

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

N-NİTROZOPİROLİDİN İLE *in vivo*
ETKİLEŞTİRİLEN SIÇANLARIN KARACİĞER VE BÖBREK
SİTOPLAZMİK GLUTATYON-S-TRANSFERAZ ÖZGÜL
AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ŞULE ERÜÇ ALTINPINAR

Danışman Öğretim Üyesi
Yrd. Doç. Dr. İzzet YELKOVAN

SİVAS
2005

Annem ve Babama

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 05.01.1984 tarih ve 84/1 sayılı kararı ile kabul edilen " Tez Yazma " yönergesine göre hazırlanmıştır.

TEŐEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleőtirilmesinde ve yetiőtmemde değerli katkılarını esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. İzzet YELKOVAN'a, Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Ahmet olak'a, Prof. Dr. İlhan Sezgin'e, Doç. Dr. Ergün Pınarbaőt'na, Doç. Dr. Öztürk Özdemir'e, her zaman yardımlarını ve desteklerini gördüğüm anabilim dalındaki arkadaşlarıma, istatistiki değerlendirme sırasındaki yardım ve güler yüzünden dolayı Yrd. Doç. Dr. Ziyet ÇINAR'a teőtekkür ederim.

Ayrıca hayatta sahip olduğum ve başarabildiğim her őeyi borçlu olduğum, her zaman güvenlerini ve sevgilerini yanıbaşımnda hissettiğim, aldığım kararlarda beni büyük bir özveriyle destekleyen, her zaman yapıcı ve olumlu olan aileme, tezimin yazımı aşamasında yaptığı çevirilerle omuzlarımdaki yükü hafifleten, her zaman bana güç veren, beni yüreklendiren ve her konuda özverisini esirgemeyen sevgili eőtım Mustafa ALTINPINAR'a ve son olarak varlığıyla őimdiden hayata daha farklı, daha mutlu ve daha umutlu gözlerle bakmamı sağlayan henüz doğmamıő bebeğime en içten teőtekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. NİTROZOPİROLİDİN	3
2.1.1. Nitrozopirolidin'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	3
2.1.2. Nitrozopirolidin Metabolizması	4
2.1.3. Ekzojen ve Endojen Nitrozopirolidin Oluşumu	4
2.1.4. Nitrozopirolidin ve Mutagenез	6
2.1.5. Nitrozopirolidin ve Karsinogenez	7
2.1.6. Nitrozopirolidin'in Biyomoleküllerle Etkileşimi	8
2.2. GLUTATYON-S-TRANSFERAZ	9
2.2.1. GST'lerin Sınıflandırılması ve Yapısı	9
2.2.2. GST'lerin Glutatyon (GSH) ile Konjugasyonu	11
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	14
3.1. Deney Hayvanları ve Nitrozopirolidin Uygulanması	14
3.2. Dokuların Özütleme (Homojenizasyonu)	15
3.3. Stoplazmik Fraksiyonun Eldesi	15
3.4. GST Aktivitesinin İzlenmesi	15
3.5. Protein Derişim Değerlerinin Bulunması	17
3.6. Enzim Özgöl (Spesifik) Aktivitesinin Hesaplanması	18
3.7. Verilerin Değerlendirilmesi	18
4. BULGULAR	19
4.1. Nitrozopirolidin'in Karaciğer GST Aktivitesi Üzerine Etkisi	20
4.2. Nitrozopirolidin'in Böbrek GST Aktivitesi Üzerine Etkisi	20
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	22
6. ÖZET	26
7. SUMMARY	27
8. KAYNAKLAR	28

ŞEKİLLER

Şekil 1: Nitrozopirolidin ($C_4H_8N_2O$)

Sayfa
3

Şekil 2: Nitrozaminlerin oluşumu

5

Şekil 3: Glutasyon ile elektrofilik bileşiklerin konjugasyon tepkimesi

12

Şekil 4: Dimerik bir GST molekülünün iki aktif bölgesinin gösterimi

12

TABLolar ve GRAFİKLER

Tablo 1: Sitozolik GST sınıfları, altbirimleri ve bulunduğu dokular

10

Tablo 2: Npyr ile etkileştirilen sıçanlarda karaciğer ve böbrek GST aktivitesinin gruplara göre değişimi

19

Grafik 1: Karaciğer GST aktivitesinin gruplara göre değişimi

20

Grafik 2: Böbrek GST aktivitesinin gruplara göre değişimi

21

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Her geçen gün kimyasallarla daha fazla kirlenen dünyada, insan vücudu da gerek besin zinciri, gerek solunum, gerekse gıdalarda kullanılan katkı maddeleriyle çok çeşitli karsinojenik ve mutajenik etkiye sahip kimyasal maddeyle etkileşmektedir. Bu maddeler organizmada birikerek genetik yapıda değişik oranlarda hasara yol açabilir. (1, 2, 3).

Bu çalışmanın konusu olan N-Nitrozopirolidin (Npyr) hem endojen hem de ekzojen kaynaklardan insanlara ulaşır. Tütün dumanı; içiciler ve pasif içiciler tarafından vücuda ekzojen kaynaktan alınır. Bunun yanı sıra saklama amacıyla sosis, salam, sucuk ve salamura yapılmış ve dumanlama ile pişirilmiş et ve balık ürünleri Npyr içeren besin maddeleridir. Ayrıca Npyr, baharat katılarak hazırlanmış ve pişirilmiş etler aracılığıyla da vücudumuza girmektedir (4, 5, 6, 7).

Npyr endojen olarak da oluşabilen bir maddedir. Npyr oluşumu tükürükte, mide özsuyunda, kanda ve idrarda ikincil aminlerin nitrozo'lu bileşiklere dönüşmesi sonucu meydana gelir (8).

Nitrat ve nitrit endojen Npyr oluşumunda öncül maddelerdir (9). İnsanlar nitratı başlıca yiyeceklerden ve içme suyundan alırlar. Nitrat toksik olmayan bir maddedir. İnsan vücudundaki toplam nitratın %5'i toksik olan nitrite dönüşür. Kandaki nitritin hemoglobin ile tepkimesi sonucu yeni doğanlarda methemoglobin oluşur ve oluşan bu molekül, hemoglobin gibi oksijen bağlama yeteneğine sahip değildir (10, 11,12).

Hayvansal kaynaklı besin maddelerinde de koruyucu madde olarak nitrat (E251) ve nitrit (E250) kullanılmaktadır (13). En önemli nitrat kaynağı ise bitkilerdir. İnsanlarda günlük ortalama nitrat alımının %85'i bitkilerden, kalan %15i ise içme suyundan sağlanır. İçme suyundaki nitrat oranı bitkilerdekine

oranla çok daha düşüktür ve içme suyunun cinsine bağlı olarak değişir. Dünya sağlık örgütü verilerine göre; son on yılda suni gübre, tarımsal ilaçlar ve bunların yoğun ve kontrolsüz kullanımı sonucu yüzey ve kaynak sularındaki nitrat düzeyinin artması insanlar için risk oluşturmaktadır. (10,11).

Vücutta nitrat düzeyine paralel olarak artan nitrit belirli bir periyotta nitrozaminleri oluşturmak üzere ikincil aminlerle tepkimeye girer. Oluşan nitrozamin türevleri (*Nitrozodimetilamin, Nitrozopirolidin, Nitrozomorfolin, Nitrozonornikotin, Nitrozoanatabin gibi*) organizmada karsinojenik etki gösterebilmektedir. Nitrozopirolidin de siklik bir nitrozamindir (9). Yapılan çalışmalarda askorbik asit, tokoferoller ve laktik asitin endojen nitrozasyonu inhibe ettiği bildirilmiştir (10, 11, 13).

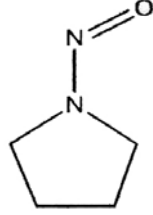
N-Npyr gibi toksik maddeler karaciğer hücreleri Endoplazmik Retikulum (E.R.) Oksidasyon Sistemi tarafından yıkılır. E.R. Oksidasyon Sisteminde bulunan enzimler sitokrom P- 450 olarak bilinirler ve elektron transport zincirinin en son basamağındaki enzimlerdir. Birçok nitrozamin gibi N-Npyr de sitokrom P-450 enzim sistemi tarafından metabolize edilir. Detoksifikasyon mekanizmaları Faz I ve Faz II tepkimeleri olarak ikiye ayrılır. Faz I; oksidasyon, hidroliz ve kopma tepkimelerinin gerçekleştiği basamaktır. Faz II ise Faz I reaksiyonları sonucunda oluşan polar bileşiklerin konjugasyon tepkimelerinin gerçekleştiği basamaktır. Glutatyon-S-Transferaz (GST)'ler, Faz II tepkimelerinde rol oynayan önemli bir enzim ailesidir. GST'ler ekzojen ve endojen orjinli elektrofilik bileşiklerin büyük bir kısmının metabolize olmasını sağlarlar (14, 15, 16).

Kaynak taramalarımızda GST ile N-Npyr' nin etkileşimi ile ilgili daha önce *in vivo* olarak düzenlenmiş herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışma Nitrozopirolidin'in detoksifiye edilmesinde rol oynadığını düşündüğümüz GST enzimlerinin Nitrozopirolidin'den nasıl etkilendiğini araştırma amacına yöneliktir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. NİTROZOPİROLİDİN



Şekil 1: Nitrozopirrolidin (C₄H₈N₂O)

İnsan vücudu, yaşamı boyunca pek çok kimyasal ile etkileşmektedir. Bu kimyasalların büyük bir çoğunluğu besinler aracılığıyla vücuda alınırlar. Besinler kullanma ve saklama tekniğine göre çeşitli işlemlerden geçirilirler. Gıda maddelerinde kullanım sırasında uygulanan pişirme, kızartma, kavurma ve besinleri saklama amacıyla yapılan dumanlama (tütsüleme) ve salamura gibi işlemler sırasında insanların sağlığını ciddi biçimde etkileyebilecek karsinojenik etkili çok sayıda toksik madde oluşabilmektedir (3). Npyr de bu toksik bileşenlerden bir tanesidir.

2.1.1. Nitrozopirrolidin'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Npyr kimyasal araştırmalarda kullanılan ve kimya endüstrisi dışında ticari amaçla üretilmeyen sarı renkli bir sıvıdır. Npyr ilk defa 1888 yılında pirolidinin potasyum nitratla hidroklorik asit solüsyonunda bir haftalık süredeki reaksiyonu sonucu oluşmuştur.

Nitrozopirrolidin'in 185- 200 ° C ye kadar ısıtılması sonucu da Npyr meydana gelir.

Npyr ısı ve ışığa duyarlı bir maddedir, ısıtılırsa ve ışıktan korunmazsa bozulur ve toksik nitrojen oksit gazı açığa çıkar. Npyr özellikle UV ışınlarından çok etkilenir. Güçlü oksidanlarla etkileştiğinde amin ve hidrazine, hidrolize karşı çok dayanıklı olmasına rağmen hidrojen bromid ile etkileştiğinde ise asetik asite indirgenebilir (5,17).

2.1.2. Nitrozopirolidin Metabolizması

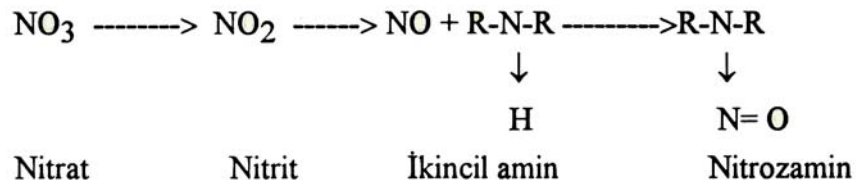
Ratlara 6mg/kg oranında [2,5- ¹⁴C] veya [3,4- ¹⁴C] – Npyr intraperitoneal olarak uygulandığında bu bileşiklerden % 18- 25 'inin 6 saat içinde ¹⁴CO₂ 'e dönüştüğü, kalan radyoaktif bileşiklerin % 7 'sinin ürin, %1- 2 'sinin ise gaita ile atıldığı tespit edilmiştir. [2,5- ¹⁴C] – Npyr 4mg/kg 'lık oral dozunun % 77 'si ¹⁴CO₂ 'e dönüşürken, 650 mg 'lık oral dozunun yalnızca % 14 'ü 24 saat içinde ¹⁴CO₂ 'e dönüşmüştür (5).

2.1.3. Ekzojen ve Endojen Nitrozopirolidin Oluşumu

Npyr vücudumuza tütün dumanı, sosis, salam, sucuk ve salamura yapılmış et ve balık ürünleri, baharat katılarak hazırlanmış ve pişirilmiş etler aracılığıyla ekzojen kaynaklardan alınır (4, 5, 6, 7). Türk sucukları ile yapılan bir çalışmada kızartma sıcaklığı arttıkça oluşan Npyr miktarının da aynı oranda arttığı görülmüştür (18). Bir başka çalışmada kızartılmış domuz etinde 4- 25 µg/kg Npyr'e rastlanırken, kızartılmamış domuz etinde Npyr bulunamamıştır (12). Yemeklerde kullandığımız kırmızıbiberde de 29 µg/kg gibi yüksek oranda Npyr tespit edilmiştir (4). 1994 yılında Tayland'da yapılan bir çalışmada salamura balık ve konserve sebzelerde Npyr'e rastlanmıştır (19).

Kimyasal endüstride, lastik ve deri endüstrisinde, dökümhane ve metal işleme tesislerinde çalışan insanlar da yoğun olarak Npyr ve benzeri nitrozaminlerle etkileşmektedir (7).

Siklik bir nitrozamin olan Npyr endojen olarak nitrit ile bazı ilaçların etkileşimi yoluyla meydana gelebildiği gibi insanda tükürükte, mide özsuyunda, kanda ve idrarda ikincil aminlerin nitrozolu bileşiklere dönüşmesi sonucu oluşabilmektedir (şekil 2) (1,8).



Şekil 2: Nitrozaminlerin oluşumu

Hayvansal kaynaklı besin maddelerinde (et, balık, sucuk gibi) koruyucu madde olarak nitrat ve nitrit kullanılmaktadır. Bu gıdaların uzun süre bekletilmesi ve pişirilmesi sonucunda çeşitli nitrozaminler meydana gelebilmektedir (13). Çok sayıda bakteri türünün sekonder amin ve nitrit varlığında nitrozamin oluşumunu katalize ettiği bilinmektedir. Bunun yanı sıra alınan sebze veya diğer besinlerdeki nitrat miktarı yüksek olsa bile eğer bunlarla birlikte vitamin C, vitamin E ve bazı fenolik ve sülfürlü bileşikler de alındığında N-nitrozo bileşiklerinin oluşumu inhibe olmaktadır. Yapılan bir çalışmada pişmiş sebze yedikten sonra prolinin nitrozasyonunda önemli derecede artış saptanmış ama çiğ sebze yedikten sonra çok düşük seviyede bir artış gözlenmiştir. Bunun olası nedeni askorbik asitin parçalanması ama nitratın bozulmamasıdır (1, 11, 20).

İnsan tükürüğünde ve mide salgısında bulunan tiyosiyanat nitrozasyonu arttırmaktadır. Sigara içenlerin tükürüklerindeki tiyosiyanat miktarının sigara içmeyenlere göre 3- 4 kat fazla olduğu saptanmıştır (11).

2.1.4. Nitrozopirolidin ve Mutagenез

Npyr'nin mutajenik etkileri metabolitlerinin DNA'ya kovalent olarak bağlanmasıyla (guanin ve adenin baz bölgeleri) ortaya çıkar. DNA'nın bu haline DNA addukt (adduct) adı verilmektedir. DNA addukt Npyr gibi serbest radikallerin veya bunların metabolitlerinin DNA'ya bağlanarak oluşturduğu artık DNA'yı ifade etmektedir. Böylece DNA'nın başlangıç fazı dönüşümsüz olarak bölünmekte ve DNA'daki bu değişiklik ilerleme fazına geçildiğinde malign fenotipe dönüşümün ilk basamağını oluşturmaktadır (21).

Npyr ratlarda kovalent addukt meydana getirir ve bu addukt "2 -amino-6,7,8,9-tetrahydro-9-hydroxypyrido[2,1-f]purine-4[3H]one" olarak tanımlanmıştır. Npyr uygulanan fare, rat ve hamsterlerin karaciğer, böbrek ve akciğerlerinde bu yapı oluşmaktadır. 56- 900 mg/kg vücut ağırlığı oranında oral yoldan Npyr verilen ratlarda 7,8-pyridoguanine adduktları ortaya çıkmaktadır. P-450 monooksijenazların Npyr'nin bu alkilleyici ajanının metabolik aktivasyonuna karşı çok az etkisi olmuştur. Mikrozomal amin oksidazın inhibitörü olan imidazol ve aldehid dehidrogenazın inhibitörü olan disulfiram, Npyr'nin alkilleyici etkisini azaltmaktadır (22). Yapılan başka bir çalışmada ise Npyr metabolizmasının ilk ürünü ve karsinojenik etki gösteren formu olan alfa- asetoksi- N-nitrozopirolidin ile yine Npyr'nin bir metaboliti olan krotanaldehid'in DNA adduktları meydana getirdiği saptanmıştır (23).

Npyr uygulanmış ratlarla yapılan bir başka çalışmada N7,C8 guanin oranının RNA'da DNA'ya göre iki kat daha fazla olduğu görülmüştür. N7,C8 guanin oluşumu Guo ile dGuo'ya göre sekiz kat daha fazladır. Bunların % 51 i hiçbir değişikliğe uğramadan ürün ile atılmaktadır (24).

m13mp2 faj DNA'sına Npyr ve UVA ışını beraber uygulandığında faj DNA'sında 8-oksodGuo meydana gelir ve buda GC--> AT transversiyonuna neden olmaktadır (25). Ratlarda yapılan benzer bir çalışmada Npyr uygulanan

ratlarda hepatokarsinogeneze bağlı genotoksik süreçte zgl DNA adduktları oluşmuş ve buna bağlı olarak %49,3 oranında AT-->GC transisyonu meydana gelmiştir (26).

İnsan lenfosit kültürlerinde N-Npyr'nin kromozom anomalileri ve satellit separasyonuna sebep olduğu, DNA, RNA ve protein sentezinde inhibisyona yol açtığı bildirilmektedir (27).

2.1.5. Nitrozopirolidin ve Karsinogenez

Npyr insanlar için karsinojenik ve hepatotoksik bir maddedir ve birinci derece hedef organları karaciğer ve böbrektir. Eğer Npyr içme suyuyla ratlara verilirse her iki cinste de akciğer adenomuna, hepatoselüler karsinoma, lösemiye, kolon karsinomuna, tunika vajinaliste papiller mesoteliomuna, interstitial hücre tümörlerine ve erkek ratlarda testiste hemanjioma neden olmaktadır (5).

Sıçanlarda yapılan araştırmalarda dimetil nitrozopirolidinin karaciğerde, 3- 4 dikloro nitrozopirolidinin ise zofogusta tümöre neden olduğu bildirilmiştir (28). Suriye altın hamsterlarla yapılan bir diğer çalışmada 25 hafta boyunca intraperitoneal Npyr enjeksiyonu yapılan hayvanlarda doza bağlı olarak larinks ve trake tümörleri gibi solunum yolu tümörlerine rastlanmıştır (29). Npyr uygulanmış MRC ratlarında ise karaciğer ve genital mezotelyum tümörleri oluştuğu grlmştir (5).

N-Nitrozopiperidin (NPIP) ve Nitrozopirolidin ile karşılaştırmalı olarak yapılan bir çalışmada; Rat zofagus mikrozoamlarının NPIP'ni aktive ettiği fakat Npyr'ni aktive etmediği, karaciğer mikrozoamlarının ise Npyr'ni aktive ederken NPIP'ni aktive etmediği grlmştir. Nitrozaminlerin doku spesifik aktivasyonları, doku spesifik tümör oluşumuna neden olmaktadır (30).

2.1.6. Nitrozopirolidin'in Biyomoleküllerle Etkileşimi

Cengiz ve arkadaşları 1993'te yaptıkları bir çalışmada rat karaciğer hücre zarı gangliosid kompozisyonunda ve fraksiyonlarında Npyr'nin uygulama süresi ile uyumlu azalışlar kaydetmişlerdir (31). *In vitro* olarak düzenlenen diğer çalışmalarda ise N-Npyr'nin etkileştirildiği piruvat kinaz, sitrat sentetaz (32) ve NA/K-ATPaz (33) enzimlerini inhibe ettiği bildirilmiştir.

Mikrozomal amin oksidazın inhibitörü olan imidazol ve aldehid dehidrogenazın inhibitörü olan disulfiram, Npyr'nin alkilleyici etkisini azaltmaktadır (22). Yapılan başka bir çalışmada ise Npyr metabolizmasının ilk ürünü ve karsinojenik etki gösteren formu olan alfa-asetoksi-N-nitrozopirolidin ile yine Npyr'nin bir metaboliti olan krotanaldehid'in DNA adductları meydana getirdiği saptanmıştır (23).

2.2. GLUTATYON-S-TRANSFERAZ

Organizma içerisine alınan ve toksik etki gösterebilen kimyasallar, bazı enzimler sayesinde zararsız hale getirilmektedir. Bu değişim "Biyotransformasyon" olarak tanımlanmaktadır. Biyotransformasyonda görev yapan enzimlerin aktiviteleri sırasında meydana gelebilecek her türlü hasar enzimi bloke eder ve toksik bileşikler organizmaya zarar verir.

Detoksifikasyon mekanizmaları Faz I ve Faz II tepkimeleri olarak ikiye ayrılır. Faz I; oksidasyon, hidroliz ve kopma tepkimelerinin gerçekleştiği basamaktır. Faz II'de ise Faz I tepkimeleri sonucunda oluşan polar bileşiklerin konjugasyon tepkimeleri meydana gelir. Konjugasyon tepkimeleri kimyasal maddelerin organizmadaki endojen maddelerle birleşerek vücuttan atılımının kolaylaştığı aşamadır (15).

Glutatyon-S-Transferaz'lar Faz II tepkimelerinde rol oynayan ve elektrofillerin büyük bir kısmının Glutatyon (GSH) ile konjugasyonunu katalizleyen kompleks ve çok işlevli bir enzim ailesidir (14,16).

GST'ler katalitik rollerine ek olarak benzo[a]pyrene diol-epoxide, aflatoxin- 2,3- epoxide ve reaktif sulfatlar gibi karsinojenleri (34), bilirubini (35), steroid ve tiroid hormonları (36), pestisidleri ve çevre kirleticilerini (37) bağlayarak hücre membranıyla etkileşimini ve yığılmasını önlemektedir.

2.2.1. GST'lerin Sınıflandırılması ve Yapısı

Memeli GST'leri yedi sınıfa ayrılır. Bu enzim sınıflarından beş tanesi sitozolik, iki tanesi ise membran bağlıdır. Sitozolik enzim sınıflarının 13 adet alt birimi bulunmaktadır (34,38). Sitozolik enzim sınıfları ve alt birimleri tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Sitozolik GST sınıfları, altbirimleri ve bulunduğu dokular

Sitozolik GST sınıfları	Sitozolik GST altbirimleri	Bulunduğu dokular
Alpha (α)	GSTA1,GSTA2,GSTA3,GSTA4	Karaciğer, Böbrek, Beyin, Testis
Mu (μ)	GSTM1,GSTM2,GSTM3,GSTM4,GSTM5	Karaciğer, Beyin, Testis
Pi (π)	GSTP1	Karaciğer, Beyin, Testis
Theta (θ)	GSTT1,GSTT2	Karaciğer
Sigma(δ)		Dalak

Aynı GST sınıfından olan alt birimler kendi aralarında dimer oluşturabilirken farklı sınıfta bulunan alt birimlerle dimer oluşturamazlar (38).

Sitozolik GST'ler dimerik proteinlerdir ve her bir alt birimin tahmini moleküler ağırlığı 25.000 Da'dur. GST proteinlerinin büyük bir kısmı karaciğerde bulunur ve total çözümlü proteinin % 3-5'ini teşkil eder (14).

Oksidasyon sisteminde yer alan pek çok metabolik enzimde olduğu gibi GST'de de bireyler arası çeşitlilik (polimorfizm) mevcuttur. Bu gen ailesindeki genetik polimorfizm vücuda alınan zararlı kimyasalların farklı metabolize edilmesinin en önemli nedenidir. GSTM1 polimorfik olarak eksprese olur ve üç alleli vardır (GSTM1- 0, GSTM1a, GSTM1b). GSTT1 lokusunda ise fonksiyonel olarak iki farklı genotip tanımlanmıştır. Birincisi homozigot bir delesyon sonucu meydana gelen GSTT1- 0'dır, ikincisi ise bir yada iki fonksiyonel alleli bulunan genotiplerle uyuşan GSTT1- 1 dir. Bunların dışında GSTP1'inde üç değişik alleli

vardır. GSTT veya GSTM'nin homozigot delesyonu (null genotip) bulunan bireylerde GST aktivitesi ya azalmıştır ya da hiç yoktur, bu yüzden bu bireylerde elektrofilik karsinojenlerin etkin olarak elimine edilmesi mümkün değildir (39).

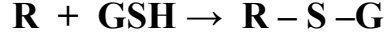
Detoksifikasyon enzim gen polimorfizmlerinin akut lösemi etiolojisindeki rollerini araştırmak amacıyla düzenlenmiş bir çalışmada GSTM1 "null" allelinin akut lösemi gelişiminde risk faktörü oluşturduğu tespit edilmiştir (40). Türk toplumunda akciğer kanserli hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada ise yine GSTM1 "null" allel frekansı incelenmiş ve buna bağlı olarak GSTM1 enzim aktivitesinin olmadığı bireylerde akciğer kanseri riskinin fazla olduğu gözlenmiştir (41).

Prostat kanserli hastalarda polimorfik GSTT1, GSTM1 ve GSTP1 enzimleri ile hastalık arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bulgulara ulaşılamamıştır (42). Ayrıca GSTT1 enzim aktivitesinin olmadığı bireylerde akciğer kanseri gelişme riskinin üç kat fazla olduğu bildirilmiştir (43).

2.2.2. GST'nin Glutatyon (GSH) ile Konjugasyonu

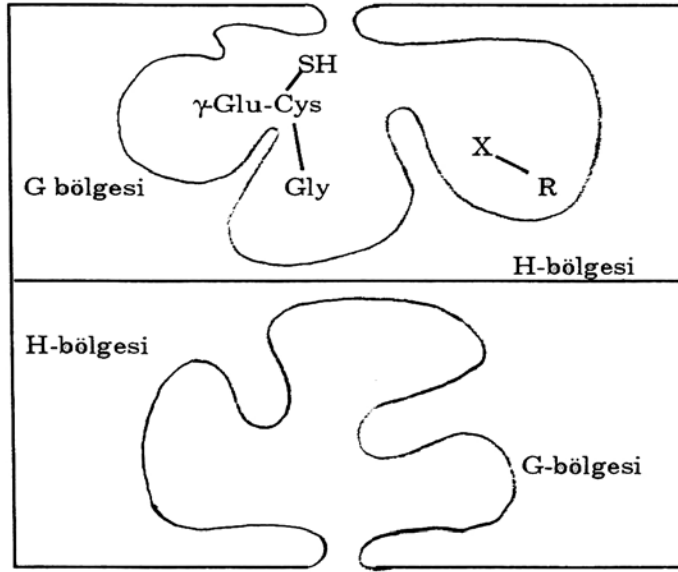
Detoksifikasyon sistemleri arasında GST'ler kritik bir rol oynar, organizmayı elektrofillere ve oksidatif stres ürünlerine karşı korur (16). GST bu görevini GSH ile elektrofilik bileşiklerin konjugasyonunu sağlayarak yapar (44).

Glutatyon (γ -glutamil sisteinil glisin) ; glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptiddir. Başta karaciğer olmak üzere çoğu dokuda yüksek düzeyde bulunur. DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve hücre dışı transportlar gibi hücresel fonksiyonları dışında antioksidan olarak hücre savunmasında da rol oynar. Bir grup toksik elektrofilik bileşik şekil 3'te gösterilen tepkimelerle GSH'a konjuge edilir (45, 46, 47).



Şekil 3: Glutatyon ile elektrofilik bileşiklerin konjugasyonu tepkimesi

GSH'nin elektrofilik bileşiklerle konjugasyonu enzim üzerindeki G ve H olmak üzere iki farklı bölge ile katalizlenmektedir. G bölgesi GSH'nin, H bölgesi ise elektrofilik bileşiklerin bağlanma bölgesidir (şekil 4) (48).



Şekil 4: Dimerik bir GST molekülünün iki aktif bölgesinin gösterimi

Potansiyel olarak toksik bileşikler GSH ile konjuge edilmeyecek olursa bunlar DNA, RNA veya hücre proteinleri ile kovalent bağlanabilecek ve bu da ciddi hücre hasarına yol açabilecektir. Bu nedenle GSH; ilaçlar, karsinojenler ve pestisidler gibi kimyasal bileşiklere karşı önemli bir savunma mekanizması oluşturur (2).

GSH konjugasyonu hücre içerisinde oluşur, daha sonra safra ya da genel dolaşıma salınır. Kana geçen glutatyon konjugatları atılmadan önce daha ileri metabolize edilir. Glutatyona ait glutamil ve glisinil grupları özgül enzimler ile uzaklaştırılır ve kalan sisteinil parçasının amino grubuna asetil - KoA tarafından

bir asetil grubu eklenir. Oluşan bileşik L-asetilsisteinin bir konjugatı olan merkaptürik asit olup böbrek tarafından idrarla atılmaktadır (2,14).

Bazı elektrofilik bileşiklerin metabolitleri GST etkinliğini uyarabilir ya da inhibe edebilir. Ratlarda yapılan bir çalışmada Brombenzen ve karbontetraklorür uygulamasından sonra karaciğer GST aktivitesinin azaldığı, serum GST aktivitesinin ise arttığı gözlenmiştir (44). Şifalı bir bitki olan *Thonningia sanguinea*'dan izole edilen ve antioksidan bir madde olan thonningianin A (ThA), *in vitro* olarak karaciğer sitozolik GST ile etkileştirildiğinde kuvvetli inhibitör etkisi yaptığı tespit edilmiştir (37). Yine ratlarda yapılan bir çalışmada kahveye özgü bileşenler olan ve antikarsinojenik etkisiyle bilinen Kafestol ve Kahveol'un GSTP aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. GSTP düzeyinde geri dönüşümlü bir indüksiyon görülmüştür. Kafestol ve Kahveol'un antikarsinojenik etkisinin GSTP'nin bu spesifik indüksiyonuna bağlı olabileceği düşünülmektedir (49).

Plasental GST ile çeşitli ilaçların etkileşiminin araştırıldığı bir çalışmada; prematüre doğumların önlenmesinde kullanılan Pre-Par (ritodrin, HCl) ve antibakteriyel etkili Ampisid (ampisilin)'in enzim aktivitesini % 50- 55 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir. Antiemetik olarak kullanılan Metpamid (metoclopramid) enzim aktivitesini % 80- 85 oranında inhibe ederken, klinik kullanımı oldukça yaygın olan ağrı kesici ve ateş düşürücü etkili Novaljin (metamizol)'in enzim aktivitesini % 70- 80 oranında inhibe ettiği saptanmıştır. Bu bulgular hamilelerin bu tip ilaçları kullanırken çok dikkatli olması gerektiğini ortaya koymaktadır (50).

Ranitidin H₂ reseptörleri üzerinde histaminin etkisini bloke eden bir ilaçtır. Duodenum ve mide ülserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Ranitidin uygulanan ratlarda karaciğer GST enziminin aktive olduğu tespit edilmiştir. Bu aktivasyon anlamlı bir düzeyde olduğu için GST mekanizması ile ilacın inaktive olduğu düşünülmektedir (44).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deney Hayvanları ve Nitrozopirolidin Uygulanması

Araştırmamızda Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarından sağlanan, daha önce başka bir amaçla üzerinde hiçbir deney yapılmamış sağlıklı 24 adet Wistar albino (Rat rattus var. albino) sıçan kullanıldı. Her birinde üç erkek ve üç dişi sıçan bulunan üç ayrı deney (n=6 x 3) ve bir kontrol grubu (n=6) oluşturuldu. Sıçan ağırlıklarının 140- 170g arasında olmasına dikkat edildi. Araştırma süresince tüm sıçanlara sınırsız yem ve serbest su verildi.

Sıçanlara uygulanacak dozlar belirlenirken daha önce Uluslararası kanser araştırma kurulu çalışma grubu tarafından kanser morbidite çalışmalarında kullanılan 1,6mg-150mg arasında değişen oral dozlar ile Mc Coy ve arkadaşlarının çalışmalarında kullanılan 0,5mmol-0,25mmol'lık oral dozlar yardımıyla ortalama intraperitoneal doz değeri belirlendi (5, 29). Bu değerden yola çıkarak I.grup için 10µl /50ml, II. grup için 20µl/50ml, III. grup için 30µl/50ml N-Npyr çözeltisi hazırlandı. Çözücü olarak serum fizyolojik (SF) kullanıldı. Çözeltiler uygulama anına kadar ve uygulama esnasında alüminyum folyo ile sarılarak güneşten korundu. N-Npyr 0,5 ml'lik hacimlerde; I.gruba 10µg/sıçan, II. gruba 20µg/sıçan, III. gruba 30µg/sıçan olacak şekilde intraperitoneal olarak verildi. Dozlamada 1ml'lik kullanılıp atılabilir insülin enjektörleri kullanıldı. Dozlama deney gruplarına belirtilen miktarlarda 7 defa gūnaşırı olarak yapıldı. Kontrol grubuna ise Npyr yerine SF enjekte edildi.

Dozlama süresinin bitiminde metabolik uyumunu sağlamak amacıyla sıçanlar 24 saat aç bırakıldı. .Daha sonra yaşam ortamlarından alınarak uygulama odasına getirilen sıçanlar servikal dislokasyon yöntemi ile öldürüldü. Sıçanlar vakit kaybetmeden tüm batın açılarak, böbrek ve karaciğerleri çıkarıldı. Organlar

soğuk 0,15M KCl (izotonik sıvı) içinde üzeri bistüri ile çizilerek bir süre yıkandı (Kısmi perfüzyon) ve sonra sargı bezi üzerine alınarak fazla KCl uzaklaştırıldı.

3.2. Dokuların Özütleme (Homogenizasyonu)

Homogenizasyon (Özütleme) için B.Braun tipi teflon cam homogenizatör kullanıldı. Kullanım öncesinde homogenizatör kabı buz ile dolduruldu. Daha sonra her bir organdan 1,5g ağırlığında parçalar tartıldı. Tartılan dokuların üzerine 1: 3 g/ml oranında 0,15 M KCl eklenerek homogenizatör tüpüne alındı. Karaciğer 1400 devir/dk'da, böbrek ise 1200 devir/dk'da 3 vuruşla homogenize edildi.

3.3. Sitoplazmik Fraksiyonun Eldesi

Homogenatların daha sonraki deneysel aşamalarda kullanılabilmesi için sitoplazmik fraksiyonlarının elde edilmesi gerekiyordu. Bunun için soğutmalı ve vakumlu olan Beckman Model J 2 Santrifüj, santrifüjün JA 21 başlığı (rotor) ve orijinal santrifüj tüpleri kullanıldı.

Stoplazmik fraksiyonu elde etmek için homogenatlar 16500 rpm'de 0°C ve vakumla 15 dk santrifüj edildi. Oluşan dökelti sıvısı (süpernatant) santrifüj tüplerinden mikropipet yardımıyla alınarak daha önce buz banyosunda bekletilen silikonize tüplere pipetlendi. Tüplerdeki örnekler çalışma süresince buz banyosu içerisinde tutuldu.

3.4. GST Aktivitesinin İzlenmesi

Çalışmamızda GST özgül aktivitesini değerlendirirken tüm stoplazmik GST değerleri bir arada izlenmiş, alt tiplerine yönelik bir çalışma yapılmamıştır. Aktivitenin izlenmesinde aşağıdaki çözeltilerden faydalanıldı.

A - Fosfat Tamponu (10 mM, pH= 6,7)

B - Glutasyon (GSH, 5mM)

C - CDNB (1 kloro 2,4 dinitrobenzen, 300mM)

Tepkime karışımı ise aşağıda gösterildiği gibi hazırlandı.

Fosfat Tamponu	2,725 mL
GSH	200 µL
CDNB	50 µL
Örnek	25 µL

Buzdolabında saklanan Fosfat tamponu, GSH ve CDNB enzim aktivitesini etkilememesi için çalışmaya başlamadan önce okuma odasında oda sıcaklığına ulaşana dek ısıtıldı. Bu çözeltilerle hazırlanan tepkime karışımına en son enzim kaynağı eklenerek tepkime başlatıldı. Enzim kaynağı olarak karaciğer ve böbrek örnekleri kullanıldı. GST aktivitesinin absorbansı Labomed.Inc. Spectro UV- VIS Double Beam PC Scanning ile 340 nm dalga boyunda 30 saniyede bir kaydedildi. Absorbans değerlerinin farkı alınarak, 30 saniyedeki absorbans değişimi (ΔA) bulundu. Bu değerler kullanılarak 30 saniyedeki volum aktivite değerler hesaplandı.

Volum Aktivite 30 saniye (VA) değerleri;

Volum Aktivite 30 saniye (U/mL) = $3,00 \times \Delta A / E_{340} \times 1 \times \ddot{O}$
($E_{340} = 6,22 \text{ cm}^2 / \text{mol}$, \ddot{O} = Tepkimeyi başlatan örnek miktarı

formülü yardımıyla hesaplandı.

3.5. Protein Derişim Değerlerinin Bulunması

Örneklerin protein derişim değerleri "Lowry Yöntemi" ile bulunmuştur (51).

Çözeltileri,

A – 0,5 g beş sulu bakır sülfat ve 1g sodyum sitrat 100 mL suda çözüldü.

B – 20 g sodyum karbonat ile 4 g sodyum hidroksit 1L suda eritildi.

C – 50 mL çözelti B ile 1mL çözelti A kullanım öncesi karıştırıldı.

D – 10 mL Folin Ciocalteu's Phenol (2N Sigma, F- 9252) üzerine 10 mL su eklendi.

E – Standart protein olarak sığır serum albümini (2mg/mL) kullanıldı.

0,5 mL örnek ile 2,25 mL çözelti C karıştırıldı ve 10 dakika oda ısısında bekletildi. Sonra 0,25 mL çözelti D'den eklendi ve çalkalandı. 30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 650 nm'de absorbanslar okundu.

Sığır serum albümininden hazırlanan stok (2mg/mL) 1:3 oranında sulandırılarak Standart protein eğrisi oluşturmak için kullanıldı. Standart protein eğrisinde absorbanslara karşılık gelen protein derişimleri bulunarak bu değerlerle bir grafik hazırlandı. Örneklerin absorbansları bu grafiğe yerleştirilerek örneklerin protein derişim değerleri hesaplandı.

3.6. Enzim Özgöl (Spesifik) Aktivitesinin Hesaplanması

Doku örneklerinin enzim özgöl (spesifik) aktiviteleri (SA), daha önceki aşamalarda kaydedilen volüm aktivite değerleri ile protein derişim değerleri kullanılarak;

$$\text{Özgöl aktivite (U/mg protein)} = \text{VA 30 saniye / Protein derişimi} \\ \text{(mL inkübasyon karışımındaki mg protein)}$$

formülü ile hesaplandı.

3.7. Verilerin Değerlendirilmesi

Yapılan deneyler sonucunda elde edilen veriler SPSS (ver: 10.0) programına yüklenerek verilerin değerlendirilmesinde "Kruskal Wallis testi" kullanılmıştır. Kruskal Wallis testi sonucunda gruplar arası farklılık önemli bulunduğunda; farklılık yapan grup ya da grupları belirlemek için " Mann-Whitney U testi " uygulanmıştır (52). Yanılma düzeyi 0,05 olarak alınmıştır. P (olasılık) değeri yanılma düzeyinden küçük olduğunda farklılık önemli kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Araştırmamızda 10µl/50ml, 20µl/50ml ve 30µl/50ml N-Npyr çözeltisi ile etkileştirilen sıçanlar dozlama süresince yaşam ortamlarında gözlemlendi. Bu gözlemler sonucunda sıçanların davranışlarında belirgin bir değişime rastlanmadı. Dozlama sürecinin bitiminde servikal dislokasyonla öldürülen sıçanlar tüm batin açıldığında iç organların görünümünde herhangi bir anormallik gözlenmemiştir. N-Npyr'nin GST aktivitesi üzerine etkisi hem karaciğer hem de böbrek için değerlendirildiğinde tablo 2'de gösterilen sonuçlara ulaşılmıştır.

Tablo 2: Npyr ile etkileştirilen sıçanlarda karaciğer ve böbrek GST aktivitesinin gruplara göre değişimi

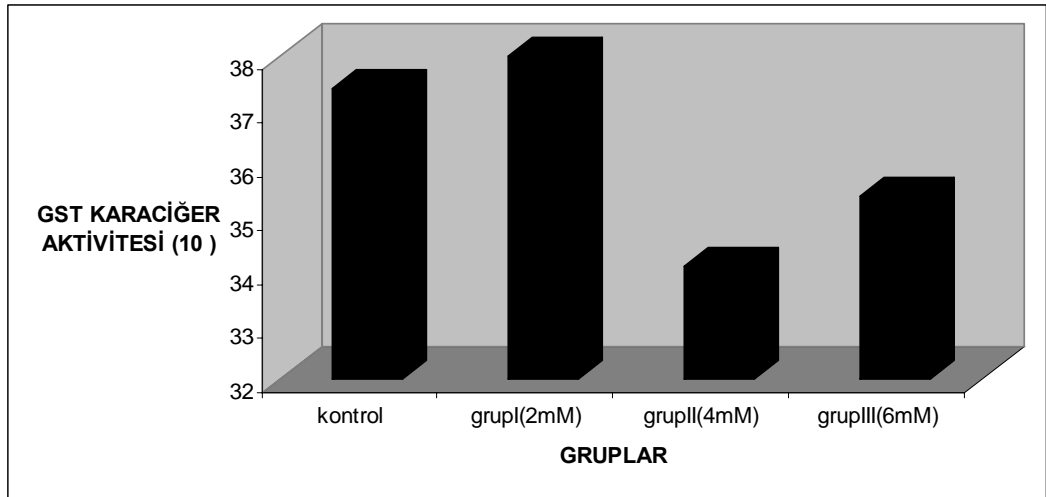
GRUPLAR	KARACİĞER X ± S (x 10 ⁻³)	BÖBREK X ± S (x 10 ⁻³)	KARACİĞER BÖBREK (x 10 ⁻³)
KONTROL	37,4 ± 10,3	19,7 ± 6,2	p = 28 (p<0,05)
GRUP I	38,0 ± 8,9	17,1 ± 5,1	p = 28 (p<0,05)
GRUP II	34,1 ± 15,8	10,6 ± 3,6	p = 28 (p<0,05)
GRUP III	35,4 ± 2,0	16,0 ± 5,8	p = 46 (p<0,05)
SONUÇ	KW= 720 p > 0,05	KW= 37 p < 0,05	

Tablo 2'de taralı olarak gösterilen bölgeler istatistiksel olarak anlamlı değişiklikleri ifade etmektedir. Burada da görüldüğü gibi karaciğer ve böbrek GST aktiviteleri arasında belirgin bir farklılık vardır.

4.1. Nitrozopirolidin'in Karaciğer GST Aktivitesi Üzerine Etkisi

Her dört gruptaki sıçanların karaciğer GST değerleri karşılaştırıldığında; I.grupta GST aktivitesi kontrol grubuna göre artış göstermiştir. II. grupta ise GST aktivitesi hem kontrole hem de I.gruba göre çok düşük seviyede kalmıştır. III. gruba bakıldığında GST aktivitesi kontrole ve I. gruba göre düşükken, II. gruba göre yüksektir. Ancak istatistiksel olarak her dört gruptaki karaciğer GST aktivite değerleri arasındaki farklılık önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). Karaciğer GST aktivite değişimi grafik 1 'de gösterilmiştir.

Grafik 1: Karaciğer GST aktivitesinin gruplara göre değişimi

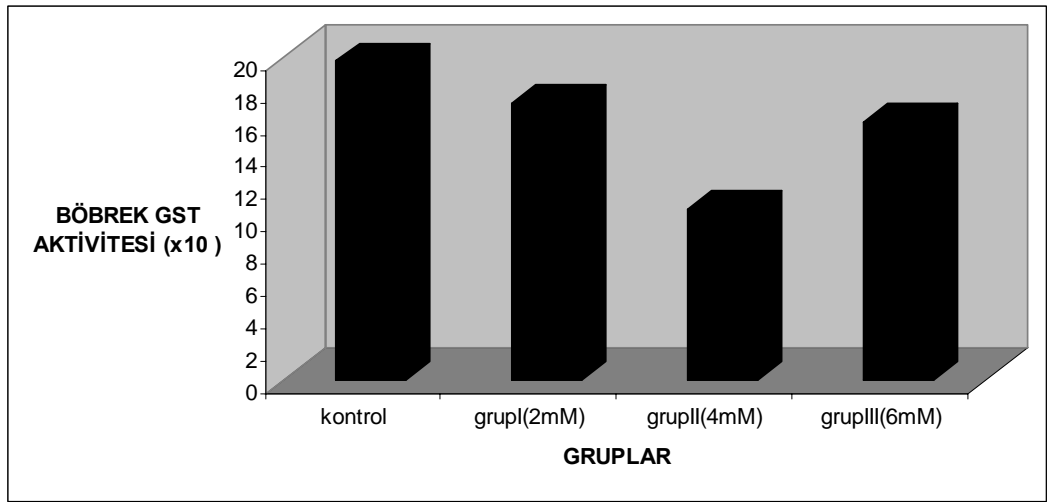


4.2. Nitrozopirolidin'in Böbrek GST Aktivitesi Üzerine Etkisi

Gruplara ait böbrek GST değerleri karşılaştırıldığında her üç grubun enzim değerlerinin kontrol grubuna oranla düşük olduğu gözlenmiştir. I. ve III. gruplardaki GST aktivitesi birbirine yakınken, II. grup GST aktivitesi çok düşük seviyede kalmıştır. Buna göre gruplardaki sıçanların böbrek enzim aktivite değerleri arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Grupların böbrek GST aktivitesi ikişerli olarak karşılaştırıldığında; kontrol ile II. grup ($p = 0,015$), I. grupta II. grup ($p = 0,026$) ve II. grupta III. grup ($p = 0,041$) arasındaki farklılık önemli bulunurken ($p < 0,05$), diğer gruplar arası farklılıklar önemsiz bulunmuştur ($p > 0,05$). Böbrek GST aktivite değişimi grafik 2’de gösterilmiştir.

Grafik 2: Böbrek GST aktivitesinin gruplara göre değişimi



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çağdaş yaşam ve gelişen teknoloji; insanların geleceğini, sağlığını ve yaşadığı çevreyi tehdit eden birçok unsuru da beraberinde getirmiştir. Gerek değişen beslenme alışkanlıkları ve besinlerde bulunan katkı maddeleri gerekse su kaynaklarının kirlenmesi ve yoğun sigara tüketimi gibi etkenler insan vücudunun birçok kimyasalla etkileşmesine neden olmaktadır. Bu kimyasallar genelde bir atom ya da molekül yörüngesinde eşleşmemiş bir elektron içeren yüksek oranda reaktif elektrofilik bileşiklerdir. Elektrofilik bileşikler vücuda dışarıdan çeşitli yollarla alınabildiği gibi, vücutta doğal metabolik yollarla da oluşabilir. Endojen orijinli elektrofilik bileşikler detoksifikasyon sistemleriyle ortadan kaldırılır ve herhangi bir sitotoksositeye yol açmaz. Ancak vücut yoğun olarak bu elektrofilik bileşiklerle etkileşirse bunlar toksik, kanserojenik, mutajenik ve teratojenik hasarlara neden olabilmektedir (46). Bir nitrozamin türevi olan Npyr doğada çok yaygın olarak bulunan bir elektrofilik bileşiktir.

Yapılan birçok çalışmada Npyr'nin kanserojenik ve mutajenik etkisi tespit edilmiştir.

Mc Coy ve arkadaşlarının Suriye altın hamsterlarıyla yaptığı bir çalışmada; 25 hafta boyunca günde 0,5 mmol Npyr verilen hayvanlarda larinks ve trake tümörleri oluşmuştur (29).

Sezgin ve Atalay'ın insan lenfosit kültürlerinde Npyr'nin etkisini incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada; Npyr'nin kromozom anomalileri ve satellit separasyonuna sebep olduğu, DNA, RNA ve protein sentezinde inhibisyona yol açtığı bildirilmektedir (27).

Npyr'nin ayrıca birçok metabolik enzimle etkileşerek aktivitelerinde değişikliğe yol açtığı birçok çalışmayla ortaya konmuştur. Çetinkaya ve Atalay Npyr'nin farelerde NA/K-ATPaz enziminin aktivitesini % 22 oranında inhibe ettiğini bulmuşlardır (33). Cengiz ve Atalay da 2 mM Npyr'nin Piruvat kinaz enziminde % 73, 6 mM Npyr'nin Glukoz -6- fosfatdehidrojenaz enziminde % 98 ve 30 mM Npyr'nin sitrat sentetaz enziminde % 71 oranında inhibisyona yol açtığını bildirmişlerdir (32).

Glutatyon-S-Transferazlar elektrofilik bileşiklerin büyük bir kısmının glutatyonla konjugasyonunu katalizleyen, detoksifikasyon sisteminin en önemli enzimlerinden birisidir. GST'lerin büyük bir kısmı karaciğerde bulunur. Çalışmamızda bir elektrofilik bileşik olan ve hedef organları karaciğer ve böbrek olarak bilinen Npyr'nin karaciğer ve böbrek GST enzimleri ile etkileşimi incelendi ve şu sonuçlara ulaşıldı. Deney grupları ve kontrol grubu karaciğer enzim değerleri karşılaştırıldığında 2 mM Npyr ile etkileşen I. grup GST değerleri kontrole göre artış gösterirken, sırasıyla 4mM ve 6 mM Npyr ile etkileşen II. ve III. grup GST değerleri kontrole göre azalmıştır. I. gruptaki artış 2 mM gibi düşük dozdaki Npyr'ni elimine edebildiği ve bu yüzden aktive olduğu şeklinde yorumlanabilir. Çetinkaya ve arkadaşları farklı sürelerde günde 2 mg/kg intramuskular olarak ranitidin enjekte ettikleri ratlarda karaciğer GST enziminin aktive olduğunu bulmuşlardır (44). Yelkovan ve arkadaşları ise tavşan karaciğer ve böbreğinden izole ettikleri GST ile 0,1 M ve 0,5 M Npyr'ni *in vitro* etkileştirdiklerinde; GST aktivite değerlerinde herhangi bir değişiklik gözlemlenmemişlerdir (53).

Gruplara ait böbrek GST enzim değerleri karşılaştırıldığında her üç deney grubunun enzim değerlerinin kontrol grubuna oranla daha düşük olduğu gözlenmiştir. I. ve III. gruplardaki GST miktarı birbirine yakinken, II. grup GST miktarı çok düşük seviyede kalmıştır. Buna göre gruplardaki sıçanların böbrek enzim değerleri arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

Artan Npyr dozuna göre aktivasyonu azalan GST enzimleri sağlıklı dokuyu potansiyel olarak riskli hale getirmektedir. Azalan detoksifikasyon işlemi zararlı metabolitlerin bu dokuda birikimine neden olacak ve buna paralel olarak da sitotoksik ve genotoksik olayları beraberinde getirecektir. Karaciğerde aktivasyonda belirli bir dozdan sonra meydana gelen düşüş de aynı şekilde yorumlanabilir.

Yapılan benzer çalışmalarda diğer bazı elektrofilik bileşiklerinde GST aktivitesinde azalmaya yol açtığı bulunmuştur. Aniya ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada brombenzen ve karbontetraklorür uygulamasından sonra rat karaciğer GST aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir (44). Yine Maxwell ve arkadaşlarının çalışmasında antioksidan bir madde olan thonningianin A in vitro olarak karaciğer sitozolik GST ile etkileştirildiğinde kuvvetli inhibitör etkisi yapmıştır (37).

Bu çalışmalara ek olarak, plasental GST ile çeşitli ilaçların etkileşiminin araştırıldığı bir çalışmada; prematüre doğumların önlenmesinde kullanılan Pre-Par (ritodrin HCl) ve antibakteriyel etkili Ampisid (ampisilin)'in enzim aktivitesini % 50- 55 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir. Antiemetik olarak kullanılan Metpamid (metoclopramid) enzim aktivitesini % 80- 85 oranında inhibe ederken, klinik kullanımı oldukça yaygın olan ağrı kesici ve ateş düşürücü etkili Novaljin (metamizol)'in enzim aktivitesini % 70- 80 oranında inhibe ettiği saptanmıştır. (50).

Tüken; insan plasental GSTP enziminin bazı nitrozaminlerle in vitro etkileşimini incelediği çalışmasında 22 mM Npyr'nin enzimi % 50 oranında inhibe ettiğini bulmuştur (54). Çelik de benzer şekilde civcivlerden saflaştırdığı karaciğer GST enzimlerinin bir bitki büyüme düzenleyicisi olan daminozid ile etkileşimi sonucunda; daminozidin GST'yi doza bağlı olarak inhibe ettiği sonucuna ulaşmıştır (55).

Yapılan bu çalışmaların sonuçları böbrek GST aktivitesinde gözlemlediğimiz azalmayla paralellik göstermektedir. Npyr'nin GST aktivitesinde meydana getirdiği azalmaya; bu elektrofilik bileşiğin enzime bağlanması sonucu aktif merkezin üç boyutlu yapısını değiştirmesi ve/veya substrata karşı katalitik aktivitenin azalması neden olabilir. Bunun dışında Npyr gibi elektrofilik bileşikler proteinlerdeki aminoasitlerin nükleofilik atomlarına atak yapabilir. Enzimdeki bu grupların alkilenmesi doğal olarak katalitik aktiviteyi azaltacaktır. Mutajenik etkisi bilinen Npyr'nin DNA'ya ve DNA'nın paketlenmesinde ve genlerin ekspresyonunda rol alan proteinler üzerine etki ederek GST sentezini inhibe edebileceği de göz ardı edilmemelidir.

Gerek yaptığımız çalışma gerekse literatür verileri Npyr'nin detoksifikasyonunda GST'nin rol almadığını işaret etmektedir. Buradan Npyr'nin GST için substrat olmadığı sonucuna da ulaşılabilir. Yelkovan ve arkadaşları tavşan karaciğer ve böbreğinden izole ettikleri GST ile 0,1 M ve 0,5 M Npyr'ni *in vitro* etkileştirdiklerinde; GST aktivite değerlerinde herhangi bir değişiklik gözlemlenmemişlerdir (53). Npyr, detoksifikasyon sistemlerinin Faz I ve Faz II reaksiyonlarını katalizleyen başka enzimlerce substrat olarak kullanılıyor olabilir. Söz konusu enzimler üzerinde de benzer çalışmalar yapılmasının, Npyr metabolizması ile ilgili yeni bilgilere ulaşılması açısından gerekli olduğu kanısındayız.

6. ÖZET

Nitrozopirolidin (Npyr), hem endojen hem de değişik kaynaklardan ekzojen olarak organizmalara ulaşabilen karsinojenik ve hepatotoksik bir maddedir. Npyr'in hedef organları olarak bilinen karaciğer ve böbrekte, sitoplazmik Glutasyon-S-Transferaz (GST) özgül aktivitesi üzerine olası *in vivo* etkisini incelendik.

Her birinde üç erkek ve üç diři sıçan bulunan üç ayrı deney (n=6 x 3) ve bir kontrol grubu (n=6) oluşturuldu. I. deney grubu sıçanlara 2 mM, II. deney grubu sıçanlara 4 mM, III. deney grubu sıçanlara 6 mM Npyr ve kontrol grubu sıçanlara da serum fizyolojik çözeltisi intraperitoneal olarak 0,5 ml'lik hacimler halinde yedi defa gūnaşırı (iki gūnde bir) verildi.

Deney grupları ile kontrol grubu karaciğer GST özgül aktivite değerleri karşılaştırıldığında; I. grupta kontrole göre artış gözlenirken, II. ve III. gruplarda azalma gözlendi. Deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise karaciğer GST özgül aktivite değerleri; I. grupta, II. ve III. gruplara göre, III. grupta da II. gruba göre daha yüksek bulundu ($p>0,05$). Gruplara ait böbrek GST özgül aktivite değerleri karşılaştırıldığında her üç grubun enzim aktivitesinin kontrol grubuna oranla düşük olduğu gözlendi. I. ve III. gruplardaki GST özgül aktivitesi birbirine yakınken, II. grup GST aktivitesi çok düşük seviyede kaldığı bulundu ($p<0,05$).

Bulgularımız Npyr'nin sıçanlarda karaciğer GST özgül aktivitesini etkilemediği, böbrek GST aktivitesinde ise azalmaya neden olduğunu göstermektedir.

7. SUMMARY

INVESTIGATION ON THE SPECIFIC ACTIVITY OF CYTOPLASMIC GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE FROM LIVER AND KIDNEY OF RATS TREATED WITH N-NITROSPYRROLIDINE

Nitrosopyrrolidine is a carcinogenic and hepatotoxic compound which can be transmissible to organisms from various endogenic and exogenic sources. We have investigated the effect of Npyr on the specific activity of Glutathione-S-Transferase (GST) in target organs such as liver and kidney.

Three different experimental rat groups having 3 males and 3 females (n=6x3) and a control group (n=6) were established. Three groups of rats were supplied with 2mM, 4mM and 6mM Npyr respectively and the control group was supplied with physiologic saline solution. 0,5 ml Npyr was injected to the rats intraperitonally 7 times with two day intervals (once in two days).

When experimental groups were compare to the control group, specific activity of liver GST was increased in the first group, the activity of the enzyme was decreased in groups two and three. When three groups were compared to each other, enzyme activity was the highest in first group, then the third group and the second group have fallowed it ($p>0,05$). The kidney GST activities of all experimental groups were found lower than of control group. While the activity was found similar in the first and third groups, enzyme activity of the second group was found very low.

Our findings showed that Npyr application did not have any effect on specific activity of liver GST while it caused a decrease in the specific activity of kidney GST.

KAYNAKLAR

- 1- Knosmüller S, Schwob C, Parzefall W: Kanzerogene und gentoxische substanzen in Lebensmitteln und naturliche Protektionmechanismen. Institut für Tumorbiologie-Krebsforschung der Universität Wien. J Ernährungsmedium. 3(1):5-16, 2001
- 2- Murray K.R: Harper' in Biyokimyası. Zenobiyotiklerin metabolizması ISBN:975-95331-1-1, 799-806, 1996
- 3- Kaya S: Soframızdaki tehlike: Gıdaların pişirilmesi, işlenmesi, saklanması sırasında oluşan zararlı maddeler. Türk Veteriner Hekimleri Birliği Dergisi 2(3-4), 2002
- 4- Domanska K, Kowalski B: Effect of different storage conditions on N-nitrosamine content in polish edible offals processed meat products. Bull. Vet. Inst. 46: 317-324, 2002
- 5- International Agency for Research on Cancer Working Group, Lyon: IARC Monographs on the Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some Nitroso Compounds. Volume 17, 1978
- 6- O'Neill I.K, Von Borstel R.C, Miller C.T, Long J, Bartsch H: WHO International Agency for Research on Cancer N-Nitroso Compounds. Occurrence, biological effects and relevance to human cancer. 5,351, 1983
- 7- <http://enius.de/schadstoffe/n-nitrosopyrrolidin.html>

- 8- <http://www.inchem.org/nitrite>
- 9- Halliwell B, Gutteridge J.M.C: Free Radicals in Biology and Medicine. Third Edition 9,13,707 , 1999
- 10- Ingrid T.M. Vermeer, Danieller M.F.A. Pachen, Jan W. Dallinga, Jos C.S. Kleinjons, Jan M.S. von Maanen: Department of Health Risk Analysis and Toxicology, Maastricht University, The Netherlands. Environmental Health Perspectives 106(8), August 1998
- 11- <http://www.hekimce.com/konu.php?konu=95>
- 12- Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. Wld Hlth Org. Tech. Rep. Ser. , No:539, 1974
- 13- <http://www.cibilliyet.com/CHA/Haber-Analiz>
- 14- Seidegard J, Ekström G: The Role of Human Glutathione-S-Transferases and Epoxide Hydrolases in the Metabolism of Xenobiotics. Environmental Health Perspectives 105(4), June 1997
- 15- Raunio H, Pelkonen O: Cancer Genetics. Genetic factors in the activation and inactivation of chemical carcinogens. Drugs, Diet and Disease 1:229-258, 1995
- 16- Hirvonen A: Polymorphisms of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes and Susceptibility to Cancer. Environmental Health Perspectives 107(1):37-47, Feb. 1999
- 17- <http://www.sanitaweb.it/web/Biblioteca/carcinogens/rahc/nitrosopyrrolidine.pdf>

- 18- Özdemir M, Bati B, Gökalp Y : Nitrate, nitrite and nitrosamines contents of Turkish soudjoucks. *Fleischwirtschaft* 64(12):476-7, 1497-8, 1984
- 19- Mitacek E.J, Brunnemann K.D, Suttajit M, Martin N, Limsila T, Ohshima H, Caplan L.S: Exposure to N-nitroso compounds in a population of high liver cancer regions in Thailand: volatile nitrosamine (VNA) levels in Thai food. *Food Chem. Toxicol.* 37(4):297-305 April 1999
- 20- <http://www.genetikbilimi.com/gen/serbestradikaller.htm>
- 21- <http://www.toraks.org.tr/sub/sigarasiz/sigaranın%20hücresele-etkileri-funda-öztuna.pdf>
- 22- Hunt E.J, Shank R.C: Formation and persistence of a DNA adduct in rodents treated with N-nitrosopyrrolidine. *Carcinogenesis* 12(4):571-5, April 1991
- 23- Hecht S.S, Upadhyaya P, Wang M: Reactions of alpha-acetoxy-N-nitrosopyrrolidine and crotonaldehyde with DNA. *IARC Sci. Publ.* (150):147-54, 1999
- 24- Wang M, Hecht S.S: A cyclic N7,C8 guanine adduct of N-nitrosopyrrolidine (Npyr): formation in nucleic acids and excretion in the urine of Npyr treated rats. *Chem Res Toxicol.* 10(7):772-8, July 1997
- 25- Arimoto-Kobayashi S, Anma N, Yoshinaga Y, Douki T, Cadet J, Hayatsu H: Oxidative damage and induced mutations m13mp2 phage DNA exposed to N-nitrosopyrrolidine with UVA radiation. *Mutagenesis* 15(6):473-7 Nov. 2000
- 26- Kanki K, Nishikawa A, Masumura K, Umemura T, Imazawa T, Kitamura Y, Nohmi T, Hirose M: In vivo mutational analysis of liver DNA in gpt delta transgenic rats treated with the hepatocarcinogens N-nitrosopyrrolidine, 2-amino-

- 3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, and di(2-ethylhexyl) phthalate. *Mol Carcinog.* 42(1):9-17, Jan. 2005
- 27- Sezgin İ, Atalay A: The Effects of Nitrosopyrrolidine on human lymphocyte chromosomes. *J Health Sci.* 7:29-35, 1995
- 28- Brunnemann K.D, Yu L, Hoffman D: Assesment of carcinogenic volatile N-Nitrosamines in tobacco and mainstream and sidestream smoke from cigarettes. *Cancer Res.* 37:3218-22, 1997
- 29- Mc Coy G.D, DeMarco G.J, Haxhiu L, Roggero E, Sudilovsky E.C, Sudilovsky O: Effect of acute administration of N-Nitrosopyrrolidine to male Syrian golden hamsters. *Cancer Lett.* 79(2):161-5, May 1994
- 30- Wong H.L, Murphy S.E, Wang M, Hecht S.S: Comparative Metabolism of N-Nitrosopiperidine and N-Nitrosopyrrolidine by rat liver and esophageal microsomes and cytochrome p450 2A3. *Carcinogenesis* 24(2):291-300, Feb. 2003
- 31- Cengiz M, Çetinkaya Ö, Cengiz S: The Influence of N-Nitrosopyrrolidine on rat liver gangliosides. *Tr J of Medical Sciences* 21:87-91 1994
- 32- Cengiz M: Nitrozopirrolidinin piruvat kinaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, sitrat sentetaz enzimlerine in vitro etkileri ve bağlanma özellikleri. (Doktora tezi) C.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1998
- 33- Çetinkaya Ö, Çetinkaya S, Atalay A: Effect of intraperitoneal administration of some nitrosamines on mouse liver Na/K ATPase activities. *Tr J of Medical Sciences* 22:81-3, 1994
- 34- Wormhaudt L.W, Commandeur J.N.M., Vermeulen N.P.E.: Genetic polymorphisms of human N-acetyl-transferase, cytochrome p450, Glutathione-S-

- Transferase and Epoxide Hydrolase Enzymes: Relevance to Xenobiotic Metabolism and Toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* 29(1):59-124, 1999
- 35- Fukai F, Yatomi S, Morita T, Nishizawa S, Nagai T, Katayama T: Protection of glutathione-s-transferase from bilirubin inhibition. *J Biochem (Tokyo)* 105(6): 968-73, June 1989
- 36- Ishigaki S, Abramovitz M, Listowsky I: Glutathione-s-transferases are major cytosolic thyroid hormone binding proteins. *Arch Biochem Biophys* 273(2):265-72, Sep. 1989
- 37- Gyamfi M.A, Ohtani I.I, Shinno E, Aniya Y: Inhibition of glutathione-s-transferases by thoningianin A, isolated from the African medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, in vitro. *Food and Chemical Toxicology* 42(9):1401-8, Sep. 2004
- 38- McCarver D.G, Hines R.N: The Ontogeny of Human Drug-Metabolizing Enzymes: Phase II Conjugation Enzymes and Regulatory Mechanisms. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics JPET* 300:361-6, 2002
- 39- Coughlin S.S, Hall I.J: Glutathione-s-transferase Polymorphisms and Risk of Ovarian Cancer. *Modifications in Genetics in Medicine* 4(4):250-7, 2002
- 40- Sayitoğlu M.A, Hatırnaz Ö, Özbek U: Detoksifikasyon enzim gen polimorfizmlerinin akut lösemi etiyolojisindeki rolleri. *Turkish Journal of Haematology* 20(3), 2003
- 41- Aras S: GSTM1 geninin normal bireylerde ve akciğer kanserli hastalarda RFLP analizi ile incelenmesi. T.C. Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi Kesin Raporu, 2001

- 42- La Creis R, Woodson K, Taylor P.R, Albanes D, Virtamo J, Tangrea J.A: Polimorphisms in Glutathione-s-transferase genes (GST-M1, GST-T1 and GST-P1) and susceptibility to prostate cancer among male smokers of the ATBC cancer prevention study. *European Journal of Cancer Prevention* 12(4):317-20, August 2003
- 43- Hou S.M, Falt S, Nyberg F: Glutathione-s-transferase T1-null genotype interacts synergistically with heavy smoking on lung cancer risk. *Environ Mol. Mutagen* 38(1):83-6, 2001
- 44- Çetinkaya S, Pınarbaşı H, Pınarbaşı E, Çetinkaya Ö, Atalay A: Ranitidin verilmiş ratlarda karaciğer ve böbrek glutatyon-s-transferaz aktiviteleri. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 15(2), 1993
- 45- Zengin Ulakoğlu E, Gümüştaş M.K, Belce A, Altuğ T, Kökoğlu E: Strese bağlı mide mukozası hasarında endojen Glutatyon tükenişinin enerji metabolizması ile ilişkisi. *Cerrahpaşa J. Med.* 29(3):127-31 1998
- 46- Öztürk M, Güzelhan Y, Soyar K, Tüzün Ü: Yaygın gelişimsel bozukluğu olan çocuklarda plazma Malondialdehit ve Glutatyon düzeylerinin araştırılması. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni* 11: 155-9, 2001
- 47- Özgüroğlu M: Akciğer kanserinde ilaç direnci. *Solunum* 5(3):180-3, 2003
- 48- Aliya S, Reddanna P, Thyagaraju K: Does glutathione-s-transferase (GST-Pi) a marker protein for cancer. *Molecular and Cellular Biochemistry* 253:319-27, 2003
- 49- Shilter B, Perrin I, Cavin C, Hugget A.C: Placental glutathione-s-transferase (GST-P) induction as a poten mechanism for the anticarcinogenic effect of the

coffee-specific components cafestol and kahweol. Carcinogenesis 17(11): 2377-84, Nov. 1996

- 50- Çelik K.V, Armutçu F, Aker A: İnsan plasental glutatyon-s-transferazın izolasyonu, kinetik özellikleri ve bazı ilaçlarla in vitro etkileşimi. C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 25(4):187-92, 2003
- 51- Burtis C.A, Ashwood E.R: Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Second Edition 698-9, ISBN:0-7216-4472-4, 1994
- 52- Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V: Biyoistatistik. Hatiboğlu yayınları 277-9, 2000
- 53- Yelkovan İ, Göze İ, Bakır S: İn vitro şartlarda N-Nitrozopirolidin'in tavşan karaciğer ve böbrek glutatyon-s-transferaz aktivitesine etkisinin araştırılması. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi 30(3): 13-20, 2001
- 54- Tüken F: Bazı nitrozaminlerin glutatyon-s-transferaz enzimi üzerindeki in vitro etkileri ve bağlanma özellikleri. (Doktora Tezi) C.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D. Sivas, 1993
- 55- Çelik V.K: Daminozid uygulanmış civcivlerde ince bağırsak ve karaciğer glutatyon-s-transferaz enzimlerinin karşılaştırılması olarak incelenmesi. (Doktora Tezi) C.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D. Sivas, 1995
- 56- Yelkovan İ, Göze İ, Bakır S: İn vitro şartlarda N-Nitrozopirolidin'in tavşan karaciğer ve böbrek glutatyon-s-transferaz aktivitesine etkisinin araştırılması. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi 30(3): 13-20, 2001