

17034

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

L-VALİN AMİNO ASİTİ'NİN İNSAN ERİTROSİT MƏMBRANINDAN
TAŞINIMINA DİETİLNİTROZAMİN'İN ETKİSİ

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Yavuz SİLİĞ

DANIŞMAN ÜĞRETİM ÜYESİ : YARD. DOÇ. DR. Ahmet AKER

SİVAS-1990



Büyükannem

Fatma SİLİĞ'e



Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun
5.1.1984 tarih ve 84/1 sayılı kararıyla kabul edilen
tez yazma yönergesine göre hazırlanmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde katkıları bulunan Sayın Hocalarım Prof. Dr. Atilla ATALAY ve Yard. Doç. Dr. Ahmet AKER'e içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Yüksek Lisans eğitimim süresince , bilimsel katkılarını ve yardımlarını esirgemeyen sayın Hocam Yard. Doç. Dr. Öge ÇETİNKAYA'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ŞEKİLLER

	sayfa
Şekil 1 : Basit ve Kolaylaştırılmış Diffüzyonun Şematik Gösterimi	4
Şekil 2 : Primer Aktif Taşınımın Şematik Gösterimi	7
Şekil 3 : Sekonder Aktif Taşınımın Şematik Gösterimi	8
Şekil 4 : Nitrozaminlerin Oluşum Tepkimesi	12
Şekil 5 : DENA'nın Oluşum Tepkimesi	15
Şekil 6 : İnkübasyon Süresinin L-Valin Amino Asiti Taşınımına Etkisi	25
Şekil 7 : Hemotakrit Değerinin L-Valin Amino Asiti Taşınımına Etkisi	27
Şekil 8 : DENA Derişiminin L-Valin Amino Asiti Taşınımına Etkisi	28
Şekil 9 : DENA ile L-Valin Amino Asitinin 20 dk'lık İnkübasyondan sonra Etkileşimi	30
Şekil 10 : DENA ile L-Valin Amino Asitinin 24 saat'lik İnkübasyondan sonra Etkileşimi	31

İÇİNDEKİLER

	sayfa
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hücre Zarından Taşınım	3
2.2. Taşıyıcı Maddeler	9
2.3. Nitrozaminler	12
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	19
3.1. GEREÇ	19
3.2. YÖNTEM	20
4. BULGULAR	25
4.1. İnkübasyon Süresinin L-Valin Amino Asiti Taşınımına Etkisinin Saptanması	25
4.2. Hematokrit Değerinin L-Valin Amino Asiti Taşınımına Etkisinin Saptanması	26
4.3. Değişen DENA Derişiminin L-Valin Amino Asiti Taşınımına Etkisinin Saptanması	27
4.4. DENA ile L-Valin Amino Asitinin Etkileşiminin Spektrofotometrik Yöntemle İncelenmesi	29
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	32
6. ÖZET	39
7. SUMMARY	40
8. KAYNAKLAR	41

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde, tüm dünyada değeri gittikçe daha iyi anlaşılan bir konu var : "Temiz ve yaşanabilir bir çevre". Günümüz teknolojisinin bu kadar gelişmesine karşın bu konuya yeterince eğinilmediğinden ve insanlar bu konuda bilinçlendirilmediğinden dolayı çevre gün geçtikçe giderek daha fazla kirlenmektedir.

Çevre kirletici kimyasal maddeler arasında en büyük yeri nitrozolu bileşiklerin aldığı bilinmektedir(1,2). Kanserojenik ve mutajenik etkileri olan bu bileşikler, besin maddelerinde koruyucu olarak kullanılan nitritlerle ikincil aminlerin tepkimesi sonucunda midede in vivo koşullarda oluşmaktadır(3,4). Fizyolojik pH'larda da bu tepkimelerin oluşabileceği gösterilmiştir(5). Nitrozolu bileşiklerden dietilnitrozamin'in (DENA), DNA polimeraz'da ardışık dizi değişikliği oluşturduğu ve DNA'yı alkillediği saptanmıştır(6). DENA'nın karaciğer ve akciğer'de RNA ve protein sentezini inhibe ettiği de bulunmuştur(7).

In vivo koşullarda bazı enzim aktivelerinin inhibe olduğu, Na^+/K^+ ATPaz enziminin aktive olduğu bulunmuştur(8,9).

Nitrozolu bileşikler elektrofilik özellikleri ile proteinlerin nükleofilik bölgelerine bağlanmakta ya da bu bölgeleri alkillemektedirler(10). Alkillelenen proteinlerin ise fonksiyonlarının bozulacağı ya da değişeceği beklenir.

Bu düşünceden hareketle DENA'nın membran proteinlerini etkileyerek , en azından taşınım aktivitesini değiştirebileceği fikri doğdu. Bu fikri doğrulamak amacıyla eritrosit membranında valin amino asitinin taşınımına DENA'nın etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hücre Zarından Taşınım

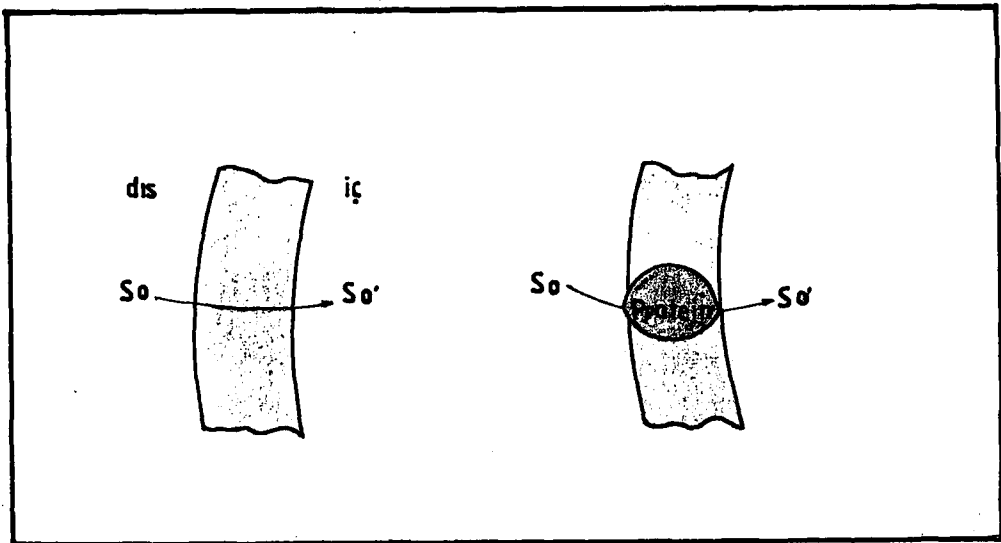
Maddelerin hücre zarından taşınmasına hizmet eden iki temel mekanizma vardır. İlki "Diffüzyon" diğeri ise "Aktif Taşınım" dır.

2.1.1. Diffüzyon

Maddelerin, yüksek derişimden düşük derişime doğru moleküllerin kinetik enerjileri sayesinde hücre zarından geçebilmesine diffüzyon ya da basit diffüzyon denir. Lipidlerde çözünen maddelerin diffüzyon yoluyla membrandan geçebilmesi doğaldır. Bazı maddelerin lipidlerde çözünlüğü oldukça az olduğu halde bu maddeler yine de lipid matriksini kolaylıkla geçebilirler. Bu olayda kolaylaştırılmış diffüzyonun rolü vardır. Kolaylaştırılmış diffüzyon mekanizması ile bir maddenin membrandan geçiş hızı o maddenin zarın iki yanındaki derişiminin farkına , zardaki taşıyıcı madde miktarına ve bu olayda yer alan kimyasal reaksiyonların işleyiş çabukluğuna bağlıdır.

Kolaylaştırılmış diffüzyon mekanizmalarının çoğu aktif taşınımındaki mekanizmalara benzemektedir. Aktif taşınım ile bir zarın taşınan maddeler, bu maddelerin az yoğunlukta bulunduğu taraftan çok yoğunlukta bulunduğu tarafa götürülebilir. Halbuki kolaylaştırılmış diffüzyon mekanizması bir maddeyi ancak yüksek derişimden alçak derişime doğru götürebilir.

Diğer taraftan, bir zarın geçişte kolaylaştırılmış diffüzyon ile serbest parçacıkların basit diffüzyonu arasında şu fark vardır ; Serbest parçacıkların net diffüzyon hızı, zarın iki tarafındaki derişimleri farkı ile hemen hemen orantılıdır. Taşıyıcılardan yararlanarak sağlanan geçişlerde, yani özel taşıyıcıların araya girdiği (Carrier-Mediated) taşınma olaylarında ancak iki taraf arasındaki deriş-



Şekil 1 :Basit ve Kolaylaştırılmış diffüzyonun şematik gösterilmesi.

şim farkı çok az olduğu zaman diffüzyon miktarının derişim farkı ile orantılı olduğu görülür. Derişim farkı yüksek olduğu zaman bu kural işlemez. Çünkü sistem bir bakıma doymuş hale gelir. Bunun anlamı şudur: Kolaylaştırılmış diffüzyonda taşınma hızı, iki taraf arasındaki derişim farkı yanında, taşıyıcı madde miktarına, taşıyıcı madde ile taşınan madde arasında birleşme ve ayrışmalar sırasında işleyen kimyasal reaksiyonların hızınada bağlıdır(11,12).

Taşıyıcı yardımıyla taşınım, basit taşınımdan stereoözüllüğü gibi özelliklerden dolayı birbirinden ayrılabilir. Bir membran sisteminde basit diffüzyon ile glukoz'un L- ve D- izomerileri eşit oranda taşınmaktadır. Ancak taşıyıcı yardımıyla taşınımında taşıyıcı sadece D-Glukoz'u tanıyıp taşımaktadır. Enzimle katalizlenen reaksiyonlarda olduğu gibi taşıyıcı proteinler substrata özgüdür(13).

2.1.2. Aktif Taşınım

Maddelerin, bir takım kimyasal reaksiyonlar yolu ile ve bir enerji tüketimi sayesinde belirli taşıyıcı maddeler tarafından taşınarak hücre zarından geçişine aktif taşınım denir. Hücre zarından geçerek, az derişimden çok derişime doğru taşınan parçacıklar için hücre zarında bir enerji harcanır ve derişim farkı büyüdükçe harcanan enerji miktarı artar.

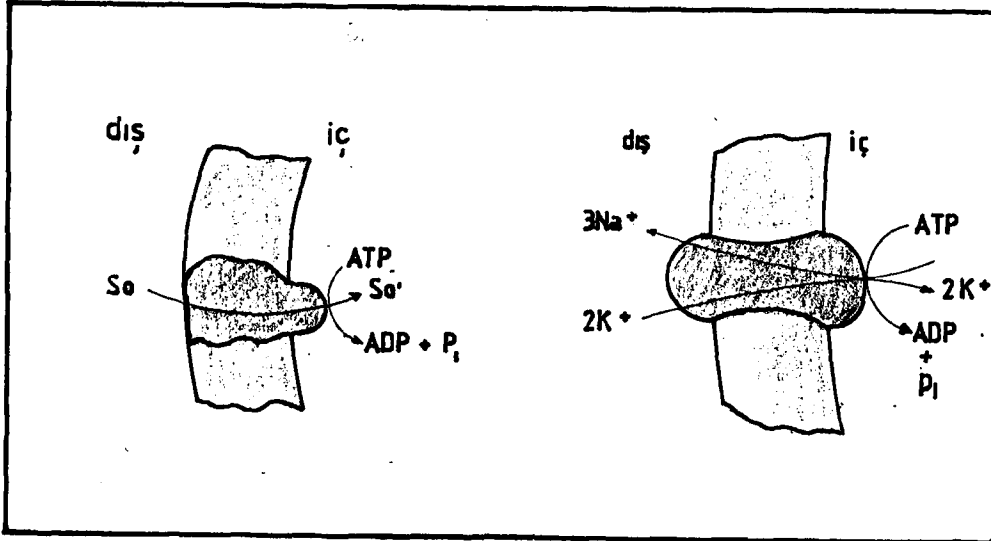
Aktif taşınım olayında taşınma mekanizmasının esası, bütün maddeler için birbirinin aynısıdır ve "Taşıyıcılar" (Carriers) kullanmak suretiyle yapılmaktadır. Aktif taşınım olayı, bir maddenin (taşınacak-madde) diğer bir madde ile (taşıyacak-madde) birleşmesi işleminde tamamen normal kimyasal yasalara uymaktadır. Taşıyıcı maddenin taşınacak maddeye karşı doğal bir affinitesi olduğunu düşünerek, zarın dış yüzeyinde bu maddelerin kolayca birbiriyle birleştiği kabul edilir. Böylece oluşan bileşik madde zarın içinden iç yüzeye doğru diffüzyonla ilerler. Burada bir enzimle katalizlenen kimyasal bir reaksiyon meydana gelir. Bu reaksiyon ATP'nin hidrolizinden oluşan enerjiyi kullanarak o maddeyi taşıyıcıdan ayırır. Yanlız kalan taşıyıcı madde tekrar zarın dış yüzeyine diffüzlenir(11,12,13,14). Aktif taşınım işleyiş mekanizması bakımından ikiye ayrılır.

2.1.2.1. Primer Aktif Taşınım

Canlı hücreleri içinde düşük bir Na^+ derişimine karşı yüksek bir K^+ derişimi bulunması hücrenin içi ile dışı arasında elektriksel potansiyel meydana getirmektedir. Hücre dışı Na^+ ve K^+ derişimi, hücre içi Na^+ ve K^+ derişimi ile dengeye gelmeye çalışacaktır. Na^+ 'un hücreden dışarıya K^+ 'un hücre içine pompalayan bir transmembran proteini bulunduğu bildirilmiştir. Bu proteinin gerek iyon translokasyonlarını gerekse ATP hidrolizini gerçekleştiren

bir enzim olduğu saptanmıştır. Bu enzim $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ olarak adlandırılmaktadır. ATP'nin hidrolizi ile açığa çıkan enerji membranın bir tarafından diğer tarafına Na^+ ve K^+ taşınımı için $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ tarafından potansiyel enerjiye dönüştürülmektedir. Na^+ 'ün hücre dışına taşınımı K^+ 'un hücre içine taşınımı fosforilasyon, defosforilasyon ve her iki yüzeyde ligantların, enzimlerdeki konformasyonel değişiklikler aracılığı ile olduğu düşünülmektedir.

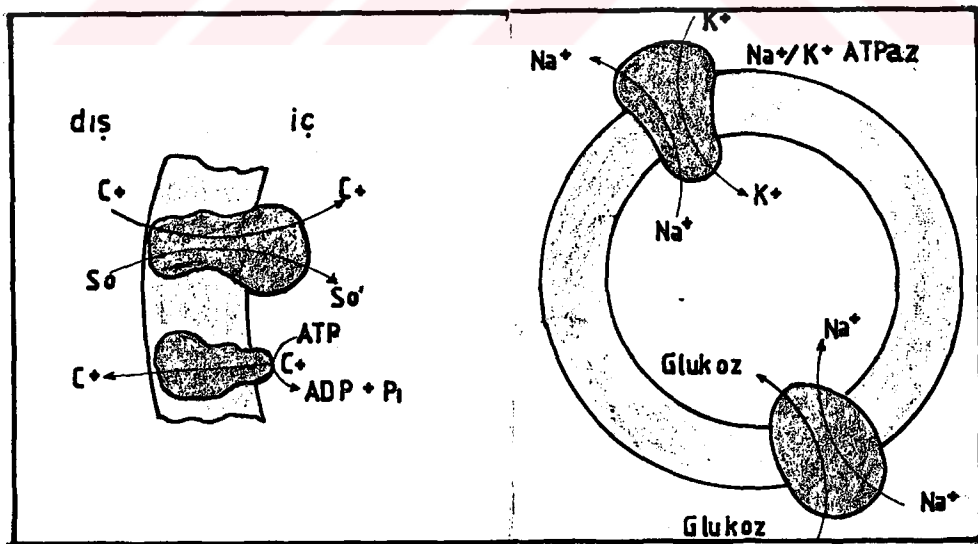
Memeli sistemlerinde Na^+ ve Ca^{++} pompaları primer aktif taşınım için iyi bir örnektir. Ayrıca Gram-Negatif Bakterilerde şeker ve amino asitlerin, protein sistemlerine kimyasal enerji ile bağlanmaları sonucu primer aktif taşınım ile taşındığı bildirilmiştir(13,14).



Şekil 2 : Primer Aktif Taşınımın şematik gösterimi.

2.1.2.2. Sekonder Aktif Taşınım

Hücre dışındaki Na^+ 'un hücre içerisine girme eğilimi oldukça fazladır. Kimyasal gradientlerin hücre içi ve hücre dışı derişim farkından oluşan serbest enerji bazı maddelerin hücre içerisine taşınmasını kolaylaştırmaktadır. Na^+ hücre içerisine girerken aynı zamanda bir taşıyıcı tarafından derişim gradientlerine karşı taşınacak maddeler de taşınmaktadır. Na^+ 'un hücre içi ve hücre dışı derişim farkını muhafaza edebilmesi için hücre içine giren Na^+ 'un tekrar dışarı çıkması gerekir. Bu işlem Na^+ pompası tarafından yapılır. Na^+ 'un tekrar hücre dışına çıkması enerji gerektiren bir olaydır. Bu enerji ATP'nin hidroliziyle karşılanır.



Şekil 3 : Sekonder Aktif Taşınımın şematik gösterimi.

Bazı memeli hücrelerinde şeker, nötral amino asitler ve bazı maddelerin taşınımı sekonder aktif taşınım ile olduğu bildirilmiştir. Bağırsaktaki gradient derisimine karşı glukoz'un kana taşınımı bu taşınım iyi bir örnektir(13,15).

2.2. Taşıyıcı Maddeler

2.2.1. Taşıyıcı Maddelerin Kimyasal Yapısı

Taşıyıcı maddelerin kimyasal yapı bakımından protein yada lipoprotein olduğu kabul edilmektedir. **Protein** molekülü veya moleküllerin protein bölümü taşınacak madde için özel bağlanma yerlerine sahiptir. Molekülün lipid bölümü ise, hücre zarının lipid bölgesinde taşınacak molekülün çözünmesini sağlamaktadır.

Taşıyıcı yardımıyla taşınımın iki şekilde olabileceği düşünülmektedir: Taşıyıcı amino asiti bağladıktan sonra çeşitli bükülme hareketleri yaparak amino asiti hücre içine taşıdığı düşünülmektedir. Diğer düşünce ise; Taşıyıcı yüzeyinde var olduğu düşünülen bağlanma yerlerinden birisine amino asit bağlandıktan sonra molekül boyunca bir bağlanma yerinden diğerine geçerek hücre içine taşınabileceği şeklindedir(11).

2.2.2. Taşıyıcı Maddelere Bağlı Taşınım Sistemlerinin Özellikleri.

1- Taşınım sistemleri enzimler gibi özgüdür. Bu özgüllük taşıyıcı maddelerin substrata olan

steroözgüllüğünden kaynaklanır .

2- Bir taşınım sistemi, kimyasal yapıları benzer olan substratların ancak belirli bir miktarının taşınmasını gerçekleştirebilirler.

3- Bir substratın taşınma hızı o substratın derişimine bağlıdır (14).

2.2.3. Amino Asitlerin Taşınması

Hemen hemen bütün amino asitler hücre zarındaki gözeneklerden (porlardan) geçemeyecek kadar büyüktür. Belki küçük miktarda amino asit hücre zarı matriksinden çözünerek hücre içine diffüzleniyor olabilir. Fakat amino asitlerin hücre içine taşınım mekanizmalarının taşıyıcı bir madde aracılığıyla aktif taşınım veya kolaylaştırılmış diffüzyon sayesinde gerçekleştiği bilinmektedir. Glukoz taşınımında olduğu gibi amino asit taşınımında da taşıyıcı bir sistemin varlığına ihtiyaç vardır (16,17).

Newsholme ve Leech adlı araştırmacılar dokularında amino asitlerin hücre içine taşınmasında 7 farklı taşınım sisteminin rol oynadığını bildirmişlerdir. Bu sistemler sırayla A, ASCP, L, Ly, Dikarboksilat, N, β , sistemleridir. Sistem A'nın Alanin, Glisin, Prolin, Serin ve Metionin gibi kısa yan zincir içeren amino asitler için , Sistem ASCP'nin Alanin , Serin, Sistein ve Prolin gibi amino asitler için , Sistem L'nin Lösin, İzölösin, Valin , Fenilalanin, Metionin, Tirozin ve Triptofan gibi nötral ve aro-

matik amino asitler için , Sistem Ly'nin Lizin, Arjinin, Ornitin ve Histidin gibi bazı amino asitler için , Sistem Dikarboksilat'ın Glutamik ve Aspartik asit gibi asitik amino asitler için , Sistem N'nin Glutamin, Asparajin ve Histidin gibi amino asitler için , Sistem β 'nın Taurin ve β -Alanin gibi amino asitler için özgül oldukları bildirilmiştir(17).

Raben adlı araştırmacı ise, insan eritrositlerin de 5 farklı taşıyıcıya bağlı taşınım sistemlerinin bulunduğunu bildirmiştir. Bunlar sırasıyla L, T, Ly, ASC. ve Glisin sistemi olarak bildirilmiştir.

Sistem L : L-Lösin, L-Fenilalanin, L-Metionin ve L-Valin

Sistem T : L-Triptofan, L-Tirozin

Sistem Ly : L-Lizin, L-Arjinin

Sistem ASC :L-Alanin, L-Sistein, L-Serin

Sistem Glisin :L-Glisin

amino asiti için özgül olduğu bildirilmiştir(18,19, 20).

Amino asit taşınım sistemlerinde L- stereoizomer taşınımı D- stereoizomeri taşınımına oranla daha yaygın olarak görülmektedir. D-Lösin, L-Lösin ve L-Fenilalanin için yapılan taşınım deneylerinde D- ve L-Lösin'nin kinetik değerlerinin farklı olduğu saptanmıştır. Fakat L-Lösin ve L-Fenilalaninin kinetik değerlerinin birbirine yakın olduğu tesbit edilmiş ve taşınım sistemlerinin stereoözgül olduğu bildirilmiştir-

tir (18,21).

ASC ve Glisin sistemlerinin Na^+ bağımlı olduğu gösterilmesine rağmen diğer 3 sistemin Na^+ bağımlı olduğuna dair delil bulunamadığı bildirilmiştir. Taşınım ortamına Na^+ yerine K^+ konulduğunda L-Valin, L-Fenilalanin ve L-Lösin taşınımının kinetik değerlerinde değişiklik olmadığı bildirilmiştir (18,19).

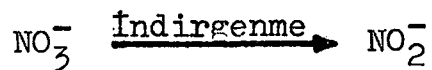
2.3. Nitrozaminler

Bir çok nitrozolu bileşiğin mutajenik, karsinojenik, teratojenik ve sitotoksik etkilere sahip olduğu ve ikincil aminlerle nitritlerin asitik ortamda tepkimeye girmesi ile oluştuğu bildirilmiştir (22, 23, 24).



Şekil 4 : Nitrozaminlerin Oluşum Tepkimesi

Nitrozaminlerin oluşumunda etkili olan nitritlerin ; kimyasal maddeler, zirai ilaçlar, su ve bitkilerde büyük oranda bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca doğada yaygın olarak bulunan nitrat'ın bakteriler tarafından nitrit'e indirgenmesiyle oluşmaktadır (4,25).



Nitrozaminlerin oluşumunda etkili olan diğer madde ise ikincil aminlerdir. İkincil aminler ;

tekstil ve kauçuk endüstrisinde, gübrelerde ve kimyasal madde olarak laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Ayrıca ikincil aminlerin balık, tahıl, çay, sigara ve sigara dumanında bulunduğu tesbit edilmiştir. Kızartılmış ve uzun süre bekletilip kokuşmaya yüz tutmuş besin maddelerinde ikincil amin olan piperidin ve pirrolidin oluştuğu gösterilmiştir. Bunlar nitritlerle asitik ortamda reaksiyona girdiğinde ise endojen kaynaklı nitrozaminler oluşmaktadır (22,23). Nitrozaminlerin sadece memeli midesinde değil fizyolojik koşullarda da yüksek verimle oluştuğu gösterilmiştir (5,26)

Nitrozamin kaynakları arasında önemli bir yeri sigara ve sigara dumanı alır. Sigara dumanında 680-1170 ng Dimetilnitrozamin'in (DMN), 8-73 ng DENA'in 9-75 ng Monometilnitrozamin'in (MENA) ve 204-612 ng NPYR'in bulunduğu bildirilmiştir (27). Tütün içen ve içmeyen kişilerin tükürüklerinde Sıvı ve Gaz Kromatografileri kullanılarak nitrozaminlere bakıldığında ; Tütün içen kişilerin tükürüklerinde nitrozaminlerin bulunduğu ve bunların tükürükte bulunan alkoloidlerin nitrozolanmasıyla oluştuğu bildirilmiştir (28).

Önemli bir nitrozamin oluşum kaynağı da, besin endüstrisinde kullanılan nitrat ve nitritlerdir. Bu nitrat ve nitritler et, balık ve diğer konservecilikte besinlere koruyucu ve direnç arttırıcı özellik

verilmesinden dolayı bol miktarda kullanılır. Bunların mide ortamında ikincil aminlerle nitrozolu bileşikler verdiği bildirilmiştir(26).

300 civarında kimyasal maddeye Salmonella - Mikrozoom testi uygulanarak yapılan çalışmalarda, tüm nitrozamin türevlerinin mutajenik olduğu bildirilmiştir(24). Amin ve amid taşıyan ilaçların nitroz asitle reaksiyonu sonucunda kuvvetli karsinojenik ve mutajenik N-Nitrozo formuna dönüştükleri, Salmonella - Typhimurium mutajenite testi yapılarak gösterilmiştir(29).

N-Nitrozo birleşiklerinin büyük bir kısmı biyolojik aktiftirler. Bu bileşikler ;

-- Dialkilnitrozaminler

Dimetilnitrozamin (DMN)

Dietilnitrozamin (DENA)

-- Halkasal nitrozaminler

Nitrozopirolidin (NPYR)

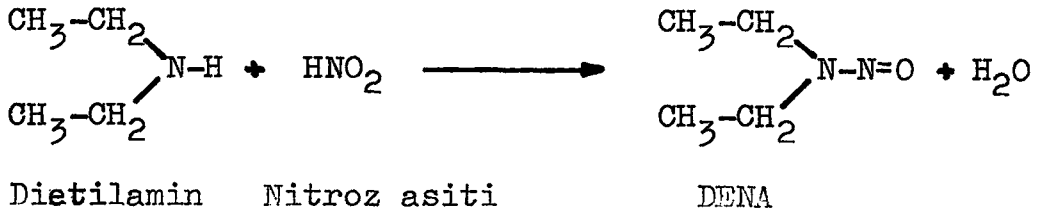
Nitrozomorfolin (NMOR)

-- Aril nitrozaminler

Fenilmetilnitrozamin (FMNA) sayılabilir(22,23).

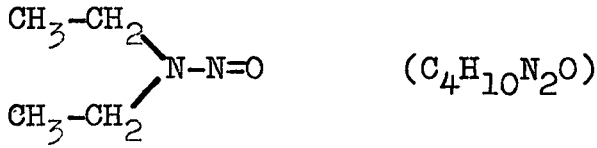
2.3.1. Dietilnitrozamin

Dialkilnitrozaminlerin bir üyesi olan ve kuvvetli mutajenik ve karsinojenik etkisi olduğu saptanan DENA, ilk kez 1863'de dietilamin ile nitroz asit'in tepkimesiyle elde edilmiştir(30).



Şekil 5 : DENA'nın Oluşum Tepkimesi

DENA'nın Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Görünüşü	: Sarı, Uçucu
Molekül Ağırlığı	: 102,12 gr/mol
Kaynama Noktası	: 176,9 °C
Kırılma İndisi	: n_D^{20} 1,4386
Özgül Ağırlığı	: D_4^{20} 0,9422
Spektroskopik Özelliği	: λ_{max} 230-332 nm
Çözünürlüğü	: Suda ve çeşitli organik çözücülerde çözünür.
Dayanıklılığı	: Oda sıcaklığında düşük pH' larda kararsız. Oda sıcaklığında alkali ve nötral pH'lardaki çözeltilerde 14 güne kadar dayanıklıdır.

Tekstil ürünlerinin hazırlanmasında, yağ ve kauçuk endüstrisinde kullanılan DENA'nın ratlarda karsinojenik ve mutajenik etkilerinin yüksek olduğu saptanmıştır(30,31,32).

DENA ve DMN gibi nitrozaminlerin kendilerinin fazla mutajenik olmadığı fakat memeli enzim sistemleri tarafından kuvvetli mutajenik ara ürünlere

metabolize edilmeleri sonucunda etkili oldukları bildirilmiştir(33). Hayvan ve insanlarda kanser oluşumu karmaşık ve çok adımlı bir işlemdir. İlk adımda karsinojen olan nitrozaminlerin metabolik enzimler yardımıyla alkilleyici özellikler kazandığı düşünülmektedir(34). Metabolik bir aldehit oluşumuyla başlar. Daha sonra alkildiazohidroksiit, alkildiazonyum katyonu ve karboanyon oluşumuyla alkilleyici ajanın oluştuğu bildirilmiştir(22).

DENA'nın fare karaciğer, akciğer ve böbrek mikrozomal fraksiyonları tarafından mutajenik ara ürünlere çevrildiği gösterilmiştir. Metabolik adımlardaki bu olaylar radyoaktif işaretli maddelerle izlenir. Farelere ^3H -DENA tek dozda verildikten 10 gün sonra karaciğer, böbrek, dalak ve bağırsaktaki bağlı ^3H -aktivitesi sırasıyla şu oranlarda bulundu ; 100 :74 : 40 : 17 bu şekilde farklı değerlerin bulunması DENA'nın kanser yapıcı özelliğinin organlara özgül olduğunu göstermektedir(35,36). Azot 15 işaretli nitrozaminler ratlara verildiğinde karaciğer proteinlerinde ve nükleik asitlerde, idrar üresinde ve plazma proteinlerinde işaretli maddeler saptanmıştır (22).

DENA uygulanan farelerin safra keselerinde hiperplazi ve böbrek tümörü oluştuğu bildirilmiştir (37). Oral olarak DENA uygulandığında hepatik karsinomalar ve çeşitli tümörler oluştuğu, tümörlerin lenf ve kan damarlarını kapladığı akciğer ve böbreklerde metastaz yaptığı gösterilmiştir(38).

DENA ile beslenen farelerde bir kaç hafta sonra DNA replikasyonunda artma olduğu ve daha sonra normal düzeye indiği bildirilmiştir. Kansere oluşumu sırasında DNA polimeraz α aktivitesinde artış olurken DNA polimeraz β aktivitesinde daha yavaş bir artış olduğu bildirilmiştir (6,39). ayrıca DENA ile başlayan kanserleşme sırasında DNA polimeraz α - β enzimlerinde ardışık dizi değişiklikleri olduğu ve DNA'yı alkillediği bildirilmiştir (7,39,40,41). DNA'nın alkillenmesi, DNA yapısında bulunan pürin bazlarından Adenin'in N-1, N-3, N-7, Guanin'in N-3, N-7, O-6, C-8 ve pirimidin bazlarından Stozin'in N-3 nolu atomlarından olduğu bildirilmiştir. DNA'nın alkillenme miktarı 7-etilguanin'in ölçümüyle tesbit edildiği ve yüksek dozlarda DENA uygulandığında O⁶-etilguanin'in, düşük dozlarda DENA uygulandığında ise N⁷-etilguanin'in olduğu bildirilmiştir (42).

DENA'nın in vitro ve in vivo ortamlarda enzim aktivitesi üzerine çeşitli etkileri olduğu bilinmektedir. DENA, sıçan karaciğer amino asit metabolizma enzimlerinden Triptofan Oksijenaz, Tirozin ve Ornitin Transferaz, Serin Dehidrataz ve Histidaz'ı inhibe ettiği gösterilmiştir(43). Başka bir çalışmada ise, maya Glukoz-6-fosfatdehidrogenaz (G6PDH) enziminin DENA tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir (44).

DENA'nın in vivo koşullarda Piruvat Kinaz ve G6PDH enzimlerini inhibe ettiği gösterilmiştir (45). In vivo koşullarda DENA'nın Na^{*}/K^{*}ATPaz enzimini aktive ettiği bulunmuştur (8).



3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Kullanılan Aletler

-- Soğutmalı Santrifüj, Beckman Model J2-21,
Başlık JA-20

-- Hematokrit Santrifüjü, NT-315, Nüve

-- Mikroskop, Euromax Arohem

-- Sıvı Sintilasyon Sayıcısı, 1212 Rackbeta
Liquid-Scintillation Counter

-- Masa Santrifejü , Hettich Eba-3S

-- Terazî, Bosch S.2000

-- Eritrosit Pipeti, Thoma İamı

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

-- Antikoagülen madde olarak liquemine (5000-
1U/ml Heparin)

-- (Hidroksimetil) amino metan (TRİS), ($C_4H_{11}NO_3$)

-- L-(2-3,³H) Valin (Stok; 1ml/ml-17,7Ci/mmol)

-- Dietilnitrozamin (DENA)

-- Saponin

-- PPO (2,4-Difenilokzazol)

-- POPOP (1,4-bis(2(5-Fenilokzazol))benzen)

ve çalışmada adı geçen diğer kimyasal maddeler Merck ve Sigma firmalarından sağlandı.

3.2.YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan kanlar gönüllü olarak kan vermek isteyen öğrencilerden sağlandı. Kanlar önceden heparinlenerek hazırlanan deney tüplerine ön kol Ven'inden alınarak +4 C°de saklandı. Örnekler aynı gün çalışıldı.

3.2.1.1. Hematokrit Değerinin Tayini

Kanın şekilli elemanlarının veya sadece eritrositlerin plazmaya oranını saptamak amacıyla yapıldı. Bir miktar kan özel kapiller tüplere alındı. Kapiller tüplerin bir ucu bek alevinde eritilerek kapatıldı. Kapiller tüpler hematokrit santrifüjine yerleştirilerek 10000 devir/dakika'da 10dk santrifüj edildi. Tüpler eseke konarak eritrosit ve plazma uzunlukları ölçüldü. Böylece eritrosit ve kandaki elemanların plazmaya oranı saptandı.

3.2.1.2. Eritrosit Sayımı Tayin Yöntemi

Özel eritrosit pipetlerine alınan taze kan Hayem çözeltisiyle 200 kez sulandırılarak sayım için hazırlandı. Hücre sayımı Thoma lamı üzerinde mikroskopun 40/0,65 konumuyla yapıldı. Sayılan kare sayısı ve sulandırma faktöründe gözönünde bulundurularak 1 mm^3 kandaki eritrosit sayısı hesaplandı.

3.2.1.3. Amino Asit Taşınımının Tayin Yöntemi

Bu yöntem, hücre içine taşınan işaretli amino asitin beta sayıcısında cpm olarak ölçülmesi prensibine dayanır.

3.2.2. Çözeltiler

1- Yıkama Çözeltisi

140 mM NaCl

5 mM MgCl₂

5 mM KCl

1 mM Na₂HPO₄ HCl

18 mM Tris (pH : 7,40 ; 25°C)

2- İşaretli Amino Asit Çözeltisi

L-(2-3,³H) Valin Stok : 1mCi/ml-17,7Ci/mmol

100µCi/ml olacak şekilde sulandırıldı.

3- Karsinojen

9,203 M Stok DENA'dan çeşitli derişimlerde yıkama çözeltisiyle sulandırılarak hazırlandı.

4- Taşınımı Durdurucu Çözeltiler

% 30 TCA (Trikloroasetik asit)

% 10mg Saponin

5- Scintilasyon Çözeltisi

% 0,4 PPO (2,4-Difenilokzazol)

% 0,01 POPOP (1,4-bis(2(5-Fenilokzazol))benzen)

Toluen'de

3.2.3. Kanın Deneyler İçin Hazırlanması

3.2.3.1. Eritrosit Sayımı ve Hematokrit Değeri

Heparinlenmiş deney tüpüne alınan kanın hema-

tokrit ve eritrosit sayımı yapıp not edildi.

3.2.3.2. Kanın Yıkama

29 x 105 mm boyutlarındaki santrifüj tüpü içine her 1ml kan için 10ml yıkama çözeltisi (140 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄, 18 mM TRIS pH :7,40 ; 25 °C) ilave edildi. Hücre içindeki amino asitlerin dışarıya çıkması için 10 dk oda sıcaklığında bekletildi Daha sonra 7500xg'de 3 dk santrifüj edildi. Dökelti atılıp pelet'e yukardaki işlem 4 kez uygulandı. Bu işlem bitince yeniden hematokrit ve eritrosit sayımı yapıp not edildi.

3.2.4. Deneyler

3.2.4.1. İnkübasyon Süresinin Amino Asit Taşınımına Etkisi

Yıkama taze kandan , yıkama çözeltisi kullanarak hematokrit değeri % 20 olacak şekilde ayarlanıp eritrosit sayımı yapıldı. 13 x 69^{mm} boyutlarındaki deney tüplerine 1ml kan alınıp üzerine 1 μ Ci/10ml L-(2-3,³H) Valin amino asidi ilave edilip karıştırıldı. 25 °C 'de farklı zaman aralıklarında (10,20, 30,40,50,60,90,120 dk) inkübe edildi. Daha sonra

3.2.4.4. 'deki taşınımı durdurma ve sayım işlemi uygulandı.

3.2.4.2. Hematokrit Değerinin Amino Asit Taşınımına Etkisi

Yıkama taze kandan, yıkama çözeltisiyle hematokrit değeri farklı (% 10-40 arasında)kan örnekleri

hazırlandı. Bu örneklerin eritrosit sayımı yapılarak not edildi. Her örnekten 1ml alınıp 13 x 69 mm boyundaki plastik santrifüj tüplerine konuldu. Her tüpe 1 μ Ci/10ml L-(2-3, 3 H) Valin amino asiti ilave edilip karıştırıldı. 20 dk 25 °C'de inkübe edildi. Daha sonra 3.2.4.4.'deki taşınımı durdurma ve sayım işlemi yapıldı.

3.2.4.3. DENA'nın Amino Asit Taşınımına Etkisi

Yıkanan taze kandan, yıkama çözeltisiyle hemotokrit değeri % 20 olacak şekilde ayarlanıp eritrosit sayımı yapıldı ve not edildi. 13 x 69 mm boyutlarındaki plastik deney tüplerine 1ml kan konuldu. Üzerine farklı derişimlerde hazırlanan (9M, 5M, 3M, 1M) DENA'lardan 100 μ lt kadar ilave edildi. Kontrolere ise DENA kadar yıkama çözeltisi ilave edildi. Bu tüpler 25 °C'de 10 dk ön inkübasyona tabi tutuldu. Bu işlemden sonra her tüpe 1 μ Ci/10ml L-(2-3, 3 H) Valin amino asidi ilave edilip karıştırıldı ve 25 °C'de 20 dk inkübe edildi. Daha sonra 3.2.4.4.'deki taşınımı durdurma ve sayım işlemi yapıldı.

3.2.4.4. Taşınımı Durdurma ve Sayım İşlemi

3.2.4.1, 3.2.4.2, 3.2.4.3, deki inkübasyon işlemlerinden sonra 13 x 69 mm boyutlarındaki tüpler 29 x 105 mm boyutlarındaki santrifüj tüplerinin içine yerleştirilip 0 °C'da 20 dk 15 000xg'de santrifüj edildi (Bu işlem amino asit taşınımını durdurmak için yapıldı). Küçük tüpler çıkarılıp dökeltiller

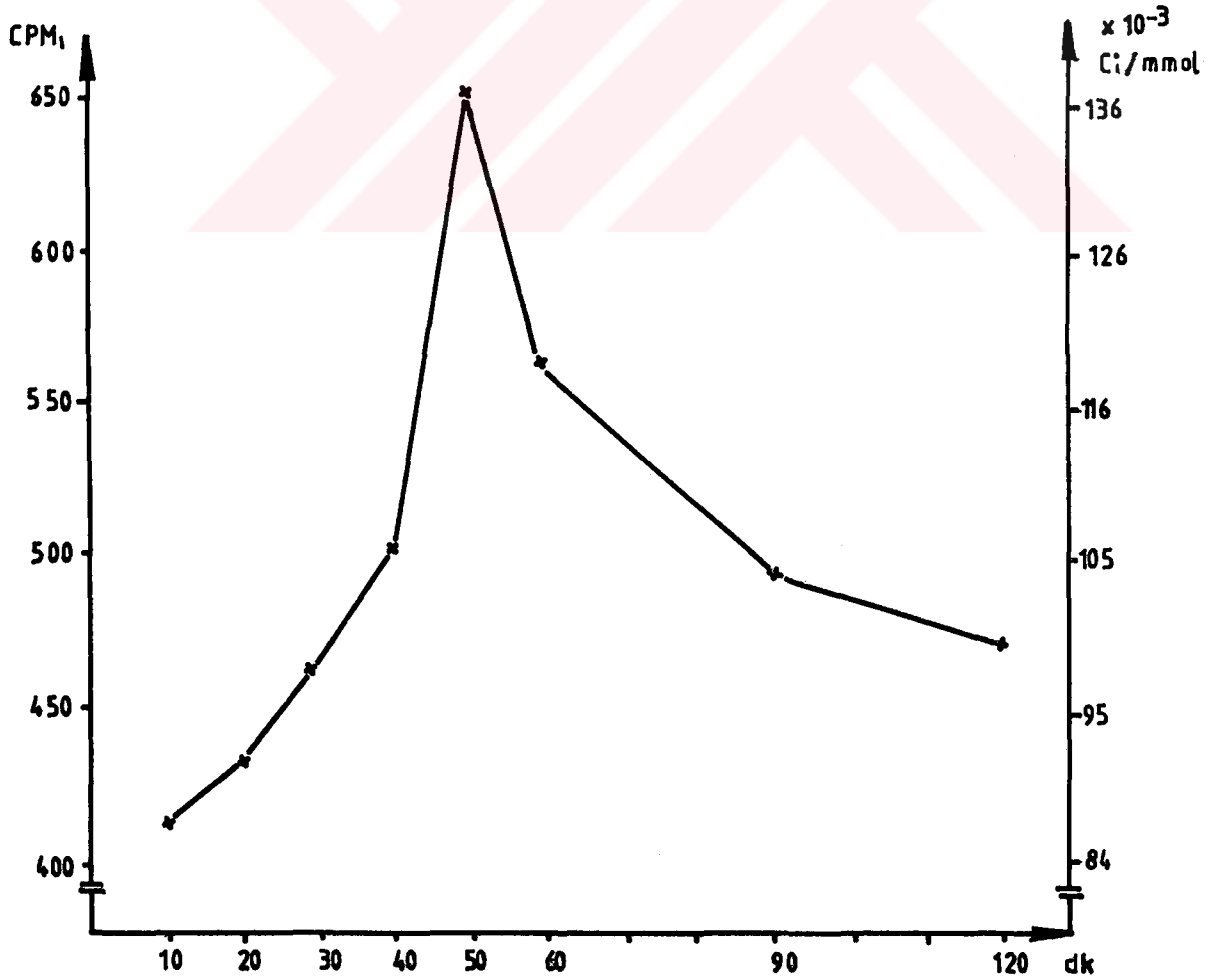
gömülme üzere biriktirildi. Tüplerdeki pelete % 10 mg'lık Saponin'den 700 μ lt, %30' luk TCA'dan 200 μ lt ilave edilip bağıtle homojenize edildi. Daha sonra 6000g de 10 dk. santrifüj edilip dökelti ayrıldı.

1212 Rackbeta Liquid Scintillation Counter'ın özel cam tüplerinden alınıp bunlara dökeltiden 500 μ lt konuldu. Üzerine 5ml sintilasyon çözeltisi (% 0,4 PFO, % 0,01 POPOP Toluen'de) ilave edilip sayıcıya verildi. Değerler yazıcı'dan cpm olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. İnkübasyon Süresinin Amino Asit Taşınımına Etkisinin Saptanması

İnkübasyon süresine bağlı olarak L-Valin amino asitinin hücre içine taşınım değerleri şekil 6'daki grafikte verilmiştir.



Şekil 6 :İnkübasyon süresinin valin amino asiti taşınımına etkisi.

50. dakikaya kadar hücre içine taşınan L-Valin amino asitinin miktarının arttığı gözlemlendi. 50. dakikadan sonra taşınımın hızla azaldığı tesbit edildi. L-Valin amino asitinin hücre içine taşınması için 20 dakika inkübasyon süresi kullanmaya karar verildi.

Hematokrit : % 20

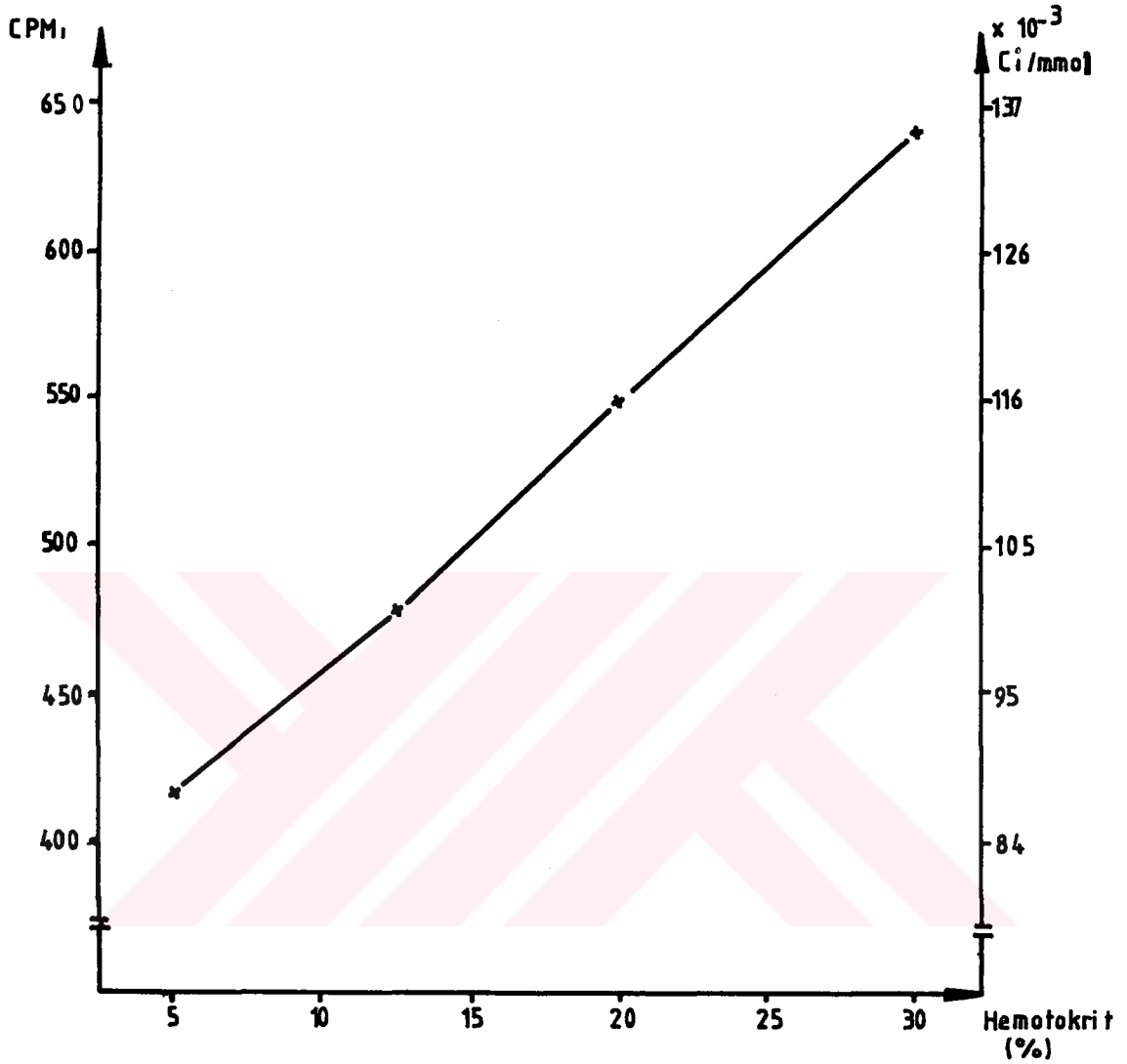
Kan sayımı : 2.290.000 adet/mm³

4.2. Hematokrit Değerinin L-Valin Amino Asit Taşınımına Etkisi Saptanması.

Hematokrit değerine bağlı olarak L-Valin amino asitinin hücre içine taşınım değerleri şekil 7'deki

Grafikte hematokrit değeri arttıkça hücre içine taşınan L-Valin amino asitinin miktarının arttığı gözlemlendi. L-Valin amino asitinin hücre içine taşınımı için %20 hematokrit değerinin kullanılmasına karar verildi.

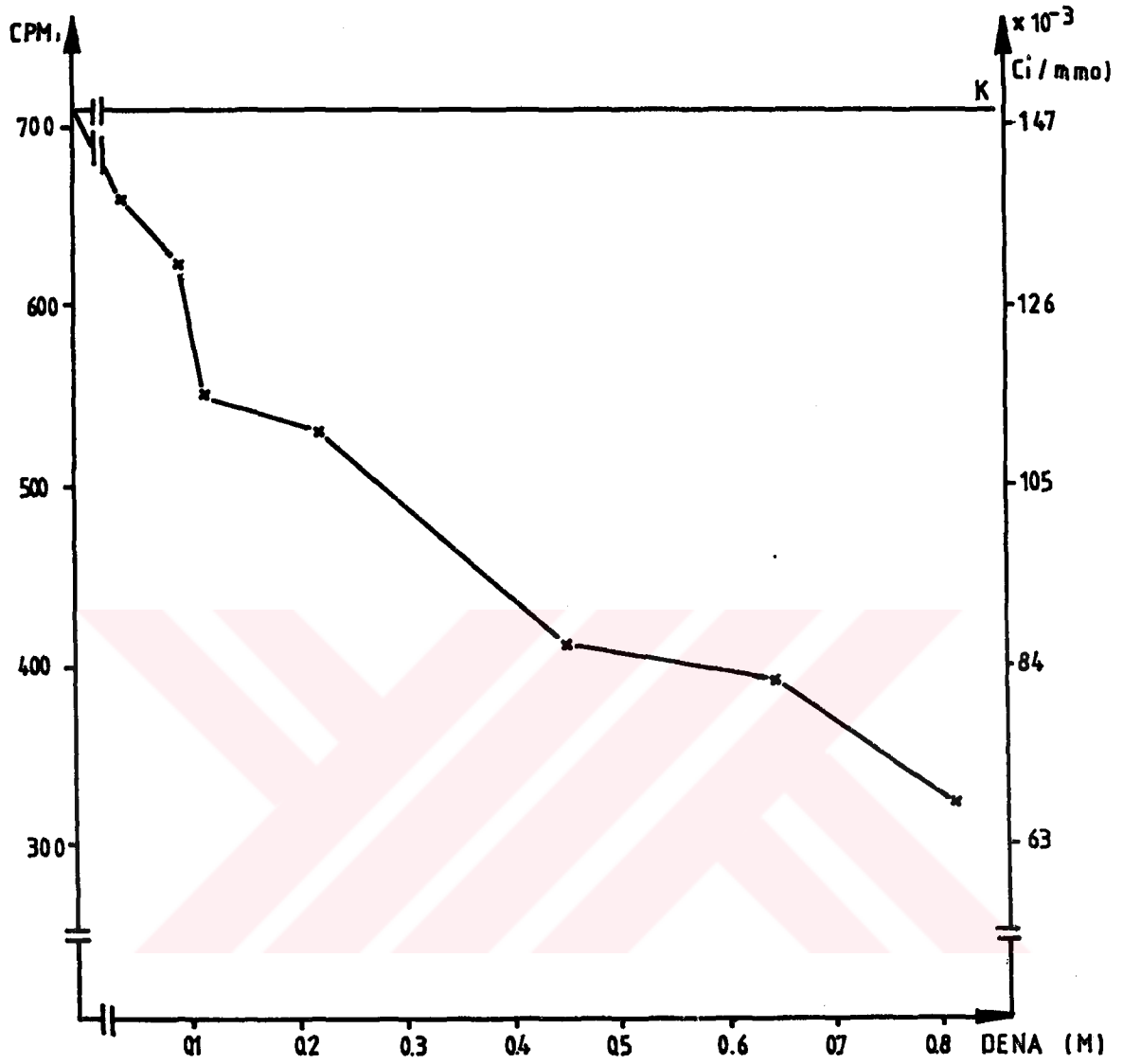
<u>Hematokrit</u>	<u>Kan sayımı (adet/mm³)</u>
% 5	860.000
% 10	1.170.000
% 20	2.310.000
% 30	4.160.000



Şekil 7 : Hemotokrit değerinin L-Valin amino asiti taşınımına etkisi.

4.3. Değişen DENA Derişimlerinin L-Valin Amino Asiti Taşınımına Etkisinin Saptanması.

Farklı derişimlerdeki DENA'nın L-Valin amino asitinin hücre içine taşınım değerleri şekil 8'deki grafikte verilmiştir.



Şekil 8 : DENA derişiminin L-Valin amino asiti taşınımına etkisi.

Grafikte DENA derişimi arttıkça hücre içine taşınan L-Valin amino asiti miktarının kontrole kıyasla azaldığı gözlemlendi.

Hemotokrit : % 20

Kan sayımı : 2.350.000 adet/mm³

4.4. DENA ile L-Valin Amino Asitinin Etkileşiminin Spektrofotometrik Yöntemle İncelenmesi.

4.4.1. DENA ile L-Valin Amino Asitinin 20 Dk İnkübasyondan Sonra Etkileşimlerinin Saptanması.

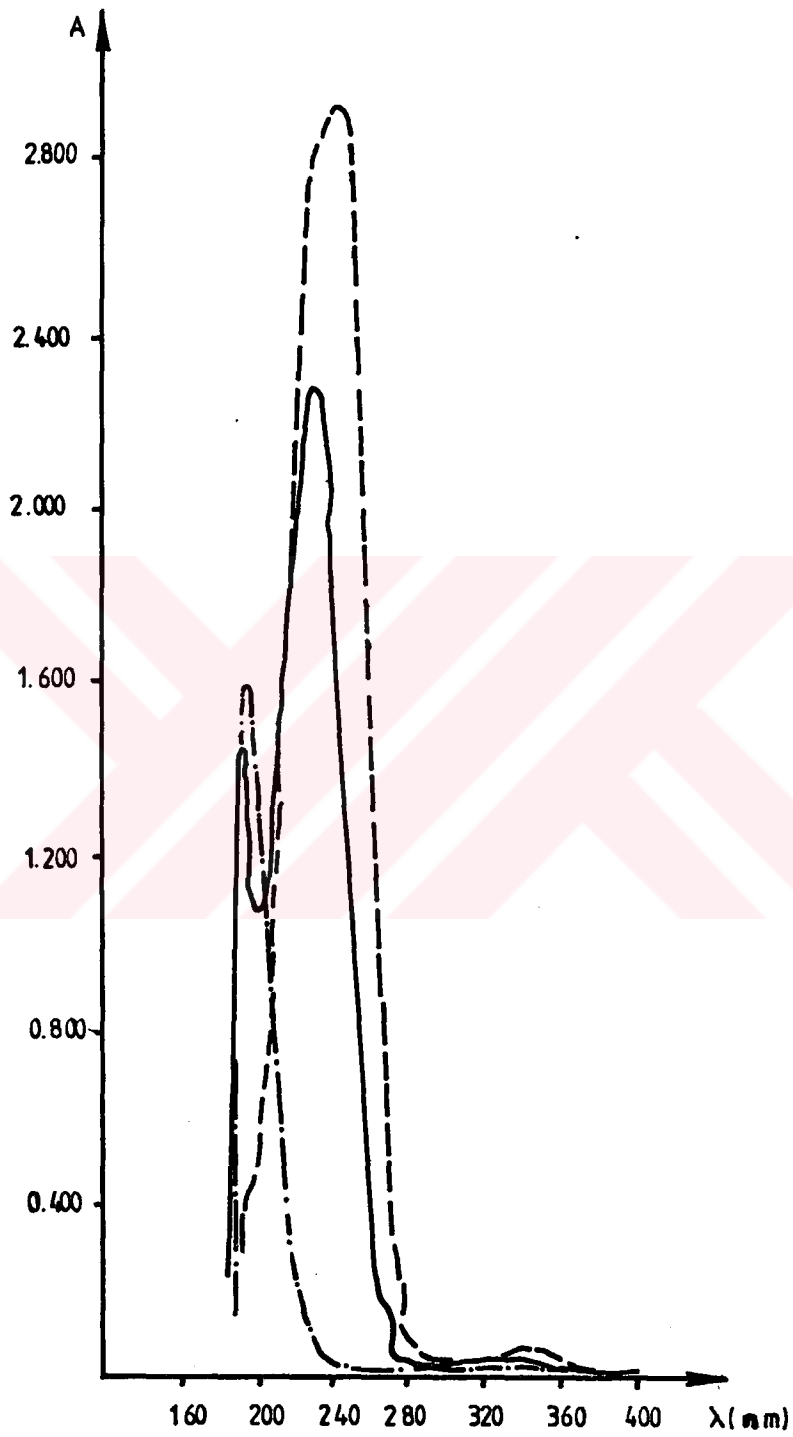
DENA ile L-Valin amino asitinin 20 dk inkübasyondan sonraki değerleri şekil 9'daki grafikte verilmiştir.

Grafikte 20 dk inkübasyon sonunda DENA ile L-Valin amino asitinin etkileşmediği gözlenmiştir.

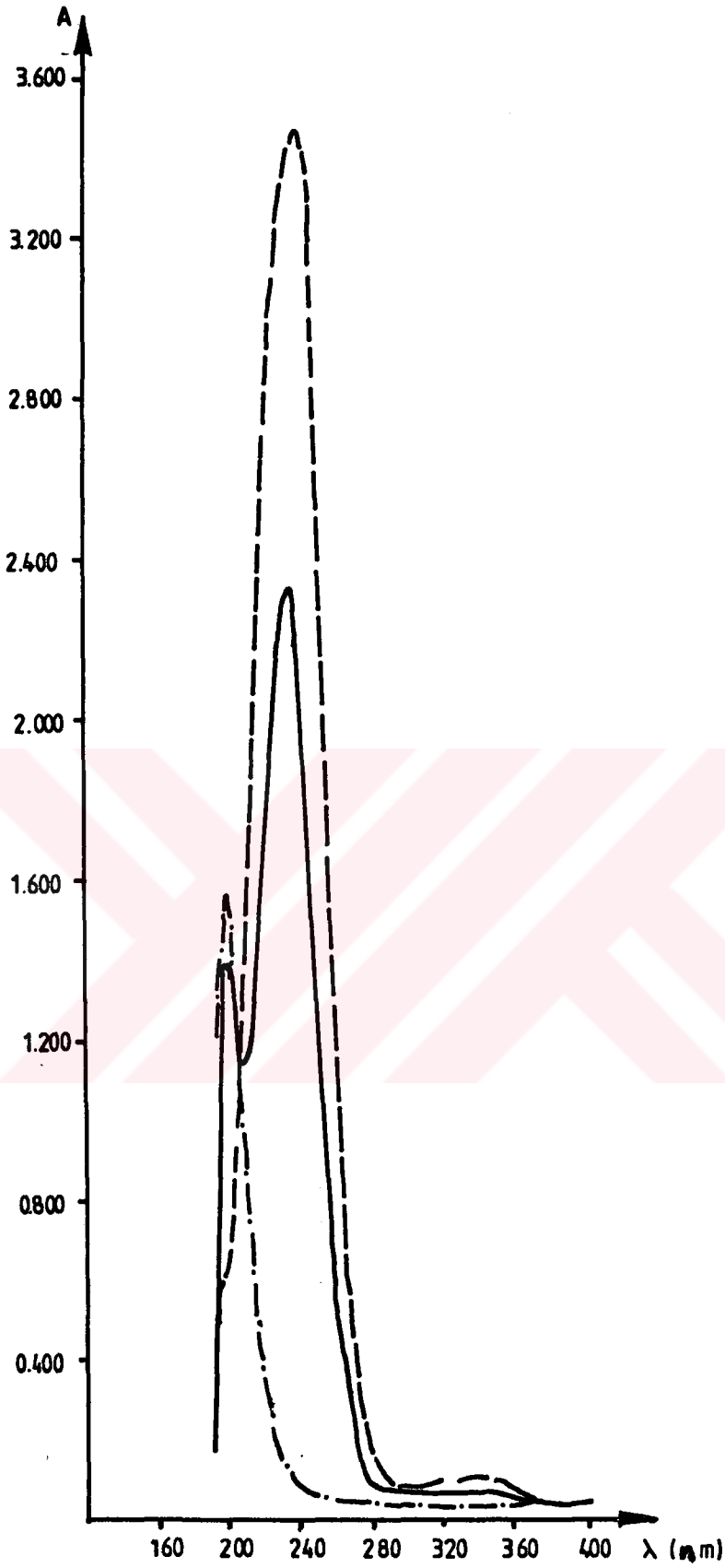
4.4.2. DENA ile L-Valin Amino Asitinin 24 Saat İnkübasyondan Sonra Etkileşimlerinin Saptanması.

DENA ile L-Valin amino asitinin 24 saat inkübasyondan sonraki değerleri şekil 10'daki grafikte verilmiştir.

Grafikte 24 saat inkübasyon sonunda DENA ile L-Valin amino asitinin etkileşmediği gözlemlendi.



Şekil 9 : DENA ile L-Valin amino asitinin 20 dk inkübasyondan sonra etkileşimi. - - - Standart DENA, - · - · - Standart L-Valin, ——— 20dk inkübe edilen karışım.



Şekil 10 : DENA ili L-Valin amino asitinin 24 saat inkübasyondan sonra etkileşimi. --- Standart DENA, -.-.- Standart L-valin, — 24 saat inkübe edilen karışım.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada , karsinojenik ve mutajenik etkileri olduğu bilinen DENA'nın insan eritrositlerinde L-Valin amino asitinin hücre içine taşınımına etkisi incelenmiştir.

Çalışmamızın ilk aşamasında inkübasyon süresinin eritrosit membranından L-Valin amino asitinin taşınımına etkisi incelendi. Hücre ortamına $1 \mu\text{Ci}/10\text{ml}$ L-(2-3, ^3H) Valin amino asiti ilave edilip farklı zaman aralıklarında inkübe edildi. Inkübasyon sonunda 50.dakikaya kadar hücre içine taşınan L-Valin amino asitinin miktarının arttığı tesbit edildi. 50. dakikadan sonra taşınımın hızla azaldığı gözlemlendi. Bu azalışın deney ortamında fazla bekletilen eritrositlerin hemoliz olmasından kaynaklandığı tesbit edildi. Bu bulguların sonucu olarak, hemolizin en az olduğu 20 dakikalık inkübasyon süresinin kullanılmasına karar verildi.

L-Valin amino asitinin taşınımı için uygun hematokrit degerinin saptanması, çalışmamızın ikinci aşamasını oluşturuyor^{du}. Farklı hematokrit degerlerinde hazırlanan her bir kan örneği L-Valin ile 20 dk inkübasyona bırakıldı. Sonuçta, hematokrit degeri artıkça hücre içine taşınan L-Valin amino asiti miktarının arttığı ve yüksek hematokrit degerlerinde eritrositlerin hemoliz olduğu tesbit edildi. Bu sonuçlardan yararlanarak L-Valin amino asitinin taşınım deneylerinde % 20 hematokritli kanın kullanılmasına karar verildi.

L-Valin amino asiti ile DENA deney ortamına aynı anda ilave edilip, 20 dk inkübasyondan sonra DENA'nın taşınımına etkisi gözlemlendi. Bu şekilde yapılan deneylerde DENA'nın L-Valin amino asiti taşınımına etkisi olmadığı tesbit edildi.

Amino asitlerin hücre içine taşınımı^{nm} kolaylaştırılmış diffüzyon veya aktif taşınım ile olduğu bilinmektedir. Kolaylaştırılmış diffüzyon veya aktif taşınımın gerçekleşmesi için taşıyıcı bir maddenin bulunduğu ve bu taşıyıcı maddenin protein veya lipoprotein yapısında olduğu bildirilmiştir. Bu taşıyıcıların amino asit grupları için özgül olduğu, ayrıca taşıyıcıda amino asitlerin bağlanması için aktif merkezler bulunduğu ve bu aktif merkezlerin amino asitler için stereoözgül olduğu bildirilmiştir. Yan zincirleri benzer özellik taşıyan amino asitlerin aynı sistem

tarafından taşındığı bildirilmiştir (11,13,14,18,21).

Amino asit taşınımında taşıyıcı bir sistemin varlığı bilinmektedir. Bu bilgiler ışığında , taşınım olayının ilk aşamasında DENA ile taşıyıcıyı etkileştirmeyi düşündük. Bu amaçla ilk önce deney ortamına L-Valin ilavesinden önce DENA ilave edilip 10 dk ön inkübasyon yapıldı. Ön inkübasyondan sonra ortama L-Valin ($1 \mu\text{Ci}/10\text{ml}$)ilave edilip 20 dk inkübasyon yapıldı. Sonuçta, DENA'nın L-Valin'in hücre içine taşınımını, kontrolle kıyaslandığında, inhibe ettiği saptandı. İnhibisyonun tesbitinden sonra farklı DENA derişimlerinin L-Valin taşınımına etkisi incelendi. Sonuçta, DENA derişimi arttıkça hücre içine taşınan L-Valin amino asitinin miktarının kontrole kıyasla azaldığı tesbit edildi.

DENA'nın memeli sistemler tarafından metabolize edilerek oldukça reaktif olan elektrofilik ara ürünlere dönüştüğü bildirilmiştir (24,33,46,47). Bu ara ürünlerin makromoleküllerdeki nükleofilik bölgelere saldırarak bu bölgelerde alkilasyona sebep olduğu tesbit edilip DNA'yı alkillediği ve buna bağlı olarak RNA ve Protein Sentezini inhibe ettiği saptanmıştır (7,42,48).

DENA'nın aromatik amino asitler, Sistein ve Methiyonin gibi SH grubu içeren amino asitlerle etkileşimi İnce-Tabaka Kromatografi yöntemi ile incelenmiş ve DENA ile inkübe edilen amino asitlerin

standartlara kıyasla farklı pikler verdiği saptanıp DENA'nın amino asitlere bağlanabileceği bildirilmiştir (10). Ayrıca NMOR'nin aromatik amino asitlerle etkileştiği saptanmıştır (9). DENA'dan oluşan ara ürünlerdeki elektrofillerin proteinlerdeki çeşitli nükleofilik atomlarla kovalent bağlar yaptığı saptanmıştır. Proteinlerde DENA'nın bağlanabileceği nükleofilik atomların Methiyonin'in ve Sistein'in kükürt, Histidin'in halka azotu ve Tirozin'in üçüncü karbon atomu olduğu saptanmıştır (49,50).

Nitrozaminlerin amino asitlerle etkileşimi canlı sistemlerde bir çok işlevsel bozukluklara yol açacaktır. Enzim yapısında bulunan proteinlerdeki amino asitlere bağlanarak enzimlerin aktivitesini azaltarak işlevini engelleyecektir. Serbest amino asitlerle etkileşerek protein sentezinde hatalara yol açarak oluşan proteinlerin fonksiyonlarını yapmasını engelleyebilecektir.

DENA'nın L-Valin amino asitinin hücre içine taşınımını inhibe etmesinin iki şekilde olabileceği düşünülmektedir; Bunlardan ilki ; Taşınan L-Valin amino asitini DENA'nın elektrofilik ara ürünleriyle alkillemesi sonucu taşıyıcı protein veya lipoprotein'in alkillenmiş amino asiti tanımaması, yani amino asitin taşıyıcının aktif merkezine bağlanamayacak bir konuma gelmesi sonucu olarak düşünülebilir. Fakat bilindiği gibi L-Valin nötral bir amino asittir

ve yan zincirde nükleofilik bir bölgesi yoktur. Ayrıca, DENA'da matabolize edilmiş değildir. Bu nedenle L-Valin amino asitinin DENA ile etkileşebileceği tezi zayıflamaktadır. Bu düşünceyle DENA ile L-Valin amino asitinin in vitro etkileşimi spektrofotometrik yöntemle incelenmiştir. 25 °C de 20 dk ve 24 saat olmak üzere iki zaman aralığında DENA ve L-Valin inkübe edildi. Sonuçta, iki zaman aralığında da DENA'nın L-Valin amino asitiyle etkileşmediği tesbit edildi. İkinci düşünce ise ; DENA'nın taşıyıcıyı alkillemesi sonucu taşınımın engellenmiş olabileceği şeklindedir. Bu alkilasyon, taşıyıcı maddenin (protein veya lipoprotein) amino asiti taşımak için bağlandığı aktif merkezdeki amino asitlerin nükleofilik hedeflerinin alkillenmesi sonucu işlevini yapamaz hale gelmesiyle olabileceğidir.

L-Triptofan taşınımının 0,25 mM Phloretin tarafından kuvvetle inhibe edildiği bildirilmiştir. Ayrıca L-Triptofan taşınımının SH-Reaktif olan 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzen ve Amino-Reaktif olan N-Ethylmaleimide ve P-Kloromerküfenilsülfonat ile kuvvetle (%80-95) inhibe edildiği, diğer bir Amino-Reaktif olan 5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoik asit ile orta kuvvette (%25) inhibe edildiği, diğer taraftan özgül anyon taşınımı inhibitörü olan 4-Acetamido-4-isothiocyanono 2-2 stibene disülfonat ile de inhibe edildiği saptanmıştır (51). Nitrozaminlerle yapılan çalışmalar-

da önemli bir nitrozamin olan DENA'nın enzim aktiviteleri üzerine çeşitli etkileri olduğu bildirilmiştir. DENA verilen sıçanların karaciğer Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin kontrole kıyasla 2 ayda 2,5 kat artışı saptanmıştır(52). Diğer bir çalışmada ise, in vivo koşullarda DENA'nın Na^+/K^+ ATPaz enzimini % 77 oranında aktive ettiği bulunmuştur(8). Sıçanlara DENA uygulanmasından 4-6 hafta sonra karaciğer de hiperplastik hücre adacıkları oluşmuş, ATPaz kaybı ve Glutamin Transpeptidaz'ın artışı saptanmıştır(53).

Başka bir çalışmada ise, DENA uygulanan farelerin karaciğer'indeki Sitraz Sentaz aktivitesi zamanla azalırken Laktat Dehidrogenaz aktivitesinde artış olduğu saptanmıştır(54). DENA'nın in vitro olarak Laktat Dehidrogenaz'ı inhibe ettiği saptanmıştır(55). Diğer bir çalışmada ise, DENA verilen farelerde karaciğer dokusundaki Glukoz-6-fosfataz, Aspartat Transaminaz ve Alanin Transaminaz aktivitelerinin kontrole kıyasla azaldığı, Alkalin Fosfataz aktivitesinin ise arttığı saptanmıştır(56).

Yukarda bahsedilen çalışmalarda DENA'nın enzimlerin görevlerini yapmalarını engellediği anlaşılmaktadır. Bu engellemenin DENA'nın alkilleyici özelliğinden ileri geldiği saptanmıştır. Enzimlerin DENA tarafından alkillenerek inhibe olması elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir. Yani protein veya lipoprotein yapısındaki taşıyıcı maddelerin alkillenme-

siyle L-Valin amino asitinin hücre içine taşınımı inhibe edilmiştir.

Böylece, doğada yaygın olarak bulunan DENA'nın nükleik asitleri alkilleyerek mutasyonlara neden olması yanı sıra, taşıyıcı sistemlerdeki taşıyıcı proteinlere bağlanarak taşınma sistemlerini de inhibe edebileceği gösterilmiş olmaktadır.



6. ÖZET

Bu çalışmada mutajenik ve karsinojenik etkileri olduğu bilinen dietilnitrozaminin insan eritrosit membranında L-Valin amino asiti taşınımına etkisi incelendi.

İnkübasyon süresi için yapılan deneyler sonucunda 20 dk seçildi. 50. dk üzerinde hemoliz olayından dolayı hücre içine taşınan L-Valin miktarında azalma olduğu gözlemlendi. Kullanılan kan numunelerinde hematokrit değeri arttıkça taşınımın arttığı bulundu. Bütün deneyler % 20 hematokrit değerli kanlar kullanılarak standart bir ortam sağlandı.

DENA derişiminin amino asit taşınımına etkisini belirlemek için yapılan çalışmalarda DENA'nın derişimi arttıkça hücre içine taşınan L-Valin miktarının kontrollere kıyasla azaldığı başka bir deyişle DENA'nın L-Valin'in hücre içine taşınımını inhibe ettiği saptandı. Bu inhibisyonun, L-Valin'in DENA ile bağlanmasıyla değil, DENA'nın taşıyıcı sistemdeki proteini alkillemesiyle oluşabileceği gösterildi.

7. SUMMARY

THE EFFECT OF DENA ON L-VALIN AMINO ACID TRANSPORT FROM THE HUMAN ERYHROCYTE MEMBRANE

In this work, it has been attempted to investigate the effect of DENA, known to have mutagenic and carcinogenic effect, on L-Valin amino acid transport from the human erythrocyte membrane.

As a result of experiments conducted, a 20-min. incubation period was selected. In incubations over 50-min., a decrease was observed in the amount of L-Valin transported into the cell due to hemolysis. It was noted that the transport increased with the increase of hemotocrite values of the blood samples used. A standard medium was secured by using blood with 20 hemotocrite values in all the experiments.

In investigations made to determine the effect of DENA concentration on amino acid transport, it was established that with the increase of DENA concentration, L-Valin amount transported into the cells decreased when compared to that of the controls, in other words DENA inhibited intracellular transport. It was demonstrated that this inhibition could have occurred not because of L-Valin binding with DENA but may have rather from DENA's alkylation of protein in the transport system.

8. KAYNAKLAR

- 1. Fine, D. H., Rounbehler, D. P., Pellizzari, E. D. et al : N-nitrosodimethylamine in air. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 15:739-746, 1976.
- 2. Scanian, R. A. : N-nitrosamines in Foods. Crit. Rev. Food. Technol., 5: 357,1975.
- 3. Galea, V., Preda, N., Popa, L., Simu, G. : Experimental Production of Nitrosamines In Vivo. Bogovski, P., Walker, F.A.(ED.). I.A.R.C. Scientific Publ., No: 9, N-Nitroso Compounds in the Environment. Lyon, France, 115, 1973.
- 4. Lijinsky, W., Eipstein, S.S. : Nitrosamines as Environmental carcinogens. Nature, 225:21-23, 1975.
- 5. Morrison, J.B. and Hecht, S.S. : A Sensitive New Method for the Detection of N-Nitrosomorpholine Formation In Vivo. Can. Res., 44 (7), 2873-2877, 1984.
- 6. Craddock, U., Ansley, M.: Sequential changes in DNA polymerase- α and β during DENA induced carcinogenesis, Biochim. Biophys.Acta, 564, 15-22, 1979.

- 7. 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.
- 8. Çetinkaya, Ö. : Bazı Nitrozaminlerin Fare Karaciğer Na/K ATPaz Enzimi Üzerindeki Etkileri ve Bağlanma Özellikleri. Doktora Tezi, C.Ü. Sağ. Bil. Ens. Biyokimya Ana Bilim Dalı., Sivas-1988.
- 9. Çetinkaya, S. : N-Nitrozomorfolin'in Malat Dehidrogenaz Enzimi Üzerindeki İn Vivo ve İn vitro Etkileri. Doktora Tezi. C.Ü.Sağ. Bil. Ens. Biyokimya Ana Bilim Dalı., Sivas-1988.
- 10. Çelik, K. : Aromatik Amino Asitler ve Kükürt içeren Amino Asitlerin DENA ile etkileşiminin İnce-Tabaka Yöntemi ile İncelenmesi. Y. Lisans Tezi., C.Ü. Sağ. Bil. Ens. Biyokimya Ana Bilim Dalı., Sivas-1989.
- 11. Arthur, C. Guyton. :Transport Thorough the Cell Membrane. Medical Physiology, Chap.14, 40-53 W.B. Saunders Company, 1974.
- 12. Mentş, N. K. : Membrandan Taşınım, Harper'ın Biyokimyaya Bakışı, Bölüm32 E. Ü. Basınevi 613-616, 1988.
- 13. Zubay, G. : Biological Membranes:Transport, Biochemistry, Chap. 17, 621-656, Addison-Westey Pub. Co. , 1983.
- 14. Noyan, A. : Membran Transportlarının Çeşitli Tipleri, Aktif Transport ve Membran Biyokimyası., Fizyoloji Ders Kitabı, A. Ü. Yayinevi, 9-22,1984.

- 15. White, A., Handler, P., et al. : Transport : Principles of Biochemistry., Chap. 14, 302-314, Seventh Edition, 1985.
- 16. Arthur, C. Guyton. : Transport and Storage of amino Acid : Aktive Transport of Amino Acid in to the Cell., Medical Physiology Chap. 69., 930-931, W.B. Saunders Company, 1974.
- 17. Newholme, E.A., Leech, A.R. : Amino Acid Metabolism : Transport of Amino Acid into Cell. Biochemistry for the Medical Sciences., Chap. 10, 398-400, 1986.
- 18. Rosenberg, R. : Na-Independent and Na-Dependent Transport of Neutral Amino Acids in the Human Red Blood Cell., Acta Physiol Scand. 116:321-330, 1982.
- 19. Rosenberg, R. : Amino Acid Transport in Human Red Blood Cells., Acta Pschiatr.Scand. 78:25-28, 1988.
- 20. Rosenberg, R. : L-Leucine Transport in Human Red Blood Cells: A Detailed Kinetic Analysis., J. Membrane Biol., 62:79-99, 1981.
- 21. Arthur, C. Guyton. : Digestion and Absorption in the Gastro Intestinal : Basic Mechanisms of Amino Acid Transport., Medical Physiology. Chap. 65:890-891, 1974.
- 22. Magee, P. : Metabolism of Nitrosamines : Microsomes, Drug Oxidations and Chemical Carcinogenesis., by Coon, M. Academic Press. Inc ., 2:1081-1092, 1979.
- 23. Lijinsky, W. : Reaction of Drug with Nitrous Acid as a Source of Carcinogenic Nitrosamines.

- Cancer Research., 34:255-258, 1974.
- 24. Mc Cann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, N.B. : Detection of Carcinogens as Mutagens in the Salmonella/Micosome Test : Assay of 300 Chemicals. Proc. Nat. Acad. Sci., 72:5135-5139, 1975.
 - 25. Gough, T.A., et al. : An Examination of Foodstuffs for the Presence of Volatile Nitrosamines. J.S.F.A., 28:345-351, 1977.
 - 26. Cooney, R.V., Ross, P.D., Bartolina, G.L., Romseyer, J. : N-Nitrosamine Formation : Factors Influencing the Aqueous Reaction of Nitrogen Oxide with Morpholine. Environ. Sci Technol., 21:77-83, 1987.
 - 27. Brunnemann, K.D., Yu, L., Hoffman, D. : Assesment of Carcinogenic Volatile N-Nitrosamines in Tobacco and in Mainstream and Sidestream Smoke from Cigarettes. Cancer Research., 37:3218-3222, 1977.
 - 28. Spahilamani, A., Chadna, M., Bhidi, S., Pratap, A Nair, J. : Detection of Nitrosamines in the Saliva., of Habitual Chewers of Tobacco., Food and Chem. Toxicol., 22(4), 261-264, 1984.
 - 29. Andrews, A.W., Lijinsky, W., Snyder, S.W. : Mutagenicity of Amino Drugs and Their Products of Nitrosation. Mutation Research., 135:105-108, 1984.
 - 30. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Human. A.R.C.L. 17:125-175, 1978.
 - 31. Adler, I.D.; Review of the Coordinated Research Effort on the Comparison of Test Systems for the Detection of Mutagenic Effects. Sponsored by the E.E.C.

- Mutation Research., 74:77-93, 1980.
- 32. Dennis. S., Meldine, A., Farber, E. :Rapid Emergence of Carcinogen Induced Hyperplastic Lesion in a New Model for the Sequential Analysis of Liver Carcinogenesis. Am.J.Pathol., 88:597-610, 1977.
 - 33. Malling, H.V., Frantz, C.N. :Metabolic Activation of Dimethylnitrosamine and Diethylnitrosamine to Mutagens. Mutation Research., :25:176-186, 1974.
 - 34. Weisburger, J. : Liver Cells Carcinogen Metabolism and Mechanism of Action., Ann.New York Acad. Sci., 5:228-231, 1980.
 - 35. Weckes, U., Gletten, F., Brusick, D. : Conversion of DENA and DMNA to Mutagenic Metabolites By Microsomal Fractions from Liver, Lung and Kidney Tissues of 4 Mouse Strainnes., Mut. Res. Sect. Environ. Mutagenesis Relat. Subs. 26:453, 1974.
 - 36. Rojewsky, M., Douber, W. : Liver Carcinogenesis by DENA in the Rat., Science. 152:83-85, 1966.
 - 37. Smith, G., Deluce, C. : A Model of Bile Duct Hyperplasion in the Rat Induced by DENA and Selective Cytotoxicity., Pathology. 16:396-400, 1984.
 - 38. Argus, M., Ligeti, C. :Induction of Malignant Tumors in the Guinea. Pig by Oral Administration of DENA., JNCI. 80:533-544, 1968.
 - 39. Swann, P.F., Magee, F.N. : Nitrosamine-Induced Carcinogenesis. Biochem.J. 110:39-47, 1986.

- 40. Stumpf, R., Margison, G.P., Montesano, R., Pegg, A. E. : Formakion and Loss of Alkylated Purines from DNA of Hamster Liver After Administration of DMN. Cancer Res. 39:50-54, 1979.
- 41. Mendoza-Figureoa, T., Lopez-Revilla, R., Villa-Trivino, S. : Dose-Dependent DNA Ruptures Induced by the Procercinogen dimethylnitrosamine on Primary Rat Liver Cultures., Cancer Res. 39:3254-3257, 1979 .
- 42. Pegy, E., Balog, B. : ~~Formtion~~^{Formation} and Subsequent Excision of O⁶-Ethylquanine from ow Rat Liver Following Administration of DENA., Can. Res., 39:5003-09.1979.
- 43. 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., Can. Res., 35:1075-1084, 1975.
- 44. Atalay, A., Aker, A. : Maya Glukoz-6, fosfat Dehidrogenazın Dietilnirozamin Tarafından inhibisyonu. Doğa Tu. Tıp ve Ecz. Der. 11:8-12, 1987.
- 45. Bakır, S. : N-nitrozodietilaminin ve Kararlı Metaboliti olan Asetaldehit'in Pürüvát Kinaz ve Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz Enzimleriyle In Vitro Etkileşimi. Doktora Tezi., C.Ü. Sağ. Bil. Ens. Biyokimya Ana Bilim Dalı ., Sivas-1988.
- 46. Bartsch, H., Malaveille, C., Montesana, R. : In Vitro Metabolism and Microsome-Mediated Mutagenicity of Dialkylnitrosamines in Rat, Hamster and Mouse Tissues., Cancer Res., 35:644-651, 1975.

- 47. Phillips, J.C., Lake, B.G., Minski, M.J., Gangolli, S.D., Lloyd, A.G. : Studies on the Metabolism of Diethylnitrosamine in the Rat. , Biochem.Soc. Tran.
- 48. Matte, E., Delpion, A., Ferrini, U. : Protein Synthesis Inhibition Induced by Dimethylnitrosamine and Diethylnitrosamine on Isolated Rat Hepatocytes., Experienta., 35:213-215, 1979.
- 49. Miller, A., Miller, E. : Metabolic Activation and Reactivity of Chemical Carcinogens., Mutation Research 33:25-26, 1975.
- 50. Miller, E., Miller, A. : The Metabolism of Chemical Carcinogens to Reactive Electrophiles and their Possible Mechanism of Action in Carcinogenesis., Cecil C. (ed), Chem.Car. ASC Mon.Wash. 737-762, 1976.
- 51. Rosenberg, R. : A Kinetic Analysis L-Tryptophan Transport in Human Red Blood Cells. Biochem.Biophys. Acta ., 649:262-268, 1981.
- 52. Türközkan, N. : Karsinojen Madde Verilmiş Sıçanların Karaciğer Hücre Zarlarındaki Bazı Biyokimyasal Değişiklikler., Doçentlik Tezi., A.İ.T.İ.A., Dış Hekimliği Fak., Ankara-1982.
- 53. Schieferstein, G., Pirschel, J., Frank, W. : Quantitative Studies on the Irreversible Loss of two Enzyme Activities in the Rat Liver. Application of DENA . Z. Krebsforsch. 82:191-208, 1974.
- 54. Özkurt, M. : Karsinerojen Madde Verilmiş Farelerin

Karaciğer Hücrelerinde Biyokimyasal Değişiklikler.,
Gazi Üni. Tıp Fak., Biyokimya Anabilim Dalı., Bilim
Uzmanlığı Tezi , 1985.

- 55. Atalay, A. : Nitrozolu Bileşiklerin Sıçan Kara-
ciğer LDH Enzimine İn Vitro Etkileri. C. Ü. Tıp Fak.
Dergisi., 3(3-4), 208-214, 1981.
- 56. Giuliani, E., Zaki, F., Hall, J. : Serum and He-
patic Enzyme Activity in Rats Treated with DENA.
Toxicol. Pathol. ,11(1), 23-27, 1983.

ÖZGEÇMİŞİM

1966 yılında Sivas'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Sivas'da tamamladım. 1988 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden mezun oldum. Aynı yıl Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladım ve devam etmekteyim.

Yavuz SİLİĞ

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi