

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

**5-AMİNO SALİSİLİK ASİT'İN CYP450 BAĞIMLI
METABOLİZMASININ KARAKTERİZE EDİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELİF KALE

DENİZLİ, TEMMUZ- 2016

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



**5-AMİNO SALİSİLİK ASİT'İN CYP450 BAĞIMLI
METABOLİZMASININ KARAKTERİZE EDİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELİF KALE

DENİZLİ, TEMMUZ- 2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

ELİF KALE tarafından hazırlanan “**5-AMİNO SALİSİLİK ASİT’İN CYP BAĞIMLI METABOLİZMASININ KARAKTERİZE EDİLMESİ**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 15.07.2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Alaattin ŞEN

Üye
Pror. Dr. Azra BOZCAARMUTLU

Üye
Doç. Dr. Şevki ARSLAN

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 03/08/2016 tarih ve .. 28/17 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet Ali SARIĞÖL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2015FBE042 tarafından nolu proje ile desteklenmiştir.

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



ELİF KALE

ÖZET

5-AMİNO SALİSİLİK ASİT'İN CYP450 BAĞIMLI METABOLİZMASININ KARAKTERİZE EDİLMESİ YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELİF KALE

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ALAATTİN ŞEN)

DENİZLİ, TEMMUZ - 2016

5-aminosalisilik asit (5-ASA), enflamatuvar bağırsak hastalıkları (IBH), özellikle ülseratif kolit gibi hastalıkların tedavisinde dayanak noktası olan bir ajandır. Bu ilacın faz II reaksiyonlarından asetilasyon reaksiyonu ile biyotransforme edildiği biliniyor. Ancak sitokrom P450 enzimleri tarafından metabolize edilmesi hakkında net bilgiler bulunmuyor. Bu çalışmada 5-aminosalisilik asit metabolizmasının temel yolağı olan N-asetilasyon yolağı haricinde alternatif diğere ilaç metabolizması yolaklarının mikrozomal enzimlerden P450 (CYP) enzimleri ile ilişkisine bakıldı. 5-aminosalisilik asitin saf P450 izozimleri ile (CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6, CYP2C19) in vitro olarak inkübasyonu neticesinde metabolize edilip edilmediği tayin edildi. Bu amaçla 5-ASA'nın reaksiyon ortamında kolorimetrik ölçümü için bir metot geliştirilip optimize edildi. Bu metot 5-ASA'nın CYP3A4 ve CYP2D6 izoformları için substrat olarak davrandığını gösterdi. P450 izozimlerinin özgül prototip inhibitörleriyle karşılaştırıldığında 5-ASA ve saf CYP izoformlarının birlikte inkübe edilmesi CYP3A4 ve CYP1A2 yani eritromisin N-demetilaz ve metoksiresorufin aktivitesinin inhibisyonuna yol açtı. Bu sonuçlar 5-ASA'nın CYP3A4 için hem substrat hem de inhibitör olduğunu, CYP2D6 için substrat olduğunu ve CYP1A2 için ise inhibitör olduğunu gösterdi. Bu veriler literatür için yenidir. Seçilen CYP izoformları ile 5-ASA metabolizmasına ek olarak, HepG2 ve Caco-2 hücre hatları üzerinde seçilen genlerin ekspresyonlarına 5-ASA'nın etkisi RT-PZR analizi ile araştırıldı. 5-ASA birçok onkogenin etki mekanizmasıyla birlikte enflamasyona neden olan genlerin ifadesini azalttı. Bu çalışma 5-ASA'nın ilaç-ilaç etkileşimi ve ilaç-gen etkileşimi üzerine yapılacak olan çalışmalara ipucu sağlayacaktır.

ANAHTAR KELİMELER:5-ASA, CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6, CYP2C19

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF CYP450-DEPENDENT METABOLISM OF 5-AMINO SALICYLIC ACID

MSC THESIS

ELİF KALE

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. ALAATTİN ŞEN)

DENİZLİ, JULY 2016

5-aminosalicylic acid (5-ASA) is an effective drug that is currently used for treating diseases such as inflammatory bowel diseases (IBD) and particularly ulcerative colitis. It is known to be mainly metabolized by the acetylation via Phase II enzymes. However, there was no clear information on whether 5-ASA metabolized by cytochrome P450 enzymes or not. In this study, the possible metabolism of 5-ASA by the microsomal enzymes of drug metabolizing cytochrome P450s (CYPs) was examined beyond that N-acetylation pathway. 5-ASA was incubated in vitro with pure CYP isozymes (CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6, CYP2C19) to determine whether it acts as a substrate and/or inhibitor for selective P450. For this purpose, a method was developed and optimized for quantitative measurement of the 5-ASA calorimetrically in reaction medium. It has shown that 5-ASA acted as a substrate for the CYP3A4 and CYP2D6 isoforms. The incubation of pure CYP isoforms together with 5-ASA have led to inhibition of prototype activities of CYP3A4 and CYP1A2, namely erythromycin N-demethylase and methoxyresorufin O-demethylase activities, respectively, as compared to selective prototype inhibitors of P450 isozymes. It was suggested that the 5-ASA is both substrate and inhibitor for CYP3A4, a substrate for CYP2D6 and inhibitor for CYP1A2. These are the new contributions to the literature. In addition to the metabolism of 5-ASA by selected CYP isoforms, the effect of 5-ASA on the gene expression profiles of selected genes in the HepG2 and Caco-2 cell lines were investigated by applying qPCR. 5-ASA suppressed the expression of genes that cause inflammation along with affecting several oncogenes. The tumor suppressor genes and the genes that take part in cell signaling and apoptosis were also affected in a way that the cell health and viability was promoted. This study has provided new clues for further studies required to be carried out to clarify the effect of 5-ASA as drug-drug interaction and drug-gene interactions.

KEYWORDS: 5-ASA, CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6, CYP2C19

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	xii
SEMBOL LİSTESİ	xiii
ÖNSÖZ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Biyotransformasyon Reaksiyonları	1
1.1.1 Faz I Reaksiyonları	2
1.1.1.1 Sitokrom P450 Enzimleri	3
1.1.1.1.1 CYP1 Ailesi	6
1.1.1.1.1.1. CYP1A2 Alt Ailesi	6
1.1.1.1.1.2 CYP2 Ailesi	6
1.1.1.1.2.1. CYP2C9 Alt Ailesi	7
1.1.1.1.2.2. CYP2C19 Alt Ailesi	7
1.1.1.1.2.3. CYP2D6 Alt Ailesi	8
1.1.1.1.3 CYP3 Ailesi	8
1.1.1.1.3.1. CYP3A Alt Ailesi	8
1.2 Nonsteroid Antiinflamatuvar İlaçlar (NSAİİ)	9
1.3 5-Aminosalisilik Asit ve Metabolizması	11
1.4 5-Aminoalisilikasit ve Gen Etkileşimi	14
1.4.1 TNF Sinyal İletimi	15
1.4.2 Enflamasyon Yolağı	16
1.4.3 Onkogenler, Tümör Baskılayıcı Genler ve Hücre Döngüsünü Düzenleyici Proteinler	19
1.4.4 Protein Kinazlar	22
1.5 Tezin Amacı	23
2. MATERYAL ve METOT	24
2.1 Materyal	24
2.1.1 Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	24
2.1.2 Çalışmada kullanılan cihazlar:	24
2.1.3 Çalışmada kullanılan primerler	25
2.2 METOT	26
2.2.1 CYP İzofomlarının 5-ASA Aktivitelerinin Ölçülmesi	26
2.2.2 CYP Aktivitelerinin Prototip Substratları İle Ölçülmesi	28
2.2.2.1 Eritromisin N-Demetilaz Aktivite Tayini	28
2.2.2.2 Aminopren N-Demetilaz Aktivite Tayini	29
2.2.2.3 Metoksirezorufin O-demetilaz (MROD) Aktivite tayini	31
2.2.3 5-ASA'nın Prototip CYP aktiviteleri Üzerine Etkisi	31
2.2.3.1 5-ASA'nın CYP3A4 Aktivitesi Üzerine Etkisi	31
2.2.3.2 5-ASA'nın CYP2C9 ve CYP2C19 Aktivitesi Üzerine Etkisi	32
2.2.3.3 5-ASA'nın CYP1A2 Aktivitesi Üzerine Etkisi	33
2.2.4 Prototip İnhibitörlerin CYP Aktiviteleri Üzerine Etkisi	34
2.2.4.1 Ketakonazol'un CYP3A4 Aktivitesi Üzerine Etkileri	34

2.2.4.2	Omeprazol'ün CYP2C19, Sülfafenazol'ün CYP2C9 Aktivitesi Üzerine Etkileri	35
2.2.4.3	Furafillin'in CYP1A2 Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	36
2.2.5	Hücre kültürü çalışmaları	37
2.2.5.1	Caco-2 Hücreleri	37
2.2.5.2	HepG2 Hücreleri	37
2.2.5.3	Hücre Kültürünün Kurulması	38
2.2.5.4	Hücrelerin Pasajı	38
2.2.5.5	Hücre Canlılığının Belirlenmesi	39
2.2.5.5.1	SÇTT (WST) Metoduyla Hücre Canlılığının Belirlenmesi ...	39
2.2.5.6	Belirlenen Dozlarda 5-ASA Uygulanan Hücrelerden RNA izolasyonu	40
2.2.5.7	Total RNA'nın Agaroz Jel Elektrofrezisi İle Görüntülenmesi	41
2.2.5.8	cDNA SENTEZİ :	41
2.2.5.9	mRNA Ekspresyon Düzeyinin Tayini : Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	42
2.2.6	İstatistiksel Analizler	43
3.	BULGULAR	44
3.1	Aktivite Deneyleri	44
3.1.1	CYP İzofomlarının 5-ASA Aktivitelerinin Ölçülmesi.....	44
3.1.2	CYP Aktivitelerinin Prototip Substratları İle Ölçülmesi, 5-ASA ve CYP Prototip İnhibitörlerinin CYP Aktiviteleri Üzerine Etkisi	45
3.2	SÇTT (WST) Metoduyla Hücre Canlılığının Belirlenmesi:.....	48
3.3	Hücre Kültüründen RNA İzolasyonu	49
3.4	mRNA Ekspresyon Düzeylerinin tayin edilmesi: Gerçek zamanlı Polimeraz zincir reaksiyonu	50
3.4.1	TNF Sinyal İletimi Yolağı Genleri	50
3.4.2	Enflamasyon Genleri	52
3.4.3	Proto-Onkogenler, Tümör Baskılayıcı Genler ve Hücre Döngüsünü Düzenleyici Proteinler	54
3.4.4	Protein Kinazlar	59
4.	TARTIŞMA	61
5.	SONUÇ.....	70
6.	KAYNAKLAR.....	71
7.	EK-1	86
8.	ÖZGEÇMİŞ.....	88

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1 : Bakteriyel sitokrom P450'deki penta yerleşimli hem prostetik grup ..	3
Şekil 2 : Sitokrom P450'deki reaksiyon basamakları	4
Şekil 3 : Sitokrom P450 enzimlerinin isimlendirilmesi	4
Şekil 4 : Sülfasalazin ve bileşenlerinin kimyasal yapısı	11
Şekil 5 : 5-ASA kimyasal yapısı.....	11
Şekil 6 : Salisilazosülfopridinin metabolik yıkımı ve 5-ASA'nın faz II reaksiyonları ile biyotransformasyonu	12
Şekil 7 : Sülfasalazinin (SASP), sülfapiridin (SP), metabolik yolağı.....	13
Şekil 8 : Hücre zarındaki TNF reseptör bölgeleri ve sinyal iletim mekanizmaları.....	16
Şekil 9 : IL-1'in etkileri.....	17
Şekil 10: 5-ASA'nın diazotize reaksiyonu ve floroglusinol ile bağlanma reaksiyonu.....	27
Şekil 11 : Eritromisin N-demetilasyonu.....	29
Şekil 12 : Aminopiren N-demetilasyonu.....	30
Şekil 13 : WST'nin formazana indirgenmesi	39
Şekil 14 : 5-ASA'nın belirlenen metot ile oluşturulan standart eğri grafiğı. ..	44
Şekil 15 : CYP1A2 için belirlenen prosedür sonunda hesaplanan yüzde aktivite grafiğı.....	46
Şekil 16 : CYP3A4 için belirlenen prosedür sonunda hesaplanan yüzde aktivite grafiğı.....	46
Şekil 17 : CYP2C19 için belirlenen prosedür sonunda hesaplanan yüzde aktivite grafiğı	47
Şekil 18 : CYP2C9 için belirlenen prosedür sonunda hesaplanan yüzde aktivite grafiğı.....	47
Şekil 19 : 5-ASA'nın Caco hücre hattında hücre canlılığına etkisi.....	48
Şekil 20 : 5-ASA'nın HepG2 hücre hattında hücre canlılığına etkisi.....	49
Şekil 21 : HepG2 ve Caco-2 hücrelerinden izole edilen RNA'ların jel elektroforez görüntüsü.....	49
Şekil 22 : 5-ASA'nın Caco-2 hücre hattında TNF- α Yolağı ile ilişkili genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi	51
Şekil 23 : 5-ASA'nın HepG2 hücre hattında TNF- α Yolağı ile ilişkili genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi	52
Şekil 24 : 5-ASA'nın Caco-2 hücre hattında enflamasyon Yolağı ile ilişkili genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi	53
Şekil 25 : 5-ASA'nın HepG2 hücre hattında enflamasyon Yolağı ile ilişkili genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi	54
Şekil 26 : 5-ASA'nın Caco-2 hücre hattında tümör baskılayıcı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	55
Şekil 27 : 5-ASA'nın Caco-2 hücre hattında proto-onkogenlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	56
Şekil 28 : 5-ASA'nın Caco-2 hücre hattında hücre döngüsünü düzenleyici genlerin mRNA seviyesine olan etkisi	56
Şekil 29 : 5-ASA'nın HepG2 hücre hattında tümör baskılayıcı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	57

Şekil 30 :	5-ASA'nın HepG2 hücre hattında proto-onkogenleri mRNA seviyesine olan etkisi.....	58
Şekil 31 :	5-ASA'nın HepG2 hücre hattında hücre döngüsünü düzenleyen genlerin mRNA seviyesine olan etkisi	58
Şekil 32 :	5-ASA'nın Caco-2 hücre hattında protein kinaz yolları ile ilişkili genlerin ve hücre döngüsünü düzenleyici genlerin mRNA seviyesine olan etkisi.....	59
Şekil 33:	5-ASA'nın HepG2 hücre hattında Protein kinaz ve sinyal yolları ile ilişkili genlerin ve hücre döngüsünü düzenleyici genlerin mRNA seviyesine olan etkisi	60



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1:	Faz I ve Faz II'de gerçekleşen reaksiyonlar	2
Tablo 2:	Sitokrom P450 ailesi	5
Tablo 3:	Seçilen genler için tanımlanan primer dizileri	25
Tablo 4:	5-ASA'nın CYP izoformları ile aktivite ölçüm reaksiyonu bileşenleri.....	28
Tablo 5:	CYP3A4 aktivitesi için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler	29
Tablo 6:	CYP2C19 aktivite tayini için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler.....	30
Tablo 7:	CYP2C9 aktivite tayini için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler.....	30
Tablo 8:	CYP1A2 aktivite tayini için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler.....	31
Tablo 9:	CYP3A4'ün aktivite tayini için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler.....	32
Tablo 10:	CYP2C9'un aktivite tayini için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler.....	33
Tablo 11:	CYP2C19'un aktivite tayini için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler.....	33
Tablo 12:	CYP1A2'nin aktivite tayini için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler.....	34
Tablo 13:	CYP3A4'nin aktivite tayini için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler.....	35
Tablo 14:	CYP2C19'un aktivite tayini için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler.....	36
Tablo 15:	CYP2C9'un aktivite tayini için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler.....	36
Tablo 16:	Reaksiyon ortamına eklenen bileşenler	37
Tablo 17:	cDNA sentez karışımı ve prosedürü	42
Tablo 18:	qRT-PZR koşulları	42
Tablo 19:	PZR sıcaklık, döngü ve zamanları	43
Tablo 20:	Cyp P450 enzimlerinin 5-ASA ile muamelesi sonucunda hesaplanan aktiviteleri.....	45
Tablo 21:	Caco-2 ve HepG2 hücre hatları için 5-ASA uygulaması sonucunda 24 adet genin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler.	65

SEMBOL LİSTESİ

5-ASA	: 5-aminosalisilik asit
AJE	: Agaroz jel elektroforezi
BSA	: Sığır serum albümin
Casp3	: Kaspaz-3
Casp8	: Kaspaz-8
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CDKNI	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
c-MYC	: MYC protoonkogen proteini
COX	: Siklooksijenaz
CYP1A2	: Sitokrom P4501A2
CYP2C19	: Sitokrom P4502C19
CYP2C9	: Sitokrom P4502C9
CYP2D6	: Sitokrom P4502D6
CYP3A4	: Sitokrom P4503A4
CYP450	: Sitokrom P450
DEPC	: Dietil pirokarbonat
DMEM	: Dulbeco modifiye eagle besiyeri
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen deamin tetra asetik asit
EMEM	: Eagle modfiye esansiyel besiyeri
ERK2	: Mitojen aktive edici kinaz
EtBr	: Etidyum bromür
FADD	: Fas ilişkili ölüm domaini
FBS	: Fetal sığır serumu
HEPES	: 2-[4-(2-Hidroksietil)-1-piperazin]etansulfonik asit
IL-1	: İnterlökin 1
IL-10	: İnterlökin 10
IL-13	: İnterlökin 13
IL-2	: İnterlökin 2
IL-6	: İnterlökin 6
JNK1	: Mitojen aktivite protein kinaz
KPi	: Potasyum fosfat tamponu
LO	: Lipooksijenaz
MAPK	: Mitojen aktive edici protein kinaz
MROD	: Metoksirezorufin O-demetilaz
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF- κB	: Nükleer faktör kappa B
NSİİ	: Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar
P53	: Tümör baskılayıcı protein kinaz
PBS	: Fosfot tamponlu tuz çözeltisi
PDK	: PI3P bağımlı kinazlar
PG	: Prostoglandin
PI3K	: Fosfoinozitid-3 kinaz
PTEN	: Tümör baskılayıcı protein fosfataz ve tensin homolog
qRT-PZR	: Gerçek zamanlı kantitatif polimer zincir reaksiyonu
RB	: Retinoblastom

RIP	: Reseptör etkileşim proteini
SASP	: Sülfasalazin
SÇTT (WST)	: Suda çözülebilen tatrazolum tuzu
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SP	: Sülfapridin
TAE	: Tris-asetik asit-EDTA tamponu
TNF	: Tümör nekrozis faktör
TRADD	: TNF reseptör ilişkili ölüm domaini
TRAF	: TNF reseptör bağlantılı faktör



ÖNSÖZ

Bu çalışma süresince tüm bilgilerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen, bilgi birikiminin artmasında ve bilim anlamında yetişmemde büyük emeği olan, aynı zamanda kişilik olarak da bana çok şey katan değerli danışman hocam Prof. Dr. Alaattin ŞEN'e ayrıca benden bilgisini ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Şevki ARSLAN'a;

Tezimin düzenlenmesi ve değerlendirilmesi aşamasında ki katkılarından dolayı değerli jüri üyem sayın Prof. Dr. Azra BOZCAARMUTLU'ya,

Sadece laboratuvar çalışmalarında değil hayatımın diğer alanlarında da desteklerini ve bilgilerini benden esirgmeden hep yanımda olan doktora öğrencisi Gurbet TURGUT ÇELİK'e, Özden ÖZGÜN ACAR'a, yüksek lisans öğrencilerinden Buket AYAR'a, Buket KABALAY'a ve Nazmiye BOZAĞAÇ'a;

Maddi desteklerinden dolayı Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine;

Bu güne kadar hep arkamda olan, beni her ne olursa olsun her zaman destekleyen, bana güvenen ve beni hep mutlu eden çok sevdiğim bir tanem annem Leyla KALE'ye, canım babam Fahrettin KALE'ye ve biricik ablam Burcu KALE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

Ksenobiyotikler canlı organizmalar tarafından üretilmeyen, vücuda dışarıdan alınan yabancı kimyasallardır. Ksenobiyotikler arasında ilaçlar, böcek öldürücüler, anestetikler, petrol ürünleri, diyet ve sigara dumanı içerisinde yer alan karsinojenler sayılabilir (Murray 1996). Ksenobiyotiklerin organizmadaki enzimlerin etkisiyle kimyasal değişikliklere uğramalarına biyotransformasyon denir. Kimyasalların çoğu lipofilik bileşiklerdir ve uzaklaştırılmadıkları sürece hücrelerde kolaylıkla birikip toksik ya da öldürücü konsantrasyonlara ulaşabilirler. Böyle bir birikimi engellemek için organizmaların ksenobiyotiklerin suda çözünen ve vücuttan kolaylıkla uzaklaştırılan bileşikler haline dönüştürülmeleri gerekmektedir. Metabolizma, bu anlamda kimyasalların biyotransformasyonunda ve organizmadan atılmasında önemli bir rol oynar. Biyotransformasyonun yapıldığı esas yer karaciğerdir, ancak diğer dokular (akciğer, böbrekler, mide bağırsak kanal mukozası ve lümeni, tükürük bezleri, süt bezleri ve deri) da ksenobiyotiklerin metabolizmasında rol oynarlar (Ingelman-Sundberg 2001).

Biyotransformasyon sonucu oluşan bileşiklere metabolit denir ve genellikle metabolitler ana ilaçtan daha polar bileşiklerdir. İlaçların vücut dışına atılmaları için daha polar metabolitlere dönüştürülmeleri gerekmektedir çünkü nonpolar bileşiklerin yağ/su partiyon katsayıları yüksektir, dolayısıyla böbrekten geçerken tekrar plazmaya difüze olurlar ve vücutta uzun süre kalırlar (Rollas 1992).

1.1 Biyotransformasyon Reaksiyonları

Metabolizma reaksiyonları ilaçların enzimatik olarak uğradığı kimyasal değişimlerin türüne göre önce iki büyük gruba ayrılır. Bunlardan ilki, oksidatif, redüktif ve hidrolitik reaksiyonları kapsayan faz I, ikincisi ise enzimatik tepkimeler ile ilaçlara polar yapıların bağlanmasını kapsayan faz II (konjugasyon) reaksiyonlarıdır (Tablo 1).

Faz I reaksiyonlarıyla yapıya - OH, - NH₂, - COOH, - SH gibi polar ve fonksiyonel gruplar takılır, böylece farmakolojik aktivitede azalma (deaktivasyon), artma (aktivasyon), değişme ve toksisitede artma meydana gelebilir.

Faz II reaksiyonları ise, ya yapısında karboksil, alkol, fenol, amin, amid, üretan ve aktif hidrojen içeren gruplar, ya da faz I reaksiyonları ile oluşan fonksiyonel gruplar üzerinden devam eder ve ilaçları aktif olmayan polar metabolitlere dönüştürür (Baer ve Rettie 2006).

Tablo 1: Faz I ve Faz II’de gerçekleşen reaksiyonlar (Ingelman-Sunberg 2001).

FAZ I REAKSİYONLARI			FAZ II REAKSİYONLARI
OKSİDASYON	REDÜKSİYON	HİDROLİZ	KONJUGASYON
Aromatik Halka Hidroksilasyonu	Azo Ve Nitro Grubu Amin Dönüşüm Reaksiyonları	Hidroliz	Glukuronik Asitle Birleşme
Alifatik Hidroksilasyon			Glutasyon Konjugasyonu
N-,O-,S-Dealkilasyon			N-, O-, S- Metilasyon
Desülfürasyon	Nitro Grubu-Hidroksilamin Dönüşüm Reaksiyonları	Dekarboksillenme	Sülfat Konjugasyonu
N-, S-, Oksidasyon (Sülfidril Oluşumu)			
N-Hidroksilasyon			
α -Metilli Aminlerin Oksidasyonu	Aldehid-Alkol Dönüşüm Reaksiyonları	Glikozidlerin Hidrolizi	Asetilasyon Aminoasitlerle Birleşme

1.1.1 Faz I Reaksiyonları

İlaç metabolizma reaksiyonlarının en önemlisi oksidatif reaksiyondur. Çünkü bu reaksiyon birçok ilaç ve ksenobiyotiğin organizmadan eliminasyonunu sağlar. Bu kimyasal değişikliği yürüten enzim sistemi sitokrom P450 (CYP450) ve monooksijenazlar (mikrozomal enzimler)’dir.

1.1.1.1 Sitokrom P450 Enzimleri

P450 enzimleri oksijenazlar olarak adlandırılan enzim ailesinin üyesidir. CYP450 enzimleri çoğu ilaç ve diğer lipofilik xenobiyotiklerin oksidatif biyotransformasyonunu katalize edebilen temel enzim ailesini oluştururlar (Nelson 2004; Guengerich 2008; Zanger ve diğ. 2008). P450 enzimleri intraselüler hemproteinlerdir (Şekil 1). Her biri yaklaşık 500 aminoasit içerir ve prostetik grup olarak demir protoforfirin halkasına sahip olarak zara bağlıdır (Hasler ve diğ. 1999).

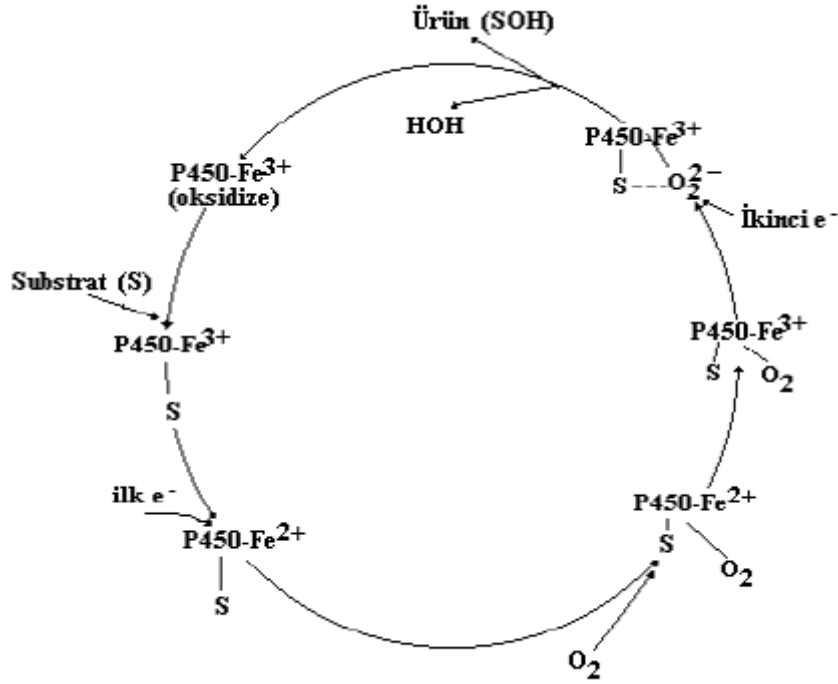


Şekil 1 : Bakteriyel sitokrom P450'deki penta yerleşimli hem prostetik grup (Ortiz de Monteliano 1989).

Keşfedilmeleri 1958 yılında Klinberg tarafından olmuştur (Guengerich 2008). Genellikle mikrozoim olarak adlandırılan endoplazmik retikulum veziküllerinden hazırlanan süspansiyondan karbonmonoksit gazı geçirildikten sonra sodyum dithionate gibi indirgeyici bir ajan eklenince çok özel bir absorbans spektrumu elde edilir. Bu işlem sırasında indirgenmiş hem proteinine karbonmonoksit bağlanır ve 450 nm'de pik yapan bir absorbans spektrumu elde edilir. 450 nm'de gösterdikleri absorbans sebebiyle sitokrom P450 olarak isimlendirilirler (Omura ve Sato 1964). CYP450 enzimlerinin aktif noktası demir iyonlarıdır. Memeli P450 enzimleri oksidatif dönüşüm için bir dizi reaksiyonu katalizler. Aktif bölge oksitlenmiş durumda iken enzim substratı bağlar ve enzim substrat ile kompleks yapar (Peterson ve Prough 1986). Kompleksin indirgenmesi için NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi ile NADPH'dan bir elektron, enzim-substrat kompleksine transfer edilir. Enzim-substrat-oksijen kompleksi ayrışır. Substrat bir tane moleküler oksijen tarafından okside edildiği için bu reaksiyon monooksijenasyon reaksiyonu bu

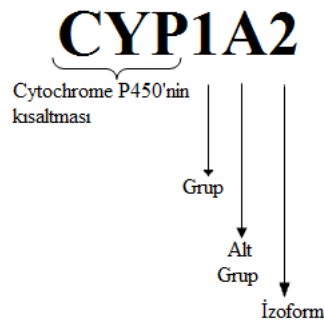
enzimlere de P450 monooksijenaz enzimleri adı verilir (Şekil 2), (Lu ve Coon, 1968; Lu ve diğ. 1976; Adalı ve Arıncı, 1990).

P450 enzimlerin katalizlediği genel reaksiyon; $\text{NADPH}^+ + \text{O}_2 + \text{SH} \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O} + \text{S-OH}$ şeklindedir. Buradaki substrat (S), steroid, yağ asiti, ilaç veya oksijen bağlanma yeri olarak görev yapan alkan, alken, aromatik halka veya heterosiklik halka ekleri olan diğer kimyasal maddeler olabilir (Guengerich 1993).



Şekil 2 : Sitokrom P450'deki reaksiyon basamakları.

Adlandırma sisteminde CYP1A2 kısaltmasında CYP; sitokrom P450'yi, 1 rakamı; grup numarasını, A harfi; alt grup sonda yer alan 2 rakamı ise izoformu göstermektedir (Şekil 3).



Şekil 3 : Sitokrom P450 enzimlerinin isimlendirilmesi (Nelson ve diğ. 1996).

İnsan genomunda 57 tane CYP450 kodlayan gen bulunur (Bertz ve German 1997).

- Daha çok ksenobiyotik metabolizmasında yer alan CYP aileleri (CYP1-3),
- Endojen metabolizmasında rol alan CYP aileleri (CYP5- 51) ,
- Yağ asitleri metabolizmasında ve kısmen ksenobiyotik metabolizmasında yer alan CYP4 ailesi

Bunlardan ilk grup günümüzde kullanılan ilaçların faz I bağımlı metabolizmalarının yaklaşık % 70 - 80'ini gerçekleştiren sitokrom P450 enzimlerini içerir (Tablo 2), (Evans ve Relling 1999).

Tablo 2: Sitokrom P450 ailesi (Hukkanen 2000'den değiştirilerek şematize edilmiştir.)

Gen Ailesi	Görevi	Alt Aile	İsimleri
CYP 1	ilaç ve steroid (özellikle östrojen) metabolizması	3 alt aile, 3 gen, 1 Psödogen	CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1
CYP 2	ilaç ve steroid Metabolizması	13 alt aile, 16 gen, 16 psödogen	CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13,CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9,CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6,CYP2E1, CYP2F1, CYP2J2, CYP2R1
CYP 3	ilaç ve steroid Metabolizması	1 alt aile, 4 gen, 2 Psödogen	CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43
CYP 4	Araşidonik asit ya da yağ asidi metabolizması	6 alt aile, 11 gen, 10 psödogen	CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4V2, CYP4X1, CYP4Z1
CYP 5	Tromboksan A2 sentezi	1 alt aile, 1 gen	CYP5A1
CYP 7	Safra asidi biyosentezi	2 alt aile, 2 gen	CYP7A1, CYP7B1
CYP 8	Çeşitli görevleri bulunmaktadır.	2 alt aile, 2 gen	CYP8A1 (prostasiklin sentezi), CYP8B1 (safra asidi biyosentezi)
CYP 11	Steroid biyosentezi	2 alt aile, 3 gen	CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2
CYP 17	Steroid biyosentezi, 17- alfa hidroksilaz	1 alt aile, 1 gen	CYP17A1
CYP 19	Steroid biyosentezi	1 alt aile, 1 gen	CYP19A1
CYP 20	Görevi bilinmiyor	1 alt ajle, 1 gen	CYP20A1
CYP 21	Steroid biyosentezi	2 alt aile, 2 gen,1 Pseudogen	CYP21A2
CYP 24	Vitamin D yıkımı	1 alt aile, 1 gen	CYP24A1
CYP 26	Retinoik asid hidroksilaz	3 alt aile, 3 gen	CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1
CYP 27	Çeşitli görevleri bulunmaktadır.	3 alt aile, 3 gen	CYP27A1 (safra asidi biyosentezi), CYP27B1 (vitamin D3 1-alfa hidroksilaz), CYP27C1 (görevi bilinmiyor)

CYP 39	2,4-hidroksikolesterolün 7-alfa hidroksilasyonu	1 alt aile, 1 gen	CYP 39 A1
CYP 46	Kolesterol 24-hidroksilaz 1	1 alt aile, 1 gen	CYP46A
CYP 51	Kolesterol biyosentezi	1 alt aile, 1 gen,3 psödogen	CYP51A1 (lanosterol 14-alfa demetilaz)

1.1.1.1.1 CYP1 Ailesi

Psödogen bulunmayan bu gen ailesi ilaç-steroid (özellikle östrojen) metabolizmasında önemli rol oynar ve CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 genlerini içerir (Nelson ve diğ. 1996). Yüksek ölçüde korunmuş olan CYP1A1 ve CYP1A2 genleri 15q24.1 kromozomal bölgede yer alır ve yedi ekzon ve altı intron bölgesi içerir (Murray ve diğ. 2001; Nelson ve diğ. 2004). 2, 3, 7, 8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) ve polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH) ile uyarılmakta ve PAH metabolizmasının DNA'ya bağlanma aşamasında aktiftirler (Shimada ve diğ. 1994).

1.1.1.1.1.1. CYP1A2 Alt Ailesi

Karaciğerde nispeten yüksek ekspresyonu nedeniyle CYP1A2 birçok klinik açıdan önemli ilaç metabolizmasında önemli bir rol oynar (Gunes ve Dahl 2008; Zhou ve diğ. 2009). Karaciğerde total CYP450 miktarının % 10-15'ini oluşturur. Bazı ilaçlar antiandrojen flutamid dâhil CYP1A2 tarafından bioaktive edilir (Kang ve diğ. 2008). Aril ve 2 aminoantrasen ve 2-asetilaminofloren gibi heterosiklik aminlerin metabolik aktivasyonunu katalizler. Ayrıca asetaminofen, antipirin, teofilin, kafein, 7-etoksiresorufin, lidokain, fenasetin gibi ksenobiyotikleri oksitler (Ingelman-Sundberg 2001). Bu ilaçların arasında endojen substratlar arakidonik asit, prostaglandin, östrojen, melatonin ve retinoik asit bulunur. (Nebert ve Dalton 2006).

1.1.1.1.2 CYP2 Ailesi

Heterojen enzimlerden oluşan bu aile ilaç ve steroid metabolizmasında önemli rolü olan bir diğer CYP450 ailesidir. İnsan CYP2C altailesinde bulunan

CYP2C18 CYP2C19, CYP2C9 ve CYP2C8 yüksek oranda homologtur. 10q23.3 kromozomal bölgede bu sıra ile yer alan (sentromerden telomere) yaklaşık ~390 kb gen kümelerinden oluşur. CYP2C9 bu alt aile içerisinde diğerlerine kıyasla en yüksek seviyede eksprese edilir (Coller ve diğ. 2002; Koukouritaki ve diğ. 2004; Rettie ve Jones 2005; Naraharisetti ve diğ. 2010; Ohtsuki ve diğ. 2012).

1.1.1.1.2.1. CYP2C9 Alt Ailesi

CYP2C9 yaklaşık 55 kb uzunluğunda ve 9 ekzondan oluşan bir gen dir. CYP2C9 geni kromozomun 10 q24.1 bölgesinde bulunur. CYP2C9 da diğer P450 enzimleri gibi substratlarının dealkilasyon, demetilasyon ve hidroksilasyonundan sorumludur. Ayrıca diğer P450 enzimleri gibi CYP2C9'un metabolize ettiği substratlar arasında endojen bileşiklerde yer alır. CYP2C9 karaciğer araşidonik asitini tek başına metabolize eder. CYP2C9 için en iyi bilinen ilaç substratları yapılarında karboksilik grup içeren zayıf asitlerdir. Tolbutamid gibi oral hipoglisemik ajanlar, fenitoin gibi antiepileptik ilaçlar, oral antikoagülan kumadin, ibuprofen gibi nonsteroidal antiinflamatuar ilaçlar ve losartan gibi angiotensin II blokerleri CYP2C9 tarafından metabolize edilir (Ablin ve diğ. 2004). CYP2C9 birçok ilacın metabolize edilmesine katılır ve bu gendeki polimorfizm ilaçların etkisini değiştirebilir veya toksisitesini artırabilir (Ablin ve diğ. 2004).

1.1.1.1.2.2. CYP2C19 Alt Ailesi

CYP2C19 enzimi 10'nuncu kromozomda (10q24.1-24.3) bulunan CYP2C19 geni tarafında kodlanır (Conney 2003). Bu gende bulunan 9 ekzon 490 aminoasitlik enzimin kodlanmasında sorumludur. CYP2C19 antiülser, antikanser, antidepresan, antihipertansif ve antitrombotik gibi çeşitli ilaç gruplarının bulunduğu birçok ilacın oksidatif biyotransformasyonundan sorumludur.

1.1.1.1.2.3. CYP2D6 Alt Ailesi

İki formu vardır. Bu formların enzimatik yetileri farklıdır ve ilaçların birçoğunun metabolizmasında rol oynarlar. Geni 22. kromozomda yer alır. Karaciğerde bulunan enzimlerin % 2'sini oluştursa da 70'den fazla farmasötüğün oksidatif metabolizmasında yer alır. Karaciğer dışında da bulunur (Pollock 2004). Beyinde bu enzim karaciğerdeki düzeyinin % 0,25'i oranında bulur. Bu enzim beyinde de hepatik enzimin benzeri olarak tespit edilmiş olup dopamin taşınmasıyla bağlantılıdır. Varlığı veya yokluğu ile parkinson hastalığı, bazı kanserler, alzheimer hastalığı vb. gibi hastalıklara duyarlılığı değiştirir. Antidepresan, antihistamin, antidiyabetik gibi ilaçların metabolizmasında rol oynar (Nemeroff ve diğ. 1996).

1.1.1.1.3 CYP3 Ailesi

CYP3 ailesi sadece bir alt aile içerir. Bu aile CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 ve CYP3A43 genlerini içerir. CYP3A enzimleri 'overlapping' katalitik aktiviteye sahiptir ve ekspresyonları dokuya göre farklılık gösterir. CYP3 ailesi CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 ve CYP3A43 genlerini içerir. Özellikle CYP3A4 karaciğerde, CYP3A5 ekstrahepatik dokularda eksprese olurken, CYP3A7 fetal karaciğerde eksprese olur.

1.1.1.1.3.1. CYP3A Alt Ailesi

CYP3 karaciğerde en çok bulunan ailedir ve tek bir alt aileyi içerir. N-dealkilasyon reaksiyonlarını katalize eden CYP3A4 ilaç metabolizmasında rol alan CYP450 enzimleri içinde, en aktif olanıdır. Ayrıca kalın bağırsakta yüksek yoğunlukta bulunur (Rendic ve diğ. 1997). CYP3A alt ailesi, protein seviyesi bireyler arasında 40 kat değişebilmesine rağmen, insan karaciğerindeki toplam P450'nin % 30'unu oluşturur (Shimada ve diğ. 1994). Bu alt aile 3 üyeden oluşur (Nelson ve diğ. 1996). İnsan karaciğerinde en çok bulunan CYP enzimi CYP3A4'tür ve pek çok dokuda ekspres edilir. Ancak ilaçların ve diğer kimyasalların metabolizmasında, karaciğer kadar ince bağırsaktaki ekspresyonda çok önemlidir. CYP3A4 günümüzde kullanılan ilaçların yarısının metabolizmasına katılır (Bertz ve

Granneman 1997). Örneğin; testosteron 6 β -hidroksilasyonu, nifedipin oksidasyonu ve eritromisin *N*-demetilasyonu bu enzim tarafından katalize edilir. CYP3A4'un bilinen substratları, asetaminofen (Mr 151), siklosporin A (Mr 1201) gibi düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. CYP3A4 enzimi karaciğerde ilaç metabolizmasında rol alan en önemli CYP alt ailesidir. Hepatik CYP enzimleri % 30-40 oranında CYP3A4 içerir (Shimada ve diğ. 1994) .

1.2 Nonsteroid Antienflamatuar İlaçlar (NSAİİ)

Çoğu organik asit yapısında olan ve yapısal olarak genellikle heterojen olmalarına rağmen benzer terapötik etki ve yan etki gösteren bir ilaç grubudur. Analjezik, antipiretik ve anti-enflamatuar etki gösterirler. Aspirin bu grup ilaçların prototipidir ve nonstreoid anti-enflamatuar ilaçlar (NSAİİ) olarak tanımlanırlar (Brooks 2000; Ardoin ve Sundry 2006). İlk kez 1820'de kolşisin, 1860'da salisilikasit tanımlanmış ve ilk aspirin tablet 1897'de Felix Hoffman tarafından üretilmiştir. Nonstreoid antieflamatuar ilaç isminin 1949 yılında ilk kullanılışı, fenilbutazon'un sentezlenmesi ile eş zamanlıdır. 1971'de John R. Vane etki mekanizmaları konusunda yaptığı çalışmalar sonucunda ilk defa siklooksijenaz (COX) enzimini tanımlamış ve bu buluşla Nobel ödülü almıştır (Vane 1971). 1976'da ise ilk defa prostoglandin endoperoksit sentetaz enzimi elde edildi. Bu konu ile ilgili son gelişme 1990'ların başında COX'un tek bir molekül olmadığı, birden fazla izomerlerinin ve bunların da farklı işlevlerinin olduğunun gösterilmesi oldu (Brooks ve diğ. 2000). Semptomatik iyileşme sağlayan bu ilaçlar halen dünyada en çok reçete edilen ilaçların başında gelir. Toplumda NSAİİ kullanım prevalansının yaklaşık % 5 olduğu düşünülür (Stovitz ve Johnson 2003).

Enflamasyona neden olan uyarılar, araşidonik asitten COX enzimi yoluyla prostasiklin sentezini artırır ve bu sırada siklik endoperoksitler (PGG₂ ve PGH₂), tromboksan A₂ ve trombosit aktivite edici faktör (PAF) oluşumu da artar. Bu maddeler veya bunlardan oluşan metabolitler enflamasyon bölgesinde bulunur. Benzer şekilde iltihaplı dokuda lipooksijenaz (LO) yolu ürünleri olan lökotrienlerin miktarlarının arttığı da yapılan çalışmalarla gösterildi (Solomon 2009).

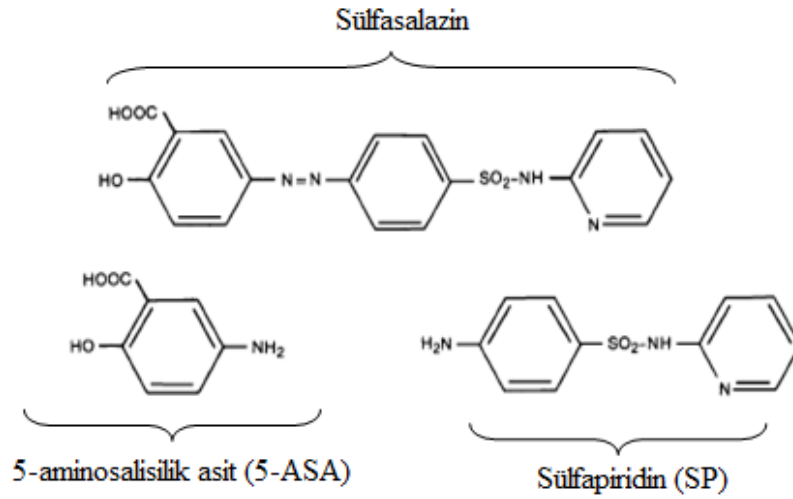
Eikozanoidlerin kaynağını teşkil eden araşidonik asit, hücre membranındaki fosfolipidlerden fosfolipaz A2 enzimi aracılığı ile koparılır. NSAİİ'lar ise, COX enzimini inhibe ederek enflamasyona aracılık eden COX ürünlerinin sentezini azaltırlar. Bu ilaçların antienflamatuar etki güçleri ile COX enzimini inhibe etme potensiyelleri arasında sıkı bir korelasyon vardır. Daha güçlü antienflamatuar etki gösteren glukokortikoidler ise fosfolipaz A2 enzimi üzerine inhibitör etki göstererek, sadece COX ürünlerinin değil, aynı zamanda LO ürünlerinin sentezini de azaltırlar (Solomon 2009.). 1991 yılında Daniel L Simmons tarafından COX-2 enzimi bulundu ve böylece COX enziminin en az iki formunun olduğu ortaya kondu. Bunlardan COX-1 yapısal bir enzimdir ve birçok normal fizyolojik olayda düzenleyici rol oynar. Prostaglandinler (PG) ve tromboksanın fizyolojik etkilerinden COX-1 tarafından sentez edilen prostanooidler sorumludur. COX-2 enflamasyonda ekspres edilen bir enzimdir ve COX-2'nin inhibisyonu NSAİİ'ların istenen etkilerine yol açabilir. NSAİİ'ların bu 2 enzim üzerine olan selektiviteleri aynı değildir ve büyük farklılıklar gösterir. Selektif olmayan inhibisyonda COX-1 enzim inhibisyonuna bağlı yan etkiler ortaya çıkarken, selektif inhibisyonda enflamasyon yan etkiler olmadan baskılanabilir (Green 2002; Solomon 2009).

NSAİİ'lerin antienflamatuar etkilerinden sorumlu diğer başka olası mekanizmaları da vardır. Nötrofillerin çeşitli uyarılar tarafından aktivasyonunun inhibe edilmesi; prostaglandinler, nötrofilleri, monosit ve makrofajları aktive ederek onları enflamatuar bölgeye çekerler. Bu ilaçlarla prostaglandin sentezinin inhibe edilmesi sonucunda, nötrofil lökositlerin aktive edilmesi ve buna eşlik eden olaylar inhibe edilir. Aktif oksijen radikallerinin bağlanması; gerek LO yolunda ve gerekse COX yolu esnasında oldukça sitotoksik olan aktif serbest oksijen radikalleri oluşur. Bazı NSAİİ'lar antienflamatuar etkilerini kısmen enflamasyon bölgesinde aktif oksijen radikallerini bağlayarak veya oluşmalarını inhibe ederek yaparlar.

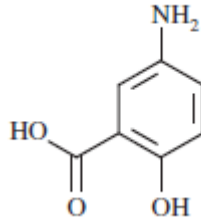
NSAİİ'lerin bu kadar yoğun kullanılmalarına rağmen akciğer, karaciğer ve gastrointestinal sistemlerde ciddi yan etkilere neden olabilir. Kronik kullanım ile ilişkili olarak doz bağımlı olmayan toksisiteler genel olarak karaciğerde gözlenir ve bu toksik aktivitenin mekanizması tam olarak aydınlatılmış değildir (Lewis 1984; Jurima Romet ve diğ. 1994; Boelsterli ve diğ. 1995).

1.3 5-Aminosalisilik Asit ve Metabolizması

İlk 5-aminosalisilik asit (5-ASA) ön formu olan sülfasalazin, 1940 yılında İsveç Profesör Nana Svartz tarafından romatoid artrit tedavisi için 5-ASA ve sülpiridin (SP) azo bağı ile bağlanmasıyla oluşan bir ilaç olarak geliştirildi (Şekil 4), (Das ve Dubin, 1976). Mesalazin, mesalamin ya da 5-ASA olarak bilinen bu molekülün kapalı formülü $C_7H_7NO_3$ 'dur. 153,135g/mol moleküler ağırlığa sahip olan mesalazin inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBH), özellikle ülseratif kolit gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan nonsteroid antiinflamatuvar bir ajandır (Şekil 5), (Kruis ve diğ. 2001).



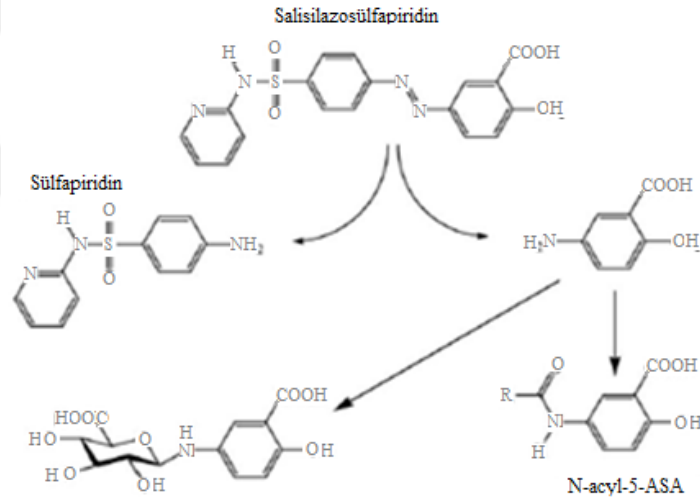
Şekil 4: Sülfasalazin ve bileşenlerinin kimyasal yapısı



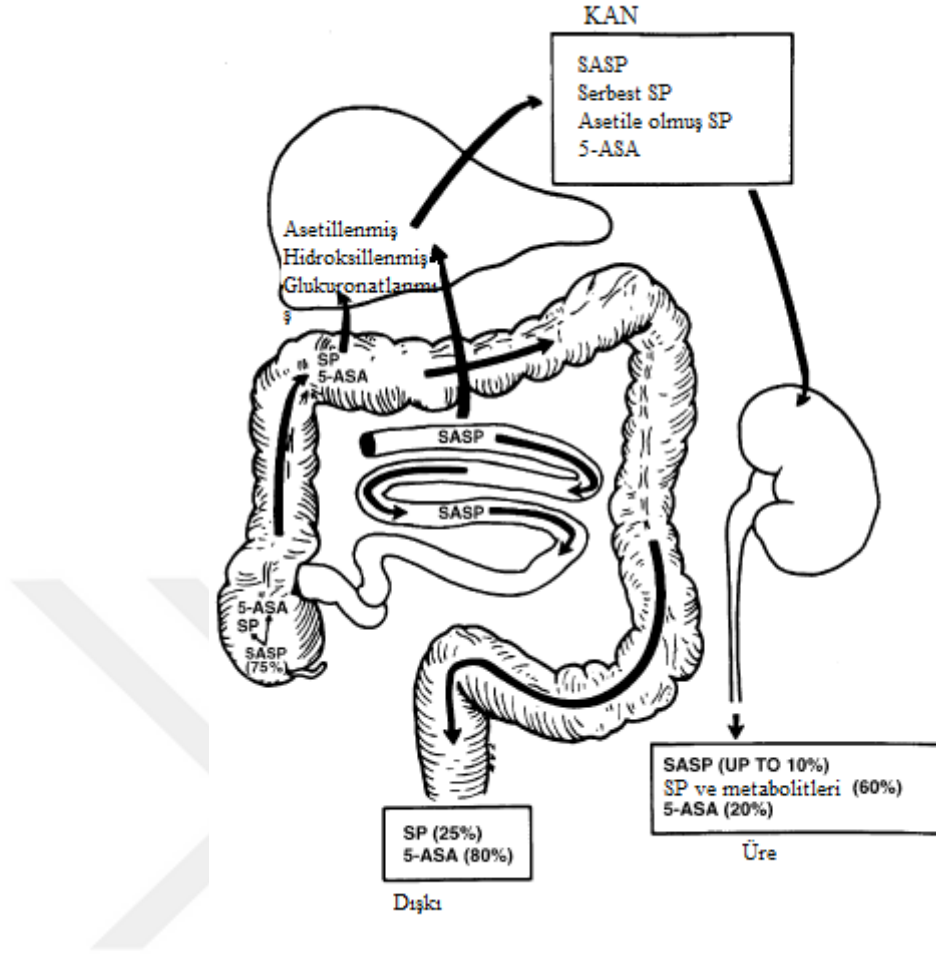
Şekil 5 : 5-ASA kimyasal yapısı

5-ASA'nın muhtemel etki mekanizmaları arasında 'natural killer' hücrelerinin, antikor sentezinin, COX ve LO yollarının ve nötrofil fonksiyonlarının

inhibisyonu ile serbest oksijen radikallerinin temizlenmesi yer alır. 5-ASA (sülfasalazinde aktif parça) ve sülfapridinin her ikisi de ince bağırsaktan kolayca absorbe olabilirse de azo bağının varlığı her ikisinin ince bağırsakta absorbe olmasını engeller (Shafii ve Das 1982). Sülfasalazin çekuma ulaşınca azoredüktaz enzimi aracılığıyla SP ve 5-ASA arasındaki azo bağını parçalar ve aktif bileşik 5-ASA açığa çıkar (Peppercorn ve Goldman 1972; Das ve diğ. 1974). Aktif bileşik olan 5-ASA bağırsak duvarı ve karaciğerde faz II biyotransformasyon reaksiyonlarından olan asetilasyon reaksiyonları tarafından asetile edilir ve N-asetil-5-ASA'ya metabolize olur (Şekil 6). SP parçaları kolaylıkla kolondan absorbe olabilirler, karaciğerde glukronik asit ile konjuge olurlar ve asetile olurlar sonunda üre ile vücuttan çıkarılırlar. Halbuki 5-ASA kolonik epitel hücreleri tarafından sınırlı lokal metabolizma ile dışkı ile atılır (Şekil 7), (Das ve Sternlieb 1975; Das ve Dubin 1976).



Şekil 6 : Salisilazosülfopridinin metabolik yıkımı ve 5-ASA'nın faz II reaksiyonları ile biyotransformasyonu.



Şekil 7 : Sülfasalazinin (SASP), sülfapiridin (SP), metabolik yolağı. (Das ve Sternlieb 1975)

Sülfasalazinin ülseratif kolit hastalığının kontrol altında tutulabilmesi ve gerilemesinin başlamasında etkinliği vardır (Azad ve Howes 1980). Bununla birlikte doz bağımlı toksisite ve SP parçalarının yan etkilerinin yüksek oranı yüzünden sülfasalazinin kullanımı kısıtlar (Das 1973). Gerçekte SASP molekülünün yaklaşık 2/3 ü SP'lerden kaynaklı istenmeyen yan etkiler ya da toksisite olmadan enflamasyon bölgesinde yüksek doz 5-ASA kullanılmasına olanak sağlar (Das 1973). Oral olarak alınan 5-ASA tek başına jejunumdan hızlıca emilir, ince bağırsak ve kalın bağırsak hastalığı olan hastalarda bu nedenle 5-ASA sınırlı etki gösterir. Bu sorunu aşabilmek için iki temel gecikmeli salınma formülasyonu geliştirildi. 5-ASA'nın pH-bağımlı formu olan asacol 5-ASA'nın akrilik resin ile kaplanmasıyla hazırlanır. Pentasa (mesalamin formu) zamanında salınmış 5-ASA'nın etilselüloz mikrogranüller içine kapsüllenmiş formudur. Akrilik ana resin pH 7'den daha büyük pH'larda erir

dolayısıyla 5-ASA salınımının yaklaşık % 10 ila 15'i terminal ileumda ve çoğunluğu kolonda gerçekleşir. Etilselüloz yarı geçirgen zar görevi görür ve etkili bir şekilde 5-ASA'nın proksimal ince bağırsakta zaman bağımlı salınımının başlamasına izin verir. Toplam miktarın % 30 - % 40'ı ince bağırsakta geri kalanı kolonda salınır. Bu formülasyonlar maksimal ilaç emiliminin ince bağırsağın distal kısmında ve kolonda olmasını sağlar böylece bu ilaçlar kolon ve ince bağırsağın distal kısmını ilgilendiren hatalıklardan olan ülseratif kolit ve crohn hastalıkları için ideal hale gelir (Hillel ve diğ. 2006). Çalışmalar potansiyel patojenik T hücresi ve B hücresi popülasyonlarının klonal genişlemesini engelleyen, buna bağlı olarak, hem in vivo hem in vitro lenfosit DNA sentezi ve hücre döngüsü ilerlemesini bloke ederek SASP ve 5-ASA immünsupresif etkileri olduğunu gösterir (Hillel ve diğ. 2006).

Salisilik asitin bir türevidir olan 5-ASA, metabolizmanın hasarlı yan ürünleri olan serbest radikallere karşı antioksidandır. 5-ASA'nın, güçlü bir serbest radikal sürükleyici ve antioksidan olarak hareket etme yeteneğine sahip olması, oksijen ve nitrojenin ürettiği reaktif metabolitlerin zararlı etkilerini indirgemesi 5-ASA'nın bir başka olası ilaç etkisidir (Craven ve diğ. 2008).

1.4 5-Aminoalisilikasit ve Gen Etkileşimi

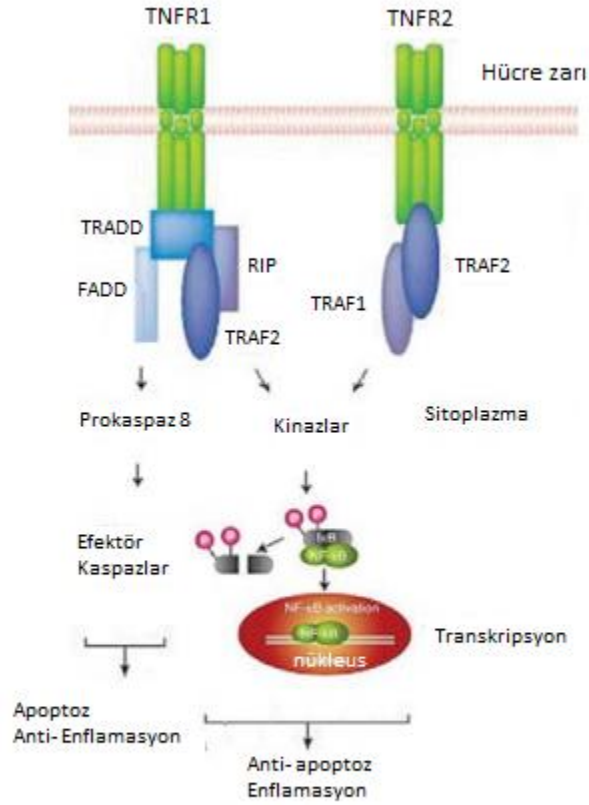
In vitro çalışmalar, SASP ve 5-ASA'nın enflamatuar hücresel yanıt ile ilişkili olan lipoksijenaz yolağının çeşitli ürünlerin sentezini bloke ettiğini gösterir. Bu eylem, prostaglandin oluşumunu engeller (Sharon ve diğ. 1978; Stenson ve diğ. 1982; Hawkey ve diğ. 1985). Fagositoz, kemotaksis ve yapışma da dâhil olmak üzere tüm akut enflamatuar yanıtta önemli bir rol oynayan makrofaj ve polimorfonükleer lökosit fonksiyonları 5-ASA ve sülfasalazin ile önemli ölçüde engellenir (Rhodes ve Bartholomew 1981; Cominell ve diğ. 1992). 5-ASA'nın kolorektal kanserin önlenmesi ve kanser ile kardiyovasküler hastalıklar gibi diğer durumların tedavisindeki önleme potansiyeli ile ilgili çalışmalar bulunur (Solomon 2008). Çeşitli araştırmalar 5-ASA ajanları, interlökin 1 (IL-1), interlökin 2 (IL-2) ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi proenflamatuar sitokinlerin fonksiyonunu inhibe etmede başarılı olduğunu ortaya koyar. Artan mukozal üretim bu proenflamatuar ajanlar ile ilişkilendirilir (Shanahan ve diğ. 1978; Rhodes ve Bartholomew 1981; Hawkey ve diğ. 1985; Cominell ve diğ. 1992; Fiocchi ve Podolsky 1995).

1.4.1 TNF Sinyal İletimi

TNF sinyal iletiminde iki mekanizma görülür. Bunlar apoptoz (antiinflamasyon) ve inflamasyon mekanizmalarıdır. Bu sinyal iletim mekanizmasında apoptoz veya inflamasyon yollarının başlamasının ilk adımını makrofaj veya diğer hücrelerden salınan TNF'lerin konak hücre zarındaki reseptörlerine bağlanması oluşturur. TNF, reseptöre bağlandığı zaman reseptörler aktive olarak sitozol içerisinde sinyallenme mekanizmasını başlatan adaptör proteinler ile birleşirler. Bu adaptör proteinlerin bir grubunu TRAF'lar (TNF reseptör bağlantılı faktörler) ve RIP (reseptör etkileşim proteini) diğerini de TRADD (TNF reseptör ilişkili ölüm domaini) ve FADD (Fas ilişkili ölüm domaini) oluşturur. TRAF adı verilen adaptör proteinler birden altıya kadar sıralanır. Bu sinyal mekanizmasında TRAF-1 ve TRAF-2 adaptör proteinleri görev alır (Abbas ve diğ. 1991).

Hücre zarında bulunan tümör nekroz faktör reseptörü 1 (TNF-RI) reseptörünün sitozol içerisinde kalan kısmı eğer sitozoldeki TRADD, TRAF-2 ve RIP adaptör proteinleri ile birleşirse bu sinyallenme mekanizmasında kinaz enzimleri aktif hale gelir. Aktive olmuş bu kinaz enzimleri daha sonra sitozol içerisinde bulunan ve bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa B (NF- κ B)'yi uyarırlar. Sitozol içerisinde inhibitörü olan I κ B (inhibitör κ B) ile bağlı haldeki NF κ B aktif kinazların etkisiyle inhibitöründen ayrılır. I κ B'den ayrılmış olan NF κ B çekirdek zarına girmek için hazır hale gelir. Şayet bu ayrılma gerçekleşmez ise NF κ B sitozol içerisinde kalır. Daha sonra çekirdek içerisine girmiş olan NF κ B; inflamasyon olayında yer alan bazı sitokinler, kemokinler ve endotel adezyon molekülleri ile ilgili birçok genin transkripsiyonunu sağlar. Böylece inflamasyon yolu gerçekleşmiş olur (Kırmaz ve Özentürk 2004). Diğer bir sinyal mekanizması sonucuyla da apoptoz (antiinflamasyon) meydana gelir. Bu mekanizma da TNF-RI reseptörü sitozol içerisinde TRADD, TRAF-2 ve RIP yerine TRADD ve FADD adaptör proteinleriyle birleşirse, bu kez kinazlar değil prokaspaz8 enzimi aktive edilir ve böylece apoptoz ile sonuçlanan kaspaz aktivasyonu gerçekleşir. Ancak hücrede gerçekleşen bu iki ayrı mekanizma oluşumunda, hücrenin hangi yolu nasıl seçtiği halen tam olarak açıklanamamaktadır (Şekil 8). Görüldüğü gibi TNF-RI reseptörü hem apoptoz hem de inflamasyon sinyal mekanizmalarını oluşturabilir. TNF-RI reseptörüne karşılık TNF-RII reseptörü ise, sadece inflamasyon sinyal mekanizmasını gerçekleştirebilir.

Apoptoz sinyal mekanizması engellenir. Burada da yine TNF ile birleşmiş TNF-RII reseptörüne sitozol içerisinde TRAF-1 ve TRAF-2 adaptör proteinleri bağlanır. Sırasıyla önce kinaz aktivasyonu ardından NFκB transkripsiyon faktörünün aktive olması ile enflamasyon yolu gerçekleşmiş olur ve apoptoz engellenir (Mocellin ve diğ. 2005).



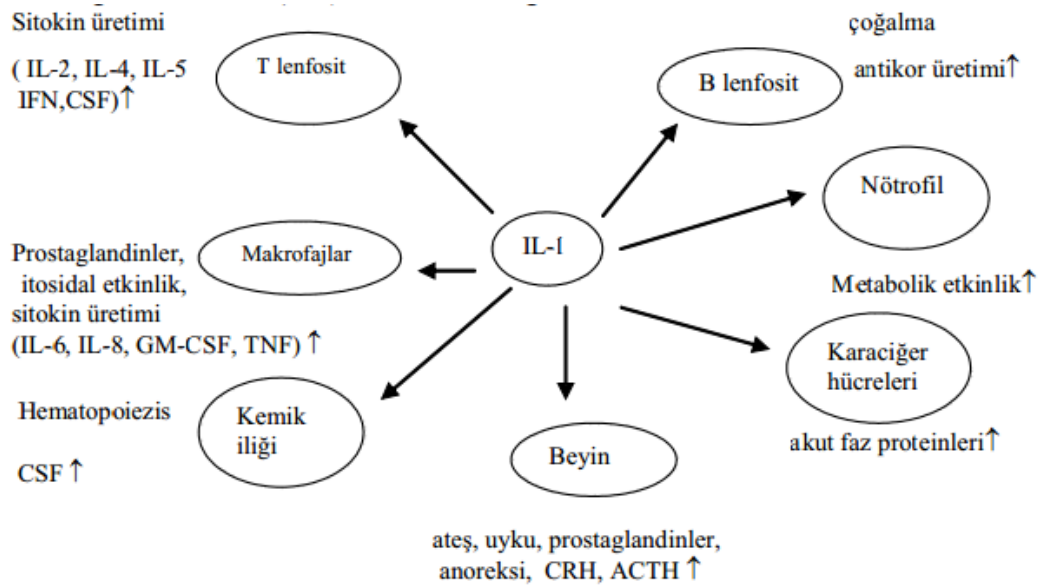
Şekil 8 : Hücre zarındaki TNF reseptör bölgeleri ve sinyal iletim mekanizmaları (Mocellin ve diğ. 2005'ten değiştirilerek şematize edilmiştir)

1.4.2 Enflamasyon Yoluğu

Hücre sel bağışıklık yanıtları, sitokinler olarak adlandırılan protein ve glikoprotein yapısındaki maddeler tarafından düzenlenir. İnterlökinler (IL1-18), granülosit koloni stimulan faktör (G-CSF) gibi koloni sitimulan faktörler, TNF α , β , γ gibi gelişim ve büyüme faktörleri sitokinler olarak adlandırılır (Trotta 1991). Lökositler arasındaki haberleşmeyi düzenlemede görev yapan monositler, doku makrofajları ve lenfositler tarafından üretilen moleküllere 1979 yılında İsviçre'de

yapılan II. Uluslararası Lenfokin kongresinde “ İnterlökin” adı verilmektedir. (Arda ve diğ. 1994).

IL-1, endojen pirojen veya lenfosit etkinleştirici faktör olarak da adlandırılan IL-1, makrofajlarda, endotel hücrelerinde, dendritik hücrelerde, astrositlerde, keratinositlerde, fibroblastlarda, nötrofiller ile T ve B lenfositlerde üretilir. IL-1 hücrede kalır ve hücrenin diğer bir hücre ile teması sırasında etkisini gösterir (Arda ve diğ. 1994). IL-1, damar endoteli ve tek çekirdekli fagositlerde IL-1 ve IL-6 üretimini artırır. Lenfositlerin çoğalması üzerine doğrudan etkili değildir (Abbas ve diğ. 1991). Fibroblastların çoğalmasını sağlayarak kollajen üretimini artırır. Bazı tümör hücre tipleri üzerine çoğalmayı önleyici etkisi vardır. IL-1’in başlıca hematolojik etkisi nötrofil ve trombosit sayısını artırır (Stein 1994). Farelere IL-1 verilmesinin beyinde noradrenalin, serotonin ve triptofan düzeylerinde artışa neden olduğu bildirilmektedir (Dunn ve Ando 1999). IL-1, karaciğer parankim hücrelerinden serum amiloid A gibi akut faz proteinlerinin salınımını artırır. Osteoklast oluşumunu artırır. Hipotalamustaki preoptik merkezi uyurarak ateşe neden olur. Uyku, beslenme, ovulasyon ve ekzersiz gibi sinirsel fonksiyonların düzenlenmesinde görev yapar. Ayrıca, adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve kortikosteron düzeylerini artırırken, tiroit bezi ile dişi ve erkekte gonadlardan salınan hormonların miktarını azaltır (Şekil 9), (Imurave Fukata 1991; Grimble 1991; Rees 1992; Dunn ve Ando 1999; Szelenyi 2001).



Şekil 9 : IL-1'in etkileri (Dinarello 1988).

IL-2, önceleri T lenfosit gelişim faktörü olarak adlandırılmış olan IL-2, T lenfositlerde üretilir. IL-2, T ve B lenfositler ile timositlerin çoğalmasını artırır. Sitotoksik hücreleri etkinleştirerek, tümör hücrelerinin yok edilmesini sağlar (Trotta 1991). Yardımcı T lenfositler, B lenfositler, monositler ve doğal öldürücü hücreleri etkileyerek çeşitli sitokinlerin üretimini artırır (Arda ve diğ. 1994). IL-2 tarafından etkinleştirilen T lenfositler, TGF- β , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, gibi lenfokinleri salgırlar. IL-2'nin in vivo olarak adrenokortikotropik hormon ile kortizolün serum düzeylerini arttırır (Imura ve diğ. 1991). Ayrıca büyüme hormonu ve prolaktin salınımına yol açan IL- 2, doğal öldürücü hücrelerin gelişimini ve bunların hücre öldürücü etkinliklerini de arttırır (Akyol 1994).

B lenfosit uyarıcı faktör-2 olarak da adlandırılmış olan IL-6, fibroblastlarda, damar endotel hücrelerinde, adipositlerde, tek çekirdekli makrofajlarda, T ve B lenfositlerde, glial hücreler ile astrositlerde üretilir (Trotta 1991; Abbas ve diğ. 1991; Szelenyi ve diğ. 2001). IL-6, T ve B lenfosit gelişimi ve farklılaşması ile antikor üretimini artırır, sitotoksik lenfositler için farklılaşma faktörü olarak görev yapar (Kishimoto ve diğ. 1992; Barkhudaryan ve Dunn 1999). IL-6, prostaglandin E2 (PGE2)'ye bağımlı bir mekanizma yoluyla ateşe neden olur (Revel 1988; Grimble 1991; Lotz 1993). IL-6'nın hipofiz bezinden adrenokortikotropik hormon ve böbreküstü bezinden glukokortikosteroidlerin salınmasına neden olduğu, B lenfositlerden immünoglobülin üretimini artırdığı, mhematopoitik progenitor hücrelerin granüositlere dönüşümünde önemli bir rol üstlendiği, beyin serotonin ve triptofan metabolizmasını artırdığı, bunun yanında IL-2 üretimi ve IL-2 reseptörlerinin etkinliğini artırdığı görülür (Grimble 1991; Kishimoto ve diğ. 1992; Dunn ve Ando 1999). IL-6, nötrofil ve makrofajların olgunlaşmasını ve sitotoksik T lenfositler ile doğal öldürücü hücrelerin farklılaşmasını sağlar. Nöron farklılaşması ve gelişiminde önemli bir rol üstlenir ve dopamin sentezini düzenler. Osteoklastların sayı ve fonksiyonunu artırarak kemik erimesine neden olur (Barton 1996; Frei ve diğ. 1989). IL-6, T lenfosit çoğalması, IL-2 üretimi ve sitotoksik T lenfosit farklılaşmasında IL-1; sitotoksik T lenfosit farklılaşmasında IL-2 ve megakaryosit kolonilerinin sayısını arttırmada ise IL-3 ile sinerjik etki gösterir. IL-6'nın tek başına periferel kan trombosit sayısını artırdığı da gösterilir (Lotz ve diğ. 1993).

Sitokin üretimini azaltıcı faktör olarak da adlandırılmış olan IL-10, yardımcı T lenfositler, B lenfositler, mast hücreleri, eozinofiller, monositler, makrofajlar ve keratinositler tarafından üretilir (Akyol ve diğ.1991; Lalani ve diğ. 1997). IL-10'un, interferonlar, IL-2, IL-3, IL-6 gibi sitokinlerin üretimini, TNF- α ve makrofajların antijen sunma yeteneklerini azaltır (Quesniaux 1992; Lalani ve diğ. 1997). IL-10, T lenfositler üzerine IL-2 ve IL-4'ün çoğalma oluşturma görevini ve IL-2'nin uyardığı sitotoksik T hücre gelişimini artırır (MacNeil 1990). IL-10, doğrudan T ve B lenfositler ile mast hücrelerinin fonksiyonu ve gelişmelerini etkiler. IL-10, antijenle uyarılan T lenfositlerin çoğalmasını azaltır (Akyol 1994).

IL-13, T lenfosit alt tipleri ve dendritik hücrelerde üretilen bir sitokindir. IL-4 ve IL-13 uyarı iletiminde aynı reseptörü kullanır. IL-4'ün aksine IL-13, yardımcı T2 lenfositlerin farklılaşmasına neden olmaz. IL-13'ün in vitro olarak proenflamatuar sitokin (IL-1 ve TNF) üretimini azalttığı ve in vivo olarak güçlü antienflamatuar etkilere sahiptir (De-Wall Malefyt ve diğ. 1993; De-Vries 1998).

1.4.3 Onkogenler, Tümör Baskılayıcı Genler ve Hücre Döngüsünü Düzenleyici Proteinler

Hücresinin kendine benzer iki hücreye çoğalması (replikasyonu) dış uyarılar sonucu biyokimyasal olarak başlatılan bir seri fazlardan geçer ve hem dış hem de iç büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Bazı onkogenler ve hücre siklusuna özgü proteinler hücre siklusu boyunca senkronize bir şekilde aktifleştirilir ve ardından inaktifleştirilirler.

Siklinler hücre siklusunun çeşitli fazlarını aktive eden spesifik proteinlerdir. Bölünme yeteneğine sahip çoğu normal hücre büyüme faktörleri, bazı hormonlar ve hücre yüzey reseptörlerini etkileyen antijen-histokompatibilite kompleksleri gibi dış uyarılara karşı yanıt olarak bölünür. Bu hücre yüzey reseptörleri alınan sinyali iletir ve hücre bölünür. Tirozin kinazlar hücre dışı büyüme faktörlerinden nükleusa kadar olan bir kaskad (arka arkaya gelen bir dizi süreç) şeklinde ilerleyen proliferatif sinyal sürecinin çok önemli bir parçasıdır. Siklinler, kendilerine spesifik olan ve siklin-bağımlı kinazlar (CDK) olarak adlandırılan tirozin kinazlarla kombine olurlar, onları aktifleştirirler ve etkilerini düzenlerler. Hücre siklusunda çeşitli fazlarda çeşitli

siklinler sentezlenir ve düzeyleri senkronize bir şekilde siklusun çeşitli fazları boyunca azalır ya da artar.

Çoğalma kapasitesine sahip hücreler normal olarak belli kontrol noktalarında dururlar. Bunların ilki DNA sentezinden hemen önce ve ikincisi mitozisten hemen öncedir. Bu histolojik olarak dinlenme periodları, olasılıkla CDK'ların ve tümör baskılayıcı proteinlerin aktivitelerinin azalmasıyla gerçekleşir. Gerçekte, bu fazdaki hücreler hücre siklusunun bir sonraki fazına girecek proteinleri sentezlediklerinden biyokimyasal olarak aktiftirler. Bu geçiş dönemlerinde (kontrol noktalarında), varsa genetik defektler düzeltilir. Sonuç olarak, hücre siklus boyunca ilerlerken iki kontrol noktasında durur ve kontrol edilmiş olur (Ekmekçi ve diğ. 2006).

Siklin, CDK ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI) tarafından kontrol edilir. CDK'lar kendi başlarına inaktiftirler. Bu proteinler, sikline bağlandıklarında aktifleşerek siklin-CDK kompleksine dönüşürler. Bu kompleks hedef proteinleri fosforile ederek hücre döngüsünün devamlılığını sağlar. Memeli hücrelerinde hücre döngüsünün düzenlenmesinde 11 adet CDK ve 16 adet siklin rol oynar. Siklin D ve CDK hücre döngüsünde S fazına geçişte görev alan kompleksi oluşturan iki proteindir. Siklin/CDK kompleksin aktivitesi CDK1 tarafından kontrol edilir. Bu proteinler siklin/CDK kompleksi oluşumunu ve DNA replikasyonunu inhibe ederler. Tüm bu genlerin ekspresyonlarında ve proteinlerin miktarlarındaki artış ve azalış birçok kanser türünde karşımıza çıkar (Cabadak 2008).

Onkogenler normal hücrelerin malign transformasyonuna neden olan genler demektir. Her zaman malignensi ile ilişkilidirler veya hücreSEL ya da retroviral orijinli olabilirler. Genel olarak, kanserde birden fazla onkogen anormal olarak aktiftir. Hücre bölünmesi için gerekli olan, onkogenler arasındaki çok çeşitli interaksiyonlar tipik olarak bu interaksiyonlar olmasa normal kalacak olan birçok diğer onkogenin aktifleşmesine neden olur. Çoğu kanserler ile tek bir onkogen anormalliği arasındaki bire bir ilişki genellikle saptanamaz. Onkogenler siklinler ve hücre bölünme siklus genleri üzerinden etki gösterebilirler (Turner ve diğ. 2003).

Uyarı iletim sisteminde en iyi bilinen protoonkogen Ras'tır. İnsan tümöründe tek en sık dominant onkogen anormalliği Ras geninde mutasyondur. (Kolch 2000). Büyüme faktörü (GF) ile indüklenen mitogenez olayında Ras önemli rol oynar. Ras blokajı GF'lerin proliferatif cevabını önler. Normal hücrelerde Ras proteinleri inaktif

halde (Ras-GDP) halde bulunur. Ras, GF ile aktive olunca GDP'den GTP'ye ve Raf'ı hareketlendirir. Aktive olan Ras, Raf kinazlar ile bağlanır. Raf kinazların hücre membranına yerleşimini ve aktivasyonunu sağlar. Raf, Map kinaz yolunu uyararak mitogenez başlatılır. Tüm sinyaller nükleusa girer ve mitotik sıklusa doğru regülasyon yapar. Nükleusta lokalize onkogen ürünleri Myc-Myb-Jun ve Fos'tur. En önemlisi Myc protoonkogenidir. Uyarıyı alan Myc, Max adı verilen protein ile dimer oluşturur. Oluşan bu kompleks DNA'ya bağlanır ve transkripsiyonel aktivatör fonksiyonda bulunur (Kolch 2000; Karp ve diğ. 2001). Transkripsiyonel faktörler sinyal iletiminin son safhasında yer alırlar. Bunların bazıları kısa ömürlüdür ve nukleusdan dışarı çıkmazlar. Örneğin, c-Jun ve c-Fos proteinleri G₀-S fazında transkripsiyonu yapılan ilk proteinlerdendir ve hücre siklusunu başlattıkları görülür. Siklinlerin, hücrenin hücre siklusuna ve ayrıca c-Myc'nin transkripsiyonunu aktifleştirerek de mitozise girmesini başlattığı düşünülür.

Tümör baskılayıcı genler hücre bölünmesinin baskılanmasından sorumlu genlerdir. Bozuklukları halinde organizma genetik olarak anormal hücreleri yok edemediğinden kanser gelişir. Bu genlerden bazıları; Retinoblastom (Rb), P53, PTEN genleridir. Rb proteininin aktivasyonu fosforilasyon ile düzenlenir. Bu proteinin defosforile formu transkripsiyon faktörlerini bağlar. Böylelikle hücre siklusunun G₁'den S fazına geçmesi engellenmiş olur. Büyüme faktörleri ile uyarılan hücrede Rb fosforillenir ve inaktif hale geçer. Bu inaktivasyon hücrenin S fazına geçmesini sağlar (Zhuang ve diğ. 2010).

Bu genler içinde en önemli gen P53 genidir. Bu genin ürünü olan P53 proteini birçok kompleks aktivitesi olan ve hücre siklusunu baskılayan bir proteindir. Bu protein nükleotid hatalı eşleşmeleri, DNA sarmalının kırıkları gibi DNA lezyonlarını ve ayrıca radyasyon veya kemoterapi ile oluşan DNA hasarlarını saptayabilir. DNA lezyonu saptandığında, P53 hücre siklusunu G₁ fazında durdurur, böylece hücrenin S fazına girişini önler. Ardından ya tamir mekanizması proteinlerini ya da apoptoza yol açan proteinleri indükler (Nicholson ve Anderson 2002).

İn vitro çalışmalar, kemoterapi ve radyasyonun kanser hücrelerini DNA hasarı yaratarak ve böylece P53'le indüklenen apoptoza yol açarak öldürdüklerini gösterir (Haris 1996).

Tümör baskılayıcı proteinlerden PTEN, fosfotidilinozitol 3, 4, 5 trifosfat (PIP3) oluşumunu inhibe ederek negatif düzenleyici rol oynar. PTEN ekspresyonunda azalma hücrelerin apoptozdan kurtulması ve hücrelerin çoğalması ile sonuçlanır (Cantley 1999; Nicholson ve Anderson 2002)

1.4.4 Protein Kinazlar

Sinyal iletimi yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkojenik mutasyonlara sık olarak rastlanır. Sinyal iletiminde meydana gelen değişimler hücrenin çoğalma ve/veya yaşama işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırır. Böylelikle onkojenik sinyal iletimi tümör gelişimi ile invazyon/metastaz sürecinde etkin rol oynar (Hanahan ve Weinberg 2000).

Mitojen aktive edici kinaz (MAPK) süper ailesinde yer alırlar. Ökaryotik hücrelerin tümünde mevcut olan bu proteinler hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasında çok önem taşımaktadır. Bu sinyal iletimi kaskadları, embriyogenezis, yaşama, çoğalma, diferansiasyon ve apoptozis işlevlerinin düzenlenmesinde rol alır. Hormonlar, büyüme faktörleri, diferansiasyon faktörleri ve tümör promotör maddeler bu sinyal yolunu kullanırlar. Bu iletim yolu Ras aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla Raf, Mek ve Erk proteinleri ile kinaz kaskadı ilerler. Ras iletim yolu ile tetiklenen transformasyon sürecinde sinerjik etkileşim de önem taşır. Fosfoinozitol-3 kinaz (PI3K) ailesi, büyüme ve yaşama sinyallerinin iletiminden sorumlu proteinlerdir (Chang ve diğ. 2003). Reseptörün uyarılmasından sonra PI3K, hücre membranında inozitol fosfolipidlerin fosforilasyonunu katalizler. Fosfotidilinozitol trifosfat (PIP3), bu yolla oluşan bir lipid mediatördür. PIP3, PIP3 bağımlı kinazlar (PDK) ve protein kinaz B (PKB)'nin aktivasyonundan sorumludur (Blume 2001). Sitokinler ve büyüme faktörleri PI3K ve PKB yolunu aktive ederek hücreler için yaşama sinyalleri oluştururlar. Tümör baskılayıcı proteinlerden PTEN ise, PIP3 oluşumunu inhibe ederek negatif düzenleyici rol olarak oynar (Cantley 1999; Nicholson ve Anderson 2002).

1.5 Tezin Amacı

İlaçların nasıl metabolize edildiğinin belirlenmesi insanlarda ortaya çıkarabilecekleri olası etkilerin bilinmesinde önemli rol oynar. Bu çalışmada 5-ASA'nın metabolizmasının temel yolağı olan N-asetilasyon yolağı haricinde alternatif diğler ilaç metabolizması yolaklarının mikrozomal enzimlerden P450 (CYP) enzimleri ile ilişkili olup olmadığın bulunması amaçlandı. Bu amaçla öncelikle 5-ASA'nın ölçülebilmesi için kolorimetrik bir metot geliştirildi. Sonrasında geliştirilen bu metot kullanılarak, 5-ASA'nın saf CYP450 izozimleri ile (CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6) in vitro olarak inkübasyonu neticesinde metabolize edilip edilmediği tayin edildi. Buna ek olarak Caco-2 ve HepG2 hücre hatları kullanılarak 5-ASA'nın enflamasyon, TNF sinyal iletimi, tümör baskılayıcı gen gibi yolaklara olan etkilerinin belirlenmesi, bu yolaklardaki seçilen genlerin mRNA seviyesinde ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değışiklikler incelendi.

2. MATERYAL ve METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Sülfamik asit (Sigma-383120); Floroglusinol (Sigma-P3502); Kalsiyum klorid (Sigma-C5670); L-Glutamin (Sigma-G8540); Sığır serum albümin (Sigma-A4919); Tripın Mavisi çözeltisi (Sigma-93595); 5-aminosalicylic acid (5-ASA) (Sigma-A3537); CYP450 1A2 (Sigma-E9788); CYP450 2C9 (Sigma-E9538); CYP450 2C19 (Sigma-E9153); CYP450 3A4 (Sigma-E9038); CYP450 2D6 (Sigma-E9413); Furafillin (Sigma-F124); Omeprazol (Sigma-O104); EasyScript™ Plus cDNA Sentez Kiti (G236) ve KiloGreen 2X qPZR (MasterMix-KS), LGC (LGS Standards GmbH, Mercatorstr. 51, 46485 Wesel, Germany) firmasından; 50 nmol, Oligo-DNA (primerler) Genescript (GenScript, 860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA) firmasından; Fetal Sığır Serumı Gibco (ThermoFisherScientific, 81 Wyman Street, Waltham, MA 02451 USA) firmasından; Dulbeco's Modified Eagle's Medium (DMEM, 12-741F), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, 17-513), Eagle's Modified Essential Medium (EMEM, 12-662F), Penislin-Streptomisin karışımı (17602), RNeasy Plus Mini Kit (74136) Qiagen (27220 Turnberry Lane, Suite 200, Valencia, CA 91355, USA) firmasından; Ultra Flux kapaklı PZR tüpleri (0,2 ml, 3247-40) SSI (Scientific Specialties, Inc., 1310 Thurman Street Lodi, CA 95240, USA) firmasından temin edilerek kullanıldı.

2.1.2 Çalışmada kullanılan cihazlar:

Bu tez kapsamında başlıca şu cihazlar kullanıldı: Bioneer gerçek zamanlı PZR cihazı, Biosa kuru blok ısıtma termostatu, Maestrogen Nanodrop cihazı, Sigma 3K30 soğutmalı santrifüj, Sigma 1-14K soğutmalı/soğutmasız santrifüjler, Bioneer Exi Spin PZR tüp karıştırıcısı, Thermo agaroz jel elektroforez sistemi, DNR jel görüntüleme sistemi, Cisco laminarflow, Nuair CO₂ inkübatörü, Olympus ters

mikroskop, Olympus CX31 mikroskop ve Thermo Scientific Multiskan GO mikropilaka okuyucu spektrometre.

2.1.3 Çalışmada kullanılan primerler

Çalışmamız ile ilişkili genlerdaha öncesinde Gülsüm TERZİOĞLU'nun 2014 yılındaki tez çalışması için GenBank/EMBL veri bankaları taranarak uygun primer dizileri saptandı. Dizilerin NCBI/Primer-Blast veri tabanı kullanılarak doğruluğu teyit edilmesi sonucunda primer dizileri Metabolian International AG firmasına 0,2 µM sentezlettirilip -20 derecede saklanmış olan stoklar kullanıldı (Tablo 3).

Tablo 3 : Seçilen genler için tanımlanan primer dizileri

Gen	İleri Primer ve Geri Primerleri (5'→3')
IL-6	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG
	CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG
IL-2	AACCTCAACTCCTGCCACAA
	GCATCCTGGTGAGTTTGGGA
FOS	TGGCGTTGTGAAGACCATGA
	AGTTGGTCTGTCTCCGCTTG
IL-1b	CTGTACCTGTCCTGCGTGTT
	GGGAAGTGGGCAGACTCAA
JUN	GCCTCCAAGTGCCGAAAAAG
	GCTGCGTTAGCATGAGTTGG
c-MYC	TGGCGGGAAAAAGAACGGAG
	GAGGCGAAGCCCCCTATTC
CDKN1A	CAGCTGAGGTGTGAGCAGC
	GTTCTGACGGACATCCCA
MAP2K1	GGGCTTCTATGGTGC GTTCTA
	CCCACGGGAGTTGACTAGGAT
RAF	GAAAACGATTGTGAGGCGGG
	CATCGTAGCAAACGCGCTC
IL-13	CCTCATGGCGCTTTTGTTGAC
	TCTGGTTCTGGGTGATGTTGA
FOXP3	GTGGCCCGGATGTGAGAAG
	GGAGCCCTTGTCGGATGATG
CASP8	TCTGGAGCATCTGCTGTCTG
	CCTGCCTGGTGTCTGAAGTT
CASP3	GCAGCAAACCTCAGGGAAAC
	TGTCGGCATACTGTTTCAGCA
JNK	GCGCGGATCCTTGCTTGCCATCATGAGCAG
	GCGCGGATCCCAGACGACGATGATGATGGA
ERK	CATCGCCGAAGCACCATTCAAG

	GATAAGCCAAGACGGGCTGGAG
P53	ATCTACAAGCAGTCACAGCACAT GTGGTACAGTCAGAGCCAACC
RB-1	ATCTATATTTACCCCTGAAGAGTC TTCAGAAGGTCTGCCAACACCAACA
SİKLİN D1	CGCCCCACCCCTCCAG CCGCCAGACCCTCAGACT
SİKLİN D2	TTCCGCAGTGCTCCTACTTC CGCACTTCTGTTCCTCACAG
PTEN	CCCAGACATGACAGCCATC TCTGCAGGAAATCCCATAGC
B-aktin	TCCTCCTGAGCGCAAGTACTC CTGCTTGCTGATCCACATCTG

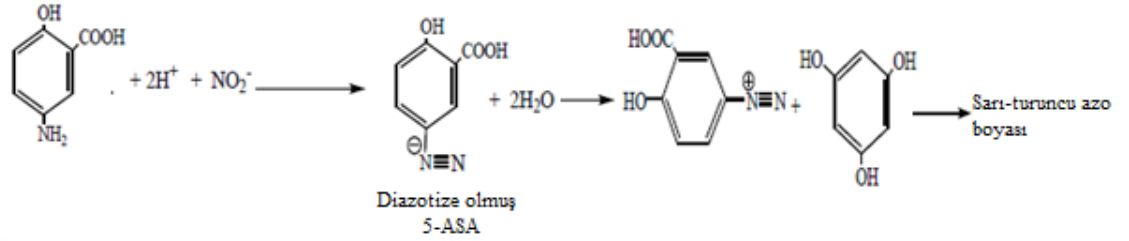
2.2 METOT

2.2.1 CYP İzofomlarının 5-ASA Aktivitelerinin Ölçülmesi

5-ASA'nın spektrofotometrik ölçümünde 5-ASA diazonyum tuzu oluşturmak üzere asidik ortamda nitrit ile reaksiyona sokuldu. Yan reaksiyonlar sebebi ile oluşan nitrit kalıntıları sülfamik asit ile uzaklaştırıldıktan sonra diazonyum tuzu alkali ortamda floroglisinol reaktifi ile birleştirildi. Diazotlanmış 5-ASA ve floroglisinol reaktifinin alkali ortamda birleştirilmesi ile oluşan sarı-turuncu renkli ve suda çözünebilen azo boyasının absorpsiyonu ölçüldü (Şekil 10). Hamdon ve diğ. (2011) metotundan ilham alınarak metot optimize edildi.

Standart reaksiyon karışımı 32 μM 'lık 5-ASA ana stok çözeltisi, 1N hidroklorik asit, % 1'lik sodyum nitrit, % 3'lük sülfamik asit, % 1'lik floroglisinol, 1N sodyum hidroksit ve ultra saf su kullanılarak hazırlandı. Aryı ayrı ependorflara ilk olarak 32 μM ana 5-ASA stoğundan sırasıyla 0 μl , 3 μl , 6 μl , 12 μl , 18 μl , 25 μl , 38 μl alınarak son konsantrasyonlar 0 μM , 0,38 μM , 0,76 μM , 1,52 μM , 2,30 μM , 3,2 μM , 4,8 μM olacak şekilde ependorfa eklendi ve son hacim ultra saf su ile 250 μl 'ye tamamlandı. Ardından karışımlardan 125 μl yeni ependorflara transfer edildi ve üzerlerine 125 μl aseton ilave edildi. 200 μl karışımdan ayrıldıktan sonra ise renklendirme reaksiyonları için sırasıyla 1N hidroklorik asitten 7,5 μl ve % 1 'lik sodyum nitritten 5 μl reaksiyon ortamına eklendi. 3 dakikalık inkübasyon süresinin

ardından % 3 'lük sülfamik asitten 2,5 µl her bir ependorfa eklendi ve 4 dakika inkübe edildi. Sonrasında her bir ependorfa % 1'lik floroglusinden 40 µl ve 1N sodyum hidroksitten 20 µl eklendiğinde 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sora her bir ependorfтан 250 µl mikropalakaya aktarıldı ve standartlarda oluşan renk 430 nm'de köre karşı okundu.



Şekil 10: 5-ASA'nın diazotize reaksiyonu ve floroglusinol ile bağlanma reaksiyonu

5-ASA'nın CYP izozimleri (CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19) ile metabolizması dolaylı olarak ortamdaki 5-ASA konsantrasyonunun hesaplandığı kolorimetrik yöntem ile ölçüldü. Bu doğrultuda stok olarak 0,4 M pH 7,8 HEPES tamponu, 10 µM 5-ASA, 10 mM NADPH, 1 pmol/µl CYP izozimleri kullanıldı. Her bir çözeltinin nasıl hazırlandığı Ek-1'de verilmektedir.. Her bir CYP izozimi ve reaksiyonu için tek tek olmak şartı ile ependorflara eklenen çözeltilerin hacim ve son konsantrasyonları Tablo 4'te verilmektedir. Reaksiyon aktivitesinin kontrol grubu olarak her bir CYP izozimi için reaksiyon ortamına 95 °C'de 5 dakkika inkübe edilmiş (kaynatılmış) CYP izozimleri (enzimlerin hacim ve konsantrasyonları diğer reaksiyonlar ile aynıdır) ve diğer reaksiyon bileşenleri eklendi. Ultra saf su ile reaksiyon hacmi 125 µl'ye tamamlandı. Reaksiyon ortamına NADPH eklendikten sonra her bir ependorf 60 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Sonrasında reaksiyonu durdurmak için her bir ependorfun içerisine 125 µl aseton konuldu. Karışım 12000 rpm'de 15 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmından 200 µl alınarak yeni ependorflara aktarıldı. Renklendirme reaksiyonları için sırasıyla 1N hidroklorik asitten 7,5 µl ve % 1'lik sodyum nitritten 5 µl reaksiyon ortamına eklendi. 3 dakikalık inkübasyon süresinin ardından % 3'lük sülfamik asitten 2,5 µl her bir ependorfa eklendi ve 4 dakika inkübe edildi. Ardından her bir ependorfa % 1'lik floroglusinden 40 µl ve 1N sodyum hidroksitten 20 µl eklendiğinde 5 dakika

inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sora her bir ependorftan 250 µl mikropalakaya aktarıldı ve oluşan renk 430 nm’de okundu. Standart olarak kullanılan ve 5-ASA’nın farklı konsantrasyonları yardımı ile oluşturulan kalibrasyon grafiğinin eğiminden yararlanılarak aktiviteler hesaplandı.

Tablo 4: 5-ASA’nın CYP izoformları ile aktivite ölçüm reaksiyonu bileşenleri

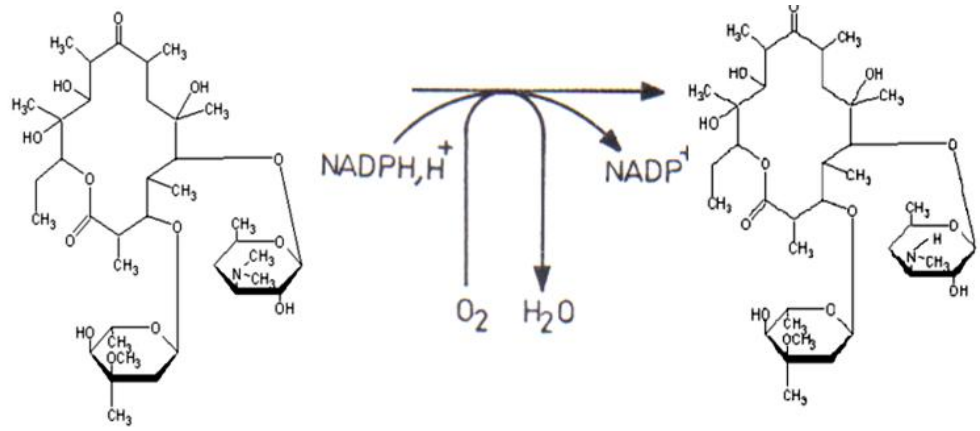
STOK ÇÖZELTİ	ALINAN HACİM (µl)	SON KONSANTRASYON
0,4 M pH 7,8 HEPES	31,25	0,1 M
10 µM 5-ASA	25	2 µM
10 mM NADPH	3,125	0,25 mM
1 pmol/µl CYP izoformları	12,5	0,1 pmol/µl
dH ₂ O	53,125	125 µl

2.2.2 CYP Aktivitelerinin Prototip Substratları İle Ölçülmesi

2.2.2.1 Eritromisin N-Demetilaz Aktivite Tayini

Eritromisin N-demetilaz aktivitesi Cochin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen yöntem ve Nash (1953) metotuna göre formaldehit miktarının ölçülmesiyle tespit edildi (Şekil 11). Bu doğrultuda stok olarak 0,4 M pH 7,8 HEPES tamponu, 0,75 N perklorik asit, 10 µM 5-ASA, 10 mM NADPH, izozimi (CYP3A4), 50 mM eritromisin (substrat) ve Nash reaktifi kullanıldı. Her bir çözeltinin nasıl hazırlandığı Ek-1’de verilmektedir.. Ependorf içerisine eklenen çözeltilerin hacim ve son konsantrasyonları Tablo 5’te verilmektedir. Ependorf içerisindeki son hacim ultra saf su kullanılarak 125 µl’ye tamamlandı. Reaksiyon ortamına NADPH eklendikten sonra her bir ependorf 30 dakika boyunca 37 °C’de inkübe edildi. Sonrasında reaksiyonu durdurmak için ortama 125 µl 0,75 N perklorik asit eklendi ve karışım 12000 rpm’de 15 dakika 4 °C’de santrifüj edildi. Süpernatant kısmından 200 µl alınarak iki yeni ependorfa her birinde 100 µl olacak şekilde aktarıldı. Üzerlerine 100 µl Nash reaktifi eklenerek 10 dakika boyunca 50 °C’de inkübe edildi. Son olarak karışım mikropalakaya alınarak 412 nm’de köre göre okundu. Kör için standart prosedür şu şekildedir; 31 µl 0,4 M pH 7,8 HEPES tamponu üzerine 94 µl ultra saf su ile hacim 125 µl’ye tamamlandı. Üzerine 125 µl 0,75 N perklorik asit eklendi.

Sonrasında 100 µl Nash reaktifi eklenerek 10 dakika boyunca 50 °C’de inkübe edildi. Son olarak karışım mikropalakaya alınarak 412 nm’de okundu.



Şekil 11: Eritromisin N-demetilasyonu

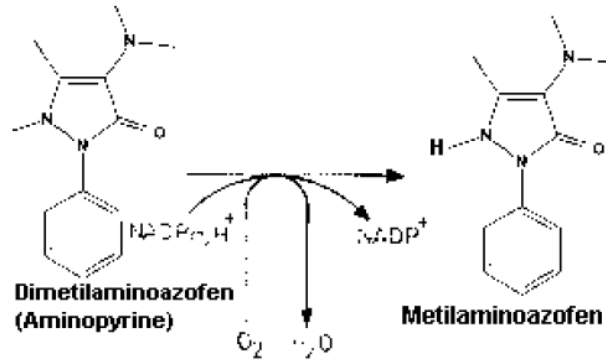
Tablo 5: CYP3A4 aktivitesi için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler

STOK ÇÖZELTİ	ALINAN HACİM (µl)	SON KONSANTRASYON
0,4 M pH 7,8 HEPES	31,25	0,1 M
50 mM Eritromisin	2,5	1 mM
10 mM NADPH	3,125	0,25 mM
1 pmol/µl CYP3A4	12,5	0,1 pmol/µl
dH ₂ O	78,75	125 µl

2.2.2.2 Aminopren N-Demetilaz Aktivite Tayini

Aminopren N-demetilaz aktivitesi Cochin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen yöntem ve Nash (1953) metotuna göre formaldehit miktarının ölçülmesiyle tespit edildi (Şekil 12). Bu doğrultuda stok olarak 0,4 M pH 7,8 HEPES tamponu, 0,75 N perklorik asit, 10 µM 5-ASA, 10 mM NADPH, 1 pmol/µl CYP izozimleri (CYP2C9, 2C19), 1 mM aminopren (substrat) ve Nash reaktifi kullanıldı. Her bir çözeltinin nasıl hazırlandığı Ek 1’de verilmektedir. Her bir CYP izozimi için tek tek yapılmak koşulu ile reaksiyon ortamına eklenen çözeltilerin hacim ve son konsantrasyonları Tablo 6 ve 7’de verilmektedir. Ependorflar içerisindeki son hacim ultra saf su kullanılarak 125 µl’ye tamamlandı. Reaksiyon ortamına NADPH

eklendikten sonra her bir ependorflar 30 dakika boyunca 37 °C’de inkübe edildi. Sonrasında reaksiyonu durdurmak için ortama 125 µl 0,75 N perklorik asit eklendi ve karışım 12000 rpm’de 15 dakika 4 °C’de santrifüj edildi. Süpernatant kısmından 200 µl alınarak iki yeni ependorfa her birinde 100 µl olacak şekilde aktarıldı. Üzerlerine 100 µl Nash reaktifi eklenerek 10 dakika boyunca 50 °C’de inkübe edildi. Son olarak karışım mikropalakaya alınarak 412 nm’de köre göre okundu. Köre için standart prosedür başlık 2.2.2.1’de uygulanan prosedür ile aynıdır.



Şekil 12 : Aminopiren N-demetilasyonu

Tablo 6: CYP2C19 aktivite tayini için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler

STOK ÇÖZELTİ	ALINAN HACİM (µl)	SON KONSANTRASYON
0,4 M pH 7,8 HEPES	31,25	0,1 M
1 mM Aminopren	5	0,04 mM
10 mM NADPH	3,125	0,25 mM
1 pmol/µl CYP2C19	12,5	0,1 pmol/µl
dH ₂ O	73,125	125 µl

Tablo 7: CYP2C9 aktivite tayini için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler

STOK ÇÖZELTİ	ALINAN HACİM (µl)	SON KONSANTRASYON
0,4 M pH 7,8 HEPES	31,25	0,1 M
1 mM Aminopren	5	0,04 mM
10 mM NADPH	3,125	0,25 mM
1 pmol/µl CYP2C9	12,5	0,1 pmol/µl
dH ₂ O	73,125	125 µl

2.2.2.3 Metoksirezorufin O-demetilaz (MROD) Aktivite tayini

Metoksirezorufin O-demetilaz aktivitesi Burke ve Mayer (1974) metodu ile tespit edilmektedir ayrıca Arınç ve Şen (1994) tarafından optimize edilen şartlar kullanılmaktadır. Bu doğrultuda stok olarak 0,4 M pH 7,8 KPi tamponu, 1M NaCl, 1,2 mg BSA, 1 pmol/μl CYP izozimi (CYP1A2), 10 mM NADPH ve 10 mM 7-Metoksirezorufin (7-MR) kullanıldı. Her bir çözeltinin nasıl hazırlandığı Ek-1’de verilmektedir. Ölçüm için reaksiyon ortamına eklenen çözeltiler hacim ve son konsantrasyonları ile birlikte Tablo 8’de verilmektedir. Reaksiyon çözeltisi Tablo 8’de belirtilen hacimlerde stok çözeltilerden alınarak, florometre küvetinde hazırlandı. Reaksiyon en son substrat ilave edilerek başlatıldı ve reaksiyon Cary Eclipse (Varian) Florometre’de 1 dakika boyunca takip edildi. Son olarak, reaksiyon karışımına iç standart olarak resorufinin bilinen miktarı eklendi ve florosanstaki artış kaydedildi. Enzim aktiviteleri, resorufin eklenmesinin neden olduğu florosan artış kullanılarak hesaplandı.

Tablo 8: CYP1A2 aktivite tayini için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler

STOK ÇÖZELTİ	ALINAN HACİM (μl)	SON KONSANTRASYON
0,4 M pH 7,8 KPi	62,5	0,1 M
1 M NaCl	25	100 mM
10 mM NADPH	2,5	0,1 mM
1 pmol/μl CYP1A2	12,5	0,1 pmol/μl
12 mg/ml BSA	25	1,2 mg/ml
10 mM 7-MR	37,5	1,5 mM
dH ₂ O	85	250 μl

2.2.3 5-ASA’nın Prototip CYP aktiviteleri Üzerine Etkisi

2.2.3.1 5-ASA’nın CYP3A4 Aktivitesi Üzerine Etkisi

Eritromisin N-demetilaz aktivite tayini başlığı (2.2.2.1) altında kullanılan bileşenler ile farklı olarak reaksiyon ortamına 10 μM 5-ASA ana stoğundan Tablo 9’da verilen hacimde eklendi (kullanılan diğer bileşenler aynıdır). Reaksiyon

ortamında kullanılan çözeltilerin hacim ve son konsantrasyonları Tablo 9’da verilmektedir. Ependorf içerisindeki son hacim ultra saf su kullanılarak 125 µl’ye tamamlandı. Reaksiyon ortamına NADPH eklendikten sonra her bir ependorf 30 dakika boyunca 37 °C’de inkübe edildi. Sonrasında reaksiyonu durdurmak için ortama 125 µl 0,75 N perklorik asit eklendi ve karışım 12000 rpm’de 15 dakika 4 °C’de santrifüj edildi. Süpernatant kısmından 200 µl alınarak iki yeni ependorfa her birinde 100 µl olacak şekilde aktarıldı. Üzerlerine 100 µl Nash reaktifi eklenerek 10 dakika boyunca 50 °C’de inkübe edildi. Son olarak karışım mikropalakaya alınarak 412 nm’de köre göre okundu.

Tablo 9: CYP3A4’ün aktivite tayini için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler

STOK ÇÖZELTİ	ALINAN HACİM (µl)	SON KONSANTRASYON
0,4 M pH 7,8 HEPES	31,25	0,1 M
50 mM Eritromisin	2,5	1 mM
10 mM NADPH	3,125	0,25 mM
1 pmol/µl CYP3A4	12,5	0,1 pmol/µl
10 µM 5-ASA	62,5	5 µM
dH ₂ O	13,125	125 µl

2.2.3.2 5-ASA’nın CYP2C9 ve CYP2C19 Aktivitesi Üzerine Etkisi

Aminopren N-demetilaz aktivite tayini başlığı (2.2.2.2) altında kullanılan bileşenler ile farklı olarak reaksiyon ortamına 10 µM 5-ASA ana stoğundan Tablo 10 ve 11’de verilen hacimlerde eklendi (kullanılan diğer bileşenler aynıdır). Reaksiyon ortamında kullanılan çözeltilerin hacim ve son konsantrasyonları Tablo 10 ve 11’de verilmektedir. Ependorflar içerisindeki son hacim ultra saf su kullanılarak 125 µl’ye tamamlandı. Reaksiyon ortamına NADPH eklendikten sonra her bir ependorf 30 dakika boyunca 37 °C’de inkübe edildi. Sonrasında reaksiyonu durdurmak için ortama 125 µl 0,75 N perklorik asit eklendi ve karışım 12000 rpm’de 15 dakika 4 °C’de santrifüj edildi. Süpernatant kısmından 200 µl alınarak iki yeni ependorfa her birinde 100 µl olacak şekilde aktarıldı. Üzerlerine 100 µl Nash reaktifi eklenerek 10

1 dakika boyunca 50 °C’de inkübe edildi. Son olarak karışım mikropalakaya alınarak 412 nm’de köre göre okundu.

Tablo 10: CYP2C9’un aktivite tayini için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler

STOK ÇÖZELTİ	ALINAN HACİM (µl)	SON KONSANTRASYON
0,4 M pH 7,8 HEPES	31,25	0,1 M
1 mM Aminopren	2,5	0,04 mM
10 mM NADPH	3,125	0,25 mM
1 pmol/µl CYP2C9	12,5	0,1 pmol/µl
10 µM 5-ASA	62,5	5 µM
dH ₂ O	13,125	125 µl

Tablo 11: CYP2C19’un aktivite tayini için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler

STOK ÇÖZELTİ	ALINAN HACİM (µl)	SON KONSANTRASYON
0,4 M pH 7,8 HEPES	31,25	0,1 M
1 mM Aminopren	2,5	0,04 mM
10 mM NADPH	3,125	0,25 mM
1 pmol/µl CYP2C19	12,5	0,1 pmol/µl
10 µM 5-ASA	62,5	5 µM
dH ₂ O	13,125	125 µl

2.2.3.3 5-ASA’nın CYP1A2 Aktivitesi Üzerine Etkisi

Metoksirezorufin O-demetilaz aktivite tayini başlığı (2.2.2.3) altında kullanılan bileşenler farklı olarak reaksiyon ortamına 100 µM 5-ASA ana stoğundan Tablo 12’de verilen hacimde eklendi (kullanılan diğer bileşenler aynıdır). Reaksiyon çözeltisinin hazırlanmasında Tablo 12’de belirtilen hacimlerde stok çözeltilerden alınarak, florometre küvetinde reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon en son substrat ilave edilerek başlatıldı ve reaksiyon Cary Eclipse (Varian) Florometre’de 1 dakika boyunca takip edildi. Son olarak reaksiyon karışımına iç standart olarak resorufinin bilinen miktarı eklendi ve florosanstaki artış kaydedildi. Enzim aktiviteleri, resorufin eklenmesinin neden olduğu florosan artış kullanılarak hesaplandı.

Tablo 12: CYP1A2'nin aktivite tayini için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler

STOK ÇÖZELTİ	ALINAN HACİM (µl)	SON KONSANTRASYON
0,4 M pH 7,8 KPi	62,5	0,1 M
1 M NaCl	25	100 mM
10 mM NADPH	2,5	0,1 mM
1 pmol/µl CYP1A2	25	0,1 pmol/µl
12 mg/ml BSA	25	1,2 mg/ml
10 mM 7-MR	37,5	1,5 mM
100 µM 5-ASA	12,5	5 µM
dH ₂ O	60	250 µl

2.2.4 Prototip İnhibitörlerin CYP Aktiviteleri Üzerine Etkisi

2.2.4.1 Ketakonazol'ün CYP3A4 Aktivitesi Üzerine Etkileri

Bu doğrultuda stok olarak 0,4 M pH 7,8 HEPES tamponu, 0,75 N perklorik asit, 10 µM 5-ASA, 10 mM NADPH, 1 pmol/µl CYPizozimi (CYP3A4), 50 mM eritromisin (substrat), Nash reaktifi ve 50 µM ketakonazol kullanıldı. Her bir çözeltinin nasıl hazırlandığı Ek 1'de ependorf içerisine eklenen çözeltilerin hacim ve son konsantrasyonları ise Tablo 13'da verilmektedir. Ependorf içerisindeki son hacim ultra saf su kullanılarak 125 µl'ye tamamlandı. Reaksiyon ortamına NADPH eklendikten sonra her bir ependorf 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Sonrasında reaksiyonu durdurmak için ortama 125 µl 0,75 N perklorik asit eklendi ve karışım 12000 rpm'de 15 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmından 200 µl alınarak iki yeni ependorfa her birinde 100 µl olacak şekilde aktarıldı. Üzerlerine 100 µl Nash reaktifi eklenerek 10 dakika boyunca 50 °C'de inkübe edildi. Son olarak karışım mikropalakaya alınarak 412 nm'de köre göre okundu.

Tablo 13: CYP3A4'nin aktivite tayini için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler

STOK ÇÖZELTİ	ALINAN HACİM (µl)	SON KONSANTRASYON
0,4 M pH 7,8 HEPES	31,25	0,1 M
50 mM Eritromisin	2,5	1 mM
10 mM NADPH	3,125	0,25 mM
1 pmol/µl CYP3A4	12,5	0,1 pmol/µl
50 µM Ketakonazol	12,5	5 µM
dH ₂ O	63,125	125 µl

2.2.4.2 Omeprazol'ün CYP2C19, Sülfafenazol'ün CYP2C9 Aktivitesi Üzerine Etkileri

Bu doğrultuda stok olarak 0,4 M pH 7,8 HEPES tamponu, 0,75 N perklorik asit, 10 mM NADPH, 1pmol/µl CYP izozimleri (CYP2C9, 2C19), 1 mM aminopren (substrat) , Nash reaktifi, 50 µM omeprazol ve 50 µM süföfenazol kullanıldı. Her bir çözeltinin nasıl hazırlandığı Ek-1'de verilmektedir. Her bir CYP izozimi için tek tek yapılmak koşulu ile ependorflar içerisine eklenen çözeltiler hacim ve son konsantrasyonları ile birlikte Tablo 14 ve 15'de verilmektedir. Ependorflar içerisindeki son hacim ultra saf su kullanılarak 125 µl'ye tamamlandı. Reaksiyon ortamına NADPH eklendikten sonra her bir ependorflar 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Sonrasında reaksiyonu durdurmak için ortama 125 µl 0,75 N perklorik asit eklendi ve Karışım 12000rpm'de 15 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmından 200 µl alınarak iki yeni ependorflara her birinde 100 µl olacak şekilde aktarıldı. Üzerlerine 100 µl Nash reaktifi eklenerek 10 dakika boyunca 50 °C'de inkübe edildi. Son olarak karışım mikropalakaya alınarak 412 nm'de köre göre okundu.

Tablo 14: CYP2C19'un aktivite tayini için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler

STOK ÇÖZELTİ	ALINAN HACİM (µl)	SON KONSANTRASYON
0,4 M pH 7,8 HEPES	31,25	0,1 M
1 mM Aminopren	2,5	0,04 mM
10 mM NADPH	3,125	0,25 mM
1 pmol/µl CYP 2C19	12,5	0,1 pmol/µl
50 µM Omeprazol	12,5	5 µM
dH ₂ O	63,125	125 µl

Tablo 15: CYP2C9'un aktivite tayini için reaksiyon ortamına eklenen bileşenler

STOK ÇÖZELTİ	ALINAN HACİM (µl)	SON KONSANTRASYON
0,4 M pH 7,8 HEPES	31,25	0,1 M
1 mM Aminopren	2,5	0,04 mM
10 mM NADPH	3,125	0,25 mM
1 pmol/µl CYP 2C9	12,5	0,1 pmol/µl
50 µM Sülfafenazol	12,5	5 µM
dH ₂ O	63,125	125 µl

2.2.4.3 Furafillin'in CYP1A2 Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bu doğrultuda stok olarak 0,4 M pH 7,8 KPi tamponu, 1M NaCl, 1,2 mg BSA, 1 pmol/µl CYP izozimi (CYP1A2), 10 mM NADPH, 10 mM 7-MR ve 50 µM Furafillin kullanıldı. Her bir çözeltinin nasıl hazırlandığı Ek-1'de verilmektedir. Reaksiyon çözeltisinin hazırlanmasında Tablo 16'de belirtilen hacimlerde stok çözeltilerden alınarak, florometre küvetinde reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon en son substrat ilave edilerek başlatıldı ve reaksiyon Cary Eclipse (Varian) Florometrede 1 dakika boyunca takip edildi. Son olarak, reaksiyon karışımına iç standart olarak resorufinin bilinen miktarı eklendi ve floresanstaki artış kaydedildi. Enzim aktiviteleri, resorufin eklenmesinin neden olduğu floresans artış kullanılarak hesaplandı.

Tablo 16: Reaksiyon ortamına eklenen bileşenler

STOK ÇÖZELTİ	ALINAN HACİM (µl)	SON KONSANTRASYON
0,4 M pH 7,8 KPi	62,5	0,1 M
1 M NaCl	25	100 mM
10 mM NADPH	2,5	0,1 mM
1 pmol/µl CYP1A2	25	0,1 pmol/µl
12 mg/ml BSA	25	1,2 mg/ml
10 mM 7-MR	37,5	1,5 mM
50 µM Furafilin	25	5 µM
dH ₂ O	47,5	250 µl

2.2.5 Hücre kültürü çalışmaları

2.2.5.1 Caco-2 Hücreleri

Çalışmalarımızda kullandığımız insan kolon kanser hücre hattı (CaCo-2) Sloan Kettering Enstitüsünde geliştirilmiş hücrelerdir. Çalışma boyunca kullanılmış olan insan kolon adenokarsinoma hücreleri (Caco-2) %20 FBS ve % 1 penisilin içeren EMEM besi ortamı içerisinde 37°C, % 5 CO₂ ve % 95 nem içeren ortamda inkübe edildi.

2.2.5.2 HepG2 Hücreleri

Çalışmalarımızda kullandığımız insan karaciğer kanser hücreleri (HepG2) European Collection of Cell Cultures (ECACC)'tan satın alındı. % 10 FBS ve % 1 penisilin içeren DMEM besi ortamı içerisinde 37°C, % 5 CO₂ ve % 95 nem içeren ortamda inkübe edildi.

2.2.5.3 Hücre Kültürünün Kurulması

Hücre kültürü laboratuvarımızda kullanılan hücre hatlarının haftada 2 kez düzenli pasajları yapılmaktadır. Hücre kültürlerine, % 1 penisilin, % 10 FBS içeren 500ml DMEM, kullanıldı. HepG2 ve Caco-2 hücre hatları için DMEM besi ortam kullanılmaktadır. -80 °C'de % 10 DMSO içerisinde saklanan hücreler 37 °C'de eriyene kadar bekletildi, eridikten sonra flaska hücreler ekildi ve üzerine 14 ml DMEM besi ortamı eklenerek 37°C'de, % 5 CO₂ ve % 95 nem içeren ortamda 1 gün inkübe edildi. Ertesi gün DMSO'dan kurtarmak için besiyeri değiştirildi ve CO₂ inkübatöründe hücreler deney için yeterli stok sayısına ulaşınca kadar yukarıda belirtilen şartlarda inkübe edildiler. Üretim sırasında kontaminasyonu önlemek amacıyla filtre kapaklı hücre kültürü flaskaları kullanıldı. Hücrelerin besiyeri iki günde bir değiştirildi ve canlılıkları, çoğalma hızları takip edildi. Yeterli hücre yoğunluğuna sahip flaskaların besiyerleri çekilerek boşaltıldı. Hücreler bir kez Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ tuzları içermeyen steril PBS ile yıkandı.

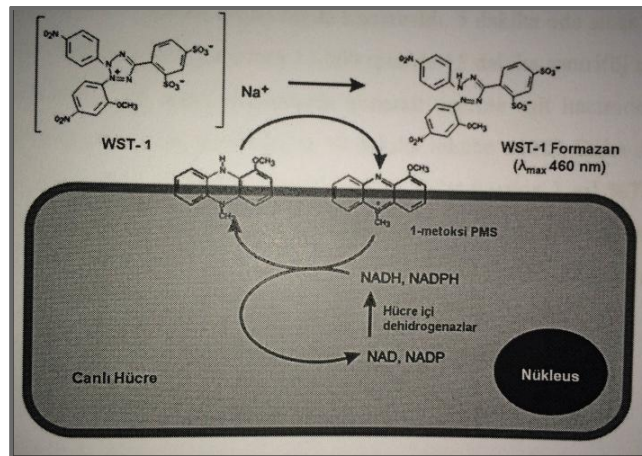
2.2.5.4 Hücrelerin Pasajı

Hücrelerin çoğaltıldığı kültür kaplarında, hücreler tek tabaka olduklarında pasajları yapıldı. Pasaj işlemi için öncelikle kültür besiyeri uzaklaştırıldı. Daha sonra hücreler 2 ml % 0,25'lik tripsin ile yaklaşık 5 dakika muamele edildi ve hücrelerin yüzeyden ayrılmaları sağlandı. Süspansiyon haline getirilen hücreler steril santrifüj tüpüne alındı ve tripsinin inaktif hale gelmesi için üzerine 13 ml DMEM besi ortamı eklendi. 2000 xg hızda 5 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 1 ml besi ortamı eklenerek, ependorfta hazırlanan tripan mavisini ve hücre karışımı (1:1) Thoma lamında sayıldı ve hücreler deney planına göre ekim için hazır hale getirildi.

2.2.5.5 Hücre Canlılığının Belirlenmesi

2.2.5.5.1 SÇTT (WST) Metoduyla Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Çalışma prensibi, temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu (MTT: sarı, WST1: kırmızı) kullanarak formazan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak spektrofotometre ile ölçülmesine dayalıdır. Dolayısıyla formazan oluşumu, canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır (Şekil 13). Caco-2 ve HepG2 hücrelerinin 5-ASA dozları ile muamelesinden sonra sitotoksik cevabın saptanması için yapıldı. 5-ASA'nın suda çözünürlüğünün az olmasından dolayı 5-ASA, besiyeri ve belirlenen miktar kadar 0,1 M NaOH yardımı ile çözüldü (900 µl besiyeri, 100 µl 0,1 M NaOH). Hücreler hemositometri ile sayılarak 96'lık plakaya kuyucuk içerisinde 1×10^3 hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra değişik konsantrasyonlarda hazırlanan 5-ASA hücrelere uygulandı. Uygulamadan 24 saat sonra 96'lık plaka içerisindeki hücreler üzerine 10 µl WST reaktifi eklenerek hücrelerin yaşam oranları mikropilaka okuyucu kullanılarak 450-690 nm'de 30 dakika, 60 dakika ve 120 dakika sonunda ölçüldü. Kör olarak besiyeri, kontrol grubu olarak ise % 10 0,1M NaOH içeren besiyeri kullanıldı. Yapılan bu çalışmalar üç farklı zamanda tekrarlandı. Belirlenen dozlardaki 5-ASA ile muamele edilen gruplar kontrol grubu ile karşılaştırılarak, dozların hücre canlılığına etkisi saptandı.



Şekil 13: WST'nin formazana indirgenmesi.

2.2.5.6 Belirlenen Dozlarda 5-ASA Uygulanan Hücrelerden RNA izolasyonu

İzolasyon QIAGEN RNeasy Plus Mini kit kullanılarak laboratuvarımızda optimize ettiğimiz şekliyle aşağıdaki prosedüre göre gerçekleştirildi.

Besiyeri hücrelerden uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. Yıkama işlemi ortamın besiyerinden arındığına kanaat getirilene kadar tercihe göre birkaç kez yapıldı (genelde 3 kez yeterlidir). Yıkama işleminin ardından hücre yoğunluğuna göre 350-600 µl RLT plus tamponu eklendi. Bu işlem neticesinde hücreler mukusumsu bir yapı kazandı, yumuşadı ve kolayca kazınır hale geldi. Lizis tamponu hücre kazıyıcı ile iyice hücreler üzerine yayıldı ve toplanıp ependorfa alındı. Birkaç kez yavaşça altüst edildi. Süspansiyon gDNA tutan kolona alındı. 100 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve sıvı kısım kolondan geçmediyse işlem daha yüksek hızda veya daha uzun süre tekrarlandı. Kolon atıldı ve alta geçen kısmın üzerine 500 µl % 70'lik EtOH eklendi. Yavaşça ve nazikçe pipetaj yapıldı ve iyice karıştırıldı. Sıvıdan en fazla 600 µl RNeasy spin kolona aktarıldı. Kalan sıvı olmayı halinde işlem tekrar edildi. 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve sıvı kısım kolondan geçmediyse işlem daha yüksek hızda veya daha uzun süre tekrar edildi. Alta geçen kısım döküldü ve kolona 700 µl RW1 yıkama tamponu eklendi. 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve tekrar alta geçen kısım döküldü. Kolona 500 µl RPE tamponu eklendi ve 11 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve alta geçen kısım döküldü. Bu işlem 2 kez daha tekrar edildi. Kolon bir şey eklemeyen 11000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Kolon yeni bir ependorfa alındı ve üzerine 45 µl RNaz içermeyen su eklenerek 9000 xg'de 1 dakika 15 saniye santrifüj edildi. Kolon atıldı ve RNA bulunan ependorf etiketlenerek ve temsili bölüntülere bölünerek -80°C'ye kaldırıldı.

İzole edilen RNA örneklerinin saflığının kontrolünün belirlenmesi için Nano Drop, MN913 kullanılarak ölçüm yapıldı. RNA'nın saflığını değerlendirirken A260/A280 ve A260/A230 oranına bakılmaktadır. A260/A280 oranının yaklaşık olarak 1,9 ve A260/A230 oranının ise 1,8 ile 2,2 arasında olması izole edilen RNA'nın saf olduğunu gösterir.

2.2.5.7 Total RNA'nın Agaroz Jel Elektrofrezine İle Görüntülenmesi

İzole edilen RNA'lar yatay agaroz jel elektrofrezinde yürütüldü. % 1'lik agaroz jel Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponunda hazırlandı. Agaroz çözünene kadar mikrodalga fırında ısıtıldı. Tam çözünme sağlandıktan sonra agaroz solüsyonu soğutuldu ve üzerine 1µl Etidyum bromür (EtBr) eklendi. Bu karışım elektrofrez tablasına dökülerek katılaştırılması beklendi. Katılaştıran jel, RNA'nın - kutuptan + kutuba yürüyebilmesi için elektrofrezin - kutbuna doğru yerleştirildi. Elektrofrez tankı 1X TAE tamponuyla dolduruldu. Bu tampon RNA'nın jel üzerinde yürütmesini sağladı. 3 µl RNA örneği, 5 µl steril su, 2 µl yürütme boyası karıştırılarak jel üzerindeki kuyucuklara mikropipet yardımıyla yüklendi. Elektrofrez güç kaynağına bağlandı ve 90 volt, 500 mA'de 40 dakika yürütüldü. Yürütme bitince jel UV transilluminatörde incelenip DNR LightBis ProImage Analysis System (DNR BioImaging System Ltd. Jerusalem, Israel) cihazında fotoğraflandı.

2.2.5.8 cDNA SENTEZİ :

Nanodrop cihazında konsantrasyonları belirlenen yüksek kaliteli total RNA'lar kullanılarak ABM cDNA sentez kiti ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bir PZR tüpü içerisinde 2,5 µg total RNA kit içerisindeki oligo d(T) primerleri (1µl), dNTP çözeltisi (1µl) ve RNAz içermeyen su (bu aşamada son hacim 14,5 µl olacak şekilde eklendi) ile karıştırılarak 65°C'de 5 dakika ön işleme tabi tutuldu. Ardından bu karışım yine kit içeriğinde yer alan reaksiyon tamponu (4 µl), RNAz inhibitörü (0,5 µl) ve 'EasyScript RTase' enzimi (1 µl) ile birleştirildi. Böylece bir tüpteki son hacim 20 µl olur ve 50°C'de 50 dakika inkübe edilerek cDNA sentezlendi. Süre sonunda, enzim inhibe edilmek üzere 85°C'de 5 dakika bekletildi. Sentezlenen cDNA'lar RT-PZR yapılmak üzere -20 derecede saklandı. cDNA sentez karışımı prosedürü tabloda verilmektedir.

Tablo 17 : cDNA sentez karışımı ve prosedürü

BİLEŞENLER	HACİM	SON HACİM
Total RNA	Değişken	2 µg/ml
Gen spesifik primer(Oligo (dt) (10µM)	1 µl	0,5 µM
dNTP Karışımı (her biri 10mM)	1 µl	500 µM
RNAaz içermeyen su	Değişken	14,5 µl
Karışım Hazırlandıktan sonra 5 dakika 65 °C ısıtıcıda beklenir.		
5X RT tamponu	4 µl	1X
Ribonükleaz inhibitörü(40U/µl)	0,5 µl	20 U/rxn
Reverse Transkriptaz Enzimi (200U/µl)	1 µl	200 U/rxn
TOPLAM HACİM	20 µl	
Karışım sentez için 55 dakika inkübatörde bekletilir.		

2.2.5.9 mRNA Ekspresyon Düzeyinin Tayini : Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gerçek zamanlı PZR reaksiyonları ABM kilogrenn 2X qPZR Master Mix kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği talimatlara göre gerçekleştirildi. Primer ve cDNA miktarları laboratuvarımızda optimize edildi. Sonuçlar Exicycler 3 programı kullanılarak “house keeping” geni olan β-aktin’e göre normalize edildi.

Tablo 18 : qRT-PZR koşulları

Bileşenler	Reaksiyon Karışımı
Kilo Green 2X Master Mix	12,5 µl
İleri Primer	0,6 µl
Geri Primer	0,6 µl
cDNA	5 µl (1:4 seyreltilmiş)
dH2O	6,3 µl

Tablo 19: PZR sıcaklık, döngü ve zamanları

Döngü	Sıcaklık	Süre
Ön denatürasyon	94°C	5 dk
Denatürasyon	94°C	20 sn
Yapışma	X°C	25 sn
Uzama	72°C	20 sn

2.2.6 İstatistiksel Analizler

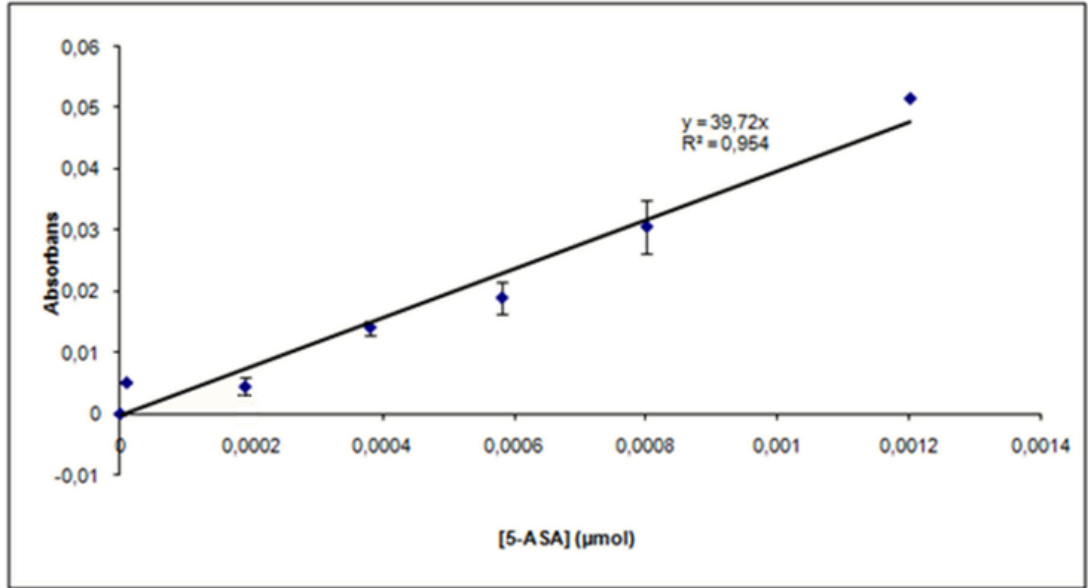
Elde edilen sonuçlar her biri veri için Ortalama \pm Standart Sapma olarak ifade edildi. Farklı gruplar içinde ve arasında kayda değer bir fark olup olmadığını analiz etmek için “öğrenci t-test “ uygulandı. qRT-PZR verilerinin analizleri Qiagen firmasının ücretsiz olarak sağladığı RT² Profiller™ PZR Array Data Analysis v3.4 ile web üzerinden gerçekleştirildi.

3. BULGULAR

3.1 Aktivite Deneyleri

3.1.1 CYP İzofomlarının 5-ASA Aktivitelerinin Ölçülmesi

5-ASA'nın CYP enzimlerince substrat olarak tüketilmesi materyal metot bölümünde 5-ASA-CYP aktivitesi ölçümü (2.2.1) ana başlığı altında tanımlandığı şekli ile ölçüldü. 5-ASA'nın geliştirilen metot ile ölçümü sonrasında çizilen standart eğri grafiği Şekil 14'te ve 5-ASA'nın CYP enzimleri ile inkübasyonu sonucunda hesaplanan aktivite değerleri pmol5-ASA/dak/pmolCYP olarak Tablo 20'de verilmektedir.



Şekil 14: 5-ASA'nın belirlenen metot ile oluşturulan standart eğri grafiği. Veriler 3 tekrarın ortalama değerleridir.

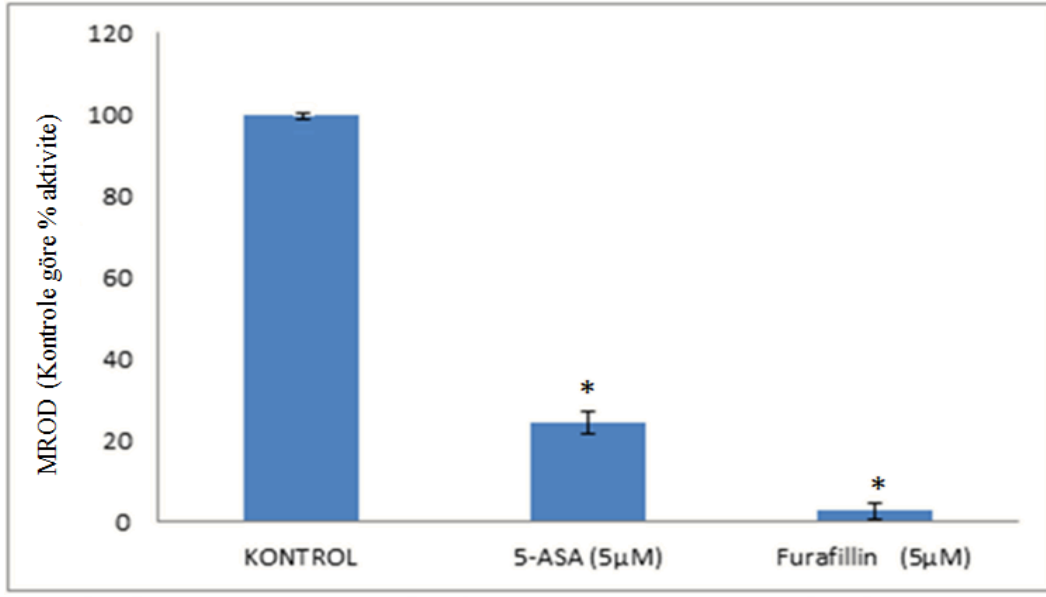
Tablo 20: Cyp P450 enzimlerinin 5-ASA ile muamelesi sonucunda hesaplanan aktiviteleri. Veriler 3 tekrarın ortalama değerleridir.

CYP P450	AKTİVİTE
	($\mu\text{mol5-ASA/dak}/\mu\text{molCYP}$)
Cyp 1A2	0
Cyp 2C9	0
Cyp 2C19	0
Cyp 2D6	0,280 \pm 0,04
Cyp 3A4	0,228 \pm 0,09

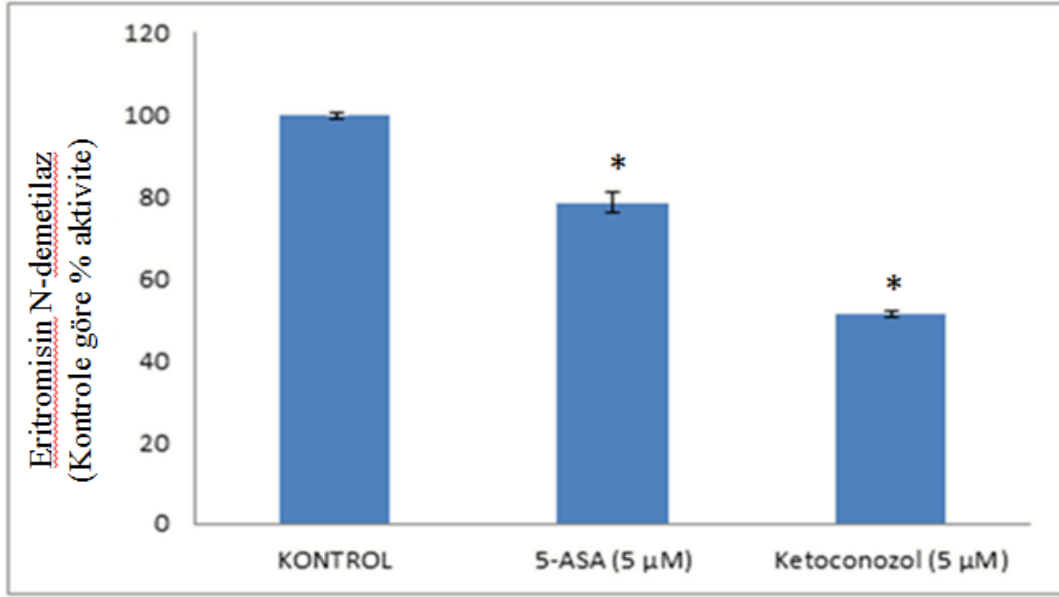
3.1.2 CYP Aktivitelerinin Prototip Substratları İle Ölçülmesi, 5-ASA ve CYP Prototip İnhibitörlerinin CYP Aktiviteleri Üzerine Etkisi

CYP aktivitelerinin prototip substratları ile ölçümü materyal metot bölümünde 2.2.3 ana başlığı altında tanımlandığı, 5-ASA ve CYP prototip inhibitörlerin CYP aktiviteleri üzerine etkisi materyal metot bölümünde 2.2.4 ana başlığı altında tanımlandığı şekli ile ölçüldü.

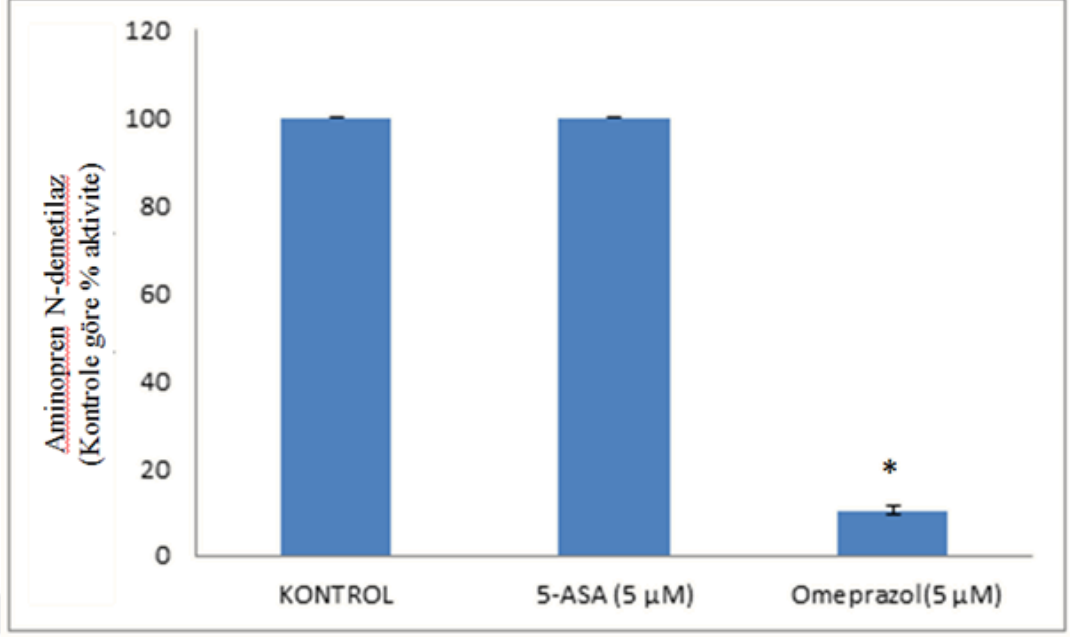
CYP1A2, CYP3A4, CYP2C19, CYP2C9 için belirlenen prosedür sonunda hesaplanan yüzde aktivite grafikleri sırası ile Şekil 15, 16, 17 ve 18’de verilmektedir.



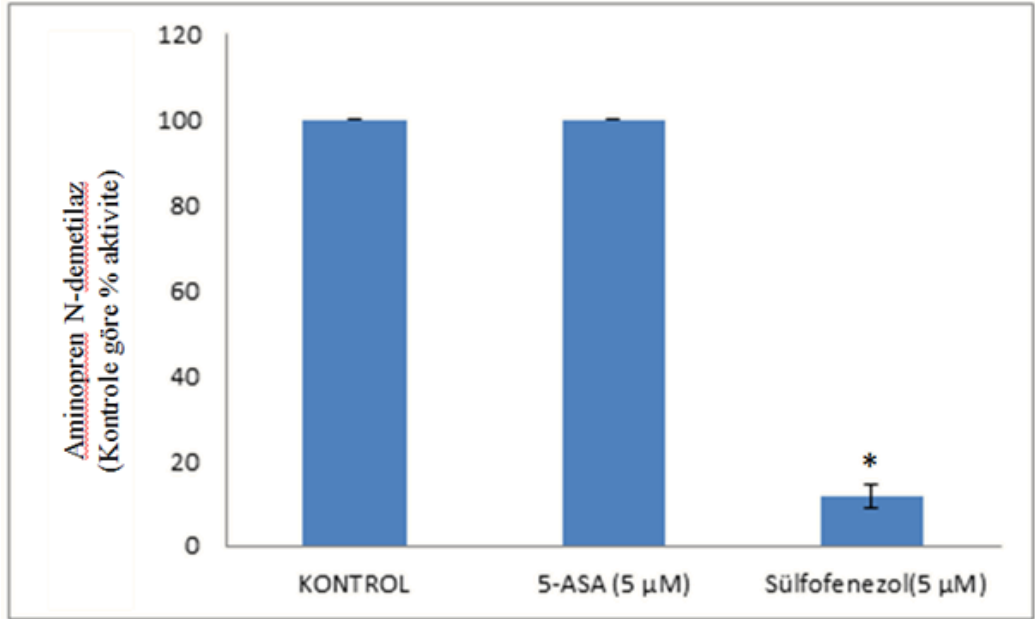
Şekil 15: CYP1A2 için belirlenen prosedür sonunda hesaplanan yüzde aktivite grafiği (Kontrol değeri 100 olarak alındı). Veriler 2 tekrarın ortalama değerleridir.



Şekil 16: CYP3A4 için belirlenen prosedür sonunda hesaplanan yüzde aktivite grafiği (Kontrol değeri 100 olarak alındı). Veriler 2 tekrarın ortalama değerleridir.



Şekil 17: CYP2C19 için belirlenen prosedür sonunda hesaplanan yüzde aktivite grafiği (Kontrol değeri 100 olarak alındı). Veriler 2 tekrarın ortalama değerleridir.

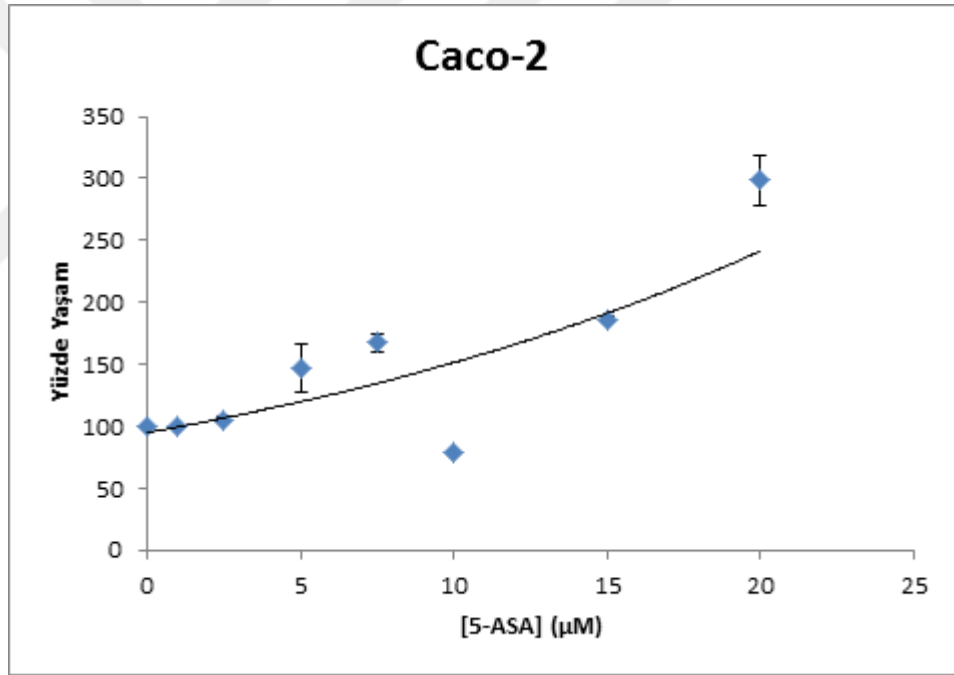


Şekil 18: CYP2C9 için belirlenen prosedür sonunda hesaplanan yüzde aktivite grafiği (Kontrol değeri 100 olarak alındı). Veriler 2 tekrarın ortalama değerleridir.

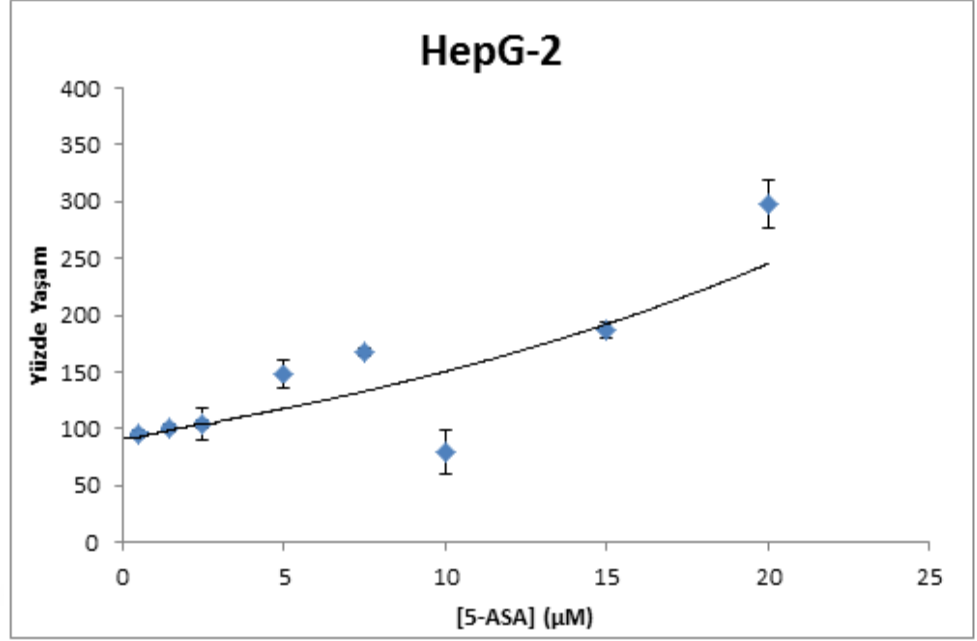
3.2 SÇTT (WST) Metoduyla Hücre Canlılığının Belirlenmesi:

Çalışmanın ileri deneylerinde kullanılacak olan en uygun 5-ASA dozunun saptanması için yapılan hücre sitotoksikite ölçümü için hücreler 1×10^3 olacak şekilde ekilerek 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM ve 50 mM olmak üzere 6 farklı 5-ASA dozu ile muamele edildi.

Sonuçlar, herhangi bir doz ile muamele edilmeyen durumdan elde edilen sonuçlar ile oranlanarak % kontrol olarak değerlendirildi. Buna göre; uygulanan dozların Caco-2 ve HepG2 hücre hatlarında sitotoksik aktivite göstermediği gözlemlendi (Şekil 19, 20). Yapılan bu çalışmalar üç farklı zamanda tekrarlanmış ve benzer sonuçlar gözlemlendi. Çalışmamızın devamında kullanılacak olan üç farklı doz (10 mM, 20 mM, 50 mM) literatür taramasında bulunan değerlere paralel olarak belirlendi.



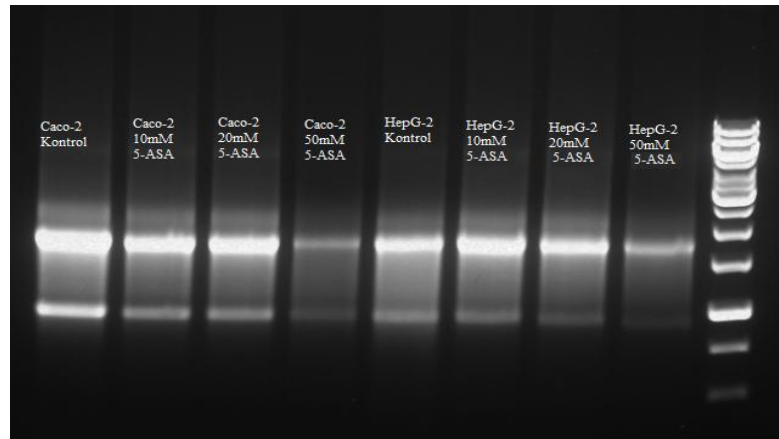
Şekil 19: 5-ASA'nın Caco-2 hücre hattında hücre canlılığına etkisi



Şekil 20: 5-ASA'nın HepG2 hücre hattında hücre canlılığına etkisi

3.3 Hücre Kültüründen RNA İzolasyonu

Hücre kültüründe çoğaltılan hücrelerden RNA'lar Qiagen RNeasy Plus Mini kiti kullanılarak başlık 2.2.5.6'da anlatılan prosedür ile izole edildi ve izole edilen RNA'lar başlık 2.2.5.7'de anlatılan prosedür ile % 1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülüp görüntülendi. Caco-2 ve HepG2 hücre hatlarından izole edilen RNA'ların jel elektroforez görünüşü Şekil 21'de gösterilmektedir.



Şekil 21 :HepG2 ve Caco-2 hücrelerinden izole edilen RNA'ların jel elektroforez görüntüsü

3.4 mRNA Ekspresyon Düzeylerinin tayin edilmesi: Gerçek zamanlı Polimeraz zincir reaksiyonu

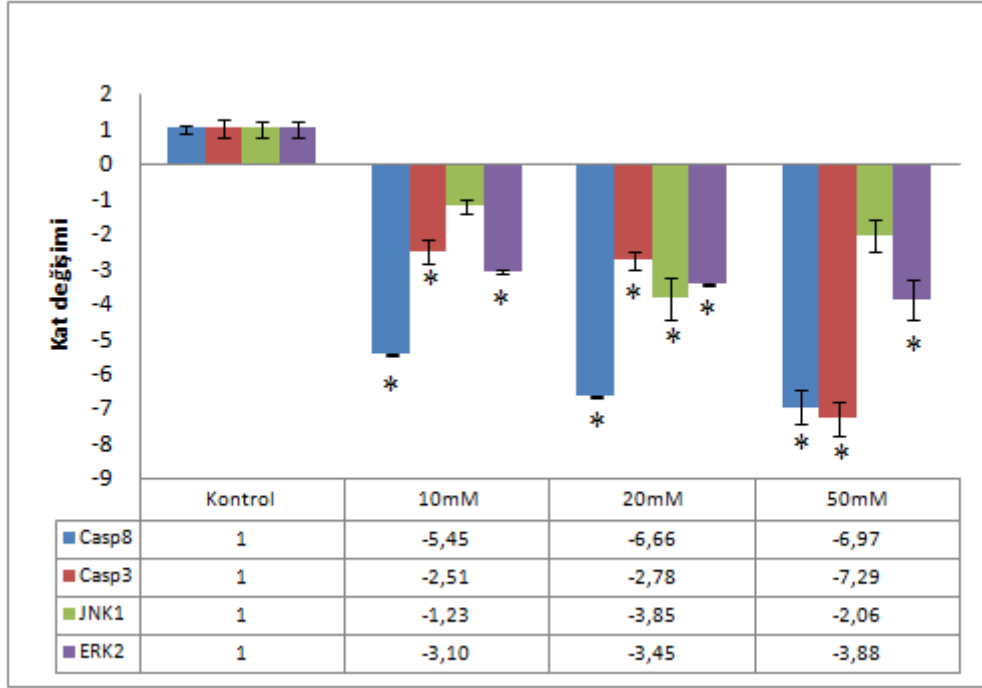
Konsantrasyonları belirlenen RNA'lerden seçilen genlerin mRNA ekspresyon seviyelerini belirlemek için cDNA sentezlendi. RT-PZR yöntemi ile seçilen genlere uygun primerler için yapışma sıcaklıkları ve döngü sayısı belirlendi.

qRT-PZR verilerinin analizleri Qiagen firmasının ücretsiz olarak sağlandığı RT2 Profiler™ PZR Array Data Analysis v3.4 ile web üzerinden çevrimiçi gerçekleştirildi.

Çalışma kapsamında birçok farklı yolakla ilişkili 24 adet genin Caco-2 ve HepG2 hücre hattında 5-ASA'nın uygulanması sonucunda mRNA düzeylerinde meydana gelen değişimlere ait sonuçlar elde edildi. Bu genler rol aldıkları yollar ile ilişkilendirilerek TNF sinyal iletimi yolağı genleri, enflamasyon yolağı genleri, onkogenler, antionkogenler ve hücre döngüsünü düzenleyici genler, sinyal yolağı genleri olarak gruplandırıldı.

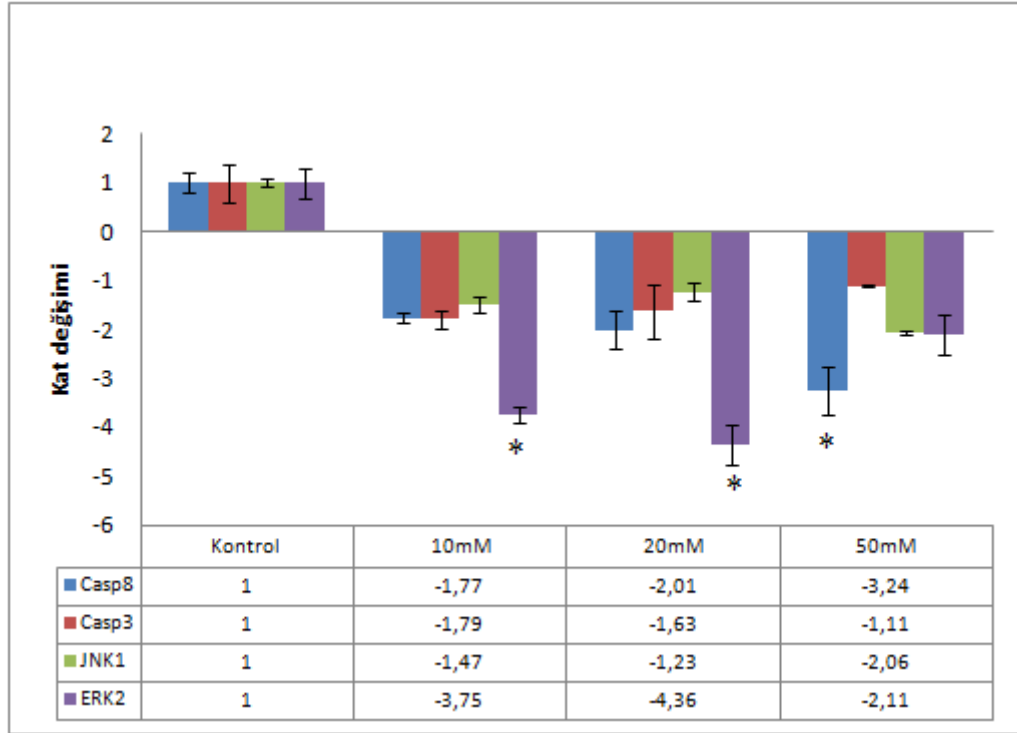
3.4.1 TNF Sinyal İletimi Yolağı Genleri

Caco-2 ve HepG2 hücre hatlarında belirlenen 5-ASA dozlarının uygulanması sonucunda TNF- α sinyal iletim yolağında çeşitli görevleri olan Casp8, Casp3, JNK1, ERK2 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. Caco-2 hücre hattında Casp8 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 5-ASA'nın 10 Mm, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 5,44, 6,66 ve 6,96 kat azalış elde edildi. Casp3 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 5-ASA'nın 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 2,51, 2,77 ve 7,28 kat azalış gözlemlendi. JNK1 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 5-ASA'nın 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,22, 3,84 ve 2,05 kat azalma, son olarak ERK2 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 5-ASA'nın 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 3,0, 3,45 ve 3,88 kat azalış elde edildi (Şekil 22). Bu azalışlardan sadece JNK1 geninin 10 mM ve 50 mM'lık uygulamaları istatistiksel olarak anlamsız bulundu.



Şekil 22 : 5-ASA'nın Caco-2 hücre hattında TNF- α Yolağı ile ilişkili genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı. (*) p<.05 düzeyinde kontrol grubunda anlamlı olarak farklılık görüldü.

HepG2 hücre hattında Casp8 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 5-ASA'nın 10mM, 20mM ve 50mM'lık dozları uygulanmasında sırasıyla 1,76, 2,00, 3,23 kat azalış elde edildi. Casp3 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 5-ASA'nın 10mM, 20mM ve 50mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,79, 1,63, 1,11 kat azalış gözlemlendi. JNK1 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 5-ASA'nın 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,47, 1,22, 2,05 kat azalma gözlemlendi. Son olarak ERK2 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 5-ASA'nın 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla, 3,74, 4,36, 2,10 kat azalış elde edildi (Şekil 23). Bu azalışlardan Casp8 geninde 50 mM doz uygulaması, ERK2 geninde 10 mM ve 20 mM doz uygulamaları istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

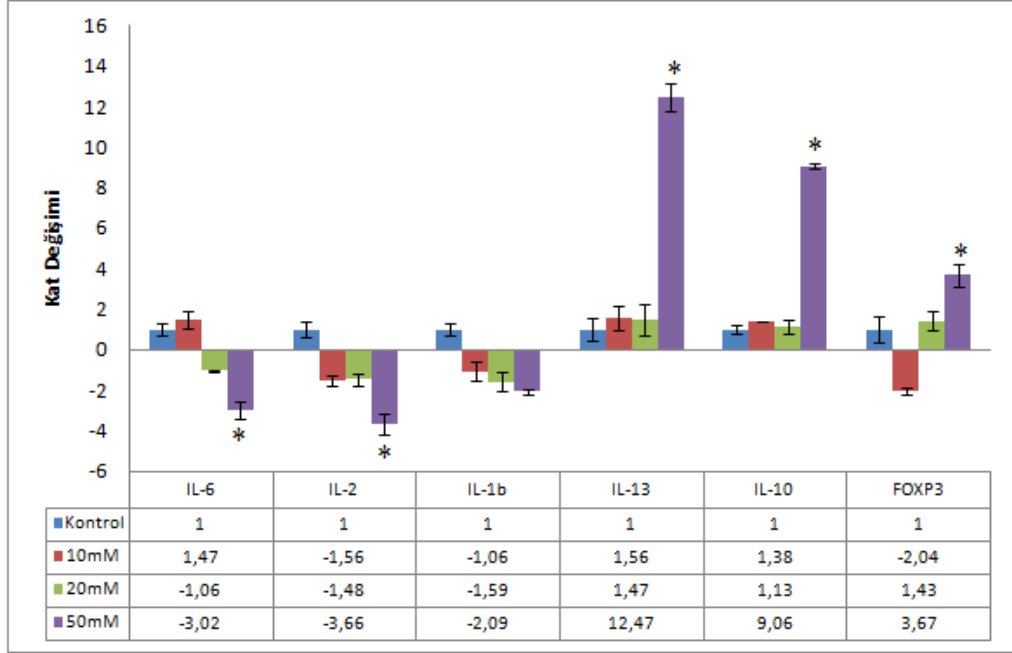


Şekil 23 : 5-ASA'nın HepG2 hücre hattında TNF- α Yolağı ile ilişkili genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı. (*) $p < .05$ düzeyinde kontrol grubunda anlamlı olarak farklılık görüldü.

3.4.2 Enflamasyon Genleri

Caco-2 ve HepG2 hücre hatlarında belirlenen 5-ASA dozlarının uygulanması sonucunda enflamasyon yolağı ile ilişkili olduğu bilinen IL-6, IL-2, IL-1b, IL-13, IL-10, FOXP3 genlerinin mRNA seviyelerindeki değışimlere bakıldı. Verilerden elde edilen sonuçlara göre Caco-2 hücre hattında IL-6 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,47, 1,05, 3,02 kat azalış gözlemlendi. IL-2 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık dozları uygulanmasında sırasıyla 1,55, 1,48, 3,65 kat azalış gözlemlendi. IL-1b geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,06, 1,58, 2,08 kat azalış elde edildi. IL-13 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık dozları uygulanmasında sırasıyla 1,55, 1,47, 12,46 kat artış gözlemlendi. IL-10 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık dozları uygulanmasında sırasıyla 1,37, 1,12, 9,06 kat artış elde edildi. FOXP3 geninin mRNA ekspresyon

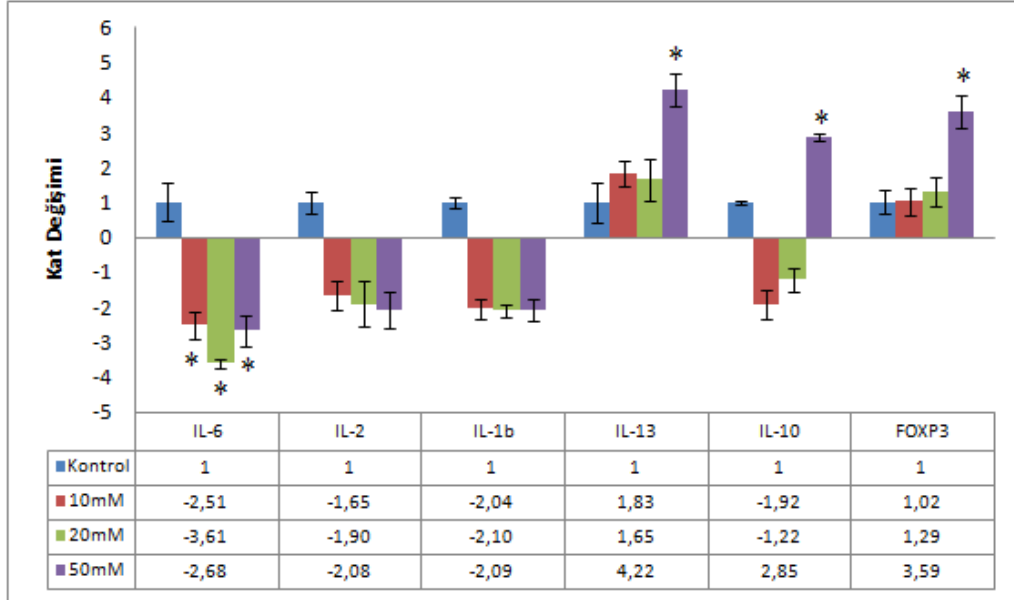
düzeylerinde 10 mM, doz uygulanmasında 2,03 kat azalma, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında 1,42, 3,66 kat artış gözlemlendi (Şekil 24). Bu sonuçlara göre Caco-2 hücre hattında IL-6, IL-2, IL-13, IL-10 geninde 50 mM'lık doz uygulanmasındaki artışlar ve FOXP3 geninde 50 mM'lık doz uygulanmasındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



Şekil 24: 5-ASA'nın Caco-2 hücre hattında enflamasyon Yolağı ile ilişkili genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı. (*) p<.05 düzeyinde kontrol grubunda anlamlı olarak farklılık görüldü.

HepG2 hücre hattında IL-6 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 2,51, 3,60, 2,67 kat azalış elde edildi. IL-2 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,65, 1,89, 2,07 kat azalış gözlemlendi. IL-1b geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 2,04, 2,09, 2,08 kat azalış elde edildi. IL-13 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,83, 1,65, 4,22 kat artış elde edildi. IL-10 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,91, 1,21, 2,84 kat artış elde edildi. FOXP3 13 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık

doz uygulanmasında sırasıyla 1,02, 1,29, 3,59 kat artış gözlemlendi (Şekil 25). Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde IL-6 tüm doz uygulamalarındaki azalış, IL-13, IL-10, FOXP3 geninin 50mM'lık doz uygulanmasındaki artış anlamlı bulundu.

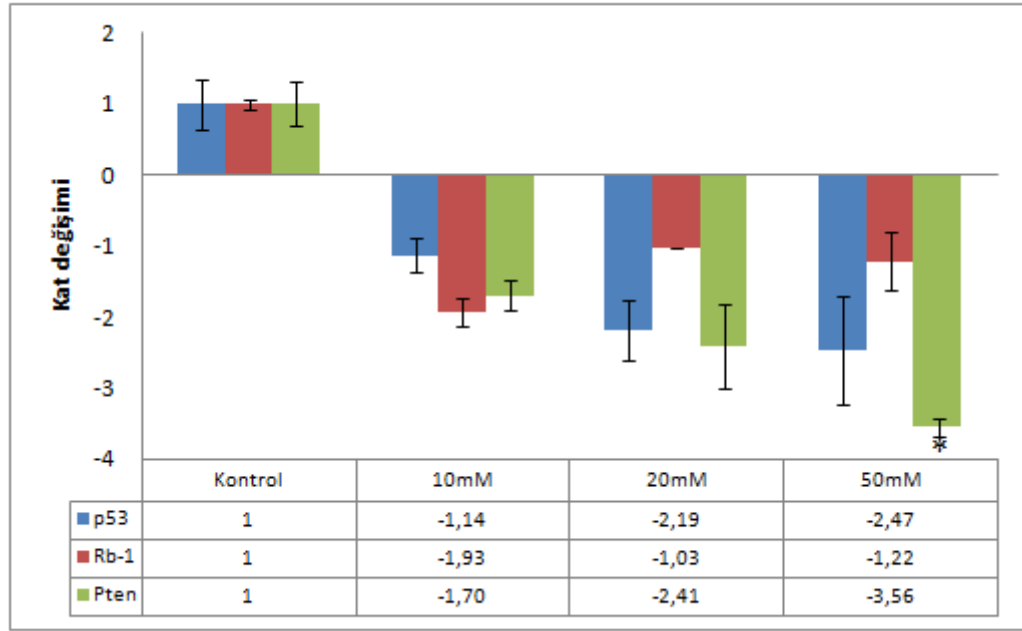


Şekil 25: 5-ASA'nın HepG2 hücre hattında enflamasyon Yoluyla ile ilişkili genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı. (*) p<0.05 düzeyinde kontrol grubunda anlamlı olarak farklılık görüldü.

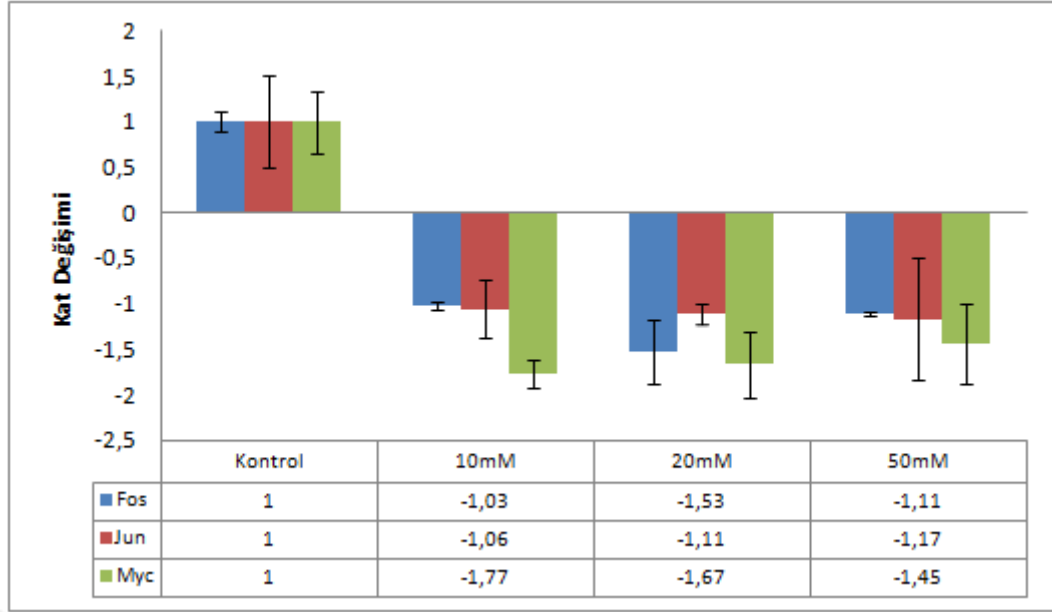
3.4.3 Proto-Onkogenler, Tümör Baskılayıcı Genler ve Hücre Döngüsünü Düzenleyici Proteinler

Caco-2 ve HepG2 hücre hatlarında belirlenen 5-ASA dozlarının uygulanması sonucunda onkogenler, tümör baskılayıcı ve hücre döngüsünü düzenleyici genler ile ilişkili olarak P53, Rb, Siklin D1, Siklin D2, CDKN1A, PTEN, Myc, Fos, Jun genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. Sonuçlara göre Caco-2 hücre hattında P53 geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,13, 2,19, 2,46 kat azalış görüldü. Rb geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık dozları uygulanmasında sırasıyla 1,92, 1,03, 1,21 kat azalış, PTEN geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla, 1,69, 2,41, 3,55 azalış (Şekil 26), Myc geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,77, 1,67, 1,44

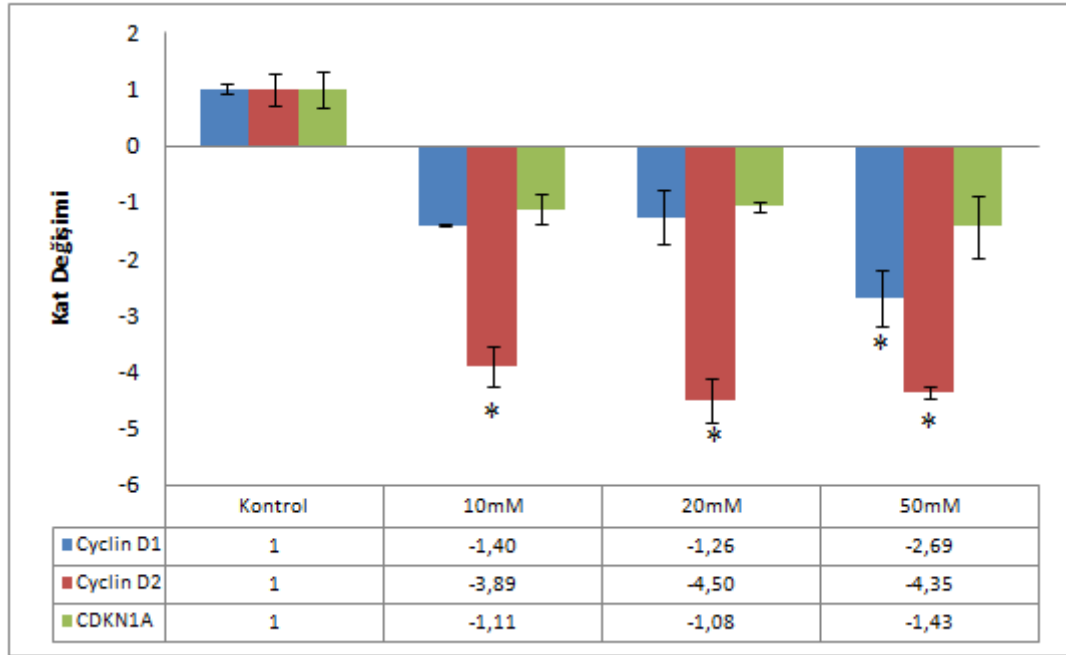
kat azalış, Fos geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,02, 1,52, 1,11 kat azalış, Jun geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,05, 1,105, 1,16 kat azalış (Şekil 27), Siklin D1 geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,39, 1,25, 2,69 kat azalış, Siklin D2 geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 3,88, 4,50, 4,34 kat azalış, CDKN1A geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,11, 1,07, 1,42 azalış elde edildi (Şekil 28). Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde P53 geninde 50 mM'lık doz uygulanmasındaki azalış, Siklin D1 geninde 50 mM'lık dozları uygulanmasındaki azalış, siklin D2 geninde uygulanan tüm dozlardaki azalış, PTEN geninde 50 mM'lık doz uygulanmasındaki azalış anlamlı bulundu.



Şekil 26: 5-ASA'nın Caco-2 hücre hattında tümör baskıyıcı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı. (*) $p < .05$ düzeyinde kontrol grubunda anlamlı olarak farklılık görüldü.

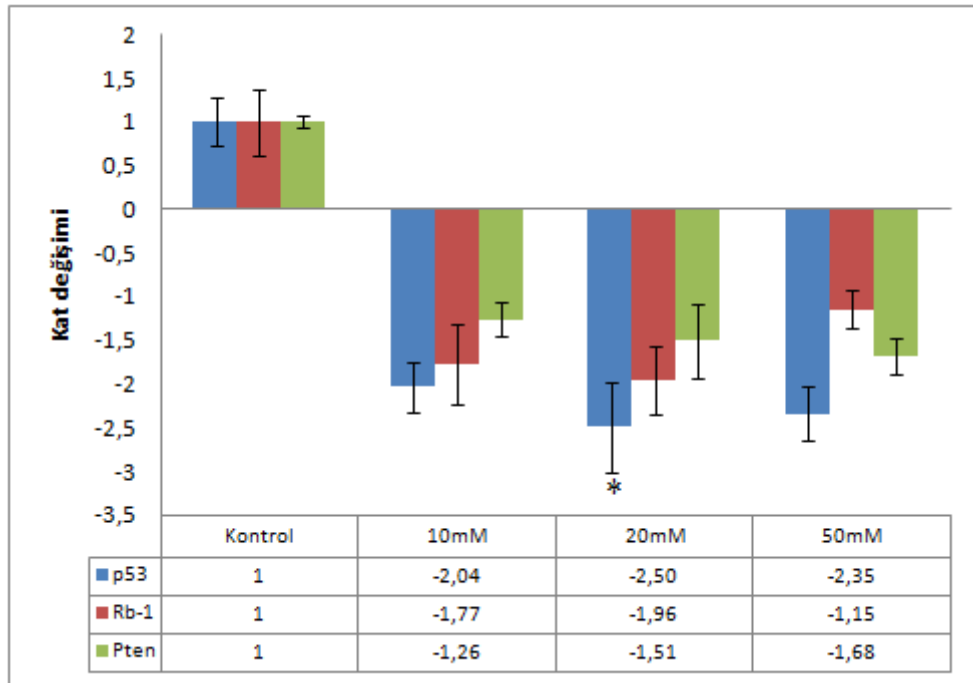


Şekil 27: 5-ASA'nın Caco-2 hücre hattında proto-onkogenlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı. (*) $p < .05$ düzeyinde kontrol grubunda anlamlı olarak farklılık görüldü.

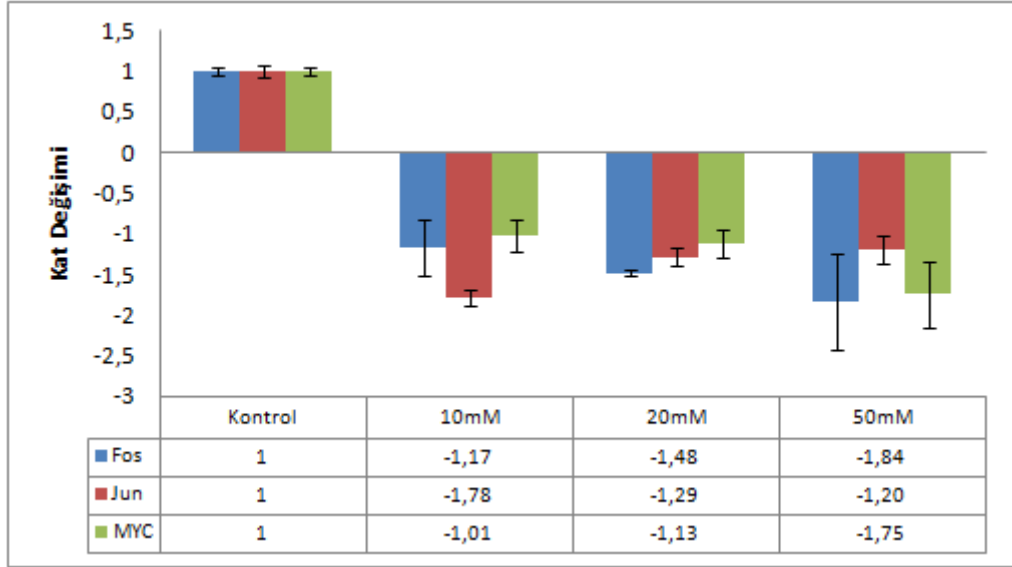


Şekil 28: 5-ASA'nın Caco-2 hücre hattında hücre döngüsünü düzenleyici genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı. (*) $p < .05$ düzeyinde kontrol grubunda anlamlı olarak farklılık görüldü.

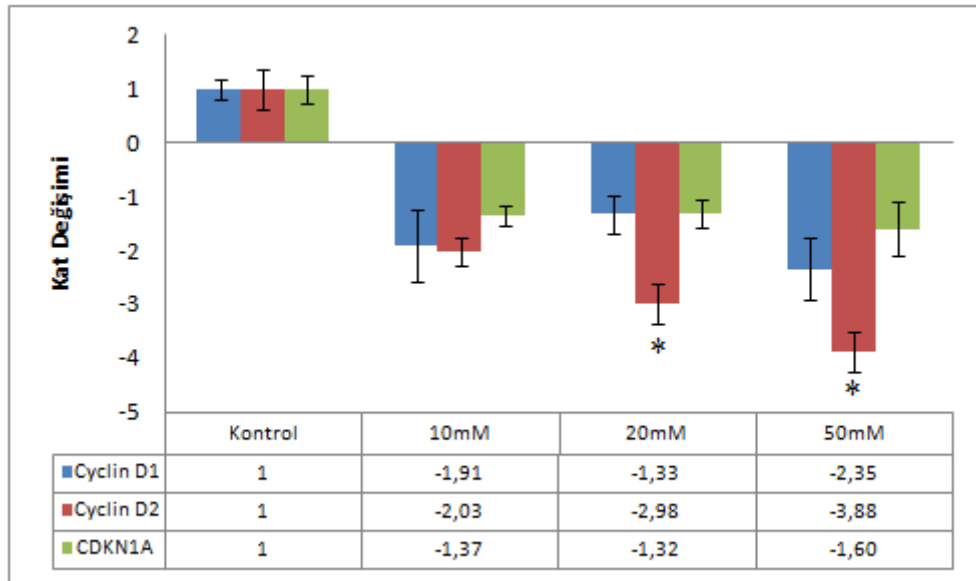
HepG2 hücre hattında P53 geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 2,03, 2,49, 2,34 kat azalış görüldü. Rb1 geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,77, 1,95, 1,14 kat azalış, PTEN geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla, 1,25, 1,50, 1,68 azalış (Şekil 29), Myc geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,01, 1,12, 1,74 kat azalış, Fos geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,17, 1,48, 1,83 kat azalış, Jun geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,78, 1,28, 1,19 kat azalış (Şekil 30), Siklin D1 geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,91, 1,32, 2,34 kat azalış, Siklin D2 geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 2,02, 2,97, 3,87 kat azalış, CDKN1A geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,36, 1,32, 1,59 azalış elde edildi (Şekil 31). Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde P53 geninde 20 mM'lık doz uygulanmasındaki azalış, Siklin D2 geninde 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulamasındaki azalış anlamlı bulundu.



Şekil 29: 5-ASA'nın HepG2 hücre hattında tümör baskılayıcı genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı. (*) $p < .05$ düzeyinde kontrol grubunda anlamlı olarak farklılık görüldü.



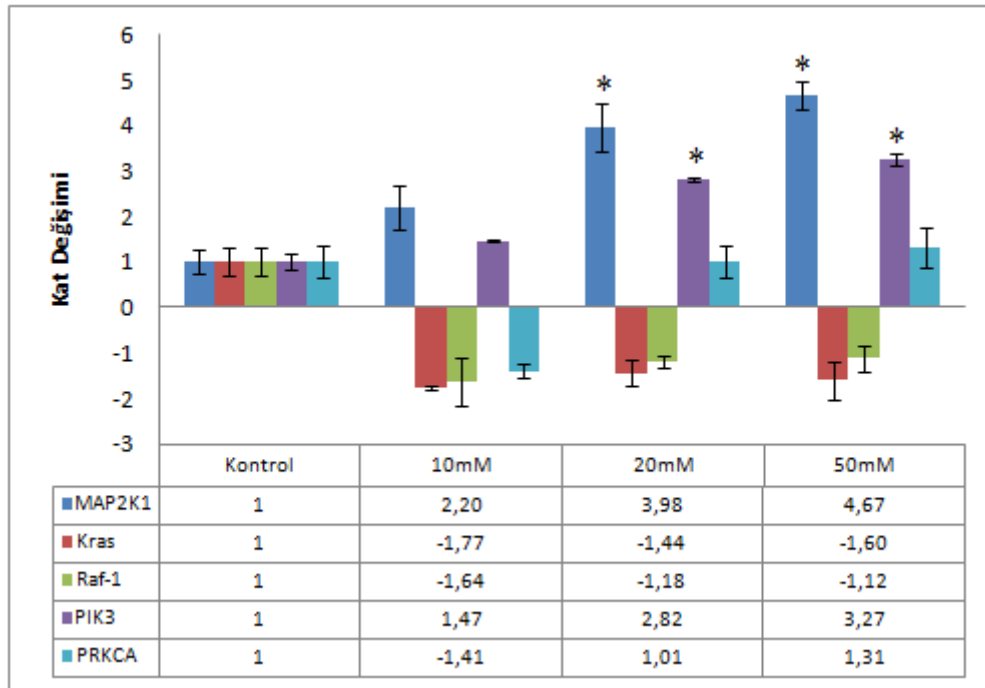
Şekil 30: 5-ASA'nın HepG2 hücre hattında proto-onkogenleri mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edilmiştir. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı. (*) $p < .05$ düzeyinde kontrol grubunda anlamlı olarak farklılık görüldü.



Şekil 31: 5-ASA'nın HepG2 hücre hattında hücre döngüsünü düzenleyen genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı. (*) $p < .05$ düzeyinde kontrol grubunda anlamlı olarak farklılık görüldü.

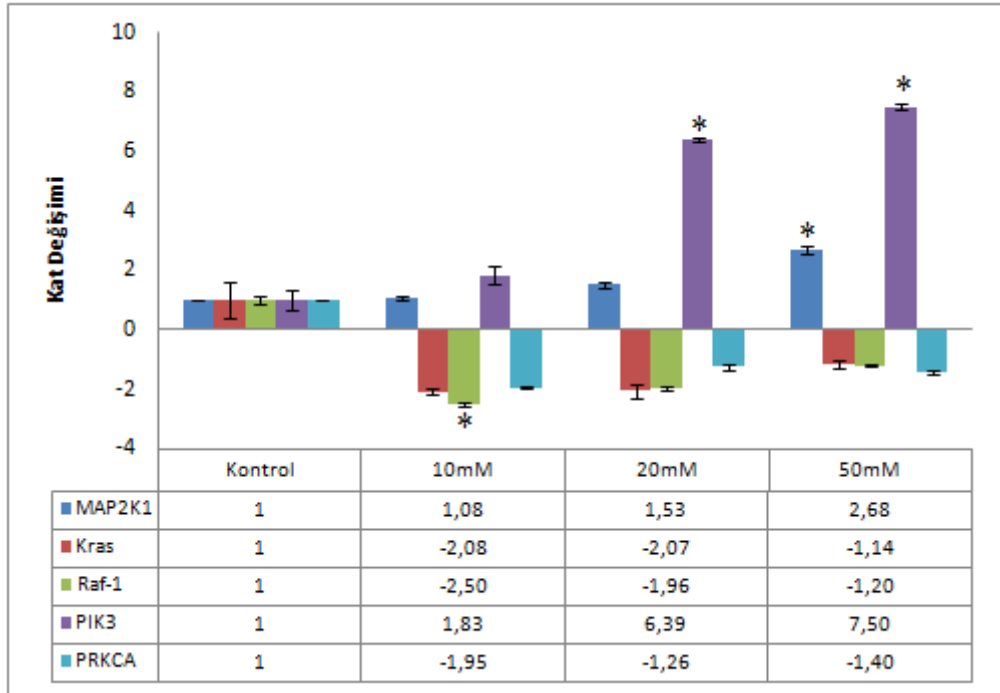
3.4.4 Protein Kinazlar

Caco-2 ve HepG2 hücre hatlarında belirlenen 5-ASA dozlarının uygulanması sonucunda protein kinazlar ve sinyal yollarını ile ilişkili olarak MAP2K1, Kras, Raf, PIK3, PRKCA genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. Elde edilen sonuçlara göre Caco-2 hücre hattında MAP2K1 geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 2,19, 3,97, 4,67 kat artış elde edildi. Kras geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,77, 1,43, 1,60 kat azalış, Raf1 geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,63, 1,17, 1,11 kat azalış görüldü. PI3K geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık dozları uygulanmasında sırasıyla 1,47, 2,81, 3,27 artış, PRKCA geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,40 kat azalış, 1,01, 1,31 kat artış görüldü (Şekil 32). Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde MAP2K1 geninde 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasındaki artış PI3K 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulamasındaki artış anlamlı bulundu.



Şekil 32: 5-ASA'nın Caco-2 hücre hattında protein kinaz yollarını ile ilişkili genlerin ve hücre döngüsünü düzenleyici genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı. (*) $p < 0.05$ düzeyinde kontrol grubunda anlamlı olarak farklılık görüldü.

HepG2 hücre hattında MAP2K1 geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,08, 1,52, 2,68 kat artış, Kras geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 2,07, 2,06, 1,14 kat azalış elde edildi. Raf1 geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 2,49, 1,95, 1,20 kat azalış görüldü. PI3K geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,83, 6,38, 7,50 kat artış, PRKCA geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,94, 1,25, 1,39 kat azalış görüldü (Şekil 33). Bu değişimlerden MAP2K1 geninde 50 mM doz uygulanmasındaki artış, Kras geninde 10 mM, 20 mM doz uygulamasındaki azalış, Raf geninin 10 mM doz uygulamasındaki azalış, PI3K 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulamasındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



Şekil 33: 5-ASA'nın HepG2 hücre hattında Protein kinaz ve sinyal yolları ile ilişkili genlerin ve hücre döngüsünü düzenleyici genlerin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Sonuçlar B-aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı. (*) $p < 0.05$ düzeyinde kontrol grubunda anlamlı olarak farklılık görüldü.

4. TARTIŞMA

Ksenobiyotikler canlı organizmalar tarafından üretilmeyen, vücuda dışarıdan alınan yabancı kimyasallardır. Ksenobiyotikler arasında ilaçlar, böcek öldürücüler, anestetikler, petrol ürünleri, diyet ve sigara dumanı içerisinde yer alan karsinojenler sayılabilir (Murray 1996).

Metabolizma reaksiyonları ilaçların enzimatik olarak uğradığı kimyasal değişmelerin türüne göre önce iki büyük gruba ayrılır. Bunlardan ilki, oksidatif, redüktif ve hidrolitik reaksiyonları kapsayan faz I, İkincisi ise enzimatik tepkimeler ile ilaçlara polar yapıların bağlanmasını kapsayan faz II (konjugasyon) reaksiyonlarıdır.

Faz I reaksiyonlarıyla yapıya - OH, - NH₂, - COOH, - SH gibi polar ve fonksiyonel gruplar takılır, böylece farmakolojik aktivitede azalma (deaktivasyon), artma (aktivasyon), değişme ve toksisitede artma (intoksikasyon) meydana gelebilir.

Faz II reaksiyonları ise, ya yapısında karboksil, alkol, fenol, amin, amid, üretan ve aktif hidrojen içeren gruplar, ya da faz I reaksiyonları ile oluşan fonksiyonel gruplar üzerinden devam eder ve ilaçları aktif olmayan polar metabolitlere dönüştürür (Baer ve Rettie 2006). İlaç metabolizma reaksiyonlarının faz I reaksiyonlarından en önemlisi oksidatif reaksiyondur. Çünkü bu reaksiyon birçok ilaç ve ksenobiyotiğin organizmadan eliminasyonunu sağlar. Bu kimyasal değişikliği yürüten enzim sistemi sitokrom P450 veya monooksijenazlardır. Sitokrom P450 enzimleri (CYPs) çoğu ilaç ve diğer lipofilik ksenobiyotiklerin oksidatif biyotransformasyonunu katalize edebilen temel enzim ailesini oluştururlar (Nelson 2004; Guengerich 2008; Zanger ve diğ. 2008).

Nonsteroid antienflamatuar ilaçların çoğu organik asit yapısında olan ve yapısal olarak genellikle heterojen olmalarına rağmen benzer terapötik etki ve yan etki gösteren bir ilaç grubudur. Analjezik, antipiretik ve antienflamatuar etki gösterirler. Etki mekanizması İnflamasyona neden olan uyarımlar, araşidonik asitten siklooksijenaz enzimi yoluyla prostasiklin sentezini artırır ve bu sırada siklik

endoperoksitler (PGG2 ve PGH2), tromboksan A2 ve trombosit aktivite edici faktör (PAF) oluşumu da artar (Solomon 2009).

5-aminosalisilik asit özellikle ülseratif kolit gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan nonsteroid antiinflamatuvar bir ajandır. 5-ASA'nın muhtemel etki mekanizmaları arasında "doğal öldürücü" hücrelerinin, antikor sentezinin, siklooksijenaz ve lipooksijenaz yollarının ve nötrofil fonksiyonlarının inhibisyonu ile serbest oksijen radikallerinin temizlenmesi yer alır. Aktif bileşik olan 5-ASA bağırsak duvarı ve karaciğerde faz II biyotransformasyon reaksiyonlarından olan asetilasyon reaksiyonları tarafından asetile edilir ve N-asetil-5-asa'ya metabolize olur. In vitro çalışmalar, sülfasalazin ve 5-ASA'nın enflamatuvar hücre sel yanıt ile ilişkili olan lipooksijenaz yolağının çeşitli ürünlerin sentezini bloke ettiğini göstermektedir (Sharon ve diğ. 1978; Stenson ve diğ. 1982; Hawkey ve diğ. 1985). Bu eylem, proenflamatuvar lökotrienler ve prostaglandinler oluşumunu engeller. Bu ilacın faz II reaksiyonlarından asetilasyon reaksiyonu ile biyotransforme edildiği biliniyor. Ancak sitokrom P450 enzimleri tarafından metabolize edilip edilmediği hakkında net bilgiler yoktur. Bu çalışmada 5-ASA metabolizmasının temel yolağı olan N-asetilasyon yolağı haricinde alternatif diğer ilaç metabolizması yollarının mikrozomal enzimlerden P450 (CYP) enzimleri ile ilişkili olup olmadığına bakılması amaçlandı. 5-ASA saf P450 izozimleri ile (CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6, CYP2C19) in vitro olarak inkübasyonu neticesinde metabolize edilip edilmediği tayin edilmiştir. Buna ek olarak HepG2 ve Caco-2 hücre hatları kullanılarak 5-ASA ile inkübasyonu sonrasında in vivo ortamdaki diğer olası etki mekanizmaları araştırıldı.

5-ASA'nın ilaç metabolizmasında görev alan P450 enzimleri üzerine olan etkisine ve 5-ASA'nın hangi CYP450 enzimi ile metabolize edilebileceğine bakılmak amacıyla enzim aktivite deneyleri yapıldı. 5-ASA'nın öncelikle belirlenen renklendirme reaksiyonu metodu ile standart eğri grafiği çıkartılmak üzere ölçümü optimize edildi. Ölçüm sonrasında 5-ASA ve saf CYP450 enzimleri (CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19) ile reaksiyon sokuldu. 5-ASA ve saf CYP450 enzimleri inkübe edildiğinde oluşan rengin yoğunluğunun okunması esasına dayanan bu metodun sonuçlarına göre 5-ASA'nın CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 enzimleri ile metabolize olmadığı saptandı. Bu da bu enzimlerin 5-ASA'nın

metabolizasyonu içinde rol oynamadıklarını düşünebilir. Bunun yanı sıra CYP2D6 ve CYP3A4 enzimlerinde sırası ile $0,280 \pm 0,04$ (pmol5-ASA/dak/pmolCYP) ve $0,228 \pm 0,09$ (pmol5-ASA/dak/pmolCYP) değerlerinde aktivite tayin edildi. Bu da CYP2D6'nın daha yüksek aktivite gösteriyor olması şartı ile hem CYP2D6'nın hem de CYP3A4'ün 5-ASA metabolizmasında rol aldığı söylenebilir. 5-ASA'nın CYP450 enzimleri ile metabolizması üzerine etkilerini saptamak ve paralel kontrol deneyler yapmak amacı ile saf enzimlerin sadece 5-ASA ile inkübasyonları ve 5-ASA'nın kolorimetrik ölçümlerinin yanı sıra; saf CYP izoenzimlerin prototip substratları ile aktive ölçümleri ve bu aktivite üzerine 5-ASA ve bilinen prototip inhibitörlerin etkileri de saptandı. Bu prototip aktivitelerden ilki olan eritromisin N-demetilaz aktivitesi üzerine 5-ASA ve ketokonazolün etkileri birlikte tayin edildi. Eritromisinin substratı olduğu enzim CYP3A4 enzimi, sadece eritromisin ile reaksiyona sokulduğunda saptanan değer yüzde yüz olarak kabul edilerek hesaplamalar yapıldı. CYP3A4 hem eritromisin'in hem de 5-ASA'nın olduğu bir reaksiyon ortamına konulduğunda reaksiyon yüzde aktivitesi yüzde 80'e kadar düşmüştür. CYP3A4, substratı eritromisin ve enzimin özgül inhibitörü olan ketokonazol ile reaksiyona sokulduğunda enzimin yüzde aktivitesi yüzde 50'ye kadar düşmüştür. Bu da 5-ASA'nın CYP3A4 enzimi için hem substrat hem de inhibitör özelliğinde olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca 5-ASA'nın yarışmalı inhibisyon yapma olasılığı yüksektir. Aminopren N-demetilaz ile yapılan aktivite deneylerinde CYP2C9 ve CYP2C19 enzimlerine ait bir aktiviteye rastlanmadı. Bu da bu enzimlerin 5-ASA metabolizmasında yer almıyor olabileceklerini göstermektedir. Metoksirezorufin O-demetilaz ile yapılan aktivite tayininde ise CYP1A2 substratı olan 7-MR ile reaksiyona girdiğinde yüzde aktivitenin yüzde yüz olduğu görülmüştür. Reaksiyon ortamında CYP1A2, substratı olan 7-MR'nin ortamda 5-ASA bulunduğunda aktivitesinin %80 oranında düştüğü tayin edildi. Reaksiyon ortamında CYP1A2'nin substratı 7-MR ve özgül inhibitörü olan furallin varlığında enzim hiç aktivite gösterememektedir. Bunlar 5-ASA'nın CYP1A2 enzimi üzerinde inhibitör rolü olabileceğini gösteren kuvvetle muhtemel verilerdir.

CYP2D6 aktivitesi ölçümü için maalesef laboratuvarımızda bir metot uygulanmamaktadır. Bu yüzden sadece 5-ASA kolorimetrik yöntemi ile saptanan aktivitelerin prototip bir substrat ile tayini mümkün olmadı. Sonuç olarak 5-ASA'nın bilinen ilaçların %55'inden fazlasını metabolize eden beş CYP izozimi ile ilişkili

metabolizması irdelendiğinde 5-ASA'nın CYP3A4 ve enteresan olarak CYP2D6 ile metabolize edildiği saptandı. Ayrıca 5-ASA'nın CYP1A2 ve CYP3A4 enzim aktivitelerini inhibe ettiği in vitro ortamda tayin edildi. Bu veriler literatür için çok önemli birincil verilerdir. Çünkü özellikle CYP3A4 bilinen birçok ilacı metabolize etmektedir. Bu nedenle 5-ASA kullanan hastaların ilaç-ilaç etkileşimleri ve toksikasyonlar açısından birlikte reçete edilen ilaçlar için dikkat edilmesi gerekmektedir. Benzer durumun CYP2D6 ve CYP1A2 için de geçerli olduğu göz önüne alındığında ve 5-ASA'nın hastalar tarafından ömür buyu kullanıldığı dikkate alındığında bu olası ilaç ilaç etkileşimlerini tehlikeli olabileceği çok açıktır.

5-ASA miktarının ölçümüne dayalı geliştirdiğimiz bu metot ölçümlerinin yüzde yüz kesin bir şekilde iddia edilebilmesi için ölçümlerin LC-MS ile paralel olarak validasyonu gereklidir. Buna rağmen ölçüm için uygulanan kontrol ve tekrarlı yöntemler sonuçların ileri deneyler için önemli bulgular olarak ele alınabilir ve güvenilir sonuçlar olduğunu göstermektedir.

Çalışma kapsamında 5-ASA'nın hücresel etkisinin araştırılması amacıyla kolon kanseri olan Caco-2 ve karaciğer kanseri HepG2 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri ve farklı yollara ait 24 genin mRNA ekspresyon düzeylerindeki değişimlere bakıldı. Yapılan sitotoksikite deneyi sonucunda hiçbir sitotoksik doz bulunamadı (Das 1973). Çalışmanın devamında kullanılacak olan dozlar literatürde belirtilen dozlara paralel olarak her iki hücre hattı için 10 mM, 20 mM ve 50 mM olarak seçildi.

Çalışma kapsamında belirlenen hücre hatlarında birçok metabolik yolla ilişkili 24 adet genin 5-ASA uygulamasından sonra mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimlerin istatistiksel analizleri yapılarak yorumlanan değerler Tablo 21'de verildi.

Tablo 21 : Caco-2 ve HepG2 hücre hatları için 5-ASA uygulaması sonucunda 24 adet genin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler. (Kırmızı; mRNA seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artma, Mavi; mRNA seviyesinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı azalma)

Genler	10 mM		20 mM		50 mM	
	Caco-2	HepG2	Caco-2	HepG2	Caco-2	HepG2
CASP8	-5,45	-1,77	-6,66	-2,01	-6,97	-3,24
CASP3	-2,51	-1,79	-2,78	-1,63	-7,29	-1,11
JNK1	-1,23	-1,47	-3,85	-1,23	-2,06	-2,06
ERK2	-3,1	-3,75	-3,45	-4,36	-3,88	-2,11
IL-6	1,47	-2,51	-1,06	-3,61	-3,02	-2,68
IL-2	-1,56	-1,65	-1,49	-1,9	-3,66	-2,08
IL-1b	-1,06	-2,04	-1,59	-2,1	-2,09	-2,09
IL-13	1,56	1,83	1,47	1,65	12,47	4,22
IL-10	1,38	1,92	1,13	1,22	9,06	2,85
FOXP3	-2,04	1,03	1,43	1,29	3,67	3,59
P53	-1,14	-2,04	-2,19	-2,5	-2,47	-2,35
RB-1	-1,93	-1,77	-1,03	-1,96	-1,22	-1,15
Siklin D1	-1,4	-1,91	-1,26	-1,33	-2,7	-2,35
Siklin D2	-3,89	-2,03	-4,5	-2,98	-4,35	-3,88
CDKN1A	-1,11	-1,37	-1,08	-1,32	-1,43	-1,6
PTEN	-1,7	-1,26	-2,41	-1,51	-3,56	-1,68
MYC	-1,77	-1,01	-1,67	-1,13	-1,45	-1,75
FOS	-1,03	-1,17	-1,53	-1,49	-1,11	-1,84
JUN	-1,06	-1,78	-1,11	-1,29	-1,17	-1,2
MAP2K1	2,2	1,08	3,98	1,53	4,67	2,69
KRAS	-1,77	-2,08	-1,44	-2,07	-1,6	-1,14
RAF-1	-1,64	-2,5	-1,18	-1,96	-1,12	-1,2
PIK3	1,47	1,83	2,82	6,39	3,27	7,51
PRKCA	-1,41	-1,95	1,01	-1,26	1,31	-1,4

TNF sinyal iletiminde görülen iki mekanizma anti-enfazyon ve enfazyon mekanizmasıdır. Bu yollardan hangisinin başlayacağını ilk adımını makrofaj veya diğer hücrelerden salınan TNF'lerin konak hücre zarındaki reseptöre bağlanması oluşturur (Abbas ve diğ. 2005). TNF, reseptöre bağlandığı zaman reseptörler aktive olarak sitozol içerisinde sinyallenme mekanizmasını başlatan adaptör proteinler ile birleşirler ve hücre buna göre ya apoptoza gider ya da gen ekspresyonu ile hücrenin yaşaması söz konusu olur. Çalışmamızın kapsamında bu

yolak ile ilişkili olarak Casp8, Casp3, JNK1, ERK2 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde Caco-2 hücre hattı için Casp8 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 5-ASA'nın 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 5,44, 6,66 ve 6,96 kat azalış saptandı. Casp3 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 5-ASA'nın 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 2,51, 2,77 ve 7,28 kat azalış gözlenirken, JNK1 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 5-ASA'nın 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık dozları uygulanmasında sırasıyla 1,22, 3,84 ve 2,05 kat azalma, son olarak ERK2 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 5-ASA'nın 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla, 3,0, 3,45 ve 3,88 kat azalış elde edildi.

HepG2 hücre hattında Casp8 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 5-ASA'nın 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık dozları uygulanmasında sırasıyla 2,00, 3,23 kat azalış tespit edildi. Casp3 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir değişme gözlenmezken, JNK1 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 5-ASA'nın sadece 50 mM'lık doz uygulanmasında 2,05 kat anlamlı bir azalma söz konusudur. Son olarak ERK2 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 5-ASA'nın 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla, 3,74, 4,36, 2,10 kat azalış elde edildi. Casp8 geninin ekspresyonundaki anlamlı azalma hücrenin apoptozdan kaçışının bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Böylelikle 5-ASA hem hücre yaşamını korurken (antiinflamatuvar) apoptozu da engelleyerek bağırsak ve karaciğer hücrelerinin yaşamını koruyucu etki gösterdiği tespit edildi. Bu etki 5-ASA'nın ilave iyileştirici etkisi olarak değerlendirilebilir. Bu yollar ile 5-ASA'nın koruyucu olduğunu söylemek mümkündür.

Enflamasyon yolağı sitokinler olarak adlandırılan protein ve glikoprotein yapısındaki maddeler tarafından düzenlenir. İnterlökinler (IL1-18), (TNF α , β , γ) ailesi gibi gelişim ve büyüme faktörleri en bilinen sitokinlerdir. Proenflamatuvar sitokin olan IL-1, IL-6, lenfositler için bir gelişim faktörü olan ve diğer sitokinlerin sentezini uyararak IL-2, antiinflamatuvar sitokin olan IL-13, IL-10 ve FOXP3 genleri çalışmamızda kullanıldı ve bu genlerin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. Caco-2 hücre hattı için Caco-2 hücre hattında IL-6 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 50 mM'lık doz uygulanmasında 3,02 kat azalış gözlenirken, IL-2 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 50 mM'lık doz uygulanmasında 3,65 kat azalış gözlemlendi. IL-1b geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 50 mM'lık doz

uygulanmasında 2,0 kat azalış elde edilirken, IL-13 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 50 mM'lık doz uygulanmasında 12,46 kat artış, IL-10 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 50 mM'lık doz uygulanmasında 9,06 kat artış elde edildi. FOXP3 13 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 10 mM, dozları uygulanmasında 2,03 kat azalma, 50 mM'lık dozları uygulanmasında 3,66 kat artış gözlemlendi. Bu sonuçlardan yola çıkarak 5-ASA'nın yüksek dozlarının proenflamatuar genleri baskılaması ve anti-enflamatuar genleri indüklemesi 5-ASA'nın anti-enflamatuar bir ilaç olduğunu teyit etmektedir ve bizim çalışmalarımızda da tespit edildi (Rhodes ve Bartholomew 1981; Hawkeyve diğ. 1985; Shanahan ve diğ. 1990; Cominell ve diğ. 1992; Fiocchi ve Podolsky 1995).

HepG2 hücre hattında IL-6 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık dozları uygulanmasında sırasıyla 2,51, 3,60, 2,67 kat azalış gözlenirken, IL-2 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 50 mM'lık dozları uygulanmasında 2,07 kat azalış gözlemlendi. IL-1b geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık dozları uygulanmasında sırasıyla 2,04, 2,099, 2,08 kat azalış elde edilirken, IL-13 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 50 mM'lık dozları uygulanmasında 4,22 kat artış, IL-10 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 50 mM'lık dozları uygulanmasında sırasıyla 1,91, 1,21, 2,84 kat artış elde edildi. FOXP3 13 geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde 50 mM'lık dozları uygulanmasında 3,59 kat artış gözlemlendi. HepG2 hücre hattından da Caco-2 hücre hattında olduğu gibi proenflamatuar genler baskılanmış, anti-enflamatuar genler indüklendi bu da 5-ASA'nın anti-enflamatuar bir ilaç olduğuna dair bir diğer göstergedir.

5-ASA'nın anti-enflamatuar bir ilaç olduğu hem bizim çalışmamızda hem de literatürde görülmektedir (Weber ve diğ. 2000). 5-ASA'nın enflamatuar genleri baskılama etkisi Caco-2 hücre hattında HepG2 hücre hattına göre çok daha kuvvetlidir. Bu etkisi 5-ASA'nın emiliminin ince bağırsağın distal kısmında ve kolonda olması neticesiyle mümkün olabilir (Hillel ve diğ. 2006).

Tümör baskılayıcı genler hücre çoğalmasını kontrol altında tutan genlerdir. Etkilerini hücre döngüsünün devamını engelleyerek, gerekli durumlarda hücreleri apoptoza yönlendirerek gösterirler.

MAPK, PI3K gibi proliferatif hücre içi sinyal yolları hücrenin çoğalmasında oldukça önemlidir. Sinyal iletimi yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkojenik mutasyonlara sık olarak rastlanmaktadır. Sinyal iletiminde meydana gelen değişimler hücrenin çoğalma ve/veya yaşama işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırır. Böylelikle, onkojenik sinyal iletimi tümör gelişimi ile invazyon/metastaz sürecinde etkin rol oynamaktadır. Bu yollar, büyüme faktörlerinin reseptörlerine bağlanması sonrasında aktive olup DNA'ya direkt bağlanarak transkripsiyonu arttıran mediyatörlerin sentezine aracılık ederler. Sinyalin iletimi G-protein aktivasyonu (Ras aktivasyonu) ile başlar ve MAPKKK'nın (MAP kinaz kinaz kinaz) aktivasyonundan sonra sırasıyla MAPKK (MAP kinaz kinaz) ve MAPK (MAP kinaz) aktive olur. MAPK ise sitoplazmik substratlarını (hücre iskeleti elemanları, diğer protein kinazlar) ve/veya nükleusta transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive eder ve hücrenin biyolojik cevabı oluşur (Kolch 2000).

Çalışmamızda protoonkogenler, tümör baskılayıcı genler ve hücre döngüsünü düzenleyici genler ile ilişkili olarak P53, Rb-1, Siklin D1, Siklin D2, CDKN1A, PTEN, Myc, Fos, Jun genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. Sonuçlara göre Caco-2 hücre hattında P53 geninde 20 mM ve 50 mM'lık dozları uygulanmasında sırasıyla 2,19, 2,46 kat azalış görülmüştür. Rb1 geninde anlamlı bir değişim olmazken Siklin D1 geninde 50 mM'lık doz uygulanmasında 2,69 kat azalış gözlemlendi. Siklin D2 geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık dozları uygulanmasında sırasıyla 3,88, 4,50, 4,34 kat azalışa rastlanırken PTEN geninde 20 mM ve 50 mM'lık dozları uygulanmasında sırasıyla, 2,41, 3,55 azalış görüldü. Myc, Fos, Jun ve CDKN1A geninde anlamlı bir değişim görülmedi. Bu sonuçlara göre 5-ASA'nın hücre döngüsünü yavaşlatıcı etkisinin olduğunu bununla birlikte tümör baskılayıcı genlerde hiçbir anlamlı etki göstermemesi ile bu yollar üzerinde etkili olmadığını söylemek muhtemeldir.

Çalışmamızda protein kinazlar ve sinyal yolları ile ilgili olarak MAP2K1, Kras, Raf, PIK3, PRKCA genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlere bakıldı. Caco-2 hücre hattında MAP2K1 geninde 10 mM, 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 2,19, 3,97, 4,67 kat artış gözlenirken PI3K geninde 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 2,81, 3,27 artış gözlemlendi. PRKCA, Kras ve Raf-1 geninde anlamlı bir değişim olmadı. HepG2 hücre hattında ise MAP2K1 geninde 50 mM'lık doz uygulanmasında 2,68 kat artış, Kras geninde 10 mM, 20

mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 2,07, 2,06 kat azalış, Raf geninde 10 mM'lık doz uygulanmasında 2,49 kat azalış görülmüştür. PI3K geninde 20 mM ve 50 mM'lık doz uygulanmasında sırasıyla 1,83, 6,38, 7,504 kat artış elde edilirken PRKCA geninde anlamlı bir değişim bulunamadı. Bütün bu sonuçlar 5-ASA uygulamasının hücrede büyüme ve yaşama sinyallerinin oluşturulabileceğini göstermektedir. Bu noktada her ne kadar MAP2K1 geninde meydana gelen anlamlı artışlar gözlemiş olsakta bu MEK yolağında rol alan ve MAP2K1 altında yer alan Raf ve diğer genlerde gözlenen azalma ya da değişkenlikler 5-ASA'nın antienflamatuar etkisini destekler vaziyettedir. Tabiki bu genlerin protein düzeylerinde ölçülmesi gereklidir.

Özetle tüm sonuçlar değerlendirildiğinde 5-ASA metabolizması için önerilen yeni metotun tam manasıyla güvenilir olmamasına karşın diğer aktivite deney sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde CYP450 enzimlerinden CYP2D6 ve CYP3A4 5-ASA'metabolizmasında rol alıyor olabileceklerini göstermektedir. 5-ASA CYP2D6 için sadece substrat rolünderken, CYP3A4 için hem substrat hem de inhibitör rolünde, CYP1A2 için ise sadece inhibitör rolündedir. Bu veriler literatür için yenidir.

5-ASA'nın hücreler üzerine etkisinin Caco-2 ve HepG2 hücre hattı üzerindeki uygulamalarından yola çıkılarak elde edilen anlamlı sonuçlar 5-ASA'nın antienflamatuar bir ilaç olduğunu göstermektedir. 5-ASA'nın antienflamatuar etkilerinin varlığının yanı sıra hücre büyüme ve yaşamı destekler nitelikteki sonuçları da mevcuttur. 5-ASA'nın etkilerinin farklı yollarda rol alan genler aracılığı ile incelenmiş olup ileride 5-ASA ile yapılacak olan araştırmalara ipucu sağlayacaktır.

5. SONUÇ

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada 5-ASA'nın CYP450 izozimlerinden olan CYP3A4 enzimi için substrat ve inhibitör, CYP2D6 enzimi için substrat ve CYP1A2 enzimi için inhibitör özellikte olduğunu in vitro çalışmalar ile gösterildi. Bununla beraber, CYP2C9 ve CYP2C19 enzimlerinin çalışmamızda kullandığımız 5-ASA dozları ile aktivite göstermemesi bu enzimlerin 5-ASA metaboizmasında rol almıyor olabileceğini gösterdi. Bunun yanı sıra 5-ASA'nın hücrenin birçok yaşamsal yolağında etkili olduğu gen ekspresyon düzeylerine bakılarak yapılan çalışmalarla bulundu. Tüm bunlar 5-ASA'nın antienflamatuar bir ilaç olmasının yanı sıra diğer birçok ilaç gibi tek bir etki mekanizmasının olmadığını hücrede apoptoz ve hücrenin yaşamı dâhil olmak üzere çok sayıda farklı hücresel cevaba neden olan fazlaca yolağı etkilediğini gösterdi. CYP450 enzimlerinin önemi 5-ASA'metabolizmasının istenmeyen metabolitlerin oluştuğu asetilasyon reaksiyonları dışında bir başka biyotransformasyon reaksiyonunda rol almasıyla bir kez daha ortaya çıktı.

6. KAYNAKLAR

Abbas, A., Lichtman, A., Pober, J., “*Cellular and molecular immunology*” Philadelphia: W.B. Saunders Company, (1991).

Ablin, J., Cabili, S., Eldor, A., Lagziel, A., Peretz, H., “Warfarin therapy is feasible in CYP2C9*3 homozygous patients”, *European Journal of Internal Medicine*, 15:22-27, (2004).

Adalı, O., ve Arınc, E., “Electrophoretic, spectral, catalytic and immunochemical properties of highly purified cytochrome P450 from sheep lung”, *International Journal of Biochemistry*, 22,1437-1444, (1990).

Akyol, G., Baysal, B., “İnterlökinler”, *Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 10: 117-123, (1991).

Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., İzgür, M., Diker, K.S., “İmmünoloji”, *Medisan Yayınevi*, Medisan Yayın Serisi No: 13, Ankara, (1994).

Ardoin, S., Sundry, J., “Update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs”, *Current Opinion in Rheumatology Journal*, 18:221-26, (2006).

Arınc, E., Sen, A., “Effects of *in vivo* benzo(a)pyrene treatment on liver microsomal mixed-function oxidase activities of gilthead”, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 107C, 404-414, (1994).

Azad, Khan AK., Howes, DT., Piris, J., “Optimum dose of sulfasalazine for maintenance treatment in ulcerative colitis”, *Gut*, 21: 232–240, (1980).

Baer, BR., Rettie, AE., “CYP4B1: An enigmatic P450 at the interface between xenobiotic and endobiotic metabolism”, *Drug Metabolism Reviews*, 38:451–476, (2006).

Barkhudaryan, N., Dunn, AJ., “Molecular Feyyaz Önder, Ercan Keskin 136 mechanisms of actions of interleukin-6 on the brain, with special reference to serotonin and the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis”, *Neurochemical Research*, 24:1169-1180, (1999).

Barton, BE., ”The biological effects of interleukin 6”, *Medical Research Reviews*, 16: 87-109, (1996).

Bertz, RJ., Granneman, GR., “Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions”, *Clinical Pharmacokinetics*, 32(3):210-58, (1997).

Blalock, WL., Navolanic, PM., Steelman, LS., ve diğ., “Requirement for the PI3K/Akt pathway in MEK1-mediated growth and prevention of apoptosis: Identification of an Achilles heel in leukemia”, *Leukemia*, 17:1058-67, (2003).

Blume, P., ve Hunter, T., “Oncogenic kinase signaling”, *Nature*, 411:355-64, (2001).

Boelsterli, AU., Zimmerman, HJ., Kretz-Rommel, A., “Idiosyncratic liver toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs:molecular mechanisms and pathology”, *Critical Reviews in Toxicology*, 25:207-35. (1995).

Brooks PM., “NSAIDs. In: Klippel JH, Dieppe PA, Textbook of Rheumatology, 2th ed. London”, *Harcourt Publisher Ltd*, 3.5.1-6. (2000).

Burke, M.D., Mayer, R. T., “Ethoxyresorufin: direct fluorometric assay of microsomal O-dealkylation which is preferentially induced by 3-methylcholanthrene” *Drug Metabolism Disposition*, 2, 583-588, (1974).

Burress, GC., Musch, MW., Jurivich, DA., ve diğ., ” Effects of mesalamine on the hsp72 stress response in rat IEC-18 intestinal epithelial cells”, *Gastroenterology*, 113:1474–1479, (1997).

Cabadak, H., “ Hücre siklusu ve Kanser Gen polimorfizmi ve Kansere Yatkinlik” *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(3), 51-6, (2008).

Cantley, LC., Neel, BG., “New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3 kinase/AKT pathway” *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 96:4240-5, (1999).

Chandrasekharan, NV., Dai, H., Roos, KL., Evanson, NK., Tomsik, J., Elton, TS., Simmons, DL., “COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression”, *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 99:13926-31, (2002).

Chang, F., Lee, J., Navolanic, PM., ve diğ., “Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation, A target for cancer chemotherapy”, *Leukemia*, 17: 590-603, (2003).

Cochin, J., Axelrod, J., “Biochemical and pharmacological changes in the rat following chronic administration of morphine, nalorphine, and normorphine”, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 125, 105-110, (1959).

Coller, K., Krebsfaenger, N., Klein, K., Endrizzi, K., Wolbold, R., Lang, T., “The influence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genotypes on the formation of the potent antioestrogen Z-4-hydroxy-tamoxifen in human liver” *British Journal of Clinical Pharmacology*, 54.157–167, (2002).

Cominell, F., Zipser, CA., Dinarello, CA., “Sulfasalazine inhibits cytokine production in human mononuclear cells: a novel antiinflammatory mechanism”, *Gastroenterology*, 96:A96, (1992).

Conney, AH., “Induction of drug-metabolizing enzymes: a path to the discovery of multiple cytochromes P450”, *Annual Review of Pharmacology Toxicology*, 43, 1-30, (2003).

Cornelis, MC., El-Soheby, A., Kabagambe, EK., Campos, H., “CYP1A2 genotype, and risk of myocardial infarction”, *JAMA*, 295:1135- 1141, (2006).

Craven, PA., Pfanstiel, J., Saito, R., ve diğ., ”Actions of sulfasalazine and 5-aminosalicylic acid as reactive oxygen scavengers in the suppression of bile acid-increases in colonic epithelial cell loss and proliferative activity” *Gastroenterology*, 92:1998, (2008).

Das, KM., “Sternlieb ISalicylazosulfapyridine in inflammatory bowel disease”, *American Journal of Digestive Diseases*, 20:971–976, (1975).

Das, KM., Dubin, R., “Clinical pharmacokinetics of sulfasalazine”, *Clinical Pharmacokinetics*, 1:406–425, (1976).

Das, KM., Eastwood, MA., McManus, JPA., ve diğ., “Adverse reactions during salicylazosulfapyridine therapy and the relation with drug metabolism and acetylator phenotype” *The New England Journal of Medicine*, 289: 491–495, (1973).

Das, KM., Eastwood, MA., McManus, JPA., ve diğ., “The metabolism of salicylazosulfapyridine in ulcerative colitis. The relationship between metabolites and response to treatment of in-patient”, *Gut*, 14: 631, (1973).

Das, KM., Eastwood, MA., McManus, JPA., ve diğ., ” The role of the colon in the metabolism of salicylazosulfapyridine”, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 9:137 141, (1974).

Davila L., Ranganathan P., “Pharmacogenetics: implications for therapy in rheumatic diseases”, *Nature Reviews Rheumatology*, 7, 537-550, (2011).

De-Vries, JE., "The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses" , *J Aller Clin Immunol* 102:165-169, (1998).

De-Wall Malefyt, R., Figdor, R., De-Vries, JE., "Effects of interleukin 4 on monocyte functions: comparison to interleukin 13" *Immunologic Research*, 144: 629-633. 49, (1993).

Dunn, AJ., Ang, J., Ando, T., "Effects of cytokines on cerebral neurotransmission", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 461: 117-127, (1999).

Ekmekçi, A., Konaç, E., Önen, H.İ., "Gen polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık", *Marmara Medical Journal*, 21 (3), 282-295, (2006).

Evans, W.E., Relling, M.V., "Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics", *Science*, 286(5439), 487-91, (1999).

Fiocchi, C., Podolsky, DK., "Cytokines and growth factors in inflammatory bowel disease. In: Kirsner JB, Shorter RG, eds. Inflammatory Bowel Disease. 4th ed", *Philadelphia, Lea Febriger*, (1995).

Frei K., Malipiero, UV., Leist, TP., Zinkernagel, RM., Schwab, ME., Fontana, A., "On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases", *European Journal of Immunology*, 19: 689-694, (1989).

Geske, FJ., Gerschenson, LE., "The biology of apoptosis", *Human Pathology*, 32: 1029-1038, (2001).

Giaffer, MH., O'Brien, CJ., Holdsworth, CD., "Clinical tolerance to three 5-aminosalicylic acid releasing preparations in patients with inflammatory bowel disease intolerant or allergic to sulphasalazine", *Alimentary Pharmacology Therapeutics*, 6: 51, (1992).

Green, GA., "Understanding NSAIDS: from aspirin to COX-2", *Clinical Cornerstone*, 3:50-5, (2002).

Grimble, R., "Inflammation, cytokines and nutrition", *European Journal of Clinical Nutrition*, 45: 413-417, (1991).

Guengerich, F., "Metabolic reactions: Types of reactions of cytochrome P450 enzymes; in Schenkman JB, Greim H (eds.): Handbook of Experimental Pharmacology", *Heidelberg, Springer-Verlag Press*, 105:pp 89-103, (1993).

Guengerich, F., "Cytochrome P450 and chemical toxicology", *Chemical Research in Toxicology*, 21:70–83, (2008).

Gunes, A., Dahl, M., "Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications: influence of environmental factors and genetic polymorphisms", *Pharmacogenomics*, 9:625–637, (2008).

Hanahan, D., Weinberg, RA., "The hallmarks of cancer", *Cell*, 100:57-70, (2000).

Haris, CC., "Structure and function of the p53 tumor suppressor gene : clues for rational cancer therapeutic strategies", *Journal of the National Cancer Institute*, 88,1442-1455. (1996).

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

Hawkey, CJ., Boughton-Smith, NK., Whittle, BJ., "Modulation of human colonic arachidonic acid metabolism by sulfasalazine" *Digestive Diseases and Sciences*, 30:1161–1165, (1985).

Hillel, D., Cohen, MD., ve Kiron, M., Das, MD., “The Metabolism of Mesalamine and Its Possible Use in Colonic Diverticulitis as an Anti-inflammatory Agent” *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40:S150–S154, (2006).

Hukkanen, J., “Xenobiotic metabolizing cytochrome P450 enzymes in human lung”, *Acta Univ. Oul.D 621, Oulu University Press, Finland*, (2000).

Imura, H., Fukata, J., Mori, T., “Cytokines and endocrine function: An interaction between the immune and neuroendocrine systems”, *Clinical Immunology*, 35: 107-115, (1991).

Ingelman-Sundberg, M., “Genetic Variability in Susceptibility and Response to Toxicants”, *Toxicology Letters*, 120, no. 1-3 : 259-68, (2001).

Jurima-Romet, M., Crawford, K., Huang, HS., “Comparative cytotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs in primary cultures of rat hepatocytes”, *Toxicol In Vitro*, 8:55-66, (1994).

Kang, P., Dalvie, D., Smith, E., Zhou, S., Deese, A., Nieman, J., “Bioactivation of flutamide metabolites by human liver microsomes”, *Drug Metabolism and Disposition*, 36:1425–1437, (2008).

Karp, JE., Lancet, JE., Kaukmann, SH., ve diğ., “Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: A phase I clinical- laboratory correlative trial”, *Blood*, 97: 3361-9, (2001).

Kawai S, Kojima F, Kusunoki N., “Recent Advances in Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs” *Allergology International*, 54:209-15. (2005).

Kerr, JF., Wyllie, AH., Currie, AR., “Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics”, *British Journal of Cancer*, Aug; 26:239-57, (1972).

Kırmaz, C., Özentürk, Ö., “Malignitelere Karşı Gelişen İmmün Yanıt, Astım Allerji İmmünoloji”, 2(3), 167-174, (2004).

Kishimoto, T., Akira, S., Taga, T., “Interleukin-6 and its receptors”, *Science*, 258: 593- 597, (1992).

Kolch W. Meaningful relationships, “ The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions”, *Biochemical Journal*, 351:289-305, (2000).

Koukouritaki, B., Manro, R., Marsh, A., Stevens, C., Rettie, E., McCarver, G., ve diğ., “Developmental expression of human hepatic CYP2C9 and CYP2C19”, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 308:965-974, (2004).

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

Lalani, I., Bhol, K., Ahmed, AR., “Interleukin-10: Biology, role in inflammation and autoimmunity”, *Annal of Allergy, Asthma Immunology*, 79: 469-483,(1997).

Lee, JTi., McCubrey, JA., “ The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia”, *Leukemia*, 16:486-507, (2002).

Lewis, JH., "Hepatic toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs" *Clinical Pharmacology*, 3:128-38, (1984).

Liem, AA., Chamberlain, MP., Wolf, CR., Thompson, AM., "The role of signal transduction in cancer treatment and drug resistance", *European Journal of Surgical Oncology*, 28: 679-84, (2002).

Lotz, M., "Interleukin-6", *Cancer Investigation*, 11: 732-742, (1993).

Lu, AY. H., ve Coon, MJ., "Role of hemoprotein P450 in fatty acid w-hydroxylation in soluble enzyme system from liver microsomes", *The Journal of Biological Chemistry*, 243, 1331-1332, (1968).

Lu, AY. H., ve Lewin, W., "The resolution and reconstitution of the liver microsomal hydroxylation system", *Biochimica et Biophysica Acta*, 344, 205-240, (1974).

MacNeil, IA., Suda, T., Moore, KW., Mosman, TR., Zlotnik, A., "IL-10, a novel growth factor for mature and immature T cells", *The Journal of Immunology*, 145: 4167-4173, (1990).

Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Reboul, P., Pelletier, J-P., "Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs", *Ann of the Rheumatic Diseases*, 62:501-9, (2003).

McCormick, F., "Signalling networks that cause cancer", *Trends Cell Biol*; 12:53-6, . (1999).

Misiewicz JJ, Lond MB., "Controlled trial of sulphasalazine in maintenance therapy for ulcerative colitis", *Lancet*, 2: 185.1, (1965).

Mocellin, S., Rossi, C.R., Pilati, P., ve diğ., "Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. Cytokine Growth Factor Rev., 16:35-53, (2005).

Murray, G., Melvin, W., Greenlee, W., Burke, M., “Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1”, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41:297-316, (2001).

Murray, K.R., “Zenobiyotiklerin Metabolizması”, *Harper’in Biyokimyası*, 799-806, ISBN:975-953-1-1 , (1996).

Naraharisetti, B., Lin, S., Rieder, J., Marciante, D., Psaty, M., Thummel, K., ve diğ., “Human liver expression of CYP2C8: gender, age, and genotype effects”, *Drug Metabolism and Disposition*, 38: 889–893, (2010).

Nash, T., “The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction”, *Biochemistry Journal*, 55, 416-421, (1953).

Nebert, DW., Russell, DW., “Clinical importance of the cytochromes P450”, *Lancet*, 360, 1155-1162, (2002).

Nebert, W., Dalto, T., “The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis”, *Natural Reviews Cancer*, 6:947–960, (2006).

Nelson, D., “Cytochrome P450 nomenclature”, *Methods in Molecular Biology*, 320:1–10, (2004).

Nelson, DR., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, JJ., Feyereisen, R., Waxman, DJ., Waterman, MR., Gotoh, O., Coon, MJ., Estabrook, RW., Gunsalus, IC., Nebert, DW., “P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature” , *Pharmacogenetics*, 6(1):1-42 , (1996).

Nemeroff, CB., DeVana, CL., Pollock, BG., “Newer antidepressants and the cytochrome P450 system”, *The American Journal of Psychiatry* ,153:311-320, (1996).

Niehs, E., "Apoptosis. A Review of Programmed Cell Death", *Toxicol Pathology*, 35(4): 495–516, (2007).

Nicholson, KM., Anderson, NG., "The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy", *Cellular Signalling*, 14: 381-95, (2002).

Ohtsuki, S., Schaefer, O., Kawakami, H., Inoue, T., Liehner, S., Sato, A., ve diğ., "Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochrome P450s and UDP glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities", *Drug Metabolism and Disposition*, 40:83–92, (2012).

Omura, T., ve Sato, R., "The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes, 1. Evidence for its hemoprotein nature", *The Journal of Biological Chemistry*, 239, 2370-2378, (1964).

Ortiz de Monteliano, PR., ve diğ., "Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry", *New York: Plenum*, 505-23, (1989).

Özerol, E., "CytochromP450 containing monooxygenase enzym systems", *Journal of Turgut Özal Medical Center*, 3(33):257-275, (1996).

Peppercorn, MA., Goldman, P.," The role of intestinal bacteria in the metabolism of salicylazosulfapyridine and its metabolites", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 181:555–562, (1972).

Perera, F. P., "MolecularEpidemiology: InsightsIntoCancerSusceptibility, Risk Assessment, andPrevention", *Journal of the National Cancer Institute*, 88, no. 8:496-509, (1996).

Peterson, J. A., ve Prough, R. A., "Cytochrome P-450 reductase and cytochrome b5 in cytochrome P-450 catalysis. In: Ortiz de Montellano, P. R. (ed). Cytochrome P450 structure, mechanism, and biochemistry", *New York, Plenum*, p. 89, (1986).

Pınarbaşı, H.,” Bir türk populasyonunda GSTM1 polimorfizmi ve akciğer kanseri ilişkisi”, Doktora Tezi, *Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı*, Sivas, (2002).

Pollock, BG., “Recent developments in drug metabolism of relevance to psychiatrists” *Harvard Review of Psychiatry*, 2:204-213, (1994).

Quesniaux, VFJ., “ Interleukins 9, 10, 11 and 12 and kit ligand: A brief overview”, *Immunologic Research*, 143: 385-400, (1992).

Rees, RC., “Cytokines as biological response modifiers”, *Journal of Clinical Pathology*, 45: 93-98, (1992).

Rendic, S., Di-Carlo, F. J. “Human cytochrome P450 enzymes: A status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors”, *Drug Metabolism Reviews*, 29,413-580 (1997).

Rettie, E., Jones P., “Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: drug–drug interactions and pharmacogenetics”, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45:477–494, (2005).

Rhodes, JM., Bartholomew, TC., Jewell, DP., “Inhibition of leukocyte motility by drugs used in ulcerative colitis” *Gut*, 22: 642–647, (1981).

Rollas, S., “İlaçların metabolizması (Biyotransformasyon)”, 525-10, Marmara Üniversitesi Eczacılık fakültesi: Marmara Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Döner Sermaye İşletmesi Matbaa birimi, ISBN: 975-400-078-6, (1992).

Ryeo E, Go., Kyung-A, Hwang., Kyung Chul, Choi., “Cytochrome P450 1 family and cancers”, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 147:24–30, (2015).

Shafii, A., Roy Chowdury, J., Das, KM., “ Absorption, enterohepatic circulation and excretion of 5-aminosalicylic acid in rats”, *The American Journal of Gastroenterology*, 77:297–299, (1982).

Shafii, A., Roy-Chowdury, J., Das, KM., “Absorption, enterohepatic circulation and excretion of 5-aminosalicylic acid in rats”, *The American Journal of Gastroenterology*, 77:297–299, (1982).

Shanahan, F., Niederlehner, A., Carramanzana, N., ve diğ., “Sulfasalazine inhibits the binding of TNF alpha to its receptor”, *Immunopharmacology*, 20:217–224, (1990).

Sharon, P., Ligumsky, M., Rachmilewitz, D., ve diğ., “Role of prostaglandins in ulcerative colitis: enhanced production during active disease and inhibition by sulfasalazine”, *Gastroenterology*, 75: 638–640, (1978).

Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y., Guendrich, F., “Intreindividual variations inhuman liiver cytochrome P-450 enzymes involved in oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals”, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 270:414-423, (1994).

Smaili, S.Hsu Y., ve diğ., “ Mitochondria in CA²⁺ Signalling and Apoptosis “, *Journal of Bioener and Biomembranes*, 32;35-46, (2000).

Smith, KA., “Interleukin-2.inception, impact and implication”, *Science*, 240: 1169-1176, (1988).

Solomon, DH., “NSAIDs: Mechanism of action”, *Journals Reviewed by UpToDate*, 17.2. (2009).

Solomon, DH., “NSAIDs: Therapeutic use and variability of response in adults”, *Journals Reviewed by UpToDate* 17.2, (2009).

Solomon, DH., “Overview of selective COX-2 inhibitors”, *Journals Reviewed by UpToDate* 17.2: (2009).

Song, L., Morris, M., Bagui, T., Lee, F. Y., Jove R. ve Haura E. B., “Dasatinib “Selectively Induces Apoptosis in Lung Cancer Cells Dependent on Epidermal Growth Factor Signaling for Survival”, *Cancer Research*, (BMS-354825),66 (11), 5542-5, (2006).

Staal, SP., “ Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: Amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma.”, *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 84: 5034-7, (1987).

Stein, RC., Dalglish, AG., “Immunomodulatory agents: The cytokines”, *European Journal Cancer*, 30A: 400-404, (1994).

Stenson, WF., Lobos, E., “Sulfasalazine inhibits the synthesis of chemotactic lipids by neutrophils”, *Journal of Clinical Investigation*, 69:494–497, (1982).

Stovitz, SD., Johnson, RJ., “NSAIDs and Musculoskeletal Treatment”, *What Is the Clinical Evidence Physician Sports Medicine*; 31: 35-40. (2003).

Szelenyi, J., “Cytokines and the central nervous system”, *Brain Research Bulletin*, 54:329-338. (2001).

Trotta, PP.,” Cytokines: An Overview”, *American Journal of Reproductive Immunology*, 25: 137-141, (1991).

Truan, G., Cullin, C., Reisdorf, P., “Enhanced in vivo monooxygenase activities of mammalian P450s in engineered yeast cells producing high levels of NADPH P450 reductase and human cytochrome b5”, *Gene*, 125:49-55. (1993).

Turner, P.C., McLennen, A.G., Bates, A.D., White, M. R. H., “Instant Notes in Molecular Biology Paperback”, (2003).

Vane, JR., “Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs”, *Nature New Biology*, 231: 235-37, (1971).

Weber, CK., Liptay, S., Wirth T. ve diğ., “Suppression of NF-kB activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of IκB kinases alpha and beta”, *Gastroenterology*, 119:1209–1218, (2001).

Wilkins Dennis A. Casciato, Barry B., “Medical Oncology Principles Of Cancer Biology Casciato Lippincott Williams”, *Lowitz Manual Of Clinical Oncology*, (2000).

Zanger, U., Turpeine, M., Klein, K., Schwab, M., “Functional pharmacogenetics/ genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392:1093–1108, (2008).

Zhou, S., Wang, B., Yang, L., Liu, J., “Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2”, *Drug Metabolism Reviews*, 42:268–354, (2009).

Zhuang, W., Sgourakis, N.G, Li, Z, Garcia, A.E, Mukamel, S., “Discriminating early stage A(beta) 42 monomer structures using chirality-induced 2DIR spectroscopy in a simulation study”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (2010).

7. EK-1

Reaksiyon Ortamında Sıklıkla Kullanılan Kimyasalların Hazırlanışı:

0,4M pH 7,8 KPi Hazırlanışı;

13,601g KH_2PO_4 ve 17,418g K_2HPO_4 250ml ultra saf suda çözüldü. K_2HPO_4 yavaşyavaş KH_2PO_4 ile pH 7,8'e titre edildi.

12mg/ml BSA Hazırlanışı;

0,12g BSA tartıldı ve balon jodede 10ml'ye ultra saf su ile tamamlandı.

10mM NADPH Hazırlanışı;

0,84mg NADPH hassas terazi ile tartıldı ve 0,1 ml ultra saf su içerisinde çözüldü.

1M NaCl Hazırlanışı (Ma: 58,44g/mol);

5,84g NaCl tartıldı bir miktar ultra saf su ile çözüldü son hacim 100ml'ye ultra saf su ile tamamlandı.

1,5mM stok MROD (Ma: 227,22g/mol) Hazırlanışı;

1mg 7-MR tartıldı, 2,93ml DMSO içinde çözüldü. Ependorflara 0,3ml olacak şekilde bölündü. Aliminyum folyo ile sarılıp -20 derecede saklandı. Kullanmadan hemen önce 1:50 oranında 0,4M KPi pH 7,8 ile seyreltildi.

0,75N Perklorik asit Hazırlanışı;

11,65N olan stoktan 6,44ml alınarak ultra saf su ile 100ml'ye tamamlandı.

Nash reaktifi Hazırlanışı;

7,7g Amonyun asetat, 0,15 ml glasiyal asetik asit, 0,1 ml Asetil aseton karışımı 25ml'ye ultra saf su ile tamamlandı. Ancak asetil asetonu ortama eklendiğinde reaksiyon hemen başladığından dolayı Nash reaktifi koymadan önceki basamakta hazırlandı ve karıştırıcıdan çekildi.

50mM Eritromisin Hazırlanışı;

0,073g eritromisin tartıldı, 1ml EtOH ve 1ml ultra saf su karışımında çözüldü.

0,4M pH 7,8 HEPES Tamponu Hazırlanışı;

9,53g HEPES tartıldı bir miktar su ile çözüldükten sonra 0,4N NaOH ile pH 7,8'e titre edildi. Son hacim 100ml'ye tamamlandı.

1mM Aminopren Hazırlanışı;

0,0012g aminopren tartıldı ve 5ml soğuk su içerisinde çözüldü.

1 N Hidroklorik Asit Hazırlanışı

8,5ml konsantre asitin 100ml ultra saf su ile seyreltilmesi ile hazırlandı.

%1'LİK SODYUM NİTRAT HAZIRLANIŞI

1g sodyum nitrat bir miktar ultra saf su içinde çözüldü ve son hacim 100ml'ye tamamlandı.

%3'lik Sülfamik Asit Hazırlanışı

3g sülfamik asit bir miktar ultra saf su içinde çözüldü ve son hacim 100ml'ye tamamlandı.

%0,1'lik Floroglisinol Hazırlanışı

0,1g florolisinol tartılarak bir miktar ultra saf su içinde çözüldü ve son hacim 100ml'ye ultra saf su ile tamamlandı.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Elif KALE
Doğum Yeri ve Tarihi : Çorum, 27.07.1989
e-mail : elifkale89@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Yüksek Lisans : Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji A.B.D. (2015-2016)
Lisans : Pamukkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (%30 İngilizce) (2008-2013) (Yüksek onur Öğrencisi)
Lise : Denizli Süper Lisesi (2003-2007)

Lisans Bitirme Tezi ve Tez Danışmanı

“Bleomisin’in 5-Amino Salisilik Asit, Ellajik Asit ve O-Kumarik Asit İle Etkileşiminin Kolon Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Araştırılması” Prof. Dr. Alaattin ŞEN, PAU, Denizli, 2013.

Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı

“5-Amino Salisilik Asit’in Cyp450 Bağımlı Metabolizmasının Karakterize Edilmesi” Prof. Dr. Alaattin ŞEN, Fen Bilimleri Enstitüsü, PAÜ, Denizli, 2016.

Kurs ve Sertifikalar

Bilgisayar İşletmenliği Sertifikası (2009).

NLP (Neuro-Linguistic Programming) Kişisel gelişim Sertifikası (2009).

Türk-Amerikan Derneği İngilizce Sertifikası (Intermediate derecesi) (2009).

Pamukkale Üniversitesi Yabancı Diller Yüksek Okulu Başarı Belgesi (2009).

KOSGEB Uygulamalı Girişimcilik Eğitimi Sertifikası (2016).

Katıldığı Kongreler

Şubat 2012, Türkkök 2. Kök Hücre Öğrenci Sempozyumu, Denizli.

Nisan 2011, 6. Moeküler Biyoloji Bahar Okulu, Trabzon.

Haziran 2010, 20.Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli.

Eylül 2009, Urbanisation, Land Use, Land Degradation And Environment
“ULE” Workshop, Denizli.

Kasım 2016, 4th International Congress of The Molecular Biology
Association, Ankara.

Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

Ayar B., Celik Turgut G., Ozgun O., Kale E., Yılmaz A., GAZIOGLU I.,
Topcu G., SEN A., (2016) Investigation of the in vitro anticancer activities of the
diterpenoid alysine B isolated from Teucrium Alyssifolium. 4th International
Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, Ankara, Book of
Abstract:49.