Veterinarium (2004) 15,1: 27-31

Azoksimetanla Kolonik Anormal Kript Formasyonu Oluşturulmuş Farelerde Kefir'in Aspartat Aminotransferaz (Ast) Ve Alanin Aminotransferaz (Alt)Aktiviteleri Üzerine Etkisi

Effect of Kefir Supplementation on the Aspartate Aminotransferase (AST) and Alanine Aminotransferase (ALT) Activities of Mice which was Induced Colonic Aberrant Crypt Foci Formation by Azoxymethane

A. Kadir Devrim[1] Sena Çenesiz[1] Ayla Özcan[1] Necati Kaya[1] Mahmut Sözmen[2]

Summary: In this study we investigated the effect of kefir on AST and ALT activities in sera and liver tissues of mice which have colonic abnormal crypt formation formed by azoxymethane.

We used 30 Swiss Albino mice which are on avarage 12 weeks old and 31.49 g weight. The mice were seperated into 3 groups. First group was the control group, second group was the azoxymethane and third group was the azoxymethane+kefir group. We applied azoxymethane to the second group and azoxymethane+kefir to the third group. Mice were fed *ad libitum* by dry grain feed during the experiment period. First and second groups were given water and third group was given kefir, 50% diluted with water. During 7 weeks and two times a week, 5 mg/kg azoxymethane were injected s.c. to the second and third groups. At the end of the experiment we got the sera and liver tissue samples from all of the groups. In the sera AST activities, we observed increases in the second and third groups when compared with first group ($p<0.001$). Although, statistically we didn't observed any alterations in the liver tissue activity. Additionally in the sera ALT activities, we didn't observed any alterations in the second and third groups when compared with first group. On the contrary ALT activities in the liver tissue were increased statistically ($p<0.001$).

Consequently, it's observed that application of kefir which is used as a probiotic, in the colon cancer development period hasn't an important effect on AST and ALT activities which are important markers of the hepatic damage.

Key Words: Azoxymethane, colonic aberrant crypt formation, AST, ALT, mice, kefir.

Özet: Bu çalışmada azoksimetanla kolonik anormal kript formasyonu oluşturulan farelerde kefirin serum ve karaciğer dokusundaki AST ve ALT aktiviteleri üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal olarak ortalama 31.49 g ağırlıkta, 30 adet 12 haftalık Swiss Albino türü fare kullanıldı.1. grup kontrol, 2. grup azoksimetan, 3. grup.ise azoksimetan+ kefir verilen grubu oluşturdu. Tüm gruplara deneme boyunca kuru pelet yem, 1. ve 2. gruba içme suyu, 3. gruba ise kefir % 50 sulandırılarak *ad libitum* olarak verildi. 2. ve 3. grup hayvanlara haftada 2 gün 7 hafta boyunca 5mg/kg azoksimetan derialtına enjekte edildi.7 haftalık deneme sonunda hayvanlardan kan ve karaciğer doku örnekleri alındı. Yapılan analizler sonucunda serum AST aktivitesinde kontrol grubuna göre her iki grupta da artış ($p<0.001$) görülürken, karaciğer doku aktivitesinde ise istatistiksel anlamda herhangi bir değişikliğe rastlanmadı. Serum ALT aktivitesinde ise kontrol grubuna göre her iki grupta da istastistiki anlamda herhangi bir değişikliğe rastlanılmaz iken, karaciğer dokusunda artış ($p<0.001$) görülmüştür.

Yapılan bu çalışma sonucunda probiyotik olarak kullanılan kefirin kolon kanseri gelişim dönemi boyunca alınması durumunda karaciğer hasarının önemli göstergesi olan AST ve ALT aktiviteleri üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Azoksimetan, kolonik anormal kript formasyonu, AST, ALT ,fare, kefir

1. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı-KARS
2. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı-KARS

Giriş

NCI (National Cancer Institute) tarafından yayınlanan raporlara göre, kolon kanseri en çok teşhis edilen ve ölümle sonuçlanan ikinci kanser tipidir. Her yıl, 50-60 bini ölümle sonuçlanan 133 bin ile 160 bin arasında kolorektal kanser olgusu teşhis edilmektedir. Kanseri oluşturan risk faktörlerinin temelde genetik ve çevresel olduğu bildirilmektedir (1).

Günümüzde, kanser riskinin düşürülmesi amacıyla yapılan çalışmalar, probiyotiklerin tüketimi üzerine odaklanmaktadır. Probiyotiklerin, bulundukları organizmanın intestinal bölgesinde, gerek kanser hücrelerini oluşturan bakterileri, gerekse tümör hücrelerinin oluşumunu engelleyerek etkilerini gösterdiği kaydedilmiştir (1).

Probiyotikler arasında yer alan kefir; kefir tanelerini veya starter kültürünü kullanarak sütün fermente edilmesi ile elde edilen hafif asitli, alkollü ve köpüklü bir süt içeceğidir (2). Mikrobiyolojik olarak, yapısında laktobasilleri (*L.lactis, L. helveticus, L. casei*), streptokokları (*S. cremoris, S. lactis*) ve mayaları starter kültür olarak bulundurur (3).

İnsan ve hayvanlar üzerinde yürütülen ve kolon kanserini araştıran birçok çalışmada, araştırmacılar kanseri harekete geçiren yüksek enzim aktiviteleri ve kolondaki prekarsinojenik kimyasal madde artışı üzerine, bazı diyet ve kimyasal madde uygulamalarının etkilerini incelemişlerdir. Günümüzde bu çalışmalar, belirli probiyotiklerin tüketimi neticesinde kanseri hazırlayan faktörlerin olumlu yönde değiştiğini göstermektedir (1). Bu çalışmada; önemli bir probiyotik olan kefirin, kanserin gelişim dönemi boyunca alınması durumunda, aberant kriptler oluştuktan sonraki dönemde, karaciğer hasarının önemli belirteçleri olan AST ve ALT aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve metot

Çalışmanın hayvan materyalini; 12 haftalık ve ortalama 31.49 g ağırlığında olan 30 adet Swiss Albino türü laboratuvar faresi oluşturdu. Fareler, her bir grupta 10 adet olmak üzere üç gruba ayrıldı. 1.grup kontrol, 2. grup azoksimetan, 3. grup.ise azoksimetan ve kefir verilen grubu oluşturdu. Hayvanlara tüm deneme boyunca, kuru pelet yem, 1. ve 2. gruba içme suyu, 3. gruba ise sadece kefir % 50 sulandırılarak *ad libitum* olarak verildi. Hayvanlar 7 haftalık deneme süresince, oda ısısındaki (24±2 °C) laboratuvar hayvanları deneme ünitesinde barındırıldı.

Araştırmada kullanılan kefir granülleri, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'ndan temin edildi. UHT yöntemi ile üretilmiş % 3 yağlı hazır inek sütüne, % 5 oranında aktif kefir granülleri ilave edilerek ve 22 °C'de 20 saat inkübasyona bırakılarak elde edilen kefir araştırma süresince her gün taze olarak hazırlandı (4).

2. ve 3. grup hayvanlara haftada 2 gün, 7 hafta boyunca 5mg/kg azoksimetan derialtına enjekte edildi (5). Denemenin sonunda hayvanların kuyruklarından kan alındı ve serumları çıkartıldı. Daha sonra hayvanlara eter anestezisi altında ötenazi uygulandı. Nekropsisi yapılan hayvanların kolon ve karaciğerleri çıkarılarak serum fizyolojik ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından tartılan karaciğerler, hem patolojik muayenelerinin yapılabilmesi hem de enzim aktivitelerinin tayini için iki parçaya bölündü. Patolojik muayene için rutin olarak hazırlanan parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında alınan kesitler Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyanarak ışık mikroskobunda incelendi.

Biyokimyasal analizlerin gerçekleştirilmesi amacıyla karaciğerler önce küçük parçalara ayrıldı; daha sonra fosfat tamponu ilave edilerek dokular homojenize edildi. Serumlar ve doku homojenatları analiz yapılıncaya kadar –24 °C' de saklandı. Serum ve karaciğer

dokusundaki AST ve ALT aktivitesi Reitman-Frankel metodu (6) ile ölçüldü.

Bulgular

Kolonda yapılan patolojik muayenede azoksimetan grubunda daha fazla sayıda kript ile daha bazofilik boyanmaları ile karakterize olan, hafif bir hiperplazi tablosuna da rastlandı.

Azoksimetan verilen gruba ait karaciğerlerde en karakteristik lezyon etkenin antimitotik etkisinden kaynaklanan ve hepatositlerin sitoplazma ve özellikle çekirdeklerinde gözlenen jigantizmdi (megalositozis). Çekirdeklerin içinde bir ya da iki adet asidofilik inklüzyon cisimciği tespit edildi. İki çekirdekli hepatositlerde ise artış tespit edildi. Büyüyen hücrelerin baskısıyla sinüzoidlerde kapanma gözlendi.

Azoksimetan+kefir grubunda gözlenen değişiklikler azoksimetan grubuna benzer özellikler taşımakla beraber lezyonların şiddeti daha azdı.

Serum AST aktivitesinde kontrol grubu ile azoksimetan grubu arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı idi ($p<0.001$). Serum ALT aktivitesinde ise istatistiki olarak bir fark görülmedi.

Karaciğer doku AST aktivitesinde istatistiki olarak bir değişiklik bulunmazken, ALT aktivitesinde her iki grupta da artış ($p<0.001$) görüldü.

Tablo 1. Serum ve Karaciğer Dokusunda AST ve ALT Aktiviteleri*.
Table 1. AST and ALT Activities of the Sera and the Liver Tissues*.

n= 10	Serum (IU/L)		Karaciğer (IU/g doku)	
	AST	ALT	AST	ALT
Kontrol	18.9±4.4[a]	10.2±7.5	49.1±3.3	83.4±4.2[a]
Azoksimetan	21.9±4.8[ab]	11.2±8.4	58.4±4.3	115.8±1.7[bc]
Azoksimetan + Kefir	22.8±5.3[b]	10.7±8 5.	52.3±4.3	109.25±2.4[c]

*Aynı sütun içerisinde farklı harfler anlamlı (Significant difference between the means in the same column).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde gerek kötü beslenme koşulları gerekse hazır yiyeceklere katılan katkı maddeleri nedeniyle daha çok ortaya çıkan kolon kanseri, son yıllarda ölüme sebebiyet veren kanserler arasında ikinci sırada yer almaktadır. Yapılan bu çalışmada azoksimetanla kolonik anormal kript formasyonu oluşturulmuş farelerde kefirin AST ve ALT aktiviteleri üzerine nasıl bir etki yaptığı araştırılmıştır.

Kolon kanseri gelişimindeki ilk adım, karsinojenin hücre DNA'sını bozmasıyla başlar. Takip eden dönemde mutasyonlar oluşur ve bu mutasyonlar sonucunda tümör hücresi oluşmaya başlar. Tümör hücresinin oluşumunu izleyen ikinci adım ise kolonda anormal kriptlerin oluşmasıdır. Kolonda görülen anormal kriptlerin izlenmesi ile de artık kolon kanserinin gelişiminin başladığı anlaşılabilmektedir (1). Çalışmada azoksimetanla kolonda anormal kriptler oluşturuldu (5,7,8) ve bunların patolojik olarak tespitinin ardından, karaciğer dokusundaki ve serumdaki AST ve ALT aktivite düzeyleri araştırıldı.

Kefir bileşiminde laktik asit, yağ, esansiyel amino asitler, kalsiyum, magnezyum, biotin, folik asit, B_{12}, B_1 ve K vitaminlerini sütten daha fazla oranda bulunduran bir probiyotiktir (9). Fermente süt ürünlerinde bulunan kazein

ve kalsiyumun mutasyonun önlenmesinde etkili birer bileşen oldukları bildirilmiştir (10,11).

Fermente süt ürünleri tüketiminin etkisini araştıran çalışmalar arasında, kolon kanseri riskini azalttığını veya çok az oranda etkilediğini bildiren çalışmalar olduğu gibi (12-13), kanser riskini azaltmadığını (14-15) bildirenler de vardır. Yapılan bu çalışmada da kefir uygulamasının, anormal kript oluşumunu azalttığı tespit edilmiştir.

Enzimler; hayatın devamını sağlayan bir çok biyokimyasal reaksiyonun oluşmasına neden olan yaşamsal faktörlerdir. Bu sebeple enzim aktivite değişiklikleri organizmanın sağlık durumunu yansıtmaktadır (16). Karaciğer, metabolizmanın merkezi kontrol organıdır ve karaciğerin metabolik aktivitesi ölçülerek, fonksiyonel durum hakkında bilgi edinilebilir. AST ve ALT karaciğer için spesifik enzimler olup, akut karaciğer hastalıklarında hücre zarının yıkımı ve hücre nekrozu sonucu plazmadaki aktiviteleri artmaktadır (17,18,19).

Yapılan bu çalışmada; serum AST aktivitesinde kontrol grubuna göre azoksimetan grubunda artış ($p<0.001$) gözlenmiştir. AST'nin karaciğer doku aktivitesinde ise azoksimetan+kefir grubunda azoksimetan grubuna göre daha düşük aktivite olmasına karşın istatistiki anlamda aralarında bir fark görülememiştir. ALT aktivitesinde ise kontrol grubuna göre diğer gruplarda karaciğer doku aktivitesinde artış görülürken ($p<0.001$), serum aktivitesinde ise kefir grubu azoksimetan grubuna göre daha düşük aktivite göstermiş fakat istatistiki anlamda aralarında fark görülememiştir.

Sonuçta probiyotik olarak kullanılan kefirin kolon kanseri gelişim dönemi boyunca alınması durumunda kolonda anormal kript oluşumunu olumlu yönde etkilediği buna karşın karaciğer hasarının önemli göstergesi olan AST ve ALT aktiviteleri üzerine önemli bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Brady, L.J., Gallaher, D.D., Busta, F.F.: The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. J. Nutr. 130:410-414, 2000.

2. Lili, J.A.P., Moon. N.J.: Kefir- A new fermented milk product. Cultured Dairy Products J.,11-12, August, 1983.

3. Yaman, H.: Partial Characterisation of Lactobacilli Isolated from Commercial Kefir Grain, PhD Thesis, Huddersfield University, UK, 2000.

4. Marshall, M.V., Cole, W.M.: Methods for making kefir and fermented milks based on kefir. J. Dairy Res. 52, 451-456, 1985.

5. Chung, H., Wu, D., Han, S.N., Gay, R., Goldin, B., Bronson, R.E., Mason, J.B., Smith, D.E., Meydani, S.N.: Vitamin E supplementation does not alter azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci formation in young or old mice. J.Nutr.133:528-532, 2003.

6. Richterich, R.: Clinical Chemistry. Theory and Practice. S. Kargel, Basel(Switzerland). Academy Press, 321-431. 1969.

7. Komatsu, S, Watanabe, H., Oka, T., Tsuge, H., Nii, H., Kato, N.: Vitamin B-6-supplemented diets compared with a low vitamin B-6 diet suppress azoxymethane-induced colon tumorigenesis in mice by reducing cell proliferation. J.Nutr.131:2204-07, 2001.

8. Coleman, L.J., Landström, E. K., Royle, P.J., Bird, A.R., McIntosh, G.H.: A diet containing α-cellulose and fish oil reduces aberrant crypt foci formation and modulates other possible markers for colon cancer risk in azoxymethane-treated rats. J. Nutr. 132:2312-2318, 2002.

9. Krukowski, K., Rusiecki, M.: Influence of some factors involved in the culture of grains on the organoleptic and

chemical properties of kefir. Przegl. Mlecz., 11(10), 1-11,1963.

10. Bodana, A.R., Rao, D.R.: Antimutagenic activity of milk fermented by Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus. J. Dairy Sci.73:3379-84, 1990.

11. Abdelali, H., Cassand, P., Soussotte, V., Koch-Bocabeille, B., Narbonne, J.F.: Antimutagenicity of components of dairy products. Mutat. Res. 331:133-11, 1995.

12. Malhotra, S.L.: Dietary factors in a study of cancer colon from cancer registry, with special reference to the role of saliva, milk and fermented milk products and vegetable fibre. Med. Hypotheses, 3:122-34, 1977.

13. Peters, R:K:, Pike M.C., Garabrant, D., Mack, T.M.: Diet and colon cancer in Los Angeles County, California. Cancer Causes Control, 3:457-73, 1992.

14. Kampman, E., Goldbohm, R.A., van den Brandt, P.A., van Veer, P.: Fermented dairy products, calcium and colorectal cancer in the Netherlands cohort study. Cancer Res., 54:3189-90, 1994.

15. Kearney, J., Giovannucci, E., Rimm, E, et.al.: Calcium, vitamin D and dairy foods and the occurrence of colon cancer in men. Am. J. Epidemiol., 143:907-17, 1996.

16. Kuchmar, J.F., Moss, D.W.: Fundamentals of Clinical Chemistry. Enzymes (Nobert W.T.) Saunders Company. Philadelphia, 562-698,1982.

17. Cornellus C.E.: Liver function: Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Kaneko J.J.). 3rd Ed. New York, London, Academic Press, 230-242, 1980.

18. Whitby, L.G., Percy-Robb, I.W., Smith, A.T.: Enzyme test in diagnosis.Blackwell Sci. Pub., 138-69, 1984.

19. Kuchel, P.W., Ralston, G.B.:Schaum's outline of theory and problems of biochemistry. McGraw-Hill Inc., 411-49, 1988.