

FENOBARBİTAL İLE İNDÜKLENMİŞ SIÇAN KARACİĞER MİKROZOMAL MONOOKSİJENAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN GÜNCİ DEĞİŞİMLERİ

Zuhal Yıldırım¹, Nedret Kılıç¹, Hakan Zengil²

ÖZ

Amaç: İlaç biyotransformasyonunda rol oynayan enzim sistemlerinin aktivitelerinin biyolojik ritimlerden dolayı günüci (sirkadiyen) değişiklikler gösterdiği ve bu durumun ilaç alınma zamanına bağlı olarak ilaç farmakokinetiğini değiştirebildiği bilinmektedir. Ancak literatürde, enzim indüksiyonuna yol açan uygulamaların aktivite ritimlerini nasıl etkilediği konusunda bir bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada, karaciğer mikrozomal enzimlerinden etilmorfin N-demetilaz, 7-etoksikumarin O-deetilaz ve 7-etoksirezorfin O-deetilaz enzim aktivitelerindeki günüci ritmik değişikliklerin fenobarbitalle indüksiyonundan sonra nasıl değiştiğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem: Çalışmamızda 12 saat aydınlık (08⁰⁰-20⁰⁰) ve 12 saat karanlık (20⁰⁰-08⁰⁰) olacak şekilde senkronize edilmiş 200-250 g ağırlığındaki erkek sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar rastgele olarak iki gruba ayrılmış ve bir grubuna 4 gün üstüste fenobarbital (75 mg/kg/gün, günde tek doz, 10 ml/kg, i.p.) verilerek enzim indüksiyonu sağlanmış, kontrol grubuna ise eş zamanlı olarak % 0.9 serum fizyolojik enjeksiyonları yapılmıştır. Sıçanların günüci 6 değişik saatinde (09⁰⁰, 13⁰⁰, 17⁰⁰, 21⁰⁰, 01⁰⁰, 05⁰⁰) öldürülmesiyle elde edilen karaciğerler homojenize edilerek santrifüjasyonla postmitokondriyal fraksiyon elde edilmiş ve N-demetilaz aktivitesi Hantysch reaksiyonuyla, O-deetilaz aktivitesi ise 7-hidroksikumarin ve rezorfin üzerinden fluorometrik olarak ölçülmüştür.

Bulgular: İncelenen enzimlerden 7-etoksikumarin O-deetilaz ve 7-etoksirezorfin O-deetilaz aktivitelerinde kontrol ve fenobarbital grupları arasında anlamlı günüci fark bulunmuştur. Etilmorfin N-demetilaz aktivitesi ise kontrol ve fenobarbital gruplarında ritmik özellik göstermemiştir.

Sonuç: İlaç metabolizmasında rol oynayan mikrozomal enzimlerin aktivite-sindeki günüci değişiklikler ilgili ilaçların uygulama zamanına bağlı olarak farmakokinetik özelliklerin değişmesine ve dolayısıyla ilaç etkinliğinde değişikliklere neden olabilir.

Anahtar Kelimeler: Etilmorfin N-demetilaz, 7-etoksikumarin O-deetilaz, 7-etoksirezorfin O-deetilaz, Fenobarbital, Günüci değişimler.

CIRCADIAN VARIATIONS IN PHENOBARBITAL INDUCED RAT LIVER MONOOXYGENASE ENZYME ACTIVITIES

ABSTRACT

Purpose: The activities of the enzyme systems which take part in the drug biotransformation is known to exhibit daily variations as a result of the biological rhythms and this situation may alter the drug pharmacokinetics depending on the drug taking time. However there is not any publication indicating how the enzyme induction mechanisms affect the activity rhythms. In this study it was aimed to investigate the daily rhythmic variations in the activities of some hepatic microsomal drug metabolizing enzymes, namely ethylmorphine N-demethylase, ethoxycoumarin O-deethylase and ethoxyresorufin O-deethylase, with phenobarbital induction.

Materials and Methods: In this study the male rats (weighting between 200-250 g) which were synchronised by 12h light (08⁰⁰-20⁰⁰h) and 12h dark (20⁰⁰-08⁰⁰h) cycle were used. The rats were randomly divided into two groups and as the phenobarbital and the control. The rats in the phenobarbital group were injected with a single dose of phenobarbital (75 mg/kg/day, 10 ml/kg, i.p.) for 4 successive days in order to induce the enzyme activities. The control group received 0.9% saline injections simultaneously. The rats were killed by cervical dislocation at six different time points of the day (09⁰⁰, 13⁰⁰, 17⁰⁰, 21⁰⁰, 01⁰⁰, 05⁰⁰) and the liver specimens were homogenized to obtain the post-mitochondrial supernatant fractions. The N-demethylase activity was measured by Hantysch reaction whereas the O-deethylase was measured fluorometrically through 7-hydroxycoumarin and the resorufin.

Results: 7-ethoxycoumarin O-deethylase and 7-ethoxyresorufin O-deethylase activities of the control and the phenobarbital groups displayed significant daily rhythmic variations. However, ethylmorphine N-demethylase activities in the control and the phenobarbital groups did not show any circadian rhythm.

Conclusion: The daily rhythmic variations in the microsomal enzyme activities which have a role on drug metabolism may affect the pharmacokinetics depending on the time of the day of the drug intake. This situation may lead to the variations on the drug effectiveness.

Key Words: Ethylmorphine N-demethylase, 7-ethoxycoumarin O-deethylase, 7-ethoxyresorufin O-deethylase, Phenobarbital, Circadian variations.

GİRİŞ

Memelilerde hemen bütün fizyolojik fonksiyonlarda son derece iyi ayarlanmış düzenleyici mekanizmalar (biyolojik zamanlayıcılar ve osilatörler) tarafından kontrol edilen bir zamanlama söz konusudur (1,2). Biyolojik ritimler olarak adlandırılan bu durumdan dolayı organizma günün farklı zamanlarında farklı fonksiyonel durumlarda bulunmaktadır. Kronofarmakolojik çalışmalar ilaçların absorpsiyon, dağılım, biyotransformasyon ve atılım gibi farmakokinetik özelliklerinin alınma/uygulanma zamanına bağlı olarak değişebildiğini göstermektedir. Bunun temel nedeni ilaç farmakokinetiğini şekillendiren bazı fizyolojik fonksiyonların ve değişkenlerin de günüci ritimler göstermesidir. Benzer şekilde, hedef organların sabit bir ilaç konsantrasyonuna olan duyarlılığı da günüci değişiklikler gösterebilmektedir. Memeli karaciğeri birçok kompleks metabolik fonksiyondan sorumludur. Bunlar arasında karbohidrat, lipid, mineral ve proteinlerin depolanması ve metabolizması, hormon ve vitaminlerin metabolizması, safra oluşumu, kan koagülasyon faktörlerinin ve plazma proteinlerinin sentezi sayılabilir (2,3). Karaciğerin önemli fonksiyonlarından birisi de endojen veya ekzojen kimyasalların irreversibl biyotransformasyon reaksiyonlarıdır (4,5). İlaç biyotransformasyon reaksiyonlarının çoğu esas olarak düz endoplazmik retikulumda yerleşik olan çok unsurlu bir elektron transport sistemi tarafından yürütülür. Bu sistem "Mikrozomal Monooksijenaz" veya "Karma Fonksiyonlu Oksidaz Sistemi" olarak adlandırılmaktadır. Karaciğer hücrelerinin mikrozomal fraksiyonunda zenobiyotikleri metabolize eden Faz I ve Faz II enzimleri bulunmaktadır (3,4,5).

Sitokrom P-450 monooksijenaz sistemiyle katalize edilen oksidatif reaksiyonlar, toksik kimyasal ajanlar ve ilaçların etkisizleştirilmesi için ana yollardan biridir. Vücuttan temizlenmeleri bu oksidatif reaksiyonların hepatik işleyişine doğrudan bağlı olan fenitoin, teofilin, tolbutamid ve varfarin gibi ilaçlar; ilgili enzimlerin aktivitelerindeki kronobiyolojik varyasyonlar ile uyumlu olarak biyotransformasyona uğrarlar (6,7). Ayrıca, bu karaciğer enzimleri oral yoldan ilaç uygulamalarındaki ilk geçiş eliminasyonundan da sorumludurlar. Yani propranolol, kalsiyum antagonistleri ve birçok analjezik ve antihistaminik ajanlar gibi ilaçların oral biyoyararlanımları, bu karaciğer proseslerinin zamana bağlı varyasyonları tarafından etkilenebilmektedir (8, 9,10). Karaciğer mikrozomal enzimlerinin önemli özelliklerinden birisi de aralarında ilaçların da bulunduğu çeşitli zenobiyotikler tarafından indüklenebilir olmalarıdır. Literatürde ilaçların farmakokinetik özelliklerinde uygulama zamanına bağlı değişiklikler olduğunu bildiren çalışmaların bir kısmı ilaç metabolizmasında rol oynayan enzimlerin aktivitesindeki günüci ritimler ile ilgilidir (11,12). Ancak, bu enzimlerin indüklenmesinin ilaç biyotransformasyonuna nasıl yansıdığı konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada sitokrom P-450 karma fonksiyonlu oksidaz enzimlerinden etilmorfin N-demetilaz, 7-etoksikumarin O-deetilaz

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya, Ankara, Türkiye

²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji, Ankara, Türkiye

ve 7-etoksirezorfin O-deetilazın aktivitelerinde günüçi ritmik değişiklikler olup olmadığı ve varsa bu değişikliklerin fenobarbitalle indüklenmesinin bu değişiklikleri nasıl etkilediğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Kullanılan Kimyasal Maddeler

NADP (Sigma), DL-isositrik asit (Sigma), isositrik dehidrojenaz (Sigma), 7-etoksikumarin (Sigma), 7-OH-kumarin (Sigma), 7-etoksirezorfin (Sigma), 7-OH-rezorfin (Sigma), semikarbazit (Sigma), etilmorfin hidroklorit (Sigma). Kullanılan diğer kimyasal maddeler analitik saflıktaydı.

Deney Hayvanları ve Enzim İndüksiyonu

Çalışmamızda 200-250 g ağırlığında erkek sıçanlar kullanıldı. Aynı anne-babadan elde edilen yavruların kendi aralarında 15 nesilden fazla döllenmesi sonucunda elde edilen bu sıçan popülasyonu *inbred* olarak kabul edilebilir nitelikteydi. Sıçanlar doğumlarından itibaren 12 saat karanlık- 12 saat aydınlık (ışıklar 08⁰⁰-12⁰⁰ arası açık) olacak şekilde yaklaşık 100 lüks ışık şiddeti ile aydınlatılan, sıcaklığı 22-24°C'de tutulan ve sürekli havalandırılan bir laboratuvarında tutuldu. Senkronizasyonu etkilememek amacıyla yemek ve sularının tamamlanması ve kafes temizliği düzenli olarak sabah 09⁰⁰-11⁰⁰ saatleri arasında yapıldı. Sıçanlar rastgele iki gruba ayrılarak bir gruba kontrol grubu olarak değerlendirildi ve diğer gruba dört gün üst üste günde tek kez olacak şekilde intraperitoneal yoldan 75 mg/kg (10 ml/kg hacimde) fenobarbital verilerek literatürde tarif edildiği şekilde enzim indüksiyonu yapıldı (11). Kontrol grubuna aynı saatlerde aynı yoldan % 0.9 NaCl 10 ml/kg hacimde uygulandı. Enjeksiyonlar saat 13⁰⁰-14⁰⁰ arasında yapıldı ve dördüncü enjeksiyonu takip eden gün 4 saatlik aralarla (09⁰⁰, 13⁰⁰, 17⁰⁰, 21⁰⁰, 01⁰⁰, 05⁰⁰) eter anestezisi altında karaciğerler izole edildi. Kontrol grupları her saat için 6-8 sıçandan, fenobarbital indüksiyonu grupları ise 8-11 sıçandan oluşuyordu ve deneylerde randomizasyonun sağlanması için tek-kör uygulaması yapıldı.

Karaciğer Homojenatlarının Hazırlanması

Ağırlığı kaydedilen her bir karaciğer, ağırlığının % 75'i kadar homojenizasyon sıvısı (pH'sı 8.2 olan Tris-HCl tamponu) ile homojenize edildi ve 0.1 g taze doku/ml olacak şekilde konsantre edilerek 10000xg ve 2-4°C'de 20 dakika santrifüj edildi (9). Postmitokondriyal süpernatant alındıktan sonra hacmi kaydedilerek bundan sonra yapılacak enzim aktivitelerinin hesaplanması için kullanıldı. Süpernatantlar 37°C'de 10 dakika süreyle çalkalamalı su banyosunda inkübe edilerek ileri işleme tabi tutuldu.

Etilmorfin N-demetilaz Aktivitesinin Saptanması

Etilmorfinin N-demetilasyonu sonucunda açığa çıkan formaldehitin semikarbazit tarafından tutulması sonucu oluşan ürün (Hantysch reaksiyonu) kolorimetrik olarak saptandı (9). Bunun için, 0.1 ml doku homojenatına 0.2 ml semikarbazit, 1 ml kofaktör ilave edildi ve pH'sı 8.2 olan 50mM Tris-HCl tamponu ile hacim ayarlamaları yapıldı. Örnekler 37°C'de 5 dakika süreyle çalkalayıcı su banyosunda ön inkübasyona tabi tutulduktan sonra test tüplerine 0.2 ml etilmorfin substratı, kör tüplerine ise Tris-HCl tamponu ilave edilerek 37°C'de 10 dakika tekrar inkübe edildi. Ardından tüm tüplere 1 ml %

5'lik (w/v) Çinko sülfat (ZnSO₄), 1 ml satüre baryum hidrokisit (Ba(OH)₂), kör ve standart tüplerine 0.2 ml etilmorfin substratı ve standart tüplerine ise 0.3 ml formaldehit standardı ilave edilerek +4°C'de 2000xg'de 15 dakika santrifüj edildi ve 2 ml süpernatant alındı. Alınan süpernatanta 2 ml Nash reaktifi ilave edildi ve 412 nm absorbandsda spektrofotometrede ölçüldü. Ayrıca formaldehit standardının kalibrasyonu da yapıldı. Etilmorfin N-demetilaz aktivitesi nmol/dak/mg protein olarak verildi.

7-etoksikumarin O-deetilaz Aktivitesinin Saptanması

7-etoksikumarinin O-deetilasyonu sonucunda oluşan 7-hidroksikumarin fluorometrik olarak saptandı (9). Bunun için, 0.05 ml doku homojenatına 1 ml kofaktör ilave edildi ve pH'sı 7.8 olan 50mM Tris-HCl tamponu ile hacim ayarlamaları yapıldı. 37°C'de 5 dakika çalkalayıcı su banyosunda ön inkübasyon sonrasında sadece test tüplerine 0.5 ml 7-etoksikumarin substratı ilave edilerek 10 dakika daha inkübasyon yapıldı. Ardından tüm tüplere 1 ml % 5'lik (w/v) ZnSO₄ ve 1 ml satüre Ba(OH)₂, kör ve standart tüplerine 0.5 ml 7-etoksikumarin substratı ve standart tüplerine ise 0.1 ml 7-hidroksikumarin standardı ilave edildi ve +4°C'de 2000xg'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra 1ml süpernatant alınarak pH'sı 10.5 olan 0.5 M glisin-NaOH mevcudiyetinde 380 nm eksitasyon ve 452 nm emisyonunda fluorometrede ölçüm yapıldı. 7-etoksikumarin O-deetilaz aktivitesi nmol/dak/mg protein olarak verildi.

7-etoksirezorfin O-deetilaz Aktivitesinin Saptanması

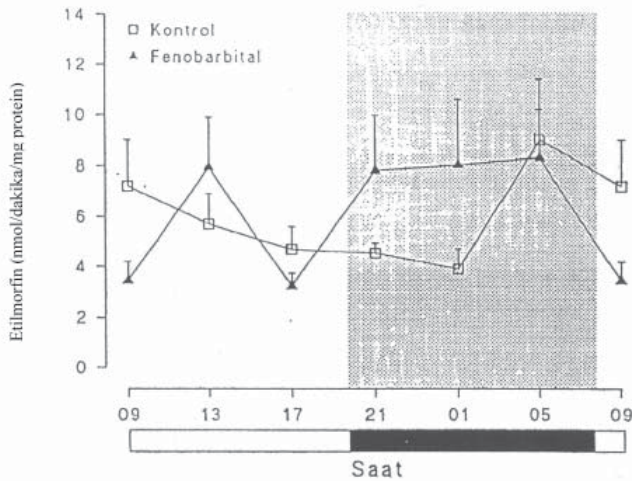
7-etoksirezorfinin O-deetilasyonu sonucunda oluşan rezorfin fluorometrik olarak saptandı (9). Bunun için, 0.05 ml doku homojenatına 1 ml kofaktör ilave edildi ve pH'sı 8.4 olan 50mM Tris-HCl tamponu ile hacim ayarlaması sağlanarak 37°C'de 5 dakika çalkalayıcı su banyosunda ön inkübasyon yapıldı. Sonra sadece test tüplerine 0.1 ml 7-etoksirezorfin substratı ilave edilerek 10 dakika daha inkübasyon yapıldı. Ardından tüm tüplere 1 ml % 5'lik (w/v) ZnSO₄ ve 1 ml satüre Ba(OH)₂, kör ve standart tüplerine 0.1 ml 7-etoksirezorfin substratı ve sadece standart tüplerine 0.2 ml rezorfin standardı ilave edilerek +4°C'de 2000xg'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 535 nm eksitasyon ve 582 nm emisyonunda fluorometrede ölçüm yapıldı. 7-etoksirezorfin O-deetilaz aktivitesi nmol/dak/mg protein olarak verildi.

Protein Miktarının Saptanması

Örneklerdeki protein miktarı standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılarak Lowry yöntemi ile saptandı (13).

İstatistik Analiz

Sonuçlar ortalama ± standart hata şeklinde ifade edildi. Enzim aktivitelerinin ritmik değişiklik gösterip göstermediğinin incelenmesi için zaman gruplarına varyans analizi uygulandı. Enzimlerden etilmorfin N-demetilaz kontrol ve fenobarbital grubu sonuçları normal dağılıma uyduğu ve varyansları homojen olduğu için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Normal dağılıma uymayan ve/veya varyansları homojen olmayan 7-etoksikumarin O-deetilaz ve 7-etoksirezorfin O-deetilaz enzimleri kontrol ve fenobarbital grupları için ise non-parametrik bir test olan Kruskal-Wallis varyans analizi ve post hoc Dunn testi ile değerlendirildi. p<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi.



Şekil 1: Sıçan karaciğerinde etilmorfin N-demetilaz enzimi aktivitesinin günüçi değişimine fenobarbitalin etkisi. Sıçanlar 12 saat aydınlık-12 saat karanlık döngüsü (08⁰⁰-20⁰⁰ aydınlık) ile senkronize edilmişlerdir. Fenobarbital grubuna dört gün süreyle günde 75 mg/kg i.p. fenobarbital uygulanmıştır. Gerek kontrol (n=6-8) gerekse Fenobarbital (n=8-11) gruplarında anlamlı fark bulunmamıştır. Apsisteki siyaha boyalı kısım karanlık dönemini temsil etmektedir. Grafikte saat 0900 değeri iki defa kullanılmıştır.

BULGULAR

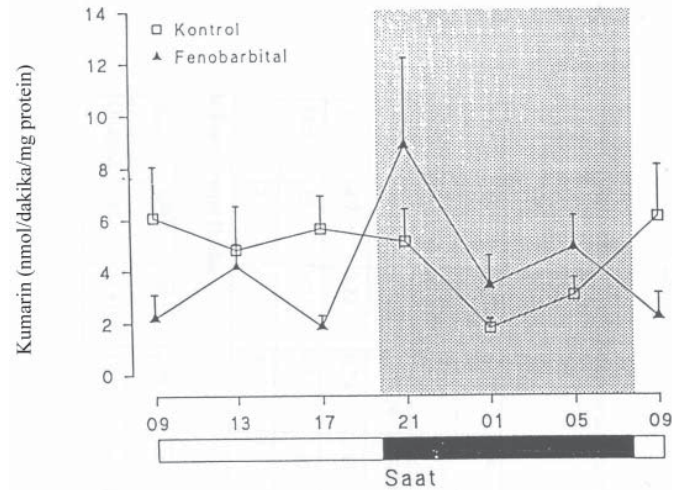
24 saat içinde dört saatlik aralıklarla aktivitesi ölçülen enzimlerden etilmorfin N-demetilaz kontrol grubunda 05⁰⁰'de maksimum, 01⁰⁰'de ise minimum aktivite göstermiştir, ancak izleme zamanları arasında istatistiksel fark bulunamamıştır (Şekil 1). Dört gün süreyle 75 mg/kg/gün dozunda fenobarbital uygulaması özellikle 21⁰⁰ ve 01⁰⁰ saatlerinde enzim aktivitesinde kontrol grubuna nazaran belirgin artışa neden olmuştur (Şekil 1). Fenobarbital ile indüksiyon yapılan grupta 05⁰⁰'de maksimum, 17⁰⁰'de minimum aktivite saptanmış ancak altı izleme zamanı arasında istatistik farklılık bulunamamıştır.

Sıçan karaciğerinde 7-etoksikumarin O-deetilaz aktivitesi günün altı değişik zamanında incelendiğinde istatistik açıdan anlamlı fark göstermektedir (p<0.05). Bu günüçi ritimde enzim aktivitesinin 09⁰⁰'da maksimum, 01⁰⁰'de minimum olduğu görülmektedir (Şekil 2). Fenobarbital indüksiyonu uygulanan gruplarda 7-etoksikumarin O-deetilaz aktivitesinin 21⁰⁰'de maksimum, 17⁰⁰'de minimum düzeyde olduğu ve varyans analizi ile zaman grupları açısından anlamlı (p <0.001) bir günüçi ritim sergiledikleri gözlenmiştir (Şekil 2).

7-etoksiresorfin O-deetilaz aktiviteleri de kontrol grubunda 21⁰⁰'de maksimum, 09⁰⁰'da minimum, fenobarbital grubunda ise 01⁰⁰'de maksimum, 13⁰⁰'de minimum olacak şekilde istatistik açıdan anlamlı (sırasıyla p<0.001 ve p<0.01) günüçi değişiklik göstermiştir (Şekil 3). Fenobarbital grubunda dikkati çeken bir özellik de enzim indüksiyonunun karanlık döneminde (sıçanlar için aktivite dönemi) daha belirgin olmasıdır.

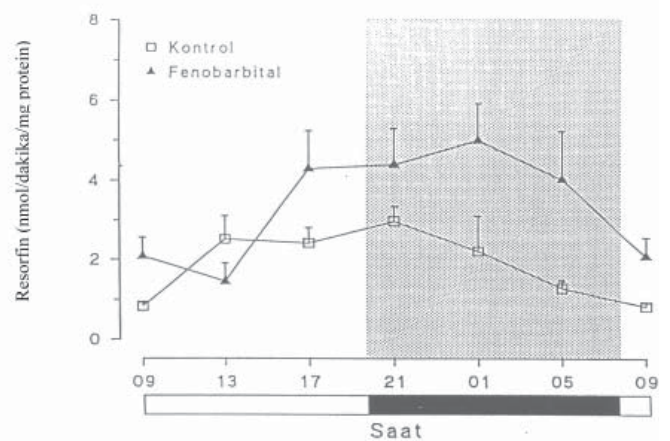
TARTIŞMA VE SONUÇ

Memelilerde hemen hemen tüm biyolojik fonksiyonların belirli aralıklarla düzenli tekrarlayan, dolayısıyla öngörülebilir, aktivite/düzyer değişiklikleri gösterdikleri bilinmektedir. Bu biyolojik ritimlerden en fazla incelenenleri 24 saat civarın-



Şekil 2: Sıçan karaciğerinde 7-etoksikumarin O-deetilaz enzimi aktivitesinin günüçi değişimine fenobarbitalin etkisi. Sıçanlar 12 saat aydınlık-12 saat karanlık döngüsü (08⁰⁰-20⁰⁰ aydınlık) ile senkronize edilmişlerdir. Fenobarbital grubuna dört gün süreyle günde 75 mg/kg i.p. fenobarbital uygulanmıştır. Kontrol (n=6-8) grubu günüçi fark göstermemekle beraber Fenobarbital (n=8-11) grubunda ise anlamlı fark bulunmuştur (ANOVA; p<0.001). Apsisteki siyaha boyalı kısım karanlık dönemini temsil etmektedir. Grafikte saat 0900 değeri iki defa kullanılmıştır.

da frekanslara sahip olan günüçi ritimler ile mevsimsel ritimlerdir. İnsan organizmasında kan hücrelerinin sayıları, vücut sıcaklığı, kan basıncı, kalp hızı, hormon ve nörotransmitter düzeyleri, hatta reseptör dansiteleri belirgin günüçi ritimler gösterirler. Biyolojik ritimlerden dolayı organizma günün farklı zamanlarında farklı fonksiyonel durumlarda bulunur. Bu durumun insan sağlığı açısından önemli özelliklerinden iki tanesi a) ilaçların absorpsiyon ve biyotransformasyon gibi farmakokinetik özellikleri, dolayısıyla etki yerlerinde ulaştıkları konsantrasyonlar uygulanma zamanına bağlı olarak farklılık gösterebilmesi, ve b) organizmadaki hedef yapıların ilaç du-



Şekil 3: Sıçan karaciğerinde 7-etoksiresorfin O-deetilaz enzimi aktivitesinin günüçi değişimine fenobarbitalin etkisi. Sıçanlar 12 saat aydınlık-12 saat karanlık döngüsü (08⁰⁰-20⁰⁰ aydınlık) ile senkronize edilmişlerdir. Fenobarbital grubuna dört gün süreyle günde 75 mg/kg i.p. fenobarbital uygulanmıştır. Hem kontrol (n=6-8) hem de Fenobarbital (n=8-11) grubunda anlamlı günüçi fark bulunmuştur (ANOVA; sırasıyla p<0.001 ve p<0.01). Apsisteki siyaha boyalı kısım karanlık dönemini temsil etmektedir. Grafikte saat 0900 değeri iki defa kullanılmıştır.

yarlılığı, dolayısıyla ilaca verdikleri yanıt açısından uygulanma zamanına bağlı farklılıklar gösterebilmesidir. Bu arada, çeşitli hastalık durumlarında hastalık semptomlarının ortaya çıkışı ve belirtilerin şiddetlenmesi açısından da zamansal organizasyonlar sözkonusudur (14).

Kronofarmakolojik çalışmalarda ilaçların absorpsiyon, dağılım, biyotransformasyon ve atılım gibi farmakokinetik özelliklerinin uygulanma zamanına bağlı olarak değişebildiği gösterilmiştir. Bunun temel nedeni ilaç farmakokinetiğini şekillendiren bazı fizyolojik fonksiyonların ve değişkenlerin de günüçi ritimler göstermesidir. Örneğin; midenin sıvı faz boşalma hızı sabah saatlerinde daha fazladır ve bazı ilaçlar sabahleyin alındıklarında günün diğer saatlerinde alınmalarına nazaran daha hızlı absorbe edilirler. Benzer şekilde, ilaç biyotransformasyonunda primer rol oynayan enzimlerin etkinliğindeki ritmik özelliklerin uygulama zamanına bağlı olarak ilaç konsantrasyonlarını değiştirebilmesidir (11,12).

Her memeli genomunda en az elli P-450 geni değişik kromozomlarda lokalize olmuştur. Steroitler, yağ asitleri, vitamin D₃, ilaçlar, çevre kirleticileri, toksikanlar gibi çeşitli zenobiyotikler sitokrom P-450 sistemi tarafından metabolize edilirler (15). Bir kısım P-450 enzim sistemi ise detoksifikasyonda rol oynar ve lipofilik zenobiyotikleri suda daha iyi çözülebilen dolayısıyla daha az etkili ve vücuttan daha kolay uzaklaştırılabilen şekillerine dönüştürür (16).

Sitokrom P-450'nin izozimlerinden çoğu indüklenebilir özelliktedir. Örneğin, fenobarbital gibi ilaçların tekrarlayarak uygulanması düz endoplazmik retikulum hipertrofinine neden olur ve yeni enzim sentezinin hızlanması sonucu birkaç gün içerisinde sitokrom P-450 miktarında önemli derecede artışa neden olur. İndüksiyon mekanizması detaylı olarak incelenmiştir ve sitokrom P-450 mRNA'sının transkripsiyonunda artış sonucu gerçekleştiği anlaşılmıştır (16).

Karaciğerde total P-450 düzeyinin ve çeşitli enzimlerin aktivitelerinin günüçi ritimler gösterdiği bildirilmiştir (2,3,4,5,6,7,8,11). Hepatik enzimlerin ritmik özelliklerinin sürekli ışık veya sürekli karanlığa maruz bırakılan hayvanlarda, en azından kısmen, çevrenin ışık düzeninden etkilendiği bildirilmiştir (2,3,4). Hepatik enzim aktivitelerinin çeşitli indükleyici ajanların verilmesinden sonra değiştirilebildiğini bildiren yayınlar da mevcuttur (9). Ancak indüklenen enzim aktivite ritimlerini nasıl etkilediği bilinmemektedir.

Çalışmamızda 24 saat süreyle dörder saatlik aralıklarla 200-250 g ağırlığında ve erkek sıçanlardan oluşan kontrol ve fenobarbitalle indüklenmiş deney hayvanı grupları oluşturularak sitokrom P-450 karma fonksiyonlu oksidaz enzimlerinden etilmorfin N-demetilaz, 7-etoksikumarin O-deetilaz ve 7-etoksirezorfin O-deetilazın aktivitelerindeki günüçi ritmik değişimler incelenmiştir. Bu enzimlerden etilmorfin N-demetilaz aktivitesinin günüçi ritim göstermediği, 7-etoksikumarin O-deetilaz ve 7-etoksirezorfin O-deetilaz aktivitelerinde ise anlamlı günüçi ritmik değişimler bulunduğu saptanmıştır. Fenobarbital ile yapılan enzim indüksiyonu ise günün sadece belirli saatlerinde, özellikle sıçanların aktivite dönemleri olan karanlık döneminde, enzim aktivitesinde anlamlı artışa neden olmuş, diğer saatlerde ise oluşan değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Sonuç olarak, biyolojik ritimlere ilişkin bilgi birikiminin son yıllarda artmasıyla insan biyolojisinin zamansal orga-

nizasyonu daha iyi anlaşılacak ve dolayısıyla günlük yaşamda daha fazla kullanılabilir hale gelmektedir. Bu çalışmanın bulguları da ilaç metabolizmasında rol oynayan mikrozomal enzimlerin aktivitesindeki gün içi değişikliklerin ilaçların uygulama zamanına bağlı olarak farmakokinetik farklılıklara ve dolayısıyla ilaç etkinliğinde değişikliklere neden olabileceğini düşündürmektedir. Benzer bilgilerin artması ve klinikte uygulanabilecek şekilde geliştirilmesi ile ilaçların kronofarmakokinetik özelliklerine uygun olarak seçilmiş zamanlarda uygulanmasında, ilaç etkinliğinin artırılmasında ve de yan etkilerinin azaltılmasında yarar sağlayabilir.

Yazışma Adresi

Zuhal Yıldırım

Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

06500 Beşevler, Ankara, Türkiye

Tel: 0 544 4111594 Fax: 0 312 2203238

E-mail: zyildirim2004@yahoo.com

KAYNAKLAR

1. Reinberg A, Smolensky MH. Circadian changes of drug disposition in man. *Clin Pharmacokinet* 1982; 7(5): 401-420.
2. Radzialowski FM, Bousquet WF. Circadian rhythm in hepatic drug metabolizing activity in the rat. *Life Sci* 1967; 6(23): 2545-2548.
3. Radzialowski FM, Bousquet WF. Daily rhythmic variation in hepatic drug metabolism in the rat and mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 1968; 163(1): 229-238.
4. Nair V, Casper R. The influence of light on daily rhythm in hepatic drug metabolizing enzymes in rat. *Life Sci* 1969; 8(23): 1291-1298.
5. Belanger PM. Chronobiologic variation in the hepatic elimination of drugs and toxic agents. *Ann Rev Chronopharmac* 1988; 4: 1-46.
6. Tredger JM, Chhabra RS. Circadian variations in microsomal drug-metabolizing enzyme activities in rat and rabbit tissues. *Xenobiotica* 1977; 7(8): 481-489.
7. Miyasaki Y, Yatagai M, Imaoka S, Funae Y, Motohashi Y, Kobayashi Y. Temporal variation in hepatic cytochrome P-450 isoenzymes in rats. *Ann Rev Chronopharmac* 1990; 7: 149-153.
8. Belanger PM, Lalande M, Labrecque G, Dore FM. Diurnal variations in the transferases and hydrolases involved in glucuronide and sulfate conjugation of rat liver. *Drug Metab Dispos* 1985; 13(3): 386-389.
9. Snell K, Mullock B (eds): *Biochemical toxicology a practical approach*. IRL Press Limited, Oxford, 1987, P: 183-215.
10. Belanger PM, Desgagne M, Boutet M. The mechanism of the chro-nohepatotoxicity of chloroform in rat: Correlation between covalent binding to hepatic subcellular fraction and histologic changes. *Ann Rev Chronopharmac* 1988; 5: 235-238.
11. Labrecque G, Belanger PM. Biological rhythms in the absorption, distribution, metabolism and excretion of drugs. *Pharmacol Ther* 1991; 52(1): 95-107.
12. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61: 882-888.
13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 (1): 265-275.
14. Lemmer B: *Temporal aspects of the effects of cardiovascular active drugs in humans*. Marcel Dekker Inc: Chronopharmacology: Cellular and Biochemical Interactions. New York, 1989, P: 525-541.
15. Gonzalez FJ. Molecular genetics of the P-450 superfamily. *Pharmacol Ther* 1990; 45(1): 1-38.
16. Arino E, Schenkman JB, Hodgson E: *Molecular aspects of oxidative drug metabolizing enzymes*. Nato ASI Series Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1995, Vol H 90 P:65-67.