

70358

T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

FENOBARBİTAL İLE İNDÜKLENMİŞ SIÇAN
KARACİĞER MİKROZOMAL MONOOKSİJENAZ
ENZİM AKTİVİTELERİNİN GÜNCİ DEĞİŞİMLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

BİYOLOG ZUHAL YILDIRIM

TEZ YÖNETİCİSİ

PROF. DR. NEDRET KILIÇ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen tez yöneticim Sayın Prof. Dr. Nedret KILIÇ' a, çalışmalarımda emeği geçen Uzm. Biyolog Mehmet KESİMER ve Uzm. Biyolog Hatice ALDEMİR' e ve Biyokimya Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üye ve yardımcılarına, Farmakoloji Anabilim Dalı' ndan Sayın Prof. Dr. Hakan ZENGİL ve öğretim görevlisi Dr. Uğur HODOĞLUGİL' e, anlayış ve yardımlarında dolayı Etimesgut Halk Sağlığı Laboratuvarı Müdürü Mik. Uzm. Dr. Emin SEVİNÇ ve çalışma arkadaşlarıma, ve son olarak en içten minnet duygularıyla yaşantımın her döneminde bana destek olan aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Zuhal YILDIRIM

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.SİTOKROM P-450'NİN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ	4
2.2.HEPATİK İLAÇ REAKSİYONLARI	8
2.3.SİTOKROM P-450 MONOOKSİJENAZ SİSTEMİ	9
3.GEREÇ VE YÖNTEM	12
3.1.KULLANILAN GEREÇLER	12
3.1.1.Deney Hayvanları	12
3.1.2. Kullanılan Araçlar	12
3.1.3.Kullanılan Kimyasal Maddeler	13
3.2.UYGULANAN YÖNTEMLER	14
3.2.1.Deney Hayvanlarının Hazırlanması	14
3.2.2.Homojenatların Hazırlanması	15
3.2.3.Yöntemlerin Uygulanması	17
3.2.3.1. 7-Etoksiresorfin O-deetilaz Aktivitesinin Saptanması	17
3.2.3.2. 7-Etoksikumarin O-deetilaz Aktivitesinin Saptanması	21
3.2.3.3.Etilmorfin N-demetilaz Aktivitesinin Saptanması	23
3.2.3.4.Protein Tayini	27
3.3.SONUÇLARIN ANALİZİ	31
4.BULGULAR	32
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	38
6.ÖZET	41
7.YABANCI DİLDE ÖZET	43
8.KAYNAKLAR	45

1.GİRİŞ

Son yirmibeş yıl içindeki çalışmalarda belirtildiği gibi ilaçların etkileri ve farmakokinetikleri gün ve hatta yıl içindeki uygulama zamanlarının bir fonksiyonu olarak değişmektedir ⁽¹⁾. Bu gelişmeler kronofarmakoloji kavramının gündeme gelmesine neden olmuştur. Bu yeni alandaki çalışmalar aşağıdaki belli noktalarda yoğunlaşmaktadır:

1. Uygulama zamanının ilaç etkisinde yaptığı değişimler,
2. İlaçların etkinlikleri ve toksisitelerindeki bu geçici değişimlerin mekanizmaları,
3. Biyolojik ritimlerin tedavi alanındaki uygulamaları.

İlaçların kinetiklerinin ve bir hedef organın sabit bir ilaca olan hassasiyetinin zamana bağlı değişimlerinin incelenmesi ilaçların etkilerinin zamanın bir fonksiyonu olduğunun ortaya konulmasını sağlamaktadır. Kronofarmakolojik çalışmalar, ilaçların absorpsiyonu, dağılımı, metabolizması ve atılımında rol oynayan bazı fizyolojik fonksiyonlar ve değişkenlerin gün içinde farklılaştığını göstermektedir. Ancak en üst ve en alt değişim limitleri 24 saatlik zaman içinde rastgele olarak izlenmemektedir. Aksine, son derece iyi ayarlanmış ve düzenleyici mekanizmalar (biyolojik zamanlayıcılar ve osilatörler) tarafından kontrol

edilen bir zamanlama söz konusudur. Bu düzenleme içinde rol alan elemanların birbirine bağıntılı olduğu ve bir düzen içinde fonksiyon gördükleri düşünülmektedir^(2,3). Böylece bir ilacın kinetiği bir uygulama zamanından bir diğerine farklılık göstermekte ve ilaçların etkileri veya kinetiklerindeki sirkadien değişimler sadece midede besin oluşu, hastalıklar veya ilaç etkileşimleri gibi dış faktörlerle açıklanamamaktadır.

İlaç metabolizmasının birçok reaksiyonları esas olarak düz endoplazmik retikulumda bulunan çok unsurlu bir elektron transport sistemi tarafından yürütülür. Bu sistem “Mikrozomal Monooksijenaz” veya “Karışık Fonksiyonlu Oksidaz Sistemi” olarak bilinmektedir. Karaciğer hücresi mikrozom fraksiyonu ksenobiyotikleri metabolize eden Faz I ve Faz II olarak gruplandığımız enzim aktivitelerini içermektedir^(4,5). Sitokrom P-450 karışık fonksiyonlu oksidaz enzimleri Fazı I enzimleri grubunda yer almaktadır⁽⁶⁾.

Sitokrom P-450 monooksijenaz sistemiyle katalizlenen oksidatif reaksiyonlar, toksik kimyasal ajanlar ve ilaçların zehirleştirilmesi için major bir yoldur. Vücuttan temizlenmeleri direkt olarak bu oksidatif reaksiyonların hepatik işleyişine bağlı olan antiprin, fentoin, teofilin, tolbutamid ve warfarin gibi önemli ilaçlar; bu enzimlerin kronobiyolojik varyasyonlarıyla uyumlu olarak metabolize olurlar^(7,8). Dahası karaciğerdeki bu transformasyonlar aynı zamanda bu ilaçlar oral olarak alındığında ilk

etap eliminasyonundan da sorumludurlar. Yani propanolol, kalsiyum antagonistleri ve birçok analjezik ve antihistaminik ajanlar gibi ilaçların oral bio-yararlılıkları, bu karaciğer proseslerinin zamana bağlı varyasyonları tarafından etkilenebilmektedir ^(9,10,11).

Yapılan literatür taramalarında ilaçların farmakokinetik özelliklerinde uygulama zamanına bağlı değişiklikler olduğu tespit edilmiştir. Bu değişikliklerin bir kısmının nedeni ilaç metabolizmasında rol oynayan enzimlerin aktivitesindeki g n   ritimlerdir.

Bu bilgilerin ışığı altında çalışmamızda 24 saat süreyle dörder saatlik periyotlarda deney hayvanı grupları oluşturarak sitokrom P-450 karışık fonksiyonlu oksidaz Faz I enzimlerinden Etilmorfin N-demetilaz, 7-Etoksikumarin O-deetilaz ve 7-Etoksiresorfin O-deetilazın aktivitelerinin g n   ritmik de i imlerinin uzun tesir süreli barb tiratlardan olan fenobarbitalle indüklenmesinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Bilindiği üzere karaciğer memelilerde en önemli organlardandır ve birçok kompleks metabolik fonksiyonları görmektedir. Bunlar arasında karbohidrat, lipit, mineral ve proteinlerin depolanması ve metabolizması, hormon ve vitaminlerin metabolizması, safra oluşumu, kan koagülasyon faktörlerinin ve plazma proteinlerinin sentezi sayılabilir ^(3,4). Karaciğerin fonksiyonlarından en önemlilerinden birisi de ilaç ve toksik ajanların irreversibl transformasyonları ve bunların safra ve idrarla atılmasının sağlanmasıdır. Bazı durumlarda karaciğer bu eksojen komponentleri farmakolojik olarak aktif ürünlere ya da kimyasal ara ürünlere metabolize eder. Bu ara ürünler de biyolojik makromoleküllerle reaksiyona girerek hücre nekrozuna ve mutasyon yoluyla kansere neden olabilirler ^(5,6).

Yaklaşık son 25 yıldır laboratuvarlarda insan ve hayvanlarda yapılan deneylerde, İlaç ve kimyasalların toksisitesinin farmakokinetiğinin büyük oranda sirkadien ve diğer temporal farklılıklardan ileri geldiği rapor edilmiştir⁽¹²⁾.

2.1. Sitokrom P-450'nin Moleküler Biyolojisi

1962 yılında Omura ve Sato adlı araştırmacılar karbonmonoksit bağımlı hemoprotein olan sitokrom P-450'yi bulmuştur ⁽¹³⁾.

Sitokrom P-450 spektrofotometrik yöntemlerle saptanmaktadır. İndirgenmiş hemoprotein karbonmonoksitle birleşir ve 450 nm'de maksimum değere ulaşan karakteristik bir spektrum verir ⁽¹⁰⁾.

Sitokrom P-450 hemoglobin gibi bir hemoproteindir. Karaciğerin endoplazmik retikulum membranlarında en yüksek miktarlarda yer alır, bu membranlarda varolan total proteinin yaklaşık % 20'sini oluşturur. Aynı zamanda diğer dokularda da mevcuttur. Adrenalde, endoplazmik retikulumun yanısıra mitokondrilerde de bulunur.

Sitokrom P-450'nin reaksiyon metabolizmasında katılan NADPH'ın (indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) büyük rolü vardır.

Okside sitokrom P-450'den indirgenmiş P-450'yi açığa çıkarmak için NADPH'tan yararlanan enzim sitokrom P-450 redüktazdır. Bu enzim sitokrom P-450 sisteminin önemli bir komponentidir. Lipitler de sitokrom P-450 sisteminin komponentleridir. Tercih edilen lipit, endoplazmik retikulum membranlarının temel lipiti olan fosfatidilkolindir.

Sitokrom P-450'nin çoğu türleri indüklenebilir özelliktedir. Örneğin, fenobarbital veya diğer ilaçların uygulanması düz endoplazmik retikulumda bir hipertrofiye ve 4-5 gün içerisinde sitokrom P-450'nin miktarında 3-4 misli bir artışa neden olur. İndüksiyon mekanizması geniş

olarak incelenmiştir ve sitokrom P-450'ye ait mRNA'nın (messenger ribonükleik asit) transkripsiyonunda bir artışı kapsamaktadır.

Sitokrom P-450'nin türlerinden biri olan sitokrom P-448'in karakteristik emilim maksimumu 450 nm değil 448 nm'dir. Bu tür, polisiklik aromatik hidrokarbonlar için nispeten spesifiktir, bundan ötürü de aromatik hidrokarbon hidroksilaz diye adlandırılır. Bu enzim polisiklik aromatik hidrokarbonlardan oluşan karsinogeneziste çok önemlidir ⁽¹⁴⁾.

Bir hemoprotein olan sitokrom P-450 mikrozomal, mitokondriyal ve sitozolik NADPH bağımlı elektron transport yolunda terminal monooksijenaz olarak rol oynar ⁽¹⁵⁾.

Her memeli genomunda en az elli P-450 geni değişik kromozomlarda lokalize olmuştur. Steroitler, yağ asitleri, vitamin D₃, ilaçlar, çevre kirleticileri, toksidanlar ve kimyasal karsinojenler olarak bilinen ksenobiyotikler sitokrom P-450 sistemi tarafından metabolize edilirler ⁽¹⁶⁾.

Bir kısım P-450 enzim sistemi ise detoksifikasyonda rol oynar ve lipofilik ksenobiyotikleri suda çözülebilen formlara dönüştürür. Bu reaksiyonlardaki ürünlerin bazıları kimyasal olarak anstabil ve karsinogeneze neden olabilirler ⁽¹⁵⁾.

Günümüzde ikiyüzyirmiden fazla farklı sitokrom P-450 formlarının primer yapısı bilinmektedir ⁽¹⁷⁾. Bunlardan sadece bir formunun üç boyutlu yapısı bilinmektedir. Bu form sitokrom P-450_{cam} olarak tanımlanmıştır ⁽¹⁸⁾. Bu form *Pseudomonas putida*'dan izole edilmiştir. Diğer bakteriyel sitokrom P-450 ise kristalize edilmiştir. Bu form da sitokrom P-450_{terp} diye isimlendirilmiştir ⁽¹⁹⁾. Diğer izole edilen üçüncü bakteriyel sitokrom P-450 ise fizyon protein sitokrom P-450_{BM3}'ün hemoprotein unsurudur ⁽²⁰⁾.

Bütün ökaryotlarda P-450 mikrozomal veya mitokondriyal membranlara bağlı olarak bulunmaktadır. Diğer yandan bütün bakteriyel P-450'ler ise sitozolik solubl proteinlerdir. Mikrozomal P-450 membrana bağlı flavoproteinlerden elektron alır. Mitokondriyal P-450 ise bakteriyel P-450 gibi solubldır ve demir-sülfür proteinlerinden elektron alır. Solubl olması nedeniyle bakteriyel P-450 proteinlerini saflaştırmak ökaryotik proteinlerden daha kolaydır ⁽¹⁸⁾.

Sitokrom P-450 aromatik bölgelerin bulunup bulunmadığına bağlı olarak başlıca E ve B grubu olmak üzere iki gruba ayrılır. E grubu aromatik bölge içerirken B grubu aromatik bölge içermez ⁽¹⁵⁾.

2.2.Hepatik İlaç Reaksiyonları

Karaciğer ilaç metabolizmasında majör organdır. Karaciğer hücrelerinde bu reaksiyonları katalize eden enzimlerin lokalizasyonu ve genel yolakları Tablo 1’de özetlenmiştir. Enzimatik reaksiyonlar kimyasal olarak; oksidatif, redüktif, hidrolitik ve konjugatif olarak sınıflandırılırlar. Tüm bu karaciğer enzimlerinin genel bir özelliği bunların substrata karşı spesifik olmalarıdır.

Tablo 1: Hepatik ilaç metabolizmasının genel yolları ⁽⁶⁾.

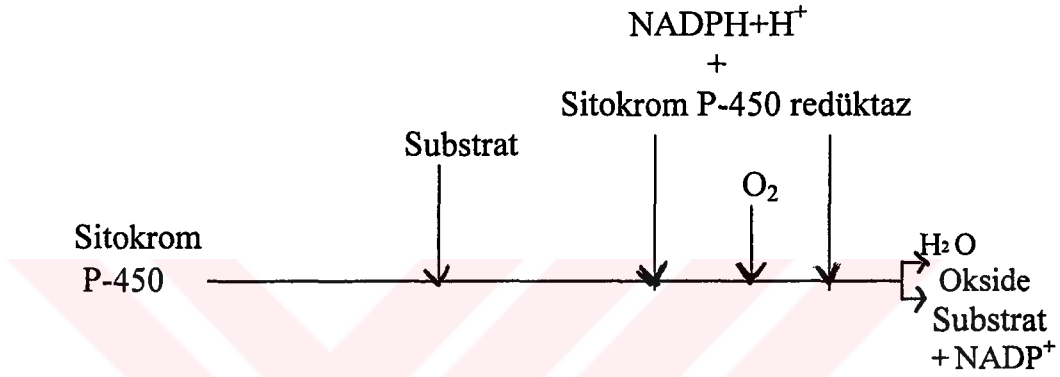
REAKSİYONLAR	ENZİMLERİN HÜCRESEL YERLERİ
OKSİDASYONLAR	
Alifatik hidroksilasyon	Mikrozomlar
Aromatik hidroksilasyon	Mikrozomlar
N-, O- ve S-dealkilasyon	Mikrozomlar
N- ve S- oksidasyon	Mikrozomlar
Deaminasyon	Mikrozomlar, Mitokondri
Epoksidasyon	Mikrozomlar
REDÜKSİYONLAR	
Keton redüksiyonu	Mikrozomlar, Sitozol
Nitro redüksiyon	Mikrozomlar
HİDROLİZLER	
Deesterifikasyon	Mikrozomlar, Sitozol, Lizozom
Deamidasyon	Mikrozomlar, Sitozol
KONJUGASYONLAR	
Asetilasyon	Sitozol
Glukuronidasyon	Mikrozomlar
Glutasyon Konjugasyonu	Sitozol
Glisin Konjugasyonu	Mitokondri
Sülfat Konjugasyonu	Sitozol

2.3. Sitokrom P-450 Monooksijenaz Sistemi

Tablo 1’de görülen ilaç metabolizmasının bu reaksiyonları esas olarak düz endoplazmik retikulumda bulunan çok unsurlu bir elektron transport sistemi tarafından yürütülür. Bu sistem “Mikrozomal Monooksijenaz” veya “Karışık Fonksiyonlu Oksidaz Sistemi” olarak bilinmektedir. Karaciğer hücresi mikrozom fraksiyonu ksenobiyotikleri metabolize eden Faz I ve Faz II olarak gruplandığımız enzim aktivitelerini içermektedir ⁽¹⁰⁾. Sitokrom P-450 karışık fonksiyonlu oksidaz enzimleri grubunda yer almaktadır. Bu enzim sistemi saflaştırılmış ve iki ana unsurdan oluştuğu bulunmuştur. Bunlar, sitokrom c-redüktaz ve bunlara ilaveten aynı zamanda bir fosfolipit (majör olarak fosfatidilkolin) içerir. Bunlar ksenobiyotiklerin ve ilaçların mikrozomal oksidasyonlarının katalizlenmesi için temel unsurlardır.

Monooksijenaz sisteminin reaksiyon basamakları Şekil 1’de görüldüğü gibi yürümektedir. İlk önce yağda çözünen substrat, sitokrom P-450’nin okside formuna bağlanır ve bu kompleks bir elektron taşıyıcısı olarak görev yapan sitokrom P-450 redüktaz ve NADP’nin redükte formundan kaynaklanan bir elektronu alarak redükte olur. Sonra atmosferik oksijen redüklenmiş komplekse bağlanır ve böylece kompleks ikinci bir reaksiyona uğrar. Bundan sonra bir mol H_2O ve okside substrat spontan olarak enzimatik kompleksten salınır. Bu işlemden sonra sitokrom P-

450'nin okside formu ve kofaktörü rejenere olarak yeni bir reaksiyon için hazır olur. Bu işlemde fosfolipitler, farklı unsurların bağlanmasını ve P-450 kompleksine redüktazdan elektron transferini kolaylaştırır.



Şekil 1: Sitokrom P-450'nin katalizlediği reaksiyonların şematik gösterimi ⁽⁶⁾.

Özetle Sitokrom P-450 monooksijenaz sistemiyle katalizlenen oksidatif reaksiyonlar, toksik kimyasal ajanlar ve ilaçların zehirleştirilmesi için majör bir yoldur. Vücuttan temizlenmeleri direkt olarak bu oksidatif reaksiyonların hepatik işleyişine bağlı olan antiprin, fentoin, teofilin, tolbutamid ve warfarin gibi önemli ilaçlar, bu enzimlerin kronobiyolojik varyasyonlarıyla uyumlu olarak metabolize olurlar. Dahası, karaciğerdeki bu transformasyonlar aynı zamanda bu ilaçlar oral olarak alındığında ilk etap eliminasyonundan da sorumludurlar. Yani propanolol,

kalsiyum antagonistleri ve birçok analjezik ve antihistaminik ajanlar gibi birçok ilaçların oral biyo-yararlılıkları, bu karaciğer proseslerinin zamana bağlı varyasyonları tarafından etkilenebilmektedir ^(7,8,9).



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.KULLANILAN GEREÇLER

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışma için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı hayvan laboratuvarlarından temin edilen 200-250 gram ağırlığındaki erkek sıçanlar kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Araçlar

Homojenizatör (Virtis)

Yüksek devirli soğutmalı santrifüj (Damon IEC B-20 A)

Düşük devirli soğutmalı santrifüj (Hermle)

Dual-beam Spektrofotometre (Milton Roy Spectronic 3000)

Spektrofluorometre (Jasco FP-550)

Çalkamalı su banyosu (Heto Maxi Shake)

Vorteks karıştırıcı (Heidolh Reax 2000)

Sonikatör (Virtix-Virsonic 50)

Hassas dijital terazi (libror AEG-220)

Ph metre (Nel Ph 896)

Ultrasonik su banyosu (Transultrasonic 660-H)

Sıvı azot tankları

Biyokimyasal analizler için gerekli olan diğer malzemeler

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

NADP (Sigma), DL-isositrik asit (Sigma), isositrik dehidrogenaz (Sigma), 7-Etoksikumarin (Sigma), 7-OH-Kumarin (Sigma), 7-Etoksiresorfin (Sigma), 7-OH-resorfin (Sigma), Semikarbazit (Sigma), Etilmorfin hidroklorit (Sigma), Formaldehit (Merck), Tris (Sigma), Amonyum asetat (Sigma), Glasial asetik asit (Merck), Redistile asetilaseton (Merck), Çinko sülfat (Sigma), HCl (Merck), Baryum hidroksit (Sigma), Sodyum klorür (Merck), Sodyum hidroksit (Merck), Magnezyum sülfat (Merck), Sodyum karbonat (Sigma), Bakır sülfat (Merck), Glisin (Sigma), Potasyum tartarat (Sigma), Folin ve Ciocalteu'nun fenol reaktifi (Sigma).

3.2. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Bu çalışma için 200-250 gram ağırlığındaki erkek sıçanlar kullanıldı.

Sıçanlar doğumlarından itibaren 12 saat karanlık - 12 saat aydınlık (ışıklar 08⁰⁰-20⁰⁰ arası açık) olacak şekilde ışıklandırılan (ışık şiddeti yaklaşık 10 lüx), sıcaklığı 22-24° C de tutulan, sürekli havalandırılan bir laboratuvar da tutuldu. Genetik homojenliği sağlamak amacıyla dışarıdan getirilen hiç bir sıçan üretime katılmadı ve en az 20 jenerasyon kendi içlerinde çiftleştirildi. Ritmisiteyi etkilememek amacıyla yemek ve sularının değiştirilmesi sabah 09⁰⁰-11⁰⁰ saatleri arasında yapıldı.

Sıçanlara 75 mg/kg/gün günde tek kez olacak şekilde dört gün üst üste fenobarbital verilerek enzim indüksiyonu yapıldı ⁽¹⁾. Enjeksiyonlar saat 13⁰⁰-14⁰⁰ arasında yapıldı ve dördüncü enjeksiyonu takip eden gün sabah 09⁰⁰ dan itibaren eter anestezi altında karaciğerleri izole edildi. Kan ürünlerinden ayırmak için soğuk serum fizyolojik (izotonik NaCl) içinde yıkandı, spanan arasında fazla suları alındı, alüminyum folyolara sarılarak sıvı azot içersine atıldı (tüm bu işlem anestezi→ sıvı azot süresi hayvan başına 2 dakikadan daha az sürdü).

Kontrol hayvanlarının hafta içerisinde başka bir 24 saatlik periyotta karaciğerleri izole edildi. Kontrol ve fenobarbital alan hayvanlar 09⁰⁰, 13⁰⁰, 17⁰⁰, 21⁰⁰, 01⁰⁰ ve 05⁰⁰ saatlerinde kesildi. Her grupta kontrol için 6-8, fenobarbital ile indüklenen grupta 8-11 hayvan bulunmaktadır.

Gruplara rastgele numaralar verilerek Etilmorfin N-demetilaz, 7- Etoksikumarin O-deetilaz ve 7-Etoksiresorfin O- deetilaz enzim aktiviteleri çalışılırken randomizasyon sağlanmıştır (tek kür uygulama).

3.2.2. Homojenatların Hazırlanması ⁽¹⁰⁾

Sıvı nitrojenden çıkarılan karaciğerler homojenizasyon işlemine tabi tutuldu. Bunun için ağırlığı kaydedilen her bir karaciğer, ağırlığının % 25'i kadar homojenizasyon sıvısı ile homojenize edildi. Her bir karaciğer için homojenizatörle 40 devirde beş vuruş uygulandı.

Homojenize edilen karaciğer 0.1 g taze doku/ml olacak şekilde dilüe edilerek 10000 g'de 2-4 °C'de 20 dakika santrifüj edildi. Post-mitokondriyal süpernatant alındıktan sonra volümü kaydedilerek bundan sonra yapılacak enzim aktivitelerinin ölçümleri için kullanıldı.

Bu çalışmada sitokrom P-450 karışık fonksiyonlu oksidaz Faz I enzimlerinden Etilmorfin N-demetilaz, 7- Etoksikumarin O-deetilaz ve

aktivitelerinin saptanması için reaksiyon ortamları Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2: Ölçümü yapılan karışık fonksiyonlu oksidaz enzimlerinin inkübasyon ortamları ⁽¹⁰⁾.

TÜR	Etilmorfin N- demetilaz	7-Etoksikumarin O- deetilaz	7-Etoksiresorfin O- deetilaz
	Sıçan	Sıçan	Sıçan
SUBSTRAT (mM)	5.0	5.0	0.0005
K NADP⁺(mM)	0.5	0.75	0.5
O DL- isositrik asit (mM)	3.75	7.5	7.5
F İsositrik dehidrogenaz	1	1	1
A (Ünite)			
K Mg SO₄ (mM)	5	5	5
T			
Ö			
R			
L			
E			
R			
Tampon pH (50 mM Tris-HCl)	8.2	7.8	8.4
Doku Volümü	0.1	0.05	0.05

Toplam inkübasyon hacmi 2 ml’dir.

Numuneler 37 °C’de 10 dakika süreyle çalkalamalı su banyosunda inkübe edilerek ileri işlemlere tabi tutuldu.

Etilmorfinin N- demetilasyonu sonucunda açığa çıkan formaldehitin semikarbazit tarafından tutulması sonucu oluşan Hantzsch reaksiyonu kolorimetrik olarak saptandı⁽¹⁰⁾.

7-Etoksikumarinin O-deetilasyonu sonucunda oluşan 7-hidroksikumarin fluorometrik olarak saptandı ⁽¹⁰⁾.

7-Etoksiresorfinin O-deetilasyonu sonucunda oluşan resorfin fluorometrik olarak saptandı ⁽¹⁰⁾.

Postmitokondriyal süpernatanın protein miktarı bovine serum albumini (BSA)'nın standart olarak kullanıldığı Lowry metoduna göre çalışıldı ⁽¹⁰⁾.

3.2.3. Yöntemlerin Uygulanması

3.2.3.1. 7-Etoksiresorfin O-deetilaz Aktivitesinin Saptanması ⁽¹⁰⁾

7-Etoksiresorfinin O-deetilasyonu resorfinin oluşumu ile sonuçlandı ve oluşan resorfin fluorometrik olarak saptandı.

a. Reaktifler

5 mM 7-Etoksiresorfin

Stok substrat -20°C'de saklandı. Bir parça 7-Etoksiresorfin, 50 mM Tris-HCl tamponunda (pH 8.4) 5 ml eklenerek çözüldü. Bu işlem ultrasonik su banyosunda 10-15 dakika yapıldı. Bunun absorbansı 400-800 nm'de çift ışıklı spektrofotometrede saptandı ve maksimum absorbansı 482 nm'de tespit edildi.

Substrat konsantrasyonu şöyle hesaplandı:

$$\text{Substrat konsantrasyonu (nmol/ml)} = \frac{A_{482\text{nm}}}{1} \times \frac{1000}{22.5}$$

Bu konsantrasyona göre 50 mM Tris-HCl ile son konsantrasyon 5 nmol/ml'ye ayarlandı.

Resorfin Standardı

Katı resorfin standartı oda ısısında ve stok solusyon etanolde +4°C'de saklandı. 50 mM Tris-HCl ile etanoldeki solusyon 5 ml'ye tamamlandı, absorbansı 572 nm'de saptandı ve substrat konsantrasyonu şöyle hesaplandı.

$$\text{Substrat konsantrasyonu (nmol/ml)} = \frac{A_{572\text{nm}}}{1} \times \frac{1000}{40}$$

50 mM Tris-HCl ile (pH 8.4) son konsantrasyonu 5nmol/ml'ye ayarlandı. Solusyon ışığa duyarlı olduğundan taze hazırlandı.

0.5 M Glisin-NaOH Tamponu pH 8.5

37.54 g glisin 600 ml distile su içinde çözüldü ve NaOH ile pH8.5'a ayarlandı. Daha sonra distile su ile 1 lt'ye tamamlandı.

50 mM TrisHCl tamponu pH 8.4

% 5 (w/v) ZnSO₄

50 g ZnSO₄. 7H₂O 1lt distile suda çözüldü.

Satüre Baryum Hidroksit

Çözünmüş karbondioksiti çıkarmak için distile su kaynatıldı ve aşırı miktarda katı baryum hidroksit eklendi. Karışım bir süre hafifçe kaynatıldı ve soğumaya bırakıldı, filtre edildi ve sıkıca kapatılmış bir kapta saklandı.

Kofaktör Çözeltisi

Tablo 2’de belirtildiği şekilde hazırlandı.

1. Deneyin Yapılışı

10 ml’lik test tüpleri buz üzerindeki spora yerleştirildi. Her mikrozom fraksiyonu için iki standart tüp, bir kör tüpü ve iki test tüpü hazırlandı. Tüplere 1 ml kofaktör ve 0.05 ml doku homojenatı ilave edildi. Test ve kör tüplerinde total volümün 1.8 ml olması için 0.75 ml pH 8.4 olan Tris-HCl tamponu konurken standart tüplerde total volümün 1.6 ml olması için 0.55 ml pH 8.4 Tris-HCl tamponu ilave edildi. Tüpler vortekslendi ve 37°C’de 5 dakika çalkalayıcı su banyosunda ön inkübasyona tabi tutuldu. Sonra sadece test tüplerine 0.1 ml 7-Etoksiresorfin substratı ilave edildi. Tüm tüpler vortekslenerek 37 °C’de 10 dakika çalkalayıcı su banyosunda

inkübe edildi. Su banyosundan çıkarılan spor buz çantasındaki buz kalıpları üzerine konuldu. Tüm tüplere 1 ml % 5'lik (w/v) ZnSO₄ ve 1ml satüre baryum hidroksit ilave edildi. Kör ve standart tüplere 0.1 ml 7-Etoksiresorfin substratı ve standart tüplere 0.2 ml resorfin standardı ilave edildi. Tüpler tekrar vortekslenerek +4°C'de 2000g'de 15 dakika soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi ve 1 ml süpernatant alındı. Alınan süpernatanta pH 8.5 olan 0.5 M glisin-NaOH'den 2 ml ilave edildi ve tüpler tekrar vortekslendi.

535 nm eksitasyon ve 582 nm emisyonunda fluorometrede ölçüm yapıldı.

c. Hesaplama

7- Etoksiresorfin O-deetilaz aktivitesi (nmol/dak/ml doku) aşağıdaki şekilde hesaplandı:

$$\frac{\text{Floresans (test - kör)}}{1} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{\text{Ölçülen doku volümü (ml)}} \times \frac{\text{Standart solüsyonun konsantrasyonu (nM)} \times 0.2}{\text{Floresans (standart -kör)}}$$

Standart solüsyonun konsantrasyonu 5 nM olarak değerlendirildi.

Hesaplanan değer numunenin mg protein miktarına bölünerek enzim aktivitesi nmol/dak/mg protein olarak hesaplandı ve tüm aktiviter bu birim altında değerlendirildi.

3.2.3.2. 7-Etoksikumarin O-deetilaz Aktivitesinin Saptanması ⁽¹⁰⁾

7- Etoksikumarinin O-deetilasyonu 7- hidroksikumarin oluşumu ile sonuçlandı. Oluşan 7- hidroksikumarin fluorometrik olarak saptandı.

a. Reaktifler

2mM Etoksikumarin için 50 mM Tris-HCl Tamponu pH 7.8

0.380 mg/ml 7-Etoksikumarin 50 mM Tris HCl tamponunda çözülerek pH 7.8 'e ayarlandı. 37 °C'de korundu ve taze hazırlandı.

0.1 mM 7-Hidroksikumarin

40.5 mg 7- hidroksikumarin 50 ml etanolde çözülüp 5 ml'si distile su ile 250 ml'ye tamamlandı ve taze hazırlandı.

0.5 M Glisin-NaOH pH 10.5

37.54 g glisin 600 ml distile su içinde çözüldü ve NaOH ile pH 10.5'a ayarlandı. Daha sonra distile su ile 1 lt'ye tamamlandı.

% 5 (w/v) ZnSO₄

Satüre Baryum Hidroksit

Kofaktör Çözeltisi

Tablo 2’de belirtildiği şekilde hazırlandı.

1. Deneyin Yapılışı

10 ml’lik test tüpleri buz üzerindeki spora yerleştirildi. Her mikrozom fraksiyonu için iki standart tüp bir kör tüpü ve iki test tüpü hazırlandı. Tüplere 1 ml kofaktör ve 0.05 ml doku homojenatı ilave edildi. Test ve kör tüplerinde total volümün 1.5 ml olması için 0.45 ml pH 7.8 olan Tris-HCl tamponu konurken standart tüplerde total volümün 1.4 ml olması için 0.35 ml pH 7.8 Tris-HCl tamponu ilave edildi. Tüpler vortekslendi ve 37°C’de 5 dakika çalkalayıcı su banyosunda ön inkübasyona tabi tutuldu. Sonra sadece test tüplerine 0.5 ml 7-Etoksikumarin substratı ilave edildi. Tüm tüpler vortekslenerek 37 °C’de 10 dakika çalkalayıcı su banyosunda inkübe edildi. Su banyosundan çıkarılan spor buz çantasındaki buz kalıpları üzerine konuldu. Tüm tüplere 1 ml % 5’lik (w/v) ZnSO₄ ve 1ml satüre baryum hidroksit ilave edildi. Kör ve standart tüplere 0.5 ml 7-Etoksikumarin substratı ve standart tüplere 0.1 ml 7-hidroksikumarin standardı ilave edildi. Tüpler tekrar vortekslenerek +4°C’de 2000 g’de 15 dakika soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi ve 1 ml süpernatant alındı.

Alınan süpernatana pH 10.5 olan 0.5 M glisin-NaOH'den 2 ml ilave edildi ve tüpler tekrar vortekslendi.

380 nm eksitasyon ve 452 nm emisyonunda fluorometrede ölçüm yapıldı.

c. Hesaplama

7- Etoksikumarin O-deetilaz aktivitesi (nmol/dak/ml doku) aşağıdaki şekilde hesaplandı:

$$\frac{\text{Floresans (test - kör)}}{1} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{\text{Ölçülen doku volümü (ml)}} \times \frac{10}{\text{Floresans (standart - kör)}}$$

Hesaplanan değer numunenin mg protein miktarına bölünerek enzim aktivitesi nmol/ dak /mg protein olarak hesaplandı ve tüm aktiviteler bu birim altında değerlendirildi.

3.2.3.3. Etilmorfin N- demetilaz Aktivitesinin Saptanması ⁽¹⁰⁾

Etilmorfin N- demetilasyonu ile oluşan formaldehitin semikarbazit tarafından tutulması Hantysch reaksiyonu ile kolorimetrik olarak saptandı.

a. Reaktifler

50 mM Etilmorfin Hidroklorit Substratı

19.3 mg/ml olacak şekilde distile suda hazırlandı.

Formaldehit Standart Solüsyonu

Ticari formaldehit solüsyonunun distile suyla 10000 kat dilüe edilmesiyle standart stok solusyonu hazırlandı.

50 mM Tris-HCl tamponu pH 8.2

50 mM Semikarbazit Hidroklorit

557.7 mg semikarbazit hidroklorit yaklaşık olarak 60 ml distile suda çözüldü ve pH 7'ye NaOH ile ayarlandı. pH 7'ye ayarlandıktan sonra toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Nash Reaktifi

Stok solüsyon, 308.3 gr amonyum asetat 1 lt distile suda % 0.6 glasiyal asetik asit içerecek şekilde hazırlandı. Çalışmadan hemen önce bu amonyum asetat-asetik asit stok solüsyonunun 100 ml'sinde 0.4 ml iki kere distile edilmiş asetilaseton çözüldü.

% 5 (w/v) $ZnSO_4$

Satüre Baryum Hidroksit

Kofaktör Çözeltisi

Tablo 2’de belirtildiği şekilde hazırlandı.

1. Deneyin Yapılışı

10 ml’lik test tüpleri buz üzerindeki spora yerleştirildi. Her mikrozom fraksiyonu için iki standart tüp, bir kör tüpü ve iki test tüpü hazırlandı. Bütün tüplere sırasıyla 0.2 ml semikarbazit, 1 ml kofaktör ve 0.1 ml doku homojenatı ilave edildi. Test ve kör tüplerinde total volümün 1.8 ml olması için 0.5 ml pH 8.2 olan Tris-HCl tamponu konurken standart tüplerde total volümün 1.5 ml olması için 0.2 ml pH 8.2 Tris-HCl tamponu ilave edildi. Tüpler vortekslendi ve 37°C’de 5 dakika çalkalayıcı su banyosunda ön inkübasyona tabi tutuldu. Sonra sadece test tüplerine 0.2 ml etilmorfin substratı ilave edildi. Tüm tüpler vortekslenerek 37 °C’de 10 dakika çalkalayıcı su banyosunda inkübe edildi. Su banyosundan çıkarılan spor buz çantasındaki buz kalıpları üzerine konuldu. Tüm tüplere 1 ml % 5’lik (w/v) ZnSO₄ ve 1ml satüre baryum hidroksit ilave edildi. Kör ve standart tüplere 0.2 ml etilmorfin substratı ve standart tüplere 0.3 ml formaldehit standardı ilave edildi. Tüpler tekrar vortekslenerek +4°C’de 2000 g’de 15 dakika soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi ve 2 ml süpernatant alındı. Alınan süpernatana 2 ml Nash reaktifi ilave edildi. Ayrıca formaldehit standardının kalibrasyonu yapıldı. Bunun için dört tüp

hazırlandı. İlk tüpümüz kontrolümüz olup 2 ml distile su konuldu. Diğer üç tüpe ise 1.8 ml distile su ve 0.2 ml formaldehit standardı konuldu. Daha sonra tüm tüplere 2 ml Nash reaktifi ilave edildi. Tüm tüpler vortekslenerek 37 °C’de 1 saat çalkalayıcı su banyosunda inkübe edildi. Su banyosundan çıkarılan tüpler vortekslendi.

412 nm absorbandsda spektrofotometrede ölçüm yapıldı ve üçlü standart absorbandsın ortalaması alındı.

c. Hesaplama

Çalışma standart solusyonun formaldehit konsantrasyonu, formaldehitin Nash reaktifi ile oluşturduğu renkli kompleksin 8 cm²/nmol olan ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplandı.

$$\frac{A_{412\text{nm}} (\text{kalibrasyon standardı} - \text{kör})}{1} \times \frac{1}{8} \times \frac{4}{0.2}$$

Formaldehit standardının konsantrasyonu 1.2 mM olarak bulundu. Bu değer 1- 1.5 mM uygunluk sınırları içinde bulundu.

Etilmorfin N-demetilaz aktivitesi (nmol/dak/ml doku) aşağıdaki şekilde hesaplandı:

$$\frac{A_{412\text{nm}} (\text{test} - \text{kör})}{1} \times \frac{1}{\text{Ölçülen doku volümü (ml)}} \times \frac{\text{Standart solüsyonun konsantrasyonu (mM)} \times 0.3}{A_{412\text{nm}} (\text{standart} - \text{kör})}$$

Hesaplanan değer numunenin mg protein miktarına bölünerek enzim aktivitesi nmol/dak/mg protein olarak hesaplandı ve tüm aktiviteler bu birim altında değerlendirildi.

3.3.3.4. Protein Tayini

Postmitokondriyal süpernatanın protein miktarı bovine serum albumini (BSA) 'nin standart olarak kullanıldığı Lowry metoduna göre çalışıldı⁽¹⁰⁾.

a. Reaktifler

0.5 M NaOH

20g NaOH, 1000 ml distile su içerisinde çözüldü

% 2 (w/v) Na₂CO₃

40g Na₂CO₃, 2000 ml distile suda çözüldü

500 µg/ml Bovine Serum Albumin

50 mg bovine serum albumin, 100 ml 0.5 M NaOH içinde çözüldü.

Folin Ciocalteu's Fenol Reaktifi

Stok ticari reaktif, distile su ile 1/1 oranında seyretildi.

Lowry Reaktifi

100 volüm sodyum karbonat solüsyonu, sodyum potasyum tartarat solüsyonu ve bakır sülfatın 1'er volümü karıştırılarak hazırlandı. Kullanmadan hemen önce hazırlandı.

b. Deneyin Yapılışı

Örnekler 1/20 oranında 0.5 M NaOH ile (4.75 ml 0.5 NaOH+0.25 ml örnek olacak şekilde) dilüe edildi. Deney için iki kör ve her numune için iki test tüpü hazırlandı. Standart eğrisi ise 1 mg/ml (0.5 M NaOH'de) BSA stok standartının 50-500 µg arasında dilüe edilmesiyle hazırlandı. Kör tüplerine 0.5 M NaOH'den 0.1 ml, test tüplerine 0.1 ml dilüe numune ilave edildi. Daha sonra bütün tüplere 1 ml taze hazırlanmış olan Lowry reaktifi ilave edildi. Tüm tüpler vortekslendi ve 10 dakika oda ısısında bekletildi. Sonra tüm tüplere taze hazırlanmış Folin Ciocalteu's fenol reaktifinden 0.1 ml ilave edildi ve 30 dakika oda ısısında bekletildi.

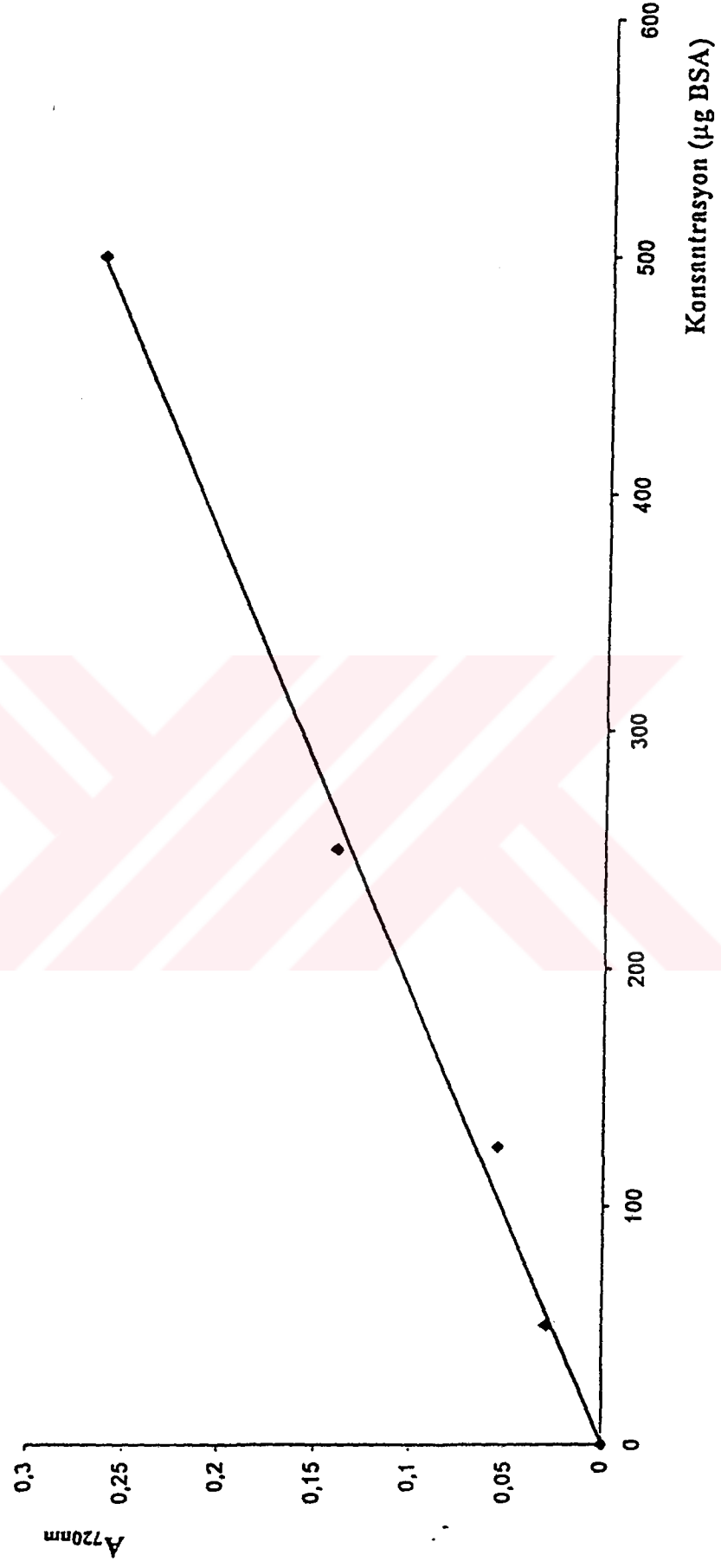
720 nm absorbandsda spektrofotometrede ölçüm yapıldı.

Protein Standart Grafiğinin Çizilmesi

Protein standart grafiği bovine serum albumini (BSA)'nin 50-500 µg'lık konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbands değerlerinin ifadesi şeklinde çizildi (Şekil 2).

$$\text{Mikrozomal protein fraksiyonu (mg / ml)} = \frac{\text{A}_{720} \text{ Protein (Grafikten ölçülen miktar)}}{1000} \times \frac{1}{\text{Ölçülen dilüsyonun volümü (ml)}} \times \frac{4.75}{0.25}$$

$$\frac{\text{Mikrozomal Protein Fraksiyonu (mg / ml)}}{\text{Mikrozomal Doku Konsantrasyonu (g doku / ml)}}$$



Şekil 2: Doku protein miktar tayinlerinde kullanılan standart grafik.

3.3. SONUÇLARIN ANALİZİ

Sonuçlar verilen numaralara göre tekrar gruplandı. Ortalama ve standart hataları hesaplandı.

Normal dağılıma uyan (normality testini geçen) ve varyansları homojen olan Etilmorfin N- demetilaz enzimi kontrol ve fenobarbital grubu için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Normal dağılıma uymayan ve/veya varyansları homojen olmayan 7- Etoksikumarin O-deetilaz ve 7-Etoksiresorfin O- deetilaz enzimleri kontrol ve fenobarbital gruplarına non-parametrik bir test olan Kruskal-Wallis varyans analizi uygulandı.

4.BULGULAR

Fenobarbital verilen ve 60 erkek sıçandan oluşan grup ile 45 erkek sıçandan oluşan kontrol grubunun 09⁰⁰, 13⁰⁰, 17⁰⁰, 21⁰⁰, 01⁰⁰, 05⁰⁰ saatlerindeki 7- Etoksiresorfin O-deetilaz enzim aktiviteleri Tablo 3a ve b ve Şekil 3’de gösterilmektedir.

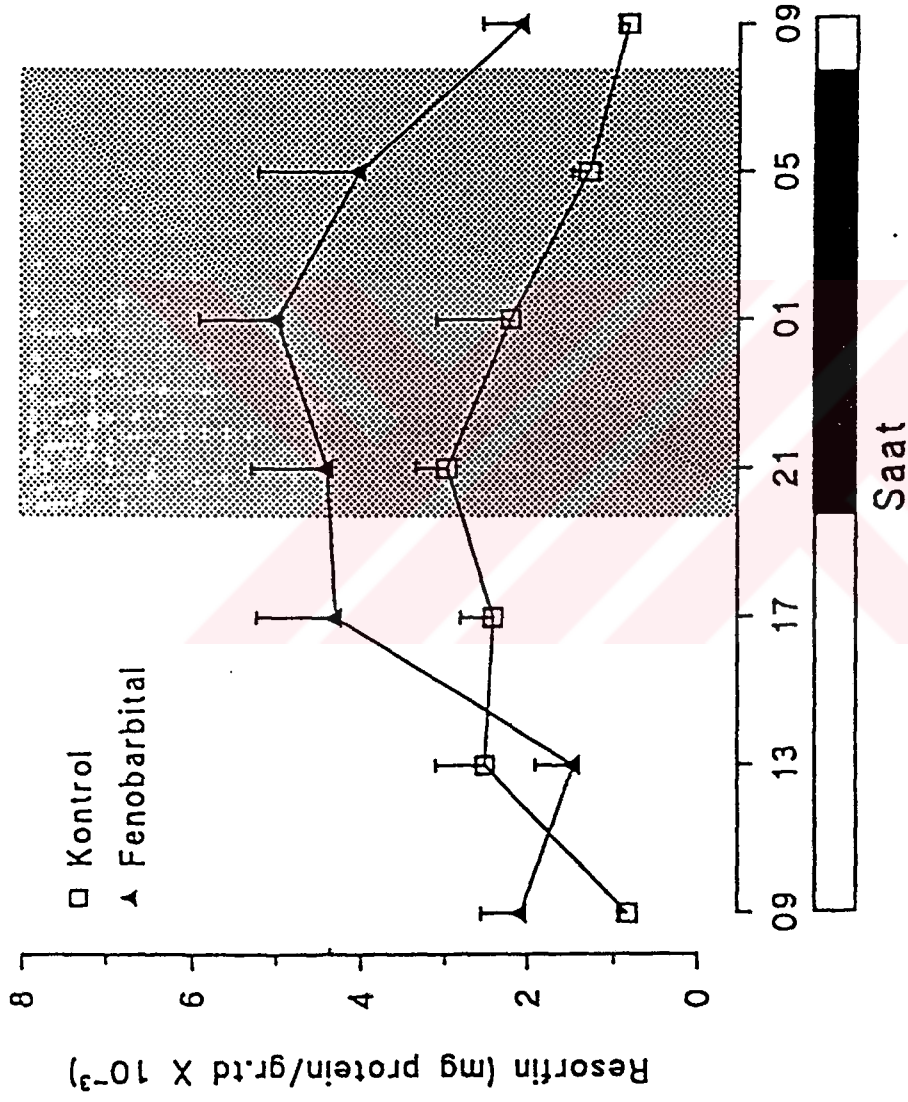
Tablo 3: Etoksiresorfin O-deetilaz enzim aktiviteleri

a.Kontrol Grubu

Saat	09 ⁰⁰	13 ⁰⁰	17 ⁰⁰	21 ⁰⁰	01 ⁰⁰	05 ⁰⁰
Ortalama	0.835	2.52143	2.425	2.98125	2.2175	1.2925
SEM	0.09251	0.59303	0.40095	0.36402	0.89561	0.1895
Min	0.5	0.52	0.75	1.54	0.96	0.5
Max	1.05	4.45	4.23	4.25	8.4	2.16
n	6	7	8	8	8	8

b. Fenobarbital Grubu

Saat	09 ⁰⁰	13 ⁰⁰	17 ⁰⁰	21 ⁰⁰	01 ⁰⁰	05 ⁰⁰
Ortalama	2.08182	1.464	4.299	4.407	4.994	4.03
SEM	0.48764	0.45205	0.9397	0.90927	0.92997	1.195
Min	0.84	0.4	1.3	0.82	0.45	0.93
Max	6.4	2.83	10.48	10.06	11.2	10.1
n	11	10	10	10	10	9



Şekil 3: 7-Etoksiresorfin O-deetilaz enzim aktivitesindeki g n ci değişim.

Fenobarbital verilen ve 58 erkek sıçandan oluşan grup ile 44 erkek sıçandan oluşan kontrol grubunun 09⁰⁰, 13⁰⁰, 17⁰⁰, 21⁰⁰, 01⁰⁰, 05⁰⁰ saatlerindeki 7- Etoksikumarin O-deetilaz enzim aktiviteleri Tablo 4a ve b ve Şekil 4’de gösterilmektedir.

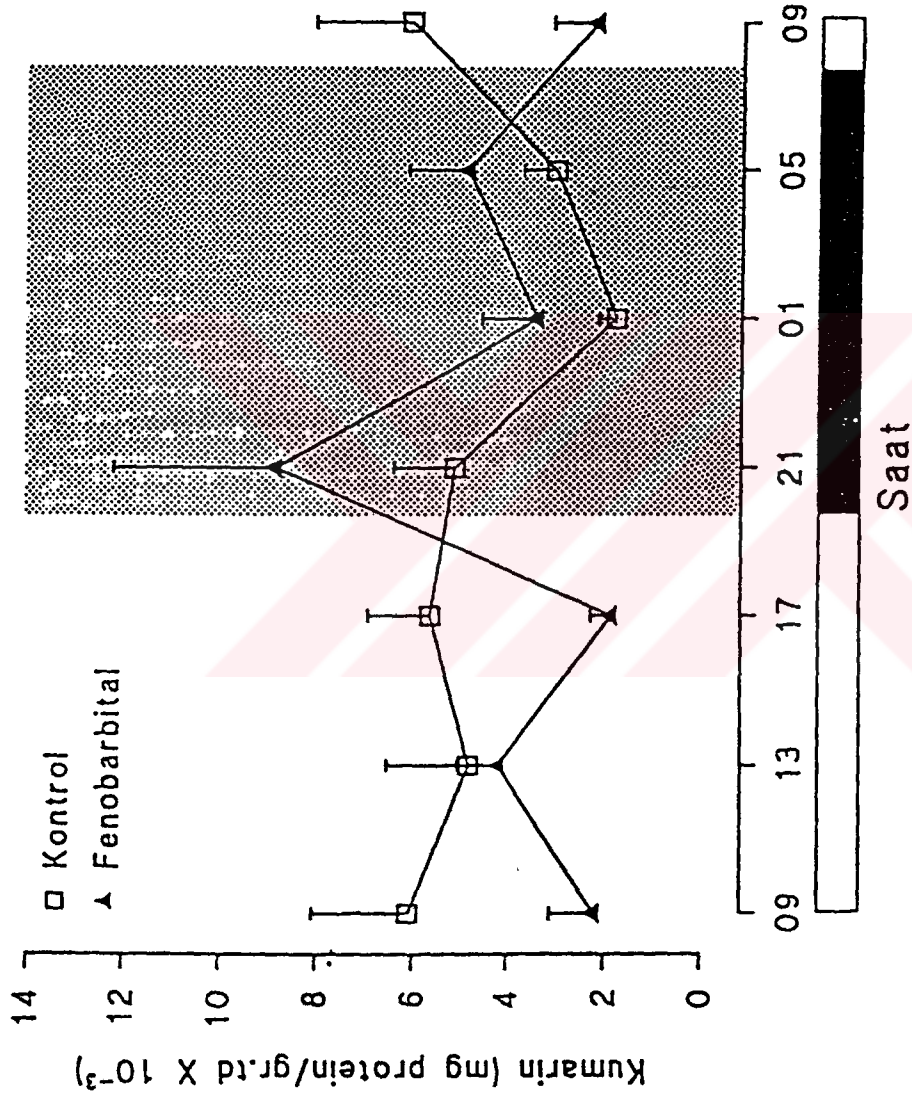
Tablo 4: 7-Etoksikumarin O-deetilaz enzim aktiviteleri

a. Kontrol Grubu

Saat	09 ⁰⁰	13 ⁰⁰	17 ⁰⁰	21 ⁰⁰	01 ⁰⁰	05 ⁰⁰
Ortalama	6.08667	4.84286	5.6525	5.1475	1.775	3.02
SEM	1.95765	1.70624	1.28021	1.27433	6.35976	0.68791
Min	2.1	1.35	1.78	1.45	0.8	0.72
Max	12.25	14.4	12.6	12.8	3.71	6.41
n	6	7	8	8	8	7

b. Fenobarbital Grubu

Saat	09 ⁰⁰	13 ⁰⁰	17 ⁰⁰	21 ⁰⁰	01 ⁰⁰	05 ⁰⁰
Ortalama	2.21636	4.184	1.857	8.83875	3.392	4.9
SEM	0.89401	0.91443	0.42757	3.38272	1.20705	1.2437
Min	0.52	0.44	0.48	2.51	0.5	13.5
Max	10.95	10.9	4.27	32.23	13.67	1.08
n	11	10	10	8	10	9



Şekil 4: 7-Etoksikumarin O-deetilaz enzim aktivitesindeki g n   değişim.

Fenobarbital verilen ve 55 erkek sıçandan oluşan grup ile 41 erkek sıçandan oluşan kontrol grubunun 09⁰⁰, 13⁰⁰, 17⁰⁰, 21⁰⁰, 01⁰⁰, 05⁰⁰ saatlerindeki Etilmorfin N-demetilaz enzim aktiviteleri Tablo 5a ve b ve Şekil 5’de gösterilmektedir.

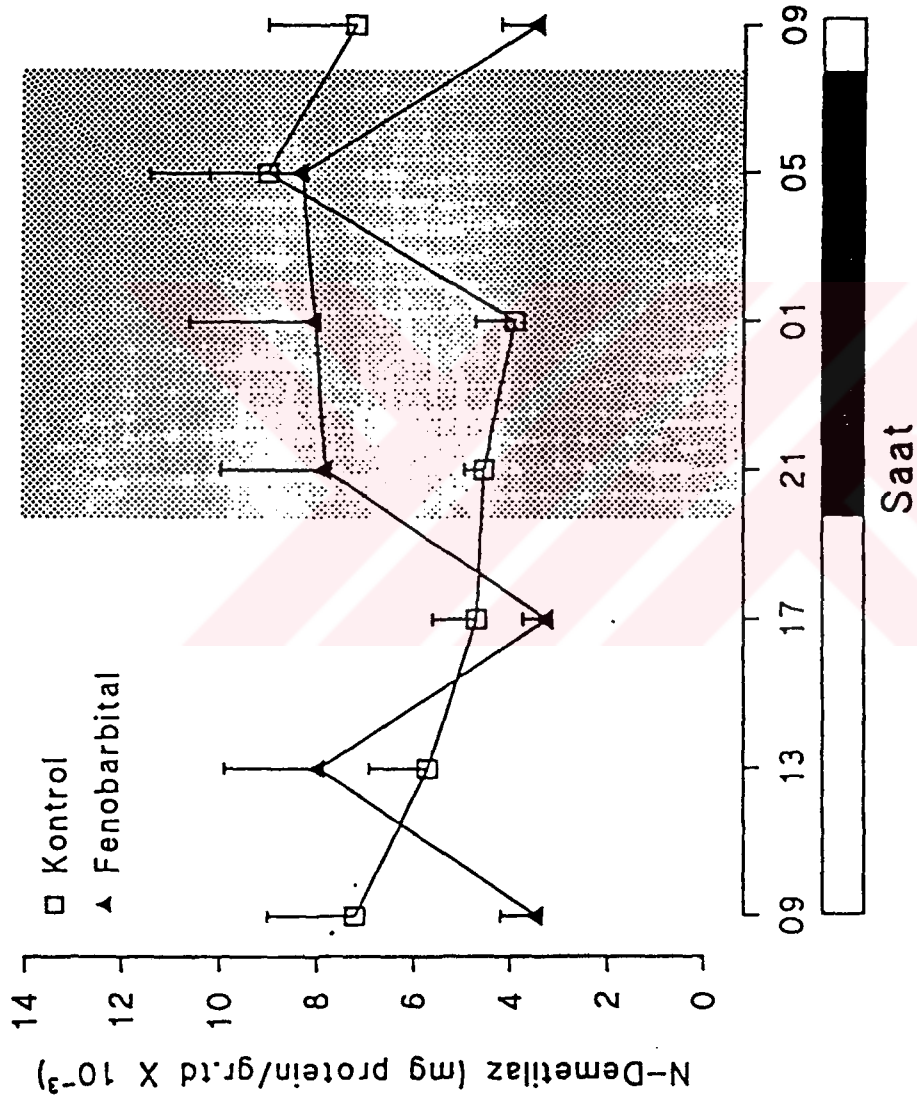
Tablo 5: Etilmorfin N- demetilaz enzim aktiviteleri

a. Kontrol Grubu

Saat	09 ⁰⁰	13 ⁰⁰	17 ⁰⁰	21 ⁰⁰	01 ⁰⁰	05 ⁰⁰
Ortalama	7.212	5.66667	4.705	4.55857	3.88875	8.99286
SEM	1.79353	1.22217	0.90116	0.40981	0.8207	2.42622
Min	2.7	2.22	0.79	2.88	1.7	4.06
Max	12.5	9.72	9.5	5.67	7.9	22.6
n	5	6	8	7	8	7

b. Fenobarbital Grubu

Saat	09 ⁰⁰	13 ⁰⁰	17 ⁰⁰	21 ⁰⁰	01 ⁰⁰	05 ⁰⁰
Ortalama	3.436	7.95364	3.2275	7.82111	8.02667	8.29875
SEM	0.76569	1.94722	0.50995	2.15592	2.59517	1.91317
Min	0.66	1.46	1.3	1.16	1.51	1.6
Max	9.2	21.29	5.12	10.12	25.1	15
n	10	11	8	9	9	8



Şekil 5: 7-Etilmorfîn-N-demetilaz enzim aktivitesindeki gûnîçi değışim.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Hepatik enzimlerin ritmisitesinin sürekli ışık veya sürekli karanlığa bırakılan hayvanlarda en azından kısmen, çevrenin ışık miktarından etkilendiği bildirilmiştir ^(3,4,5). Hepatik enzim aktivitelerinin çeşitli indükleyici ajanların verilmesinden sonra değiştirilebildiğini bildiren yayınlar da mevcuttur ⁽¹⁰⁾.

Çalışmamızda 24 saat süreyle dörder saatlik periyotlarda 200-250 g ağırlığında ve erkek sıçanlardan oluşan kontrol ve fenobarbitalle indüklenmiş deney hayvanı grupları oluşturularak sitokrom P-450 karışık fonksiyonlu oksidaz Faz I enzimlerinden Etilmorfin N-demetilaz, 7- Etoksikumarin O-deetilaz ve 7-Etoksiresorfin O-deetilazın enzim aktivitesinin günüçi ritmik değişimleri incelenmiştir.

Spektrofotometrik yöntemle ⁽¹⁰⁾ enzim aktivitesi saptanan Etilmorfin N- demetilazın 41 sıçandan oluşan kontrol grubu saat 05⁰⁰,de maksimum, saat 01⁰⁰,de minimum aktivite gösterirken; fenobarbitalle indüklenen 55 sıçandan oluşan grup saat 05⁰⁰,de maksimum, saat17⁰⁰,de minimum aktivite göstermiştir (Tablo 5a ve b). Fluorometrik yöntemle ⁽¹⁰⁾ enzim aktivitesi saptanan 7-Etoksiresorfin O- deetilazın 45 sıçandan oluşan kontrol grubu saat 21⁰⁰,de maksimum, saat 09⁰⁰,da -minimum aktivite gösterirken; fenobarbitalle indüklenen 60 sıçandan oluşan grup saat 01⁰⁰,de maksimum,

saat 13⁰⁰'de minimum aktivite göstermiştir (Tablo 3a ve b). Yine fluorometrik yöntemle⁽¹⁰⁾ enzim aktivitesi saptanan 7-Etoksikumarin O-deetilazın 44 sıçandan oluşan kontrol grubu saat 09⁰⁰'da maksimum, saat 01⁰⁰'de minimum aktivite gösterirken; fenobarbitalle indüklenen 58 sıçandan oluşan grup saat 21⁰⁰'de maksimum, saat 17⁰⁰'de minimum aktivite göstermiştir (Tablo 4a ve b).

Etilmorfin N-demetilaz aktiviteleri kontrol grubunda (05⁰⁰'de maksimum, 01⁰⁰'de minimum) ve fenobarbital grubunda (05⁰⁰'de maksimum, 17⁰⁰'de minimum) anlamlı bir sirkadien ritim göstermemiştir. Ancak, 7-Etoksikumarin O-deetilaz aktiviteleri kontrol grubunda (09⁰⁰'de maksimum, 01⁰⁰'de minimum) ($p<0.04$) ve fenobarbital grubunda (21⁰⁰'de maksimum, 17⁰⁰'de minimum) ($p<0.001$) anlamlı bir sirkadien ritim göstermiştir. Benzer olarak 7-Etoksiresorfin O-deetilaz aktiviteleri de kontrol grubunda (21⁰⁰'de maksimum, 09⁰⁰'de minimum) ($p<0.005$) ve fenobarbital grubunda (01⁰⁰'de maksimum, 13⁰⁰'de minimum) ($p<0.01$) anlamlı bir sirkadien ritim göstermiştir.

Yaklaşık son 25 yılda laboratuvarlarda insan ve hayvanlarda yapılan deneylerde, büyük oranda ilaç ve kimyasalların toksisitesinin farmokinetiğinin sirkadien ve diğer temporal farklılıklardan ileri geldiği rapor edilmiştir⁽¹²⁾.

Sitokrom P-450'nin çoğu türleri indüklenebilir özelliktedir. Örneğin, fenobarbital veya diğer ilaçların uygulanması düz endoplazmik retikulumda bir hipertrofiye ve 4-5 gün içerisinde sitokrom P-450'nin miktarında 3-4 misli artışa neden olur. İndüksiyon mekanizması geniş kapsamlı incelenmiştir ve sitokrom P-450'ye ait mRNA'nın transkripsiyonunda bir artışı kapsamaktadır ⁽¹⁵⁾.

Biz de bu çalışmamızdaki bulgularla, ilaç metabolizmasında rol oynayan mikrozomal enzimlerin aktivitesindeki günüçi değişikliklerin ilaçların uygulama zamanına bağlı olarak farmakokinetik farklılıklara ve dolayısıyla ilaç etkinliğinde değişikliklere neden olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca sık kullanılan bazı ilaçların etkinliğinin artırılması ve yan etkilerinin azaltılması konusunda katkılar sağlanması da amaçlanmaktadır.

6.ÖZET

İlaçların farmakokinetik özelliklerinde uygulama zamanına bağlı değişiklikler olduğu bilinmektedir. Bu değişikliklerin bir kısmının nedeni ilaç metabolizmasında rol oynayan enzimlerin aktivitesindeki g n   ritimlerdir. Hepatik enzimlerin aktivitesinin çeşitli indükleyici ajanların verilmesinden sonra de i tirilebildi i bilinmektedir.

Bu çalışmada 12 saat aydınlık (08⁰⁰-20⁰⁰) ve 12 saat karanlık (20⁰⁰-08⁰⁰) olacak şekilde ışık periyodu ile senkronize edilmiş 200-250g a ırlı ındaki erkek sıçanlarda, karaciğer mikrozomal ve ilaç metabolize eden Etilmorfin N-demetilaz, 7-Etoksikumarin O-deetilaz ve 7-Etoksiresorfin O- deetilaz enzim aktivitelemi incelenmiştir. Enzim indüklenmesini incelemek için sıçanlara günlük 75 mg'lık fenobarbital dozu enjekte edilerek fenobarbital grubu oluşturulmuştur. Fenobarbital uygulaması yapılmayan sıçanlar kontrol grubunu oluşturmuştur. Deneyler erkek sıçanların günün 6 değişik saatinde (09⁰⁰,13⁰⁰,17⁰⁰,21⁰⁰,01⁰⁰,05⁰⁰)  ld r lmesiyle elde edilen karaciğer homojenatlarının postmitokondriyal fraksiyonunda yapılmıştır. Etilmorfin N-demetilaz aktivitesi Hantysch reaksiyonuyla kolorimetrik,O-deetilaz aktivitesi ise 7-hidroksikumarin ve resorfin üzerinden fluorometrik olarak ölçülmüş ve nmol/dak/mg protein cinsinden ifade edilmiştir. Sonuçlar arasında istatistiksel fark olup olmadığı

Wallis varyans analizi ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirilmiştir.

İncelenen enzimlerden 7-Etoksikumarin O-deetilaz ve 7-Etoksiresorfin O-deetilaz aktivitelerinde kontrol ve fenobarbital gruplarında anlamlı günüçi fark bulunmuştur. Etilmorfin N-demetilaz kontrol ve fenobarbital gruplarında ise ritmik özellik saptanamamıştır.

İlaç metobolizmasında rol oynayan mikrozomal enzimlerin aktivitesindeki günüçi değişiklikler ilgili ilaçların uygulama zamanına bağlı farmakokinetik farklılıklara ve dolayısıyla ilaç etkinliğinde değişikliklere neden olabilir.

7. YABANCI DİLDE ÖZET

In this study some hepatic microsomal drug metabolizing enzymes, namely ethylmorphine N-demethylase, ethoxycoumarin O- deethylase and ethoxyresorufin O – deethylase were investigated in male rats (weighting between 200-250 g) subjected to 12h light (08⁰⁰-20⁰⁰h) and 12h dark (20⁰⁰-08⁰⁰h) cycle. In order to induce the enzyme activities, the rats in the phenobarbital group were injected with phenobarbital 75 mg/kg daily. The rats were killed by cervical dislocation at 6 different time points (09⁰⁰, 13⁰⁰, 17⁰⁰, 21⁰⁰, 01⁰⁰, 05⁰⁰) Then, the liver samples were homogenized in the 25% homogenizing medium, and were adjusted to a final concentration of approximately 0.1 g fresh tissue /ml. After that, post-mitochondrial supernatant fraction was prepared by centrifugation at 10000 g average for 20 min at 2-4°C. Post-mitochondrial supernatants were used for measurement of the enzyme activities.

The N-demethylation of ethylmorphine result in the formation of formaldehyde which was estimated colorimetrically by means of the Hantzsch reaction. The O-deethylation of 7-ethoxycoumarin results in the production of 7-hydroxycoumarin and the O-deethylation of 7-ethoxyresorufin results in the production of resorufin. The last two products were measured fluorometrically.

The activities of ethylmorphine N-demethylase in the control and the phenobarbital groups did not show a circadian rhythm. However, 7-ethoxycoumarin O-deethylase and 7-ethoxyresorufin O-deethylase activities among the control and the phenobarbital groups showed a circadian rhythm.



8.KAYNAKLAR

- 1.Labrecgue,G.and Belanger,P.M.: Biological rhythms in the absorbtion.distribution, metabolism and excretion of durgs. Pharmac. Ter. 52,95-107. (1991).
- 2.Reinberg, A.and Smolensky, M.H.: Circadian rhythms in drug disposition in man.Clin.Pharmacokin.7,401-420. (1983).
- 3.Radzialowski, F.M. and Bousguet, W.F.: Circadian rhythm in hepatic drug metabolizing activity of the rat. Life Sci. 6,2545-2548. (1967).
- 4.Radzialowski, F.M. and Bousguet, W.F.: Daily rhythmic variation in hepatic drug metabolism in the rat and mouse. J. Phar. Exp. Ther. 163, 229-238. (1968).
- 5.Nair,V. and Casper, R.: The influence of light on daily rhythm in hepatic drug metabolizing enzymes in rat . Life Sci. 8, 1291-1298. (1969) .
6. Belanger, P.M.: Chronobiologic variaion in the hepatic elimination of drugs and toxic agents. Ann. Rev. Chronopharmac. 4, 1- 46. (1988).

7.Miyasaki, Y., Yatagai, M., Imaoka S., Funae,Y., Motohashi, Y., and Kobayashi, Y.: Temporal variation in hepatic cytochrome P-450 isoenzymes in rats. *Ann. Rev. Chronopharmac.* 7,149-153.(1990).

8.Tredger, J.M. and Chhabra, R.S.: Circadian variation in microsomal drug metabolizing enzyme activities in rat and rabbit tissues. *Xenobiotica* 7, 481-489. (1977).

9. Belanger, P. M., Lalande, M., Labrecque, G. and Dore, F. M.: Diurnal variation in the transferases and hydrolases involved in glucuronide and sulfate conjugation of rat liver. *Drug Metab. Disp.* 13,386-389. (1985).

10.Snell, K. and Mullock, B. (Eds.) *Biochemical toxicology a practical approach*, IRL Press Limited, Oxford, 183-215. (1987).

11.Belanger, P.M., Desgagne, M. and Boutet, M.: The mechanism of the chronohepatotoxicity of chloroform in rat: Correlation between covalent binding to hepatic subcellular fraction and histologic changes. *Ann Rev. Chronopharmac.* 5, 235-238. (1988).

12.Beutler, E., Duron, O. and Miku-Kelly, B.: Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. & Clin. Med.* 61(5), 882-888. (1963).

12. Beutler, E., Duron, O. and Miku-Kelly, B.: Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. & Clin. Med.* 61(5), 882-888. (1963).
13. Omura T. and Sato R.: A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol Chem.* 237;1375-1376. (1962).
14. Murray, R.K. Mayes, P.A. Granner, D.K. and Rodwell, V. W.: *Harper's Biochemistry*, 812-814. (1993).
15. Arınç E., Schenkman J.B. and Hodgson E.: *Molecular Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes*, NATO ASI Series, Vol. H 90, 65-67, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1995).
16. Gonzalez F.J.: Molecular genetics of the P-450 superfamily. *Pharmacol. Ther* 45,1-38. (1990).
17. Schenkman J.B. and Greim, H.(Eds.) *Cytochrome P-450. Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 105, Springer-Verlag, Heidelberg. (1993).
18. Poulos, T.L. Finzel, B.C. and Howard A.J.: High resolution crystal structure of cytochrome P-450_{cam}. *J.Mol.Biol.* 195,687-700. (1987).

distinct classes of the cytochrome P-450 superfamily. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89, 5567-5571. (1992).

20. Ravichandan, K., Bodupalli, S.; Hasemann, C.; Peterson, J.A. and Desinehofer, J.: Crystal Structure of hemoprotein domain of P-450_{BM3}, a prototype for microsomal P-450s. Science 261, 731-736. (1993).



ÖZGEŞMİŞ

1970 yılı Edremit doğumluyum. 1992 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. Etimesgut Halk Sağlığı Laboratuvarında Biyolog olarak çalışmaktayım. 1996 yılında Gazi Tıp Biyokimya Anabilim Dalında master yapmaya başladım. Halen bu bölümde çalışmalarına devam ediyorum.

