

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ-TOKSİKOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**BAZI KOYUN IRKLARINDA
KAFEİNİN FARMAKOKİNETİĞİ ve METABOLİZMASININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Kamil ÜNEY

Danışman

Prof.Dr. Bünyamin TRAŞ

KONYA-2007

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ-TOKSİKOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI
BAP PROJE NO: 06102001

**BAZI KOYUN IRKLARINDA
KAFEİNİN FARMAKOKİNETİĞİ ve METABOLİZMASININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Kamil ÜNEY

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından/...../2007 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği* ile kabul edilmiştir (S.B.E. Yön.Kur. Karar tarih ve No:).

Tez Jürisi:

Jüri başkanı : Prof. Dr. Kadir SERVİ

Danışman : Prof. Dr. Bünyamin TRAŞ

Üye : Prof. Dr. Muammer ELMAS

Üye : Doç. Dr. Vahdettin ALTUNOK

Üye : Doç. Dr. Enver YAZAR

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1-2
2. LİTERATÜR BİLGİ.....	3-32
2.1. Farmakogenetik Metotlar.....	3
2.1.1. Fenotipik Metotlar.....	4
2.1.1.1. Fenotipik metotların uygulama alanları ve klinik problemleri.....	5
2.1.1.2. Prob ilaç uygulamaları.....	7
2.1.1.2.A. İdeal prob ilaçta bulunması gereken özellikler	9
2.1.1.2.B. Tek prob ilaç uygulamaları.....	11
2.2. Kafein.....	16
2.2.1. Kafein ve metabolitlerinin farmakolojik etkileri	17
2.2.1.1. Paraksantin.....	20
2.2.1.2. Teobromin.....	21
2.2.1.3. Teofilin.....	21
2.2.2. Kafein farmakokinetiği.....	21
2.2.3. Kafeinin karaciğer metabolik kapasitesi ve bazı enzim aktivitelerinin belirlenmesinde kullanımı.....	25
3. MATERYAL ve METOT.....	33-40
3.1. Kullanılan Alet ve Malzemeler.....	33
3.2. Kimyasal Maddeler, Solüsyonlar ve Kitler.....	33
3.3. Araştırma Materyali.....	34
3.4. Deneysel Uygulamalar.....	34
3.5. Plazma Örneklerinin Analiz İçin Hazırlanması.....	35
3.6. Kafein ve Ana Metabolitlerinin Miktar Tayinleri.....	35
3.7. Metot Validasyonu.....	35
3.7.1. Özgünlük (Specificity)	36
3.7.2. Doğrusallık (Linearity)	36

3.7.3. Geri kazanım (Recovery)	36
3.7.4. Duyarlılık (Sensitivity).....	36
3.7.5. Kesinlik (Precision)	37
3.8. Biyokimyasal Parametrelerin Belirlenmesi.....	37
3.9. Farmakokinetik Hesaplamalar.....	37
3.10. Karaciğerin Metabolik Kapasitesinin ve CYP1A2 Enzim Aktivitesinin Fenotipik Yönden Belirlenmesi.....	39
3.11. İstatistik Analizleri.....	40
4. BULGULAR.....	41-52
4.1. Metot Validasyonu.....	41
4.1.1. Özgünlük.....	41
4.1.2. Doğrusallık.....	41
4.1.3. Geri Kazanım.....	41
4.1.4. Duyarlılık.....	41
4.1.5. Kesinlik.....	41
4.2. Biyokimyasal parametreler.....	45
4.3. Farmakokinetik Parametreler.....	45
4.7. Karaciğerin Metabolik Kapasitesinin ve CYP1A2 Enzim Aktivitesinin Fenotipik Yönden Belirlenmesi.....	50
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	54-64
6. ÖZET.....	65-66
7. SUMMARY.....	67-68
8. KAYNAKLAR.....	69-83
9. ÖZGEÇMİŞ.....	84
10. TEŞEKKÜR.....	85

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 4.1. Kafein ve ana metabolitlerinin HPLC kromatogramları.....	42
Grafik 4.2. Teobromin, paraksantin, teofilin ve kafeinin farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış standart çözeltilerinin (10-10000 µg/L) kalibrasyon doğruları ve korelasyon katsayıları.....	43
Grafik 4.3. Kafeinin Morkaraman, Akkaraman ve Orta Anadolu Merinosu ırkı koyunlara tek doz (5 mg/kg) damar içi uygulama sonrası çizilen yarı logaritmik plazma konsantrasyon-zaman eğrileri	46
Grafik 4.4. Teobrominin Morkaraman, Akkaraman ve Orta Anadolu Merinosu ırkı koyunlarda kafeinin tek doz (5 mg/kg) damar içi uygulama sonrası çizilen yarı logaritmik plazma konsantrasyon-zaman eğrileri	46
Grafik 4.5. Paraksantin Morkaraman, Akkaraman ve Orta Anadolu Merinosu ırkı koyunlarda kafeinin tek doz (5 mg/kg) damar içi uygulama sonrası çizilen yarı logaritmik plazma konsantrasyon-zaman eğrileri	47
Grafik 4.6. Teofilinin Morkaraman, Akkaraman ve Orta Anadolu Merinosu ırkı koyunlarda kafeinin tek doz (5 mg/kg) damar içi uygulama sonrası çizilen yarı logaritmik plazma konsantrasyon-zaman eğrileri	47

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Kafein metabolizması.....	24
--------------------------------------	----

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Farmakogenetik polimorfizmlerin belirlenmesinde bazı fenotipik metotlar.....	6
Tablo 2.2. <i>İn vivo</i> enzim aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan bazı karma uygulamalar.....	8
Tablo 2.3. <i>İn vivo</i> prob ilaç uygulamalarının olumlu ve olumsuz yönleri.....	9
Tablo 2.4. Farklı prob ilaçların olumlu ve olumsuz yönleri.....	12-15
Tablo 2.5. <i>İn vivo</i> enzim aktivitelerinin spesifik ve spesifik olmayan fonksiyon testlerinde kullanılan prob ilaçlar.....	16
Tablo 2.6. Doğal ve kola, çikolata gibi endüstriyel ürünlerde bulunan kafein miktarları.....	17
Tablo 2.7. Adenozin analogları ve kafeinin farmakolojik etkileri.....	18
Tablo 2.8. Kafein ile CYP1A2 enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ölçütlerin geçerlilik kriterlerinde güncel durumlar.....	29
Tablo 2.9. CYP1A2, NAT2, CYP2A6 ve KO enzim aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan kafeinin idrar metabolik-metabolit oranları.....	31
Tablo 4.1. Kafein ve ana metabolitlerinin plazma kesinlik değerleri.....	44
Tablo 4.2. Morkaraman, Akkaraman ve Orta Anadolu Merinosu koyun ırklarında bazı biyokimyasal parametreler ve sağlıklı koyunlardaki referans aralıkları.....	45
Tablo 4.3. Kafeinin Morkaraman, Akkaraman ve Orta Anadolu Merinosu koyun ırklarında tek doz (5 mg/kg) damar içi uygulama sonrası bazı farmakokinetik parametreleri.....	48
Tablo 4.4. Kafeinin Morkaraman, Akkaraman ve Orta Anadolu Merinosu koyun ırklarında tek doz (5 mg/kg) damar içi uygulama sonrası teobromin, paraksantin ve teofilinin bazı farmakokinetik parametreleri.....	49
Tablo 4.5. Karaciğerin metabolik kapasitesi ve CYP1A2 enzim aktivitesinin fenotipik yönden değerlendirilmesinde kullanılan bazı farmakokinetik parametreler ve oranlar arasındaki ilişkiler.....	52
Tablo 4.6. Karaciğerin metabolik kapasitesi ve CYP1A2 enzim aktivitesinin fenotipik yönden değerlendirilmesinde kafein ve ana metabolitlerinin EAA ₀₋₄₈ değerleri ve 10. saat plazma konsantrasyonları (TB için 12. saat) baz alınarak hesaplanmış oranlar.....	53
Tablo 4.7. Kafeinin EAA ₀₋₄₈ ve 10. saatteki plazma konsantrasyonlarına göre hesaplanan ana metabolitlerine dönüşüm oranları.....	53

1. GİRİŞ

İlaç ve toksik maddelere alınan cevapta tür, ırk ve bireyler arasında görülen farklılıkların temel nedeni; farmakokinetik ve farmakodinamik olaylarda rol alan enzim ve proteinlerin yapı ve sentezlerindeki farklılıklardır. İlaçların ve toksik maddelerin kinetiğinde, taşıyıcı proteinler, plazma proteinleri ve enzimler önemli rol oynar.

Enzimler, kinetik olaylarda önemli bir paya sahiptir. Aktiviteleri ve sentezlenmeleri; tür, ırk, cinsiyet, genetik, hastalık, çevre gibi faktörlerin etkisine bağlı olarak önemli oranda farklılık arz eder. Bu farklılıkların sonucu olarak ilaç/toksik madde metabolizması ve etkilerinde değişiklikler meydana gelebilir. Bu değişikliklerin yansımaları ise ilaç etkisinde uzama, ters ilaç etkileşimleri, ilaç ön maddesinin aktif şekline dönüşmemesi, ilaç toksisitesi, zararlı olabilen/olmayan alternatif yollardan metabolize edilme ve kalıntı arınma sürelerinde farklılıklar şeklinde gözlenir. Ürünleri insan tüketimine sunulan hayvanlarda bu farklılıkların olması; tedavi etkinliğini, ana madde ya da metabolitlerin rezidü miktarlarını değitirebileceğinden insan ve hayvan sağlığı ile ekonomik açıdan önemlidir. Belirtilen faktörlerin enzimler üzerine etkisinin araştırılması ile ilgili yeterli bilgi bulunmaması, bu alanda insan ve hayvan sağlığı için önemli bir bilgi eksikliğine neden olmaktadır.

Birçok ilaç ve toksik maddenin hayvanlarda metabolizma yollarının henüz belirlenmemiş olması ve metabolizma yollarının tür ve ırklar arasında farklılık göstermesi; ilaç ya da toksik maddelere duyarlılığın nedenlerinin açıklanabilmesini, bunlar arasındaki etkileşimlerin tahmin edilmesini, bir türden elde edilen verilerin diğer türe uyarlanmasını ve yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesini de güçleştirmektedir. Özellikle bu yönde gerçekleştirilecek çalışmalar, ürünleri insan tüketimine sunulan hayvan türleri üzerinde de yürütülmelidir.

Günümüzde, insan ve hayvanlarda ilaç ya da toksik maddelerin metabolizmasında rol oynayan enzimler için belirlenmiş herhangi bir referans aralık yoktur. Yapılacak çalışmalarla bunların ortaya konulması, dozaj rejiminin uygun şekilde belirlenmesinde ve test sonuçlarının yanlış yorumlanmasının önlenmesi açısından önemlidir.

Çalışmada, klinik olarak sağlıklı Morkaraman, Akkaraman ve Orta Anadolu Merinosu koyun ırklarında prob ilaç olarak seçilen kafeinin 5 mg/kg dozunda damar içi uygulanmasından sonra ilacın ve ana metabolitlerinin (teobromin, paraksantin ve teofilin) farmakokinetik özelliklerinin, fenotipik yönden karaciğerin metabolik kapasitesinin ve CYP1A2 enzim aktivitesinin kafeinin eğrinin altında kalan alan,

klerens, yarılanma ömrü, eğrinin altında kalan alan ve metabolik oran (metabolit/kafein) parametreleri kullanılarak belirlenmesi amaçlandı. Ayrıca, koyunlarda karaciğer metabolik kapasitesinin ve enzim aktivitesinin belirlenmesinde metabolik oranların fazla örnek toplamayı gerektiren eğrinin altında kalan alan, klerens, yarılanma ömrü ve eğrinin altında kalan alan oranları gibi değişkenler yerine kullanılabilirliklerinin değerlendirilmesi hedeflendi.

2. LİTERATÜR BİLGİ

2.1. Farmakogenetik Metotlar

Farmakoloji bilimindeki hızlı ve yoğun gelişmelere rağmen günümüzde ilaçla ilgili hala aydınlatılması gereken çeşitli problemler vardır. Bunların başlıcaları, önerilen geleneksel dozda ilaç etkisinde gözlenen farklılıklar, ilaçlara bağlı istenmeyen etkiler, hastalığa ve bireye özgü ilaç ve dozajın belirlenme zorunluluğu, ilaçlara direnç gelişimi, yeni ilaçların sentezlenmesi ve tedavide kullanım etkinliğinin geliştirilmesi, ilaç ya da toksik maddelere ırk duyarlılıkları, ilaçların bilinmeyen etki ve etki mekanizmalarının belirlenmesi gibi birçok bilim alanını ilgilendiren problemlerdir. Son yıllarda genetik alanındaki ilerlemelere paralel olarak farmakogenetik bilimindeki gelişmelerle çoğu ilaç cevabının genetik yapı ile ilişkisi ortaya konulmuş ve belirtilen çoğu problemin nedenlerinin açıklanabilmesi ve çözümüne katkı sağlanmıştır.

İlaç etkinliği üzerinde fizyolojik, fizyopatolojik, çevresel faktörler, tür, ırk ve bireysel duyarlılığa neden olan genetik yapı önemli rol oynar. İlaçların farmakokinetik ve farmakodinamik davranışlarını ve dolayısı ile ilaçların farmakolojik etkilerini belirleyen faktörler (enzim, reseptör, taşıyıcı sistem, hastalık, anatomik yapı) canlının genetik özellikleri ile ilişkilidir (Meyer 2000). Farmakogenetik, ilaç cevabında; tür, ırk ve bireysel farklılıklara neden olan genetik farklılıklar ile ilaç cevabı arasındaki ilişkiyi belirleyen ve bu yolla uygun tedavi stratejilerinin geliştirilmesini sağlayan bir bilim dalıdır (Meisel ve ark 2003).

Popülasyonda gözlenen ilaç cevabındaki farklılıkların en önemli nedenlerinden biri farmakogenetik kapsamında incelenen polimorfizmlerdir (Steimer ve Potter 2002). Polimorfizm, normal popülasyonda en az iki fenotipin bulunduğu ve bu fenotiplerden birisinin sıklığının %1'den fazla olduğu monojenik bir özellik olup, ilaç cevabı yönünden de popülasyonda farklı fenotiplerin ortaya çıkmasına yol açar. Bu durum genel olarak polimorfizmlere bağlı farmakokinetik ve farmakodinamik gen-ilaç etkileşimleri olmak üzere iki durumdan kaynaklanır (Bozkurt ve Kayaalp 2000). Enzimler ve taşıyıcı sistemlerde meydana gelen polimorfizmler, ilaçların hedef noktadaki ve diğer biyolojik sistemlerdeki ilaç konsantrasyonunu belirlerken, hedef yapılar ve hastalıkla ilgili yollardaki polimorfizmler ise hedef noktaların cevabını etkiler. İlaç cevabı, her iki durumun ve/veya diğer faktörlerin (çevresel faktörler gibi)

etkileşimi sonucu oluşur. Etkileşimin derecesine bağlı olarak popülasyon içinde farklı fenotipik özellikler (yavaş ve hızlı metabolizör gibi) ortaya çıkar (Meisel ve ark 2003).

Farmakolojik cevapta farklılığa neden olan polimorfizmlerin ortaya konması ile popülasyonda ilaç cevabında görülen farklılıkların (ırklar ve bireyler arası gibi) sebepleri, etkili tedavi ve dozaj rejimi, bireylerin hastalıklara ve ilaçlara tahmini cevapları, bazı hastalıkların teşhisi, etkili ve güvenilir ilaçların geliştirilmesi ve klinik çalışmaların uygun bireyler üzerinde yürütülmesi gibi bir çok fayda sağlanabilir (Morley 2002).

Farmakogenetik polimorfizmlerin belirlenmesinde genel olarak fenotipik ve genotipik metotlar kullanılır. Ancak, geçmişte fenotipik analizlerle belirlenen çoğu polimorfizmin moleküler temelini artık bilinmesi nedeni ile fenotipin tahmin edilmesinde genotipik analizlerin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (Daly 2004).

Fenotipik metotlar, enzim düzeylerinin veya biyolojik sıvılarda prob ilaç/metabolit düzeylerinin, genotipik metotlar ise DNA baz dizilimindeki bozuklukların belirlenmesini temel alır. Fenotipik analizlerle özellikle ilaç metabolizmasında rol oynayan enzimlerin aktiviteleri, genotipik analizlerle ise farmakogenetik ile ilgili proteinlerde (enzim, taşıyıcı protein, reseptör vb.) oluşmuş çoğu polimorfizm belirlenebilir (Daly 2004).

Her iki metodun da tercih edilen kullanım alanları ve kullanımlarını sınırlayan durumlar vardır (Kivisto ve Kroemer 1997, Daly 2004). Ancak, genotip fenotipin tahmin edilmesinde ön aşamadır. Bu nedenle, gerçek enzim aktivitesinin ölçülmesinde en uygun metot fenotiptir. Fenotipin belirlenmesi genetik, çevresel ve endojen faktörlerin enzim aktivitesi üzerindeki birleşik etkilerini yansıttığı için doğrudan uygulanabilir bilgi sağlar (Streetman ve ark 2000).

2.1.1. Fenotipik Metotlar

Bu metotlar direkt ve indirekt olarak ikiye ayrılır. Fenotipin belirlenmesinde en uygun metot, eritrosit ve lökosit gibi enzimlerin mevcut olduğu hücre ya da dokularda enzim aktivitesi veya protein düzeylerinin direkt ölçülmesidir (Tablo 2.1). Ancak, farmakogenetik ile ilgili çoğu enzim bu hücrelerde yüksek düzeylerde bulunmaz veya hiç sentezlenmezler (Schmitz ve ark 2001, Daly 2004). Direkt enzim aktivitesi ölçümü özellikle faz II reaksiyonlarda yer alan enzimlerde [tiopurin-S-metiltransferaz, katekol-O-metiltransferaz, glutasyon-S-transferazlar (GSTM1, GSTT1) ve fenol

sülfotransferazlar gibi] ve bazı sitokrom P450 (CYP) enzim izoformlarında (CYP1A1, CYP2E1 gibi) tercih edilen bir metottur (Campbell ve ark 1984, Seidegard ve Pero 1985, Price ve ark 1989, Hallier ve ark 1993, Raucy ve ark 1997, Ford ve Berg 2003, Daly 2004).

Günümüzde, direkt enzim ölçümlerinin kullanımındaki sınırlamalardan dolayı prob ilaç uygulamaları ile yapılan indirekt analizler (Tablo 2.1) özellikle ilaç metabolizmasında yer alan enzimlerin fenotiplerinin belirlenmesinde yaygın şekilde kullanılan metottur. Prob ilaç uygulamaları sadece enzim fenotipinin belirlenmesinde değil aynı zamanda ilaçların emilimi, dağılımı ve atılımında rol oynayan p-glikoprotein aktivitesinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır.

2.1.1.1. Fenotipik metotların uygulama alanları ve klinik problemleri

Fenotipik metotlarla:

- 1- Enzim aktivitelerinde bireyler ve ırklar arası farklılıklar,
- 2- Genotipik analizlerle tespit edilen polimorfizmlerin fonksiyonel önemi,
- 3- Enzim substratlarının tahmini kan kararlı durum konsantrasyonları,
- 4- İlk ve tekrarlayan ilaç uygulamalarında kullanılacak ilaç miktarı ve doz aralığı,
- 5- Kansere ve toksik bileşiklere bireylerin duyarlılığı ve
- 6- Enzim sentezinin yapıldığı dokuların fonksiyonu belirlenebilir (Kivisto ve Kroemer 1997, Johnson ve ark 2000, Zaigler ve ark 2000).

Bu metotlar ayrıca;

- 1- Aktiviteyi etkileyen faktörlerin varlığında ve yokluğunda enzim aktivitesinin belirlenmesinde,
- 2- Bireysel doz uygulamalarında bilgi vermesi ve tedavi sonrasında prognostik faktör olarak kullanılarak kontrollü ilaç kullanımının sağlanmasında,
- 3- Enzim ve taşıyıcı proteinlerin aktivitelerini etkileyen faktörlerin (ilaç etkileşimleri gibi) belirlenmesinde ve
- 4- Klinik denemelerde kullanılacak bireylerin seçiminde (yavaş metabolizörlerin dahil edilmemesi gibi) kriter olarak kullanılabilir (Fuhr ve ark 2007).

Tablo 2.1. Farmakogenetik polimorfizmlerin belirlenmesinde bazı fenotipik metotlar.

Enzim	Metot	Örnek	Kaynaklar
Kolinesteraz	Enzim inhibisyonu	Plazma	Whittaker ve ark 1983
KOMT	Enzim düzeyi	Eritrosit	Campbell ve ark 1984
CYP1A2	Kafein	Kan, salya, idrar	Carrillo ve ark 2000
CYP2A6	Kumarin	İdrar	Cholerton ve ark 1992
CYP2C9	Tolbutamid	İdrar	Veronese ve ark 1990
CYP2C19	Mefenitoin	İdrar	Wedlund ve ark 1984
CYP2C19	Omeprazol	Kan	Kanazawa ve ark 2003
CYP2D6	Debrizokin	İdrar	Wedlund ve ark 1984
CYP2D6	Dekstrometorfan	İdrar	Jacqz-Aigrain ve ark 1989
CYP2E1	Klorzoksazon	Kan	Marchand ve ark 1999
CYP2E1	Enzim düzeyi	Lenfosit	Raucy ve ark 1997
CYP3A4	6-hidroksikortizol	İdrar	Totsuka ve ark 1999
CYP3A4	Eritromisin solunum testi	Solunum havası	Watkins ve ark 1990
CYP3A4	Kinin	Kan, idrar	Rajaa ve ark 2003
FMO3	Trietilamin düzeyi	İdrar	Alwaiz ve ark 1989
GSTM1	Enzim düzeyi	Lökosit	Seidegard ve Pero 1985
GSTT1	Enzim düzeyi	Eritrosit	Hallier ve ark 1993
NAT-2	Kafein	İdrar	Grant ve ark 1983a
Paraoksonaz	Enzim düzeyi	Plazma	Akgür ve ark 2003
Sülfotransferaz	Enzim düzeyi	Trombosit	Price ve ark 1989
TPMT	Enzim düzeyi	Eritrosit	Ford ve Berg 2003
KO	Kafein	İdrar	Chainuvati ve ark 2003
P-glikoprotein	Digoksin klerensi	Kan	Greiner ve ark 1999

KOMT; katekol-O-metiltransferaz, FMO3; flavin içeren monooksijenaz 3, GSTM1; glutasyon-S-transferaz M1, GSTT1; glutasyon-S-transferaz T1, NAT-2; N-asetiltransferaz 2, TPMT; tiopurin-S-metiltransferaz, KO; ksantin oksidaz.

İlaç metabolizmasında rol oynayan enzimlerin fenotipik testlerinde karşılaşılabilecek problemler aşağıda belirtilmiştir.

- 1- Fenotipik ölçümlerin ve çoğu prob ilacın geçerliliğinin olmaması,
- 2- Fenotipin bilinmeyen klinik yönleri,
- 3- Metabolik olmayan faktörlerin etkisi,
- 4- Yarışmalı ve karmaşık biyotransformasyon yollarının oluşması/olması,
- 5- Enzime spesifik prob ilacın bulunmaması/olmaması,
- 6- Nokta örnek almayı gerektirmesi,
- 7- Uygulama zorlukları ve
- 8- Güvenilir analitik metotların geliştirilmesinin gerekli olmasıdır (Fuhr ve ark 1996, Zaigler ve ark 2000).

2.1.1.2. Prob ilaç uygulamaları

CYP ve diğer enzimlerin aktivitelerinin ölçülmesinde kullanılan prob ilaçlar, ilaçların ve çevresel bileşiklerin *in vivo* metabolizmasında genetiğe, çevreye, ırka ve bireye bağlı farklılıkları belirlemek için yaygın şekilde kullanılmaktadır (Rostami-Hodjegan ve ark 1996). Prob ilaçlarla enzim aktivitesi, ilaç uygulama sonrasında ilaç konsantrasyonlarının ve bazı endojen maddelerin (6-hidroksikortizol gibi) düzeylerinin biyolojik sıvılarda ölçülmesi ile belirlenir (Daly 2004).

Prob ilaçlarla fenotipin belirlenmesinde, tek prob ve karma (kokteyl) uygulamalar olmak üzere iki metot vardır. Karma uygulamalar, iki veya daha fazla prob ilacın eşzamanlı uygulamasını temel alır (Tablo 2.2) ve son yıllarda olumlu yönleri nedeni ile yaygın şekilde kullanılmaktadır (Tanaka ve ark 2003).

Karma uygulamalar özellikle ilaç araştırmalarında ve *in vivo* ilaç etkileşimlerinin tahmin edilmesinde önemlidir. Bu yaklaşımın en önemli avantajı, zamana bağlı oluşan bireysel ve bireyler arası farklılığın olumsuz etkisini azaltmasıdır (Tablo 2.3, Tanaka ve ark 2003, Zhou ve ark 2004).

Her iki metot da biyolojik sıvılarda farmakokinetik parametrelerin belirlenmesini temel alır. Prob ilaçların geçerliliği, enzim aktivitesini belirlemede kullanılan parametrik sisteme bağlıdır. İdeal parametrik ölçü, ilgili metabolik yolla metabolize edilen prob bileşiğin intrinsik klerensidir. Ancak, bu parametrenin hesaplanması çok

fazla veri toplamayı gerektirdiğinden ve pratik olmadığından, büyük populasyonlarda enzim aktivitesinin ölçülmesinde basit farmakokinetik parametrelerin kullanımı pratik açıdan daha uygundur. Bu nedenle, indirekt parametreler tercih edildiğinde geçerliliğinin ve enzim aktivitesine duyarlılığının olması gereklidir (Rostami-Hodjegan ve ark 1996).

Tablo 2.2. *İn vivo* enzim aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan bazı karma uygulamalar.

Prob ilaç (Enzim)	Parametre	Cihaz	Kaynaklar
Kafein (CYP1A2)	Plazma paraksantin/kafein oranı	HPLC	Frye ve ark 1997
Mefenitoin (CYP2C19)	İdrar 4-hidroksimefenitoin miktarı	HPLC	
Debrizokin (CYP2D6)	İdrar HDB/HDB+DB	HPLC	
Klorzoksazon (CYP2E1)	Plazma 6-hidroksiklorzoksazon/klorzoksazon oranı	HPLC	
Dapson (CYP3A)	İdrar HDA/HDA+DA	HPLC	
Kafein (CYP1A2)	Plazma paraksantin/kafein oranı	HPLC	Zhu ve ark 2001
Mefenitoin (CYP2C19)	İdrar S-mefenitoin/R-mefenitoin oranı	HPLC	
Metoprolol (CYP2D6)	İdrar metoprolol/ α -hidroksimetoprolol oranı	HPLC	
Klorzoksazon (CYP2E1)	Plazma 6-hidroksiklorzoksazon/klorzoksazon oranı	HPLC	
Midazolam (CYP3A4)	Plazma 1-hidroksimidazolam/midazolam oranı	HPLC	
Kafein (CYP1A2)	Plazma paraksantin/kafein oranı	HPLC	Christensen ve ark 2003
Omeprazol (CYP2C19)	Plazma omeprazol/4-hidroksiomeprazol oranı	HPLC	
Debrizokin (CYP2D6)	İdrar debrizokin /4-hidroksidebrizokin	HPLC	
Losartan (CYP2C9)	İdrar losartan/E-3174 (losartan metaboliti) oranı	HPLC	
Kinin (CYP3A4)	Plazma kinin/3-hidroksikinin oranı	HPLC	
Kafein (CYP1A2)	İdrar 1X+1U+AFMU/17U oranı	HPLC	Chainuvati ve ark 2003
Kafein (NAT-2)	İdrar AFMU/1X+1U oranı	HPLC	
Kafein (Ksantin oksidaz)	İdrar 1U/1X+1U oranı	HPLC	
Omeprazol (CYP2C19)	Plazma omeprazol/4-hidroksiomeprazol oranı	HPLC	
Dekstrometorfan (CYP2D6)	İdrar dekstrometorfan/dekstrorfan oranı	HPLC	
Varfarin+Vit.K (CYP2C9)	S-varfarinin serum EAA	HPLC	
Midazolam (CYP3A)	Plazma midazolam klerensi	HPLC	
Kafein (CYP1A2)	Kafein plazma EAA	HPLC	Schmider ve ark 1999
Alprazolam (CYP3A4)	Alprazolam plazma EAA	HPLC	

HDB; 4-hidroksidebrizokin, DB; debrizokin, HDA; hidroksidapson, DA; dapson, 1X; 1-metilksantin, 1U; 1-metilürat, NAT-2; N-asetiltransferaz 2, AFMU; 5-asetilamino-6-formilamino-3-metilurasil, 17U; 1,7-dimetilürük asit, EAA; eğrinin altında kalan alan.

Tablo 2.3. *In vivo* prob ilaç uygulamalarının olumlu ve olumsuz yönleri (Tanaka ve ark 2003, Zhou ve ark 2004).

Metot	Olumlu Yönleri	Olumsuz Yönleri
Karma uygulamalar	Tek uygulama ile farklı CYP enzim aktiviteleri hakkında eşzamanlı bilgi edinilir ve zamana bağlı oluşan bireysel ve/veya bireyler arası farklılık azdır.	Prob ilaçların yan etkileri vardır, analiz için gerekli örnek miktarı fazladır ve analiz prosedürü uzundur.
Tek prob ilaç uygulaması	Tek CYP enzim izoformu hakkında bilgi verir, analiz için gerekli örnek miktarı az ve analiz hızlıdır.	Prob ilacın yan etkileri vardır ve CYP enzimleri aktivitesi hakkında sınırlı bilgi verir.

İki veya daha fazla enzimin prob ilaç metabolizmasında yer aldığı durumlarda, enzim tarafından katalize edilen prob ilacın kısmi klerensi geçerli parametrik ölçü olarak kullanılabilir (Kalow ve Tang 1993).

Enzim aktivitesinin belirlenmesinde genellikle eğrinin altında kalan alan (EAA), klerens, metabolik ve metabolit oran parametreleri kullanılmaktadır. Klinik açıdan EAA, genellikle metabolik-metabolit orandan daha önemlidir. Ancak, enzimin metabolizmaya büyük oranda katkısının bulunmadığı, polimorfik yolun tek olmadığı ve fenotipler arasındaki ayrımın önemli oranda yapılamadığı durumlarda, EAA polimorfizmin zayıf bir göstergesidir (Jackson ve Tucker 1990, Fuhr ve ark 1996). Biyolojik sıvılarda prob ilaç ve metabolit/metabolitlerinin belirli zaman diliminde veya nokta zamanda ölçülmesini temel alan metabolik-metabolit oran, çok sayıda örnek toplamayı gerektirmemesi nedeni ile tam farmakokinetik profilin çıkarılması yerine tercih edilir. Hesaplamalarda, formülde ana maddenin yer aldığı oranlar metabolik oran, sadece metabolitlerin yer aldığı oranlar ise metabolit oran olarak ifade edilir (Zaigler ve ark 2000).

2.1.1.2.A. İdeal prob ilaçta bulunması gereken özellikler

Enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan parametrelerin (EAA, sistemik klerens, yarılanma ömrü, metabolik oran gibi) geçerliliklerinin olması için gerekli kriterler aşağıda belirtilmiştir:

- 1- Karaciğer biyopsi örneklerinde belirlenen enzim aktivitesi ile ilişkili olmalı,
- 2- Biyopsi örneklerinde belirlenen enzim miktarı ile ilişkili olmalı,

- 3- Prob ilacın hedef enzime bağlı oluşan fraksiyonel klerensi ile ilişkili olmalı,
- 4- Diğer enzim substratlarının varlığında enzim aktivitesinde azalma olmalı,
- 5- Enzim inhibitörlerinin varlığında enzim aktivitesinde belirgin azalma olmalı,
- 6- Enzim indükleyicilerinin varlığında enzim aktivitesinde belirgin artma olmalı,
- 7- Enzim önemli ölçüde karaciğerde sentezleniyorsa, sağlıklı ve karaciğer bozukluğu bulunan bireyler arasında enzim aktivitesinde belirgin farklılıklar olmalı,
- 8- Sonuçlar, genetik polimorfizmleri de yansıtmalı,
- 9- Tekrarlayan testler arasında varyasyon katsayısı çok düşük olmalı (yeniden üretilebilirliği),
- 10- Enzim substratının EAA değeri ile diğer parametrik ölçüler ilişkili olmalı,
- 11- Kullanılan testin *in vitro* duyarlılığı ispatlanmalı ve
- 12- Enzim ölçümlerinde geçerli olan diğer fenotipik prosedürlerle ilişkili olmalıdır (Tanaka ve Breimer 1997, Zaigler ve ark 2000, Fuhr ve ark 2007).

İdeal bir prob ilaçta bulunması gereken özellikler:

- 1- Eliminasyonu tam olarak karaciğer metabolizmasına bağımlı olmalı,
- 2- Linear farmakokinetik özellik taşımalı,
- 3- Metabolizması, karaciğer kan akımından ve plazma proteinlerine bağlanma oranından çok az düzeyde etkilenmeli,
- 4- Metabolizma yolu ve enzimler bilinmeli,
- 5- Tek prob ilaç uygulaması ile farklı enzimlerin aktiviteleri ve polimorfik yollar, spesifik metabolit/metabolitlerin kullanımı ile eşzamanlı olarak belirlenebilmeli,
- 6- Prob ilacın atılımını etkileyen idrar pH'sı, idrar akış hızı ve böbrek klerensi gibi faktörlerden etkilenmemeli veya çok az etkilenmeli,
- 7- Oral yolla uygulanıyor ise tam ve hızlı olarak emilmeli,
- 8- Hem sağlıklı hem de karaciğer hastalığı bulunan bireylerde toksik etkili olmamalı,
- 9- Diğer enzim sistemlerinden etkilenmemeli,

- 10- Uygulama dozunda önemli farmakolojik etkileri bulunmamalı,
- 11- Prob ilaç ve/veya metabolitleri biyolojik sıvılarda ölçülebilmeli,
- 12- Tekrarlayan testlerde birey içi farklılıklar düşük olmalı,
- 13- Örnek toplama süresince hata oranları düşük olmalı,
- 14- Kimyasal ve çevresel faktörler ile etkileşimi olmamalı veya çok az düzeyde olmalı,
- 15- Kullanılan yöntemlerin bireylere etkisi çok düşük ve kolayca uygulanabilir olmalı,
- 16- Ölçülmesinde kullanılan analiz yöntemi ve ekipman, basit ve yaygın şekilde kullanılabilir olmalı,
- 17- İlaç iyi tolere edilebilmeli ve
- 18- Mümkünse ilaç radyoaktif madde özelliğinde olmamalıdır (Tanaka ve Breimer 1997, Zaigler ve ark 2000, Fuhr ve ark 2007).

2.1.1.2.B. Tek prob ilaç uygulamaları

Enzim aktivitelerinin belirlenmesinde çok sayıda ilaç, prob olarak önerilmiştir. Ancak, aynı enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ilaçların (Tablo 2.4) birbirlerine üstünlükleri bulunmaktadır (Streetman ve ark 2000). Tek ilaç uygulama sonrası, bir enzime duyarlı parametrelerin ölçümü yapılarak enzim aktivitesi spesifik, birden fazla enzime (karaciğerin metabolik kapasitesi) duyarlı parametrelerin ölçümü ile spesifik olmayan şekilde belirlenir (Tablo 2.5, Tanaka ve Breimer 1997). Özellikle CYP enzimleri karaciğerde bulunduğu ve enzim aktivitesi, karaciğer hastalıklarına bağlı olarak önemli ölçüde değiştiğinden, prob ilaç uygulamaları ile bu organın fonksiyonu da belirlenebilir (Tanaka ve Breimer 1997). Organ fonksiyonunun belirlenmesinde kullanılan ilaç uygulamaları son yıllarda diğer organ fonksiyon testlerine alternatif olarak tercih edilmektedir. Ancak, bireyler arasında enzim aktivitesi genetik faktörler (polimorfizmler) nedeniyle önemli oranda farklılık gösterdiğinden, organ fonksiyonu belirlenmeden önce bireylerin enzim aktivitesinin genetik yönü ortaya konmalıdır (Tanaka 1998).

Tablo 2.4. Farklı prob ilaçların olumlu ve olumsuz yönleri (Streetman ve ark 2000).

Enzim	Prob İlaç	Reaksiyonlar	Olumlu Yönleri	Olumsuz Yönleri
CYP1A2	Kafein	Kafein 3-demetilasyon Paraksantin 7-demetilasyon	Plazma, salya ve idrar kullanılarak güvenilir metotlar tanımlanmıştır. Test dozlarında güvenilirdir. Ksantin oksidaz (KO) ve N-asetiltransferaz enzim fenotiplerinin belirlenmesinde de kullanılabilir.	Farklı enzimleri (CYP1A1, 1A2, 2A6, 2E1, 3A, NAT2, KO) içeren karmaşık metabolizması vardır. Tri ve dimetilksantinlerin Cl _b 'leri idrar akımına bağımlıdır. Paraksantin CYP1A2 enziminin hem ürünü hem de substratıdır.
	Teofilin	Teofilin 1-demetilasyon	Metabolizması kafeine göre daha az karmaşıktır. Aynı zamanda CYP1A1 aktivitesinin ölçülmesinde spesifik bir prob ilaç olabilir.	Plazma ve idrar kafein oranları ile arasındaki ilişki zayıftır. Kafein kadar güvenilir değildir. 1-demetilasyonun sadece yaklaşık %23'ü CYP1A2 enzimi ile gerçekleştirilir.
CYP2C9	Tolbutamid	Tolbutamid hidroksilasyon	CYP2C9 aktivitesinin belirlenmesinde kullanımı, <i>in vitro</i> verilerle desteklenmiştir.	Hipoglisemi riski vardır. CYP2C9 enzimi de metabolizmada rol oynar. İdrar oranının <i>in vivo</i> geçerliliği ile ilgili sınırlı bilgi vardır.
	Fenitoin	Fenitoin 4'-hidroksilasyon	Hem plazma hem de idrarda fenotipik oranlar tanımlanmıştır.	Dar terapötik indekse sahiptir. Fenitoinin Cl _b 'i idrar akımına bağımlıdır. Önerilen oranların <i>in vivo</i> kullanımı ile ilgili bilgi sınırlıdır.
	Varfarin	(S)-varfarin 6- ve 7-hidroksilasyon	(S)-varfarin metabolizması önemli oranda CYP2C9 enzimi ile gerçekleştirilir.	Kanama riski vardır. Varfarinin fenotipik metotları ile ilgili az sayıda <i>in vivo</i> çalışma vardır.
	Losartan	Losartan oksidasyon	Diğer CYP2C9 enzim problemlerine göre daha güvenilirdir.	<i>İn vivo</i> çalışmalarda E3174 oluşumunda CYP3A enziminin önemli oranda rolü vardır. <i>İn vivo</i> prob ilaç kullanımının geçerliliği yoktur.

Tablo 2.4.'ün devamı

Enzim	Prob İlaç	Reaksiyonlar	Olumlu Yönleri	Olumsuz Yönleri
CYP2C19	Mefenitoin	(S)-mefenitoin 4'-hidroksilasyon	<i>In vivo</i> çalışmalarla, CYP2C19 enzimi yönünden yavaş metabolizörlerin belirlenmesinde kullanılabilirliği gösterilmiştir.	İstenmeyen etkilerinin oluşma ve (S)-mefenitoin veya 4-OH-mefenitoin konsantrasyonlarının idrarda belirlenememe riski vardır. S/R oranı önemli oranda muhafaza şartlarına bağlı olarak artar.
	Omeprazol	Omeprazol 5-hidroksilasyon	Konsantrasyonlarının belirlenmesi ile ilgili problemleri azdır. Enzim aktivitesi yüksek olan bireylerin belirlenmesinde kullanılabilir. İstenmeyen etkileri çok azdır.	Bazı örneklerde omeprazol konsantrasyonlarının belirlenememesidir. Kullanımı ile ilgili az sayıda <i>in vivo</i> çalışma bulunmaktadır.
	Proguanil	Proguanil hidroksilasyon	İdrar oranının kullanımı ile ilgili <i>in vivo</i> çalışmalar vardır.	İdrar oranı ile hızlı ve yavaş metabolizörler tam olarak ayırt edilemez. Mefenitoin oranları ile ilişkisi karmaşıktır.
CYP2D6	Dekstrometorfan	Dekstrometorfan O-demetilasyon	Prob ilaç olarak kullanımı ile ilgili çok sayıda <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> veri vardır.	Böbrek fonksiyonu bozulmuş bireylerde idrar oranlarının kullanımında problemler vardır.
	Debrizokin	Debrizokin 4-hidroksilasyon	CYP2D6 ultrahızlı metabolizörlerin belirlenmesinde en iyi prob ilaçtır.	Hipotansiyon riski vardır. Kullanımı Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından yasaklanmıştır.
	Sparteın	Sparteın N ₁ -oksidasyon	Böbrek fonksiyonu bozulmuş bireylerde dekstrometorfan yerine kullanılabilir.	Kullanımı FDA tarafından yasaklanmıştır.
	Metoprolol	(R)-metoprolol O-demetilasyon; metoprolol α-hidroksilasyon	Kolaylıkla bulunabilir ve kullanılabilir.	Diğer CYP2D6 problemleri ile ilişkisi önemli oranda farklıdır.

Tablo 2.4.'ün devamı

Enzim	Prob İlaç	Reaksiyonlar	Olumlu Yönleri	Olumsuz Yönleri
CYP2E1	Klorzoksazon	Klorzoksazon 6'-hidroksilasyon	CYP2E1 enzimi için tanımlanmış en iyi prob ilaçtır.	Metabolizmasında CYP1A1, 1A2 ve 3A rol oynar. Plazma ve idrar oranlarının kullanımı ile ilgili bilgi sınırlıdır.
CYP3A4	Midazolam	Midazolam 1- ve 4-hidroksilasyon	<i>In vitro</i> ve <i>in vivo</i> çalışmalarla kullanımı önemli ölçüde belirlenmiştir. P-glikoprotein substratı değildir.	Sedatif etkisi vardır. FDA III programında kontrollü ilaç kullanım statüsünde yer alır. Klerensi CYP3A aktivitesi yüksek bireylerde karaciğer kan akımı ile ilişkilidir. Klerensin belirlenmesinde çok fazla kan örneği gereklidir.
	¹⁴ C-Eritromisin	Eritromisin N-demetilasyon	Prob ilaç olarak kullanımı <i>in vivo</i> çalışmalarla desteklenmiştir. Sadece tek solunum örneği gereklidir. Hemen sonuç alınır.	İntravenöz uygulamayı gerektirir. Test sonuçları dağılım hacmi ve plazma proteinlerine bağlanma oranına bağlı olarak değişir. CYP3A aktivitesinin yüksek olduğu durumlarda duyarlılığı çok düşüktür. P-glikoprotein substratıdır.
CYP3A	Kortizol	Kortizol 6-β-hidroksilasyon	Endojen bir substrattır.	Sadece enzim indüksiyonunun belirlenmesinde kullanımı önerilmiştir. Karaciğerden farklı dokularda da metabolize edilir.
	Dapson	Dapson N-hidroksilasyon	Oral yolla uygulanabilir. NAT2 aktivitesinin belirlenmesinde de kullanılabilir.	Diğer prob ilaçlarla ilişkisi zayıftır. Metabolizmasında CYP2E1 enzimi de rol oynar. Karaciğerden farklı dokularda da metabolize edilir.
	Dekstrometorfan	Dekstrometorfan ve dekst-rorfan N-demetilasyon	Oral yolla uygulanabilir. Geniş kullanımı vardır. CYP2D6 enzim aktivitesinin belirlenmesinde de kullanılır.	Diğer prob ilaçlar ile ilişkisi zayıftır. Metabolizmasında CYP2E1 enziminin de rolü vardır.

Tablo 2.4.'ün devamı

Enzim	Prob İlaç	Reaksiyon(lar)	Olumlu Yönleri	Olumsuz Yönleri
CYP3A	Lidokain	Lidokain N-deetilasyon		Klerensi önemli oranda karaciğer kan akımına bağlıdır. <i>İn vivo</i> kullanımı sınırlıdır.
	Alfentanil	Piperidin N-deakilasyon	Klerensi kısmen karaciğer kan akımından bağımsızdır.	Az sayıda <i>in vivo</i> çalışma vardır. Damar içi yolla uygulanır. FDA-II programında kontrollü ilaç kullanımı statüsündedir.
	Nifedipin	Nifedipin dehidrojenasyon	Oral yolla kullanılabilir.	<i>İn vivo</i> kullanımı sınırlıdır.

Tablo 2.5. *In vivo* enzim aktivitelerinin spesifik ve spesifik olmayan fonksiyon testlerinde kullanılan prob ilaçlar (Tanaka ve Breimer 1997)

Prob ilaç	Uygulama yolu	Örnek	Enzimler
Spesifik fonksiyon testleri			
Kafein	Oral	Kan	CYP1A2
Klorzoksazon	Oral	Kan	CYP2E1
Eritromisin	İV	Solunum havası	CYP3A4
Lidokain	İV	Kan	CYP3A4
Midazolam	İV	Kan	CYP3A4
Spesifik olmayan fonksiyon testleri			
Aminopirin	Oral	Solunum havası	CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4
Antipirin	Oral veya İV	Kan veya idrar	CYP1A2, CYP2B6, CYP2C, CYP3A4
Trimetadion	Oral	Kan	CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4

2.2. Kafein

Kafein (KF), ksantin alkaloidlerindendir ve ‘coffee, caffè’ kelimelerinden köken alır. KF, guarana bitkisinde bulunduğu “guaranine”, Paraguay çayında (mate) bulunduğu “mateine”, çayda (tea) bulunduğu “theine” olarak da bilinir. Sistematik ismi 1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione, diğer isimleri ise 1,3,7-trimetilksantin, trimetilksantin veya metilteobromin’dir. KF, kimyasal olarak 1819 yılında izole edilmiş, 1895 yılında sentetik olarak üretilmiştir. Altmıştan fazla bitkinin öz suyunda, yapraklarında ve tohumlarında bulunur ve bu bitkilerle beslenen bazı insektlerin paralizine ve ölümüne yol açar (Institute of Medicine Staff 2001, Andersson ve ark 2005, Anonim 2007a).

Doğal ve kola, çikolata gibi endüstriyel ürünler KF içerir. Miktarı (Tablo 2.6), bitki türüne ve elde edilme yöntemine göre farklılık gösterir (Magkos ve Kavouras 2005). KF içeren birçok doğal ürün, aynı zamanda teofilin (TF) ve teobromin (TB) gibi kalp uyarıcı etkinliği olan ksantin alkaloidlerini de içerir. KF’in bulunduğu ana kaynak kahve tohumlarıdır. Kahvedeki KF miktarı, kahve tohumunun tipine ve hazırlanma metoduna göre değişim gösterir. Kahvede az miktarda TF vardır, ancak TB içermez. Çay KF içeren diğer kaynaktır. KF miktarı çay türüne göre de farklılık gösterir. Çay, az miktarda TB

ve kahveye göre daha fazla miktarda TF içerir. Kola ve enerji içecekleri de KF içerir. Bu içeceklerdeki KF, içeriğinde bulunan doğal kaynaklardan gelir ya da sonradan ilave edilir. Kakao kullanılarak yapılan çikolata az miktarda KF içerir. Çikolatanın uyarıcı etkisi TF, TB ve KF'den kaynaklanır (Anonim 2007a).

Tablo 2.6. Doğal ve kola, çikolata gibi endüstriyel ürünlerde bulunan kafein miktarları (Magkos ve Kavouras 2005).

Kaynak	Kafein miktarı (mg)	Hacim veya ağırlık
Kahve	40-180	150 ml
Çay	25-50	150 ml
Kakao	5-10	150 ml
Çikolata barları	5-20	100 gr
Soft içecekler	20-40	250 ml
Enerji içecekleri	30-85	250 ml
Reçetesiz satılan ürünler (OTC)	30-200	1 tablet

2.2.1. Kafein ve metabolitlerinin farmakolojik etkileri

KF önemli fizyolojik fonksiyonları olmayan ancak farklı organ ve dokularda etkileri bulunan, farmakolojik olarak aktif bir maddedir (Magkos ve Kavouras 2005). KF ve diğer metilksantinler, adenosin reseptörlerini ve fosfodiesteraz enzimini inhibe ederek ve hücre içi depolardan kalsiyumun salınımına yol açarak etkilerini gösterirler (Institute of Medicine Staff 2001). Ancak, KF içeren besin ve içeceklerin alınımını takiben oluşan serum konsantrasyonu, enzim inhibisyonu ve kalsiyum mobilizasyonu ile oluşan farmakolojik etkileri ortaya çıkarmaz (Andersson ve ark 2005).

KF'in farmakolojik etkileri çoğunlukla adenosin reseptörlerini yarışmalı olarak bloke etmesi ile ilişkilidir. Adenosin normal hücre bileşenlerinden biridir. Hücrelerde nükleik asit metabolizması ve birçok reaksiyonda rol oynar. Molekülün purin kısmının kimyasal yapısı KF'e benzer. KF'in genel olarak etkileri adenosinin etkilerine zıt yöndedir (Tablo 2.7, Andersson ve ark 2005).

Adenosin A₁, A_{2A}, A_{2B} ve A₃ adı verilen dört farklı reseptör ile etkileşir. Reseptörlerin uyarılması adenilat siklaz yoluyla hücre içi siklik AMP konsantrasyonunu

etkiler. Adenozin, A_1 reseptörlerine daha yüksek ilgi duyar ve uyarılması G_i adı verilen guanil nükleozid bağlayıcı protein aracılığıyla adenilat siklazı inhibe eder. A_{2A} reseptörlerine daha düşük ilgi duyar ve uyarılması G_s adı verilen diğer bir guanil nükleozid bağlayıcı protein aracılığıyla adenilat siklazı aktive eder. Bu nedenle A_1 ve A_{2A} reseptörleri hücre düzeyinde zıt etkilere sahiptir (Andersson ve ark 2005).

Tablo 2.7. Adenozin analogları ve kafeinin farmakolojik etkileri (Andersson ve ark 2005)

Etkilenen Fizyolojik Sistem (Fonksiyon)	Kafein	Adenozin
Merkezi sinir sistemi	Spontan elektriksel aktiviteyi artırır, Nörotransmitter madde salınımını artırır, Konvülsan aktivite, Lokomotor aktiviteyi uyarır	Spontan elektriksel aktiviteyi azaltır, Nörotransmitter madde salınımını inhibe eder, Antikonvülsan aktivite, Lokomotor aktiviteyi baskılar
Kalp	Pozitif inotropik/kronotropik etki	Negatif inotropik/kronotropik etki
Böbrek	Diürezis, Renin salınımını uyarır	Antidiürezis, Renin salınımını uyarır
Periferel damarlar	Genişletir	Daraltır
Merkezi damarlar	Daraltır	Genişletir
Gastrointestinal sistem	Mide salgısını artırır	—
Solunum sistemi	Bronkodilatasyon	Bronkodilatasyon/Bronkokonstrüksiyon
Yağ dokusu	Lipolizi uyarır	Lipolizi baskılar

KF, etkisini A_1 ve A_{2A} reseptörleri aracılığıyla gösterir ve seçici olmayan bir şekilde reseptörleri antagonize eder (Andersson ve ark 2005). KF tarafından adenozin reseptörlerinin inhibe edilmesi; davranış ve algılamaya yönelik etkilerin oluşumu ile ilişkili norepinefrin, dopamin, asetilkolin, seratonin, glutamat, gamma-aminobütirik asit (GABA) ve nöropeptidlerin salınımını etkiler (Institute of Medicine Staff 2001).

KF'in A_1 reseptörleri için inhibisyon sabitesinin (K_i) 27-55 μM aralıkta, A_{2A} reseptörlerinde ise 46-50 μM aralığında olduğu bildirilmiştir. TF'in inhibisyon sabitesi (A_1 ve A_{2A} reseptörleri için K_i sırasıyla 8.5-14 μM ve 11-25 μM) KF'den daha düşüktür. Bu nedenle TF'in adenozin reseptörleri üzerindeki antagonist etkileri KF'den nispeten daha güçlüdür. Metilksantinlerin adenozin reseptörleri üzerindeki antogonistik etkisi için 10-100 μM 'lik plazma konsantrasyonu gereklidir. Fosfodiesteraz enzim inhibisyonu, $GABA_A$ reseptörlerinin blokajı ve hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum mobilizasyonu için

gerekli plazma konsantrasyonu, adenozin reseptörleri üzerindeki etkisi için gerekli olandan sırasıyla 20, 40 ve 100 kat daha fazladır (Andersson ve ark 2005).

KF, iskelet kaslarında ve yağ dokusunda fosfodiesteraz enzimini inhibe ederek siklik AMP'nin hücre içi konsantrasyonunu artırır. Bu etki lipazların aktivitesini artırarak lipolize neden olur. İskelet kaslarında enerji kullanımı lipoliz yolağından sağlanır ve kas glikojen tüketimi azalır. Siklik AMP düzeyindeki artış kan katekolamin düzeyini de artırır. KF zayıf bir fosfodiesteraz enzim inhibitörüdür ve bu nedenle davranışsal etki için gerekli dozlarda bu etkilerin sağlanması zordur (Institute of Medicine Staff 2001). Dokularda fosfodiesteraz enziminin inhibe edilmesi için 0.1-1 mM düzeyinde plazma konsantrasyonu gereklidir (Andersson ve ark 2005). Ancak, TF ve KF'in bronşları ve soluk borusunu genişletici ve kalp uyarıcı etkilerinde fosfodiesteraz enzim inhibisyonu önemlidir (Institute of Medicine Staff 2001).

KF, iskelet ve kalp kaslarında ve sinir dokusunda hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyumun mobilize olmasına yol açabilir. Etkinin oluşabilmesi için 1 mM üzerinde plazma konsantrasyonu gereklidir (Andersson ve ark 2005).

KF, hayvanlarda ve insanlarda davranış üzerine etkileri bulunan benzodiazepinlerin etkilerini antagonize veya modifiye eder. Antagonistik etkinin benzodiazepin reseptörlerini bloke edilmesi ile oluştuğu bildirilmiş olmasına rağmen, KF'in bu reseptörler üzerinde zayıf antagonistik etkisi vardır. Ancak bu mekanizmanın oluşabilmesi için yüksek konsantrasyon gereklidir. Son yıllarda KF ve benzodiazepinler arasındaki etkileşimin KF'in adenozin reseptörleri üzerindeki etkilerinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Institute of Medicine Staff 2001).

Metilksantinlerin öncelikli farmakolojik etkileri merkezi sinir sistemi (MSS) uyarıcısı olmalarıdır. KF ve TF'in MSS uyarıcı etkileri belirgin olarak görülürken TB'in bu yöndeki etkileri oldukça zayıftır. KF ile karşılaştırıldığında TF'in MSS üzerinde daha güçlü ve hayatı tehdit eden şekilde uyarıcı etkileri vardır. KF psikolojik etkinlik gösterir ve bellek fonksiyonları üzerinde genellikle bir etkisi yoktur. KF'in uykusuzluk yapıcı, dikkati ve yorgunluğa karşı direnci artırıcı ve fiziksel, psikomotor ile entellektüel performansı artırıcı etkileri vardır. İnsanlarda KF'in MSS üzerindeki uyarıcı etkilerine karşı tolerans gelişimi görülmemesine rağmen bağımlılık ve yoksunluk semptomları bildirilmiştir (Andersson ve ark 2005).

KF ve TF'in kalp-damar sistemi üzerine belirgin etkileri vardır. Etkileri karmaşıktır ve bazen antagonist etkinlik şeklinde ortaya çıkabildiğinden etkilerini tahmin etmek zordur. Tolerans gelişmemiş bireylerde KF ve TF uygulamalarını takiben sistolik ve diastolik kan basıncında artış, doza bağımlı olarak bradikardi veya taşikardi ve adrenalin, noradrenalin ile renin salınımına bağılı olarak nöroendokrin etkiler görülür. KF ve TF'in kalp-damar sistemi üzerindeki etkilerine karşı hızlı bir tolerans gelişir. Bu nedenle KF'in uzun süreli alınımını takiben kalp-damar sistemi üzerindeki etkileri belirgin olarak görülmez veya ortadan kalkar (Andersson ve ark 2005).

KF solunum merkezinin karbondioksite duyarlılığını artırarak solunum sayısını artırır. Bu neden ile KF ve TF yeni doğanlarda idiopatik apnenin tedavisinde kullanılır. Astımlı bireylerde KF ve öncelikli olarak TF bronkodilatasyona neden olur. Ancak, KF'in bronkodilatasyon etkileri için MSS toksisitesi oluşturan dozlarda kullanılması gerektiğinden bronşiyal astım tedavisinde TF kullanılır (Andersson ve ark 2005).

KF, TF ile TB sodyum ve suyun böbreklerden atılımını artırır. En güçlü diüretik etkinliği olan TF'dir. Diüretik etki, glomerüler filtrasyon hızının artışına ve sodyum ile suyun tubüllerden geri emilimini inhibe etmesine bağılıdır. KF ve TF böbreklerden renin salınımına yol açarak sodyum atılımını artırır. Uzun süreli kullanımı takiben diüretik etkiye karşı tolerans gelişir (Andersson ve ark 2005).

KF'in mideden hidroklorik asit ve pepsin salınımını artırdığı bildirilmiştir. Ancak, bu etkileri dekafeinize edilmiş kahvenin alınımını takiben de görülmesi nedeniyle aynı zamanda kahvede bulunan diğer maddeler de mide salgısı artışına yol açabilir. KF ve kahvenin alt özefagus sfinkter basıncını azalttığı belirlenmiştir (Andersson ve ark 2005).

KF ve TF, sirkülasyondaki katekolamin düzeyini artırır. Plazma renin aktivitesini, serbest yağ asidi, kortizol ve glukoz düzeylerini ve metabolik hızı etkiler. KF alınımını takiben kalsiurinin arttığı, demir ve diğer esansiyel elementlerin emiliminin inhibe edildiği bildirilmiştir (Andersson ve ark 2005).

KF karaciğerde CYP450 oksidazlar ve flavin içeren monooksijenazlar (FMO) tarafından her biri vücutta bireysel etkilere sahip üç ana dimetilksantin metabolitlerine (paraksantin, teobromin, teofilin) dönüştürülür (Anonim 2007a).

2.2.1.1. Paraksantin

Bitkiler de bulunmaz. İnsan ve hayvanlarda KF'in metabolizması ile oluşur. Paraksantin (PK) farklı fizyolojik etkilere sahiptir. KF gibi merkezi sinir sistemini uyarıcı

etkinliği vardır. Adenozin reseptörlerini yarışmalı olarak inhibe eder ve etkileri nonselektiftir. PK, diastolik kan basıncını ve plazma epinefrin düzeyini artırır. Plazma epinefrin düzeyini artırması nedeniyle KF'in lipolitik etkilerinden sorumludur. PK serum serbest yağ asidi düzeyini artırır. PK, KF'den farklı olarak Na⁺/K⁺ ATPaz'ın enzimatik etkisini artırarak iskelet kas dokusuna potasyum iyonlarının girişine neden olur. Aynı zamanda kas dokusunda kalsiyum miktarını da artırır (Anonim 2007b).

2.2.1.2. Teobromin

Öncelikli olarak kakaoda ve dolayısıyla çikolatada bulunan alkaloiddir. Güçlü bir siklik AMP fosfodiesteraz enzim inhibitörüdür. TB tarafından enzimin inhibisyonu, hücrede siklik AMP düzeyinde artışa neden olur. Siklik AMP düzeyindeki artış birçok hormonal ve nörotransmitter maddelerin etkinliğini artırır ve oluşan etki genellikle uyarıcı niteliktedir. TB'in kalp üzerindeki uyarıcı etkisi merkezi sinir sisteminden daha güçlüdür. TB genellikle vazodilatör, diüretik ve miyokard stimülanı olarak kullanılır. Bronşları genişletici etkisinden dolayı astım tedavisinde de kullanılabilir (Anonim 2007c).

2.2.1.3. Teofilin

Bronşlarda düz kasların genişlemesine neden olur ve astım tedavisinde kullanılır. Ancak, astım tedavisi için gerekli doz miktarı KF metabolizması ile oluşan miktarın çok üzerindedir. TF; astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi solunum sistemi hastalıklarının tedavisinde kullanılan ve KF'e benzer yapısal ve farmakolojik etkileri olan bir maddedir. TF'in bronş düz kaslarını genişletici, pozitif inotropik ile kronotropik etkileri, kan basıncı ile böbrek kan akımını artırıcı ve yangı önleyici etkileri vardır (Anonim 2007d).

2.2.2. Kafein farmakokinetiği

KF ve diğer metilksantinler uygulamalarını takiben mide ve ince bağırsaktan tam olarak emilirler ve tüm vücuda dağılırlar. Düşük oranda plazma proteinlerine bağlanırlar. Karaciğerde metabolize edilerek birinci derece kinetiğine göre vücuttan atılırlar (Andersson ve ark 2005).

KF ağız yoluyla alındıktan sonra mide-bağırsak sisteminden hızlı ve tam olarak emilir. Mide myenterik ve submukozada bulunan sinirleri uyarak midenin boşalmasını artırır. Bu, KF'in mideden direkt emilip kana geçmesi ile olur. Alınan miktarın yaklaşık %99'u, 45 dakika içinde ve tamamı 1 saat içinde emilir. 10 mg/kg'lık doza kadar emilim dozdan bağımsızdır (Magkos ve Kavouras 2005).

KF ağız yoluyla alındıktan sonra genellikle maksimum plazma konsantrasyonuna 15-120. dakikalar arasında ulaşır. Düşük dozlarda alındığında bu süre daha kısa olabilir. İlk geçiş etkisine çok düşük oranda maruz kaldığından, oral ve damar içi uygulanma sonrasında ulaşılan plazma konsantrasyonları benzerdir (Institute of Medicine Staff 2001). KF dozu ile pik plazma konsantrasyonu arasındaki doğrusallık 1-10 mg/kg dozlarında oral uygulama sonrası görülmüştür (Magkos ve Kavouras 2005).

KF hidrofobik bir maddedir. Vücutta tüm biyolojik zarlardan kolay geçer ve dokulara dağılır. İnsanlarda kararlı durum dağılım hacmi 500-800 ml/kg'dır. İnsanlarda, deri altı yağ dokusunun hücre dışı sıvı KF konsantrasyonları plazmadan farklı değildir. Bu, bağlı olmayan ilacın hücre zarlarından kolaylıkla geçmesine bağlıdır. Ratlarda çeşitli dokulardaki (beyin, yağ, kas, karaciğer) KF'in hücre dışı sıvı konsantrasyonlarının kan konsantrasyonu ile benzer olduğu belirlenmiştir. KF ve diğer metilksantinler albümine düşük oranda (%10-30) bağlanırlar. Hayvanlarda yapılan çalışmalarda uygulama sonrası hücre içi KF konsantrasyonu yönünden dokular arasında (beyin, kalp, böbrekler, karaciğer, akciğer, dalak, testis ve kas) farklılıkların olduğu belirlenmiş olmasına rağmen 30-60 dakika sonrasında plazma ve hücre içi sıvı konsantrasyonları arasında farklılık bulunmamıştır (Magkos ve Kavouras 2005).

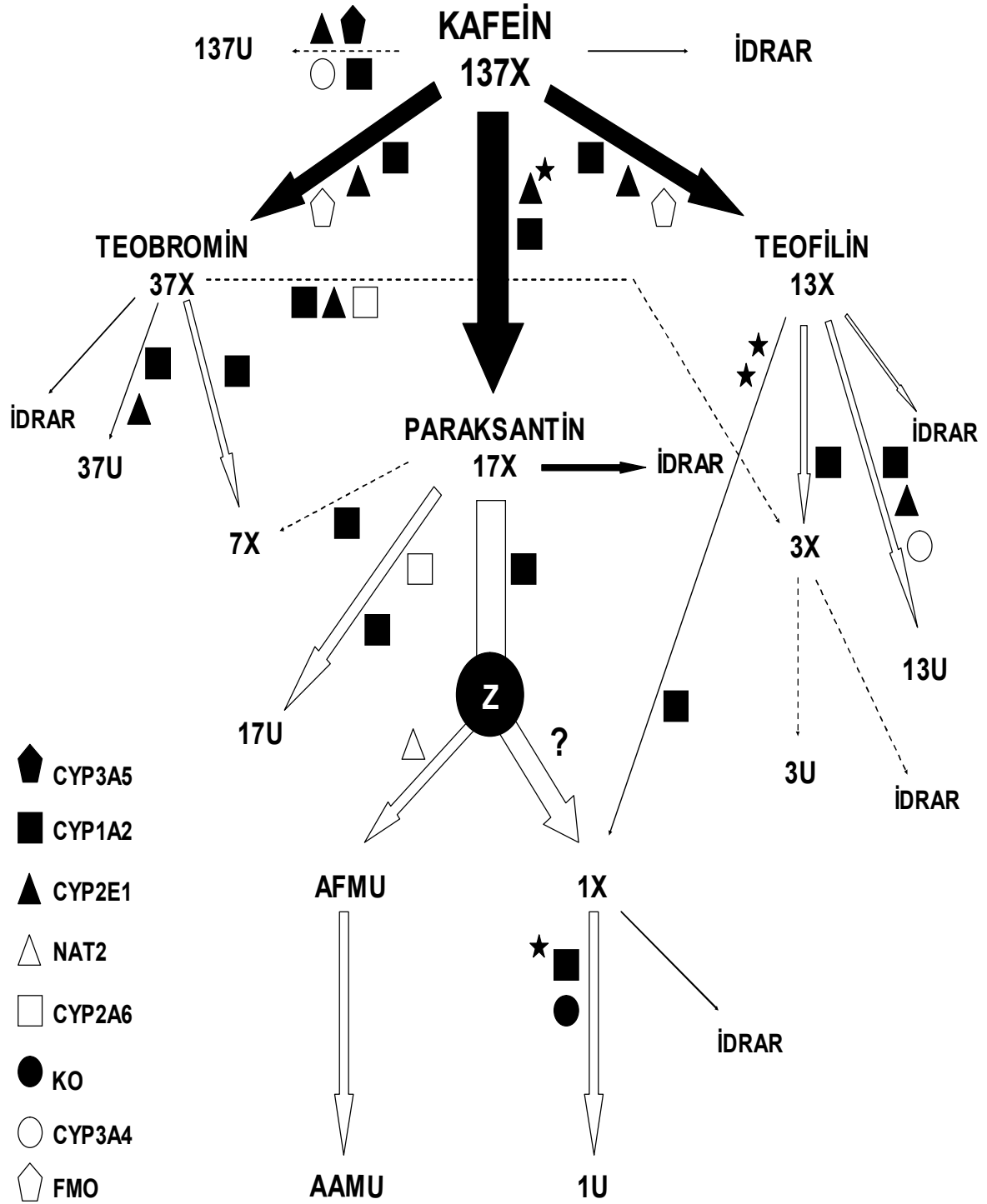
Alınan KF'in yaklaşık %2'sinden daha azı idrarla değişmeden atılır. En az %98'i karaciğerde mikrozom enzimler tarafından di- ve mono-metilksantinler, tri, di ve mono-metilurik asitler ve çeşitli metillenmiş urasil türevlerine metabolize edilir. Bu, pürin halkasının 8-pozisyonunda demetilasyon, oksidasyon ve 8- ve 9-pozisyonlarında zincir açılması reaksiyonları ile sağlanır (Şekil 2.1, Rostami-Hodjegan ve ark 1996, Magkos ve Kavouras 2005, Andersson ve ark 2005).

İnsan (Andersson ve ark 2005), sığır, koyun (Danielson ve Golsteyn 1996), at, eşek (Peck ve ark 1997) ve köpekte (Tse ve Szeto 1981) KF'in biyotransformasyonunda en önemli metabolik yollar, demetilasyon tepkimeleri ile 3 farklı dimetilksantin (TB, PK, TF) oluşumudur (Şekil 2.1). TB (3,7-dimetilksantin (37X)) N-1 demetilasyon, PK (1,7-dimetilksantin (17X)) N-3 demetilasyon ve TF (1,3-dimetilksantin (13X)) N-7 demetilasyon tepkimeleri ile oluşur. Memeli türleri arasında metabolizma farklılıklarına bağlı olarak ana metabolitlerin (TB, PK, TF) oranları ve idrarla atılan metabolit miktarları önemli oranda farklılık gösterir. KF'in öncelikli ana metabolitinin insan (Berthou ve ark 1992) ve sığırdaki (Danielson ve Golsteyn 1996) PK, koyun (Danielson ve Golsteyn 1996), cynomolgus maymunu (Berthou ve ark 1992), köpek (Tse ve Szeto 1981), at ve eşekte

(Peck ve ark 1997) ise TF olduğu belirlenmiştir. KF'den ana metabolit oluşum miktarları insan (Berthou ve ark 1992) ve sığırdaki (Danielson ve Golsteyn 1996) PK>TF>TB, at ve eşekte (Peck ve ark 1997) ise TF>TB>PK sırasını izler.

İnsan ve deney hayvanları arasında KF'in metabolitlerine dönüşüm oranlarında büyük farklılıklar vardır (Bonati ve ark 1984-1985, Berthou ve ark 1992, Danielson ve Golsteyn 1996). Ayrıca, deney hayvanlarında KF'in metabolizmasında ek reaksiyon tepkimeleri ve metabolit oluşumları da görülür. Rat, fare ve hamster'larda ana metabolik yol PK oluşumu olmasına rağmen kantitatif açıdan insanlardan daha az önemlidir. KF'in insanlarda %80'i, ratlarda %40'ı, farelerde %60'ı ve hamsterlarda %50'si PK yoluyla metabolize edilir. İnsanlarda KF'in sadece %1-2'si 8-hidroksilasyon yoluyla 1,3,7-trimetilürük aside dönüşür. Fare ve hamster'da bu miktar % 5-8'iken, ratta % 15'dir. Ratlarda aynı zamanda 1,3,7-trimetilürük asit trimetilallantoine metabolize edilir. KF rat, fare ve hamster'da insanlarda bulunmayan hidrofilik ürünlere metabolize edilir. Farelerde idrardaki bütün KF metabolitlerinin % 22'sinden daha fazlasını PK'in β -N-glukronid bileşiği oluşturur. İnsanlardakine zıt olarak deney hayvanlarında KF'in sülfür içeren metabolitleri de oluşur (Andersson ve ark 2005).

KF çok sayıda enzimin rol oynadığı karmaşık bir metabolizmaya sahiptir (Şekil 2.1, Rostami-Hodjegan ve ark 1996, Magkos ve Kavouras 2005). KF metabolizmasında karaciğer dışı CYP1A1 enziminin rol oynadığı bildirilmiş olmasına rağmen bunun katkısı sınırlıdır. Ayrıca, KF'in 3-demetilasyonunda CYP2E1 enziminin etkisi önemsiz düzeydedir (Rostami-Hodjegan ve ark 1996).



Şekil 2.1. Kafein metabolizması (Rostami-Hodjegan ve ark 1996, Magkos ve Kavouras 2005).

137X; 1,3,7-trimetilksantin (kafein), 137U; 1,3,7-trimetilürat, 13X; 1,3-dimetilksantin (teofilin), 17X; 1,7-dimetilksantin (paraksantin), 37X; 3,7-dimetilksantin (teobromin), 13U; 1,3-dimetilürik asit, 17U; 1,7-dimetilürik asit, 37U; 3,7-dimetilürik asit, 1X; 1-metilksantin, 3X; 3-metilksantin, 7X; 7-metilksantin, 1U; 1-metilürat, 3U; 3-metilürat, AFMU; 5-asetilamino-6-formilamino-3-metilurasil, AAMU; 5-asetilamino-6-amino-3-metilurasil, Z; paraksantinden oluşan bilinmeyen ara metabolit, KO; ksantin oksidaz, FMO; filavin içeren monooksijenaz, ?; enzim/lerin bilinmemesi, *; minimum düzeyde etkisinin olduğunu veya hiçbir bilgi olmadığını ifade eder ve eşitliklerde yer almaz, **; 1X oluşumunda teofilin metabolizmasından çok paraksantin metabolizması önemli olduğundan sadece teofilin eliminasyonunun belirleneceği durumlarda dikkate alınması gerektiğini ifade eder.

2.2.3. Kafeinin karaciğer metabolik kapasitesi ve bazı enzim aktivitelerinin belirlenmesinde kullanımı

KF, toksisitesinin ve proteine bağlanma oranının düşük olması, test dozlarında doza bağımlı farmakokinetik özellik göstermemesi, oral uygulamadan sonra hızlı ve tam emilmesi, metabolizmasının karaciğer kan akımından etkilenmemesi ve önemli ölçüde karaciğere bağımlı olması ve kolayca bulunabilmesi nedeni ile (Kalow ve Tang 1993, Rostami-Hodjegan ve ark 1996) **CYP1A2** (Grant ve ark 1983b, Campbell ve ark 1987, Kalow ve Tang 1993), **CYP2A6** (Grant ve ark 1983b, Bendriss ve ark 2000, Bechtel ve ark 2000, Nowell ve ark 2002), **ksantin oksidaz** (KO, Grant ve ark 1983b, Aklillu ve ark 2003) ve **N-asetiltransferaz 2** (NAT2, Grant ve ark 1983b, Cascorbi ve ark 1985, Carrillo ve Benitez 1994, Asprodini ve ark 1998) enzimlerinin eşzamanlı olarak fenotiplerinin belirlenmesinde ve **karaciğer fonksiyonunun (karaciğerin metabolik kapasitesinin)** tespitinde (Cornelius 1987, Barstow ve Small 1990, Tanaka ve ark 1992a, b, c, d, Tanaka ve Bremier 1997, Jodynis-Liebert ve ark 2004) yaygın şekilde kullanılan prob ilaçtır. KF aynı zamanda ideal bir prob ilaçta bulunması gereken birçok özelliği de taşır (Zaigler ve ark 2000, Fuhr ve ark 2007).

KF, CYP1A2 enzim aktivitesinin belirlenmesinde en çok tercih edilen prob ilaçlardandır. CYP1A2, önemli oranda karaciğerde sentezlenir ve enzim aktivitesi bireyler arasında 60 kat farklılık gösterebilmektedir. Bu farklılık, genetik (özellikle indüklenmesinde) ve genetik olmayan (sigara içme, ırk, cinsiyet, diyet, hastalık, ilaç kullanımı gibi) faktörlerden kaynaklanır (Guengerich 1995, Zaigler ve ark 2000, Hamdy ve ark 2003). Enzim aktivitesinde oluşan değişimlerin gözlenmesi ile özellikle bazı kanser tiplerine ve ilaçlara karşı bireysel duyarlılık, karaciğer fonksiyonu ve substratlarının tahmini kan konsantrasyonları belirlenebilir (Zaigler ve ark 2000). Enzim; benzimidazoller, KF, TF, fenasetin, asetaminofen, verapamil, haloperidol, aminopirin, antipirin, aflatoksinler, karsinojenik aromatik aminler olmak üzere çoğu ilaç ve toksik/karsinojenik maddelerin metabolizmasında yer alır (Tanaka ve Breimer 1997, Ozawa 1999, Tanaka 2001, Velik ve ark 2004).

KF kullanılarak CYP2A6 ve KO enzim aktivitelerinin belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalar, CYP1A2 enzime göre daha azdır. CYP2A6 aktivitesinde cinsiyet, sigara içme ve oral kontraseptif kullanımı durumlarında herhangi bir farklılık olmamasına rağmen, yaş (Krul ve Hageman 1998, Nowell ve ark 2002) ve ırkın (Grant ve ark 1983b, Nowell ve ark 2002) etkisi tartışmalıdır. Enzim öncelikli olarak nikotin (Messina ve ark 1997) ve

kumarinin (Oscarson 2001) biyotransformasyonunda yer alır. Aflatoksin B1 (Begas ve ark 2007) ve 3-metilindol (Thornton-Manning ve ark 1996) gibi prokarsinojen ve promotajenleri aktive eder. Ayrıca N-nitrozodietilamin gibi nitrozaminler (Camus ve ark 1993) ile klormethiazol, metoksifluran, halotan, valproik asit ve disulfiram gibi ilaçların metabolizmasında da rol oynar. Enzim, barbitüratlar tarafından indüklenir (Nowell ve ark 2002). Yüksek enzim aktivitesi karaciğer ve kolorektal kanser riski ile ilişkilidir (Oscarson 2001).

KO, endojen purin ve pirimidinlerin oksidasyonu ile tiopurinler ve metilksantinler gibi ilaçların metabolizmasında yer alan sitoplazmik bir enzimdir (Begas ve ark 2007). Enzim polimorfik olmamasına rağmen erişkin bireyler arasında enzim aktivitesinin 2-4 kat farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Kashuba ve ark 1998). Enzim aktivitesi cinsiyet (Kalow ve Tang 1991, Aklillu ve ark 2003) ve sigara içme durumlarında (Aklillu ve ark 2003) genellikle değişmez. Ancak, bazı çalışmalarda enzim aktivitesinin sigara içen bireylerde (Vistisen ve ark 1991) ve dişilerde (Relling ve ark 1992) arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, Etiyop (%4, Aklillu ve ark 2003), Kafkas (%20, Guercioli ve ark 1991), Japon (%11, Saruwatari ve ark 2002) ve İspanyol (%4, Carrillo ve Benitez 1994) popülasyonlarında KO enzimi yönünden yavaş metabolizör bireylerin varlığı da bildirilmiştir.

KF, NAT2 enzim aktivitesinin belirlenmesinde de en çok tercih edilen prob ilaçlardan biridir. NAT2, faz II reaksiyonlarda yer alan ve çeşitli karsinojen maddelerin detoksifikasyonunu (Kashuba ve ark 1998) ve dapson, sülfonamidler, prokainamid, hidralazin ve izoniazid gibi ilaçların asetilasyonunu katalize eden bir enzimdir (Gu ve ark 2005). NAT-2 enzimi polimorfiktir ve bireyler enzim aktivitesi yönünden yavaş ve hızlı asetilatördürler. Kafkaslıların %50-60'ı, Japonların %10-20'si ve Kuzey Afrikalıların %90'ı yavaş asetilatördür (Marchand ve ark 1996, Iyer ve Ratain 1998). NAT2 polimorfizmi klinik olarak bazı ilaçların yan etkileri (amonafid, sülfonamidler gibi) ve kansere duyarlılık yönünden önemlidir (Iyer ve Ratain 1998).

Yapısal, histolojik, statik, sentez ve ilaç metabolizma testleri (dinamik) karaciğer fonksiyonunun değerlendirilmesinde yaygın şekilde kullanılır. Yapısal, histolojik, statik ve sentez testlerin genellikle uygulama zorluğu, güvenilir sonuç vermeme gibi problemleri vardır. Karaciğerin metabolik kapasitesinin değerlendirilmesinde lidokain biyotransformasyon hızı, aminopirin ve antipirin solunum testleri gibi çok sayıda ilaç metabolizma testi geliştirilmiştir (Barstow and Small 1990). Genellikle belirtilen bu testlerin pratikte kullanımı zordur ve zararlı bileşikler olduğundan tercih edilmezler. KF,

belirtilen maddelere üstünlüklerinin olması ve metabolizmasının tam olarak karaciğerde CYP450'ye bağlı monooksijenazlar tarafından gerçekleştirilmesi nedeniyle karaciğerin metabolik kapasitesinin belirlenmesinde ideal bir test maddesi olarak önerilmiştir (Holstege ve ark 1989, Scott ve ark 1989, Wahllander ve ark 1990, Cheng ve ark 1990, Tanaka ve ark 1992b, Ziebell ve Shaw-Stiffel 1995, Jover ve ark 1997).

KF'in EAA, total klerens, eliminasyon yarı ömrü gibi parametreleri ve metabolit/KF EAA (TB/KF, PK/KF, TF/KF) oranları karaciğerin metabolik kapasitesinin değerlendirilmesinde en çok tercih edilen değişkenlerdir. Ancak, prob ilaç uygulamalarında öncelikli amaç pratik ve bireye az rahatsızlık verici uygulamaların geliştirilmesidir. Bu amaçla klerens, eliminasyon yarı ömrü, EAA ve EAA (metabolit/KF) oranları gibi kan alımı ve yoğun örnek toplamayı gerektiren uygulamalar yerine daha az rahatsızlık veren, basit ve pratik testler (iki nokta analizi ile klerensin belirlenmesi, değişkenlerin salya örneklerinden tespiti, plazma ve idrar metabolik oranlarının kullanımı gibi) geliştirilmiştir (Rostami-Hodjegan ve ark 1996, Schmider ve ark 1999, Zaigler ve ark 2000).

Plazma KF klerensi, karaciğerin metabolik kapasitesinin (Desmond ve ark 1980, Renner ve ark 1984, Jost ve ark 1987, Cheng ve ark 1990) belirlenmesinde en çok kullanılan parametrelerden biri olmasına rağmen, klerensin çok nokta analizi ile belirlenmesi pratik değildir. Bu nedenle, bu parametrenin daha az örnekleme zamanıyla belirlenmesi (iki veya üç nokta analizi) kolaylaştırılmış bir metot olarak önerilmiştir (Jost ve ark 1987, Lewis ve Rector 1992, Tanaka ve ark 1992b, Wittayalertpanya ve ark 1996). Tanaka ve ark (1992b) tarafından insanlarda üç nokta analizi ile belirlenen KF klerensinin dokuz nokta ile belirlenen ile kuvvetli ilişki ($r= 0.988$, $P<0.001$) gösterdiği belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda, salya ve plazma KF eliminasyonu arasında kuvvetli ilişki [$r= 0.940$, $P\leq 0.05$ (Wahllander ve ark 1990); $r= 0.754$, $P\leq 0.0001$ (Lewis ve Rector 1992); $r_{\text{salya}}= 0.97$, $P\leq 0.0001$ (Carrillo ve ark 2000)] ortaya konulmuştur. Salya KF klerensi, basit ve bireyin rahatsızlık verici uygulamalara maruziyetinin düşük olması nedeniyle rutin olarak kullanımı önerilen metotlardandır (Zylber-Katz ve ark 1984, Scott ve ark 1989, Wahllander ve ark 1990, Lewis ve Rector 1992, Jover ve ark 1997).

Tanaka ve ark (1992b) tarafından karaciğer metabolik kapasitesinin değerlendirilmesinde KF biyotransformasyon yollarının kullanımı ile ilgili farklı oranlar [TB/KF, PK/KF, TF/KF, (TB+PK+TF)/KF gibi metabolik oranlar] önerilmiştir. Üç nokta

analizi ile belirlenen KF klerensi ile serum PK/KF (2. saat: $r = 0.903$, $P < 0.001$; 4. saat: $r = 0.911$, $P < 0.001$) ve (TB+PK+TF)/KF (2. saat: $r = 0.898$, $P < 0.001$; 4. saat: $r = 0.905$, $P < 0.001$) oranları arasında da kuvvetli ilişki tespit edilmiştir.

Ratlarda kimyasal maddelerle karaciğer hasarı oluşturularak yapılan çalışmada (Tanaka ve ark 1992a), KF uygulaması sonrası 1., 2. ve 4. saatlerde tespit edilen TB/KF, PK/KF ve TF/KF konsantrasyon oranları ile KF klerensi ($r = 0.74-0.96$, $P < 0.01$) arasında kuvvetli ilişki olduğu belirlenmiştir. Ratlarda seçici CYP450 enzim indükleyicileri verilerek yapılan diğer bir çalışmada da (Tanaka ve ark 1992c) KF uygulaması sonrası 1. saatte belirlenen TB/KF, PK/KF ve TF/KF konsantrasyon oranları ile KF klerensi (sırasıyla $r = 0.989$, $r = 0.959$, $r = 0.986$, $P < 0.01$) ve eliminasyon yarı ömrü (sırasıyla $r = -0.908$, $r = -0.881$, $r = -0.892$, $P < 0.01$) arasında kuvvetli ilişki olduğu ortaya konulmuştur.

İnsanlarda KF ile CYP1A2 aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ölçütlerin geçerlilik kriterlerinde güncel durumlar Tablo 2.8’de belirtildi (Zaigler ve ark 2000, Han ve ark 2001, Jodynis-Liebert ve ark 2004). KF ile CYP1A2 aktivitesinin ölçülmesinde ideal metot, KF’in enzim tarafından metabolize edilen kısmının (kısmi klerens) belirlenmesidir. Ancak, pratik olmaması nedeni ile *in vivo* uygulaması sınırlıdır (Kalow ve Tang 1993). İnsanlarda CYP1A2 aktivitesinin ölçülmesinde diğer güvenilir parametreler, EAA ve KF klerensinin belirlenmesidir (Rostami-Hodjegan ve ark 1996).

İnsanlarda KF’in total klerensi (Cl_T)’nin yaklaşık %90’ı CYP1A2 enzimi ile gerçekleştirildiğinden enzim aktivitesinin belirlenmesinde Cl_T kullanılabilir. Plazma örneklerinden hesaplanan Cl_T , salya örneklerinden hesaplanan Cl_T ile yüksek derecede ilişkili ($r = 0.947-0.99$) bulunmuştur (Fuhr ve ark 1996). *In vivo* ve *in vitro* CYP1A2 aktivitesinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, salya ve plazma örneklerinden hesaplanan Cl_T ’in, immunoreaktif CYP1A2 protein miktarı (plazma; $r = 0.77$, $P < 0.005$, salya; $r = 0.82$, $P < 0.001$) ve KF’in (3-demetilasyon yolu) *in vitro* intrinsik klerensi (Cl_{int}) (plazma; $r = 0.74$, $P < 0.005$, salya; $r = 0.82$, $P < 0.001$) ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Fuhr ve ark 1996). Butler ve ark (1989) KF’in 3-demetilasyonunun insan karaciğer mikrozomlarındaki immunoreaktif CYP1A2 miktarı ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bu nedenlerle, KF Cl_T ’i, KF’in CYP1A2 enzimi tarafından oluşturulan kısmi klerensine alternatif bir metot olarak kullanılabilir (Streetman ve ark 2000).

CYP1A2 aktivitesinin belirlenmesinde, KF’in verilmesinden sonraki 3. ve 6. saatlerde plazma veya salya örneklerinde belirlenen PK (17X) konsantrasyonunun KF

Tablo 2.8. Kafein ile CYP1A2 enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ölçütlerin geçerlilik kriterlerinde güncel durumlar (Zaigler ve ark 2000, Han ve ark 2001, Jodynis-Liebert ve ark 2004).

Test/Parametre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Total klerens	+	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	uo	+	+	-	-	+
Kafein solunum testi	+	?	+	+	?	+	+	+	?	+	?	uo	-	+	-	+	-
Kafein 3-demetilasyonunu temel alan idrar metabolit oranları	-	-	+	±	?	+	+	+	?	+	+	uo	-	-	+	+	+
Paraksantin metabolizmasını temel alan idrar metabolit oranları	-	-	±	±	?	+	+	+	?	?	?	uo	-	-	+	+	+
Plazma paraksantin/kafein oranı	+	+	+	?	?	+	+	+	?	+	+	+	+	+	-	+	+
Salya paraksantin/kafein oranı	+	+	+	?	?	+	+	?	?	+	+	uo	±	+	+	+	+

+: Geçerlilik kriterlerini yerine getirmesi, -: Geçerlilik kriterlerini yerine getirmemesi, ±; Çelişkili sonuçların olması, ?; Veri olmaması, uo; Uygulanabilirliğinin olmaması

1: Karaciğer fonksiyonuyla ilişkisi, 2: Karaciğerdeki miktarıyla ilişkisi, 3: Kafeinin fraksiyonel klerensiyle ilişkisi, 4: Diğer fenotipik prosedürler ile ilişkisi, 5: Diğer enzim substratlarının varlığında enzim aktivitesinin azalması, 6: Enzim inhibitörlerinin varlığında enzim aktivitesinin azalması, 7: Enzim indükleyicilerinin varlığında enzim aktivitesinin artması, 8: Karaciğer bozukluğu bulunan bireylerde enzim aktivitesinin azalması, 9: Karaciğer yokluğunda metabolizmanın olmaması, 10: *In vitro* özgünlüğü, 11: Yeniden üretilebilirliği, 12: Genetik poliforfizmleri yansıtması, 13: Testte yanlıya yol açabilecek faktörlerden etkilenmemesi, 14: Analitik ölçümün geçerliliği, 15: Kullanılan yöntemlerin bireylere etkisi ve toksisitesinin düşük olması, 16: Bireylere kolayca uygulanabilir olması, 17: Teknik kullanımının kolay olması.

(137) konsantrasyonuna oranı da kullanılmaktadır. Bu oran, KF'in Cl_T , immunoreaktif CYP1A2 protein miktarı ve *in vitro* Cl_{int} (3-demetilasyon yolu) ile yüksek oranda ilişkili bulunmuştur (Fuhr ve ark 1996).

Enzim aktivitesinin belirlenmesinde, KF uygulamasından sonraki 5-7. saatlerde (özellikle 6. saat) toplanan plazma ve salya örneklerindeki PK/KF oranı güvenilir metot olarak kullanılır. Bu oran, uygulama sonrası örnek toplama zamanı ve CYP1A2 aktivitesinden etkilenir (Rostami-Hodjegan ve ark 1996). PK, CYP1A2 enziminin hem substratı hem de ürünü olduğundan PK/KF oranının amacı PK oluşumunu ölçmektir. Sonuç olarak, örnek toplama zamanı uzadıkça PK konsantrasyonları PK oluşumunu yansıttığından örnek toplama zamanının kritik önemi vardır (Streetman ve ark 2000).

KF'in idrar metabolik-metabolit oranları da enzim aktivitesinin belirlenmesinde tercih edilebilir (Tablo 2.9). Ancak, KF metabolizmasının karmaşık, metabolik-metabolit oranları arasında ilişkinin zayıf ve metabolitlerin böbreklerden atılımını etkileyen çok sayıda faktör olması nedeni ile enzim aktivitesinin belirlenmesinde bu oranların kullanımının uygun olmadığı bildirilmiştir (Streetman ve ark 2000). En iyi idrar metabolik-metabolit oranları (oran 3, 4 ve 5) arasından oran 4, idrar akımındaki farklılıklardan etkilenmediğinden diğerlerine göre daha üstün özellikte bir orandır (Rostami-Hodjegan ve ark 1996).

KF ve PK'in birlikte ölçülmesini gerektiren idrar metabolik oranları (oran 1 ve 2) idrar akımından etkilenir. Bu oranlar, idrar akımının yüksek ve değişmez olduğu durumlarda pratik bir öneme sahiptir. Oran 1 ve 2 kullanıldığında, nokta zamanda idrar toplanmalıdır. Nokta zamandan önce idrar toplanması yeterli bilgi vermez sonra toplanmasında ise önemi olmamaktadır (Rostami-Hodjegan ve ark 1996).

^{13}C ve ^{14}C KF solunum testleri enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılabilir. 2,5 μCi KF'i (1,3,7-trimetil- ^{14}C veya 1,3,7-trimetil- ^{13}C , 3mg/kg KF'e eşdeğer) oral yolla alan 10 bireyde solunum test sonuçları ve KF'in oral metabolik klerensi karşılaştırılmış ve metabolik klerens oranı, 1. ve 2. saatlerde solunum havasında belirlenen işaretlenmiş CO_2 miktarı ile ilişkili ($r= 0.90$) bulunmuştur (Kotake ve ark 1982). Testte, sadece 137X'in 3-demetilasyonunun ölçülmesinde ve 1,3-dimetilksantin veya 3,7-dimetilksantin kontaminasyonunun önlenmesinde örnek toplama zamanı önemlidir. Ayrıca bireylerin CYP1A2 bazal aktivitesini ölçmek için dinlenme halinde olmaları gerekir (Kalow ve Tang

1993). Ancak, testin uygulama zorluğu, özel bir ekipmana gerek duyma ve radyoaktif madde kullanım gerekliliği gibi problemleri mevcuttur (Streetman ve ark 2000).

Tablo 2.9. CYP1A2, NAT2, CYP2A6 ve KO enzim aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan kafeinin idrar metabolik-metabolit oranları

Enzim	İdrar metabolik-metabolit oranı	Parametre	Kaynak
CYP1A2	Oran 1	17X/137X	Kadlubar ve ark 1990
	Oran 2	17U+17X/ 137X	Butler ve ark 1992
	Oran 3	AFMU+1X+1U/17X	Grant ve ark 1983a
	Oran 4	AFMU+1X+1U/17U	Campbell ve ark 1987
	Oran 5	AFMU+1X+1U+17X/137X	Notarianni ve ark 1995
	Oran 6	13X+17X+37X/137X	Tanaka ve ark 1992b
NAT2	Oran 7	AFMU/1X	Grant ve ark 1983a
	Oran 8	AFMU/1X+1U	Tang ve ark 1991
	Oran 9	AFMU/1X+1U+AFMU	Tang ve ark 1991
CYP2A6	Oran 10	17U/17X	Grant ve ark 1983b
KO	Oran 11	1U/(1U+1X)	Kalow ve Tang 1991

137X; 1,3,7-trimetilksantin (kafein), 13X; 1,3-dimetilksantin (teofilin), 17X; 1,7-dimetilksantin (paraksantin), 37X; 3,7-dimetilksantin (teobromin), 17U; 1,7-dimetilürük asit, 1X; 1-metilksantin, 1U; 1-metilürat, AFMU; 5-asetilamino-6-formilamino-3-metilurasil, NAT2; N-asetiltransferaz 2, KO; Ksantin oksidaz.

Yüksek dozda, doza bağımlı farmakokinetik gösterdiğinden, KF ile fenotipin belirlenmesinde KF'in düşük dozları tercih edilmelidir. KF'in idrar metabolik-metabolit oranları ile Cl_T arasındaki ilişkinin nispeten düşük dozlardan ($r= 0.85$) yüksek dozlara ($r= 0.5$) gidildikçe azaldığı belirlenmiştir (Streetman ve ark 2000).

CYP1A2 oranları ile karşılaştırıldığında NAT2 enzimi için kullanılan idrar metabolit oranları enzim aktivitesine spesifik ve daha duyarlıdır (Tablo 2.9). Metabolizma ve metabolitlerin oluşumu, ksantin oksidaz ve CYP1A2 enzimleri ile gerçekleştirildiğinden oran 7, NAT2 enzim aktivitesinin belirlenmesinde en az duyarlı olandır. İlaç metabolizmasında hem CYP1A2 hem de NAT2 enziminin birlikte rol oynadığı durumlarda enzim aktivitelerinin kombine etkisini belirleyebilir. Oran 7 ve 8'in bilinmeyen ara metabolitten 1X oluşum oranına duyarlı olması ve bu reaksiyonun enzimolojisinin

bilinmemesi nedeni ile oran 9, NAT2 aktivitesinin ölçülmesinde en iyi parametredir (Rostami-Hodjegan ve ark 1996).

KF kullanılarak enzim aktivitelerinin ve karaciğerin metabolik kapasitesinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışmalar günümüzde hayvanlardan çok insanlarda gerçekleştirilmiştir. Bazı memeli türlerinde KF ile CYP1A enzim aktivitesi (Danielson ve Golsteyn 1996) ve özellikle karaciğerin metabolik kapasitesi belirlenmiştir (Cornelius 1987, Aramaki ve ark 1991, Boothe ve ark 1994, Golden ve ark 1994, De Graves ve ark 1995, Danielson ve Golsteyn 1996, Peck ve ark 1997, Janus ve Antoszek 2000). Karaciğerin metabolik kapasitesinin ölçülmesinde KF'in plazma klerensinin kullanımıyla ilgili rat (Tanaka ve ark 1992a, c, d), köpek (Boothe ve ark 1994, Golden ve ark 1994), at (Aramaki ve ark 1991, Peck ve ark 1997), koyun (Danielson ve Golsteyn 1996) ve sığırlarda (De Graves ve ark 1995, Danielson ve Golsteyn 1996, Janus ve Antoszek 2000) yapılan çalışmalar mevcuttur. Koyun ve sığırlarda KF kullanılarak CYP1A enzim aktivitesi fenotipik yönden tespit edilmiştir (Danielson ve Golsteyn 1996).

İnsanlarda ilaç metabolizmasında rol alan enzimlerin aktivitelerinde etnik farklılıkların varlığı birçok çalışmada gösterilmiş olmasına rağmen (Bertilsson ve ark 1995, Sowinski ve ark 1996) hayvanlarda ırklar arası karşılaştırılması ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur (Depelchin ve ark 1988, Diliberto ve ark 1999, Dacasto ve ark 2005, Giantin ve ark 2006). Yapılan literatür incelemelerinde, koyun ırkları arasında CYP450 enzim aktivitelerinin belirlenmesi ile ilgili *in vitro* ve *in vivo* yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır.

Bu çalışmada, klinik olarak sağlıklı Morkaraman, Akkaraman ve Orta Anadolu Merinosu koyun ırklarında KF ve ana metabolitlerinin (TB, PK ve TF) farmakokinetik özelliklerinin, fenotipik yönden karaciğerin metabolik kapasitesinin ve CYP1A2 enzim aktivitesinin KF'in EAA, klerens, yarılanma ömrü, EAA ve metabolik oran (metabolit/KF) parametreleri kullanılarak belirlenmesi amaçlandı.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Kullanılan Alet ve Malzemeler

- Derin dondurucu (-20 °C, Beko, Türkiye)
- Oto Analyzer (Prestige 24i, Thomas TMS 1024, Tokyo Boeki Medical System, Japan)
- pH metre (İnolab, WTW series, Terminal 740, Germany)
- Saf su sistemi (ELGA, Purelab Ultra, Ultra Genetic, England)
- Santrifüj (Sigma, 3K 18, Germany)
- Terazı (Metler Toledo, AG204, Switzerland)
- Uçurucu (TurboVap II evaporator, Zymark Corporation, Hopkinton, USA)
- Ultrasonik su banyosu (Bandelin Sonorex, RK 100 H, Germany)
- Vorteks (Thermolyne, Type 37600 mixer, USA)
- Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC, Thermo Electron Corporation, Finnigan Surveyor, SRVYR-PDA5 Detector, Autosampler, England)
- Kolon (Phenomenex, Gemini 5 µ C18 11ØA, 250 x 4.60 mm)
- Prekolon sistemi (Phenomenex, C18, 5 µ, 4.0 L x 2.0 ID mm)
- Naylon membran (Bio-crom, 47 mm * 0.45 µm, Sartolon polyamid)

3.2. Kimyasal Maddeler, Solüsyonlar ve Kitler

Asetonitril (Merck), metanol (Merck), sodyum asetat (Merck), glasiyal asetik asit (% 100, Merck), ultra saf su (18 mΩ), KF (C1778, Sigma), TF (T1633, >%99, Sigma), PK (D-5385, %98, Sigma), TB (T4500, >%99, Sigma) ve 7-(β-hidroksietil)teofilin (βHE-Teofilin, H9006, Sigma) kullanıldı.

Hayvanlara uygulama için prob ilaç olarak Kafemin® enjeksiyonluk çözelti (kafein 300 mg+sodyum benzoat 250 mg/ml, 20 ml, Eczacıbaşı İlaç Sanayi, Türkiye) kullanıldı.

KF, TF, PK, TB ve βHE-Teofilin için stok solüsyonlar 1g/L olacak şekilde mobil fazda çözdürülerek hazırlandı ve çalışma süresince 4 °C’de tutuldu.

Sodyum asetat buffer, 25 mmol olarak hazırlanmış sodyum asetat ve asetik asit solüsyonlarının pH 4 olacak şekilde karıştırılmasıyla hazırlandı. Sıvı kromatografisine

uygulanmadan önce tüm solüsyon ve çözeltiler naylon membran (47 mm * 0.45 µm) filtreden geçirildi.

Karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri için ALT (Cormay), AST (Cormay), GGT (Cormay), ALP (Cormay), total protein (Cormay), total bilirubin (Cormay), üre (Spinreact) ve kreatinin (Cormay) kitleri kullanıldı.

3.3. Hayvan Materyali

Çalışmada sağlıklı oldukları tespit edilmiş her ırktan 10 hayvan olacak şekilde Morkaraman (MK, 34.70±1.16 kg, Erciş, Özel İşletme, Van), Akkaraman (AK, 41.70±2.54 kg, Özel işletme, Ilgın, Konya) ve Orta Anadolu Merinosu (OAM, 36.00±1.70 kg, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvancılık Araştırma ve Uygulama Merkezi, Konya) ırkı toplam 30 koyun (10-12 aylık, dişi) kullanıldı.

Hayvanlar herhangi bir ilaç uygulamasını önlemek için 2 ay boyunca aynı şartlarda bakım ve beslemeye alındı. Hayvanlara besleme süresince konsantre yem olarak toklu besi yemi ve arpa, kaba yem olarak saman ve şeker pancarı posası verildi.

DeneySEL uygulamalar AK ve MK ırklarında özel bir işletmede (Ilgın, Konya), OAM’nda Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvancılık Araştırma ve Uygulama Merkezi’nde gerçekleştirildi.

Denemeye başlamadan önce Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kuruluna yapılan başvuru sonrasında tüm çalışma sürecinde hayvanlar üzerinde gerçekleştirilecek işlemlerin uygunluğuna dair Etik Kurul onayı (No:2005/013, 2007/065) alındı.

3.4. DeneySEL Uygulamalar

KF (5 mg/kg) her koyuna damar içi yolla (*V. jugularis*) bolus enjeksiyon şeklinde uygulandı. Damar içi uygulamalar sabah 06.30-07.30 saatleri arasında yapıldı. İlaç uygulama öncesi (0) ve takibeden 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 24, 32 ve 48. saatlerde *V. jugularis*’e yerleştirilmiş kateter yardımıyla EDTA’lı tüplere kan örnekleri (5 ml) toplandı. Biyokimyasal değerlendirme için ilaç uygulamasından 48 saat önce kan örnekleri serum çıkarma tüplerine alındı. Örnekler bir saat içinde 3500 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen plazmalar -20 °C’de saklandı. Serumlar 24 saat içinde ölçüm yapılmak üzere biyokimyasal analiz için laboratuara gönderildi.

3.5. Plazma Örneklerinin Analiz İçin Hazırlanması

KF ve ana metabolitlerinin (TB, PK ve TF) plazma konsantrasyonları Christensen ve ark (2003) tarafından bildirilen metoda göre HPLC’de ölçüldü. 250 µl plazma örneği 2 ml’lik tüplere aktarılarak üzerine ekstraksiyondaki kayıpların değerlendirilmesi için internal standart olarak 25 µl βHE-Teofilin (10 mg/L) eklendi. Proteinlerin denatürasyonunu sağlamak amacıyla 750 µl asetonitril eklenerek 30 sn vortekste karıştırıldı ve 25 °C’de 13.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen üst faz temiz bir tüpe aktarılarak 40 °C’de nitrojen altında uçuruldu. Rezidü 200 µl mobil faz ile çözdürülerek 15 µl’i sisteme uygulandı.

3.6. Kafein ve Ana Metabolitlerinin Miktar Tayinleri

KF ve ana metabolitlerinin kantitatif tayinleri HPLC’de gerçekleştirildi.

Kolon	:	Phenomenex, Gemini 5 µ C18, 11ØA, 250 x 4.60 mm
Prekolon	:	Phenomenex, 5 µ C18, 4.0 L x 2.0 ID mm
Kolon sıcaklığı	:	25 °C
Mobil faz	:	25 mmol sodyum asetat buffer:metanol (70:30, v/v), pH 4
Akış hızı	:	1 ml/dak
Dalga boyu	:	273 nm
Dedektör	:	Diode array dedector (DAD)
Enjeksiyon hacmi	:	15 µl
Ahkonma zamanları	:	Teobromin : ~7. dk Paraksantin : ~10. dk Teofilin : ~12. dk βHE-Teofilin : ~13. dk Kafein : ~18. dk

3.7. Metot Validasyonu

Özgünlük, doğrusallık, ölçüm aralığı, geri kazanım, duyarlılık (tespit limiti ve hesaplanabilir limit) ve kesinlik metot validasyonunun belirlenmesinde performans ölçütleri olarak alındı.

3.7.1. Özgünlük (Specificity)

Tayin edilecek maddelerin analiz sonuçları ortamda bulunan başka maddelerden etkilenmemelidir. Özgünlük, kullanılan metodun örneklerde bulunan bileşiklerden herhangi biri ile etkileşim olmadan aranan maddelerin tayin edilebilmesidir.

Ana madde ve metabolitlerini içermeyen plazma (boş plazma) kullanılarak kromatogramda β HE-teofilin, KF ve ana metabolitlerinin alıkonma zamanlarında plazma ve diğer kaynaklı piklerin girişim yapıp yapmadığı incelendi.

3.7.2. Doğrusallık (Linearity)

Bir analitik prosedürün doğrusallığı (belirli sınırlar içerisinde) ölçülen sinyalin konsantrasyonu ile ne derece doğru orantılı olduğu ile belirlenir.

Çalışma boyunca kullanılacak standartlar, stok solüsyonların 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 10000 $\mu\text{g/L}$ 'lik dilüsyonları şeklinde günlük olarak hazırlandı. Standartların pik alanları tayin edildi. Konsantrasyonlar ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen pik alan değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrileri çizildi ve korelasyon katsayıları hesaplandı.

3.7.3. Geri kazanım (Recovery)

Ana madde ve metabolitlerini içermeyen plazma örneklerine KF, TF, PK ve TB içeren standart solüsyonların farklı miktarları (12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400 ng/ml) eklendi. Geri kazanımlar, herhangi bir numune gibi değerlendirilen plazma örneklerinde tayin edilecek maddelerin pik alanlarının standartların pik alanları ile karşılaştırılmasıyla hesaplandı.

3.7.4. Duyarlılık (Sensitivity)

Bir analitik yöntemin saptayabildiği en küçük konsantrasyon değeri olup tespit limiti [limit of detection (LOD)] ve hesaplanabilir limit [limit of quantification (LOQ)] olarak ifade edilir. LOD, analit sinyalinin geri plan gürültüden ayrılabilmesi için gereken en az analit miktarıdır. LOQ, analitin güvenilir bir şekilde doğru ölçümünün yapılabilmesi için gerekli en düşük miktardır. Tespit limiti olarak kromatogramın temel çizgisi üzerinde maddelerin oluşturdukları sinyallerin geri plan gürültüye oranının (S/G) 3 olduğu konsantrasyon, hesaplanabilir limit olarak ise sinyal/gürültü oranının 6 olduğu konsantrasyon düzeyi baz alındı.

KF ve ana metabolitlerinin en düşük standart solüsyonları (5, 10, 15, 25, 50 ng/ml) boş plazma örnekleri ile yüklendi. Kromatogram üzerinde S/G oranı 3 olan konsantrasyon LOD, S/G oranı 6 olan konsantrasyon LOQ olarak tespit edildi.

3.7.5. Kesinlik (Precision)

Bir analitik metodun birbirini takip eden ölçümleri arasındaki yakınlık derecesinin ifadesidir. Kesinlik parametresi standart sapma ve/veya varyasyon katsayısıyla (VK, relatif standart sapma) ifade edilir. Analitik yöntemin kesinliğinin belirlenmesi için istatistiksel açıdan yeterli sayıda aynı konsantrasyona sahip örnekler kullanılarak ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayıları tayin edilir.

Kesinlik için gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik (repeatability) ölçütü olarak kullanıldı. Gün içi ve günler arası farklılığın tespiti için standart solüsyonların ölçüm aralığında yer alan 3 farklı miktarı (25, 100, 800 ng/ml) ana madde ve metabolitlerini içermeyen plazma örneklerine eklendi. Her düzeyde 6 tekrarlı analiz yapıldı. Bu kademeler 3 farklı günde tekrarlandı. Tüm örneklerde konsantrasyon tayin edildi. Zenginleştirilmiş plazma örneklerindeki konsantrasyonlar üzerinden ortalama, standart sapma ve % varyasyon katsayısı hesaplandı. Tekrar edilebilirlik, pik alanlara karşılık gelen konsantrasyonların % varyasyon katsayılarının 15'den küçük olmasına göre değerlendirildi.

3.8. Biyokimyasal Parametrelerin Belirlenmesi

Koyunların karaciğer ve böbrek fonksiyonlarının belirlenmesinde serum aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), gamma glutamil transferaz (GGT), alkalen fosfataz (ALP), total bilirubin (Tbilirubin), total protein (Tprotein), üre ve kreatinin düzeyleri otoanalyzer cihazında ölçüldü.

3.9. Farmakokinetik Hesaplamalar

Her hayvanda KF ve ana metabolitlerinin plazma konsantrasyon-zaman eğrileri WinNonlin 4.1 (WinNonlin® Professional Version 4.1, Pharsight Corporation, Scientific Consulting Inc., North Carolina, USA) programı kullanılarak hazırlandı. Her hayvanın KF (damar içi bolus uygulama yolu) ve ana metabolitleri (damar dışı uygulama yolu) için farmakokinetik değişkenleri non-compartmental (bölmesiz) model analizi ile tayin edildi.

Her hayvanın KF için eliminasyon yarı ömrü ($t_{1/2\lambda_z}$), eğrinin altında kalan alan (EAA_{0-48}), dağılım hacmi (V_Z), klerens (Cl), birinci moment eğrisi altında kalan alan

(EMAA₀₋₄₈) ve ortalama kalış süresi (MRT₀₋₄₈) değişkenleri, ana metabolitleri için $t_{1/2\lambda_z}$, EAA₀₋₄₈, EMAA₀₋₄₈ ve MRT₀₋₄₈ değişkenleri WinNonlin® 4.1 programı kullanılarak hesaplandı.

Son ölçüm noktasına kadar olan eğrinin altında kalan alan (EAA₀₋₄₈) doğrusal trapezoidal (yamuk) yöntemle hesaplandı.

$$EAA \Big|_{t_1}^{t_2} = \delta t \times \frac{C_1 + C_2}{2} \quad (\text{Eşitlik 1})$$

Bu formülde t_1 ve t_2 , örnekleme zamanlarını; δt , t_1-t_2 ve C_1 ile C_2 , t_1 ve t_2 örnekleme zamanlarında KF ve ana metabolitlerinin plazma konsantrasyonunu ifade eder.

Eliminasyon hız sabiti (λ_z) terminal fazın doğrusallık gösteren kısmından doğrusal regresyon analiziyle tayin edildi. Eliminasyon hız sabiti regresyon doğrusunun eğimine eşittir.

KF ve ana metabolitlerinin $t_{1/2\lambda_z}$ ve MRT₀₋₄₈ değişkenleri ile KF'in Cl ve V_z değişkenleri aşağıdaki eşitlikler kullanılarak tayin edildi.

$$t_{1/2\lambda_z} = \frac{0.693}{\lambda_z} \quad (\text{Eşitlik 2})$$

$$MRT_{0-48} = \frac{EMAA_{0-48}}{EAA_{0-48}} \quad (\text{Eşitlik 3})$$

$$Cl = \frac{Doz}{EAA_{0-\infty}} \quad \text{veya} \quad Cl = 0.693 \frac{V_z}{t_{1/2\lambda_z}} \quad (\text{Eşitlik 4})$$

$$V_z = \frac{Doz}{\lambda_z \times EAA_{0-\infty}} \quad (\text{Eşitlik 5})$$

EMAA₀₋₄₈ birinci moment eğrisi altında kalan alandır.

$$EMAA \Big|_{t_1}^{t_2} = \delta t \times \frac{t_1 \times C_1 + t_2 \times C_2}{2} \quad (\text{Eşitlik 6})$$

KF ana metabolitlerinin doruk konsantrasyon (C_{doruk}) ve doruk konsantrasyona ulaştığı zaman (t_{doruk}) değerleri her hayvanın plazma konsantrasyon-zaman eğrisi üzerinde direkt bakı (gözlem değerlerinden) ile tayin edildi. Her ırk için C_{doruk} değerleri ortalama±standart sapma (SS) hesaplanarak belirtildi. t_{doruk} değerleri aralık gösterilerek ifade edildi.

3.10. Karaciğerin Metabolik Kapasitesinin ve CYP1A2 Enzim Aktivitesinin Fenotipik Yönden Belirlenmesi

Karaciğerin metabolik kapasitesinin değerlendirilmesinde;

- KF'in geçerliliği olan EAA_{0-48} , Cl ve $t_{1/2\lambda z}$ parametreleri,
- Metabolitlerin EAA_{0-48} değerleri toplamının KF'in EAA_{0-48} değerine oranı (TB+PK+TF/KF),
- TB ve TF'in EAA_{0-48} değerlerinin KF'in EAA_{0-48} değerine oranı (TB/KF, TF/KF) ve
- 3-16. saatlerde (3-16. saat aralığı, metabolitlerin oluşumunu tam olarak yansıttığından tercih edildi) alınmış kan örneklerinde metabolitlerin plazma konsantrasyonları toplamının KF konsantrasyonuna (TB+PK+TF/KF) oranları ve belirtilen saatlerdeki TB ve TF'in plazma konsantrasyonunun KF'in plazma konsantrasyonuna oranları (TB/KF, TF/KF) kullanıldı.

CYP1A2 enzim aktivitesini fenotipik olarak ifade etmek amacıyla PK ve KF'in EAA_{0-48} değerlerinin birbirine oranı (PK/KF) ve 3-16. saatlerdeki PK ve KF'in plazma konsantrasyonlarının birbirine oranı (PK/KF) kullanıldı.

Plazma metabolit/KF konsantrasyon oranları (3-16. saatler), metabolit/KF EAA_{0-48} oranları ve diğer geçerliliği olan parametreler (EAA_{0-48} , Cl, $t_{1/2\lambda z}$ gibi) arasındaki ilişkiler korelasyon katsayıları hesaplanarak belirtildi. Koyunlarda rutin laboratuvar analizlerinde hızlı sonuç elde edebilmek için en yüksek ilişkinin belirlendiği saatteki plazma metabolit/KF konsantrasyon oranlarının tam farmakokinetik profil çıkarılarak hesaplanan parametrelerin (EAA_{0-48} , Cl, $t_{1/2\lambda z}$ ve EAA_{0-48} oranları) yerine kullanılabilirliği değerlendirildi. Konu içerisinde en yüksek korelasyon katsayısının belirlendiği saatteki oranlar tartışıldı.

KF'in ana metabolitlerine dönüşüm oranlarının tespiti, her bir metabolitin EAA_{0-48} değeri, üç metabolitin EAA_{0-48} değerleri toplamına bölünerek (metabolit/TB+PK+TF) belirlendi. Ayrıca, her bir metabolitin 10. saatteki kan örneklerinde belirlenmiş plazma konsantrasyonunun üç metabolitin plazma konsantrasyonu toplamına bölünmesiyle elde edilen oranlar da (metabolit/TB+PK+TF) dönüşüm oranlarının tespiti için kullanıldı ve metabolit/TB+PK+TF EAA_{0-48} oranları ile ilişkisi korelasyon katsayısı belirtilerek ifade edildi.

3.11. İstatistik Analizleri

Tüm değerler ortalama \pm SS (standart sapma) olarak gösterildi. $t_{1/2\lambda z}$ ve MRT için harmonik ortalama hesaplandı. Bu parametreler arasındaki istatistiksel farklılıklar Minitab release 12.1 (Minitab[®] for Windows, Minitab Inc.) istatistik paket programı kullanılarak *Mann-Whitney U* testi ile belirlendi. Diğer farmakokinetik değişkenler, metabolik oranlar, metabolit dönüşüm oranları ve biyokimyasal parametreler arasındaki istatistiksel farklılıklar ise SPSS 10.0 (SPSS for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) istatistik paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Gruplar arası farklılıklar *Duncan testi* kullanılarak belirtildi.

Karaciğerin metabolik kapasitesinin ve enzim aktivitelerinin değerlendirilmesi açısından ölçülen parametreler (EAA_{0-48} , Cl, $t_{1/2\lambda z}$ ve EAA_{0-48} ve metabolik oranlar) arasındaki ilişkilerin derecesi, SPSS 10.0 istatistik paket programında *Pearson Correlation testi* ile korelasyon katsayıları hesaplanarak belirtildi.

KF ve ana metabolitleri için metodun gün içi ve günler arası farklılıklarının ifadesi olarak standart sapma ve % varyasyon katsayısı dikkate alındı. Tekrarlı analizlerde belirlenen konsantrasyonlar üzerinden tanımlayıcı istatistik yapılarak ortalama \pm SS ve % varyasyon katsayısı hesaplandı.

Tüm analizlerde güven aralığı %95 olarak kabul edildi. İstatistiksel anlamda önemlilik sınırı olarak $P<0.05$ değeri alındı.

4. BULGULAR

4.1. Metot Validasyonu

4.1.1. Özgünlük

Ana madde ve metabolitlerini içermeyen plazma örneklerinin HPLC sistemine uygulanması sonrasında kromatogram üzerinde β HE-teofilin, KF ve metabolitlerinin alikonma zamanlarında plazma kaynaklı pikler gözlenmedi (Grafik 4.1).

4.1.2. Doğrusallık

KF ve ana metabolitlerin stok solüsyonlarının 10-10000 $\mu\text{g/L}$ 'lik dilüsyonları şeklinde hazırlanan standartların 15 μl 'si HPLC sistemine enjekte edildi. Konsantrasyonlar ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen pik alan değerleri kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrileri ve hesaplanan korelasyon katsayıları Grafik 4.2'de gösterildi.

4.1.3. Geri Kazanım

Ana madde ve metabolitlerini içermeyen plazmalara standart solüsyonların farklı miktarları (12.5-6400 ng/ml) ile yükleme yapılarak hesaplanan ortalama geri kazanım değerleri TB için % 99.1 \pm 3.1, PK için % 99.7 \pm 3.4, TF için 100.3 \pm 2.2 ve KF için % 97.8 \pm 2.8 olarak belirlendi.

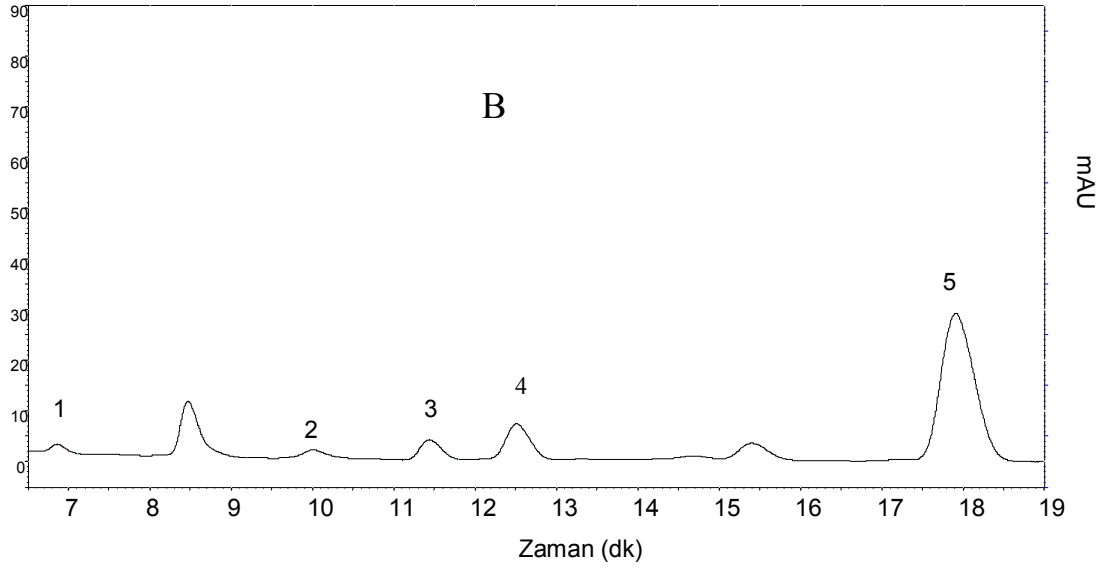
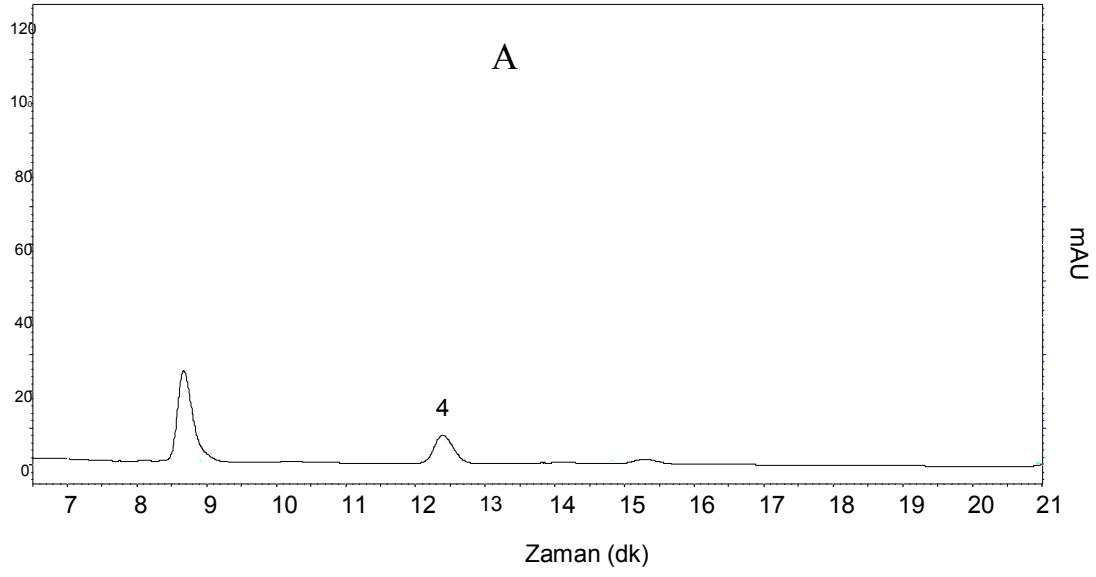
4.1.4. Duyarlılık

- **LOD:** S/G oranı 3'den büyük olan en düşük konsantrasyon TB, PK ve TF için 0.010 $\mu\text{g/ml}$ ve KF için 0.020 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edildi.

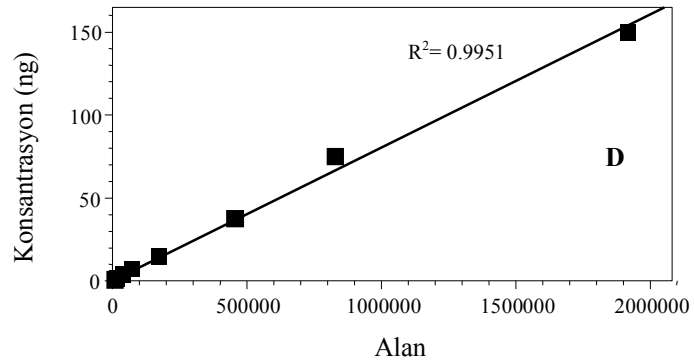
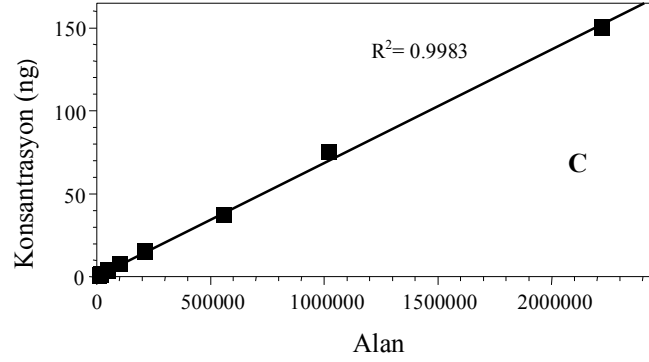
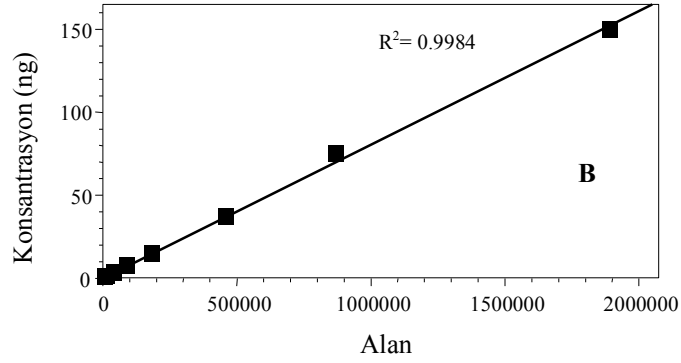
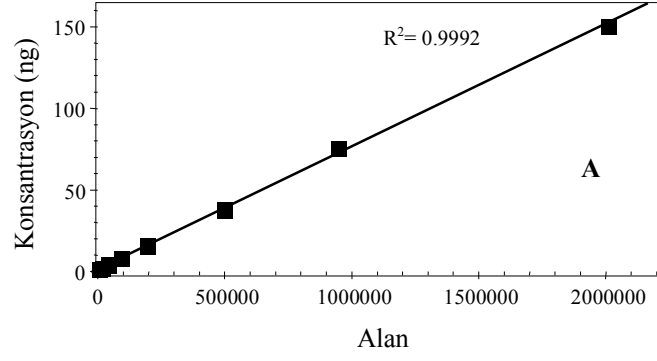
- **LOQ:** S/G oranı 6'dan büyük olan en düşük konsantrasyon TB ve PK için 0.015 $\mu\text{g/ml}$, TF ve KF için 0.025 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edildi.

4.1.5. Kesinlik

TB, PK, TF ve KF için zenginleştirilmiş plazma örneklerindeki pik alanlara göre belirlenmiş konsantrasyonlar üzerinden hesaplanan ortalama, standart sapma ve % varyasyon katsayısı değerleri Tablo 4.1'de belirtildi.



Grafik 4.1. Kafein ve ana metabolitlerinin HPLC kromatogramları, A; İnternal standart (İS) eklenmiş boş plazma örneği, B; 4. saat plazma örneği, 1; Teobromin, 2; Paraksantin, 3; Teofilin, 4; (İS) β HE-teofilin, 5; Kafein.



Grafik 4.2. Teobromin (A), paraksantin (B), teofilin (C) ve kafeinin (D) farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış standart çözeltilerinin (10-10000 µg/L) kalibrasyon doğruları ve korelasyon katsayıları.

Tablo 4.1. Kafein ve ana metabolitlerinin plazma keskinlik değerleri.

Yüklenen konsantrasyon (ng/ml)	TB			PK			TF			KF		
	Ölçülen konsantrasyon (ng/ml, ortalama)	SS	%VK	Ölçülen konsantrasyon (ng/ml, ortalama)	SS	%VK	Ölçülen konsantrasyon (ng/ml, ortalama)	SS	%VK	Ölçülen konsantrasyon (ng/ml, ortalama)	SS	%VK
Gün içi tekrar edilebilirlik												
25	24.83	1.17	4.71	25.33	0.63	2.49	25.67	0.86	3.35	24.05	0.94	3.91
100	98.5	3.87	3.93	99.17	4.26	4.30	100.5	2.51	2.50	97.83	2.64	2.70
800	797.50	20.03	2.51	798.33	18.96	2.37	802.67	19.20	2.39	787.16	26.11	3.32
Günler arası tekrar edilebilirlik												
25	24.17	1.54	6.37	24.61	1.05	4.27	25.22	1.42	5.63	25.06	1.47	5.87
100	97.94	3.47	3.54	100.06	4.17	4.17	100.17	5.28	5.27	98.89	4.28	4.33
800	790.50	33.83	4.28	801.39	29.30	3.66	791.39	52.00	6.57	775.72	60.13	7.75

TB; Teobromin, PK; Paraksantin, TF; Teofilin, KF; Kafein, SS; standart sapma, VK; varyasyon katsayısı.

4.2. Biyokimyasal parametreler

Koyunların karaciğer ve böbrek fonksiyonlarının izlenmesi için değerlendirilen biyokimyasal parametreler Tablo 4.2’de gösterildi. AST, ALT, ALP, total bilirubin ve kreatinin değerlerinin referans aralıklarda (Kaneko 1989, Rankins ve ark 1991, Karagül ve ark 2000, Kaya 2002, Dubreuil ve ark 2005) olmakla beraber ırklar arasında istatistiksel anlamda farklı olduğu belirlendi ($P<0.05$).

Tablo 4.2. Morkaraman, Akkaraman ve Orta Anadolu Merinosu koyun ırklarında bazı biyokimyasal parametreler ve sağlıklı koyunlardaki referans aralıkları (Kaneko 1989, Rankins ve ark 1991, Karagül ve ark 2000, Kaya 2002, Dubreuil ve ark 2005).

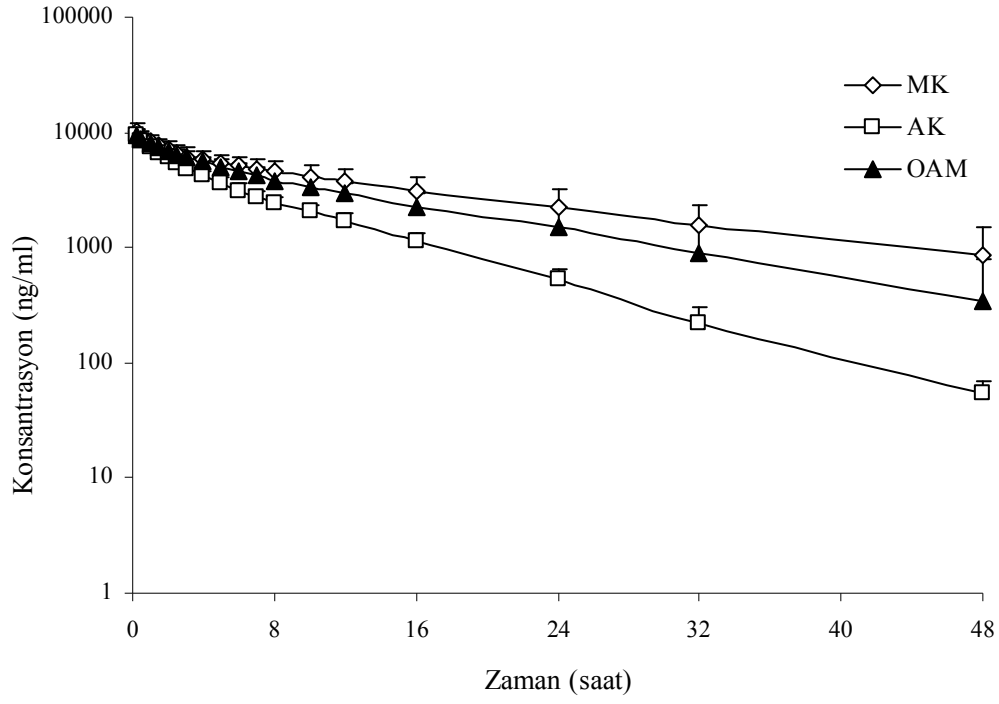
Parametre	Referans Aralık	MK	AK	OAM
AST (U/L)	20-60	40.00±9.58 b	53.00±4.19 a	41.50±7.35 b
ALT (U/L)	4-22	9.90±3.21 c	20.40±2.27 a	14.00±2.62 b
GGT (U/L)	20-52	48.20±15.77 a	43.00±6.06 a	45.20±5.53 a
ALP (U/L)	68-387	172.5±116.6 b	311.9±76.7 a	292.5±99.3 a
Tprotein (g/dl)	5.9-7.8	7.43±1.09 a	7.72±0.68 a	7.02±0.39 a
Tbilirubin (mg/dl)	0-0.5	0.08±0.04 a	0.00±0.00 b	0.01±0.03 ab
Üre (mg/dl)	17-43	27.80±8.34 a	32.10±3.41 a	26.30±5.89 a
Kreatinin (mg/dl)	0.6-2	0.60±0.05 b	0.67±0.07 a	0.64±0.05 ab

a, b, c; Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

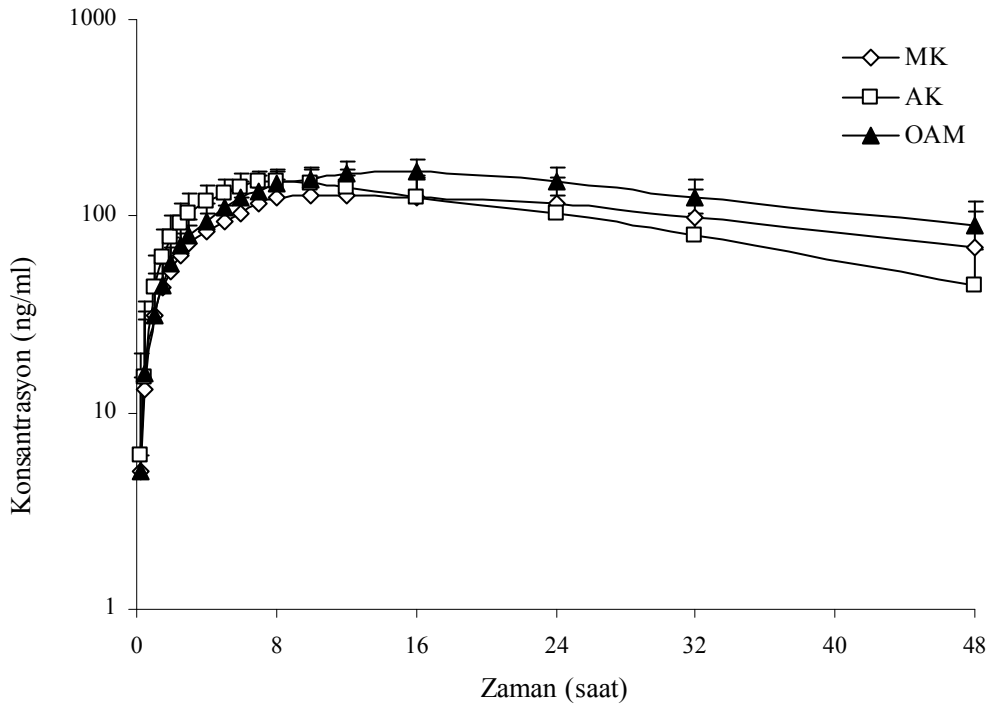
MK; Morkaraman, AK; Akkaraman, OAM; Orta Anadolu Merinosu, AST; aspartat aminotransferaz, ALT; alanin aminotransferaz, GGT; gamma glutamil transferaz, ALP; alkalin fosfataz, Tprotein; total protein, Tbilirubin; total bilirubin.

4.3. Farmakokinetik Parametreler

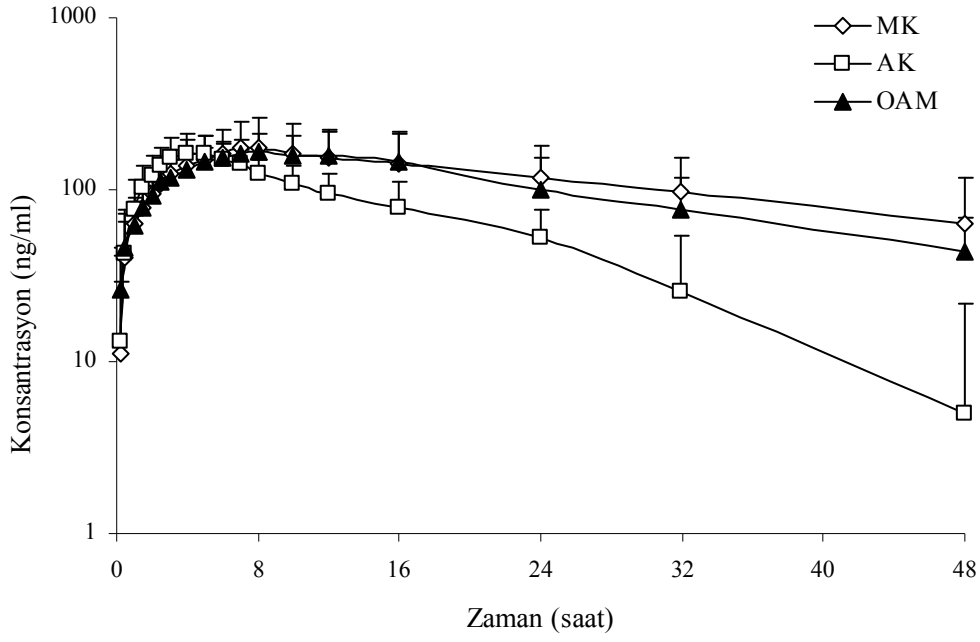
Morkaraman, Akkaraman ve Orta Anadolu Merinosu koyun ırklarında ana ilaç ve metabolitlerinin ortalama plazma konsantrasyon değerleri kullanılarak plazma konsantrasyon-zaman eğrileri çizildi (Grafik 4.3, 4, 5, 6).



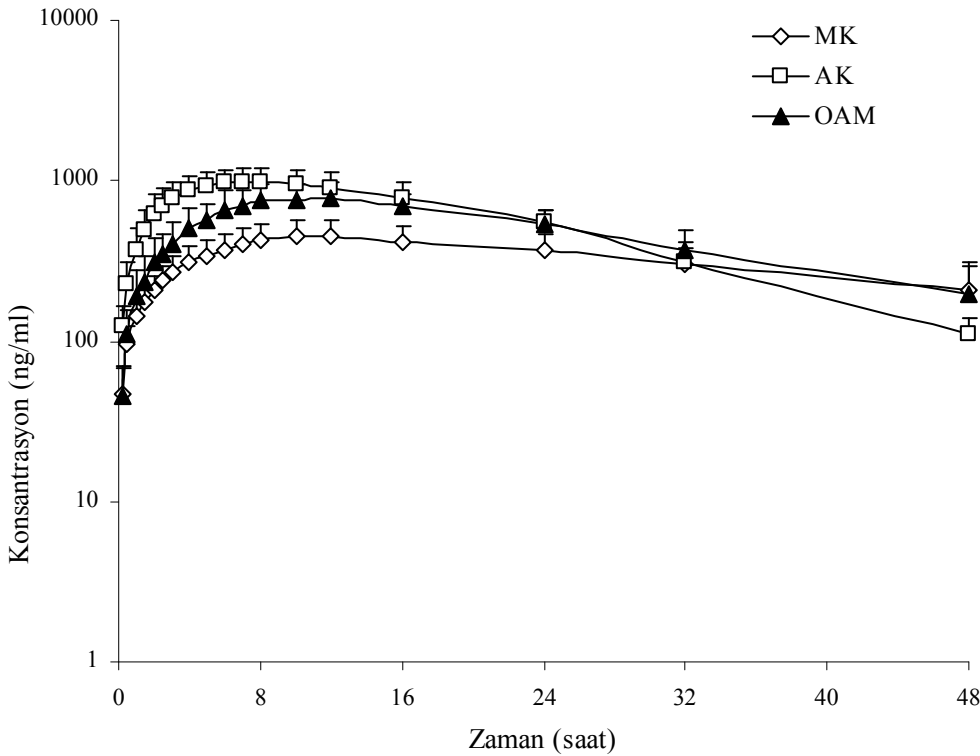
Grafik 4.3. Kafeinin Morkaraman, Akkaraman ve Orta Anadolu Merinosu ırkı koyunlara tek doz (5 mg/kg) damar içi uygulama sonrası çizilen yarı logaritmik plazma konsantrasyon-zaman eğrileri (n=10).



Grafik 4.4. Teobrominin Morkaraman, Akkaraman ve Orta Anadolu Merinosu ırkı koyunlarda kafeinin tek doz (5 mg/kg) damar içi uygulama sonrası çizilen yarı logaritmik plazma konsantrasyon-zaman eğrileri (n=10).



Grafik 4.5. Paraksantinin Morkaraman, Akkaraman ve Orta Anadolu Merinosu ırkı koyunlarda kafeinin tek doz (5 mg/kg) damar içi uygulama sonrası çizilen yarı logaritmik plazma konsantrasyon-zaman eğrileri (n=10).



Grafik 4.6. Teofilinin Morkaraman, Akkaraman ve Orta Anadolu Merinosu ırkı koyunlarda kafeinin tek doz (5 mg/kg) damar içi uygulama sonrası çizilen yarı logaritmik plazma konsantrasyon-zaman eğrileri (n=10).

Koyun ırklarında nonkompartmental model analiziyle kafein (Tablo 4.3) ve metabolitlerinin (Tablo 4.4) farmakokinetik parametreleri hesaplandı.

ırklar arasında KF'in $t_{1/2\lambda z}$ (HO), EAA_{0-48} , Cl, $EMAA_{0-48}$ ve MRT_{0-48} (HO) parametrelerinde istatistiksel anlamda önemli farklılıklar ($P<0.05$) tespit edilirken (Tablo 4.3) V_Z 'nin ırklar arasında benzer ($P<0.05$) olduğu görüldü.

Tablo 4.3. Kafeinin Morkaraman, Akkaraman ve Orta Anadolu Merinosu koyun ırklarında tek doz (5 mg/kg) damar içi uygulama sonrası bazı farmakokinetik parametreleri

Parametre	MK	AK	OAM
$t_{1/2\lambda z}$ (HO) (saat)	15.74±7.35 a	6.84±0.79 c	9.68±5.21 b
EAA_{0-48} (µg saat/ml)	149±38 a	60±6 c	103±30 b
V_Z (L/kg)	0.725±0.063 a	0.806±0.117 a	0.720±0.118 a
Cl (L/saat kg)	0.031±0.010 c	0.081±0.009 a	0.050±0.018 b
$EMAA_{0-48}$ (µg saat/ml)	2407±926 a	486±80 c	1322±706 b
MRT_{0-48} (HO) (saat)	14.87±2.37 a	7.93±0.81 c	11.38±3.03 b

a, b, c; Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

MK; Morkaraman, AK; Akkaraman, OAM; Orta Anadolu Merinosu, $t_{1/2\lambda z}$; eliminasyon yarı ömrü, EAA_{0-48} ; eğrinin altında kalan alan, V_Z ; dağılım hacmi, Cl; toplam plazma klerensi, $EMAA_{0-48}$; birinci moment eğrisi altında kalan alan, MRT_{0-48} ; ortalama kalış süresi, HO; harmonik ortalama.

ırklar arasında PK ve TF'in eliminasyon yarı ömürleri ile TB ve TF'in doruk konsantrasyonlarında istatistiksel anlamda farklılıkların ($P<0.05$) olduğu belirlendi (Tablo 4.4). Metabolitlerin doruk konsantrasyona ulaşma zamanlarının her ırk için geniş zaman aralığında olduğu görüldü (Tablo 4.4). Metabolitlerin EAA_{0-48} , $EMAA_{0-48}$ ve MRT_{0-48} (HO) parametrelerinde ırklar arasında istatistiksel anlamda farklılıklar ($P<0.05$) tespit edildi (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Kafeinin Morkaraman, Akkaraman ve Orta Anadolu Merinosu koyun ırklarında tek doz (5 mg/kg) damar içi uygulama sonrası teobromin, paraksantin ve teofilinin bazı farmakokinetik parametreleri.

Parametre	TB			PK			TF		
	MK	AK	OAM	MK	AK	OAM	MK	AK	OAM
$t_{1/2\lambda z}$ (HO) (saat)	32.81±16.25 a	22.81±11.76 a	28.47±18.42 a	30.11±15.10 a	10.28±5.381 c	20.56±10.16 b	27.50±16.96 a	10.77±3.00 c	14.91±4.77 b
C_{doruk} (µg)	0.140±0.032 b	0.162±0.025 ab	0.176±0.022 a	0.184±0.082 a	0.173±0.046 a	0.187±0.055 a	0.467±0.114 c	1.038±0.211 a	0.818±0.179 b
t_{doruk} (saat)	7-24	6-12	12-24	5-16	3-7	5-16	7-16	6-12	7-16
EAA_{0-48} (µg saat/ml)	4.76±1.53 b	4.52±1.00 b	6.03±0.81 a	5.39±2.78 a	2.55±1.19 b	4.96±1.86 a	15.75±4.15 b	25.15±5.14 a	22.82±4.21 a
$EMAA_{0-48}$ (µg saat/ml)	109±41 b	91±26 b	139±27 a	112±68 a	31±27 b	97±43 a	348±109 b	428±82 ab	457±109 a
MRT_{0-48} (HO) (saat)	22.52±1.68 a	19.64±2.28 b	22.88±1.85 a	19.86±2.45 a	10.56±2.88 b	18.42±2.83 a	21.78±1.91 a	17.04±0.89 c	19.64±2.26 b

a, b, c; Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

MK; Morkaraman, AK; Akkaraman, OAM; Orta Anadolu Merinosu, TB; Teobromin, PK; Paraksantin, TF; Teofilin, $t_{1/2\lambda z}$; eliminasyon yarı ömrü, C_{doruk} ; doruk konsantrasyon, t_{doruk} ; doruk konsantrastona ulaşma süresi, EAA_{0-48} ; eğrinin altında kalan alan, $EMAA_{0-48}$; birinci moment eğrisi altında kalan alan, MRT_{0-48} ; ortalama kalış süresi, HO; harmonik ortalama.

4.7. Karaciğerin Metabolik Kapasitesinin ve CYP1A2 Enzim Aktivitesinin Fenotipik Yönden Belirlenmesi

Plazma metabolit/KF konsantrasyon oranları (3-16. saatlerde), metabolit/KF EAA₀₋₄₈ oranları ve diğer geçerliliği olan parametreler (EAA₀₋₄₈, Cl, t_{1/2λz} gibi) arasındaki ilişkilerin derecesini belirlemek amacıyla hesaplanan korelasyon katsayıları Tablo 4.5’de verildi.

TF+PK+TB/KF EAA₀₋₄₈ oranı ile KF’in EAA₀₋₄₈ (r= -0.831) ve t_{1/2λz} (r= -0.723) parametreleri arasında negatif yönde, Cl (r= 0.896) ile arasında ise pozitif yönde korelasyon olduğu görüldü (Tablo 4.5). 3-16. saatlerdeki plazma konsantrasyon oranları (TB+PK+TF/KF) ile KF’in EAA₀₋₄₈ (r= -0.817), t_{1/2λz} (r= -0.699) ve Cl (r= 0.916) parametreleri arasında en yüksek korelasyon katsayısı 7. saatte, TB+PK+TF/KF EAA₀₋₄₈ oranı (r= 0.976) arasında ise 10. saatte tespit edildi (Tablo 4.5).

TB’in 3-16. saatlerdeki plazma konsantrasyon oranları (TB/KF) ile TB/KF EAA₀₋₄₈ oranı arasındaki en yüksek korelasyon katsayısı 12. saatte (r= 0.915) belirlendi (Tablo 4.5).

TF’in 3-16. saatlerdeki plazma konsantrasyon oranları (TF/KF) ile TF/KF EAA₀₋₄₈ oranı arasındaki en yüksek korelasyon katsayısı ise 10. saatte (r= 0.980) görüldü (Tablo 4.5).

CYP1A2 enzim aktivitesinin değerlendirilmesinde kullanılan PK’in 3-16. saatlerdeki plazma konsantrasyon oranları (PK/KF) ile PK/KF EAA₀₋₄₈ oranı arasındaki en yüksek korelasyon katsayısı 10. saatte (r= 0.855) tespit edildi (Tablo 4.5).

Karaciğerin metabolik kapasitesinin belirlenmesinde kullanılan KF’in EAA₀₋₄₈, t_{1/2λz} ve Cl parametrelerinde ırklar arasında istatistiksel anlamda farklılıkların (P<0.05) olduğu belirlendi (Tablo 4.3). EAA₀₋₄₈ ve en yüksek korelasyon katsayısının belirlendiği saatlerdeki plazma konsantrasyon oranlarında (TF+PK+TB/KF, TB/KF, TF/KF, Tablo 4.6) da KF’in parametrelerinde belirlendiğine benzer şekilde ırklar arasında istatistiksel farklılıkların (P<0.05) olduğu tespit edildi.

PK’in EAA₀₋₄₈ ve 10. saatteki plazma konsantrasyon oranlarında (PK/KF) ırklar arasında istatistiksel anlamda fark (P>0.05) bulunmadı (Tablo 4.6).

ırklar arasında metabolit dönüşüm oranlarının istatistiksel anlamda farklı (P<0.05) olduğu görüldü (Tablo 4.7). EAA₀₋₄₈ ve 10. saatteki plazma konsantrasyonları baz alınarak hesaplanmış en yüksek metabolit dönüşüm oranları TB için MK ve OAM ırklarında, PK için MK ırkında ve TF için AK ırkında belirlendi. EAA₀₋₄₈ (TB/TF+PK+TB, PK/TF+PK+TB, TF/TF+PK+TB) ve 10. saatteki plazma konsantrasyon oranları

(TB/TF+PK+TB, PK/TF+PK+TB, TF/TF+PK+TB) arasındaki ilişkinin derecesi için hesaplanan korelasyon katsayıları sırasıyla 0.954, 0.952 ve 0.797 ($P<0.01$) olarak tespit edildi (Tablo 4.7).

Tablo 4.5. Karaciğerin metabolik kapasitesi ve CYP1A2 enzim aktivitesinin fenotipik yönden değerlendirilmesinde kullanılan bazı farmakokinetik parametreler ve oranlar arasındaki ilişkiler.

Parametre (TF+PK+TB/KF)	KF			EAA ₀₋₄₈ (TF+PK+TB/KF)	TF		PK		TB	
	EAA ₀₋₄₈	t _{1/2λz}	Cl		Parametre (TF/KF)	EAA ₀₋₄₈ (TF/KF)	Parametre (PK/KF)	EAA ₀₋₄₈ (PK/KF)	Parametre (TB/KF)	EAA ₀₋₄₈ (TB/KF)
EAA ₀₋₄₈	- 0.831	- 0.723	0.896	-	-	-	-	-	-	-
3. saat	-0.782	-0.648	0.887	0.919	3. saat	0.934	3. saat	0.514	3. saat	0.755
4. saat	-0.804	-0.678	0.902	0.938	4. saat	0.957	4. saat	0.507	4. saat	0.796
5. saat	-0.795	-0.669	0.899	0.947	5. saat	0.962	5. saat	0.563	5. saat	0.812
6. saat	- 0.799	- 0.679	0.903	0.958	6. saat	0.969	6. saat	0.612	6. saat	0.844
7. saat	- 0.817	- 0.699	0.916	0.969	7. saat	0.978	7. saat	0.709	7. saat	0.862
8. saat	- 0.807	- 0.690	0.905	0.974	8. saat	0.976	8. saat	0.791	8. saat	0.905
10. saat	- 0.793	- 0.682	0.890	0.976	10. saat	0.980	10. saat	0.855	10. saat	0.898
12. saat	- 0.742	- 0.642	0.842	0.960	12. saat	0.964	12. saat	0.817	12. saat	0.915
16. saat	- 0.741	- 0.624	0.854	0.968	16. saat	0.974	16. saat	0.808	16. saat	0.915

Korelasyon katsayılarının her birinde $P < 0.01$ 'dir.

TB; Teobromin, PK; Paraksantin, TF; Teofilin, KF; Kafein, EAA₀₋₄₈; eğrinin altında kalan alan, t_{1/2λz}; eliminasyon yarı ömrü, Cl; toplam plazma klerensi.

Tablo 4.6. Karaciğerin metabolik kapasitesi ve CYP1A2 enzim aktivitesinin fenotipik yönden değerlendirilmesinde kafein ve ana metabolitlerinin EAA₀₋₄₈ değerleri ve 10. saat plazma konsantrasyonları (TB için 12. saat) baz alınarak hesaplanmış oranlar.

Parametre	MK	AK	OAM
EAA ₀₋₄₈ oranı			
TF+PK+TB/KF	0.187±0.055 c	0.542±0.136 a	0.351±0.114 b
TF/KF	0.127±0.060 c	0.423±0.109 a	0.241±0.096 b
PK/KF	0.041±0.019 a	0.043±0.020 a	0.048±0.012 a
TB/KF	0.037±0.014 c	0.077±0.024 a	0.058±0.014 b
10. saat			
TB+PK+TF/KF	0.197±0.092 c	0.592±0.181 a	0.345±0.132 b
TF/KF	0.123±0.070 c	0.465±0.148 a	0.249±0.113 b
PK/KF	0.042±0.019 a	0.053±0.020 a	0.048±0.010 a
TB/KF (12. saat)	0.036±0.014 c	0.088±0.035 a	0.063±0.022 b

a, b, c; Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

EAA₀₋₄₈; eğrinin altında kalan alan, MK; Morkaraman, AK; Akkaraman, OAM; Orta Anadolu Merinosu, TB; Teobromin, PK; Paraksantin, TF; Teofilin, KF; Kafein.

Tablo 4.7. Kafeinin EAA₀₋₄₈ ve 10. saatteki plazma konsantrasyonlarına göre hesaplanan ana metabolitlerine dönüşüm oranları.

Parametre	MK	AK	OAM
EAA ₀₋₄₈ oranı			
TF/TF+PK+TB	0.61±0.11 b	0.78±0.05 a	0.67±0.06 b
PK/TF+PK+TB	0.20±0.07 a	0.08±0.03 c	0.15±0.05 b
TB/ TF+PK+TB	0.18±0.04 a	0.14±0.03 b	0.18±0.02 a
Toplam	0.99	1.00	1.00
10. saat			
TF/TF+PK+TB	0.60±0.11 c	0.78±0.04 a	0.71±0.05 b
PK/TF+PK+TB	0.22±0.08 a	0.09±0.03c	0.15±0.04 b
TB/ TF+PK+TB	0.17±0.04 a	0.13±0.02 b	0.15±0.02 a
Toplam	0.99	1.00	1.01

a, b, c; Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

EAA₀₋₄₈; eğrinin altında kalan alan, MK; Morkaraman, AK; Akkaraman, OAM; Orta Anadolu Merinosu, TB; Teobromin, PK; Paraksantin, TF; Teofilin, KF; Kafein.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan literatür incelemelerine göre, prob ilaç KF kullanılarak farklı koyun ırklarında karaciğerin metabolik kapasitesi ve CYP1A2 enzim aktivitesinin belirlenmesi ile ilgili bu dizaynda hazırlanmış ilk çalışma olduğu söylenebilir. Çalışmada, MK, AK ve OAM ırklarında KF ve ana metabolitlerinin farmakokinetik özellikleri, karaciğerin metabolik kapasitesi ve CYP1A2 enzim aktivitesi belirlendi. Plazma metabolit/KF konsantrasyon oranlarının EAA₀₋₄₈ oranları ve KF'in EAA₀₋₄₈, t_{1/2λz} ve Cl parametreleri yerine pratik bir test olarak kullanımları değerlendirildi.

Çalışmada koyunların karaciğer ve böbrek fonksiyonlarının normal olup olmadığının tespiti için yapılan biyokimyasal testler sonucunda (Tablo 4.2), ırklar arasında AST, ALT, ALP, total bilirubin ve kreatinin değerleri istatistiksel anlamda farklı ($P<0.05$) olmasına rağmen sağlıklı koyunlar için belirtilen sınırlar arasında (Tablo 4.2) olduğu saptandı (Kaneko 1989, Rankins ve ark 1991, Karagül ve ark 2000, Kaya 2002, Dubreuil ve ark 2005). Bazı biyokimyasal parametrelerin (AST, ALT, ALP gibi) koyun ırkları arasında normal sınırlar içinde farklılık gösterdiği belirlenmiş ve bunun morfolojik ve fizyolojik değişikliklere bağlı olabileceği bildirilmektedir (Pastorova ve ark 2000).

KF ve ana metabolitlerinin plazmadan tayini, Christensen ve ark (2003) tarafından bildirilen metoda göre gerçekleştirildi. Belirtilen yöntemde KF ve PK tayini için metodun geçerliliği ortaya konulmuş olmasına rağmen, TB ve TF tayini üzerine herhangi bir sonuç bildirilmemiştir. Çalışmada, aynı zamanda metodun TB ve TF tayininde kullanılabilirliği ortaya kondu. Kullanılan yöntem, KF ve ana metabolitlerinin tayininde kullanılan diğer yöntemlere (Tse ve Szeto 1981, Butler ve ark 1992, Danielson ve Golsteyn 1996, Carrillo ve ark 2000, Wasfi ve ark 2000) göre hızlı, basit, pratik ve ekonomik olduğu için tercih edildi. Metodun TB, PK, TF ve KF için geri kazanımlarının yüksek (sırasıyla % 99.1±3.1, % 99.7±3.4, 100.3±2.2, % 97.8±2.8), tespit (TB, PK ve TF için 0.010 µg/ml, KF için 0.020 µg/ml) ve hesaplanabilir limitlerinin (TB ve PK için 0.015 µg/ml, TF, KF için 0.025 µg/ml) düşük ve tekrar edilebilirliklerinin (her bir madde için VK<%15) olduğu görüldü. Tüm bu validasyon sonuçları, KF ve ana metabolitlerinin tayininde kullanılan diğer metotlara benzerdi (Tse ve Szeto 1981, Butler ve ark 1992, Danielson ve Golsteyn 1996, Wasfi ve ark 2000, Carrillo ve ark 2000, Terziivanov ve ark 2003).

KF'in yüksek dozda (>5 mg/kg) doza bağımlı farmakokinetik gösterebilmesi ihtimalini bertaraf etmek (Bonati ve ark 1984-1985) ve koyunlarda *in vivo* CYP1A2 enzim

aktivitesinin belirlendiği çalışma (Danielson ve Golsteyn 1996) baz alınarak fenotipin belirleneceği bu çalışmada, KF 5 mg/kg dozunda uygulandı.

KF'in $t_{1/2\lambda z}$, EAA_{0-48} , Cl , $EMAA_{0-48}$ ve MRT_{0-48} parametrelerinin MK ve OAM koyunlarında AK ırkına göre ırk içi (bireylerarası) geniş varyasyon gösterdiği belirlendi (Tablo 4.3). Alınan KF'in en az % 98'i karaciğerde mikrozomal enzimler tarafından metabolize edilmektedir (Rostami-Hodjegan ve ark 1996) ve metabolizmada rol oynayan enzimlerde polimorfizmler belirlenmiştir (Tanaka 2001). MK ve OAM koyunlarında görülen bireylerarası farklılıklar, bu grupların farklı polimorfik enzim/enzimlere sahip bireylerden oluşmasına bağlı olabilir. Ayrıca, koyunların aynı ve/veya farklı ebeveynin yavruları olması, aynı ırktan ebeveynin farklı bir işletmeden temini gibi yetiştiricilikte üremeye yönelik yapılan uygulamalar da popülasyonun homojenliğini değiştirebilir. Aynı etnik kökene sahip insanlar arasında da KF'in bazı farmakokinetik parametrelerinde geniş farklılıkların olduğu tespit edilmiştir (Dorne ve ark 2001, Terziivanov ve ark 2003). Bu varyasyonların insanlara göre daha dar sınırlar içinde kalması, koyun popülasyonlarının insan popülasyonlarına göre daha homojen olması ve/veya metabolizmayı indükleyen ve inhibe eden maddelere daha az maruz kalmaları ile açıklanabilir.

Çalışmada, ırklar arasında KF klerensinin belirgin şekilde farklı ($P<0.05$) olduğu görüldü (Tablo 4.3). KF klerensi AK (0.081 L/saat kg) ırkında, MK (0.031 L/saat kg) ve OAM (0.050 L/saat kg) ırklarına göre sırasıyla %161 ve %62 oranında daha yüksek bulundu. KF klerensinin OAM ırkında Suffolk ırkı koyunlar (0.048 L/saat kg, Danielson ve Golsteyn 1996) ile benzer olduğu görüldü. KF gibi kapasite ile kısıtlı eliminasyon gösteren ilaçların klerensi, ilacın intrinsik klerensine (ilacı metabolize eden enzimlerin total etki kapasitesi) ve plazma proteinlerine bağlanma oranlarına bağlıdır (Barstow ve Small 1990). KF plazma proteinlerine düşük oranda (%10-33) bağlanır. Metabolizması önemli oranda (%98) karaciğerde gerçekleştiğinden klerens, ilacı metabolize eden enzimlerin total etki kapasitesinden daha çok etkilenir (Bonati ve ark 1984-1985). Buna bağlı olarak sağlıklı koyun ırklarında klerenste görülen bu ayrımların, KF'i metabolize eden enzimlerin total etki kapasitesindeki farklılıklardan kaynaklandığı söylenebilir. Ayrıca, KF'in plazmadan eliminasyon hızının ırklar arasında (türler ve bireyler arasında olduğu gibi) karaciğerin metabolik kapasitesinin değerlendirilmesinde bir parametre olarak kullanılabilceğini de gösterebilir.

Irklar arasında KF eliminasyon yarı ömrünün klerense uyumlu şekilde istatistiksel farklılık ($P<0.05$) gösterdiği tespit edildi (Tablo 4.3). KF'in $t_{1/2\lambda z}$, MK (15.74 saat) ırkında,

AK (6.84 saat) ve OAM (9.68 saat) ırklarına göre sırasıyla %130 ve %42 oranında daha uzundu. OAM'nda KF'in $t_{1/2\lambda z}$ Suffolk ırkı koyunlarda (8.9 saat) belirlenen sonuçlarla benzerdi (Danielson ve Golsteyn 1996). Farklı etnik kökene sahip insanlar arasında da metabolizmaya bağlı olarak bazı ilaçların eliminasyon yarılanma ömürlerinde farklılıkların olduğu ortaya konulmuştur (Bertilsson ve ark 1995). Eliminasyon yarı ömrü, Cl ve V_z parametrelerine bağlı bir değişkendir ve bu parametrelerdeki değişiklikler eliminasyon yarı ömrünü etkiler (Eşitlik 4). Irklar arasında dağılım hacminin benzer olması (Tablo 4.3), $t_{1/2\lambda z}$ 'nde görülen bu farklılıkların direkt klerens ile ilişkilendirilebileceğini yani metabolizmadaki farklılıklardan kaynaklandığını gösterir niteliktedir.

Antipirin de KF gibi karaciğerin metabolik kapasitesinin değerlendirilmesinde yaygın kullanılan ilaçlardan biridir (Vesell 1979). Blue White Belgian ve Friesian ırkı buzağılarda antipirinin dağılım hacminin benzer ve eliminasyon yarı ömrünün sırasıyla 4.9 ve 2.1 saat olduğu belirlenmiş, yarı ömründeki ayırımın metabolizmada rol oynayan enzimlerin aktivitelerindeki farklılıklardan veya hipertrofik kas özelliği bulunan Blue White Belgian buzağılarda kas/vücut oranındaki dengesizliğe bağlı olarak karaciğerin daha küçük olmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Depelchin ve ark 1988). Ancak, çalışmada kullanılan koyun ırkları ile ilgili kas/vücut oranı dengesizliği yönünden herhangi bir bilgiye rastlanmadı. Antipirinle yapılan diğer çalışmalarda da eliminasyon yarılanma ömrünün Dutch cüce keçilerde (0.6-0.97 saat) Nubian keçilerinden (2.58 saat) daha kısa olduğu (Witkamp ve ark 1989, 1990) ve bu durumun cüce keçilerdeki daha yüksek oranda biyotransformasyona bağlı olabileceği bildirilmiştir (Ali ve El Sheikh 1992). Ancak, Nubian keçilerinde antipirinin yarılanma ömrü Dutch melez keçilerinden farklı bulunmamıştır (Meesen ve ark 1986). Antipirinin çöl koyunlarındaki yarılanma ömrünün (4.04 saat), Lacaune koyunlarından (2.47 saat) keçilerde olduğu gibi karaciğer enzim aktivitesine bağlı olarak farklılık gösterdiği ifade edilmiştir (Ali ve El Sheikh 1992). Ancak, antipirin ile ilgili bu sonuçların çoğu farklı deneysel şartlar altında yürütülen çalışmalardan elde edilmiştir. Mevcut çalışma, aynı deneysel dizayn oluşturularak koyun ırklarında karaciğerin metabolik kapasitesinin ve KF'in farmakokinetiğinin karşılaştırılmasıyla ilgili ilk çalışma olması nedeniyle farklıdır.

KF'in EAA_{0-48} değerinin ırklar arasında istatistiksel olarak farklı ($P<0.05$) ve bu farklılıkların KF'in $t_{1/2\lambda z}$ ve Cl parametreleri ile uyumlu olduğu belirlendi (Tablo 4.3). KF'in EAA_{0-48} değeri MK ırkında (149 μg saat/ml) AK (60 μg saat/ml) ve OAM (103 μg saat/ml) ırklarına göre sırasıyla %148 ve %45 oranında daha büyüktü. KF'in EAA_{0-48}

değeri OAM ırkında Suffolk koyunlarda (106 µg saat/ml) tespit edilen ile benzerdi (Danielson ve Golsteyn 1996). Kafein V_Z 'nin ırklar arasında benzer olması aynı zamanda koyunlarda EAA_{0-48} değerinin de karaciğerin metabolik kapasitesinin belirlenmesinde güvenilir bir parametre olarak kullanılabileceğini gösterir niteliktedir. Ayrıca, kafein farmakokinetiği doza bağımlı (Bonati ve ark 1984-1985) olduğundan, özellikle MK ırkında tedavi dozlarında kafeinin doza bağımlı kinetik göstereceği düşünülebilir.

KF V_Z 'nin koyun ırkları arasında benzer olduğu görüldü. Ancak, üç ırkta da dağılım hacminde belirlenen bu sonuçlar (Tablo 4.3) Suffolk koyunlarında (0.56 L/kg) tespit edilenden nispeten yüksekti (Danielson ve Golsteyn 1996). KF, vücutta tüm biyolojik zarlardan kolay geçer ve dağılım hacmi hemen hemen gerçek dağılım hacmine (0.6 L/kg) yakındır (Magkos ve Kavouras 2005). KF V_Z 'nin genel olarak türler arasında birbirine yakın olduğu belirlenmiş ve türler arasındaki farmakokinetikteki farklılıkların dağılımdan çok klerense bağlı olduğu bildirilmiştir (Bonati ve ark 1984-1985). Değişik tipteki karaciğer hastalıklarında da KF dağılım hacminin farklılık göstermediği belirlenmiştir (Boothe ve ark 1994, Jodynis-Liebert ve ark 2004). Irklar arasında dağılım hacminin benzer olması nedeniyle KF'in $t_{1/2\lambda_z}$ ve EAA_{0-48} değerlerinde görülen farklılıkların türler arası farklılıklarda olduğu gibi dağılımdan çok klerensten kaynaklandığı söylenebilir. Ayrıca V_Z 'nin ırklar arasında benzer olması, kafeinin EAA_{0-48} ve $t_{1/2\lambda_z}$ 'nün koyunlarda da metabolik kapasitenin belirlenmesinde güvenilir parametre olarak kullanılabilirliklerini destekleyici niteliktedir.

Çalışmada, kafein ana metabolitleri için doz miktarının girilmesini gerektirmeyen (V_Z ve Cl , doz miktarının girilmesini gerektirir) farmakokinetik değişkenleri hesaplandı (Tablo 4.4). Irklar arasında PK ve TF'in $t_{1/2\lambda_z}$ 'nde istatistiksel anlamda farklılıkların ($P<0.05$) olduğu görüldü. Metabolitlerin eliminasyon yarı ömürleri en kısa AK, en uzun ise MK ırkında bulundu (Tablo 4.4). Irklar arasında metabolitlerin $t_{1/2\lambda_z}$ 'ndeki farklılıklar, dağılım hacimlerine, plazma proteinlerine bağlanma oranlarına ve metabolizmalarına bağlı olabilir.

Irklar arasında TB ve TF'in doruk konsantrasyonlarında istatistiksel anlamda farklılıkların ($P<0.05$) olduğu belirlendi (Tablo 4.4). TF ve TB'in en yüksek doruk konsantrasyonları (C_{dorum}) sırasıyla AK (1.038 µg) ve OAM (0.176 µg) ırklarında bulundu. PK'de ise farklılık tespit edilmedi. Üç ırkta da TB ve PK'nin doruk konsantrasyonlarının Suffolk koyunlarında belirlenen sonuçlar (maksimum 0.2 µg/ml) ile benzer olduğu görüldü (Danielson ve Golsteyn 1996). TF'nin doruk konsantrasyonlarının ise AK ve OAM

ırklarında Suffolk koyunlarında bulunan sonuçlar ile (~1 µg/ml, Danielson ve Golsteyn 1996) uyumlu olduğu belirlendi. C_{doruk} değeri, ilacın emilim hızı ve oranı hakkında bilgi verir. Bundan hareketle, metabolitlerin C_{doruk} değerlerinin metabolizma hızı ve oranının bir göstergesi olduğu söylenebilir. Irklar arasında PK ve TF'nin C_{doruk} değerleri sırasıyla CYP1A2 enzim aktivitesi ve karaciğerin metabolik kapasitesi ile ilişkili bulundu. Metabolitlerin C_{doruk} ve EAA_{0-48} değerleri arasında ise anlamlı bir ilişki görülmedi. Bu, metabolit farmakokinetiğinin belirlenmesi için örnekleme zamanlarının yeterli olmamasından ve metabolitlerin farmakokinetik davranışlarından (dokuya affinite gibi) kaynaklanabilir.

Çalışmada, koyunlarda KF'in temelde üç farklı dimetilksantine (TB, PK, TF) metabolize edildiği görüldü (Tablo 4.4, 7). Bu sonuçlar, Danielson ve Golsteyn (1996) tarafından Suffolk ırkı koyunlarda yapılan çalışma sonuçları ile uyumlu bulundu. Ayrıca, sığır (Danielson ve Golsteyn 1996), deve (Wasfi ve ark 2000), at, eşek (Peck ve ark 1997), köpek (Boothe ve ark 1994) ve insan (Rostami-Hodjegan ve ark 1996) gibi metabolizma yolları benzer olan memeli türlerinde de *in vivo* yapılan çalışmalarda KF'in öncelikli olarak bu üç dimetilksantine metabolize edildiği ortaya konulmuştur.

Mevcut çalışmada, KF'in öncelikli ana metabolitinin teofilin olduğu belirlendi (Tablo 4.4, 7). MK, AK ve OAM ırklarında teofilinin 10. saatteki plazma konsantrasyonları ve EAA_{0-48} değerleri temel alınarak, dönüşüm oranları sırasıyla %60/78/71 ve %61/78/67 oranında hesaplandı. KF uygulama sonrası Suffolk koyunlarında da KF'in öncelikli ana metabolitinin teofilin (%72) olduğu belirlenmiştir (Danielson ve Golsteyn 1996). Benzer şekilde deve (Wasfi ve ark 2000), at, eşek (Peck ve ark 1997), köpek (Boothe ve ark 1994) ve cynomolgus maymunlarında (Berthou ve ark 1992) da KF'in öncelikli ana metaboliti teofilin olmasına rağmen, insan (Berthou ve ark 1992) ve sığırdaki (Danielson ve Golsteyn 1996) ise paraksantindir. İnsanlarda CYP1A2 sentezi CYP1A1 sentezinden daha fazladır ve KF CYP1A2 enzimiyle öncelikli olarak PK'e metabolize edilir (Butler ve ark 1989, Berthou ve ark 1992, Fuhr ve Rost 1994). Ancak, cynomolgus maymunlarında (Macaca fascicularis), her iki izoenzim sentezinin düşük olduğu belirlenmiş (Berthou ve ark 1992, Bullock ve ark 1995) ve KF'in diğer CYP enzimleri (Danielson ve Golsteyn 1996) ve FMO (Chung ve Cha 1997) tarafından öncelikli olarak teofiline metabolize edildiği bildirilmiştir. Berthou ve ark (1992) tarafından insan karaciğer mikrozomlarında KF metabolizması sonucu oluşan toplam dimetilksantinlerin %81'ini PK'in, cynomolgus maymun karaciğer mikrozomlarında ise %89'unu teofilinin oluşturduğu belirlenmiştir.

CYP1A2 aktivitesinin değerlendirilmesinde kullanılan 7-etoksiresorufin deetilaz aktivitesi (*in vitro*, Szotakova ve ark 2004) ve PK/KF oranının (*in vivo*, Danielson ve Golsteyn 1996), koyunlarda KF'i öncelikli olarak PK'e metabolize eden sığırlardan yaklaşık 7 kat daha düşük olduğu tespit edilmiştir. İnsan ve maymun (Berthou ve ark 1992) ile sığır ve koyun (Szotakova ve ark 2004) arasında belirlenen bu farklılıkların sonucu olarak, TF oluşumunda koyunlarda maymunlara benzer şekilde CYP1A2 dışındaki diğer CYP ve FMO enzimlerinin öncelikli etkiye sahip oldukları söylenebilir.

Bu araştırmada, koyunlarda karaciğerin metabolik kapasitesinin değerlendirilmesinde KF'in EAA_{0-48} , Cl ve $t_{1/2\lambda z}$ parametreleri ile EAA_{0-48} ve metabolik oranlar (TF+PK+TB/KF, TB/KF ve TF/KF oranları), CYP1A2 enzim aktivitesinin tayininde ise PK/KF oranları (EAA_{0-48} ve metabolik oranlar) kullanıldı. Karaciğerin metabolik kapasitesinin tayininde KF'in EAA, Cl, $t_{1/2\lambda z}$ parametreleri ile metabolik ve EAA oranları memeli türlerinde kullanılabilir. Ancak, CYP1A2 enzim aktivitesinin belirlenmesinde KF'in hangi parametrelerinin (EAA, Cl ve $t_{1/2\lambda z}$ gibi) kullanılacağı türler arasında farklılık gösterir. Bu farklılık, enzimin KF metabolizmasındaki katkısına bağlıdır. İnsanda önemli metabolik yolak CYP1A2 enzimiyle PK'e dönüşüm olduğundan ve diğer metabolitlerin oluşumunda da rol oynadığından enzim aktivitesinin belirlenmesinde EAA, Cl ve $t_{1/2\lambda z}$ parametreleri kullanılabilir (Rostami-Hodjegan ve ark 1996). Ancak, KF metabolizmasında TF'in önemli metabolik yol olduğu deve (Wasfi ve ark 2000), at, eşek (Peck ve ark 1997), köpek (Boothe ve ark 1994) ve koyun (Danielson ve Golsteyn 1996) gibi türlerde ise bu parametrelerin enzim aktivitesinin belirlenmesinde değil karaciğerin metabolik kapasitesinin belirlenmesinde kullanımı daha uygundur.

Karaciğerin metabolik kapasitesinin değerlendirilmesinde kullanılan KF'in EAA_{0-48} , Cl ve $t_{1/2\lambda z}$ parametreleri, EAA_{0-48} (TB+PK+TF/KF, TB/KF, TF/KF) oranları ile 3-16. saatlerdeki plazma TB+PK+TF/KF, TB/KF ve TF/KF konsantrasyon oranları arasında yüksek korelasyonlar olduğu görüldü (Tablo 4.5). CYP1A2 enzim aktivitesinin değerlendirilmesinde kullanılan PK/KF EAA_{0-48} oranı ile 3-16. saatlerdeki plazma PK/KF oranları arasında da yüksek korelasyonlar belirlendi (Tablo 4.5). KF'in plazma metabolik oranlarının karaciğerin metabolik kapasitesi ve CYP1A2 enzim aktivitesinin belirlenmesinde pratik bir test olarak kullanımlarının geliştirilmesiyle ilgili farklı örnekleme zamanları önerilmiş ve bunların geçerliliği olan diğer testler ile ilişkisi birçok araştırmada ortaya konulmuştur (Tanaka ve ark 1992a, b, c, d, Fuhr ve ark 1996, Rostami-Hodjegan ve ark 1996). Çalışmada, 3-16. saatlerdeki plazma metabolik oranları metabolit

oluşumlarını tam olarak yansıttığından tercih edildi. Koyunlarda 3-16. saatlerdeki plazma örneklerinde belirlenen metabolik oranlar ile KF'in EAA₀₋₄₈, Cl ve t_{1/2λz} parametreleri (sadece TB+PK+TF/KF oranı arasında) ve EAA₀₋₄₈ oranları arasındaki korelasyon katsayıları tümünde yüksek ve önemli (P<0.01) bulunmuş olmasına rağmen en yüksek korelasyon katsayıları TB+PK+TF/KF için 7. ve 10. saatlerde, TB/KF için 12. saatte, PK/KF ve TF/KF için 10. saatlerdeki plazma örneklerinde belirlendi. Plazma metabolik oranların belirlenmesinde geçerliliği ortaya konulmuş en iyi örnekleme zamanı 6. saat (Fuhr ve ark 1996, Rostami-Hodjegan ve ark 1996) olmasına rağmen, diğer örnekleme zamanları (2-12. saatler) ile Cl ve t_{1/2λz} arasında da yüksek korelasyonlar olduğu belirlenmiştir (Tanaka ve ark 1992a, b, c, d, Spigset ve ark 1999, Teziivanov ve ark 2003, Jodynis-Liebert ve ark 2004). Çalışmada belirtilen oranlar arasında yüksek korelasyonlar bulunduğundan, tek bir örnekleme zamanında belirlenen metabolik oranlar çok sayıda örnekleme gerektiren parametrelerin [KF'in EAA₀₋₄₈, Cl ve t_{1/2λz} parametreleri, EAA₀₋₄₈ (TB+PK+TF/KF, TB/KF, TF/KF) oranları] yerine kullanılabilceği kanaatine varıldı.

Irklar arasında karaciğerin metabolik kapasitesinin fenotipik yönden değerlendirilmesinde kullanılan KF'in EAA₀₋₄₈, Cl, t_{1/2λz} parametreleri ve TF+PK+TB/KF, TB/KF ve TF/KF oranlarının (EAA₀₋₄₈ ve metabolik oranlar) istatistiksel anlamda farklı (P<0.05) olduğu görüldü (Tablo 4.6). KF'in ana metabolitlerine dönüşümünde çok sayıda enzim rol oynar (Rostami-Hodjegan ve ark 1996, Chung ve Cha 1997, Magkos ve Kavouras 2005) ve insanlarda CYP1A2'nin KF'in N-1, N-3 ve N-7 demetilasyonundan sorumlu en önemli enzim olduğu ortaya konmuştur (Fuhr ve ark 1992, Tassaneeyakul ve ark 1992). CYP2E1 enzimi ise KF'in N-1 ve N-7 demetilasyonunda rol alır ve bu tepkimelerde CYP1A2 enzimine göre katkısının daha az olduğu bildirilmiştir (Tassaneeyakul ve ark 1994). Ancak, Chung ve Cha (1997), KF'in N-1 ve N-7 demetilasyonunda flavin içeren monooksijenazların daha etkin enzimler olduğunu öne sürmüşlerdir. Rettie ve Lang (2000) ise KF'in N-1 ve N-7 demetilasyonunda FMO öneminin olmadığını bildirmişlerdir. TB/KF ve TF/KF oranlarında koyun ırkları arasında belirlenen farklılıklar, PK/KF oranları baz alınarak hesaplanan CYP1A2 enzim aktivitesinin benzer olması nedeniyle KF'in N-1 ve N-7 demetilasyonundan sorumlu CYP2E1 ve FMO enzimlerinin sentez profillerinin (koyunlarda KF metabolizmasında FMO rol oynamaması ya da N-1 ve N-7 demetilasyonda CYP2E1 enziminin öncelikli sorumlu olması gibi) ve aktivitelerinin farklı olmasına bağlanabilir. TB/KF ve TF/KF oranlarındaki ırk farklılıklarının benzer olması, KF'in N-1 ve N-7 demetilasyon

reaksiyonlarında aynı enzimlerin rol oynaması ile ilişkilendirilebilir. Irklar arasında TF+PK+TB/KF oranlarında belirlenen farklılıklar ise bu oran içerisinde TF ve TB kısmının daha fazla olmasından kaynaklanabilir.

Çalışmada, CYP1A2 enzim aktivitesinin tayininde PK/KF oranları (EAA₀₋₄₈ ve metabolik oranlar) kullanıldı, ırklar arasında ise enzim aktivitesinde istatistiksel olarak farklılığa ($P>0.05$) rastlanmadı (Tablo 4.6). MK, AK ve OAM ırklarında 10. saatteki kan örneğinde belirlenen plazma PK/KF oranları, Danielson ve Golsteyn (1996) tarafından Suffolk koyunlarında KF uygulama sonrası 5. saatte belirlenen orandan (0.03) nispeten yüksekti. Bu farklılık, PK/KF oranının tespit edildiği 10. saatte 5. saate göre PK konsantrasyonunun yüksek, KF konsantrasyonunun ise düşük olmasından kaynaklanabilir. İnsanlarda ise CYP1A2 enzim aktivitesinde geniş etnik ve bireyler arası farklılıkların olduğu belirlenmiştir (Campbell ve ark 1987). Enzim aktivitesi genetik ve genetik olmayan (cinsiyet, diyet, hastalık, ilaç ve sigara kullanımı gibi) faktörlere bağlı olarak bireyler arasında 60 kat farklılık gösterebilmektedir (Guengerich 1995, Zaigler ve ark 2000, Hamdy ve ark 2003). Çalışmada ırklar arası ve ırk içi geniş farklılıkların görülmemesinin nedeni, koyunların insanlara göre enzim aktivitesini etkileyen faktörlere daha düşük oranda maruz kalmalarına bağlı olabilir. Ancak, kontrollü yetiştiricilik yapılan bazı fare ırklarında yapılan çalışmada (Casley ve ark 1997) ise KF uygulama sonrası 2. saatte belirlenen serum PK/KF oranlarının erkek fare ırklarında 0.12-2.92, dişi fare ırklarında ise 0.12-1.69 arasında değiştiği belirlenmiş ve bu farklılıkların, genetik varyasyondan kaynaklandığı bildirilmiştir.

CYP1A2 enzim aktivitesinin değerlendirilmesinde kullanılan parametrelerin geçerliliklerinin belirlenmesine yönelik araştırmalar özellikle insanlarda gerçekleştirilmiştir (Butler ve ark 1989, Fuhr ve ark 1996, Streetman ve ark 2000). Literatür verilerde koyunlarda KF uygulaması sonrasında belirlenen plazma PK/KF oranının genotipik ve *in vitro* fenotipik metotlarla ilişkisinin değerlendirildiği herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak, Van't Klooster ve ark (1993), indüklenmemiş hepatositlerde 7-etoksiresorufin deetilasyon (*in vitro* şartlarda CYP1A2 enzim aktivitesinin değerlendirilmesinde kullanılır) hızının sığır ve keçilerde koyunlara göre daha yüksek olduğunu ifade etmişlerdir. Benzer şekilde, Szotakova ve ark (2004), 7-etoksiresorufin deetilaz aktivitesinin koyunlarda (51 pmol/dak mg), sığırlardan (522 pmol/dak mg) belirgin olarak düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Danielson ve Golsteyn (1996), KF uygulama sonrası 300. dakikadaki CYP1A2 enzimi ile ilişkili PK/KF oranını koyunlarda

0.03, sığırlarda ise 0.23 olarak bildirmişlerdir. CYP1A2 enzim aktivitesinin değerlendirilmesinde *in vitro* ve *in vivo* olarak belirlenen bu değerlerin uyumlu olması koyunlarda *in vivo* olarak elde edilen sonuçların güvenilirliğini destekleyici niteliktedir.

EAA₀₋₄₈ ve 10. saatteki plazma konsantrasyonlarına göre hesaplanmış KF'in ana metabolitlerine dönüşüm oranlarının ırklar arasında istatistiksel farklılık ($P<0.05$) gösterdiği belirlendi (Tablo 4.7). EAA₀₋₄₈ ve 10. saatteki plazma konsantrasyonları baz alınarak hesaplanmış en yüksek metabolit dönüşüm oranları teobromin için MK ve OAM ırklarında, PK için MK ırkında ve TF için AK ırkında görüldü. 10. saatteki plazma örneklerinde belirlenmiş TB/PK/TF oluşumlarının MK, AK ve OAM ırklarında sırasıyla %17/22/60, %13/9/78 ve %15/15/71 düzeylerinde olduğu tespit edildi. Danielson ve Golsteyn (1996) tarafından 5. saatteki plazma örneklerinde KF'den TB/PK/TF dönüşüm oranlarının sırasıyla %15/12/72 olduğu ve metabolit oluşumunun PK<TB<TF sırasını izlediği belirlenmiştir. Mevcut çalışmada AK ve OAM ırklarında elde edilen sonuçlar, Danielson ve Golsteyn (1996) tarafından ifade edilen değerlere benzerlik göstermesine rağmen, MK ırkında (TB<PK<TF) farklıydı.

Sonuç;

MK, AK ve OAM ırklarında KF ve ana metabolitlerinin vücuttaki hareketlerinde önemli farklılıkların bulunduğu ve farmakokinetikteki farklılıklar kafeinin farmakolojik etkilerini de değiştirebileceğinden kafeinin tedavi amaçlı kullanımında belirtilen unsurların mutlaka göz önünde bulundurulması gerektiği,

Koyunlarda, kafein öncelikli olarak teofiline metabolize edilmekle beraber metabolit oluşum oranlarının ırklar arasında farklılıklar gösterdiği ve vücutta metabolitlerin farklı farmakolojik etkileri bulunması nedeniyle tedavi amaçlı kullanımda bu durumun önemli olabileceği,

Koyunlarda karaciğerin metabolik kapasitesinin ve CYP1A2 enzim aktivitesinin değerlendirilmesinde kafeinin metabolik oran parametrelerinin fazla örnek toplamayı gerektiren diğer parametreler yerine kullanılabilirliği,

Koyunlarda karaciğerin metabolik kapasitesi ve CYP1A2 enzim aktivitesinin değerlendirilmesinde kafein uygulaması sonrasında 3-16. saatlerde alınan kan örneklerinde belirlenen metabolik oranların tümünün kullanılabilirliği, ancak ideal örnekleme zamanları olarak TF+PK+TB/KF oranı için 7. ve 10. saatlerin, PK/KF ve TF/KF için 10. saatin, TB/KF için de 12. saatin daha uygun olduğu,

MK, AK ve OAM koyun ırkları arasında karaciğerin metabolik kapasitesinin farklı olduğu, CYP1A2 enzim aktivitesinin fenotipik açıdan benzerlik gösterdiği ve metabolik kapasitedeki farklılıkların muhtemel nedeninin CYP1A2 dışındaki diğer enzimlerin aktivitelerindeki değişikliklerden (CYP2E1 ve/veya FMO) kaynaklanabileceği ve koyun ırklarında görülen bu ayrımların sebeplerinin açıklanabilmesi için enzimlerin kafein metabolizmasına katkı oranlarının ve enzim aktivitelerindeki farklılıkların muhtemel nedenlerinin (polimorfizm gibi) belirlenmesinin gerekli olduğu,

MK, AK ve OAM ırklarında kafein metabolizmasında yer alan CYP1A2 dışındaki diğer enzimler tarafından metabolize olan maddelerin kinetiklerinin, rezidü miktarlarının ve etkilerinin farklılık gösterebileceği ve,

Kafein uygulaması sonrası karaciğerin metabolik kapasitesinin değerlendirilmesinde ırk ve bireyler arasında fenotipik açıdan belirgin farklılıkların olduğu ve sağlıklı bireylerin hasta olarak değerlendirilmemesi için enzimlerin referans aralıklarının mutlaka belirlenmesinin gerekli olabileceği sonuçlarına varıldı.

Öneriler;

Bireysel doz rejimi uygulamaları etkili tedavi ve yan etkilerin azaltılması gibi yönleriyle insan ve hayvan sağlığı açısından oldukça önemlidir. Ancak, günümüzde insanlarda dahi bazı ilaçlarla sınırlı olan bireysel doz rejimi uygulamalarının hayvanlarda uygulanabilirliği oldukça güçtür. Bu nedenle, hayvan ırklarına göre popülasyon farmakokinetiğinin çıkarılarak ortalama doz rejiminin ırka göre uygulanması pratik bir yaklaşım olabilir. Hayvan ırkları insan ırklarına göre daha homojen popülasyonlar olduğundan önerilen doz rejiminden sapmalar insanlardakine göre daha tolere edilebilir niteliktedir.

Hayvanlarda prob ilaçların enzim aktiviteleri ve organ fonksiyonunun belirlenmesinde kullanımları ve pratikte uygulanabilirliklerinin geliştirilmesine yönelik yeterince çalışma bulunmamaktadır. Tek deneysel dizaynla birden fazla enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan karma ve tek prob ilaç uygulamalarının hayvanlarda kullanılabilirliklerinin geliştirilmesi ve bazı olumsuzluklarının (ilaç etkileşimi, çok fazla örnek toplamayı gerektirmesi, birey içi farklılıklar, yaş ve cinsiyet farklılıkları gibi) en aza indirilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Hayvan popülasyonlarında fenotipik ve genotipik metotlar kullanılarak yapılacak çalışmalarda tür, ırk, yaş, cinsiyet gibi faktörler dikkate alınarak enzim aktivitelerinin

referans aralıkları belirlenebilir. Enzim aktivitesi-enzim substratı arasındaki ilişki değerlendirilerek uygun doz rejimi faktörlere göre özelleştirilebilir.

Vücutta metabolize olan ilaçlarda ırk farklılıklarının bulunması enzim substratlarının kalıntı arınma sürelerini de değiştirebilir. Buna bağlı olarak kalıntı arınma sürelerinin ırka özel ya da tür içi taramalarda en uzun sürenin belirlendiği zaman dikkate alınarak ifade edilmesi daha uygun olacaktır.

In vitro ve *in vivo* çalışmalarla popülasyondaki bireylerin enzim aktivitesi yönünden yavaş, ara, hızlı ve ultra hızlı metabolizör sıklıkları belirlenebilir. Sıklıkla görülen enzim aktivitesi dikkate alınarak substratı için belirlenen doz rejimi (farmakokinetik çalışmalarda yapılarak) tüm popülasyona uyarlanabilir. Böylece ilaca bağlı oluşabilecek ters ilaç etkileşimlerinin ve yan etkilerin sıklığı azaltılabilir.

Günümüzde farmakolojik ve toksikolojik önemi olan çoğu maddenin metabolizma yolları ve metabolizmayı etkileyen faktörler (enzim inhibisyonu ve indüksiyonu gibi) bilinmemektedir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarla metabolizma yollarının ve enzim inhibitörü ve indükleyicilerinin belirlenmesi ile yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi, ilaç etkinliğinin artırılması, ilaç etkileşimlerinin tespiti gibi optimum tedavi için eksik yönler tamamlanabilir.

Klinik etkinlik ve halk sağlığı (rezidü gibi) açısından vücutta yüksek oranda metabolize edilen veteriner ilaçların ırklar ve türler arasındaki metabolizma farklılıklarının ortaya konulmasına hız verilmelidir.

6. ÖZET

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakoloji-Toksikoloji (VET) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2007

Kamil ÜNEY

Bazı Koyun Irklarında

Kafeinin Farmakokinetiği ve Metabolizmasının Karşılaştırılması

Amacı, ırk faktörünün karaciğerin metabolik kapasitesi ve CYP1A2 aktivitesine yönelik etkisini belirlemek olan çalışma koyunlar üzerinde yürütüldü. Üç koyun ırkında kafein ve ana metabolitlerinin farmakokinetiği, plazma konsantrasyon-zaman eğrisi altında kalan alan (EAA) ve 3-16. saatlerdeki metabolik oranlar karşılaştırıldı. Ayrıca, karaciğerin metabolik kapasitesi ve CYP1A2 aktivitesinin belirlenmesinde tek örnekleme zamanı ile tayin edilebilen metabolik oranların kullanılabilirliği de değerlendirildi.

Çalışmada, her ırktan 10 hayvan olacak şekilde Morkaraman, Akkaraman and Anadolu Merinosu koyun ırkları kullanıldı. Kafein 5 mg/kg dozunda damar içi yolla uygulandı. İlaç uygulama öncesi (0) ve takibeden 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 24, 32 ve 48. saatlerde kan örnekleri toplandı. Kafein ve metabolitlerinin (teobromin (TB), paraksantin (PK), teofilin (TF)) plazma konsantrasyonları HPLC ile tayin edildi. Her hayvan için kafein ve metabolitlerinin farmakokinetik parametreleri hesaplandı. Kafein ve metabolitlerinin 3-16. saatlerdeki plazma konsantrasyonları ve EAA değerleri kullanılarak TB+PK+TF/KF, TB/KF, PK/KF ve TF/KF oranları belirlendi.

Kafeinin dağılım hacmi dışında bütün farmakokinetik parametrelerinin ırklar arasında istatistiksel farklılık ($P < 0.05$) gösterdiği belirlendi. Kafein eliminasyonunun Morkaraman (Cl; 0.031 L/saat kg, $t_{1/2\lambda z}$; 15.74 saat) ve Orta Anadolu Merinosu (Cl; 0.050 L/saat kg, $t_{1/2\lambda z}$; 9.68 saat) ırklarında Akkaraman (Cl; 0.081 L/saat kg, $t_{1/2\lambda z}$; 6.84 saat) ırkına göre daha yavaş olduğu tespit edildi. Karaciğerin metabolik kapasitesinin belirlenmesinde kullanılan metabolik (M) ve EAA oranlarının (TB+PK+TF/KF, TB/KF, TF/KF) ırklar arasında farklı ($P < 0.05$) olduğu görüldü. En yüksek oranlar Akkaraman ırkında belirlendi. CYP1A2 aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan $(PK/KF)_M$ ve $(PK/KF)_{EAA}$ oranları ise ırklar arasında benzerdi. Kafeinin farmakokinetik parametreleri

(EAA₀₋₄₈, Cl, t_{1/2λz}) ve (TB+PK+TF/KF)_{EAA} oranı, kafeinin farmakokinetik parametreleri (EAA₀₋₄₈, Cl, t_{1/2λz}) ve (TB+PK+TF/KF, 3-16 saatlerde)_M oranlar, (TB+PK+TF/KF, 3-16 saatlerde)_M ve (TB+PK+TF/KF)_{EAA} oranları, (TB/KF, 3-16 saatlerde)_M ve (TB/KF)_{EAA} oranları, (PK/KF 3-16 saatlerde)_M ve (PK/KF)_{EAA} oranları ve (TF/KF 3-16 saatlerde)_M ve (TF/KF)_{EAA} oranları arasında yüksek korelasyonlar olduğu tespit edildi.

Koyun ırkları arasında CYP1A2 aktivitesi benzer olmasına rağmen karaciğer metabolik kapasitesinin farklı olduğu ve bunun, kafeini TB ve TF metabolize eden CYP1A2 dışındaki diğer enzimlerin aktivitelerindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği sonucuna varıldı. Ayrıca, koyunlarda karaciğer metabolik kapasite ve CYP1A2 aktivitesinin kafein uygulamasını takiben alınacak tek kan örneğinde kafein ve metabolitlerinin plazma konsantrasyon oranları hesaplanarak belirlenebileceği kanatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Kafein, farmakokinetik, enzim aktivitesi, karaciğerin metabolik kapasitesi, koyun, ırk.

7. SUMMARY

Comparisons of Caffeine Pharmacokinetics and Metabolisms

In Some Sheep Breeds

The aim of this study was to evaluate the effect of breed on metabolic capacity of liver and CYP1A2 activity. It was compared pharmacokinetics, metabolic (M) ratios at 3-16 h and area under the plasma concentration time curve (AUC) ratios of caffeine (CF) and its metabolites in three sheep breeds. In addition, it was evaluated the usefulness of single sampling method including metabolic ratios in the determination of hepatic metabolic capacity and CYP1A2 activity.

Morkaraman, Akkaraman and Anatolia Merino sheep breeds including ten animals in each breed was used in the study. Caffeine was given intravenously at dosage of 5 mg/kg bw. Blood samples were collected before injection and at 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 24, 32 and 48th hours after caffeine injection. The plasma levels of CF and its primary metabolites-theobromine (TB), paraxanthine (PX) and theophylline (TP)- were measured by HPLC. Pharmacokinetic parameters of CF and its metabolites for each animal were calculated. TB+PX+TP/CF, TB/CF, PX/CF and TP/CF ratios were calculated using plasma concentrations (3-16 h) and AUCs of CF, and its metabolites.

In the three sheep breeds, all kinetic parameters of CF were different significantly ($P < 0.05$) except for volume of distribution. Elimination of CF was slow in Morkaraman (Cl; 0.031 L/h kg, $t_{1/2\lambda z}$; 15.74 h) and Orta Anadolu Merinosu (Cl; 0.050 L/h kg, $t_{1/2\lambda z}$; 9.68 h) breeds when compared to Akkaraman (Cl; 0.081 L/h kg, $t_{1/2\lambda z}$; 6.84 h) breed. Metabolic (M) and AUC ratios (TB+PX+TP/CF, TB/CF, TP/CF) used to determine metabolic capacity of liver were different significantly ($P < 0.05$) among breeds. The highest ratios were determined in Akkaraman breed. However, $(PX/CF)_M$ and $(PX/CF)_{AUC}$ ratios used as an indicator of CYP1A2 function were similar. High correlations were determined between pharmacokinetic parameters (AUC_{0-48} , Cl, $t_{1/2\lambda z}$) of caffeine and $(TB+PX+TP/CF)_{AUC}$ ratio, pharmacokinetic parameters (AUC_{0-48} , Cl, $t_{1/2\lambda z}$) of caffeine and $(TB+PX+TP/CF)$ at 3-16 h)_M ratios, $(TB+PX+TP/CF)$ at 3-16 h)_M and $(TB+PX+TP/CF)_{AUC}$ ratios, (TB/CF) at 3-16 h)_M and $(TB/CF)_{AUC}$ ratios, (PX/CF) at 3-16 h)_M and $(PX/CF)_{AUC}$ ratios and (TP/CF) at 3-16 h)_M and $(TP/CF)_{AUC}$ ratios.

As results; hepatic metabolic capacities of sheep breeds are different, although CYP1A2 activities is not different. It may be depend on differences in activities of other enzymes except for CYP1A2 metabolized caffeine to TB and TP in sheep. These findings

indicate that it is possible to evaluate metabolic capacity of liver and CYP1A2 activity by measuring the plasma concentration ratios of CF to its metabolites using single blood sampling after CF administration in sheep.

Keywords: Caffeine, pharmacokinetics, enzyme activity, metabolic capacity of liver, sheep, breed.

8. KAYNAKLAR

- Akgür SA, Öztürk P, Solak I, Moral AR and Ege B (2003)** *Human serum paraoxonase (PON1) activity in acute organophosphorous insecticide poisoning*. Forensic Science International, 133, 136-140.
- Aklillu E, Carrillo JA, Makonnen E, Bertilsson L and Ingelman-Sundberg M (2003)** *Xanthine oxidase activity is influenced by environmental factors in Ethiopians*. European Journal of Clinical Pharmacology, 59, 533–536.
- Ali BH and El Sheikh HA (1992)** *Some comparative aspects of drug metabolism in Nubian goats (Capra hircus), Desert sheep (Ovis aries) and Dromedary camels (Camelus dromedarius)*. Comparative Biochemistry and Physiology C, 101, 189-195.
- Alwaiz M, Ayesh R, Mitchell SC, Idle JR, and Smith RL (1989)** *Trimethylaminuria the detection of carriers using a trimethylamine load test*. Journal of Inherited Metabolic Disease, 12, 80-85.
- Andersson HC, Hallström H and Kihlman BA (2005)** *Intake of caffeine and other methylxanthines during pregnancy and risk for adverse effects in pregnant women and their foetuses*. Nordic Council of Ministers, Copenhagen, 113-141, Denmark.
- Anonim (2007a)** *Caffeine*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Caffeine>, Erişim tarihi: 27.04.2007.
- Anonim (2007b)** *Paraxanthine*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Paraxanthine>, Erişim tarihi: 27.04.2007.
- Anonim (2007c)** *Theobromine*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Theobromine>, Erişim tarihi: 27.04.2007.
- Anonim (2007d)** *Theophylline*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Theophylline>, Erişim tarihi: 27.04.2007.
- Aramaki S, Suzuki E and Ishidaka O (1991)** *Pharmacokinetics of caffeine and its metabolites in horses after intravenous, intramuscular or oral administration*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 39, 2999-3002.
- Asproдини EK, Zifa E, Papageorgiou I and Benakis A (1998)** *Determination of N-acetylation phenotyping using caffeine as a metabolic probe*. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 23, 501–506.

- Barstow L and Small RE (1990)** *Liver function assessment by drug metabolism.* Pharmacotherapy, 10, 280-288.
- Bechtel YC, Haffen E, Lelouet H, Brientini MP, Paintaud G, Miguet JP et al (2000)** *Relationship between the severity of alcoholic liver cirrhosis and the metabolism of caffeine in 226 patients.* International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 38, 467–475.
- Begas E, Kouvaras E, Tsakalof A, Papakosta S and Asproдини EK (2007)** *In vivo evaluation of CYP1A2, CYP2A6, NAT-2 and xanthine oxidase activities in a Greek population sample by the RP-HPLC monitoring of caffeine metabolic ratios.* Biomedical Chromatography, 21, 190-200.
- Bendriş E, Markoglou N and Wainer IW (2000)** *Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of caffeine and fourteen caffeine metabolites in urine.* Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications, 746, 331–338.
- Berthou F, Guillois B, Riche C, Dreano Y, Jacoz-Aigrain E and Beaune PH (1992)** *Interspecies variations in caffeine metabolism related to cytochrome P4501A enzymes.* Xenobiotica, 6, 671-680.
- Bertilsson L, Dahl M, Ingelman-Sundberg M, Johansson I and Sjoqvist F (1995)** *Interindividual and interethnic differences in polymorphic drug oxidation. Implications for drug therapy with focus on psychoactive drugs.* In “Advances In Drug Metabolism In Man” Ed. By GM Pacifici and GN Fracchia, 85-136, European Commission.
- Bonati M, Latini R, Tognoni G, Young JF and Garattini S (1984-85)** *Interspecies comparison of in vivo caffeine pharmacokinetics in man, monkey, rabbit rat, and mouse.* Drug Metabolism Reviews, 15, 1355-1383.
- Boothe DM, Cullen JM, Calvin JA, Jenkins WL, Brown SA, Gren RA et al (1994)** *Antipyrine and caffeine disposition in clinically normal dogs and dogs with progressive liver disease.* American Journal of Veterinary Research, 55, 254-261.
- Bozkurt A and Kayaalp O (2000)** *Farmakogenetik; genetik farklılığa göre ilaçların metabolizma ve etkilerinin bireyler arasında değişmesi.* In “Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji” Ed. by O Kayaalp, 9, 1, 150-158, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti, Ankara.

- Bullock P, Pearce R, Draper A, Podval J, Bracken W, Veltman J et al (1995)** *Induction of liver microsomal cytochrome P450 in cynomolgus monkeys.* Drug Metabolism Disposition, 23, 736-748.
- Butler MA, Iwasaki M, Guengerich FP and Kadlubar FF (1989)** *Human cytochrome P-450_{PA} (P-4501A2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines.* Biochemistry, 86, 7696-7700.
- Butler MA, Lang NP, Young JF, Caporaso NE, Vineis P, Hayes RB et al (1992)** *Determination of CYP1A2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites.* Pharmacogenetics, 2, 116-127.
- Campbell ME, Spielberg SP and Kalow W (1987)** *A urinary metabolite ratio that reflects systemic caffeine clearance.* Clinical Pharmacology and Therapeutics, 42, 157-165.
- Campbell NRC, Dunnette JH, Mwaluko G, van Loon J and Weinshilboum RM (1984)** *Platelet phenol sulfotransferase and erythrocyte catechol-O-methyltransferase activities: correlation with methyl dopa metabolism.* Clinical Pharmacology and Therapeutics, 35, 55-63.
- Camus AM, Geneste O, Honkakoski P, Bereziat JC, Henderson CJ, Wolf CR et al (1993)** *High variability of nitrosamine metabolism among individuals: role of cytochromes P450 2A6 and 2E1 in the dealkylation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in mice and humans.* Molecular Carcinogenesis, 7, 268-275.
- Carrillo JA and Benitez J (1994)** *Caffeine metabolism in a healthy Spanish population: N-Acetylator phenotype and oxidation pathways.* Clinical Pharmacology and Therapeutics, 55, 293-304.
- Carrillo, JA, Christensen M, Ramos SI, Alm C, Dahl M, Benitez J et al (2000)** *Evaluation of caffeine as an in vivo probe for CYP1A2 using measurements in plasma, saliva, and urine.* Therapeutic Drug Monitoring, 22, 409-417.
- Cascorbi I, Drakoulis N, Brockmoller J, Maurer A, Sperling K and Roots I (1995)** *Arylamine N-acetyltransferase (NAT-2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity.* American Journal of Human Genetics, 57, 581-592.

- Casley WL, Menzies JA, Girard M, Larocque L, Mousseau N, Whitehouse LW et al (1997)** *Differences in caffeine 3-demethylation activity among inbred mouse strains: a comparison of hepatic CYP1A2 gene expression between two inbred strains.* *Fundamental and Applied Toxicology*, 40, 228-237.
- Chainuvati S, Nafziger AN, Leeder JS, Gaedigk A, Kearns GL, Sellers E et al (2003)** *Combined phenotypic assessment of cytochrome P450 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the “Cooperstown 5+1 cocktail”.* *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 74, 437-447.
- Cheng WS, Murphy TL, Smith MT, Cooksley WG, Halliday JW and Powell LW (1990)** *Dose-dependent pharmacokinetics of caffeine in humans: relevance as a test of quantitative liver function.* *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 47, 516-524.
- Cholerton S, Idle ME and Vas A (1992)** *Comparison of a novel thin-layer chromatographic-fluorescence detection method with a spectrofluorometric method for the determination of 7-hydroxycoumarin in human urine.* *Journal of Chromatography*, 575, 325-330.
- Christensen M, Andersson K, Dalen P, Mirghani RA, Muirhead GJ, Nordmark A et al (2003)** *The Karolinska cocktail for phenotyping of five human cytochrome P450 enzymes.* *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 73, 517-528.
- Chung WG and Cha YN (1997)** *Oxidation of caffeine to theobromine and theophylline is catalyzed primarily by flavin-containing monooxygenase in liver microsomes.* *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 235, 685-688.
- Cornelius CE (1987)** *A review of new approaches to assessing hepatic function in animals.* *Veterinary Research Communications*, 11, 423-441.
- Dacasto M, Eeckhoutte C, Capolongo F, Dupuy J, Carletti M, Calleja C et al (2005)** *Effect of breed and gender on bovine liver cytochrome P450 3A (CYP3A) expression and inter-species comparison with other domestic ruminants.* *Veterinary Research*, 36, 179–190.
- Daly AK (2004)** *Development of analytical technology in pharmacogenetic research.* *Naunyn-Schmiedeberg’s Arch Pharmacol*, 369, 133-140.
- Danielson TJ and Golsteyn LR (1996)** *Systemic clearance and demethylation of caffeine in sheep and cattle.* *Drug Metabolism and Disposition*, 24, 1058-1061.

- De Graves FJ, Ruffin DC, Duran SH, Spano JS, Whatley EM, Schumacher J et al (1995)** *Pharmacokinetics of caffeine in lactating dairy cows*. American Journal of Veterinary Research, 56, 619-622.
- Depelchin BO, Bloden S, Michaux C and Ansay M (1988)** *Effects of age, sex and breed on antipyrine disposition in calves*. Research in Veterinary Science, 44, 135-139.
- Desmond PV, Patwardhan RV, Johnson RF and Schenker S (1980)** *Impaired elimination of caffeine in cirrhosis*. Digestive Diseases and Sciences, 25, 93-197.
- Diliberto JJ, Burgin DE and Birnbaum LS (1999)** *Effects of CYP1A2 on disposition of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl in CYP1A2 knockout and parental (C57BL/6N and 129/Sv) strains of mice*. Toxicology and Applied Pharmacology, 159, 52-64.
- Dorne JLCM, Walton K and Renwick AG (2001)** *Uncertainty factors for chemical risk assessment: human variability in the pharmacokinetics of CYP1A2 probe substrates*. Food and Chemical Toxicology, 39, 681-696.
- Dubreuil P, Arsenault J and Belanger D (2005)** *Biochemical reference ranges for groups of ewes of different ages*. Veterinary Record, 156, 636-638.
- Ford LT and Berg JD (2003)** *Determination of thiopurine S-methyltransferase activity in erythrocytes using 6-thioguanine as substrate and a non-extraction liquid chromatographic technique*. Journal of Chromatography B, 798, 111-115.
- Frye RF, Matzke GR, Adedoyin A, Proter JA and Branch RA (1997)** *Validation of the five-drug "Pittsburgh cocktail" approach for assessment of selective regulation of drug-metabolizing enzymes*. Clinical Pharmacology and Therapeutics, 62, 365-376.
- Fuhr U and Rost KL (1994)** *Simple and reliable CYP1A2 phenotyping by the paraxanthine/caffeine ratio in plasma and in saliva*. Pharmacogenetics, 4, 109-116.
- Fuhr U, Doehmer J, Battula N, Wolfel C, Kudla C, Keita Y et al (1992)** *Biotransformation of caffeine and theophylline in mammalian cell lines genetically engineered for expression of single cytochrome P450 isoforms*. Biochemical Pharmacology, 43, 225-235.
- Fuhr U, Jetter A and Kirchheiner (2007)** *Appropriate phenotyping procedures for drug metabolizing enzymes and transporters in humans and their simultaneous use in the "Cocktail" approach*. Clinical Pharmacology and Toxicology, 81, 270-283.

- Fuhr U, Rost KL, Engelhardt R, Sachs M, Liermann D, Belloc C et al (1996)** *Evaluation of caffeine as a test drug for CYP1A2, NAT2 and CYP2E1 phenotyping in man by in vivo versus in vitro correlations.* Pharmacogenetics, 6, 159-176.
- Giantin M, Carletti M, Capolongo F, Nebbia C and Dacasto M (2006)** *Expression of liver cytochrome P450 drug metabolizing enzymes in different meat cattle breeds.* Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 29, 117, 10th International Congress of The European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT), 17-22 September, Turin, Italy.
- Golden DL, Spano JS, Wilson RC, De Graves FJ and Whatley EM (1994)** *Application of an enzyme-multiplied immunoassay technique for determination of caffeine elimination kinetics as a test of liver function in clinically normal dogs.* American Journal of Veterinary Research, 55, 790-794.
- Grant DM, Tang BK and Kalow W (1983a)** *Polymorphic N-acetylation of a caffeine metabolite.* Clinical Pharmacology and Therapeutics, 33, 355-359.
- Grant DM, Tang BK and Kalow W (1983b)** *Variability in caffeine metabolism.* Clinical Pharmacology and Therapeutics, 33, 591-602.
- Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, VonRichter O, Zundler J et al (1999)** *The role of intestinal p-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin.* The Journal of Clinical Investigation, 104, 147-153.
- Gu J, Liang D, Wang Y, Lu C and Wu X (2005)** *Effects of N-acetyltransferase 1 and 2 polymorphisms on bladder cancer risk in Caucasians.* Mutation Research, 581, 97-104.
- Guengerich FP (1995)** *Cytochromes P450 of human liver. Classification and activity profiles of the major enzymes.* In "Advances In Drug Metabolism In Man" Ed. By GM Pacifici and GN Fracchia, 181-281, European Commission.
- Guerciolini R, Szumlanski C and Weinshilboum RM (1991)** *Human liver xanthine oxidase: Nature and extent of individual variation.* Clinical Pharmacology and Therapeutics, 50, 663-672.
- Hallier E, Langhof T, Dannappel D, Leutbecher M, Schroder K, Goergens HW et al (1993)** *Polymorphism of glutathione conjugation of methyl bromide, ethylene oxide and dichloromethane in human blood: influence on the induction of sister chromatid exchanges (SCE) in lymphocytes.* Archives of Toxicology, 67, 173-178.

- Hamdy SI, Hiratsuka M, Narahara K, Endo N, El-Enany M, Moursi N et al (2003)** *Genotyping of four genetic polymorphisms in the CYP1A2 gene in the Egyptian population.* British Journal of Clinical Pharmacology, 55, 321-324.
- Han X, Ou-Yang D, Lu P, Jiang C, Shu Y, Chen X et al (2001)** *Plasma caffeine metabolite ratio (17X/137X) in vivo associated with G-2964A and C734A polymorphisms of human CYP1A2.* Pharmacogenetics, 11, 429-435.
- Holstege A, Staiger M, Haag K, Gerok W (1989)** *Correlation of caffeine elimination and Child's classification in liver cirrhosis.* Klinische Wochenschrift, 67, 6-15.
- Institute of Medicine Staff (2001)** *Caffeine for the sustainment of mental task performance: formulations for military operations.* National Academic Press, Washington, 25-32, USA.
- Iyer L and Ratain MJ (1998)** *Pharmacogenetics and cancer chemotherapy.* European Journal of Cancer, 34, 1493-1499.
- Jackson PR and Tucker GT (1990)** *Pharmacokinetic-pharmacogenetic modelling in the detection of polymorphisms in xenobiotic metabolism.* The Annals of Occupational Hygiene, 34, 653-662.
- Jacqz-Aigrain E, Menard Y, Popon M and Mathieu H (1989)** *Dextromethorphan phenotypes determined by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection.* Journal of Chromatography, 27, 361-363.
- Janus K and Antoszek J (2000)** *The effect of sex and age on caffeine pharmacokinetics in cattle.* Research in Veterinary Science, 69, 33-37.
- Jodynys-Liebert J, Flieger J, Matuszewska A and Juszczak J (2004)** *Serum metabolite/caffeine ratios as a test for liver function.* Journal of Clinical Pharmacology, 44, 338-347.
- Johnson JA, Herring VL, Wolfe MS and Relling MV (2000)** *CYP1A2 and CYP2D6 4-hydroxylate propranolol and both reactions exhibit racial differences.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 294, 1099-1105.
- Jost G, Wahllander A, VonMandach U and Preisig R (1987)** *Overnight salivary caffeine clearance: a liver function test suitable for routine use.* Hepatology, 7, 338-344.

- Jover R, Carnicer F, Sanchez-Paya J, Climent E, Sirvent M and Marco JL (1997)** *Salivary caffeine clearance predicts survival in patients with liver cirrhosis.* The American Journal of Gastroenterology, 92, 1905-1908.
- Kadlubar FF, Talaska G, Butler MA, Teitel CH, Masseng JP and Lang NP (1990)** *Determination of carcinogenic arylamine N-oxidation phenotype in human by analysis of caffeine urinary metabolites.* Progress in Clinical and Biological Research, 340B, 107-114.
- Kalow W and Tang BK (1991)** *Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities.* Clinical Pharmacology and Therapeutics, 50, 508-519.
- Kalow W and Tang BK (1993)** *The use of caffeine for enzyme assays: a critical appraisal.* Clinical Pharmacology and Therapeutics, 53, 503-514.
- Kanazawa H, Okada A, Higaki M, Yokota H, Mashige F and Nakahara K (2003)** *Stereospecific analysis of omeprazole in human plasma as a probe for CYP2C19 phenotype.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 30, 1817-1824.
- Kaneko JJ (1989)** *Clinical Biochemistry of Domestic Animals; Appendix VII: Normal blood analyte values in large animals.* Academic Press, Inc, 4, United Kingdom, 886-891.
- Karagül H, Altıntaş A, Fidancı UR and Sel T (2000)** *Klinik Biyokimya; Çeşitli hayvanlarda ve insanda kan parametrelerine ait normal değerler.* Medisan, Ankara, 1, 419.
- Kashuba AD, Bertino JS, Kearns GL, Leeder JS, James AW and Gotschall R (1998)** *Quantification of three-month intraindividual variability and influence of sex and menstrual cycle phase on CYP1A2, N-acetyltransferase-2 and xanthine oxidase activity determined with caffeine phenotyping.* Clinical Pharmacology and Therapeutics, 63, 540-551.
- Kaya S (2002)** *Bazı hayvan türlerinde kanda normal biyokimyasal değerler.* In "Veteriner Hekimliğinde Farmakoloji" Ed. by S Kaya, İ Pirinçci and A Bilgili, 3, 1, 224-225, Medisan Yayınevi, Ankara
- Kivisto KT and Kroemer HK (1997)** *Use of probe drugs as predictors of drug metabolism in humans.* Journal of Clinical Pharmacology, 37, 40-48.

- Kotake AN, Schoeller DA, Lambert GH, Baker AL, Schaffer DD and Josephs H (1982)** *The caffeine CO₂ breath test: dose response and route of N-demethylation in smokers and nonsmokers.* Clinical Pharmacology and Therapeutics, 32, 261-269.
- Krul C and Hageman G (1998)** *Analysis of urinary caffeine metabolites to assess biotransformation enzyme activities by reversed-phase high performance liquid chromatography.* Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications, 709, 27-34.
- Lewis FW and Rector WG (1992)** *Caffeine clearance in cirrhosis: the value of simplified determinations of liver metabolic capacity.* Journal of Hepatology, 14, 157-162.
- Magkos F and Kavouras SA (2005)** *Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45, 535-562.
- Marchand LL, Sivaraman L, Franke AA, Custer LJ, Wilkens LR, Lau AF et al (1996)** *Predictors of N-acetyltransferase activity: should caffeine phenotyping and NAT2 genotyping be used interchangeably in epidemiological studies?* Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention, 5, 449-455.
- Marchand LL, Wilkinson GR and Wilkens LR (1999)** *Genetic and dietary predictors of CYP2E1 activity: a phenotyping study in Hawaii Japanese using chlorzoxazone.* Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention, 8, 495-500.
- Meesen BPW, Van Deurzen EJM, Van Duin CTM, Van Gogh H and Van Miert ASJPAM (1986)** *The effect of testosterone on the plasma disappearance rates of sulphadimidine and antipyrine in castrated dwarf goats.* Veterinary Quarterly, 8, 343-345.
- Meisel C, Gerloff T, Kirchheiner J, Mrozkiewicz PM, Niewinski P, Brockmüller J et al (2003)** *Implications of pharmacogenetics for individualizing drug treatment and for study design.* Journal of Molecular Medicine, 81, 154-167.
- Messina ES, Tyndale RF and Sellers EM (1997)** *A major role for CYP2A6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 282, 1608-1614.
- Meyer UA (2000)** *Pharmacogenetics and adverse drug reactions,* Lancet, 356, 1667-1671.

- Morley K (2002)** *Pharmacogenetics and pharmacogenomics*. Molecular Bioscience, 6, September, 1-2, Australia.
- Notarianni LJ, Oliver SE, Dobrocky P, Bennett PN and Silverman BW (1995)** *Caffeine as a metabolic probe: a comparison of the metabolic ratios used to assess CYP1A2 activity*. British Journal of Clinical Pharmacology, 39, 65-69.
- Nowell S, Sweeney C, Hammons G, Kadlubar FF and Lang NP (2002)** *CYP2A6 activity determined by caffeine phenotyping: association with colorectal cancer risk*. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention, 11, 377–383.
- Oscarson M (2001)** *Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene: implications for interindividual differences in nicotine metabolism*. Drug Metabolism and Disposition, 29, 91-95.
- Ozawa S (1999)** *Diagnosis of hepatic enzyme activities of drug metabolizing enzymes-phenotyping and genotyping*. Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku, 117, 63-76.
- Pastorova B, Buleca J, Pilipainec E, Vick E And Szarek J (2000)** *Plasma neuromediators and the enzymatic profile of sheep*. Acta Veterinaria Brno, 69, 277–280.
- Peck K, Mealey KL, Matthews NS and Taylor TR (1997)** *Comparative pharmacokinetics of caffeine and three metabolites in clinically normal horses and donkeys*. American Journal of Veterinary Research, 58, 881-884.
- Price RA, Spielman RS, Lucena AL, Van Loon JA, Maidak BL and Weinshilboun RM (1989)** *Genetic polymorphism for human platelet thermostable phenol sulfotransferase (TS PST) activity*. Genetics, 122, 905-914.
- Rajaa AM, Ericsson O, Tybring G, Gustafsson LL and Bertilsson L (2003)** *Quinine 3-hydroxylation as a biomarker reaction for the activity of CYP3A4 in man*. European Journal of Clinical Pharmacology, 59, 23-28.
- Rankins DL, Smith JGS and Hallford DM (1991)** *Serum constituents and metabolic hormones in sheep and cattle fed Kochla Scoparla Hay*. Journal of Animal Science, 69, 2941-2945.
- Raucy JL, Schultz ED, Wester MR, Arora S, Johnston DE, Omdahl JL et al (1997)** *Human lymphocyte cytochrome P450 2E1, a putative marker for alcohol-mediated*

changes in hepatic chlorzoxazone activity. Drug Metabolism and Disposition, 25, 1429-1435.

Relling MV, Lin JS, Ayers GD and Evans WE (1992) *Racial and gender differences in N-acetyltransferase, xanthine oxidase and CYP1A2 activities.* Clinical Pharmacology and Therapeutics, 52, 643-658.

Renner E, Weitholz H, Hugenin P, Arnaud MJ and Preisig R (1984) *Caffeine: a model compound for measuring liver function.* Hepatology, 4, 38-46.

Rettie AE and Lang DH (2000) *Can caffeine metabolism be used as an in vivo probe for human flavin-containing monooxygenase activity?* Pharmacogenetics, 10, 275-277.

Rostami-Hodjegan A, Nurminen S, Jackson PR and Tucker GT (1996) *Caffeine urinary metabolite ratios as markers of enzyme activity: a theoretical assessment.* Pharmacogenetics, 6, 121-149.

Saruwatari J, Nakagawa K, Shindo J, Tajiri T, Fujieda M, Yamazaki H et al (2002) *A population phenotyping study of three drug-metabolizing enzymes in Kyushu, Japan, with use of the caffeine test.* Clinical Pharmacology and Therapeutics, 72, 200-208.

Schmider J, Brockmoller J, Arold G, Bauer S and Roots I (1999) *Simultaneous assessment of CYP3A4 and CYP1A2 activity in vivo with alprazolam and caffeine.* Pharmacogenetics, 9, 725-734.

Schmitz G, Aslanidis C and Lackner KJ (2001) *Pharmacogenomics: implications for laboratory medicine.* Clinica Chimica Acta, 308, 43-53.

Scott NR, Stambuk D, Chakraborty J, Marks V and Morgan MY (1989) *The pharmacokinetics of caffeine and its dimethylxanthine metabolites in patients with chronic liver disease.* British Journal of Clinical Pharmacology, 27, 205-213.

Seidegard J and Pero RW (1985) *The hereditary transmission of high glutathione transferase-activity towards trans-stilbene oxide in human mononuclear leukocytes.* Human Genetics, 69, 66-68.

Sowinski KM, Lima JJ, Burlew BS, Massie JD and Johnson JA (1996) *Racial differences in propranolol enantiomer kinetics following simultaneous i.v. and oral administration.* British Journal of Clinical Pharmacology, 42, 339-346.

- Spigset O, Hagg S, Söderström E and Dahlqvist R (1999)** *The paraxanthine: caffeine ratio in serum or in saliva as a measure of CYP1A2 activity: when should the sample be obtained?* Pharmacogenetics, 9, 409-412.
- Steimer W and Potter JM (2002)** *Pharmacogenetic screening and therapeutic drugs.* Clinica Chimica Acta, 315, 137-155.
- Streetman DS, Bertino JS and Nafziger AN (2000)** *Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes.* Pharmacogenetics, 10, 187-216.
- Szotakova B, Baliharova V, Lamka J, Nozinova E, Wsol V, Velik J et al (2004)** *Comparison of in vitro activities of biotransformation enzymes in pig, cattle, goat and sheep.* Research in Veterinary Science, 76, 43-51.
- Tanaka E (1998)** *Clinical importance of non-genetic and genetic cytochrome P450 function tests in liver disease.* Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 23, 161-170.
- Tanaka E (2001)** *Polymorphism of drug metabolizing enzymes in humans.* Sepsis, 4, 247-254.
- Tanaka E and Breimer DD (1997)** *In vivo function tests of hepatic drug-oxidizing capacity in patients with liver disease.* Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 22, 237-249.
- Tanaka E, Ishikawa A and Misawa S (1992a)** *Simplified test for determination of drug-oxidizing capacity in rats with chemical-induced liver injury using caffeine and trimethadione as model drugs.* Pharmacology and Toxicology, 70, 177-180.
- Tanaka E, Ishikawa A, Yamamoto Y, Osada A, Tsuki K, Fukao K et al (1992b)** *A simple useful method for the determination of hepatic function in patients with liver cirrhosis using caffeine and its three major dimethylmetabolites.* International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology, 30, 336-341.
- Tanaka E, Ishikawa A, Yamamoto Y, Uchida E, Kobayashi S, Yasuhara H et al (1992c)** *A simplified approach for evaluation of hepatic drug-oxidizing activity with a simultaneous determination of caffeine and trimethadione and their demethylated metabolites in rats with a selective cytochrome P-450 inducer.* Biopharmaceutics and Drug Disposition, 13, 263-272.

- Tanaka E, Ishikawa A, Yamamoto Y, Uchida E, Kobayashi S, Yasuhara H et al (1992d)** *Simplified approach for evaluation of hepatic drug-oxidizing capacity with a simultaneous determination of caffeine and its primary demethylated metabolites in carbon tetrachloride-intoxicated rats.* *Xenobiotica*, 22, 535-541.
- Tanaka E, Kurata N and Yasuhara H (2003)** *How useful is the 'cocktail approach' for evaluating human hepatic drug metabolizing capacity using cytochrome P450 phenotyping probes in vivo?* *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 28, 157-165.
- Tang BK, Kadar D, Qian L, Iriah J, Yip J and Kalow W (1991)** *Caffeine as a metabolic probe: validation of its use for acetylator phenotyping.* *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 49, 648-657.
- Tassaneeyakul W, Birkett DJ, McManus ME, Tassaneeyakul W, Veronese ME, Andersson T et al (1994)** *Caffeine metabolism by human hepatic cytochromes P450: contributions of 1A2, 2E1 and 3A isoforms.* *Biochemical Pharmacology*, 47, 1767-1776.
- Tassaneeyakul W, Mohamed Z, Birkett DJ, McManus ME, Veronese ME, Tukey RH, et al (1992)** *Caffeine as a probe for human cytochromes P450: validation using cDNA-expression, immunoinhibition and microsomal kinetic and inhibitor techniques.* *Pharmacogenetics*, 2, 173-183.
- Terziivanov D, Bozhinova K, Dimitrova V and Atanasova I (2003)** *Nonparametric expectation maximisation (NPEM) population pharmacokinetic analysis of caffeine disposition from sparse data in adult Caucasians: Systemic caffeine clearance as a biomarker for cytochrome P450 1A2 activity.* *Clinical Pharmacokinetics*, 42, 1393-1409.
- Thornton-Manning J, Appleton ML, Gonzalez FJ and Jost GS (1996)** *Metabolism of 3-methylindole by vaccinia-expressed P450 enzymes: correlation of 3-methyleneindolenine formation and protein-binding.* *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 276, 21-29.
- Totsuka S, Watanabe T, Koyanagi F, Tanaka K, Yasuda M and Manabe S (1999)** *Increase in urinary excretion of 6 β -hydroxycortisol in common marmosets as a marker of hepatic CYP3A induction.* *Archives Toxicology*, 73, 203-207.

- Tse FLS and Szeto DW (1981)** *Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of caffeine and its N-demethylated metabolites in dog plasma.* Journal of Chromatography, 226, 231-236.
- Van't Klooster GAE, Blaauboer BJ, Noordhoek J and Van Miert ASPJAM (1993)** *Cytochrome P450 induction and metabolism of alkoxyresorufins, ethylmorphine and testosterone in cultured hepatocytes from goats, sheep, and cattle.* Biochemical Pharmacology, 46, 1781-1790.
- Velik J, Baliharova V, Fink-Gremmels J, Bull S, Lamka J and Skalova L (2004)** *Benzimidazole drugs and modulation of biotransformation enzymes.* Research in Veterinary Science, 76, 95-108.
- Veronese ME, Miners JO, Randles D, Gregov D and Birkett DJ (1990)** *Validation of the tolbutamide metabolic ratio for population screening with use of sulfaphenazole to produce model phenotypic poor metabolizers.* Clinical Pharmacology and Therapeutics, 47, 403-411.
- Vesell ES (1979)** *The antipyrine test in clinical pharmacology.* Clinical Pharmacology and Therapeutics, 26, 275-286.
- Vistisen K, Loft S and Poulsen HE (1991)** *Cytochrome P450 IA2 activity in man measured by caffeine metabolism: effect of smoking, broccoli and exercise.* Advances in Experimental Medicine and Biology, 283, 407-411.
- Wahllander A, Mohr S and Paumgartner G (1990)** *Assessment of hepatic function: comparison of caffeine clearance in serum and saliva during the day and at night.* Journal of Hepatology, 10, 129-137.
- Wasfi IA, Boni NS, Elghazali M, Abdel Hadi AA, Almuhammi AM, Barezaig IM et al (2000)** *The pharmacokinetics, metabolism and urinary detection time of caffeine in camels.* Research in Veterinary Science, 69, 69-74.
- Watkins PB, Hamilton TA, Annesley TM, Ellis NC, Kolars JC and Voorhees JJ (1990)** *The erythromycin breath test as a predictor of cyclosporine blood levels.* Clinical Pharmacology and Therapeutics, 48, 120-129.
- Wedlund PJ, Aslanian WS, Mc Allister CB, Wilkinson GR and Branch RA (1984)** *Mephenytoin hydroxylation deficiency in Caucasians: frequency of a new oxidative drug metabolism polymorphism.* Clinical Pharmacology and Therapeutics, 36, 773-780.

- Whittaker M, Britten JJ and Dawson PJG (1983)** *Comparison of a commercially available assay system with two reference methods for the determination of plasma cholinesterase variants.* Clinical Chemistry, 29, 1746-1751.
- Witkamp RF, Nijmeijer SM, Van Duin CTM, Bevers MM, Wensing TH, Van Gogh H et al (1989)** *Has bovine somatotropin BST an affect upon drug disposition? Comparative studies in goats and cattle with sulphadimidine and antipyrine after parenteral administration of BST, zeranol and proligestone.* Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 12, 163-178.
- Witkamp RF, Van't Klooster GAE and Van Miert ASJPAM (1990)** *The influence of gender and gonadal hormones on the plasma clearance and metabolite formation of antipyrine in ruminants.* European Journal of Pharmacology, 183, 176-177.
- Wittayalerpanya S, Israsena S, Thamaree S, Tongnoprana P, Komolmit P (1996)** *Caffeine clearance by two point analysis: a measure of liver function in chronic liver disease.* The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine, 21, 195-201.
- Zaigler M, Tancheva-Poor I and Fuhr U (2000)** *Problems and perspectives of phenotyping for drug-metabolizing enzymes in man.* International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 37, 1-9.
- Zhou H, Tong Z and James FM (2004)** *"Cocktail" approaches and strategies in drug development: valuable tool or flawed science?* Journal of Clinical Pharmacology, 44, 120-134.
- Zhu B, Ou-Yang D, Chen X, Huang S, Tan Z, He N et al (2001)** *Assessment of cytochrome P450 activity by a five-drug cocktail approach.* Clinical Pharmacology and Therapeutics, 70, 455-461.
- Ziebell J and Shaw-Stiffel T (1995)** *Update on the use of metabolic probes to quantify liver function: caffeine versus lidocaine.* Digestive Diseases, 13, 239-250.
- Zylber-Katz E, Granit L and Levy M (1984)** *Relationship between caffeine concentrations in plasma and saliva.* Clinical Pharmacology and Therapeutics, 36, 133-137.

9. ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Konya'nın Ilgın ilçesinde doğdu. İlköğrenimini Ilgın Milli Egemenlik İlkokulu'nda, orta öğrenimini Ilgın Fatih Ortaokulu'nda ve lise öğrenimini Ilgın Lisesi'nde tamamladı. 1996 yılında girmiş olduğu Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni 2001 yılında birincilikle bitirdi. 2002 yılında açılan araştırma görevliliği sınavını kazanarak, 26.12.2002 tarihinde Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Halen aynı Anabilim Dalında görev yapmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıdır.

10. TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasında yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof.Dr. Bünyamin TRAŞ'a, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof.Dr. Ahmet Levent BAŞ, Prof.Dr. Halis OĞUZ, Prof.Dr. Muammer ELMAS, Doç.Dr. Enver YAZAR ve Arş.Gör. Ayşe ER'e, Pendik Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü Farmakoloji Bölümünde görev yapan Dr. İlyas TÜMER ve diğer çalışanlarına, Yrd.Doç.Dr. Esat Sami POLAT'ın şahsında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvancılık Araştırma ve Uygulama Merkezi Koyunculuk Ünitesi çalışanlarına ve uygulama sırasındaki emek ve ilgilerinden dolayı eşime, anneme ve kardeşlerime teşekkür ederim.

