

İnsan ve rat karaciğer primer hücre kültürlerinde farklı N-nitroso bileşiklerinin DNA üzerindeki etkileri

Taner PAMUKÇU¹, Alexandre SCOTT²

¹ Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kırıkkale; ² Straytelyde Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Glasgow

Özet: On kanserojen N-nitroso bileşiği, insan ve rat karaciğer primer hücre kültürleri üzerinde DNA'ya hasar verici aktiviteleri açısından denendi; alkaline elüsyon tekniği kullanılarak DNA bölünmesi ve nicel otoradyografi kullanılarak da programlanmamış DNA sentezleri ölçüldü. Subtoksik konsantrasyonların aralığında pozitif dozla ilgili cevaplar her iki türün hücrelerinden 10-32 mM'lik N-nitrosodiethylamine, 1,8-10 mM'lik N-nitrosodi-n-propylamine, 1-3,2 mM'lik N-nitrosomorpholine, 1-3,2 mM'lik N-nitrosopiperidine, 3,2-18 mM'lik N-nitrosopyrrolidine, 0,32-1,8 mM'lik N-nitroso-N-methylurea, 0,32-1,8 mM'lik N-nitroso-N-ethylurea ve 0,1-0,32 mM'lik N-nitroso-N-butylurea kullanılarak elde edildi. N-nitrosodi-n-butylamine 1 mM'lik doymuş çözeltisi sabitti. İnsan karaciğer hücrelerinin tepkileri nitelik açısından rat karaciğer hücreleriyle benzerdi. Fakat istatistik açıdan, N-nitrosodimethylamine, N-nitrosomorpholine, N-nitrosopiperidine, N-nitrosopyrrolidine ve N-nitroso-N-butylurea kullanılarak gözlemlenen programlanmamış DNA sentezlerinde ve DNA hasar miktarlarında iki tür arasında önemli farklılıklar görüldü. Diğer taraftan, 20 insan ve 20 rat donöründen alınan kültürlerde 5 mM'lik N-nitrosodimethylamine ile uyarılmış genotoksik etkilerdeki miktarsal farklılıklar bu nitrosamine ve diğer N-nitroso bileşikleriyle ortaya çıkarılan ortalama türler arası farklılıklardan daha büyüktü. Rat hepatositlerindeki DNA onarım duyarlılığını işaret eden bu sonuçlar, insan hepatositlerindeki N-nitroso bileşiklerinin genotoksik potansiyelini tahmin etmek için geçerli bir model olduğunu gösterdi.

Anahtar kelimeler: DNA hasarı, insan, karaciğer primer hücre kültürü, N-nitroso bileşikleri, rat

The effects of different N-nitroso compounds in primary cultures of human and rat hepatocytes on the DNA

Summary: Ten carcinogenic N-nitroso compounds were examined for DNA-damaging activity in primary cultures of human and rat hepatocytes. DNA fragmentation was measured by the alkaline elution technique, and unscheduled DNA synthesis was by quantitative autoradiography. Positive dose-related responses in the range of subtoxic concentrations indicated were obtained in cells of both species with N-nitrosodiethylamine (10-32 mM), N-nitrosodi-n-propylamine (1.8-10 mM), N-nitrosomorpholine (1-3.2 mM), N-nitrosopiperidine (1-3.2 mM), N-nitrosopyrrolidine (3.2-18 mM), N-nitroso-N-methylurea (0.32-1.8 mM), N-nitroso-N-ethylurea (0.32-1.8 mM) and N-nitroso-N-butylurea (0.1-0.32 mM). N-nitrosodi-n-butylamine was practically inactive at the maximal soluble concentration (1 mM). The results obtained from human hepatocytes were qualitatively similar to those of rat hepatocytes, but statistically, important differences between the two species in the amounts of DNA damage and/or unscheduled DNA synthesis were observed with N-nitrosodimethylamine, N-nitrosomorpholine, N-nitrosopiperidine, N-nitrosopyrrolidine and N-nitroso-N-butylurea. On the other hand, quantitative differences in the genotoxic effects induced by 5 mM-N-nitrosodimethylamine in cultures derived from 20 human donors and from 20 rat were greater than average compounds. These results indicate that the rat hepatocyte DNA repair assay is a valid interspecies differences displayed by this nitrosamine and by other N-nitroso model for predicting the genotoxic potential of N-nitroso compounds in human hepatocytes.

Key words : DNA damage, hepatocyte, human, N-nitroso compounds, rat

Giriş

N-nitroso bileşikleri (NOC)'nin birçok hayvan türünde tümör oluşumuna neden olduğu ortaya çıkarılmıştır (2,9,14,20). Kuvvetli kanserojen aktiviteleri nedeniyle, NOC'un geniş çevresel oluşumları, ön aminlerden ve azotlu maddelerden *in vivo* oluşum ihtimali ve önemli ölçüdeki etkileri, belirli bölgelerdeki artan kanser olayları ile ilişkilendirilmesini ve insanın maruz kaldığı miktarın tayin edilmesini sağlamıştır (14,19,29,32). Bartsch ve Montesano (1) *in vivo* olarak oluşan ya da mesleki ve çevresel nedenlerle ortamda olan NOC'ye maruz kalan

insanların bu bileşiklerin kanserojen etkilerine karşı duyarlılıklarını biyokimyasal, patolojik, deneysel ve epidemiyolojik incelemelerden elde edilen sonuçlar ışığında incelemiştir. Metabolizmadaki nitrozaminler genellikle karaciğere karaciğer dışı dokulardan daha yüksek oranda ilgi gösterdiği için, insan karaciğerindeki kimyasal maddelerin biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesi için güvenilir bir modeli olarak gösterilen insan karaciğer dokularının primer kültürleri üzerinde deneyler yapılmıştır. (6,8,13,24,34). DNA bölünmesi, alkaline elüsyon tekniği (17) ve nükleon başına net ağırlık olarak mik-

tarsal otoradyografi (36) yoluyla programlanmamış DNA sentezi (UDS) kullanılarak değerlendirilmiştir. Model olarak ratın kullanılmasının doğruluğunu kontrol etmek, risk miktarlarındaki değerler konusunda daha iyi bilgi sağlamak ve NOC'nin potansiyel kanserojen özelliklerini bulmak amacıyla, ratın karaciğer hücrelerinin primer kültürlerindeki aynı uç noktalar ölçülerek bir karşılaştırma yapılmıştır (3,15,37).

Bu çalışmada, insandaki NOC'nin potansiyel genotoksik aktivitesi konusunda ek bilgi edinmek için insan hücrelerindeki DNA'nın onarım ve hasarı ile ilgili sentezleri ve kist oluşum kapasiteleri konusunda on kimyasal madde incelenmiştir.

Materyal ve Metot

Karaciğer primer hücre kültürleri

Çalışmanın materyalini operasyon sonrası atılacak olan taze insan karaciğer dokuları ve Sprague-Dawley erkek albino ratlarından alınan karaciğer dokuları oluşturdu. Karaciğer donörlerinin sonuçları Tablo 1'de sunuldu. Karaciğer hücreleri, daha önce Strom ve ark. (33) tarafından tarif edildiği gibi kesik yüzeydeki büyük kan damarlarına sokulan sondalar sayesinde kollajen perfüzyonla sağlıklı dokudan ayrıldı. Çeşitli donörlerden elde edilen karaciğer hücreleri, 5×10^6 'dan 10×10^9 'a kadar sulandırıldı. Trypan blue exclusion'la ölçüldüğü gibi perfüzyondan sonra kullanılabilir hücre oranları Tablo 1'de sunuldu.

Rat karaciğer hücreleri, Williams (35) tarafından tarif edildiği gibi kollajen perfüzyon yoluyla, Sprague-Dawley erkek albino ratlarından (200'den 250 g'a kadar) elde edildi. Kullanılabilir hücre oranları %80'den %95'e kadar sınıflandırıldı.

İzole insan ve rat karaciğer hücreleri, %10 fetal dana serumu ve 50 mg/ml'lik gentamisin içinde muhafaza edildi. Bu süspansiyon eşit miktarlarda aşağıda tarif edildiği gibi plastik kapların içine yerleştirildi. DNA bölünmesi üzerine yapılacak deney için 60 mm'lik açık kapların içine 2×10^6 hücre ve UDS'nin belirlenmesi amacıyla yapılacak deney için ise kollajen ile kaplanmış 3,5 mm'lik kaplar içine 1×10^6 hücre yerleştirildi. %95'i hava, %5'i CO₂'den oluşan bir atmosferde 37°C'lik ısı altında 3 saatlik ek bir süreden sonra, karaciğer hücreleri serumsuz Williams hücre kültürü medyumuna (WME) içinde test bileşiği ile 20 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. NOC kullanımından hemen önce direkt olarak ortamından ayrıldı ve 10 µCi/ml [metill-³H] timidin inkübasyon ortamına ilave edildi.

Bu işlemin bitiminde hücreler, trypan blue exclusion yoluyla sitotoksisite, DNA bölünmesi ve UDS için denendi.

Kullanılan N-nitroso bileşikleri

10-32 mM'lik N-nitrosodiethylamine (NDEA), 1,8-10 mM'lik N-nitrosodi-n-propylamine (NDPA), 1-3,2 mM'lik N-nitrosomorpholine (NMOR), 1-3,2 mM'lik N-nitrosopiperidine (NPIP), 3,2-18 mM'lik N-nitrosopyrrolidone (NPYR), 0,32-1,8 mM'lik N-nitroso-N-methylurea (NMU), 0,32-1,8 mM'lik N-nitroso-N-ethylurea (NEU), 0,1-0,32 mM'lik N-nitroso-N-butylurea (NBU), 1 mM'lik doymuş çözeltisi sabit N-nitrosodi-n-butylamine (NDBA), 5 mM'lik N-nitrosodimethylamine (NDMA).

DNA bölünmesi ve alkalın elüsyon tekniği

DNA bölünmesi, daha önce tarif edildiği gibi (4) alkalın elüsyon tekniği ile değerlendirildi. Bu teknikte, tek zincir kırıkları olan DNA'nın ve/veya alkaliye dayanıksız bölgelerin mevcudiyeti, kontrollerle karşılaştırıldığı gibi, hızlandırılmış DNA elüsyonu ile ortaya çıkarıldı. Sonuçlar hem filtreden yıkayıp giderilmiş DNA'nın yüzde oranı olarak hem de kontroller (Kt-Kc) üzerinden elüsyon oranı olarak ifade edildi. Denklem aşağıdaki gibi oluşturulur.

$$K = \frac{(-\ln FR)}{V}$$

K (ml⁻¹): DNA elüsyonunun başlangıç oranı

FR: Filtre üzerinde kalan DNA

V: Elüsyon miktarı (13 ml)

"K" direkt bir şekilde tek zincir kırılma sayısı ile orantılıdır.

DNA onarım sentezleri ve otoradyografik deneme

UDS, Williams'a göre (36) küçük değişikliklerle otoradyografik olarak izah edilir (21). Hem insan hem de ratlarda yüzer adet hücre üzerinden değerlendirme yapıldı. Nükleus üzerindeki gümüş tanecikler eksi otoplazma içinde eşit boyuttaki bir saha üzerindeki tanecikler her bir nükleus başına net ağırlık olarak hesaplandı. Nükleusları gümüş tanecikleri ile çok yoğun bir şekilde işaretli olan S safhasındaki hücreler kolay bir şekilde fark edildi.

Bu çalışma, Straytelyde Üniversitesi Biyoloji Bölümü Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Bulgular

Sitotoksisite konusundaki ön veriler, incelenen 10 adet NOC'nin, farklı konsantrasyonlarına 20 saat süre ile serumsuz WME uygulanan rat karaciğer hücrelerinden arta kalan fraksiyonların ölçülmesiyle elde edildi. Trypan blue excluding'li hücrelerin %60 oranından daha fazlası, 100 mM NDMA, NDEA ve NPYR; 18 mM NDPA, 10 mM NMOR, NPIP ve NMU; 3,2 mM NEU ve 1 mM

Tablo 1. Karaciğer hücrelerinin izolasyonundan elde edilen numunelerin hastalarına ait veriler.

Table 1. Details of patients from whom liver samples were obtained for the isolation of hepatocytes.

	1	2	3	4	5	6	7
Cinsiyet	Erkek	Kadın	Erkek	Erkek	Erkek	Kadın	Kadın
Yaş (yıl)	58	47	71	54	70	39	80
Kriter için tanı	(Safra kanalı karsinomu)	Kavernöz hemanjiom	Kavernöz hemanjiom	Karaciğer karsinomu	Kistik kanal stenozu	Hidatid kist	Safra kesesi adenokarsinomu
Bilirubin (mg/dl)		0.5	1.1	9.7	13.7	0.3	16.7
ALP (U/L)		78	100		425		
AST ^a (U/L)	31	24	36	551	63	32	156
ALT (U/L)	29	3130	41	1131	55	64	158
y-GT (U/L)		42			386	59	
CPK (U/L)		22		2026	34	73	
LDH (U/L)		260		574	163	207	256
Canlı hücre (%)	91	91	95	87	53	82	95
	8	9	10	11	12	13	14
Cinsiyet	Erkek	Kadın	Kadın	Erkek	Erkek	Erkek	Erkek
Yaş (yıl)	68	66	67	66	52	65	75
Ameliyat için belirti	Kolon karsinomunun karaciğer metastazları	Kolon korsinomunun karaciğer metastazları	Kolon karsinomunun karaciğer metastazları	Karaciğer karsinomu	Safra kanalı karsinomu	Mide adenokarsino- munun karaciğer metastazı	Karaciğer adenomu
Bilirubin (mg/dl)	0.3	0.4		0.9	4.7	0.5	1.4
ALP (U/L)	154	115		152	181	103	136
AST ^a (U/L)	40	37	15	142	93	51	73
ALT (U/L)	30		37	167	92	43	12
y-GT (U/L)	40	42		589	234		153
CPK (U/L)				79			34
LDH (U/L)		209	374	197	165		123
Canlı hücre (%)	71	95	85	80	82	86	81
	15	16	17	18	19	20	
Cinsiyet	Erkek	Kadın	Erkek	Erkek	Kadın	Erkek	
Yaş (yıl)	74	70	35	57	66	56	
Ameliyat için belirti	Karaciğer karsinomu	Karaciğer karsinomu Noma	Mide karsinomunun karaciğer metastazı	Hidatid kist	Hidatid kist	Yaygın safra kanalı tıkanıklığı ve karaciğer apsisi	
Bilirubin (mg/dl)	0.9	0.6	0.6	0.7	0.5	0.9	
ALP (U/L)	94	136	104	69	421	289	
AST ^a (U/L)	27	28	36	21	31	48	
ALT (U/L)	96	22	47	79	32	159	
y-GT (U/L)	58	131		32	178	353	
CPK (U/L)	33	79	34	23	24	84	
LDH (U/L)	275	549	211	142	126	182	
Canlı hücre (%)	73	77	91	76	86	67	

ALP, alkalin fosfataz; AST^a, aspartat aminotransferaz; ALT, alanine aminotransferaz; y-GT, gamma glutamiltransferaz; CPK, kreatin fosfokinaz; LDH, laktat dehidrojenaz.

NBU seviyesinde elde edildi. NDBA'da ise; düşük çözülebilirlik özelliğinden dolayı sitotoksik bir konsantrasyona ulaşamadı. Her bir NOC için, sitotoksikite denemelerinde test edilen en yüksek doz, ilk denemede hücre büyümesini %30'dan daha aşağıya çekmek için, maksimum seviyedeydi. Benzer bir duyarlılığı elde etmek için, insan karaciğer hücrelerindeki UDS ve DNA bö-

lünmesini sağlayan NOC kapasitesi, aynı sınıf konsantrasyonlara maruz bırakıldıktan sonra incelendi. Fakat, insan ve rat karaciğer hücreleri arasındaki veya aynı türün farklı donörlerinden elde edilen hepatosit primer kültürü arasındaki sitotoksikitenin muhtemel farklılıklarının bulunması için canlı kalan hücre parçaları her bir denemede ölçüldü. NDBA 5 mM'lik konsantrasyon halinde pozitif

kontrol olarak kullanıldı. İncelenen NOC'nin genotoksik etkilerinin karşılaştırılması, NDEA'nın rat karaciğer hücreleri için daha toksik olmasına karşın, MMOR'nin sürekli bir şekilde insan karaciğer hücrelerindeki hücre büyümesi üzerinde azaltıcı bir etki sağladığını göstermektedir. Diğer tüm NOC'lerin, canlı kalan hücre parçaları açısından iki tür arasında önemli bir fark oluşturmadığı ortaya çıkmıştır. Sitotoksisite test sonuçları, DNA elüsyon oranındaki bir artışın, örneğin; DNA bölünmesi gibi ve UDS'nin NDEA, NDPA, NMOR, NPIP, NPYR, NMU, NEU ve NBU tarafından hem insan hem de rat karaciğer hücrelerinde uyarıldığında, bunların 0,1'den 10 mM'ye kadar sınıflandırılabilir en küçük efektif konsantrasyonlar olduğunu göstermiştir. Bunun aksine; DNA hasar ve tamirinin ya düşük derecede ya da her iki türün, hepatosit primer kültürünün ve NOC'nin çözülebilirlik limitini gösteren 1 mM'lik NDBA'ya maruz bırakıldıklarında hemen hemen hiç mevcut olmadıkları görüldü. Aktif NOC'de DNA bölünme miktarının doza bağlı olmasına karşın, zaman zaman daha yüksek konsantrasyonlarda toksisite uyarımıyla DNA onarım sentezlerinin kısmi olarak engellenmesiyle karşılaşıldı.

Genellikle aynı türün farklı donörlerinden alınan kültürlerle uygulanan NOC ile uyarılan DNA hasar ve

tamir miktarında, hem insan hem de rat karaciğer hücre miktarlarında farklılıklar gözlemlendi. Tüm denemelerde 5 mM'lik NDMA pozitif kontrol için kullanıldığından (örneğin; 20 insan ve 20 ratın hepatosit primer kültüründe), NOC'nin sitotoksitesinde olası tür içi değişiklikler konusunda bilgi edinmenin en iyi yolu, bu yolla elde edilen verilerdir. K₁-K_c olarak ölçülen DNA bölünme miktarı, insan karaciğerinde 5 katı iken rat hepatosit primer kültüründe 7 katıdır.

Bu büyük tür içi değişikliğe rağmen iki tür arasındaki DNA'nın hasarı ve NDMA, NMOR, NPIP, NPYR ve NBU'nun UDS etkisi konusunda istatistik olarak önemli farklılıklar gözlemlendi (Tablo 2).

Tartışma ve Sonuç

Hayvanlarda uygulanan kısa ve uzun süreli deneylerden elde edilen sonuçların insana uygulanması, kanser araştırmalarında önemli bir aşamadır (16,30). Esas problemlerden biri ksenobiyotik metabolizmadaki türler arası farklılıkların varlığını ortaya koymaktır (13,18,25). Gerçekte kimyasalların kanserojenik etkisi karmaşık bir süreç olmasına karşın, kanser süreci esasındaki metabolik aktivasyonun ve daha sonraki DNA hasarlarının, tümör oluşumunda önemli ilk adımlar olduğuna inanılır

Tablo 2. NOC'nin insan ve rat hepatositlerindeki DNA parçalanması ve programlanmamış DNA sentezi potansiyeli.
Table 2. Potency of NOC in inducing DNA fragmentation and unprogrammed DNA synthesis in human and rat hepatocytes.

Bileşikler	Ortalama ± standart sapma			
	DNA-hasar verme etkisi (X mM ⁻¹) ^a		UDS-oluşturma etkisi (X mM ⁻¹) ^b	
	İnsan	Rat	İnsan	Rat
NDMA	10.02 ± 3.76	18.37 ± 4.24c	4.05 ± 1.55	4.48 ± 2.57
NDEA	2.21 ± 0.58	3.02 ± 1.26	1.89 ± 0.61	1.69 ± 0.80
NDPA	5.19 ± 3.33	7.48 ± 3.43	4.11 ± 2.33	6.45 ± 3.75
NMOR	14.01 ± 1.78	14.95 ± 6.26	10.97 ± 6.26	3.53 ± 1.83d
NPIP	6.27 ± 1.29	2.43 ± 1.74c	2.14 ± 2.63	10.17 ± 4.52d
NPYR	1.33 ± 0.43	3.19 ± 1.96c	4.60 ± 3.83	1.75 ± 1.12c
NMU	27.23 ± 6.41	31.88 ± 12.09	20.54 ± 9.60	30.28 ± 15.14
NEU	16.88 ± 9.36	11.34 ± 4.03	7.58 ± 5.53	7.84 ± 3.90
NBU	71.78 ± 26.76	31.03 ± 14.00c	54.26 ± 19.52	19.90 ± 10.25c

a) DNA hasar verme etkisi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\frac{(K_1 - K_c)}{\text{Yoğunluk (mM)}} \times 1000$$

Bu formülde "(K₁-K_c)" kontrol üzerinde filtreden geçme oranıdır. Değerler 3 değişik yoğunluk seviyesinde test edilen DNA-hasar verme kuvvetlerinin averajıdır.

b) UDS-oluşturma etkisi aşağıdaki formülü kullanarak hesaplanmıştır:

$$\frac{(NG_1 - NG_c)}{\text{Yoğunluk (mM)}}$$

Bu formülde (NG₁-NG_c) her çekirdekteki net parçacıkların kontrol üzerindeki artışıdır. Bu değerler değişik yoğunluk seviyelerinde ilerleyen bir net nükleer parçacık artışına neden olan UDS meydana getirme kuvvetlerinin averajıdır. Bu "Doz-Cevap" eğrisinin yükselen bölümüdür.

c) p<0.001-t-testi (Student t testi)

d) p<0.01-t-testi (Student t testi)

e) p<0.05-t-testi (Student t testi)

(11,22). Harris (10) tarafından son zamanlarda incelendiği gibi, laboratuvar hayvanlarından ve insan donörlerden alınan hücrelerdeki sitotoksosite ve kimyasal metabolizma üzerinde yapılan araştırmalar *in vitro* olarak da karşılaştırma yapmak için eşsiz fırsatlar sunar (13,26-28). Özellikle, izole edilmiş insan karaciğer hücrelerindeki, kimyasal kanserojenlerin metabolik hareketleri ve hareketsizliklerindeki tür içi ve türler arası değişikliklerin değerlendirilmesi büyük değere sahiptir. NOC, birçok çeşit hayvan türünde tümör yapan kuvvetli bir kanserojen grubunu temsil ettiği için, insanlardaki kanser riskinin tayininde ek bilgi elde etmek adına, insan ve rat karaciğer hücrelerinin primer kültürlerindeki uyarıcı DNA hasar ve tamir sentezlerinin 10 adet NOC'sinin kapasitesini karşılaştırmanın faydalı olacağı düşünüldü. Bu sitotoksitenin uç noktalarının seçimi metabolik olarak yeter miktardaki primer karaciğer hücre kültürlerindeki UDS'nin ve DNA bölünmesinin birçok sınıf kanserojen madde için potansiyel olan kanserojen göstergelerinin doğruluğunu gösteren birçok deneysel kanıtla gözlemlendi (31,36-38). Elde edilen sonuçlar, incelenen 10 NOC'nin, (NDMA, NDEA, NDPA, MMOR, NPIP, NPYR, NMU, NEU, NBU, NDBA) karaciğer hücrelerinde DNA tamir sentezleri oluşturduğunu göstermiştir. DNA'da, az çözülebilirliği nedeniyle test edilebilen maksimum konsantrasyondaki (1 mM) NDBA, her iki türün hepatosit primer kültüründe zaman zaman az aktivite göstermiş, bazen de hiç aktivite göstermemiştir. NOC'nin incelenen test sonuçlarının bir kısmı aşağıda belirtilen test sonuçlarıyla uyumludur. İnsan karaciğer hücrelerinin primer kültürleri NDMA'ya (5-7,33) ve NDEA (33,34)'ya maruz bırakıldıktan sonra UDS'nin indüksiyonu fark edildi ve aynı NOC'nin ikinci kez kültürü yapılmış insan fibroblastlarının mutasyonuna sebep olan ürünlere tepki vermesi için insan karaciğer hücreleriyle harekete geçirildiği ortaya çıkmıştır (13,34). İnsan karaciğerinden elde edilen örneklerin, NDMA, NDPA, NPIP, NPYR ve N-nitrosomethylethylamine (27,28) için yapılan Ames testinde etkin bir mutagenik aktivator olduğu görülmüştür. Nükleik asit metilasyon ve *in vitro*'daki insan karaciğer dilimleriyle NDMA'nın metabolizması 1970'te Montesano ve Magee (23) tarafından tarif edildi ve yeni metillenmiş pürinlerin NDMA zehirlenmesinden sonra insan karaciğer DNA'sında mevcut olduğu farkedilmiştir (12). İnsan ve rat karaciğer hücrelerinde UDS'nin meydana çıkması ve DNA'nın hasar görmesinde rol oynayan 9 aktif NOC'nin ortalama etkisi, Tablo 2'de gösterilmiştir. İki tür arasında istatik olarak önemli bir fark olduğu NDMA, NMOR, NPIP, NPYR ve NBU ile ortaya konulmuştur. DNA'nın hasar verici oranı

NPIP ve NBU insan karaciğer hücreleri karşısında daha aktif olmasına karşın, NDMA ve NPYR'nin rat karaciğer hücreleri karşısında daha aktif olduğu görülmüştür. UDS, NMOR, NPYR ve NBU'yu uyarma oranı insanda daha çok iken, NPIP ratlarda daha kuvvetlidir. NPIP'nin, insan karaciğer hücrelerinin DNA'sına daha büyük ölçüde hasar vermesi ve bunun aksine ratlarda DNA onarımını teşvik etmede daha aktif olması ve tam tersinin de NPYR'de olduğu dikkate değerdir. UDS miktarı sadece DNA lezyonlarının sıklığına değil aynı zamanda iki tür için farklı olabilecek olan DNA onarım sentezlerini içeren enzim sistemlerinin aktivitelerine de bağlı olduğu için yukarıdaki farklılıklar şaşırtıcı değildir. Her bir N-nitroso bileşiğinin genotoksik aktivitesini değerlendirmek için kullanılan iki türün az sayıdaki donörleri nedeniyle, gözlemlenen türler arasındaki DNA'nın hasar verici ve UDS'nin uyarıcı gücündeki farklılıklar, istatistik açıdan önemli olsa bile, tedbirli bir şekilde yorumlanmalıdır. Bazı NOC'ler için insan ve rat karaciğer hücreleri arasında miktarsal farklılıkların bunların hareketlerini ve detoksikasyonlarını içeren metabolik süreçlerinin randımanıyla oluşabilme olasılığı bir örnektir. Bu yönüyle bulgularımızın, NOC'nin duyarlılığı açısından tür içi farklılıkların gerçekte iki tür arası farklılıktan daha büyük olabilmesi olasılığını göstermesi açısından önemlidir. Zaten, iki türün birçok donörü üzerinde (20 insan-20 rat) yapılan tek NOC testi olan NDMA'dan elde edilen sonuçlar, bu bileşiğin ortalama DNA hasar gücü, insanda rattan sadece 1,5 kat daha büyük olduğunu göstermiştir. Buna karşın, aynı parametre, sözü edilen ilk türün farklı donörleri arasında 2,5 kat, ikinci türün farklı donörleri arasında ise 6 kat gibi bir değişkenlik gösterdi. Farklı insan donörlerinden elde edilen hepatosit primer kültüründeki NOC ile uyarılan UDS ve DNA bölünme miktarlarında ölçülebilir varyasyonlar tespit edildi. Bu varyasyonlar, DNA onarım sentezlerinin etkinliğindeki farklılıklardan olduğu kadar patolojik şartlardan, ilaçlardan, gıda maddelerinden, cinsiyetten, yaştan da etkilendiği bilinen, karaciğer detoksifikasyon enzimlerinin hareketlerindeki farklılıkları da yansıtabilir.

Fakat, bu çalışmadaki veriler, donörlerin yaş ve cinsiyetlerinin kalıtsal bir etkisi olduğunu göstermedi. Ayrıca, karaciğer fonksiyonlarını değerlendirmek için ölçülen biyokimyasal parametrelerdeki değişiklikler ile UDS ve DNA hasar miktarları arasında da herhangi bir ilişki saptanamadı. Sadece, birçok deney sayesinde elde toplanan veriler, bu varyasyonların nedenleri konusunda ayrıntılı analizler yapılmasını sağladı.

Sonuç olarak, rat karaciğer hücrelerinin NOC'nin genotoksik etkisini anlamak için çalışmanın uygun bir model olduğunu gösterdi.

Kaynaklar

1. **Bartsch H, Montesano R** (1984): *Relevance of nitrosamines to human cancer*. Carcinogenesis (Lond), **5**, 1381-1393.
2. **Bogovski P, Bogovski S** (1981): *Animal species in which N-nitroso compounds induce cancer*. Int J Cancer, **27**, 471-474.
3. **Bradley MO, Dysart G, Fitzsimmons K, Harbach P, Lewin J, Wolf G** (1980): *Measurements by filter elution of DNA single and double strand breaks in rat hepatocytes: effects of nitrosamines and γ -irradiation*. Cancer Res, **42**, 2592-2597.
4. **Brambilla G, Cavanna M, Parodi S, Sciaba L, Pino A, Robbiano L** (1978): *DNA damage in liver, colon, stomach, lung and kidney of BALB/c mice treated with 1,2-dimethylhydrazine*. Int J Cancer, **22**, 174-180.
5. **Butterworth BE, Bermudez E, Smith-Oliver T, Earle L, Cattley R, Martin J, Popp JA, Strom S, Jirtle R, Michalopoulos G** (1984): *Lack of genotoxic activity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in rat and human hepatocytes*. Carcinogenesis (Lond), **5**, 1329-1335.
6. **Butterworth BE, Earle LI, Strom SC, Jirtle RL, Michalopoulos G** (1983): *Measurement of chemically induced DNA repair in human hepatocytes*. Proc Am Assoc Cancer Res, **24**, 69.
7. **Butterworth BE, Earle L, Strom S, Jirtle R, Michalopoulos G** (1983): *Induction of DNA repair in human and rat hepatocytes by 1,6-dinitropyrene*. Mutat Res, **122**, 73-80.
8. **Cole KE, Hsu IC, Trump BF** (1986): *Comparative ultrastructural effects of aflatoxin B1 on mouse, rat, and human hepatocytes in primary culture*. Cancer Res, **46**, 1290-1296.
9. **Druckrey H, Preussmann R, Ivankovic S, Schmahl D** (1967): *Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten*. Z Krebsforsch, **69**, 103-201.
10. **Harris CC** (1987): *Human tissues and cells in carcinogenesis research*. Cancer Res, **47**, 1-10.
11. **Heidelberger C** (1975): *Chemical carcinogenesis*. Annu Rev Biochem, **44**, 79-121.
12. **Herron DC, Shank RC** (1980): *Methylated purines in human liver DNA after probable dimethylnitrosamine poisoning*. Cancer Res, **40**, 3116-3117.
13. **Hsu IC, Harris CC, Lipsky MM, Snyder S, Trump BF** (1987): *Cell and species differences in metabolic activation of chemical carcinogens*. Mutat Res, **177**, 1-7.
14. **International Agency for Research on Cancer** (1978): *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Some N-Nitroso Compounds*. Vol. 17. Lyon, France: IARC.
15. **Jones CA, Huberman E** (1980): *A sensitive hepatocyte-mediated assay for the metabolism of nitrosamines to mutagens for mammalian cells*. Cancer Res, **40**, 406-411.
16. **Kito K, Kihana T, Sugita A, Murao S, Akchi S, Sato M, Tachibana M, Kimura S, Ueda N** (1996): *Incidence of p53 and Ha-ras gene mutations in chemically induced rat mammary carcinomas*. Mol Carcinog, **17**, 78-83.
17. **Kohn KW, Erickson LC, Ewig RAG, Friedman CA** (1976): *Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution*. Biochemistry, **15**, 4629-4637.
18. **Langebach R, Nesnow S, Rice JM** (1983): *Organ and Species Specificity in Chemical Carcinogenesis*. Plenum Press, New York.
19. **Lu SH, Ohshima H, Fu HM, Tian Y, Li FM, Blettner M, Wahrendorf J, Bartsch H** (1986): *Urinary excretion of N-nitrosamino acids and nitrate by inhabitants of high- and low-risk areas for esophageal cancer in Northern China: endogenous formation of nitrosoproline and its inhibition by vitamin C*. Cancer Res, **46**, 1485-1491.
20. **Magee PN, Barnes JM** (1967): *Carcinogenic nitroso compounds*. Adv Cancer Res, **10**, 163-24.
21. **Martelli A, Robbiano L, Ghia M, Giuliano L, Angelini G, Brambilla G** (1986): *A study of the potential genotoxicity of cimetidine using human hepatocyte primary cultures: discrepancy from results obtained in rat hepatocytes*. Cancer Lett, **30**, 11-16.
22. **Miller EC** (1978): *Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals*. Cancer Res, **38**, 1479-1496.
23. **Montesano R, Magee PN** (1970): *Metabolism of dimethylnitrosamine by human liver slices in vitro*. Nature (Lond), **228**, 173-174.
24. **Moore CJ, Gould MN** (1984): *Metabolism of benzo(a)pyrene by cultured human hepatocytes from multiple donors*. Carcinogenesis (Lond), **5**, 1577-1582.
25. **Muller D, Nelles J, DeParade E, Arni P** (1980): *The activity of S9-liver fractions from seven species in the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test*. Mutat Res, **70**, 279-300.
26. **Neis JM, Roelofs HMJ, van Gemert PJJ, Henderson PT** (1986): *Mutagenicity towards Salmonella typhimurium of some known genotoxic agents, activated by isolated hepatocytes of monkey (Macaca fascicularis.) Comparison with isolated human hepatocytes*. Mutat Res, **164**, 139-143.
27. **Neis JM, Yap SH, van Gemert PJJ, Roelofs HMJ, Bos RP, Henderson PT** (1986): *Assay of mutagens by hepatocytes and liver 9000 xg supernatant from human origin in the Salmonella typhimurium mutagenicity assay. Comparison with rat liver preparations*. Mutat Res, **164**, 41-56.
28. **Phillipson CE, Ioannides C** (1984): *A comparative study of the bioactivation of nitrosamines to mutagens by various animal species including man*. Carcinogenesis (Lond), **5**, 1091-1094.
29. **Preston-Martin S, Yu MC, Benton B, Henderson BE** (1982): *Nitroso compounds and childhood brain tumors: a case-control study*. Cancer Res, **42**, 5240-5245.
30. **Qin X, Zarkovic M, Nakatsuru Y, Arai M, Oda H, Ishikawa T** (1994): *DNA adduct formation and assessment of aberrant crypt foci in vivo in the rat colon mucosa after treatment with N-methyl-N-nitrosourea*. Carcinogenesis, **15**, 851-855.

31. **Sina JF, Bean CL, Dysart GR, Taylor VI, Bradley MO** (1983): *Evaluation of the alkaline elution/rat hepatocyte assay as a predictor of carcinogenic/mutagenic potential.* Mutat Res, **113**, 357-391.
32. **Singer GM, Chuan J, Roman J, Min-Hsin L, Lijinsky W** (1986): *Nitrosamines and nitrosamine precursors in foods from Linxian, China, a high incidence area for esophageal cancer.* Carcinogenesis (Lond), **7**, 733-736.
33. **Strom SC, Jirtle RL, Jones RS, Novicki DL, Rosenberg MR, Novotny A, Irons G, McLain JR, Michalopoulos G** (1982): *Isolation, culture, and transplantation of human hepatocytes.* J Natl Cancer Inst, **68**, 771-778.
34. **Strom SC, Novicki DL, Novotny A, Jirtle RL, Michalopoulos G** (1983): *Human hepatocyte-mediated mutagenesis and DNA repair activity.* Carcinogenesis (Lond), **4**, 663-686.
35. **Williams GM** (1976): *Primary and long-term culture of adult rat liver epithelial cells.* Methods Cell Biol, **14**, 357-364.
36. **Williams GM** (1977): *The detection of chemical carcinogens by unscheduled DNA synthesis in rat liver primary cell cultures.* Cancer Res, **37**, 1845-1851.
37. **Williams GM, Laspia MF** (1979): *The detection of various nitrosamines in the hepatocyte primary culture/DNA repair test.* Cancer Lett, **6**, 199-206.
38. **Williams GM, Laspia MF, Dunkel VC** (1982): *Reliability of the hepatocyte primary culture/DNA repair test in testing of coded carcinogens and noncarcinogens.* Mutat Res, **97**, 359-370.

Geliş tarihi : 26.6.2001 / Kabul tarihi : 24.10.2001

Yazışma adresi:

Doç.Dr.Taner Pamukçu
Kırıkkale Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
71450 Kampüs
Yahşihan Kırıkkale