **Alimonti A, Bocca B, Lamazza A, Forte G, Rahimi S, Mattei D, Fiori E, Iacomino M, Schillaci A, De Masi E, Pino A:** A study on metals content in patients with colorectal polyps. *J Toxicol Env Health*, 71, 342-347, 2008.
29. **Cunzhi H, Jiexian J, Xianwen Z, Jingang G, Shumin Z:** Serum and tissue levels of six trace elements and copper/zinc ratio in patients with cervical cancer and uterine myoma. *Biol Trace Elem Res*, 94, 113-22, 2003.
30. **Razazadeh H, Athar M:** Evidence that iron overload promotes 7-12-dimethyl benz(a)anthracene-induced skin tumourigenesis on mice. *Redox Report*, 3, 1-7, 1997.
31. **Hrabinski D, Hertz JL, Tantillo C, Berger V, Sherman AR:** Iron repletion attenuates the protective effects of iron deficiency in DMBA-induced mammary tumours in rats. *Nutr Cancer*, 24, 133-142, 1995.
32. **Selby JV, Friedman GD:** Epidemiologic evidence of an association between body iron stores and risk of cancer. *Int J Cancer*, 41, 677-682, 1988.
33. **Stevens RG, Jones DY, Micozzi MS, Taylor PR:** Body iron stores and the risk of cancer. *New Engl J Med*, 319, 1047-1052, 1988.
34. **Ciftci H, Bakal U:** The effect of lipoic acid on macro and trace metal levels in living tissues exposed to oxidative stress. *Anti Canc Agents Med Chem*, 9, 560-568, 2009.
35. **Larson SC, Bergkvist L, Wolk A:** Magnesium intake in relation to risk of colorectal cancer in women. *J Am Med Assoc*, 293 (1): 86-89, 2005.