

**İN VİTRO ŞARTLARDA N- NİTROZOPROLİDİN'İN  
TAVŞAN KARACİĞER VE BÖBREK GLUTATYON -S- TRANSFERAZ  
AKTİVİTESİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

AN INVESTIGATION ON THE EFFECT OF N-NITROSOPIRROLIDINE ON THE  
RABBIT LIVER AND KIDNEY GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE ACTIVITY  
IN VITRO

**İzzet YELKOVAN\*, İsmihan GÖZE\*\*, Sevtap BAKIR\*\*\***

\* Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, SİVAS

\*\* Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, SİVAS

\*\*\* Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, SİVAS

58140-SİVAS

**ÖZET**

*Çalışmada tavşan karaciğerinden ve böbreklerinden izole edilen Glutasyon-S- Transferaz'ın kanserojen etkili bir madde olan N-nitrozoprolidin ile etkileşimi incelendi.*

*Glutasyon -S-Transferaz enzimi in vitro şartlarda değişik dozlarda N-nitrozoprolidin ile muamele edilerek, reaksiyonları gözlemlendi. Bulgular 1 kloro 2 ,4 dinitro benzen (KDNB) substrat olarak kullanıldığında bulunan aktivite ile karşılaştırıldı. Regresyon ve korelasyon analizi yapıldı. Sonuçlar spesifik aktivite olarak verildi.*

**Anahtar Kelimeler:** N-nitrozoprolidin, Glutasyon -S-transferaz

**ABSTRACT**

*We analyzed the interaction of glutation- S- transferase, which is isolated from the liver and kidney of rabbits with N-nitrosopyrrolidine which is an effective carcinogenic.*

*Glutathione-S-transferase enzymes were treated with N-nitrosopyrrolidine in vitro conditions at various doses, and the reactions were recorded. The activities observed were compared with that of the activity observed in the presence of 1 chloro 2, 4 dinitrobenzen as a substrate and a regression analysis was performed to investigate the correlation. The result were expressed as spesific activities.*

**Key Words:** *N-nitrosopyrrolidine, Glutathione S-Transferase*

## GİRİŞ

Siklik bir nitrozamin olan N-nitrozoprolidin (N-Npry) havada, sigara dumanında, et ve balık ürünlerinde bulunur (1). Birçok nitrozamin gibi N-Npry' de sitokrom P-450 tarafından metabolize edilir (2). P-450IIE1' in metabolik aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (2). Nitrozo bileşikleri konusunda bir çok araştırmalar mevcuttur. Ratlarda yapılan araştırmalarda dimetil nitrozoprolidin'in karaciğerde, 3,4 dikloro nitrozoprolidin'in ise özafagusta tümöre neden olduğu (3), oral yolla ratlara verilen 1- nitrozo-piperidin ise karaciğer ve özafagusta DNA hasarına yol açtığı bildirilmiştir (4) Yine ratlardaki bir çalışmada N-Npry'nin mutasyon yaptığı ve GC - AT transversiyonuna neden olduğu belirlenmiştir (5). Bazı çalışmalarda N-Npry' nin laktat dehidrogenaz (6), piruvat kinaz (7), Na /K- ATPaz (8) enzimlerini inhibe ettiği bildirilmiştir.

Glutatyon-S-transferaz (GST) detoksifikasyonda görevli bir enzimdir. İnsan dokularında farklı substrat özgülüğü gösteren GST tipleri mevcuttur. Potansiyel olarak zehirli bazı elektrofilik ksenobiyotikler ile GSH (glutatyon)' in SH (sülfidril) gruplarının konjuge olmasını sağlar. Bunlar çok işlevli enzim gruplarıdır, sadece GSH konjugasyonunu katalizlemez; steroid yapılı hormonlarla tiroid hormonlarını ve bazı ksenobiyotikleri de bağlar ve yığılmasını azaltarak sitotoksik etkilerini engeller (6-9). Bir araştırmada GSH' in nitrozo bileşikleri ile etkilenen DNA iplikciklerinin hasar görmesine engel olamadığı bildirilmiştir (10). Başka bir çalışmada da benzer şekilde dimetilnitrozamin'in böbrek proksimal ve distal tübüllerinde yaptığı hasarı GSH'in engelleyemediği görülmüştür (11).

Çalışmada, İnsanların besin zinciri yoluyla ve çevresel şartlar nedeni ile sürekli etkilendiği N-nitrozoprolidin'in, tavşan karaciğeri ve böbreklerinden izole edilen GST enzimi ile in vitro şartlardaki etkileşiminin araştırılması amaçlandı.

## MATERYAL- METOD

Ketamin anestezisi ile tavşanların karaciğerleri ve böbrekleri çıkarıldı. Tartılıp ağırlıklarının üç katı izotonik sıvı (0,15 M KCl) ilave edilip homojenize edildi (B.Braun Tip 85 3202.). Homojenat 1,5 saat 1000 g'de santrifüj edilip (Beckman Model J2 santrifüj JA 21 rotor) süpernatant DEAE-selüloz kolondan geçirildi. Aktivitenin görüldüğü kısma amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Presipitat potasyum fosfat tamponunda çözülüp diyalizlendi. Dialize edilen materyal CM-selüloz kolondan geçirildi (12,13). Kolondan çıkan ve aktivite gözlenen kısımlar GST enzim kaynağı olarak kullanıldı ve aktivite saptandı (13). GST enziminin tepkime karışımı-substrat glutatyon, recipient 1 kloro 2,4 dinitro benzen (KDNB) - varlığında böbrek homojenatında 12,5 mM'dan 600 mM'a kadar, karaciğer homojenatı ise 50 mM' dan 600 mM'a kadar bir skala içerisinde her bir tepkime karışımına inhibitör olarak 0,1mM ve 0,05 mM hazırlanmış N-nitrozoprolidin çözeltisi eklenerek belirlendi. Aktiviteler spektrofotometrede (Shimadzu UV-1201,UV-Vis, Nüve BM 101 benmari ataşman) kinetik olarak ölçüldü. Her molaritede, her bir doz için beş ölçüm yapıldı. Bulunan enzim aktivite değerleri, kontrol (N-nitrozoprolidin içermeyen KDNB'li tepkime karışımı) değerleri ile karşılaştırıldı. Protein tayini Lowry yöntemi ile yapıldı (14).

Araştırmanın istatistiksel analizi SPSS (7.5 Ver) programı ile yapıldı ve değerlendirilmede regresyon, korelasyon analizleri ve Kruskal Wallis varyans analizi uygulandı (15).

## SONUÇ VE TARTIŞMA

Araştırmamızda böbrek ve karaciğer homojenatında saptanan spesifik aktivite değerleri (U/mg protein) ve lineer regresyon analizi sonuçları tablo 1 ve 2 ' de verilmiştir.

**Tablo 1:** KDBN ve-N nitrozoprolidin'in Belirli Konsantrasyonlarında Tavşan Böbrek GST Enziminin Spesifik Aktivite Değerleri (U/mg protein)

	12,5	25	50	75	KDNB mM						r	X+Sh	Medya
					100	150	200	250	300	600			
<b>0,1 M N-Npry</b>	0,93	1,119	1,679	2,052	2,238	2,798	2,798	2,985	2,985	2,900	<b>r=0,72</b>	2,24+0,24	2,51
<b>0,05M N-Npry</b>	0,74	1,119	1,865	2,425	2,425	3,171	3,358	3,358	3,544	3,573	<b>r=0,75</b>	2,55+0,32	2,80
<b>Kontrol</b>	0,74	1,305	1,679	2,238	2,425	2,798	3,171	3,171	3,544	3,544	<b>r=0,79</b>	2,46+0,31	<b>2,61</b>

KW=1,36,p>0,05

Böbrek homojenatı verilerine logaritmik dönüşüm yapılarak regresyon yöntemi uygulandığında, KDNB doz miktarlarına bağlı olarak 0,1 M ve 0,05 M N-nitrozoprolidin çözeltisi verilen gruplar ile N-nitrozoprolidin uygulanmayan kontrol grubunun GST aktiviteleri arasında aşağıda regresyon denklemleri verilen doğrusal bağıntı bulunmuştur.

$$y_{\text{kont}} = 1,695 + 0,004 \times \text{KDNB} \quad (\text{Kontrol -N-nitrozoprolidin içermeyen})$$

$$y_{0,1} = 1,68 + 0,003 \times \text{KDNB} \quad (0,1\text{M -N-nitrozoprolidin})$$

$$y_{0,05} = 1,73 + 0,004 \times \text{KDNB} \quad (0,05 \text{ M -N-nitrozoprolidin})$$

Böbrek homojenatı çalışmasında, KDNB doz miktarı ile 0,1 M N-nitrozoprolidin uygulanan grubun GST değerleri arasında aynı yönlü korelasyon gözlenmiştir. KDNB doz miktarı arttığında GST aktivite değerleri yükselmektedir ( $r=0,72$ ). Aynı yönlü korelasyon 0,05 M N-nitrozoprolidin çözeltisi için ( $r=0,75$ ) ve kontrol grubu için de saptanmıştır ( $r=0,79$ ). Bu üç korelasyonda istatistiksel olarak önemlidir ( $p<0,05$ ).

**Tablo 2:** KDBN ve -N nitrozoprolidin'in belirli Konsantrasyonlarında Tavşan Karaciğer GST Enziminin Spesifik Aktivite Değerleri (U/mg protein)

	50	100	KDNBmM				X+Sh	Medyan
			200	300	600			
<b>0,1 M N-Npry</b>	2,602	3,857	4,920	6,123	7,348	<b>r=0,99</b>	4,97+0,83	4,92
<b>0,05 M N-Npry</b>	2,270	3,674	5,919	6,950	7,685	<b>r=0,98</b>	5,29+1,01	5,91
<b>Kontrol</b>	2,541	4,268	4,901	5,909	6,827	<b>r=0,97</b>	4,77+0,66	4,90

KW=0,37,p>0,05

Aynı logaritmik dönüşüm işlemleri karaciğer homojenatı verileri için de yapılmış ve deney grubu ile kontrol grubu arasında doğrusal bağıntı bulunmuştur. Regresyon denklemleri aşağıda verilmiştir.

$$y_{\text{k o n t}} = -2,98 + 3,44 \times \text{KDNB} \quad (\text{kontrol, N-nitrozoprolidin içermeyen})$$

$$y_{0,1} = -5,004 + 4,43 \times \text{KDNB} \quad (0,1 \text{ M N-nitrozoprolidin})$$

$$y_{0,05} = -6,747 + 5,35 \times \text{KDNB} \quad (0,05 \text{ M N-nitrozoprolidin})$$

Karaciğer homojenatında da böbrek de olduğu gibi GST aktivite değeri KDNB doz miktarı artışı ile yükselmektedir. KDNB doz miktarı ile 0,1 M N-nitrozoprolidin verilen grupta ( $r=0,99$ ), 0,05 M N-nitrozoprolidin verilen grupta ( $r=0,98$ ) ve kontrol grubunda ( $r=0,97$ ) aynı yönde korelasyon izlenmiştir. Üç korelasyon da istatistiksel olarak önemlidir ( $p<0,05$ ).

Böbrek ve karaciğer homojenatında 0,1 M. ve 0,05 M N-nitrozoprolidin çözeltisi uygulanan gruplar ile N-nitrozoprolidin verilmeyen kontrol grubuna ait GST aktivite değerleri Kruskal Wallis varyans analizi ile karşılaştırıldığında gruplar arası farklılık önemsiz bulunmuştur ( $p>0,05$ ) (Tablo 1,2).

Nitrozoprolidin sigara dumanında, kirli havada, tüketime sunulan bir çok gıda maddesinde bulunması nedeni ile bir çok araştırmaya konu olmuştur. Mc Coy ve arkadaşları hamsterlerde yaptıkları bir denemede 0,33 mmol N-Npry'nin tek dozda solunum yollarında tümöre neden olduğunu bildirmiştir (16). Bir başka araştırmada ise N-Npry'nin karaciğerde tümöre, genital organda mezotelyamaya yol açtığı rapor edilmiştir (17). 5120 adet kemirgende yapılan bir araştırmada ise N-Npry ve N-nitrozo dimetilamin'nin doza bağlı olarak karaciğer ve özafagusta kansere yol açtığı bildirilmiştir (18). Oral yolla 40 mg/kg dozunda verilen 1-nitrozo piperidinin karaciğerde hasara neden olduğu ve uygulama süresine bağlı olarak da aynı organda kansere neden olduğu izlenmiştir (4). Kemirgenlerde kanserojen etkili olan N-Npry'nin aynı zamanda mutasyon etkisinin de olduğu ve GC-AT transversiyonuna yol açtığı saptanmıştır (5). Nitrozo bileşiklerinin DNA üzerinde GC-AT transversiyonuna neden olması veya DNA iplikçığı üzerinde hasara neden olması karsinojenik etkisinin bir göstergesi olarak düşünülebilir. Yapılan bazı araştırmalar ise detoksifikasyonda görevli bir enzim olan GST' nin, nitrozolu bileşiklerle etkileştirilen karaciğer ve böbreklerde oluşan sitotoksik DNA hasarını engelleyemediğini göstermektedir (10,11). Lash ve Woods bazı kimyasalların sıçan böbreklerinde distal ve proksimal tübül hücrelerinde oluşturabileceği hasarı tesbit için metil vinil keton, allil alkol ve N-Dimetil nitrozamini böbrek tübül hücrelerine inkübe etmiş ve sonuçta metil vinil keton ve allil alkolün GSH ile baskılandığını, N-Dimetilnitrozaminin ise etkilenmediğini bildirmişlerdir (11). N-Dimetilnitrozaminle yapılan bir diğer çalışmada da 0,2 mg/kg N-Dimetilnitrozamin gavaj yolu ile ratlara verilmiş ve GSH etkileşimi izlenmiş, veriliş süresi ve doza bağlı olarak hasarın arttığı bildirilmiştir (10). Çeşitli araştırmaların sonuçlarında N-Npry 'nin laktat

dehidrogenaz enzimini (19) ve Na/K-ATPaz enzimini % 20 oranında (20), piruvat kinaz enzimini % 73 oranında (21) inhibe ettiği bildirilmiştir. İn vitro şartlarda N-Npry ile etkilenen lenfosit kültüründe ise kromozomlarda satellit separasyonu ve birçok anomali saptanmış, DNA ve protein sentezinde inhibisyon rapor edilmiştir (22). N-Npry çalışmalarında hedef organın karaciğer olduğu belirlenmiştir (20,23).

Araştırmamızda in vitro şartlarda N-Npry'nin 0,1 M ve 0,05 M konsantrasyonunda hazırlanan dozlarının karaciğer ve böbrekten izole edilen GST' nin aktivite değerlerinde kontrol (KDNB) değerlerine göre değişime neden olmadığı bulunmuştur. Bulgularımız nitrozo bileşiklerinin detoksifikasyonunda GST' nin rol almadığını bildiren literatür bilgileri ile uyumludur (4,5,10,11). Ancak bu bulgunun ileri araştırmalarla desteklenmesi gerektiği kanısındayız.

#### KAYNAKLAR

1. **Sen N.P, Miles W.F, Donaldson B, Panalaks T.** "NPRY and dimethylnitrosamine in bacon". *Nature.*,241:473-4 (1973)
2. **Yang C.S,Smith T, Ishizaki H, Hong J.Y.** "Enzyme mechanisms in the metabolism of nitrozamines" *JARC Sci Publ.*,105:265-74 (1991)
3. **Brunnemann K.D, Yu L, Hoffman D.** "Assessment of carcinogenic volatile N-nitrosamines in tobacco and in mainstream and sidestream smoke from cigarettes". *Cancer Res.*,37:3218-3222 (1977)
4. **Kitchin K.T,Brown J.L, Lijinsky W.** "Biochemical studies of six nitrogen-containing heterocycles in rat tissues". *Biochem Pharmacol.*, 38(16):2733-8 (1989)
5. **Arimato K.S,Anma N, Yoshinaga Y, Douki T.** "Oxidative damage and induced mutation in ml3mp2 phage DNA exposed to N-Npry with UUA radiation". *Mutagenesis.*, 15(6): 473-7(2000)
6. **Tricker A.R, Pfundstein W, Kalbe T, Preusseman R** "Seconder amine precursors to nitrozamine in human saliva, gastric juice, blood, urine and feaces" *Carcinogenesis.*, .13:563-8 (1992)

7. **Grelen J.B.** "Biochemical aspect of chemical carcinogenesis". *Bull.Cancer.*,65:249-54 (1978)
8. **IARC Monograph.** " On the evaluation of the carcinogenesis risk of chemical to human some N-nitroso compound." 17(83)125-313 (1978)
9. **Boyer T.D, Vessey D.A, Holcomb C, Soly N;** "Studies of the relationship between the catalitic activitiy and binding of nonsubstrate ligands by GST". *Biochem J.*, 217:179-185 (1984)
10. **Brambilla G,Carlo P, Finollo R.** "Effect of ten thiocompounds on rat liver DNA damage induced by a small dose of N-nitrosodimethylamine". *Arch Toxicol.*,66(4):286-90 (1992)
11. **Lash L.H,Woods E.B.** "Cytotoxicity of alkalating agents in isolated rat kidney proximal tubular and distal tubular cells". *Arch Biochem Biophys.*, 286 (1):46-56 (1991)
12. **Mannervek B, Guthenberg C.** Human placenta *Methods in Enzymology* ., 77: 213-231 (1981)
13. **Habig W,Pabst M, Jacoby W;** Glutation- S-transferases. *J. Biological Chemistry*,249 (25) :7130-7139 (1974)
14. **Kaleti G,Leder W.H;** Protein-Lowry Handbook of Micromethods for the Biological Sciences, . New York, fourt ed. p.87-88 (1974)
15. **Sümbüloğlu K,Sümbüloğlu V.** Biyoistatistik. 4. Baskı Özdemir yayıncılık Ankara .(1993)
16. **Mc Coy G.D, De Marco G J, Haxhiu L.** "Effect of acute administration of N-Npry to male Syrian Golden hamster". *Cancer Lett.*,79:\61-5 (1994)
17. **Greenblat M,Lijinsky W.** "Nitrosamine studies; neoplaesm of liver and genital meshoteliom in Npry treated MCR rats". *JNat.Cancer*, 48:1678-9 (1972)
18. **Peto R,Gray R,Brantom P, Grasso P.** "Nitrosamine carcinogenesis in 5120 rodents: chronic administration of sixteen different concentrations of NDEA, NDMA, NPRY and NPIP in the water of 4440 inbreed rats, with parallel studies on NDEA alone the effect of

- age of starting (3,6,20 weeks) and of species (rats,mice or hamsters)". *IARC Sci Publ.*, 57: 627-65.(1984)
19. **Atalay A.**" Nitrozolu bileşiklerin sıçan karaciğer laktat dehidrogenaz enzimine in vitro etkileri". *C.Ü.Tıp Fak. Dergisi.*, 3: 208-14 (1981)
20. **Çetinkaya Ö, Çetinkaya S, Atalay A.**" Bazı nitrozaminlerin Na/K- ATPaz enzimi üzerindeki inhibisyon kinetiklerinin incelenmesi". *Biyokimya Dergisi.*, XV:67-75 (1991)
21. **Cengiz M, Atalay A,** "İnvitro effects and binding properties of NPRY on pyruvate kinase enzyme ".*Doğa TrJ.MedSci.*, 16: 167-74 (1992)
22. **Sezgin A, Atalay A.**" The effect of NPRY on human lymphocyte chromosomes". *J.Health Sci* 7: 29-35 (1995)
23. **Hunt E J, Shank R.** "Formation and persistence of DNA adduct in rodents treated with Npry" *Carcinogenesis* **12** (4): 571-75 (1991)

**Başvuru Tarihi: 14.06.2001**

**Kabul Tarihi: 12.092001**