

Metimazolun sığır karaciğer mikrozomal flavin monooksijenaz tarafından metabolizması: imipramin ve klorpromazin ile değişimi, koyun enzimi ile karşılaştırılması

[Metabolism of methimazole by bovine liver microsomal flavine monooxygenase: modulation by imipramine and chlorpromazine, comparison with sheep enzyme]

^{1,2}Deniz Fulya Aktas,

¹Birsen Can Demirdöğen,

¹Orhan Adalı

¹Biyokimya Anabilim Dalı ve Biyoloji Bölümü,
Orta Doğu Teknik Üniversitesi, 06531 Ankara,
Türkiye

²Şimdiki adres: University of Oklahoma, Chemistry
and Biochemistry Department, OK, Amerika
Birleşik Devletleri

Yazışma Adresi

[Correspondence Address]

Birsen CAN DEMIRDÖĞEN
Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı
Gıda Güvenliği ve Beslenme Araştırma Müdürlüğü
Sıhhiye Ankara Türkiye
Tel: 90 312 458 21 40
Faks: 90 312 458 23 95
E-posta: birsencan.demirdogen@gmail.com

Kayıt Tarihi: 20 Kasım 2008; Kabul Tarihi: 9 Şubat 2009

[Received: 20 November 2008; Accepted: 9 February 2009]

ÖZET

Amaç: Veteriner hayvanları çeşitli ksenobiyotiklere maruz kalmaktadır. Metimazol, sığırlarda yasa dışı olarak kilo aldırma amaçlı kullanılan anti-tiroidik bir ilaçtır. İmipramin ve klorpromazin anti-depresan ilaçlardır. Bu çalışmada bu üç ilacın sığır karaciğer mikrozomları tarafından metabolizmasının incelenmesi ve flavin-içeren monooksijenaz enzimleri tarafından katalizlenen metimazol oksidasyon aktivitesinin biyokimyasal ve kinetik özelliklerinin tanımlanması amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: Enzim kaynağı olarak kullanılan karaciğer mikrozomları taze dokulardan hazırlanmış ve enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Bulgular ve sonuçlar: Bu çalışmada metimazol, imipramin ve klorpromazinin sığır karaciğer mikrozomlarındaki metabolizması incelendi. Sığır karaciğer mikrozomal flavin monooksijenaz enziminin ortalama aktivitesi $2,38 \pm 1,04$ nmol/dk/mg protein (ortalama \pm standart sapma, n=12) olarak bulundu. Maksimum enzim aktivitesi 37°C ve pH 8,0'de saptandı. Metimazol için sığır karaciğer mikrozomal enziminin görünür K_m değeri 0,11 mM olarak belirlendi. Sığır karaciğer mikrozomlarının imipramine ve klorpromazine karşı aktivitesi sırasıyla 3,73 ve 3,75 nmol okside NADPH/dk/mg mikrozomal protein olarak bulundu. Ayrıca bu ilaçların, sığır karaciğer mikrozomal flavin monooksijenaz tarafından katalizlenen metimazol oksidasyonunu engelledikleri gözlemlendi. Özetle, bu çalışma sığır karaciğer mikrozomal flavin monooksijenaz enziminin antitiroidik ilaç metimazolun metabolizmasındaki rolünü gösteren ilk çalışmadır. İlaveten, sığır karaciğer mikrozomlarının antidepresan ilaçlar olan imipramin ve klorpromazin metabolizmasında görev aldığı gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada sığır karaciğer enzimi ile elde edilen bulgular daha önce koyun enzimi ile elde edilen bulgularla karşılaştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Flavin içeren monooksijenaz, sığır, karaciğer, metimazol, mikrozom

ABSTRACT

Aim: Veterinary animals are exposed to a variety of xenobiotics. Methimazole is an anti thyroid drug which has been illegally used as a fattening agent in cattle and imipramine and chlorpromazine are antidepressant drugs. In the present study, the aim was to study metabolism of these three drugs by cattle liver microsomes and to characterize biochemical and kinetic properties of bovine liver microsomal flavin-containing monooxygenase catalyzed methimazole oxidation.

Methods: Liver microsomes were prepared from fresh tissues and enzyme activities were determined spectrophotometrically, using liver microsomes as enzyme source.

Data and Results: The average methimazole oxidation activity of bovine hepatic microsomal flavin monooxygenase was found to be 2.38 ± 1.04 nmol/min/mg protein (mean \pm standard deviation, n=12). Maximum enzyme activities were detected at 37°C and at pH 8.0. The apparent K_m value of bovine microsomal flavin monooxygenase for methimazole was found to be 0.11 mM. Hepatic bovine microsomal enzyme activity towards imipramine and chlorpromazine were determined to be 3.73 and 3.75 nmol NADPH oxidized/min/mg microsomal protein, respectively. We also observed that these two drugs inhibited bovine liver microsomal flavin monooxygenase-catalyzed methimazole oxidation. In summary, this is the first study to show the metabolism of methimazole by bovine liver microsomal flavin monooxygenase. Furthermore, results obtained with bovine liver enzyme in this study are compared to those obtained previously with sheep enzyme.

Key Words: flavin containing monooxygenase, bovine, liver, methimazole, microsome

Giriş

Bütün organizmalar tüm hayatları boyunca kaçınılmaz olarak, ilaçlar, endüstriyel atıklar, toksinler, pestisitler, alkaloidler gibi yabancı kimyasallara, ksenobiyotiklere, maruz kalmaktadır. Bu kimyasallar, karaciğer, akciğer, böbrek, beyin gibi dokularda ve plazmada çeşitli enzimler tarafından metabolize edilerek vücuttan atılır. Bu enzimlerin en önemlileri arasında sitokrom P450 (1) ve flavin içeren monooksijenaz (FMO; E.C.1.14.13.8) (2, 3) yer almaktadır. Çiftlik hayvanları da veteriner ilaçları (antibiyotikler, antiparazitikler), gıda katkıları, pestisitler ve çevresel kirleticiler gibi çok çeşitli ksenobiyotiklere maruz kalmaktadır. Bahsedilen enzim sistemlerinin metabolik aktiviteleri, kullanılan her türlü kimyasalın hedef canlıda kalıcılığını belirlemede önemli bir rol oynamaktadır. Yenen dokularda bulunan ilaç kalıntıları tüketici için risk oluşturmaktadır (4).

Metimazol (N-metil-2 merkaptimidazol) insanlarda ve kedilerde hipertiroidi tedavisi için yaygın olarak kullanılan anti-tiroidik bir ilaçtır (5,6). Bu ilacın kesimden önce sığırlarda kullanımı, sindirim sisteminde ve kas dokusunda suyun tutulmasına, dolayısı ile de sığırlarda canlı et ağırlığının artmasına yol açmaktadır (7). Ayrıca, metimazolun burun mukozasında ve muhtemelen reaktif metabolitlerinin bağlandığı diğer dokularda toksisiteye neden olduğu bildirilmiştir (8). Tiroid baskılayıcı ilaçların çiftlik hayvanlarında kullanımı Türkiye de dâhil olmak üzere birçok Avrupa ülkesinde yasaklanmıştır ve Avrupa Birliği'nde üretilen veya buraya ithal edilen hayvansal gıdalarda bu tip ilaçların kalıntıları bulunmamalıdır (9). İmipramin ve klorpromazin de kilo alımına yol açabilen antidepresan ilaçlardır.

Metimazol mikrozomal bir Faz-I enzimi olan FMO tarafından metabolize edilmektedir (10). FMO, NADPH ve moleküler oksijenin varlığında metimazolun S-oksit formuna oksitlenmesini katalizler; oluşan metabolit S-glukuronidasyon ile vücuttan atılır (11-13). Şu ana dek FMO gen ailesinin 6 üyesi tespit edilmiştir (14,15). FMO'lar, sitokrom P450'ler gibi (16-18), insanlar da dâhil olmak üzere birçok memeli türünün karaciğer (19-21), akciğer (15,22), böbrek (23) gibi dokularında bulunmasının yanı sıra, kuş ve balıklarda da tespit edilmiştir (24). FMO ekspresyonu türler ve dokular arasında değişiklik göstermektedir (25). Ayrıca diyabet, gebelik, yaş ve cinsiyet gibi faktörler de FMO gen ekspresyonunu etkilemektedir. Ancak FMO seviyesi ve aktivitesi fenobarbital veya benzo[a]piren gibi ksenobiyotiklerle indüklenmemektedir ve bu özelliğiyle P450 enzim sisteminden ayrılmaktadır (26,27). FMO'lar morfin, kokain, nikotin, klorpromazin, imipramin, tamoksifen, forat, fonofos ve aldikarb gibi ilaç ve çevresel toksinler gibi çok çeşitli ksenobiyotiklerin oksidasyonunu katalizlerler (13, 28-30). Ksenobiyotiklerin yanı sıra, trimetilamin (31) ve metiyonin (32,33) gibi endojen bileşikler de FMO tarafından metabolize edilmektedir. Trimetilamin bozuk balık gibi kokar ve insan karaciğerinde FMO3 tarafın-

dan kokusuz N-oksit formuna dönüştürülerek vücuttan atılır. FMO3 geninde bulunan bazı polimorfizmlerin trimetilamin metabolizmasını yavaşlattığı ve Balık Kokusu Sendromuna neden olduğu bilinmektedir (34,35). Sığır ve koyun tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de eti için beslenen hayvanlardır ve insan beslenmesi ve sağlığı için son derece önemlidir. Ancak, laboratuvar hayvanlarında yoğun olarak çalışıldığı halde çiftlik hayvanlarında FMO enzimi ve ilaç metabolizması çalışmalarını çok sınırlı kalmıştır (4, 36-38). Özellikle yasa dışı olarak canlı et ağırlığının artırılması için kullanılan tehlikesi bulunan metimazolun metabolizması sığırlarda daha önce incelenmemiştir. Bu sebeplerle, bu çalışmada metimazol, imipramin ve klorpromazinin sığır karaciğer mikrozomları tarafından metabolizmasının incelenmesi, sığır karaciğer mikrozomal FMO'nun biyokimyasal ve kinetik özelliklerinin FMO enzimleri için çok spesifik bir substrat olan metimazol kullanılarak tanımlanması ve iki antidepresan ilacın, imipramin ve klorpromazinin, bu aktivite üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metodlar

Mikrozomların hazırlanması

İyi beslenmiş sığırların karaciğerleri kesimin hemen ardından yerel bir mezbahadan (Mısırdalı Mezbahası, Sincan, Ankara) alınmıştır. Karaciğer mikrozomları daha önce tarif edildiği şekilde hazırlanmıştır (39). Mikrozomlardaki protein konsantrasyonu Lowry metodu ile belirlenmiştir (40).

Metimazol oksidasyon hızının belirlenmesi

Şekil 1'de gösterilen metimazol oksidasyon reaksiyonunun ölçülmesi için Metimazol/5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoat) (DTNB) metodu (41) daha önce anlatıldığı gibi (42) üzerinde küçük değişiklikler yapılarak kullanıldı. Enzim aktivitesi ölçümü için kullanılan 1 ml'lik karışım pH 8,0'lık 0,05 M tris-HCl tamponu, 0,06 mM DTNB, 0,02 mM DL-dithiothreitol (DTT), 0,1 mM NADPH, 250 µg sığır karaciğer mikrozomal protein, 0,1% Triton X-100 ve 1 mM metimazol içermekteydi. 412 nm'deki absorbans düşüşü 3 dk. boyunca takip edildi ve enzim aktivitesi substratlı ve substratsız ortamda ölçülen absorbans farkı ve 28 mM⁻¹ cm⁻¹ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplandı.

Deterjanların metimazol oksidasyon hızına etkisi, kinetik parametrelerin, optimum sıcaklığın ve pH'nın belirlenmesi

Deterjanların sığır karaciğer mikrozomal FMO aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek için Triton X-100 (%0,1 ve 0,2) ve Emulgen 913 (%0,5) adlı deterjanlar reaksiyon ortamına eklendi ve metimazol oksidasyon hızı ölçüldü. Sığır FMO enziminin substrat bağımlılığını belirlemek için reaksiyon ortamına eklenen metimazol konsantrasyonu 0,05mM'dan 2 mM'a kadar yükseltildi. Reaksiyon sıcaklığının sığır karaciğer mikrozomal FMO aktivite-

sine etkisini tespit etmek için ortam sıcaklığı 10°C ila 75°C arasında değiştirildi. Önce karaciğer mikrozomları eklenmemiş reaksiyon karışımı istenen sıcaklığa getirildi; sonra mikrozom ve substratın eklenmesi ile reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon hızı, sıcaklık kontrol ünitesi olan bir spektrofotometrede 3 dk. süreyle takip edildi. Karaciğer mikrozomal FMO aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için enzimin metimazol oksidasyon aktivitesi 5 ila 10 arasında değişen ortam pH'larında, üç değişik tampon çözelti (asetat, Tris-HCl ve glisin-NaOH) kullanılarak ölçüldü.

İmipramin ve klorpromazin oksidasyon hızının belirlenmesi

İki antidepresan ilaç substratın, imipramin ve klorpromazinin, sığır karaciğer mikrozomal enzimleri tarafından metabolizması, daha önce tarif edildiği gibi (42), NADPH kofaktörünün okside olmasının spektrofotometrik olarak 340 nm'de, 37 °C'de 3 dk. süreyle takip edilmesi ile ölçüldü.

İmipramin ve klorpromazinin metimazol oksidasyon aktivitesine etkisinin belirlenmesi

İlaç substratların sığır karaciğer mikrozomal FMO tarafından katalizlenen metimazol oksidasyon aktivitesi üzerindeki etkisini tespit etmek için metimazol/DTNB metodu reaksiyon ortamına imipramin (50-1000 µM) veya klorpromazin (1-300 µM) eklenerek gerçekleştirildi. Modülatörler reaksiyon ortamına kontrol aktivitenin (%100) ölçülmesinden sonra eklendi. Modülatörler eklendikten sonra elde edilen aktiviterler kontrol aktivitenin yüzdesi olarak verildi.

Veriler ve istatistiksel metotlar

On iki farklı sığırdan elde edilen karaciğer mikrozom örneğinin metimazol oksidasyon aktiviterleri ortalama ± standart sapma (SS) olarak verildi. Sığır karaciğer FMO enziminin karakterizasyon parametreleri 2 veya 3 bağımsız deneyle ve grafiklerdeki her bir nokta da 2

(bazen 3) ölçümün ortalaması alınarak elde edildi. Sığır karaciğer mikrozomal substrat oksidasyon aktiviterleri Mann-Whitney testi ile karşılaştırıldı. İstatistiksel hesaplamalar için SPSS 13.0 programı kullanıldı.

Sonuçlar

Metimazolun metabolizması

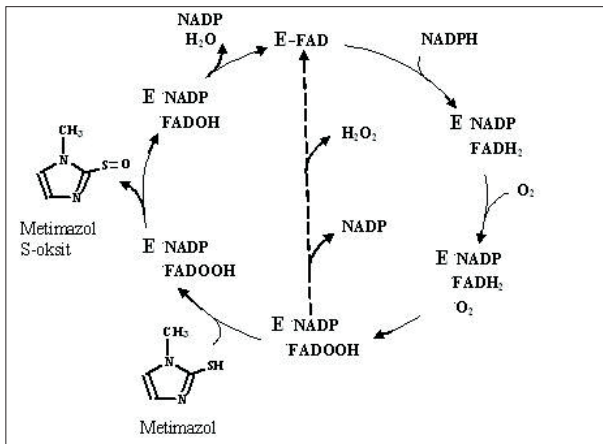
Metimazol metabolizması değişik sığır karaciğer mikrozomları kullanılarak ölçüldüğünde ortalama spesifik aktivite $2,38 \pm 1,04$ nmol/dk/mg protein (Ortalama ± SS, n=12) olarak bulundu. Sığır karaciğer mikrozomal FMO tarafından katalizlenen metimazol metabolizması için substrat aktivite ilişkisi Şekil 2'de gösterilmiştir. Bu aktivitenin Michaelis-Menten kinetiğine uygun olduğu görüldü. Sığır karaciğer FMO için K_m değeri 0,110 mM ve maksimum hız 1,24 nmol/dk/mg protein olarak bulundu. Maksimum FMO metimazol oksidasyon aktivitesi 37°C ve pH 8.0'de ölçüldü.

Deterjanların etkisi

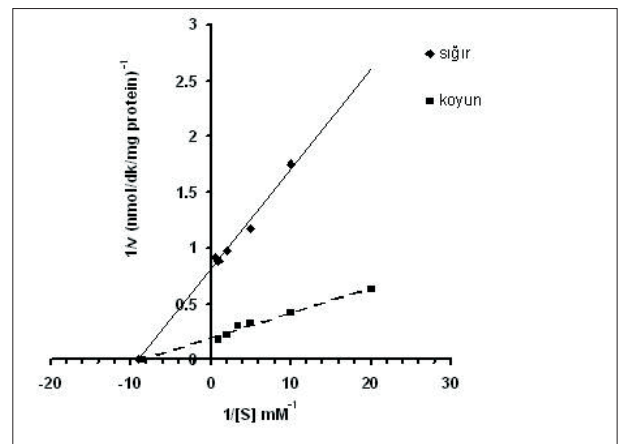
Triton X-100 ve Emulgen 913'ün sığır karaciğer FMO tarafından katalizlenen metimazol oksidasyon aktivitesi üzerine etkisi ile ilgili sonuçlar Şekil 3'te verilmektedir. Kontrol aktiviteye göre en fazla artış (3,6 kat) reaksiyon ortamına %0,5 Emulgen 913 eklendiğinde elde edildi. %0,1 Triton X-100 spesifik aktiviteyi kontrole göre 2,4 kat arttırdı. Ortama eklenen Triton X-100 miktarı %0,2'ye çıkarıldığında FMO aktivitesi kontrole göre 3,4 kat arttı. Bu çalışma boyunca deterjan etkisi ölçümü dışındaki tüm FMO metimazol oksidasyon aktivitesi ölçümleri için reaksiyon ortamında %0,1 Triton X-100 kullanılmıştır.

İmipramin ve klorpromazinin metabolizması

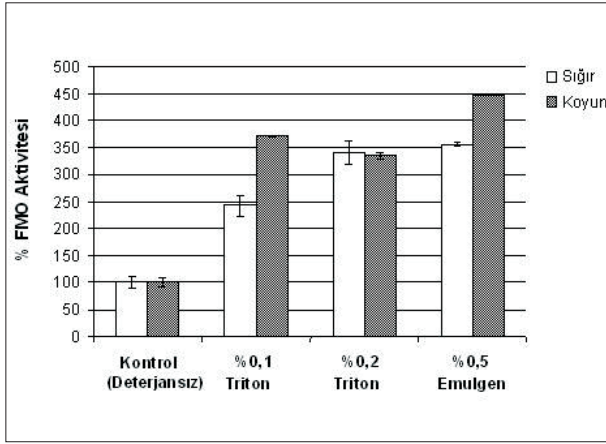
İmipramin ve klorpromazinin sığır karaciğer mikrozomları tarafından oksidasyonu Şekil 4'te metimazol oksidasyon aktivitesi ile karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. İmipramin ve klorpromazin için mikrozomal enzim



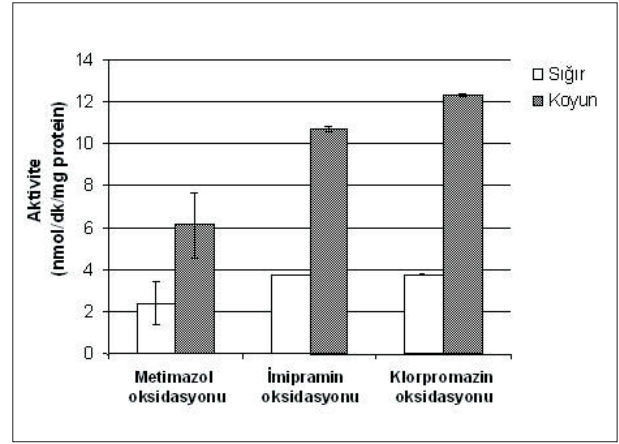
Şekil 1. FMO tarafından katalize edilen metimazol-S oksidasyon reaksiyonu. E: enzim, FAD: Flavin adenin dinükleotid, NADP: nikotinamid adenin dinükleotid (Poulsen, 1991 (12) ve Ziegler, 1988 (13) yayınlarından adapte edilmiştir).



Şekil 2. Sığır ve koyun (42) karaciğer mikrozomal FMO enzimleri tarafından katalize edilen metimazol oksidasyon reaksiyonları için Lineweaver-Burk eğrisi.



Şekil 3. Sığır ve koyun (42) karaciğer mikrozomal FMO metimazol oksidasyon aktivitesine deterjanların etkisi.



Şekil 4. Metimazol, imipramin ve klorpromazinin sığır ve koyun (42) karaciğer mikrozomları tarafından oksidasyonu.

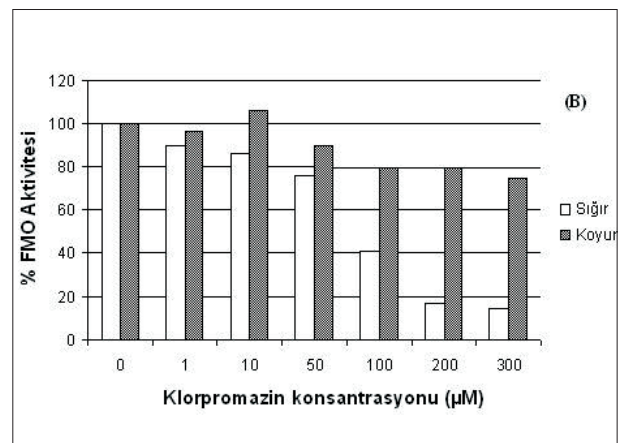
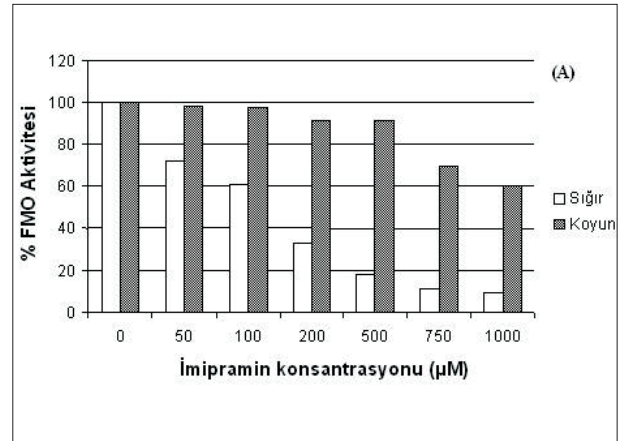
aktiviteleri sırasıyla 3,73 nmol okside NADPH/dk/mg mikrozomal protein ve 3,75 nmol okside NADPH/dk/mg mikrozomal protein olarak bulundu.

Metimazol oksidasyonunun imipramin ve klorpromazin tarafından engellenmesi

İmipramin denenen bütün konsantrasyonlarda (50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M, 750 μ M ve 1000 μ M) sığır karaciğer mikrozomal FMO tarafından katalizlenen metimazol oksidasyon reaksiyonunu engellemiştir (Şekil 5A). Reaksiyonun engellenme derecesi imipramin konsantrasyonuna göre değişmektedir. 50 μ M imipramin sığır karaciğer FMO tarafından katalizlenen metimazol oksidasyonunu %30 engelledi ve 1mM imipramin kullanılması enzim aktivitesini kontrol aktivitenin %9'una düşürdü. Şekil 5B'de görüldüğü gibi klorpromazin de FMO tarafından katalizlenen metimazol oksidasyonu üzerinde engelleyici etkide bulundu. Reaksiyon ortamına eklenen 300 μ M klorpromazin sığır karaciğer FMO aktivitesinin başlangıçtaki %14'üne düşmesine neden oldu.

Tartışma

Metimazol insanlarda ve kedilerde hipertiroid hastalığının tedavisi için kullanılan tiroid baskılayıcı bir ilaçtır. Tiroid hormonu tiroksinin üretimini engelleyen tiroid baskılayıcı maddeler çiftlik hayvanı yetiştiriciliğinde canlı et ağırlığının artırılması için kullanılabilir. Ağırlık artışı, sindirim sisteminde su miktarının artmasına ve dokularda suyun tutulmasına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Tiroid baskılayıcılarla muamele edilmiş hayvanların etleri kalitesizdir. Ayrıca, metimazolun farelerde akciğer bronşiyal epiteline ve karaciğer dokularına bağlandığı ve buralarda toksisiteye neden olduğu bulunmuştur (8). Avrupa Birliği içerisinde eti tüketilen hayvanlarda tiroid baskılayıcı ilaçların kullanımı yasaklanmıştır (9). Metimazol Faz-I enzimlerinden flavin-içeren monooksijenaz enzimleri (FMO) tarafından karaciğerde metabolize edilir. Memeli mikrozomal FMO enzimleri ayrıca nükleofilik nitrojen, sülfür, fosfor ve selenyum



Şekil 5. Sığır ve koyun (42) karaciğer mikrozomal FMO tarafından katalize edilen metimazol oksidasyon reaksiyonu üzerine A) imipramin ve B) klorpromazinin etkisi.

atomu içeren çok sayıda ilaç, pestisit ve diğer kimyasalların oksidasyonunu katalizler (43,44). Bu çalışmada sığır karaciğer mikrozomal FMO enziminin metimazol metabolizmasındaki rolünün ve iki antidepresan ilacın, imipramin ve klorpromazinin, bu aktivite üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Koyun karaciğer mikrozomları kullanılarak gerçekleştirilen önceki çalış-

mamızla (42) karşılaştırma da yapılmıştır.

Sığır karaciğer mikrozomal FMO enziminin metimazol oksidasyon aktivitesi ($2,38 \pm 1,04$ nmol/dk/mg protein, $n=12$) koyununkine ($6,12 \pm 1,40$ nmol/dk/mg protein, $n=6$) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p<0,001$) düşüktür. Bu fark, ana ilacın koyunda sığıra göre daha hızlı vücuttan atılacağına işaret edebilir. Sığır ve koyun FMO enzimlerinin substrat bağlama afiniteleri yaklaşık aynı olmasına rağmen (sığır $K_m=0,110$ mM, koyun $K_m=0,118$ mM), koyun karaciğer enzimine ait V_{max} değerinin sığır enzimininkinden 4,3 kat fazla olduğu görülmüştür (42). Sığır ve koyun arasındaki bu farkın, dokulardaki FMO enzim miktarı farkından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Literatürde sığır karaciğer mikrozomal FMO enziminin K_m değeri ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır. Longin-Sauvageon ve ark. (45) tarafından yapılan çalışmada koyun karaciğer mikrozomal FMO için K_m 0,103 mM olarak bildirilmiştir. Ziegler ve ark. (46) ise domuz karaciğer FMO enziminin metimazol oksidasyon aktivitesi için K_m değerini 0,005 mM olarak rapor etmiştir.

Bu çalışmada karaciğer mikrozomal FMO aktivitesini artırmak ve reaksiyonun seyrini daha doğru izleyebilmek için reaksiyon ortamına çeşitli deterjanlar eklenmiştir. Sığır karaciğer FMO aktivitesini 3,6 kat artıran %0,5 Emulgen 913, koyun karaciğer FMO enzimini 4,5 kat artırmıştı. Triton X-100 reaksiyon ortamında %0,1 oranında kullanıldığında sığır FMO spesifik aktivitesini 2,4 kat artırdığı halde koyun enzimini 3,7 kat artırmıştır. Hem sığır hem koyun karaciğer FMO aktivitesi %0,2 Triton X-100 ile 3,4 kat artmıştır (42).

FMO aktivitesinin ölçülmesi için reaksiyon ortamına deterjan eklenmesi, Dixit ve Roche tarafından tarif edilen (41) orijinal metimazol/DTNB metodu üzerinde yaptığımız en önemli değişikliktir. Bu çalışmada deterjan etkisi ölçümü dışındaki tüm FMO metimazol oksidasyon aktivitesi ölçümleri için reaksiyon ortamında %0,1 Triton X-100 kullanılmıştır. Enzim aktivitesinin çok daha fazla artmasını sağlayan Emulgen 913'ün tercih edilmemesinin nedeni bu deterjanın mikrozomal fraksiyonda yüksek miktarda bulunduğu bilinen sitokrom P450 enzimleriyle etkileşime girdiğinin bilinmesidir. Hem sığır hem de koyun karaciğer mikrozomal FMO'nun deterjanlarla aktive olması, mikrozom zarında meydana gelen bozulma sonucu kofaktör ve substratların enzime ulaşımının kolaylaşmasından kaynaklanmaktadır.

İmipramin ve klorpromazin yatıştırıcı etkileri olan antidepresan ilaçlardır. Bu tür ilaçların bilinen yan etkilerinden biri de kilo alımıdır. Bu çalışmada imipramin ve klorpromazinin sığır karaciğer mikrozomları tarafından okside edildiği gösterilmiştir. Koyun karaciğer mikrozomları ile elde edilen sonuçlarla (42) karşılaştırıldığında sığır karaciğer mikrozomlarının bu antidepresan ilaçları koyun karaciğer mikrozomlarından önemli derecede yavaş metabolize ettiği görülmüştür ($p<0,05$). İmipramin ve klorpromazinin hem FMO'lar hem de sitokrom P450'ler tarafından metabolize edildiği bilin-

mektedir (47). Bu ilaçların metabolizmasında sığır karaciğer FMO'nun rolünü ortaya koymak için bu iki ilacın sığır karaciğer mikrozomal FMO tarafından katalizlenen metimazol oksidasyon aktivitesi üzerine etkisi çalışılmıştır. Sonuçta, reaksiyon ortamında imipramin veya klorpromazin varlığında sığır karaciğer mikrozomal FMO tarafından katalizlenen metimazol oksidasyon aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. Öte yandan, sığır enzimine göre koyun FMO enziminin reaksiyon ortamında bulunan imipraminden daha az etkilendiği bildirilmiştir. Koyun karaciğer mikrozomal FMO tarafından katalizlenen metimazol oksidasyon aktivitesi, 50 μ M ile 500 μ M arasındaki imipramin konsantrasyonlarından etkilenmemiştir (42). Sığır karaciğer FMO aktivitesinin, imipraminde olduğu gibi klorpromazine karşı da koyun enzimine göre daha hassas olduğu görülmüştür. 300 μ M klorpromazin eklendikten sonra koyun karaciğer mikrozomal FMO tarafından katalizlenen metimazol oksidasyon aktivitesinin %75'i hala ölçülebilirken (42), sığır enziminin aktivitesi %14'e düşmüştür. Metimazol FMO enzimi için spesifik bir substrat ve bazı sitokrom P450 izoformları için inhibitör (48) olduğu için metimazol oksidasyon aktivitesinin imipramin ve klorpromazin tarafından engellenmesi, bu ilaçların metabolizmasının en azından kısmen sığır karaciğer mikrozomal FMO tarafından katalizlendiğini göstermektedir. Ayrıca, sığır karaciğer mikrozomal FMO, koyun enzimine göre antidepresan ilaçlardan çok daha fazla etkilenmektedir. Metimazol ile imipramin veya klorpromazine aynı anda maruz kalınması, karaciğerde metimazol oksidasyon metabolizmasının durmasına, dolayısı ile de kilo artışına ve toksisiteye yol açabilir.

Son yıllarda çeşitli ilaç ve pestisitlerin laboratuvar hayvanları tarafından metabolizmasının çalışılması konusuna büyük bir ilgi vardır (20, 23, 49, 50). Öte yandan, sığır ve koyun karaciğeri yüksek besleyici değere sahip olduğu ve insanlar tarafından da sıkça tüketildiği halde, çiftlik hayvanlarında FMO enzimlerinin ilaç metabolizmasındaki rolü hakkında yeterli bilgi yoktur. Bu çalışma sığır karaciğer mikrozomal FMO enziminin antitiroid ilaç metimazolun metabolizmasındaki rolünü gösteren ilk çalışmadır. İlaveten, sığır karaciğer mikrozomlarının antidepresan ilaçlar imipramin ve klorpromazin metabolizmasında görev aldığı gösterilmiştir.

Teşekkür

Bu çalışma Orta Doğu Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi BAP-2002-07-02-00-67 tarafından desteklenmiştir.

Bu çalışma kısmen 15th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, July, 4-9, 2004, Mainz, Germany kongresinde poster olarak sunulmuştur.

Kaynaklar

- [1] Philpot RM, Smith BR. (1984) Role of cytochrome P-450 and related enzymes in the pulmonary metabolism of xenobiotics. *Environ Health Perspect.* 55:359-67.
- [2] Krueger SK, Williams DE. (2005) Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacol Ther.* 106(3):357-87.
- [3] Cashman JR. (2000) Human flavin-containing monooxygenase: substrate specificity and role in drug metabolism. *Curr Drug Metab.* 1(2):181-91.
- [4] Virkel G, Lifschitz A, Sallovitz J, Pis A, Lanusse C. (2004) Comparative hepatic and extrahepatic enantioselective sulf-oxidation of albendazole and fenbendazole in sheep and cattle. *Drug Metab Dispos.* 32(5):536-44.
- [5] Hoffman SB, Yoder AR, Trepanier LA. (2002) Bioavailability of transdermal methimazole in a pluronic lecithin organogel (PLO) in healthy cats. *J Vet Pharmacol Ther.* 25(3):189-193.
- [6] Raiszadeh F, Solati M, Etemadi A, Azizi F. (2004) Serum paroxonase activity before and after treatment of thyrotoxicosis. *Clin Endocrinol.* 60(1):75-80.
- [7] Doganoc DZ, Grebenc S. (1998) Indirect determination of thio-uracils in slaughter cattle by measuring the mass of the thyroid gland. *Veterinarski Arhiv.* 68:85-90.
- [8] Bergman U, Brittebo EB. (1999) Methimazole toxicity in rodents: Covalent binding in the olfactory mucosa and detection of glial fibrillary acidic protein in the olfactory bulb. *Toxicol Appl Pharmacol.* 155:190-200.
- [9] Avrupa Birliği Konseyi Direktifi 96/22. EC Council Directive 96/22, Official Journal of the European Community, 1996, No. L 125/3.
- [10] Hukkanen J, Dempsey D, Jacob P, Benowitz NL. (2005) Effect of pregnancy on a measure of FMO3 activity. *Br J Clin Pharmacol.* 60(2):224-226.
- [11] Sitar DS, Thornhill DP. (1973) Methimazole: absorption, metabolism and excretion in the albino rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 184(2):432-9.
- [12] Poulsen LL. (1991) The multisubstrate FAD-containing monooxygenase. *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes* (Derleyen: Miller F), vol. 2, s. 87-100, CRC Press, Boca Raton, FL.
- [13] Ziegler DM. (1988) Flavin-containing monooxygenases: catalytic mechanism and substrate specificities. *Drug Metab Rev.* 19:1-32.
- [14] Philpot RM, Biagini CP, Carver GT, Overby LH, Wyatt MK, Itagaki K. (1999) Expression and regulation of flavin-containing monooxygenases. *Molecular and Applied Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes* (Derleyen: Arinc E ve diğ.), s. 71-79, Plenum, New York.
- [15] Kruger SK, Yueh M-F, Martin SR, Pereira CB, Williams DE. (2001) Characterization of expressed full-length and truncated FMO2 from rhesus monkey. *Drug Metab Dispos.* 29:693-700.
- [16] Arinç E, Arslan S, Bozcaarmutlu A, Adali O. (2007) Effects of diabetes on rabbit kidney and lung CYP2E1 and CYP2B4 expression and drug metabolism and potentiation of carcinogenic activity of N-nitrosodimethylamine in kidney and lung. *Food Chem Toxicol.* 45(1):107-18.
- [17] Adali O, Arinç E. (1990) Electrophoretic, spectral, catalytic and immunochemical properties of highly purified cytochrome P-450 from sheep lung. *Int J Biochem.* 22(12):1433-44.
- [18] Arinç E, Philpot M. (1976) Preparation and properties of partially purified pulmonary cytochrome P-450 from rabbits. *J Biol Chem.* 251(11):3213-20.
- [19] Bhamre S, Bhagwat SV, Shankar SK, Williams DE. (1993) Cerebral flavin-containing monooxygenase-mediated metabolism of antidepressants in brain: immunochemical properties and immunocytochemical localization. *J Pharmacol Exp Ther.* 267:555-559.
- [20] Tynes RE, Sabourin PJ, Hodgson E. (1985) Identification of distinct hepatic and pulmonary forms of microsomal flavin-containing monooxygenase in the mouse and rabbit. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 126:1069-1075.
- [21] Sabourin PJ, Smyser BP, Hodgson E. (1984) Purification of the flavin-containing monooxygenase from mouse and pig liver microsomes. *Int J Biochem* 16:713-720.
- [22] Williams DE, Ziegler DM, Nordin DJ, Hale SE. (1984) Rabbit lung flavin-containing monooxygenase is immunochemically and catalytically distinct from the liver enzyme. *Biochem Biophys Res Commun.* 125:116-122.
- [23] Tynes RE, Hodgson E. (1985) Catalytic activity and substrate specificity of the flavin-containing monooxygenase in microsomal systems: characterization of the hepatic, pulmonary and renal enzymes of the mouse, rabbit, and rat. *Arch Biochem Biophys* 240:77-93.
- [24] Schlenk D. (1998) Occurrence of flavin-containing monooxygenase in non-mammalian eukaryotic organisms. *Comp Biochem Physiol C.* 121:185-195.
- [25] Tynes RE, Philpot RM. (1987) Tissue and species-dependent expression of multiple forms of mammalian microsomal flavin containing monooxygenase. *Mol Pharmacology.* 31:569-574.
- [26] Falls JG, Cherrington NJ, Clements KM, Philpot RM, Levi PE, Rose RL, Hodgson E (1997). Molecular cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of mouse flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3): comparison with the human isoform. *Arch Biochem Biophys.* 347:9-18.
- [27] Williams DE, Meyer HH, Dutchuk MS. (1989) Distinct pulmonary and hepatic forms of flavin-containing monooxygenase in sheep. *Comp Biochem Physiol.* 93B:465-470.
- [28] Kupfer D, Dehal SS. (1996) Tamoxifen metabolism by microsomal cytochrome P450 and Flavin-containing monooxygenase. *Methods in Enzymology.* (Derleyenler: Johnson EF, Waterman MR), vol. 272, s. 152-163, Academic Press, Inc. San Diego.
- [29] Bhamre S, Bhagwat SV, Shankar SK, Boyd MR, Ravindranath V. (1995) Flavin-containing monooxygenase mediated metabolism of psychoactive drugs by human brain microsomes. *Brain Res.* 672:276-280.
- [30] Cashman JR, Park SB, Berkman CE, Cashman LE. (1995) Role of hepatic flavin-containing monooxygenase 3 in drug and chemical metabolism in adult humans. *Chem Biol Interact.* 96(1):33-46.
- [31] Waiz MA, Ayez R, Mitchell SC, Idle JR and Smith RL. (1987) Trimethylaminuria (fish-odoursyndrome); an inborn error of oxidative metabolism. *Lancet* 1:634-635.
- [32] Krause RJ, Ripp SL, Sausen PJ, Overby LH, Philpot RM and Elfarra AA. (1996) Characterization of the methionine S-oxidase activity of rat liver and kidney for FMO3 being the major catalyst. *Arch Biochem Biophys.* 333:109-116.
- [33] Duescher RJ, Lawton MP, Philpot RM and Elfarra AA. (1994) Flavin-containing monooxygenase (FMO)-dependent metabolism of methionine and evidence for FMO3 being the major FMO involved in methionine sulfoxidation in rabbit liver and kidney microsomes. *J Biol Chem.* 269:17525-17530.
- [34] Cashman JR, Zhang J. (2002) Interindividual differences of human flavin-containing monooxygenase 3: genetic polymorphisms and functional variation. *Drug Metab Dispos.* 30(10):1043-52.

- [35] Mitchell SC, Smith RL. (2001) Trimethylaminuria: the fish mal-odor syndrome. *Drug Metab Dispos.* 29:517–521.
- [36] Durringer JM, Buhler DR, Craig AM. (2004) Comparison of hepatic in vitro metabolism of the pyrrolizidine alkaloid sene-ionine in sheep and cattle. *Am J Vet Res.* 65(11):1563-72.
- [37] Virkel G, Lifschitz A, Soraci A, Sansinanea A, Lanusse C. (2000) Enantioselective liver microsomal sulphoxidation of albendazole in cattle: effect of nutritional status. *Xenobiotica* 30(4):381-93.
- [38] Huan JY, Miranda CL, Buhler DR, Cheeke PR. (1998) Species differences in the hepatic microsomal enzyme metabolism of the pyrrolizidine alkaloids. *Toxicol Lett.* 99(2):127-37.
- [39] Arınç E, Adalı O. (1983) Solubilization and partial purification of two forms of cytochrome P-450 from trout liver microsomes. *Comp Biochem Physiol.* 76B:653-662.
- [40] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265–275.
- [41] Dixit A, Roche TE. (1984) Spectrophotometric assay of the flavin containing monooxygenase and changes in its activity in female mouse liver with nutritional and diurnal conditions. *Arch Biochem Biophys.* 233:50–63.
- [42] Can Demirdögen B, Adalı O. (2005) Characterization and modulation by drugs of sheep liver microsomal flavin-mono-oxygenase activity. *Cell Biochem Funct.* 23:245-251.
- [43] Adalı O, Carver GC, Philpot RM. (1998) Modulation of human flavin-containing monooxygenase 3 activity by tricyclic anti-depressants and other agents: importance of residue 428. *Arch Biochem Biophys.* 358:92-97.
- [44] Ziegler DM. (1993) Recent studies on the structure and function of multisubstrate flavin-containing monooxygenases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 33:179-199.
- [45] Longin-Sauvageon C, Lattard V, Lilaz-Michel C, Buron-fosse T, Beneoit E. (1998) Expression of two different FMOs in sheep liver. *Drug Metab Dispos.* 26 (3):284-287.
- [46] Ziegler DM, Poulsen LL, Duffel MW. (1980) Kinetic studies on mechanism and substrate specificity of the microsomal flavin-containing monooxygenase. *Microsomes, Drug Oxidations and Chemical Carcinogenesis* (Derleyenler: Coon MJ, Conney AH, Estabrook RW, Gelboin HV, Gillette JR, O'Brien PJ), vol. 2, s. 637-645, Academic Press, New York.
- [47] Narimatsu S, Yamamoto S, Kato R, Masubuchi Y, Horie T. (1999) Contribution of flavin containing monooxygenase and cytochrome P450 to imipramine N-oxidation in rat hepatic microsomes. *Biol Pharm Bull.* 22(6):567-71.
- [48] Guo Z, Raeissi S, White RB, Stevens JC. (1997) Orphenadrine and methimazole inhibit multiple cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 25:390-393.
- [49] Rouer E, Rouet P, Delpech M, Leroux JP. (1988) Purification and comparison of liver microsomal flavin-containing monooxygenase from normal and streptozotocin-diabetic rats. *Biochem Pharmacol.* 37(18):3455-9.
- [50] Poulsen LL. (1981) Organic sulfur substrates for the microsomal flavin-containing monooxygenase. *Reviews in Biochemical Toxicology* (Derleyenler: Hodgson E, Bend JR, Philpot RM), vol. 3, s. 33-49, Elsevier North Holland, Inc.