

Subkronik nikotin uygulamasının, ratlarda lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitelerine etkisi

Recep Sütçü, Duygu Doğuç, Onur Aktürk, İrfan Altuntaş, Namık Delibaş

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya AD, Isparta

Özet

Sigara içimi modern ülkelerde önlenemez ölüm nedenlerinden biridir. Nikotin sigara dumanının major toksik bileşeni olup, sigara içenlerde kardiyovasküler hastalıklar ve akciğer kanserinin gelişiminde önemli bir rol oynar. Bu çalışmada genç ve yaşlı subkronik nikotin uygulamasının genç ve yaşlı ratlarda antioksidan enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyonu üzerine olan etkilerini araştırmayı planladık. Bu amaçla genç nikotin, genç kontrol, yaşlı nikotin, yaşlı kontrol grubu olmak üzere 4 grup oluşturduk. Her grup 10 erkek Sprague Dawley rattan oluşuyordu. Nikotin ratlara 0.45 mg/kg olacak şekilde, günde iki kez 18 gün boyunca cilt altına enjekte edildi. Kontrol grubuna da eş zamanlı olarak serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı. Deneysel sonucunda kan örnekleri alınarak antioksidan enzim aktiviteleri ve malondialdehit düzeyleri ölçüldü. Subkronik nikotin uygulamasının antioksidan enzim aktivitelerinde ve malondialdehit düzeylerinde önemli bir değişikliğe yol açmadığı görüldü.

Anahtar kelimeler: Nikotin, antioksidan enzimler, malondialdehid, oksidatif stres

Abstract

The effects of subchronic nicotine administration on level of the lipid peroxidation and antioxidant enzymes activities in rats.

Smoking is one of the causes of death which can be prevented in modern countries. Nicotine, a major toxic component of cigarette smoke, plays an important role in the development of cardiovascular disease and lung cancer in smokers. In this study we have undertaken to examine the effects of subchronic nicotine administration on the antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in young and old rats. For this purpose we arranged 4 groups as; young nicotine, aged nicotine, young control and aged control. Each group includes 10 male Sprague dawley rats. Rats were injected subcutaneously with 0.45 mg/kg daily nicotine for 18 days. Control groups were injected normal saline at same time. At the end of experiment, malondialdehyde and antioxidant enzyme activities were assayed in erythrocyte samples. It was observed that subchronic nicotine administration was not lead to a significant change.

Key words: Nicotine, antioxidant enzymes, malondialdehyde, oxidative stress

Giriş

Nikotin piridin ve pirolidin halkasından oluşan ve tütün bitkisinin yapraklarından izole edilen alkaloid bir bileşiktir (1). Sigara dumanının major toksik bileşeni olup, periferik ve santral sinir sisteminde reaktif oksijen türlerinin üretimini uyararak oksidatif stresin oluşumuna yol açtığı kabul edilmektedir (2-4). Nikotinin mitokondrial solunum zincirini kırarak süperoksit anyonunu ve hidrojen peroksit oluşumunu arttırdığı rapor edilmiştir (1). Ek olarak nikotinin sitokrom P450' nin monooksijenazlarınca yönlendirilen metabolizması oksijene ihtiyaç duyar. Yüksek doz nikotin ve enantiomerlerin hücre içi

metabolizması esnasında sitokrom P450 enzimlerinin aktivitesi artarak serbest radikal oluşumuna neden olabilir (5).

İlginç olarak oksidan etkilerinin tersine Parkinson ve Alzheimer hastalığında nikotinin sağladığı yararın antioksidan mekanizmalar üzerinden olabileceği düşünülmüştür. Sigaradaki nikotinin Parkinson hastalığına karşı koruyucu bir etkisi vardır (6,7). Ratlarda yapılan çok sayıda çalışmada nikotin uygulamasının öğrenme ve bellek süreçleri üzerine yararlı etkilerine işaret edilmiştir. Genç ve yaşlı ratlarda nikotin tedavisinin kognitif fonksiyonları düzelttiği görülmüştür (1,8).

Nikotinin iki yönlü olarak oksidatif stresi uyarıcı veya engelleyici etkilerinin olması ve tedavi amacıyla nörodejeneratif hastalıklarda kullanılması bu

Yazışma Adresi: Yrd. Doç. Dr. Recep SÜTÇÜ
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı 32260 / Isparta - TURKEY.
Fax : 00.90. 246. 2371651
E-mail : repectsutcu@med.sdu.edu.tr

çalışmanın çıkış noktası olmuştur. Bu çalışma ile subkronik nikotin tedavisinin genç ve yaşlı ratlarda lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim düzeylerine olan etkisini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Deney Grupları

Bu çalışmada ortalama ağırlıkları 250–300 gr olan Spraque Dawley cinsi toplam 40 adet erkek rat kullanıldı. Ratlar 3–6 aylık ve 12–24 aylık, genç ve yaşlı grup oluşturmak üzere iki grup halindeydi. Ratlar standart ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık) ve ısı (25 ° C) da yem ile suyun kısıtlanmadığı koşullarda beslendiler. Ratlar genç kontrol grubu (n=10), genç nikotin grubu (n=10), yaşlı kontrol grubu (n=10) ve yaşlı nikotin grubu (n=10) olmak üzere toplam 4 gruba ayrılarak özel olarak hazırlanmış kafeslerde beşerli gruplar halinde tutuldular. Deney süresince ratlarda nikotine bağlı herhangi bir yan etki görülmedi. Deney esnasında genç nikotin grubundan 4 tane, genç kontrol grubundan 2 tane, yaşlı nikotin grubundan 2 tane ve yaşlı kontrol grubundan 1 tane rat öldü.

Nikotin enjeksiyonu

Ratlara uygulanacak yeteri kadar (-)-nikotin hidrogen tartarat tuzu (Sigma, Almanya) her gün tartılıp, serum fizyolojik içinde çözülüp, fosfat tamponu kullanılarak pH'ı 7.4 e ayarlandı. Nikotin ratlara 0.45 mg/kg olacak şekilde, günde iki kez (08:30 ve 17:30), 18 gün boyunca cilt altına enjekte edildi. Kontrol grubuna da eş zamanlı olarak serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı.

Son enjeksiyondan 15 saat sonra eter anestezisi altında ratlar dekapite edildi. Laparotomi ile renal venden EDTA' lı tüplere 1.5-2 cc miktarında kan örneği alındı. Kan örneklerinden hemolizat hazırlandı. Heparinli tüpe alınmış kandan 0.5 ml, 3000 devir/dk'da 10 dk. santrifüj edildi ve plazması aspire edildi. Eritrositler 3 ml %0.9 NaCl ile 3000 devir/dk /10 dk santrifüj edilerek 3 defa yıkandı. Yıkamış eritrositler 2 mL soğuk distile suyla hemoliz edildi. Hemogloblin konsantrasyonu siyanomethemogloblin metoduyla hemolizattan tayin edildi (9).

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan malondialdehid (MDA) ölçümü için Draper ve Hadley'in çift ısıtma yöntemi kullanıldı. (10). Metodun prensibi MDA-TBA (Tiobarbitürik asit) kompleksinin 532 nm de verdikleri absorbanın ölçülmesi esasına dayanır. Sonuçlar nmol/g Hb olarak verildi.

Süperoksid Dismutaz (SOD) aktivitesi Woolliams ve arkadaşlarının metoduna göre ölçüldü (11). Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi Paglia ve Valentina'nın yöntemine göre ölçüldü (12). SOD ve GSH-Px aktiviteleri U/g Hb cinsinden ifade edildi. Hidrojen peroksidin katalaz (CAT) tarafından parçalanması temeline dayalı UV spektrofotometrik yöntem ile katalaz aktiviteleri tayin edildi (13). CAT aktivitesi k/g Hb olarak verildi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler “ SPSS 11.0 for Windows” paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Genel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek için Kruskal-Wallis varyans analiz testi kullanıldı.

Sonuçlar

Tablo 1 de tüm gruplara ait ortalama \pm SEM değerleri gösterilmiştir.

Gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda eritrosit SOD, GSH-Px ve CAT enzim aktiviteleri ve MDA düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$)

Tartışma

Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu ve organizmada patolojik olayları tetikleyen oksidan strese katkıda bulunan önemli bir faktörün sigara içimi olduğu vurgulanmaktadır. Sigara dumanı birçok oksidan ve prooksidan madde içerir, bu maddeler aracılığıyla in vivo oksidatif stresi arttırabilir (14). Nikotinin de sigara dumanının major toksik bileşeni olup reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açarak oksidatif strese yol açtığı bildirilmiştir (3). Husain ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kronik nikotin uygulamasının karaciğerde SOD aktivitesinde artışa, böbrek ve testiste ise bu enzimin aktivitesinde azalmaya yol açtığını göstermişlerdir (15). Karaciğerdeki SOD aktivitesindeki artış, nikotin metabolizmasının sonucunda oluşan reaktif oksijen metabolitlerinin artışına bağlı olabilir. Katalazın hepatik aktivitesinde azalma, böbrek, akciğer ve testis dokularında ise katalaz aktivitesinde artış saptanmıştır. Bu azalmadan enzim proteininin oksidatif inaktivasyonu sorumlu tutulmuştur (15). MDA düzeylerinde ise karaciğerde önemli bir yükselme görülmüştür. GSH-Px aktivitesi doku düzeyinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Nikotin karaciğerde metaboliti olan kotinine dönüşmekte ve serbest radikallerin üretimine yol açarak dokulardaki oksidatif hasarı başlatmaktadır (15).

Tablo 1. Tüm gruplarda eritrosit SOD, CAT, GSH-Px ve MDA düzeylerinin ortalamaları ve SEM değerleri

Gruplar	SOD (U/g Hb)	GSH-Px (U/gHb)	CAT (k/g Hb)	MDA (nmol/g Hb)
GN (n=6)	2738.70 ± 149.47	463.17 ± 52.43	183.41 ± 9.49	508.92 ± 15.74
GK (n=8)	2254.95 ± 81.86	397.26 ± 32.05	226.78 ± 27.84	541.35 ± 45.74
YN (n=8)	2336.37 ± 239.67	488.66 ± 56.64	218.60 ± 31.66	583.31 ± 67.08
YK (n=9)	2502.01 ± 278.30	458.33 ± 44.71	206.02 ± 21.01	519.23 ± 38.26

GN: Genç nikotin, GK: Genç kontrol, YN: Yaşlı nikotin, YK: Yaşlı kontrol

Birçok çalışmada rat serum ve dokularında nikotinin lipid peroksidasyon ürünlerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (16-18). Bu durumun SOD ve CAT gibi antioksidan enzim aktivitelerindeki azalma ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Bu enzimlerin aktivitelerindeki azalma süperoksit ve peroksit radikallerinin birikimine neden olarak hidroksil radikalının üretimi sonucunda lipid peroksidasyonu başlatmaktadır (17).

Bizim çalışmamızda subkronik nikotininin antioksidan enzim aktivitelerinde ve MDA düzeylerinde önemli bir değişime yol açmadığı bulunmuştur. Bu sonucum nikotinin uygulama dozu ve süresi ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Newhouse ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada elde ettikleri sonuçlarla şöyle bir hipotez kurmuşlardır; düşük konsantrasyonda nikotin serbest radikal oluşumunu engelleyerek veya zincir kırıcı etkiyle lipid peroksidasyonunu engelleyerek antioksidan gibi davranmaktadır (19). Dolayısıyla nikotinin oksidan, antioksidan veya bu açıdan hiçbir etkisinin olmadığını gösteren çeşitli çalışmalar vardır (6).

Nikotinin oksidatif stres ve nöral koruma üzerine olan etkileri uygulanan doz ve mekanizma açısından farklılık göstermektedir. Genel olarak yüksek doz nikotin nörotoksisite ve oksidatif stresi stimüle eder.

Ancak düşük konsantrasyonda nikotin antioksidan özellik göstermekte ve nöral koruyucu etki açısından çok önemli bir rol oynamaktadır (1). Düşük konsantrasyonda nikotinin oksidatif stresi engellemesi, lipid peroksidasyonunu uyaran hidrojen peroksidin nikotin tarafından inhibisyonu ile açıklanmıştır (20-22). Ancak insan hücre kültürlerinde ve sigara içiminin sağladığı nikotin konsantrasyonu ile daha detaylı çalışmalar yapılmalıdır. Cevap nikotin konsantrasyonuna ve dokuya özgü olabilir. Bizim çalışmamızın sonuçları uyguladığımız nikotin dozunun oksidatif hasara yol açmadığını göstermiştir. Nikotinin oksidatif stres, apoptosis ve hücre proliferasyonu gibi belirli alanlardaki tartışmalı etkilerini açıklamaya yönelik araştırmalar devam etmektedir. Nikotinin uyardığı oksidatif stresin genellikle yüksek konsantrasyonlarda gerçekleştiği,

düşük konsantrasyonlarda ise oksidatif stresi inhibe ettiği yönündedir. Farklı deneysel yöntemlerle nikotinin biyolojik etkilerini açıklamaya yönelik daha ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

- 1- Zhi-Zhong G, Wen-Feng Y, Agneta N. Dual effects of nicotine on oxidative stress and neuroprotection in PC12 cells. *Neurochemistry International* 2003; 43:243-49
- 2- Hoffmann D, Rivenson A, Hecht SS. The biological significance of tobacco-specific N-nitrosamines: smoking and adenocarcinoma of the lung. *Crit Rev Toxicol* 1996; 26:99-211.
- 3- Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke: radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 686:12-27
- 4- Latha MS, Vijayammal PL, Kurup PA. Effect of nicotine administration on lipid metabolism in rats. *Indian J Med Res* 1993; 98:44-9
- 5- Newman MB, Arendash GW, Shytle RD, Brickford PC, Tighe T, Sanberg PS. Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. *Life Sciences* 2002; 71:2807- 820
- 6- Linert W, Bridge MH, Huber M, Bjugstad KB, Grossman S, Arendash GW. In vitro and in vivo studies investigating possible antioxidant actions of nicotine: relevance to Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Biochimica Acta* 1999; 1454:143-52
- 7- Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Hermidia-Amerijeiras A, Lopez-Real AM, Labandeira-Garcia JL. Effects of (-) nicotine and (-) cotinine on 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance for Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 125-35
- 8- Rezvani AH, Levin HD. Cognitive effects of nicotine. *Biol Psychiatry* 2001; 49:258-67
- 9- Van kampfen EJ, Zjilstra WG. Determination of hemoglobin and its derivatives. *Toxicol Appl Pharmacol* 1965; 8:141-87
- 10- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186:421-31
- 11- Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the blood in various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci* 1983; 253-56

- 12-Paglia DE, Valentina WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70(9):158-69
- 13-Aebi H. Catalase in vitro. *Method Enzymol* 1984; 105:121-26
- 14-Ashakumary L, Vijayammal, PL Lipid peroxidation in nicotine treated rats. *J Ecotoxicol Environ Monit* 1991; 1:283– 90
- 15-Husain K, Scott BR, Reddy SK, Somani SM. Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. *Alcohol* 2001; 25:89-97
- 16-Ashakumary L, Vijayammal, PL. Effect of nicotine on antioxidant defence mechanisms in rats fed a high-fat diet. *Pharmacology* 1996; 52(3):153-58
- 17-Ashakumary L., Vijayammal P.L. Additive effect of alcohol and nicotine on lipid peroxidation and antioxidant defence mechanism in rats. *J Appl Toxicol* 1996; 6:305–08
- 18- Baskaran S, Lakshmi S, Prasad PR. Effect of cigarette smoke on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in albino rat. *Indian J Exp Biol* 1999; 37(12):1196-1200
- 19- Newhouse PA, Potter A, Kelton M, Corwin J. Nicotinic treatment of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 2001; 49:268-78
- 20- Guan ZZ, Yu, WF, Nordberg A.. Dual effects of nicotine on oxidative stress and neuroprotection in PC12 cells. *Neurochem. Int* 2003; 43(3):243–49
- 21-Yildiz D. Nicotine, its metabolism an overview of its biological effects. *Toxicon* 2004; 43:619-32
- 22-Crowley-Weber CL, Dvorakova K, Crowley C, Bernstein H, Bernstein C, Garewal H, Payne CM. Nicotine increases oxidative stress, activates NF-kappaB and GRP78, induces apoptosis and sensitizes cells to genotoxic/xenobiotic stresses by a multiple stress inducer, deoxycholate: relevance to colon carcinogenesis. *Chem Biol Interact* 2003; 145(1):53-66