



Dietilnitrozamin ile İndüklene Tavsanlarda β -Karotenin Nitrik Oksit ve Malondialdehit Düzeylerine Etkisinin Araştırılması

Cansu DEMİR MERKİT^{1,a}, Oğuz MERHAN^{2,b,✉}

¹Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars, TÜRKİYE

²Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kars, TÜRKİYE

^aORCID: 0000-0002-1313-3254; ^bORCID: 0000-0002-3399-0667

Geliş Tarihi/Received
05.02.2021

Kabul Tarihi/Accepted
06.04.2021

Yayın Tarihi/Published
30.06.2021

Öz

Nitrozaminler günlük yaşamda sıklıkla maruz kalınan karsinojenik bileşiklerdendir ve en bilindik üyesi dietilnitrozamin (DEN) olup, hepatik karsinoma neden olmaktadır. Dietilnitrozaminin erken dönem etkileri serbest radikal ve lipid peroksidasyonundaki artışı ile karakterizedir. β -karoten ise DEN'in hepatik hasarlarına karşı koruyucu etkileri olduğu düşünülen bir karotenoid türevidir. Bu çalışmada DEN toksikasyonuna karşı β -karoten uygulamasının serum nitrik oksit (NO) ve malondialdehit (MDA) değerleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 21 Yeni Zelanda ırkı tavşan 3 gruba ayrılmış ve ilk grup kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Dietilnitrozamin toksikasyonu oluşturulan gruptaki hayvanlara (2. grup) intraperitoneal yolla 100 mg/kg oranında DEN uygulanmıştır. Diğer gruptaki hayvanlara (3. grup) ise 100 mg/kg oranında DEN toksikasyonunun ardından 7 gün boyunca 2 mg/kg/gün oranında β -karoten oral olarak verilmiştir. Deneyin 1, 4 ve 7. günlerinde kan örnekleri alınarak serumlarından NO ve MDA değerleri belirlenmiştir. Nitrik oksit seviyeleri β -karoten uygulanan grupta yalnızca DEN uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak azalmış ($P<0.01$) ve 1, 4 ve 7. günlerde benzer trendini korumuştur. Ancak 4 ve 7. günlerdeki MDA seviyeleri 1. gün MDA seviyelerine kıyasla artış göstermiştir. Sonuç olarak, β -karotenin DEN toksikasyonunda serum MDA ve NO seviyelerini istatistiksel olarak düşürdüğü görülmüştür. Bu yüzden, DEN'in toksik etkisine karşı β -karotenin NO ve MDA üzerinde koruyucu etkisinin olabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: β -karoten, dietilnitrozamin, oksidatif stres

The Investigation of the Effect of β -Carotene on Nitric Oxide and Malondialdehyde Levels in Rabbits Induced with Diethylnitrosamine

Abstract

Nitrosamines are carcinogenic compounds that are frequently exposed in daily life and the most well-known member is diethylnitrosamine (DEN) which causing hepatic carcinoma. Early effects of DEN are characterized by the increase in free radical and lipid peroxidation. β -carotene is a carotenoid derivative thought to have protective effects against DEN's hepatic damage. In this study, it was aimed to determine the effects of β -carotene administration against DEN intoxication on serum nitric oxide (NO) and malondialdehyde (MDA) values. For this purpose, 21 New Zealand rabbits were divided into 3 groups and the first group was evaluated as the control group. 100 mg/kg of DEN was administered intraperitoneally to the animals in the group of DEN toxication (2. group). The animals in the other group (3. group) were given-carotene orally at a rate of 2 mg/kg/day for 7 days after 100 mg/kg DEN toxicity. Blood samples were taken on the 1st, 4th and 7th days of the experiment and NO and MDA values were determined from their serum. NO levels decreased in the β -carotene treated group compared to the DEN only group and maintained a similar trend on days 1, 4 and 7. However, MDA levels on days 4 and 7 increased compared to MDA levels on day 1. In conclusion, β -carotene was found to decrease serum MDA and NO levels in DEN intoxication. Therefore, β -carotene may have a protective effect on NO and MDA against toxic effects of DEN.

Key Words: β -carotene, diethylnitrosamine, oxidative stress

GİRİŞ

Asidik ortamda nitroz aside dönüşen nitritler, karsinojenik etkiye sahip N-nitrozo bileşiklerinin prekürsörüdür. Sekonder yapılı aminler, nitroz asitle reaksiyona girerek nitrozamin bileşiklerini oluştururlar. Doğada yaygın olarak bulunan nitrozaminler karsinojenik bileşiklerdir. Bazı kozmetik, pestisit ve çoğu kauçuk ürünlerin imalatında kullanılan nitrozaminler; lateks ürünlerinde, tahıl, çay, birçok gıdada, sigara ve sigara dumanında bulunur. Dietilnitrozamin (DEN) ise

nitrozaminlerin en bilindik üyesidir ve hepatik karsinoma neden olabilmektedir (1). Bu yönüyle DEN güncel olarak deneysel karaciğer kanseri oluşturmak için kullanılan kanserojenik ajanlardan biridir (2). Karaciğerde metabolize edildiğinde DNA alkilasyonuna ve oksidatif strese neden olarak kanserojenik etki göstermesi nedeniyle DEN'in erken dönem kanserojenik etkileri, doku ve plazma düzeyinde serbest radikal artışı ve lipid peroksidasyonunun indüksiyonu ile izlenebilmektedir (3-6).

Karotenoidler yapılarında seri karbon çift bağ özellikleri sayesinde antioksidan yeteneğe sahip pigment grubudur. Diğer karotenoidlerden farklı olarak, fotosentez kaynaklı oksidatif etkilere karşı koruyucu olduğu bilinen β -karotenin ise aynı zamanda insan sağlığı üzerindeki önemi birçok araştırmayla ortaya konulmuştur (7, 8).

Nitrik oksit (NO), arjininin nitrik oksit sentaz tarafından oksitlenmesiyle ya kalsiyuma bağımlı olarak ya da kalsiyumdan bağımsız olarak sentezlenebilmektedir. Endojen olarak üretilen NO'nun pek çok fizyolojik olayda önemli bir rol oynamasından ziyade, süperoksit iyonu ile reaksiyona girerek epitel hücrelere karşı oldukça toksik olan bir reaktif oksijen ve azot türü olan peroksinitriti oluşturduğu da bilinmektedir (9). Peroksinitrit ise epitelyuma çeşitli şekillerde zarar verebildiği bildirilmiştir (10). Malondialdehit (MDA) ise enzimatik olmayan oksidatif lipid peroksidlerinin parçalanması sonucu meydana gelen son ürünlerden biridir ve bu yönüyle MDA, lipid peroksidasyonunun bir belirteci olarak çeşitli çalışmalarda değerlendirilmektedir (11, 12).

Bu çalışmanın amacı, serbest radikal ve lipid peroksidasyonu artışına neden olan DEN uygulamasına maruz bırakılan tavşanların kan serum örneklerinde β -karotenin NO ve MDA düzeylerine etkisinin araştırılmasıdır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada 21 adet 5-7 aylık (ortalama 3750 g ağırlığında) Yeni Zelanda ırkı tavşan kullanılmıştır. Hayvanlar yaklaşık 25°C'lik oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık karanlık döngüdeki laboratuvar koşullarında *ad libitum* beslenmiş ve tüm deney aşamalarına hayvanların iki haftalık adaptasyon süreleri sonunda başlanmıştır. Araştırma için Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan HADYEK-2012/9 numaralı izin alınmıştır.

Deney grupları her bir grupta 7 tavşanı (n=7) içeren 3 grup şeklinde oluşturulmuştur. İlk grup kontrol grubu olarak değerlendirilmiş ve bu gruptaki hayvanlara tek doz % 0,9'luk NaCl uygulaması yapılmıştır. İkinci grup DEN grubu olarak değerlendirilmiş ve bu gruptaki hayvanlara tek doz 100 mg/kg oranında DEN uygulaması yapılmıştır. Üçüncü grup ise DEN+ β -karoten grubu olarak değerlendirilmiş ve bu gruptaki hayvanlara tek doz 100 mg/kg DEN uygulaması yapıldıktan sonra 7 gün boyunca oral olarak 2 mg/kg/gün oranında β -karoten (Sigma) uygulaması yapılmıştır. DEN ve NaCl enjeksiyonlarının tamamı eşzamanlı olarak intraperitoneal yolla yapılmıştır.

Kan örnekleri, enjeksiyonu takip eden 1, 4, ve 7. günlerde *vena auricularis*'ten antikoagülansız tüplere alınmış ve +4°C'de 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek elde edilen serumlar ivedilikle -20°C'de stoklanmıştır.

Biyokimyasal Analizler

Serumda NO düzeyleri, Miranda ve ark. (13) bildirdikleri yöntemle tayin edilmiştir. Bu yöntemde nitrat, vanadyum (III) klorür ile nitrite indirgenir ve daha sonra asidik ortamda nitrit renkli diazonyum bileşiği üretmek için sülfanilamid ile reaksiyona sokularak 540 nm'de ölçülmektedir. Nitrit ve nitrat ölçümleri ayrı ayrı belirlendikten sonra ikisinin toplamı NO

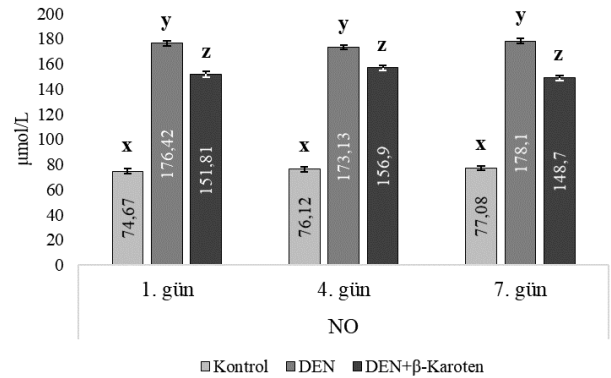
miktarı olarak belirlenmektedir. MDA tayini ise Yoshioka ve ark. (14) yöntemine göre ölçülmüştür. Bu yöntem tiyobarbitürik asit ile lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak üretilen MDA arasındaki reaksiyona dayanmakta ve 535 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmektedir.

İstatiksel Analiz

Spektrofotometrik analizler sonucu elde edilen veriler IBM SPSS 16.0.2 yazılımına aktararak veri seti oluşturulmuştur. Veri setindeki tüm parametrelere öncelikle Shapiro-Wilk normallik testi ve Levene homojenlik testi uygulanmıştır. Bu testlerden elde edilen sonuçlar doğrultusunda tüm parametrelere One-Way ANOVA testi uygulanarak anlamlılığın bulunduğu parametrelere Student-Newman Keul's Test (SNK) posthoc testi uygulanmıştır. Yapılan tüm istatistiksel analizlerde p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir. Parametrik verilerin analiz sonuçlarının görselleştirilmesinde kullanılan grafikler ise ortalama ve standart hata değerleri kullanılarak hazırlanmıştır.

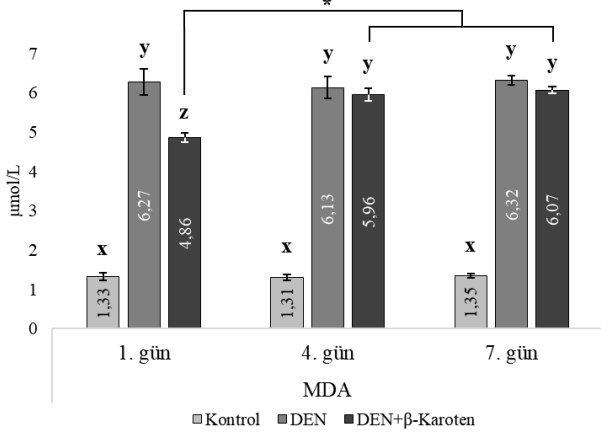
BULGULAR

Yapılan istatistiksel analizler sonucu, DEN ve DEN+ β -karoten gruplarının serumlarında NO seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür (p<0.01). Ek olarak β -karoten uygulamasının, yalnızca DEN aracılı olarak artan serum NO seviyelerini istatistiksel olarak p<0.01 düzeyinde anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir. Deney gruplarının 1, 4 ve 7. gün serum NO seviyeleri arasında ise, istatistiksel olarak anlamlı bir artma veya azalma trendi tespit edilmemiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Kontrol, DEN, DEN+ β -Karoten grubu tavşanlara ait NO düzeyleri (xy,xz,yz p<0.01).

Elde edilen serum MDA seviyelerinde ise DEN uygulaması yapılan her iki gruptaki (DEN ve DEN+ β -karoten) artışın, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak p<0.01 düzeyinde anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak DEN uygulamasının yanında β -karoten uygulanan grubun serum MDA seviyelerinin, 4 ve 7. günlerde yalnızca DEN uygulanan grup değerlerine ulaştığı fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde ise DEN+ β -karoten uygulanan grubun 1. gün serum MDA değerleri ile 4 ve 7. gün serum MDA değerleri arasında p<0.05 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Kontrol, DEN, DEN+ β -Karoten grubu tavşanlara ait MDA düzeyleri (^{xy,xz}p<0.01, *p<0.05).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Gıdalar, hastalıkları önlemede olduğu kadar hastalık sebebi olarak da önemli bir rol oynamaktadır (15). Gıdalara koruyucu amaçla ilave edilen nitrozaminlerden biri DEN olup, metabolizması monooksijenaz enzimleri tarafından katalizlenmektedir. Dietilnitrozamin biyoaktivasyonu sonucu oluşan süperoksit anyonu gibi reaktif ara ürünlerin ise hücre bileşenleriyle kovalent bağlar oluşturabildiği ve nekrotik etkilerinin yanı sıra DNA mutasyonlarına da neden olarak, başta hepatokarsinom olmak üzere kanser patogeneğinde yer aldığı bilinmektedir (2, 4, 5).

Organizmada fizyolojik olarak oksidan ve antioksidan seviyesi dengede tutulmaktadır, fakat stres, kronik hastalık ve enfeksiyonlar immün sistemi uyarmakta, bunun bir sonucu olarak da serbest radikal miktarının artması nedeniyle doku hasarı ve yangı oluşmaktadır (16). Serbest radikaller, vücut için gerekli miktarı aşınca lipidler, karbonhidratlar, proteinler ve nükleik asitler gibi moleküllerle etkileşime girerek oksidatif hasara neden olurlar (17). Serbest radikallerin oluşturduğu hasarı önlemek amacıyla görev yapan sistem de antioksidan sistem olarak tanımlanmaktadır (18). Son yıllarda, bitkilerde bulunan karotenoidlere olan ilgi sadece A provitami aktivitelerinden dolayı değil, aynı zamanda oksijen radikallerini yakalayarak organizmada oksidatif stresi azaltmalarından yani antioksidan etkilerinden de kaynaklanmaktadır (19).

Yapılan *in vivo* çalışmalar DEN'in çeşitli derecelerde hepatik hasarlara neden olduğunu göstermektedir (4, 6, 20). Lipit peroksidasyonunun bir belirteci olan MDA'nın DEN uygulaması ile deney hayvanlarının karaciğer dokularındaki miktarının yükseldiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (21, 22). Mevcut çalışmada da bu bilgilere paralel olarak, DEN uygulamasına maruz bırakılan tavşanların serum örneklerinde MDA miktarlarının yaklaşık 4,7 kat artış gösterdiği, ancak bu artışın zamana bağlı olarak trendini bozmadığı görülmüştür. Bu yönüyle, literatürde DEN aracılı yükselen hepatik MDA miktarlarının, serum MDA seviyeleri ile pozitif korelasyon gösterdiği söylenebilir (23), ancak serumda gerçekleşen bu artışın extrahepatik veya intrahepatik kaynaklı mı gerçekleştiği açık değildir.

Yapılan çeşitli çalışmalardan elde edilen veriler aynı zamanda çeşitli koruyucu takviyelerin DEN aracılı oluşturulan hepatik hasara karşı koruyucu etkiler gösterdiğini işaret etmektedir (23-25). β -karoten'in de DEN aracılı hepatik hasarlara karşı koruyucu etkilerinin olabileceği Latief ve ark. (22) tarafından yapılan çalışmada ortaya konulmuştur. Sunulan çalışmada elde edilen veriler ise β -karoten'in, DEN aracılı meydana gelen serum MDA artışını ilk gün önemli ölçüde azalttığını, ancak β -karoten takviyesinin devam etmesine karşın, bu etkinin ilerleyen günlerdeki MDA miktarlarına yansımadağını göstermektedir.

Nitrik oksit ise fizyolojik görevlerinin dışında oksidan ajan olarak değerlendirilen bir moleküldür. Normal koşullarda küçük miktarlarda üretilen NO guanilat siklazın uyarılması, kan damarlarının gevşemesi, iyon kanallarının açılıp kapanması gibi görevleri üstlenirken, sürekli ve yüksek miktarlarda NO üretimi hücre ölümüne kadar gidebilecek toksik etkiye sahiptir (26). Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da DEN uygulamasının NO düzeyleri üzerinde artırıcı etkilerinin olduğu ve çeşitli bitkisel takviyelerin ise DEN aracılı NO artışını baskıladığı gösterilmiştir (21, 27, 28). Bu çalışmada elde edilen veriler de β -karoten'in diğer bitkisel takviyeler gibi NO miktarları üzerinde baskılayıcı etkilerinin olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, β -karotenin DEN toksikasyonunda serum MDA ve NO seviyelerini istatistiksel olarak düşürdüğü görülmüştür. Bu yüzden, DEN'in toksik etkisine karşı β -karotenin NO ve MDA üzerinde koruyucu etkisinin olabileceği kanısına varılmıştır.

TEŞEKKÜR

2012-VF-24 kodlu proje ile bu yüksek lisans tez çalışmasının yapılmasındaki maddi katkılarından dolayı Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Kumar RS, Muruganathan G, Balasubramanian R. (2017). Anticarcinogenic Potential of Ethanol Extract of *Indigofera cordifolia* Roth. (Fabales: Fabaceae) on Diethylnitrosamine Induced Hepatocarcinogenesis in Rats. *Braz J Biol Sci.* 4: 53-66.
2. Zhang X, Cao L, Ji B, Li L, Qi Z, Ding S. (2020). Endurance Training but not High-Intensity Interval Training Reduces Liver Carcinogenesis in Mice with Hepatocellular Carcinogen Diethylnitrosamine. *Exp Gerontol.* 133: 1-9.
3. Bartsch H; Hietanen E, Malaveille C. (1989). Carcinogenic Nitrosamines: Free Radical Aspects of Their Action. *Free Radic Biol Med.* 7: 637-644.
4. Yamada K, Yamamiya I, Utsumi H. (2006). In Vivo Detection of Free Radicals Induced by Diethylnitrosamine in Rrat Liver Tissue. *Free Radical Biol Med.* 40: 2040-2046.
5. Santos NP, Pereira IC, Pires MJ, et al. (2012). Histology, Bioenergetics and Oxidative Stress in Mouse Liver Exposed to N-diethylnitrosamine. *In Vivo.* 26: 921-929.
6. Adebayo OA, Akinloye O, Adaramoye OA. (2020). Cerium Oxide Nanoparticles Attenuate Oxidative Stress and Inflammation in the Liver of Diethylnitrosamine-treated Mice. *Biol Trace Elem Res.* 193: 214-225.

7. Young AJ, Lowe GL. (2018). Carotenoids-antioxidant Properties. Antioxidants (Basel). 7: 1-4.
8. Ribeiro D, Freitas M, Silva AMS, Carvalho F, Fernandes E. (2018). Antioxidant and Pro-oxidant Activities of Carotenoids and Their Oxidation Products. Food Chem Toxicol. 120: 681-699.
9. Radi R. (2018). Oxygen Radicals, Nitric Oxide, and Peroxynitrite: Redox Pathways in Molecular Mmedicine. Proc Natl Acad Sci USA. 115: 5839-5848.
10. Atakisi E, Merhan O. (2017). Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide Involvement in Different Toxicities. In: Nitric Oxide Synthase-Simple Enzyme-Complex Roles. Saravi SSS (ed). pp. 525-542. InTechOpen, Croatia.
11. Kamiloğlu NN, Kaçar C, Güven A, et al. (2017). Changes in Lipid Peroxidation, Glutathione and Fertility in Tuj Sheep after Combined Administration of Vitamin A and E and Passive İmmunization with Testosterone Antibodies. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 23: 459-465.
12. Aslankoç R, Demirci D, İnan Ü, et al. (2019). The Role of Antioxidant Enzymes in Oxidative Stress-superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPx). Med J SDU. 26: 362-369.
13. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. (2001). A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. Nitric Oxide: Biol Chem. 5: 62-71.
14. Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M. (1979). Lipid Peroxidation in Maternal and Cord Blood and Protective Mechanism Against Active-oxygen Toxicity in the Blood. Am J Obstet Gynecol. 135: 372-376.
15. Bayraktar N, Gökçe R, Ergün O. (1998). Gıdalarda Nitrat ve Nitrit Kalıntılarının İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. Ekoloji. 28: 28-30.
16. McCord JM. (1993). Human Disease, Free Radicals, and the Oxidant/Antioxidant Balance. Clin Biochem. 26: 351-357.
17. Karabulut H, Gülay MŞ. (2016). Serbest Radikaller. MAKÜ Sağ Bil Enst Derg. 4: 50-59.
18. Süleyman H, Gül V, Erhan E. (2018). Oksidatif Stres ve Doku Harsarı. Erzincan Tıp Derg. 1: 1-4.
19. Merhan O. (2017). The Biochemistry and Antioxidant Properties of Carotenoids. In: Carotenoids. Cvetkovic D, Nikolic G (eds). pp. 51-66. InTechOpen, Croatia.
20. Merhan O, Özcan A, Atakisi E, Ogun M, Kükürt A. (2016). The Effect of β -Carotene on Acute Phase Response in Diethylnitrosamine Given Rabbits. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 22: 533-537.
21. Ertekin A, Türel İ, Oto G, Çelikezen FÇ, Yaşar S. (2008). İsrırgan Otunun Dimetilbenzantrasen Uygulanan Tavşanlarda Lipit Peroksidasyonu, Antioksidan Maddeler ve Nitrit-nitrat Düzeyleri Üzerine Etkisi. Van Vet J. 2: 11-15.
22. Latief U, Husain H, Ahmad R. (2018). β -Carotene Supplementation Ameliorates Experimental Liver Fibrogenesis via Restoring Antioxidant Status and Hepatic Stellate Cells Activity. J Func Foods. 49: 168-180.
23. Atakışı E, Özcan A. (2005). Dietilnitrozamin Verilen Ratlarda Omega-3 Yağ Asitlerinden Zengin Balık Yağının Koruyucu Rolünün Araştırılması. Türk Biyokimya Derg. 30: 279-284.
24. Karaca EG, Bayşu Sözbilir N. (2007). Dietilnitrozamin Verilen Ratlarda Alfa Lipoik Asidin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması. Kocatepe Tıp Derg. 7: 11-17.
25. Agrawal A, Sharma M, Rai SK, Singh B, Tiwari M, Chandra R. (2008). The Effect of the Aqueous Extract of the Roots of *Asparagus Racemosus* on Hepatocarcinogenesis Initiated by Diethylnitrosamine. Phytother Res. 22: 1175-1182.
26. Önger ME, Genc H, Tan F. (2011). Effects of NOS Inhibitors Applied with Cadmium Sulphate on Total Lipid and Protein Quantities in Central Nervous System of Rat (Wistar albino). J Exp Clin Med. 28: 175-181.
27. Atakışı O, Atakışı E, Özcan A, Karapehlivan M, Kart A. (2013). Protective Effect of Omega-3 Fatty Acids on Diethylnitrosamine Toxicity in Rats. Eur Rev Med Pharmacol. 17: 467-471.
28. Liu J, Man S, Li J, Zhang Y, Meng X, Gao W. (2016). Inhibition of Diethylnitrosamine-induced Liver Cancer in Rats by Rhizoma Paridis Saponin. Environ Toxicol Pharmacol. 46: 103-109.

✉ **Sorumlu Yazar:**

Oğuz MERHAN

Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kars, TÜRKİYE

E-posta: oguzmerhan@hotmail.com