

8357

T. C.

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

BAZI SİGARA NİTROZAMİNLERİ VE NİTRİTİN
SIÇAN (*Rattus norvegicus*) KARACİĞERİ
MİKROZOMLARINA VE GLUTATYON (GSH)
DÜZEYLERİNE ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

H. Nursevin ÖZTOP

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ : Doç. Dr. Salih CENGİZ

SİVAS

NİSAN - 1989

Y. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE;

İş bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Atilla ATALAY

Üye : Prof.Dr. Nazmi ÖZER

Üye : Doç.Dr. Salih CENGİZ

Atilla Atalay
Nazmi Özer
Salih Cengiz

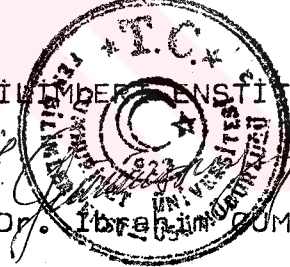
ONAY

Yukardaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

13./6./1989

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Prof.Dr. İbrahim GÜMÜŞSUYU





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



Annem 'e

TEŐEKKÖR

Araştırma Grevliliğim süresince; yetişmemde büyük katkısı olan, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, Doktora çalışmamda sürekli destek ve yardımını gördüğüm Sayın Hocam Doç. Dr. Salih Cengiz'e en içten teŐekkürü bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalarımda ilgi ve desteğini gördüğüm Sayın Prof. Dr. Atilla Atalay'a teŐekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarıma gönüllü olarak katılanlara ayrıca teŐekkr ederim.

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge-1. Sigara İçen Ve İçmeyen Kişilerin Tükürüklerindeki NO_2^- Derişimleri	24
Çizelge-2. Sigara İçen Ve İçmeyen Kişilerin Tükürüklerindeki DMN, DENA, ve NPyr Derişimleri	25
Çizelge-3. Sigara Dumanı DMN ve DENA Derişimi	25
Çizelge-4. Sigara İçen Erkeklerle Ait Bulgular	35
Çizelge-5. Sigara İçen Bayanlara Ait Bulgular	36
Çizelge-6. Sigara İçmeyen Erkeklerle Ait Bulgular	37
Çizelge-7. Sigara İçmeyen Bayanlara Ait Bulgular	38
Çizelge-8. Nitrit Enjeksiyonu Öncesi Ve Sonrası Rat Kanı GSH Düzeyleri	42
Çizelge-9. Sigara Nitrozaminleri Enjeksiyonu Öncesi Ve Sonrası Rat Kanı GSH Düzeyleri	42

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil-1. NAMM ve NAMB'nin Mikrozoamlarda Bozunması	4
Şekil-2. DMN'nin Metabolizasyonu	7
Şekil-3. Bazı Tütün Alkaloidleri	9
Şekil-4. Tütün Üzgöl Nitrozaminlerinin Oluşumu	11
Şekil-5. Methemoglobinin Hemoglobine Dönüşümü	13
Şekil-6. RH Substratı İle Cyt P-450'nin Hidroksilasyon Mekanizması	14
Şekil-7. Sigaraların İçirildiği Yarı Otomatik İçici Düzeneği	17
Şekil-8. Nitrit İyonunun Saptanmasında Kullanılan Düzenek	17
Şekil-9. Nitrit İyonu Saptanmasında Kullanılan Standart Eğri	17
Şekil-10. Tükürük Üzütlerinin Kromatogramı	26
Şekil-11. Sigara Dumanı Uçucu Nitrozaminlerinin HPLC Kromatogramı	27
Şekil-12. Sigara Dumanı Uçucu Olmayan Nitrozaminlerinin Kromatogramı	28
Şekil-13. Standart DENA ve DMN'nin HPLC Kromatogramları	29
Şekil-14. Mikrozoam Kesiti İle Nitrit İyonlarının Etkileşim UV-VIS Fark Spektrumu	30

Şekil-15. Mikrozom Kesiti İle Uçucu Sigara Nitrozaminlerinin Etkileşim UV-VIS Fark Spektrumu	31
Şekil-16. Sigara Dumanı Uçucu Nitrozaminlerinin Absorpsiyon Spektrumları	32
Şekil-17. Standart GSH Derişim Grafiği	34
Şekil-18. Rat Kanı Sigara Nitrozaminleri Enjeksiyonu Sonrası Zamana Karşı GSH Derişimi Grafiği	41
Şekil-19. Arilnitrozo Bileşenleriyle Glutatyon Konjugasyonunun Mekanizması	48

KISALTMALAR

DENA	: Dietilnitrozamin
DMN	: Dimetilnitrozamin
NPyr	: N-Nitrozopirrolidin
NNN	: N-Nitrozonornikotin
NNK	: 4-(N-metil-N-Nitrozamino)-1-(3-piridil)- 1-Butanon
NAB	: N-Nitrozoanabazin
NAT	: N-Nitrozoanatabin
NAMM	: Nitrozoasetoksimetilmetilamin
NAMB	: Nitrozoasetoksimetil-n-bütilamin
Cyt P-450	: Sitokrom P-450
GSH	: İndirgenmiş Glutatyon
GSSG	: Yükseltgenmiş Glutatyon
ISE	: İyon Seçimli Elektrot
HPLC	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatograf

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
4. BULGULAR	23
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	45
6. ÖZET	54
7. SUMMARY	56
8. KAYNAKLAR	59

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Doğada çevre kirleticisi ve kanserojen bileşikler olarak bulunan nitrozaminlerin önemli kaynaklarından biri de sigara dumanıdır. DMN, DENA, MENA, NPyr gibi uçucu nitrozaminler ve NNN, NNK, NAB, NAT gibi uçucu olmayan nitrozaminler sigara temel ve yan dumanında saptanmıştır (1,2).

Ağız kanserleri ile kronik sigara içimi ve tütün çiğneme arasında bağlantı kurulmuştur. İçim sırasında ağız boşluğunda oluşan NNN'in farelerde akciğer tümörü oluşumuna, ratlarda özafagus ve burun boşluğunda karsinomaya neden olduğu gösterilmiştir. NAB'nin özafagus tümörleri oluşturduğu, NNK'nın akciğer kanserine neden olduğu belirtilmektedir (3).

Kronik sigara içiminin akciğer dokusunda yaptığı etki DNA replikasyonu ve onarımıyla ilgilidir. Farelerde invivo ve invitro DNA replikasyonu ve normal DNA sentezinde de değişiklikler oluşturduğu bilinmektedir. Bu da kronik sigara içimi ile genetik materyalde de değişme olabileceğini göstermektedir (3).

Nitrozaminlerin vücutta nitrit ve ikincil aminlerden de oluştuğu bilinmektedir (4). Nitrit ayrıca

methemoglobin oluşturarak oksijen taşımını engeller.

Bu çalışmada; ülkemizde en çok tüketilen yerli sigaraların nitrozaminlerinin saflaştırılıp, Cyt P-450 ile etkileşiminin incelenmesi, sigara içen ve içmeyen kişilerin tükürüklerindeki nitrit ve nitrozamin düzeylerinin karşılaştırılması, sigara içiminin önemli bir detoksifikasyon bileşiği olan GSH zerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

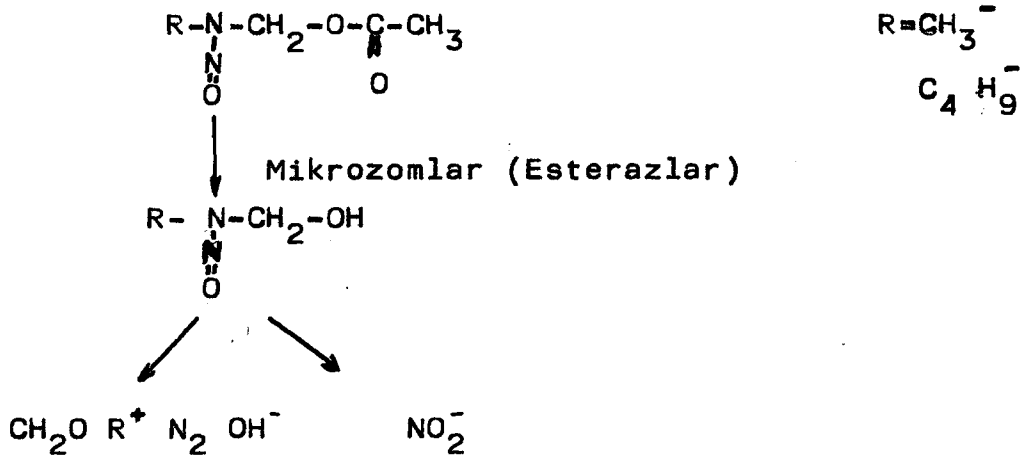
2. GENEL BİLGİLER

2.1. NİTRİT

Nitritlerin temel kaynağı olan nitratlar; başlıca sebzeler ve içme suyuyla alınır. Nitratlı gübrelerin kullanımının artması, sebzelerde nitrat birikimini yükseltir. Suyun saflaştırılmasında nitratlı süzme uygulanması sonucu içme suyu nitrat düzeyi de artmaktadır (5). Besin koruyucusu olarak kullanılan nitrat ve nitritten nitrozomiyoglobin oluşur (6).

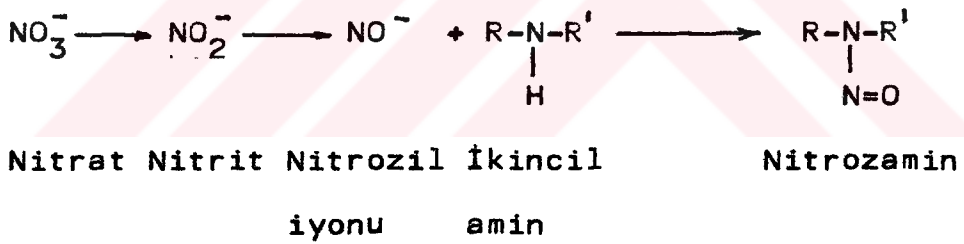
Besinlerle alınan nitratlar, barsak florasındaki mikroorganizmalar ve diğer etkenlerle nitritlere indirgenirler (7).

Nitrit; Cyt P-450'nin katalizlediği nitrozamin moleküllerinin bir elektron indirgenme tepkimesi sırasında da oluşur (Şekil-1). NAMM (Nitrozoasetoksimetilmetilamin) ve NAMB (Nitrozoasetoksimetil-n-bütilamin) su ve esterazlarla hidrolizlendiğinde, serbest α -hidroksillenmiş nitrozamin oluşur. Bu da kolaylıkla formaldehit ve bütil diazohidroksit gibi nitrozamin metabolizması kanserojenlerine ve NO_2^- 'ye dönüşür (8).



Şekil-I NAMM ve NAMB' nin mikrozozlarda bozunması

Vücuda dışarıdan alınan veya burada oluşan nitritler, ikincil ve üçüncül aminlerle tepkime sonucu nitrozamin oluştururlar. Bu yolun aşağıdaki şekilde olduğu gösterilmiştir (9).



Yüksek nitrit düzeyleri karaciğer mitokondrial fonksiyonlarını bozar(10).Memeli karaciğer Cyt P-450 ile invitro etkileşerek kararsız Cyt P-450-NO kompleksi oluşturur ki; bu kompleks hemen inaktif Cyt P-420-NO kompleksine dönüşerek Karışık Fonksiyonlu Oksidazların aktivitesini inhibe eder .

Sodyum nitrit ve morfolinin eş zamanlı verilmesinin hayvanların midelerinde N-nitrozomorfolin ürettiği , fare ve ratlarla onların embriyolarında tümör

oluşturduğu saptanmıştır (12).

Nitrit; hemoglobini oksitleyerek methemoglobin oluşumuna neden olur. 300 mg sodyum nitritin 1 litre kanda 20 g methemoglobin oluşturduğu saptanmıştır. Kısa peryotlarla nitrit alımı sonucu methemoglobin oluşumu hızlıdır. Bebeklerde hemoglobinin fetal şekli($\alpha_2\gamma_2\text{F}$) yetişkinlere göre daha çabuk oksitlenir. Çünkü onlarda eritrositlerin hemoglobini indirgemesi için gerekli enzim sistemleri gelişmemiştir. Methemoglobinemianın %15 olması siyanozis ve deride mavi renk oluşturur. %30-40 olması anoxia semptomlarına, başağrısı, başdönmesi, zafiyet, nefes darlığı ve taşikardiye neden olur. Yüksek derişimlerde kusma, baygınlık, bilinç kaybı gözlenir. %70 methemoglobinemiada dolaşımın zayıflaması ve ölüm görülebilir (13).



C ve E vitaminleri gibi antioksidanlar nitritamin etkileşimini önlerler. Yüksek dozda vitamin E verilmesinin DMN'nin akut hepatotoksitesinde azalmaya neden olduğu, metabolizmasının yavaşladığı ve demetilaz enzim aktivitesini azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca askorbik asitin de midede sodyum nitritten DMN oluşumunu engellediği bildirilmiştir (15).

2.2. NİTROZAMİNLER

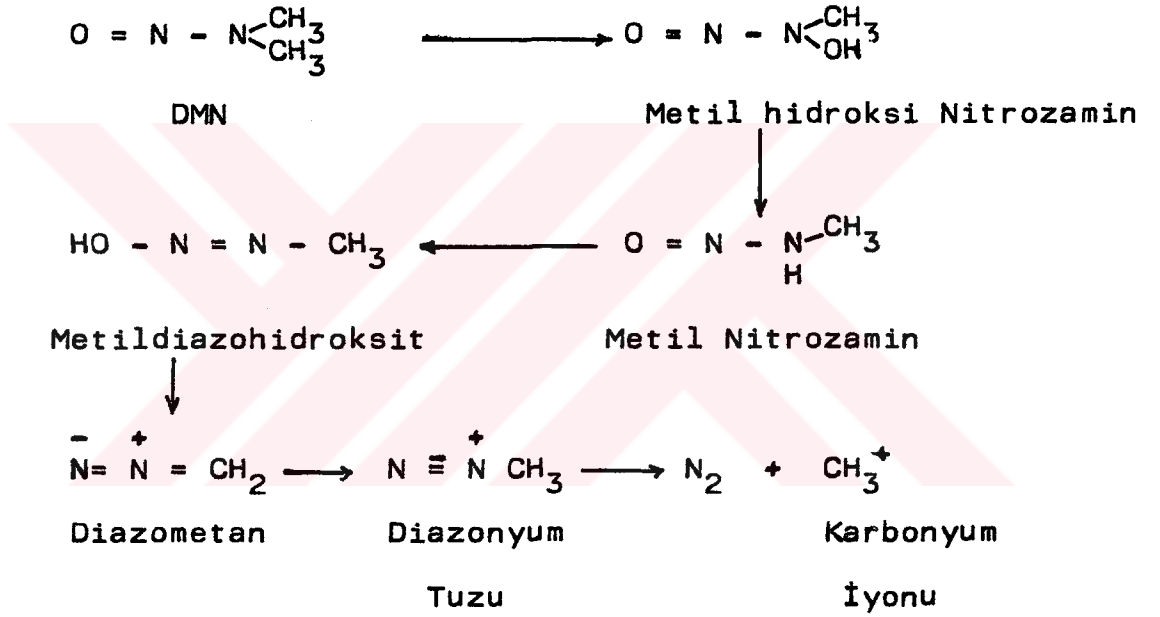
Nitrozaminler; genel formülü $\begin{matrix} R \\ \searrow \\ N-N=O \\ \nearrow \\ R \end{matrix}$ olan karsinojenik maddelerdir. İlk kez 1950'de hepatotoksik ajan oldukları ortaya kondu. Daha sonra; koruyucu olarak nitrit katılmış besinlerle beslenen kürk hayvanlarında karaciğer hastalıklarına ve ölümlere neden olduğu gözlemlendi (13).

Deney hayvanlarında ve insanlarda ikincil ve üçüncül amin yapılı ilaçların midede asit ortamında nitrit ile etkileşerek nitrozamin türevlerinin oluştuğu gözlenmiştir. Sıçanlara aminoprin, fenasetin, oksitetrasiklin ve diğer birçok amin türevi ilaçların sodyum nitrit ile birlikte bir süre ağızdan verilmesinin, yalnızca DMN verildiğinde oluşana benzeyen türde karaciğer tümörü yaptığı bulunmuştur. Piperazinin sodyum nitritle birlikte verilmesi ise; invivo oluşan N-nitrozopiperazin nedeniyle hayvanda akciğer adenomu yapar. Ağızdan alınan ilaçların etkileşmesi sonucu da nitrozamin oluşabilir. Örneğin; organik nitratlar (izosorbid - dinitrat) propanolol ile birlikte verildiğinde N-nitrozopropanolol oluşur (7).

Doğrudan yiyeceklerle alınan veya asidik ortamda ikincil aminlerle değişik nitrozolama ajanları(NO^+ , N_2O_3 , XNO , $AcONO$) ile tepkiyerek oluşan nitrozaminlerin(16) karsinojenik ve sitotoksik etki göstermeleri için metabolik aktivasyonları gereklidir. Aktivasyon

işlemi genellikle Cyt P-450 bağımlı tepkimelerle gözlenen α C'unun oksitlenmesini içerir (17,18,19) . Aktivasyon sonucu azot yanındaki gruplarla nitrozaminler kuvvetli reaktif metabolitlerine çevrilirler.

Alifatik dialkilnitrozaminler kolayca monoalkilnitrozaminlere metabolize olurlar ve bunlar da bozularak diazoalkanlar oluşur. Örneğin; DMN aşağıdaki tepkime sırasına göre metabolize olur (13).



Şekil-2. DMN'nin Metabolizasyonu

Oluşan bu reaktif metabolitler, makromoleküllerle birleşerek hepatoselluler zarara neden olurlar ve DNA bazlarıyla birleşerek kanserojenik etki yaparlar(20). Karbonyum iyonu; DNA'yı metilleyerek O⁶- metilguanin 3-metil adenin, 7-metil guanin oluşturur.DNA sentezi

sirasında bazlarda eşleşim bozukluğu oluşturup mutasyona neden olur(21,22,23).

Otuzun üzerinde nitrozaminin burun boşluğu kanseri oluşturduğu gözlenmiştir (24). DMN'nin akciğer, karaciğer ve böbrek için önemli bir kanserojen olduğu belirtilmiştir(25).

Sıklık nitrozamin olan nitrozopirolidin etlerin pişirilmesi ve işlenmesi sırasında ve sigara dumanında oluşur (26). Karaciğer mikrozomları mutajen ara ürünler oluşturur.

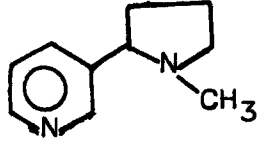
Diş hastaları ve takma diş kullananlarda maya oluşumu nedeniyle pH düşmesi gözlenmekte ve nitritten nitrozamin oluşumuna elverişli ortam hazırlanmaktadır(27).

2.3. TÜTÜN VE SİGARA NİTROZAMİNLERİ

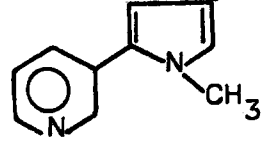
Tütün; ilk kez Antil Adaları'ndan Tobago'da bulunmuştur. Daha sonra; İspanyol gemiciler tarafından Avrupa'ya getirilmiştir. Türkiye'de 1605 yılından beri kullanılmaktadır. En yaygın tütün içimi sigara ile dir.

Sigara dumanındaki zararlı maddeler olarak; nikotin, toksik gazlar, iritan maddeler, aromatik alkoller, fenoller, yağ asitleri ve nitrozaminler sayılabilir(28).

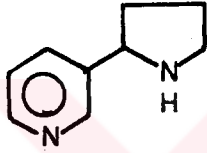
Tütün özgül nitrozaminleri; tütün alkaloidlerinin türevleridirler. Bunların pek çoğu piridin halkası içerirler. Bazı tütün alkaloidleri Şekil-3'te gösterilmiştir.



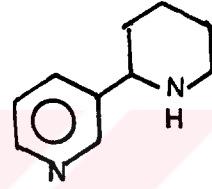
Nikotin



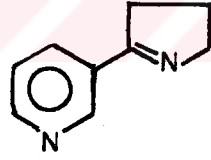
Nikotrin



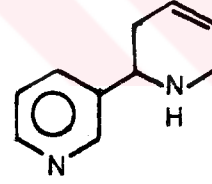
Nornikotin



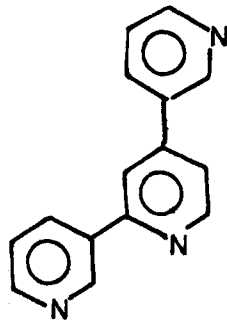
Anabazin



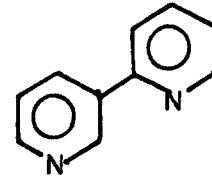
Myosmin



Anatabin



Nikotellin



İzonikotin

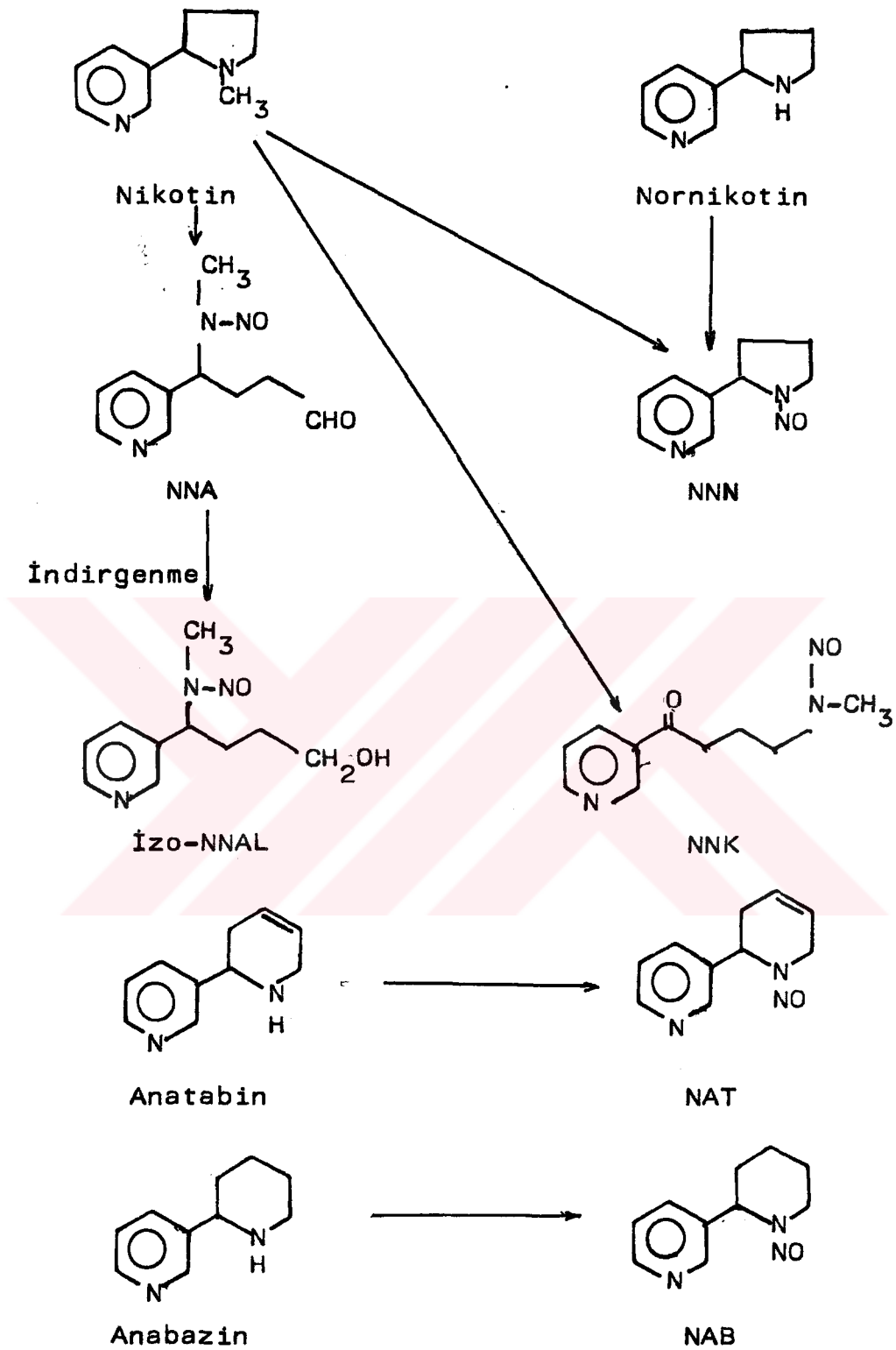
Şekil-3. Bazı Tütün Alkaloidleri

Nikotin; sigara dumanının içerdiği alkaloidlerin %95'-ini oluşturur. Sigara başına tüketilen tütün miktarı 0.7-1 g'dır. Bu; 9-17 mg nikotin içerir. Bunun %25-31'i pirolizle bozunur. %30-40'ı yan sigara dumanına taşınır. %5-10'u filtresiz sigaranın ucunda kalır. Filtrede de %25-71'i tutulur. Diğer alkaloidler sigara dumanında sigara başına 5-50µg olarak belirirler. Tütünde bulunmayan diğerleri piroliz ürünü olarak sigara içiminde oluşurlar (13).

Sigara dumanının uçucu olmayan nitrozaminleri; N-nitrozonornikotin (NNN), N-nitrozoanatabin (NAT) ve 4-(N-metil-N-Nitrozamino)-1-(3-piridil)-1-Butanon(NNK) dur. Bunların nikotinden oluşumu Şekil-4'te gösterilmiştir (29).

Hoffmann ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; 5 farklı sigara tütününde; 0.22-7 ppm NNN, 0.13-0.74 ppm NNK ve 0.44-3.2 ppm NAB bulunmuştur. Aynı sigaraların temel ve yan dumanında ise sırasıyla; 0.24-37, 0.15-6.1 µg/sigara NNN, 0.11-0.42, 0.19-0.66 µg/sigara NNK ve 0.33-4.6, 0.15-1.5 µg/sigara NAB bulunmuştur (30).

Brunnemann ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada uçucu nitrozaminler temel sigara dumanında; 1.7-97 ng DMN, 0.1-9.1 ng MENA, 4.8 ng üzerinde DENA, 2.6-52 ng NPyr, yan sigara dumanında; 680-1770 ng DMN, 9-75 ng MENA, 8-73 ng DENA, 204-612 ng NPyr olarak bulunmuştur (1).



Şekil-4. Tütün Özgül Nitrozaminlerinin Oluşumu

Ratlarla yapılan deneylerde; NNN ve NNK' nin burun boşluğu, akciğer, esophagus, trachea ve karaciğer tümörleri oluşturduğu açıklanmıştır (31).

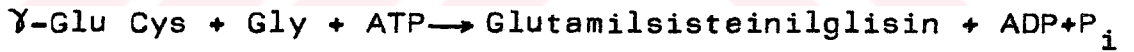
2.4. GLUTATYON

γ -Glutamil sisteinil glisin; bir tripeptittir. Endojen peroksitler ve serbest radikallerin yokedilmesinde, proteinlerin -SH grubunun korunmasında, zararlı bileşenlerin detoksifikasyonunda, disülfid değişim tepkimelerinde, membran boyunca amino asit taşınmasında önemli görevleri vardır.

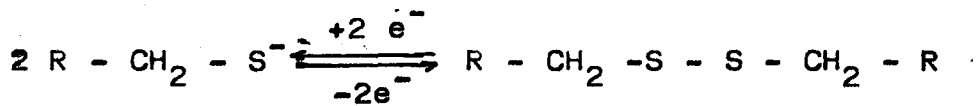
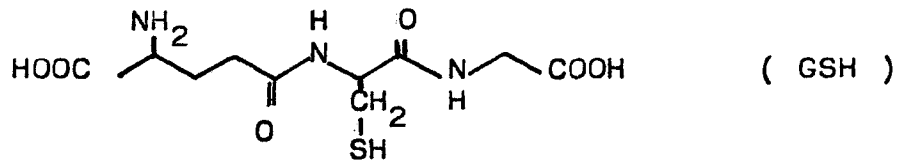
Glutatyon eritrositlerde aminoasitlerden sentezlenir. İki enzim gereklidir. γ - Glutamil sistein sentetaz enzimi sentezin ilk adımını katalizler.



İkinci adımda Glutatyon sentetaz görev yapar (32).

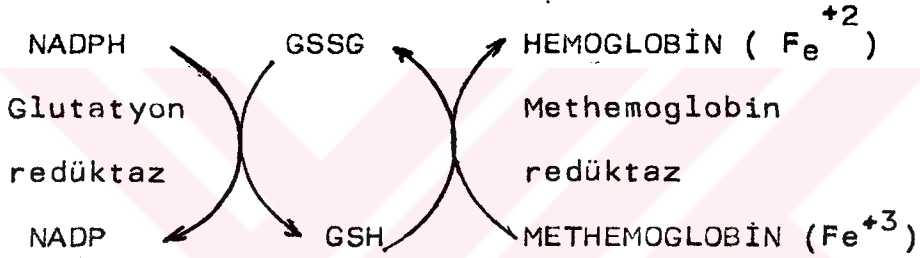


Zararlı bileşenler ve onların metabolitlerinin bulunması durumunda eritrositlerdeki glutatyon oksitlenmiş şekline çevrilir (33).



Normalde, NADPH ' ın harcanmasıyla GSSG, GSH'a yeniden indirgenir. Ancak normal olmayan eritrositlerde glukoz 6 - fosfat dehidrogenaz eksikliği NADPH ' ın azalmasına neden olur. Glutatyonun indirgenmesi azalır. Eritrositler parçalanır, hemoglobin oksitlenerek bozunur (23).

Şekil-5'te görüldüğü gibi glutatyon; methemoglobin hemoglobine çevrilmesine yardımcıdır(13).

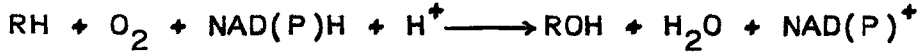


Şekil-5. Methemoglobinin, Hemoglobine Dönüşümü
Eritrositlerde GSH eksikliği temel metabolik işlemlerde ağır bozukluklara neden olur ve hemoliz oluşturur. Pentoz Fosfat Yolu'nun işlevi için gerekli enzim düzeyi yaşlı eritrositlerde azalır. Ayrıca soya çekim olarak enzim eksikliği de gözlenebilir. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi eksikliği olan hastalara çeşitli ilaçlar verildiğinde; GSH düzeyinde hızlı bir azalma gözlenir. Yaşlı hücrelerde enzim eksikliğinin çok büyük olması sonucu o hücreler hemolizlenir(34).

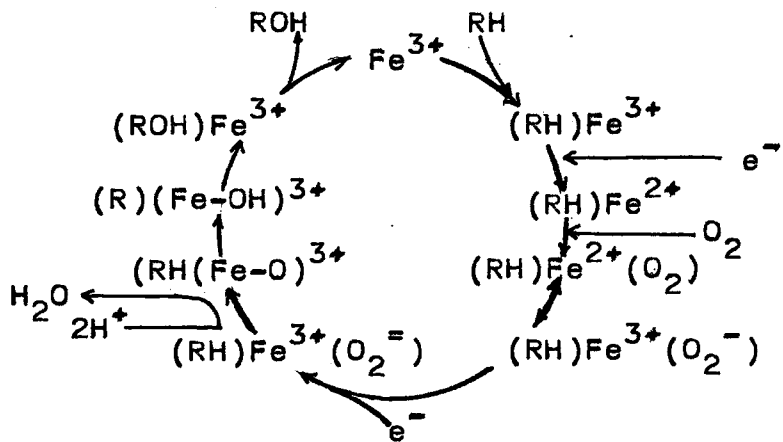
Glutatyon; kuvvetli nükleofildir ve elektrofilik metabolitlerle tepkir. Glutatyon konjugatları; N-asetil-sistein ve merkaptürik asit türevleridir(23).

2.5. SİTOKROM P-450

İndirgenmiş durumda CO ile birleştiğinde 450 nm'de maksimum absorpsiyon gösteren bir sitokromdur. Birçok hayvan dokusunda, bitkiler ve mikroorganizmalarda bulunur ve hidrofobik bileşenlerin birçoğunun monooksijenasyonunu katalizler. Cyt P-450 aşağıda gösterilmiş olan redoks tepkimesinde redoks enzimi veya elektron transferleyici protein varlığında oksijenleyici katalist olarak görev yapar.



Karaciğer Cyt P-450 sistemi; yalnızca alifatik ve aromatik karbonların katalizini değil, N-oksidasyon, desülfirasyon, ve dehalojenizasyon tepkimelerini de kapsar. Genellikle xenobiotiklerin detoksifikasyonunda; onları suda çözünür ve salgılanabilir hale getirirse de bazı durumlarda bileşenler oldukça mutajenik, sitotoksik veya karsinojenik özellik kazanırlar (32).



Şekil-6. RH Substratı İle Cyt P-450'nin Hidroksilasyon Mekanizması

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

Deneysel çalışmalarda; C.Ü.Fen-Ed.Fak.Kimya Bölümü ve C.Ü.Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda bulunan madde, cihaz ve malzemeler kullanıldı. DMN ve DENA Fluka, DTNB Boehringer Mannheim, NaNO_2 , Na_2SO_4 , H_2SO_4 , NaOH, Al_2O_3 , KCl, NaCl, Na_2HPO_4 , NaHPO_4 , askorbit asit, sodyum sitrat, metafosforik asit, EDTA, GSH, metil alkol, kloroform ve sikloheksan Merck firmasından sağlandı.

Nitrit saptanmasında: Orion Research Model 95-46 NO_2 seçimli elektrot, nitrozamin saptanmasında Waters Associate 6000A Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatograf (HPLC) mikrozomların eldesinde: Beckman J-21 soğutmalı santrifüj, Beckman L-5-70 ultrasantrifüj ve Braun Potter Elvehjen doku homojenizatörü, fark spektrumlarının alınmasında Hitachi Model 220 Spektrofotometre, GSH düzeylerinin saptanmasında Perkin Elmer Model 35 Spektrofotometre, buharlaştırma işlemlerinde Heidolph Vakumlu döner buharlaştırıcı kullanıldı.

Sigara dumanının tutulmasında kendi yapımız aygıt (Şekil-7), nitrozaminlerin ayrılmasında Al_2O_3 dolgu kolon kullanıldı.

3.2. YÖNTEMLER

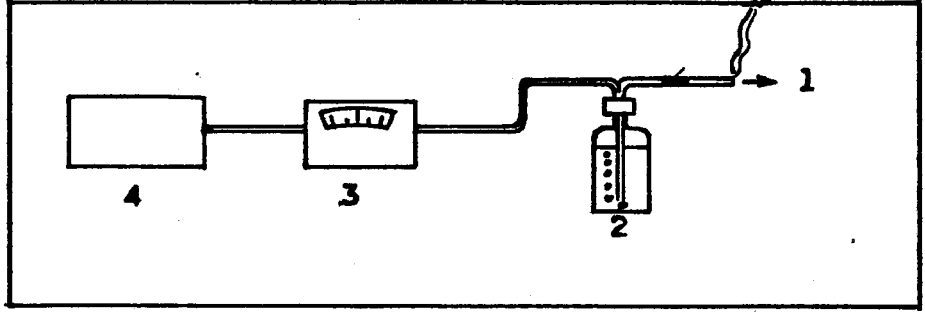
3.2.1. Gönüllülerin Tükürüklerinde Nitrit İyonu Saptanması:

Nitrit analizleri ; gönüllü tiryakiler ve sigara içmeyenlerin tükürüklerinde yapıldı. 200 mg askorbik asit içeren ağız kapaklı cam örnek kaplarına toplanan 20 ml tükürük örnekleri 1/1 oranında sulandırıldı. Aynı şekilde sulandırılmış standartlara karşı ISE Yöntemiyle Orion Research NO₂ gaz duyarlı elektrotla ölçüldü. (Şekil-8). Ölçümler için Na₂SO₄/H₂SO₄ karışımı ile pH 2' ye düşürüldü (35).

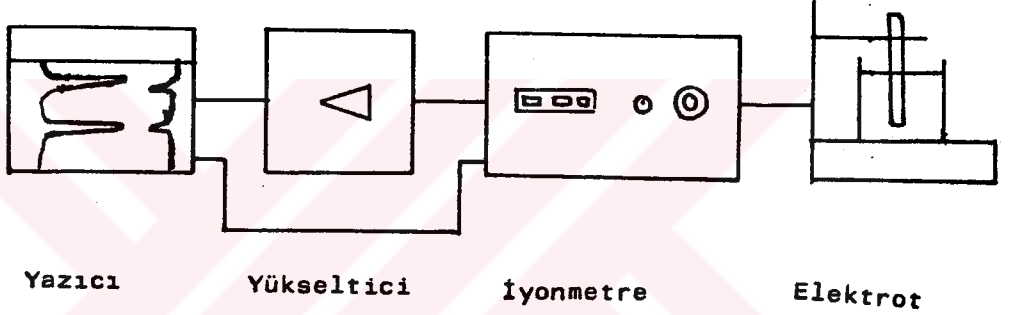
İşlemin Teorisi: ISE yöntemiyle nitrit iyonunun saptandığı düzenek şeması Şekil-8' de gösterilmiştir. NO₂ elektrot; örnek çözeltiyi elektrot iç çözeltisinden ayıran hidrofobik gaz geçirici bir zar kullanır. Nitrit içeren örneğin asitlendirilmesiyle nitroz asit gaz anhidritleri, zarın her tarafında azot oksitlerinin (NO , NO₂ , N₂O₃ ve N₂O₄) basıncı aynı olana dek yayılırlar. Gaz anhidritlerinin alınan örnekteki kısmi basıncı onların derişimiyle orantılıdır.



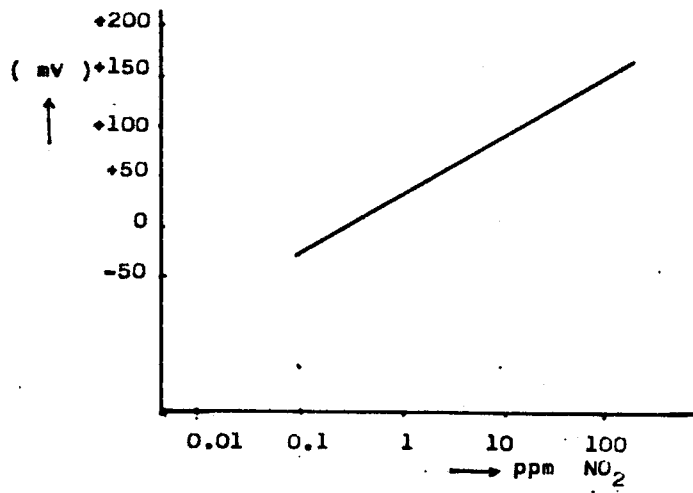
Deney sırasında 10⁻² - 10⁻⁶ M NaNO₂ standartları aynı işlemlerden geçirilerek standart eğri elde edilir. Daha sonra örneklerdeki NO₂⁻ düzeyi bu standart eğri-den saptanır(Şekil-9).



Şekil-7. Sigaraların İçirildiği Yarı Otomatik İçici Düzeneği (1. Sigara, 2. Toplama Şişesi 3. Gaz Sayacı 4. Vakum Pompası)



Şekil-8. Nitrit İyonunun Saptanmasında Kullanılan Düzenek



Şekil-9. Nitrit İyonu Saptanmasında Kullanılan Standart Eğri

3.2.2. Gönüllülerin Tükürüklerinde Nitrozamin

Saptanması :

200 mg askorbik asit üzerine toplanan 20 ml tükürük örneklerinin pH'ı 4.5 yapılarak 2x10 ml CH_2Cl_2 ile özütlendi. Nikotin, nitroalkan v.b. içeriklerini atmak için özüt 2x10 ml 2 N NaOH ile yıkanıp 3000 dev/dk da santrifüjlendi. Organik faz Na_2SO_4 ile kurutulup değiştirildi ve 0.45 μm lik milipore süzgeçten süzüldü. Örnekler ve aynı işlemleri görmüş standart çözeltiler 10 μl lik enjeksiyonlar halinde Waters HPLC, Altech Econosil-C-18 kolondan metil alkol / su (80/20) çözücü sistemiyle geçirildi. 254 nm fotometrik monitordan alınan kromatogramlar yardımıyla tükürük nitrozamin düzeyleri bulundu (36).

3.2.3. Sigara Dumanı Nitrozaminlerinin Eldesi :

Sigara nitrozaminlerinin HPLC ile saptanması için en çok tüketilen yerli sigaralardan Maltepe, Tokat, Bafra (filtreli ve filtresiz) ve Lüks Bitlis sigaraları seçildi. Her bir örnekten 20 adet sigara yarı otomatik içicide (Şekil-7) yakılarak duman içeriğinin 100 ml 20 mM askorbik asit + sitrat tamponuna (pH= 4.5) geçmesi sağlandı. 2x50 ml kloroform ile özütlenerek 1 g Na_2SO_4 eklenmesiyle Heidolph vakumlu döner buharlaştırıcıda 55 C'ta 5 ml'ye dek buharlaştırıldı. Elde edilen örnek 70 g Al_2O_3 içeren kolona verildi.

Uçucu nitrozaminler 200 ml kloroform ile kolon-

dan alındı. kloroform vakumlu döner buharlaştırıcıda buharlaştırıldıktan sonra uçucu nitrozaminler 10 ml (pH= 7.5) fosfat tampona alındı (30).

Kolonda kalan ve uçucu olmayan nitrozaminler 200 ml kloroform / aseton (4:1) karışımı ile alındı. Çözücü buharlaştırılarak uçucu olmayan nitrozaminler 10 ml fosfat tampona toplandı.

3.2.4. Sigara Dumanı Nitrozaminlerinin HPLC İle Saptanması :

Sigara dumanından elde edilen uçucu ve uçucu olmayan nitrozamin örnekleri 0.45 µm lik milipore süzgeçten süzülerek 2 µl lik enjeksiyonlar halinde Waters HPLC Silika kolondan kloroform / sikloheksan (70:30) çözücü sistemiyle geçirildi. (çözücü hızı:1 ml/dk, kağıt hızı:0.5 cm / dk, 0.01 AUFS) 254 nm fotometrik monitordan alınan kromatogramlardan nitrozaminler saptandı.

3.2.5. Rat Karaciğer Mikrozoim Fraksiyonlarının Hazırlanması :

80 mg/kg Luminal enjekte edilen rat 4 gün sonra boynu kırılarak öldürüldü. Karaciğeri çıkarılarak soğuk 0.15 M KCL çözeltisi ile yıkandı. Tartılan karaciğer gram yaş doku başına 3 ml 0.15 M KCL eklenerek Braun Peter Elwehjen doku homojenizatöründe dört vuruşta homojenize edildi. Homojenat J2 - 21 Beckman santrifüjü ile +4°C'ta 15000 g de 30 dk santrifüjlendi. El-

de edilen süpernatant Beckman L5-75 B Ultrasantrifüjde 105000 g de +4 °C ta 60 dk santrifüjlendi. Toplanan çökelek 0.05 M (pH = 7.5) fosfat tamponda çözüldü.

3.2.6. Rat Karaciğer Mikrozoim Fraksiyonuyla Sigara Nitrozaminlerinin UV-VIS Fark Spektrumu :

50 µl mikrozoim 2.5 ml pH=7.5 fosfat tampon içerisinde 50 µl sigara nitrozaminleri ile 36 °C ta 15 dk inkübe edildikten sonra 50 µl mikrozoim + 2.5 ml tampona karşı Hitachi Model 220 Spektrofotometrede fark spektrumu alındı.

3.2.7. Rat Karaciğer Mikrozoim Fraksiyonuyla Nitritin Etkileşim UV-VIS Fark Spektrumu :

20000 g de elde edilen süpernatant 0.0025 M NO₂⁻ ile etkileştirilip 5,10,15. dakikalarda fark spektrumu alındı.

3.2.8. Sigara İçen Ve İçmeyen Kişilerin Kanlarındaki Glutatyon (GSH) Düzeylerinin Saptanması :

Kullanılan Çözeltiler:

Çöktürücü: 1.67 g meta fosforik asit+ 0.2 g EDTA + 30 g NaCl / 100 ml

Fosfat Çözeltisi: 0.3 mol/l Na₂HPO₄

DTNB Çözeltisi: 40 mg 5,5'- ditiobis (2-nitrobenzoik asit); 1 g/dl sitrat çözeltisi içinde

GSH Standartları: (m/v) %10 - %100'lük çözeltiler

Sigara içen ve içmeyen gönüllülerden alınan kan örneklerine aşağıda gösterilen sıradaki işlemler uygu-

landı:

1. 0.2 ml tam kana 1.8 ml su eklenip hemolizlendi.
2. 3.0 ml çöktürücü eklenip karıştırıldı.
3. Oda sıcaklığında 5 dk beklendikten sonra süzüldü.

4. Absorbans ölçümü için kör ve örnek tüpleri

hazırlandı:

<u>Çözelti (ml)</u>	<u>Kör</u>	<u>Örnek</u>
Süzüntü	----	2.0
Çöktürücü	1.2	----
Su	0.8	----
Fosfat tampon	8.0	8.0
DTNB	1.0	1.0

5. 412 nm'de Perkin Elmer Model 35 Spektrofotometrede absorbanslar okundu.

6. Alınan kan örneklerinin hematokritleri saptandı.

7. GSH standartlarına süzme adımı atlanarak yukarıdaki işlemler uygulandı (37).

3.2.9. Rat Kanı GSH Düzeylerinin Saptanması:

Ortalama 250 \pm 5 g ağırlığındaki 20 adet ratan alınan kanlarda GSH düzeyleri saptandı. Bunlardan 3 tanesine kan alındıktan 4 gün sonra 3 ml Bafra sigarası uçucu nitrozaminleri enjekte edilerek 1/2, 3, 5. saat sonunda kalplerinden alınan kanda GSH düzeyleri saptandı.

Enjeksiyon öncesi GSH düzeyleri saptanmış 10 adet

rata 4 gün sonra 3 ml Bafra sigarası uçucu nitrozaminleri karın zarından içeri enjekte edildi. Enjeksiyondan 1/2 saat sonra kalplerinden alınan kanda GSH düzeyleri saptandı.

Enjeksiyon ncesi GSH derişimi saptanmış 5 adet rata 20 mg NaNO₂ enjekte edildikten 1/2 saat sonra kalplerinden alınan kanda GSH düzeyleri saptandı.

4. BULGULAR

4.1. Gönüllülerin Tükürüklerinde Nitrit İyonu Ve Nitrozamin Düzeyleri:

ISE Yöntemi'yle tükürüklerde saptanan nitrit iyonu derişimi Çizelge-1' de gösterilmiştir. Tükürük nitrozaminlerinden DMN, DENA, ve NPyr derişimleri Çizelge-2' de , tükürük HPLC kromatogramı Şekil-10' dadır.

4.2. Sigara Dumanı Nitrozamin Düzeyleri:

5 adet yerli sigaradan analizlenen uçucu nitrozaminleri gösteren HPLC kromatogramı Şekil-11' de, uçucu olmayan nitrozaminlerin HPLC kromatogramı Şekil- 12' - dedir. Standart DMN ve DENA HPLC kromatogramından (Şekil-13) yararlanılarak tanımlanabilen DMN ve DENA derişimleri Çizelge-3'te gösterilmiştir.

4.3. Rat Karaciğer Mikrozoim Kesitiyle NO₂⁻ ve Sigara Nitrozaminlerinin Etkileşim UV-VIS Fark Spektrumları:

20000 g supernatani, 2.5 mM NO₂⁻ ile etkileştirildiğinde alınan fark spektrumu Şekil-14'tedir.

105000 g deki mikrozoim kesiti ile yerli sigaraların uçucu nitrozaminlerinin etkileşim fark spektrumu Şekil-15' te gösterilmiştir. Sigara dumanı uçucu nitrozaminlerinin absorpsiyon spektrumu ise Şekil-16' da dır.

Çizelge-1. Sigara İçen Ve İçmeyen Kişilerin
Tükürüklerinde NO_2^- Derişimleri

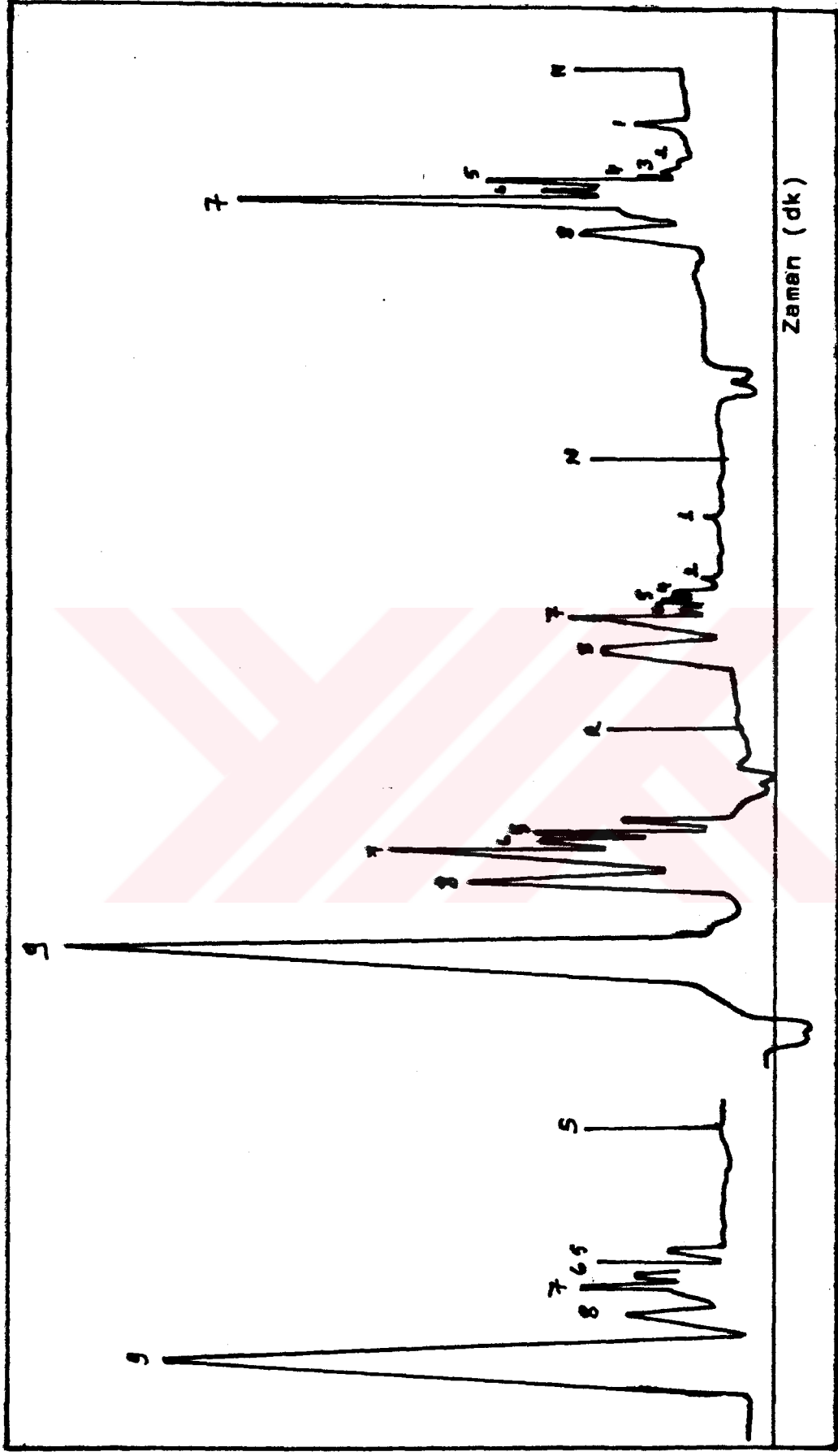
<u>Sigara Tiryakileri</u>	<u>NO_2^- Derişimi (mg/l)</u>
1. (K)	18.4
2. (E)	25.8
3. (E)	28.7
4. (E)	24.2
5. (E)	27.8
6. (E)	19.2
7. (K)	9.2
8. (K)	9.4
<u>Sigara İçmeyenler</u>	
1. (K)	2.8
2. (K)	4.6
3. (K)	2.8
4. (K)	4.6
5. (K)	4.4
6. (E)	4.3
7. (K)	2.4
8. (E)	0.0
9. (K)	2.2

Çizelge-2. Sigara İçen ve İçmeyen Kişilerin Tükürüklerindeki DMN, DENA ve NPyR Derişimleri ($\mu\text{g}/\text{l}$)

<u>Tiryakiler</u>	<u>DMN</u>	<u>DENA</u>	<u>NPyR</u>
1	3.1	22.0	51.0
2	4.0	28.1	65.0
3	2.9	26.0	56.2
4	2.7	18.4	63.9
<u>İçmeyenler</u>			
1	0.0	0.0	11.6
6	0.7	0.5	11.8
7	0.0	0.0	9.6
8	0.0	0.0	16.2
9	0.2	0.3	10.4

Çizelge-3. Sigara Dumanı DMN Ve DENA Derişimleri

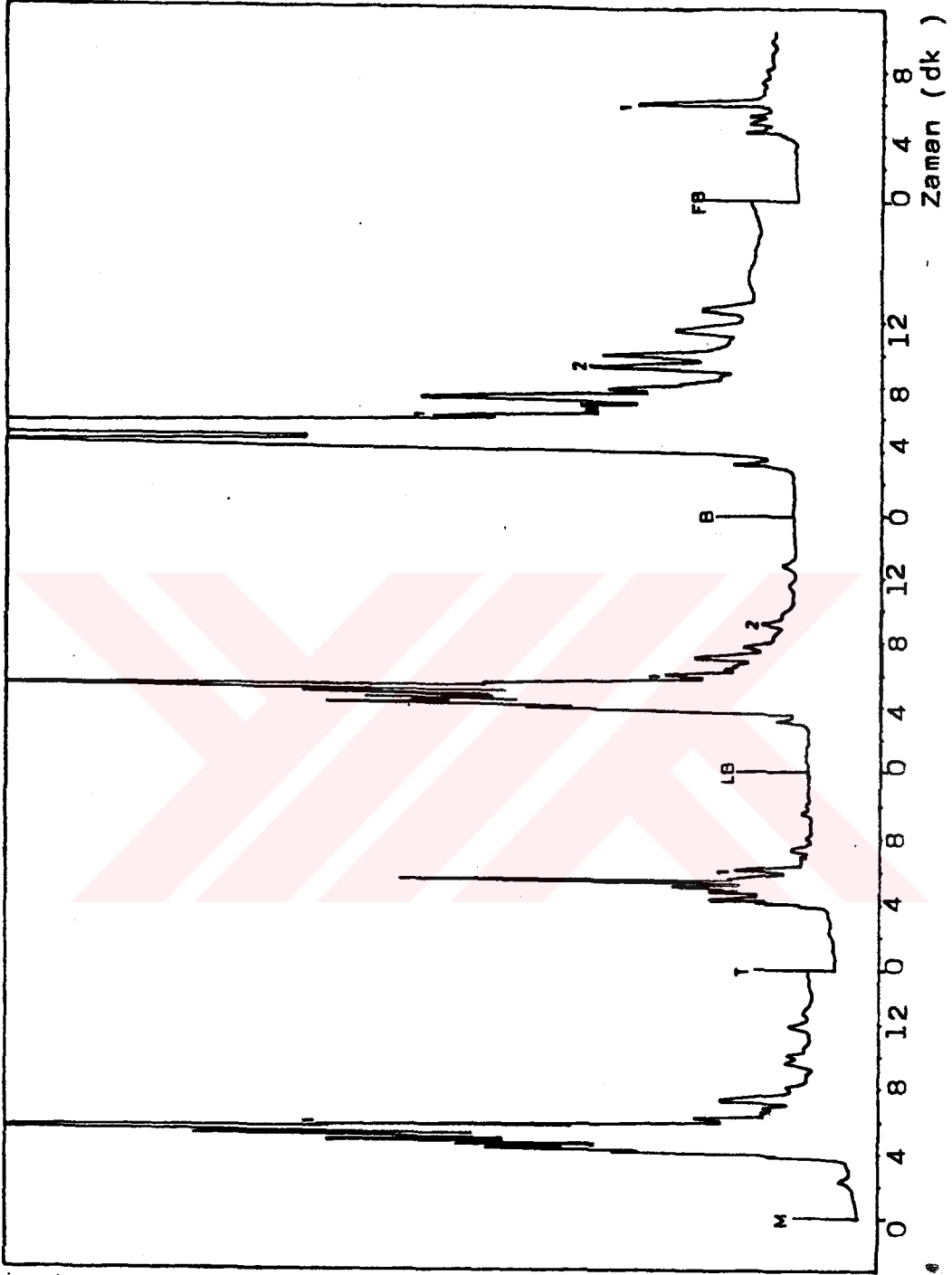
<u>Sigara</u>	<u>DENA ($\mu\text{g}/\text{sigara}$)</u>	<u>DMN ($\mu\text{g}/\text{sigara}$)</u>
Maltepe	21.1	0.0
Bafra	13.9	12.5
Bafra filtreli	6.2	0.0
Lüks Bitlis	5.5	2.7
Tokat	3.4	0.0



Şekil-10. Tükürük Üzütlerinin Kromatogramı (H:Dumanaltı, N:İçmeyen, R:Tiryaki (1.5)paket/gün), S: Tiryaki (1 paket/gün) R'nin özütü 10 ml, diğerlerinin 20 ml'dir)

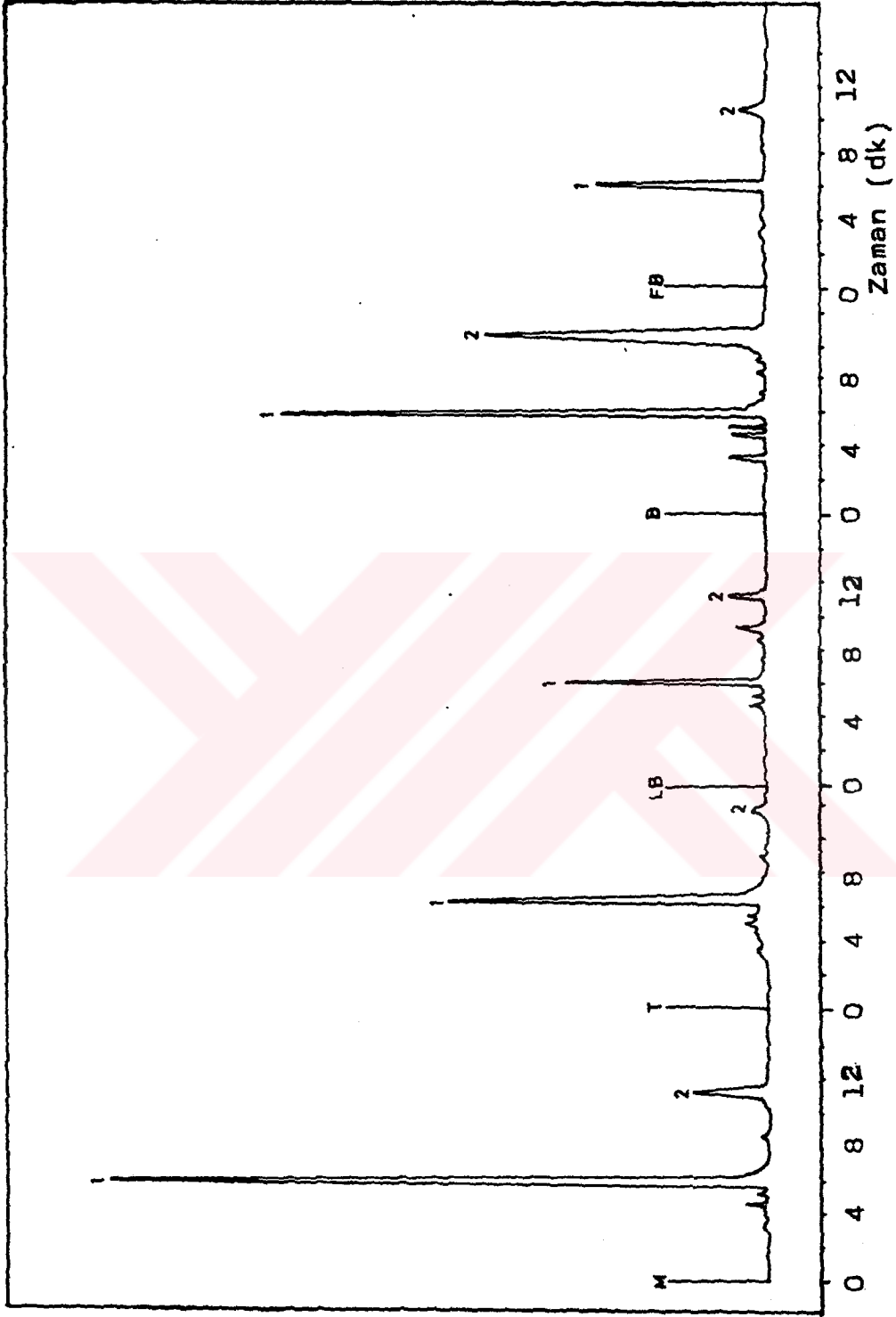
1. DMN 2. DENA 3.NPYr

0.01
AUFS



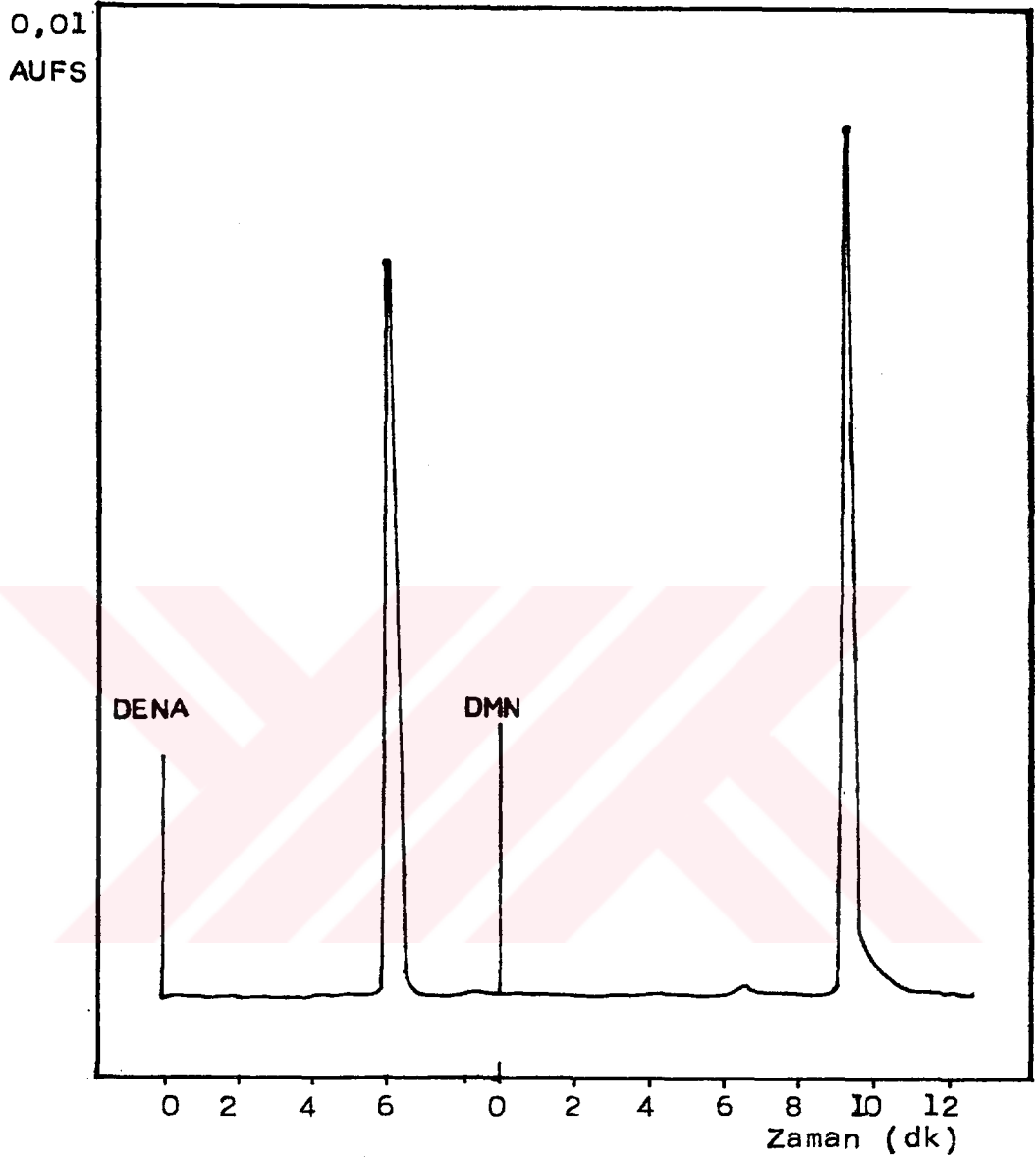
Şekil-11. Sigara Dumanı Uçucu Nitrozaminlerinin HPLC Kromatogramı

1. DENA , 2. DMN(M:Maltepe,T:Tokat,LB:Lüks Bitlis,B:Safra,FB:Filtreli Bafra)

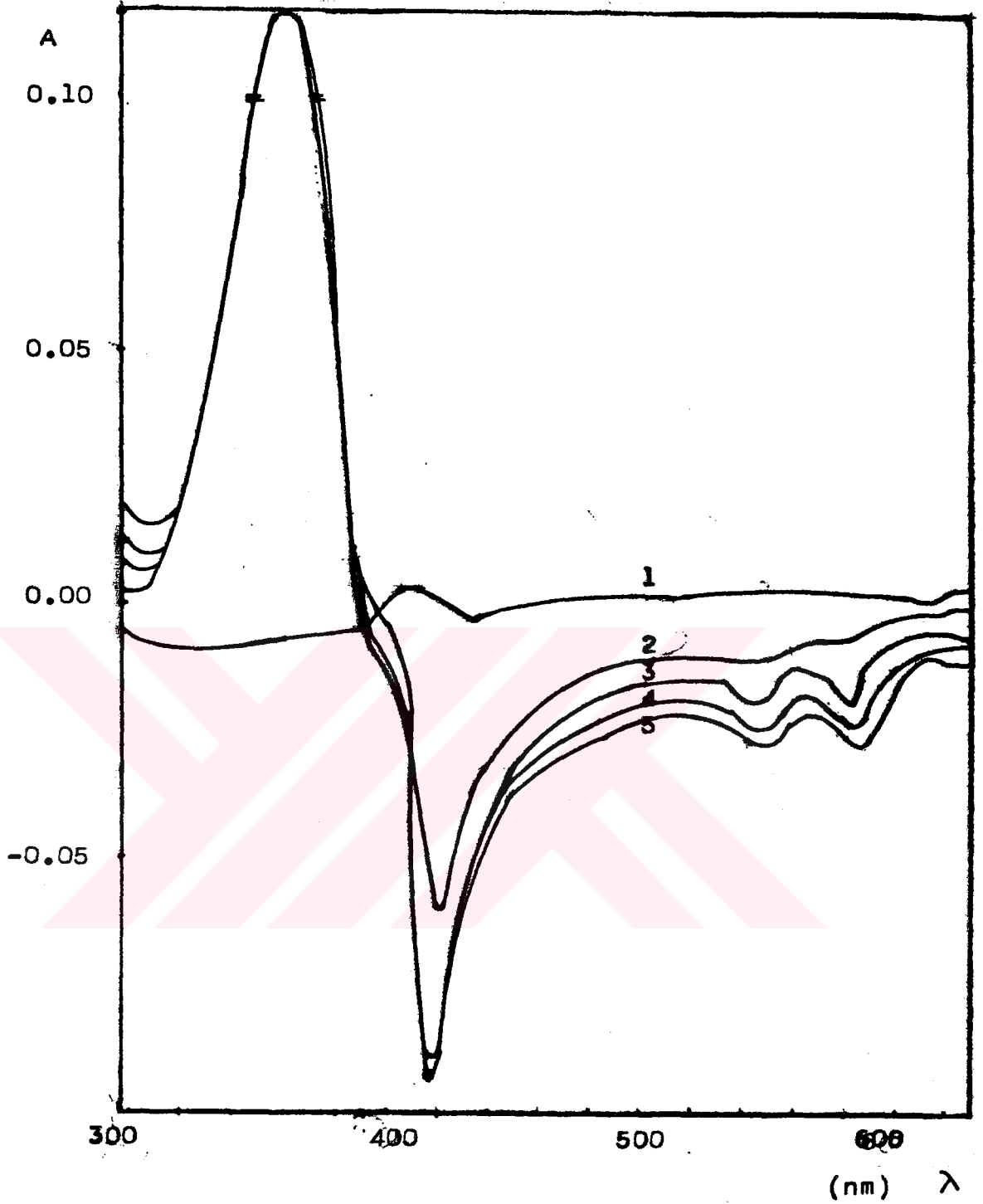


Şekil-12. Sigara Dumanı Uçucu Olmayan Nitrozaminlerinin HPLC Kromatogramı

1. NAT , 2. NNK (M:Maltepe, T:Tokat, LB:Lüks Bitlis, B:Bafra, FB:Filtreli Bafra)

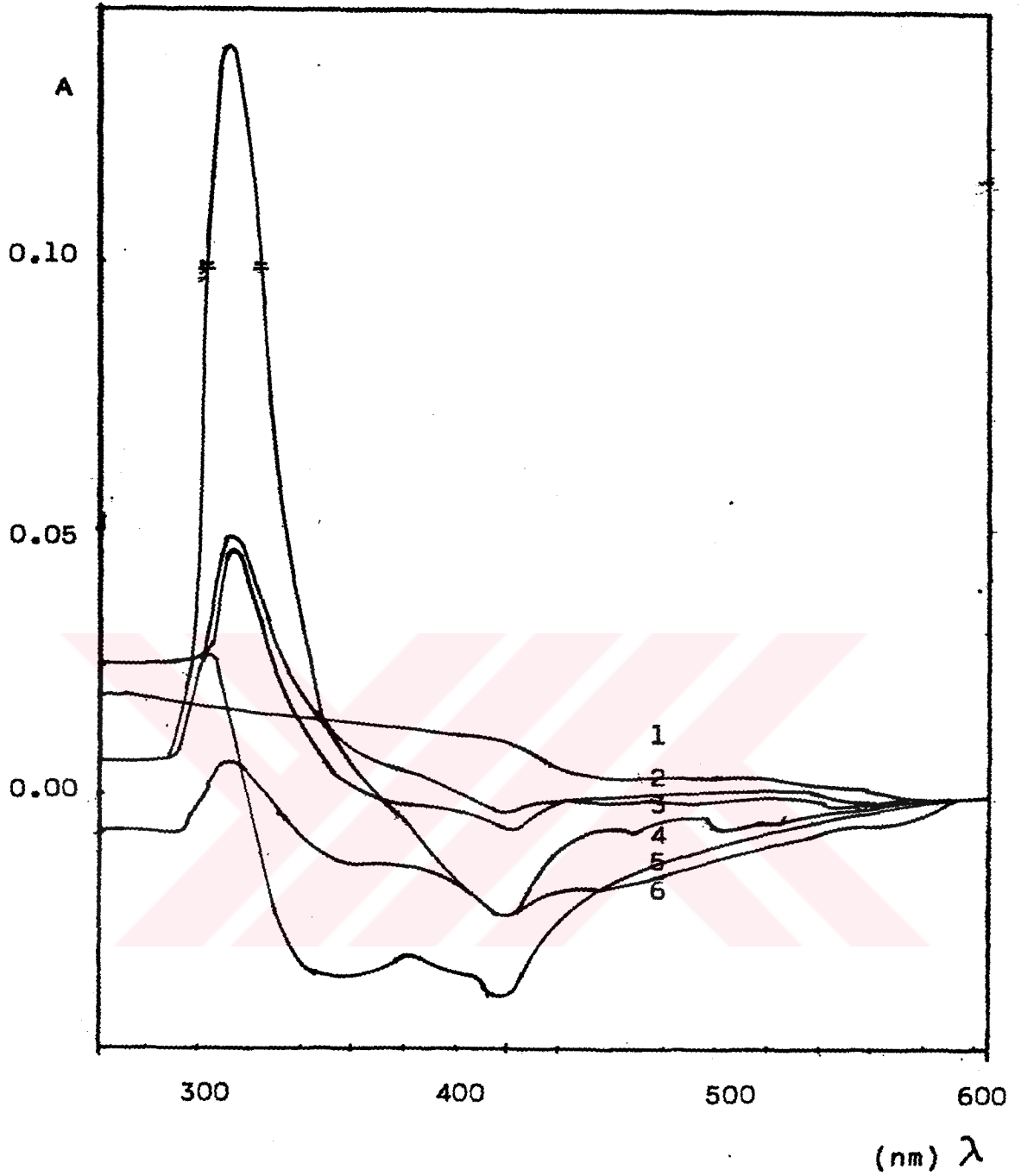


Şekil-13. Standart DENA ve DMN'in HPLC Kromatogramları



Şekil-14. Mikrozoom Kesiti İle Nitrit İyonlarının Etkileşim UV-VIS Fark Spektrumu

1- S ve R küvetlerinde eş derişimde 20000 g supernatanı vardır. 2- R küvetine 2.5 mM NO_2^- eklendi 3- 2+ (5dk)
4- 3+ (5dk) 5- 4+ (5dk)



Şekil-15. Mikrozoim Kesiti İle Uçucu Sigara

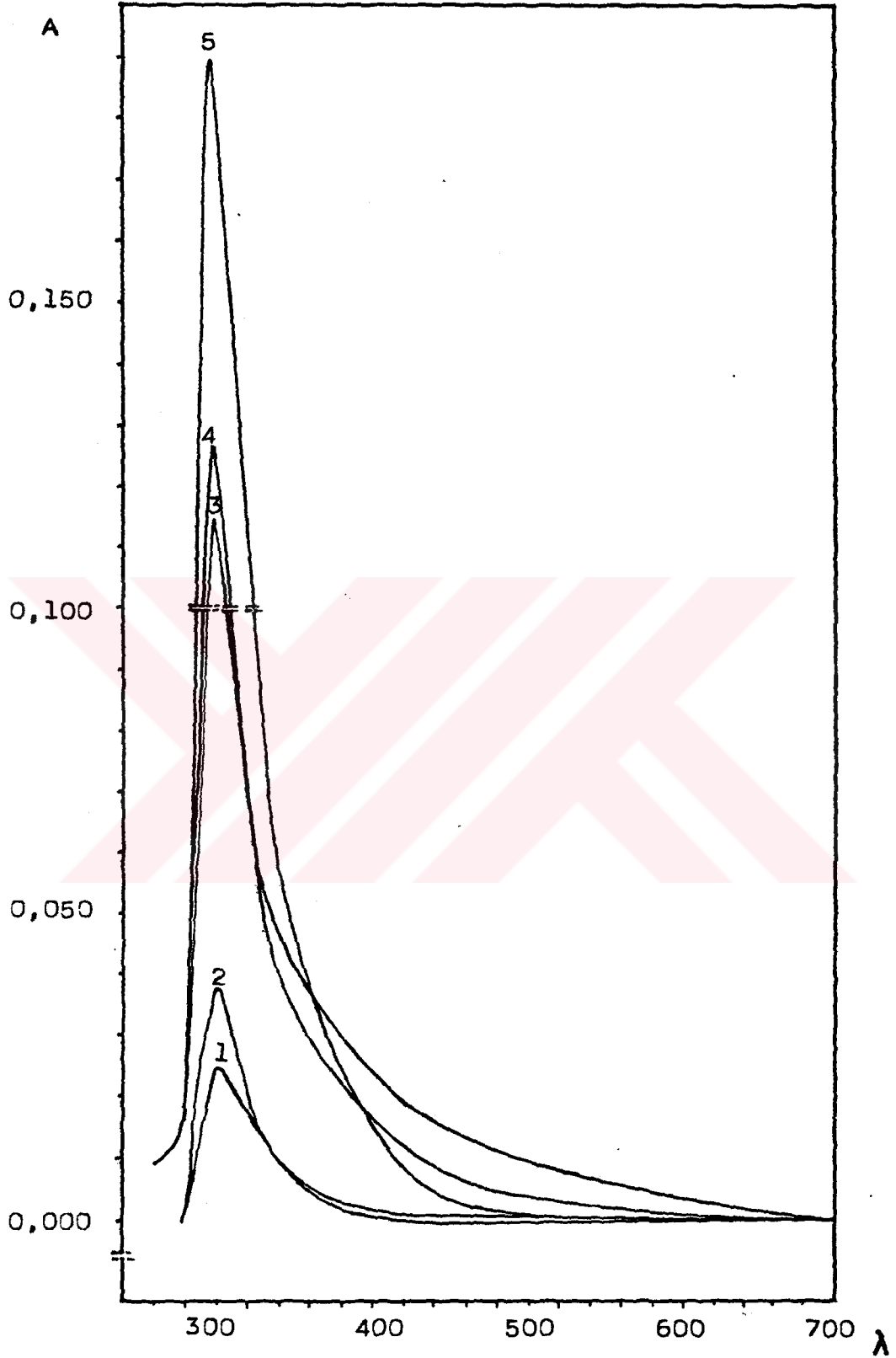
Nitrozaminlerinin Etkileşim UV-VIS Fark Spektrumu

Örnek: 50 µl mikrozoim + 2.5 ml tampon + 50 µl sigara Üzütü

Referans: 50 µl mikrozoim + 2.5 ml tampon

2. Tokat 3. Maltepe 4. Filtreli Bafra 5. Filtresiz

Bafra 6. Lüks Bitlis 31



Şekil-16 Sigara Dumanı Uçucu Nitrozaminlerinin
Absorbsiyon Spektrumları
1.Filtreli Bafra, 2.Tokat, 3.Lüks Bitlis,
4.Maltepe, 5.Filtresiz Bafra

4.4. Sigara İçen Ve İçmeyen Kişilerin Kanlarındaki Glutatyon GSH Düzeyleri :

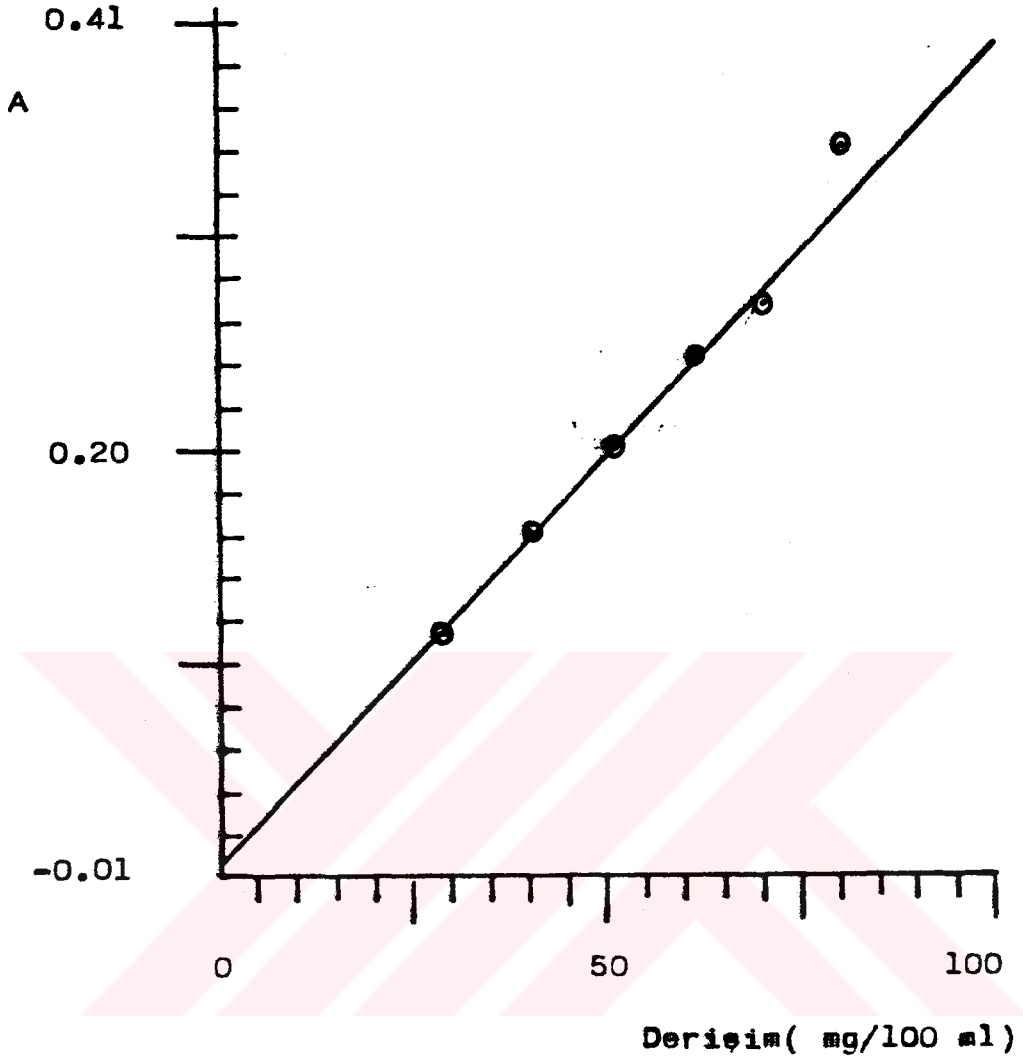
Sigara içen ve içmeyen gönüllü 80 kişiden alınan kanlardaki GSH derişimi; 3.2.8 'de anlatılan işlemler uygulandıktan sonra aşağıda gösterilen formülden hesaplandı.

$$\text{GSH (mg/dl eritrosit)} = \frac{\text{GSH Derişimi (St. Eğriden Bulunan)}}{\text{Hematokrit}}$$

Normal Değerler :47-100 mg GSH/dl eritrosit

GSH derişiminin bulunması için kullanılan standart eğri Şekil-17'dedir.

Sigara içen erkeklere ait bulgular izelge-4'te bayanlara ait bulgular izelge-5'tedir. Sigara içmeyen erkeklerin bulguları izelge-6'da, bayanların bulguları izelge-7'de gösterilmiştir.



Şekil-17. Standart GSH Derişim Grafiği

<u>Derişim</u>	<u>Absorbans</u>
0.0	0.00
30.0	0.11
40.0	0.16
50.0	0.21
60.0	0.24
70.0	0.27
80.0	0.34

Çizelge-4 . Sigara İçen Erkeklere Ait Bulgular

	Sigara/gün	Hematokrit	Absorbans $\times 10^3$	Grafik GSH	GSH [†]
BK	40	53	286	72	136
İA	40	51	280	70	137
MY	30	47	254	64	136
TE	30	48	248	62	129
AA	20	46	231	58	126
AE	20	52	260	65	125
EÜ	20	49	248	62	127
NÜ	20	45	223	56	124
KÇ	20	45	228	57	127
UU	20	54	280	70	130
YS	20	48	252	63	131
AS	20	47	235	59	126
HT	20	52	252	63	121
AK	20	45	223	56	124
HA	20	50	252	63	126
MA	20	48	240	60	125
MK	20	51	254	64	125
EÇ	20	47	235	59	126
MŞ	20	50	252	63	126
MG	20	48	248	62	129

† GSH = mg/dl eritrosit

Çizelge-5. Sigara içen Bayanlara Ait Bulgular

Sigara-gün	Hematokrit	Absorbans $\times 10^3$	Grafik GSH	GSH ⁺	
SY	30	46	198	50	109
HY	30	44	191	48	109
AÇ	30	46	204	51	111
SG	20	42	187	47	112
FG	20	42	187	47	112
ÜÜ	20	45	176	45	100
HK	20	41	162	41	100
İG	20	48	195	49	102
MA	20	38	167	42	111
NG	15	44	195	49	111
NT	10	37	165	42	114
RC	10	38	183	46	121
GP	10	43	186	47	109
FG	10	35	162	41	117
BZ	8	46	220	55	120
ZL	7	43	169	43	100
YY	6	43	171	43	100
MS	5	39	169	43	110
FA	5	42	166	42	100
AT	4	45	200	50	111

+ GSH = mg/dl eritrosit

Çizelge-6. Sigara İçmeyen Erkeklere Ait Bulgular

	Hematokrit	Absorbans X 10 ³	Grafik GSH	GSH ⁺
EK	45	130	33	73
GY	48	150	38	79
RK	45	151	38	84
ŞS	45	127	32	71
AA	48	159	40	83
EK	40	109	28	70
İP	47	138	35	74
HA	48	141	36	75
OE	48	160	41	85
MT	43	128	33	77
KS	50	134	38	76
CU	44	106	31	70
İT	53	166	42	79
SÇ	51	130	36	71
YK	44	100	32	73
MY	53	154	39	74
RÜ	47	131	33	70
SK	48	157	40	83
ST	48	150	38	79
AY	42	134	34	81

+ GSH = mg/dl eritrosit

Çizelge-7. Sigara İçmeyen Bayanlara Ait Bulgular

	Hematokrit	Absorbans $\times 10^3$	Grafik GSH	+ GSH
EE	42	122	31	74
HG	43	134	34	79
FD	42	126	32	76
GD	41	125	32	78
GA	44	139	35	80
HÇ	37	117	30	81
RS	46	154	39	85
GÇ	45	130	33	73
ST	38	125	32	84
HA	35	119	29	83
ŞA	44	134	34	77
NT	44	140	36	82
NÜ	44	130	33	75
EH	44	130	33	75
SA	43	130	33	77
FC	44	132	34	77
SK	44	142	36	82
RT	41	126	32	78
GŞ	39	122	31	79
ŞG	39	126	32	82

+ GSH = mg/dl eritrosit

4.5. İnsan Kanı GSH Derişimlerine Uygulanan İstatistik Sonuçları:

Sigara içen ve içmeyen erkeklerle bayanlar arasında "İki Ortalama Arasındaki Farkın Önemlilik Testi" uygulanmış ve aşağıdaki sonuçlar alınmıştır (38) :

Sigara içen erkeklerle içmeyen erkeklerin GSH düzeyleri arasındaki fark:

<u>Sigara İçen Erkekler</u>	<u>Sigara İçmeyen Erkekler</u>
$\bar{X}_1 = 127.8$	$\bar{X}_1 = 76.35$
$S_1 = 4.3$	$S_1 = 5.0$
$n = 20$	$n = 20$

1. Hipotez: İki ortalama arasında fark yoktur.

$$\bar{X}_1 - \bar{X}_2 = 0$$

2. S_d = İki ortalama arasındaki farkın standart hatası

$$S_d = \sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}} = 1.48$$

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_d} = 34.78$$

Yanılma Olasılığı $\alpha = 0.01$

Serbestlik Derecesi $SD = n_1 + n_2 - 2 = 38$

t tablosundan $SD=38$ için $t_{tablo} = 2.72$ dir.

$t > t_{tablo}$ olduğu için hipotez reddedilir. Yani; içenlerle içmeyenlerin GSH değerleri farklıdır.

Sigara içen bayanlarla içmeyen bayanların GSH düzeyleri arasındaki fark:

<u>Sigara İçen Bayanlar</u>	<u>Sigara İçmeyen Bayanlar</u>
$\bar{X}_1 = 108.9$	$\bar{X}_2 = 78.8$
$S_1 = 6.66$	$S_2 = 3.44$
$n = 20$	$n = 20$
$S_d = 1.676$	
$t = 17.96$	
$\alpha = 0,01$	

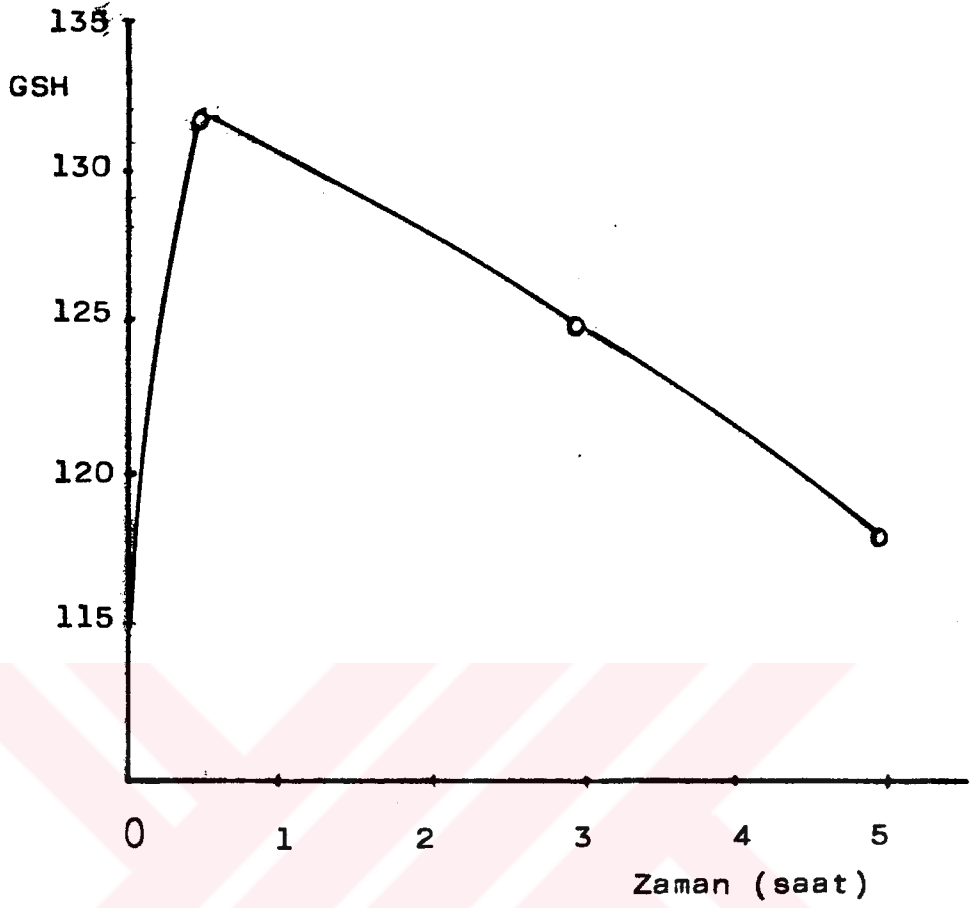
$$SD = 38 \text{ için } t_{\text{tablo}} = 2.72$$

$t > t_{\text{tablo}}$ olduğu için ; sigara içen bayanlarla içmeyen bayanların GSH değerleri arasında fark vardır. ($p < 0.01$)

4.6. Rat Kanı GSH Düzeyleri :

3 adet ratın sigara nitrozaminleri enjeksiyonu sonrası; zamana karşı GSH derişimini veren grafik Şekil-18'dedir. Kanda GSH düzeyi en yüksek orana 1/2 saat sonra ulaştığı için enjeksiyon sonrası kan alma süresi 1/2 saat sonra olarak saptanmıştır.

10 adet rat kanı GSH düzeyi nitrit enjeksiyonu öncesi ve sonrası Çizelge-8' de, sigara nitrozaminleri enjeksiyonu öncesi ve sonrası Çizelge-9' da gösterilmiştir.



Şekil-18. Rat Kanı Sigara Nitrozaminleri Enjeksiyonu Sonrası Zamana Karşı GSH Değişimi Grafiği

Zaman (saat)	GSH (mg/dl eritrosit)
0	115
1/2	132
3	125
5	118

Çizelge-8. Nitrit Enjeksiyonu Öncesi Ve Sonrası
Rat Kanı GSH Düzeyleri (mg/dl eritrosit)

	Enjeksiyondan Önce			Enjeksiyondan 1/2 Saat Sonra		
	H	AX.10 ³	GSH	H	AX.10 ³	GSH
1.	49	310	139	40	293	160
2.	49	288	129	39	260	146
3.	50	306	134	45	321	156
4.	43	266	137	40	288	158
5.	45	210	136	39	288	162

Çizelge-9. Sigara nitrozaminleri Enjeksiyonu Öncesi
Ve Sonrası Rat Kanı GSH Düzeyleri (mg/dl eritrosit)

	Enjeksiyondan Önce			Enjeksiyondan 1/2 saat Sonra		
	H	AX.10 ³	GSH	H	AX.10 ³	GSH
1.	49	310	139	44	321	159
2.	49	288	129	43	288	147
3.	50	306	134	43	312	158
4.	43	266	137	40	288	158
5.	45	280	136	42	300	157
6.	45	230	113	40	235	130
7.	45	260	127	41	265	141
8.	48	150	71	43	159	84
9.	46	153	74	42	154	83
10.	48	198	92	42	208	109

H = Hematokrit , A = Absorbans

4.7. Rat Kanı GSH Derişimlerine Uygulanan İstatistik Sonuçları :

Enjeksiyon öncesi ve sonrası rat kanı GSH düzeylerine "Korrelasyon Katsayısı Önem Kontrolü" uygulanmış ve aşağıdaki bulgular elde edilmiştir (38) :

Enjeksiyon Öncesi Enjeksiyon Sonrası

$$\bar{X} = 115.2$$

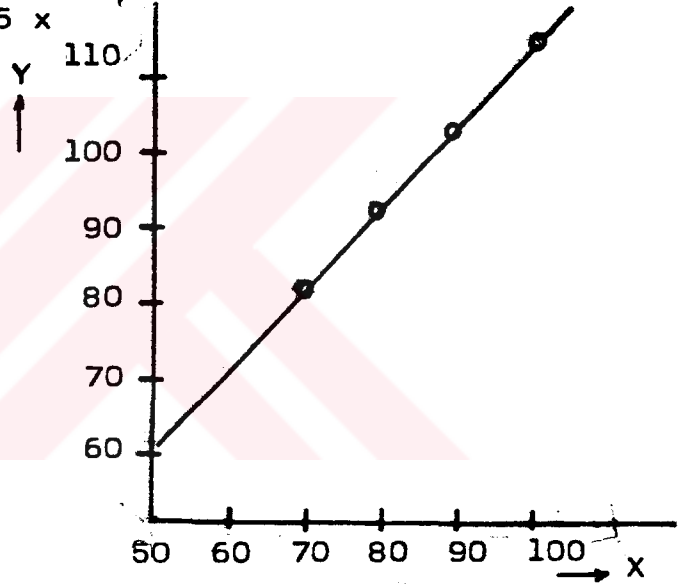
$$\bar{Y} = 132.6$$

$$a = 1.835 \quad ; \quad b = 1.135 \quad ; \quad r = 0.9962$$

$$y = 1.835 + 1.135 x$$

Grafik için:

<u>X</u>	<u>Y</u>
70	81
80	93
90	104
100	115



1. Hipotez: Korrelasyon katsayısı tesadüfidir.

2. Korrelasyon katsayısının st. hatası : S_r

$$S_r = \frac{1 - r^2}{n-2} = 0.031 (n = \text{örnek sayısı})$$

$$3. \quad t = \frac{r}{S_r} = 32.38$$

$$SD = n-2 = 8 \quad \alpha = 0.01 \quad \text{için;}$$

$$t_{\text{tablo}} = 2.31 \quad \text{dir.}$$

t) t_{tablo} olduğu için; rat kanı, sigara nitrozaminleri enjeksiyonu öncesi ve sonrası GSH değerleri

birbirinden farklıdır ($p < 0.01$).

Ratlara nitrit enjeksiyonunda:

Enjeksiyon Öncesi

Enjeksiyon Sonrası

$$\bar{X} = 135$$

$$\bar{Y} = 156.4$$

$$a = -43.77 ; b = 1.48 ; r = 0.906$$

$$y = -43.77 + 1.48x$$

Grafik için:

X	Y
125	141.6
130	149
140	164

$$SD = 3$$

$$S_r = 0.244$$

$$t = 3.72$$

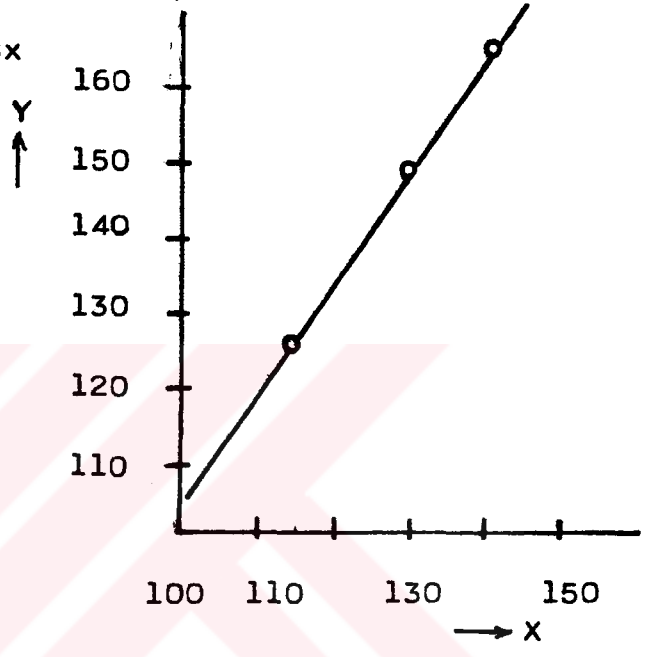
$\alpha = 0.05$ için;

$$t_{\text{tablo}} = 3.72$$

$t > t_{\text{tablo}}$ olduğu için rat kanı; nitrit enjeksi-

yonu öncesi ve sonrası GSH değerleri birbirinden fark-

lıdır ($p < 0.05$).



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Nitrozaminlerin mutajen ve kanserojen bileşikler olduğu, karsinojenik ve sitotoksik etki göstermeleri için metabolik aktivasyonlarının gerektiği bilinmektedir.

Tütün önemli bir nitrozamin kaynağıdır. Bu nedenle 5 adet yerli sigaranın nitrozamin içeriği araştırıldı. Uçucu nitrozaminleri gösteren HPLC kromatogramı Şekil-11' de dir. Bunlardan tanımlanabilen DMN ve DENA derişimleri Çizelge-3' te görüldüğü gibi oldukça yüksektir. Uçucu olmayan nitrozaminleri gösteren HPLC kromatogramından (Şekil-12) **NAT** ve **NNN** tanımlanmış ancak miktarları saptanamamıştır.

Mustafa Özdemir ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; yerli sigaralarda **NNN**: 88-139, **NPyr**: 15-36, **NNK**: 51-100, **NAB**: 15-45, **NAT**: 22-38, ng/sigara olarak, azot oksit düzeyleri ise; **NO_x** olarak 168.65-407.50 µg/sigara arasında bulunmuştur (2).

Nitrit pekçok besinde doğal olarak bulunduğu gibi besin koruyucusu olarak da kullanılmaktadır. **FAO / WHO** tarafından açıklanan alınabilecek maksimum miktarlar **NaNO₃** için; 5-10 mg/kg , **NaNO₂** için 0.4-0.8

mg/kg dir. İşlenmiş et ve balık için üst sınır değeri 500 ve 200 ppm'dir (9).

Çalışmamızda; sigara içiminin tükürük nitrit ve nitrozamin düzeyine etkisi araştırıldı. Çizelge-1' de görüldüğü gibi; sigara içenlerin tükürük nitrit derişimi 9.2-28.7 mg/l arasında değişirken, içmeyenlerde 0.0-4.6 mg/l arasındadır.

Çizelge-2' de ise; sigara içenlerin tükürüklerinde tanımlanabilen nitrozamin düzeyleri gösterilmiştir. Bunlardan DMN içenlerde: 2.7 -4.0 içmeyenlerde:0.0-0.7 DENA içenlerde: 18.4-28.1, içmeyenlerde: 0.0-0.5, NPyr içenlerde: 51-65, içmeyenlerde:9.6-16.2 µg/l'dir.

Sigara içenlerle içmeyenlerin tükürük nitrit ve nitrozamin düzeyleri arasındaki farklar, sigara dumanındaki nitrit ve nitrozaminlerin içim sırasında tükürüğe geçtiğini kanıtlamaktadır.

Dışarıdan alınan veya nitritten vücutta oluşan nitrozaminler, diğer zararlı bileşenler gibi detoksifikasyona uğrarlar. Detoksifikasyonda iki yol vardır:

1. Cyt P-450 katalizli monooksijenasyon ,
2. N-açilamin ve merkaptürik asit oluşumu (32).

Birçok N ligantı Cyt P-450 ile etkileşerek spektral değişikliklere neden olur. Ayrıca Cyt P-450 bağımlı karışık fonksiyonlu oksidazların aktivitesini de etkiler. Nitrit ve DMN ile DENA nın Cyt P-450 ile et-

kileşerek Cyt P-450-NO kompleksinin oluştuğu ve bu kompleksin hemen Cyt P-420-NO 'ya dönüştüğü bilinmektedir (39,40).

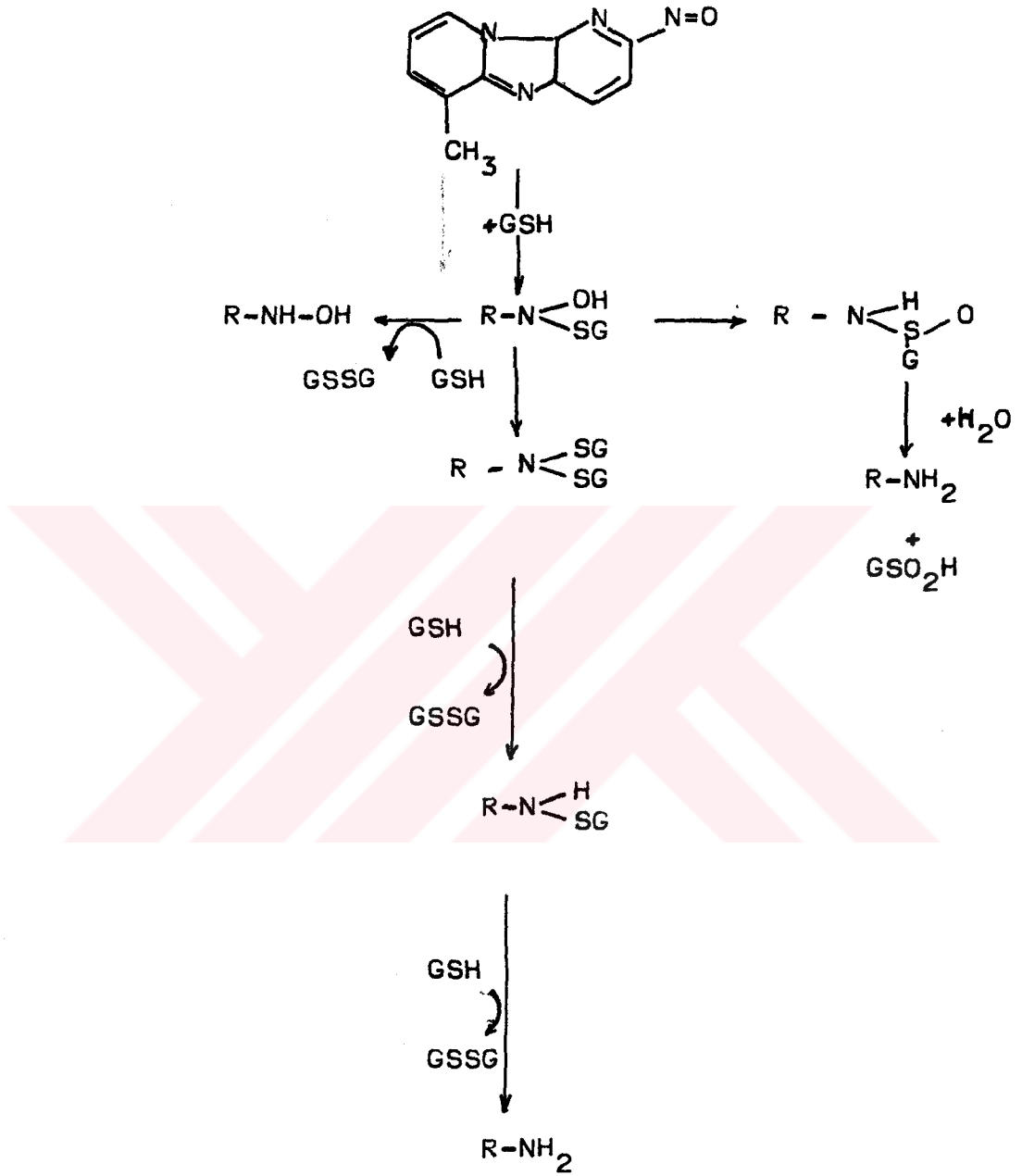
Nitrit ve sigara nitrozaminleri rat karaciğer mikrozom kesiti ile etkileştirilerek UV-VIS fark spektrumu alındı. (Şekil-14, 15). Bu spektrumlarda gerek nitritin gerekse sigara nitrozaminlerinin Cyt P-450 ile Cyt P-420-NO kompleksini oluşturduğu gözlenmektedir. Bu dönüşümün nitrit ve nitrozamin miktarıyla orantılı olduğu açıktır.

Detoksifikasyonda ikinci yol; merkaptürik asit oluşumudur. Merkaptürik asit; Glutasyon S-transferazla katalizlenir. Alifatik, aromatik ve heterosiklik bileşenler gibi elektrofilik C atomu taşıyanlar transferazlar için substrattırlar (32).

Glutasyon S-transferazın temel görevi; glutasyonun karsinojenlerle DNA' dan daha fazla alkilasyonunu katalizleyerek, karsinojenik ajanların detoksifikasyonunu sağlamaktır (41).

Kazuki Saito ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; karsinojenik-mutajenik aril nitrozo bileşenleri ile GSH' ın konjugasyon tepkimesi ürünlerinin N-hidroksil aminler, aril aminler ve kısa ömürlü GSH-konjugatları olduğu ve örnek mekanizmanın Şekil-19^A da gösterilen yolu izlediği FAB Kütle Spektro-

metresiyle saptanmıştır (42).



Şekil-19. Arilnitrozo Bileşenleriyle Glutatyon Konjugasyonunun Mekanizması

Oksidatif bileşenlerle GSH arasındaki etkileşimde değişik literatür bilgileri vardır.

J. Takahashi; ratlara nitrit vererek methemoglobin oluşturmuş ve bu oluşumla GSH düzeyinin azaldığını saptamıştır (43).

A. Ryfeld; invivo ve havalandırılarak perfüze edilmiş rat akciğerinde, sigara içiminin akciğer GSH içeriğini azalttığını bildirmiştir (44).

K.M. Toth ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise; sigara içen 7 erkek ve 7 bayanda yüksek GSH ve katalaz bulunmuştur. GSH düzeyi içmeyen erkek ve bayanlarda 5 $\mu\text{M/g}$ Hb iken, içen erkek ve bayanlarda sırasıyla; 6.7 ve 6.0 $\mu\text{M/g}$ Hb ($p < 0.05$) dir (45).

Sigara dumanı kuvvetli bir oksidanttır. İçerdiği nitrozaminlerin nitelik ve nicelik bakımından fazlalığı, tükürükte bulunmaları ve yukarıda anlatılan çelişkiler gözönüne alınarak sigara içen ve içmeyen kişilerde GSH düzeyleri saptandı. GSH miktarları Çizelge-4 ve Çizelge-5' te görüldüğü gibi sigara içen erkek ve bayanlarda sırasıyla; 127.8 ± 4.3 , 108.9 ± 6.66 , içmeyenlerde (Çizelge-6 ,Çizelge-7) 76.35 ± 5.0 , 78.8 ± 3.4 mg GSH/dl eritrosit olarak bulundu ($p < 0.01$).

Bu sonuçların desteklenmesi için ratlara sigara nitrozaminlere ve nitrit enjekte edilerek GSH düzeyleri saptandı. Sigara nitrozaminlerinin enjeksiyonu ön-

cesi GSH düzeyi; 115.2 mg GSH/dl eritrosit, enjeksiyon sonrası; 132.6 mg GSH/dl eritrosit olarak bulundu (Çizelge-9), ($p < 0.01$). Nitrit enjeksiyonu öncesi; 135 mg GSH/dl eritrosit iken, sonrası 156.4 mg GSH/dl eritrosit olarak bulundu (Çizelge-8), ($p < 0.05$).

Bu sonuçlar; gerek nitrit gerekse nitrozamin eklenmesinin eritrosit GSH düzeyini arttırdığını göstermektedir.

İnsanlar için normal değerler; 47-100 mg GSH/dl eritrosittir. Sigara içmeyenlerin GSH düzeyleri bu sınırlar içinde kalırken, içenlerin düzeyi bu sınırların üzerinde bulunmuştur.

Ayrıca ratlarda GSH değişimi; Sigara özütünün enjeksiyonundan 1/2 saat sonra en yüksek düzeyine ulaşmakta ve daha sonra azalarak 5. saat sonunda normale dönmektedir (Şekil-18).

Sigara içenlerin karşılaşacakları hastalıklar özetlenirse;

Akciğer kanseriyle sigara içiminin çok yakın ilişkisi vardır. Sigara içenler içmeyenlerden çok yüksek periodontal hastalıklar, ağız, burun boşluğu, mesane kanseri oranına sahiptirler. Genelde bronşit ve nefeste düzensizlikler gözlenir. Kardiovasküler bozukluklar ve kronik kalp hastalıklarından ölüm riski içmeyenlere göre önemli ölçüde fazladır. Hipertansiyon,

hiperkolesterolemia ve diabet sigara içimi ile artar. Periferel vascular hastalıklar ve cerebrovascular yetmezliklerle karşılaşılabilir. Sigara içimi günde 35 ve daha yüksek olan kadınlarda 20 kat daha fazla kalp krizi görülmektedir. Sigara içenlerin karboksi-hemoglobini fazladır. Bu durum oksijen taşımını engeller. Sigara içmeyenlerde çevresel nedenlerle toplam hemoglobinin yaklaşık 0.5'i COHb'dir. İçicilerde bu oluşum %6, tiryakilerde %20 üzeridir. Gastrointestinal düzensizlikler içim ile artar. Nikotin, burada iskemik bölgeler oluşturur ve pankreatik tamponlayıcı salgıyı azaltır. Gastrik asit salgısının normalin üzerinde olmasıyla peptik ülser oluşur (46).

Sigara içimiyle birlikte alkol alınması da kanser riskini arttırmaktadır (47).

Sigara dumanı içerdiği nitrozaminler yanında prolidin ve piperidin gibi birçok ikincil amini de içermektedir. Bu aminler sigara içimi sırasında tükürüğe geçerler. İkincil aminler ayrıca balık ürünlerinde tahıllarda ve çayda bulunur. Besinlerin pişirilmesi ve proteinlerin pirolizi sonucu; prolin, arjinin ve hidroksiprolin gibi aminoasitlerle, prolidin ve piperidin gibi ikincil aminler oluşur. Özellikle bozulmuş balık ve etlerde bulunan kadaverin ve putresin gibi diaminler ısıtma ile piperidin ve pirolidine çevrilir-

ler.Prolin yemekle alındığında; nitrit varlığında midede nitrozopiroline çevrilir. İnce barsak ve duodenumda bakterilerle dekarboksillenerek kuvvetli karsinogen nitrozopirolidine dönüşür (4).

Besinlerle alınan bu kanserojenlere bir de sigara içimi sonucu alınanların eklenmesi, tiryakilerin yukarıda anlatılan hastalıklara tutulma oranını yükseltecektir.

En çok çalışılan nitrozamin olan DMN'nin hedef organlarının karaciğer ve böbrek olduğu bilinmektedir (48).

N-[¹⁴C] nitrozonornikotin verilen ratlarda nasal mukozada ve karaciğerden saflaştırılan proteinlerle nükleik asitlere bağlanma saptanmıştır (49).

NNN'in yapılan bütün deneylerde; hayvanlarda esophagus, üst sindirim yolu, burun boşluğu, soluk borusu, akciğer tümörleri oluşturduğu gözlenmiştir (50).

Tiryakilerin detoksifikasyon merkezi olan karaciğer hücrelerinin büyük bir risk altında oldukları bir gerçektir.

Nitrozamin oluşumuna yolaçan nitrit ayrıca met-hemoglobin düzeyini arttıracak ve oksijen taşımını engelleyecektir.

Bulgularımızdan görüldüğü gibi sigara dumanı kuvvetli bir oksidanttır. Sigara içimi GSH düzeyini

arttırmaktadır. Bu durum vücudun zararlı maddeleri atmak için sürekli bir çaba içerisinde girmesine ve sürekli GSH üretmesine neden olur. GSH üretimi için NADPH gereklidir. Pentoz Fosfat Yolunda NADPH üretimi için sürekli glukoz ve ATP harcanması metabolizmanın bozulmasına neden olacaktır. Ayrıca GSH'ın hepsi bu yolda harcanacak, diğer görevlerini yapmasını engelleyecektir.

Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz enzimi eksik olan insanlarda oksidant bileşiklerle GSH düzeyi azalmaktadır. Bu insanların sigara içimi sonucu GSH düzeyi azalmasıyla karaciğer hücreleri kimyasal zedelenmeye karşı dayanıksız hale gelecektir. Karaciğer nekrozu ve fibrozis gözlenebilecektir.

Çalışmamızda saptayamadığımız diğer sigara nitrozaminlerinin bulunması için GS-MS spektrumları gerekmektedir. Ayrıca GSH- nitrozamin bağlanma ürünlerinin saptanması için FAB kütle spektrumları, radikalik ürünler için de ESR spektrumlarının alınması gerekmektedir. Bunları almaya olanağımız bulunmadığı için daha sonraki çalışmalara bırakılmıştır.

6. ÖZET

Bu çalışmada; en çok tüketilen yerli sigaraların nitrozaminlerinin saflaştırılıp; sıçan karaciğer mikrozomu Sitokrom P-450 ile etkileşiminin incelenmesi, sigara içen ve içmeyen kişilerin tükürüklerindeki nitrit ve nitrozamin düzeylerinin karşılaştırılması, sigara içiminin önemli bir detoksifikasyon bileşiği olan Glutatyon (GSH) üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

5 adet yerli sigaradan saflaştırılan nitrozaminlerden High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ile tanımlanabilen Dietilnitrozamin (DENA) ve Dimetilnitrozamin (DMN) derişimleri sırasıyla; Maltepe'de 21.1-0.0; Bafra'da 13.9-12.5; Filtreli Bafra'da 6.2-0.0 Lüks Bitlis'te 5.5-2.7; Tokat'ta 3.4-0.0 µg/sigara olarak bulundu. Ayrıca uçucu olmayan nitrozaminlerden Nitrozoanatabin (NAT) derişimi azalan sıraya göre; Maltepe > Bafra > Tokat > Lüks Bitlis > Filtreli Bafra; N-Nitrozonornikotin ise; Bafra > Maltepe > Lüks Bitlis > Filtreli Bafra > Tokat olduğu görüldü.

Sigara içmeyenlerin tükürüklerindeki nitrit iyonu derişimi; 0.0-4.6 mg/l iken; tiryakilerde 9.2-28.7 mg/l arasında değiştii bulundu.

Sigara içmeyenlerin tükürük nitrozamin derişimleri ise sırasıyla DMN, DENA ve Nitrozopirrolidin (NPyr) için; 0.0-0.7, 0.0-0.5, 9.6-16.2 µg/l iken; tiryakilerde 2.7-4.0, 18.4-28.1, 51.0-65.0 µg/l olduğu bulundu.

Sigara içenlerle içmeyenlerin tükürük nitrit ve nitrozamin düzeyleri arasındaki farklar; sigara dumanındaki nitrit ve nitrozaminlerin içim sırasında tükürüğe geçtiğini kanıtlamaktadır.

Sıçan karaciğer mikrozom kesitiyle nitrit ve sigara nitrozaminleri etkileştirilip UV-VIS fark spektrumları alındı. Bunun sonucu; nitrit ve nitrozaminlerin Sitokrom P-450'ye bağlanarak Cyt P-450-NO kompleksi oluşturduğu ve bunun Cyt P-420-NO kompleksine dönüştüğü saptandı.

Sigara içmeyen erkek ve bayanların eritrosit GSH düzeyleri sırasıyla; 76.3[±]5.0, 78.8[±]3.4; içenlerinki 127.8[±]4.3, 108.9[±]6.6 mg GSH/dl eritrosit olarak bulundu.

Sıçanlara nitrit ve sigara nitrozaminleri enjekte edilerek, kanlarında GSH düzeyleri saptandı. Nitrit enjeksiyonu öncesi; 135 mg GSH/dl eritrosit iken, sonrası 156.4 mg GSH/dl eritrosit değerine ulaştığı bulundu.

Nitrozamin enjeksiyonu öncesi GSH düzeyi 115.2 mg/dl eritrosit iken, sonrası 132.6 mg/dl eritrosit olarak bulundu.

Bu sonuçlar; sigara içiminin GSH dengesini bozduğunu göstermektedir.

7.SUMMARY

In this study; the effects of nitrosamines of most widely used Turkish cigarettes on rat liver microsome Cytochrome P-450 was investigated, and the levels of nitrite and nitrosamines in the saliva of smokers and nonsmokers was compared. Effects of smoking on the important detoxification compound Glutation(GSH) was investigated.

The purified nitrosamines from 5 Turkish cigarettes and the measured concentrations of the Diethylnitrosamine (DENA) and Dimethylnitrosamine (DMN) by using High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) was founded to be 21.1-0.0, µg/cigarette in Maltepe, 13.9-12.5 µg/cigarette in Bafra, 6.2-0.0 µg/cigarette in Filter Bafra, 5.5-2.7 µg/cigarette in Lüks Bitlis, 3.4-0.0 µg/cigarette in Tokat respectively. Moreover the concentrations of the Nitrosoanatabin (NAT) as one of the nonvolatile nitrosamine derivative in the Turkish cigarettes was founded to be in relatively increasing manner as below:

Filter Bafra < Lüks Bitlis < Tokat < Bafra < Maltepe.

and the N-Nitrosornnicotine (NNN) was founded to be as Tokat < Filter Bafra < Lüks Bitlis < Maltepe < Bafra.

The concentrations of nitrite in the saliva was founded to be 0.0-4.6 mg/l in nonsmokers and 9.2-28.7

The concentrations of DMN, DENA and N-Nitrosopirrolidine (NPyr) were founded to be 0.0-0.7, 0.0-0.5, 9.6-16.2 µg/l respectively in nonsmoker's saliva and were 2.7-4.0, 18.4-28.1, 51.0-65.0 µg/l respectively in smoker's saliva.

The difference between the levels of nitrite and nitrosamines in saliva have been shown that nitrite and nitrosamines in smoke have been transferred to the saliva during smoking.

Nitrite and cigarette nitrosamines were incubated with rat liver microsome fractions and UV-VIS difference spectra was obtained. As a result of binding nitrosamines and nitrite to Cyt P-450, the Cyt-P-450-NO complex have been occurred and this was changed to Cyt P-420-NO complex.

Erythrocyte GSH levels in smokers males and females were founded to be 127.8 ± 4.3 , 108.9 ± 6.6 mg GSH/dl erythrocyte respectively while GSH levels were 76.3 ± 5.0 , 78.8 ± 3.4 mg GSH/dl erythrocyte in nonsmokers males and females respectively.

The nitrite and cigarette nitrosamines were injected to the rats and their blood GSH levels were founded to be 156.4 mg and 132.6 mg respectively while the GSH values were 135 mg and 115.2 mg respectively for each group before injection.

These findings have been shown that cigarette smoking impaired the GSH mechanism in the body.



KAYNAKLAR

1. 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.
2. Üzdemir, M., Yaşar, Y.; Studies on analytical
and health aspects of cigarette smoke. Doğa TU J. Eng
and Environ. 11: 273-279, 1987.
3. Aksoy, M.; Beslenme ve Kanser. Çağ Matbaası,
Ankara: 27-39, 1984.
4. Lijinsky, W., Eipstein, S.S.; Nitrosamines as
environmental carcinogens. Nature. 225: 21-23, 1975.
5. Forman, D., Al-Dabbagh, S., Doll, R.; Nitrates,
nitrites and gastric cancer in Great Britain. Nature.
313: 620-625, 1985.
6. Fraizer, W.C., Westhoff, D.C.; Food Microbio -
logy, Mc Graw Hill. 160, 1978.
7. Kayaalp, O.; Tıbbi Farmakoloji. Nüve Matbaası.
Ankara: 268, 1981.
8. Appel, K.E., Wiessler, M., Sehoepke, M., Rühl,
C.S., Hildebrandt, A.G.; Metabolic nitrite formation
from N-nitrosamines. Carcinogenesis. 7(4);659-663, 1986.

9. Deeb, B.S., Sloan, K.W.; Nitrates, nitrites and health. Bulletin 750. Agricultural Experiment Station. Urbana Champaign: 32-33, 1975.
10. Arillo, A., Mensi, P., Pirozzi, G.; Nitrite binding to cytochrome P-450 from liver microsomes of trout. Toxicology Letters. 21: 369-374, 1984.
11. Shertzer, H.G., Duthu, S.G.; Nitrite binding to rabbit liver microsomes and effects on aminopyrine demethylation. Biochemical Pharmacology. 28:837-879, 1979.
12. Inui, N., Nishi, Y., Taketomi, M., Mori, M., Yamamoto, M., Yamada, T., Tanimura, A.; Transplacental mutagenesis of products formed in the stomach of golden hamsters given sodium nitrite and morpholine. Int. J. Cancer. 24: 365-372, 1979.
13. Bowmann, W.C., Rand, M.J.; Textbook of Pharmacology. Blackwell Scientific Publications, Oxford: 26-46, 26-37, 38-9, 42-30, 21-44, 26-28, 1980.
14. White, A., et. all.; Principles of Biochemistry, Mammalian Biochemistry. Mc Graw Hill. Singapore: 80-82, 1986.
15. Dashman, T., Kamm, J.J.; Effect of high doses of vitamin E on dimethylnitrosamine hepatotoxicity and drug metabolism in the rat: Biochemical Pharmacology. 28: 1485-1490, 1979.
16. Casado, J., Castro, A., Lorenzo, M.F., Meijide, F.; Kinetic studies on the formation of N-Nitroso

compounds XI. Monatshefte für Chemie. 117: 335-344, 1986.

17. Yang, S.C., Koop, D.R., Wang, T., Coon, M.J.; Immunochemical studies on the metabolism of nitrosamines by ethanol-inducible Cytochrome P-450. Biochemical and Biophysical Research Communications. 128(2): 1007-1013, 1985.

18. Tu, Y.Y., Yang, S.C.; Demethylation and denitrosation of nitrosamines by cytochrome P-450 isozymes. Archives of Biochemistry and Biophysics. 242(1): 32-40, 1985.

19. Kerklaan, P.M.R., Bouter, S., Zijlstra, J.A., Mahn, G.R.; The effect of mixed-function oxidase and amine oxidase inhibitors on the activation of dialkyl nitrosamines and 1,2-dimethylhydrazine to bacterial mutagens in mice. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 111: 196-202, 1986.

20. Kawanishi, T., Ohno, Y., Takahashi, A., Takanaka, A., Kasuya, Y., Omdri, Y.; Relation between hepatic microsomal metabolism of N-nitrosamines and cytochrome P-450 species. Biochemical Pharmacology. 34(7): 919-924, 1985.

21. Harris, C.C., Autrup, H., et. all. ; Metabolism of benzo(a)pyrene, N-nitrosodimethylamine and N-nitrosopyrrolidine and identification of the major carcinogen-DNA adduct formed in cultured human esophagus. Cancer Research. 39: 4401-4406, 1979.

22. Guttenplan, J.B., Hutterer, F., Garro, A.T.;

Effects of cytochrome P-448 and P-450 inducers on microsomal dimethylnitrosamine demethylase activity and the capacity of isolated microsomes to activate dimethylnitrosamine to a mutagen. Mutation Research. 35 : 415-422, 1976.

23. Parke, D.V.; The Biochemistry Of Foreign Compounds. Pergamon Press. New York. 31:102-132, 1974.

24. Dahl, A.R.; Activation of nitrosamines to mutagens by rat and rabbit nasal, lung and liver S-9 homogenates. Adv. Exp. Med. Biol. 197:367-372, 1986.

25. Heath, D.F.; The decomposition and toxicity of dialkylnitrosamines in rats. Biochem. J. 85:72-91, 1962.

26. Hecht, S.S., Chen, C.B., Hoffmann, D.; Evidence for metabolic hydroxylation of N-nitrosopyrrolidine. Cancer Research. 38: 215-218, 1978.

27. Broschinski, L., Diener, W., Fischer, G., Namenschk, A., Wettig, K., Gemeinhardt, H.; Untersuchungen zum vorkommen von candida albicans im menschlichen speichel in beziehung zum nitrat und nitritgehalt. Mykosen. 29(4): 177-182, 1986.

28. Kılıçoğlu, N.; Tütün ve sigaranın tarihçesi. Meteoroloji Dergisi. 34: 43-48, 1988.

29. 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.

30. Hoffman, 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.

31. Hecht, S.S., Riverson, A., Braley, J., Di Bello, J., Adams, J.D., Hoffman, D.; Induction of oral cavity tumors in F 344 rats by tobacco-specific nitrosamines and snuff. Cancer Research. 46: 4162-4166, 1986.

32. White, A., et. all.; Principles of Biochemistry, General Aspects. Mc Graw Hill. Singapore: 600,376,623, 1985.

33. Telefoncu, A.; Biyokimya. Sermet Matbaası. Vize: 36, 1988.

34. Montgomery, R.; Biochemistry, A Case-Oriented Approach. C.V. Mosby Co. London: 308-309, 1980.

35. Nitrogen oxide electrode, Intruction manual Orion Research Inc., 1976.

36. Sıpahımalanı, S.V., Chadha, M.S.; Deşection of N-nitrosamines in the saliva of habitual chewers of tobacco. Food and Chemical Toxicology. 22(4): 261-264, 1984.

37. Tietz, N.W., Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Co., Hong Kong: 1508-1509, 1986.

38. Sümbüloğlu, K.; Sağlık Bilimlerinde Araştırma Teknikleri ve İstatistik. Matisş Yay., Ankara: 121-124, 190-191, 1978.

39. Duthu, G.S., Shertzer, H.G.; Effect of nitrite on rabbit liver mixed-function oxidase activity. Drug Metabolism Disposition. 7(5):263-269, 1979.

40. Saprin, A.N., Ramseyer, J., Piette, L.H.; Electron spin resonance and optical spectra. Biochemical and Biophysical Research Communications. 77(2):789-796, 1977.

41. Russel, S.E.H., Pearson, C., Kelly, M., Mc Quaid, S., Humphries, P.; Long-term dosing studies using mutagenic carcinogens indicate a highly significant correlation between elevations in the level of rat glutathione S-transferase P messenger RNA and liver tumours of hepatocellular origin. Biochem. J. 249:105-109, 1988.

42. Saito, K., Kato, R.; Glutathione conjugation of aryl nitroso compound: Detection and monitoring labile intermediates insitu inside a fast atom bombardment mass spectrometer. Biochemical and Biophysical Research Communications. 124(1): 1-5, 1984.

43. Takahashi, J.; Effect on intra-pregastric administration of nitrite on erythrocyte GSH and GSSG contents of male golden hamster. Comp. Biochem. Physiol. 76B (1): 1-4, 1983.

44. Ryrfeldt, A., Kröll, F., Berggren, M., Moldeus, P.; Hydroperoxide and cigarette smoke induced effects on lung mechanics and Glutathione status in rat isolated perfused and ventilated lungs. Life Sciences.

42(15): 1439-1445, 1988.

45. Toth, K.M., Berger, E.M., Beehler, C.J., Repine, J.E.; Erythrocytes from cigarette smokers contain more glutathione and catalase and protect endothelial cells from hydrogen peroxide better than do erythrocytes from nonsmokers. American Rev. of Resp. Disease. 134(2):281-284, 1986.

46. Osol, A.; Remington's Pharmaceutical Sciences. M. Publishing Co. Pennsylvania: 1292-1293, 1980.

47. Wynder, E.L., Stellman, S.D.; Comparative Epidemiology of tobacco-related cancers. Cancer Research. 37: 4606-4622, 1977.

48. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. 1: 95-106, 1973

49. Löfberg, B., Brittebo, E.B., Tjalve, H.; Localization and binding of N-Nitrosornicotine metabolites in the nasal region and in some other tissues of sprague dawley rats. Cancer Research. 42: 2877-2883, 1982.

50. IARC Monographs on the Evaluation of the carcinogenic Risk of Chemicals to Human. Lyon, France. 37: 241-261, 1985.

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

OZGEÇMİŞ

1961 yılında Sivas'ta doğdum. 1978 yılında Sivas Lisesi'ni bitirdikten sonra 1982 yılında Ankara Devlet Mühendislik Mimarlık Akademisi Kimya Mühendisliği Bölümünden mezun oldum. 1983 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım. C.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında 1986 yılında yüksek lisansımı tamamladım. C.Ü.Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi