

FLUOKSETİN'İN SİTOGENETİK OLARAK ANALİZİ

Derya ÜSTÜNER

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Meşelik / ESKİŞEHİR

Özet

Depresyon beyindeki biyokimyasal değişikliklerden kaynaklanan bir hastalık olup toplumdaki en yaygın psikiyatrik durumlardan biridir. Bu çalışmada, son yıllarda dünyada yaygın olarak kullanılan bir antidepresan preparatın etken maddesi olan fluoksetinin, mitotik aktivite ve kromozom düzeyindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için fluoksetinin in vivo şartlardaki etkilerini belirlemek üzere çalışma düzenlenmiştir. In vivo çalışmamızda 32 adet 225-250 gram ağırlığındaki 3 aylık Sprague dawley erkek sıçana 21 gün boyunca intraperitoneal olarak 5mg/kg, 7.5mg/kg, 10mg/kg'lık fluoksetin enjeksiyonu yapılmıştır. Sıçan kemik iliği hücrelerinden hazırlanan preparatlar mitotik indeks, sayısal ve yapısal kromozom düzensizliği açısından değerlendirilmiştir. Fluoksetin antidepresanlar içerisinde büyük bir keşif olarak görünmesine rağmen yüksek dozlarında, DNA onarımının engellenmesi protein sentezini etkilemektedir. Bu da mitotik indeksde, kromozomlarda düzensizliğe (anöploidi) neden olmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Fluoksetin, kromozom, in vivo

ANALYSIS OF FLUOXETINE CYTOGENETICALLY

Abstract

Depression is an illness caused by the brain, biochemical changes in the society is one of the most common psychiatric conditions. In this study, a widely used antidepressant in the world in recent years, with the active ingredients of the preparation of fluoxetine, was to determine the effects of mitotic activity and chromosome level. For this study to determine the effects of fluoxetine in-vivo conditions are arranged. In vivo study of 32 Sprague Dawley male rats 225-250 grams in weight 3 months for 21 days intraperitoneally 5mg/kg, 7.5mg/kg, 10mg/kg were injected with fluoxetine. Preparations of rat bone marrow cells prepared were evaluated in terms of mitotic index, numerical and structural chromosomal disorder. Fluoxetine antidepressants, though it seems as a great discovery in high doses, blocking protein synthesis and affects DNA repair. This is caused the mitotic index, chromosome disorder (aneuploidy).

Key words : Fluoxetine, chromosome, in vivo

1.Giriş

İnsanlarda en sık rastlanan hastalıklardan biri olan depresyon, önemli düzeyde intihardan kaynaklanan morbidite ile ilişkilidir. Çünkü her yedi depresyon hastasından biri genellikle depresyon tedavisi için kendilerine verilen ilaçları yüksek dozda alarak intihar girişiminde bulunmaktadır. Bu nedenle özellikle antidepresan ilaçların yüksek dozda güvenilirliği çok önemlidir [1,2]. Depresyona karşı kullanılan antidepresan ilaç grubundan SSRI'lar, (Selektif Serotonin Re-uptake Inhibitörü) mutluluk duygusu veren serotonin hormon seviyesinin artmasına neden olur. 1987 yılında piyasaya sunulan fluoksetin 1988 yılından itibaren klinikte depresyon tedavisinde en çok reçete edilen antidepresan olmuştur [1]. Fakat mutluluk hapi olarak, kozmetik farmakolojiye hizmet ettirilerek kullanılan fluoksetin, ilaç kullanımında suistimale uğramıştır [3]. Modern toplum ürünlerinden biri olarak tanımlanan depresyon, günümüzde ilaçlarla, uyuşturucularla karşılıklı ilişki içindedir. Depresyondaki kişi ilaçlara yönelmekte ve ilaçlar da depresyonu bir taraftan tedavi ederken bir taraftan da besleyip yeniden üretmektedir [3].

Son yıllarda artan fluoksetin kullanımına bağlı olarak bu ilacın yüksek dozlardaki güvenilirliği önem kazanmıştır. Özellikle T hücre proliferasyonu (artışı) üzerine olan etkisi incelenmeye başlanmıştır. T hücre proliferasyonundaki etki, somatik hücre bölünme defektleri ile birlikte farklı kromozom anomalilerine neden olma riskini de beraberinde getirmektedir [4,5,6,7,8].

Fluoksetinin moleküler ağırlığı 345.79'dur. 14mg/ml'de distile su veya serum fizyolojik ile maksimum çözünme sağlar. Fluoksetin bir fenil ve bir toyl grubu ile ikinci amin grubundandır, yani fenilpropilamin türevidir. Yapıca amfetaminlere benzer [9]. Fluoksetin bir seçici serotonin geri alım inhibitörüdür, diğer nörotransmitterler üzerinde çok az etkisi bulunmaktadır. Ağız yoluyla alındıktan sonra emilimi iyidir ve en yüksek plazma düzeyine 6-8 saat içinde ulaşır. Fluoksetin 4-6 günlük bir yarılanma ömrüne sahipken, aktif metaboliti olan norfluoksetin 7-10 günlük yarılanma ömrüne sahiptir. Bu uzun yarılanma ömrü sporadik olarak ilaç kullanımına uyumsuzluk gösteren hastalarda koruyucu olmakta ve ilaç kesme fenomeninin ortaya çıkmasını önlemektedir. İlaç kullanımından 2-8 hafta içinde iyileşme başlamaktadır [10]. Fluoksetinin önerilen başlangıç ve sürdürüm dozu 20mg/gün'dür. Bu doz hastaların çoğu için yeterli olmakla birlikte günlük doz maksimum 80 mg/gün olabilir. Tedavide 2-3 hafta içinde bir ilerleme kaydedilmediyse 20mg/gün'lük bir artış düşünülebilir [1, 11].

Çalışmada, in vivo koşullarda fluoksetinin mitotik aktivite ve kromozom düzeyindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için, sıçan kemik iliği hücrelerinde farklı dozlardaki (5mg/kg, 7.5mg/kg, 10mg/kg) fluoksetinin mitotik aktiviteyi ve kromozomları nasıl etkilediği sitogenetik yöntemlerle incelenmiştir.

2.Deney ve Tartışma

2.1. Materyal

In vivo çalışmada 3 aylık Sprague dawley 32 adet erkek sıçan kullanılmıştır. Farklı dozlardaki (5 mg/kg, 7.5 mg/kg, 10 mg/kg'lık) fluoksetinle 21 gün boyunca enjeksiyon yapılmıştır. Sıçan kemik iliği hücrelerinden metafaz kromozom preparatı hazırlanarak, Levan ve arkadaşlarının hazırladığı sıçan kromozom haritası baz alınarak sayısal ve yapısal kromozom anomalileri açısından değerlendirilmiştir [12, 13].

2.2.Yöntemler

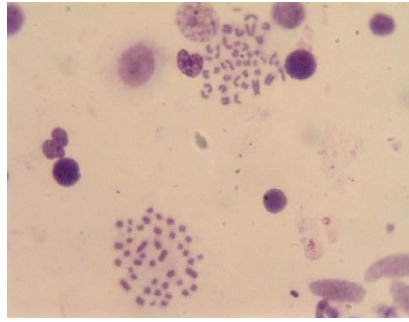
Sıçanlara, eter anestezi altında sakrifikasyonundan 2 saat önce 4 mg/kg kolsemid enjeksiyonu yapılmıştır. Sakrifikasyondan sonra ise, kemik iliği almak için sıçanların femur kemikleri çıkarılarak, proksimal ucu ilik kanalı görülebilecek şekilde açılıp, 3 ml transport medyum bulunan enjektöre alınmıştır. Transport medyumlu kemik iliği santrifüj tüplerine aktarılmış ve 1300 rpm'de 8 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant bir pastör pipeti yardımıyla atılarak hücre peletinin üstüne 5 ml. 0.075 M KC1 yavaş ayarlı vorteks üzerinde damla damla ilave edilmiştir. 30 dakika 37°C'lik etüvde bekletildikten sonra taze hazırlanmış Cornay fiksatifinden (1/3 oranında asetik asit/methanol) tüplere 3-5 damla damlatılmış ve 1300 rpm'de 8 dakika santrifüj edilmiştir. Cornay fiksatif ile yıkama işlemi 2 kez daha tekrarlanmıştır. En son olarak santrifüj edilmiş ve süpernatantı alınmış hücre peleti pipetaj işleminden sonra temizlenmiş lamlara 20-25 cm yükseklikten 45°'lik açıyla yayma işlemi yapılmıştır.

Direkt boyama ya da solid bantlama 1970'li yıllara kadar rutin olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu tip boyama ile kromozomların büyük bir kısmını tanımlamak mümkün değildir. Günümüzde, kromozom kırık noktalarını saptamada, kromozomları saymada ya da mikronukleus analizlerinde kullanılmaktadır. Yayma işlemi yapıp yaşlandırılmış olan lamlar %5'lik Giemsa solüsyonunda 3-5 dakika tutularak distile sudan geçirilen preparatlar mikroskop altında değerlendirilmeye alınmıştır. In vitro olarak, preparatları değerlendirilebilecek 30 bölge seçilerek doz-süre kombinasyonlarına ait kültürlerden MI (Mitotik İndeks) için 1000 hücre, kromozom düzensizliği için 200 adet metafaz plağı sayısal ve yapısal açıdan olympus-BX mikroskobunda değerlendirilmiştir. Preperatlardaki görüntüler, insight color Olympus CH-40 CCD kamera aracılığıyla alınmıştır. Elde edilen değerlerin sıklığının anlamlı olup olmadığını belirleyebilmek için SPSS70 paket programındaki istatistiksel testlerden faydalanılmıştır.

3.Bulgular ve Tartışma

3.1 Farklı dozlardaki Fluoksetinin In vivodaki Mitotik Aktivitesi

1.grup (5 mg/kg), 2.grup (7.5 mg/kg), 3.grup (10 mg/kg) ve kontrol grupları mitotik aktivite açısından değerlendirilmiştir (Şekil 3.1, Çizelge 3.1, Çizelge 3.2, Şekil 3.2).

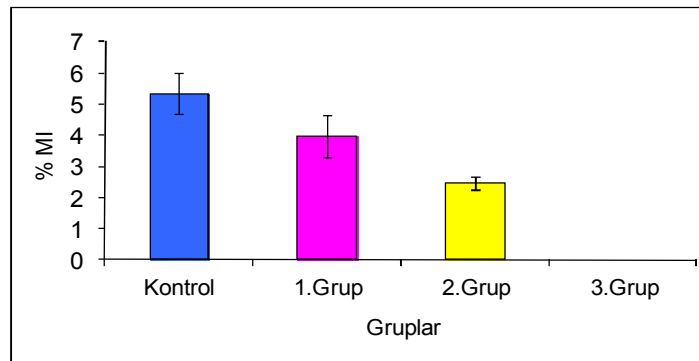


Şekil 3.1. 100'lük büyütmedeki sıçan metafaz kromozomları

Çizelge 3.1. In vivodaki fluoksetinin farklı dozlarındaki %MI değerleri

Grup	n	Mitoza Giren Hücre	Ortalama MI	% MI
Kontrol	8	428	53.500	5.350
1	8	318	39.750	3.975
2	8	198	24.750	2.475
3	8	-	-	-

% MI: % Mitotik İndeks n: Sıçan Sayısı



Şekil 3.2. In vivodaki farklı fluoksetin dozlarındaki % MI değerlerinin karşılaştırılması

Çizelge 3.2. Grupların % MI (% Mitotik İndeks) açısından karşılaştırılması

Karşılaştırılan Gruplar		p
Kontrol	1.Grup	0.209 ^{ns}
Kontrol	2.Grup	0.001 ^{***}
Kontrol	3.Grup	0.001 ^{***}
1.Grup	2.Grup	0.150 ^{ns}
1.Grup	3.Grup	0.001 ^{***}
2.Grup	3.Grup	0.006 ^{**}

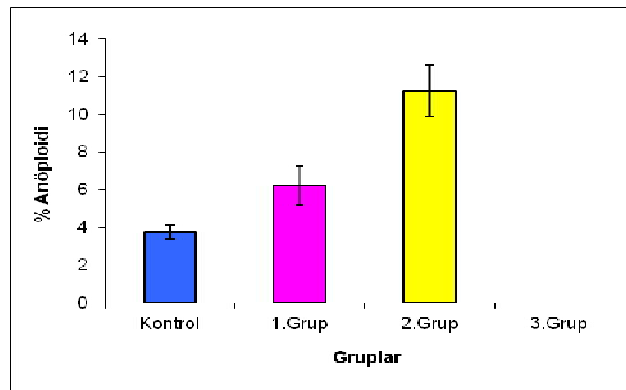
*** : p<0.001, **: p<0.01, * : p<0.05, ns: p>0.05

3.2 Farklı Dozlardaki Fluoksetinin In vivodaki Sayısal ve Yapısal Kromozom Anomalisi Açısından İncelenmesi

In vivoda, sayısal ve yapısal kromozom anomalisini belirleyebilmek için her hayvana ait 200 metafaz kromozomu incelenirken 2. grupta (7.5mg/kg fluoksetin) 8 sıçandan 1'inde tekrarlamayan 2 adet kromatid tipi kırığa rastlanmıştır. Fakat diğer metafaz kromozomlarında bu anomali tekrar etmediği için bu bulgu anlamlı kabul edilmemiştir. Sayısal kromozom anomalisi açısından metafaz kromozomları incelendiğinde gruplar arasında anöploidi oranlarının farklılığı ortaya konmuştur (**Çizelge 3.3** ve **Çizelge 3. 4 Şekil 3.3**). Her hayvana ait 200 metafaz hücresinde kromozomlarda artan fluoksetin dozuna karşılık kromozomal anöploidi tipindeki sayısal düzensizlikler tek yön Anova testi ile de doğrulanmıştır.

Çizelge 3.3. In vivoda farklı dozlardaki fluoksetinin anöploidi oranları

Gruplar	% Anöploidi
Kontrol	3.750±0.365
1.Grup	6.250±1.030
2.Grup	11.250±1.359
3.Grup	0

**Şekil 3.3** In vivoda farklı dozlardaki fluoksetin gruplarındaki anöploidi oranları

Çizelge 3.4. Anöplöidi açısından grupların karşılaştırılması

Gruplar		p
Kontrol	1.Grup	0.203 ^{ns}
Kontrol	2.Grup	0.001***
Kontrol	3.Grup	0.025*
1.Grup	2.Grup	0.002**
1.Grup	3.Grup	0.001***
2.Grup	3.Grup	0.001***

*** : p<0.001, **: p<0.01, * : p<0.05, ns: p>0.05

Çalışmamızda, 5mg/kg, 7.5mg/kg ve en yüksek doz olarak da 10mg/kg'lık fluoksetin dozunu sıçana 21 gün boyunca uyguladık. Fluoksetinin uygulama dozu yükseldikçe; örneğin, 7.5mg/kg'da mitotik aktivite azalırken, en yüksek uygulama dozu olan 10mg/kg'lık fluoksetinin mitozu inhibe edici etkisi belirlenmiştir. En düşük doz olan 5 mg/kg'lık fluoksetinin kontrol grubuyla mitotik aktivite açısından karşılaştırıldığında farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

4. Sonuçlar

Raep ve arkadaşları, 0,3-1 mg/kg'lık fluoksetin enjeksiyonlarının insanlardaki günlük 20-60 mg'lık normal fluoksetin kullanımıyla eş olduğunu belirtmişlerdir [14]. Çalışmamızda da sıçanlara uyguladığımız fluoksetin dozları 5mg/kg, 7.5mg/kg ve 10mg/kg'dır. Bu uygulamalar sırasıyla insanlardaki 100-300 mg/kg, 150-450 mg/kg ve 200-600 mg/kg'lık fluoksetin alımlarına denk gelmektedir. Bizim bulgularımız gösteriyor ki; insanlardaki günlük alımın 7.5 katına kadar olan dozlarda, mitotik aktivite açısından kontrol grubuna göre çok büyük oranda fark bulunmazken, fluoksetinin 10 katlık alımlarında hücre bölünmesi engellenmektedir. Bu bulgu da fluoksetinin farklı doz ve sürelerde hücre bölünmesini önemli derecede baskıladığını, doz zaman artışına bağlı olarak kromozom anomalilerine sebep olabileceğini ve mitotik indeksi yani hücre bölünme frekansını azalttığını göstermiştir.

Çalışmamız sonucunda, fluoksetinin farklı doz ve sürelerde hücre bölünmesini önemli derecede baskıladığını, doz zaman artışına bağlı olarak kromozom anomalilerine sebep olabileceğini ve mitotik indeksi yani hücre bölünme frekansını azalttığını gösterdik. Bununla beraber fluoksetinin farklı dozlarında MN (MikroNükleus) ve SCE (Sister Chromosome Exchange) gibi kromozom kırıklarının ölçen çalışmalara da ihtiyaç vardır.

Teşekkür:

Hocam Yrd.Doç.Dr. Muhsin Özdemir'e çalışmam boyunca bana olan desteklerinden dolayı teşekkürü borç bilirim.

Kaynaklar

- [1]Stokes, P.E., Holtz, A., "Clinical Therapeutics", *Excerpta Medica*, 19 (5) (1997).
- [2]Tylee, A., Gastpar, M., Lepine, J.P., Mendlewicz, J., "Depres II (Avrupa Toplumunda Depresyon Araştırması II): Toplumdaki Depresyon Semptomları, Yeti Yitimi ve Güncel Yaklaşımlarla İlgili Bir Hasta İncelemesi" *Int. Clin. Psychopharmacol*, 14: 139-151 (1999).
- [3]Wurtzel, E., "Prozac Toplumunu", *İletişim Yayınları*, Mefkure Bayatlı, (2000).
- [4]Berkeley, B.M., Daussin, S., Hernandez, C.M., Bayer, B.M., "In Vitro Effects of Cocaine, Lidocaine and Monoamine Uptake İnhibitors on Lymphocyte Proliferative Responses", *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 16: 165-178 (1994).
- [5]Edgar, V.A., Genaro, A.M., Cremaschi, G., Sterin-Borda, L., "Fluoxetine Action on Murine T-Lymphocyte Proliferation: Participation of PKC Activation and Calcium Mobilisation", *Cell Signal*, 10: 721-726(1998).
- [6]Edgar, V.A., Genaro, A.M., Cremaschi, G.A., Borda, S.L., "Fluoxetine action upon human T lymphocyte proliferation". *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam*, 48: 191-197 (1998).
- [7]Edgar, V.A., Sterin-Borda, L., Cremaschi, G.A., Genaro, A.M., "Role of protein kinase C and cAMP in fluoxetine effects on human T-cell proliferation". *European Journal of Pharmacology*, 372: 65-73 (1999)

- [8]Genaro, A.M., Edgar, V.A., Stern-Borda, L., "Differential Effects of Fluoxetine on Murine B-cell Proliferation Depending on the Biochemical Pathways Triggered by Distinct Mitogens". *Biochemical Pharmacology*, 60: 1279-1283(2000).
- [9]Hardman, J.G. , Limbird, L. E. , " Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics", The McGrawHill Companies Inc, USA, (1996).
- [10]Nierenberg, A.A., Farabaugh, A.H., Alpert, J.E., Gordon, J., Worthington, J.J., Rosenbaum, J.F., Fava, M., "Timing of Onset of Antidepressant Response With Fluoxetine Treatment", *Am J. Psychiatry*, 157: 1423-1428 (2000).
- [11]Özden, H., Bildirici, K., Üstüner, D., Üstüner, C., Cengiz, B., Tülay, A. ve Yılmaz, V., "Fluoksetinin deneysel verilmesinden sonra rat karaciğerinin Hİ incelenmesi", *Türkiye Ekopatoloji Dergisi*, 11(1):9-15 (2005).
- [12]Çakmak, A.E., Başaran, N., Değirmenci, I., Güneş, V.H., Gün, H., Cingi, I.M., Başaran, A., Kalkandelen, G., "The Effects of Lindane (8-Benzene Hexachloride) on the Abnormalities in Rat Bone Marrow Cells", *J. Health Sci*, 7: 13-19 (1995).
- [13]Levan, G., Szpirer, J., Szpirer, C., Klinga, K., Hanson, C., Islam, Q.M., "The Gene Map of the Norway Rat (*Rattus norvegicus*) and Comparative Mapping with Mouse and Man", *Genomics*, 10: 699-718 (1991).
- [14]Raep, K.D., Evans, S., Garcia, F.L.Q., Muma, A.N., Wolf, A.W., Battaglia, G.W., Van De Kar, D.L., "Daily Injections of Fluoxetine Induce Dose-Dependent Desensitization of Hypothalamic 5-HT_{1A} Receptors: Reductions in Neuroendocrine Responses to 8-OH-DPAT and in Levels of G_z and G_i proteins", *Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 288: 98-106 (1999).