

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METASTATİK MEME KANSERLİ HASTALARDA  
CES1 GEN POLİMORFİZMLERİNİN  
GÖRÜLME SIKLIKLARI VE CAPECİTABİNE  
KULLANANLARDA İLAÇ YANITINA ETKİLERİNİN  
RETROSPEKTİF OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Arş. Gör. Duygu Döndü AYGÜNEŞ

DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Dr. Buket KOSOVA

İZMİR  
2008

## DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

**Başkan (Danışman) :** Yrd. Doç. Dr. Buket KOSOVA

**Üye :** Doç. Dr. Canfeza SEZGİN

**Üye :** Yar. Doç. Dr. Zühal EROĞLU

Yüksek Lisans Tezinin Kabul Edildiği Tarih: .....

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince desteğini esirgemeyen, yanımda olan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak bana destek olan tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Buket KOSOVA' ya,

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini hep yanımda hissettiğim Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Nejat TOPÇUOĞLU' na,

Tez çalışmamın istatistiki bilgilerini düzenleme konusunda bana yardımcı olan, sorularımı cevapsız bırakmayan Sayın Doç.Dr. Cumhur GÜNDÜZ' e

Yüksek lisansa başladığımdan beri sevgi ve desteğini hep hissettiğim Sayın Yrd. Doç. Dr. Zuhale EROĞLU' na

Tez çalışmam için gerekli olan hasta grubunu temin edip, çalışmayı özveriyle takip eden Sayın Doç.Dr. Canfeza SEZGİN' e

Bana kattıkları ve dostlukları için Sayın Arş. Gör. Çığır BİRAY AVCI, Sayın Arş. Gör. Nur SELVİ, Sayın Arş. Gör. Burçin TEZCANLI, Sayın Arş. Gör. Aslı TETİK ve Sayın Arş. Gör. Yavuz DODURGA' ya

Aynı coğrafyada olmasak da her zaman yanımda olduklarını bildiğim, bana hep destek veren, hayatımı paylaştığım çok sevgili dostlarım Sayın Devin İNATÇI, Sayın Pınar Buket DEMİREL, Sayın Ezgi ERDOĞAN, Sayın Rana SOYLU ve Sayın Didem ALACA' ya,

Beni dünyaya getirip büyüten, hiç bir fedakarlıktan kaçınmayan, her zaman destek olan ve beni hiç yalnız bırakmayan sevgili annem Sayın Sevgi AYGÜNEŞ ve sevgili babam Sayın Ramazan AYGÜNEŞ' e,

Hayattaki en yakın arkadaşım ve sevgili kardeşim Sayın Eren  
AYGÜNEŞ' e

Burada adını sayamadığım tüm anabilim dalı personel ve akademik  
üyelerine ve bugünkü 'ben'de emeği olan herkese sonsuz teşekkürler...

Arş.Gör. Duygu Döndü AYGÜNEŞ

İZMİR 2008

## İÇİNDEKİLER

I. BÖLÜM.....	4
1.1 GİRİŞ VE AMAÇ .....	4
1.2 GENEL BİLGİLER .....	7
1.2.1. MEME KANSERİ .....	7
1.2.1.1 MEME KANSERİNİN EPİDEMİYOLOJİSİ .....	7
1.2.1.2 MEME KANSERİNİN ETİYOLOJİSİ .....	7
1.2.1.2.1 ÜREMEYLE İLGİLİ ETKENLER.....	8
1.2.1.2.2 HORMONAL ETKENLER.....	8
1.2.1.2.3 GENETİK ETKENLER.....	9
1.2.1.2.4 BESLENME.....	10
1.2.1.2.5 SOSYO-EKONOMİK DURUM .....	10
1.2.1.3 MEME KANSERİNİN PATOLOJİSİ .....	10
1.2.1.3.1 BELİRTİLER .....	12
1.2.1.3.2 TANI.....	13
1.2.1.3.3 EVRELER.....	14
1.2.1.3.3.1 METASTAZ.....	19
1.2.2 FARMAKOGENETİK .....	19
1.2.2.1. FAZ I REAKSİYONLARI VE ENZİMLERİ.....	20
1.2.2.1.1 SİTOKROM P - 450 AİLESİ .....	21
1.2.2.1.2 ALKOL DEHİDROGENAZ.....	22
1.2.2.1.3 KARBOKSİL ESTERAZLAR .....	23
1.2.2.1.3.1 KARBOKSİL ESTERAZ 1 .....	23
1.2.2.1.3.2 KARBOKSİL ESTERAZ 2.....	25
1.2.2.2. FAZ II REAKSİYONLARI VE ENZİMLERİ.....	28
1.2.2.2.1 N- ASETİLTRANSFERAZ 2 .....	29
1.2.2.2.2 URİDİN DİFOSFAT GLUKURONOSİLTRANSFERAZ.....	29
1.2.2.2.3 GLUTATYON S-TRANSFERAZ.....	30
1.2.2.2.4 TİYOPÜRİN S-METİLTRANSFERAZ.....	30
1.2.3 CES1 GEN POLİMORFİZMLERİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER.....	31
1.2.3.1 TEK NÜKLEOTİT POLİMORFİZMLERİ .....	32
1.2.3.1.1 RESTRİKSİYON FRAGMAN UZUNLUK POLİMORFİZMİ	
BÖLÜM II.....	34
2.1 GEREÇ VE YÖNTEM .....	34
2.1.1 Kontrol ve Çalışma Grubu .....	34
2.1.2 CES1 H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmlerinin Analizi.....	35
2.1.2.1 CES1 H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmleri Analizinde Kullanılan Cihazlar.....	35
2.1.2.2 CES1 H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmleri Analizinde Kullanılan Kimyasallar .....	36
2.1.2.3 CES1 H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmleri Analizinde Kullanılan Hazır Kitler .....	37
2.1.2.3.1 DNA İzolasyonu Kiti .....	37
2.1.2.4 CES1 H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmleri Analizinde Kullanılan Primerler.....	38
2.1.2.5 CES1 H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmleri Analizinde Kullanılan Restriksiyon Enzimleri.....	39

2.1.2.5.1 <i>CES1</i> H199R Gen Polimorfizmi Analizinde Kullanılan Restriksiyon Enzimi.....	39
2.1.2.5.2 <i>CES1</i> N75S Gen Polimorfizmi Analizinde Kullanılan Restriksiyon Enzimi.....	40
2.1.2.5.3 <i>CES1</i> I49V Gen Polimorfizmi Analizinde Kullanılan Restriksiyon Enzimi.....	40
2.1.2.6 <i>CES1</i> H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmleri Analizinde Kullanılan DNA Belirteci.....	41
2.1.3 <i>CES1</i> H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmleri Analizi İçin Çalışma Protokolü.....	41
2.1.3.1 Parafine Gömülü Dokudandan DNA İzolasyonu Aşaması.....	41
2.1.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	43
2.1.3.2.1 <i>CES1</i> H199R Gen Polimorfizmi İçin PCR.....	45
2.1.3.2.2 <i>CES1</i> N75S Gen Polimorfizmi İçin PCR.....	46
2.1.3.2.3 <i>CES1</i> I49V Gen Polimorfizmi İçin PCR.....	47
2.1.3.3 PCR Sonrası % 2' lik Agaroz Jel Elektroforezi.....	49
2.1.3.4 Restriksiyon Enzim Kesimi ile Polimorfizm Analizi.....	49
2.1.3.4.1 <i>CES1</i> H199R Gen Polimorfizmi Analizi için Restriksiyon Enzim Kesimi.....	49
2.1.3.4.2 <i>CES1</i> N75S Gen Polimorfizmi Analizi için Restriksiyon Enzim Kesimi.....	50
2.1.3.4.3 <i>CES1</i> I49V Polimorfizm Analizi için Restriksiyon Enzim Kesimi.....	51
2.1.3.5 <i>CES1</i> Geni Amplikonlarının Restriksiyon Enzim Kesimi Ürünlerinin Değerlendirilmesi.....	52
2.1.3.6 <i>CES1</i> H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmlerinin Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	53
2.1.4 <i>CES1</i> H199R, N75S ve I49V GEN POLİMORFİZMLERİ ANALİZLERİNDE KULLANILAN KİMYASAL ÇÖZELTİLER VE ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANIŞI.....	53
2.1.4.1 Etidyum Bromür Hazırlanması.....	53
2.1.4.2 dNTP Hazırlanması.....	53
2.1.4.3 TAE (Tris-Asetat-EDTA) Tamponu.....	54
2.1.4.4 % 2' lik Agaroz Jelin Hazırlanması.....	54
2.1.4.5 Enzim Kesimleri İçin Reaksiyon Karışımlarının Hazırlanması.....	55
2.1.4.6 % 3' lük NuSieve Jel Elektroforezi.....	56
2.1.5 İSTATİSTİKSEL ANALİZ YÖNTEMLERİ.....	56
III. BÖLÜM.....	57
3.1 BULGULAR.....	57
3.1.1 Kontrol ve Çalışma Gruplarının Genel Özelliklerinin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizleri.....	57
3.1.1.1 Kontrol Grubu.....	57
3.1.1.2 Çalışma Grubu.....	58
3.2 <i>CES1</i> H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmlerine Ait Bulgular.....	60
3.2.1 <i>CES1</i> H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmleri Analizi İçin PCR Amplifikasyonları.....	60
3.2.1.1 <i>CES1</i> H199R Gen Polimorfizmi PCR Amplifikasyonu.....	60
3.2.1.2 <i>CES1</i> N75S Gen Polimorfizmi PCR Amplifikasyonu.....	61
3.2.1.3. <i>CES1</i> I49V Gen Polimorfizmi PCR Amplifikasyonu.....	61

3.2.2 Restriksiyon Enzim Kesimi Sonuçlarına Göre Olguların <i>CES1</i> H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmleri İçin Genotiplendirilmeleri Ve Elde Edilen Bulgular .....	62
3.2.2.1 <i>CES1</i> H199R Gen Polimorfizmi Genotiplendirilmesi .....	62
3.2.2.2 <i>CES1</i> N75S Gen Polimorfizmi Genotiplendirilmesi .....	64
3.2.2.3 <i>CES1</i> I49V Gen Polimorfizmi Genotiplendirilmesi .....	65
3.2.3 <i>CES1</i> R199H, N75S, I49V Gen Polimorfizmlerinin Genotip ve Haplotip Analizleri .....	66
3.2.3.1 Kontrol Grubu .....	66
3.2.3.2 Çalışma Grubu .....	66
3.2.3.3 Kontrol ve Çalışma Gruplarının <i>CES1</i> H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmlerinin İstatistiksel Analizi .....	72
3.2.4. <i>CES1</i> H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmlerinin Çalışma Grubu İçerisinde Toksikiteye Göre Genotip Dağılımı .....	72
3.2.4.1 <i>CES1</i> H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmleri İle Toksikite İlişkisi İstatistiksel Analizi .....	74
3.2.5. <i>CES1</i> H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmlerinin Kontrol ve Çalışma Grubu İçerisinde Yaşa Göre Genotip Dağılımı ve Alel Sıklığı .....	74
3.2.5.1.Kontrol Grubu .....	74
3.2.5.2.Çalışma Grubu .....	75
<b>BÖLÜM IV .....</b>	<b>83</b>
4.1 TARTIŞMA .....	83
<b>BÖLÜM V .....</b>	<b>88</b>
5.1 SONUÇ VE ÖNERİLER .....	88
<b>BÖLÜM VI .....</b>	<b>89</b>
6.1. ÖZET .....	89
6.2. ABSTRACT .....	91
<b>BÖLÜM VII .....</b>	<b>93</b>
7.1 YARARLANILAN KAYNAKLAR .....	93
7.2 KISALTMALAR .....	104
7.3. ÖZGEÇMİŞ .....	106

# I. BÖLÜM

## 1.1 GİRİŞ VE AMAÇ

Geçtiğimiz yüzyıl içinde gerçekleştirilen ilaç araştırmaları ve sonucunda ilaç üretimi, dağıtımı ve tüketimi bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de hızla artış göstermiştir. Bu artışa paralel olarak da ilaç güvenliği konusu, bütün ülkelerin ilgili kamuoylarında güncel tartışma konuları arasında yerini almış bulunmaktadır (59).

İlaç güvenliği konusu, özellikle toksisite ve ilaç yanıtı gibi alt konuları gündeme getirmiştir. İlaç yanıtı ve toksisite uzun yıllar doğrudan kullanılan ilaç dozuyla ilişkilendirilmiş olsa da, geçen zaman içerisinde, bu konuların genetik faktörlerle ilgili olabileceği yorumu getirilmiştir. Bununla ilgili olarak, ilaç yanıtındaki bireysel değişiklikleri açıklayan “farmakogenetik” kavramı ilk olarak 1959 yılında ortaya atılmıştır.

Son yıllarda farmakogenetik çalışmalar multidisipliner bir şekilde tıbbın tüm alanlarında uygulamaya konulmak üzere hız kazanmıştır. Bununla birlikte Onkoloji alanı, farmakogenetik çalışmaların en fazla ihtiyaç duyulduğu alanlardan biridir. Bu ihtiyaç, kişiye en uygun kemoterapötik ajan ve dozların hala kesin olarak bilinemeyip, genellikle deneme yanılma yolu ile uygulanmasından, ilaca bağlı olarak ortaya çıkan yan etkilerin ağır sonuçlar doğurmalarından ve bazen ölüm ile sonuçlanabilmesinden kaynaklanmaktadır.

Kanser tüm dünyada ve ülkemizde sürekli artış gösteren bir hastalıktır. Yüz civarında kanser tipi olmakla birlikte en yaygın kanser tipleri cinsiyet

hormonlarıyla doğrudan veya dolaylı olarak ilişkili olan kanserlerdir. Bunlar, erkeklerde prostat kanserleri; kadınlarda ise uterus, over ve meme kanserleridir.

Her kanser kendi içinde, tümörün safhasına göre derecelendirilmektedir. Kanserlerin genellikle IV. dereceleri (grade IV) en son safhayı gösterir ki, bu da metastaz yani herhangi bir tümör odağından ayrılan tümör hücresinin çeşitli yollarla başka bir doku ya da organa giderek orada tümör odağı oluşturması safhası olarak ele alınır. Metastaz olayı meme kanserinde oldukça yaygındır. Meme kanserinin en çok metastaz yaptığı yerler akciğerler, lenf nodları ve kemiklerdir.

Metastatik meme kanseri (MMK) tedavisinde, diğer kanserlerde olduğu gibi, ilaçla tedavi rejimleri önemli bir yer tutar. Bu amaçla kullanılan bazı ilaçlar siklofosamid, metotreksat, fluorourasil, doksorobisin, dosetaksel, vinorelbin, gemitabin ve capecitabine' dir. Bunlardan capecitabine oral yolla alınan etkili bir kemoterapötik ajandır. Tümör hücrelerini hedefleyerek sitotoksositeye neden olur (33, 37). Capecitabine' in aktif 5-Fluorourasil bileşiğine dönüşebilmesi için, karaciğerde öncelikle Karboksilesteraz 1 (CES1) ve Karboksilesteraz 2 (CES2), sonra sitidin deaminaz (CDA) ve timidin fosoforilaz (TP) enzimleri tarafından metabolize edilmesi gerekir (69). Capecitabine' e ilaç yanıtı, metabolik yolağında rol alan bu enzimlerin aktiviteleriyle ilgilidir. Bunlardan CES1; insanda karaciğerde, bağırsaklarda, olgun monosit ve makrofajların endoplazmik retikulum lümeninde ifade edilir. Geni oldukça polimorfik olan CES1' in ilaç yanıtı üzerindeki etkileri henüz tam olarak bilinmemektedir.

Bu alışmada Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı' na MMK Őikayetiyle gelen hastalardan yola çıkılarak, Türk toplumu MMK olgularında *CES1* genine ait H199R, N75S ve I49V gen polimorfizmlerinin sıklıkları ve ilaç yanıtlarıyla iliŐkilerinin araŐtırılması amaçlanmıŐtır.

## **1.2 GENEL BİLGİLER**

Kanser, normal bir vücut hücresinin çeşitli etkenlerle genetik yapısının değişerek kontrolsüz bölünmesi olarak tanımlanabilir. Tüm kanser hücrelerinin ortak özellikleri, sınırsız bölünme kapasiteleri ve kan ya da lenf dolaşımıyla, uzak organlara gidip orada yeni tümörler oluşturabilmeleridir.

Kanserler arasında genellikle cinsiyet hormonlarıyla ilgili olanlar yaygın ve ölümcül olanlarıdır. Bunlar, erkeklerde prostat kanseri, kadınlarda ise uterus, over ve meme kanserleridir.

### **1.2.1. MEME KANSERİ**

#### **1.2.1.1 MEME KANSERİNİN EPİDEMİYOLOJİSİ**

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipi olup, dünyada akciğer kanserinden sonra ölümlere neden olan en önemli ikinci kanserdir (2). Dünya Sağlık Örgütü' nün (WHO, World Health Organization) 2002 yılı istatistiklerine göre her yıl 220.000 yeni meme kanseri vakası tespit edilirken, yılda ortalama beş milyon kadın da meme kanseri tedavisi görmektedir. Türkiye' de ise kanser ölümlerinin % 25' inden yine meme kanseri sorumludur (77).

#### **1.2.1.2 MEME KANSERİNİN ETİYOLOJİSİ**

Çoğu olguda gelişen meme kanserinin etiyolojisi bilinmemekle birlikte, ilgili olduğu düşünülen pek çok faktör ileri sürülmüştür. Bunlardan bazıları üremeyele ilgili etkenler, hormonal etkenler, genetik etkenler, beslenme ve sosyo-ekonomik durumdur.

### **1.2.1.2.1 ÜREMEYLE İLGİLİ ETKENLER**

Yapılan çalışmalarda üremeyle doğrudan ya da dolaylı olarak ilişkili olan faktörlerin meme kanserine karşı koruyuculuk ya da yatkınlık sağlayabilecekleri sonucuna varılmıştır.

Örneğin erken yaşta görülen menstruasyonun, meme dokusunun östrojene maruz kalma süresini uzattığı için, meme kanseri riskini artırdığı belirtilmiştir (48). Doğum yapmamış ya da evlenmemiş olan kadınlarda da meme kanseri görülme riski daha fazladır. Ayrıca, ilk doğumunu 35 yaşından sonra yapmış veya geç menopoza girmiş olan kadınlarda da meme kanseri geliştirme riski yüksektir (14, 54).

Buna karşılık, uzun süreli laktasyonun (doğum sonrası süt verme) ovulasyon dönem sayısını azaltarak, meme kanserine karşı koruyucu etki yaptığı varsayılmaktadır (29, 47).

### **1.2.1.2.2 HORMONAL ETKENLER**

Laktasyonun yanında gebeliğin de meme kanserine karşı koruyucu olduğu ileri sürülmektedir. Deneysel olarak farelerde puberteden önce ooforektomi (overlerin alınması) yapılmasıyla meme kanseri oranının çok düştüğü; buna karşılık erkek farelerde kastrasyon (hadım edilme) sonrası östrojen verilmesinin yüksek oranda meme kanseri oluşturduğu gözlenmiştir (63).

Oral kontraseptif (doğum kontrol hapı) kullanım süresinin, meme kanseri riskini artırıp artırmadığıyla ilişkili çalışmalarda, oral kontraseptif kullanım süresiyle risk artışı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (11). Ancak, 45 yaşın altındaki kadınlarda uzun süreli oral kontraseptif kullanımının etkisi

araştırıldığında bunun meme kanseri riskinde anlamlı bir artışa neden olduğu gözlenmiştir (57).

Androjen düzeyinin yüksek olduğu postmenopozal dönemdeki kadınlarda yine meme kanseri geliştirme riski yüksektir.

### **1.2.1.2.3 GENETİK ETKENLER**

Meme kanseri olan anne, kız ve kız kardeşler arasındaki meme kanseri görülme insidansı normal popülasyondan iki kat fazladır. Meme kanseri aile hikayesi olanlarda meme kanserinin ortaya çıkma yaşı daha erken ve bilateral (çift taraflı) olma eğilimindedir (14, 63).

Meme kanseriyle ilişkili olduğu düşünülen bazı genler bulunmuştur. Bunlardan biri olan *BRCA1*, genomda 17q21' e lokalizedir ve genindeki mutasyonların ailesel meme ve over kanserlerinde rol oynadığı saptanmıştır. Mutant *BRCA1* genine sahip kadınlarda 70 yıllık yaşam periyodunda meme kanseri geliştirme riski % 85 olarak hesaplanmıştır (72).

Meme kanseriyle ilişkili olduğu düşünülen bir diğer gen ise *BRCA2*' dir. Genomda 13q12.3' e lokalize olan bu gendeki mutasyonlar, hastalığın erken ve bilateral olarak ortaya çıkmasında önemlidir. *BRCA1* ve *BRCA2*' nin DNA çift zincir kırıklarını tamir eden enzimleri kodladıkları daha sonraları gösterilebilmiştir.

Meme kanseri olan bir kadının yaşamı boyunca ikinci kez meme kanseri geliştirme riski % 25-30' dur. Meme cerrahisi sonrası geride kalan meme dokusu risk altındadır. Fakat bu risk, diğer memede kanser oluşma riski kadar ve her yıl için % 0.5-1' dir (24).

#### **1.2.1.2.4 BESLENME**

Deney hayvanı modellerinde gösterildiği gibi, diyetteki hayvansal yağların % 10' dan fazla olması meme kanseri riskini artırmakta; buna karşılık % 5' in altında olması ve özellikle yağ içermeyen diyetle beslenme, tümörün büyümesini dahi inhibe edebilmektedir (14, 43, 64).

Liften zengin gıdaların bağırsaktan östrojen absorpsiyonunu engelleyerek meme kanserini önleyebileceği düşünülmektedir (65). Bazı çalışmalara göre de bitkisel ağırlıklı beslenme ile meme kanseri arasında herhangi bir ilişki bulunmamaktadır (13).

Şekerli besinlerin, kırmızı etin, kızartılmış besinlerin (özellikle akrilamid içeren patates kızartması ve cipsin) fazlaca tüketilmesinin meme kanseri riskini oldukça artırdığı belirlenmiştir (45, 53).

Ayrıca, düzenli alkol kullanan kadınlarda meme kanserinin daha fazla görüldüğü saptanmıştır (45).

#### **1.2.1.2.5 SOSYO-EKONOMİK DURUM**

Sosyo-ekonomik düzeyleri düşük olan kişi ya da toplumlarda meme kanserinin görülme oranı, sosyo-ekonomik yönden gelişmiş olanlara oranla, daha azdır. Bunun nedenleri arasında, sosyo-ekonomik yönden gelişmiş kadınların doğurmamaları ya da geç doğurmaları, emzirmemeleri, aşırı 'fast food', sigara ve alkol tüketimleri, egzersizden yoksun monoton yaşam sürmeleri sayılabilir (4).

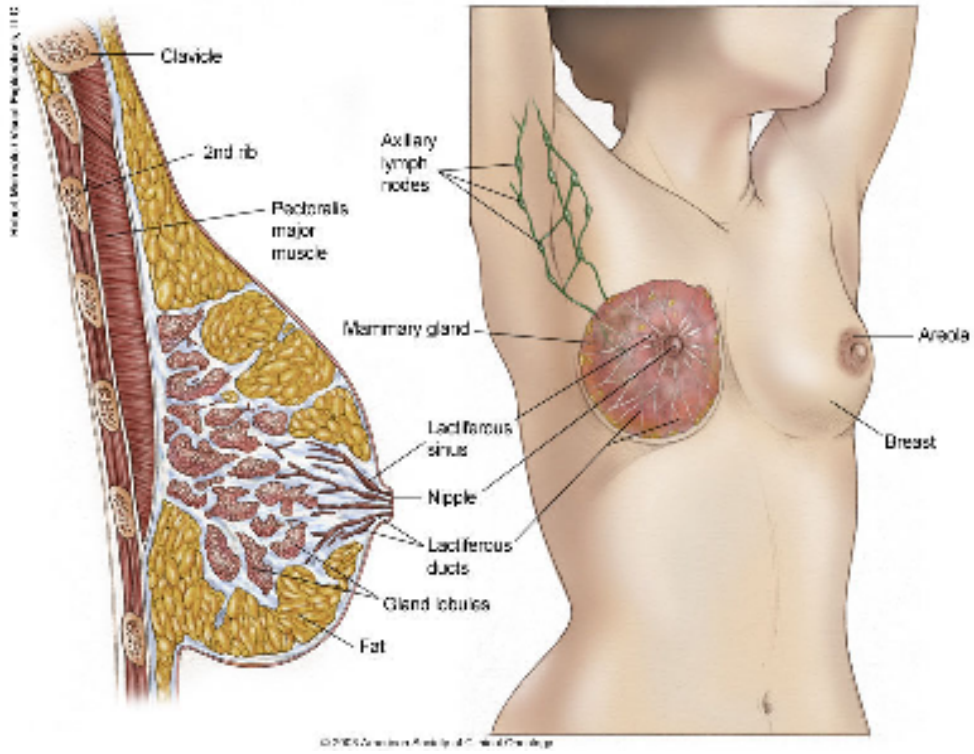
#### **1.2.1.3 MEME KANSERİNİN PATOLOJİSİ**

Meme süt bezlerinden, süt kanallarından, dolgu malzemesi olan yağ dokusundan ve taşıyıcı olan lif dokusundan oluşmaktadır. Süt bezleri lob adı

verilen gruplarda toplanirlar. Her lob, pek çok sayıdaki daha küçük lobu içerir. Bu küçük loblar 15-20 adet, üzüm benzeri minik ampul şeklindeki bezleri içerirler ve süt buralarda üretilir. ‘Duct’ adı verilen küçük kanalcıklar, üretilen sütü göğüs ucuna taşırlar.

Göğsün içinde kas yoktur, ama pectoralis major ve pectoralis minor adı verilen iki kas göğsün altındaki kaburgalara bağlı olarak bulunurlar (Şekil 1).

Göğsün içinde, göğse oksijen ve besin taşıyan damarlar bulunur. Damarlardaki kan ile birlikte dolaşımda bulunan lenf sıvısı, damar duvarlarından sızar ve hücrelerin arasındaki boşlukta birikir. Bunların toplanması ve ana kan dolaşımına geri kazandırılması için lenf kanalları bulunur. Lenf kanalları boyunca lenf sıvısı, lenf bezleri adı verilen fasulye tanelerine benzeyen organlar tarafından süzülür. Göğüste toplanan lenf sıvısının büyük bir bölümü koltuk altında toplanır; burada harici lenf bezleri tarafından süzöldükten sonra lenf sıvısı dolaşım sistemine geri döner.



### **Şekil 1: Meme anatomisi**

Solda, meme dokusu enine kesiti, sağda önden görünüşü bulunmaktadır. Enine kesitte klavikula kemiği, ikinci kaburga kemiği, pectoralis major kasi, süt salıcı sinüs, meme ucu, süt salıcı kanal, salgı lobülleri ve yağ doku gösterilmektedir. Önden görünüşte ise bunlara ek olarak, aksiler lenf nodları gösterilmektedir.

Meme kanseri bir takım belirtilerle kendini gösteren ve çeşitli evreleri olan bir hastalıktır. Bulunduğu evreye göre hastalığın ciddiyeti ve buna bağlı olarak tedavi seçenekleri de çeşitlilik gösterir.

#### **1.2.1.3.1 BELİRTİLER**

Meme kanserinin en yaygın belirtisi ağrısız bir kitlenin hissedilmesidir. Ancak, hastaların % 10 kadarı kitle olmaksızın ağrı hissetmektedir. Meme kanserinin daha seyrek görülen belirtileri arasında, göğüste oluşan geçici olmayan değişimlerdir; örneğin kalınlaşma, şişlikler, deride tahriş ya da bozulmalar ve anlık akıntılar, aşınma, göğüs ucunun hassaslaşması ya da içe dönmesi gibi.

Tedavisi en kolay olan erken aşamadaki meme kanserleri, tipik olarak hiç bir belirti göstermezler. Bu nedenle, kadınların meme kanserinin erken tanısı için önerilen kontrol programlarına uylamaları çok önemlidir (32).

#### **1.2.1.3.2 TANI**

Diğer kanserlerde olduğu gibi meme kanserinde de erken tanı çok önemlidir. Erken tanı tedavi seçeneklerinin sayısını, tedavinin başarıya ulaşmasını ve hayatta kalma şansını önemli oranda artırmaktadır.

Erken tanı için temelde önerilen ve birbirini tamamlayıcı üç yöntem bulunmaktadır. Bunlar, kişisel (kendi kendine yapılan) göğüs kontrolleri, klinik (doktor tarafından yapılan) göğüs kontrolleri ve mamogramlardır.

Kendi kendine muayene erken evredeki tümörlerin, özellikle yıllık mamogramlar ve klinik meme muayeneleri arasında gelişen tümörlerin saptanmasında yararlıdır. Kendi kendine yapılan aylık meme muayeneleri normal koşullarda memenin nasıl görüldüğü ve nasıl duyumsandığı konusunda kişiye bir fikir verir. Bu şekilde kalınlaşma, yumrular, spontan meme ucu akıntısı, büzüşme ya da çukurlaşma gibi değişiklikler meydana geldiğinde kolayca fark edilmesini sağlarlar.

Klinik meme muayenesi olası değişiklikler açısından meme ve koltuk altının görünümünü ve dokusunu kontrol etmek amacıyla hekimler tarafından yapılmaktadır. Amerikan Kanser Örgütü (ACS, *American Cancer Society*) yirmili ve otuzlu yaşlardaki kadınların rutin sağlık kontrollerinin bir parçası olarak en azından 'üç yılda bir kez' klinik meme muayenesinin yapılmasını önermektedir. Kırk yaşın üzerindeki kadınlar da yılda en az bir kez bu muayeneden geçmelidirler.

Mamogram memeyi görüntülemek üzere X-ışınlarının kullanıldığı bir yöntemdir ve elle hissedilemeyen tümörleri saptayabilmektedir. Mamogram mevcut tarama yöntemlerinin en iyisi olarak nitelendirilmektedir. Tümörü, en etkin biçimde tedavi edilebileceği erken evrede saptayabilmektedir. Kırk yaş ve üzerindeki kadınların her yıl mamogram yaptırmaları önerilmektedir (31, 32).

### 1.2.1.3.3 EVRELER

Kanserin evrelendirilmesi amacı ile TNM evrelendirme sistemi geliştirilmiştir. Burada T tümörün boyutunu, N lenf bezlerinin durumunu ve M kanserin metastaz yapıp yapmadığını belirtir.

Kanser evrelerinin numaralar ile belirtilmesi; kanserin evresini, tümörün boyu ve kanserin yayılımı tanımlar. Evrelendirme sisteminde evreler 0 ile 4 arasındaki rakamlar ile belirtilir (Tablo 1).

**Tablo 1:** Meme Kanserinin Evrelendirilmesi (67)  
(2002 yılı Wittekind, Ch; Sobin, L. H' e göre verilmiştir)

	Evre 0	Tis	N0	M0
Erken evre	Evre I	T1	N0	M0
	Evre IIA	T0	N1	M0
		T1	N1	M0
		T2	N0	M0
	Evre IIB	T2	N1	M0
T3		N0	M0	
Lokal ileri evre	Evre IIIA	T0	N2	M0
		T1	N2	M0
		T2	N2	M0
		T3	N1	M0
		T3	N2	M0
Metastatik	Evre IIIB	T4	N(herhangi)	M0
	Evre IIIC	T(herhangi)	N3	M0
	Evre IV	T(herhangi)	N(herhangi)	M1

Evre 0: Bu evre aynı zamanda *'in-situ'* olarak da adlandırılır. Evre 0 kanserleri, yerlerinde kalmış ve çevre dokulara sızmamış kanserlerdir. Klinik kontrollerde tanısı konulan kanserlerin ~ % 15 - % 20' si Evre 0 kanserleridir. Evre 0 kanserleri oluştukları yerlere göre ikiye ayrılırlar; süt bezlerinde (lobül) oluşmuşlarsa "lobular karsinoma *in situ*" (LCIS), süt kanallarında (ductus) oluşmuşlarsa "ductal karsinoma *in situ*" (DCIS) olarak adlandırılırlar.

Evre I : Orijinal tümör 2 cm ya da daha küçüktür ve lenf bezlerine sızmamıştır (Tablo 2). Evre I kanserlerin tedavisi için genellikle iki yol izlenmektedir. 1) Meme koruyucu tedavi: Lumpektomi (kanserli kitlenin etrafındaki bir parça sağlıklı göğüs dokusu ile birlikte alınması) ve koltuk altı lenf bezlerinin alınmasını takiben radyasyon tedavisi gerçekleştirilir. Gerekliyse kemoterapi veya hormonoterapiler ile desteklenir. 2) Mastektomi (kanserin bulunduğu göğsün alınması operasyonu) ve bunun yanında koltuk altı lenf bezlerinin çıkarılması önerilir.

Evre IIA: Orijinal tümör 2 - 5 cm arasındadır ve lenf bezlerine sızmamıştır (Tablo 2).

Evre IIB: Orijinal tümör 2 - 5 cm arasındadır ve koltuk altı lenf bezlerine sızmıştır ya da orijinal tümör 5 cm den daha büyüktür ve koltuk altı lenf bezlerine sızmamıştır (Tablo 2).

Evre II için uygulanan tedavi genellikle Evre I ile aynıdır; ancak tümör büyükse ya da lenf bezlerine sızmışsa kemoterapi, hormonoterapi ve radyoterapi tamamlayıcı olarak önerilir.

Evre IIIA: Orijinal tümör koltuk altı lenf bezlerine ve göğüs dışı dokulara sıçramıştır (Tablo 2). Bu evrede meme kanserinin standart tedavisi mastektomidir; sonrasında göğsün yeniden yapılmasını hedefleyen estetik operasyonlar gerçekleştirilebilir. Tümörün sağlıklı göğüs dokusundan kesilerek ayrılabilmesinin olası olduğu durumlarda, lampektomi de yapılabilir. Operasyon sonrasında genellikle radyoterapi ve sistematik tedavi olarak kemoterapi ve hormon tedavisi uygulanır. Eğer tümör çok büyükse, operasyon öncesinde tümör boyunun küçültülmesi amacıyla kemoterapi uygulanabilir; bu tip kemoterapi uygulamalarına neoadjuvant kemoterapi denir. Bazı durumlarda neoadjuvant kemoterapiye yardımcı olması amacıyla operasyon öncesi hormon tedavisi de uygulanır.

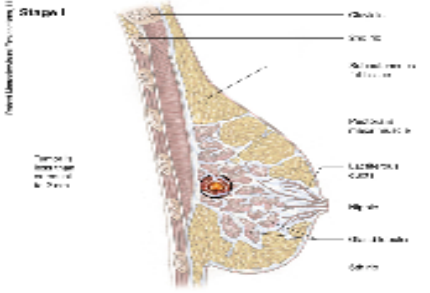
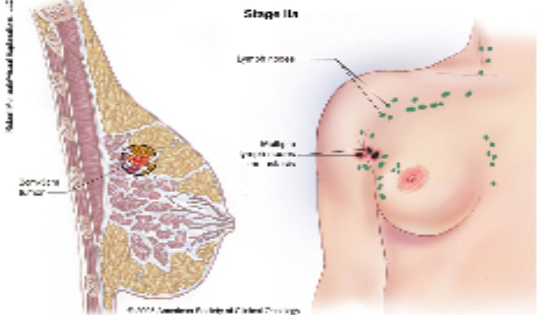
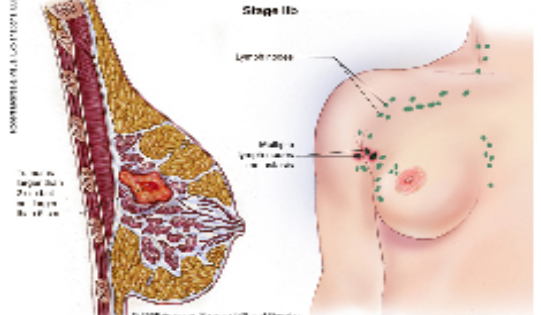
Evre IIIB: Orijinal tümörün boyutuna bakılmaksızın, tümörün kendisini göğüs duvarına bağladığı ve göğüs lenf bezlerine sıçradığı durumlarda kanser Evre IIIB olarak adlandırılır (Tablo 2). Evre IIIB meme kanserinin standart tedavisi genellikle neoadjuvant kemoterapi ile başlar. Orijinal tümör boyunun istenen oranda küçülmesi ile birlikte, lampektomi veya mastektomi yapılabilir. Operasyon sonrası uygulanan standart tedavi ise radyoterapi, kemoterapi ve hormon tedavisidir.

Evre IIIC: Koltuk altındaki 10 veya daha fazla sayıdaki lenf nodunda, memedeki tümörle aynı taraflı köprücük kemiği altındaki lenf nodları ve komşu boyun lenf nodlarında veya meme içindeki lenf nodları ve kolun altındaki lenf nodlarında yayılım görülür (Tablo 2).

Evre IV: Kanser göğüs dışına vücudun diğer bölümlerine (kemikler, akciğer, karaciğer, beyin v.s.) sıçramıştır, yani metastaz yapmıştır (Tablo 2). Evre IV meme kanseri tedavisindeki temel amaç, yaşam süresini ve kalitesini

arttırmak ve hastanın şikâyetlerini gidermektir. Tedavide genellikle kemoterapi ve hormon tedavisi gibi tüm vücudu etkileyen sistematik tedaviler uygulanır. Hastanın şikâyetlerinin azaltılması amacı ile bazı durumlarda mastektomi de önerilebilir (34).

**Tablo 2:** Meme kanserinde evrelere göre doku ve organ tutulumları.

EVRE	ŞEKİL	AÇIKLAMA
Evre I	 <p>Stage I</p> <p>Tümör 2 cm'den küçük ve lenf nodu tutulumu yoktur.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Tümör &lt; 2.0 cm</li> <li>•Lenf nodu tutulumu yok (N0)</li> <li>•Metastaz yok (M0)</li> </ul> <p>(T1, N0, M0)</p>
Evre II A	 <p>Stage IIa</p> <p>Lenf nodu tutulumu vardır.</p> <p>Mamilla ve çevresinde tutulum olabilir.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Tümör &gt; 2.0 &lt; 5 cm</li> <li>•Aksiller lenf nodu tutulumu yok/var (N0/1)</li> <li>•Metastaz yok (M0)</li> </ul> <p>(T1/T1mic, N1, M0) (T2, N0, M0) (T0, N1, M0)</p>
Evre II B	 <p>Stage IIb</p> <p>Lenf nodu tutulumu vardır.</p> <p>Mamilla ve çevresinde tutulum olabilir.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Tümör &gt; 2.0 &lt; 5 cm veya &gt;5</li> <li>•Aksiller lenf nodu tutulumu yok/var (N0/1)</li> <li>•Metastaz yok (M0)</li> </ul> <p>(T2, N1, M0) (T3, N0, M0)</p>

Evre III A		<ul style="list-style-type: none"> <li>•Tümör &lt; 5 - &gt;5 cm</li> <li>•Aksiller lenf nodu tutulumu var (N1/2)</li> <li>•Metastaz yok (M0)</li> </ul> <p>(T1, N2, M0 veya T2, N2, M0) (T3, N1, M0 veya T3, N2, M0)</p>
Evre III B		<ul style="list-style-type: none"> <li>•Tümör göğüs duvarına yayılmış</li> <li>•Aksiller lenf nodu tutulumu yok/var (N0-2)</li> <li>•Metastaz yok (M0)</li> </ul> <p>(T4, N0, M0) (T4, N1, M0) (T4, N2, M0)</p>
Evre III C		<ul style="list-style-type: none"> <li>•Tümör farklı boyutlarda</li> <li>•Lenf nodu tutulumu var (N3)</li> <li>•Metastaz yok (M0)</li> </ul> <p>(Herhangi T, N3, M0)</p>
Evre IV		<ul style="list-style-type: none"> <li>•Tümör – herhangi</li> <li>•Lenf nodu tutulumu - herhangi</li> <li>•Metastaz var (M1)</li> </ul> <p>(Herhangi T, Herhangi N, M1)</p>

### **1.2.1.3.3.1 METASTAZ**

Kanser hücreleri büyüme ve bölünmelerini kontrol etme yeteneklerini kaybetmişlerdir. Sonuç olarak komşu dokuları istila edebilen malign (kötü huylu) tümörler geliştirebilirler. Bazen kanser hücreleri primer (birincil) tümörden ayrılarak kan veya lenf dolaşım sistemine katılırlar ve bu yolla, diğer dokulara yerleşirler. Orada büyür, gelişir ve sekonder (ikincil) tümör odaklarını oluştururlar. Metastaz olarak adlandırılan bu olay, bilinen kanserlerin son safhası olup, ölümlü sonuçlanma olasılıkları yüksektir (22).

Metastatik meme kanserinde metastazlar genellikle lenf nodları, akciğerler, beyin ve kemiklere olmaktadır. Özellikle beyin ve kemik metastazlarında tedavi oldukça zor ve sıkıntılıdır. Bu nedenle özellikle ilaçla tedavi metastazda çok önemli bir yer tutar. Kanser son aşamasında olan hastalar için, kullanılan ilacın efektif ve yanıt alınabilen bir ilaç olması çok önemlidir. Burada farmakogenetik bilgi devreye girer.

### **1.2.2 FARMAKOGENETİK**

İlaç güvenliği konusu özellikle 20. yüzyılın ortalarından itibaren tartışılmaya başlanmış ve konuyla ilgili daha kapsamlı araştırmalar yapılarak, farklı bakış açıları değerlendirilmeye çalışılmıştır. İlerleyen zaman içerisinde, farmakolojiyle ilgili birçok yeni kavram da ortaya çıkmıştır. İlk kez 1957' de, advers veya yan etki olarak değerlendirilen birçok reaksiyonun gerçekte karaciğerdeki ilaç metabolize eden enzimlerin aktivitelerindeki değişikliklerden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Bundan çok kısa bir süre sonra, 1959 yılında "farmakogenetik" kavramı ortaya atılmıştır (16).

Klinik farmakolojinin alanlarından biri olan farmakogenetik, genetik farklılıklar sonucunda ilaç yanıtında bireyler arasında gözlenen değişiklikleri

araştıran bir bilim dalıdır (1, 20). Farmakogenetik aynı zamanda farmakoterapiye rehberlik edip, bireysel ve bilime dayalı tedavi seçenekleri sunarak, hastalığın prognozunu geliştirmek amacıyla genetik bilgiyi kullanmaktadır (17).

Farmakogenetik kavramının ortaya atılmasıyla birlikte ilaç tedavisi ve kalıtım arasındaki ilişki araştırılmaya başlanmış ve 'normal' dozlarda alınan ilaçların yüzlerce olguda meydana getirdikleri advers reaksiyonda kalıtımın rolü ortaya konmaya çalışılmıştır. Terapötik indeksi (toksik bir etki meydana getirmek için gerekli dozun, istenen terapötik cevabı elde etmek için gerekli doza oranı) dar olan ilaçlar için bu durum daha çok geçerli olmaktadır. Birçok olguda, kişinin aldığı ilaçtan beklenen etkinin görülmemesinin nedeni de bu olaya dayanmaktadır (16).

İlaç metabolizması ve yanıtında rolü bulunan genler ve bu genlerdeki bazı polimorfizmler günümüzde tespit edilmiş durumdadır. İlaçların metabolizmaları, kendi içlerinde gösterdikleri metabolik basamaklara göre faz I ve faz II reaksiyonları olmak üzere ikiye ayrılırlar ve burada yer alan enzimler birbirlerinden farklıdırlar.

#### **1.2.2.1. FAZ I REAKSİYONLARI VE ENZİMLERİ**

Faz I reaksiyonlarında genellikle ana bileşiğe ya işlevsel bir grup eklenir ya da işlevsel bir grubu maskelenir. Faz I reaksiyonları farmakolojik aktivitenin kaybolmasına neden olmakla birlikte, ilaç aktivitesinin gecikmesine ya da artmasına da neden olabilirler. Faz I biyotransformasyon ürünleri hızlı bir şekilde idrar içine atılmazlarsa, endojen bileşiklerle reaksiyona girerek

suda çözünlükleri çok düşük olan konjugatları oluştururlar. Nadiren, bir ilacın farmakolojik aktivitesi metabolizması sonucu değişebilir.

Faz I sisteminin temel enzimleri Sitokrom P450 (CYP450) enzim süper ailesi üyelerindedirler (30). Bununla birlikte, alkol dehidrogenaz (ADH) ve karboksilesterazlar (CES) da Faz I enzimleri arasında yer alır.

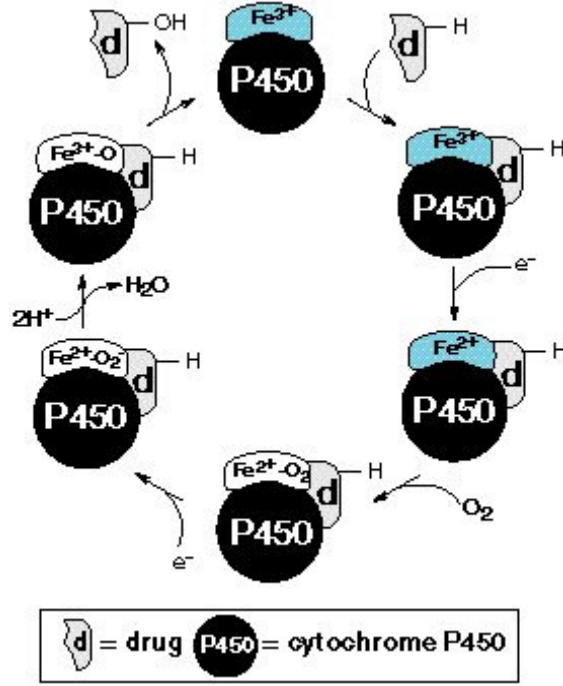
### **1.2.2.1.1 SİTOKROM P - 450 AİLESİ**

İlaç metabolizmasında kalıtsal farklılıklara yol açan enzimlerden çoğu sitokrom P-450 (CYP450) ailesine üyedirler. Bu ailedeki enzimler ilaç biyotransformasyon mekanizmalarının en temel katalizatörleridir. CYP450 enzimleri 'hem' grubu taşıyan ve çeşitli dokuların granülsüz endoplazmik retikulumlarında lokalize olmuş proteinlerdir.

İnsan genomunda 50 farklı sitokrom (CYP) kodlayan gen bulunmakla birlikte, günümüzde yalnızca 12 adet CYP' ye ilişkin veriler bulunmaktadır. Sayıları gittikçe artan çeşitli kimyasalların, besinsel zehirlerin ve ilaçların metabolizmalarına uyum sağlamak için P-450 enzimleri zaman içerisinde farklılaşmışlardır. Farklılaşma sonucu oluşan enzim ailesi çok çeşitli oksidasyon reaksiyonlarını katalize eder hale gelmişlerdir ve kimyasal yapıları farklı substratlara karşı da aktivite gösterebilmektedirler (30) (Şekil 2).

Polimorfik P-450' ler ve diğer enzimler, popülasyonu genel anlamda iki gruba ayırırlar: Yavaş metabolize ediciler ve hızlı metabolize ediciler. Yavaş metabolize edicilerde, enzimler ya inaktiftir ya da disfonksiyoneldir. Hızlı metabolize edicilerde ise enzim aktivitesi normaldir (28).

CYP 450 süper ailesinden en çok araştırılmış olanları CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 ve CYP3A4' dür (Tablo 3).



**Şekil 2:** Bir ilacın sitokrom P-450 enzim sistemi tarafından oksidasyonu. Aktif bölgedeki hem demiri “Fe” olarak gösterilmiştir. Elektronlar sitokrom P-450 redüktaz aracılığı ile NADPH’ den sağlanmaktadır (30).

#### 1.2.2.1.2 ALKOL DEHİDROGENAZ

Alkolün metabolik yıkım hızının bireyler arasındaki farklı genetik özelliklere bağlı olarak değişkenlik gösterdiği, ikiz araştırmalarıyla kanıtlanmıştır. Buna göre, bireyler arasındaki farklı alkol duyarlılıkları, alkolü inaktive eden alkol dehidrogenaz (ADH) enziminin alkolü yavaş ya da hızlı yıkan izozimlerinin bulunmasından kaynaklanır (Tablo 3).

Araştırmalar, beyaz ırkın ~ % 90' ında bu enzimin yavaş metabolize eden tipinin, Çin ve Japonya gibi Doğu Asya kökenlilerde ise hızlı metabolize eden tipinin bulunduğunu ortaya koymuştur.

Diğer bir etken ise, oluşan asetaldehiti metabolize eden aldehit dehidrogenaz (ALDH) aktivitesindeki farklılıklardır. Doğu Asya kökenlilerin ve Amerika Kızılderililerinin % 90' ında yavaş metabolize edici enzim tipinin bulunduğu gösterilmiştir. Sonuçta, Asyalı ve Kızılderililerde, alkolün ciltte, boyun ve yüzde oluşan kızarıklıklardan sorumlu olan metabolitinin asetaldehite dönüşümü hızlı, fakat yıkımı yavaş olmaktadır. Bu durum ise kanda asetaldehit birikimine ve asetaldehite bağlı istenmeyen reaksiyonların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (16).

#### **1.2.2.1.3 KARBOKSİL ESTERAZLAR**

Karboksil esterazlar (CES) ksenobiotikleri (27), kokain ve eroin gibi ester ve amid bağları içeren maddeleri (42, 19), çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan bazı ilaçları ve birçok başka sbstratı metabolize eden serin esteraz süper ailesinin üyesidirler. Bu enzimler aynı zamanda uzun zincirli yağ asit esterlerini ve tiyoesterleri de hidrolize ederler (60). Karboksilesterazlar içinde CES1 ve CES2 en çok çalışılmış olanlarıdır.

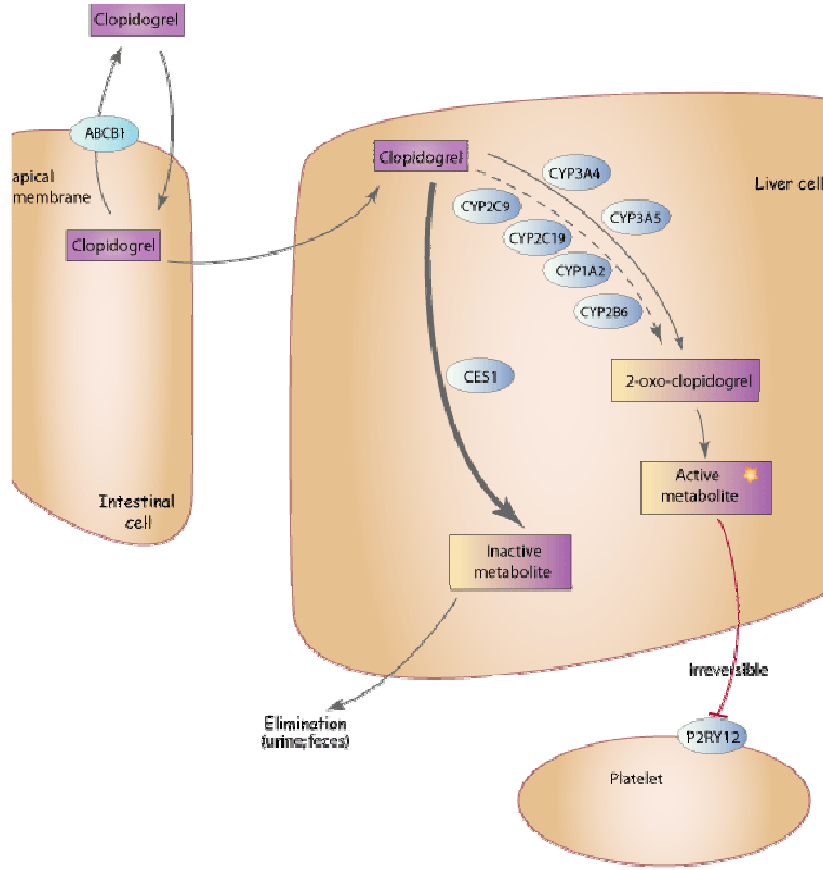
##### **1.2.2.1.3.1 KARBOKSİL ESTERAZ 1**

Karboksil esteraz 1 (CES1) insan karaciğerinde, bağırsaklarında, olgun monosit ve makrofajların endoplazmik retikulum lümeninde ifade edilen iki karboksilazdan biridir. CES1' in aromatik ve alifatik esterleri yıktığı ve hücresel kolesterol esterifikasyonu için gerekli olduğu bilinmektedir. CES1 bunun yanında akciğerdeki detoksifikasyonda ve merkezi sinir sistemini ester ve amid bileşiklerinden koruma olaylarında da rol oynamaktadır.

Karboksilesteraz eksikliğinin non-Hodgkin lenfoma ve B-hücre lenfositik lösemiye yatkınlık sağladığı düşünölmektedir

Genomda 16q13-q22.1' e lokalize olan *CES1* geni üzerinden 3 farklı izoformunu kodlayan 3 transkript varyantı transkribe edilmektedir. *CES1'* in 14 eksonu bulunur ve uzunluğu yaklaşık olarak 30 kb' dir. Kodladığı proteinin uzunluğu ise 567 amino asittir.

*CES1'* in, metabolik basamaklarında görev aldığı ilaçlar arasında irinotecan (kolon kanserlerinde) (41, 62) (Şekil 4), tamoxifen (meme kanserlerinde) (10), capecitabine (metastatik meme ve kolorektal kanserlerde) (12) gibi kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar; temocapril, cilazopril, quinapril, imidapril (19), benazepril, delapril, clopidogrel (71) (Şekil 3) gibi ACE inhibitörleri; meperidine gibi sakinleştiriciler; lidocaine gibi kalp aritmilerinde ve lokal anesteziye kullanılan ilaçlar; ibrolipim (39, 50) gibi lipoprotein lipaz aktivatörü olup kalp hastalıkları tedavisinde kullanılan ilaçlar ve dikkat eksikliği-hiperaktivite bozukluğu tedavisinde kullanılan metilfenidat içerikli ilaçlar bulunur (78) (Tablo 3).



**Şekil 3:** Clopidogrel metabolizmasında CES1' in rolü (35).

Clopidogrel, platelet (trombosit) birikimini önleyen, genellikle kalp-damar rahatsızlığı bulunan olgulara reçete ile verilen bir ilaçtır. Absorbsiyonu bağırsakta gerçekleşen bir prodrug (öncül ilaç)'dır ve hepatic CYP450 izoenzimleri tarafından aktive edilmesi gerekir. İlacın yaklaşık % 85' i CES1 tarafından inaktif karboksilik asitlere hidrolize edilir. Karaciğerde az bir kısmı CYP450 bağlı bir yolakla 2-oxo-clopidogrel' e çevrilir. Burada en önemli görevin CYP3A4 ve CYP3A5' e, daha küçük görevlerin CYP2C9, CYP2C19, CYP2B6 ve CYP1A2' ye ait olduğu düşünülmektedir. Bir tienopiridin derişimi olan clopidogrel, platelet P2RY12 purinerjik reseptörüne spesifik ve geri dönüşümsüz olarak bağlanır ve ADP (adenozin di-fosfat) tarafından düzenlenen platelet aktivasyonunu ve agregasyonunu inhibe eder. 2-oxo-clopidogrel'in hidrolizi aktif metabolitin oluşumunu sağlar. Clopidogrel' in aktif metaboliti, P2RY12 reseptörü üzerinde bulunan serbet bir sisteine bağlanan tiyol grubu içerir ve ADP bağlanmasını ve reseptör aktivasyonunu geri dönüşümsüz olarak bloke eder. Bu blokama bir kez oluşunca, plateletler 7-10 günlük yaşamları boyunca bu durumdan etkilenirler. ABCB1 (ATP-bağlayıcı kaset B1), bir MDR/TAP alt ailesi üyesi olup ksenobiyotikleri pompalar ve taşınmasında görev alır.

Şekilde clopidogrel' in sırasıyla bağırsak hücresine, karaciğer hücresine ve aktif metabolitinin trombositte geçişleri görülmektedir.

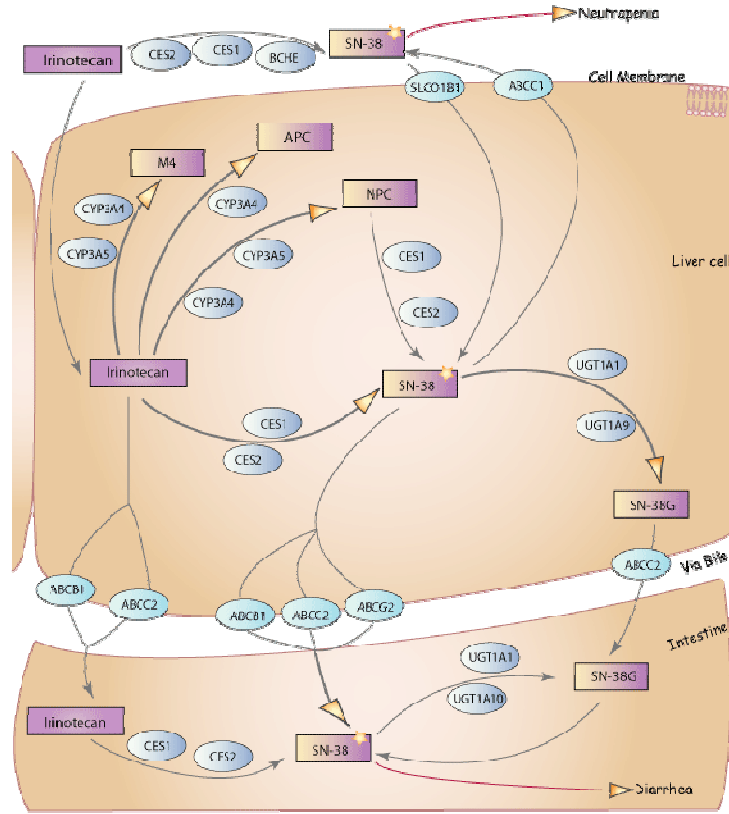
### 1.2.2.1.3.2 KARBOKSİL ESTERAZ 2

Karboksil esteraz 2 (CES 2) geniş bir multi gen ailesinin bir üyesi olup, insan karaciğerinde, bağırsaklarında, olgun monosit ve makrofajların endoplazmik retikulum lümeninde ifade edilen diğer bir karboksilazdır.

Bu enzimin spesifik fonksiyonu henüz tam olarak tanımlanamamış olunsa da, karboksilesterazların lipid metabolizmasında ve kan-beyin bariyer sisteminde rolü olduğu düşünülmektedir. *CES2*' nin iki farklı izoformunu kodlayan, iki farklı işlenmiş transkript varyantı bulunmaktadır.

Aynı ailede bulunmalarına karşılık, diğer bir karaciğer karboksilazı olan *CES1*' den, parçaladığı ilaçlardaki ester substratı özellikleri, dokulardaki dağılımı, immünolojik özellikleri ve gen regülasyonu bakımından farklılıkları bulunur (49).

*CES2*' nin metabolik basamaklarında görev aldığı ilaçlar arasında en bilineni kolon kanserinde kullanılan irinotecan' dır (41, 62) (Şekil 4; Tablo 3).



PharmGKB Copyright 2004

#### Şekil 4: Irinotecan metabolizmasında CES1 ve CES2' nin rolleri (36)

Şekildeki yolak, kemoterapik bir prodrug olan irinotecan'ın bir DNA topoizomeraz I inhibitörü olan aktif metabolit SN-38'i oluşturmak için gerçekleşen biyotransformasyonunu göstermektedir. SN-38, öncelikle UGT1A1 ile inaktif SN-38 glukuronid' e metabolize edilir. Irinotecan, genellikle metastatik kolorektal kanserlerin tedavisinde kullanılır. Irinotecan yanıtında hastalar arası geniş bir çeşitlilik ve diare (ishal), nötropeni gibi bazı yan etkiler gözlenmektedir. Bu farklılıkların, irinotecan metabolizmasında görevli enzim ve transporterlerin genetik farklılıklarından dolayı meydana geldiği düşünülmektedir. Bu yolağı etkileyebilecek iyi bilinen varyantlar, UGT1A1 (UGT1A1\*28)' deki promoter polimorfik tekrarları ve ABCB1' deki 1236C>T polimorfizmidir. UGT1A1\*28 genotipi toksisiteyle ilişkilendirilirken, ABCB1 varyantları toksisiteyle ilişkilendirilememiştir.

Tablo 3' de, Faz I enzimlerini kodlayan *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP3A4*, *ADH*, *CES1* ve *CES2* genlerine ait bazı bilgiler verilmiştir.

**Tablo 3:** Faz I enzimlerini kodlayan genler, açık adları, metabolize ettikleri ilaçlar ve ilgili hastalıklar.

<b>GEN</b>	<b>AÇIK ADI</b>	<b>METABOLİZE ETTİĞİ İLAÇLAR / MADDELER</b>	<b>İLGİLİ HASTALIKLAR</b>
<i>CYP2D6</i>	Sitokrom 2D6	Desipramin, fluoksantin, sertralin, ondansetron, tropisetron,deprenil, perheksilin	Depresyon, psikoz, hipertansiyon, aritmi
<i>CYP2C19</i>	Sitokrom 2C19	Diazepam, omeprazol, proguanil, propranolol, S-mefenitoin, heksobarbital, imipramin	Anksiyete, ülser, hiperlipidemi
<i>CYP2C9</i>	Sitokrom 2C9	Varfarin, tolbudamid, losartan, fenitoin	Yüksek kolesterol, diyabet, epilepsi
<i>CYP3A4</i>	Sitokrom 3A4	Fenitoin, griseofulvin, eritromisin, etinilestradiol	Depresyon, fungal enfeksiyon, epilepsi
<i>ADH</i>	Alkol dehidrogenaz	Alkol	Alkolizm
<i>CES1</i>	Karboksil esteraz 1	İrinotecan tamoxifen capecitabine, temocapril, cilazopril, quinapril, imidapril, benazepril, delapril, clopidogrel, meperidine, lidocaine ibrolipim, metilfenidat	Kolon kanseri, meme kanseri, metastatik meme kanseri, kolorektal kanser, aritmi, platelet aggregasyonu, dikkat eksikliği-hiperaktivite bozukluğu
<i>CES2</i>	Karboksil esteraz 2	İrinotecan	Kolon kanseri

### 1.2.2.2. FAZ II REAKSİYONLARI VE ENZİMLERİ

Faz II reaksiyonları genellikle konjugasyon reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonlarda ana bileşikteki işlevsel gruba kovalent bağ ile glukuronik asit, asetat, sülfat, glutatyon veya aminoasit bağlanır. Polaritesi yüksek olan bu konjugatlar sonra genellikle inaktive olup, idrar ya da dışkı ile vücuttan dışarı atılırlar (30).

Faz II reaksiyonlarda görev alan enzimler arasında N-asetiltransferaz (NAT2), Uridin difosfat glukuronosiltransferaz (UGT), glutatyon S-transferaz (GST), Tiyopürin S-metiltransferaz (TPMT) gibi enzimler bulunur (Tablo 4).

#### **1.2.2.2.1 N- ASETİLTRANSFERAZ 2**

Yaklaşık 50 yıl önce tanımlanmış ve geniş çapta araştırılmış olan enzim polimorfizmlerinden biri, asetilasyon polimorfizmi olarak adlandırılan N-asetiltransferaz 2 (NAT2) enziminin genetik polimorfizmidir. NAT2, başta izoniazid olmak üzere prokainamid, hidralazin ve sulfonamidler gibi bazı ilaçların yıkımında rol oynamaktadır. NAT2 aktivitesi bakımından toplumlarda bimodal (iki tip) dağılım gözlenir ve bireyler yavaş ve hızlı asetilleyiciler olarak sınıflandırılır.

Yavaş asetilleyicilerin sıklığı Japonlarda % 8 dolayında olduğu halde, bu sıklık bazı Afrika toplumlarında % 75 kadar yüksektir. Avrupa toplumlarında yavaş asetilleyici sıklığı % 50-60 dolaylarında bulunmuştur. Türk bireylerde ise NAT2 alel dağılımı Avrupa toplumlarındakine benzer ve yavaş asetilleyicilerin sıklığı % 57.4' dür (1).

#### **1.2.2.2.2 URİDİN DİFOSFAT GLUKURONOSİLTRANSFERAZ**

Uridin difosfat glukuronosiltransferaz (UGT) en önemli faz II reaksiyonu olan glukuronidasyonu katalize eder. Glukuronik asit, içerdiği çeşitli hidroksil (-OH) grupları ve bir karboksil (-COOH) grubu nedeniyle kovalent bağlandığı bileşiklerin suda çözünürlüklerini artırır. UGT diğer transferazlardan farklı olarak sitoplazmada değil, endoplazmik retikulumda bulunur (30).

UGT süper ailesinin birçok izoformu bulunur. Ana aile UGT1 ve UGT2, A ve B alt gruplarına ayrılır (18).

Bilirubin eliminasyonunda hız kısıtlayıcı enzim olan *UGT-1A1* genindeki promoter bölge polimorfizmi (-3263' de T' nin G' ye değişimi), konjuge olmayan hiperbilirubinemiye neden olur ve kernikterus (sarılık) gelişir.

Gilbert Sendromu' nda glukuronidasyon aktivitesinin % 70 azalması, *UGT-1A1* geninin promoter bölgesindeki TATA kutusundaki TA dizisinin 6 kez yerine 7- 8 kez tekrarlanmasından kaynaklanmaktadır. Crigler- Najjar Sendromu da *UGT-1A1* C1091T mutasyonuna bağlı olarak gelişir (76).

#### **1.2.2.2.3 GLUTATYON S-TRANSFERAZ**

Karaciğer ve eritrositlerde bulunan glutatyon S-transferaz (GST) enzimleri çeşitli substratların kükürt atomları üzerindeki glutatyonla konjugasyonunu sağlar (76).

GST' lerin merkapturik asit oluşumunda görevli olduklarının anlaşılmasından sonra (55), çeşitli ksenobiyotiklerin hücrel metabolizmalarından ve detoksikasyondan sorumlu oldukları görülmüştür (9, 58). Bu nedenle GST' lerin kanser ile ilişkili genler oldukları tahmin edilmektedir.

GST süper gen ailesi iyi karakterize edilmiş birçok polimorfizm içerir. Beyaz ırkın yaklaşık % 50' si *GSTM1* ve % 20' si de *GSTT1* delesyonları için homozigot taşıyıcıdır. *GSTP1* geninin de 105. kodonunda, isoleüsinin valine değişikliği ile karakterize bir polimorfizmin çeşitli kanser tipleri için yatkınlık oluşturduğu saptanmıştır (44).

#### **1.2.2.2.4 TİYOPÜRİN S-METİLTRANSFERAZ**

Tiyopürin S-metiltransferaz (TPMT) enzimleri, tiyopürinleri inaktif metabolitlerine dönüştürürler (76).

*TPMT* genindeki polimorfizmler otozomal eş baskın kalıtım gösterirler. Bireylerin % 90' ında yabancı tip olan, yüksek aktiviteli *TPMT* bulunurken, ~ % 9-10' unda heterozigot ve % 0.3' ünde de *TPMT* aktivitesi belirlenemeyen homozigot aleller bulunur (73).

Enzim yetersizliği olanlarda normal dozlardaki tiyopürinler bile hematopietik dokularda birikir ve şiddetli toksisiteye neden olur (76).

Tablo 4' de, Faz II enzimlerini kodlayan *NAT2*, *UGT*, *GST* ve *TPMT* genlerine ait bazı bilgiler verilmiştir

**Tablo 4:** Faz II enzimlerini kodlayan genler, açık adları, metabolize ettikleri ilaçlar ve ilgili hastalıklar.

<b>GEN</b>	<b>AÇIK ADI</b>	<b>METABOLİZE ETTİĞİ İLAÇLAR / MADDELER</b>	<b>İLGİLİ HASTALIKLAR</b>
<i>NAT2</i>	N-asetiltransferaz	İzoniazid, prokainamid, hidralazin, sulfonamid	Tüberküloz, aritmi, bakteriyel enfeksiyon, hipertansiyon
<i>UGT</i>	Uridin difosfat glukuronosiltransferaz	Bilirubin *Irinotecan kullanımında yan etkilere yol açar	Kernikterus, Gilbert Sendromu, Crigler-Najjar Sendromu *Diare, nötropeni
<i>GST</i>	Glutasyon S-transferaz	Ksenobiyotikler	Kanserler
<i>TPMT</i>	Tiyopürin S-metiltransferaz	Tiyopürin	Kanserler

### 1.2.3 GEN POLİMORFİZMLERİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Moleküler genetik alanındaki gelişmeler, genlerde meydana gelen değişikliklerin tespitini mümkün kılmıştır. Polimorfizmlerin tespitinde en çok kullanılan yöntem Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR, *Polymerase Chain*

*Reaction*) sonrası Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*)' dir.

### **1.2.3.1 TEK NÜKLEOTİT POLİMORFİZMLERİ**

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) genom dizisi içerisinde A, T, C yada G bazlarından birisinin değişmesiyle meydana gelen DNA dizi farklılıklarıdır. Örneğin, GGCTAC dizisinin GGGTAC dizisi şekline dönüşmesi ile bir SNP oluşur. Belirli bir SNP' den söz etmek için, o SNP' in popülasyonda en az % 1 oranında görülmesi gerekmektedir (67, 68). İnsanlar arasında genetik farklılıkların % 90' ını oluşturan SNP' ler, genomda yaklaşık her bin bazda bir meydana gelmektedirler (68). Bu SNP' lerin yaklaşık yarısı, protein kodlama bölgesinde meydana gelmekte ve insanlar arası tüm kalıtsal varyasyonların sebebini oluşturmaktadır. Fonksiyonel bir SNP, bir proteinin aminoasit dizisini veya ekspresyonunu değiştirerek, kişinin davranış özelliklerini, hastalıklara yatkınlığını, dayanıklılığını ve tedaviye verdiği yanıtı değiştirebilir.

İnsan genomunun SNP haritasının çıkarılması konusunda dünyada çok sayıda grup çalışmaktadır. Bu gruplar içinde en önemli olanlar, SNP Konsorsiyumu (TSC project) ve International HapMap Project ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org))' tir.

SNP' lerin varlıkları, pek çok değişik moleküler yöntem ile ortaya konulabilmektedir. En yaygın olarak kullanılan metod Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmidir.

### 1.2.3.1.1 RESTRİKSİYON FRAGMAN UZUNLUK POLİMORFİZMİ

SNP' lerin belirlenmesi için kullanılan moleküler biyolojik yöntemlerden biri, restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmidir (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*).

Restriksiyon endonükleaz enzimleri, çift sarmal DNA' yı özgül baz dizilerinden kesen ve bu şekilde DNA ile çalışılmasını mümkün kılan çok önemli enzimlerdir. Bu enzimler ile insan DNA' sı, 1.000 – 10.000 baz çifti uzunluğundaki fragmanlara ayrılabilir. Bu enzimler ile insan DNA' sı, 1.000 – 10.000 baz çifti uzunluğundaki fragmanlara ayrılabilir.

Bakterilerin büyük bir bölümü bir veya birkaç farklı türde restriksiyon enzimi sentezleyebilmektedirler. Asıl görevleri, bakteri içine dışarıdan giren yabancı genetik materyalleri ayrıştırarak mutasyonları önlemek ve bu şekilde bakteri DNA' sını korumaktır. Bakteriye özgül olan bu enzimler, çift iplikli DNA (dsDNA) üzerindeki özgün bir bölgeyi ('palindrom') tanır ve dsDNA' nın her iki zincirindeki fosfodiester bağına keserek DNA' yı tanıdıkları kesim noktasından parçalara ayırır. Günümüzde 500' e yakın restriksiyon enzimi değişik mikro organizmalardan elde edilmektedir. İsimleri, izole edildikleri bakterinin ilk harfi cins, ilk iki harfi tür; aynı bakteriden birkaç enzim elde edildi ise Roma rakamı ile belirtilmektedir.

RFLP yönteminde, örnek DNA bir veya daha fazla restriksiyon endonükleaz ile kesildikten sonra, fragmanlar moleküler büyüklüklerine göre jel elektroforezinde ayrıştırılır. Moleküler ağırlık standardı (belirteç) yardımıyla, fragmanların moleküler ağırlıkları belirlenir. Jel, etidyum bromür ile boyandıktan sonra, fragmanlar UV (260 nm) ışık altında görünür hale getirilir ve incelenir.

## BÖLÜM II

### 2.1 GEREÇ VE YÖNTEM

#### 2.1.1 Kontrol ve Çalışma Grubu

Kontrol ve çalışma grubumuz, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF) İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı' nda 1997-2004 yılları arası metastatik meme kanseri (MMK) tanısı almış olgular arasından seçilmiştir. Buna göre çalışma grubunu capecitabine kullanan 20 olgu ve kontrol grubunu tedavilerinde capecitabine kullanmayan 60 olgu oluşturmaktaydı.

İlaç kullanan bireyler arasında, yanıt alınan ve alınmayan, aynı zamanda toksisite görülen ve görülmeyen hastaların genetik analizleri yapılmıştır.

MMK tanısıyla izlenmiş olguların ilk tanı anlarında, tedavilerin planlanmasından önce rutin olarak alınmış olan ve primer tümör dokusunu içeren, EÜTF Patoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan parafin bloklarından hasta başına 5×5 µm' lik kesitler alınarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Hastaların tedavi süreçlerindeki ilaç kullanım süreleri, ilaç kullanımına bağlı olarak herhangi bir yan etki gelişip gelişmediği gibi bilgiler retrospektif (geriye dönük) olarak EÜTF İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı arşivinden elde edilip, mevcut polimorfizmlerle istatistiksel olarak ilişkilendirilmiştir.

Çalışma protokolümüz Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu tarafından 07.05.2008 tarihli ve 07-6.1/5 sayılı karar ile onaylanmıştır.

Ancak, kontrol ve çalışma grubunu oluşturan olguların tamamına yakınının kaybedilmiş olması nedeniyle 'Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu' nu okuyup imzalamaları mümkün olmamıştır.

### **2.1.2 CES1 H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmlerinin Analizi**

Araştırmadaki amacımıza uygun olarak seçilen kontrol ve çalışma grubu olgularının DNA' ları izole edildikten sonra CES1 H199R, N75S ve I49V gen polimorfizmlerinin analizleri için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gerçekleştirildi. PCR sonrası oluşan ampikon, Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) ile değerlendirildi.

#### **2.1.2.1 CES1 H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmlerinin Analizinde Kullanılan Cihazlar**

Tablo 5' de CES1 H199R, N75S ve I49V gen polimorfizmlerinin analizinde kullanılan cihazlar verilmiştir.

**Tablo 5:** Kullanılan Cihazlar

<b>CİHAZ</b>	<b>MARKA</b>
Thermal Cyclers (PCR cihazı)	Corbett
Thermomikser	Eppendorf
Yatay Jel Tankı ve Düzeneci	Thermo
Elektroforez Güç Kaynağı	Thermo
Derin Dondurucu (-20 ° C)	Uğur
Derin Dondurucu (-86 ° C)	Revco
Hassas Teraziler	Sartorius
Mikrodalga Fırın	Samsung
Mikropipetler	Eppendorf, Finnpiette, Boeco
Santrifüj Cihazı	Eppendorf, Heraeus
Buzdolabı	Siemens
Jel Görüntüleme Cihazı	Vilber Lourmat
Vorteks Cihazı	Fisions
Spektrofotometre	Nanodrop ND-1000

#### **2.1.2.2 CES1 H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmlerinin Analizinde**

##### **Kullanılan Kimyasallar**

Tablo 6' de CES1 H199R, N75S ve I49V gen polimorfizmlerinin analizinde kullanılan kimyasallar verilmiştir.

**Tablo 6:** Kullanılan Kimyasal Malzemeler

<b>KİMYASAL MADDE</b>	<b>MARKA</b>
Ksilol	J.T.Baker
Ethanol	J.T.Baker
Isopropanol	Applichem
dNTP Karışımı (4x20 mM)	Fermentas
NH <sub>4</sub> SO <sub>2</sub> Buffer	Fermentas
Taq DNA Polimeraz (5U/μl)	Fermentas
Tris	Fermentas
EDTA	Fermentas
Agaroz	Fermentas
NuSieve Agaroz	Applichem

### 2.1.2.3 CES1 H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmlerinin Analizinde

#### Kullanılan Hazır Kitler

##### 2.1.2.3.1 DNA İzolasyonu Kiti

Kontrol ve çalışma grubu olgularına ait, Patoloji ABD arşivinden 5x5 μm' lik kesitler halinde aldığımız ve ilk tanı anında primer tümörden alınan dokulardan DNA izolasyonu için High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science, Germany) kullanıldı.

High Pure PCR Template Preparation Kit İçeriği:

1. Bağlanma Çözeltisi (Binding Buffer) : 4 M üre, 200 mM NaCl, 200 mM

EDTA, pH 7.4, 25°C

2. Proteinaz K

3. İnhibitör Uzaklaştırıcı Çözelti (Inhibitor Removal Buffer): 5 M guanidine HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6.6, 25°C (20 ml etanol eklendikten sonra kullanıldı)
4. Yıkama Çözeltisi (Wash Buffer) : 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25°C (80 ml etanol eklendikten sonra kullanıldı)
5. Elüsyon Çözeltisi (Elution Buffer) : 10 mM Tris, pH 8.5, 25°C
6. High Pure filtre tüpleri
7. Toplama (Collection) tüpleri

#### **2.1.2.4 CES1 H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmlerinin Analizinde Kullanılan Primerler**

*CES1* genine ait üç farklı gen polimorfizmi incelenmiştir. Bu polimorfizmler, genin üç farklı bölgesine yerleşim gösterdiklerinden PCR metodu ile amplifikasyonları için, her bir gen bölgesine özgül primer dizileri seçilerek, sentez ettirilmiştir (Fermentas & TIB MOL BIOL ) (Tablo 5).

Liyofilize halde ve 0.02 µmol sentez skalasında ticari olarak satın alınan *CES1* ileri ve geri primerleri 100 pmol/µl konsantrasyonda olacak şekilde her biri için tavsiye edilen miktarlarda ve PCR için uygun saflıktaki steril distile su eklenerek çözülmüş ve 50 µl' lik hacimler halinde -20°C' de muhafaza edilmiştir.

Tablo 7' de *CES1* H199R, N75S, I49V gen polimorfizmlerini saptamak için sentez ettirilen primerler ve her bir polimorfizm için amplifiye edilen gen bölgelerinin büyüklükleri verilmiştir.

**Tablo 7:** *CES1* H199R, N75S, I49V gen polimorfizmlerini saptamak için sentezlettilen primerler ve amplicon büyüklükleri

Polimorfizm	<i>CES1</i> H199R	<i>CES1</i> N75S	<i>CES1</i> I49V
<b>İleri Primer</b>	ACAT mis: 5'- GGTCACCAG GACCAGGTGG -3'	N75S F: 5'-TAGAAGGAT TTGCACAGCC-3'	I49V F: 5'- TCAGCTTAG AAGGATTTGCAC -3'
<b>Geri Primer</b>	ACAT A: 5'- ACTTTCTCC TCCCGCTGACTCT-3'	N75S R: 5'- ATGCCGCAG CTTACATAG -3'	I49V R: 5'- GCTTACATA GGAGGGTACGAG -3'
<b>Amplicon Büyüküğü</b>	111 bç.	153 bç.	151 bç

### 2.1.2.5 *CES1* H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmlerinin Analizinde Kullanılan Restriksiyon Enzimleri

#### 2.1.2.5.1 *CES1* H199R Gen Polimorfizmi Analizinde Kullanılan Restriksiyon Enzimi

*CES1* geninin H199R polimorfizm analizinde enzim kesimi aşaması için *Haemophilus haemolyticus* bakterisinden elde edilen *HhaI* restriksiyon enzimi seçildi.

*HhaI* enzimi, toplam 2000 U ve 10 U/μl konsantrasyonda olacak şekilde temin edildi. *HhaI* ile birlikte, 1 ml 10x Tango tampon çözeltisi de [10 mM Tris-HCl (25°C' de pH 7.4), 100 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.2 mg/ml BSA ve %50 gliserol] bulunmaktaydı.

*HhaI* restriksiyon enziminin tanıma bölgesi aşağıda gösterilmektedir:

5'-.....G C G↓C.....-3'

3'-.....C↑G C G.....-5'

#### 2.1.2.5.2 *CES1* N75S Gen Polimorfizmi Analizinde Kullanılan

##### Restriksiyon Enzimi

*CES1* geninin N75S polimorfizm analizinde enzim kesimi aşaması için, *Arthrobacter luteus* bakterisinden elde edilen *AluI* restriksiyon enzimi seçildi.

*AluI* enzimi, toplam 600 U ve 10 U/μl konsantrasyonda olacak şekilde temin edildi. *AluI* ile birlikte, 1 ml 10x Tango tampon çözeltisi de [10 mM Tris-HCl (25°C' de pH 7.4), 100 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.2 mg/ml BSA ve %50 gliserol] bulunmaktaydı.

*AluI* restriksiyon enziminin tanıma bölgesi aşağıda gösterilmektedir:

5'-.....AG↓CT.....-3'

3'-.....TC↑GA.....-5'

#### 2.1.2.5.3 *CES1* I49V Gen Polimorfizmi Analizinde Kullanılan

##### Restriksiyon Enzimi

*CES1* geninin I49V polimorfizm analizinde enzim kesimi aşaması için, *Micrococcus luteus* bakterisinden elde edilen *MisI* restriksiyon enzimi seçildi.

*MisI* enzimi, toplam 200 U ve 5 U/μl konsantrasyonda olacak şekilde temin edildi. *MisI* ile birlikte, 1 ml 10x R tampon çözeltisi de [10 mM Tris-HCl (37°C'de pH 8.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA] bulunmaktaydı.

*MisI* restriksiyon enziminin tanıma bölgesi aşağıda gösterilmektedir:

5'-.....TGG↓CCA.....-3'

3'-.....ACC↑GGT.....-5'

### **2.1.2.6 CES1 H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmlerinin Analizinde Kullanılan DNA Belirteci**

PCR amplifikasyonları sonrasında elde edilen ampliconların büyüklük kontrolleri için GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, Germany) DNA belirteci olarak kullanılmıştır. Restriksiyon enzim kesimi sonrasında elde edilen DNA fragmanlarının büyüklüklerinin saptanmasında yine aynı DNA belirteci kullanılmıştır.

### **2.1.3 CES1 H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmleri Analizi İçin Çalışma Protokolü**

#### **2.1.3.1 Parafine Gömülü Dokudandan DNA İzolasyonu Aşaması**

CES1 H199R, N75S ve I49V gen polimorfizmlerinin tayinlerindeki ilk aşama, parafine gömülü dokudan cam lifli filtreye nükleik asit bağlama metoduna göre gerçekleştirilen DNA izolasyonudur. Çalışmalar, ticari olarak satılan DNA izolasyonu kiti protokolüne göre gerçekleştirildi.

Protokol, aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır:

1. Parafine gömülü dokulardan mikrotom vasıtasıyla alınan 50 µm kalınlığındaki doku örnekleri 1,5 ml' lik Eppendorf tüplere yerleştirilir.
2. Üzerlerine 500' er µl ksilol eklenir.
3. Ksilol eklenen doku örnekleri birkaç saniye vortekslenir.
4. Sonra 20 dakikalığına shaker' a konularak parafin dokunun erimesi sağlanır.
5. Shaker' dan alınan tüpler 4500 rpm' de 1 dakika santrifüj edildikten sonra, üstte kalan süpernatant atılır.
6. Her tüpe yeniden 500' er µl ksilol eklenir ve tüpler tekrar vortekslenir.
7. Vortekslenen tüpler 60 °C' de 15 dakika 1200 rpm' de kalmak üzere thermomixer cihazına konulur.

8. Thermomixer' dan alınan tüpler 4500 rpm' de 1 dakika santrifüj edildikten sonra, üstte kalan süpernatant atılır.
9. 6-8. basamaklar bir kez daha tekrar edilir.
10. Doku örnekleri üzerine v:v %50 olan absolu etanol-ksilol karışımından 500 µl eklenir.
11. Vortekslenen tüpler 60 °C' de 15 dakika 1200 rpm' de kalmak üzere thermomixer' a konulur.
12. Thermomixer' dan alınan tüpler 4500 rpm' de 1 dakika santrifüj edildikten sonra, üstte kalan süpernatant atılır.
13. Her tüpe 500' er µl absolu etanol eklenir ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılır.
14. Inkübasyonun ardından tüpler 4500 rpm' de 1 dakika santrifüj edildikten sonra, üstte kalan süpernatant atılır.
15. Tüplere %50' lik etanolden 500' er µl eklenir ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılır.
16. Inkübasyonun ardından tüpler 4500 rpm' de 1 dakika santrifüj edildikten sonra, üstte kalan süpernatant atılır.
17. Tüplere 500' er µl distile su eklenir.
18. Distile su eklenen tüpler 5000 rpm' de 3 dakika süreyle santrifüj edilir.
19. Santrifüjden alınan tüplerdeki süpernatant atılır.
20. 17-19. basamaklar bir kez daha tekrar edilir.
21. Tüplerin içindeki dokular cam bagetle iyice ezilir.
22. Ezilen dokuların üzerine 200' er µl doku parçalayıcı tampon ve 40' ar µl Proteinaz K eklenir.
23. Tüpler bir gece boyu 37 °C' de inkübasyona bırakılır.
24. Ertesi gün 37 °C' den alınan tüplere 200' er µl bağlama tamponu eklenir ve 70 °C' de bulunan thermomixer' da 10 dakika süreyle inkübe edilir.
25. 100 µl isopropanol eklenir.
26. İyice pipetlenen tüp içeriği collection tüplerin üzerine yerleştirilmiş filtreli tüplere aktarılır.
27. Tüpler 8000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
28. Santrifüjden alınan collection tüpler atılır, üzerlerindeki filtreli tüpler yeni ve temiz collection tüplere aktarılır.

29. Filtreli tüplere 500' er µl inhibitor uzaklaştırıcı tampon eklenir.
30. 8000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
31. Collection tüpler atılır, üzerlerindeki filtreli tüpler yeni collection tüplere aktarılır ve filtreli tüplere 500' er µl yıkama tamponu eklenir.
32. Tüpler 8000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
33. 31 ve 32. basamaklar tekrar edilir.
34. Collection tüpler atılır, üzerlerindeki filtreli tüpler yeni collection tüplere aktarılır ve yeni bir madde eklenmeden yaklaşık 10 saniyelik bir santrifügasyon yapılır. Bu şekilde, filtrede kalan etanolün tamamen uzaklaştırılması sağlanır.
35. Ardından collection tüpler atılır ve filtreli tüpler 1.5 ml' lik Eppendorf tüpler içersine yerleştirilir.
36. Üzerlerine önceden 70 °C' de ısıtılmış elüsyon tamponundan 200' er µl eklenir.
37. 8000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
38. Santrifügasyon sonrası filtreli tüpler atılır. Eppendorf tüpleri içerisindeki sıvıda DNA' mız bulunmaktadır. DNA' ların konsantrasyonları Nanodrop spektrofotometre cihazında ölçüldükten sonra kriyo tüplere aktarılır ve -20 °C' de saklanır.

### 2.1.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), herhangi bir organizmaya ait genomik DNA' da dizisi bilinen belirli bir bölgenin çoğaltılmasına (amplifikasyon) olanak veren *in vitro* DNA sentez yöntemidir ve 3 ana basamaktan oluşur:

1. Amplifiye edilecek çift iplikli DNA' nın yüksek sıcaklıkta denatürasyonu (denaturation)
2. Primerlerin özgül hibridizasyona olanak sağlayacak sıcaklıkta ( $T_m$  değerinin 3-5°C altındaki sıcaklık) hedef bölgelere bağlanmaları (annealing)

3. *Taq* DNA Polimeraz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği 72°C sıcaklıkta, zincirlerin primerlerden itibaren uzamaları (elongation).

PCR' da yer alan bileşenler;

1. Amplifiye edilecek hedef DNA dizisini içeren kalıp DNA
2. Amplifiye edilecek hedef DNA dizisinin komplementeri olacak şekilde seçilmiş kısa primerler
3. Termostabil karakterde *Taq* DNA Polimeraz enzimi.

Hedef bölgeye özgül uygun primer çiftlerinin (ileri ve geri primer) doğru seçimi oldukça önemlidir. Primerler, genomik DNA' daki hedef bölge ile hibridize olabilen, 15-20 nükleotid uzunluğunda, sentetik olarak sentez edilmiş tek zincirli oligonükleotidlerdir. Denatürasyonun ardından primerlerin bağlanma aşamasındaki  $T_m$  (erime derecesi) değerinin saptanması, PCR reaksiyonunun gerçekleşmesi açısından büyük öneme sahiptir ve yandaki formül ile kolayca hesaplanır:  $T_m = 4^\circ\text{C} (G+C) + 2^\circ\text{C} (A+T)$ .

Zincirin uzama reaksiyonunu gerçekleştiren *Taq* DNA Polimeraz enzimi *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen, optimal aktivitesini 72°C' de gösteren ve 94°C' de bile aktivitesini kaybetmeyen bir enzimdir. *Taq* DNA polimerazın görevi, tek zincirli DNA' ya bağlanmış komplementer dizilerden itibaren DNA' yı çoğaltmaktır. Polimeraz enzimleri aktivite gösterebilmek için  $Mg^{2+}$  iyonlarına ihtiyaç duyarlar;  $Mg^{2+}$  iyonları, *Taq* enziminin kofaktörü olarak işlev görürler. Bu nedenle, en uygun  $MgCl_2$  konsantrasyonunun oluşturulması gerekmektedir.  $MgCl_2$  konsantrasyonunun fazla olduğu reaksiyonlarda hatalı eşleşmeler meydana gelirken, eksik olduğu reaksiyonlarda yeterli miktarda hibridizasyon gerçekleşmemektedir. Primerler ile başlatılan çift sarmal

oluşumu, hedef zincirin *Taq* DNA polimeraz tarafından dNTP' lerin (deoksinükleotid trifosfat) kullanılarak uzatılmasıyla devam etmektedir. dNTP' ler (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) *Taq* DNA polimerazının sübstratlarıdır. Zincir, tek iplikli hedef DNA' nın komplementeri primer ile başlar ve *Taq* DNA polimeraz, ortamdaki dNTP' leri kullanarak bu zinciri uzatır. Tek iplikli DNA çift iplikli forma gelir. PCR denatürasyon, bağlanma ve uzama adımlarının tekrarlarına dayanan 30-50 döngü sonrasında tamamlanır ve sonunda hedef DNA' nın milyonlarca kopyası oluşturulur.

### 2.1.3.2.1 *CES1* H199R Gen Polimorfizmi İçin PCR

*CES1* geni 199. kodonda bulunan Guanin' in Adenin' e transisyonu sonucunda; polar ve hafif bazik Histidin amino asitinin, polar ve kuvvetli bazik olan Arginin amino asitine değişimine neden olan polimorfizmin tespiti amacıyla, polimorfizmi içeren 111 bç.' lik gen bölgesi PCR ile çoğaltıldı.

Her bir örnek için, daha önce otoklavda sterilize edilen 0.2 ml' lik PCR tüpünde 50 µl' lik bir PCR reaksiyon karışımı hazırlandı:

<b><u>Bileşenler</u></b>	<b><u>Hacim</u></b>	<b><u>Son konsantrasyon</u></b>
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3,0 µl	(1.5 mM)
ACAT mis (100 µM)	1,0 µl	(100 µ M)
ACAT A (100 µM)	1,0 µl	(100 µ M)
dNTP Karışım (2 mM)	5,0 µl	(0.2 mM)
10x PCR Tamponu	5,0 µl	(1x)
<i>Taq</i> DNA Polimeraz (5 U/µl)	0,4 µl	(1 U)
Steril Distile Su	29,6 µl	
<u>İzole genomik DNA</u>	<u>5,0 µl</u>	
Toplam hacim	50 µl	

Hazırlanan karışım daha sonra PCR cihazına yüklenerek, istenilen gen bölgesi çoğaltıldı.

*CES1* H199R gen polimorfizmini içeren gen bölgesi amplifikasyonu için belirlenen PCR protokolü:

Denatürasyon	95°C' de	10 dakika	
Amplifikasyon			
	95°C' de	30 sn denatürasyon	} 45 döngü
	60°C' de	45 sn bağlanma	
	72°C' de	1 dk uzama	
Son uzama	72°C' de	7 dk	
Soğutma	4°C' de	∞ Sonsuz	

#### 2.1.3.2.2 *CES1* N75S Gen Polimorfizmi İçin PCR

*CES1* geni 75. kodonda bulunan Guanin' in Adenin' e transisyonu sonucunda; Asparagin amino asitinin, Serin amino asitine değişimine neden olan polimorfizmin tespiti amacıyla, polimorfizmi içeren 153 bç.' lik bir gen bölgesi PCR ile çoğaltıldı.

Her bir örnek için, daha önce otoklavda sterilize edilen 0.2 ml' lik PCR tüpünde 50 µl' lik bir PCR reaksiyon karışımı hazırlandı:

<b><u>Bileşenler</u></b>	<b><u>Hacim</u></b>	<b><u>Son konsantrasyon</u></b>
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3,0 µl	(1.5 mM)
N75S F (100 µM)	1,0 µl	(100 µ M)

N75S R (100 µM)	1,0 µl	(100 µ M)
dNTP Karışım (2 mM)	5,0 µl	(0.2 mM)
10x PCR Tamponu	5,0 µl	(1x)
Taq DNA Polimeraz (5 U/µl)	0,4 µl	(1 U)
Steril Distile Su	29,6 µl	
<u>İzole genomik DNA</u>	<u>5,0 µl</u>	
Toplam hacim	50 µl	

Hazırlanan karışım daha sonra PCR cihazına yüklenerek, istenilen gen bölgesi çoğaltıldı.

*CES1* N75S gen polimorfizmini içeren gen bölgesi amplifikasyonu için belirlenen PCR protokolü:

Denatürasyon	95°C' de	10 dakika	
Amplifikasyon			
	95°C' de	30 sn denatürasyon	} 45 döngü
	50°C' de	45 sn bağlanma	
	72°C' de	1 dk uzama	
Son uzama	72°C' de	7 dk	
Soğutma	4°C' de	∞ Sonsuz	

### 2.1.3.2.3 *CES1* I49V Gen Polimorfizmi İçin PCR

*CES1* geni 49. kodonda bulunan Adenin' in Guanin' e transisyonu sonucunda; İzolösin amino asitinin, Valin amino asitine değişimine neden olan polimorfizmin tespiti amacıyla, polimorfizmi içeren 151 bç.' lik bir gen bölgesi PCR ile çoğaltıldı.

Her bir örnek için, daha önce otoklavda sterilize edilen 0.2 ml' lik PCR tüpünde 50 µl' lik bir PCR reaksiyon karışımı hazırlandı:

<b><u>Bileşenler</u></b>	<b><u>Hacim</u></b>	<b><u>Son konsantrasyon</u></b>
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3,0 µl	(1.5 mM)
I49V F (100 µM)	1,0 µl	(100 µ M)
I49V R (100 µM)	1,0 µl	(100 µ M)
dNTP Karışım (2 mM)	5,0 µl	(0.2 mM)
10x PCR Tamponu	5,0 µl	(1x)
Taq DNA Polimeraz (5 U/µl)	0,4 µl	(1 U)
Steril Distile Su	29,6 µl	
<u>İzole genomik DNA</u>	<u>5,0 µl</u>	
Toplam hacim	50 µl	

Hazırlanan karışım daha sonra PCR cihazına yüklenerek, istenilen gen bölgesi çoğaltıldı.

CES1 I49V gen polimorfizmini içeren gen bölgesi amplifikasyonu için belirlenen PCR protokolü:

Denatürasyon	95°C' de	10 dakika	
Amplifikasyon			
	95°C' de	30 sn denatürasyon	} 45 döngü
	51°C' de	45 sn bağlanma	
	72°C' de	1 dk uzama	
Son uzama	72°C' de	7 dk	

Soğutma

4°C' de ∞ Sonsuz

### **2.1.3.3 PCR Sonrası % 2' lik Agaroz Jel Elektroforezi**

*CES1* genindeki istenilen polimorfizmlerin tespiti için yapılan PCR' lar sonrasında elde edilen ürünlerin büyüklüklerinin kontrolü amacı ile jel elektroforezi gerçekleştirildi. Bunun için, örnekler % 2' lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme ve dokümantasyon sisteminde görüntülendi.

### **2.1.3.4 Restriksiyon Enzim Kesimi ile Polimorfizm Analizi**

Restriksiyon enzimleri, çift sarmal DNA' yı özgül tanıma bölgelerinden kesip DNA analizlerine olanak veren önemli enzimlerdir. Bakteriye özgül olan bu enzimler, çift iplikli DNA (dsDNA) üzerinde özgün bir bölgeyi tanımakta ve dsDNA' nın her iki zincirindeki fosfodiester bağını keserek DNA' yı tanıdıkları kesim noktalarından parçalara ayırmaktadır.

PCR sonrası % 2' lik agaroz jelde uygun bant büyüklüğüne sahip ürünler tespit edildikten sonra *CES1* H199R, N75S ve I49V gen polimorfizmlerinin analizleri restriksiyon enzim kesimi sonuçlarına göre gerçekleştirildi.

#### **2.1.3.4.1 *CES1* H199R Gen Polimorfizmi Analizi için Restriksiyon**

##### **Enzim Kesimi**

*CES1* geninin PCR ile çoğaltılan 111 bç.' lik hedef bölgesi, *HhaI* restriksiyon enzimi için uygun bir kesim bölgesi içermektedir. Eğer hedef gen bölgesinde G → A değişimi yoksa (kırmızı ile gösterilen bölge), bir kesim yeri oluşmakta ve amplifikasyon ürünü bu yerden kesilmektedir.

*HhaI* restriksiyon enziminin 111 bç.' lik *CES1* PCR ürünündeki tanıma bölgesi (alt çizgi ile işaretlendirilmiş) ve kesim noktası (↓) aşağıda gösterilmektedir.

→ İleri primer

5'GGTCACCTGGACCAGGTGGCTGCCCTGCC↓CTGGGTCCAGGACAAC  
ATTGCCAGCTTTGGAGGGAACCCAGGCTCTGTGACCATCTTTGGAGAGT  
CAGCGGGAGGAGAAAGT 3'

Geri primer ←

*CES1* geninden elde edilen PCR ürününün *HhaI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucunda ve olguların genotipine göre elde edilecek bantlar aşağıda belirtilmektedir:

- Polimorfizmi bulunmayan, yabanıl genotipteki olgulardan 82 bç. ve 29 bç. büyüklüğünde iki DNA fragmanı
- Polimorfizm için heterozigot olan olgulardan 111 bç., 82 bç. ve 29 bç. büyüklüğünde üç DNA fragmanı,
- Polimorfizm için homozigot (mutant) olan olgulardan 111 bç. büyüklüğünde tek bir DNA fragmanı elde edilmektedir.

#### 2.1.3.4.2 *CES1* N75S Gen Polimorfizmi Analizi için Restriksiyon

##### Enzim Kesimi

*CES1* geninin PCR ile çoğaltılan 153 bç.' lik hedef bölgesi, *AluI* restriksiyon enzimi için uygun bir kesim bölgesi içermektedir. Eğer hedef gen bölgesinde G → A değişimi yoksa (kırmızı ile gösterilen bölge), bir kesim yeri oluşmakta ve amplifikasyon ürünü bu yerden kesilmektedir.

*AluI* restriksiyon enziminin 153 bç.' lik *CES1* PCR ürünündeki tanıma bölgesi (alt çizgi ile işaretlendirilmiş) ve kesim noktası (↓) aşağıda gösterilmektedir.

→ İleri primer

5'TAGAAGGATTTGCACAGCCGTGTGGCCATTTTCCTGGGAATCCCTTTTG  
CCAAGCCGCCTCTTGGACCCCTGAGGTTTACTCCACCGCAGCCTGCAG  
AACCATGGAG↓CTTTGTGAAGAATGCCACCTCGTACCCTCCTATGTAAG  
CTGCGGCAT3'

Geri primer ←

*CES1* geninden elde edilen PCR ürününün *Alu* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucunda ve olguların genotipine göre elde edilecek bantlar aşağıda belirtilmektedir:

- a. Polimorfizmi bulunmayan, yabanıl genotipteki olgulardan 106 bç. ve 47 bç. büyüklüğünde iki DNA fragmanı
- b. Polimorfizm için heterozigot olan olgulardan 153 bç., 106 bç. ve 47 bç. büyüklüğünde üç DNA fragmanı,
- c. Polimorfizm için homozigot (mutant) olan olgulardan 153 bç. büyüklüğünde tek bir DNA fragmanı elde edilmektedir.

#### 2.1.3.4.3 *CES1* I49V Polimorfizm Analizi için Restriksiyon Enzim

##### Kesimi

*CES1* geninin PCR ile çoğaltılan 151 bç.' lik hedef bölgesi, *MisI* restriksiyon enzimi için uygun bir kesim bölgesi içermektedir. Eğer hedef gen bölgesinde A → G değişimi yoksa (kırmızı ile gösterilen bölge), bir kesim yeri oluşmakta ve amplifikasyon ürünü bu yerden kesilmektedir.

*MslI* restriksiyon enziminin 151 bç.' lik *CES1* PCR ürünündeki tanıma bölgesi (alt çizgi ile işaretlendirilmiş) ve kesim noktası (↓) aşağıda gösterilmektedir.

→ *İleri primer*

5'**TCAGCTTAGAAGGATTTGCAC**AGCCTGTGG↓CC**A**TTTTCTGGGAATC  
CCTTTTGCCAAGCCGCCTCTTGGACCCCTGAGGTTTACTCCACCGCAGC  
CTGCAGAACCATGGAGCTTTGTGAAGAATGCCAC**CTCGTACCCTCCTAT**  
**GTAAGC** 3'

*Geri primer* ←

*CES1* geninden elde edilen PCR ürününün *MslI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucunda ve olguların genotipine göre elde edilecek bantlar aşağıda belirtilmektedir:

- Polimorfizmi bulunmayan, yabanıl genotipteki olgulardan 121 bç. ve 30 bç. büyüklüğünde iki DNA fragmanı
- Polimorfizm için heterozigot olan olgulardan 151 bç., 121 bç. ve 30 bç. büyüklüğünde üç DNA fragmanı,
- Polimorfizm için homozigot (mutant) olan olgulardan 151 bç. büyüklüğünde tek bir DNA fragmanı elde edilmektedir.

### **2.1.3.5 *CES1* Geni Amplikonlarının Restriksiyon Enzim Kesimi Sonrası % 3' lük Milipore Agaroz Jel Elektroforezi**

*CES1* geninin PCR ile çoğaltılan 111 bç. lik bölgesinin *HhaI* restriksiyon enzimi ile, 153 bç.lik bölgesinin *AluI* restriksiyon enzimi ile, 151 bç.lik bölgesinin *MslI* restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu sonucu oluşan

ürünler % 3' lük millipore agaroz (NuSieve) jelde yürütüldükten sonra görüntülendi ve değerlendirildi.

#### **2.1.3.6 CES1 H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmlerinin Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

PCR' ın ardından gerçekleştirilen RFLP işlemi sonucunda, örnekler NuSieve agaroz jelde yürütüldüklerinde tek, çift ya da üç bant görüntüsüne göre olguların yabanıl tip, heterozigot ya da mutant olarak değerlendirilmeleri gerçekleştirilmiştir.

#### **2.1.4 CES1 H199R, N75S ve I49V GEN POLİMORFİZMLERİNİN ANALİZİNDE KULLANILAN KİMYASAL ÇÖZELTİLER VE ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANIŞI**

##### **2.1.4.1 Etidyum Bromür Hazırlanması**

10 mg/ml stok solüsyon elde etmek için, 1 g etidyum bromür 100 ml steril distile suda çözüldü ve karanlık ortamda 4°C' de saklandı.

##### **2.1.4.2 dNTP Hazırlanması**

Amplifikasyon esnasında denatüre edilen zincirlerin tamamlanmasında kullanılacak olan deoksinükleotit trifosfatlar (dNTP' ler) eşit oranda dATP, dGTP, dCTP, dTTP' lardan oluşur. 2 mM konsantrasyondaki stok solüsyonunun hazırlanması için dNTP' ler distile suda sulandırıldı, küçük hacimlere (10-15 örneklik) bölündü ve - 20°C' deki derin dondurucuda saklandı. Bunun için dATP, dCTP, dGTP ve dTTP' nin her birinden 4 µl olmak üzere toplam 16 µl dNTP ve 184 µl steril distile su pipetlendi.

### **2.1.4.3 TAE (Tris-Asetat-EDTA) Tamponu**

Konsantre stok solüsyon olarak 50x TAE hazırlandı.

#### **50x TAE;**

242 gr Tris

57.1 ml Glasial Asetik Asit

100 ml 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8.0) kullanılarak hazırlandı.

242 gr Tris, 500 ml saf su içinde çözüldü. 57.1 ml Glasial Asetik Asit ve 100 ml 0.5 M EDTA eklendi, son hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı. % 2' lik Agaroz ve % 3' lük NuSieve agaroz için kullanılan 1x TAE tamponu, 50x TAE stok solüsyondan 1 ml alınıp, distile su ile 50 ml' ye tamamlanması suretiyle hazırlandı.

### **2.1.4.4 % 2' lik Agaroz Jelin Hazırlanması**

0.8 gr Agaroz, 40 ml 1xTAE içine ilave edildi ve mikrodalga fırında eritildi. Tamamen homojen bir eriyik haline gelen jel ~50 °C' ye soğutulduktan sonra, 5 µl Etidyum Bromür (150 µl/lt 1x TAE) eklenip iyice karıştırıldı ve yükleme kuyularını oluşturacak tarağın da takılı olduğu elektroforez transfer kabına döküldü. Jelin 4°C' de 15 dakika polimerleşmesi beklenildi. Jel polimerize olduktan sonra, tarak çıkarıldı ve agaroz jelin bulunduğu transfer kabı elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankı, jelin 1-2 mm üzerini kaplayacak şekilde 1xTAE tampon çözeltisi ile doldurulup, örnekler kuyucuklara yüklendi.

\*Birinci kuyucuğa, 8 µl belirteç DNA yüklendi (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder).

\*İkinci kuyucuğa, 10 µl PCR ürünü + 2 µl 6x turuncu yükleme boyası [10 mM Tris-HCl (pH 7.6), % 0.15 orange G, % 0.03 ksilen siyanol FF, % 60 gliserol, 60 mM EDTA; 6x turuncu yükleme boyası] karışımı yüklendi.

\*Diğer kuyucuklar da, 10 µl PCR ürünü + 2 µl 6x yükleme boyası karışımı içerecek şekilde yüklendi.

Güç kaynağı 90 V/25 mA olacak şekilde ayarlanarak, jele yüklenen örnekler 50 dakika yürütüldü. Yürütme sonrasında jel, Vilber Lourmat jel görüntüleme, analiz ve dokümantasyon sistemi ile görüntülendi.

#### **2.1.4.5 Enzim Kesimleri İçin Reaksiyon Karışımlarının Hazırlanması**

*CES1* H199R gen polimorfizmi analizinde ampliconların restriksiyon enzimi ile muamelesi için,

\*PCR ürünü 3 µl

\* Tango Tamponu 1 µl

\* 1 ünite *HhaI* 0.1 µl

*CES1* N75S gen polimorfizmi analizinde ampliconların restriksiyon enzimi ile muamelesi için,

\*PCR ürünü 3 µl

\* Tango Tamponu 1 µl

\* 1 ünite *AluI* 0.1 µl

*CES1* I49V gen polimorfizmi analizinde ampliconların restriksiyon enzimi ile muamelesi için,

\*PCR ürünü 3 µl

\* R Tamponu 1 µl

\* 2 ünite *MisI* 0.2 µl eklendi.

Karışımlar, steril 1.5 ml' lik Eppendorf tüplerine konulduktan sonra, toplam hacim steril distile su ile 10 µl' ye tamamlandı. Tüpler, 2 saat süreyle 37°C' de kuru ısı bloğunda inkübe edildi ve inkübasyon sonrası, restriksiyon enzim kesimini inaktif etmek amacıyla, 65°C' de 20 dakika inkübe edilip, -20 °C' deki derin dondurucuya kaldırıldı.

#### **2.1.4.6 % 3' lük NuSieve Jel Elektroforezi**

*CES1* gen polimorfizmlerinin belirlenmesi için ampikonların uygun restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu elde edilen ürünler % 3' lük millipore agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi.

% 3' lük Millipore agaroz hazırlamak için, 1.2 g Millipore agaroz, 40 ml 1x TAE içerisine eklenerek, mikrodalga fırında çözüldü. Bu aşamadan sonraki işlemler, % 2' lik agaroz ile aynı şekilde gerçekleştirildi.

#### **2.1.5 İSTATİSTİKSEL ANALİZ YÖNTEMLERİ**

Hasta ve kontrol olgularının *CES1* H199R, N75S ve I49V gen polimorfizmleri için genotipleri belirlendikten sonra elde edilen bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Ki-kare Testi ( $\chi^2$ ) kullanılmıştır.

Ki- Kare testi istatistikte en çok kullanılan temel örnekleme dağılımlarından biri olup, çok çeşitli uygulama alanları bulunur. Güvenilir bir analiz yöntemi olduğundan, sağlık araştırmalarında da sıklıkla kullanılır. Ki-kare analizi, grupları çapraz tablo gözlerindeki gözlenen değerler ile beklenen değerler arasındaki farkı dikkate alarak karşılaştıran bir testtir. Anlamlılık değeri,  $p < 0.05$ ' tir.

## III. BÖLÜM

### 3.1 BULGULAR

#### 3.1.1 Kontrol ve Çalışma Gruplarının Genel Özelliklerinin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizleri

Kontrol grubu aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan, E.Ü.T.F. İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Onkoloji Bölümü'nce metastatik meme kanseri tanısı konmuş ve capecitabine kullanmayan 60 olgudan oluşmaktadır. Çalışma grubu ise yine aynı şekilde tanı almış ancak tedavi için capecitabine kullanan 20 olgudan oluşmaktadır.

Tüm olguların E.Ü.T.F. Patoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan parafin bloklarından hasta başına 5× 5 µm'lik kesitler alınarak DNA izolasyonu yapıldıktan sonra, *CES1* geni H199R, N75S ve I49V gen polimorfizmleri için PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiş, ardından Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) metodu ile polimorfizm analizleri yapılmıştır.

Kontrol ve çalışma grubu ile ilgili genel bilgiler, elde edilen bulgular ve istatistiksel analiz sonuçları aşağıda belirtilmiştir.

##### 3.1.1.1 Kontrol Grubu

Capecitabine kullanmayan MMK'lı olgulardan oluşan kontrol grubunda 5' i erkek ve 55' i kadın, toplam 60 olgunun yaş ortalaması  $50.6 \pm 11.876$  olarak saptanmıştır. Kontrol grubuna ait genel özellikler Tablo 8' de, çalışmadaki toplam yüzdeleri Grafik 1' de ve yaş ortalamaları da Grafik 2' de verilmiştir.

**Tablo 8:** Kontrol Grubuna Ait Genel Özellikler

	<i>n</i>	%
Toplam	60	75
Yaş Ortalaması±SD*	50.60 ±11.88	

\*SD: Standart Sapma

### 3.1.1.2 Çalışma Grubu

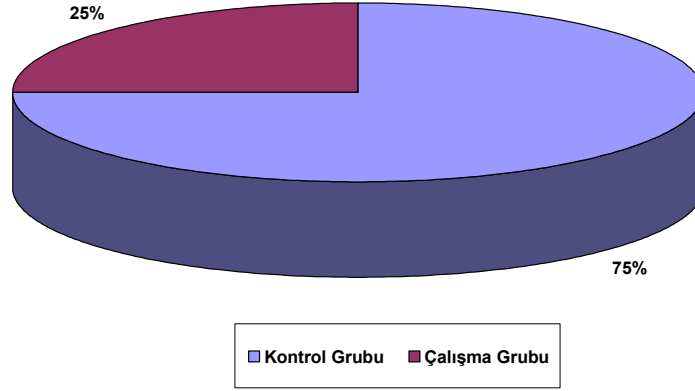
MMK tedavisi için capecitabine kullanan 20 kadın olgudan oluşan çalışma grubunda yaş ortalaması 51.45±11.87 olarak saptanmıştır. Çalışma grubuna ait genel özellikler Tablo 9' da, çalışmadaki toplam yüzdeleri Grafik 1' de ve yaş ortalamaları da Grafik 2' de verilmiştir.

Her iki grubun yaş ortalamaları da 50.813±11.875 olarak saptanmış ve Grafik 2' de verilmiştir.

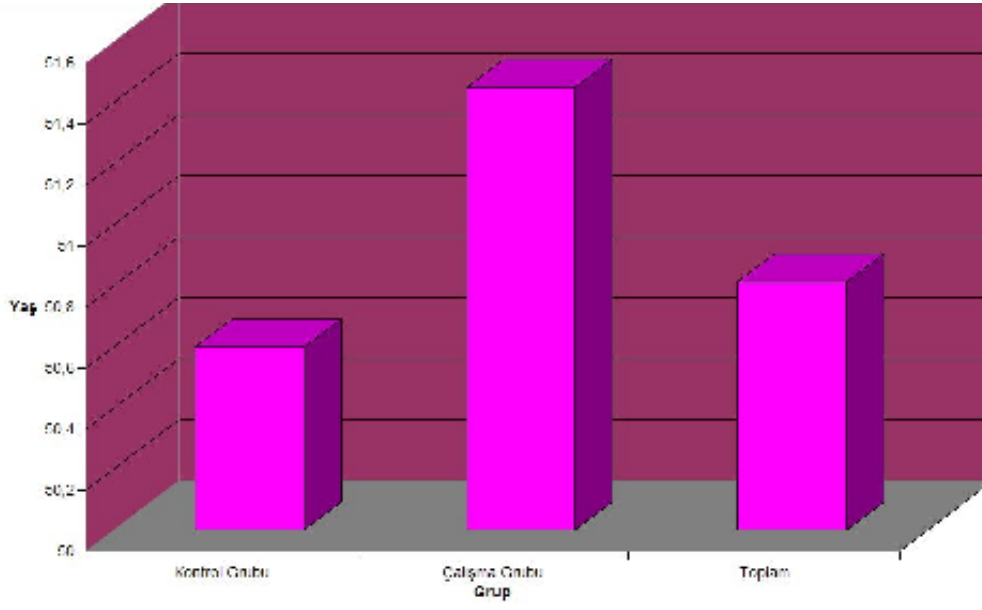
**Tablo 9:** Çalışma Grubuna Ait Genel Özellikler

	<i>n</i>	%
Toplam	20	25
Yaş Ortalaması±SD*	51.45 ±11.87	

\*SD: Standart Sapma



**Grafik 1:** Kontrol ve Çalışma Gruplarının Yüzdeleri



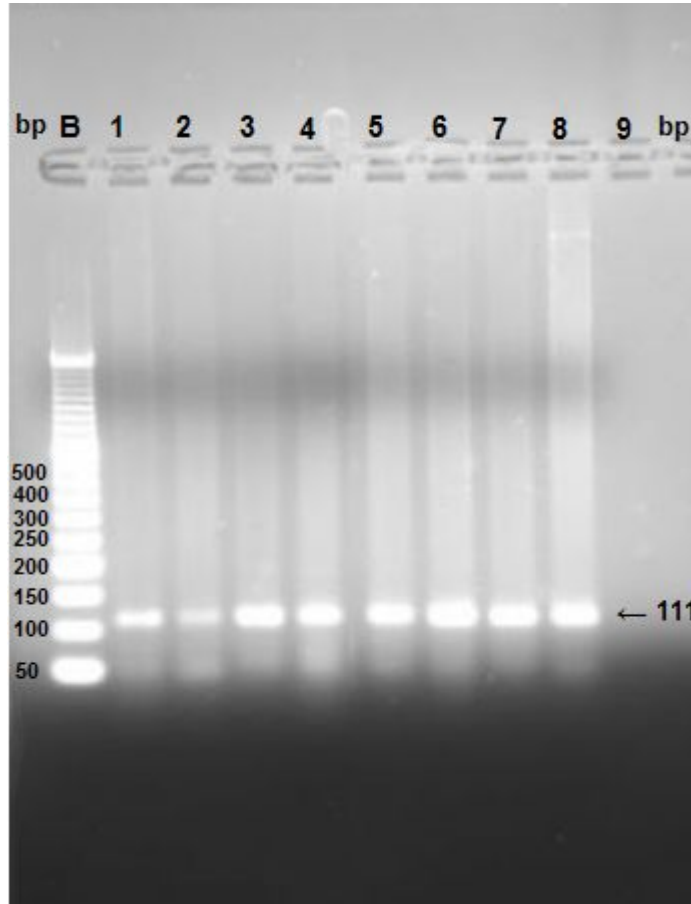
**Grafik 2:** Kontrol ve Çalışma Gruplarının Yaş Ortalamaları

## 3.2 CES1 H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmlerine Ait Bulgular

### 3.2.1 CES1 H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmleri Analizi İçin PCR Amplifikasyonları

#### 3.2.1.1 CES1 H199R Gen Polimorfizmi PCR Amplifikasyonu

Kontrol ve çalışma grubunu oluşturan olguların genomik DNA' larından amplifiye edilen ve H199R polimorfik bölgesini içeren CES1 genine ait 111 bç.' lik PCR ürünlerinin % 2' lik agaroz jel görüntüleri Şekil 5' de verilmiştir.

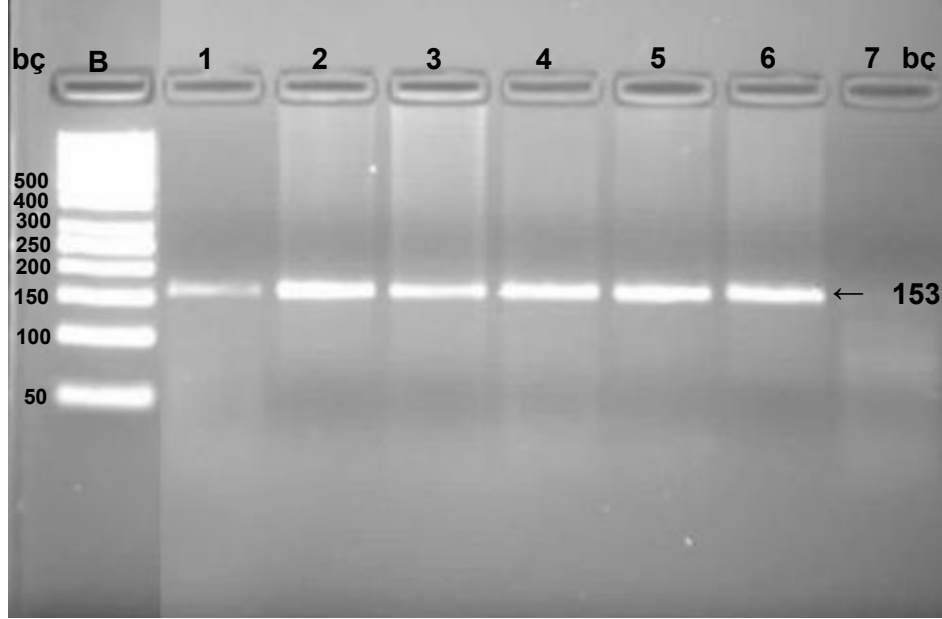


**Şekil 5:** Kontrol ve çalışma grubundaki bazı olgulara ait 111 bç.' lik CES1 gen ürününün % 2' lik agaroz jel üzerinde koşulmalarından sonraki görüntüleri.

B: Belirteç DNA (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; MBI Fermentas, Germany); 1: No' lu olgu, H12; 2: No' lu olgu, H13; 3: No' lu olgu, H19; 4: No' lu olgu, H20; 5: No' lu olgu, K1 ve 6: No' lu olgu, K17, 7: No' lu olgu, K21; 8: No' lu olgu, K43; 9: Negatif Kontrol

### 3.2.1.2 CES1 N75S Gen Polimorfizmi PCR Amplifikasyonu

Kontrol ve çalışma grubunu oluşturan olguların genomik DNA' larından amplifiye edilen ve N75S polimorfik bölgesini içeren CES1 genine ait 153 bç.' lik PCR ürünlerinin % 2' lik agaroz jel görüntüleri Şekil 6' da verilmiştir.

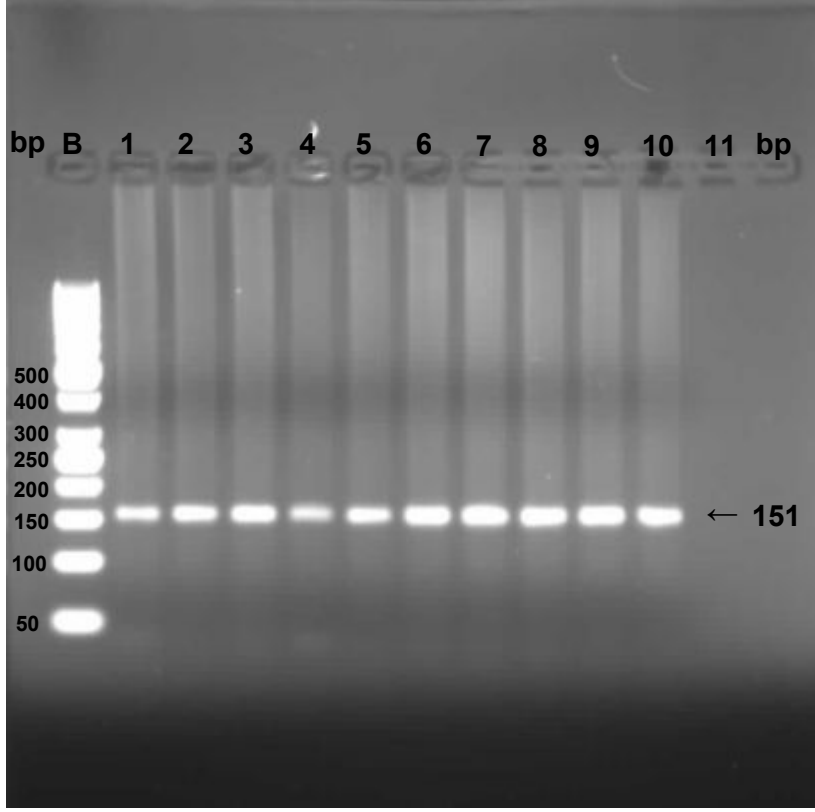


**Şekil 6:** Kontrol ve çalışma grubundaki bazı olgulara ait 153 bç.' lik CES1 gen ürününün % 2' lik agaroz jel üzerinde koşulmalarından sonraki görüntüleri.

B: Belirteç DNA (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; MBI Fermentas, Germany); 1: No' lu olgu, H9; 2: No' lu olgu, H14; 3: No' lu olgu, H18; 4: No' lu olgu, K40; 5: No' lu olgu, K37 ve 6: No' lu olgu, K1, 7: Negatif Kontrol

### 3.2.1.3. CES1 I49V Gen Polimorfizmi PCR Amplifikasyonu

Kontrol ve çalışma grubunu oluşturan olguların genomik DNA' larından amplifiye edilen ve I49V polimorfik bölgesini içeren CES1 genine ait 151 bç.' lik PCR ürünlerinin % 2' lik agaroz jel görüntüleri Şekil 7' de verilmiştir.



**Şekil 7:** Kontrol ve çalışma grubundaki bazı olgulara ait 151 bç.' lik *CES1* gen ürünününün % 2' lik agaroz jel üzerinde koşulmalarından sonraki görüntüleri.

*B:* Belirteç DNA (*GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder*; MBI Fermentas, Germany); 1: No' lu olgu, H9; 2: No' lu olgu, H20; 3: No' lu olgu, H13; 4: No' lu olgu, H10; 5: No' lu olgu, H17 ve 6: No' lu olgu, K1, 7: No' lu olgu, K15; 8: No' lu olgu, K43; 9: No' lu olgu, K54; 10: No' lu olgu, K38 ve 11: Negatif Kontrol

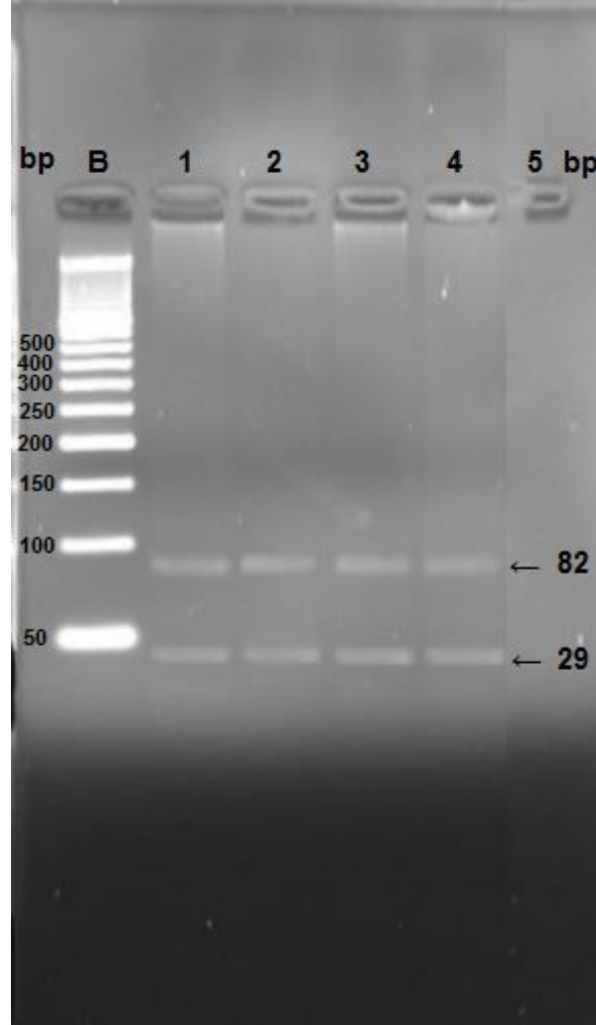
### 3.2.2 Restriksiyon Enzim Kesimi Sonuçlarına Göre Olguların *CES1* H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmleri İçin Genotiplendirilmeleri Ve Elde Edilen Bulgular

#### 3.2.2.1 *CES1* H199R Gen Polimorfizmi Genotiplendirilmesi

Olguların *CES1* H199R polimorfizmi (G→A; Histidin→Arjinin) için genotiplendirilmeleri, RFLP işlemi sonrasında *CES1* ürünlerinden elde edilen DNA fragmanına göre gerçekleştirilmiştir.

Buna göre, yabanıl genotipe sahip olguların (H/H) 82 bç. ve 29 bç. büyüklüğündeki 2 DNA fragmanına; *CES1* H199R gen polimorfizmi için homozigot olan (mutant) olguların (R/R) 111 bç. büyüklüğündeki tek bir DNA

fragmanına ve *CES1* H199R gen polimorfizmi için heterozigot olan olguların (H/R) 111 bç., 82 bç., ve 29 bç. büyüklüğündeki 3 DNA fragmanına sahip olmaları beklenmektedir. Ancak, bizim çalışma ve kontrol gruplarımızda yalnızca yabancı tipe sahip genotipe rastlanmış ve 82 bç. lik ve 29 bç. lik 2 DNA fragmanı görüntülenebilmiştir (Şekil 8).

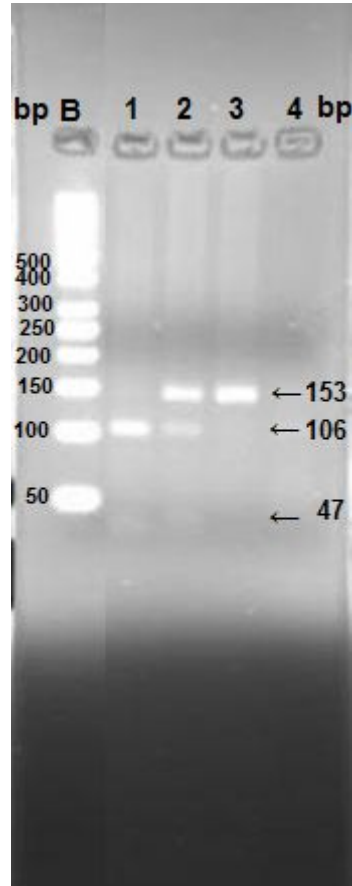


**Şekil 8:** Kontrol ve çalışma grubundaki bazı olgulara ait örneklerin, restriksiyon enzim kesimi ve % 3' lük NuSieve agaroz jelde koşulmalarından sonra, *CES1* H199R polimorfizmi için genotiplendirilmeleri.  
*B:* Belirteç DNA (*GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder*; *MBI Fermentas, Germany*); *1:* No' lu olgu, *H2*; *2:* No' lu olgu, *H11*; *3:* No' lu olgu, *K13*; *4:* No' lu olgu, *K20*; *5:* Negatif Kontrol; Hasta ve kontrollerin tamamı yabancı genotipte (*H/H*)

### 3.2.2.2 CES1 N75S Gen Polimorfizmi Genotiplendirilmesi

Olguların CES1 N75S gen polimorfizmi (G→A; Asparagin→Serin) için genotiplendirilmeleri, RFLP işlemi sonrasında CES1 ürünlerinden elde edilen DNA fragmanına göre gerçekleştirilmiştir.

Buna göre, yabancı genotipe sahip olgular (N/N) 106 bç. ve 47 bç. büyüklüğündeki 2 DNA fragmanına; CES1 N75S gen polimorfizmi için homozigot olan (mutant) olgular (S/S) 153 bç. büyüklüğündeki tek bir DNA fragmanına ve CES1 N75S gen polimorfizmi için heterozigot olan olgular (N/S) 153 bç., 106 bç., ve 47 bç. büyüklüğündeki 3 DNA fragmanına sahiptirler (Şekil 9).



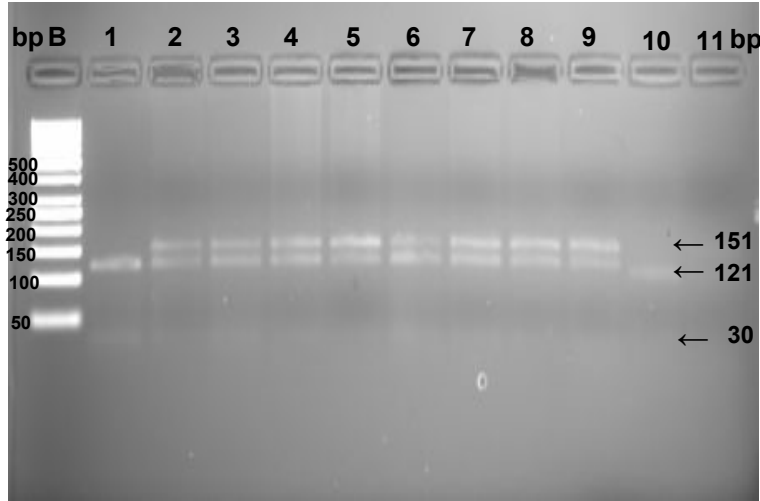
**Şekil 9:** Kontrol ve çalışma grubundaki bazı olgulara ait örneklerin, restriksiyon enzim kesimi ve % 3' lük NuSieve agaroz jelde koşulmalarından sonra, CES1 N75S polimorfizmi için genotiplendirilmeleri.

B: Belirteç DNA (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; MBI Fermentas, Germany); 1 :No' lu olgu yabancı (N/N), K17; 2: No' lu olgu heterozigot (N/S), H1; 3: No' lu olgu mutant (S/S) H16 4: Negatif Kontrol.

### 3.2.2.3 CES1 I49V Gen Polimorfizmi Genotiplendirilmesi

Olguların CES1 I49V gen polimorfizmi (A→G; İzolösin→Valin) için genotiplendirilmeleri, RFLP işlemi sonrasında CES1 ürünlerinden elde edilen DNA fragmanına göre gerçekleştirilmiştir.

Buna göre, yabancı genotipe sahip olguların (I/I) 121 bç. ve 30 bç. büyüklüğündeki 2 DNA fragmanına; CES1 I49V gen polimorfizmi için homozigot olan (mutant) olguların (V/V) 151 bç. büyüklüğündeki tek bir DNA fragmanına ve CES1 I49V gen polimorfizmi için heterozigot olan olguların (I/V) 151 bç., 121 bç. ve 30 bç. büyüklüğündeki 3 DNA fragmanına sahip olmaları beklenir. Ancak bizim kontrol ve çalışma grubumuzda yalnız heterozigot ve yabancı tip genotipe sahip olgular tespit edilmiş, homozigot bireye rastlanmamıştır. Dolayısıyla 2 ve 3 DNA fragmanına sahip bantlar görüntülenmiştir (Şekil 10).



**Şekil 10:** Kontrol ve çalışma grubundaki bazı olgulara ait örneklerin, restriksiyon enzim kesimi ve % 3' lük NuSieve agaroz jelde koşulmalarından sonra, CES1 I49V polimorfizmi için genotiplendirilmeleri.

B: Belirteç DNA (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; MBI Fermentas, Germany); 1 ve 10: No' lu olgular yabancı tip (I/I), H2- K33; 2- 9: No' lu olgular heterozigot, H3, H5, H8, H10, K1, K4, K5, K6, K7; 11: Negatif Kontrol.

### 3.2.3 *CES1* R199H, N75S, I49V Gen Polimorfizmlerinin Genotip ve Haplotip Analizleri

#### 3.2.3.1 Kontrol Grubu

Toplam 60 olgudan oluşan bu grupta;

*CES1* H199R gen polimorfizmi için 60 olgunun tamamının (% 100) yabancı (H/H) genotipe sahip olduğu (Tablo 10, Grafik 3); alel sıklığı 120 adet (% 100) Guanin (H-Histidin) haplotipi olarak belirlenmiştir (Tablo 10, Grafik 4).

*CES1* N75S gen polimorfizmi için 60 olgudan 41 olgunun (% 68.3) yabancı (N/N), 16 olgunun (% 26.7) heterozigot (N/S), 3 olgunun (% 5.0) mutant (S/S) genotipe sahip olduğu (Tablo 11, Grafik 5); alel sıklığının 98 adet (% 81.6) Guanin (N-Asparagin), 22 adet (% 18.4) Adenin (S-Serin) haplotipi olarak belirlenmiştir (Tablo 11, Grafik 6).

*CES1* I49V gen polimorfizmi için 60 olgudan 8 olgunun (% 13.3) yabancı (I/I), 52 olgunun (% 86.7) heterozigot (I/V) genotipe sahip olduğu (Tablo 12, Grafik 7); alel sıklığının 68 adet (% 56.6) Adenin (I-Isolesin), 52 adet (% 43.4) Guanin (V-Valin) haplotipi olarak belirlenmiştir (Tablo 12, Grafik 8)

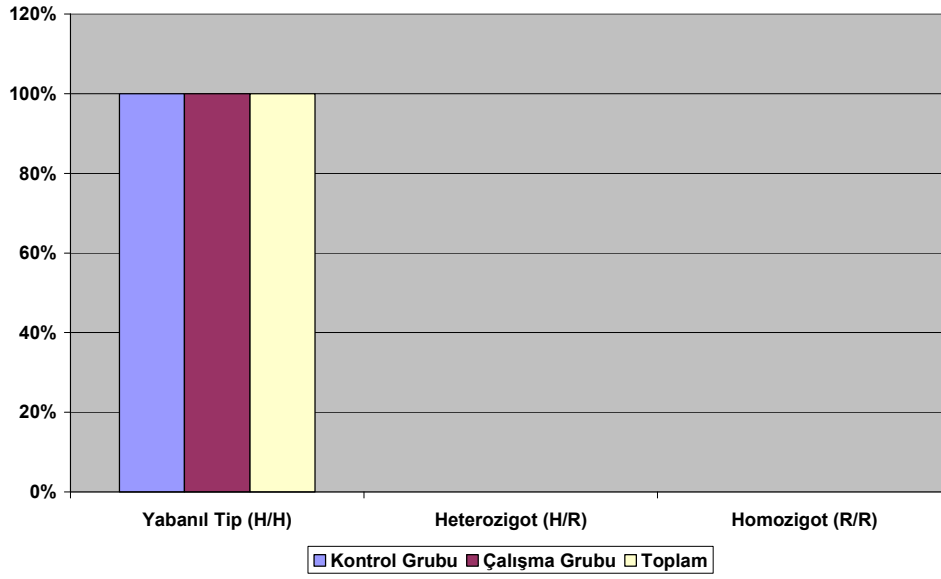
#### 3.2.3.2 Çalışma Grubu

Capecitabine kullanan 20 olgudan oluşan bu grupta;

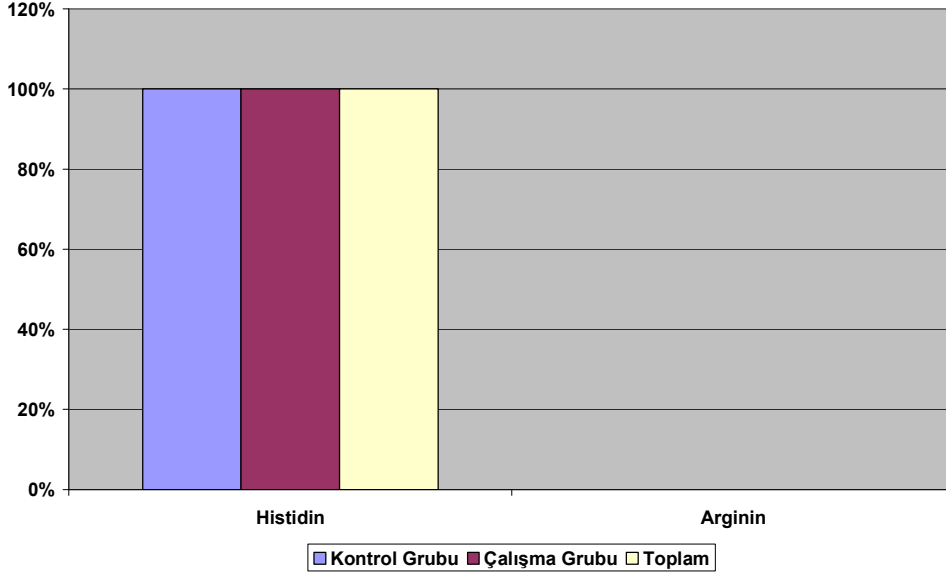
*CES1* H199R gen polimorfizmi için 20 olgunun da (% 100) yabancı (H/H) genotipe sahip olduğu (Tablo 10, Grafik 3); alel sıklığının, 40 adet (% 100) Guanin (H-Histidin) haplotipi olarak belirlenmiştir (Tablo 10, Grafik 4).

**Tablo 10:** Kontrol ve çalışma grubunda *CES1* H199R alel sıklığı ve genotip dağılımı

<i>CES1</i> H199R	Alel Sıklığı		Genotip Dağılımı		
	Histidin	Arginin	H/H	H/R	R/R
Kontrol Grubu (n = 60)	120 (% 100)	-	60 (% 100)	-	-
Çalışma Grubu (n = 20)	40 (% 100)	-	20 (% 100)	-	-
Toplam (n = 80)	160 (% 100)	-	80 (% 100)	-	-



**Grafik 3:** Kontrol grubu ve çalışma grubunun *CES1* H199R gen polimorfizmi analiz sonuçlarının karşılaştırılması; genotip dağılımı.

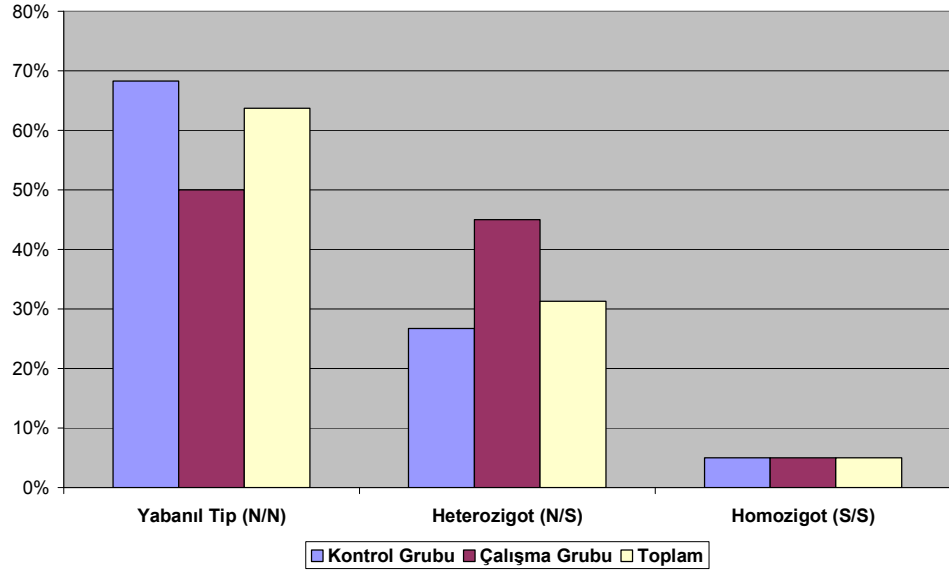


**Grafik 4:** Kontrol grubu ve çalışma grubunun *CES1* Histidin/Arjinin haplotip analiz sonuçlarının karşılaştırılması; alel sıklığı.

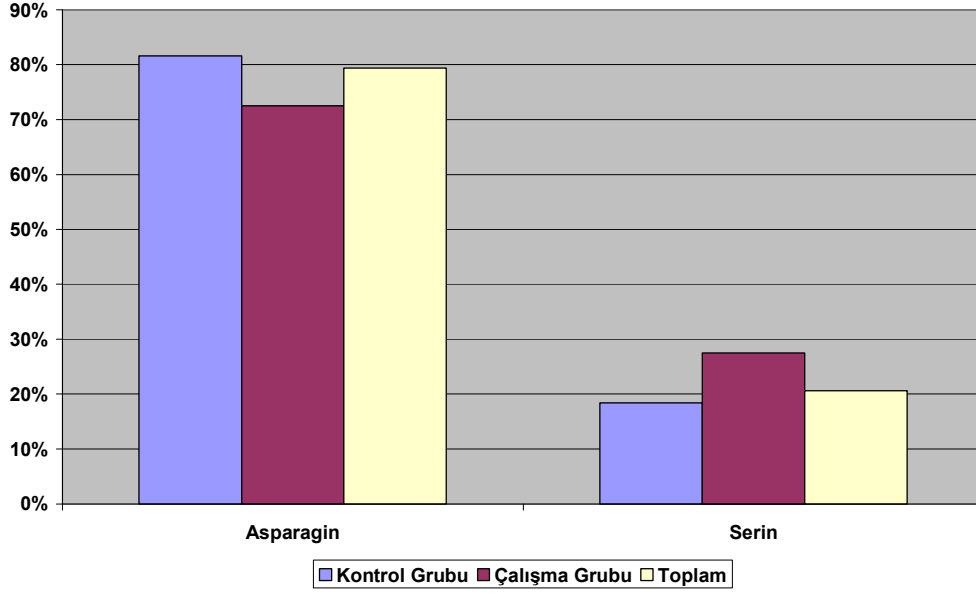
*CES1* N75S gen polimorfizmi için 20 olgudan 10 olgunun (% 50) yabanıl (N/N), 9 olgunun (% 45) heterozigot (N/S), 1 olgunun (% 5.0) mutant (S/S) genotipe sahip olduğu (Tablo 11, Grafik 5); alel sıklığının 29 adet (% 72.5) Guanin (N-Asparagin), 11 adet (% 27.5) Adenin (S-Serin) haplotipi olarak belirlenmiştir (Tablo 11, Grafik 6).

**Tablo 11:** Kontrol ve çalışma grubunda *CES1* N75S alel sıklığı ve genotip dağılımı.

<i>CES1</i> N75S	Alel Sıklığı		Genotip Dağılımı		
	Asparagin	Serin	N/N	N/S	S/S
Kontrol Grubu (n = 60)	98 (% 81.6)	22 (% 18.4)	41 (% 68.3)	16 (% 26.7)	3 (% 5)
Çalışma Grubu (n = 20)	29 (% 72.5)	11 (% 27.5)	10 (% 50)	9 (% 45)	1 (% 5)
Toplam (n = 80)	127 (% 79.4)	33 (% 20.6)	51 (% 63.7)	25 (% 31.3)	4 (% 5)



**Grafik 5:** Kontrol grubu ve çalışma grubunun *CES1* N75S gen polimorfizmi analiz sonuçlarının karşılaştırılması; genotip dağılımı.

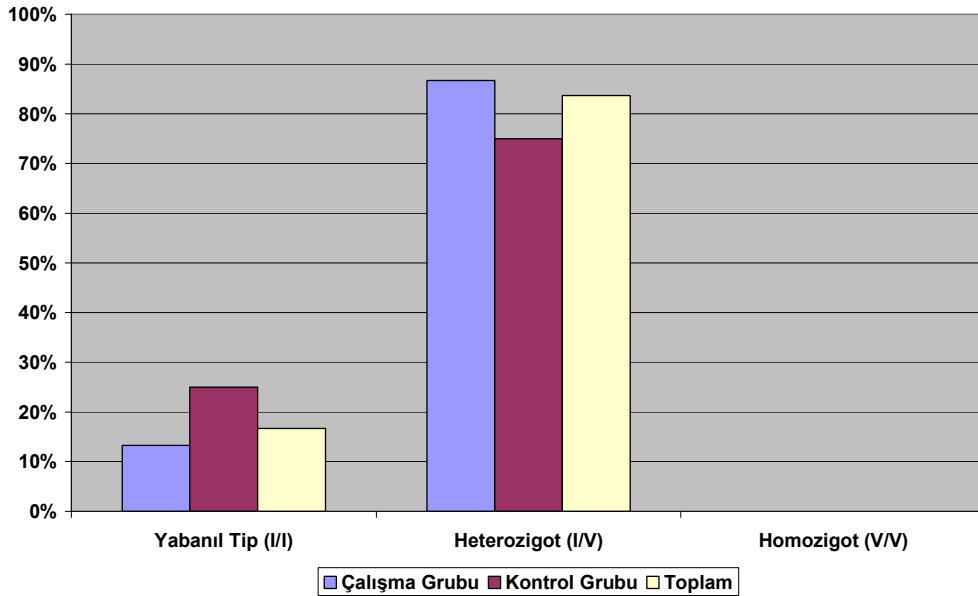


**Grafik 6:** Kontrol grubu ve çalışma grubunun CES1 Asparagin/Serin haplotip analiz sonuçlarının karşılaştırılması; alel sıklığı.

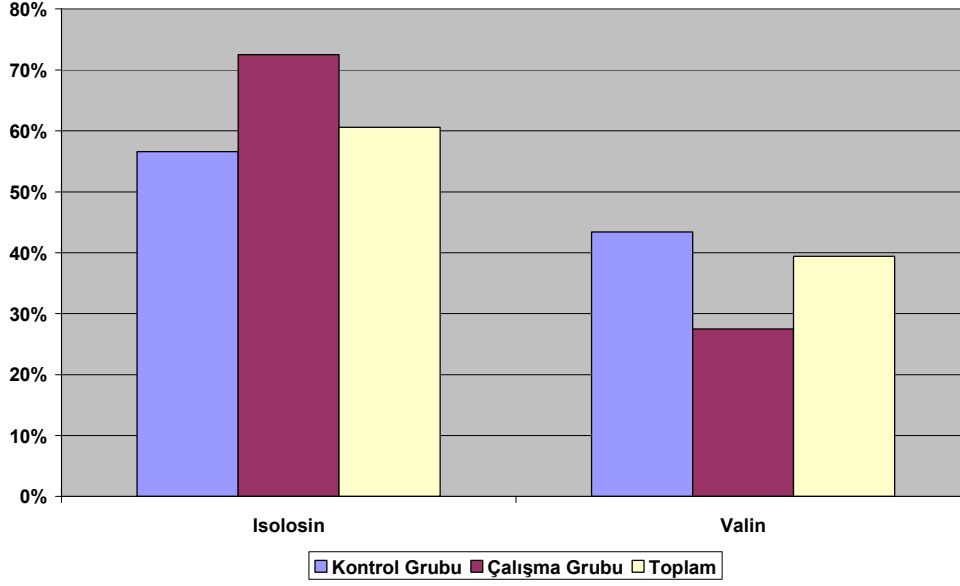
CES1 I49V gen polimorfizmi için 20 olgudan 5 olgunun (% 25) yabancı (I/I), 15 olgunun (% 75) heterozigot (I/V) genotipe sahip olduğu Tablo 12, Grafik 7); alel sıklığının 25 adet (% 62.5) Adenin (I-İsolosin), 15 adet (% 37.5) Guanin (V-Valin) haplotipi olarak belirlenmiştir (Tablo 12, Grafik 8)

**Tablo 12:** Kontrol ve çalışma grubunda *CES1* I49V alel sıklığı ve genotip dağılımı.

<i>CES1</i> I49V	Alel Sıklığı		Genotip Dağılımı		
	Isolosin	Valin	I/I	I/V	V/V
Kontrol Grubu (n = 60)	68 (% 56.6)	52 (% 43.4)	8 (% 13.3)	52 (% 86.7)	-
Çalışma Grubu (n = 20)	25 (% 62.5)	15 (% 37.5)	5 (% 25)	15 (% 75)	-
Toplam (n = 80)	93 (% 58.1)	67 (% 41.9)	13 (% 16.3)	67 (% 83.7)	-



**Grafik 7:** Kontrol grubu ve çalışma grubunun *CES1* I49V gen polimorfizmi analiz sonuçlarının karşılaştırılması; genotip dağılımı.



**Grafik 8:** Kontrol grubu ve çalışma grubunun CES1 Isolosin/Valin haplotip analiz sonuçlarının karşılaştırılması; alel sıklığı.

### 3.2.3.3 Kontrol ve Çalışma Gruplarının CES1 H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmlerinin İstatistiksel Analizi

Kontrol ve çalışma grubunu oluşturan olgular CES1 H199R (kontrol ve çalışma gruplarındaki olguların tamamında yabancı tip alel bulunduğu için Ki-kare sonucu yoktur), N75S ( $\chi^2=3.537$ ,  $p>0.05$ ), I49V ( $\chi^2= 2.409$ ,  $p>0.05$ ) polimorfizmleri açısından karşılaştırıldıklarında, kontrol ve çalışma grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

### 3.2.4. CES1 H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmlerinin Çalışma Grubu İçerisinde Toksikiteye Göre Genotip Dağılımı

Capecitabine kullanan 20 olgudan oluşan bu grupta 13 olguda (% 65) toksisite gözlenmezken, 7 olguda (% 35) toksisite bulgusuna rastlanmıştır (Tablo 13). Toksikite gözlenen olgular içinde ise, toplam 7 olgudan 2' sinde (% 28.6) el-ayak sendromu, 2' sinde (% 28.6) halsizlik, 1' inde (% 14.3)

konjüktivite, 1' inde (% 14.3) anemi, 1' inde (% 14.3) emezis bulgusuna rastlanmıştır.

**Tablo 13:** *CES1* geni çalışma grubunda toksisite bulguları

<b><i>CES1</i></b>	<b>Toksisite Var</b>	<b>Toksisite Yok</b>
Çalışma Grubu	7	13
( <i>n</i> = 20)	(% 35)	(% 65)

*CES1* H199R gen polimorfizmi için 20 olgunun tamamı yabancı tip (H/H) olduğundan toksisite-polimorfizm ilişkilendirmesi yapılamamıştır.

*CES1* N75S gen polimorfizmi için yabancı (N/N) genotipe sahip olgularda, 7 (% 53.8) olguda toksisite bulunmazken, 3 olguda (% 42.9) toksisiteye rastlanmıştır. Heterozigot (N/S) genotipe sahip olgulardan 5 olguda (% 38.5) toksisite bulgusu bulunmazken, 4 olguda (% 57.1) toksisiteye rastlanmıştır. Homozigot (S/S) genotipe sahip tek olguda (% 7.7) toksisite bulgusuna rastlanmamıştır (Tablo 14).

**Tablo 14:** *CES1* N75S gen polimorfizmi için toksisite bulguları

<b><i>CES1</i> N75S</b>	<b>Toksisite Var</b>	<b>Toksisite Yok</b>
<b>Yabancı</b>	3	7
<b>Heterozigot</b>	4	5
<b>Homozigot</b>	-	1
<b>Toplam</b>	7	13

*CES1* I49V gen polimorfizmi için yabancı (I/I) genotipe sahip olgularda 4 olguda (% 30.8) toksisite bulgusu yokken, 1 olguda toksisite vardır (% 14.3). Heterozigot (I/V) genotipe sahip olgulardan 9' unda (% 69.2) toksisite yokken, 6' sında (% 85.7) toksisite bulunmaktadır (Tablo 15).

**Tablo 15:** *CES1* I49V gen polimorfizmi için toksisite bulguları

<b><i>CES1</i> I49V</b>	<b>Toksisite Var</b>	<b>Toksisite Yok</b>
<b>Yabancı</b>	1	4
<b>Heterozigot</b>	6	9
<b>Toplam</b>	7	13

### 3.2.4.1 *CES1* H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmleri İle Toksisite İlişkisi İstatistiksel Analizi

Çalışma grubunda bulunan ve toksisiteye sahip olan olgular, capecitabine kullanmayan kontrol grubu olguları ile karşılaştırıldıklarında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

*CES1* H199R gen polimorfizminde olguların tamamı yabancı genotipe sahip olduklarından Ki-kare analizi yapılamamıştır. *CES1* N75S için  $\chi^2= 2.920$  ve  $p>0.05$ ; *CES1* I49V için  $\chi^2= 0.005$  ve  $p>0.05$  bulunmuştur.

### 3.2.5. *CES1* H199R, N75S ve I49V Gen Polimorfizmlerinin Kontrol ve Çalışma Grubu İçerisinde Yaşa Göre Genotip Dağılımı ve Alel Sıklığı

#### 3.2.5.1. Kontrol Grubu

40 yaş ve altı olgular değerlendirildiklerinde 15 olgudan;

*CES1* H199R gen polimorfizmi için, tamamı (% 100) yabancı tipte (H/H) ve alel sıklığı ise 30 adet (% 100) Histidin ' dir (Tablo 16).

*CES1* N75S gen polimorfizmi için, 12' si (% 80) yabancı tipte (N/N), 2' si (% 13.3) heterozigot (N/S), 1' i (% 6.7) homozigottur (S/S). Alel sıklığı ise 26 adet (% 86.7) Asparagin ve 4 adet (% 13.3) Serin' dir (Tablo 17).

*CES1* I49V gen polimorfizmi için, 2' si (% 13.3) yabancı tipte (I/I), 13' ü (% 86.7) heterozigottur (I/V). Alel sıklığı ise 17 adet (% 56.7) İzolösin ve 13 adet (% 43.3) Valin' dir (Tablo 18).

40 yaş üstü olgular değerlendirildiğinde 45 olgudan;

*CES1* H199R gen polimorfizmi için, tamamı (% 100) yabancı tipte (H/H) ve alel sıklığı ise 90 adet (% 100) Histidin ' dir (Tablo 19).

*CES1* N75S gen polimorfizmi için, 30' u (% 66.7) yabancı tipte (N/N), 13' ü (% 28.9) heterozigot (N/S), 2' si (% 4.4) homozigottur (S/S). Alel sıklığı ise 73 adet (% 81.1) Asparagin ve 17 adet (% 18.9) Serin' dir (Tablo 20).

*CES1* I49V gen polimorfizmi için, 6' si (% 13.3) yabancı tipte (I/I), 39' u (% 86.7) heterozigottur (I/V). Alel sıklığı ise 51 adet (% 56.7) İzolösin ve 39 adet (% 43.3) Valin' dir (Tablo 21).

### **3.2.5.2. Çalışma Grubu**

40 yaş ve altı olgular değerlendirildiğinde 4 olgudan;

*CES1* H199R gen polimorfizmi için, tamamı (% 100) yabancı tipte (H/H) ve bunlarda alel sıklığı ise 8 adet (% 100) Histidin ' dir (Tablo 16).

**Tablo 16:** Kontrol ve çalışma grubunda 40 yaş altı olgularda *CES1* H199R alel sıklığı ve genotip dağılımı

<b>CES1 H199R</b>	<b>Alel Sıklığı</b>		<b>Genotip Dağılımı</b>		
	<b>Histidin</b>	<b>Arginin</b>	<b>H/H</b>	<b>H/R</b>	<b>R/R</b>
Kontrol Grubu (n = 15)	30 (% 100)	-	15 (% 100)	-	-
Çalışma Grubu (n = 4)	8 (% 100)	-	4 (% 100)	-	-
Toplam (n = 19)	38 (% 100)	-	19 (% 100)	-	-

*CES1* N75S gen polimorfizmi için, 2' si (% 50) yabancı tipte (N/N), 2' si de (% 50) heterozigottur (N/S). Alel sıklığı ise 6 adet (% 75) Asparagin ve 2 adet (% 25) Serin' dir (Tablo 17).

**Tablo 17:** Kontrol ve çalışma grubunda 40 yaş altı olgularda *CES1* N75S alel sıklığı ve genotip dağılımı.

<b>CES1 N75S</b>	<b>Alel Sıklığı</b>		<b>Genotip Dağılımı</b>		
	<b>Asparagin</b>	<b>Serin</b>	<b>N/N</b>	<b>N/S</b>	<b>S/S</b>
Kontrol Grubu (n = 15)	26 (% 86.7)	4 (% 13.3)	12 (% 80)	2 (% 13.3)	1 (% 6.7)
Çalışma Grubu (n = 4)	6 (% 75)	2 (% 25)	2 (% 50)	2 (% 50)	-
Toplam (n = 19)	32 (% 84.2)	6 (% 15.8)	14 (% 73.7)	4 (% 21)	1 (% 5.3)

*CES1* I49V gen polimorfizmi için, 2' si (% 50) yabancı tipte (I/I), 2' si de (% 50) heterozigottur (I/V). Alel sıklığı ise 6 adet (% 75) Isolesin ve 2 adet (% 25) Valin' dir.

**Tablo 18:** Kontrol ve çalışma grubunda 40 yaş altı olgularda *CES1* I49V alel sıklığı ve genotip dağılımı.

<i>CES1</i> I49V	Alel Sıklığı		Genotip Dağılımı		
	Isolesin	Valin	I/I	I/V	V/V
Kontrol Grubu (n=15)	17 (% 56.7)	13 (% 43.3)	2 (% 13.3)	13 (% 86.7)	-
Çalışma Grubu (n=4)	6 (% 75)	2 (% 25)	2 (% 50)	2 (% 50)	-
Toplam (n=19)	23 (% 60.5)	15 (% 39.5)	4 (% 21)	15 (% 79)	-

40 yaş üstü olgular değerlendirildiğinde 16 olgudan;

*CES1* H199R gen polimorfizmi için, tamamı (% 100) yabancı tipte (H/H) ve alel sıklığı ise 32 adet (% 100) Histidin ' dir (Tablo 19).

**Tablo 19:** Kontrol ve çalışma grubunda 40 yaş üstü olgularda *CES1* H199R alel sıklığı ve genotip dağılımı

<i>CES1</i> H199R	Alel Sıklığı		Genotip Dağılımı		
	Histidin	Arginin	H/H	H/R	R/R
Kontrol Grubu (n = 45)	90 (% 100)	-	45 (% 100)	-	-
Çalışma Grubu (n = 16)	32 (% 100)	-	16 (% 100)	-	-
Toplam (n = 61)	122 (% 100)	-	61 (% 100)	-	-

*CES1* N75S gen polimorfizmi için, 7' si (% 43.8) yabancı tipte (N/N), 8' i (% 50) heterozigot (N/S) ve 1' i (% 6.2) homozigottur (S/S). Alel sıklığı ise 22 adet (% 68.8) Asparagin ve 10 adet (% 31.2) Serin' dir (Tablo 20).

**Tablo 20:** Kontrol ve çalışma grubunda 40 yaş üstü olgularda *CES1* N75S alel sıklığı ve genotip dağılımı.

<i>CES1</i> N75S	Alel Sıklığı		Genotip Dağılımı		
	Asparagin	Serin	N/N	N/S	S/S
Kontrol Grubu (n = 45)	73 (% 81.1)	17 (% 18.9)	30 (% 66.7)	13 (% 28.9)	2 (% 4.4)
Çalışma Grubu (n = 16)	22 (% 68.8)	10 (% 31.2)	7 (% 43.8)	8 (% 50)	1 (% 6.2)
Toplam (n = 61)	95 (% 77.9)	27 (% 22.1)	37 (% 60.7)	21 (% 34.4)	3 (% 4.9)

*CES1* I49V gen polimorfizmi için, 3' ü (% 18.8 ) yabancı tipte (I/I), 13' ü de (% 81.2) heterozigottur (I/V). Alel sıklığı ise 19 adet (% 59.4) Isolosin ve 13 adet (% 40.6) Valin' dir (Tablo 21).

**Tablo 21:** Kontrol ve çalışma grubunda 40 yaş üstü olgularda *CES1* I49V alel sıklığı ve genotip dağılımı.

<i>CES1</i> I49V	Alel Sıklığı		Genotip Dağılımı		
	Isolosin	Valin	I/I	I/V	V/V
Kontrol Grubu (n = 45)	51 (% 56.7)	39 (% 43.3)	6 (% 13.3)	39 (% 86.7)	-
Çalışma Grubu (n = 26)	19 (% 59.4)	13 (% 40.6)	3 (% 18.8)	13 (% 81.2)	-
Toplam (n = 61)	70 (% 57.3)	52 (% 46.7)	9 (% 14.8)	52 (% 85.2)	-

3.3. Kontrol Grubunda CES1 Geni H199R, N75S ve I49V Polimorfizmleri Genotip Sonuçları ve Diğer Parametrelerle İlişkileri (Tablo 22)

CES1 gen polimorfizmi								
Olgu No	Olgu	Yaş	Cinsiyet	Metastaz Yeri	Toksisite	H199R	N75S	I49V
1	H2	46	Kadın	Karaciğer, Kemik	Konjüktivit	H/H	N/N	I/I
2	H3	48	Kadın	Kemik	Anemi	H/H	N/N	I/V
3	H5	64	Kadın	Lenf	El-Ayak Send.	H/H	N/N	I/V
4	H8	66	Kadın	Akciğer	Yok	H/H	N/N	I/V
5	H10	44	Kadın	Plevra	Emezis	H/H	N/N	I/V
6	H12	38	Kadın	Lenf	Yok	H/H	N/N	I/V
7	H13	54	Kadın	Lenf	Yok	H/H	N/N	I/V
8	H18	53	Kadın	Kemik	Yok	H/H	N/N	I/V
9	H19	39	Kadın	Lenf	Yok	H/H	N/N	I/I
10	H1	74	Kadın	Karaciğer	El-Ayak Send.	H/H	N/S	I/V
11	H4	52	Kadın	Beyin, Karaciğer	Halsizlik	H/H	N/S	I/V
12	H6	61	Kadın	Lenf	Yok	H/H	N/S	I/V
13	H7	60	Kadın	Lenf	Yok	H/H	N/S	I/V
14	H9	30	Kadın	Lenf	Yok	H/H	N/S	I/I
15	H11	64	Kadın	Karaciğer	Halsizlik	H/H	N/S	I/I
16	H14	64	Kadın	Kemik iliği	Yok	H/H	N/S	I/V
17	H15	36	Kadın	Akciğer	Yok	H/H	N/S	I/V
18	H17	41	Kadın	Kemik	Yok	H/H	N/S	I/V
19	H20	52	Kadın	Karaciğer	Yok	H/H	N/S	I/I
20	H16	43	Kadın	Kemik	Yok	H/H	S/S	I/V

3.4. Çalışma Grubunda CES1 Geni H199R, N75S ve I49V Polimorfizmleri Genotip Sonuçları ve Diğer Parametrelerle İlişkileri (Tablo 23)

Olgu No	Olgu	Yaş	Cinsiyet	Metastaz Yeri	CES1 gen polimorfizmi		
					H199R	N75S	I49V
1	K1	36	Kadın	Akciğer	H/H	N/N	I/V
2	K4	68	Kadın	Kemik	H/H	N/N	I/V
3	K5	33	Kadın	Beyin	H/H	N/N	I/V
4	K6	67	Kadın	Kemik	H/H	N/N	I/V
5	K7	48	Kadın	Akciğer, Kemik	H/H	N/N	I/V
6	K8	55	Kadın	Akciğer	H/H	N/N	I/V
7	K11	28	Kadın	Beyin	H/H	N/N	I/V
8	K12	37	Kadın	Karaciğer	H/H	N/N	I/V
9	K14	47	Kadın	Karaciğer, Kemik	H/H	N/N	I/V
10	K15	33	Kadın	Lenf	H/H	N/N	I/V
11	K16	61	Kadın	Lenf, Karaciğer	H/H	N/N	I/V
12	K17	40	Kadın	Lenf	H/H	N/N	I/V
13	K19	67	Kadın	Lenf	H/H	N/N	I/V
14	K20	66	Erkek	Prostat	H/H	N/N	I/V
15	K21	63	Kadın	Lenf	H/H	N/N	I/V
16	K22	42	Kadın	Lenf	H/H	N/N	I/V
17	K25	68	Kadın	Kemik	H/H	N/N	I/V
18	K28	47	Kadın	Lenf	H/H	N/N	I/V
19	K29	50	Kadın	Lenf	H/H	N/N	I/V
20	K30	63	Kadın	Lenf	H/H	N/N	I/V
21	K31	53	Kadın	Lenf	H/H	N/N	I/V
22	K32	33	Kadın	Lenf	H/H	N/N	I/V
23	K33	53	Kadın	Lenf	H/H	N/N	I/V
24	K34	58	Kadın	Lenf	H/H	N/N	I/V
25	K35	55	Kadın	Lenf	H/H	N/N	I/V
26	K36	35	Kadın	Akciğer, Kemik	H/H	N/N	I/V
27	K37	64	Erkek	Lenf	H/H	N/N	I/V
28	K38	56	Kadın	Karaciğer	H/H	N/N	I/V
29	K39	54	Kadın	Lenf	H/H	N/N	I/V

30	K42	36	Kadın	Lenf	H/H	N/N	IV
31	K45	33	Kadın	Akciğer	H/H	N/N	VI
32	K47	50	Kadın	Karaciğer	H/H	N/N	IV
33	K48	37	Kadın	Lenf	H/H	N/N	IV
34	K50	54	Kadın	Lenf	H/H	N/N	IV
35	K52	46	Kadın	Beyin	H/H	N/N	VI
36	K53	50	Kadın	Akciğer	H/H	N/N	IV
37	K54	50	Kadın	Karaciğer	H/H	N/N	IV
38	K55	49	Kadın	Karaciğer	H/H	N/N	IV
39	K57	62	Kadın	Lenf	H/H	N/N	IV
40	K58	56	Kadın	Lenf	H/H	N/N	VI
41	K59	61	Kadın	Kemik	H/H	N/N	IV
42	K60	35	Kadın	Kemik, Akciğer, Lenf	H/H	N/N	IV
43	K3	40	Kadın	Kemik, Akciğer	H/H	N/S	IV
44	K9	42	Kadın	Akciğer	H/H	N/S	IV
45	K10	41	Erkek	Akciğer	H/H	N/S	IV
46	K13	48	Kadın	Akciğer	H/H	N/S	IV
47	K18	55	Kadın	Lenf	H/H	N/S	IV
48	K23	38	Kadın	Akciğer, Karaciğer, Kemik	H/H	N/S	IV
49	K24	44	Kadın	Lenf	H/H	N/S	IV
50	K27	48	Kadın	Akciğer	H/H	N/S	IV
51	K40	62	Kadın	Akciğer	H/H	N/S	IV
52	K41	41	Kadın	Karaciğer	H/H	N/S	VI
53	K43	78	Kadın	Lenf	H/H	N/S	IV
54	K44	68	Kadın	Lenf	H/H	N/S	IV
55	K49	46	Kadın	Periton	H/H	N/S	IV
56	K51	61	Erkek	Lenf, Kemik iliği	H/H	N/S	IV
57	K56	50	Erkek	Karaciğer	H/H	N/S	IV
58	K2	78	Kadın	Karaciğer	H/H	S/S	IV
59	K26	67	Kadın	Lenf	H/H	S/S	IV
60	K46	30	Kadın	Karaciğer	H/H	S/S	IV

## BÖLÜM IV

### 4.1 TARTIŞMA

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipidir (2). Meme kanserinin de, diğer kanserler gibi son safhası metastazdır. Metastatik meme kanserinin tutulumu genelde lenf bezleri, akciğerler, beyin ve kemikler olmaktadır. Özellikle beyin ve kemik metastazlarında tedavi oldukça zorlaşır ve bu noktada kullanılan ilaçlar da ayrı bir önem kazanır.

Capecitabine metastatik meme kanseri tedavisinde kullanılan terapötik bir ajandır. Tek başına kullanılabilirdiği gibi, başka kemoterapötik ilaçlarla da kullanılabilir (23, 25, 52). Kendisi doğrudan sitotoksik etkili olmasa da, birkaç enzimatik reaksiyonla 5-fluorourasil' e yıkılır ve tümör hücresinde sitotoksik hale gelir (51). Diğer kemoterapötik ilaçlarla kıyaslandığında daha iyi tedavi sonuçları verir ve maliyeti daha düşüktür. 2006 yılında Hussein ve arkadaşlarının metastatik kolon kanserli hastalarda yaptıkları bir çalışmada, capecitabine' le tedavinin alternatif kemoterapötiklerle yapılan tedavilere oranla binlerce Euro daha ekonomik ve efektif olduğu ortaya çıkmıştır (38). Benzer şekilde, Di Costanzo ve arkadaşlarının yine kolon kanserli hastalarda yaptıkları bir çalışmada da capecitabine' in oldukça 'farmakoekonomik' bir ilaç olduğuna dikkat çekilmiştir (15).

Yakın zamana kadar capecitabine, antrasiklin ve taksan' lara dirençli metastatik tümörler için reçete edilebilen, FDA (Besin ve İlaç Derneği, *Food and Drug Administration*) onaylı tek ilaç olma özelliğini korumuştur (56).

Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalar içerisinde, ön tedavileri taksan ve antrasiklinlerle yapılmış, ardından capecitabine başlanmış hastaların ilaç yanıtları ve sağ kalım süreleri değişiklik göstermiştir. Örneğin Blum ve arkadaşlarının 1999 yılında 162 metastatik meme kanserli hasta ile yaptıkları bir çalışmaya göre, ön tedavilerinde hastaların % 100' ü taksan ve % 91' i antrasiklin almış, daha sonra bu hastalara capecitabine başlanmıştır. Hastaların ortalama ilaca yanıt süreleri 8 ay, hayatta kalma süreleri 12.8 ay olmuştur (5). Ancak, Wist ve arkadaşlarının 2004' de 48 metastatik meme kanserli hasta ile yaptıkları benzer bir çalışmada ise, ön tedavilerinde her iki ilacı da hasta grubunun % 100' ü de kullanmış, ardından capecitabine başlanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda ise capecitabine kullanımı sonrasında ortalama ilaca yanıt süreleri 4.5 ay, hayatta kalım süreleri ise 9.4 ay olarak belirlenmiştir (74).

Capecitabine' in birçok avantajına rağmen bazı çalışmalarda bir takım yan etkilerinden de bahsedilmiştir. Bu yan etkiler çoğu kez mide bulantısı (5, 6, 61, 70, 74), kusma (5, 6, 70), diare (5, 6, 21, 61, 70), nötropeni (5, 6, 21, 61, 70) ve el-ayak sendromu (5, 6, 21, 61, 70, 74) olarak gösterilse de bazı çalışmalarda az da olsa kalp spazmları (8), gastrointestinal toksisite (46) ve serebellar disfonksiyonun (40) varlığına da dikkat çekilmiştir.

Capecitabine' e karşı yanıt, yanıtsızlık veya toksisite geliştirilmesinin, metabolizmasında rol oynayan enzimleri kodlayan genlerdeki değişikliklere göre farklılık göstereceği tahmin edilmektedir. Birkaç metabolik basamaktan geçen capecitabine' in aktif formu 5- Fluorourasil' dir. Aktif 5-Fluorourasil bileşiğine dönüşebilmesi için, karaciğerde öncelikle CES1 ve CES2, sonra sitidin deaminaz ve timidin fosforilaz enzimleri tarafından metabolize

edilmesi gerekir (69). Bu enzimlerden CES1 bir karboksil esterazdır. Birçok tek nükleotid polimorfizmine sahip olan *CES1*' in ilaç yanıtı üzerindeki etkileri henüz tam olarak bilinmemektedir.

Son yıllarda *CES1* ile ilgili yapılan çalışmalarda bu gene ait bazı polimorfizmler incelenmiştir. Marsh ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada çeşitli toplumlardan (Avrupa, Amerika) seçtikleri 120 bireyde bazı *CES1* polimorfizmleri incelenmiştir. İnceledikleri 17 polimorfizmden 2' si UTR (tercüme edilmemiş bölge, *untranslated region*)' larda ve 15 tanesi intronlarda bulunan polimorfizmlerdir. Sağlıklı ve kolon kanserli hastaların karşılaştırıldıkları bu çalışmada iki grup arasında SNP içerikleri açısından anlamlı bir farka rastlanmamıştır (66). 2008 yılında Zhu ve arkadaşlarının Dikkat eksikliği ve Hiperaktivite Sendrom' lu hastalarla yaptıkları bir çalışmada ise *CES1* ekson 4' de bulunan Gly143Glu ve ekson 6' da bulunan Asp260fs (frameshift) polimorfizmlerinin sıklıkları, methylphenidate kullanan bireylerde araştırılmış ve her iki polimorfizmin de ilaç yanıtında anlamlı bir değişikliğe yol açtığı saptanmıştır (26).

Bizim çalışmamızda ise *CES1*' in ekson 2' de bulunan I49V ve N75S gen polimorfizmleriyle, ekson 5' te bulunan H199R gen polimorfizmi, Türk toplumundaki sıklıkları araştırılmış ve metastatik meme kanserinde capecitabine' e olan ilaç yanıtı ile toksisite açısından değerlendirilmiştir.

Tüm frekans sonuçları <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/> 'de bulunan HapMap Projesi sonuçları ile karşılaştırıldığında, *CES1* I49V gen polimorfizmi için ilgili bir değere rastlanamamıştır. Bizim çalışmamızda, Türk toplumu için I/I genotipine sahip olgular % 13, I/V genotipine sahip olgular % 67'dir. Polimorfizm açısından homozigot bireye rastlanmamıştır. Alel sıklığı

açısından değerlendirildiğinde ise I alelinin % 60.6, V alelinin ise % 39.4 olduğu bulunmuştur. HapMap projesi sonuçlarında *CES1* N75S gen polimorfizmi N/N genotipine sahip olgular % 89.7, N/S genotipine sahip olgular % 10.3 olarak bulunup S/S sıklığı mevcut değildir. Bizim çalışmamızda ise, N/N % 63.7, N/S % 31.3 ve S/S % 4 olarak bulunmuştur. Alel sıklığı açısından değerlendirildiğinde HapMap projesi sonuçlarında N aleli % 94.9, S aleli ise % 5.1 olarak verilmiş, bizim çalışmamızda ise N aleli sıklığı % 79.4 olup, S aleli sıklığı % 20.6' dır. *CES1* H199R gen polimorfizmi için HapMap projesi sonuçlarında H/H genotipine sahip olgular % 97.6, R/R genotipine sahip olgular % 2.4 olarak verilmiş H/R genotipine sahip olgu bilgisi verilmemiştir. Bizim çalışmamızda ise tüm olgular H/H genotipine sahiptir (%100). Alel sıklığı açısından HapMap projesi sonuçlarında H aleli sıklığı % 98.8, R aleli sıklığı ise % 1.2' dir. Çalışmamızda tüm olgular H/H genotipine sahip olduğundan H aleli sıklığı % 100' dür.

Bu çalışma kapsamında *CES1* I49V, N75S ve H199R gen polimorfizmlerini incelememizdeki amaç, her üç gen polimorfizminde proteinin fonksiyonel olan üçüncül yapısını değiştirebilecek olan amino asit değişikliklerine yol açmalarıdır. Buna göre *CES1* I49V gen polimorfizminde nonpolar izolosin amino asidi, yine nonpolar valin amino asidine; *CES1* N75S gen polimorfizminde polar olan asparagin amino asidi yine polar olan serin amino asidine ve *CES1* H199R gen polimorfizminde ise bazik olan histidin amino asidi, yine bazik olan arjinin amino asidine değişmektedir.

İlgili *CES1* gen polimorfizmleri, enzim aktivitesinde değişikliklere yol açarak, ilaç yanıtı ve toksisite üzerinde etkili olabilir. Bu bağlamda, bizim olgularımızın ilaç yanıtları ve gelişen toksisitelerle ilişkileri

değerlendirildiğinde, ilaç kullanan olgularda polimorfizm bulguları ve toksisite arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamamıştır. Aynı şekilde, hasta ve kontrol grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Bunların nedeni olarak çalışma ve kontrol gruplarında incelenen olgularının sayısının yetersiz olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamız *CES1* geninde I49V, N75S ve H199R gen polimorfizmlerini dünyada ilk defa inceleyen ve, çalışma ve kontrol grubunda metastatik meme kanserli olguları *CES1* geni için araştıran ilk çalışma olması açısından önemlidir.

## BÖLÜM V

### 5.1 SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, 20 tane metastatik meme kanseri tanısı almış ve tedavilerinde capecitabine kullanan ve 60 tane metastatik meme kanseri tanısı konmuş ancak capecitabine kullanmayan toplam 80 olguda *CES1* I49V, N75S ve H199R gen polimorfizmlerinin Türk toplumundaki sıklıkları ve ilaç toksisitesi ile ilişkileri incelenmiştir.

Elde edilen bulguların değerlendirilmesi sonucunda, aşağıdaki sonuçlara varılmıştır:

Çalışmamızın sonunda, farmakogenetik sahasında Faz I enzimleri arasında yer alan karboksilesterazlardan *CES1*' in I49V, N75S ve H199R gen polimorfizmleri açısından kontrol ve çalışma grubu arasında ve çalışma grubu içerisinde, ilaca bağlı toksisite gösteren ve göstermeyen olgular arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Nedenlerden biri olarak, her iki gruptaki olgu sayısının yeterli olmamasını gösterebiliriz.

İleriki hedeflerimiz arasında olgu sayısını artırmak ve 2. ekson içinde yerleşim gösteren, nonpolar Valin amino asidinin yine nonpolar İzolösin amino asidine dönüştüğü *CES1* V38I gen polimorfizmini de incelemek bulunmaktadır. Bununla ilgili etik kurul izni, mevcut çalışmamızla birlikte 07.05.2008 tarihinde, 07-6.1/5 sayılı karar ile onaylanmıştır. Ayrıca, *CES1* gen polimorfizmlerinin PCR-RFLP protokolleri yerine, daha hızlı sonuç veren gerçek-zamanlı PCR çalışma protokollerini oluşturmak da hedeflerimizin arasında yer almaktadır.

## BÖLÜM VI

### METASTATİK MEME KANSERLİ HASTALARDA *CES1* GEN POLİMORFİZMLERİNİN GÖRÜLME SIKLIKLARI VE CAPECİTABİNE KULLANANLARDA İLAÇ YANITINA ETKİLERİNİN RETROSPEKTİF OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

#### 6.1. ÖZET

Meme kanseri dünyada sık görülen ve kadın ölümlerinden en fazla sorumlu olan multifaktoriyel bir hastalıktır. Nedenleri arasında üremeye ilgili etkenler, hormonal etkenler, genetik etkenler ve sosyo-ekonomik durum gibi faktörler yer almaktadır.

Mevcut tümörün safhasına göre sınıflandırılan meme kanserinin en son aşaması, diğer dokulara yayılım gösterdiği metastaz aşamasıdır. Meme kanserinin en çok metastaz gösterdiği yerler lenf nodları, akciğerler, beyin ve kemiklerdir.

Metastatik meme kanserinin tedavisinde, ilaçla tedavi önemli bir yer tutmaktadır. Mevcut ilaçlar içerisinde FDA onaylı olan ve ekonomik olması açısından en çok tercih edilen ilaçlardan biri capecitabine' dir. Capecitabine birkaç metabolik basamaktan geçerek 5-fluorourasil aktif bileşiğine dönüştürülür ve bağırsaklardan emilerek tümör hücrelerinde sitotoksositeye neden olur. Capecitabine' nin metabolik basamaklarında görevli enzimlerden biri, karboksilestaraz olan *CES1*' dir.

*CES1* geninde meydana gelen genetik değişikliklerin ilaç yanıtı ve toksisitesi üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla, çalışmamızda amino asit değişikliklerine neden olan ve eksonik bölgelerden seçilen *CES1* I49V, N75S ve H199R gen polimorfizmlerinin Türk

toplumdaki sıklıkları incelenmiş ve capecitabine kullanan metastatik meme kanserli olgulardaki toksisite ile ilişkisi araştırılmıştır.

*CES1* I49V gen polimorfizmi için kontrol grubunda bulunan 60 olgunun 8'i (% 13.3) yabancı genotipe (I/I) sahipken, 52'si (% 86.7) heterozigot genotipe bulunmuştur (I/V). Çalışma grubunda ise 20 olgudan 5'i (% 25) yabancı genotipe sahipken, 15'i (% 75) heterozigot bulunmuştur. *CES1* N75S gen polimorfizmi için kontrol grubundaki 60 olgudan 41'i (% 68.3) yabancı genotipe (N/N), 16'sı (% 26.7) heterozigot (N/S) ve 3'ü de (% 5) homozigot genotiptedir. Çalışma grubunda 20 olgudan 10'u (% 50) yabancı genotipe (N/N), 9'u (% 45) heterozigot (N/S) ve 1'i (% 5) de homozigot genotipe bulunmuştur (S/S). *CES1* H199R gen polimorfizmi için çalışma ve kontrol gruplarının tamamı (% 100) yabancı genotipe (H/H) bulunmuştur. *CES1* N75S gen polimorfizmi için çalışma grubunda, kontrol grubuna göre heterozigot olgularda artış gözlenmekle birlikte, ikisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ayrıca, araştırılan üç *CES1* gen polimorfizminin capecitabine' e bağlı ilaç toksisitesi ile ilişkileri saptanamamıştır.

Çalışma hem *CES1*' de görülen bu üç polimorfizmin sıklıklarını araştıran hem de bunların metastatik meme kanserinde capecitabine toksisitesi ile ilişkilerini saptayan ilk çalışma olmasından dolayı özgündür.

# FREQUENCIES OF *CES1* GENE POLYMORPHISMS IN PATIENTS WITH METASTATIC BREAST CANCER AND EVALUATION OF DRUG RESPONSE EFFECTS IN CAPECITABINE USERS AS RETROSPECTIVELY

## 6.2. ABSTRACT

Breast cancer is a frequently observed multifactorial disorder with the highest rate of mortality between women all over the world. Reproductive effects, hormonal effects, genetic effects and socio-economic situations are considered as factors that can cause breast cancer.

The last stage of the breast cancer which is classified according to the stage of the existing tumor is metastasis. Lymph nodes, lungs, brain and bones are the most vulnerable regions to breast cancer metastasis.

Medication takes an important part in treatment of metastatic breast cancer. Among these drugs, capecitabine is the most preferable drug due to its FDA approval and economic price. Capecitabine is absorbed in the intestines after converted to its active 5- fluorouracil compound by passing through several metabolic steps and exhibits cytotoxic effects in tumor cells. In one of the enzymes that is responsible for its metabolism is *CES1*, a carboxyesterase.

It is considered that genetic alterations in the *CES1* gene may cause different drug responses and toxic effects. For this reason, the aim of our study was first to analyse the frequencies of the *CES1* I49V, N75S ve H199R gene polymorphisms that are located in exonic regions and trigger amino acid changes in the Turkish population and later the relation between these

polymorphisms and the presence toxic side effects of capecitabine in cases with metastatic breast cancer.

For *CES1* I49V gene polymorphism, eight cases (13.3 %) had a wild type (I/I) and 52 cases (86.7 %) had a heterozygous(I/V) genotype from a total of sixty control group cases. From twenty cases in study group five cases (25 %) had a wild type and 15 (75 %) had a heterozygous genotype. For *CES1* N75S gene polymorphism, forty-one cases (68.3 %) were found to carry a wild type (N/N), 16 cases (26.7 %) a heterozygous (N/S) and 3 cases (5 %) a homozygous genotype in control group. Whereas, in study group, 10 cases (50 %) were found to carry a wildtype (N/N), 9 cases (45 %) a heterozygous (N/S) and 1 case (5 %) a homozygous (S/S) genotype. All study and control groups cases (100 %) were found to carry the wild type (H/H) genotype for *CES1* H199R gene polymorphism. When we compare the study and control group, an increase of heterozygous cases was observed in the study group, but with no statistically significant difference. And also, no association was found between capecitabine-related drug toxicity and three *CES1* gene polymorphisms that was investigated.

This study is original, since it is the first one to investigate the frequencies of three *CES1* gene polymorphisms and their association with metastatic breast cancer and capecitabine toxicity.

## BÖLÜM VII

### 7.1 YARARLANILAN KAYNAKLAR

- 1- A. Şükrü AYNACIOĞLU (2001). Psikiyatrik Hastalıkların İlaçlarla Tedavisinde Farmakogenetiğin Önemi. Klinik Psikiyatri;4:249-252
- 2- American Cancer Society (1999) Cancer facts and figures 1999. Atlanta Ga., American Cancer Society
- 3- Bencharit, S., Morton, C. L., Yu, X., Potter, P. M., Redinbo, M. R. (2003). Structural basis of heroin and cocaine metabolism by a promiscuous human drug-processing enzyme. Nat. Struct. Biol. 10, 349-356.
- 4- Bentley R, Kavanagh AM, Subramanian SV, Turrell G. (2008). Area disadvantage, individual socio-economic position, and premature cancer mortality in Australia 1998 to 2000: a multilevel analysis. Cancer Causes Control 19:183–193
- 5- Blum JL, Dieras V, Lo Russo PM, Horton J, Rutman O, Buzdar A, et al. (2001). Multicenter phase II study of capecitabine in taxane-pretreated metastatic breast carcinoma patients. Cancer 2001; 92:1759–1768.
- 6- Blum JL, Jones S, Buzdar AU, LoRusso PM, Kuter I, Vogel C, et al. (1999). Multicenter phase II study of capecitabine in paclitaxel-refractory metastatic breast cancer. J Clin Oncol 17:485–493.
- 7- Blum JL. (1999). Xeloda in the treatment of metastatic breast cancer. Oncology. Jul;57 Suppl 1:16-20

- 8- C A Papadopoulos, H Wilson (2008). Capecitabine-associated coronary vasospasm: a case report. *Emerg Med J* May 2008 Vol 25 No 5
- 9- Chasseaud LF.(1979). The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv Cancer Res* 29: 175-274.
- 10- Christopher D. Fleming, Sompop Bencharit, Carol C. Edwards, Janice L. Hyatt, Lyudmila Tsurkan, Feng Bai, Charles Fraga, Christopher L. Morton<sup>4</sup>, Escher L. Howard-Williams, Philip M. Potter, Matthew R. Redinbo. (2005) Structural Insights into Drug Processing by Human Carboxylesterase 1: Tamoxifen, Mevastatin and Inhibition by Benzil. *J. Mol. Biol.* 352, 165–177
- 11- Collaborative Group on hormonal factors in breast cancer.(1996) Breast cancer and hormonal contraceptives, Collaborative reanalysis of individual data on 53.297 woman with breast cancer and 100.239 women without breast cancer-from 54 epidemiological studies. *Lancet* 47:1713-27.
- 12- David J. Burkhart, Benjamin L. Barthel, Glen C. Post, Brian T. Kalet, Jordan W. Nafie, Richard K. Shoemaker, Tad H. Koch. (2006) Design, Synthesis, and Preliminary Evaluation of Doxazolidine Carbamates as Prodrugs Activated by Carboxylesterases. *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 49, No. 24
- 13- De Lima FE, Do Rosário Dias de Oliveira Latorre M, De Carvalho Costa MJ, Fisberg RM (2008). Diet and cancer in Northeast Brazil: evaluation of eating habits and food group consumption in relation to

breast cancer. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 24(4):820-828, abr.

- 14- Değerli Ü. (1998) Meme Kanseri. Değerli Ü. (eds). Genel Cerrahi.İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri. 288-96.
- 15- Di Costanzo F, Sobrero A, Twelves C et al. (2006) Italian economic evaluation of capecitabine vs. bolus 5-FU/LV as adjuvant chemotherapy for patients with Dukes' C colon cancer. Ann Oncol 2006; 17 (suppl 6): 63
- 16- Doç. Dr. Gökñur Aktay. (2003) Farmakoantropoloji: Polimorfizm ve Bireysel İlaç Tedavisi. STED Cilt 12 Sayı 12 462
- 17- Doç. Dr. Lut Tamam (2005) Bipolar Bozukluğun Farmakogenetiği. 1. Ulusal Psikofarmakoloji Kongresi Kitapçığı, İstanbul
- 18- Dr. Pınar Saip. (2004) Farmakogenetik. Tıbbi Onkoloji Derneği İlaç Etkileşimleri Kursu, Pamukkale.
- 19- Eiichi Geshi, Tomomi Kimura, Mika Yoshimura, Hiroshi Suzuki, Shinji Koba, Tetsuo Sakai, Tsukasa Saito, Atsuro Koga, Masaaki Muramatsu, Takashi Katagiri (2005). A Single Nucleotide Polymorphism in the Carboxylesterase Gene Is Associated with the Responsiveness to Imidapril Medication and the Promoter Activity. Hypertens Res Vol. 28, No. 9
- 20- Filiz Emir, Ali Özden (2005) Genetik Polimorfizm ve Polimorfizm Çalışmaları. Güncel Gastroenteroloji 10/1 24-28
- 21- Fumoleau P, Largillier R, Clippe C, Die` ras V, Orfeuvre H, Lesimple T, et al. (2004) Multicentre phase II study evaluating capecitabine

- monotherapy in patients with anthracycline and taxane pretreated metastatic breast cancer. *Eur J Cancer* 40:536–542
- 22-** Genetik, William S. Klug, Michael R. Cummings, Çev. Prof. Dr. Cihan Öner (2003). 646-647, Palme Yayıncılık Ankara
- 23-** Geyer CE, Forster J, Lindquist D et al (2006) Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 355:2733–2743
- 24-** Haagensen CD. (1986) *Diseases of Breast*. 3rd edition. Philadelphia: WB Saunders.
- 25-** Hamilton A, Hortobagyi G (2005) Chemotherapy: what progress in the last 5 years? *J Clin Oncol* 23:1760–1775
- 26-** Hao-Jie Zhu, Kennerly S. Patrick, Hong-Jie Yuan, Jun-Sheng Wang, Jennifer L. Donovan, C. Lindsay DeVane, Robert Malcolm, Julie A. Johnson, Geri L. Youngblood, Douglas H. Sweet, Taimour Y. Langae and John S. Markowitz. (2008) Two CES1 Gene Mutations Lead to Dysfunctional Carboxylesterase 1 Activity in Man: Clinical Significance and Molecular Basis. *The American Journal of Human Genetics* May
- 27-** Heymann E. (1980) Carboxylesterases and amidases. In *Enzymatic Basis of Detoxication* New York: Academic Press, Volume II:291-323
- 28-** Hong-Guang Xie, R., Kim Alastair, B., Wood, JJ., Michael Stain, C. (2001). Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; 41:815-850.
- 29-** Hoover R, Gray IA, Cole P et al. (1976) Menapousal estrogens and breast cancer. *N Engl J Med*;295:401-406.
- 30-** <http://pharm.ege.edu.tr/pp/metinertosun/biyotransformasyon.pdf>

- 31-** [http://www.alanyadevlethastanesi.gov.tr/kutuphane/MemeKanseriHak\\_kinda.pdf](http://www.alanyadevlethastanesi.gov.tr/kutuphane/MemeKanseriHak_kinda.pdf)
- 32-** <http://www.herbalistatabay.com/memekanser.html>
- 33-** [http://www.internetdoktoru.com/Hst\\_Meme\\_Kanseri.htm](http://www.internetdoktoru.com/Hst_Meme_Kanseri.htm)
- 34-** <http://www.onkolojik.info/kanser/meme-kanseri>
- 35-** <http://www.pharmgkb.org/do/serve?objId=PA154424674&objCls=Pathway>
- 36-** <http://www.pharmgkb.org/search/pathway/irinotecan/liver.jsp>
- 37-** <http://www.tansan.com.tr/cgibin/cancer.asp?act=show&BulletinID=6>
- 38-** Hussein F, Douillard J-Y, Ychou M et al. (2006). Capecitabine vs. Mayo Clinic and de Gramont 5-FU/LV regimens for stage III colon cancer: cost-effectiveness analysis in the French setting. *Ann Oncol*; 17 (suppl 6): 64
- 39-** Hyatt JL, Moak T, Hatfield MJ, Tsurkan L, Edwards CC, Wierdl M, Danks MK, Wadkins RM, Potter PM. (2007). Selective inhibition of carboxylesterases by isatins, indole-2,3-diones. *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 50, No. 8
- 40-** J. Breeze, F. Mc Kinna, D. C. Howlett. (2008) Rising Carcinoembryonic Antigen during Follow-up for Colonic Carcinoma and an Unusual Presentation of Medullary Carcinoma of the Thyroid. *Clinical Oncology* p382 February
- 41-** Jinsheng Yu, William D. Shannon, Mark A. Watson, Howard L. McLeod. (2005) Gene Expression Profiling of the Irinotecan Pathway in Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research* Vol. 11, 2053–2062, March 1

- 42-** Kamendulis LM, Brzezinski MR, Pindel EV, Bosron WF, Dean RA. (1996). Metabolism of cocaine and heroin is catalyzed by the same human liver carboxylesterases. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* Nov;279(2):713-7.
- 43-** Kayhan Ö, Özkan N, Malazgirt Z. (1996) Genel Cerrahi. Ankara, Hacettepe-Taş Kitapçılık
- 44-** Kote-Jarai Zstotia, Easton Douglas, Edwards Steven M., Jefferies Sarah, Durocher Francine, Jackson Ruchel A., Singh Rashmi, Ardern-Jones Audrey, Murkin Annette, Dearnaley David P., Shearer Robert, Kirby Roger, Houlston Richard, Eeles Ros . (2001). Relationship between glutathione S-transferase M1, P1 and T1 polymorphisms and early onset prostate cancer. *Pharmacogenetics*, vol. 11, no4, pp. 325-330
- 45-** Landers P, Tkacheva-Jameson O, Anderson S, Tolma E, Skaggs V. (2008).An update on breast cancer in Oklahoma and the dietary changes women make after diagnosis. *J Okla State Med Assoc*. 2008 Jan;101(1):15-9.
- 46-** M. Findlay, G. von Minckwitz, A. Wardley. (2008) Effective oral chemotherapy for breast cancer: pillars of strength. *Annals of Oncology* 19: 212–222,
- 47-** Mac Mahon B, Cole P, Lin T. (1970) Age of first birth and breast cancer risk. *Bull WHO*; 43:209-21.
- 48-** Mac Mahon B, Trichopoulos D,Brown J et al.(1982). Age at menarche,probability of ovulation and breast cancer. *Int J Cancer*;29: 13-20.

- 49-** Masakiyo Hosokawa, Tomomi Furihata, Yumiko Yaginuma, Naoko Yamamoto, Nao Koyano, Ayako Fujii, Yuko Nagahara, Testuo Satoh, Kan Chiba. (2007) Genomic Structure and Transcriptional Regulation of the Rat, Mouse, and Human Carboxylesterase Genes, *Drug Metabolism Reviews*, 39: 1–15, 2007
- 50-** Masuhiro Nishimura, Teruko Imai, Yujiro Morioka, Shunji Kuribayashi, Tetsuya Kamataki, Shinsaku Naito (2004). Effects of NO-1886 (Ibrolipim), a lipoprotein lipase-promoting agent, on gene induction of cytochrome P450s, carboxylesterases, and sulfotransferases in primary cultures of human hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet.* Dec;19(6):422-9
- 51-** Muhammad Wasif Saif, Nikos A. Katirtzoglou, Kostas N. Syrigos. (2008). Capecitabine: an overview of the side effects and their management. *Anti-Cancer Drugs*, Vol 19 No 5
- 52-** NCCN (2008) Breast cancer; clinical practice guidelines in oncology - v.2. [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/PDF/breast.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/breast.pdf). Accessed 11 Feb 2008
- 53-** Olesen PT, Olsen A, Frandsen H, Frederiksen K, Overvad K, Tjønneland A. (2008). Acrylamide exposure and incidence of breast cancer among postmenopausal women in the Danish Diet, Cancer and Health study. *Int. J. Cancer*: 122, 2094–2100 (2008)
- 54-** Özışık Y. Baltalı E. (2004) Meme kanseri. Yasavul Ü (eds). Hacettepe İç Hastalıkları Kitabı. Ankara, Semih Ofset;. 1426-435.

- 55-** Pabst MJ, Habig WH, Jakoby WB. (1973). Mercapturic acid formation: the several glutathione transferases of rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*;52(4): 1123-8.
- 56-** Perez Edith A. (2008) Impact, mechanisms, and novel chemotherapy strategies for overcoming resistance to anthracyclines and taxanes in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 10549-008-0005-6 April
- 57-** Pike M, Bernstein L, Spicer D. (1993). Exogenous hormones and breast cancer risk. Neiderhuber J.(eds). *Current Therapy in Oncology*.St.Louis: Decker.
- 58-** Pinkus LM, Ketley JN, Jakoby WB. (1977). The glutathione S-transferases as a possible detoxification system of rat intestinal epithelium. *Biochem Pharmacol*;26(24): 2359-63.
- 59-** Prof. Dr. Semra Şardaş. (2006) Türkiye’de ilaç güvenliliği ile ilgili gelişmeler. *Toksikoloji Bülteni Sayı: 25* 6-8
- 60-** Redinbo MR, Bencharit S, Potter PM. (2003) Human carboxylesterase 1: from drug metabolism to drug discovery. *Biochemical Society Transactions Volume 31, part 3* 620- 624
- 61-** Reichardt P, Von Minckwitz G, Thus-Patience PC, Jonat W, Kölbl H, Janicke F, et al. (2003). Multicenter phase II study of oral capecitabine (Xeloda) in patients with metastatic breast cancer relapsing after treatment with a taxane-containing therapy. *Ann Oncol* 2003; 14:1227–1233.
- 62-** Ron H. J. Mathijssen, Sharon Marsh, Mats O. Karlsson, Rujia Xie, Sharyn D. Baker, Jaap Verweij, Alex Sparreboom, Howard L. McLeod.

- (2003). Irinotecan Pathway Genotype Analysis to Predict Pharmacokinetics. *Clinical Cancer Research*, August 15 Vol. 9, 3246–3253
- 63-** Sayek İ. (1996) Meme Hastalıkları. Temel Cerrahi. 1. Cilt. Ankara, Güneş Kitabevi. 864-72.
- 64-** Schulz M, Hoffmann K, Weikert C, Nöthlings U, Schulze MB, Boeing H.(2008) Identification of a dietary pattern characterized by high-fat food choices associated with increased risk of breast cancer: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study.*British Journal of Nutrition* 2008
- 65-** Scmizu Y, Kato H, Schull WJ. (1990) Study on mortality of A bomb survivors. *Radit Res*: 121-141
- 66-** Sharon Marsh, Ming Xiao, Jinsheng Yu, Ranjeet Ahluwalia, Matthew Minton, Robert R. Freimuth, Pui-Yan Kwok, Howard L. McLeod. (2004) Pharmacogenomic assessment of carboxylesterases 1 and 2. *Genomics* 84 661–668
- 67-** Sherry S.T. et al.(2001) dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.*;29, 308-311.
- 68-** Stoneking M. (2001). Single Nucleotide Polymorphisms. From the Evolutionary Past, *Nature*,; 15: 821-822.
- 69-** Tabata, T., Katoh, M., Tokudome, S., Nakajima, M., Yokoi, T. (2004). Identification of the cytosolic carboxylesterase catalyzing the 5'-deoxy-5-fluorocytidine formation from capecitabine in human liver. *Drug Metab. Dispos.* 32:1103–1110.

- 70-** Talbot DC, Moiseyenko V, Van Belle S, O'Reilly SM, Alba Conejo E, Ackland S, et al. (2002) Randomized phase II trial comparing oral capecitabine (Xeloda) with paclitaxel in patients with metastatic/advanced breast cancer pretreated with anthracyclines. *Br J Cancer* 2002; 86:1367–1372
- 71-** Tang M, Mukundan M, Yang J, Charpentier N, LeCluyse EL, Black C, Yang D, Shi D, Yan B.(2006), Antiplatelet agents aspirin and clopidogrel are hydrolyzed by distinct carboxylesterases, and clopidogrel is transesterificated in the presence of ethyl alcohol., *J Pharmacol Exp Ther.* Dec;319(3):1467-76.
- 72-** Tannock IF, Hill RP. (1992). *The Basic Science of Oncology*. 2nd edition. New York: McGraw-Hill.
- 73-** TS Jones, W Yang, WE Evans, MV Relling. (2007) Using HapMap Tools in Pharmacogenomic Discovery: The Thiopurine Methyltransferase Polymorphism. *Nature Publishing Group Clinical Pharmacology & Therapeutics* Volume 81 Number 5 May
- 74-** Wist EA, Sommer HH, Ostenstad B, Risberg T, Bremnes Y, Mjaaland (2004) .Oral capecitabine in anthracycline- and taxane-pretreated advanced/metastatic breast cancer.*Acta Oncol.* 2004;43(2):186-9.
- 75-** Wittekind, Ch; Sobin, L. H. (2002). *TNM classification of malignant tumours*. New York, Wiley-Liss.
- 76-** [www.ctf.edu.tr/farma/farmakogenetik.pdf](http://www.ctf.edu.tr/farma/farmakogenetik.pdf)
- 77-** [www.who.int](http://www.who.int)

**78-** Zejin Sun, Daryl J. Murry, Sonal P. Sanghani, Wilhelmina I. Davis, Natalia Y. Kedishvili, Qin Zou, Thomas D. Hurley, and William F. Bosron. (2004) Methylphenidate Is Stereoselectively Hydrolyzed by Human Carboxylesterase CES1A1. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* Vol. 310, No. 2 469-476

## 7.2 KISALTMALAR

5-FU: 5-fluorourasil

ACS: Amerikan Kanser Örgütü

A: Adenin

ACE: Angiotensinogen converting enzyme

ADH: Alkol dehidrogenaz

ADP: Adenozin difosfat

ALDH: Aldehit dehidrogenaz

ATP: Adenozin trifosfat

BRCA 1: Breast cancer 1, early onset

BRCA 2: Breast cancer 2, early onset

BT: Bilgisayarlı tomografi

C: Sitozin

CES1: Karboksilesteraz 1

CES2: Karboksilesteraz 2

CYP450: Sitokrom P450

CYP2C9: Sitokrom P450 2C9

CYP2C19: Sitokrom P450 2C19

CYP2D6: Sitokrom P450 2D6

CYP3A4: Sitokrom P450 3A4

DCIS: Ductal karsinoma *in situ*

DNA: Deoksiribonükleik asit

dsDNA: Çift iplikli DNA

EDTA: Etilen Diamin Tetraasetik Asit

G: Guanin

GSH: Glutatyon

GST: Glutatyon S-transferaz

H: Histidin

I: İzolosin

Ile: İzolösün

kb : Kilobaz

LCIS: Lobuler karsinoma *in situ*

Mb: Megabaz

MMK: Metastatik meme kanseri

MRI: manyetik rezonans görüntüleme

N: Asparagin

NAT2: N-asetiltransferaz 2

R: Arjinin

RFLP: Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi

S: Serin

SNP: (Single Nucleotide Polymorphism) Tek nükleotid Polimorfizmi

T: Timin

Tm: Erime Sıcaklığı

TNM: Tümör, nod, metastaz

TPMT: Tiyopürin S-metiltransferaz

UGT: Uridin difosfat glukuronosiltransferaz

V: Valin

WHO: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)

### **7.3. ÖZGEÇMİŞ**

11.01.1983 tarihinde Ankara' da doğdum. 2001- 2005 yılları arası Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü' nde lisans eğitimimi aldım. 2005 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' nda yüksek lisans eğitimime başladım. 07.07.2006 tarihi itibariyle aynı bölümde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.