

59667

T.C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**BAZI NİTROZAMİNLERİN DİYABETİK RAT KARACİĞER  
MİKROZOMAL SİSTEMİ İLE OLUŞTURULAN  
DENİTROZASYON VE DEALKİLASYON  
TEPKİMELERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Yavuz SİLİĞ**

Danışman Öğretim üyesi

**Doç.Dr. Öge ÇETİNKAYA**

SİVAS 1997



Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 5/1/1984 tarih ve 84/1 no'lu kararı ile kabul edilen Tez Yazma Yönergesine göre hazırlanmıştır.



## **TEŐEKKÖR**

Bu çalıőmanın gerçekleőtirilmesinde ve akademik çalıőmalarımın her aőamasında yardımlarını gördüğüm Sayın Hocalarım Prof.Dr. Atilla ATALAY'a ve Doç. Dr. Öge ÇETİNKAYA'ya en içten teőekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
<b>2.1.0. Sitokrom P-450</b>	3
2.1.1. Sitokrom P-450 nin adlandırılması ve sınıflandırılması	3
2.1.2. Sitokrom P-450'nin ksenobiyotik metabolizmasındaki rolü	4
<b>2.2.0. Monooksijenaz Enzim Sistemlerinin verdiği reaksiyonlar</b>	6
2.2.1. Monooksijenaz aktivitesi	6
2.2.2. Oksidaz aktivitesi	7
2.2.3. İndirgeme aktivitesi	7
<b>2.3.0. Nitrozaminler</b>	8
2.3.1. N-Nitrozodimetilamin	11
2.3.2. N-Nitrozodietilamin	13
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>	16
<b>3.1.0. Kimyasallar ve Gereçler</b>	16
3.1.1. Kimyasallar	16
3.1.2. Gereçler	16
<b>3.2.0. Hayvanlar ve Enjeksiyonlar</b>	16
<b>3.3.0. Karaciger mikrozomal peletin hazırlanması</b>	17
<b>3.4.0. Protein tayini :</b>	17
<b>3.5.0. pH çalışmaları</b>	18
3.5.1. N-Nitrozodimetilamin'in denitrozasyon ve demetilasyonuna pH'nın etkisi	18
3.5.2. N-Nitrozodietilamin'in denitrozasyon ve dealkilasyonuna pH'nın etkisi	18
<b>3.6.0. N-Nitrozodimetilamin ve N-Nitrozodietilamin'in metabolizmasına NADPH-yenileyen sistemin etkisi</b>	19

3.6.1. N-Nitrozodimetilamin'in denitrozasyon ve demetilasyonuna NADPH-yenileyen sistemin etkisi	19
3.6.2. N-Nitrozodietilamin'in denitrozasyon ve dealkilasyonuna NADPH-yenileyen sistemin etkisi	20
<b>3.7.0. Kinetik Çalışmalar</b>	20
3.7.1. N-Nitrozodimetilamin'in denitrozasyon ve demetilasyon tepkimelerinin kinetik incelenmesi	20
3.7.2. N-Nitrozodietilamin'in denitrozasyon ve dealkilasyonuna tepkimelerinin kinetik incelenmesi	21
<b>3.8.0. İnhibisyon Çalışmaları</b>	21
3.8.1. N-Nitrozodietilamin'in dealkilasyonuna N-Nitrozodimetilamin'in etkisi	21
3.8.2. N-Nitrozodimetilamin'in dealkilasyonuna N-Nitrozodietilamin'in etkisi	22
<b>3.9.0. Metabolitlerin tayini</b>	23
3.9.1. Nitrit tayini	23
3.9.2. Formaldehit tayini	23
3.9.3. Asetaldehit tayini	24
3.9.4. Formaldehit varlığında asetaldehit tayini	24
<b>4. BULGULAR</b>	25
4.1.0. Kimyasal diyabet oluşumu	25
4.2.0. Optimum pH belirlenmesi	25
4.3.0. N-Nitrozodimetilamin ve N-Nitrozodietilamin'in metabolizmasına NADPH-yenileyen sistemin etkisi	28
<b>4.4.0. Km ve Vmax değerlerinin saptanması</b>	30
4.4.1. N-Nitrozodimetilamin'in denitrozasyon ve demetilasyon tepkimelerinin Km ve Vmax değerinin saptanması	30
4.4.2. N-Nitrozodietilamin'in denitrozasyon ve dealkilasyon tepkimelerinin Km ve Vmax değerinin saptanması	33

<b>4.5.0. İnhibisyon çalışmaları</b>	<b>37</b>
4.5.1. N-Nitrozodietilamin'in dealkilasyonuna	
N-Nitrozodimetilamin'in etkisi	37
4.5.2. N-Nitrozodimetilamin'in dealkilasyonuna	
N-Nitrozodetilamin'nin etkisi	40
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>44</b>
<b>ÖZET</b>	<b>52</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>53</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>54</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>63</b>

## ŞEKİLLERİN DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1 : Sitokrom P-450'nin hidroksilasyon reaksiyonu mekanizması.	6
Şekil 2 : Nitrozaminlerin dealkilasyon ve denitrozasyon reaksiyonlarının kinetiği.	10
Şekil 3 : NDMA'in denitrozasyonunun optimum pH grafiği.	26
Şekil 4 : NDMA'in demetilasyonunun optimum pH grafiği.	26
Şekil 5 : NDEA'in denitrozasyonunun optimum pH grafiği.	27
Şekil 6 : NDEA'in dealkilasyonunun optimum pH grafiği.	27
Şekil 7 : NDMA'in denitrozasyonuna NADP'in etkisi.	28
Şekil 8 : NDMA'in demetilasyonuna NADP'in etkisi.	28
Şekil 9 : NDEA'in denitrozasyonuna NADP'in etkisi.	29
Şekil 10 : NDMA'in dealkilasyonuna NADP'in etkisi.	29
Şekil 11 : NDMA'in denitrozasyonunun Michaelis-Menten grafiği.	30
Şekil 12 : NDMA'in denitrozasyonunun Lineweaver-Burk grafiği.	31
Şekil 13 : NDMA'in demetilasyonunun Michaelis-Menten grafiği.	32
Şekil 14 : NDMA'in demetilasyonunun Lineweaver-Burk grafiği.	32
Şekil 15 : NDEA'in denitrozasyonunun Michaelis-Menten grafiği.	34
Şekil 16 : NDEA'in denitrozasyonunun Lineweaver-Burk grafiği.	34
Şekil 17 : NDEA'in dealkilasyonunun Michaelis-Menten grafiği.	35
Şekil 18 : NDEA'in dealkilasyonunun Lineweaver-Burk grafiği.	36
Şekil 19 : NDEA'in dealkilasyonuna NDMA'in etkisinin Dixon grafiği. Kontrol grubu.	37
Şekil 20 : NDEA'in dealkilasyonuna NDMA'in etkisinin Dixon grafiği. Diyabet grubu.	38
Şekil 21 : NDEA'in dealkilasyonuna NDMA'in etkisinin Dixon grafiği. Diyabet+Etanol grubu.	38
Şekil 22 : NDEA'in dealkilasyonuna NDMA'in etkisinin Dixon grafiği. Diyabet+İzopropanol grubu.	39

<b>Şekil 23 :</b> NDEA'in dealkilasyonuna NDMA'in etkisinin Dixon grafiği. Diyabet+Aseton grubu.	39
<b>Şekil 24 :</b> NDMA'in demetilasyonuna NDEA'in etkisinin Dixon grafiği. Kontrol grubu.	41
<b>Şekil 25 :</b> NDMA'in demetilasyonuna NDEA'in etkisinin Dixon grafiği. Diyabet grubu.	41
<b>Şeki 26 :</b> NDMA'in demetilasyonuna NDEA'in etkisinin Dixon grafiği. Diyabet+Etanol grubu.	42
<b>Şekil 27 :</b> NDMA'in demetilasyonuna NDEA'in etkisinin Dixon grafiği. Diyabet+İzopropanol grubu.	42
<b>Şekil 28 :</b> NDMA'in demetilasyonuna NDEA'in etkisinin Dixon grafiği. Diyabet + Aseton grubu.	43

## TABLULARIN DİZİNİ

<b>Tablo 1 :</b> Streptozotosin enjekte edilen ratlarda fizyolojik parametreler	25
<b>Tablo 2 :</b> Nitrozodimetilaminin denitrozasyonunun Km ve Vmax değerleri.	31
<b>Tablo 3 :</b> Nitrozodimetilaminin demetilasyonunun Km ve Vmax değerleri	33
<b>Tablo 4 :</b> Nitrozodietilaminin denitrozasyonunun Km ve Vmax değerleri	35
<b>Tablo 5 :</b> Nitrozodietilaminin deetilasyonunun Km ve Vmax değerleri	36
<b>Tablo 6 :</b> Nitrozodietilaminin dealkilasyonuna Nitrozodimetilaminin inhibisyonunun Ki değerleri	40
<b>Tablo 7 :</b> Nitrozodimetilaminin dealkilasyonuna Nitrozodietilaminin inhibisyonunun Ki değerleri	43



## 1. GİRİŞ ve AMAÇ :

İnsanlar, çevre kirlenmesine neden olan çeşitli kimyasal maddelerin (ksenobiyotikler), ilaçlar ve gıdalardaki katkı maddelerinin artan bir şekilde etkisi altında kalmaktadır. Bu ksenobiyotiklerin çoğu canlıların karaciğer mikrozomal sistemleri tarafından metabolize edilerek konjugatlar halinde vücuttan atılmaktadır. Ksenobiyotik metabolizmasında karışık fonksiyonlu oksidazlar olarak adlandırılan enzim sistemi rol oynar. Bu enzim sistemine ayrıca sitokrom bağımlı monooksijenazlar veya kısaca sitokrom P450 enzimleri denilir. Bu enzim sistemi başta karaciğer olmak üzere bir çok dokuda yer almaktadır(1-4). Mikrozomal monooksijenaz sisteminin aktivitesi, NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesi ve P450 miktarının ölçülmesiyle saptandığı bildirilmiştir(5-7).

Çevre kirletici ve aynı zamanda karsinojenik ve mutajenik etkileri olduğu bilinen nitrozaminlerin, metabolize edilmesinde sitokrom P450'in rol oynadığı bilinmektedir(8,9). Sitokrom P450'nin bir çok izoenziminin bulunduğu gösterilmiştir. Bu izoenzimlerden sitokrom P450 IIE1'in N-Nitrozodimetilamin (NDMA) ve N-Nitrozodietilamin (NDEA) in oksidatif denitrozasyonunda ve dealkilasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca sitokrom P450'ye bağlı monooksijenazlar ile oluşturulan oksidatif dealkilasyon ve demetilasyon tepkimeleri sonucu oluşan metabolitler ve nitrozaminlerin kendilerinin nükleik asitler ve proteinlerle etkileşerek yapısal ve işlevsel bozukluklar oluşturduğu gösterilmiştir(10-12).

Nitrozodimetilamin demetilaz (NDMA<sub>d</sub>) enziminin nitrozamin metabolizmasında etkili olduğu bilinmektedir ve birçok kimyasal indükleyicinin bu sistem üzerinde etkileri çalışılmıştır. Aseton ve izopropil alkol verilen ratlarda NADPH bağımlı NDMA<sub>d</sub> aktivitesinin arttığı ve NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesinde ve sitokrom P450 içeriğinde de ılımlı bir artış olduğu bildirilmiştir(13).

Yang ve arkadaşları nitrozaminleri metabolize eden sistemin diyabet tarafından indüklendiğini göstermişlerdir(9-11). Diyabet sonrası maruz kalınan kimyasal maddelerin bu sistemi nasıl etkilediği sorusuna cevap aramak amacıyla deneysel diyabet oluşturulan ve diyabet oluşturduktan sonra çeşitli kimyasal indükleyiciler (Etanol, Aseton, İzopropanol) verilen ratlarda NDMA ve NDEA'in kinetik parametreleri ile her iki nitrozaminin birbirinin metabolizması üzerindeki etkileri incelenmiştir.

## **2. GENEL BİLGİLER :**

### **2.1.0. SİTOKROM P450**

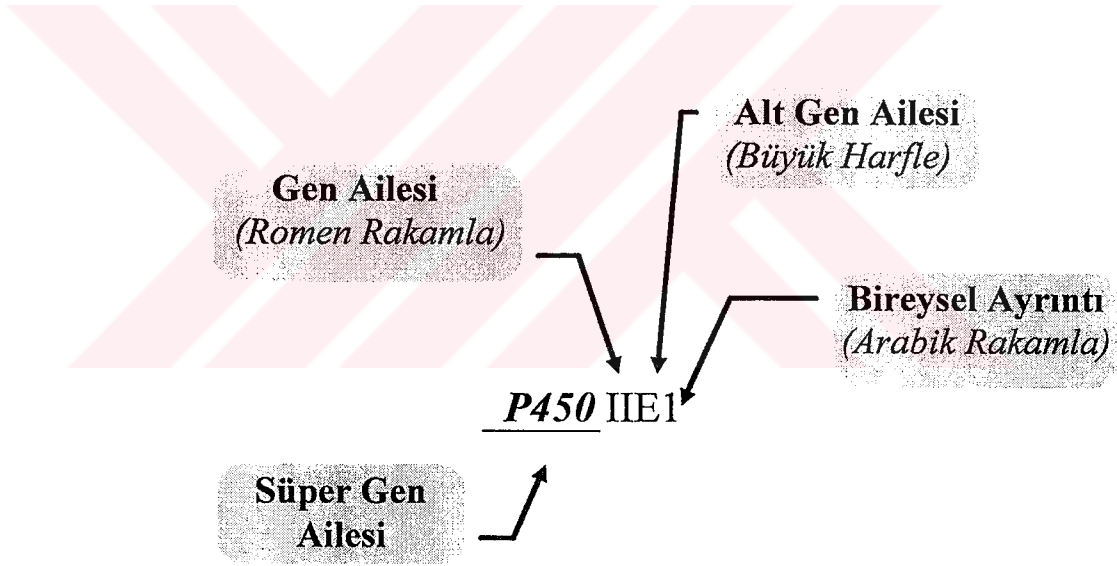
Sitokrom P450, NADPH-sitokrom P450 redüktaz ve fosfolipidlerin dahil olduğu monooksijenaz yada karışık fonksiyonlu oksidazlar diye adlandırılan enzim sisteminin bileşenlerindedir. sitokrom P450'nin araştırıldığı bütün canlı türlerinde ; bakteri, mantar, böcek, bitki, balık ve memelilede yaygın olarak bulunduğu gösterilmiştir. Bu enzim sistemi insanlarda başta karaciğer olmak üzere bir çok dokuda yer almaktadır(1,4,14).

Enzimler hücrelerde Endoplazmik Retikulum membranına gömülü olarak yer almaktadır. Karaciğer mikrozomal monooksijenaz sisteminin streoidler, yağ asitleri, ilaçlar, karsinojenler ve diğer ksenobiyotiklerin biyotransformasyonlarında önemli rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca sitokrom P450 içeren enzim sisteminin, antikanser ilaçlarının da dahil olduğu bir çok ilaçların aktivasyonunda ve inaktivasyonunda da anahtar enzim olarak rol oynadığı gösterilmiştir(15-17).

#### **2.1.1. Sitokrom P450'nin adlandırılması ve sınıflandırılması :**

Sitokrom P450 izoenzimleri çeşitli metodlarla farklı laboratuarlarda saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Bu gün 221 farklı sitokrom P450 var olduğu son çalışmalarda bildirilmiştir. Bu izoenzimlerin spektral, katalitik özellikleri ve molekül ağırlıkları farklıdır(18,19). Bu enzimler üzerinde çalışan bir çok araştırmacı saflaştırdıkları izoenzimleri adlandırmak için farklı farklı adlandırmalar kullanmışlardır. Çeşitli araştırmacılarca sistematik adlandırmadan önce nitrozaminlerin metabolizmasında rol oynayan sitokrom P450 IIE1'e P450 LM3ac, P450alc, P450DM, P450et, P450ac ve P450j gibi adlar verilmiştir (20-24).

Sitokrom P450 izoenzimleri'nin teknolojik standartizasyonuna yıllarca ihtiyaç duyulmuştur. 1982 yılında Fujii Kuriyama cDNA sını ilk kez rapor etmesinden sonra sitokrom P450'nin Süper gen ailesine göre adlandırılması yeniden yapılmıştır. Bu adlandırmada, sitokrom P450 süper gen ailesi, gen ailesi, alt gen ailesi ve bireysel ayrıntı diye 3 alt grup oluşturulmuştur. Örnek şematize edilerek aşağıda gösterilmiştir. Sitokrom P450 italik olarak (*P450*) yazılır, dahil olduğu gen ailesi(II) romen rakamıyla yazıp arkasından alt gen ailesi (E) büyük harfle yazılır ve sonuna arabik rakamlarla bireysel ayrıntı (1) eklenir. Sitokrom P450 izoenzimlerinin, 12 si bütün memelilerde olmak üzere toplam 36 gen ailesinden oluştuğu bildirilmiştir. İnsanda yaklaşık 70 farklı sitokrom P450 bilinmektedir(17,19,25,26).



### 2.1.2. Sitokrom P450'nin ksenobiyotik metabolizmasındaki rolü :

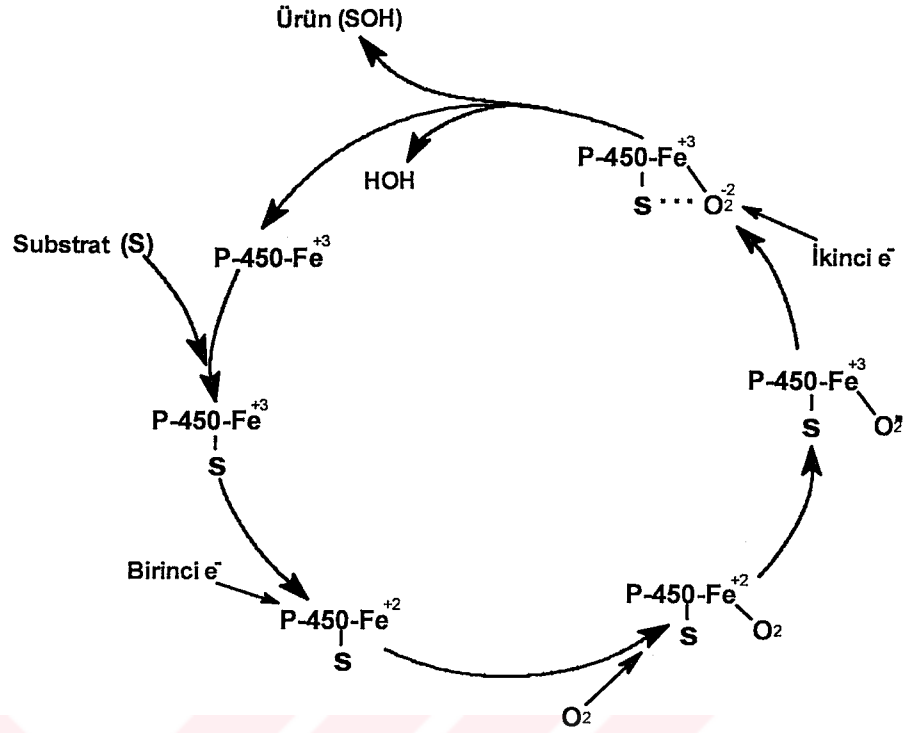
Besinlerle alınan doğal bileşikler dışında kalan çeşitli yollarla insan vücuduna giren kimyasal maddelere ksenobiyotik adı verilir. Çağdaş yaşamda ilaçtan başka, yiyecekler, içecekler ve hava yoluyla bir çok ksenobiyotiğe maruz kalınmaktadır. Bu ksenobiyotiklerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için oluşturulan biyotransformasyondan mikrozomal enzimler sorumludur. Biyotransformasyon reaksiyonları Faz I ve Faz II tepkimeleri olmak üzere iki ayrı grupta gerçekleşir.

Faz I tepkimesinde, yükseltgenme, indirgenme ve hidroliz reaksiyonları gerçekleşir. İlk ikisinde molekül üzerindeki bir kimyasal grubun daha polar bir gruba dönüşmesi söz konusudur. Üçüncüsünde ise esterleşme veya eterleşme sonucu maskelenmiş bir polar grup kopması sonucu serbest hale gelir. Sitokrom P450 gerçekleştirdiği hidroksilasyon olayı şekil 1 de gösterilmiştir.

Faz II tepkimesi ise, Faz I tepkimesi sonucu oluşan moleküllerin değişen kısmı üzerinde olur. Bu tepkimeler ; glukoronidasyon, sülfasyon, glutatyon konjügasyonu, amino asit konjügasyonu, metilasyon ve asetilasyondur.

Ksenobiyotik metabolizmasındaki bu 2 fazın baştan sona amacı, ksenobiyotiklerin sudaki çözünürlüklerini arttırmak ve böylece vücuttan atılımlarını kolaylaştırmaktır. Bazı durumlarda, Faz I tepkimesi ile ksenobiyotikler inaktif formdan biyolojik aktif bileşikler haline dönüşürler. Bu durumlarda orijinal ksenobiyotiklere proilaçlar veya prokarsinojenler denilir(1,3,27).

Ksenobiyotik olan nitrozaminlerden NDMA'nin Faz I tepkimesinde sitokrom P450 IIE1 tarafından hidrofobik bir ürüne çevrilmesi ve NDMA dealkilaz aktivitesi sonucu alkilleyici ara ürünlerin oluşumu karsinojenik aktivitenin ortaya çıkmasına yol açarken, NDMA denitrosasyonu sonucu alkilleyici olmayan ara ürünlere çevrilmesiyle de detoksifiye olduğu bildirilmiştir(11,28,29).



Şekil 1 : Sitokrom P450'nin hidroksilasyonu mekanizması (16)

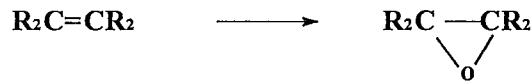
## 2.2.0. Monooksijenaz Enzim Sistemlerinin verdiği reaksiyonlar

### 2.2.1 Monooksijenaz Aktivitesi :

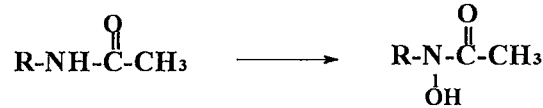
#### 1. Hidroksilasyon



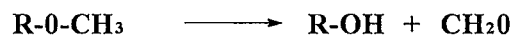
#### 2. Epoksidasyon



#### 3. N- Hidroksilasyon

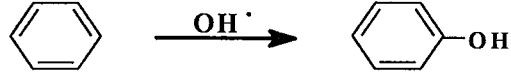


#### 4. O-Dealkilasyon

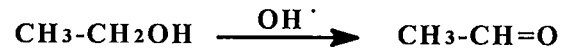


## 2.2.2. Oksidaz Aktivitesi :

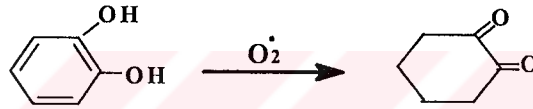
### 1. Aromatik Hidroksilasyon :



### 2. Etanol Oksidasyonu :



### 3. Katekol Oksidasyonu :



## 2.2.3. İndirgeme Aktivitesi :

### 1. Azo İndirgenme :



### 2. Nitro İndirgenme :

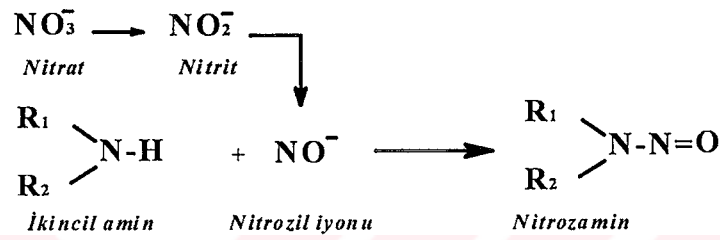


### 3. Redüktif Dehalojenasyon :



### 2.3.0. NİTROZAMİNLER :

Nitrozaminler karsinojenik ve mutajenik bileşiklerdir. Çevresel kaynaklardan alınabileceği gibi memeli midesinde de öncülleri olan ikincil amin ve nitritlerden oluşturulduğu gösterilmiştir(30).



Nitrozamin oluşumu için gerekli ikincil aminler balık ürünleri, tahıl, çay, sigara ve sigara dumanında mevcuttur. Ayrıca bir çok ilaç yapısında ikincil aminin bulunduğu bildirilmiştir(30-33 ).

Nitrozaminlerin oluşumunda etkili olan nitritlerin kimyasal maddeler, zirai ilaçlar, su ve bitkilerde büyük oranda bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca doğada yaygın olarak bulunan nitratın bakteriler tarafından nitrite indirgenmesiyle de oluşmaktadır(31,34,35).

Nitrozaminlerin yalnız memeli midesinde değil fizyolojik koşullarda da yüksek verimle oluştuğu gösterilmiştir(36,37).

Çalışılan bütün deney hayvanlarında nitrozaminlerin mutasyonlara neden olduğu tümör oluşumunu artırdığı, karsinojenik ve mutajenik etkisini çoğunlukla mikrozomal sistem tarafından aktive edildikten sonra gösterdiği bildirilmiştir(38).

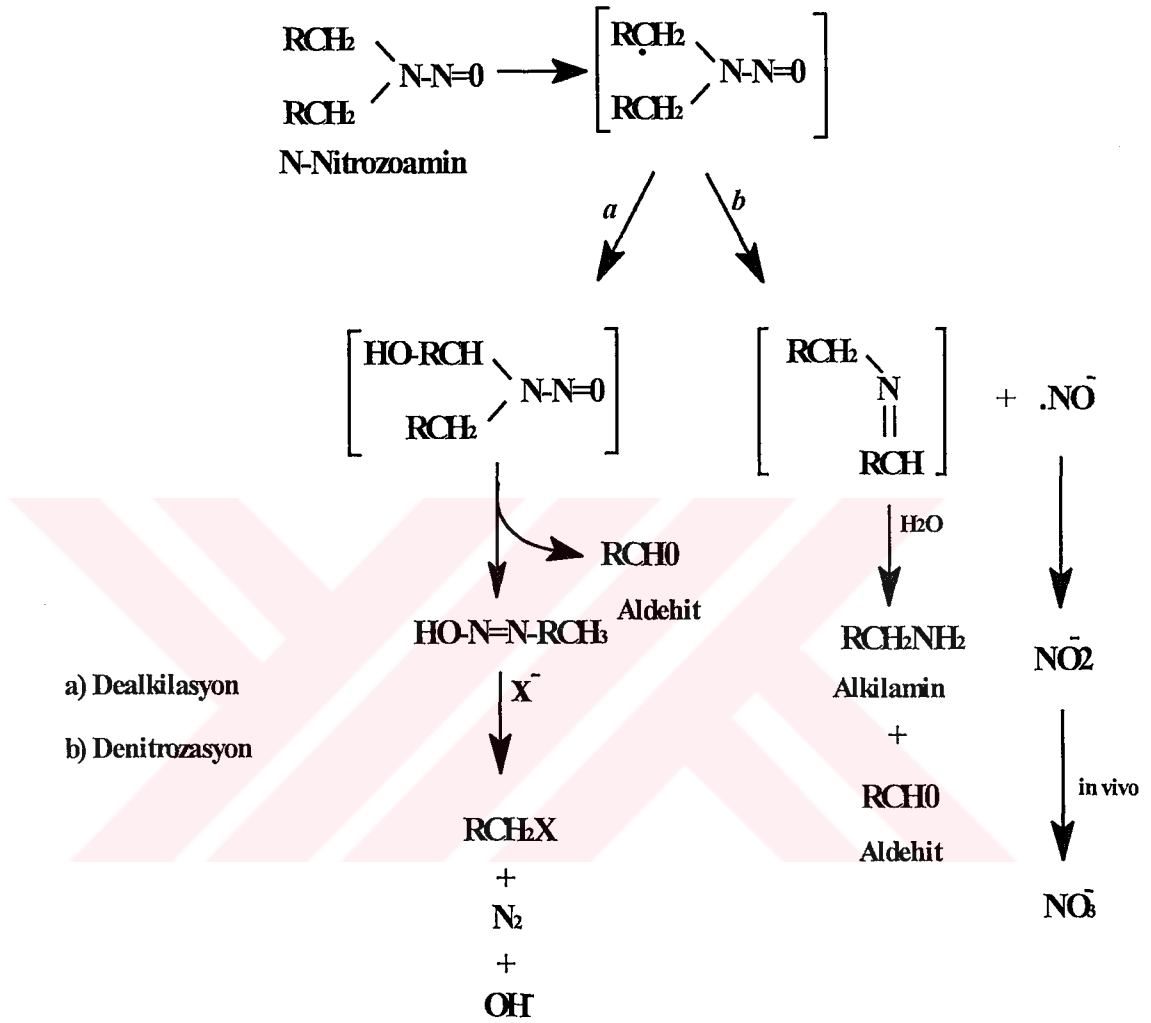


Nitrozaminlerin oksidatif dealkilasyonunun (metabolik aktivasyon) ve redüktif denitrozasyonunun (deaktivasyon) sitokrom P450, NADPH-sitokrom P450 redüktaz ve fosfolipid içeren monooksijenaz sistem tarafından gerçekleştirildiği gösterilmiştir. Aktivasyon işlemi, sitokrom P450 bağımlı tepkimelerle nitrozaminlerin  $\alpha$  karbonunun oksitlenmesiyle gerçekleşir, NDMA ve NDEA'nin metabolik aktivasyonunda sitokrom P450 IIE1 önemli rol oynadığı bir çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir(9,21,39,40).

Nitrozaminlerin sitokrom P450 IIE1 in aktif bölgesine bağlanma çalışmalarında, alkil gruplarının N-Nitrozo gruplarından çok daha önemli rol aldığı gösterilmiştir. Yapılarının benzerliğinden dolayı NEMA ve NDEA de sitokrom P450 IIE1 tarafından tercih edilirler. N-Nitrozoprolidinin de sitokrom P450 IIE1 tarafından tercih edildiği gösterilmiştir. Büyük alkil zinciri içeren nitrozaminlerde N-Nitrozobütülmethylaminin demetilasyonu sitokrom P450 IIE1 tarafından katalizlenirken demetilasyonunun sitokrom P450 IIB1 tarafından daha etkili olarak katalizlendiği bildirilmiştir(9,11,41).

Nitrozaminin  $\alpha$  karbonu sitokrom P450'nin katıldığı bir reaksiyonla hidroksillenir(Şekil 2). Hidroksillenen bu yeni ürün ( $\alpha$ -Nitrozo alkol) kararlı değildir.  $\alpha$ -Nitrozo alkol alkildiazohidroksit ve aldehit de dönüşür. Alkildiazohidroksit metilleyici bir ajandır. Oluşan bu ajan DNA ve diğer hücrel moleküllerle reaksiyon vererek karsinojenik ve sitotoksik etkili olur. Bu olay nitrozaminlerin aktivasyonu yada dealkilasyon yolu olarak bilinir.

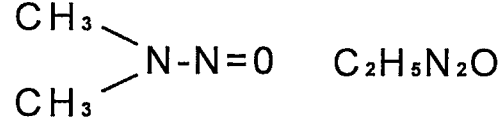
Alternatif bir yol olarak  $\alpha$ -Nitrozamin radikali nitrik oksit ve hidrolizlenmesi sonucu aldehit ve alkil amine dönüşen imino ya çevrilir. Nitrik oksit yükseltgenerek nitrite dönüşür. Bilinen bir alkilleyici ajan meydana gelmediği için bu denitrozasyon yolu I genellikle detoksifikasyon yolu olarak bilinir(9,11,42,43)



Şekil 2 : Nitrozaminlerin dealkilasyon ve denitrozasyon reaksiyonlarının akış şeması(9).

### 2.3.1. N-Nitrozodimetilamin

#### 1.1. Yapısı molekül formülü ve ağırlığı



Mol Ağırlığı : 74.1 gr/mol

#### 1.2. NDMA'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri

- a . Görünüşü : Sarı, sıvı
- b. Kaynama noktası : 151 °C ( 760 mm Hg )
- c. Yoğunluğu : 1.0061 kg/lt
- d. Kırılma İndisi : 1.4363
- e. Spektroskopik Özelliği :  $\lambda_{\text{max}}$  230 ve 232 nm ( $\epsilon$  =979,9 ve 12,8)
- f. Çözünürlüğü : Suda, organik çözücülerde ve lipidlerde çözülür.
- g. Dayanıklılığı : Karanlıkta oda sıcaklığında, nötral ve alkali çözücüler içinde 14 gün dayanıklıdır. Asitik çözeltilerde daha az kararlıdır(38).

NDMA 1895 yılında ilk kez Renouf tarafından dimetilaminin, asitik çözeltisi ile sodyum nitritin tepkimesi sonucu elde edilmiştir. Sıvı roket yakıtı olan 1,1-dimetilhidrazinin sentezinde ve endüstride çözücü olarak kullanıldığı bildirilmiştir(38,44).

Dimetilamin kullanan bir fabrikada havada 0-140 ng /m<sup>3</sup> NDMA bulunduğu, ayrıca fabrikanın atık sularının verildiği kanalizasyonunda 3.0 µg/lt ve deniz suyunda 0.08-0.25 µg/lt NDMA bulunduğu saptanmıştır(45,46).

Çeşitli peynir örneklerinde NDMA analizi yapılmış 26 farklı peynirde NDMA 2-68 µg/kg düzeyinde bulunmuştur. 16 farklı sebze de yapılan deneylerde NDMA bulunamamıştır. Fakat taze rafine edilmiş soya fasulyesi yağında 0-20 µg/kg NDMA bulunduğu bildirilmiştir(38,47).

Johnson ve Rhoades adlı araştırmacılar bir sigarada 0-140 ng NDMA bulunduğu saptamışlardır. Bir başka araştırmacı sigara dumanı ile dolu bir odanın havasında 90-240 ng/m<sup>3</sup> NDMA bulunduğunu bildirmiştir(48).

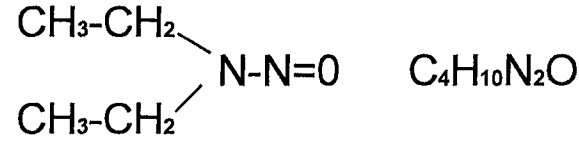
Farelere laboratuvar koşullarında 250 ng Na-nitrit ve 50 ng dimetilamin gavaj yoluyla verildiğinde in vivo NDMA oluştuğu gösterilmiştir(49).

NDMA'le deney hayvanlarında yapılan bir çok çalışma sonucunda bu maddenin toksik ve karsinojenik etkilere sahip olduğu saptanmıştır(50,51). Bu nitrozaminin kendisinden çok metabolitlerinin karsinojenik ve mutajenik etkileri olduğu bir çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir. NDMA in başlıca metabolize olduğu yer karaciğer mikrozomal sistemdir. Rat, fare ve kemirgen karaciğer mikrozomlarında NDMA'nin demetilasyonla formaldehide ve denitrozasyonla nitrite dönüştüğü bir çok çalışmada gösterilmiştir. NDMA in mikrozomal metabolizmasında sitokrom P450 izoenzimlerinden sitokrom P450 IIE1 in rol oynadığı bildirilmiştir (11,52-54).

NDMA mikrozomal ara ürünlerinin nükleik asit ve proteinlerde alkilasyona neden oldukları gösterilmiş ve nükleik asitlerde alkilasyon sonucu oluşan ana ürünün 7-metilguanin olduğu saptanmıştır. Ayrıca 1-metil, 3-metil ve 7-metiladenin, O-6 metil ve 3-metilguanin, 3-metilsitozin, 3-metil ve O-4 metiltimidin de oluştuğu bildirilmiştir. NDMA in vivo olarak DNA yı alkilediği gibi RNA yı da alkilleyerek çeşitli metilasyonlar oluşturduğu bulunmuştur(55-58).

### 2.3.2. N-Nitrozodietilamin :

#### 1.1. Yapısı molekül formülü ve ağırlığı



Mol Ağırlığı : 102.1 gr/mol

#### 1.2. NDEA'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri

- a . Görünüşü : Sarı
- b. Kaynama noktası : 177 °C ( 760 mm Hg )
- c. Yoğunluğu : 0.9422 kg/lt
- d. Kırılma İndisi : 1.4386
- e. Spektroskopik Özelliği :  $\lambda_{\text{max}}$  230 ve 340 nm ( $\epsilon = 726,7$  ve 8,3)
- f. Çözünürlüğü : Suda, organik çözücülerde ve lipidlerde çözünür.
- g. Dayanıklılığı : Karanlıkta oda sıcaklığında, nötral ve alkali çözücüler içinde 14 gün dayanıklıdır(38).

NDEA ilk kez 1863 de Geuther ve Kreutzhage tarafından dietilamin ile nitroz asitin tepkimesi sonucu elde edilmiştir(38).

Sigara dumanı, su, hava ve peynir, balık ve et ürünlerinde bulunan ayrıca, tekstil ürünlerinin hazırlanmasında, yağ ve kauçuk endüstrisinde kullanılan NDEA nin ratlarda karsinogenik ve mutajenik etkilerinin yüksek olduğu saptanmıştır (38,48,59).

NDEA nın fare karaciğer, akciğer ve böbrek mikrozomal sistemleri tarafından, mutajenik ve karsinojenik etkisi nitrozaminden daha fazla olan, ara ürünlere dönüştürüldüğü bildirilmiştir(60,61). NDEA in mikrozomal denitrozasyon ve dealkilasyon reaksiyonlarını sitokrom P450 izoenzimlerinden sitokrom P450 IIE1 ve sitokrom P450 IIA6 tarafından gerçekleştirildiği gösterilmiştir(9,62).

NDEA ile beslenen farelerde bir kaç hafta sonra DNA replikasyonunda artma olduğu ve daha sonra normal düzeye indiği bildirilmiştir. Kanser oluşumu sırasında DNA polimeraz  $\alpha$  aktivitesinde artış olurken DNA polimeraz  $\beta$  aktivitesinde daha yavaş bir artış olduğu saptanmıştır. Ayrıca NDEA ile başlayan kanserleşme sırasında DNA polimeraz  $\alpha$ - $\beta$  enzimlerinde ardışık dizi değişiklikleri olduğu ve DNA yı alkillediği bildirilmiştir(55,63-65). DNA'nın alkillenmesi, pürin bazlarından Adenin N-1, N-3, N-7, Guaninin N-3, N-7, 0-6, 0-8, pirimidin bazlarından Stozinin N-3 nolu atomlarında gerçekleşmiştir(66).

NDEA nin düşük derişimlerinde poliploidi, halka kromozom ve kromozom kırıkları oluşturduğu, yüksek derişimlerde kırık sayısının arttığı ve hücre bölünmesinin durması bu bileşiklerin oldukça toksik ve mutajenik etkilere sahip olduklarını ortaya koymaktadır(67).

NDEA 'nın in vitro ve in vivo ortamlarda enzim aktiviteleri üzerine çeşitli etkileri olduğu bilinmektedir. NDEA in sıçan karaciğer amino asit metabolizma enzimlerinden Triptofan Oksijenaz, Tirozin ve Ornitin Transferaz , Serin Dehidrataz ve Histidaz'i inhibe ettiği gösterilmiştir(68).

Atalay ve arkadaşları NDEA in sıçan karaciğer dokusunda Laktat dehidrogenaz, fare karaciğerinde Malat dehidrogenaz in vitro koşullarda ise maya Glukoz-6-fosfat dehidrogenazını inhibe ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca fare karaciğer Na/K ATP az aktivitesi üzerine NDEA, NMOR ve Npyr nin etkileri çalışılmış ve NDEA nin enzimi % 77 oranında aktive ettiğini buna karşılık NMOR, Npyr ile % 30 ve % 20 oranında inhibisyon oluştuğu gösterilmiştir(69-72).

NDEA'in insan eritrosit membranından L-Valin amino asiti taşınımını inhibe ettiği de saptanmıştır(73).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEMLER**

#### **3.1.0. Kimyasallar ve Gereçler**

##### **3.1.1. Kimyasallar**

Deneylerde kullanılan Streptozotosin (STZ), Glukoz-6-fosfat (G-6-P), Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-P DH), Redükte  $\beta$ -Nikotinamidadenindinükleotid(NADPH), NDMA, NDEA, Sığır Serum Albumin (BSA) Coomassie Blue G 250, Asetilaseton, Sülfanilik asit, N-1-Naftiletilediamin dihidroklorit, p-Hidroksibifenil, Formaldehit, Asetaldehit, Sodyum Nitrit, ve diğer kimyasal maddeler Sigma ve Merck firmalarından sağlandı.

##### **3.1.2. Gereçler**

Dokuların homojenizasyonunda B.Braun Potter Elvejhen doku homogenizatörü, mikrozomal fraksiyonun elde edilmesinde ise Beckman L5-75 B ultrasantrifüjü ile Beckman J2-21 soğutmalı santrifüjleri kullanıldı. Ayrıca enzim aktivitesinin ölçülmesi için LKB-Bromma su banyosu ve ısıtıcılı Hitachi model 220 spektrofotometre kullanıldı.

#### **3.2.0. Hayvanlar ve Enjeksiyonlar**

Deney için kullanılan yaklaşık 150-260 gr ağırlığındaki Wistar Albino cinsi ratlar Cumhuriyet Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından sağlandı.

Biri kontrol grubu olmak üzere 4 ayrı deney grubu için, her grupta 6 adet olmak üzere toplam 30 adet rat kullanıldı. Kontrol grubu hariç diğer gruplara 65 mg/kg vücut ağırlığı Streptozotosin (0.05 M sitrat tamponunda pH: 4.50) i.p. olarak



enjekte edildi(74). Kontrol grubuna aynı miktarda serum fizyolojik enjekte edildi. On gün sonra kontrol grubu ve I. grup öldürüldü. II. gruba öldürülmesinden 18 saat önce % 25 lik Aseton içeren çözeltilerden 2.5 ml/ kg gavaj yoluyla verildi. III. gruba öldürülmesinden 24 saat önce % 25 İzopropil alkol içeren çözeltilerden 2.5 ml/kg gavaj yoluyla verildi. IV. grubun içme sularına üç gün boyunca % 15 lik etanol çözeltisi karıştırılarak içmeleri sağlandı(21,80).

### **3.3.0. Karaciğer mikrozomal peletin hazırlanması**

Ratlar 8 saat aç bırakıldıktan sonra eter ile bayıltılıp kan glukoz seviyelerine bakmak için kalplerinden kan alındı. Karaciğerleri çıkartıldı. Gram yaş doku başına 3ml 154 mM KCl, 10mM EDTA eklendi ve B.Braun marka doku homogenizatöründe dört vuruşta homojenize edildi. Parçalanmamış hücrelerin membran kalıntılarının ve mitokondrilerin uzaklaştırılması için + 4 °C de 15.000g de 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen dökelti Beckman L5-75 B ultrasantrifüjle + 4 °C de, 105.000g de 60 dakika santrifüj edildi. Daha saf mikrozomal pellet elde etmek için pelet taze tamponla yeniden süspanse edildikten sonra 105.000g de tekrar santrifüjlendi(75). Elde edilen pelet aynı tampon ile istenilen protein derişiminde (1mg/ml protein olacak şekilde) sulandırıldı.

### **3.4.0. Protein tayini**

100mg Coomossie Brilliant Blue-G250, 50 ml % 95 lik etanol içinde çözüldü. 100 ml % 85 lik fosforik asitle karıştırıldı. toplam hacim distile suyla 1 lt ye tamamlandı. Çözünmeyen kısım süzülüp atıldı. Bu çözeltinin 1-2 hafta dayanıklı olduğu göz önünde bulundurularak kullanıldı.

Numuneler 20 dakika sonra spektrofotometrede köre karşı 595 nm dalga boyunda okundu. Sığır serum albumin ile hazırlanan standard eğri yardımıyla numunelerin derişimi bulundu. Son derişimi 1 mg/ml olacak şekilde sulandırılıp deneyler sırasında kullanılmak üzere -20 °C de saklandı(76).

### **3.5.0. pH çalışmaları**

#### **3.5.1. N-Nitrozodimetilaminin denitrozasyon ve demetilasyonuna pH'nın etkisi**

Değişik pH değerlerinde ( 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 ) 10 mM MgCl<sub>2</sub> , 150 mM KCl, 50 mM Tris-HCl içeren tamponlar hazırlandı. Toplam hacim 1 ml olacak şekilde 40 mM NDMA'dan, tamponlardan ve mg/ml mikrozomal fraksiyondan 0.5 mg/ml ilave edildi. İki dakika 37 °C de inkübe edildi. ve NADPH-yenileyen sistemin (0.4 mM NADP, 10 mM Glukoz-6-Fosfat, 0.2 U Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz) ilavesiyle tepkime başlatıldı. Onbeş dakika 37 °C de inkübasyondan sonra 100 µl % 25 lik ZnSO<sub>4</sub> ve 100 µl doymuş Ba(OH)<sub>2</sub> ilave edilerek reaksiyon durduruldu(75) Santrifüj edilip dökeltide nitrit(NO<sub>2</sub>) ve formaldehit (HCHO) tayini yapıldı.

Kontrol ve diğer 4 deney grubu için her pH değerinde deneyler tekrarlandı.

#### **3.5.2. N-Nitrozodietilamin'in denitrozasyon ve dealkilasyonuna pH'nın etkisi**

Değişik pH değerlerinde ( 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 ) 10 mM MgCl<sub>2</sub> , 150 mM KCl 50 mM Tris-HCl içeren tamponlar hazırlandı. Toplam hacim 1 ml olacak şekilde 40 mM NDEA'dan, tamponlardan ve mg/ml mikrozomal fraksiyondan 0.5 mg/ml ilave edildi. İki dakika 37 °C de inkübe edildi ve NADPH-yenileyen sistemin (0.4 mM NADP, 10 mM Glukoz-6-Fosfat, 0.2 U Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz)

ilavesiyle tepkime başlatıldı. Onbeş dakika 37 °C de inkübasyondan sonra 100 µl % 25 lik ZnSO<sub>4</sub> ve 100 µl doymuş Ba(OH)<sub>2</sub> ilave edilerek tepkime durduruldu. Santrifüj edilip dökeltide nitrit(NO<sub>2</sub>) ve asetaldehit (CH<sub>3</sub>CHO ) tayini yapıldı.

Kontrol ve diğer 4 deney grubu için her pH değerinde deneyler tekrarlandı.

### **3.6.0. N-Nitrozodimetilamin ve N-Nitrozodietilamin'in metabolizmasına NADPH-yenileyen sistemin etkisi**

#### **3.6.1. N-Nitrozodimetilamin'in denitrozasyon ve demetilasyonuna NADPH-yenileyen sistemin etkisi**

0.134, 0.286 ve 0.536 mM olmak üzere NADP üç farklı derişimde olan ve 10 mM Glukoz-6-Fosfat, 0.2U Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz içeren NADPH-Yenileyen sistem hazırlandı. Toplam hacim 1 ml olacak şekilde 10 mM MgCl<sub>2</sub> , 150 mM KCl 50 mM Tris-HCl pH : 7.4 tampondan, 40 mM NDMA'dan, ve mg/ml mikrozomal fraksiyondan 0.5 mg/ml ilave edildi. İki dakika 37 C de inkübe edildi ve NADPH-yenileyen sistemin ilavesiyle tepkime başlatıldı. Onbeş dakika 37 °C de inkübasyondan sonra 100 µl % 25 lik ZnSO<sub>4</sub> ve 100 µl doymuş Ba(OH)<sub>2</sub> ilave edilerek tepkime durduruldu . Santrifüj edilip dökeltide nitrit(NO<sub>2</sub>) ve formaldehit (HCHO) tayini yapıldı.

Kontrol ve diğer 4 deney grubu, için üç farklı NADPH-yenileyen Sistem kullanılarak deneyler tekrarlandı.

### **3.6.2. N-Nitrozodietilamin'in denitrozasyon ve dealkilasyonuna NADPH-yenileyen sistemin etkisi**

0.134, 0.286 ve 0.536 mM olmak üzere NADP üç farklı derişimde olan ve 10 mM Glukoz-6-Fosfat, 0.2U Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz içeren NADPH-Yenileyen sistem hazırlandı. Toplam hacim 1 ml olacak şekilde 10 mM MgCl<sub>2</sub> , 150 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH : 7.4 tampondan, 40 mM NDEA'dan, ve mg/ml mikrozomal fraksiyondan 0.5 mg/ml ilave edildi. İki dakika 37 °C de inkübe edildi. NADPH-yenileyen sistemin ilavesiyle tepkime başlatıldı. Onbeş dakika 37 °C de inkübasyondan sonra 100 µl % 25 lik ZnSO<sub>4</sub> ve 100 µl doymuş Ba(OH)<sub>2</sub> ilave edilerek tepkime durduruldu. Santrifüj edilip dökeltide nitrit(NO<sub>2</sub>) ve asetaldehit ( CH<sub>3</sub>CHO ) tayini yapıldı.

Kontrol ve diğer 4 deney grubu, için üç farklı NADPH-yenileyen Sistem kullanılarak deneyler tekrarlandı.

### **3.7.0. Kinetik çalışmalar**

#### **3.7.1. N-Nitrozodimetilamin'in denitrozasyon ve demetilasyon tepkimelerinin kinetik incelenmesi**

NDMA'in denitrozasyon ve demetilasyon tepkimelerinin Km ve Vmax değerlerini saptamak için 10, 20, 40, 80, 160, 320, mM NDMA çözeltileri hazırlandı. Toplam hacim 1 ml olacak şekilde 10 mM MgCl<sub>2</sub> , 150 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH : 7.4 tampondan, NDMA çözeltilerinden, ve mg/ml mikrozomal fraksiyondan 0.5 mg/ml ilave edildi. İki dakika 37 °C de inkübe edildi. NADPH-yenileyen sistemin

(0.4 mM NADP, 10 mM Glukoz-6-Fosfat, 0.2 U Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz) ilavesiyle tepkime başlatıldı. Onbeş dakika 37 °C de inkübasyondan sonra 100 µl % 25 lik ZnSO<sub>4</sub> ve 100 µl doymuş Ba(OH)<sub>2</sub> ilave edilerek tepkime durduruldu. Santrifüj edilip dökeltide nitrit(NO<sub>2</sub>) ve formaldehit (HCHO) tayini yapıldı.

Kontrol ve diğer 4 deney grubu için deneyler tekrarlandı.

### **3.7.2. N-Nitrozodietilamin'in denitrozasyon ve dealkilasyon tepkimele- rinin kinetik incelenmesi :**

NDEA'in denitrozasyon ve dealkilasyon reaksiyonlarının Km ve Vmax değerlerini saptamak için 10, 20, 40, 80, 160, 320, mM NDEA çözeltileri hazırlandı. Toplam hacim 1 ml olacak şekilde 10 mM MgCl<sub>2</sub> , 150 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH : 7.4 tampondan, NDEA çözeltilerinden, ve mg/ml mikrozomal fraksiyondan 0.5 mg/ml ilave edildi. İki dakika 37 °C de inkübe edildi. NADPH-yenileyen sistemin (0.4 mM NADP, 10 mM Glukoz-6-Fosfat, 0.2 U Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz) ilavesiyle tepkime başlatıldı. Onbeş dakika 37 °C de inkübasyondan sonra 100 µl % 25 lik ZnSO<sub>4</sub> ve 100 µl doymuş Ba(OH)<sub>2</sub> ilave edilerek tepkime durduruldu. Santrifüj edilip dökeltide nitrit(NO<sub>2</sub>) ve asetaldehit ( CH<sub>3</sub>CHO ) tayini yapıldı.

Kontrol ve diğer 4 deney grubu için deneyler tekrarlandı.

### **3.8.0. İnhibisyon Çalışmaları**

#### **3.8.1. N-Nitrozodietilamin'in dealkilasyonuna N-Nitrozodimetilamin'in etkisi**

NDEA'in dealkilasyonuna NDMA'in etkisini incelemek amacıyla 10, 20, 40, 80, mM NDEA ve 10, 20, 40, 80 mM NDMA çözeltileri hazırlandı. Her NDEA derişiminin bulunduğu ortama yukardaki derişimlerde NDMA ilave edilip toplam

hacim 1 ml olacak şekilde 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH : 7.40 tampondan, ve mg/ml mikrozomal fraksiyondan 0.5 mg/ml ilave edildi. İki dakika 37°C de inkübe edildi. NADPH-yenileyen sistemin (0.4 mM NADP, 10 mM Glukoz-6-Fosfat, 0.2 U Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz) ilavesiyle tepkime başlatıldı. Onbeş dakika 37 °C de inkübasyondan sonra 100 µl % 25 lik ZnSO<sub>4</sub> ve 100 µl doymuş Ba(OH)<sub>2</sub> ilave edilerek tepkime durduruldu. Santrifüj edilip dökeltide asetaldehit (CH<sub>3</sub>CHO) tayini yapıldı.

Kontrol ve diğer 4 deney grubu için deneyler tekrarlandı

### **3.8.2. N-Nitrozodimetilamin'in dealkilasyonuna N-Nitrozodietilamin'in**

**etkisi :**

NDMA'in dealkilasyonuna NDEA'in etkisini incelemek amacıyla 10, 20 40, 80, mM NDMA ve 5, 10, 20, 400, 80 mM NDEA çözeltileri hazırlandı. Her NDMA derişiminin bulunduğu ortama yukardaki derişimlerde NDEA ilave edilip toplam hacim 1 ml olacak şekilde 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH : 7.40 tampondan, ve mg/ml mikrozomal fraksiyondan 0.5 mg/ml ilave edildi. İki dakika 37°C de inkübe edildi. NADPH-yenileyen sistemin (0.4 mM NADP, 10 mM Glukoz-6-Fosfat, 0.2 U Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz) ilavesiyle tepkime başlatıldı. Onbeş dakika 37 °C de inkübasyondan sonra 100 µl % 25 lik ZnSO<sub>4</sub> ve 100 µl doymuş Ba(OH)<sub>2</sub> ilave edilerek tepkime durduruldu. Santrifüj edilip dökeltide formaldehit (HCHO) tayini yapıldı.

Kontrol ve diğer 4 deney grubu için deneyler tekrarlandı

### **3.9.0. Metabolitlerin tayini :**

#### **3.9.1. Nitrit tayini :**

Nitrit, sülfanilik asit ve N-1-Naftiletilediamin dihidroklorit'in tepkimesi sonucu oluşan azo bileşiklerin kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Deney sonucunda elde edilen dökeltiden 350 µl alınıp 75 µl 100mM sülfanilik asit ile (3 N HCl içinde ) karıştırıldı 5 dakika sonra 75 µl 1 mM N-1-Naftiletilediamin dihidroklorit ( 3 N HCl içinde ) eklendi. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 546 nm'de köre karşı okundu(77).

Standard olarak NaNO<sub>2</sub> kullanılarak standard eğri çizildi. Standard eğri yardımıyla nitrit miktarları tayin edildi. Sonuçlar nmol nitrit /mg mikrozomal protein/dakika olarak verildi.

#### **3.9.2. Formaldehit tayini :**

Formaldehit'in Nash reaktifi (15 gr Amonyum asetat, 0.2 ml Asetilaseton % 3 lük 18 ml Asetik asit içinde) ile tepkimesi sonucu sarı renkli bir bileşik (3,5-diasetil-1,4-dihidrolutidine) oluşur. Yöntem bu oluşan ürünün spektrofotometre de 412 nm dalga boyunda izlenmesine dayanır. Deney sonucunda elde edilen dökeltiden 350 µl alınıp üzerine 150 µl Nash reaktifi ilave edilip karıştırıldı. 30 dakika 50 °C de inkübe edildi. Süre sonunda spektrofotometrede 412 nm de köre karşı okundu(77).

Formaldehit (HCHO) kullanılarak standard eğri çizildi. Standard eğri yardımıyla formaldehit miktarları tayin edildi. Sonuçlar nmol formaldehit /mg mikrozomal protein/dakika olarak verildi.

### 3.9.3. Asetaldehit tayini

Asetaldehit tayininde de kolorimetrik yöntem kullanıldı. Deney sonucunda elde edilen dökeltiden 350 µl alınıp % 12 CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O den 1 damla damlatıldı. Üzerine 3 ml soğuk derişik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> buz banyosu içinde ilave edildi. 10 dakika sonra tüpler karıştırıldı. 60 µl p-hidroksibifenil (% 1, % 2 lik NaOH içinde) den tüpün çeperlerine bulaştırmadan sıvı yüzeyine ilave edildi ve karıştırıldı. İki dakika kaynayan su banyosunda bekletildi. Daha sonra soğutulup oluşan mavi renk spektrofotometrede 545 nm dalga boyunda köre karşı okundu(78).

Asetaldehit ( CH<sub>3</sub>CHO ) kullanılarak standard eğri çizildi. Standard eğri yardımıyla asetaldehit miktarları tayin edildi. Sonuçlar nmol asetaldehit/mg mikrozomal protein/dakika olarak verildi.

### 3.9.4. Formaldehit varlığında asetaldehit tayini

Asetaldehit tayini yapılan ortamda formaldehit varsa, formaldehit, asetaldehit ile girişim yapar. Bu sebepten dolayı yukarda anlatılan asetaldehit tayin yönteminden önce ortamdaki formaldehiti girişim vermeyecek bir ara ürüne çevirmek gereklidir. Deney sonucunda elde edilen dökeltiden 200 µl alınıp üzerine 150 µl Nash reaktifi (30.8 gr Amonyum asetat, 5ml derişik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 0.4 Asetilaseton 100 µl de) ilave edildi. Deneyin kararlı olabilmesi için oda sıcaklığında bekletildikten sonra normal asetaldehit tayin yöntemi uygulandı.(78)

Asetaldehit ( CH<sub>3</sub>CHO ) kullanılarak standard eğri çizildi. Standard çözeltilerde 1mg/ml Semikarbazit HCl olacak şekilde hazırlandı. Standard eğri yardımıyla asetaldehit miktarları tayin edildi. Sonuçlar nmol asetaldehit /mg mikrozomal protein/dakika olarak verildi.



## 4.0. BULGULAR

### 4.1.0. Kimyasal diyabet oluşumu

Streptozotosin enjekte edilen ratların açlık kan glukoz düzeylerinin kontrol grubu kan glukoz düzeylerine kıyasla 2,5-4 kat yükseldiği görüldü. Kan glukoz düzeyi kontrolde ortalama 90 mg/dl olarak ölçüldü. Diyabetik ratlarda enjeksiyon öncesi ve sonrası vücut ağırlıklarındaki artışın kontrollerdekinden az olduğu görüldü(Tablo I).

**Tablo 1 :** Streptozotosin enjekte edilen ratlarda fizyolojik parametreler†

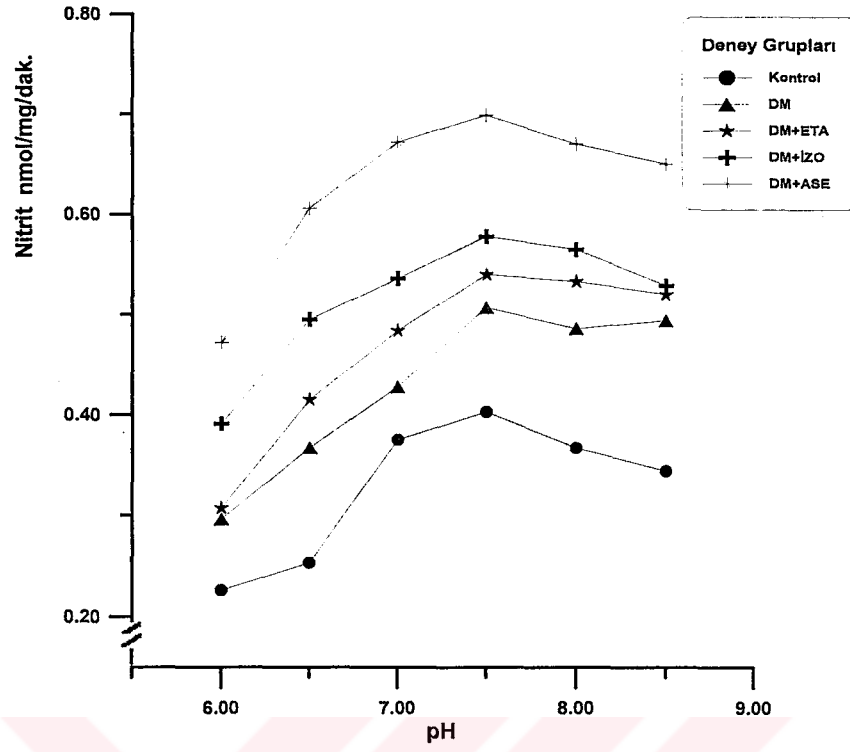
Enjeksiyon	Rat sayısı	Vücut Ağırlığı		Karaciğer Ağırlığı (gr)	Kan Glukozu mg/dl
		Başlangıç	Son		
<i>Kontrol</i>	6	208±11	230±10	7,45±0,35	90±08
<i>I. Streptozotosin(Stz)</i>	6	220±22	235±24	7,15±0,65	262±40
<i>II. Stz. + Aseton</i>	5*	264±03	275±05	7,85±0,45	256±05
<i>III. Stz + İsoopropanol</i>	6	183±09	197±13	7,10±0,15	344±08
<i>IV. Stz + Etanol</i>	6	150±03	162±03	5,75±0,85	334±41

\* Rat'ın bir tanesi kontrolümüz dışında ölmüştür

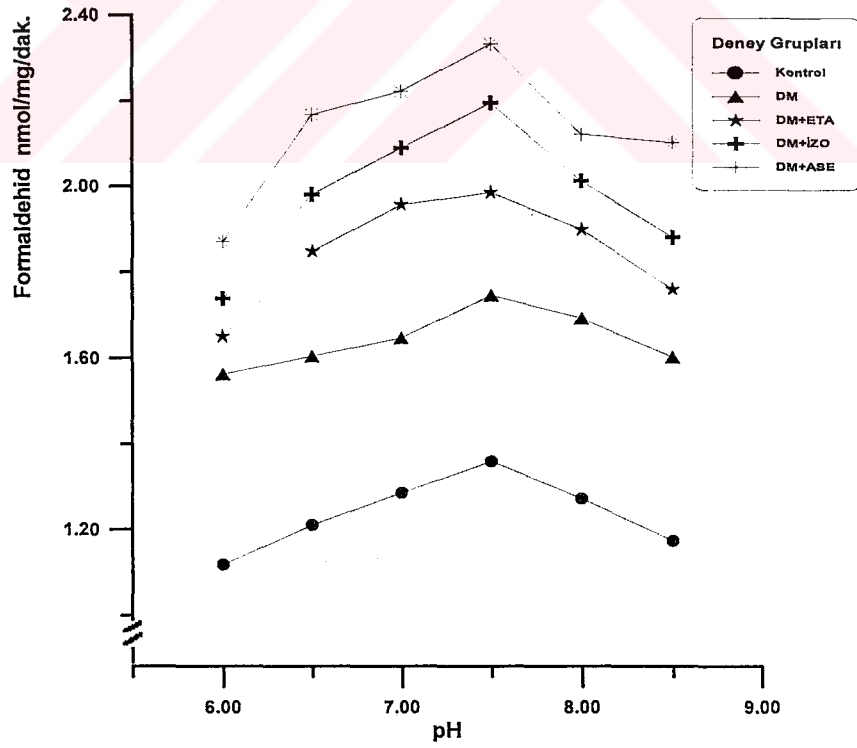
† Bütün değerler ±SD olarak verilmiştir.

### 4.2.0. Optimum pH belirlenmesi

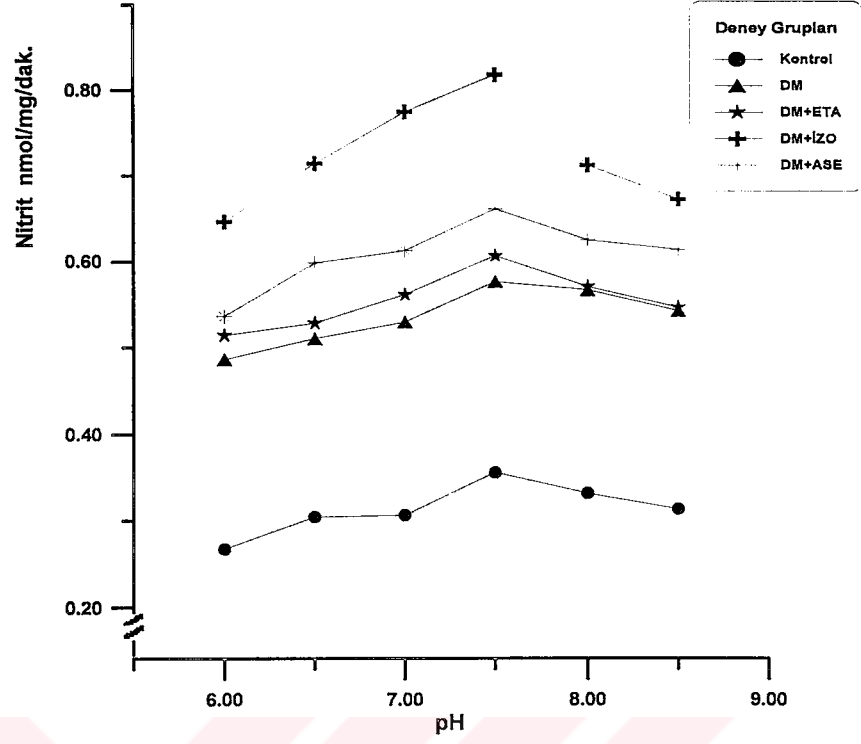
NDMA ve NDEA'in metabolize edilmesinde optimum pH nın belirlenmesi için 6 farklı pH daki tampon çözeltiler (6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5) kullanıldı. Her iki Nitrozaminin 40 mM derişimdeki çözeltileri kullanılarak NDMA'de nitrit, formaldehit ve NDEA'de nitrit ile asetaldehit tayin edildi. Her iki nitrozaminin optimum pH sı 7.5 olarak bulundu ve grafiklendi(Şekil:3,4,5,6).



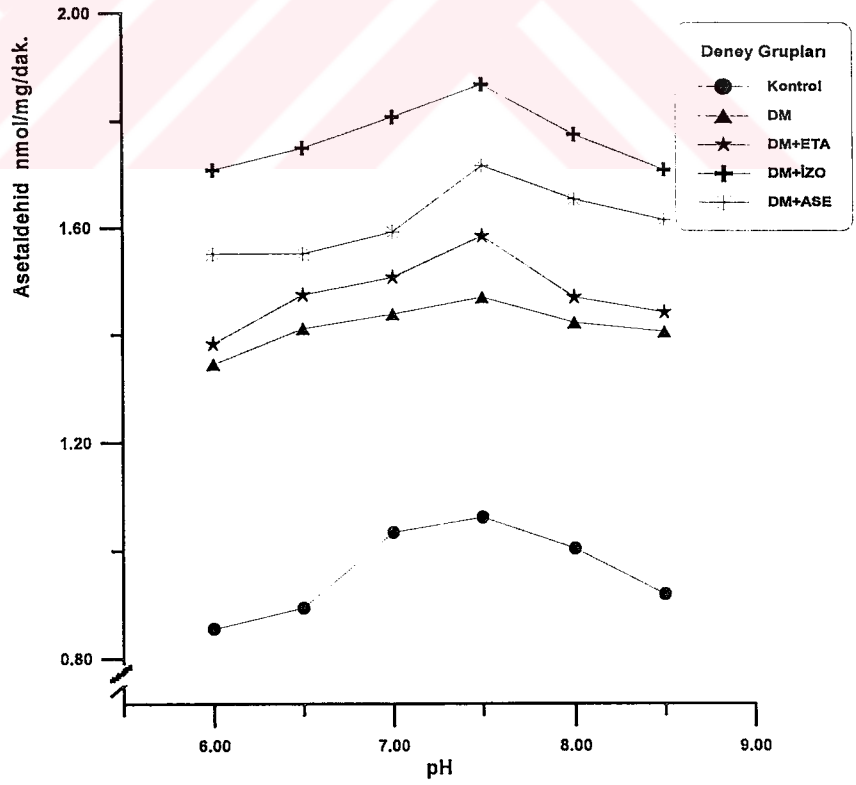
Şekil 3 : NDMA'in denitrozasyonunun optimum pH grafiği



Şekil 4 : NDMA'in demetilasyonunun optimum pH grafiği



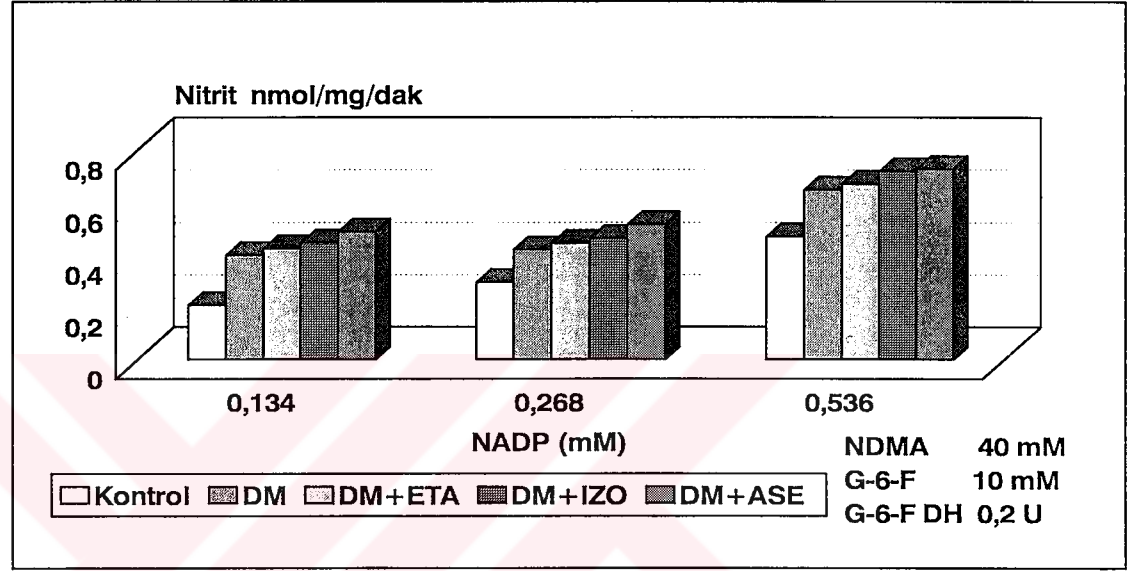
Şekil 5 : NDEA'in denitrozasyonunun optimum pH grafiği



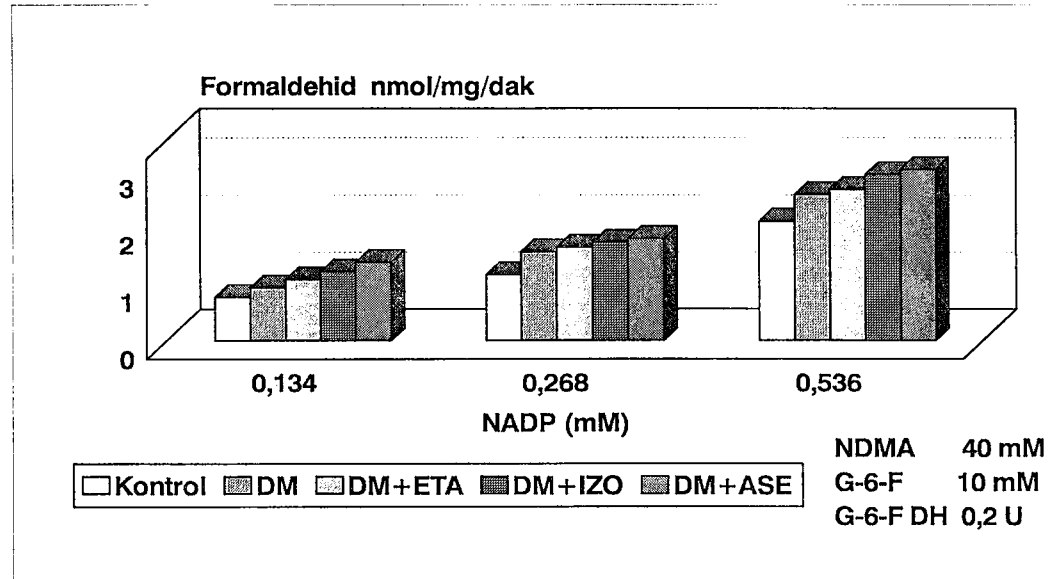
Şekil 6 : NDEA'in dealkilasyonunun optimum pH grafiği

#### 4.3.0. N-Nitrozodimetilamin ve N-Nitrozodietilamin metabolizmasına NADPH-yenileyen sistemin etkisi

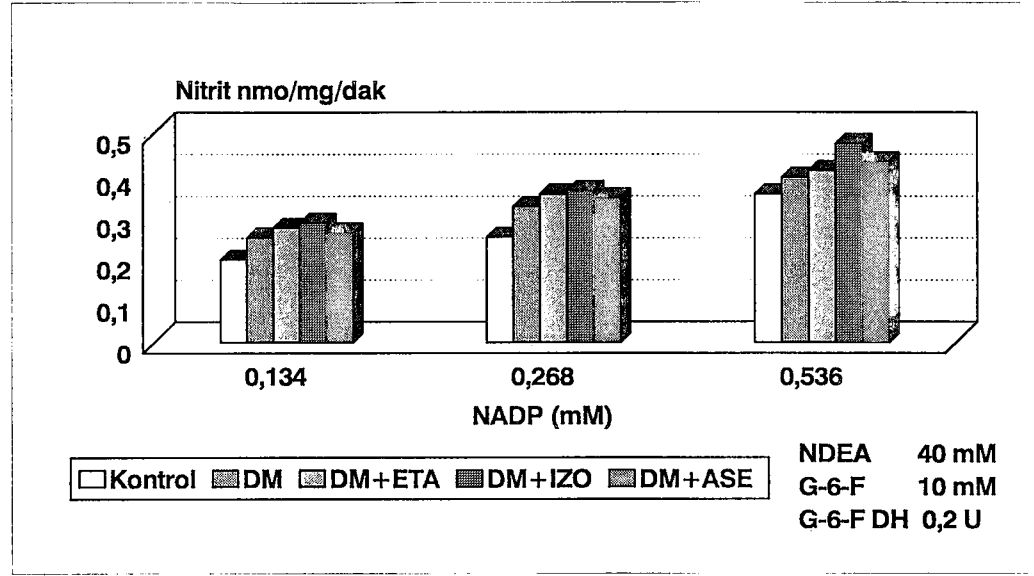
NADP derişimindeki değişikliklerin NO<sub>2</sub>, formaldehit ve asetaldehitte oluşumlarında ortaya çıkan değişimler şekil 7,8,9 ve 10 da gösterildi.



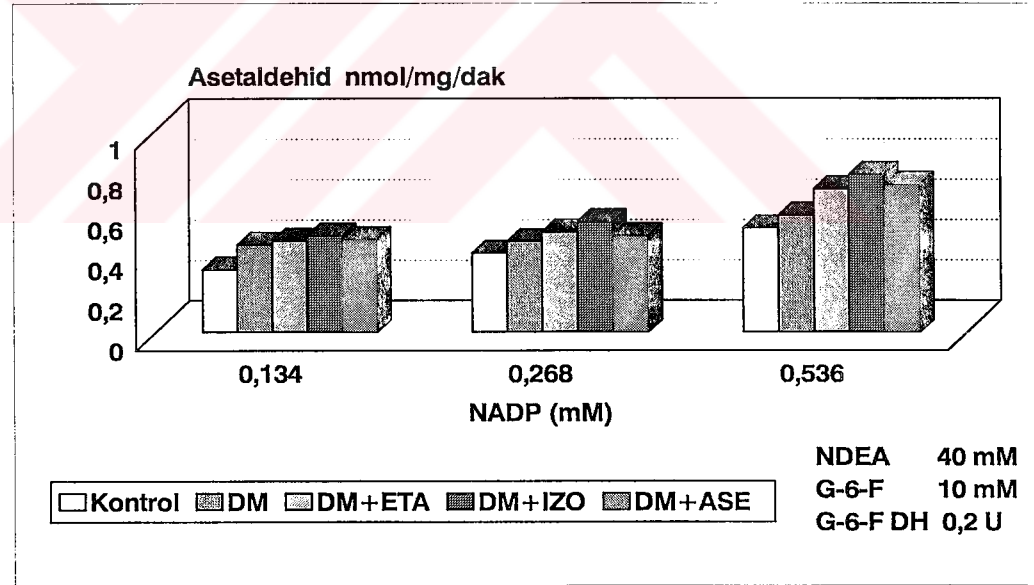
Şekil 7 : NDMA'in denitrozasyonuna NADP'in etkisi



Şekil 8 : NDMA'in demetilasyonuna NADP'in etkisi



**Şekil 9 : NDEA'in denitrozasyonuna NADP'in etkisi**

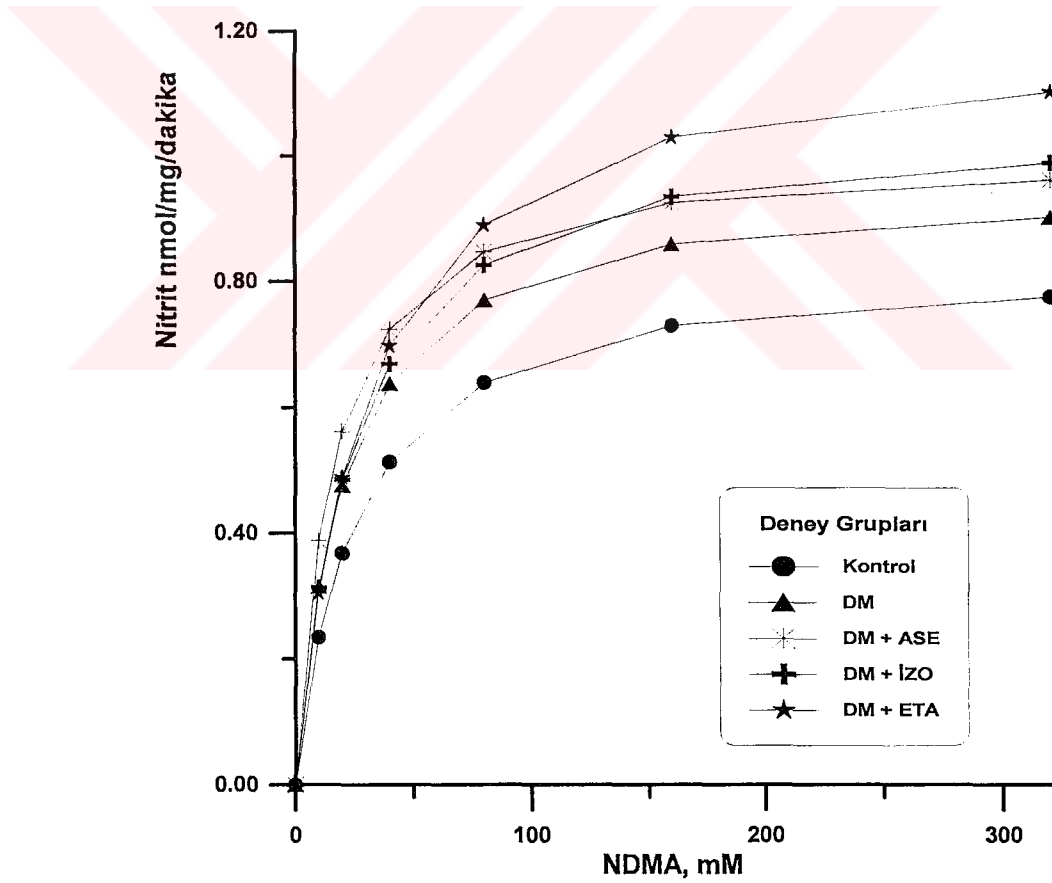


**Şekil 10 : NDMA'in dealkilasyonuna NADP'in etkisi**

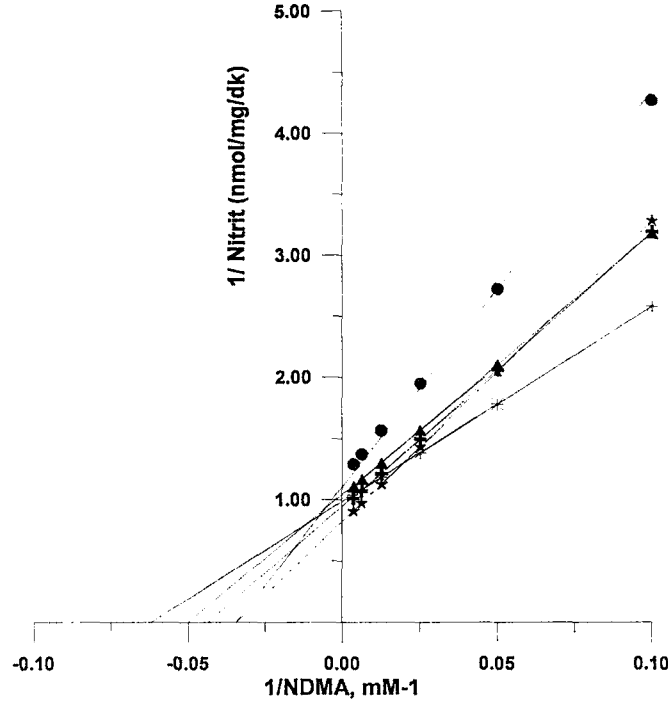
#### 4.4.0. Km ve Vmax değerlerinin saptanması :

#### 4.4.1. N-Nitrozodimetilamin'in denitrozasyon ve demetilasyon tepkimelerinin Km ve Vmax değerinin saptanması

pH 7.5 tamponunda hazırlanan 6 farklı NDMA (10, 20, 40, 80, 160, 320 mM) derişiminde çalışılarak Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafikler yardımıyla Km ve Vmax değerleri belirlendi. Grafiklerin çiziminde en küçük kareler metodu uygulandı.( Şekil 11,12,13,14)



Şekil 11 : NDMA'in denitrozasyonunun Michaelis-Menten grafiği

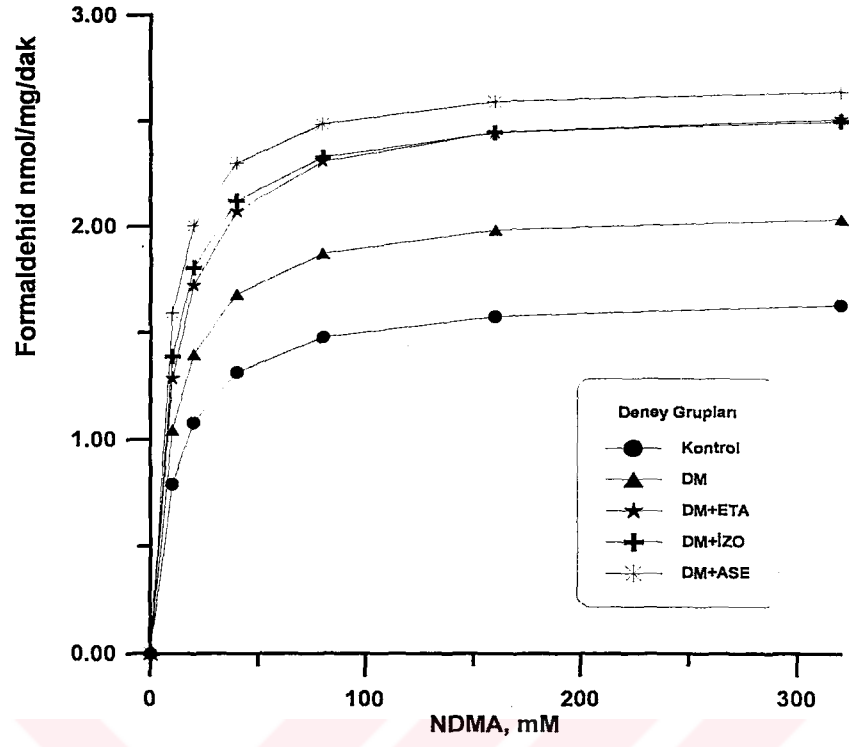


Şekil 12 : NDMA'in denitrozasyonunun Lineweaver-Burk grafiği

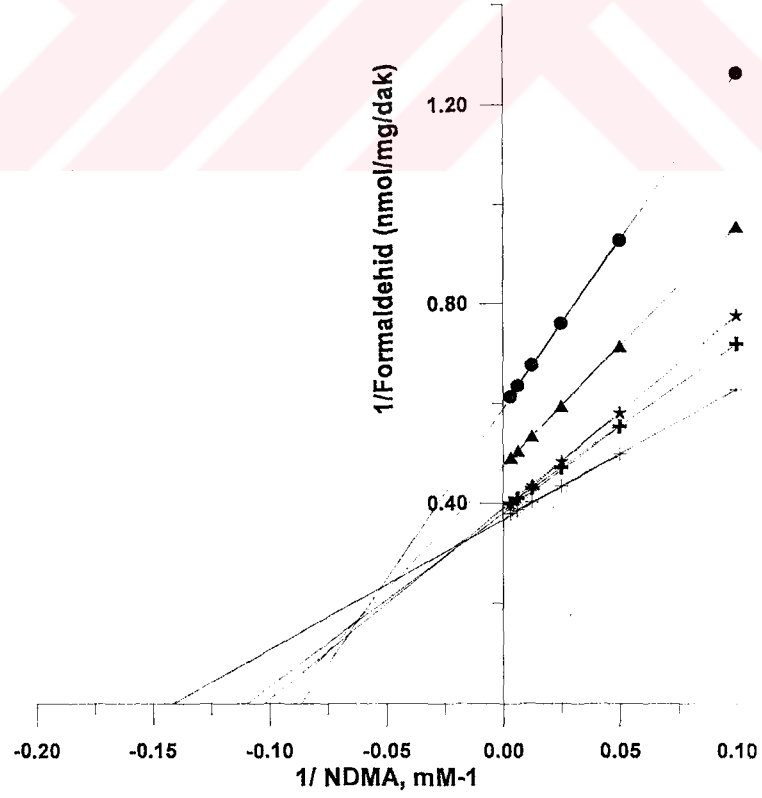
Tablo 2 : Nitrozodimetilaminin denitrozasyonunun Km ve Vmax değerleri.

Deney grubu	Vmax (Nitrit nmol/mg/dakika)	Km (mM)
Kontrol	0.764	28.96
Diyabet	0.972	20.88
Diyabet + Etanol	1.224	28.11
Diyabet + İzopropanol	1.077	23.69
Diyabet + Aseton	1.019	16.28

NDMA'in denitrozasyon tepkimesinde kontrol grubunun Vmax : 0.764 nitrit nmol/mg mikrozomal protein/ dakika Km : 28.96 mM olarak bulundu. Diyabet grubunun Vmax ve Km değeri kontrol grubuna göre sırasıyla Vmax'in % 27 arttığı Km'in % 28 azaldığı gözlemlendi. Diyabet sonrası indükleyici verilen ratlarda ise Vmax ve Km değerleri şöyle idi. Etanol uygulanan grupta Vmax % 60 artış, Km de ise % 1 azalış görüldü, İzopropil alkol uygulanan grupta Vmax % 41 artış Km de ise % 18 azalma gözlemlendi ayrıca Aseton uygulanan grupta Vmax % 33 artmış Km de ise % 43 azalmış olarak bulundu (tablo2).



Şekil 13 : NDMA'in demetilasyonunun Michaelis-Menten grafiği



Şekil 14 : NDMA'in demetilasyonunun Lineweaver-Burk grafiği



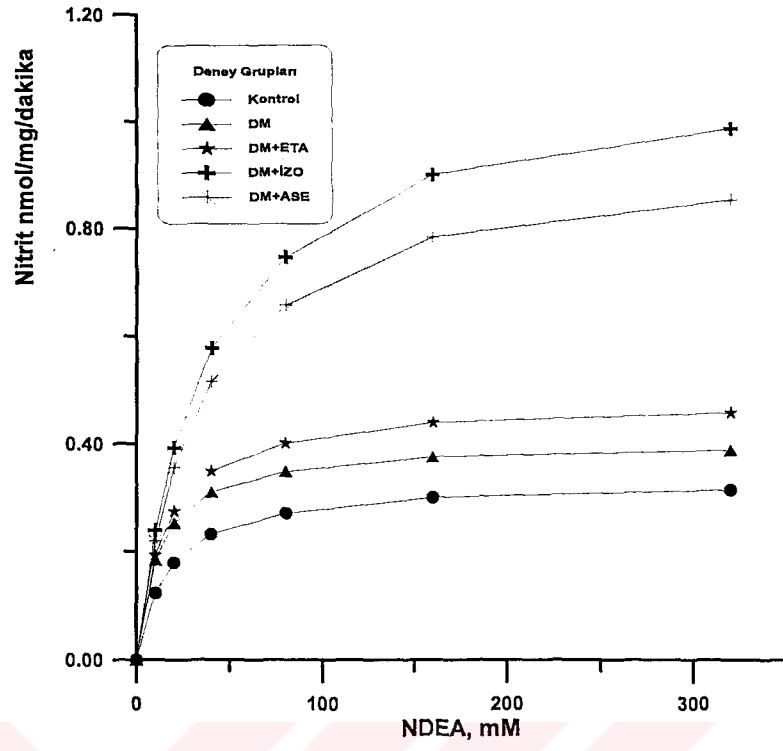
**Tablo 3 :** Nitrozodimetilaminin demetilasyonunun Km ve Vmax değerleri.

<b>Deney grubu</b>	<b>Vmax</b> (Formaldehit nmol/mg/dakika)	<b>Km (mM)</b>
Kontrol	1.688	11.34
Diyabet	2.107	10.15
Diyabet + Etanol	2.590	9.77
Diyabet + İzopropanol	2.578	8.51
Diyabet + Aseton	2.700	6.93

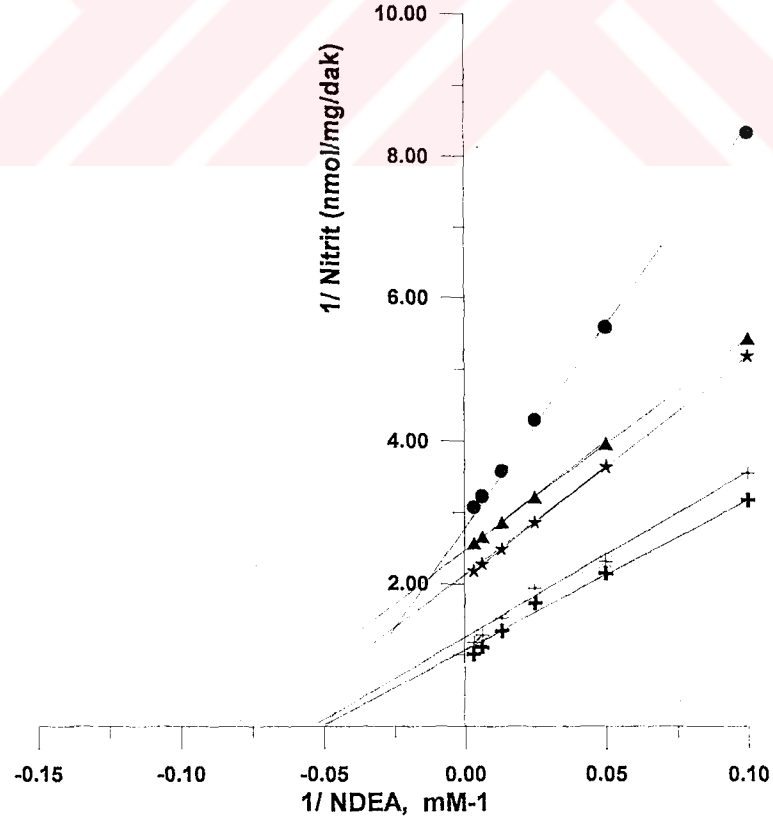
NDMA'in demetilasyon tepkimesinde kontrol grubunun Vmax : 1.688 formaldehit nmol/mg mikrozomal protein/ dakika Km : 11.34 mM olarak bulundu. Diyabet grubunun Vmax ve Km değeri kontrol grubuna göre sırasıyla Vmax'in % 25 arttığı Km'in % 11 azaldığı gözlendi. Diyabet sonrası indükleyici verilen ratlarda ise Vmax ve Km değerleri şöyle idi. Etanol uygulanan grupta % 49 artış Km de ise % 14 azalış görüldü, İzopropil alkol uygulanan grupta Vmax % 53 artış Km de ise % 25 azalma gözlendi ayrıca Aseton uygulanan grupta Vmax % 60 artmış Km de ise % 39 azalmış olarak bulundu (tablo 3).

#### **4.4.2. N-Nitrozodietilamin'in denitrozasyon ve dealkilasyon tepkimelerinin Km ve Vmax değerinin saptanması :**

pH 7.5 tamponunda hazırlanan 6 farklı NDEA (10, 20, 40, 80, 160, 320 mM) derişiminde çalışılarak Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafikler yardımıyla Km ve Vmax değerleri belirlendi. Grafiklerin çiziminde en küçük kareler metodu uygulandı ( Şekil 15,16,17,18).



Şekil 15 : NDEA'in denitrozasyonunun Michaelis-Menten grafiği

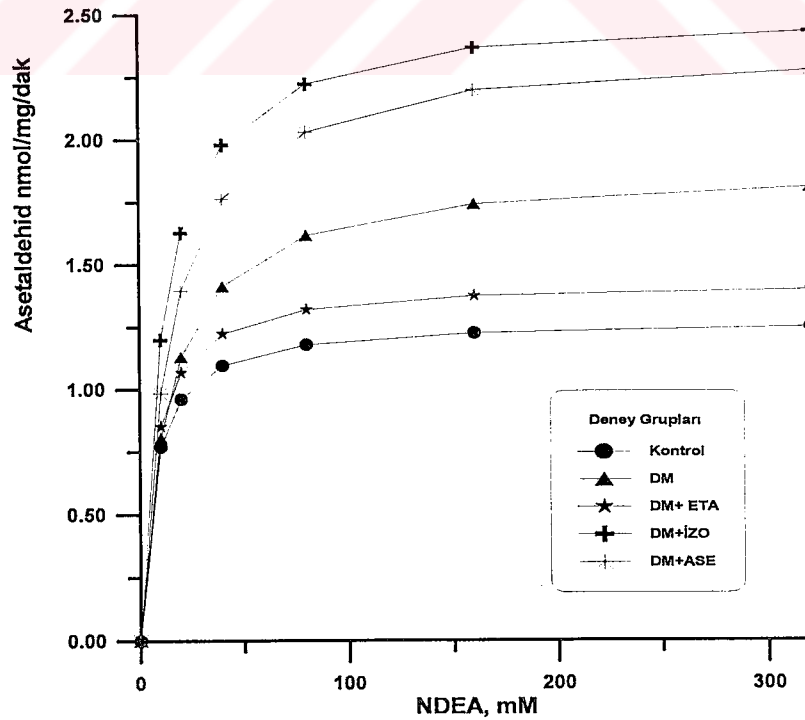


Şekil 16 : NDEA'in denitrozasyonunun Lineweaver-Burk grafiği

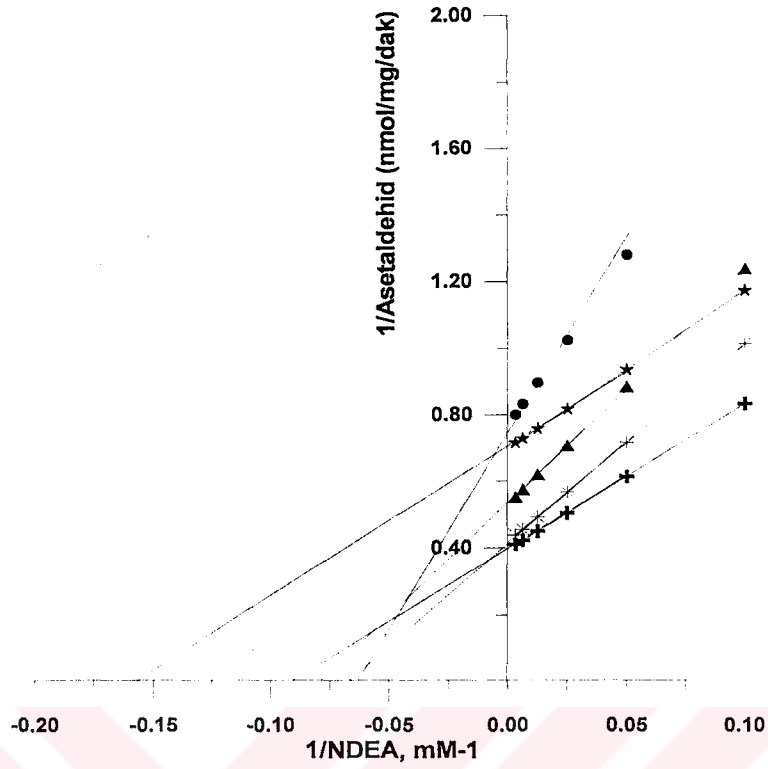
**Tablo 4 :** Nitrozodietilaminin denitrozasyonunun Km ve Vmax değerleri.

Deney grubu	Vmax (Nitrit nmol/mg/dakika)	Km (mM)
Kontrol	0.333	20.35
Diyabet	0.403	11.85
Diyabet + Etanol	0.479	14.79
Diyabet + İzopropanol	0.788	18.73
Diyabet + Aseton	0.917	18.53

NDEA'in denitrozasyon tepkimesinde kontrol grubunun Vmax : 0.333 formaldehit nmol/mg mikrozomal protein/ dakika, Km : 20.35 mM olarak bulundu. Diyabet grubunun Vmax ve Km değeri kontrol grubuna göre sırasıyla Vmax'in % 21 arttığı Km'in % 42 azaldığı gözlendi. Diyabet sonrası indükleyici verilen ratlarda ise Vmax ve Km değerleri şöyle idi. Etanol uygulanan grupta % 44 artış Km de ise % 27 azalış görüldü, İzopropil alkol uygulanan grupta Vmax % 136 artış Km de ise % 7.9 azalma gözlendi ayrıca Aseton uygulanan grupta Vmax % 175 artmış Km de ise % 8.9 azalmış olarak bulundu (tablo 4).



**Şekil 17 :** NDEA'in dealkilasyonunun Michaelis-Menten grafiği



Şekil 18 : NDEA'in dealkilasyonunun Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 5 : Nitrozodietilaminin dealkilasyonunun Km ve Vmax değerleri.

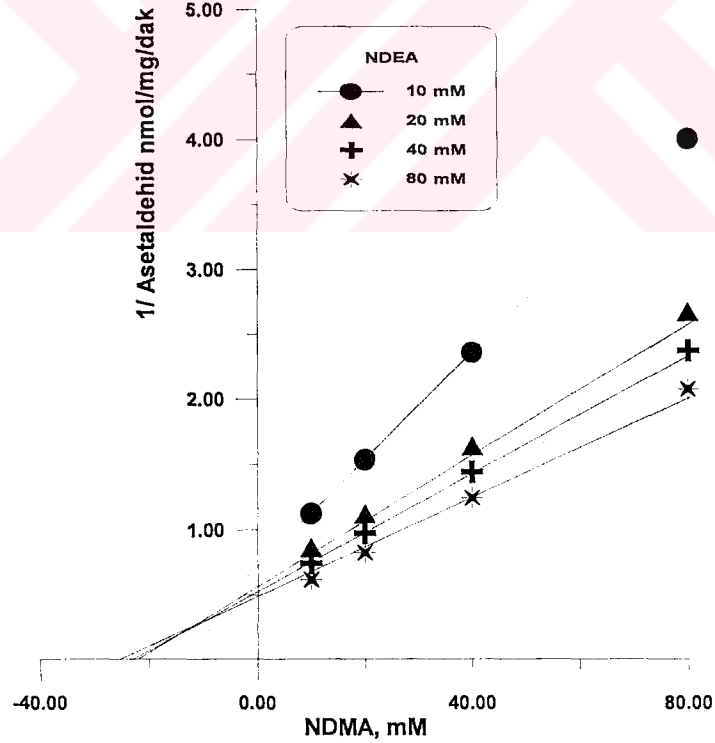
Deney grubu	Vmax (Asetaldehit nmol/mg/dakika)	Km (mM)
Kontrol	1.302	15.37
Diyabet	1.887	13.40
Diyabet + Etanol	1.429	6.79
Diyabet + İzopropanol	2.529	11.07
Diyabet + Aseton	2.390	14.26

NDEA'in dealkilasyon tepkimesinde kontrol grubunun Vmax : 1.302 asetaldehit nmol/mg mikrozomal protein/ dakika, Km : 15.37 mM olarak bulundu. Diyabet grubunun Vmax ve Km değeri kontrol grubuna göre sırasıyla Vmax % 45 arttığı Km de % 13 azaldığı gözlemlendi. Diyabet sonrası indükleyici verilen ratlarda ise Vmax ve Km değerleri şöyle idi. Etanol uygulanan grupta % 9.7 artmış Km de ise % 55 azalış görüldü, İzopropil alkol uygulanan grupta Vmax % 94 artmış Km de ise % 28 azalma gözlemlendi ayrıca Aseton uygulanan grupta Vmax % 83 artmış Km de ise % 7.2 azalmış olarak bulundu(tablo 5).

#### 4.5.0. İnhibisyon Çalışmaları

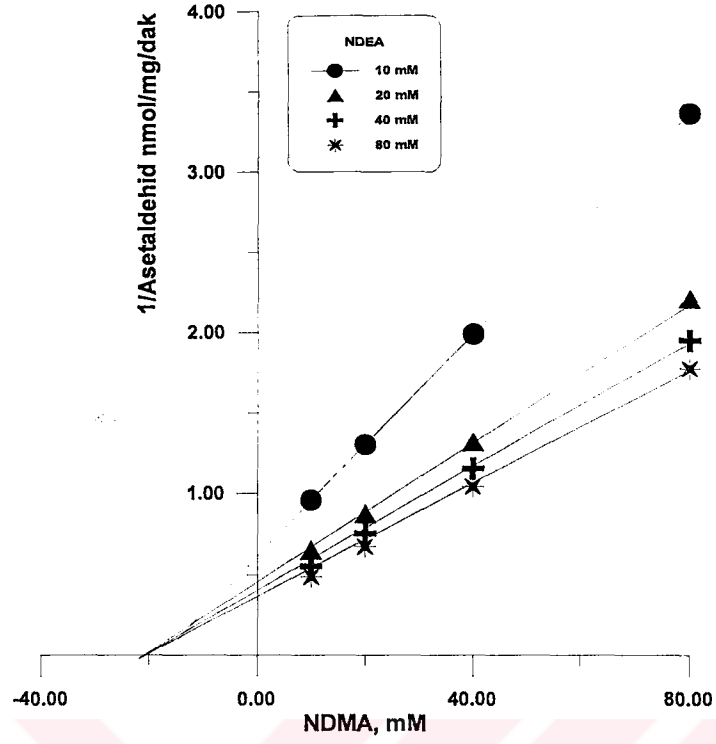
##### 4.5.1. N-Nitrozodietilamin'in dealkilasyonuna N-Nitrozodimetilamin' in etkisi

NDEA'in dealkilasyonuna NDMA'in etkisini incelemek için 4 farklı derişimde ( 10, 20, 40, 80 mM ) NDEA'nin hazırlandı. Herbir NDEA'in bulunduğu ortama farklı derişimde ( 10, 20, 40, 80 mM) NDMA'nin ilave edilerek asetaldehit tayini yapıldı ve İnhibitöre (NDMA) karşı  $1/V_0$  (1/asetaldehit nmol/mg/dakika) grafiğe alınarak Dixon grafiği çizildi (Şekil 19, 20, 21, 22, 23). Eğrilerin kesişdiği noktalardan  $K_i$  değerleri bulundu ve bu değerler Tablo 6 da verildi. Kontrol ve diğer 4 deney grubu için deneyler tekrarlandı.



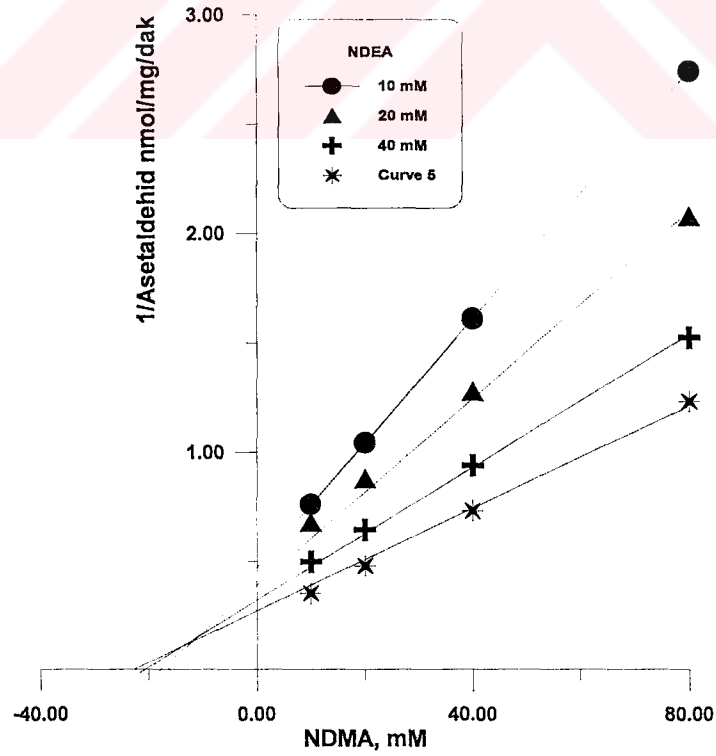
Şekil 19 : NDEA'in dealkilasyonuna NDMA'in etkisinin Dixon grafiği.

Kontrol grubu



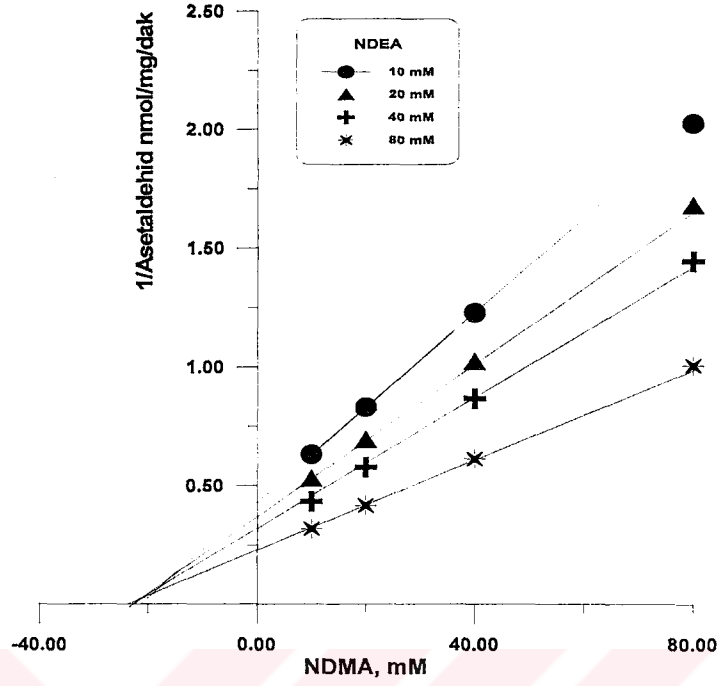
Şekil 20 : NDEA'in dealkilasyonuna NDMA'in etkisinin Dixon grafiği.

Diyabet grubu



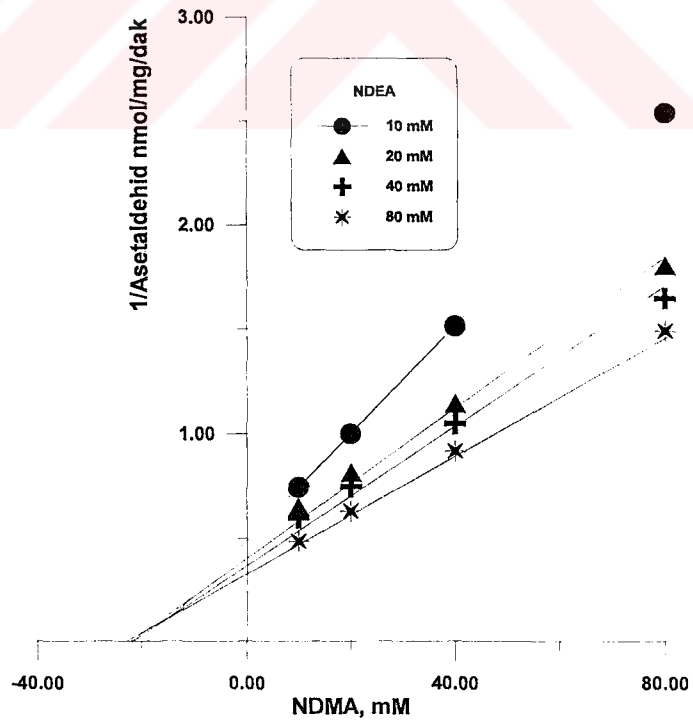
Şekil 21 : NDEA'in dealkilasyonuna NDMA'in etkisinin Dixon grafiği.

Diyabet+Etanol grubu.



Şekil 22 : NDEA'in dealkilasyonuna NDMA'in etkisinin Dixon grafiği.

Diyabet+İzopropanol grubu



Şekil 23 : NDEA'in dealkilasyonuna NDMA'in etkisinin Dixon grafiği.

Diyabet+Aseton grubu

**Tablo 6** : Nitrozodietilaminin dealkilasyonuna Nitrozodimetiaminin inhibisyonunun Ki değerleri.

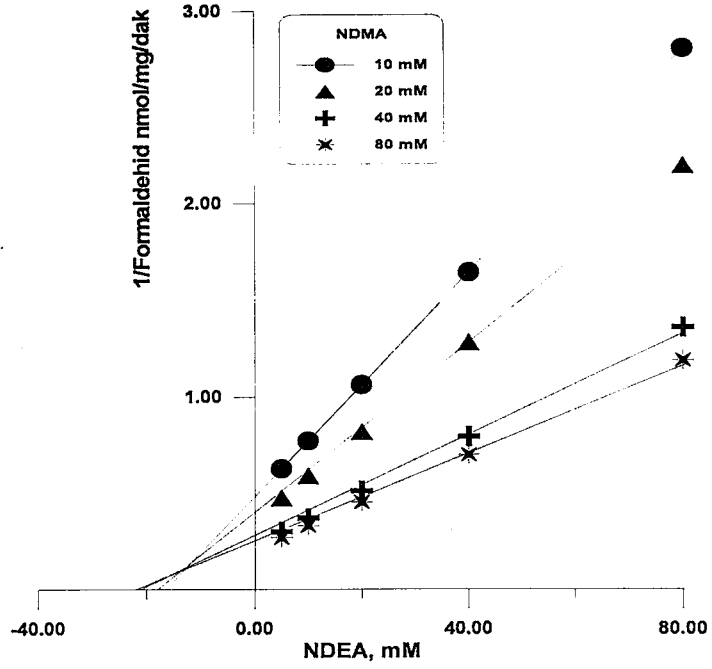
<b>Deney grubu</b>	<b>Ki (mM)</b>
Kontrol	10
Diyabet	14
Diyabet + Etanol	13
Diyabet + İzopropanol	17
Diyabet + Aseton	16

NDEA nin dealkilasyonuna NDMA nin etkisini araştırmak için yapılan çalışmada, NDEA nin dealkilasyonunun NDMA tarafından kompetitif olarak inhibe edildiği gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre Ki değerlerinde artış olmaktadır. Diyabet sonrası etanol verilen grubun Ki değerinde diyabetik gruba göre azalma olduğu saptanmıştır.

#### **4.5.2. N-Nitrozodimetilamin'in dealkilasyonuna N-Nitrozodetilamin' in etkisi**

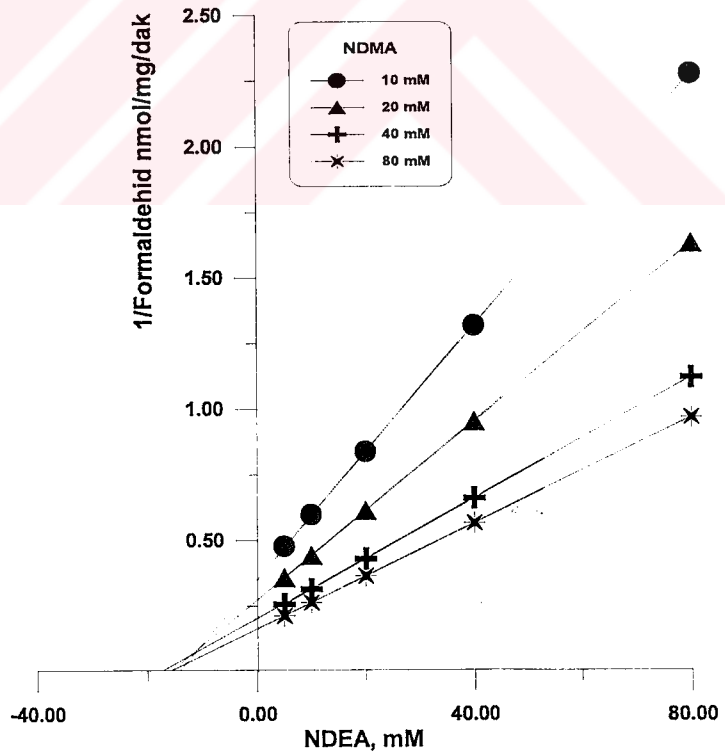
NDMA'in dealkilasyonuna NDEA'in etkisini incelemek için 4 farklı derişimde (10, 20, 40, 80 mM ) NDMA hazırlandı. Herbir NDMA'in bulunduğu ortama farklı derişimde (5, 10, 20, 40, 80 mM) NDEA ilave edilerek formaldehit tayini yapıldı. İnhibitöre (NDEA) karşı  $1/V_0$  ( $1/\text{formaldehit nmol/mg/dakika}$ ) grafiğe alınarak Dixon grafiği çizildi (şekil 24, 25, 26, 27, 28). Eğrilerin keşişdiği noktalardan Ki değerleri bulundu ve bu değerler Tablo 7 de gösterildi. Kontrol ve diğer 4 deney grubu için deneyler tekrarlandı.





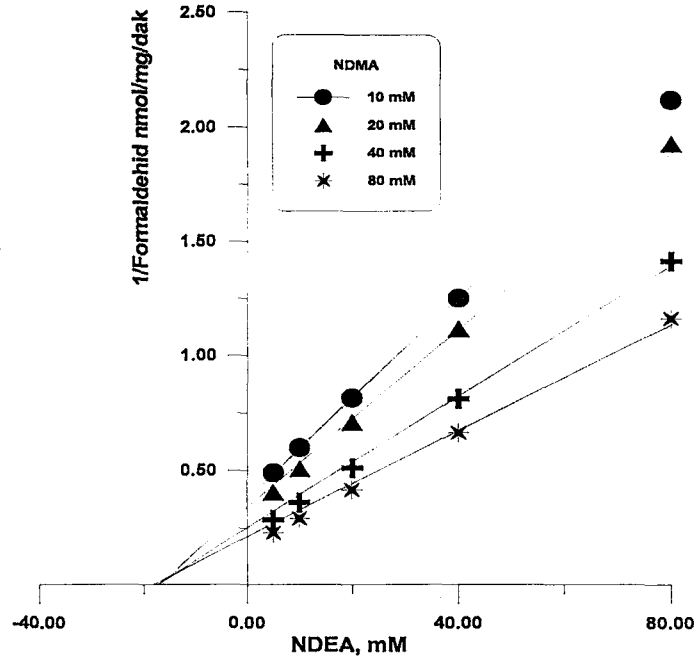
Şekil 24 : NDMA'in demetilasyonuna NDEA'in etkisinin Dixon grafiği.

Kontrol Grubu



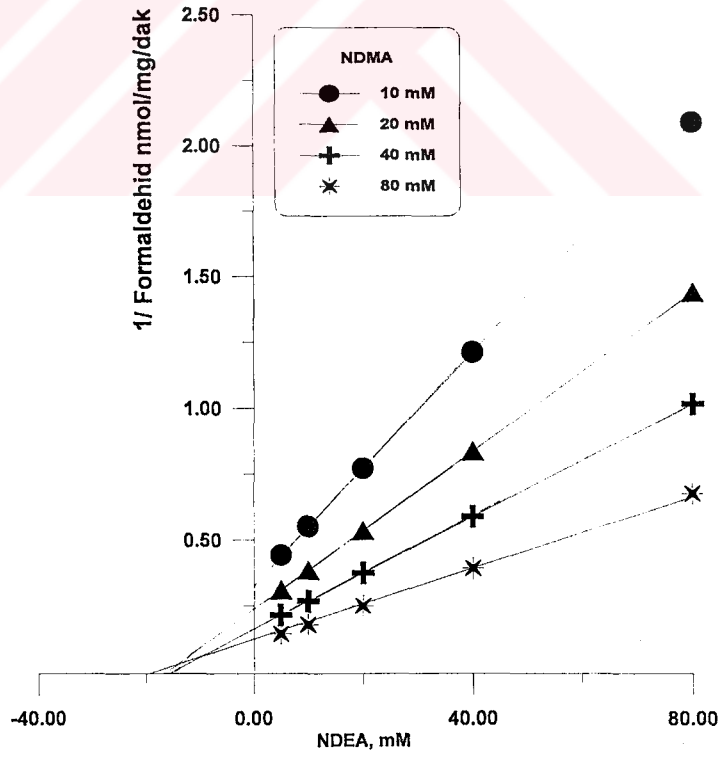
Şekil 25 : NDMA'in demetilasyonuna NDEA'in etkisinin Dixon grafiği.

Diyabet grubu.



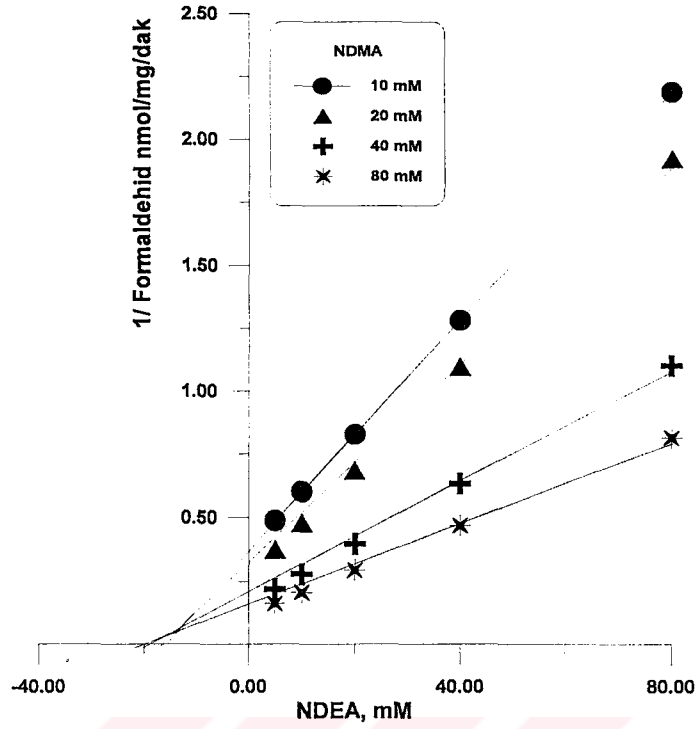
Şekil 26 : NDMA'in demetilasyonuna NDEA'in etkisinin Dixon grafiği.

Diyabet+Etanol grubu.



Şekil 27 : NDMA'in demetilasyonuna NDEA'in etkisinin Dixon grafiği.

Diyabet+İzopropanol grubu.



Şekil 28 : NDMA'in Demetilasyonuna NDEA'in Etkisinin Dixon grafiği.

Diyabet + Aseton Grubu.

Tablo 7 : Nitrozodimetilaminin dealkilasyonuna Nitrozodietilaminin inhibisyonunun Ki değerleri

Deney grubu	Ki (mM)
Kontrol	13
Diyabet	12
Diyabet + Etanol	14
Diyabet + İzopropanol	12.5
Diyabet + Aseton	12

NDMA nin dealkilasyonuna NDEA nin etkisini araştırmak için yapılan çalışmada NDMA nin dealkilasyonunu NDEA nin kompetitif olarak inhibe ettiği gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre Ki değerlerinde çok az azalış olduğu bulundu. Diyabet sonrası etanol verilen grupta ise artış görüldü.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çevre kirletici ve karsinojenik olarak bilinen NDMA ve NDEA metabolizması üzerine yapılan çalışmalarda nitrozaminlerin endoplazmik retikulumda NADPH bağımlı ve sitokrom P450 nin bir çok özelliğini taşıyan bir reaksiyonla metabolize olduğu gösterilmiştir. NDMA'nın metabolizmasını katalizleyen sitokrom P450'nin bir çok izoenzimleri tavşan ve rat karaciğerinden saflaştırılmıştır. Bu izoenzimlerden sitokrom P450 IIE1'in NDMA'nın denitrozasyonun ve demetilasyonunda diğer izoenzimlerden çok daha aktif olduğu gösterilmiştir. Ayrıca sitokrom P450 IIE1 miktarının türe ve yaşa göre farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir.

Son günlerde sitokrom P450 IIE1 in aktif merkezine nitrozaminlerin bağlanma affinitesi üzerine yapılan çalışmalar göstermiştir ki ; sitokrom P450IIE1 özellikle metil yada etil grubu içeren düşük molekül ağırlıklı nitrozaminlerin aktivasyonunda anahtar enzim olarak rol oynamaktadır. NDMA e benzerliğinden dolayı Nitrozoetilmetilamin (NEMA) ve NDEA de sitokrom P450 IIE1 tarafından metabolize edildiği bildirilmiştir. Ayrıca Nitrozobütilmetilamin gibi uzun zincirli nitrozaminlerin demetilasyonunu sitokrom P450 IIE1 ile katalizlenirken, debütilasyonu fenobarbital ile indüklenen sitokrom P450 IIB1 tarafından çok daha etkili olarak katalizlendiği gösterilmiştir(9,10,11,79).

Bu çalışmada, kimyasal olarak diyabet oluşturulan ve diyabet oluşturulduktan sonra etanol, aseton ve izopropil alkol verilen ratların karaciğer mikrozomal sisteminde NDMA ve NDEA'nın denitrozasyon ve dealkilasyon tepkimeleri incelenmiştir. Her iki nitrozaminin de denitrozasyon tepkimesi sonucu oluşan nitrit miktarı tayin edilip nmol/mg mikrozomal protein/dakika olarak verilmiştir.

Dealkilasyon tepkimelerinde ise, NDMA'in demetilasyonunda oluşan formaldehit ve NDEA'in deetilasyonunda oluşan asetaldehit miktarları tayin edilip nmol/mg mikrozomal protein/ dakika olarak verilmiştir.

NDMA ve NDEA'in karaciğer mikrozomal sistem tarafından denitrozasyon ve dealkilasyonuna pH'nın etkisi araştırılmıştır. Her iki tepkimenin pH : 7.5 da maksimum hızla gerçekleştiği gözlenmiştir. İlerleyen çalışmalarda bu pH değerinde çalışılmıştır.

NADPH-yenileyen sistemin, NDMA ve NDEA karaciğer mikrozomal sistemi tarafından denitrozasyon ve dealkilasyonunun etkisinin araştırılması amacıyla 3 farklı (0.134, 0.286, 0.536 mM) derişimde NADP içeren NADPH-yenileyen sistem hazırlanmıştır. NADP derişiminin artmasının tepkime hızını arttırdığı gözlenmiştir. Deneylerimizin kinetik ve inhibisyon çalışmalarında 0.400 mM NADP, 10 mM Glukoz-6-fosfat, 0.2U Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz içeren NADPH-yenileyen sistem çalışılmıştır.

Her iki nitrozaminin 6 farklı derişimde denitrozasyon ve dealkilasyon tepkimeleri mikrozomal sistemin bulunduğu ortamda gerçekleştirilmiş, oluşan nitrit, formaldehit ve asetaldehit miktarları tayin edilmiştir. Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla denitrozasyon ve dealkilasyonlarının Km ve Vmax değerleri hesaplanmıştır.

NDMA nin denitrozasyon tepkimesinde, kontrol grubuna (Km: 28.96 mM, Vmax: 0.764 nmol/mg/dak.) kıyasla diyabet oluşturulan grupta (Km: 20.88 mM, Vmax: 0.972 nmol/mg/dak.) enzimin indüklendiği tespit edildi. Diyabet sonrası indükleyici verilen deney gruplarında da Vmax lardaki artış en fazla etanol (Vmax: 1.224 nmol/mg/dak.) daha sonra izopropil alkol (Vmax: 1.077 nmol/mg/dak.) ve

aseton ( $V_{max}$ : 1.019 nmol/mg/dak.) verilen ratlarda görüldü.  $K_m$  değerlerine bakıldığında en fazla enzim indüksiyonu aseton verilen ratlarda ( $K_m$ : 16.28 mM) gözlemlendi. Etanol ( $K_m$ : 28.11 mM) ve izopropil alkol verilen deney gruplarında ( $K_m$ : 23.69 mM) ise indüksiyonun azaldığı görüldü.

NDMA nin demetilasyon tepkimesinde kontrol ( $K_m$ : 11.34 mM,  $V_{max}$ : 1.688 nmol/mg/dak.) grubuna kıyasla diyabet oluşturulan grupta ( $K_m$ : 10.15 mM,  $V_{max}$ : 2.107 nmol/mg/dak.) enzimin indüklendiği tespit edildi. Diyabet sonrası indükleyici verilen deney gruplarında da en fazla indüksiyonun aseton verilen grupta ( $K_m$ : 6.93 mM,  $V_{max}$ : 2.700 nmol/mg/dak.) olduğu anlaşıldı. İzopropil alkol ( $K_m$ : 8.51 mM,  $V_{max}$ : 2.578 nmol/mg/dak.) ve etanol ( $K_m$ : 9.77 mM,  $V_{max}$ : 2.590 nmol/mg/dak.) verilen gruplarda da diyabetik gruba kıyasla enzimin indüklendiği görüldü.

Yang ve arkadaşları, etanol, aseton ve isopropil alkol verilmiş ratlarda ve ayrıca açlık ve streptozotosin ile indüklenmiş diyabetde de karaciğer mikrozomal NDMA demetilaz aktivitesinin arttığını gösterdiler. 2 yada 3 gün açlığın NDMA demetilaz aktivitesini 2-3 kat arttırdığı diyabetin ise bu enzimin düzeyinin 2 kez artırdığı bildirilmiştir(80,81).

Bir başka çalışmada ise, streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş ratların karacigerlerinden NDMA demetilaz enzimi saflaştırılmış ve molekül ağırlığı 50.000 olarak tespit edilmiştir. Kinetik çalışmalar sonucunda  $K_m$  0.05 mM olarak bulunmuştur. Ayrıca diyabetlilerde NDMA nin metabolizmasının arttığı gözlenmiştir. Nitrozometilanilini ve Nitrozometilbenzililanilinin metabolizmasının etkilenmediği de gözlenmiştir(82).

Bu çalışmada elde ettiğimiz  $K_m$  değeri literatürlerdeki  $K_m$  değerinden yüksektir. Genelde çalışmamıza benzer çalışmalarda, enzim saflaştırıldıktan sonra kinetik çalışma yapılmıştır yada bir kaç substrat derişiminde metabolit tayini yapıp kıyaslamalar verilmiştir. Çalışmamızda  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinden anlaşıldığı üzere diyabet ve diyabet sonrası verilen kimyasalların NDMA demetilaz enzimini indüklediği görülmüştür.

NDEA'in denitrozasyon tepkimesinde kontrol grubuna ( $K_m$ : 20.35 mM,  $V_{max}$ : 0.333 nmol/mg/dak.) kıyasla diyabet oluşturulan grupta ( $K_m$ : 11.85 mM,  $V_{max}$ : 0.403 nmol/mg/dak.) enzimin indüklendiği tespit edildi. Diyabet sonrası indükleyici verilen deney gruplarında da  $V_{max}$  lardaki artış en fazla aseton ( $V_{max}$  : 0.917 nmol/mg/dak.) daha sonra izopropil alkol ( $V_{max}$  : 0.788 nmol/mg/dak.) ve etanol ( $V_{max}$  : 0.479 nmol/mg/dak.) verilen ratlarda görüldü.  $K_m$  değerlerine bakıldığında en fazla enzim indüksiyonunun diyabetik ratlarda ( $K_m$ :11.85 mM) olduğu. Etanol ( $K_m$ :14.79 mM) ve izopropil alkol ( $K_m$ :18.73 mM) verilen deney gruplarında ise indüksiyonun azaldığı görüldü.

Deetilasyon tepkimesinde kontrol grubuna ( $K_m$ : 15.37 mM,  $V_{max}$ : 1.302 nmol/mg/dak.) kıyasla diyabet oluşturulan grupta ( $K_m$ : 13.40 mM,  $V_{max}$ : 1.887 nmol/mg/dak.) enzimin indüklendiği tespit edildi. Diyabet sonrası indükleyici verilen deney gruplarındada  $V_{max}$  lardaki artış en fazla izopropil alkol ( $V_{max}$ : 2.529) daha sonra aseton ( $V_{max}$ : 2.390) ve etanol ( $V_{max}$ : 1.429) verilen ratlarda görüldü.  $K_m$  değerlerine bakıldığında en fazla enzim indüksiyonunun etanol ( $K_m$ : 6.79 mM) verilen ratlarda daha sonra izopropil alkol ( $K_m$ : 11.07 mM) ve diyabette ( $K_m$ : 13.40 mM) gözlandı. Aseton ( $K_m$ : 14.26 mM) verilen deney gruplarında ise indüksiyonun azaldığı görüldü.

Chau ve arkadaşları, içme sularına fenobarbital verilmiş Sprague-Dawley ratların karaciğer mikrozomlarında NDMA, NDEA ve NEMA'in oksidatif dealkilasyonunu NDMA'in Km : 118 mM Vmax : 11 nmol formaldehit /mg/dakika, NDEA'in Km : 8.1 mM Vmax : 4.6 nmol asetaldehit /mg/dakika ve NEMA'in Km (formaldehit) : 48 mM Vmax : 2.5 nmol formaldehit /mg/dakika, Km (asetaldehit) : 75 mM Vmax : 4.7 nmol asetaldehit /mg/dakika olarak bulmuşlardır(75).

Rat ve tavşan sitokrom P450 IIE1'i NDMA demetilaz yenileyen sistem ile Km değeri 3 mM olarak bulunmuştur. Bu değer karaciğer hücresi, kesiti ve perfüze karaciğerden saflaştırılan enzimin Km değerinden (50-70µM) çok yüksektir(11,23).

Diyabet NDMA demetilaz ve NDEA deetilaz enzimlerinin Km değerlerinde kontrole göre ılımlı bir azalışa neden olduğu gözlemlendi. Diyabet sonrası Etanol verilen grupta NDMA demetilaz aktivitesindeki artış çok az olurken NDEA deetilaz aktivitesinde iki kata yakın artış bulundu. Aseton ve izopropil alkol verilen grupta ise NDEA deetilaz aktivitesinde değişiklik gözlenmezken, NDMA demetilaz aktivitesinde yine iki kata varan artış gözlemlendi. Buradan diyabetin her iki nitrozaminin dealkilasyonunu aynı oranda aktive ettiği fikri oluştu. Ama diyabet sonrası verilen kimyasalların aynı oranda etkili olmadığı ve Etanol'ün NDEA deetilazı daha fazla aktive ederken asetonun da NDMA demetilazı aktive ettiği görüldü.

Ratlarda Streptozotosin ile oluşturulan diyabetin NDMA'd aktivitesini ve sitokrom P450ac (aseton/etanol)'yı indüklediği gösterilmiştir. Bir başka çalışmada ise Streptozotocin ve Alloksan ile oluşturulan diyabet rat modeli ve kendiliğinden oluşan diyabet rat modeli'nin detayları çalışılmıştır. Bütün bu diyabetlerde üç



parametrenin artığı bulunmuştur ; a) Sitokrom P450ac düzeyinin iyi bir göstergesi olduğu bilinen NDMA demetilaz aktivitesi b) Sitokrom P450ac düzeyi c) Sitokrom P450 mRNA sının düzeyi(24).

Diyabet ve açlık gibi ketojenik durumlar kadar aseton ve ketoncisimleri de NDMA demetilaz aktivitesini (sitokrom P450 IIE1'in düzeyinin yansıması) indüklemektedir. Açlık durumunda hepatik NDMA demetilaz aktivitesi ve kan aseton düzeyi arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir(83).

Etanol ve aseton verilen ratlarda in vivo ve in vitro NDMA demetilaz'ın indüklediği DNA metilasyonunun arttığı ve sonuçta hepatotoksisite potansiyel olarak arttırdığı bildirilmiştir. NDMA'nin in vivo DNA metilasyonu üzerindeki bu etkisinin NDMA'nin yüksek dozlarında ( >25 mg/kg vücut ağırlığı ) meydana geldiği gösterilmiştir(80,84).

Açlık, diyabet oluşumu ve ayrıca aseton, etanol, izopropil alkol, benzen ve eter gibi birçok kimyasalın mikrozomal monooksijenaz sistemi ile etkileşimi birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. NDMA'yi metabolize eden sistemin etkisi incelenirken NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktiviteleride irdelenmiştir. Aseton ve izopronal verilen Spraque Dawley ratlarında NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesinde ılımlı bir artış olduğu bulunmuştur. Uzun süre alkol verilen ratlarda Mikrozomal Etanol Oksitleyici Sistem (mikrozomal sitokrom P450 , NADPH-sitokrom P450 redüktaz ve fosfolipidler) aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (9,11,13,85,86).

Bir çok kimyasal indükleyicinin NDMA'de enzimi üzerindeki etkileri çalışılmıştır. Mikrozomal monooksijenaz sistem üzerine aseton ve izopropil alkolün etkisi çalışılmış ve nitrozamin metabolizmasında bu enzim sisteminin rolü olduğu gösterilmiştir. Aseton ve İzopropil alkol verilen ratların NADPH bağımlı NDMA

demetilaz aktivitesinin 3-4.5 kez arttığı ve NADPH-sitokrom P450 redüktaz aktivitesinde ve sitokrom P450 içeriğinde de ılımlı bir artış olduğu bildirilmiştir (84). İnhibisyon çalışmaları, bir enzimin özgüllüğü, aktif merkezin fiziksel ve kimyasal yapısı ve tepkimenin kinetik mekanizması hakkında bilgi verir. Diyabet ve diyabet sonrası indükleyiciler verilen ratlarda NDMA ve NDEA i metabolize eden sistemin indüklendiğini gözledik. Bu sistemin her iki nitrozaminin aynı anda bulunduğu deney ortamındaki davranışını izlemek ve indükleyicilerin farklı izoenzimleri indükleyip indüklemediğini araştırmak için inhibisyon çalışması yaptık.

NDEA nin dealkilasyonuna NDMA nin etkisini araştırmak için yapılan çalışmada, NDEA nin dealkilasyonunun NDMA tarafından kompetitif olarak inhibe edildiği gözlenmiştir. Dixon grafiği  $I_0$  (NDMA)'a karşı  $1/V_0$  (1/asetaldehit nmol/mg/dakika) çizilerek  $K_i$  değerleri bulunmuştur.

Bilindiği gibi  $K_i$ , enzimin inhibitöre karşı ilgisinin bir ölçüsüdür. Herhangi bir substrat ve inhibitör derişiminde  $K_i$ 'nin düşmesi inhibisyon derecesini yükseltir.

Kontrol grubuna göre  $K_i$  değerlerinde artış olduğu gözlendi.  $K_i$  değerindeki bu artış enzim inhibitör (NDMA) kompleksinin azaldığını yani enzim substrat (NDEA) kompleksinin daha fazla olduğunu gösterir. Diğer bir değişle enzimin inhibitöre karşı ilgisinin azaldığını substrata karşı ilginin arttığını gösterir. Kontrol grubuna göre inhibisyon derecesi azalmaktadır.

NDMA nin dealkilasyonuna NDEA nin etkisini araştırmak için yapılan çalışmada NDMA nin dealkilasyonunu NDEA nin kompetitif olarak inhibe ettiği gözlenmiştir. Dixon grafiği,  $I_0$  (NDEA) karşı  $1/V_0$  (1/formaldehit nmol/mg/dakika) çizildi.  $K_i$  değerleri bulundu. Kontrol grubuna göre  $K_i$  değerlerinde çok az azalış olduğu gözlendi.

Tavşan ve ratlarda sitokrom P450 izoenzimleriyle yapılan çalışmalarda sitokrom P450 klasik inhibitörü olarak bilinen SKF-525 A sitokrom P450 IIE1 bağımlı NDMA demetilazı inhibe etmediği bildirilmiştir. Bununla beraber, reaksiyonun 2-feniletılamin, 2-amino 1,2-4, triazol ve pyrozole gibi klasik olmayan inhibitörlerle inhibe edildiğinde gösterilmiştir(11)

İnhibisyon çalışması sonucunda, her iki nitrozaminin aynı anda ve aynı miktarda bulunduğu deney ortamında, nitrozaminlerin aynı oranda metabolize olduğu görüldü. Metabolize eden sistemin her iki nitrozamini metabolize etmek için yarıştığı gözlemlendi. Diyabet ve diyabet sonrası verilen indükleyicilerin sadece bir tane izoenzimi indüklediği düşüncesi desteklendi.

Endüstriyel toplumlarda yaygın olarak kullanılan ve çevre kirleticisi olarak bilinen nitrozaminler birçok canlı yaşamını olumsuz olarak etkilemektedir. Nitrozaminlerin karaciğerde metabolize edilmesi (aktivasyon) sonucu oluşan metabolitlerin kendilerinden daha fazla karsinojenik olduğu bilinmektedir. Nitrozaminlere maruz kalan canlılarda bu aktivasyon işlemi aynı oranda olmaz. Diyabetik canlılarda aktivasyon işlemi normal canlılara göre daha hızlıdır. Diyabetik olan canlıların aseton, etanol ve izopropil alkol gibi kimyasalara maruz kalması bu aktivasyon işlemi daha da hızlandırdığı tesbit edilmiştir. Bu nedenle normal canlılardan daha fazla diyabetik canlıların, aseton, etanol ve izopropil alkol gibi kimyasallara maruz kalan canlıların nitrozamin ve nitrozamin içeren besin maddelerinden kendilerini korumaları canlı sağlığı için önem taşımaktadır.

## ÖZET

Bu çalışmada, kimyasal olarak diyabet oluşturulan ve diyabet oluşturulduktan sonra etanol, aseton ve izopropanol uygulanan ratların karaciğer mikrozomal sisteminde Nitrozodimetilamin ve N-Nitrozodietilaminin denitrozasyon ve dealkilasyon tepkimeleri incelendi.

Her iki nitrozaminin de denitrozasyon tepkimesi sonucu oluşan nitrit miktarı tayin edilip nmol/mg mikrozomal protein/dakika olarak verildi. Dealkilasyon tepkimelerinde ise, Nitrozodimetilaminin demetilasyonunda oluşan formaldehit ve N-Nitrozodietilaminin deetilasyonunda oluşan asetaldehit miktarları tayin edilip nmol/mg mikrozomal protein/ dakika olarak verildi.

Diyabet ve diyabet sonrası indükleyici verilen ratlarda ; her iki nitrozamini metabolize eden dealkilasyon ve denitrozasyon enzimlerinin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri bulundu. Her iki nitrozamin için, kontrol grubuna göre diyabetin, diyabetik gruba göre de indükleyici uygulanan enzimlerin indüklendiği görüldü.

İnhibisyon çalışması sonucunda, nitrozaminlerin aynı oranda metabolize olduğu görüldü. Metabolize eden sistemin her iki nitrozamini (kompetitif olarak inhibe ettiği) metabolize etmek için yarıştığı gözlemlendi. Diyabet ve diyabet sonrası verilen İndükleyicilerin sadece bir tane izoenzimi indüklediği düşüncesi desteklendi.

## SUMMARY

In this study, following the administration of inducers such as ethanol, acetone and isopropanol, denitrosation and dealkylation reactions of N-Nitrosodimethylamine and N-Nitrosodiethylamine were investigated in liver microsomal system of rats with diabetes and which were occurred by chemicals.

Nitrite amounts as a denitrosation reaction product for both nitrosamines were detected and given as nmol/mg microsomal protein/min. Formaldehyde and acetaldehyde which are occurred demethylation of N-Nitrosodimethylamine and deethylation of N-Nitrosodiethylamine, respectively as a product of dealkylation reactions were also detected and given as nmol/mg microsomal protein/min.  $K_m$  and  $V_{max}$  values of dealkylation and denitrosation enzymes which act metabolization of both nitrosamines were assessed in diabetic and inducer applied diabetic rats. Enzyme's inductions were increased statistically significant in rats with diabetes and inducer applied diabetic rats compare to control and diabetic group, respectively.

As a result of inhibition studies, nitrosamines were metabolized given same ratio and inhibited competitively so, it is supported that there is only one isoenzyme can be induce in diabetic and inducer applied diabetic rats.

## KAYNAKLAR :

1. **Vural, N.** : Ksenobiyotiklerin Biyotransformasyon mekanizmaları : *Toksikoloji. Ankara Üniversitesi yayın evi.* 56:34-51,1984.
2. **Pacifici, G.M., Fracchia G.N.** : Drug Metabolism in vivo : Role of drug metabolism in drug disposition and effects. *Advances in Drug Metabolism in man.* Chapter 1: 3-35, 1995.
3. **Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K., Rodwell, V.W.** : Ksenobiyotiklerin metabolizması. *Harper'ın Biyokimyası.* Konu 60:811-817 1993.
4. **Kayaalp, S.O.**: İlaçların metabolizması (Biyotransformasyon). *Tıbbi Farmakoloji.* 5:91-127, 1987.
5. **Tu Y.Y., Sonnenberg J., Lewis K.F., Yang C.S.**: Pyrazole-İ nduced cytochrome P450 in rat liver microsomes: an isozyme with high affinity for dimethylnitrosamine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 103:905-12, 1981.
6. **Yang C.S.** : Interactions between solubilized cytochrome P450 and hepatic microsomes. *J. Biol. Chem.*, 252:293, 1977.
7. **Yang C.S., Stirickhart F.S., and Kicha L.P.**: Interaction between NADPH-cytochrome P450 reductase and hepatic microsomes. *Biochem. Biophys. Acta.*, 509:32, 1978.
8. **Mc Cann, j., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, N.B.** : Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella Microsome Test : Assay of 300 Chemicals. *Proc. Nat Acad. Sci* 72 : 5135-39, 1979.
9. **Yang C.S., Smith T.J., Hong J., Zhou S.** : Kinetics and enzymes involved in the metabolism of nitrosamines. *ACS Symposium Series 553*, Chapter 14, 176-69, 1994.

10. **Yang, C.S.,** Patten, C.J, Ishizaki, H., Yoo, J.H. : Induction purification and characterization of cytochrome P450IIE . *Methods In Enzymology*, 206: 595-603, 1991.
11. **Yang C.S.,** Yoo JSH., Ishizaki H., Hong J. : Cytochrome P450IIE1 : Roles in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation. *Drug Metabolism Reviews*, 22:147-59, 1990.
12. **Koenigsmann, M.,** Schmerold, I., Jeltsch, W., Ludeke, B., Kleihues P and Wiessler M. : Organ end cell specificity of DNA methylation by N-Nitrosomethylamylamin rat. *Cancer Research*, 48 : 5482-86, 1988.
13. **Yong, Y.T.,** Peng, R., Chang, Z., Yang, C.S.: Induction of a high affinity nitrosamine demethylase in rat liver microsomes by acetone and isopropanol. *Chem.Biol. Inter.*, 44: 247-60,1983.
14. **Gonzalez, F.J. :** The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmac. Reviews*. 40: 243-288, 1989.
15. **Baskin L.S.,** Yang C.S.: Cross-Linking studies of cytochrome P450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P450 reductase. *Biochemistry*, 19:2260-64, 1980.
16. **Devlin T.M. :** Biotransformations : The cytochromes P450. *Textbook of Biochem. with Clin. Correlations*, Chapter 23:987-89, 1992.
17. **Doehmer, J.,** Goepfer, A.R., Vermeulen, Nico P.E.: Cytochromes P450 and drug resistance. *Cytotechnology*, 12 : 357-366,1993.
18. **Astrom, A.,** DePierre J.W. : Rat-liver microsomal cytochrome P450 : purification, characterization, multiplicity and induction. *Biochem. Biophys. Acta*, 853: 1-27, 1986.
19. **Ryan, D.E.,** Levin W.: Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P450. *Pharmac. Ther.* 45:153-239,1990.

20. **Yoo, J-S.H.**, Ishizaki, H., Yang C.S. : Roles of cytochrome P450IIE1 in the dealkylation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in rat liver microsomes. *Carcinogenesis*, 11(12):2239-2243, 1990.
21. **Yang C.S.**, Tu Y.Y. : Demethylation and denitrosation of nitrosamines by cytochrome P450 isozymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 242(1):32-40, 1985.
22. **Levin, W.**, Thomas, P.E., Oldfield N., Ryan D.E. : N-Demethylation of N-Nitrosodimethylamine catalyzed by purified rat hepatic microsomal cytochrome P450 : Isozyme specificity and role of cytochrome b<sub>5</sub>. *Arch. Biochem. Biophys.* 248(1):158-165, 1986.
23. **Patten, C.J.**, Ning S.M., Lu, A.Y.H., Yang, C.S.: Acetone-inducible cytochrome P450 : purification catalytic activity, and interaction with cytochrome b<sub>5</sub>. *Arch. Biochem. Biophys.* 251(2):629-638, 1986.
24. **Dong, Z.**, Hong, J., Ma, Q., Li D., Bullock, J., Gonzalez, J.F., Park, S.S., Gelboin, H.V., Yang, C.S. : Mechanism of induction of cytochrome P450ac (P450<sub>j</sub>) in chemically induced and spontaneously Diabetic rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 263(1):29-35, 1988.
25. **Fujii-Kuriyama, Y.**, Mizukami, Y., Kawajiri, K., Sogawa, K., Muramatsu, M.: Primary structure of a cytochrome P450 : coding nucleotide sequence of phenobarbital-inducible cytochrome P450 cDNA from rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:2793-2797, 1982.
26. **Gonzalez, F.J.** : Molecular genetics of the P450 superfamily. *Pharmac. Ther.* 45: 1-38, 1990.
27. **Hodgson, E.**, Silver, I.S., Butler, L.E., Lawton, M.P., Levi P.E.: Biotransformation : *Metabolism. Handbook of Pesticide Toxicology*. Chapter 3(1):107-143, 1991.
28. **Suzuki, H.**, Kaku, M., Hori, S., Shimoyama, T.: Effect of dietary protein depletion and on demethylation and denitrosation of N-nitrosodimethylamine by rabbit liver microsomes. *J. Nutr. Sci Vitaminol*, 37:285-96, 1991.



29. **Yang, C.S., Yoo J-S.H.:** Enzyme specificity in the metabolic of N-Nitrosodimethylamine to a mutagen for Chinese Hamster V79 Cells. *Cancer Research.* 45:5569-5574,1985.
30. **Fine, D.H.,** Rounbehler, D.P., Pellizzari, E.D. : N-Nitrosodimethylamine in air. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 15:739-746, 1976.
31. **Lijinsky, W.,** Eipstein, N.N. : Nitrosamines as environmental carcinogens. *Nature.* 225:21-23, 1975.
32. **Scanian, R.A. :** N-Nitrosamines in foods. *Crit. Rev. Food Technol.* 5:357, 1975.
33. **Andrews, A.W.,** Lijinsky, W., Snyder, S.W.: Mutajenicity of amino drugs and their products of nitrosation. *Mutation Res..* 135:105-108, 1984.
34. **Eisenbrand, G.,** Ungarer, O., Preussmann, R. : Formation of N-nitroso compounds from agricultural chemicals and nitrite, *I.A.R.C. Sci. Publ.9:* Lyon,France, 1973.
35. **Gough, T.A. :** An examination of foodstuffs for the presence of volatile nitrosamines *J.S.F.A.* 28:345-351, 1977.
36. **Morrison, J.B.,** Hecht, S.S. : A sensitive new method for the detection of NMOR formation in vivo. *Cancer Research.* 44(7),2873-2877, 1984.
37. **Cooney, R.V.,** Ross, P.D., Bartolini, G.L., Romseyer, J. : N-Nitrosamine formation : Factors influencing the aqueous reactions of nitrogen oxide with morfoline. *Environ. Sci.* 21:77-83, 1987.
38. **IARC Monographs** on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. : Some N-nitroso compounds, 17:83-125, 125-175,1978.
39. **Appel, K.E.,** Christion, E.R., Hildebrandt, G.A.: Oxidative dealkylation and reductive denitrosation of nitrosomethylaniline in vitro. *Chem. Biol. Interect.* 53:69-76, 1885.

40. **Yang, C.S.,** Hong, J.Y.: Molecular aspects of cytochrome P450III<sub>E1</sub> and Its roles in chemical toxicity. *Molecular Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes : Their Significance in Enviromental Toxicology, Chemical Carcinogenesis and Health. NATO ASI Series Cell Biology*, Vol.90:181-192,1995.
41. **Lee, M.,** Ishizaki, H., Brady, J.F., Yang, C.S. : Substrate specificity and alkyl group selectivity in the metabolism of N-nitrosodialkylamines. *Cancer Research*. 49:1470-1474, 1989.
42. **Magee, P.N,** Barnes, J.M.: Carcinogenic nitroso compounds. *Adv. Cancer Research*. 10:163-246, 1967.
43. **Wade, C.,** Yang, C.S., Metral, C.J., Roman, J.M., Hrabie, J.A., Riggs, C.W., Anjo, T., Keefer, L.K., Mico, B.A.: Deuterium isotope effect on denitrosation and demethylation of N-nitrosodimethylamine by rat liver microsomes. *Cancer Research*. 47:3373-3377, 1987.
44. **IARC :** IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man. 1: Lyon 95-106, 1972.
45. **Fine, D.H.,** Rounbehler, D.P., Belcher, N.M., Epstein, S.S.: N-nitroso compounds : detection in ambient air. *Science*. 192:1328-1330, 1976.
46. **Fine, D.H.,** Rounbehler,D.P.: N-Nitroso compounds in water. In : Keith, L.H., ed. Identification and analysis of organic pollutants in water. *Ann Arbor, Michigan Ann Arbor Science Press*, 255-264, (1967).
47. **Havery, D.C.,** Kline,D.A., Miletta, E.M., Joe, F.L., Fazio, T.: Survey of food products for volatile N-nitrosamines. *J.Ass. Off. Analyt. Chem.* 59:540-546, 1967.
48. **Johnson,D.E.,** Rhoades, J.W.: N-Nitrosamines in smoke condensate from several varieties of tobacco. *J.Nat.Cancer Inst.* 48:1845-1847, 1972.

49. **Rounbehler, D.P.**, Ross, R., Fine, D.H., Iqbal, Z.M., Epstein, S.S.: Quantitation of dimethylnitrosamine in the whole mouse after biosynthesis in vivo from trace levels of precursors. *Science*. 197:917-918, 1977.
50. **Heath, D.F.** : The Decomposition and toxicity of dialkylnitrosamines in rats. *Biochem. J.* 85:72-9, 1962.
51. **Magee, P.N.**, Montesano, R., Preussmann, R. : N-Nitroso compounds and related carcinogens. In : Searle, C.E., ed., Chemical Carcinogens (ACS Monograph 173), Washington DC, *American Chemical Society*, 491-625, 1976.
52. **Lake, B.G.**, Phillips, J.C., Heading, C.E., Gangolli, S.D.: Studies on the in vitro metabolism of dimethylnitrosamine by rat liver. *Toxicology* 5:297-309, 1976.
53. **Argus, M.F.**, Hoch-Ligeti, C. : Comparative study of carcinogenic activity of nitrosamines. *J. Nat.Cancer Inst.*27:695-709, 1961.
54. **Appel, K.E.**, Ruhl, C.S., Hildedrandt, G.A.: Metabolic inactivation of N-nitrosamines by Cyt P450 in vitro and in vivo. N-Nitroso Compounds : Occurrence, Biological Effects and Relevance to Human Cancer. *I.A.R.C. Sc. Publ.* 57:443-457, Lyon, 1984.
55. **Stumpf, R.**, Margison, G.P., Montesano, R., Pegg, A.E.: Formation and loss of alkylated purines from DNA of hamster liver after administration of DMN. *Cancer Research*. 39:50-54, 1979.
56. **Mendoza, F.T.**, Lopez, R.R., Villa, T.S.: Dose-dependent DNA ruptures induced by the procarcinogen dimethylnitrosamine on primary rat liver cultures. *Cancer Research*. 39:3254-3257, 1979.
57. **Magee, P.N.**, Farber, E.: Methylation of rat liver nucleic acid by dimethylnitrosamine in vivo. *Biochem.J.* 83:114-124, 1962.
58. **Swann, P.F.**, Magee P.N.: The alkylation of nucleic acids of the rat by N-Methyl-N-Nitrosourea, dimethylnitrosamine, dimethylsulphate and methyl-methylnesulphonate. *Biochem.J.* 110:39-46, 1968.

59. **Sen, N.P.**, Smith, D.C., Schwinghamer, L. Marleau, J.J.: Diethylnitrosamine and other N-nitrosamines in foods. *J.Ass.Off Analyt.Chem.* 52:47-52, 1969.
60. **Weckes, U.**, Gletten, F., Brusick, D. : Conversion of DENA and DMNA to mutagenic metabolites by microsome fraction from liver, lung and kidney tissues of 4 mouse strains. *Mut. Res.ect Enveran. mutagenesis Relat. Subs.* 26:453, 1973.
61. **Rojewsky, M.**, Douber, W. : Liver carcinogenesis by DENA in the rat. *Science.* 152:83-85, 1966.
62. **Guengerich F.P.**, Metabolic reaction types of reactions of cytochrome P450 enzymes : Chenkman, J.B., Greim, H ed. *Cytochrome P450 Heidelberg : Springer*, 89-103, 1993.
63. **Craddock, U.**, Ansley, M.: Sequential changes in DNA polymerase  $\alpha$  and  $\beta$  during DENA induced carcinogenesis. *Biochem. Biophys. Acta.* 564:15-22, 1979.
64. **Swann, P.F.**, Magee, F.N. : Nitrosamine-induced carcinogenesis. *Biochem.J.* 110:39-47, 1986.
65. **Witschi, H.** : The effects of DENA on RNA and protein synthesis in the liver and lung of Syrian Golden Hamster. *Biochem.J.* 136, 789-794, 1971.
66. **Pegy, E.**, Balog, B. : Formation and subsequent excision of O<sup>6</sup>-ethylquanine from on rat liver following administration of DENA. *Cancer Research*, 39:5003-09, 1979.
67. **İ lhan, S.**, Atalay, A. : Dietilnitrosaminin insan kromozomları üzerine etkileri. *C.Ü.Tıp Fak Der.* 7(1-2):28-32, 1985.
68. **Kitagawa, T.**, Pitot, H.C. : The regulation of serin dehydratase and Glucose-6-phosphatase in hyperplastic nodules of liver during DENA and N-2-fluorenylacetamide feeding. *Cancer Research.* 35:1075-1084, 1975.

69. **Atalay, A.** : Nitrozolu bileşiklerin sı çan karaciğer laktat dehidrogenaz enzimine in vitro etkisi. *C.Ü.Tıp Fak Der.* 3:208-214, 1981.
70. **Atalay, A.** : Fare karaciğer malat dehidrogenaz enziminin dietilnitrozamin tarafından inhibisyonu. *Biyokimya Dergisi.* 10(1):22-28, 1985.
71. **Atalay, A., Aker, A.** : Maya glukoz-6-fosfat dehidrogenaz'ı nı n dietilnitrozamin tarafından inhibisyonu. *Doğa Tıp ve Ecz. Derg.* 11(11):8-12, 1985.
72. **Çetinkaya, Ö., Çetinkaya, S., Atalay, A.** : Effect of intraperitoneal administration of some nitrosamine on mouse liver Na/K ATP ase activities. *Tr. J.Medical Sciences Tübitak* 22:81-83, 1994.
73. **Siliğ, Y., Çetinkaya, Ö., Aker, A., Atalay, A.** : L-Valin amino asitinin insan eritrosit membranı ndan taşı nı mı na dietilnitrozaminin etkisi. *Biyokimya Dergisi.* 3:65-75, 1992.
74. **Dong, Z., Hong, J., Ma, Q., Li, D., Bullock, J., Gonzalez, J.F., Park, S.S., Gelboin, H.V., Yang, C.S.**: Mechanism of induction of cytochrome P450ac (P450j) in chemically induced and spontaneously diabetic rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, 263: 29-35, 1988.
75. **Chau I, Y., Dagani, D., Archer, M.C.** : Kinetic studies on the hepatic microsomal metabolism of dimethylnitrosamine, diethylnitrosamine and methylethylnitrosamine in the rat. *J.Natl. Cancer Inst.* 61(2):517-520, 1978.
76. **Scopes, R.K.** : Methods for measuring protein concentration. *Protein Purification.* Caph. 8. 5:239-243, 1982
77. **Lorr, N.A., Tu, Y.Y., Yang, C.S.** : The nature of nitrosamine denitrosation by rat liver microsomes. *Carcinogenesis* 3(9):1039-1043, 1982.
78. **Dagani, D., Archer, M.C.**:Colorimetric determination acetaldehyde in the presence of formaldehyde. *Anal. Biochem.* 87, 455-459, 1978.

79. **Funae, Y.,** Imaoka, S. : Cytochrome P450 in rodents. Handbook of experimental pharmacology Vol. 105 *Cytochrome P450, Springer-Verlag Berlin Heidelberg* Chapter 15 221-238, 1993.
80. **Lorr, N.A.,** Miller, K. W., Chung, H.R., Yang, C.S.: Potentiation of the hepatotoxicity of N-Nitrosodimethylamine by Fasting, Diabetes, Acetone and Isopropanol. *Toxicol. App. Pharm.* 173:423-431, 1984.
81. **Yong, Y.T.,** Peng, R., Chang, Z., Yang, C.S.: Induction of a high affinity nitrosamine demethylase in rat liver microsomes by acetone and isopropanol. *Chem.Biol Interact.*, 44:247-260, 1983.
82. **Peng, R.,** Tennant, P., Lorr, N.N., Yang, C.S.: Alterations of microsomal monooxygenase system and carcinogen metabolism by streptozotocin-induced diabetes in rats. *Carcinogenesis*. 4,6:703-708, 1983.
83. **Miller, K.W.,** Yang, C.S.: Studies on the mechanisms of induction of N-nitrosodimethylamine demethylase by fasting, acetone and ethanol. *Arch. Biochem. Biophys.* 229:483-491, 1984.
84. **Hong, J.Y.,** Yang, C.S. : The nature of microsomal of N-nitrosodimethylamine demethylase and its role in carcinogen activation. *Carcinogenesis* 6:1805-1809, 1985.
85. **Dignam, J.D.,** Strobel, H.W.:Preparation of homogenous NADPH-cytochrome P450 reductase from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63:848-82, 1975
86. **Suzuki, H.,** Kaku, M., Hori, S.: Shimoyama T. Effect of dietary protein depletion and on demethylation and denitrosation of N-nitrosodimethylamine by rabbit liver microsomes. *J. Nutr. Sci Vitaminols.*, 37:285-96, 1991.

## ÖZGEÇMİŞ

1966 yılında Sivas'ta doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Sivas'ta tamamladı. 1988 yılında Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünden mezun oldu. Aynı yıl Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek lisans öğrenimine başladı. 1991 yılında Yüksek Lisans eğitimini tamamladı. 1991 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün açmış olduğu kadrolu Doktora sınavını kazanıp Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak Doktora eğitimine başladı. Halen aynı üniversitede araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

Evli ve bir çocuk babasıdır.