



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**ŞİZOFRENİ HASTALARINDA KLOZAPİN VE
NORKLOZAPİN KAN PLAZMA DÜZEYLERİNE
ABCB1 3435C>T VE UGT1A4 L48V
POLİMORFİZMLERİNİN ETKİSİ**

Fezile ÖZDEMİR

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
ADLİ KİMYA VE ADLİ TOKSİKOLOJİ PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof.Dr. H. Sinan SÜZEN**

ANKARA

2020

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ŞİZOFRENİ HASTALARINDA KLOZAPİN VE
NORKLOZAPİN KAN PLAZMA DÜZEYLERİNE
ABCB1 3435C>T VE UGT1A4 L48V
POLİMORFİZMLERİNİN ETKİSİ**

Fezile ÖZDEMİR

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
ADLİ KİMYA VE ADLİ TOKSİKOLOJİ PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof.Dr. H. Sinan SÜZEN

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
18L0217001 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2020

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Şizofreni Hastalarında Klozapin ve Norklozapin Kan Plazma Düzeylerine ABCB1 3435C>T Ve UGT1A4 L48V Polimorfizmlerinin Etkisi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/ hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/ araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Fezile Özdemir.

04.02.2020

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı
Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Doktora Programında

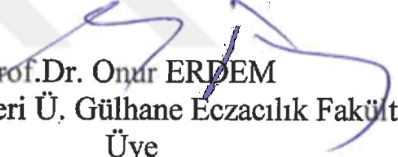
Fezile ÖZDEMİR tarafından hazırlanan

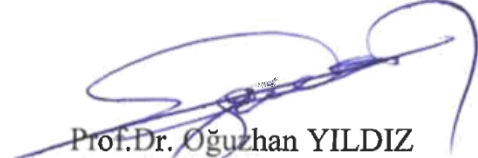
“Şizofreni Hastalarında Klozapin ve Norklozapin Kan Plazma Düzeylerine ABCB1 3435C>T
ve UGT1A4 L48V Polimorfizmlerinin Etkisi ” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak
OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

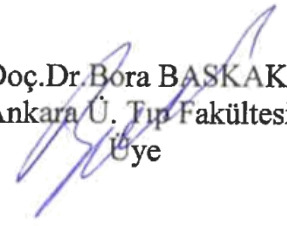
04.02.2020


Prof.Dr. H.Sinan SÜZEN
Ankara Ü. Eczacılık Fakültesi
Jüri Başkanı


Prof.Dr. Tülay ÇOBAN
Ankara Ü. Eczacılık Fakültesi
Üye


Prof.Dr. Onur ERDEM
Sağlık Bilimleri Ü. Gülhane Eczacılık Fakültesi
Üye


Prof.Dr. Oğuzhan YILDIZ
Sağlık Bilimleri Ü. Gülhane Tıp Fakültesi
Üye


Doç.Dr. Bora BASKAK
Ankara Ü. Tıp Fakültesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof.Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Mental Bozukluklar	1
1.2. Şizofreni	2
1.3. Klozapin	4
1.3.1. Farmakodinamik	6
1.3.1.1. Klozapin Etki Mekanizması	6
1.3.1.2. Klozapin Yan Etkileri	8
1.3.2. Farmakokinetik	10
1.3.2.1. Klozapin Absorbsiyonu	10
1.3.2.2. Klozapin Dağılımı	11
1.3.2.3. Klozapin Metabolizması	11
1.3.2.4. Klozapinin Eliminasyonu	12
1.3.3. İlaç Kullanımında Klinikte Karşılaşılan Sorunlar	13
1.3.4. Terapötik İlaç İzlemi	14
1.3.5. Klozapin ve Norklozapin Plazma Düzeyine Etki Eden Biyolojik ve Çevresel Etmenler	14
1.3.5.1. Kan Alımı ile Kan Alınmadan Önceki Son İlaç Dozunun Alınması Arasındaki Süre	15
1.3.5.2. Yaş	15
1.3.5.3. Cinsiyet	16
1.3.5.4. Beden Kitle İndeksi	17
1.3.5.5. Sigara Kullanımı	18
1.3.5.6. Kafein Kullanımı	19
1.3.5.7. Irk	21
1.3.5.8. KLZ/ DKLZ Oranı	22
1.3.6. Farmakogenetik	22
1.3.6.1. İlaç Tedavisinde Farmakogenetiğin Önemi	24
1.3.6.1.1. Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Farmakogenetik Çalışmalardaki Önemi	24
1.3.6.2. ABCB1 Geni	26
1.3.6.2.1. Genotmik Yapı	28
1.3.6.2.2. C3435T Polimorfizmi	29
1.3.6.2.3. ABCB1 C3435T Polimorfizminin Klozapin Taşınması ile İlişkisi	30
1.3.6.3. UGT1A4 Geni	33
1.3.6.3.1. Genomik Yapı	34
1.3.6.3.2. UGT1A4*3 Polimorfizmi	35

1.3.6.3.3.UGT1A4*3 Polimorfizminin Klozapin Eliminasyonu ile İlişkisi	36
1.4. Amaç	38
2. GEREÇ ve YÖNTEM	40
2.1. Gereçler	40
2.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	40
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	41
2.2. Deney Protokolü	42
2.2.1. Çalışma Grubu	42
2.2.2. Çalışma Grubu Kriterleri	43
2.2.2.1. Dahil Olma Kriterleri	43
2.2.2.2. Dışlama Kriterleri	44
2.2.3. Numunelerin Toplanması	45
2.2.4. Yöntem	45
2.2.4.1. Buffy Coat'tan Yüksek Tuz Metodu ile Genomik DNA İzolasyonu	45
2.2.4.2. DNA Miktarı ve Safılık Tayini	46
2.2.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	46
2.2.4.3.1. PZR Aşamaları	47
2.2.4.3.2. PZR Bileşenleri	48
2.2.4.3.3. ABCB1 Gen Bölgesinin Amplifikasyonunda Kullanılan PZR Yöntemi	49
Optimizasyonu	49
2.2.4.3.3.1. PZR Komponentleri ile İlgili Optimizasyon Çalışmaları	49
2.2.4.3.3.2. ABCB1 Gen Bölgesi İçin PZR Programı ile İlgili Sıcaklık ve Süre	51
Optimizasyonları	51
2.2.4.3.4. UGT1A4 Gen Bölgesinin Amplifikasyonunda Kullanılan PZR Yöntemi	53
2.2.4.3.4.1. PZR Komponentleri ile İlgili Optimizasyon Çalışmaları	53
2.2.4.3.4.2. UGT1A4 Gen Bölgesi İçin PZR Programı ile İlgili Sıcaklık ve Süre	55
Optimizasyonları	55
2.2.4.4. Agaroz Jel Elektroforezi	56
2.2.4.4.1. PZR Ürünleri İçin Jel Hazırlanması	56
2.2.4.4.2. Jel Tankı İçin Tampon Solüsyonun Hazırlanması	57
2.2.4.4.3. Jel Elektroforezine Numunelerin Uygulanması	57
2.2.4.5. Restriksiyon Parçası Uzunluk Polimorfizmi (RPUP)	59
2.2.4.5.1. ABCB1 3435C>T Polimorfizminin MboI Restriksiyon Enzimi ile	59
Belirlenmesi	59
2.2.4.5.1.1. ABCB1 PZR Ürününün Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi	60
(RPUP) Optimizasyonu	60
2.2.4.5.1.2. ABCB1 C3435T Polimorfizminin RPUP Analizi ile Belirlenmesi	60
2.2.4.5.2. UGT1A4 L48V Polimorfizminin Eco147I Restriksiyon Enzimi ile	62
Belirlenmesi	62
2.2.4.5.2.1. UGT1A4 PZR ürünün Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm (RPUP)	63
Optimizasyonu	63
2.2.4.5.2.2. UGT1A4 L48V Polimorfizminin RPUP Analizi ile Belirlenmesi	63
2.2.4.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) Yöntemi ile Klozapin ve	66
Norklozapinin Analizi	66
2.2.4.6.1. YPSK için Gerekli Solüsyonların Hazırlanması	67
2.2.4.6.2. Sıvı- Sıvı Ekstraksiyon Yöntemi ile Numunelerin Hazırlanması	69
2.2.4.6.3. Cihazın Ölçüm için Hazırlanması ve Numunelerin Okutulması	70

2.2.4.6.4. Validasyon Çalışmaları	70
2.2.4.6.4.1. Teşhis Sınırı (LOD)	70
2.2.4.6.4.2. Tayin Alt Sınırı (LOQ)	71
2.2.4.6.4.3. Özgünlük (Spesifite)	71
2.2.4.6.4.4. Seçicilik (Selektivite)	72
2.2.4.6.4.5. Doğruluk (Accuracy)	72
2.2.4.6.4.5.1. Geri Kazanım (Recovery)	72
2.2.4.6.4.5.1. Kesinlik (Precision)	73
2.2.4.6.4.6. Doğrusallık (Linearity)	73
2.2.4.6.4.7. Çalışma Aralığı (Range)	74
2.2.4.7. Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	74
3. BULGULAR	76
3.1. Çalışmaya Katılan Bireylerin Sosyodemografik Bilgileri	76
3.2. Genotip Analiz Sonuçları	77
3.2.1. <i>ABCB1</i> C3435T Polimorfizmi Genotip Analiz Sonuçları	77
3.2.2. <i>UGT1A4</i> L48V Polimorfizmi Genotip Analiz Sonuçları	77
3.3. Klozapin ve Desmetil Klozapin YPSK ile Tayin Sonuçları	78
3.3.1. Özgünlük ve Seçicilik	78
3.3.2. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)	79
3.3.3. Geri Kazanım (Recovery)	80
3.3.4. Kesinlik	80
3.3.4.1. Gün İçi Tekrarlanabilirlik (Intraday)	80
3.3.4.2. Günler Arası Tekrarlanabilirlik (Interday)	81
3.3.5. Doğrusallık	82
3.3.6. Çalışma Grubunun Plazma Konsantrasyon Değerleri	83
3.3.8. Biyolojik ve Çevresel Etmenlerin KLZ ve DKLZ Plazma Konsantrasyon Değerlerine Etkisi	84
3.3.8.1. Yaş	84
3.3.8.2. Cinsiyet	88
3.3.8.3. Sigara Kullanımı	90
3.3.8.4. Kafein Kullanımı	92
3.3.8.5. Kullanılan Doz Miktarı	94
3.3.8.6. Beden Kitle İndeksi	99
3.3.9. Genotip Dağılımına Göre Ortalama KLZ ve DKLZ Plazma Konsantrasyonları ile KLZ/DKLZ ve C/D Oranları	100
3.3.9.1. <i>ABCB1</i> C3435T Polimorfizmi Genotip Dağılımına Göre	101
3.3.9.1.1. KLZ Plazma Konsantrasyonları	101
3.3.9.1.2. DKLZ Plazma Konsantrasyonları	102
3.3.9.1.3. KLZ/ DKLZ Plazma Konsantrasyon Oranları	104
3.3.9.1.4. KLZ C/D Oranları	106
3.3.9.1.5. DKLZ C/D Oranları	107
3.3.9.2. <i>UGT1A4*3</i> Polimorfizmi Genotiplerinin KLZ ve DKLZ Plazma Konsantrasyonlarına Etkisi	109
3.3.9.2.2. DKLZ Plazma Konsantrasyonları	111
3.3.9.2.3. KLZ/DKLZ Plazma Konsantrasyon Oranları	112
3.3.9.2.4. KLZ C/D Oranları	114

3.3.9.2.5. DKLZ C/D Oranları	115
3.3.9.3. <i>ABCB1</i> ve <i>UGT1A4</i> Genotip Kombinasyonlarının KLZ ve DKLZ Plazma Konsantrasyonlarına Etkisi	116
4.TARTIŞMA	119
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	134
ÖZET	137
SUMMARY	138
KAYNAKLAR	139
EKLER	150
Ek-1. Etik Beyan	150
ÖZGEÇMİŞ	152



ÖNSÖZ

Bu çalışmada klorzapin toksikokinetiğinde rol oynayan *ABCB1* ve *UGT1A4* genlerindeki polimorfizmlerin kan plazma klorzapin ve norklorzapin düzeylerine etkisi araştırılmıştır. Kan plazma klorzapin ve norklorzapin düzeyleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile ölçülmüş ve gen polimorfizmleri PZR- RPUP analizleri ile belirlenmiştir. Bireyselleştirilmiş etkin tedavinin dikkat çekmeye başlaması ile klorzapin toksikokinetiğinde rol oynayan proteinlerin/ enzimlerin kan plazma klorzapin ve norklorzapin düzeylerine etkisinin belirlenmesi ile klorzapin metabolizmasının aydınlatılması ve bireye özgü tedavilerinin belirlenmesine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmanın planlanmasında, yürütülmesinde ve sonuçlanmasında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmalarına yön veren, tüm bilgisini benimle paylaşan akıl danışmanım değerli danışman hocam **Prof. H. Sinan SÜZEN**'e,

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen **Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ**'a, **Dr. Öğr. Üyesi Emrah DURAL**'a, ve **Arş. Gör. Kenan Can TOK**'a, **Uzm. Bio. Ayşe KARAKUŞ**'a,

Hastalara ulaşmamı sağlayan ve çalışmanın gerçekleşmesine katkıda bulunan **Doç. Dr. Bora BASKAK**'a, **Uzm. Dr. Yağmur KIR**'a ve **Arş. Gör. Dr. Adnan KUŞMAN**'a,

Doktora eğitim boyunca yanımda olan, yol gösteren **Doç. Dr. Dilek KAYA AKYÜZLÜ**'ye,

Eğitim boyunca yanımda olan ve yardımcı olan **Arş. Göv. Merve VATANSEVER**, **Arş. Göv. Merve KOÇAK**, **Arş. Göv. Hilal KAYA** ve **Arş. Göv. Gökçe BAYKUZU GÜNDÜZ**'e, **Arş. Göv. Merve DEMİRBÜGEN ÖZ**

Her zaman maddi ve manevi yanımda olan beni destekleyen **ANNEME, BABAMA** ve **KIZ KARDEŞLERİME**,

Doktora eğitim süresince, 2211- C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs programı ile bana destek olan **TUBİTAK- BİDEB**'e,

Tezimi destekleyen **ANKARA ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ MÜDÜRLÜĞÜ**'ne teşekkür ederim.



SİMGELER VE KISALTMALAR

µl	Mikrolitre
g	Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng/ml	nanogram/mililitre
nm	Nanometre
5-HT	Serotonin Reseptörü
5-HT2A	Serotonin reseptörü 2A
A	Adenin
ABC	Adenozin Trifosfat Bağlayıcı Kaset Taşıyıcı Proteini
ATP	Adenozin Trifosfat
bç	Baz Çifti
BİAS	Sistemik Hata
BKİ	Beden Kitle İndeksi
BSS	Bağıl Standart Sapma
C	Sitozin
C/D	Doz Düzeltilmiş
CYP	Sitokrom P450
D1	Dopamin Reseptörü 1
D2	Dopamin Reseptörü 2
D3	Dopamin Reseptörü 3
D4	Dopamin Reseptörü 4
D5	Dopamin Reseptörü 5
dak	Dakika
DKLZ	Norklozapin (N- Desmetil Klozapin)
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTPs	Deoksinükleotid Trifosfatlar
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit

EtBr ₂	Etidyum Bromür
F primer	Öncül primer (Forward Primer)
FMO3	Mikrozomal Flavın Monooksijenaz
G	Guanin
h	Hacim
HCl	Hidroklorik Asit
KLZ	Klozapin
KOH	Potasyum Hidroksit
Leu	Lösin
LOD	Teşhis Sınırı (Limit of Detection)
LOQ	Tayin Alt Sınırı (Limit of Qauntitation)
M	Marker (Belirteç)
Maks	Maksimum
MDR1	Çoklu İlaç Direnç Proteini 1
Mg	Magnezyum
Min	Minumum
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
NaOH	Sodyum Hidroksit
Ort	Ortalama
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R primer	Ters primer (Reverse Primer)
RE	Restriksiyon Enzimi
RPUP	Restriksiyon Parçası Uzunluk Polimorfizmi
SD	Analitin Standart Sapması
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SS	Standart Sapma
T	Timin
TBE	Tris borik asit- EDTA
Tİİ	Terapötik İlaç İzlemi
TNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
U	Ünit
UGT	UDP Glukuronil Transferaz

UV	Ultraviyole
Val	Valin
WHO	World Health Organization
$\tilde{x}$	Ortanca
YPSK	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi



ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	KLZ'in hepatositlerdeki metabolizması	12
Şekil 1.2.	ABCB1 proteinin altı domaininden ve ATP bağlanma bölgesinden oluşan iki homolog yarımı	27
Şekil 1.3.	P-gp ekspresyonun gerçekleştiği dokular	28
Şekil 1.4.	<i>ABCB1</i> genin 7. kromozom üzerindeki lokalizasyonu	28
Şekil 1.5.	<i>ABCB1</i> gen bölgesinde yer alan en yaygın üç polimorfizm	29
Şekil 1.6.	Hücre içine çeşitli proteinlerle alınan klozapinin P-gp ile hücre dışına çıkarılması	31
Şekil 1.7.	<i>UGT1A</i> gen lokusu ve gen bölgesinde yer alan polimorfizmler (Ehmer ve ark., 2004)	34
Şekil 1.8.	<i>UGT1A4</i> 'ün 2. Kromozom üzerindeki lokasyonu	35
Şekil 1.9.	<i>UGT1A4</i> *3 polimorfizmine bağlı olarak <i>UGT1A4</i> gen bölgesindeki nükleotit ve amino asit değişimi	36
Şekil 1.10.	Klozapin ve norklozapinin <i>UGT1A4</i> ile katalizlenmesi sonucu oluşan glukuronidasyon ürünleri	37
Şekil 2.1.	PZR'ın aşamaları	48
Şekil 2.2.	<i>ABCB1</i> gen bölgesine ait 208 bç'lik PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M: 100 bç DNA ladder)	59
Şekil 2.3.	<i>UGT1A4</i> gen bölgesine ait 576 bç'lik PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M: 100 bç DNA ladder)	59
Şekil 2.4.	<i>ABCB1</i> C3435T polimorfizmi RPUP analizi jel görüntüsü (M: 100 bç) DNA ladder, 1:CT (208+ 145+ 63 bç); 2: CC (145+ 63 bç); 3: TT (208 bç)	62
Şekil 2.5.	<i>UGT1A4</i> L48V polimorfizmi RPUP analizi agaroz jel görüntüsü M:100bç DNA ladder, 1:TG (576+ 324+ 252 bç); 2:GG (576 bç); 3:TT (324+252 bç)	65
Şekil 3.1.	KLZ ve DKLZ içermeyen boş plazma numunesine ait kromatogram görüntüsü	79
Şekil 3.2.	1 ppm KLZ ve DKLZ eklenmiş plazmaya ait kromatogram	79
Şekil 3.3.	KLZ'ne ait kalibrasyon eğrisi	82
Şekil 3.4.	DKLZ'ye ait kalibrasyon eğrisi	83
Şekil 3.5.	KLZ plazma düzeyinin yaş gruplarına göre kutu grafiği	86
Şekil 3.6.	KLZ plazma düzeyinin yaş gruplarına göre kutu grafiği	86
Şekil 3.7.	KLZ C/D düzeylerinin yaş gruplarına göre kutu grafiği	87
Şekil 3.8.	DKLZ C/D düzeylerinin yaş gruplarına göre kutu grafiği	88

Şekil 3.9.	Cinsiyete göre KLZ ve DKLZ düzeylerinin sora ortalamaları sütun grafiği	89
Şekil 3.10.	KLZ C/D düzeylerinin sigara kullanımına göre kutu grafiği	91
Şekil 3.11.	DKLZ C/D düzeylerinin sigara kullanımına göre kutu grafiği	92
Şekil 3.12.	Kafein kullanım gruplarına göre KLZ ve DKLZ düzeylerinin sıra ortalamalarının sütun grafiği	94
Şekil 3.13.	Uygulanan doza karşılık gelen KLZ plazma konsantrasyon değerleri	94
Şekil 3.14.	Uygulanan doza karşılık gelen DKLZ plazma konsantrasyon değerleri	95
Şekil 3.15.	Uygulanan doz miktarına göre plazma DKLZ düzeyinin kutu grafiği	97
Şekil 3.16.	Uygulanan doz miktarına göre plazma KLZ C/D düzeyinin kutu grafiği	98
Şekil 3.17.	Uygulanan doz miktarına göre plazma KLZ C/D düzeyinin kutu grafiği	99
Şekil 3.18.	BKİ gruplarına göre tüm değerlerin sıra ortalaması dağılımı	100
Şekil 3.19.	KLZ plazma konsantrasyonlarının <i>ABCB1</i> genotiplerine göre nokta grafiği gösterimi ($p>0,05$)	102
Şekil 3.20.	KLZ plazma konsantrasyonlarının <i>ABCB1</i> genotiplerine göre saplı kutu grafiği ile gösterimi ($p>0,05$)	102
Şekil 3.21.	DKLZ plazma konsantrasyonlarının <i>ABCB1</i> genotiplerine göre nokta dağılımı ($p>0,05$)	104
Şekil 3.22.	<i>ABCB1</i> genotiplerine göre DKLZ plazma konsantrasyon değerlerinin saplı kutu grafiği ile gösterimi ($p>0,05$)	104
Şekil 3.23.	<i>ABCB1</i> genotiplerine göre KLZ/DKLZ plazma konsantrasyonu oranlarının değerlerinin saplı kutu grafiği ile gösterimi ($p>0,05$)	106
Şekil 3.24.	<i>ABCB1</i> genotiplerine göre KLZ C/D oran dağılımının saplı kutu grafiği ile gösterimi ($p>0,05$)	107
Şekil 3.25.	<i>ABCB1</i> genotiplerine göre DKLZ C/D oran dağılımının saplı kutu grafiği ile gösterimi ($p>0,05$)	109
Şekil 3.26.	<i>UGT1A4*3</i> genotiplerine göre KLZ plazma konsantrasyonlarının dağılımı ($p>0,05$)	110
Şekil 3.27.	<i>UGT1A4</i> genotiplerine göre KLZ plazma konsantrasyonlarının dağılımlarının saplı kutu grafiği ile gösterimi ($p>0,05$)	111
Şekil 3.28.	DKLZ plazma konsantrasyonlarının <i>UGT1A4*3</i> genotiplerine göre dağılımı ($p > 0,05$)	112
Şekil 3.29.	<i>UGT1A4</i> genotiplerine göre KLZ/DKLZ plazma konsantrasyon oran dağılımına ait kutu grafiği ($p>0,05$)	113

- Şekil 3.30.** *UGT1A4* genotiplerine göre KLZ C/D düzeylerinin dağılımına ait kutu grafiği ($p>0,05$) 115
- Şekil 3.31.** *UGT1A4* genotiplerine göre DKLZ C/D düzeylerinin dağılımına ait kutu grafiği ($p>0,05$) 116
- Şekil 3.32.** *ABCB1*+ *UGT1A4* gen kombinasyonlarına KLZ ve DKLZ düzeylerinin karşılaştırılması 118



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Mental bozukluklar	1
Çizelge 1.2.	KLZ kullanımına bağlı oluşan yan etkilerin yüzdesi (Naber ve ark., 1992)	8
Çizelge 2.1.	<i>ABCB1</i> hedef gen bölgesinin PZR’nda kullanılan bileşikler ve konsantrasyonları	51
Çizelge 2.2.	<i>ABCB1</i> geninin amplifikasyonunun gerçekleştirildiği koşullar	52
Çizelge 2.3.	<i>UGT1A4</i> hedef gen bölgesinin PZR’nda kullanılan bileşikler ve konsantrasyonları	54
Çizelge 2.4.	<i>UGT1A4</i> geninin amplifikasyonunun gerçekleştirildiği koşullar	56
Çizelge 2.5.	<i>ABCB1</i> geni için RPUP reaksiyon koşulları ve miktarları	61
Çizelge 2.6.	<i>UGT1A4</i> geni için RPUP reaksiyon koşulları ve miktarları	64
Çizelge 2.7.	KLZ ve DKLZ için en uygun olan sıvı - sıvı ekstraksiyonu içindenlenmiş olan çözeltiler	66
Çizelge 2.8.	Standart DKLZ solüsyonlarının hazırlanması	67
Çizelge 2.9.	Standart KLZ solüsyonlarının hazırlanması	68
Çizelge 2.10.	KLZ ve DKLZ analizinde YPSK teknik özellikleri	69
Çizelge 3.1.	Çalışmaya katılan bireylere ait demografik bilgiler	76
Çizelge 3.2.	<i>ABCB1 C3435T</i> polimorfizminin allel frekansları ile gözlenen ve beklenen genotip frekansları	77
Çizelge 3.3.	<i>UGT1A4*3</i> polimorfizminin allel frekansları ile gözlenen ve beklenen genotip frekansları	78
Çizelge 3.4.	KLZ ve DKLZ geri kazanım değerleri	80
Çizelge 3.5.	KLZ gün içi tekrarlanabilirlik	80
Çizelge 3.6.	DKLZ gün içi tekrarlanabilirlik	81
Çizelge 3.7.	KLZ günler arası tekrarlanabilirlik	81
Çizelge 3.8.	DKLZ günler arası tekrarlanabilirlik	81
Çizelge 3.9.	Doksan dört bireye ait plazma konsantrasyon değerleri	83
Çizelge 3.10.	İki yaş grubu arasında KLZ- DKLZ plazma değerlerinin karşılaştırılması	85
Çizelge 3.11.	Cinsiyete göre KLZ- DKLZ değerlerinin karşılaştırılması	88
Çizelge 3.12.	Sigara kullanım gruplarına göre KLZ- DKLZ değerlerinin karşılaştırılması	90

Çizelge 3.13.	KLZ- DKLZ plazma konsantrasyon değerlerinin kafein kullanımına göre dağılımları	93
Çizelge 3.14.	Doza bağlı değişen KLZ- DKLZ düzey dağılımları	95
Çizelge 3.15.	Bireylerin BKİ'lerine göre KLZ- DKLZ dağılımları	99
Çizelge 3.16.	<i>ABCB1</i> C3435T genotip dağılımına göre KLZ plazma konsantrasyonları	101
Çizelge 3.17.	<i>ABCB1</i> C3435T genotip dağılımına göre DKLZ plazma konsantrasyonları	103
Çizelge 3.18.	KLZ/DKLZ plazma konsantrasyon oranlarının <i>ABCB1</i> genotip dağılımı	105
Çizelge 3.19.	KLZ C/D oranlarının <i>ABCB1</i> genotiplerine göre dağılımı	106
Çizelge 3.20.	DKLZ C/D oranlarının <i>ABCB1</i> genotiplerine göre dağılımı	108
Çizelge 3.21.	KLZ plazma düzeylerinin <i>UGT1A4</i> genotiplerine göre dağılımı	110
Çizelge 3.22.	DKLZ plazma düzeylerinin <i>UGT1A4</i> genotiplerine göre dağılımı	112
Çizelge 3.23.	<i>UGT1A4*3</i> genotiplerine göre KLZ/DKLZ plazma düzey oranlarının dağılımı	113
Çizelge 3.24.	KLZ C/D oranlarının <i>UGT1A4*3</i> genotiplerine göre dağılımı	114
Çizelge 3.25.	DKLZ C/D oranlarının <i>UGT1A4*3</i> genotiplerine göre dağılımı	115
Çizelge 3.26.	<i>ABCB1</i> + <i>UGT1A4</i> gen kombinasyonlarına göre KLZ ve DKLZ plazma düzeyleri	117
Çizelge 4.1.	<i>ABCB1</i> C3435T polimorfizminin allel ve genotip frekanslarının diğer populasyonlarda şizofreni gruplarında yapılan çalışmalar ile karşılaştırılması	121
Çizelge 4.2.	<i>UGT1A4</i> L48V polimorfizminin allel ve genotip frekanslarının diğer populasyonlarda şizofreni gruplarında yapılan çalışmalar ile karşılaştırılması	122

1. GİRİŞ

1.1. Mental Bozukluklar

Akıl sağlığı öznel yeterlilik ve yetkinlik, bireyin kendi yeteneklerini tanıdığı, üretken ve verimli çalışarak topluma katkıda bulunabildiği, yaşamın stresi ile başa çıkabildiği öznel iyi oluş halidir. Kısacası, sosyal, fiziksel ve ruhsal yönden iyi oluş hali olup bireyin çevreye uyumunda ve bilişsel gelişimindeki bozukluk sonucunda mental bozukluklar oluşmaktadır. Dünya genelinde 450 milyondan fazla insan mental bozukluklardan muzdarip olup mental bozukluklara fakirlerde, işsizlerde, düşük eğitim almış kişilerde, şiddet mağdurlarında, göçmen ve mültecilerde, gelişim çağındaki bireylerde, istismara uğramış kadınlar ile ihmale uğramış yaşlılarda daha çok rastlanmaktadır (WHO, 2003). Çizelge 1.1’de Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı V’e (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V) göre mental bozukluklar listelenmiştir (DSM V, 2013). Dünya genelinde 150 milyondan fazla kişi depresyondan, 38 milyon kişi epilepsiden, 90 milyondan fazla kişi de alkol veya madde kullanım bozukluğundan ve 25 milyon kişi de şizofreniden muzdariptir (WHO, 2003).

Çizelge1.1. Mental bozukluklar

Nörogelişimsel Bozukluklar	Obsesif–Kompulsif Bozukluklar	Eliminasyon Bozuklukları
Şizofreni Spektrumu ve Diğer Psikotik Bozukluklar	Travma ve Stres İlişkili Bozukluklar	Uyku- Uyanıklık Bozuklukları
Bipolar ve İlişkili Bozukluklar	Dissosiyatif Bozukluk	Cinsel İşlev Bozuklukları
Depresif Bozukluklar	Somatik Belirti ve İlişkili Bozukluklar	Cinsel Disfori
Anksiyete Bozuklukları	Beslenme ve Yeme Bozuklukları	Yıkıcı, Dürtü-Kontrol ve Davranış Bozuklukları
Madde Bağımlılığı ve Bağımlılık Bozuklukları	Nörobilişsel Bozukluklar	Kişilik Bozukluklar
Parafilik Bozukluklar		

1.2. Şizofreni

Genellikle ergenliğin son dönemlerinde yetişkinliğin başlarında kendini gösteren, beyinde bölgesel ve nörotransmitterlerin işlevlerinde değişiklik olarak ortaya çıkan şizofreni hastalığı kelime olarak zihinsel bölünme anlamına gelen “schizm” (bölünme) ve “-phrenia” (zihinsel) kelimelerinden türemiştir (Atbaşoğlu, 2009; Kane MJ, 1996). Halüsinasyon, delüzyon, konuşma esnasında anlatılanlardan sık sık sapma veya anlatılanların tutarsız olması gibi pozitif belirtilerden en az birinin hastada gözlemlenmesi tanı koymada yol gösteren başlıca kriterlerdir. Bunların yanı sıra hastalarda gözlemlenebilecek en belirgin negatif semptomlar bireyin katatonik davranışlar sergilemesi, irade kaybı, bir aktiviteyi başlatma veya onu devam ettirip sonlandıramama sorunu, asosyal davranışlar ve duygusal ifadenin azalmasıdır. Bireylerde ayrıca göz temasından kaçınma, mimiklerde azalma veya konuşma esnasında el, kafa ile konuşmaya duygusal vurgu katma gibi davranışlar gözlemlenmektedir (DSM- V, 2013; Atbaşoğlu, 2009; Kane MJ, 1996).

Şizofreni belirtileri ve derecesi bireyler arasında farklılık gösterebilen, kalıtlı birliğin yüksek bir hastalıktır. Şizofreni prevalansı dünya genelinde 1000’de 3-7 arasında değişiklik göstermekte, ortalama yaşam boyu prevalansı 4/1000 olup, yaşam boyu hastalık riski 1000’de 7,2’dir (McGarth ve ark., 2008; DSM V, 2013). Türkiye’de şizofreni ilgili yayınlardan elde edilen verilerin değerlendirildiği bir çalışma sonucunda Türkiye’deki yaşam boyu şizofreni sıklığı 8,9/1000 olarak belirlenmiş olup diğer ülkelere göre prevalans yüksek bulunmuştur (Binbay et al., 2011). Hastalığın oluşumuna doğum zamanı, doğum komplikasyonları, cinsiyet, ebeveyn yaşı, enfeksiyon ve immün sistem enfeksiyonları, otoimmün hastalıklar, etnik köken, yerleşim bölgesi, göçmenlik gibi birçok etmen etkili olabilmektedir (Messias ve ark., 2007). Erkeklerde kadınlara göre, göçmenlerde yerli olanlara göre, kentte yaşayanlarda karma kentlerde veya kırsalda yaşayanlara göre şizofreninin daha sık rastlandığı belirtilmiştir (McGarth ve ark., 2008). Kısacası, şizofrenide akrabalık derecesinin ve bireysel fenotiplerin bilinmesi, psikolojik veya sosyal

etmenlerin yaş, cinsiyet, göçmenlik, ırk, etnik köken gibi çevresel faktörler ile değerlendirilerek hastalığın derecesinin veya tipinin belirlenmesinde önemli olabilmektedir (Atbaşıoğlu, 2009; Kohlrausch, 2013).

Şizofreninin tedavisinde ana hedef bireyin topluma yeniden kazandırılması olup hastalığın belirtilerinin giderilerek, hastalığın tekrarlamasını engellemektir. Şizofreninin tedavisinde farmakolojik terapi vazgeçilmez olup nadiren hastalar topluma yeniden uyum sağlayabilmektedir ve bunda zorluk yaşadıkları için tedavi bireysel veya grup psikoterapileri ile desteklenebilmekte ancak kesinlikle sadece bunlarla sınırlı kalınmaması farmakolojik tedaviler uygulanması önerilmektedir (Patel ve ark., 2014). Farmakolojik tedaviye uyumda hastalarda problemlerle karşılaşmaktadır. Bu durum genellikle şizofreni hastalarında paranoyaya bağlı olarak hastalığın inkarı ve tedavinin reddi şeklinde kendini göstermekte olup psikoterapiler yardımı ile bu durum aşılabilmektedir (Patel ve ark., 2014).

Tedavinin sağlanamaması durumunda hastalık tekrarlamakta, bazen tamamlanmış intihar ile sonuçlanabilmekte veya etrafındakilere zarar verebilecek davranışlar sergilemesine sebep olarak hastanın yatılı tedavisini gerektirecek kadar kötü durumlara neden olabilmektedir. Bu nedenle bilişsel davranışçı, kişisel veya uyum terapileri ile hastalar eğitilerek hastalıkları ve tedavilerinin gerekliliği, riskleri ve etkililiği hakkında bilgilendirilmelidir (Patel ve ark., 2014).

Bireysel psikoterapinin yanı sıra, ilacın düzenli kullanımının hastaya veya yakınlarına sorularak takip edilmesi, bunun mümkün olmadığı durumlarda veya psikiyatristin hastanın hatalı bilgi verdiğiinden şüphelenmesi durumunda ilaç plazma düzeylerinin belirlenmesi etkin tedavinin sürdürülebilmesine yardımcı olabilmektedir. Bununla birlikte bazı hastalarda ilaca bağlı istenmeyen yan etkiler gözlemlenebilir veya uygulanan dozun yüksek olmasına rağmen yine de etkin bir tedavi elde edilemediği durum gözlemlenebilmektedir. Bu nedenle hastanın ailesine hastanın nasıl izleneceği ve hangi durumlarda klinisyenlere tedavinin olumsuz

etkilerini bildirmeleri gerektiği hakkında bilgi verilmelidir (Patel ve ark., 2014; Srirenakumar ve ark., 2015; Olanju ve ark., 2018).

Farmakolojik tedavi şizofreninin tedavisinde hayati önem taşımakta olup hastanın yanıtına, hastalık derecesine göre doz ayarlaması yapılarak ilk olarak hastanın ruh halinin, kişisel bakımının ve sosyalleşmesinin iyileştirilmesi amaçlanmaktadır. Şizofreninin tedavisinde flufenazin, haloperidol gibi tipik antipsikotikler ile karşılaştırıldıklarında daha az ekstrapiramidal yan etkilere neden olduklarından dolayı risperidon, aripiprazol, omeprazol, klozapin gibi atipik antipsikotikler tercih edilmektedir. Klozapin (KLZ) genellikle agranülositoz oluşturma riskinden dolayı daha az tercih edilse de hastaların %10-30'u tipik antipsikotiklere yanıt vermemekte ve direnç gösteren bu hastalarda KLZ etkin tedavinin gerçekleştirilmesine olanak sağlamaktadır (Göğüş, 2009; Patel ve ark., 2014).

Bazı hastalarda tedavi sürecinde ilaca bağlı istenmeyen yan etkiler gözlemlenebilir veya uygulanan dozun yüksek olmasına rağmen yine de etkin bir tedavi elde edilemediği durum gözlemlenebilmektedir. Bu durumda ilacın farmakokinetiğinde ve farmakodinamiğinde yer alan gen bölgelerindeki farklılıklar incelenerek hasta için etkin bireyselleştirilmiş tedavi belirlenebilmesi hayati önem taşıyabilmektedir (Srirenakumar ve ark., 2015; Olanju ve ark., 2018).

1.3. Klozapin

1950'li yıllarda Wander Laboratuvarları antidepresan aktiviteye sahip trisiklik özellikteki kimyasalları araştırmaya başladığında trisiklik antidepresanlarla karşılaştırılabilen, nöroleptik özellikteki kimyasalları keşfetmeye başladılar. Klozapin de bu moleküllerden biri olup ilk kez 1959 yılında keşfedilmiş, analjezik etkiye de sahip olan bir ilaçtır. 1970'li yıllarda KLZ klinik verileri incelendiğinde ekstrapiramidal semptomların gelişmesinin antipsikotik aktiviteye bağlı olmadığı ve

Finlandiya’da KLZ kullanan bazı hastalarda nötroopeni ve agranülositoz geliştiği görülmüştür. Bazı hastaların agranülositoza bağlı olarak öldüğü keşfedilince KLZ piyasadan çekilerek kullanımı yasaklanmıştır (Hippus, 1999). Ancak tedaviye yanıt veren hastalarda ilacın kesilmesi ile hastalıkları tekrarlamış ve yapılan protestolar sonucu birkaç ülkede sürekli gözetim altında kullanılmasına izin verilmiştir. İleriki yıllarda tedaviye dirençli olan hastalarda KLZ ile etkin tedavinin sağlanabildiğinin keşfedilmesiyle KLZ’in popülerliği yeniden artmış ve 1990 yılında tedaviye dirençli şizofreni hastalarında kullanılabilmesi için Amerikan Gıda ve İlaç Kurumundan (Food and Drug Administration) onay almıştır (Hippus, 1999).

KLZ özellikle diğer antipsikotiklere yanıt vermeyen dirençli hastalarda kullanılmakta olup özellikle şizofreni hastalarında intihar davranışlarını ve girişimlerini azaltması ile birlikte saldırganlık, şiddet davranışlarında da azalmaya neden olduğu için tercih edilmektedir (Bersani ve ark., 2011; Ellison ve Dufresne, 2015; Srirenakumar ve ark., 2015; Shah ve ark., 2018). Terapötik indeksi dar olan KLZ’ne 12,5 mg/gün olarak başlanması önerilmekte ve ortalama olarak 300 - 400 mg/güne kadar doz artırılabilirken, bazı hastalarda ise 100 - 250 mg/gün gibi düşük dozlarda etkin tedavi sağlanabilmektedir (Couchman ve ark. 2010; Fang ve Mosier, 2014).

KLZ’nin diğer antipsikotiklere direnç geliştiren hastalarda etkili olması, şizofreni hastalarında intihar davranışlarını ve girişimleri ile birlikte saldırganlık, şiddet davranışlarında da azalmaya neden olması ve diğer antipsikotikler ile karşılaştırıldıklarında çok düşük oranda ekstrapiramidal yan etkilere neden olmaları KLZ’nin avantajları arasında yer almaktadır (Patchan ve ark., 2015). Ancak agranülositoz gibi ciddi bir yan etkinin yanı sıra epileptik nöbet, kilo artışı gibi diğer yan etkiler oluşturmaları, dar terapötik aralığa sahip olmasından dolayı doz ayarlamasının hayati önem taşıması ve agranülositoz riskine karşı sürekli hastaların takip edilerek plazma KLZ düzeylerinin ve beyaz kan hücrelerinin takip edilmesi gerektiğinden maliyet açısından dezavantajlı duruma da gelebilmektedir.

1.3.1.Farmakodinamik

Organizmaya uygun yolla belirli bir dozda alınan ilacın etki yerine ulaşarak spesifik enzime, taşıyıcı moleküle veya reseptörlere bağlanıp yanıt oluşturmaya o ilacın farmakodinamiğini göstermektedir.

1.3.1.1. Klozapinin Etki Mekanizması

Şizofreninin oluşumu hakkında genetik yatkınlık, reseptörlere bağlı gelişmesi gibi birçok teori ortaya atılmış olsa da kesin olarak neye bağlı olarak oluştuğu kanıtlanamamıştır. 1977 yılında Arvid Carlsson yapmış olduğu çalışmalarda dopamin reseptörlerinin beyinin motor davranışlardan sorumlu olan bazal gangliyon bölgelerinde yoğunlaştığını ve antipsikotik ilaçların dopamin reseptörlerini bloke ederek etki gösterdiklerini belirterek şizofreni hastalığının oluşum nedeni hakkında dopamin teorisini ortaya atmış ve 2000 yılında da Nobel Ödülü'nü kazanmıştır (Carlsson A, 1977; 1978; Yeregani ve ark. 2010).

Şizofreninin dopamin reseptörlerinin yanı sıra serotonin (5-HT), histaminerjik, muskarinik, adrenerjik ve kolinerjik reseptörler ile de ilişkili olabileceğini gösteren çalışmalar mevcut olsa da bu reseptörlerinde yine dopamin yolağı üzerinden etki ettiği düşünülmektedir (Bell ve ark., 1998; Bersani ve ark., 2011; Kohlrausch, 2013) ve KLZ'nin de esas etki mekanizması dopamin reseptörleri üzerindedir.

Dopamin reseptörleri D1, D2, D3, D4 ve D5 olmak üzere beş adettir. Şizofrenide prefrontal korteks bölgesinde dopamin azlığına bağlı olarak D1 reseptörleri stimülasyonunda azalma olmakta ve hastalarda katatonik davranışlar, yapılan işten zevk almama, motivasyon düşüklüğü veya kendini ifadenin azalması gibi negatif belirtiler ortaya çıkmaktadır (Howes ve Kapur, 2009; Brisch ve ark.,

2014). Subkortikal bölgede ise dopamin artışı ile D2 reseptör aktivasyonu meydana gelmekte ve şizofrenin pozitif belirtileri olan halüsinasyon ve delüzyonlar hastalarda oluşmaktadır (Brisch ve ark., 2014). Yapılan çalışmalarda D1 reseptörlerinin D5 ile D2 reseptörlerinin ise D3, D4 ile benzer yapısal özellik gösterdiği ve ilaç duyarlılığının bu reseptörler arasında yakın olduğu bulunmuştur (Ayano, 2016).

Şizofrenide özellikle diğer ilaçlara karşı direnç gösteren hastaların tedavisinde tercih edilen KLZ, dopamin reseptörlerinin yanı sıra serotonin (5-HT) reseptörlerine de bağlandığından, ekstrapiramidal yan etkilere neden olmadığından ve negatif belirtilere karşı etkili olduğundan atipik antipsikotikler arasında yer almaktadır (Göğüş, 2009; Bersani ve ark., 2011). KLZ dopamin ve 5-HT reseptörlerinin yanı sıra histaminerjik, muskarinik, andrejenik ve kolinerjik reseptörlere afinite göstermekte olup (Bell ve ark., 1998; Bersani ve ark., 2011; Kohlrausch, 2013); KLZ D4, 5HT2A, muskarinik ve histaminerjik reseptörlere D2 reseptörlerinden daha yüksek afinite göstermektedir (Bersani ve ark., 2011; Olganju ve ark., 2018).

KLZ'nin aktif metaboliti olan norklozapin (N- desmetil klozapin, DKLZ) ise tek M1 agonist özelliği gösteren antipsikotik olup prefrontal korteks ve hipokampus bölgelerinde 5-HT2A antagonizması ile dopamin ve asetilkolin salınımını artırarak bu bölgelerdeki aktiviteyi artırmaktadır (Bersani ve ark., 2011). Böylece prefrontalde asetilkolin artışı ile bilişsel fonksiyonlar pozitif yönde etkilenirken, dopamin artışı ile de negatif belirtiler daha az görülmektedir (Meltzer, 2002). Ayrıca DKLZ D2, D3, muskarinik ve 5-HT reseptörlerine afinite göstermektedir (Bersani ve ark., 2011).

KLZ'nin D4 reseptörlerine olan afinitesi D2 ve D3 reseptörlerine olandan on kat daha fazladır (Sanyal ve ark., 1997). D4 reseptörleri sempatik sinir sistemi, santral sinir sistemi, hipokampus, amigdala, frontal korteks, globus pallidus, hipotalamus, talamus, böbrek, adrenal bezler, kalp, kan damarları ve sindirim sisteminde yer almaktadır. D4 reseptörleri bilişsel işlevlerin ve renal fonksiyonların

düzenlenmesinden, bağırsak hareketlerinden ve bunların yanı sıra vazodilatasyon ve kan basıncından sorumludur (Ayano, 2016). D4 reseptörlerinin kan damarlarında yer alması vazodilatasyona neden olmasını ve şizofreni hastalığının negatif yan etkileri arasında yer alan sedasyonu ve halsizliği; sindirim sisteminde yer alması kabızlığa neden olmasını ve beyinde bilişsel işlevlerden sorumlu olan bölgelerde yer alması ise şizofrenide görülen halüsinasyon, delüzyon gibi pozitif belirtilerin nedenini açıklayabilir (Ayano, 2016). KLZ özellikle mezolimbik dopamin yolağında D2, D3 ve D4 reseptörlerini bloke ederek hastalığa ait pozitif belirtilerin, prefrontal korteks bölgesinde ise D1 reseptörlerinin uyarılmasını artırarak hastalığa bağlı gelişen negatif belirtilerin giderilmesini sağlayarak etkisini göstermektedir. Ancak, KLZ'nin afinitesi D4 reseptörüne daha fazla olduğundan etkisini özellikle D4 reseptörlerini bloke ederek göstermektedir (Sanyal ve ark., 1997; Brisch ve ark., 2014; Ayano, 2016;).

1.3.1.2. Klozapinin Yan Etkileri

KLZ dar terapötik aralığa sahip bir ilaç olup genel olarak ortalama terapötik KLZ plazma düzeyi 350 - 600 ng/ml arasında değişebilmektedir. KLZ plazma düzeyinin 600 - 1000 ng/ml ve üzerindeki plazma KLZ düzeylerine çıkıldıkça advers etkilerin şiddeti ve türü değişmektedir (Hiemke ve ark., 2011; Fang ve Mosier, 2014). Naber ve ark., tarafından KLZ kullanımına bağlı gelişen yan etkiler Çizelge 1.2'de verilmiştir (Naber ve ark., 1992). KLZ tardif diskineziye neden olmayan bir antipsikotiktir (Kane, 1996). KLZ kullanımında daha çok metabolik yan etkiler gözlemlenirken, KLZ gibi ikinci jenerasyon antipsikotikler daha az ekstrapiramidal yan etkilere neden olmaktadır (Patel ve ark., 2014). KLZ nadiren de olsa kalp ve damar hastalıklarına neden olabilmekte veya karaciğer yetmezliğine bağlı olarak ölümlere yol açabilmektedir (Couchman ve ark., 2010; Patel ve ark., 2014).

Çizelge 1.2. KLZ kullanımına bağlı oluşan yan etkilerin yüzdesi (Naber ve ark., 1992)

Yan etkiler	%
EEG' de artış	34,4

Yorgunluk	27,7
Karaciğer enzim indüksiyonu	20,9
Postural hipotansiyon	17,4
Çarpıntı	13,8
Lökosit sayısında artış	13,5
Kilo artışı	13
ECG	9,9
Ateş	8,8
Hipersalivasyon	8
Bulantı- kusma	6,6
Hezeyan	4,3
Dermatolojik reaksiyon	1,2
Lökosit sayısında azalma	0,6
Nöbet	0,2

KLZ kullanımında ortaya çıkan bazı yan etkiler doza bağımlı olarak gelişmekteyken, hayati tehdit edici hale gelebilen agranülositoz gibi bazı yan etkiler ise doza bağımlı olmaksızın ortaya çıkabilmektedir (Bell ve ark., 1998). KLZ tedavisinde agranülositoz riski %0,8 olup tedavinin başında bu risk daha yüksektir. Agranülositoza bağlı olarak ölüm gerçekleşmesi %0,01 oranındadır. Advers etkilerin oluşumunun engellenmesi için düzenli olarak hastaların özellikle de ilaca yeni başlayan hastalarda plazma KLZ düzeyleri düzenli olarak kontrol edilmelidir (Kane, 1996; Flanagan ve Dunk, 2008). Amerika’da ilacın kullanılmasına başladıktan sonra ilk altı hafta haftalık olarak sonraki zamanlarda ise iki haftada bir olacak şekilde; İngiltere’de ise ilk onsekiz hafta düzenli olarak, sonrasında ilk bir yıl iki haftada bir ve daha sonraki zamanlarda ayda bir KLZ plazma düzeylerinin ölçülmesi önerilmektedir (Flanagan ve Dunk, 2008).

Klozapin kullanımına bağlı olarak gelişebilen diğer önemli yan etki ise miyokardit/ kardiyomiyopatidir. Klozapin kullanımına bağlı miyokardit ve kardiyomiyopati gelişme riski sırasıyla %0,1-1 ve %0,02-0,1 arasında olup miyokardite bağlı mortalite riski %10-30 arasındadır. Hastaların bazılarında kardiyomiyopati belirtileri ortaya çıksa da vakaların %40-83’ü asemptomatik olup

kalp yetmezliğine bağlı ölüm riski %12,5-24 arasında değişebilmektedir (Curto ve ark., 2016).

Klozapin kullanımında doza bağlı gelişebilen diğer önemli yan etki ise nöbetlerdir. Bunlar jeneralize tonik- klonik nöbet, miyoklonik nöbetler, basit veya kompleks parsiyel nöbetler şeklinde olabilir. Miyoklonik nöbetler özellikle tedavinin başlangıcında doz titrasyonu sürecinde daha çok ortaya çıkmakta olup kullanılan doz 600 mg/gün ve üzeri olduğunda nöbet riski artarken, plazma klozapin düzeyinin 750 µg/L olması ise nöbet riskini 5 kat artırmaktadır (Williams ve Park, 2015).

Baş ağrısı, baş dönmesi, uyuşukluk, sedasyon, hipersalivasyon, yüksek ateş, postural hipotansiyon, kilo alımı, hiperlipidemi, diyabet, kabızlık, titreme, kalp çarpıntısı gibi yan etkiler ise doza bağımlı olarak görülebilmektedir (Bell ve ark., 1998; Couchman ve ark., 2010; Kohlrausch, 2013; Patel ve ark., 2014). Bu yan etkilerin KLZ'nin kolinerjik ve histaminik reseptörler ile güçlü antagonizmasına bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmekte olup dozun azaltılması ile doza bağlı gelişen bu tip etkiler ortadan kaldırılabilir (Couchman ve ark., 2010; Bersani ve ark., 2011).

1.3.2. Farmakokinetik

Belirli dozda uygulanan ilacın absorpsiyonundan, vücuttaki dağılımına, metabolizmasına ve atılımına kadar olan süreç, kısacası uygulanan ilacın vücuda girişinden atılımına kadar olan süreci kapsamaktadır.

1.3.2.1. Klozapinin Absorpsiyonu

KLZ oral olarak uygulanmakta ve ilk geçiş etkisi nedeniyle biyoyararlanım %60-70 arasındadır. Uygulamanın ardından ortalama iki buçuk saat içerisinde plazmadaki

konsantrasyonu en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Yaklaşık olarak dört saat içerisinde ilaçtan maksimum yararlanma gözlemlenmektedir ancak bazen gastrointestinal sistemdeki gecikmelere bağlı olarak da emilim gecikebilmektedir (Bersani ve ark., 2011; Ellison ve Dufresne, 2015; Krivoy ve ark., 2016). KLZ'nin yarılanma ömrü uygulanan doza bağlı olarak yaklaşık ortalama olarak 12 saat olup DKLZ'nin yarılanma ömrü KLZ'den daha uzundur (Ellison ve Dufresne, 2015).

1.3.2.2. Klozapinin Dağılımı

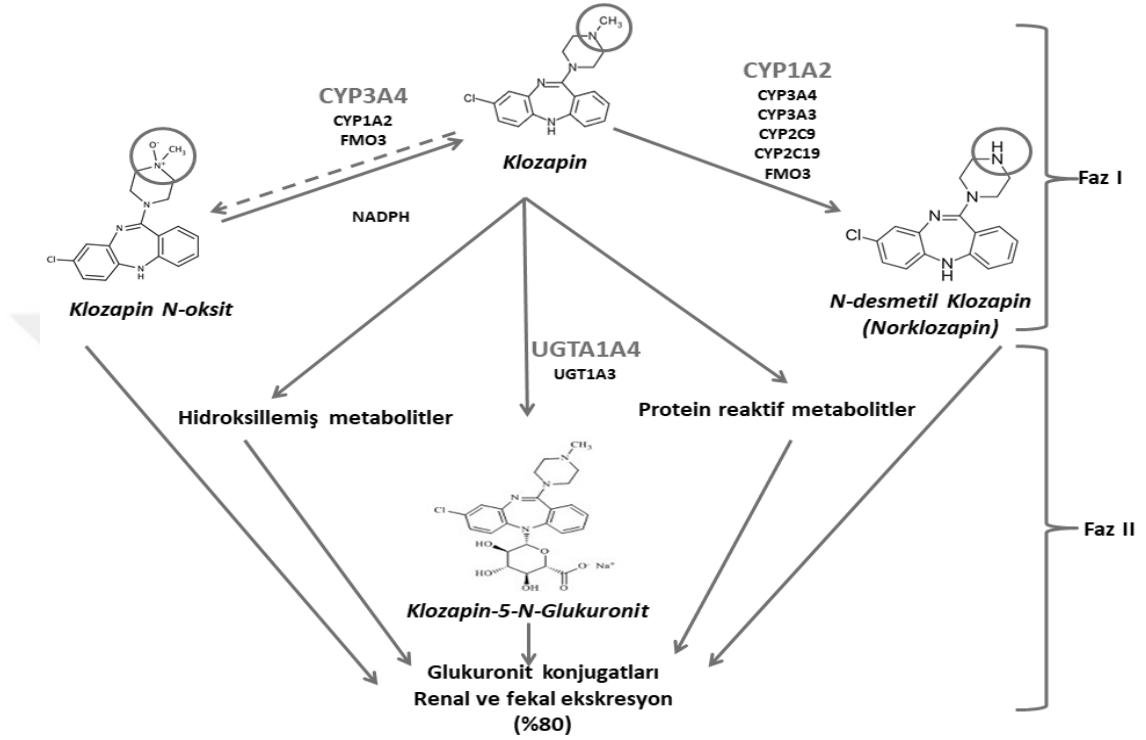
Oral yoldan alınan KLZ'nin %92-95'i plazma proteinlerine bağlanarak taşınmaktadır (Bell ve ark., 1998; Krivoy ve ark., 2016). KLZ'nin %27-47'si metabolik olarak değişime uğramadan sistemik dolaşıma girerken, %50-73'ü ise ilk geçiş metabolizmasının ardından sistemik dolaşıma geçmektedir (do Carmo Borges ve ark., 2012; Krivoy ve ark., 2016).

1.3.2.3. Klozapinin Metabolizması

KLZ karaciğerde başlıca sitokrom P450 (CYP) mikrozomal enzimleri ile metabolize olarak aktif metabolitlerine dönüşmektedir. KLZ'nin iki adet aktif metaboliti bulunmaktadır. Absorbe edilen KLZ'nin %75-90'ı esas aktif metaboliti olan DKLZ'ne dönüşürken, %10-35'i ise diğer aktif metabolit olan N- oksit KLZ'e dönüşmektedir (Bell ve ark., 1998). Çok az miktarda da hidroksillenmiş ve protein reaktif metabolitler açığa çıksada bunların oluşumu oldukça azdır.

KLZ'nin metabolizmasında görev alan enzimler ile oluşan metabolitler Şekil 1.1'de şematize edilmiştir. KLZ başlıca CYP3A4 daha az CYP1A2 ve mikrozomal flavin monooksijenazlar (FMO3) ile oksidasyona uğrayarak N- oksit KLZ'ne dönüşmekte ancak bu reaksiyon tersinir olduğundan N- oksit KLZ oranı oldukça düşüktür (Bell ve ark., 1998; Krivoy ve ark., 2016). DKLZ oluşumu ise esas olarak CYP1A2 ile olurken bunun yanı sıra CYP3A4, CYP3A3, CYP2C9, CYP2C19 ve

FMO3 ile de katalize olabilmektedir. Bu mikrozomal enzimler KLZ'nin N-metilasyonuna neden olarak bir metil grubunu ana bileşikten ayırmakta ve farmakolojik olarak aktif metabolit olan DKLZ'yi oluşturmaktadırlar (Bell ve ark., 1998; Dragovic ve ark., 2013; Ellison ve Dufresne, 2015; Krivoy ve ark., 2016).



Şekil 1.1. KLZ'in hepatositlerdeki metabolizması

Daha sonra aktif olan metabolitler başlıca UDP glukuronil transferaz (UGT) 1A4 ile daha polar hale getirilmek üzere glukuronidasyona uğramakta böylece metabolitlerin eliminasyonu daha kolay hale getirilmektedir. Glukuronidasyon sonucunda az miktarda 7- hidroksi KLZ glukuronit oluşurken, daha yüksek miktarda 8- hidroksi- 8 diklor DKLZ ve onun glukuronit ürünü ile 7- hidroksi DKLZ sülfat vücuttan elimine olmak üzere böbreklere iletilmektedir (Krivoy ve ark., 2016).

1.3.2.4. Klozapinin Eliminasyonu

Karaciğerde metabolize olan KLZ ve metabolitleri olan DKLZ ve KLZ N- oksit molekülleri böbreklerde glomerulustan filtre olmaktadır. Filtre olan KLZ'nin %90'ı

tübüllerden geri emilirken, DKLZ ve KLZ N- oksit ise tübüllerden salgılanmaktadır. KLZ'nin polar hale gelen metabolitlerinin %30'u feçes ile %50'si idrar yolu ile vücuttan elimine olurken, KLZ N- oksitin idrarla atılımı diğer konjugasyon ürünlerinden daha hızlıdır (Bersani ve ark., 2011; Krivoy ve ark., 2016). İdrarla atılımda glukuronidasyon ürünlerinin yanı sıra çok az miktarda KLZ, DKLZ'de bulunmaktadır.

KLZ metabolitlerinin eliminasyon hızını belirleyen en önemli etkenlerden biri de hücre zarlarında lokalize olan adenozin trifosfat (ATP) bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı proteinlerinden biri olan ABCB1 proteindir. Bu protein karaciğer, bağırsak ve böbreklerde lokalize olarak KLZ ve metabolitinin hücreSEL geri salınımında ve dağılımında önemli rol oynamaktadır (Consoli ve ark., 2009).

1.3.3. İlaç Kullanımında Klinikte Karşılaşılan Sorunlar

KLZ metabolizma hızı bireyler arasında elli kat farklılık gösterirken, aynı gün içerisinde aynı doz uygulanan hastaların plazma KLZ düzeyleri arasında ise beş ile sekiz kat arasında farklılık gözlemlenebilmektedir (Couchman ve ark., 2010; do Carmo Borges ve ark., 2012). Özellikle hastaların belirlenen dozu almaması veya belirlenen dozun üzerinde alması, biyolojik, çevresel faktörlerin KLZ metabolizmasına olan etkisi gibi çeşitli etkenler psikiyatristlerin hastalara uygun tedavi dozunu belirlenmesinde zorluk yaşamasına neden olmaktadır. Hastaların çoğu aldıkları doz hakkında, KLZ metabolizmasına etki eden sigara, kafein gibi kullandıkları maddelerin miktarları konusunda çoğu zaman psikiyatrİstlere yanıltıcı bilgiler vermektedir (Llorca ve ark., 2002; Kohlrausch, 2013). Bu durumda psikiyatristlerin hastalar için en iyi klinik değerlendirmeyi yapabilmesi, hastaya özgü yarar- zarar oranını belirleyebilmesi ve uygulanan doza bağlı gelişebilecek agranülositoz veya diğer yan etkileri en aza indirgeyerek hastanın yaşam kalitesinin artırılması ve en yüksek düzeyde tedaviden yararlanabilmesi için hastaların düzenli olarak plazma ilaç düzeylerini belirlemek önemlidir.

1.3.4. Terapötik İlaç İzlemi

Terapötik ilaç izlemi (Tİİ) ile vücut sıvılarında ilaç düzeyi terapötik aralıkta tutularak hastanın tedaviden optimum düzeyde yararlanabilmesi ve advers etkilerin oluşmaması için bireye özgü en uygun dozun belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bireyler arasında kan, plazma, idrar gibi vücut sıvılarındaki ilaç konsantrasyonu ilaç farmakokinetiğindeki değişkenlere veya daha birçok etkene bağlı olarak farklılık göstermekte ve özellikle dar terapötik aralığa sahip ilaçlarda doz bağımlı advers etkiler ortaya çıkabilmektedir. Tİİ ile elde edilen veriler ilacın farmakokinetiği, farmakodinamiği, hastanın klinik durumu ve örnek alma zamanı ile birlikte değerlendirilerek tüm veriler psikiyatrist tarafından yorumlanır. Böylece Tİİ ile tedavide bireye özgü dozun belirlenmesi sağlanarak bireylerde ilaç etkililiği artırılabilmekte ve toksisite en aza indirgenebilmektedir (Ghiculescu, 2008; Kang ve Lee, 2009).

Tedaviye başladıktan sonra ilacın vücut sıvılarında kararlı hale ulaşabilmesi için ilacın yarılanma ömrünün 4-5 katı kadar zamanın geçmesi gerekir. Tİİ’de önemli olan ilacın vücut sıvılarında kararlı hale ulaşmasının beklenmesi ve bir sonraki dozu almadan hemen önce vücut sıvıları alınarak ölçüm yapılmasıdır. Tüm bunlar gerçekleştirildiğinde en doğru sonuca ulaşılabilinecektir (Ghiculescu, 2008).

1.3.5. Klozapin ve Norklozapin Plazma Düzeyine Etki Eden Biyolojik ve Çevresel Etmenler

KLZ güven aralığı dar bir ilaç olduğundan plazma düzeyini etkileyebilecek çevresel ve genetik faktörler KLZ’in etkinliğini ve tolere edilebilirliğini etkileyerek bireyler arasında aynı doz uygulansa dahi plazma KLZ düzeyleri farklılık gösterebilecektir. Aynı zamanda yüksek oranda KLZ’in metabolizmasından sorumlu olan CYP1A2’ye etki eden etmenler KLZ’nin ABCB1 ile hücre dışına aktarılmasına ve KLZ’in

UGT1A4 ile glukuronidasyona uğramasına etki edeceğinden bu faktörlerin KLZ ve DKLZ düzeylerine etkisinin belirlenmesi önemlidir.

Yaş, cinsiyet, kilo, sigara, kafein kullanımı gibi etkenlerin yanı sıra KLZ/ DKLZ oranına veya klozapin metabolizmasında yer alan enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfizmlere bağlı olarak bireyler arasında KLZ metabolizması farklılık gösterebilmektedir. KLZ metabolizmasındaki farklılığın yanı sıra KLZ plazma miktar tayini için alınan kan numunesi ile son ilaç dozunun alınması arasındaki zaman da yine KLZ plazma düzeyinde etkili olabilmektedir. Tüm bu etkenler göz önünde alındığında bireysel etkin tedavinin belirlenebilmesi için tüm bu faktörlerin KLZ ve DKLZ plazma düzeylerine etkilerinin bilinmesi büyük önem taşımaktadır.

1.3.5.1. Kan Alımı ile Kan Alınmadan Önceki Son İlaç Dozunun Alınması Arasındaki Süre

Belirli bir dozda sürekli ilaç alındığında, ilacın plazmadaki konsantrasyonunun kararlı hale gelmesi yaklaşık 5 - 7 günlük zamanı alabilmekte ve KLZ'in yarılanma ömrü ortalama 12 saat olduğundan ilaç alımından 12 saat sonra dokulara ilaç yeterli düzeyde dağılabilmektedir (Bell ve ark., 2001). Bu nedenle son ilaç doz alımının üzerinden 12 saat geçince bir sonraki doz alınmadan ve kahvaltıdan önce kan alınmaya çalışılarak, hatalı ve yanıltıcı ilaç ölçümü yapılması engellenmeye çalışılmalıdır (Ghiculescu ve ark., 2008; Bell ve ark., 2001; Fang ve Mosier, 2014).

1.3.5.2. Yaş

Bireylerde yaşın artmasıyla metabolizma hızı yavaşladığından yaşlı olan bireylerde, KLZ ve metaboliti daha az yavaş katalizleneceğinden, KLZ plazma düzeyi genç

bireylere göre daha yüksek olabilecektir. Dolayısıyla, bireylerde ilaç dozunun ayarlanmasında yaş da göz önüne alınması gereken etmenlerden biridir.

Bazı çalışmalarda yaş ile KLZ plazma düzeyleri arasında doğru orantılı bir ilişki olduğu bulunmuştur (Couchman ve ark., 2010; Rostami- Hodjegan ve ark., 2004). Bazı çalışmalarda ise herhangi bir bağlantı bulunamamıştır (Özdemir ve ark., 2001; Palego ve ark., 2002; Rajkumar ve ark., 2013).

Jann ve ark. (1993) gerçekleştirdikleri çalışmada plazma klozapin düzeyinin 45 yaşında olan bireylerde 35 yaş altında olanlara göre daha düşük olduğunu bulmuşlardır (Jann ve ark., 1993).

Lane ve ark. (1999), yaştaki her bir yıllık artışın KLZ ve DKLZ plazma düzeylerini sırasıyla %1.1 ve %1 artırdığını belirtmişlerdir (Lane ve ark., 1999).

Rostami- Hodjegan ve ark. (2004), ise yapmış oldukları araştırmada 40 yaş referans olarak kullanıldığında bireylerin yaşındaki her bir beş yıllık farkın KLZ plazma konsantrasyonunu $\pm$ %4 oranında etkileyebileceğini belirtmişlerdir (Rostami- Hodjegan ve ark., 2004).

1.3.5.3. Cinsiyet

Kadınların yağ dokusu erkeklere göre daha fazladır ve buna bağlı olarakta ilaç dağılımı daha uzun süreceğinden ilaç yarılanma ömrü daha uzun olmakta ve kadınlarda ilaç plazma konsantrasyonları erkeklere göre daha yüksek olabilmektedir (Couchman ve ark., 2010; Palego ve ark., 2002; Rostami- Hodjegan ve ark., 2004). Yapılan çalışmalarda cinsiyetin ilaç KLZ düzeyine etki etmediği saptanmış (Rajkumar ve ark., 2013) olsa da cinsiyete göre KLZ düzeyinin farklılık gösterebileceğini belirten çalışmalarda mevcuttur.

Lane ve ark. (1999), kadınlarda erkeklere oranla KLZ ve DKLZ plazma düzeylerinin sırasıyla %34,9 ve %36,3 daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (Lane ve ark., 1999).

Rostami- Hodjegan ve ark. (2004), yapmış oldukları çalışmada KLZ/ DKLZ oranlarını karşılaştırarak KLZ metabolik aktivitesinin kadınlarda daha yavaş olduğunu ve dolayısı ile KLZ plazma konsantrasyonunun kadınlarda erkeklere göre %17 daha fazla olduğunu bulmuşlardır (Rostami- Hodjegan ve ark., 2004).

Anderson ve ark. (2015), cinsiyet bir etmen olarak göz önüne alınmadan hastalara KLZ uygulandığında kadınların KLZ plazma düzeylerinin erkeklerinkine göre daha yüksek olduğunu bulmuş olsalar da DKLZ düzeyleri arasında bir farklılık bulamamışlardır (Anderson ve ark., 2015).

1.3.5.4. Beden Kitle İndeksi

Bazı çalışmalarda ağırlık ile KLZ plazma düzeyi arasında bir fark bulunamamıştır (Lane ve ark., 1999; Özdemir ve ark., 2001; Palego ve ark., 2002). Ancak, bireylerin beden kitle indeksi (BKİ) ilaç dozunun belirlenmesinde kullanılan etmenlerden biridir ve ağırlık artışına bağlı olarak KLZ dozu artırılmaktadır. Ağırlığın artışı ile metabolik aktivite daha büyük bir karaciğerin varlığıyla artsa da dağılım hacmi daha yavaş olacağından KLZ plazma yarılanma ömrü uzayacak ve KLZ plazma düzeyinde az bir değişim olacaktır (Couchman ve ark., 2010; Rostami- Hodjegan ve ark., 2004).

Anderson ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada kadınlarda BKİ'nin erkeklerden daha yüksek olduğunu bulmuşlar ve terapötik ilaç izlenmesi süresince elde edilen bilgilerden BKİ'deki artışa bağlı olarak yüksek doku maruziyeti ile KLZ veya DKLZ'in ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir (Anderson ve ark., 2015).

Rostami- Hodjegan ve ark. (2004), 80 kg ortalama kilo olarak alındığından ağırlıktaki her bir 10 kg'lık değişim sonucunda KLZ plazma konsantrasyonunun $\pm$ %5 değişebileceğini belirtmişlerdir (Rostami- Hodjegan ve ark., 2004).

1.3.5.5. Sigara Kullanımı

Yapılan bir araştırmada ayakta tedavi gören psikiyatri hastaları ile normal populasyonun sigara kullanma sıklıkları karşılaştırıldığında psikiyatri hastalarında sigara kullanım eğiliminin 1,6 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. Ayrıca şizofreni, depresyon, kişilik bozukluğu, anksiyete ve mani olan bireylerde sigara kullanımının daha yüksek olduğu bulunmuştur (Hughes ve ark., 1986).

Van der Wiede ve ark. (2003), sigara içenlerde KLZ plazma konsantrasyonunun uygulanan doza olan oranını sigara içmeyenlere göre 2,4 kat daha düşük olarak bulmuşlardır. Ayrıca, sigara içenlerde etkin tedavinin sağlanabilmesi için uygulanması gereken ortalama KLZ tedavi dozunun sigara içmeyenlere göre 1,9 daha fazla olması gerektiğini belirtmişlerdir (Van der Wiede ve ark., 2003).

Rostami- Hodjegan ve ark. (2004), yapmış oldukları çalışmada KLZ tedavisi gören ve sigara kullananlarda uygulanan KLZ dozunun sigara kullanmayanlardakine göre daha yüksek olsada sigara kullananların KLZ ve DKLZ plazma konsantrasyonlarının sigara kullanmayanlarınkine göre daha az olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca, sigara kullanan ve kullanmayan hastalarda KLZ/ DKLZ oranı karşılaştırılmış, KLZ metabolizmasının sigara içenlerde daha yüksek olduğunu ve bunun da sigaranın CYP1A2'yi indükleyerek KLZ N-demetilasyonunu artırması sonucu olabileceği varsayımında bulunmuşlardır. Çalışmaları sonucunda sigara kullanmayanların KLZ plazma düzeylerinin sigara kullananlara göre %48 daha fazla olduğunu göstermişlerdir (Rostami- Hodjegan ve ark., 2004).

Haslemo ve ark. (2006), KLZ kullanan şizofreni hastalarında gerçekleştirmiş oldukları çalışmada sigara içenlerin KLZ serum konsantrasyonunun %50 daha az olduğunu ve günde 7-12 arasında sigara kullanımına bağlı olarak KLZ metabolizmasının maksimum oranda indüklendiğini belirtmişlerdir. Bu nedenle sigara kullananlara uygulanan dozun sigara kullanmayanlara göre %50 daha fazla olmasını önermektedirler (Haslemo ve ark., 2006).

Tütün ürünleri CYP1A2'yi indükleyerek KLZ plazma düzeyinin azalmasına neden olmaktadır (Zullino ve ark.,2002). Sigara kullanımı bırakıldığında CYP1A2 aktivitesi azalacağından KLZ dozunun %30-%40 oranında azaltılacak şekilde yeniden doz ayarlanması gerekebilmektedir (Lowe and Ackman, 2010).

Faber ve Fuhr (2004), günde 20'nin üzerinde sigara içen kişilerde sigara kesildikten sonra CYP1A2 indüklenmesinin 38,6 saatte yarı yarıya azaldığını bu nedenle ortalama 4 günlük bir süre içerisinde CYP1A2 aktivitesinin kararlı hale geçeceğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar, hastaların sigarayı azaltması veya bırakması durumunda CYP1A2 ile katalizlenen KLZ gibi güven aralığı dar olan ilaçların dozlarının yeniden ayarlanması gerektiğini önermektedirler (Faber ve Fuhr, 2004).

Cormac ve ark. (2010), 48'i sigara kullanan toplam 51 kişilik retrospektif bir çalışma gerçekleştirmişler ve çalışmanın başlangıcında sigara kullanan 2 kişinin plazma KLZ düzeyi 1000 µg/mL'iken, tüm bireylerde sigara yasaklandıktan üç ay ve altı ay sonra KLZ plazma düzeylerini kontrol etmişlerdir. Üç ay sonunda hastaların 14'ünün, altı ay sonra ise 20'sinin plazma KLZ düzeylerinin 1000 µg/mL'nin üzerinde olduğu saptanmıştır (Cormac ve ark., 2010). Bu nedenle sigara kullanımı azaltıldığında veya kesildiğinde KLZ plazma düzeylerinin takip edilerek yeni doz ayarlamalarının yapılması önerilmektedir.

1.3.5.6. Kafein Kullanımı

Kahve, ay ve kola gibi alkolsüz içeceklerde yer alan kafein yorgunluğu giderdiği, iş yapma kapasitesini artırdığı ve ruhsal durum yükselmesine neden olduğu için tercih edilen ieceklerdendir. Kafein, KLZ metabolizmasında da görev alan başlıca enzim olan CYP1A2 ile metabolize edilmektedir (Carrillo ve Benitez, 2000). Her iki substrat CYP1A2'ye bağlanmakta olup, KLZ'in CYP1A2'ye olan afinitesi kafeininkinden daha yüksektir. Ancak kafein miktarının artmasıyla kafein CYP1A2'ye KLZ'den daha çok bağlanacağından KLZ metabolizması yetersiz kalabilmektedir. Bu nedenle kafeinin CYP1A2 üzerinde inhibe edici etkiye sahip olması, farmakokinetik etkileşimler nedeniyle KLZ plazma düzeyine etki edebilmektedir (Bertilsson ve ark., 1994; Carrillo ve Benitez, 2000).

Carrillo ve ark. (1998), tarafından gerçekleştirilen çalışmada KLZ kullanan hastalarda 5 gün boyunca kafeinden yoksun diyet uygulanması sonucu, KLZ plazma konsantrasyonunun yaklaşık %47 oranında azaldığını, bu nedenle KLZ tedavisi uygulamasında hastaların günlük kafein kullanım miktarının da göz önüne alınarak düzenlenmesi gerektiğini önermektedirler (Carrillo ve ark., 1998).

Hagg ve ark. (2000), ise 12,5 mg KLZ verilen 12 sağlıklı bireyde 400 - 1000 mg kafein alınması durumunda kafeinin CYP1A2'yi inhibe ederek KLZ atılımını azalttığını göstermişlerdir (Hagg ve ark., 2000).

Raaska ve ark. (2004), ise kafein kullanımı sonucunda serum KLZ ve DKLZ konsantrasyonlarının sırasıyla %26 ve %7 oranında arttığını ve bunun kafeinin CYP1A2 üzerindeki inhibisyonundan kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir (Raaska ve ark., 2004).

Rajkumar ve ark. (2013), kafein kullanımının klozapinin CYP1A2 ile metabolizmasını inhibe ederek, serum klozapin düzeyini düşürdüğünü göstermişlerdir. Klozapin dozunun 250 mg/gün altında olduğu durumlarda valporat

ve kafein kullanımı bulunduğunda hastaların %73,3'de serum klozapin düzeyinin yetersiz olabileceğini öngörmüşlerdir (Rajkumar ve ark., 2013).

KLZ metabolizmasında görev alan CYP1A2'nin aktivitesindeki artış veya azalışa bağlı olarak KLZ ve DKLZ plazma konsantrasyonları değişebileceğinden, KLZ ve DKLZ'in ABCB1 ile hücre dışına çıkarılmasının ve UGT1A4 ile glukuronidasyonunun CYP1A2'deki aktivite değişimine bağlı olarak etkilenmesini beklemekteyiz.

1.3.5.7. Irk

Her ırkın kendine özgü bir gen frekansı bulunmakta ve bu söz konusu gene ait frekansı bilmek gen tarafından kodlanan enzim ile metabolize olan substratların plazma düzeyleri hakkında bize bilgi verebilmektedir. CYP1A2 aktivitesini etkileyen polimorfizmlerin populasyonlardaki frekanslarının bilinmesiyle, büyük çoğunluğu CYP1A2 tarafından metabolize edilen KLZ'in plazma düzeyi için populasyonlar arasında bir fark bekleyip beklememiz gerektiği hakkında bilgi sağlayabilecektir.

Sarı ırkta yer alan Asya'lılarda CYP1A2 aktivitesi beyaz ırkta olanlara göre daha düşük olacağından sarı ırklarda KLZ düzeyinin daha yüksek olması beklenmektedir (Parera ve ark., 2012; Parkinson ve ark., 2010)

Aynı şekilde *ABCB1* C3435T ve *UGT1A4* L48V polimorfizmlerinin Türk populasyonlarındaki frekanslarının KLZ ve DKLZ plazma düzeyleri ile karşılaştırılması ve elde edilen verilerin de diğer populasyonlardaki gen frekansları ve KLZ ve metabolitinin plazma konsantrasyonları ile kıyaslanması bize KLZ metabolizması ve Türk populasyonunda uygulanabilecek terapötik doz hakkında önemli bilgiler verecektir.

1.3.5.8. KLZ/ DKLZ Oranı

Uygulanan doz miktarı arttıkça KLZ ve DKLZ plazma düzeylerinin de yüksek olması beklenmektedir günlük dozdaki her 1 mg'lık artışa bağlı olarak plazma KLZ düzeyinin %0,31, DKLZ'in ise %0,27 daha fazla olması beklenmektedir (Lane ve ark., 1999). Sonuç olarak uygulanan doza bağlı olarak da KLZ/ DKLZ oranı KLZ metabolizma kapasitesinin belirlenmesinde ölçülebilir bir değer olarak kullanılabilmektedir.

Rostami- Hodjegan ve ark. (2004), gerçekleştirmiş oldukları çalışmada KLZ/ DKLZ oranını ortalama olarak 1,32 bulmuşlar ve KLZ/ DKLZ oranı için bu değer referans olarak alındığında bu orandaki her bir 0,1'lik değişimin KLZ plazma konsantrasyonunu $\pm$ %8 etkileyebileceği sonucuna varmışlardır (Rostami- Hodjegan ve ark., 2004).

Couchman ve ark. (2010), 85958 bireyde 1993-2007 yıllarında gerçekleştirdikleri çalışmada uygulanan dozun artmasıyla KLZ ve DKLZ plazma konsantrasyonlarının da doğru orantılı olarak arttığını ve KLZ/ DKLZ oranını 0,5 ile 3 arasında değişiklik gösterdiğini bulmuşlardır (Couchman ve ark., 2010).

Sonuç olarak tüm bu biyolojik ve çevresel etmenlerin yanı sıra *UGT1A4* ve *ABCB1* gen bölgelerinde yer alan genetik polimorfizmlerin bu etmenler ile KLZ ve DKLZ düzeylerinin etkilerinin Türk şizofreni hastalarında tespit edilerek terapötik dozun belirlenebilmesi ve bireylere özgü etkin tedavilerin gerçekleştirilebilmesi için büyük önem taşımaktadır.

1.3.6. Farmakogenetik

Bazı bireylerde etkin tedavinin sağlanamaması, advers etkilerin gözlemlenmesi veya yan etkilerin bireyler arasında farklılık göstermesi yanlış doz uygulaması, ilaç- ilaç

veya ilaç- gıda etkileşimleri, ilaç alerjileri, genetik yatkınlığın da aralarında yer aldığı birçok faktöre bağlı olarak oluşabilmektedir. Farmakogenetik çalışmalarda amaç tedavide advers veya yan etki oluşumu için düşük veya yüksek risk taşıyan bireylerin genomlarındaki farklılıkları genotipleme analizleri ile aydınlatarak bireye özgü etkin ve güvenli tedavinin belirlenmesini sağlamaktır.

Hastalıkların genetik ile ilişkili olabileceği düşüncesi milattan önce 510 yılında Pisagor'un bakla tüketiminin bazı kişilerde ölüme neden olduğunu keşfetmesiyle ortaya çıkmış ancak genetiğin temelleri 1866 yılında Mendel'in kalıtımın temellerini oluşturmasıyla ortaya çıkmıştır. 1950'li yıllarda glukoz-6 - fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği keşfedilmiş ve ilk kez Vogel tarafından farmakogenetik terimi ortaya atılmıştır (Carson ve ark., 1956; Vogel, 1957). Bu yıllarda yapılan çalışmalarda sıtma ilacının kullanıldığı bazı bireylerde glukoz-6 - fosfat dehidrogenaz enzim eksikliğine bağlı hemoliz geliştiği; kas gevşetici olarak süksinilkolin verilen bazı hastalarda ise solunum kaslarında uzun süreli felç olduğu görülmüştür. 1970'li yıllarda antihipertansif ilaç kullanımı sonucunda bazı hastaların kan basıncında ani düşüş olabildiği; tüberküloz tedavisinde ise izoniazid kullanıldığında ilacın nörotoksik etkisine karşı duyarlı olan hastalarda periferik nöropatinin gelişebildiği bulunmuştur (Sadec, 1999). Daha sonra nörotoksik etkinin izoniazidin metabolizmasında görev alan enzimleri kodlayan gen bölgelerindeki polimorfizmlere bağlı olarak ortaya çıktığı saptanmıştır (Kalow ve ark., 2000). Yıllar içinde farmakogenetik alanında yapılan çalışmaların literatüre yapmış olduğu katkılar ile birlikte insan genom projesinin 2003 yılında tamamlanması ile ilaç metabolizmasında ve yanıtında rol alan genler ile varyantlarının tanımlanmasının etkin tedavideki önemi kanıtlanmıştır.

Günümüzde farmakogenetikte özellikle hastalık ile ilişkili olabilecek genler ile ilaç farmakokinetiği ve farmakodinamiğinde görev alan gen bölgelerindeki farklılıkların belirlenerek bunların klinikte uygulanması ile bireye özgü tedavinin belirlenmesi ve ilaç etkinliğinin artırılarak, advers ve yan etkilerin azaltılması amaçlanmaktadır.

1.3.6.1. İlaç Tedavisinde Farmakogenetiğin Önemi

Farmakogenetik alanında yapılan çalışmalar ile ilaç farmakokinetiğinde ve farmakodinamiğinde görev alan enzim ve proteinleri kodlayan genlerdeki farklılıkların aydınlatılması ile ilaç tedavisinde %10- 20 oranında yarar sağlanmıştır (Ingelman- Sundberg, 2001). İlaç yanıtında ve metabolizmasında bireyler arasında farklılığın nedeni %20- 40 oranında genetik farklılıklara bağlıyken, bireyler arasında advers etkilerde görülen farklılığında %50'si genetik faktörler ile ilişkili olabilmektedir (Ingelman- Sundberg, 2001; Spear ve ark., 2001). Aynı gün içerisinde aynı doz uygulanan hastalarda plazma KLZ düzeyleri beş ile sekiz kat arasında farklılık gösterebilirken, KLZ metabolizma hızı da bireyler arasında elli kat farklılık gösterebilmektedir (Couchman ve ark., 2010; do Carmo Borges ve ark., 2012;). İkizlerde yapılan çalışmalar sonucunda etkin tedavinin sağlanamamasının ve advers reaksiyon oluşumunun ilaç metabolizmasında rol alan genetik faktörlere bağlı olduğu gösterilmiştir (Vesell, 1989; Spear ve ark., 2001). Tek yumurta ikizlerinde yapılan araştırmalarda KLZ tedavisinin ardından yanıt ve semptom gelişimindeki benzerlikler (Vojvoda ve ark., 1996) ve KLZ kullanımına bağlı gelişen agranülositoz oluşumu genetiğin KLZ tedavisindeki etkisini ortaya koymuştur (Horáček ve ark., 2001; Anıl Yağcıoğlu ve ark., 2011). Bu nedenle KLZ gibi özellikle de dar terapötik aralığa sahip ilaçlarda etkin tedavinin sağlanması, advers ve yan etkilerin en aza indirgenebilmesi için ilaç metabolizmasında görev alan enzim ve proteinlerdeki genetik farklılıkların tanımlanarak kliniğe uyarlanması bireysel etkin tedavinin sağlanmasında farmakogenetik çalışmaların önemini ortaya koymaktadır.

1.3.6.1.1. Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Farmakogenetik Çalışmalardaki Önemi

İnsan genomunda yapılan analizler sonucunda DNA metilasyonu, somatik ve hücre karyotip mutasyonları gibi epigenetik ve somatik varyasyonların yanı sıra gen kopya sayılarında değişiklikler, değişken sayıda ardışık tekrar dizileri, delesyon, insersiyon

veya tek nükleotid polimorfizmleri (TNP) gibi varyasyonların genom boyunca yer aldığı saptanmıştır (Brockm ller ve Tzvetkov, 2008).

İnsan genom projesinin tamamlanması ile insanlarda altı milyar baz çiftinin olduğu ve yaklaşık 20000 adet protein kodlayan gen bölgesi bulunduğu keşfedilmiştir. Bireyler arası gen farklılığı %0,01 olup en sık rastlanan gen varyasyonu her 1000 bazda gözlemlenebilen adenin (A), guanin (G), sitozin (C) veya timin (T) bazlarından herhangi birinin değışimi sonucu meydana gelen TNP'leri olup popülasyonda görülme sıklığı %1'den fazladır. Polimorfizmler mutasyonlar gibi hastalığa neden olmamakta ancak hastalığa veya bir ksenobiyotiğe karşı duyarlılıkta etkili olabilmektedir.

TNP p rin bazlarının (A ve G) pirimidin bazlarına (C ve T) dönüşmesi sonucu transversiyon veya p rin bazının diğ r p rin bazına veya pirimidin bazının diğ r bir pirimidin bazına dönüşmesi sonucu transisyon şeklinde ortaya çıkabilir. Bu değışimler bazen protein kodlayan veya kodlamayan bölgelerde, promotor ve gen bölgesinin başında (5') veya sonunda (3') translasyona uğramayan bölgelerde meydana gelebilir. Bunlar sonucunda işlevsiz protein üretilebileceğı gibi, protein ekspresyonda artış veya azalışa bağılı olarak protein fonksiyonun indüksiyonu veya inhibisyonu meydana gelebilmektedir. Bu durum ilaç tedavisinde  n ilaç aktivasyonunda eksiklik, alternatif ara yollar ile katabolizma, etkili doz miktarında artış, uzamış farmakolojik etki, ilaç toksisitesi veya advers etki, ilaç- ilaç veya ilaç-gıda etkileşimleri şeklinde etkilere neden olabilmektedir (Wolf ve ark., 2000).

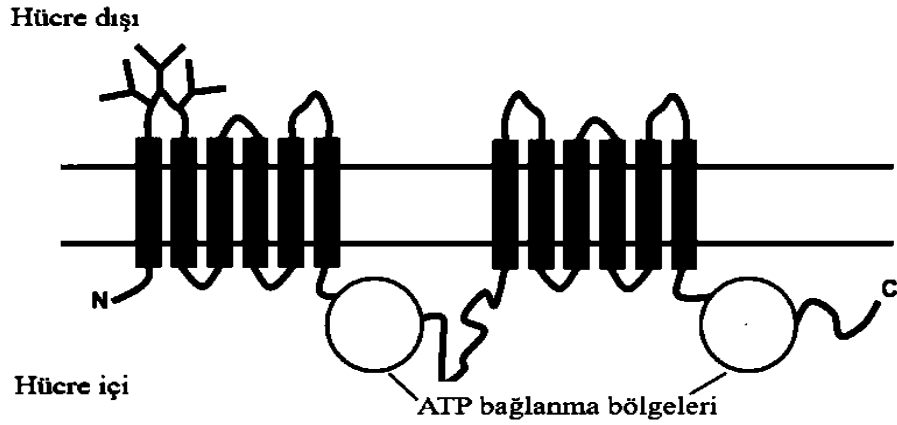
TNP'lerinin belirlenmesinde kullanılan birçok farmakogenetik test yöntemi bulunsa da spesifik primerler yardımı ile hedef gen bölgesinin çoğaltıldığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve polimorfik bölgeyi tanıyarak kesim bölgesi oluşturan restriksiyon enzimlerinin kullanıldığı restriksiyon parçası uzunluk polimorfizmi (RPUP) testlerinin birlikte uygulandığı PZR - RPUP analizi en çok tercih edilen TNP belirleme yöntemlerinden biridir (Meyer ve ark., 1997).

Genetik varyasyonlara bağlı olarak fenotipik değişiklikler bireylerarası ilaç etkinliğinin, metabolizmasının ve advers etkilerinin farklılıklarında rol oynasada özellikle fonksiyonel değişikliğe yol açan varyantların belirlenerek bunların diğer popülasyonlardaki sıklıklarının belirlenmesi toplumlar arası ve ırklar arası haplotip haritalarının oluşturulması için önemlidir.

Sonuç olarak özellikle ilaç metabolizmasında ve taşınmasında görev alan enzim ve proteinlerdeki polimorfizmlerin tanımlanarak ilaç yanıt profilinin oluşturulması ve bireye özgü etkin tedavinin sağlanabilmesi için farmakogenetik çalışmalarda tek nükleotid polimorfizmlerinin belirlenerek bunların biyogösterge olarak kullanılması oldukça önemlidir. Bu nedenle KLZ'nin hücresel taşınmasında görev alan ABCB1 proteini ile konjugasyonunda görev alan UGT1A4 enzimlerini kodlayan gen bölgelerindeki TNP'lerin biyogösterge olarak kullanılmasının araştırılması KLZ farmakokinetiği için önemli olabilmektedir.

1.3.6.2. ABCB1 Geni

ABCB1 proteini, ilk kez 1976 yılında kolşisine dirençli Çin hamster yumurtalık hücrelerinden izole edilmiştir. Bu biyomolekül fosforile ve glikolize yapıya sahip bir integral hücre yüzey proteini olup P-glikoprotein (P-gp) olarak da adlandırılmaktadır. İnsanlarda kırk farklı ABC (adenozin trifosfat (ATP) bağlayıcı kaset) taşıyıcı proteini bulunmakta ve yedi alt aileye ayrılmaktadır. ABCB1 proteini de ABC taşıyıcı proteinlerinin B alt ailesinde yer alan ve adenozin trifosfatı (ATP) hidrolize ederek substratları taşıyan bir efluks hücre membran proteinidir. Şekil 1.2'de gösterildiği gibi iki homolog yarımdan oluşan ABCB1'in iki homolog yapısı bir birine esnek yapıda olan bir polipeptit ile bağlıyken, proteinin hücre içine bakan kısmında bir ATP bağlanma bölgesi ve hücre membranında yer alan kısmında ise altı hidrofobik transmembran domaini yer almaktadır (Juliano ve Ling., 1976; Rosenberg ve ark., 1997; Sakaeda, 2012; Sharom, 2014).

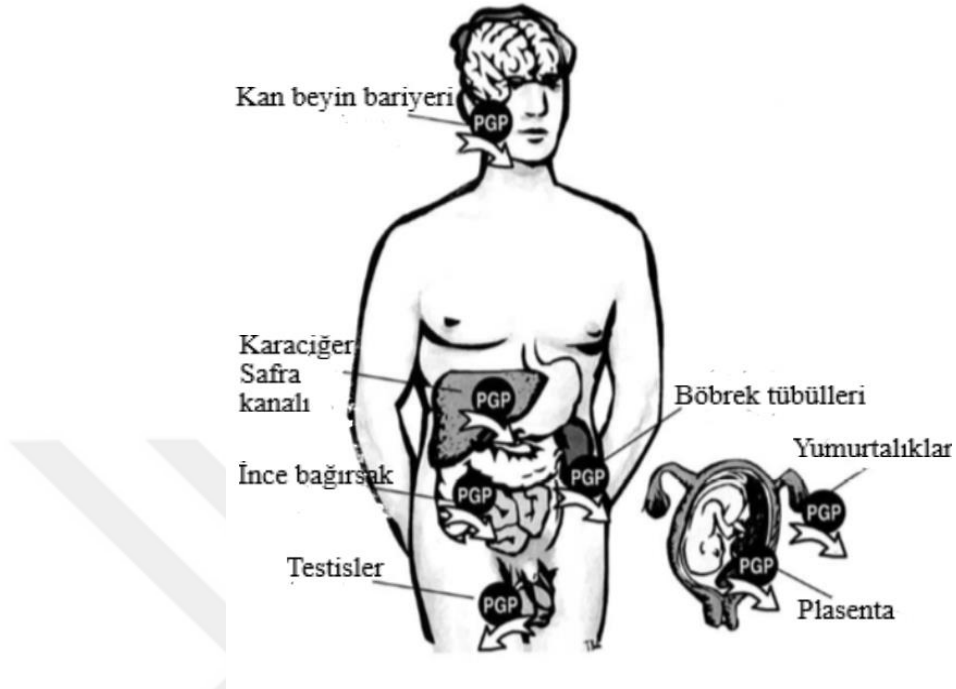


Şekil 1.2. ABCB1 proteinin altı domainden ve ATP bağlanma bölgesinden oluşan iki homolog yarımı

P-gp'nin aşırı ekspresyonu sonucu antikanser ilaçların hücre içindeki aktif ilaç konsantrasyonlarında azalma meydana geldiğinden ilaca karşı direnç meydana gelebilmekte ve bunlar çoklu ilaç direnç (*MDR1*, multidrug resistance) geni olarak da adlandırılmaktadır (Broxterman ve ark, 1995). Efluks özellikteki P-gp antikanser, antibiyotik, immün baskılayıcılar, kalp ilaçları, HIV proteaz inhibitörleri ve antihistaminler gibi birçok ilacı ve metabolitlerini hücre içinden hücre dışına ATP'yi hidrolize ederek taşıyarak birçok toksik maddeye karşı hücreleri korumaktadır. Bunların yanı sıra P-gp klor ve ATP kanalı olarak rol alabildiği gibi kolesterol biyosentezi aşamasında da görev almaktadır (Germann ve Chambers, 1998; Hoffmeyer ve ark., 2000).

Şekil 1.3'te gösterildiği gibi P-gp mide bağırsak kanalında apikal membranlarda, hepatositlerin kanaliküllerinde ve böbreklerde proksimal tübül epitel hücrelerinde, testislerde, yumurtalık hücrelerinde, plasentada, kan beyin bariyerinde serebral kapillerin endotel hücrelerinin luminal membranlarında ifade edilmektedir (Cordon-Cardo ve ark. 1989; Marzolini ve ark., 2004). Böylece ksenobiyotiklerin safra, idrar ve intestinal lümen yoluyla atılmasına yardımcı olarak söz konusu maddelerin hücresel miktarını sınırlarken, beyinde ise ilaçların konsantrasyon gradientinin tersi yönünde plazmaya taşıyarak onların beyinde birikimlerini engellemektedir. Kısacası ilaçların absorpsiyonunda, dağılımında ve eliminasyonlarında etkilidirler ve dolayısı ile *ABCB1* geninin ekspresyonu bu

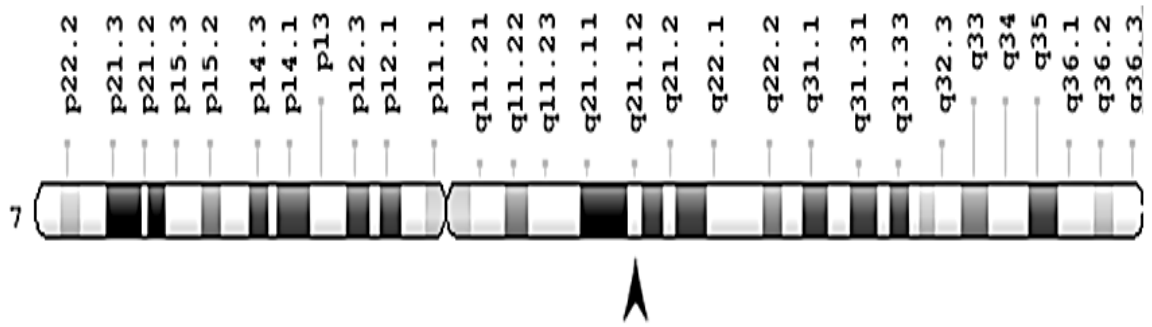
maddelerin terapötik etkinliğine etki etmektedir (Hoffmeyer ve ark., 2000; Lin ve Yamazaki, 2003).



Şekil 1.3. P-gp ekspresyonun gerçekleştiği dokular

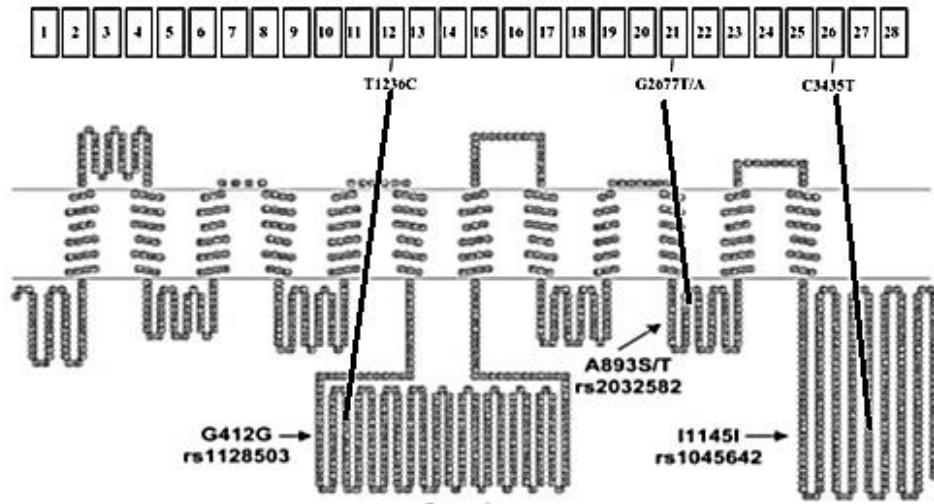
1.3.6.2.1. Genomik Yapı

ABCB1 geni 170 kDa olup 7. kromozomda q21.12 pozisyonunda yer almaktadır (Şekil 1.4.) ve 1280 amino asidi kodlayan 28 ekzon bölgesi içermektedir (Juliano ve Ling., 1976; Tovialla Zàrate ve ark., 2014).



Şekil 1.4. *ABCB1* genin 7. kromozom üzerindeki lokalizasyonu

ABCB1 gen bölgesi 170'den fazla tek nükleotit polimorfizmi (TNP) içermektedir. Ekzon 2, 5 ve 11'de yer alan TNP'ler amino asit değişimine neden olurken 12 ve 26. ekzonlarda yer alanlar amino asit değişimine neden olmamakla birlikte 4, 6, 12, 16, ve 17. intron bölgelerinde de TNP'ler bulunmaktadır (Hoffmeyer ve ark., 2000; Toviolla Zàrate ve ark., 2014). *ABCB1* geni üzerinde yer alan ve yaygın olarak çalışılan başlıca üç polimorfizm bulunmaktadır (Şekil 1.5). Bunlar T1236C, G2677T/A ve C3435T TNP'leridir (Hoffmeyer ve ark., 2000; Sakaeda, 2005).



Şekil 1.5. *ABCB1* gen bölgesinde yer alan en yaygın üç polimorfizm

1.3.6.2.2. C3435T Polimorfizmi

C3435T polimorfizmi *ABCB1* gen bölgesinde 26. ekzonda izolösün amino asitini kodlayan 1145. kodonun üçüncü pozisyonunda sitozin (C) nükleotidinin timin (T) nükleotidine (AUC> AUT) dönüşmesine neden olan sessiz bir mutasyondur (rs 1045642) (Fujii ve ark., 2012; Hoffmeyer ve ark., 2000).

Hoffmeyer ve ark. (2000), tarafından yapılan *in vivo* araştırmada *ABCB1* gen bölgesinde 3435. pozisyonda TT genotipine sahip bireylerde MDR1 ekspresyonunun 2 kat daha az olduğu, dolayısı ile aktivitesinin daha yavaş olduğundan bu genotipe

sahip bireylerde ilaç plazma düzeylerinin CC genotipine sahip olanlara göre 4 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur (Hoffmeyer ve ark., 2000).

Wang ve Sadée (2006) ise *in vitro* ortamda yapmış oldukları çalışmada 3435. pozisyonda T allelinin bulunduğu durumlarda mRNA stabilitesinin 1,5-2 kat arasında azaldığını ve protein düzeyinde düşmeye neden olduğunu saptamışlardır (Wang ve Sadée, 2006).

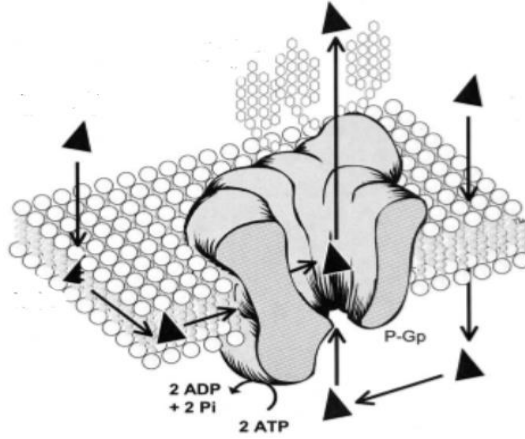
ABCB1 3435C>T polimorfizminin T allel frekansı sağlıklı birçok popülasyonda araştırıldığında sonuç Sırplar'da ve Polonyalılar'da 0,53 (Kurzawski, 2006; Milojkovic ve ark., 2011), Almanlar'da ve Ruslar'da 0,54 (Cascorbi ve ark., 2001; Gaikovitch ve ark., 2003), Portekizliler'de 0,65 (Cavaco ve ark., 2003), İngilizler'de 0,52 (Ameyaw,2001), İspanyollar'da 0,48 (Vicente ve ark., 2008), Türkler'de ise 0,46 – 0,52 arasında bulunmuştur (Bebek ve ark.,2005; Gümüş- Akay ve ark, 2010; Nassar ve ark., 2014).

1.3.6.2.3. *ABCB1* C3435T Polimorfizminin Klozapinin Taşınması ile İlişkisi

Genetik ve çevresel birçok etkene bağlı olarak KLZ plazma düzeyi bireyler arasında farklılık gösterebilmektedir. Plazma KLZ ve onun aktif metaboliti olan DKLZ plazma düzeyindeki farklılıklara bağlı olarak KLZ tedavisinde yaklaşık olarak %30 oranında tedaviye yanıt yetersiz kalabilmektedir (Buckley ve ark., 2001; Mouaffak ve ark., 2006). KLZ ve DKLZ plazma düzeylerinin düşük olması durumunda etkin tedavi sağlanamadığından tedavide yanıt elde edilememekte; plazma düzeylerinin yüksek olması durumunda ise ilaca bağlı istenmeyen yan etkiler oluşabilmektedir (Freeman ve Oyewumi, 1997; Perry ve ark., 2001; Spina ve ark., 2000).

Yapılan çalışmalarda Şekil 1.6'da gösterildiği gibi P-gp'nin aralarında KLZ'nin ve metabolitinin de aralarında bulunduğu birçok antipsikotik ilacın taşınmasında görev almaktadır (El Ela ve ark., 2004). Fareler üzerinde yapılan *in*

vitro çalışmada, P-gp'nin substrat olarak DKLZ'e olan ilgisinin KLZ'e göre olan ilgisinden daha fazla olduğu ve *ABCB1* geninden yoksun olan farelerin beyinlerinde DKLZ konsantrasyonunun 8,8 kat artmış olduğu bulunmuştur (Schmitt ve ark., 2012).



Şekil 1.6. Hücre içine çeşitli proteinlerle alınan klozapinin P-gp ile hücre dışına çıkarılması

Sirot ve ark. (2009), 75 İsviçreli şizofreni hastasında yapmış oldukları çalışmada 3435. pozisyonda TT genotipine sahip olan bireylerde ortalama KLZ plazma konsantrasyonu ortancasının CC genotipine sahip olan bireylere göre 1,6 kat daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (Sirot ve ark., 2009).

Consoli ve ark. (2009), 60 kişilik KLZ kullanan İtalyan şizofreni hastasında KLZ ve DKLZ ile *ABCB1* C3435T polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve CC genotipine sahip bireylerin KLZ düzeylerinin TT genotipine sahip olan bireylere göre daha düşük olduğunu bulmuşlardır. CC genotipine sahip bireylerde ilaç plazma düzeylerinin istenilen düzeye ulaşması ve ilaçtan maksimum yararlanım elde edilebilmesi için günlük KLZ dozunun diğer genotipe sahip bireylerinkine göre daha fazla olması gerektiğini önermişlerdir (Consoli ve ark., 2009).

Mouaffak ve ark. (2011), ise Fransız kökenli 26 kişilik ultra dirençli şizofreni hastası ile tedaviye yanıt veren 71 kişilik hasta grubunun *ABCB1* C3435T polimorfizmini ve KLZ plazma düzeylerini karşılaştırmışlar. Ultra dirençli hasta

grubunda CC, CT ve TT genotip dağılımını sırasıyla %7,7, %57,7 ve %34,6 olarak bulurken, tedaviye yanıt verenlerde bu genotiplerin yüzdeleri sırasıyla %18,3, %59,1 ve %22,6 olarak bulmuşlardır. Plazma KLZ düzeyleri ise tedaviye yanıt verenlerde ortalama 344,2 ng/ml, dirençli hasta grubunda ise 545,5 ng/ml olarak bulunmuştur (Mouaffak ve ark., 2011).

Olsson ve ark. (2015), KLZ kullanan 95 İsveçli bireyde yaptıkları çalışmada *ABCB1* C3435T polimorfizmi ile KLZ ve DKLZ plazma düzeyleri arasında bir ilişki bulamamışlardır (Olsson ve ark., 2015).

Anıl Yağcıoğlu ve ark. (2016), ise 101 kişilik KLZ kullanan Türk şizofreni hastalarında *ABCB1* polimorfizmi ile KLZ kullanımına bağlı olarak gelişen agranülositoz arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Ancak çalışma grubunda KLZ plazma miktar tayini yapılmamıştır. 10 kişide agranülositoz geliştiğinden geri kalan 91 kişilik şizofreni grubu kontrol grubu olarak seçilmiştir. 10 kişilik agranülositoz gelişen grupta TT genotipine rastlanmadığından bu genotipe sahip olan şizofreni hastalarının agranülositoza karşı daha dirençli olabileceği belirtilmiş ancak çok düşük sayıdaki bir grup üzerinde gerçekleştirildiğinden istatistiksel olarak anlamlı sonuca ulaşılamamıştır (Anıl Yağcıoğlu ve ark., 2016).

Akamine ve ark. (2017), ise 45 Japon hastada yaptıkları araştırmada %37,8'sinin CC genotipine sahip olduğunu ve bunlarda doz normalize KLZ ve DKLZ'nin sırasıyla ortalamalarını 1,79 ng/ml/mg ve 0,74 ng/ml/mg olarak belirlemişlerdir. Bireylerin %53,4'ün CT genotipine sahip olduğunu ve bu bireylerde ortalama doz normalize KLZ ve DKLZ'nin sırasıyla 1,49 ng/ml/mg ve 0,62 ng/ml/mg olarak tespit etmişlerdir. TT genotipine sahip bireylerin ise toplam kişilerin %8,8'ni oluşturduğunu bu kişilerde ise ortalama doz normalize KLZ'leri 1,89 ng/ml/mg ve doz normalize DKLZ ortalamaları ise 0,68 ng/ml/mg olarak bulunmuştur. Ancak çalışma sonucunda genotiplere göre bu düzeyler arasında bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir (Akamine ve ark., 2017).

Piatkov ve ark. (2017), farklı ırklardan oluşan çalışma gruplarında KLZ serum ortalamalarını 533,41 ng/ml, DKLZ serum düzey ortalamalarını 271,3 ng/ml, KLZ/ DKLZ oranı ise 1,96 olarak bulmuşlardır. Yirmi beş kişinin CC, otuz kişinin CT ve on üç kişinin de TT genotipine sahip olduğunu belirlemişler ve genotipe göre KLZ, DKLZ serum düzeylerinin ve KLZ/ DKLZ oranının ilişkili olmadığını göstermişlerdir (Piatkov ve ark., 2017).

Türk populasyonunda *ABCB1* C3435T polimorfizminin çeşitli hastalıklarla ilişkisi araştırılmış olsa da *ABCB1* polimorfizmin KLZ ve DKLZ düzeyine olan etkisi araştırılmamıştır. Her gene ait polimorfizm frekansı populasyonlar arasında farklılık gösterdiğinden; *ABCB1* C3435T polimorfizmi ile ilaç plazma düzeyi arasındaki ilişkinin Türk şizofreni hastalarında belirlenmesi, varyant bireylerde ilaç dozunun değişebilecek olması bireysel etkin tedavinin gerçekleştirilmesinde önem arz etmektedir.

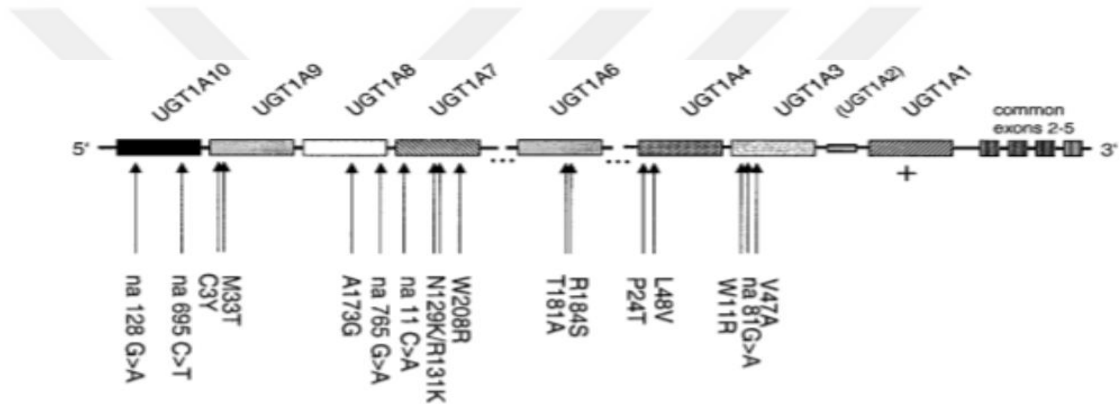
1.3.6.3. *UGT1A4* Geni

İnsan genomunda protein sekansları %55 aynı olan 19 farklı UGT enzimi sentezlenmektedir. Protein sekansındaki %45'lik farklılık sayesinde genomik yapılanmada oluşan farklılık ile UDP glukuronil transferaz (*UGT*) enzimleri; *UGT1A*, *UGT2A* ve *UGT2B* olmak üzere üç alt aileden meydana gelmektedir (Tukey ve Strassburg, 2000).

Canlılarda bilirubin, steroid hormonlar gibi endojen veya poliaromatik hidrokarbonlar, antidepresan, antikanser ilaçlar gibi eksojen kaynaklı birçok madde UGT enzimlerinin substratıdır. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi bazı substratların aminleri dördüncül yapıdayken; antipsikotik veya trisiklik antidepresanlar gibi birçok substrat ise ikincil, dördüncül veya aromatik yapıda aminler içermektedir. UGT'ler bu substratlara hidroksil, karboksil, amino veya tiyol grubu üzerinden glukuronik asit ilave ederek onların lipofilik halden hidrofilik glukuronitlere dönüştürülmesinde rol alan faz II enzimleridir. Özellikle UGT1 alt

ailesinde yer alan proteinler başlıca bu substrastların amin grupları üzerinden N-glukuronidasyona oluşumuna neden olarak substratların suda çözünürlüğünü artırarak onların idrar veya safra yoluyla eliminasyonu kolaylaştırmaktadır (Ehmer ve ark., 2004; Hakooz ve ark., 2012; Radominaska- Pandya ve ark., 1999; Tukey ve Strassburg, 2000; López ve ark., 2013).

UGT1A gen bölgesi 200 kb olup insanlarda 2. kromozomda yer almakta ve Şekil 1.7’de gösterildiği gibi *UGT1A4* (UDP glukuronil transferaz 1 ailesi, polipeptit A)’ün de içerisinde yer aldığı 9 farklı geni kodlamaktadır (Ehmer ve ark., 2004; López ve ark., 2013).



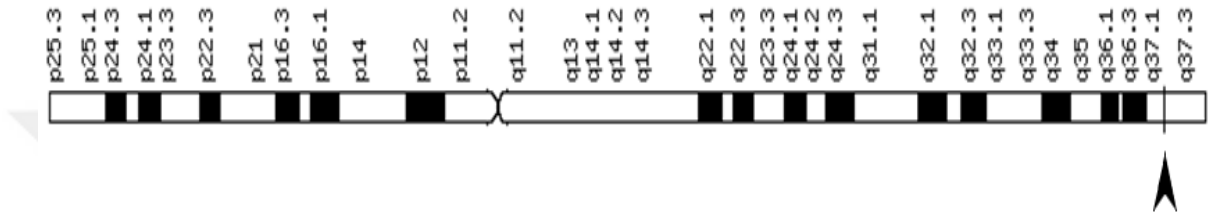
Şekil 1.7. *UGT1A* gen lokusu ve gen bölgesinde yer alan polimorfizmler (Ehmer ve ark., 2004)

Başlıca karaciğerde hepatositlerde, safra kanalı epitelyumunda, ince ve kalın bağırsaktaki hücrelerin endoplazmik retikulumlarında bulunan *UGT1A4*, birçok terapötik ilacın birincil, ikincil veya aromatik amin gruplarına glukuronik asit ekleyerek N- glukuronidasyonuna neden olmaktadır (Benoit-Biancamano ve ark., 2009; Ehmer ve ark., 2004; Mori ve ark., 2005; Tukey ve Strassburg, 2000).

1.3.6.3.1. Genomik Yapı

55 kDa olan *UGT1A4* Şekil 1.8’de gösterildiği gibi 2. kromozomda q37.1 pozisyonunda yer almaktadır. Toplamda 2374 baz çiftinden oluşan 534 amino asiti kodlayan *UGT1A4* geni 5 ekzon içermektedir (Mori ve ark., 2005; Tukey ve ark., 2000). Bu gen bölgesinde toplamda 21 tek nükleotit polimorfizmi bulunmakta ve

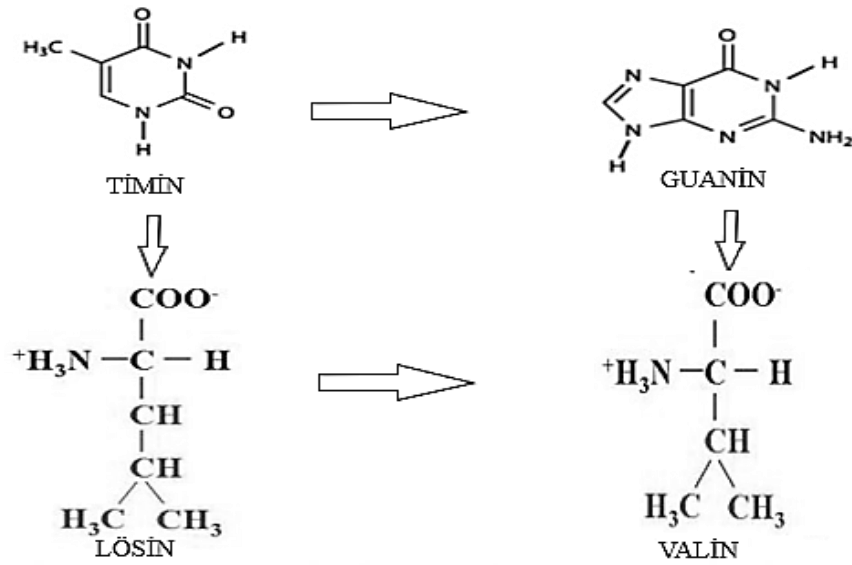
bunlardan ikisi çerçeve kaymasına neden olurken, sekizi amino asit değişimine, beşi sessiz mutasyona neden olmakta ve sekizi de kodlanmayan bölgede yer almaktadır (Ehmer ve ark., 2004; Saeki ve ark., 2005). Yapılan bir araştırmada beyaz ırkta *UGT1A4* gen bölgesinde intron ve promotor bölgelerinde sırasıyla 13 ve 39 adet polimorfizm olduğu; beyaz ırk ile Afrikalı Amerikalılar'da ise ortak olarak ilk ekzonda 10 amino asit değişimi ile sonuçlanan 14 tek nükleotit değişikliği bulunduğu saptanmıştır (Benoit-Biancamano ve ark., 2009;).



Şekil 1.8. *UGT1A4*'ün 2. Kromozom üzerindeki lokasyonu

1.3.6.3.2. *UGT1A4**3 Polimorfizmi

Birinci ekzonda yaygın olan iki adet yanlış anlamlı mutasyon bulunmaktadır. Bunlardan biri ekzon 1'de 142. pozisyonda Timin (T) nükleotitinin Guanine (G) transversiyonu (142 T>G) sonucunda 48. amino asiti kodlayan kodonun 1. pozisyonundaki nükleotit değişimi sonucu (TTTG > GTTG) lösin (L) yerine valin (V) amino asiti (L48V) sentezlenmesi ile meydana gelmektedir (Şekil 1.9). Tek nükleotid değişimi sonucunda oluşan bu polimorfizm *UGT1A4**3 veya *UGT1A4* L48V polimorfizmi şeklinde ifade edilmektedir (rs 2011425) (Benoit-Biancamano ve ark., 2009; Ehmer ve ark., 2004). Lösin amino asidi yerine valin amino asidi gelmesi sonucunda *UGT1A4* enziminin substrat bağlanma bölgesinde etilen grubuna bağlı bir sterik değişiklik meydana gelmekte ve bu da enzimin substrata bağlanmasında etki edebilmektedir (Ghotbi ve ark., 2010).



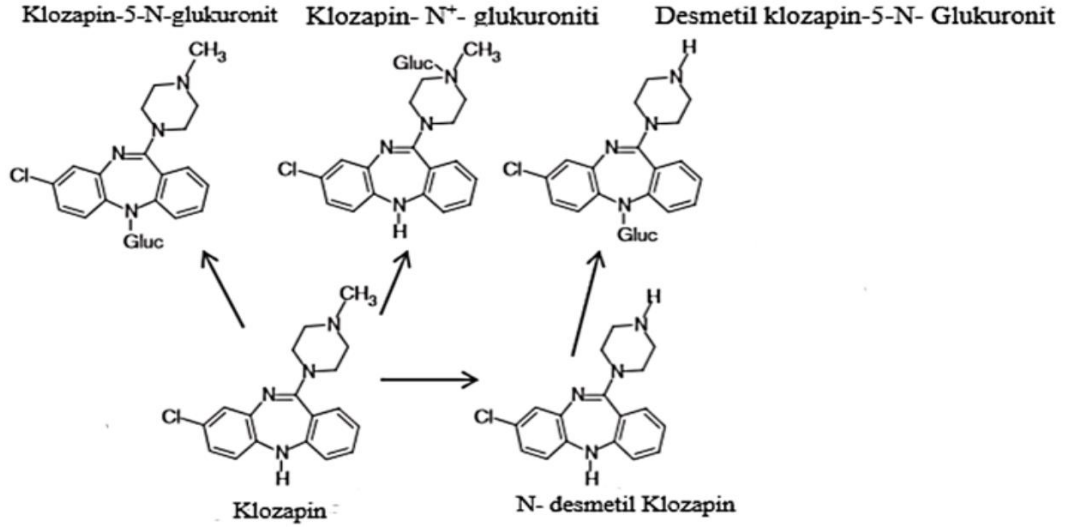
Şekil 1.9. *UGT1A4*3* polimorfizmine bağlı olarak *UGT1A4* gen bölgesindeki nükleotit ve amino asit değişimi

*UGT1A4*3* polimorfizminin beyaz ırktaki allel frekansı 0,11 (Thomas ve ark., 2006), Alman popülasyonunda 0,09 (Ehmer ve ark., 2004), Kanadalı Fransızlarda 0,083 (Ménard ve ark., 2009), İspanyollarda 0,086 (Lopez ve ark., 2013) olarak bulunurken, Türk popülasyonunda 0,13 (Gulçebi ve ark., 2011) olarak tespit edilmiştir.

1.3.6.3.3. *UGT1A4*3* Polimorfizminin Klozapinin Eliminasyonu ile İlişkisi

Klozapin tedavisinde uygulanan dozun %97'si metabolize olarak safra, idrar veya feçes yolu ile elimine olmaktadır. Klozapin ve onun aktif metaboliti olan norklozapinin (DKLZ) glukuronidasyonu sonucu yedi adet glukuronidasyon ürünü oluşsa da başlıca üç glukuronidasyon ürünü oluşmaktadır (Erikson- Ridout ve ark., 2012). Yapılan *in vitro* çalışmalar sonucunda Şekil 1.10'da yer aldığı gibi klozapinin *UGT1A4* ile glukuronidasyonu sonucu üçüncül ve dördüncül yapıdaki glukuronit ürünleri olan klozapin-5-N- glukuroniti ve klozapin- N⁺- glukuroniti oluşturduğu; DKLZ'i katalizlemesi sonucu da desmetilklozapin-5-N- glukuronitin (DKLZ-5-N- glukuronit) oluşumunu katalizlediği bulunmuştur. Erickson- Ridout ve ark. (2012), *in vitro* ortamda gerçekleştirmiş oldukları çalışmada KLZ-5-N- glukuronit ve DKLZ-5-

N- glukuronitin sadece UGT1A4 ile katalizlendiğini göstermişlerdir (Erikson- Ridout ve ark., 2012).



Şekil 1.10. Klozapin ve norklozapinin UGT1A4 ile katalizlenmesi sonucu oluşan glukuronidasyon ürünleri

Mori ve ark. (2005), tarafından gerçekleştirilen *in vitro* çalışmada elde edilen sonuçlarda ise varyant bireylerin yabancı tip genotipe sahip bireylere göre KLZ’i iki kat daha etkili bir şekilde katalize ettiği; yabancı tipte olan bireylere ait hücre kültürlerinde KLZ miktarının artmasıyla enzim aktivitesinin maksimum hıza (V_{max}) ulaştıktan sonra ortamda halen KLZ’in bulunmasıyla enzimin substrata karşı doygunluğa ulaşarak inhibe olduğu ve böylece *UGT1A4* yabancı tipteki bireylerde substrata yani klozapine bağlı olarak glukuronidasyonun yavaşlamakta olduğu bulunmuştur (Mori ve ark., 2005).

Enzimin substratına olan ilgisi K_m değeri ile ifade edilmektedir. İnsanlardan alınan karaciğer hücrelerinde gerçekleştirilen bir diğer *in vitro* çalışmada ise *UGT1A4* enzimi için DKLZ-5-N- glukuronitin K_m değerinin KLZ-5-N- glukuronitin K_m değerinin 2,2 katı olduğu böylece hücrelerde desmetil klozapin glukuronidasyonunun klozapin glukuronidasyonuna göre daha çok olduğu bulunmuştur. Polimorfik olarak varyant bireylerde (*UGT1A4* 48 Val) V_{max}/K_m değerlerinin yabancı tip bireylere (*UGT1A4* 48 Leu) göre KLZ-5-N- glukuronit,

KLZ-N+- glukuronit ve DKLZ-5-N- glukuronit için sırasıyla 5,2, 2,0 ve 3,4 kat daha fazla olduğu bulunmuştur (Erikson- Ridout ve ark., 2012).

Yapılan bir diğer in vitro çalışmada substrata bağlı olarak *UGT1A4* L48V polimorfizmi için mutantlarda aktivitenin değişebileceği bulunmuştur (Ehmer ve ark, 2004).

Olsson ve ark. (2015), KLZ kullanan 95 İsveçli bireyde yaptıkları çalışmada *UGT1A4* L48V polimorfizminin KLZ ve DKLZ plazma düzeylerine etkisini araştırdıklarında farklılık tespit etmemişlerdir (Olsson ve ark., 2015).

Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında *UGT1A4*3* polimorfizminin KLZ metabolizasyonunda önemli bir yere sahip olduğu ve varyant bireylerde glukuronidasyonun artması ile KLZ ve onun aktif metaboliti olan DKLZ plazma miktarlarının yabani tipteki bireylere göre daha düşük olabileceği düşünülmektedir. Polimorfizme bağlı olarak glukuronidasyonda oluşabilen artış ile hastalarda aynı dozda terapötik ilaçlar uygulansa dahi hastaların plazma ilaç düzeyleri birbirinden farklılık gösterebilecektir. Bundan dolayı da hastalarda standart doz uygulaması yapılması durumunda etkin tedavinin her hastada sağlanamayacağı öngörülmektedir. Çalışmamızda da *UGT1A4*3* polimorfizmi açısından mutasyonlu bireylerin belirlenmesi ile polimorfik bireylerde ilaç dozunun belirlenmesi ve tedavinin etkin bir şekilde yapılmasına katkıda bulunulması planlanmaktadır.

1.4. Amaç

Yaygın psikotik hastalıkların başında gelen şizofreninin tedavisinde en çok kullanılan atipik antipsikotiklerden biri de KLZ'dir. Ancak tedavide %30 oranında istenilen yanıt elde edilememekte ve bunun sonucunda hastalarda ilaç dozunun arttırılmasına bağlı olarak yan etkiler oluşabilmektedir. Bu durumun tersi olarak yetersiz ilaç düzeyine sahip hastalarda ise etkin tedavi sağlanamadığından tedavide

zorluklar yaşayabilmekte ve uygun etkin tedavi sağlanamamaktadır (Mouaffak ve ark.,2006). KLZ tedavisinde ilaca karşı olan bireysel yanıtın belirlenmesinde ve etkin tedavinin sağlanabilmesi için KLZ farmakokinetiğinde rol alan proteinleri kodlayan genlerdeki polimorfizmler önemlidir.

Tüm çalışmalar göz önüne alındığında *ABCB1* çeşitli hücrelerde eksprese edildiğinden C3435T polimorfizminin KLZ ve DKLZ'in absorpsiyonunda, dağılımında, eliminasyonunda ve terapötik etkinliğinde rol oynayabilmektedir. Yapılan çalışmalarda *ABCB1* gen bölgesinde CC genotipine sahip bireylerin KLZ ve DKLZ plazma düzeylerinin düşük olduğu ve bu bireylerde KLZ dozunun artırılarak etkin tedavinin sağlanabileceği önerilmektedir.

*UGT1A4*3* polimorfizminin KLZ metabolizasyonunda önemli bir yere sahip olduğu ve varyant bireylerde glukuronidasyonun artması ile KLZ ve onun aktif metaboliti olan DKLZ plazma miktarlarının yabani tipteki bireylere göre daha düşük olabileceği düşünülmektedir. Polimorfizme bağlı olarak glukuronidasyonda oluşabilen artış ile hastalarda aynı dozda terapötik ilaçlar uygulansa dahi hastaların plazma ilaç düzeyleri birbirinden farklılık gösterebilecektir. Bundan dolayı da hastalarda standart doz uygulaması yapılması durumunda etkin tedavinin her hastada sağlanamayacağı öngörülmektedir.

Çalışmamızda KLZ farmakokinetiğinde rol alan *ABCB1* C3435T ve *UGT1A4*3* polimorfizmleri ile bu genotiplerin KLZ ve DKLZ plazma düzeylerine etkisinin araştırılması hedeflenmektedir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Steril ependorf tüp (1,5 ml ve 0,2 ml' lik)	Axygen Genuine
Pipet uçları (10 µl, 100 µl, 1000µl)	Finntip
Otomatik mikropipetler	Ependorf, Thermo
Vorteks karıştırıcı	Biosan
Santrifüj	Heraeus
Otoklav	Nüve
Su Purifikasyon Sistem	Human Up 900
Etüv	Memmert
Mikrodalga fırın	Arçelik
Elektrikli hassas terazi	Shimadzu Libror
pH metre	Mettler Toledo
Laminar Flow kabin	ESCO
Thermal Cycle PCR cihazı	Techne Tc512
Yatay elektroforez cihazı	Scie-Plas, OWL™ B1A
Güç Kaynağı	Bio-Rad
Jel Görüntüleme cihazı	Syngene
Hassas Terazi	Metler Toledo 4 Digit
Manyetik Karıştırıcı	Thermolyne Mirak
Vial (2 ml)	Pathtech Elkay

Cam Malzemeler

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

EDTA	Merck
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Appllichem
Sodyum klorür (NaCl)	Merck
Etanol	Merck
Saf etanol	Merck
Primerler	Oligomer
Etidyum Bromür	Appllichem
Agaroz	Sigma Aldrich
DNA's, RNA's free water	Promega Wizard
Hücre Liziz	Promega Wizard
Çekirdek Liziz	Promega Wizard
Protein Çöktürme Solüsyonu	Promega Wizard
İzopropanol	Sigma Aldrich
Restriksiyon Enzimi (<i>MspI</i>)	NEB (New England Biolab)
Restriksiyon Enzimi (<i>Eco147I</i>)	Thermo Scientific
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	Amplicon
dNTP	Fermantas
Mg ⁺²	Amplicon
10x Tampon	Amplicon

100 bp ladder	Fermentas
6X loading çözeltisi	Fermentas
Metanol	Sigma Aldrich
N- Hekzan	Sigma Aldrich
İzoamil alkol	Merck
Kloroform	Merck
Metil tert bütıl eter	Sigma Aldrich
Dietileter	Merck
Diklorometan	Merck
Etilasetat	Merck
Fosforik asit	Merck
Trietilamin	Merck
Potasyum hidroksit	Merck
Asetonitril	Sigma Aldrich
Klozapin	Sigma Aldrich
Desmetilklozapin	Sigma Aldrich
Sodyum hidroksit	Merck
Hidroklorik asit	Merck

2.2. Deney Protokolü

2.2.1. Çalışma Grubu

Çalışma Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Anabilim Dalı ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı arasında işbirliği içinde yürütülmüştür. Araştırma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran, burada Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı V (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V, DSMV) ölçütlerine göre şizofreni tanısı almış ve KLZ tedavisi görmekte olan yüz hastada prospektif çalışma olarak gerçekleştirilmiştir. Psikiyatristlerin hastalarla yaptıkları görüşmeler sonucunda klinik değerlendirmeler ve veriler elde edilmiş, ardından hastalara çalışma hakkında yeterli bilgiler verilerek bilgilendirilmiş olur formları imzalatılmıştır. Hastaların demografik bilgileri (cinsiyet, boy, kilo, yaş, ilaç dozları, hastalık süreleri, sigara ve kafein tüketim miktarları) ile kan numuneleri rızaları alındıktan sonra elde edilmiştir. Çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'un 11.12.2017 tarih ve 20-1266-17 karar no' lu izni ile gerçekleştirilmiştir (Ek- 1).

2.2.2. Çalışma Grubu Kriterleri

2.2.2.1. Dahil Olma Kriterleri

Tüm dahil olma kriterlerine sahip bireyler çalışmaya dahil edilmiştir. Dahil olma kriterleri;

- Hastanın 18 yaşından büyük olması,
- Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı V kriterlerine göre şizofreni tanısı almış ve KLZ tedavisi görüyor olması,
- Hastanın karaciğer, böbrek fonksiyonlarının ve kan düzeylerinin normal olması,

- Çalışmaya dahil olmak istediğini belirten bilgilendirilmiş olur formunu okuyarak imzalamış olması

2.2.2.2. Dışlama Kriterleri

Aşağıda yer alan durumlarından en az birine sahip olan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

- Hastanın 18 yaşından küçük, 65 yaşından büyük olması,
- Beyaz ırk dışından olması,
- Bireyin madde bağımlılığı öyküsünün olması veya klinik olarak yoksunluk belirtileri göstermesi,
- Hastanın ATP- bağlayıcı kaset ailesinin üyesi olan *ABCB1* ve Uridin Difosfat (*UDP*) glukuronoziltransferaz (*UGT*) genlerini indükleyen veya inhibe eden ilaç kullanması,
- Eş zamanlı tıbbi veya nörolojik hastalık veya zihinsel engelilik durumunun bulunması,
- Klozapinin gastrointestinalden emilimini engelleyebilecek durumlar olması (diyare veya mide barsak operasyonu geçirmiş olması vb.),
- Hastaya ait kayıtların yetersiz olması

2.2.3. Numunelerin Toplanması

Bireylerden heparinli tüp içerisine alınan periferik 10 ml kan örneği 24 saat içerisinde 2500g'de 10 dakika santrifüj edilerek plazma ve buffy coat ayrılarak analiz süresinceye kadar -80°C'de bekletilmiştir. Plazmadan KLZ ve DKLZ'in kantitatif analizi, buffy coat'tan ise genomik DNA elde edilerek buradan genotipleme analizleri yapılmıştır.

2.2.4. Yöntem

2.2.4.1. Buffy Coat'tan Yüksek Tuz Metodu ile Genomik DNA İzolasyonu

1. Analiz süresinceye kadar -80°C'de muhafaza edilen numuneler sırasıyla -20°C ve +4°C'ye getirelerek dereceli olarak eritilmiştir. Tamamen çözünen buffy coat'un iyice karışması için 15 dakika rotatörde çevrilmiştir.
2. Numunelerden iyice pipetaj yapılarak, 500 µl alınarak 2 ml'lik ependorf tüpüne konulmuştur. Üzerine hücre liziz solüsyonu eklenerek 10 dakika rotatörde çevrilmiş, ardından numune 14000 g'de iki buçuk dakika santrifüj edilmiştir.
3. Santrifüjden çıkarılan numunelerin üst fazı atılarak, kalan pelet 25- 30 saniye kadar vortekslenmiştir. Daha sonra çekirdek liziz solüsyonu ve Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) solüsyonu eklenerek pelet iyice çözününceye kadar pipetaj yapılmıştır.
4. İyice çözünen karışımın üzerine protein çöktürme solüsyonu ilave edilmiş ve 10 saniye kadar vortekslenerek 4 dakika 14000 g'de santrifüj edilmiştir.

5. Numuneler santrifüjden çıkarılarak pelet kısmı hareket ettirilmeden üst faz yeni 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılmıştır. Tüpe izopropanol eklenerek 2 dakika kadar tüp alt üst edilerek çevrilmiş ve numune 14000 g'de iki buçuk dakika santrifüjlenerek genomik DNA beyaz pelet şeklinde çöktürülmüştür.
6. Santrifüjden çıkarılan numunelerin üst fazı uzaklaştırılarak tüpe %70'lik etanol eklenmiş ardından iki buçuk dakika 14000 g'de santrifüj edilmiştir.
7. Santrifüj sonunda tüp dibinde çöken genomik DNA hareket ettirilmeden üst faz uzaklaştırılarak alkolün iyice uçması için tüp kapağı açık bir şekilde 10 dakika kurumaya bırakılmıştır. Ardından genomik DNA'nın iyice çözünmesi için DNA rehidratasyon solüsyonu ilave edilerek 24 saat +4°C'de muhafaza edilmiştir. Sonrasında ise analiz süresinceye kadar izole edilmiş DNA'lar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

2.4.4.2. DNA Miktarı ve Saflık Tayini

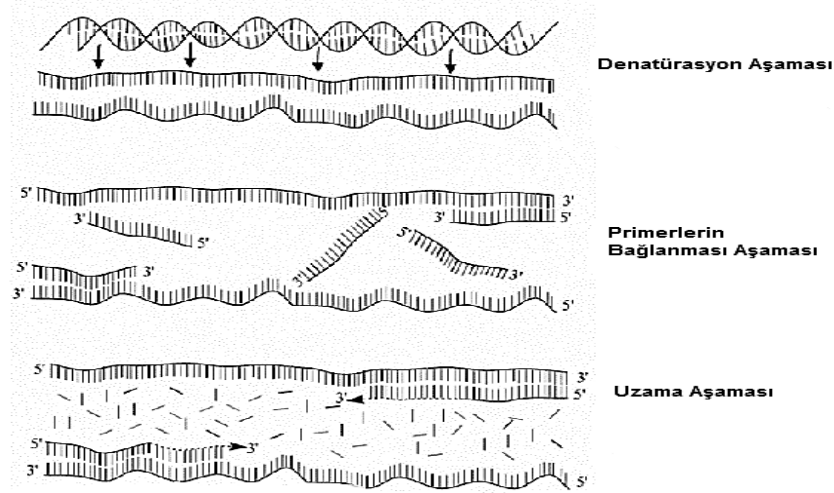
İzole edilen DNA'ların kantitatif analizi için her biri yaklaşık 100 µl'lik numuneden 5 µl alınarak spektrofotometrede 260 nm'de ve 280 nm'de absorbans değerleri tespit edilmiştir. 260 nm'de elde edilen değerler DNA miktarını verirken, 260 nm'de elde edilen değerin 280 nm'de elde edilen değere bölünmesiyle elde edilen orandan DNA saflık tayini yapılmıştır. Saflığın belirlenmesinde numunelerden elde edilen oran değerler 1,7 - 2,0 arasında bulunmuştur. Bu da DNA'ların yeterli saflıkta elde edildiğini göstermiştir.

2.2.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

DNA üzerinde spesifik olarak çoğaltılmak istenen gen bölgesinin *in vitro* bir ortamda yüksek sıcaklıkta aktivite gösteren *Thermus aquaticus*'tan elde edilen *Taq* enzimi ile çoğaltılmasına olanak sağlayan hızlı, hassas ve maliyeti düşük olan genetik araştırmaların en çok tercih edilen yöntemlerinden biridir. Temelde üç aşamadan oluşan PZR'nin bileşenleri DNA, primerler, dNTP'ler, *Taq* DNA polimeraz ve polimeraz tamponundan oluşmaktadır (Sharma ve ark., 2002).

2.2.4.3.1. PZR Aşamaları

1. *Denatürasyon*: Yaklaşık olarak 94°C gibi yüksek sıcaklık ile çift sarmal haldeki DNA molekülünün iki iplikçiğinin birbirinden ayrıldığı safhadır.
2. *Primerlerin Hedef Bölgeye Bağlanması*: *Taq* DNA polimerazın senteze başlayabilmesi için 3' hidroksil grubuna sahip, çoğaltılmak istenen hedef DNA bölgesine spesifik olan 15- 30 nükleotid uzunluğundaki primerlerin DNA iplikçikleri üzerine bağlandığı aşamadır. Bu aşamadaki sıcaklık primerlerin nükleotit içeriğine bağlı olarak 37°- 65°C'de 30 saniye ile 1 dakika arasında sürebilmektedir.
3. *Uzama*: *Taq* DNA polimerazın 72°C'de primerlerin 3' hidroksil gruplarına bağlanmasıyla 5'→3' yönünde deoksiribonükleozid trifosfat'ları (dNTP) ekleyerek orjinal DNA ipliğinin komplementerini sentezlediği aşamadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. PZR'ın aşamaları

2.2.4.3.2. PZR Bileşenleri

- a) *Enzim Tamponu*: Enzimin optimum koşullarda aktivite göstereceği pH'ın sağlanması için PZR karışımına ilave edilir.
- b) *Magnezyum*: Polimeraz enzimleri aktivite gösterebilmeleri için iki değerlikli katyonlara ihtiyaç duyarlar. Ortama katılan Mg^{+2} miktarı ile polimeraz enzim aktivitesi doğru orantılıdır. Bu nedenle, optimum DNA eldesi için magnezyum PZR için oldukça önemlidir.
- c) *Deoksiniükleotid Trifosfatlar (dNTPs)*: Yeni DNA ipliklerinin sentezlenebilmesi için gerekli A, T, G ve C nükleotidleridir.
- d) *Primerler*: DNA üzerinde çoğaltılacak olan gen bölgesine spesifik olan öncül (forward, F) ve ters (reverse, R) olmak üzere iki adet homolog diziden oluşur. Primer miktarının fazla olması durumunda primer- dimer oluşumuna neden olacağından, az olması durumunda ise yeterli ürün eldesi sağlanamayacağından PZR karışımındaki primer miktarını ayarlamak oldukça önemlidir.

e) *Taq DNA polimeraz*: Yapılacak PZR yöntemine, çoğaltılacak olan DNA özelliği ile hedef gen bölgesinin büyüklüğüne göre çok çeşitli polimeraz enzimleri kullanılabilmektedir. En yaygın kullanılanlardan biri *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen ve 72°C’de maksimum aktivite gösteren *Taq DNA* polimerazdır. DNA polimeraz 5’→3’ yönünde orjinal DNA ipliklerinin karşısına uygun dTNP’leri ekleyerek kompelementer yeni DNA ipliklerinin sentezlenmesini sağlar.

f) *DNA*: Çoğaltılmak istenen hedef DNA bölgesini içeren genomik DNA’dır.

2.2.4.3.3. ABCB1 Gen Bölgesinin Amplifikasyonunda Kullanılan PZR Yöntemi Optimizasyonu

Çalışmamızda *ABCB1* gen bölgesi için sadece hedeflenen gen parçalarının çoğaltıldığı ve sonraki aşama için yeterince ürün elde edilebileceği en uygun PZR koşullarının belirlenebilmesi için primer, dNTP, Mg, *Taq DNA* polimeraz ve DNA miktarları titrasyonu ile birlikte primerlerin DNA üzerine bağlanabileceği en uygun sıcaklığı belirleyebilmek için primer bağlanma sıcaklığı ve döngü sayısı titrasyonunu içeren optimizasyon deneyleri yapılmıştır.

2.2.4.3.3.1. PZR Komponentleri ile İlgili Optimizasyon Çalışmaları

PZR için oligonükleotid dizaynı: Uygun PZR koşullarını saptamak için <http://www.justbio.com/oligocalc/index.php> internet sayfasından *ABCB1* gen bölgesi ürünlerinin T_m (Melting temperature) değerleri ve %GC oranları hesaplanarak teorik olarak en uygun yapışma ve denatürasyon sıcaklıkları hesaplanmıştır. Aynı zamanda önceki yıllarda yayınlanmış çalışmalardan da yararlanılmıştır. Buna göre, *ABCB1* C3435T farklılığını içeren hedef gen bölgesinin PZR yöntemi ile çoğaltılmasında forward primer olarak 5’-

TTGATGGCAAAGAAATAAAGC-3' ve reverse primer olarak ise 5'-CTTACATTAGGCAGTGACTION-3' kullanılmıştır.

Magnezyum iyon (Mg^{+2}) konsantrasyonu: Tampon 15 mM Mg içerdiğinden bir tüpe hiç Mg katılmadan 2,5 µl tampon kullanılarak PZR yapılmış ancak yeterli miktarda ürün gözlemlenmemiştir. Tampondaki Mg'dan ayrı olarak reaksiyona ekstra 25 mM Mg iyon konsantrasyonundan 0,5 µl, 0,75 µl, 1 µl, 1,25 µl ve 1,5 µl arasında katılarak Mg titrasyonu yapıldı. PZR reaksiyonunda yeterli düzeyde ürün elde edildiği ve ekstra bantların gözlemlenmediği en iyi sonuç totalde 62,5 mM konsantrasyonda Mg katıldığında gözlemlenmiştir.

Deoksiniükleotid trifosfat (dNTP; dATP, dCTP, dGTP ve dTTP) konsantrasyonu: dNTP stok çözeltisi 10mM/ ml şeklinde firmadan temin edilmiş ve reaksiyonda kullanılmak üzere 0,125 mM/ µl olacak şekilde dilüe edilmiştir. Hedef bölgelerin en doğru şekilde çoğaltılabilmesi 0,125 mM stoktan 1 µl, 2 µl, 2,5 µl, 4 µl ve 6 µl dNTP reaksiyona katılarak denenmiştir. Ekstra bantların gözlemlenmediği en iyi sonuç 0,375 mM konsantrasyon dNTP kullanıldığında gözlemlenmiştir.

Primer konsantrasyonları: İki primerin stokları 100 pmol/µl konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı. Konsantrasyonun reaksiyon üzerindeki etkilerini görmek için her iki primerin 5, 10, 15 ve 20 pmol/µl konsantrasyonları hazırlanarak reaksiyon gerçekleştirildi. ABCB1 gen bölgesi için primer dimerizasyonunun gözlemlenmediği en iyi sonucun 10 pmol/µl değerinde olduğu tespit edildi.

DNA konsantrasyonu: Genomik DNA 100, 200, 300, 400 ve 500 ng arasındaki farklı konsantrasyonlarda denenmiş ve en iyi sonucun 500 ng değerinde olduğu tespit edilmiştir.

Taq DNA polimeraz konsantrasyonu: Başarılı ve istenen bölgenin en doğru şekilde çoğaltılabilmesi için Taq DNA polimeraz 1,0 U, 1,25 U, 1,50 U, 1,75 ve 2,0 U

konsantrasyonlarda denenmiştir. En iyi sonucun ise 1,50 U konsantrasyonda olduğu tespit edilmiştir.

Tüm PZR komponentleri optimizasyon çalışmaları sonucunda hedef *ABCB1* gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PZR programları Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. *ABCB1* hedef gen bölgesinin PZR’nda kullanılan bileşikler ve konsantrasyonları

Gen Bölgesi	Bileşen	Reaksiyon hacmi (µl)	Ana stok konsantrasyonu
<i>ABCB1</i>	10 X Tampon	2,5	10 X Tampon Amonyum, 15 mM Mg
	Magnezyum	1	25 mM
	dNTP	3	0,125 mM
	F primer - R primer	1,25 - 1,25	10 pmol
	Taq	0,3	5 U/µl
	DNA	5	100 ng

2.2.4.3.3.2. *ABCB1* Gen Bölgesi İçin PZR Programı ile İlgili Sıcaklık ve Süre Optimizasyonları

Denatürasyon sıcaklığı: Denatürasyon sıcaklığı 5 dakikada sırasıyla 92, 94, 95, 96 ve 97 °C sıcaklıklarında denenmiş ve en uygun denatürasyon sıcaklığının 94 °C olduğu gözlemlendi.

Denatürasyon Sıcaklık süreleri: Denatürasyon sıcaklığı ilk aşamada 3- 8 dakika arasında ardından 30 saniye, 45 saniye, 1 dakika, 1 dakika 30 saniye ve 2 dakika olacak şekilde beş farklı parametrede denendi. En iyi olan sonuçlar ilk denatürasyon için 5 dakika, sonraki denatürasyon için 1 dakika 30 saniyede tespit edildi.

Primer bağlanma sıcaklığı: PZR amplifikasyonunda kritik parametre olan primerlerin DNA'ya yapışma sıcaklığı 50°C, 52°C, 54°C, 55°C ve 57°C arasındaki farklı değerlerde denendi. En uygun yapışma sıcaklığı 55°C olarak belirlendi.

Primer bağlanma süresi: Yeterince ürün elde edilebilmesi ve hedef olan tek bir bandın görüldüğü bağlanma süresi için 30 saniye, 1 dakika, 1 dakika 30 saniye, 2 dakika ve 2 dakika 30 saniyelerde primer bağlanma optimizasyonu gerçekleştirildiğinde en iyi sonuç 1 dakikada elde edildi.

Sentez süresi: Genotiplemede bir sonraki aşamada kullanılabilecek kadar ürün elde edilmesinde sentez süresi 30 saniye, 45 saniye, 1 dakika, 1.5 dakika ve 2 dakikalarda ayarlanarak sentez süresi optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. En iyi sonuç 1 dakika 30 saniyelik sentez süresi ile elde edildi.

Döngü sayısı: Yeterli miktarda ürün elde edebilmek adına en uygun döngü sayısının tespiti için 20, 25, 30, 35, 40 döngüleri denendi. En iyi döngü sayısının 35 olduğu tespit edildi.

ABCB1 gen bölgesinin PZR amplifikasyon koşulları Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. *ABCB1* geninin amplifikasyonunun gerçekleştirildiği koşullar

Gen bölgesi	Forward ve Reverse Primerler	Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü	PZR ürünü baz çifti uzunluğu
ABCB1	5'- TTGATGGCAAAGAAATAAAGC- 3' 5'- CTTACATTAGGCAGTGACTCG- 3'	Başlangıç denatürasyonu	94° C	5 dak	1	208 bç
		Denatürasyon	95° C	1.5 dak	35	
		Primerlerin bağlanması	55° C	1 dak		
		Uzama	72° C	1.5 dak		
		Son uzama	72° C	7 dak	1	

2.2.4.3.4. UGT1A4 Gen Bölgesinin Amplifikasyonunda Kullanılan PZR Yöntemi

UGT1A4 gen bölgesi için sadece hedeflenen gen bölgesinin çoğaltıldığı ve sonraki aşama için yeterince ürün elde edilebileceği en uygun PZR koşullarının belirlenebilmesi için primer, dNTP, Mg, Taq DNA polimeraz ve DNA miktarları titrasyonu ile birlikte primerlerin DNA üzerine bağlanabileceği en uygun sıcaklığı belirleyebilmek için primer bağlanma sıcaklığı ve döngü sayısı titrasyonunu içeren optimizasyon deneyleri yapılmıştır.

2.2.4.3.4.1. PZR Komponentleri ile İlgili Optimizasyon Çalışmaları

PZR için oligonükleotid dizaynı: Uygun PZR koşullarını belirlemek amacıyla <http://www.justbio.com/oligocalc/index.php> internet sayfasından UGT1A4 gen bölgesi ürünlerinin T_m (Melting temperature) değerleri ile %GC oranları hesaplanarak teorikte uygun olan yapışma ve denatürasyon sıcaklıkları hesaplanmıştır. Ayrıca daha önce yayınlanmış çalışmalardan da yararlanılmış ve elde edilen veriler doğrultusunda UGT1A4 L48V farklılığını içeren hedef gen bölgesinin PZR yöntemi ile çoğaltılmasında aşağıda verilen primerler forward ve reverse primerler sırasıyla 5'- GTTGGGCCCATAACGAAAGGCAGTT -3' ve 5'- GCTCCACACAACACCTATGAAG -3' tür.

Magnezyum iyon (Mg^{+2}) konsantrasyonu: Tampon 15 mM Mg içerdiğinden bir tüpe sadece 2,5 µl tampon katılarak ekstradan hiç Mg katılmadan, diğer tüplere ise tampondaki 15 mM Mg'dan ayrı olarak 0,5 µl, 0,75 µl, 1 µl, 1,25 µl ve 1,5 µl ilave edilerek PZR yapılmıştır. PZR reaksiyonunda yeterli düzeyde ürün elde edilmesi ve ekstra bantların gözlemlenmemesi için sadece tampondaki 37,5 mM'lık Mg yeterli gelmiştir.

Deoksinükleotid trifosfat (dNTP; dATP, dCTP, dGTP, ve dTTP) konsantrasyonu: dNTP stok çözeltisi 10mM/ ml şeklinde firmadan temin edilmiş ve 0,125 mM/ µl olacak şekilde reaksiyonda kullanılmak üzere dilüe edilmiştir. Hedef bölgelerin en doğru ve başarılı bir şekilde çoğaltılabilmesi 0,125 mM stok dNTP'den 1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl ve 6 µl alınarak dNTP titrasyonu yapıldığında ekstra bantların gözlemlenmediği en iyi sonuç 0,375 mM konsantrasyon dNTP kullanıldığında gözlemlenmiştir.

Primer konsantrasyonları: Her iki primerin konsantrasyonları 100 pmol/µl olacak bir şekilde dilüe edilerek stokları ayarlandı. Ardından her iki primerin 5, 10, 15 ve 20 pmol/µl konsantrasyonları ayarlanarak, konsantrasyondaki değişimlerin reaksiyonda meydana getirdiği etkiler incelendi. *UGT1A4* gen bölgesi için primer dimerizasyonunun gözlemlenmediği en iyi sonucun 10 pmol/µl değerinde olduğu tespit edildi.

DNA konsantrasyonu: Genomik DNA konsantrasyonları sırasıyla 100, 200, 300, 400 ve 500 ng olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda denenmiş ve en iyi sonucun 400 ng değerinde olduğu bulunmuştur.

Taq DNA polimeraz konsantrasyonu: Hedef bölgenin en doğru şekilde çoğaltılabilmesi için 0,50 U, 0,75 U, 1,0 U, 1,25 ve 1,50 U konsantrasyonlarda *Taq* DNA polimeraz enzimi katılarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir. En iyi sonucun ise 1,0 U konsantrasyonda olduğu tespit edilmiştir.

Tüm PZR komponentleri optimizasyon çalışmaları sonucunda hedef *UGT1A4* gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PZR programları Çizlge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. *UGT1A4* hedef gen bölgesinin PZR'nda kullanılan bileşikler ve konsantrasyonları

Gen Bölgesi	Bileşen	Reaksiyon hacmi (µl)	Reaksiyon konsantrasyonu
-------------	---------	----------------------	--------------------------

UGT1A4	10 X Tampon	2,5	10 X Tampon Amonyum, 15 mM Mg
	dNTP	3	0,125 mM
	F primer - R primer	1 - 1	10 pmol
	Taq	0,2	5 U/ μ l
	DNA	4	100 ng

2.2.4.3.4.2. UGT1A4 Gen Bölgesi İçin PZR Programı ile İlgili Sıcaklık ve Süre Optimizasyonları

Denatürasyon sıcaklığı: Denatürasyon sıcaklığı sırasıyla 92°C, 94°C, 95°C, 96°C ve 97°C sıcaklıklarında denendiği zaman en uygun denatürasyon sıcaklığının 94°C olduğu gözlemlendi.

Denatürasyon Sıcaklık süreleri: Denatürasyon sıcaklığı ilk aşamada 1- 5 dakika arasında ardından 20 saniye, 30 saniye, 45 saniye, 1 dakika ve 1 dakika 30 saniye 5 farklı parametrelerde denendi. En iyi olan sonuçlar ilk denatürasyon için 2 dakika, sonraki denatürasyon için 30 saniye olarak tespit edildi.

Primer bağlanma sıcaklığı: PZR amplifikasyonunda kritik parametre olan yapışma sıcaklığı 56°C, 57°C, 58°C, 59°C ve 60°C arasındaki farklı değerlerde denenmiş ve primerler için en uygun yapışma sıcaklığı 59°C olarak tespit edildi.

Primer bağlanma süresi: Yeterince ürün elde edilebilmesi ve tek bir bandın görüldüğü bağlanma süresi için 20, 30, 40, 50 ve 60 saniyelerde primer bağlanma optimizasyonu gerçekleştirildiğinde en iyi sonucun 30 saniye bağlanma süresi uygulandığında elde edildiği gözlemlendi.

Sentez süresi: Genotiplemede bir sonraki aşamada kullanılabilecek kadar ürün elde edilmesinde sentez süresi 30 saniye, 45 saniye, 1 dakika, 1.5 dakika ve 2 dakika

olacak şekilde optimizasyon gerçekleştirildi. En iyi sonuç 45 saniyelik sentez süresi uygulandığında elde edildi.

Döngü sayısı: En uygun döngü sayısını tespiti etmek için 25, 30, 35, 40, 45 döngüleri denenmiş ve en iyi döngü sayısının 40 olduğu bulunmuştur.

Tüm sıcaklık ve süre optimizasyon çalışmaları sonucunda hedef *UGT1A4* gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PZR programları Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. *UGT1A4* geninin amplifikasyonunun gerçekleştirildiği koşullar

UGT1A4	5'- GTTGGGCCCATAACGAAAGGCAGTT- 3' 5'-GCTCCACACAACACCTATGAAG-3'	Başlangıç denatürasyonu	94° C	2 dak	1	576 bç
		Denatürasyon	94° C	30 san	40	
		Primerlerin bağlanması	59° C	30 san		
		Uzama	72° C	45 san		
		Son uzama	72° C	7 dak	1	

2.2.4.4. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA molekülleri içerdikleri fosfat nedeniyle negatif yüklüdürler. PZR sonucu elde edilen ürünlerin varlığını ve doğru bölgenin çoğaltıldığını kanıtlamak amacıyla agaroz jel elektroforezine akım uygulandı. Moleküler büyüklüklerine göre ürünler negatif kutupdan pozitif kutuba göç ettirildi. Düşük moleküler ağırlığa sahip DNA molekülleri agaroz jel elektroforezinde daha hızlı ilerlerken, yüksek moleküler ağırlıktaki ürünler ise jelde daha yavaş hareket etmiştir. Aynı zamanda jele yüklenen marker yardımı ile de DNA moleküllerinin büyüklüğü tespit edilerek amplifikasyon doğrulanmıştır.

2.2.4.4.1. PZR Ürünleri İçin Jel Hazırlanması

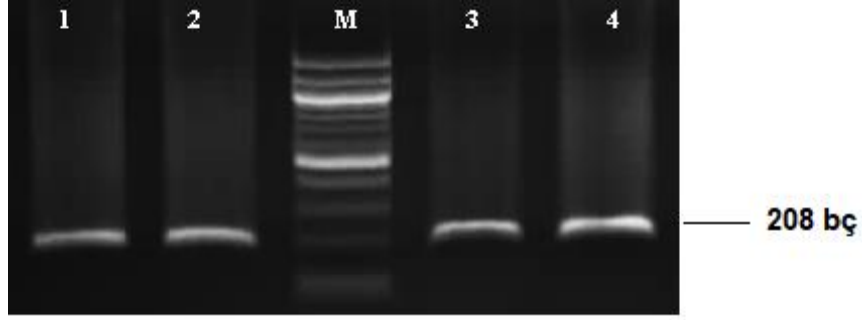
- 0,4 gram toz agaroz hassas terazide tartılarak erlenmayere alındı.
- 4 ml Tris borik asit- EDTA (TBE) mezürde ölçülerek bidistile su ile 40 ml'ye tamamlanarak, karışım erlen içerisindeki agarozla ilave edildi.
- Agaroz tamamen eriyinceye kadar mikrodalgada kaynatıldı.
- Üzerine 20 µl Etidiyum Bromür (EtBr_2) eklenerek, iyice homojen hale gelmesi için çalkalandı.
- İçerisinde tarak yerleştirilen plaka içerisine dökülürken hava kabarcığı oluşturulmamasına özen gösterildi, oluşmuş ise pipet ucu yardımı ile jel katılaşmadan kabarcıklar giderildi.
- 30- 45 dakika kadar jelin tamamen katılaşması için beklendi.

2.2.4.4.2. Jel Tankı İçin Tampon Solüsyonunun Hazırlanması

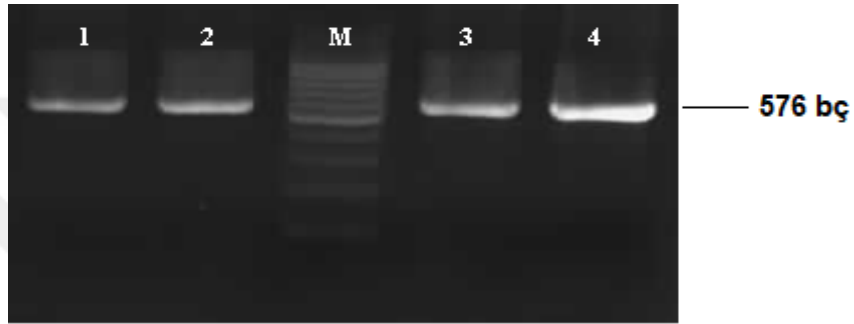
- 20 ml TBE mezürde ölçülerek son hacim bidistile su ile 200 ml'ye tamamlandı.
- Üzerine 16 µl EtBr_2 ilave edildi.
- Jel donduğu zaman tarak çıkarılır, tank haznesine yerleştirilerek üzerine hazırlanan tampon dökülür.

2.2.4.4.3. Jel Elektrofrezine Numunelerin Uygulanması

- PZR ürünleri ile 7000 g'de 20 saniye santrifüj edilerek tüp çeperinde kalan sıvıların dibe çökmesi sağlandı.
- PZR ürünlerinden 8 µl alınarak üzerlerine jelde kuyucuklara çökmelerini ve yüklerken görülmesini kolaylaştırmak amacıyla 2 µl yükleme tamponu ilave edilerek tekrardan santrifüj edilmiştir.
- Donmuş olan agaroz jel, kuyucukları anot (-) uca gelecek şekilde tanka yerleştirilerek tarağı çıkartıldı. Üzerine tampon solüsyon eklenerek numunelerin yüklenmesi için hazır hale getirilmiştir.
- Yükleme tamponu ile karıştırılan PZR ürünleri sırasıyla jele yüklenmiştir. PZR ürünlerinin büyüklüklerini tespit edebilmek amacıyla 10 µl marker karışımı (1 µl marker, 2 µl yükleme tamponu, 7 µl bidistile su içerir) jele yüklenir.
- Kablolar kuyucukların olduğu tarafta anot (-), karşısında ise katot (+) olacak şekilde tanka bağlandı. Güç kaynağı 100 Volt, 30 Watt ve 0,30 Amper'e ayarlanarak ürünlerin jelin sonuna kadar gelebilmeleri için 30- 45 dakika akım uygulandı.
- Jel tanktan çıkarılarak Syngene Jel Görüntüleme Sistemi ile UV ışığı altında görünür hale getirilerek fotoğraflanmıştır. PZR sonunda *ABCB1* gen bölgesi için görülmesi beklenen fragment büyüklüğü 208 bp (Şekil 2.2), *UGT1A4* için de 576 bp'dir (Şekil 2.3).



Şekil 2.2. *ABCB1* gen bölgesine ait 208 bç'lik PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M: 100 bç DNA ladder)



Şekil 2.3. *UGT1A4* gen bölgesine ait 576 bç'lik PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M: 100 bç DNA ladder)

2.2.4.5. Restriksiyon Parçası Uzunluk Polimorfizmi (RPUP)

DNA molekölü üzerinde 5- 10 bazlık spesifik bölgeleri tanıyarak DNA'yı fragmentlere ayıran, bakterilerden elde edilen enzimlere “restriksiyon enzimleri” denir. Restriksiyon enzimleri (RE) ile kesim sonucunda oluşan fragmentler “restriksiyon parçası” olarak adlandırılmakta ve farklı DNA'lar aynı RE ile kesilse dahi polimorfizm varlığında farklı büyüklükte restriksiyon parçaları elde edilebilmektedir. Bu durumda elde edilen fragmentlerin büyüklüğüne göre genotipleme yapılabilmektedir.

2.2.4.5.1. *ABCB1* 3435C>T Polimorfizminin *MboI* Restriksiyon Enzimi ile Belirlenmesi

2.2.4.5.1.1. ABCB1 PZR Ürününün Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RPUP) Optimizasyonu

RPUP optimizasyonu çalışmasında restriksiyon enzim konsantrasyonu, reaksiyon hacim optimizasyonu ve inkübasyon süresi çalışmaları gerçekleştirildi.

Restriksiyon enzim konsantrasyonu: Enzim konsantrasyonları 5 U, 10 U, 15 U olarak denenmiştir. Ürünün tam olarak kesilmesini sağlayan enzim konsantrasyonu 10 U olarak saptandı.

PZR ürün miktarı: RPUP analizine katılacak olan PZR ürün miktarları 15 µl, 17 µl, 18 µl ve 20 µl olarak denenmiş ve en iyi sonucun 17 µl ürün katıldığında elde edildiği gözlemlenmiştir.

Reaksiyon hacmi: Reaksiyon hacimleri 10 µl, 15 µl, 17 µl ve 20 µl olarak denenmiştir. En uygun olan reaksiyon hacmin 20 µl olduğu belirlendi.

Inkübasyon süresi: Yukarıdaki belirtilen parametreler kombinasyonlu olarak 12 saat, 18 saat ve tüm bir gece boyunca inkübasyon süreleriyle karşılaştırıldı. *Mbo I* restriksiyon enzimi için en iyi inkübasyon süresinin gece boyunca olduğu tespit edildi.

2.2.4.5.1.2. ABCB1 C3435T Polimorfizminin RPUP Analizi ile Belirlenmesi

MboI restriksiyon enziminin tanıma bölgeleri 5' ↓GATC 3' ve 3' CTAG↓ 5' olup C3435T polimorfizminin *ABCB1* gen bölgesi üzerinde olduğu yerde yer almaktadır. *MboI* enziminin *ABCB1* gen bölgesinde bu tanıma bölgelerini ayırt etmesi durumunda bu bölgelerden kesim yaparak farklı uzunluklarda fragmentler

oluşturmaktadır. Polimorfizme bağılı olarak tanıma bölgesini ayırt edememesi durumunda ise ürünler kesilmeden kalacaktır.

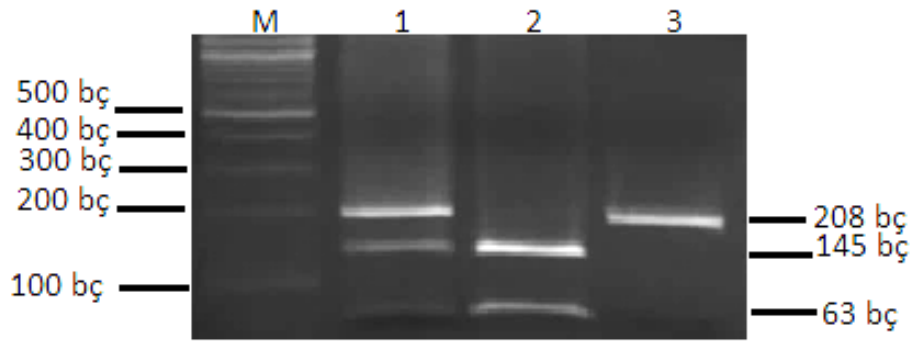
- RPUP analizi yapılacak olan *ABCB1* PZR ürünleri 7000 g'de 10- 20 saniye santrifüj edilerek tüp çeperinde bulunanların dibe çökmesi sağlandı.
- PZR sonucunda yapılan jel elektroforezinden ürün miktarı bant kalınlığına bakılarak yaklaşık olarak tahmin edilerek 17 µl alınarak ince çeperli 0,5 ml'lik tüplere aktarılarak üzerlerine isimleri yazılmıştır.
- Tek bir numune için *MboI* enziminden 1 µl, *MboI* enzim tamponundan 2 µl ve son hacmi 20 µl'ye tamamlanmıştır (Çizelge 2.5). Bu karışım numune sayısının fazla olduğu durumda, pipetajdan kaynaklanacak kaybı engellemek için numune sayısının bir fazlası olacak şekilde karışım hazırlanarak her bir numune tüpüne 5 µl olacak şekilde de dağıtılabilir.

Çizelge 2.5. *ABCB1* geni için RPUP reaksiyon koşulları ve miktarları

<i>ABCB1</i> RPUP	Miktarlar	Çalışma sıcaklığı	Çalışma süresi
PZR ürünü	17 µl	37°C	Gece boyu
<i>MboI</i> enzim	1 µl		
<i>MboI</i> tampon	2 µl		
Toplam hacim	20 µl		

- PZR ürünlerinin üzerine ilave edilen karışımın iyice karışması için tüpler alt üst edildi. Ardından hepsinin tüpün dibine çökmesi için 7000 g'de 10- 20 saniye santrifüj edildi.
- Ardından enzimin çalışma sıcaklığına bakılarak gece boyunca numuneler uygun sıcaklıkta etüvde bekletildi.

- Bir sonraki gün RPUP ürünleri etüvden alınarak buharlaşma ile tüp kapağında biriken sıvıların çökmesi için mini santrifüjde 7000 g'de 10 - 20 saniye santrifüj edildi.
- RPUP ürünleri üzerine 4 µl yükleme tamponu ilave edilerek tüp alt üst edilerek 7000 g'de 10- 20 saniye santrifüj edildi.
- RPUP ürünleri 2.2.4.4.3.'te anlatıldığı şekilde PZR jelinden farklı olarak elde edilen fragmentlerin daha iyi ayrılması ve görüntülenmesi için 1,0 gr agaroz içeren %2,5'luk agaroz jel elektroforezine yüklenerek bir saat akım uygulandıktan sonra UV altında görüntülendiler.
- Genotip sonuçları agaroz jelde UV dedektör altında farklı uzunluklara sahip 3 banda göre belirlenmiştir. Şekil 2.4'te gözlemlendiği gibi 145 bç ve 63 bç uzunluğunda bantlara sahip numuneler CC, 208 bç, 145 bç ve 63 bç fragmentler gözlenen örnekler CT, 208 bç uzunluğunda bant veren numuneler ise TT olarak genotiplendirilmiştir.



Şekil 2.4. *ABCB1* C3435T polimorfizmi RPUP analizi jel görüntüsü (M:100bç DNA ladder, 1:CT (208+ 145+ 63 bç); 2: CC (145+ 63 bç); 3: TT (208 bç))

2.2.4.5.2. *UGT1A4* L48V Polimorfizminin *Eco147I* Restriksiyon Enzimi ile Belirlenmesi

2.2.4.5.2.1. UGT1A4 PZR ürünün Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RPUP) Optimizasyonu

RPUP optimizasyonu çalışmasında restriksiyon enzim konsantrasyonu, reaksiyon hacim optimizasyonu ve inkübasyon süresi çalışmaları gerçekleştirildi.

Restriksiyon enzim konsantrasyonu: Enzim konsantrasyonları 5 U, 10 U, 15 U olarak denenmiştir. Ürünün tam olarak keseilmesini sağlayan enzim konsantrasyonu 10 U olarak saptandı.

PZR ürün miktarı: RPUP analizine katılacak olan PZR ürün miktarları 15 µl, 17 µl, 18 µl ve 20 µl olarak denenmiş ve en iyi sonucun 15 µl ürün katıldığında elde edildiği gözlemlenmiştir.

Reaksiyon hacmi: Reaksiyon hacimleri 10 µl, 15 µl, 17 µl ve 20µl olarak denenmiştir. En uygun olan reaksiyon hacmin 20 µl olduğu belirlendi.

İnkübasyon süresi: Yukarıdaki belirtilen parametreler kombinasyonlu olarak 12 saat, 18 saat ve tüm bir gece boyunca inkübasyon süreleriyle karşılaştırıldı. *Eco 147I* restriksiyon enzimi için en iyi inkübasyon süresinin gece boyunca olduğu tespit edildi.

2.2.4.5.2.2. UGT1A4 L48V Polimorfizminin RPUP Analizi İle Belirlenmesi

UGT1A4 gen bölgesinde yer alan T142G polimorfizmi *Eco147I* restriksiyon enzimi tanıma bölgesi olan 5' AGG↓CCT 3' ve 3' TCC↓GGA 5' bölgesinde bulunmaktadır. Kesim bölgesinde yer alan tek nükleotit değişimine bağlı olarak enzim kesim

bölgesini tanıya bilmekte ve kesim gerçekleştirebilmekte, aksi durumda ise kesimi gerçekleştirememektedir.

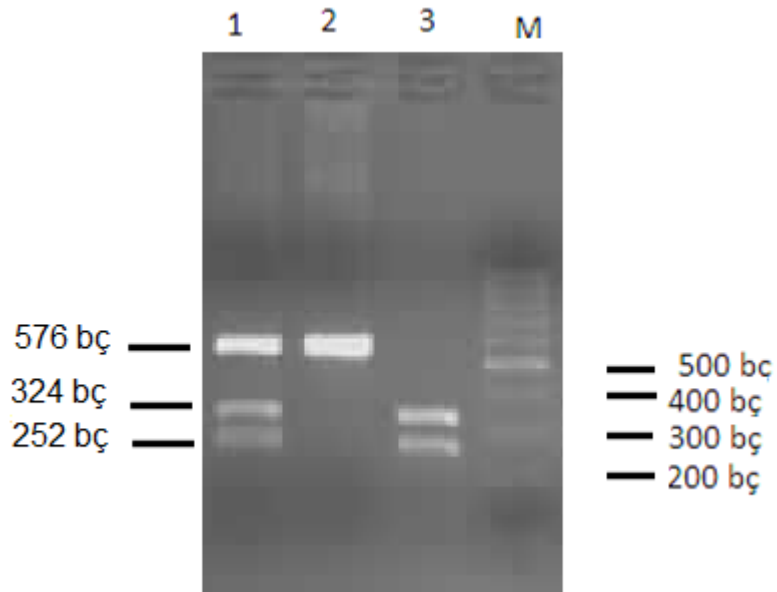
- *UGT1A4* PZR ürünleri 7000 g'de 10- 20 saniye santrifüj edilerek tüp çeperinde bulunan sıvıların dibe çökmesi sağlandı.
- PZR'nun ardından gerçekleştirilen agaroz jel elektroforezinden PZR ürün miktarlarının bant kalınlıklarından RPUP için gerekli olan PZR ürün miktarı 15 µl olarak belirlendi ve 0,5 ml'lik PZR tüplerine transfer edilerek üstlerine isimleri yazılmıştır.
- Tek bir PZR ürünün RPUP analizi için *Eco147I* enziminden 1 µl, enzim tamponundan 2 µl ve 5 µl distile su katılarak son hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır. Birden fazla numune olması durumunda ise karışım bir numune sayısı fazla hesaplanacak şekilde hazırlanmış daha sonra numunelerin üzerine 5 µl olacak şekilde bölünmüştür. *UGT1A4* için uygun RPUP reaksiyon koşul ve miktarları Çizelge 2.6' da verilmiştir.

Çizelge 2.6. *UGT1A4* geni için RPUP reaksiyon koşulları ve miktarları

<i>UGT1A4</i> RPUP	Miktarlar	Çalışma sıcaklığı	Çalışma süresi
PZR ürünü	15 µl	37°C	Gece boyu
<i>Eco147I</i> enzim	1 µl		
<i>Eco147I</i> tampon	2 µl		
Distile su	5 µl		
Toplam hacim	20 µl		

- Ardından tüpler alt üst edilerek mini santrifüjde 10- 20 saniye 7000 g'de santrifüj edilerek enzim için en uygun olan sıcaklık olan 37°C'de bir gece etüvde inkübe edildi.

- Ertesi gün etüvden alınan numuneler buharlaşmanın etkisiyle tüpün kapağında toplanan sıvıların dibe çökmesi amacıyla tekrardan 7000 g'de 10 - 20 saniye santrifüj edildi.
- RPUP ürünleri üzerine jelde kuyucuklara çökmesini sağlamak amacıyla 4 µl yükleme tamponu eklenerek mini santrifüjde santrifüj edildi. Böylece tampon ile ürünlerin iyice karışması sağlandı.
- Ardından pipetaj yapılarak ürünler 2.2.4.4.3.'te bahsedildiği gibi %2'lik (0,8 gr) agaroz jelde 1 saat akım uygulanarak Syngene Jel Görüntüleme Sistemi ile UV ışığı altında görüntülenerek fotoğraflandı.
- Şekil 3.2'de verildiği gibi kesim sonucunda agaroz jelde fragmentlerin uzunluklarına göre TT, TG ve GG genotipleri belirlenmiştir. Yabanıl (TT, Leu/Leu), heterozigot (TG, Leu/Val) ve varyant (GG, Val/ Val) genotipler için agaroz jelde gözlemlenen fragment uzunlukları sırasıyla 324+ 252 bç, 576+ 324+ 252 bç ve 576 bç'dir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. *UGT1A4* L48V polimorfizmi RPUP analizi agaroz jel görüntüsü M:100bç DNA ladder, 1: TG (576+ 324+ 252 bç); 2: GG (576 bç); 3: TT (324+252 bç)

2.2.4.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) Yöntemi ile Klozapin ve Norklozapinin Analizi

KLZ ve onun aktif metaboliti DKLZ'in plazma konsantrasyonlarının belirlenmesinde Avenoso ve ark., ile Rosland ve ark., tarafından yapılan çalışmalar göz önüne alınarak farklı akış hızları, pH ve mobil fazlar kullanılarak KLZ ve DKLZ'in geri kazanımının en yüksek olduğu en iyi yöntem seçilmiştir (Avenoso ve ark., 1998; Rosland ve ark., 2007).

En uygun KLZ ve DKLZ plazma ekstraksiyonu için birçok optimizasyon yapılmıştır. İlk olarak tampon çözeltinin pH'ı 4 olarak denenmeye başlandı, ardından denemeler sonucunda pH 3'te piklerin kuyruk oluşturmadığı ve pikler arasında aralıklar daha çok olduğu için pH 3'ün daha uygun olduğuna karar verilmiştir.

Standartların hazırlanmasında ise metanol ve hareketli faz karşılaştırılmıştır. Metanol kullanıldığında ilk dakikalarda gelen piklerin hareketli faz kullanıldığında gelen piklere göre daha çok olduğu bulunmuştur. Bu nedenle hareketli faz ile standartların hazırlanmasına karar verilmiştir.

Bunun yanı sıra Çizelge 2.7'de verilen sıvı- sıvı ekstraksiyon çözeltileri teker teker denenmiş; bunlardan 95: 5 (h:h) oranında n-hekzan- izoamilalkol karışımı ile kloroformla yapılan ekstraksiyon yöntemleri arasında kalınmıştır. Kloroformla ekstraksiyon sinyal görüntü oranı oldukça düşükken, n-hekzan- izoamilalkol (95: 5; h/h) karışımında ise ekstraksiyon verimi oldukça yüksekti, bu nedenle 95: 5 oranında n-hekzan- izoamilalkol karışımı ile sıvı- sıvı ekstraksiyon yapılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 2.7. KLZ ve DKLZ için en uygun olan sıvı - sıvı ekstraksiyonu için denenmiş olan çözeltiler

n-hekzan içeren	Kloroform içeren	Diğerleri
-----------------	------------------	-----------

n-hekzan- İzooamilalkol (99: 1; h/h)	Kloroform- İzooamilalkol (95: 5; h/h)	Metil tert bütıl eter
n-hekzan- İzooamilalkol (98: 2; h/h)	Kloroform- İzooamilalkol (90: 10; h/h)	Dietileter
n-hekzan- İzooamilalkol (95: 5; h/h)	Kloroform- İzopropanol (95: 5; h/h)	Diklorometan
n-hekzan- İzooamilalkol (90: 10; h/h)	Kloroform	Etilasetat
n-hekzan- İzopropanol (90: 10; h/h)		

2.2.4.6.1. YPSK için Gerekli Solüsyonların Hazırlanması

Tampon Çözeltisi: 500 ml bidisitile su içersine % 0.1 fosforik asit ve % 0.1 trietilamin eklendi ardından 0.1 M potasyum hidroksit (KOH) ile pH 3'e ayarlandı. Çözelti içinde bulunan ve gözle görünmeyen kolona zarar verebilecek maddeleri uzaklaştırmak için selüloz asetat filtreden vakum yardımıyla süzöldü.

Hareketli Faz: Kolonda analitinin hareketini sağlayan hareketli faz, 70: 30 (h:h) oranında tampon çözelti- asetonitril karışımı olacak şekilde hazırlandı. Ardından içersindeki oksijenden kaynaklanan gaz kabarcıklarının giderilmesi için 10 dakika ağzı kapalı şekilde ultrasonik banyo içersinde bekletilerek degaze edildi.

Durgun Faz: Kolon materyali analizdeki durgun fazdır. Çalışmada kullanılan kolon Kinetix C₁₈, 150 mm x 4.6 mm; 5 µm (Phenomenex, Torrance CA, USA)'dir.

Standart Solüsyonlarının Hazırlanması: KLZ ve DKLZ ana stokları 0.01 g KLZ ve DKLZ hassas terazide tartılarak ayrı ayrı 1 L metanol içersinde çözölerek her bir çözelti 0.01 mg/ml (1000ng/ml= 10ppm) olacak şekilde hazırlandı. Ardından Çizelge 2.8 ve Çizelge 2.9'da verilen şekillerde sırasıyla DKLZ ve KLZ standart solüsyonları hazırlandı.

Çizelge 2.8. Standart DKLZ solüsyonlarının hazırlanması

Stok DKLZ alınan miktar	Mobil faz miktarı	Stok Standart DKLZ solüsyonu
2 µl	200 µl	10 ng/ml

5 µl		25 ng/ml
10 µl		50 ng/ml
20 µl		100 ng/ml
40 µl		200 ng/ml
60 µl		300 ng/ml
100 µl		500 ng/ml
200 µl		1000 ng/ml

Çizelge 2.9. Standart KLZ solüsyonlarının hazırlanması

Stok KLZ alınan miktar	Mobil faz miktarı	Stok Standart KLZ solüsyonu
4 µl		20 ng/ml
10 µl		50 ng/ml
20 µl		100 ng/ml
40 µl		200 ng/ml
80 µl		400 ng/ml
120 µl		600 ng/ml
200 µl		1000 ng/ml
400 µl		2000 ng/ml

KLZ ve DKLZ Kalibrasyon Standartlarının Hazırlanması: Herhangi bir ilaç içermeyen boş 500 µl'lik plazmaya 10, 25, 50, 100, 200, 300, 500 ve 1000 ng/ml DKLZ ve 20, 50, 100, 200, 400, 600, 1000, 2000 ng/ml olacak şekilde KLZ standart solüsyonları eklenerek sıvı- sıvı ekstraksiyon yapılarak cihaza verildi. Kalibrasyon standartlarına tekrardan ihtiyaç duyulması halinde kullanılmak üzere en çok 5 gün kontaminasyonu engellemek için -80°C'de saklanmıştır.

Yıkama Solüsyonu: Asetonitril- distile su (60: 40/ h:h) karışımından oluşmaktadır.

Numunelerin Ölçümü: Analiz edilmek istenen kan numuneleri 2.2.4.6.2.'de verilen yöntem ile ekstrakte edilerek Çizelge 2.6'da verilen koşullarda YPSK ile analiz edilmiştir.

YPSK’de KLZ ve DKLZ analizinde teknik özellikler Çizelge 2.10’da özetlenmiştir.

Çizelge 2.10. KLZ ve DKLZ analizinde YPSK teknik özellikleri

Cihaz	Agilent 1100 HPLC
Kolon	Kinetix C ₁₈ , 150 mm x 4.6 mm; 5 µm (Phenomenex, Torrance CA, USA)
Enjeksiyon hacmi (µl)	10
Taşıyıcı faz akış hızı aralığı (ml/dak)	1
Kolon sıcaklığı	25°C
Dedektör/ dalga boyu (nm)	UV/ 220
DKLZ Alıkonma süresi (dak)	3,061
KLZ Alıkonma süresi (dak)	3,727

2.2.4.6.2. Sıvı- Sıvı Ekstraksiyon Yöntemi ile Numunelerin Hazırlanması

1. – 80°C’de muhafaze edilen plazma +4°C’ye çıkarılarak çözünmesi sağlandı.
2. 500 µl plazma 15 ml’lik falkon tüplerine alınarak üzerine 8 ml 95: 5 oranında n-hekzan: izoamilalkol karışımı ile 200 µl 0.1 M sodyum hidroksit (NaOH) eklenir. Bu aşamada proteinlerin çökerek plazmada proteinlere bağlı bulunan KLZ ve DKLZ’in mobil faza geçmesi sağlanır.
3. Numunler 1 dakika vortekslenir ve 40 rpm’de rotatörde 10 dakika döndürülür. Ardından 3500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek peletin dibe çökmesi sağlanır.
4. Süpernatant kısmı ekstrakte edilmek üzere yeni 15 ml’lik falkon tüpüne aktarılır.
5. Süpernatant üzerine 200 µl 0.1 M hidroklorik asit (HCl) eklenir.

6. Numune 1 dakika vortekslenir. 10 dakika 40 rpm’de rotatörde döndürülmesinden sonra 3500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilir.
7. Bu sefer altta kalan yaklaşık 200 µl olan sulu faz mikropipetle çekilerek içerisine insert yerleştirilen vialer aktarılarak cihaza yerleştirilir.

2.2.4.6.3. Cihazın Ölçüm için Hazırlanması ve Numunelerin Okutulması

1. Kolonun yıkanması, kolonun doygunluğa ulaşması ve sistemin dengeye gelmesi için 3 ml/dak akış hızı ile mobil faz cihaza verilir.
2. Akış hızı 1 ml/dak düşürülür. Ardından cihaza her bir KLZ ve DKLZ kalibrasyon standartları her seferinde 20 µl enjekte edilecek şekilde en az üç kez cihaza verildi ve her iki madde için ayrı ayrı kalibrasyon eğrisi oluşturulur.
3. Hastalara ait plazmalar 2.2.4.6.2.’de anlatıldığı şekilde sıvı- sıvı ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilerek elde edilen numuneler, içerisine insert yerleştirilen vialer yaklaşık 200 µl olacak şekilde aktarılarak otoörnekleyiciye yerleştirildi. Her bir numune en az üç kez okutuldu.
4. Ölçüm sonunda kolondaki materyallerin ve mobil fazın giderilmesi için 20 dakika boyunca akış hızı 3 ml/dak olacak şekilde cihaza verilerek sistemin temizlenmesi sağlanarak cihaz kapatıldı.

2.2.4.6.4. Validasyon Çalışmaları

2.2.4.6.4.1. Teşhis Sınırı (LOD)

Zemin gürültüsünden farklı olarak saptanan ve miktarı belirlenemeyen kantitatif sınırlar içerisinde bulunmayan en düşük analit derişimi teşhis sınırıdır (LOD- Limit of Detection). Sinyal/ gürültü oranı 3 alındığında, aşağıdaki denklemden LOD değeri hesaplanarak bulunabilir.

$$LOD= 3.3 \times SD/m$$

SD: Boş ya da düşük derişimdeki analit çözeltisinin standart sapması

m: kalibrasyon eğrisinin eğim değeri ($y= mx+n$).

2.2.4.6.4.2. Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Uygun kesinlik ve doğrulukla miktarı tespit edilebilen en küçük analit miktarı veya doğrusallığın en alt konsantrasyonunu oluşturan değer tayin alt sınırıdır (LOQ- Limit of Quantitation). Sinyal/ gürültü oranı 10 olarak alındığında LOQ değeri şu şekilde hesaplanır;

$$LOQ= 10 \times SD/m$$

SD: Boş ya da düşük derişimdeki analit çözeltisinin standart sapması.

m: kalibrasyon eğrisinin eğim değeri ($y= mx+n$).

2.2.4.6.4.3. Özgünlük (Spesifite)

Kullanılan analitik yöntemin sadece analiz edilmesi hedeflenen maddeyi ya da maddeleri tespit edebilme kabiliyeti olup sayısal karşılığı yoktur. Yani kullanılacak olan analitik yöntem sadece analiz edilecek maddeyi tespit edebilme özelliğinde olmalıdır, diğer fiziksel ya da kimyasal özellikteki interfere edici maddelerden etkilenmemelidir.

2.2.4.6.4.4. Seçicilik (Selektivite)

Ortamda bulunan fiziksel veya kimyasal kaynaklı girişim veya engelleyicilerin (interefare edicilerin) bulunduğu durumda hedeflenen analitin doğru bir şekilde tespit edilebilmesidir. Kısacası, ortamda bulunan başka maddeler varlığında analitik metodun sadece hedeflenen maddeyi analiz edebilme yeteneğidir.

2.2.4.6.4.5. Doğruluk (Accuracy)

Analiz edilen numunenin, bağımsız laboratuvarlar tarafından onaylanan, derişimi bilinen standard referans maddelerin okutulmasıyla elde edilen doğru veya doğru olarak belirtilene yakınlığını gösterir. Bir yöntemin doğruluğunun belirlenmesinde geri kazanım ve kesinlik oldukça önemlidir.

2.2.4.6.4.5.1. Geri Kazanım (Recovery)

Numune içinde analiz edilecek maddenin tayin edilen miktarının, saf analit çözeltisine göre ne kadar verimle geri kazanıldığının belirlenmesidir. Geri kazanım, üç farklı derişimi bilinen standart analitin herhangi bir ilaç içermeyen boş plazmaya eklenmesi ve bunun ekstrakte edildikten sonra cihazda üçer kez tayin sonucunda elde edilen sonuçlarının bilinen miktarla karşılaştırılması sonucu % hata olarak verilen değerdir. Ölçümün sistematik hatası (bias), ölçüm sonucunda elde edilen ortalama değer ile gerçek değer arasındaki fark ($D = C_s - C_{ref}$) ile belirlenir. Sistematik hatanın da gerçeğe yakınlık yüzdesinden bağıl hata hesaplanır. Geri kazanım aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$\% \text{ geri kazanım} = (C_u / C_s) \times 100$$

Cu: Analiz sonucunda elde edilen derişim

Cs: Bilinen ya da standartların okutulması sonucunda elde edilen derişim

KLZ ve NKLZ için ortalama değerlerin, % geri kazanımı, sistematik hata ile bağıl hatayı hesaplamak için boş plazmaya her bir konsantrasyondan 3 adet olacak şekilde sırasıyla 100- 400- 1000 ng/ml KLZ ve 50- 200- 500 ng/ml DKLZ uygulanarak, sıvı- sıvı ekstraksiyon işlemi yapıldı. Ardından bu numuneler üçer kez cihaza okutulmuştur. % geri kazanım, ortalama değerler, sistemik hata (bias) ve % bağıl standart sapma (%BSS) değerleri hesaplanmıştır.

2.2.4.6.4.5.1. Kesinlik (Precision)

Kesinlik, ölçüm sonucunda elde edilen değerlerin tekrarlanabilirliğini göstermektedir. Ölçüm sonucunda elde edilen değerlerin, daha sonra ölçüm aynı cihaz, aynı kimyasallar, aynı kişi ve aynı laboratuarda 2- 3 farklı derişimin ard arda 5-6 ölçümünün aynı gün içinde (intraday) ve belirli aralıklı günlerde (interday) ölçülmesi sonucunda elde edilen değerlerin birbirine yakınlığını yani tekrarlanabilirliğini göstermektedir. Elde edilen sonuçların standart sapmaları değerleri burada önemlidir.

Herhangi bir ilaç içermeyen boş plazmaya düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda olacak şekilde sırasıyla 100- 400- 1000 ng/ml KLZ ve 50- 200- 500 ng/ml DKLZ uygulanarak, sıvı- sıvı ekstraksiyon işlemi yapıldı. Ardından bu numuneler gün içi tekrarlanabilirlik için sabah ve akşam ve günler arası tekrarlanabilirlik için de 3 farklı gün olacak şekilde KLZ ve DKLZ tayini yapılmıştır. KLZ ve DKLZ için ayrı ayrı standart sapma (SS) ve % bağıl standart sapma (%BSS) değerleri hesaplandı.

2.2.4.6.4.6. Doğrusallık (Linearity)

Analitin derişimine karşılık dedektör cevabının doğru orantılı olarak artmasıyla elde edilen grafikte sonraki ölçümlerin doğru üzerinde veya doğruya yakın olarak elde edilmesidir. Elde edilen eğrinin eğimi, kesişim noktaları ve korelasyon katsayısı (R^2) doğrusallığın belirlenmesinde kullanılmakta olup R^2 'nin bire yakın olmas istenir. Ayrıca konsantrasyona karşı cevap için doğrusal regresyon hattının y deklemini ile korelasyon katsayısı ile de belirlenebilir.

LOD/ LOQ sonuçları ile tedavide KLZ ve DKLZ'in plazmada bulunabilme oranları göz önüne alınarak KLZ ve DKLZ için ölçüm aralığı sırasıyla 20- 2000 ng/ml ve 10 - 1000 ng/ml olarak belirlenmiştir. Her bir konsantrasyon enjekte edilerek X ekseninde yer alan konsantrasyon değerine karşılık gelen Y eksenindeki KLZ ve DKLZ alanları oranlanmıştır. Elde edilen plazma konsantrasyonlarının (C) hastalara verilen doza (D) oranlanmasıyla normalize edilmiş konsantrasyon değerleri (C/D) elde edilmiştir.

2.2.4.6.4.7. Çalışma Aralığı (Range)

Kalibrasyon eğrisinde tayin edilebilen en düşük konsantrasyondaki değer ile doğrusallıkta sapmanın belirlendiği konsantrasyon arasında yer alan aralıktır.

2.2.4.7. Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Çalışma istatistiksel analizlerde SPSS 21.0 programından yararlanılmıştır. Nicel değişkenlerde ortalama (Ort)± standart sapma (SS) ve minimum (Min) ile maksimum (Maks) değerler verilirken, istatistiksel olarak normal dağılım göstermeyenler için ortanca ($\tilde{x}$), minumum (Min) ve maksimum (Maks) değerler verilmiştir. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Her iki gen bölgesine ait genotip ve allel frekansları belirlenerek Hardy Weinberg uygunluk testi uygulandı. Elde edilen frekans verileri Türk populasyonunun da içinde yer aldığı beyaz ırktan ve diğer ırktan olan şizofreni gruplarının *ABCB1* ve *UGT1A4* genotip ve allel frekansları Fisher Exact Test ile karşılaştırıldı.

KLZ ve DKLZ plazma düzeylerinin (C), hastalara uygulanan KLZ dozuna oranlanmasıyla normalize edilmiş konsantrasyon değerleri (C/D) elde edildi.

İstatistiksel analizlerde önce verilerin normal dağılıp dağılmadığı Kolmogorov- Smirnov Testi ile analiz edilmiştir. Her bir polimorfizm için bireyler homozigot yabanıl tip, heterozigot veya homozigot mutant genotip grupları halinde gruplara ayrıldı ve bu genotip dağılımları ile bireylere ait plazma KLZ ve DKLZ düzeyleri, KLZ/ DKLZ oranları, KLZ C/D ve DKLZ C/D oranları ile gruplar ikili olduğundan Mann-Whitney U Testi ile karşılaştırılırken, grupların üçlü olması durumunda Kruskal Wallis Testleri ile karşılaştırılmıştır. Tüm analizler için anlamlılık değeri 0,05 olarak seçilip, çoklu analizlerde Bonferroni düzeltmesi ile çoklu analizlerden kaynaklanabilecek Tip-1 hata olasılığı giderilmiştir.

3. BULGULAR

İki aşamada gerçekleştirilen çalışmada Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı'na başvuran ve burada Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı (DSM)'na göre şizofreni tanısı almış yüz hastaya ait kan numunelerinden ilk aşamada buffy coat elde edilerek KLZ ve DKLZ farmakokinetiğinde rol oynayan *ABCB1* ve *UGT1A4* gen polimorfizmleri PZR-RPUP metodu ile belirlenmiştir. İkinci aşamada ise plazmalarından YPSK cihazı ile plazma KLZ ve DKLZ düzeyleri belirlenmiştir. Yüz hastadan altsının kan plazma KLZ ve DKLZ düzeyleri tespit edilemediğinden çalışma dışı bırakılarak araştırmanın tamamı 94 hasta ile gerçekleştirilmiştir.

3.1. Çalışmaya Katılan Bireylerin Sosyodemografik Bilgileri

Çalışmaya otuz dördü kadın altmış erkek olmak üzere 94 kişi katılmış olup bireylerin sosyodemografik bilgileri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Bireylerden kan numuneleri son ilaç dozlarını aldıktan ortalama $10,68 \pm 3,29$ saat sonra kan numuneleri alınarak çalışma gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmaya katılan bireylere ait demografik bilgiler

Özellikler		Sonuçlar
Cinsiyet		Kadın:34 (%36,2) Erkek: 60 (%63,8)
Yaş		$40,19 \pm 10,65$ (20- 62)
Boy(cm)		$170,73 \pm 8,24$ (155- 190)
Kilo(kg)		$77,62 \pm 16,92$ (50-147)
BMI		$26,51 \pm 4,83$ (17,36- 46,4)
Sigara Kullanımı	Hiç içmeyen ve Günde <7	52 (%55,3)
	Günde >7	42 (%44,7)
Kafein Kullanımı	0,4 g/gün'den az	48 (%51,1)
	0,4 g/gün'den çok	46 (%48,9)
Günlük kullanılan KLZ dozu (mg)		$361,17 \pm 180,82$ (50- 800)

3.2. Genotip Analiz Sonuçları

3.2.1. *ABCB1* C3435T Polimorfizmi Genotip Analiz Sonuçları

Genotip sonuçları agaroz jelde UV dedektör altında farklı uzunluklara sahip 3 banda göre belirlenmiştir. *MboI* restriksiyon enzimi *ABCB1* gen bölgesine ait 208 bç' lik PZR ürünlerini yabancı genotipin bulunması durumunda farklı uzunlukta fragmentlere ayırmıştır. 145 bç ve 63 bç uzunluğunda bantlara sahip numuneler CC, 208 bç, 145 bç ve 63 bç fragmentler gözlenen örnekler CT, 208 bç uzunluğunda bant veren numuneler ise TT olarak genotiplendirilmiştir.

KLZ kullanan hastalarda (n= 94), *ABCB1* C3435T polimorfizminin genotip frekansları CC, CT ve TT için sırasıyla % 25,5; % 47,9 ve % 26,6'dır. Allel frekansları ise C alleli için % 49, T alleli için ise % 51 olarak belirlenmiştir. Genotip frekanslarının gözlenen ve beklenen değerleri Çizelge 3.2'de verildiği gibi olup *ABCB1* C3435T polimorfizminin allel ve genotip sonuçlarının istatistiksel olarak Hardy- Weinberg dengesine uygun olduğu saptanmıştır ($p > 0.05$).

Çizelge 3.2. *ABCB1* C3435T polimorfizminin allel frekansları ile gözlenen ve beklenen genotip frekansları

Gen Bölgesi	Genotip	Gözlenen	Beklenen	Allel	χ^2	p
<i>ABCB1</i>	CC	24	23	C:0,49 T:0,51	0,17	0,68
	CT	45	47			
	TT	25	24			

3.2.2. *UGT1A4* L48V Polimorfizmi Genotip Analiz Sonuçları

UGT1A4 gen bölgesinin 576 bç PZR ürünleri T142G polimorfizminin genotiplendirilebilmesi için *Eco 147I* restiriksiyon enzimi ile 37°C’de gece boyu kesime bırakılmıştır. Kesim sonucunda agaroz jelde fragmentlerin uzunluklarına göre 324 + 252 bç yabanıl (TT, Leu/ Leu), 576 + 324 + 252 bç heterozigot (TG, Leu/ Val) ve 576 bç varyant (GG, Val/ Val) olarak genotiplendirilmiştir.

KLZ kullanan bireylere (n=94) ait *UGT1A4* geni *T142G* polimorfizmi sonucunda genotip frekansları TT %77,7; TG %19,1 ve GG %3,2 olarak belirlenirken GG genotipine sahip bireye rastlanmamıştır. T allel frekansı % 87 G allel frekansı ise %13 olarak belirlenmiştir. Genotip ve allel frekansları Hardy-Weinberg dengesi ile uyumlu bulunmuştur ($p>0.05$). Allel frekansları ile genotip frekanslarının gözlenen ve beklenen değerleri Çizelge 3.3’de verilmiştir.

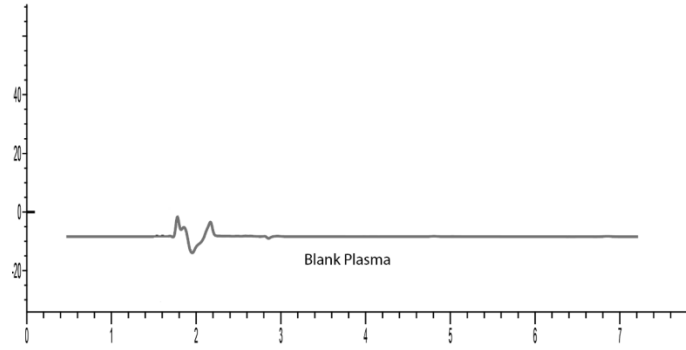
Çizelge 3.3. *UGT1A4**3 polimorfizminin allel frekansları ile gözlenen ve beklenen genotip frekansları

Gen Bölgesi	Genotip	Kodlanan Amino asit	Gözlenen	Beklenen	Allel	χ^2	p
<i>UGT1A4</i>	TT	Leu/ Leu	73	71,5	T:0,89	1,85	0,17
	TG	Leu/ Val	18	20,9	G:0,13		
	GG	Val/ Val	3	1,5			

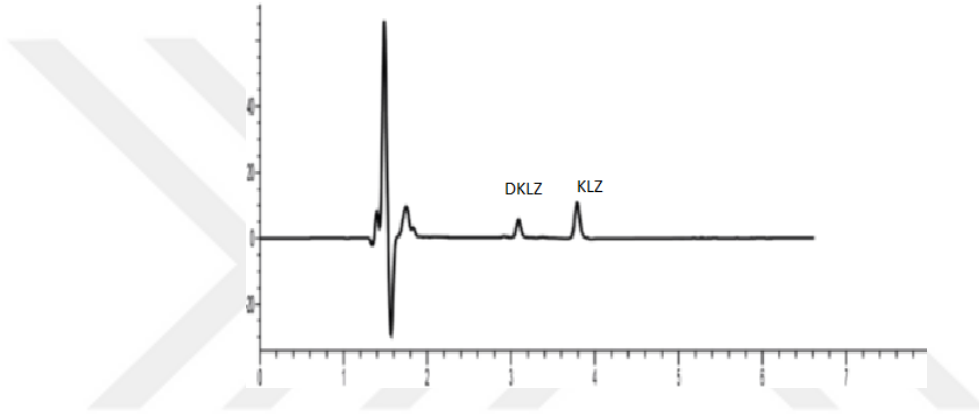
3.3. Klozapin ve Desmetil Klozapin YPSK ile Tayin Sonuçları

3.3.1. Özgünlük ve Seçicilik

KLZ ve DKLZ ölçümünde kullanılan yöntemin özgünlüğü ve seçiciliğinin kanıtlanması için KLZ ve DKLZ piklerinin elde edildiği kromatogram örnekleri ile boş plazma kromatogramları arasındaki farklılığın ispatlanması önemlidir. Şekil 3.1’de verilen kromatogram 220 nm dalga boyunda boş plazma numunesine ait, Şekil 3.2’te verilen kalibrasyon esnasında analiz edilen KLZ ve DKLZ eklenmiş plazmaya ait kromatogramdır.



Şekil 3.1. KLZ ve DKLZ içermeyen boş plazma numunesine ait kromatogram görüntüsü



Şekil 3.2. 1 ppm KLZ ve DKLZ eklenmiş plazmaya ait kromatogram

3.3.2. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Bölüm 2.2.4.6.4.1. ve 2.2.4.6.4.2.'de açıklanan şekilde yapılan analizler ve hesaplamalar sonucu KLZ ve DKLZ'nin LOD ve LOQ değerlerinin belirlenebilmesi için kalibrasyon eğrilerinde kullanılan minimum konsantrasyon değerine sahip KLZ için 20 ng/ml, DKLZ için 10 ng/ml çözeltileri beş kez analiz edilerek elde edilen sonuçların standart sapmaları alınmıştır. KLZ için teşhis sınırı (LOD) 5,52 ng/ml, tayin alt sınırı (LOQ) ise 16,56 ng/ml olarak; DKLZ için de teşhis sınırı (LOD) 2,21 ng/ml, tayin alt sınırı (LOQ) ise 6,62 ng/ml olarak tespit edilmiştir.

3.3.3. Geri Kazanım (Recovery)

Uygulanan yöntemin doğruluğu geri kazanım çalışmaları ile analiz edilmiştir. KLZ ve DKLZ'nin 1 ppm'lik standartları boş plazmaya eklenerek geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.4'de verilmekte olup, elde edilen sonuçlara göre uygulanan biyoanalitik analizin kabul edilebilir bir geri kazanım değeri vardır.

Çizelge 3.4. KLZ ve DKLZ geri kazanım değerleri

	KLZ	DKLZ
1 ppm	0.8699	0.8957
Geri Kazanım (%)	86.99	89.57
BİAS	13,01	10,43

* 5 enjeksiyonun ölçümü sonucunda elde edilen alan.

3.3.4. Kesinlik

3.3.4.1. Gün İçi Tekrarlanabilirlik (Intraday)

Gün içi tekrarlanabilirlik için gün içinde düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda hazırlanan solüsyonlar gün içinde beş farklı saat diliminde cihaza verilmiştir. Çizelge 3.5'te KLZ'na ait, Çizelge 3.6'da DKLZ'ye gün içi tekrar sonuçları verilmiştir.

Çizelge 3.5. KLZ gün içi tekrarlanabilirlik

	100 ng (düşük)	400 ng (orta)	1000 (yüksek)
Zaman	Alan	Alan	Alan
10: 00	23,50	86,80	218,00
12: 00	23,70	86,40	217,90
14: 00	23,80	87,10	218,40
16: 00	24,40	87,40	217,90
18: 00	23,60	87,20	217,90

Ortalama	23,80	86,98	218,02
SS	0,35	0,39	0,22
BSS (%)	1,49	0,45	0,10

Çizelge 3.6. DKLZ gün içi tekrarlanabilirlik.

	50 ng (düşük)	200 ng (orta)	500 (yüksek)
Zaman	Alan	Alan	Alan
10: 00	10,50	39,30	97,60
12: 00	10,80	39,10	97,60
14: 00	10,50	39,50	97,90
16: 00	10,80	39,90	97,90
18: 00	10,50	39,40	97,50
Ortalama	10,62	39,44	97,70
SS	0,16	0,30	0,19
BSS (%)	1,55	0,75	0,19

3.3.4.2. Günler Arası Tekrarlanabilirlik (Interday)

Farklı iki günde düşük, orta ve yüksek olmak üzere her birinden beş adet olacak şekilde plazmalar hazırlanarak günler arası tekrarlanabilirlik test edilmiştir. Günler arası tekrar sonucunda elde edilen KLZ alanları Çizelge 3.7’de, DKLZ alanları ise Çizelge 3.8’de sunulmuştur.

Çizelge 3.7. KLZ günler arası tekrarlanabilirlik

	100 ng (düşük)			400 ng (orta)			1000 (yüksek)		
Zaman	Ortalama	SS	BSS	Ortalama	SS	BSS	Ortalama	SS	BSS
	Alan*		(%)	Alan*		(%)	Alan*		(%)
1. gün	23,64	0,86	3,63	89,18	3,69	4,13	212,78	3,89	1,83
2. gün	28,08	0,30	1,08	154,04	1,24	0,81	227,26	1,49	0,66
Ortalama	25,86	0,58	2,36	121,58	2,46	2,47	220,02	2,69	1,24

*5 enjeksiyon sonunda elde edilen alanların ortalaması.

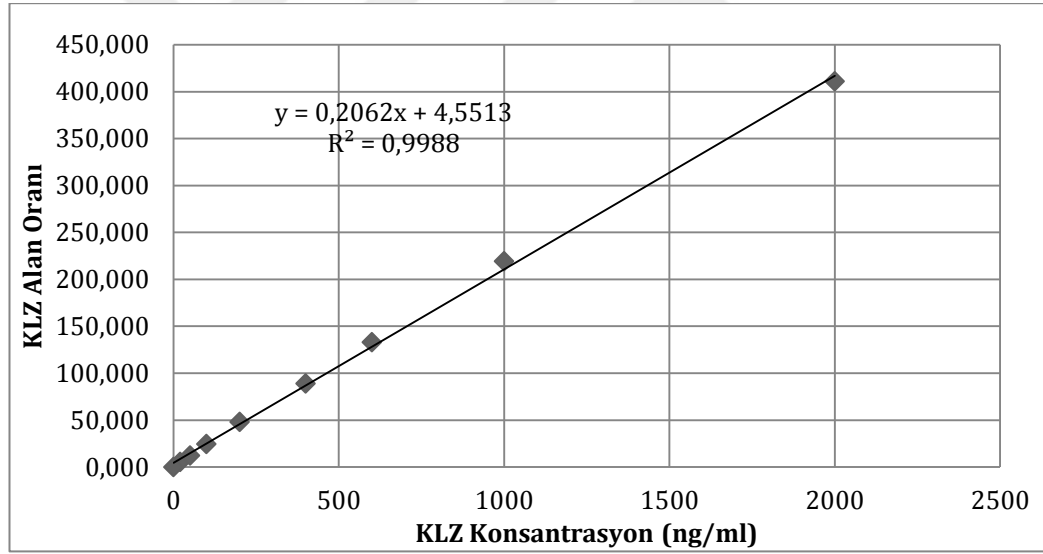
Çizelge 3.8. DKLZ günler arası tekrarlanabilirlik

	50 ng (düşük)			200 ng (orta)			500 (yüksek)		
Zaman	Ortalama Alan*	SS	BSS (%)	Ortalama Alan*	SS	BSS (%)	Ortalama Alan*	SS	BSS (%)
1. gün	11,46	0,43	3,78	41,58	1,88	4,51	98,48	2,38	2,42
2. gün	12,58	0,28	2,21	39,74	0,93	2,34	102,57	1,01	0,99
Ortalama	12,02	0,36	2,99	40,66	1,40	3,42	100,53	1,69	1,70

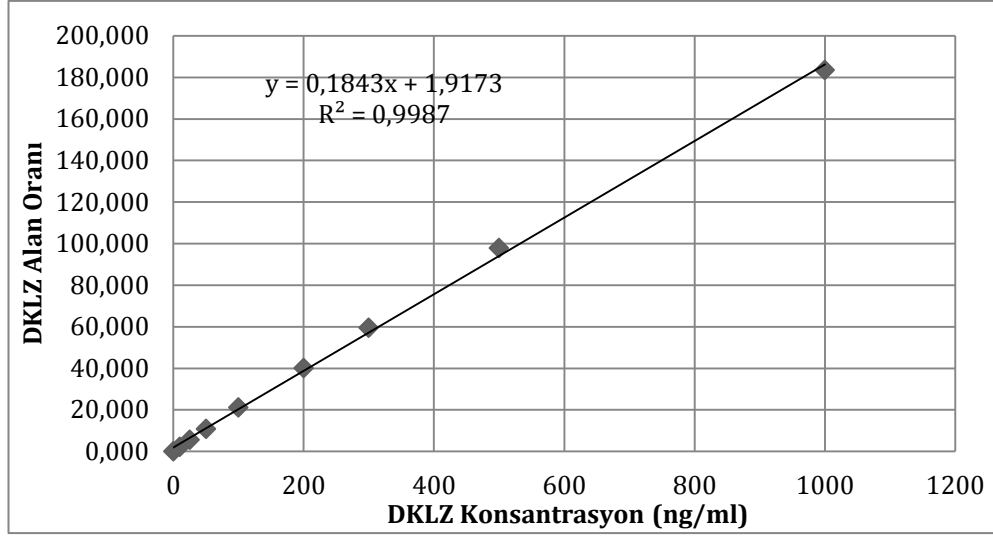
*5 enjeksiyon sonunda elde edilen alanların ortalaması.

3.3.5. Doğrusallık

KLZ ve DKLZ ait kalibrasyon eğrilerine ait grafikler sırası ile Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.3. KLZ'ne ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.4. DKLZ'ye ait kalibrasyon eğrisi

3.3.6. Çalışma Grubunun Plazma Konsantrasyon Değerleri

Doksan dört bireye ait plazma KLZ konsantrasyon ortalaması $550,75 \pm 368,21$ ng/ml; DKLZ plazma konsantrasyon değerleri ortalaması $206,61 \pm 122,74$ ng/ml; plazma KLZ/DKLZ konsantrasyon oran ortalaması $2,78 \pm 1,65$; doz normalize KLZ C/D ortalaması $1,88 \pm 1,70$ ng/ml/mg ve DKLZ C/D plazma konsantrasyon oran değerleri ortalaması ise $0,68 \pm 0,53$ ng/ml/mg olarak bulunmuş olup minimum, maksimum ve ortanca değerler ile birlikte Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Doksan dört bireye ait plazma konsantrasyon değerleri

N=94	KLZ (ng/ml)	DKLZ (ng/ml)	KLZ/DKLZ	KLZ C/D (ng/ml/mg)	DKLZ C/D (ng/ml/mg)
Ort	550,75	206,61	2,78	1,88	0,68
SS	368,21	122,74	1,65	1,70	0,53
Min	34,57	31,77	0,64	0,06	0,06
Maks	1492,96	602,90	14,04	10,49	4,12
$\bar{x}$	488,65	176,57	2,49	1,45	0,57

3.3.8. Biyolojik ve Çevresel Etmenlerin KLZ ve DKLZ Plazma Konsantrasyon Değerlerine Etkisi

Sigara ve kafein kullanımı gibi çevresel faktörler ile birlikte yaş, cinsiyet, beden kitle indeksi gibi biyolojik faktörlerin ilaç metabolizmasında etkili olduğu bilinmektedir. Çalışmada yer alan bireylerin yaş, cinsiyet, BKİ, sigara ve kafein kullanım miktarlarının KLZ ve DKLZ plazma konsantrasyon oranları üzerine etkileri aşağıda yer alan çizelgelerde gösterilmiştir.

3.3.8.1. Yaş

Bireyler yaş 45 yaş referans alındığında metabolizmanın yavaşlaması (Jann ve ark., 1993) beklendiği için iki gruba ayrılmış ve iki yaş grubuna ait minimum (Min), maksimum (Maks) ve ortanca ($\bar{x}$) KLZ, DKLZ plazma konsantrasyonları, KLZ/DKLZ plazma konsantrasyon oranı ile doz normalize KLZ ve DKLZ konsantrasyon değerleri Çizelge 3.10'da verilmiştir.

20- 44 yaş aralığında bulunan bireylerin ortalama $\pm$ SS KLZ ve DKLZ plazma konsantrasyonları sırasıyla 478,78 $\pm$ 342,65 ng/ml ve 179,53 $\pm$ 115,23 ng/ml; plazma KLZ/DKLZ düzey oranları ortalaması 2,78 $\pm$ 1,86; normalize KLZ ve DKLZ doz ortalamaları sırası ile 1,63 $\pm$ 1,49 ng/ml/mg ve 0,58 $\pm$ 0,32 ng/ml/mg olarak bulunmuştur. 45- 62 yaş aralığında yer alan bireylerin plazma KLZ ortalaması 697,01 $\pm$ 380,35 ng/ml DKLZ plazma konsantrasyon düzey ortalaması ise 261,64 $\pm$ 120,80 ng/ml; KLZ/ DKLZ oran ortalamaları 2,77 $\pm$ 1,14; normalize KLZ ve DKLZ oranları ise sırasıyla 2,37 $\pm$ 2,02 ng/ml/mg ve 0,89 $\pm$ 0,78 ng/ml/mg olarak tespit edilmiştir.

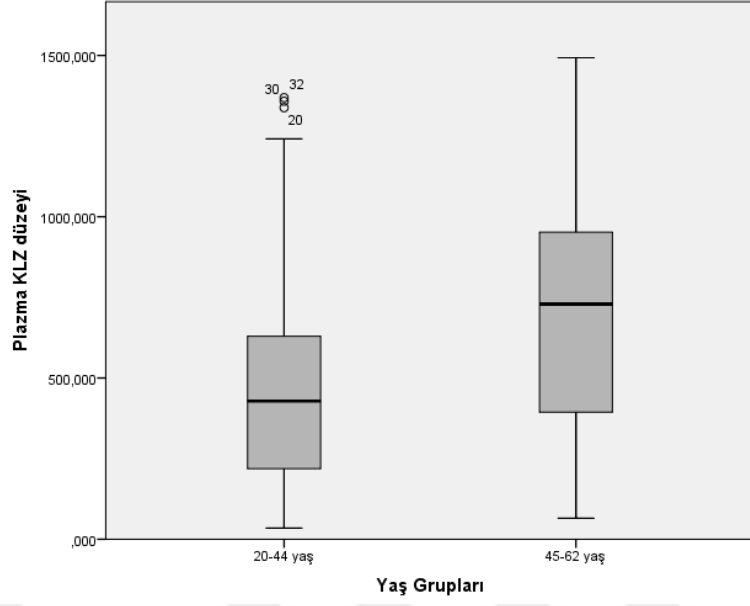
KLZ ve DKLZ düzeyleri yaş gruplarına göre normal dağılım göstermediğinden grupların ortanca ($\bar{x}$) değerleri Çizelge 3.10'da verilmiş ve veriler

istatistiksel olarak parametrik olmayan Mann- Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Yaş gruplarına göre KLZ, DKLZ plazma düzeyleri, KLZ C/D ve DKLZ C/D düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlense ($p<0,05$) de KLZ/DKLZ düzeyleri arasında istatistiksel açıdan bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).

Çizelge 3.10. İki yaş grubu arasında KLZ- DKLZ plazma değerlerinin karşılaştırılması

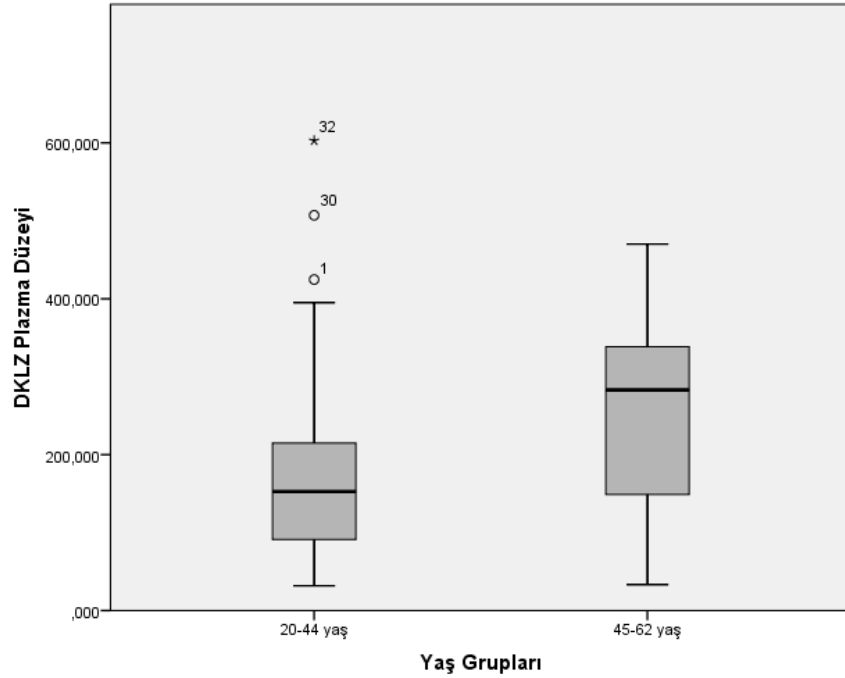
Değerler	Yaş: 20- 44 (N=63)	Yaş: 45-62 (N=31)	
KLZ [$\tilde{x}$, (min-maks)] (ng/ml)	428,4 (34,6-1368,9)	729,2 (65,34-1492,96)	$Z=1320,5$ $P=0,006$
DKLZ [$\tilde{x}$, (min-maks)] (ng/ml)	152,69 (31,77-602,9)	283,12 (33,38-470,21)	$Z=3,116$ $P=0,002$
KLZ/DKLZ [$\tilde{x}$, (min-maks)]	2,35 (0,64-14,04)	2,55 (0,87-5,75)	$Z=0,82$ $P=0,412$
KLZ C/D [$\tilde{x}$, (min-maks)] (ng/ml/mg)	1,23 (0,06-9,72)	2,28 (0,22-10,49)	$Z=2,336$ $P=0,019$
DKLZ C/D [$\tilde{x}$, (min-maks)] (ng/ml/mg)	0,52 (0,06-1,79)	0,65 (0,11-4,12)	$Z=2,119$ $P=0,034$

45-62 yaş grubu KLZ plazma konsantrasyonu ($\tilde{x}=428,4$ ng/ml; ranj=1334,33), 20-44 yaş gurubuna göre ($\tilde{x}=729,2$ ng/ml; ranj=1427,62) anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($Z=1320,5$, $p=0,006$) (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. KLZ plazma düzeyinin iki yaş gruplarına göre kutu grafiği

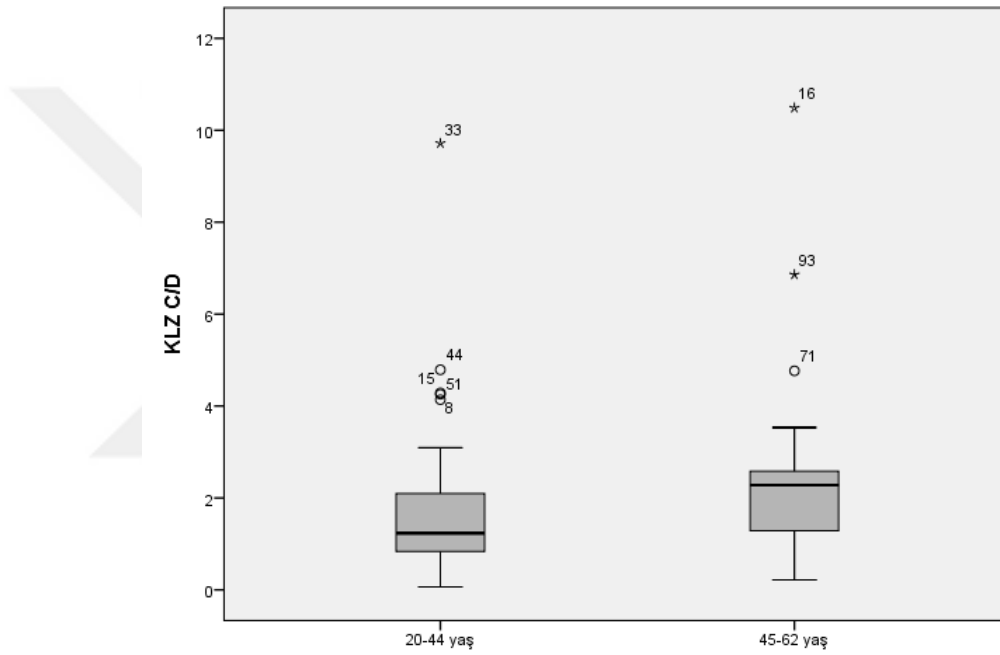
45-62 yaş grubu DKLZ plazma konsantrasyonu ($\bar{x}$ =152,69 ng/ml; ranj =571,13), 20-44 yaş gurubuna göre ($\bar{x}$ =283,12 ng/ml; ranj =436,83) anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (Z =3,116, p =0,002) (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. DKLZ plazma düzeyinin yaş gruplarına göre kutu grafiği

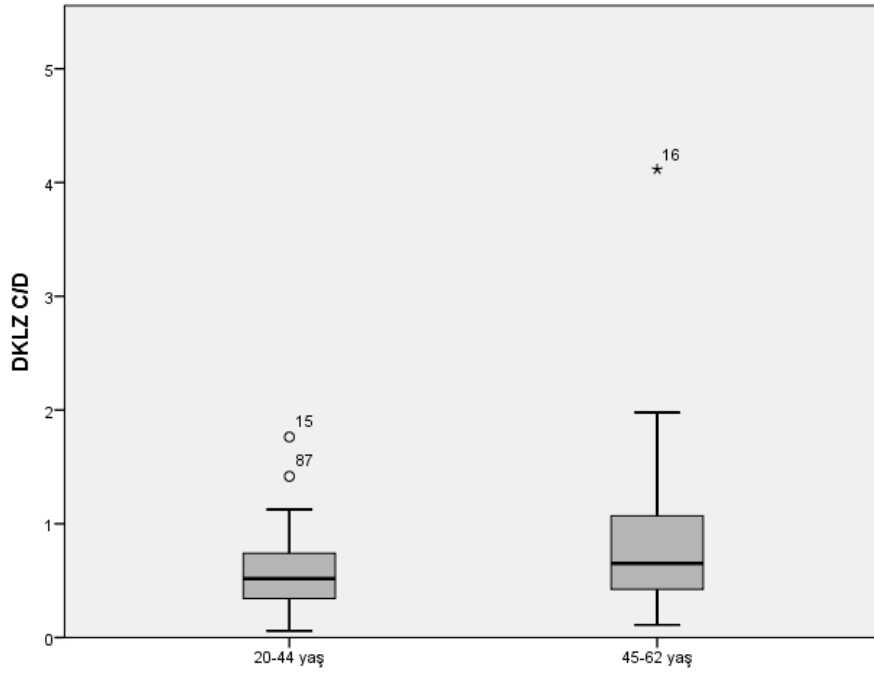
20-44 yaş gurubu ($\tilde{x}=2,35$; ranj=13,4) ile 45-62 ($\tilde{x}=2,55$; ranj=4,88) yaş grubunun KLZ/DKLZ oranları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($Z=0,82$, $p=0,412$).

45-62 yaş grubu KLZ C/D düzeyleri ($\tilde{x}=1,23$ ng/ml/mg; ranj=9,65), 20-44 yaş gurubuna göre ($\tilde{x}=2,28$ ng/ml/mg; ranj=10,27) anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($Z=2,336$, $p=0,019$) (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. KLZ C/D düzeyinin yaş gruplarına göre kutu grafiği

45-62 yaş grubu DKLZ C/D düzeyleri ($\tilde{x}=0,52$ ng/ml/mg; ranj=1,71), 20-44 yaş gurubuna göre ($\tilde{x}=0,65$ ng/ml/mg; ranj=4,0) anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($Z=2,119$, $p=0,034$) (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. DKLZ C/D düzeyinin yaş gruplarına göre kutu grafiği

3.3.8.2. Cinsiyet

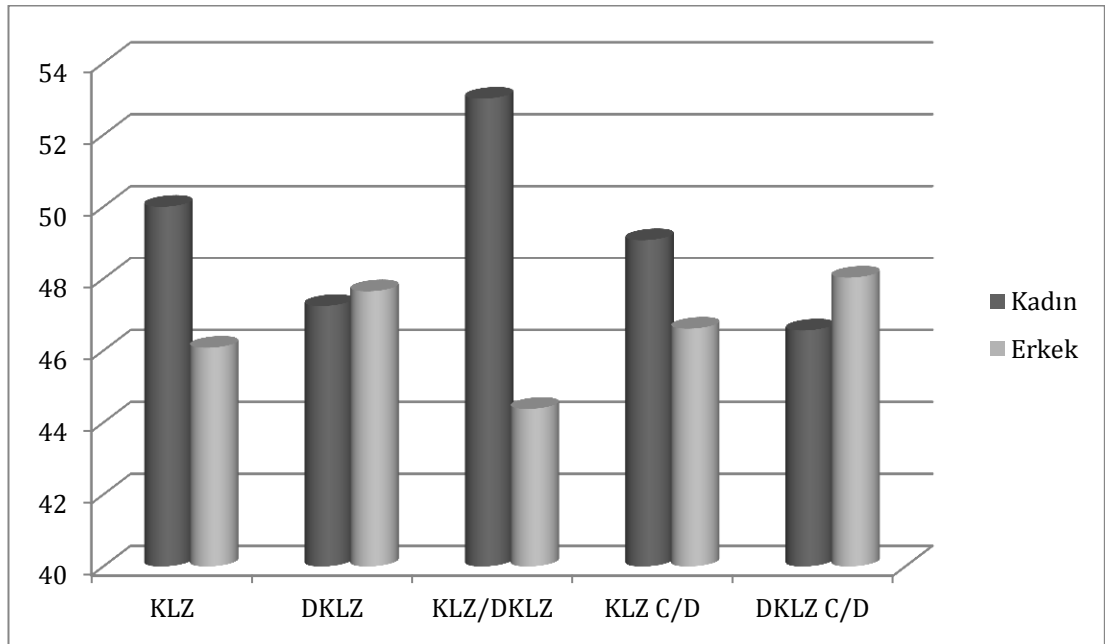
Cinsiyete göre gruplanan bireylerin ortalama $\pm$ SS KLZ, DKLZ plazma konsantrasyon düzeyleri sırasıyla kadınlar için 593,44 $\pm$ 398,39 ng/ml ve 207,89 $\pm$ 128,28 ng/ml, erkekler için 526,56 $\pm$ 351,13 ng/ml ve 205,88 $\pm$ 120,59 ng/ml olarak bulunmuştur. KLZ/ DKLZ plazma konsantrasyon oranı erkeklerde 2,71 $\pm$ 1,86, kadınlarda ise 2,89 $\pm$ 1,19 olarak bulunmuştur. Doz normalize KLZ ve DKLZ değerleri ise kadınlar için sırasıyla 2,03 $\pm$ 1,98 ng/ml/mg ve 0,73 $\pm$ 0,72 ng/ml/mg; erkekler için sırasıyla 1,79 $\pm$ 1,54 ng/ml/mg ve 0,66 $\pm$ 0,40 ng/ml/mg olarak tespit edilmiştir.

Tüm sonuçlar Çizelge 3.11’de yer almaktadır. Tüm KLZ ve DKLZ düzeyleri cinsiyetlere göre normal dağılım göstermediğinden parametrik olmayan Mann-Whitney U test ile analiz edilmişlerdir. İstatistiksel olarak Mann Whitney U analizi sonucunda cinsiyete göre söz konusu düzeyler arasında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir ($p > 0,05$).

Çizelge 3.11. Cinsiyete göre KLZ- DKLZ değerlerinin karşılaştırılması

Değerler	Kadın (N=34)	Erkek (N=60)	
KLZ [$\tilde{x}$, (min-maks)] (ng/ml)	527,15 (61,6-1371,69)	467,08 (34,57-1492,96)	$Z=-0,669$ $P=0,504$
DKLZ [$\tilde{x}$, (min-maks)] (ng/ml)	178,65 (39,38-507,1)	176,57 (31,77-602,9)	$Z=0,071$ $P=0,944$
KLZ/DKLZ [$\tilde{x}$, (min-maks)]	2,7 (0,91-5,75)	2,38 (0,64-14,04)	$Z=-1,475$ $P=0,14$
KLZ C/D [$\tilde{x}$, (min-maks)] (ng/ml/mg)	1,63 (0,21-10,89)	1,37(0,06-9,72)	$Z=-0,421$ $P=0,674$
DKLZ C/D [$\tilde{x}$, (min-maks)] (ng/ml/mg)	0,55 (0,11-4,12)	0,59 (0,05-1,8)	$Z=0,252$ $P=0,8$

Normal dağılım göstermediklerinden sıra ortalamaları karşılaştırıldığında KLZ plazma düzeyi, KLZ/ DKLZ oranı ve KLZ C/D düzeyi kadınlarda erkeklere göre sırasıyla %7,84; %16,28 ve %5,01 daha yüksekken; plazma DKLZ düzeyi ve DKLZ C/D oranı erkeklerde kadınlara göre sırasıyla %0,86 ve %3,06 daha yüksek olarak bulunmuştur (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Cinsiyete göre KLZ ve DKLZ düzeylerinin sıra ortalamalarının sütun grafiği

3.3.8.3. Sigara Kullanımı

Sigara kullanım miktarına göre hiç içmeyenler ve günde 7'den az içenler ile 7'den fazla sigara kullananlar olmak üzere iki gruba ayrılan bireylerin KLZ, DKLZ plazma konsantrasyon düzeyleri, KLZ/ DKLZ plazma konsantrasyon oranı, doz normalize KLZ ve DKLZ değerleri üzerine etkisi analiz edilmiştir. Veriler Çizelge 3.12.'de sunulmuştur.

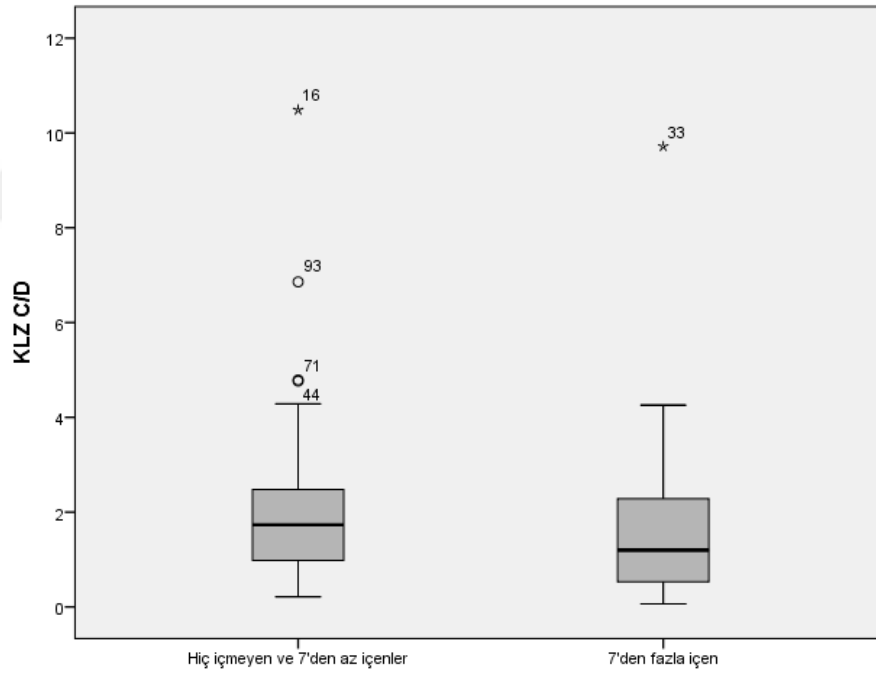
Çizelge 3.12. Sigara kullanım gruplarına göre KLZ- DKLZ değerlerinin karşılaştırılması

Değerler	Hiç içmeyen ve <7 (N=52)	≥7 (N=42)	
KLZ [$\tilde{x}$, (min-maks)]	507,5 (64,98-1492,96)	346 (34,57-1368,9)	$Z=-1,319$ $P=0,187$
DKLZ [$\tilde{x}$, (min-maks)]	185,29 (39,38-507,1)	155,98 (31,77-602,9)	$Z=-1,354$ $P=0,176$
KLZ/DKLZ [$\tilde{x}$, (min-maks)]	2,61 (0,64-5,89)	2,27 (0,87-14,04)	$Z=-0,886$ $P=0,376$
KLZ C/D [$\tilde{x}$, (min-maks)]	1,73 (0,21-10,49)	1,19(0,06-9,72)	$Z=-1,993$ $P=0,046$
DKLZ C/D [$\tilde{x}$, (min-maks)]	0,59 (0,18-4,12)	0,4 (0,06-1,52)	$Z=-1,958$ $P=0,05$

Hiç sigara içmeyen ve 7'den az içen grubun plazma KLZ ve DKLZ düzeylerinin ortalama $\pm$ SS sırasıyla 590,14 $\pm$ 362,44 ng/ml ve 217,97 $\pm$ 116 ng/ml'iken, 7'den fazla sigara tüketenlerde bu değerler sırasıyla 501,98 $\pm$ 373,8 ng/ml ve 192,54 $\pm$ 130,5 ng/ml'dir. Hiç içmeyen ve 7'den az içen grupta KLZ/ DKLZ oranı ortalaması 2,77 $\pm$ 1,19, KLZ C/D ve DKLZ C/D düzeylerinin ortalamaları ise sırasıyla 2,1 $\pm$ 1,75 ng/ml/mg ve 1,6 $\pm$ 1,63 ng/ml/mg'dır. 7'den fazla sigara tüketenlerde ise KLZ/ DKLZ oranı 2,78 $\pm$ 2,08; KLZ ve DKLZ C/D düzeylerinin ortalamaları sırasıyla 1,6 $\pm$ 1,63 ng/ml/mg ve 0,58 $\pm$ 0,38 ng/ml/mg'dır.

Sigara kullanımlarına göre hasta gruplarının KLZ ve DKLZ düzeyleri normal dağılım göstermediğinden gruplardaki her bir düzeyin sıra ortalamaları karşılaştırıldığında hiç içmeyen ve 7'den az içenlerin bulunduğu birinci gruptaki plazma KLZ, plazma DKLZ ve KLZ/ DKLZ oranı günde 7'den fazla sigara tüketenlerden sırasıyla %14,69; %15,04 ve %10,07 daha yüksektir.

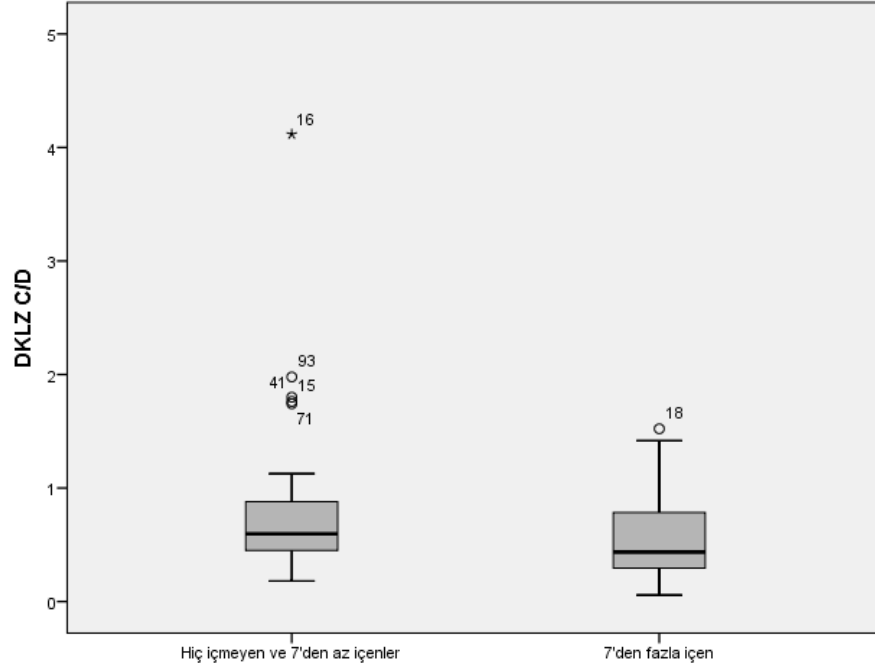
Sigara kullanımlarına göre hasta gruplarının KLZ ve DKLZ düzeyleri normal dağılım göstermediğinden istatistiksel olarak parametrik olmayan Mann- Whitney U testi ile analiz edilmiştir. İstatistik analizi sonuçları incelendiğinde günde 7'den fazla içen grupta KLZ C/D düzeyleri ($\bar{x}=1,73$ ng/ml/mg; $\text{ranj}=10,27$), hiç içmeyen ve 7'den az içenlerin bulunduğu gruptan ($\bar{x}=1,19$ ng/ml/mg; $\text{ranj}=9,65$), anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($Z=-1,993$, $p=0,046$) (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. KLZ C/D düzeylerinin sigara kullanımına göre kutu grafiği

DKLZ C/D düzeyinin p değeri 0,05 olarak bulunmuş olup 0,05'ten küçük olmadığı için anlamlı kabul edilmese de günde 7'den fazla içen grupta DKLZ C/D düzeyleri ($\bar{x}=0,59$ ng/ml/mg; $\text{ranj}=3,93$), hiç içmeyen ve 7'den az içenlerin

bulunduğu gruptan ($\bar{x}=0,4$ ng/ml/mg; ranj=1,46), anlamlılık sınırında daha düşük olduğu bulunmuştur ($Z=-1,958$, $p=0,05$) (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. DKLZ C/D düzeylerinin sigara kullanımına göre kutu grafiği

3.3.8.4. Kafein Kullanımı

Kafein kullanım miktarına göre günlük kullanım dozu 0,4 g'dan az olanlar, 0,4 g'dan fazla olanlar şeklinde bireyler iki gruba ayrılmıştır. KLZ ve DKLZ düzeylerinin ortalamaları günde 0,4 g'dan az kullananlarda $561,74 \pm 298,99$ ng/ml ve $210,28 \pm 202,94$ ng/ml; 0,4 g'dan fazla kullananlarda $539,76 \pm 429,49$ ng/ml ve $202,93 \pm 135,45$ ng/ml'dir. KLZ/ DKLZ oranı, KLZ C/D ve DKLZ C/D düzeylerinin ortalamaları ise 0,4 g'dan az kullananlarda sırasıyla $2,84 \pm 1,26$; $2,02 \pm 1,62$ ng/ml/mg ve $0,76 \pm 0,63$ ng/ml/mg'ken; 0,4 g'dan fazla kullananlarda bu değerler sırasıyla $2,7 \pm 1,96$; $1,73 \pm 1,79$ ng/ml/mg ve $0,6 \pm 0,4$ ng/ml/mg'dır.

Kafein kullanımlarına göre hasta gruplarının KLZ ve DKLZ düzeyleri normal dağılım göstermediğinden gruptaki her bir düzeyin sıra ortalamaları

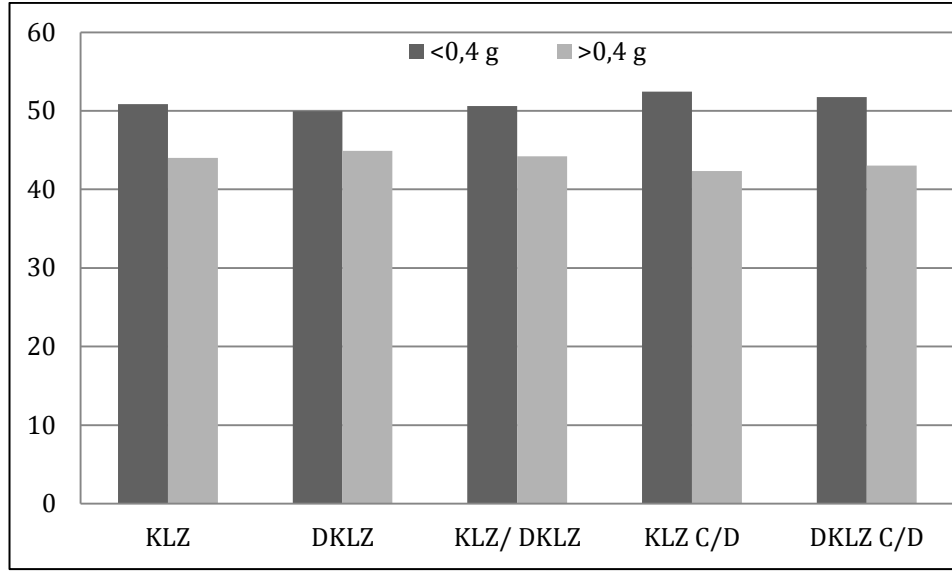
karşılaştırıldığında 0,4 g'dan az kafein plazma KLZ, plazma DKLZ, KLZ/ DKLZ oranı, KLZ C/D ve DKLZ C/D düzeyleri günde 0,4 g'dan fazla kafein tüketenlere göre sırasıyla %13,43; %10,14; %12,73; %19,24 ve %16,86 daha yüksektir.

KLZ ve DKLZ düzeyleri, KLZ/ DKLZ plazma düzey oranları, KLZ ve DKLZ doz normalize sonuçları normal dağılım göstermediğinden parametrik olmayan Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir (Çizelge 3.13). İstatistik analizi sonuçları incelendiğinde kafein kullanım miktarına göre söz konusu düzeyler arasında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0,05$).

Çizelge 3.13. KLZ- DKLZ düzeylerinin kafein kullanımına göre dağılımları

Değerler	<0,4 g (N=48)	>0,4 g (N=46)	
KLZ [$\tilde{x}$, (min-maks)] (ng/ml)	522,64 (61,6-1368,1)	353,65 (34,57-1492,96)	$Z=-1,214$ $P=0,225$
DKLZ [$\tilde{x}$, (min-maks)] (ng/ml)	181,12 (39,8-507,1)	158,15 (31,77-602,9)	$Z=-0,9$ $P=0,368$
KLZ/DKLZ [$\tilde{x}$, (min-maks)]	2,62 (0,64-5,89)	2,3 (0,87-14,04)	$Z=-1,146$ $P=0,252$
KLZ C/D [$\tilde{x}$, (min-maks)] (ng/ml/mg)	1,73 (0,3-10,49)	1,13 (0,06-9,72)	$Z=-1,793$ $P=0,073$
DKLZ C/D [$\tilde{x}$, (min-maks)] (ng/ml/mg)	0,62 (0,2-4,12)	0,52 (0,06-1,98)	$Z=-1,551$ $P=0,121$

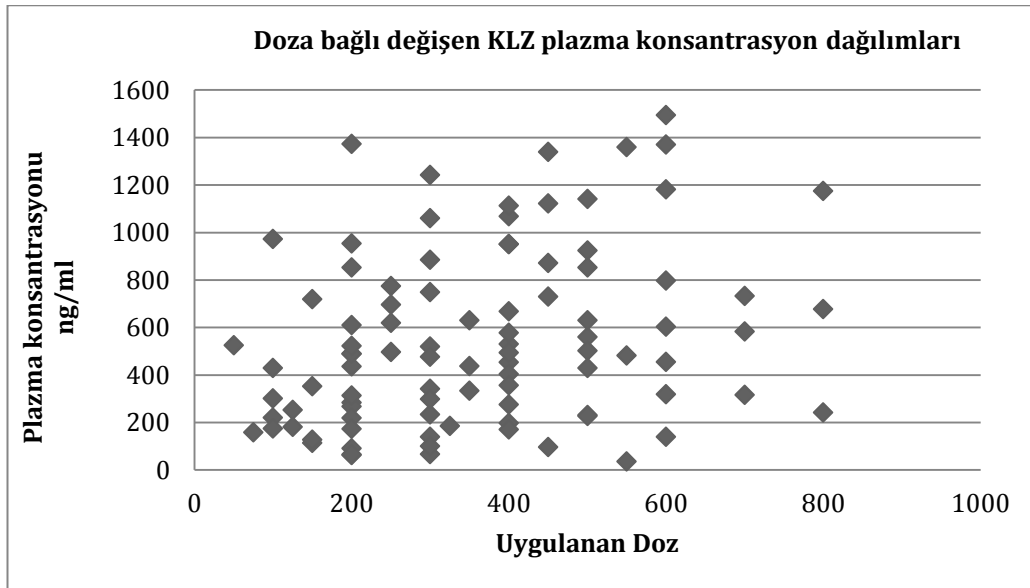
Kafein kullanım miktarlarına göre KLZ, DKLZ plazma konsantrasyon düzeyleri, KLZ/ DKLZ plazma konsantrasyon oranı, doz normalize KLZ ve DKLZ değerlerinin sıra ortalamalarına göre dağılımı Şekil 3. 12'de sunulmuştur.



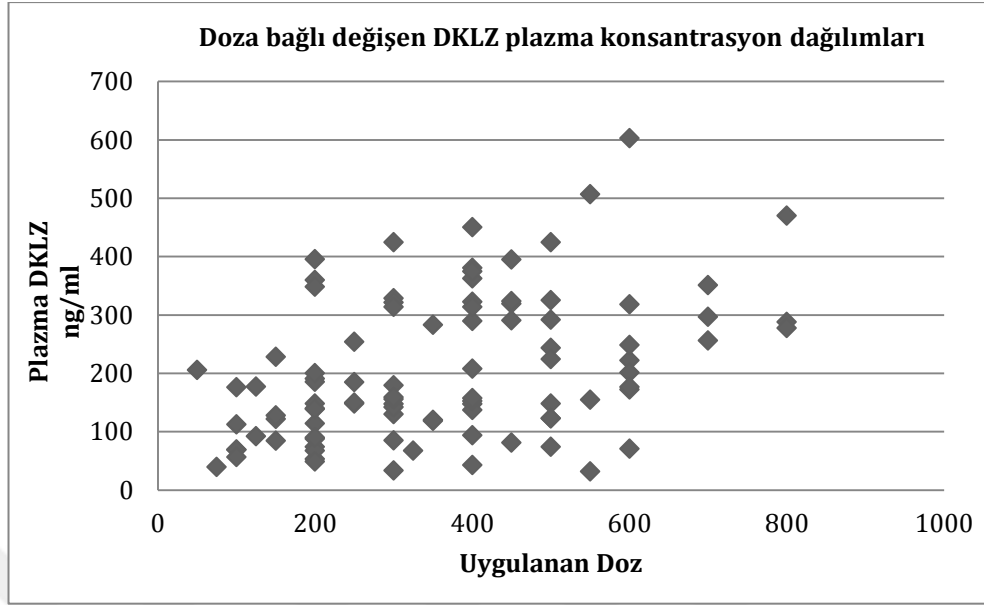
Şekil 3.12. Kafein kullanım gruplarına göre KLZ ve DKLZ düzeylerinin sıra ortalamalarının sütun grafiği

3.3.8.5. Kullanılan Doz Miktarı

Hastalara uygulanan ilaç dozuna karşılık gelen KLZ ve DKLZ ortalama plazma değerlerinin dağılımını gösteren grafikler sırasıyla Şekil 3.13 ve Şekil 3.14’de verilmiştir.



Şekil 3.13. Uygulanan doza karşılık gelen KLZ plazma konsantrasyon değerleri



Şekil 3.14. Uygulanan doza karşılık gelen DKLZ plazma konsantrasyon değerleri

Bireyler kullandıkları KLZ doz miktarlarına göre günde 300 mg'dan az, 300 - 600 mg/gün ve 600 mg'dan fazla kullananlar olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Günde 300 mg'dan az kullananlar, 300- 600 mg arasında kullananlar ve 600 mg'dan fazla kullananlar için plazma KLZ düzey ortalamaları $\pm$ SS sırasıyla 430,74 $\pm$ 304,31 ng/ml; 618,62 $\pm$ 393,95 ng/ml ve 619,99 $\pm$ 334,74 ng/ml; DKLZ plazma düzey ortalamaları sırasıyla 149,87 $\pm$ 88,31 ng/ml; 229,37 $\pm$ 129,85 ng/ml ve 323,3 $\pm$ 78,6 ng/ml; KLZ/ DKLZ oranlarının ortalamaları sırasıyla 3,07 $\pm$ 2,33; 2,69 $\pm$ 1,08 ve 1,84 $\pm$ 0,69; KLZ C/D düzeylerinin ortalamaları sırasıyla 2,73 $\pm$ 2,36 ng/ml/mg; 1,45 $\pm$ 0,93 ng/ml/mg ve 0,82 $\pm$ 0,42 ng/ml/mg; DKLZ C/D düzeylerinin ortalamaları sırasıyla 0,94 $\pm$ 0,73 ng/ml/mg; 0,55 $\pm$ 0,32 ng/ml/mg ve 0,43 $\pm$ 0,09 ng/ml/mg'dır.

Tüm düzeyler doz gruplarına göre normal dağılım göstermediğinden parametrik olmayan Kruskal Wallis testi ile analiz edilmişler ve elde edilen istatistik sonuçları ile uygulanan doza karşılık plazma KLZ ve DKLZ düzeyleri KLZ/DKLZ oranı, KLZ C/D ve DKLZ C/D değerleri Çizelge 3.14'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.14. Doza bağlı değişen KLZ- DKLZ düzey dağılımları

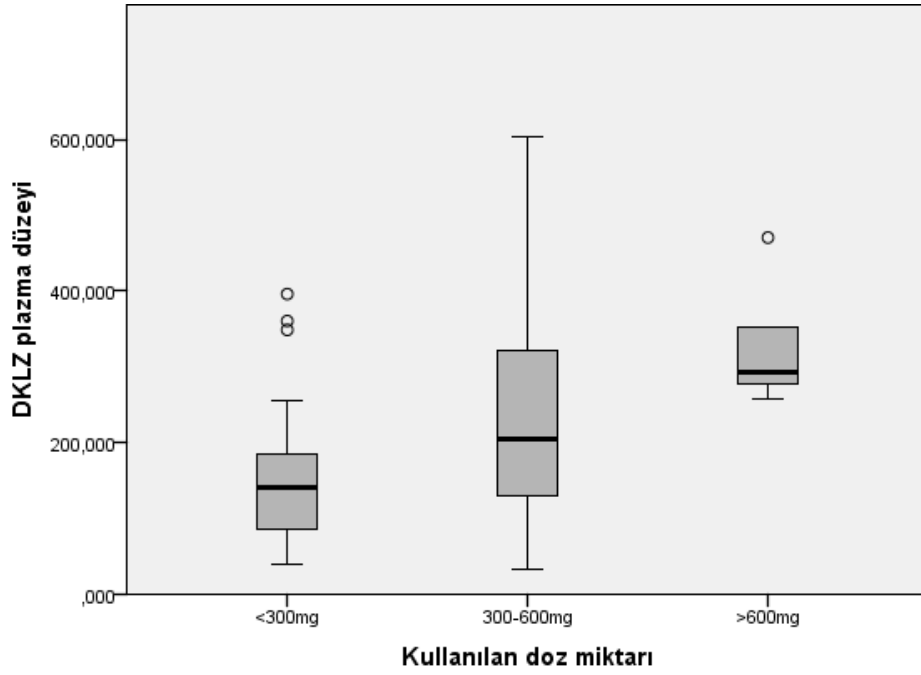
Değerler	<300 mg/gün (N=34)	300- 600 mg/gün (N=54)	>600 mg/gün (N=6)	
KLZ [$\tilde{x}$, (min-maks)] (ng/ml)	353,65 (61,6-1371,7)	524,4 (34,57-1492,96)	629,2 (241,46-1173,8)	$\chi^2=5,44$ $P=0,066$
DKLZ [$\tilde{x}$, (min-maks)] (ng/ml)	139,3 (39,8-395,75)	204,65 (31,77-602,9)	292,36 (256,42-470,21)	$\chi^2=14,111$ $P=0,001$
KLZ/DKLZ [$\tilde{x}$, (min-maks)]	2,62 (0,88-14,02)	2,5 (0,64-5,85)	2 (0,87-2,5)	$\chi^2=3,81$ $P=0,149$
KLZ C/D [$\tilde{x}$, (min-maks)] (ng/ml/mg)	2,19 (0,3-10,49)	1,25 (0,06-4,14)	0,84 (0,3-1,47)	$\chi^2=13,081$ $P=0,001$
DKLZ C/D [$\tilde{x}$, (min-maks)] (ng/ml/mg)	0,72 (0,25-4,12)	0,49 (0,06-1,428)	0,39 (0,59-0,7)	$\chi^2=12,459$ $P=0,002$

Günlük 600 mg'dan fazla kullanan hastaların KLZ sıra ortalaması 300 mg'dan az ve 300-600 KLZ kullanan hastalarınınkinden sırasıyla %30,38 ve %6,84 daha yüksektir; KLZ/ DKLZ oranlarının sıra ortalaması ise sırasıyla %46,29 ve %45,56 daha düşük bulunmuştur. Ancak, kullanılan doz miktarına göre üç grubun plazma KLZ düzeyleri ile KLZ/ DKLZ oranı istatistiksel olarak karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ($p>0,05$).

İstatistik analizi sonuçları incelendiğinde plazma DKLZ ($p=0,001$) ve doz normalize KLZ ($p=0,001$) ile DKLZ ($p=0,002$) düzeylerinin kullanılan KLZ miktarına göre gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık gösterdiği ($p > 0,05$) belirlenmiştir. Farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunun bulunması için ikişerli gruplar yapılarak Mann- Whitney U Testi ile karşılaştırma yapılmıştır. Ancak gruplar tekli olarak karşılaştırılacağından ve çok sayıda analiz yapılacağından kaynaklanan olan Tip-1 hata olasılığını ortadan kaldırmak için Bonferroni düzeltmesi yapılmıştır. Böylece muhtemel karşılaştırma sayısı üç olacağından Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U Testinde dikkate alınacak p değeri $0,05/3=0,0167$ 'dir.

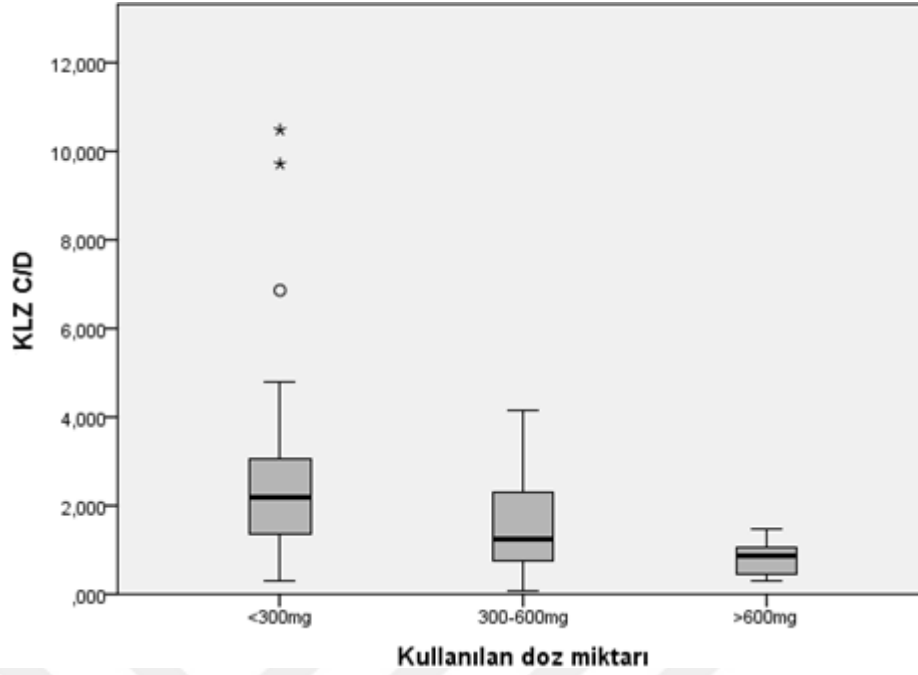
Günde 300-600 mg arasında KLZ kullanan grupta plazma DKLZ konsantrasyonu ($\tilde{x}=204,65$ ng/ml; ranj=571,13), günde 300 mg'dan az kullanan

gruba göre ($\bar{x}$ =139,3 ng/ml; ranj=355,95), anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($Z=-2,837$; $p=0,005$) (Şekil 3.15). 600 mg'dan fazla KLZ kullanan grupta DKLZ konsantrasyonu ($\bar{x}$ =292,36 ng/ml; ranj=213,79), günde 300 mg'dan az kullanan gruba göre ($\bar{x}$ =139,3 ng/ml; ranj=355,95), anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($Z=-3,333$; $p=0,000$) (Şekil 3.15).



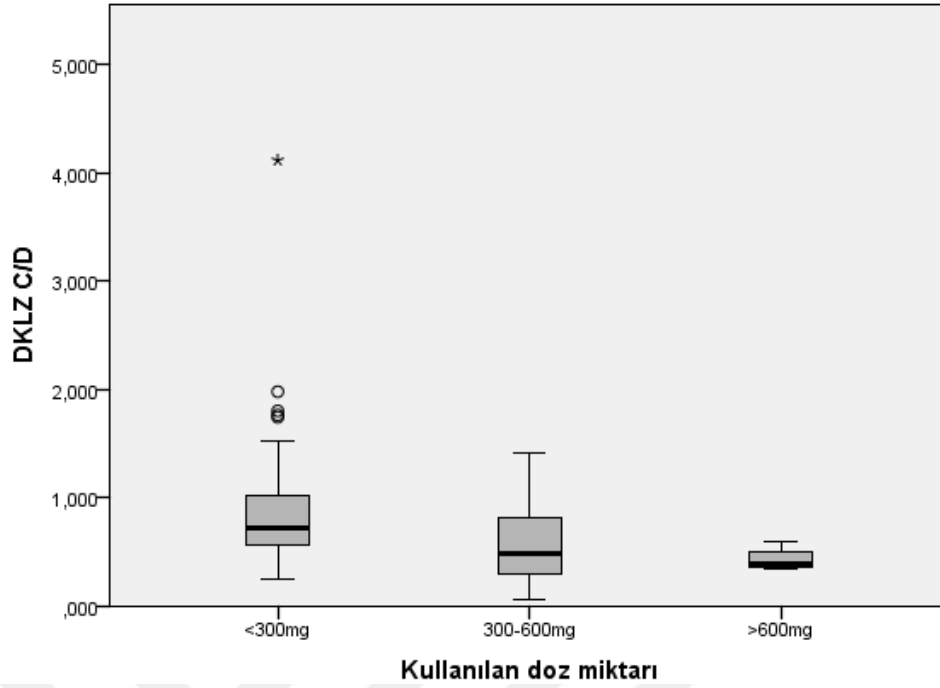
Şekil 3.15. Uygulanan doz miktarına göre plazma DKLZ düzeyinin kutu grafiği

Günde 300-600 mg arasında KLZ kullanan grupta KLZ C/D düzeyleri ($\bar{x}$ =1,25 ng/ml/mg; ranj=4,07), günde 300 mg'dan az kullanan gruba göre ($\bar{x}$ =2,19 ng/ml/mg; ranj=10,18) anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($Z=-2,931$; $p=0,003$) (Şekil 3.156). 600 mg'dan fazla KLZ kullanan grupta KLZ C/D düzeyleri ($\bar{x}$ =0,84 ng/ml/mg; ranj=1,17), günde 300 mg'dan az kullanan gruba göre ($\bar{x}$ =2,19 ng/ml/mg; ranj=10,18), anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($Z=2,727$; $p=0,004$) (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. Uygulanan doz miktarına göre KLZ C/D düzeylerinin kutu grafiği

Günde 300-600 mg arasında KLZ kullanan grupta DKLZ C/D düzeyleri ($\bar{x}$ =0,49 ng/ml/mg; ranj=1,36), günde 300 mg'dan az kullanan gruba göre ($\bar{x}$ =0,72 ng/ml/mg; ranj=3,87) anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($Z=-3,158$; $p=0,002$) (Şekil 3.17). 600 mg'dan fazla KLZ kullanan grupta DKLZ C/D düzeyleri ($\bar{x}$ =0,39 ng/ml/mg; ranj=0,24), günde 300 mg'dan az kullanan gruba göre ($\bar{x}$ =0,72 ng/ml/mg; ranj=3,87), anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($Z=2,727$; $p=0,004$) (Şekil 3.16).



Şekil 3.17. Uygulanan doz miktarına göre DKLZ C/D düzeylerinin kutu grafiği

3.3.8.6. Beden Kitle İndeksi

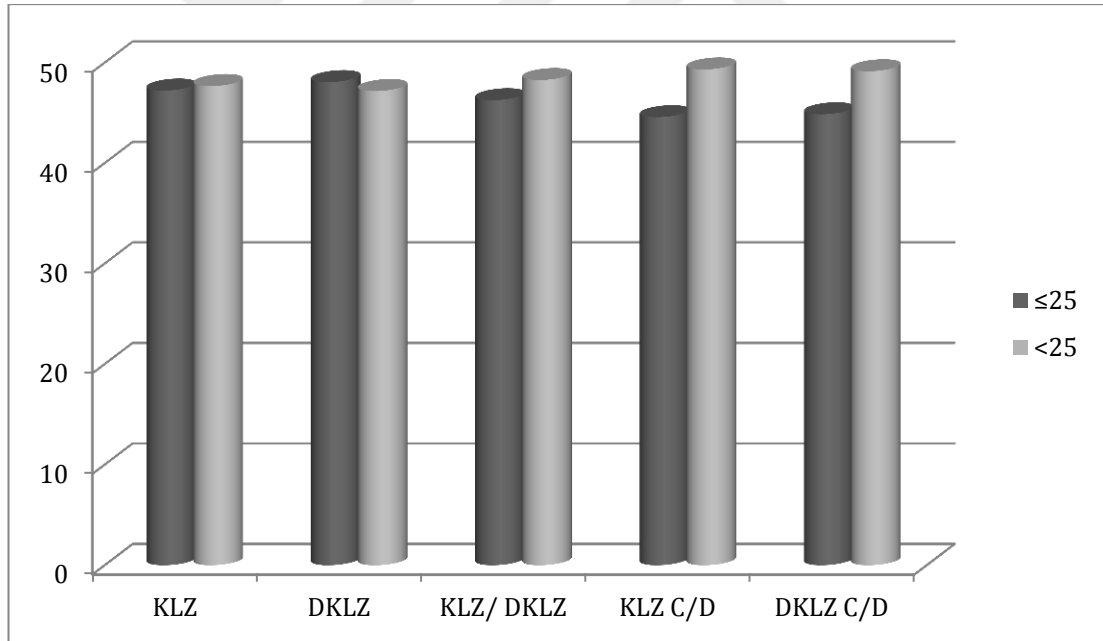
BKİ değerleri sağlıklı bireyler için en fazla 25 olarak kabul edildiğinden bireyler BKİ 25'nin altında ve üstünde olarak iki gruba ayrılarak plazma KLZ, DKLZ ve KLZ/DKLZ, normalize doz KLZ ve DKLZ düzeyleri karşılaştırılmıştır. Veriler normal dağılım göstermediğinden Mann-Whitney U testi ile analiz yapılmış olup sonuçlar Çizelge 3.15'de verilmiştir.

Çizelge 3.15. Bireylerin BKİ'lerine göre KLZ ve DKLZ dağılımları

Değerler	≤25 (N=36)	>25 (N=58)	
KLZ [$\tilde{x}$, (min-maks)] (ng/ml)	453,65 (61,6-1492,9)	498,6 (34,57-1371,69)	$Z=0,078$ $P=0,938$
DKLZ [$\tilde{x}$, (min-maks)] (ng/ml)	174,63 (33,38-507,1)	176,57 (31,77-602,9)	$Z=-0,156$ $P=0,876$
KLZ/DKLZ [$\tilde{x}$, (min-maks)]	2,49 (0,8-5,75)	2,49 (0,64-14,04)	$Z=0,346$ $P=0,729$

KLZ C/D [$\tilde{x}$, (min-maks)] (ng/ml/mg)	1,4 (0,21-4,77)	1,53 (0,06-10,49)	$Z=0,821$ $P=0,412$
DKLZ C/D [$\tilde{x}$, (min-maks)] (ng/ml/mg)	0,53 (0,11-1,74)	0,59 (0,06-1,76)	$Z=0,739$ $P=0,46$

KLZ- DKLZ düzeylerinin BKİ gruplarına göre dağılım grafiği ise Şekil 3.18’de verilmiştir. KLZ plazma düzeyi BKİ 25’in üstünde olanlarda 25’in altında olanlara göre %0,94 daha yüksek, DKLZ ise %1,88 daha düşük olarak bulunmuştur. Doz normalize ilaç ve metabolitine bakıldığında ise BKİ 25’in üstünde olanlarda 25’in üzerinde olanlara kıyasla doz normalize KLZ düzeyi %9,63 daha fazla, doz normalize DKLZ ise %8,71 ve KLZ/ DKLZ oranı %4,16 fazla bulunmuştur. Ancak, istatistik analiz sonuçlarına göre BKİ’nin 25’in üzerinde veya altında olması KLZ ve DKLZ plazma düzeyleri, KLZ/ DKLZ oranı, KLZ ve DKLZ C/D düzeyleri arasında anlamlı bir farklılığa yol açmadığı istatistiksel olarak belirlenmiştir ($p>0,05$).



Şekil 3.18. BKİ gruplarına göre tüm değerlerin sıra ortalaması dağılımı

3.3.9. Genotip Dağılımına Göre Ortalama KLZ ve DKLZ Plazma Konsantrasyonları ile KLZ/ DKLZ ve C/D Oranları

3.3.9.1. ABCB1 C3435T Polimorfizmi Genotip Dağılımına Göre

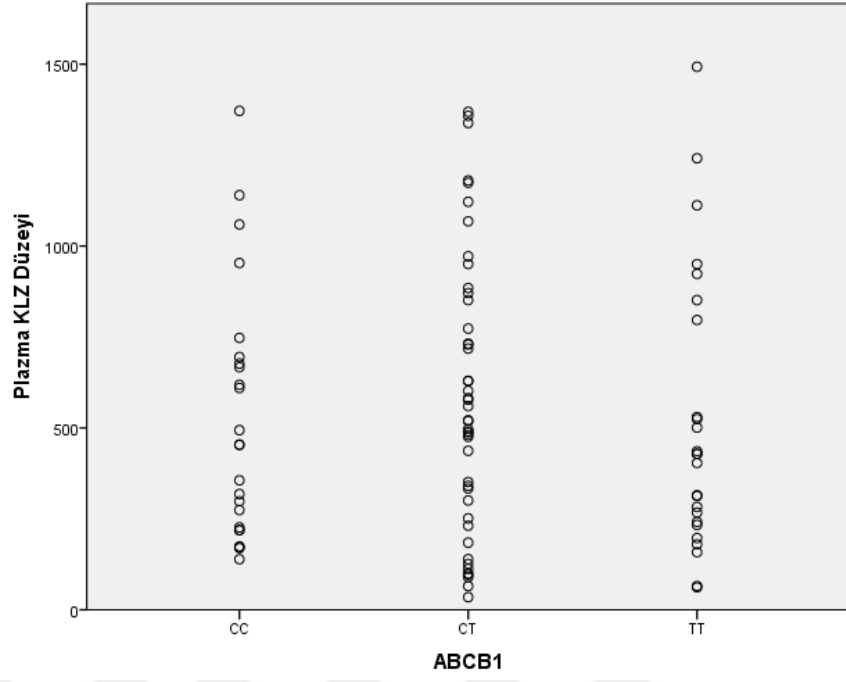
3.3.9.1.1. KLZ Plazma Konsantrasyonları

ABCB1 yabanıl tip (CC), heterozigot (CT), mutant (TT) gruplarındaki KLZ plazma konsantrasyon değerleri Çizelge 3.16’da özetlenmiş olup genotiplere göre plazma KLZ konsantrasyonlarının dağılımı Şekil 3.19’da verilmiştir.

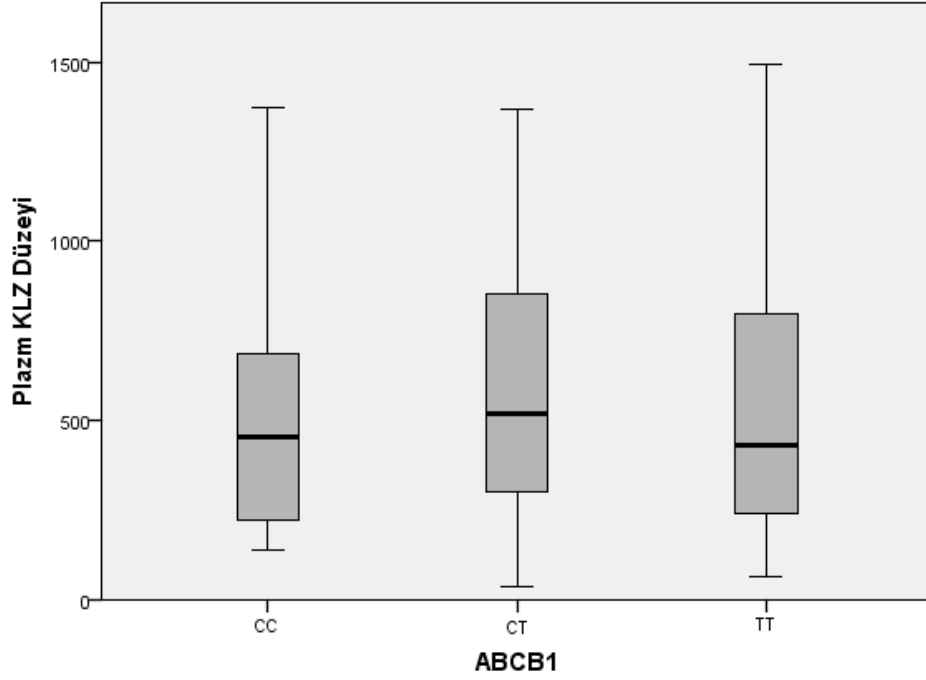
Plazma KLZ düzeyi ABCB1 genotiplerine göre normal dağılım göstermediğinden sonuçlar parametrik olmayan Kurskal Wallis testi ile karşılaştırılmıştır. CC genotipine sahip bireylerin KLZ plazma düzeyleri ortalamaları ($\pm$ SS) 521,05 ng/ml ($\pm$ 342,41); CT genotipine sahip olanların 585,14 ng/ml ($\pm$ 378,03) ve TT genotipine sahip olanların 517,36 ng/ml ($\pm$ 383,09) olarak bulunmuştur. Yabanıl genotipe sahip olan bireylerin sıra ortalaması heterozigot genotipe sahip olanlara göre %9,56 daha azken; mutant genotipe sahip olanlardan %3,92 daha yüksektir. Ancak Kruskal Wallis testi ile sıra ortalamaları karşılaştırıldığında genotip grupları arasında plazma KLZ düzeylerinin farklılık göstermediği istatistiksel olarak gösterilmiştir ($p>0,05$) (Şekil 3.20).

Çizelge 3.16. ABCB1 C3435T genotip dağılımına göre KLZ plazma konsantrasyonları

KLZ Plazma Konsantrasyonu	Yabanıl Tip (CC) (Normal Taşıyıcı)	Heterozigot (CT) (Orta düzeyde taşıyıcı)	Mutant (TT) (Yavaş Taşıyıcı)
n	24	45	25
$\bar{x}$ (ng/ml)	453,65	520,98	428,37
Min	138,81	34,57	61,6
Maks	1371,69	1368,9	1492,96
	$\chi^2= 0,941; P=0,625$		



Şekil 3.19. KLZ plazma konsantrasyonlarının *ABCB1* genotiplerine göre nokta grafiği gösterimi ($p>0,05$)



Şekil 3.20. KLZ plazma konsantrasyonlarının *ABCB1* genotiplerine göre saplı kutu grafiği ile gösterimi ($p>0,05$)

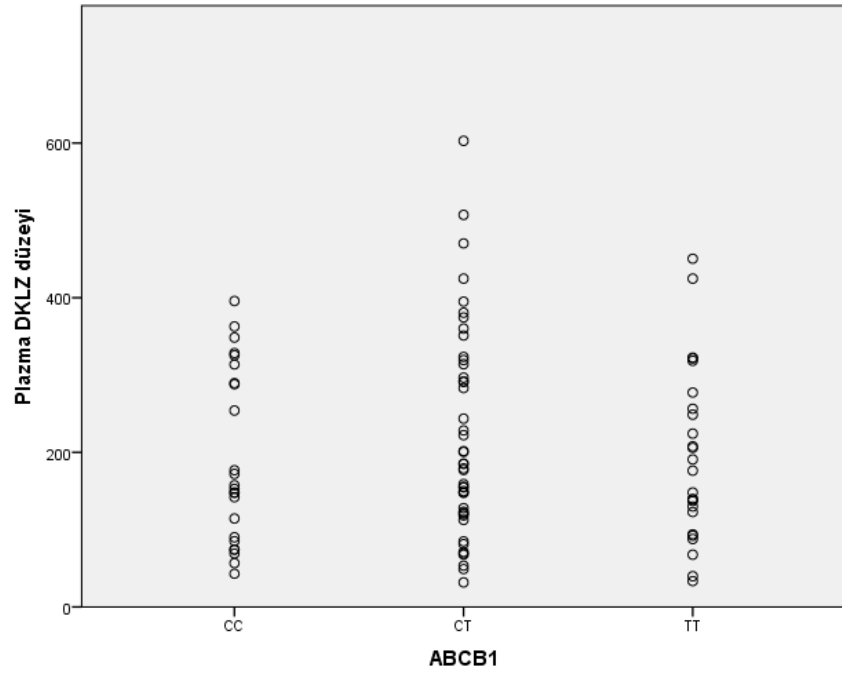
3.3.9.1.2. DKLZ Plazma Konsantrasyonları

ABCB1 yabanıl tip (CC), heterozigot (CT), mutant (TT) gruplarındaki DKLZ plazma konsantrasyon değerleri Çizelge 3.17’de özetlenmiştir.

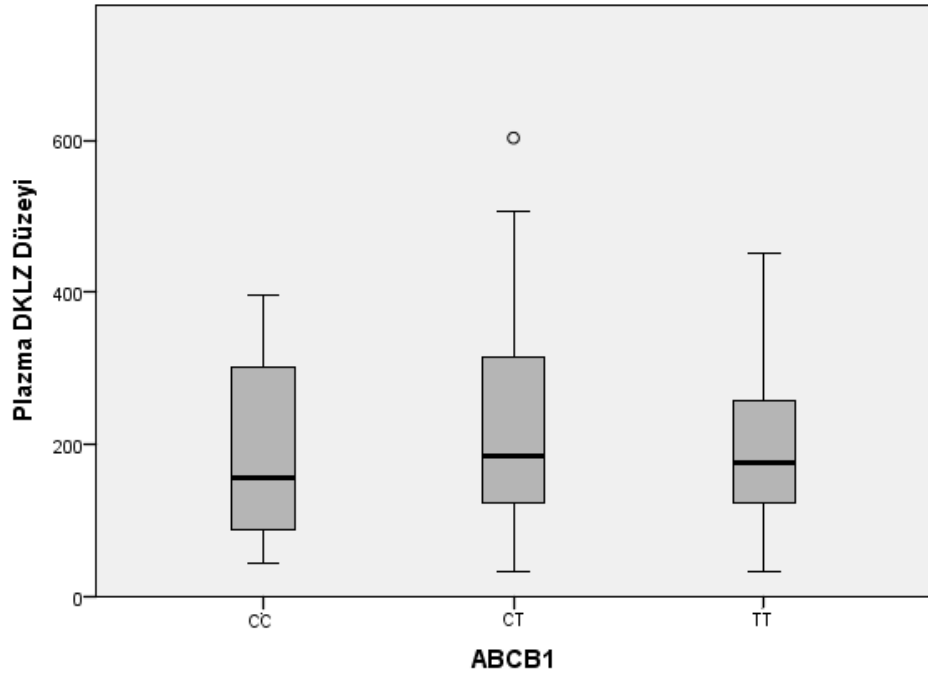
ABCB1 genotiplerine göre plazma DKLZ düzeylerinin dağılımı normal dağılım göstermemekte olup yabanıl, heterozigot ve mutant genotiplere sahip bireylerin DKLZ plazma sonuçları parametrik olmayan Kruskal Wallis testi ile analiz edilmiştir. Yabanıl, heterozigot ve mutant genotipe sahip bireylerin plazma DKLZ düzey ortalamaları ($\pm$ SS) sırasıyla 192,07 ng/ml ($\pm$ 112,29); 585,14 ng/ml ($\pm$ 378,02) ve 517,09 ng/ml ($\pm$ 383,09) olarak bulunmuştur. Heterozigot genotipe sahip olanların DKLZ plazma düzeyleri yabanıl ve mutant tipinkilerden sırasıyla %10,54 ve %9,48 daha yüksektir. Ancak Kruskal Wallis Testi sonucunda üç genotip grubunun DKLZ plazma düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). *ABCB1* genotipine göre DKLZ plazma düzeylerinin dağılımı nokta grafiği ile gösterimi Şekil 3.21’de; kutu grafiği ile gösterimi ise Şekil 3.22’de verilmiştir.

Çizelge 3.17. *ABCB1* C3435T genotip dağılımına göre DKLZ plazma konsantrasyonları

DKLZ Plazma Konsantrasyonu	Yabanıl Tip (CC) (Normal Taşıyıcı)	Heterozigot (CT) (Orta düzeyde taşıyıcı)	Mutant (TT) (Yavaş Taşıyıcı)
n	24	45	25
$\bar{x}$ (ng/ml)	155,03	185,19	176,3
Min	42,97	31,77	33,38
Maks	395,75	602,9	450,49
	$\chi^2 = 0,795; P = 0,672$		



Şekil 3.21. DKLZ plazma konsantrasyonlarının *ABCB1* genotiplerine göre nokta dağılımı ($p>0,05$)



Şekil 3.22. *ABCB1* genotiplerine göre DKLZ plazma konsantrasyon değerlerinin saplı kutu grafiği ile gösterimi ($p>0.05$)

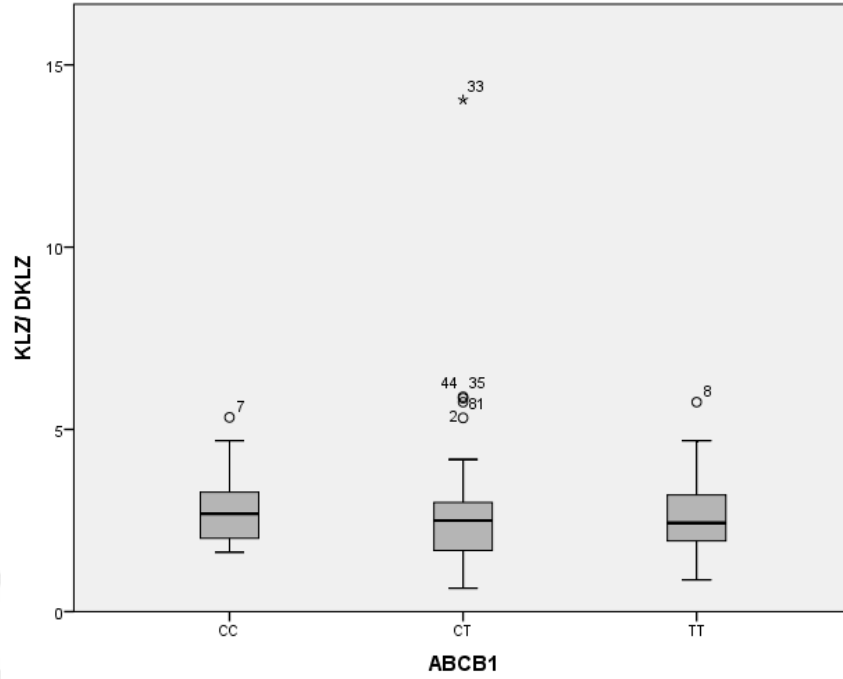
3.3.9.1.3. KLZ/ DKLZ Plazma Konsantrasyon Oranları

KLZ/DKLZ plazma konsantrasyon oranlarının *ABCB1* yabanıl tip (CC), heterozigot (CT), mutant (TT) gruplarına göre dağılımları Şekil 3.23’de, değerleri ise Çizelge 3.18’de özetlenmiştir.

Yabanıl, heterozigot ve mutant tipe ait KLZ/DKLZ oranları normal dağılım göstermediğinden istatistiksel analizler Kruskal Wallis testi ile yapılmıştır. Üç gruba ait KLZ/DKLZ oranlarının ortalamaları ($\pm$ SS) yabanıl tipler için 2,79 ($\pm$ 0,95), heterozigotlar için 2,83 ($\pm$ 2,11) ve mutant genotipe sahip olanlar için 2,65 ($\pm$ 1,19). KLZ/DKLZ oranlarının sıra ortalamaları yabanıl genotipe sahip olanlarda heterozigot ve mutant genotipe sahip olanlarınkine göre %13,62 ve %9,93 daha fazladır. Ancak istatistiksel olarak üç grup arasındaki plazma DKLZ düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 3.18. KLZ/DKLZ plazma konsantrasyon oranlarının *ABCB1* genotip dağılımı

KLZ/ DKLZ	Yabanıl Tip (CC) (Normal Taşıyıcı)	Heterozigot (CT) (Orta düzeyde taşıyıcı)	Mutant (TT) (Yavaş Taşıyıcı)
n	24	45	25
$\bar{X}$	2,69	2,49	2,43
Min	1,63	0,64	0,87
Maks	5,33	14,04	5,75
	$\chi^2= 1,075; P=0,584$		



Şekil 3.23. *ABCB1* genotiplerine göre KLZ/DKLZ plazma konsantrasyon oranlarının değerlerinin saplı kutu grafiği ile gösterimi ($p>0.05$)

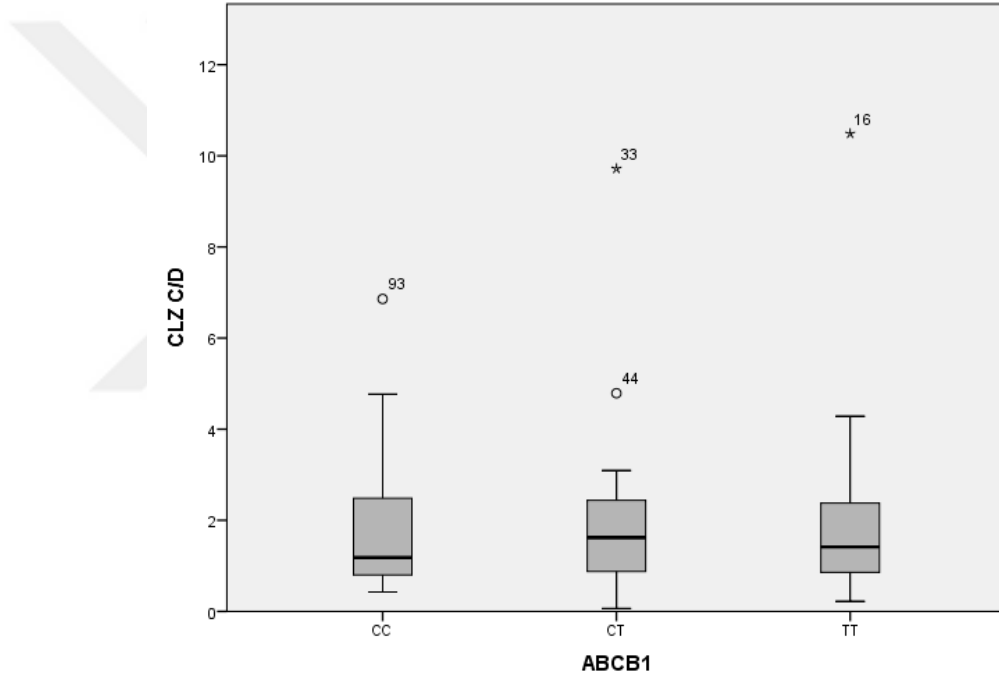
3.3.9.1.4. KLZ C/D Oranları

KLZ C/D oranlarının *ABCB1* yabanıl tip (CC), heterozigot (CT) ve mutant (TT), gruplarına göre değerleri ise Çizelge 3.19’da özetlenmiştir.

KLZ C/D değerleri normal dağılım göstermediğinden yabanıl, heterozigot ve mutant genotiplerin KLZ C/D değerleri parametrik olmayan test olan Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırılmış ancak istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir ($p>0.05$). Yabanıl tip, heterozigot ve mutant genotipe sahip bireylerin doz normalize KLZ düzeyleri ortalamaları ($\pm$ SS) sırasıyla 1,84 ng/ml/mg ($\pm$ 1,55); 1,81 ng/ml/mg ($\pm$ 1,56) ve 2,03 ng/ml/mg ($\pm$ 2,13)’tür. Heterozigot genotipe sahip olanların KLZ C/D sıra ortalamaları yabanıl ve mutant genotipe sahip olanlarından sırasıyla %2,54 ve %1,56 daha fazladır. Genotiplere göre KLZ C/D saplı kutu grafiği Şekil 3.24’de verilmiştir.

Çizelge 3.19. KLZ C/D oranlarının *ABCB1* genotiplerine göre dağılımı

KLZ C/D Konsantrasyonu	Yabanıl Tip (CC) (Normal Taşıyıcı)	Heterozigot (CT) (Orta düzeyde taşıyıcı)	Mutant (TT) (Yavaş Taşıyıcı)
n	24	45	25
$\bar{x}$ (ng/ml/mg)	1,18	1,62	1,41
Min	0,42	0,06	0,22
Maks	6,86	9,72	10,49
	$\chi^2 = 0,034$ $P=0,983$		



Şekil 3.24. *ABCB1* genotiplerine göre KLZ C/D oran dağılımının saplı kutu grafiği ile gösterimi ($p>0.05$)

3.3.9.1.5. DKLZ C/D Oranları

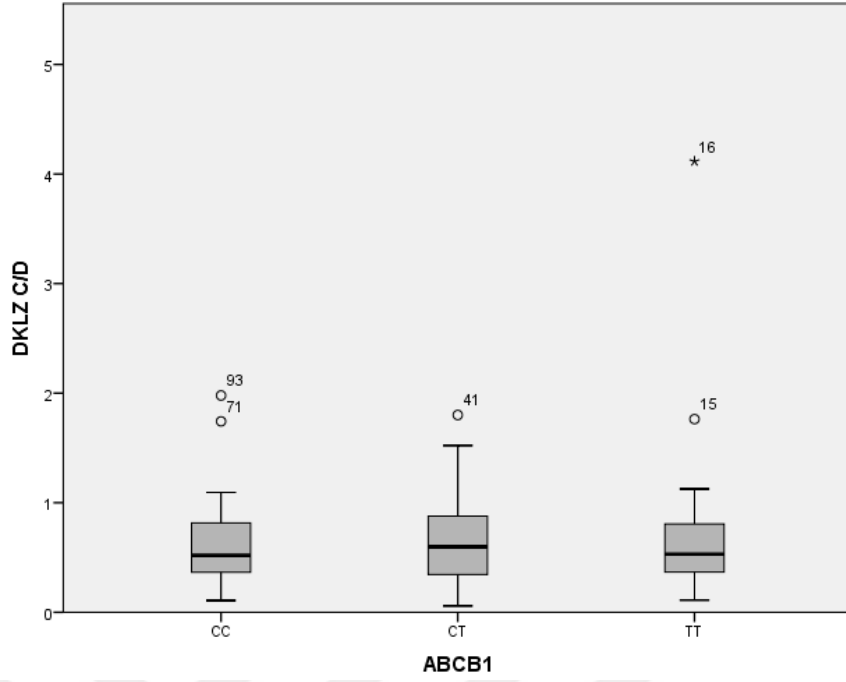
DKLZ C/D oranlarının *ABCB1* yabanıl tip (CC), heterozigot (CT) ve mutant (TT) gruplarına göre dağılımları Şekil 3.25’de, değerleri ise Çizelge 3.20’de özetlenmiştir.

Yabanıl tip, heterozigot ve mutant genotipe sahip bireylerin doz normalize DKLZ düzeyleri ortalamaları ($\pm$ SS) sırasıyla 0,65 ng/ml/mg ($\pm$ 0,46); 0,66 ng/ml/mg ($\pm$ 0,39) ve 0,75 ng/ml/mg ($\pm$ 0,78). Heterozigot genotipe sahip olanların KLZ C/D sıra ortalamaları yabanıl ve mutant genotipe sahip olanlarınkinden sırasıyla %7,38 ve %2,69 daha fazladır.

DKLZ C/D değerleri normal dağılım göstermediğinden DKLZ C/D değerlerinin yabanıl, heterozigot ve mutant genotiplere göre karşılaştırılması parametrik olmayan test olan Kruskal- Wallis testi ile yapılmış ancak istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir ($p > 0.05$).

Çizelge 3.20. DKLZ C/D oranlarının *ABCB1* genotiplerine göre dağılımı

KLZ C/D Konsantrasyonu	Yabanıl Tip (CC) (Normal Taşıyıcı)	Heterozigot (CT) (Orta düzeyde taşıyıcı)	Mutant (TT) (Yavaş Taşıyıcı)
n	24	45	25
$\bar{x}$ (ng/ml/mg)	0,52	0,59	0,53
Min	0,11	0,06	0,11
Maks	1,98	1,8	4,12
	$\chi^2 = 0,273; P = 0,873$		



Şekil 3.25. *ABCB1* genotiplerine göre DKLZ C/D oran dağılımının saplı kutu grafiği ile gösterimi ($p>0.05$)

3.3.9.2. *UGT1A4**3 Polimorfizmi Genotiplerinin KLZ ve DKLZ Plazma Konsantrasyonlarına Etkisi

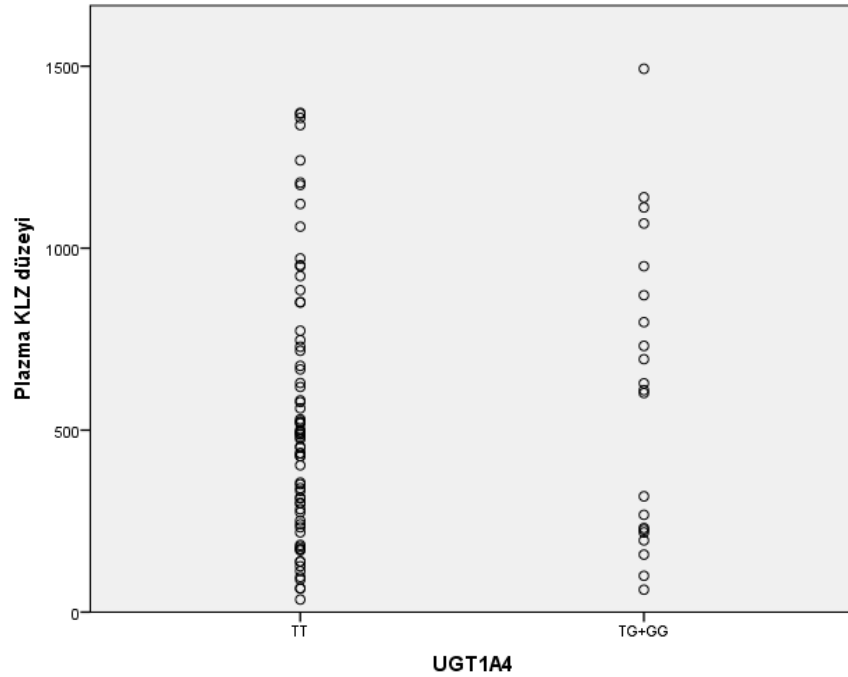
UGT1A4 geni için mutant genotipe sahip 3 birey olduğundan istatistiksel analizler yapılırken heterozigot ve mutant genotipe sahip bireyler birlikte analiz edilmiştir. *UGT1A4* yabanıl tip (TT), heterozigot (TG) ve mutant (GG) gruplarına göre plazma KLZ ve DKLZ, KLZ/ DKLZ oranları ile KLZ C/D ve DKLZ C/D düzeyleri Çizelge 3.21’de özetlenmiş, nokta dağılımları grafiği Şekil 3.26’da ve Şekil 3.27’de ise kutu grafiği ile gösterilmiştir.

Plazma KLZ düzeyleri yabanıl tip ile heterozigot ve mutant genotip grupları arasında normal dağılım göstermediğinden parametrik olmayan Mann- Whitney U Testi ile analiz edilmiştir. Genotipe göre plazma KLZ konsantrasyonları istatistiksel olarak farklılık göstermemektedir ($p>0,05$).

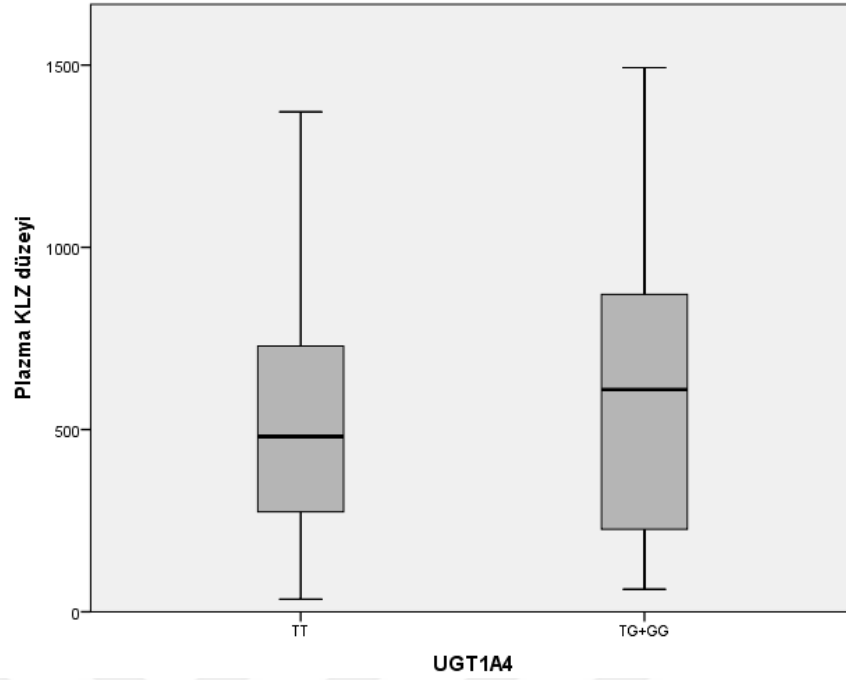
KLZ plazma konsantrasyonları ortalaması ($\pm$ SS) yabanıl ve heterozigot+ mutant genotip gruplarında sırasıyla 538,29 ng/ml ($\pm$ 357,82) ve 594,07 ng/ml ($\pm$ 408,64) olup plazma KLZ konsantrasyon sıra ortalaması heterozigot+ mutant grubunda yabanıl tipte olanlara göre %6,27 daha yüksektir.

Çizelge 3.21. KLZ plazma düzeylerinin *UGT1A4* genotiplerine göre dağılımı

KLZ Plazma Konsantrasyonu	Yabanıl Tip (TT) (Yavaş Konjuge Edici)	Heterozigot ve Mutant (TG+GG) (Normal Konjuge Edici)
n	73	21
$\bar{x}$ (ng/ml)	481,05	609,8
Min	34,57	61,6
Maks	1371,69	1492,96
$Z=-0,463$; $P= 0,643$		



Şekil 3.26. *UGT1A4**3 genotiplerine göre KLZ plazma konsantrasyonlarının dağılımı ($p>0,05$)



Şekil 3.27. *UGT1A4* genotiplerine göre KLZ plazma konsantrasyonlarının dağılımlarının saplı kutu grafiği ile gösterimi ($p>0,05$)

3.3.9.2.2. DKLZ Plazma Konsantrasyonları

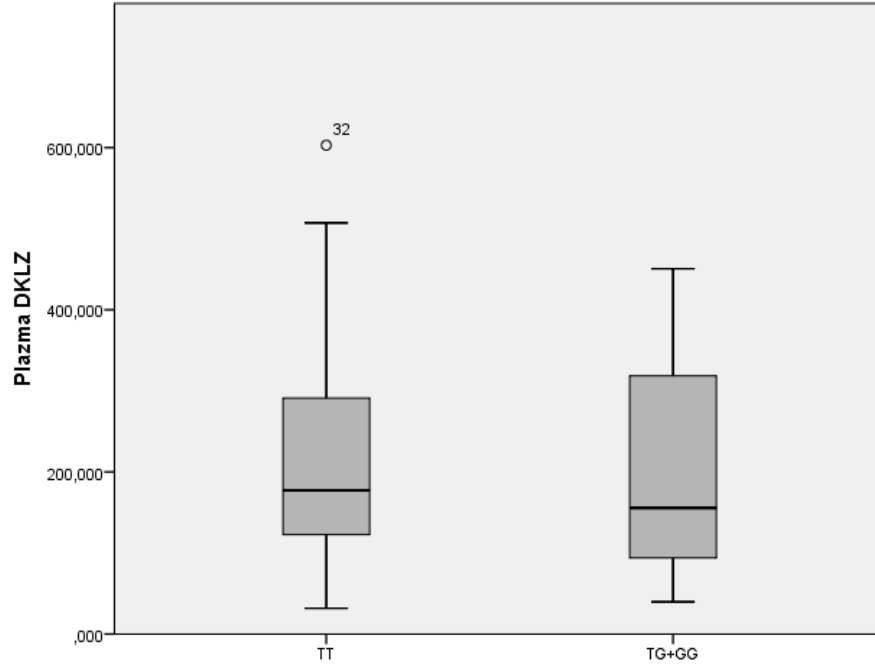
Plazma DKLZ düzeylerinin *UGT1A4* yabanıl tip (TT) ve heterozigot (TG) ile mutant (GG) gruplarına göre dağılımları Şekil 3.28’de ve plazma değerleri ise Çizelge 3.22’de gösterilmiştir.

DKLZ plazma konsantrasyonları ortalaması ($\pm$ SS) TT ve TG+GG genotip gruplarında sırasıyla 208,31 ng/ml ($\pm$ 123,23) ve 200,7 ng/ml ($\pm$ 123,86) olup plazma DKLZ konsantrasyon sıra ortalaması TT genotipine sahip olanlarda TG+GG grubunda olanlara göre %4,17 daha yüksektir.

Plazma DKLZ düzeyleri yabanıl tip ile heterozigot ve mutant genotip grupları arasında normal dağılım göstermediğinden parametrik olmayan Mann- Whitney U Testi ile analiz edilmiştir. Genotipe göre plazma KLZ konsantrasyonları istatistiksel olarak farklılık göstermemektedir ($p>0,05$).

Çizelge 3.22. DKLZ plazma düzeylerinin *UGT1A4* genotiplerine göre dağılımı

DKLZ Plazma Konsantrasyonu	Yabanıl Tip (TT) (Yavaş Konjuge Edici)	Heterozigot ve Mutant (TG+GG) (Normal Konjuge Edici)
n	73	21
$\bar{x}$ (ng/ml)	177,15	155,62
Min	31,77	39,8
Maks	602,9	450,49
	$Z=-0,295; P= 0,768$	



Şekil 3.28. DKLZ plazma konsantrasyonlarının *UGT1A4*3* genotiplerine göre kutu grafiği dağılımı ($p > 0,05$)

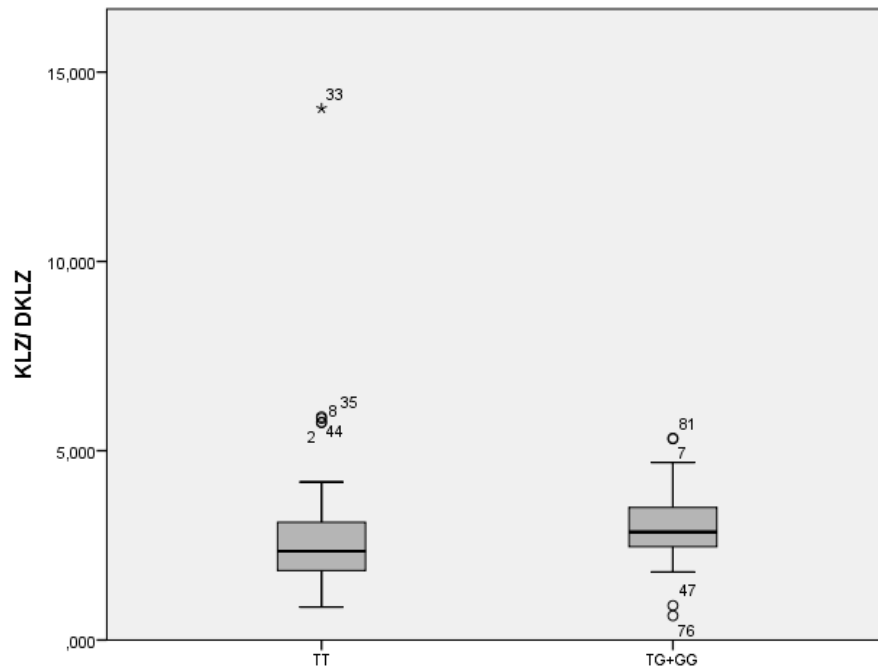
3.3.9.2.3. KLZ/DKLZ Plazma Konsantrasyon Oranları

UGT1A4 yabanıl tip (TT) ve heterozigot (TG) + mutant (GG) gruplarına göre KLZ/DKLZ plazma konsantrasyon oran değerleri ise Çizelge 3.23’de gösterilmiştir.

KLZ/ DKLZ plazma konsantrasyon oranlarının *UGT1A4* yabanıl (TT) ve heterozigot (TG) ile mutant (GG) genotiplerine göre dağılımı normal dağılım göstermediğinden Mann- Whitney U Testi ile analiz edilmiş, ancak TG+GG grubundakilerin KLZ/ DKLZ oranlarının sıra ortalaması TT genotipine sahip olan bireylerinkine göre %19,26 daha fazla olsa da iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir (Şekil 3.29) ($p>0,05$). KLZ/ DKLZ oranlarının ortalamaları ($\pm$ SS) TT ve TG+GG genotip gruplarında sırasıyla 2,72 ($\pm$ 1,74) ve 2,99 ($\pm$ 1,27)'dur.

Çizelge 3.23. *UGT1A4**3 genotiplerine göre KLZ/DKLZ plazma düzey oranlarının dağılımı

KLZ/ DKLZ	Yabanıl Tip (TT) (Yavaş Konjuge Edici)	Heterozigot ve Mutant (TG+GG) (Normal Konjuge Edici)
n	73	21
$\bar{X}$	2,35	2,85
Min	0,87	0,64
Maks	14,04	5,33
$Z=-1,593; P= 0,111$		



Şekil 3.29. *UGT1A4* genotiplerine göre KLZ/DKLZ oran dağılımına ait kutu grafiği ($p>0,05$)

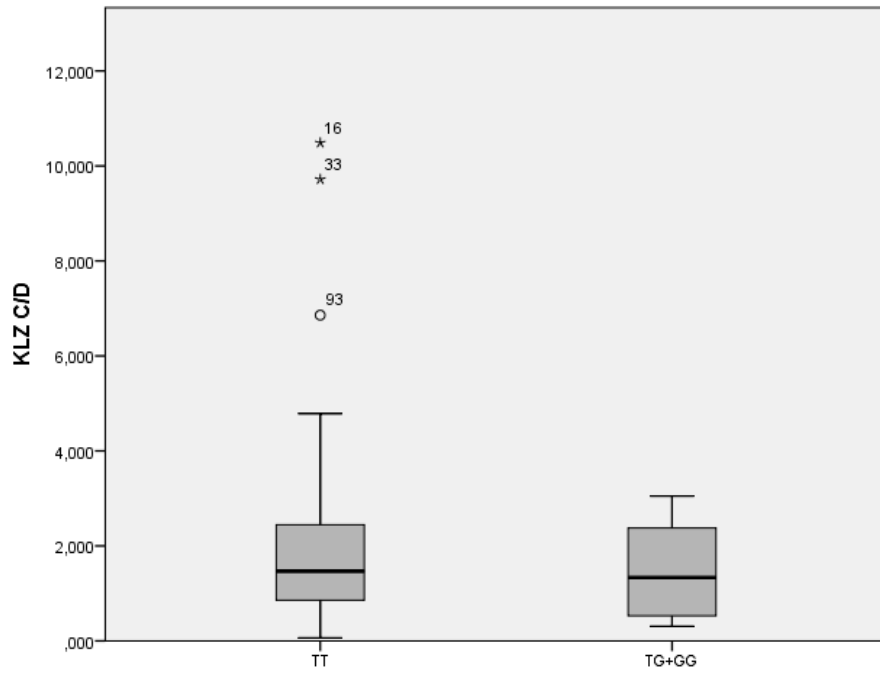
3.3.9.2.4. KLZ C/D Oranları

KLZ C/D düzeylerinin *UGT1A4* yabanıl tip (TT) ve heterozigot (TG) + mutant (GG) gruplarına göre değerleri Çizelge 3.24’de gösterilmiştir.

KLZ C/D düzeyleri ortalamaları ($\pm$ SS) TT ve TG+GG genotip gruplarında sırasıyla 1,97 ng/ml/mg ($\pm$ 1,87) ve 1,55 ng/ml/mg ($\pm$ 0,94)’dir. KLZ C/D değerleri gruplar arasında normal dağılım göstermediğinden parametrik olmayan Mann-Whitney U testi ile analiz edildiğinde TT genotipe sahip olan grubun KLZ C/D sıra ortalaması TG+GG genotipe sahip olan gruba göre %4,48 daha yüksek olsa da iki grubun KLZ C/D düzeylerinde istatistiksel açıdan bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$) (Şekil 3.30).

Çizelge 3.24. KLZ C/D oranlarının *UGT1A4**3 genotiplerine göre dağılımı

KLZ C/D	Yabanıl Tip (TT) (Yavaş Konjuge Edici)	Heterozigot ve Mutant (TG+GG) (Normal Konjuge Edici)
n	73	21
$\bar{x}$ (ng/ml/mg)	1,47	1,33
Min	0,06	0,31
Maks	10,49	3,05
	$Z=-0,318; P= 0,751$	



Şekil 3.30. *UGT1A4* genotiplerine göre KLZ C/D düzeylerinin dağılımına ait kutu grafiği ($p>0,05$)

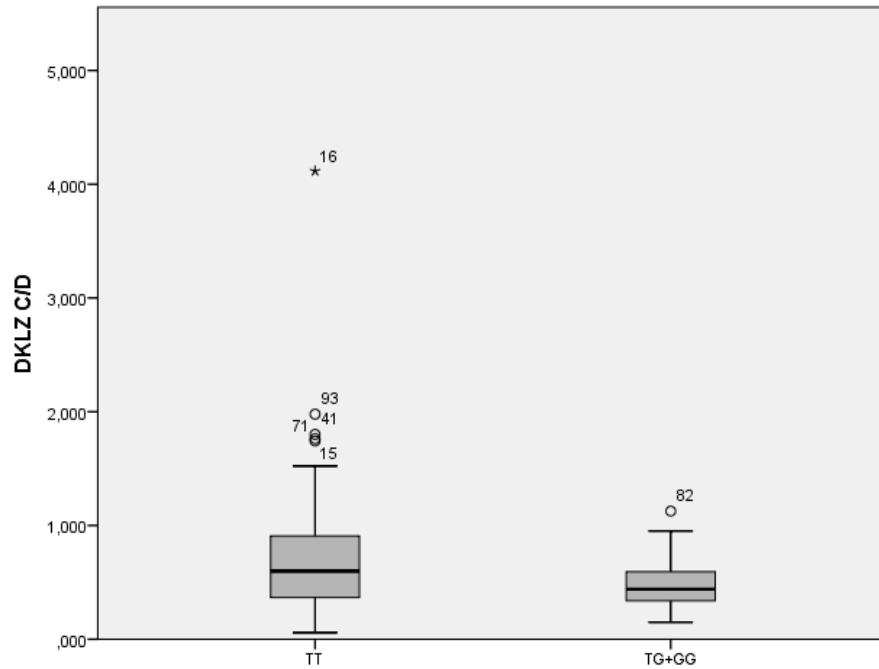
3.3.9.2.5. DKLZ C/D Oranları

DKLZ C/D düzeylerinin *UGT1A4* yabanıl tip (TT) ve heterozigot (TG) + mutant (GG) gruplarına göre değerleri Çizelge 3.25’de gösterilmiştir.

DKLZ C/D değerleri iki grup arasında (TT ve TG+GG) normal dağılım göstermediğinden parametrik olmayan Mann-Whitney U testi ile analiz edildiğinde iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ($p>0,05$) (Şekil 3.31). DKLZ C/D sıra ortalaması TT genotipine sahip olan gruptakilerde TG+GG genotipe sahip olan gruptakilere göre %22,38 daha yüksek olsa da iki grubun DKLZ C/D düzeylerinde istatistiksel açıdan farklılık göstermemektedir. DKLZ C/D düzey ortalamaları ($\pm$ SS) birinci (TT) ve ikinci (TG+GG) grupları için sırasıyla 0,73 ng/ml/mg ($\pm$ 0,58) ve 0,51 ng/ml/mg ($\pm$ 0,25)’dir.

Çizelge 3.25. DKLZ C/D oranlarının *UGT1A4*3* genotiplerine göre dağılımı

DKLZ C/D	Yabanıl Tip (TT) (Yavaş Konjuge Edici)	Heterozigot ve Mutant (TG+GG) (Normal Konjuge Edici)
n	73	21
$\bar{x}$ (ng/ml/mg)	0,59	0,44
Min	0,06	0,15
Maks	4,12	1,13
	$Z=-1,657; P= 0,098$	



Şekil 3.31. *UGT1A4* genotiplerine göre DKLZ C/D oranları dağılımına ait kutu grafiği ($p>0,05$)

3.3.9.3. *ABCB1* ve *UGT1A4* Genotip Kombinasyonlarının KLZ ve DKLZ Plazma Konsantrasyonlarına Etkisi

Çalışma popülasyonu içerisinde *ABCB1* yabanıl genotipi (CC) ve *UGT1A4* mutant (GG) genotipe sahip bireye rastlanmadığından, *ABCB1* yabanıl genotipi (CC) ve *UGT1A4* heterozigot (GT) genotipine sahip bireyler ve *ABCB1* mutant (TT) ile *UGT1A4* yabanıl tipe sahip (TT) bireyler olarak iki gruba ayrılmıştır. Bu iki gen

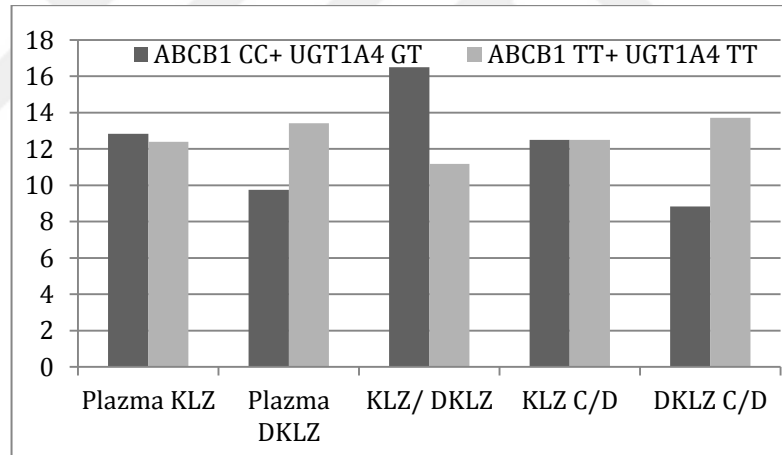
kombinasyonuna sahip bireylerin plazma KLZ ve DKLZ değerleri ise izelge 3.26’da ve düzeylerin sıra ortalamalarının karşılaştırılması şekil 3.32’de gösterilmiştir.

İki grup arasında KLZ ve DKLZ düzeyleri normal dağılım göstermediğinden iki gen kombinasyonuna sahip bireylerdeki KLZ ve DKLZ düzeyleri arasındaki farklılık parametrik olmayan Mann- Whitney U testi ile incelenmişir. KLZ C/D düzeylerinin sıra ortalaması her iki grup için eşit olup, DKLZ C/D düzeyleri sıra ortalamaları özellikle doz normalize DKLZ düzeyinin *ABCB1* TT+ *UGT1A4* TT grubunda *ABCB1* CC+ *UGT1A4* GT grubundakilere göre %34,65 daha yüksek olduğu KLZ/ DKLZ oranının ise tam aksine %32,3 *ABCB1* CC+ *UGT1A4* GT grubundakilerde daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak istatistiksel olarak KLZ ve DKLZ düzeyleri kombine iki grup arasında farklılık göstermemektedir ($p>0,05$).

Çizelge 3.26. *ABCB1* + *UGT1A4* gen kombinasyonlarına göre KLZ ve DKLZ plazma düzeyleri

Düzeyler	Değerler	<i>ABCB1</i> CC+ <i>UGT1A4</i> GT (Normal Metabolizasyon)	<i>ABCB1</i> TT+ <i>UGT1A4</i> TT (Yavaş Metabolizasyon)
Plazma KLZ	n	6	18
	$\tilde{x}$ (ng/ml)	463,96	428,39
	Min	218,8	65,34
	Maks	1139,7	1241,4
		$Z=-0,133; P=0,923$	
Plazma DKLZ	n	6	18
	$\tilde{x}$ (ng/ml)	131,25	183,55
	Min	74,17	33,38
	Maks	325,6	424,7
		$Z=-1,1; P=0,28$	
KLZ/DKLZ	n	6	18
	$\tilde{x}$	3,28	2,09
	Min	1,79	0,87

	Maks	5,33	5,75
		$Z=-1,6; P=0,119$	
KLZ C/D	n	6	18
	$\tilde{x}$ (ng/ml,mg)	1,69	1,43
	Min	0,45	0,22
	Maks	3,05	10,49
		$Z=0; P=1$	
DKLZ C/D	n	6	18
	$\tilde{x}$ (ng/ml,mg)	0,47	0,69
	Min	0,15	0,11
	Maks	0,65	4,12
		$Z=-1,467; P=0,156$	



Şekil 3.32. ABCB1 + UGT1A4 gen kombinasyonlarına KLZ ve DKLZ düzeylerinin karşılaştırılması

4. TARTIŞMA

Dünya genelinde 25 milyona yakın insanı etkileyen şizofreni hastalığı nörotransmitterlerdeki veya beyinde bölgesel işlev farklılıklarına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Kane MJ, 1996; WHO, 2003). Hastalarda gözlemlenen halüsinasyon, delüzyon, tutarsız konuşma ve davranış hareketleri pozitif belirtiler arasında yer alırken; irade kaybı, asosyal ve katatonik davranışlar, kendini ifade yeteneğinin azalması ise negatif belirtiler arasında yer almaktadır (DSM- V, 2013; Atbaşoğlu, 2009; Kane MJ, 1996). Hastalığın oluşum sebebi birçok nedene bağlı olabilmekte ve hastalığın derecesi ile belirtileri bireyler arasında farklılık gösterebilmektedir.

Hastalarda semptomlar benzerlik gösterse de tıbbi ve psikiyatrik geçmişleri, sosyoekonomik durumları, etnik kökenleri, eğitim düzeyleri, sosyal ilişkileri, beslenme alışkanlıkları, bilişsel davranışları birbirinden farklılık göstermektedir. Birçok ilaç tedavisinde görülebildiği gibi psikiyatri alanında farmakoterapide hastalara doğru ilaç uygun sürede ve dozda uygulansa dahi bazı hastalarda etkin tedavi sağlanamamakta veya istenmeyen etkiler ile karşılaşılabilir. Bu iki durumun oluşmasında ya hastalığın doğası ile ilgili ya da hastanın kendisi ile ilgili faktörler etkili olabilmektedir.

Şizofreninin tedavisinde farmakoterapi vazgeçilmez olup bunun yanı sıra bireysel ve grup tedavileri ile bireylerin tedavi edilmesi amaçlanmaktadır. Farmakoterapide kullanılan tipik ve atipik birçok antipsikotik bulunsada özellikle diğer antipsikotiklere direnç gösteren hastaların etkin tedavisinin sağlanmasında KLZ büyük önem taşımaktadır.

Dar terapötik aralığa sahip ve agranülositoz gibi mortalite ile sonlanabilecek ciddi bir advers etkiye neden olan KLZ tedavisinde klinisyenler hasta için en uygun tedaviyi sağlamaya büyük özen göstermektedir. Bunun içinde 20. yüzyılın sonuna doğru bireyselleştirilmiş tedavi uygulamaları klinik ve bilimsel alanlarda önem

kazanırken, son yıllarda da sağlık sigortası ve geri ödemeleri ile ilaç sektörü alanında da önemli hale gelmiştir (Steimer 2010, Evers 2009).

Psikofarmakoterapide etkin tedavinin sağlanamaması veya istenmeyen yan etkilerin gözlemlenmesinde bireyin beslenme ile sigara, kafein tüketim alışkanlıkları, kronik hastalığı, kullandığı ek ilaçlar gibi birçok çevresel faktör etkili olsada ilacın etkililiği üzerine, organizmadaki metabolizması ve bu metabolik yolda görev yapan proteinleri kodlayan gen bölgelerindeki farklılıklar da etkili olabilmektedir.

ABCB1 proteini hücre içinden hücre dışına ksenobiyotiklerin taşınmasında görev alarak onların sistemik dolaşıma katılmalarında görev yapmaktadır. Böylece organizmada hücresel ksenobiyotik birikimini engelleyerek koruma mekanizması sağlamaktadırlar (Broeks ve ark., 1996). Çalışmamızda da ABCB1 proteinin KLZ ve onun aktif metaboliti olan DKLZ taşınmasındaki etkisi, plazma KLZ ve plazma DKLZ düzeyleri karşılaştırılarak araştırılmıştır. ABCB1 proteinini kodlayan gen bölgesinde meydana gelebilen tek nükleotit farklılığının proteinin aktivitesinin azalması yönünde bir değişiklik meydana getirmesi ksenobiyotiklerin hücrede birikmesine neden olabilmektedir.

Gerçekleştirilen çalışma sonucunda ABCB1 proteinini kodlayan gen bölgesinde *C3435T* polimorfizminin varyant allel yüzdesi %51 olarak bulunmuştur. Her ırkın kendine özgü bir gen frekansı vardır ve *ABCB1 C3435T* polimorfizminin diğer şizofreni popülasyonlarındaki dağılımı Çizelge 4.1’de verilmiştir. Fisher exact test ile gerçekleştirilen çalışmaya ait allel frekansları ile diğer popülasyonlara ait allel frekansları karşılaştırılmıştır. Elde edilen allel frekansları Türklerinde arasında yer aldığı İtalyan, İsveç, Hırvat, Sloven, Fransız, Yunan gibi beyaz ırka ait olan şizofreni hastalarındaki allel frekansları ile uyumlu olarak bulunmuştur. Bununla birlikte analiz sonucunda çalışmamızdaki allel frekansları ile Akamine ve ark.’nın sarı ırk için Japon şizofreni hastalarında elde ettiği allel frekansları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık gözlemlenmiş olup *p* değerleri 0,046 olarak bulunmuştur. Bu da ırk faktörünün genotip üzerindeki etkisi ile açıklanabilmektedir.

Çizelge 4.1. *ABCB1* C3435T polimorfizminin allel ve genotip frekanslarının diğer populasyonlarda şizofreni gruplarında yapılan çalışmalar ile karşılaştırılması

Populasyon	n	Genotip Frekansı (%)			Allel Frekansı		Kaynak
		CC	CT	TT	C	T	
Türk	94	25,5	47,9	26,6	49	51	Mevcut çalışma
Türk	101	28,7	54,5	16,8	56	44	Anıl Yağcıoğlu ve ark., 2016
Hırvat	117	23,1	47,9	29	47	53	Bozina ve ark., 2006
Hırvat	101	22,2	50,9	26,9	48	52	Kuzman ve ark., 2008
Beyaz ırk	73	24,6	54,8	20,5	52	48	Sirot ve ark., 2009
İtalyan	60	25	45	35	45	55	Consoli ve ark., 2009
İsveç	112	18,8	45,5	35,7	42	58	Ghotbi ve ark., 2010
İsveç	95	34	52	15	59	41	Olsson ve ark., 2015
Sloven	59	15,3	45,8	39	38	62	Kastelic ve ark., 2010
Hırvat	101	25,7	45,6	29,7	48	52	Kuzman ve ark., 2011
Fransız	26	7,7	57,7	34,6	37	63	Mouaffak ve ark., 2011
Yunan	71	21,1	53,5	25,4	48	52	Papazisis ve ark., 2017
Karışık	137	n/a	n/a	n/a	62	38	Piatkov ve ark., 2017
Japon*	45	37,8	53,4	8,8	64	36	Akamine ve ark., 2017

*Fischets exact test için $p < 0,05$.

KLZ ve metabolitlerinin glukuronidasyonunda görev alan UGT enzimi lipofilik haldeki ksenobiyotiklerin faz II reaksiyonlarını katalizleyerek onların hidroksil, karboksil, amino veya tiyol grubu üzerinden glukuronik asit eklemekte ve ksenobiyotiklerin hidrofilik hale gelmesini sağlayarak atılımlarını kolaylaştırmaktadır (Ehmer ve ark., 2004; Radominaska- Pandya ve ark., 1999; Tukey ve Strassburg, 2000). *UGT1A4* gen bölgesinde ekzon 1'de *T142G* polimorfizmi sonucunda 48. aminoasitte lösin yerine valin aminoasiti kodlanmakta (Leu48Val, L48V) ve buna bağlı olarak enzimin substrata olan ilgisi değişiklik gösterebilmekte ve ksenobiyotiklerin organizmadan atılımları değişkenlik gösterebilmektedir (Benoit-Biancamano ve ark., 2009; Ghotbi ve ark., 2010; Ehmer ve ark., 2004). Bu polimorfizm aynı zamanda *UGT1A4*3* olarak tanımlanmaktadır.

UGT1A4*3 polimorfizmi için çalışmamızda varyant allel frekansı %13 olarak bulunmuş olup diğer şizofreni popülasyonlarındaki allel ve genotip frekansları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Fisher exact test ile gerçekleştirilen çalışmaya ait allel frekansları ile diğer popülasyonlara ait allel frekansları karşılaştırılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen allel frekansları beyaz ırk içerisinde yer alan İsveçli ve Norveçli diğer şizofreni hastalarının allel frekansları ile benzerlik göstermektedir ($p>0,05$).

Çizelge 4.2. UGT1A4 L48V polimorfizminin allel ve genotip frekanslarının diğer popülasyonlarda şizofreni gruplarında yapılan çalışmalar ile karşılaştırılması

Çalışma Grubu	n	Genotip Frekansı (%)			Allel Frekansı		Kaynak
		TT	TG	GG	T	G	
Türk	94	77,7	19,1	3,2	87	13	Mevcut çalışma
İsveç	112	74,1	25,9	-	87	13	Ghotbi ve ark., 2010
Norveç	558	82,1	16,1	1,8	90	10	Haslemo ve ark., 2012
İsveç	95	88	11	1	94	6	Olsson ve ark., 2015

KLZ dar teröpatik aralığa sahip antipsikotikler arasında yer almakta ve plazma düzeyinin 350- 600 ng/ml arasında olması hedeflenmektedir (Hiemke ve ark., 2011; Fang ve Mosier, 2014). Plazma düzeyinin 600- 1000 ng/ml arasında veya daha üzerinde olması bireylerde baş ağrısı, baş dönmesi, uyuşukluk, sedasyon, kilo alımı gibi birçok advers etkinin hastalarda gözlemlenmesine neden olabilmektedir (Bell ve ark., 1998; Couchman ve ark., 2010; Kohlrausch, 2013; Patel ve ark., 2014). Advers etkilerin çoğu hastalar ile yapılan görüşmelerde alınan anamnezler ile klinisyenler tarafından belirlenebilmekte ve klinisyen aldığı yanıtlar doğrultusunda doz ayarlaması yapabilmektedir. Mortalite ile sonuçlanabilecek advers etkilerin önlenmesi için KLZ kullanan hastalarda düzenli KLZ plazma düzeyinin klinisyenler tarafından kontrol edilmesiyle advers etki riski azaltılabilmektedir (Kane, 1996; Flanagan ve Dunk, 2008).

Gerçekleştirilen çalışmada 94 bireye ait plazma KLZ plazma konsantrasyon ortalaması ($\pm$ SS) 550,70 ng/ml ($\pm$ 368,21), DKLZ plazma konsantrasyon ortalaması

206,61 ng/ml ($\pm 122,74$), plazma KLZ/DKLZ konsantrasyon oran ortalaması 2,78 ($\pm 1,65$), doz normalize KLZ C/D ortalaması 1,88 ng/ml/mg ($\pm 1,70$) ve DKLZ C/D plazma konsantrasyon ortalaması ise 0,68 ng/ml/mg ($\pm 0,53$) olarak bulunmuştur.

KLZ ile tedavide hastalar aynı doz ile tedavi edilse dahi hastaların plazma KLZ düzeyleri birbirinden 5-8 kat arasında farklılık gösterebilmekte ve KLZ'nin metabolizma hızı da bireyler arasında 50 kat farklılık gösterebilmektedir (Couchman ve ark., 2010; do Carmo Borges ve ark., 2012). Çalışmamızda plazma KLZ/ DKLZ oran ortalaması 2,78 ($\pm 1,65$) olarak bulunmuştur. Couchman ve ark (2010) 85958 bireyde KLZ/ DKLZ oranını 0,5-3 arasında bulmuşlardır (Couchman ve ark., 2010). Rostami- Hodjegan ve ark. (2004), gerçekleştirmiş oldukları çalışmada KLZ/ DKLZ oranını ortalama olarak 1,32 bulmuşlar ve KLZ/ DKLZ oranı için bu değer referans olarak alındığında bu orandaki her bir 0,1'lik değişimin KLZ plazma konsantrasyonunu $\pm$ %8 etkileyebileceği sonucuna varmışlardır (Rostami- Hodjegan ve ark., 2004).

Hastalar çoğu zaman psikiyatristlerin önerdiği doza uyum göstermeyebilmekte veya sigara, kafein gibi KLZ metabolizmasına etki edebilecek maddeleri kullanım miktarları hakkında psikiyatristlere tam doğru bilgi vermeyebilmektedir (Llorca ve ark., 2002; Kohlrausch, 2013). Bu durumda KLZ metabolizmasına etki eden biyolojik ve çevresel faktörler psikiyatristlerin bireyler için en uygun dozu belirlemede zorluklar yaşamasına yol açabilmektedir. Böyle bir durumda en iyi klinik değerlendirmenin yapılabilmesi için uygulanan doza bağlı gelişebilecek yan etkileri en aza indirgeyerek, hastanın yaşam kalitesi artırılarak en uygun tedavinin hastaya sunulabilmesinde; plazma ilaç düzeylerinin belirlenerek çevresel ve biyolojik faktörler ile birlikte değerlendirmesi sonucunda yarar - zarar oranının belirlenerek bireye özgü en uygun dozun belirlenmesi önemlidir.

Bireylerde yaşın artmasıyla metabolizma hızı yavaşladığından yaşlı olan bireylerde, KLZ ve metaboliti daha az yavaş katalizleneceğinden, KLZ plazma düzeyi genç bireylere göre daha yüksek olabilmektedir. Dolayısıyla, bireylerde ilaç

dozunun ayarlanmasında yaş da göz önüne alınması gereken etmenlerden biridir (Gareri ve ark., 2008; Couchman ve ark., 2010). Gerçekleştirmiş olduğumuz çalışma sonunda bireyler 20-44 yaş aralığında ve 45-62 yaş aralığında olanlar olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Çalışma sonucunda 20-44 ve 45-62 yaş aralığında olan grupların KLZ C/D düzey ortancaları (Min; Maks) sırasıyla 1,23 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 9,72 ng/ml/mg) ve 2,28 ng/ml/mg (0,22 ng/ml/mg; 10,49 ng/ml/mg) olarak bulunurken, DKLZ C/D düzey ortancaları sırasıyla 0,52 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 1,76 ng/ml/mg) ve 0,65 ng/ml/mg (0,11 ng/ml/mg; 4,12 ng/ml/mg) olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar literatür ile uyumlu olup 45-62 yaş aralığındaki bireylerin bulunduğu grupta, 20-44 yaş aralığındaki gruba göre istatistiksel olarak hem KLZ C/D hem de DKLZ C/D düzeylerinin yüksek olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar yaşın artması ile birlikte metabolizmanın bireylerde yavaşlamasının göstergesidir. Aynı zamanda KLZ ve DKLZ düzeylerinin yaşın yüksek olduğu grupta daha yüksek olması, yaş artışıyla KLZ ve DKLZ'nin glukuronidasyonunda görev alan UGT1A4 enzim aktivitesinin azaldığının bir göstergesi olabilir. Yapılan bazı çalışmalarda yaşın UGT1A4 aktivitesini etkileyebileceği görülmüştür (Court, 2010). Bu veriler sonucunda psikiyatristlerin hastalar için uygun dozu belirlerken yaşı göz önüne alarak doz rejimi uygulaması önerilmektedir. Ayrıca literatürde bazı çalışmalarda yaş ile KLZ plazma düzeyleri arasında doğru orantılı bir ilişki saptanmıştır. Lane ve ark. (1999), yaştaki her bir yıllık artışın KLZ ve DKLZ plazma düzeylerini sırasıyla %1.1 ve %1 artırdığını belirtmiş (Lane ve ark., 1999); Rostami-Hodjegan ve ark. (2004), ise 40 yaş referans olarak kullanıldığında bireylerin yaşındaki her bir beş yıllık farkın KLZ plazma konsantrasyonunu $\pm$ %4 oranında etkilediğini bulmuşlardır (Rostami- Hodjegan ve ark., 2004). Literatürde yer alan bazı çalışmalarda ise yaşın KLZ plazma düzeyi üzerinde bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır (Özdemir ve ark., 2001; Palego ve ark., 2002; Rajkumar ve ark., 2013).

Genellikle kadınlarda yağ dokusu erkeklere göre daha fazla olmakta ve bu nedenle ilaç dağılımı daha uzun süreceğinden ilaç yarılanma ömrü uzamakta ve kadınlarda ilaç plazma konsantrasyonları erkeklere göre daha yüksek olabilmektedir (Couchman ve ark., 2010; Palego ve ark., 2002; Rostami- Hodjegan ve ark.,2004).

Çalışmamızda kadın ve erkeklerdeki KLZ C/D ortancası (Min; Maks) sırasıyla 1,63 ng/ml/mg (0,21 ng/ml/mg; 10,89 ng/ml/mg) ve 1,37 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 9,72 ng/ml/mg) olarak bulunurken; DKLZ C/D ortancaları ise sırasıyla 0,55 ng/ml/mg (0,11 ng/ml/mg; 4,12 ng/ml/mg) ve 0,59 ng/ml/mg (0,05 ng/ml/mg; 1,8 ng/ml/mg) olarak tespit edilmiştir. KLZ/ DKLZ oranı ortancalarına (Min; Maks) baktığımızda ise kadınlarda 2,70 (0,91; 5,75), erkeklerde ise 2,38 (0,64; 14,04). Literatür ile uyumlu olarak sonuçlarımızda kadınlarda KLZ dağılımı erkeklere göre daha uzun sürebildiğinden ilaç yarılanma ömrünün kadınlarda erkeklere göre daha uzun olabileceği ve bu nedenle kadınlarda KLZ/ DKLZ oranının daha yüksek olmuş olabileceğini söyleyebiliriz. Literatürde cinsiyetin ilaç KLZ düzeyine etki etmediğini gösteren çalışmalar (Rajkumar ve ark., 2013) mevcut olsa da Lane ve ark. (1999), kadınlarda erkeklere oranla KLZ ve DKLZ plazma düzeylerinin sırasıyla %34,9 ve %36,3 daha yüksek olduğunu (Lane ve ark., 1999); Anderson ve ark. (2015) da KLZ uygulanan hastalarda kadınların KLZ plazma düzeylerinin erkeklerinkine göre daha yüksek olduğunu bulmuş ancak cinsiyete göre DKLZ düzeyleri arasında bir farklılık bulamamışlardır (Anderson ve ark., 2015). Rostami- Hodjegan ve ark. (2004), KLZ metabolik aktivitesinin kadınlarda daha yavaş olduğunu ve dolayısı ile KLZ plazma konsantrasyonunun kadınlarda erkeklere göre %17 daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir (Rostami- Hodjegan ve ark., 2004). Bizim çalışmamızda da Rajkumar ve ark. (2013), gibi istatistiksel anlamlılık gözlemlenmese de literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu olarak cinsiyete göre KLZ düzeyleri kadınlarda erkeklere göre daha yüksek bulunmuştur bu da kadınlarda KLZ metabolizmasının daha yavaş olduğunun göstergesi olabilir. Ayrıca kadınlarda UGT1A4 aktivitesinin daha az olabileceği gösterilmiş olup bizim bulgularımızda da literatür ile tutarlı olarak kadınlarda plazma düzeyleri daha yüksek olup metabolizması daha yavaştır (Court, 2010). Sonuç olarak bireye özgü dozun belirlenmesi esnasında cinsiyete de dikkat edilerek uygun doz rejimi uygulanması önerilmektedir.

Ağırlığın artışına bağlı olarak metabolizma hızı daha büyük bir karaciğer varlığıyla artış gösterse de dağılım hacmi yavaş olacağından ilaçların plazma yarılanma ömrünü uzaması dolayısıyla da beden kitle indeksindeki (BKİ) artışa bağlı olarak az da olsa plazma ilaç düzeyinin artması beklenmektedir (Couchman ve ark.,

2010; Rostami- Hodjegan ve ark., 2004). Doksan dört kişilik şizofreni grubumuzun BKİ <25 olanlarda KLZ C/D ve DKLZ C/D ortancaları (Min; Maks) sırasıyla 1,4 ng/ml/mg (0,21 ng/ml/mg; 4,77 ng/ml/mg) ve 0,53 ng/ml/mg (0,11 ng/ml/mg; 1,74 ng/ml/mg) olarak bulunmuş; BKİ >25 olanlarda ise bu değerler sırasıyla 1,53 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 10,49 ng/ml/mg) ve 0,59 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 1,76 ng/ml/mg) olarak tespit edilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda BKİ'deki artışla KLZ C/D ve DKLZ C/D düzeylerinin arttığı tespit edilmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilememiştir. Rostami- Hodjegan ve ark. (2004), ortalama kiloyu 80 kg olarak aldığından ağırlıktaki her bir 10 kg'lık değişimin KLZ plazma konsantrasyonunu $\pm$ %5 değiştirebileceğini belirtmişlerdir (Rostami- Hodjegan ve ark., 2004). Bunun gibi BKİ'nin plazma KLZ veya DKLZ düzeyi ile ilişkili olabileceğini gösteren çalışmalar mevcut olsa da (Anderson ve ark., 2015) BKİ'nin plazma düzeylerine etkisinin olmadığını gösteren çalışmalarda literatürde mevcuttur (Lane ve ark., 1999; Özdemir ve ark., 2001; Palego ve ark., 2002).

Gerçekleştirilen bir çalışmada ayakta tedavi gören psikiyatri hastaları ile normal popülasyonun sigara kullanma eğilimleri karşılaştırıldığında psikiyatri hastalarının eğiliminin 1,6 kat daha fazla olduğu ve özellikle de şizofreni, depresyon, kişilik bozukluğu, anksiyete ve mani olan bireylerde sigara kullanımının daha yüksek olduğu saptanmıştır (Hughes ve ark., 1986). KLZ'nin metabolizmasında görev alan major enzim CYP1A2 olup tütün ürünleri CYP1A2'yi indükleyerek KLZ N-demetilasyonunu artırarak KLZ metabolizmasının hızlanmasına ve plazma KLZ düzeyinin azalmasına neden olmaktadır (Zullino ve ark.,2002; Rostami- Hodjegan ve ark., 2004). Bunun yanı sıra yapılan çalışmalarda UGT1A4'ün nikotinin glukuronidasyonunda görev aldığı gösterilmiştir (Nakajima ve ark., 2005; Wassenaar ve ark., 2015) ve sigara tüketiminin UGT1A4 enzim aktivitesini indüklediği gösterilmiştir (Court, 2010). Bizim çalışmamızda da sigara tüketiminin çok olduğu grupta plazma düzeyleri daha düşük bulunmuş olup bunun sigaranın CYP1A2'nin yanı sıra UGT1A4 üzerine olan etkisinden de kaynaklanmış olabileceğini söyleyebiliriz. Haslemo ve ark. (2006), şizofreni çalışma grubunda yaptıkları araştırma sonucunda günde 7-12 arasında sigara kullanımının KLZ plazma metabolizmasını maksimum oranda indüklediği ve serum KLZ konsantrasyonunu

%50 oranında azalttığını belirtmişlerdir. Yaptığımız çalışmada hastalar hiç içmeyenler ve günde 7'den az içenler ile 7'den fazla sigara kullananlar olmak üzere iki gruba ayrılarak plazma KLZ ve DKLZ düzeyleri incelenmiştir. Veriler sonucunda hiç içmeyenler ile günde 7'den az kullananlarda ve 7'den fazla sigara tüketenlerde KLZ C/D düzeyleri ortancaları (Min; Maks) sırasıyla 1,73 ng/ml/mg (0,21 ng/ml/mg; 10,49 ng/ml/mg) ve 1,19 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 9,72 ng/ml/mg) olarak DKLZ C/D düzeylerinin ise sırasıyla 0,59 ng/ml/mg (0,18 ng/ml/mg; 4,12 ng/ml/mg) ve 0,4 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 1,52 ng/ml/mg) olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlardan sigara kullanımının artmasıyla KLZ ve DKLZ düzeylerinin azaldığı görülmektedir bunun da CYP1A2'nin sigara kullanımına bağlı indüklenmesi sonucu meydana gelmiş olabileceğini söyleyebiliriz. Sonuçlar literatür ile uyumludur ancak istatistiksel anlamlılık mevcut değildir. Van der Wiede ve ark. (2003), sigara kullanan hastalarında plazma KLZ düzeylerinin sigara kullanmayanlara göre 2,4 kat daha düşük olduğunu bulmuşlar ve sigara kullananlara uygulanacak olan dozun sigara içmeyenlere göre yaklaşık 1,9 kat daha yüksek dozda verilmesini önermektedirler (Van der Wiede ve ark., 2003). Rostami- Hodgegan ve ark. (2004), sigara kullananlara uygulanan KLZ dozunun kullanmayanınkilere göre daha yüksek olsa da plazma KLZ ve DKLZ düzeylerinin daha düşük olduğunu KLZ/ DKLZ metabolik oranı karşılaştırıldığında sigara içenlerde oran daha yüksek bulunmuştur. Metabolik hızın yüksek olmasını sigaranın CYP1A2'yi indükleyerek KLZ N-demetilasyonunu artırması sonucu olabileceği varsayımında bulunmuşlardır (Rostami- Hodgegan ve ark., 2004). Çinli şizofreni grubunda sigara içen erkekler ile sigara tüketmeyen erkeklerde KLZ C/D ve DKLZ C/D oranları sigara içen grupta daha düşük bulunmuştur (Tang et al., 2007). Çalışmamızda KLZ/ DKLZ oran ortancaları 7'den fazla sigara tüketenlerde (Min; Maks) 2,27 (0,87; 14,04); 7'den az ve hiç içmeyenlerin bulunduğu grupta 2,61 (0,64; 5,89) bulunmuştur. Bu da Rostami- Hodgegan ve ark. (2004)'nın sonuçları ile uyumlu olup 7'den fazla sigara tüketen grupta KLZ metabolizmasının daha hızlı olduğunu göstergesidir. Lowe and Ackman ise yaptıkları çalışma sonucunda sigara tüketen grupta tüketmeyenlere göre daha yüksek dozda KLZ uygulansa dahi bu bireylerde plazma KLZ ve DKLZ düzeylerinin daha düşük olduğunu göstermişler. Sigara kullanımının bırakılması sonucunda CYP1A2 aktivitesi azalacağından hastalarda KLZ plazma düzeyinin artış

gösterebileceğini ve KLZ dozunun %30-%40 oranında azaltılacak şekilde yeniden doz ayarlanması yapılabileceğini önermektedirler (Lowe and Ackman, 2010). Faber ve Fuhr (2004), günde 20'nin üzerinde sigara kullanan bireylerin sigarayı bırakması sonucu 38,6 saatte CYP1A2 indüklenmesinin yarı yarıya azaldığını belirtmişlerdir. Buna bağlı olarak hastaların sigarayı azaltması veya tamamen kullanımına son vermesi durumunda CYP1A2 ile katalizlenen ve dar güven aralığına sahip olan KLZ'nin bu gibi durumlarda yeniden doz ayarlamasının yapılması gerektiğini önermektedirler (Faber ve Fuhr, 2004). Cormac ve ark. (2010), gerçekleştirdikleri retrospektif çalışmada 48'i sigara kullanan toplam 51 kişilik deney grubunda 2 kişinin plazma KLZ düzeyi 1000 µg/mL'iken, tüm bireylerde sigara yasaklandıktan üç ay ve altı ay sonra KLZ plazma düzeylerini kontrol ettiklerinde üç ay sonunda hastaların 14'ünün, altı ay sonra ise 20'sinin plazma KLZ düzeylerinin 1000 µg/mL'nin üzerinde olduğu saptanmıştır (Cormac ve ark., 2010). Sonuç olarak CYP1A2'nin sigara kullanımının artmasıyla indüklendiği ancak kullanımı azaltıldığında veya bırakıldığında CYP1A2'nin indüklenmesinin düştüğü bu nedenle hastaların sigara kullanımı ve KLZ plazma düzeyleri düzenli olarak takip edilerek yeni doz ayarlamalarının yapılması önerilmektedir. Bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlar Rostami- Hodjegan ve ark.,'nın bulguları ile tutarlılık gösterip CYP1A2'nin veya UGT1A4'ün sigara ile indüklenmesi sonucu olabileceğini söyleyebiliriz.

Kahve, çay, kola gibi kafein içeren içecekler yorgunluğu giderdiği, iş yapma kapasitesini artırdığı ve ruhsal durum yükselmesine neden olduğu için tercih edilmektedir. KLZ'nin yanı sıra kafeinde CYP1A2'nin substratıdır (Carrillo ve Benitez, 2000). KLZ'nin CYP1A2'ye olan afinitesi kafeininkinden daha yüksek olsa da kafein miktarının artmasıyla kafeinin CYP1A2'ye daha çok bağlanmakta ve KLZ metabolizması yavaşlayabilmektedir. Bu durumda kafein CYP1A2 üzerinde inhibe edici etki gösterip KLZ plazma düzeyinin artmasına neden olabilmektedir (Bertilsson ve ark., 1994; Carrillo ve Benitez, 2000). Çalışma grubumuzda bireyleri günde <0,4 g'da az kullananlar ve 0,4 g'dan çok kafein kullananlar olmak üzere grupladığımızda KLZ C/D düzeyleri ortancaları (Min; Maks) sırasıyla 1,73 ng/ml/mg (0,3 ng/ml/mg; 10,49 ng/ml/mg) ve 1,13 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 9,72 ng/ml/mg); DKLZ C/D 0,62 ng/ml/mg (0,25 ng/ml/mg; 4,12 ng/ml/mg) ve 0,52 ng/ml/mg (0,06

ng/ml/mg; 1,98 ng/ml/mg) olarak bulunmuştur. KLZ/ DKLZ oranları ortanca (Min; Maks) değerleri ise <0,4 g'dan az kullananlarda 2,62 ng/ml/mg (0,64 ng/ml/mg; 5,9 ng/ml/mg) ve >0,4 g'dan fazla kullananlarda 2,3 ng/ml/mg (0,87 ng/ml/mg; 14,04 ng/ml/mg) bulunmuştur. Carrillo ve ark. (1998), KLZ kullanan hastalara beş günlük kafeinden yoksun diyet uyguladıklarında KLZ plazma konsantrasyonunun yaklaşık %47 oranında azaldığını bulmuşlar ve KLZ tedavisi uygulamasında hastaların günlük kafein kullanım miktarının da göz önüne alınarak düzenlenmesi gerektiğini önerisinde bulunmuşlardır (Carrillo ve ark., 1998). Hagg ve ark. (2000), ise 12 sağlıklı birey 12,5 mg KLZ ve 400- 1000 mg kafein verdiklerinde kafeinin CYP1A2'yi inhibe ederek KLZ atılımını azalttığını göstermişlerdir (Hagg ve ark., 2000). Raaska ve ark. (2004), ise kafein kullanımının CYP1A2'yi inhibe etmesi sonucunda serum KLZ ve DKLZ konsantrasyonlarının sırasıyla %26 ve %7 oranında artabileceğini belirtmişlerdir (Raaska ve ark., 2004). Literatürdeki bu verilerin yanı sıra Rajkumar ve ark. (2013), gerçekleştirdikleri çalışmada CYP1A2 aktivitesini inhibe ederek, 250 mg/gün altında tedavi dozu uygulanan hastaların %73,3'de serum KLZ düzeyinin yetersiz kalabileceğini göstermişlerdir. Bizim bulgularımız da istatistiksel olarak anlamlı olmasa da Rajkumar ve ark. (2004), bulguları ile tutarlı olup, plazma KLZ ve DKLZ düzeyleri kafein tüketimi fazla olan grupta daha düşük bulunmuştur (Rajkumar ve ark., 2004). Rajkumar ve ark. (2004) kahve tüketiminin genellikle sigara tüketimi ile birlikte olduğunu ve ikisinin beraber CYP1A2 üzerindeki etkisinin daha detaylı incelenmesini ve kafein haricindeki diğer içeceklerden de gelebilecek CYP1A2 etkisinin daha detaylı incelenmesi gerektiğini önermektedirler (Rajkumar ve ark., 2004). Bizim çalışmamızdaki verilere bakıldığında sigara kullanımının çok olduğu grupta kafein tüketiminde arttığı bireylerde gözlemlenmiştir. Bundan yola çıkarak kafein tüketiminin çok olduğu bireylerde sigara tüketiminden kaynaklanabilecek bir indüksiyona bağlı gelişebilecek düşük plazma değerlerine rastlanmış olabileceğini düşünebiliriz. Elde edilen veriler dikkate alındığında KLZ kullanan hastalarda kafein tüketiminin de hasta için en uygun dozun belirlenmesinde önemli bir etkiye sahip olabileceğini ve klinisyenin uygun doz seçimini belirlemede kafein kullanımının CYP1A2 üzerindeki etkisinin de göz önünde bulundurulması önerilmektedir.

KLZ gibi özellikle de dar terapötik aralığa sahip ilaçlarda etkin tedavinin sağlanması, advers ve yan etkilerin en aza indirgenebilmesi için yukarıda yer alan çevresel ve biyolojik etmenlerin yanı sıra ilaç metabolizmasında görev alan enzim ve proteinlerdeki genetik farklılıkların da tanımlanarak kliniğe uyarlanması bireysel etkin tedavinin sağlanmasında büyük önem taşımaktadır.

Wang ve Sadée (2006) *in vitro* ortamda gerçekleştirdikleri deneyde 3435. pozisyonda T allelinin bulunduğu durumlarda mRNA stabilitesinin 1,5 ile 2 kat arasında azaldığını ve protein düzeyinde azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir (Wang ve Sadée, 2006). Farelerde yapılan *in vitro* çalışmada, P-gp'nin substrat olarak DKLZ'e olan ilgisinin KLZ'e göre olan ilgisinden daha fazla olduğu ve *ABCB1* geninden yoksun olan farelerin beyinlerinde DKLZ konsantrasyonunun 8,8 kat artmış olduğu bulunmuştur (Schmitt ve ark., 2012). Bu çalışma sonucunda da CC, CT ve TT genotipine sahip olan bireylerde KLZ C/D düzeyi ortancaları (Min; Maks) 1,18 ng/ml/mg (0,42 ng/ml/mg; 6,86 ng/ml/mg), 1,62 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 9,72 ng/ml/mg) ve 1,41 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 10,49) olarak bulunmuştur. Bulgulara göre KLZ C/D düzeyi TT genotipe sahip olanlarda CC genotipine sahip olanlara göre daha yüksek olduğundan KLZ taşınmasının TT genotipine sahip olanlarda azalmış olabileceğini söyleyebiliriz. Çalışmamızda da *ABCB1* C3435 polimorfizminin DKLZ C/D düzeyi ile arasındaki ilişki araştırıldığında CC, CT ve TT genotipine sahip bireylerdeki DKLZ C/D düzeyi ortancaları (Min; Maks) 0,52 ng/ml/mg (0,11 ng/ml/mg; 1,98 ng/ml/mg), 0,59 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 4,12 ng/ml/mg) ve 0,53 ng/ml/mg (0,11 ng/ml/mg; 4,12 ng/ml/mg) olarak bulunmuştur. Bulgularımız sonucunda TT genotipine sahip bireylerde CC genotiplilerle karşılaştırıldığında KLZ'de olduğu gibi DKLZ taşınmasında azalma meydana geldiği görülmüştür. Hoffmeyer ve ark. (2000), gerçekleştirdikleri *in vivo* deney sonucunda *ABCB1* gen bölgesinde 3435. pozisyonda TT genotipine sahip bireylerde CC genotipine sahip olanlara göre MDR1 ekspresyonunun 2 kat daha az olduğu ve ilaç plazma düzeylerinin 4 kat daha fazla olduğunu bulmuştur (Hoffmeyer ve ark., 2000). Sirot ve ark. (2009), 75 İsviçreli şizofreni hastasında yapmış oldukları çalışmada 3435TT genotipine sahip olan

bireylerde ortalama KLZ plazma konsantrasyonunun CC genotipine sahip olan bireylere göre 1,6 kat daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (Sirot ve ark., 2009).

Consoli ve ark. (2009), 60 kişilik KLZ kullanan İtalyan şizofreni hastasında *ABCB1* için CC genotipine sahip bireylerin KLZ düzeylerinin CT veya TT genotipine sahip olan bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğunu bulmuşlardır. CC genotipine sahip bireylerde ilaç plazma düzeylerinin istenilen düzeye ulaşması ve ilaçtan maksimum yararlanım elde edilebilmesi için günlük KLZ dozunun diğer genotipe sahip bireylerinkine göre daha fazla olması gerektiğini önermişlerdir (Consoli ve ark., 2009). Akamine ve ark. (2017), ise 45 Japon hastada yaptıkları çalışmada CC genotipine sahip bireylerde doz normalize KLZ ve DKLZ'nin sırasıyla ortalamalarını 1,79 ng/ml/mg ve 0,74 ng/ml/mg olarak belirlemişler, CT genotipine sahip oldukları bunlarda ise ortalama doz normalize KLZ ve DKLZ'nin sırasıyla 1,49 ng/ml/mg ve 0,62 ng/ml/mg olarak tespit etmişlerdir. TT genotipine sahip bireylerde ise ortalama doz normalize KLZ'leri 1,89 ng/ml/mg ve doz normalize DKLZ ortalamaları ise 0,68 ng/ml/mg olarak bulunmuştur. Ancak çalışma sonucunda genotiplere göre bu düzeyler arasında bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir (Akamine ve ark., 2017). Piatkov ve ark. (2017), farklı ırklardan oluşan çalışma gruplarında gerçekleştirdikleri çalışmada yirmi beş kişinin CC, otuz kişinin CT ve on üç kişinin de TT genotipine sahip olduğunu belirlemişler ve genotip ile KLZ ve DKLZ serum düzeylerinin ilişkili olmadığını göstermişlerdir (Piatkov ve ark., 2017). Olsson ve ark. (2015) ise 95 kişilik İsveçli hasta grubunda gerçekleştirdikleri çalışma sonucunda genotiplerin KLZ ve DKLZ düzeylerine etkisine rastlamamışlardır (Olsson ve ark., 2015). Literatürdeki verilerle elde edilen sonuçlar ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda da genotiplere göre KLZ ve DKLZ düzeyleri arasında istatistiksel açıdan bir farklılık tespit edilememiştir. Ancak tüm veriler göz önüne alındığında sonuçlarımız istatistiksel olarak anlamlılık göstermese de literatürdeki diğer bulgular ile uyumlu olarak CC genotipine sahip olan bireylerde plazma düzeyleri daha düşük bulunmuştur. Bunlarla birlikte literatürde Türk popülasyonunda *ABCB1* genotiplerinin agranülositoz ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışma mevcut olup çalışmada plazma konsantrasyon tayini yapılmamıştır. Bu nedenle Türk şizofreni hastalarında plazma KLZ ve DKLZ

düzeyleri ölçülerek bu düzeylere *ABCB1* genotiplerinin etkisinin araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğine de sahiptir.

Klozapinin *UGT1A4* ile glukuronidasyonu sonucu üçüncül ve dördüncül yapıdaki glukuronit ürünleri olan klozapin-5-N- glukuroniti ve klozapin- N⁺- glukuroniti oluşurken DKLZ’i katalizlemesi sonucu da desmetilklozapin-5-N- glukuronitin (DKLZ-5-N- glukuronit) oluşmaktadır (Erikson- Ridout ve ark., 2012). *UGT1A4**3 polimorfizmi sonucunda lösin amino asidi yerine valin amino asidi gelmesi sonucunda *UGT1A4* enziminin substrat bağlanma bölgesinde etilen grubuna bağlı bir sterik değişiklik meydana gelmekte ve bu da enzimin substrata bağlanmasında etki edebilmektedir (Ghotbi ve ark., 2010). Verilerimiz sonucunda *UGT1A4* T142G polimorfizminde TT ve TG+GG genotipine sahip bireylerde KLZ C/D ortancaları (Min; maks) sırasıyla 1,47 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 10,49 ng/ml/mg) ve 1,33 ng/ml/mg (0,31 ng/ml/mg; 3,05 ng/ml/mg); DKLZ C/D düzeyleri ortancaları (Min; Maks) ise 0,59 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 4,12 ng/ml/mg) ve 0,44 ng/ml/mg (0,15 ng/ml/mg; 1,13 ng/ml/mg) olarak bulunmuştur. Bulgularımız göstergesinde polimorfizm sonucunda *UGT1A4**3 ile KLZ ve DKLZ’nin glukuronidasyonunun hızlandığını ve varyant bireylerde plazma düzeyinin daha düşük olduğu bulunmuştur. Mori ve ark. (2005), *in vitro* ortamda gerçekleştirdikleri çalışmada varyant bireylerin yabanıl tip genotipe sahip bireylere göre KLZ’i iki kat daha etkili bir şekilde katalize ettiğini belirtmişlerdir (Mori ve ark., 2005). İnsanlardan alınan karaciğer hücrelerinde gerçekleştirilen bir diğer *in vitro* çalışmada varyant bireylerde (*UGT1A4* 48Val) V_{max}/K_m değerlerinin yabanıl tip bireylere (*UGT1A4* 48Leu) göre KLZ-5-N- glukuronit, KLZ-N⁺- glukuronit ve DKLZ-5-N- glukuronit için sırasıyla 5,2; 2,0 ve 3,4 kat daha fazla olduğu bulunmuştur (Erikson- Ridout ve ark., 2012). Olsson ve ark. (2015), KLZ kullanan 95 İsveçli bireyde yaptıkları çalışmada *UGT1A4* L48V polimorfizminin KLZ ve DKLZ plazma düzeylerine etkisini araştırdıklarında farklılık tespit etmemişlerdir (Olsson ve ark., 2015). Bizim verilerimizde Olsson ve ark. (2015) verileri ile uyumlu olup TT genotipine sahip olanlarda daha düşük KLZ ve DKLZ görülsede istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilememiştir. Ancak KLZ ve DKLZ düzeylerinin TT genotipine sahip olan bireylerde daha düşük olmasına bağlı olarak klinisyenlerin bu genotipe

sahip olan bireylerde etkin tedaviyi elde edebilmeleri ve hastanın tedaviden maksimum oranda yararlanım sağlayabilmesi için genotipleme sonuçlarını da dozun belirlenmesinde bir biyogösterge olarak kullanılması önerilmektedir. Ayrıca çalışmamız *UGT1A4* polimorfizminin Türk şizofreni popülasyonunda araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğine sahip olup bu genotiplerin plazma KLZ ve DKLZ düzeyleri üzerinde etkisinin de incelendiği ilk araştırma olma özelliği taşımaktadır.

ABCB1 ve *UGT1A4* genotipleri her iki enzim içinde hızlı çalışanlar (*ABCB1* CC+ *UGT1A4* TG) ve yavaş çalışmaya neden olanlar (*ABCB1* TT+ *UGT1A4* TT) olmak üzere gen kombinasyonları yapılarak KLZ C/D ve DKLZ C/D düzeyleri karşılaştırıldığında KLZ C/D düzeyleri ortancaları (Min; Maks) *ABCB1* CC+ *UGT1A4* TG ve *ABCB1* TT+ *UGT1A4* TT grupları için sırasıyla 1,69 (0,45; 3,05) ve 1,43 (0,22; 10,49) olarak bulunmuştur. DKLZ C/D düzeyleri ortancaları (Min; Maks) *ABCB1* CC+ *UGT1A4* TG için 0,47 ng/ml/mg (0,15 ng/ml/mg; 0,65 ng/ml/mg), *ABCB1* TT+ *UGT1A4* TT grubu için 0,69 ng/ml/mg (0,11 ng/ml/mg; 4,12 ng/ml/mg) olarak bulunmakta olup bu da *ABCB1* TT+ *UGT1A4* TT genotiplerine sahip olan grupta KLZ C/D düzeyi daha düşük, DKLZ düzeyinin ise diğer gruba göre daha yüksek bulunmuştur. Bulgularımız sonucunda *ABCB1*'in plazma düzeylerine olan etkisi göz önünde bulundurulabilir ancak bizim sonuçlarımıza göre yanıt veya advers etki gelişiminde bir etkisinin olabileceği klinik olarak söylenemez. Ancak *ABCB1* geninde TT genotipine sahip olanlarda hücrel atılımın azaldığını bu nedenle bu bireylerde DKLZ düzeyinin daha yüksek olduğunu; *UGT1A4* geninde TT genotipine sahip olunması durumunda DKLZ atılımının daha azaldığını ve böylece DKLZ'nin daha yüksek olduğunu söyleyebiliriz. Sonuç olarak her iki gen bölgesinde *ABCB1* TT+ *UGT1A4* TT genotipine sahip olan bireylerde hücrel atılımın ve eliminasyonun yavaş olacağından bu bireylerde doz ayarlamasının diğer genotiplere sahip olan bireylere göre daha dikkatli yapılması önerilmektedir. Sonuç olarak *ABCB1*'in aksine, *UGT1A4*'ün ilacın metabolizmasında ve plazma düzeyine etkisinde klinik olarak önemli olduğunu söyleyebiliriz.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

KLZ ve DKLZ'nin hücrel taşınmasında rol oynayan ABCB1 proteinini ve her iki molekülün glukuronidasyonla eliminasyonunda görev alan UGT1A4 enzimini kodlayan gen bölgelerinde meydana gelen polimorfizmler proteinlerin/ enzimlerin ifadesinde değişikliğe neden olarak KLZ ile tedavi gören hastalarda tedavide bireyler arasında farklılığa neden olabilmektedir. Bu çalışmada, KLZ kullanan şizofreni hastalarında KLZ ve onun aktif metaboliti olan DKLZ plazma düzeylerine *ABCB1* C3435T ve *UGT1A4**3 gen polimorfizmlerinin etkileri incelenmiştir. Çalışmamızda ayrıca cinsiyet, yaş, sigara, kafein miktarları ve BKİ gibi çevresel ve sosyal etmenlerinde plazma KLZ ve DKLZ düzeylerine etkilerine bakılmıştır.

Sonuçlarımıza göre erkeklerde kadınlara göre ve BKİ 25'in altında olanlarda 25'in üstünde olanlara göre KLZ ve DKLZ düzeyleri daha düşük bulunurken, 45 yaşın üzerinde bulunanlarda bu düzeyler daha yüksek olarak saptanmıştır. Bununla birlikte günde 7'nin üzerinde sigara içenlerde hiç kullanmayan ve günde 7'den az kullanan gruptakilerle karşılaştırıldığında daha düşük KLZ ve DKLZ düzeylerine sahip oldukları saptanmıştır. Aynı şekilde kafein kullanımı günde 0,4 g üzerinde olanlarda 0,4 g'dan az kullananlara göre daha düşük KLZ ve DKLZ düzeylerine sahip oldukları görülmüştür.

ABCB1 ve *UGT1A4* genotipleri ile KLZ ve DKLZ düzeyleri arasında istatistiksel açıdan bir anlamlılık bulunamamıştır ($p>0,05$). Buna rağmen *ABCB1* TT genotipine sahip olanlarda KLZ C/D ve DKLZ C/D düzeyleri *ABCB1* CC genotipine sahip olanlardan daha yüksek bulunmuştur. *UGT1A4* TT genotipine sahip olanlarda da *UGT1A4* TG+ *UGT1A4* GG genotiplerine sahip olan grupla karşılaştırıldığında KLZ C/D ve DKLZ C/D düzeyleri daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlardan yola çıkarak her iki gen için hızlı çalışmaya yol açan genotip kombinasyonu (*ABCB1* CC+ *UGT1A4* GT) ve her iki gen için yavaş çalışmaya yol açan genotip kombinasyonu (*ABCB1* TT+ *UGT1A4* TT) birlikte değerlendirildiğinde, *ABCB1* TT+ *UGT1A4* TT

grubundakilerde daha düşük DKLZ düzeylerine sahip olduğu görülmüştür. Sonuç olarak tüm bulgularımız değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmediğinden klinik öneme sahip olamayabileceğini söyleyebiliriz. Ancak, *ABCB1* C3435T ve *UGT1A4**3 polimorfizmlerinin KLZ ve DKLZ düzeyleri üzerinde etkili olabileceği bulunan sonuçlar ile gösterilmiş ve elde edilen verilerin literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür. Bunun sonucunda da bireysel tedavide etkililiğin artırılması ve yan etkilerin en aza indirgenmesinde *ABCB1* C3435T ve *UGT1A4**3 polimorfizmlerinin psikofarmakoterapide farmakogenetik biyogösterge olarak kullanılma potansiyeli vardır. İstatistiksel olarak anlamlı sonuçlar için çalışma grubunun genişletilmesi önerilmektedir.

Araştırma kapsamında çalışılan proteinler/ enzimler, KLZ farmakokinetiğinde görev almaktadır. Bu genlerde yer alan polimorfizmlere bağlı olarak bu genlerin kodlamış olduğu proteinlerde polimorfizmlerin bulunduğu nokta ve oluş şekillerine göre proteinin yapısında ve fonksiyonunda değişiklik meydana gelerek KLZ toksikokinetiğini değiştirebilmektedir. Buna bağlı olarak polimorfik bireylerde diğer bireylerle aynı doz uygulansa da kan ilaç ve metabolit düzeyi normal bireylere göre daha farklı olabilecektir. Dolayısıyla bu genler açısından mutasyonlu bireylerin belirlenmesi ile polimorfik bireylerde ilaç dozunun belirlenmesi ve tedavinin etkin bir hale getirilmesi potansiyeli araştırılmıştır.

*Bu potansiyelin sonuçları bireysel etkin tedavinin sağlanarak hastanın yaşam kalitesinin artırılabilmesi, hastalıktan etkilenmenin en aza indirgenebilmesi ile yaşamını idame ettirebilmesine yardımcı olunabilecektir.

*Söz konusu araştırılan genlerin ileride farmakogenetik biyogöstergeler olarak kullanılabilmesi potansiyeli bulunmaktadır.

*Bu araştırma benzer fonksiyonları olan diğer enzim ve proteinlerin gen polimorfizmlerinin çalışılacağı diğer çalışmalara da örnek olabilecektir.

* Araştırma sonunda kurulan genotipleme yöntemlerinin ileriki yıllarda kit haline getirilerek hastanelerde kullanılabilme potansiyeli de bulunmaktadır.

* Çalışmanın sonuçları adli bilimler açısından değeriendirildiğinde; Türkiye’de şizofreni hastalarında etkin tedavinin görülemmediği durumlarda hastalığın yan etkisi olarak bireylerde halüsinasyon ve delüzyonlara bağılı olarak intihar riskinin arttığı görülebilmektedir. Bunun nedenlerinden biri de KLZ kullanan hastalarda etkin tedavinin sağlanamamasından kaynaklanabilmektedir. Ayrıca, yüksek doz uygulamasına bağılı olarak tedavide advers etkiler gözlemlenebilmektedir. Elde edilen verilerimiz ile hastalarda *ABCB1* ve *UGT1A4* gibi KLZ farmakokinetiğinde rol alan genlerdeki TNP’lerinin belirlenmesi ile KLZ tedavisinde etkililik artırılarak hastaların halüsyon ve delüzyonları azaltılarak intihar risklerinin ve doza bağılı gelişebilecek toksisitenin azaltılabileceğı düşünölmektedir.

ÖZET

Şizofreni Hastalarında Klozapin ve Norklozapin Kan Plazma Düzeylerine ABCB1 3435C>T ve UGT1A4 L48V Polimorfizmlerinin Etkisi

Klozapin (KLZ), tedaviye dirençli şizofreni hastalarında kullanılan atipik bir antipsikotiktir. Bu ilaç dar terapötik indekse sahip olması, çevresel ve biyolojik faktörlerin plazma ilaç düzeyine etkileri nedenleriyle kullanımda çeşitli sorunlarla karşılaşılabilir. Plazma KLZ seviyesindeki farklılıkların nedenleri arasında ilaç metabolizma enzimlerini kodlayan genlerdeki farklılıklar büyük öneme sahiptir. Bu çalışmada KLZ metabolizmasında görev yapan *ABCB1* ve *UGT1A4* genlerindeki farklılıkların plazma KLZ ve ana metaboliti olan norklozapin (DKLZ) düzeylerine etkisi araştırılmıştır.

Şizofren tanısı alan 94 hastada plazma KLZ ve DKLZ düzeylerinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile miktar tayini yapılmıştır. Bu hastalardaki hedef gen polimorfizmleri ise polimeraz zincir reaksiyonu- restriksiyon parçası uzunluk polimorfizmi yöntemi ile analiz edilmiştir.

ABCB1 C3435T ve *UGT1A4* L48V polimorfizmi varyant allele frekansı sırasıyla %49 ve %13'tür. Bu çalışmada *ABCB1* CC, CT ve TT genotipine sahip olan bireylerde KLZ C/D düzeyi ortancası ($\bar{x}$) (Min; Maks) değerleri sırasıyla 1,18 ng/ml/mg (0,42 ng/ml/mg; 6,86 ng/ml/mg), 1,62 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 9,72 ng/ml/mg) ve 1,41 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 10,49) olarak bulunmuştur. *UGT1A4* T142G polimorfizminde TT ve TG+GG genotipine sahip bireylerde KLZ C/D $\bar{x}$ (Min; Maks) sırasıyla 1,47 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 10,49 ng/ml/mg) ve 1,33 ng/ml/mg (0,31 ng/ml/mg; 3,05 ng/ml/mg); DKLZ C/D düzeyleri $\bar{x}$ (Min; Maks) ise sırasıyla 0,59 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 4,12 ng/ml/mg) ve 0,44 ng/ml/mg (0,15 ng/ml/mg; 1,13 ng/ml/mg) olarak bulunmuştur. Ayrıca, her iki gen bölgesi kombine edildiğinde *ABCB1* TT+ *UGT1A4* TT genotipine sahip olan bireylerde hücrel atılımın ve eliminasyonun yavaş olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak her iki polimorfizm ve genetik kombinasyonların plazma KLZ ve DKLZ düzeylerine etkisinden elde edilen sonuçlardan, *ABCB1* ve *UGT1A4* genotiplerinin KLZ tedavisinde etkililiğin artırılabilmesinin ve advers ilaç reaksiyonlarının minimuma indirilebilmesinin sağlanabilmesinde farmakogenetik analiz olarak kullanıma potansiyeline sahip olduğu görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Klozapin, Desmetilklozapim, *ABCB1*, *UGT1A4*, Plazma düzeyi.

SUMMARY

The Effect of *ABCB1* 3435 C>T and *UGT1A4* L48V Polymorphisms to the Plasma Clozapine and Norclozapine Levels in Patients with Schizophrenia

Clozapine (KLZ) is an atypical antipsychotic which used in treatment-resistant schizophrenia patients. The various problems may be encountered in treatment due to KLZ has a narrow therapeutic index and the effects of environmental or biological factors on plasma drug levels. Differences in the genes encoding as a drug metabolism enzyme have major importance among the differences in plasma KLZ level. The aim of this study was to investigate the effects of *ABCB1* and *UGT1A4* genes on plasma CLZ and its main metabolite, norklozapine (DKLZ).

Plasma CLZ and DKLZ levels were quantified by high performance liquid chromatography in 94 patients with schizophrenia. Target gene polymorphisms in these patients were analyzed by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method.

The variant allele frequency of *ABCB1* C3435T and *UGT1A4* L48V polymorphism is 49% and 13%, respectively. In this study, the mean values ($\bar{x}$) (min; max) of KLZ C/D in individuals with *ABCB1* CC, CT, TT genotypes were found 1,18 ng/ml/mg (0,42 ng/ml/mg; 6,86 ng/ml/mg), 1,62 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 9,72 ng/ml/mg) and 1,41 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 10,49). Also, KLZ C/D levels mean ($\bar{x}$) (min; max) were measured as 1,47 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 10,49 ng/ml/mg) and 1,33 ng/ml/mg (0,31 ng/ml/mg; 3,05 ng/ml/mg); DKLZ C/D levels were found as 0,59 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 4,12 ng/ml/mg) and 0,44 ng/ml/mg (0,15 ng/ml/mg; 1,13 ng/ml/mg) for individuals with *UGT1A4* GG and *UGT1A4* TG+TT genotypes in *UGT1A4* T142G polymorphism. Furthermore, when both gene regions were combined, cellular excretion and elimination were found to be slow in individuals with *ABCB1* TT + *UGT1A4* TT genotype.

In conclusion, it was found that according to the effects of both polymorphisms and genetic combinations on plasma KLZ and DKLZ levels, the genetic analysis has the potential to be used to provide individual effective treatment by increasing efficacy in treatment and reducing adverse drug reactions.

Key words: Clozapine, Desmethylclozapine, *ABCB1*, *UGT1A4*, Plasma level.

KAYNAKLAR

- AKAMINE Y, SUGAWARA- KIKUCHI Y, UNO T, SHIMIZU T, MIURA M (2017). Quantification of the steady-state plasma concentrations of clozapine and N-desmethylozapine in Japanese patients with schizophrenia using a novel HPLC method and the effects of CYPs and ABC transporters polymorphisms. *Annals of Clinical Biochemistry*. **54**: 1-9.
- AMEYAW MM, REGATEIRO F, LI T, LIU X, TARIQ M, MOBAREK A, THORNTON N, FOLAYAN GO, GITHANG J, INDALO A, OFORI- ADJEI D, PRICE- EVANS DA, McLEOD HL (2001). MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics*, **11**: 217-221.
- ANDERSON SG, LIVINGSTON M, COUCHMAN L, SMITH DJ, CONNOLLY M, MILLER J, FLANAGAN RJ, HEALD AH (2015). Sex differences in plasma clozapine and norclozapine concentrations in clinical practice and in relation to body mass index and plasma glucose concentrations: a retrospective survey. *Ann Gen Psychiatry*. **14**: 1-4.
- ANIL YAĞCIOĞLU AE, İLHAN BC, GÖKTAŞ MT, BABAOĞLU MO, UZ E, YAZICI MK (2011). Agranulocytosis related to clozapine in monozygotic twins and association with allelic variants of multidrug resistance gene MDR1. *J Clin Psychopharmacology*. **31**: 247-249.
- ANIL YAĞCIOĞLU AE, YOCA G, AYHAN Y, KARACA RÖ, ÇEVİK L, MÜDERRİSOĞLU A, GÖKTAŞ MT, ENİ N, YAZICI MK, BOZKURT A, BABAOĞLU MO (2016). Relation of the Allelic Variants of Multidrug Resistance Gene to Agranulocytosis Associated with Clozapine. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, **36**: 257 – 261.
- ATBAŞOĞLU C (2014). Bölüm 6: Şizofreni. In: *Ruh Sağlığı ve Hastalıkları*. Ed: Devrimci Özgüven H, Ankara Üniversitesi Yayınları, Ankara. 59 -78.
- AVENOSO A, FACCIOLÀ G, CAMPO GM, FAZIO A, SPINA E (1998). Determination of clozapine, desmethylozapine and clozapine N-oxide in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **714**: 299-308.
- AYANO G (2016). Dopamine: Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders: Review of Literatures. *J Ment Disord Treat*. **2**: 1-4.
- BEBEK N, ÇİNE N, ÖNER GO, ESKAZAN E, UĞUR HÖ (2005). Genotype and Allele Frequencies of MDR-1 C3435T Polymorphism in Turkish Population. *Journal of Neurological Sciences*, **22**: 261-266.
- BELL R, McLAREN A, COPOLOV D (2001). How reliable are reported plasma clozapine levels? *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*. **35**: 468-473.
- BELL R, McLAREN A, GALANOS J, COPOLOV D (1998). The clinical use of plasma clozapine levels. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*. **32**: 567-574.

- BENOIT-BIANCAMANO MO, ADAM JP, BERNARD O, COURT MH, LEBLANC MH, CARON P, GUILLEMETTE C (2009). A pharmacogenetics study of the human glucuronosyltransferase UGT1A4. *Pharmacogenetics and Genomics*, **19**: 945-954.
- BERSANI FS, CAPRA E, MINICHINO A, PANNESE R, GIRARDI N, MARINI I, CHIAIE RD, BIONDI M (2011). Factors affecting interindividual differences in clozapine response: a review and case report. *Hum. Psychopharmacol Clin Exp*. **26**: 177-187.
- BERTILSSON L, CARILLO JA, DAHL ML, LLERENA A, ALM C, BONDESSON U, LINDSTRÖM L, RODRIGUEZ DE LA RUBIA I, RAMOS S, BENITEZ J (1994). Clozapine disposition covaries with CYP1A2 activity determined by a caffeine test. *Br J clin Pharmacol*. **38**: 471-473.
- BİNBAY T, ULAŞ H, ELBİ H, ALPTEKİN K (2011). Türkiye’de Psikoz Epidemiyolojisi: Yaygınlık Tahminleri ve Başvuru Oranları Üzerine Sistemik Bir Gözden Geçirme. *Türk Psikiyatri Dergisi*, **22**: 40-52.
- BOZINA N, KUZMAN MR, MEDVED V, JOVANOVIĆ N, SERTIĆ J, HOTUJAC L (2006). Associations between MDR1 gene polymorphisms and schizophrenia and therapeutic response to olanzapine in female schizophrenic patients. *Journal of Psychiatric Research*. **42**: 89-97.
- BRISCH R, SANIOTIS A, WOLF R, BIELAU H, BERNSTEIN HG, STEINER J, BOGERTS B, BRAUN K, JANKOWSKI Z, KUMARATILAKE J, HENNEBERG M, GOS T (2014). The role of dopamine in schizophrenia from a neurobiological and evolutionary perspective: old fashioned, but still in vogue. *Front. Psychiatry*. **5**: 1-11.
- BROEKS A., GERRARD B., ALLIKMETS R, DEAN M, PLASTERK RH (1996). Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J*. **15**: 6132-6143.
- BROXTERMAN HJ, GIACCONE G, LANKELMA J (1995). Multidrug resistance proteins and other drug transport-related resistance to natural product agents. *Curr Opin Oncol*, **7**: 532-540.
- BUCKLEY P, MILLER A, OLSEN J, GARVER D, MILLER DD, CSERNANSKY J (2001). When symptoms persist: clozapine augmentation strategies. *Schizophr Bull*, **27**: 615-628.
- CARILLO JA, BENITEZ J (2000). Clinically Significant Pharmacokinetic Interactions Between Dietary Caffeine and Medications. *Clin Pharmacokinet*. **39**: 127-153.
- CARILLO JA, HERRAIZ AG, RAMOS SI, BENITEZ J (1998). Effects of caffeine withdrawal from the diet on the metabolism of clozapine in schizophrenic patients. *J Clin Psychopharmacol*. **18**: 311-316.
- CARLSSON A (1977). Does dopamine play a role in schizophrenia? *Psychological Medicine*. **7**: 583-597.
- CARLSSON A (1978). Antipsychotic Drugs, Neurotransmitters, and Schizophrenia. *Am J Psychiatry*. **135**: 165-173.

- CARSON PE, FLANAGAN CL, ICKES CE, ALVONG AS (1956). Enzymatic deficiency in primaquine sensitive erythrocytes. *Science*. **124**: 484-485.
- CASCORBI I, GERLOFF T, JOHNE A, MEISEL C, HOFFMEYER S, SCHWAB M, SCHAEFFLER E, EICHELBAUM M, BRINKMANN U, ROOTS I (2001). Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **69**: 169-174.
- CAVACO I, GIL JP, GIL-BERGLUND E, RIBEIRO V (2003). CYP3A4 and MDR1 Alleles in a Portuguese Population. *Clin Chem Lab Med*, **41**: 1345-1350.
- CONSOLI G, LASTELLA M, CIAPPARELLI A, CATENA DELL'OSSO M, CIOFI L, GUIDOTTI E, DANESI R, DELL'OSSO L, DEL TACCA M, DI PAOLO A (2009). ABCB1 polymorphisms are associated with clozapine plasma levels in psychotic patients. *Pharmacogenomics*. **10**: 1267-76.
- CORDON- CARDO, O' BRIEN JP, CASALS D, RITTMAN- GRAUER L, BIEDLER JL, MELAMED MR, BERTINO JR (1989). Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**: 695-698.
- CORMAC I, BROWN A, CREASEY S, FERRITER M, HUCKSTEP B (2010). A retrospective evaluation of the impact of total smoking cessation on psychiatric inpatients taking clozapine. *Acta Psychiatr Scand*. **121**: 393-397.
- COUCHMAN L, MORGAN PE, SPENCER EP, FLANAGAN RJ (2010). Plasma Clozapine, Norclozapine, and the Clozapine: Norclozapine Ratio in Relation to Prescribed Dose and Other Factors: Data From a Therapeutic Drug Monitoring Service, 1993–2007. *Ther Drug Monit*. **32**: 438-447.
- COURT MH (2010). Interindividual variability in hepatic drug glucuronidation: Studies into the role of age, sex, enzyme inducers, and genetic polymorphism using the human liver bank as a model system. *Drug Metab Rev*. **42**: 209-224.
- CURTO M, GIRARDI N, LIONETTO L, CIAVARELLA GM, FERRACUTI S, BALDESSARANI RJ. (2016) Systematic Review of Clozapine Cardiotoxicity. *Current Psychiatry Reports*, **18**: 68-86.
- DO CARMO BORGES NC, ASTIGARRAGA RB, SVERDLOFF CE, GALVINAS PR, BORGES BC, MORENO RA (2012). Comparative Bioavailability of Two Oral Formulations of Clozapine in Steady State Administered in Schizophrenic Volunteers Under Individualized Dose Regime. *Current Clinical Pharmacology*. **7**: 241-253.
- DRAGOVIC S, GUNNESS P, INGELMAN-SUNDBERG M, VERMEULEN NPE, COMMANDEUR JNM (2013). Characterization of Human Cytochrome P450s Involved in the Bioactivation of Clozapine. *Drug Metab Dispos*. **41**: 651-658.
- DSM, AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (2013). Section 2: Diagnostic Criteria and Codes, Schizophrenia Spectrum and Other Psychotic Disorders. In: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (5th Ed.). Ed: First MB, Ward MN. American Psychiatric Publishing, Washington, DC. 99-105.
- EHMER U, VOGEL A, SCHÜTTE JK, KRONE B, MANNS MP, STRASSBURG CP (2004). Variation of Hepatic Glucuronidation: Novel Functional Polymorphisms of the UDP-Glucuronosyltransferase UGT1A4. *Hepatology*, **39**: 970-977.

- EL ELA AA, HÄRTTER S, SCHMITT U, HIEMKE C, SPAHN-LANGGUTH H, LANGGUTH P (2004). Identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors among psychoactive compounds – implications for pharmacokinetics of selected substrates. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **56**: 967-975.
- ELLISON JC, DUFRESNE RL (2015). A review of the clinical utility of serum clozapine and norclozapine levels. *Ment Health Clin*. **5**: 68-73.
- ERICKSON- RIDOUT KK, SUN D, LAZARUS P (2012). Glucuronidation of the second-generation antipsychotic clozapine and its active metabolite N-desmethylozapine. Potential importance of the UGT1A1 A(TA)₇TAA and UGT1A4 L48V Polymorphisms. *Pharmacogenetics and Genomics*, **22**: 561-576.
- EVERS K (2009). Personalized medicine in psychiatry: ethical challenges and opportunities. *Dialogues Clin Neurosci*. **11**: 427-434.
- FABER MS, FUHR U (2004). Time response of cytochrome P450 1A2 activity on cessation of heavy smoking. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. **76**: 178-184.
- FANG J, MOSIER KE (2014). Literature Values of Terminal Half-Lives of Clozapine are Dependent on the Time of the Last Data Point. *J Pharm Pharm Sci*. **17**: 187-189.
- FLANAGAN RJ, DUNK L (2008). Haematological toxicity of drugs used in psychiatry. *Hum. Psychopharmacol Clin Exp*. **23**: 27-41.
- FREEMAN DJ, OYEWUMI LK (1997). Will routine therapeutic drug monitoring have a place in clozapine therapy? *Clin Pharmacokinet*, **32**: 93-100.
- FUJII T, OTA M, HORI H, SASAYAMA D, HATTORI K, TERAISHI T, YAMAMOTO N, HASHIKURA M, TATSUMI M, HIGUCHI T, KUNUGI H (2012). Association between the functional polymorphism (C3435T) of the gene encoding P-glycoprotein (ABCB1) and major depressive disorder in the Japanese population. *J Psychiatr Res*, **46**: 555-559.
- GAIKOVICH EA, CASCORBI I, MROZIKIEWICZ PM, BROCKMOLLER J, FROTSCHL R, KOPKE K, GERLOFF T, CHERNOV JN, ROOTS I (2003). Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur J Clin Pharmacol*, **59**: 303-312.
- GARERI P, DE FAZIO P, RUSSO E, MARIGLIANO N, DE FAZIO, DE SARRO G (2008). The safety of clozapine in the elderly. *Expert Opin. Drug Saf*. **7**: 525-538
- GERMAN UA, CHAMBERS TC (1998). Molecular analysis of the multidrug transporter, P-glycoprotein. *Cytotechnology*, **27**: 31-60.
- GHICULESCU RA (2008). Therapeutic drug monitoring: which drugs, why, when and how to do it. *Aust Presc*. **31**: 42-44.
- GHOTBI R, MANNHEIMER B, AKLILLU E, SUDA A, BERTILSSON L, ELIASSEN E, OSBY U (2010). Carriers of the UGT1A4 142T>G gene variant are predisposed to reduced olanzapine exposure—an impact similar to male gender or smoking in schizophrenic patients. *Eur J Clin Pharmacol*. **66**: 465-474.

- GÖĞÜS AK (2014) Bölüm 22: Psikiyatrik Hastalıklarda Somatik Tedaviler. In: *Ruh Sağlığı ve Hastalıkları*. Ed: Devrimci Özgüven H, Ankara Üniversitesi Yayınları, Ankara. 309-329.
- GÜLÇEBİ Mİ, ÖZKAYNAKÇI A, GÖREN MZ, AKER RG, ÖZKARA C, ONAT FY (2011). The relationship between UGT1A4 polymorphism and serum concentration of lamotrigine in patients with epilepsy. *Epilepsy Res.*, **95**: 1-8.
- GÜLTEKİN BK (2010). Ruhsal Bozuklukların Önlenmesi: Kavramsal Çerçeve ve Sınıflandırma. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar*. **2**: 583-594.
- GÜMÜŞ- AKAY G, RÜSTEMOĞLU A, KARADAĞ A, SUNGUROĞLU A (2010). Haplotype-Based Analysis of MDR1/ABCB1 Gene Polymorphisms in a Turkish Population. *DNA and Cell Biology*, **29**: 83 – 90.
- HAGG S, SPIGSET O, MJORNDAL T, DAHLQVIST R (2000). Effect of caffeine on clozapine pharmacokinetics in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*. **49**: 59-63.
- HAKOOZ N, ALZUBIEDI S, YOUSEF AM, ARAFAT T, DAJANIR, ABABNEH N, ISMAIL S (2012). UDP-glucuronosyltransferase 1A4 (UGT1A4) polymorphisms in a Jordanian population. *Mol Biol Rep*, **39**: 7763-7768.
- HASLEMO T, EIKESETH PH, TANUM L, MOLDEN E, REFSUM H (2006). The effect of variable cigarette consumption on the interaction with clozapine and olanzapine. *Eur J Clin Pharmacol*. **62**: 1049-1053.
- HASLEMO T, LORYAN I, UEDA N, MANNHEIMER B, BERTILSSON L, INGELMAN-SUNDBERG M, MOLDEN E, ELIASSON E (2012). UGT1A4*3 Encodes significantly Increased glucuronidation of Olanzapine in Patients on Maintenance treatment and in Recombinant systems. *Clin Pharmacol Ther*. **92**: 221-227.
- HIEMKE C, BAUMANN P, BERGEMANN N, CONCA A, DIETMAIER O, EGBERTS K, FRIC M, GERLACH M, GREINER C, GRUNDER G, HAEN E, HAVEMANN-REINECKE U, JAQUENOUD SIROT E, KIRCHHERR H, LAUX G, LUTZ UC, MESSER T, MULLER MJ, ve ark., (2011). AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011. *Pharmacopsychiatry*. **44**: 195-235.
- HIPPUS H (1999). A Historical Perspective of Clozapine. *J Clin Psychiatry*, **60**: 22-23.
- HOFFMEYER S, BURK O, VON RICHTER O, ARNOLD HP, BROCKMÖLLER J, JOHNE A, CASCORBI I, GERLOFF T, ROOTS I, EICHELBAUM M, BRINKMANN U (2000). Functional polymorphisms of the human multidrugresistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **97**: 3473-3478 .
- HORÁČEKJ, LIBIGER J, HÖSCHL C, BORZOVA K, HENDRYCHOVÀ I (2001). Clozapine-induced concordant agranulocytosis in monozygotic twins. *Int J Psychiatry Clin Pract*. **5**: 71-73.
- HOWES OD, KAPUR S (2009). The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Version III- The Final Common Pathway. *Schizophrenia Bulletin*. **35**: 549-562.

- HUGHES JR, HATSUKAMI DK, MITCHELL JE, DAHLGREN LA (1986). Prevalence of Smoking Among Psychiatric Outpatients. *Am J Psychiatry*, **143**: 993-997.
- JANN, M.V.V., Grimsley, S.R, Gray E.C, Chang, W.H. (1993) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of clozapine. *Clinical Pharmacokinetics* 24: 161-76.
- JULIANO RL, LING V (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*, **455**: 152-162.
- KALOW W 2000. Pharmacogenetics and evolutionr. *Pharmacogenetics*. **10**: 1-3.
- KANE JM (1996). Drug Therapy. *The New England Journal of Medicine*. **334**: 34-41.
- KANG JS, LEE MH (2009). Overview of Therapeutic Drug Monitoring. *Korean J Intern Med*. **24**: 1-10.
- KASTELIC M, KOPRIVSEK J, PLESNICAR BK, SERRETTI A, MANDELLI L, LOCATELLI I, GRABNAR I, DOLZAN V. MDR1 gene polymorphisms and response to acute risperidone treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. **34**: 387-392.
- KOHLRAUSCH FB (2013). Pharmacogenetics in schizophrenia: a review of clozapine studies. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. **35**: 305-317.
- KRIVOY A, GAUGHRAN F, WEIZMAN A, BREEN G, MACCABE JH (2016). Gene polymorphisms potentially related to the pharmacokinetics of clozapine: a systematic review. *International Clinical Psychopharmacology*. **31**: 179-184.
- KUZMAN MR, MEDVED V, BOŽINA N, GRUBIŠIN J, JOVANOVIĆ N, SERTIC J (2011). Association study of MDR1 and 5-HT_{2C} genetic polymorphisms and antipsychotic-induced metabolic disturbances in female patients with schizophrenia. *Pharmacogenomics J*. **11**: 35-44.
- KUZMAN MR, MEDVED V, BOŽINA N, HOTUJAC LJ, ŠAIN I, BILUŠIĆ H (2008). The influence of 5-HT_{2C} and MDR1 genetic polymorphisms on antipsychotic-induced weight gain in female schizophrenic patients. *Psychiatry Research*, **160**: 308-315.
- LANE HY, CHANG YC, CHANG WH, LIN SK, TSENG YT, JANN MW (1999). Effects of gender and age on plasma levels of clozapine and its metabolites: analyzed by critical statistics. *J Clin Psychiatry*. **60**: 36-40.
- LIN JH, YAMAZAKI M (2003). Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clin Pharmacokinet*, **42**: 59-98.
- LLORCA PM, LANCON C, DISDIER B, FARISSE J, SAPIN C, AUQUIER P. (2002) Effectiveness of clozapine in neuroleptic-resistant schizophrenia: clinical response and plasma concentrations. *J Psychiatry Neurosci*. **27**: 30-37.
- LÓPEZ M, DORADO P, ORTEGA A, PENAS- LLEDO E, MONROY N, SILVA-ZOLEZZI I, COBALEDA J, GALLEGU-AGUILERA A, ALONSO ME, LLERNA A (2013). Interethnic differences in UGT1A4 genetic polymorphisms between Mexican Mestizo and Spanish populations. *Mol Biol Rep*, **40**: 3187-3192.
- LOWE EJ, ACKMAN ML (2010). Impact of Tobacco Smoking Cessation on Stable Clozapine or Olanzapine Treatment. *The Annals of Pharmacotherapy*. **44**: 727-732.

- MARZOLINI C, PAUS E, BUCLIN T, KIM RB (2004). Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **75**: 13-33.
- MCGARTH J, SAHA S, CHANT D, WELHAM J (2008). Schizophrenia: A Concise Overview of Incidence, Prevalence, and Mortality. *Epidemiologic Reviews*. **30**: 67-76.
- MELTZER, H.Y. (2002). Neuropsychopharmacology the fifth generation of progress. Mechanism of action of atypical antipsychotic drugs. pp. 819-31. American College of Neuropsychopharmacology.
- MÉNARD V, GIRARD H, HARVEY M, PÉRUSSE L, GUILLEMETTE C (2009). Analysis of Inherited Genetic Variations at the UGT1 Locus in the French-Canadian Population. *Human Mutation*, **30**: 677-687.
- MESSIAS E, CHEN CY, EATON WW (2007). Epidemiology of Schizophrenia: Review of Findings and Myths. *Psychiatr Clin North Am*. **30**: 323-338.
- MEYER UA, ZANGER UM (1997). Molecular Mechanisms of Genetic Polymorphisms of Drug Metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. **37**: 269-296.
- MILOJKOVIC M, STOJNEV S, JOVANOVIĆ I, LJUBISAVLJEVIĆ S, STEFANOVIĆ V, SUNDER- PLASSMAN R (2011). Frequency of the C1236T, G2677T/A and C3435T MDR1 gene polymorphisms in the Serbian population. *Pharmacological Reports*, **63**: 808-814.
- MORI A, MAURO Y, IWAI M, SATO H, TAKEUCHI Y (2005). UDP-Glucuronosyltransferase 1A4 Polymorphisms In A Japanese Population and Kinetics of Clozapine Glucuronidation. *Drug Metabolism and Disposition*, **33**: 672-675.
- MOUAFFAK F, KEBIR O, PICARD V, BONHAMME- FAIVRE L, MILLET B, OLIÉ JP, REYNAUD M, KREBS MO, BENYAMINA A (2011). Ultra-Resistant Schizophrenia Is Not Associated with the Multidrug-Resistant Transporter 1 (MDR1) Gene rs1045642 Variant. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, **31**: 236-238.
- MOUAFFAK F, TRANULIS C, GOUREVITCH R, POIRIER MF, DOUKI S, OLIEÉ JP, LOO H, GOURION D (2006). Augmentation strategies of clozapine with antipsychotics in the treatment of ultraresistant schizophrenia. *Clin Neuropharmacol*, **29**: 28-33.
- NABER D, HOLZBACH R, PERRO C, HIPPIUS H (1992). Clinical Management of Clozapine Patients in Relation to Efficacy and Side-Effects. *British Journal of Psychiatry*. **160**: 54-59.
- NAKAJIMA M, YOKOI T (2005). Interindividual Variability in Nicotine Metabolism: C-Oxidation and Glucuronidation. *Drug Metab. Pharmacokinet*. **20**: 227-235.
- NASSAR S, AMRO O, ABU- RMAILEH H, ALSHAER I, KORACHI M, AYESH S (2014). ABCB1 C3435T and CYP2C19*2 polymorphisms in a Palestinian and Turkish population: A pharmacogenetic perspective to clopidogrel. *Meta Gene*, **2**: 314-319.
- OLAGANJU AT, CLARK SR, BAUNE BT (2018). Clozapine and Psychosocial Function in Schizophrenia: A Systematic Review and Meta Analysis. *CNS Drug*. **32**: 1011-1023.

- OLSSON E, EDMAN G, BERTILSSON L, HUKIC DS, LAVEBRATT C, ERIKSSON SV, OSBY U (2015). Genetic and Clinical Factors Affecting Plasma Clozapine Concentration. *Prim Care Companion CNS Disord.* **17**: 1-6.
- ÖZDEMİR V, KALOW W, POSNER P, COLLINS EJ, KENNEDY JL, TANG BK, ALBERS LJ, REIST C ROY R, WALKES W, AFRA P (2001). CYP1A2 activity as measured by a caffeine test predicts clozapine and active metabolite norclozapine steady-state concentration in patients with schizophrenia. *Journal of Clinical Psychopharmacology.* **21**: 398-407.
- PALEGO L, BIONDI L, GIANNACCINI G, SARNO N, ELMI S, CIAPPARELLI A, CASSANO GB, LUCACCHINI A, MARTINI C, DELL'OSSO L (2002) Clozapine, norclozapine plasma levels, their sum and ratio in 50 psychotic patients: influence of patient-related variables. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.* **26**: 473-480.
- PAPAZISIS G, GOULAS A, SARRIGIANNIDIS A, BARGIOTA S, ANTONIADIS D, RAIKOS N, BASGIOURAKI E, BOZIKAS VP, GARYFALLOS G (2017). ABCB1 and CYP2D6 polymorphisms and treatment response of psychotic patients in a naturalistic setting. *Human Psychopharmacology Clinical and Experimental.* **33**: 1-7.
- PARKINSON A, MUDRA DR, JOHNSON C, DWYER A, CARROLL KM (2010). The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology.* **199**: 193-209.
- PATCHAN KM, RICHARDSON C, VYAS G, KELLY DL (2015). The risk of suicide after clozapine discontinuation: Cause for concern. *Ann Clin Psychiatry.* **27**: 253-256.
- PATEL KR, CHERIAN J, GOHIL K, ATKINSON D (2014). Schizophrenia: Overview and treatment options. *P T.* **39**: 638-645.
- PERERA V, GROSS AS, McLACHLAN AJ (2012). Influence of Environmental and Genetic Factors on CYP1A2 Activity in Individuals of South Asian and European Ancestry. *Clinical pharmacology & Therapeutics.* **92**: 511-519.
- PERRY PJ, MILLER DD, ARNDT SV, CADORET RJ (1991). Clozapine and norclozapine plasma concentrations and clinical response of treatment-refractory schizophrenic patients. *Am J Psychiatry.* **148**: 231-235.
- PIATKOV I, CAETANO D, ASSUR Y, LAU SL, JONES T, BOYAGES SC, McLEAN M (2017). ABCB1 and ABCC1 Single- Nucleotide Polymorphisms in Patients Treated with Clozapine. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine.* **10**: 235-242.
- PIATKOV I, CAETANO D, ASSUR Y, LAU SL, JONES T, BOYAGES SC, McLEAN M (2017). ABCB1 and ABCC1 Single- Nucleotide Polymorphisms in Patients Treated with Clozapine. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine.* **10**: 235-242.
- RAASKA K, RAITASOU V, LAITILA J, NEUVONEN PJ (2004). Effect of Caffeine-Containing versus Decaffeinated Coffee on Serum Clozapine Concentrations in Hospitalised Patients. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* **94**: 13-18.
- RADOMINSKA- PANDYA A, CZERNIK PJ, LITTLE JM (1999). Structural and Functional Studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metabolism Reviews.* **31**: 817-899.

- RAJKUMAR AP, POONKUHALI B, KURUVILLA A, JACOB M, JACOB KS (2013). Clinical predictors of serum clozapine levels in patients with treatment-resistant schizophrenia. *Int Clin Psychopharmacol*. **28**: 50-56.
- ROSENBERG MF, CALLAGHAN R, FORD RC, HIGGINS CF (1997). Structure of the Multidrug Resistance P-glycoprotein to 2.5 nm Resolution Determined by Electron Microscopy and Image Analysis. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**: 10685-10694.
- ROSLAND M, SZETO P, PROCYSHYN R, BARR AM, WASAN KM (2007). Determination of clozapine and its metabolite, norclozapine in various biological matrices using high-performance liquid chromatography. *Drug Dev Ind Pharm*, **33**: 1158-66.
- ROSTAMI- HODJEGAN A, AMIN AM, SPENCER EP, LENNARD MS, TUCKER GT, FLANAGAN RJ (2004). Influence of Dose, Cigarette Smoking, Age, Sex, and Metabolic Activity on Plasma Clozapine Concentrations: A Predictive Model and Nomograms to Aid Clozapine Dose Adjustment and to Assess Compliance in Individual Patients. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. **24**: 70-78.
- SADEE W (1999). Pharmacogenomics. *BMJ*. **319**:1-4.
- SAEKI M, SAITO Y, JINNO H, SAI K, HACHISUKA A, KANIWA N, OZAWA S, KAWAMOTO M, KAMATANI N, SHIARO K, MINAMI H, OHTSU A, YOSHIDA T, SAIJO N, KOMAMURA K, KOTAKE T, MORISHITA H, KAMAKURA S, KITAKAZE M, TOMOIKE H, SAWADA J (2005). Genetic Variation and Haplotypes of UGT1A4 in a Japanese Population. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **20**: 144-151.
- SAKAEDA T (2005). MDR1 Genotype-related Pharmacokinetics: Fact or Fiction? *Drug Metab. Pharmacokinet*, **20**: 391-414.
- SANYAL S, VAN TOL HHM (1997). Review the Role of Dopamine D4 Receptors in Schizophrenia and Antipsychotic Action. *J Psychiatr Res*. **31**: 219-232.
- SCHABER G, STEVENS I, GAERTNERHJ, DIETZ K, BREYEN-PTAFF U (1998). Pharmacokinetics of clozapine and its metabolites in psychiatric patients: plasma protein binding and renal clearance. *Br J Clin Pharmacol*. **46**: 453-459.
- SCHMITT U, KIRSCHBAUM KM, POLLER B, KUSCH- PODDAR M, DREWE J, HIEMKE C, GUTMANN H (2012). In vitro P-glycoprotein efflux inhibition by atypical antipsychotics is in vivo nicely reflected by pharmacodynamic but less by pharmacokinetic changes. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **102**: 312-320.
- SHAH P, IWATA Y, PLITMAN E, BROWN EE, CARAVAGGIO F, KIM J, NAKAJIMA S, HAHN M, REMINGTON G, GERRETSEN P, GRAFF GUERRERO A (2018). The impact of delay in clozapine initiation on treatment outcomes in patients with treatment-resistant schizophrenia: A systematic review. *Psychiatry Res*. **268**: 114-122.
- SHARMA R, SINGH M, SHARMA A (2002). Polymerase Chain Reaction: An Emerging Tool For Research In Pharmacology. *Indian Journal of Pharmacology*, **34**: 229-236.

- SHAROM FJ, 2014 Complex interplay between the P-glycoprotein multidrug efflux pump and the membrane: its role in modulating protein function. *Frontiers in Oncology*, **4**: 1-19.
- SIROT EJ, KNEZEVIC B, MORENA GP, HARENBERG S, ONEDA B, CRETOL S, ANSERMOT N, BAUMANN P, EAP CB (2009). ABCB1 and Cytochrome P450 Polymorphisms Clinical Pharmacogenetics of Clozapine. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, **29**: 319-326.
- SPINA E, AVENOSO A, FACCIOLA G, SCORDO MG, ANCIONE M, MADIA AG, VENTIMIGLIA A, PERUCCA E (2000). Relationship between plasma concentrations of clozapine and norclozapine and therapeutic response in patients with schizophrenia resistant to conventional neuroleptics. *Psychopharmacology*, **148**: 83-89.
- SRIRETNAKUMAR V, HUANG E, MULLER DJ (2015). Pharmacogenetics of clozapine treatment response and side-effects in schizophrenia: an update. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **11**: 1709-1731.
- STEIMER W (2010). Pharmacogenetics and psychoactive drug therapy: ready for the patient? *Ther Drug Monit.* **32**: 381-386.
- TANG YI, MAO P, LI FM, LI W, CHEN Q, JIANG F, CAI ZJ, MITCHELL PB (2007). Gender, age, smoking behaviour and plasma clozapine concentrations in 193 Chinese inpatients with schizophrenia. *Br J Clin Pharmacol.* **64**: 49-56.
- TAZZITE A, KASSOGUE Y, DIAKITÉ B, HOUHADI H, DEHBI H, BENIDER A, NADIFI S (2016). Association between ABCB1 C3435T polymorphism and breast cancer risk a Moroccan case-control study and meta-analysis. *BMC Genet.* **17**: 126-136.
- THOMAS SS, LI SS, LAMPE JW, POTTER JD, BIGLER J (2006). Genetic variability, haplotypes, and htSNPs for exons 1 at the human UGT1A locus. *Hum Mut.* **27**: 1-14.
- TOVIALLA ZÀRATE CA, VARGAS I, HERNÁNDEZ S, FRESÀN A, AGUILAR A, ESCAMILLA R, SARACCO R, PALACIOS J, CAMARENA B (2014). Association study between the MDR1 gene and clinical characteristics in schizophrenia. *Rev Bras Psiquiatr.* **36**: 227-232.
- TUKEY RH ve STRASSBURG CP (2000). Human UDP-Glucuronosyltransferases: Metabolism, Expression, and Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **40**: 581-616.
- VAN DER WEIDE J, STEIJNS LSW, VAN WEELDEN MJM (2003). The effect of smoking and cytochrome P450 CYP1A2 genetic polymorphism on clozapine clearance and dose requirement. *Pharmacogenetics.* **13**: 169-172.
- VESELL ES (1989). Pharmacogenetic Perspectives Gained From Twin and Family Studies. *Pharmac. Ther.* **41**: 535-552.
- VICENTE J, SINUES B, FANLO A, VASQUEZ P, MEDINA JC, MARTINEZ- JARRETA B (2008). Polymorphism C3435T of the MDR1 gene in Central Americans and Spaniards. *Mol Biol Rep.* **35**: 473-478.
- VOGEL F (1956). Moderne probleme der Humangenetik. *Ergeb Inn Med Kinderheild.* **12**: 52-125.

- VOJVODA D, GRIMMELL K, SERNYAK M, MAZURE CM (1996). Monozygotic twins concordant for response to clozapine. *Lancet*. **347**: 61.
- WANG D, SADÉE W (2006). Searching for Polymorphisms That Affect Gene Expression and mRNA Processing: Example ABCB1 (MDR1). *The AAPS Journal*, **8**: 515 – 520.
- WASSENAAR CA, CONTI DV, DAS S, CHEN P, COOK EH, RATAIN MJ, BENOWITZ NL, TYNDALE RF (201). *UGT1A* and *UGT2B* Genetic Variation Alters Nicotine and Nitrosamine Glucuronidation in European and African American Smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **24**: 94-104.
- WHO (World Health Organization). What is mental health? In: *Investing in Mental Health*. Nove Impression, Geneva, Switzerland. 7-7.
- WILLIAMS, A. M, PARK, S.H. (2015). Seizure associated with clozapine: incidence, etiology, and management. *CNS Drugs*. 29: 101-11.
- WOLF CR, SMITH G, SMITH RI (2000). Science, Medicine and Future, Pharmacogenetics. *BMJ*. **320**: 987-990.
- ZULLINO DF, DELESSERT D, PREISIG M, BAUMANN P (2002). Tobacco and cannabis smoking cessation can lead to intoxication with clozapine orolanzapine. *International Clinical Psychopharmacology*. **17**: 141-143.

EKLER

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Şizofreni Hastalarında Kloropin ve Noriklozapin Kan Plazma Düzeylerine ABCB1 3435C>T ve UGT1A4 L48V Polimorfizmlerinin Etkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA
	TELEFON	0312 595 82 27
	FAKS	0312 310 63 70
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.H.Sinan SÜZEN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Moleküler Genetik ve Toksikoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
		FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☐		
Diğer ise belirtiniz: Deneyisel Genetik Analiz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER		TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒ ULUSLARARASI ☐	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasını yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Şizofreni Hastalarında Klorazepin ve Norklorazepin Kan Plazma Düzeylerine ABCB1 3435C>T ve UGT1A4 L48V Polimorfizmlerinin Etkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Yeniye Numarası	Değerlendirme
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Tutarlı ☐ İlgili ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Tutarlı ☐ İlgili ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Tutarlı ☐ İlgili ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Tutarlı ☐ İlgili ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Yeniye Numarası	Açıklama
	TEKORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BIYOLİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	ILAN	☐		
	TİLLİK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
KARAR BELGELERİ	Karar No:20-1266-17	Tarih:11 Aralık 2017		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuruya dosyası ile ilgili belgeler araştırılmış/olup olmadığına, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına ilişkin karar etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BASKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Ünvanlık Alanı	Kuruma	Görevi	Araştırma Etik Kurulu	Karar *	İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ö. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H			
Prof.Dr.İrfan SOYKAN	Gastroenteroloji	A.Ö. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H			
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Tıbbi Biyokimya	A.Ö. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H			
Prof.Dr.Levan YAZICIOĞLU	Kalp ve Damar Cerrahisi	A.Ö. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H			
Prof.Dr.Şahin ŞENGÜL	Neftoloji	A.Ö. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H			
Prof.Dr.İsmail E.İHAN	Rob. Sağlık ve Hastalıkları	A.Ö. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H			
Prof.Dr.Senay SİVRİ	Çocuk Sağlık ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H			
Prof.Dr.Zeynep ŞAHİNÇAK	Endokrin	A.Ö. Halkın Fakültesi	E ☐ K ☒ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H			
Prof.Dr.İsmail ÇAKIR	Halk Sağlık	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H			
Doç.Dr.Deniz ÖZDEMİR	Biyoimünoloji	A.Ö. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H			
Doç.Dr.Selma Kızık TOFRAK	Hematoloji	A.Ö. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H			
Yrd.Doç.Dr.Nalan KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ö. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H			
Yrd.Doç.Dr.Ali Duman ÖZBİLİR	Fizyoloji	A.Ö. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H			
Yrd.Doç.Dr.Önder İLİHİ	Tıp Tarih ve Etik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H			
İlhan BERTAS	Matematik, Mikrobiyoloji	Tatlıya Köyü İşletme Genel Müdürlüğü	E ☐ K ☒ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H ☐ H			

* Toplantıda Belirlenen

Etik Kurul Başkanı

Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ

İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı: Fezile

Soyadı: Özdemir

Doğum yeri ve tarihi: Lefkoşa, 1991

Uyruğu: T.C.

Medeni Durumu: Bekar

İletişim Adresi ve Tel.: Emek Mah. Yeni 15 Cad. Ankara / 5350794905

II. Eğitimi

2013-2015- Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Anabilim Dalı, Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Bölümü (Yüksek Lisans)

2009-2013- Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (Lisans)

2005-2009- 20 Temmuz Fen Lisesi

2002-2005- Bayraktar Ortaokulu

1997-2002- Gönyeli İlkokulu

Yabancı Dili: İngilizce

III. Mesleki Deneyimi

Yok

IV. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Yok

V. Bilimsel İlgi Alanları

Uluslararası dergilerde basılan makaleler

Fezile Ozdemir, Merve Demirbugen Oz and Hilat S. Suzen*, “A Novel PCR-RFLP Method for Detection of POR*28 Polymorphism and its Genotype/Allele Frequencies in a Turkish Population”, Current Drug Metabolism (2019) 20: 845. <https://doi.org/10.2174/1389200220666190913121052>

Ulusal dergilerde basılan makaleler

Özdemir F, Kır Y, Tok KC, Baskak B, Suzen HS. A Novel Genotyping Method for Detection of Muscarinic Receptor M1 Gene rs2067477 Polymorphism and Its Genotype/Allele Frequencies in a Turkish Population. Turk J Pharm Sci . (2019- basım aşamasında)

Özdemir F, Kayaaltı Z, Kaya-Akyüzlü D. “Toxic Effects of Xenobiotics on DNA and Toxicogenetics”. Marmara Pharmaceutical Journal 2015;19(3):246-251. doi: 10.12991/mpj.20151927137.

Kaya-Akyüzlü D, Kayaaltı Z, Özdemir F, Tutkun E, Söylemezoğlu T. “Association between multidrugresistance associated protein 1 (MRP1) G1666A gene polymorphism and urinary arsenic levels.” Marmara Pharmaceutical Journal 2016;20(1): 28-33. doi:10.12991/mpj.2016202877554.

Kayaaltı Z, Özdemir F, Kaya-Akyüzlü D, Söylemezoğlu T. “Genotype and Allele Frequencies of -2841A>T Polymorphism in Glucose Transporter 1 gene in Turkish Population”. Marmara Pharmaceutical Journal 2016; 20(2): 152-156. doi:10.12991/mpj.20162067368.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler:

Kaya Akyüzlü D, Kayaaltı Z, Söylemez E, Bal C, Özdemir F, Tutkun E, Söylemezoğlu T. “Effect of Glutathione-S-Transferase Omega 2 N142D Gene Polymorphism on Urinary Mercury Levels in School-Aged Children”. 50th Congress of the European Societies of Toxicology, Edinburgh, İskoçya. Toxicology Letters 2014; 229S:S89’da yayınlanmıştır. doi:10.1016/j.toxlet.2014.06.334. (ISI).

Kayaaltı Z, Kaya Akyüzlü D, Söylemez E, Tutkun E, Özdemir F, Bal C, Söylemezoğlu T. “Glutathione-S-Transferase P1 Ile105Val Gene Polymorphism and Acute Elemental Mercury Exposure”. 50th Congress of the European Societies of Toxicology, Edinburgh, İskoçya. Toxicology Letters 2014; 229S:S229’da yayınlanmıştır. doi:10.1016/j.toxlet.2014.06.768. (ISI).

Özdemir F, Kaya- Akyüzlü D, Kayaaltı Z. “Occupational Exposure to Arsenic in Turkey: An Evalution From Legal and Toxicogenetic Perspective”. 2nd International Congress of Forensic Toxicology- Industrial and Environmental Toxicology, 2016, Ankara, Turkey. Page:85.

Özdemir F, Kayaaltı Z, Kaya- Akyüzlü D. “Genetic Discrimination and Genetic Susceptibility”. 2nd International Congress of Forensic Toxicology- Industrial and Environmental Toxicology, 2016, Ankara, Turkey. P204; Page:283.

VI. Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı Burslar

TUBİTAK 2011-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Bursu

Ödüller

Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Üçüncülüğü

Projeler

“Şizofreni Hastalarında Klozapin ve Norklozapin Kan Plazma Düzeylerine ABCB1 3435C>T Ve UGT1A4 L48V Polimorfizmlerinin Etkisi”, Lisans Üstü Tez Projesi, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü (18L0217001).

Katıldığı Bilimsel Kurslar, Sempozyumlar, Çalıştaylar

1. “4. Bilirkişilik Sempozyumu, Adli Toksikoloji, Prof. Dr. Tülin Söylemezoğlu Onuruna”, 2013, Ankara.
2. “Adli Antropoloji Kursu”, 2013, Ankara.
3. “4. Ulusal Tıp Günleri”, 2013, Ankara.
4. “Adli Bilimlerde Yeni Ufuklar Sempozyumu”, 2014, Ankara.
5. “Adli Psikoloji Günleri”, 2014, Ankara.
6. “Adli Bilimler Bahar Sempozyumu”, 2014, Marmaris.
7. “V. Ulusal Tıp Günleri”, 2014, Kastamonu.

Katıldığı Bilimsel Kongreler

1. “Uluslararası Katılımlı 10. Anadolu Adli Bilimler Kongresi”, 2013, Malatya.
2. “1. Çocuk ve Bilgi Güvenliği Kongresi”, 2013, Ankara.
3. “2. Ulusal Felaket Kurbanlarının Kimliklendirilmesi Kongresi”, 2014, Ankara.
4. “11. Uluslararası Anadolu Adli Bilimler Kongresi”, 2014, Bayburt.
5. “1st International Congress of Forensic Biology and Genetics”, 2014, Ankara.
6. “1st International Congress and Workshop of Forensic Toxicology.”, 2014, Ankara.

VII. Diğer Bilgiler

Erasmus Staj Hareketliliği

Molecular Medicine Center, Medical University of Sofia, Bulgaristan (09/2019-12/2019).