

INFLUENȚA INHIBITORILOR ÎN FORMAREA N-NITROZAMINELOR ÎN SISTEMELE SUCULUI GASTRIC

Maria GONȚA

Catedra Chimie Industrială și Ecologică

The formation of N-trosamines in gastric juice during the nitrosation of secondary amines by nitrite ions has been investigated. It has been established, that the ratio of nitrosation of amines in gastric juice is higher than in model systems, due to the presence of catalysts. On the nitrosation of the formed metabolites generated during the proteolysis of casein and albumin in gastric juice, the rate of this process is pH and enzyme activity dependent. The dihydroxyfumaric acid and sodium dihydroxyfumarate demonstrate inhibition properties during the formation of N-nitroamines in gastric juice at the proteolysis of proteins in the presence of different proteolysis enzymes. The result of the comparative study of the degree of diminishing of the concentration of nitrite ions at the proteolysis of proteins in the presence of DFH₄, AAs and (+)-Ct demonstrate that the rate of NO₂⁻ consumption in the presence of DFH₄ is the highest, while the constants of the reaction speed vary as follows

$$k_{\text{DFH}_4} > k_{\text{AAs}} > k_{(+)\text{Ct}}$$

$$0,94 \cdot 10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1} \quad 0,6 \cdot 10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1} \quad 0,4 \cdot 10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$$

Introducere

Conversia nitraților și nitriților în tractul digestiv

Ionii nitrați sunt componenți naturali ce se găsesc în diferite produse alimentare, în special în produse vegetale și cele de carne. Aproape 80% de nitrați ce pătrund în organism din exterior sunt de natură vegetală, 19% se conțin în produsele de carne [1]. S-a calculat cantitatea aproximativă de ioni-nitrați ce pătrund odată cu hrana în organismul uman într-o zi. Omul primește pe zi, în medie, circa 100 mg NO₃⁻, iar în Japonia această cantitate este de 300 mg, în Olanda – 131 mg, în SUA – 106 mg, în Germania – 75 mg și în Elveția – 48 mg [2].

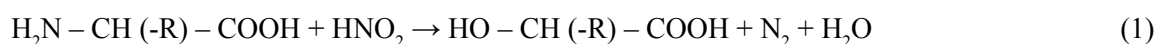
Pătrunderea ionilor de nitriți în organismul uman alcătuiește în medie 12-15 mg/zi: cu hrana – 0,02-0,2 mg, ca aditivi alimentari – 1,2-2,95 mg, din nitrați (produse vegetale) se formează pe cale endogenă 10 mg de NO₂⁻, cu apa pătrund 0,6 mg și în sistemul gastrointestinal se formează 0,33 mg NO₂⁻ [1].

Din datele prezentate constatăm că cantitatea cea mai mare de ioni nitriți se formează din NO₃⁻ pe cale endogenă, preponderent în cavitatea bucală. Conform datelor din literatură, concentrația de NO₂⁻ în stomacul normal este mai mică de 10 mM (460 mg/l), în stomacul hipoacid > 150 mM (6900 mg/l), la bolnavi cu ulcer < 2 μM/L (0,09 mg/l) [1].

Ionii nitrați ingerați din produsele alimentare sunt absorbiți în intestin, iar 30% sunt transportați în sânge, concentrați în glandele salivare și resecretati în cavitatea bucală [3], unde sunt reduși la ionul nitrit sub acțiunea bacteriilor nitrat-reducătoare [1]. Bacteriile din cavitatea bucală reduc circa 30% din ionul nitrat salivar la ionul nitrit, iar acesta este apoi înghițit cu saliva și transportat în stomac. Acest proces este unul dintre cele mai principale în acumularea nitritului gastric. Concentrația NO₂⁻ salivar este de circa 50 μM și poate să crească până la 200 μM după îngerarea unei porții de salată ce conține 2 mM de NO₃⁻ [4]. Studiind saliva nestimulată, Mirvish și col. [5] au constatat un nivel mediu de NO₃⁻ și NO₂⁻, care este egal cu 38 mg/l (0,61 mM) și 7,9 mg/l (0,17 mM), corespunzător. Valori relativ similare au fost prezentate și de Bodawi și col. [6]. Pe lângă NO₃⁻, glandele salivare mai preiau activ și tiocianații, pe care de asemenea îi secretă în salivă. Tiocianații pot fi secretați direct în suctul gastric [7]. Concentrația ionilor tiocianați din salivă și suctul gastric se înscrie în limitele de la 200 μM la 2 mM, fiind cea mai mare la fumători [7]. Ionii tiocianați sunt catalizatori importanți în formarea agenților de nitrozare în condiții acide [8]. Nitriții formați în sistemul gastrointestinal interacționează cu aminele și amidele pe cale endogenă, formând N-nitrozamine și N-nitrozamide, în rezultatul catalizei acide sau bacteriene.

Deci, ionul nitrit salivar este un factor determinant în extinderea nitrozării gastrice. N-nitrozocompușii cancerigeni de proveniență dietară sau din fumul de țigară, care pătrund pe cale exogenă sau se formează *in vivo* din predecesorii dietici, pot contribui în etiologia cancerului limbii, stomacului, esofagului, cavității nazale, vezicii urinare și cavității bucale, precum și a leucemiei [5,6].

Conversia ionilor nitrați în nitriți în tractul digestiv, în special în stomac, poate fi evaluată luând în considerație flora intestinală. Yoshida a observat [8] că la incubarea NO₂⁻ în condiții anaerobe în stomacul șoarecilor cu floră normală la 37°C, pH 3,5, se formează N₂ gazos în cantități mari (Fig.1(b)), iar în cantități comparativ mai mici – NO. Se presupune că producerea N₂ gazos are loc direct la interacțiunea aminelor cu NO₂⁻ (metoda lui Van Slyke, utilizată în determinarea aminelor) după reacția prezentată mai jos [8]:



În [9] autorii confirmă că, în cea mai mare parte, în condiții normale ionul nitrit în stomac este convertit la N_2 de către proteinele din dieta șoarecilor, iar altă parte poate interacționa cu aminele, formând N-nitrozamine (NNA). La fel, nitriții interacționează și cu acidul ascorbic, formând NO [10].

Investigațiile experimentale efectuate asupra conversiei NO_3^-/NO_2^- în intestin au constatat că concentrația NO_3^- scade complet după 6 ore, iar concentrația NO_2^- întâi crește, apoi NO_2^- dispare după 6 ore; în schimb, concentrația NH_3 în sistem crește. Deci, în intestin NO_3^- este convertit în NH_3 (Fig.1(b)) Aceste rezultate au fost confirmate *in vivo* prin injectarea $^{15}N-NO_2^-$ la șoareci și obținerea $^{15}N-NH_3$ în intestin [8].

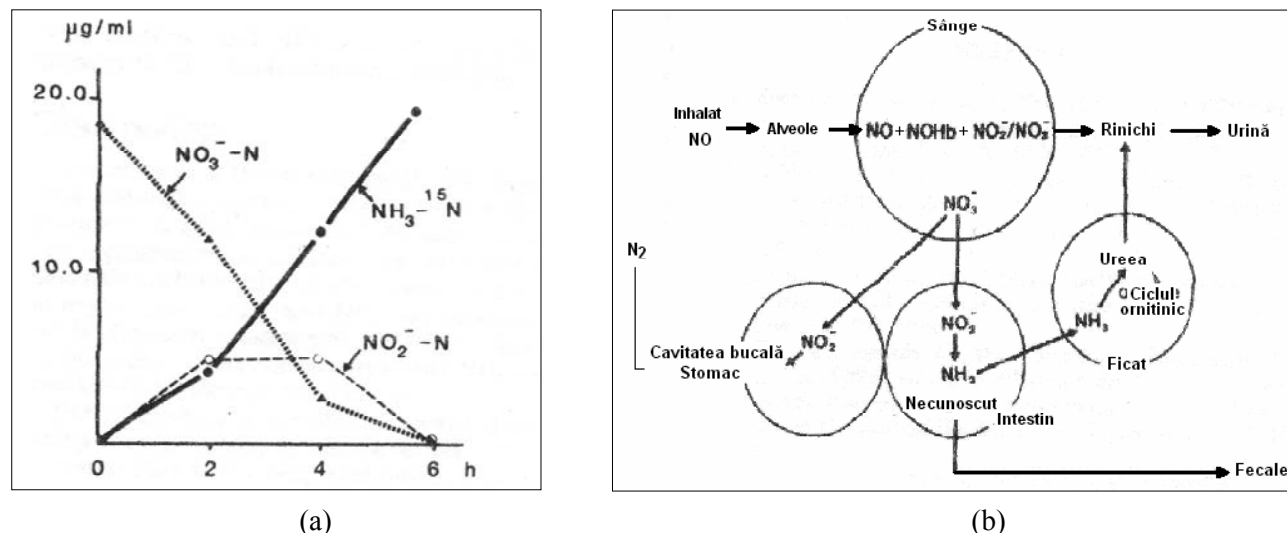


Fig.1. Formarea metaboliților la inhalarea NO (a) și transformarea $^{15}NO_3^-$ *in vitro* în fecalele șoarecilor (b) [9].

Mai sus s-a menționat că o parte de NO_2^- în stomac interacționează cu acidul ascorbic (secretat de către mucoasa gastrică) și formează NO. Concentrația NO format crește odată cu creșterea $[NO_2^-]$ în stomac [11-13], iar concentrația acidului ascorbic în sucul gastric scade semnificativ [14]. Scăderea concentrației de acid ascorbic (AAs) corelează cu creșterea $[NO_2^-]$ în salivă. Procesul de reducere a NO_2^- la NO are loc la intrarea în stomac la pH 1,5-2,5 în prezența AAs și se realizează în câteva secunde. În mediul acid în stomac se formează diferite specii de nitrozare (N_2O_3 , NO^+), care interacționează cu AAs, oxidându-l la radicalul ascorbat, iar apoi la acidul dihidroascorbic [3,10,15]. O moleculă de AAs poate reduce două molecule ale speciilor de nitrozare, generând două molecule de oxid nitric [2]. Prezența tiocianților mărește viteza de producere a NO, deoarece în sistem se formează specii mai active de nitrozare (NOSCN) [2], a căror concentrație crește odată cu creșterea acidității mediului.

În absența AAs în sucul gastric se produce o cantitate mică de NO, iar viteza procesului depinde de pătratul concentrației HNO_2 :

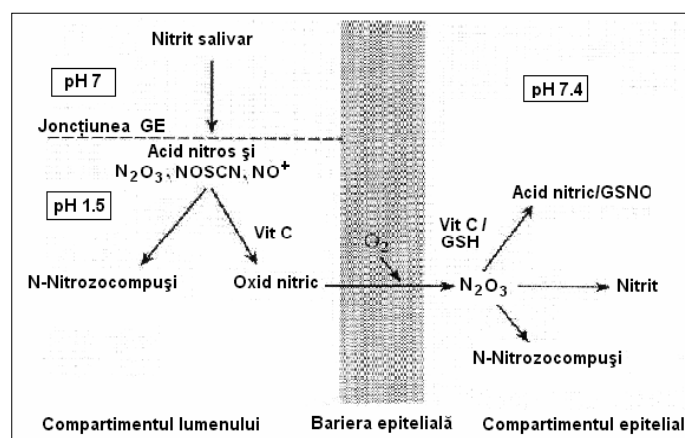


Fig.2. Procese chimice de transformare a NO_2^- în joncțiunea gastroesofagică.

Însă, NO format se poate oxida sub acțiunea oxigenului, formând NO_2 . Dacă raportul AAs/ NO_2^- este mare, atunci NO_2 format la oxidarea lui NO cu O_2 este redus de AAs. Tiocianții măresc viteza de consum a AAs prin două mecanisme: 1) prin mărirea vitezei reacției dintre speciile de nitrozare și AAs și 2) prin generarea unui nivel inițial mai înalt de NO, care duce la o creștere a vitezei de reacție dintre NO și O_2 [16]. În condiții de foame pH-ul intragastric este de circa 1,5, concentrația medie a AAs este în medie de $100 \mu M$ ($10-300 \mu M$) și a ionului tiocianat în medie de $500 \mu M$ ($200 \mu M-2 mM$) [14,17,18]. În aceste condiții NO_2^- va fi rapid redus de AAs. În locul unde saliva se întâlnește cu sucul gastric, formarea NO ar putea fi relevantă în incidența ridicată a mutagenzei. Oxidul de azot (II)

generat de lumen (Fig.2) va difuza rapid și va reacționa cu O_2 pentru formarea speciilor de nitrozare [19], care, la rândul lor, pot leza ADN direct – prin dezaminarea bazelor sau indirect – prin formarea N-nitrozocompușilor (NNC) [9,20]. Viteza mare de generare a NO la joncțiunea gastroesofagică umană va duce la consumul local și la epuizarea AAs. Aceasta va produce un stres în plus datorită capacității NO_2^- acidificat de a forma NNC, potențiali cancerigeni, în absența AAs în reacția catalizată de tiocianat [21,22].

Transformarea oxidului de azot (II) în organismul uman

În rezultatul determinării nitraților din dieta alimentară utilizată și a celor secretați de organism, s-a constatat că organismul uman elimină mai mulți ioni nitrați decât utilizează în dietă. Aceasta a condus la ideea că unii compuși în organism se oxidează cu formarea nitriților și nitraților [23]. Astfel, s-a constatat că rolul biologic al oxidului de azot (II) este destul de mare atât în realizarea unor procese fiziologice, cât și în evoluarea diferitelor patologii.

În afară de formarea NO direct din NO_2^- alimentar în prezența AAs, în stomac există un alt mecanism de formare a oxidului de azot (II), care în continuare se oxidează la ioni nitriți și, în cantități mici, la ioni nitrați.

În organismul uman și animal oxidul de azot (II) (NO) este sintetizat de către NO-sintetaza din azotul guanidinic al L-argininei. În rezultatul reacției de oxidare a L-argininei, proces mediat și catalizat de numeroase enzime, se formează și L-citrulină în cantități echimolare cu NO. Biosinteza NO din proteine a fost descoperită în 1987, datorită proprietății lui de a interacționa cu atomul de fier hemic, cu formarea legăturii Fe-N [23], proces ce determină dilatarea vaselor sangvine. Datorită proprietăților sale fizice și chimice, NO este implicat în multe procese vitale. Fiind o moleculă nepolară, oxidul de azot se dizolvă în lipide și difuzează ușor prin membranele celulare. Solubilitatea oxidului de azot (II) în apă constituie cca 2 mmoli. În prezența oxigenului în soluțiile apoase ale oxidului de azot (II) au loc diferite transformări ce duc la formarea agenților de nitrozare, nitraților și nitriților. Conținutul de NO_3^- în soluție nu întrece 3% [24]. Reacțiile în care participă oxidul de azot (II) și care stau la baza multor fenomene biologice *in vivo* pot fi clasificate în trei grupe mari: 1) interacțiuni cu fierul hemic și nehemeric; 2) reacții cu grupele -SH și $-NH_2$; 3) procese cu implicarea radicalilor liberi.

S-a constatat că oxidul de azot (II) inhibă formarea trombelor, manifestă acțiune în permeabilitatea vaselor sangvine mici [24]. Sunt date experimentale care demonstrează implicarea NO în reglarea neurotumorală a tonusului musculaturii netede a tractului digestiv, a bronhiilor și a altor organe [25]. În prezent este demonstrat că NO sintetizat de NO-sintetaza inductibilă în macrofagii activi reprezintă un element esențial al rezistenței nespecifice a organismului [16,26].

Oxidul de azot (II) are un rol important în formarea memoriei și participă la transmiterea intercelulară și intracelulară a informației, în reacțiile imune legate de cele mai periculoase boli, inclusiv infarctul miocardic, insulțul, cancerul și diabetul.

Dar, s-a constatat că oxidul nitric participă la reglarea multor funcții vitale atât ca factor de stabilizare în evoluarea diferitelor stări patologice, cât și ca factor de inducere a acestor patologii. Astfel, sunt importante implicațiile oxidului de azot (II) în diferite patologii.

Acumularea intensă a NO în organism este însoțită de intensificarea formării superoxidului O_2^- , care, interacționând cu NO, formează peroxinitritul [24,27]:



Dacă prin reacția 3 în procesele biochimice sunt excluse cu o viteză foarte mare două molecule deosebit de importante, cu formarea peroxinitritului foarte toxic, atunci în reacția 4 oxidul de azot are rolul de a inhiba oxidarea peroxidică a lipidelor.

Interacțiunea oxidului de azot (II) cu radicalul superoxid (reacția 3) și cu radicalul peroxid lipidic (reacția 4) este esențială în menținerea stării antioxidante celulare:



În soluții neutre peroxinitritul se descompune cu formarea radicalilor liberi foarte reactivi NO, NO_2 și OH, care sunt potențiali de a induce distrugerea oxidativă a celulelor și structurilor celulare prin oxidarea sau nitrozarea lor [28]. Peroxinitritul, în prezența oxigenului, poate nitroza direct în proteină resturile de tirozină, cauzând astfel efecte distructive atât la nivel structural și de activitate a enzimelor, cât și în blocarea signalizării celulare.

Radicalii liberi pot distruge structurile celulare și extracelulare ale componentelor țesutului conjunctiv, cu proliferarea hondrocitelor, pot intensifica procesele scindării proteolitice a substanțelor intercelulare ale țesutului conjunctiv [29]. Oxidând resturile de triptofan, cisteină și tirozină din proteine, radicalii liberi inactivează ireversibil un șir de fermenți și, de asemenea, distrug structura ADN, cauzând astfel apariția mutațiilor [30]. În prezența radicalilor liberi se intensifică oxidarea peroxidică a acizilor grași polinesaturați, distrugându-se integritatea membranelor biologice. În rezultat, structurile celulare devin neprotejate față de acțiunea factorilor distructivi [31,32].

Modificările în metabolismul NO induc dezvoltarea unor patologii: boli ale sistemului cardiovascular, inclusiv hipertonie, infarctul miocardului, hipertensiune pulmonară, ateroscleroză, insult, diabet, incompatibilitatea transplantului, procese de inflamare cronică și acută, ciroza ficatului, boli oncologice etc. [33].

Atunci când în organism există procese de inflamare cronică are loc micșorarea sursei endogene de oxid de azot din L-arginină. În acest caz, enzima începe a reduce oxigenul până la radicalul superoxid și peroxid, dereglând astfel procesele antioxidante tisulare. Stările de inflamare cronică se caracterizează prin acumulări locale ale diferiților oxizi de azot în țesuturile apropiate (vecine), favorizând astfel procesele de nitrozare a aminelor și ADN-ului. Se cunoaște că produsele modificării aminelor de către speciile reactive de oxid de azot: NO, NO₂, N₂O₃, ONOO⁻ se includ în procesele tumorale de multiplicare [34-36]. De asemenea, s-a constatat că celulele tumorale pot genera NO. Se presupune că NO este implicat în metastazarea tumorilor [37].

Acumularea excesivă a NO în organism duce la micșorarea proliferării și la mărirea frecvenței apoptozei limfocitare și a macrofagilor și, ulterior, la dezvoltarea imunodeficitară secundară. Una dintre urmările nedorite ale acumulării de NO în organism este sinteza endogenă a N-nitrozocompușilor, care se formează în rezultatul interacțiunii compușilor organici ce conțin azot (amine, amide, ureea, guanidina, uretanii) și agentului de nitrozare [38].

Nitrozoaminele generează carbocazioni și prezintă organotropism pentru vezică, stomac, colon, ficat. În procesul de metabolizare a derivaților nitrozoaminici de către complexul enzimatic P-450 are loc hidroxilarea carbonului α în paralel cu denitrozarea oxidativă și formarea de aldehydă și mononitrozoderivați. Monoalchil-nitrozoamina se descompune spontan în carbocationul responsabil de alchilarea bazelor purinice și pirimidinice și a resturilor de fosfat din ADN [39-41].

S-au efectuat și se efectuează în continuare numeroase cercetări în scopul elucidării toxicității produselor finale ale metabolismului oxidului nitric, nitraților și nitriților. Prin utilizarea diferitelor tehnici experimentale de performanță s-a demonstrat că ionii de NO₃⁻ și NO₂⁻, caracterizați prin proprietăți de oxidare relativ slabe, manifestă asemenea activități biochimice, fiziologice și patologice deosebite, datorită faptului că în organismul omului și al animalelor NO₂⁻ se reduce ușor în NO, formându-se astfel un ciclu metabolic închis [42].

Material și metode

Nitrozarea substratelor cu nitriți în suc gastric imitat și real

Pentru a studia în sisteme reale procesul de nitrozare a aminelor în suc gastric, au fost colectate probe de suc gastric, cu caracteristici variate de la diferiți pacienți voluntari din clinica de gastrochirurgie a Spitalului Clinic Republican. Diagnosticul pacienților include diferite maladii: pancreatită cronică, colicestită cronică, gastrită cronică, colită cronică, hepatită și ciroză cronică (Tab.1).

Tabelul 1

Caracteristicile fizico-chimice ale probelor de suc gastric colectate de la voluntari

Probe	Anul nașterii	Domiciliul	Diagnosticul	Cantitatea colectată, ml	pH-ul	Hb, g/l
Pr.1	1974	mun. Chișinău	pancreatită cronică	98	7,82	150
Pr.2	1950	mun. Chișinău	colecistită cronică	100	6,74	128
Pr.3	1987	or. Florești	gastrită cronică	40	2,94	121
Pr.4	1965	or. Cahul	gastrită cronică	104	2,22	133
Pr.5	1987	mun. Chișinău	gastrită cronică	100	2,58	135
Pr.6	1960	or. Cantemir	pancreatită cronică	50	7,71	125
Pr.7	1950	or. Briceni	gastrită cronică	30	1,98	137
Pr.8	1947	or. Briceni	pancreatită cronică	48	2,13	120
Pr.9	1961	or. Glodeni	colită cronică	50	6,37	103
Pr.10	1949	or. Ungheni	hepatită cronică	55	1,66	128
Pr.11	1951	or. Florești	ciroză hepatică	47	7,25	138
Pr.12	1950	or. Fălești	colecistită cronică	20	2,44	122

Probele au fost colectate în eprubete sterile din polietilenă. Imediat după colectare probele au fost omogenizate, folosind un omogenizator magnetic, după care s-a determinat pH-ul. Din datele incluse în Tabelul 1 observăm că intervalul de pH al sucului gastric este destul de larg, variind între limitele 1,66 ÷ 7,82. Pentru gastrita cronică, la majoritatea probelor sunt caracteristice mărimi joase ale pH-ului, iar pentru pancreatite și colicestite – pH-uri mai mari. La fel, a fost determinată și concentrația hemoglobinei, care nu variază atât de mult în funcție de diagnosticul pacientului. În continuare, probele de suc gastric (SG) au fost păstrate la temperaturi joase (-30°C). Determinarea concentrației totale de NNC a fost efectuată prin metoda analizei termo-energetice (ATE) [42]. Partea alicotă omogenizată de SG a fost injectată direct în acetat de etil refluxat, care conținea HCl/HBr și în acid acetic glacial, iar după cantitatea de NO format la denitrozare s-a determinat concentrația de NNA.

Deoarece NO_2^- influențează asupra analizei NNC prin metoda ATE, ei au fost înlăturați din SG, prin adăugarea acidului sulfamic. La fel, în probele de suc gastric au fost determinați ionii nitriți și nitrați. În continuare s-a studiat nitrozarea aminelor în SG sub acțiunea ionilor nitriți. În calitate de amine au fost studiate dimetilamina (DMA), dietilamina (DEA) și morfolina (MORF). Procesul de nitrozare în SG a fost studiat în absența și în prezența diferiților inhibitori.

Rezultate și discuții

Concentrația ionilor nitrați și nitriți în suc gastric în funcție de pH

Pentru a determina legătura dintre N-nitrozarea intragastrică, pH-ul gastric și concentrația ionilor nitriți, au fost studiate diferite mostre de suc gastric în care s-a analizat concentrația N-nitrozocompușilor, a ionilor nitrați și nitriți. S-a constatat că concentrația NO_2^- depinde de pH-ul gastric, iar la $\text{pH} < 5$ concentrația lor este foarte mică.

Concentrația ionilor nitriți în suc gastric normal este, în medie, de 0,12 mg/l (26 μmol) și această valoare crește odată cu creșterea pH-ului până la pH 5 [43]. Creșterea concentrației nitriților se observă la pacienții care au anemie gravă sau alte patologii. S-a constatat că ionul nitrit în suc gastric dispare timp de o oră, deoarece în mediul acid are loc transformarea lui în acid azotos. O parte de HNO_2 este absorbită de mucoasă, iar o altă parte se transformă în NO_2 și NO , care, la rândul său, se oxidează până la ionul nitrit sau reacționează cu compușii reducători, aminele, formând N-nitrozoderivați [44].

În rezultatul investigațiilor experimentale s-a constatat că conținutul de ioni nitriți și nitrați variază în funcție de diagnosticul pacientului (Tab.2).

Tabelul 2

Concentrația NO_3^- și NO_2^- în suc gastric colectat de la pacienți cu diferite patologii

Patologia	$[\text{NO}_3^-]$, mol/l	$[\text{NO}_2^-]$, mol/l
Pancreatită	$(4,07 - 5,95) \cdot 10^{-4}$	$(3,12 - 4,78) \cdot 10^{-5}$
Colecistită	$(1,12 - 1,5) \cdot 10^{-4}$	$(4,27 - 2,55) \cdot 10^{-5}$
Gastrită	$(3,81 - 7,01) \cdot 10^{-4}$	$(2,8 - 2,67) \cdot 10^{-5}$
Hepatită	$(7,01 - 7,38) \cdot 10^{-4}$	$(3,37 - 6,49) \cdot 10^{-5}$

Cea mai înaltă concentrație a nitraților și nitriților s-a depistat în cazul hepatitelor cronice (Tab.2), iar cea mai joasă – în cazul colecistitelor cronice. Conținutul de NO_2^- și NO_3^- în suc gastric este mai înalt la persoanele de sex masculin (Tab.3).

Tabelul 3

Concentrația nitraților și nitriților în suc gastric

Sexul	$[\text{NO}_3^-]$, mol/l	$[\text{NO}_2^-]$, mol/l
Feminin	$(1,50 - 6,32) \cdot 10^{-4}$	$(2,67 - 4,71) \cdot 10^{-5}$
Masculin	$(1,51 - 11,2) \cdot 10^{-4}$	$(2,04 - 8,22) \cdot 10^{-5}$

S-a constatat că conținutul de ioni nitrați și nitriți în probele colectate de suc gastric depinde de pH-ul mediului. Concentrația ionilor nitriți este mai mică la pH-uri scăzute. În intervalul de pH 1,66–2,96, concentrațiile nitriților variază de la 1,41 mg/l ($2,04 \cdot 10^{-5}$ mol/l) până la 2,98 mg/l ($4,32 \cdot 10^{-5}$ mol/l). La $\text{pH} > 6$ – variază în intervalul de la 2,86 mg/l ($4,14 \cdot 10^{-5}$ mol/l) până la 5,68 mg/l ($8,22 \cdot 10^{-5}$ mol/l) (Fig.3).

În condiții cu aciditate normală (pH 2,5) flora bacteriană nu se dezvoltă și ionul nitrit intragastric este de natură salivară. Când pH-ul gastric crește, se mărește viteza de dezvoltare a microorganismelor, ce reduc ionul nitrat la ionul nitrit, iar pH-ul optim pentru reducerea ionului nitrat sub acțiunea bacteriilor este între 7 și 8. Aceste date experimentale sunt în acord cu datele din literatură [45-47]. Creșterea concentrației de ioni nitriți, odată cu mărirea pH-ului, este determinată de creșterea vitezei de transformare enzimatică a NO_3^- în NO_2^- .

Expunerea organismului la acțiunea nitraților este determinată în mare măsură de nivelul de

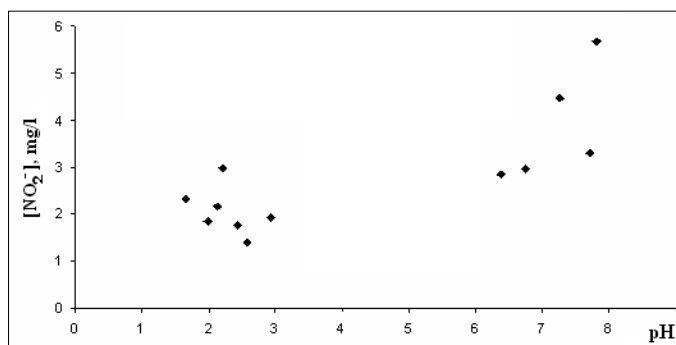


Fig.3. Concentrația ionilor nitriți în diferite probe de suc gastric în funcție de pH.

poluare a apelor, mai ales în localitățile rurale, unde apele freactice sunt utilizate fără a fi tratate. Comparând conținutul total de ioni nitrați ce pătrund în organismul uman (în 12 țări), Mirvish [45] a găsit o corelație importantă între incidența cancerului gastric (CG) și concentrația NO_3^- . Cea mai mare incidență a CG a fost depistată în Japonia, iar cea mai mică în SUA (în Japonia de trei ori mai mare decât în SUA). Consumul înalt de nitrați în Japonia este legat de conținutul lor înalt în vegetale, iar incidența scăzută a CG în SUA este explicată prin utilizarea permanentă a fructelor și legumelor proaspete.

Concentrația ionilor nitrați în probele analizate de suc gastric este cu mult mai înaltă decât concentrația NO_2^- și variază în intervalul $1,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l (12,8 mg/l) – $1,12 \cdot 10^{-3}$ mol/l (95,2 mg/l) (Fig.4).

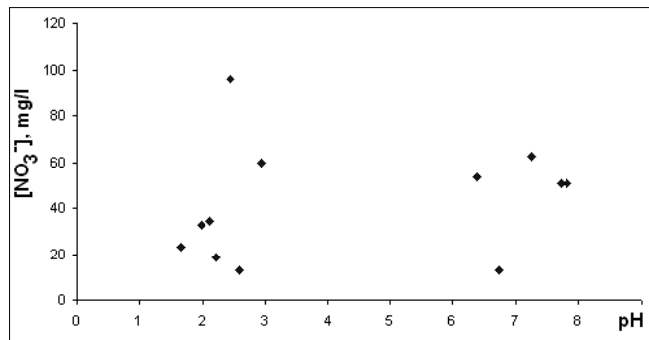


Fig.4. Conținutul ionilor nitrați în diferite probe.

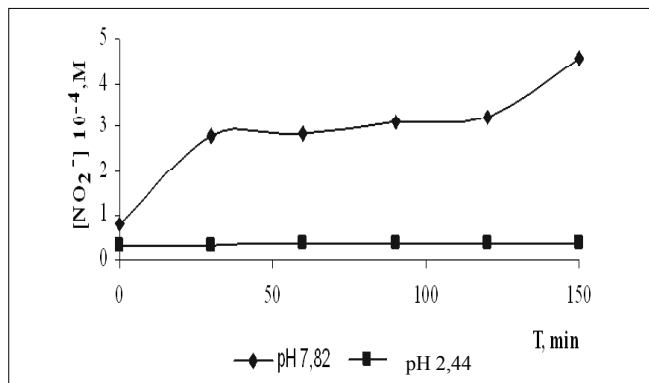


Fig.5. Variația $C_{\text{NO}_2^-}$ în timp, la pH diferit de suc gastric în f(pH), în sucul gastric, $t=37^\circ\text{C}$.

la ionul nitrit timp de 60 min. Pentru doza de Bificol utilizată (0,33 doze la fiecare probă) concentrația ionului nitrit crește semnificativ, până la 0,25 M.

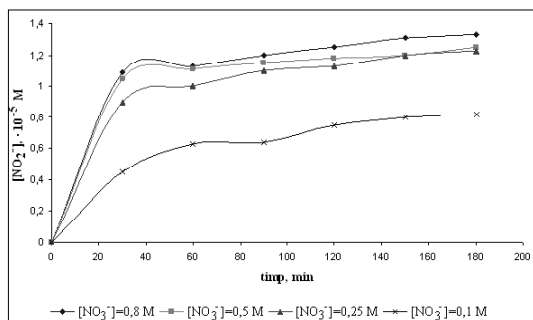


Fig.6. Curbele cinetice de formare a NO_2^- la reducerea NO_3^- în prezența Bificolului în f($[\text{NO}_3^-]_0$); pH 7, $t = 25^\circ\text{C}$.

Concentrația ionilor nitriți crește semnificativ la incubarea (37°C) probei de suc gastric cu pH 7,82, comparativ cu pH 2,44 (Fig.5), în care acest proces nu are loc.

Aceste studii experimentale confirmă că concentrația ionului nitrit din sucul gastric este dependentă de pH-ul intragastric și la pH < 6 concentrațiile NO_2^- sunt mai mici, deoarece în aceste condiții stabilitatea nitritului este joasă, fiind determinată de reactivitatea lui înaltă. Nitriții se consumă la interacțiunea cu aminele, amidele, peptidele ș.a.

Reducerea enzimatică a nitraților în prezența Bificolului și nitrozarea aminelor secundare în suc gastric

În rezultatul studiilor experimentale s-a constatat că viteza de transformare a ionului nitrat în ionul nitrit depinde de diferiți parametri: $[\text{NO}_3^-]_0$, pH-ul mediului și doza de microorganisme din sistem. Pentru studiul experimental al procesului de transformare a nitraților în nitriți a fost utilizat Bificolul, care reprezintă o masă microbiană uscată, obținută prin liofilizare și care conține microorganisme antagoniste active, bifidobacterii (*B. bifidum*) și *Escherichia coli* (*E. coli M-17*).

S-a studiat transformarea ionului nitrat în sistem-model în prezența Bificolului după acumularea ionului nitrit (Fig.6). Analizând datele prezentate în Figura 6 constatăm că ionul nitrat în astfel de condiții se reduce

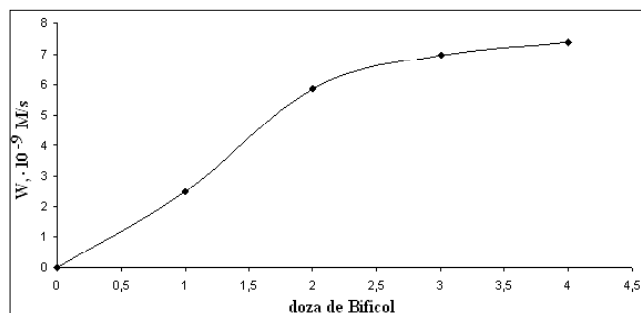


Fig.7. Viteza de reducere a NO_3^- la NO_2^- în f($[\text{Bificol}]_0$).

În Figura 7 este prezentată viteza de formare a ionului nitrit, care crește odată cu mărirea dozei de Bificol de la 0 până la $7,39 \cdot 10^{-9} \text{ Ms}^{-1}$. Formarea ionului nitritului din nitrat în prezența Bificolului este influențată direct de pH-ul mediului [50]. La pH-uri acide sau bazice viteza de reducere este scăzută și crește la pH neutru, trecând prin maxim la pH 7 (Fig.8). Aceste rezultate sunt în corelație cu rezultatele prezentate în Figura 3.

Astfel, constatăm că procesul de reducere a ionului nitrat la NO_2^- în stomac, unde pH-ul normal este de circa 2,5, decurge destul de lent și astfel în sucul gastric cu pH mic obținem concentrații înalte de ioni nitrați (Fig.4).

În cazul aclorhidriei sau altor boli, care induc mărirea pH-ului, este stimulată dezvoltarea microorganismelor nitrat-reducătoare, care reduc nitrații la nitriți.

Ionii nitriți, formați în urma procesului de reducere a ionilor nitrați, servesc ca agenți de nitrozare pentru diferiți compuși nitrozabili: amine, amide, aminoacizi, polipeptide, proteine. Cele mai mari concentrații de NNC au fost determinate la valorile pH-ului între 6,0–8,42 ($3,57 \pm 0,33 \mu\text{mol/l}$) și mai scăzute la pH 1,1–2,99 ($1,45 \pm 0,17 \mu\text{mol/l}$). Aceste mărimi s-au comparat cu concentrațiile NNC găsite la pH 3,00–5,99 ($1,02 \pm 0,12 \mu\text{mol/l}$), care sunt cele mai mici. Astfel, concentrația NNC formați depinde de concentrația ionilor nitriți atât pentru mediul acid, cât și pentru cel neutru sau bazic.

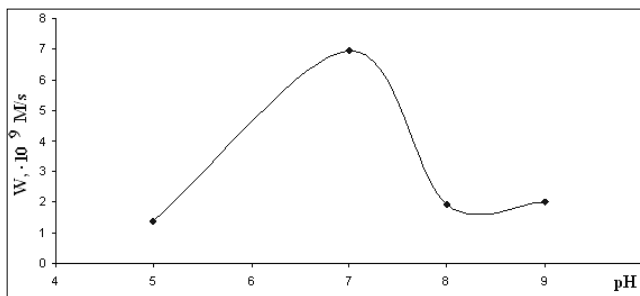


Fig.8. Viteza de reducere a nitraților la nitriți în prezența Bificolului în f(pH).

Din analiza conținutului total de N-nitrozamine volatile ce se conțin în probe de suc gastric s-a constatat că principalele NNA sunt: N-nitrozodimetilamina, N-nitrozodietilamina, N-nitrozoetilmetilamina, N-nitrozomorfolina, N-nitrozopirolidina, N-nitrozopiperidina, N-nitroso-di-propilamina. Concentrația de NNA volatile totale este în medie de $4,84 \text{ nmol/l}$ ($0 - 17,7 \text{ nmol/l}$) [46]. În rezultatul determinării concentrației NNA volatile în suc gastric în funcție de pH, s-a găsit o corelație pozitivă în intervalul de pH 4,0–7,5 între concentrația NNA volatile totale și individuale și pH, care se explică prin intensificarea creșterii bacteriene ce mărește viteza de conversie a ionului nitrat în ion nitrit.

La fel, conținutul NNA volatile totale și individuale este mare la pH-uri joase (1,0–1,5), deoarece în acest caz are loc un proces de cataliză acidă a nitrozării substratelor. Tricher [47] a analizat conținutul de amine secundare ce se conțin în suc gastric, care a fost colectat de la diferiți pacienți. Principalele amine secundare nitrozabile găsite în salivă, suc gastric, sânge, urină au fost DMA $0,87 \mu\text{g/l}$, pirolidina (Pyr, $0,18 \mu\text{g/l}$), piperidina (PIP $1,35 \mu\text{g/l}$) și DEA $0,05 \mu\text{g/l}$.

N-nitrozocompuși cancerigeni, care se formează în stomac, sunt potențiali agenți inițiatori în patogeneza cancerului gastric. În acest context, studiul procesului de nitrozare a aminelor în suc gastric și, în special, inhibiția acestui proces are o importanță mare. Unii inhibitori studiați în prezenta lucrare au fost testați și comparați pentru efectul lor de diminuare a concentrației de ion nitrit și NNC.

În calitate de inhibitori s-au studiat acidul dihidroxifumaric, extractul carotenoidic din spirulină (pigment carotenoidic, PC), esterii dimetilici al acidului tartric și dihidroxifumaric și rezveratrolul. Procesul de inhibiție a fost studiat atât după variația $[\text{NO}_2^-]$ în sistem, cât și după formarea NNC, prin metoda ATE. În proba de suc gastric cu pH 1,86 a fost studiată nitrozarea DEA, DMA și MOR [49-51]. Nitrozarea în suc gastric (sistem real) are loc cu o viteză mai mare decât în sistemul-model. La nitrozarea comparativă a MOR în suc gastric și în sistem-model, s-a constatat că concentrația NMOR în suc gastric este mai mare [59]. În același timp, în prezența PC are loc micșorarea randamentului reacției de formare a NMOR odată cu creșterea PC (Fig.9). Pigmentul carotenoidic este activ nu doar în sistemul-model, dar și în suc gastric și astfel inhibă procesul de formare al N-nitrozomorfolinei.

Sucul gastric este un sistem complex care conține în special HCl. Totuși, pe lângă HCl, în suc gastric se mai conține acid lactic format în rezultatul fermentării lactice: acizii acetic, valerianic, oleic reprezintă la fel produse ale proceselor fermentative. În suc gastric sunt prezente diferite enzime (pepsină, tripsină), ionii de clor, SCN^- , compuși ai azotului ș.a. Unii din acești componenți servesc drept catalizatori (SCN^-) în procesul de nitrozare a aminelor.

Rezultatele experimentale (Fig. 10) indică la faptul că inhibitorii utilizați în procesul formării NMOR în suc gastric diminuează $[\text{NO}_2^-]$, astfel concentrația NMOR formate va fi cu mult mai mică. Din Figura 10 constatăm că cel mai eficient inhibitor la nitrozarea MOR în suc gastric este DFH_4 . Astfel, procesul de formare a NNC în stomac depinde de concentrația catalizatorilor și inhibitorilor. Totuși, concentrația ionilor nitriți este primul factor limitativ, deoarece concentrația aminelor în stomac este în exces. În mediul acid al sucului gastric are loc nitrozarea substratelor sub acțiunea catalizei acide cu formarea agenților de nitrozare formați din nitriți.

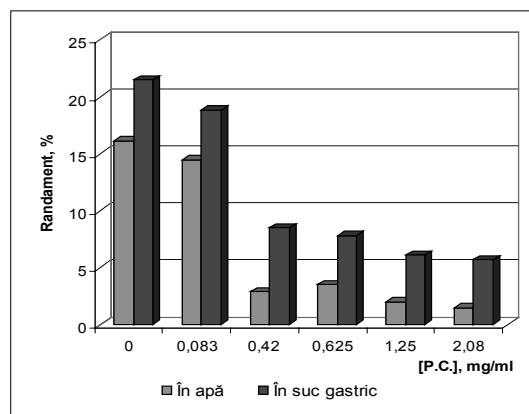


Fig.9. Dependența η a reacției de nitrozare a MOR în prezența PC în suc gastric și în sistemul-model; $[\text{NO}_2^-]_0 = 5 \text{ mM}$, $[\text{MOR}]_0 = 5 \text{ mM}$, $[\text{NaCl}]_0 = 0,5 \text{ mM}$; pH 2,5.

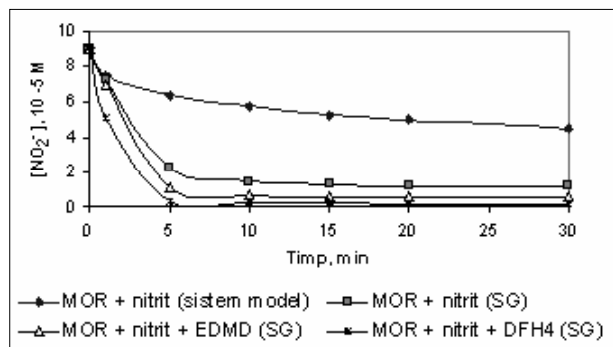


Fig.10. Dependenta consumului de nitrit la nitrozarea morfolinei în diferite sisteme:

$$[\text{NO}_2^-]_0 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}, [\text{Inhib}]_0 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M},$$

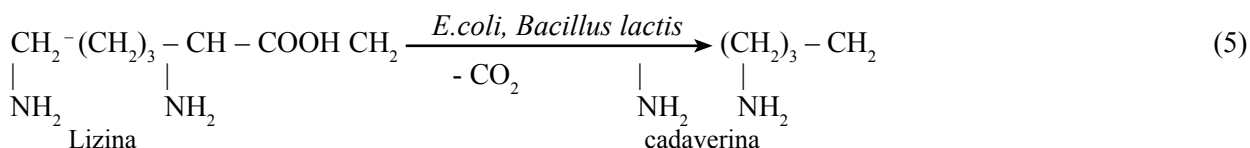
$$[\text{MOR}]_0 = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}; \text{pH } 3,4, t = 37^\circ \text{ C}.$$

Astfel, proteinele din produse alimentare, în tractul gastrointestinal, se transformă în aminoacizi liberi sub influența unui grup succesiv de enzime proteolitice [44]. Transformarea proteinelor și a aminoacizilor liberi în tractul gastrointestinal este influențată de microflora intestinală – microorganismele care sunt prezente în mod normal în intestin. O parte din aminoacizi, sub influența microorganismelor, se transformă în amine, acizi grași, alcooli, fenoli, indol, scatol, H_2S ș.a. în rezultatul următoarelor procese [45]:

1) decarboxilarea aminoacizilor în prezența microorganismelor și formarea aminelor respective, care pot fi toxice;

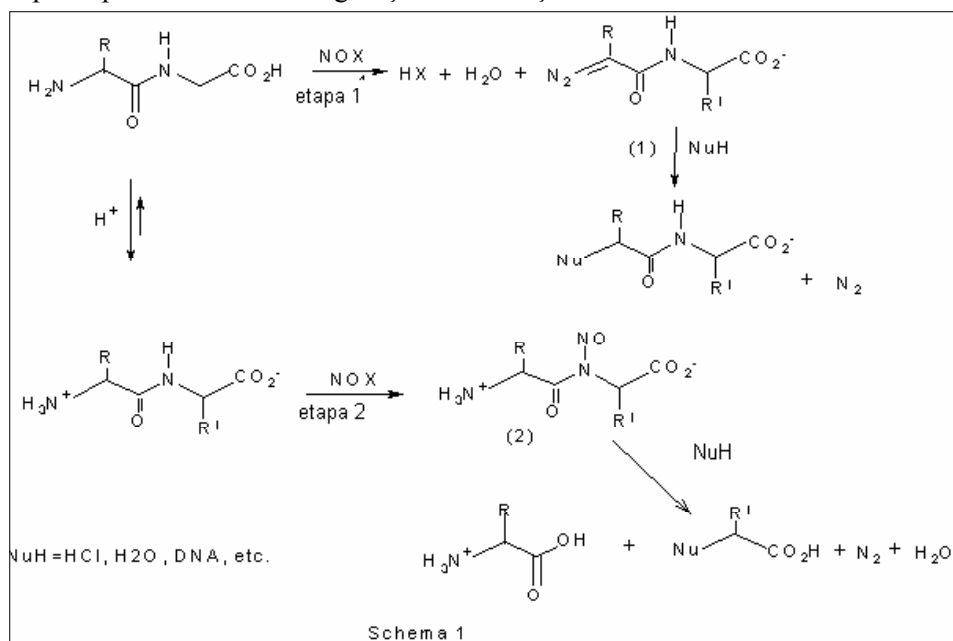
2) dezaminarea aminoacizilor, care duce la ruperea aminogrupei sub formă de amoniac și, în dependență de condiții, la formarea diferitelor produse, ca acizii saturați și nesaturați, ceto- și oxoacizii.

Aminele obținute la decarboxilarea aminoacizilor sunt substanțe active din punct de vedere farmacologic, iar unele sunt chiar toxice. Sub influența microorganismelor din aminoacizi se formează așa amine, ca: putrescina, cadaverina (ec.5.), feniletilamina, indoliletilamina, care se neutralizează în ficat [45].



Microorganismele *Escherichia coli* conțin un grup de fermenți, care hidrolizează legăturile peptidice din proteină și în rezultatul acestor procese biochimice se formează peptide, care în continuare pot fi supuse nitrozării.

Nitrozarea are loc la grupa amino-primară terminală cu formarea diazopeptidelor, care sunt instabile, iar la atomul de azot al peptidei se formează o N-nitrozopeptidă. Sub acțiunea nitritului în mediul acidifiat, de obicei, diazopeptidele se formează mai ușor decât N-nitrozopeptidele, dar se descompun mai rapid. Însă, diazopeptidele se formează rapid la pH neutru din oxizii gazoși ai azotului și sunt relativ stabile în asemenea condiții. N-nitrozopeptidele sunt



mult mai stabile decât diazopeptidele – atât la pH acid, cât și neutru. Atât diazopeptidele, cât și N-nitrozopeptidele sunt citotoxice.

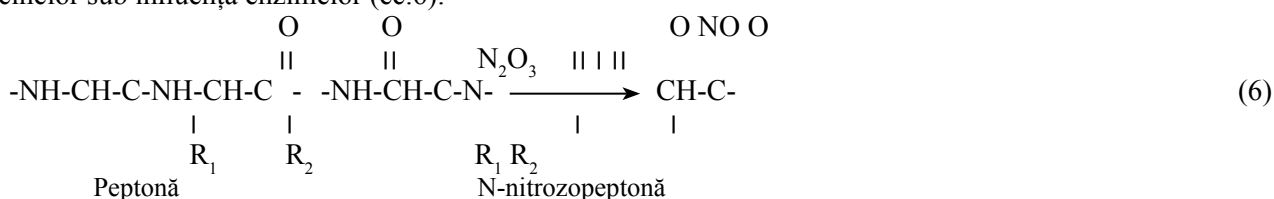
Ca și alți aminocompuși, peptidele reacționează cu agenții de nitrozare în anumite condiții. Natura produșilor formați depinde de aminoacizii constituenți ai peptidelor. Dar, în formă generală se pot prezenta două reacții, indiferent de natura acestor constituenți (schema 1). Prima reacție (etapa 1) implică grupa amino-primară terminală, care suferă deaminarea cu formarea unui diazoderivat (1). A doua reacție (etapă 2) include

reacția atomilor de azot ai peptidelor cu formarea N-nitrozoderivatului, care, interacționând cu nucleofili (NuH), provoacă ruperea legăturii peptidice [43]:

a) Nitrozarea metaboliților formați la proteoliza cazeinei

Scopul principal al cercetărilor experimentale efectuate a fost studierea procesului de nitrozare ce se produce în condițiile unui sistem gastrointestinal imitat la pătrunderea alimentelor în stomac și studierea capacității reductonilor în prevenirea acestui proces. În rezultatul proteolizei, proteinele din alimente sunt scindate în stomac, sub acțiunea pepsinei care se găsește în sucul gastric. Această enzimă acționează mai mult asupra legăturilor îndepărtate de capetele lanțului polipeptidic cu formarea peptonelor, care nu sunt absorbite în stomac. În intestin, sub acțiunea tripsinei, chimotripsinei, carboxipeptidazei, produsele obținute se supun în continuare scindării proteolitice. Tripsina scindează, mai ales, legăturile formate din grupele carboxilice ale aminoacizilor arginină sau lizină. Chimotripsina scindează legăturile peptidice atât ale proteinelor nescindate, cât și ale peptonelor (mai ales, legăturile formate între aminoacizi aromatici, precum tirozina, triptofanul, fenilalanina).

Astfel, în sucul gastric, componente de nitrozare pot fi metaboliții formați de la scindarea hidrolitică a proteinelor sub influența enzimelor (ec.6):



În intestin, nitrozarea decurge la un pH bazic și acest proces este influențat de microflora intestinală. Studiile experimentale denotă că bacteria *E.coli* reduce ionii nitriți până la NO cu o mică parte de N₂O în condiții anaerobe. Cercetările au demonstrat că sub influența *E.coli* în intestin se formează, preponderent, nitrozodimetilamina (NDMA) din dimetilamină (DMA), ion-nitrit și microorganisme prezente în microflora intestinală. Însă, acest proces depinde nu atât de prezența microflorei, cât de componența enzimatică [18].

Experimental s-a studiat [55-58] procesul de formare a NNC la nitrozarea cu ioni nitriți a metaboliților formați la hidroliza proteinelor (cazeină și albumină) în funcție de diferiți parametri: pH, [NO₂⁻]₀, concentrația proteinei, acidului dihidroxifumaric, hidrogenodihidroxifumaratului de sodiu [DFH₃Na], (+)-catehinei ((+)-Ct) și acidului ascorbic (AAs).

Analiza NNC formați s-a efectuat prin metoda spectrofotometrică-extracțională. La fel, concentrația NNC s-a determinat prin metoda ATE [42]. Cazeina a fost dizolvată în mediu bazic la baie de apă fierbândă timp de 10-15 min., apoi a fost răcită până la temperatura camerei și acidulată cu HCl până la pH 2,5. În sistem a fost adăugată soluție tampon citrat-fosfat și proba a fost termostată la 37°C.

Enzimele proteolitice s-au solubilizat în soluție tampon cu pH-ul optim respectiv: pepsina se dizolvă la pH 2,5, iar tripsina – la pH 7,8, chimotripsina – la pH 8. Pe parcursul reacției în diferite perioade de timp se prelevează probe (5 ml) din care se efectuează extracția NNC, mai întâi cu 4 ml, apoi cu 3 ml de eter dietilic. Extractul obținut se spectrofotometrează la λ₁=335 nm și λ₂=235 nm.

S-a studiat procesul de formare a NNC la proteoliza cazeinei în funcție de concentrația agentului de nitrozare. Studiul s-a efectuat pentru diferite enzime la pH-urile caracteristice fiecărei din ele. S-a utilizat următoarele concentrații: cazeină (2 %), pepsină (pH 2,5), tripsină (pH 7,8), chimotripsină (pH 8) cu concentrații de 5 mg/ml; NaNO₂ (1·10⁻⁴, 5·10⁻⁴, 1·10⁻³ M), soluție tampon citrat-fosfat (pH 2,5 și 7,8-8,0).

S-a constatat că mărirea concentrației agentului de nitrozare în intervalul 1·10⁻⁴–1·10⁻³M duce la creșterea concentrației de NNC formați. Viteza inițială de formare a NNC crește odată cu creșterea [NO₂⁻] și este maximă în prezența chimotripsinei (Fig. 11). În cazul chimotripsinei, în sistem crește concentrația de nitrozocompuși și diazocompuși formați la nitrozarea cazeinei. Acest proces poate fi explicat prin proteoliza mai profundă a cazeinei sub acțiunea chimotripsinei în comparație cu pepsina și tripsina. Este cunoscut că chimotripsina scindează, preponderent, legăturile peptidice ale aminoacizilor aromatici; în așa mod, se formează peptide cu aminoacizi aromatici terminali, care nu formează diazocompuși, ci nitrozocompuși.

Procesul de nitrozare a metaboliților cazeinei depinde de pH-ul mediului [55]. S-a studiat procesul de formare a

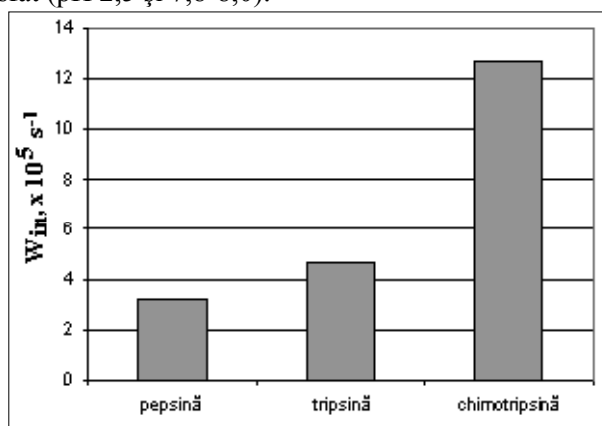


Fig.11. Viteza inițială de nitrozare a cazeinei în prezența enzimelor; [NO₂⁻]₀=1·10⁻⁴ M, [cz]₀=1%, [enz]₀=5 mg/ml, t=37°C.

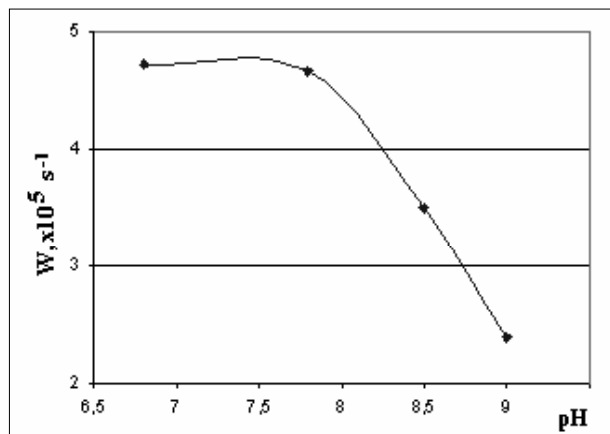


Fig.12. Viteza de nitrozare în f(pH) la proteoliza cazeinei sub acțiunea tripsinei; $[cz]_0=1\%$, $[tripsin\text{ă}]_0=2,5$ mg/ml, $[NO_2^-]_0=1 \cdot 10^{-4}$ M, $t=37^\circ C$.

determinată prin metoda spectrofotometrică extracțională la $\lambda_{max}=235$ nm în f $[NO_2^-]_0$ la proteoliza Alb sub acțiunea pepsinei, este prezentată în Figura 13(1). Ordinul de reacție față de $[NO_2^-]_0$ este egal cu 1. Astfel, constatăm că în calitate de agent la nitrozarea peptidelor, formate în sistem în aceste condiții, participă cationul de nitrozaniu.

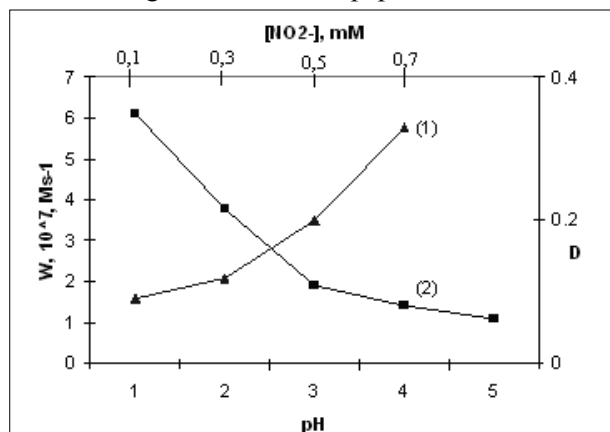


Fig.13. (1) Dependența D a NNC la $\lambda=235$ în f $[NO_2^-]_0$ la nitrozarea Alb; pH 2,5; $[Alb]_0=0,4\%$; $[peps]_0=2,5$ mg/l; (2) Viteza de consum a NO_2^- la nitrozarea Alb în f(pH); $[Alb]_0=0,4\%$; $[peps]_0=2,5$ mg/l; $[NO_2^-]_0=1 \cdot 10^{-4}$ M.

NNC în prezența tripsinei în intervalul de pH 6,8÷9. S-a constatat că creșterea pH-ului diminuează viteza procesului de formare a NNC în acest interval (Fig.12).

Concentrația NNC formați este maximă în intervalul de pH 6,8÷7,8 (Fig.12). Viteza inițială de formare se micșorează odată cu creșterea pH-ului, datorită faptului că tripsina își pierde activitatea odată cu depășirea intervalului optim. Astfel, nu are loc procesul de proteoliză cu scindarea legăturilor din grupele carboxilice ale argininei și lizinei și, la rândul său, cel de nitrozare a substratilor.

b) Nitrozarea metaboliților formați la proteoliza albuminei

În cazul proteolizei albuminei la formarea NNC sub acțiunea pepsinei se urmăresc aceleași tendințe. Viteza de nitrozare crește odată cu creșterea concentrației ionilor nitriți în sistem. Variația densității optice (D) a NNC, determinată prin metoda spectrofotometrică extracțională la $\lambda_{max}=235$ nm în f $[NO_2^-]_0$ la proteoliza Alb sub acțiunea pepsinei, este prezentată în Figura 13(1). Ordinul de reacție față de $[NO_2^-]_0$ este egal cu 1. Astfel, constatăm că în calitate de agent la nitrozarea peptidelor, formate în sistem în aceste condiții, participă cationul de nitrozaniu.

Viteza de nitrozare a metaboliților formați la proteoliza Alb sub acțiunea pepsinei se micșorează odată cu creșterea pH-ului în intervalul pH 1,5–4,0 (Fig.13(2)). Pentru a diminua concentrația NNC formați la proteoliza Alb, s-au utilizat următorii reducători: DFH₄, (+)-Ct și AAs. Procesul s-a studiat după formarea NNC sub acțiunea acestor inhibitori și după variația concentrației de NO_2^- . Dacă comparăm W_{in} de consum a NO_2^- în procesul de proteoliză a Alb pentru diferiți inhibitori, constatăm că ea este maximă în prezența DFH₄ și crește odată cu creșterea $[DFH_4]_0$ (Fig.14). Constantele vitezei de consum a ionului nitrit în funcție de natura inhibitorului în acest sistem sunt următoarele:

$$k_{DFH_4} > k_{AAs} > k_{(+)\text{Ct}}$$

$$0,94 \cdot 10^2, M^{-1}s^{-1} \quad 0,6 \cdot 10^2, M^{-1}s^{-1} \quad 0,4 \cdot 10^2, M^{-1}s^{-1}$$

Din datele experimentale obținute la nitrozarea albuminei și cazeinei constatăm că mai ușor se supun nitrozării metaboliții formați la scindarea proteolitică a cazeinei (Fig.14).

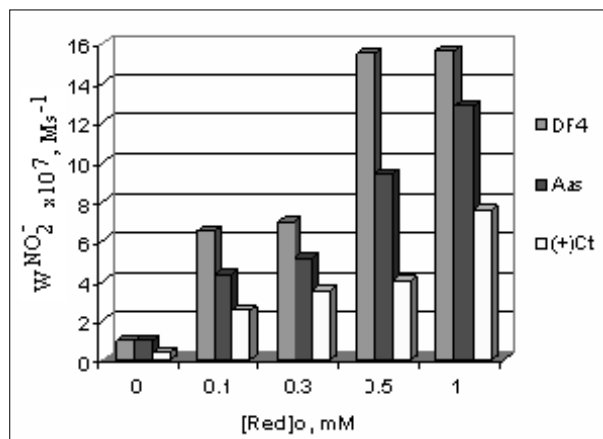


Fig.14. Variația $W^{NO_2^-}$ în f $[Red]_0$ la nitrozarea Alb sub acțiunea pepsinei; pH 2,6; $[Alb]_0=0,4\%$; $[peps]_0=2,5$ mg/l; $[NO_2^-]_0=1 \cdot 10^{-4}$ M, $t=37^\circ C$.

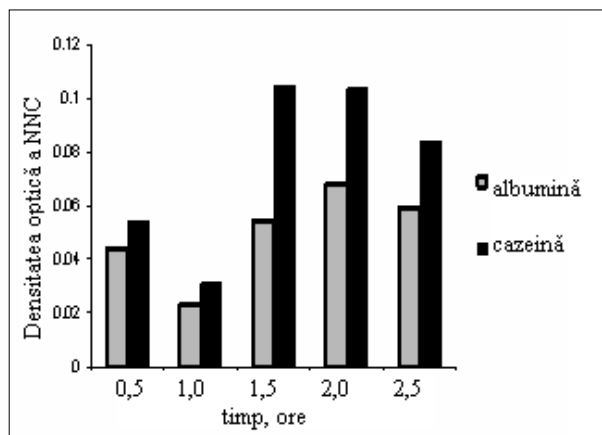


Fig.15. Nitrozarea Alb și Cz în tractul gastrointestinal imitat; $t=37^\circ C$; $[prot]_0=0,4\%$; $[peps]=2,5$ mg/l.

Concluzii

√ S-a constatat că în probele de suc gastric (SG) colectate de la diferiți pacienți concentrația nitraților și nitriților depinde de pH-ul SG. Concentrația ionilor nitriți este mai mică la pH-uri joase (pH 1,5-2,5) și variază între 1,41 mg/l ($2,04 \cdot 10^{-5}$ M) și 2,98 mg/l ($4,32 \cdot 10^{-5}$ M). La pH > 6 concentrația NO_2^- nitriților crește în intervalul de pH 6-8 de la 2,86 mg/l ($4,14 \cdot 10^{-5}$ M) până la 5,68 mg/l ($8,22 \cdot 10^{-5}$ M), datorită dezvoltării microflorei bacteriene.

√ Concentrația ionilor nitrați în probele analizate de SG este cu mult mai înaltă comparativ cu $[\text{NO}_2^-]$ și variază în intervalul $1,5 \cdot 10^{-4}$ M (12,8 mg/l) – $1,12 \cdot 10^{-2}$ M (95,2 mg/l). Spre deosebire de ionii nitriți, concentrația ionilor nitrați este mai înaltă în mediul acid, deoarece la pH-uri joase microflora bacteriană se dezvoltă mai puțin.

√ Viteza de nitrozare a aminelor în suc gastric este mai înaltă decât în sistemul-model, deoarece prezența ionilor de SCN^- catalizează acest proces, iar factorul limitativ este concentrația nitriților, deoarece concentrația aminelor este în exces.

√ La nitrozarea metaboliților formați la proteoliza cazeinei în prezența enzimelor s-a constatat că viteza procesului depinde de natura lor (pepsină, tripsină, chimotripsină) și este maximă sub acțiunea chimotripsinei. Viteza procesului la fel depinde de pH-ul mediului.

√ S-a constatat că DFH_3Na și DFH_4 posedă proprietăți de inhibitor în formarea NNC la proteoliza cazeinei și albuminei în prezența diferitelor enzime. Concentrația NNC se micșorează de 1,5 ori la $[\text{DFH}_3\text{Na}] = 5 \cdot 10^{-4}$ M față de proba control.

√ Analiza conținutului substratului nehidrolizat în corelație cu concentrația produselor hidrolizei demonstrează că activitatea enzimelor studiate nu este influențată de prezența DFH_3Na la concentrațiile studiate.

√ În rezultatul studiului comparativ al gradului de diminuare a nitriților la proteoliza albuminei în prezența DFH_4 , AAs și (+)-Ct, s-a constatat că viteza de consum a NO_2^- în prezența DFH_4 este maximă, iar constantele de viteză sunt următoarele:

$$k_{\text{DFH}_4} > k_{\text{AAs}} > k_{(+)\text{Ct}}$$

$$0,94 \cdot 10^2, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1} \quad 0,6 \cdot 10^2, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1} \quad 0,4 \cdot 10^2, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

Referințe:

1. Боговский П.А., Роома М.Я. Нитрозирующие предшественники канцерогенных N-нитрозосоединений в окружающей среде и в организме человека // Вопросы онкологии. - 1987. - Том XXXIII. - №.5.- С.3-11.
2. Iijima K., Eyfe V. McColl K.E.L. Studies of nitric oxide generation from salivary in human gastric juice // Scand. J. Gastroenterol. - 2003; 38:246-252.
3. Mirvish S.S., Grandjean A.C., Reimers K.J., Connelly B.J., Chen S.-C., Gallagher J., et al. Dosing time with ascorbic acid and nitrate, gum and tobacco chewing, fasting, and other factors affecting N-nitrosoproline formation in healthy subjects taking Proline with a standard meal // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. - 1995; 4:775-82.
4. Li Hong., Duncan C., Townend J., Killham K., Smith L. M., Johnston I., Dykhuizen R., Kelly D., Golden M., Benjamin N., and Leifert C. Nitrate- reducing bacteria on rat tongues // Appl. Environ. Microbiol. - 1997; 63:924-930.
5. Mirvish S.S., Reimers K.J., Kutler B., Chen S.C., Haorah J., Morris C.R., Lyden E.R. Nitrate and nitrite concentrations in human saliva for men and women an different ages and times of the day and their consistency over time // European J. of Cancer Prevention. - 2000. - No 9. -P.335-342.
6. Badawi A.F. Hosny G, Mostafa M. Salivary nitrate, nitrite and nitrate reductase activity in relation to risk of oral cancer in Egypt // Dis Markers, 14, 91-7.
7. Boulos P.B., Whitfield P.F., Dover M., Faber R.G., Hobsley M. Thiocyanate as a marker of saliva in gastric juice // Gut. - 1980; 21:18-22.
8. Katsumi Zoshida and Cazuo Kasama. Biotransformation of nitric oxide // Environmental Health Perspectives.-1987.- Vol.73.- P.201-206.
9. Laval F., Wink D.A., Laval J. A discussion of mechanisms of NO genotoxicity: implication of inhibition of DNA repair proteins // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. - 1997; 131:175-91.
10. Mirvish S.S., Wallcave L., Eagen M., Shubik P. Ascorbate -nitrite reaction: possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds // Science. - 1972; 177:65-8.
11. McKnight C.M., Smith L.M., Drummond R.S., Duncan C.W., Benjamin N. Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans // Gut. - 1997; 40:211-4.
12. Benjamin N., O'Driscoll F., Dougall H., Duncan C., Smith L., Golden M., et al. Stomach NO synthesis // Nature. - 1994; 368:502.
13. Duncan C., Dougall H., Johnston P., Green S., Brogan R., Leifert C., et al. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate // Nat. Med. - 1995; 1:6:546-51.
14. Mowat C., Carswell A., Wirz A., McColl K.E.L. Omeprazole and dietary nitrate independently affect levels of Vitamin C and nitrite in gastric juice // Gastroenterology. - 1999; 16:813-22.
15. Mirvish S.S. Inhibition by vitamins C and E of in vivo nitrosation and vitamin C occurrence in the stomach // Eur. J. Cancer Prev. - 1996; 5 Suppl 1:131-6.

16. Sarih M., Souvannavong V., Adam A. Nitric oxide syntase induced macrophage death by apoptosis // *Biochim. Biophys. Res. Commun.* - 1993. -No 3. - P.503-507.
17. Sobala G.M., Pignatelli B., Schorah C.J., Bartsch H., Sanderson M., Dixon M.F., et al. Levels of nitrite, nitrate, N-nitroso compounds, ascorbic acid and total bile acids in gastric juice of patients with and without precancerous conditions of the stomach // *Carcino genesis.* - 1991; 12:193-8.
18. Waring A.J., Drake I.M., Schorah C.J., White K.L.M., Lynch D.A.F., Axon A.T.R., et al. Ascorbic acid and total vitamin C concentrations in plasma, gastric juice, and gastrointestinal mucosa: effects of gastritis and oral supplementation // *Gut.* - 1996; 38:171-6.
19. Liu X., Miller M.J.S., Joshi M.S., Thomas D.D., Lancaster J.R. Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1998; 95:2175-9.
20. Byrne J.P., Bhatnagar S., Hamid B., Armstrong G.R., Attwood S.E.A. Comparative study of intestinal metaplasia and mucin staining at the cardia and esophagogastric junction in 225 symptomatic patients presenting for diagnostic open-access gastroscopy // *Am. J. Gastroenterol.* - 1999; 94:98-103.
21. Mirvish S.S. 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; 93:17-48.
22. Moriya A., Grant J., Mowat C., Williams C., Carswell A., Preston T., et al. In vitro studies indicate that acid catalysed generation of N-nitrosocompounds from dietary nitrate will be maximal at the gastroesophageal junction and cardia // *Scand. J. Gastroenterol.* - 2002; 37:253-61.
23. Недоспасов А.А., Беда Н.В., Биогенные оксиды азота // *Природа.* - 2005. - №7. - С.25-42.
24. Проскурняков С. Я., Коноплянников А.Г., Иванников А.И., Ссворцов В.Г. Биология окиси азота // *Успехи современной биологии.* - 1999. - Т.119. - № 4. - С.380-395.
25. Gryglewski R., Palmer R., Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelial-derived vascular relaxing factor // *Nature.* -1986. -Vol.320. - P.454-457.
26. Szabo C., Zingarelli B., O'Connor M., Salzman A.L. DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1996. - Vol.93. - No5. - P.1753-1758.
27. Beckman J., Beckman T., Chen J. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1990. - Vol.87. - P.1620-1622.
28. Van der Vliet A. et al. Interactions of peroxynitrite with human plasma and its constituents: oxidative damage and antioxidant depletion // *Biochem. J.* - 1994. - No 2. - P.295-301.
29. Бердинских Н., Король Д. Изменения белков клеточных мембран в процессе канцерогенеза, вызванного N-нитрозодиэтиламином // *Биохимия.* - 1990. -Том 55. - Выпуск 3. - С.432-436.
30. Владимиров Ю., Бобырев В. Биоантиоксиданты, облигатные факторы питания // *Вопросы медицинской химии.*-1992.- №4.- С.21-26.
31. Осипов А. Н., Азизова О. А., Владимиров Ю. В. Активные формы кислорода и их роль в организме // *Успехи биологии и химии.* - 1990. - Том 31. - С.180-208.
32. Подколзин А.А., Мегреладзе А.Г., Донцов В.И., Арутюнов С.Д., Мрикаева О.М., Жукова Е.А. Система антиоксидантной защиты организма и старение // *Профилактика старения.* - 2000. -Выпуск 3 (online)
33. Culotta E., Koshland D. NO news is good news // *Science.* - 1992. - P.1862-1865.
34. Tamir S., Tannenbaum S.R. The role of nitric oxide (NO) in carcinogenic process // *Biochimica et Biophysica Acta.* - 1996. - 1288. - P.F31-F36.
35. Padmaja S., Huie R. The reaction of nitric oxide with organic peroxyl radicals // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*- 1993.- Vol.195.- P.539-544.
36. Sandau K., Pfeilschfter J., Brune B. The balance between nitric oxide and superoxide determines apoptotic and necrotic death of rat mesangial cells // *J. Immunol.* -1997. -Vol.158. - No10. - P.4938-4946.
37. Shephard S.E., Schlatter C. and Lutz W.K. N-Nitrosocompounds: relevance to human cancer.- In: Bartels H., O'Neill I.K. and Herman R.S. (eds) // *IARC Scientific Publications.* - 1987. - No 57. - P.328-332.
38. Lancaster J., Langrehr J., Bergonia H., Murase N. EPR detection of neme nonheme iron containig protein nitrosylation by nitric oxide during rejection of rat heard allograft // *J. Biol. Chem.* -1992. - No 16. - P.10994-10998.
39. Саприн А.Н. Механизмы метаболической активации и детоксикации нитрозосоединений. Канцерогенные N-нитрозосоединения и их предшественники – образование и определение в окружающей среде: Тезисы докладов VII Всесоюзного симпозиума.- Таллин, 1990, с.71.
40. Snoz S.V. Dmitrenko N.P. Activity of the rat cytochrome P-450 system in conditions of the induction immunity and nitric oxide synthesis // *Toxicol. Lett.* - 1995. - Vol.78. - Supl. 1.- P.75-76.
41. Yang C.S., Yoo J.-S. H., Ishizaki H. Hong J. Cytochrome P-450 IIE1: roles in nitrosoamine metabolism and mechanisms of regulation // *Drug Metab. Rev.* - 1990, 22, No 2 -3. -P.147-159.
42. Xu G.P., Reed P.I. Method for group determination of total N-nitroso compounds and nitrite in fresh gastric juice by chemical denitrosation and thermal energy analysis // *Analyst.* - 1993; 118, 877-883.
43. Xu G.P., Reed P.I. N-nitroso compounds in fresh gastric juice and their relation in intragastric pH and nitrite employing an improved analytical method//*Carcinogenesis.* - 1993. - Vol.14. - No 12. - P.2547-2551.
44. Tannenbaum S.R., Moran D., Falchuk K.R., Cuello C. Nitrit stability and nitrosation potential in human gastric juice // *Canc. Lett.* - 1981. - Vol.14. - P.131-136.
45. Mirvish S. S. The etiology of gastric cancer. Intra-gastric nitrozamide formation and other theories // *J.NCI.* - 1983. - Vol.71. - No.3. - P.613-647.

46. Stockbrugger R.W., Kleinjans J.C.S. Volatile N-nitrosamines in gastric juice of patients with various conditions of the gastrointestinal tract determined by gas-chromatography – mass spectrometry and related to intragastric pH and nitrate and nitrite levels // *Canc. Lett.* - 1998. - Vol.124. - P.119-125.
47. Tricker A.R., Pfundstein R., Kalble T. Preussmann R.. Secondary amine precursors to nitrosamines in human saliva, gastric juice, blood, urine and faeces // *Carcinogenesis.* - 1992. - Vol.13. - No 4. - P.563-568.
48. Ленинджер А. Основы биохимии. - Том 3. - Москва, 1985, с.747-750.
49. Gonța M., Iambarțev V., Bejenaru I. Modelarea procesului de formare a N-nitrozaminelor în tractul digestiv. Studiul procesului de nitrozare a dimetilaminei cu nitrit-ion în prezența acidului clorhidric // Conferința științifică republicană a tinerilor cercetători „Chimia ecologică și estimarea riscului chimic”, ediția a V-a. - Chișinău: CE USM, 2001, p.62.
50. Gonța M., Iambarțev V., Paladi T. Modelarea procesului de nitrozare a dietilaminei în tractul gastrointestinal cu nitrit-ion // Conferința științifică republicană a tinerilor cercetători „Chimia ecologică și estimarea riscului chimic”, ediția a V-a. - Chișinău: CE USM, 2001, p.60.
51. Gonța M., Maidan D. Formarea N-NA în tractul gastrointestinal din amine secundare // Conferința științifică republicană a tinerilor cercetători „Chimia ecologică și estimarea riscului chimic”, ediția a VI-a. - Chișinău: CE USM, 2002, p.31.
52. Brain C. Challis, Chemistry and biology of nitrosated peptides // *Cancer Surveys.* - 1989. - Vol.8. - No 2. -P.363-384.
53. Tricher A.R., Perkins M.J., Massey R.C. McWeeny D.J. Synthesis of three N-nitroso-dipeptides N-terminal and a method for determination in food // *Food Additives and Contaminant.* - 1984. -No1. - P.307-312.
54. Guadagni Stefano, Pistoia Maria A., Valenti Marco, Leocata Pietro, Coletti Gino, Calvisi Giuseppe, Madonna Raffaella, Deraco Marcello, Reed Peter I., N-Nitroso Compounds, Bacteria, and Carcinoembryonic Antigen in the Gastric Stump // *FRACG, Journal of Surgical Research.* -Vol.80. - 1998. - Article No. Jr985444. - P.345-351.
55. Duca Gh., Gonța M., Stepanov I., Porubin D., Port A. Formation of N-nitroso compounds in gastrointestinal tract on protein ingestion // Conferința internațională la Chimie Ecologică. - Chișinău, 2002, p.316.
56. Gonța M., Porubin D., Voloc N. Formarea nitrozocompușilor la digestia proteinelor în tractul gastrointestinal // Conferința științifică studențească, ediția a VIII-a, dedicată Zilei USM. - Chișinău: CE USM, 2003, p.121.
57. Gonța M. The influence of polyphenols on n-nitrosoamines formation during proteins fermentation. The Ist international conference of the Moldavian chemical society // *Abstracts of communications, october 6-8, Chișinău, 2003, p.68.*
58. Duca Gh., Gonța M., Stepanov I., Port A., Bejenaru I., Porubin D., Voloc N. Inhibition of carcinogenic N-nitroso compounds formation in simulated gastric juice // Conferința internațională la Chimie Ecologică. - Chișinău, 2002, p.196-206.
59. Gonța M., Porubin D. Formarea nitrozaminelor la digestia proteinelor în tractul gastrointestinal // Conferința științifică republicană a tinerilor cercetători „Chimia ecologică și estimarea riscului chimic”, ediția a VI-a. - Chișinău: CE USM, 2002, p.30.
60. Gonța M., Voloc N. Studiul proceselor de transformare a proteinelor în prezența fermentului proteolitic // Conferința științifică republicană a tinerilor cercetători „Chimia ecologică și estimarea riscului chimic”, ediția a VI-a. - Chișinău: CE USM, 2002, p.25.
61. Duca M., Gonța M., Porubin D., Voloc N. Cercetări privind formarea nitrozocompușilor în sisteme model // *Analele Științifice ale USM.* - Chișinău, 2003, p.419-425.

Prezentat la 16.10.2008