

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DIETİLNİTROZAMİN VERİLEN TAVŞANLARDA  $\beta$ -KAROTENİN  
NİTRİK OKSİT ve MALONDİALDEHİT DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Cansu DEMİR MERKİT

Danışman  
Doç. Dr. Oğuz MERHAN

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KARS-2018

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DIETİLNİTROZAMİN VERİLEN TAVŞANLARDA  $\beta$ -KAROTENİN  
NİTRİK OKSİT ve MALONDİALDEHİT DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Cansu DEMİR MERKİT  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman  
Doç. Dr. Oğuz MERHAN

Bu Çalışma KAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Tarafından Desteklenmiştir. Proje No: 2012-VF-24

KARS-2018

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Cansu DEMİR MERKİT tarafından hazırlanmış olan “**Dietilnitrozamin Verilen Tavşanlarda  $\beta$ -Karotenin Nitrik Oksit ve Malondialdehit Düzeylerine Etkisinin Araştırılması**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy ...*k. r. l. j. p.*..... ile ..*k. a. b. u. l.*..... edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13.11.2018

**Adı Soyadı:**

**İmza**

**Başkan:** Prof. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ.....

**Üye:** Prof. Dr. Emine ATAKİŞİ.....

**Üye:** Doç. Dr. Oğuz MERHAN.....

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... / ..... / ..... gün ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Bu çalışmada, kanserojenik etkisi olduğu bilinen dietilnitrozoamin (DEN)'in toksik etkisine karşı bir antioksidan olan  $\beta$ -karotenin koruyucu etkisinin nitrik oksit (NO) ve malondialdehit (MDA) düzeylerine etkisi incelenmek istenmiştir. Materyal olarak 21 adet, 5–7 aylık Yeni Zelanda ırkı tavşan kullanılarak, ağırlıklarına göre her bir grupta 7 tavşan olmak üzere toplam 3 grup oluşturuldu. Tek doz % 0,9'luk NaCl solüsyonu verilen kontrol grubu, DEN verilen grup ve DEN+ $\beta$ -karoten verilen grup olmak üzere toplam 3 grup üzerinden deneyler yapılmıştır. DEN verildiği zaman NO ve MDA düzeylerinin arttığı, DEN+ $\beta$ -karoten verildiği zaman ise NO ve MDA düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu azalışın sebebi ise muhtemelen  $\beta$ -karotenin süperoksit anyonlarını inhibe ederek doku hasarını azaltmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü yardım ve fedakârlığı sağlayan, bilgi ve deneyimlerini sabırla paylaşan, saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Oğuz MERHAN'a, aldığım eğitim süresince deneyimlerinden faydalandığım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli kürsü hocalarım Prof. Dr. Şaban MARAŞLI'ya, Prof. Dr. Ayla ÖZCAN'a, Prof. Dr. Mahmut KARAPEHLİVAN'a, Prof. Dr. Emine ATAKİŞİ'ye, Doç. Dr. Metin ÖĞÜN'e ve tezimin hazırlanması sırasında beni cesaretlendiren, desteğini her zaman hissettiğim sevgili eşim'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

Simgeler ve Kısaltmalar	V
Şekil Dizini	VI
Grafik Dizini	VII
Tablolar Dizini	VIII
Özet	IX
Summary	X
<b>1.GİRİŞ ve AMAÇ</b>	1
<b>2.GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1.Serbest Radikaller	3
2.1.1.Oksidatif Stres	4
2.1.2.Nitrik Oksit	5
2.1.2.1.Nitrat ve Nitrit	6
2.2.Malondialdehit	8
2.3.Sekonder Aminler	8
2.3.1.Nitrozaminler	8
2.3.1.1.Dietilnitrozamin	10
2.4.Antioksidanlar	11
2.5.Karotenoidler	12
2.5.1.β-Karoten	13
<b>3.MATERYAL ve METOT</b>	16
3.1.MDA Tayini	16
3.1.1.Deneyde Kullanılan Çözeltiler	16
3.1.2.Deneyin Yapılışı	17
3.1.3.Sonuçların Hesaplanması	17
3.2.Nitrik Oksit Tayini	18
3.2.1.Deneyde Kullanılan Çözeltiler	18
3.2.2.Nitrat Analizinin Yapılışı	19
3.2.3.Nitrit Analizinin Yapılışı	20
3.2.4.Sonuçların Hesaplanması	21
3.3.İstatiksel Analiz	21
<b>4.BULGULAR</b>	22
<b>5.TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	23

**6.KAYNAKLAR**

26

**7.ÖZGEÇMİŞ**

35

**Simgeler ve Kısaltmalar**

- R<sup>-</sup>: Alkoksil Radikali  
CAT: Katalaz  
CuSO<sub>4</sub>: Bakır Sülfat  
DMBA: 7,12-dimetilbenzantrasen  
eNOS: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz  
g: Gram  
GSH: Redükte Glutasyon  
GSH-P<sub>x</sub>: Glutasyon Peroksidaz  
GST: Glutasyon-S-Transferaz  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen Peroksit  
HCl: Hidroklorik Asit  
iNOS: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz  
İP: İntraperitoneal  
kg: Kilogram  
MDA: Malondialdehit  
µl: Mikrolitre  
mL: Mililitre  
mmol/L: Milimol/Litre  
mM: Milimolar  
µM: Mikromolar  
nm: Nanometre  
NEDD: Naftil Etilen Diamin Dihidroklörür  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Nitrat  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: Nitrit  
NO: Nitrik Oksit  
NOS: Nitrik Oksit Sentaz  
nNOS: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz  
n-3 FA: n-3 Yağ Asitleri  
SOD: Süperoksit Dismutaz  
TBA: Tiyobarbütirik Asit  
TCAA: Triklorasetik Asit  
VaCl<sub>3</sub>: Vanadyum (III) Klorür

**Şekiller Dizini**

<b>Şekil 1:</b> Dietilnitrozaminin kimyasal yapısı	10
<b>Şekil 2:</b> İzopropenin kimyasal yapısı	12
<b>Şekil 3:</b> $\beta$ -Karotenin kimyasal yapısı	14



**Grafik Dizini**

<b>Grafik 1:</b> MDA düzeyinin saptanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi	18
<b>Grafik 2:</b> Nitrat düzeyinin saptanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi	19
<b>Grafik 3:</b> Nitrit düzeyinin saptanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi	20

## VIII

### Tablolar Dizini

<b>Tablo 1:</b> Sık karşılaşılan radikaller, simgeler ve özellikleri	4
<b>Tablo 2:</b> Nitrit ve nitratın fiziksel ve kimyasal özellikleri	7
<b>Tablo 3:</b> Antioksidanlar ve reaksiyonları	11
<b>Tablo 4:</b> Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi	12
<b>Tablo 5:</b> Bazı vücut sıvı ve dokularındaki $\beta$ -karoten konsantrasyonu	14
<b>Tablo 6:</b> Yaygın $\beta$ -karoten kaynakları	14
<b>Tablo 7:</b> MDA ölçüm yöntemi	17
<b>Tablo 8:</b> Nitrat ölçüm yöntemi	20
<b>Tablo 9:</b> Nitrit ölçüm yöntemi	20
<b>Tablo 10:</b> DEN verilen tavşanlarda NO ve MDA düzeyleri	22

**ÖZET**

Bu çalışmanın amacı dietilnitrozamin (DEN) verilen tavşanlarda  $\beta$ -karotenin nitrik oksit (NO) ve malondialdehit (MDA) düzeylerine etkisinin araştırılmasıdır. Materyal olarak kullanılan 21 adet, 5–7 aylık Yeni Zelanda ırkı tavşan, her birinde 7 adet olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. **Kontrol:** Tek doz % 0,9'luk NaCl solüsyonu intraperitoneal (İP), **Grup I:** Tek doz 100 mg/kg DEN (İP), **Grup II:** Tek doz 100 mg/kg DEN (İP) + 2 mg/kg/gün  $\beta$ -karoten 7 gün boyunca oral yolla verildi. DEN verilen gruplarda NO ve MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı arttığı ( $p<0.01$ ), DEN+ $\beta$ -karoten verilen gruplarda ise NO ve MDA düzeylerinin DEN verilen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı azaldığı ( $p<0.01$ ) belirlenmiştir. Sonuç olarak, DEN'in toksik etkisine karşı  $\beta$ -karotenin NO ve MDA üzerinde koruyucu etkisinin olabileceği kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:**  $\beta$ -Karoten, Dietilnitrozamin, Malondialdehit, Nitrik Oksit

**The Investigation of the Effect of  $\beta$ -Carotene on Nitric Oxide and Malondialdehyde  
Levels in Rabbits Given Diethylnitrosamine**

**SUMMARY**

The aim of this study was to investigate the effect of  $\beta$ -carotene on nitric oxide (NO) and malondialdehyde (MDA) levels in rabbits given diethylnitrosamine (DEN). Twenty-one New Zealand race rabbits at 5-7 months of age were divided into 3 groups each having 7 ones. **Control group** received single dose of 0.9 % NaCl solution intraperitoneally (IP); **Group 1** received single dose of 100 mg/kg DEN (IP); **Group 2** received both 100 mg/kg DEN (IP) and 2 mg/kg/day  $\beta$ -carotene orally for 7 days. NO and MDA levels were found to be statistically significantly increased ( $p < 0.01$ ) compared to control group and NO and MDA levels were found to be statistically significant ( $p < 0.01$ ). As a result,  $\beta$ -carotene may have a protective effect on NO and MDA against toxic effects of DEN.

**Keywords:**  $\beta$ -Carotene, Diethylnitrosamine, Malondialdehyde, Nitric Oxide

## 1.GİRİŞ ve AMAÇ

Doğada çok çeşitli ve yaygın olarak bulunan nitrozaminler kanserojenik bileşiklerdir. Sularda ve sebzelerde yüksek miktarda bulunan nitrat, birçok gelişmiş ve gelişmekte olan ülke için ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Bunun yanısıra vücuda dışarıdan alınan veya vücutta oluşan nitrit, sekonder ve tersiyer aminlerle tepkimeye girerek nitrozaminleri oluşturur (Cooney ve ark. 1987, Morselli 1995). Nitrozamin oluşumu için gerekli sekonder aminlerin balık ürünleri, çay, tahıl, sigara ve sigara dumanında ve birçok ilacın yapısında bulunduğu bildirilmiştir (Atakişi ve Merhan 2017). Nitrozaminlerin oluşumunda etkili olan nitritlerin kimyasal maddeler, zirai ilaçlar, su ve bitkilerde büyük oranda bulunduğu bilinmektedir. Son yıllarda yoğun kimyasal gübre kullanımından dolayı çevrede nitrat düzeyinde artış gözlenmiştir. Doğada yaygın olarak bulunan nitrat, bakteriler tarafından nitrite indirgenir (Gough 1977). Nitrozaminlerin metabolizması öncelikle karaciğerde gerçekleşir. Ancak, başta dietilnitrozamin (DEN) olmak üzere nitrozaminler toksik etkilerini öncelikle kanda ama özellikle karaciğerde oluştururlar. Çeşitli araştırmalarda deney hayvanlarına farklı nitrozaminler verildiğinde başta karaciğer olmak üzere diğer organ ve doku tümörlerine neden olduğu gösterilmiştir (Vendemiale ve ark. 2001, Thirunavukkarasu ve Sakthisekaran 2001). Nitrozaminler içinde en zararlı olanları DEN, dimetilnitrozamin ve nitrozopirolidin'in doğada çok yaygın olarak bulunan mutajenik ve kanserojenik bileşikler olduğu saptanmıştır (Atakişi ve Merhan 2017).

Fizyolojik ve patolojik olaylarda merkezi bir rol oynayan önemli bir molekül olan nitrik oksit (NO), arjininin nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından oksitlenmesiyle ya konstitutif ve kalsiyuma bağımlı olarak ya da indüklenebilir ve kalsiyumdan bağımsız olarak sentez edilir. Endojen olarak üretilen NO, immun sistemi regüle etmesinin yanı sıra, vasküler tonusun ve nöronal iletinin düzenlenmesi de dâhil olmak üzere pek çok fizyolojik olayda da önemli bir rol oynar. NO; suda ve yağda çözünebilen, solüsyon içinde yarılanma ömrü 30 saniye olan ve kolaylıkla nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) ve nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ) okside olabilen renksiz ve stabil bir gazdır. Düşük konsantrasyondaki NO,  $\text{O}_2$ 'e nazaran hemoglobine 3000 kat daha fazla affinite ile bağlanır. Hemoglobin oksijen formunda iken, NO'yu kısa sürede  $\text{NO}_3^-$  'a oksitler. Özellikle dolaşımdaki oksihemoglobin NO için kuvvetli bir inhibitördür (Türköz ve Özerol 1997, Kuyumcu ve ark. 2004). Dokularda fizyolojik ve patolojik birçok olayda değişik biyolojik etkilere sahip aktif bir molekül olan NO'nun süperoksit radikali ile reaksiyonu sonucu peroksinitrit radikalinin oluşumuna yol açarak oksidatif strese rol aldığı bildirilmektedir (Rubbo ve ark. 1994).

Malondialdehit (MDA) enzimatik olmayan oksidatif lipid peroksidlerinin parçalanması sonucu meydana gelen toksik etkili son ürünlerden birisidir. İki'den çok çift bağ bulunduran yağ asitlerinin otooksidasyonunda veya eikozanoid sentezinde serbestleşen halkalı endoperoksidler MDA'nın asıl kaynağını oluşturmaktadır. MDA düzeyinin ölçümü, lipid peroksid miktarlarının saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, peroksidasyon sırasında meydana gelen dien konjugatlarının ölçümünde *in vivo* lipid peroksidlerinin seviyesini belirlemektedir. Lipid peroksidasyonunun; hücre zarının lipid yapısındaki oluşturduğu değişiklikler sonucu hücre zarı işlevinin bozulması, oluşan serbest radikallerin, enzimler ve diğer hücre bileşenleri üzerine etkisi, son ürünler olan aldehitlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden olduğu sanılmaktadır (Öğüş ve ark. 2004).

Karotenoidlerin glutation-S-transferaz ve glutation peroksidaz gibi kanserojenleri detoksifiye eden enzimlerin aktivitelerini de arttırdığı bildirilmektedir (Hughes 2000). Karotenoidlerin kanseri önleyici etkisinin, antioksidan özelliklerinin yanı sıra hücreler arası boşluk bağlantı iletimlerini uyarıcı ve bağışıklık sistemini güçlendirici etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Stahl ve Sies 1996). Sağlık açısından birçok önemli fonksiyonu bulunan  $\beta$ -karoten, A vitamininin ön maddesi (provitamini) dir (Merhan 2017). Karotenoidlerce zengin meyve ve sebze tüketiminin bazı kanser türlerinin, kalp-damar hastalıklarının ve katarakt gibi göz hastalıklarının görülme sıklığını azalttığı ve bağışıklık sistemini güçlendirdiği bildirilmektedir (Dietmar ve Bamedi 2001). Biyolojik antioksidan olarak da karotenoidler son zamanlarda birçok çalışmanın ilgi odağı olmuştur (Kalt 2005). Epidemiyolojik çalışmalar karotenoidce zengin meyve ve sebze tüketiminin kanser (McKevith 2005), kalp-damar hastalıkları ve göz hastalıkları riskini azalttığını bildirmektedir (Dietmar ve Bamedi 2001). Nitekim  $\beta$ -karoten alımı ile akciğer ve mide kanserleri gibi bazı kanser türlerinin görülme sıklığı arasında zıt bir ilişki olduğu belirlenmiş ve karotenoidlerin antikarsinojenik özellikleri ortaya konmuştur (Di Mascio ve ark. 1988).  $\beta$ -karotenin destek besin ögesi olarak alınması özellikle kanserin ilerleme aşamasında tümör hücrelerinin gelişimini engelleyen veya tümörü yok eden doğal öldürücü hücrelerin aktivitesini de arttırmaktadır (Astorg 1997).

Bu çalışmanın amacı, DEN verilen tavşanlarda  $\beta$ -karotenin NO ve MDA düzeylerine etkisinin araştırılmasıdır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1.Serbest Radikaller

Elektron transferi, enerji üretimi ve pek çok diğer metabolik işlevde temel oluşturan serbest radikaller, son yörüngelerinde eşlenmemiş elektron bulunduran ve bu açığı kapatabilmek için başka bileşiklerin elektronlarını paylaşmaya çalışan yüksek aktiviteli kimyasal yapılardır. Serbest radikaller düşük molekül ağırlıklı, kısa ömürlü ve kararsız yapılardır (Thomas 2000, Halliwell 2009). Bu çiftlenmemiş elektron serbest radikallere büyük bir reaktivite kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır (Diplock 1998). Oksidasyona neden olan serbest radikaller temel olarak oksijen kaynaklı metabolitler; süperoksit anyonlar ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikali ( $OH^\cdot$ ), hipoklorik asit, kloroaminler, azotdioksit, ozon ve lipid peroksitlerdir (Zasadowski ve ark. 2004). Bunlar organizmalar tarafından hücre içinde mitokondriyal solunum zincirinde ya da hücre dışında özellikle fagositler tarafından oluşturulur. Serbest radikaller kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasarlara neden olur (Kaur ve Kapoor 2001, Halliwell 2009, Kumar 2011).

Atomik ya da moleküler yapılarda ortaklaşmamış tek elektron bulunduran ve başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine giren moleküllere serbest oksijen radikalleri ya da reaktif oksijen radikalleri de denilmektedir (Koca ve Karadeniz 2014).

Serbest radikaller, nerede ve nasıl üretildiklerine bakılmaksızın 3 yolla meydana gelmektedirler.

**1. Kovalent bağlarda homolitik kırılma:** Yüksek sıcaklık ( $500-600\text{ }^\circ\text{C}$ ) ve yüksek elektromanyetik dalgalar kimyasal bağları kırmaktadırlar. Bu kırılma esnasında bağ yapısında bulunan iki elektronun ayrı ayrı atomlarda kalmasına homolitik kırılma denilmektedir. Atomlar üzerinde kalan elektronlar eşleşmemiş elektronlardır. Homolitik kırılan organik moleküllerde bulunan bağlar zıt yüklü reaktif iyon çiftleri oluşturmaktadırlar.

**2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi:** Serbest radikal özelliğinde olmayan bir molekül elektron kaybederek dış orbitalinde eşleşmemiş elektron kalması ve radikal formunun oluşmasıdır. Örneğin, GSH radikalleri indirgemesi sırasında tiyil radikali ( $RS^\cdot$ ) oluşmaktadır. Tepkimeye giren iki tiyil radikali sonucunda meydana gelen tür ise glutatyonun oksitlenmiş formudur (GSSG).

**3. Normal bir moleküle elektron transferi:** Serbest radikal özelliğinde olmayan bir moleküle elektron eklenmesi sonucu oluşan bu yol biyolojik sistemlerde yaygın olarak meydana geldiği için oldukça önem arz etmektedir (Akkuş 1995).

Sonuçta üretilen serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötr olabildiği gibi organik ya da inorganik moleküller olabilmektedirler. Demir (Fe), bakır (Cu), çinko (Zn), kobalt (Co), mangan (Mn), nikel (Ni), krom (Cr) ve molibden (Mo) gibi elementlerde eşleşmemiş elektron bulundurmasına rağmen serbest radikal olarak kabul edilmemektedirler. Bu elementler canlıların oksijen kullanabilmesi için gerekli olduğundan geçiş elementi ya da geçiş metalleri olarak adlandırılmaktadırlar (Diplock 1998).

Serbest radikaller organizmada metabolik olaylar sırasında oluşabildiği gibi radyasyon, ilaçlar ve kimyasal maddeler gibi dış etkenler nedeniyle de oluşur. Büyük çoğunluğu oksijen ve azot kaynaklı olan bu radikallerin organizmada karbon ve kükürt kaynaklı olanları da vardır (Akkuş 1995).

**Tablo 1.** Sık karşılaşılan radikaller, simgeler ve özellikleri (Dündar ve Aslan 2000)

Radikaller	Simgeler	Özellikleri
Hidrojen	H <sup>+</sup>	Bilinen en basit radikal
Süperoksit	O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil	OH <sup>+</sup>	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti radikal
Hidrojen Peroksit	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet Oksijen	O <sub>2</sub>	Yarılanma ömrü hızlı, güçlü oksidatif oksijen formu
Perhidroksi radikal	HO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikal	ROO <sup>-</sup>	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olur
Triklorometil	CCL <sub>3</sub>	CCL <sub>4</sub> metabolizması ürünü karaciğerde üretilen bir radikal
Tiyil radikali	RS <sup>+</sup>	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil	RO <sup>+</sup>	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Nitrojen oksit	NO	L-arjinin amino asitinden <i>in vivo</i> üretilir
Nitrojen dioksit	NO <sub>2</sub>	NO <sup>*</sup> in oksijen ile reaksiyonundan üretilir

### 2.1.1.Oksidatif Stres

Vücutta doğal metabolik yollarla oluşan serbest radikaller normalde radikal parçalayan antioksidan sistemlerle ortadan kaldırılmaktadır. Ancak, çeşitli nedenlerle reaktif oksijen türlerinin artması ve antioksidan mekanizmaların yetersiz kalması sonucu oksidatif stres adı verilen bir dizi patolojik olay meydana gelmektedir. Oksidatif stresin, farklı mekanizmalar ile DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları ve DNA-protein



çapraz bağlanması gibi bir takım lezyonlara neden olarak hasara yol açtığı bilinmektedir (Cooke ve ark. 2003).

### 2.1.2.Nitrik Oksit

Son yılların en ilgi çekici molekülü olan NO iki atom içeren, 30 molekül ağırlığında, membranlardan kolayca difüze olabilen, gaz yapısında bir serbest radikaldir (Synder ve Bredt 1992, Moncada ve ark. 1997). NO oda ısısında, atmosferik basınç altında gaz durumundadır. Ancak biyolojik sistemlerin çoğunda çözülmüş nonelektrolit biçimindedir, diğer bir deyişle işlevlerini oluştururken çoğu kez gaz durumunda değildir. Bununla birlikte akciğer ve paranasal sinüs havasında gaz olarak bulunur. Sulu ortamda difüzyon hızı saniyede 40 mikrondur. Suda çözünürlüğü çok düşük olan NO membran ve hücrelerin lipid fazında selektif olarak çözünür. NO paylaşılmamış elektron taşıyıcı ve paramagnetiktir. NO'nun biyolojik sistemlerdeki kimyasal etkileşimleri bu paylaşılmamış elektronun stabilizasyonu ile karakterizedir. Bir radikal olarak süperoksit, hidroksil gibi radikallerden daha az reaktiftir yani daha stabil paylaşılmamış elektron taşıyıcısıdır. Biyolojik aktivitesi molekülün şeklinden çok molekülün küçüklüğüne, reaktivitesine, difüzibilitesine bağlıdır. Yarılanma ömrü 3-10 saniyedir (Synder ve Bredt 1992, Dawson ve Dawson 1995, Kröncke ve ark. 1995, Yun ve ark. 1996).

Nitrik oksit, nitrik oksit sentazlar (NOS)'ın (EC: 1.14.13.39) L-arjinini okside ederek L-sitrullin oluşturmasıyla sentezlenmektedir (Porasuphatana ve ark. 2003, Förstermann 2010, Kopincova ve ark. 2011, Atakişi ve Merhan 2017). NO bakterilerden memelilere kadar biyolojik öneme sahip bir moleküldür. Organizmada NO sentezini sağlayan mekanizmalar son derece kısıtlıdır. Organizmaya giren nitro bileşiklerinin metabolize edilmesi sonucu oluşan NO bir tarafa bırakılacak olursa endojen NO oluşturan tek kaynak NOS enzimidir (Dröge 2002). Memelilerin, damar endoteli, beyin, makrofaj, üriner sistem gibi farklı dokularından nöronal (nNOS), uyarılabilir (iNOS) ve entoteliyal (eNOS) olmak üzere üç farklı tip NOS izoformu izole edilmiştir (Porasuphatana ve ark. 2003, Daff 2010). Nöronal NOS (nNOS, NOS1) merkezi ve periferik sinir sistemindeki hücrelerde ve çizgili kaslarda bulunan,  $Ca^{+2}$  bağımlı, 166 kDa ağırlığında bir enzimdir (Kopincova 2011). İndüklenebilen NOS (iNOS, NOS2)  $Ca^{+2}$ 'dan bağımsız, bazı sitokinler (IL-1, TNF, IF- $\gamma$ ) veya bakteriyel endotoksinlerle uyarılabilen ve ilk kez aktive olmuş makrofajlardan izole edilen 130 kDa ağırlığında bir enzimdir (Choudhari ve ark. 2013). Endotel NOS (eNOS, NOS3) vasküler endotel hücreleri, hipokampus sinir hücreleri, pulmoner ve renal epitel hücreleri ile kardiyak miyositlerde lokalize olup 135 kDa ağırlığında,  $Ca^{+2}$ /kalmomodulin bağımlı bir enzimdir (Kopincova 2011).

Entoteliyal NOS aracılığıyla sentezlenen NO, sağlam damarları aterosklerotik süreçten koruyan önemli bir faktördür. NO substratı olan L-arjininle kronik tedavinin, ateroskleroz oluşan hayvanlarda, aterosklerotik lezyon oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Aji ve ark. 1997). Deneysel modellerde, eNOS'un genetik olarak eksikliğinde, aortada aterosklerotik lezyon oluşumunun tetiklendiği bildirilmiştir (Kuhlencordt ve ark. 2001).

Nöronal NOS, beyinde davranış ve bellek gibi fonksiyonları etkileyen NO üretiminden sorumludur (Christopherson ve Bredt 1997). NO, ayrıca enflamatuvar hücre ölümünün regülasyonunda cGMP'den bağımsız yollarla etki göstermektedir (Sessa 2005). NO'nun mast hücrelerinde ve trombositlerde proenflamatuvar mediyatörlerin yapımını inhibe ederek antiadeziv etki gösterdiği saptanmıştır (Kurose ve ark. 1994).

Nitrik oksit sentezlenirken NOS dışında, moleküler oksijene ve dört tane kofaktöre gerek duyulur. Bunlar; Hem, FAD, FMN ve tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>)'dir (Çekmen ve ark. 2001). Bu mekanizma, L-arjininin L-ornitine dönüşümü ile sonuçlandığında, NO yerine arjinaz enziminin ortaya çıktığı ve arjinazın da arjinin kullanımında NO ile yarışıp NO üretimini azalttığı belirtilmiştir (Pendurthi ve ark. 1999). NO, damar tonusunun fizyolojik olarak düzenlenmesinde özellikle kan basıncı ve kan akımının ayarlanmasında önemli rol oynamaktadır (Davies 1995).

Nitrik oksitin belirli koşullarda enflamasyonu artırıcı etki gösterdiğini ileri sürmüştür. Bu hipoteze göre NO molekülü süperoksit ile reaksiyona girerek peroksinitriti oluşturmakta ve oldukça güçlü olan bu reaktif oksijen bileşiği de doku hasarını arttırmaktadır (Connelly ve ark. 2005).

### 2.1.2.1. Nitrat ve Nitrit

Bir azot atomuna bağlı iki oksijen atomundan oluşan, antimikrobiyal özelliğe sahip olan ve suda çok iyi çözünen nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) çevrede sıklıkla bulunmaktadır. Ayrıca nitrit iyonu, nitratın (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) kimyasal veya biyolojik yollarla indirgenmesi sonucunda da oluşmaktadır. Nitritin hızla ve nitrata yükseltgenmesinden dolayı çevrede normal olarak nitrata oranla daha az miktarda bulunmaktadır. Bir azot atomuna bağlı üç oksijen atomundan oluşan nitrat, suda çok iyi çözünen, ısıyla bozulan ve yükseltgen özelliği olan billur yapıları katılardır. Patlayıcıların yapımında oksitleyici etken olarak ve cam imalatında saf potasyum nitratın eldesinde kullanılmaktadır. Sularda bulunan başlıca azot bileşikleri azalan yükseltgenme basamağına göre nitrat azotu (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N), nitrit azotu (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N), amonyak azotu (NH<sub>3</sub>-N) ve organik azot (organik-N) şeklinde sıralanmaktadır (Singhal ve Kulkarni 2004).

**Tablo 2.** Nitrit ve nitratın fiziksel ve kimyasal özellikleri (Singhal ve Kulkarni 2004)

	Asitlik	Çözünürlük	Reaktiflik	Azot Dönüşümü
Nitrit	Zayıf Asit; HNO <sub>2</sub> pKa= 3,4	Suda iyi çözünür	Reaktif (Hemoglobindeki Fe <sup>+2</sup> 'yi Fe <sup>+3</sup> 'e oksitler veya çeşitli amin bileşiklerini nitrozolar.	1 mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L = 0,304 (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N)/L
Nitrat	Kuvvetli asit; HNO <sub>3</sub> pKa= -1,3	Suda iyi çözünür	Reaktif değil	1 mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L = 0,226 (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N)/L

Nitrojen yaşam için gerekli; aminoasit, protein ve nükleik asitlerin kurucu elementidir. Nitrojen atmosferde (nitrojen gazı N<sub>2</sub> formunda) en bol bulunan element olmasına rağmen, fiksasyona uğramadığı sürece hayvanlar ve bitkiler tarafından kullanılamaz. Fiksasyon formları nitrojen siklusunun önemli bir parçasıdır. Bu siklusta N<sub>2</sub>, amonyum ve çeşitli nitrojen oksitlere çevrilir. Oluşan daha yüksek nitrojen oksitler sonunda aşamalı olarak indirgenir. Tekrar oluşan nitrojen atmosfere salınır ve böylece siklus tamamlanır. Bakteriler farklı nitrojen oksitlerin karşılıklı birbirlerine dönüşümlerini de içeren herbir basamağı katalize ettiklerinden siklusta önemli bir rol oynarlar. Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) ve nitrik oksit (NO) hepsi nitrojen siklusunun denitrifikasyon kısmında zorunlu ara ürünlerdir ve sırasıyla nitrat, nitrit ve NO redüktazlar tarafından katalize edilirler (Lundberg ve Weitzberg 2010). Bakteriler bu substratları oksijen yokluğunda terminal elektron alıcıları olarak kullanır. Nitrojen oksitlerin üretimi ve metabolizması memelilerde de meydana gelir. Nitrat memelilerde bakteri ve memelilere ait enzimlerin etkisiyle kolayca nitrite çevrilir. Nitrit ise amin, amid ve aminoasitlerle kanserojenik olabilen N-nitroso bileşiklerini oluşturmak üzere reaksiyona girebilir (Atakişi ve Merhan 2017).

Nitrit ve nitratlar, insanlar tarafından tüketilen sebze ve meyvelerde ve özellikle hayvan yemlerinde oluşabilirler (Horita ve ark. 1997). Sebze ve meyveler, nitrit ve nitratı genellikle buldukları topraktan almaktadırlar. Toprak içerisinde nitrit ve nitratın varlığı birçok etkene bağlıdır. Bunlar arasında kuraklık, don, zararlı ot mücadelesinde kullanılan herbisitler, toprağın azot ve fosfor yönünden zengin oluşu, bitkilerin genç oluşu ve ışık yetersizliği sayılabilir. Söz konusu bu faktörler hem bitki köklerinin topraktan azot almasını kolaylaştırıcı hem de bitkilerin büyümesini sınırlayıcı bir etkiye sahiptir (Pasquali ve ark. 2007). Bitkilerde görünüm ve verimi arttırmak için fazla miktarda kullanılan azotlu gübreler sonucunda, bitkiler ihtiyacından fazla miktarda nitrat depolamaktadırlar. Alınan nitrat miktarı fazla olduğunda, amonyağa indirgenme sınırlanmakta ve ara metabolizma ürünü olarak nitrit birikmektedir (Pennington 1998).

## 2.2.Malondialdehit

Lipit peroksidasyonu; fosfolipit, glikolipit, gliserid ve steroidlerin yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinin oksidan maddeler tarafından alkol, aldehit, hidroksi asit, etan ve pentan gibi ürünlere yıkılmasını sağlayan zincir reaksiyonu olmasından dolayı (Yerer ve Aydoğan 2000) oksidatif stres ile birlikte yağ dokusunu etkileyerek, obezite ve metabolik sendromla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Daniels ve ark. 2005). Uzun zincirli doymamış yağ asitleri birden çok çift bağ içerir ve metilen grupları bulundurlar. Metilen grupları oksidan maddelere karşı yüksek reaktiviteye sahip olup uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile ilk ürün olarak peroksil radikal oluştururlar. Serbest radikaller birçok moleküllerle reaksiyona girerler ve iki radikal ajan bir araya gelirse elektronlarını paylaşarak kovalent bağ oluştururlar. MDA'nın hücre membranlarının geçirgenliğini arttırdığı, membranların iyon alışverişine etki ederek hücre içi iyon dengesini bozduğu, enzim aktivitelerinin bozulmasına, DNA'nın yapısında kırılmalara ve baz değişimlerine neden olduğu gösterilmiştir (Rio ve ark. 2005).

## 2.3.Sekonder Aminler

Aminler azot atomuna bağlı alkil ya da aril grubunun sayısına göre; primer ( $R-NH_2$ ), sekonder ( $R_2-NH$ ) ve tersiyer ( $R_3-N$ ) olarak sınıflandırılırlar. Aminler orta polarlıkta bileşiklerdir. Kaynama noktaları benzer molekül kütleli alkanlardan yüksek, alkollerden düşüktür. Primer ve sekonder aminlerin molekülleri birbiriyle ve suyla güçlü hidrojen bağları oluşturabilirler. Tersiyer aminlerin molekülleri birbiriyle hidrojen bağları yapamaz ve bu nedenle tersiyer aminler sekonder ve primer aminlerden daha düşük sıcaklıkta kaynarlar. Uçucu aminler çok keskin ve genellikle çok kötü bir kokuya sahiptirler. Aril aminler, alkil aminler gibi kötü kokulu değildirler fakat anilin gibi aril aminler zehirlidir ve cilde temas ettiklerinde tehlike oluştururlar (Solomons ve Fryhle 1998).

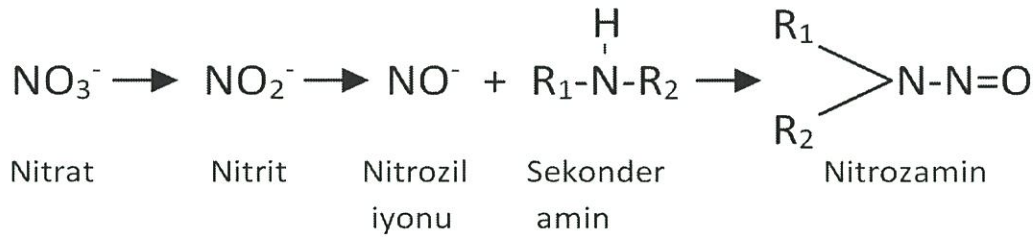
Aminler sulu çözeltide zayıf bazdırlar ve tersinir bir asit-baz tepkimesiyle sudan bir proton kopartırlar. Azot atomu üzerindeki alkil grubu gibi elektron verici bir grup, katyon üzerindeki pozitif yükün dağılmasına neden olur ve bazlık kuvvetini artırır. Bu nedenle bazlık  $NH_3$ ,  $CH_3NH_2$ ,  $(CH_3)_2NH$  sırasına göre artmaktadır. Fakat salvasyondan dolayı tersiyer aminlerin bazlığı düşüktür (Wade 2006).

### 2.3.1.Nitrozaminler

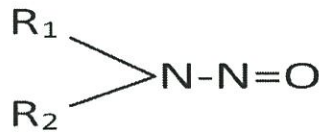
N-nitrozo bileşikleri; nitrozamidler ve nitrozaminler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Nitrozamidler; amid, guanidin, karbamat, karboksamid gibi maddelerin türevleridirler. Nitrozaminler 100 yılın üzerinde bir süre önce tanımlanmış bir sınıf kimyasal

bileşiklerdir. Genel formülleri  $R_1R_2NN=O$  şeklindedir.  $R_3$  ve  $R_2$  alkil veya aril gruplardan oluşabilmektedir. Bu bileşikler insanlar tarafından tüketilen gıda maddelerinde yaygın olarak bulunabilen ve diğer çevre şartlarında oluşabilen genetik etkili kimyasal kansorejenlerin büyük bir grubunu oluştururlar. Nitrozaminler karsinojenik ve mutajenik bileşiklerdir. Çevresel kaynaklardan alınabileceği gibi memeli midesinden de öncülleri olan ikincil amin ve nitritlerden oluştuğu gözlemlenmiştir (Honikel 2008).

Kürlenmiş etlerde, sigara dumanında ve kauçuk endüstrisinde karşımıza çıkabilen nitrit ve nitratın aminlerle reaksiyonu sonucu oluşan N-nitrozaminlerle ilgili yapılan çalışmalar bu moleküllerin karsinojenik etkilerini ortaya koymaktadır. Nitrit, karsinojenik etkiye sahip N-nitrozo bileşiklerinin prekürsör maddesidir (Parnaud ve ark. 2000, Atakişi ve Merhan 2017). Nitritler asidik ortamda nitroz aside dönüşür, nitroz asit de sekonder yapıli aminler ile reaksiyona girerek nitrozamin bileşiklerini oluştururlar.



Nitrozaminler ise genel formülleri aşağıda gösterilen kimyasal bileşiklerdir.



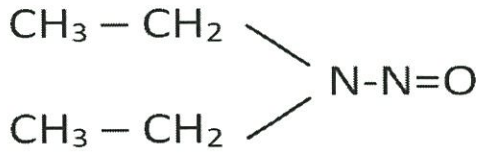
Nitrozaminler bazı kozmetik, pestisit ve çoğu kauçuk ürününün imalatında kullanılır. Nitrozaminler, lateks ürünlerinde, tahıl, çay birçok gıdada, sigara ve sigara dumanında bulunur. Ayrıca doğada yaygın olarak bulunan nitratın bakteriler tarafından nitrite indirgenmesi ile de oluşmaktadır. Toksikasyon oluşturmak amacıyla en yaygın kullanılan N-nitrozo bileşikleri, dimetilnitrozamin (N-nitrozodimetilamin=NDMA), dietilnitrozamin (DEN=N nitrozodietilamin=NDEA), N-nitrozoprolidin (NPYR) ve N-nitrozopiperidin (NPIP)'dir (Atakişi ve Merhan 2017).

Nitrozamin oluşumu için gerekli sekonder aminler balık ürünleri, tahıl, çay, sigara ve sigara dumanında mevcuttur. Ayrıca bir çok ilaç yapısında ikincil amin bulunduğu

bildirilmiştir (Ekici ve ark. 2008). Nitrozaminlerin oluşumunda etkili olan nitritlerin kimyasal maddeler, zirai ilaçlar, su ve bitkilerde büyük oranda bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca doğada yaygın olarak bulunan nitratın bakteriler tarafından nitrite indirilmesiyle de oluşmaktadır (Parthasarathy ve Bryan 2012). Çalışılan bütün deney hayvanlarında nitrozaminlerin mutasyonlara neden olduğu tümör oluşumunu arttırdığı, karsinojenik ve mutajenik etkisini çoğunlukla mikrozomal sistem tarafından aktive edildikten sonra gösterdiği bildirilmiştir (Vendemiale ve ark. 2001).

### 2.3.1.1. Dietilnitrozamin

Dietilnitrozamin (DEN), tarımda kullanılan kimyasallardan ve nitrattan şekillendiği, sigara dumanında bulunduğu, kauçuk endüstrisi gibi iş sahalarında, sigara dumanı, alkollü içecekler ve işlenmiş et ürünlerinde bulunmaktadır. İnsektisitlerden, zirai kimyasallardan ve nitritten, çeşitli nitrozolu bileşiklerin oluştuğu saptanmıştır. Bu bileşiklerden birisi de dietilnitrozamindir. DEN çevre kirleticisi olarak doğada yaygın olarak bulunur, sigara ve besin maddelerinde de mevcuttur (Matsuda ve ark. 2005).



Şekil 1. Dietilnitrozaminin kimyasal yapısı (Ataşi ve Merhan 2017)

Dietilnitrozaminler elektrofilik maddeler olmaları nedeniyle nükleik asit ve proteinlerdeki nükleofilik atomlara bağlanırlar. Karsinojenik elektrofiller tarafından proteinlerde değişikliğe uğratılan nükleofilik atomlar, methionin ve sisteindeki kükürt, histidindeki halka azot ve tirozindeki 3. karbon atomu olarak belirlenmiştir (Golkar ve Bergmark 1988, Atalay 1989). Dietilnitrozaminin metabolitleri, DNA'ya bir ya da iki oksidasyon sağlayan elektron ile kovalent bağlanarak tümör promotörlerinin bağlanmasına aracılık eder (Ma ve ark. 2003). Tümör promotörü bir süperoksit anyonu indükleyicisi olarak görev yaparak reaktif oksijen molekülleri ve hidrojen peroksit oluşumunu sağlar. Bunun sonucunda süperoksit ve hidrojen peroksit birikimi gerçekleşir. Bu birikim, koruyucu antioksidan mekanizmanın azalması ve yüksek oranda reaktif hidroksil radikali oluşumunu sağlar. Bunun sonucunda DNA'nın yapısında kopma ve deoksiriboz parçalanması ortaya çıkar. Reaktif hidroksil radikalleri ayrıca, lipid membran yağ asitlerinin hidrojen atomlarını

ayırır. Hidroperoksit radikalleri, hidrojen atomları ile doymamış çok karbonlu yağ asitlerinin karbonil gruplarıyla birleşme sağlayarak, lipid hidrojenperoksit düzenlenmesindeki zincir reaksiyonundan hidrojeni ayırır. Dolayısıyla süperoksit ve hidroperoksit radikalleri lipid peroksidasyonunun artmasına neden olur ve hücre membranında hasar artışı ortaya çıkar (Thirynavukkarasu ve Sakthiesekaran 2003, Tharappel ve ark. 2008).

#### 2.4. Antioksidanlar

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek veya mevcut radikalleri süpürerek hücrenin zarar görmesini engelleyen ve yapısında genellikle fenolik fonksiyon taşıyan moleküllerdir (Kahkönen ve ark. 1999). Antioksidanlar vücut hücreleri tarafından üretildikleri gibi, gıdalar yoluyla da alınabilmektedir. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, esas olarak vitaminler (C, E ve A vitaminleri), flavonoidler, karotenoidler ve polifenollerdir. Çoğu araştırmada meyve ve sebze tüketimi ile belirli kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu saptanmıştır (Rice-Evans ve Miller 1997).

Antioksidan savunma:

- 1-Radikal metabolit üretiminin önlenmesi,
- 2-Üretilmiş radikallerin temizlenmesi,
- 3-Oluşan hücre hasarlarının onarılması,
- 4-Sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması,
- 5-Endojen antioksidan kapasitenin artırılması olarak ayrımlanan beş değişik blokta yürür (Gutteridge 1995, Rice-Evans ve Miller 1997).

**Tablo 3.** Antioksidanlar ve reaksiyonları (Dündar ve ark. 2000)

Antioksidan	Reaksiyonu
SOD	Süperoksidin giderilmesi reaksiyonlarında katalizör
Katalaz	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'nin yüksek konsantrasyonlarının giderilmesini katalizler
GSH-P <sub>x</sub>	H <sub>2</sub> O'nin düşük konsantrasyonlarının giderilmesinde kullanılır
Vitamin E	Membran lipidlerinde çözünerek peroksidasyon zincirini kırar
β-Karoten	Radikal türleri toplar, ayrıca singlet oksijen oluşumunu inhibe eder
Askorbik asit	Hidroksil radikal giderici ve tokoferolü indirgeyici vitamin
Transferin	Serbest demir iyonlarını bağlayarak fenton reaksiyonunu inhibe eder
Laktoferrin	Düşük pH'lı ortamlardaki demir iyonlarını bağlar
Haptogloblin	Hemogloblin bağlayarak 'hem'in salınmasını önler
Hemopeksin	Ortamdaki hem proteinlerini bağlayarak oksidasyonu inhibe eder
Albümin	HOCL radikalini toplar, hem proteini ve bakır metal iyonlarını bağlar
Seruloplazmin	Süperoksit radikalini nötralize eder, bakır iyonlarını bağlar
Bilirubin	Önemli bir peroksil radikali toplayıcısıdır
Mukus	Hidroksil radikali toplayıcı olarak işlev yapar

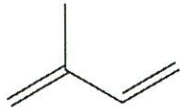
Antioksidanlar küçük miktarlarda, kolayca okside olabilen maddelerin oksidasyonunu büyük ölçüde geciktiren ya da engelleyen maddeler olarak tanımlanmaktadır. Antioksidanlar yapılarına göre enzim olanlar [Süperoksit dismütaz “SOD”, glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), glutatyon-S-transferaz (GST)] ve enzim olmayanlar [Redükte glutatyon (GSH), vitamin E, vitamin C, vitamin A, melatonin] şeklinde sınıflandırılabilir gibi hücre lokalizasyonlarına göre de intrasellüler antioksidanlar (SOD, CAT, GPx), ekstrasellüler antioksidanlar (albümin, vitamin C, ürat) ve membran antioksidanları (vitamin E, vitamin A) olarak sınıflandırılabilir (Akkuş 1995, Gutteridge 1995).

**Tablo 4.** Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi (Akkuş 1995)

Enzimatik Antioksidanlar	Nonenzimatik Antioksidanlar	
Süperoksit dismütaz (SOD)	Glutatyon (GSH)	Seruloplazmin
Katalaz (CAT)	$\alpha$ -Tokoferol (vit E)	Transferin
Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)	Askorbik asit (vit C)	Ferritin
Glutatyon-S-Transferaz(GST)	$\beta$ -Karoten	Laktoferrin
Glutatyon redüktaz (GSSG-R)	Flavonoidler	Melatonin
Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGSH-Px)	Ürat	Sistein
Paraoksonaz	Bilirubin	Kafeik asit fenetil ester (CAPE)

## 2.5.Karotenoidler

Terpenler, izopren zincirlerinden türemiş yapılardır. İzopren molekülünün kimyasal formülü  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$  (2-metil-1,3-butadien)'dir. Molekülde iki çift bağ vardır ve bu bağlar konjügedir. 5 karbonlu izopren molekülleri polimerize olduklarında terpenler adı verilen bileşikler türemiş olur. Bu gruba biyolojik yönden çok önemli maddeler girer. Bunlardan bazıları, likopen, karoten, vitamin A, squalen gibi maddelerdir (Merhan 2017).



**Şekil 2.** İzoprenin kimyasal yapısı (Atakişi ve Merhan 2017)

Terpenler biyosentetik olarak izopren birimlerden türetilirler, bu birimin kimyasal formülü  $\text{C}_5\text{H}_8$  olup terpenlerin temel moleküler formülleri de bunun katlarıdır, yani  $(\text{C}_5\text{H}_8)_n$  (n birleştirilmiş izopren birimlerinin sayısıdır). İzopren birimler baş-kuyruk şeklinde bağlanarak düz zincirler oluşturabilirler veya halkalar oluşturabilirler. İzopren birim doğada çok yaygın olarak kullanılan bir yapı taşıdır. Terpenlerin en önemli grubu, 8 izopren birimi içeren bir

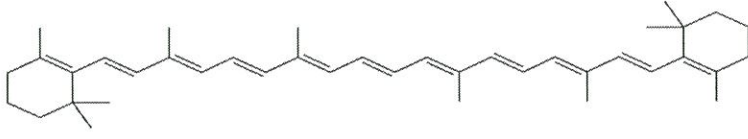


tetraterpen olan  $C_{40}H_{64}$  molekül formülüne sahip karotenoidlerdir. Karotenoidler; 5 karbonlu izopren moleküllerinin bağlanmasıyla oluşan terpen grubu maddeler olup izopren moleküllerinin kondenzasyonu ile meydana gelen düz zincir yapılıdır. Açık sarıdan koyu kırmızıya kadar değişen renklerini taşıdıkları çift bağlardan alan karotenoidler diğer lipidler gibi organik çözücülerde ve yağlarda çözünürler (Iriti ve Faoro 2009, Merhan 2017). 700'den fazla doğal karotenoid tanımlanmıştır ve her yıl yeni karotenoidler eklenmiştir (Arvayo-Enriquez ve ark. 2013, Amorim-Carrilho ve ark. 2014, Mezzomo ve Ferreira 2016). Karotenoidler kırmızı, sarı ve turuncu renkli meyve ve sebzelerin yanısıra tüm yeşil yapraklı sebzelerde de bulunmaktadır (Gomez-Garcia ve Ochoa-Alejo 2013). Karotenoidler; bitkisel dokularda serbest halde (kristal veya amorf) veya yağlı ortamda çözünmüş olarak bulunurlar. Ayrıca yağ asitleriyle esterleşmiş halde veya şeker ve proteinlerle kompleks halde de bulunabilirler (Sajilata ve ark. 2008). Karotenoidlerin sahip olduğu konjuge çift bağ yapısı, bu bileşiklerin karakteristik rengini belirlediği gibi (Britton 1995), fotosentez sırasında ışığı absorbe etme, enerji transferi ve hücreleri ışığın zararlı etkilerinden koruma gibi biyolojik fonksiyonlarını da belirlemektedir (Krinsky 1994, Deming ve Erdman 1999).

Karotenoidler yapılarına göre hidrokarbon karotenoidler ve ksantofiller olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Karotenler olarak da adlandırılan apolar özellikteki hidrokarbon karotenoidlerin başlıcaları;  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten,  $\gamma$ -karoten ve likopendir. Ksantofiller ise, daha polar özellikte olup yapısında metoksi, hidroksi, keto, karboksi ve epoksi formunda oksijen içermektedir. Ksantofillere örnek olarak, lutein, zeaksantin,  $\beta$ -kriptoksantin, astaksantin ve fukoksantin verilebilir (Jaswir ve ark. 2011, Eldahshan ve Singab 2013, Merhan 2017). Karotenoidler ayrıca zincir uçlarında halka grubu içerip içermemesine göre de halkalı ve halkasız karotenoidler olarak da gruplandırılmaktadır (Eldahshan ve Singab 2013).

### 2.5.1. $\beta$ -Karoten

Hidroaromatik halkaya sahip olan karotenoidlere, karotenler adı verilir. Bu halkalar 4 izopren molekülünün iki ucunda yer alır. Yani her bir karoten molekülünde 2 hidroaromatik halka vardır. Bu hidroaromatik halkalara iyonon halkaları denir ve üç iyonon halkası vardır. Bunlar  $\alpha$ ,  $\beta$  ve pseudo iyonon halkalarıdır.  $\alpha$  ve  $\beta$  iyonon halkaları, kapalı halkalar olup, yalnız bir çift bağ taşırlar. Çift bağın yeri  $\alpha$  ve  $\beta$  iyonon halkalarında farklı yerlerdedir. Pseudoiyonon halkası ise, 2 çift bağ taşır ve açıktır. Karoten, 8 izopren birimden biyokimyasal olarak sentezlenen bir terpendir. Başlıca üç türü vardır, bunlar  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten ve  $\gamma$ -karotendir (Merhan 2017).



**Şekil 3.**  $\beta$ -Karotenin kimyasal yapısı (Merhan 2017)

$\beta$ -karoten, A vitaminin ön maddesi olup vücuda alınımı ile birlikte bağırsaklar ve karaciğerde vitamin A'ya dönüşmektedir. En az 80 provitamin bilinmesine karşın bunların en aktif ve en yaygın olanı  $\beta$ -karotendir. Saf  $\beta$ -karoten kırmızı, eriyik hali sarımsı turuncu renklidir ve A vitamini gibi suda erimez, ancak yağda ve yağ eriticilerinde erirler (Maenpaa ve ark. 1988, Tek ve ark. 2002). Retinolün ön maddesi olan  $\beta$ -karoten 2 retinal molekülünün aldehit uçlarından birleşmesiyle oluşan sarı renkli pigmentlerdir (Kankofer ve Albera 2008). Vücuttaki en önemli  $\beta$ -karoten rezervuarı kan plazması ve bunu takiben karaciğer ve yağ dokularıdır. En yoğun  $\beta$ -karoten konsantrasyonu korpus luteumda (sarı cisim) bulunur ve dokuya sarı rengi veren  $\beta$ - karotendir (Akar ve Gazioğlu 2006).

**Tablo 5.** Bazı vücut sıvı ve dokularındaki  $\beta$ -karoten konsantrasyonu (Akar ve Gazioğlu 2006)

Serum ( $\mu\text{g}/100\text{ml}$ )	Plazma ( $\mu\text{g}/100\text{ml}$ )	Folikül sıvısı ( $\mu\text{g}/100\text{ml}$ )	Korpus luteum ( $\mu\text{g}$ )	Karaciğer ( $\mu\text{g}$ )
300-400 <sup>1</sup>	277.4 <sup>16</sup>	37 <sup>17</sup>	76.3 <sup>18</sup>	7.01 <sup>19</sup>
129 <sup>20</sup>	94.0 <sup>16</sup>	2.49 <sup>21</sup>	14.2 <sup>16</sup>	3.00 <sup>16</sup>
125 <sup>22</sup>	230.0 <sup>23</sup>			
100.67 <sup>24</sup>	94-158 <sup>25</sup>			
182.0-188.6 <sup>26</sup>	169-178 <sup>27</sup>			
141-545 <sup>28</sup>				

$\beta$ -karotenin bol miktarda alınması durumunda A vitamini ihtiyacı da karşılanmış olur.  $\beta$ -karoten, havuç, brokoli, yeşilbiber, patates ve ıspanak gibi sebzeler ile hint kirazı, karpuz, portakal, kavun ve kayısı gibi meyvelerde bulunmaktadır (Okonkwo 2009). En iyi karoten kaynakları yeşil çayırklar olup kurutma işlemi boyunca önemli kayıplar gerçekleşmektedir. Silajda ise kayıp çok az düzeydedir (Mangles ve ark. 1993, DSM 2005).

**Tablo 6.** Yaygın  $\beta$ -karoten kaynakları (Mangles ve ark. 1993, DSM 2005)

Sebzeler (mg/100 g)	Meyveler (mg/100 g)
Havuç (1.8-14.7)	Hint kirazı (0.1-3.7)
Brokoli (0.5-1.1)	Karpuz (0.2)
Yeşil biber (0.1-0.3)	Portakal (0-0.5)
ıspanak (3.0-6.7)	Kayısı (0.6-6.4)

Son yıllarda bitkilerde bulunan karotenoidlere olan ilgi sadece A provitamini aktivitelerinden dolayı değil, aynı zamanda oksijen radikallerini yakalayarak organizmada oksidatif stresi azaltmalarından yani antioksidan etkilerinden de kaynaklanmaktadır (Rao ve Agarwal 1999, Merhan 2017). Strese bağlı doku hasarı ve enflamasyonun patogenezinde serbest oksijen radikallerinin önemli rolleri vardır. Koruyucu ve hasar verici mekanizmalar arasındaki dengesizlik nötrofil infiltrasyonunun eşlik ettiği akut enflamasyonla sonuçlanır (Mittal ve ark. 2002). Nötrofillerin oluşturduğu süperoksit radikalleri ise lipidlerle tepkimeye girerek lipid peroksidasyonuna neden olurlar (Valko ve ark. 2006). Karotenoidler, aktif radikalleri elektron transfer ederek, hidrojen vererek ya da radikale bağlanarak inhibe edebilmektedir (Kopsell ve Kopsell 2006).

Yapısındaki konjuge çift bağ sayısı karotenoidlerin süperoksit inhibe edici etkisi ile yakından ilişkilidir (Stahl ve Sies 2005, Eldahshan ve Singab 2013). Karotenoidler, reaktif oksijen türlerinden singlet oksijenleri ve peroksil radikallerini ortadan kaldırdığı gibi aynı zamanda oluşumunu da engellemektedir (Young ve Woodside 2001). Karotenoidlerin hücre yenilenmesi ve transformasyonunu engelleyebildiği ve belirli kanser türlerinin oluşumunu önlemede rol oynayan gen ekspresyonunu düzenlediği belirtilmektedir. Buna karşın karotenoidlerin bazı durumlarda kanseri uyarabildiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Örneğin, sigara içenlerde akciğer kanseri ve kardiyovasküler hastalıklara karşı sentetik  $\beta$ -karotenin koruyucu özelliği olmadığı gibi hastalığı daha da arttırdığı rapor edilmiştir (Tapiero ve ark. 2004, Merhan 2017).

### 3.MATERYAL ve METOT

Çalışmaya başlamadan önce, deney hayvanları için Kafkas Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulundan (KAÜ-HADYEK-2012/9) onay alındı. Bu çalışmada materyal olarak 21 adet, 5–7 aylık Yeni Zelanda ırkı tavşan kullanıldı. 2 hafta süreyle yaklaşık olarak 25 °C'lik oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık-karanlık döngüsü ayarlanabilen ve havalandırması mevcut bir ortamda muhafaza edilerek *ad-libitum* olarak beslenen hayvanların ortama adaptasyonu sağlandı. Ağırlıklarına göre her bir grupta 7 tavşan olmak üzere toplam 3 grup oluşturuldu.

**Kontrol:** Tek doz % 0,9'luk NaCl solüsyonu (İP)

**Grup I:** Tek doz 100 mg/kg DEN (İP)

**Grup II:** Tek doz 100 mg/kg DEN (İP) + 2 mg/kg/gün β-karoten (Sigma) 7 gün boyunca günlük oral gavajla verildi.

Biyokimyasal analizler için enjeksiyondan sonraki 1., 4. ve 7. günlerde *vena auricularis*'ten alınan kan örneklerinin serumları ayrılarak analizler yapılınca kadar -20 °C'de saklandı.

#### 3.1.MDA Tayini

Serumda MDA tayini Yoshioka ve ark.'nın (1979) bildirdiği yöntemle göre ölçüldü.

**Preisp:** Tiyobarbütirik asit (TBA) tepkimesinde lipit içerik, düşük pH ve TBA varlığında ısıtıldığında 535 nm'de maksimum pik oluşturan stabil kırmızı-pembe renk meydana gelir. Kırmızı-pembe renk, MDA molekülü ile iki TBA molekülünün birleşmesi sonucu oluşan kromojenden dolayıdır.

#### 3.1.1.Deneyde Kullanılan Çözeltiler

**Triklorasetik asit (% 20):** 20 g triklorasetik asit (TCAA) distile suda çözüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Tiyobarbütirik asit (% 0,67):** 1,675 g tiyobarbütirik asit (TBA) distile suda çözüldü ve hacim 250 ml'ye tamamlandı.

**Stok Standart Çözelti (20 mmol/L):** 0,494 ml 1,1,3,3-tetraetoksipropan (d:0,92; % 97; MA: 220,3) 100 ml alkolde çözülerek, 20 mmol/L'lik stok standart çözelti hazırlandı.

**Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması:** 20 mmol/L'lik Stok Standart Çözeltiden 0,1 ml alınarak hacmi 100 ml'ye tamamlandı ve 20 mmol/L'lik standart çözelti elde edildi. Bu çözelti

ile 10 - 5 - 2,5 - 1,25 - 0,625 - 0.3125  $\mu\text{mol/L}$ 'lik dilüsyonlar hazırlanarak aşağıda açıklandığı şekilde çalışıldı. 535 nm'de köre karşı optik dansiteleri okundu ve kalibrasyon eğrisi çizildi.

### 3.1.2.Deneyin Yapılışı

Test ve kör olarak işaretlenen cam deney tüpleri alındı ve test tüpüne 0.5 ml serum, kör tüpüne 0.5 ml distile su pipetlendi. Bütün tüplere 2,5 ml %20'lik TCAA ve 1 ml TBA ilave edildi. Tüpler 90 °C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edildi, soğutuldu ve üzerine 4 ml n-bütanol pipetlenerek 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra n-bütanol tabakası başka bir tüpe aktarılarak 535 nm'de köre karşı testin absorbanası spektrofotometrede okundu.

**Tablo 7.** MDA ölçüm yöntemi

	Kör	Test
Serum	-	0.5 ml
Distile su	0.5 ml	
TCAA	2.5 ml	2.5 ml
TBA	1 ml	1 ml

90 °C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra tüpler su altında soğutuldu.

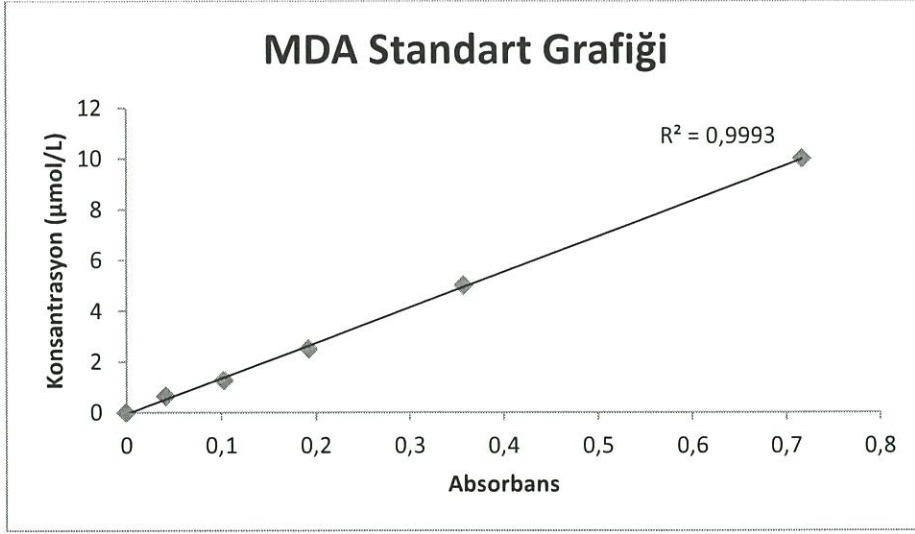
---

**n-Bütanol**                      4 ml                      4 ml

3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan tabaka ayrılarak 535 nm'de köre karşı optik dansiteler okundu.

### 3.1.3.Sonuçların Hesaplanması

Sonuçlar kalibrasyon eğrisinden hesaplanarak bulundu.



**Grafik 1.** MDA düzeyinin saptanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi

### 3.2. Nitrik Oksit Tayini

Nitrik oksit düzeyleri Miranda ve ark.'nın (2001) bildirdikleri yöntemle tayin edildi.

**Prensip:** Nitrat, vanadyum (III) klorür ile nitrite dönüştürülür. Nitritle sülfanilamidin asidik ortamda N-(1-Naftil) etilen diaminedihidroklorür ile reaksiyonu sonucu kompleks diazonyum bileşiği oluşur. Oluşan bu renkli kompleks 540 nm'de ölçülür. Nitrit ve nitrat ölçümleri ayrı ayrı yapıldıktan sonra ikisinin toplamı NO düzeylerini gösterir.

#### 3.2.1. Deneyde Kullanılan Çözeltiler

**Çinko Sülfat (% 10):** 10 g çinko sülfat distile suda çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Sodyum Hidroksit (0,3 M):** 1,2 g sodyum hidroksit distile suda çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**1 M HCl:** 8,29 ml HCl (d: 1,19; %37; MA: 36,46) içinde bir miktar distile su bulunan balon jøjede çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Vanadyum (III) Klorür (% 0,8):** 800 mg vanadyum (III) klorür 1 M HCl'de çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Sülfanilamid (% 2):** 2 g sülfanilamid % 5'lik HCl'de çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

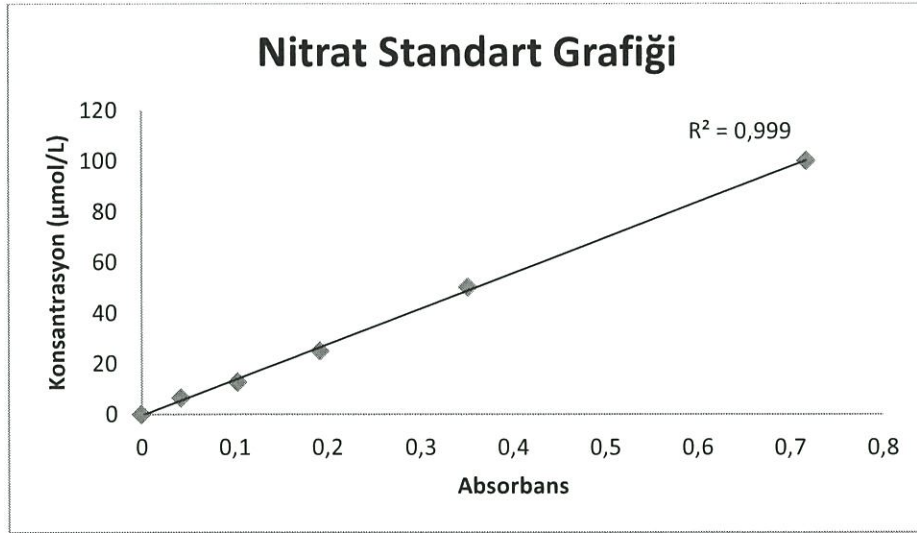
**Naftil Etilen Diamin Dihidroklorür (% 0,1):** 100 mg 1-Naftil etilen diaminedihidroklorür (NEDD) distile suda çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Griess Ayracı:** 50 ml % 0,1 NEDD ve 50 ml % 2 sülfanilamid eşit miktarda karıştırıldı.

**Stok Nitrit Çözeltisi (1 mM):** 6,9 mg  $\text{NaNO}_2$  distile suda çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Stok Nitrat Çözeltisi (1 mM):** 8,5 mg  $\text{NaNO}_3$  distile suda çözülerek hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması:** 1 mM'lık stok nitrit ve nitrat çözeltilerinden 100 - 50 - 25 - 12,5 - 6,25 - 3,125  $\mu\text{M}$ 'lık dilüsyonlar hazırlanarak nitrat ve nitrit analizlerindeki işlemler gerçekleştirildi. 540 nm'de köre karşı optik dansiteleri okundu ve kalibrasyon eğrisi çizildi.



**Grafik 2.** Nitrat düzeyinin saptanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi

### 3.2.2. Nitrat Analizinin Yapılışı

Mikroplak kuyucuklarına 100  $\mu\text{l}$  serum pipetlendi. Tüm kuyucuklara 100  $\mu\text{l}$   $\text{VaCl}_3$  ve 100  $\mu\text{l}$  griess ayracı ilave edildi. 30 dakika  $37^\circ\text{C}$ ' de etüvde inkübe edildikten sonra 540 nm dalga boyunda absorbanslar okundu.

**Tablo 8.** Nitrat ölçüm yöntemi

	Kör	Test
Distile su	100 µl	-
Serum	-	100 µl
Vanadyum (III) Klorür	100 µl	100 µl
Griess Ayracı	100 µl	100 µl

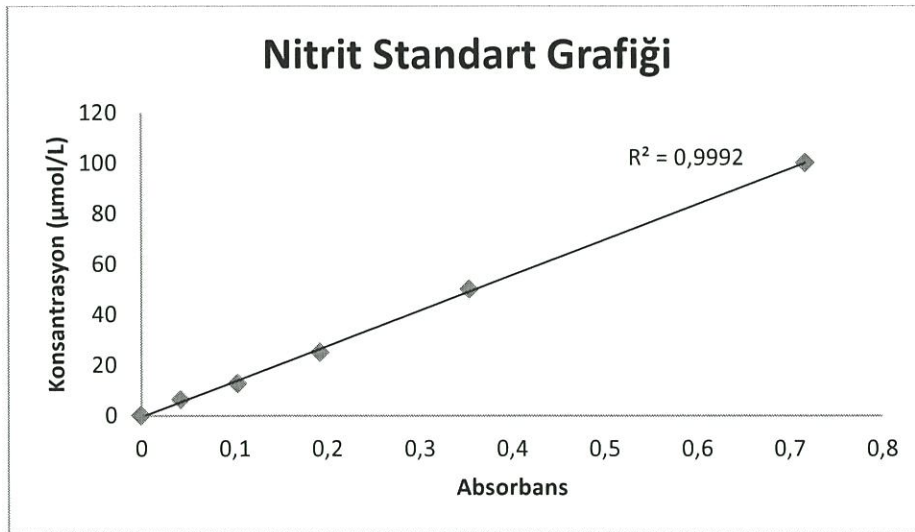
**3.2.3.Nitrit Analizinin Yapılışı**

Mikroplak kuyucuklarına 100 µl numune ve 100 µl griess ayıracı pipetlendi. 30 dakika 37°C’de etüvde inkübe edildikten sonra absorbanlar 540 nm dalga boyunda okundu.

**Tablo 9.** Nitrit ölçüm yöntemi

	Kör	Test
Distile Su	100µl	-
Serum	-	100µl
Griess Ayracı	100µl	100µl

37 C’de 30 dk inkübe edildikten sonra 540 nm’de okundu.

**Grafik 3.** Nitrit düzeyinin saptanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi

**Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması:** 1 mM’lık stok nitrit ve nitrat çözeltilerinden 100 - 50 - 25 - 12,5 - 6,25 - 3,125 µM’lık dilüsyonlar hazırlanarak nitrat ve nitrit analizlerindeki



işlemler gerçekleştirildi. 540 nm'de köre karşı optik dansiteleri okundu ve kalibrasyon eğrisi çizildi.

#### **3.2.4.Sonuçların Hesaplanması**

Kalibrasyon eğrisinden hesaplanarak bulunan nitrat ve nitrit konsantrasyonları toplandı ve NO konsantrasyonu bulundu (Miranda ve ark. 2001).

$$\text{NO } (\mu\text{M}) = \text{Nitrat } (\mu\text{M}) + \text{Nitrit } (\mu\text{M})$$

#### **3.3.İstatiksel Analiz**

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS for Windows 16.0.2 paket program kullanılarak yapıldı. Deney verilerinin istatistik değerlendirmesinde kontrol ve deney grupları arasındaki fark One Way ANOVA ve gruplar arasındaki farkın derecesi Student-Newman Keul's Test (SNK) uygulanarak belirlenmiştir. Sonuçlar, ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir.

#### 4. BULGULAR

Gruplar arası karşılaştırmada; DEN verilen grupta (1. grup) 1., 4. ve 7. günlerde NO ve MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı arttığı ( $p<0.01$ ), NO ve MDA'nın en yüksek değerlerine ise 7. günde ulaştığı belirlenmiştir. DEN+ $\beta$ -karoten verilen grupta (2. grup) ise 1., 4. ve 7. günlerde NO düzeyinin DEN verilen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı azaldığı ( $p<0.01$ ) belirlenmiştir. DEN+ $\beta$ -karoten verilen grupta (2. grup) 1. günde MDA düzeyinin DEN verilen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı azaldığı ( $p<0.01$ ), fakat 4. ve 7. günlerde MDA düzeyindeki azalışın ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

Günler arası karşılaştırmada; DEN verilen gruplarda 1. güne göre NO ve MDA değerlerinin 4. günde azaldığı, 7. günde ise arttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. DEN+ $\beta$ -karoten verilen gruplarda ise, 1. güne göre NO değerinin 4. günde arttığı, 7. günde ise azaldığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ve MDA düzeylerinin ise DEN'e göre 4. ve 7. günlerde anlamlı olarak arttığı ( $p<0.05$ ) belirlenmiştir.

**Tablo 10.** DEN verilen tavşanlarda NO ve MDA düzeyleri

Parametreler	Gruplar	Zaman (gün)			P
		1	4	7	
NO ( $\mu\text{mol/L}$ )	Kontrol	74.67 $\pm$ 1.87 <sup>x</sup>	76.12 $\pm$ 1.80 <sup>x</sup>	77,08 $\pm$ 1,84 <sup>x</sup>	NS
	DEN	176.42 $\pm$ 1.99 <sup>y,a</sup>	173.13 $\pm$ 1.52 <sup>y,a</sup>	178.10 $\pm$ 2.20 <sup>y,a</sup>	NS
	DEN+ $\beta$ -Karoten	151.81 $\pm$ 2,28 <sup>z,a</sup>	156.90 $\pm$ 2.01 <sup>z,a</sup>	148.70 $\pm$ 2.21 <sup>z,a</sup>	NS
	P	P<0.01	P<0.01	P<0.01	
MDA ( $\mu\text{mol/L}$ )	Kontrol	1.33 $\pm$ 0.09 <sup>x</sup>	1.31 $\pm$ 0.07 <sup>x</sup>	1.35 $\pm$ 0.06 <sup>x</sup>	NS
	DEN	6.27 $\pm$ 0.33 <sup>y,a</sup>	6.13 $\pm$ 0.28 <sup>y,a</sup>	6.32 $\pm$ 0.12 <sup>y,a</sup>	NS
	DEN+ $\beta$ -Karoten	4.86 $\pm$ 0.11 <sup>z,a</sup>	5.96 $\pm$ 0.16 <sup>y,a</sup>	6.07 $\pm$ 0.08 <sup>y,b</sup>	P<0.05
	P	P<0.01	P<0.01	P<0.01	

<sup>a,b</sup>: Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ( $p<0.05$ )

<sup>x,y,z</sup>: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ( $p<0.01$ )

NS: Önemsiz

## 5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Gıdalar hastalıkları önlemede olduğu kadar hastalık sebebi olarak da önemli bir rol oynamakta, bir yandan beslenme ihtiyacını karşılarken, diğer yandan sağlık riski yaratabilmektedir. Hem gıdalarla alınan hem de çevrede bulunan N-nitrozaminlerin bu risklerden biri olduğu kaydedilmektedir (Bayraktar ve ark. 1998). Et ve et ürünlerine koruyucu amaçla ilave edilen nitrozaminlerin birçok dokuda kansere sebep oldukları ileri sürülmekte fakat kanserlerin oluşumunda nitrozaminlerin rolünün mekanizması hala açıklanamamış bir soru olarak kalmaktadır (Jimenez-Colmenero ve ark. 2001, Palamutoğlu ve Sarıçoban 2012). Gıdalara koruyucu amaçla ilave edilen nitrozaminlerin önemlilerinden biri DEN olup metabolizması sitokrom P-450'ye bağlı monooksijenaz sisteminin enzimleri tarafından katalizlenmektedir. DEN biyoaktivasyonu sonucu oluşan süperoksit anyonu gibi reaktif ara ürünleri hücre bileşenleriyle kovalent bağlar oluşturabildikleri, bu şekilde mutasyon, kanser ve nekrozun başlamasını uyardıkları öne sürülmektedir (Yamada ve ark. 2006, Atakişi ve Merhan 2017).

Normal koşullarda, organizmada oksidan ve antioksidanlar denge halindedir. Ancak yangı, enfeksiyon ve stres gibi durumlarda bu denge oksidanlar lehine bozularak hücre ya da dokularda hasara neden olabilen oksidatif stres oluşturmaktadır (Tabakoğlu ve Durgut 2013). Oksidatif streste konsantrasyonu artan serbest radikaller; lipid, karbonhidrat, protein ve nükleik asit gibi molekülleri etkileyerek oksidatif hasara neden olurlar (Gutteridge 1995). Hücre zarındaki doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olan serbest oksijen radikalleri, bir taraftan zardaki yağ asitlerini etkileyerek yeni radikallerin oluşumuna neden olurken diğer taraftan açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlerine dönüştürürler (Tabakoğlu ve Durgut 2013). Lipid peroksitlerden en iyi bilineni araşidonik asidin oksijenasyonu ya da doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı sonucu oluşan MDA'dır (Katz ve ark. 1996).

Latief ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada ratlara tek doz 100 mg/kg DEN ve koruyucu olarak da  $\beta$ -karoten verilmiştir. Hepatik dokuda DEN'in MDA'yı arttırarak karaciğer hasarı oluşturduğu ve bununla birlikte günde 3 kez 2 hafta süreyle verilen  $\beta$ -karotenin koruyucu etkisi olduğunu bildirmişlerdir.

Atakişi ve Özcan (2005) yaptıkları bir çalışmada ratlara koruyucu olarak omega-3 ( $\omega$ -3) yağ asidi içeren balık yağı ve toksik dozda (150 mg/kg) DEN verilmiştir. Sadece DEN verilen grupta karaciğer dokusunda MDA miktarının arttığını tespit etmişlerdir. Balık yağındaki  $\omega$ -3 yağ asitlerinin ratlarda karaciğer kanseri oluşumu aşamasında lipid peroksidasyonunu düşürerek koruyucu bir rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Karaca ve Bayşu Sözbilir (2007)'in yaptıkları bir çalışmada ratlara  $\alpha$ -lipoik asit ve tek doz 150 mg/kg DEN verilmiştir. DEN'in lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'yı arttırdığını ve karaciğer hasarında  $\alpha$ -lipoik asidin koruyucu etkisi olduğunu tespit etmişlerdir.

Agrawal ve ark. (2008) yapmış oldukları bir çalışmada ratlara 2 hafta boyunca haftada 1 defa olmak üzere 200 mg/kg DEN verilen grupta MDA miktarının arttığını, enflamasyon ve karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılan *Asparagus racemosus* (kuşkonmaz) sulu ekstraktının DEN ile birlikte 20 gün boyunca verildikten sonra ise oksidatif stresin ve DEN'den kaynaklanan hepatotoksitenin azaldığını ileri sürmüşlerdir.

Yukarıda yapılan çalışmalarla uyumlu olarak, çalışmamızda da DEN verilen grupta lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA miktarının önemli derecede arttığı ve koruyucu olarak verilen  $\beta$ -karotenin antioksidan özelliğinin DEN'in toksik etkisini azaltarak 1. günde MDA düzeyini düşürdüğü tespit edilmiştir. Fakat 4. ve 7. günlerdeki MDA düzeyinde ise anlamlı bir azalış olmadığı belirlenmiştir.

Aslında serbest bir radikal olan NO hem hücrel hem de vücuda ait fizyolojik olaylarda önemli roller üstlenmektedir. 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 (Önger ve ark. 2011). NO'nun oluşturduğu peroksinitritin DNA hasarı ve enzim fonksiyon bozukluklarına neden olan zararlı etkileri olduğunun kaydedilmesinin yanı sıra antioksidanlar gibi oksidatif hasara karşı koruyucu ve düzenleyici olarak etki gösterdiği de bildirilmiştir (Laspina ve ark. 2005, Singh ve ark. 2008).

Atakişi ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada ratlara 7 gün boyunca 0,4 g/kg n-3 yağ asitleri (n-3 FA) ve 150 mg/kg DEN vererek NO düzeylerini araştırmışlardır. DEN verilen ratlarda NO konsantrasyonunun kontrol grubuna göre arttığını, DEN+n-3 FA verilen grupta ise DEN verilen gruba göre azaldığını tespit etmişlerdir. Çalışmalarının sonunda, n-3 FA'ların serbest radikal temizleme aktivitesiyle DEN'in toksik etkilerini iyileştirebileceği kanısına varmışlardır.

Liu ve ark. (2016) ratlara, *Paris polyphylla* bitkisinde bulunan anti-tümör etkilerinden sorumlu aktif bir bileşen olan Rhizoma Paridis saponin (RPS) ve DEN vererek yaptıkları bir çalışmada karaciğer dokularındaki NO düzeyini araştırmışlardır. DEN verilen grupta NO düzeyinin arttığını belirledikten sonra, 20 hafta boyunca ratlara RPS vermişlerdir. Çalışmanın sonunda RPS'nin ratların karaciğer dokularındaki DEN'in toksik etkisini azaltarak NO düzeyini düşürdüğünü tespit etmişlerdir.

Ertekin ve ark. (2008) tavşanlara 0.2 ml/kg ısırgan otu ekstresi ve 0.5 ml/kg/gün dozunda % 10'luk 7,12-dimetilbenzantrazen (DMBA) vererek NO oksidasyon ürünleri, lipit peroksidasyon ürünleri ve antioksidan madde düzeyleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. DMBA ve DMBA+ısırgan otu verilen gruplarda nitrit ve nitrat düzeylerinde artış tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda DEN verilen grupta süperoksit radikali ile reaksiyonu sonucu peroksinitrit radikalinin oluşumuna yol açan ve oksidatif strese rol alan NO miktarının önemli derecede arttığı ve  $\beta$ -karotenin antioksidan özelliğinin DEN'in toksik etkisini azaltarak NO düzeyini düşürdüğü tespit edilmiştir.

Yapılan bu çalışmada; bir antioksidan olan,  $\beta$ -karotenin toksik bir madde olan DEN'in meydana getirdiği zararlı etkilere karşı koruyucu olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. NO ve MDA'nın anlamlı derecede artışının tavşanlara verilen DEN'in sebep olduğu ve DEN'in toksik etkilerine bağlı olarak lipit peroksidasyonu artışına sebep olabileceği düşünülmüştür. DEN'in oluşturduğu bu hasarı azaltmak amacıyla DEN ve  $\beta$ -karoten birlikte verilmiştir. DEN ile birlikte verilen  $\beta$ -karotenin, NO ve MDA serum düzeylerini DEN verilen gruba göre düşürdüğü belirlenerek  $\beta$ -karotenin koruyucu etkisinin olabileceği düşünülmüştür. Muhtemelen bu düşüşün,  $\beta$ -karotenin süperoksit anyonlarını inhibe ederek doku hasarını azaltmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada, ekzojen  $\beta$ -karoten takviyesinin oksidatif stresi azaltarak, DEN toksisitesine karşı koruyucu etkisi olabileceği kanısına varılmıştır.

## 6.KAYNAKLAR

Agrawal A, Sharma M, Rai SK, Singh B, Tiwari M, Chandra R: The effect of the aqueous extract of the roots of *asparagus racemosus* on hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine, *Phytotherapy Research Phytother Res*, 22, 1175–1182, 2008.

Aji W, Rawalli S, Szabolcs M: L-arginine prevents xantoma deveelopment and inhibits atherosclerosis in LDL receptor knockout mice. *Circulation*, 95: 430-437, 1997.

Akar Y, Gazioglu A: Relationship between vitamin A and  $\beta$ -carotene levels during the postpartum period and fertility parameters in cows with and without retained placenta. *Bull Vet Inst Pulawy*, 50, 93-96, 2006.

Akkuş İ: Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Mimoza yayınları, Konya, 1995.

Amorim-Carrilho KT, Cepeda A, Fente C, Regal P: Review of methods for analysis of carotenoids. *Trends in Analytical Chemistry*, 56: 49–73, 2014.

Arvayo-Enriquez H, Mondaca-Fernandez I, Gortarez-Moroyoqui P: Carotenoids extraction and quantification: a review. *Analytical Methods*, 5:2916–2924. DOI: 10.1039/C3AY26295B, 2013.

Astorg P: Food carotenoids and cancer prevention: An overview of current research. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 406–413, 1997.

Atakişi E, Özcan A: Dietilnitrozamin verilen ratlarda omega-3 yağ asitlerinden zengin balık yağının koruyucu rolünün araştırılması, *Türk Biyokimya Dergisi*, 30: 279-284, 2005.

Atakişi O, Atakişi E, Özcan A, Karapehlivan M, Kart A: Protective effect of omega-3 fatty acids on diethylnitrosamine toxicity in rats, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 17: 467-471, 2013.

Atakisi E, Merhan O: Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide Involvement in Different Toxicities, *Nitric Oxide Synthase - Simple Enzyme-Complex Roles*, Dr. Seyed Soheil Saeedi Saravi (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/intechopen.68494, 2017.

Atalay A: Nitrosaminlerin proteinlerle etkileşimi, *Biyokimya Dergisi*, 14(3): 30-33, 1989.

Bayraktar N, Gökçe R, Ergün O: Gıdalarda nitrat ve nitrit kalıntılarının insan sağlığı üzerine etkileri. *Ekoloji*, 28, 28-30, 1998.

Britton G: Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal*, 9, 1551–158,1995.

Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V: Nitric oxide and cancer: A review. *World Journal of Surgical Oncology*, 11: 118, 2013.

Christopherson KS, Bredt DS: Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J Clin Invest*, 100: 2424-2429, 1997.

Connelly L, Madhani M, Hobbs AJ: Resistance to endotoxic shock in endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) knock-out mice: a pro-inflammatory role for eNOS-derived NO *in vivo*. *J Biol Chem*, 280(11): 10040-10046, 2005.

Cooke, M.S, Evans, MD, Dizdaroglu M, Lunec J: Oxidative DNA damage: Mechanism, mutation and disease. *FASEB J*, 17(10): 1195- 214, 2003.

Cooney RV, Ross PD, Bartolini GL, Romseyer J: Nnitrosamine formation: Factors influencing the aqueous reactions of nitrogen oxide with morfoline. *Environ Sci*, 21: 77-83, 1987.

Çekmen MB, Turgut M Türköz Y, Aygün D, Gözükara EM: Nitrik oksit (NO) ve nitrik oksit sentaz (NOS)'ın fizyolojik ve patolojik özellikleri. *T Klin Pediatri*, 10: 226-236, 2001.

Daff S: NO synthase, Structures and mechanisms, 23: 1-11, 2010.

Daniels SR, Arnett DK, Eckel RH, Gidding SS, Hayman LL, Kumanyika S, Robinson TN, Scott BJ, St Jeor S, Williams CL: Overweight in children and adolescents: pathophysiology, consequences, prevention, and treatment *Circulation*. 111(15): 1999-2012, 2005.

Dawson VL, Dawson TM: Physiological and toxicological action of nitric oxide in the central nervous system, *Adv Pharmacol*, 34: 323, 1995.

Davies PF: Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*, 75: 519-560, 1995.

Deming DM, Erdman JW: Mamalian carotenoid absorption and metabolism, *Pure and Applied Chemistry*, 71: 2213-2223, 1999.

Dietmar EB, Bamedi A: Carotenoid esters in vegetables and fruits: A screening with emphasis on  $\beta$ -cryptoxanthin esters, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2064-2067, 2001.

Di Mascio P, Murphy C, Ullrey E, Chenoweth W, Michelakis A, Malone W, Boone C, Fink G: Bioavailability of  $\beta$ -carotene in humans, *American Journal of Clinical Nutrition*, 48: 298-304, 1988.

Diplock A: Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, 59 p. Belgium, 1998.

Dröge W: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev*, 82: 47-95, 2002.

DSM: Beta-carotene. A healthy color. DSM Nutritional Products, DSM Nutritional Products Inc, USA, 2005.

Dündar Y, Aslan R: Hekimlikte oksidatif stres ve antiokasidanlar. Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, Ankara; Yayın No: 29 (1): 5-52, 2000.

Ekici K, Aliyaşarlı M, Sancak YC: Peynir çeşitlerinde nitrit ve nitrozaminler. Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 2: 71-72, 2008.

Eldahshan OA, Singab ANB: Carotenoids. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2: 225–234, 2013.

Ertekin A, Türel İ, Oto G, Çelikezen FÇ, Yaşar S: Isırgan otunun dimetilbenzantrazen uygulanan tavşanlarda lipit peroksidasyonu, antioksidan maddeler ve nitrit-nitrat düzeyleri üzerine etkisi, Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, (2): 11-15, 2008.

Förstermann U: Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, 459: 923–939, 2010.

Golkar SO, Bergmark E: Alkylation of haemoglobin, plasma proteins and DNA in the mouse by diethylnitrosamine. *Carcinogenesis*, 9(11): 1915-1917, 1988.

Gomez-Garcia Mdel R, Ochoa-Alejo N: Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (*Capsicum spp.*). *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 19025–19053, 2013.

Gough TA: An examination of foodstuffs for the presence of volatile nitrosamines *J.S.F.A.* 28: 345-351, 1977.

Gutteridge JM: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.*, 41(12): 1819-1828, 1995.

Halliwell B: The wanderings of a free radical. *Free Radical Bio Med*, 46: 531-542, 2009.

Honikel KO: The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 78(1-2): 68–76, 2008.



Horita K, Wang G, Satake M: Spectrophotometric determination of nitrate and nitrite in soil and water samples with a diazotizable aromatic amine and coupling agent using column preconcentration on naphthalene supported with ion-pair of tetradecyldimethylbenzylammonium and iodide. *Analytica Chimica Acta*, 350: 295-303, 1997.

Hughes DA: Dietary antioxidants and human immune function, *Nutrition Bulletin*, 25: 35-41, 2000.

Iriti M, Faoro F: Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 3371–3399, 2009.

Jaswir I, Noviendri D, Hasrini RF, Octavianti F: Carotenoids: sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5: 7119–7131, 2011.

Jimenez-Colmenero F, Carballo J, Cofrades S: Healthier meat and meat products: Their role as functional foods. *Meat Sci*, 59: 5-13, 2001.

Kahkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M: Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3954-3962, 1999.

Kalt W: Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 70: 11-19, 2005.

Kankofer M, Albera E: Postpartum relationship of beta carotene and Vitamin A between placenta, blood and colostrum in cows and their Newborns. *Exp Clin Endoc Diabetes*, 116: 409-412, 2008.

Karaca, EG, Bayşu Sözbilir N: Diyetilnitrozamin verilen ratlarda alfa lipoik asidin koruyucu etkilerinin araştırılması. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 7: 11-17, 2007.

Katz D, Mazor D, Dvilansky A, Meyerstein N: Effect of radiation on red cell membrane and intracellular oxidative defense systems. *Free Radic Res*, 24: 199-204, 1996.

Kaur C, Kapoor HC: Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health. *Int. J. Food Sci. Tech.* 36: 703-725, 2001.

Koca F, Karadeniz F: Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 32-27, 2014.

Kopincova J, Puzserova A, Bernatova I: Biochemical aspects of nitric oxide synthase feedback regulation by nitric oxide. *Interdisciplinary Toxicology*, 4: 63–68, 2011.

- Kopsell DA, Kopsell DE: Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crops. *Trends in Plant Science*, 11, 499–507, 2006.
- Krinsky NI: The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 66, 1003–1010, 1994.
- Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V: Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities, *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 376: 327, 1995.
- Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F: Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double knock out mice. *Circulation*, 104: 448-454, 2001.
- Kumar S: Free radicals and antioxidants: Human and food system. *Adv Appl Sci Res*, 2: 129-135, 2011.
- Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN: Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by NO. *Circ Res*, 74(3): 376-382, 1994.
- Kuyumcu A, Düzgün AP, Özmen MM, Besler HT: Travma ve enfeksiyonda nitrik oksidin rolü. *Ulus Travma Derg*, 10(3): 149-159, 2004.
- Laspina NV, Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP: Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant Science*, 169: 323-330, 2005.
- Latief U, Husain H, Ahmad R:  $\beta$ -Carotene supplementation ameliorates experimental liver fibrogenesis via restoring antioxidant status and hepatic stellate cells activity. *Journal of Functional Foods*, 49: 168-180, 2018.
- Liu J, Man S, Li J, Zhang Y, Meng X, Gao W: Inhibition of diethylnitrosamine-induced liver cancer in rats by *Rhizoma paridis* saponin. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 46: 103–109, 2016.
- Lundberg JO, Weitzberg E: The biological role of nitrate and nitrite, *Nitric Oxide*, 22: 61–63, 2010.
- Ma XD, Ma X, Sui Y, Wang WL, Wang C: Signal transduction of gap junctional genes, connexin 32, connexin 43 in human hepatocarcinogenesis, *World J Gastroenterol*, p 9-950, 2003.
- Maenpaa PH, Pirhonen A, Koskinen E: Vitamin A, E and D Nutrition in Mares and Foals During the Winter Season; Effect of Feeding two different Vitamin-Mineral Concentrates. *J. Anim. Sci*, 66, 1424-1429, 1988.
- Mangels A, Holden J, Beecher G, Forman M, Lanza E: Carotenoid content of fruits and vegetables: An evaluation of analytic data. *J Am Diet Assoc*, 93, 284-296, 1993.

Matsuda M, Nakamoto Y, Suzuki S, Kurata T, Kaneko S: Interferon-mediated hepatocarcinogenesis in mice treated with diethylnitrosamine, *Laboratory Investigation*, 85, 655–663 p, 2005.

McKevith B: A carrot a day to keep cancer away, *Nutrition Bulletin*, 30: 117-119, 2005.

Merhan O: The Biochemistry and Antioxidant Properties of Carotenoids, Carotenoids Dragan J. Cvetkovic and Goran S. Nikolic, IntechOpen, 2017.

Mezzomo N, Ferreira SRS: Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: a review. *Journal of Chemistry*. Article ID 3164312, 16 pages. DOI: 10.1155/2016/3164312, 2016.

Miranda KM, Espey MG, Wink DA: A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide: Biol Chem*, 5(1): 62-71, 2001.

Mittal G, Kaur M, Soni G: Impact of hypercholesterolemia on in vitro toxicity on N-nitrosodiethylamine: effect on lipidperoxidation of blood and tissue. *Indian J Exp Biol*, 40, (9): 1071-1073, 2002.

Moncada S, Higgs A, Furchgott R: XIV. International Union of Pharmacology Nomenclature in nitric oxide research, *Pharmacol Rev*.49: 137, 1997.

Morselli PL: Drug metabolism in vitro: Role of drug metabolism in drug disposition and effects. In: Pacifici GM, Fracchia GN (Editors). *Advances in Drug Metabolism in Man*. Luxembourg: European Commission, Office for Official Publications of the European Communities, 3-34, 1995.

Okonkwo JC: Effects of breed and storage duration on the beta-carotene content of egg yolk. *Pakistan J Nutr*, 8 (10): 1629-1630, 2009.

Öğüş E, Yılmaz FM, Yılmaz H, Duranay M, Yücel D: Hemodiyaliz ve periton diyalizi hastalarında serum malondialdehit düzeyleri ve oksidasyona yatkınlık, *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 24: 316-322, 2004.

Önger ME, Genc H, Tan F: 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, 2011.

Palamutoğlu R, Sarıçoban C: Et ürünlerinde nitrat ve nitrite alternatif doğal kürlleme maddeleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7: 46-58, 2012.

Parnaud G, Pignatelli B, Peiffer G, Tache S, Corpet DE: Endogenous N-nitroso compounds, and their precursors, present in bacon, do not initiate or promote aberrant crypt foci in the colon of rats. *Nutrition and Cancer*, 38: 74–80, 2000.

Parthasarathy DK, Bryan NS: Sodium nitrite: the “cure” for nitric oxide insufficiency. *Meat Science*, 92(3): 274–9, 2012.

Pasquali CEL, Hernando PF, Alegri JSD: Spectrophotometric simultaneous determination of nitrite, nitrate and ammonium in soils by flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 600: 177-182, 2007.

Pendurthi UR, Williams JT, Rao LV: Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells: a possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19: 419-426, 1999.

Pennington JAT: Dietary nitrates exposure models for and nitrites. *Food Control*, 9: 385-395, 1998.

Porasuphatana S, Tsai P, Rosen GM: The generation of free radicals by nitric oxide synthase. *Comparative Biochemistry and Physiology C Toxicology & Pharmacology*, 134: 281–289, 2003.

Rao AV, Agarwal S: Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. *Nutrition Research*. 19: 305–323, 1999.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G: Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2: 152-159, 1997.

Rio DD, Stewart AJ, Pellegrini NA: A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Met. Cardiovasc Dis*. 15(4): 316-328, 2005.

Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA: Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J. Biol. Chem*, 269, 26066-26075, 1994.

Sajilata MG, Singhal RS, Kamat MY: The carotenoid pigment zeaxanthin—a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7: 29–49, 2008.

Sessa WC: Regulation of endothelium derived nitric oxide in health and disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100(1): 15-18, 2005.

Singh HP, Batish DR, Kaur G, Arora K, Kohli RK: Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. *Environmental and Experimental Botany*, 63: 158-167, 2008.

Singhal RS and Kulkarni PR: Preservatives: Permitted Preservatives; Nitrate and Nitrite. Encyclopedia of Food Microbiology, 7: 1762-1769, 2004.

Solomons G, Fryhle C: Organic Chemistry Seventh Edition John Wiley&Sons. Inc USA, 1998.

Stahl W, Sies H: Perspectives in biochemistry and biophysics, Arch. Biochem. Biophys, 336(1): 1–9, 1996.

Stahl W, Sies H: Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. Biochim. Biophys. Acta. 1740, 101-107, 2005.

Snyder SH, Bredt D: Biological roles of nitric oxide, Scientific Amer, 5: 28, 1992.

Tabakoğlu E, Durgut R: Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri. AVKAE Derg, 3: 69-75, 2013.

Tapiero H, Townsend DM, Tew KD: The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. Biomed Pharmacother, 58: 100-110, 2004.

Tek S, Kılıçarslan MR, Tek Ç, Sabuncu A: Tavşanlarda beta karoten'in fertilite üzerine etkisi. Tr J Vet Anim Sci, 26: 497502, 2002.

Tharappel JC, Spear BT, Glauert HP: Effect of phenobarbital fenobarbital on hepatic cell proliferation and apoptosis in mice deficient in the p50 subunit of NF- $\kappa$ B, Toxicol Appl Pharmacol, 226, 3, 338-44 p, 2008.

Thirunavukkarasu C, Sakthisekaran D: Effect of selenium on N-nitrosodiethyl-amine-induced multistage hepatocarcinogenesis with reference to lipid peroxidation and enzymic antioxidants. Cell Biochem. Funct, 19 (1): 27-35, 2001.

Thomas MJ: The role of free radicals and antioxidants. Nutrition, 16: 7-8, 2000.

Türköz Y, Özerol E: Nitrik oksitin etkileri ve patolojik rolleri. J Turgut Ozal Medical Center. 4(4): 453-461, 1997.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem. Biol. Interact, 160, 1-40, 2006.

Vendemiale G, Grattagliano I, Caruso ML: Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine induced liver fibrosis in the rat: effect of n-acetylcysteine and interferonalpha. Toxicol Appl Pharmacol, 175(2): 130-139, 2001.

Yamada K, Yamamiya I, Utsumi H: *In vivo* detection of free radicals induced by diethylnitrosamine in rat liver tissue. *Free Radical Biol Med*, 40: 2040-2046, 2006.

Yerer MB, Aydoğan S: Oksidatif stres ve antioksidanlar, *Erciyes Üniv. Sağlık Bilimleri Dergisi*, 9(1): 49-53, 2000.

Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M: Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against active-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol.*, 135: 372-376, 1979.

Young IS, Woodside JV: Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 54, 176-186, 2001.

Yun HY, Dawson VL, Dawson TM: Neurobiology of nitric oxide, *Crit Rev Neurobiol* 10: 291, 1996.

Wade JrLG: Amines. *Organic Chemistry*, 6th Edition, Chapter 19, 2006.

Zasadowski iA, Wysocki A, Barski D, Spodniewska A: Some aspects of reactive oxygen species (ROS) and antioxidative system agent's action. Short review. *Acta Toxicol*, 12: 5-19, 2004.

## 7.ÖZGEÇMİŞ

Cansu DEMİR MERKİT, 1986 yılında Ardahan'da doğdu. İlkokulu Kars İsmet Paşa İlköğretim Okulu, orta ve lise öğrenimini Kars Anadolu Lisesi'nde tamamlayıp 2004 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı. 2010 yılında mezun olduktan sonra 2012 yılında Kars Belediyesi İçme Suyu Arıtma Tesisi'nde kimyager olarak işe başladı ve aynı yıl Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda lisansüstü eğitimine başladı. Evli ve Demir isminde bir erkek çocuğu annesidir.