

Evaluation of the effect of exposure to N-nitrosodiethylamine on rat lung and intestine and the protective effect of tyrosol: A Biochemical and Histopathological study

Elahe Maleki¹,
Mehryar Zargari²,
Mansooreh Mirzaei³,
Abbas Ali Karimpour Malakshah⁴,
Fereshteh Talebpour Amiri⁵

¹ Master of Science in Anatomy, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ PhD in Comparative Histology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received July 20, 2025; Accepted September 22, 2025)

Abstract

Background and purpose: N-nitrosodiethylamine (NDEA) is a carcinogenic substance found in various foods. This toxic compound induces oxidative stress, resulting in damage to the structure of several internal organs, particularly the gastrointestinal and respiratory systems. Tyrosol (Tyr), a stable natural flavonoid and a primary component of olive oil, exhibits strong antioxidant properties. This study aims to investigate the protective effects of Tyrosol against NDEA-induced tissue damage in the lung and intestine.

Materials and methods: In this experimental study, 36 adult female rats were randomly divided into six groups: control, Tyr at doses of 10 and 20 mg/kg (administered by gavage for seven consecutive days), NDEA at a dose of 200 mg/kg (single dose on day four), and NDEA combined with Tyr at 10 and 20 mg/kg. Histopathological examinations of lung and jejunal tissue structure changes and biochemical analyses of oxidative stress parameters were performed on day nine. Data were analyzed with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test.

Results: Histopathological findings revealed that NDEA exposure caused inflammatory cell infiltration, alveolar wall thickening, collapse of some alveolar sacs, and edema in lung tissue. In the jejunum, administration of NDEA resulted in hemorrhage, infiltration of inflammatory cells within the submucosal layer, and a reduction in goblet cell density. Furthermore, biochemical analyses showed that NDEA induced oxidative stress by reducing GSH levels and elevating MDA concentrations. Tyr administration at both 10 and 20 mg/kg preserved the tissue structure of the lungs and jejunum, with the 20 mg/kg dose exhibiting a more significant protective effect.

Conclusion: The results indicate that Tyr, owing to its antioxidant properties and its ability to modulate oxidative stress parameters, may potentially prevent structural damage in pulmonary and jejunal tissues caused by NDEA.

Keywords: N-nitrosodiethylamine, Tyrosol, Lung Injury, Intestine Injury, Oxidative Stress

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35 (250): 3-14 (Persian).

Corresponding Author: Fereshteh Talebpour Amiri - Faculty of Medicine, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: ftaleb2001@yahoo.co.uk)

ارزیابی اثر مواجهه با ان-نیتروزودی اتیل آمین بر ریه و روده موش صحرایی و اثر محافظتی تیروزول: یک مطالعه بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژیکی

الهه ملکی^۱
مهریار زرگری^۲
منصوره میرزایی^۳
عباسعلی کریم پور ملک شاه^۴
فرشته طالب پور امیری^۵

چکیده

سابقه و هدف: ان-نیتروزودی اتیل آمین (NDEA)، یک ماده سرطانزا است که در نتیجه افزودن مواد نگهدارنده در مواد غذایی یافت می شود. این ماده سمی از طریق القاء استرس اکسیداتیو، منجر به آسیب در ساختار اکثر احشاء می شود. تیروزول (Tr) به عنوان یک ترکیب فلاونوئیدی طبیعی پایدار و از ترکیبات اصلی روغن زیتون، دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بسیار قوی می باشد. این مطالعه با هدف بررسی اثر محافظتی تیروزول بر آسیب بافت های روده ای و ریوی ناشی از NDEA، انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، ۳۶ موش صحرایی ماده بالغ به صورت تصادفی به شش گروه کنترل، Tr با دو دوز ۱۰ و ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم (برای ۷ روز متوالی، به صورت گاوآذ)، NDEA با دوز ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم (تک دوز، در روز چهارم مطالعه)، NDEA+Tr 10 و NDEA+Tr 20، تقسیم شدند. ارزیابی هیستوپاتولوژیکی برای مشاهده تغییرات در ساختار بافتی روده و ریه و ارزیابی بیوشیمیایی برای اندازه گیری پارامترهای استرس اکسیداتیو در روز نهم مطالعه انجام شد.

یافته ها: بررسی بافت شناسی در این مطالعه نشان داد که NDEA در بافت ریه منجر به ارتشاح سلول های التهابی، ضخیم شدن دیواره آلئولی، کلاپسه شدن برخی از کیسه های آلئولی و ادم شد. در بافت ژژنوم، NDEA منجر به خونریزی، ارتشاح سلول های التهابی در لایه زیر مخاطی و کاهش در تعداد سلول های گابلت گردید. از طرفی این ماده سمی با کاهش GSH و افزایش MDA منجر به القاء استرس اکسیداتیو شد. دریافت Tr در هر دو دوز ۱۰ و ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم توانست ساختار بافتی روده و ریه را حفظ نماید. دوز ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم Tr نقش مؤثرتری را نشان داد.

استنتاج: احتمالاً، Tr با خاصیت آنتی اکسیدانی و از طریق کاهش پارامترهای استرس اکسیداتیو می تواند از آسیب ساختاری در بافت های روده و ریه ناشی از NDEA جلوگیری نماید.

واژه های کلیدی: ان-نیتروزودی اتیل آمین، تیروزول، آسیب روده ای، آسیب ریوی، استرس اکسیداتیو

مؤلف مسئول: فرشته طالب پور - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزر آباد، مجتمع پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران E-mail: ftaleb2001@yahoo.co.uk

۱. کارشناسی ارشد علوم تشریح، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استاد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۳. دکتری بافت شناسی مقایسه ای، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. استاد گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۵. استاد گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۴/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۴/۵/۶ تاریخ تصویب: ۱۴۰۴/۶/۳۱

مقدمه

ان-نیتروزودی‌اتیل آمین (N-nitrosodiethylamine) (NDEA) از جمله نیتروزامین‌های فرار با خاصیت جهش‌زایی و سرطان‌زایی شناخته شده است که در مواد غذایی نظیر پنیر، سویا، ماهی دودی، گوشت، آب آشامیدنی، برخی داروها، مشروبات الکلی و دود تنباکو یافت می‌شود (۴-۱). نیتروزامین‌ها به‌عنوان یکی از سه گروه اصلی مواد سرطان‌زای بالقوه، با آسیب به DNA، القای جهش‌های ژنی و تحریک فرایندهای سرطانی شناخته شده‌اند (۳). سدیم نیتریت که به‌طور گسترده در نگهداری فراورده‌های گوشتی کاربرد دارد، در حضور اسید معده و روده با ترکیبات پروتئینی و آمین‌های بیوژنیک حاصل از تجزیه پروتئین‌ها، منجر به تشکیل نیتروزامین‌ها از جمله NDEA می‌شود (۵، ۶). این ترکیب می‌تواند در اثر فرایندهای حرارتی نیز در محصولات گوشتی و دریایی ایجاد گردد (۵). مطالعات متعدد اثرات کارسینوژنیک NDEA را بر اندام‌هایی چون کبد، روده، معده و ریه از طریق القای استرس اکسیداتیو، التهاب، فیروژنز و آپوپتوز تأیید کرده‌اند (۷، ۸). NDEA با تولید گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive oxygen species (ROS)) منجر به القاء استرس اکسیداتیو می‌گردد (۹). به‌طور معمول بین میزان رادیکال‌های آزاد تولید شده در بدن و سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی تعادلی پویا برقرار است و از بدن در برابر اثرات مضر آن‌ها محافظت می‌کند. اما قرار گرفتن در برابر توکسینی چون NDEA سبب برهم خوردن این تعادل می‌شود (۱۰). مصرف رژیم غذایی حاوی آنتی اکسیدان‌ها نقش مهمی در جلوگیری از آسیب اکسیداتیو دارد. بنابراین، عوامل آنتی اکسیدان موجود در گیاهان می‌توانند از استرس اکسیداتیو و سمیت ناشی از NDEA جلوگیری کنند. ترکیبات گیاهی فنولیک یا فلاونوئید در این مسیر به صورت مؤثر ایفای نقش می‌کنند. این ترکیبات رادیکال‌های آزاد را پاکسازی کرده و واکنش‌های زنجیره‌ای پراکسیداتیو را قطع می‌کنند (۱۱).

تیروزول (2-(4-hydroxyphenyl)ethanol) یک ترکیب فنولیک شناخته شده است که منبع اصلی آن در

روغن زیتون می‌باشد (۱۲). مطالعات متعدد اثبات کرده‌اند که این ماده با تعدیل مسیرهای مختلف سلولی و تنظیم miRNA های دخیل در بیماری‌های مزمن، سبب کاهش استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۳). مطالعات نشان داده‌اند که این ترکیب اثر مهارکنندگی و اثر پاکسازی کننده بر رادیکال‌های آزادی چون پراکسی نیتریت و آنیون سوپراکسید دارد (۱۴، ۱۵). تیروزول با تجمع داخل سلولی می‌تواند عملکرد آنتی اکسیدانی مؤثری داشته باشد (۱۶). تیروزول یک ترکیب نسبتاً پایدار است، در نتیجه نسبت به سایر ترکیبات پلی فنول، امکان اتواکسیداسیون کم‌تری دارد که این نکته بیانگر آن است که این ترکیب در شرایط بحرانی نیز فعالیت آنتی اکسیدانی خود را حفظ کرده و در مقایسه با سایر فلاونوئیدهای طبیعی، فعالیت آنتی اکسیدانی شدیدتری از خود نشان داده‌اند و اما گاهی اوقات نیز تبدیل به پرو اکسیدان شدند (۱۷).

اثرات آنتی اکسیدانی، ضد سرطانی و آنتی باکتریال تیروزول توسط سایر محققین تایید شده است (۱۸). هم‌چنین اثرات مفید آن در برابر فشار خون، آترواسکلروزیس، بیماری‌های عروق کرونری قلب، نارسایی مزمن قلبی، چاقی و مقاومت انسولینی از طریق مهار التهاب نشان داده شد (۱۹). با توجه به موارد فوق، این فرضیه مطرح می‌باشد که تیروزول می‌تواند اثر محافظتی بر آسیب ریوی و روده‌ای ناشی از NDEA داشته باشد و با توجه به این که تاکنون مطالعه‌ای برای بررسی اثر تیروزول بر آسیب ریه و روده ناشی از NDEA صورت نگرفته است، مطالعه حاضر به بررسی اثر سمی احتمالی NDEA بر بافت ریه و روده و اثرات آنتی اکسیدانی تیروزول بر آسیب ریوی و روده‌ای متعاقب NDEA با ارزیابی بیوشیمیایی بافتی و هیستوپاتولوژیکی، پرداخت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، ۳۶ موش صحرایی ویستار ماده بالغ ۶-۸ هفته با وزن ۱۸۰-۲۰۰ g استفاده شد که از

مرکز تحقیقات حیوانات دانشگاه علوم پزشکی مازندران تهیه گردید. این حیوانات به منظور سازگاری با محیط، ۱ هفته در قفس های خود با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری و تحت شرایط محیطی استاندارد (۱۲) ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای 23 ± 2 درجه سانتی گراد و رطوبت 55 ± 5 درصد قرار گرفتند. کلیه کار با حیوانات آزمایشگاهی با توجه به دستورالعمل های کمیته کنترل و نظارت بر حیوانات آزمایشگاهی، و کمیته اخلاق حیوانات (ID: IR.MAZUMS.AEC.1403.021) انجام شد.

حیوانات به طور تصادفی به ۶ گروه (در هر گروه ۶ رت) تقسیم شدند. گروه کنترل، حیوانات، هم حجم گروه های تجربی نرمال سالین دریافت کردند. گروه ان-نیتروزودی اتیل آمین (NDEA)، حیوانات این گروه تک دوز 200 mg/kg ان-نیتروزودی اتیل آمین را به صورت تزریق داخل صفاقی در روز چهارم مطالعه دریافت کردند (۲۰، ۲۱). گروه تیروزول 10 (Tyr10) ، حیوانات این گروه تیروزول را با دوز 10 mg/kg ، به مدت ۷ روز متوالی و به صورت گاوژ دریافت کردند (۲۲، ۲۳). گروه تیروزول 20 (Tyr20) ، حیوانات این گروه تیروزول را با دوز 20 mg/kg ، به مدت ۷ روز متوالی و به صورت گاوژ دریافت کردند (۲۳). گروه ان-نیتروزودی اتیل آمین و تیروزول 10 (NDEA+Tyr10) ، حیوانات این گروه تیروزول را با دوز 10 mg/kg ، از روز اول مطالعه تا ۷ روز متوالی به صورت گاوژ و ان-نیتروزودی اتیل آمین را با تک دوز 200 mg/kg به صورت تزریق داخل صفاقی در روز چهارم مطالعه دریافت کردند. گروه ان-نیتروزودی اتیل آمین و تیروزول 20 (NDEA+Tyr20) ، حیوانات این گروه تیروزول را با دوز 20 mg/kg ، از روز اول مطالعه تا ۷ روز متوالی به صورت گاوژ و ان-نیتروزودی اتیل آمین را با تک دوز 200 mg/kg به صورت تزریق داخل صفاقی در روز چهارم مطالعه دریافت کردند.

در هر یک از گروه های ۶ گانه، موش های صحرایی ماده در روز نهم مطالعه با کتامین (50 mg/kg)

و زایلازین (5 mg/kg) بیهوش شدند و تحت جراحی قرار گرفتند. برای جمع آوری نمونه روده و ریه، پس از استریل کردن ناحیه توراکس و شکم با الکل و بتادین، از پایین شکم تا ناحیه توراکس در خط وسط برش داده شد. پس از شناسایی دئودنوم، بخشی از ابتدای ژژنوم از داخل شکم خارج گردید. بافت های اضافی اطراف روده ها و ریه ها را برداشته و وزن آن ها ثبت گردید. بخشی از ریه و روده بلافاصله در نیتروژن مایع و سپس در فریزر -80°C برای ارزیابی بیوشیمیایی ذخیره گردید و بخش دیگر این دو بافت در بافر فرمالین ۱۰ درصد جهت تهیه مقاطع هیستولوژی فیکس شد.

سنجش مالون دی آلدئید (MDA)

مالون در آلدئید، یک مارکر برای استرس اکسیداتیو و محصول نهایی پراکسیداسیون چربی می باشد که با تیوباریتوریک اسید واکنش نشان داده و به شکل یک مجموعه قرمز رنگ دیده می شود. برای این منظور، نمونه بافت های ریه و روده به صورت مجزا به نسبت ۱ به ۱۰ وزن نمونه ها با محلول 0.15 KCl مولار در شرایط سرما هموژن شده و سپس ۱ میلی لیتر از هموژن، با ۱ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۵ درصد و ۱ میلی لیتر تیوباریتوریک اسید (سیگما، آلمان) مخلوط گردید و در حمام آب به مدت ۶۰ دقیقه جوشانیده شد. مخلوط فوق در دمای اتاق خنک گردید و به مدت ۱۰ دقیقه با دور 3000 rpm سانتریفیوژ شد. در نهایت، جذب نوری مایع رویی از مخلوط فوق در طول موج 532 nm بررسی گردید. عدد به دست آمده به عنوان بیان گر nmolMDA/g بافت در نظر گرفته شد. تست حاضر به صورت دو بار تکرار بر هر نمونه انجام گردید (۲۴، ۲۵).

سنجش گلوتاتیون GSH

به منظور ارزیابی میزان آنتی اکسیدان بافتی، میزان GSH به عنوان یک آنتی اکسیدان داخل سلولی از طریق واکنش با $5,5\text{'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (0.01)}$ واکنش با $5,5\text{'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (0.01)}$ در متانول (DTNB) سنجیده شد. بدین منظور،

نمونه‌های بافتی به صورت جداگانه و با نسبت ۱ به ۱۰ وزن نمونه‌ها با EDTA ۰/۰۲ مولار در شرایط سرما هموژن گردیدند. ۰/۵ میلی لیتر از هموژن بافتی با ۱۰۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ انکوبه گردید. سپس مخلوط فوق به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و به ۰/۵ میلی لیتر از مایع رویی، ۱۰۰ میکرولیتر DTNB و ۱۴۰۰ میکرولیتر بافر تریس بیس ۰/۴ مولار با PH ۸/۹ اضافه و ترکیب شد. در نهایت میزان جذب در طول موج ۴۱۲ نانومتر خوانده شد. غلظت گلوکوتایون از روی منحنی استاندارد گلوکوتایون بر حسب $\mu\text{mol/g}$ بافت ثبت گردید. جهت افزایش دقت، تست حاضر به صورت دو بار تکرار انجام گرفت (۲۴، ۲۵).

ارزیابی هیستوپاتولوژی

بافت‌های روده و ریه در بافر فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت فیکس شد. بافت فیکس شده در یک سری الکل طبقه بندی شده جهت آبگیری و در زایلل برای شفاف سازی و در پارافین قالب گیری گردید. سپس با استفاده از یک میکروتوم دوار مقاطعی با ضخامت $5\mu\text{m}$ تهیه شد. مقاطع پارافینی به مدت ۲۰ دقیقه در زایلل پارافین زدایی و پس از آن در ردیفی از اتانول طبقه بندی شده دوباره آبدی شدند و سپس برای رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) مورد استفاده قرار گرفتند. جهت ارزیابی هیستوپاتولوژی سپس، اسلایدها توسط یک متخصص بافت شناسی بدون آگاهی از گروه بندی نمونه‌ها، زیر میکروسکوپ نوری (المپوس، توکیو، ژاپن) مشاهده شدند.

برای ارزیابی نیمه کمی بافت ریه، میزان آسیب ریه برای هر فیلد بر اساس ارتشاح سلول‌های التهابی (نوتروفیل‌ها، گلبول‌های قرمز، ماکروفاژها، لنفوسیت‌ها) در کیسه آلوئولی یا ناحیه اطراف عروقی، تراوش کیسه آلوئولی، فروپاشی کیسه آلوئولی، ضخیم شدن دیواره‌های آلوئولی، ادم، احتقان و خونریزی، در مقیاسی از ۰ (ریه طبیعی)، ۱ (خفیف)، ۲ (ملایم)، ۳ (متوسط) و ۴ (شدید) امتیاز داده شدند (۲۶).

برای ارزیابی نیمه کمی بافت روده، اسلایدهای آماده شده با استفاده از یک سیستم امتیازدهی از نظر آسیب ژژنوم ارزیابی شدند. با توجه به وسعت و شدت آسیب ژژنوم برای هر فیلد، مورفولوژی، ارتشاح سلول‌های التهابی، احتقان، ریزش سلول‌های اپیتلیال، آسیب ژژنوم در مقیاسی از: ۰ (ژژنوم طبیعی)، ۱ (خفیف)، ۲ (ملایم)، ۳ (متوسط) و ۴ (شدید) امتیازدهی شدند. برای این منظور، اسلایدها در پنج فیلد از هر اسلاید ارزیابی شدند و سپس، میانگین امتیاز برای هر نمونه در نظر گرفته شد (۲۴).

آنالیز آماری با استفاده از نسخه ۹ نرم افزار Graph Pad Prism انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان گردید. بعد از تعیین نرمالیتی داده‌ها با تست Kruskal-Wallis، تست‌های آماری مورد استفاده one-way ANOVA test و Tukey's post-hoc بود. $p > 0.05$ به عنوان حد معنادار تعریف گردید.

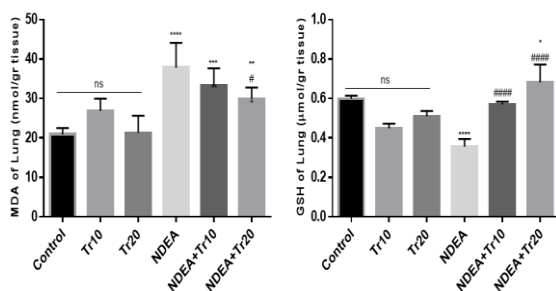
یافته‌ها

یافته‌های بیوشیمیایی بافتی تاثیر تیروزول وان-نیروزودی اتیل آمین بر استرس اکسیداتیو در بافت روده در موش‌های گروه NDEA، میزان MDA در بافت روده در مقایسه با موش‌های کنترل افزایش یافت ($P < 0.0001$) و سطح GSH در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت ($P < 0.0001$). سطح MDA در موش‌های در معرض NDEA، هنگامی که تیروزول در دو دوز ۱۰ و ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم دریافت کردند، در مقایسه با گروه NDEA تنها کاهش یافت (به ترتیب $P < 0.0001$ و $P < 0.01$). میزان GSH هنگامی که موش‌های در معرض NDEA با تیروزول درمان شدند در مقایسه با موش‌های در معرض NDEA تنها افزایش یافت ($P < 0.0001$) (تصویر شماره ۱).

یافته‌های بیوشیمیایی بافتی تاثیر تیروزول وان-نیروزودی اتیل آمین بر استرس اکسیداتیو در بافت ریه در موش‌های گروه NDEA، میزان MDA در بافت ریه در مقایسه با موش‌های کنترل افزایش یافت ($P < 0.0001$)

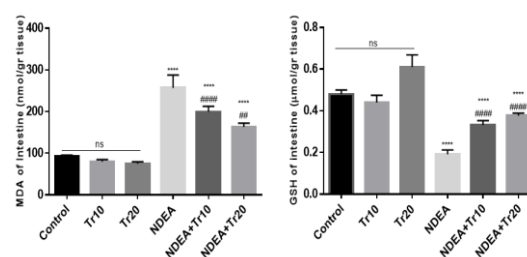
یافته‌های هیستوپاتولوژیک تاثیر تیروزول وان-نیتروزودی اتیل آمین بر ساختار بافتی ریه

تصویر شماره ۳، فتومیکروگراف‌های بافت ریه را در همه گروه‌ها نشان می‌دهد. بافت‌های ریه در گروه کنترل دارای ساختار ریوی نرمال بودند. رت‌هایی که تیروزول را در دو دوز ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کردند در ساختار ریه برونش‌ها، کیسه آلئولی و ضخامت دیواره آلئولی مشابه با گروه کنترل بودند.

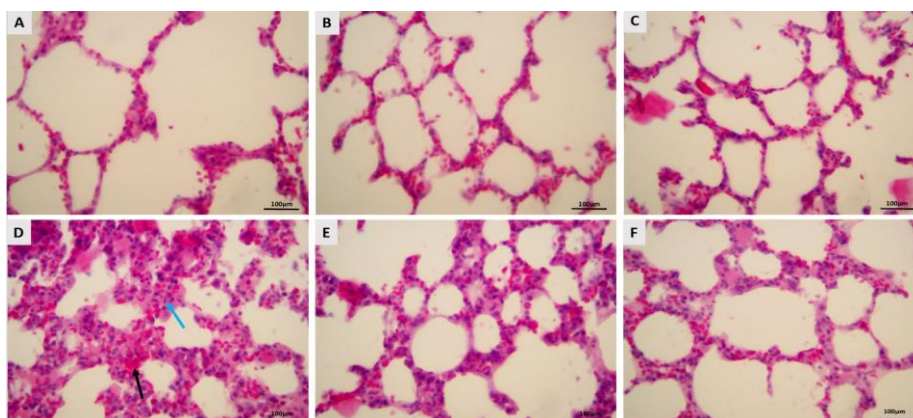


تصویر شماره ۲: سطح MDA (مالون دی آلدئید) و GSH (گلوتاتیون) در بافت ریه موش‌ها، موش‌های گروه NDEA (N-nitrosodiethylamine) در مقایسه با گروه کنترل، افزایش MDA و کاهش GSH را نشان دادند، درمان با Tr (تیروزول) در هر دو دوز در موش‌های در معرض NDEA به طور قابل توجهی غلظت MDA را کاهش و میزان GSH را در بافت ریه در مقایسه با گروه NDEA افزایش داد، همه مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده‌اند، * معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل، # معنی‌دار در مقایسه با گروه NDEA، **** $P < 0.0001$ ، *** $P < 0.001$ ، ** $P < 0.01$ ، * $P < 0.05$

P) و سطح GSH در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت ($P < 0.0001$). سطح MDA در موش‌های در معرض NDEA، هنگامی که با تیروزول در دو دوز ۱۰ و ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم دریافت کردند، در مقایسه با گروه NDEA تنها کاهش یافت. این کاهش فقط برای دوز ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم معنی دار بوده است ($P < 0.05$). میزان GSH هنگامی که موش‌های در معرض NDEA با تیروزول درمان شدند در مقایسه با موش‌های در معرض NDEA تنها افزایش یافت ($P < 0.0001$) (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۱: سطح MDA (مالون دی آلدئید) و GSH (گلوتاتیون) در بافت روده موش‌ها، موش‌های گروه NDEA (N-nitrosodiethylamine) در مقایسه با گروه کنترل، افزایش MDA و کاهش GSH را نشان دادند، درمان با Tr (تیروزول) در موش‌های در معرض NDEA به طور قابل توجهی غلظت MDA را کاهش و میزان GSH را در بافت روده در مقایسه با گروه NDEA افزایش داد، همه مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده‌اند، * معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل، # معنی‌دار در مقایسه با گروه NDEA، **** $P < 0.0001$ ، *** $P < 0.001$ ، ** $P < 0.01$ ، * $P < 0.05$



تصویر شماره ۳: فتومیکروگراف‌هایی از بافت ریه در تمامی گروه‌ها، A: کنترل، B: Tyr 10 (تیروزول ۱۰)، C: Tyr20 (تیروزول ۲۰)، D: NDEA، E: NDEA+Tyr10، F: NDEA+Tyr20، رنگ آمیزی H&E، تصاویر A، B و C نشان دهنده بافت سالم ریه می‌باشند. تصویر D آسیب ریوی گسترده را در گروه NDEA نشان می‌دهد (فلش آبی: ارتشاح سلول‌های التهابی و ضخیم شدن جدار کیسه‌های هوایی، فلش مشکی: هموراژی)، تصاویر E و F نمایانگر بهبود آسیب ریوی در گروه‌های درمان شده با تیروزول هستند که کاهش ضخامت جدار کیسه‌های هوایی، التهاب و خونریزی به خصوص در تصویر F مشاهده گردید.

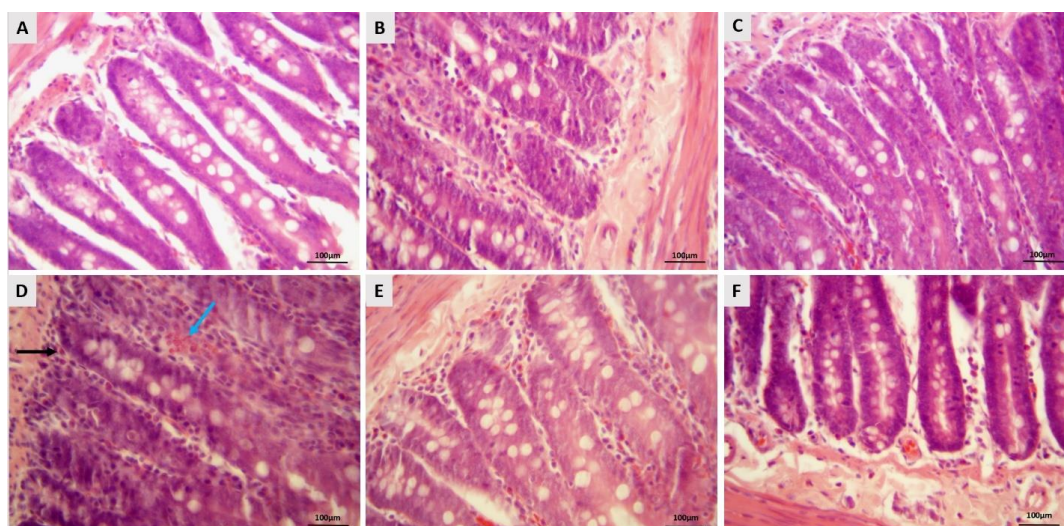
ساختار بافتی ریه در موش‌های صحرایی که NDEA را با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی دریافت کردند، خونریزی ریوی، پرخونی مویرگی، ارتشاح سلول‌های التهابی (نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها) به کیسه آلئولی و ناحیه اطراف عروقی، ضخیم شدن دیواره آلئولی، فروپاشی کیسه آلئولی و ادم را نشان دادند. تجویز تیروزول در رت‌های دریافت‌کننده NDEA کاهش قابل توجهی در ارتشاح سلولی ریوی و ضخامت دیواره آلئولی و خونریزی در مقایسه با گروه NDEA تنها نشان داد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که تیروزول در هر دو دوز می‌تواند ساختار ریوی را حفظ کند. اما این تاثیر در دوز ۲۰ موثرتر بود و به شکل پنومونیت خفیف مشهود بود.

یافته‌های هیستوپاتولوژیک تاثیر تیروزول و ان-نیتروزودی‌اتیل‌آمین بر ساختار بافتی روده

تصویر شماره ۴، فتومیکروگراف‌های بافت روده را در همه گروه‌ها نشان می‌دهد. در گروه کنترل، ساختار بافت ژژنوم در تمام لایه‌های مخاطی، زیر مخاطی، عضلانی و سروزی طبیعی بود. رت‌هایی که تیروزول را

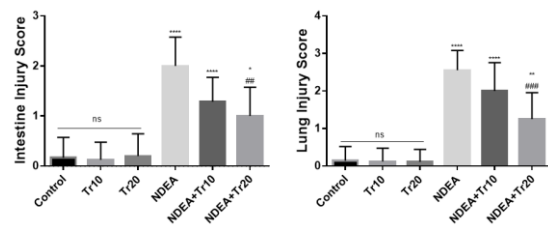
در دو دوز ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کردند، ساختار روده مشابه گروه کنترل را نشان دادند. در رت‌هایی که NDEA دریافت کردند خونریزی، ارتشاح سلول‌های التهابی به لایه زیر مخاطی و کاهش تعداد سلول‌های گابلت مشهود بود. تجویز تیروزول قبل از دریافت NDEA این آسیب در ساختار بافتی را کاهش داد. در بین دو دوز تیروزول تجویز شده، دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم در مقایسه با ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم، اثربخشی بیش‌تری در حفظ ساختار بافتی نشان داد.

تصویر شماره ۵، نمرات نیمه کمی نتایج میکروسکوپی نمونه‌های روده و ریه در موش‌های در معرض NDEA و تیروزول را نشان می‌دهد. میانگین این نمره در موش‌های در معرض NDEA برای دو بافت روده و ریه به ترتیب 0.45 ± 0.2 و 0.53 ± 0.26 در مقایسه با گروه کنترل 0.4 ± 0.17 و 0.38 ± 0.14 بود. این نمرات در گروه‌های NDEA با تیروزول در دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم برای بافت روده به ترتیب $P > 0.05$ و $P < 0.05$ و برای بافت ریه به ترتیب $P > 0.05$ و $P < 0.01$ بود.



تصویر شماره ۴: فتومیکروگراف‌هایی از بافت روده در تمامی گروه‌ها، A: کنترل، B: Tyr 10 (تیروزول ۱۰)، C: Tyr 20 (تیروزول ۲۰)، D: NDEA (N-nitrosodiethylamine)، E: NDEA+Tyr10، F: NDEA+Tyr20، رنگ آمیزی H&E، تصاویر A، B و C نشان دهنده بافت سالم ژژنوم می‌باشند، تصویر D آسیب بافتی ژژنوم را در گروه NDEA نشان می‌دهد (فلش مشکی: ارتشاح سلول‌های التهابی، فلش آبی: هموراژی)، به همراه کاهش سلول‌های گابلت، تصاویر E و F نمایانگر بهبود آسیب در گروه‌های درمان شده با تیروزول هستند.

پذیرتر می کند. مطالعات نشان داده اند که تجویز دی اتیل نیتروزامین به طور قابل توجهی میزان Nrf2 را در کبد، معده و کولون کاهش می دهد. کاهش Nrf2 با کاهش چشمگیر محتوای GSH و افزایش نشانگر استرس اکسیداتیو (MDA) و نشانگرهای التهابی ($IL-1\beta$ و $TNF-\alpha$) همراه می باشد (۷). از طرفی محققین نشان دادند که فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی بر اساس ساختار آن هاست که می تواند به عنوان دهنده ی الکترون یا هیدروژن عمل کنند یا الکترون آزاد در ترکیبات کربنی را جا به جا کرده و سبب پایداری رادیکال های آزاد شوند (۱۵). تیروزول با تجمع داخل سلولی می تواند عملکرد آنتی اکسیدانی مؤثری داشته باشد. هم چنین تیروزول با القاء افزایش بیان پروتئین های آنتی اکسیدان داخل سلولی، سبب مهار رادیکال های آزاد و استرس اکسیداتیو می شود (۱۳). تجویز تیروزول سبب افزایش فعالیت SOD (Superoxide Dismutase)، GSH (Reduced glutathione) و آنزیم های آنتی اکسیدانی بدن شده و هم چنین رادیکال های آزاد را کاهش می دهد (۲۳). GSH یک تیول غیر پروتئینی مهم در سلول های جانوری و یک نوکلئوفیل قدرتمند است که در واکنش های مختلف سم زدایی شرکت می کند و همچنین با دارا بودن گروه تیول خود در برابر آسیب های اکسیداتیو نقش حفاظتی دارد. از آنجایی که GSH در محیط آبی سلول حضور دارد، ممکن است به راحتی در دسترس محیط لیپیدی غشای سلولی نباشد؛ با این حال، نمی توان به طور کامل نقش مستقیم و مؤثر GSH در حذف رادیکال های آزاد درون زاد را رد کرد (۲۹). یافته های مارک های استرس اکسیداتیو در مطالعه حاضر با توجه به ویژگی های تیروزول تایید می گردد. تیروزول با افزایش سطح GSH در بافت ریه و روده، اثر محافظتی خود را اعمال نمود. فرآیند پراکسیداسیون لیپیدی یکی از شناخته شده ترین پرمطالعه ترین اثرات ناشی از سمیت اکسیژن است. در این فرآیند، مالون دی آلدئید (MDA) به عنوان محصول جانبی تولید می شود که در شرایط استرس اکسیداتیو



تصویر شماره ۵: اثر NDEA و تیروزول بر امتیاز نیمه کمی آسیب میکروسکوپی روده و ریه، NDEA: N-nitrosodiethylamine، همه مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده اند، * معنی دار در مقایسه با گروه کنترل، # معنی دار در مقایسه با گروه NDEA، ****: $P < 0.0001$ ، ***: $P < 0.001$ ، **: $P < 0.01$ ، *: $P < 0.05$ ، ###: $P < 0.01$ ، ####: $P < 0.001$.

بحث

این مطالعه اثرات سمی NDEA را به همراه اثرات محافظتی تیروزول بر بافت های ریه و روده با بررسی بافت شناسی و بیوشیمیایی بافتی مورد ارزیابی قرار داد. یافته ها اذعان نمودند که تجویز تک دوز ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم NDEA سبب بروز سمیت در بافت ریه و روده شده و تیروزول به عنوان یک ترکیب پلی فنول در برابر این سمیت، می تواند به عنوان عامل محافظتی مناسب از طریق اعمال اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی عمل نماید.

یافته های بیوشیمی بافتی ریه و روده در مطالعه حاضر نشان داد که NDEA منجر به افزایش MDA و کاهش GSH شد. فعال سازی متابولیک NDEA توسط آنزیم های سیتوکروم P450 باعث تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) (Reactive oxygen species) و رادیکال های آزاد می شود (۲۷). همچنین، NDEA از طریق NADPH-reductase (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) اکسید شده، منجر به القاء استرس اکسیداتیو و تولید ROS ها می گردد (۲۸). علاوه بر این محققین نشان داده اند که فاکتور هسته ای مرتبط با اریترئوئید ۲ (Nrf2) نقش محوری در بیان القایی ژن های کد کننده سیستم های سم زدایی و تنظیم آنزیم های متابولیزه کننده دارو در فاز II و آنزیم های سم زدایی و آنتی اکسیدانی دارد. کمبود Nrf2 بدن را در برابر سمیت و سرطان زایی ناشی از مواد سرطان زا آسیب

شکل می گیرد. MDA به عنوان یک نشانگر قابل اعتماد برای آسیب اکسیداتیو مرتبط با غشای پلاسمایی شناخته می شود و میزان تولید آن می تواند منعکس کننده ی سطح تخریب اکسیداتیو در سلول باشد (۳۰). بدین ترتیب استرس اکسیداتیو با سطح بالای MDA در بافت ریه و روده ی حیوانات گروه NDEA شناسایی گردید.

یافته های بافت شناسی نشان دادند که NDEA سبب بروز خونریزی در بافت ریه شده و التهاب نیز با ارتشاح سلول های التهابی مشاهده گردید. همچنین ضخامت دیواره آلوئولی در بافت ریه به طور قابل توجهی افزایش یافته بود. القاء طولانی مدت NDEA می تواند سبب بروز سرطان در سیستم تنفسی شود (۳۱). القاء استنشاقی NDEA سبب بروز تومور در نای، مجاری تنفسی و ریه ها و هم چنین کارسینومای سلول های سنگفرشی و آدنو کارسینوما در بافت ریه می شود (۳۲). اگر چه فعال سازی متابولیک NDEA توسط آنزیم های سیتوکروم P-450 به طور اولیه در کبد انجام می شود، اما سلول های موکوس بینی و سلول های کلاب برونشول ها نیز به طور گسترده این توکسین را متابولیزه می کنند که توضیح دهنده علت آسیب زایی این توکسین حتی در حالت القاء غیر استنشاقی می باشد (۲۷، ۳۳، ۳۴).

محققین نشان داده اند که تجویز طولانی مدت نیتروزامین به صورت خوراکی منجر به ایجاد سرطان در سلول های سنگفرشی در مری و آدنو کارسینومای معده می شود (۳۵). القاء طولانی مدت NDEA نیز می تواند سبب ایجاد تومور در مسیر دستگاه گوارش به خصوص در مری شود (۳۶). بررسی های بافت شناسی در مطالعه حاضر نشان داد که القاء NDEA در کوتاه مدت سبب بروز آسیب بافتی در ژنوم شده که با خونریزی، ارتشاح سلول های التهابی و کاهش سلول های گابلت همراه بود.

در مطالعه Daniela Gabbia و همکاران در سال ۲۰۲۳، تأثیر تیروزول و هیدروکسی تیروزول را بر فیروز کبدی ناشی از کرین تراکلرید نشان دادند. تیروزول با کاهش بیان NADPH oxidase و miRNA

های مرتبط با استرس اکسیداتیو اثرات آنتی فایبریک از خود نشان می دهد. تیروزول با کاهش برخی از اینترلوکین ها و میزان بیان NADPH oxidases، دارای اثر ضد التهابی و آنتی اکسیدانی است (۱۳). ارزیابی بافتی در این مطالعه اثر ضد التهابی را در ساختار بافت ریه و روده تایید می کند.

از جمله محدودیت های این مطالعه می توان به بازه ی زمانی کوتاه آن اشاره کرد که امکان بررسی اثرات دراز مدت این توکسین بر بافت های ریه و روده را فراهم نداشت. به منظور دستیابی به نتایج دقیق تر و قابل اتکاتر، پیشنهاد می شود ارزیابی ها در زمان های طولانی تر، نظیر یک تا دو ماه پس از مواجهه، نیز صورت گیرد. هم چنین بهره گیری از رنگ آمیزی اختصاصی تری کروم ماسون می تواند ابزاری مناسب برای بررسی دقیق تر میزان فیروز بافتی باشد و به غنای داده های هیستوپاتولوژیک کمک نماید.

در نهایت، با در نظر گرفتن مشاهدات مطالعه حاضر، NDEA از طریق القا استرس اکسیداتیو منجر به اختلال در ساختار بافتی ریه و روده شد. همچنین، تیروزول از طریق خواص آنتی اکسیدانی، میزان اختلال در GSH و MDA ناشی از در معرض NDEA بودن را بهبود بخشید. علاوه بر آن، تیروزول توانست با کاهش استرس اکسیداتیو از ساختار بافتی ریه و روده نیز محافظت کند.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مستخرج از بخشی از پایان نامه مصوب به شماره ۱۸۹۹۳ و با کد اخلاق IR.MAZUMS.AEC.1403.021 متعلق به دانشجوی رشته علوم تشریح خانم الهه ملکی، که از محل معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران (مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی) تامین اعتبار شده است

References

- Herrmann SS, Duedahl-Olesen L, Granby K. Occurrence of volatile and non-volatile N-nitrosamines in processed meat products and the role of heat treatment. *Food Control* 2015; 48:163-169.
- Li X, Bei E, Qiu Y, Xiao H, Wang J, Lin P, et al. Intake of volatile nitrosamines by Chinese residents in different provinces via food and drinking water. *Sci Total Environ* 2021; 754: 142121 PMID: 32911156.
- Janmeda P, Jain D, Chaudhary P, Meena M, Singh D. A systematic review on multipotent carcinogenic agent, N- nitrosodiethylamine (NDEA), its major risk assessment, and precautions. *J Appl Toxicol* 2024; 44(8): 1108-1128 PMID: 38212177.
- Chain EPoCitF, Schrenk D, Bignami M, Bodin L, Chipman JK, del Mazo J, et al. Risk assessment of N- nitrosamines in food. *Efsa Journal* 2023; 21(3): e07884.
- Xie Y, Geng Y, Yao J, Ji J, Chen F, Xiao J, et al. N-nitrosamines in processed meats: Exposure, formation and mitigation strategies. *Journal of Agriculture and Food Research* 2023; 13: 100645.
- Dietrich M, Block G, Pogoda JM, Buffler P, Hecht S, Martin SP. A review: dietary and endogenously formed N-nitroso compounds and risk of childhood brain tumors. *Cancer Causes & Control* 2005; 16(6): 619-635 PMID: 16049800.
- Mansour DF, Abdallah HM, Ibrahim BM, Hegazy RR, Esmail RS, Abdel-Salam LO. The carcinogenic agent diethylnitrosamine induces early oxidative stress, inflammation and proliferation in rat liver, stomach and colon: protective effect of ginger extract. *Asian Pac J Cancer Prev* 2019; 20(8): 2551-2561 PMID: 31450931.
- Somade OT, Adeyi OE, Ajayi BO, Asunde OO, Iloh PD, Adesanya AA, et al. Syringic and ascorbic acids prevent NDMA-induced pulmonary fibrogenesis, inflammation, apoptosis, and oxidative stress through the regulation of PI3K-Akt/PKB-mTOR-PTEN signaling pathway. *Metab Open* 2022; 14: 100179 PMID: 35340717.
- Meng R, Zhou R, Wang S, Sun R, Xiao H, Jin S, et al. Research progress on the toxicity mechanisms and health risks of N-nitrosamine disinfection by-products in drinking water. *Water Quality Research Journal* 2025; 60(3): 451-467.
- Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog* 2006; 5: 14 PMID: 16689993.
- Ogar GO, Minari JB, Bello AJ, Chiwetalu J, Omogunwa OE, Oshikoya OS, et al. Influence of ethanolic extract of *Allium sativum* on TP53 gene and its anticancer potential in N-Nitrosodiethylamine (NDEA)-induced hepatocellular carcinoma in male albino rats. *Iran J Basic Med Sci* 2022; 25(4):497-505 PMID: 35656070.
- Karković Marković A, Torić J, Barbarić M, Jakobušić Brala C. Hydroxytyrosol, tyrosol and derivatives and their potential effects on human health. *Molecules* 2019; 24(10): 2001 PMID: 31137753.
- Gabbia D, Carpi S, Sarcognato S, Zanutto I, Sayaf K, Colognesi M, et al. The phenolic compounds tyrosol and hydroxytyrosol counteract liver fibrogenesis via the transcriptional modulation of NADPH

- oxidases and oxidative stress-related miRNAs. *Biomed Pharmacother* 2023; 157: 114014 PMID: 36379119.
14. de la Puerta Ro, Domínguez MEMn, Ruíz-Gutiérrez V, Flavill JA, Hoult JRS. Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitregric neurotransmission. *Life Sci* 2001; 69(10): 1213-1222 PMID: 11508353.
15. Salucci S, Burattini S, Battistelli M, Buontempo F, Canonico B, Martelli AM, et al. Tyrosol prevents apoptosis in irradiated keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2015; 80(1): 61-68 PMID: 26166167.
16. Di Benedetto R, Vari R, Scazzocchio B, Filesi C, Santangelo C, Giovannini C, et al. Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007; 17(7): 535-545 PMID: 16928436.
17. Perona JS, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutierrez V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nutr Biochem* 2006; 17(7): 429-445 PMID: 16481154.
18. Bahrani HMH, Ghobeh M, Homayouni Tabrizi M. The anticancer, anti-oxidant, and antibacterial activities of chitosan-lecithin-coated parthenolide/tyrosol hybrid nanoparticles. *J Biomater Sc Polym Ed* 2023; 34(11): 1603-1617 PMID: 36755525.
19. Chang CY, Huang IT, Shih HJ, Chang YY, Kao MC, Shih PC, et al. Cluster of differentiation 14 and toll-like receptor 4 are involved in the anti-inflammatory effects of tyrosol. *Journal of Functional Foods* 2019; 53: 93-104.
20. Kaya E, Ozer Kaya S, Yilmaz S, Ceribasi AO, Turk G. Evaluation of ameliorating effect of lycopene against testicular toxicity due to diethylnitrosamine using biochemical, spermatological and histopathological data. *Andrologia* 2019; 51(6): e13274 PMID: 30907024.
21. Ali SA, Ibrahim NA, Mohammed MM, El-Hawary S, Refaat EA. The potential chemo preventive effect of ursolic acid isolated from *Paulownia tomentosa*, against N-diethylnitrosamine: initiated and promoted hepatocarcinogenesis. *Heliyon* 2019; 5(5): e01769 PMID: 31193530.
22. Bu Y, Rho S, Kim J, Kim MY, Lee DH, Kim SY, et al. Neuroprotective effect of tyrosol on transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience Lett* 2007; 414(3): 218-221 PMID: 17316989.
23. Chandramohan R, Pari L, Rathinam A, Sheikh BA. Tyrosol, a phenolic compound, ameliorates hyperglycemia by regulating key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. *Chem Biol Interact* 2015; 229: 44-54 PMID: 25641191.
24. Arzani S, Farzipour S, Amiri FT, HosseiniMehr SJ. Gliclazide protects ionizing radiation-induced intestinal injury in mice by inhibiting oxidative stress and caspase-3. *BioTechnologia* 2024; 105(4): 367-376 PMID: 39844874.
25. Talebpour Amiri F, Arzani S, Farzipour S, HosseiniMehr SJ. Radioprotective effects of gliclazide against irradiation-induced cardiotoxicity and lung injury through inhibiting oxidative stress. *Med Oncol* 2022; 39(12): 199.
26. Farzipour S, Amiri FT, Mihandoust E, Shaki F, Noaparast Z, Ghasemi A, et al. Radioprotective effect of diethylcarbamazine on radiation-induced

- acute lung injury and oxidative stress in mice. *J Bioenerg Biomembr* 2020; 52(1): 39-46.
27. El-Tohamy MM. The mechanisms by which oxidative stress and free radical damage produce male infertility. *Life Sci J* 2012; 9(1): 674-688.
 28. Miatmoko A, Faradisa AA, Jauhari AA, Hariawan BS, Cahyani DM, Plumeriastuti H, et al. The effectiveness of ursolic acid niosomes with chitosan coating for prevention of liver damage in mice induced by n-nitrosodiethylamine. *Sci Rep* 2022; 12(1): 21397 PMID: 36496469.
 29. Jeyabal PVS, Syed MB, Venkataraman M, Sambandham JK, Sakthisekaran D. Apigenin inhibits oxidative stress- induced macromolecular damage in N- nitrosodiethylamine (NDEA)- induced hepatocellular carcinogenesis in Wistar albino rats. *Mol Carcinog* 2005; 44(1):11-20 PMID: 15924350.
 30. Zeng Y, Lian S, Li D, Lin X, Chen B, Wei H, et al. Anti-hepatocarcinoma effect of cordycepin against NDEA-induced hepatocellular carcinomas via the PI3K/Akt/mTOR and Nrf2/HO-1/NF- κ B pathway in mice. *Biomed Pharmacother* 2017; 95: 1868-1875 PMID: 28968944.
 31. Khanduja K, Gandhi R, Pathania V, Syal N. Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. *Food Chem Toxicol* 1999; 37(4): 313-318 PMID: 10418948.
 32. Tanaka A, Hisanaga A, Inamasu T, Hirata M, Ishinishi N. A comparison of the carcinogenicity of N-nitrosodiethylamine and N-nitrosodimethylamine after intratracheal instillation into Syrian golden hamsters. *Food Chem Toxicol* 1988; 26(10): 847-850 PMID: 3220327.
 33. Jensen R, Sleight S. Toxic effects of N-nitrosodiethylamine on nasal tissues of Sprague-Dawley rats and golden Syrian hamsters. *Fundam Appl Toxicol* 1987; 8(2): 217-229.
 34. Luo D, Liu D, Zhou X, Yang S, Tang C, Liu G. Bone marrow-derived cells contribute to NDEA-induced lung squamous cell carcinoma. *Tumor Biol* 2013; 34(1): 145-154 PMID: 23055190.
 35. Binato M, Schmidt MK, Volkweis BS, Ribeiro GBS, Edelweiss MI, Gurski RR. Mouse model of diethylnitrosamine-induced gastric cancer. *J Surg Res* 2008; 148(2): 152-157.
 36. Althoff J, Fehst HJ, Mohr U. The influence of metabolic liver defects on diethylnitrosamine (NDEA)-carcinogenesis in Gunn rats. *Exp Pathol* 1985; 27(3): 171-178 PMID: 2988995.