

5514

T. C.

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

SİGARA NİTROZAMİN FRAKSİYONLARININ
BAZİ MITOKONDRI SİTOKROMLARINA ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ferda (GÜRLEYÜK) CANDAN

SİVAS

OCAK - 1989

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE;

İş bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : ..Prof.Dr..Atilla.ATALAY

Üye : ..Doç.Dr..Refik.ÖZKAN

Üye : ..Doç.Dr..Selih.CENGİZ

Üye :

Üye :

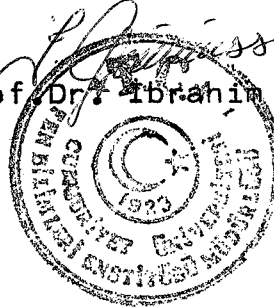
ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.25./.1../1989

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Prof.Dr. İbrahim GÜMÜŞSUYU



T E Ő E K K Ü R

Bu alışma süresince, yetişmemde, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, danışman hocam Doç.Dr.Salih CENGİZ'e teőekkür ederim.

Ayrıca çok değerli yardımlarından dolayı Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Atilla ATALAY'a teőekkürlerimi sunarım.

KISALTMALAR

cyt	: Sitokrom
DENA	: Dietilnitrozamin
DMN	: Dimetilnitrozamin
HPLC	: Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi
MENA	: Metiletilnitrozamin
NAB	: Nitrozoanabazin
NAtB	: Nitrozoanatabin
NNA	: 4-(N-metil-N-Nitrozamin)-4-(3-Piridil)Butanol
NNAL	: 4-(metilnitrozamin)-1-(3-Piridil)-1-butanol
izo-NNAL	: 4-(metilnitrozamin)-4-(3-Piridil)-1-butanol
NNK	: 4-(metilnitrozamin)-1-(3-Piridil) -1-butanon
NNN	: Nitrozonornikotin
NPyr	: Nitrozoprolidin

ÇİZELGELERİN ve ŞEKİLLERİN LİSTESİ

ÇİZELGE-1: Sigara Dumanı DENA ve DMN Derişimleri	21
ÇİZELGE-2: Sitokrom c ile (A) Uçucu ve (B) Uçucu Olmayan Sigara Nitrozaminlerinin Etkileşiminde 37°C deki İnkübasyon Zamanının Etkisi	22
ÇİZELGE-3: Sitokrom c'ye (A) Uçucu ve (B) Uçucu Olmayan Sigara Nitrozaminlerinin Etkisi	24
ÇİZELGE-4: Sitokrom c'ye Değişik Miktardaki DENA ve DMN'in Etkisi	26
ŞEKİL - 1: Tütün Spesifik N-Nitrozaminlerin Oluşumu	8
ŞEKİL - 2: Memeli Sitokrom c'sinin Üç Boyutlu Yapısı	12
ŞEKİL - 3: Sigaraların İçirildiği Yarı Otomatik İçici Düzeneği	15
ŞEKİL - 4: Sigara Dumanı Uçucu Nitrozaminlerinin HPLC Kromatogramı	19
ŞEKİL - 5: Standart DENA ve DMN'nin HPLC Kromatogramları	20
ŞEKİL - 6: Sigara Dumanı Uçucu Olmayan Nitrozaminlerinin HPLC Kromatogramları	21
ŞEKİL - 7: Sitokrom c ile Uçucu Sigara Nitrozaminlerinin Etkileşmesi İçin İnkübasyon Zamanının etkisi	23

ŞEKİL - 8: Sitokrom c ile Uçucu Olmayan Sigara Nitrozaminlerinin Etkileşmesi İçin İnkübasyon Zamanının Etkisi	23
ŞEKİL - 9: Sitokrom c'ye Uçucu Sigara Nitrozaminlerinin etkisi	25
ŞEKİL -10: Sitokrom c'ye Uçucu Olmayan Sigara Nitrozaminlerinin Etkisi	25
ŞEKİL -11: Sitokrom c'ye DENA ve DMN'in Etkisi	26
ŞEKİL -12: Sigara Dumanı Uçucu Nitrozaminlerinin Absorbsiyon Spektrumları	29
ŞEKİL -13: Sigara Dumanı Uçucu Olmayan Nitrozaminlerinin Absorbsiyon Spektrumları	30
ŞEKİL -14: Mitokondri Fraksiyonunun Absorbsiyon Spektrumu	31
ŞEKİL -15: Mitokondri Fraksiyonu ile İnkübe Edilmiş Uçucu Sigara Nitroz Aminlerinin UV-VIS Fark Spektrumları	32
ŞEKİL -16: Mitokondri Fraksiyonu ile İnkübe Edilmiş Uçucu Olmayan Sigara Nitrozaminlerinin UV-VIS Fark Spektrumları	33
ŞEKİL -17: Sitokrom c ve Sitokrom c ile Uçucu Sigara Nitrozaminlerinin Etkileşim Absorbsiyon Spektrumu	34
ŞEKİL -18: Sitokrom c ile Uçucu Sigara Nitrozaminlerinin Etkileşimlerinin UV-VIS Fark Spektrumları	35

ŞEKİL - 19: Sitokrom c ile Uçucu olmayan Sigara Nitrozaminlerinin Etkileşimlerinin UV-VIS Fark spektrumları	36
ŞEKİL - 20: Sitokrom c ve Sitokrom c ile DENA ve DMN'nin Etkileşimlerinin Absorbsiyon Spektrumu	37



İÇİNDEKİLER

Sayfa

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	
2.1.Nitrozaminler	3
2.2.Sigara Nitrozaminleri	7
2.3.Sitokrom C	11
3. DENEYSEL TEKNİK	
3.1.Kullanılan maddeler	14
3.2.Kullanılan Yöntemler	14
3.2.1. Sigara Dumanındaki Nitrozaminlerin Elde Edilmesi.....	14
3.2.2. Sigara Dumanındaki Nitrozaminlerin HPLC ile Saptanması	16
3.2.3. Rat Karaciğer Mitokondrilerinin İzolasyonu	16
4. BULGULAR	
4.1. HPLC Kromatogramlarından Elde Edilen Bulgular.....	18
4.2. Sitokrom c'nin Sigara Nitrozaminleri İle Etkileşmesi İçin Optimum Koşullar.	22
4.2.1. İnkübasyon Zamanının Etkisi.....	22
4.2.2. Sigara Nitrozaminlerinin Etkisi...	24
4.2.3. Sitokrom c'ye DENA ve DMN'nin Etkisi	26
4.3. Spektrofotometrik Bulgular.....	27
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	38
6. ÜZET.....	43
7. SUMMARY	45
8. KAYNAKLAR.....	47

1.GİRİŞ VE AMAÇ

1950'li yıllardan beri polisiklik karbonlar, aromatik aminler, azo bileşikleri ve nitrozaminler gibi pek çok karsinojenlerin hedef dokudaki proteinlere kovalent bağla bağlanarak, insan ve hayvanlarda kanser oluşturdıkları bilinmektedir. Protein ve nükleik asitlerin nükleofilik yani elektronca zengin kısımları, kimyasal karsinojenlerinin veya metabolitlerinin hedefini oluşturmaktadır.(1,2)

Sigara dumanının insan sağlığına yaptığı zararları saptamak üzere yapılan çalışmalar, sigara dumanının pek çok kanserojen maddenin kaynağı olduğunu çok açık bir biçimde ortaya koymuştur.

Tütün ve sigara dumanı, nitrozaminler için önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Tütün spesifik nitrozaminleri tütün alkaloidlerinin türevidir ve sigara bağımlı kanser oluşumundan sorumludurlar.(3)Yapılan çalışmalarda sigaranın akciğer, larynx, esophagus ve mesane kanserlerine neden olduğu, bu oluşumun alkol tüketimi ile arttığı saptanmıştır(4). Tütün ürünlerinin, tüm kanser ölümlerine katkısı % 30 dolayındadır(5).

Ülkemizde, çevre ve insan sağlığı bakımından zararlı olan sigaranın üretiminin yanında tüketimide

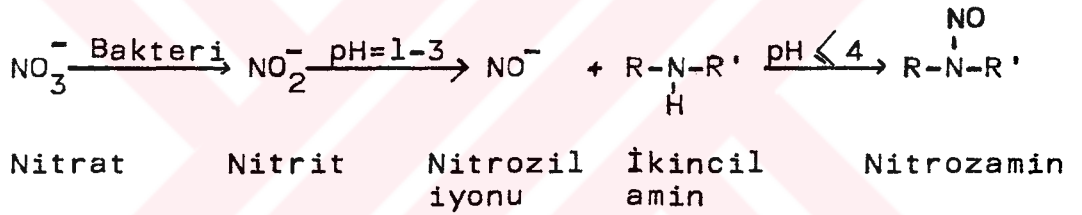
çok fazladır. Bunun yanında Türk sigaralarının içerdiği toksik ve kanserojenik maddelere ilişkin çalışmalar ise çok sınırlıdır.

Bu çalışma, bu alandaki eksiklikleri kısmen tamamlamak üzere ele alınmıştır. Ayrıca sigara nitrozaminlerinin saptanmasına ve rat karaciger mitokondri fraksiyonları ile mitokondride elektron taşıma zincirinin bir üyesi olan sitokrom c'ye etkisinin incelenmesine çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. NİTROZAMİNLER

N- Nitrozaminler, kanserojen ve hepatotoksik bileşenlerin en güçlü bir grubudur. Nitrit ile ikincil veya üçüncül aminler arasındaki tepkime sonucu nitrozaminler oluşur. Bunların yakın geçmişe kadar aşağıdaki yolu izleyerek oluştuğu savunulmuştur(6).



Oysa günümüzde bunların fizyolojik pH'ta oluştuğu kanıtlanmıştır(7).

Nitrozaminlerin öncüllerinden nitrit, doğada, suda ve toprağa verilen nitratlı gübrelerden dolayı bitkilerde yaygın olarak bulunan nitratın, bakteriler tarafından indirgenmesi ile oluşmaktadır. Ayrıca nitrit tükürüğün normal bileşenlerinden biri olduğu gibi besin koruyucusu olarak da kullanılmaktadır. Nitrat ve nitrit genellikle et, balık ve peynirlerin korunmasında kullanılır(8).

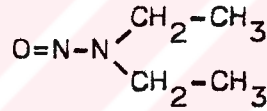
Diğer bir öncül olan ikincil aminler ise balık, balık ürünleri, çay, tahıl, sigara ve sigara dumanında

bulunmaktadır(8).

Mirvish ve arkadaşları,aminler ve nitrit arasındaki kimyasal reaksiyon ile kanserojenik N-Nitrozo bileşiklerinin oluşumunun askorbik asit ile engellendiğini açıklamışlardır(9).

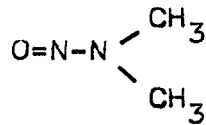
Nitrozaminlerin çalışılan bütün hayvanlarda mutasyona neden olduğu ve kötü huylu tümörler oluşturduğu belirlenmiştir(10).Çünkü nitrozo bileşikleri, toksik,karsinojenik,mutajenik ve teratojenik etkiye sahiptirler(11).

Alifatik dialkil nitrozaminlerden birisi olan Dietilnitrozamin (DENA);



Molekül ağırlığı; 102,1 , k.n.; 177°C, d.n.; 64-65°C, d; 0,9422 olan sarı,uçucu bir sıvıdır(12).

Diğer bir dialkil nitrozamin olan Dimetilnitrozamin (DMN) ise;

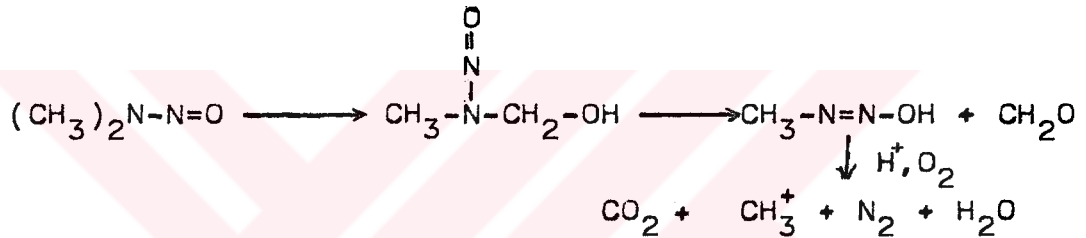


Molekül ağırlığı;74,1, k.n.; 149-150°C,d.n;50°C d;1,0048 olan düşük viskoziteli bir sıvıdır(13).

Her iki nitrozamin'de su,organik çözücü ve lipidlerde çözünebilir. Nötral ve alkali çözeltilerde oda sıcaklığında 14 günden daha fazla dayanırlar.

Işığa, özellikle Ultraviyole ye duyarlı olup λ_{max} 'ları 230 ve 332 nm dir(12,13).

Dialkil nitrozaminlerin hepatotoksik ve kanserojenik etkilerinin gözlenebilmesi için metabolik aktivasyonlarının gerektiği bilinmektedir. Bu bileşenler genellikle kararsız monoalkil aminlere metabolize olurlar. Bunu reaktif diazoalkanlar ve karbonyum iyonuna bozunma izler(14).



Diazoalkanların, proteinleri, nükleik asitleri ve diğer hücresel birimler üzerinde alkilleyici etkileri vardır. Alkilleme genellikle elektrofilik katılma şeklinde olur. Metilleme ise proteinlerde histidindeki halka azotuna ve DNA ile RNA daki guaninin N-7 durumuna olmaktadır(1).

DENA ve DMN'nin yüksek kanserojenik etkisi bilinmektedir. DENA hepatoselüler karsinomalar oluşturur. Bazıları akciğer metastazlıdır. Böbrek tümöründe oluşturabildiği bilinmektedir(15).

Bir çok nitrozolu bileşiklerle yapılan çalışmalar sonucunda bu bileşiklerin, deney hayvanlarında değişik enzimleri genellikle inhibe ettiği gözlenmiştir.

Atalay ve arkadaşlarının çalışmalarında DENA'nın rat karaciğer Laktat Dehidrogenaz aktivitesini azalttığı (16), hücre bölünmesini durdurduğı(17)ve maya G-6-P-Dehidrogenazı inhibe ettiği gözlenmiştir(18).

Marvin ve arkadaşları, mitokondri metabolik aktivitesi üzerine DMN' nin etkisini incelemişler ve sonuç olarak hem in vivo hem de in vitro çalışmalarında oksidatif fosforilasyonu inhibe ettiğini bulmuşlardır. (19).



2.2. SİGARA NİTROZAMİNLERİ

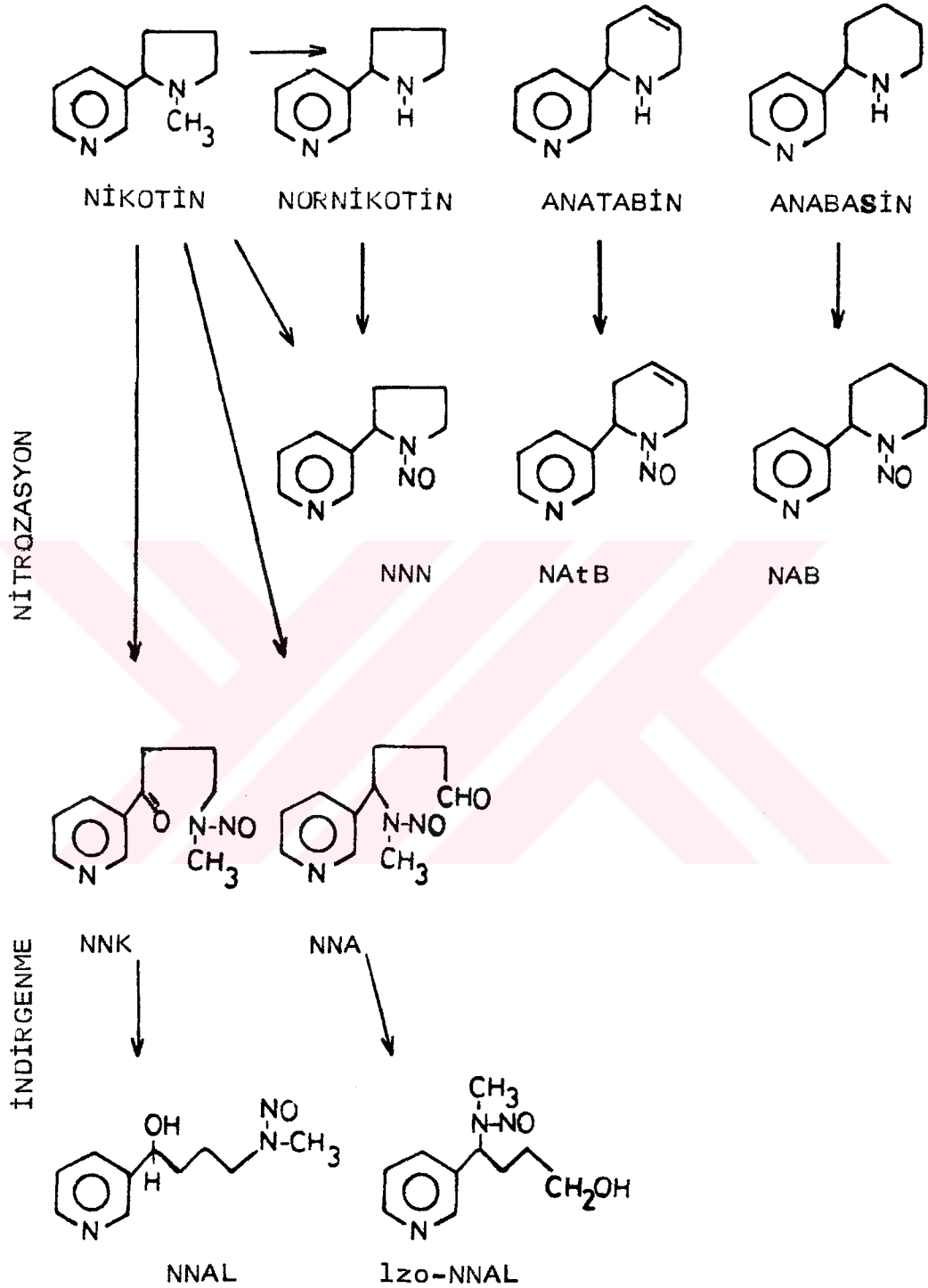
Nitrozaminlerin en önemli kaynaklarından birisi tütün ve sigara dumanıdır (3,5,20,21,22).

Tütün spesifik nitrozaminleri, tütün alkaloidlerinin türevidir(3). Tütün alkaloidleri nornikotin, anatabin, anabasin, nikotin ve N-formilnikotin dir. Bunlar ikincil ve üçüncül aminler olup, tütün spesifik nitrozaminlerinin oluşum nitrozasyonundan sorumludurlar(3,20) (Şekil-1).

Bu nitroz aminler, N-Nitrozonornikotin (NNN), N-Nitrozoanatabin (NAtB), N-Nitrozoanabasin (NAB), 4-(metilnitrozamin)-1-(3-Pridil)-1-butanon (NNK) ve 4-(N-metil-N-nitrozamin)-4-(3-Pridil) butanal (NNA) dır(3,20).

Tütün spesifik N-Nitrozaminleri, tütünün yıllanmasında, fermentasyonunda, yanma ve içme esnasında oluşmaktadır(20).

NNN, NNK ve NNA için öncü madde nikotindir. NNN, nornikotinden de oluşmaktadır. Ağızdan enfiye kullananların ve tütünü ağızda çiğneyenlerin tükürüğünde, sigara ve puronun ana ve yan dumanında ve çiğneme tütünü, enfiye, sigara, puro gibi bir çok çeşit tütün ürününde NNN bulunmuştur(21). NNN, hasat edilen tütünde



bulunmaz.Ancak tütünün kurutulup,depolanması sırasında oluşur(3).Tükrükteki NNN'in bir kısmı endojen olarak tükrükteki nitritten ve tütün alkaloidlerinden oluştuğu düşünülmektedir.Böylece tütün ürünlerini kullananlar arasında NNN ile çok geniş bir etki altında kalma durumu vardır(21).

Birçok deneyde değişik uygulama yöntemleri ile rat,fare ve hamsterlerde NNN,NNK veNAAtB'nın kanserojen etkileri test edilmiştir(22).

Ağızdan uygulamayı takiben NNN başlıca esophagus da olmak üzere üst sindirim yolu tümörlerine,ratlarda ve hamsterlerde burun boşluğu tümörlerine neden olmaktadır.Cilt altı uygulamalarını takiben'de NNN ilk olarak hamsterlerde soluk borusu tümörleri,ratlarda burun boşluğu tümörü oluşmaktadır.Karın zarına enjeksiyonlar da ise farelerde akciğer tümörüne,hamsterlerde soluk borusu ve burun boşluğu tümörüne neden olmaktadır. Bir eksojen metabolik sistemin varlığında NNN, Salmonella typhimurium(Tifo) bakterisi için mutajeniktir.Fare karaciğer pirimer kültüründe proğramsız DNA sentezine sebep olmaktadır(21).

1986 da Üzdemir ve arkadaşlarının Türk sigaraları ile yaptıkları çalışmalar sonucunda sigaraların ana ve yan dumanında 1,6-3,2 ve 2,1-5,2 mg/sigara dolayında nikotin olduğunu açıklamışlardır.Ayrıca nicel olarak nitrozamin miktarlarını NNN;88-139,

NAB;15-45, NAT;22-38 ve NNK'da; 51-100 ng/sigara düzeyinde bulmuşlardır(5).

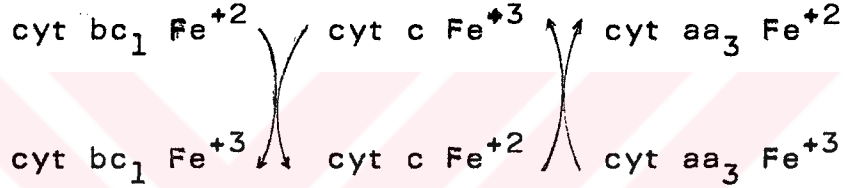
Tütün ürünlerinde ve sigara dumanında NNN,NNK, NAB ve NAT gibi uçucu olmayan tütün spesifik nitrozaminleri saptandığı gibi uçucu sigara nitrozaminlerinde tanımlanmıştır.

Brunnemann ve arkadaşları,tütün ve sigara dumanını inceleyerek karsinogenik uçucu nitrozaminleri tütünde, yan sigara dumanı ve ana sigara dumanında saptamışlardır.Çalışmalarında 17 çeşit ticari ve deneysel sigaraların 50 adedini kullanmışlar ve sigaraların ana dumanında 1,7-97 ng Dimetilnitrozamin(DMN),0,1-9.1 ng metiletılnitrozamin (MENA),2.6-52 ng nitrozopirolidin(NPyr) bulmuşlardır.Yan sigara dumanında ise bu uçucu nitrozaminler daha yüksek derişimlerde olup 680-1770 ng DMN, 9-75 ng MENA, 8-73 ng Dietılnitrozamin (DENA) ve 204-612 ng NPyr olarak saptamışlardır (23).

Ayrıca tütün spesifik nitrozaminleri, Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile tütün içenlerin ve içmeyenlerin tükrüklerinde bakılmış ve tütün içenlerde yüksek derişimlerde DENA, DMN, NNN ve NPyr tayin edilmiştir(24,25). Bu nitrozaminlerde tütünde bulunan tütün alkaloidlerin nitrozolanmasıyla oluşmaktadır(24,25).

2.3. SİTOKROM C

Sitokrom c, mitokondride elektron taşıma zincirinin bir bileşeni olarak elektronları sitokrom bc₁ kompleksinden alır ve sitokrom oksidaz (aa₃) kompleksine vermek suretiyle görev yapar.



Suda çözünen bir Hem proteini olan sitokrom c dışarıya mitokondri membranına gevşekçe bağlıdır(26). Sitokrom c mitokondri iç membranlarına çapraz bağlandığından önemli oranda elektron transferini sağlamaktadır(27).

At kalbi sitokrom c' nin üç boyutlu yapısı saptanarak büyük ölçüde analiz edilmiştir. Şekil-2 deki bu globüler protein çalışılan bütün memelilerde 104 amino asid diziliş sırasına sahiptir. Bu polipeptit zincirde iki tiyoeter bağlantıları ile sisteinil kalıntılarına kovalent olarak bağlanan (protoporfirin - IX -Fe) tek bir Hem grubu içermektedir(26). Hemi çevreleyen Lizin kalıntıları sitokrom bc₁ ve sitokrom oksidaz'ın sitokrom c'ye bağlanmasında önemli olmaktadır(27).



Şekil-2 Memeli sitokrom c'sinin üç boyutlu yapısı

Hem gurubu molekülün hidrofobik iç kısmında gömülüdür ve onun demir atomunun dört düzlemsel pozisyonu porfirin azotları ile doludur. Bir dik pozisyona bir imidozol N (His-18),diğer bir dik pozisyona kükürt atomu (Met-80) bağlıdır(26).

Sitokrom c'nin elektron transfer mekanizması tam olarak açık değildir.

Yapılan çalışmalarda cyt b_5 ve cyt c'nin düşük iyonik kuvvetlerde kararlı bir kompleks oluşturdıkları bulunmuştur(28).

Yüksek intramembran iyonik kuvvetler altında cyt c'nin iç membrandan serbest bırakıldığı ve elektronları dış membranın iç yüzeyinde bulunan cyt b_5 'den, iç membran üzerindeki sitokrom oksidaza transfer edebildiği ileri sürülmüştür(28).

Nötral pH'da, indirgenmiş sitokrom c ile O_2 ve CO_2 , yükseltgenmiş sitokrom c ile de CN^- veya N_3^- reaksiyon vermez(26).

3. DENEYSEL TEKNİK

3.1. KULLANILAN MADDELER

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin tümü analitik saflıkta olup Sigma ve Merck ürünüdür. At kalbi sitokrom c (Tip VI) Sigma firmasından, DENA ve DMN ise Fluka firmasından sağlanmıştır.

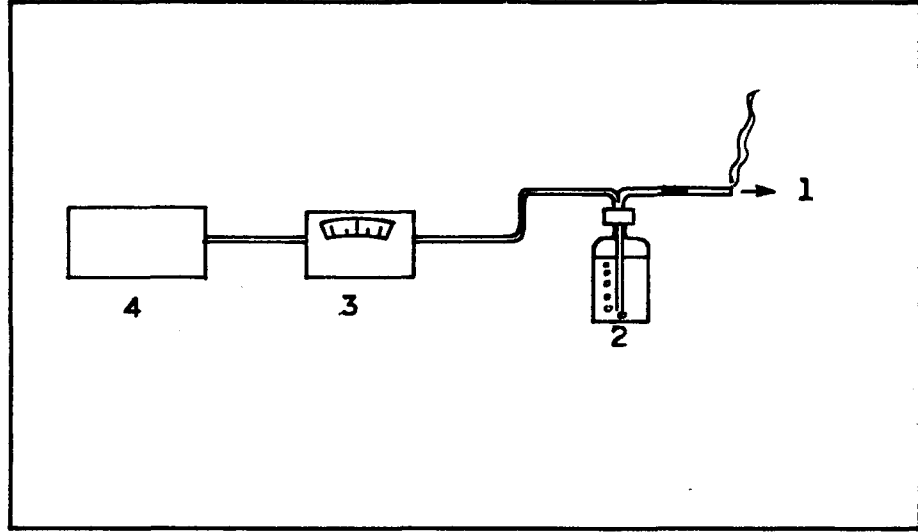
Sigaralar ise Türk Tekel İdaresinin ürettiği Maltepe(Filtreli), Tokat(Filtreli), Bafra(Filtreli ve Filtresiz) ve Lüks Bitlis(Filtreli) dir. Bu sigaraların tütünleri N-Tabaccum, N-Rustica ve bu iki varyetanın melezlerinin karıştırılmasından elde edilmiştir.

3.2. KULLANILAN YÜNTEMLER

3.2.1. SİGARA DUMANINDAKİ NİTROZAMİNLERİN ELDE EDİLMESİ

Maltepe, Tokat, filtreli ve filtresiz Bafra ile Lüks Bitlis sigaralarının 20 adedi Şekil-3 deki gibi yarı otomatik içicide içirilmiştir.

Bu sigaraların duman içeriğinin gaz tuzağında ki 100 ml 20 mM Askorbik asit, Sitrat-Fosfat tamponuna (pH; 4,5) geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra bu tampon 2x50 ml kloroform ile ekstrakte edilmiştir. Ekstrakta 1 gr Na_2SO_4 ilave edilerek, "Heidolph Vakumlu" döner buharlaştırıcıda 55 °C de 5 ml'ye buharlaştırılmıştır. Bu örnek 70 gr Al_2O_3 içeren kolona verilmiş



Şekil-3. Sigaraların İçirildiği Yarı Otomatik İçici Düzeneği

1. Sigara, 2. Toplama Şişesi ve Tamponu, 3. Gaz sayacı, 4. Vakum Pompası

ve uçucu nitrozaminler 200 ml kloroform ile kolondan alınmıştır. Kloroform, vakumlu döner buharlaştırıcıda uçurulduktan sonra nitrozaminler 10 ml (pH; 7,5) fosfat tamponuna alınmış ve 0,45 mikrometrelik milipore süzgeçten süzülmüştür.

Kolonda kalan uçucu olmayan sigara nitrozaminleri olarak bilinen NNN ve NATB ise kloroform; Aseton (150; 50 ml) karışımının geçirilmesi ile alınmıştır. Çözücü karışımı buharlaştırıldıktan sonra uçucu olmayan nitrozaminlerde 10 ml (pH; 7,5) fosfat tampona alınıp milipore süzgeçten süzülmüştür.

3.2.2. SİGARA DUMANINDAKİ NİTROZAMİNLERİN HPLC İLE SAPTANMASI

Sigara dumanından elde edilen uçucu nitrozaminler 2 μ l'lik enjeksiyonlar halinde Waters Associate HPLC silika kolondan % 70 kloroform ve % 30 sikloheksan çözücü sistemi ile geçirilmiştir. Çözücü akışı 1 ml/ dk, kağıt hızı 0,5 cm/dk ve 0,01 AUFS şartlarında çalışılmıştır. 254 nm fotometrik monitörden alınan kromatogramlar, aynı koşullarda çalışılan DENA ve DMN standartlarının kromatogramları ile karşılaştırılıp tanımlanabilen bu nitrozamin düzeyleri hesaplanmıştır.

3.2.3, RAT KARACİĞER MİTOKONDRİLERİNİN İZOLASYONU

Yapılan çalışmada, deney hayvanı olarak ağırlıkları 160-200 gr arasında değişen, ortalama iki aylık rat'lar kullanılmıştır. Karın zarından 80 mg/kg Luminal enjekte edilen rat, 4 gün sonra boynu kırılarak öldürülmüş ve karaciğeri çıkartılmıştır. Mitokondrilerin izolasyonunda Sottocasa ve arkadaşlarının önerdiği yöntem uygulanmıştır(29).

Çıkarılan organ, buzla soğutulan 0,25M Sukroz çözeltisi içinde bırakılarak makasla iyice parçalanmıştır. Çözelti dekante edildikten sonra, karışım iki kez 10 ml sukroz ile yıkanmıştır. Kirli üst sıvı atılarak karaciğer parçaları, karaciğer ağırlığının üç katı kadar sukroz çözeltisi ile 60 ml'lik homojenizasyon kabına

aktarılmıştır. B. Braun Potter Elvehjen doku homojenizatörün de teflon bir piston yardımı ile 5 vuruşta homojenize edilen doku iki santrifüj kabına eşit olarak dağıtılmıştır. Homojenat Beckman Model J2-21 santrifüjünde 600 g de 15 dakika santrifüjlendikten sonra ayrılan üst sıvı 6500 g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Mitokondrilerin oluşturduğu çökelti 4 ml 0,1 M fosfat tamponu (pH;7,5) içinde süspansiyon haline getirilmiştir. Mitokondrilerin izolasyonunda kullanılan her işlemin 0-4°C arasında uygulanmasına dikkat edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1.HPLC KROMATOGRAMLARINDAN ELDE EDİLEN BULGULAR

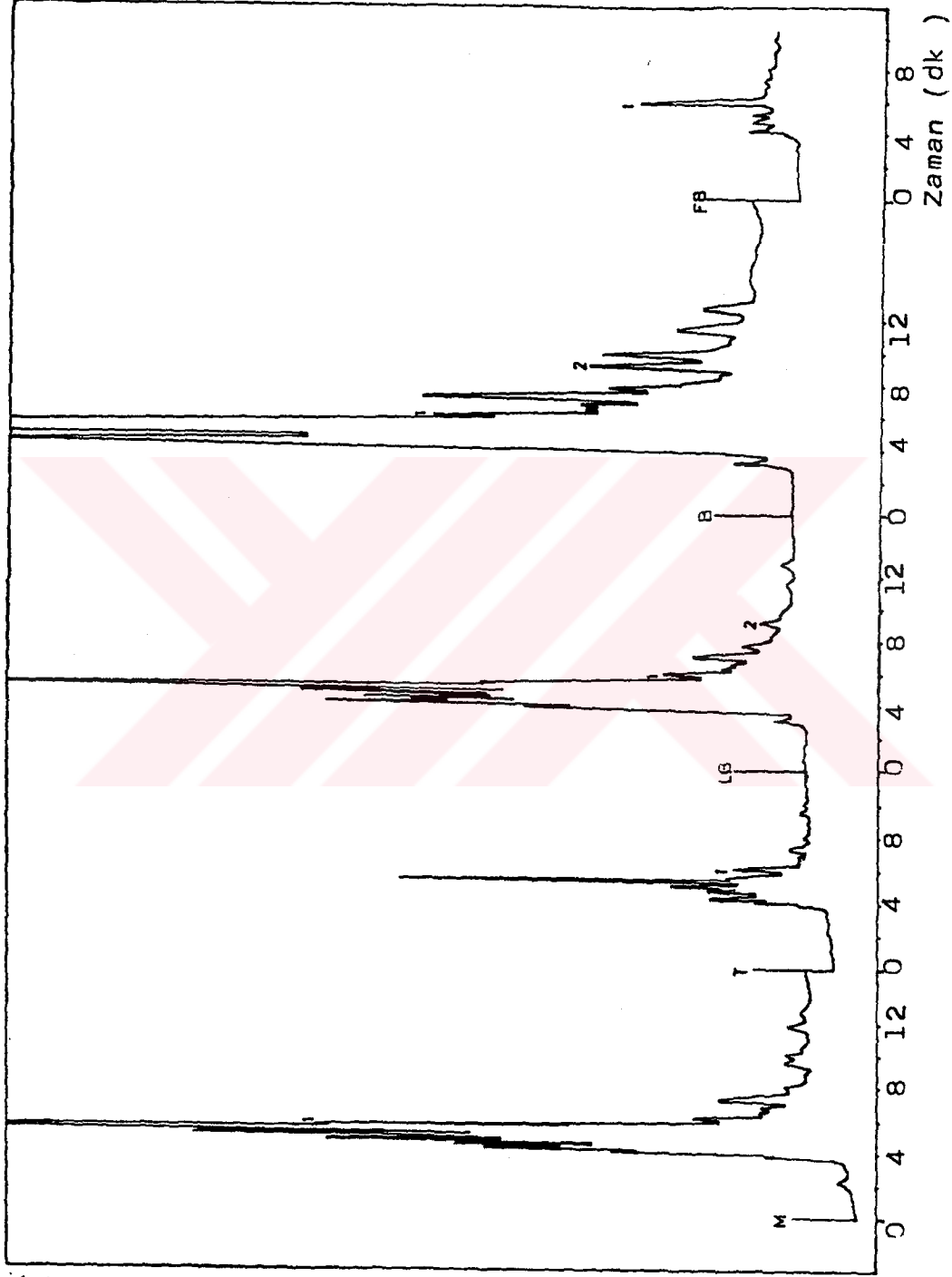
Seçilen 5 adet yerli sigaraların dumanından analizlenen uçucu nitrozaminlerini gösteren HPLC kromatogramı Şekil - 4 dedir. Kromatograma göre sigara dumanındaki nitrozaminler gerek tür ve gerekse nicelik bakımından azımsanmayacak ölçülerdedir.Ancak bunlardan Dietil nitrozamin (DENA) ve Dimetilnitrozamin (DMN) tanımlanabilmiştir.

Şekil- 5 deki standart DENA ve DMN'in HPLC kromatogramı sayesinde sigaralarda hesaplanan DENA ve DMN derişimleri Çizelge- 1 de görüldüğü gibi oldukça yüksek bulunmuştur.Uçucu olmayan nitrozaminleri gösteren Şekil -6 daki HPLC kromatogramlarından ise NATB ve NNN tanımlanabilmiştir(22).

Çizelge-1 Sigara Dumanı DENA ve DMN Derişimleri ($\mu\text{g/Sigara}$)

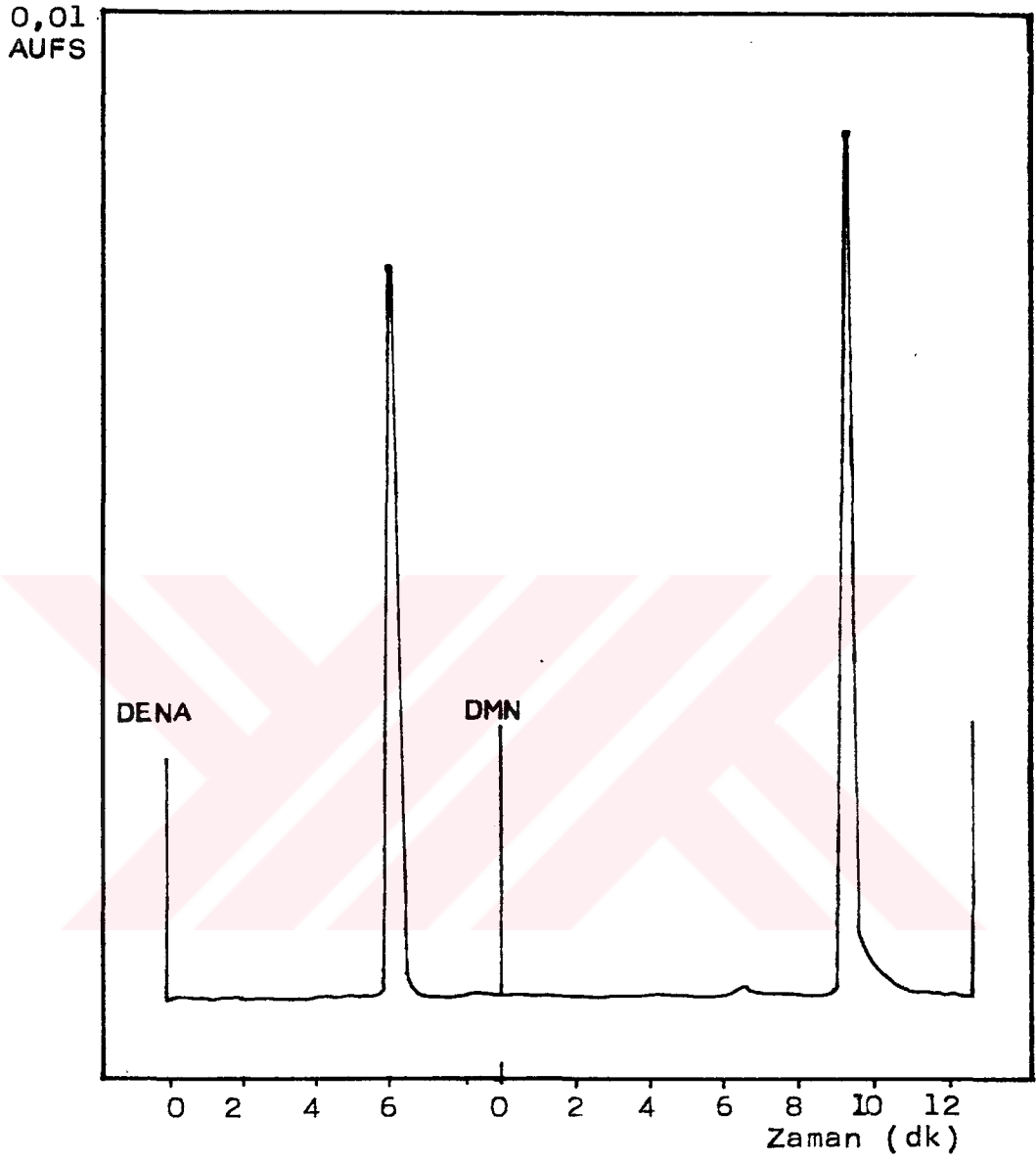
SİGARA	DENA	DMN
Maltepe (M)	21,0	0,0
Filtresiz Bafra (B)	13.9	12.5
Filtreli Bafra (FB)	6.2	0.0
Lüks Bitlis (LB)	5.5	2.7
Tokat (T)	3.4	0.0

0,01
AUFS



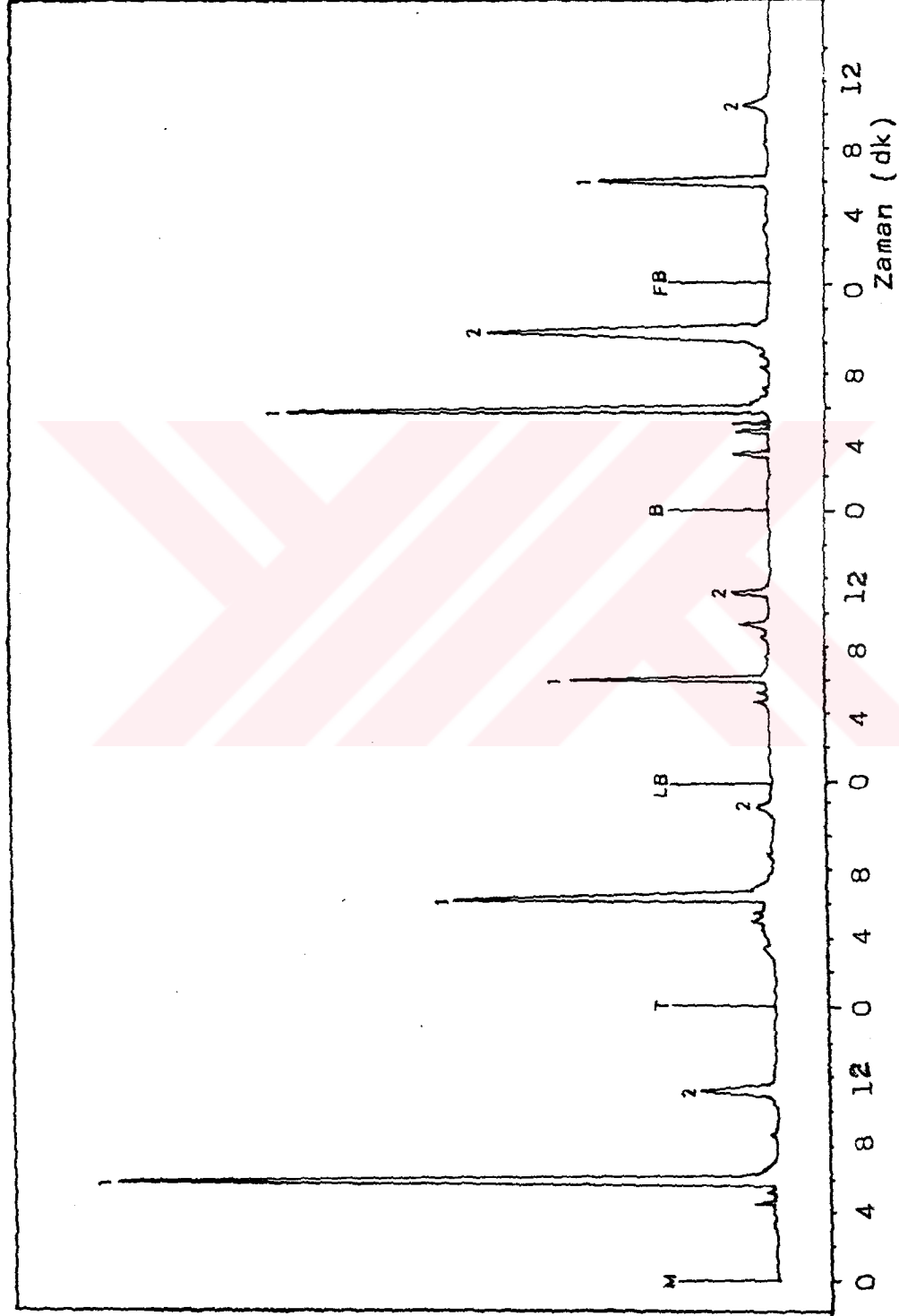
Şekil-4. Sigara Dumanı Uçucu Nitrozaminlerinin HPLC Kromatogramı

1.DENA , 2.DMN



Şekil-5. Standart DENA ve DMN'in HPLC Kromatogramları

0,01
AUPS



21

Şekil-6. Sigara Dumanı Uçucu Olmayan Nitrozaminlerinin HPLC Kromatogramı
1.NAtB, 2.NNN

4.2. SİTOKROM C'NİN SİGARA NİTROZAMİNLERİ İLE ETKİLEŞMESİ İÇİN OPTİMUM KOŞULLAR

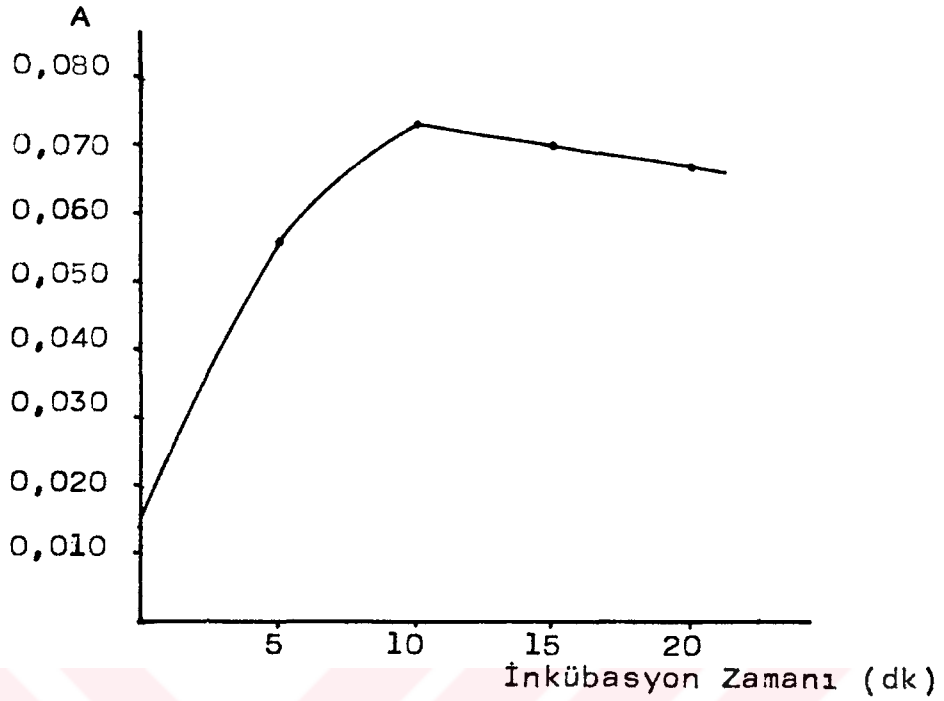
4.2.1. İNKÜBASYON ZAMANININ ETKİSİ

0,1 M Fosfat Tampon (pH;7,5) ile hazırlanan $2,86 \times 10^{-6}$ M Sitokrom c çözeltisinin 500 μ l'sine nitrozamin düzeyi en fazla olan filtresiz Bafra sigarasının dumanından elde edilen uçucu ve uçucu olmayan sigara nitrozaminlerinden 20 μ l eklenmiştir. Bu örnekler 37°C de su banyosunda 5 dakika süre ile inkübe edilerek 550 nm dalga boyunda okunan absorbands değişimleri Çizelge - 2 deki gibi bulunmuştur.

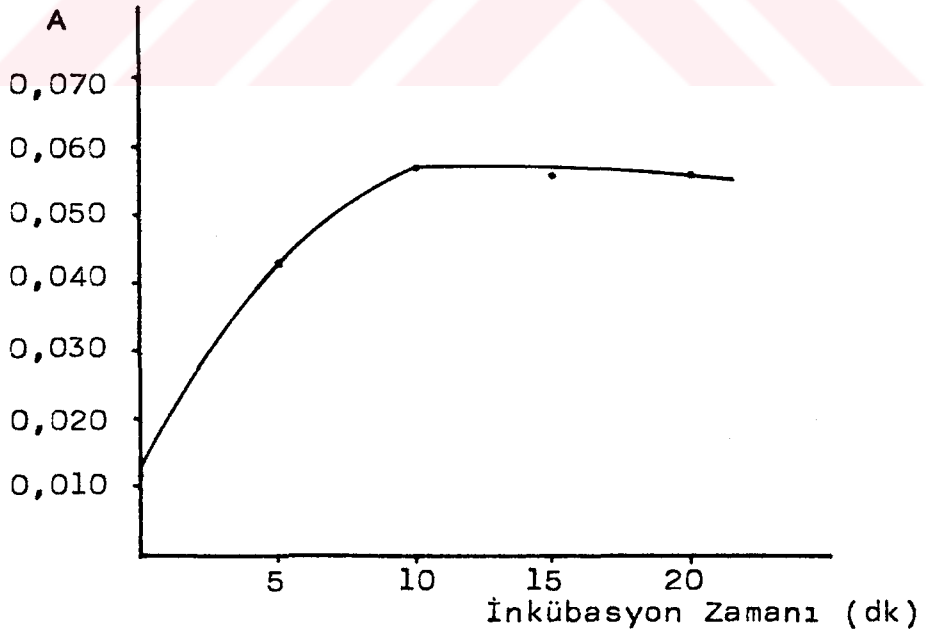
Çizelge-2. Sitokrom c ile (A) Uçucu ve(B) Uçucu olmayan Sigara Nitrozaminlerinin Etkileşiminde 37°C deki İnkübasyon Zamanının Etkisi

İnkübasyon süresi (dk)	(A) Absorbans	(B) Absorbans
5	56	43
10	73	57
15	70	56
20	67	56

Bu bulgular, kullanılan deney koşullarında inkübasyon süresinin 10 dakika olması gerektiğini göstermiştir.(Şekil-7-8)



Şekil-7 Sitokrom c İle Uçucu Sigara Nitrozaminlerinin Etkileşmesi İçin İnkübasyon Zamanının Etkisi



Şekil-8 Sitokrom c İle Uçucu Olmayan Sigara Nitrozaminlerinin Etkileşmesi İçin İnkübasyon Zamanının Etkisi

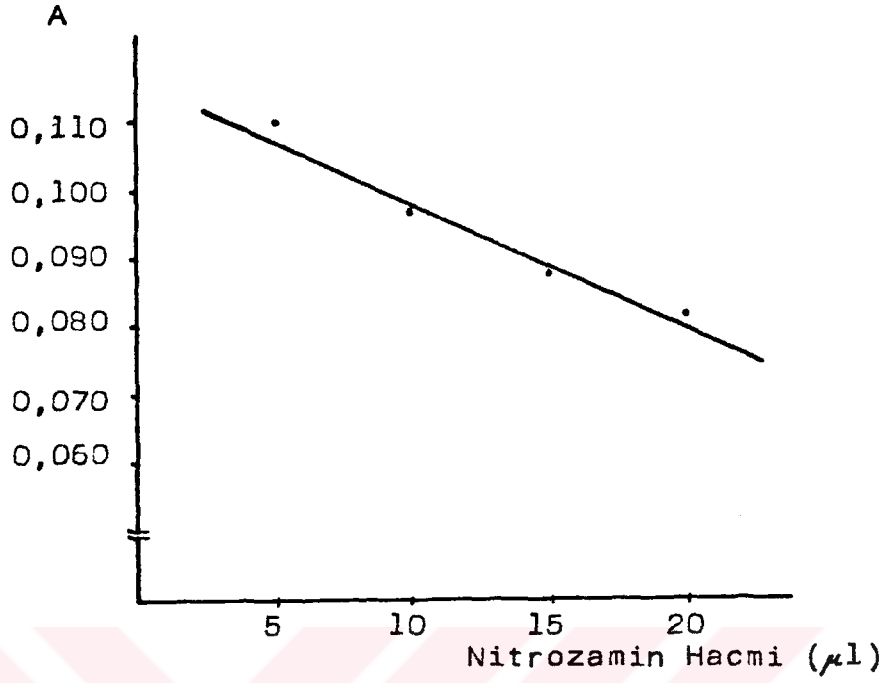
4.2.2. SİGARA NİTROZAMİNLERİNİN ETKİSİ

Sigara nitrozaminleri ayrı ayrı tanımlanamadığından sigara nitrozaminlerinin derişimi hesaplanamamıştır. Bu yüzden sitokrom c'ye ilave edilen sigara nitrozaminlerini hacimleri değiştirilerek sitokrom c ile etkileşimleri incelenmiştir. Bu amaçla $2,86 \times 10^{-6}$ M sitokrom c çözeltisinin 500 μ l'si 5, 10, 15 ve 20 μ l uçucu ve uçucu olmayan sigara nitrozaminleri ile 37°C de inkübe edilmiş ve 550 nm dalga boyundaki absorbsiyon değişimleri Çizelge - 3 deki gibi bulunmuştur.

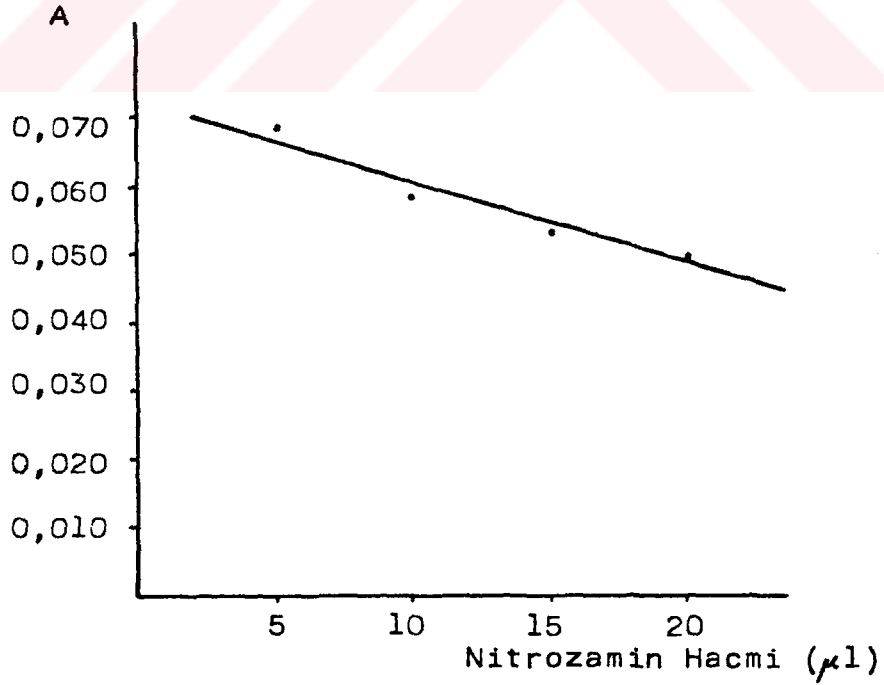
Çizelge- 3. Sitokrom c'ye (A) Uçucu ve (B) Uçucu olmayan Sigara Nitrozaminlerinin Etkisi

Nitrozamin hacmi (μ l)	(A)	(B)	Enküçük kareler Yöntemine göre	
	Absorbans	Absorbans	(A)	(B)
5	110	69	107	67
10	97	59	98	61
15	88	54	89	55
20	82	50	80	49

Bu bulgular sonucunda en yüksek absorbans 5 μ l sigara nitrozaminleri ile okunmuştur. (Şekil-9,10)



Şekil-9 Sitokrom c'ye Uçucu Sigara Nitrozaminlerinin Etkisi



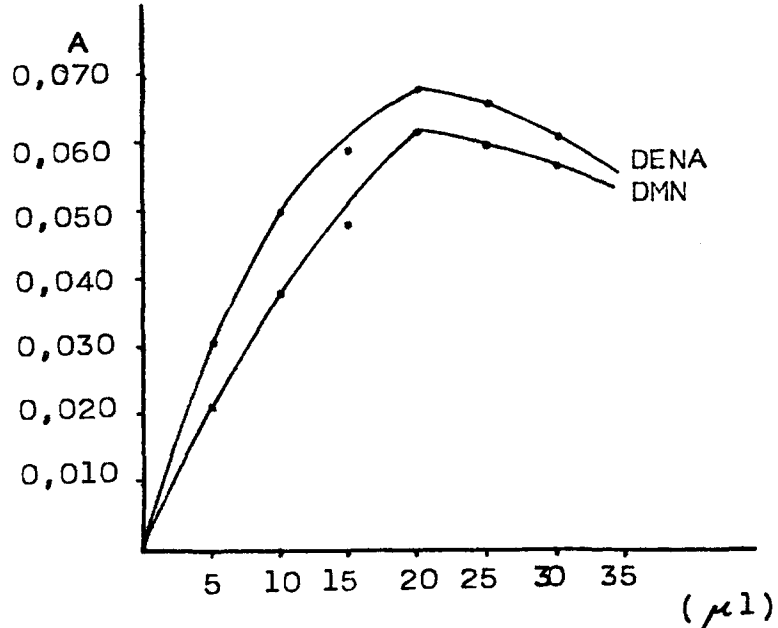
Şekil-10 Sitokrom c'ye Uçucu Olmayan Sigara Nitrozaminlerinin Etkisi

4.2.3. SİTOKROM C'YE DENA VE DMN'İN ETKİSİ

500 μl , $2.86 \times 10^{-6}\text{M}$ sitokrom c ile değişik hacimlerdeki $9.30 \times 10^{-4}\text{M}$ DENA ve $1.35 \times 10^{-3}\text{M}$ DMN'in 37°C de 10 dakika inkübasyonu sonucu 550 nm dalga boyunda okunan absorbands değerleri Çizelge-4 deki gibi bulunmuştur. En yüksek absorbands değeri 20 μl DENA ve DMN'de okunmuştur. (Şekil-11)

Çizelge-4. Sitokrom c'ye değişik miktardaki DENA ve DMN'in etkisi

DENA ve DMN Miktarı (μl)	(DENA) Absorbans	(DMN) Absorbans
5	31	21
10	50	38
15	59	48
20	68	62
25	66	60
30	61	57



Şekil-11 Sitokrom c'ye DENA ve DMN'in etkisi

4.3. SPEKTROFOTOMETRİK BULGULAR

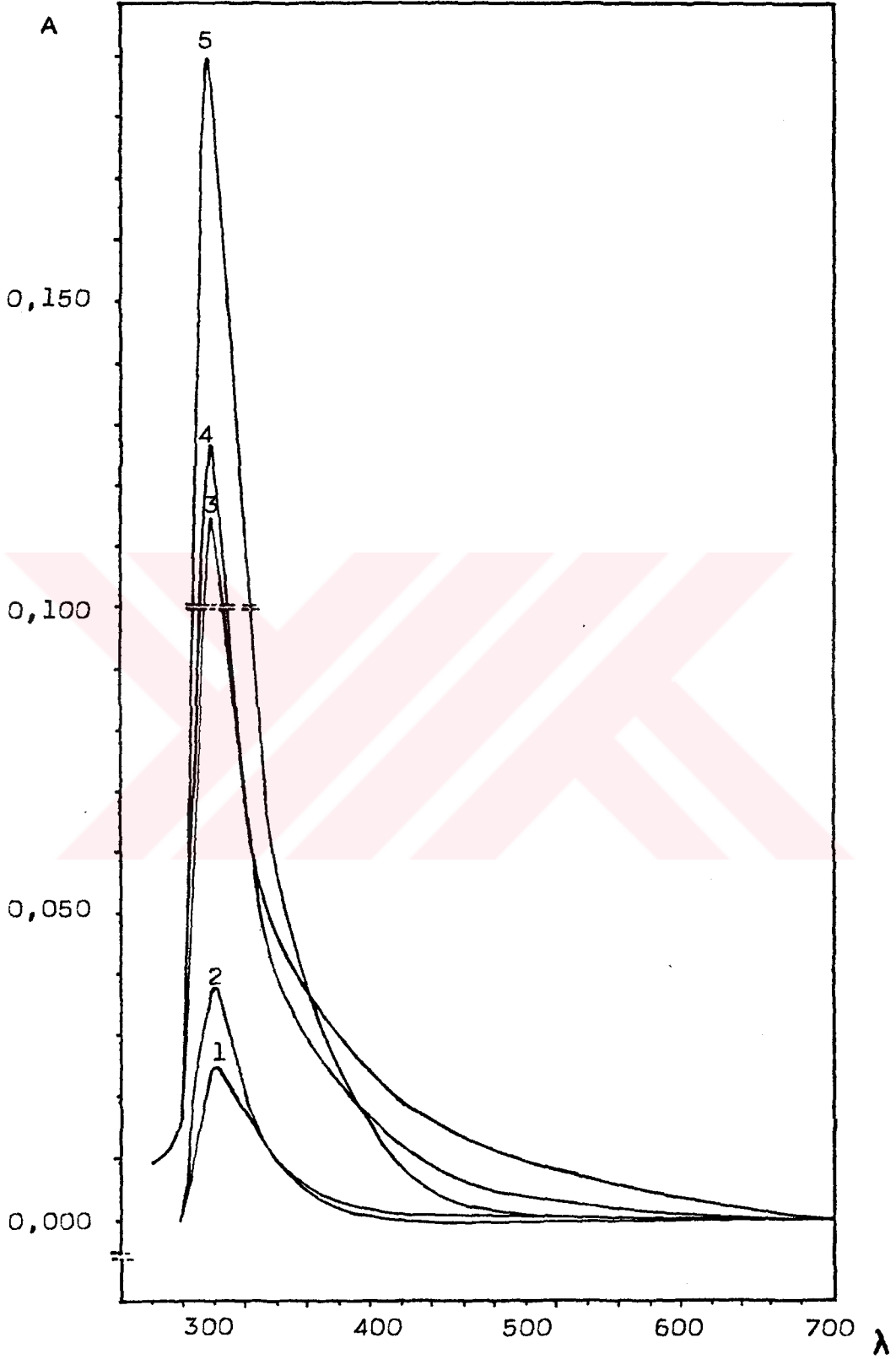
Bütün örneklerin absorbans ve UV-VIS fark spektrumları HITACHI model 220 UV-VIS çift ışın demetli taramalı spektrofotometresinden elde edilmiştir.

2,5 ml fosfat tamponundaki 25 μ l uçucu ve uçucu olmayan sigara nitrozaminlerinin absorpsiyon spektrumlarından bu nitrozaminlerin 303 nm dalga boyunda pik verdikleri gözlenmiştir(Şekil-12, 13). 5 μ l mitokondri fraksiyonunun absorpsiyon spektrumu ise Şekil-14 deki gibi elde edilmiştir. Bu spektrumlar alınırken referans olarak 2,5 ml fosfat tamponu (pH;7,5) kullanılmıştır.

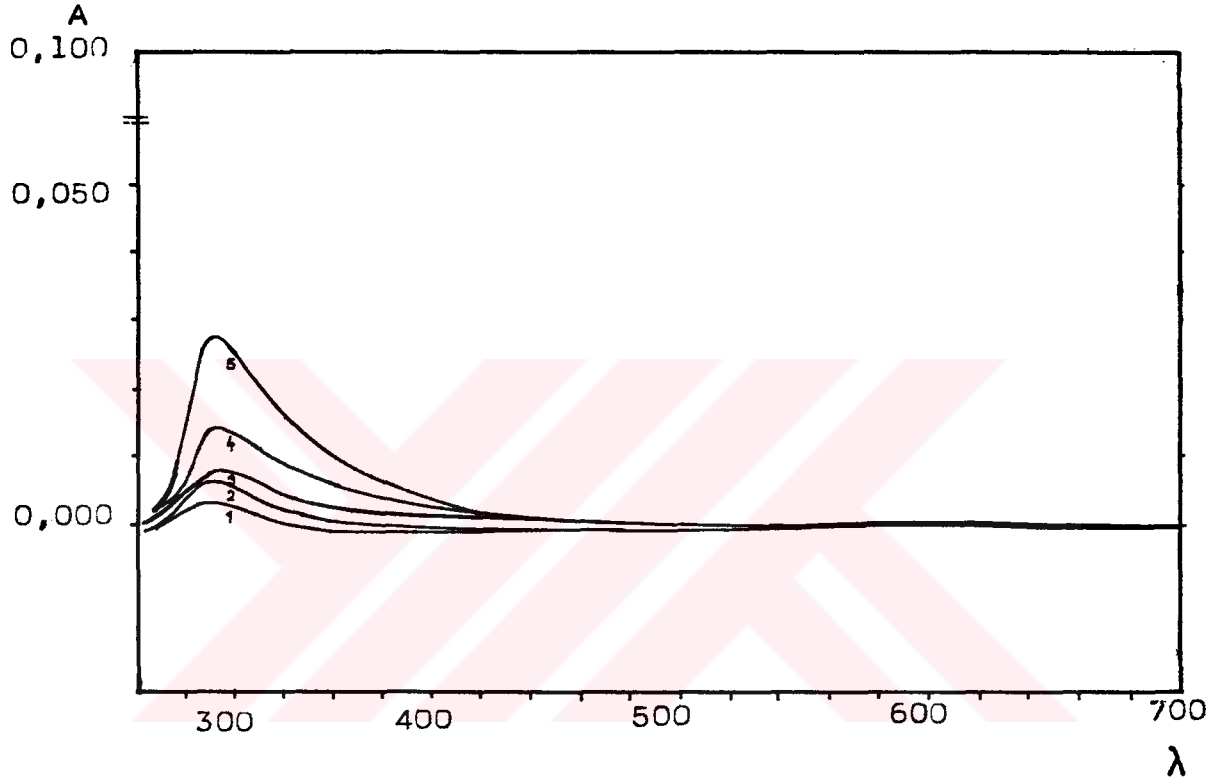
Beş çeşit sigaradan elde edilen 25 μ l uçucu ve uçucu olmayan nitrozaminler ile 37 °C de 15 dakika inkübe edilen 5 μ l Rat karaciger mitokondri fraksiyonunun UV-VIS fark spektrumları Şekil-15 ve 16 daki gibi bulunmuştur.

Sitokrom c ile yapılan çalışmalarda ise sadece nitrozamin içeriği en fazla olan filtresiz Bafra sigarasının nitrozaminleri kullanılmıştır.Fosfat tamponunda hazırlanan 500 μ l 2.86×10^{-6} M sitokrom c'nin 5,10, 15,20 μ l uçucu sigara nitrozaminleri ile 37°C de 10 dk. inkübasyonu sonucu elde edilen absorpsiyon ve fark spektrumları Şekil-17 ve 18 dedir. Uçucu olmayan sigara nitrozaminleri ile etkileşimlerinin fark spektrumu ise Şekil-19 dadır.

Sitokrom c'nin $20 \mu\text{l}$ $9,30 \times 10^{-4} \text{M}$ DENA ve $20 \mu\text{l}$ $1,35 \times 10^{-3} \text{M}$ DMN ile etkileşimlerinin absorpsiyon spektrumu da Şekil- 20 deki gibi bulunmuştur. Burada sitokrom c'nin dalga boyu 416 nm den 407 nm ye kaymıştır. Ancak $5, 10, 15, 25$ ve $30 \mu\text{l}$ DENA ve DMN ile yapılan çalışmalarda ise sitokrom c'nin 416 nm dalga boyunda bir kayma gözlenememiştir.

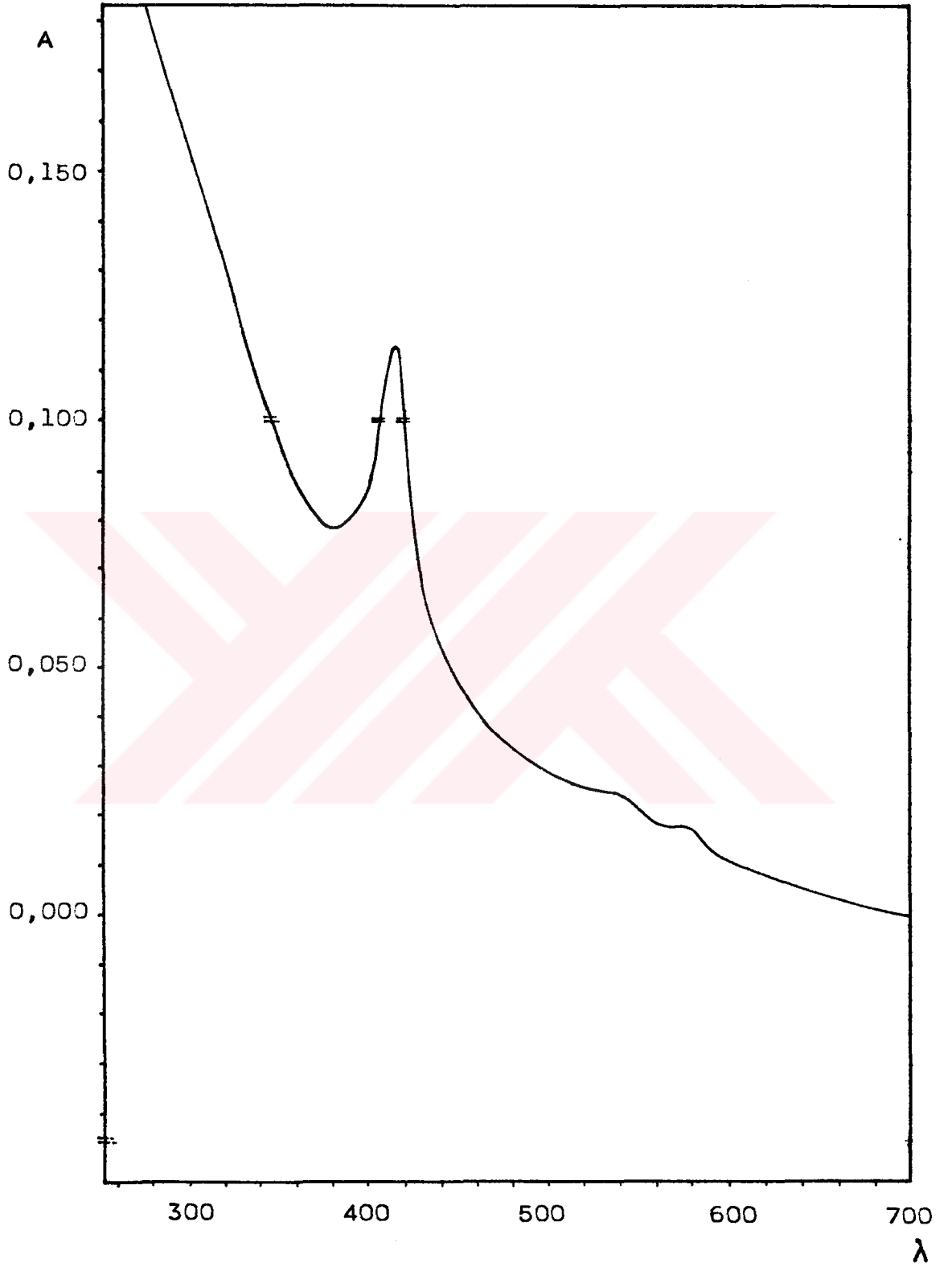


Şekil-12 Sigara Dumanı Uçucu Nitrozaminlerinin
Absorbsiyon Spektrumları
1.Filtreli Bafra, 2.Tokat, 3.Lüks Bitlis,
4.Maltepe, 5.Filtresiz Bafra

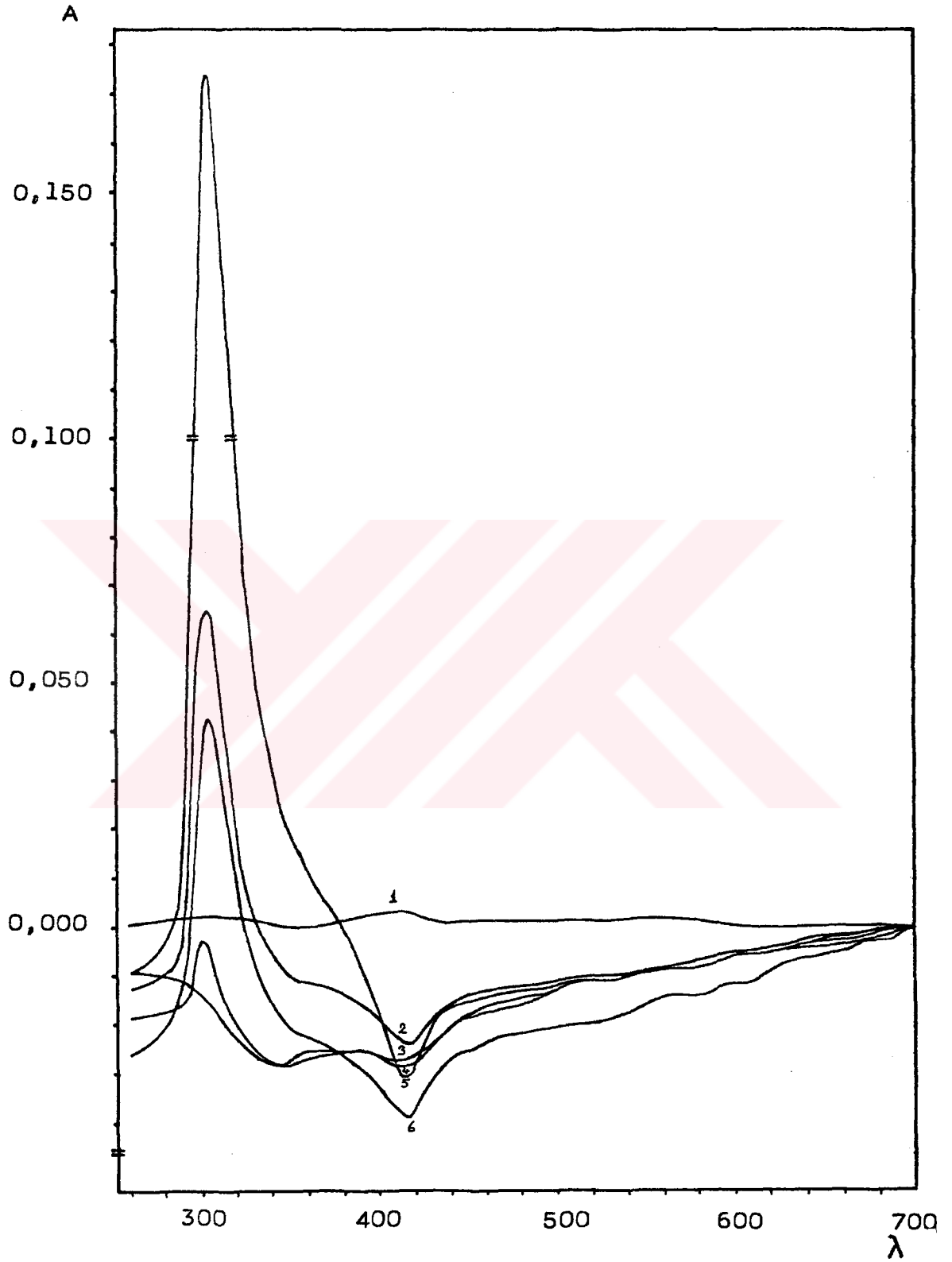


Şekil.13 Sigara Dumanı Uçucu Olmayan Nitroz-
aminlerinin Absorbsiyon Spektrumları

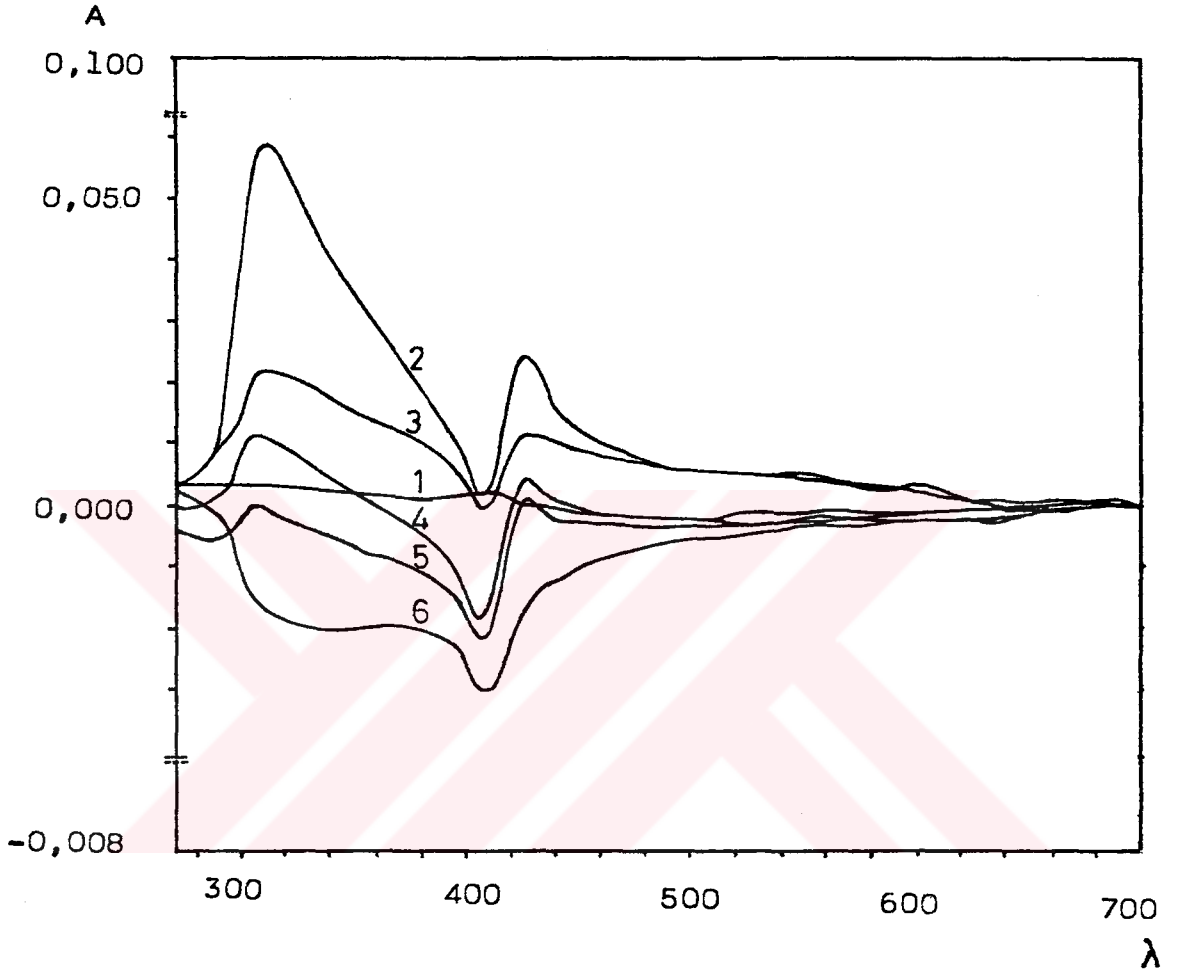
1.Filtreli Bafra, 2.Tokat, 3.Lüks Bitlis
4.Maltepe, 5.Filtresiz Bafra



Şekil-14 Mitokondri Fraksiyonunun Absorbsiyon Spektrumu

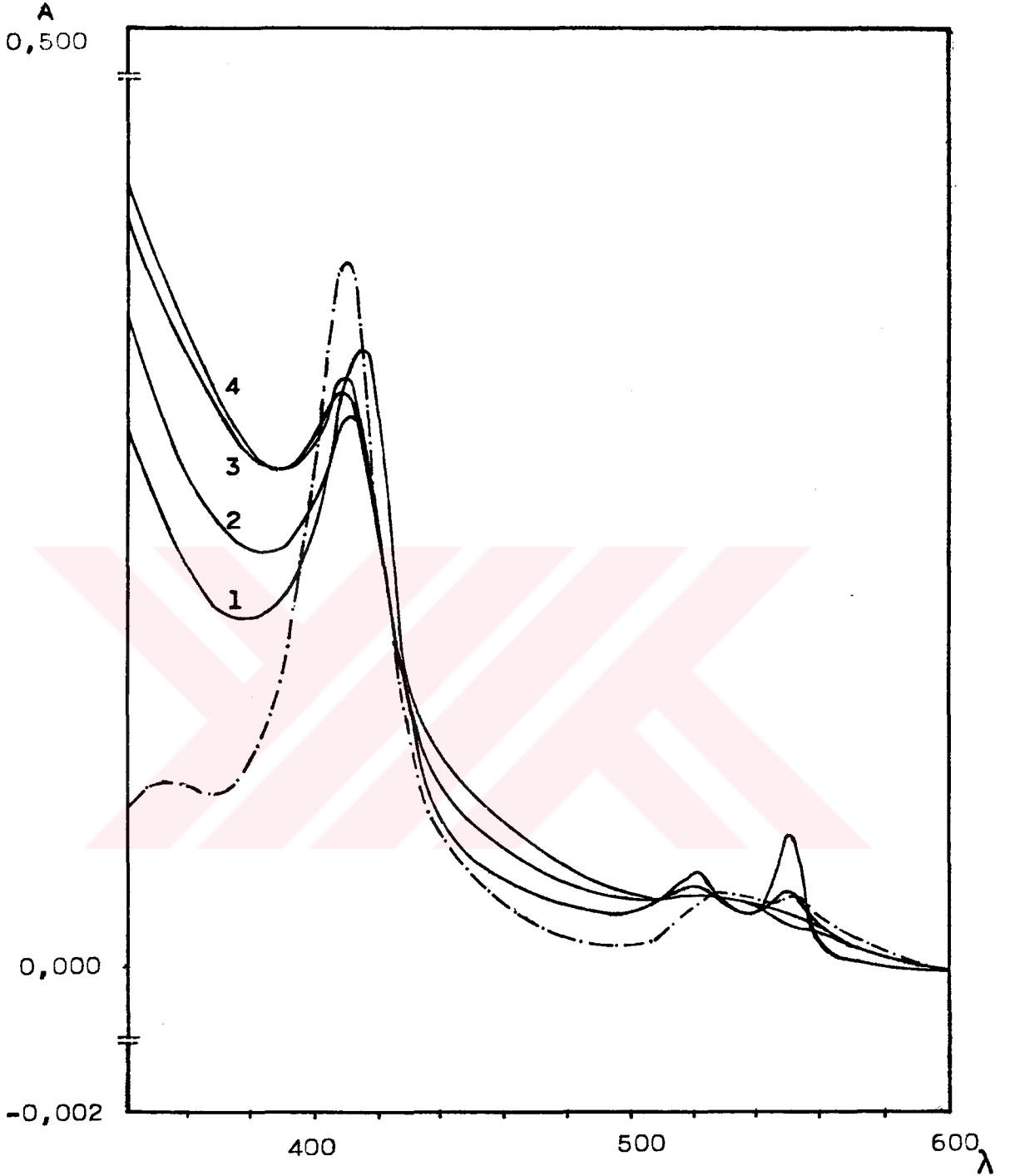


Şekil-15 Mitokondri Fraksiyonu İle İnkübe Edilmiş Uçucu Sigara Nitrozaminlerinin UV-VIS Fark Spektremleri 1.Sıfır, 2.Maltepe, 3.Filtreli Bafra, 4.Tokat, 5.Filtresiz Bafra, 6.LÜks Bitlis



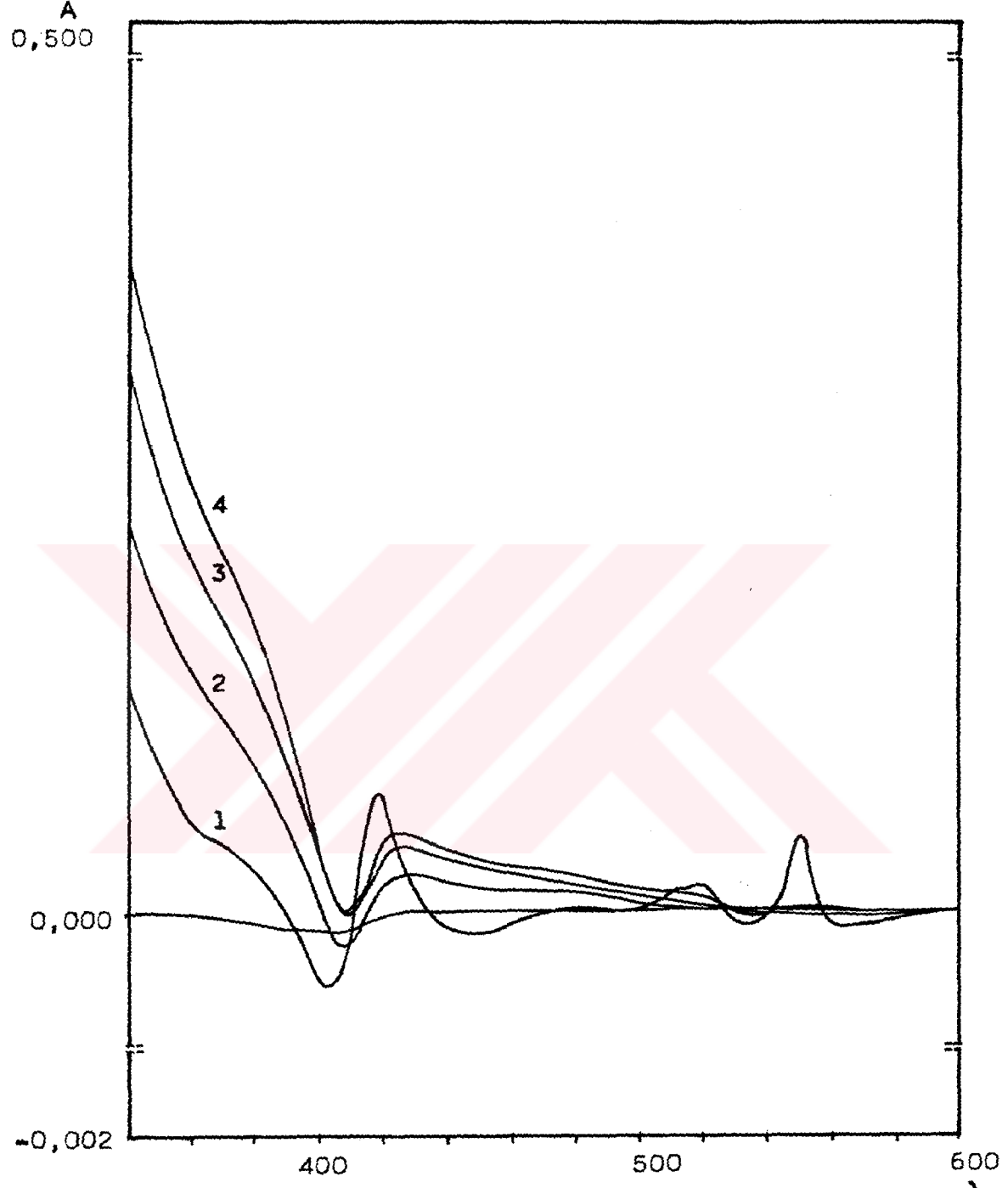
Şekil-16 Mitokondri Fraksiyonu ile İnkübe Edilmiş Uçucu Olmayan Sigara Nitrozaminlerinin UV-VIS Fark Spektrumları

1.Sıfır, 2.Filtresiz Bafra, 3.Lüks Bitlis,
4,Maltepe, 5.Tokat, 6.Filtreli Bafra

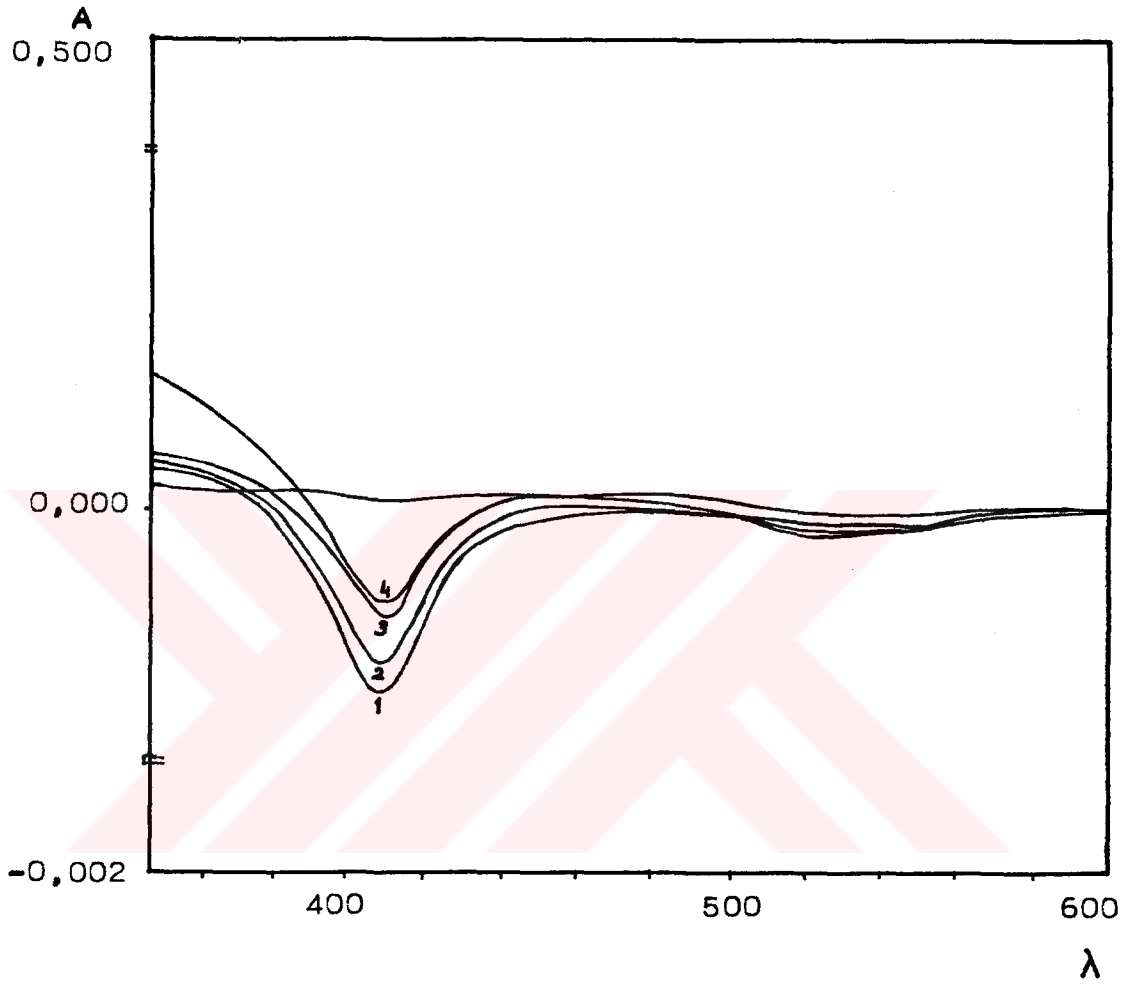


Şekil-17 (-.-.)Sitokrom c'nin Absorbsiyon Spektrumu. (—)Sitokrom c ile Uçucu Sigara Nitrozaminlerinin Etkileşim Absorbsiyon Spektrumu.

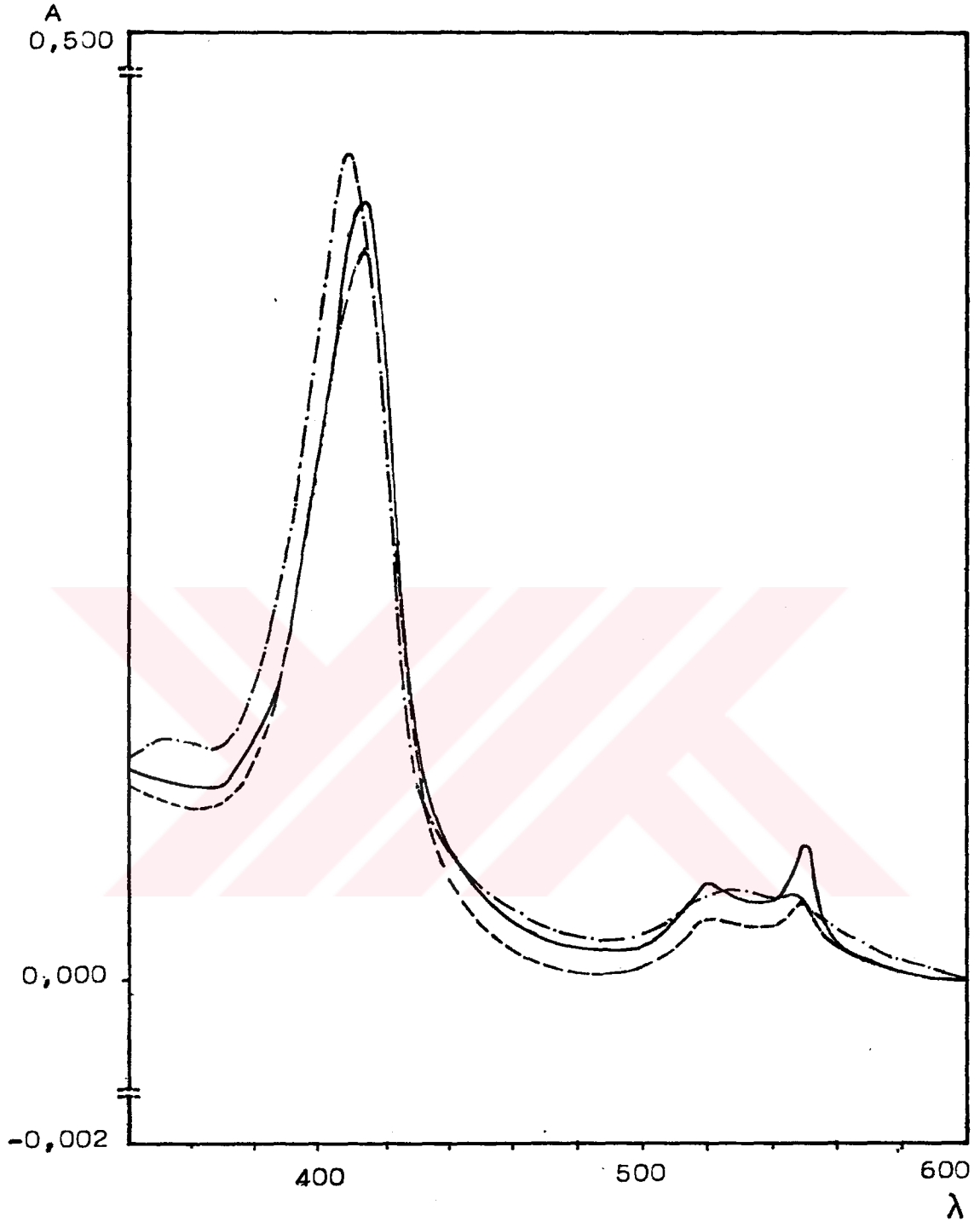
1.5 μ l, 2.10 μ l, 3.15 μ l, 4.20 μ l Uçucu Sigara Nitrozaminleri



Şekil-18 Sitokrom c ile (1) 5 μ l, (2) 10 μ l, (3) 15 μ l, (4) 20 μ l Uçucu Sigara Nitrozaminlerinin Etkileşimlerinin UV-VIS Fark Spektrumları.



Şekil-19 Sitokrom c ile (1) 5 μ l, (2) 10 μ l, (3) 15 μ l, (4) 20 μ l Uçucu Olmayan Sigara Nitrozaminlerinin Etkileşimlerinin UV-VIS Fark Spektrumları.



Şekil-20 Sitokrom c (-.-.), Sitokrom c ile DENA (—) Ve DMN (---)'nin Etkileşimlerinin Absorbsiyon Spektrumu.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Analizlenen 5 adet yerli sigaranın uçucu sigara nitrozaminlerini gösteren HPLC kromatogramı Şekil-4'dedir. Burada görüldüğü gibi nitrozaminler sigara dumanında gerek tür ve gerekse nicelik bakımından azımsanmayacak ölçüdedir. Bunlardan tanımlana bilen uçucu sigara nitrozaminlerinden Diötilnitrozamin (DENA) ve Dimetilnitrozamin (DMN) hakkında bilgi edinilmiş ve DENA, Maltepe de; 21, Filtresiz Bafrada; 13,9, Filtreli Bafrada; 6,2, Lüks Bitlis de; 5,5, Tokatta; 3,4 $\mu\text{g}/\text{Sigara}$, DMN ise Filtresiz Bafrada; 12,5, Lüks Bitlis de; 2,7 $\mu\text{g}/\text{sigara}$ olarak saptanmıştır.

Uçucu olmayan nitrozaminleri gösteren HPLC kromatogramında (Şekil-6) NNN ve NATB tanımlanabilmiştir (22).

Sigara dumanındaki bu nitrozaminlerle ilgili kaynak bulgulardan, her birinin çalışılan bütün hayvanlarda mutasyona neden olduğu belirtilmiş ve mutajenin bunların detoksifikasyonu sırasındaki ara ürün olduğu kanıtlanan gerçekler arasında gösterilmiştir (10).

Bulgularımızdan anlaşılacağı üzere sigara tiryakilerinin akciğer başta olmak üzere gastro - entestinal sistem hücreleri nitrozaminlerin doğrudan doğruya etkisi altındadır. Detoksifikasyon merkezi olan

karaciğer hücrelerinin büyük bir risk altında oldukları ayrı bir gerçek olarak karşımıza çıkmaktadır.

Yapılan önceki çalışmalarda, sigara içen ve içmeyen kişilerin tükürüklerinde DENA, DMN ve NPyr bulunmuştur(24,25). Ancak yaptığımız bu çalışma sonucunda sigara dumanında NPyr saptanamamıştır. Sigara dumanında görünmeyen NPyr'nin sigara içenlerin tükürüğünde ortaya çıkması yanma ürünleri içinde pirolidinin var olduğunu ve tükürüğün doğal bir bileşeni olan NO_2 'in varlığı ile de NPyr'e dönüşe bildiğini düşündürmektedir. Daha önceki yapılan çalışmalarda, uçucu sigara nitrozaminlerinin bir çoğunun, prosentez ile içme esnasında ve bazı tütün spesifik nitrozaminlerin ise tütünden dumana direkt transferi ile oluştuğunu göstermiştir(22).

Böylece hem sigara dumanındaki nitrozaminler ve hemde ağızda içme sırasında oluşan nitrozaminler ile tütün spesifik nitrozaminlerin sayısı artmakta ve sigara içenlerin, sigara bağımlı kanser oluşumuyla karşı karşıya oldukları anlaşılmaktadır.

Bir çok çalışmadan, nitrozolu bileşiklerin karaciğerde bir çok enzim aktivitesini etkilediği, yaygın doku nekrozuna ve daha sonrada kansere yol açtığı anlaşılmıştır(10,11,16,17,18).

Sigara nitrozaminlerinin mitokondri fraksiyonu ile inkübasyonu sonucu, mitokondri sitokromlarının sigara nitrozaminleri ile aktive olduğu gözlenmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalara göre mitokondri dış zarı enzimi olan sitokrom b_5 'in 413 nm'de yükseltgenmiş formunun, 424 nm'de ise indirgenmiş formunun absorpsiyon bantları olduğu bilinmektedir(29 , 30).

Sigara nitrozaminleri ile inkübe edilen mitokondri fraksiyonunun UV-VIS fark spektrumundan (Şekil-15,16) sitokrom b_5 'in bir redoks tepkimesine girdiği gözlenmiştir. 424 ve 405 nm'deki soğurma bantlarından sitokrom b_5 'in yükseltgenmiş formunun uçucu sigara nitrozaminleri ile inkübasyonu sonucu indirgendiği, buna karşılık NNN ve NATB 'ce zengin uçucu olmayan sigara nitrozaminleri ile inkübasyonu sonucunda ise indirgenmiş formunun arttığı ve uçucu nitrozaminler gibi mitokondride oksitlenmediği fikrini vermiştir.

Sitokrom c ile yapılan çalışmalarda ise sitokrom c'nin 416 nm de yükseltgenmiş formunun,407 nm de ise indirgenmiş formunun absorpsiyon bantları olduğu bilinmektedir(30).

Sigara nitrozaminleri ile inkübe edilen sitokrom c'nin de bir redoks tepkimesine girdiği gözlenmiştir. Soğurma bandından sitokrom c'nin yükseltgenmiş formunun 5 μ l uçucu sigara nitrozaminleri ve ayrıca 20 μ l DENA ve DMN ile 10 dakika inkübasyonu sonucu indirgendiği, ancak nitrozamin miktarı arttıkça sitokrom c'nin tekrar yükseltgendiği ve bu durumda kaldığı gözlenmiştir. Ancak bu sonuç uçucu olmayan sigara

nitrozaminleri ile yapılan çalışmada gözlenememiştir.

Sitokrom b_5 ve c ile yapılan çalışmalar sonucunda uçucu sigara nitrozaminlerinin bu sitokromlar için indirgen olduğu bulunmuştur. Bu indirgenme sigara nitrozaminlerinin sitokrom c üzerindeki amino grupları ile etkili olarak reaksiyon vermesinden dolayı olabileceğini düşündürmektedir. Her ne kadar nitrozaminlerin bağlanma yerleri kesinlikle bilinmiyorsa da bunların Demir'i indirgeyecek bir yer olan "hem" bölgesinin olabileceği sanılmaktadır.

Kimyasal karsinojenlerin hedef dokudaki proteinlere kovalent bağla bağlandıkları uzun yıllardan beri bilinmektedir. Protein ve nükleik asitlerin nükleofilik yani elektronca zengin kısımları, kimyasal karsinojenlerin hedefidir. Bu hedefler nükleik asitlerde, Adenin N-1, N-3 ve N-7 atomu, Sitozinin N-3 atomu, Guaninin N-3, N-7 ve O-6 atomu ile proteinlerde, Sistein ve Metiyoninin S, Histidinin N-1 ve N-3, Tirozinin ise C-3 atomu olarak saptanmıştır(2).

Yoshihiko ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kanserojen maddelerin varlığında rat karaciğerindeki sitokromların spektrofotometrik analizlerinden, mikrozomal sitokrom b_5 ve P-450 içeriği, kanserojen maddelerin varlığında derece derece azalmadığını ancak hepatomada birden bire azaldığını bulmuşlardır(31).

Sitokrom c + c₁'in konsantrasyonunun ise ratların 4'-metil- 4-Dimetil aminobenzen ile beslenmesiyle başlangıçta az arttığı, daha sonra da 16.Haftaya kadar derece derece azaldığını bulmuşlardır(31).

Yapılan bu çalışmada da sitokrom c ile nitrozaminlerin etkileşimlerinin absorbanları belli bir nitrozamin miktarına kadar artmakta daha sonra derece derece azalmaktadır.Sitokrom c ile uçucu ve uçucu olmayan sigara nitrozaminleri, DENA ve DMN'nin etkileşimlerinin UV-VIS fark spektrumlarından da görüldüğü gibi nitrozamin miktarı arttıkça sitokrom c'nin 407 nm deki yükseltgenmiş formunun absorpsiyon pikinin terslenmesi ve nitrozamin miktarına bağlı olarak azalması sitokrom c ile nitrozaminler arasında bir etkileşimin olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, Türk sigaralarının kanserojen içerikleri ve mitokondri de elektron transferini sağlayan sitokromlara etkileri göz önüne alındığında Türkiye'de nüfusun tiryaki kesiminin ve hatta pasif içicilerin ne derecede büyük bir riskin altına girdikleri kendiliğinden açıkça ortaya çıkmaktadır.

6. ÖZET

Nitrozaminlerin en önemli kaynaklarından biri olan sigara dumanında, gerek tür ve gerekse nicelik bakımından azımsanmayacak düzeyde nitrozamin bulunmaktadır.

Sigara dumanındaki nitrozaminlerin saptanması ve sitokrom c ile rat karaciğer mitokondri fraksiyonlarına etkilerinin araştırılması için yapılan bu çalışmada, en çok tüketilen yerli sigaralardan Maltepe, Tokat, Filtreli Bafra, Filtresiz Bafra ve Lüks Bitlis seçildi. Bu sigaraların dumanından elde edilen uçucu ve uçucu olmayan nitrozaminler Waters HPLC sisteminin HPLC silika kolonundan geçirilerek 254 nm de fotometrik dedektör ile monitörize edildi.

Bu çalışmanın sonunda nitrozamin düzeyleri sigara örneklerinde sırasıyla; Dietilnitrozamin (DNA) Maltepede; 21, Filtresiz Bafrada; 13,9, Filtreli Bafrada; 6,2, Lüks Bitliste; 5,5, Tokatta; 3,4 µg/sigara, dimetilnitrozamin (DMN) Filtresiz Bafrada; 12,5, Lüks Bitliste; 2.7 µg/sigara olarak saptandı.

Sigara dumanından elde edilen uçucu ve uçucu olmayan nitrozamin fraksiyonları, rat karaciğer mitokondri fraksiyonu ve sitokrom c ile inkübe edildi.

Etkileşimlerinin UV-VIS fark spektrumları alınarak bu spektrumlar sayesinde mitokondri sitokromlarının aktive olduğu gözlemlendi ve sitokrom c'nin uçucu sigara nitrozaminleri ile indirgendiği belirlendi.



7. SUMMARY

In the cigarette smoke which is the most important source of nitrosamines has a great deal of nitrosamines either variety and quantities.

Determination of the quantities of nitrosamines in cigarette smoke and their effects on cytochrom c with Rat liver mitochondria fractions have been obtained in this study. Mostly used Turkish cigarettes were chosen, such as Maltepe, Tokat, Filter Bafra, Non-Filter Bafra and Lux Bitlis.

Volatile and non volatile nitrosamines fractions of these cigarettes smoke have been injected to the HPLC silica column of waters HPLC system and monitored by 254 nm photometric detector.

As results of this study, Nitrosamines levels were; Diethylnitrosamine (DNA), Maltepe; 21, Non-Filter Bafra; 13, 9, Filter Bafra; 6, 2, Lux Bitlis; 5, 5, Tokat; 3, 4 μ g/cigarette, Dimethylnitrosamine (DMN), Non-Filter Bafra; 12, 5, Lux Bitlis; 2, 7 μ g/cigarette respectively in cigarette samples.

Volatile and nonvolatile nitrosamines fractions of cigarette smoke have been incubated with rat liver mitochondrial fraction and cytochrom c respectively

and UV-VIS difference spectra of their effects have been obtained. By these spectrums, it was determined that cytochrom c is reduced by volatile nitrosamines of cigarette smoke.



8. KAYNAKLAR

1. Farke, D.V.: "Biochemical Mechanisms Carcinogenesis. The Biochemistry of Foreign Compounds." Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, 30-31, 1974

2. Miller, E.C., Miller, J.A.; "The Metabolism of Chemical Carcinogens to Reactive Electrophiles and Their Possible Mechanism of Action Carcinogenesis." ACS. Monograph 173. Am. Chem. Soc. Wash. DC., 737-762, 1976

3. Hecht, S.S., Chen, C.B., Hiroto, N., Ornof, R.M., Tso, T.C., Hoffmann, D.; "Tobacco-Specific Nitrosamines; Formation From Nicotine In Vitro and During Tobacco Curing and Carcinogenicity in Strain A Mice." J. Natl Cancer Inst., 60, 4, 819-823, 1978

4. Wynder, E.L., Stellman, S.D.; "Comparative Epidemiology of Tobacco-related Cancers" Cancer Research ., 37, 4608-4622, 1977

5. Özdemir, M., Yaşar, Y.; "Studies on Analytical and Health Aspects of Cigarette Smoke." Doğa Tu. J. Eng. and Environ. 11, 2, 273-278, 1987

6. Deeb, B.S., Sloan, K.W.; Nitrates, Nitrates and Health Bulletin 750. Agricultural Experiment Station. Urbana Champaign. 32-33, 1975

7. Cooney, R.V., Ross, P.D., Bartolini, G.L., Ramsyer J.; "N-Nitrosamine and N-Nitrosamine Formation Factors Influencing the Aqueous Reactions of Nitrogen Oxide With Morpholine." Environ Sci. Technol. 21, 1 77-83 , 1985

8. Lijinsky, W., Eipstein, S.S.; "Nitrosamines as Enviromental Carcinogens." Nature , 225, 21-23, 1975

9. Mirvish, S.S., Wallcave, L., Eagen, M., Shubik, P.
"Ascorbate-Nitrite reaction: Possible Means of Blocking the Formation of Carcinogenic N-Nitroso Compounds." Science, 177, 65-68, 1972
10. Philipson, G.E., Iannides, C.: "A Comparative Study of the Bioactivation of Nitrosamines to Mutagens by Various Animal Species Including Man." Carcinogenesis, 5, 8, 1091-1094, 1984
11. Magee, P.N.: "Metabolism of Nitrosamines: an Overview." Microsomes, Drug Oxidations, and Chemical Carcinogenesis, 2, 1081-1089, 1979
12. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. 1, 95-106, Int. Agency for Res on Cancer, Lyon, 1972
13. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. 1, 107 - 123, Int. Agency for Res on Cancer, Lyon, 1972
14. Saprin, A.N., Ramseyer, J., McConn, J., Piette, L.H.: "Electron Spin Resonance and Optical Spectra of the Complexes of Dialkylnitrosamines with Cytochrome P-450." Biochemical and Biophysical Research Communications, 77, 2, 789 - 796, 1977
15. Argus, M.F., Hoch-Ligeti, C.: "Comparative Study of the Carcinogenic Activity of Nitrosamines." J. Natl Cancer Inst., 27, 3, 695 - 700, 1961
16. Atalay, A.: "In vitro Effects of Nitroso Compounds on Rat Liver LDH." C.Ü. Tıp Fak. Derg. 3, 3, 208 - 214, 1981.
17. Sezgin, I., Atalay, A.: "The Effects of DENA on Human Chromosomes." C.Ü. Tıp Fak. Derg. 7, 1, 28 - 34, 1985
18. Atalay, A., Aker, A.: "The Inhibition of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase by DENA." DOĞA Tıp ve Ecz. Derg. 11, 1, 8 - 12, 1987.

19. Friedman, M.A., Watt, K.M., Higgins, E.S.: "In vitro and In Vivo Effects of Dimethylnitrosamine on Mouse Liver Mitochondrial Function." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 154, 530-533, 1977
20. Brunnemann, K.D., Genoble, L., Hoffmann, D.: "Identification and Analysis of a new Tobacco-Specific N-nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol." Carcinogenesis, 8, 3, 465-469, 1987
21. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human. 37, 241-261 IARC, Lyon, France, 1985
22. Hoffmann, D., Adams, J.D., Brunnemann, K.D., Hecht, S.S.: "Assessment of Tobacco-Specific N-Nitrosamines in Tobacco Products." Cancer Research, 39, 2505-2509, 1979
23. Brunnemann, K.D., Yu, L., Hoffmann, D.: "Assessment of Carcinogenic Volatile N-Nitrosamines in Tobacco and in Mainstream and Sidestream Smoke from Cigarettes." Cancer Research, 37, 3218-3222, 1977
24. Sipahimalani, A.T., Chadha, M.S., Bhide, S.V., Pratap, A.I., Nair, J.: "Detection of N-Nitrosamines in the Saliva of Habitual Chewers of Tobacco." Food and Chemical Toxicology, 22, 4, 261-264, 1984
25. Cengiz, S., Üztop, N., Gürleyük, F., "A Comparative Study of some Nitrosamine Levels in Human Saliva and Cigarette Main Stream Smoke and Their Effect to Rat Liver Mitochondria and Microsome Cytochromes." Marmara Medical Journal, 1, 3, 55, 1988
26. Smith, E.L., Hill, R.L., et al.: "Cytochromes" Principles of Biochemistry, Chap. 16, 367-369, Sev. Ed. 1985
27. Hochman, J., Ferguson-Miller, S., Schindler, M.: "Mobility in the Mitochondrial Electron Transport Chain." Biochemistry, 24, 10, 2509-2516, 1985

28. Stonehuerner, J., Williams, J.B., Millet, F.: "Interaction between Cytochrome c and Cytochrome b₅." Biochemistry, 18, 24, 5422-5427, 1979
29. Sottocasa, G.L., Kuylenstierna, B., Ernster, L., Bergstrand, A.: "An Electron Transport System Associated With the Outer Membrane of Liver Mitochondria." The Journal of Cell Biology, 32, 415-438, 1967
30. Mahler, H.R., Cordes, E.H.: "Biological Oxidation." Biological Chemistry, Chap.15, 664-690, Sec.Ed. 1971
31. Oyanagui, Y., Sato, N., Hagihara, B.: "Spectrophotometric Analysis of Cytochromes in Rat Liver during Carcinogenesis." Cancer Research, 34, 458-462, 1974