

## Bazı Nitrozaminlerin Ratlarda Doku Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Etkileri \*

Seval YILMAZ<sup>1</sup>  
İzzet KARAHAN<sup>2</sup>  
Fatih Mehmet KANDEMİR<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Firat Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi,  
Biyokimya Anabilim Dalı  
Elazığ-TÜRKİYE

<sup>2</sup> Firat Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi,  
Farmakoloji ve Toksikoloji  
Anabilim Dalı,  
Elazığ-TÜRKİYE

Çalışmada; ratlara düşük dozda, uzun süreli olarak bazı nitrozaminlerin içme suyu ile verilmesinin pirüvat kinaz aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı.

Ratlar her grupta 12 hayvan olacak şekilde 4 gruba bölünerek, birinci grup kontrol olarak ayrıldı. Grup 2, 3 ve 4'teki ratlara sırasıyla N-Nitrozodietilamin (N-NDEA), 1-Nitrozopiperidin (1-NPip) ve N-Nitrozopirolidin (N-NPir) 30 gün süreyle 200 ppb miktarında içme suyuna katılarak verildi. Uygulamaları takiben alınan kan ile karaciğer ve böbrek doku örneklerinde Beutler yöntemine göre pirüvat kinaz aktivitesi ölçüldü. Uzun süreli N-NDEA, 1-NPip ve N-NPir uygulamaları kan pirüvat kinaz aktivitesinde kontrol grubuna göre değişiklik oluşturmadı. Karaciğer ve böbrek dokularında N-NDEA verilmesi enzim aktivitesini önemli derecede değiştirmezken; 1-NPip ve N-NPir uygulamaları sonucunda kontrol grubuna göre karaciğer ve böbrek doku pirüvat kinaz aktivitelerinin azaldığı saptandı (p<0,05) .

Sonuç olarak, ratlarda uzun süreli nitrozamin uygulamalarının ve özellikle 1-NPip ve N-NPir'in öncelikle karaciğer ve böbrek pirüvat kinaz aktivitesini azalttığı ve buna bağlı olarak karbonhidrat metabolizmasında bozulma olabileceği, glikozun farklı metabolik yollara yönelebileceği ortaya konuldu. Bu nedenle, başta su olmak üzere çeşitli yollarla nitrozaminlere maruz kalınmasının sağlık problemlerine yol açabileceğinden dolayı gereken önleyici tedbirlerin alınmasının gerekli olduğu kanaatine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** N-Nitrozodietilamin, 1-Nitrozopiperidin, N-Nitrozopirolidin, pirüvat kinaz.

### Effects of Some Nitrosamines on Pyruvate Kinase Activity in Tissues of Rats

In study, we investigated effects on pyruvate kinase activity following prolonged low amounts administrations in drinking water of some nitrosamines in rats.

Rats were divided into four groups and each group had 12 animals. Group I was control group. Groups 2, 3 and 4 administered N-Nitrosodiethylamine (N-NDEA), 1-Nitrosopiperidine (1-NPip) and N-Nitrosopyrrolidine (N-NPyr) at the amount of 200 ppb with drinking water for 30 successive days, respectively. Pyruvate kinase activities in blood, liver and kidney tissue samples were measured according to the method of Beutler following the administrations. No changes in blood pyruvate kinase activity were observed during prolonged administrations of N-NDEA, 1-NPip and N-NPyr in rats according to the control group. While administration of N-NDEA in liver and kidney tissues wasn't significantly change at enzyme activity, it was found significantly decrease in pyruvate kinase activities of liver (p<0.05) and kidney (p<0.05) tissues in 1-NPip and N-NPyr prolonged treated group in rats according to the control group.

In conclusion, these findings demonstrate that prolonged administration of nitrosamines in rats, especially 1-NPip and N-NPyr decreased pyruvate kinase activities in liver and kidney. It was remind that carbohydrate metabolism could be destroyed with decrease of pyruvate kinase activity, turn towards to different metabolic pathways of glucose. Therefore, it is important to remind that nitrosamine exposure of different resources particularly water may cause serious health problems and thus it requires necessary attention.

**Key Words:** N-Nitrosodiethylamine, 1-Nitrosopiperidine, N-Nitrosopyrrolidine, pyruvate kinase.

Geliş Tarihi : 05.03.2008  
Kabul Tarihi : 14.04.2008

### Yazışma Adresi Correspondence

Seval YILMAZ  
Firat Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi,  
Biyokimya Anabilim Dalı  
23119  
Elazığ-TÜRKİYE

sevyilars@yahoo.com

### Giriş

Nitrozaminler doğada çok çeşitli ve yaygın olarak bulunan kanserojenik bileşiklerdir. Sularda ve sebzelerde yüksek miktarda nitrat bulunması birçok gelişmiş ve gelişmekte olan ülke için ciddi bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Vücuda dışardan alınan veya vücutta oluşan nitrit, ikincil ve üçüncül aminlerle tepkimeye girerek nitrozaminleri oluşturur (1, 2). Nitrozamin oluşumu için gerekli ikincil aminlerin balık ürünleri, tahıl, çay, sigara ve sigara dumanında ve birçok ilaç yapısında bulunduğu bildirilmiştir (3). Nitrozaminlerin oluşumunda etkili olan nitritlerin kimyasal maddeler, zirai ilaçlar, su ve bitkilerde büyük oranda bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca doğada yaygın olarak bulunan nitratın bakteriler tarafından nitrite indirgenmesiyle de oluşmaktadır. Son yıllarda yoğun

\* III. ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, KONYA.

kimyasal gübre kullanımından dolayı çevrede nitrat düzeyinde artış gözlenmiştir (4). Nitratlı gübrelere ve lağım sularının sulama amacıyla yeniden kullanılması, kök ve yapraklı bitkilerde nitrat biriminin artmasına neden olmuştur. Nitrit ve nitrat bileşikleri insanların tüketmekte olduğu et, balık, peynir ve sucuk gibi gıdalarda koruyucu olarak kullanılmaktadır (5).

Nitrozaminlerin protein ve nükleik asitlere bağlanarak kanserojenik etki gösterdikleri bilinmektedir. Mide, özafagus, nazofarenks, mesane ve karaciğer kanserleriyle, nitrat-nitrit ile nitrozaminlerin eksojen alımı ve endojen nitrozamin oluşumu arasında kuvvetli bir ilişki bulunmuştur. Nitrozaminler ve özellikle N-Nitrozodietilamin (N-NDEA) çevresel ortamlarda yaygın olarak bulunabilmekte ve güneş ışığı altında kolayca yıkılmaktadır. Fakat çevre ortamında bulunan N-nitrozo bileşikleri ile nitrat ve nitrit gibi bunların ön maddeleri vücuda alındıktan sonra kanser oluşumları için potansiyel risk faktörlerini oluşturmaktadır. Araştırmacılar gıdalar ile içme suyu içindeki nitrat ve nitritin de nitrozaminlerin oluşumuna yol açarak kanser oluşturabileceğini bildirmektedirler (3, 6, 7).

Nitrozaminlerin metabolizması öncelikle karaciğerde gerçekleşir. Ancak, başta N-NDEA olmak üzere nitrozaminler toksik etkilerini öncelikle kanda, ama özellikle karaciğerde oluştururlar. Ayrıca kan akımının fazla olduğu böbrekler gibi diğer organlar da bu durumdan karaciğere göre daha düşük düzeyde etkilenirler. Çeşitli araştırmalarda deney hayvanlarına farklı nitrozaminler verildiğinde başta karaciğer olmak üzere diğer organ ve doku tümörlerine neden olduğu gösterilmiştir (8, 9).

Pirüvat kinaz (E.C.2.7.1.40); adenosin difosfatın substrat düzeyinde fosforilasyonunu katalize eden bir enzim olup fosfoenolpirüvatın fosfat grubunu adenosindifosfata transfer etmekte ve sonuçta ATP ve pirüvat elde edilmektedir. Pirüvat kinaz enzimi glikoliz ve özellikle de glikoneogenezin göreceli olarak hızının kontrol edilmesinde görev alır (10). Tümör hücrelerinde karbonhidrat metabolizmasında değişiklikler gözlenmiştir. İyi ve kötü huylu doku proliferasyonlarında pirüvat kinaz aktivitesinin genellikle arttığı rapor edilmiştir. Bu da tümör hücrelerinin metabolizmasındaki enerji ve metabolitlerin sağlanması için glikolizin gerekliliğini açıklamaktadır (11). Daha önceki biyokimyasal çalışmalarda hepatosellüler tümörlerin gelişimi esnasında L-tip pirüvat kinaz izoenzimin azaldığı, M<sub>2</sub>-tip pirüvat kinaz izoenzimin ise arttığı gösterilmiştir (12, 13). Klimek ve Bannasch (12) N-nitrozomorfin (NNM) ile oluşturulan hepatokarsinogenezin erken dönemde görülen normal ve asidofilik hücre odaklarında pirüvat kinaz aktivitesinin arttığını, daha sonraki safhalarında hem karışık ve bazofilik hücre odaklarında hem de bazofilik karaciğer tümörlerinde azaldığını bildirmişlerdir.

Nitrozaminlerin çeşitli yollarla alınmalarının insan ve hayvanlarda özellikle karsinojenik potansiyelleri bakımından önemi büyüktür. Bu nedenle, çalışmada düşük miktarda ve uzun süreli olarak bazı nitrozaminlerin

içme suyu içinde ratlara verilmesinin pirüvat kinaz aktivitesi üzerine etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Bu araştırmada; 48 adet, 170-220 g ağırlıklarında, 8 haftalık Sprague-Dawley ırkı ratlar kullanıldı. Araştırmada deneysel uygulamalar laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımı şartlarına (12 saat aydınlık: 12 saat karanlık ve 24±3°C) uygun olarak yürütüldü. Deneysel uygulamalar süresince ratlara standart ticari rat yemi (pellet yem, Elazığ Yem Sanayi) ve musluk suyu *ad libitum* sağlandı.

Hayvanlar, her grupta 12 rat olacak şekilde 4 gruba bölündü. Kontrol grubu (Grup 1) ratlara içme suyu verildi. Grup 2, 3 ve 4'teki ratlara ise sırasıyla N-NDEA, 1-NPip, N-NPir (Sigma, St Louis MO, USA) birbirini takip eden 30 gün süreyle uygulandı. Çalışmada kullanılan nitrozaminlerin miktarı daha önceki çalışmalara (6, 7) göre belirlenerek, deneme gruplarına nitrozaminlerin içme suyundaki son konsantrasyonu 200 ppb olacak şekilde her gün taze içme suyuna katılarak uygulandı.

Uygulamaların 30. gününde ratlar sakrifiye edilerek kan, karaciğer ve böbrek doku örnekleri alındı. Kan örnekleri antikoagülan (%2 sodyum okzalate) içeren tüplerde toplandı ve plazmalarını ayırmak için +4°C'de 2.000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Eritrositler serum fizyolojik (% 0,9'luk NaCl) ile 3 kez yıkanarak hemolizat hazırlandı. Hemolizat ile karaciğer ve böbrek doku örnekleri biyokimyasal analizler yapıncaya kadar -20 °C'de saklandı. Analizler öncesinde karaciğer ve böbrek dokuları serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra Tris-HCl tamponu (50 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 7,6) ile 1:10 oranda sulandırılarak Teflon cam homojenizatörde homojenize edildi. Homojenat soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) 8.000 g'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant alındı. Pirüvat kinaz aktivitesi fruktozdifosfat varlığında, 340 nm'de NADH'in azalan absorbans hızının ölçülmesi esasına dayanan Beutler ve ark. (14)'nin yöntemiyle ölçüldü.

Alınan tüm örneklerde belirlenen veriler; ortalama değerler (X±S.E.M) olarak tabloda verildi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizini takiben Duncan testiyle ve SPSS/PC paket programa göre (versiyon 12.0) değerlendirildi.

## Bulgular

Tüm uygulamalardaki kan ile karaciğer ve böbrek dokularında oluşan pirüvat kinaz aktivitelerindeki değişimler Tablo 1'de sunuldu. Uzun süreli N-NDEA, 1-NPip ve N-NPir uygulaması ile kan pirüvat kinaz aktivitesinde istatistik olarak önemli bir değişiklik oluşmadığı görüldü. Karaciğer dokusunda pirüvat kinaz aktivitesi N-NDEA uygulanan grupta 13,04±1,66, 1-NPip uygulanan grupta 3,29±1,06, N-NPir uygulanan grupta ise 5,86±1,20 U /g doku olarak bulundu. Böbrek dokusunda pirüvat kinaz aktivitesi N-NDEA uygulanan grupta 6,18±0,85, 1-NPip uygulanan grupta 2,17±0,71,

N-NPir uygulanan grupta  $0,75 \pm 0,20$  U /g doku olarak saptandı.

Karaciğer ve böbrek dokularında uzun süreli N-NDEA verilmesi kontrol grubuna göre enzim aktivitesini önemli

derecede değiştirmezken; 1-NPip ve N-NPir verilmesi sonucunda ise hem karaciğer ( $p < 0,05$ ) ve hem de böbrek ( $p < 0,05$ ) dokularında pirüvat kinaz aktivitelerinin kontrol grubuna göre azaldığı belirlendi.

**Tablo 1.** Ratlarda uzun süreli (30 gün) N-NDEA, 1-NPip and N-NPir uygulanmasından sonra kan(U/ml) ile karaciğer ve böbrek (U/g doku) pirüvat kinaz aktivitelerinin değişimi.

	Kontrol	N-NDEA	1-NPip	N-NPir
<b>Kan</b>	26,10 $\pm$ 6,90	35,50 $\pm$ 3,66	36,83 $\pm$ 1,49	42,14 $\pm$ 5,09
<b>Karaciğer</b>	11,05 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	13,04 $\pm$ 1,66 <sup>a</sup>	3,29 $\pm$ 1,06 <sup>b</sup>	5,86 $\pm$ 1,20 <sup>b</sup>
<b>Böbrek</b>	4,40 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	6,18 $\pm$ 0,85 <sup>a</sup>	2,17 $\pm$ 0,71 <sup>b</sup>	0,75 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Aynı satırda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir ( $p < 0,05$ ).

## Tartışma

Endüstriyel toplumlarda yaygın olarak kullanılan ve çevre kirleticisi olarak bilinen nitrozaminler birçok canlı yaşamını olumsuz olarak etkilemektedir. Nitrozaminlerin karaciğerde metabolize edilmesi sonucu oluşan metabolitlerin kendilerinden daha fazla karsinojenik olduğu bilinmektedir (1). Dimetilnitrozamin (NDMA) kullanılan bir fabrikada havada, fabrikanın atık sularının verildiği kanalizasyonda ve deniz suyunda NDMA bulunduğu saptanmıştır (15). Sigara dumanı, su, hava ile peynir, balık ve et ürünlerinde bulunan, ayrıca tekstil ürünlerinin hazırlanmasında, yağ ve kauçuk endüstrisinde kullanılan NDEA'in ratlarda karsinojenik ve mutajenik etkilerinin yüksek olduğu saptanmıştır (16).

Nitrozaminlerin metabolik aktivasyonu ile spontan olarak oluşan N-nitrozöüre hedef dokunun DNA'sı ile etkileşerek bazların değişimine neden olmakta ve karsinogenez başlatmaktadır. Çalışılan bütün deney hayvanlarında nitrozaminlerin mutasyonlara neden olduğu, tümör oluşumunu artırdığı, karsinojenik ve mutajenik etkisini çoğunlukla mikrozomal sistem tarafından aktive edildikten sonra gösterdiği bildirilmiştir (13, 15, 17). Phillipson ve Ioannides (17) insan, fare, sıçan, hamster ile domuzda NDMA, dipropilnitrozamin, metiletilnitrozamin, 1-NPip, ve N-NPir'in mutajenliğini incelemişler ve bu bileşiklerin farklı oranlarda mutajen etkisi gösterdiklerini bildirmişlerdir. NDMA'in başlıca metabolize olduğu yer karaciğer mikrozomal sistemdir. Rat, fare ve kemirgen karaciğer mikrozomlarında NDMA'nin demetilasyonla formaldehide ve denitrozasyonla nitrite dönüştüğü, bu nitrozaminin kendisinden çok metabolitlerinin karsinojenik ve mutajenik etkileri olduğu birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (15, 17, 18).

Tümör hücrelerinin enzimoloji ile ilişkisi, tümörlü hücrede karbonhidrat, pürin ve pirimidin metabolizmasını düzenleyen enzimlerin aktivitelerinin değişikliğe uğramalarından ileri gelmektedir (19). Atalay (20) ve Çetinkaya (21) tarafından NDEA'in sıçan karaciğer dokusunda laktat dehidrogenaz, fare karaciğerinde malat dehidrogenaz, in vitro koşullarda ise maya glikoz-6-fosfat dehidrogenazı inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca fare

karaciğerinde Na/K ATPaz aktivitesi üzerine NDEA, N-nitrozonornikotin (NOR) ve N-Pir'in etkileri çalışılmış ve NDEA'in enzimi %77 oranında aktive ettiği, buna karşılık NOR, N-Pir'in ise %30 ve %20 oranında inhibe ettiği saptanmıştır. Diğer yandan; beyin tümörleri, retinoblastomalar, rhabdomyosarcomalar, medullar tiroid kanserleri, karaciğer, meme kanserleri ve hepatomalar gibi neoplastik dokularda M<sub>2</sub>-tip pirüvat kinaz aktivitesinde değişim olduğu tespit edilmiş ve tümörlü dokuda bulunan M<sub>2</sub>-tip pirüvat kinaz aktivitesi ile tümör arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır (22, 23). Tümör M<sub>2</sub>-tip pirüvat kinaz izoenzimi karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde aktif rol oynamaktadır. Tiroid kanseri ve hepatomalarda pirüvat kinazın spesifik aktivitesinin arttığı, sarkomalarda, insan beyin tümörlerinde ise düştüğü bildirilmiştir (24).

Pek çok deneysel çalışmada farklı nitrozamin türlerinin özellikle karaciğerde olmak üzere oluşturdukları doku hasarlarında pirüvat kinaz aktivitesinin değiştiği bildirilmektedir (12, 25, 26, 27, 28). Gerbracht ve ark. (25) ise; ratlara 8 hafta süre ile NDEA uyguladıktan sonra karaciğer parankimasının %36'sında GGT-pozitif, %54'ünde GST-pozitif lezyon oluştuğunu bildirmişler ve bu değişikliklerin karaciğer pirüvat kinaz, laktat dehidrogenaz ve gliserol-3-fosfat dehidrogenaz aktivitesindeki azalma ile ilişkili olabileceğini düşünmüşlerdir. Karaciğerde glikoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi %113 oranında artmıştır. Bu veriler rat karaciğerinde preneoplastik odakların gelişmesi esnasında pentoz fosfatlar ile indirgeyici ürünler artarken, pirüvat sentezinin azaldığı ve glikozun triaçilgliserollere yönlendiğini desteklemektedir. Yapılan diğer bir çalışmada (12) ratlara ağız yolu ile NNM verilmesi ile rat karaciğerinde hepatokarsinogenezin olduğu ve erken safhasında fokal karaciğer lezyonlarının görüldüğü, karbonhidrat metabolizmasının bozulduğu bildirilmiştir. Preneoplastik ve neoplastik karaciğer lezyonlarında, özellikle glikojen depolayan odaklarda, karışık hücre odaklarında, bazofilik hücre odaklarında, hepatosellüler adenom ve karsinomda glikolizisin anahtar bir enzimi olan pirüvat kinaz enzim aktivitesi ölçülmüş, glikojen depolayan odaklarda artış, karışık hücre odaklarında ise çok az bir düşüş

saptanmıştır. Buna karşın düşük glikojen bazofilik odakta ve bazofilik karaciğer tümörlerinde pirüvat kinaz aktivitesinde önemli ölçüde bir azalma gözlenmiştir. Pirüvat kinaz aktivitesindeki azalmanın glikojen depolayan odaktan hepatosellüler karsinoma yol açan hücrel değişiklikler esnasında nispeten geç oluşan bir sonuç olduğunu desteklediği öne sürülmektedir. Diğer yandan, bir başka çalışmada (26) ratlara NDEA uygulanması ile oluşan hepatokarsinogeneze pirüvat kinazın total aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. Total pirüvat kinaz aktivitesi karaciğer dokusundaki primer tümöral odakta olduğu gibi hiperplastik semptomların görülmesi ile de artmıştır. Primer hepatomalarda L-tip pirüvat kinaz azalırken M<sub>2</sub>-tip pirüvat kinaz aktivitesi artmıştır. Çalışmada pirüvat kinaz aktivitesinin tüm deneme gruplarında kontrol grubuna göre kanda değişmezken, böbrek ve özellikle karaciğer dokusunda azaldığı saptanmıştır. Bu bulgular yukarıdaki araştırmacıların bulgularıyla paralellik göstermektedir. Pirüvat kinaz aktivitesi ile karaciğer dokusunda metabolize edilen nitrozaminlerin mutajenik etkileri arasında bir ilişki olabilir. Pirüvat kinaz enzim aktivitesinin normal dokulardan farklı olması kısmen değişmiş bir gen ifadesi ile açıklanmaktadır (27).

Ahn ve ark. (28) tarafından 7 hafta süre ile ratların içme sularına 12 mg/100 ml konsantrasyonda NNM uygulanmasından sonra 12, 23 ve 34. haftalarda böbreklerde normal hücre tubülleri ile karşılaştırıldığında asidofilik hücre tubülleri ve tümörlerinin saydam hücrelerinde glikolitik ve mitokondrial enzim

aktivitelerinde artış saptanmıştır. Normal toplayıcı kanal epitelyumu ile karşılaştırıldığında glikolitik enzimler olan gliseraldehid-3-fosfat-dehidrogenaz ve pirüvat kinaz aktivitelerinde artışın daha az olduğunu göstermişlerdir. Diğer yandan, böbrek toplayıcı kanal epitelyumunda saydam hücre tubüllerinin gelişmesi ile glikolitik ve mitokondrial enzimlerde azalma görülmüştür. Bu enzim aktivitelerindeki azalma preneoplastik ve neoplastik lezyonların ilerlemesi esnasında karbonhidrat metabolizmasında temel bir değişme gösteren saydam/asidofilik hücre tümörlerinde artmaya meyletmektedir. Bu durum benzer şekilde çalışmamızda böbrek dokusu pirüvat kinaz aktivitelerinde azalma şeklinde kendini göstermiştir.

Sonuç olarak, ratlarda uzun süreli nitrozamin uygulamalarının ve özellikle 1-NPip ve N-NPir'in öncelikle karaciğer ve böbrek pirüvat kinaz aktivitesini azalttığı ortaya konuldu. Pirüvat kinaz aktivitesinin azalmasına bağlı olarak karbonhidrat metabolizmasında bozulma olabileceği, başta su olmak üzere çeşitli yollarla nitrozaminlere maruz kalınması sağlık problemlerine yol açabileceğinden önleyici tedbirlerin alınmasının gerekli olduğu kanaatine varıldı. Kullanılan denitrifikasyon yöntemleri oldukça pahalı ve ileri derecede teknik bir işlem olduğundan bu konuda en etkili yöntem, etkenin oluşmadan yok edilmesi, yani nitrat-nitrit kirliliğine neden olan kaynakların kontrol altına alınması olacaktır.

## Kaynaklar

- Morselli PL. Drug metabolism in vitro: Role of drug metabolism in drug disposition and effects. In: Pacifici GM, Fracchia GN (Editors). *Advances in Drug Metabolism in Man*. Luxembourg: European Commission, Office for Official Publications of the European Communities, 1995: 3-34
- Cooney RV, Ross PD, Bartolini GL, Romseyer J. N-nitrosamine formation: Factors influencing the aqueous reactions of nitrogen oxide with morfoline. *Environ Sci* 1987; 21: 77-83.
- Andrews AW, Lijinsky W, Snyder SW. Mutagenicity of amine drugs and their products of nitrosation. *Mutat Res* 1984; 135 (2): 105-108.
- Gough TA, McPhail MF, Webb KS, Wood BJ, Coleman RF. An examination of some foodstuffs for the presence of volatile nitrosamines. *J Sci Food Agric* 1977; 28 (4): 345-351.
- Hodgson E, Silver IS, Butler LE, Lawton MP, Levi PE. Metabolism. In: Hayes WJ, Laws ER. (Editors). *Handbook of Pesticide Toxicology*. Vol. 1. Academic Press, San Diego, CA, 1991; 107-143.
- Aiub CA, Pinto LF, Felzenszwalb I. N-nitrosodiethylamine mutagenicity at low concentrations. *Toxicol Lett* 2003; 145 (1): 36-45.
- Mirvish SS. Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett* 1995; 93 (1): 17-48.
- Vendemiale G, Grattagliano I, Caruso ML, et al. Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine induced liver fibrosis in the rat: effect of n-acetylcysteine and interferon-alpha. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 175 (2): 130-139.
- Thirunavukkarasu C and Sakthisekaran D. Effect of selenium on N-nitrosodiethyl-amine-induced multistage hepatocarcinogenesis with reference to lipid peroxidation and enzymic antioxidants. *Cell Biochem. Funct* 2001; 19 (1): 27-35.
- Valentini G, Chiarelli L, Fortin R et al. The allosteric regulation of pyruvate kinase. *J Biol Chem* 2000; 275 (24): 18145-52.
- Van Erp HE, Van Unnik JA, Rijksen G, Smits JG, Staal GE. Cellular expression of K-type pyruvate kinase in normal and neoplastic human tissues. *Cancer* 1991; 68 (12): 2595-601.
- Klimek F, Bannasch P. Biochemical microanalysis of pyruvate kinase activity in preneoplastic and neoplastic liver lesions induced in rats by N-nitrosomorpholine. *Carcinogenesis* 1990; 11 (8): 1377-1380.
- Klimek F, Moore MA, Schneider E, Bannasch P. Histochemical and microbiological demonstration of reduced pyruvate kinase activity in thioacetamide-induced neoplastic nodules of rat liver. *Histochemistry*. 1988; 90 (1): 37-42.
- Beutler E, Blume KG, Kaplan JC et al. International committee for standardization in haematology:

- Recommended methods for red-cell enzyme Analysis. *Br J Haematol* 1977; 35: 311-340.
15. Lake BG, Phillips JC, Heading CE, Gangolli SD. Studies on the in vitro metabolism of dimethylnitrosamine by rat liver. *Toxicology* 1976; 5 (3): 297-309.
  16. Fine DH, Rounbehler DP, Belcher NM, Epstein SS. N-Nitroso compounds: Detection in ambient air. *Science* 1976; 192 (4246): 1328.
  17. Phillipson CE, Ioannides C. A comparative study of the bioactivation of nitrosamines to mutagens by various animal species including man. *Carcinogenesis* 1984; 5 (8): 1091-1094.
  18. Karahan İ, Yılmaz S. Ratlarda bazı nitrosoaminlerin düşük miktarda, uzun süreli verilmesinin kan, karaciğer ve böbreklerde oksidatif stres üzerine etkileri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2006; 20 (1): 73-78.
  19. Rigden DJ, Phillips SE, Michels PA, Fothergill-Gilmore LA. The structure of pyruvate kinase from *Leishmania mexicana* reveals details of the allosteric transition and unusual effector specificity. *J Mol Biol.* 1999; 20, 291(3): 615-635.
  20. Atalay A. Nitrozolu bileşiklerin sıçan karaciğer laktat dehidrogenaz enzimine in vitro etkisi. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 1981; 3: 208-214.
  21. Çetinkaya Ö, Çetinkaya S, Atalay A. Effect of intraperitoneal administration of some nitrosamine on mouse liver Na/K ATPase activities. *Tr J Medical Sciences Tübitak* 1994; 22: 81-83.
  22. Elbers JR, Van Unnik JA, Rijksen G et al. Pyruvate kinase activity and isozyme composition in normal fibrous tissue and fibroblastic proliferations. *Cancer* 1991; 67 (10): 2552-2559.
  23. Yılmaz S, Ozan S, Özercan İH. Comparison of pyruvate kinase variants from breast tumor and normal breast. *Arch Med Res* 2003; 34 (4): 315-324.
  24. Pedersen SN. The glycolytic enzyme activity of the human cervix uteri. *Cancer* 1975; 35 (2): 469-474.
  25. Gerbracht U, Eigenbrodt E, Simile MM et al. Effect of S-adenosyl-L-methionine on the development of preneoplastic foci and the activity of some carbohydrate metabolizing enzymes in the liver, during experimental hepatocarcinogenesis. *Anticancer Res* 1993; 13 (6A): 1965-1972.
  26. Kil'dema LA. Changes in the isoenzymatic make up of pyruvate kinase in hepatic carcinogenesis. *Vopr Med Khim* 1979; 25 (4): 383-387.
  27. Reinacher M, Eigenbrodt E, Gerbracht U et al. Pyruvate kinase isoenzymes in altered foci and carcinoma of rat liver. *Carcinogenesis* 1986; 7 (8): 1351-1357.
  28. Ahn YS, Zerban H, Grobholz R, Bannasch P. Sequential changes in glycogen content, expression of glucose transporters and enzymic patterns during development of clear/acidophilic cell tumors in rat kidney. *Carcinogenesis* 1992; 13 (12): 2329-2334.

