

30 005

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

**BAZI NİTROZAMİNLERİN GLUTATYON
S-TRANSFERAZ ENZİMİ ÜZERİNDEKİ İN VİTRO
ETKİLERİ VE BAĞLANMA ÖZELLİKLERİ**

DOKTORA TEZİ

FATMA TÜKEN

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ: PROF.DR. ATILLA ATALAY

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

SİVAS-1993



Bu Tez: Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 5.1.1984 tarih ve 84/1 sayılı kararıyla kabul edilen Tez Yazma Yönergesi'ne göre hazırlanmıştır.

TEŐEKKÜR

Doktora programım süresince bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Hocam Prof. Dr. Atilla Atalay'a sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarımnda sürekli destek ve yardımını gördüğüm Yrd.Doç.Dr. Nursevin Öztop'a teŐekkür ederim.

Grafiklerin bilgisayarda çizilmesine yardımcı olan Yrd.Doç.Dr. NeŐet Aydın'a ve Bilim Grafik & Dizgi çalışanlarına teŐekkür ederim.

KISALTMALAR

GST	Glutasyon S-Transferaz
DENA	Dietilnitrozamin
DMN	Dimetilnitrozamin
NPYR	Nitrozopirolidin
NMOR	N-nitrozomorfolin
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
CDNB	1-Kloro-2,4 dinitrobenzen
GSH	Glutasyon
HAN	Haloasetonitril
DBAN	Dibromoasetonitril
BCAN	Bromokloroasetonitril
(MCAN)	Monokloroasetonitril
(DCAN)	Dikloroasetonitril
(TCAN)	Trikloroasetonitril

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1 : GST ın Katalizlediği Tepkimeler	4
Şekil 2 : GST ın Substratları	5
Şekil 3 : N-nitrozolu Bileşiklerin Biyoaktivasyonu	7
Şekil 4 : DMN in Metabolizması	9
Şekil 5 : GST ın DENA ile İnhibisyonunda Sürenin Etkisi	15
Şekil 6 : GST ın DENA ile Etkileşiminde Michaelis Menten Grafiği	17
Şekil 7 : GST ın DENA ile Etkileşiminde Lineweaver -Burk Grafiği	18
Şekil 8 : DENA için I Derişimine Karşı $1/V_{max}$ (gözlenen) Grafiği	19
Şekil 9 : GST ın DMN ile İnhibisyon Süresinin Etkisi	20
Şekil 10 : DMN ile Etkileştirilen GST ın Michaelis Menten Grafiği	21
Şekil 11 : GST ın DMN ile Etkileşiminde Lineweaver-Burk Grafiği	22
Şekil 12 : DMN için I Derişimine Karşı $1/V_{max}$ (gözlenen) Grafiği	23
Şekil 13 : GST ın NPYR ile İnhibisyonunda Sürenin Etkisi	24

Şekil 14 : GST ın NYR ile Etkileşminde Michaelis Menten Grafiği	26
Şekil 15 : GST ın NPYR ile Etkileşiminde Linewaere-Burk Grafiği	27
Şekil 16 : NPYR için I Derişimine Karşı $1/V_{max}$ (gözlenen) Grafiği	28
Şekil 17 : UV-VIS Soğurum Spektrumu	30
Şekil 18 : GST ile Etkileştirilen DENA ın UV-VIS Fark Spektrumu	31
Şekil 19 : GST ın G Bölge Modeli	33

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

	Sayfa No
Çizelge 1 : DENA Derişiminin GST Aktivitesine	
Etkisi	16
Çizelge 2 : GST ın DENA ile Etkileşiminde Km ve Vmax	
Değerleri	16
Çizelge 3 : DMN Derişiminin GST Aktivitesine	
Etkisi	20
Çizelge 4 : GST ın DMN ile Etkileşiminde Km ve Vmax	
Değerleri	23
Çizelge 5 : NPYR Derişiminin GST Aktivitesine	
Etkisi	25
Çizelge 6 : NPYR in GST ile Etkileşiminde Km ve Vmax	
Değerleri	25

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
GEREÇ ve YÖNTEMLER	12
BULGULAR	15
TARTIŞMA	32
ÖZET	37
SUMMARY	39
KAYNAKLAR	41



HASAN'a

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Nitrozaminler doğada çok çeşitli ve yaygın olarak bulunan kanserojenik bileşikler grubundadır (1). Bu bileşiklerin kanserojenik ve sitotoksik formlara dönüşebilmesi için de metabolik aktivasyona uğramaları gerekmektedir (2).

Nitrozaminlerin en önemli öncülü olan nitrat, besin ve içme sularıyla vücuda alınmaktadır. Vücuda alınan nitrat ağız ve barsak florasındaki bakteriler tarafından ve mide ortamında nitrite dönüşür (3). Vücuda dışarıdan alınan veya vücutta oluşan nitrit, ikincil ve üçüncül aminlerle tepkimeye girerek nitrozaminleri oluşturur (4). Nitrozaminlerin de protein ve nükleik asitlere bağlanarak kanserojenik etki gösterdikleri bilinmektedir (5).

Nitrozaminler içinde en zararlıları olan Dietilnitrozamin (DENA), Dimetilnitrozamin (DMN) ve Nitrozopirolidin (NPYR)'in doğada çok yaygın olarak bulunan mutajenik ve kanserojenik bileşikler olduğu saptanmıştır (6,7).

Bu çalışmanın amacı DENA, DMN ve NPYR'ın çeşitli dokularda bulunan ksenobiotik ve fizyolojik bileşiklerin taşınması veya detoksifikasyonunda önemli rolü olan çok işlevli Glutasyon S-Transferaz (GST) enziminin nitrozolu bileşikleri substrat olarak kullanıp kullanamayacağını saptamak ve bu bileşiklerin enzim aktivitesine olan in vitro etkilerini incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. GLUTATYON S-TRANSFERAZ ENZİMİ

Glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon ile endojen ve ekzojen hidrofobik elektrofillerin konjugasyonunu katalizleyerek homeostasisi sağlayan çok işlevli bir enzimdir (8,9). Bu enzimin hücredeki görevleri şu şekilde özetlenebilir.

- Ksenobiotikler ve belirli endojen bileşikler içeren elektrofillerin glutatyon ile kovalent bağlanmasını sağlayarak detoksifikasyona yardımcı olma (10,11,12).

- Prostaglandinlerin izomerizasyonu, Hem ve bilirubin gibi nonsubstrat ligandların glutatyona bağlanması (9,13).

- Çeşitli antikanser ilaçlar, hormon ve hidrokarbonlar bu enzim tarafından glutatyona bağlanarak suda daha çok çözünür hale getirilerek idrar ve safrayla atılımı kolaylaştırılır (14).

GST karaciğer, böbrek, ince ve kalın barsak, akciğer, meme gibi birçok organın sitozolündeki proteinlerin %5'ini oluşturmaktadır (14,15).

Yapılan çeşitli çalışmalarda GST 'in izoenzimleri farklı şekilde sınıflandırılmıştır. Hayes ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda bu izoenzimler izoelektrik noktalarına göre asidik, bazik ve nötral olmak üzere 3 büyük gruba ayrılmıştır. Her bir izoenzim dimerik olup mol kütleleri sırasıyla 24800, 26000, 26700 olan Yf, Ya ve Yb alt birimlerden ibarettir. Ayrıca karaciğerde dördüncü bir izoenzim olan mikrozomal GST izoenzimi bulunmuştur (15). Kaisney ve arkadaşları tarafından GST enzimi elektroforetik olarak GST-1, GST-2, GST-3 şeklinde sınıflandırılmıştır. Bundan başka sadece kas dokusuna özgü

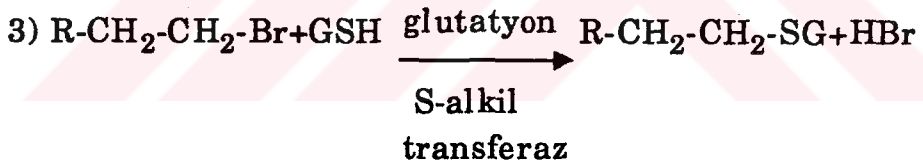
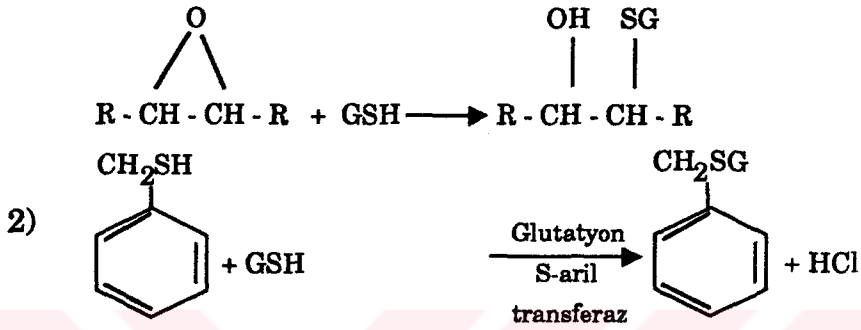
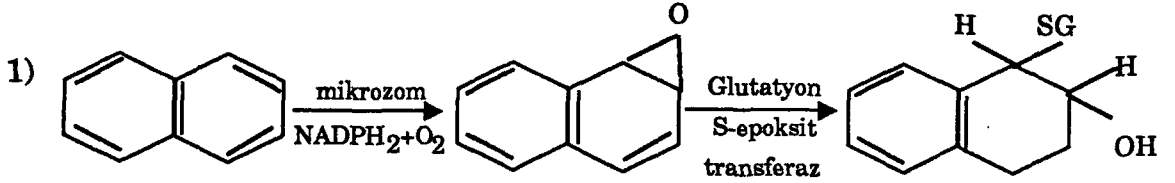
olan GST-4 ve beyin dokusuna özgü olan GST-5 izoenzimleri bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda bu izoenzimlerin üç farklı gen tarafından düzenlendiği saptanmıştır (14,15,16,17). Boyland tarafından yapılan başka bir çalışmada GST'in 23000-30000 arasında değişen mol kütleli GST-1, GST-2, GST-3, GST-4 alt birimlerinden oluştuğu, GST-7 nin de sadece fetal karaciğer hücrelerinde bulunduğu belirlenmiştir (8).

Wilbert ve Perters enzimin karaciğerde mol kütlesi 25 000-27 000 Da olan bazik, ince barsakta mol kütlesi 24 000-27 000 Da olan asidik alt birimleri içerdiğini ileri sürmektedirler (18).

Jakobay ve arkadaşları tarafından GST in izoenzimleri 1-1, 1-2, 2-2, 3-3, 3-4 ve 4-4 şeklinde sınıflandırılmış ve bu sınıflandırma şekli günümüzde daha çok kabul görmektedir (19,20).

GST in çok sayıda alifatik, aromatik ve heterosiklik substratları bulunmaktadır. Glutasyonun sülfhidril grubu ile substratın karbon atomu arasında tiyoeter bağı oluşumu GST enzimi tarafından katalizlenmektedir (21).

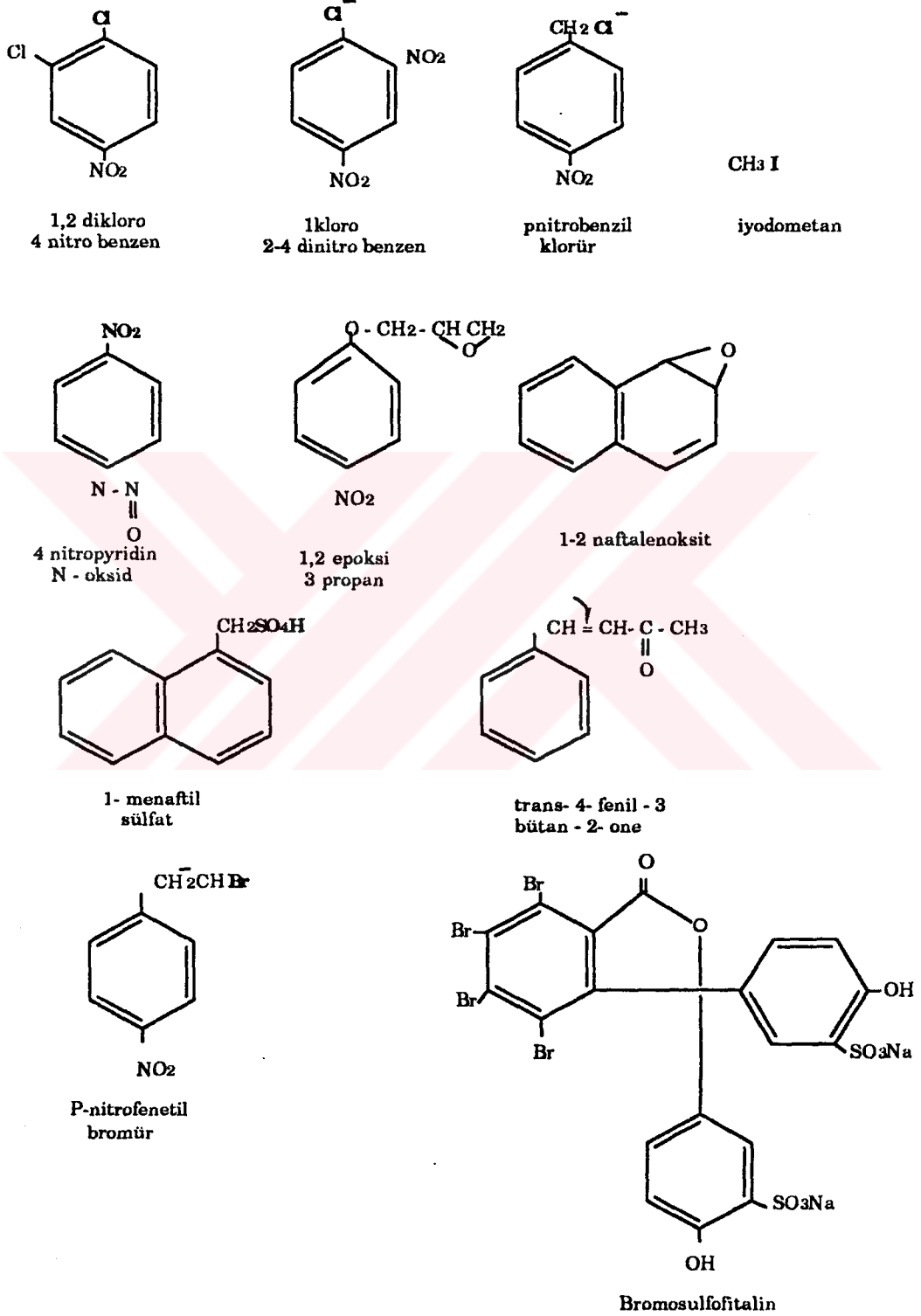
GST in katalizlediği tepkimeler Şekil 1'de gösterilmiştir (22).



Şekil 1: GST in Katalizlediği Tepkimeler

Tepkimenin sonucunda merkaptürik asid türevleri oluşmaktadır (23).

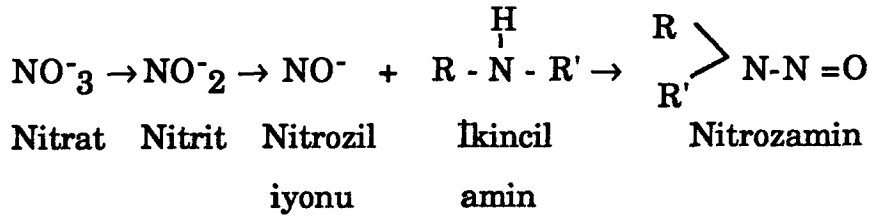
GST in substratları şekil (2) de gösterilmiştir (24,25).



Şekil 2: GST in Substartları (Koyu renkle gösterilen gruplar tepkimeye girmektedir)

2.2. NİTROZAMİNLER

Genel formülü $\begin{matrix} R_1 \\ \diagdown \\ R_2 \end{matrix} > N-N = O$ olan nitrozaminler (20,25)vücuda dışardan alınan veya vücutta oluşan nitritlerle sekonder aminlerin tepkimeye girmesiyle oluşurlar. Bu yolun aşağıdaki şekilde olduğu gösterilmiştir (26).

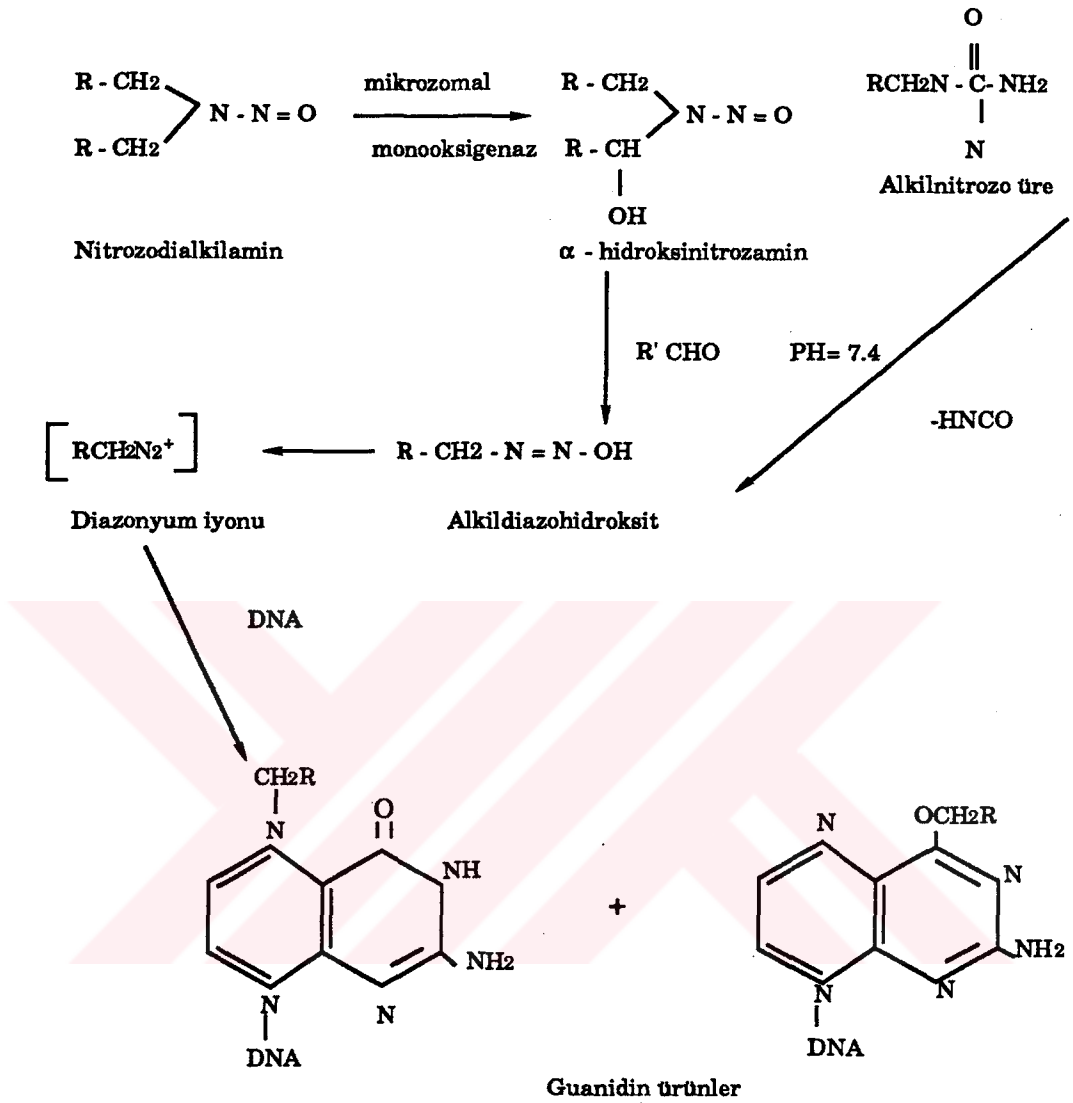


Son yıllarda kullanılan yakıtlardan dolayı çevrede nitrat düzeyinde artış gözlenmiştir. Nitratlı gübrelerin ve lağım sularının sulama amacıyla yeniden kullanılması, kök ve yapraklı bitkilerde nitrat biriminin artmasına neden olmuştur. Suların nitrattan süzülerek saflaştırılması sonucu içme suyunda da bulunmuştur (4). Nitritler ayrıca et ve balık ürünlerinde renk verici ve koruyucu olarak da kullanılmaktadırlar (27).

Vücuda alınan nitratlar ağız ve barsak florasındaki bakteriler tarafından nitritlere indirgenirler. Vücuda giren nitritler tükürük ve mide suyuyla salgılanır, barsaktan tekrar emilirler (26).

Nitrit iyonları sekonder aminlerle nitrozaminleri oluşturmaktadırlar (4), yapılan hayvan deneylerinde nitrozaminlerin kanserojenik etkileri gösterilmiştir (28,29,30).

Nitrozaminler nötral pH'da kararlıdırlar. Kanserojenik etki gösterebilmeleri için in vivo olarak metabolik transformasyona uğramaları gerekmektedir. Nitrozaminlerin metabolize olma sırası Magee ve Barnes tarafından şekil 3'de gösterildiği gibi açıklanmıştır (28).



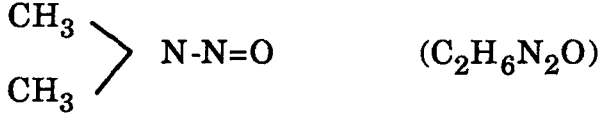
Şekil 3: N-nitrozolu Bileşiklerin Biyoaktivasyonu

Harris ve arkadaşlarının Dimetilnitrozamin (DMN) ile yaptıkları çalışmada DNA'da hasarlar oluşturarak mutajenik ve kanserojenik etki yaptığı saptanmıştır (31). Khodoley ve arkadaşları Salmonella typhimuriumda Dietilnitrozamin, Dimetilnitrozamin ve N-nitrozo morpholin (NMOR)'ın, Suzuki ve arkadaşları da Escherichia coli de monoalkil nitrozaminlerin mutajenik etkilerini göstermişlerdir (17).

Yapılan çeşitli çalışmalarda nitrozaminlerin yaygın kanser oluşturucu grup olduğu, kanserojenik ve sitotoksik etkileri

için metabolik aktivasyonların gerektiği bilinmektedir (31).

Dimetilnitrozamin, (N-nitrozodimetilamin) (DMN-NDMA)



Dimetilnitrozaminin buğday unu, peynir, tütülenmiş et, balık ve diğer gıda maddelerinde bulunduğu belirlenmiştir (32,33). Fong ve arkadaşları tarafından güney Çin'de tuzla kurutulan balıkların 0.6 - 9.0 ppm DMN içerdiği saptanmıştır (28). Fazio ve arkadaşları nitrat uygulanan veya nitritle tütülenen çiğ balıklarda 4 - 26 ppm DMN oluştuğunu, soya fasülyesi yağında 0.38 - 0.45 ppm derişimlerinde DMN bulunduğunu göstermişlerdir (33).

Öztop tarafından yerli sigaralardan saflaştırılan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tanımlanabilen DMN derişimi Maltepe'de 0.0; Bafra'da 12.5; Filtreli Bafra'da 00.; Lüks Bitlis'te 2.7; Tokat'ta 0.0 µg/sigara olarak bulunmuştur (34). Nükleik asitlerin alkilenmesine 0.01 - 0.03 ppm yeterlidir (31).

DMN in vivo olarak hepatositlere uygulandıktan 24 - 48 saat sonra, nekrozis geliştiği saptanmıştır (31). Değişik türde fareler üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda, akciğerde adenom ve adenokarsinoma, karaciğerde hepatokarsinomanın DMN tarafından oluşturulduğu saptanmıştır (35). İçme suyuna eklenen %0.05 derişimindeki DMN'nin bir haftada akciğer tümörleri oluşturmak için yeterli olduğu bulunmuştur. DMN'nin hedef organları karaciğer, akciğer ve böbreklerdir (33).

DENA'nın farelerde özefagus, karaciğer ve böbreklerde tümör oluşturan kuvvetli bir nitrozamin olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda burun boşluğu, trachea ve akciğerlerde de tümör oluşturduğu yapılan deneylerde gösterilmiştir (33,36).

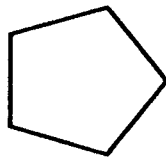
13 tavşana 0.04 µg/l DENA içeren su 6 gün boyunca verildiğinde, hayvanlarda hepatik karsinoma ve adenokarsinoma oluşturduğu ve sonunda hayvanların öldüğü belirlenmiştir (33).

550µg DENA verilen 30 rat 6-8 hafta sonra öldürülerek yapılan histolojik incelemede onbeş hayvanda neoplastik veya hiperplastik lezyonların geliştiği saptanmıştır. Ayrıca dördünde hepatosellüler karsinoma, üçünde sarkoma ve diğerlerinde fibrous hiperplasia geliştiği gözlenmiştir (37).

Longo ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada DENA'nın nazal mukoza ve karaciğerde kanserojenik etki yaptığı saptanmıştır (38).

DENA'nın metabolize olmasıyla dietilamin ve nitrozolayıcı öncül ajanlar oluşmaktadır. Bu reaktif metabolitler de DNA ve RNA'daki bazları alkilleyerek 7-etil guanin, 3-etil adenin ve O⁶ etil guanin oluşturmaktadır (30,39,40).

DENA'nın Glukoz - 6 fosfataz, Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz, ATPaz, Serin dehidrataz, β glukokinaz Na⁺- K⁺ ATPaz enzimlerini inhibe ettiği gösterilmiştir (41,42,43).



N-N=O

N-Nitrozopiperidin (NPYR)

C₄H₈N₂O

Havada, sigara dumanında, et ve balık ürünlerinde bu-

lanmaktadır (33).

Brunnemann ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada sigara dumanında 204-612 ng NPYR bulunduğunu saptanmıştır (44).

Alan tarafından tavşan ve ratlara NPYR verilerek yapılan deneylerde, tavşanlarda nazal dokuda, ratların akciğer ve karaciğerinde kansere yol açtığı saptanmıştır (36).

Harris ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada NPYR metabolitlerinin özefagusta DNA ve proteinlere bağlandığını saptadılar (28).

NPYR'in α hidroksilasyonu sonucunda 4-hidroksi bütiraldehit veya 2-hidroksi tetra hidrofuran ürünleri oluştuğu belirlenmiştir. Genel metabolizma sonucunda CO_2 oluşmaktadır (45).

NPYR tarafından aktivitesi azaltılan enzimler; Laktat Dehidrogenaz, Priuvat Kinaz, Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz, Sitrat Sentaz, $Na^+ - K^+ - ATP$ az olarak belirlenmiştir (43,46).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER:

Deneylerde kullanılan Dimetil nitrozamin (DMN), Dietil-nitrozamin (DNA), Nitrozopirrolidin (NPYR), Glutasyon (GSH), 1-Kloro-2.4 dinitrobenzen (CDNB), sığır serum albumin, comassie blue (CB 6250) Sigma firmasından, sodyum fosfat, etanol, perklorikasit, asetonitril, asetik asit, bütanol, Merck firmasından sağlandı. Glutasyon S-Transferaz olarak Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim dalında saflaştırılmış olan (presenta) PiGST kullanıldı. Deneylerde Hitachi Model 220 spektrofotometre, Perkin Elmer 35 spektrofotometre, Bosch 2000 terazi, Nüve tüp karıştırıcısı ve su banyosu kullanıldı.

3.2. YÖNTEM:

3.2.1. *Glutasyon S-Transferaz aktivitesinin ölçümü:*

GST enzim aktivitesi, enzimin katalizlediği glutasyon ile CDNB'nin konjugasyon tepkimesi spektrofotometrik olarak izlenerek bulundu (47).

Kullanılan Çözeltiler:

1-0.1 M Fosfat tampon (pH:7.3)

2-0.25 mM CDNB (deney sırasında hazırlandı)

3-0.1 mM GSH (deney sırasında hazırlandı)

Deney Karışımı

Fosfat tampon	1200 µL
CDNB	100 µL
GSH	100 µL
GST	100 µL

Soğurum ölçümü 25°C'ta bir dakika aralıklarla yapıldı.

E: 9.6 mM⁻¹ cm⁻¹ olarak alınıp aktivite hesaplandı.

1 Ünite Aktivite: 25°C'ta PH=7'de 1 dakikada 1µmol süstratı ürüne çeviren enzim miktarıdır.

Protein tayini:

60 mg Comassie blue 1 L %'3'lük perklorik asitte çözüldü. Değişik derişimlerde albumin çözeltilisi hazırlandı. 1 ml boya ile 1 ml albumin karıştırılarak 595 nm de soğurum ölçüldü. Aynı işlemler enzimle tekrarlandı. Standart çalışma grafiği yardımıyla enzim protein düzeyi saptandı.

3.2.2.İnhibisyon Çalışmaları

3.2.2.1. DENA derişiminin GST aktivitesine etkisi:

Değişik derişimlerde DENA çözeltileri hazırlandı ve enzimle 25°C'ta etkileştirilerek inhibisyon saptandı.

4mM, 8. 3mM, 16.6 mM DENA çözeltileri enzim ile 25°C'ta farklı sürelerde inkübe edilerek aktivite ölçümü yapıldı ve inhibisyona zamanın etkisi araştırıldı.

0.0156, 0.03125, 0.0625,0.125, 0.25, 0.50 mM CDNB çözeltileri hazırlanarak değişen substrat miktarına göre DENA yokluğunda ve varlığında aktivite ölçümü yapıldı.

3.2.2.2. DMN derişiminin GST aktivitesine etkisi:

Değişik derişimlerde hazırlanan DMN çözeltileri ile enzim 25°C'ta etkileştirilerek inhibisyon saptandı.

5mM, 7, 5mM, 25mM DMN enzim ile değişik sürelerde etkileştirilerek aktivite ölçümü yapıldı.

Değişen substrat miktarına göre DMN varlığında ve yokluğunda aktivite ölçülerek kinetik çalışma yapıldı.

3.2.2.3. NPYR derişiminin GST aktivitesine etkisi:

Değişik derişimlerdeki NPYR ile etkileştirilen enzim aktivitesinde inhibisyon saptandı.

NPYR derişimleri 4 mM, 13.3 mM ve 25 mM olarak seçildi. Enzim ile 25°C'ta değişik sürelerde etkileştirilerek aktivite ölçümü yapıldı.

3.2.2.4. Enzim-nitrozamin bağlanmasının incelenmesi:

Tampona karşı DENA, GSH ve enzimin UV-VIS spektrofotometrede değişik dalga boylarında soğurumları incelendi. Fark spektrumu ile enzime nitrozamin bağlanması araştırıldı.

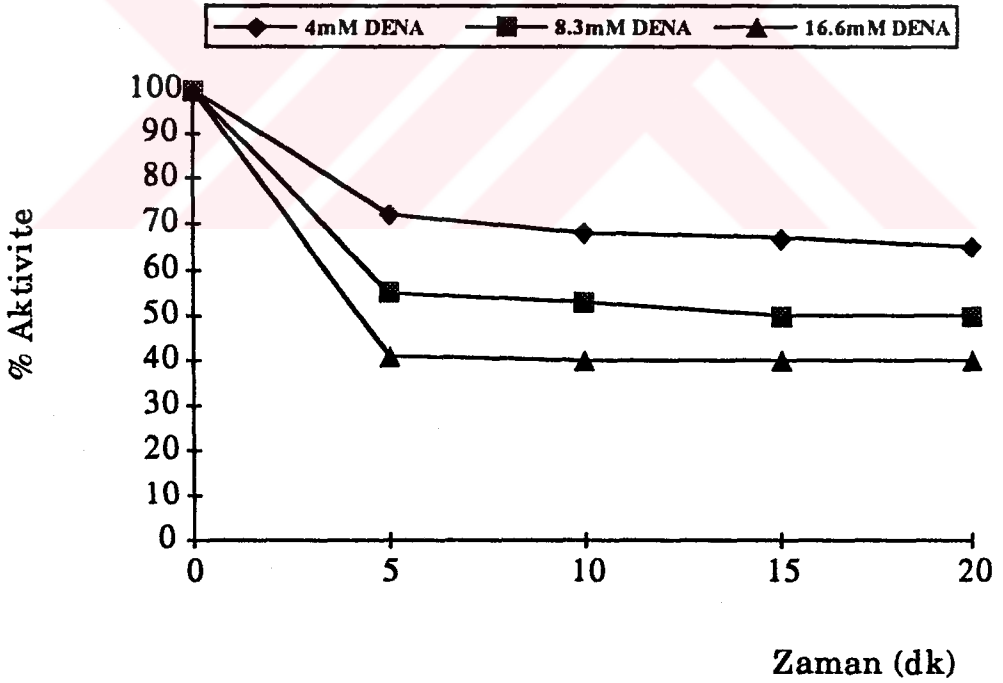
3.2.2.5. İnce tabaka kromatografisi:

Enzim-nitrozamin bağlanmasının araştırılması için silikagelden 20X20 cm lik tabakalar hazırlandı. 2 µl örnekler (DENA, GSH, enzim) uygulandı. Asetonitril-su (65/35 mL), asetik asit-bütanol-su (45/35/20 mL) çözücü karışımlarında örnekler yürütüldü, tabakalar kurutulduktan sonra ninhidrin ve iyot çözeltileriyle renklendirme çalışması yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Glutasyon S Transferaz ile Dietilnitrozaminin Etkileşimi:

DENA'nın GST üzerine etkisi araştırıldı ve inhibisyon saptandı Farklı derişimlerdeki DENA ile enzimin 5, 10, 15 ve 20 dakika süre ile etkileşimi sonunda en fazla inhibisyon ilk 5 dakikada gözlemlendi (şekil 5). Bu nedenle diğer deneyler enzim ile DENA'nın 25°C'ta 5 dakika inkübe edilmesiyle yapıldı.



Şekil 5: GST'in DENA ile İnhibisyonunda Sürenin Etkisi

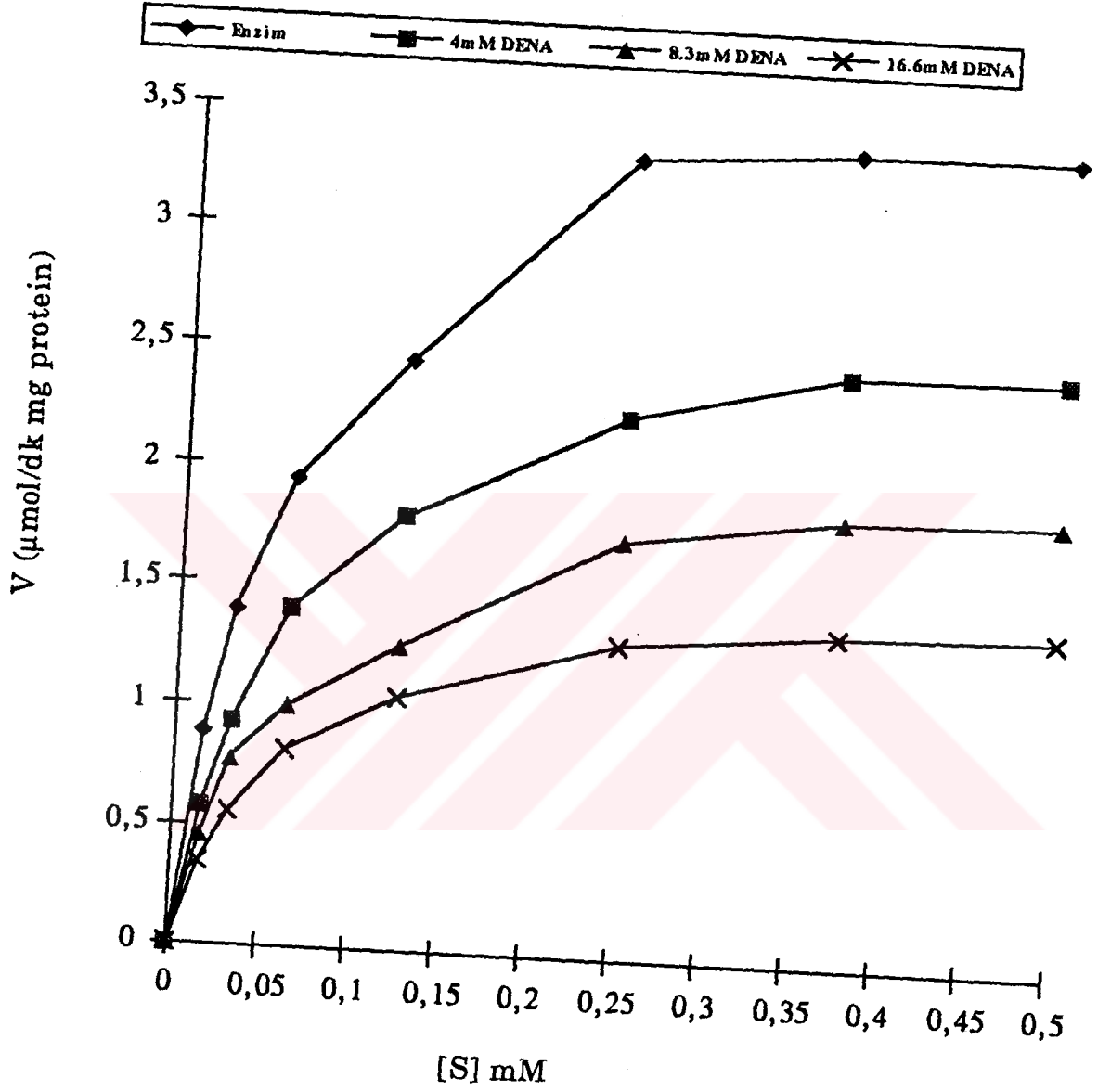
Enzim için hesaplanan % aktivite ve % inhibisyon değerleri Çizelge-1 de gösterildi. Enzimin substrat doymuşluk eğrisi çalışıldı ve Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu saptandı (Şekil 6). Bu çalışma için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 7). Grafikten bulunan Km ve Vmax değerleri Çizelge-2 de gösterildi.

Çizelge-1. DENA derişiminin GST aktivitesine etkisi

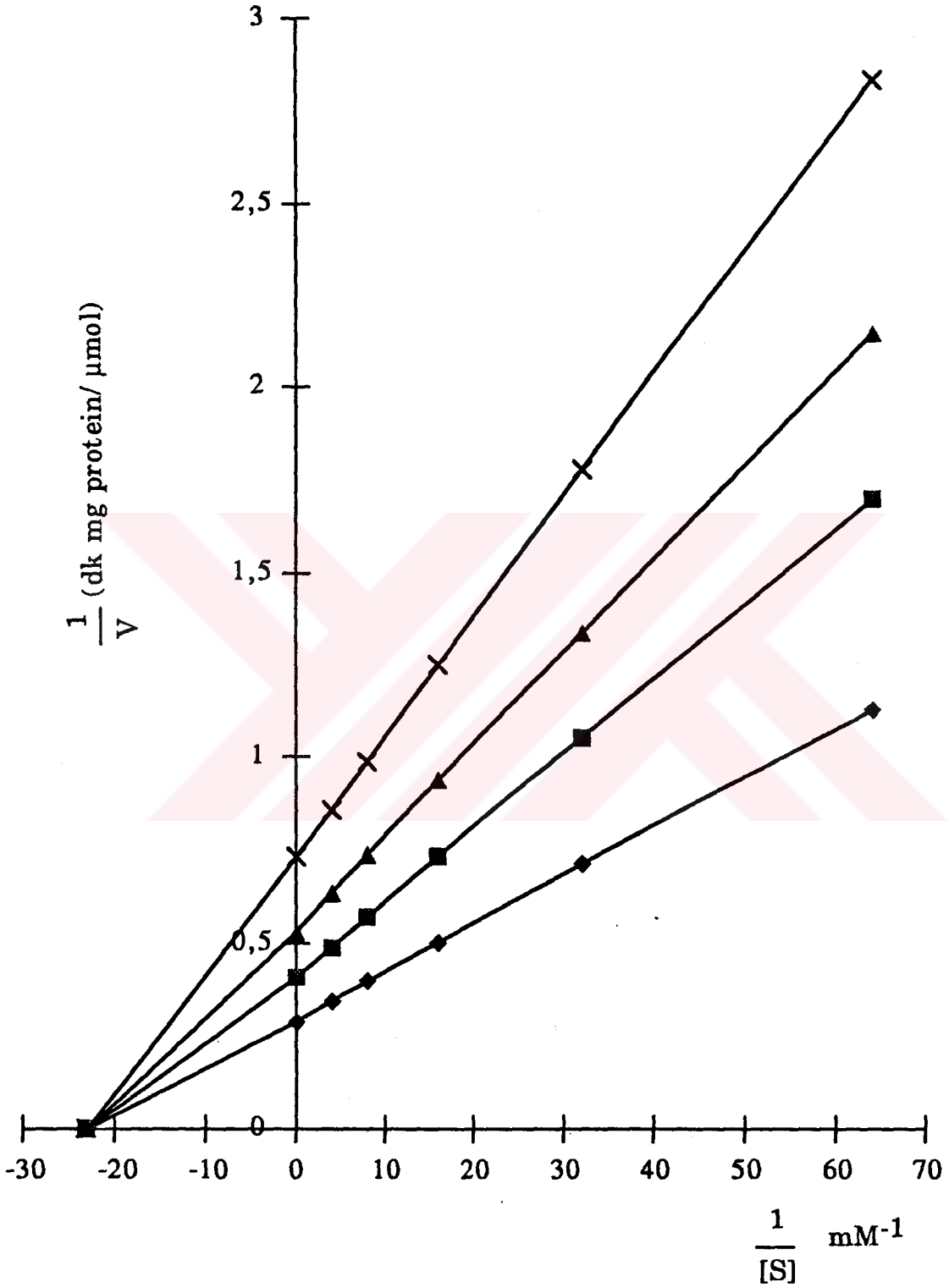
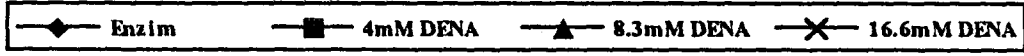
	%Aktivite	%inhibisyon
Enzim	100	00
4mM DENA ile	72	28
8.3mM DENA ile	55	45
10.0 mM DENA ile	50	50
16.6mM DENA ile	41	59

Çizelge-2. GST'nin DENA ile Etkileşiminde Km ve Vmax Değerleri

	Km(mM)	Vmax (μ mol/dk mg Protein)
Enzim	0.044	3.39
4mM DENA ile	0.049	2.45
8.3mM DENA ile	0.047	1.87
16.6mM DENA ile	0.045	1.38

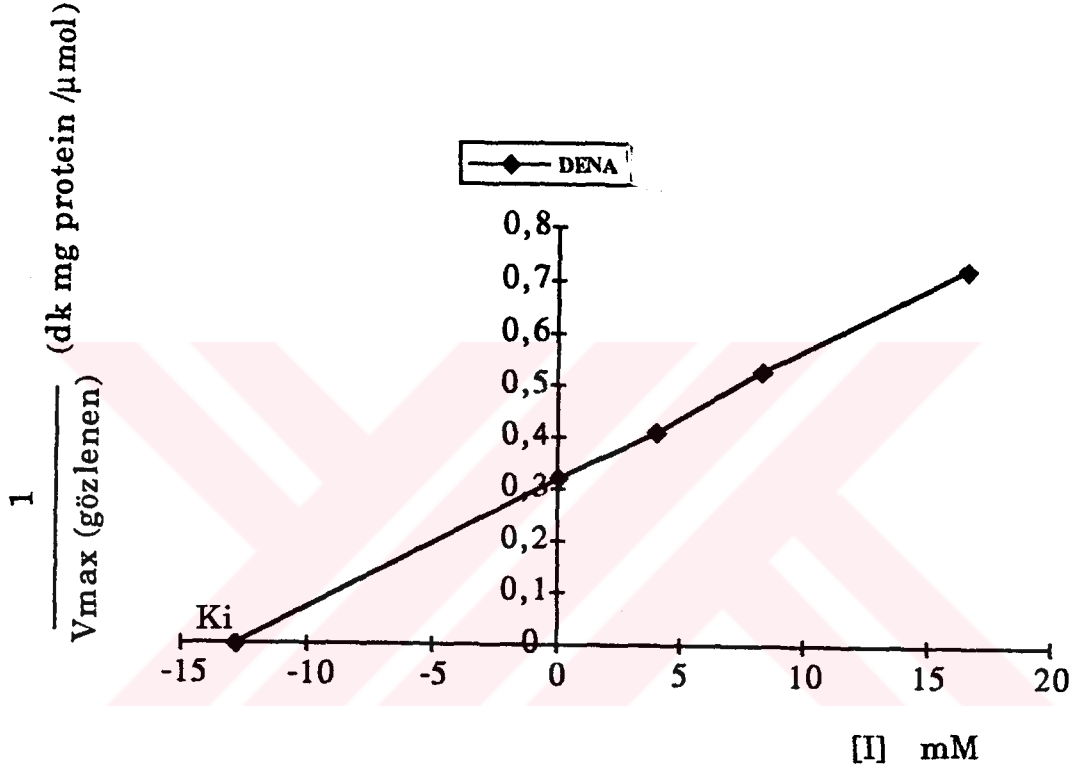


Şekil 6: GST'in DENA ile Etkileşiminde Michaelis Menten Grafiği



Şekil 7: GST'in DENA ile Etkileşiminde Lineweaver-Burk Grafiği

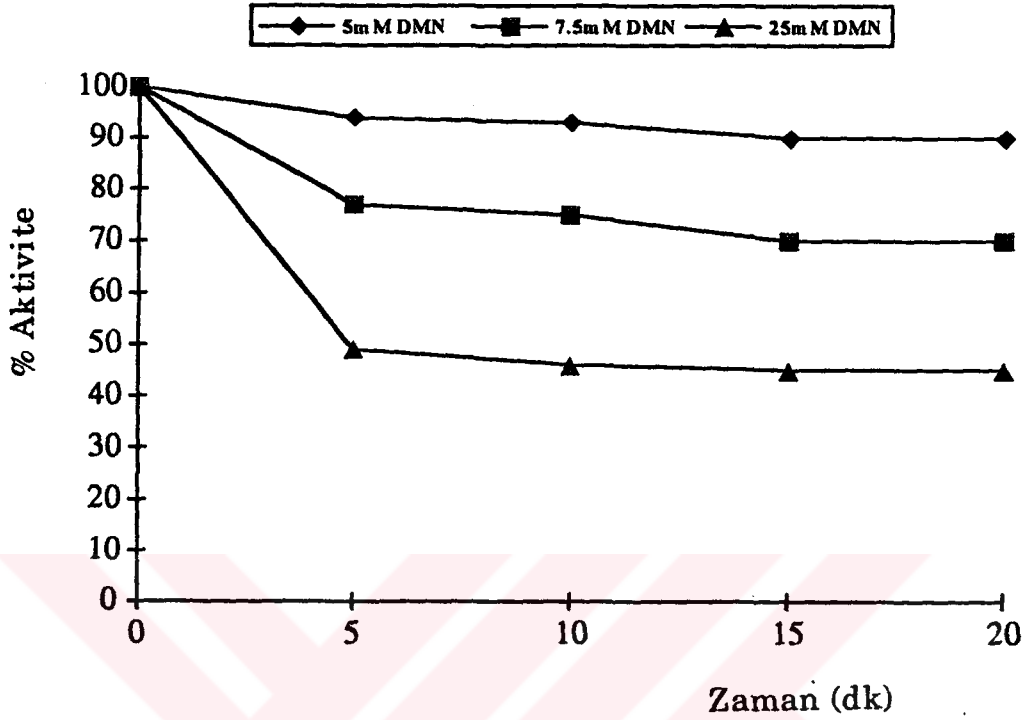
Bu bulgular DENA'nın GST için nonkompetitif inhibitör olduğunu göstermiştir. Nonkompetitif inhibisyon için $1/V_{max}(\text{gözlenen})$ değerleri inhibitör derişimine karşı grafiklenerek K_i değeri 13 mM olarak bulundu (Şekil-8).



Şekil 8: DENA için I Derişimine Karşı $1/V_{max}$ (gözlenen) Grafiği

4.2. Glutasyon S-Transferaz ile Dimetilnitrozaminin Etkileşimi:

Değişik derişimlerdeki DMN ile etkileştirilen enzim aktivitesinde inhibisyon saptandı. İnhibisyonun zamanla değişimi incelendi. (Şekil-9). Deneyler için inkübasyon süresi 5 dk olarak seçildi.



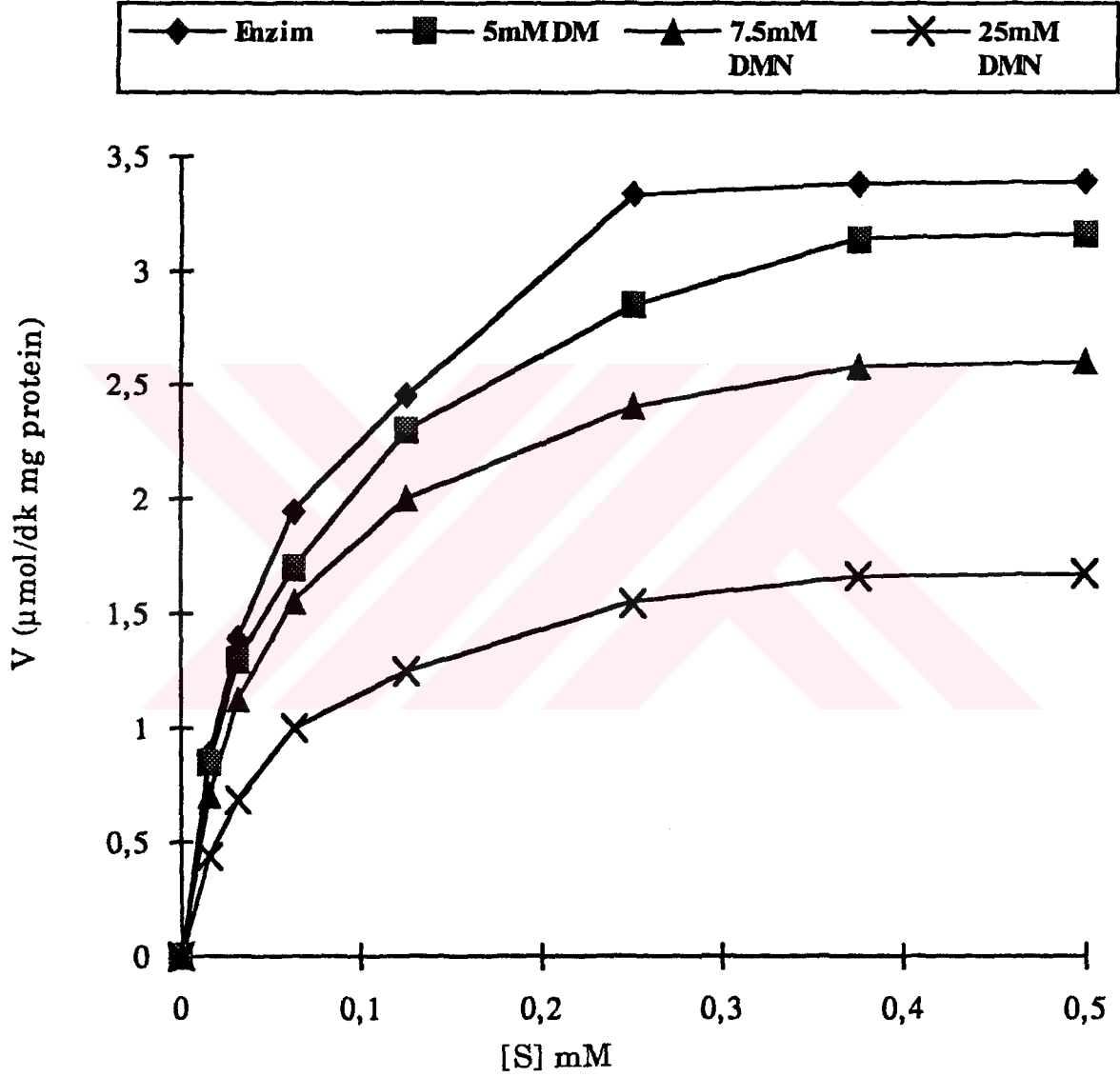
Şekil 9: GST'in DMN ile İnhibisyonunda Sürenin Etkisi

Enzim için hesaplanan % aktivite ve % inhibisyon değerleri Çizelge-3'te gösterildi.

Çizelge-3. DMN Derişiminin GST Aktivitesine Etkisi:

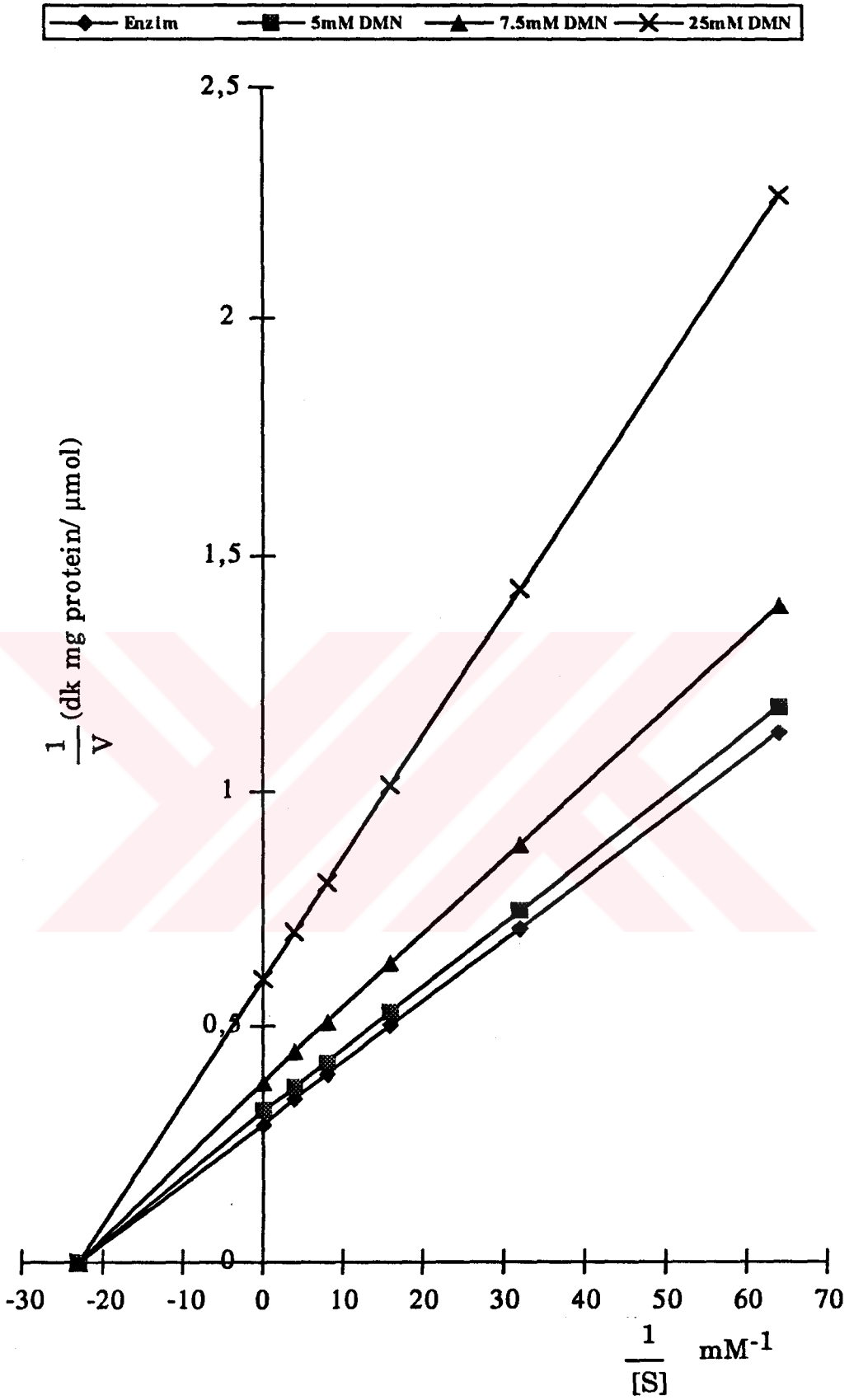
	% Aktivite	% inhibisyon
Enzim	100	00
5 mM DMN ile	94	06
7.5mM DMN ile	77	23
25mM DMN ile	49	51

DMN ile etkileştirilen enzimin substrat doymuşluk eğrisi çalışıldı ve Şekil 10'dan görüldüğü gibi Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu saptandı.



Şekil 10: DMN ile Etkileştirilen GST'in Michaelis Menten Grafiği

Bu çalışma için çizilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil-11 de hesaplanan K_m ve V_{max} değerleri Çizelge 4'te gösterildi.

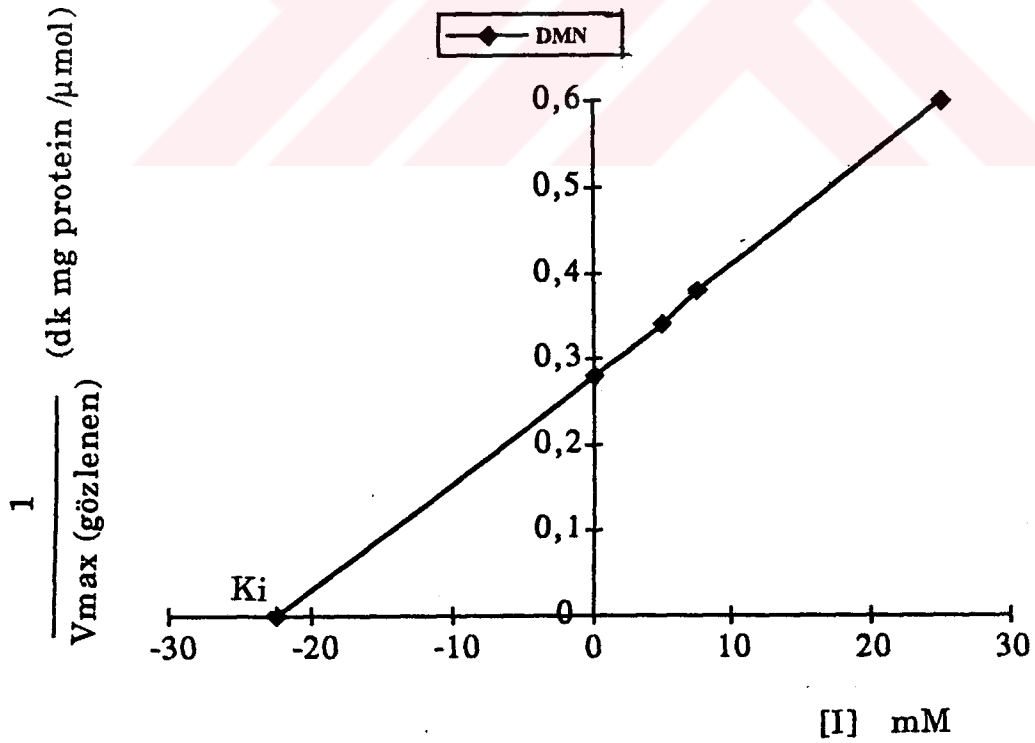


Şekil 11: GST'in DMN ile Etkileşiminde Lineweaver-Burk Grafiği

Çizelge-4. GST' in DMN ile Etkileşiminde Km ve Vmax Değerleri

	Km(mM)	Vmax ($\mu\text{mol/dk mg protein}$)
Enzim	0.044	3.39
5mM DMN ile	0.043	3.16
7.5mM DMN ile	0.041	2.30
25mM DMN ile	0.043	1.67

Bu bulgular DMN' in GST' i nonkompetitif olarak inhibe ettiğini göstermiştir. DMN için K_i değeri $1/V_{\text{max}}(\text{gözlenen})$ inhibitör derişimi grafiğinden 24.7 mM olarak bulundu(Şekil 12).

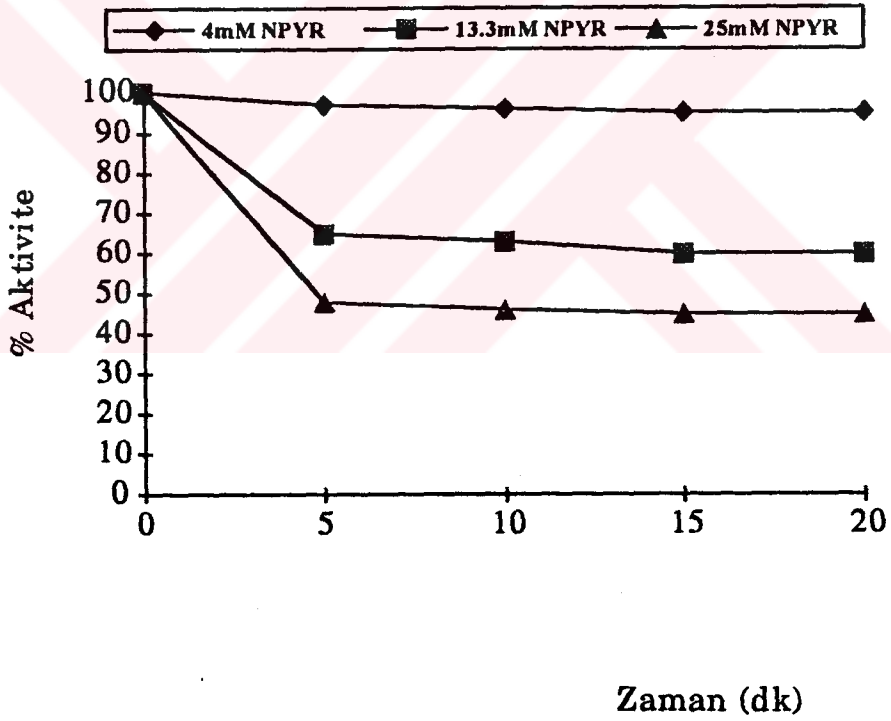


Şekil 12: DMN için I Derişimine Karşı $1/V_{\text{max}}$ (gözlenen) Grafiği

4.3. Glutasyon S Transferaz ile Nitrozomorfolin

Etkileşimi:

GST ile etkileştirilen NPYR enzim ile 5, 10, 20 dk süreyle etkileştirilerek zamanla aktivite değişimi incelendi (Şekil-13). Deneyleerde inkübasyon süresi 5 dk olarak seçildi.



Şekil 13: GST'in NPYR ile İnhibisyonunda Sürenin Etkisi

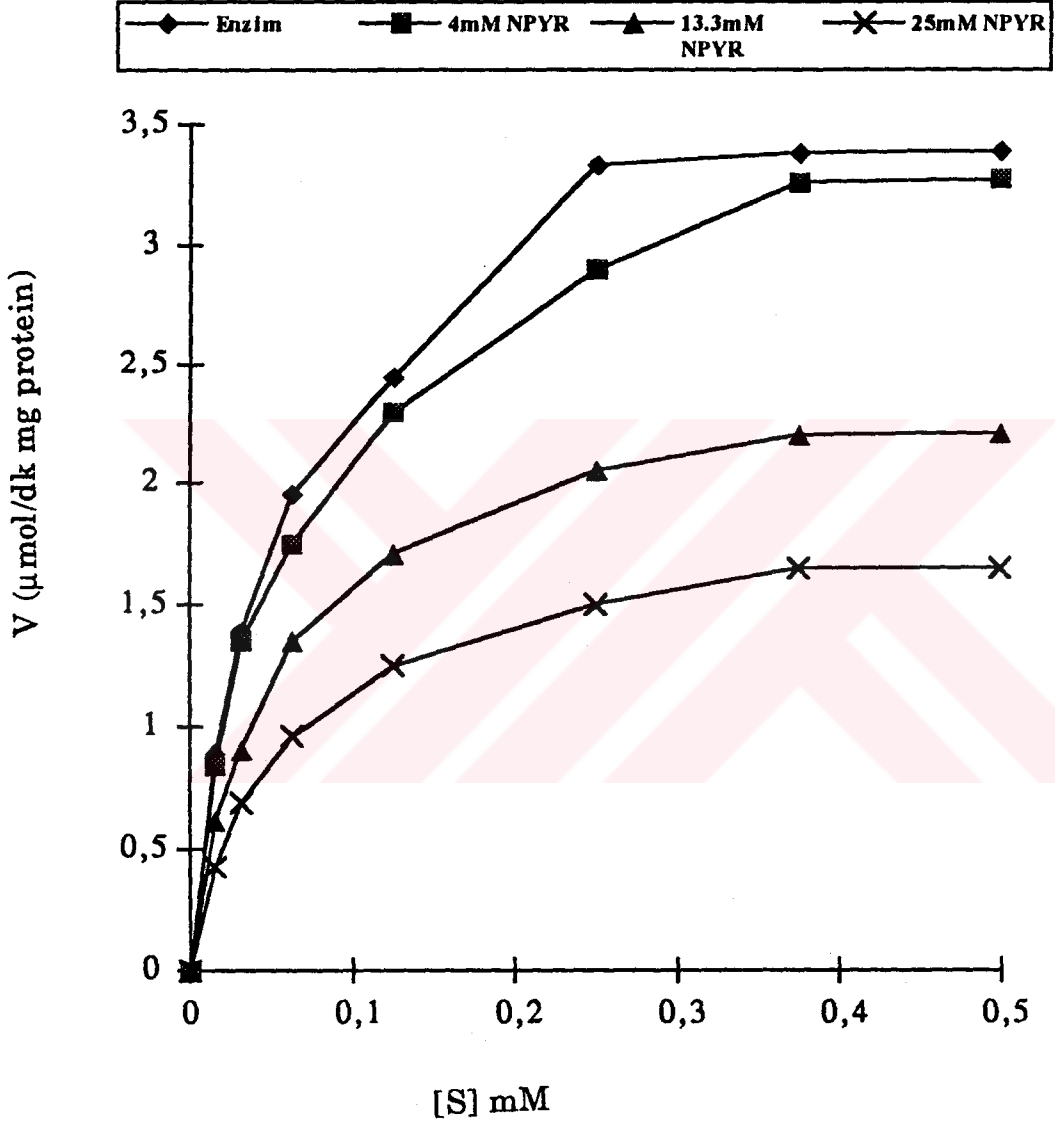
Çizelge 5'te % aktivite ve % inhibisyon değerleri gösterildi. Enzim substrat doymuşluk eğrisi Şekil 14'de gösterildi. Şekil-15'de bu çalışma için çizilen Lineweaver-Burk grafiği gösterildi. Grafikten bulunan Km ve Vmax değerleri Çizelge-6'da gösterildi.

Çizelge-5 NPYR Derişiminin GST Aktivitesine Etkisi

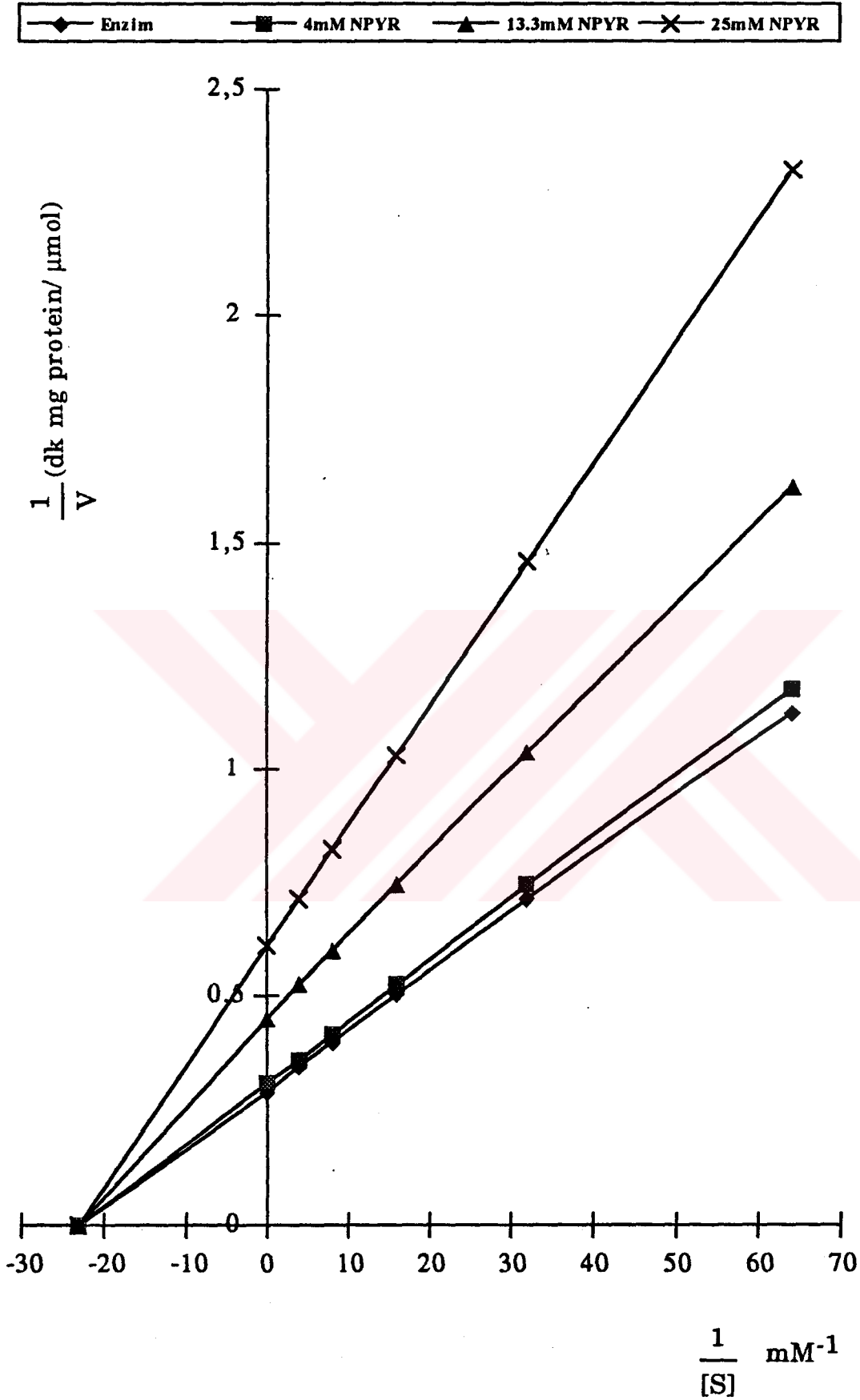
	% Aktivite	% İnhisyon
Enzim	100	00
4 mM NPYR ile	97	03
13.3 mM NPYR ile	65	35
23 mM NPYR ile	50	50
25 mM NPYR ile	48	52

Çizelge-6. NPYR' in GST ile Etkileşiminde Km ve Vmax Değerleri

	Km(mM)	Vmax (μ mol/dk mg protein)
Enzim	0.044	3.39
4 mM NPYR ile	0.045	3.27
13.3 mM NPYR ile	0.045	2.21
25 mM NPYR ile	0.046	1.67

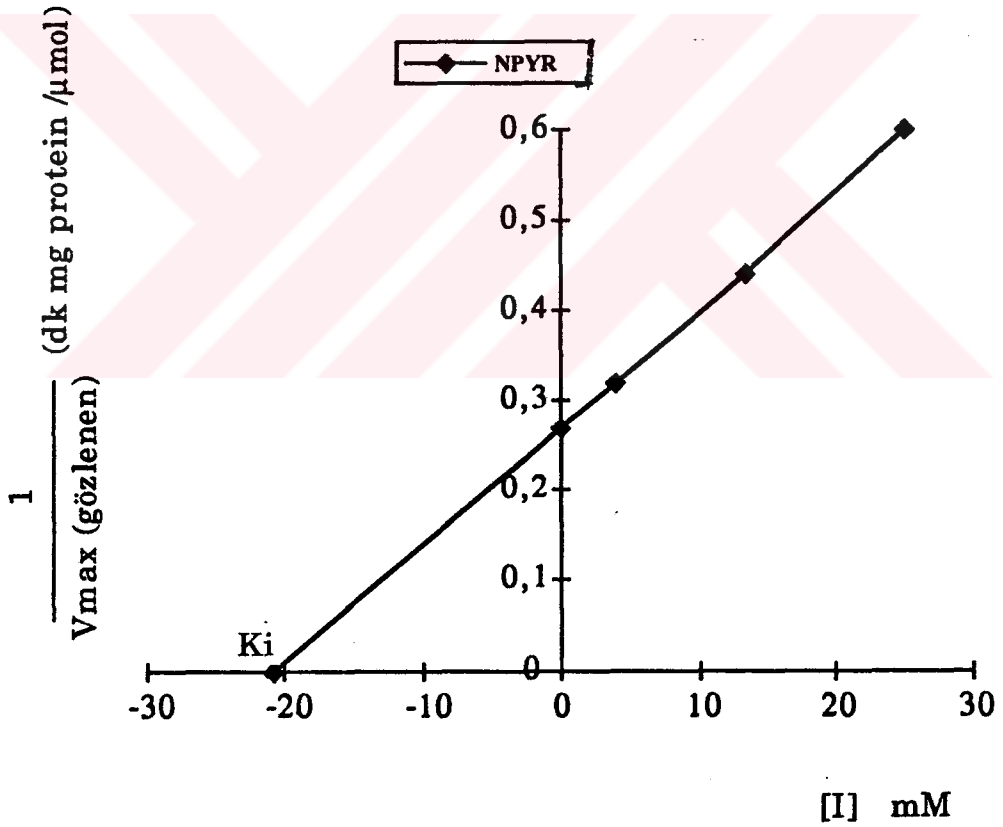


Şekil 14 : GST'in NPYR ile Etkileşiminde Michaelis Menten Grafiği



Şekil 15 : GST'in NPYR ile Etkileşiminde Lineweaver-Burk Grafiği

Bu bulgular NPYR' in enzimi nonkompetetif olarak inhibe ettiğini gösterdi. $1/V_{max(\text{gözlenen})}$ 'e karşı inhibitör derişimi grafiğe geçirilerek NPYR için K_i değeri 21 mM olarak bulundu. (Şekil-16)



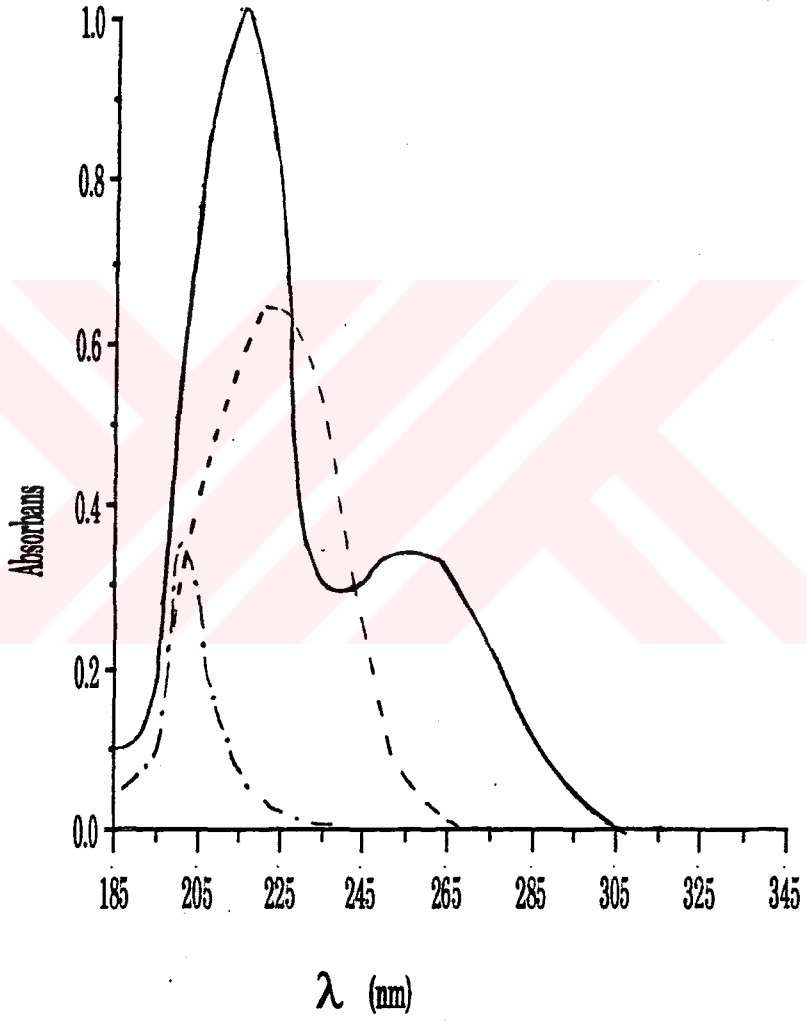
Şekil 16: NPYR için I Derişimine Karşı $1/V_{max}$ (gözlenen) Grafiği

4.4. Enzim-Nitrozamin Bağlanmasının İncelenmesi:

GSH, enzim ve DENA'nın UV-VIS Spektrofotometrede değişik dalga boyları taranarak elde edilen soğurum spektrumu Şekil-17'dedir. Şekil 18'deki fark spekturumunda DENA pikinin küçülmesi, DENA'nın 25°C'ta 5 dk inkübasyon sonunda bir kısmının enzime bağlanarak ortamdaki serbest DENA derişimini düşürdüğünü göstermektedir.

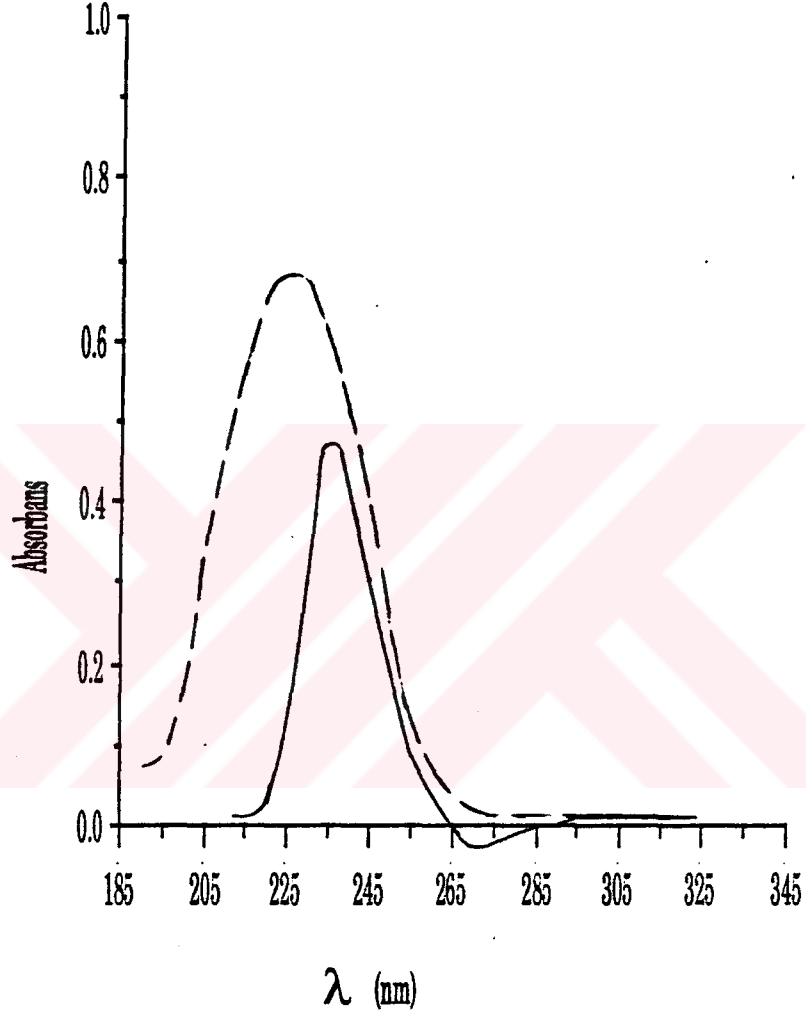
4.5. İnce Tabaka Kromotografisi:

Yapılan çalışmalarda denenen değişik boyama teknikleriyle örnekler boyanamadı. Tabakaların kazınarak asitte çözülmesiyle hazırlanan çözeltilerin spektrofotometrede yapılan incelemede de bir sonuç alınamadı.



Şekil 17 : UV-VIS Soğurum Spektrumu

———— Enzim, ----- DENA GSH



Şekil 18 : GST ile Etkileştirilen DENA'nın UV-VİS Fark Spektrumu

Referans : Tampon + GSH + Enzim

Örnek : Tampon + GSH - Enzim + DENA
(25°C'ta 5 dk inkübasyon sonunda)

5. TARTIŞMA

Dietilnitrozamin, Dimetilnitrozamin ve Nitrozopirolidin'in mutajen ve kanserojen bileşikler olduğu ve doğada çok yaygın olarak buldukları bilinmektedir. Çalışmamızda DENA, DMN ve NPYR in Glutasyon S-transferaz enzimine etkileri in vitro olarak incelendi. Enzim aktivitesi üzerine etkileri çalışıldı.

Nitrozolu bileşikler güçlü elektrofilik ve alkilleyici ajanlar olarak yapılan birçok hayvan deneyleri ile kanserojen oldukları belirlenmiştir. N-nitrozaminlerin metabolik aktivasyonu ile spontan olarak oluşan N-nitrozoüre hedef dokunun DNA'sıyla etkileşerek bazların değişimine neden olmakta ve karsinogenezi başlatmaktadır. Nitrozaminlerin in vivo ve in vitro olarak metabolizma basamakları Şekil-3'de gösterilmiştir. Son çalışmalar siklik nitrozaminler için de bu aktivasyon yolunun geçerli olduğunu göstermektedir (29).

GST memelilerde birçok dokunun sitozolünde yüksek derişimlerde bulunmakta ve birçok tepkimeyi kataliz etmektedir.

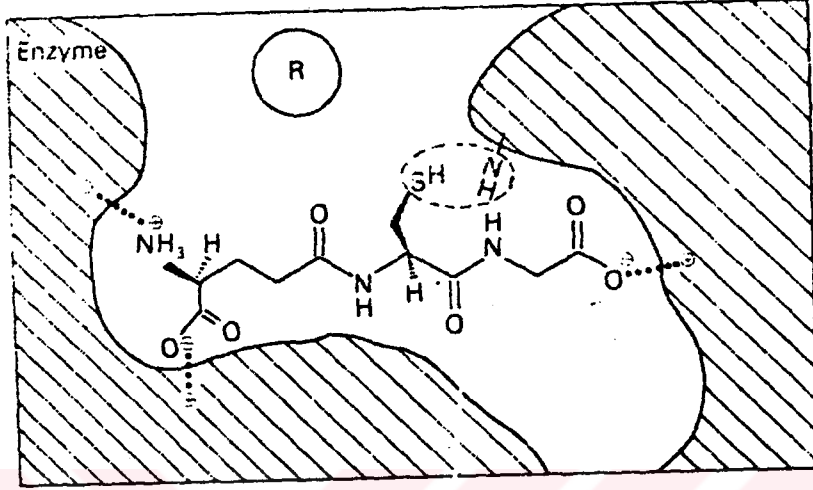
GST'ın katalitik merkezindeki hidrofobik bölgeye (H bölgesi) bağlanmanın olabilmesi için substratların hidrofobik olmaları gerekmektedir. GST'ın kosubstratı olan glutatyona karşı çok özgül olan G bölgesi bulunmaktadır (48).

Yapılan bu çalışmada;

Enzimin 2,4 dikloronitrobenzen (CDNB) substratı ile aktivite ölçümü sonucunda $K_m=0.044$ mM, $V_{max}=3.39$ μ mol/dk/mg protein olarak bulundu.

Enzim-nitrozamin etkileştirilmesiyle yapılan çalışmalarda inhibisyon saptandı.

Değişik derişimlerdeki DENA, DMN ve NPYR ile enzim, farklı sürelerde inkübe edildi. Aktivitedeki en fazla düşüş ilk 5 dk. da gözlemlendi (Şekil 5,9,13). Bu nedenle kinetik çalışmalarda inkübasyon süresi 5 dk olarak seçildi.



Şekil 19: Glutatyon S-Transferaz Enziminin G Bölgesi Modeli

GST enzimini %50 inhibe eden DENA, DMN ve NPYR derişimleri sırasıyla 10.0 mM, 25 mM ve 22.0 mM olarak saptandı. Enzimi inhibe eden DENA, DMN ve NPYR derişimlerinin farklı olması toksik etkilerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır (29).

Çizelge (2) ve Şekil (7) de görüldüğü gibi enzimin DENA ile sağlanan inhibisyon kinetiği çalışması sonucunda $k_m = 0.046$ mM olduğu ve V_{max} ın inhibitörsüz kontrole göre azaldığı görüldü. Bu sonuçlar DENA'nın enzimi nonkompetitif olarak inhibe ettiğini göstermektedir.

Çizelge (4) ve Şekil (11) de görüldüğü gibi enzimin DMN ile yapılan inhibisyon kinetiği incelenmesi sonucunda K_m 'in değişmemesi ($K_m = 0.043$) ve V_{max} 'ın azalması, DMN'nin enzi-

mi nonkompetitif olarak inhibe ettiğini göstermektedir.

Çizelge (6) ve Şekil (15) de görüldüğü gibi enzimin NPYR ile yapılan inhibisyon kinetiği incelenmesi sonucunda $K_m=0.046$ olması ve V_{max} 'ın azalması, NPYR'in enzimi nonkompetitif olarak inhibe ettiğini göstermektedir.

Schramm ve çalışma arkadaşları *in vivo* ve *in vitro* olarak PEDA (perfluorodekonik asit) ile yaptıkları çalışmalarda; PEDA'nın GST enzim aktivitesini nonkompetitif olarak inhibe ettiğini bulmuşlardır (49).

Vessey ve Boyer, 1 mM 6 hidroksoidopamin ve 1 mM klora-min T'nin GST enzim aktivitesinde %50 inhibisyona neden olurken, 1 mM etakrinik asitin %98 inhibisyon oluşturduğunu saptamışlardır (50).

Edith ve arkadaşları Haloasetonitril (HAN) grubundan Dibromoasetonitril (DBAN), Bromokloroasetonitril (BCAN), Monokloroasetonitril (MCAN), Dikloroasetonitril (DCAN) ve Trikloroasetonitril (TCAN)'in GST enzimini inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Bu inhibisyonun HAN için GSH ile direkt olarak tepkimeye girerek GSH 'i azalttığı, CDNB (1-kloro-2-4 dinitrobenzen) ile yarışmaya girerek veya GST'a bağlanarak enzimi inaktive ettiği şeklinde olabileceğini savunmaktadırlar (51).

Cengiz, 2 mM NPYR'ın Piruvat Kinaz enzimini %73, 6 mM NPYR'ın Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G 6 P D) enzimini %98, 30 mM NPYR'ın sitrat sentaz enzimini %71 oranlarında inhibe ettiğini ve bu inhibisyonun da nonkompetitif olduğunu bulmuştur (46).

Çetinkaya tarafından *invitro* olarak DENA ve asetaldehit'in $Na^+-K^+-ATPaz$ enzimini inhibe ettiği bulunmuştur. Ayrıca çalışmada NMOR verilen farelerde %30. NPYR'inde %22 oranında inhibisyon yaptığı bu inhibisyonunda nonkompetitif olduğu saptanmıştır (43).

Atalay tarafından yapılan bir çalışmada 3.8×10^{-4} M deri-

şimindeki NPYR'in Laktat Dehidrogenaz enzimini inhibe ettiğini bulmuştur (52).

Atalay ve Aker tarafından yapılan bir başka çalışmada ise Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz enziminin DENA tarafından inhibe edildiği ve DENA'nın enzime bağlandığı diyaliz ve spektrofotometrik yöntem ile gösterilmiştir (41).

Danielson, 5 µM 4-hydroxyalk-2-enals rat GST enzimini %50 oranında inhibe ettiğini saptamıştır (19).

Gregus sıçan ve farelerde 4 gün boyunca günde iki kere 200 mg/kg fenobarbital trans stilben oksit ve günde bir kere 75 mg/kg pregnenolon-16α karbonitril vererek yaptığı deneylerde GST aktivitesinin düştüğünü bulmuştur (53).

Yapılan bu çalışmaların sonuçları inhibisyon açısından bulgularımız ile paralellik göstermektedir. Nitrozolu bileşiklerin oluşturduğu nonkompetitif inhibisyon bu bileşiklerin enzime bağlanmaları sonucu aktif merkezin üç boyutlu yapısını değiştirerek substrata karşı katalitik aktiviteyi azaltmaları ile olabilir.

Nitrozolu bileşiklerin elektrofilik grupları proteinlerdeki sistein ve metiyonin'in kükürt atomu, histidin'in halka azotu ve tirozin'in 3 nolu karbonu gibi nükleofilik atomlara atak yaptığı bilinmektedir. Enzimdeki bu grupların alkillenmesi doğal olarak katalitik aktiviteyi azaltacaktır (54).

Bu çalışmada ayrıca GST enzimi ile nitrozaminlerin bağlanması araştırıldı.

Şekil 17'deki UV-VIS soğurum spektrumundan görüldüğü gibi DENA, enzim ve GSH pikleri üst üste çakışmaktadır. Bu nedenle enzim-DENA bağlanmasının araştırılması için fark spektrumu alındı (Şekil 18). Buradan görüldüğü gibi DENA piki inkübasyon sonucunda küçülmüştür. Bu da DENA'nın enzime bağlandığını ve ortamdaki serbest DENA'nın azalarak küçük pik verdiğini göstermektedir.

Örneklerle değişik çözücülerde ve boyama teknikleriyle

yapılan ince tabaka kromatografisinde ise GSH ve karışımın boyanmasına karşın DENA, DMN, NPYR ve enzim boyanamadığı için sonuç alınmadı.

Bu çalışmanın ilerki aşaması enzim nitrozamin bağlanmasının HPLC ile araştırılması olarak düşünülmektedir.

Sonuç olarak, nitrozolu bileşiklerin, detoksifikasyonunda GST yardımcı olamamaktadır. Diğer bir deyişle, nitrozolu bileşikler GST için substrat olarak kullanılamamaktadır. Ayrıca, GST'ı nonkompetitif olarak inhibe ettikleri için GST'in diğer işlevleri yanında detoksifikasyon işlevini de azalmaktadırlar.



ÖZET

Bu çalışmada nitrozolu bileşiklerden Dietilnitrozamin (DENA), Dimetilnitrozamin (DMN) ve N-Nitrozopirolidin'in (NPYR) glutatyon S-Transferaz (GST) enzim aktivitesine olan in vitro etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Deneylerde enzim aktivite tayini için enzimin katalizlediği glutatyon ile 1-kloro-2,4 dinitrobenzen'in (CDNB) konjugasyon tepkimesi spektrofotometrik olarak izlenerek bulundu.

GST enzimini %50 inhibe eden DENA, DMN ve NPYR derişimleri sırasıyla 10.0 mM, 25.0 mM ve 23.0 mM olarak gözlemlendi. Enzimin K_m değeri 0.044 mM, V_{max} değeri 3.39 $\mu\text{mol/dk mg}$ protein olarak bulundu. Enzimin DENA etkileşimi sonucunda K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla;

4 mM DENA ile; 0.049mM, 2.45 $\mu\text{mol/dk mg}$ protein

8.3mM DENA ile; 0.047mM, 1.87 $\mu\text{mol/dk mg}$ protein

1.6mM DENA ile; 0.045mM, 1.38 $\mu\text{mol/dk mg}$ protein olarak saptandı.

Enzimin DMN ile etkileşimi sonucunda K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla;

5 mM DMN ile 0.043 mM, 3.16 $\mu\text{mol/dk mg}$ protein;

7.5 mM DMN ile 0.041 mM, 2.60 $\mu\text{mol/dk mg}$ protein;

25 mM DMN ile 0.043 mM, 1.67 $\mu\text{mol/dk mg}$ protein

olarak bulundu.

Enzimin NPYR ile etkileşimi sonucunda K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla;

4 mM NPYR ile 0.048 mM, 3.29 $\mu\text{mol/dk mg protein}$;

13.3 mM NPYR ile 0.045 mM, 2.37 $\mu\text{mol/dk mg protein}$;

25 mM NPYR ile 0.046 mM, 1.67 $\mu\text{mol/dk mg protein}$ olarak saptandı.

Bu sonuçlar nitrozaminlerin enzimin K_m değerini değiştirmediğini, V_{max} değerinde değişiklik yaptiğını gösterdi. Enzim V_{max} değerinin değişmesi nitrozaminlerin enzimi non-kompetitif olarak inhibe ettiğini göstermektedir. Dalga boyları taranarak elde edilen fark spektrumunda nitrozlu bileşiklerin bir kısmının enzime bağlandığı belirlenmiştir.

SUMMARY

In this study we aimed at studying in vitro effects on glutathione S-transferase activity of nitroso compounds; diethylnitrosamine (DENA), dimethylnitrosamine (DMN) and with N-nitrosopyrrolidine (NPYR).

1-Choloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB) conjugation reaction with glutathione catalized by enzyme for the determination of enzyme activity was found by spectrofotometric study.

DENA, DMN and NPYR concentrations which inhibits GST enzyme 50% were observed as 10.0 mM, 25.0 mM and 23.0 mM, respectively. The K_m value of enzyme was found 0.044 mM and V_{max} value as 3.39 $\mu\text{mol}/\text{min mg protein}$. As a result of DENA mutual effect, K_m and V_{max} values were respectively determined as;

with 4 mM DENA; 0.049 mM, 2.45 $\mu\text{mol}/\text{min mg protein}$

with 8.3 mM DENA; 0.047 mM, 1.87 $\mu\text{mol}/\text{min mg protein}$

with 1.6 mM DENA; 0.045 mM, 1.38 $\mu\text{mol}/\text{min mg protein}$

As a result of interaction of enzyme with DMN, the K_m and V_{max} values was respectively found as;

with 5 mM DMN; 0.043 mM, 3.16 $\mu\text{mol}/\text{min mg protein}$;

with 7.5 mM DMN; 0.041 mM, 2.6 $\mu\text{mol}/\text{min mg protein}$;

with 25 mM DMN; 0.043 mM, 1.67 $\mu\text{mol}/\text{min mg protein}$.

As a result of interaction of enzyme with NPYR, the K_m and V_{max} values was respectively found as;

with 4 mM NPYR; 0.048 mM, 3.29 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ protein,
with 13.3 mM NPYR; 0.045 mM, 2.37 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ protein,
with 25 mM NPYR; 0.046 mM, 1.67 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ protein.

Such results showed that; nitrosamines did not change the K_m value of enzyme. The change of V_{max} value of enzyme shows that nitrosamine inhibit enzyme noncompetetively. It was determine that some of nitroso compounds were bound to the enzyme on the differential spectrum obtained by scanning wavelength.

KAYNAKLAR

- 1- Inwi, N., Nishi, Y., Taketomi, M., Mori, M., Yamoto, M., Yamada, T., Tanimura, A.; Transplacental mutagenesis of products formed in the stomach of golden hamstres given sodium nitrite and morpholine. **Int. J. Cancer.** 24: 365-372,1979.
- 2- Yang, S.C., Koop, D.R., Wang, T., Coon, M.J.; Immunochemical studies on the metabolism of nitrosamines by ethanol-inducible cytochrome p-450. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 128 (2): 1007-1013,1985.
- 3- Forman, D., Al-Dabbagh, S., Doll, R.: Nitrates, nitrites and gastric cancer in Great Britain. **Nature.** 313: 620-625, 1985.
- 4- Deeb, B.S., Sloan, K.W.: Nitrates, nitrites and health **Bulletin 750. Agricultural Experiment Station.** Urbana Champaign: 32-33, 1975.
- 5- Fraizer, W.C., West hoff D.C.; Food Microbiology. **Mc.Graw Hill.** 160, 1978.
- 6- Bartsch, H., Camus, A., Malaveille, C.: Comparative mutagenicity of N-Nitrosamine in a semisolid and in a luquid incubation system in the prensence of rat or human tissue fractions. **Mut. Res.** 37: 149-162, 1976.
- 7- Lijinsky, W., Wayne, T.: The effects of substituents on te carcinogenity of N-Nitrosopyrrolidine in Spraque Dawley rats. **Cancer Res.** 3: 1988-1990, 1976.
- 8- Vandenberghe, Y., Foriers, A., Rogiers, V., Vercruysse, A.: Changes in expression and "de novo" synthesis of glutathione-S-transferase subunits in cultured adult rat hepatocytes. **Biochem. Pharmacol.** 39 (4): 685-690, 1990.

- 9- La Creta F.P., Olszewski, J.J., Tew, K.D.: Purification of glutathione-S-transferases from rat liver and Walker 256 mammary carcinoma cells by high performance liquid chromatography and a glutathione affinity column: **J.Chromatog.** 434: 83-93, 1988.
- 10- Morgenstern, R., De Pierre, J. W.: Membrane-bound glutathione transferase: **Biochem-Soc. Transact.** 15: 719-721, 1987.
- 11- Steinberg, P., Schramm, H., Schladt, L., Robertson, L.W., Thomas, H., Oesch, F.; The distribution, induction and isoenzyme profile of glutathione S-transferase and glutathione peroxidase in isolated rat liver parenchymal, Kupffer and endothelial cells. **Biochem. J.** 264: 737-744, 1989.
- 12- Puchalski, R.B., Fahl, W.E.; Expression of recombinant glutathione S-transferase π , γ or γ_1 confers resistance to alkylating agents. **Proc.Natl. Acad. Sci. USA.** 87: 22-43-2447, 1990.
- 13- Vandenberghe, Y., Morel, F., Pemble, S., Taylor, J.B., Rogiers, V., Ratanasavanh, D., Vercruyse, A., Ketterer, B., Guillouzo, A.; Changes in expression of mRNA coding for glutathione S-transferase subunits 1-2 and 7 in cultured rat hepatocytes. **Mol. Pharmacol.** 37: 372-376, 1989.
- 14- Smith, E.L., Hill, R.L., Lehman, I.R., Lefkowitz, R.J., Handler, P., White, A.: **Principles of Biochem.** Mc Graw. Hill Book Company 625-627, 1981.
- 15- Hayes, P.C., Harrison, D.J., Bouchier, A.D., McLellan L.I., Hayes, J.D.: Cytosolic and microsomal glutathione-S-transferase isoenzymes in normal human liver and intestinal epithelium. **Gut:** 30: 854-859, 1989.

- 16- Peters, W.H.M., Nagengast, M.F., Wobbes, T.: Glutathione-S-transferases in normal and cancerous human colon: **Carcinogenesis**. 10 (12): 2371-2374, 1989.
- 17- Suzuki, T., Coggan, M., Shaw, D.C., Board, P.G.: Electrophoretic and immunological analysis of human glutathione S-transferase isozymes: **Ann. Hum. Genet.** 51: 95-106, 1987.
- 18- Peters, M., Wilbert, H.; Purification and partial characterization of human intestinal glutathione S-transferases. **Biochem. Pharmacol.** 37 (11): 2288-2291, 1988.
- 19- Danielson, H.U., Mannervik, B.: 4-Hydroxyalk-2-enals are substrates for glutathione transferase: **FEBS Letters**. 179 (2): 267-270, 1985.
- 20- Farrants, A.K.O., Meyer, D.J., Coles, B., Southan, C.A., Ken, A., Johnson, P.J., Ketterer, B.; The separation of glutathione transferase subunits by using reverse-phase high-pressure liquid chromatography. **Biochem. J.** 245: 423-428, 1987.
- 21- Vural, N.; Toksikoloji, **Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları**: 48-81, 1984.
- 22- Parke, D.V.: **The Biochemistry of Foreign Compounds**. Pergamon Press. New York. 92-97, 1974.
- 23- Simons, P.C., Jagt, D.L.V.; Purification of glutathione S-transferases from human liver by glutathione- affinity chromatography. **Anal. Biochem.** 82: 334-341, 1977.
- 24- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B.: Glutathione S-transferases. **J.Biol.Chem.** 249 (22): 7130-7139, 1974.
- 25- Morgenstern, R., Lundqvist, G., Hancock, V., De Pierre, J.W.; Studies on the activity and activation of rat liver microsomal glutathione transferase in particular with a substrate analogue series. **J.Biol. Chem.** 263 (14): 6671-6675, 1988.

- 26- Kayaalp, O.; **Tıbbi Farmakoloji**. Nüve Matbaası, Ankara: 283, 1981.
- 27- Bowmann, W.C., Rand, M.J.; **Textbook of pharmacology**. Blackwell Scientific Publications, Oxford: 26-44, 1980.
- 28- Archer, M.C.; Mechanisms of action of N-nitroso compounds. **Cancer Surveys**. 8(2). 241-249, 1989.
- 29- Yang, C.S., Koop, D.R., Wang, T., Coon, M.J.; Immunochemical studies on the metabolism of nitrosamines by ethanol-inducible cytochrome P.450. **Biochem. Biophys. Res Commun**. 128 (2). 1007-1013, 1985.
- 30- Biro, L.C., Chin, W., Archer, M.C., Pollanen, M.S., Hayes, M.A.; Toxicity of N-nitrosodimethylamine, N-nitrosomethylbenzylamine, and 1,2-dimethylhydrazine in isolated rat hepatocytes. **Toxicol. Appl. Pharmacol**. 102: 191-194, 1990.
- 31- Harris, C.C., Autrup, H., Stoner, G.D., Trump, B.F., Hillman, E., Schafer, P.W., Jeffrey, A.M.; Metabolism of benzo(a) pyrene, N-nitrosodimethylamine and N-nitrosopyrrolidine and identification of the major carcinogen. DNA adducts formed in cultured human esophagus. **Can. Res**. 39: 4401-4406, 1979.
- 32- Scherf, H.R., Frei, E., Wiessler, M.; Carcinogenic properties of N-nitrodimethylamine and N-nitromethylamine in the rat. **Carcinogenesis**. 10: 1977-1981, 1989.
- 33- **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man**. 1: 95-106, 107-123, 263-281, 1971.
- 34- Öztop, H.N.; Bazı sigara nitrozaminleri ve nitritin sıçan (*Rattus norvegicus*) karaciğeri mikrozomlarına ve glutatyon düzeylerine etkisi. **Doktora Tezi**, Sivas 1989.

- 35- Lewis, R.J.; **Rapid Guide to Hazardous chemicals in the workplace. Van Hostrand Reindhold.** New York, 1990.
- 36- Dahl, A.R.; Activation of nitrosamines to mutagens by rat and rabbit nasal, lung and liver S-9 homogenates. **Adv. Exp. Med. Biol.** 197: 367-372, 1986.
- 37- Kawanishi, T., Onno, Y., Takahashi, A., Takanaka, A., Kasuya, Y., Omdri, Y.; Relation between hepatic microsomal metabolism of N-nitrosamines and cytochrome P-450 species. **Biochem. Pharmacol.** 34 (7): 919-924, 1985.
- 38- Longo, V., Citti, L., Gervasi, P.G.; Metabolism of diethylnitrosamine by nasal mucosa and hepatic microsomes from hamster and rat: species specificity of nasal mucosa. **Carcinogenesis.** 7(8): 1323-1328, 1986.
- 39- Russell, S.E.H., Pearson, C., Kelly, M., Humphries, P.; Long-term dosing studies using mutagenic carcinogens indicate a highly significant correlation between elevations in the level of rat glutathione S-transferase P messenger RNA and liver tumours of hepatocellular origin. **Biochem. J.** 249: 105-109, 1988.
- 40- Montesano, R., Bartsch, H.; Mutagenic and carcinogenic N-nitroso compounds: Possible environmental hazards. **Mut. Res.** 32: 179-228, 1976.
- 41- Atalay, A., Aker, A.; Maya Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenazin dietilnitrozamin tarafından inhibisyonu. **Doğa TU. Tıp ve Ecz. Der.** 11: 8-12, 1987.
- 42- Guliani, E.R., Zaki, G., Hall, J.C.; Serum and hepatic enzyme activity in rats treated with DENA. **Toxicol. Pathol.**, 11, 1, 23-27, 1983.

- 43-Çetinkaya, Ö.; Bazı nitrozaminlerin fare karaciğer Na^+ - K^+ -ATP az enzimi üzerindeki etkileri ve bağlanma özellikleri. **Doktora Tezi.** Sivas 1988.
- 44-Brunnemann, K.D. Yu, L., Hoffmann, D.; Assessment of carcinogenic volatile N-nitrosamines in tobacco and in mainstream and sidestream smoke from cigarettes **Cancer Res.** 37: 3218-3222, 1977.
- 45- Chen, C.B., McCoy, D.G., Hecht, S.S., Hoffmann, D., Wynder, L.E., HPLC assay for hydroxylation of N-nitrosopyrrolidine by isolated rat liver microsomes. **Cancer Res.** 38: 3812-3816, 1978.
- 46- Cengiz, M.; N-nitrozopirrolidin'in piruvat kinaz, glukoz-6 fosfat dehidrogenaz, sitrat sentaz enzimlerine in vitro etkisi ve bağlanma özellikleri. **Doktora Tezi.** Sivas 1988.
- 47- Bowman, B.P., Snell, T.W., Cochrane, B.J.: Isolation and purification of glutathione S-transferases from *Brachionus plicatilis* and *B. Calyciflorus* (Rotifera) **Comp. Biochem. Physiol.** 95B, 3, 619-624, 1990.
- 48- Adang, A.E.P., Brussee, J., Gen, A.V.D., Mulder J.G.; The glutathione - binding site in glutathione S-transferases. **Biochem. J.** 269: 47-54, 1990.
- 49- Schramm, H., Friedberg, T., Robertson, L.W., Oesch, F., Kissel, W.; Perfluorodecanoic acid decreases the enzyme activity and the amount of glutathione S-transferases proteins and mRNAs in vivo **Chem. Biol. Interact.** 70: 127-143, 1989.
- 50- Vessey, D.A., Boyer, T.D.; Characterization of the activation of rat liver glutathione S-transferases by nonsubstrate ligands. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 93: 275-280, 1988.

- 51- Lin, E.L.C., Guton, C.W.; Interaction of haloacetonitriles with glutathione and glutathione S-transferase. **Biochem. Pharmacol.** 38 (4): 685-688, 1989.
- 52- Atalay, A.; Nitrozolu bileşiklerin sıçan karaciğer laktak dehidrogenaz enzimine in vitro etkileri. **C.Ü. Tıp Fak. Der.** 3: 208-214, 1981.
- 53- Gregus, Z., Madhu, C., Klaassen, C.D.; Inducibility of glutathione S-transferases in hamsters. **Cancer Letters.** 44: 89-94, 1989.
- 54- Miller, E.C., Miller, J.A.; The metabolism of chemical carcinogens to reactive electrophiles and their possible mechanism of action in carcinogenesis. **ACS Monograph** 173. Am. Chem. Soc. Washington, D.C. 737-762, 1976.