

Klorpromazin ve Haloperidol'ün İnsan Eritrosit Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enzimi Üzerine İnvitro Etkileri

Dr. Mehmet Emin Büyükokuroğlu¹, Dr. Sayit Altıkat²,
Dr. Mehmet Çiftçi³, Dr. Zekiye Nur Banoğlu¹, Dr. Fatma Göçer¹

ÖZET:

KLORPROMAZİN VE HALOPERİDOL'ÜN İNSAN ERİTROSİT GLUKOZ 6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİMİ ÜZERİNE İN VİTRO ETKİLERİ

Amaç: Klorpromazin ve haloperidolün in vitro koşullarda insan eritrosit glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine etkileri belirlemek amacıyla bu çalışma yapıldı. **Yöntem:** Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi insan eritrositlerinden saflaştırıldı. Enzim aktivitesinin tayini Beutler metoduna göre spektrofotometrik olarak 340nm 'de yapıldı. **Bulgular:** Çalışmanın sonuçlarına göre I₅₀ değerleri klorpromazin için 0,42 mM, haloperidol için 0,37 mM oldu. **Sonuç:** Elde edilen veriler göstermektedir ki, klorpromazin ve haloperidol glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin aktivitesini in vitro olarak güçlü bir şekilde inhibe etmiştir.

Anahtar sözcükler: klorpromazin, haloperidol, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, eritrosit, in vitro

Klinik Psikofarmakoloji Bülteni 2001;11:101-105

ABSTRACT:

IN VITRO EFFECTS OF CHLORPROMAZINE AND HALOPERIDOL ON HUMAN ERYTHROCYTE GLUCOSE 6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE ENZYME

Objective: Effects of chlorpromazine and haloperidol on erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase enzyme activity were investigated in invitro conditions. **Methods:** Glucose 6-phosphate dehydrogenase was purified from human erythrocyte. Enzyme activity was determined according to the Beutler method by using a spectrophotometer at 340 nm. **Results:** The results of study showed that I₅₀ values were 0,42 mM for chlorpromazine and 0,37 mM for haloperidol in invitro study. **Conclusion:** The results of this study suggested that chlorpromazine and haloperidol have significant inhibition effect on the activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase enzyme in invitro.

Key words: chlorpromazine, haloperidol, glucose 6-phosphate dehydrogenase, erythrocyte, in vitro

Bull Clin Psychopharmacol 2001;11:101-105

GİRİŞ

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) pentoz fosfat yolunun ilk basamağını katalize eden anahtar bir enzimdir (1). Eritrositlerde NADPH oluşumu için tek kaynak pentoz fosfat metabolik yolu olup, G6PD eksikliğinde NADPH üretimi önemli ölçüde azalır. NADPH'nın eritrositlerdeki en önemli rolü ise glutatyonu (GSH) indirgemektir. G6PD eksikliği olanlarda hemoliz yapan maddelerin verilmesi durumunda onların kendisi veya metabolitleri hemolize karşı dayanıklılığı sağlayan GSH'yi oksitleyerek (GSSG-okside glutatyon) inaktive ederler. Bunun sonucunda eritrositlerde hemoliz meydana gelir. Hemoliz oluşturmundan hemen önce eritrosit GSH düzeyi azalır ve GSSG artar. GSSG hücreden dışarı çıkar ve hücre içi

total GSH miktarı azalır. Eritrosit membran proteinlerindeki sülfidril gruplarının oksidasyonu membran fonksiyonunu bozar ve dalakta, daha ağır durumlarda ise karaciğerde de eritrositlerin erken yıkımına neden olur (2). G6PD enzimi normal olanlarda oksidan madde ile karşılaşma sonrası GSSG hızla GSH şeklini alır.

G6PD eksikliği ilk olarak primakin alanlarda belirlendiği için bu genetik defekt önceleri "primakin duyarlılığı" şeklinde isimlendirilmiştir. Fava fasulyesi (Fava beans; Vicia fava) yenildiği zaman ortaya çıktığı için bu hastalığa bazan favizm adı da verilmektedir (3,4). G6PD eksikliği esas olarak Afrika, Akdeniz bölgesi, Orta Doğu, Güneydoğu Asya, Kafkas halklarında ve onların soylarından gelenlerde görülmektedir (3,5). Bazı kaynaklarda ise, İspanyol Yahudileri,

¹Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji AD, ²Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, ³Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi

Yazışma Adresi / Address reprint requests to: Yrd. Doç. Dr. M. Emin Büyükokuroğlu, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji AD, Erzurum 25240 Türkiye
Tel: +90 (442) 233 1122-2190 Faks: +90 (442) 234 9013 E-mail: memin@atauni.edu.tr

Kabul tarihi: 28 Mayıs 2001

Yunanlılar, Çinliler, Filipinliler, Endonezyalılar ve Hintli'ler de %5-40 oranında bu enzimin eksikliğinin görüldüğü belirlenmiştir (6). Türkiye'deki olgular daha çok Çukurova ve Van'ın Başkale ilçesinde bulunmaktadır. Eti Türkleri'nde %11,4, Çukurova bölgesinde %8,2, Kıbrıslılarda %3,5 oranında G6PD eksikliğine rastlanmıştır (7). G6PD eksikliğinin farmakolojik açıdan önemi primakin ve kinin gibi antimalaryal ilaçlar, aminopirin ve asetil salisilik asit gibi analjezik ve antipiretikler, sülfonamidler, nitrofuranlar, K vitamini, kloramfenikol, metilen mavisi ve diğer bazı ilaçlar, naftalin gibi kimyasal maddeler ve baklanın (Vicia faba) normal kişilere oranla defektili kişilerde yan etki olarak ciddi boyutta hemolize neden olmalıdır (3,8).

Söz konusu enzimi etkileyen ilaçların kendileri yan etki olarak hemoliz oluşturabilecekleri gibi, bu enzimin düzeyini azaltan ilaçları kullanan kişilerde yukarıda bahsedilen hemolitik ilaçların kombine kullanılması halinde, hemolitik yan etkilerin daha da artabileceği düşüncesinden hareketle; psikiyatri pratiğinde sıklıkla kullanılan ve uzun süre uygulanması gereken nöroleptiklerden ikisinin, fenotiazin grubu ilaçlardan klorpromazin ve butirofenon grubu ilaçlardan haloperidolün invitro koşullarda insan eritrosit G6PD enzim aktivitesi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla bu çalışma yapıldı.

YÖNTEM

Gereç

İnsan Eritrositlerinden G6PD'ın Saflaştırılması:

Sağlıklı 28 yaşındaki bir kişiden alınmış olan taze kandan hemolizat hazırlandı. EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri küçük ependorf tüplerine konuldu ve 15 dakika 2500 xg'de santrifüj edildi. Tüplerin üst kısmındaki plazma ve lökosit tabakaları damlalıklarla alındı. Daha sonra elde edilen eritrosit peleti 0,16 M KCl çözeltisi ile 3 defa yıkandı. Her defasında 2500 xg'de santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Elde edilen eritrositlerden bir hacim alınıp, 5 hacim buzlu su eklenerek hemoliz edildi. Daha sonra hücre ve artıklarının uzaklaştırılması için 10.000xg'de 30 dakika santrifüj edilerek hemolizat hazırlandı. Elde edilen hemolizatta %35-65 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Daha sonra 4 °C'ta 50 mM K-asetat / 50 mM K-fosfat (pH: 7) tamponuna karşı 2 saat süreyle 2 defa değiştirilerek diyaliz işlemi yapıldı. Bundan sonra 2', 5' ADP-Sepharose 4B jeli

kullanılarak afinite kromatografisi ile enzim saflaştırıldı (9-13).

SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi:

Saflaştırılan enzimin saflığı SDS poliakrilamid jel elektroforeziyle kontrol edildi. Elektroferez sırasında yığıma jel için %4, yürütme jel için %10 akrilamid konsantrasyonu kullanıldı. Jel'e ayrıca %1 oranında SDS katıldı. Elektroferez Laemmli'nin tanımladığı metoda göre yapıldı (14).

İnhibitör Çalışması:

Klorpromazin için $2,8 \times 10^{-4}$, $4,2 \times 10^{-4}$, $5,6 \times 10^{-4}$, $8,4 \times 10^{-4}$, $11,2 \times 10^{-4}$ mM kuvvet konsantrasyonlarında, haloperidol için ise $2,66 \times 10^{-4}$, $3,99 \times 10^{-4}$, $5,32 \times 10^{-4}$, $7,98 \times 10^{-4}$ ve $10,64 \times 10^{-4}$ mM kuvvet konsantrasyonlarında 3 kez aktivite ölçümleri yapılarak ortalamaları alındı. Her bir ilaç için 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda [İlaç]-%Aktivite grafikleri çizildi. İlaçsız kuvvetin aktivitesi %100 kabul edildi. %50 inhibisyona neden olan ilaç konsantrasyonu (I_{50}) grafiklerden hesaplandı.

Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Aktivitesinin Ölçümü:

Enzim aktivitesinin ölçümü spektrofotometrede 37 °C'ta Beutler metoduna göre yapıldı (15). Bu metod, NADP'nin G6PD tarafından glukoz 6-fosfat varlığında indirgenmesi esasına dayanır. NADPH'nın oluşum oranı G6PD aktivitesine bağımlı olup, 340 nm'deki absorbans artışı ile ölçülmüştür.

Materyaller:

2', 5' ADP-Sepharose 4B Pharmacia'dan, NADP+ ve G6P Sigmadan, diğer kimyasallar ise Sigma veya Merck'ten temin edildi. Klorpromazin Eczacıbaşı Rhone Poulenc'den, haloperidol ise Ali Raif A.Ş.'den temin edildi.

İstatistiksel Analiz:

% Aktivite değerleri Ortalama \pm Standard Deviyasyon olarak verildi. Verilerin değerlendirilmesinde non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi uygulandı. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. I_{50} değerinin belirlenmesi için regresyon analizi (Microsoft Excel programındaki üstel yöntem kullanılarak) uygulandı.

BULGULAR

G6PD amonyum sülfat çöktürmesi ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite jeli ile ve %51,6 verim ile 9300 kez saflaştırılmıştır. % Aktivite değerleri klorpromazin için Tablo 1'de ve haloperidol için Tablo 2'de verilmiştir. Tablo 1 ve 2'ye bakıldığında, farklı ilaç konsantrasyonlarında elde edilen % aktive değerlerinin, kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir ($p < 0,005$). Regresyon analizinden elde edilen I_{50} değerleri klorpromazin için 0,42 mM ($R^2: 0,09873$) ve haloperidol 0,37 mM ($R^2: 0,9894$) olmuştur. Ayrıca klorpromazin ve haloperidolün 5 farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak elde edilen %aktivite-[I] grafikleri Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Farklı klorpromazin konsantrasyonlarında elde edilen enzim aktivite değerlerinin Ortalama \pm Standard Deviyasyon'ları (Ort \pm S.D.). İlaçsız ortam kontrol olarak ve aktivitesi %100 kabul edilmiştir.

İlaç konsantrasyonu (M)	%Aktivite (Ort \pm S.D.)
0	100 \pm 0.0
2.8×10^{-4}	69 \pm 0.0*
4.2×10^{-4}	50 \pm 1.0*
5.6×10^{-4}	34 \pm 0.0*
8.4×10^{-4}	23.9 \pm 1.002*
11.2×10^{-4}	15.7 \pm 0.608*

N=3, * $p < 0.005$

Tablo 2. Farklı haloperidol konsantrasyonlarında elde edilen enzim aktivite değerlerinin Ortalama \pm Standard Deviyasyon'ları (Ort \pm S.D.). İlaçsız ortam kontrol olarak ve aktivitesi %100 kabul edilmiştir.

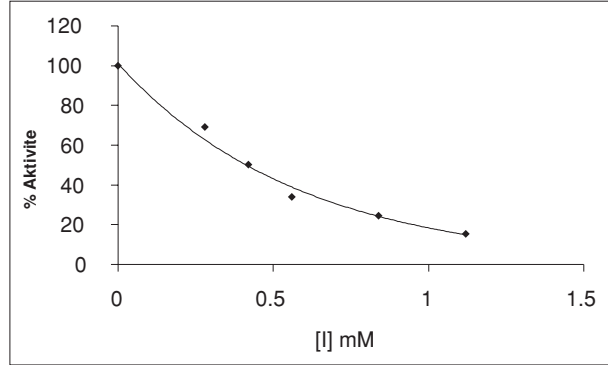
İlaç konsantrasyonu (M)	%Aktivite (Ort \pm S.D.)
0	100 \pm 0.0
2.66×10^{-4}	63 \pm 1.0*
3.99×10^{-4}	52.5 \pm 7.64*
5.32×10^{-4}	35 \pm 0.0*
7.98×10^{-4}	19 \pm 1.0*
10.64×10^{-4}	14 \pm 0.0*

N=3, * $p < 0.005$

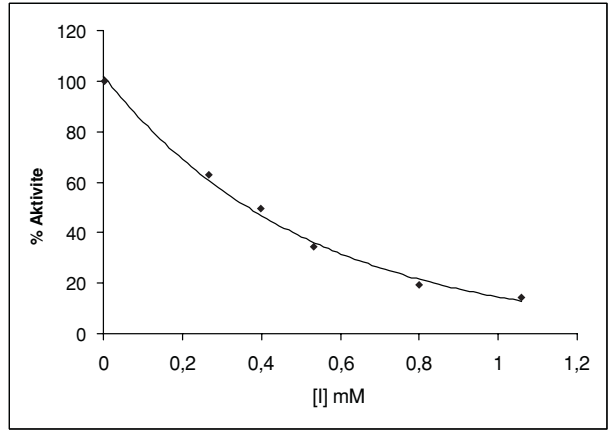
TARTIŞMA

Hemolitik anemilerle birlikte giden eritrosit enzim defektleri ilk kez Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) eksikliğinin tanımlanması ile gündeme gelmiştir. Eritrositlerde yaklaşık olarak 15 enzim defekti

Şekil 1. Klorpromazin 5 farklı konsantrasyonu kullanılarak elde edilen %aktivite-[I] grafikleri.



Şekil 2. Haloperidolün 5 farklı konsantrasyonu kullanılarak elde edilen %aktivite-[I] grafikleri



tanımlanmış olup; dünyada en sık görülen, hemolitik anemiye neden olan ve klinik açıdan en önemli G6PD eksikliğidir (2). G6PD bütün dokularda yaygın olarak bulunmakla beraber, en ciddi patolojik durumlar eritrositlerdeki eksikliği durumunda ortaya çıkmaktadır (7). Ortaya çıkan hemolizin şiddeti enzim eksikliğinin düzeyine ve alınan oksidan madde miktanna göre değişmektedir. Bu nedenle oksidan özelliği bulunan ilaçlar G6PD eksikliği olan kişilerde kullanılırken, ilaç dozunun çok iyi belirlenmesi gerekmektedir. Yine aşırı G6PD eksikliği olan bazı kişilerde, düşük dozlarda dahi hemoliz ortaya çıkabilmektedir.

Eski bir tanı olan G6PD eksikliği ile şizofreninin akut deliran formu arasında bir ilişki olduğu iddia edilmiştir (16). Yine şizofrenlerde lökosit G6PD aktivitesinin azaldığı, eritrosit G6PD aktivitesinde ise an-

lamalı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir (17). Sekiz haftalık lityum tedavisinin nefronlardaki G6PD aktivitesini azalttığını, lityumun kesilmesinden 8 hafta sonra ise enzim aktivitesinin normale döndüğü gösterilmiştir. Ayrıca lityum ile nöroleptik kombinasyonunun da enzim aktivitesinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (18). Antipsikotikler başta, şizofreni olmak üzere bazı psikoza tedavisinde kullanılan ve santral sinir sisteminde dopaminerjik etkinliği baskılayan ilaçlardır. Haloperidol ve klorpromazin, en fazla kullanılan antipsikotiklerdendir. Özellikle şizofreni tedavisinin başlangıcında yükleme dozunda verilir, daha sonra idame tedavisine geçilir (3). Çalışmamızın sonuçları, oldukça düşük konsantrasyonlarda klorpromazin ve haloperidolün G6PD aktivitesini inhibe ettiğini göstermiştir. Bu bulgular, G6PD eksikliği bulunan psikotik hastalarda her iki ilacın da dik-

katle kullanılması gerektiği sonucunu ortaya koymaktadır. Yine bu kişilerin özellikle tedavinin başlangıcında, yani yükleme dozunun verildiği günlerde, klinik ve laboratuvar açısından takibi gerekebilir. Ayrıca haloperidol ve klorpromazin kullanan kişilerde, G6PD enzimi eksikliği olanlarda hemoliz yaptığı bilinen ilaçların kombine kullanımı durumunda hemoliz olasılığına dikkat edilmelidir.

Sonuç olarak, Türkiye'nin doğu ve güney bölgelerinde çalışan hekimlerin, bu her iki ilacın G6PD enzimini inhibe ettiğini göz önünde bulundurmalarının ve psikotik hastaların tedavisini bunu dikkate alarak düzenlemelerinin uygun olacağını düşünüyoruz. Ayrıca bu ilaçların in vivo inhibisyon düzeyi ve sürelerinin bilinmesinin, tedavi dozu ve sürelerinin belirlenmesine katkıda bulunacağı kanısındayız.

Kaynaklar:

1. Telefoncu A, Telefoncu F. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesine primaquine'nin etkisi. *Tr J Medical Sci* 1989; 14:57-63.
2. Sodeman WA Jr, Sodeman TM. *Sodeman's Pathologic Physiology Mechanism of Disease*, 1985. Çev: kurul, Fizyopatoloji cilt-2, Ankara:Türkiye Klinikleri Yayınevi, 1991:720-724.
3. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 9. Baskı. Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık 2000:155-156.
4. Weksler BB, Moore A, Tepler J. Hematology. In: Andreoli TE, Carpenter CCJ, Plum F, Smith LH Jr eds. *Cecil Essentials of Medicine*. USA: WB Saunders Co., 1990:342-403.
5. Laurence DR, Bennett PN, Brown MJ. *Clinical Pharmacology*, China: Churchill Livingstone 1997:77-120.
6. Cotran RS, Kumar V, Collins TR. *Pathological Basis of Disease*. USA: W.B. Saunders Co. 1999:601-643.
7. Tamer I, Ünal B, Aksoy K. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği gözlenen olgularda eritrosit zarı Na⁺-K⁺/Mg⁺⁺ adenosin 5'-trifosfataz, eritrosit süperoksid dismutaz ve plazma malondialdehid düzeyleri. *Ç.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 1998; 23:114-118.
8. Beutler E. G6PD deficiency. *Blood* 1994; 81:3613-3636.
9. Shreve DS, Levy HR. On the molecular weight of human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Com* 1977; 78:1369-75.
10. Çiftçi M, Küfrevioğlu Ö, Gündoğdu M, Özmen İ. Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Pharmacol Res* 2000; 41:109-113.
11. Ninfali P, Orsenigo T, Barociani L, Rapa S. Rapid purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from mammal's erythrocyte. *Prep Biochem* 1990; 20:297-309.
12. Delgado C, Tejedor C, Luque J. Partial purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat erythrocyte haemolysate by partitioning in aqueous two-phase system. *J Chromatogr* 1990; 498:159-168.
13. Morelli A, Benatti U, Gaetani GF, De Flora A. Biochemical mechanisms of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Proc Natl Acad Sci* 1978; 75:1979-1983.
14. Laemmli DK. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-83.
15. Beutler E. *Red Cell Metabolism Manuel of Biochemical Methods*. London: Academic Press 1971.

16. Nasr J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency with psychosis. *Arch Gen Psychiatry* 1976; 33:1202-1203.
17. Alevizos BH, Stefanis CN. Enzyme activity of G-6-PD, gamma-GT and Lysozyme in white cells of schizophrenics. *Neuropsychobiology* 1980; 30:181-184.
18. Norgaad T, Faarup P, Hansen BB, Kristensen AR, Christensen S. Correlation between distal nephron enzyme activity, structure and function in rats during lithium and lithium plus neuroleptic treatment. *Ren Physiol* 1985; 8:50-61.