

40596

**DIETİL NİTROZAMİN'İN MDA, SOD VE  
E VİTAMİNİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Fahrettin AKYÜZ**

**Osmangazi Üniversitesi**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**  
Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği Uyarınca  
Biyokimya Anabilim Dalı'nda  
**DOKTORA TEZİ**  
Olarak Hazırlanmıştır.

**Danışman : Prof. Dr. Mine İNAL**

**Temmuz 1994**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Fahrettin AKYÜZ'ün DOKTORA tezi olarak hazırladığı "Dietil Nitrozamin'in MDA, SOD ve E Vitamini Üzerine Etkileri " başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

13.07.1994

Üye : Prof. Dr. Mine İNAL

Üye : Doç. Dr. Kıymet AKSOY

Üye : Y. Doç. Dr. Ömer GÖZLAK

---

Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 13.07.1994 gün ve 203/840 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

14 SUBAT 1995  
ASLI GİBİDİR

Prof. Dr. Nurettin BAŞARAN  
Enstitü Müdürü



## Ö Z E T

Bu çalışmada önemli bir karsinogen olan DEN verilen ratlarda, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA ile SOD ve E vitamini düzeyleri üzerine GSH'nın koruyucu etkileri araştırıldı. Kontrol (n=8), DEN verilen grup (n=8), DEN+GSH verilen grup (n=8) olmak üzere 3 grup oluşturuldu. Ratlar 1. 24. 48. 72. 96. saatlerde kanları alındıktan sonra öldürülerek karaciğer ve böbrek dokuları alındı.

Plazma MDA düzeylerinde 24. ve 96. saatlerde DEN verilen grupta önemli düzeyde artış gözlemlendi ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ). Eritrosit SOD aktivitesinde kontrol grubu ile kıyaslandığında 24. saatte DEN verilen grupta anlamlı düşme ( $p<0.05$ ), 72. saatte DEN+GSH verilen grupta önemli derecede artış saptandı ( $p<0.01$ ). E vitamini düzeylerinde DEN verilen grupta 24. ve 72. saatlerde anlamlı azalma vardı ( $p<0.05$ ). 96. saatte kontrol grubuna göre diğer gruplarda artma vardı ( $p<0.01$ ).

Rat karaciğer dokusunda MDA düzeyleri kontrol grubuna göre diğer gruplarda artmıştı ( $p<0.05$ ). SOD, DEN verilen grupta azalmıştı ( $p<0.001$ ). E vitamini DEN+GSH verilen grupta düşmüştü ( $p<0.05$ ).

Böbrek dokusunda kontrol grubuna göre MDA düzeylerinde fark gözlenmezken, SOD aktivitesi DEN verilen grupta azalmış ( $p<0.01$ ), DEN+GSH verilen grupta artmıştı ( $p<0.01$ ). Vi+E değerleri ise DEN grubunda artmıştı ( $p<0.01$ ).

DEN'in lipid peroksidasyonu ile SOD ve Vit E üzerine önemli etkisi olduğu, GSH'nın bu peroksidasyonda yeterince koruyucu görevi yapmadığı kanısına varıldı.

**Anahtar Kelimeler :** Dietil Nitrozamin, Lipit peroksidasyonu, Süperoksit dismutaz, E vitamini

## S U M M A R Y

In this study examined effects of DEN on lipid peroxidation and antioxidants, and also the protective effects of GSH on this mechanism. For this aim, we determined the liver and kidney tissue and also erythrocyte SOD activity, vitamin E and MDA levels. The groups were designed as follows: Control (n=8), DEN infused group (n=8), DEN+GSH infused group (n=8). The blood samples were taken at 1, 24, 48, 72, 96th hours after administration and the tissues were removed immediately.

In the DEN group, plasma MDA levels were increased significantly at 24th and 96th hours ( $p<0.05$ ),  $p<0.01$ ). The erythrocyte SOD activity was significantly decreased as compared with control at 24th hour in DEN group ( $p<0.05$ ). This enzyme activity was also decreased in DEN + GSH group at 72th hour ( $p<0.01$ ).

Vitamin E levels were decreased in DEN group at 24th and 72th hour ( $p<0.05$ ). However, vitamin E levels were increased at 96th hour in both two group as compared with controls ( $p<0.01$ ).

Rat liver tissue MDA levels were increased in both two group as compared with controls ( $p<0.05$ ). The SOD activity was decreased in DEN+GSH group ( $p<0.05$ ).

There was no difference in kidney tissue MDA levels. The SOD activity was decreased in DEN group ( $p<0.01$ ). However, this enzyme activity was increased in DEN+GSH group ( $p<0.01$ ). The vitamin E levels was increased in DEN group ( $p<0.01$ ).

In conclusion, DEN has an important effects on lipid peroxidation, SOD activity and vitamin E levels. GSH cannot protect enough the tissues against the effects of DEN.

**Key words** : Diethyl nitrosamine, Lipid peroxidation, Superoxide dismutase, Vitamin E

## T E Ő E K K Ü R

Bu çalışmanın planlanmasında ve tezimin hazırlanmasının her kademesinde değerli katkıları ile beni yönlendiren Sayın Hocam Prof.Dr. Mine İNAL'a ve Yrd.Doç.Dr. Ömer ÇOLAK, Yrd.Doç.Dr. Özkan ALATAŐ, Yrd.Doç.Dr. Emine SUNAL, Yrd.Doç.Dr. Sema USLU ve Biyokimya Anabilim Dalında görev yapan tüm çalışma arkadaşlarıma teőekkürü bir borç bilirim.

İstatistiklerimin yapılmasında yardımcı olan Prof.Dr. Kazım ÖZDAMAR, Yrd.Doç.Dr. Setenay DİNÇER'e, histolojik çalışmalarımda yardımcı olan Doç.Dr. Cengiz BAYCU'ya ve Rat çalışmalarımda yardımcı bulunan Tekn. Muzaffer YARDIMCI'ya ayrıca teşekkür ederim.

## İ Ç İ N D E K İ L E R

### Sayfa

ÖZET .....	iii
SUMMARY .....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	x
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Kimyasal karsinojenler .....	3
2.2. Ksenobiyotik metabolizması .....	4
2.3.1. Nitrat, Nitrit ve Nitrozaminler .....	8
2.3.2. Nitrozaminlerin Metabolizması .....	10
2.4. Dietil nitrozamin .....	11
2.5. Reaktif oksijen özellikleri .....	12
2.6. Lipid peroksidasyonu .....	14
2.7. Antioxidan defans .....	14
2.7.1. Enzimatik defans .....	15
2.7.1.1. Süperoksit dismutaz .....	16
2.7.2. Non enzimatik defans .....	16
2.7.2.1. E vitamini .....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	19
3.1. Deney hayvanları ve materyal .....	19
3.1.1. Hemolizat hazırlanması .....	20
3.1.2. Doku homojeneatların hazırlanması .....	20
3.2. Yöntemler .....	20
3.2.1. Malonil dialdehit ölçümü .....	20

	<u>Sayfa</u>
3.2.2. SOD aktivitesi belirlenmesi . . . . .	21
3.2.3. E Vitamin ölçümü . . . . .	21
3.3. İstatistiksel analiz . . . . .	22
4. BULGULAR . . . . .	23
4.1. Biyokimyasal Bulgular . . . . .	23
4.1.1. Plazma ve eritrosit . . . . .	23
4.1.2. Karaciğer dokusu . . . . .	23
4.1.3. Böbrek dokusu . . . . .	24
4.2. Mikroskopik Bulgular . . . . .	29
4.2.1. Karaciğer dokusu . . . . .	29
4.2.2. Böbrek dokusu . . . . .	32
5. TARTIŞMA . . . . .	33
6. SONUÇ . . . . .	41
7. KAYNAKLAR DİZİNİ . . . . .	42
8. EK-ÇİZELGELER . . . . .	49
9. ÖZGEÇMİŞ . . . . .	50

**Ş E K İ L L E R D İ Z İ N İ**

<b><u>Sekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1. Glutasyon konjugatları biotransformasyonu . . . . .	7
2.2. Nitrozaminlerin aktif karsinojene transformasyonu .. . . .	10
2.3. Serbest radikaller ve mekanizması . . . . .	13
2.4. $\alpha$ -5,7,8 Trimetil Tokol ( $\alpha$ -tokoferol) . . . . .	16
4.1. Kontrol karaciğer dokusunda normal histolojik yapı . . . . .	29
4.2. DEN verilen grup karaciğer dokusunda histolojik yapı . . . . .	30
4.3. DEN verilen grup karaciğer dokusundaki histolojik görünüm . . . . .	30
4.4. DEN+GSH verilen grup karaciğer dokusunda histolojik yapı . . . . .	31
4.5. Kontrol grubu böbrek dokusu histolojik görünüm . . . . .	32
4.6. DEN grubu böbrek dokusunda histolojik görünüm . . . . .	33
4.7. DEN+GSH grubu böbrek dokusunda histolojik görünüm . . . . .	34



**Ç İ Z E L G E L E R D İ Z İ N İ**

<b><u>Çizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1. Bazı önemli kimyasal karsinojenler . . . . .	3
2.2. Biyolojik sistemlerde antioksidan defans . . . . .	15
4.1. Plazma MDA istatistik değerleri . . . . .	25
4.2. Eritrosit SOD istatistik değerleri . . . . .	26
4.3. Eritrosit E vitamini istatistik değerleri . . . . .	27
4.4. Karaciğer dokusu MDA, SOD ve Vit E değerleri istatistik sonuçları . . . . .	28
4.5. Böbrek dokusu MDA, SOD ve Vit E değerleri istatistik sonuçları . . . . .	28
Ek-Çizelge 1. Plazma MDA değerleri . . . . .	49
Ek-Çizelge 2. Eritrosit SOD değerleri . . . . .	50
Ek-Çizelge 3. Eritrosit E vitamini değerleri . . . . .	51
Ek-Çizelge 4. Karaciğer dokusu MDA, SOD ve Vit E değerleri .	52
Ek-Çizelge 5. Böbrek dokusu MDA, SOD ve Vit E değerleri . . .	53

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b><u>Simgeler</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
GSH	Redükte glutatyon
DEN	Dietil Nitrozamin
MDA	Malonil Dialdehit
DNA	Deoksiribo nükleik Asit
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte)
KoA	Koenzim A
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid (redükte)
RNA	Ribonükleik asit
ATP	Adenozin tri fosfat
ADP	Adenozin di fosfat
AMP	Adenozin mono fosfat
GSSG	Okside glutatyon
GSSGR	Glutatyon redüktaz
SOD	Superoksit dismutaz
Vit E	E vitamini
TBA	Tiobarbitürik asit
TPTZ	2,4,6 Tripyridil-S-triazine
NBT	Nitro blue tetrazolium
ü	ünite
gr	gram
Hb	Hemoglobin

## 1. G İ R İ Ő

Kanser dünyada kardiovasküler hastalıklardan sonra ikinci sık rastlanan ölüm nedenidir. Tüm yaşlardaki bireylerde kanser gelişebilir ve çok çeşitli organlar etkilenir. Kanserde bireylerin çektikleri ac ile birlikte topluma yüklenen ekonomik maliyet oldukça yüksektir. Bu nedenle kanser araştırmaları tüm dünyada hızla devam etmektedir. Bu araştırmalarda kanser nedenleri : radyasyon enerjisi, virüsler ve kimyasal bileşikler olmak üzere üç ana grupta toplanmıştır (35).

Kimyasal bileşiklerin pekçok çeşidi karsinojeniktir. Bu nedenle bu tür bileşiklere kimyasal karsinojenler denir. Kimyasal karsinojenler içinde sıklıkla incelenenlerden birisi de nitrozaminlerdir. Doğada oldukça yaygın bulunan nitrozaminler, çevresel kaynaklarla alınarak veya insan vücudunda oluşarak sağlığımız için tehlike yaratmaktadır. Bu gruba giren nitrozaminlerden birisi de dietil nitrozamindir (6, 15, 46).

Dietil nitrozaminin etkileri, ksenobiyotik metabolizması ile ilişkisi ve çeşitli enzimlerle olan ilişkileri, son yıllarda çalışılan, araştırılan konular arasındadır.

Hücrede lipid peroksidasyonunun yaptığı hasar, serbest radikallerin zararlı etkileri bugün bilinen bir gerçektir. In vivo normal metabolizmanın ürünleri şeklinde açığa çıkan serbest radikaller, ayrıca organizmanın iyonize edici radyasyona, oksitleyici özellik taşıyan ajanlara ve doğal durumunda serbest radikal metabolitleri oluşturabilen ksenobiyotiklere (hücreye yabancı olan maddeler) maruz kaldığı durumlarda da meydana gelirler. Canlılığın devamının bir gereği olan oksijen radikalleri birçok enzimatik tepkime ve biyolojik fonksiyonlar için de gereklidir. Ancak herbir radikalın yapısı ve etkili olduğu yere göre

hücresele hedefler risk altındadır. Buna karşı hücredeki bazı defans mekanizmaları da bilinmektedir. Bunlardan redükte glutatyon (GSH) ile süperoksit dismutaz enzimi ve E vitamini ( $\alpha$ -tokoferol), hücresele hasara karşı koymaya çalışırlar (8, 45).

Biz de bu verilerden yola çıkarak kimyasal karsinojenik bir madde olan dietil nitrozaminin (DEN), oksidatif bir hasara neden olup, olmadığını ve hücresele antioksidan sistemlerini nasıl etkilediğini araştırdık, bu amaçla lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malonil dialdehit (MDA) ile SOD ve E vitamini üzerine etkilerini inceledik. Ayrıca reaktif oksijen ürünlerini temizlemede önemli etkisi olan GSH nın bu mekanizmalar üzerine etkisini araştırdık.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kimyasal Karsinojenler

İnsanlarda oluşan kanserlerin %80 gibi önemli bir kısmının başta kimyasallar olmak üzere çevresel faktörlerle meydana geldikleri belirlenmiştir. Kişinin bu faktörlerin etkisi altında kalması, mesleğinden, diyetinden, yaşam tarzından veya diğer nedenlerden olabilir. Kimyasal karsinojenler organik yapıda olabildiği gibi inorganik de olabilir. Bazı önemli kimyasal karsinojenleri şöyle sınıflayabiliriz.

Çizelge 2.1. Bazı önemli kimyasal karsinojenler

SINIF	BİLEŞİK
Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar	Benzo(a) piren Dimetil Benzotrasin
Aromatik Aminler	2 - Asetil aminofloren n - metil - 4 amino benzen (MAB)
Nitrozaminler	Dimetil nitrozamin Dietil nitrozamin
Muhtelif İlaçlar	Alkilleyici Ajanlar (Ör : Siklo fosfamid), dietil stil bestrol
Doğal Bulunan Bileşikler	Daktinomisin, aflatoxin B <sub>1</sub>
İnorganik Bileşikler	Arsenik, asbest, berilyum, kadmium, krom

Bu bileşiklerin çeşitliliği bunları karsinojenliğe yönelten bir ortak özelliğe sahip olmadıklarını gösterir. Bazı kimyasal karsinojenler hedef

moleküller ile doğrudan etkileşerek etkisini gösterirler ki bunlara direk karsinojenler denir (örneğin:  $\beta$ -propyolakton). Diğerlerinin ise karsinojenik olmak için önceden metabolize olmayı gerektirdikleri anlaşılmıştır ki bunlar, prokarsinojenlerdir. Bir veya daha fazla enzimin katalizlediği reaksiyonlar ile prokarsinojenlerin karsinojenlere dönüştüğü olay metabolik aktivasyondur. Meydana gelen ara ürünlerin herhangi biri proksimat karsinojen olarak adlandırılır. Hücrenel bileşikler (ör : DNA) ile reaksiyona giren son bileşik ise en son karsinojendir. Yani olay şu şekildedir (15, 35).

Prokarsinojen -----> Proksimat karsinojen -----> Son karsinojen

Prokarsinojenlerin kendisi kimyasal reaktif bir tür değildir, halbuki son karsinojen ekseriya yüksek derecede reaktiftir. Genel olarak son karsinojenlerin önemli bir özelliği DNA, RNA ve proteinlerdeki nükleofilik gruplara kolaylıkla saldırabilen elektrofiller olmalarıdır.

## 2.2. Ksenobiyotik Metabolizması

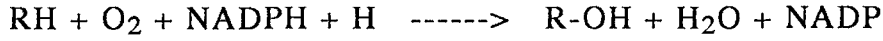
Prokarsinojenler ve diğer ksenobiyotiklerin metabolizması monooksijenazlar ve transferazlar ile ilişkilidir. “Ksenobiyotik” vücuda yabancı olan bileşiklerin genel adıdır. Bazı ilaçlar kimyasal karsinojenler ve çeşitli bileşikler, ksenobiyotik olarak adlandırılır. Bu bileşiklerin çoğu insan vücudunda metabolizmaya uğrarlar. Bu olay ile ilişkili temel organ karaciğerdir. Bir ksenobiyotik bazen bir değişikliğe uğramaksızın da atılıma uğrayabilir (2, 17, 35, 39).

Ksenobiyotik metabolizması Faz I ve Faz II reaksiyonları olarak iki kısımda incelenir.

Faz I in temel reaksiyonu, monooksijenazlar ve sitokrom p-450 türleri olarak adlandırılan enzim sınıfının üyeleri tarafından katalizlenen

hidroksilasyondur. Faz I in diğ er reaksiyonları hidroliz ve redüksiyonu içerirler. Faz I de oluşmuş hidroksile ve diğ er bileşikler faz II de spesifik enzimler aracılığı ile glukoronik asit, sulfat, asetat, glutatyon ve bazı amino asitler ile konjugasyon veya metilasyon sonucu çeşitli polar metabolitlere dönüştürülür (21, 35).

Faz I in temel reaksiyonu hidroksilasyondur. Sorumlu enzimler monooksijenazlar veya sitokrom p-450 türleridir. Genel reaksiyonu şöyle gösterebiliriz.



Buradaki RH çok geniş bir ilaç grubunu, karsinojenleri, çevre kirliliğine etken olan nedenleri ve steroidler gibi bazı endojen bileşikleri simgeleyebilir. Sitokrom p-450 nin katalizlediği reaksiyon şöyle de gösterilebilir.



Sitokrom p-450 türleri endoplazmik retikulumun temel monooksijenazlarıdır. Bu enzimler son derece önemlidir. Çünkü hastaların aldıkları ilaçların yaklaşık %50 sinin sitokrom p-450 türleri tarafından metabolize oldukları belirlenmiştir. Aynı enzim, çeşitli karsinojenler ve çevre kirliliğine yol açan etkenler üzerine de etkilidir (17, 21, 53).

Faz I reaksiyonları ile ksenobiyotikler, genelde daha polar hidroksile türevlere dönüştürülürler. Faz II reaksiyonları ile bu türevler, glukoronik asit, sulfat veya glutatyon gibi moleküller ile konjugasyona uğrarlar. Böylece suda çözünür hale gelerek idrar ya da safra ile atılıma uğrarlar.

## Faz II reaksiyonlarının en önemlileri şunlardır :

**-Glukoronidasyon :** Bilirubinün glukoronitleşmesi örnektir. UDP-glukoronik asit glukoronil donörüdür, hem endoplazmik retikulum hemde sitozolde çeşitli glukoronil transferazlar katalizördür. Bir karsinojen olan 2 asetil-amino fluoren, anilin, benzoik asit ve steroidler gibi pek çok molekül glukoronatlar şeklinde atılıma uğrarlar.

**-Sulfasyon :** Bazı alkoller, aril aminler ve fenoller sulfatlanırlar, sulfat donörü adenozin 3' fosfat 5' fosfosulfattır. Bu bileşiğe aktif sulfat denir.

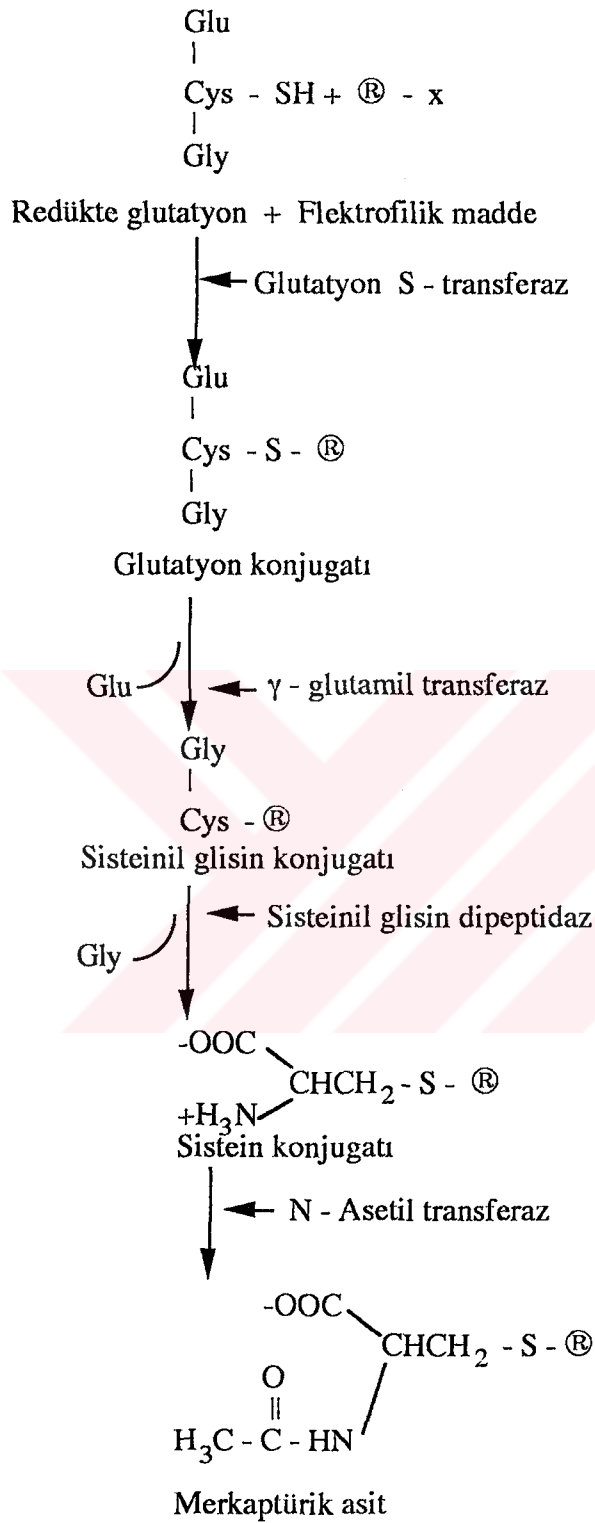
**-Glutasyon ile konjugasyon :** Glutasyon, glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptittir. GSH olarak gösterilir. SH sisteinin sulfhidril grubunu belirtir. Bazı elektrofilik ksenobiyotikler, nükleofilik GSH ile konjuge olurlar.

$R + GSH \rightarrow R-S-G$  ile bu reaksiyonlar şematize edilebilir.

Buradaki R, elektrofilik bir ksenobiyotiği temsil etmektedir. Bu reaksiyonu glutasyon-S-transferazlar katalize eder. Eğer toksik potansiyeli olan ksenobiyotikler GSH ile konjugasyona uğramasalardı, DNA, RNA ve hücre proteini ile kovalen olarak birleşmekte serbest olacaklar ve ciddi hücre hasarlarına yol açabileceklerdi. Bundan dolayı GSH bazı ilaçlar ve karsinojenler gibi çeşitli toksik bileşiklere karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır (35, 39).

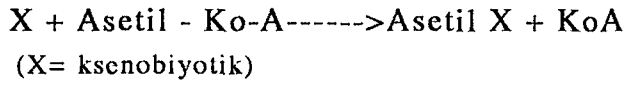
Glutasyon konjugeleri ekskresyon öncesi daha ileri metabolizasyona uğrarlar. Glutasyona ait glutamil ve glisinil grupları spesifik enzimler tarafından uzaklaştırılır. Ve geri kalan sisteinil kısmının amino grubuna asetil Ko-A dan sağlanan bir asetil grubu eklenir. Sonuçta meydana gelen bileşik idrarla atılıma uğrayan 1-asetil sisteinin konjugesi olan merkaptürik asittir (Şekil 2.1.) (32, 33, 36).





Şekil 2.1. Glutatyon konjugatları biotransformasyonu.

-Çok önemli faz II reaksiyonlarından ikisi ise asetilasyon ve metilasyondur. Asetilasyon



Ksenobiyotiklerin çok az bir kısmı ise, metil donörü olarak S-adenozil metiyonin kullanan metil transferazlar ile metilasyona uğrarlar.

Ksenobiyotik metabolizmasında faz I ve faz II nin baştan sona amacı, ksenobiyotiklerin sudaki çözünürlüklerini artırmak ve böylece vücuttan atılmalarını kolaylaştırmaktır (21, 35).

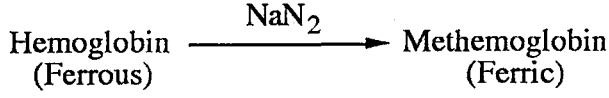
Bazı durumlarda, Faz I metabolik reaksiyonları ile ksenobiyotikler inaktif formdan biyolojik aktif bileşikler haline dönüştürülürler. Bu durumdaki ksenobiyotiklere proilaçlar ve prokarsinojenler denilir. Bazı durumlarda ise konjugasyon öncesi ilave faz I reaksiyonları sayesinde aktif bileşikler daha az aktif veya inaktif şekillere dönüştürülürler. Daha başka durumlarda ise faz I reaksiyonlarının aktif ürünleri bizzat konjugasyon reaksiyonları aracılığı ile, daha sonra idrar veya safra ile atılıma uğrayan az aktif veya inaktif türlere dönüşürler. Bazı nadir durumlarda ise konjugasyon bir ksenobiyotiğin biyolojik aktivitesini artırabilir (21, 35, 39).

### 2.3.1.Nitrat, Nitrit, Nitrozaminler

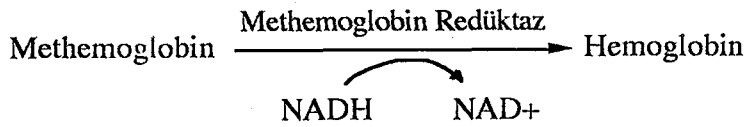
Nitratlar doğada, özellikle toprağın verimliliği açısından gereklidir. Nitrat toksik değildir, fakat yiyeceklerdeki nitratlar insan infantının gastrointestinal traktında bakteriyel hareketlerle nitrite redüklenir. Nitritin direk toksik hasarı söz konusu olabileceği gibi, sekonder ve tersiyer aminlerle redüksiyonu ile N-nitroso bileşiklerine dönüşebilir (3, 26, 46, 49).

Hemoglobinin ferrous formdan, ferrik forma dönüşerek

methemoglobini oluşturmasında nitritin direk toksik etkisi önemlidir. Bu reaksiyon irreversible olup şoyledir.



Hemoglobinin ferrous durumda muhafaza edilmesi bazı fizyolojik faktörlere bağlıdır. NADH methemoglobin redüktaz enzimi bunu sağlar(46).



Her ne kadar nitrat ve nitritler toksikolojik bir problem yaratıyorsa da esas problem karsinojen olan nitrozamin bileşiklerine dönüşmesiyle oluşur (4, 9, 43).

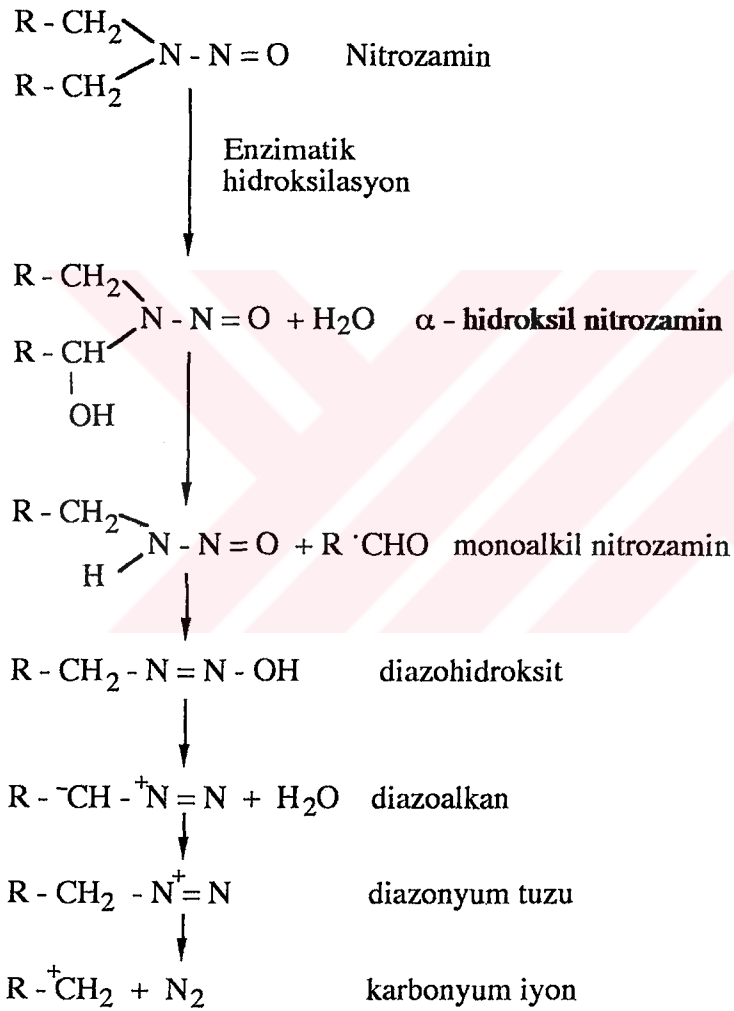
N-nitroso bileşikleri toksik, teratojenik, mutajenik ve karsinojeniktir (5, 15). N-nitroso bileşiklerinin kimyasal stabilitesi ve strüktürü onların organ etkilerinde önemli rol oynar. Birçok dialkil, siklik nitrozaminler kimyasal olarak stabil moleküllerdir. Metabolizmaları tarafından aktif, toksik, mutajenik ve karsinojenik metabolitlere çevrilirler (15, 28, 46).

Nitrozaminlerin karsinojenik aktivitesi, karaciğer kanserini oluşturur, fakat diğer spesifik dokulardaki tümörleri de oluşturur. Örneğin metil-bütil nitrozamin, diğer asimetrik nitrozaminler gibi, içme suyu veya inhalasyonla verildiğinde özafagus kanserlerini, di-n-bütil nitrozamin mesane kanserlerini, tek doz dimetil nitrozamin rat böbreğinde mezanşimal tümörleri, tek doz dietil nitrozamin rat böbreğinde epitelial tümörleri meydana getirebilirler. Bu olay nitrozamin metabolitlerinin değişik dokularda aktif formlara metabolize olma kapasitesine bağlıdır. Örneğin hamster ratlarda DEN metabolizması akciğer kanseri oluşmasında daha

aktiftir (14, 27, 42, 46).

İnsan yiyeceklerinde renk ve tazeliğin korunmasında kullanılan nitratların, toksik miktarlarının kanser oluşumunu dietteki aminlerin nitrozasyonu ile stimüle ettiği bildirilmiştir (3, 46, 49).

### 2.3.2. Nitrozaminlerin metabolizması



Şekil 2.2. Nitrozaminlerin aktif karsinojene transformasyonu

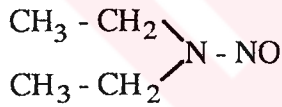
Nitrozaminler enzimatik hidroksilasyon reaksiyonları ile alkilleyici ajanlara dönüşürler. Bu aktif alkilleyici ajanlar, diazo alkan, diazonyum tuzu veya karbonyum iyonu olabilir. Şekildeki R grupları alkil grupları

olup, ekseriya metil veya etildir. Hücre içinde dimetil nitrozamin potent bir karsinojendir (Şekil 2.2) (15, 30, 47).

#### 2.4. Dietil Nitrozamin

İnsektisitlerden, zirai kimyasallardan ve nitritten, çeşitli nitrozolu bileşiklerin oluştuğu saptanmıştır. Bu bileşiklerden birisi de dietil nitrozamindir. Dietil nitrozamin çevre kirleticisi olarak doğada yaygın olarak bulunur, sigara ve besin maddelerinde de mevcuttur (5, 23, 25, 26, 52). Midede ve fizyolojik koşullarda nitritin sekonder ve tersiyer aminlerle reaksiyona girmesi sonucu oluşur (22, 26, 46).

Dietil nitrozaminin kimyasal yapısı şöyledir:



Dietil nitrozamin de diğer birçok nitrozaminler gibi enzimatik hidroksilasyon reaksiyonları ile alkilleyici ajanlar olan diazoalkan, diazonyum tuzu veya karbonyum iyonuna dönüşürler. Fakat bunlardan hangisi olduğu kesin değildir (15, 16, 52).

Dietil nitrozaminler elektrofilik maddelerdir. Bu nedenle nükleik asit ve proteinlerdeki nükleofilik atomlara bağlanırlar. Karsinojenik elektrofiller tarafından proteinlerde değişikliğe uğratılan nükleofilik atomlar, methionin ve sisteindeki kükürt, histidindeki halka azotu ve tirozindeki 3. karbon atomu olarak tesbit edilmiştir (5, 7, 16).

Dietil nitrozamin dokularda, mikrozomal karışık fonksiyonlu oksidazlar tarafından mutajenik aktif ara ürünlere çevrilmektedir. Dietil nitrozamin, DNA ve RNA da alkilasyon yapmakta ve protein sentezini inhibe etmektedir (16, 25, 34). DEN'in insan lenfosit kromozomlarında kırık ve poliploidi oluşturduğu, ratlarda böbrek ve karaciğer kanserine

neden olduğu gösterilmiştir (7, 23, 44). Fare testisinde DNA sentezini inhibe ettiği, DNA polimeraz enzimlerinde ardışık değişiklikler oluşturduğu bildirilmiştir (12, 23, 44).

Hücre metabolizmasında santral pozisyonu daima nükleik asitlerin alkilasyonuna odaklanmıştır. Ortak nokta guaninin N-7 pozisyonuna atak yapılır. Guaninin O<sup>6</sup> pozisyonun alkilasyonu DNA baz çiftleşmesinde ilginçtir. Bununla birlikte karsinogenik aktivite ile O<sup>6</sup> guaninin alkilasyonu arasındaki korelasyon yeterli değildir (31, 46, 47).

## 2.5. Reaktif Oksijen Özellikleri

Aerobik organizmalar için serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Oksijenin redüksiyonu ve aerobik hücrelerin enzimatik oksidasyonu sırasında negatif yüklü bir ara ürün olan superoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) açığa çıkar. Bu radikal superoksit dismutaz enziminin katalizi ile hidrojen peroksite çevrilir.



Yine superoksit radikalinin yer aldığı bir dizi reaksiyon sonucu özellikle mitokondri içinde hidroksil radikali (OH<sup>-</sup>) oluşur (8, 29).

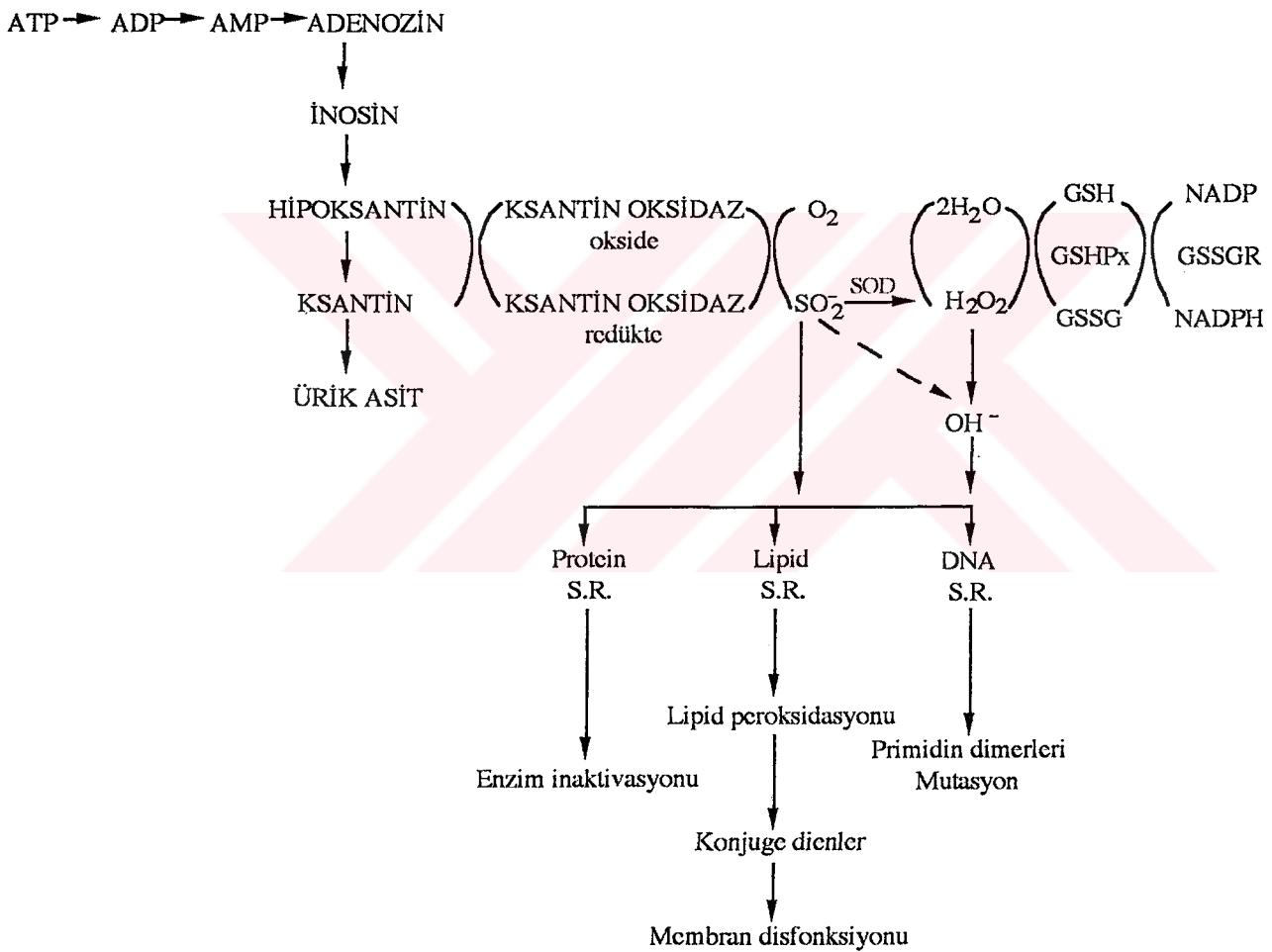
Normal metabolizmanın yanısıra hiperoxia, inflamasyon, radyasyonla artan oksijen metabolizması, superoksit, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit oluşumunu artırır (Şekil 2.3.) (8, 45).

Serbest radikallerin oluşumundan sonra bazı hücresel komponentler risk altına girerler. Bunlar proteinler, lipidler ve DNA dır. Proteinlerin serbest radikal hasarından ne derece etkileneceği aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Proteinin hücresel lokalizasyonu ve radikalın toksisite gücüne göre protein harabiyetinin boyutları değişebilir.

Nükleik asitler ve DNA: Radyasyonla hücre içinde enerji

depolanması sonucu iyonlar, serbest radikaller ve aktif moleküller meydana gelir. İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyon ve ölüme yol açarlar.

Membran kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon oluştururlar. Bu konjuge dien oluşumuna neden olur. Bütün bunlar membran disfonksiyonu ile sonuçlanır (8, 11, 45).



Şekil 2.3. Serbest radikaller ve mekanizması.

## 2.6. Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu, kanser, inflamatuvar hastalıklar, ateroskleroz, yaşlanma gibi durumlara neden olabilen doku hasarından sorumludur. Metilen ile kesintiye uğramış çift bağları içeren yağ asitlerinin peroksitlerin oluşumu sırasında meydana gelen serbest radikaller ( $ROO^-$ ,  $RO^-$ ,  $OH^-$ ) tarafından zararlı etkiler başlatılır. Lipid peroksidasyonu bir zincir reaksiyonu olup daha ileri peroksidasyonu başlatan serbest radikaller için de devamlı bir kaynak sağlar (11, 35).

Serbest radikallerin etkisiyle bir H atomunu kaybeden yağ asidi zinciri radikal niteliğini kazanır. Böylece oluşan lipid radikali ( $L^*$ ) dayanıksız bir bileşik olup bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağ aktarılmasıyla dien konjugatları, daha sonra lipid radikalinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikali oluşur. Lipid peroksit radikalleri, zar yapısındaki doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumunu sağlamakta, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine dönüşür ( $LOOH$ ). Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin, aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile sona erer. Bu bileşiklerden biri olan malonildialdehit lipid peroksidasyonunun saptanmasında kullanılmaktadır (11, 18, 37).

## 2.7. Antioksidan Defans

Hücreleri serbest radikal hasarından koruyan çeşitli sitoplazmik temizleyiciler ve enzimler vardır. Bunları iki grupta toplamak mümkündür.: Nonenzimatik ve enzimatik defans mekanizmaları. Bunların genel bir özeti çizelge 2.2.da gösterilmiştir.



Çizelge 2.2. Biyolojik sistemlerde antioksidan defans.

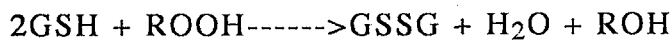
Nonenzimatik	Enzimatik
$\alpha$ - Tokoferol (Vitamin E)	Superoksit dismutaz (SOD)
Askorbat (Vitamin C)	Glutatyon peroksidaz
Glutatyon (GSH)	Katalaz
Flavanoidler	NADPH-kinaz-okside redüktaz
Bazı kimyasallar	Epoksit hidrolaz
$\beta$ - Karoten	Konjugasyon enzimleri (Glutatyon -S- transferaz vs.)
Urat	Glutatyon redüktaz
Bazı plazma proteinleri	NADPH'ya bağlı bazı enzimler (G6FD)

### 2.7.1.Enzimatik defans

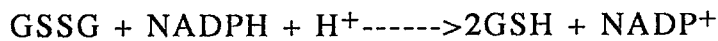
Bunların en önemlileri superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz, glutatyon redüktazdır.

Glutatyonun çoğu redükte formdadır (GSH) ve bu bileşik serbest radikalleri indirgeyebilir.

Hücre içinde glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzimleri ile katalizlenen bir redoks siklusu vardır. Glutatyon peroksidaz, peroksit redüksiyonunu katalizler. Glutatyonun peroksitler ile reaksiyonundan okside glutatyon (GSSG) oluşur.



GSSG glutatyon redüktaz enziminin katalizi ile yeniden indirgenir.



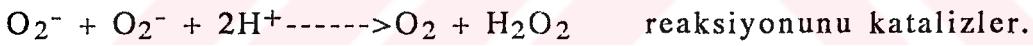
Bu enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar ile (GSH/GSSG) (500/1) oranı korunur. Bu oran Hücrelerin oksidatif hasardan korunmasında önemli bir rol oynar. Katalaz, benzer şekilde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nin parçalanmasından sorumlu bir diğer enzimdir (35, 45).

Antioksidan sistemi enzimleri denen bu enzimlerden başka bazı moleküller serbest radikalleri etkileyerek daha az toksik forma indirgerler.

### 2.7.1.1. Superoksit dismutaz (SOD:EC.1.15.1.1)

Memeli dokularında ilk kez 1969 da Mc-Cord ve Fridovich tarafından bulunmuştur. İlk belirlenen formu Cu-Zn-SOD dır. Molekül ağırlığı 33.000 olup non-kovalent olarak bağlanmış iki alt üiteden oluşur. İki Cu, iki Zn atomuna sahiptir. Mn-SOD izoenzimi daha sonra gösterilmiştir. Bu izoenzim non kovalent bağlı 4 alt üiteden oluşur. Cu-Zn-SOD hem sitozolde, hem de mitokondride bulunurken Mn-SOD sadece mitokondride bulunur (8, 19).

Serbest oksijen radikallerine karşı enzim sistemlerinden olan SOD:



Ancak burada oluşan hidrojen peroksit organizma için son derece toksik ve tehlikeli bir madde olduğundan katalaz ve peroksidaz enzim sistemleri ile ortadan kaldırılır (18).

### 2.7.2. Nonenzimatik defans

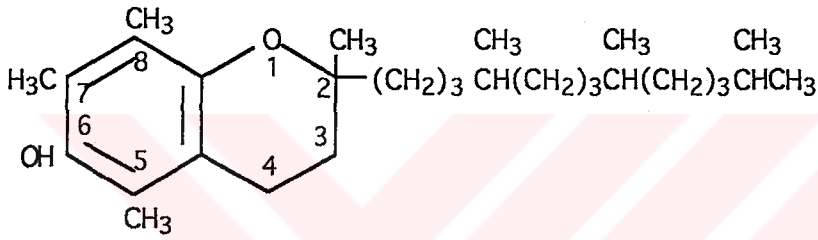
Askorbat suda çözünebilir bir redüktan ve radikal temizleyici olup, ayrıca tokoferolleri indirgenmiş aktif formda tutar. β-karoten de lipid peroksidasyonunu önler. Şekerler, doymamış amino asitler, sülfür içeren amino asitler, doymamış yağ asitleri ve E vitamini ile GSH dan özellikle söz etmek gerekir.

GSH nonenzimatik defansta çok önemlidir. Hücrelerin lipid

peroksidasyonundan, dolayısıyla serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmasında rolü vardır.

GSH, eritrosit metabolizmasında çeşitli proteinlerin, örneğin hemoglobin, katalaz ve hücre zarındaki lipoproteinlerin sulfhidril gruplarını koruyucu olarak önemli rol oynar. Redükte glutatyon non spesifik redüksiyon ajanıdır ve oksidasyon mekanizmalarında önemli görev üstlenmiştir (13, 45).

### 2.7.2.1. E Vitamini



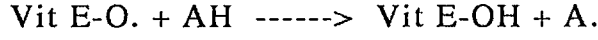
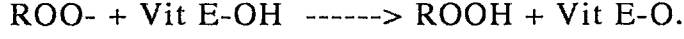
Şekil 2.4.  $\alpha$  - 5,7,8, Trimetil Tokol ( $\alpha$ -tokoferol)

Bitkilerde sentez edilen E vitamini hidroksi 6-kroman türevleridir. Bunlar doğada yan zinciri doymuş olan tokoferoller halinde ya da yan zinciri doymamış olan toko-tri-enollerdir. Tokoferoller arasında en fazla biyolojik aktivite gösteren alfa tokoferol olup, diğerleri beta, gamma, lamda ve sigma tokoferoldür. Tokoferoller 6 nolu karbon atomuna bağlı hidroksil grubundan dolayı stabil değildir, asetat türevine dönüşerek daha stabil hale gelirler. Ester türevi antioksidan aktivite göstermez, organizmada esterazlar tarafından hidroliz edilerek tokoferollere çevrilir (35).

E vitamininin biokimyasal fonksiyonu tam bir açıklığa kavuşturulamamış olmakla birlikte, en fazla üzerinde durulan özelliği antioksidan oluşudur.

E vitamini, in vivo olarak meydana gelen serbest radikalleri yakalayarak, onların dokulardaki doymamış lipidlerle meydana getireceği

peroksidasyon reaksiyonlarından korur (8, 24).



Moleküler çalışmalar, E vitamini molekülünün yan zincirinde bulunan 4 ve 8 nolu karbon atomları ile zarlara bağlı fosfolipidlerdeki araşidonik asidin stabil bir kompleks oluşturabileceğini göstermiştir. Biyolojik membranların değişmez lipid komponenti olan E vitamininin yağda çözünebilirlik özelliği, bu vitaminin bilinen en önemli fonksiyonuyla doğrudan ilişkilidir. Membran lipidlerinin peroksidasyonunda inhibitör olarak davrandığı bilinen E vitamini kolesterole benzer şekilde biyolojik membranların komponentlerinin moleküler mobilitesini kısıtlayarak ya da potansiyel olarak toksik olan poliansatüre yağ asitlerini peroksidasyondan korurken, hem olmayan demiri içeren proteinlerin oksidasyonunu da önler. Lipidlere bağlı araşidonik asitle kompleks teşkil ederek zarların yapısına giren E vitamini, hücre ve hücre zarlarında bulunan uzun zincirli doymamış yağ asidi, özellikle araşidonik asit içeren zarların geçirgenliklerini azaltması, zarlara bağlı fosfolipidlerin in vitro fosfolipaz tarafından bozunmasını önlemesi gibi önemli özelliklere sahiptir (10).

### 3. G E R E Ç V E Y Ö N T E M

#### 3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışma Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalında gerçekleştirildi. Çalışma materyalimiz olan erkek Wistar ratlar Anabilim Dalımız Hayvan laboratuvarından sağlandı.

8 er hayvandan oluşan 3 grup teşkil edildi. 1. grup kontrol grubu idi ve bu gruba diğer gruplarla eşdeğer miktarda serum fizyolojik intraperitoneal olarak enjekte edildi. 2. gruba tek doz 200 mg/kg olmak üzere DEN (dietyl nitrozamin) intraperitoneal olarak verildi. 3. grup ise tedavi grubu idi ve 200 mg/kg DEN ile birlikte 300 mg/kg GSH (Redükte glutatyon) intraperitoneal olarak enjekte edildi. Bu hayvanların 1. 24. 48. 72. 96. saatlerde intra kardiak olarak heparinli tüplere kanları alındıktan sonra dekapite edilerek öldürüldü. Sonra karaciğer ve böbrek dokuları alındı. Dokular 3 defa serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra bir kısmı formal içine alınarak histolojik inceleme için ayrıldı.

Bu ayrılan karaciğer ve böbrekler %10 luk nötral formalinde 24 saat tesbit edildikten sonra artan dereceli alkollerde dehidrate edilip parafine gömüldüler. 5 µ luk kesitler, hematotoksilen eosin ile boyandılar. Kesitler incelenerek olympus PMIO-ADS fotomikroskop ile mikrofotoğrafları çekildi.

Kalan diğer dokular ise çalışmaya kadar -25°C da Bosch marka derin dondurucuda muhafaza edildi.

Kanlar alındıktan hemen sonra santrifüj edilerek Malonil dialdehit ölçümleri için plazmaları ayrıldı. Kalan kanlar 3 defa %0.9 luk serum fizyolojik ile yıkanarak eritrosit paketi hazırlandı. Bu eritrosit paketinden hemoglobin ölçümleri yapıldı. SOD ve E vitamini için eritrosit

hemolizatları hazırlandı. Bu plazma ve hemolizatlar çalışmaya kadar  $-25^{\circ}\text{C}$  da saklandı.

### **3.1.1.Hemolizat Hazırlanması**

Plazması ayrılan ve serum fizyolojik ile yıkanan eritrositlerden hemoglobin ölçümü Drabkin yöntemi ile belirlendi. Bu eritrosit paketinden 0.5 ml alınarak 3.5 ml soğuk distile su 1.0 ml etanol ve 0.6 ml kloroform eklenerek kloroform-etanol ekstraksiyonu uygulandı. Daha sonra 3000 rpm. de 10 dakika santrifüj edilerek üstteki berrak kısım ayrıldı.

### **3.1.2.Doku homojenatlarının hazırlanması**

Bunun için dokular küçük parçalara ayrıldı, sonra homojenize edildi. 2000 g de santrifüj edilerek homojenatlar ayrıldı. Bu homojenatlardan MDA, SOD ve Vit E ölçümleri ile protein miktar tayini yapıldı. Protein tayini Biüret yöntemi ile belirlendi (48).

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1.Malonil dialdehit ölçümü**

Malonil dialdehit lipid peroksidasyonunun sekonder bir ürünü olup, lipidlere ait peroksidasyonun belirlenmesinde en çok kullanılan parametrik birimdir.

Bu çalışmada Okhawa ve arkadaşlarının yöntemi modifiye edilerek uygulandı (40). Bu yöntemin esası MDA nın Tiyobarbitürik asitle verdiği renk reaksiyonunun optik dansitesinin ölçümüne dayanır. Bunun için önceden hazırlanan plazma örnekleri ve homojenatlar, sodyum dodesil sulfat, %20 asetik asit pH:3.5, %0.8 TBA içeren ortamda 60 dakika  $90^{\circ}\text{C}$

da kaynatıldı. Butanol-piridin ekstraksiyonu ile ayrılan berrak üst kısmın 532 nm. de köre karşı verdiği absorbanlar ölçüldü. Lipid peroksit standardı olarak 1.1.3.3. tetraetoksipropan kullanıldı.

Sonuçlar nmol/ml MDA olarak belirlendi. Dokularda ise nmol/mg protein olarak hesaplandı.

### 3.2.2.SOD aktivitesinin belirlenmesi

SOD aktivitesi Winterbourn ve arkadaşlarının geliştirdikleri, temeli Beauchamp ve Fridovich'in metoduna dayanan yöntem uygulanarak tayin edildi (51).

Yöntemin esası fotoredükte riboflavin ile oksijenin reaksiyonundan açığa çıkan superoksit radikalının Nitro Blue Tetrazolium'u (NBT) redüklemesinin SOD enzimi tarafından engellenmesi esasına dayanır.

0.1 M EDTA+NaCN, 1.5 mM NBT, 0.12 mM riboflavin ve 3 ml hacme tamamlanmak üzere M/15 (pH=7.8) fosfat tamponu kullanılan reaktiflerdi. Tüpler çalkalandıktan sonra 15 dakika uniform aydınlatmaya maruz bırakıldı. Sonra 560 nm de optik dansiteler belirlendi. SOD enzim miktarı Ü/gr.Hb olarak, dokularda ise Ü/mgr.protein olarak hesaplandı.

### 3.2.3.E Vitamini Ölçümü

Örneklerimizde E vitamini düzeyleri Hashim'in yöntemi uygulanarak tayin edildi (20). Bu yöntemin prensibi  $\alpha$ - tokoferolun, demir (+++) iyonlarını, demir (++) iyonları haline redükleyerek, bunların da TPTZ (2,4,6 Tripyridyl-S-triazine) ile oluşturdukları renkli mavi-menekşe kompleksin spektrofotometrik değerlendirilmesine bağlıdır. Örneklerle eklenen absolu etanol, ksilen ve distile su ile 6 ml lik hacim 2000 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek en üstteki berrak ksilen tabakası üzerine TPTZ ve FeCl<sub>3</sub> eklenerek 600 nm de optik dansiteler hemen okundu. Standart

olarak  $\alpha$ -tokoferol (%1 mg) kullanıldı. Hemolizat E vitaminleri mg/gr Hb, homojenatlarda ise mg/gr protein olarak hesaplandı.

Tüm spektrofotometrik ölçümlerde UV-120 Shimadzu spektrofotometri kullanıldı.

### **3.3. İstatistiksel Analiz**

Tüm istatistiksel değerlendirmeler, tek yönlü varyans analizi ve Tukey-W testinin birlikte kullanılmasıyla yapıldı (41).





## 4. B U L G U L A R

### 4.1. Biyokimyasal Bulgular

#### 4.1.1. Plazma ve eritrosit

Kontrol grubu ile DEN verilen grup ve DEN+GSH verilen grup arasındaki plazma MDA değerleri Ek izelge 1 de ve istatistiksel verileri ise izelge 4.1. de gösterilmiştir.

Buna göre 24. ve 96. saatlerde DEN verilen grupta istatistiksel olarak önemli düzeyde artış gözlendi ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ).

Eritrosit SOD aktivitesi değerlerinde (Ek,izelge 2) 1., 48., 96. saatlerde anlamlı bir fark yoktu. Buna karşın 24. saatte kontrol grubu ile kıyaslandığında DEN verilen grupta ( $p<0.05$ ) düzeyinde anlamlı düşme saptandı. 72. saatte DEN+GSH verilen grupta önemli düzeyde artış vardı ( $p<0.01$ ) (izelge 4.2.).

Eritrosit E vitamini düzeylerinde 24. ve 72. saatlerde DEN verilen gruplarda anlamlı düzeyde azalma gözlendi ( $p<0.05$ )(Ek-izelge 3). Fakat 96. saat E vitamini bulgularımız, kontrol grubu ile kıyaslandığında diğer gruplarda artış görüldü ( $p<0.01$ ) (izelge 4.3.).

#### 4.1.2. Karaciğer dokusu

İncelediğimiz rat karaciğerlerinde llen MDA, SOD ve Vit E değerleri Ek-izelge 4'de ve istatistiksel bulguları izelge 4.4 te gösterildi. Buna göre MDA düzeyleri kontrol grubuna göre DEN ve DEN+GSH gruplarında önemli derecede artış gösterdi ( $p<0.05$ ).

Superoksit dismutazın karaciğerdeki istatistiksel incelenmesinde DEN verilen grubun kontrol grubuna göre önemli oranda düştüğü görüldü ( $p<0.001$ ).

E vitamininde karaciğerde, tedavi grubunda (DEN+GSH) önemli düzeyde düşme gözlemlendi ( $p<0.05$ ).

#### **4.1.3. Böbrek Dokusu**

Rat böbreklerinde de MDA, SOD ve E vitamini düzeyleri ölçüldü (Ek-Çizelge 5). Kontrol grubu ile DEN verilen grup ve DEN+GSH verilen grup arasındaki istatistiksel değerlendirmeler çizelge 4.5 te gösterildi. Bu tabloda görüldüğü gibi MDA düzeylerinde gruplar arasında DEN verilen grupta ılımlı bir artma olmakla birlikte istatistiksel bir fark yoktu ( $p>0.05$ ).

Böbrek SOD verilerinde ise kontrol grubuna göre DEN verilen grupta önemli düzeyde düşme gözlenirken ( $p<0.01$ ) DEN+GSH verilen grupta artış gözlemlendi ( $p<0.01$ ).

Böbrek Vit E değerleri ise DEN verilen grupta kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli derecede artmıştı ( $p<0.01$ ).

Çizelge 4.1. Plazma MDA istatistik değerleri (nmol/ml  $\pm$  SH)

KAN ALMA ZAMANI GRUPLAR	n	1. Saat	24. Saat	48. Saat	72. Saat	96. Saat
KONTROL	8	3.45 $\pm$ 0.08	2.72 $\pm$ 0.10	3.19 $\pm$ 0.08	3.58 $\pm$ 0.21	3.36 $\pm$ 0.13
DEN Verilen GRUP	8	3.6 $\pm$ 0.20	3.0 $\pm$ 0.12	3.24 $\pm$ 0.11	3.52 $\pm$ 0.09	4.05 $\pm$ 0.09
DEN + GSH Verilen GRUP	8	3.3 $\pm$ 0.17	2.62 $\pm$ 0.09	3.01 $\pm$ 0.15	3.11 $\pm$ 0.18	3.62 $\pm$ 0.15
Kontrol ile DEN		p>0.05	p<0.05	p>0.05	p>0.05	p<0.01
Kontrol ile DEN+GSH		p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
DEN ile DEN+GSH		p>0.05	p<0.05	p>0.05	p>0.05	p<0.01

Çizelge 4.2. Eritrosit SOD istatistik değerleri (ü/gr. Hb±SH)

KAN ALMA ZAMANI GRUPLAR	n	1. Saat	24. Saat	48. Saat	72. Saat	96. Saat
KONTROL	8	4051±90.24	3768±144.38	4384±188.5	3860±87.6	4363±132.3
DEN Verilen GRUP	8	4352±251.9	3204±185.4	4186±244.3	3742±98.2	4123±129.9
DEN + GSH Verilen GRUP	8	4784±251.45	3842±63.3	4508±288.8	4216±69.55	4346±132.5
Kontrol ile DEN		p>0.05	p<0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Kontrol ile DEN+GSH		p>0.05	p>0.05	p>0.05	p<0.01	p>0.05
DEN ile DEN+GSH		p>0.05	p<0.05	p>0.05	p<0.01	p>0.05

Çizelge 4.3. Eritrosit E vitamini istatistik değerleri (mg/g Hb ± SH)

KAN ALMA ZAMANI GRUPLAR	n	1. Saat	24. Saat	48. Saat	72. Saat	96. Saat
		KONTROL	8	0.232±0.001	0.220±0.001	0.213±0.002
DEN Verilen GRUP	8	0.231±0.003	0.214±0.001	0.210±0.002	0.214±0.001	0.221±0.004
DEN + GSH Verilen GRUP	8	0.233±0.002	0.219±0.001	0.210±0.002	0.216±0.001	0.224±0.001
Kontrol ile DEN		p>0.05	p<0.05	p>0.05	p<0.05	p<0.01
Kontrol ile DEN+GSH		p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p<0.01
DEN ile DEN+GSH		p>0.05	p<0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05

Çizelge 4.4. Karaciğer dokusu MDA, SOD ve Vit E değerleri istatistik sonuçları  
(Ortalama  $\pm$  SH)

PARAMETRE GRUPLAR	n	MDA (nmol/mg prot.)	SOD Ü/mg prot.)	Vit E (mg/gr prot.)
KONTROL	8	0.66 $\pm$ 0.07	5.67 $\pm$ 0.2	1.73 $\pm$ 0.07
DEN Verilen GRUP	8	0.98 $\pm$ 0.07	3.81 $\pm$ 0.2	1.70 $\pm$ 0.08
DEN + GSH Verilen GRUP	8	0.92 $\pm$ 0.08	5.51 $\pm$ 0.1	1.48 $\pm$ 0.05
Kontrol ile DEN		p<0.05	p<0.001	p>0.05
Kontrol ile DEN+GSH		p<0.05	p>0.05	p<0.05
DEN ile DEN+GSH		p>0.05	p<0.001	p<0.05

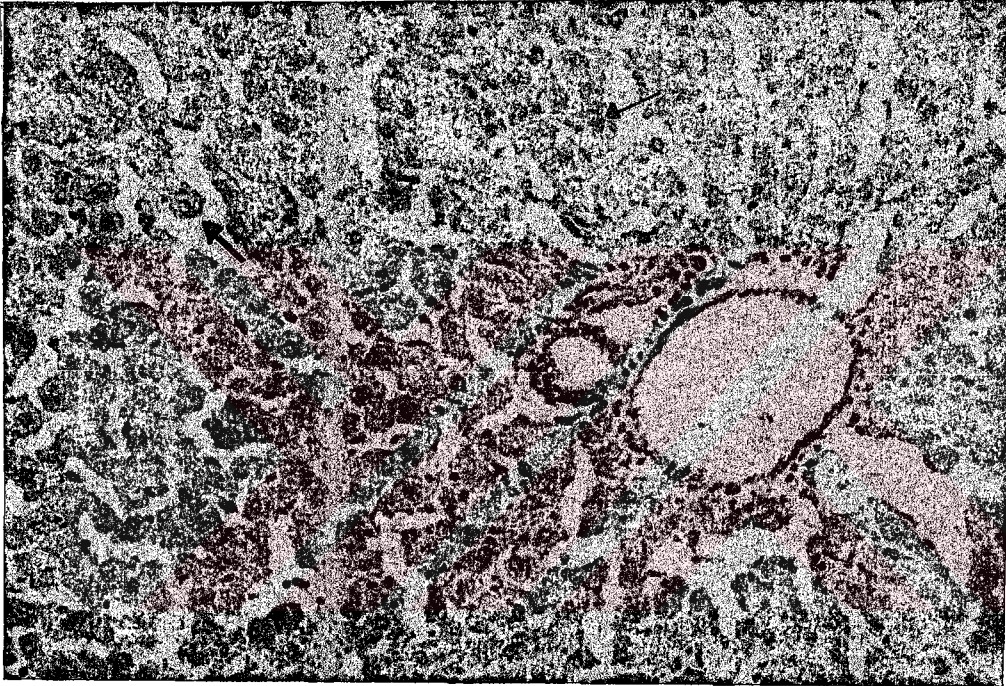
Çizelge 4.5. Böbrek dokusu MDA, SOD ve Vit E değerleri istatistik sonuçları  
(Ortalama  $\pm$  SH)

PARAMETRE GRUPLAR	n	MDA (nmol/mg prot.)	SOD (Ü/mg prot.)	Vit E (mg/ g prot.)
KONTROL	8	0.55 $\pm$ 0.05	4.90 $\pm$ 0.13	1.24 $\pm$ 0.05
DEN Verilen GRUP	8	0.67 $\pm$ 0.04	3.51 $\pm$ 0.14	1.56 $\pm$ 0.04
DEN + GSH Verilen GRUP	8	0.53 $\pm$ 0.03	5.82 $\pm$ 0.15	1.09 $\pm$ 0.04
Kontrol ile DEN		p>0.05	p<0.01	p<0.01
Kontrol ile DEN+GSH		p>0.05	p<0.01	p<0.01
DEN ile DEN+GSH		p>0.05	p<0.001	p<0.001

## 4.2. Mikroskopik Bulgular

### 4.2.1. Karaciğer dokusu

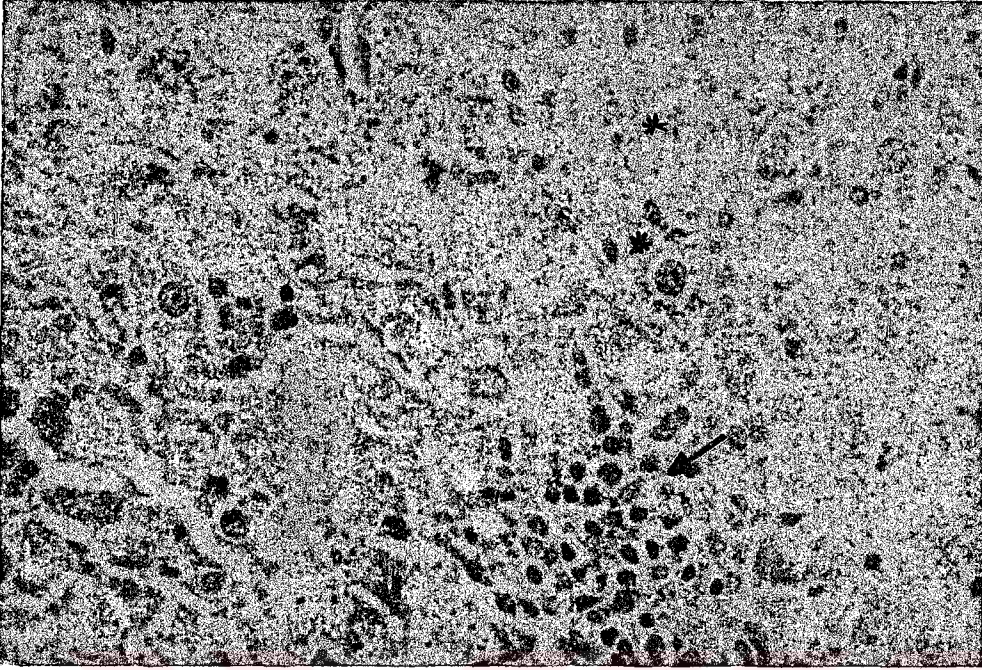
**Kontrol grubu :** Kontrol grubu karaciğer kesitlerinde normal histolojik yapı görüldü (Şekil 4.1.).



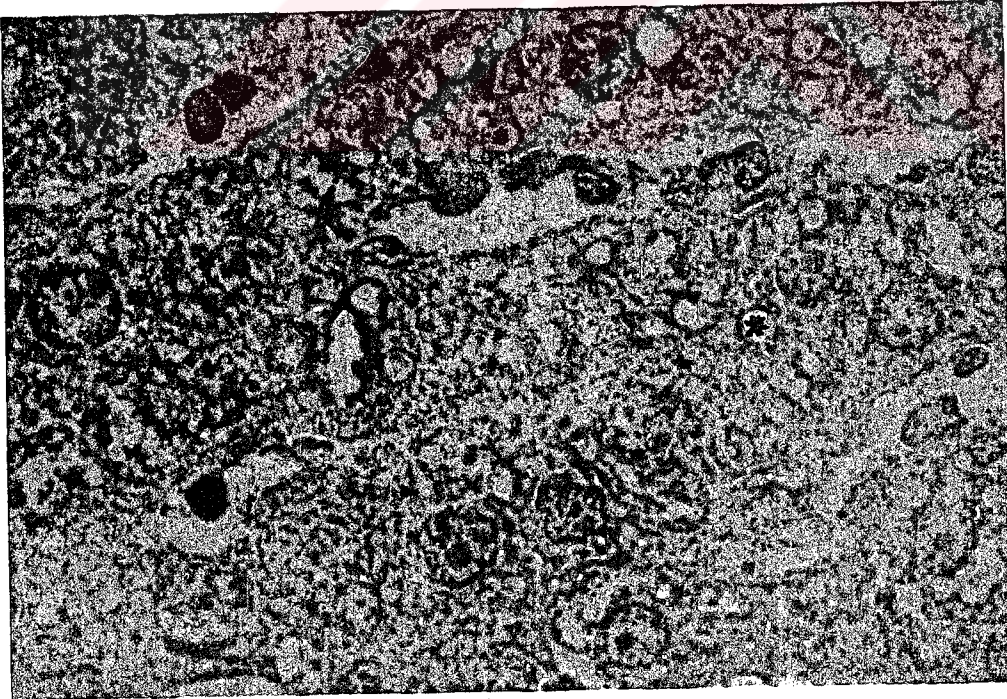
Şekil 4.1. Kontrol karaciğer dokusunda normal histolojik yapı  
(--->) : Hepatositler H.E. X 64

**DEN verilen grup :** Bu grup karaciğer dokusunda yoğun hidropik dejenerasyonlu, ve piknotik çekirdekli ve hatta nekroze olmuş hepatositlere rastlandı. Bazı hepatositlerde yağlı dejenerasyonda görülmüyordu. Karaciğerdeki ışınal yapının yer yer bozulduğu gözlemlendi. Hücre infiltrasyonlu bölgeler tespit edildi. Hiperemik damarlara rastlandı. Dokudaki bozukluklar genel olarak yaygın hidropik dejenerasyon şeklinde görülmüyordu. İntersellüler alanlarda genişlemeler yoğun olarak vardı (Şekil 4.2., 4.3.).





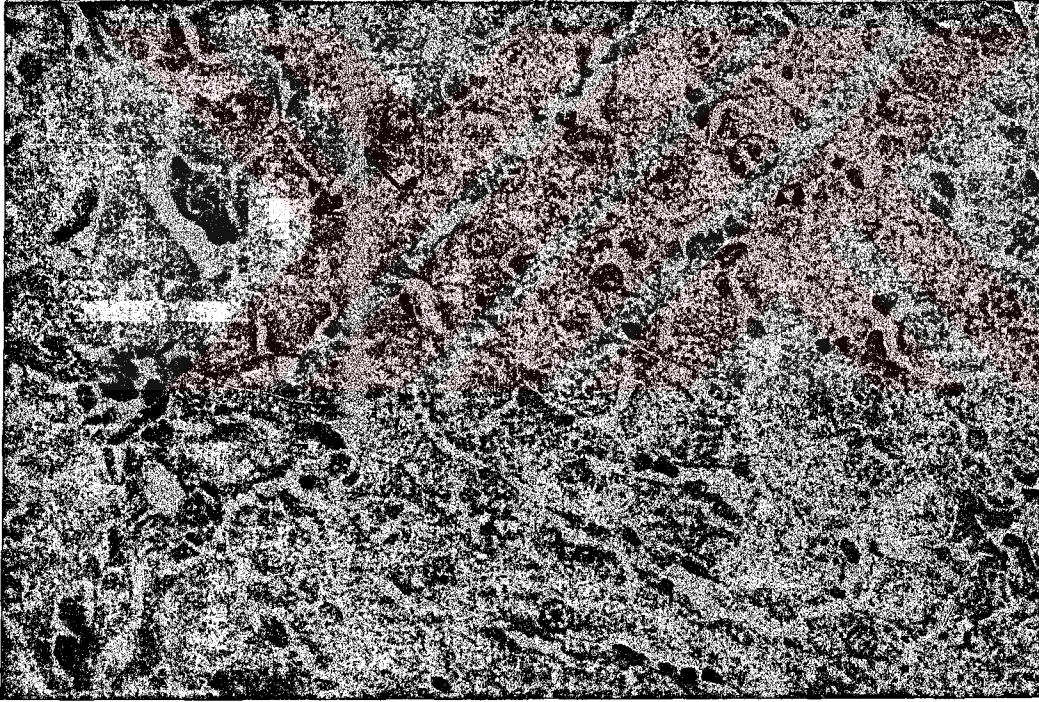
Şekil 4.2. DEN verilen grup karaciğer dokusunda yoğun hidropik dejenerasyonlu hücreler (\*) ve nekrotik alan (--->) görülmekte. H.E X 132



Şekil 4.3. DEN verilen grupta karaciğer hücrelerindeki lipid birikimi (\*). H.E X 320



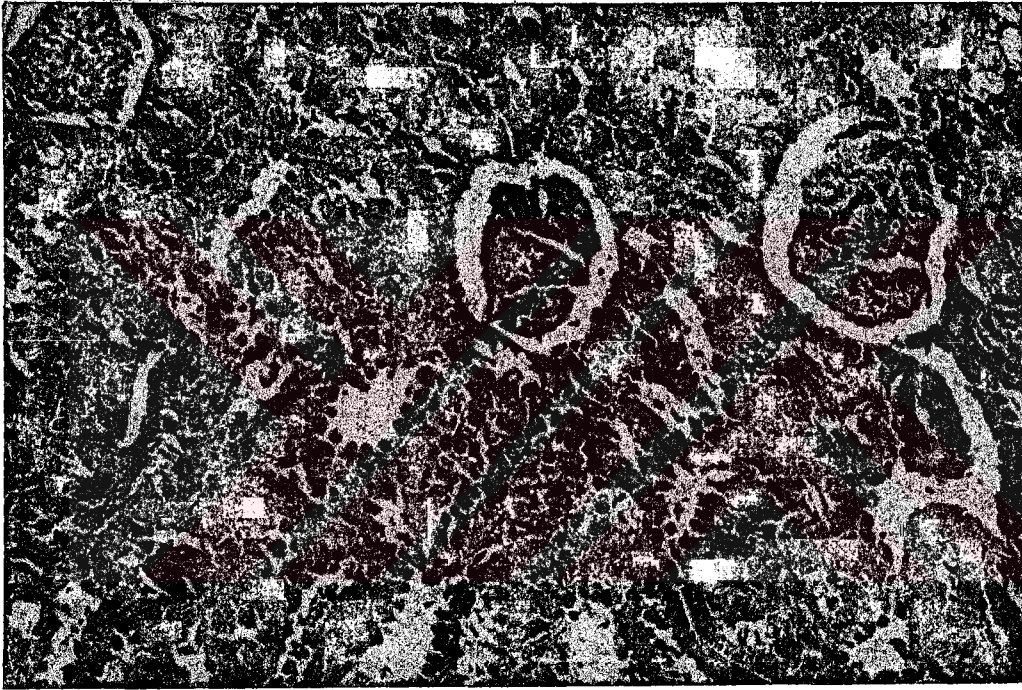
**DEN+GSH verilen grup :** Bu grubu incelediğimizde dokudaki hiperemik damarlar dikkatimizi çekti. DEN+GSH verilen bu grup karaciğerde, DEN grubuna göre yağlı dejeneratif bozuklukların kaybolduğu gözlemlendi. Ancak hidropik dejeneratif değişikliklerin yer yer devam ettiği görülmüyordu. Bu grup karaciğerlerinde bozuklukların bu düzeyde olmasına rağmen hücre sınırları seçilebilmekteydi. Az miktarda hücre infiltrasyonu da vardı. Sonuç olarak normal karaciğer hücrelerine rastlamış olmamıza rağmen genelde GSH'nın karaciğerde tamamen düzelmeye neden olmadığını görüyoruz (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. DEN + GSH verilen grup karaciğer dokusunda yağlanmanın ortadan kalktığı, normal (--->) karaciğer hücreleri yanında yer yer hidropik dejenerasyonlu (>) görülmekte. H.E X 132

#### 4.2.2.Böbrek dokusu

**Kontrol grubu :** Normal histolojik yapı dışında bir bulguya rastlanmadı (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Kontrol grubu böbrek dokusu normal yapı. H.E X 64

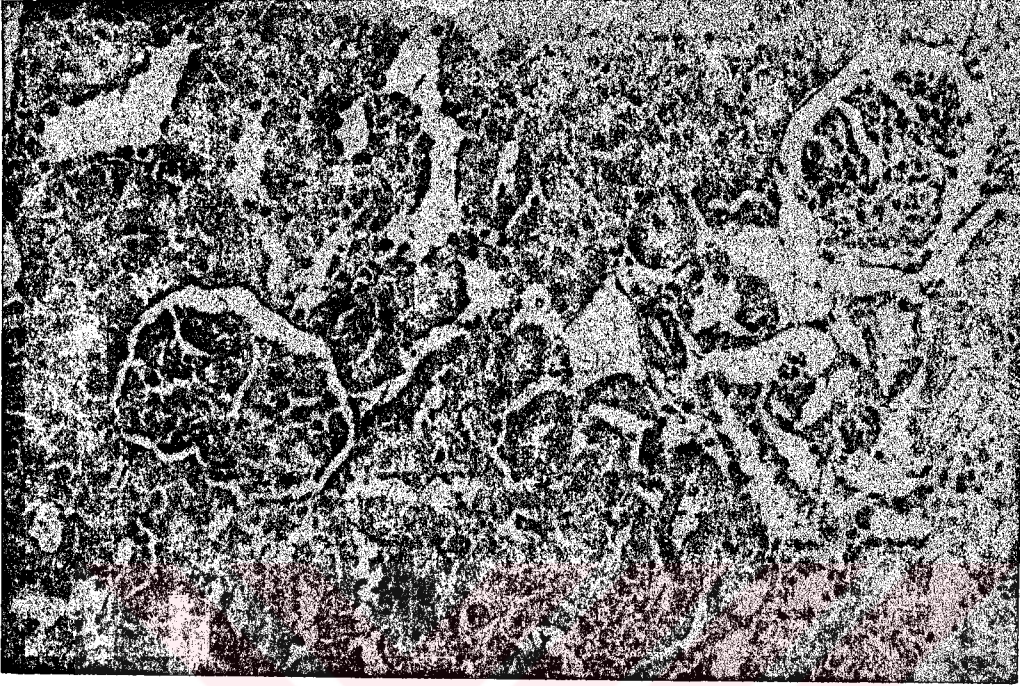
**DEN verilen grup :** Doku, konjestif görünümde idi. Gerek korteks gerek medullada bu durum vardı. Tübüler yapılardan, gerek distal gerek proksimal bölümlerinde herhangi bir bozukluğa rastlanmamakla beraber distallerde minimal dilatasyonlara rastlandı (Şekil 4.6.).





Şekil 4.6. DEN grubu böbrek dokusunda normale yakın histolojik yapı, (\*) Dilate distal tübüller H.E X 64

**DEN+GSH verilen grup :** Proksimal ve distal tübülslerde, glomerul yapısında ve medulla bölgesi (toplayıcı ve boşaltma boruları) yapılarında herhangi bir dejenerasyon görülüyordu (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. DEN + GSH grubu böbrek dokusunda normal histolojik yapı. H.E. X 32

## 5. T A R T I Ő M A

Nitrozaminlerle yapılan çeşitli çalıŐmalarda dietil nitrozaminin ratlarda karaciğer kanserojenezini baŐlattığı, hepatotoksik bir madde olduğu, in vitro çalıŐmalarda ise değişik organ ve dokulara ait birçok enzimin aktivitesini inhibe ettiği (7, 9, 35, 46) bulunmuştur. Kanserojenik maddelerle karaciğer kanseri oluşumu çok basamaklı bir olaydır. Bu çok basamaklı olayın en önemli karakteristiklerinden biri mikroskobik lezyonlardır. Böyle lezyonları karakterize etmek için çok sayıda biolojik ve biokimyasal belirleyiciler kullanılmaktadır (50). Enzim aktivitesindeki deėiŐimler biokimyasal belirleyiciler arasında yer almaktadır.

Son yıllarda serbest radikal çalıŐmalarının yoėunlaŐmasıyla birlikte antioksidan sistemini ilgilendiren lipid peroksidasyonu, superoksit dismutaz enzimi ve E vitamini de üzerinde durulan materyaller arasında yerlerini almıŐlardır. Bu aynı zamanda bu parametrelerin kanser ile iliŐkilerini araŐtırmada ıŐık tutabilmektedir.

Bu çalışmada, serbest radikaller, dietil nitrozamin, kanser ile, E vitamini, superoksit dismutaz enzimi ve lipid peroksidasyonunun iliŐkileri incelenmeye çalıŐıldı. Bu amaçla 5 ayrı zamanda alınan kanlarda ve karaciğer ile böbrek dokularında Dietil nitrozamin ile, dietil nitrozamin+GSH nın SOD, E vitamini ve lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malonil dialdehit üzerine etkilerini araştırdık.

MDA lmleri plazmada 24. ve 96. saatlerde anlamlılık gösterdi. Buna göre 24. saatte kontrol grubuna göre DEN verilen grupta anlamlı yükselme gözlendi ( $p<0.05$ ), DEN+GSH verilen grupta ise kontrol grubuna göre fark gözlenmedi. Bu grup DEN verilen grup ile kıyaslandığında anlamlı düşme gözlendi ( $p<0.05$ ).

İlk bakıŐta bu tablodaki deėiŐiklikler lipid peroksidasyonunun 24.

saatte başladığı izlenimini vermektedir. 48. ve 72. saatlerde fark sürmesine rağmen bu istatistiksel olarak ortaya konamadı. 96. saatte ise DEN verilen grubun diğer gruplarla kıyaslanmasında istatistiksel anlamlılığın artışı ( $p < 0.01$ ) lipid peroksidasyonunun sürdüğünü göstermektedir.

Bu durum 96. saat sonunda alınan karaciğer dokusu ile de bir uyum göstermektedir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında DEN verilen grupta ve tedavi grubunda önemli ölçüde artma vardı ( $p < 0.05$ ). DEN verilen grup ile DEN+GSH verilen grup kıyaslandığında ise tedavi grubunda ılımlı bir azalma gözlenmesine rağmen bu azalma istatistiksel olarak farksızdı ( $p > 0.05$ ).

Böbrek dokusunda ise DEN verilen grupta MDA düzeylerinde hafif bir artma görülmesine rağmen her üç grup arasında istatistiksel bir fark bulunamadı ( $p > 0.05$ ). Bütün bu bulgular DEN in karaciğer üzerine toksik etkisi olduğunu ve lipid peroksidasyonunu özellikle karaciğer üzerinde gösterdiğini kanıtlamaktadır. Histolojik bulgularda da gözleendiği gibi karaciğer dokusu DEN verilen grupta patolojik lezyonlar göstermektedir. Ancak buna karşın GSH nın lipid peroksidasyonu üzerinde yeterince tedavi edici etkisi olmadığı söylenebilir. Bu durum DEN verilen grup ile DEN+GSH verilen grupların gerek plazma, gerekse dokulardaki istatistiksel olarak farksız bulunan değerleri karşılaştırılınca görülebilir.

Kanserojenik ajanların hücre zarlarının geçirgenliği üzerinde etkisi olması doğaldır. Dietil nitrozamini de içine alan kimyasal karsinojenler hücre zarlarının biolojik aktivitesini değiştirmektedir (50). Lipid peroksidasyonunun hücre hasarına hatta hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir (11, 18, 45).

Novi ve arkadaşları aflatoksinin oluşturduğu karaciğer kanserini GSH nın görünür olarak düzelttiğini söylemişlerdir (38). Diğer bir çalışmada ise Ahluwalia ve arkadaşları, intragastrik olarak verilen GSH nın karaciğer kanseri üzerine etkili olmadığını bildirmişlerdir (1).



Hücrede moleküler oksijenin reaktif ve toksik ürünleri olan oksijen radikallerine karşı doğrudan koruyucu fonksiyonu gören ilk ve tek enzim superoksit dismutaz (SOD) enzimi olup, iki superoksit radikali arasındaki dismutasyon tepkimesini katalizler.

Çalışmamızda eritrosit SOD değerlerinde 1., 48., 96. saatlerde anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p>0.05$ ). 24. saatte kontrol grubu ile kıyaslandığında DEN verilen grupta önemli düzeyde düşme gözlendi ( $p<0.05$ ). 72. saatte de kontrol grubuna göre DEN verilen grupta ılımlı bir azalma olmasına rağmen bu azalma istatistiksel olarak farksızdı. Tedavi grubunda ise diğer saatlerde kontrol grubuna yaklaşan değerler görüldü.

24. saatte lipid peroksidasyonun başlamasıyla birlikte SOD aktivitesindeki azalmalar dikkati çekmektedir. Karaciğer dokusunda SOD enzimi DEN verilen grupta önemli ölçüde azaldı ( $p<0.001$ ). DEN+GSH verilen grupta ise kontrol grubuna yaklaşmıştı ( $p>0.05$ ).

Benzer bulgular böbrek dokusunda da elde edildi. DEN verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı azalma gözlendi ( $p<0.01$ ). Tedavi grubunda ise artış vardı ( $p<0.01$ ).

Enzim aktivitelerinde meydana gelen bu artma ve azalmaların, hedef dokuların hücrelerinde kimyasal karsinojenler ile hücredeki proteinler, DNA ve RNA arasında kovalent bağlar oluşmasıyla gerçekleştiği kabul edilmektedir. Kimyasal kartinojenler proteinelere bağlanarak enzim proteininde kanformasyonel değişikliğe neden olmaktadır (15, 25, 46).

Gerçekten kanser oluşumuna, bu bileşiklerin, hücrelerdeki çeşitli makromoleküllerde kovalent bağ oluşturan değişik elektrofilik maddelere dönüşümü yol açmaktadır. DEN'in dokuya özgü enzimatik N-dealkilasyonu sonucu elektrofilik bir ara madde oluşur. Bu ara madde DNA yı etilleme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle DEN'in toksik, mutajenik ve kanserojenik özelliklerinden, dokuya özgü N-dealkilasyon sorumlu tutulmaktadır. DEN zararlı biyolojik etkisini, mikrozomal karışık

fonksiyonlu oksidazlar tarafından metabolik aktivasyona uğratılıp aktif ara maddelere dönüşerek gösterir (25, 52, 53). Bulgularımıza dikkat edersek karaciğer dokusunda, böbrek dokusunda ve eritrositlerde genellikle, DEN verilen grupta SOD enzimi anlamlı olarak azalırken DEN+GSH verilen grupta, kontrol değerlerine yaklaşmıştı. Özellikle 24. saatte lipid peroksidasyonunun anlamlılık kazanmasına karşın aynı saatte SOD enziminin anlamlı olarak düşmesi ilginçtir. 72. saatte tedavi grubunda SOD enzimidaki artış, lipid peroksidasyonunda 96. saatte maksimum azalmayı oluşturmuştur. DEN'in toksik etkisiyle karaciğerin detoksifiye etme kapasitesinin azalması, protein sentezinin inhibisyonu ve karaciğer hücrelerinin harabiyeti sonucu SOD enzim aktivitesi azalmaktadır.

GSH'nın tedavi edici etkisi ile ilgili çelişkili görüşler vardır. N.Frank ve arkadaşları intraperitoneal olarak ratlara DEN verdiklerinde GSH içeriğinin karaciğer dokusunda arttığını bulmuşlardır. Bunun sonucunda GSH'nın yeterince koruyucu görevi yapmadığını söylemişlerdir (14). Bir başka çalışmada ise karaciğer kanserlerini GSH'nın görünür olarak düzelttiği bildirilmiştir (38).

DEN uygulanan farklı hayvan gruplarında genellikle doku enzimlerinin inhibe edildiği bildirilmiştir (5, 22, 23). DEN grubunda SOD aktivitesi azalmaları buna uyum göstermektedir. Lipid peroksidasyonunun aktive olması, yıkım ürünlerinin ortamda artmasına yol açmaktadır. Dolayısıyla buna karşı koymaya çalışan antioksidan sistemi enzimlerinden SOD'ın azalmasına yol açabilir.

E vitamini, sellüler ve subsellüler membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonuna karşı ilk savunma hattını oluşturuyor gibi gözükmektedir. Mitokondri, endoplazmik retikulum ve plazma membran fosfolipidlerinin  $\alpha$ -tokoferole karşı afiniteleri vardır ve bu konumlarda yoğunlaştığı zannedilmektedir. Tokoferoller ferolik bir hidrojeni, peroksidasyona uğramış bir poliansatüre yağ asidindeki serbest peroksit radikale aktarabilmenin



sonucu serbest radikal zincir reaksiyonlarını kırarak antioksidan bir davranış ortaya koymaktadır (8, 18, 35).

Eritrosit membranlarında yoğunlaştığı kabul edilen E vitamininin eritrositlerdeki düzeylerini DEN ve DEN+GSH verilen gruplarda ölçerek, kontrollerle kıyasladık. Buna göre 24. ve 72. saatlerde DEN verilen grupta anlamlı düşmeler gözledik ( $p<0.05$ ). DEN+GSH verilen grup ise kontrol grubuna göre anlamsızdı ( $p>0.05$ ). E vitaminin SOD enzimine benzer şekilde değişim gösterdiği görüldü. Ancak 96. saatte kontrol grubuna göre DEN verilen grupta ve tedavi grubunda artış vardı ( $p<0.01$ ). Bu bulgularımız E vitaminin DEN'in oluşturduğu lipid peroksidasyonundan etkilendiğini göstermektedir. Ancak dokular için ters bir durum söz konusu idi. Çünkü karaciğer dokusunda kontrol grubuna göre DEN verilen grupta anlamlı fark yokken, tedavi grubunda E vitamini azalmıştı ( $p<0.05$ ). Böbrek dokusunda ise DEN verilen grupta kontrol grubuna göre artarken ( $p<0.01$ ), tedavi grubunda düşmüştü ( $p<0.01$ ). Bu bulgular GSH'nin E vitamini üzerinde yeterince koruyucu görev yapmadığı izlenimi vermektedir.

Tüm bu biokimyasal açıklamaları histolojik bulgularla birleştirecek olursak DEN metabolizmasındaki alkilasyonun nükleus yapısında özellikle DNA da bozukluklar yapması söz konusudur. Bunun sonucunda karaciğerde nükleik asitlerin ve protein sentezini değişikliğe uğratmaktadır. Böylece maddenin toksik etkisiyle hücrede en önemli faaliyetler bozulmakta ve çeşitli histopatolojik bozukluklara neden olmaktadır. Bizim çalışmamızda özellikle DEN grubunda, büyük bir olasılıkla, açıklanan nedenlerden dolayı dokuda hasar oluşmuştur. Tüm bulguların ışığında DEN karaciğerde belirlenen süre içinde toksisite oluşturmuştur. Ancak bu durum böbrekte aynı şekilde olmamıştır. Çünkü kullandığımız madde primer olarak karaciğerde metabolize olup, kısa sürede böbrekte toksisite yapmadığı kanısına varılmıştır.

GSH'nin görevi, serbest radikal hasarından hücreyi korumaktır.

Bizim çalışmamızda GSH'nın, dietil nitrozaminin neden olduğu lipid peroksidasyonunu azaltması söz konusudur. Nitekim karaciğerdeki histolojik bulgularda verilen doz ve süreye bağlı olarak iyileşme görülmüştür. En azından akut evrede GSH, DEN'in etkisini bir miktar baskılamıştır, ancak bu düzelmeler yeterli düzeyde olmamıştır. Bu nedenle GSH'nın doz uygulanmasında, doz miktarına, süresine ve doz verme aralıklarının iyi belirlenmesi gerektiği sonucuna varıldı.



## 6. S O N U Ç L A R

Kanser ile serbest radikaller arasındaki ilişki, son zamanlarda üzerinde çok çalışılan konular arasındadır. Karsinojenik bir madde olan Dietil Nitrozamin'in rat kanı ile karaciğer ve böbrek dokularında MDA, SOD ve E vitamini düzeyleri üzerine önemli derecede etkileri olabileceği bu çalışmada araştırıldı. Lipit peroksidasyonuna karşı bir defans mekanizması oluşturduğu bilinen GSH nın, bu zararlı etkileri ortadan kaldırmakta yeterince etkili olmadığı görüldü.

Bu çalışmanın özellikle GSH dozu üzerinde olmak üzere daha ileri araştırmalarla desteklenmesi gerektiği sonucuna varıldı.

**KAYNAKLAR DİZİNİ**

1. Ahluwalia, M.B., Rodstein, J., Tatematsi, M., Roomi, M.W. and Farber, E. : Failure of glutathione to prevent liver cancer development in rats initiated with diathylnitrosamine in the resistant hepatocyte model. *Carcinogenesis*, **4**: 119, 1983.
2. Aitio, M.L., Hiateman, E., Bereziat, J.C., Arvela, P. and Bartsch, H. : Drug metabolism in rats with cancer induced by N-Nitrosodiethylamine and phenobarbital **70**: 468-474, 1992.
3. Akpoyraz, M., Durak, İ. : Pişirilmiş gıda maddelerinde mutajenik ve kanserojenik maddelerin oluşması ve bunun sağlık açısından önemi. *Optimal Tıp Dergisi* **2(4)**: 175-179, 1989.
4. Archer, C.M., Tannenbaum, S.R., Fan, T.Y., Weisman, M. : Reaction of Nitrite with ascorbate and its relation to nitrosamine formation. *Journal of the National Cancer Institute* **54(5)**: 1203-1205, 1975.
5. Atalay, A.: Nitrosaminlerin proteinlerle etkileşimi, *Biokimya Dergisi* **14(3)**: 30-33, 1989.
6. Bakır, S., Atalay, A. : N-nitrosodietil aminin maya glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin kinetik özelliklerine etkisi. *Doğa Tr.J.Med.Sci.* **14**: 653-656, 1990.
7. Bakır, S., Aker, A., Atalay, A.: Dietilnitrosaminin Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz heksokinaz ve malat dehidrogenaz enzimlerine etkisi. *Biokimya Dergisi* **XIV(2)**: 7-12, 1989.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

8. Bast, A., Guida, R.M.M.H., Coes, J.A.D. : Oxidants and antioxidants : State of the Art. Am.J. Med. **91(suppl 3C):** 2-12, 1991.
9. Braunnemann, K.D., Heicht, S.S., Hoffman, D.: N-Nitrosamines : Environmental occurrence in vivo formation and metabolism. J. Toxicol-Clin Toxicol **19(687):** 661-688, 1982.
10. Chapkin, R.S., Haberstrah, B, Liu, T et al. : Effect of vitamin E supplementation on serum and high density lipoprotein cholesterol in renal patients on maintenance hemodialysis. Am.J. Clin.Nutr., **38:** 253-256, 1983.
11. Cochrane, C.G. : Celluler injury by oxdants. Am.J.Med. **91(Suppl. 3c):** 23-30, 1991.
12. Craddock, V.M., Ansley, C.M. : Sequential changes in DNA polymerases on during diethyl nitrosamine induced carcinogenesis. Biochem. Biophys. Acta, **561:** 15-22, 1979.
13. Erden, M., Bor, M.N.: Redükte glutatyon ve glutatyon redüktaz enziminin klinik önemi. Doğa Tr.J.Med. Sci. **4:** 24-32, 1980.
14. Frank, N., Bartram, B., Frei, E., Hadjiolov, D., Wiessler, M., : Influence of thiocompaunds on the metabolism of N-Nitrosodiethylamine. Carcinogenesis **9(7):** 1303-1306, 1988.
15. Goldstein, A., Aronow, L, Kalman, S.M. Principles of Drug Action the Basis of Pharmacology, Second edition Wilay International Edition, New York, 1976, 685-688.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

16. Golkar, S.O., Bergmark, E. : Alkylation of haemoglobin, plasma proteins and DNA in the mouse by diethylnitrosamine. *Carcinogenesis* **9(11)**: 1915-1917, 1988.
17. Gözükara, M.E.: *Biyokimya*. Ofset Repromat Ltd Şti. Ankara, 1990, s. 921-922.
18. Hallwell, B. : Reactive oxygen species in living systems source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.* **91(Suppl 3C)**: 11-21, 1991.\*
19. Hagglöf, B., Marklund, S.L., Holmgren, G. : Cu-Zn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase and glutathione peroxidase in lymphocytes, erythrocytes in insulin dependent diabetic children. *Acta Endocrinol.* **102**: 235-239, 1988.
20. Hashim, S.A., Schuthinger, G.R. : Rapid determination of tocopherol in macro and microquantities of plasma. *Am. J. Clin. Nutr.* **19**: 137-145, 1966.
21. Jakoby, W.B. and Ziegler, D.M. The enzymes of detoxification. *J. Biol. Chem.* **265(34)**: 20715-20718, 1990.
22. Kılınç, C., Sunguroğlu, K., Kavutçu, M., Gökhan, İ.H. : Rat karaciğer asit fosfatazının saflaştırılması ve dietil nitrozamin'in enzim aktivitesine etkisinin araştırılması. *Optimal Tıp Dergisi* **6(2)**: 67-70, 1993.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

23. Koca, Y., Atalay, S. : Dietil nitrozamin'in sıçan kalbi kreatin kinaz izozimlerine etkisi. *Biyokimya Dergisi*, **XIII(3)**: 17-22, 1988.
24. Kurıdu, M., Ayaka, S., Toluku, Y., Takeda, R. : Serum antioxidant activity in üremic patients. *Nephron*, **41**: 293-298, 1985.
25. Küçükyurt, İ., Aker, A., Atalay, A. : Dietil nitrozamin'in Albino *Mus musculus* cinsi farelerin serum ve karaciğerlerinde aspartat ve alanin transaminaz ile kreatin kinaz aktiviteleri üzerine etkisi. *Biyokimya Dergisi* **16(1)**: 15-26, 1989.
26. Lijinsky, W. : Reaction of drugs with nitrous acid as a source of carcinogenic nitrosamines. *Cancer Res.* **34**: 255-258, 1974.
27. Lijinsky, W., Taylor, H.W. : Relative carcinogenic effectiveness of derivatives of nitrosodiethylanine in rats. *Cancer Res.* **38**: 2391-2394, 1978.
28. Maduaguu, E.N., Frei, E., Frank, N., Spiegelhalder, B. and Preussmann, R. : Nitrosamine metabolism in Kwashiorkor rats. *Biochemical Pharmacology* **32(23)**: 3577-3581, 1983.
29. Maede, Y., Kuurabara, M., Sasaki, A. et al. : Elevated glutathione accelerates oxidative damage to erythrocytes produced by aromatic disülfide. *Blood* **73**: 312-317, 1989.
30. Magee, P.N., Hultan, T. : Toxic liver injury and carcinogenesis. *Biochem. J.* **83**: 106-113, 1962.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

31. Magee, P.N., Farber, E.: Toxic liver injury and carcinogenesis. *Biochem. J.* **83**: 114-123, 1962.
32. Mannervik, B. : Glutathione transferase. *Methods Enzymol.* **77**: 231-235, 1981.
33. Mannervik, B. : The isosymes of glutathione transferase; *Adv.Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* **57**: 357-406, 1985.
34. Mattei, E., Delpino, A., Ferrini, V. : Protein synthesis inhibition induced by dimethylnitrosamine and diethyl nitrosamine on isolated rat hepatocytes. *Experienta*, **35**: 1213-1215, 1979.
35. Mayes, P.A., Grammer, D.K., Rodwell, V.W., Murray, R.K. (Çev.: Gülriz Menteş, Bilton Ersöz): *Harper'in Biyokimyası. A Large Medical Books (Barış Kitabevi)*, 1993.
36. Meitter, A. : The glutathione S transferases : A group of multifunctional detoxification proteins. *Adv. Enzymol.* **46**: 383-414, 1978.
37. Nadkarni, G.D., D'Souza, N.B. : Hepatic antioxidant enzymes and lipid peroxidation in carbon tetrachloride induced liver cirrhosis in rats. *Biochem. Med. Metabolic Biology* **40**: 42-45, 1988.
38. Novi, A.M., Flörke, R. and Stukenkemper, M. : Glutathione and aflatoxin B<sub>1</sub>-induced liver tumors requirement for an intact glutathione molecule for regression of malignancy in neoplastic tissue. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **62**: 397, 1982.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

39. Okey, B.A., Roberts, E.A., Harper, P.A. and Michael J.D. : Introduction of drug metabolizing enzymes mechanisms and consequences. *Clinical Biochem.* **19**: 132-141, 1986.
40. Okhawa, H., Ohiski, N., Yagi, K. : Assay for lipid peroxidation in animal tissue by thiobarbitüric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**: 351-58, 1979.
41. Özdamar, K.: Biyoistatistik. İkinci Baskı, Bilim ve Teknik Yayınevi, Eskişehir, 1986.
42. Pound, A.W. and Mc.Guire, L.J. : Influence of repeated liver regeneration on hepatic carcinogenesis by diethylnitrosamine in mice. *Br. J. Cancer* **37**: 595, 1978.
43. Scanian, R.A. : N-nitrosamine in foods . *Crit. Rev. Food. Technol.* **5**: 357, 1975.
44. Sezgin, İ. : Atalay, A. : Dietyl nitrozaminin insan kromozomları üzerine etkisi. *C.Ü. Tıp Fak. Dergisi*, **7(1-2)**: 28-39, 1985.
45. Sies, H. : Oxidative stress. From basic research to clinical application. *Am. J. Med.* **91(Suppl 3C)**: 31-38, 1991.
46. Swann, P.F.: The toxicology of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *J.Sci.Fd.Agric.* **26**: 1761-1770, 1975.
47. Swann, P.F., Magee, P.N. : Nitrosamine induced carcinogenesis. *Biochem. J.* **110**: 39-47, 1968.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)**

48. Tietz, N.W. : Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company - Philadelphia, 1986, p.582-584.
49. Turek, B., Hlavšiva, D., Tucvek, J., Valtmann, J., Cerna, J. : The fate of nitrates and nitrites in the organism. IARC, Scientific Pub. **31**: 625-632, 1980.
50. Türközkan, N., Ciliv, G. : Dietil nitrozaminle ratlarda başlatılan karaciğer kanserojenезisi sırasında ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) ATPaz aktivitesindeki değişimler. Biyokimya Dergisi, **XIII(1)**: 29-35, 1988.
51. Winterbourn, C.C., Hawkins, R.E., Brian, M., Carrell, R.W. : The estimation of red cell superoxide dismutase activity. J.Lab.Clin.Med. **85**:337-342, 1975.
52. Yamazaki, H., Inui, Y., Yun, C.H., Guengerich, F.P., Shimada, T. : Cytochrome p-450 2E, and 2A6 enzymes major catalysts for metabolic activation of N,nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microcomes. Carcinogenesis, **13(10)**: 1789-1794, 1992.
53. Yong, T.Y. and Yong, C.J. : Demethylation and denitrosotion of nitrosamines by cytocrome p-450 isosymes. **242(1)**: 32-40, 1985.

Ek-Çizelge 1. Plazma lipid peroksit (MDA) değerleri (nmol/ml)

KAN ALMA ZAMANI GRUPLAR						
		1	24	48	72	96
KONTROL GRUBU (n=8)	1	3.5	2.8	3.2	3.0	3.2
	2	3.4	2.2	3.1	3.5	3.6
	3	3.5	2.4	3.5	4.4	3.0
	4	3.4	2.8	3.3	3.9	3.3
	5	3.9	3.0	3.3	3.7	3.1
	6	3.1	2.8	3.2	3.8	3.9
	7	3.5	2.9	2.7	2.5	3.8
	8	3.3	2.9	3.2	3.8	3.0
DEN Verilen GRUP (n=8)	1	3.2	3.2	3.3	4.0	4.0
	2	2.8	2.5	3.1	3.6	3.8
	3	3.6	3.0	3.0	3.4	3.8
	4	3.5	3.7	3.9	3.5	4.2
	5	4.8	2.5	3.0	3.1	4.5
	6	3.7	2.9	3.0	3.5	4.0
	7	3.3	2.8	3.2	3.6	4.1
	8	3.6	3.0	3.4	3.5	4.2
DEN+GSH Verilen GRUP (n=8)	1	2.7	2.3	3.9	2.8	3.2
	2	2.6	3.1	2.9	4.3	4.0
	3	3.7	2.8	3.0	2.8	3.7
	4	3.5	2.4	3.1	2.7	4.2
	5	3.7	2.6	2.4	3.1	2.9
	6	3.8	2.5	2.7	2.8	3.9
	7	2.9	2.6	3.1	3.2	3.7
	8	3.5	2.7	3.0	3.2	3.6

Ek-Çizelge 2. Eritrosit SOD değerleri (ü/gr Hb)

KAN ALMA ZAMANI GRUPLAR		1	24	48	72	96
	KONTROL GRUBU (n=8)	1	3696	3680	3669	3770
2		4527	4240	5197	4121	3925
3		4065	4140	5010	3751	4382
4		4092	3560	4693	4305	4931
5		4263	4240	4199	3927	4899
6		3986	3510	3907	3760	4090
7		3880	3090	4201	3529	4400
8		3899	3690	4198	3780	4100
DEN Verilen GRUP (n=8)	1	4694	2331	3116	3234	3498
	2	5080	3074	4313	3787	4196
	3	4415	2974	4588	4073	4283
	4	4641	3137	3281	4054	4741
	5	2952	3591	5016	3568	3919
	6	3591	3591	4351	3663	3862
	7	4680	3767	3980	3653	4200
	8	4770	3950	4850	3905	4285
DEN+GSH Verilen GRUP (n=8)	1	3100	3750	4988	4035	3481
	2	4601	3825	4894	4280	4341
	3	5200	3780	4422	4394	4632
	4	5266	4095	4988	4460	4544
	5	4907	3615	4677	3846	4477
	6	5150	4050	3894	4250	4216
	7	4999	4100	3213	4190	4490
	8	5050	3925	4990	4280	4588

Ek-Çizelge 3.Eritrosit E vitamini değerleri (mg/grHb)

KAN ALMA ZAMANI GRUPLAR						
		1	24	48	72	96
KONTROL GRUBU (n=8)	1	0.236	0.225	0.228	0.219	0.202
	2	0.228	0.217	0.211	0.219	0.209
	3	0.234	0.215	0.208	0.221	0.21
	4	0.23	0.227	0.208	0.22	0.213
	5	0.231	0.217	0.21	0.212	0.214
	6	0.231	0.22	0.215	0.22	0.209
	7	0.232	0.222	0.209	0.219	0.211
	8	0.31	0.219	0.212	0.219	0.21
DEN Verilen GRUP (n=8)	1	0.231	0.207	0.211	0.213	0.21
	2	0.235	0.215	0.217	0.214	0.216
	3	0.21	0.215	0.206	0.217	0.219
	4	0.236	0.218	0.2	0.215	0.224
	5	0.233	0.215	0.21	0.21	0.225
	6	0.232	0.217	0.211	0.214	0.219
	7	0.236	0.214	0.208	0.213	0.215
	8	0.235	0.212	0.209	0.214	0.216
DEN+GSH Verilen GRUP (n=8)	1	0.224	0.216	0.213	0.214	0.23
	2	0.238	0.22	0.215	0.227	0.223
	3	0.235	0.216	0.202	0.214	0.222
	4	0.21	0.228	0.21	0.214	0.223
	5	0.235	0.216	0.204	0.217	0.227
	6	0.238	0.218	0.21	0.215	0.225
	7	0.235	0.22	0.215	0.214	0.224
	8	0.237	0.219	0.211	0.213	0.22

Ek-Çizelge 4.Karaciğer dokusu MDA, SOD ve Vit E değerleri

PARAMETRE GRUPLAR		MDA (nmol/mg prot.)	SOD (ü/mg prot.)	Vit E (mg/gr prot.)
KONTROL GRUBU (n=8)	1	0.75	4.56	1.67
	2	0.53	5.31	1.56
	3	1.1	5.62	2.14
	4	0.65	5.8	1.79
	5	0.6	6.43	1.69
	6	0.46	6	1.48
	7	0.6	5.9	1.72
	8	0.63	5.9	1.78
DEN Verilen GRUP (n=8)	1	1.07	4.21	1.32
	2	1.13	4.81	1.81
	3	0.96	3.38	1.95
	4	1.23	3.6	2
	5	0.53	2.88	1.56
	6	0.94	3.9	1.8
	7	1	4	1.5
	8	1	3.7	1.6
DEN+GSH Verilen GRUP (n=8)	1	0.65	5.54	1.36
	2	1.11	5.58	1.54
	3	0.95	5.78	1.23
	4	1.24	4.89	1.53
	5	0.53	5.66	1.62
	6	0.94	5.62	1.56
	7	1	5.56	1.41
	8	0.87	5.47	1.6

Ek-Çizelge 5.Böbrek Dokusu MDA, SOD ve Vit E değerleri

PARAMETRE GRUPLAR		MDA (nmol/mg prot.)	SOD (ii/mg prot.)	Vit E (mg/gr prot.)
KONTROL GRUBU (n=8)	1	0.65	4.15	1.14
	2	0.51	4.49	1.19
	3	0.43	5.23	1.13
	4	0.42	5.09	1.14
	5	0.51	5.04	1.22
	6	0.86	5.11	1.58
	7	0.51	5.01	1.22
	8	0.52	5.1	1.29
DEN Verilen GRUP (n=8)	1	0.63	2.85	1.64
	2	0.88	3.32	1.66
	3	0.73	3.67	1.44
	4	0.65	3	1.77
	5	0.57	3.74	1.51
	6	0.56	3.67	1.5
	7	0.67	3.95	1.45
	8	0.67	3.85	1.53
DEN+GSH Verilen GRUP (n=8)	1	0.4	6.22	0.87
	2	0.46	5.8	1.1
	3	0.71	5.73	1.24
	4	0.5	6.62	1.23
	5	0.53	5.43	1.13
	6	0.63	5.33	1.1
	7	0.5	5.78	0.93
	8	0.49	5.67	0.9

## Ö Z G E Ç M İ Ő

1955 yılında ESKİŞEHİR’de doğdu. 1977 yılında Eskişehir İ.T.İ.A. Kimya Mühendisliđi Y.O. dan mezun oldu. 1982 de memur olarak Anadolu Üniversitesi Tıp Fakóltesi Biokimya A.B.D. da göreve başladı. 1984’te teknisyen, 1986’da Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biokimya A.B.D. Araştırma görevlisi oldu. 1988 de Biokimya Bilim uzmanı ünvanı aldı. Halen Osmangazi Üniversitesi’nde bu görevine devam eden AKYÜZ evli ve 1 çocuk babasıdır.

