



Meltem KIZIL<sup>1, a</sup>  
Mehmet ÇAY<sup>1, b</sup>

<sup>1</sup> Fırat Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Fizyoloji Anabilim Dalı,  
Elazığ, TÜRKİYE

<sup>a</sup> ORCID: 0000-0001-6457-6809

<sup>b</sup> ORCID: 0000-0003-3896-0042

## Benzo(a)pyrene Uygulanan Ratlarda Antioksidan Vitamin Düzeyleri

Bu çalışmada, benzo(a)pyrene uygulanan ratlarda A vitamini,  $\beta$ -karoten, C vitamini ve E vitamini düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada 40 adet dişi wistar albino rat kullanılmıştır. Ratlar kontrol ve benzo(a)pyren grupları olarak iki eşit gruba ayrılmış, kontrol grubuna intraperitoneal serum fizyolojik uygulanırken, benzo(a)pyren grubuna deri altı tek doz 10.08 mg dozunda benzo(a)pyren uygulanmıştır. On iki hafta sonunda ratlardan kan örnekleri alınarak plazmaları çıkarılmıştır. Plazma A vitamini,  $\beta$ -karoten, C vitamini ve E vitamini düzeyleri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Kontrol ile deney grubu kıyaslandığında plazma A vitamini,  $\beta$ -karoten, C vitamini ve E vitamini seviyelerinde istatistiksel olarak önemli bir azalmanın olduğu görülmüştür. Sonuçta, bu tür maddelerin organizmada neden olduğu yoğun strese karşı korunmada antioksidan vitamin ilavelerinin yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Rat, benzo(a)pyrene, antioksidan vitamin

### Levels of Antioxidant Vitamins in the Rats Exposed to Benzo(a)pyren

The aim of this study was to determine the vitamin A,  $\beta$ -caroten, vitamin C and vitamin E in the rats apply with benzo(a)pyrene. A total of 40 healthy Wistar albino rats were used in this study. These rats were divided into two equal groups as control and benzo(a)pyrene group. The rats in the control group were exposed to one dose isotonic sodium chloride solution via intraperitoneal, and the other group exposed to 10.08 mg benzo(a)pyrene subcutaneously. At the end of twelve weeks the blood samples were taken from the rats and plasma was separated. Plasma vitamin A,  $\beta$ -caroten, vitamin C and vitamin E levels were determined spectrophotometrically. There was a statistically significant decrease in plasma vitamin A,  $\beta$ -carotene, vitamin C and vitamin E levels in experimental group when compared to control group. As a result, it was concluded that the antioxidant vitamin supplements may be useful in protecting against the intense stress caused by such substances in the organism.

**Key Words:** Rat, benzo(a)pyrene, antioxidant vitamin

### Giriş

Benzo(a)pyrene (BaP, 3,4-benzopyrene), polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) grubunda yer alan, çalışma ortamlarında, diyetle, sigara dumanında, çevrede yaygın olarak bulunan ve kuvvetli kanserojen etkinliğe sahip bir maddedir. BaP'in biyotransformasyonu süresince çok sayıda serbest radikal oluşur. Serbest radikaller reaktif yapıları nedeniyle, başta lipitler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere yükseltgenebilen tüm hücre elemanları ile kolayca etkileşime girebilirler (1-4). BaP'nin membran lipitleriyle reaksiyona girerek lipit peroksidasyonda artışa neden olması, serbest radikal temizleyici düzeylerindeki bir azalma sonucu olabilir (1, 5).

Biyolojik sistemlerde endojen ve ekzojen kökenli stres faktörleri nedeniyle, sürekli olarak serbest radikaller ve diğer oksijen kökenli radikaller üretilmektedir. Hücre bu stres faktörlerine maruz kalmayı sınırlamak için, güçlü ve kompleks bir sistem geliştirmiştir (6, 7). Organizmayı serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyan bu sistemler, başlıca enzimsel ve enzimsel olmayan savunma sistemleridir. Enzimsel savunma sisteminin yeterli olmadığı hallerde düşük molekül ağırlıklı serbest radikal tutucuları lipit peroksit radikalleri ile etkileşerek reaksiyonların ilerlemesini önlemeye çalışır (6, 7).

En önemli serbest radikal tutucuları E vitamini, karotenler, C vitamini (askorbik asit) ve glutatyon'dur (4, 6). E vitamini, biyolojik sistemlerde serbest radikal reaksiyonlarının yayılmasını önleyen zincir kırıcı en önemli antioksidandır (8). E vitamini mitokondri, endoplazmik retikulum ve plazma membranı gibi özellikle doymamış yağ asitleri bakımından zengin olan hücre membranlarını lipit peroksidasyondan korur. Plazmada, yağda çözünen diğer antioksidanlara nazaran yaklaşık 15 misli daha fazla bulunduğundan, plazma ve düşük moleküllü lipoproteinlerdeki (LDL) en önemli antioksidandır (3, 9-11). E vitamininin fenolik grubu bir peroksil radikali ile karşılaştığında, hidrojen atomunu peroksil radikale vererek zincir reaksiyonunu sonlandırır (9, 12, 13).

**Geliş Tarihi** : 29.01.2019  
**Kabul Tarihi** : 26.02.2019

### Yazışma Adresi Correspondence

**Meltem KIZIL**  
Fırat Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Fizyoloji Anabilim Dalı,  
Elazığ – TÜRKİYE

[mkizil@firat.edu.tr](mailto:mkizil@firat.edu.tr)

C vitamini, ekstrasellüler sıvılardaki en önemli antioksidanlardan biridir. Askorbatın süperoksit (O<sub>2</sub>), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) hipoklorit (OCL), hidroksil radikali (OH), peroksil radikali (ROO.) ve saf oksijeni etkili şekilde ortadan kaldırdığı bildirilmektedir (3, 6). Askorbatın ya bir antioksidan gibi etki göstererek tokoferollere yardımcı olduğu ya da tokoferoksil (tokoferolün okside formu) radikalinden bir oksijen atomunu uzaklaştırarak aktif tokoferol haline dönüştürdüğü ileri sürülmüştür. Böylece tokoferolün radikal temizleyici etkisi restore edilmiş olur (14, 15).

A vitamini, hücrelerin ve hücre içi yapıların lipoprotein yapıdaki membranlarının permeabilitesinde ve stabilitesinde önemli rol oynar. Yeterli düzeylerdeki A vitamini lipoprotein membranları geçerek lipid ve proteinler arasında çapraz bağlayıcı ajan olarak rol oynar ve böylece membran stabilize edilir (8, 16). Her ne kadar A vitamininin zincir kırıcı özelliği olmasa da, yağda eriyen ve enzimsel olmayan antioksidan olarak sınıflandırılmaktadır (17). En etkili hücre içi antioksidanlardan birisi de β-karotendir. β-karoten'in antioksidan rolü birleştiği alkil yapı içinde karbon merkezli radikalleri stabilize etme yeteneğinden kaynaklanır. β-karoten düşük oksijen konsantrasyonlarında etkili olduğundan, yüksek konsantrasyonlarda etkili olan E vitamininin antioksidan etkisini de tamamlayabilir (18).

Bu çalışmada, çevrede çok miktarda bulunan ve canlıların her zaman çeşitli miktarlarda maruz kalması sonucu organizmayı yoğun strese sokan BaP'nin uygulandığı ratlarda, antioksidan vitamin düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen 10-12 haftalık 40 adet dişi wistar albino ırkı rat kullanıldı. Ratlar çalışmadan bir ay önce alınarak ortama adaptasyonları sağlandı ve kafesleri düzenli olarak temizlendi. Ratlar her grupta 20 rat olacak şekilde iki gruba ayrıldı ve kontrol ile benzo(a)pyren grupları olarak adlandırıldı. Kontrol grubuna plasebo olarak intraperitoneal serum fizyolojik uygulanırken, BaP grubuna deri altı 10.08 mg dozunda BaP (B-1760 Sigma) uygulandı. Gruplardaki bütün ratlardan, 12 haftalık süre sonunda, kardiyak punksiyonla kan örnekleri alındı. ETDA'lı kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra plazmaları çıkarıldı ve -20 °C de derin dondurucuda muhafaza edildi. Elde edilen plazma örneklerinde E, C, A vitamini ve beta karoten düzeyleri belirlendi. Plazmada A vitamini ve beta karoten düzeyleri Suziki ve Katoh (19)'un bildirdikleri spektrofotometrik metodla, beta karoten ve retinol için sırasıyla 453 ve 325 nm'lerde okundu. Plazma C vitamini düzeyleri fosfotungustat metodu ile kolorimetrik olarak belirlendi (20). Örneklerin optik dansiteleri spektrofotometrede çalışma standardına karşı 700 nm'de okundu. Plazma E vitamini düzeyleri Martinek (21) metoduyla spektrofotometrik olarak belirlendi ve 535 nm'de okundu. İstatistiksel analizler, SPSS Ms Windows Release 10.0 paket programı yardımıyla, bağımsız t-testi kullanılarak yapıldı.

## Bulgular

Çalışma sonuçlarına bakıldığında kontrol grubuyla, BaP uygulanan grup arasında antioksidan vitamin düzeyleri açısından önemli farklılıkların olduğu görülmektedir. Bu farklılıkların düzeyi ile gruplara ait vitamin düzeyleri, ortalama değerleri ve standart sapma düzeyleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Kontrol grubu ve BaP uygulanan ratlarda antioksidan vitamin düzeyleri

	Kontrol (X±SD)	BaP (X±SD)	P
Vitamin A (µg/dL)	72.38 ± 12.5	43.82 ± 7.1	**
β-karoten (µg/dL)	24.11 ± 2.8	14.77 ± 3.1	**
Vitamin C (mg/dL)	109.66 ± 13.5	89.23 ± 5.2	*
Vitamin E (mg/dL)	0.118 ± 0.02	0.084 ± 0.01	*

\*: P< 0.01, \*\*: P<0.001

## Tartışma

Birçok toksik reaktif oksijen türü (ROS) normal metabolizmanın kaçınılmaz yan ürünü olarak organizmada oluşmaktadır (22). Oksidatif stres, hücrelerdeki ROS ile mevcut antioksidan moleküller arasındaki sıkı dengenin ROS lehine bozulması durumudur (23-26). Çalışma ortamlarında, diyetle, sigara dumanında, çevrede yaygın olarak bulunan ve kuvvetli kanserojen etkinliğe sahip olan BaP'in biyotransformasyonu süresince çok sayıda serbest radikal oluşur. Serbest radikaller reaktif yapıları nedeniyle, başta lipitler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere yükseltgenen tüm hücre elemanları ile kolayca etkileşime girebilirler (1-4). Organizma, radikallerin hücrelerde aşırı birikimini önleyen, enzimsel ve enzimsel nitelikte olmayan bir antioksidan sisteme sahiptir (11, 24). Bu sistemin bileşenleri, koruyucu veya zincir kıran antioksidanlar olarak bilinmektedir. Enzimsel nitelikte olmayan antioksidanları indirgenmiş glutatyon (GSH), suda eriyen askorbat (27) ile yağda eriyen E vitamini (25) ve β-karoten oluşturmaktadır. Her ne kadar A vitamininin zincir kırıcı özelliği olmasa da, yağda eriyen ve enzimsel olmayan bir antioksidan olarak görev yaptığı ifade edilmektedir (11).

Canlıların BaP'ye maruz kalmasıyla organizmanın oksidan-antioksidan denge durumunun değiştiği ve gelişen oksidatif stresin vücutta serbest radikal düzeylerini artırdığı belirtilmektedir (28-31). Yapılan çalışmalarda, β-karotenin rat (32) ve farelerin (33) plazmalarında lipid peroksidasyonu baskıladığı, sigara içen insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada (31) antioksidan vitamin ilavelerinin BaP'nin neden olduğu DNA hasarını önlediği belirtilmektedir.

Al-Zuhair ve Mohamed (34), diyabetli ratlarda C vitamini uygulamalarının karaciğerde lipid peroksidasyonu önemli derecede azalttığı, C vitamini ve E vitamini uygulamalarının ratların çeşitli dokularında kanser oluşumunu önlediği belirtilmektedir (5, 35). Erişkin ratların testislerinde formaldehit uygulamasının neden olduğu oksidatif hasara karşı E vitamininin etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada (36), E vitaminin

testis dokusu ve sperm kalitesini oksidatif hasardan koruduğu ve E vitamininin bu etkisinin direkt olarak serbest radikal temizleyici özelliğinden kaynaklandığı belirtilmektedir. Sisplatin verilerek yapılan bir çalışmada (37) oksidatif hasar oluşturulan ratlarda, kontrollere nazaran A vitamini, beta karoten ve E vitamini düzeylerinin azaldığı ifade edilmektedir.

Bu çalışmanın sonuçlarına bakıldığında (Tablo 1) kontrol ile deney grubu kıyaslandığında plazma A vitamini,  $\beta$ -karoten, C vitamini ve E vitamini seviyelerinde istatistiksel olarak önemli bir azalmanın (sırasıyla  $P<0.001$ ,  $P<0.001$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.01$ ) olduğu

görülmüştür. Bu sonuçlar stres sırasında vitamin düzeylerinin azalacağını ifade eden literatür bilgileriyle uyumlu bulunmuştur.

Sonuç olarak, aynı ortamda aynı yemlerle bakım ve beslemesi yapılarak BaP uygulanan ratlarda, kontrollere nazaran, vitamin düzeylerindeki önemli azalmaların BaP uygulamasına bağlı olarak, organizmada gelişen yoğun oksidatif stres ve buna bağlı olarak antioksidan vitaminlerin artan kullanımları olduğu düşünülmüştür. Bu tür maddelerin organizmada neden olduğu yoğun strese karşı korunmada antioksidan vitamin ilavelerinin yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

### Kaynaklar

1. Evangelou A, Kalpouzos S, Karkabounas S, et al. Dose-related preventive and therapeutic effects of antioxidants-anticarcinogens on experimentally induced malignant tumors in Wistar rats. *Can Lett* 1997; 115: 105-111.
2. Frenkel K. Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmacol Ther* 1992; 53: 127-166.
3. Lee BM, Lee SK, Kim HS. Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C,  $\beta$ -carotene and red ginseng). *Can Lett* 1998; 132: 219-222.
4. Chapple ILC. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 287-296.
5. Kallistratos G, Fasske E. Inhibition of benzo(a)pyrene carcinogenesis in rats with vitamin C. *Cancer Res Clin Onchol* 1980; 97: 91-96.
6. Lanhance PA, Nakat Zeina BS, Woo-Sik Jeong MS. Antioxidants: An integrative approach. *Nutr* 2001; 17: 835-838.
7. Miller JK, Slebodzinska EB. Oxidative stress, antioxidants and animal functions. *J Dairy Sci* 1993; 76: 2812-2823.
8. Buttner GR, Burns CP. Vitamin E slows the rate of free radical mediated lipid peroxidation in cells. *Arch Biochem Biophys* 1996; 334: 261-267.
9. Morrissey PA, O'Brien NM. Dietary antioxidants in health and disease. *Int Dairy J* 1998; 8: 463-472.
10. Sies H, Stahl W, Sundquist AR. Antioxidant functions of vitamins. *Ann NY Acad Sci* 1992; 669: 7-15.
11. Vannucchi H, Jordoa-Junior AA, Iglissias AC, Morandi MV, Chiarello PG. Effects of different dietary concentrations of vitamin E on lipid peroxidation in rats. *Arch Latinoam Nutr* 1997; 47: 34-37.
12. Bramley PM, Elmadfa I, Kafatos A, Kelly FJ, Manios Y. Review: Vitamin E. *J Sci Food Agric* 2000; 80: 913-938.
13. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutr* 2000; 7-8: 716-718.
14. Bisby RH, Parker AW. Reaction of ascorbate with the  $\alpha$ -tocopheroxyl radical in micellar and bilayer membrane systems. *Arch Biochem Biophys* 1995; 317: 170-178.
15. Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 463-488.
16. Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J* 1995; 9: 1551-1558.
17. Edge R, McGarvey D, Truscott TG. The carotenoids as antioxidants. *J Photochem Photobiol Biol* 1997; 41: 189-200.
18. Gruszecki WI, Strzałka K. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1740: 108-115.
19. Suzuki J, Katoh N. A Simple and cheap methods for measuring serum Vitamin A in cattle using only a spectrophotometer. *Jpn J Vet Sci* 1990; 52: 1281-1283.
20. Kyaw A. A simple colorimetric method for ascorbic acid determination in blood plasma. *Clin Chim Acta* 1978; 16: 151-157.
21. Martinek RG. Method for determination of vitamin E (total tocopherols) in serum. *Clin Chem* 1964; 10: 1078-1086.
22. Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Lett* 1990; 15: 129-135.
23. Burton GW, Ingold KU.  $\beta$  carotene: An unusual type of lipit anti-oxidant. *Sci* 1984; 224: 569-573.
24. Evans PH. Free radicals in brain methabolism and pathology. *British Med Bull* 1995; 49: 577-587.
25. Lightbody JH, Stevenson LM, Jackson F, Donaldson K, Jones DG. Comparative aspects of plasma antioxidant status in sheep and goats, and influence of experimental abomasal nematoda infection. *J Comp Pathol* 2001; 124: 192-199.
26. Kamameldin A, Appelqvist LA. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 1996; 31: 671-701.
27. Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1987; 1: 441-446.
28. Kim BP, Lee BM. Oxidative stres to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxida dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene. *Can Lett* 1997; 113: 205-212.
29. Kim HS, Kwack SJ, Lee BM. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and benzo(a)pyrene-quinones in the blood of rats treated with benzo(a)pyrene. *Chem Biol Interact* 2000; 127: 139-150.
30. Lesko SA, Lorentzen RL, Benzo(a)pyrene dione-benzo(a)pyrene diol oxidation-reduction couples; involvement in

- DNA damage, cellular toxicity, and carcinogenesis. *J Toxicol Environ Health* 1985; 16: 679-691.
31. Money LVA, Madsen AN, Tang D, et al. Antioxidant vitamin supplementation reduces benzo(a)pyrene-DNA adducts and potential cancer risk in female smokers. *Can Epidemiol Biomark Prev* 2005; 14: 237-242.
  32. Chew BP. Importance of antioxidant vitamins in immunity and health animals. *Anim Feed Sci Technol* 1996; 59: 103-114.
  33. Iyama T, Takasuga A, Azuma M. Beta-carotene accumulation in mouse tissues and a protective role against lipid peroxidation. *Int J Vitam Nutr Res* 1996; 66: 301-305.
  34. Al-Zuhair H, Mohamed HE. Vitamin C attenuation of the development of the type I diabetes mellitus by interferon-alpha. *Pharmacol Res* 1998; 38: 59-64.
  35. Sidorava YA, Grisharova AY. Inhibitor effect of alpha-tocopherol on benzo(a)pyrene- induced CYP1A1 activity in rat liver. *Bull Exp Biol Med* 2005; 140: 517-520.
  36. Zhou DX, Qiu SD, Zhang J, Tian H, Wang HX. The protective effect of vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in the testes of adult rats. *Asian J Androl* 2006; 5: 584-588.
  37. Nazırođlu M, Karaođlu A, Aksoy AO. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin induced oxidative damage to renal, liver and testis tissues in rats. *Toxicol* 2004; 195: 221-230.