

27706
27689

T.C.
Marmara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Toksikoloji
Anabilim Dalı

OPİPRAMOLÜN SIÇAN KARACİĞERİ GLUTATYON DÜZEYİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Ecz. EBRU ACAR

DANIŞMAN

Prof. Dr.F.Ömer ERSOY
Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İSTANBUL - 1993

TESEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren, her konuda destek ve yardımlarını gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım sayın hocam Prof. Dr. Ömer ERSDY'ya , çalışmalarım sırasında ilgi ve yardımlarından dolayı sayın hocam Doç. Dr. Buket ALPERTUNGA'ya ve Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim ve Araştırma görevlilerine teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI	1
2. GENEL KISIM	3
2.1. Opipramol	3
2.1.1. Opipramolün Yapısı	3
2.1.2. Opipramolün Absorbsiyon ve Dağılımı	3
2.1.3. Opipramolün Metabolizması ve Atılımı	4
2.1.4. Opipramolün Yan Etkileri ve Toksisitesi ...	5
2.1.5. Opipramolün Preparasyonu,Dozajı ve Tedavide Kullanılışı	7
2.2. Glutasyon	8
2.2.1. Glutasyonun Yapısı	8
2.2.2. Glutasyonun Vücutta Bulunuşu	10
2.2.3. Glutasyonun Biyosentezi	11
2.2.4. Glutasyonun Fizyolojik Fonksiyonları	14
2.2.5. Glutasyonun Nükleofil Olarak Fonksiyonları.	15
2.2.6. Glutasyon ile Zehirsizleştirme Reaksiyonlarının Önemi	18
2.2.7. Glutasyonun Miktar Tayini Yöntemleri	19
3. BULGULAR	21
3.1. Normal Karaciğer Glutasyon Seviyesinin Saptanması	21
3.2. Opipramol Verilmiş Deney Hayvanlarında Karaciğer Glutasyon Seviyesi Miktar Tayini.	22

3.2.1.	Düşük Doz Çalışmaları	23
3.2.1.1.	Bir Defalık Düşük Doz Çalışmaları	23
3.2.1.2.	Tekrarlanan Düşük Doz Çalışmaları	24
3.2.2.	Bir Defalık Yüksek Doz Çalışmaları	25
4.	DENEYSEL KISIM	27
4.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözeltiler ve Aletler	27
4.2.	Deney Hayvanları	29
4.3.	Enjeksiyon, Dokuların Hazırlanması ve Glutasyon Miktar Tayini	29
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	31
6.	ÖZET	34
7.	SUMMARY	36
8.	KAYNAKLAR	38

1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Elektrofilik karakterli eksojen maddeler vücuda dışarıdan alınabildiği gibi, bu özellikte olmayan maddelerin de karaciğerde monooksijenaz enzim sistemi etkisi ile elektrofilik metabolitlerine dönüşebilmeleri söz konusu olabilmektedir.

Bu tip elektrofilik maddeler vücutta yine özellikle karaciğerde bulunan nükleofil glutatyon ile konjuge olarak zehirsizleşebilirler.

Vücuttaki miktarı sınırlı olan glutatyonun konjugasyon reaksiyonları ile azalması ve tüketilmesi sonucu elektrofilik maddeler vücuttaki nükleofil karakterli hücre makromolekülleri ile reaksiyona girip hücre ölümlerine, karsinojen ve teratojen etkilere sebep olurlar.

Bu şekilde oluşan toksik etkinin en bilinen örneği parasetamolün toksik metabolitinin glutatyon ile konjugasyonu sonucu, yüksek dozda parasetamolün glutatyon havuzunu tüketip, karaciğer hasarı oluşturmasıdır.

Memeli hücrelerinde monooksijenaz enzimler katalizör- lüğünde, çifte bağ taşıyan maddelerin oksidasyonları sonucu epoksit türevlerine dönüştükleri bilinmektedir. Oksitlenmeye uygun çifte bağ taşıyan trisiklik antidepresan bir madde olan

opipramolün epoksit türevine dönüşebileceği ve bu epoksit metabolitinin de vücutta glutatyon ile konjugasyona uğrayabileceği düşünülerek yapılan bu çalışmada opipramol kullanımının karaciğerde glutatyon miktarında azalmaya sebebiyet verip vermediği araştırılmıştır. Benzer kimyasal yapıya sahip olan karbamazepin ile yapılan önceki bir çalışmada (1), karaciğer glutatyon seviyesinin etkilendiğinin saptanması da bu araştırmaya öncülük etmiştir.

Bu konuda daha önce opipramol ile yapılan bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

2. GENEL KISIM

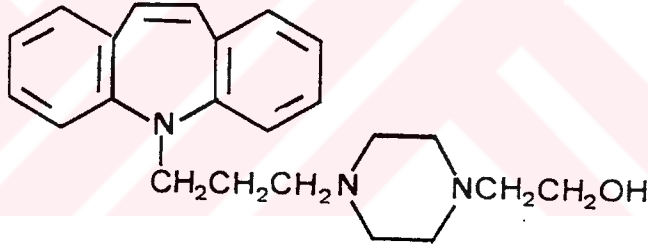
2.1. Opipramol

2.1.1. Opipramolün Yapısı

Trisiklik antidepresan bir madde olan opipramol, dibenzoazepin iminostilben türevidir (2).

Kimyasal formülü;

2 - { 4 - [3 - (5H - Dibenz [b,f] azepin - 5 -) propil] piperazin - 1 - } etanol. 2 HCl şeklindedir. (3).



Formül 1 - Opipramol

2.1.2. Opipramolün Absorbsiyon ve Dağılımı

Oral uygulamadan sonra çok iyi absorblandığı bildirilmiştir (3, 4). İlk geçiş etkisine uğradığı için sistemik etkisinin geciktiği bildirilmektedir (5).

Opipramol, yüksek oranda (>90) plazma proteinlerine bağlanmaktadır (6). Opipramol lipitte çözünür ve yaygın olarak dokulara dağılır, özellikle santral sinir sistemine kolayca

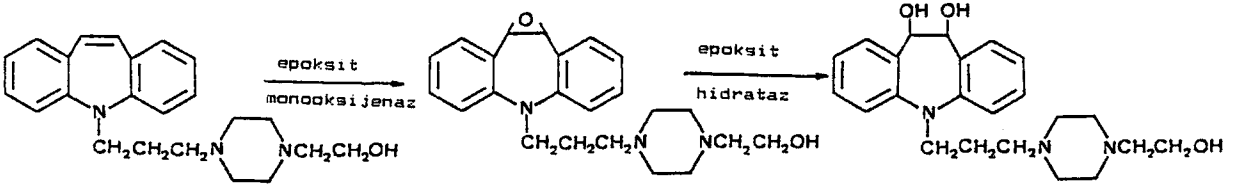
dağılılabılır (6,7). Değişmemiş halde hücre elemanlarına bağlanılır ve bunun sonucu yüksek doku konsantrasyonuna ve düşük plazma seviyesine neden olur (8).

Serum opipramol seviyesi ölçülmesi ile ilgili bir çalışmada ; opipramol serum peak konsantrasyonu 1.353 - 1.349 $\mu\text{g/ml}$ ve konsantrasyon - zaman eğrisinin zirveye ulaşma zamanı ise 2.25 - 2.70 saat olarak bildirilmiştir (9).

2.1.3. Opipramolün Metabolizması ve Atılımı

Karaciğer endoplazmik retikulumunda bulunan oksidatif enzim sistemi ile okside olur ve glukronik asitle konjugasyona uğrar (4, 8).

Biyotransformasyonda, 10-11 çifte bağda epoksidasyon olabileceği araştırılmış ve bu tip maddelerin epoksit türevlerine dönüştüğü bulunmuştur (10). Yapılan araştırmada benzer yapıdaki cyproheptadine 10-11 epoksit türevinin aynı zamanda epoksit hidrataz inhibitörü olduğu da saptanmış ve bu etkinin diğer maddeler içinde geçerli olduğu düşünülmüştür.



Şekil 1- Opipramol Metabolizması

Barbitüratlar, bazı sedatifler ve sigara dumanının mikrozomal enzim sistemine etki ile trisiklik antidepresan maddelerin hepatik metabolizmasını arttırdıkları bildirilmiştir (4). Opipramol, kısmen karaciğer safra sirkülasyonuna ve mideye geçer, idrarda reabsorblanır ve atılır (6).

Opipramolün metabolizması ile ilgili daha detaylı bilgi içeren literatüre rastlanmamıştır.

2.1.4. Opipramolün Yan Etkileri ve Toksisitesi

Yan etki olarak; ağız kuruluğu, konstipasyon, baş dönmesi, taşikardi, kalp çarpıntısı, bulanık görme, üriner retansiyon, aşırı terleme, yorgunluk, postural hipotansiyon ve tremor görülebilmektedir. Bu semptomların dozun azaltılması ile kontrol altına alınabileceği ve antikolinergik etkilere karşı tolerans gelişebileceği bildirilmiştir(4,11).

Toksik reaksiyonların en önemlileri antimüskarinik etkiler ve cerebral toksisitedir fakat kalple ilgili toksik etkiler ve ortostatik hipotansiyon da önemli bir problemdir(4) Toksik etkiler hassas kişilerde (örn; yaşlılarda) tedavi sırasında da görülebilir (8).

Aşırı doz alınması ile gelişen toksik etkiler hakkında yayınlanan raporlardan bazıları aşağıda bildirilmiştir:

-Aşırı doz almış 27 yaşındaki kişide uyku hali oluşmuştur (12).

-9 kg. ağırlığında bir çocuk 1 g. opipramol aldıktan sonra, ilk başta oluşan komadan belirgin bir düzelme meydana gelmesine rağmen ani ve beklenmeyen ölüm bildirilmiştir (13).

-Aşırı doz aldığı rapor edilen 18 olaydan 6 tanesinin ölümle sonuçlandığı, bunlardan 4 olayın ani kalp durması ile oluştuğu bildirilmiştir (13).

-Opipramolle intihar vakasında 100 tablet opipramol (5.0 g) alındığı ve ilk başta oluşan bilinç kaybından sonra bir dizi epileptik nöbet ile ölüm meydana geldiği rapor edilmiştir. Opipramol dozu 77 mg / kg olarak saptanmıştır (14).

2.1.5. Opipramolün Preparasyonu, Dozajı ve Tedavide Kullanılışı

Opipramol piyasada 50 mg'lık draje, tablet ve film tablet halinde bulunmaktadır ve günlük dozu 150 - 300 mg.dır (3,15).

Hafif vakalarda günde 50 - 100 mg, orta ciddi vakalarda 150 mg tavsiye edilmekte ve şiddetli vakalarda günde 300 mg'a kadar opipramol kullanılmaktadır.

Opipramolün terapötik ve letal dozları diğer trisiklik antidepresanlara göre daha yüksektir (8).

Opipramolün bazı yan etkilerine tolerans geliştiği, bu yüzden tedaviye düşük dozda başlanması ve daha sonra önceden belirlenen doza kadar çıkması önerilmektedir (16).

Trisiklik antidepresan bir madde olan opipramolün çeşitli ruhsal bozukluklar ve psikosomatik hastalıklarda kullanılması tavsiye edilmiştir.

Opipramolün diğer antidepresanların aksine biyojenik amin geri alınmasını (re-uptake) inhibe eden etkisinin olmadığı ve norepinefrin ve serotonin inhibitörü olarak inaktif olduğu bildirilmiştir (17). Opipramolün belirgin sedasyon etkisi yanında periferik - santral antikolinergik etkisinde bulunur (6).

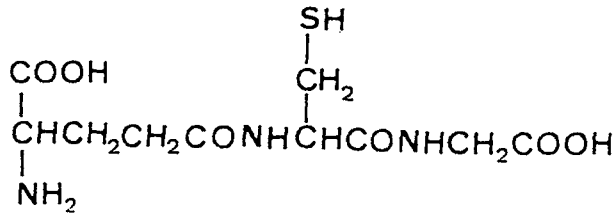
Opipramol, dopamin salıverilmesini ve metabolizmasını arttırır (18) ve NMDA (N- metil D- aspartat) agonistidir(19).

2.2. Glutatyon

2.2.1. Glutatyonun Yapısı

Memeli hücreleri, toksik maddeler ve seluler metabolizmanın normal oksidatif ürünleri ile oluşan zararlı etkileri minimuma indirmek için koruyucu mekanizmalara sahiptir. En önemli endojen koruyucu sistem ise glutatyon redoks siklusudur (20).

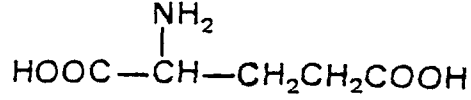
Glutatyon, 1921 yılında F.G.Hopkins tarafından bulunmuş ve yapısı tripeptid - L - glutamil - L - sisteinil glisin olarak tanımlanmıştır (21).



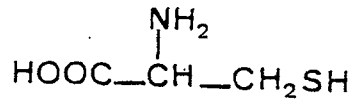
Formül 2 - Glutatyon

Glutatyonun (GSH) yapısını 3 aminoasit oluşturur.

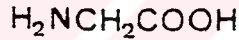
1- Glutamik asit



2-Sistein



3- Glisin



GSH molekülü 2 karakteristik yapıya sahiptir. Normal peptidaz aktiviteye dayanıklı γ - glutamil bağı ve sülfhidril grubudur (21,22).

Sülfhidril grubu nükleofil olarak etki eder, maddelerin elektrofilik bölümlerine hücum eder ve atomlarla yer değiştirir(23). γ -glutamil grubunun transferi ise GSH kullanımında önemli bir basamaktır(22).

Intraselüler glutatyonun büyük kısmı tiyol şeklinde (GSH) bulunmasına karşı, disülfidler (G-SS-protein), tiyoesterler ve daha az olarak da glutatyon disülfid (GSSG) glutatyonun

toplam hücre miktarına etki eder(21).

GSH, intraseluler non-protein tiyolün %90'ını oluşturur(24) ve intraseluler GSH, GSSG'nin 20 katı daha fazladır(22).

GSH, oksidasyon ve transhidrojenasyon ile GSSG'ye dönüşebilir(22).

2.2.2. Glutatyonun Vücutta Bulunuşu

Glutatyon, bütün memeli hücrelerinde yaklaşık 0.1 - 10 mM konsantrasyonda bulunur(22). Intraseluler GSH sitosolde bulunur, daha az miktarda mitokondride de görülmektedir(21). GSH ve GSSG düşük konsantrasyonlarda plazma, safra ve glomerüler filtrat gibi değişik vücut sıvılarında da bulunmaktadır(21). Kan plazmasında çok düşük konsantrasyonda bulunur. Sıçan kan plazmasında GSH + GSSG 25 - 35 μ M, bunun insandaki eşdeğeri ise 1 - 3 μ M dur(22).

GSH + GSSG intraseluler konsantrasyonu, sistein ve sistinden daha fazladır. Bu yüzden sülfür içeren aminoasitler için depo görevi yaparlar(22).

Memelilerde, yetişkin, fetal ve neonatal dönemde GSH biyosentezinde kullanılması ve detoksifikasyon reaksiyonlarında önemli farklılıklar vardır(24).

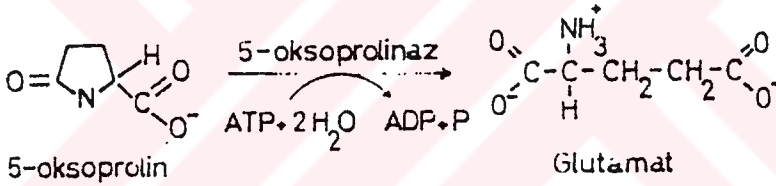
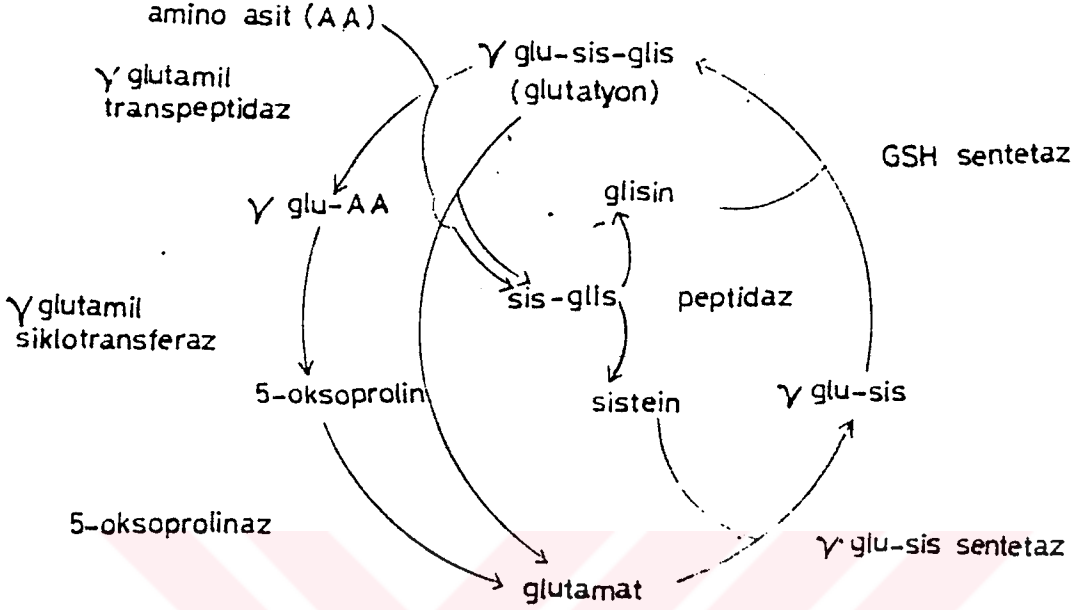
İnsanda yeni doğanın karaciğerinde sentezlenmiş GSH'ın azaldığı düşünülmüştür(25).Yeni doğmuş farede GSH normalin % 33'ü , sıçanda, fetus veya yeni doğmuşta yetişkin miktarınının % 40 ve % 60 'olarak bulunmuştur(27,28).

Yapılan bir çalışmada hepatic GSH'ın 2 havuzu olduğu saptanmıştır. Değişken havuzda 1.7 saat yarılanma ömrü ile azalma olur ve toplam hepatic GSH'ın % 50-60 'ına karşılık gelir.Stabil havuz ise fizyolojik tükenmelere dayanıklı ve yarılanma ömrü 22.8 saatdir(24).

2.2.3.Glutatyonun Biyosentezi

GSH, birçok memeli hücresinde sentez edilebilir.Karaciğer özellikle aktif ve nispeten yüksek GSH seviyesine sahiptir (4 - 10 mM) (22).

Glutatyonun asıl aminoasitlerinden sentezi γ -glutamil sistein sentetaz ve glutatyon sentetaz enzimleri ile katalizlenir(21).



Şekil 1- Glutatyonun Biyosentezi

Siklus invivo olarak oluşabilir ve aminoasitlerin transferine aracılık eder(22).

Glutatyon, kendisini oluşturan aminoasitlerden 2 reaksiyon ile oluşur(29,30) ve herbiri 1 mol ATP içerir.

Birinci adım γ -glutamyl sistein sentetaz katalizör- lüğünde L- glutamat ve L-sistein arasında L- glutamil bağı oluşmasıdır(24).



Bu reaksiyon γ -glutamat için spesifiktir fakat ikinci aminoasit için daha az spesifiklik gösterir(24).

İkinci adımda glutatyon sentetaz , glisinin glutatyon oluşturmak için γ -glutamil sisteine katılmasını sağlar(24).



GSH biyosentezi feedback inhibasyon ile düzenlenir. γ -glutamil sistein sentetaz GSH tarafından feedback inhibe edilir(31).

Vücuttaki bazı dokular özellikle karaciğer , GSH biyosentezinde çok aktiftir, böbrek ise GSH'ın kan plazmasından atılmasında aktif rol oynar(22).

GSH'ın yarılanma ömrü böbrekte 1 saatten az, eritrosit, sinir dokusu, akciğer ve dalakta birkaç gün olmak üzere değişiklik gösterir(21).

Karaciğer hücrelerinde serbest sistein GSH'ın % 2' si kadardır ve GSH kullanımını arttığı durumlarda sistein GSH sentezinde kullanılır (21).

Hepatik glutatyon düzeyindeki değişimler sentez ve tüketilmesi aşamasında bir çok faktöre bağlıdır.

Sentezi etkileyen 3 faktör :

1- γ -glutamilsistein sentetaz aktivitesi (glutasyonun sentezindeki hız kısıtlayıcı enzimdir).

2- Glutasyon sentezi enzimleri için ATP bulunması.

3- Substrat ve aminoasitler (sistein, metionin, glutamat ve glisin) bulunması (32).

2.2.4. Glutasyonun Fizyolojik Fonksiyonları

- Glutasyon kuvvetli bir nükleofil madde olarak bilinir. Elektrofilik maddeler ve karsinojen metabolitler glutasyon konjugatları oluşturarak inaktive edilirler.

- Peroksitler ve serbest radikallerin metabolizmasında redüktaz olarak görev alır.

- Membran bütünlüğü ve hücre iskeletinin korunmasını sağlar.

- Protein ve DNA sentezine katılır.

- Protein konformasyonu ve enzim aktivitesi ayarlanmasında görev alır.

- Nörotransmitter salınımı arttırılmasını sağlar.
- Elektrofilik maddelerin önemli bir kısmı olan aldehitlerin oksidasyonunda kullanılır (21,22,33).

Bu tip reaksiyonlar kendiliğinden olabilir fakat çoğunlukla glutatyon transferaz ve glutatyon peroksidaz ile katalizlenirler (33).

Glutatyon tüketiminde 3 faktör önemlidir.

- 1- Glutatyonun kimyasal kullanımı
- 2- İndirgenmiş glutatyon oksidasyonunda artma
- 3- Hücre dışına sızıntı (32).

2.2.5. Glutatyonun Nükleofil Olarak Fonksiyonları

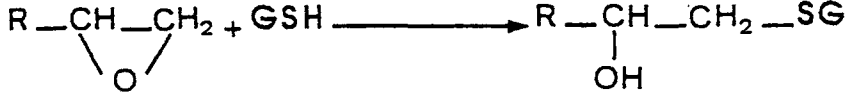
Glutatyon ile konjugasyon glutatyon-S-transferaz ile katalizlenir. Glutatyon-S- transferaz bir çok hücrede bulunur. Membrana bağlı glutatyon-S- transferaz daha çok endoplazmik retikulumda bulunur fakat elektrofilik maddelere karşı afiniteye sahiptir (33,21).

Glutasyon konjugasyonu ile metabolize olan önemli endojen bileşikler olduğu halde (lökotrienler), GSH ile reaksiyona girebilen bir çok elektrofilik madde eksojen orijindir ve bir çok memeli hücresi endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom p-450'ye bağlı monooksijenaz sistem ile reaksiyon sonucu oluşurlar. Yaygın olarak kullanılan bir analjezik olan parasetamol bu tip eksojen maddelerdendir (33).

GSH değişik tipte elektrofilik maddelerle reaksiyona girebilir :

- Halojenli nitro aromatik maddeler
- Arenoksitler
- Arilnitrobileşikler
- Alkil halojenürler
- Aril halojenürler
- Aromatik hidrokarbonlar
- Organofosfor bileşikleri
- Isotiyosiyanatlar
- Aril epoksitler
- Alkil epoksitler
- α β doymamış bileşikler (21,22,24,33,34).

2- Epoksit ile konjugasyon



Merkaptürük asitler barsakta diğer ürünlere çevrilebilirler veya feçese geçebilirler. Merkaptürük asitler idrarla atılırlar (22).

2.2.6. Glutatyon ile Zehirsizleştirme Reaksiyonlarının Önemi

Hücrede glutatyon miktarının tükenmesi sonucu, GSH ile reaksiyona girebilen maddeler toksik etkilerini gösterirler. Bu durumda GSH tükenmesi ile hücrenin ölümü meydana gelir. GSH tükenmesi ile hücrenin yaşama kabiliyetinin azalması arasındaki mekanizma şöyle açıklanabilir: Hayati hücre fonksiyonları GSH'a dayanır veya hücre içi diğer nükleofiller GSH tükenmesi ile elektrofilik hücumlar için hedef haline gelir (21).

Toksik maddelere maruziyet glutatyon kullanılmasına bu da glutatyon azalmasına neden olur. Glutatyon normal düzeyinin % 20 - 30 altına düştüğü zaman toksik maddeler hücreye zarar vererek nekroza neden olurlar (24,35,36).

GSH hepatik düzeyini arttırmak için yapılan tedavi; L-sistein veya L-metionin (37), N-asetilsistein (32) veya 2-oksoiyazolidin karboksilat (38) gibi L-sistein ön maddeleri ile yapılır. Bu maddeler ile istenmeyen yan etkilerde görülebilir, örneğin L-sistein toksik olabilir (39).

Ağız yolu ile glutatyon verilmesinin de karaciğerde glutatyon sentezinde artış oluşturduğu bildirilmiştir (40).

2.2.7. Glutatyonun Miktar Tayini Yöntemleri

Dokularda ve kanda glutatyon miktar tayini yapmak için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

İndirgenmiş ve okside olmuş glutatyon için hassas bir yöntem; glutatyonun metilglioksal ile glioksalaz I enziminin katalizörlüğü ile aramade oluşturması ve bu ara maddenin glioksalaz II ile laktik asit ve glutatyona dönüştürülmesidir (41).

Glutatyonun fluorimetrik (42,43), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (44-52) ve gaz likit kromatografisi ile miktar tayini yapılabilir (53).

Ellman tarafından önerilen ve bir çok çalışmada (1,54,55,56) tercih edilen ve Ellman belirtecinin (5-5¹-Ditiyobis [2-nitro benzoik asit] ; 3 karboksi - 4 - nitro - fenil di sülfit) glutatyon ile reaksiyonu sonucu oluşan renkli bileşimin absorbansınının 412 nm. de ölçülmesi ile glutatyon miktar tayini yapılabilir (57). Çalışmamızda Ellman belirteci kullanılan bir yöntem uygulanmıştır.



3. BULGULAR

Oksitlenmeye uygun çifte bağ taşıyan opipramolün vücutta epoksit türevine dönüşebileceği ve karaciğerdeki glutatyon seviyesinde azalmaya neden olabileceği düşünülerek yapılan bu çalışmada, karaciğerde glutatyon seviyesinin saptanması için kullanılan miktar tayini yöntemi; glutatyonun DTNB (Ellman belirteci: 5-5' - Ditiyo-bis [2 - nitro benzoik asit]; 3 karboksi - 4 -nitrofenil disülfid) ile oluşturduğu ürünün absorbansının spektrofotometrede 412 nm. de ölçülmesidir (54).

Kullanılan yöntem çok denenmiş bir yöntem olmasına rağmen önce saf glutatyon ile çalışma gerçekleştirildi ve 0-80µg glutatyon aralığında reaksiyonun lineer olarak yürüdüğü saptandı.

3.1. Normal Karaciğer Glutatyon Seviyesinin Saptanması

Yöntem denendikten sonra, deney hayvanlarının normal karaciğer glutatyon seviyeleri ölçüldü. Deney hayvanları olarak 200 -300 g ağırlığında erkek beyaz sıçanlar ile çalışıldı. Deney hayvanları eter anestezisi altında abdominal aorttan kan alınarak öldürüldü. Karaciğer çıkartılıp fosfat ve sukroz tamponu içinde homojenize edildi. Santrifüje edilip üsteki ber-

rak kısma trikloroasetik asit çözeltisi eklendi ve proteinler çöktürüldü. Tekrar santrifüje edildi ve elde edilen berrak kısımdan glutatyon miktar tayini yapıldı. Örneklerde saptanan normal glutatyon seviyeleri, ortalama ve standart sapmaları Tablo 1 'de verilmektedir.

Tablo 1 - Karaciğer normal GSH seviyesi

KARACİĞER(g.)	mg GSH / 100 g. Karaciğer
7.17	152.7
7.19	153.1
7.92	154.5
7.35	156.6
8.23	158.3
8.38	159.8
8.46	159.9

Ort. \pm S.S = 156.4 \pm 3.1
Saha = 152.7-159.9

3.2. Opipramol Verilmiş Deney Hayvanlarında Karaciğer Glutatyon Seviyesi Miktar Tayini

Deney hayvanlarına opipramol, düşük doz (4 mg /kg) ve yüksek doz (50 mg /kg) olmak üzere iki ayrı dozda verildi. Opipramol enjeksiyonluk suda çözülüp i.P.yoldan verildi.

3.2.1. Düşük Doz Çalışmaları

Düşük doz çalışmaları bir defalık ve 3 gün tekrarlanan şekilde olmak üzere 2 ayrı biçimde yapıldı.

3.2.1.1. Bir Defalık Düşük Doz Çalışmaları

Deney hayvanlarına i.P. yoldan 4 mg /kg opipramol verildikten 3 saat sonra öldürülerek karaciğer glutatyon seviyeleri ölçüldü. Çalışmaların sonuçları Tablo 2 'de verilmektedir.

Tablo 2 - Bir defalık düşük dozda opipramol uygulanmasından sonraki karaciğer glutatyon seviyesi

KARACİĞER (g.)	mg GSH / 100 g. Karaciğer	% GSH Azalması
10.11	133.0	14.90
6.16	133.4	14.70
6.23	136.4	12.79
6.41	138.2	11.63
6.51	145.4	7.07

Ort. \bar{x} S.S = 137.375.0

Saha = 133.0-145.4

Deney hayvanlarında saptanan normal karaciğer glutatyon seviyesi ortalaması ile bir defalık düşük doz uygulanan hayvanlarda elde edilen ortalamalar arasındaki farklılık istatistiksel anlamlı bulunmuştur.

$$t=8,215 > 2,228 (t \%5, 10) \quad p < 0,05$$

$$> 3,169 (t \%1, 10) \quad p < 0,01$$

$$> 4,221 (t \%0,1, 10) \quad p < 0,001$$

3.2.1.2. Tekrarlanan Düşük Doz Çalışmaları

Deney hayvanlarına 3 gün süreyle günde 2 kez i.P. yoldan opipramol verildi. Dördüncü gün verilen ilaçtan 3 saat sonra öldürülerek karaciğer glutatyon düzeyleri saptandı. Çalışmaların sonuçları Tablo 3 'de verilmektedir.

Tablo 3 - Tekrarlanan düşük dozda opipramol uygulanmasından sonraki karaciğer glutatyon seviyesi

KARACİĞER (g.)	mg GSH / 100 g. Karaciğer	% GSH Azalması
6.59	140.6	10.14
6.00	142.1	9.11
6.32	143.2	8.40
6.21	144.9	7.30
6.00	146.4	6.45

$$\text{Ort. } \bar{x} \text{ S.S} = 143.4 \pm 2.3$$

$$\text{Saha} = 140.6 - 146.4$$

Deney hayvanlarında saptanan normal karaciğer glutatyon seviyesi ortalaması ile bir defalık düşük doz uygulanan hayvanlarda elde edilen ortalamalar arasındaki farklılık istatistiksel anlamlı bulunmuştur.

$$t=7,908 > 2,228 \text{ (t \%5, 10)}$$

$$> 3,169 \text{ (t \%1, 10)}$$

$$> 4,221 \text{ (t \%0,1,10)}$$

3.2.2. Bir Defalık Yüksek Doz Çalışmaları

50 mg/kg opipramol toksik doz olarak i.P. yoldan deney hayvanlarına verildi ve 3 saat sonra öldürülerek karaciğer glutatyon seviyesi ölçüldü. Çalışmaların sonuçları Tablo 4'de verilmektedir.

Tablo 4- Bir defalık yüksek dozda opipramol uygulanmasından sonraki glutatyon seviyesi

KARACİĞER(g.)	mg GSH / 100 g. Karaciğer	% GSH Azalması
8.88	95.5	38.47
8.95	97.7	37.52
5.37	102.3	34.63
5.31	117.4	24.94
5.14	124.1	20.67

$$\text{Ort. } \pm \text{ S.S} = 107.4 \pm 12.7$$

$$\text{Saha} = 95.5 - 124.1$$

Deney hayvanlarında saptanan normal karaciğer glutasyon seviyesi ortalaması ile bir defalık düşük doz uygulanan hayvanlarda elde edilen ortalamalar arasındaki farklılık istatistiksel anlamlı bulunmuştur.

$t=9,982 > 2,228$ (t %5 ,10)

$> 3,169$ (t %1 ,10)

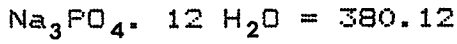
$> 4,221$ (t %0,1,10)

4. DENEYSEL KISIM

4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Çözeltiler ve Aletler

Kimyasal Maddeler :

- 3 - Sodyum fosfat. 12 H₂O



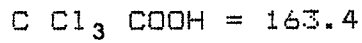
Riedel-de Haen, No: 04277

- Sükroz; sakkaroz



No: S-8501, Sigma

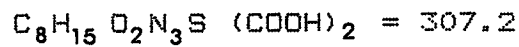
- Triklor asetik asit



Merck, No: 810

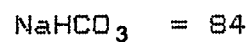
- DTNB; Ellman belirteci

5,5' - Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)



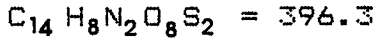
Sigma, No: D-8130

- Sodyum bikarbonat



Merck, No: 6323

- **Glutatyon**



Merck, No: 40.90

Cözeltiller :

- 0.1 M Na fosfat (pH 7.0)

9.5 g sodyum fosfat tartıldı, distile su ile 250 ml'ye tamamlandı. 1N HCl ile pH 7.0'ye ayarlandı.

- 0.1 M Na fosfat pH (7.4)

19 g Na fosfat tartıldı ve distile suda çözüldü. 500 ml'ye tamamlandı. 1 N HCl ile pH ayarlandı.

- 0.1 M Na fosfat pH (8.0)

19 g Na fosfat tartıldı ve distile su ile çözüldü. 500 ml'ye tamamlandı. pH 8.0'a ayarlandı.

- 0.25 M Sükroz

21.4 g sükroz tartıldı, distile suda çözüldü. 250 ml'ye tamamlandı.

- % 25 Triklor asetik asit

6.25 g triklor asetik asit tartıldı, distile su ile 25 ml'ye tamamlandı.

- DTNB Cözeltisi

4 mg DTNB, 1 ml 0.1 M Nafosfat (pH 7.0) tamponu içinde çözülüp 1.5 mg/ml NaHCO₃ ilave edildi.

Aletler

Spektrofotometre = Spectronic - 20, Bausch - and Lomb

Santrifüj = J - 21 B Beckman

pH metre = Metrohm 654

4.2. Deney Hayvanları

200 - 300 g ağırlığında Wistar Albino beyaz sıçanlar kullanıldı. Standart pellet yemi ile beslendiler.

4.3. Enjeksiyon, Dokuların Hazırlanması ve Glutatyon Miktar Tayini

Deney hayvanlarına enjeksiyonda, her kullanımda taze hazırlanan opipramol çözeltisi kullanıldı. Opipramol enjeksiyonluk suda çözülüp i.P. yoldan 0.5 ml verildi, enjeksiyondan 3 saat sonra eter anestezisi altında abdominal aorttan kan alınarak öldürüldüler. Karaciğer çıkartıldı, su ile yıkanarak kandan temizlendi ve kurutma kağıdı ile kurutulularak tartıldı. Ağırlığının iki misli 0.1 M Na fosfat(pH 7.4) ve 0.25 M Sükroz

tamponu içinde teflon başlıklı ve motorlu homojenizatörde homojenize edildi. Doku homojenatları 4 C de 15 dakika 4000 rpm. de santrifüje edildi. Üstteki berrak çözeltilerden 2 ml alındı, 0.5 ml % 25 triklorasetik asit ilave edildi ve proteinlerin çökmesi için 4 C de 30 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda 4 C de 15 dakika 3000 rpm. de santrifüje edildi. Üstteki berrak kısımda glutatyon miktar tayinine geçildi. Miktar tayini için üstteki çözeltilerden alınan 0.1 ml örnek, içinde 4 ml 0.1 M Na fosfat pH (8.0) olan küvet içine alındı. Bu çözeltiliye ayrıca 0.03 ml DTNB çözeltisi ilave edildi. Referans küvete 4 ml 0.1 M Na fosfat (pH 8.0), 0.1 ml Na fosfat (pH 7.4) - trikloroasetik asit karışımı (4:1 oranında) ve 0.03 ml DTNB ilave edildi. Örnekler hafifçe karıştırıldı ve absorbansları 412 nm. de ölçüldü.

Her örnek ile 3 paralel çalışma yapıldı ve ortalamaları alındı. Ölçümler arasında değişim 0.010 değerini aşmadı. Her ölçüm seansında saf glutatyon ile de miktar tayini tekrarlandı ve değişim olmadığı gözlemlendi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, yapısında çifte bağ taşıyan ve organizmada epoksit metabolitine dönüştüğü bilinen opipramol maddesinin karaciğer glutatyon seviyesinde düşme oluşturup oluşturmayacağı araştırılmıştır. Bu amaçla deney hayvanlarına i.P. yoldan opipramol verilmiş ve daha sonra karaciğer glutatyon seviyeleri spektrofotometrik bir yöntem ile ölçülerek değişiklik gözlenmiştir.

Çalışmamızda öncelikle deney hayvanlarının normal karaciğer glutatyon seviyeleri saptanmıştır. Deney hayvanları olarak kullanılan sıçanlar eter anestezisi altında öldürülerek glutatyon seviyeleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre bu seviye 7 deney hayvanında 156.4 ± 3.1 mg GSH /100 g karaciğer olarak saptanmıştır.

Deney hayvanlarına ilaç verilmesi, düşük ve yüksek doz olmak üzere 2 değişik şekilde yapılmıştır. Düşük doz uygulanması da bir defalık ve 3 günde 2 kez tekrarlanan doz olarak 2 ayrı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Bir defalık düşük doz olarak 4 mg/kg opipramol i.P. olarak enjekte edilerek 3 saat sonra karaciğer glutatyon seviyesi ölçülmüştür. 5 deney hayvanının hepsinin glutatyon seviyelerinde düşme saptanmış ve ortalama glutatyon değeri

137.3 \pm 5.0 mg GSH / 100 g karaciğer olarak tespit edilmiştir. % 12.2 oranında düşük bu değer normal seviyeden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur.

Tekrarlanan düşük doz çalışmasında 5 deney hayvanına 4 mg/kg opipramol 3 gün süre ile günde 2 kez verilmiş ve son enjeksiyondan 3 saat sonra karaciğer glutatyon seviyesi ölçümü yapılmış, ortalama değer 143.4 \pm 2.3 mg GSH/100 g karaciğer olarak bulunmuştur. Deney hayvanlarının hepsinin glutatyon değerlerinde düşme olmuştur. % 8.3 oranında düşük bu değer de normal seviyeden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur.

Yüksek doz olarak 50 mg/kg ilaç uygulanarak 5 deney hayvanında yapılan çalışmalarda karaciğer glutatyon miktarı ortalama 107.4 \pm 12.7 mg GSH /100 g karaciğer olarak tespit edilmiştir. Deney hayvanlarının hepsinde karaciğer glutatyon seviyelerinde düşme meydana gelmiştir. Elde edilen % 31.3 oranında düşük bu ortalama seviyede normal seviyeden istatistiksel olarak anlamlı farklıdır.

Bu sonuçlardan anlaşılacağı gibi opipramol maddesi deney hayvanı olarak kullandığımız sıçanlarda gerek düşük dozda gerekse yüksek dozda karaciğer glutatyon seviyelerinde düşmelere sebebiyet vermiştir. Bu düşme düşük dozda % 7.07 - 14.9 arasında gerçekleşirken yüksek dozda % 24.94 - 38.47 arasın-

da bir değere ulaşmıştır.

Glutatyon düzeyinde saptanan bu azalmaların, opipramolün elektrofilik karakterli epoksit türevinin glutatyon ile konjugasyonu sonucu olduğu düşünülmektedir. Nükleofil karakterli glutatyon elektrofilik karakterli bu metabolitle hemen konjugasyona uğrar ve mevcut glutatyon havuzunun azalması ile vücut bu tip elektrofili karakterli maddelere karşı hassas hale gelir.

Çalışmamızda ilaç verildikten kısa bir süre sonra glutatyon seviyesi ölçüldüğü için glutatyon azalmasının sentez olaylarının etkilenmesinden kaynaklanmadığı özellikle değişken havuzdaki glutatyonun tüketilmesi ile oluştuğu düşünülmektedir.

6. ÖZET

Bu çalışmada organizmada epoksit metabolitine dönüştüğü bilinen opipramol maddesinin kullanımının karaciğerde mevcut glutatyon miktarında azalma yapıp yapmadığı incelenmiştir.

Bu amaçla deney hayvanlarına i.P. olarak opipramol verilmiş ve daha sonra karaciğer glutatyon seviyeleri spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür.

Yapılan ilk ölçümlerde deney hayvanlarının normal karaciğer glutatyon seviyesi ortalama 156.4 ± 3.1 mg GSH / 100g karaciğer (n=7) olarak bulunmuştur. Opipramol deney hayvanlarına düşük ve yüksek olmak üzere 2 ayrı dozda verilmiştir. 4 mg/kg tek defalık düşük verilmesinde karaciğer GSH seviyesi ortalama olarak 137.3 ± 5.0 mg GSH / 100 g karaciğer'e (n=5) düşmüş, 3 gün günde 2 kez tekrarlanan düşük doz verilmesinde de 143.4 ± 2.3 mgGSH/100 g karaciğer (n=5) olarak yine normal ortalamadan düşük bir değer bulunmuştur.

50 mg/kg'lık tek yüksek doz uygulamasında deney hayvanlarının karaciğer GSH seviyesin de daha fazla düşme ile ortalama seviye 107.4 ± 12.7 mg GSH/100 g karaciğer (n=5) olarak saptanmıştır.

Düşük ve yüksek doz ilaç uygulanmış deney hayvan gruplarından elde edilen karaciğer GSH seviyesi ortalamaları normal seviyeden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur.



7. SUMMARY

In this study, it was investigated that opipramol, a tricyclic antidepressant, which is known to be metabolized to an electrophilic epoxide derivative in the body, causes any decrease in the hepatic glutathion (GSH) level in rats due to the conjugation of this metabolite with hepatic GSH.

This was done by administering rats with opipramol and than determining their hepatic GSH levels by means of a spectrophotometric method.

Opipramol was administered I.P. to test animals in two dose levels, low (4 mg/kg) and high (50 mg/kg). In order to take into account of the response of the liver to repeated doses, repeated low doses of opipramol were also administered to test animals 3 days, two times a day. Subsequent GSH levels were compared with control.

The resultant GSH levels were 156.4 ± 3.1 mg GSH / 100 g liver , 137.3 ± 5.0 mg GSH / 100 g liver in the low dose group (n=5), 143.4 ± 2.3 mg GSH / 100 g liver in the repeated low dose group (n=5) and 107.4 ± 12.7 mg GSH / 100 g liver in the high dose group (n=5).

As it can be seen, the liver GSH levels of all groups of animals administered with opipramol, were found decreased and this groups produced statistically significant differences in GSH levels relative to controls.



8. KAYNAKLAR

- 1- Yeşilaltay, A.K. : "Karbamazepinin Sıçan Karacığıeri Glutasyon Düzeyine Etkisinin Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 1991.
- 2- Caille, G., Sauriol, C., Albert, J.M., Mockle, J.A., Panisset, J.C.: Rev. Can. Biol., 31, 59 - 71 (1972).
- 3- Moffat, A.C.: "Clarke's Isolation and Identification of Drugs", 2.Edition, S.832, The Pharmaceutical Press, London, 1986.
- 4- Gilman, A.G., Goodman, L.S., Gilman, A.: "Goodman and Gilman's' The Pharmacolcglcal Basis of Therapeutics", 8.Ed., S.405 - 414, Macmillan Press, New York, 1990.
- 5- Pedersen, O.L., Gram, L.F., Kristensen, C.B., Moller, M., Thayssen, P., Bjerre, M., Kragh-Sorensen, P., Klitgaard, N.A., Sindrup, E., Hole, P., Brinklov, M.: Eur. J. Clin. Pharmacol., 23, 513 - 521 (1982).
- 6- Kastrbup, E.K., Boyd, J.R.: "Drug Facts and Comparisons" S.1220, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1982.

- 7- Katzung, B.G.: "Basic and Clinical Pharmacology" 3. Edition, 6.327 - 335, Appleton & Lange, Beirut, 1987.
- 8- Bickel, M.: Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm., 11, 147 - 176 (1975).
- 9- Kanarkowski, R., Wichlinski, L.M.: Materia Medica Polona, 17, 85 - 87 (1985).
- 10- Frigerio, A., Pantarotto, C.: J. Pharm. Pharmac., 28, 665 (1976).
- 11- Anon.: Br. Med. J., 2, S.102 - 104 (1968).
- 12- Pederson, O.L.: Eur. J. Clin. Pharmac., 23, 513-521 (1982).
- Ref: Moffat, A.C.: "Clarke's Isolation and Identification of Drugs", 2. Edition, The Pharmaceutical Press, London, 1986.
- 13- Fuge, C.A.: Br. Med. J., 4, 108 (1967). - Ref: Reynolds, J.E.F., Prasad, A.B.: " Martindale The Extra Pharmacopeia ", 28. Edition, The Pharmaceutical Press, London, 1982
- 14- Angst, J., Brandenberger, H., Herrmann, B.: Psychopharmacologia, 11, 174 - 178 (1967).

- 15- Reynolds, J. E.F., Prasad, A. B., " Martindale The Extra Pharmacopeia, 28. Edition, The Pharmaceutical Press, London, 1982.
- 16- Speight, M.T.: "Avery's Drug Treatment Principles and Practise of Clinical Pharmacology and Therapeutics". 3. Edition, s. 1173, ADIS Press Limited, Baltimore, 1987.
- 17- Doggrell, S.A., Woodruff. G.N. : Br. J. Pharmacol, 59, 403 - 409 (1977).
- 18- Rao, T.S., Cler, J.A., Mick. S. J, Dilworth, V. M., Contreras, P.C., Lyengor, S., Wood, P.L. : Neuropharmacology, 29, 1191 - 1197 (1990).
- 19- Rao, T. S., Cler, J.A., Mick, S. J., Ragon, D.M., Lanthorn, T.H., Contreras, P.C., Lyengor, S., Wood. P. L.: Neuropharmacology, 29, s. 1199 - 1204 (1990).
- 20- Reed, D.J.:Biochem. Pharmacol., 35, 7 - 13,1986. -Ref: C.A., 104 (1986), 49128c.
- 21- Orrenius, S., Thor, H., Bellomo, G., Moldeus, P.: Glutathione and Tissue Toxicity, Macmillan Press, 1984.
- 22- Meister, A.: "Glutathione" in "The Liver: Biology and

- Pathobiology", Ed: Arias, I., Popper, H., Schachter, D., Shafritz, D.A., 279 - 305, Raven Press, New York, 1982.
- 23- Timbrell, J.A.: Introduction To Toxicology, S.42, Taylor & Francis, London, New York, Philadelphia, 1989.
- 24- Reed, D.J., Beatty, P.W.: "Biosynthesis and Regulation of Glutathione: Toxicological Implications" in "Reviews in Biochemical Toxicology", S.213-241, Ed:Hodgson, E., Bend, J.R., Philpot, R.M., Elsevier, North - Holland, 1980.
- 25- Minnich, V., Smith, M.B., Braumer, M.J., Majerus, P.W.: J. Clin. Invest., 50, 507 (1971).
- 26- Lambert, G.L., Thorgeirsson, S.S.: Biochem. Pharmacol, 25, 1771 (1976).
- 27- Taniguchi, N., Tsukudo, Y., Hirai, H. : Biochim. Biophys. Acta, 354, 161 (1974).
- 28- Wirth, P.J., Thorgeirsson, S.S. : Cancer. Res., 38, 2861 (1978).
- 29- Snoke, J., Bloch, K.: J. Biol. Chem., 199, 407 (1952).
- 30- Snoke, J., Yanari, S., Bloch, K.: J. Biol. Chem 201, 573 (1953).

- 31- Richman. P., Meister, A.: J. Biol. Chem., 250, 1422, 1426.
(1975).
- 32- Kaplowitz, N., Kuhlenkamp, J., Goldstein, L., Reevej.:
J. Pharmacol.Exp. Ther., 212, 240 - 245 (1980).
- 33- Orrenius, S., Moldeus, P.: Trends in Pharmacological
Sciences, 5, 432 - 435 (1984).
- 34- Kayaalp, O.: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji-
Cilt 1, S.110, 6. Baskı, Feryal Matbaacılık, Ankara, 1991.
- 35- D'arcy, P.F., Griffin, J.P.: Iatrogenic Diseases, s.303,
Third Edition, Oxford Medical Publications, 1986.
- 36- Moldeus P., Quanguan, J.: Pharmacol Ther.,
33, 37 - 40 (1987).- Ref., C.A. 107 (1987), 108659 p.
- 37- Vale, J.A., Meredith, T.J., Goulding, R.: Archives of
Internal Medicine, 141, 394 - 396 (1981).
- 38- Williamson, J.M.& Meister,A.: Proceedings of The National
Academy of Sciences, 78, 936 - 939 (1981).
- 39- Olney, J.W., Ho, O.L., Rhee, V., Schainker, B.: Brain
Research, 45, 309 (1972).

- 40- Vina, J., Perez, C., Furukawa, T., Palacin, M., Vina, J.R.:
Bri. J. of Nutrition, 62, 683 - 691 (1989).
- 41- Racker, E.: J. Biol. Chem., 190, 685 - 695 (1951).
- 42- Ayers, F.C., Warner, G.L., Smith, K.L., Lawrence, D.A.:
Anal. Biochem., 154, 186 - 193 (1986).
- 43- Mokrasch, L.C., Teschke, E.J.: Anal. Biochem., 140, 506 -
509 (1984).
- 44- Komura, C., Ono, K., Schibamoto, Y., Nishidai, T.,
Takahashi, M., Abe, M.: J. Chromatogr., 338, 209 - 212
(1985).
- 45- Neuschwander, T.B.A., Roll, F.J.: Anal. Biochem., 179,
236 - 241 (1989).
- 46- Shibata, H., Furuya, E., Tagawa, K.: Tanpakushitsu,
Kakusan., Koso., 33, 1392 - 1396 (1988).
- 47- Debowska, B., Samochocka, K., Przasynski, M., Sybilska, D.:
J. Chromatogr., 455, 336 - 343 (1988).
- 48- Demaster, E.G., Redfern, B.: Methods - Enzymol, 143, 110 -
114 (1987).

- 49- Burton, N.K., Aherne, G.W.: J. Chromatogr., 382, 253 -257 (1986).
- 50- Stein, A.F., Dills, R.L., Klaassen, C.D.: J. Chromatogr., 381, 259 - 270 (1986).
- 51- Demaster, E.G., Shiroto, F.N., Redfern, B., Goon, D.J., Nagasawa, H.T.: J. Chromatogr., 308, 83 - 91 (1984).
- 52- Chaney, W.G., Spector, A.: Curr. Eye - Res., 3, 345 - 350 (1984).
- 53- Chambers, R.E.: J. Chromatogr., 154, 272 - 274 (1978).
- 54- Kaplowitz, N.: J. Pharmacol. Exp. Ther., 200, 479 - 486 (1977).
- 55- Owens, C.W.I., Belcher, R.V.: Bioch., 94, 705 - 711 (1965).
- 56- Coban, T., İşcan, M.: Pharmacia., 30, 5 - 12 (1990).
- 57- Ellman, G.: Arch. Biochem. Biophys., 82 ,70 - 77 (1959).