

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**CYP2D6 GENOTİPİNİN MESALAZİN
METABOLİZMASINDAKİ ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MELEK BESTE ÖZEN

DENİZLİ, OCAK - 2022

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**CYP2D6 GENOTİPİNİN MESALAZİN
METABOLİZMASINDAKİ ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MELEK BESTE ÖZEN

DENİZLİ, OCAK - 2022

Bu tez alışması PAÜ-BAP tarafından 2020FEBE029 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

MELEK BESTE ÖZEN

ÖZET

**CYP2D6 GENOTİPİNİN MESALAZİN METABOLİZMASINDAKİ
ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MELEK BESTE ÖZEN
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. GÜRKAN SEMİZ)
(İKİNCİ DANIŞMAN: PROF. DR. ALAATTİN ŞEN)
DENİZLİ, OCAK - 2022**

Mesalazın (5-aminosalisilik asit, 5-ASA), ülseratif kolit, Crohn gibi enflamatuvar bağırsak hastalıklarına (EBH) sahip hastalarda hem terapötik anlamda hem de remüsyon kontrolü amacıyla kullanılan temel bir anti-inflamatuvar ajandır. İBH hastaları anti-inflamatuvar ilaçları hayatları boyunca kullanır. CYP2D6 enzimleri, sitokrom P450 enzimleri arasında psikiyatrik ilaçları en yakından ilgilendiren oldukça polimorfik olan enzimlerdir. Ultra hızlı metabolizörler, hızlı metabolizatörler, normal metabolizatörler ve yavaş metabolizatörler olmak üzere fenotip olarak sınıflandırılır. CYP2D6 polimorfizmi, metabolize edici durumu nedeniyle klinik sonucu etkiler. Yavaş metabolizörler yetersiz tedavi riskiyle karşı karşıya iken, ultra hızlı metabolizörlerde toksikasyon durumu görülebilir. Bu çalışmada daha önce laboratuvarımızda yapılmış olan bir araştırmadan elde edilen verilerden yola çıkarak CYP2D6 enzimi ve 5-ASA ilişkisi incelenmiştir. 5-ASA'nın, CYP2D6 ile metabolize edilip edilmediği bilgisine kuşkusuz ulaşılması amaçlandı. Aynı zamanda varsa metabolitinin bulunması ve kinetiğinin aydınlatılmasıyla yeni bilgilerin literatüre kazandırılması tezin bir diğer amacıdır. Öncelikle 5-ASA uygun çözücü ile çözülüp CYP2D6 enzimi kullanılarak aktivite ölçümleri yapıldı. Sonrasında HPLC-ESI-MS/MS analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlara bakıldığında; mesalazinin, CYP2D6 enziminin substratı değil inhibitörü olma potansiyeli taşıdığı görüldü. Elde edilen bilgiler doğrultusunda, hastaların mesalazini ömür boyu kullandığı düşünüldüğünde, başka hastalıkların tedavileri için mesalazinin yanında farklı ilaçların kullanılması durumunda tedavi etkinliğinin düşebileceği ve bunun yanında istenmeyen ilaç yan etkilerinin ortaya çıkabileceğini söylemek yanlış olmayacaktır. Çalışmanın sonuçları göstermiştir ki klinikte ilaç dozu belirlenirken kişiye özel genotipleme testinin rutin olarak yapılması, ayrıca tedavinin kişinin kullandığı diğer ilaçlar ele alınarak düzenlenmesi gerekmektedir. Bahsedilen olası durumların, hastaların hayatını tehdit etmesinin yanısıra sağlık sistemine fazlaca yük binmesine sebep olduğu açıktır.

ANAHTAR KELİMELELER: Sitokrom P450, CYP2D6, CYP2D6 Genotip, Mesalazın (5-aminosalisilik asit, 5-ASA), Metabolizma

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE IMPORTANCE OF CYP2D6 GENOTYPE IN MESALAZINE METABOLISM

MSC THESIS

MELEK BESTE ÖZEN

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. GÜRKAN SEMİZ)

(CO-SUPERVISOR: PROF. DR. ALAATTİN ŞEN)

DENİZLİ, JANUARY 2022

Mesalazine (5-aminosalicylic acid, 5-ASA) is a basic anti-inflammatory agent both used for the purpose of therapy and as a remission control in patients with inflammatory bowel diseases (EBD) such as ulcerative colitis and Crohn's disease. EBD patients use these anti-inflammatory drugs throughout their lives. Among the cytochrome P450 enzymes, the highly polymorphic enzymes most closely related to psychiatric drugs are the CYP2D6 enzymes. They are classified into ultra-rapid metabolizers, rapid metabolizers, normal metabolizers, and slow metabolizers based on their phenotypes. The metabolism status of CYP2D6 polymorphism influences its clinical outcome. While slow metabolizers are at risk of inadequate treatment, ultra-rapid metabolizers may experience toxicity. In this study, we investigated the relationship between CYP2D6 and 5-ASA based on the data obtained from the previous study conducted in our laboratory. The aim of this study is to investigate the effect of CYP2D6 on 5-ASA. At the same time, finding its metabolite, if any, and elucidating its kinetics, to bring new information to the literature was another purpose of this thesis. First of all, 5-ASA was dissolved with an appropriate solvent and the activity measurements were performed using the CYP2D6 enzyme. Then, HPLC-ESI-MS/MS analyzes was performed. Based the our results, Mesalazine appeared to have an inhibitory potential rather than being a substrate for the CYP2D6 enzyme. Based on the results from this research, when using mesalamine for a lifetime, the use of it with other drugs can lead to inadequate treatment or side effects in patients. The results of the study showed that when determining the drug dose in the clinic, a specific genotyping test should be routinely performed on the patient and the treatment should be regulated while considering the other drugs used by the patient. It is clear that the mentioned possible situations not only threaten the life of the patients, but also place a heavy burden on the health system.

KEYWORDS: Cytochrome P450, CYP2D6, CYP2D6 Genotype, Mesalazine, (5-aminosalicylic acid, 5-ASA), Metabolism

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ.....	ix
ÖNSÖZ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Ksenobiyotik Metabolizması.....	2
1.1.1 Sitokrom P450 Enzimleri.....	4
1.1.1.1 Sitokrom P450 2 Ailesi.....	9
1.1.1.1.1 CYP2D6 Alt Ailesi.....	9
1.2 5-Aminosalisilik Asit ve Metabolizması.....	15
1.3 Tezin Amacı	19
2. YÖNTEM.....	20
2.1 MATERYAL.....	20
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	20
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	20
2.2 METOT	21
2.2.1 Mesalazin (5-ASA) Maddesini Çözme Çalışmaları	21
2.2.2 Kitteki Reaktiflerin Hazırlanması.....	21
2.2.3 AHMC Standart Eğri Grafiği Oluşturulması.....	22
2.2.4 CYP2D6 Aktivite Ölçümlerinin Karakterizasyonu	22
2.2.5 HPLC-ESI-MS/MS Analizleri.....	34
2.2.6 İstatistiksel Analizler	37
3. SONUÇLAR.....	38
3.1 Standart Eğri Çalışmaları	38
3.2 Plakaların Floresan Ölçümlerinde Elde Edilen Değerler ve Grafikleri	41
3.3 CYP2D6 Aktivite Ölçümlerinin Karakterizasyonu.....	105
3.3.1 Zaman Etkisi	105
3.3.2 Substrat Etkisi	106
3.3.3 İnhibitör Etkisi	107
3.3.4 Kinidin Etkisi.....	109
3.4 HPLC-ESI-MS/MS Ölçümleri	110
4. BULGULAR	117
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	124
6. KAYNAKLAR.....	125
7. ÖZGEÇMİŞ.....	136

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: İlaç metabolizasyonu	2
Şekil 1.2: P450 enzimlerinin absorbansı	4
Şekil 1.3: CYP450 hücre lokasyonu sitokrom P450 hem yapısı	5
Şekil 1.4: Sitokrom P450'deki reaksiyon basamakları	7
Şekil 1.5: Sitokrom P450 enzimlerinin isimlendirilmesi	8
Şekil 1.6: CYP başına metabolize edilen ilaç grafiği	9
Şekil 1.7: Aktif bölgede bağlı bir Tioridazin molekülüne sahip P4502D6'nın kapalı yapısı	10
Şekil 1.8: CYP2D6 3 boyutlu yapısı	11
Şekil 1.9: Farklı Orta Doğu ülkelerinde CYP2D6'nın genotip frekansı	14
Şekil 1.10: Dünya çapında CYP2D6 normal olmayan metabolize edici olasılık tahminleri	15
Şekil 1.11: Mesalazin kimyasal yapısı	16
Şekil 1.12: Sülfasalazinin metabolik yıkımı ve 5-ASA'nın faz II reaksiyonları ile biyotransformasyonu	16
Şekil 1.13: 5-ASA'nın kolondaki etki mekanizması	17
Şekil 1.14: Sülfapiridin'in, Balsalazid'in, İpsalazid'in ve Olsalazid'in kimyasal yapıları	18
Şekil 2.1: CYP2D6 aktivitesinin tayini	23
Şekil 2.2: AMMC'nin CYP2D6 tarafından katalizlenen demetilasyonu	23
Şekil 3.1: AHMC standart eğri grafiği 1	39
Şekil 3.2: AHMC standart eğri grafiği 2	39
Şekil 3.3: AHMC standart eğri grafiği 3	40
Şekil 3.4: AHMC ortalama standart eğri grafiği	40
Şekil 3.5: I. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	41
Şekil 3.6: I. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	42
Şekil 3.7: I. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	43
Şekil 3.8: I. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	44
Şekil 3.9: I. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	45
Şekil 3.10: I. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	46
Şekil 3.11: I. plakanın 7 ve 7' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	47
Şekil 3.12: I. plakanın 8 ve 8' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	48
Şekil 3.13: I. plakanın 9 ve 9' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	49
Şekil 3.14: II. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	50
Şekil 3.15: II. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	51
Şekil 3.16: II. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	52
Şekil 3.17: II. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	53
Şekil 3.18: II. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	54
Şekil 3.19: II. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	55
Şekil 3.20: III. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	56
Şekil 3.21: III. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	57
Şekil 3.22: III. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	58
Şekil 3.23: III. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	59
Şekil 3.24: III. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	60
Şekil 3.25: IV. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	61

Şekil 3.26: IV. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.	62
Şekil 3.27: IV. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.	63
Şekil 3.28: IV. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.	64
Şekil 3.29: IV. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.	65
Şekil 3.30: IV. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.	66
Şekil 3.31: V. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.....	67
Şekil 3.32: V. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.....	68
Şekil 3.33: V. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.....	69
Şekil 3.34: V. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.....	70
Şekil 3.35: V. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	71
Şekil 3.36: VI. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.	72
Şekil 3.37: VI. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.	73
Şekil 3.38: VI. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.	74
Şekil 3.39: VI. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.	75
Şekil 3.40: VI. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.	76
Şekil 3.41: VI. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.	77
Şekil 3.42: VII. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	78
Şekil 3.43: VII. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	79
Şekil 3.44: VII. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	80
Şekil 3.45: VII. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	81
Şekil 3.46: VII. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	82
Şekil 3.47: VIII. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.....	83
Şekil 3.48: VIII. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.....	84
Şekil 3.49: VIII. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.....	85
Şekil 3.50: VIII. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.....	86
Şekil 3.51: VIII. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.....	87
Şekil 3.52: VIII. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.....	88
Şekil 3.53: IX. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.	89
Şekil 3.54: IX. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.	90
Şekil 3.55: IX. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.	91
Şekil 3.56: IX. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.	92
Şekil 3.57: IX. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.	93
Şekil 3.58: IX. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.	94
Şekil 3.59: X. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.....	95
Şekil 3.60: X. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.....	96
Şekil 3.61: X. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.....	97
Şekil 3.62: X. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.....	98
Şekil 3.63: X. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.....	99
Şekil 3.64: XI. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	100
Şekil 3.65: XI. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.....	101
Şekil 3.66: XI. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	102
Şekil 3.67: XI. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	103
Şekil 3.68: XI. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği	104
Şekil 3.69: Zamana bağlı CYP2D6 aktivitesinin değişimi.	105
Şekil 3.70: Artan substrat konsantrasyonunda 5-ASA yokluğunda CYP2D6 aktivitesinin değişimi.	106
Şekil 3.71: Sabit substrat konsantrasyonunda artan 5-ASA varlığında CYP2D6 aktivitesinin değişimi.	107
Şekil 3.72: Artan substrat konsantrasyonu ve artan 5-ASA varlığında CYP2D6 aktivitesinin değişimi.	108

Şekil 3.73: Artan substrat konsantrasyonunda 5-ASA yokluğunda CYP2D6 aktivitesinin değişimi Lineweaver burk grafiği.	108
Şekil 3.74: Artan substrat konsantrasyonu ve artan 5-ASA varlığında CYP2D6 aktivitesinin değişimi Lineweaver burk grafiği.	109
Şekil 3.75: 5-ASA ve kinidin varlığında CYP2D6 aktivitesinin değişimi.	109
Şekil 3.76: Tüp 1'in ölçüm sonuçları.....	111
Şekil 3.77: Tüp 2'nin ölçüm sonuçları.....	111
Şekil 3.78: Tüp 3'ün ölçüm sonuçları.....	112
Şekil 3.79: Tüp 4'ün ölçüm sonuçları.....	112
Şekil 3.80: Tüp 5'in ölçüm sonuçları.....	113
Şekil 3.81: Tüp 6'nın ölçüm sonuçları.....	113
Şekil 3.82: Tüp 7'nin ölçüm sonuçları.....	114
Şekil 3.83: Kalibrasyon eğrisi.....	115
Şekil 3.84: Elde edilen LC-HRMS kromatogramı.....	116
Şekil 3.85: Örneklerin kromatogramları.....	116



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Faz I reaksiyonları.....	3
Tablo 1.2: Faz II reaksiyonları.....	4
Tablo 1.3: Bazı P450 substratları.....	6
Tablo 1.4: CYP2D6 enzimleri tarafından metabolize edilen ilaçlar.....	11
Tablo 1.5: CYP2D6 inhibitörleri.....	13
Tablo 2.1: I. plaka bileşenleri ve prosedürü.....	24
Tablo 2.2: II. plaka bileşenleri ve prosedürü.....	25
Tablo 2.3: III. plaka bileşenleri ve prosedürü.....	26
Tablo 2.4: IV. plaka bileşenleri ve prosedürü.....	27
Tablo 2.5: V. plaka bileşenleri ve prosedürü.....	28
Tablo 2.6: VI. plaka bileşenleri ve prosedürü.....	29
Tablo 2.7: VII. plaka bileşenleri ve prosedürü.....	30
Tablo 2.8: VIII. plaka bileşenleri ve prosedürü.....	31
Tablo 2.9: IX. plaka bileşenleri ve prosedürü.....	32
Tablo 2.10: X. plaka bileşenleri ve prosedürü.....	33
Tablo 2.11: XI. plaka bileşenleri ve prosedürü.....	34
Tablo 2.12: Birinci prosedür için hazırlanan tüplere konulan reaktif miktarları.....	35
Tablo 2.13: İkinci prosedür için hazırlanan tüplere konulan reaktif miktarları.....	35
Tablo 2.14: Seçilen kütle / yük oranları.....	36
Tablo 3.1: Boş okuma değerleri.....	38
Tablo 3.2: AHMC floresan ölçüm değerleri 1.....	38
Tablo 3.3: AHMC floresan ölçüm değerleri 2.....	38
Tablo 3.4: AHMC floresan ölçüm değerleri 3.....	38
Tablo 3.5: I. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerler.....	41
Tablo 3.6: I. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler.....	43
Tablo 3.7: I. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler.....	44
Tablo 3.8: I. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler.....	45
Tablo 3.9: I. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler.....	46
Tablo 3.10: I. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerler.....	47
Tablo 3.11: I. plakanın 7 ve 7' tüplerinde okunan değerler.....	48
Tablo 3.12: I. plakanın 8 ve 8' tüplerinde okunan değerler.....	49
Tablo 3.13: I. plakanın 9 ve 9' tüplerinde okunan değerler.....	50
Tablo 3.14: II. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerler.....	51
Tablo 3.15: II. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler.....	52
Tablo 3.16: II. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler.....	53
Tablo 3.17: II. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler.....	54
Tablo 3.18: II. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler.....	55
Tablo 3.19: II. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerler.....	56
Tablo 3.20: III. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerler.....	57
Tablo 3.21: III. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler.....	58
Tablo 3.22: III. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler.....	59
Tablo 3.23: III. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler.....	60
Tablo 3.24: III. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler.....	61

Tablo 3.25: IV. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerler.....	61
Tablo 3.26: IV. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler	63
Tablo 3.27: IV. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler	64
Tablo 3.28: IV. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler	65
Tablo 3.29: IV. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler	66
Tablo 3.30: IV. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerler	67
Tablo 3.31: V. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerler	68
Tablo 3.32: V. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler	69
Tablo 3.33: V. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler	70
Tablo 3.34: V. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler	71
Tablo 3.35: V. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler	72
Tablo 3.36: VI. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerler	73
Tablo 3.37: VI. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler	74
Tablo 3.38: VI. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler	75
Tablo 3.39: VI. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler	76
Tablo 3.40: VI. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler	77
Tablo 3.41: VI. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerler	78
Tablo 3.42: VII. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerler	79
Tablo 3.43: VII. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler	80
Tablo 3.44: VII. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler	81
Tablo 3.45: VII. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler	82
Tablo 3.46: VII. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler	83
Tablo 3.47: VIII. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerler.....	84
Tablo 3.48: VIII. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler.....	85
Tablo 3.49: VIII. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler.....	86
Tablo 3.50: VIII. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler.....	87
Tablo 3.51: VIII. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler.....	88
Tablo 3.52: VIII. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerler.....	89
Tablo 3.53: IX. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerler	90
Tablo 3.54: IX. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler	91
Tablo 3.55: IX. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler.....	90
Tablo 3.56: IX. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler	93
Tablo 3.57: IX. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler	94
Tablo 3.58: IX. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerler	95
Tablo 3.59: X. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerler	96
Tablo 3.60: X. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler	97
Tablo 3.61: X. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler	98
Tablo 3.62: X. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler	99
Tablo 3.63: X. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler	100
Tablo 3.64: XI. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerler	101
Tablo 3.65: XI. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler	102
Tablo 3.66: XI. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler	103
Tablo 3.67: XI. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler	104
Tablo 3.68: XI. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler	105
Tablo 3.69: Birinci prosedürde hazırlanan tüplerdeki 5-ASA miktarları	111
Tablo 3.70: İkinci prosedürde hazırlanan tüplerdeki 5-ASA miktarları	116

SEMBOL LİSTESİ

5-ASA	:	5-aminosalisilik asit
AHMC	:	8-asetil-7-hidroksi-4-metilkumarin
AHR	:	Aril hidrokarbon reseptörü
AMMC	:	3-[2-(N,N-Dietil-N-metilamonyum)etil]-7-metoksi-4-metilkumarin
APC	:	Antijen sunan hücre
Asp-301	:	Aspartat 301
CYP1	:	Sitokrom P4501
CYP1B1	:	Sitokrom P4501B1
CYP2	:	Sitokrom P4502
CYP2A6	:	Sitokrom P4502A6
CYP2B6	:	Sitokrom P4502B6
CYP2C19	:	Sitokrom P450C19
CYP2C8	:	Sitokrom P4502C8
CYP2C9	:	Sitokrom P4502C9
CYP2D6	:	Sitokrom P4502D6
CYP3	:	Sitokrom P4503
CYP3A4	:	Sitokrom P4503A4
CYP3A5	:	Sitokrom P4503A5
CYP450	:	Sitokrom P450
EBH	:	Enflamatuvar bağırsak hastalıkları
FDA	:	Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
G6P	:	Glukoz-6-Fosfat
G6PDH	:	Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
Glu-216	:	Glutamat 216
HPLC	:	Yüksek performanslı sıvı kromatografi
IFN- γ	:	İnterferon gama
m-RNA	:	Mesajcı RNA
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
Phe-120	:	Fenilalanin 120
Phe-483	:	Fenilalanin 483
PZR	:	Polimer zincir reaksiyonu
RFU	:	Nispi floresan birimi
SP	:	Sülfapiridin
SSRI	:	Selektif serotonin geri alım inhibitörü
TCA	:	Trikloroasetik asit
TH1	:	Yardımcı T hücresi
THF	:	Tetrahidrofuran
TIC	:	Toplam iyon akım kromatogramları

ÖNSÖZ

Tezimin bütün aşamalarında, karşılaştığım tüm sorunları çözmemde bana destek olan yardımlarını asla esirgemeyen, bütün hassasiyetiyle elinden gelen her şeyi yapan, yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda desteklerini hep hissettiğim, bütün laboratuvar çalışma imkanlarını sunan, her geçen gün bana daha çok şey katan değerli danışman hocalarım Prof. Dr. Gürkan SEMİZ'e ve Prof. Dr. Alaattin ŞEN'e,

Çalışmalarında LC/MS-MS ölçümleri yapan başta sayın hocam Doç. Dr. Işıl GAZİOĞLU'na, Bezmialem Vakıf Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi (İLMER)'ne ve orada emeği geçen herkese,

Sadece tezimde değil, her alanda bana bilgi ve deneyimlerini aktaran, laboratuvar ve dışında birlikte çok şey paylaştığımız aile gibi olduğumuz çalışmamın her aşamasında emeği olan Öğr. Gör. Dr. Özden ÖZGÜN ACAR'a ve Şule IRMAK BEKÇİ'ye, laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Elif KALE'ye, Hajarat Abilo ALFA'ya,

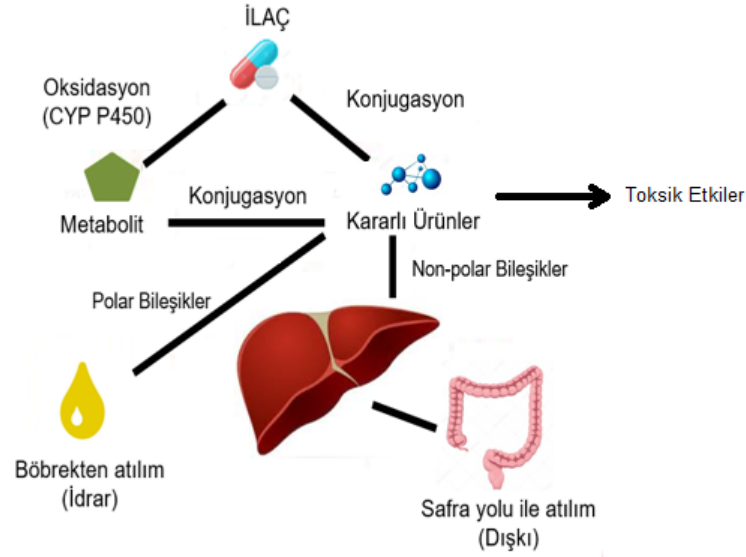
Maddi destekleri için Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Bu süreçte her zamana ihtiyacım olduğunda bana anlayış ve müsamama gösteren Buldan Göğüs Hastalıkları Hastanesi'ndeki çalışma arkadaşlarıma, ne zaman yorulsam hep yanımda olan Mehmet BARUT'a, en çok da beni bugün ben yapan, tüm eğitim hayatım boyunca asla elimi bırakmayan, sevgisini, ilgisini, tüm desteğini her zaman gördüğüm, hep arkamda olan canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

1. GİRİŞ

Son yıllarda teknoloji ve sağlık gibi alanlarda yaşanan gelişmeler yaşam tarzımızın, beslenme alışkanlıklarımızın, yaşadığımız ortamdaki çevresel faktörlerin değişmesini etkilemiştir. Hayatımızın nerdeyse her alanında olan kimyasal kullanımının ve yoğun stresli yaşantının artmasıyla hem hastalıkların hem de insanların fizyolojik anlamda rahatsızlıklarının çoğaldığını görülmektedir. Yeni hastalıkların keşfi, tıbbi tedavi yöntemlerindeki gelişmeler, daha önce tedavisi olmayan hastalıkların artık tedavi edilebilir olması ve bunlara bağlı olarak yeni ilaç üretiminin artması, toplumda kullanılan ilaç miktarının artmasına sebep olmuştur (Özata ve diğ. 2008).

Vücudumuza giren tüm ilaçlar ve yabancı maddeler farklı doku ve organlarda enzimlerin yardımıyla kimyasal değişiklikler geçirir. Alınan tüm yabancı maddeler ksenobiyotik olarak adlandırılır. Vücuttan uzaklaştırılmazlarsa toksik konsantrasyonlara ulaşarak ölümcül etki yapabilirler. Ksenobiyotikler, vücuda gastrointestinal, deri, solunum yolu gibi yollarla alınmakta olup metabolize edildikleri başlıca organ karaciğerdir (Rozman ve Klaasen 2001). Maddelerin daha az toksik hale getirilerek kısa sürede vücuttan atılmasıyla son bulan bu kimyasal değişikliklere biyotransformasyon denir. Biyotransformasyon, faz I ve faz II (konjugasyon) reaksiyonları olmak üzere iki basamakta meydana gelir. Faz I reaksiyonları P450 (CYP450) bağımlı monooksijenazlar (mikrozomal enzimler) aracılığı ile gerçekleştirilirken yapısına fonksiyonel ya da polar gruplar takılmasına bağlı olarak farmakolojik aktivite artabilir (aktivasyon), azalabilir (deaktivasyon), değişebilir veya toksisite gerçekleşebilir (Rollas 1992). Faz II reaksiyonlarında ilaçlara enzimatik tepkimelerle polar yapılar bağlanır, böylelikle ilaç metabolize olur. Bu reaksiyonların sonunda aktif olmayan polar metabolitler ortaya çıkar (Park ve diğ. 1995). Reaksiyonlar sonucunda oluşan faz II metaboliti, genellikle idrarla vücuttan uzaklaştırılır (Spatzenegger ve Jaeger 1995) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1: İlaç metabolizması (biyotransformasyonlar) (www.creative-labs.com'dan değiştirilerek düzenlenmiştir).

1.1 Ksenobiyotik Metabolizması

Biyotransformasyon, gastrointestinal sistemden ve diğer sistemlerden rahatça emilen lipofilik yani yağda çözünen kimyasalların, safra ya da idrar ile kolayca uzaklaştırılan hidrofilik yani suda çözünen kimyasallara dönüştürülmesi işlemidir.

Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda görev alan enzim sistemleri katalizledikleri reaksiyona göre; hidroliz, indirgeme, oksidasyon ve konjugasyon olmak üzere dörde ayrılırlar. Hidroliz, indirgeme ve oksidasyon reaksiyonları faz I, konjugasyon reaksiyonları faz II reaksiyonları olarak adlandırılır (Park ve diğ. 1995). Faz III taşıyıcıları ise karaciğer, bağırsak, böbrek ve beyin gibi dokularda eksprese edilir. İlacın absorpsiyonunda, dağılımında ve atılımında önemli rol oynarlar. Bir ilacın hedef organa ulaştırılması, diğer organlara dağıtılmasının engellenmesini yani böylelikle toksik etkilerin azaltılması sağlarlar. Eliminasyon sürecini kontrol ederler ve buna bağlı olarak oral biyoyararlanımı arttırırlar (Mizuno ve diğ. 2003).

Klinberg tarafından 1960 yılların başlangıcında keşfedildiği kabul edilen mikrozomal sitokrom P450 (CYP450) enzim sistemi (monooksijenazlar), faz I reaksiyonlarının büyük kısmında rol alır. P450 enzimleri, çoğu ilacın ve diğer ekzojen maddelerin (ksenobiyotiklerin) biyotransformasyonunu katalize eden temel enzim

ailesini oluşturur (Guengerich 2008). Bu enzimler; steroidler ve yağ asitleri gibi endojen bileşiklerin ve ilaçların yanısıra metabolizmasında, karsinojen ekzojen bileşiklerin metabolizmasında rol oynarlar. Ayrıca ilaç metabolizasyonu sırasında meydana gelen reaksiyonların yaklaşık %94'üne katılırlar (Yamazaki ve Shimada 1999; Rendic ve Guengerich 2015). P450 enzimleri, başta karaciğer olmak üzere; böbrekler, bağırsaklar, beyin ve akciğer organlarında bulunur. Hepatosit hücrelerinde yüksek konsantrasyonda bulunan P450'ler, memeli hücrelerinin iskelet kası ve eritrosit hücreleri haricinde diğer bütün hücrelerinin enzim çeşidine göre endoplazmik retikulumunda ya da mitokondrisinde görülür (Nelson ve diğ. 1996).

Moleküle; -SH, -NH₂, -COOH, -OH gibi polar fonksiyonel gruplar eklenir, bu şekilde molekülün polarlığı arttığı için ve faz II'de eklenecek bileşiklere domain olduğu için vücuttan atılımı daha kolay hale gelir. Faz II reaksiyonlarının substratları, genel olarak faz I reaksiyonlarının sonucunda meydana gelen metabolitlerdir (Rollas 1992; Özdemir ve Karakurt 2016) (Tablo 1.1).

Tablo 1.1: Faz I reaksiyonları.

Faz I Reaksiyonları	
Oksidatif reaksiyonlar	Aromatik oksidasyon (Aromatik hidroksilasyon)
	Alken epoksidasyonu
	Alifatik ve alisiklik karbon atomlarının oksidasyonu
	Bir <i>sp</i> ² merkeze komşu karbonların oksidasyonu
	Karbon-azot sistemlerinin oksidasyonu
	Karbon-oksijen sistemlerinin oksidasyonu (Oksidatif O-dealkilasyon)
	Karbon-kükürt sistemlerinin oksidasyonu (Oksidatif S-dealkilasyon, S-oksidasyon, desülfürasyon)
	Alkol ve aldehit oksidasyonu
	Diğer oksidatif reaksiyonlar (Oksidatif dehalojenasyon, oksidatif aromatisasyon, arenollerin kinona oksidasyonu)
Redüktif reaksiyonlar	Karbonil (aldehit, keton) redüksiyonu
	Nitro redüksiyonu
	Azo redüksiyonu
	Diğer redüksiyonlar (Tersiyer amin N-oksit redüksiyonu, redüktif dehalojenasyon, disülfid ve sülfoksit redüksiyonu)
Hidrolitik reaksiyonlar	Esterlerin ve amitlerin hidrolizi

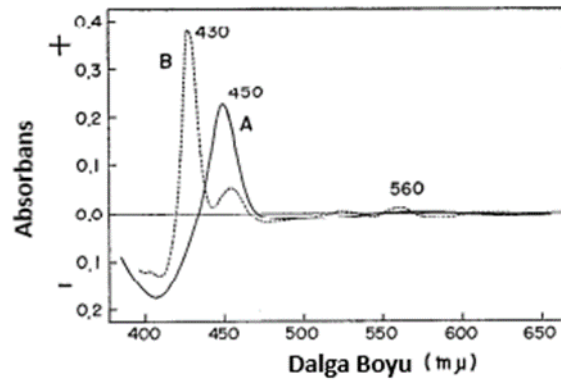
Faz II reaksiyonları ise molekülün yapısına sülfat, glutatyon gibi küçük, polar, iyonize olabilen grupların enzimatik olarak eklendiği konjugasyon (kenetlenme) reaksiyonlarıdır. Faz I reaksiyonları sonucunda oluşan reaktif gruplar, faz II reaksiyonları sırasında glukuronik asit, sülfat, glutatyon ya da aminoasitler ile kenetlenir. Kenetleme sonucunda hidrofobik ksenobiyotikler, polar (suda çözünebilen) formlara dönüştürülmüş olur (Tablo 1.2). Böylelikle kolaylıkla idrar ve safra ile vücuttan atılabilirler (Niesink ve diğ. 1996).

Tablo 1.2: Faz II reaksiyonları.

FazII Reaksiyonları
Glükuronik asit konjugasyonu (glükuronidasyon)
Sülfat konjugasyonu (sülfatasyon)
Aminoasit (glisin, glutamin ve diğer) konjugasyonu
Glutatyon konjugasyonu
Asetilasyon
Metilasyon

1.1.1 Sitokrom P450 Enzimleri

Sitokrom P450 (CYP450) enzim ailesi, ilaçların vücuttaki metabolizma yollarında görev alır. Sadece endojen ve ksenobiyotiklerin metabolizmasında değil, bazı ksenobiyotiklerin de reaktif metabolitlere dönüştürülmesinde önemli rolleri vardır (Buhler ve Williams 1988). P450'ler "hem" içeren proteinlerdir. "450" rakamının nedeni ise; "hem" içeren karaciğer pigmentlerinin, karbonmonoksit bağlandıktan sonra absorbe ettiği ışığın dalga boyunun 450 nm'de pik göstermesi olarak tanımlanmıştır (Omura ve Sato 1962) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2: P450 enzimlerinin absorbansı (Omura ve Sato 1962).

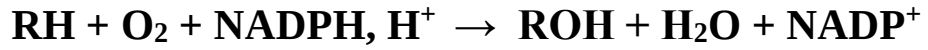
- CYP 1
- CYP 2
- CYP 3'tür.

CYP 1, aril hidrokarbon reseptörünün (AHR) yolağında etkilidir. AHR, sigara dumanı ve mangalda pişirilmiş yiyeceklerde bulunan aromatik hidrokarbonların bağlanmasıyla aktive olan çevreye duyarlı transkripsiyon faktörüdür. Ayrıca yapılan çalışmada elde edilen antikorların deniz kirliliğinin yanında çevre kirliliği ile ilgili soruların yanıtlanmasında ve kirliliğin biyokimyasal izlenmesinde yardımcı olmaktadır (Arınç ve Şen 1999). CYP 2, memelilerde bulunan en büyük P450 ailesini oluşturur. Bazı steroidlerin ve reçete edilen ilaçların çoğunun metabolizmasında rol alır. CYP 3 ailesi ise, dört üyeden oluşur. İnsan gastrointestinal sisteminde ve karaciğerinde en fazla eksprese edilen P450 enzimleri CYP3A5 ve CYP3A4'tür. Sıklıkla reçete edilen ilaçların, steroidlerin ve safra asitleri gibi endojen substratların metabolizmasında görevli olduğu bilinmektedir (Nebert ve Russell 2002; Zanger ve diğ. 2008).

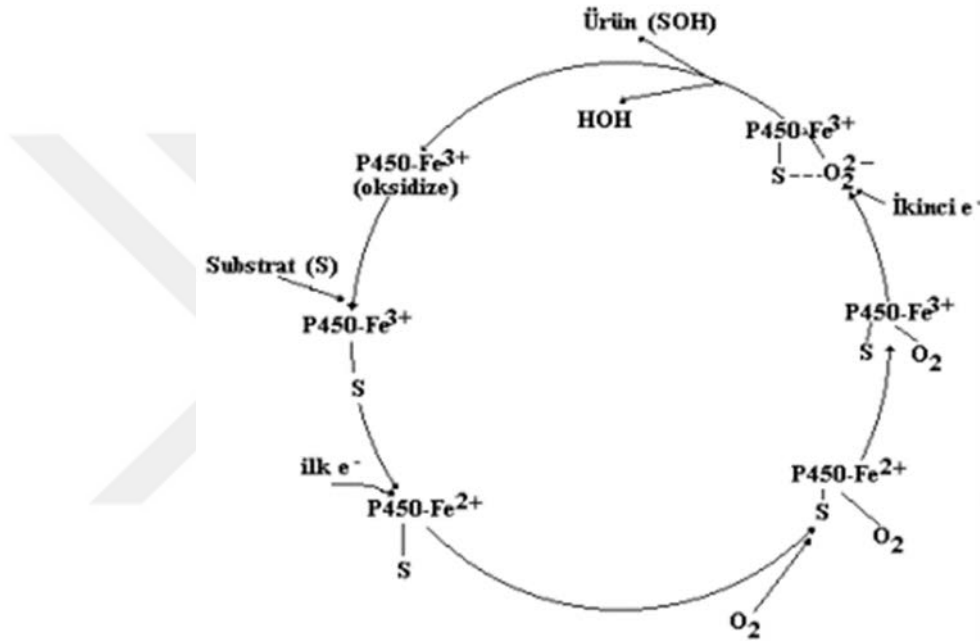
P450'lerin birçoğu; karsinogenler, ilaçlar, çevresel kirleticiler, kimyasallar ve petrol ürünleri gibi çeşitli ekzojen bileşikler metabolize edebilmektedir. Tanımlanan substratlardan bazıları da vitamin D3 türevleri, doymuş-doymamış yağ asitleri ve safra asitleridir (Tablo 1.3) (Nebert ve Russell 2002).

Tablo 1.3: Bazı P450 substratları (Porter ve Coon 1991).

Ksenobiyotikler (Ekzojen)	Endojen Bileşikler
İlaçlar	Steroidler
Karsinogenler	Eikosanoidler
Antioksidanlar	Yağ asitleri
Çözücüler	Yağ hiperoksitleri
Anestetikler	Retinoidler
Boyalar	Aseton
Pestisitler	
Petrol ürünleri	
Koku vericiler	



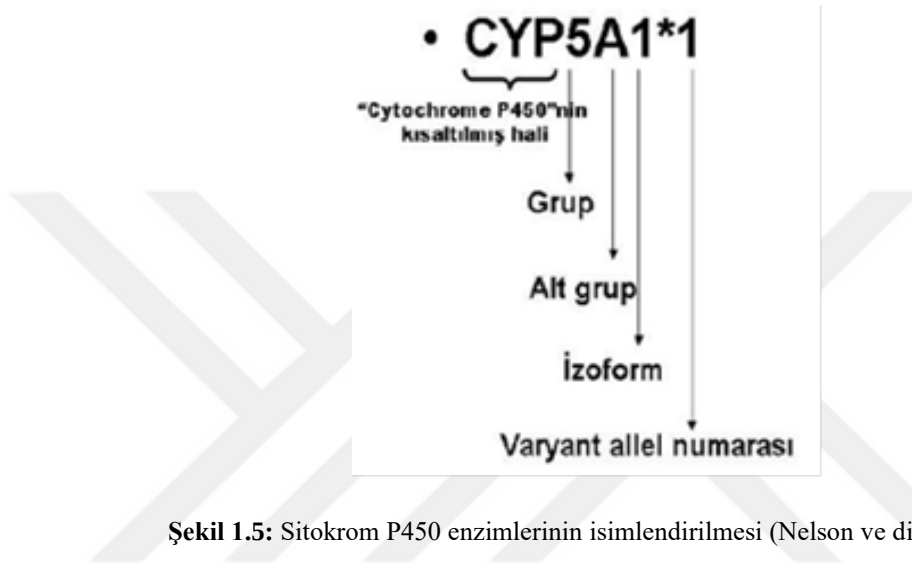
Sitokrom P450 tarafından katalizlenen genel reaksiyon yukarıda verilmiştir (Hasler ve diğ. 1999). Buradaki substrat (S), yağ asiti, steroid, oksijen ya da ilaç bağlanma yeri olarak görev alan alkan, alken, aromatik halka veya heterosiklik halka ekleri olan başka bir kimyasal madde olabilir (Guengerich 1993).



Şekil 1.4: Sitokrom P450'deki reaksiyon basamakları (Substratın bağlanması, ilk ve ikinci elektronların transfer edilmesi ve moleküler oksijenin bağlanması) (Özerol 1996).

Sitokrom P450 Redüktaz enzimi monooksigenaz enzim sisteminin bileşenlerindendir. Başta karaciğer olmak üzere birçok dokuda bulunur. Enzimler hücrelerin endoplazmik retikulum zarlarında lokalizedir. Yağ asitlerinin, kanserojenlerin, steroidlerin, ilaçların ve diğer ksenobiyotiklerin metabolizmasında rol oynar. Bu enzimin görevi mikrozomal sistem elektron transferini katalizlemektir. NADPH'tan başlar, sitokrom P450'ye ya da bir başka alıcıya elektron akışı gerçekleşir. $\text{NADPH} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow \text{FMN} \rightarrow \text{CYP 450}$ veya alıcı protein şeklinde özetlenebilir (Bakin ve Yang 1980; Roman ve Masters, 1992; Arınç ve diğ. 1995).

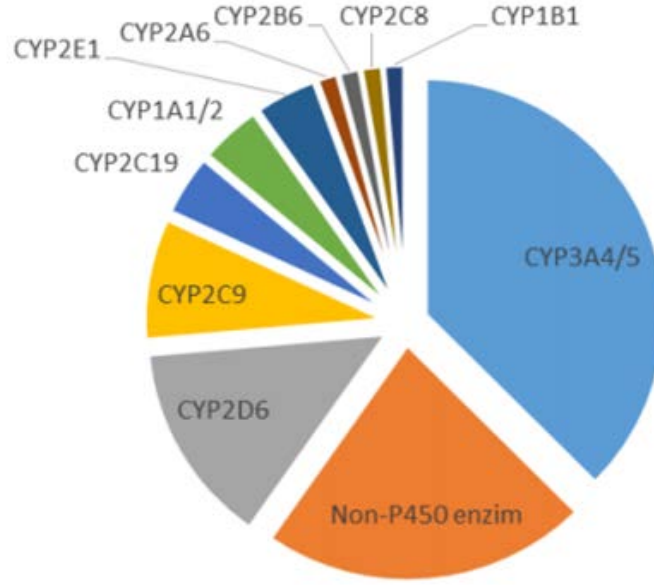
Sitokrom P450 enzimleri, amino asit sıralarındaki benzerlik ve farklılıklara bağlı olarak sınıflandırılırlar. Örneğin; CYP2 grubu içinde aminoasit sırasındaki benzerlik en az %40'tır. CYP 2D grubunda ise bu oran %55'tir (Yüksel 2001). P450 enzimleri adlandırılırken öncelikle sitokrom P450'nin kısaltması olan CYP yazılıp sonrasında sırayla grubu, alt grubu, izoformu ve son olarak varyant alel numarası yazılır. Alt gruplar büyük harflerle gösterilir (Örn: CYP2D). Bu gruplarda her bir enzim farklı farklı sayılarla ifade edilir (Örn: CYP2D6) (Nelson 2004) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5: Sitokrom P450 enzimlerinin isimlendirilmesi (Nelson ve diğ. 1996).

Bir ilacın birden fazla enzimle metabolize edilmesi mümkünken aynı zamanda bir enzim de birden fazla ilacı metabolize edebilir (Ioannides ve Parke 1990). Genetik polimorfizm, hastalıklar, etkileşimler ve yaş ilaç biyotransformasyonunu etkileyen faktörlerdendir. Bu faktörler; klinik etkinliği, farmakolojik etkileri ve toksisiteyi de değiştirebilir. Örneğin; karaciğerde işlev bozukluğu, influenza, adenovirüs gibi enfeksiyonlar ya da diyetel bileşenler, örneğin; kırmızı şarap, ilaç biyotransformasyonunu değiştirebilir (Jefferson 1998; Gopisankar 2017).

P450 enzimleri ilaç metabolizmasında oldukça önemli rol oynamaktadır. İlaçların metabolizmasında en çok rol alan CYP enzimleri arasında CYP3A, CYP2D ve CYP2C alt aileleri bulunur. Klinikte kullanılan ilaçların %50'si CYP3A4 enzimi ile metabolize edilirken, ikinci sıradaki CYP2D6 enzimi en yüksek oranda ilaç metabolizmasında etkili olmaktadır (Parkinson 2001; Brunton ve diğ. 2009) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6: CYP başına metabolize edilen ilaç grafiği (Özdemir ve Karakurt 2016).

1.1.1.1 Sitokrom P450 2 Ailesi

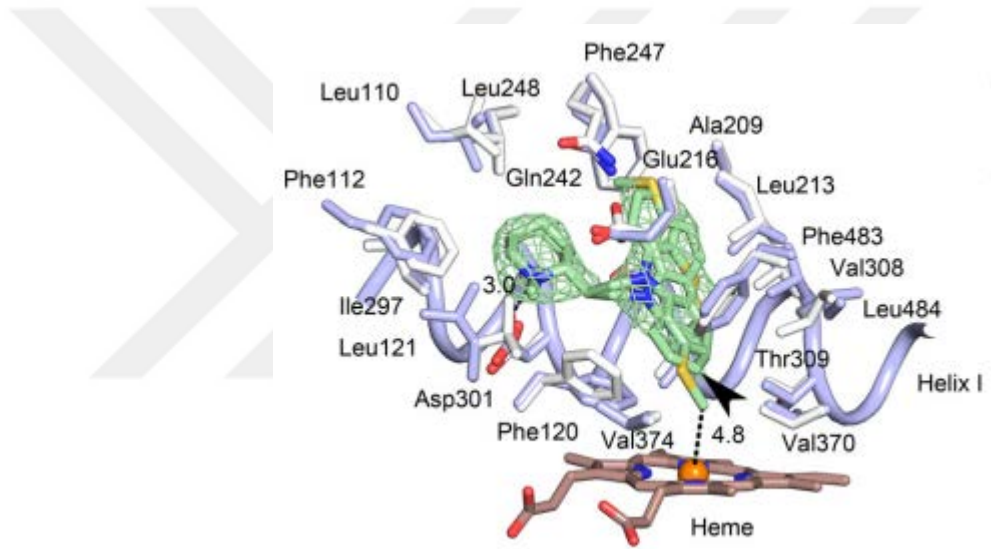
Sitokrom 2 ailesi heterojen enzimlerden oluşur. 10q23.3 kromozomal bölgede bulunur ve yaklaşık ~390 kb gen kümelerinden oluşur. Steroid ve ilaç metabolizmasında görev alırlar (Rettie ve Jones 2005).

1.1.1.1.1 CYP2D6 Alt Ailesi

Antipsikotiklerin çoğu, bir ya da birden fazla sitokrom P450 enzimi tarafından metabolize edilir. İnsan sitokrom P450 2D6 geni, CYP2D gen alt ailesindendir. CYP2D6, hem gerçek zamanlı RT-PCR ile hem de Western Blot gibi yöntemlerle kanıtlanmış insan beyninde yer alan önemli P450 izoformlarından (Dutheil ve diğ. 2009). CYP2D6, birçok antipsikotiğin birincil metabolizmasına dahil olması ve katkıda bulunması nedeniyle özellikle önem arz eder (Ravyn ve diğ. 2013). Çoğunlukla dar terapötik etkiye sahip olan antidepresanlar, antipsikotikler, opioidler ve antiaritmikler gibi yaygın olarak klinikte reçete edilen ilaçların neredeyse %25 kadarının oksidatif metabolizmasından sorumlu olması nedeniyle özellikle önem arz eder. CYP2D6'nın; beyin dokusunda, lenfositlerde ve beyin omurilik sıvısında birçok

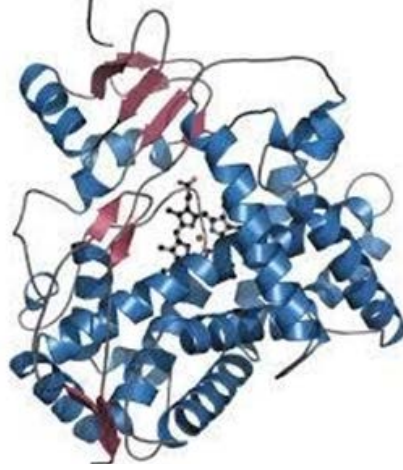
substratı bulunur. Aynı zamanda endojen substratları arasında; nörotransmitterler ve nörosteroidler, progesteron, lipidler bulunur (Wang ve diğ. 2014).

İlaçların ve alınan kimyasalların metabolizmasında klinik açıdan önemli rol oynayan CYP2D gen kümesini, 22. insan kromozomu üzerinde 497 amino asit uzunluğunda 1491 baz çifti oluşturur. Dokuz ekzon tarafından kodlanan CYP2D6 insan geni, 22. kromozomda (22q13.2) uzun kolda yaklaşık 4,3 kbps yer alır (Heim ve Meyer 1992; Dutheil ve diğ. 2009; Gopisankar 2017; Taylor ve diğ. 2020). Başta karaciğer olmak üzere, lenfoit hücrelerde, beyinde ve bağırsak dokusunda ifade edilir. Aynı zamanda CYP2D6 insan beyindeki yağ asidi ve kolesterol metabolizmasında görev alan kilit enzimlerdendir (Dutheil ve diğ. 2009).



Şekil 1.7: Aktif bölgede bağlı bir Tioridazin molekülüne sahip P450D6'nın kapalı yapısı (Oksijen, azot, kükürt, demir ve nikel atomları sırasıyla kırmızı, mavi, sarı, turuncu ve yeşil renk ile gösterilmiştir. Hem, kahverengi renkli karbonlu bir çubuk şekli olarak tasvir edilmiştir) (Wang ve diğ. 2014).

İnsan CYP2D6'nın kristal yapısı hakkında bilgiler vardır. Yapısında ailenin diğer üyelerinde de var olan karakteristik P450 kıvrımı görülür. Hem grubunun üzerinde substratın tanınmasında ve bağlanmasında rol alan Asp-301, Glu-216, Phe-483 ve Phe-120'nin bulunduğu bir aktif bölge boşluğu vardır (Şekil 1.7) (Wang ve diğ. 2014). Phe-120 çoğu substratta bulunan aromatik halkanın uygunluğunu kontrol eder. 2D6'nın neredeyse tüm substratlarında aromatik bir halka bulunur. Bu halkanın Phe-120 ve/veya Phe-483 ile etkileşime girmesi olasıdır (Rowland ve diğ. 2006). Enzimin yapısı işlevini tanımlar (Şekil 1.8).



Şekil 1.8: CYP2D6 3 boyutlu yapısı (Hassan ve diğ. 2018).

İnsan CYP'lerinin stabilizasyonunu etkileyecek ve bozulmasına sebep olacak bir faktör, yarı ömürlerini değiştirir. Buna bağlı olarak da ilaç metabolizasyonu değişmiş olacaktır. CYP2D6 klinikte kullanılan substratları; antipsikotikler, β -bloker ajanlar, antidepresanlar, analjezikler antiemetikler ve antiaritmikler gibi çeşitli olduğundan dolayı farklı ilaç metabolizmasının klinik sonucunu etkilemesi olasıdır (Preissner ve diğ. 2013) (Tablo 1.4). Bunlara ek olarak hipnotik, antiparkinsonizm, antimigren, seçici serotonin gerilim inhibitörü ilaçlar da CYP2D6'nın substratlarına dahildir (Gopisankar 2017). Bugüne kadar FDA onaylı 72 adet ilacın ürün etiketinde CYP2D6'dan söz edilmektedir (Taylor ve diğ. 2020). İnsanda bulunan CYP2D6'nın hesaplanan yarı ömrünün 46,6 ila 51 saat olduğu tahmin edilmektedir (O'Mathuna ve diğ. 2008).

Tablo 1.4: CYP2D6 enzimleri tarafından metabolize edilen ilaçlar (Preissner ve diğ. 2013).

Antidepresanlar	Beta Blokerler	Anti-Kanser	Antipsikotikler		
Amipriptilin	Alprenolol	Tamoksifen	Haloperidol	Meksiletin	Metamfetamin
Klomipramin	Karvedilol		Perfenazin	Minaprin	Bufuralol
Desipramin	Propafenon		Risperidon	Nebivolol	Klorfenamin
İmipramin	Bupranolol		Tiyoridazin	Nortriptilin	Klorpromazin
Fluoksetin	Kloridin		Zuklopertiksol	Ondansetron	Klonidin
Paroksetin	Debrizokin		Atomoksetin	Oksikodon	Kodein
Trimipramin	Metoprolol		Alprenolol	Perheksilin	Deksfenfluramin
Venlafaksin	Propranolol		Amfetamin	Fenasetin	Dekstrometorfan
	Timolol		Aripiprazol	Formin	

Bireylerin ilaçlara verdiği değişiklik gösteren yanıtlar, çoklu genetik ve endojen faktörlerin CYP'lerin katalitik aktivitelerini değiştirmeleriyle ilgilidir (Santos ve diğ. 2018). Bu endojen etkenlere örnek olarak gelişimsel faktörler, hormonal faktörler, fizyopatolojik faktörler ve cinsiyet faktörü verilebilir. Aynı zamanda steroid hormonları da endokrin sinyal yollarıyla bu enzimlerin düzenlenmesini etkiler (Monostory ve Dvorak 2011). Mann ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan araştırmada, insan beyinde CYP2D6'nın ekspresyonu ölçülmüş frontal kortekste CYP2D6 ekspresyonunun doğumla 1 yaş arasında başladığı, 20 ila 80 yaş arasında arttığı görülmüştür. Bahsedilen faktörlerde herhangi bir değişiklik olması durumunda CYP450 aktivitesi de etkilenmektedir. Bu durum ilaçların metabolizasyonunu etkilemektedir. Erkek ve kadınlar arasında da farmakokinetik açısından farklılıklar görülebildiği, CYP3A4 aktivitesinin kadınlarda daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Fakat 2D6 aktivitesiyle ilgili yapılan diğer bir araştırmalarda elde edilen sonuçlar bu durumu desteklememektedir (Soldin ve Mattison 2009).

CYP2D6 enziminin bir inhibitörü vücuda alındığında, bu enzimin sentezinde azalma görülmektedir. CYP2D6 enzimi ile metabolize olan ilacın biyotransformasyonu da bu bağlamda azalmakta ve istenilen ilaç etkisi görülememektedir. Tablo 1.5'te CYP2D6 inhibitörleri verilmiştir. Yapılan *in vivo* araştırmada; altı farklı bitkinin ekstresi, CYP2D6 substratı, debrisoquin (5 mg) verilerek sağlıklı 18 kişinin sonuçları değerlendirilmiştir. Deneklere bitki ekstraktı olarak, deve diken (Silybum marianum (L.) Gaertn.), karayılan otu (Cimicifuga racemosa L.=syn: Actaea racemosa L.), kava kava (Piper methysticum G. Forst.), altın mühür (Hydrastis canadensis L.), sarı kantaron (Hypericum perforatum L.) ve Ekinezya (Echinacea purpurea (L.) Moench) özleri uygulanmıştır. Araştırmada sadece altın mühür ekstraktının CYP2D6 aktivitesinde neredeyse %50'lik azalma sağlayan etkili bir inhibitör olduğu görülmüştür (Gurley ve diğ. 2008). Daha sonra yapılan araştırmalar da ise altın mühür bitkisine ek olarak; çörek otu (Nigella sp.), zerdeçal (Curcuma longa L.), ginseng bitkisi (Panax ginseng C.A.Mey.) ve pek çok bitkide varolan resveratrolun 2D6 enzimini inhibe ettiği ortaya çıkmıştır (Al-Jenoobi ve diğ. 2010; Kim ve diğ. 2016; Ariane ve diğ. 2017; Sasaki ve diğ. 2017; Hansten 2018). Sonuç olarak eğer hastanın düzenli olarak kullandığı bir ilaç var ise alınan diğer ilaçlara, bitkilere, besinlere dikkat edilmelidir. İnsan CYP'lerinin stabilitesini değiştiren

herhangi bir sebep, yarı ömürlerini değiştirir ve böylelikle ilaç metabolizması değişmiş olur.

Tablo 1.5: CYP2D6 inhibitörleri (Fejzullahu 2018).

Amiodaron	Klomipramin	Halofantrin	Pimozid
Amitriptilin	Kokain	Haloperidol	Propafenon
Bupropion*	Desipramin	Hidroksizin	Kinidin*
Selekoksib	Difenhidramin	İmipramin	Ritonavir
Klorfeniramin	Doksepin	Levomepromazin	Sensipar
Klorpromazin	Duloksetin	Metadon	Sertralin
Simetidin	Essitalopram	Metoklopramid	Terbinafin
Fluoksetin*	Moklobemid	Tiyoridazin	Sinakalset*
Fluvoksamin	Paroksetin*	Tiklopidin	Sitalopram
<i>H. canadensis</i> *	Perfenazin		

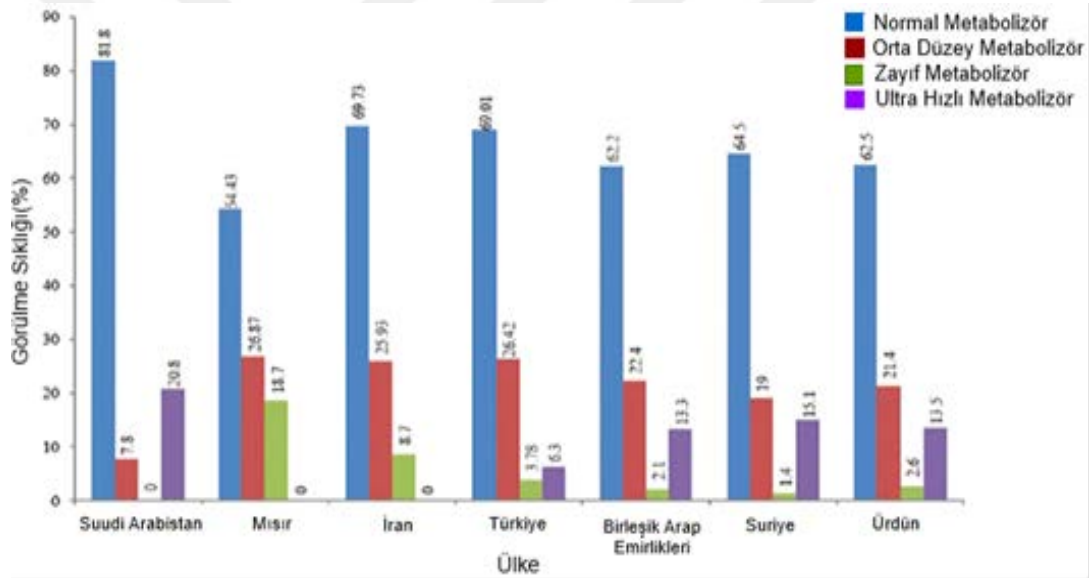
* ile gösterilenler güçlü etkiye sahip inhibitörlerdir.

İlk olarak 1848'de Van Heymingen tarafından keşfedilen kinidin, yirminci yüzyılın başlarından beri tüm kardiyak aritmilerin tedavisinde kullanılan ilk ilaçtır (Yang ve diğ. 2009). Antiaritmik etkisinden dolayı özellikle atriyal fibrilasyon tedavisinde kullanılır (Beg 2020). Sodyum kanalını bloke ederek etkisini gösterir. İnsan karaciğer mikrozomlarında ve maya mikrozomlarında yapılan araştırmalarda; kinidinin, CYP2D6 metabolik aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür. Buna bağlı olarak CYP2D6 tarafından metabolize edilen ilaçların etkisinde azalma görülmüştür (Ching ve diğ. 1995; Serdoz ve diğ. 2019). Fakat kinidinin neden bir substrat olmadığı tam olarak bilinmemektedir, çünkü bazik bir nitrojen atomu ve düz bir hidrofobik bölge olmak üzere CYP2D6 substratlarının özelliği olarak kabul görülen birçok özelliğe sahiptir (Strobl ve diğ. 1993).

Polimorfizm, bir türe ait iki veya daha fazla farklı formun aynı habitatta birlikte görülme durumu olarak açıklanmaktadır (Ford 1945). CYP2D6, 70'ten fazla allel ve tarif edilen 130 genetik varyasyon ile fazlasıyla polimorfiktir ve genetik varyantları, bir bireyin CYP2D6 enzim fenotipini belirlemek için kullanılabilir (Samer ve diğ. 2013). En yaygın olarak kullanılan CYP2D6 fenotip sınıflandırmasında; ultra hızlı metabolizörler, hızlı metabolizatörler, normal metabolizatörler ve yavaş metabolizatörler bulunur (Caudle ve diğ. 2020). CYP2D6 polimorfizmi, metabolize edici durumu nedeniyle klinik sonucu etkiler. Büyük bir örneklem kullanılarak yapılan bir çalışmada; CYP2D6'yı zayıf metabolize edici fenotipteki hastalarda ağrı kontrolü

başarısız olurken, CYP2D6'nın ultra hızlı metabolize edici fenotipteki hastalar da ise istenmeyen yan etkilere daha sıklıkla maruz kaldığı görülmüştür (Lopes ve diğ. 2020). Farmakogenetik alanının kullanımı, hasta sonuçlarına bakıldığında birçok tedavi alanında iyileştirme yeteneği gösterdiği ve alternatiflerine göre de maliyet açısından daha uygun görülmektedir (Crews ve diğ. 2012).

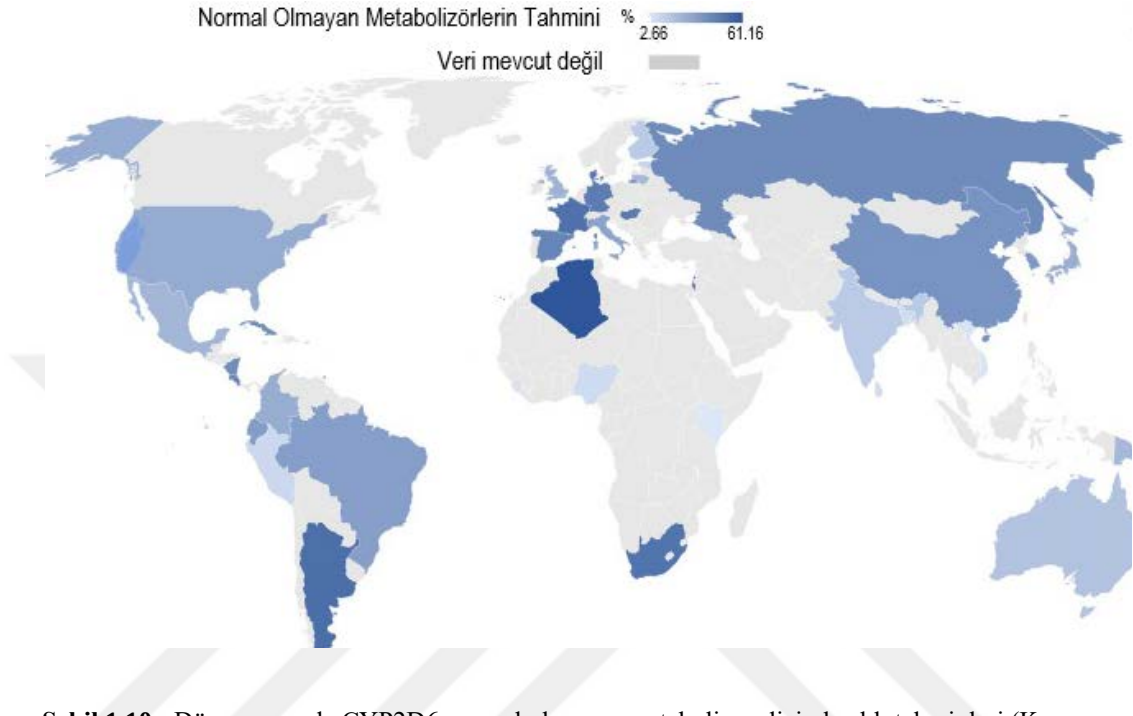
Ülkemizin de aralarında bulunduğu Orta Doğu ülkelerinde 2019 yılında yapılmış bir araştırmada, toplumda CYP2D6 genotip frekansı araştırılmış, Türkiye'de %3,7 oranında zayıf metabolizör, %6,3 oranında ultra hızlı metabolizör varlığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuçlar, toplumumuzun yaklaşık %10'luk bir kesiminin ilaç yan etkileri veya yetersiz ilaç tedavisi bakımından risk altında olduğunu göstermektedir (Khalaj ve diğ. 2019) (Şekil 1.9).



Şekil 1.9: Farklı Orta Doğu ülkelerinde CYP2D6'nın genotip frekansı (Khalaj ve diğ. 2019).

Yayınlanmış bir olgu raporunda 2006 yılında; epizyotomi sonrasında terapötik dozda morfin (kodeinin aktif metaboliti) reçete edilen annenin emzirdiği 13 günlük bebeğinin toksikasyona bağlı ölümü bildirilmiştir. Yapılan detaylı araştırmada, annenin CYP2D6 ultra hızlı metabolizmaya sahip olduğu, sütüne geçen kodein miktarının artarak bebeğin ölümüne sebebiyet verdiği ortaya çıkmıştır (Koren ve diğ. 2006).

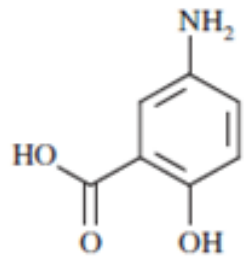
Yapılan diğ er bir meta analiz çalışmasında, 318 farklı çalışmanın verileri incelenerek; CYP2D6'nın normal olmayan metaboliz rleri araştırılmış, tahminleri bir dünya haritası üzerinde çizilmiştir (şekil 1.10). Dünya çapında bu oranın CYP2D6 için %36,4 olduğu g r lm ştir (Koopmans ve diğ. 2021).



şekil 1.10: Dünya  apında CYP2D6 normal olmayan metabolize edici olasılık tahminleri (Koopmans ve diğ. 2021).

1.2 5-Aminosalisilik Asit ve Metabolizması

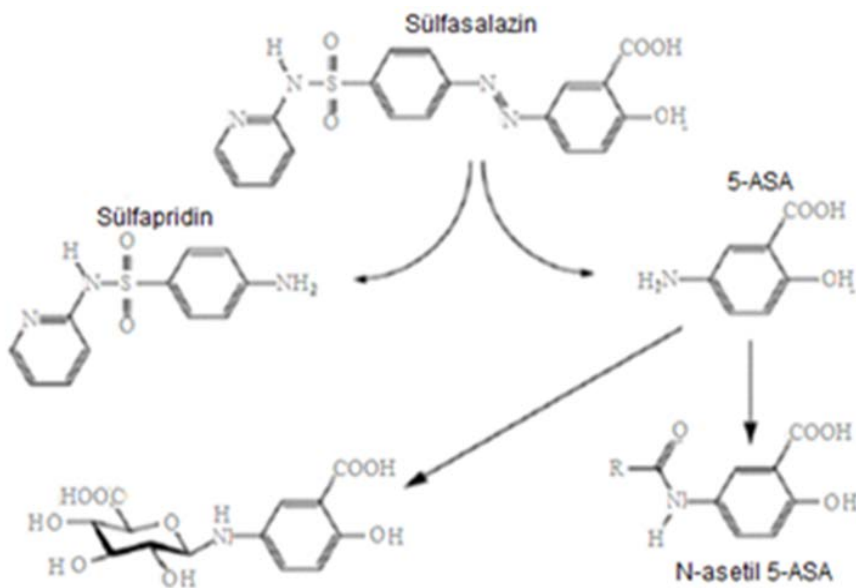
5-aminosalisilik asit (5-ASA, mesalazin, CAS 89-57-6), sülfasalazin molekülünün terapötik kısmı olarak görülüp, özellikle Crohn hastalığı ve ülseratif kolit başta olmak üzere, hem remüsyon kontrolü hem de tedavi anlamında inflamatuvar bağırsak hastalıklarını tedavi edici özelliği sebebiyle uzun yıllardır kullanılmaktadır (Svartz 1948). Svartz tarafından 1941 yılında ilk kez keşfedilen Sülfasalazin günümüzde hala terapötik anlamda kullanılmakta ve bu molekülün kapalı formülü $C_7H_7NO_3$, moleküler ağırlığı 153,135 g/mol'd r (Svartz 1942) (şekil 1.11).



Şekil 1.11: Mesalazin kimyasal yapısı (Acharjya ve diğ. 2010).

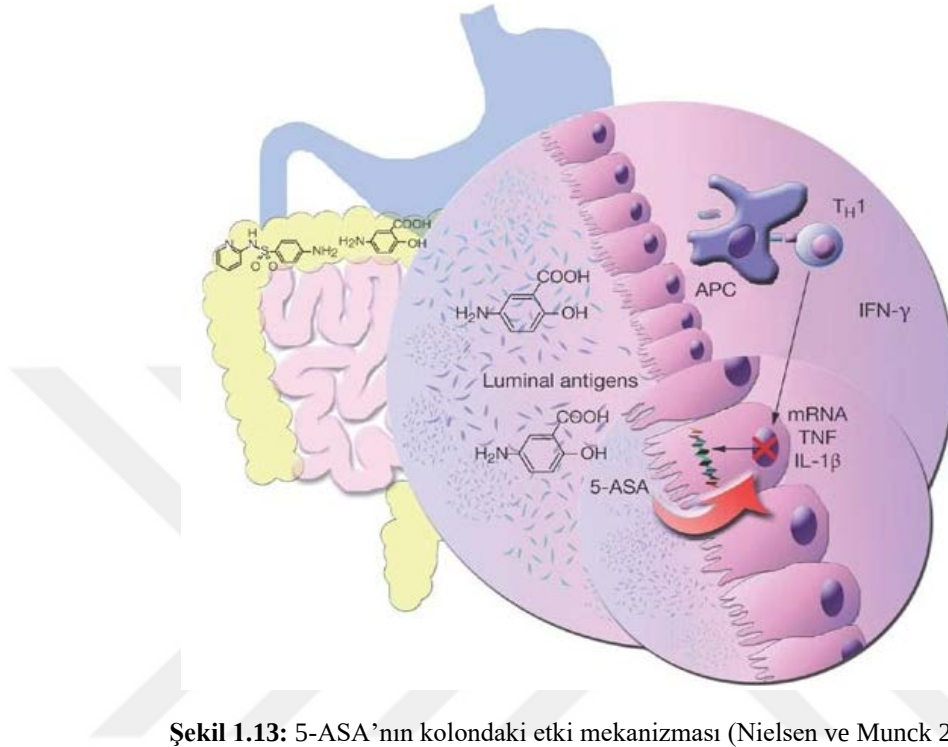
Hastalıklı olan mukozanın üzerinde lokal olarak etki gösteren anti-inflamatuar bir bileşendir ve enflamasyonu baskılar (Azad Khan ve diğ. 1977). Bu bileşik, bir ana ilaç (5-ASA) olarak ya da onun ön ilacı olan sülfasalazin (salisilazosülfapiridin, CAS 599-79-1) olarak kullanılır (Kruis ve diğ. 2001). 5-ASA'nın gösterdiği özellikler amfoteriktir ve 5-ASA polar bir bileşiktir (Nobilis ve diğ. 2006).

Sülfasalazin, azo bağı kolonik bakteriyel azoredüktazlar tarafından bölünerek sülfapiridin (SP) ve 5-aminosalisilik asit (5-ASA)'e ayrılır (Peppercorn ve Goldman 1972). Sonrasında 5-ASA, karaciğerde N-asetil-5-ASA'ya yani başlıca biyotransformasyon ürününe metabolize edilir (Allgayer ve diğ. 1989) (Şekil 1.12). Serbest kalan 5-ASA kolonda ve sonrasında karaciğerde asetillenir. Diğer bazı faz II metabolitleri de N-formil-5-ASA, N-butil-5-ASA, N-β-d-glukopiranozil-5-ASA'dır. N-Asetil-5-ASA'nın yarılanma ömrü 10 saate kadarken mesalazinin yarı ömrü yaklaşık bir saattir (Klotz 1985).



Şekil 1.12: Sülfasalazinin metabolik yıkımı ve 5-ASA'nın faz II reaksiyonları ile biyotransformasyonu (Das ve Dubin 1976).

Asetillenmiş metabolitler, bir miktar 5-ASA'yla birlikte tübüler sekresyonla ilk olarak idrarla atılır (Nielsen ve Munck 2007). Yaklaşık %50'si dışkıyla atılır ve emilen 5-ASA ve Ac-5-ASA böbrekler tarafından hızla atılır (van Hees 1979). 5-ASA, jejunumda kolaylıkla emilir ve kana geçer (Shafii ve diğ. 1982).

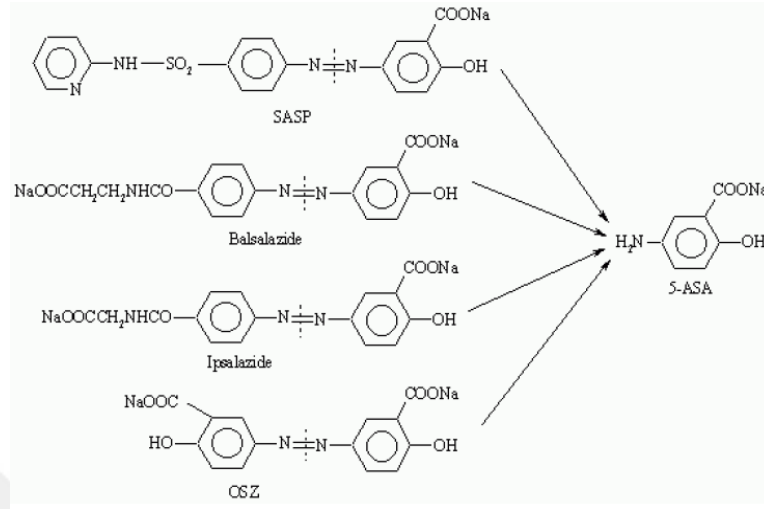


Şekil 1.13: 5-ASA'nın kolondaki etki mekanizması (Nielsen ve Munck 2007).

5-ASA, enflamatuvar bağırsak hastalığına sahip hastaların bağırsak duvarındaki inflamatuvar akışta patofizyolojik rol oynar. İlacın etki bölgesi olan alt bağırsağın bağırsak florasında azoredüktaz ile metabolize olur. APC (antijen sunan hücre)'ler, kolon duvarına nüfuz eden lümen antijenlerini tanır. TH1 (yardımcı T lenfosit) hücreleriyle IFN-γ üretimini indüklenir. IFN-γ üretimi epitel hücrelerini aktive eder. Böylelikle 5-ASA, kolonik epitel hücrelerinde inflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonunu engelleyebilir (Şekil 1.13). Ayrıca salisilik asit türevi 5-ASA'nın topikal uygulamasının kolorektal kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği ama normal mukoza üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı bilinmektedir (Mahida ve diğ. 1991; Stenson ve Lobos 1982; Bus ve diğ. 1999; Kaiser ve diğ. 1999).

Sülfapiridin ile yapılan çalışmalar incelendiğinde kolondan emilen sülfapiridin bir çok yan etkiye sahip olduğu ortaya çıkmış ve bu sebeple 5-ASA'yı en az yan etkiyle kolona taşıyacak yeni taşıyıcıların aranmasına sebep olmuştur.

Böylelikle balsalazid, ipsalazid ve son olarak olsalazid ortaya çıkmıştır. Bu yapıların hepsi 5-ASA için taşıyıcı rol oynamaktadır (Şekil 1.14).



Şekil 1.14: Sülfapiridin'in, Balsalazid'in, İpsalazid'in ve Olsalazid'in kimyasal yapıları (Chourasia ve Jain 2003).

5-ASA'nın terapötik etkisi, sistemik bir etkiden daha çok mukozanın üzerinde lokal bir etki olarak görülür (Podolsky 2002). Kolonun tedavisi için fitil, lavman gibi şekillerde de uygulanabilir. Topikal tedaviyle etkin maddenin doğrudan verilmesi sistemik tedaviye kıyasla avantajlıdır. Daha yüksek 5-ASA konsantrasyonunun elde edilmesi sağlanır (Frieri ve diğ. 1999). Diğer bir yandan 5-ASA'nın yan etkilerine bakacak olursak; yaygın yan etkiler arasında alerjik deri döküntüsü, gaz, karın ağrısı, bulantı, ishal, baş ağrısı ve kötüleşen ülseratif kolit yer almaktadır. Bilinen ciddi yan etkileri ise pankreatit, hepatit, poliüri, kromatüri, üst solunum yolu enfeksiyonu ve kızamık olarak gösterilebilir (Murray ve diğ. 2020).

Williams tarafından yayınlanan meta analizde, lokal 5-ASA tedavisinin; plasebodan, oral 5-ASA'dan ve lokal steroid tedavisinden daha üstün olduğu görülmüştür (Williams 2011). Başka bir meta analizde ise; 5-ASA ve kolorektal ilişkisini inceleyen 9 araştırmadan beşinde, 5-ASA'nın koruyucu bir etkiye sahip olduğu sonucu elde edilirken, diğer dördünde aynı sonuç elde edilememiştir. Yapılan analiz sonucunda 5-ASA'nın, 0,51 (0,37-0,69) olasılık oranıyla kolorektal kanser gelişimini önlediği sonucuna ulaşılmıştır (Velayos ve diğ. 2005). Kemopreventif olduğunu gösteren kanıtlar ise netlik göstermemektedir (Terdiman ve diğ. 2007).

1.3 Tezin Amacı

Teknoloji ve sağlık alanında yaşanan gelişmelerle birlikte hem yeni ilaçların keşfi hem de insanlar tarafından kullanılan ilaç miktarı artmıştır. 5-ASA; etkinliği kanıtlanmış özellikle ülseratif kolit gibi iltihaplı bağırsak hastalıklarının tedavisinde kullanılan nonsteroid anti-inflamatuar bir ağandır. CYP2D6 enzimi ise sitokrom P450 enzimleri arasında psikiyatrik ilaçları en yakından ilgilendiren enzimlerdendir. Yapılan literatür çalışmasında laboratuvarımızda gerçekleştirilen ve CYP2D6 enziminin 5-ASA'yı metabolize ettiğine dair sonuçlar elde edilen araştırmadan başka veriye ulaşılamamıştır (Kale ve şen 2019). Araştırma referans alınarak CYP2D6 ve 5-ASA ilişkisinin yakından incelenmesi ve reaksiyon kinetiğinin öğrenilmesi planlanmıştır. Buradan yola çıkarak bu tezin amacı iltihaplı bağırsak hastalıkları tanısı almış hastalara 5-ASA ile birlikte reçete edilebilen psikosomatik ilaçların kullanılması ile ortaya çıkabilecek olası ilaç-ilaç etkileşimlerinin araştırılmasıdır. 5-ASA'yı hastaların hayatları boyunca kullandığı dikkate alındığında, elde edilecek bilgilerin olası bir etkileşim ya da toksikasyon durumunda hastalar için hayati öneme sahip olma potansiyelinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. YÖNTEM

2.1 MATERYAL

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Proje çalışmamız süresinde; Santrifüj (Soğutmalı & Soğutmasız) (Sigma 1-14), Isı Bloğu (Biosan Dry Block Heating Thermostat TDB-100), tüp karıştırıcısı (Bioneer Exi Spin), saf su sistemi (Human Power Scholar), otoklav (HVE-50), teraziler (Precisa XB 220A), (Mettler Toledo AB 265S), (Mettler Toledo PB 602-L), -85 °C Ultralow Freezer (Nuair), güç kaynağı (Thermo, EC-250-90), buz makinesi (Hoshizaki), çalkalamalı inkübatör (Yellow Line RS10), otomatik pipetler (Eppendorf Research Plus), Multi-Mode Mikrolaka okuyucu (BioTek Synergy HTX) kullanılmıştır.

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Çalışmamızda kullandığımız kimyasallar; Dimetil sülfoksit (DMSO), 5-aminosalicylic acid (5-ASA) (Sigma-A3537), Ultra Flux kapaklı PZR tüpleri (0,2 ml, 3247-40), 96 kuyulu plaka (Bio-one Cellstar), Asetonitril (Sigma-34851), Trikloroasetik Asit (TCA), Tetrahidrofuran (THF)'dır. Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) Activity Assay Kit (Fluorometric) (Biovision-K703) ve EZCyp™ Active Human Cytochrome P450 2D6 (Biovision-7873) kullanılmıştır.

2.2 METOT

2.2.1 Mesalazin (5-ASA) Maddesini Çözme Çalışmaları

Öncelikle 5-ASA'yı çözebilmek için ultra saf su, asetonitril ve tetrahidrofuran (THF) ile denemeler yapılmıştır. 5-ASA 1,4 mg tartılarak üzerine 10 ml'ye tamamlanacak şekilde ultra saf su, asetonitril ve THF eklenmiştir. Bu denemelerde 5-ASA'nın ultra saf su ve THF ile çözünmediği fakat asetonitril ile tam olarak çözülmediği görülmüştür. Tartılan 1,4 mg 5-ASA, ultra saf su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Böylece 0,9 mM 5-ASA ana stoğu hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok solüsyonu 50 µl olacak şekilde eppendorflara ayrılp -20 °C buzdolabına kaldırılmıştır.

2.2.2 Kitteki Reaktiflerin Hazırlanması

Çalışma sırasında “Biovision Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) Activity Assay Kit (Fluorometric)” kullanılmıştır.

- CYP2D6 inhibitörü (kinidin) hazırlanırken; 2 mM stok çözeltisi elde etmek için 220 µl asetonitril eklenmiştir. Tamamen çözünene kadar vortekslenmiştir. Bölüntülenmiş ve -20 °C buzdolabına kaldırılmıştır.
- NADPH üretim sistemi (100X) hazırlanırken; 440 µl CYP2D6 tahlil tamponu ile sulandırılmıştır. Bölüntülenmiş ve -20 °C buzdolabına kaldırılmıştır.
- β -NADP⁺ stok solüsyonu 100X stok elde etmek için; 440 µl CYP2D6 tahlil tamponu eklenerek vortekslenmiştir. Bölüntülenmiş ve -20 °C buzdolabına kaldırılmıştır.
- CYP2D6 (2 mM) substratı hazırlamak için; 220 µl susuz reaktif dereceli asetonitril ile sulandırılarak vortekslenmiştir. Bölüntülenmiş ve -20 °C buzdolabına kaldırılmıştır.
- Rekombinant CYP2D6 enzimi kullanıma hazır hale getirmek için; 460 µl CYP2D6 tahlil tamponu ile sulandırılmıştır. NADPH üretim sistemi (100X) 40 µl eklenmiştir. Homojen olana kadar karıştırılmıştır. Bölüntülenmiş ve -80 °C buzdolabına kaldırılmıştır.

2.2.3 AHMC Standart Eğri Grafiği Oluşturulması

Kitten temin edilen AHMC standardına prosedüre uygun olarak 110 µl DMSO eklenmiş ve vortekslenerek çözülmüştür. Elde edilen 2 mM stok solüsyonu 5 µl şeklinde eppendorflara ayrılıp kullanılmak üzere -20 °C buzdolabında muhafaza edilmiştir. AHMC standart grafiğini oluşturmak için prosedüre uygun olarak 5 µl 2 mM AHMC stok solüsyonuna, 995 µl kit ile verilen tahlil tamponu eklenerek vortekslenmiştir. Elde edilen çalışma solüsyonundan; 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ve 10 µl alınarak 96 kuyucuklu plakaya koyulmuştur. CYP2D6 tahlil tamponu ile her bir oyuğun hacmi 50 µl'ye ayarlanmıştır. Sonrasında kinetik mod seçilerek 37 °C'de ekzitasyon ve emisyon dalga boyları (Ex/Em) 390 nm ve 468 nm olacak şekilde ayarlanmış "BioTek Synergy HTX Multi-Mode" mikroparka okuyucu kullanılarak floresan ölçümü yapılmıştır. Bu denemeler üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Elde edilen değerler kullanılarak 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80 ve 100 pmol/kuyucuk AHMC olacak şekilde AHMC standart grafiği çizilmiştir.

2.2.4 CYP2D6 Aktivite Ölçümlerinin Karakterizasyonu (3-[2-(N,N-Diethyl-N-metillamonyum)ethyl]-7-metoksi-4-metilkumarin O-Demetilaz) [AMMC O-Demetilaz]

Ghosal ve arkadaşları tarafından (2003) yapılan araştırmada elde edilen kimyasal inhibisyon verileri; AMMC'nin, insan karaciğer mikrozomlarında bulunan CYP2D6 için spesifik fonksiyonel prob olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bunun yanı sıra floresan plaka okumanın, CYP aktivitelerinin hızlı değerlendirilmesi açısından yararlı olduğu görülmüş ve çalışmamızın metodoloji kısmında bu verilerden faydalanılmıştır. CYP2D6'ya özgü aktiviteyi belirlemek için, güçlü CYP2D6 inhibitörü kinidin'in varlığında ve yokluğunda; 5-ASA'nın varlığında ve yokluğunda eş zamanlı reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Şekil 2.1 ve Şekil 2.2'de oluşan Floresan

The diagram illustrates the metabolic pathway of CYP2D6. It shows the conversion of G6P to 6-PGDL via NADPH, and the reduction of NADPH by NADPH P450 Reduktaz (CPR) to produce reduced flavoenzyme, which then reduces the CYP2D6 substrate to a fluorescent metabolite ($\lambda_{\text{max}} = 468 \text{ nm}$) while being re-oxidized to oxidized flavoenzyme. The process is inhibited by CYP2D6 inhibitors like Kinidin.



- Bileşenler reaksiyona eklenmeden; hazırlanan 0,9 mM 5-ASA ana stoğundan 10 µl alınmıştır. Tahlil tamponu 990 µl eklenerek 9 µM çalışma solüsyonu elde edilmiştir.
- Daha önce hazırlanan NADP⁺ ana stoğundan ise 10 µl alınarak tahlil tamponu ile 300 µl'ye tamamlanmıştır.
- 2 mM AMMC stok çözeltisinden 0,02 mM çalışma solüsyonu elde etmek için 10 µl alınmış ve 990 µl tahlil tamponu eklenmiştir.
- 2 mM kinidin ana stoğundan ise 5 µl alınarak tahlil tamponu ile 666 µl'ye tamamlanmıştır. Böylelikle 0,015 mM çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.

23

Tablo 2.1: I. plaka bileşenleri ve prosedürü.

Reaktifler	Tüp Numarası								
	1-1'	2-2'	3-3'	4-4'	5-5'	6-6'	7-7'	8-8'	9-9'
Tahlil tamponu	18 µl	31 µl	29 µl	25 µl	17 µl	9 µl	3 µl	8 µl	60 µl
NADPH üreten sistem	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	-
5-ASA çalışma solüsyonu	-	1 µl	2 µl	4 µl	8 µl	12 µl	15 µl	-	-
Rekombinant insan CYP2D6 enzimi	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	-
AMMC substrat çalışma solüsyonu	15 µl	1 µl	2 µl	4 µl	8 µl	12 µl	15 µl	15 µl	-
Kinidin çalışma solüsyonu	-	-	-	-	-	-	-	10 µl	-
37 °C’de blok ısıtıcıda 10 dakika inkübe edilmiştir. Kısa süre santrifüj edilmiştir.									
Tüpler duplikeleriyle birlikte 96 kuyulu plakaya aktarılmıştır.									
NADP ⁺ çalışma solüsyonundan bütün tüplere 15 µl eklenmiştir.									
Toplam HACİM	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
37 °C’de 90 dakika Ex/Em 390/468 nm floresan ölçüm yapılmıştır.									

Plakayı hazırlamak için 200 µl’lik tek kullanımlık plastik tüpler, buz üzerine yerleştirilmiştir. Tabloda belirtilen miktarlarda tahlil tamponu konulmuştur (Tablo 2.1). Sonrasında reaktiflerden; NADPH, 5-ASA çalışma solüsyonu, AMMC substrat çalışma solüsyonu, rekombinant CYP2D6 enzimi ve kinidin çalışma solüsyonu belirtilen miktarda tüp numaralarına göre eklenmiş ve karıştırılmıştır. Kuru blok ısıtıcı ile aynı zamanda çalkalanarak 37 °C’de 10 dakika inkübe edilmiştir. Yaklaşık 10 saniye hızlıca santrifüj edilmiştir. Sonrasında tüpler duplikeleriyle birlikte dikkatli bir şekilde otomatik pipet ile 96 kuyulu I. plakaya aktarılmıştır. Ardından hızlıca kuyulara 15 µl NADP⁺ eklenerek 37 °C’de kinetik mod ile 90 dakika Ex/Em 390/468 nm floresan ölçüm yapılmıştır.

Tablo 2.2: II. plaka bileşenleri ve prosedürü.

Reaktifler	Tüp Numarası					
	1-1'	2-2'	3-3'	4-4'	5-5'	6-6'
Tahlil tamponu	18 µl	31 µl	29 µl	25 µl	21 µl	60 µl
NADPH üreten sistem	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	-
5-ASA çalışma solüsyonu	-	-	-	-	-	-
Rekombinant insan CYP2D6 enzimi	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	-
AMMC substrat çalışma solüsyonu	15 µl	2 µl	4 µl	8 µl	12 µl	-
Kinidin çalışma solüsyonu	-	-	-	-	-	-
37 °C'de blok ısıtıcıda 10 dakika inkübe edilmiştir. Kısa süre santrifüj edilmiştir.						
Tüpler duplikeleriyle birlikte 96 kuyulu plakaya aktarılmıştır.						
NADP ⁺ çalışma solüsyonundan bütün tüplere 15 µl eklenmiştir.						
Toplam HACİM	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
37 °C'de 40 dakika Ex/Em 390/468 nm floresan ölçüm yapılmıştır.						

II. plaka hazırlanırken; 200 µl'lik tek kullanımlık plastik tüpler, öncelikle buz üzerine yerleştirilmiştir. Tabloda belirtilen miktarlarda tahlil tamponu eklenmiştir (Tablo 2.2). Sonrasında reaktiflerden; NADPH, AMMC substrat solüsyonu ve rekombinant CYP2D6 enzimi, tabloda belirtilen miktarda tüp numaralarına göre eklenmiş ve karıştırılmıştır. Kuru blok ısıtıcı ile çalkalanarak 10 dakika 37 °C'de inkübe edilmiştir. Yaklaşık 10'ar saniye hızlıca santrifüj edilmiştir. Sonrasında tüpler duplikeleriyle birlikte dikkatli bir şekilde otomatik pipet ile 96 kuyulu plakaya aktarılmıştır. Hızlıca kuyulara 15 µl NADP⁺ eklenerek 37 °C'de kinetik mod ile 40 dakika boyunca Ex/Em 390/468 nm floresan ölçülmüştür.

Tablo 2.3: III. plaka bileşenleri ve prosedürü.

Reaktifler	Tüp Numarası				
	1-1'	2-2'	3-3'	4-4'	5-5'
Tahlil tamponu	18 µl	29 µl	25 µl	17 µl	9 µl
NADPH üreten sistem	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
5-ASA çalışma solüsyonu	-	2 µl	4 µl	8 µl	12 µl
Rekombinant insan CYP2D6 enzimi	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
AMMC substrat çalışma solüsyonu	15 µl	2 µl	4 µl	8 µl	12 µl
Kinidin çalışma solüsyonu	-	-	-	-	-
37 °C’de blok ısıtıcıda 10 dakika inkübe edilmiştir. Kısa süre santrifüj edilmiştir.					
Tüpler duplikeleriyle birlikte 96 kuyulu plakaya aktarılmıştır.					
NADP ⁺ çalışma solüsyonundan bütün tüplere 15 µl eklenmiştir.					
Toplam HACİM	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
37 °C’de 40 dakika Ex/Em 390/468 nm floresan ölçüm yapılmıştır.					

III. plaka için; tüplere buz üzerinde öncelikle belirtilen miktarda tahlil tamponu konulmuştur (Tablo 2.3). Sonrasında reaktiflerden; NADPH, 5-ASA çalışma solüsyonu, AMMC substrat çalışma solüsyonu ve rekombinant CYP2D6 enzimi eklenmiş ve karıştırılmıştır. Kuru blok ısıtıcı ile 37 °C’de 10 dakika inkübe edilmiştir. Hızlıca santrifüj edilmiş tüpler 96 kuyulu plakaya aktarılmıştır. Kuyulara 15 µl NADP⁺ eklenerek 37 °C’de kinetik mod ile 40 dakika Ex/Em 390/468 nm floresan ölçülmüştür.

Tablo 2.4: IV. plaka bileşenleri ve prosedürü.

Reaktifler	Tüp Numarası					
	1-1'	2-2'	3-3'	4-4'	5-5'	6-6'
Tahlil tamponu	18 µl	29 µl	25 µl	17 µl	9 µl	3 µl
NADPH üreten sistem	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
5-ASA çalışma solüsyonu	-	2 µl	4 µl	8 µl	12 µl	15 µl
Rekombinant insan CYP2D6 Enzimi	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
AMMC substrat çalışma solüsyonu	15 µl	2 µl	4 µl	8 µl	12 µl	15 µl
Kinidin çalışma solüsyonu	-	-	-	-	-	-
37 °C'de blok ısıtıcıda 10 dakika inkübe edilmiştir. Kısa süre santrifüj edilmiştir.						
Tüpler duplikeleriyle birlikte 96 kuyulu plakaya aktarılmıştır.						
NADP ⁺ çalışma solüsyonundan bütün tüplere 15 µl eklenmiştir.						
Toplam HACİM	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
37 °C'de 60 dakika Ex/Em 390/468 nm floresan ölçüm yapılmıştır.						

IV. plaka için; tüplere buz üzerinde öncelikle belirtilen miktarda tahlil tamponu konulmuştur (Tablo 2.4). Sonrasında reaktiflerden; NADPH, 5-ASA çalışma solüsyonu, AMMC substrat çalışma solüsyonu ve rekombinant CYP2D6 enzimi eklenmiş ve karıştırılmıştır. Kuru blok ısıtıcıda 37 °C'de çalkalanarak 10 dakika inkübe edilmiştir. Hızlıca santrifüj edilmiştir. Tüpler 96 kuyulu plakaya aktarılmıştır. Kuyulara 15 µl NADP⁺ eklenerek 37 °C'de kinetik mod ile 60 dakika Ex/Em 390/468 nm floresan ölçülmüştür.

Tablo 2.5: V. plaka bileşenleri ve prosedürü.

Reaktifler	Tüp Numarası				
	1-1'	2-2'	3-3'	4-4'	5-5'
Tahlil tamponu	18 µl	31 µl	29 µl	25 µl	21 µl
NADPH üreten sistem	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
5-ASA çalışma solüsyonu	-	-	-	-	-
Rekombinant insan CYP2D6 enzimi	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
AMMC substrat çalışma solüsyonu	15 µl	2 µl	4 µl	8 µl	12 µl
Kinidin çalışma solüsyonu	-	-	-	-	-
37 °C’de blok ısıtıcıda 10 dakika inkübe edilmiştir. Kısa süre santrifüj edilmiştir.					
Tüpler duplikeleriyle birlikte 96 kuyulu plakaya aktarılmıştır.					
NADP ⁺ çalışma solüsyonundan bütün tüplere 15 µl eklenmiştir.					
Toplam HACİM	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
37 °C’de 60 dakika Ex/Em 390/468 nm floresan ölçüm yapılmıştır.					

V. plakayı hazırlarken; tüplere buz üzerinde öncelikle belirtilen miktarda tahlil tamponu konulmuştur (Tablo 2.5). Sonrasında reaktiflerden; NADPH, AMMC substrat çalışma solüsyonu ve rekombinant CYP2D6 enzimi eklenmiş ve karıştırılmıştır. Kuru blok ısıtıcıda 37 °C’de 10 dakika çalkalanarak inkübe edilmiştir. Hızlıca santrifüj edilmiştir. Tüpler 96 kuyulu plakaya aktarılmıştır. Kuyulara 15 µl NADP⁺ eklenerek 37 °C’de kinetik mod ile 60 dakika Ex/Em 390/468 nm floresan ölçülmüştür.

Tablo 2.6: VI. plaka bileşenleri ve prosedürü.

Reaktifler	Tüp Numarası					
	1-1'	2-2'	3-3'	4-4'	5-5'	6-6'
Tahlil tamponu	18 µl	29 µl	25 µl	17 µl	9 µl	3 µl
NADPH üreten sistem	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
5-ASA çalışma solüsyonu	-	2 µl	4 µl	8 µl	12 µl	15 µl
Rekombinant insan CYP2D6 enzimi	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
AMMC substrat çalışma solüsyonu	15 µl	2 µl	4 µl	8 µl	12 µl	15 µl
Kinidin çalışma solüsyonu	-	-	-	-	-	-
37 °C’de blok ısıtıcıda 10 dakika inkübe edildi. Kısa süre santrifüj edilmiştir.						
Tüpler duplikeleriyle birlikte 96 kuyulu plakaya aktarılmıştır.						
NADP ⁺ çalışma solüsyonundan bütün tüplere 15 µl eklenmiştir.						
Toplam HACİM	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
37 °C’de 60 dakika Ex/Em 390/468 nm floresan ölçüm yapılmıştır.						

VI. plakayı hazırlarken; tüplere buz üzerinde öncelikle belirtilen miktarda tahlil tamponu konulmuştur (Tablo 2.6). Sonrasında reaktiflerden; NADPH, 5-ASA çalışma solüsyonu, AMMC substrat çalışma solüsyonu ve rekombinant CYP2D6 enzimi eklenmiş ve karıştırılmıştır. Kuru blok ısıtıcıda 37 °C’de 10 dakika inkübe edilmiştir. Hızlıca santrifüj edilmiştir. Tüpler, plakaya aktarılmıştır. Kuyulara 15 µl NADP⁺ eklenerek 37 °C’de kinetik mod ile 60 dakika Ex/Em 390/468 nm floresan ölçülmüştür.

Tablo 2.7: VII. plaka bileşenleri ve prosedürü.

Reaktifler	Tüp Numarası				
	1-1'	2-2'	3-3'	4-4'	5-5'
Tahlil tamponu	18 µl	31 µl	29 µl	25 µl	21 µl
NADPH üreten sistem	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
5-ASA çalışma solüsyonu	-	-	-	-	-
Rekombinant insan CYP2D6 enzimi	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
AMMC substrat çalışma solüsyonu	15 µl	2 µl	4 µl	8 µl	12 µl
Kinidin çalışma solüsyonu	-	-	-	-	-
37 °C'de blok ısıtıcıda 10 dakika inkübe edilmiştir. Kısa süre santrifüj edilmiştir.					
Tüpler duplikeleriyle birlikte 96 kuyulu plakaya aktarılmıştır.					
NADP ⁺ çalışma solüsyonundan bütün tüplere 15 µl eklenmiştir.					
Toplam HACİM	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
37 °C'de 60 dakika Ex/Em 390/468 nm floresan ölçüm yapılmıştır.					

VII. plaka için; tüplere buz üzerinde öncelikle belirtilen miktarda tahlil tamponu konulmuştur (Tablo 2.7). Sonrasında reaktiflerden; NADPH, AMMC substrat çalışma solüsyonu ve rekombinant CYP2D6 enzimi eklenmiş ve karıştırılmıştır. Kuru blok ısıtıcıda 37 °C'de 10 dakika çalkalanarak inkübe edilmiştir. Hızlıca santrifüj edilmiştir. Tüpler 96 kuyulu plakaya aktarılmıştır. Kuyulara 15 µl NADP⁺ eklenerek 37 °C'de kinetik modda 60 dakika Ex/Em 390/468 nm floresan ölçülmüştür.

Tablo 2.8: VIII. plaka bileşenleri ve prosedürü.

Reaktifler	Tüp Numarası					
	1-1'	2-2'	3-3'	4-4'	5-5'	6-6'
Tahlil tamponu	18 µl	16 µl	14 µl	10 µl	6 µl	3 µl
NADPH üreten sistem	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
5-ASA çalışma solüsyonu	-	2 µl	4 µl	8 µl	12 µl	15 µl
Rekombinant insan CYP2D6 enzimi	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
AMMC substrat çalışma solüsyonu	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
Kinidin çalışma solüsyonu	-	-	-	-	-	-
37 °C’de blok ısıtıcıda 10 dakika inkübe edilmiştir. Kısa süre santrifüj edilmiştir.						
Tüpler duplikeleriyle birlikte 96 kuyulu plakaya aktarılmıştır.						
NADP ⁺ çalışma solüsyonundan bütün tüplere 15 µl eklenmiştir.						
Toplam HACİM	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
37 °C’de 60 dakika Ex/Em 390/468 nm floresan ölçüm yapılmıştır.						

VIII. plakayı hazırlarken; tüplere buz üzerinde öncelikle belirtilen miktarda tahlil tamponu konulmuştur (Tablo 2.8). Sonrasında reaktiflerden; NADPH, 5-ASA çalışma solüsyonu, AMMC substrat solüsyonu ve rekombinant CYP2D6 eklenmiş ve karıştırılmıştır. Kuru blok ısıtıcıda 37 °C’de 10 dakika çalkalanarak inkübe edilmiştir. Hızlıca santrifüj edilmiştir. Tüpler, plakaya aktarılmıştır. Kuyulara 15 µl NADP⁺ eklenerek 37 °C’de kinetik mod ile 60 dakika Ex/Em 390/468 nm floresan ölçülmüştür.

Tablo 2.9: IX. plaka bileşenleri ve prosedürü.

Reaktifler	Tüp Numarası					
	1-1'	2-2'	3-3'	4-4'	5-5'	6-6'
Tahlil tamponu	19 µl	64 µl	59 µl	54 µl	49 µl	39 µl
NADPH üreten sistem	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl
5-ASA çalışma solüsyonu	-	-	-	-	-	-
Rekombinant insan CYP2D6 enzimi	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
AMMC substrat çalışma solüsyonu	30 µl	5 µl	10 µl	15 µl	20 µl	30 µl
Kinidin çalışma solüsyonu	20 µl	-	-	-	-	-
37 °C’de blok ısıtıcıda 10 dakika inkübe edilmiştir. Kısa süre santrifüj edilmiştir.						
Tüpler duplikeleriyle birlikte 96 kuyulu plakaya aktarılmıştır.						
NADP ⁺ çalışma solüsyonundan bütün tüplere 25 µl eklenmiştir.						
Toplam HACİM	120 µl	120 µl	120 µl	120 µl	120 µl	120 µl
37 °C’de 40 dakika Ex/Em 390/468 nm floresan ölçüm yapılmıştır.						

IX. plaka için; tüplere buz üzerinde öncelikle belirtilen miktarda tahlil tamponu konulmuştur (Tablo 2.9). Sonrasında reaktiflerden; NADPH, AMMC substrat çalışma solüsyonu, kinidin çalışma solüsyonu ve rekombinant CYP2D6 enzimi eklenmiş ve karıştırılmıştır. Kuru blok ısıtıcıda 37 °C’de 10 dakika çalkalanarak inkübe edilmiştir. Hızlıca santrifüj edilmiştir. Tüpler 96 kuyulu plakaya aktarılmıştır. Kuyulara 25 µl NADP⁺ eklenerek 37 °C’de kinetik mod ile 40 dakika Ex/Em 390/468 nm floresan ölçülmüştür.

Tablo 2.10: X. plaka bileşenleri ve prosedürü.

Reaktifler	Tüp Numarası				
	1-1'	2-2'	3-3'	4-4'	5-5'
Tahlil tamponu	34 µl	29 µl	24 µl	19 µl	9 µl
NADPH üreten sistem	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl
5-ASA çalışma solüsyonu	5 µl	10 µl	15 µl	20 µl	30 µl
Rekombinant insan CYP2D6 enzimi	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
AMMC substrat çalışma solüsyonu	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
Kinidin çalışma solüsyonu	-	-	-	-	-
37 °C’de blok ısıtıcıda 10 dakika inkübe edilmiştir. Kısa süre santrifüj edilmiştir.					
Tüpler duplikeleriyle birlikte 96 kuyulu plakaya aktarılmıştır.					
NADP ⁺ çalışma solüsyonundan bütün tüplere 25 µl eklenmiştir.					
Toplam HACİM	120 µl	120 µl	120 µl	120 µl	120 µl
37 °C’de 40 dakika Ex/Em 390/468 nm floresan ölçüm yapılmıştır.					

X. plakayı hazırlarken; tüplere buz üzerinde öncelikle belirtilen miktarda tahlil tamponu konulmuştur (Tablo 2.10). Sonrasında reaktiflerden; NADPH, 5-ASA çalışma solüsyonu, AMMC substrat çalışma solüsyonu ve rekombinant CYP2D6 eklenmiş ve karıştırılmıştır. 37 °C’de 10 dakika çalkalanarak inkübe edilmiştir. Hızlıca santrifüj edilmiştir. Tüpler, plakaya aktarılmıştır. Kuyulara 25 µl NADP⁺ eklenerek 37 °C’de kinetik mod ile 40 dakika Ex/Em 390/468 nm floresan ölçülmüştür.

Tablo 2.11: XI. plaka bileşenleri ve prosedürü.

Reaktifler	Tüp Numarası				
	1-1'	2-2'	3-3'	4-4'	5-5'
Tahlil tamponu	59 µl	49 µl	39 µl	29 µl	9 µl
NADPH üreten sistem	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl
5-ASA çalışma solüsyonu	5 µl	10 µl	15 µl	20 µl	30 µl
Rekombinant insan CYP2D6 enzimi	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
AMMC substrat çalışma solüsyonu	5 µl	10 µl	15 µl	20 µl	30 µl
Kinidin çalışma solüsyonu	-	-	-	-	-
37 °C'de blok ısıtıcıda 10 dakika inkübe edilmiştir. Kısa süre santrifüj edilmiştir.					
Tüpler duplikeleriyle birlikte 96 kuyulu plakaya aktarılmıştır.					
NADP ⁺ çalışma solüsyonundan bütün tüplere 25 µl eklenmiştir.					
Toplam HACİM	120 µl	120 µl	120 µl	120 µl	120 µl
37 °C'de 40 dakika Ex/Em 390/468 nm floresan ölçüm yapılmıştır.					

XI. plaka için; tüplere buz üzerinde öncelikle belirtilen miktarda tahlil tamponu konulmuştur (Tablo 2.11). Sonrasında reaktiflerden; NADPH, AMMC substrat solüsyonu ve rekombinant CYP2D6 enzimi eklenmiş ve karıştırılmıştır. Kuru blok ısıtıcıda 37 °C'de 10 dakika çalkalanarak inkübe edilmiştir. Hızlıca santrifüj edilmiştir. Tüpler 96 kuyulu plakaya aktarılmıştır. Kuyulara 25 µl NADP⁺ eklenerek 37 °C'de kinetik mod ile 40 dakika boyunca Ex/Em 390/468 nm floresan ölçülmüştür.

Tüm bu ölçümlerde elde edilen değerler, çizilen AHMC standart eğri grafiği de kullanılarak gerekli hesaplamalar yapılmış aktivite grafiklerinin çizilmiştir..

2.2.5 HPLC-ESI-MS/MS Analizleri

Bezmialem Vakıf Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi (İLMER)'nde Doç. Dr. Işıl GAZİOĞLU tarafından yapılan ölçümler için iki farklı prosedür uygulanarak örnekler hazırlanmıştır.

Tablo 2.12: Birinci prosedür için hazırlanan tüplere konulan reaktif miktarları (µl).

Reaktifler	Tüp Numarası						
	1	2	3	4	5	6	7
Tahlil Tamponu	23 µl	19 µl	43 µl	43 µl	3 µl	23 µl	19 µl
NADPH Üreten Sistem	2 µl	4 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	4 µl
NADP ⁺ çalışma solüsyonu	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
5-ASA çalışma solüsyonu	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
Rekombinant İnsan CYP2D6 Enzimi	20 µl	20 µl	-	-	20 µl	20 µl	20 µl
Kinidin çalışma solüsyonu	-	-	-	-	20 µl	-	-
Toplam HACİM	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Tüplere tahlil tamponu, NADPH, 5-ASA çalışma solüsyonu, rekombinant CYP2D6 enzimi ve kinidin çalışma solüsyonu belirtilen miktarlarda eklenmiştir (Tablo 2.12). Son olarak NADP⁺ eklenerek 37 °C’de 120 dakika inkübe edilmiştir.

- %100 TCA Solüsyonu: Solüsyonu hazırlamak için 2,5 gr TCA tartılmış ve 1750 µl saf su eklenmiştir.

İnkübasyon sonunda tüplere hazırlanan TCA solüsyonundan 25 µl eklenerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Sonrasında tüpler 15 dakika buz üzerinde inkübe edilmiş ve süre sonunda 14.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Elde edilen sup (santrifüj) yapılacak ölçümler için gönderilmiştir.

Tablo 2.13: İkinci prosedür için hazırlanan tüplere konulan reaktif miktarları (µl).

Reaktifler	Tüp Numarası			
	1	2	3	4
Tahlil Tamponu	21 µl	19 µl	21 µl	21 µl
NADPH Üreten Sistem	4 µl	6 µl	4 µl	4 µl
NADP ⁺	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
5-ASA çalışma solüsyonu	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Rekombinant İnsan CYP2D6 Enzimi	30 µl	30 µl	40 µl	30 µl
Kinidin çalışma solüsyonu	-	-	-	20 µl
Toplam HACİM	100 µl	100 µl	110 µl	120 µl

Hazırlanan tüplere tahlil tamponu, NADPH, 5-ASA çalışma solüsyonu, rekombinant CYP2D6 enzimi ve kinidin çalışma solüsyonu verilen miktarlarda eklenmiştir (Tablo 2.13). Son olarak NADP⁺ eklenmiştir. Tüpler kuru ısıtıcı blokta 37 °C’de 60 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında reaksiyonu sonlandırmak için tüplere 25 µl TCA solüsyonu eklenmiştir. Tüpler 15 dakika buz üzerinde inkübe edilmiş ve inkübasyon süresi bitince 14.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. LC/MS-MS analizleri Bezmialem Vakıf Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi (İLMER)’nde Doç. Dr. Işıl Gazioğlu tarafından yapılmıştır.

Yapılan birinci HPLC ölçümü ile ilgili şartlar şu şekildedir: sıcaklık (22,0 ± 5,0 °C) ve bağıl nem (55±15 % rh). Her örneğin 4 µl’si analiz için HPLC-ESI- MS/MS sistemine enjekte edilmiştir. Kolon 3 µm Fortis C18–150 x 3.0 mm kullanılarak yapılmıştır. Metabolitler için HPLC kullanılmıştır. Cihazın şartları:

- **Mobil faz A:** %1 Formik Asit - H₂O
- **Mobil faz B:** %1 Formik Asit - MeOH
- **Akış hızı:** 0,35 ml / dk.

Yapılan birinci MS ölçümü şartları ise şöyledir: “Thermo Orbitrap Q-Exactive” sistemi kullanıldı. İyon kaynağı ESI’dır. Kütle tarama aralığı 175-450 m/z seçilmiştir. Kütle spektrometresi kullanılarak toplam iyon akım kromatogramları (TIC) elde edilmiştir. Çoklu reaksiyon izleme modunda, Tablo 2.14’te belirtilen m/z (kütle/yük) oranları seçilmiştir. N-Ac-5-ASA’nın kantitatif analizi için ise m/z geçişi 194 → 107 seçilmiştir.

Tablo 2.14: Seçilen kütle / yük oranları.

Kütle / Yük Oranları	
5-ASA ve 4-ASA	152 → 108
N-Ac-5-ASA	150, 194 → 107
N-Ac-4-ASA	194 → 108

Yapılan ikinci HPLC ölçümü şartları ise: C18–33 x 2 mm 5 µm kolon kullanılarak yapılmıştır.

- **Mobil faz A:** %1 Formik Asit - H₂O
- **Mobil faz B:** %1 Formik Asit - MeOH
- **Akış hızı:** 0.30 ml / dk.

Yapılan ikinci MS ölçümü şartları ise şöyledir: “Thermo Orbitrap Q-Exactive” sistemi kullanılmıştır. İyon kaynağı ESI olarak seçilmiştir. Seçilen kütle tarama aralığı: 100-300 m/z belirlenmiştir.

2.2.6 İstatistiksel Analizler

Elde edilen ölçüm değerlerine ait gruplar arası karşılaştırma Bağımsız Student's t-testi kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık seviyesi olarak $p < 0.05$ seçilmiştir. Tüm analizler Minitab 13.0 istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Çalışmamızda yer verilen grafikler Microsoft Excel paket programı kullanılarak hazırlanmıştır.

3. SONUÇLAR

3.1 Standart Eğri Çalışmaları

Kinetik mod ile 37 °C’de 60 dakika boyunca Ex/Em 390/468 nm yapılan floresan ölçüm, üç tekrarlı olarak üç deneme yapılmıştır. Tüm standart okumalardan, boş okuma (0 nmol/kuyucuk) değeri çıkarılmıştır (Tablo 3.1). Elde edilen değerler, Tablo 3.2, Tablo 3.3 ve Tablo 3.4’te verilmiştir.

Tablo 3.1: Boş okuma değerleri (0 nmol/kuyucuk) (RFU).

pmol/kuyucuk AHMC	0	0	0	0	0	0
1	79	81	85	75	80	82
2	78	79	88	75	94	87
3	97	90	87	79	95	90

Tablo 3.2: AHMC floresan ölçüm değerleri (RFU) 1.

pmol/kuyucuk AHMC	10	20	30	40	50	60	80	100
1	86	104	136	153	167	218	244	286
2	97	114	143	169	181	211	256	292
3	97	117	135	151	170	207	263	303

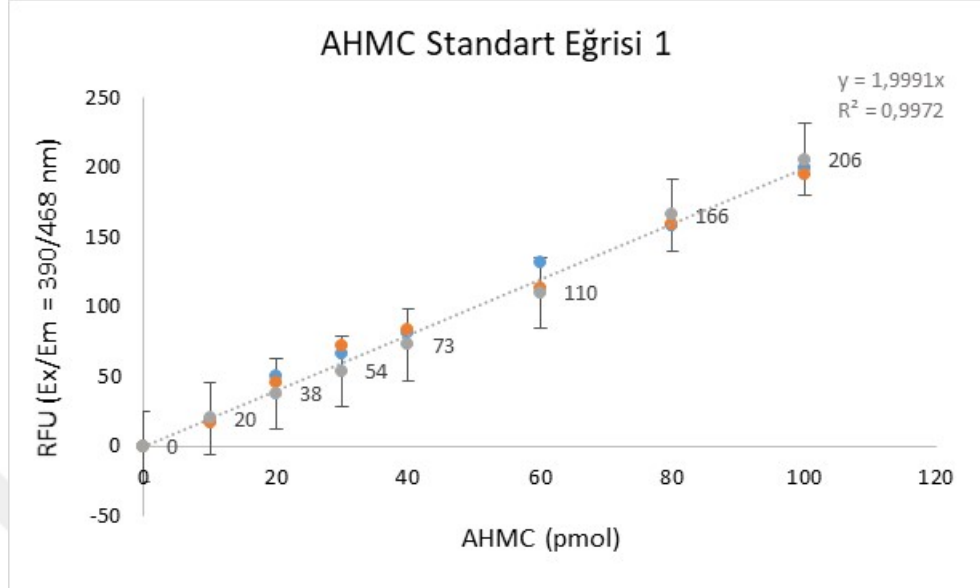
Tablo 3.3: AHMC floresan ölçüm değerleri (RFU) 2.

pmol/kuyucuk AHMC	10	20	30	40	50	60	80	100
1	101	111	135	160	182	218	244	286
2	112	122	138	151	180	211	256	292
3	104	116	142	161	190	207	263	303

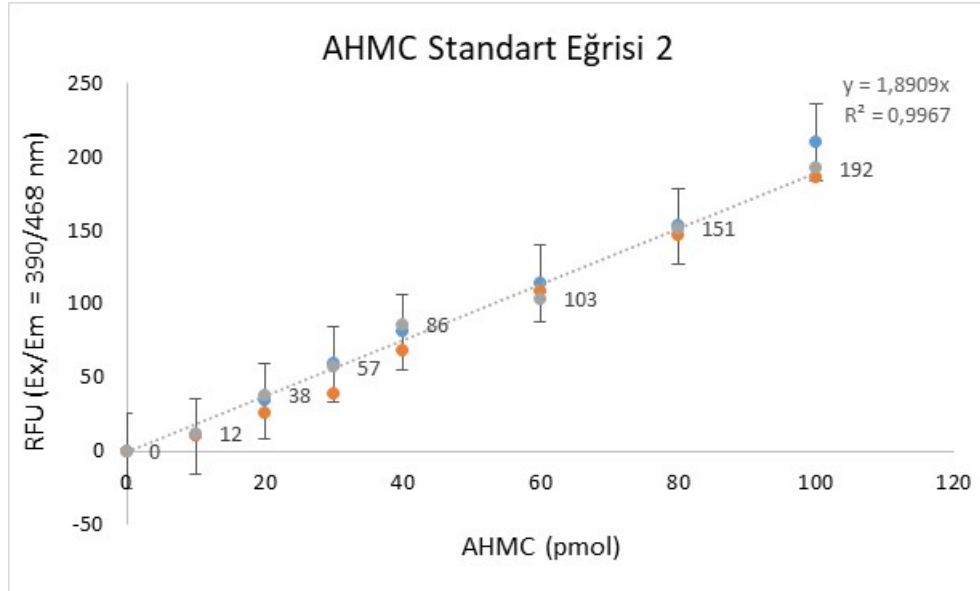
Tablo 3.4: AHMC floresan ölçüm değerleri (RFU) 3.

pmol/kuyucuk AHMC	10	20	30	40	50	60	80	100
1	95	104	133	159	168	210	255	271
2	103	114	135	144	171	208	242	287
3	109	114	139	160	188	216	239	287

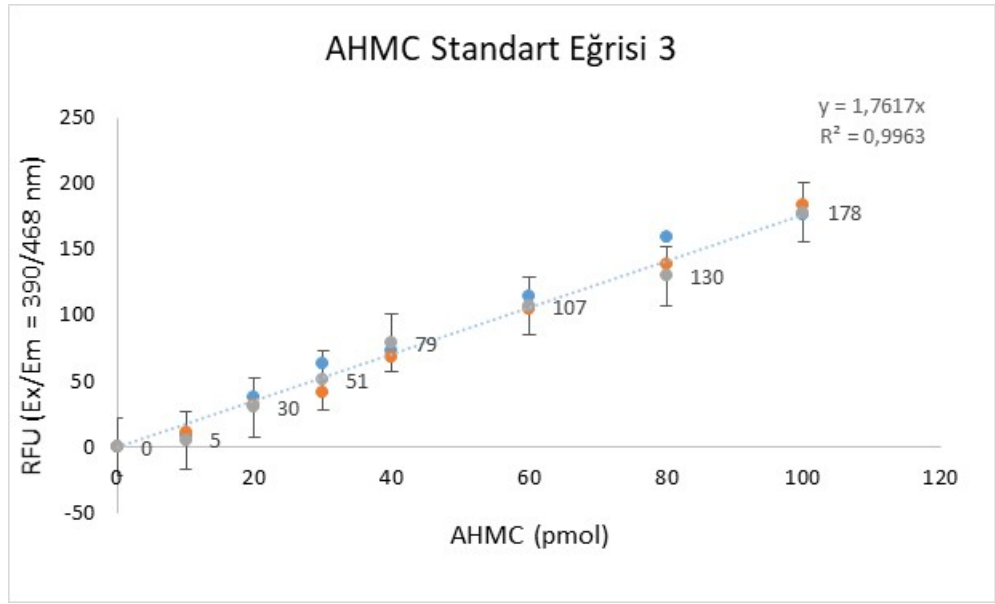
Elde edilen değerler üç tekrarın ortalaması alınarak AHMC standart eğri grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3). Yapılan üç ölçümün ortalaması alınarak çizilen grafik Şekil 3.4’te verilmiştir.



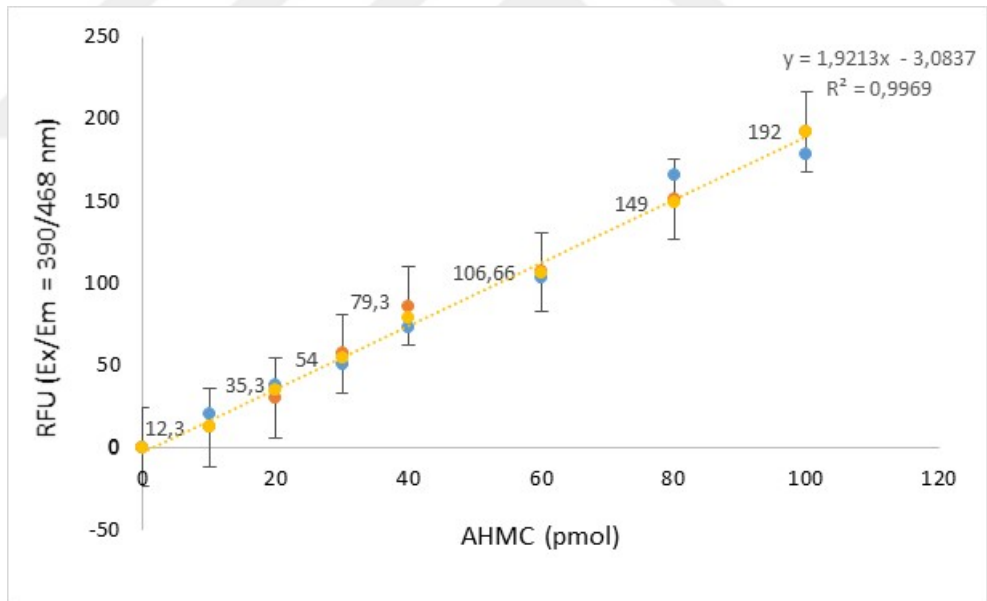
Şekil 3.1: AHMC standart eğri grafiği 1.



Şekil 3.2: AHMC standart eğri grafiği 2.



Şekil 3.3: AHMC standart eğri grafiği 3.



Şekil 3.4: AHMC ortalama standart eğri grafiği.

3.2 Plakaların Floresan Ölçümlerinde Elde Edilen Değerler ve Grafikleri

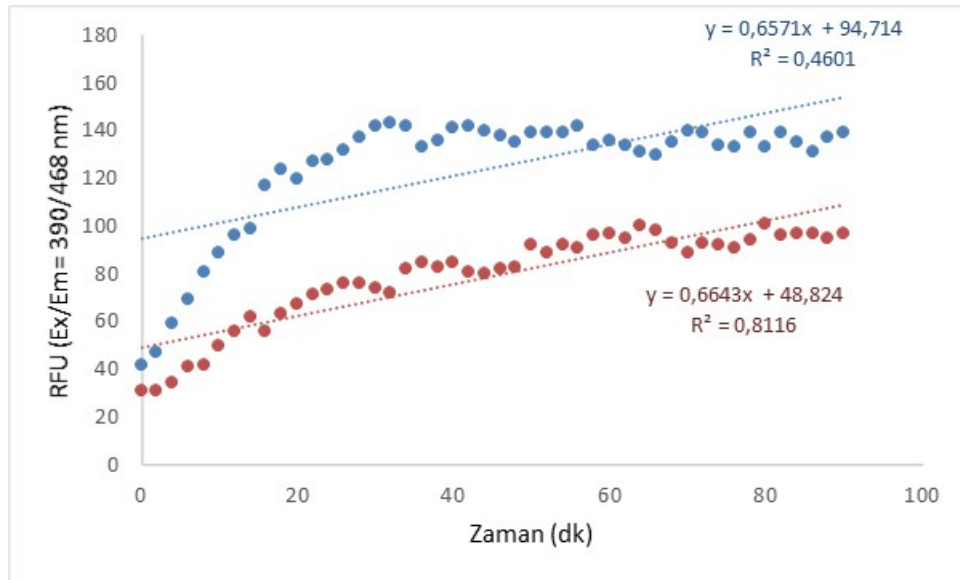
Prosedürleri verilen plakaların, 37 °C’de kinetik mod ile 90 dakika boyunca Ex/Em 390/468 nm floresan ölçümleri sonunda okunan değerler ve elde edilen grafikler şu şekildedir:

Tablo 2.1’de içeriği verilen I. plakanın, 90 dakika boyunca 37 °C’de kinetik mod ile Ex/Em 390/468 nm floresan ölçümü sonucunda elde edilen değerler verilmiş ve grafik olarak gösterilmiştir. 90 dakikalık ölçümde okuma 2 dakikada bir yapılmıştır. Değerler 6 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.5).

Tablo 3.5: I. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90
Tüp Numarası	1	42	69	96	124	128	142	133	142	135	139	136	130	139	139	135	139
	1'	31	41	56	63	73	74	85	81	83	92	97	98	93	94	97	97

I. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat (AMMC) konsantrasyonu 5 µM’dır. Yapılan ölçümde okunan değerler gösterilmiştir (Şekil 3.5). Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 368 pmol/dak/ml ve 372 pmol/dak/ml’dir.



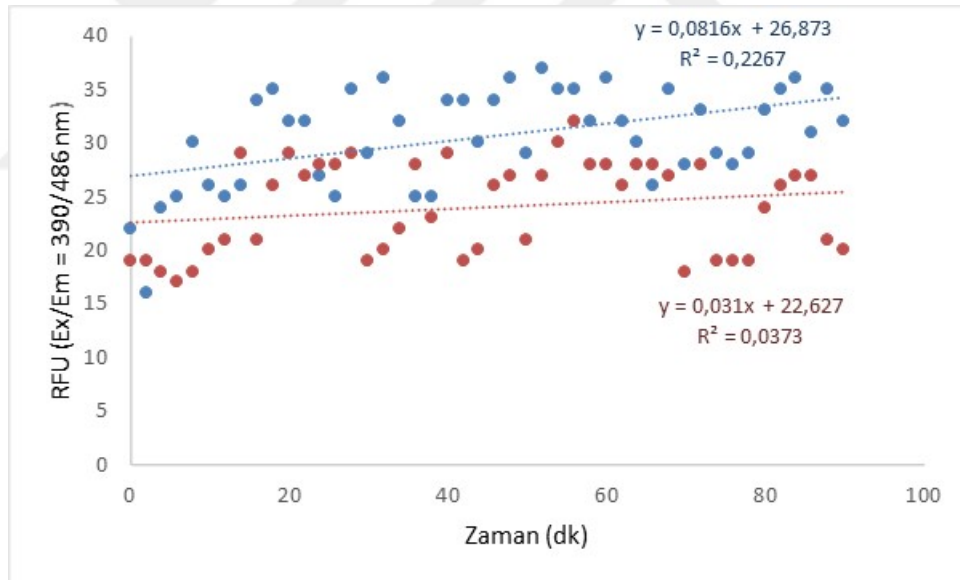
Şekil 3.5: I. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 90 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 6 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.6) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.6).

Tablo 3.6: I. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90
Tüp Numarası	2	22	25	25	35	27	29	25	34	36	35	36	26	33	29	36	32
	2'	19	17	21	26	28	19	28	19	27	30	28	28	28	19	27	20

I. plakanın 2 ve 2' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 0,15 μM , substrat konsantrasyonu ise 0,33 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 66 pmol/dak/ml ve 41 pmol/dak/ml'dir.



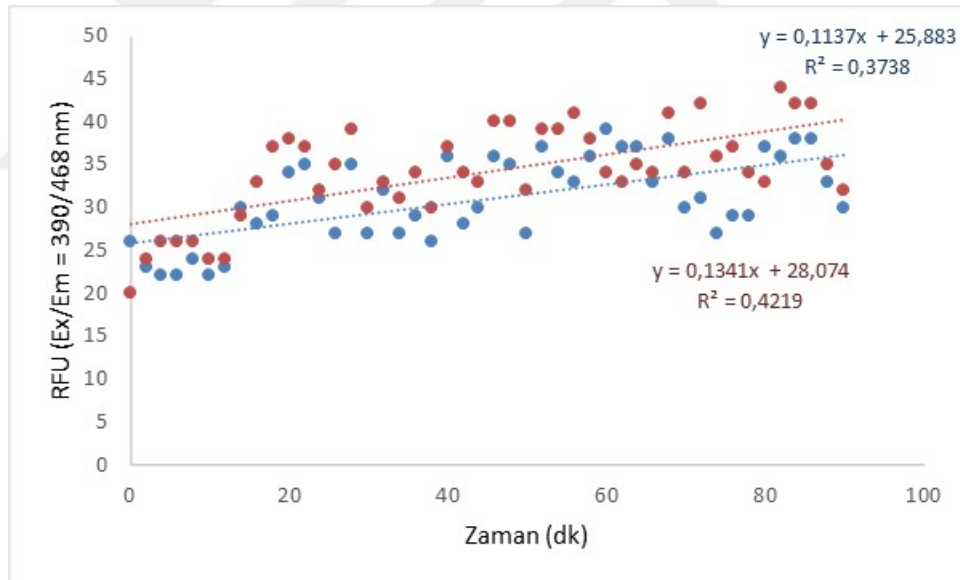
Şekil 3.6: I. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 90 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 6 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.7) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.7).

Tablo 3.7: I. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90
Tüp Numarası	3	26	22	23	29	31	27	29	28	35	34	39	33	31	29	38	30
	3'	20	26	24	37	32	30	34	34	40	39	34	34	42	34	42	32

I. plakanın 3 ve 3' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 0,3 μ M, substrat konsantrasyonu ise 0,66 μ M'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 85 pmol/dak/ml ve 96 pmol/dak/ml'dir.



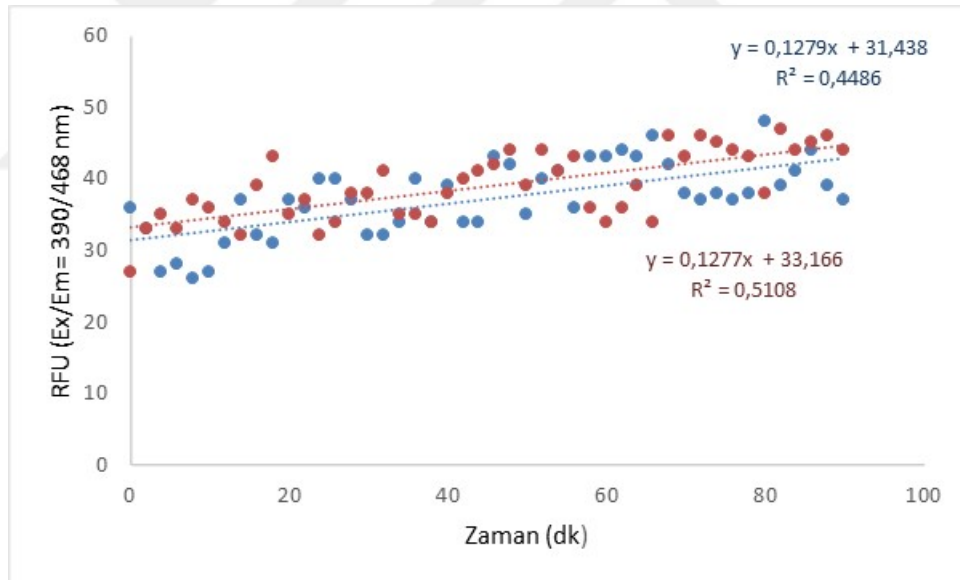
Şekil 3.7: I. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 90 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 6 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.8) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.8).

Tablo 3.8: I. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90
Tüp Numarası	4	36	28	31	31	40	32	40	34	42	41	43	46	37	38	41	37
	4'	27	33	34	43	32	38	35	40	44	41	34	34	46	43	44	44

I. plakanın 4 ve 4' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 0,6 μ M, substrat konsantrasyonu ise 1,33 μ M'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 93 pmol/dak/ml ve 93 pmol/dak/ml'dir.



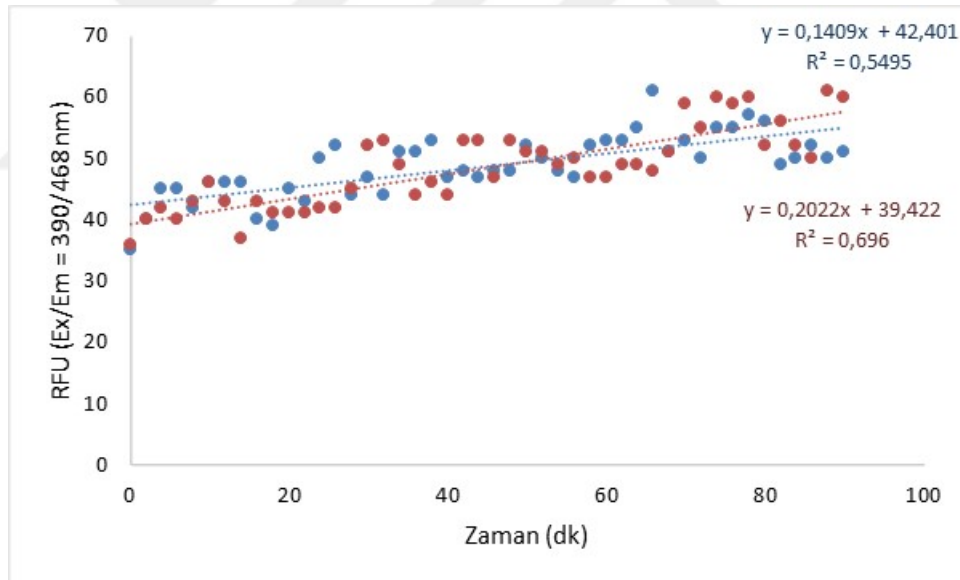
Şekil 3.8: I. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 90 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 6 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.9) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.9).

Tablo 3.9: I. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90
Tüp Numarası	5	35	45	46	39	50	47	51	48	48	48	53	61	50	57	50	51
	5'	36	40	43	41	42	52	44	53	53	49	47	48	55	60	52	60

I. plakanın 5 ve 5' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 1,2 μM , substrat konsantrasyonu ise 2,66 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 100 pmol/dak/ml ve 131 pmol/dak/ml'dir.



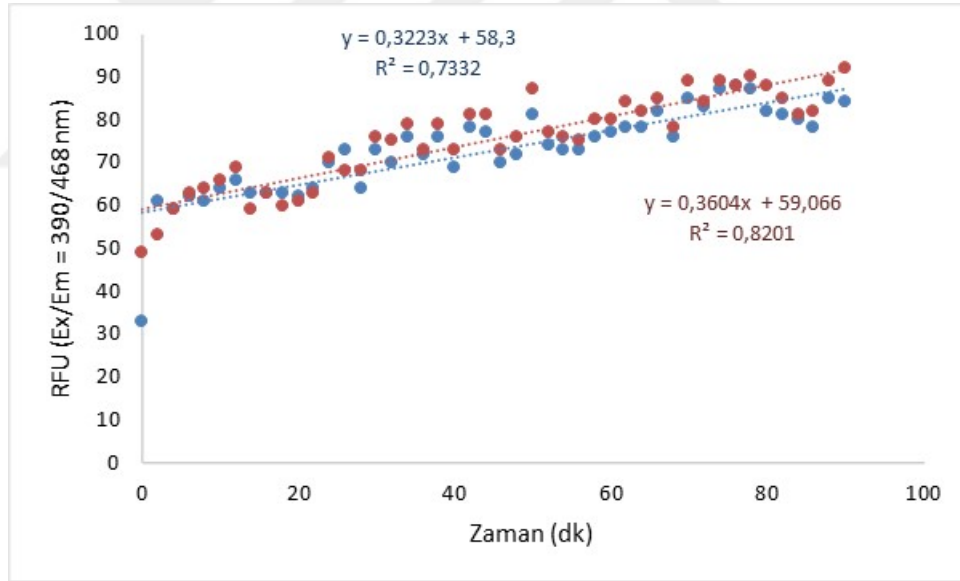
Şekil 3.9: I. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 90 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 6 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.10) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.10).

Tablo 3.10: I. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90
Tüp Numarası	6	33	62	66	63	70	73	72	78	72	73	77	82	83	87	80	84
	6'	49	63	69	60	71	76	73	81	76	76	80	85	84	90	81	92

I. plakanın 6 ve 6' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 1,8 μM , substrat konsantrasyonu ise 4 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 194 pmol/dak/ml ve 214 pmol/dak/ml'dir.



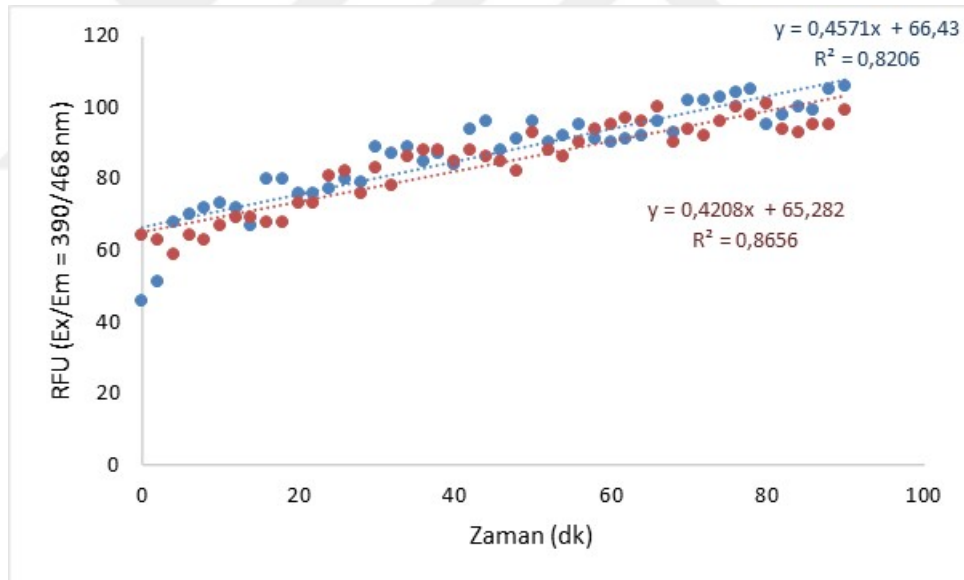
Şekil 3.10: I. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 90 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 6 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.11) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.11).

Tablo 3.11: I. plakanın 7 ve 7' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90
Tüp Numarası	7	46	70	72	80	77	89	85	94	91	92	90	96	102	105	100	106
	7'	64	64	69	68	81	83	88	88	82	86	95	100	92	98	93	99

I. plakanın 7 ve 7' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 2,25 μM , substrat konsantrasyonu ise 5 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 264 pmol/dak/ml ve 245 pmol/dak/ml'dir.



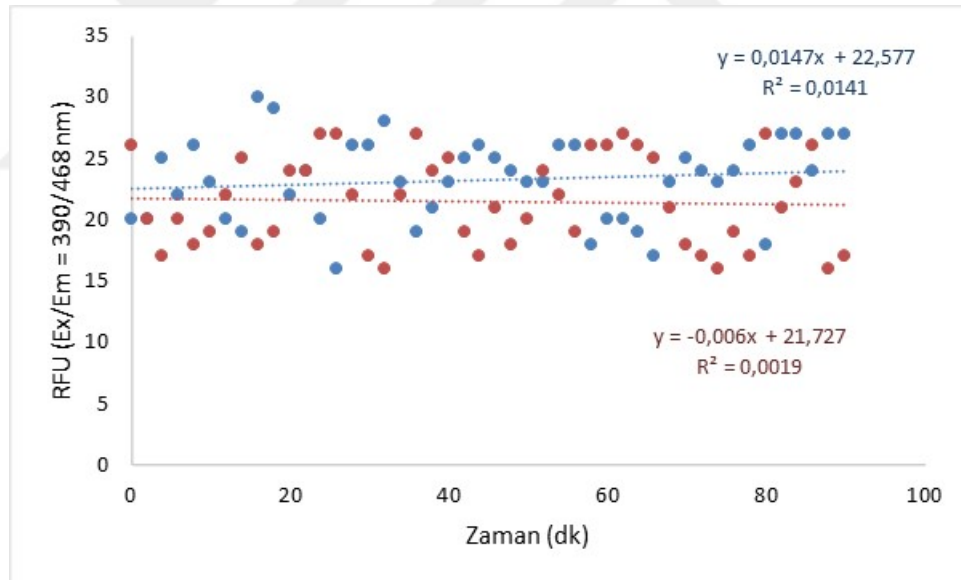
Şekil 3.11: I. plakanın 7 ve 7' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 90 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 6 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.12) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.12).

Tablo 3.12: I. plakanın 8 ve 8' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90	
Tüp Numarası	8	20	22	20	29	20	26	19	25	24	26	20	17	24	26	37	27
	8'	26	20	22	19	27	17	27	19	18	22	26	25	17	17	23	17

I. plakanın 8 ve 8' tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 5 μM ve inhibitör (kinidin) konsantrasyonu 2,5 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 34 pmol/dak/ml ve 29 pmol/dak/ml'dir.



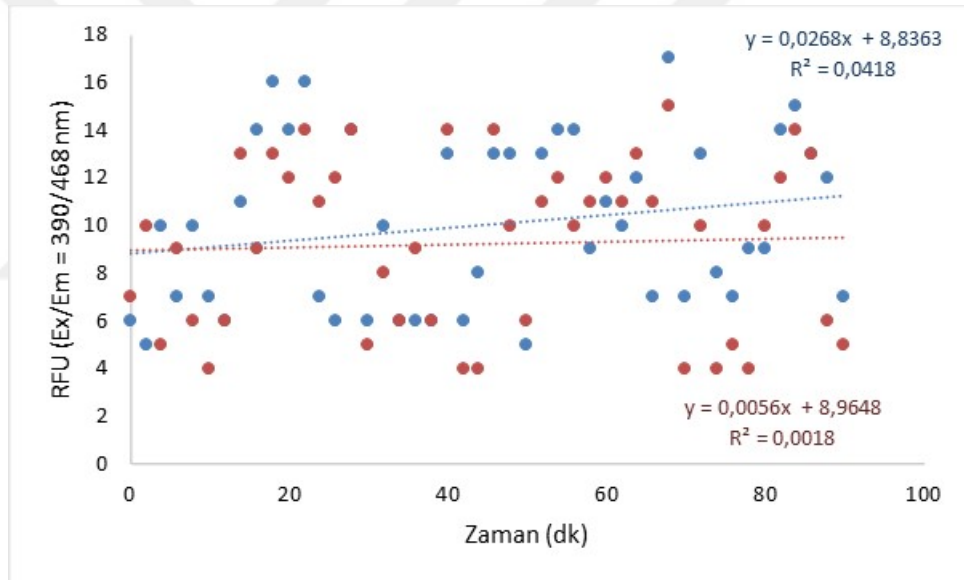
Şekil 3.12: I. plakanın 8 ve 8' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Tablo 3.13: I. plakanın 9 ve 9' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90
Tüp Numarası	9	6	7	6	16	7	6	6	6	13	14	11	7	13	9	15	7
	9'	7	9	6	13	11	5	9	4	10	12	12	11	10	4	14	5

Yapılan 90 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 6 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.13) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.13).

I. plakanın 9 ve 9' tüpleri sadece tahlil tamponu içerir.



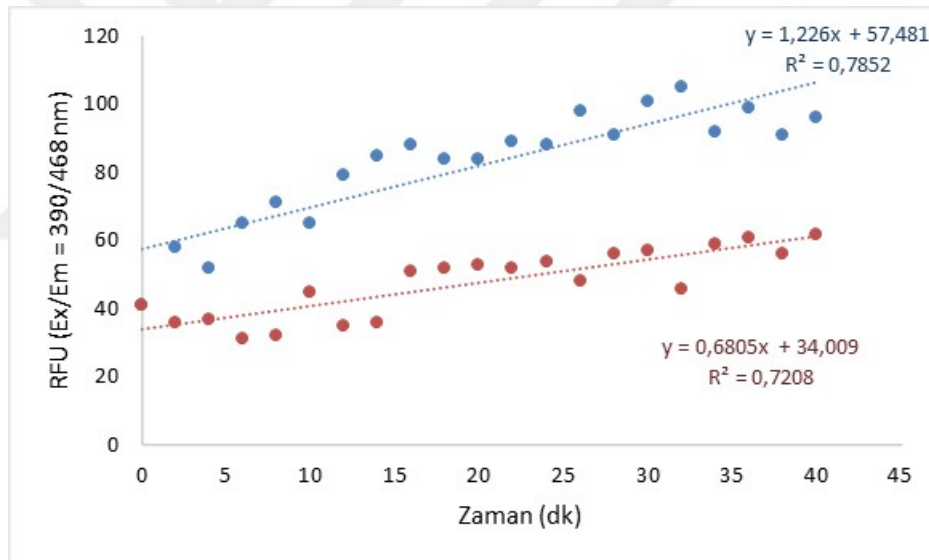
Şekil 3.13: I. plakanın 9 ve 9' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Tablo 2.2’de verilen II. plakanın, 40 dakikalık floresan ölçümünde 2 dakikada bir alınan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.14) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.14).

Tablo 3.14: II. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Tüp Numarası	1	41	58	52	65	71	65	79	85	88	84	84	89	88	98	91	101	105	92	99	91	96
	1'	41	36	37	31	32	45	35	36	51	52	53	52	54	48	56	57	46	59	61	56	62

II. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 5 μM ’dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 664 pmol/dak/ml ve 380 pmol/dak/ml’dir.



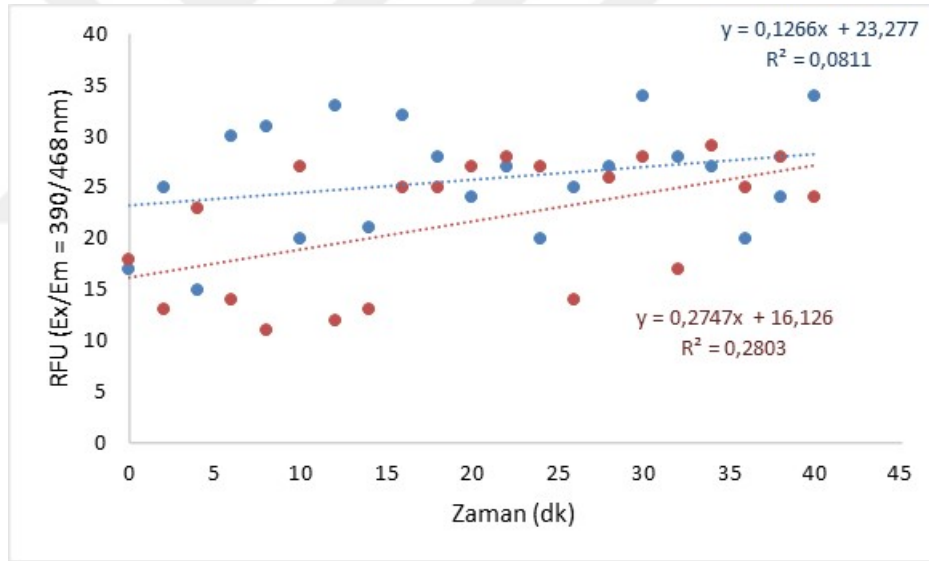
Şekil 3.14: II. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.15) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.15).

Tablo 3.15: II. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	
Tüp Numarası	2	17	25	15	30	31	20	33	21	32	28	24	27	20	25	27	34	28	27	20	24	34
	2'	18	13	23	14	11	27	12	13	25	25	27	28	27	14	26	28	17	29	25	28	24

II. plakanın 2 ve 2' tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 0,66 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 92 pmol/dak/ml ve 169 pmol/dak/ml'dir.



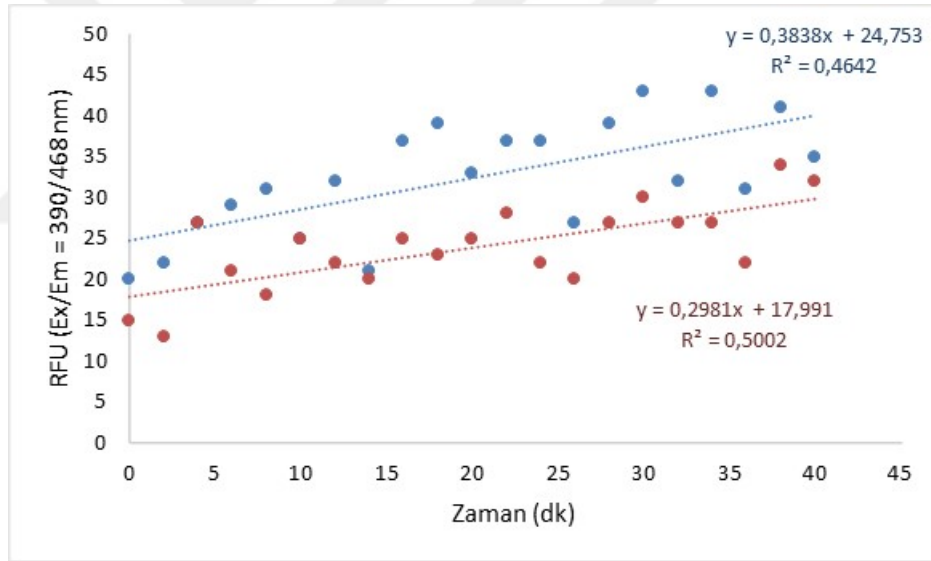
Şekil 3.15: II. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.16) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.16).

Tablo 3.16: II. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Tüp Numarası	3	20	22	27	29	31	25	32	21	37	39	33	37	37	27	39	43	32	43	31	41	35
	3'	15	13	27	21	18	25	22	20	25	23	25	28	22	20	27	30	27	27	22	34	32

II. plakanın 3 ve 3' tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 1,33 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 226 pmol/dak/ml ve 181 pmol/dak/ml'dir.



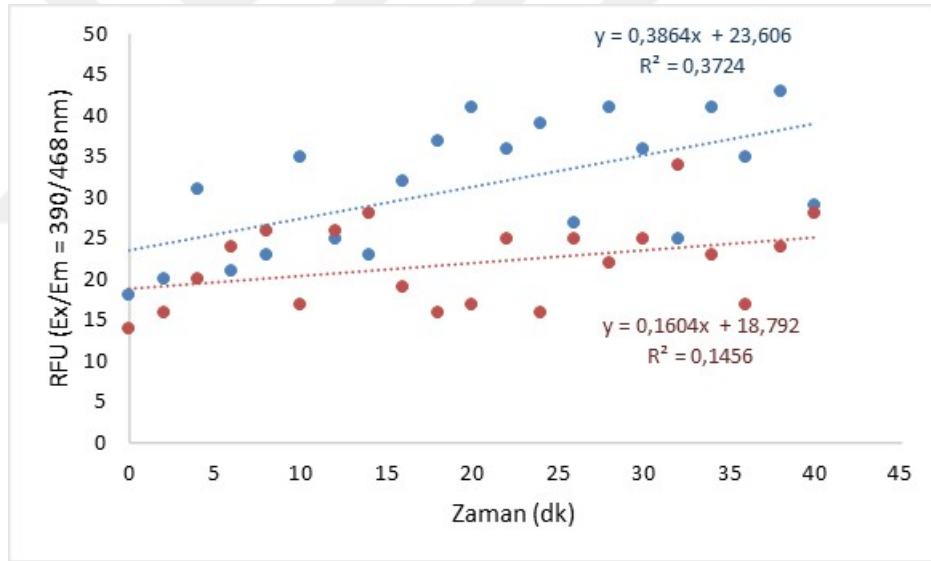
Şekil 3.16: II. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.17) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.17).

Tablo 3.17: II. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	
Tüp Numarası	4	18	20	31	21	23	35	25	23	32	37	41	36	39	27	41	36	25	41	35	43	29
	4'	14	16	20	24	26	17	26	28	19	16	17	25	16	25	22	25	34	23	17	24	28

II. plakanın 4 ve 4' tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 2,66 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 227 pmol/dak/ml ve 110 pmol/dak/ml'dir.



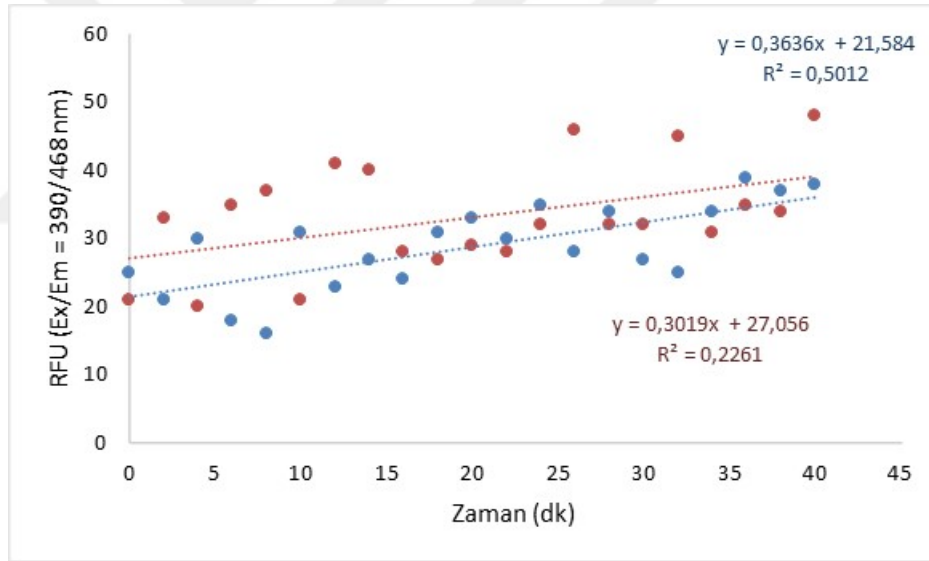
Şekil 3.17: II. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.18) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.18).

Tablo 3.18: II. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	
Tüp Numarası	5	25	21	30	18	16	31	23	27	24	31	33	30	35	28	34	27	25	34	39	37	38
	5'	21	33	20	35	37	21	41	40	28	27	29	28	32	46	32	32	45	31	35	34	48

II. plakanın 5 ve 5' tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 4 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 215 pmol/dak/ml ve 183 pmol/dak/ml'dir.



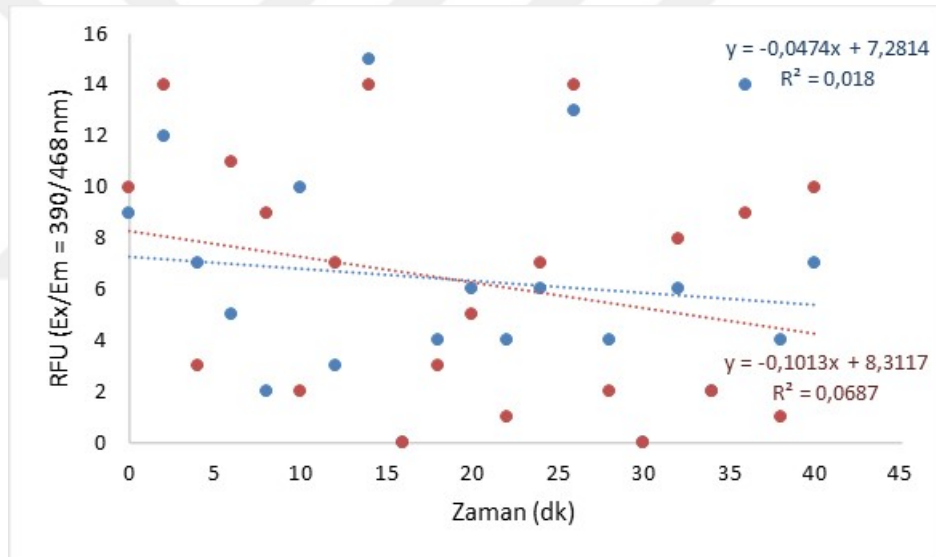
Şekil 3.18: II. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Tablo 3.19: II. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Tüp Numarası	6	9	12	7	5	2	10	3	15	0	4	6	4	6	13	4	0	6	2	14	4	7
	6'	10	14	3	11	9	2	7	14	0	3	5	1	7	14	2	0	8	2	9	1	10

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.19) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.19).

II. plakanın 6 ve 6' tüpleri sadece tahlil tamponu içermektedir.



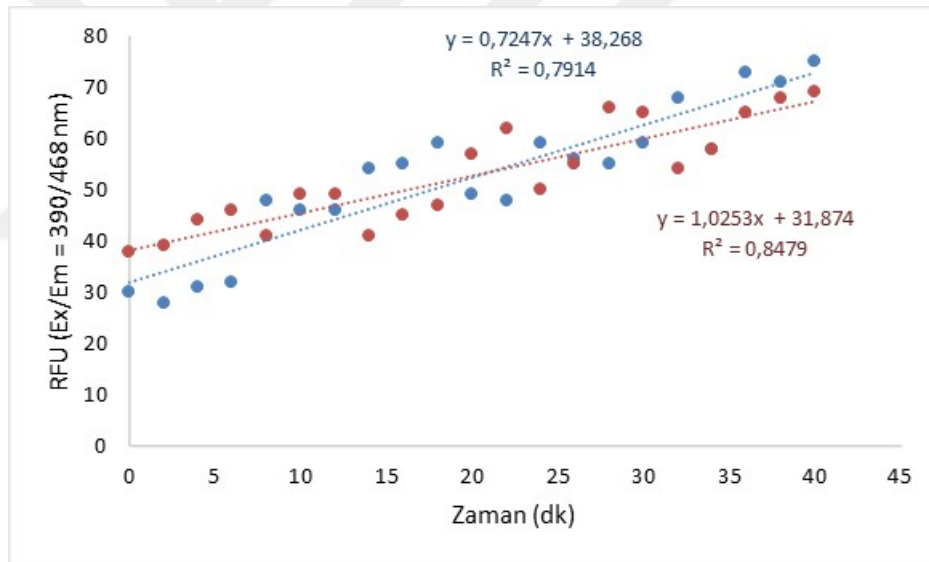
Şekil 3.19: II. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Tablo 2.3'te verilen III. plakanın, 40 dakikalık floresan ölçümünde 2 dakikada bir alınan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.20) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.20).

Tablo 3.20: III. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Tüp Numarası	1	30	28	31	32	48	46	46	54	55	59	49	48	59	56	55	59	68	58	73	71	75
	1'	38	39	44	46	41	49	49	41	45	47	57	62	50	55	66	65	54	58	65	68	69

III. plakanın 1 ve 1' tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 5 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 403 pmol/dak/ml ve 560 pmol/dak/ml'dir.



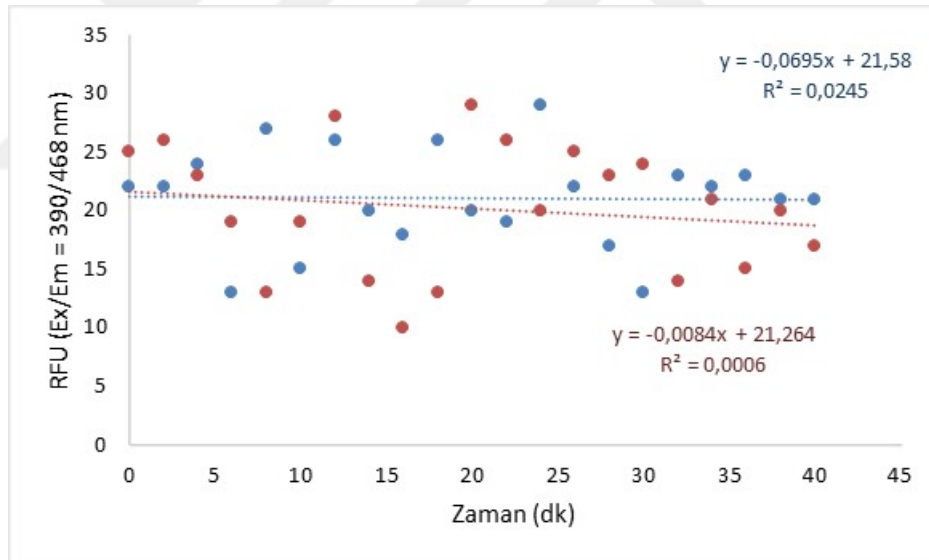
Şekil 3.20: III. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.21) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.21).

Tablo 3.21: III. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Tüp Numarası	2	22	22	24	13	27	15	26	20	18	26	20	19	29	22	17	13	23	22	23	21	21
	2'	25	26	23	19	13	19	28	14	10	13	29	26	20	25	23	24	14	21	15	20	17

III. plakanın 2 ve 2' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 0,3 μ M, substrat konsantrasyonu ise 0,66 μ M'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 62 pmol/dak/ml ve 31 pmol/dak/ml'dir.



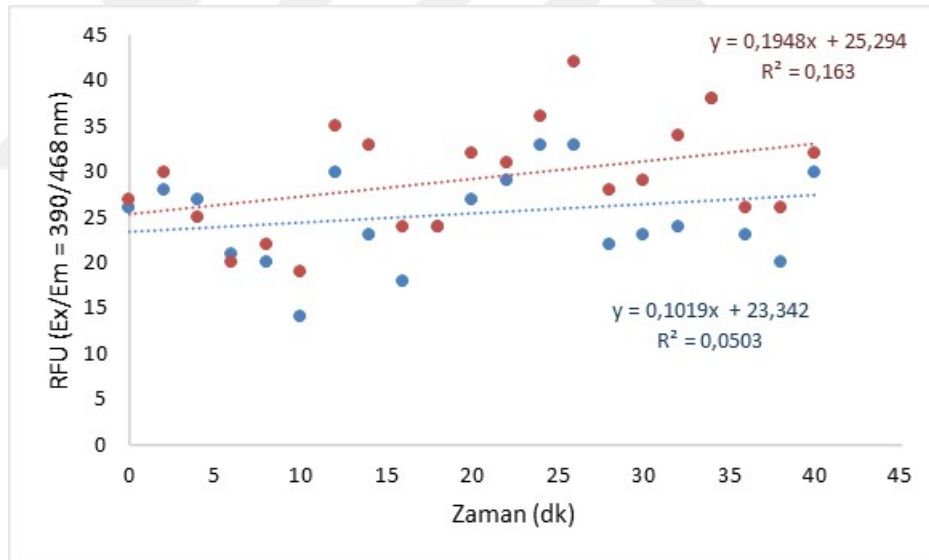
Şekil 3.21: III. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.22) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.22).

Tablo 3.22: III. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Tüp Numarası	3	26	28	27	21	20	14	30	23	18	24	27	29	33	33	22	23	24	38	23	20	30
	3'	27	30	25	20	22	19	35	33	24	24	32	31	36	42	28	29	34	38	26	26	32

III. plakanın 3 ve 3' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 0,6 μM , substrat konsantrasyonu ise 1,33 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 128 pmol/dak/ml ve 79 pmol/dak/ml'dir.



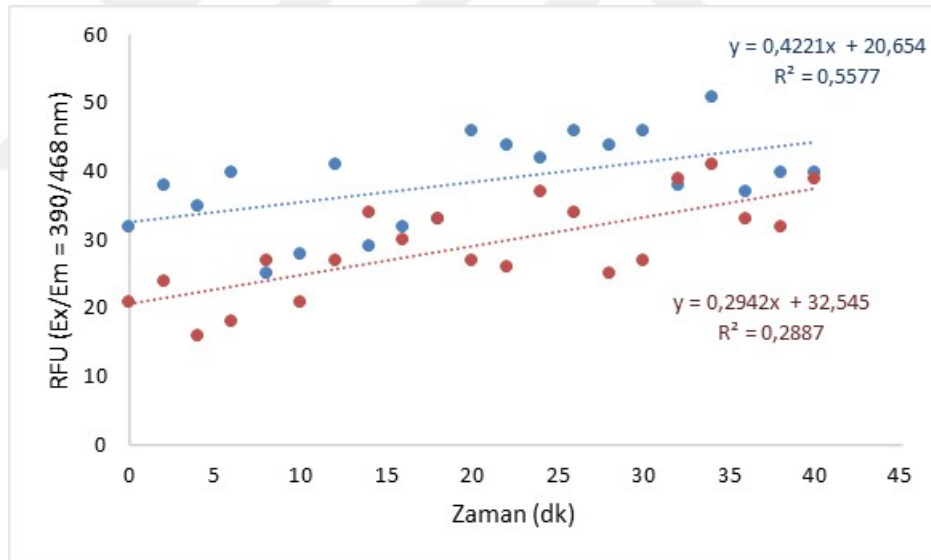
Şekil 3.22: III. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.23) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.23).

Tablo 3.23: III. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Tüp Numarası	4	32	38	35	40	25	28	41	29	32	33	46	44	42	46	44	46	51	37	40	40	
	4'	21	24	16	18	27	21	27	34	30	33	27	26	37	34	25	27	39	41	33	32	39

III. plakanın 4 ve 4' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 1,2 μM , substrat konsantrasyonu ise 2,66 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 246 pmol/dak/ml ve 179 pmol/dak/ml'dir.



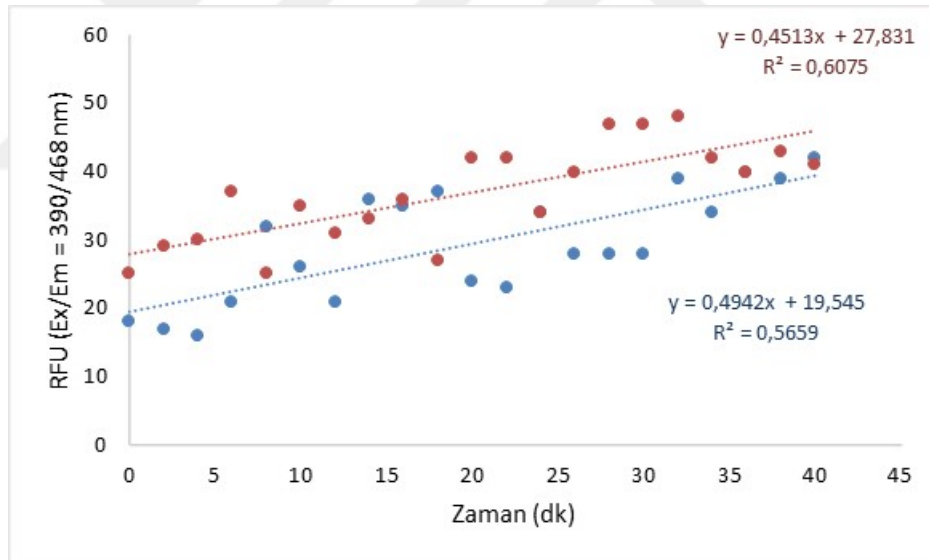
Şekil 3.23: III. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.24) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.24).

Tablo 3.24: III. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Tüp Numarası	5	18	17	16	21	32	26	21	36	35	37	24	23	34	28	28	28	39	34	40	39	42
	5'	25	29	30	37	25	35	31	33	36	27	42	42	34	40	47	47	48	42	40	43	41

III. plakanın 5 ve 5' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 1,8 μM , substrat konsantrasyonu ise 4 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 261 pmol/dak/ml ve 283 pmol/dak/ml'dir.



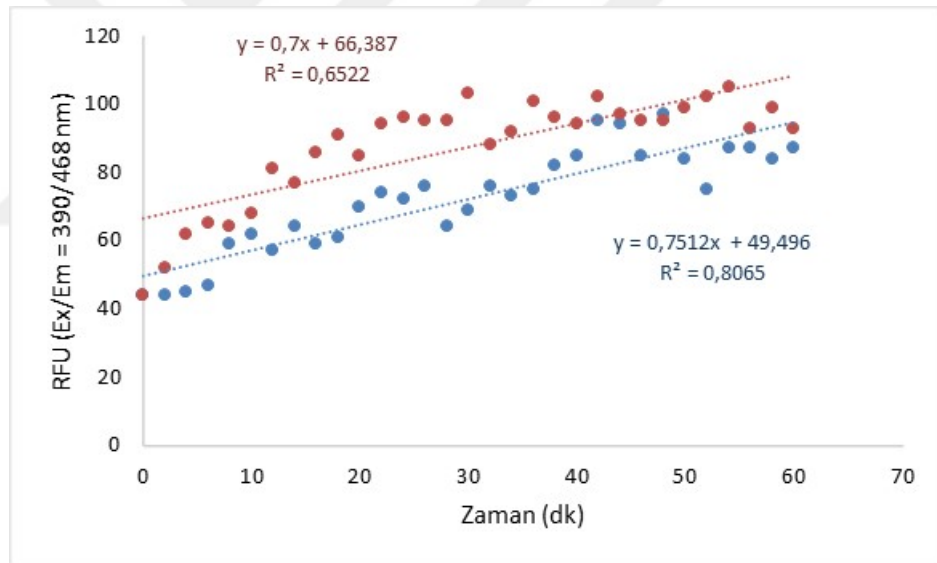
Şekil 3.24: III. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Tablo 2.4'te içeriği verilen IV. plakanın, yapılan ölçümünde 60 dakika boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.25) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.25).

Tablo 3.25: IV. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası																
1	44	45	59	57	59	70	72	64	76	75	85	94	97	75	87	87
1'	44	62	64	81	86	85	96	95	88	101	94	97	95	102	93	93

IV. plakanın 1 ve 1' tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 5 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 390 pmol/dak/ml ve 416 pmol/dak/ml'dir.



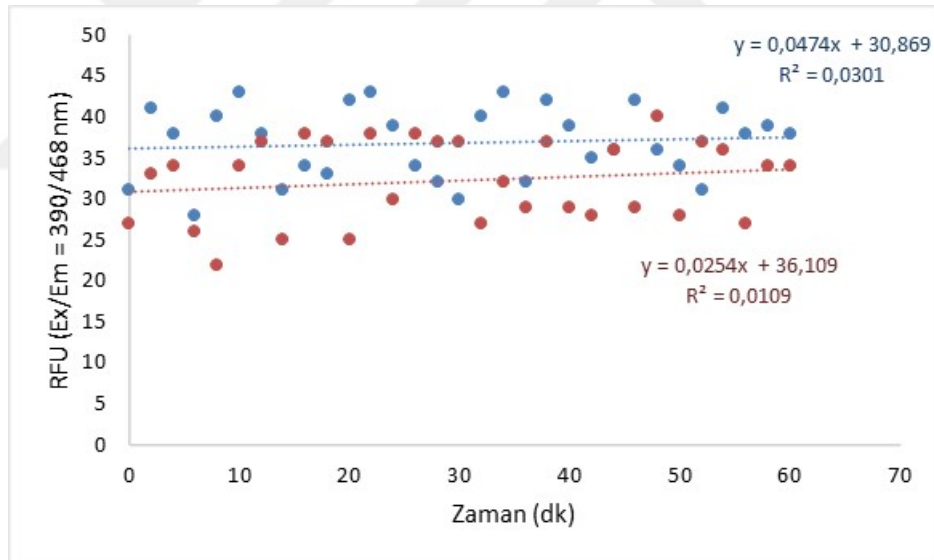
Şekil 3.25: IV. plakanın 1 ve 1' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.26) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.26).

Tablo 3.26: IV. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası	2	31	38	40	38	34	42	39	32	40	32	39	36	36	31	38	38
	2'	27	34	22	37	38	25	30	37	27	29	29	36	40	37	27	34

IV. plakanın 2 ve 2' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 0,3 μ M, substrat konsantrasyonu ise 0,66 μ M'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 51 pmol/dak/ml ve 40 pmol/dak/ml'dir.



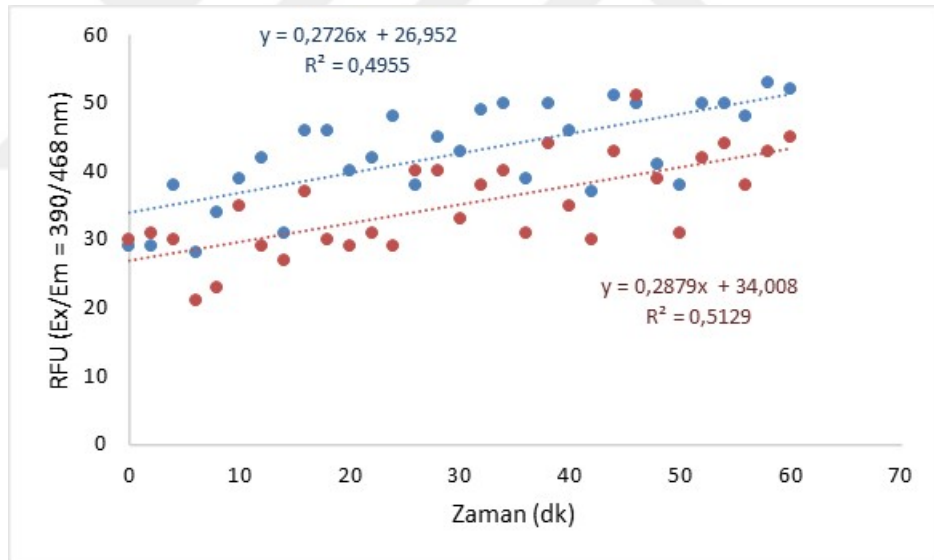
Şekil 3.26: IV. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.27) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.27).

Tablo 3.27: IV. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası	3	29	38	34	42	46	40	48	45	49	39	46	51	41	50	48	52
	3'	30	30	23	29	37	29	29	40	38	31	35	43	39	42	38	45

IV. plakanın 3 ve 3' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 0,6 μM , substrat konsantrasyonu ise 1,33 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 168 pmol/dak/ml ve 176 pmol/dak/ml'dir.



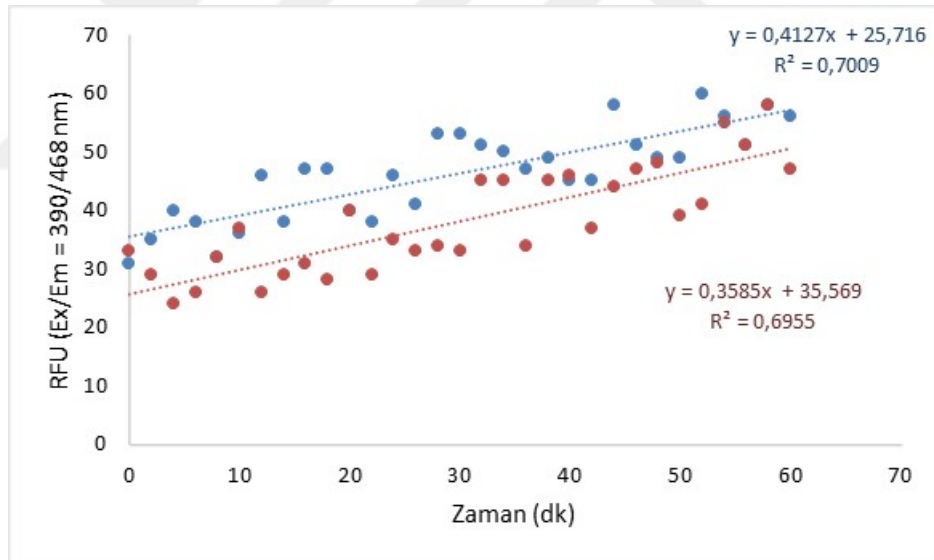
Şekil 3.27: IV. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.28) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.28).

Tablo 3.28: IV. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası	4	31	40	32	46	47	40	46	53	51	47	45	58	49	60	61	66
	4'	33	24	32	26	31	40	35	34	45	34	46	44	48	41	51	47

IV. plakanın 4 ve 4' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 1,2 μM , substrat konsantrasyonu ise 2,66 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 241 pmol/dak/ml ve 213 pmol/dak/ml'dir.



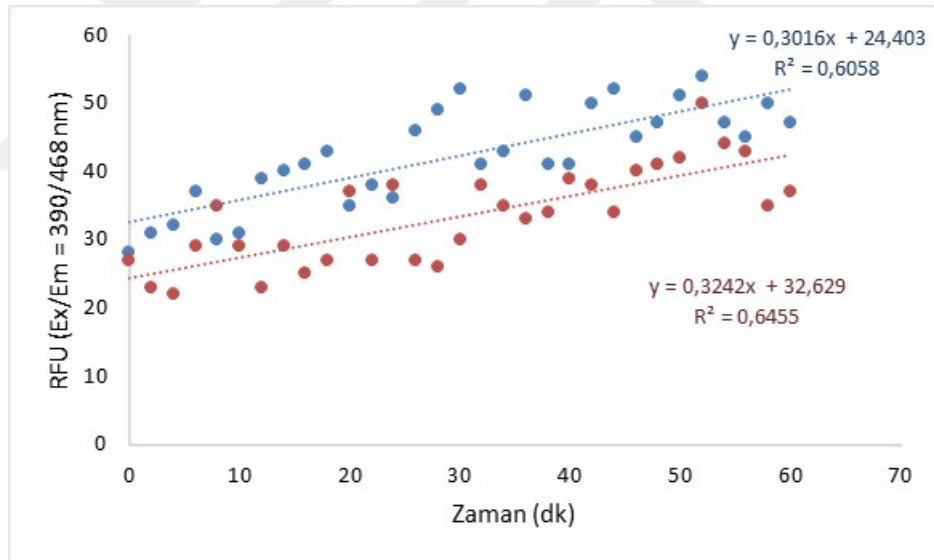
Şekil 3.28: IV. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.29) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.29).

Tablo 3.29: IV. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası	5	28	32	30	39	41	35	36	49	41	51	41	52	47	54	45	47
	5'	27	22	35	23	25	37	38	26	38	33	39	34	41	50	43	37

IV. plakanın 5 ve 5' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 1,8 μM , substrat konsantrasyonu ise 4 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 183 pmol/dak/ml ve 195 pmol/dak/ml'dir.



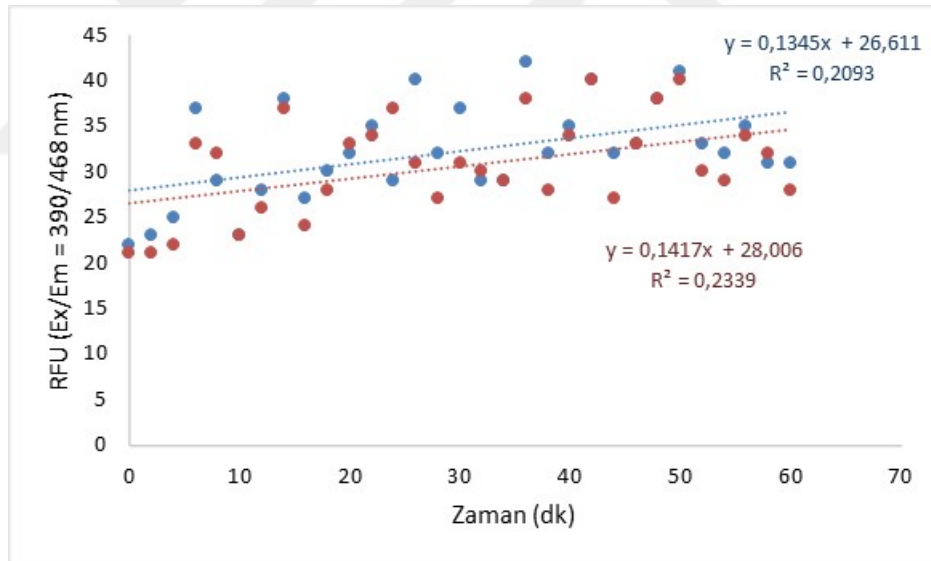
Şekil 3.29: IV. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.30) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.30).

Tablo 3.30: IV. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası	6	22	25	29	28	27	32	29	32	29	42	35	32	38	33	35	31
	6'	21	22	32	26	24	33	37	27	30	38	34	27	38	30	34	28

IV. plakanın 6 ve 6' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 2,25 μ M, substrat konsantrasyonu ise 5 μ M'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 96 pmol/dak/ml ve 100 pmol/dak/ml'dir.



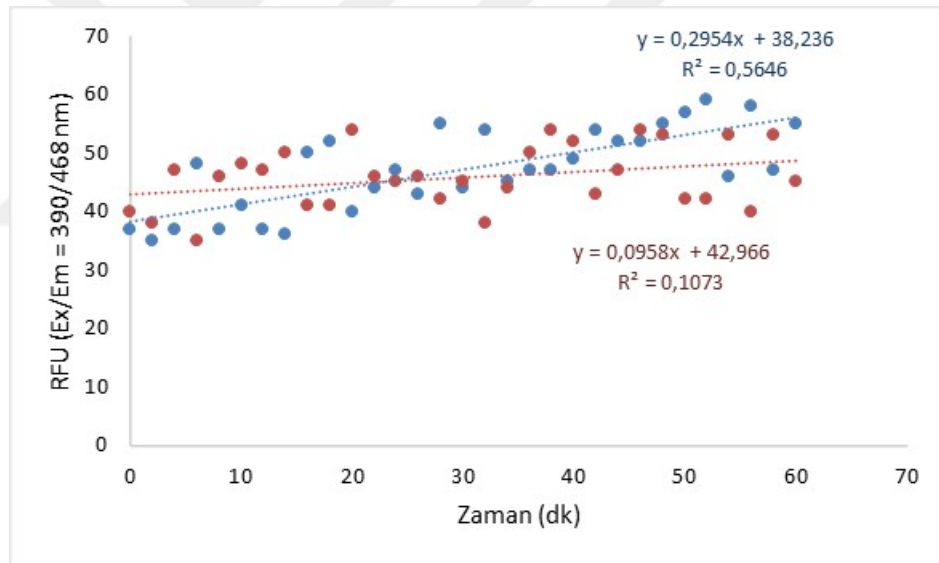
Şekil 3.30: IV. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Tablo 2.5’te içeriği verilen V. plakanın, yapılan ölçümünde 60 dakika boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.31) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.31).

Tablo 3.31: V. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası																
1	37	37	37	37	50	40	47	55	54	47	49	52	55	59	58	55
1'	40	47	46	47	41	54	45	42	38	50	52	47	53	42	40	45

V. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 5 μM ’dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 177 pmol/dak/ml ve 76 pmol/dak/ml’dir.



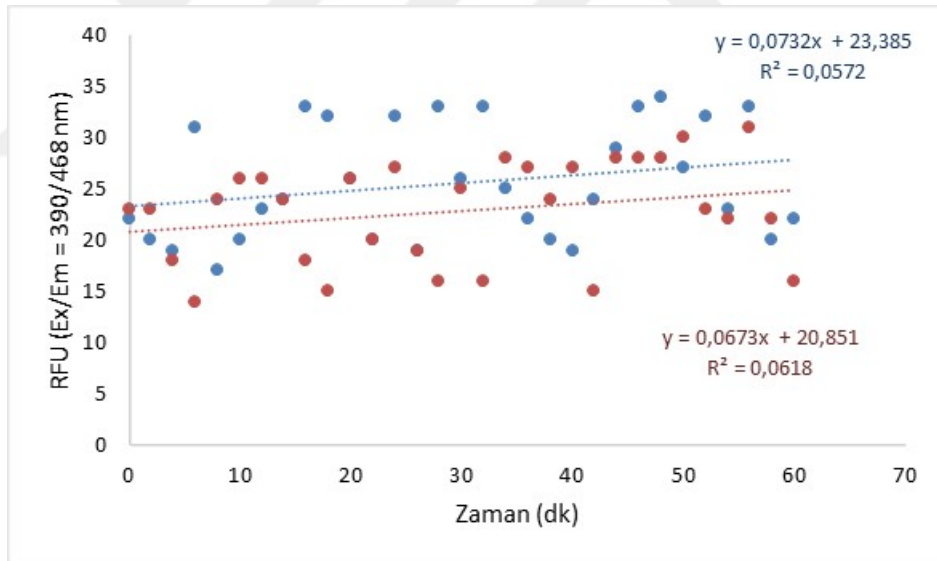
Şekil 3.31: V. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.32) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.32).

Tablo 3.32: V. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası	2	22	19	17	23	33	26	32	33	33	22	19	29	34	32	33	22
	2'	23	18	24	26	18	26	27	16	16	27	27	28	28	23	31	16

V. plakanın 2 ve 2' tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 0,66 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 64 pmol/dak/ml ve 61 pmol/dak/ml'dir.



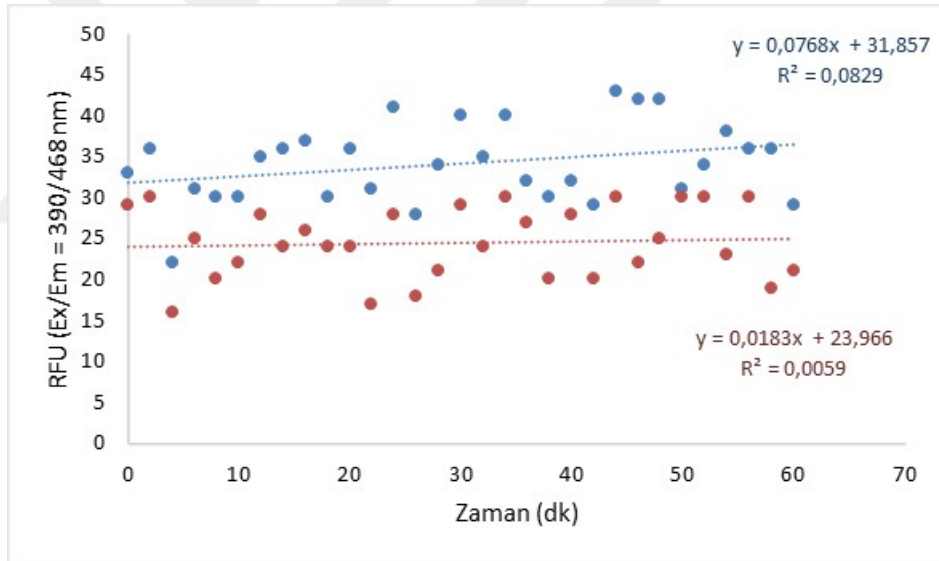
Şekil 3.32: V. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.33) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.33).

Tablo 3.33: V. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası	3	33	22	30	35	37	36	41	34	35	32	32	43	42	34	36	29
	3'	29	16	20	28	26	24	28	21	24	27	28	30	25	30	30	21

V. plakanın 3 ve 3' tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 1,33 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 66 pmol/dak/ml ve 69 pmol/dak/ml'dir.



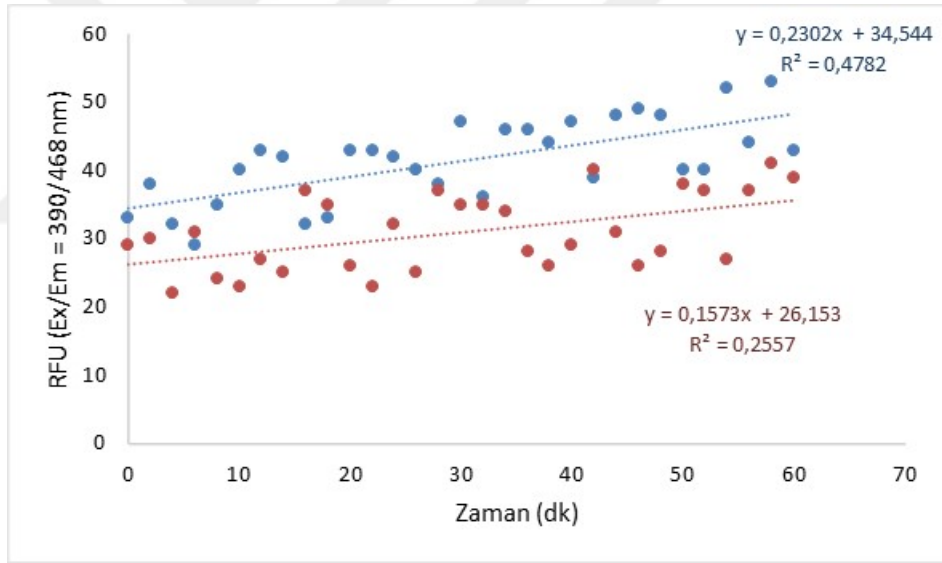
Şekil 3.33: V. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.34) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.34).

Tablo 3.34: V. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası																
4	33	32	35	43	32	43	42	38	36	46	47	48	48	40	44	43
4'	29	22	24	27	37	26	32	37	35	28	29	31	28	37	37	39

V. plakanın 4 ve 4' tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 2,66 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 146 pmol/dak/ml ve 108 pmol/dak/ml'dir.



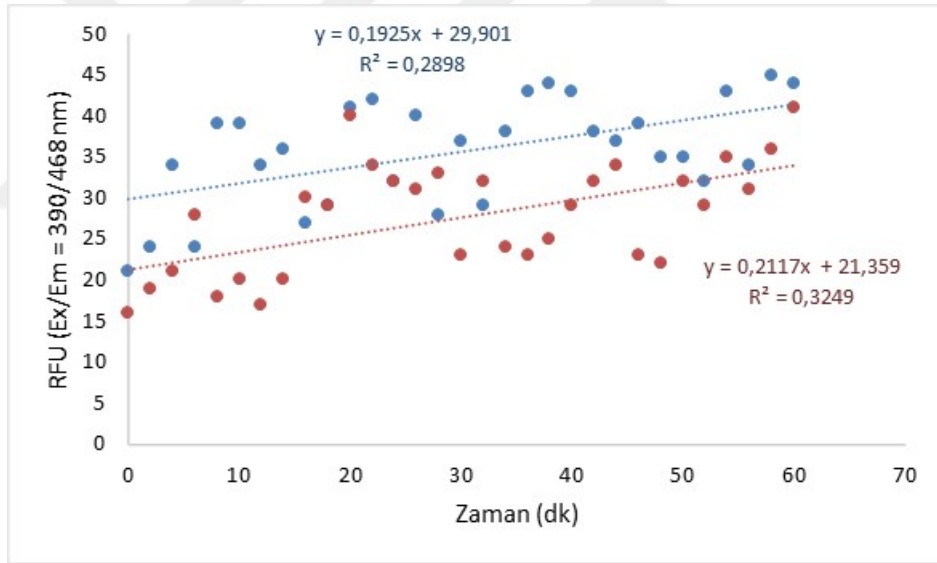
Şekil 3.34: V. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.35) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.35).

Tablo 3.35: V. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası	5	21	34	39	34	27	41	32	28	29	43	43	37	35	32	34	44
	5'	16	21	18	17	30	40	32	33	32	23	29	34	22	29	31	41

V. plakanın 5 ve 5' tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 4 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 136 pmol/dak/ml ve 126 pmol/dak/ml'dir.



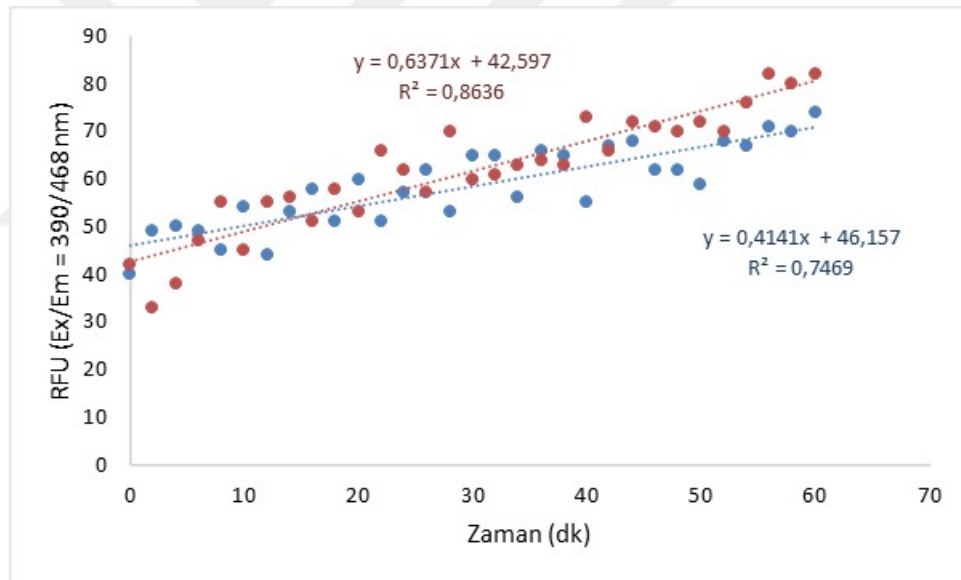
Şekil 3.35: V. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Tablo 2.6’da içeriği verilen VI. plakanın, yapılan ölçümünde 60 dakika boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.36) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.36).

Tablo 3.36: VI. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası	1	40	50	45	44	58	60	57	53	65	66	55	68	62	68	71	74
	1'	42	38	55	55	51	53	62	70	61	64	73	72	70	70	82	82

VI. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 5 μM ’dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 358 pmol/dak/ml ve 242 pmol/dak/ml’dir.



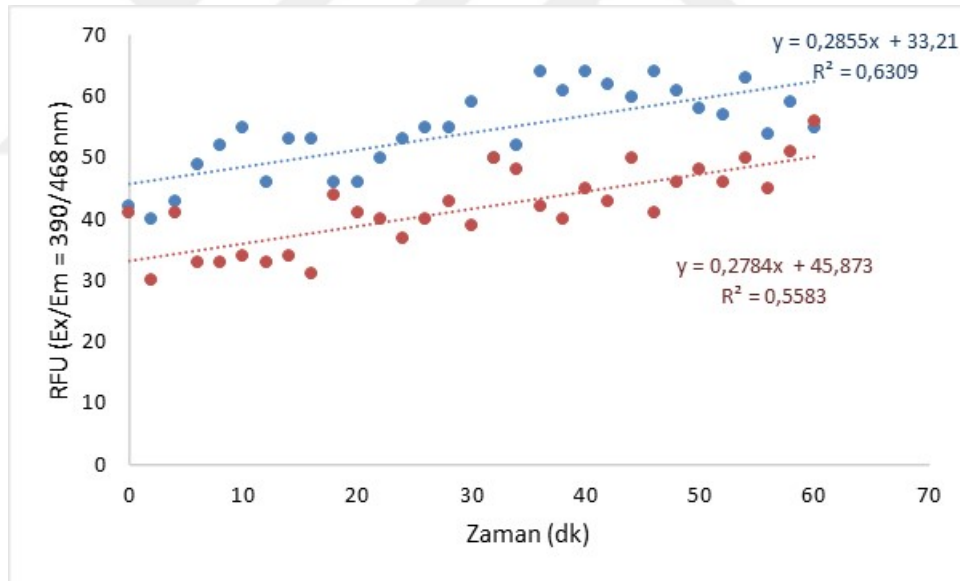
Şekil 3.36: VI. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.37) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.37).

Tablo 3.37: VI. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası	2	42	43	52	46	53	46	53	55	50	64	64	60	61	57	54	55
	2'	41	41	33	33	31	41	37	43	50	42	45	50	46	46	45	56

VI. plakanın 2 ve 2' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 0,3 μ M, substrat konsantrasyonu ise 0,66 μ M'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 96 pmol/dak/ml ve 100 pmol/dak/ml'dir.



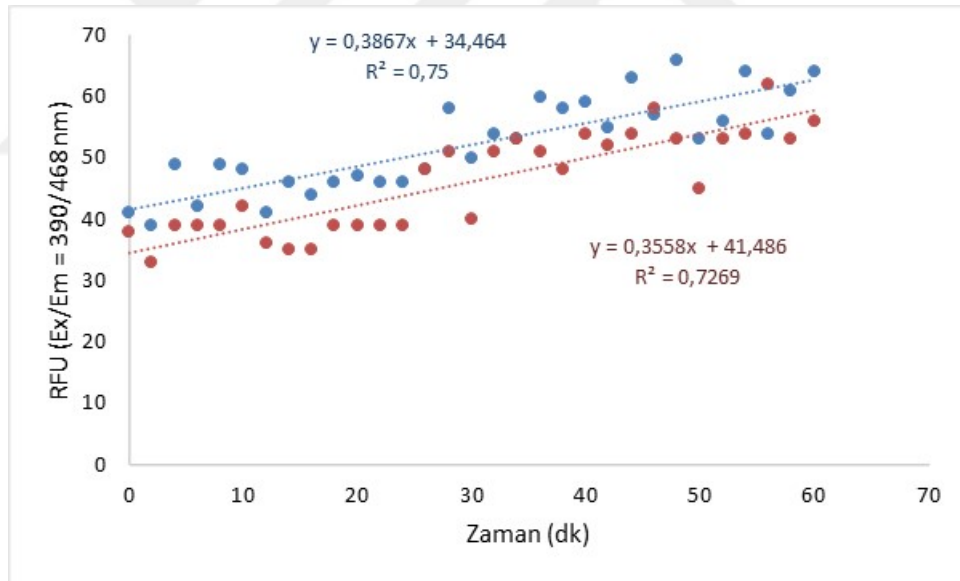
Şekil 3.37: VI. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.38) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.38).

Tablo 3.38: VI. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası	3	41	49	49	41	44	47	46	58	54	60	59	63	66	56	54	64
	3'	38	39	39	36	35	39	39	51	51	51	54	54	53	53	62	56

VI. plakanın 3 ve 3' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 0,6 μ M, substrat konsantrasyonu ise 1,33 μ M'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 228 pmol/dak/ml ve 212 pmol/dak/ml'dir.



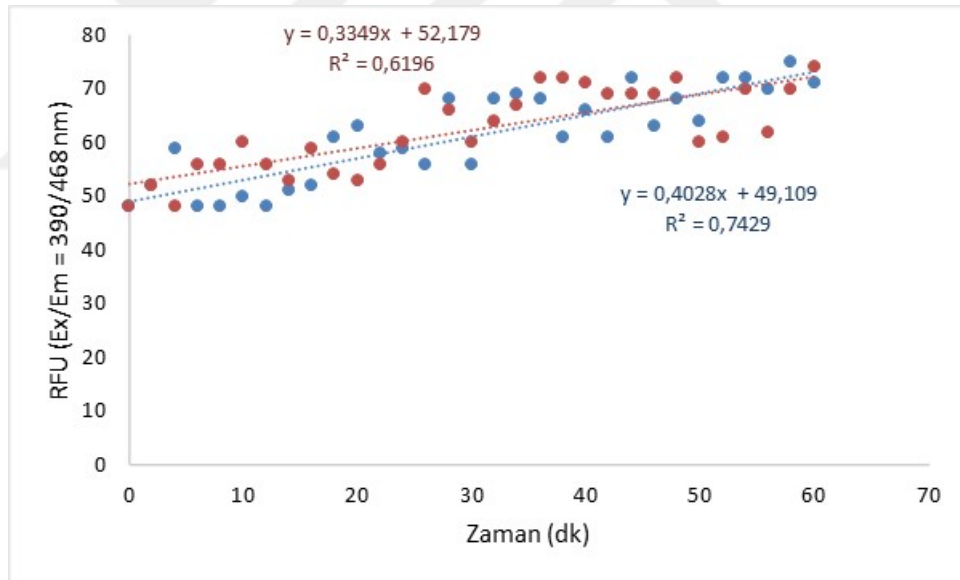
Şekil 3.38: VI. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.39) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.39).

Tablo 3.39: VI. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası																
4	40	59	48	48	52	63	59	68	68	68	66	72	68	72	70	71
4'	40	48	56	56	59	53	60	66	64	72	71	69	72	61	62	74

VI. plakanın 4 ve 4' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 1,2 μM , substrat konsantrasyonu ise 2,66 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 201 pmol/dak/ml ve 236 pmol/dak/ml'dir.



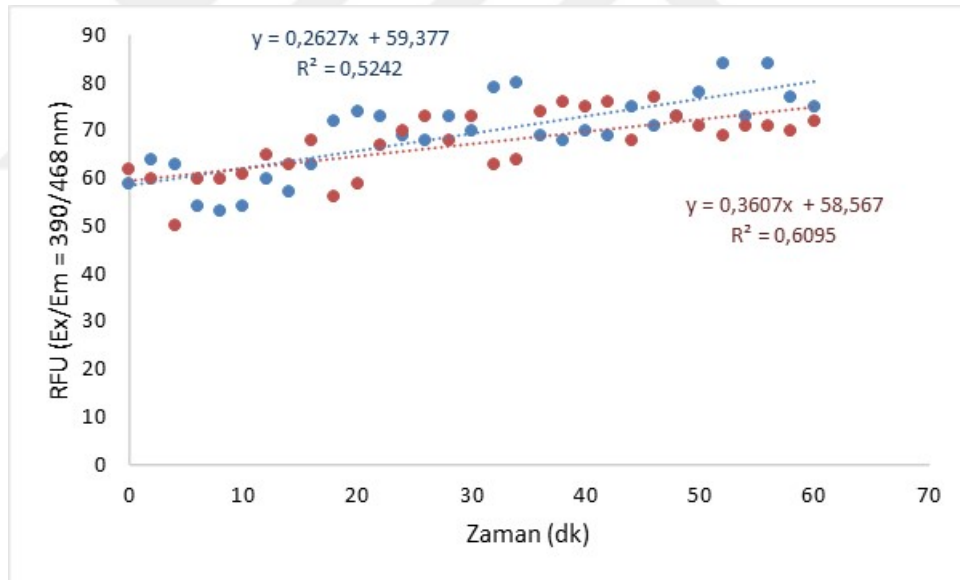
Şekil 3.39: VI. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.40) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.40).

Tablo 3.40: VI. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası	5	59	63	53	60	63	74	69	73	79	69	70	75	73	84	74	75
	5'	62	50	60	65	68	59	70	68	63	74	75	68	73	69	71	72

VI. plakanın 5 ve 5' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 1,8 μM , substrat konsantrasyonu ise 4 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 163 pmol/dak/ml ve 214 pmol/dak/ml'dir.



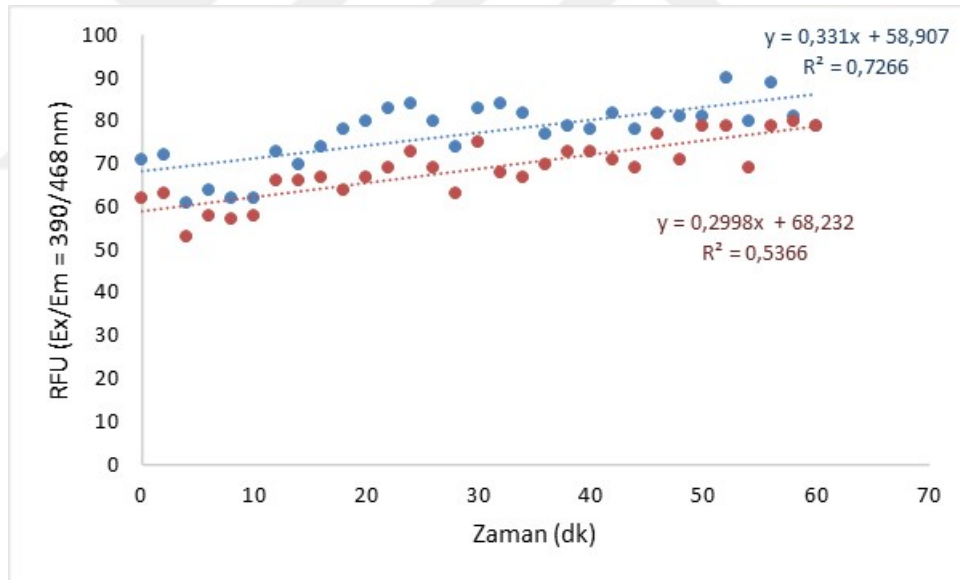
Şekil 3.40: VI. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.41) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.41).

Tablo 3.41: VI. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası	6	71	61	62	73	74	80	84	74	84	77	78	78	81	90	89	79
	6'	62	53	57	66	67	67	73	63	68	70	73	69	71	79	79	79

VI. plakanın 6 ve 6' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 2,25 μM , substrat konsantrasyonu ise 5 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 189 pmol/dak/ml ve 183 pmol/dak/ml'dir.



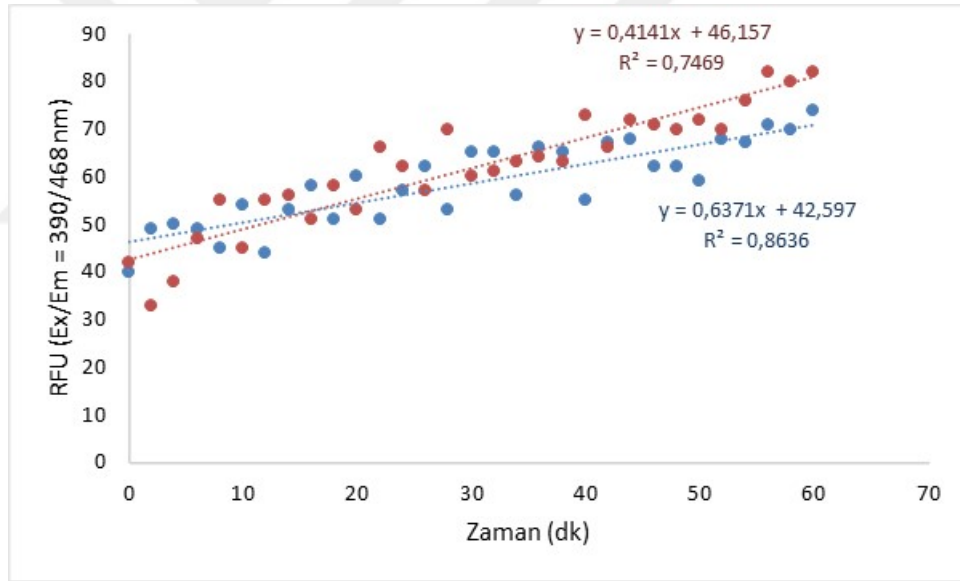
Şekil 3.41: VI. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Tablo 2.7’de içeriği verilen VII. plakanın, yapılan ölçümünde 60 dakika boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.42) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.42).

Tablo 3.42: VII. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası 1	40	50	45	44	58	60	57	53	65	66	55	68	62	68	71	74
Tüp Numarası 1'	42	38	55	55	51	53	62	70	61	64	73	72	70	70	82	82

VII. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 5 μM ’dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 242 pmol/dak/ml ve 358 pmol/dak/ml’dir.



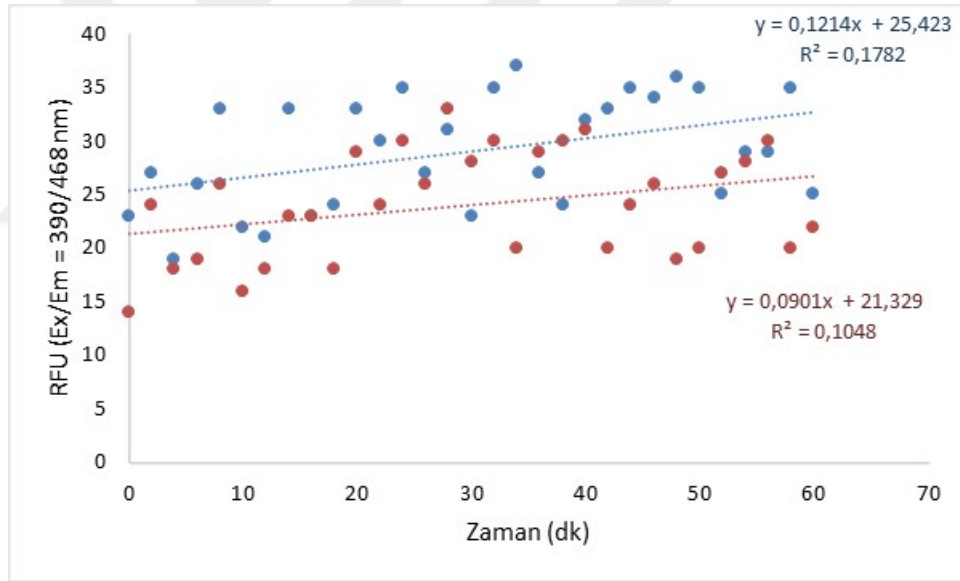
Şekil 3.42: VII. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.43) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.43).

Tablo 3.43: VII. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası	2	23	19	33	21	23	33	35	31	35	27	32	35	36	25	29	25
	2'	14	18	26	18	23	29	30	33	30	29	31	24	19	27	30	22

VII. plakanın 2 ve 2' tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 0,66 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 90 pmol/dak/ml ve 73 pmol/dak/ml'dir.



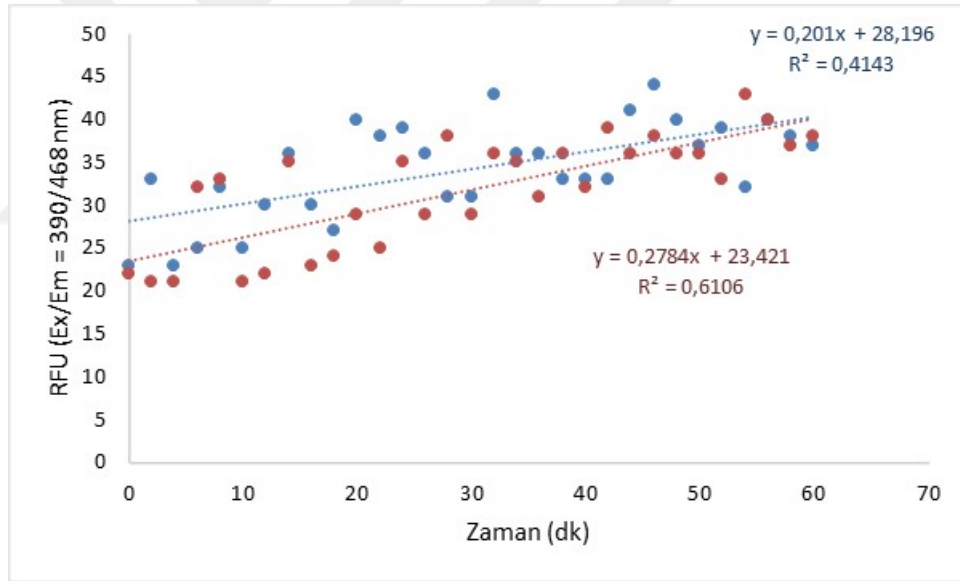
Şekil 3.43: VII. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.44) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.44).

Tablo 3.44: VII. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası	3	23	23	32	30	30	40	39	31	43	36	33	41	40	39	40	37
	3'	22	21	33	22	23	29	35	38	36	31	32	36	36	33	40	38

VII. plakanın 3 ve 3' tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 1,33 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 131 pmol/dak/ml ve 171 pmol/dak/ml'dir.



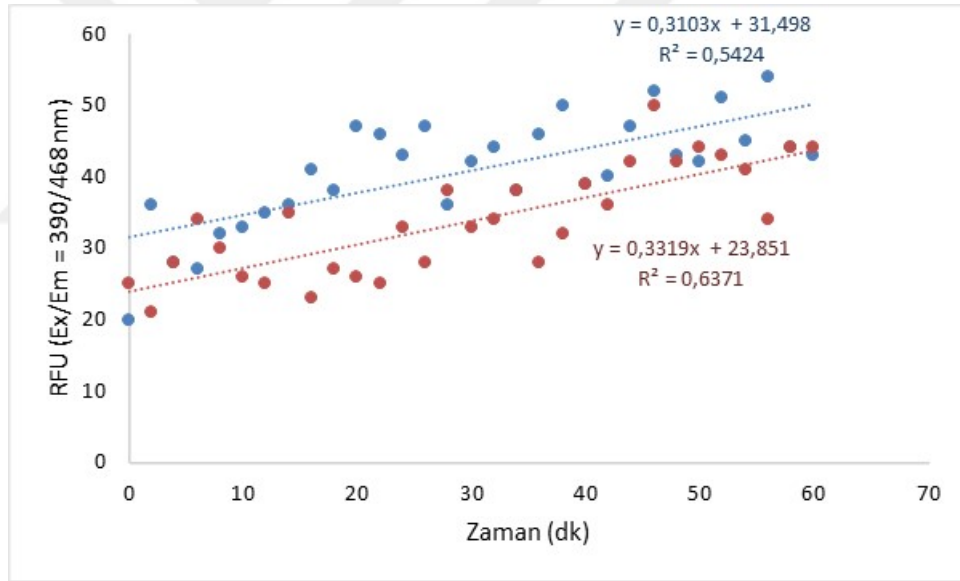
Şekil 3.44: VII. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.45) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.45).

Tablo 3.45: VII. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası																
4	20	28	32	35	41	47	43	36	44	46	39	47	43	51	54	43
4'	25	28	30	25	23	26	33	38	34	28	39	42	42	43	34	44

VII. plakanın 4 ve 4' tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 2,66 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 188 pmol/dak/ml ve 199 pmol/dak/ml'dir.



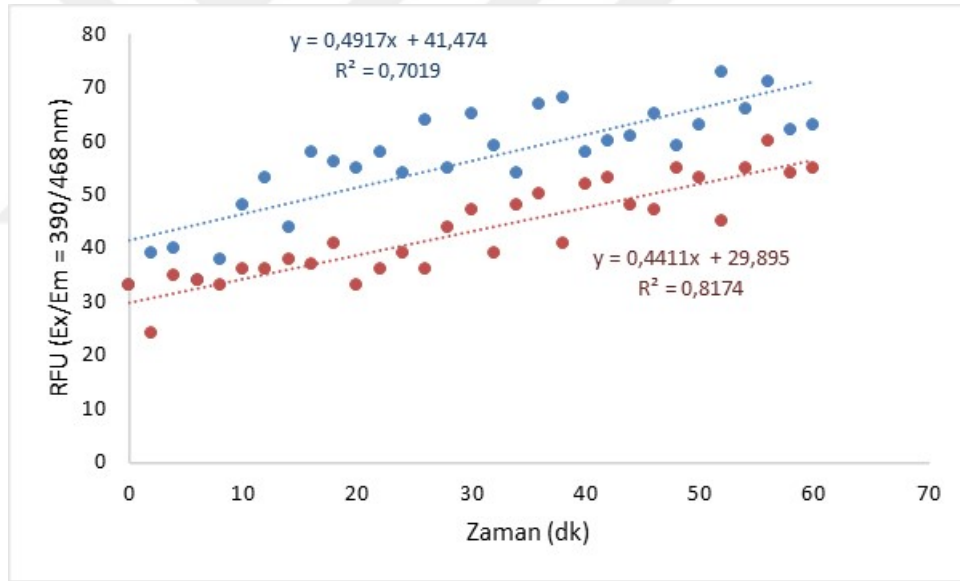
Şekil 3.45: VII. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.46) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.46).

Tablo 3.46: VII. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası	5	33	40	38	53	58	55	54	55	59	67	58	61	59	73	71	63
	5'	33	35	33	36	37	33	39	44	39	50	52	48	55	45	60	55

VII. plakanın 5 ve 5' tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 4 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 282 pmol/dak/ml ve 256 pmol/dak/ml'dir.



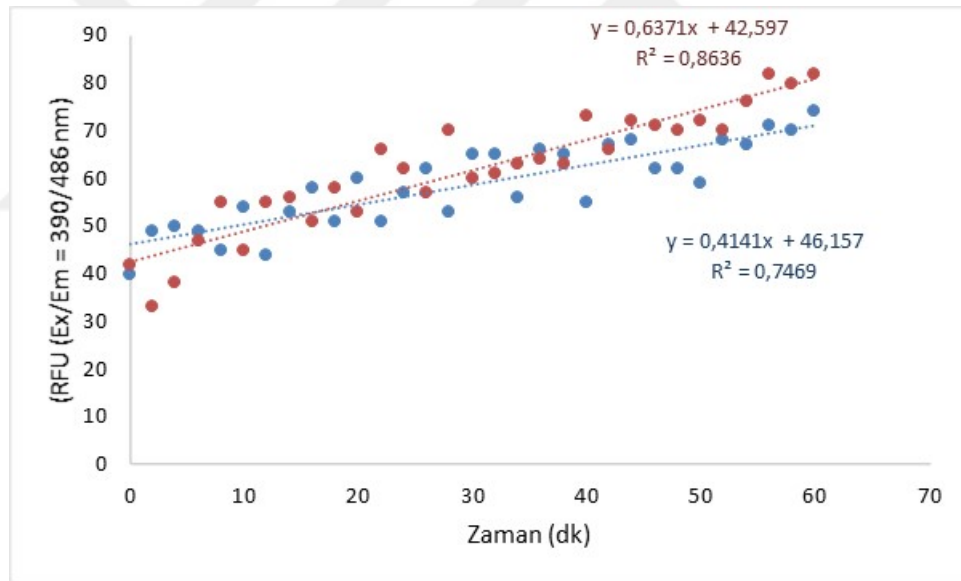
Şekil 3.46: VII. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Tablo 2.8’de içeriği verilen VIII. plakanın, yapılan ölçümünde 60 dakika boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.46) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.47).

Tablo 3.47: VIII. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası	1	40	50	45	44	58	60	57	53	65	66	55	68	62	68	71	74
	1'	42	38	55	55	51	53	62	70	61	64	73	72	70	70	82	82

VIII. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 5 μM ’dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 358 pmol/dak/ml ve 247 pmol/dak/ml’dir



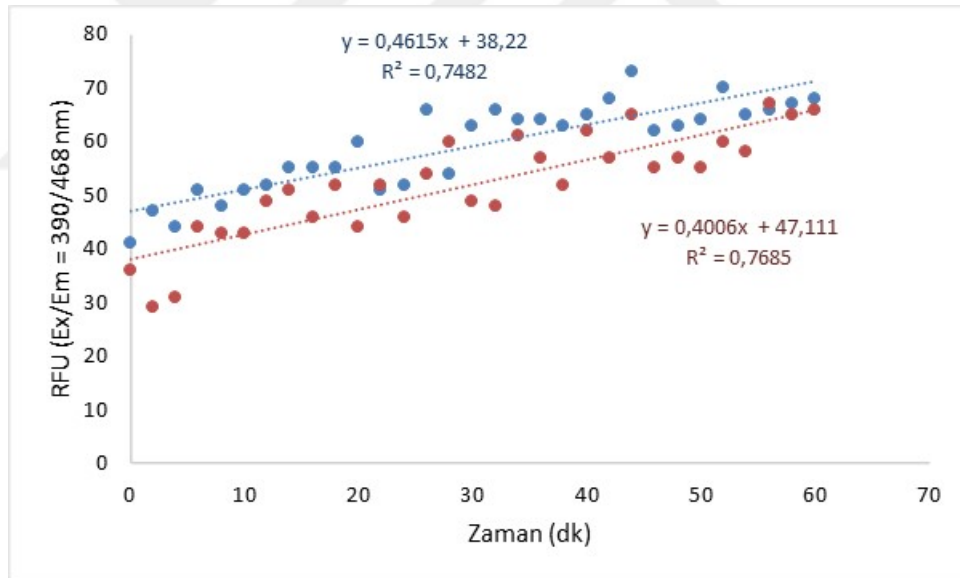
Şekil 3.47: VIII. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.48) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.48).

Tablo 3.48: VIII. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası	2	41	44	48	52	55	60	52	54	66	64	65	73	63	70	66	68
	2'	36	31	43	49	46	44	46	60	48	57	62	65	57	60	67	66

VIII. plakanın 2 ve 2' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 0,3 μM , substrat konsantrasyonu ise 5 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 267 pmol/dak/ml ve 235 pmol/dak/ml'dir.



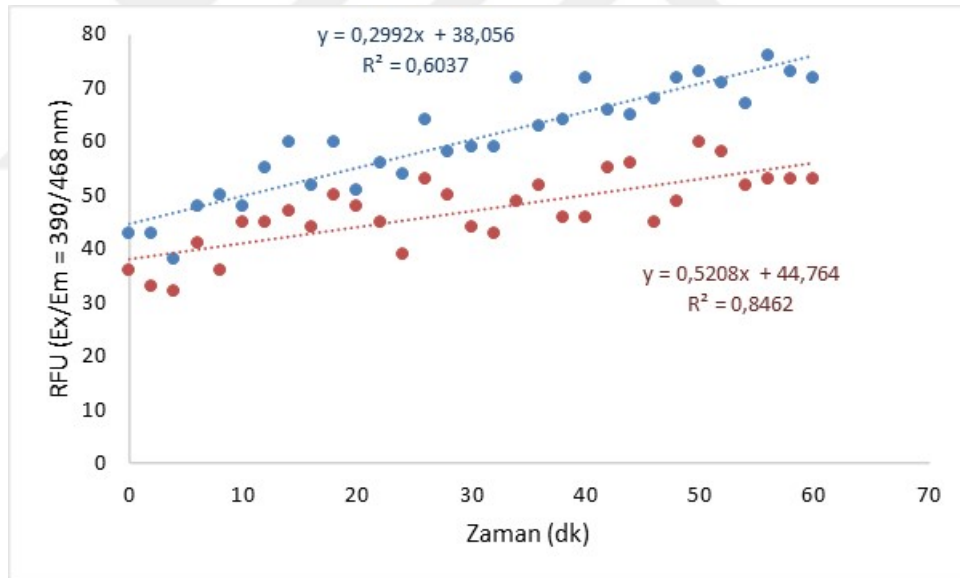
Şekil 3.48: VIII. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.49) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.49).

Tablo 3.49: VIII. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası	3	43	38	50	55	52	51	54	58	59	63	72	65	72	71	76	72
	3'	36	32	36	45	44	48	39	50	43	52	46	56	49	58	53	53

VIII. plakanın 3 ve 3' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 0,6 μ M, substrat konsantrasyonu ise 5 μ M'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 182 pmol/dak/ml ve 297 pmol/dak/ml'dir.



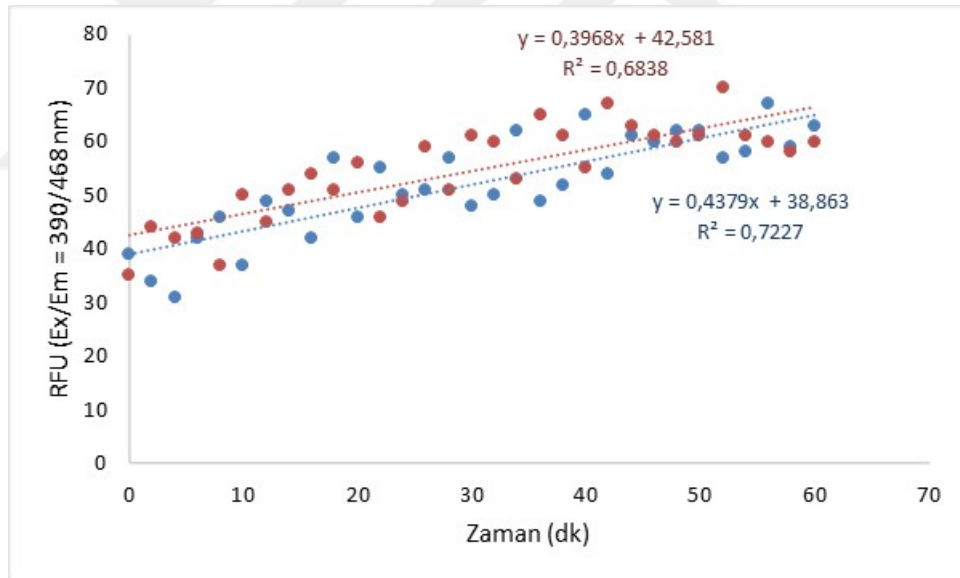
Şekil 3.49: VIII. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.50) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.50).

Tablo 3.50: VIII. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası																
4	39	31	46	49	42	46	50	57	50	49	65	61	62	57	67	63
4'	35	42	37	45	54	56	49	51	60	65	55	63	60	70	60	60

VIII. plakanın 4 ve 4' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 1,2 μM , substrat konsantrasyonu ise 5 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 233 pmol/dak/ml ve 254 pmol/dak/ml'dir.



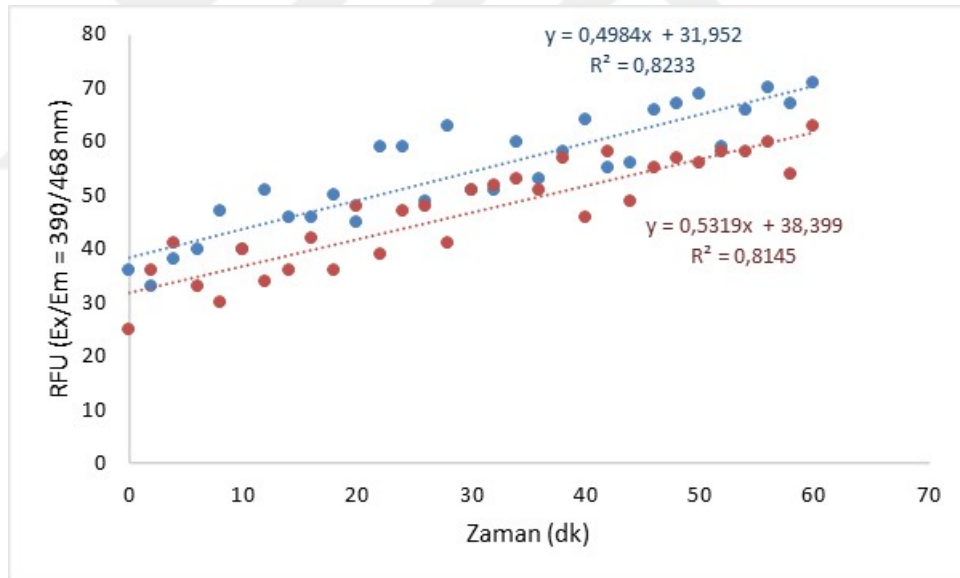
Şekil 3.50: VIII. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.51) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.51).

Tablo 3.51: VIII. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası	5	36	38	47	51	46	45	59	63	51	53	64	56	67	59	70	71
	5'	25	41	30	34	42	48	47	41	52	51	46	49	57	58	60	63

VIII. plakanın 5 ve 5' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 1,8 μM , substrat konsantrasyonu ise 5 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 286 pmol/dak/ml ve 303 pmol/dak/ml'dir.



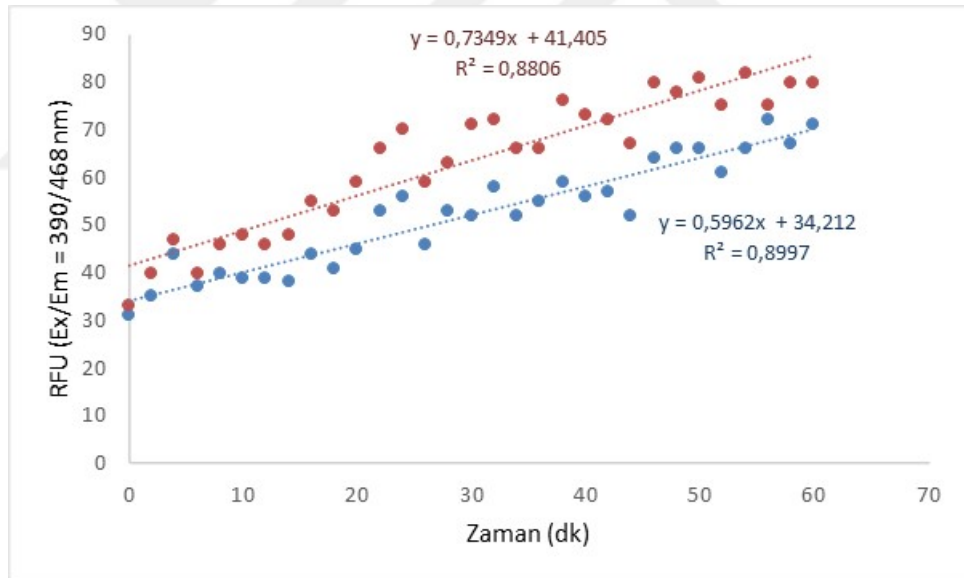
Şekil 3.51: VIII. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 60 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Değerler 4 dakika aralık seçilerek tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.52) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.52).

Tablo 3.52: VIII. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60
Tüp Numarası																
6	31	44	40	39	44	45	56	53	58	55	56	52	66	61	72	71
6'	33	47	46	46	55	59	70	63	72	66	73	67	78	75	75	80

VIII. plakanın 6 ve 6' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 2,25 μM , substrat konsantrasyonu ise 5 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 409 pmol/dak/ml ve 335 pmol/dak/ml'dir.



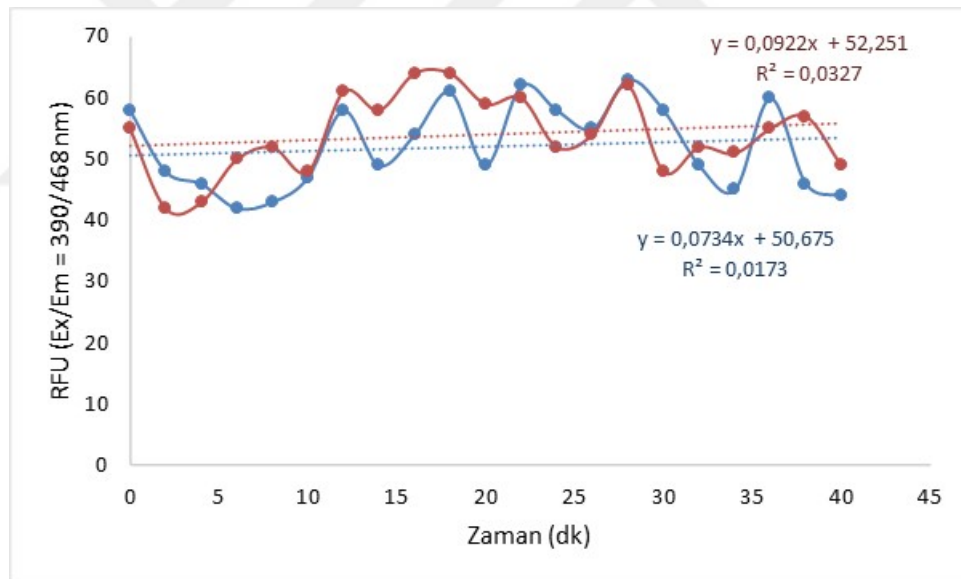
Şekil 3.52: VIII. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Tablo 2.9’da verilen IX. plakanın, 40 dakikalık floresan ölçümünde 2 dakikada bir alınan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.53) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.53).

Tablo 3.53: IX. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Tüp Numarası	1	58	48	46	42	43	47	58	49	54	61	49	62	58	55	63	58	49	45	60	46	44
	1'	55	42	43	50	52	48	61	58	64	64	59	60	52	54	62	48	52	51	55	57	49

IX. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 5 μM ve inhibitör konsantrasyonu 2,5 μM ’dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 37 pmol/dak/ml ve 32 pmol/dak/ml’dir.



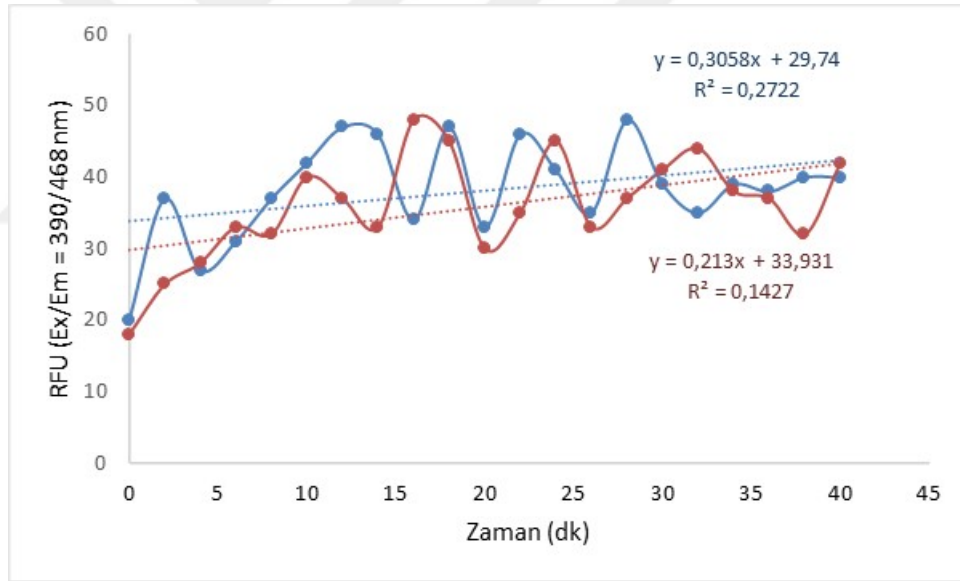
Şekil 3.53: IX. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.54) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.54).

Tablo 3.54: IX. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	
Tüp Numarası	2	20	37	27	31	37	42	47	46	34	47	33	46	41	35	48	39	35	39	38	40	40
	2'	18	25	28	33	32	40	37	33	48	45	30	35	45	33	37	41	44	38	37	32	42

IX. plakanın 2 ve 2' tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 0,83 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 92 pmol/dak/ml ve 68 pmol/dak/ml'dir.



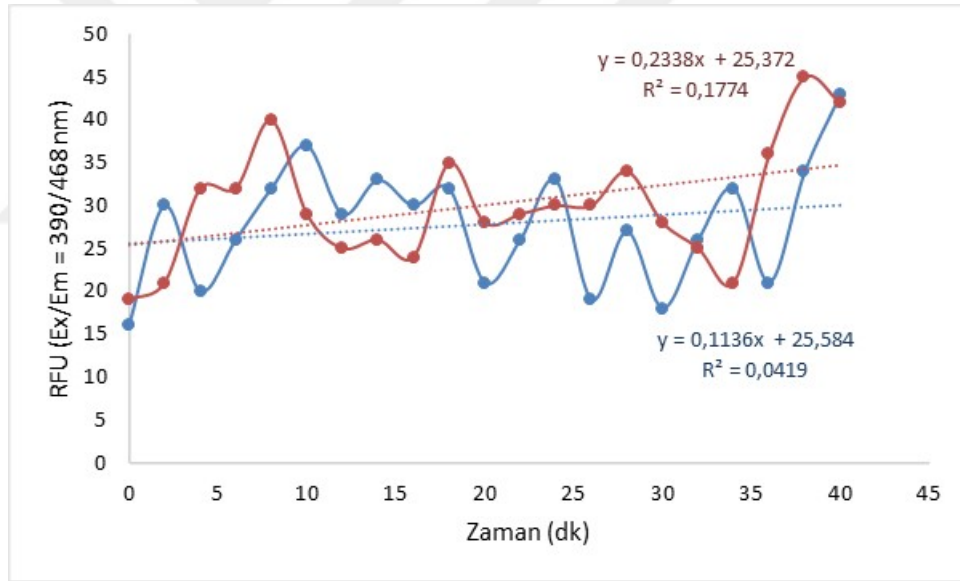
Şekil 3.54: IX. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.55) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.55).

Tablo 3.55: IX. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Tüp Numarası	3	16	30	20	26	32	37	29	33	30	32	21	26	33	19	27	18	26	32	21	34	43
	3'	19	21	32	32	40	29	25	26	24	35	28	29	30	30	34	28	25	21	36	45	42

IX. plakanın 3 ve 3' tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 1,66 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 74 pmol/dak/ml ve 43 pmol/dak/ml'dir.



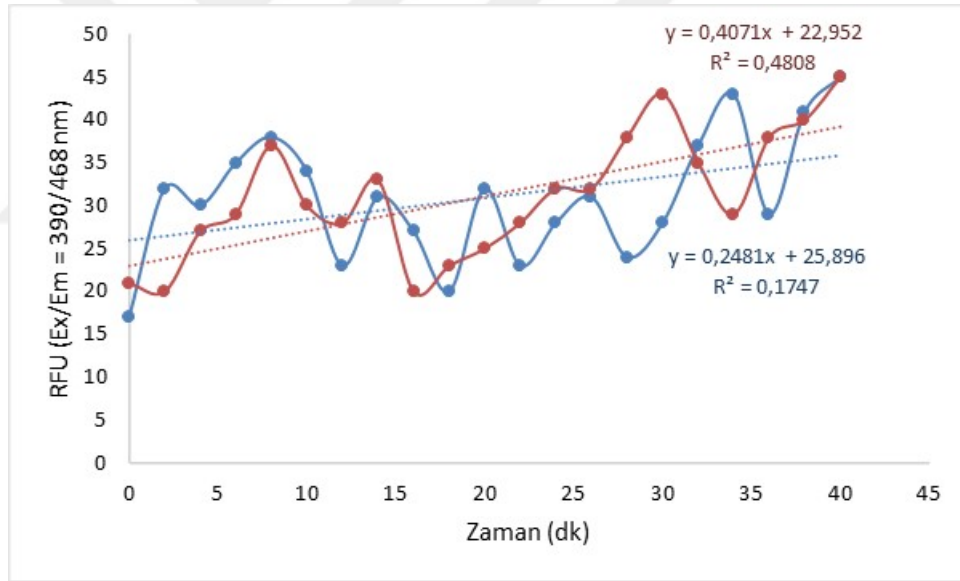
Şekil 3.55: IX. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.56) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.56).

Tablo 3.56: IX. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	
Tüp Numarası	4	17	32	30	35	38	34	23	31	27	20	32	23	28	31	24	28	37	43	29	41	45
	4'	21	20	27	29	37	30	28	33	20	23	25	28	32	32	38	43	35	29	38	40	45

IX. plakanın 4 ve 4' tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 2,5 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 119 pmol/dak/ml ve 78 pmol/dak/ml'dir.



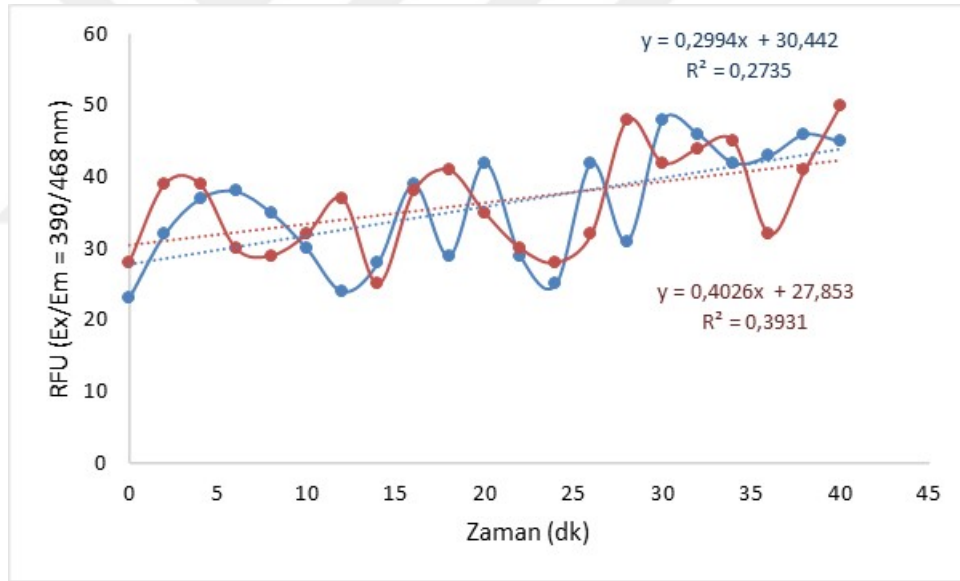
Şekil 3.56: IX. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.57) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.57).

Tablo 3.57: IX. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Tüp Numarası	5	23	32	37	38	35	30	24	28	39	29	42	29	25	42	31	48	46	42	43	46	45
	5'	28	39	39	30	29	32	37	25	38	41	35	30	28	32	48	42	44	45	32	41	50

IX. plakanın 5 ve 5' tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 3,33 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 91 pmol/dak/ml ve 118 pmol/dak/ml'dir.



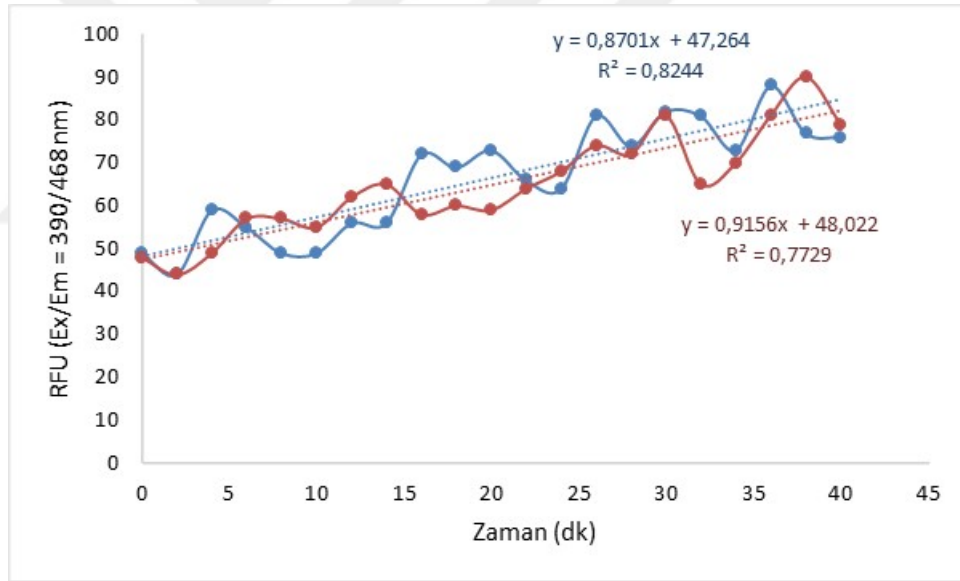
Şekil 3.57: IX. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.58) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.58).

Tablo 3.58: IX. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Tüp Numarası	6	49	44	59	55	49	49	56	56	72	69	73	66	64	81	74	82	81	73	88	77	76
	6'	48	44	49	57	57	55	62	65	58	60	59	64	68	74	72	81	65	70	81	90	79

IX. plakanın 6 ve 6' tüplerinde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 5 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 239 pmol/dak/ml ve 251 pmol/dak/ml'dir.



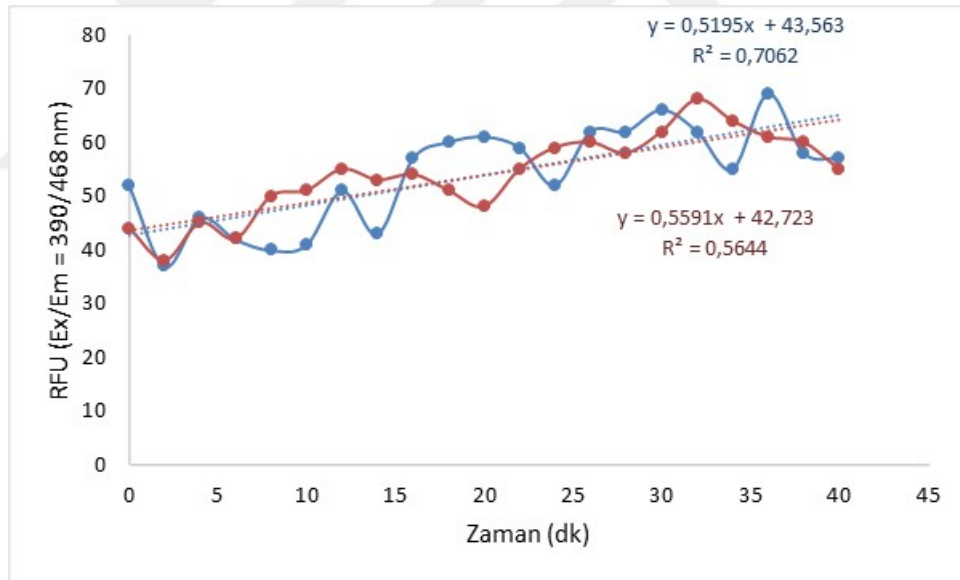
Şekil 3.58: IX. plakanın 6 ve 6' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Tablo 2.10’da verilen X. plakanın, 40 dakikalık floresan ölçümünde 2 dakikada bir alınan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.59) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.59).

Tablo 3.59: X. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Tüp Numarası	1	52	37	46	42	40	41	51	43	57	60	61	59	52	62	62	66	62	55	69	58	57
	1'	44	38	45	42	50	51	55	53	54	51	48	55	59	60	58	62	68	64	61	60	55

X. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 0,37 μM , substrat konsantrasyonu ise 5 μM ’dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 148 pmol/dak/ml ve 163 pmol/dak/ml’dir.



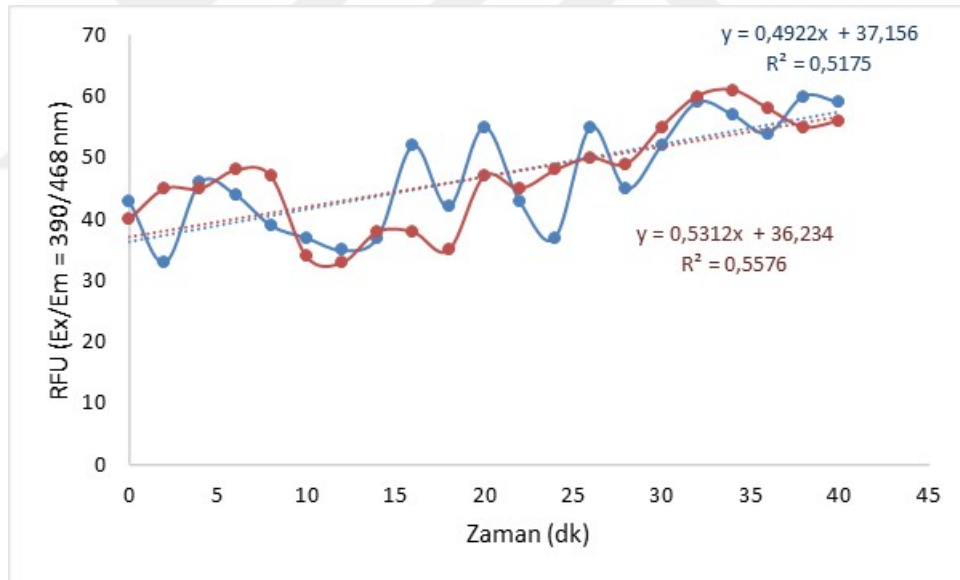
Şekil 3.59: X. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.60) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.60).

Tablo 3.60: X. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	
Tüp Numarası	2	43	33	46	44	39	37	35	37	52	42	55	43	37	55	45	52	59	57	54	60	59
	2'	40	45	45	48	47	34	33	38	38	35	47	45	48	50	49	55	60	61	58	55	56

X. plakanın 2 ve 2' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 0,75 μM , substrat konsantrasyonu ise 5 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 141 pmol/dak/ml ve 151 pmol/dak/ml'dir.



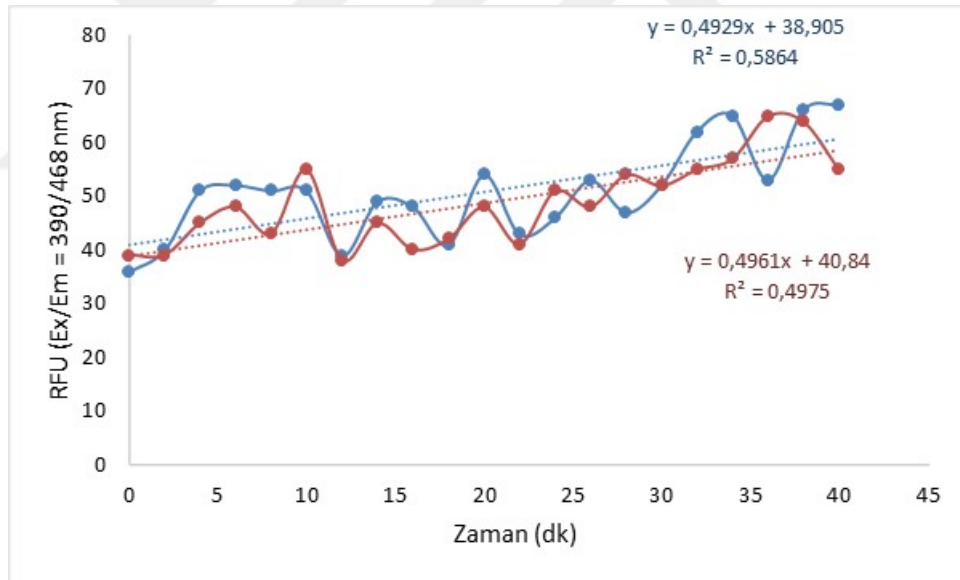
Şekil 3.60: X. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.61) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.61).

Tablo 3.61: X. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Tüp Numarası	3	36	40	51	52	51	51	39	49	48	41	54	43	46	53	47	52	62	65	53	66	67
	3'	39	39	45	48	43	55	38	45	40	42	48	41	51	48	54	52	55	57	65	64	55

X. plakanın 3 ve 3' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 1,12 μM , substrat konsantrasyonu ise 5 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 141 pmol/dak/ml ve 142 pmol/dak/ml'dir.



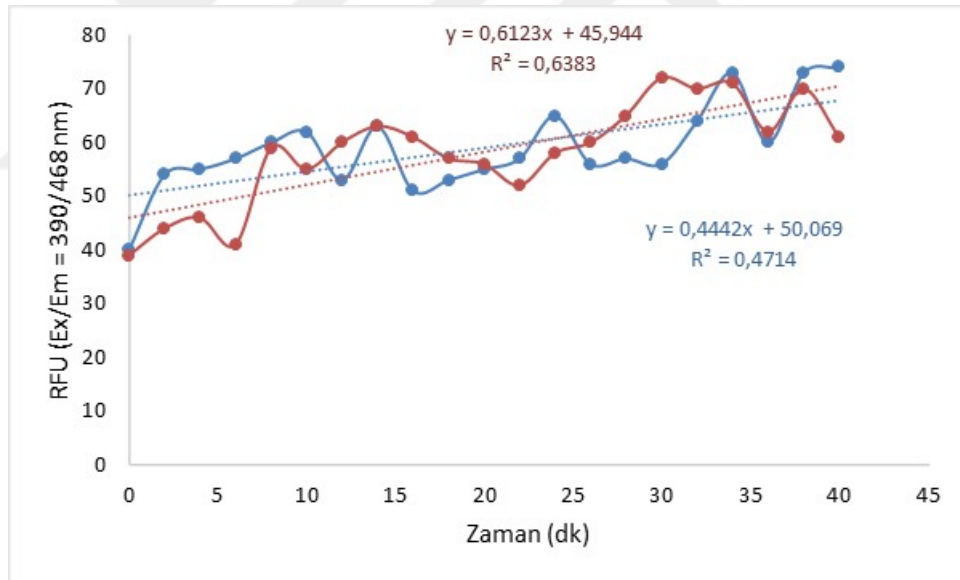
Şekil 3.61: X. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.62) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.62).

Tablo 3.62: X. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	
Tüp Numarası	4	40	54	55	57	60	62	53	63	51	53	55	57	65	56	57	56	64	73	60	73	74
	4'	39	44	46	41	59	55	60	63	61	57	56	52	58	60	65	72	70	71	62	70	61

X. plakanın 4 ve 4' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 1,5 µM, substrat konsantrasyonu ise 5 µM'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 172 pmol/dak/ml ve 129 pmol/dak/ml'dir.



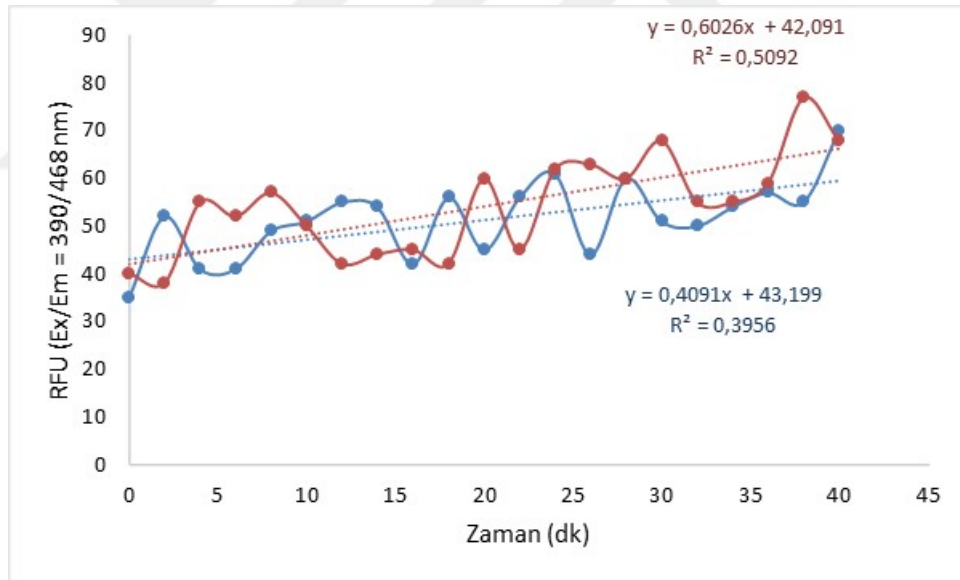
Şekil 3.62: X. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.63) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.63).

Tablo 3.63: X. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Tüp Numarası	5	35	52	41	41	49	51	55	54	42	56	45	56	61	44	60	51	50	54	57	55	70
	5'	40	38	55	52	57	50	42	44	45	42	60	45	62	63	60	68	55	55	59	77	68

X. plakanın 5 ve 5' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 2,25 μM , substrat konsantrasyonu ise 5 μM 'dir. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 170 pmol/dak/ml ve 119 pmol/dak/ml'dir.



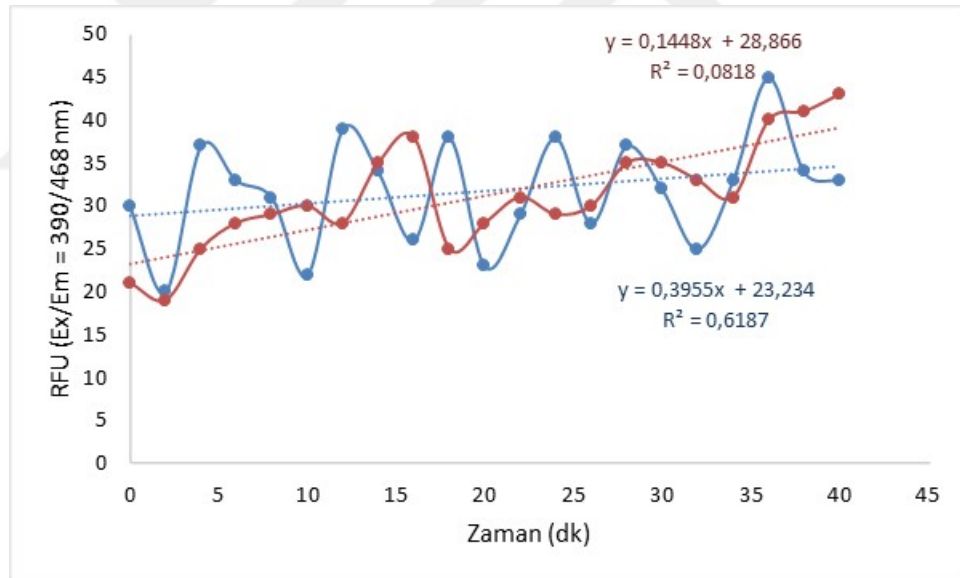
Şekil 3.63: X. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Tablo 2.9’da verilen XI. plakanın, 40 dakikalık floresan ölçümünde 2 dakikada bir alınan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.63) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.64).

Tablo 3.64: XI. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Tüp Numarası	1	30	20	37	33	31	22	39	34	26	38	23	29	38	28	37	32	25	33	45	34	33
	1'	21	19	25	28	29	30	28	35	38	25	28	31	29	30	35	35	33	31	40	41	43

XI. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 0,37 μM , substrat konsantrasyonu ise 0,83 μM ’dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 51 pmol/dak/ml ve 116 pmol/dak/ml’dir.



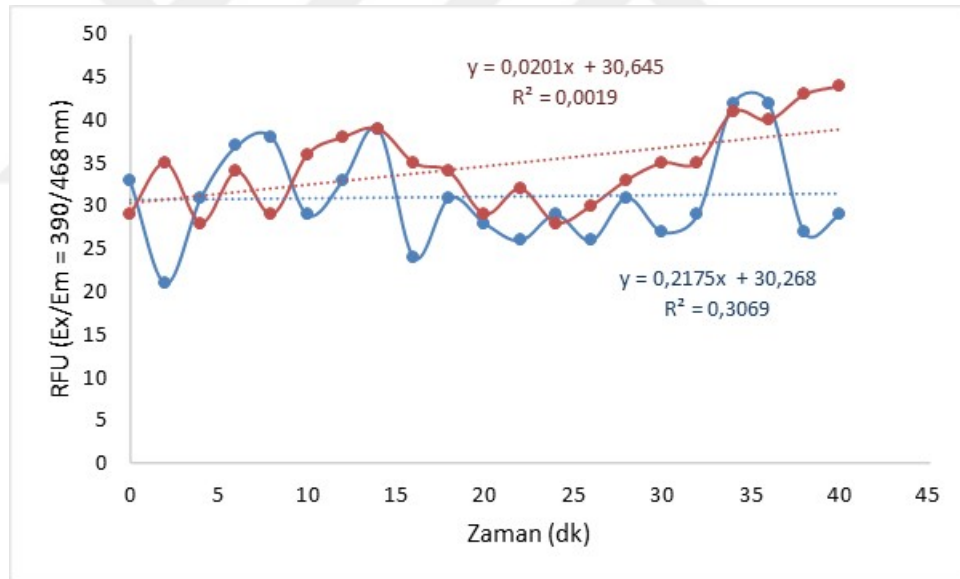
Şekil 3.64: XI. plakanın 1 ve 1’ tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.65) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.65).

Tablo 3.65: XI. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Tüp Numarası	2	33	21	31	37	38	29	33	39	24	31	28	26	29	26	31	27	29	42	42	27	29
	2'	29	35	28	34	29	36	38	39	35	34	29	32	28	30	33	35	35	41	40	43	44

XI. plakanın 2 ve 2' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 0,75 μ M, substrat konsantrasyonu ise 1,66 μ M'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 18 pmol/dak/ml ve 70 pmol/dak/ml'dir.



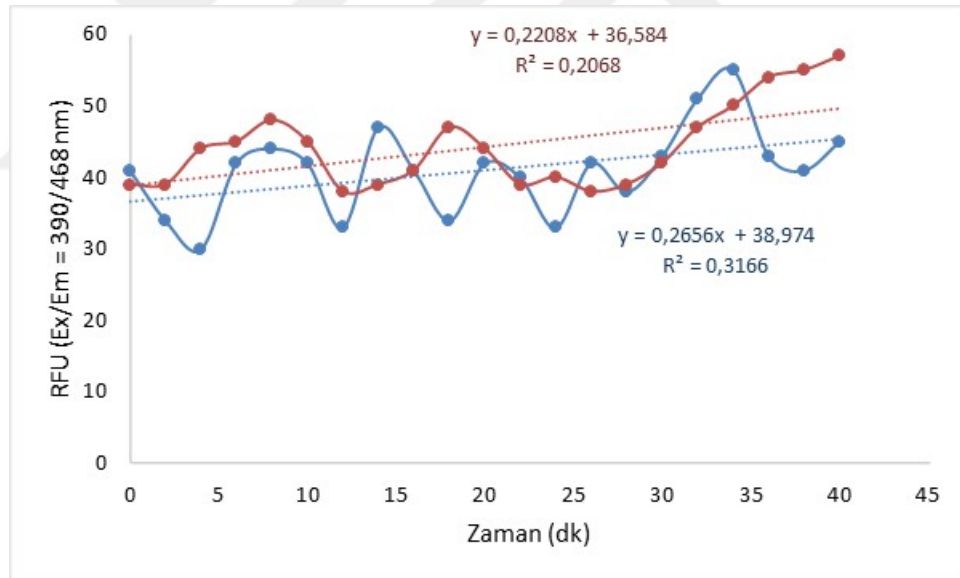
Şekil 3.65: XI. plakanın 2 ve 2' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.66) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.66).

Tablo 3.66: XI. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Tüp Numarası	3	41	34	30	42	44	42	33	47	41	34	42	40	33	42	38	43	51	55	43	41	45
	3'	39	39	44	45	48	45	38	39	41	47	44	39	40	38	39	42	47	50	54	55	57

XI. plakanın 3 ve 3' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 1,12 μM , substrat konsantrasyonu ise 2,5 μM 'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 70 pmol/dak/ml ve 82 pmol/dak/ml'dir.



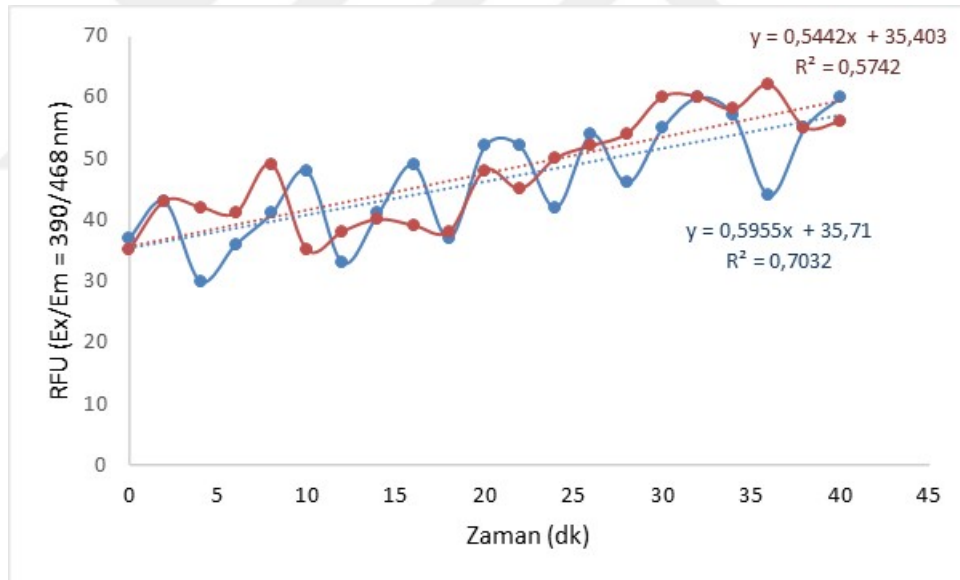
Şekil 3.66: XI. plakanın 3 ve 3' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.67) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.67).

Tablo 3.67: XI. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Tüp Numarası	4	37	43	30	36	41	48	33	41	49	37	52	52	42	54	46	55	60	57	44	55	60
	4'	35	43	42	41	49	35	38	40	39	38	48	45	50	52	54	60	60	58	62	55	56

XI. plakanın 4 ve 4' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 1,5 µM, substrat konsantrasyonu ise 3,33 µM'dır. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 155 pmol/dak/ml ve 168 pmol/dak/ml'dir.



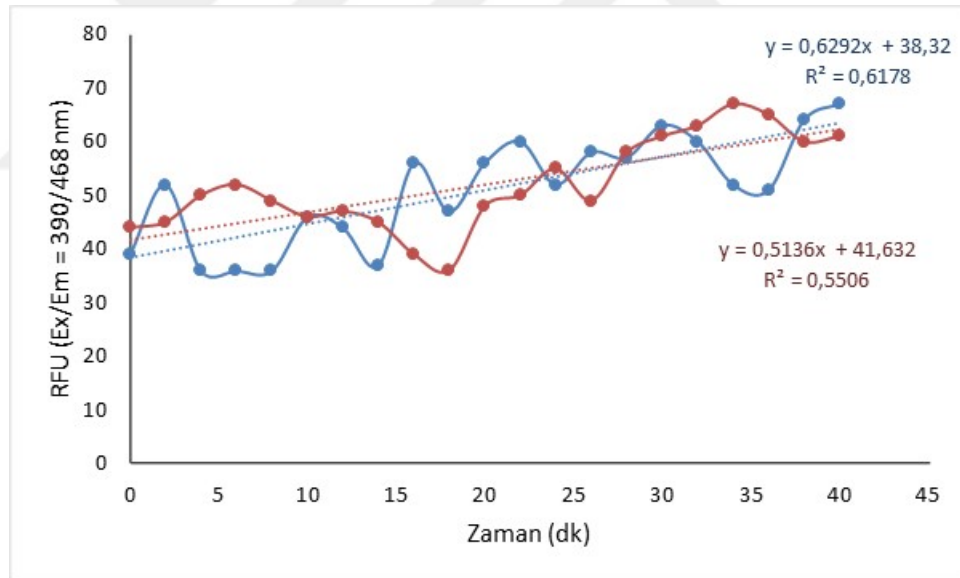
Şekil 3.67: XI. plakanın 4 ve 4' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

Yapılan 40 dakikalık floresan ölçüm boyunca 2 dakikada bir değer okunmuştur. Okunan değerler tabloya yerleştirilmiştir (Tablo 3.68) ve grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 3.68).

Tablo 3.68: XI. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerler (RFU).

Zaman (dk)		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Tüp Numarası	5	39	52	36	36	36	46	44	37	56	47	56	60	52	58	57	63	60	52	51	64	67
	5'	44	45	50	52	49	46	47	45	39	36	48	50	55	49	58	61	63	67	65	60	61

XI. plakanın 5 ve 5' tüplerinde 5-ASA konsantrasyonu 2,25 μM , substrat konsantrasyonu ise 5 μM 'dir. Bu tüplerde hesaplanan aktiviteler; 177 pmol/dak/ml ve 147 pmol/dak/ml'dir.



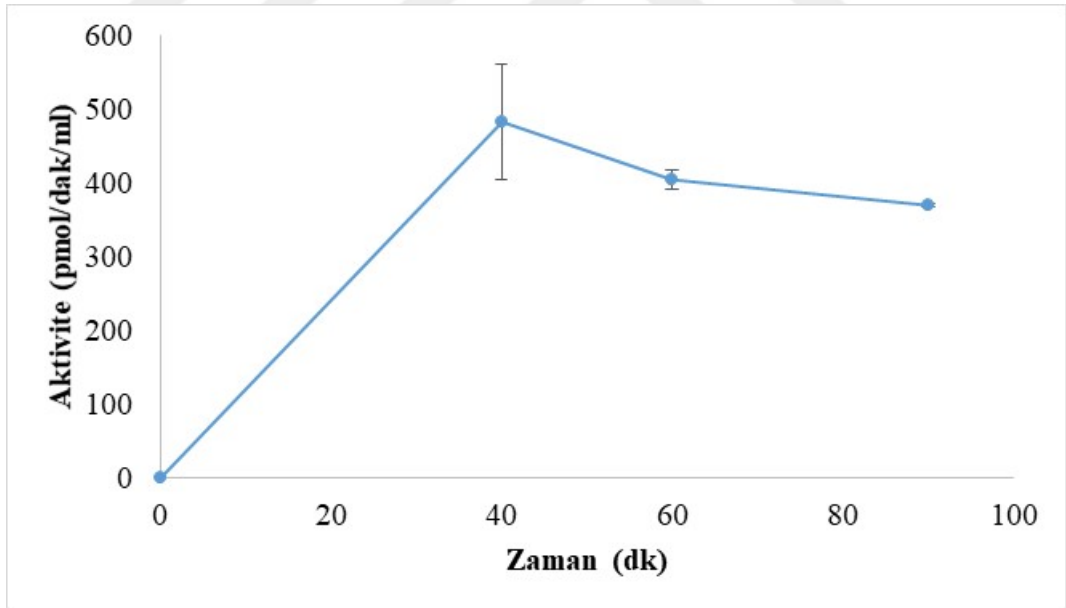
Şekil 3.68: XI. plakanın 5 ve 5' tüplerinde okunan değerlerin grafiği.

3.3 CYP2D6 Aktivite Ölçümlerinin Karakterizasyonu

Yapılan deneylerde kullanılan prosedürün standardizasyonu için öncelikle zaman etkisine sonrasında substrat konsantrasyonunun ve inhibitör etkisine bakılmıştır. Son olarak ise kinidin etkisi incelenmiştir. Enzim aktivite grafikleri çizilirken, hesaplamalarda AHMC ortalama standart eğri grafiğindeki (bkz. Şekil 3.4) değerler kullanılmıştır.

3.3.1 Zaman Etkisi

Kinetik mod ile 37 °C’de Ex/Em 390/468 nm’de yapılan floresan ölçüm, prosedürü optimize etmek için önce 90 dakika, 60 dakika sonra da 40 dakika yapılmıştır. Uygun lineer eğri 40 dakika ölçümde görülmüştür. “HTX Multi-Mode Mikroplaka Okuyucu” ile iki dakikada bir değer alınmıştır. Elde edilen değerler ve AHMC standart eğri grafiği kullanılarak aktivite hesaplanmıştır.



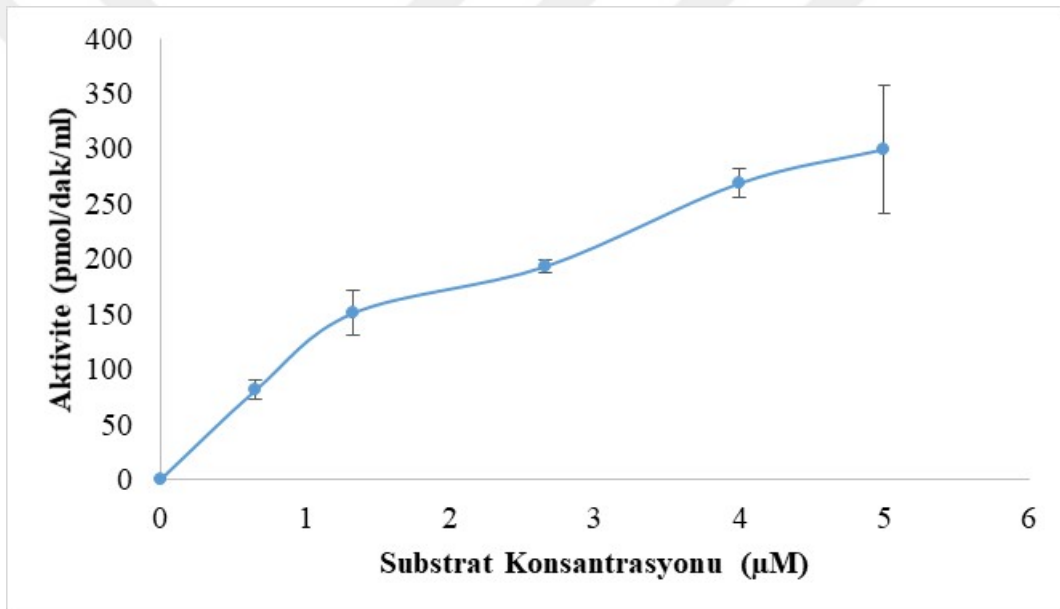
Şekil 3.69: Zamana bağlı CYP2D6 aktivitesinin değişimi.

Şekil 3.69’da CYP2D6 aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi gösterilmiştir. Zaman etkisini incelerken, 40 dakikalık aktivite için III. plakanın 1 ve 1’ tüpleri, 60 dakikalık aktivite için IV. plakanın 1 ve 1’ tüpleri, 90 dakikalık aktivite

için ise I. plakanın 1 ve 1' tüpleri kullanılmıştır. Seçilen tüplerde 5-ASA yoktur. Substrat konsantrasyonu 5 μM 'dır.

3.3.2 Substrat Etkisi

Kinetik mod ile 37 °C'de Ex/Em 390/468 nm'de 60 dk yapılan floresan ölçüm, prosedürü optimize etmek için farklı substrat konsantrasyonlarında yapılmıştır. Reaksiyon ortamına 5-ASA eklenmemiştir. İki dakikada bir floresan değeri alınmıştır. Elde edilen değerler ve AHMC standart eğri grafiği kullanılarak aktivite grafiği çizilmiştir.

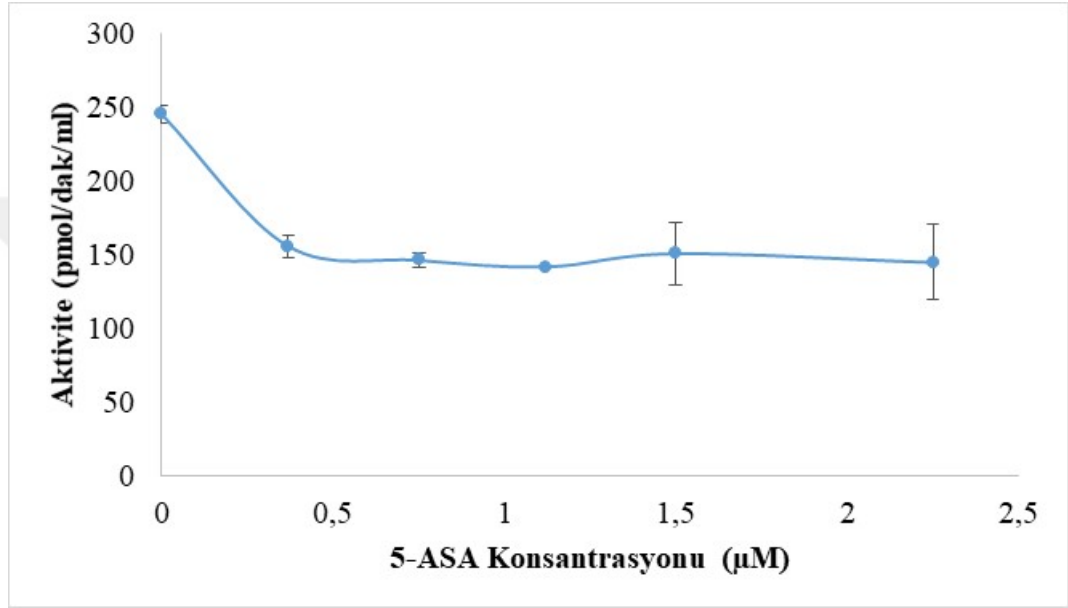


Şekil 3.70: Artan substrat konsantrasyonunda 5-ASA yokluğunda CYP2D6 aktivitesinin değişimi.

VII. plakanın 1, 1', 2, 2', 3, 3', 4, 4', 5 ve 5' tüplerinde hesaplanan aktiviteler kullanılmıştır. Substrat konsantrasyonları; 0,66 μM , 1,33 μM , 2,66 μM , 4 μM ve 5 μM 'dır (Şekil 3.70).

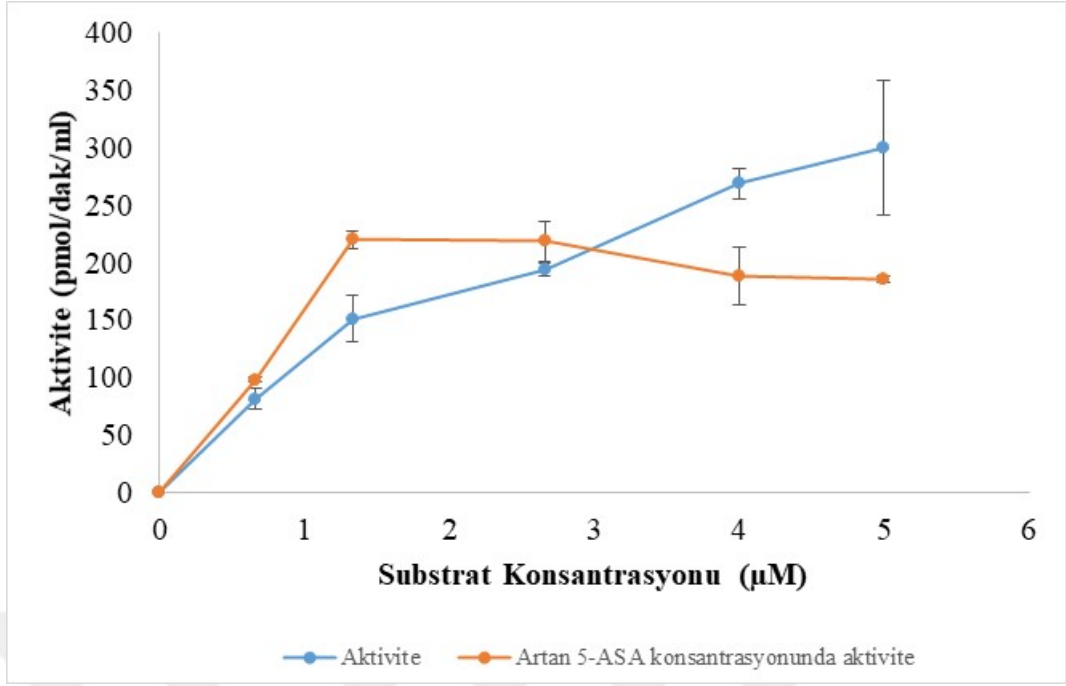
3.3.3 İnhibitör Etkisi

Kinetik mod ile 37 °C’de Ex/Em 390/468 nm’de yapılan 40 dakikalık floresan ölçümde inhibitör etkisini görebilmek için; substrat konsantrasyonu sabit ortamda ve substrat konsantrasyonun giderek arttığı iki ortamda 5-ASA konsantrasyonunu arttırarak iki dakikada bir floresan değeri alınmıştır. Elde edilen değerler ve AHMC standart eğri grafiği kullanılarak aktivite grafikleri çizilmiştir.



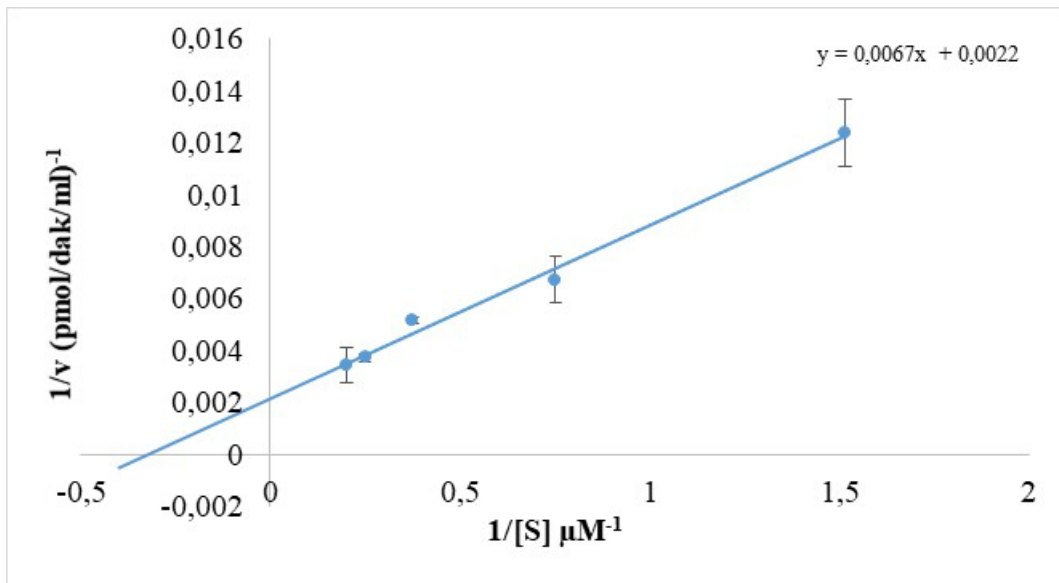
Şekil 3.71: Sabit substrat konsantrasyonunda artan 5-ASA varlığında CYP2D6 aktivitesinin değişimi.

Reaksiyon ortamında substrat konsantrasyonu 5 µM konsantrasyonunda sabit tutulmuştur. Artan 5-ASA konsantrasyonunda değişen aktivite grafiği verilmiştir (Şekil 3.71). X. plakanın 1, 1', 2, 2', 3, 3', 4, 4', 5 ve 5' tüplerinde hesaplanan aktiviteler kullanılmıştır. 5-ASA konsantrasyonları; 0,37 µM, 0,75 µM, 1,12 µM, 1,5 µM ve 2,25 µM'dır.

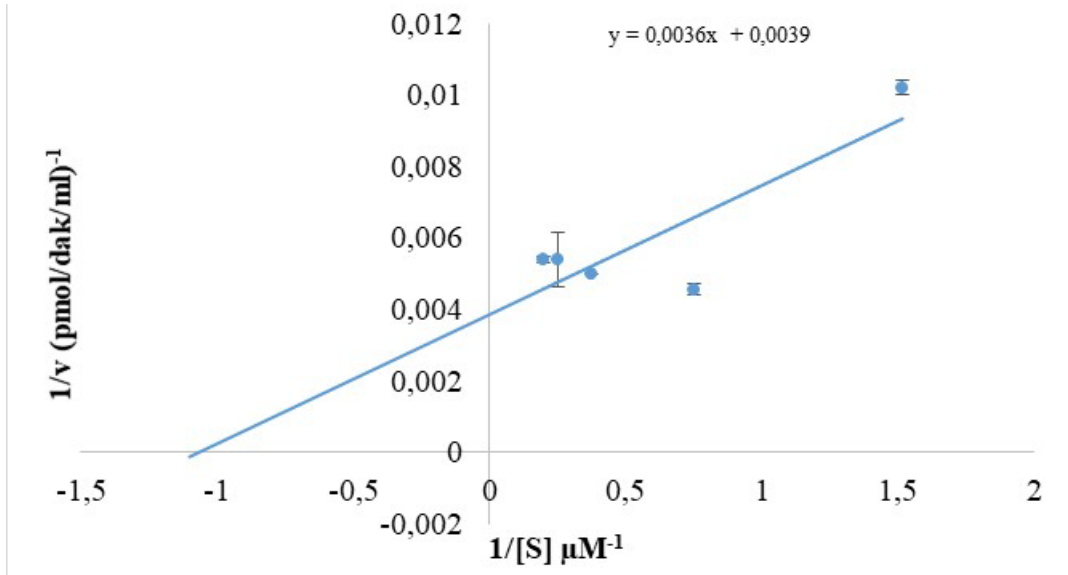


Şekil 3.72: Artan substrat miktarı ve artan 5-ASA konsantrasyonunda CYP2D6 aktivitesinin değişimi.

Grafik çizilirken; VI. plakanın 2, 2', 3, 3', 4, 4', 5, 5', 6 ve 6' tüplerinde, VII. plakanın 1, 1', 2, 2', 3, 3', 4, 4', 5 ve 5' tüplerinde hesaplanan aktiviteler kullanılmıştır (Şekil 3.72). Reaksiyon ortamında substrat konsantrasyonu 0,83 µM, 1,66 µM, 2,5 µM 3,33 µM ve 5 µM olmak üzere arttırılmıştır. 5-ASA varlığında ise konsantrasyon 0,37 µM, 0,75 µM, 1,12 µM, 3,33 µM ve 5 µM olmak üzere arttırılmıştır.



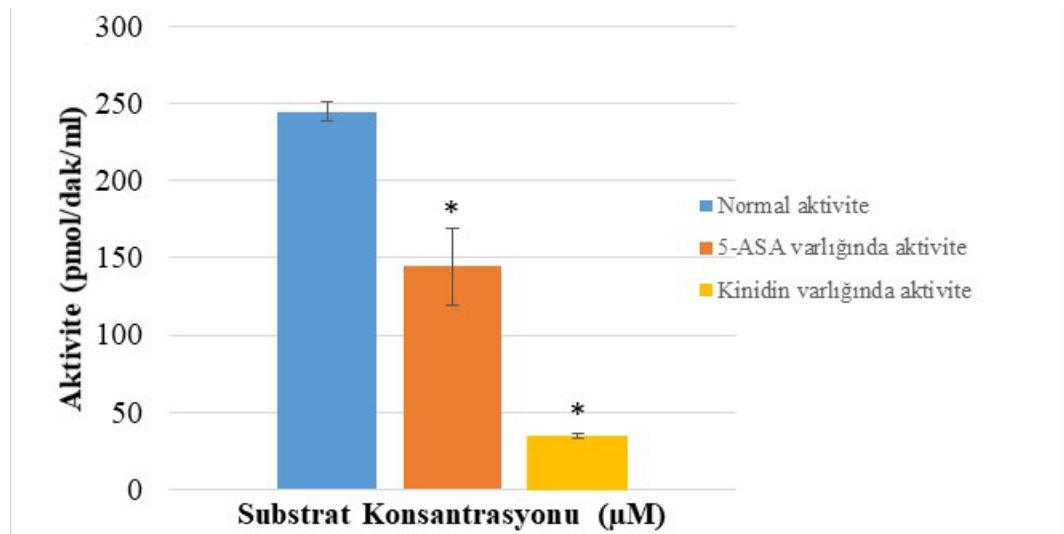
Şekil 3.73: Artan substrat konsantrasyonunda 5-ASA yokluğunda CYP2D6 aktivitesinin değişimi Lineweaver burk grafiği.



Şekil 3.74: Artan substrat konsantrasyonu ve artan 5-ASA varlığında CYP2D6 aktivitesinin değişimi Lineweaver burk grafiği.

3.3.4 Kinidin Etkisi

Aktivite üzerindeki 5-ASA ve inhibitör kinidin etkisini göstermek için grafik çizilmiştir (Şekil 3.75). Çizilen grafikte normal aktivite için IX. plakanın 6 ve 6' tüpleri seçilmiştir. 5-ASA varlığında aktivite için X. plakanın 5 ve 5' tüpleri seçilmiştir ve tüplerin 5-ASA konsantrasyonu 2,25 μM'dır. Kinidin varlığında aktivite için IX. plakanın 1 ve 1' tüpleri seçilmiştir ve tüplerin kinidin konsantrasyonu 2,5 μM'dır. Seçilen bütün tüplerin substrat konsantrasyonu sabit ve 5 μM'dır.



Şekil 3.75: 5-ASA ve kinidin varlığında CYP2D6 aktivitesinin değişimi. Yıldız işareti (*) kontrolden önemli farkı temsil eder ($p < 0,05$).

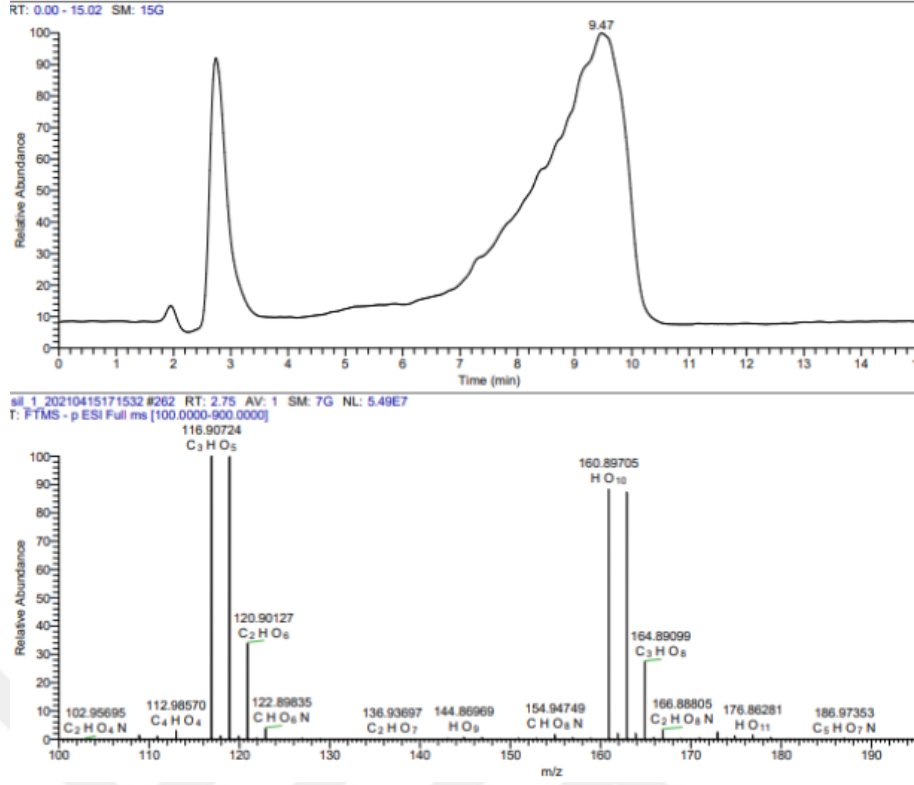
3.4 HPLC-ESI-MS/MS Ölçümleri

İçeriği belirtilen 7 tüpten birinci prosedür sonunda elde edilen supun LC/MS-MS analizleri Bezmialem Vakıf Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi (İLMER)'nde Doç. Dr. Işıl GAZİOĞLU tarafından yapılmıştır. Tüplerden hesaplanan değerler Tablo 3.69'da verilmiştir.

Tablo 3.69: Birinci prosedürde hazırlanan tüplerdeki 5-ASA miktarları.

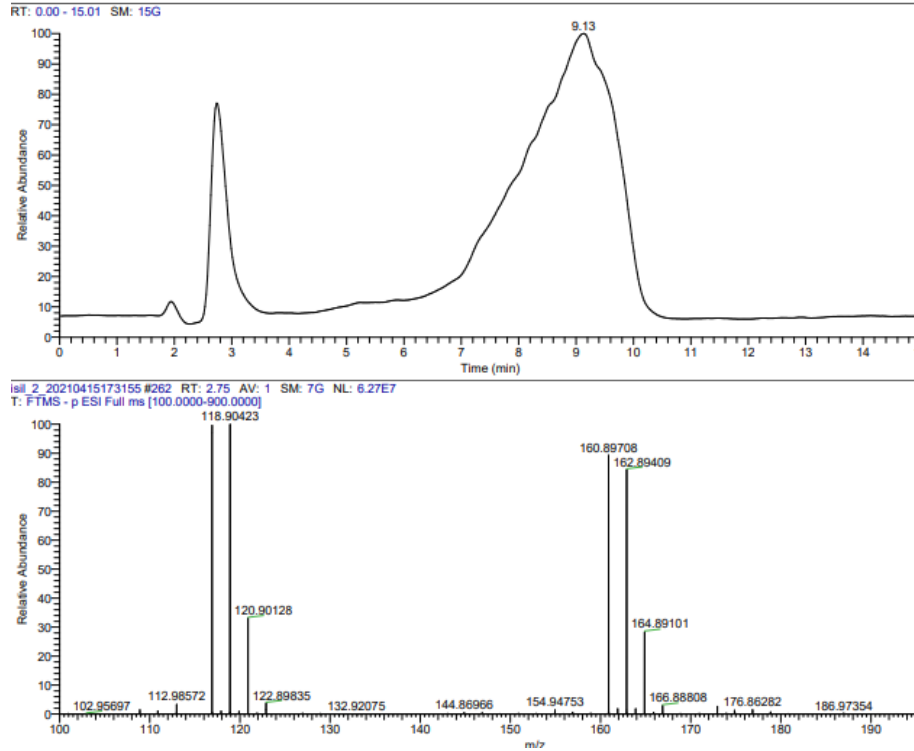
5-ASA Miktarı (mM)	
Tüp 1	-
Tüp 2	0,023 mM
Tüp 3	0,025 mM
Tüp 4	0,017 mM
Tüp 5	0,004 mM
Tüp 6	0,027 mM
Tüp 7	0,030 mM

Birinci prosedüre uygun olarak hazırlanan numunelerle yapılan ölçümlerin sonunda elde edilen değerler gösterilmiştir. Tüp 1'de görülen pikler Şekil 3.76'da verilmiştir.



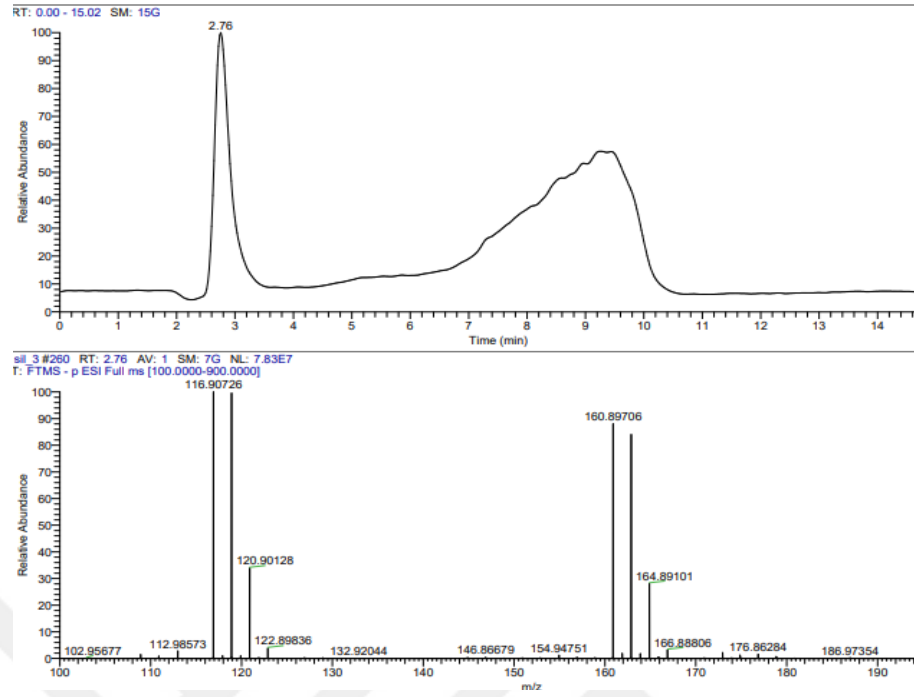
Şekil 3.76: Tüp 1'in ölçüm sonuçları.

Yapılan ölçümlerde tüp 2'de elde edilen pikler Şekil 3.77'de verilmiştir.



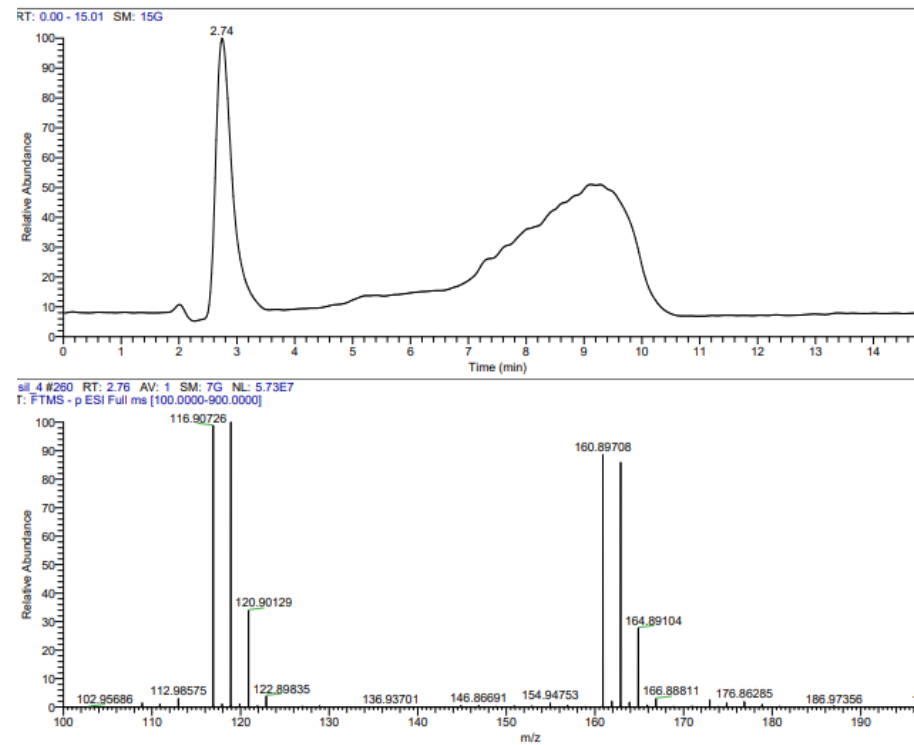
Şekil 3.77: Tüp 2'nin ölçüm sonuçları.

Yapılan ölçümlerde tüp 3'te elde edilen pikler Şekil 3.78'de verilmiştir.



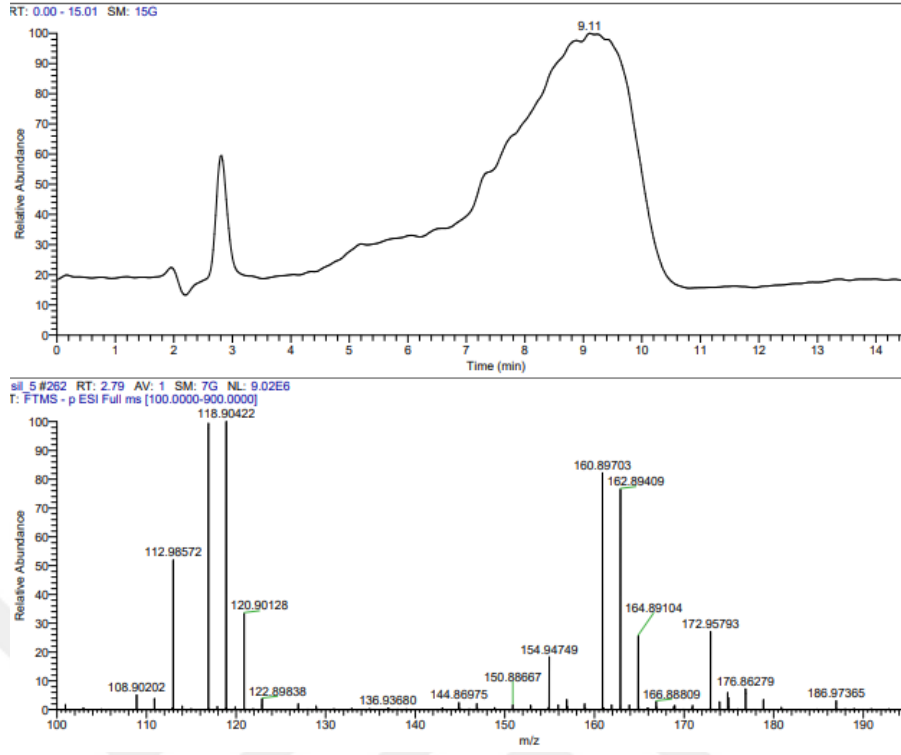
Şekil 3.78: Tüp 3'ün ölçüm sonuçları.

Yapılan ölçümlerde tüp 4'te elde edilen değerler Şekil 3.79'da verilmiştir.



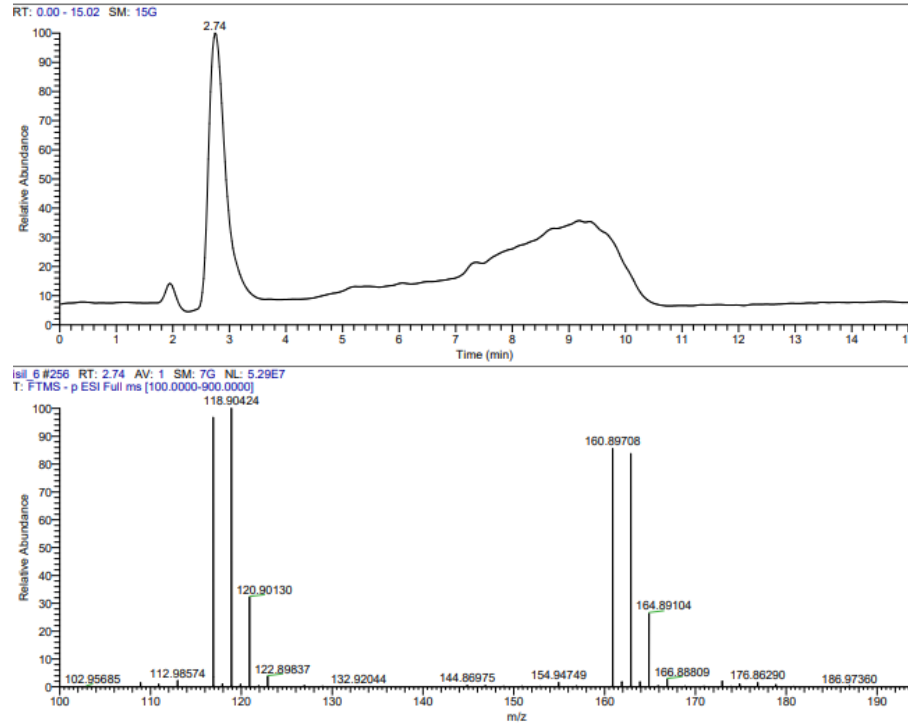
Şekil 3.79: Tüp 4'ün ölçüm sonuçları.

Tüp 5'in ölçümlerinde elde edilen pikler ise Şekil 3.80'de verilmiştir.



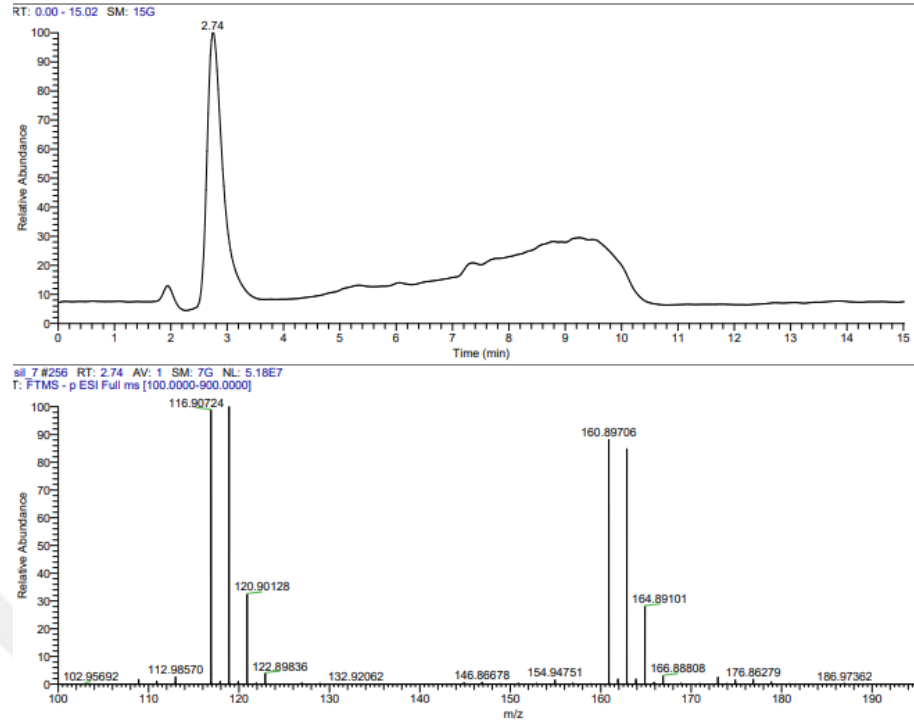
Şekil 3.80: Tüp 5'in ölçüm sonuçları.

Tablo 3.81'de 6 numaralı tüpün ölçülmesi ile elde edilen pikler gösterilmiştir.



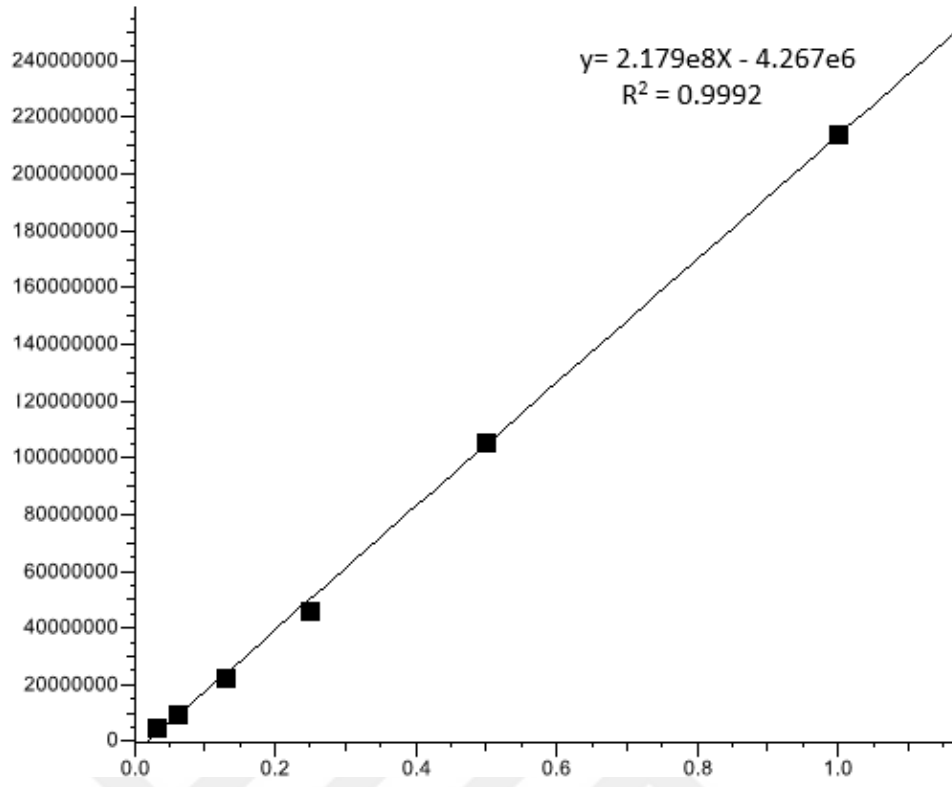
Şekil 3.81: Tüp 6'nın ölçüm sonuçları.

Tüp 7'nin ölçümünde elde edilen eğriler Tablo 3.82'de verilmiştir.



Şekil 3.82: Tüp 7'nin ölçüm sonuçları.

İçeriği belirtilen 4 tüpten ikinci prosedürün uygulanmasıyla elde edilen sup, tekrar olası metabolitlerin tayini için LC/MS-MS analizleri, Bezmialem Vakıf Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi (İLMER)'nde Doç. Dr. Işıl GAZİOĞLU tarafından yapılmıştır (bkz. Tablo 2.13). Oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 3.83'te verilmiştir.



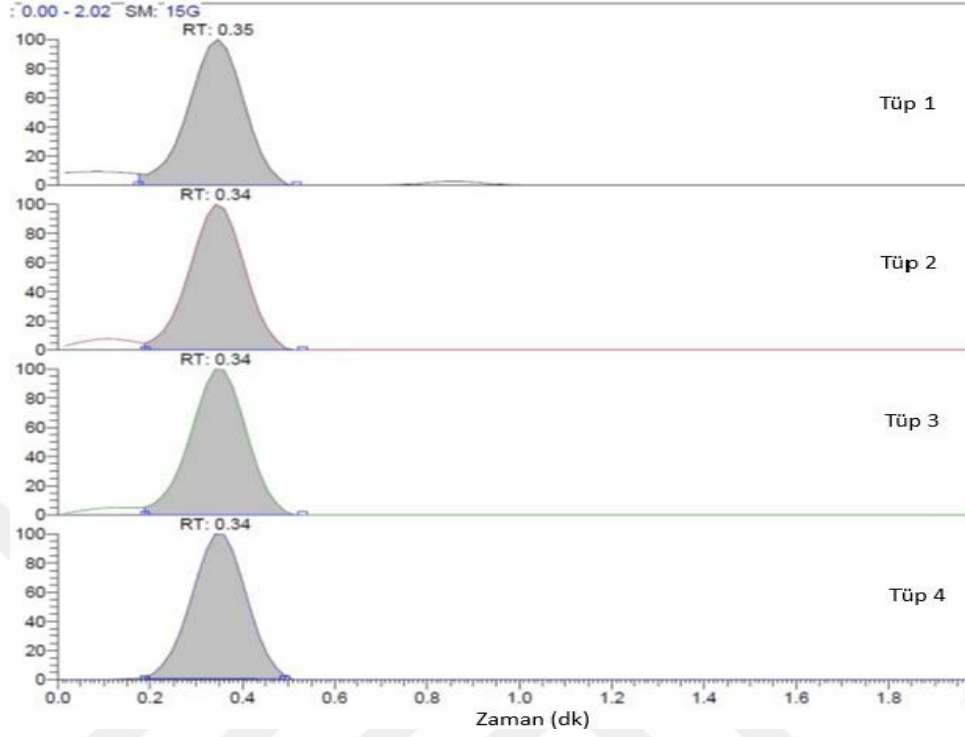
Şekil 3.83: Kalibrasyon eğrisi.

İkinci prosedüre göre hazırlanan dört tüpün içerisinde hesaplanan 5-ASA miktarları Tablo 3.69'da verilmiştir.

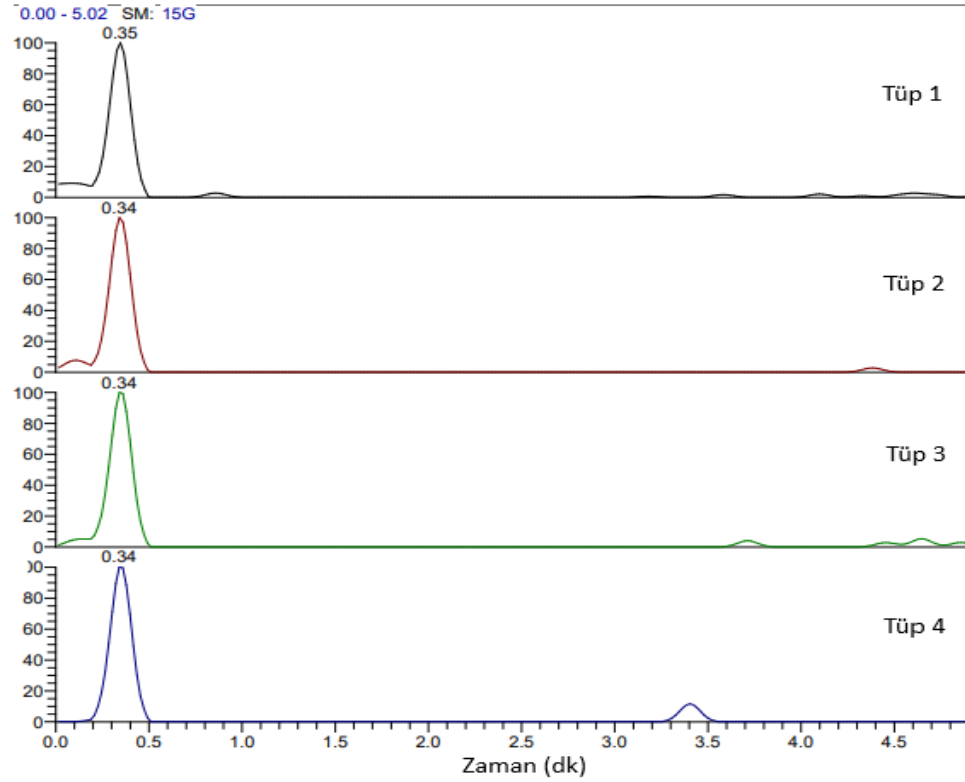
Tablo 3.70: İkinci prosedürde hazırlanan tüplerdeki 5-ASA miktarları.

5-ASA Miktarı (mM)	
Tüp 1	0,026 mM
Tüp 2	0,022 mM
Tüp 3	0,022 mM
Tüp 4	0,022 mM

İkinci prosedüre uygun olarak hazırlanan 4 tüpten elde edilen kromatogramlar ise Şekil 3.84 ve Şekil 3.85’te verilmiştir.



Şekil 3.84: Elde edilen LC-HRMS kromatogramı.



Şekil 3.85: Örneklerin kromatogramları.

4. BULGULAR

Bilim dünyasındaki gelişmelerle daha önce tedavi edilemeyen hastalıkların artık tedavi edilebilir olması mümkündür. Yeni hastalıkların keşfi ile ilaç tüketiminde yaşanan ciddi artış, istenmeyen yan etkiler, ilaç-ilaç etkileşimleri ve toksikasyon durumlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Özata ve diğ. 2008). Polifarmasinin çoklu ilaçların kullanımını, ilaç-ilaç etkileşimlerini ve yan etki reaksiyonlarını arttırdığı ve buna bağlı olarak da yaşam kalitesini düşürdüğü görülmüştür (Rodrigues ve de Oliveira 2016). Avrupa'daki hastaneye yatış oranlarının yaklaşık olarak %5'inin yan etki reaksiyonları yüzünden gerçekleştiği rapo edilmektedir. Yan etki reaksiyonları dünya çapında bakıldığında önde gelen morbidite ve ölüm sebepleri arasında gösterilmektedir (Bouvy ve diğ. 2015). Bu sonucun hem hastalara hem de sağlık sistemine büyük bir maddi yük getirdiği görülmektedir.

Biyotransformasyon; ilaçların ve ksenobiyotiklerin çeşitli doku ve organlarla enzimler aracılığı ile uğradıkları kimyasal değişimdir. Metabolizma reaksiyonları, ilaçların enzimatik olarak uğradığı kimyasal değişimlerin türüne göre iki şekilde gerçekleştirilir. Bunların birincisi olan faz I reaksiyonlarının büyük bölümünü, sitokrom P450 (CYP450) enzim sistemi (Monooksijenazlar) gerçekleştirir (Omura ve Sato 1962). P450 enzimleri, çoğu ilacın ve diğer ekzojen maddelerin (ksenobiyotiklerin) biyotransformasyonunu katalize eden temel enzim ailesini oluşturur (Nelson 2004; Guengerich 2008; Zanger ve diğ. 2008). Faz II reaksiyonları ise ilaçları aktif olmayan polar metabolitlere dönüştürür (Park ve diğ. 1995). P450 enzimleri, karaciğer başta olmak üzere; bağırsak, böbrek, akciğer ve beyinde görülmektedir. Ayrıca olgunlaşmış eritrosit ve iskelet kası hücreleri hariç diğer tüm memeli hücrelerinin mitokondrisi veya endoplazmik retikulumda bulunurlar (Preskorn 1996).

Tek bir hepatosit birçok farklı P450 enzimini içerebilir. Bir enzim birden fazla ilacı metabolize edebileceği gibi, bir ilaç da birden fazla enzimle metabolize olabilir (Ioannides ve Parke 1990). Genel olarak ilaç biyotransformasyonunu etkileyen en önemli etkenler; genetik polimorfizm, etkileşimler, hastalıklar ve yaştır. Bu faktörler; klinik etkinliği ve farmakolojik etkileri değiştirebilmektedir (Yüksel 2001).

Enzimlerin seviyesi ve katalitik aktiviteleri her insanda değişkenlik göstermektedir. Değişkenliğin sebebi genetik polimorfizmdir (Yang ve diğ. 2008). İlgili enzimde oluşacak olası bir genetik polimorfizm, ilaç vücuda alındığında etkisinin artmasına ya da azalmasına sebep olabilmektedir. Terapötik indeksi dar olan ilaçları kullanan bireyler için bu durum hayati sonuçlar ortaya çıkarabilmektedir. Aynı zamanda enzim polimorfizmi, çevresel etkenlerle direkt bağlı olduğu bilinen kanser gibi hastalıklara duyarlılığı arttırdığı için de önem arz etmektedir (Marzo ve Balant 1996).

Sitokrom P450 izoenzimleri arasında, psikiyatrik ilaçları en yakından ilgilendiren izoenzim CYP2D6'dır. Antidepresanlar, betablokerler, anti kanser ilaçlar, antipsikotikler gibi birçok ilaç bu izoenzim tarafından metabolize edilmektedir (Preissner ve diğ. 2013). CYP2D6'nın tioridazin gibi bazı substratları dar terapötik etkiye sahiptir. Bu da demek oluyor ki enzimin inhibisyonu, klinik açıdan anlamlı farmakolojik bir etkileşime sebep olabilmektedir (VandenBrink ve diğ. 2012). Ayrıca, ülseratif kolit ve Crohn hastalığı aktif dönemlerinde yangının oluşturduğu stres ve benzeri sebeplerini gidermek antidepresanlar ve antipsikotikler de reçete edilmektedir. Bu nedenle, 5-ASA'nın CYP2D6 ile ilişkisinin belirlenmesi önem arz etmektedir ve bu çalışmada ele alınmıştır. CYP2D6 oldukça polimorfik bir gendir ve 100'den fazla varyantı (aleli) vardır (Gough ve diğ. 1993). Buna bağlı olarak birçok ilacın metabolik hızında bireyler arasında farklılıklar mevcuttur (Aynacıoğlu ve diğ. 1999). Enzim aktivitesi bakımından bireyler yavaş, normal, hızlı ve ultra hızlı metabolizör olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır.

Mesalazin (5-aminosalisilik asit, 5-ASA) giriş bölümünde de detaylı olarak açıklandığı üzere ülseratif kolit başta olmak üzere enflamatuvar bağırsak hastalıkları (EBH) hastaların tedavisinde ve remüsyon kontrolünde yer alan önemli bir ilaçtır. Mesalazin inflamatuvar aracılardan oluşumunu inhibe etmektedir. 5-ASA aktif bir bileşiktir. Tabletler midede zarar görmez ve iltihabın meydana geldiğı yer olan bağırsakta etkisini göstermektedir (Kaya ve Ekin 2012). Literatür taraması sonucunda elde edilen bilgilerde, 5-aminosalisilik asitin metabolizma yolağı asetilasyon yolağı olarak bilinmektedir. Karaciğerde ve bağırsak duvarında gerçekleşen asetilasyon reaksiyonları ile N-asetil-5-ASA'ya asetile olmaktadır (Sharon ve diğ. 1978; Hawkey ve diğ. 1985). Günümüzde EBH'nin semptomatik tedavisinde kullanılan ilaçların hiç

birisi hastalığı kesin olarak tedavi etmemektedir. Hastalığın etiyolojisi ve patofizyolojisi sebebiyle hastalar mesalazini hayatları boyunca kullanmaktadırlar.

Tez çalışmamızda kullandığımız enzimin CYP2D6 seçilmesinin nedeni; yapılan literatür çalışmasında elde edilen tek verinin daha önce laboratuvarımızda yapılmış 5-aminosalisilik asit ve CYP enzimleri bağımlı metabolizmasının incelendiği araştırmada 5-ASA'nın, CYP2D6 enzimleri tarafından metabolize edildiğine dair veriler bulunmasıdır (Kale 2016; Kale ve Şen 2019). Yapılan araştırmada 5-ASA ve saf CYP450 enzimleri (CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19) reaksiyona sokulmuş, 5-ASA ve enzimlerin inkübe edilmesiyle oluşan rengin yoğunluğunun okunması (kolorimetrik) ile aktivite tayin edilmiştir. CYP2D6'nın CYP3A4'e göre daha yüksek aktivite gösterdiği sonucu elde edilmiş ancak elde edilen sonuçların doğruluğunun daha kesin olarak iddia edilebilmesi için daha ileri ve daha güvenilir ölçümler yapılması durumu ortaya çıkmıştır (Kale 2016; Kale ve Şen 2019). Bizim çalışmamızda ise, bir önceki çalışmalardan farklı olarak 5-ASA metabolizmasının, N-asetilasyon yolağı dışında farklı ilaç metabolizması yolağıyla ya da CYP2D6 enzimleri tarafından metabolize edilip edilmediğinin daha hassas ve ölçümlerle paralel olarak yapılarak aydınlatılması amaçlanmıştır.

CYP'ler hakkında bilgi edinebilmek için hepatoma hücre hatları, transgenik hücre hatları, insan birincil hepatositleri, hayvan deneyleri gibi seçenekler uygulanabilmektedir (Brandon ve diğ. 2003). Yöntemlerin avantajı ve dezavantajı düşünülerek çalışmaya uygun olan metotlar seçilmektedir. Çalışmamızda saf rekombinant CYP enzimleri kullanılması; uygulanabilirlik, tekrarlanabilirlik, maliyet, güvenilirlik ve uygulanma açısından oldukça elverişli olarak görülmüştür. İlaç-ilaç etkileşimleri sonucunda gelişebilecek olasılıklarla ilgili literatüre yeni veriler katabilmek, inhibitör etkilerini araştırmak ve karakterize edebilmek amacıyla CYP enzimleri günümüzde rutin olarak kullanılmaktadır. Rekombinant insan CYP2D6'sı; spesifik olmayan bağlanmayı en aza indirme, yüksek verimli tarama ve özellikle de diğer seçeneklere oranla maliyetin nispeten düşük olması sebebiyle çalışmamızda tercih edilmiştir. Saf enzimin maliyeti mevcut bütçemize oranla çok daha yüksek olduğu için ilgili enzim çok az miktarda temin edilebilmiştir. Bu nedenle, çok tekrarlı deneyler yapabilmek için deneylerde kullanılan enzim miktarı oldukça düşük dozda tutulmuştur.

Bu çalışmada 5-ASA'nın, ilaç metabolizmasında görev alan CYP2D6 enzimleri üzerine olan etkisini görmek ve 5-ASA'nın CYP2D6 enzimi ile metabolize edilip-edilmediğinin öğrenmek amacıyla enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır. Öncelikle 5-ASA, uygun çözücüde çözülmeye çalışılmıştır. Denemelerde ultra saf su, asetonitril ve tetrahidrofuran (THF) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlarda 5-ASA'nın ultra saf su ve THF ile çözünmediği fakat asetonitril ile tam olarak çözünmediği görülmüştür. Sonrasında kullanılan "Biovision Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) Activity Assay (Fluorometric)" kitinin reaktifleri prosedürüne uygun olarak hazırlanmıştır. AHMC standart eğri grafiği oluşturulması için 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80 ve 100 pmol/kuyucuk AHMC ile standart bir eğri vererek ölçümü üç tekrarlı olarak yapılmıştır. CYP2D6'ya özgü aktivite, güçlü CYP2D6 seçici inhibitör kinidin varlığında ve yokluğunda; 5-ASA varlığında ve yokluğunda paralel reaksiyonlar yapılarak, mevcut inhibitör ile kontrollü olarak tekrarlanmıştır. Metodun optimizasyonu için farklı plakalar hazırlanmıştır. Öncelikle ölçümler gereken lineer eğriyi belirlemek için ilk olarak 90 dakika, sonrasında ise 60 ve 40 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerin sonuçlarında elde edilen grafiklere ve bakıldığında 90 ve 60 dakikalık ölçümlerin enzim miktarına göre yeterli olmağı görülmüş ve en uygun 40 dakika ölçüm seçilmiştir. Sonrasında enzim aktivitesinin, substrat konsantrasyonu artışıyla değişimine bakılmıştır. Substrat miktarı etkisini görmek için değişen enzim miktarlarında grafikler çizilmiştir. Substrat konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesinin de arttığı görülmüştür. İnhibitör etkisini görebilmek için ise öncelikle artan substrat ve artan 5-ASA konsantrasyonunda aktivite grafikleri çizilmiştir. Sonrasında substrat miktarı sabit tutulup 5-ASA konsantrasyonu arttırıldığında aktivitenin düştüğü görülmüştür. Kinidin etkisini incelemek için seçilen tüplerin substrat konsantrasyonu 5 µM olarak sabit tutulmuştur. CYP2D6 normal aktivitesi 245 pmol/dak/ml iken 2,5 µM kinidin içeren tüpte aktivitenin 34 pmol/dak/ml'e düştüğü görülmüştür. 5-ASA aktivitesi ile karşılaştıracak olursa, 2,25 µM 5-ASA içeren tüpte ise aktivitenin 145 pmol/dak/ml'e düştüğü görülmüştür. Elde edilen bu sonuç; 5-ASA'nın, substrat değil inhibitör olduğu sonucunu desteklemektedir. Bu deneyler sırasında tüm plakalar için pH 8,0, sıcaklık 37 °C, tampon ve kofaktör sabit tutulmuştur. Bunun sebebi ise, kullanılan deneysel kitin prosedüründeki belirlenen optimum pH ve sıcaklık değerleri ve aynı zamanda mevcut literatürde de işaret edildiği şekli ile yapılmasından kaynaklanmıştır (Chou ve diğ. 2003). Çalışmada CYP2D6'ya özgü substrat AMMC kullanılmıştır ve AMMC CYP2D6 için spesifik substrat olarak

kabul edilmektedir (Fliszár-Nyúl ve diğ. 2020). AMMC'nin CYP2D6 bağımlı demetilizasyonu neticesinde oluşan AHMC, az hacimde tayin edilebilir hassas bir substrattır ve bu nedenle de çalışmamızda kullanılmıştır. Hazır kitten temin edilen kinidin, CYP2D6 için bilinen bir prototip inhibitördür. Sonrasında olası metabolitlerin varlığını tayin etmek için yapılan ölçümler Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi (İLMER)'nde Doç. Dr. Işıl GAZİOĞLU tarafından gerçekleştirilmiştir. Örneklerin ölçümlerinden elde edilen tüm değerler tezimiz içerisinde tüm detayları ile verilmiştir. Birinci tur deneyler sonucunda elde edilen örneklerin spekturumlarına baktığımızda; 154 [M⁺], 108 [M-H-CO₂], 112 [M-H-CH₂CO], 136 [M-H-H₂O] piklerinin ortak ve 5-ASA'nın pikleri olduğu görülmüştür.

HPLC-ESI-MS/MS ölçümlerinin birinci tur çalışmaları için hazırlanan 7 örneğe baktığımızda, enzim içermeyen tüp 3'te hesaplanan 5-ASA miktarı 0,025 mM'dir. Enzim eklenen tüp 6'da ise 0,027 mM olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar tezimizin çıkış noktası olan hipotezimizi destekler nitelikte bulunmamıştır. İkinci tur deneyler için hazırlanan dört örnekten elde edilen sonuçlara baktığımızda ise tüplerdeki 5-ASA miktarlarının sırasıyla 0,026 mM, 0,022 mM 0,022 mM ve 0,022 mM olduğu görülmüştür. İkinci tur ölçümlerde hesaplanan bu değerler yine 5-ASA'nın CYP2D6 substratı değil inhibitörü olduğunu desteklemektedir. Kinidin eklenen tüp 4'te ise 5-ASA miktarında herhangi bir değişiklik görülmemiştir.

Sitokrom P450 redüktaz, değişik dokuların endoplazmik retikulumunda bulunan membrana bağlıdır. Bu enzim indirgeyici eşdeğerliklerin NADPH'den sitokrom P450'ye transfer edilmesini sağlamaktadır. Sitokrom P450 redüktaz ve sitokrom P450'den oluşan monooksijenazlar, ilaçlar gibi kimyasal maddenin maddelerin hidroksilasyon reaksiyonlarını katalize etmektedirler (Lu ve diğ. 1972). Araştırmamızda HPLC-ESI-MS/MS ölçümleri için örnekler hazırlanırken enzim eklenmeyen tüpler, yani tüp 3 ve tüp 4, substratın enzim yokluğunda parçalanıp parçalanmadığını öğrenmek amacıyla hazırlanmıştır. Substratın, P450 redüktaz tarafından parçalanma ya da herhangi bir etkileşim olup olmadığının aydınlatılması için tüp 5'te ortama kinidin eklenmiştir. Böylelikle enzim çalışmıyorken parçalanma ürünleri olup-olmadığını görmek amaçlanmıştır. Sonuçlara bakıldığında ise ortamda herhangi bir parçalanma ürünü görülmemiştir. 5-ASA miktarında kinidin eklenmeyen 6. tüple karşılaştırdığımızda ise 0,023 mM fark olduğu görülmüştür. Başka açıdan

bakıldığında 5-ASA, CYP2D6'yı değil P450 redüktazı inhibe ediyor olması ihtimalini düşündürmektedir. Eğer bir inhibisyon durumu mevcut ise bu nedenle elektron transferinin gerçekleşmediği düşünülebilecektir. Bu durum çalışmamızdan elde edilen sonuçların ortaya çıkardığı yeni bir bilimsel soru olarak değerlendirilmelidir. Mevcut laboratuvar ve bütçe kısıtlamasından dolayı elimizde yeterli miktarda enzim olmaması, enzimin içerdiği redüktaz miktarının bilinmemesi gibi nedenlerden dolayı arzu edilen hedeflere ulaşamamıştır.

Temel olarak; ilaçları metabolize eden enzimlerin, ilacın etkili olduğu reseptörlerin, ilaçların metabolizma yollarının araştırılması ve hastalara biyokimyasal testlerin yanında genetik testlerin de yapılması, tedavilerin kişiselleştirilmesi için büyük önem taşımaktadır. Kişiselleştirilmiş tedavi; doğru ve uygun dozda ilaç seçimine, terapötik yanıtının maksimuma çıkmasına, yan etkilerin yanı sıra toksik belirtilerin en aza inmesine, gereksiz ilaç kullanımının önlenmesine ve böylelikle tedavi maliyetinin minimuma düşürülmesine olanak sağlayacaktır. CYP2D6'nın çoklu ilaç kullanımında büyük rol oynaması, CYP2D6 genotipine dayalı klinik reçetelemeyi önemli bir yapıtaş haline getirmektedir (Taylor ve diğ. 2020). CYP2D6 için genotipleme testinin klinikte rutin olarak yapılmadığı göz önüne alındığında, CYP2D6'ya bağımlı ilaç metabolizmasının etkisine ilişkin daha ileri prospektif çalışmaların büyük öneme sahip olduğu çok açıktır. Bu doğrultuda, sadece CYP2D6 için değil, bütün P450 ailesinin farmakogenetik profilin analiz edilmesi ve bir veritabanı oluşturulması ile hekimler, hastalarına özgü başarılı tedavi planlayabileceklerdir. Böylelikle, polimorfizmle ilgili bilgilerin artması, ilaç dozlarının bireyselleştirilmesine, tedavi yanıtlarının maksimuma çıkmasına, yan etkilerin ve toksik durumların en aza inmesini sağlayacaktır. Ayrıca, hastaların CYP2D6 metabolize edici statüleri rutin bilgilerine eklendiğinde, yan etki reaksiyonları önlenerek sağlık sisteminde kullanılan kaynaklardan tasarruf edilecek ve bu sayede sağlık sektörünün yükü hafifletilebilecektir.

Sonuç olarak; 5-ASA metabolizmasının, N-asetilasyon yolağı dışında farklı ilaç metabolizması yolağıyla CYP2D6 tarafından metabolize edilip-edilmediği incelenmiştir. 5-ASA metabolizması ile ilgili yapılan tüm aktivite çalışmaları (ölçüm sonuçları ve kullanılan metodun güvenilir olduğu da birlikte değerlendirilerek), 5-ASA'nın CYP450 enzimlerinden CYP2D6'nın aktivitesini inhibe etme özelliği

taşıdığı görülmüştür. 5-ASA'nın, klinikte reçete edilen ilaçların %25'ni metabolizmasında rol oynayan CYP2D6 izozimiyle birlikte metabolizması irdelendiğinde, 5-ASA'nın enteresan olarak CYP2D6'yı inhibe ettiği saptanmıştır. Şekil 3.72'de çizilen grafikte aktivitede Vmax değeri 300 (pmol/dak/ml), Km değeri ise 1,99 görülmüştür. Artan 5-ASA konsantrasyonunda aktivitede Vmax değeri 220 (pmol/dak/ml), Km değeri ise 0,81 görülmüştür. Böylece 5-ASA reaksiyona sokulduğunda yarışmasız inhibisyon yaptığı düşünülmüştür. Bu veriler, mevcut bilimsel literatür için yeni bir bulgudur. Kontrollü ve tekrarlı deneylerle ele alınan sonuçlar, 5-ASA kullanan hastalar için ilaç-ilaç interaksiyonları açısından hayati önemde olmakla beraber, ileride 5-ASA ile yapılacak olan araştırmalara da ışık tutacaktır. Kullanılan enzim miktarının artırılması ile yapılacak daha detaylı analizler ile sonuçların evrensel olarak geçerliliği test edilmelidir. Ayrıca, elde edilen ve gelecek vaat eden bilgiler hayvan deneyleri ve/veya insan çalışmaları ile desteklenmelidir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada inhibitör, substrat varlığında ve yokluğunda yapılan ölçümler HPLC-ESI-MS/MS analizleriyle de beraber değerlendirildiğinde, 5-ASA'nın CYP450 izozimlerinden olan CYP2D6 enziminin substratı olmadığı ancak inhibitörü olduğu görülmüştür. Sonuçlara bakıldığında 5-ASA'nın, aktif yüzeye bağlanmadığı fakat yüzey bağlanmasını etkilediği görülmüştür. Ölçümlerde elde edilen sonuçlara bakılarak yarışmasız inhibitör olduğu düşünülmüştür. Böylelikle 5-ASA'nın CYP2D6'nın substratı değil inhibitörü olduğu fikri ilk kez tarafımızca ispatlanmıştır. Crohn ve ülseratif kolit gibi enflamatuvar bağırsak hastalığına sahip hastaların tedavisine katkı sağlamak amacıyla kullandıkları ilaçlar açısından bakıldığında, bu bilgi literatür için oldukça önemlidir. Ayrıca klinikte kişiselleştirilmiş tedavinin yaygınlaştırılmasının 5-ASA'yı hayatları boyunca kullanan hastalara reçete edilen ilaçların terapötik etkisinin görülebilmesi açısından hayati olduğu da çok açıktır. Daha ileriki süreçlerde ise hayvan deneylerinde gerekli çalışmaların yürütülmesiyle desteklenerek söz konusu metabolizma daha iyi anlaşılabilir kılacaktır. Aynı zamanda literatüre kazandırılan CYP2D6 aktivite ölçümü için kullanılabilecek yeni ölçüm metoduyla, ileride başka ilaç etken maddeleri ile CYP2D6 ilişkisi kolayca değerlendirilebilecektir. Diğer taraftan tarafımızca bu tez çalışması ile literatüre eklenen bilgiyle, mevcut ilaç-ilaç etkileşimlerinin yeniden değerlendirilmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

Acharjya, S. K., Sahu, A., Das, S., Sagar, P., Annapurna, M. M., "Spectrophotometric methods for the determination of mesalamine in bulk and pharmaceutical dosage forms", *J. Pharm. Educ. Res.*, 1 (1), 63-67, (2010).

Al-Jenoobi, F. I., Al-Thukair, A. A., Abbas, F. A., Ansari, M. J., Alkharfy, K. M., Al-Mohizea, A. M., SAl-Suwayeh, S. A., Jamil, S., "Effect of black seed on dextromethorphan O- and N-Demethylation in human liver microsomes and healthy human Subjects", *Drug Metab. Dispos.*, 4, 51-55, (2010).

Allgayer, H., Ahnfelt, N. O., Kruis, W., Klotz, U., Frank-Holmberg, K., Söderberg, H. N., Paumgartner, G., "Colonic N-acetylation of 5-aminosalicylic acid in inflammatory bowel disease", *Gastroenterology*, 97 (1), 38-41, (1989).

Ariane, R., Guthrie, H. H., Chow, S., Martinez, J. A., "Effects of resveratrol on drug and carcinogen-metabolizing enzymes, implications for cancer prevention", *Pharmacol. Res. Perspect.*, 5 (1), 1-16, (2017).

Arınç, E. and Şen, A., "Hepatic cytochrome P4501A and 7-ethoxyresorufin O-deethylase induction in mullet and common sole as an indicator of toxic organic pollution in Izmir Bay, Turkey", *Mar. Environ. Res.*, 48 (2), 147-160, (1999).

Arınç, E., "General aspects of NADPH cytochrome P-450 reductase and cytochrome b5", (Eds.) Arınç, E., Schenkman, J. B., Hodgson, E., *Molecular Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes*, 90, Berlin: NATO ASI Series, 21-45, (1995).

Aynacıoğlu, A. S., Sachse, C., Bozkurt, A., Kortunay, S., Nacak, M., Schröder, T., Kayaalp, S. O., Roots, I., Brockmöller, J., "Low frequency of defective alleles of cytochrome P450 enzymes 2C19 and 2D6 in the Turkish population", *Clin. Pharmacol. Ther.*, 8, 185-192, (1999).

Azad Khan A. K., Piris, J., Truelove, S. C., "An experiment to determine the active moiety of Sulphasalazine", *Lancet*, 310, 892-895, (1977).

Bakin, L. S. and Yang, C. S., "Cross-linking studies of cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P450 reductase", *Biochemistry*, 19, 2260-2264, (1980).

Beg, M. R., “A review commentary on quinidine kinetics (PK modelling)”, online Publication, doi: 10.31219/osf.io/y2mw3, (2020).

Bouvy, J. C., De Bruin, M. L., Koopmanschap M. A., “Epidemiology of adverse drug reactions in Europe: A review of recent observational studies”, *Drug Saf.*, 38 (5), 437-453, (2015).

Brandon, E. F. A., Raap, C. D., Meijerman, I., Beijnen, J. H. Schellens, J. H. M., “An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: Pros and cons”, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 189 (3), 233-246, (2003).

Brunton, L. L., Lazo, J. S., Parker, K. L., (Ed.), Süzer, Ö., *Tedavinin Farmakolojik Temeli*, 11, 71-93, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, (2009).

Buhler, D. R. and Williams, D. E., “The role of biotransformation in the toxicity of chemicals”, *Aquat. Toxicol.*, 11, 19-28, (1988).

Bus, P. J., Nagtegaal, I. D., Verspaget, H. W., Lamers, C. B., Geldof, H., Van Krieken, J. H., Griffioen, G., “Mesalazine-induced apoptosis of colorectal cancer: on the verge of a new chemopreventive era?”, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 13, 1397-1402, (1999).

Caudle, K. E., Sangkuhl, K., Whirl-Carrillo, M., Swen, J. J., Haidar, C. E., Klein, T. E., Gammal, R. S., Relling, M. V., Scott, S. A., Hertz, D. L., Guchelaar, H. J., Gaedigk, A., “Standardizing CYP2D6 genotype to phenotype translation: Consensus recommendations from the clinical pharmacogenetics implementation consortium and dutch pharmacogenetics working group”, *Clin. Transl. Sci.*, 13 (1), 116-124, (2020).

Ching, M. S., Blake, C. L., Ghabrial, H., Ellis, S. W., Lennard M. S., Tucker G. T., Smallwood, R. A., “Potent inhibition of yeast-expressed CYP2D6 by dihydroquinidine, quinidine, and its metabolites”, *Biochem. Pharmacol.*, 50 (6), 833-837, (1995).

Chou, W. H., Yan, F. X., Robbins-Weilert, D. K., Ryder, T. B., Liu, W. W., Fairchild, C. P. M., de Leon, J., Koch, W. H., Wedlund, P. J., “Comparison of two CYP2D6 genotyping methods and assessment of genotype-phenotype relationships”, *Clin. Chem.*, 49 (4), 542-551, (2003).

Chourasia, M. K. and Jain, S. K., “Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems”, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 6, 33-66, (2003).

Crews, K. R., Hicks, J. K., Pui, C. H., Relling, M. V., Evans, W. E., “Pharmacogenomics and individualized medicine: Translating science into practice”, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 92 (4), 467-475, (2012).

Das, K. M. and Dubin, R., “Clinical pharmacokinetics of sulfasalazine”, *Clin. Pharmacokinet.*, 1, 406-425, (1976).

Dutheil, F., Dauchy, S., Diry, M., Sazdovitch, V., Cloarec, O., Mellottée, L., Bièche, I., Ingelman-Sundberg, M., Flinois, J. P., De Waziers, I., Beaune, P., Declèves, X., Duyckaerts, C., Lorient, M. A., “Xenobiotic-metabolizing enzymes and transporters in the normal human brain: Regional and cellular mapping as a basis for putative roles in cerebral function”, *Drug Metab. Dispos.*, 37, 1528-1538, (2009).

Extrahepatic Metabolism, (07 June 2019), <https://www.creative-biolabs.com/drug-discovery/therapeutics/extrahepatic-metabolism.htm>, (2020).

Fliszár-Nyúl, E., Mohos, V., Csepregi, R., Mladěnka, P., Poór, M., “Inhibitory effects of polyphenols and their colonic metabolites on CYP2D6 enzyme using two different substrates”, *Biomed. Pharmacother.*, 131, 1-9, (2020).

Fejzullahu, A., “Genetik faktörlerin (CYP2D6) ilaç metabolizması üzerindeki etkisi”, *Aydın Sağlık Dergisi*, 4 (1), 1-20, (2018).

Frieri, G., Pimpo, M. T., Palumbo, G. C., Onori, L., Viscido, A., Latella, G., Galletti, B., Pantaleoni, G. C., Caprilli, R., “Rectal and colonic mesalazine concentration in ulcerative colitis: Oral vs. oral plus topical treatment”, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 13, 1413-1417, (1999).

Ford, E. B., “Polymorphism”, *Biol.*, 20 (2), 73-88, (1945).

Ghosal, A., Hapangama, N., Yuan, Y., Lu, X., Horne, D., Patrick, J. E., Zbaida, S., “Rapid determination of enzyme activities of recombinant human cytochromes P450, human liver microsomes and hepatocytes”, *Biopharm. Drug Dispos.*, 24 (9), 375-384, (2003).

Gopisankar, M. G., “CYP2D6 pharmacogenomics”, *Egypt. J. Medical Hum. Genet.*, 18, 309-313, (2017).

Gough, A. C., Smith, C. A., Howell, S. M., Wolf, C. R., Bryant S. P., Spurr, N. K., “Localization of the CYP2D gene locus to human chromosome 22q13.1 by polymerase chain reaction, in situ hybridization, and linkage analysis”, *Genomics*, 15, 430-432, (1993).

Guengerich, F. P., "Cytochrome P450 and Chemical Toxicology", *Chem. Res. Toxicol.*, 21 (1), 70-83, (2008).

Guengerich, F., "Metabolic reactions: Types of reactions of cytochrome P450 enzymes", (eds.): Schenkman, J. B., Greim, H., *Handbook of Experimental Pharmacology*, Switzerland: Heidelberg, Springer-Verlag Press, 89-103, (1993).

Gurley, B. J., Swain, A., Hubbard, M. A., Williams, D. K., Barone, G., Hartsfield, F., Tong, Y., Carrier, D. J., Cheboyina, S., Battu, S. K., "Clinical assessment of CYP2D6-mediated herb-drug interactions in humans: Effects of milk thistle, black cohosh, goldenseal, kava kava, St. John's wort, and echinacea", *Mol. Nutr. Food. Res.*, 52 (7), 755-763, (2008).

Hansten, P. D., "The Underrated Risks of Tamoxifen Drug Interactions", *Eur. J. Drug Metab. Phar.*, 43, 495-508, (2018).

Hasler, J. A., Estabrook, R., Murray, M., Pikuleva, I., Waterman, M., Capdevila, J., Holla, V., Helvig, C., Falck, J. R., Farrell, G., Kaminsky, L. S., Spivack, S. D., Boitier, E., Beaune, P., "Human cytochromes P450", *Mol. Aspects Med.*, 20, 1-137, (1999).

Hassan, F., Mohammed, G., Mahdi, S., Mahdy, S., Win Y. F., Mohammed, S., Yousif, E., "Cytochrome P450s in breast cancer", *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, 7 (5), 243-251, (2018).

Hawkey, C. J., Boughton-Smith, N. K., Whittle, B. J., "Modulation of human colonic arachidonic acid metabolism by sulfasalazine", *Dig. Dis. Sci.*, 30, 1161-1165, (1985).

Heim, M. H. and Meyer, U. A., "Evolution of a highly polymorphic human cytochrome P450 gene cluster: CYP2D6", *Genomics*, 14 (1), 49-58, (1992).

Ioannides, C. and Parke, D. V., "The cytochrome-P450-I gene family of microsomal hemoproteins and their role in the metabolic-activation of chemicals", *Drug Metab. Rev.*, 22 (1), 1-85, (1990).

Jefferson, J. W., "Drug and diet interactions avoiding therapeutic paralysis", *J. Clin. Psychiatry*, 59, 31-39, (1998).

Kaiser, G. C., Yan, F., Polk, D. B., "Mesalamine blocks tumor necrosis factor growth inhibition and nuclear factor κ B activation in mouse colonocytes", *Gastroenterology*, 116, 602-609, (1999).

Kale, E. and Şen, A., “Characterization of human CYP450 isozymes responsible for the in vitro oxidative metabolism of mesalamine used for colitis”, *Innovations in Science and Education*, 7, 753-759, (2019).

Kale, E., “5-amino salisilik asitin CYP450 bağımlı metabolizmasının karakterize edilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Denizli, (2016).

Kaya, M. ve Ekin, N., “Ülseratif kolitte güncel tedavi”, *Güncel Gastroenteroloji*, 16 (2), 136-142, (2012).

Khalaj, Z., Baratieh, Z., Nikpour, P., Khanahmad, H., Mokarian, F., Salehi, R., Salehi, M., “Distribution of CYP2D6 polymorphism in the Middle Eastern region”, *J. Res. Med. Sci.*, 24 (61), 1-6, (2019).

Kim, D. S., Kim, Y., Jeon, J. Y., Kim, M. G., “Effect of red ginseng on cytochrome P450 and p-glycoprotein activities in healthy volunteers”, *J. Ginseng Res.*, 40 (4), 375-381, (2016).

Klotz, U., “Clinical pharmacokinetics of sulphasalazine, its metabolites and other prodrugs of 5-aminosalicylic acid”, *Clin. Pharmacokinet.*, 10 (4), 285-302, (1985).

Koopmans, A. B., Braakman, M. H., Vinkers, D. J., Hoek, H. W., van Harten, P. N., “Meta-analysis of probability estimates of worldwide variation of CYP2D6 and CYP2C19”, *Transl. Psychiatry*, 11, 1-16, (2021).

Koren, G., Cairns, J., Chitayat, D., Gaedigk, A., Leeder, S. J., “Pharmacogenetics of morphine poisoning in a breastfed neonate of a codeine-prescribed mother”, *Lancet*, 368, 704-714, (2006).

Kruis, W., Schreiber, S., Theuer, D., Branders, J., Howaldt, S., Krakamp, B., Hamling, J., Mönnikes, H., Koop, I., Stolte, M., Pallant, D., Ewald, U., “Low dose balsalazide (1.5 g twice daily) and mesalazine (0.5 g three times daily) maintained remission of ulcerative colitis but high dose balsalazide (3.0 g twice daily) was superior in preventing relapses”, *Gut*, 49, 783, (2001).

Lopes, G. S., Bielinski, S. J., Moyer, A. M., Black, J. L., Jacobson, D. J., Jiang, R., Larson, N. B., St Sauver, J. L., “Sex differences in associations between CYP2D6 phenotypes and response to opioid analgesics”, *Pharmacogenomics Pers. Med.*, 13, 71-79, (2020).

Lu, A. Y. H., Kuntzman, R., West, S., Jacobson, M., Conney, A. H., "Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds and endogenous substrates. II. role of the cytochrome P450 and P448 fractions in drug and steroid hydroxylations", *J. Biol. Chem.*, 247, 1727-1734, (1972).

Mahida, Y. R., Lamming, C. E., Gallagher, A., Hawthorne, A. B., Hawkey, C. J., "5-aminosalicylic acid is a potent inhibitor of interleukin 1 beta production in organ culture of colonic biopsy specimens from patients with inflammatory bowel disease", *Gut*, 32, 50-54, (1991).

Mann, A., Miksys, S. L., Gaedigk, A., Kish, S. J., Mash, D. C., Tyndale, R. F., "The neuroprotective enzyme CYP2D6 increases in the brain with age and is lower in Parkinson's disease patients", *Neurobiol. Aging*, 33 (9), 2160-2171, (2012).

Marzo, A. and Balant, L. P., "Investigation of xenobiotic metabolism by CYP2D6 and CYP2C19: Importance of enantioselective analytical methods", *J. Chromatogr. B*, 678, 73-92, (1996).

Mizuno, N., Niwa, T., Yotsumoto Y., Sugiyama, Y., "Impact of drug transporter studies on drug discovery and development", *Pharmacol. Rev.*, 55 (3) 425-461, (2003).

Monostory, K. and Dvorak, Z., "Steroid regulation of drug-metabolizing cytochromes P450", *Curr. Drug Metab.*, 12 (2), 154-172, (2011).

Murray, A., Nguyen, T. M., Parker, C. E., Feagan, B. G., MacDonald, J. K., "Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis", *Cochrane Database Syst. Rev.*, 8, 1-126, (2020).

Nebert, D. W. and Russell, D. W., "Clinical importance of the cytochromes P450", *Lancet*, 360, 1155-1162, (2002).

Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., Nebert, D. W., "P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, and nomenclature", *Pharmacogenet.*, 6 (1), 1-42, (1996).

Nelson, D. R., "Cytochrome P450 nomenclature", *Methods Mol. Biol.*, 320, 1-10, (2004).

Nielsen, O. H. and Munck, L. K., “Drug insight: Aminosalicylates for the treatment of IBD”, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 4 (3), 160-170, (2007).

Niesink, R. J. M., Vries, J., Hollinger, M. A. (Eds.), “Absorption, distribution and elimination of xenobiotics”, *Toxicology: Principles and Applications*, Florida: CRC Press, (1996).

Nobilis, M., Vybíralová, Z., Sládková, K., Lída, M., Holčapek, M., Květina, J., “High-performance liquid-chromatographic determination of 5-aminosalicylic acid and its metabolites in blood plasma”, *J. Chromatogr. A*, 1119, 299-308, (2006).

O'Mathuna, B., Farré, M., Rostami-Hodjegan, A., Yang, J., Cuyàs, E., Torrens, M., Pardo, R., Abanades, S., Maluf, S., Tucker, G. T., de la Torre, R., “The consequences of CYP2D6 inhibition in humans”, *J. Clin. Psychopharmacol.*, 28, 525-531, (2008).

Omura, T. and Sato, R., “A new cytochrome in liver microsomes”, *J. Biol. Chem.*, 237 (4), 1375-1376, (1962).

Özata, M., Aslan, Ş., Mete, M., “Rasyonel ilaç kullanımının hasta güvenliğine etkileri: Hekimlerin rasyonel ilaç kullanımına etki eden faktörlerin belirlenmesi”, *Selçuk Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, 20, 529-543, (2008).

Özdemir, Z. ve Karakurt, A., “İlaç metabolizması ve farmasötik kimyada önemi”, *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5 (2), 35-46, (2016).

Özerol, E., “Sitokrom P450 monooksijenaz enzim sistemleri”, *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 3 (3), 257-275, (1996).

Pandian, B. A., Sathishraj, R., Djanaguiraman, M., Prasad, P. V. V., Jugulam, M., “Role of cytochrome P450 enzymes in plant stress response”, *Antioxidants*, 9, 2-15, (2020).

Park, B. K., Pirmohamed, M., Kitteringham, N. R., “The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity”, *Pharmacol. Ther.*, 68, 3, 385-424, (1995).

Parkinson, A., “Biotransformation of xenobiotics”, (Eds.), Klaassen, C. D., Watkins, J. B., *Casarett & Doull's Essentials of Toxicology*, 3, ABD: The McGraw-Hill Companies, (2001).

Peppercorn, M. A. and Goldman, P., "The role of intestinal bacteria in the metabolism of salicylazosulfapyridine", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 131, 555-562, (1972).

Podolsky, D. K., "Inflammatory bowel disease", *N. Engl. J. Med.*, 347, 417-429, (2002).

Porter, T. D. and Coon, M. J., "Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms", *J. Biol. Chem.*, 266 (21), 13469-13472, (1991).

Poulos, T. L., Finzel, B. C., Howard, A. J., "Crystal structure of substrate-free pseudomonas putida cytochrome P-450", *Biochemistry*, 25 (18), 5314-5322, (1986).

Preissner, S. C., Hoffmann, M. F., Preissner, R., Dunkel, M., Gewiess, A., Preissner, S., "Polymorphic cytochrome P450 enzymes (CYPs) and their role in personalized therapy", *PloS One*, 8 (12), 1-12, (2013).

Preskorn, S. H., "Reducing the risk of drug–drug interaction: A goal of rational drug development", *J. Clin. Psychiatry*, 57, 3-6 (1996).

Ravyn, D., Ravyn, V., Lowney, R., Nasrallah, H. A., "CYP450 pharmacogenetic treatment strategies for antipsychotics: A review of the Evidence", *Schizophr. Res.*, 149, 1-14 (2013).

Rendic, S. and Guengerich, F. P., "Survey of human oxidoreductases and cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of xenobiotic and natural chemicals", *Chem. Res. Toxicol.*, 28 (1), 38-42, (2015).

Rettie, E. and Jones, P., "Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: drug–drug interactions and pharmacogenetics", *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 477-494, (2005).

Rodrigues, M. C. S. and Oliveria, C., "Drug-drug interactions and adverse drug reactions in polypharmacy among older adults: An integrative review", *Rev. Lat.-Am. Enferm.*, 24, 1-17, (2016).

Roman, L. J. and Masters, B. S. S., "The cytochromes P450 and nitric oxide synthases", (Ed.), Devlin, T. M., *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, ABD, 987-989, (1992).

Rollas, S., *İlaç Metabolizması (Biyotransformasyon)*, İstanbul: Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, (1992).

Rowland, P., Blaney, F. E., Smyth, M. G., Jones, J. J., Leydon, V. R., Oxbrow, A. K., Lewis, C. J., Tennant, M. G., Modi, S., Eggleston, D. S., Chenery, R. J., Bridges, A. M., "Crystal structure of human cytochrome P450 2D6", *J. Biol. Chem.*, 281 (11), 154-172, (2006).

Rozman, K. K. and Klaassen, C. D., *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, New York: The McGraw-Hill Companies, (2001).

Samer, C. F., Lorenzini, K. I., Rollason, V., Daali, Y., Desmeules J. A., "Applications of CYP450 testing in the clinical setting", *Mol. Diagn. Ther.*, 17 (3), 165-184, (2013).

Santos, M., Niemi, M., Hiratsuka, M., Kumondai, M., Ingelman-Sundberg, M., Lauschke, V. M., Rodríguez-Antona, C., "Novel copy-number variations in pharmacogenes contribute to interindividual differences in drug pharmacokinetics", *Genet. Med.*, 20, 622-629, (2018).

Sasaki, T., Sato, Y., Kumagai, T., Yoshinari, K., Nagata, K., "Effect of health foods on cytochrome P450 mediated drug metabolism", *J. Pharm. Health Care Sci*, 3 (14), 1-11, (2017).

Serdoz, L. V., Rittger, H., Furlanello, F., Bastian, D., "Quinidine-A legacy within the modern era of antiarrhythmic therapy", *Pharmacol. Res.*, 144, 257-263, (2019).

Shafii, A., Chowdhury, J. R., Das, K. M., "Absorption, enterohepatic circulation, and excretion of 5-aminosalicylic acid in rats", *Am. J. Gastroenterol.*, 77 (5), 297-299, (1982).

Sharifian, S., Homaei, A., Kamrani, E., Etzerodt, T., Patel, S., "New insights on the marine cytochrome P450 enzymes and their biotechnological importance", *Int. J. Biol. Macromol.*, 142, 811-821, (2020).

Sharon, P., Ligumsky, M., Rachmilewitz, D., Zor, U., "Role of prostaglandins in ulcerative colitis: enhanced production during active disease and inhibition by sulfasalazine", *Gastroenterology*, 75, 638-640, (1978).

Soldin, O. P., Mattison, D. R., "Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics", *Clin. Pharmacokinet.*, 48 (3), 143-157, (2009).

Spatzenegger, M. and Jaeger, W., "Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism", *Drug Metab. Rev.*, 27 (3), 397-417, (1995).

Stenson, W. F. and Lobos, E., "Sulfasalazine inhibits the synthesis of chemotactic lipids by neutrophils", *J. Clin. Investig.*, 69, 494-497, (1982).

Strobl, G. R., von Krüedener, S., Stockigt, J., Guengerich, F. P., Wolff, T., "Development of a pharmacophore for inhibition of human liver cytochrome P-450 2D6: Molecular modeling and inhibition studies", *J. Med. Chem.*, 36, 1136-1145, (1993).

Svartz, N., "Salazopyrin, a new sulfanilamide preparation. A. Therapeutic results in rheumatic polyarthritis. B. Therapeutic results in ulcerative colitis. C. Toxic manifestations in treatment with sulfanilamide preparations", *Acta Med. Scand.*, 110 (6), 577-598, (1942).

Svartz, N., "The treatment of 124 cases of ulcerative colitis with salazopyrine and attempts of desensitization in cases of hypersensitiveness to sulpha", *Acta Med. Scand.*, 206, 465-470, (1948).

Taylor, C., Crosby, I., Yip, V., Maguire, P., Pirmohamed, M., Turner, R. M., "A review of the important role of CYP2D6 in pharmacogenomics", *Genes*, 1295 (11), 1-22 (2020).

Terdiman, J. P., Steinbuch, M., Blumentals, W. A., Ullman, T. A., Rubin, D. T., "5-Aminosalicylic acid therapy and the risk of colorectal cancer among patients with inflammatory bowel disease", *Inflamm. Bowel Dis.*, 13 (4), 367-371, (2007).

van Hees, P. A. M., *Clinical and pharmacological aspects of sulfasalazine*, Nijmegen: Gist-Brocades NV Delft., 31-35, (1979).

VandenBrink, B. M., Foti, R. S., Rock, D. A., Wienkers, L. C., Wahlstrom, J. L., "Prediction of CYP2D6 drug interactions from in vitro data: Evidence for substrate-dependent inhibition", *Drug Metab. Dispos.*, 40, 47-53, (2012).

Velayos, F. S., Terdiman, J. P., Walsh, J. M., "Effect of 5-aminosalicylate use on colorectal cancer and dysplasia risk: A systematic review and metaanalysis of observational studies", *Am. J. Gastroenterol.*, 100 (6), 1345-1353, (2005).

Wang, A., Stout, C. D., Zhang, Q., Johnson, E. F., "Contributions of ionic interactions and protein dynamics to cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) substrate and inhibitor binding", *J. Biol. Chem.*, 290 (8), 5092-5104, (2014).

Wang, X., Li, J., Dong, G., Yue, J., "The endogenous substrates of brain CYP2D", *Eur. J. Pharmacol.*, 724, 211-218, (2014).

Williams, C., “Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease”, *Therap. Adv. Gastroenterol.*, 4 (4): 237-248 (2011).

Yamazaki, H. and Shimada, T., “Effects of arachidonic acid, prostaglandins, retinol, retinoic acid and cholecalciferol on xenobiotic oxidations catalysed by human cytochrome P450 enzymes”, *Xenobiotica*, 29 (3), 231-241, (1999).

Yang, F., Hanon, S., Lam, P., Schweitzer, P., “Quinidine revisited”, *Am. J. Med.*, 122 (4), 317-321, (2009).

Yang, X., Solomon, S., Fraser, L. R., Trombino, A. F., Liu, D., Sonenshein, G. E., Hestermann, E. V., Sherr, D. H., “Constitutive regulation of CYP1B1 by the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in pre-malignant and malignant mammary tissue”, *J. Cell. Biochem.*, 104 (2), 402-417, (2008).

Yüksel, N., “Sitokrom P450 enzim sistemi ve ilaç etkileşimleri”, *J. Clin. Psy.*, 4 (1) 5-16, (2001).

Zanger, U. M., Turpeinen, M., Klein, K., Schwab, M., “Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation”, *Anal. Bioanal. Chem.*, 392, 1093-1108, (2008).