

L-SERİN AMİNO ASİTİNİN İNSAN ERİTROSİT MEMBRANINDAN TAŞINIMINA DİETİLNİTROZAMİNİN ETKİSİ^(X)

Yavuz SİLİĞ, Öge ÇETİNKAYA, Atillay ATALAY

Cum. Üniv. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı

ÖZET

Karsinojenik ve mutajenik etkili bir bileşik olan dietilnitrozaminin (DENA), insan eritrosit membranından 14C-L-Serin aminoasitinin taşınması üzerindeki etkileri araştırıldı. Bu amaçla, daha önce yapılan çalışmalar sonucunda saptanan, %20 hematokrit değerine sahip kan örnekleri kullanıldı. Taşınım için yapılan deneylerde DENA'nın 77 mM ile 538 mM arasında yedi farklı derişimi kullanıldı. Bu derişimlerdeki DENA'lar 14C-L-Serinle inkübe edilerek taşınımındaki derişim kontrollere göre kıyaslandı. 77 mM'lık DENA varlığında taşınımın %23, 538 mM'lık DENA varlığında ise %58 oranında inhibe olduğu saptandı.

Anahtar sözcükler: Dietilnitrozamin, L-Serin, Aminoasit transportu

SUMMARY

The effects of diethylnitrosamine (DENA), a carcinogenic compound with a mutagenic effect, on the transportation of 14C-LSerine aminoacid from the human erythrocyte membrane have been investigated. For this purpose, blood samples of 20% hematocrite value determined following investigations made previously were used. Seven different concentrations of DENA varying between 77 mM and 538 mM were used in the experiments conducted on transportation. DENAs in these concentrations were incubated with 14C-L-Serin and the change in transportation was compared with that of the controls. It was determined that the presence of DENA of 77 mM inhibited transportation by 23% while that of 538 mM led to an inhibition 58%.

Key words: Diethylnitrosamine, L-Serine, Aminoacid transport

Çevre kirleticisi kimyasal maddeler arasında en büyük yeri nitroslu birleşiklerin aldığı bilinmektedir (1,2). Karsinojenik ve mutajenik etkileri olan bu bileşikler, besin maddelerinde koruyucu olarak kullanılan nitritlerle ikincil aminlerin tepkimeleri sonucunda midede in vivo koşullarda oluşmaktadır (3,4). Nitrozlu bileşiklerden dietilnitrozamin (DENA)'nın DNA polimerazda ardışık dizi

değişikliği oluşturduğu ve DNA'yı alkillediği saptanmıştır (5). DENA'nın karaciğer ve akciğerde RNA ve protein sentezini inhibe ettiği de bulunmuştur (6). In vivo ve in vitro koşullarda bazı enzim aktivitelerini inhibe ettiği gösterilmiştir (7,8).

Aminoasitlerin hücre için taşınım mekanizmasının taşıyıcı bir madde aracılığıyla aktif taşınım veya kolaylaştırılmış diffüzyon ile

(x). Bu Çalışma C.Ü. Araştırma Fonu Saymanlığı tarafından desteklenmiş ve 13-16 Nisan 1994 tarihlerinde yapılan XII. Ulusal Biyokimya Kongresinde sunulmuştur.

gerçekleştiği bilinmektedir. Glukoz taşınımında olduğu gibi aminoasit taşınımından da taşıyıcı bir sistemin varlığına ihtiyaç vardır (9,10).

Newsholme ve Lecch adlı araştırmacılar dokularda aminoasitlerin hücre için taşınımında 7 farklı taşınım sisteminin rol oynadığını bildirmişlerdir. Bu sistemler A, ASCP, L, Ly, Dikarboksilat, β , N, sistemlerdir (11).

Raben adlı araştırmacı ise; insan eritrositlerinde L, T, Ly, ASC ve Glisin olarak adlandırılan 5 farklı taşıyıcıya bağlı taşınım sisteminin bulunduğunu bildirmiştir (12-14).

Nitrozlu bileşikler elektrofilik özellikleri sayesinde proteinlerde nükleofilik bölgelere atak yaparak, bağlanabilmekte ve proteinlerin fonksiyonlarını bozmaktadır. L-Serin aminoasiti taşıdığı OH grubundan dolayı proteinlerin yapılarında önemli rol oynamaktadır. Ortamdaki nitrozlu bileşik tarafından etkilenebileceği beklenebilir. Bu çalışmada, eritrosit membranında L-Serin aminoasiti taşınımına DENA'nın etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda kullanılan kan örnekleri gönüllü kan vermek isteyen öğrencilerin ön kol veninden alınarak sağlandı.

Alınan kan örnekleri, 28x105 mm boyutlarındaki santrifüj tüpü için, her 1 ml kan için 10 ml yıkama çözeltisi olacak şekilde (140 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 18 mM TRIS-HCl, pH: 7,40; 25°C) ilave edildi. Hücre içindeki amino -

asitlerin dışarıya çıkması için 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 7500xg'de 3 dk santrifüj edildi. Dökelti atılıp pelete yukarıdaki işlem 4 kez uygulandı. Bu işlem bitince hematokrit değeri ve kan sayımı not edildi (12,13).

1. DENA'nın L-Serin Aminoasit Taşınımına Etkisi

%20 hematokritli taze kandan 13x69 mm boyutlarındaki santrifüj tüplerine 1 ml konuldu. Üzerine son derişimi 77-539 mM arasında değişen miktarda DENA ilave edildi. Tüpler 25°C'de 10 dk ön inkübasyona tabi tutuldu. Bu işlemden sonra tüplere 1 μ Ci/10 μ lt L-Serin-14C aminoasiti ilave edilip karıştırıldı ve 25°C'de 20 dk taşınım için inkübasyon yapıldı. İnkübasyondan sonra taşınımı durdurma ve sayım işlemi yapıldı (12,13).

2. Taşınımı Durdurma ve Sayım İşlemi

Taşınım işlemi bittiği anda taşınımı durdurmak için her bir örneğe derişimi 0.250 mM olacak şekilde soğuk Phloretin'den ilave edilip karıştırıldı. 13x69 mm boyutlarındaki tüpler 29x105 mm boyutlarındaki santrifüj tüplerinin içine yerleştirildi. 0°C'de 20 dk 15000xg'de santrifüj edildi. Küçük tüpler çıkarılıp dökelti her gömülmek üzere biriktirildi. Tüplerdeki pelete %10 mg'lık Saponin'den 700 μ lt, %30'luk TCA'dan 200 μ lt ilave edilip bagetle homojenize edildi. Daha sonra 6000 xg'de 10 dk santrifüj edilip dökelti ayrıldı. Dökeltiden 500 μ lt alınıp Sıvı Sintilasyon Sayıcı'nın özel cam tüplerine

konularak üzerine 5 ml sintilasyon çözeltisi (%0.4 PPO, %0.01 POPOP Toluene'de) ilave edilip sayıcıya verildi. Değerler sayıcıdan cpm olarak alındı (12,13).

3. Spektrofotometrik Bağlanma Çalışması

DENA ile L-Serin aminoasit 37°C'de 20 dk inkübe edilerek fark spektrumları alındı.

BULGULAR

1. DENA'nın L-Serin Aminoasit Taşımına Etkisinin Saptanması

DENA'nın L-Serin aminoasiti taşımına etkisi Şekil 1'de gösterilmiştir. DENA derişim arttıkça hücre için taşınan L-Serin amino-

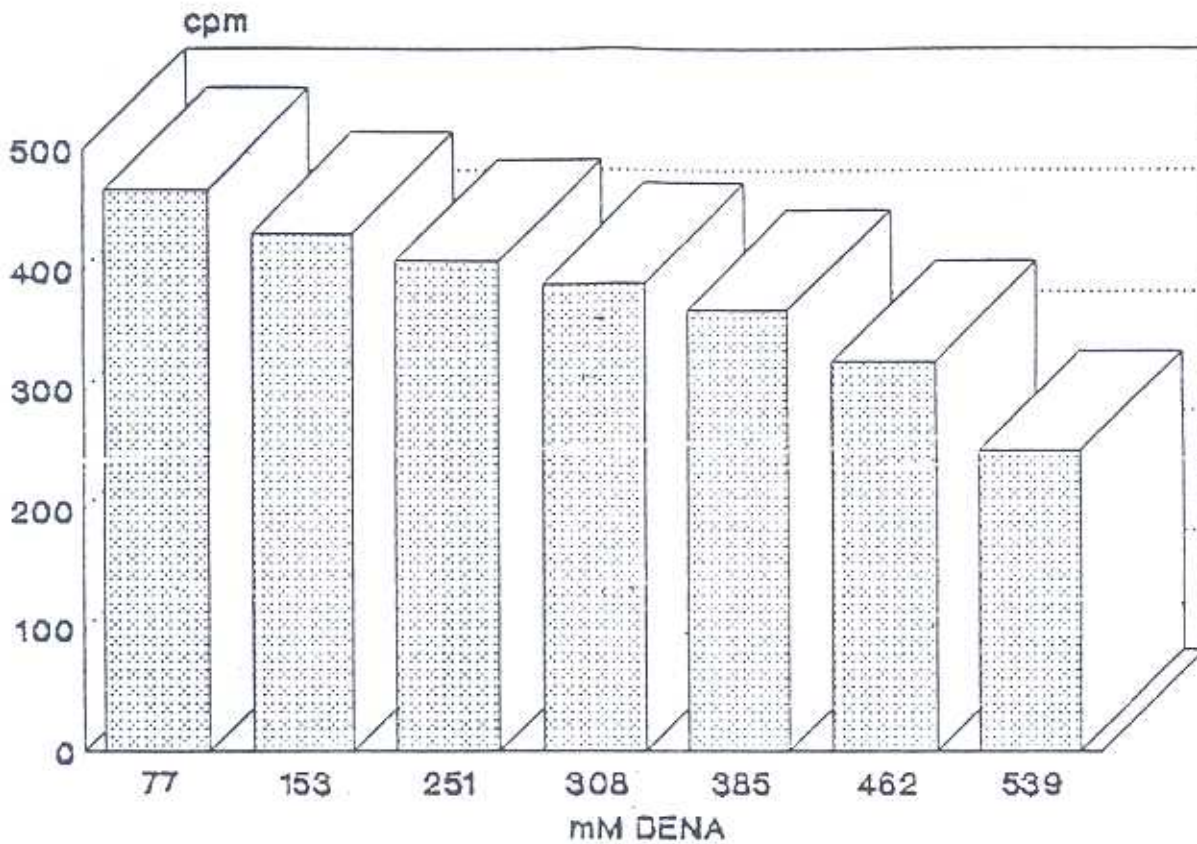
asitinin miktarı kontrole kıyasla azalmıştır. DENA'nın 77 mM ile 538 mM arasında yedi farklı derişimi kullanıldı. 77 mM'lık DENA varlığında taşınım %23, 538 mM'lık DENA varlığında ise %58 oranında inhibe olduğu saptandı.

Hematokrit : %20

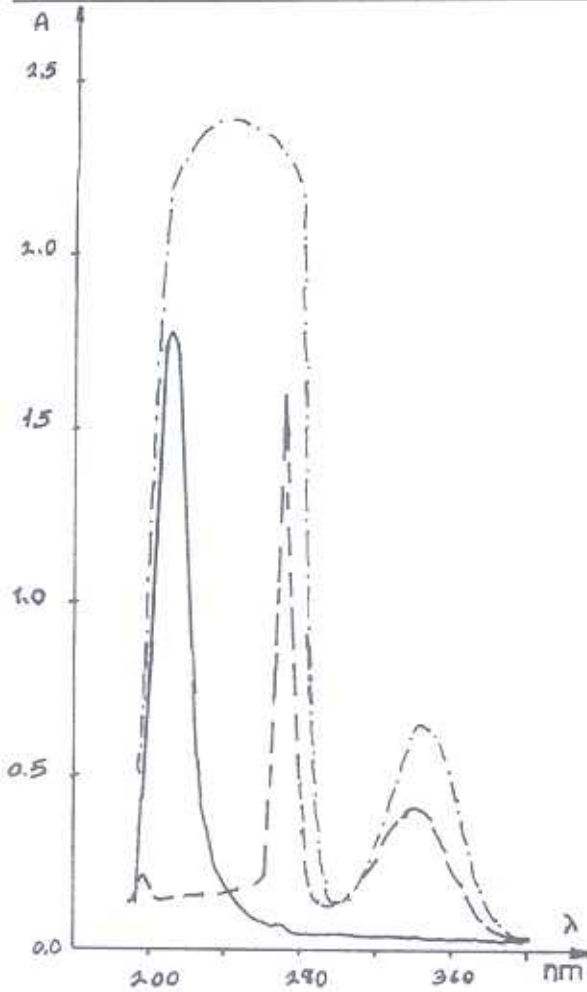
Kan Sayımı : 2.320.0000 adet/mm³

2. Spektrofotometrik Bağlanma çalışması

DENA ile L-Serin aminoasitinin 20 dk inkübasyondan sonra fark spektrumları Şekil 2'de verilmiştir. Elde edilen fark spektrumlarından L-Serin pikinin 208 nm'deki pik, 268 nm bölgesine kaydığı görüldü.



Şekil 1. DENA derişiminin L-Serin Aminoasiti taşımına etkisi



Şekil 2. DENA ile L-Serin aminoasiti'nin 20 dk inkübasyondan sonraki etkileşimi ---- Standart L-Serin, -.-.-. DENA, — Tampon + L-Serine karşı, inkübasyon karışımı

TARTIŞMA

Kimyasal karsinojenlerin hedef dokulardaki proteinlere kovalent bağla bağlandıkları 1950'li yıllardan beri bilinmektedir. Protein ve nükleik asitlerin nükleofilik yani elektronca zengin kısımları kimyasal karsinojenlerin hedefidir ve elektrofilik ataklar sonucunda bu bölgelere bağlanırlar. Kimyasal karsinojenlerin makromoleküler nükleofilik

hedefleri proteinlerde sistein ve metiyonin aminoasitlerinin S, Histidinin N-1, N-3, Tirozinin ise C-3 atomu olarak saptanmıştır (14).

Çalışmamızda insan eritrosit membranından L-serinin taşınımına nitrosulu bir bileşik olan DENA'nın etkisini inceledik. L-serinin taşınmasında rol alan sistem 0.250 mM Phloretin tarafından kuvvetle inhibe olabilen bir proteindir (12,13,15). DENA'nın (OH) grubu taşıyan ve enzim aktif merkezinde rol oynayan L-serine etkisini göstermek amacıyla, L-serin ve DENA deney ortamına aynı anda ilave edilip 20 dk inkübasyondan sonra DENA'nın taşınımına bir etkisi olmadığı bulunmuştur. DENA ve eritrositler 10 dk bir ön inkübasyona tabi tutulduktan sonra ise hücre içine taşınan L-serin aminoasit miktarının kontrollere kıyasla azaldığı saptanmıştır. 77 mM'lık DENA'nın eritrosit membranından L-serin aminoasit taşınımını %23 oranında, 538 mM'lık DENA'nın ise %58 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir.

Yapılan çalışmalar DENA'nın canlılara uygulanan sonucunda enzimlerle ve proteinlerle etkileştiğini göstermektedir. DENA'nın sıçan karaciğer aminoasit metabolizması enzimlerinden Triptofonoksjenaz, Tirozin ve Omitin Transferaz, Serin dehidrataz'ı inhibe ettiği bulunmuştur (16).

Bu çalışmalar doğrultusunda enzim aktif merkezinde rol oynayan aromatik aminoasitler, sistein ve metiyonin, DENA ile etkileştirilerek bu etkileşim ince tabaka kromo-

tografisi ile incelenmiş ve DENA ile inkübe edilen aminoasitlerin standartlarına kıyasla farklı pikler verdiği saptanmıştır. Böylece DENA'nın aminoasitlere bağlanabileceği bildirilmiştir (17). Ayrıca siklik yapıda bir nitrosamin olan nitrozomorfolininde aromatik yapıdaki aminoasitlerle etkileştiği gösterilmiştir (18).

L-serin ve DENA'nın inkübasyon sonucunda bağlanıp bağlanmadığının incelenmesi

amacıyla fark spektrumları alınmıştır. Bu fark spektrumların incelenmesi ile L-serin aminoasitine ait olan pikte kayma olduğu gözlenmiş bu da DENA'nın L-serin ile etkileşebildiği fikrini ortaya çıkarmıştır. DENA'nın L-serinle etkileşmesi sonucunda mı yoksa taşıyıcı sistemi inhibe etmesi ile mi etki gösterdiğini saptamak amacıyla daha ayrıntılı araştırmalara gereksinim olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Fine DH, Rounbehler DP, Pellizzari ED, et al. N-Nitrosodimethylamine in air. Bull Env Cont Tox, 1976; 15: 739-746.
2. Scanian RA. N-Nitrosamines in food. Crit Rev Food Technol. 1975; 5: 357-358.
3. Galea V, Preda N, Popa L, Simu G. Experimental production of nitrosamines in vivo. Bogovski P, Walker EA (ED), 1973; I.A.R.C. Scientific Publ. No: 9, Nitroso compounds in the enviromental Lyon, France. 115.
4. Lijinski W, Eipstein SS. Nitrosamines as enviromental carcinogenic. Nature, 1979; 225: 21-23.
5. Craddock U, Anyley M. Sequential changes in DNA polymerase α ve β DENA induced carcinogenesis. Biochem Biophys Acta. 1979; 564: 15-22.
6. Witschi H. The effect of DENA on end protein synthesis in the liver and lung of Syrian Golden Hamster. Biochem J 1971; 136: 789-794.
7. Atalay A, Aker A. Maya Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenazmin DENA Tarafından İnhibisyonu. Doğa. 1987; 11 (1): 8-12.
8. Çetinkaya Ö, Atalay A. Effect of intraperitoneal administration of some nitrosamines on mouse liver Na/K ATPase enzyme activities. Doğa Turkish J Med Sci 1994; 22: 81-83.
9. Zubay G. Biological Membranes: Transport, Biochemistry 1983; Chap. 17: 621-656, Addison-Westey Pub Co.
10. Arthur C, Guyton. Transport and storage of aminoacid: Aktive transport of amino in to the cell., Medical Physiology 1974; 69: 930-931, W.B. Saunders Company.
11. Newholme EA, Leech AR. Aminoacid metabolism: Transport of aminoacid into cell. Biochemistry for the Medical Sciences. 1986; 10: 398-400.
12. Rosenberg R. Na-Independent and Na-Dependent transport of aminoacid in the human red blood cell. Acta Physiol Scad 1982; 116: 321-330.
13. Rosenberg R. Aminoacid tranpost in human red blood cells. Acta Pschiatr Scad 1988; 78: 25-28.
14. Miller EC, Miller JA. The metabolism of Chemical carcinogens to Reactive

- Electrophiles and their possible Mechanism of Acton Carcinogenesis. ACS Monograph 173-Am Chem Soc. Wash DC 1976; 737-762.
15. Rosenberg R. L-Leucine transport in human red blood cells: A detailed kinetic analysis. J Membrane Biol 1981; 62: 79-99.
17. Çelik K: Aromatik aminoasitler ve kükürt içeren aminoasitlerin DENA ile etkileşimi- nin İnce Tabaka Kromatografi yöntemiyle incelenmesi. Y Lisans Tezi 1989; C.Ü, Sađ. Bil. Enst. Sivas.
18. Çetinkaya S, Çetinkaya Ö, Atalay A. Aromatik aminoasitlerin N-Nitrozomorfolin ile Etkileşiminin TLC ve Spektrofotometrik yöntemlerle incelenmesi. Ege Tıp Dergisi 1993; 32 (1-2): 81-84.