



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

EPİLEPSİLİ HASTALARDA LAMOTRİJİN TEDAVİSİ

İLE

GENETİK POLİMORFİZM İLİŞKİSİ

Dr. MEDİNE GÜLÇEBİ İDRİZ OĞLU

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2010



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

EPİLEPSİLİ HASTALARDA LAMOTRİJİN TEDAVİSİ

İLE

GENETİK POLİMORFİZM İLİŞKİSİ

Dr. MEDİNE GÜLÇEBİ İDRİZ OĞLU

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. FİLİZ YILMAZ ONAT

İSTANBUL 2010

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca yanında çalışmaktan onur duyduğum, her konuda göstermiş olduğu katkı ve hoşgörülü yaklaşımından dolayı çok değerli hocam

Prof. Dr. Kemal Berkman'a,

Çalışmalarımı yüksek öngörülerıyla şekillendiren, bilimsel yaklaşımları ile daima yol gösteren ve her zaman yanımda olduğunu hissettiğim çok değerli danışman hocam

Prof. Dr. Filiz Yılmaz Onat'a,

Benden yardımlarını, desteğini, sabrını ve bilgisini esirgemeyerek tezimin hazırlanmasında büyük desteği olan çok değerli hocam

Prof. Dr. M. Zafer Gören'e,

Engin klinik bilgisinden her zaman yararlandığım ve tezimin hazırlanmasında da yardımlarını gördüğüm çok değerli hocam *Prof. Dr. Çiğdem Özkara'ya,*

Birlikte çalışma fırsatı yakalayabildiğim ve tanıma şansı bulabildiğim çok değerli hocam *Prof. Dr. R.W. Guillery'e,*

Farmakoloji eğitimim boyunca her türlü konuda görüşlerini aldığım, her zaman danışabildiğim ve desteklerini hissettiğim değerli hocalarım *Doç. Dr. Rezzan Gülhan'a, Doç. Dr. Ahmet Akıcı'ya, Doç. Dr. Atilla Karaalp'e ve Doç. Dr. Hasan Raci Yananlı'ya,*

Tezimin hazırlanmasında başından sonuna kadar bana destek olan ve tamamlanmasında büyük emeği olan sevgili *Uzm. Dr. Aydan Özkaynakçı'ya ve Uzm. Dr. Esra Küçükibrahimoğlu'ya,*

Birlikte olmaktan her zaman mutluluk duyduğum sevgili çalışma arkadaşlarım *Ece İskender, Sema Ketenci, Kutluhan Tezcan, Eren Sakallı, Özlem Akman, Nihan Çarçak, Melike Şahiner, Ayten Kurban, Volkan Aydın, Dilek Demircan, Ayfer Bahar, Emine Özdamar, Tuğba Eryiğit, Efsane Azhari, Melike Javarova, Şule Giray, Nurettin Demirci'ye,*

Çalışmamızı destekleyen *Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na* ve ayrıca hizmet alımı yaptığımız *Bio Globe Genar Institue'ye,*

Ve bugüne kadar benim için göstermiş oldukları özveri, hoşgörü ve desteklerinden ötürü sevgili *Annem, Babam, Kardeşim ve Eşime*

teşekkür ederim.

Ocak 2010

Dr. Medine Gülcebi İdriz Oğlu

ÖZET

Epilepsi tedavisinde yaygın bir kullanıma sahip olan lamotrijin UDP-glükuronil transferaz (UGT) enzimleri tarafından metabolize edilmektedir.

Çalışmamızda Türk toplumundaki epilepsili hastaların yer aldığı lamotrijin kullanmakta olan 131 kişiden oluşan grupta, UGT 1A4 enziminin L48V ve P24T tek nükleotid polimorfizmleri araştırılmıştır. Polimorfik enzimlerin aktivitesi plazma lamotrijin düzeyleri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Plazma lamotrijin düzeyleri ‘Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)’ ile ölçülmüş, UGT1A4 enziminin P24T ve L48V polimorfizmleri ise ‘Matriks Destekli Lazer Dezorpsiyon İyonizasyonu Kütle Spektrometresi’ (MALDI-TOF) ile analiz edilmiştir.

UGT1A4*3 aleli hastalarımızın % 22,4’ünde heterozigot olarak, % 1,5’inde homozigot olarak saptanırken, UGT1A4*2 aleli yalnızca heterozigot olarak % 3,8 oranında tespit edilmiştir. UGT1A4 enziminin L48V polimorfizminin plazma lamotrijin konsantrasyonu üzerinde azaltıcı bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Sigara içme alışkanlığı olmayan monoterapi hastalarında, plazma lamotrijin düzeylerinin, L48V polimorfizmine bağlı olarak % 50 daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca sigara içmeyen heterozigot ya da sigara içen heterozigot monoterapi grubu ile sigara içmeyen yabanıl tiplerin plazma lamotrijin düzeylerinin karşılaştırması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlara ek olarak doz-konsantrasyon arasındaki ilişkinin doğrusallığı genotipleme çalışmalarından sonra farklılık göstermiştir.

Heterozigot L48V polimorfizminin Türk toplumunda % 22,4 gibi azımsanmayacak bir oranda tespit edilmesi, lamotrijin kullanımı öncesinde L48V polimorfizmi saptanan hastalarda doz ayarlaması yapılırken dikkatli olunması gerektiğini ve istenilen etkinin görülmediği durumlarda L48V polimorfizmi kontrolünün önem taşıdığını vurgulamaktadır.

Anahtar sözcükler: genetik polimorfizm, metabolizma, epilepsi, lamotrijin, alel

ABSTRACT

Lamotrigine, an anticonvulsant, that has a widespread use in epilepsy treatment as an anticonvulsant, is metabolized by UDP-glucuronosyl transferase (UGT) enzymes present in hepatic microsomal fractions.

In our study, the single nucleotide polymorphisms, L48V and P24T, of the UGT1A4 enzyme have been investigated in a Turkish population of epilepsy patients. The total number of patients was 131. Activation of the polymorphic enzymes was evaluated by comparing the plasma lamotrigine levels of wild-type and polymorphic subjects.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used for measuring lamotrigine levels. The P24T and L48V polymorphisms of UGT1A4 enzyme were analyzed with a Matrix Assisted Laser Desorption-Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry method.

The frequency of the heterozygous UGT1A4*3 allele was 22.4 % whereas it was only 1.5 % for the homozygous patients. For the UGT1A4*2 allele, 3.8 percent of the patients were heterozygous while there were not any homozygous patients for the P24T polymorphism.

The L48V polymorphic UGT1A4 enzyme was found to decrease the plasma concentration of the lamotrigine. The lamotrigine levels of non-smoking monotherapy patients were 50 percent lower for the L48V polymorphism than for normal subjects. Also plasma lamotrigine levels were significantly lower for non-smoking or smoking polymorphic alleles than for normal. Additionally the dose-plasma concentration relationship of lamotrigine was more linear for the normal subjects.

The high frequency, 22.4 %, of the heterozygous L48V polymorphism detected in the Turkish population indicates that lamotrigine dose adjustments in patients with the L48V polymorphism should be carefully recorded and the L48V polymorphism can be checked, particularly when the drug is ineffective.

Key words: genetic polymorphism, metabolism, epilepsy, lamotrigine, allele

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfalar</u>
Önsöz.....	i
Özet.....	ii
İngilizce Özet (Abstract).....	iii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	vi
1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	4
2.1. Epilepsi.....	4
2.1.1. Tanımı ve epidemiyolojisi.....	4
2.1.2. Prognoz ve mortalite.....	5
2.1.3. Patofizyolojisi.....	5
2.1.4. Epilepsi ve epilepsi nöbetlerinin sınıflandırılması	6
2.1.5. Etiyolojisi	9
2.1.6. Epilepsi Tedavisi.....	11
2.2. Farmakogenetik – Genetik Polimorfizm Kavramları ve Epilepsi Tedavisinin Farmakogenetik Çalışmalardaki Yeri.....	14
2.3. İlaçların Metabolizması.....	21
2.3.1. Faz I reaksiyonları.....	22
2.3.1.1. Oksidasyon.....	22
2.3.1.2. Redüksiyon (indirgenme).....	23
2.3.1.3. Kopma (hidroliz).....	24
2.3.2. Faz II reaksiyonları.....	24
2.3.2.1. Konjugasyon.....	24
2.3.2.1.1. Glükuronik asit ile konjugasyon.....	25
2.3.3. UDP-glükuronozil transferaz enzimlerinin farmakogenetikteki rolü.....	26
2.3.3.1. UGT1A1 enzimi.....	29
2.3.3.2. UGT1A3 enzimi.....	30
2.3.3.3. UGT1A4 enzimi.....	30
2.3.3.4. UGT1A6 enzimi.....	32
2.3.3.5. UGT1A7 enzimi.....	32
2.3.3.6. UGT1A8 enzimi.....	33
2.3.3.7. UGT1A9 enzimi.....	33
2.3.3.8. UGT1A10 enzimi.....	33
2.3.3.9. UGT2A ailesi enzimleri.....	34
2.4. Lamotrijin.....	36
2.4.1. Lamotrijinin etki mekanizması.....	37
2.4.2. Lamotrijinin farmakokinetik özellikleri.....	37
2.4.2.1. Emilim ve dağılımı.....	38
2.4.2.2. Metabolizma ve eliminasyonu.....	39
2.4.3. İlaç etkileşimleri.....	40
2.4.3.1. Farmakokinetik etkileşimler.....	40
2.4.3.2. Farmakodinamik etkileşimler.....	41
2.4.4. İstenmeyen etkileri.....	41
3. Gereç ve Yöntem.....	44
3.1. Yöntem.....	44

3.1.1. Çalışma Grubunun Özellikleri.....	44
3.1.2. Fenotipleme.....	46
3.1.2.1. Plazma Lamotrijin Düzeyinin Yüksek Performans (Basınçlı) Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analizi.....	46
3.1.3. Genotipleme.....	49
3.1.3.1. DNA izolasyonu.....	49
3.1.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	50
3.1.3.3. MALDI-TOF kütle spektrofotometresi ile analiz.....	54
3.1.3.4. Sonuçların değerlendirilmesi.....	55
3.1.4. İstatistiksel analiz.....	55
3.2. Gereçler.....	56
3.2.1. Kimyasal maddeler.....	56
3.2.2. Çözeltiler.....	56
3.2.3. Araçlar.....	56
4. Bulgular.....	58
4.1. Fenotipleme Sonuçları.....	58
4.1.1. Tek başına lamotrijin kullanan hastalar (Monoterapi).....	58
4.1.2. Lamotrijin ile birlikte valproik asit kullanan hastalar (Politerapi).....	60
4.1.3. Lamotrijin ile birlikte diğer antiepileptik ilaçları kullanan hastalar (Politerapi).....	61
4.1.4. Lamotrijin ile birlikte valproik asit ve diğer antiepileptik ilaçları kullanan hastalar (Politerapi).....	63
4.2. Genotipleme Sonuçları.....	64
4.2.1. Tek başına lamotrijin kullanan hastalar (Monoterapi).....	67
4.2.2. Lamotrijin ile birlikte valproik asit kullanan hastalar (Politerapi).....	70
4.2.3. Lamotrijin ile birlikte diğer antiepileptik ilaçları kullanan hastalar (Politerapi).....	71
4.2.4. Lamotrijin ile birlikte valproik asit ve diğer antiepileptik ilaçları kullanan hastalar (Politerapi).....	72
5. Tartışma ve Sonuçlar.....	73
5.1. Genotipleme sonuçları ve polimorfik enzimlerin aktivitesi.....	73
5.2. Fenotipleme sonuçları.....	78
6. Kaynaklar.....	83
7. Ekler.....	98
Ek 1. Gönüllülerin bilgilendirilmiş olur formu.....	98
Ek 2. Hasta takip formu.....	99
Ek 3. Etik kurul onay formu.....	100

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALT	: Alanin amino transferaz
AST	: Aspartat amino transferaz
AUC	: Eğri altında kalan alan (Area under the curve)
Cmaks	: Maksimum plazma konsantrasyonu
CYP	: Sitokrom P450
DAE	: Diğer antiepileptikler
DAO	: Diamin oksidaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleotid trifosfat
EEG	: Elektroensefalografi
FMO	: Flavın içelikli monooksijenaz
GABA	: γ -Aminobütirik asit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
ILAE	: Uluslararası Epilepsi Derneği (International League Against Epilepsy)
LTG	: Lamotrijin
MALDI-TOF	: Matriks destekli lazer dezorpsiyon iyonizasyonu (Matrix assisted laser desorption-Time of flight)
MAO	: Monoamin oksidaz
PCR	: Poimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction)
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)
UDP	: Üridin difosfat
UGT	: Üridin difosfoglükuronozil transferaz
VALP	: Valproik aist
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organizatio

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Epilepsi, geniş bir yaş aralığı içerisinde görülebilen, çeşitli nöbet tipleri ile seyreden ve nöbetleri kontrol altına alınamayan vakalarda öğrenme bozukluklarına, nörolojik defisitlere, çeşitli fizyolojik ve psikiyatrik problemlere ve hatta mortaliteye de neden olabilen kronik nörolojik bir bozukluktur. Nöbetlerin kontrolü, yaşam kalitesinin yükseltilmesi (Birbeck ve diğ., 2002) ve özellikle konvülsif ataklarla seyreden, sürekli olarak devam eden nöbetlerle ilişkili olan morbidite ve prematür mortalitesini azaltmak için gereklidir (Sander, 2004a). Farmakolojik ve bazı durumlarda da ilaç dışı tedavilerin uygulanması ile nöbetlerin kontrolü sağlanabilmektedir. Kullanılmakta olan antiepileptik ilaçların nöbetlerin kontrolü üzerindeki etkisi % 60-70 oranındadır (Duncan ve diğ., 2006). Oldukça geniş bir etki yelpazesine sahip olan antiepileptik ilaçların uygun endikasyonda ve uygun dozda kullanılması ile nöbetlerin kontrol altında tutulması hastaların çoğunda mümkün olabilmektedir (Perucca, 2002). Ancak bazı antiepileptik ilaçların terapötik dozlarının bireyden bireye farklılık göstermesi ve terapötik aralıklarının dar olması yani nöbetleri kontrol altına alan dozlarının, toksik sınırlara yakın olması gibi nedenlerden dolayı klinikte kullanımı doz optimizasyonunda problem yaratabilmektedir (Perucca, 1996a; 1996b; 2002).

İlaça karşı gelişen yanıtta bireysel farklılıklar, hem genetik hem de çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimleri sonucunda oluşmaktadır (Ferraro ve Buono, 2005). Bu durum, istenmeyen ilaç reaksiyonlarının, ilaç toksisitelerinin ya da ilacın terapötik yetersizliğinin meydana gelmesine neden olabilmektedir. Bireysel değişkenliğin nedenleri arasında ilaç-ilaç etkileşimleri, vücut ağırlığı, başka hastalığın eşlik etmesi, yaş, karaciğer ve böbrek fonksiyon bozuklukları, genetik faktörler gibi bir çok neden sayılabilirse de bunlardan en önemlisi genetik faktörlerdir (Meyer, 2000). İlaçların plazma konsantrasyonundaki farklılıklarla sonuçlanan, ilaç metabolizmasında rol alan enzimlerdeki genetik değişiklikler, özellikle doz ayarlamaları ile doğrudan ilişkilidir. Böylece ilaç metabolizmasında rol alan enzimlerin genotiplemesi pratik olarak klinik uygulamalara katılmaya en yakın durmaktadır.

Genetik polimorfizm; bir popülasyonda farklı alellere bağılı olarak iki veya daha çok alternatif fenotipin görölmesidir ve bir toplumda genetik polimorfizmden bahsedebilmek için mutant veya varyant genlerin normal popülasyonda % 1'den daha fazla sıklıkta bulunmaları gerekmektedir. Genetik polimorfizm bize toplumun küçük bir kesiminin ilaç etkisizliğı ya da toksisitesi açısından neden daha yüksek risk taşıyabildiğini açıklamaktadır (Meyer, 2000; Ingelman ve Sundberg, 2004).

Epilepsi tedavisi, epilepsi hastalığının yüksek bir prevalansa sahip olması, antiepileptik ilaçlara karşı verilen yanıtlarda farklılıkların olması, yan etki profilinin ve nöbetlerin sınıflandırılabilir olması gibi nedenlerden ötürü, farmakogenetik uygulamalar için uygun bir model oluşturmaktadır (Cassandra ve diğ., 2006). Epilepsi tedavisinde farmakogenetik yaklaşımın geliştirilmesi aynı zamanda tedavi maliyetlerinin düşürölmesi ve en uygun tedaviye ulaşılması için geçen sürenin azaltılması, nöbetlere bağılı gelişebilecek morbidite oranının ve istenmeyen etkilerin (Schlienger ve diğ., 1998), tedavide yapılan ilaç değışikliklerinin ve polifarmasinin (Kwan ve Brodie, 2000) engellenebilmesi gibi çok önemli avantajlar sağlayacaktır.

Epilepsi tedavisinde antikonvülsan olarak yaygın bir kullanıma sahip olan lamotrijin, yeni jenerasyon epilepsi ilaçlarından biri olup, yetişkin ve 12 yaşından büyük olan epilepsili çocukların hem monoterapi, hem de ek tedavilerinde yerini almıştır. Lamotrijin karaciğerde glükuronidasyon ile metabolize edilmektedir. Glükuronidasyon, biyotransformasyonun faz II reaksiyonu olan konjugasyon olaylarından biri olup, karaciğerin mikrozomal fraksiyonunda yer alan UDP-glükuronil transferaz (UGT) enzimleri tarafından katalize edilmektedir (Kayaalp, 1998).

UGT enzimlerinin genetik polimorfizimleri toksikolojik, farmakolojik ve fizyolojik öneme sahiptir (Miners ve diğ., 2002). Lamotrijinin de içinde bulunduğı yeni jenerasyon epilepsi ilaçları ile ilgili polimorfizm çalışmaları, bu ilaçları kullananların henüz yeterli sayılara ulaşamamasından ötürü zorlaşmaktadır (Ferraro ve Buono, 2005). Ayrıca çeşitli UGT izoformlarının genetik polimorfizimleri saptanmış olmasına rağmen fonksiyonel önemleri hakkında bildirimlere rastlanmamaktadır. UGT1A1 polimorfizmlerinin kalıtsal hiperbilirubinemilerle ilişkili olduğı saptanmış (Bosma ve diğ., 1992), neonatal hiperbilirubinemi ve anne sütü sarılığı için risk faktörü olduğı gösterilmiştir (Maruo ve diğ., 1999; 2000).

Ayrıca, UGT 1A3 (Iwai ve diğ., 2004), UGT 1A4 (Ehmer ve diğ., 2004; Mori ve diğ., 2005; Saeki ve diğ., 2005; Thomas ve diğ., 2006), UGT 1A6 (Ciotti ve diğ., 1997), UGT 1A8 (Guillemette ve diğ., 2000), UGT 1A10 (Huang ve diğ., 2002), UGT 2B4 (Jinno ve diğ., 2003), UGT 2B7 (Levesque ve diğ., 1999), UGT 2B15 (Levesque ve diğ., 1997) enzimlerinin de polimorfik varyantları araştırılmıştır. Lamotrijin metabolizmasının önemli bir kısmından sorumlu olan UGT 1A4 enzimi ile ilgili yapılmış olan sınırlı sayıda çalışma vardır. UGT 1A4 enziminin fonksiyonel olarak önemli olan polimorfizmleri ilk olarak 2004 yılında gösterilmiştir (Ehmer ve diğ., 2004). UGT 1A4'ün 1. ekzonunda yapılan çalışmada 24. kodonda prolin aminoasitinin yerine treonin (P24T), 48. kodonda ise lösin aminoasitinin yerine valin (L48V) geçmesi ile oluşan UGT 1A4*2 ve UGT 1A4*3 alellerinin β -naftilamin, benzidin, trans-androsteron ve dihidrotestesteron substratları üzerindeki fonksiyonel etkilerine bakılmış ve glükuronidasyon aktivitelerinin düşük olduğu saptanmıştır. Diğer bir çalışmada ise UGT 1A4*3 alelinin aktivitesi klozapin, imipiramin, siproheptadin ve trans-androsteron substratları için yüksek olarak saptanırken, tigogenin glükuronidasyonunda düşme ile sonuçlanmıştır (Mori ve diğ., 2005). Antipsikotik bir ilaç olan klozapinin glükuronidasyonu varyant enzimlerle iki katına çıkmıştır.

Çalışmamızda Türk toplumundaki epilepsili hastaların yer aldığı tek başına lamotrijin ya da diğer antiepileptiklerle birlikte lamotrijin kullanmakta olan 131 kişiden oluşan grupta, UGT 1A4 enziminin L48V ve P24T tek nükleotid polimorfizmleri araştırılacaktır. Genetik polimorfizmi olan hastalar ile genetik polimorfizmi olmayan hastaların plazma lamotrijin konsantrasyonları karşılaştırılacak ve lamotrijin ilacının metabolizması ile ilgili olan genetik polimorfizmin önemi, polimorfik enzimlerin lamotrijinin plazma konsantrasyonu üzerindeki etkisi araştırılarak belirlenecektir. Hedefimiz lamotrijin tedavisinin daha etkili ve yan etkiler bakımından da daha güvenli bir şekilde sürdürülmesi için çok büyük önem taşıyabilecek genetik polimorfizmlerin saptanması ve klinikte de hayata geçirilebilmesidir. Böylece hastaların yaşam kalitesinin artırılması ve tedavi maliyetlerinin düşürülmesi amacına ulaşılabacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Epilepsi:

2.1.1. Tanımı ve epidemiyolojisi:

Epilepsi, yeni doğandan yaşlı popülasyona kadar herkesi etkileyebilen, birbirinden çok farklı etiyoloji ve farklı çeşitte epilepsi nöbetleri üretmeye yol açan bir beyin bozukluğudur (Duncan ve diğ., 2006).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO- World Health Organization), epilepsi hastalığını serebral nöronların aşırı deşarjına bağlı tekrarlayıcı nöbetlerle karakterize, çeşitli etiyojiler ile gelişen kronik bir beyin hastalığı olarak tanımlamıştır (Gastaut, 1969). Uluslararası Epilepsi Derneği (ILAE) ise epilepsi hastalığını, beynin epilepsi nöbetleri oluşumu ile birlikte bu durumun nörobiyolojik, kognitif, fizyolojik ve sosyal sonuçları olarak açıklamıştır (Fisher ve diğ., 2005). Beyindeki sinir hücrelerinin aşırı deşarjına bağlı olarak ortaya çıkan epilepsi nöbeti, epilepsi hastalığının bir semptomu olarak kabul edilmektedir. Ayrıca epilepsi diyebilmek için farklı günlerde en az iki kez provoke olmamış epilepsi nöbeti geçirilmesi gerekmektedir (Guberman ve Bruni, 1999). Epilepsi hastalığına çoğunlukla tedavisini ve değerlendirmesini güçleştiren çeşitli sendromlar, öğrenme bozuklukları, diğer nörolojik defisitler, fizyolojik ve psikiyatrik problemler ve özellikle yaşlı hasta popülasyonunda görülen çoklu ilaç kullanımı eşlik etmektedir. Doğru ve uygun ilaç tedavisi seçimi ile epilepsi hastalarının yaklaşık üçte ikisi, nöbetlerinin kontrol altına alınması ile normal hayat kalitesine ulaşabilmektedir (Kwan ve Brodie, 2000).

Epilepsi hastalığı her yıl 100 bin kişiden 20-50 kişiyi etkilemektedir ve bu sayının çocuklarda ve yaşlı popülasyonda daha yüksek olduğu bilinmektedir (Forsgren ve diğ., 2005). Daha az varlıklı insanların bilinmeyen sebeplerden ötürü daha yüksek bir insidansa sahip olduğu gösterilmiştir (Heaney ve diğ., 2002). Sağlık sistemlerinin yetersiz olması, beyin enfeksiyonlarının daha yüksek risk taşıması ve genellikle epilepsi hastalarının tedavi görmemesi gibi nedenlerden ötürü, fakir ülkelerde epilepsi insidansı (100 bin kişiden > 100 kişi/yıl etkilenmekte) daha yüksek olmaktadır (Sander, 2004b).

Epilepsi prevalansı ise yılda 1000 kişide 4-10 kişi olarak belirtilmiştir (Forsgren ve diğ., 2005). Yapılan birkaç çalışmada farklı genetik ya da çevresel faktörlerin olduğu bölgelerde prevalansın daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Sander, 2003).

2.1.2. Prognoz ve mortalite:

Epilepsi hastalarının en az % 50'si 'selim' sayılabilecek bir prognoza sahiptir (Christian ve Schmidt, 2008). Epilepsili hastalarda doğru ve uygun olan tedavi seçimi ile epilepsi nöbetleri 5 yıl içinde % 70 oranında kontrol altına alınabilmektedir (Stefan ve diğ., 2001). İki ile beş yıl arasında gözlemlenen remisyon durumunda ise, hastaların sadece % 20'nde nöbetler tekrarlayabilmektedir (Stefan ve diğ., 2001). Remisyon süresi ne kadar uzunsa, nöbetlerin tekrarlama olasılığı da o kadar az olmaktadır. Prognoz, farklı epilepsi sendromlarında değişmektedir. Farklı epilepsi türleri farklı prognoza sahiptir (Semah ve diğ., 1998). Fakat tek başına nöbet tipi, cinsiyet, yaş, EEG (elektroensefalogram) bulguları gibi faktörlerin, prognoz üzerinde etkileri bulunmamaktadır (Stefan ve diğ., 2001).

Epilepsili hastalarda ani ölüm, travma, intihar, pnömoni ve status epileptikusa daha sık rastlanırken (Gaitatzis ve Sander, 2004a), bu hastalarda prematüre ölümleri de daha yüksek risk taşımaktadır (Lhatoo ve diğ., 2001). Hastaların % 36'sında kontrol edilemeyen, dirençli epilepsi görülmektedir (Christian ve Schmidt, 2008). Dirençli epilepsisi olan hastalarda ani ölüm oranı her yıl 200'de 1'e ulaşmaktadır ve bu oran konvülsif nöbetleri olan genç erkeklerde daha yüksek olarak bildirilmiştir (Nilsson ve diğ., 1999).

2.1.3. Patofizyolojisi:

Epilepsi nöbetlerinin mekanizması hala tam ve kesin olarak aydınlatılamamıştır. Beynin en önemli fonksiyonu, birbirinden farklı olan ağların kooperasyonudur. Kortikal ağlar osilasyonları üretir ve bu osilasyonlar, inhibitör nöronlar, nöronlar arasındaki iletişim ve nöronun intrinsik özellikleri için gereklidir (Jefferys, 2003). Epilepsi aktivitesinin oluşumu bu osilatuar ağların bir özelliği olarak birden ortaya çıkıyor olabilir. İnhibitör mekanizmalardaki yetersizlik, eksitator iletimin tetiklenmesi ya da nöronun intrinsik özelliklerindeki değişiklikler sebebi ile nöronal

yayılm ve güçlenme sonucu normal bir aktiviteden epilepsi aktivitesi meydana gelmektedir.

2.1.4. Epilepsi ve epilepsi nöbetlerinin sınıflandırılması:

Epilepsi terimi, tekrar eden spontan epilepsi nöbetleri oluştuğu zaman kullanılmaktadır. Nöbetler ve epilepsiler fokal ve jeneralize nöbet/epilepsiler olarak tanımlanabilmektedir. Fokal nöbetler, yalnızca bir hemisferden kaynaklanan nöbetler olarak tanımlanırken, jeneralize nöbetler her iki hemisferden kaynaklanan nöbetler olarak belirlenmiştir (Stefan ve Feuerstein, 2007). Epilepsinin farklı tipleri, sadece altta yatan mekanizmadaki farklılığa bağlı değildir. Tümör, enfarktüs, kortikal malformasyon gibi epilepsiye neden olan sebeplerin belirlendiği ‘semptomatik’ epilepsiler, sebebi belirlenemeyen fakat çoğunlukla kalıtsal yatkınlığın neden olarak gösterildiği ‘idiyopatik’ epilepsiler ve etiyolojik bir neden bulunamayan fakat semptomatik olan epilepsiler ise ‘kriptojenik’ epilepsiler başlığı altında incelenmektedir. Epilepsi ve epileptik nöbetlerin sınıflandırması ILAE tarafından yapılmıştır (Tablo 1 ve Tablo 2).

Epilepsi sendromu ise karakteristik nöbet tipleri, ailesel eğilim ve klinik bulguların eşlik ettiği kompleks belirtilerle tanımlanmaktadır. Epilepsi sendromlarının teşhisi uygun antikonvülsan ilacın seçilmesi için epilepsi sınıflandırmalarına ek olarak önem taşımaktadır.

Tablo 1. Epilepsilerin ve Epileptik Sendromların Uluslararası Sınıflandırılması - ILAE 1989 (Comission, 1989)

1. Lokalizasyona bağlı (fokal, lokal, parsiyel) epilepsiler ve sendromlar

1.1. İdiyopatik (yaşa bağlı başlangıç)

- Sentrotemporal dikenli selim çocukluk çağı epilepsisi
- Oksipital paroksizmlili çocukluk çağı epilepsisi
- Primer okuma epilepsisi

1.2. Semptomatik

- Temporal lob epilepsisi
- Frontal lob epilepsisi
- Pariyetal lob epilepsisi
- Oksipital lob epilepsisi
- Çocukluk çağının kronik progresif ‘epilepsia parsiyalis continua’sı
- Spesifik faktörlerle uyarılan nöbetlerle karakterize sendromlar

1.3. Kriptojenik

2. Jeneralize epilepsiler ve sendromlar

2.1. İdiyopatik (yaşa bağlı başlangıç-yaş sırasına göre sıralanmıştır)

- Selim ailesel yenidoğan konvülsiyonları
- Selim yenidoğan konvülsiyonları
- Süt çocuğunun selim miyoklonik epilepsisi
- Çocukluk çağı absans epilepsisi (piknolepsi)
- Jüvenil absans epilepsisi
- Jüvenil miyoklonik epilepsi (impulsif petit-mal)
- Uyanırken gelen grand-mal nöbetli epilepsi
- Diğer jeneralize idiyopatik epilepsiler
- Belirli aktivasyon yöntemleriyle uyarılan epilepsiler

2.2. Kriptojenik veya semptomatik (yaş sırasına göre)

- West sendromu
- Lennox-Gastaut sendromu
- Miyoklonik astatik nöbetli epilepsi
- Miyoklonik absanslı epilepsi

2.3. Semptomatik

2.3.1. Nonspesifik etiyoloji

- Erken miyoklonik ensefalopati
- Supresyon “burst”lü erken infantil epileptik ensefalopati
- Diğer semptomatik jeneralize epilepsiler

2.3.2. Spesifik sendromlar

3. Fokal ya da jeneralize olduğu belirlenemeyen epilepsiler

3.1. Jeneralize ve fokal konvülsiyonlu epilepsiler

- Yenidoğan konvülsiyonları
- Süt çocuğunun ağır miyoklonik epilepsisi
- Yavaş dalga uykusu sırasında devamlı diken-dalgalı epilepsi
- Edinsel epileptik afazi (Landau-Kleffner sendromu)
- Diğer belirlenemeyen epilepsiler

3.2. Net jeneralize ya da fokal konvülsiyon özelliği olmayanlar

4. Özel durumlar

4.1. Duruma bağlı nöbetler

- Febril konvülsiyonlar
 - İzole nöbet ya da izole status epileptikus
 - Akut metabolik veya toksik nedenlere bağlı nöbetler
-

Tablo 2. Epilepsi Nöbetlerinin Sınıflandırılması - ILAE 1981 (Comission, 1981)

I. Parsiyel (fokal, lokal) nöbetler

A. Basit parsiyel nöbetler (bilinç kaybı yoktur)

- Motor belirtiler gösterenler
- Somatasensoryal veya özel duysal semptomlarla birlikte olanlar (basit halüsinasyonlar, karıncalanma, ışıklı görme)
- Otonomik semptom belirtiler gösterenler (epigastrik his, terleme, pupiller dilatasyon, solgunluk, kızarma gibi)
- Psşik semptomlar gösterenler (yüksek beyin fonksiyonlarının bozukluğu) Nadiren bilinci bozmadan görülürler ve daha sıklıkla kompleks parsiyel nöbet şeklinde ortaya çıkarlar.

B. Kompleks parsiyel nöbetler (bilinç bozukluğu eşlik eder)

- Basit parsiyel başlayıp bilinç bozukluğu gözlenenler
- Ek olarak başka bir özelliği olmayanlar
- Basit parsiyel nöbetlerle birlikte olanlar
- Ek olarak otomatizmalar gösterenler

C. Şuur kaybı ile ortaya çıkan nöbetler

- Ek olarak başka bir özelliği olmayanlar
- Ek olarak basit parsiyel nöbeti olanlar
- Ek olarak otomatizmalar gösterenler

D. Sekonder olarak jeneralize olan parsiyel nöbetler

- Jeneralize nöbetlere dönüşen basit parsiyel nöbetler
- Jeneralize nöbetlere dönüşen kompleks parsiyel nöbetler
- Kompleks parsiyel nöbetlere, daha sonra da jeneralize nöbetlere dönüşen basit parsiyel nöbetler

II. Jeneralize nöbetler (konvülsif ya da konvülsif olmayan)

A. Absans nöbetler

- Absans nöbetler
- Atipik absans nöbetler

B. Miyoklonik nöbetler

C. Klonik nöbetler

D. Tonik nöbetler

E. Tonik-klonik nöbetler

F. Atonik nöbetler

III. Sınıflandırılmayan epileptik nöbetler

2.1.5. Etiyolojisi:

Epilepsilerin önemli bir bölümünde etiyoloji saptanamıyor olsa da, sıklıkla altta yatan bir beyin hastalığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Herhangi bir beyin rahatsızlığı epilepsiye yol açabilirken, aynı beyin rahatsızlığı olan herkeste epilepsi ortaya çıkmamaktadır. Çocuk ve genç erişkinlerde görülen epilepsinin sebebi çoğunlukla bilinemez ya da genetik orjinli olarak belirlenirken, daha yaşlı hastalarda, altta yatan bir beyin tümörü, serebrovasküler hastalık ya da kafa travması epilepsinin ortaya çıkış sebebi olarak saptanmaktadır (WHO, 2001) (Tablo 3). Ayrıca bebeklikte geçirilen ateşli konvülsiyonlar, çocukluk ve gençlik döneminde epilepsiye yol açabilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü bu oranın % 3 olduğunu bildirmiştir.

Tablo 3. Epilepsilerin etiyolojisi (Shorvon ve diğ., 2004)

Hipokampal skleroz

- Tümör
- Glioma
- Disembriyoplastik nöroepitelyal tümör
- Ganglioglioma
- Diğer

Kortikal gelişim malformasyonları

- Fokal kortikal gelişim malformasyonları
- Hemimegalensefali
- Epidermal nevüs sendromu
- Heterotopik gri madde
- Hipotalamik hamartom
- Ito hepatomelanozisi
- Diğer

Vasküler gelişim malformasyonları

- Kavernöz angioma
- Arteriovenöz malformasyon
- Sturge-Weber sendromu
- Diğer

Santral sinir sistemi enfeksiyonları

- Menenjit
- Ensefalit
- Abse
- Diğer

Santral sinir sisteminin immünolojik enflamasyonları

- Ramussen Ensefaliti
- Vaskülit
- Diğer

Hipoksik-iskemik beyin hasarı

- Fokal iskemik infarkt
- Diffüz hipoksik-iskemik hasar
- Periventriküler Lökomalazi
- Hemorajik infarkt
- Venöz sinüs trombozisi
- Diğer

Kafa travması

- İntrakraniyal hemoraji ile giden kafa travması
- Penetre kafa travması
- Kapalı kafa travması

Kalıtsal patolojiler

- Tübero-skleroz
- Progressif myoklonik epilepsi
- Metabolik sendrom
- Kanalopati
- Mitokondriyal bozukluklar
- Kromozomal ayrılma
- Genetik nedenler
- Diğer

Nedeni bilinmeyen striktürel beyin anomalileri

Diğer

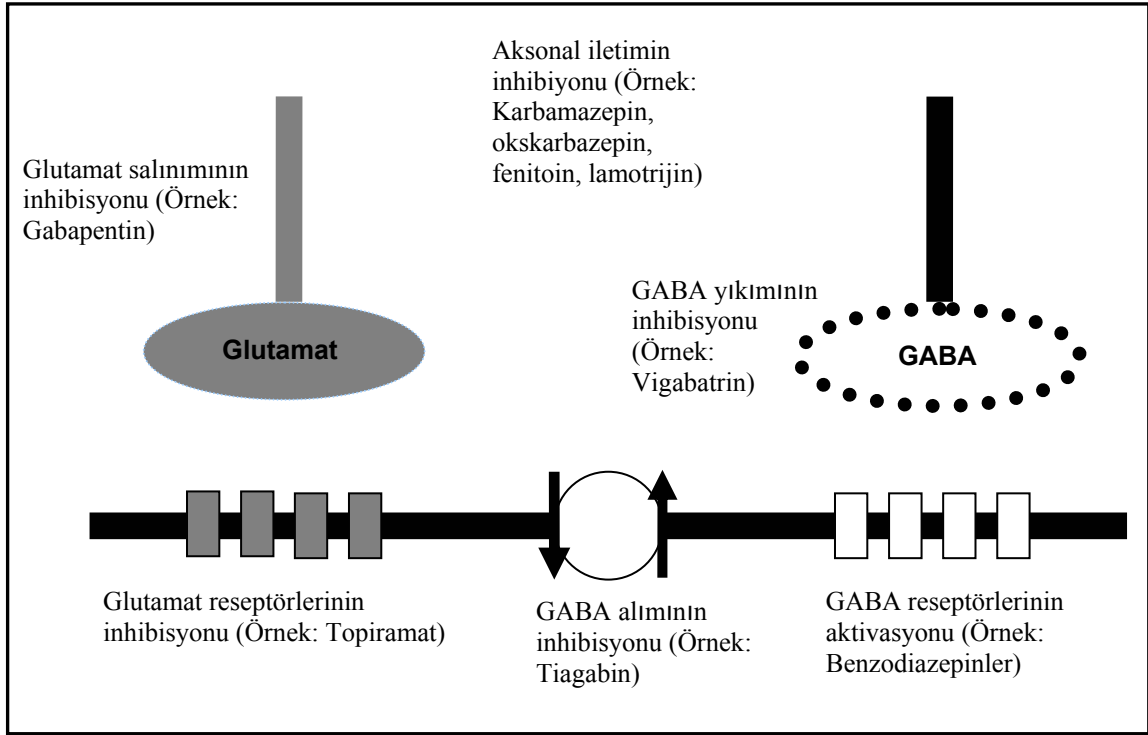
2.1.6. Epilepsi Tedavisi:

Dünyada yılda yaklaşık 4 milyon kişinin etkilendiği epilepsi hastalığının tedavisinde amaç, epilepsi nöbetlerinin en kısa sürede ve hiçbir istenmeyen etki ortaya çıkmaksızın tamamen kontrol altına alınabilmesi ve böylece hastaya iyi bir yaşam kalitesi sunulabilmesidir.

Epilepsi tedavisinde kullanılan ilaçlar epilepsi hastalığının gelişim süreci yani epileptogenezi üzerinde etkili olmayıp, yalnızca nöbetlerin ortaya çıkışını baskılayabilmektedirler. Antiepileptik ilaçlar nöronların eksitabilitesini modifiye edebilmek için farklı moleküler hedefler üzerine etki ederler. Böylece epilepsi nöbetine bağlı nöronların ateşlemesini, nöronlar arasındaki normal sinyallerin iletilmesini sağlayan, epileptik olmayan aktiviteye etki etmeden engelleyebilmektedirler (Stefan ve Feuerstein, 2007). İyon kanallarının aktivitesi sinyallerin iletimi için önemlidir. İyonların hareketi, nöronların membranı boyunca, sinaptik potansiyelleri ve aksiyon potansiyellerini ortaya çıkaran bir voltaj farkı oluşturmaktadır. Membran potansiyelleri membrana spesifik anyon ve katyon kanallarının karşılıklı etkileşimine dayanmaktadır. Kanalların açılması ve kapanması nörotransmitterlerin bağlanmasına ve voltaj değişikliklerine bağlıdır. Sodyum ve kalsiyum kanalları eksitasyona aracılık etme bakımından önemli kanallar iken, potasyum ve klor kanalları inhibisyonu düzenlemek bakımından önem taşımaktadır. Nöronal ağda sinaptik transmisyon eksitator ve inhibitör nörotransmitterler aracılığı ile düzenlenmektedir. γ -Aminobütirik asit (GABA) temel inhibitör nörotransmitter olarak görev yaparken, glutamat temel eksitator nörotransmitter olarak kabul edilmektedir.

Etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte bir çok antiepileptik ilaç birden çok etkiye sahiptir. Epilepsi nöbetlerinin tedavisinde kullanılan lamotrijin, fenitoin gibi antikonvülsan ilaçlar, voltaja bağlı iyon kanallarının modülasyonunu sağlayarak, sinaptik inhibisyonu tetikleyerek, ya da sinaptik eksitasyonu inhibe ederek etkilerini göstermektedirler. Nöronlardaki inhibisyonu artırıp, eksitasyonu azaltırlar; ya da nöronlardaki ani ateşlemeleri önlerler. Antikonvülsan ilaçların en temel mekanizmaları, inhibitör etkiden sorumlu olan GABAerjik sistemin indüklenmesi ve sodyum kanallarının inhibisyonudur. Tiagabin ve vigabatrin gibi ilaçlar GABAerjik sistemi etkilerken, karbamazepin,

okskarbazepin, lamotrijin ve fenitoin gibi ilaçlar sodyum kanalları üzerinde etki göstermektedirler (Walker ve Fisher, 2004) (Şekil 1). Konvülsif olmayan jeneralize absans epilepsi nöbetlerinin tedavisinde ise etosüksimid, valproik asit ya da zonisamid gibi düşük voltajlı T tipi kalsiyum kanallarına etki eden ilaçlar kullanılmaktadır.



Şekil 1. Antiepileptik ilaçların mekanizmasının özeti gösterilmektedir

Epilepsi nöbetlerinin tedavisi 1857 yılında bulunan bromid adlı ilaç ile başlamıştır (Christian ve Schmidt, 2008). Daha sonra 1912’de fenobarbital kullanıma girmiş ve 1935’de Merritt ve Putnam tarafından fenitoinin epilepsi tedavisinde etkili olduğunun gösterilmesi üzerine bir çok yeni antiepileptik ilaç geliştirilmiştir. Antiepileptik ilaçlar, 1990 yılından önce ve sonra bulunmaları esas alınarak, eski ve yeni antiepileptikler olarak sınıflandırılmaktadır (Duncan ve diğ., 2006) (Tablo 4). Yeni antiepileptik ilaçların tolerabilitelerinin daha yüksek olması, ilaç etkileşimlerine daha az girmeleri ve karaciğerde metabolizma enzimlerini indükleyici etkilerinin olmaması gibi avantajları vardır (Bechi, 2004).

Tablo 4. Antiepileptik ilaçlar ve özellikleri

Antiepileptik ilaç	Etki mekanizması	Erişkin başlangıç dozu (mg)	Adolesan ve erişkinlerde günlük idame doz (mg)	Yan etkiler
Asetozolamid (1952)	Karbonik anhidraz inhibisyonu	250	500-1000	İdiyosenkratik döküntü, Nadiren Steven-Johnson ve Toksik epidermal nekroliz, aplastik anemi
Karbamazepin (1963)	Sodyum kanal inhibisyonu	100-200	400- 1800	İdiyosenkratik döküntü, nadiren Steven-Johnson, aplastik anemi,
Etosüksimid (1953)	Kalsiyum kanal modifikasyonu	250	500-1500	Nadiren idiyosenkratik döküntü, Steven-Johnson sendromu, aplastik anemi
Felbamat (1993)	Glutamat inhibisyonu	400	1800-3600	Karaciğer yetmezliği, aplastik anemi
Gabapentin (1993)	Kalsiyum kanal modifikasyonu	300	1800-3600	Nöbetlerde paradoksal artma
Lamotrijin (1991)	Sodyum kanal inhibisyonu, glutamatın azaltılması	50	100-400	Nadiren idiyosenkratik döküntü, Steven-Johnson sendromu, toksik epidermal nekroliz, karaciğer yetmezliği, aplastik anemi, çoklu organ yetmezliği
Levetirasetam (1999)	Sinaptik vezikül proteinlerinin modülasyonu	250	750-3000	Davranışsal problemler
Fenobarbital (1912)	GABA artışı	30	30-180	İdiyosenkratik döküntü, nadiren toksik epidermal nekroliz, hepatotoksisite, osteomalazi, Dupuytren kontraktürü
Fenitoin (1938)	Sodyum kanal inhibisyonu	200	200-400	İdiyosenkratik döküntü, nadiren psödolenfoma, periferik nöropati, Steven-Johnson sendromu, Dupuytren kontraktürü, hepatotoksisite, osteomalazi
Pregabalin (2004)	Kalsiyum kanal modülasyonu	50	100-600	Kilo artışı, nadiren nöbetlerde artış
Primidon (1952)	GABA artışı	125	500-1500	İdiyosenkratik döküntü, nadiren agranülositoz, trombositopeni, lupus benzeri sendrom
Okskarbazepin (1990)	Sodyum kanal inhibisyonu	150-300	900-2400	İdiyosenkratik döküntü, hiponatremi

Antiepileptik ilaç	Etki mekanizması	Erişkin başlangıç dozu (mg)	Adolesan ve erişkinlerde günlük idame doz (mg)	Yan etkiler
Tiagabin (1996)	GABA artışı	5	30-45	Nöbetlerde artış, nonkonvülsif status
Topiramat (1995)	Glutamat redüksiyonu, sodyum kanal modülasyonu, kalsiyum kanal modifikasyonu	25	75-200	Kilo kaybı, böbrek taşı, kognisyonda bozulma
Valproik asid (1968)	GABA artışı	200	400-2000	Teratojenite, nadiren akut pankreatit, hepatotoksisite, trombositopeni, ensefalopati, polikistik over sendromu
Vigabatrin (1989)	GABA artışı	500	1000-2000	Görme fonksiyonlarında bozulma, nöbetlerde artış
Zonisamid (1990)	Kalsiyum kanal inhibisyonu	50-100	200-600	Döküntü, nadiren kan diskrazisi

2.2. Farmakogenetik – Genetik Polimorfizm Kavramları ve Epilepsi Tedavisinin

Farmakogenetik Çalışmalardaki Yeri:

Her epilepsi ilacının, önerilen ve standartlaşmış olarak bilinen dozda uygulandığında, birçok hasta için beklenen terapötik etkiyi sağladığı gözlemlense de, bazı hastalarda hiçbir etki göstermediği ve bazı hastalarda ise istenmeyen etkiler ve toksik etkilere yol açtığı bilinmektedir. Uygulanan ilacın etki göstermemesi dirençli epilepsilerin gözlemlenmesine, istenmeyen ya da toksik etkilerin ortaya çıkması tedavinin sürdürülememesine, çoğu zaman bırakılmasına, toksik etkiler ise morbidite ve mortalite riskinin artmasına neden olmaktadır. İlaç yanıtının bireyler arasında gösterdiği bu farklılık, aynı zamanda klinik uygulamalarda ve ilaç geliştirilmesinde de bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır.

İlaca karşı gelişen yanıtta bireysel farklılıklar, hem genetik hem de çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimleri sonucunda oluşmaktadır (Ferraro ve Buono, 2005). Bu durum, istenmeyen ilaç reaksiyonlarının, ilaç toksisitelerinin ya da ilacın terapötik yetersizliğinin meydana gelmesine neden olabilmektedir. Bireysel değişkenliğin nedenleri arasında ilaç-ilac etkileşimleri, vücut ağırlığı, başka hastalığın eşlik etmesi, yaş, karaciğer ve böbrek fonksiyon bozuklukları, sigara ve

alkol kullanımı ve genetik faktörler gibi bir çok neden sayılabilirse de bunlardan en önemlisi genetik faktörlerdir (Meyer, 2000). İnsan DNA (deoksiribonükleik asit) dizisinin % 99'dan daha fazlasının bir popülasyon içinde aynı olmasına rağmen, DNA dizilerindeki varyasyonların, insanların hastalıklar, virus, bakteri, toksinler, kimyasallar gibi çevresel faktörlere, ilaçlara ve diğer terapilere nasıl cevap vereceği üzerinde önemli etkileri vardır. İlaç metabolizmasında görev alan enzimler, taşıyıcı proteinler, reseptörler ve sinyal transdüksiyon kaskadındaki moleküller kalıtsal olarak varyant olabilmektedirler.

DNA'nın nükleotid dizilerindeki veya düzenlenmesindeki değişiklikler mutasyon olarak adlandırılmaktadır. Mutasyonlar; genom mutasyonları, kromozom mutasyonları ve gen mutasyonları olmak üzere 3 gruba ayrılmakta, hücredeki bütün kromozomların sayısının değiştiği mutasyonlar, genom mutasyonu (anöploidi), kromozomların sadece bir kısmında meydana gelen duplikasyonlar, delesyonlar, inversiyonlar ve translokasyonlar, kromozom mutasyonu olarak tanımlanmaktadır. Değişiklik DNA dizilerinde olduğunda ise gen mutasyonlarından bahsedilmektedir. Gen mutasyonlarında DNA dizilerindeki değişiklik tek bir nükleotidi kapsayabileceği gibi binlerce baz çiftini de etkileyebilmektedir (Nelson ve diğ., 1996). Gen mutasyonları, DNA'da depolanan kimyasal bilgideki değişim sonucunda ortaya çıkmakta ve DNA'da depolanan kimyasal bilgiye, topluca o organizmanın genotipi denmektedir. Böyle bir değişim, bu kimyasal bilgiyi oluşturan nükleotitlerin yer değişimlerini (substitution), kendi kopyasını oluşturmalarını (duplikasyon) ya da aradan çıkışları (delesyon) içerebilmektedir.

Farmakogenetik ve farmakogenomik çalışmalar ilaç etkililiği ve istenmeyen etkiler üzerinde önemli rol oynayan genetik faktörleri açıklamaya çalışmaktadır. Farmakogenetik, ilaçların farmakokinetiğinin ve ilaçlara karşı kişinin verdiği yanıtın genetik yapıya göre bireyler arasında ve ayrıca ilaç etkinliğinin toplumlar arasında değişmesi ile uğraşan bir bilim dalıdır (Kayaalp, 1998). Genlerin ilaç tedavisi üzerindeki etkisinin incelendiği bu bilim dalı, yaklaşık 40 yıl önce Alman genetikçi Friederich Vogel tarafından öngörülmüştür (Vogel, 1959). Kişisel ilaç kullanımı konsepti ilgi görmeye başladığından beri farmakogenetik bilim dalı bireysel epilepsi tedavisi uygulanmasında önemli bir araç haline gelmiştir (Löscher ve diğ., 2008).

Yapılan çalışmalarla genetik polimorfizmlerin antiepileptik ilaçların hem farmakokinetiği hem de farmakodinamiği üzerindeki etkisi açıkça görülebilmektedir.

Farmakogenetik alışmalar ilaçlara karşı verilen yanıtın bireyden bireye değişmesinin kalıtımsal nedenlerini ortaya koymayı hedefleyen çalışmalardır. Önceleri bireysel farklılıkların üzerinde durulurken, farmakogenetik araştırmalar geliştikçe, popülasyonlar arasında gözlenen farklılıklar ön plana çıkmaya başlamıştır (Kalow, 2000). Farmakogenetik bilim dalı tek gen mutasyonunun farmakolojik sonuçları üzerinde odaklanırken, farmakogenomik yaklaşım, çok sayıdaki genle ve karşılıklı etkileşimleri ile ilgilenmektedir (Tomalik-Scharte ve diğ., 2008).

Genetik farklılıklar ilacın farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini etkileyip, ilaca verilen yanıtta bireysel farklılıklara sebep olabilirler. İlaç taşıyıcı proteinler, plazma proteinleri, ilacı metabolize eden enzimler genetik çeşitlilik gösterebilen parametrelerdir (Ferraro ve Buono, 2005). İlaçların plazma konsantrasyonundaki farklılıklarla sonuçlanan ilaç metabolizmasında rol alan enzimlerdeki genetik değişiklikler, özellikle doz ayarlamaları ile direkt olarak ilişkilidir. Böylece ilaç metabolizmasında rol alan enzimlerin genotiplemesi pratik olarak klinik uygulamalara katılmaya en yakın durmaktadır (Tomalik-Scharte ve diğ., 2008). İlaç metabolizmasında rol alan polimorfik enzimlerden en çok alışılanların başında sitokrom P450 enzimlerinin arasında yer alan CYP2D6, CYP2C9 ve CYP2C19 gelmektedir. Genetik faktörlere bağlı etki değişikliği, ilaç metabolizma hızının genetik polimorfizm sonucu değişmesine bağlı olarak ortaya çıkan durumlar, ilacın etki şeklinin değişmesinin eşlik ettiği durumlar ve enzimlerin indüklenme ya da inhibisyon eğilimlerinin genetik farklılığına bağlı durumlar olarak üç alt başlıkta incelenmektedir (Kayaalp, 1998). Tüm bu bilgiler de son zamanlarda çalışmaların farmakogenetik ve genetik faktörler üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur.

Genin, mutasyon sonucu oluşan alternatif formları alel olarak adlandırılmaktadır. Genetik polimorfizm; bir popülasyonda, farklı alellere bağlı olarak iki veya daha çok alternatif fenotipin grlmesidir ve bir toplumda genetik polimorfizmden bahsedebilmek için mutant veya varyant genlerin normal popülasyonda % 1'den daha fazla sıklıkta bulunmaları gerekmektedir. Aleller % 1'den daha az sıklıkta bulunuyorlarsa, nadir değişimler olarak adlandırılırlar. Belirli

bir lokustaki gen çiftini oluşturan aleller birbirinin aynısı ise bunlara homozigot, farklı ise heterozigot denir (Nelson ve diğ., 1996). Genetik polimorfizm bize toplumun küçük bir kesiminin ilaç etkisizliği ya da toksisitesi açısından neden daha yüksek risk taşıyabildiğini açıklamaktadır (Meyer, 2000; Ingelman ve Sundberg, 2004). Bu polimorfizmlerin saptanması, farmakogenetiğin temel araştırma konuları arasında yer almaktadır. Özellikle tek nükleotid polimorfizmleri ('Single Nucleotide Polymorphism': SNP) ve DNA'nın tek bölgesinde yer alan varyasyonlar, insan genomunda en sık karşılaşılan varyasyonlardır. SNP'ler bireyler arasında DNA'daki tek nükleotid değişiklikleri olarak adlandırılmaktadır. Bu polimorfizmler genomda her 1000-2000 bazda bir bulunmaktadır. Ayrıca antiepileptik ilaçların, etkililik, tolerabilite, güvenlik ve etki süreleri üzerinde etki gösterebilmektedirler (Löscher ve diğ., 2008).

Epilepsi tedavisi, epilepsi hastalığının yüksek bir prevalansa sahip olması, antiepileptik ilaçlara karşı verilen yanıtlarda farklılıkların olması, yan etki profilinin ve ortaya çıkan nöbet sınıflandırmasının yapılabilir olması gibi nedenlerden ötürü, farmakogenetik uygulamalar için uygun bir model oluşturmaktadır (Cassandra ve diğ., 2006).

Epilepsi tedavisi hastaların % 70'inde etkili olup, epilepsi nöbetlerinin oluşmasını engelleyebilirken, bir antiepileptik ilacın etkisi ve istenmeyen etkilerin görülmesi bireysel değişkenlik göstermektedir. Eski ve yeni tüm antiepileptik ilaçlar istenmeyen ilaç reaksiyonlarına yol açmakta ve bu durum hastalar arasında farklılık göstermektedir. Aynı epilepsi tipine sahip kişilerde uygulanan aynı antiepileptik tedavinin sonuçları farklı olabilmektedir (Schmidt ve Löscher, 2005).

Antiepileptik ilaçların farmakokinetik özellikleri üzerine yapılan çalışmalar, genetik varyasyonların herhangi hastaya uygulanan etkili ilaç dozu üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir (Cassandra ve diğ., 2006). Farmakogenetik çalışmalar, genler arasındaki ilişkiyi ve genlerin ekspresyonunu araştırmaktadır (Tan ve diğ., 2004). Genetik ilişki üzerine yapılan araştırmalar, ilaç transport genlerini (MDR1/ABCB1) (Escayg ve diğ., 2001), ilacın hedeflediği uç organlarla ilgili genleri (Na⁺ kanalı SCN1A) (Chung ve diğ., 2004) ve immün yanıt sisteminin tüm komponentleri ile ilgili genleri (TNF α , HLA-DR, HLA-Dq ve HLA-B) (Potschka ve diğ., 2003) kapsamaktadır. Gen ekspresyonu araştırmaları ise ilaç transport genlerini

ve ilaç metabolizmasından sorumlu olan genleri (CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 ve CYP2C19) (Kuehl ve diğ., 2001) içermektedir. Antiepileptik ilaçları metabolize eden enzimler Tablo 8’de gösterilmektedir.

Antiepileptik ilaçlar arasında yer alan gabapentin ve pregabalin, amino asitlerin oluşturduğu ‘L sistemi’ adı verilen bir taşıyıcı sistemle gastrointestinal sistemden emilmekte ve bu sistemdeki olası polimorfizmler ile bu ilaçların emilimleri değişebilmektedir (Anderle ve diğ., 2004). Ayrıca bir çok antiepileptik ilacın substratı olduğu intestinal lümene sekresyonlarını sınırlandıran p-glikoprotein taşıyıcı sisteminin üyesi olduğu çoklu ilaç direnç geni (MDR) ailesinin kodlandığı ABCB1 geni polimorfizimleri de etkili olabilmektedir (Löscher ve Potschka, 2005). Ayrıca kan beyin bariyerinde, kapiller endotelial hücrelerinin p-glikoprotein ekspresyonunun yüksek olması, antiepileptik ilaçların beyin penetrasyonunu güçleştirebilmektedir (Löscher ve Potschka, 2005). Fenitoin ve karbamazepin kullanan epilepsili hastalarda yapılan çalışmalarda, ABCB1 gen polimorfiziminin daha düşük plazma seviyelerine neden olabileceği gösterilmiştir (Kerb ve diğ., 2001). Plazma proteinlerinin ilaçları bağlayıcı spesifik bölgeleri bulunmaktadır ve bu bölgelerin varyasyonları, ilacın plazma proteinine afinitesini değiştirebilmektedir. Albumin ve $\alpha 1$ asit glikoprotein proteinleri varyasyonlarının ilaçların bağlanması üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Fitos ve diğ., 2004; Kragh-Hansen ve diğ., 2004).

İlaçların metabolizması üzerinde etkili olabilen genetik polimorfizmler ise, üzerinde en çok durulan ve çalışmaların yoğunlaştığı polimorfizmler haline gelmiştir. Epilepsi tedavisinde etkili bir tedavi oluşturabilmek için amaç nöbetlerin durdurulması ve hayat kalitesinin mümkün olabildiğince en üst seviyelerde tutulmasıdır. Antiepileptik ilaçların en uygun dozda kullanılması bu iki amaca ulaşılabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Antiepileptik ilaçların doz ayarlaması için terapötik ilaç monitorizasyonu başlığı altında, ilaçların plazma konsantrasyonlarının düzenli aralıklarla kontrol edilmesi uygulamaya konmuştur (Ulrich, 2007). Böylece herhangi farmakokinetik değişikliğin fark edilmesi ve ilacın plazma konsantrasyonunun kontrolü hedeflenmiştir. Ölçülen kararlı durum plazma konsantrasyonu genellikle uygulanan ilaç dozu ile doğru orantılı, ilacın sistemik klirens değeri ile ise ters orantılı olarak değişmektedir. Antiepileptik ilaçların bir

çoğu vücuttan karaciğerde metabolizmaya uğrayarak atıldığı için, kişinin karaciğer fonksiyonu ilaç yanıtında anahtar bir rol oynamaktadır (Ulrich, 2007). İlaç metabolizmaya uğrarken, polimorfik genler tarafından kodlanan metabolizma enziminin hızlı ya da yavaş çalışması, ilacın plazma seviyesini etkilemekte ve ilaç etkililiğinin değişmesine ya da istenmeyen ve toksik etkilerin ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir.

Antiepileptik ilaçlar istenmeyen ilaç reaksiyonları arasında sık olarak gözlenen kutanöz reaksiyonların en sık nedenleri arasındadır. Kutanöz reaksiyonlar, agresif makülopapüler ekzantemden, Stevens-Johnson sendromu, toksik epidermal nekroliz ve ilaç hipersensitivite sendromu gibi hayatı tehdit edici ciddi kutanöz reaksiyonlara kadar ulaşabilmektedir. Antiepileptik ilaçlara bağlı olarak ortaya çıkan döküntüler, hastaların % 10'nda görülürken, ciddi kutanöz reaksiyonların insidansı 1:10000 olarak saptanmıştır (Marson ve diğ., 2007). Genellikle ilaç kullanmaya başladıktan iki ay içinde ortaya çıkan ciddi kutanöz reaksiyonlara yol açan antiepileptik ilaçlar arasında karbamazepin, fenobarbital, fenitoin ve lamotrijin yer almaktadır (Zaccara ve diğ., 2007). Yüksek dozda ilaç kullanımı, hızlı titrasyon, ya da yüksek serum konsantrasyonları, lamotrijin ya da karbamazepin gibi ilaçlarla gözlenen döküntü ve ciddi kutanöz reaksiyonların oluşum riskini arttırmaktadır (Zaccara ve diğ., 2007). Tüm bu bilgilerin ışığında, antiepileptik ilaçların metabolizmasında rol alan enzimlerin genetik polimorfizmleri ve polimorfik enzimlerin fonksiyonel aktivitelerinin önemi net olarak ortaya çıkmaktadır.

Antiepileptik ilaçlar çeşitli enzimlerin görev aldığı faz 1 ve faz 2 reaksiyonları aracılığı ile metabolizmaya uğramaktadırlar. İlaç metabolizmasını etkileyen enzimlerden en çok faz II reaksiyonlarında görevli olan N-asetiltransferazlar ve faz I reaksiyonda bulunan sitokrom P450 enzimleri araştırılmış ve birçoğunun genetik çeşitlilik gösterdiği saptanmıştır (Wilkinson, 2005). Özellikle polimorfik olarak saptanan, sitokrom P450 enzimleri arasında yer alan CYP2D6, CYP2C9 ve CYP2C19 klinik açıdan büyük ilgi görmüştür. Antiepileptik ilaçların metabolizması ile ilişkili olarak ise CYP2C9 ve özellikle de CYP2C19 polimorfizm çalışmaları arasında büyük yer kaplamaktadır (Ulrich, 2007). CYP2D6 enziminin polimorfizmi, Türklerde % 1-2 oranında yavaş metabolize edici özellikte, % 8 oranında ise ultra hızlı metabolize edici özellikte olarak saptanmıştır (Aynacıoğlu ve diğ., 1999a).

Fenitoin, fenobarbital gibi antiepileptik ilaçların metabolizmasından sorumlu olan CYP2C9, CYP2C19 enzimlerinin ise yavaş metabolize edici özellikteki polimorfizmleri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Mamiya ve diğ., 1998; Aynacıoğlu ve diğ., 1999b).

Faz II reaksiyonlarında görevli olan UDP- glükuronil transferaz enzimlerinin genetik varyasyonlarına ise son zamanlarda çalışılmaya başlanmıştır. UGT enzimlerinin genetik polimorfizimleri toksikolojik, farmakolojik ve fizyolojik öneme sahiptir (Miners ve diğ., 2002). Lamotrijinin de içinde bulunduğu yeni jenerasyon epilepsi ilaçları ile ilgili polimorfizm çalışmaları, bu ilaçları kullananların henüz yeterli sayılara ulaşamamasından ötürü zorlaşmaktadır (Ferraro ve Buono, 2005). Ayrıca çeşitli UGT izoformlarının genetik polimorfizmleri saptanmış olmasına rağmen fonksiyonel önemleri hakkında bildirimlere rastlanmamaktadır. UGT1A gen ailesinin farklı olan 1. ekzonlarında ve ortak olan 2-5. ekzonlarında saptanan SNP'lerin glükuronidasyon aktivitesi üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Strassburg ve diğ., 2002; Ehmer ve diğ., 2004; Lankisch ve diğ., 2005). Ayrıca UGT geninin promotör bölgesindeki polimorfizmler de bu bölgelerdeki bazal transkripsiyon oranlarını değiştirerek UGT enziminin aktivitesini etkileyebilmektedir. UGT 1A1 polimorfizmlerinin kalıtsal hiperbilirubinemilerle ilişkili olduğu saptanmış (Bosma ve diğ., 1992), neonatal hiperbilirubinemi ve anne sütü sarılığı için risk faktörü olduğu gösterilmiştir (Maruo ve diğ., 1999; 2000). Ayrıca, UGT 1A3 (Iwai ve diğ., 2004), UGT 1A4 (Ehmer ve diğ., 2004; Mori ve diğ., 2005; Saeki ve diğ., 2005; Thomas ve diğ., 2006), UGT 1A6 (Ciotti ve diğ., 1997), UGT 1A8 (Guillemette ve diğ., 2000), UGT 1A10 (Huang ve diğ., 2002), UGT 2B4 (Jinno ve diğ., 2003), UGT 2B7 (Levesque ve diğ., 1999), UGT 2B15'in (Levesque ve diğ., 1997) de polimorfik enzimler oldukları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Lamotrijin metabolizmasının önemli bir kısmından sorumlu olan UGT1A4 enzimi ile ilgili yapılmış olan çok sınırlı sayıda çalışma vardır. UGT 1A4 enziminin fonksiyonel olarak önemli olan polimorfizmleri ilk olarak 2004 yılında gösterilmiştir (Ehmer ve diğ., 2004). UGT 1A4'ün 1. ekzonunda yapılan çalışmada 24. kodonda prolin aminoasitinin yerine treonin (P24T), 48. kodonda ise lösin aminoasitinin yerine valin (L48V) geçmesi ile oluşan UGT 1A4*2 ve UGT 1A4*3 alellerinin β -naftilamin, benzidin, trans-androsteron ve dihidrotestesteron substratları üzerindeki

fonksiyonel etkilerine bakılmış ve glükuronidasyon aktivitelerinin düşük olduğu saptanmıştır (Ehmer ve diğ., 2004). Diğer bir çalışmada ise UGT 1A4*3 alelinin klozapin, imipiramin, siproheptadin ve trans-androsteron substratlarının glükuronidasyonunda artmaya yol açarken, tigogeninin farmakokinetiğinde bir düşme eğilimi olduğu belirtilmiştir (Mori ve diğ., 2005).

2.3 İlaçların Metabolizması:

Yağda çözünebilen ilaçlar biyolojik membranlardan kolaylıkla geçerek etki yerlerine ulaşabilmektedirler. Fakat ilaçların vücuttan atılabilmesi suda çözünme özelliği yüksek olan hidrofilik maddelere dönüştürülmeleri gerekmektedir. Çünkü lipofilik maddeler böbreklerde glomerüler filtrasyona uğradıktan sonra büyük oranda renal tübüllerden geri emilmektedirler. Bu nedenle, endojen olarak üretilmeyen, vücuda yabancı, farmakolojik, endokrinolojik veya toksikolojik aktivitesi olan maddeler, biyolojik aktivitelerinin sonlandırılması ve vücuttan atılmaları için hidrofilik maddelere dönüştürülmelidir. Farmakokinetik parametrelerden biri olan biyotransformasyon, ilaçların vücuda alındıkları andan itibaren enzimlerin etkisi ile vücutta kimyasal değişikliklere uğraması olarak tanımlanmaktadır. İlaçlar biyotransformasyon sonucunda çoğu zaman daha az etkili ya da etkisiz hale gelirken, bazen de daha etkili bileşiklere dönüşebilirler. İlacın biyotransformasyon enzimleri ile yıkılarak kendisinden daha etkili ya da etki süresi daha uzun olan metabolitlerinin oluşması organ toksisitesi açısından önem taşıyabilmektedir.

Biyotransformasyon sonucunda ilaçların farmakokinetik özellikleri de değişmektedir. Moleküllerinde daha fazla iyonize olabilen gruplar oluşur ve sonuç olarak vücuttan atılımları daha kolay olan daha polar moleküller ortaya çıkar. Ayrıca enzimlerle yıkılma sonucu meydana gelen metabolitlerin eliminasyon yarılanma ömürleri asıl ilaç molekülününkinden daha kısadır.

Biyotransformasyonda rol alan enzimlerin çoğu karaciğerde yerleşmiş olup, akciğer, böbrekler, mide-bağırsak mukozası, kan ve bağırsak florasındaki bakterilerde de metabolizma enzimleri bulunmaktadır. Ayrıca, enzimlerin etkisi dışında, özellikle pH'a bağlı olarak da ilaçların kimyasal değişime uğrayabileceği unutulmamalıdır. Bazı biyotransformasyon enzimlerinin polimorfik şekilleri bulunmaktadır. Polimorfik olan enzimlerin etkinlikleri de farklıdır. Bu durum enzim

sentezinin hızının farklı olmasından ya da enzimi kodlayan gendeki polimorfizm sonucu, enzimin niteliğinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Enzimin sentez hızının azalması ya da enzimin yapısal olarak bozulması metabolizma hızının azalmasına sebep olabilir. Bu şekilde genetik olarak metabolizma hızı yavaş olan bireyler, ‘yavaş metabolizör’, normal olan bireyler ‘hızlı metabolizör’, enzimin aşırı miktarda sentezlenmesi ya da aktivitesinin normalden yüksek olduğu bireyler ise ‘çok hızlı metabolizör’ olarak isimlendirilmektedir (Kayaalp, 2005).

Biyotransformasyon reaksiyonları ‘faz I reaksiyonları’ ve ‘faz II reaksiyonları’ olmak üzere sınıflandırılmaktadır.

1) Faz I Reaksiyonları:

1. Oksidasyon (yükseltgenme)
2. Redüksiyon (indirgenme)
3. Kopma (hidroliz)

2) Faz II Reaksiyonları:

Konjugasyon

2.3.1. Faz I reaksiyonları:

2.3.1.1. Oksidasyon:

Karaciğer parankim hücresinin mikrozomal P450 (CYP) enzimleri oksidasyon olaylarının büyük oranda katalizörüdür. Bu enzimlere ‘karma fonksiyonlu oksidazlar’ veya ‘monooksijenazlar’ da denir. Farmasötik bileşiklerin biyotransformasyonunda en yaygın olarak sitokrom P450 enzimleri görev almaktadır (Pattern, 2006). Amerika’da 2002 yılında yapılan bir çalışma sonucunda, en yaygın kullanılan 200 ilacın büyük bir kısmının karaciğerde metabolizmaya uğradığı ve bu ilaçların metabolizmasının üçte birinde CYP enzimlerinin görev aldığı gösterilmiştir (Şekil 2) (Williams ve diğ., 2004).

Sitokrom P450 enzimlerinin yaklaşık 20 kadar izoenzimi vardır ve bunlar indüklenebilme özelliklerine ve substrat spesifitelerine göre çeşitli sınıf ve alt sınıflara ayrılmaktadırlar. İlaçların biyotransformasyonu bakımından en çok CYP1, CYP2, CYP3 ve CYP4 sınıfları önem taşımaktadır. Sitokrom P450 enzimleri, ilaçlardan ve diğer ksenobiyotiklerden başka, steroidler, yağ asitleri, safra asitleri, prostoglandinler ve biyojenik aminler gibi endojen maddelerin ve bunlardan

bazılarının prekürsörlerinin oksidatif metabolizmasında ve/veya biyosentezinde de rol oynamaktadırlar. Karaciğer başta olmak üzere akciğer, ince barsak, böbrekler, plasenta ve deri gibi çeşitli dokuların düz endoplazik retikulum membranlarına yerleşmişlerdir (Kayaalp, 1998). Buna ek olarak hem bu hücrelerde hem de vücudun diğer organlarında bulunabilen mikrozomal olmayan bazı enzimler de oksidasyon yapabilir.

Mikrozomal Oksidasyon Reaksiyonları:

- a. Aromatik halkanın hidroksillenmesi
- b. Alifatik hidroksilasyon (yan zincir oksidlenmesi)
- c. N- dealkilasyon, O- dealkilasyon ve S-dealkilasyon
- d. Desülfürasyon (kükürtsüzlenme)
- e. α – metilli aminlerin oksidatif deaminasyonu
- f. S- Oksidasyon
- g. N- oksidasyon
- h. N- hidroksilasyon

Mikrozomal Olmayan Oksidasyon Reaksiyonları:

Karaciğer dahil barsaklar ve kan (plazma) gibi çeşitli dokuları oluşturan hücrelerin mitokondri veya sitoplazmalarında yerleşen enzimler tarafından katalize edilen reaksiyonlardır. Mikrozomal olmayan oksidasyon reaksiyonlarında görev alan enzimler (Kayaalp, 1998):

- a. Flavin içerikli monooksijenaz (FMO)
- b. Monoamin oksidaz (MAO)
- c. Diamin oksidaz (DAO)
- d. Histaminaz
- e. Ksantin oksidaz
- f. Tirozin hidroksilaz
- g. Alkol ve aldehid dehidrojenaz
- h. Hem peroksidaz

2.3.1.2. Redüksiyon (indirgenme):

Oksidasyona oranla ilaç metabolizmasında daha az meydana gelen bir reaksiyondur (Kayaalp, 1998).

- a. Aldehidlerin alkollere dönüşümü
- b. Azo (N-N) grubunun aminlere dönüşümü
- c. Nitro grubunun amin veya hidroksilamin grubuna dönüşümü

2.3.1.3. Kopma (hidroliz):

İlaç molekülünden bir grup koparılır ya da ilaç molekülü kendini oluşturan daha küçük iki moleküle ayrılmaktadır (Kayaalp, 1998).

- a. Hidroliz
- b. Dekarboksillenme
- c. Glikozidlerin hidrolizi
- d. O-dealkilasyon, N-dealkilasyon, S-dealkilasyon

2.3.2. Faz II reaksiyonları:

2.3.2.1. Konjugasyon:

Moleküle fonksiyonel bir grup veya bir molekül katıldığı için faz II reaksiyonlarına ‘konjugasyon’ ya da ‘sentez reaksiyonları’ da denir. Konjugasyon; bazı endojen maddelerin ya doğrudan ksenobiyotiğin kendisine veya faz I reaksiyonları sonucu ortaya çıkan herhangi bir metabolite kovalent bağlarla bağlanarak geçirdiği reaksiyonların tümüdür. Konjugasyon reaksiyonları sonucu ortaya çıkan ürüne de konjugat denir. Bu reaksiyonların amacı, faz I reaksiyonları ile meydana gelmiş olan bir metaboliti veya molekülünde polar gruplar taşıyan, fakat sudaki çözünürlüğü atılım için yeterli olmayan bir ilacı daha polar hale getirmektir. Konjugasyonun sekiz tipi bulunmaktadır (Kayaalp, 1998).

- a. Glükuronik asitle birleşme
- b. N-metilasyon
- c. O-metilasyon
- d. N-asetilasyon
- e. Sülfat ile konjugasyon
- f. Glutatyon ile konjugasyon
- g. Aminoasitler ile konjugasyon
- h. Diğer konjugasyon olayları

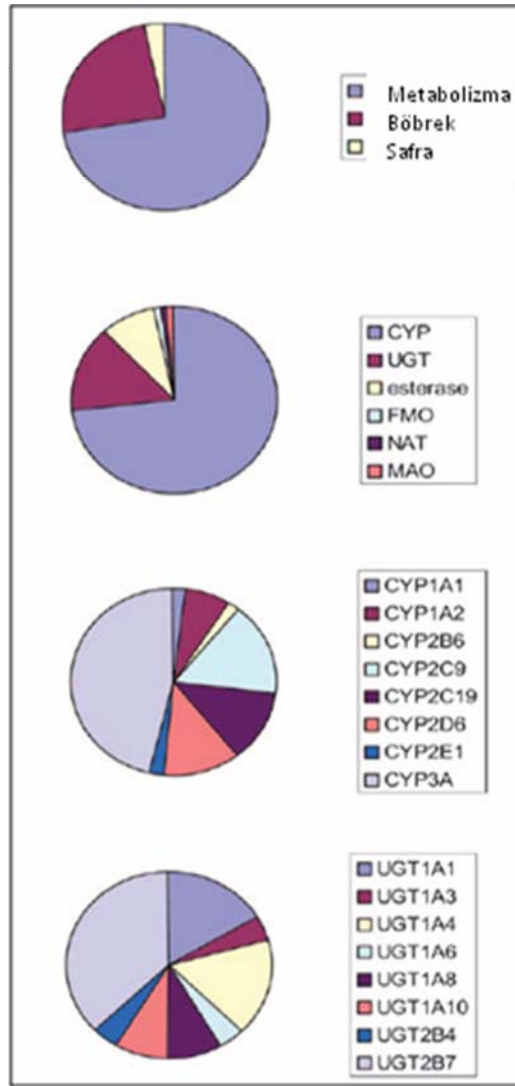
Yukarıdaki reaksiyonlardan glükuronik asit ile birleşme mikrozomal enzimlerce, diğerleri ise mikrozomal olmayan enzimlerce yapılmaktadır.

2.3.2.1.1. Glükuronik asit ile konjugasyon:

Glükuronik asit ile meydana gelen konjugasyon, CYP enzimleri ile katalize edilen metabolizma reaksiyonlarından sonra ilaçların metabolizmasında en sık rol alan reaksiyon türüdür (Williams ve diğ., 2004).

Reaksiyon UGT enzimleri aracılığı ile meydana gelmektedir. Bu enzimler diğer konjugasyon enzimlerinden farklı olarak karaciğer hücrelerinin mikrozomal fraksiyonunda bulunmaktadırlar. Karaciğer enzimleri tarafından metabolize edilen her 13 ilaçtan biri UGT enzimleri aracılığı ile reaksiyona girmektedir (Şekil 2) (Williams ve diğ., 2004). Glükuronik asit hidrofilik özelliğinin belirgin olmasından ötürü, bağlandığı maddenin lipofilikliğini azaltmakta ve vücuttan atılmasını kolaylaştırmaktadır (Kayaalp, 1998). İlaçlar glükuronik asit ile eser ya da ester türünde olmak üzere iki farklı şekilde bağlanmaktadırlar. Karboksilli asitler, ester-glükuronat yaparken alifatik alkoller ise eter-glükuronatlar oluşturmaktadır.

Meydana gelen konjugatların bir kısmı böbrekler yolu ile atılırken, bir kısmı da karaciğer hücreleri aracılığı ile enterohepatik dolaşıma uğramaktadır. Fenol grubu içeren propofol, parasetamol, nalokson gibi ilaçlar, alkol grubu içeren kloramfenikol, kodein, oksazepam gibi ilaçlar, alifatik amin grubu içeren lamotrijin ve amitriptilin gibi ilaçlar, asidik karbon atomları içeren fenilbütazon ve sülfipirazon gibi ilaçlar ve ayrıca karboksilik asit yapısına sahip olan naproksen ve ketoprofen gibi ilaç molekülleri glükuronidasyon ile metabolize edilmektedirler (Kalow, 2001).



Şeki 2. En çok kullanılan 200 ilaç için belirlenen metabolizma şekilleri ve rol alan metabolizma enzimlerinin sınıflandırılması gösterilmektedir. İlaçların metabolizmasında UGT enzimleri CYP enzimlerinden sonra en sık olarak rol alan enzimlerdir (Williams ve diğ., 2004).

2.3.3. UDP-glükuronozil transferaz enzimlerinin farmakogenetikteki rolü:

İlaç metabolizmasındaki en önemli faz II metabolizma enzimleri, UDP-glükuronozil transferaz enzimleridir (Pattern, 2006). UDP-glükuronik asitin Dutton tarafından 1953 yılında izole edilmesinin ardından transferaz proteinlerinin pürifikasyonu ve glükuronadların oluşumu tanımlanmıştır (Dutton ve Storey, 1953; Dutton, 1961; Christian ve diğ., 2008).

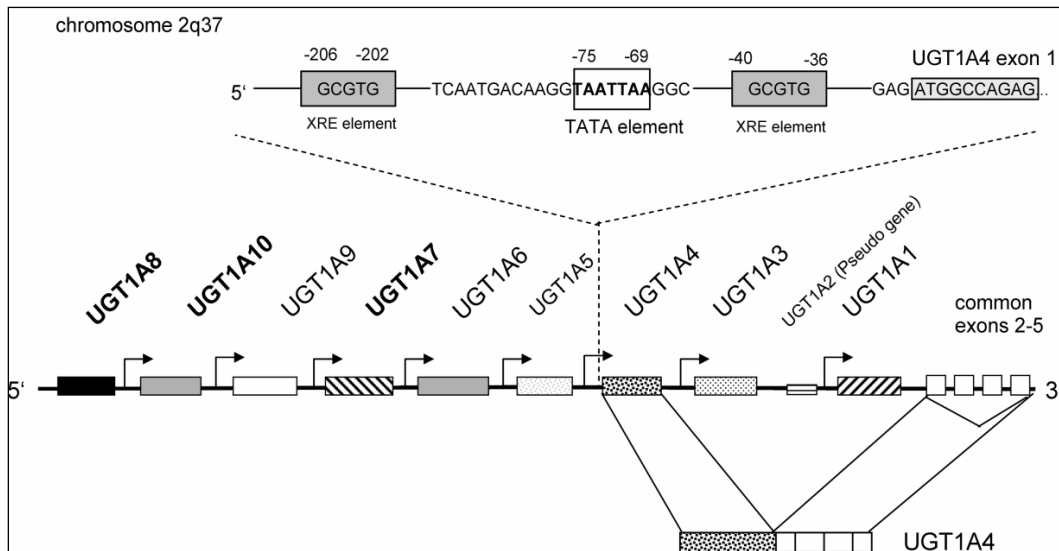
UDP-glükuronil transferaz enzimleri sitokrom P450 enzimleri ile bir çok ortak özelliğe sahip olan, geniş ve multigenik bir enzim ailesidir (Ouzzine ve diğ., 2003). Her iki enzim ailesi de çeşitli endojen ve eksojen moleküllerin fizikokimyasal özelliklerinin değişmesine yol açarak biyotransformasyonda görev almaktadırlar. Genellikle hücrelerin endoplazmik retikulumlarında bulunan UGT enzimleri, başta karaciğer olmak üzere akciğer, beyin, deri ve böbrek gibi diğer organlarda da yerleşmişlerdir (Radomska-Pandya ve diğ., 1999). UDP-glükuronil transferaz enzimleri UDP- α -D-glükuronik asitte bulunan glükuronik asitin, hidroksil, karboksil, amin ya da tiol grubu içeren moleküllere transfer edilmesini katalize etmektedirler (Ouzzine ve diğ., 2003). Reaksiyon sonunda safra ya da idrar yolu ile atılacak olan, hidrofilik özellikteki β -D-glükuronad molekülleri meydana gelmektedir. Glükuronad molekülleri faz II metabolitlerinin yaklaşık % 35'ini oluşturmaktadır (Evans ve Relling, 1999). İlaçların bir çoğu önce faz I metabolizma enzimleri ile katalize edilip sonra faz II enzimleri ile reaksiyona girse de lamotrijin, valproik asit, parasetamol ve morfin gibi ilaçlar direkt olarak glükuronidasyona uğramaktadırlar (Shipkova ve Wieland, 2005).

UDP-glükuronil transferaz enzimleri, yapılarındaki protein sekansının benzerliği dikkate alınarak UGT1, UGT2 olmak üzere iki alt sınıftan oluşmaktadır (Christian ve diğ., 2008). İki ailenin protein sekansı % 50'den daha az bir benzerlik taşımaktadır (Burchell, 2003). UGT enzimlerinin isimlendirmesi enzimin bulunduğu aileden gelmektedir. İlk rakam aileyi, takip eden harf, alt-aileyi, 2. rakam ise enzime spesifik olan numarayı göstermektedir (Christian ve diğ., 2008). Özellikle steroid ve safra asitlerinin glükuronidasyonundan sorumlu olan UGT2 enzimleri, 6 ekzon içerir ve 4q13. kromozom üzerinde yer alırlar (Christian ve diğ., 2008). UGT2 ailesinin üyeleri farklı genlerin ürünleri olup, 2 alt aileye bölünmüşlerdir. UGT2A alt ailesi burun epitelinden izole edilirken, UGT2B alt ailesi insan hepatositlerinde ve ayrıca karaciğer dışındaki dokularda bulunabilmektedir (Turgeon ve diğ., 2001). UGT2B ailesi aktif olan UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11 UGT2B15, UGT2B17 enzimleri ve aktivitesi bulunmayan UGT2B24P, UGT2B25P, UGT2B26P, UGT2B27P ve UGT2B29P enzimleri olmak üzere toplam 11 üyeden oluşmaktadır (Turgeon ve diğ., 2001).

İlaçların metabolizmasında sitokrom P450 enzimlerinden sonra, % 35'lik bir oran

ile en çok UGT2B7 rol alırken, hemen arkasından % 20'lik bir oran ile UGT1A4 gelmektedir (Şekil 2) (Williams ve diğ., 2004).

Onüç farklı izoenzimi (UGT1A1-UGT1A13) olan UGT1A enzimleri 2q37. kromozom üzerindedirler (Thomas ve diğ., 2006). Fonksiyonel olarak aktif olan UGT1A enzimleri, UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9 ve UGT1A10 enzimleridir. UGT1A2P, UGT1A11P, UGT1A12P ve UGT1A13P enzimleri ise aktif değildir (Mackenzie ve diğ., 2005a). UGT2A1 ve UGT2A2 enzimleri farklı olan 1. ekzonlarının dışında 5 ekzon tarafından kodlanırken, UGT2A3 enzimi ve UGT2B ailesinin üyeleri birbirinden farklı 6 ekzon içermektedir. UGT1A enzimlerinin 1. ekzonları farklı iken, 2-5. ekzonları ortak olarak bulunmaktadır (Şekil 3) (Tukey ve Strassburg, 2000). Ortak olarak bulunan 2-5. ekzonları proteinin karboksil terminalini kodlarken, UGT enzimlerinde farklılığı ortaya çıkaran 1. ekzonlar ise proteinin amino terminalini kodlamaktadır. Her iki UGT ailesi izoformları da, özellikle UGT proteininin karboksil bölümünde daha fazla dizi benzerliği göstermektedir. Daha değişken olabilen amino bölümünün ise UGT enzimlerinin substrat spesifikliğinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Meech ve Mackenzie, 1997).



Şekil 3. UGT1A enzimlerini kodlayan UGT1A gen lokusu gösterilmektedir. Birbirinden farklı olan 1. ekzonlar, kromozomun 5' ucunda yerleşirken, ortak olan 2-5. ekzonlar, kromozomun 3' ucunda izlenmektedir. Ayrıca UGT1A4'ün mRNA'sının transkripsiyonu örnek olarak gösterilmektedir (Christian ve diğ., 2008).

UGT1A gen lokusunun genetik organizasyonu dokuya özgü gen ekspresyonu dikkate alınarak, hepatik ve ekstrahepatik olmak üzere sınıflandırılabilir. UGT1A enzimlerinde farklılık yaratan birinci ekzonlar, özellikle hepato-gastrointestinal sistemde çalışılmış ve izole edilmiştir. UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6 ve UGT1A9 karaciğerde tanımlanırken, UGT1A7 özafagus ve mide, UGT1A8 özafagus ve kolon, UGT1A10 ise özafagus, safra, mide ve kolonda saptanmıştır (Strassburg ve diğ., 1997; 1998a; 1998b; 1999a; 1999b; 2000).

UGT enzimlerinin genetik polimorfizimleri toksikolojik, farmakolojik ve fizyolojik öneme sahiptir (Miners ve diğ., 2002). Varyant olan genler bir asteriks ile genden ayrılarak ifade edilmektedir (Örnek: UGT1A1*2, UGT1A7*3... vb). UGT genine spesifik olan yabancı tip alel, sekanslanan ilk alel gibi tanımlanmakta ve '*1' şeklinde gösterilmektedir. Nadir olan varyant diziler ise '*1a ve *1b' şeklinde ifade edilmektedir (Strassburg ve diğ., 2008).

UGT1A geni yaklaşık 200 kb'lık (1 kb= 1000 nükleotide eşit olan DNA fragmanı) alan kaplamaktadır. Yapılan bir çok genotipleme ve sekans verisi, UGT1A gen bölgesinde genetik varyasyonun çok sık olduğunu göstermiştir. UGT1A genlerinin genotiplemesi sonucunda özellikle UGT1A genlerini kodlayan promotör bölgelerde 100'den fazla SNP saptanmıştır. Bu polimorfizmlerin birbirinden bağımsız oldukları ve genel popülasyonda % 40-50'ye varan frekanslarda bulunabildikleri gösterilmiştir (Ehmer ve diğ., 2004; Thomas ve diğ., 2006). Fonksiyonel aktiviteleri değişmiş olan UGT1A varyantları protein ekspresyonu (Ehmer ve diğ., 2004) ile ya da transkripsiyondaki düzenleme ile glükuronidasyonu etkileyebilmektedirler (Lankisch ve diğ., 2005). İlaç metabolizması üzerindeki bu olası etkiden ötürü, UGT genleri, farmakolojik olarak incelenmelidir.

2.3.3.1. UGT1A1 enzimi:

UGT1A1 enzimi 1991 yılında izole edilmiştir (Meech ve Mackenzie, 1997). Suda çözünebilen bilirubin glükuronatlarını oluşturabilen tek fizyolojik enzimdir (Bosma ve diğ., 1994). Bilirubin glükuronidasyonunun dışında 2-hidroksi-östron ve östradiol, etinilöstradiol, gemfibrozil, irinotesan metabolitleri, simvastatin ve buprenorfin gibi çeşitli ilaçların metabolizmasında da görev almaktadır (Strassburg ve diğ., 2008)(Ehmer U et al, 2004)

Ayrıca N-hidroksi-2-amino-1-metil-6-fenilimidazol-piridin ve benzo(α)pirenler gibi mutajenik olan ksenobiyotiklerin konjugasyon ve detoksifikasyonundan sorumludur (Fang ve Lazarus, 2004). Bu nedenle UGT1A1 enziminin polimorfizmleri hem ilaç metabolizması hem de çevresel mutajenler açısından önemlidir.

Özellikle promotör bölgede gözlenen UGT1A1*28 varyantının UGT1A1 enziminin aktivitesini % 70 oranında azaltmakta olduğu, UGT1A1*36 varyantının ise enzim aktivitesini arttırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. UGT1A1*37 varyanı ise Crigler-Najjar hastalığı ile ilişkili olarak bulunmuştur (Beutler ve diğ., 1998). Ayrıca UGT1A1*28 varyantının frekansının bölgesel farklılık göstermesi, UGT1A1 enziminin varyantlarında etnik farklılıkların önemini ortaya koymuştur.

2.3.3.2. UGT1A3 enzimi:

UGT1A3 enzimi 1992 yılında izole edilmiştir (Meech ve Mackenzie, 1997). Poliaromatik hidrokarbonlar gibi ksenobiyotiklerin, aminlerin, ibuprofen, flurbiprofen ve ketoprofen gibi non-steroidal antienflamatuvar ilaçların, ayrıca safra asitleri, östrojenler, vitamin D deriveleri, ezetimib ve trombosit derivesi büyüme faktörü reseptörü gibi maddelerin metabolizmasında görev almaktadır (Mojarrabi ve diğ., 1996; Green ve diğ., 1998; Kuehl ve diğ., 2005; Kasai ve diğ., 2005).

UGT1A3 geninin 1. ekzonunda yer alan genetik polimorfizmleri sonucunda UGT1A3*2 ve UGT1A3*3 gibi alelleri tanımlanmış ve bu alellerin UGT1A3 proteinin ekspresyonunu fonksiyonel olarak değiştirdiği saptanmıştır (Iwai ve diğ., 2004). Özellikle Kafkaslarda varyant genlerin sıklıkla gözlenmesi ve aktivite profilinin değişiklik göstermesi UGT1A3 geninin ilaç metabolizması ve kansere eğilim üzerinde önemli olabileceğini göstermiştir.

2.3.3.3. UGT1A4 enzimi:

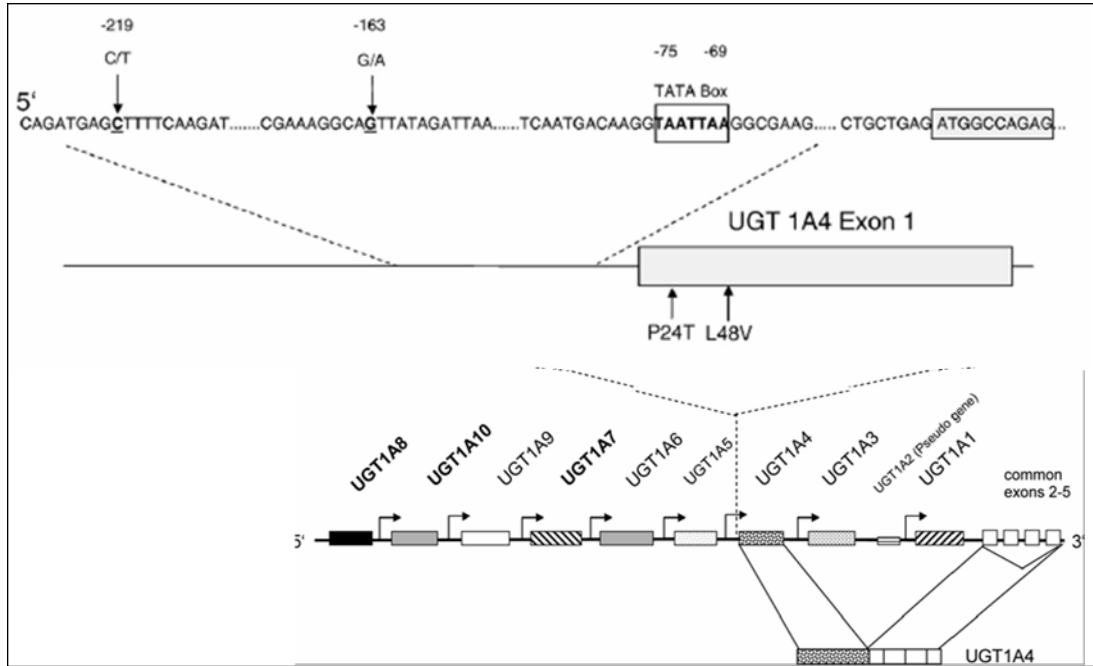
Ritter ve arkadaşları tarafından 1991 yılında klonlanan (Ritter ve diğ., 1991) UGT1A4 geni öncelikle karaciğerde eksprese edilmektedir. Ayrıca safra kanalında, kolon ve ince bağırsakta da ekspresyonu gerçekleşmektedir (Strassburg ve diğ., 1998a; 2000). Amitriptilin, imipiramin (Green ve Tephly, 1996), lamotrijin (Hiller ve diğ., 1999), klozapin (Mori ve diğ., 2005), nikotin (Tricker, 2003), tamoksifen (Sun

ve diğ., 2006), trans-androsteron (Ehmer ve diğ., 2004) ve akciğer kanserojeni olan 4-(metilnitrozamin)-1-(3-piridil)-1-butanol'ün (Wiener ve diğ., 2004) biyotransformasyonunda rol almaktadır.

UGT1A4 enziminin amino asit değişikliği sonucu enzim aktivitesini etkileyebilecek çeşitli genetik polimorfizmleri saptanmıştır (Tablo 5). UGT 1A4'ün 1. ekzonunda yapılan çalışmada 70. nükleotidde sitozin (C) yerine adenin (A) geçişi ile olan baz değişikliği, 24. kodonda prolin aminoasitinin yerine treonin aminoasitinin (P24T) gelmesine neden olurken, 142. nükleotidde timin (T) yerine guanin (G) bazının geçişi 48. kodonda lösin aminoasitinin yerine valin aminoasitinin (L48V) yerleşmesine neden olmuştur. P24T değişimi UGT 1A4*2 aleli, L48V değişimi ise UGT 1A4*3 alelini temsil etmekte olup, sırası ile popülasyonda % 8 ve % 9 oranında gözlemlendikleri bildirilmiştir (Ehmer ve diğ., 2004) (Şekil 4). Aynı çalışmada polimorfik enzimlerin β -naftilamin, benzidin, trans-androsteron ve dihidrotestesteron substratları üzerindeki fonksiyonel etkilerine bakılmış ve glükuronidasyon aktivitelerinin düşük olduğu saptanmıştır. Varyant enzimlerin aktivitelerinin ölçülmesi sonucunda yalnızca aktivite seviyesinin değişmediği, bu aktivite değişiminin substrat spesifikliğı gösterdiği saptanmıştır. UGT1A4*2 enzimi ksenobiyotiklerin glükuronidasyonunu daha çok etkilerken, UGT1A4*3 enzimi steroid hormonlara karşı daha düşük aktiviteli olarak bulunmuştur. UGT1A4*1 olan yabanıl enzim ise her iki substrata karşı aktiftir.

Diğer bir çalışmada ise UGT 1A4*3 alelinin klozapin, imipiramin, siproheptadin ve trans-androsteron substratlarının glükuronidasyonunda bir artış gösterdiği, tigogeninin farmakokinetiğinde ise bir düşme eğilimi olduğu belirtilmiştir (Mori ve diğ., 2005).

Kore'li bir grup tarafından yapılan bir çalışmada UGT1A4*2 ve UGT1A4*3 alellerinin lamotrijin kullanan epilepsili hastalarda görülen döküntü ile ilişkisinin olup olmadığına bakılmıştır. Çalışmaya katılan hastalarda P24T polimorfizmine hiç rastlanmazken, L48V polimorfizmi saptanmasına rağmen döküntü üzerinde bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Kim ve diğ., 2006).



Şekil 4. UGT1A ailesinin enzimleri ve UGT1A4 enziminin 1. Ekzonunun DNA dizisi ve P24T ve L48V polimorfizmleri ayrıca gösterilmektedir (Erichsen ve diğ., 2008).

2.3.3.4. UGT1A6 enzimi:

İlk kez 1988 yılında tanımlanan UGT1A6 enzimi serotoninin, 4-aminobifenil ve β -naftilamin gibi karsinojenik etkisi olan çeşitli benzopiren metabolitlerinin ve asetaminofen gibi sıklıkla kullanılan ilacın glukuronidasyonundan sorumludur (Bockve diğ., 1993; Krishnaswamy ve diğ., 2003; Bock ve Kohle, 2005).

UGT1A6 enziminin genetik varyantlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini değerlendiren çalışmalarda UGT1A6*2a ve UGT1A6*8 alellerinin birbirine karşıt yönde etkileri olduğu gösterilmiştir (Erichsen ve diğ., 2008).

2.3.3.5. UGT1A7 enzimi:

UGT1A7 enzimi 1995 yılında izole edilmiştir (Meech R, Mackenzie, 1997). Karsinojenik olduğu bilinen hidroksile benzo(α)pirenler gibi poliaromatik hidrokarbonların ya da 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol gibi heterosiklik aminlerin metabolizmasında görev almaktadır (Erichsen ve diğ., 2008). Yapılan çalışmalarda

UGT1A7 enziminin düşük aktivite gösteren polimorfik aleli olan UGT1A7*3 enziminin kanserojen maddelerin etkinliğini arttırabileceği saptanmıştır.

2.3.3.6. UGT1A8 enzimi:

UGT1A8 enzimi 1995 yılında izole edilmiştir (Meech R, Mackenzie, 1997). Hem kumarinlerin, antrakınonların ve östrojenlerin metabolizmasında, hem de 4-aminobifenil gibi karsinojen etkisi olan maddenin metabolizmasında rol oynamaktadır. Genetik polimorfizm çalışmaları sonunda UGT1A8 enziminin özellikle UGT1A8*2 alelinin % 15-59 oranı ile sık olarak saptandığı fakat enzim aktivitesinin normal olduğu, % 1-2 oranında saptanabilen UGT1A8*3 alelinin ise önemli ölçüde düşük bir aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Erichsen ve diğ., 2008).

2.3.3.7. UGT1A9 enzimi:

UGT1A9 enzimi 1991 yılında izole edilmiştir. Asetaminofen gibi non-steroidal antienflamatuar ilaçların, çeşitli antikanser ajanların ve bazı mutajenik olan arilaminlerin metabolizmasında görev almaktadır (Yueh ve diğ., 2001; Girard ve diğ., 2006). UGT1A9 enziminin promotör bölgesinde yüksek frekanslarda saptanabilen bir çok UGT1A9 aleli bulunmaktadır. Ayrıca ekzon bölgesinde de düşük frekanslarda olan ve etnik farklılıklar gösteren tek nokta polimorfizmleri çalışılmıştır. UGT1A9*3-UGT1A9*5 alellerinin düşük enzim aktivitesi ile çalıştıkları gösterilmiştir (Saeki ve diğ., 2003).

2.3.3.8. UGT1A10 enzimi:

UGT1A10 enzimi 1995 yılında izole edilmiştir (Meech ve Mackenzie, 1997). Özellikle immunosupresan mikofenolik asit, çeşitli antikanser ilaçları, selektif östrojen reseptör modülatörü olan raloksifen, antidiyabetik ajan troglitazon, noradrenerjik β 1-reseptör aktivatörü olan dobutamin ve non-selektif β -adrenerjik blokör olan propranolol gibi ilaçların metabolizmasında yer almaktadır (Strassburg ve diğ., 2008). UGT1A10 geninin 1. ekzonunda yapılan çalışmalarda, düşük frekanslı olan dokuz farklı tek nokta polimorfizmi saptanmıştır (Erichsen ve diğ., 2008).

2.3.3.9. UGT2 ailesi enzimleri:

UGT2B4 enzimi 1987 yılında, UGT2B7 enzimi ise 1990 yılında izole edilmiştir. UGT2B7 enzimi morfin ve karboksilik asit içeren ilaçların metabolizmasından sorumludur. Bugüne kadar UGT2B7 enziminin promotör bölgesine ait olan 8 farklı polimorfizm rapor edilmiştir. Fakat şu ana kadar özellikle morfin metabolizmasını etkileyen bir polimorfizme rastlanmamıştır (Mackenzie ve diğ., 2005b). Ayrıca UGT2B7 enziminin lamotrijin metabolizmasının küçük bir bölümünden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Shipkova ve Wieland, 2005).

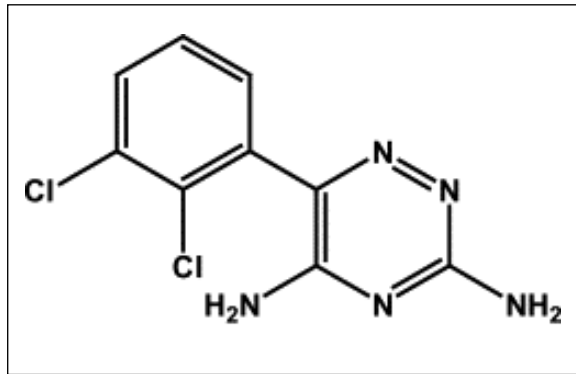
Tablo 5. UGT1A4 enziminin alelleri ve bu alellerin aktiviteleri

Alel	Nükleotid değişimi	Aminoasid değişimi	Fonksiyon	Aktivite (in vivo)	Aktivite (in vitro)	Referans
UGT1A4*1a	Referans sekans		Yabanıl tip	Normal	Normal	
UGT1A4*1b	471 (C>T)	C157C	Sessiz			Saeki M, 2005
UGT1A4*1c	-219 (C>T) / -163 (G>A)/448(T>C)/804(G>A)/ IVS1+43(C>T)	L150L/P268 P				Saeki M, 2005
UGT1A4*1d	IVS1+101(G>T)					Saeki M, 2005
UGT1A4*1e	30(G>A)	P10P	Sessiz			Saeki M, 2005
UGT1A4*1f	357(T>C)	N119N	Sessiz			Saeki M, 2005
UGT1A4*1g	-217(T>G)					Saeki M, 2005
UGT1A4*1h	-36(G>A)					Saeki M, 2005
UGT1A4*1i	IVS1+98(A>G)					Saeki M, 2005
UGT1A4*2	70(C>A)	P24T			Substrata özgü (Ehmer U, 2004)	Weiner D, 2004
UGT1A4*3a	-219(C>T)/-163(G>A)/142(T>G)	L48V			Transkrip. azalma	Weiner D, 2004
UGT1A4*3b	142(T>G)	L48V			İndüklenebilm. azalma	Saeki M, 2005
UGT1A4*4	31(C>T)	R11W			Aktivitede düşme (Ehmer U, 2004)	Saeki M, 2005
UGT1A4*5	127delA/142(T>G)	43fsX22	Çerçeve kayması			Saeki M, 2005
UGT1A4*6	175delG/325(A>G)	59fsX6	Çerçeve kayması			Saeki M, 2005
UGT1A4*7	-219(C>T)/163(G>A)/142(T>G)/271(C>T)/448(T>C)/804(G>A)/ IVS1+43(C>T)	L48V/R91C/ L150L/P268 P				Saeki M, 2005
UGT1A4*8	IVS1+1(G>T)		Bağlantı hatası			Saeki M, 2005

2.4. Lamotrijin:

Kimyasal adı C₉ H₇ Cl₂ N₅ olan lamotrijin (LTG: 3,5-diamino-6-(2,3-diklorofenil)-1,2,4 triazin), moleküler ağırlığı 256.09 Dalton, su ya da alkoldeki çözünürlüğü düşük, tatsız, kokusuz, beyaz toz halinde, feniltriazin türevi kimyasal bir maddedir (Biton, 2006) (Şekil 5). İlk önce epilepsi tedavisi gören hastalarda gelişen folik asit düzeylerinin düşmesi sebebi ile folat antagonisti bir ajan olarak geliştirilmiştir. Fakat antifolat aktivitesi ile antiepileptik aktivitesi arasında bir bağlantı bulunmamaktadır. Lamotrijin zayıf bir folat antagonisti olup, hayvan nöbet modellerinde, fenitoin ve karbamazepin aktivitelerine benzer bir aktivite göstermektedir (Kuo, 1998; White, 1999).

Lamotrijinin parsiyel epilepsi nöbetlerinde kullanılması İngiltere’de 1991 yılında, Amerika’da ise 1994 yılında olmuş, daha sonraları ise dünyanın geri kalan bölgelerinde giderek yaygınlaşan bir şekilde yerini almıştır (Matsuo, 1999). Parsiyel epilepsi nöbetlerinde kullanılmasının dışında, jeneralize epilepsi nöbetleri olan erişkinlerde ve 11 yaşından büyük olan çocuklarda, Lennox-Gastaut sendromu olan 2 yaşından büyük çocuklarda, ayrıca monoterapiye yanıt vermeyen epilepsili hastalarda da kabul gören ve tercih edilen bir ilaç olmayı başarmıştır (Stefan ve Feuerstein, 2007).



Şekil 5. Lamotrijinin kimyasal yapısı gösterilmektedir (Bialer ve diğ., 2002).

Lamotrijin, epilepsi nöbetlerinin kontrolünün dışında, bipolar bozukluk, şizoaffektif bozukluk ve post-travmatik stres bozukluğunda kullanılabilirken, tedaviye dirençli depresyonda ek tedavi olarak da karşımıza çıkmaktadır (Srichaiya ve diğ., 2008).

2.4.1. Lamotrijinin etki mekanizması:

Epilepsi nöbetlerinin tedavisinde kullanılan antikonvülsan ilaçlar, voltaja bağlı iyon kanallarının modülasyonunu sağlayarak, sinaptik inhibisyonu tetikleyerek, ya da sinaptik eksitasyonu inhibe ederek etkilerini göstermektedirler.

Lamotrijinin temel etkisi sodyum kanalları üzerinedir (Stefani ve diğ., 1998b). *In vitro* çalışmalarda lamotrijinin presinaptik olarak glutamat ve aspartat gibi nörotransmitterlerin serbestleşmesini engellediği, post sinaptik olarak ise özellikle yapılan *in vitro* hayvan çalışmalarında nöronların eksitabilitesini azalttığı gösterilmiştir (Stefani ve diğ., 1997). Sodyum kanalları üzerine olan etkisi dışında, lamotrijinin yüksek voltajlı kalsiyum kanallarının aktivitesini düşürmesi ile ilgili çalışmalar da literatürde yer almaktadır (Stefani ve diğ., 1997; 1998b).

2.4.2. Lamotrijinin farmakokinetik özellikleri:

Lamotrijinin farmakokinetik özellikleri yetişkin hastalarda yaygın olarak çalışılmış olmasına rağmen, çocuklardaki veriler henüz yeterince kapsamlı bir düzeye ulaşamamıştır (Tablo 6).

Tablo 6. Lamotrijinin farmakokinetik özellikleri (Garnett, 2002; Srichaiya ve diğ., 2008)

Emilim	Cmaks 1-3 saat
Biyoyararlanım	% 98
Proteine bağlanma	% 55
Vd (Dağılım hacmi)	0,9-1,3 L/kg
Metabolizma	Glükuronidasyon (UGT1A4 enzimi)
Eliminasyon yarılanma ömrü (t ½)	Ortalama 22 saat
Enzim indükleyici bir ilaçla birlikte	14 saat
Enzim inhibe edici bir ilaçla birlikte	> 60 saat
Klirens	42 ml/dakika

2.4.2.1. Emilim ve dağılımı:

Lamotrijin lipofilik özellikte zayıf bir baz olup, oral yolla absorpsiyonu iyidir. İlk geçiş etkisine uğramaz ve sağlıklı erişkin gönüllülerde saptanan mutlak biyoyararlanımı % 98'dir (Yuen ve Peck, 1988). Biyoyararlanımı yiyeceklerden etkilenmez.

Lamotrijin lineer bir farmakokinetiğe sahiptir. Epilepsisi olan çocuklarda ve erişkinlerde yapılan çalışmalarda, lamotrijinin ortalama maksimum plazma konsantrasyonu (Cmaks) ve plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi altında kalan alan (AUC) değerleri, 30-450 mg arasında değişen lamotrijin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak bulunmuştur (Peck, 1991; Rambeck ve Wolf, 1993). Oral yolla alınan lamotrijinin maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşması erişkinlerde 1-3 saat iken, çocuklarda 1-6 saattir. Ortalama Cmaks değeri, 120 mg tek bir oral doz lamotrijin uygulanan erişkinlerde 1,6 mg/L iken, 2 mg/kg tek bir oral doz lamotrijin alan çocuklarda 1,48 mg/L olarak saptanmıştır.

Lamotrijin düzenli ve yaygın olarak dağılır. Hayvan çalışmalarında lamotrijinin tüm organ ve dokulara yaygın olarak dağıldığı gösterilirken, insanlarda farklı organ dağılımları ile ilişkili net bir bilgi henüz yoktur. Ayrıca lamotrijin plasentadan geçebilmekte ve anne sütü ile atılabilmektedir (Biton, 2006).

In vitro çalışmalar lamotrijin plazma konsantrasyonu 1-4 mg/L arasındaki değerlerde ise lamotrijinin % 55 olan plazma proteinlerine bağlanma oranının değişmediğini göstermiştir (Miller ve diğ., 1986). Dağılım hacmi sağlıklı erişkinlerde

1,2 L/kg olup, çocuklarda 1,5 L/kg olarak belirlenmiştir. Dağılım hacmi dozdan bağımsız olup, tek doz ya da yineleyen doz lamotrijin kullanımında epilepsili hastalar ya da sağlıklı gönüllüler arasında farklılık göstermez.

2.4.2.2. Metabolizma ve eliminasyonu:

Tek doz uygulanan lamotrijinin % 70'inin metabolizması karaciğerde faz II reaksiyonu olarak bilinen glukuronidasyon ile meydana gelmektedir (Parsons ve diğ., 1995) (Şekil 6, Tablo 8). Lamotrijinin glukuronidasyonu UGT1A4 enzimi ile gerçekleşirken, UGT2B7 enziminin de minimal bir rol oynadığı düşünülmektedir (Rowland ve diğ., 2006). Oluşan metabolitleri farmakolojik olarak inaktif oldukları düşünülen 2-N-glukuronid (% 80-90 oranında), 5-N-glukuronid ve 2-N-metildir. Oral dozun yaklaşık % 2'si feçes ile atılırken, % 10 oranında lamotrijin ise böbreklerden elimine olmaktadır.

Lamotrijinin plazma klirensi bireyler arasında özellikle yaşa ve kullanılan lamotrijin dışı ilaçlara bağlı olarak farklılık göstermektedir. Lamotrijin ile monoterapi altında olan 5 yaşın altındaki çocuklarda, plazma klirensi erişkinlerinkinin 2-3 katı olarak belirlenmiştir (Elwes ve Binnie, 1996). Ayrıca hamileliğin 2 ve 3. trimestrinde lamotrijin klirensinde artış olduğu belirlenmiştir. Eliminasyon yarılanma ömrü 23-37 saat arasında değişen lamotrijinin, çocuklarda da benzer değerlerde seyrettiği saptanmıştır. Lamotrijinin eliminasyon hızı lamotrijinin plazma konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak arttığı için 1. derece kinetiğe uymaktadır.

Lamotrijinin kendi metabolizması üzerinde büyük bir rol oynayan UGT1A4 enzimi üzerinde indükleyici bir etkisi olduğu ve bu nedenle kendi metabolizması üzerinde bir indüksiyona neden olduğu konusunda yapılmış çalışmalar vardır. Bazı çalışmalar tedavi başlangıcından kararlı duruma ulaşmaya kadar, eliminasyon yarılanma ömründe % 25'lik bir düşüş olurken, klirensinin % 37 oranında arttığını göstermiştir (Buck, 1999). Benedetti'nin (2000) yaptığı bir çalışma ile lamotrijinin zayıf bir indükleyici olduğu saptanırken, bir diğer çalışmada lamotrijinin otoindüksiyon ile plazma konsantrasyonunu % 17,3 oranında düşürdüğü ve Asya'lılarda beyaz ırka göre % 28,7 oranında daha düşük bir lamotrijin klirensi saptandığı gösterilmiştir (Hussein ve Posner, 1997).

Lamotrijin metabolizması için önemli olabilecek bir faktör de UGT1A4 enziminin genetik polimorfizm göstermesidir. Yapılan çalışmalarda UGT1A4 enziminin 2 ve 3. alelinin fonksiyonel olarak da önemli olabileceği ve aktivitelerinin substrata göre değişkenlik gösterebileceği sonucuna ulaşılmıştır. Çalışmamızda bu alellerin lamotrijin kullanan epilepsili hastalardaki sıklığına ve bu polimorfizmlerin lamotrijinin plazma konsantrasyonu üzerindeki etkisine bakılacaktır.

2.4.3. İlaç etkileşimleri:

Lamotrijin monoterapi olarak kullanılsa da klinikte genellikle diğer bir antiepileptik ilaç ile birlikte uygulanmaktadır. Bu yüzden diğer antiepileptikler ve epilepsi dışında kullanılan diğer ilaçlarla olan etkileşimi önem taşımaktadır.

Lamotrijinin diğer antiepileptik ilaçlar üzerinde minimal bir etkisi varken, lamotrijinin farmakokinetik özellikleri özellikle eski antiepileptiklerin neden olduğu farmakokinetik ve farmakodinamik etkileşimler ile değişebilmektedir.

2.4.3.1. Farmakokinetik etkileşimler:

Glükuronidasyonu inhibe etme özelliğine sahip olan valproik asitin lamotrijin ile birlikte kullanımı ile lamotrijinin eliminasyon yarılanma ömrünün yaklaşık 2 katı kadar artması ve klirensinin düşmesi sonucunda plazma konsantrasyon düzeyinin yükselmesi en belirgin ve en çok çalışılmış olan farmakokinetik etkileşmedir (Yau ve diğ., 1992; Yuen ve diğ., 1992). Tek başına valproik asit ile birlikte uygulandığında lamotrijinin eliminasyon yarılanma ömrünün yaklaşık 70 saate kadar uzayabildiği bilinmektedir (Tablo 7). Bu etkileşmenin lamotrijin gibi valproik asitin metabolizmasının da büyük bir bölümünden UGT1A4 enziminin sorumlu olması ve yarışmalı bir inhibisyon meydana gelmesi nedeni ile olduğu düşünülmektedir (Tablo 8).

Karaciğer enzimlerini indüklemeye özellikleri olan fenitoin, karbamazepin, fenobarbital gibi diğer antiepileptikler ve oral kontraseptifler lamotrijinin eliminasyon yarılanma ömrünü düşürerek plazma konsantrasyonunun azalmasına neden olmaktadır (Tablo 7) (Garnett, 2002). Enzim indükleyici ilaçlarla birlikte alındığında lamotrijinin eliminasyon yarılanma ömrünün yaklaşık 14 saate kadar düştüğü bildirilmiştir. Felbamat, gabapentin, levatirasetam, topiramet gibi yeni

antiepileptik ilaçların ise herhangi bir etkisi saptanmamıştır (Weintraub ve diğ., 2005).

Tablo 7. İlaçların lamotrijin metabolizması üzerindeki farmakokinetik etkileri (Garnett, 2002)

İlaç	Etki	Mekanizma
Antiepileptikler		
Fenitoin	t1/2'yi düşürür, klirensi yükseltir	Enzim indüksiyonu
Karbamazepin	t1/2'yi düşürür, klirensi yükseltir	Enzim indüksiyonu
Fenobarbital	t1/2'yi düşürür, klirensi yükseltir	Enzim indüksiyonu
Metsüksimid	t1/2'yi düşürür, klirensi yükseltir	Enzim indüksiyonu
Okskarbazepin	t1/2'yi düşürür, klirensi yükseltir	Enzim indüksiyonu
Valproik asit	t1/2'yi yükseltir, klirensi düşürür	Enzim inhibisyonu
Felbamat	Etkisi yok	
Diğer ilaçlar		
Rifampisin	t1/2'yi düşürür, klirensi yükseltir	Enzim indüksiyonu
Asetaminofen	t1/2'yi düşürür, klirensi yükseltir	Enzim indüksiyonu
Sertralin	t1/2'yi düşürür, klirensi yükseltir	Enzim indüksiyonu

2.4.3.2. Farmakodinamik etkileşimler:

Lamotrijinin diğer antiepileptiklerle birlikte kullanıldığında epilepsi nöbetinin sıklığında bir azalma olduğu bu yüzden de lamotrijinin yaygın bir spektruma sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Matsuo, 1999). Özellikle lamotrijinin valproik asitle birlikte kullanılmasının parsiyel nöbetlerde ya da tonik-klonik nöbetlerde sinerjistik bir yanıt oluşturduğu saptanmıştır (Brodie ve Yuen, 1997).

Lamotrijin ve karbamazepin birlikte kullanıldığında karbamazepinin yan etkilerinin arttığı ve bu durumun santral sinir sistemindeki reseptör bölgelerinin farmakodinamik etkileşimden etkilenmesi nedeni ile olabileceği gösterilmiştir (Wolf, 1992).

2.4.4. İstenmeyen etkileri:

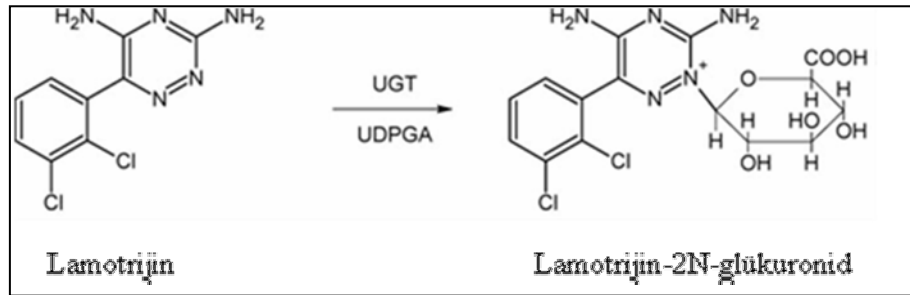
Lamotrijin genellikle hem çocuk hem de erişkin hastalarda iyi tolere edilebilen bir epilepsi ilacıdır. Lamotrijinin en sık görülen yan etkisi döküntüdür (Meesenheimer

ve Guberman, 2000). Lamotrijin kullanan hastaların % 10'unda döküntü ile karşılaşmaktadır. Döküntü bazı hastalarda Stevens-Johnson ya da Lyell sendromu gibi ciddi durumlara yol açabilir. Bir çok hastada döküntü geri dönüşümlü olsa da, başladığı anda ilacın kesilmesi önerilmektedir. Özellikle lamotrijinin valproik asitle birlikte kullanılması, doz titrasyonunun hızlı yapılması, ya da başlangıç dozunun yüksek olması durumlarında döküntü görülmesi olasılığı yüksektir.

Monoterapi olarak ya da ek tedavi olarak kullanıldığında, doza bağımlı olarak, baş dönmesi, bulantı-kusma ve baş ağrısı yaygın olarak karşılaşılan istenmeyen etkileri arasındadır (Biton, 2006). Ayrıca diplopi, idiyosenkratik trombositopeni, lökopeni ve transaminaz düzeylerinde yükselme gibi yan etkileri de görülebilmektedir. Uyku bozuklukları hastaların % 6,4'ünde saptanırken, lamotrijinin sabah ya da öğlen saatlerinde alınması bu durumu engellemektedir (Sadler, 1999).

Lamotrijinin teratojenik etkisi hayvanlarla yapılan çalışmalarda saptanamazken, klinik çalışmalardan elde edilen veriler yetersiz düzeydedir.

İstenmeyen etkilerinin dışında lamotrijin, duygu durumu stabilizatörü olarak bipolar bozuklukta kullanılabilmektedir. Ayrıca lamotrijin kullanan epilepsili hastalarda lamotrijinin antidepresif etki gösterdiği ve kognitif performansı arttırdığı bildirilmiştir (Uvebrant ve Bauzine, 1994).



Şekil 6. Lamotrijin metabolizması gösterilmektedir (Rowland ve diğ., 2006).

Tablo 8. Antiepileptik ilaçların metabolizma şekilleri (Cassandra ve diğ., 2006; Löscher ve diğ., 2008)

AED	Eliminasyon yarılanma ömrü (saat)	Eliminasyon şekli
Karbamazepin	12-24	CYP3A4, CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C19, CYP2D6, UGT1A6
Etosüksimid	36-60	CYP3A4, % 10-20 renal
Felbamat	14-23	% 40-60 renal, CYP2E1, CYP3A4, CYP2C9
Gabapentin	5-7	% 95 renal
Lamotrijin	24-36	% 70 UGT1A4, % 10 renal
Levatisasetam	6-8	% 66 renal, kanda nonhepatik hidroliz
Okskarbazepin	1-2	redüksiyon
Fenobarbital	72-96	CYP2C19, glükuronidasyon, % 25 renal
Fenitoin	20-50	CYP2C9 ve CYP2C19
Pregabalin	5-7	% 98 renal
Primidon	10-20	CYP2C9, CYP2C19
Tiagabin	4-13	CYP3A4, % 25 renal, UGT
Topiramat	20-30	% 60-80 renal oksidasyon, CYP2C9, CYP2C19
Valproik asit	8-16	%50 UGT, CYP2C9, CYP2C19
Vigabatrin	5-10	% 60-80 renal
Zonisamid	50-70	CYP3A4, N-asetilasyon, glükuronidasyon, % 30 renal

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. YÖNTEM

Bu araştırmada uygulanacak çalışma protokolü için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulundan onay alınmıştır (MAR-YÇ-2007-0159). Çalışmaya katılan tüm gönüllü hastalar çalışmaya başlamadan önce bilgilendirilmiş ve yazılı onayları alınmıştır.

3.1.1. Çalışma Grubunun Özellikleri:

Çalışma grubu, epilepsi hastalığının tedavisi ve epilepsi nöbetlerinin engellenmesi için en az 7 gün, günde 100 – 400 mg oral lamotrijin kullanan, değişik yaşlardaki 73 kadın ve 58 erkekten oluşan toplam 131 hastadan oluşmuştur (Tablo 9). Hastaların demografik özellikleri Tablo 9’da ortalama değerler verilerek sunulmuştur. Epilepsi nedeniyle lamotrijin kullanmakta olan 57 hasta, ayda 2’den fazla epilepsi nöbeti geçirdiği dikkate alınarak tedaviye dirençli, geriye kalan hastalar ise dirençli olmayan hastalar olarak değerlendirilmiştir. Epilepsi grubunu oluşturan hastalardan 35 kişinin sadece lamotrijin, 38 kişinin lamotrijin ile birlikte valproik asit, 48 kişinin lamotrijin ile birlikte diğer antiepileptikleri, 10 kişinin ise lamotrijin, valproik asit ve diğer antiepileptik ilaçlardan da bir ya da bir kaçını birlikte kullanmakta olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 73 hasta 1-3 mg/kg/gün lamotrijin kullanırken, 44 hasta 3-5 mg/kg/gün, 14 hasta ise 5 mg/kg/gün’ün üzerinde lamotrijin alan hastalar olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 9. Çalışma grubumuzda yer alan hastaların demografik özellikleri

Hastaların Demografik Özellikleri	Toplam (n=131)	Erkek (n=58)	Kadın (n=73)
Yaş	29,5	29,6	29,3
Ağırlık (kg)	67,3	75,2	61
Lamotrijin Dozu (mg/kg/gün)	3,07	2,88	3,23
Lamotrijin Kullanım Süresi (yıl)	3,7	3,4	4,04
Ortalama Lamotrijin Konsantrasyonu (mg/L)	4,78	5,3	4,3
Alişkanlıkları (sigara kullanımı)	29	14	15
Monoterapi	35	10	25
Politerapi (Lamotrijin + Valproik asit)	38	18	20
Politerapi (Lamotrijin + Diğer antiepileptik ilaçlar)	48	23	25
Politerapi (Lamotrijin + Valproik asit + Diğer antiepileptik ilaçlar)	10	5	5

Çalışmaya katılan hastalardan fenotipleme değerlendirmesi için alınan 5 ml kan örneği ile plazma lamotrijin düzeyi ölçümü yapılırken, genotipleme değerlendirmesi için alınan 5 ml kan örneği ile UGT1A4*2 ve UGT1A4*3 alellerine bakılmıştır.

3.1.2. Fenotipleme:

Fenotipleme alışmaları Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Laboratuvarında yapılmıştır.

Çalışma grubunu oluşturan epilepsili hastalardan son lamotrijin dozundan hemen önce olmak üzere kuru tüpe alınan 5 ml venöz kan rneği alınarak, 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Analizi hemen yapılamayacak olan örnekler analiz yapılacağı güne kadar – 80 derecede saklanmıştır. Plazma lamotrijin düzeyi lm ‘Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)’ kullanılarak yapılmıştır. Analiz süresince eksternal standard kalibrasyonu düzenli olarak uygulanmıştır.

3.1.2.1. Plazma Lamotrijin Düzeyinin Yüksek Performans (Basınçlı) Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analizi:

Kromatografi, katı veya sıvı bir durağan fazın yüzeyine veya içine uygulanmış bir karışımdaki moleküllerin, sıvı veya gaz halindeki hareketli (mobil) faz aracılığı ile hareket ederken birbirlerinden ayrılmaları temeline dayanmaktadır (Temizkan ve Arda, 2004). Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi amino asitler, karbonhidratlar, lipidler, nükleik asitler, proteinler, pigmentler, steroidler ve diğer biyolojik aktif moleküllerin ayrımının yapılmasında kullanılabilen bir kromatografi tekniğidir. HPLC’de hareketli faz 10-400 atmosfer basınç altında ve 0,1-5,0 cm/saniye gibi yüksek bir hızda kolondan geçirilir (Temizkan ve Arda, 2004). Bir gradyen pompa (AGILENT 1100), 4 solvent modül, degazör modülü, soğutmali otomatik rnekleyicili enjeksiyon nitesi, termostatlı kolon fırını, C18 revers faz kolonu (15 cm uzunluğunda, 4,6 m çap ve 5 m por büyüklüğünde), UV dedektörü (AGILENT 1200) ve bir bilgisayardan oluşmaktadır. Sistemde ortaya çıkan elüsyon pikleri bilgisayar programı ‘Chemstation Program (cag.bootp server)’ yardımı ile değerlendirilmiştir.

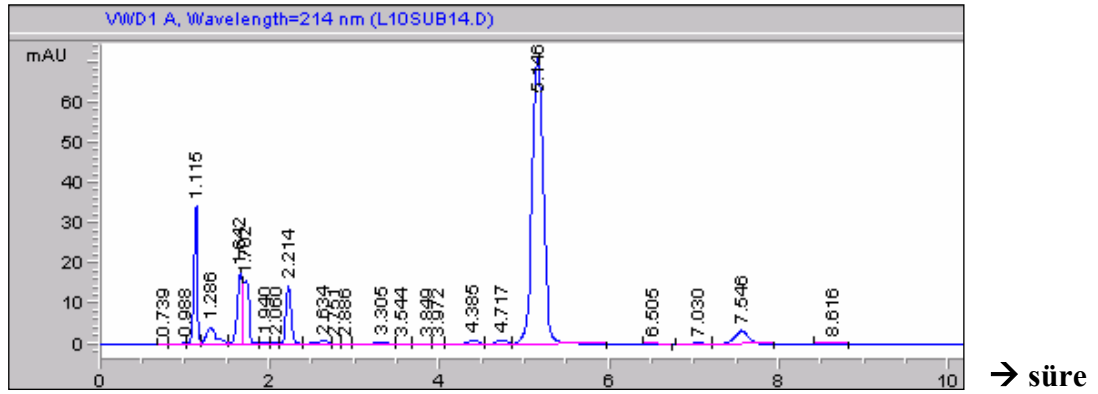
Lamotrijin konsantrasyonunun ölçümü için öncelikle konsantrasyonu bilinen standart lamotrijin örnekleri hazırlanmış, sisteme enjekte edilmiş ve seçilen 5 ayrı standart lamotrijin konsantrasyonu ölçümleri ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Standart olarak 0,5 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L ve 40 mg/L’lik konsantrasyonlarda lamotrijin içeren örnekler kullanılmıştır.

Lamotrijin için mobil faz, KH_2PO_4 (0,01 M, pH: 6,7), asetonitril ve metanolden (% 70:20:10, v/v/v) oluşmaktadır. Hazırlanan tüm mobil fazlar, 0,4 μm naylon membran filtre (Sigma) ile süzölmüş, ultrasonik banyoda degaze edilmiştir. HPLC pompa hızı 1,3 ml/dakika, kolon sıcaklığı 25 °C olup, kromatogram süresi 23 dakika olarak belirlenmiştir. Lamotrijin pikinin retansiyon zamanı 5,1 dakikadır (Şekil 7). Hasta serumları ekstraksiyon işleminin ardından otomatik örnekleyici ile 10 μl hacim içinde sisteme enjekte edilmiştir.

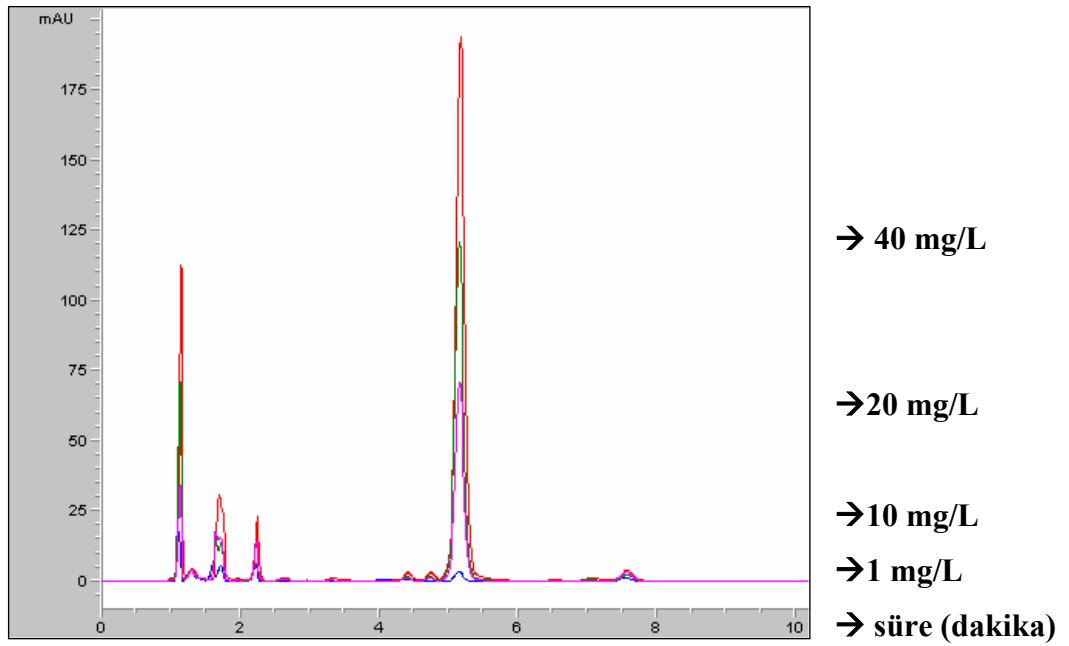
Hasta serumlarının ekstraksiyon işlemi için 100 μl hasta serumu alınarak, KH_2PO_4 ile hazırlanan tampon çözelti (100 μl , pH:6,7), tampon çözelti, asetonitril ve metanol ile 70:20:10 oranında hazırlanan mobil faz (30 μl) ve % 95 oranında hazırlanan kloroform/asetonitril çözeltisi (1000 μl) ile muamele edilmiştir. Her bir karışım, 30 sn vorteks ve 10 dakika boyunca rotatif çalkalayıcı cihazında çalkalanmıştır. Örnekler, 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek, süpernatant kısımları ayrı ependorflara alınmış ve evaporatör yardımı ile 30 dakika boyunca uçurulmuşlardır. Son olarak ilave edilen 100 μl mobil faz ile ekstraksiyon işlemi tamamlanmıştır.

Hasta serumlarının sisteme enjeksiyonundan önce mutlaka her defasında bir standart lamotrijin örneği ölçümü yapılmıştır (Şekil 7,8).

Ölçülen en düşük lamotrijin konsantrasyonu 420 fmol olup, standart lamotrijin konsantrasyonlarının varyasyon katsayısı % 3 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 7. Standart olarak 10 mg/L verilen lamotrijin ölçümünün kromatogramı gösterilmektedir. Lamotrijin piki retansiyon zamanı 5,1 dakika olarak belirlenen piktir.



Şekil 8. Standart olarak verilen 1 mg/L (mavi renkli pik), 10 mg/L (pembe renkli pik), 20 mg/L (yeşil renkli pik) ve 40 mg/L (kırmızı renkli pik) konsantrasyonundaki lamotrijin pikleri iç içe gösterilmektedir. Retansiyon zamanı 5,1 dakika olarak belirlenmiştir. Eksternal standartların piklerinden hesaplanan eğri altında kalan alan ve eksternal standart konsantrasyonu arasındaki ilişkinin korelasyon katsayısı 0,99021 olarak bulunmuştur.

3.1.3. Genotipleme

Genotipleme genetik sinyalin çözömlenmesi işlemdir. Hastalardan EDTA'lı tüplere 5'er ml'lik venöz kan örneği alınmış ve alınan örnekler DNA izolasyonu yapıłana kadar -80°C'de saklanmıştır. Periferik kandan elde edilen genomik DNA'da, 'Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)' kullanılarak istenilen bölge amplifiye edilerek UGT1A4 enziminin 2 ve 3. alelleri MALDI-TOF kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. DNA izolasyonları laboratuvarımızda gerçekleşmiş, PCR ve polimorfizm analizi için ise hizmet alımı yapılmıştır.

3.1.3.1. DNA izolasyonu

Hücreden DNA izolasyonu, hücre parçalanması sonrasında bir proteaz yardımıyla proteinlerin yıkılması ve nükleik asitlerin yüksek tuz derişimi varlığında santrifüjle çöktürölmesidir. Kan içerisindeki lökositlerde yer alan DNA miktarı PCR analizi için yeterlidir.

Çalışmamızda hastalardan EDTA'lı tüplere alınan ve genotipleme analizi yapıłana kadar -80 derecede saklanan kanlardan DNA izole etmek için, DNA izolasyon kiti (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche) kullanılmıştır.

Ependorf tüplere alınan 200 µl kan örnekleri, 200 µl bağlayıcı tampon [6 M guanidin-HCl, 10 mM üre, 10 mM Tris-HCl, %20 Triton X-100 (v/v), pH: 4,4 olan 20 ml'lik solüsyon] ve örneğın lizisini ve inaktivasyonunu sağlayan 40 µl proteinaz K ile karıştırılmış ve 70 derecede 10 dakikalık bir inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun ardından 100 µl izopropanol eklenmiş ve elde edilen örnekler, toplayıcı tüpler ile birleştirilmiş olan filtreli tüplere alınıp, 12000 rpm'de 1 dakikalık santrifüje maruz bırakılmışlardır. Santrifüj sonrasında toplama tüpünde kalan faz atılarak, filtreli tüpler yeni toplayıcı tüpler ile birleştirilmiştir. İnhibe edici ve uzaklaştırıcı solüsyondan [5 M guanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl, etanol, pH: 6.6 olan 33 ml'lik solüsyon] 500 µl eklenmesinin ardından 12000 rpm' de gerçekleştirilen 1 dakikalık santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Toplayıcı tüplerin yenilenmesini 500 µl yıkama solüsyonu [20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, etanol, pH: 7,5 olan 20 ml'lik solüsyon] ile 12000 rpm'de 1 dakikalık santrifüj işlemi ile tamamlanan yıkama işlemi izlemiştir. Yıkama işlemi 2 kez tekrarlanmış, her defasında toplayıcı tüpler değıştirilmiştir. Filtreli tüpler temiz ve steril olan ependorflara yerleştirilmiş ve daha

önceden ısıtılmış olan ayrıştırıcı solüsyondan [10 mM Tris-HCl, pH:8,5 olan 40 ml'lik solüsyon] 200 µl eklenip son kez 12000 rpm'de 1 dakikalık santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj işlemi sonrası ependorf tüplerde izole DNA elde edilmiştir.

3.1.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Genetik sinyalin büyütülmesi işlemi için kullanılan bir metoddur. İncelenecek olan hedef gen bölgesi PCR ile bir DNA polimeraz enzimi kullanılarak *in vitro* koşullarda tek bir orijinal kopyadan milyonlarca kez çoğaltılabilmektedir.

PCR, seçici olarak birkaç saat içinde tek bir DNA veya RNA molekülünü birkaç milyon katına amplifiye edebilmektedir (Nussbaum ve diğ., 2005). Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı olan, 18-20 baz uzunluğunda bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanarak, bu iki primer ile sınırlandırılan bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanmaktadır.

PCR, DNA'nın dizi analizinde ve DNA haritalaması, orak hücre anemisi, kistik fibroz, lösemi gibi genetik hastalıkların tanısı, insan genom projesi araştırmaları, doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesi ve adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesi gibi bir çok alanda güncelliğini koruyan bir yöntem olarak yerini almıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için genetik yapısı incelenecek olan bireyin hücrelerinden izole edilen kalıp DNA, ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi, oligonükleotid primerler ve enzimin kopyalama işleminde kullanacağı serbest deoksirinükleozid trifosfatlar (dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) gerekli olan bileşenlerdir. PCR tekrarlanan döngülerden oluşan bir klonlama reaksiyonudur. Bu döngüler kalıp DNA'nın zincirlerinin açılması (Denatürasyon, 92-95°C), primerlerin DNA'ya bağlanması (Annealing, 50-54°C) ve sentez (Polimerizasyon, 72°C) aşamalarıdır (Şekil 9):

1. Denatürasyon Basamağı:

Çoğaltılması planlanan DNA segmentinin çift sarmalının 92-95 dereceye kadar ısıtılarak birbirinden ayrılması işlemidir. Bu işlem sonucunda hedef DNA ipliklerini birlikte tutan hidrojen bağları kırılır, erir ve iki ayrı tek DNA iplikçisi oluşur. Ayrılan DNA iplikleri yeni sentezlenecek DNA için kalıp işlevi görürler.

2. Primerlerin Birleşmesi Basamağı (Annealing) :

Bu basamakta sıcaklık 50-60 dereceye kadar düşürülmekte ve primerler çoğaltılacak bölgenin uçlarında bulunan kendilerine özgül dizileri tanıyarak bu bölgelere hidrojen bağı ile bağlanmaktadır. Genel olarak 18-20 nükleotid uzunluğunda primerler kullanılmaktadır.

Primerlerden biri hedef dizinin bir tarafındaki DNA molekülünün bir zincirine komplementer iken diğer primer de hedef dizinin karşı tarafındaki DNA molekülünün diğer zincirine komplementerdir (Nussbaum ve diğ., 2005).

Çoğaltılacak olan hedef DNA bölgesi belirlendikten sonra, bu bölgeye uygun olan primerlerin seçilmesi önemlidir. Öncelikle primerler genom üzerinde yalnızca tek bir bölgeyi tanımalıdır ve çoğaltılacak DNA içinde yalnızca bir kez bulunmalıdır. Primerde dört bazı içeren dNTP olabildiğince eşit ve heterojen sırada kullanılmalıdır. Primerin 3' ucunun guanin (G) ve sitozin (C)'den zengin olması DNA'ya daha sıkı bağlanmaya yol açarak, polimerizasyonun daha başarılı olmasını sağlar. Çünkü; Adenin (A) ve timin (T) bazları DNA zincirini iki hidrojen bağı ile tutarlarken G ve C bazları üç hidrojen bağı ile tutmaktadır. Ayrıca primerlerin kendi üzerlerine ve birbirleri üzerine bağlanabilir olmamaları gerekir. Bu durumda primer kendi üzerine kıvrılıp sekonder yapı oluşturur. Primer dizileri rastgele seçilmelidir. GC/AT oranlarının kalıp DNA'ya yakın olması çoğalma etkinliğini artırır. Bunlara ek olarak iki primerin ayrılma ve bağlanma sıcaklıkları da birbirine yakın olmalıdır.

Primer tasarımı yapılırken çoğaltılması hedeflenen DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınmalıdır. Çalışmamızda PCR reaksiyonu her iki polimorfizm bölgesini de kapsayacak şekilde 'uniplex' olarak yapılmıştır. Kullanılan primer dizileri aşağıdadır:

F// (5')	: ACGTTGGATGTGGCCACAGGACTGCTGCTC
R// (3')	: ACGTTGGATGGTGGCCTCTGGCATGGAGC

3. Yeni Zincir Sentezi- Primerlerin Uzaması Basamağı:

Primerler, ortama katılan büyük miktarlardaki deoksiribonükleozid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) ve DNA polimeraz enzimi ile yeni bir DNA çift zincir formunda uzarlar (Barbaros, 1992). DNA polimeraz enzimi uygun tampon ve dört çeşit dNTP varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Nükleotidleri

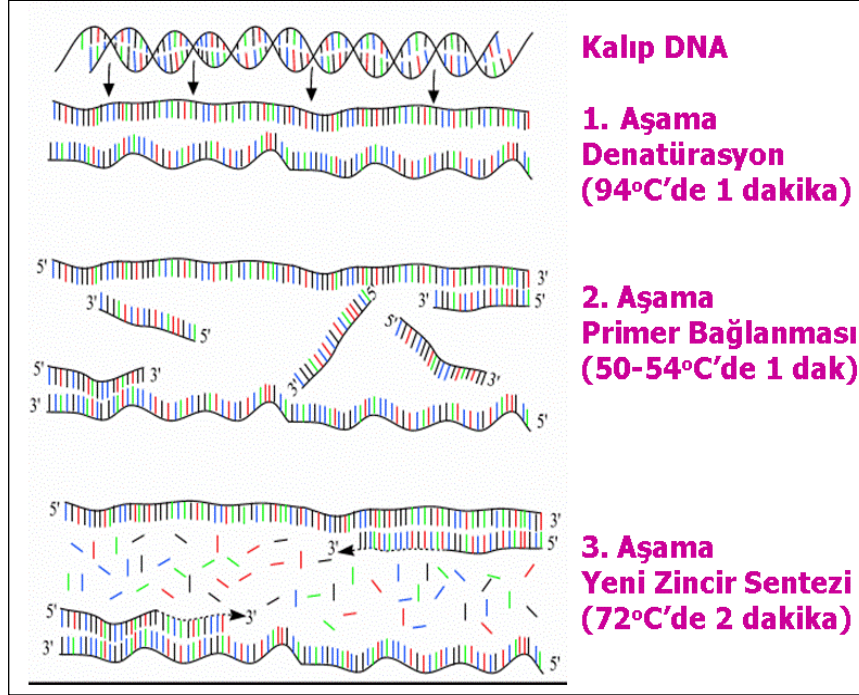
5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek primerlerin uzamasını sağlayan ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturan DNA polimeraz enzimi olarak *Thermus aquaticus* adlı bakteriden elde edilen termostabil bir enzim olan 'DNA *Taq* polimeraz' enzimi kullanılır (Temizkan ve Arda, 2004). Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmaları ile fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu gerçekleşir (Temizkan ve Arda, 2004). Dezoksiribonükleozid trifosfatlar ticari olarak sağlanır. DNA *Taq* polimeraz düşük dNTP konsantrasyonlarında (10-100 µM) kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PCR 100 µM dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir. Optimal dNTP konsantrasyonu MgCl₂ konsantrasyonuna, PCR döngü sayısına, primer konsantrasyonuna, çoğaltılmış ürünün boyuna bağlıdır (Temizkan ve Arda, 2004).

PCR'da kullanılan tamponlardan en çok kullanılanı *Tag/Amplitag* enzimlerine özgü olan tampondur. Mg⁺² iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini stimüle eder ve çift iplikli DNA'nın T_m değerini (çift iplikli nükleik asit moleküllerindeki baz çiftlerinin yarısının ortadan kalkmasına neden olan sıcaklık derecesi) artırır. Bunun dışında primer-kalıp etkileşimine de yardımcı olurlar. Bu yüzden ortamdaki Mg⁺² konsantrasyonunun PCR'ın özgülüğü ve ürün verimi üzerindeki önemi büyüktür. Düşük Mg⁺² konsantrasyonu, ürün oluşumunda azalmaya, yüksek Mg⁺² konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün birikimine neden olur.

PCR işlemi termostabil DNA polimerazları ve farklı sıcaklık derecelerini istenilen süreler boyunca otomatik olarak ayarlayabilen "thermocycler" (ısı döngücüsü) adı verilen cihaz ile gerçekleştirilir. Denatürasyon, primerlerin bağlanması ve polimeraz enzimi ile zincirin uzaması basamağı bir döngü olarak kabul edilir. PCR'ın verimli olabilmesi için denatürasyon, primerlerin bağlanması, primerlerin uzaması, döngü sayısı ve PCR makinesinin sıcaklık iniş ve çıkış süreleri önemli olan parametrelerdir. PCR'da bir döngü yaklaşık 4-5 dakika sürer ve toplam döngü sayısı genellikle 25-35 arasındadır. Bu döngünün sonunda DNA iki katına çıkar ve tekrar eden döngülerle DNA miktarı başlangıca göre geometrik olarak artar. Genellikle tercih edilen 25-35 döngünün sonunda DNA miktarı yaklaşık 1,000,000

kez artış ile sonlanır. Fakat döngü sayısının arttırılması halinde istenmeyen ürünler fazlalaşırken, istenen ürünlerde herhangi bir artış meydana gelmez. Bu yüzden 40'dan fazla sayıda döngüden oluşan PCR reaksiyonları genellikle iyi sonuç vermez (Temizkan ve Arda, 2004).

Bir PCR döngüsü farklı ısılarda çalışan 3 ardışık basamakta meydana gelir. Bu basamaklar, denatürasyon, birleşme ve uzama basamaklarıdır.



Şekil 9. PCR basamakları ile yeni zincir sentezinin gösterilmesi.

Çalışmamızda PCR'ı takiben reaksiyon ürünleri 'Shrimp alkaline phosphatase' enzimi yardımıyla bir önceki basamakta kullanılmadan kalan dNTP'ler defosforile edilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Polimorfizm bölgesine özgü tasarlanmış proba homojen nükleotid uzatma (homogeneous mass extend=hME) reaksiyonu primere ilgili bölgedeki polimorfizme uygun tamamlayıcı bazın eklenmesi ile sonlandırılmıştır. Bu reaksiyon her bir tek nükleotid polimorfizmi için ayrı problar kullanılarak, ancak aynı kuyucuk içinde yapılmıştır. Kullanılan prob diziler aşağıdadır:

P24T, hME prob : TCCTCCTCAGTGTCAG

L48V, hME prob : GGCATGGAGCTCCCGCA

Reaksiyon karışımı içerisinde bulunan tuzlar, resin uygulaması ve bunu takiben uygulanan santrifüj işlemi ile ortamdan çöktürülerek uzaklaştırılmıştır. Uzaklaştırma işleminin ardından, reaksiyonlar bir sonraki aşamadaki analiz basamağı için özel bir matrisle kaplanmış yongalara (*chip*) nanolitre Nanodispender cihazı ile aktarılmıştır.

3.1.3.3. MALDI-TOF kütle spektrofotometresi ile analiz

Kütle spektrofotometresi biyolojik moleküllerin analizinde kullanılmakta olup, bilgisayar desteğinin geliştirilmesi ile özellikle proteinlerin analizinde molekül ağırlıklarının tam olarak ölçülmesinde önemli bir yere sahip olan bir yöntemdir. Moleküler ağırlığın iyon yüküne oranını (m/z) ölçer. Temel olarak görevi peptidleri buharlaştırıp, iyonların miktarını belirlemektir. Nötr moleküllerin iyonlaştırılması ve pozitif olarak yüklenmiş iyonların bir elektrik ve/veya manyetik alandan geçerken kütle/yük oranlarına ayrılması ile gerçekleşmektedir (Temizkan ve Arda, 2004). Uçucu olmayan biyolojik makromoleküller ise elektronların püskürtülmesi ile ya da matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu [MALDI (matrix assisted laser desorption)] kullanımı sonucunda iyonize hale gelebilirler. Elektron püskürtme metodu ile makromolekül solüsyonu yaklaşık + 5000 voltluk potansiyele bağlı metal bir iğneden püskürtülür. Böylece pozitif yüklü iyonları içeren çok küçük tanecikli bir püskürtü oluşur. Çözücü uçurulur ve iyonlar kütle spektrofotometresinde saptanır. MALDI’de makromoleküller küçük organik moleküllerden oluşan bir destek materyaline yerleştirilir ve lazer ile ışınlanır. Oluşan pozitif yüklü iyonlar kütle spektrofotometresinde analiz edilir.

Moleküler ağırlığın iyon yüküne oranlandığı birim, kütle kararlılık birimi olarak adlandırılan ‘TOF (time of flight)’ birimidir. Peptidler kütlelerine göre TOF biriminde yer alan tüpün içinden geçerler ve farklı zaman aralıklarında dedektöre çarparlar.

Çalışmamızda, yongalara aktarılan reaksiyon ürünleri MALDI-TOF kütle spektrometresinde lazer etkisi ile iyonlaştırılarak uçurulmuştur. Reaksiyonlarda tek baz değişikliğinin oluşturduğu kütle farkı, iyonlaşan moleküllerin uçuş zamanında fark meydana getirmiş, bu fark sistemdeki dedektör tarafından algılanmış ve analiz edilen bölgedeki baz farkı belirlenmiştir.

3.1.3.4. Sonuçların değerlendirilmesi

Sonuçlar “Typer Analyser” yazılımı yardımı ile değerlendirilmiştir. Bu yazılımda bireylerdeki alel farkı nedeniyle primere eklenen bazın farklılığı bir kütle farkı ortaya çıkararak SNP’nin tanımlanmasına olanak sağlar.

3.1.4. İstatistiksel analiz

Çalışmamızda sonuçların istatistiksel anlamlılığı * $p < 0.05$ ya da ** $p < 0.01$ ile belirtilmiştir. Tüm genotip ya da fenotip gruplarının birbirleri arasındaki istatistiksel farklılık karşılaştırılıyorsa tek yönlü varyans analizi post hoc-Tukey testi ya da Bonferroni testi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki karşılaştırma kontrol grubu olarak belirlenen grup ile yapıyorsa, tek yönlü varyans analizi post hoc-Dunnet testi ile anlamlılık araştırılmıştır.

Karşılaştırmamızın yalnızca iki gruptan oluştuğu durumlarda ise Student’in t testi kullanılmıştır.

Ayrıca hastaların kullandıkları lamotrijin dozları ve plazma lamotrijin konsantrasyonları arasındaki doz-konsantrasyon ilişkisinin değerlendirilmesi ve korelasyon olup olmadığı Pearson testi ile belirlenmiştir.

Genotip grupları için beklenen genotip sıklıkları, tek alel sıklığından Hardy-Weinberg Yasası’na göre yapılmıştır. Bu eşitlik araştırılan genotiplerin toplumdaki frekansını belirlemek için kullanılmaktadır.

Hardy-Weinberg Yasasına göre (Harvey ve diğ., 1997);

1- Toplumdaki herhangi bir otozomal resesif gen tarafından oluşturulan hastalığın sıklığı, o resesif genin toplumdaki sıklığının karesine eşittir.

2- Heterozigot sıklığı ise bir alel sıklığı ile çarpımının 2 katına eşittir.

Hardy-Weinberg yasasına göre gen sıklığını değiştiren etkenler olmadığı takdirde genotiplerin göreceli sıklıkları kuşaklar boyu değişmeden sürer.

Hardy-Weinberg Yasası; $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ şeklinde gösterilir.

p = Dominant genin göreceli sıklığı, q = Resesif genin göreceli sıklığı

Her zaman $p + q = 1$ ’ dir.

3.2. GEREÇLER

3.2.1. Kimyasal maddeler

Lamotrijin Kontrol.....	Glaxo Smith Kline
Metanol.....	Merck
Asetonitril.....	Sigma
Kloroform.....	Sigma
İzopropanol.....	Sigma
DNA izolasyon kiti, Proteinaz K.....	Roche

3.2.2. Cözeltiler

Solüsyon I - Potasyum Fosfat: KH_2PO_4 , pH: 6,7

Solüsyon II - Mobil faz (KH_2PO_4 , asetonitril, metanol, 70:20:10 oranında)

Solüsyon III - HPLC yıkama solüsyonu, % 80 metanol ve deiyonize distile su, asetonitril, metanol, 70:20:10 oranında)

Solüsyon IV - Bağlayıcı tampon: 6 M guanidin-HCl, 10 mM üre, 10 mM Tris-HCl, %20 Triton X-100 (v/v), pH: 4,4

Solüsyon V - İnhibe edici ve uzaklaştırıcı tampon: 5 M guanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl, etanol, pH: 6.6

Solüsyon VI - Yıkama solüsyonu: 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, etanol, pH: 7,5

Solüsyon VII - Ayırıştırıcı solüsyon: 10 mM Tris-HCl, pH:8,5

3.2.3. Araçlar

pH Metre.....inoLab WTW (Almanya)

Otoklav.....NÜVE OT 012 (Türkiye)

Etüv.....Electro-mag (Türkiye)

Buzdolabı.....Arçelik (Türkiye)

Derin dondurucu (-80).....Thermo Fisher Scientific (USA)

Mikrosantrifüj.....Hettich Universal 32 R (Almanya)

Mikropipet Takımı.....Finnpipette Thermo Scientific (Finlandiya)

Hassas Terazî.....AND GR-200 (Japonya)

Vorteks.....	Janke and Kunkel IKA Labor technic (Almanya)
Su Banyosu.....	NÜVE BM 402 (Türkiye)
Ultrasonik Karıştırıcı.....	Fisher Scientific FB 15048 (Almanya)
Rotatif Çalkalayıcı.....	IKA-VIBRAX-VXR (Almanya)
Evaporatör.....	Jouan Rc 1022 (Fransa)
Gradyen Pompa (HPLC).....	Agilent 1100 (USA)
UV Dedektör (HPLC).....	Agilent 1200 (USA)
HPLC Kolonu.....	Macherey-Nagel (Almanya)

4. BULGULAR

Çalışmamızın ilk bölümünde lamotrijin kullanmakta olan epilepsili hastaların plazma lamotrijin konsantrasyonları ölçülmüş, ikinci bölümünde ise hastaların lamotrijin metabolizmasından sorumlu olan UGT1A4 enzimi açısından polimorfik olup olmadıkları saptanmıştır. Elde edilen lamotrijin plazma konsantrasyonları ile polimorfik olan UGT1A4 enzimi arasındaki olası ilişki değerlendirilmiştir. Polimorfizm saptanan hastalarda, polimorfik UGT1A4 enziminin plazma lamotrijin konsantrasyonları üzerindeki fonksiyonel etkisi saptanmaya çalışılmıştır.

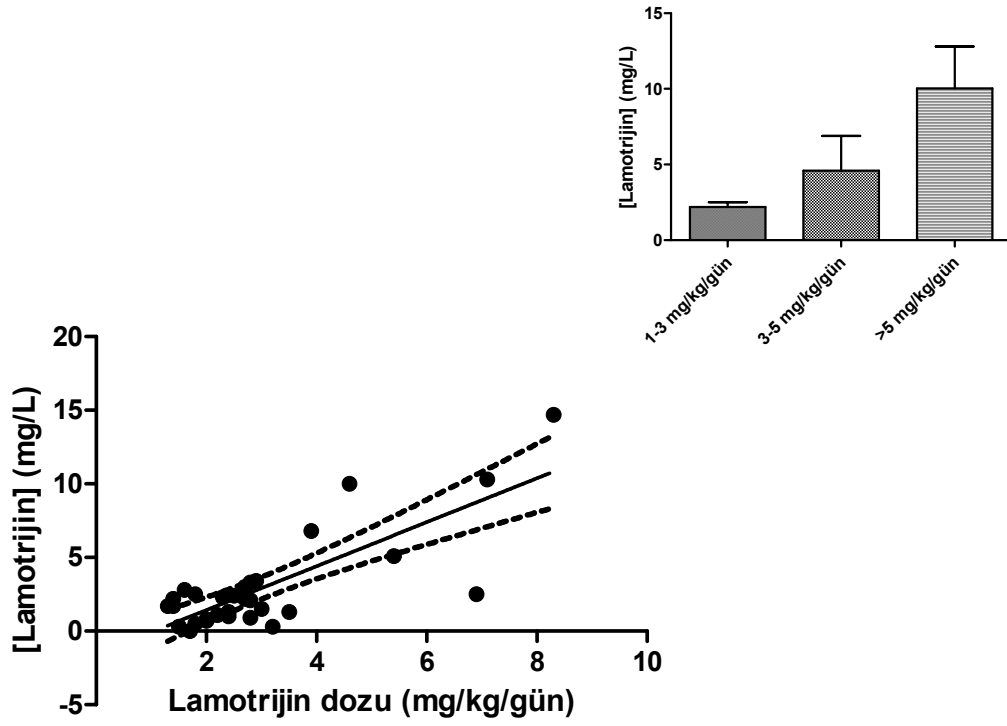
4.1. Fenotipleme Sonuçları

Çalışmamıza katılan hastalar lamotrijin ile birlikte diğer antiepileptik ilaçları da kullanıp kullanmamalarına göre sınıflandırılmış ve HPLC ile ölçülen plazma konsantrasyonları bu gruplar içerisinde değerlendirilmiştir.

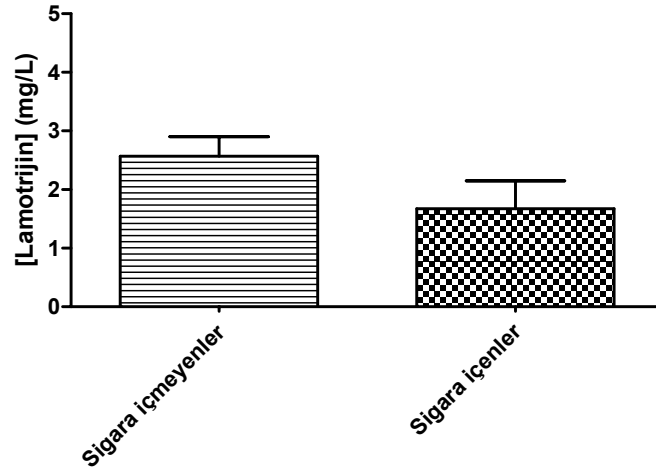
4.1.1. Tek başına lamotrijin kullanan hastalar (Monoterapi)

Bu grupta tek başına lamotrijin kullanan 10'u erkek, 25'i kadın olmak üzere toplam 35 hasta yer almıştır. Monoterapi alan hastaların plazma lamotrijin konsantrasyonlarının ortalaması 3,2 mg/L olarak hesaplanmıştır. Bu hastalardan günlük lamotrijin dozu 1-3 mg/kg/gün olan 28 hastada ortalama plazma lamotrijin düzeyi 2,2 mg/L olarak, 3-5 mg/kg/gün olan 4 hastada 4,6 mg/L olarak ve > 5 mg/kg/gün olan 3 hastada ise 10 mg/L olarak belirlenmiştir (Şekil 11). Yapılan lineer regresyon ile doz konsantrasyon ilişkisi grafikte gösterilmektedir (Şekil 10). Örnekleme zamanları lamotrijin son dozundan hemen önce olarak belirlenmiş olup, monoterapi alan hastalarda 7-12 saat arasında değişiklik göstermiştir. Örnekleme zamanları ile ölçülen lamotrijin konsantrasyonları arasında herhangi bir ilişki olmadığı, örnekleme zamanı 7-12 saat arasında değişen plazma lamotrijin konsantrasyonlarının fark göstermediği korelasyon analizi ile tespit edilmiştir ($r^2=0,03$).

Ayrıca hastalardan 10'unun sigara içme alışkanlığı olduğu ve sigara içen hastalarda plazma lamotrijin konsantrasyonunun içmeyen hastalara göre daha düşük olduğu saptanmış ancak istatistik olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 11).



Şekil 10. Tek başına lamotrijin kullanan hastalarda lamotrijin dozu ile ölçülen plazma lamotrijin konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Korelasyon analizi Pearson testi ile yapılmıştır ($r^2=0,62$, $p < 0,001$). Üstteki grafik değişen doz oranlarına göre ölçülen ortalama plazma lamotrijin konsantrasyonlarıdır.



Şekil 11. Günlük lamotrijin dozu 1-3 mg/kg olup, tek başına lamotrijin kullanan hastalarda sigara içiminin plazma lamotrijin konsantrasyonu üzerindeki etkisi gösterilmektedir. Student'in t testi uygulanmış, istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmamıştır.

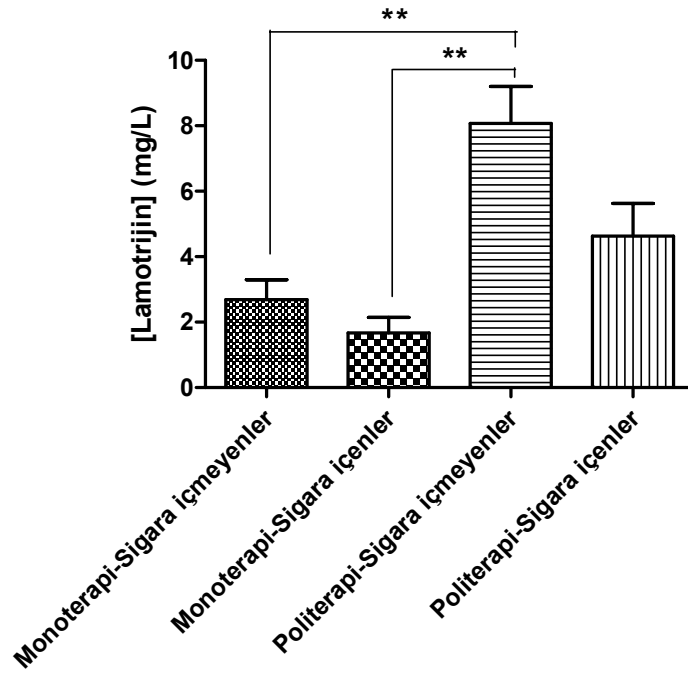
4.1.2. Lamotrijin ile birlikte valproik asit kullanan hastalar (Politerapi)

Valproik asit diğer indükleyici etkisi olan antiepileptik ilaçların tersine plazma lamotrijin konsantrasyonunu arttırıcı bir etkiye sahiptir. Bu yüzden valproik asitle birlikte lamotrijin kullanan hastalar ayrı bir grup olarak değerlendirilmeye alınmıştır.

Bu grupta lamotrijin ile birlikte valproik asit kullanan 18'i erkek, 20'si kadın olmak üzere toplam 38 hasta yer almıştır. Ortalama lamotrijin konsantrasyonu bu grupta 6,1 mg/L olarak saptanmıştır. Plazma lamotrijin düzeyi sıfır çıkan 2 hasta ve örnekleme zamanı 4 saat olan bir hastanın sonucu dahil edilmemiştir. Hastalardan 24'ünün günlük lamotrijin dozu 1-3 mg/kg iken, 12'sinin 3-5 mg/kg arasında, 2'sinin ise 5 mg/kg'ın üzerinde lamotrijin kullanmakta olduğu belirlenmiştir. Ölçülen ortalama plazma konsantrasyonları doz aralıklarına göre sırasıyla 5,2 mg/L, 8,1 mg/L ve 5 mg/L olarak hesaplanmıştır.

Ayrıca bu grupta sigara içmekte olan 11 hasta yer almaktadır. Sigaranın plazma lamotrijin konsantrasyonu üzerindeki düşürücü etkisi tespit edilmiş olduğu için, lamotrijin ile birlikte valproik asit kullanan hastalarda valproik asitin lamotrijin konsantrasyonunu arttırıcı etkisi ile sigara birlikteliği değerlendirilmiştir (Şekil 12). Sigara içen hastalarda valproik asitin lamotrijin konsantrasyonunu arttırıcı etkisini düşürme eğiliminde olduğu gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık

bulunmamıştır. Bununla birlikte monoterapi hastaları ile politerapi olarak valproik asit kullanan hastaların lamotrijin konsantrasyonları sigara içme alışkanlığına göre değerlendirildiğinde sigara içen ya da içmeyen monoterapi hastaları ile sigara içmeyen politerapi grubu arasında anlamlılık bulunmuştur ($p < 0,01$). Bu durum sigara içme alışkanlığı olan hastalarda, valproik asitin lamotrijinin plazma düzeyini artırıcı etkisini azalttığını göstermiştir. Sigara içen ve lamotrijin ile beraberinde valproik asit kullanan hastaların sonuçları karşılaştırmada anlamlı çıkmamıştır.



Şekil 12. Valproik asitin lamotrijinin plazma konsantrasyonu üzerindeki etkisi sigara içen ve içmeyen hastalarda gösterilmektedir. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey testi ile istatistiksel anlamlılık araştırılmıştır.

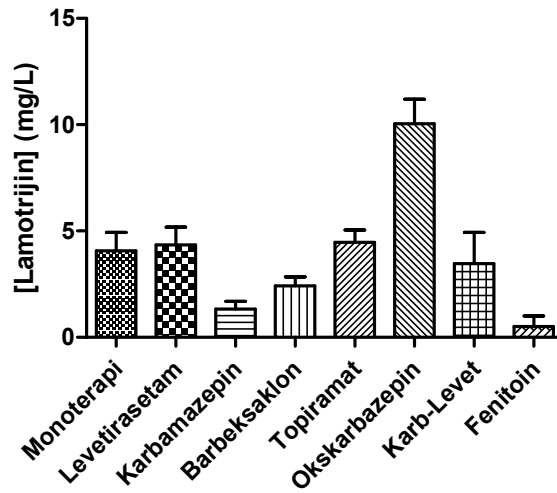
4.1.3. Lamotrijin ile birlikte diğer antiepileptik ilaçları kullanan hastalar (Politerapi)

Bu grupta lamotrijin ile birlikte fenitoin, karbamazepin, fenobarbital, levetirasetam gibi diğer antiepileptik ilaçları kullanan 23'ü erkek, 25'i kadın olmak üzere toplam 48 hasta yer almıştır. Hastalardan 14'ünün lamotrijin ile birlikte levetirasetam, 6'sının karbamazepin, 5'inin barbeksaklon, 3'ünün topiramet, 2'sinin fenitoin, diğer 2'sinin okskarbazepin kullandığı, geri kalan hastaların ise çoğunlukla levetirasetam

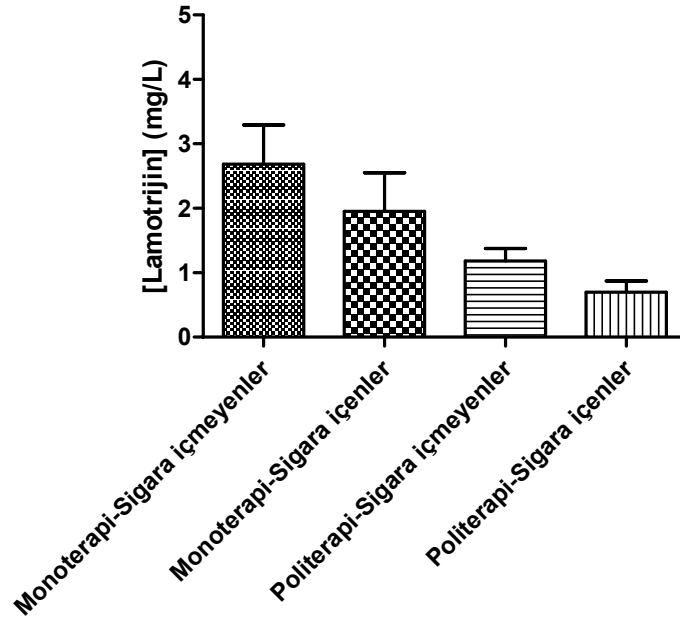
ve karbamazepini birlikte aldığı, bunların dışında diğer ilaçların kombine şekilde de kullanıldığı saptanmıştır.

Karaciğer mikrozomal enzimleri üzerindeki indükleyici özellikleri bilinen fenitoin, karbamazepin, fenobarbital gibi ilaçların lamotrijinin plazma konsantrasyonunu düşürücü etkisi bizim sonuçlarımızla da gösterilmiştir (Şekil 13). Lamotrijin ile birlikte tek başına fenobarbital kullanan hasta olmadığı için Şekil 13'deki grafiğe dahil edilmemiştir. Ayrıca barbeksaklon kullanan hastalarda da plazma lamotrijin düzeyinde bir düşme olduğu gözlenmiştir. Levetirasetam kullanan hastaların plazma lamotrijin düzeyinde herhangi bir değişiklik gözlenmezken, karbamazepin ve levetirasetam kullanan hastalarda plazma lamotrijin düzeyinin düştüğü saptanmıştır. Okskarbazepin kullanan hastaların ise lamotrijin düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı Student'ın t testi yapılarak gösterilmiştir ($p < 0,01$).

Sigara içme alışkanlığı olan hastalarda plazma lamotrijin düzeyinin içmeyenlere göre daha düşük olduğu, ayrıca hastanın enzim indükleyici bir antiepileptik ilacı da lamotrijin ile birlikte kullanması durumunda, plazma lamotrijin düzeyinin daha da düşük seyrettiği gösterilmiştir (Şekil 14).



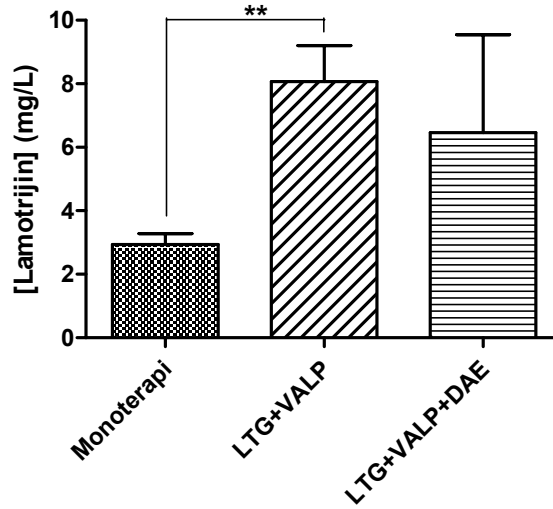
Şekil 13. Tek başına lamotrijin kullanan ve lamotrijin ile birlikte diğer antiepileptik ilaçları da kullanan hastaların plazma lamotrijin düzeylerinin karşılaştırması gösterilmektedir. Sigara içme alışkanlığı olan hastalar dahil edilmemiştir. Yapılan tek yönlü varyans analizi ve Dunnett testi ile istatistiksel olarak anlamlı bir bulgu elde edilememiştir. Karb: Karbamazepin, Levet: Levetirasetam



Şekil 14. Sigara içiminin tek başına lamotrijin kullanan hastalar ile diğer antiepileptik olarak karbamazepin ya da fenobarbital kullanan hastalarda plazma lamotrijin düzeyi üzerine etkisi gösterilmektedir. Günlük lamotrijin dozu 2 mg/kg'dan yüksek olan hastalar dahil edilmiştir. Uygulanan tek yönlü varyans analizi ve Dunnett testi ile istatistiksel bir anlamlılık saptanamamıştır.

4.1.4. Lamotrijin ile birlikte valproik asit ve diğer antiepileptik ilaçları kullanan hastalar (Politerapi)

Bu grupta lamotrijin ile birlikte hem valproik asit hem de diğer antiepileptik ilaçları kullanan 5'i erkek, 5'i kadın olmak üzere toplam 10 hasta yer almıştır. Ortalama plazma lamotrijin düzeyi 8,8 µg/ml olarak saptanmıştır. Valproik asitin lamotrijin düzeyini arttırıcı etkisi, mikrozomal enzimleri indükleyici özelliği olan fenobarbital, karbamazepin gibi ilaçların eklenmesi ile düşme göstermiştir (Şekil 15). Fakat bu iki grup arasında istatistiksel bir anlamlılık çıkmamıştır.



Şekil 15. Lamotrijin ile birlikte hem valproik asit hem de diğer antiepileptikleri birlikte kullanan hastaların plazma lamotrijin konsantrasyonları gösterilmektedir. LTG: Lamotrijin, VALP: Valproik asit, DAE: Diğer antiepileptikler

4.2. Genotipleme Sonuçları

Çalışmamızda yer alan 129 hastanın UGT1A4 enziminin UGT1A4*2 ve UGT1A4*3 alellerine bakılmıştır. UGT1A4*2 aleli UGT1A4 enziminin gen diziliminde yer alan 24. kodonda prolin amino asitinin yerine treonin amino asitinin geçmesi (P24T), UGT1A4*3 aleli ise 48. kodonda lösin amino asitinin yerine valin amino asitinin geçmesi (L48V) olarak tanımlanmaktadır. Kütle spektrofotometresi ile saptanan bu polimorfizmlere ait genotip örnekleri Şekil 16'da gösterilmiştir.

Elde ettiğimiz genotipleme sonuçlarına göre 5 hastanın heterozigot UGT1A4*2 aleli, 2 hastanın homozigot UGT1A4*3 aleli ve 29 hastanın ise heterozigot UGT1A4*3 aleli taşıdığı saptanmıştır (Tablo 10). Ayrıca 2 hastada L48V ve P24T polimorfizmlerinin ikisi birden tespit edilmiştir. Her iki genotipleme sonucumuz da Hardy Weinberg eşitliği ile uyumlu olup, P24T polimorfizmi için beklenen heterozigot genotip sıklığı 0,03 bulunurken, L48V polimorfizmi için beklenen homozigot sıklığı 0,016, heterozigot sıklığı ise 0,221 olarak hesaplanmıştır.

Hastaların UGT1A4 enziminin iki polimorfizmi heterozigot ya da homozigot olarak taşımaları doğrultusunda bir genotip gruplandırması yapıldığında en sık görülen genotipin % 72,09 oranı ile her iki polimorfizm açısından da normal alel taşıyan grubun

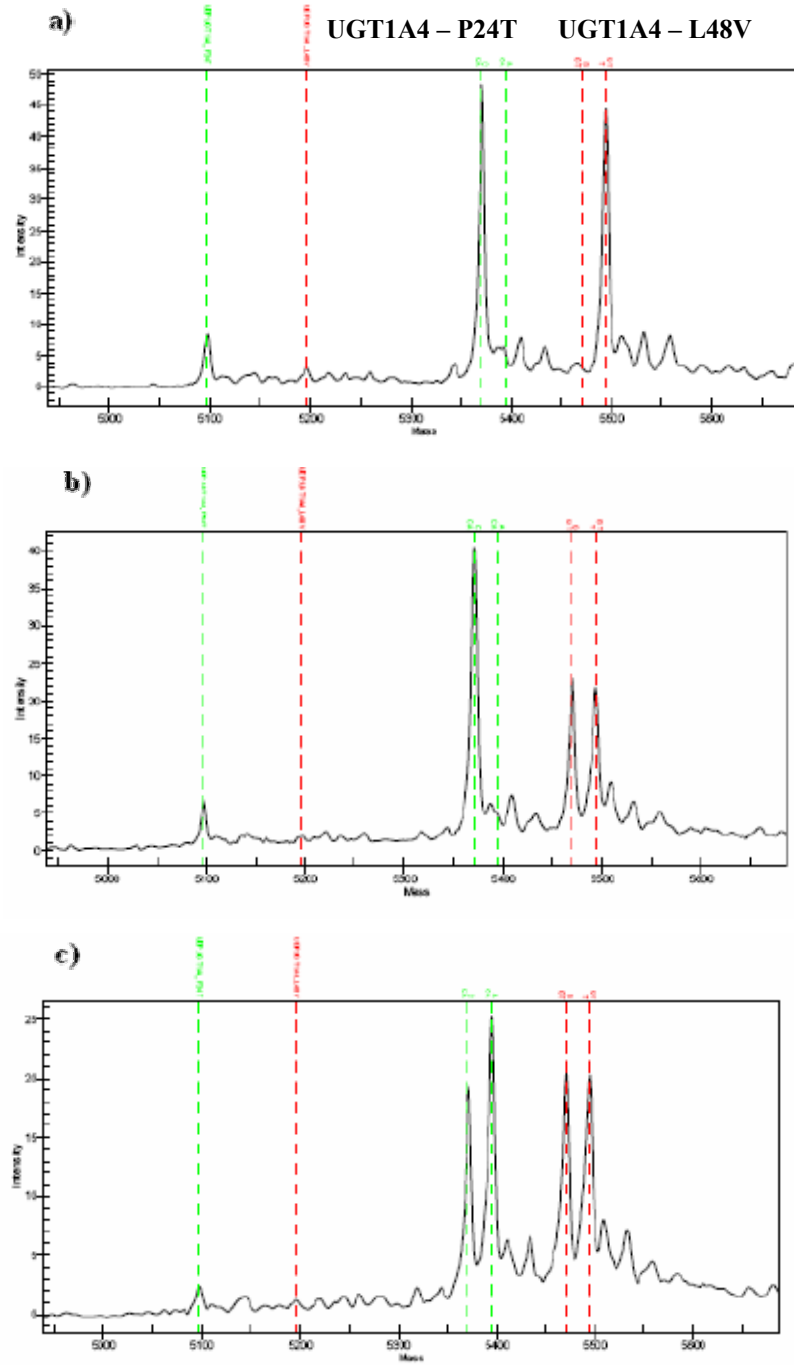
(UGT1A4^{C/T} ya da UGT1A4^{24Pro/48Lös}) olduğu saptanmıştır (Tablo 11). İkinci sıklıkta ise % 22,48 oranında görülen P24T polimorfizmi açısından normal olup, L48V polimorfizmini heterozigot olarak taşıyan UGT1A4^{C/GT} grubu izlenmiştir. P24T polimorfizmi homozigot olarak hiçbir hasta tarafından taşınmadığı için UGT1A4^{A/C} ve UGT1A4^{A/T} gruplarının sıklığı belirlenememiştir.

Tablo 10. Elde edilen genotipleme sonuçları gösterilmektedir. Sonuçlar, sayı (n) ve yüzde (%) olarak belirtilmiştir.

Alel Tipi	UGT1A4-P24T (UGT1A4*2) n (%)	UGT1A4-L48V (UGT1A4*3) n (%)
Yabancı alel (UGT1A4*1)	124 (96,2)	98 (75,96)
Homozigot alel	0 (0)	2 (1,55)
Heterozigot alel	5 (3,8)	29 (22,48)
Toplam	129 (100)	129 (100)

Tablo 11. UGT1A4*2 ve UGT1A4*3 genotip gruplarının sayı ve yüzdeleri gösterilmektedir. C: P24T normal alel, T: L48V normal alel, CA: P24T heterozigot mutant alel, GT: L48V heterozigot mutant alel, A: P24T homozigot mutant alel, G: L48V homozigot mutant alel.

Genotip Grupları	n	%
UGT1A4 ^{C/T}	93	72,09
UGT1A4 ^{C/G}	2	1,55
UGT1A4 ^{C/GT}	29	22,48
UGT1A4 ^{CA/GT}	2	1,55
UGT1A4 ^{CA/T}	3	2,32
UGT1A4 ^{A/T}	0	0
UGT1A4 ^{A/G}	0	0



Şekil 16. Kütle spektrumu ile saptanan genotip örnekleri gösterilmektedir: a) Hem P24T hem de L48V polimorfizmleri açısından yabancı tip olan alel, b) L48V polimorfizmi heterozigot olarak pozitif olan alel, c) Hem P24T hem de L48V polimorfizmi heterozigot olarak pozitif olan alel

4.2.1. Tek başına lamotrijin kullanan hastalar (Monoterapi)

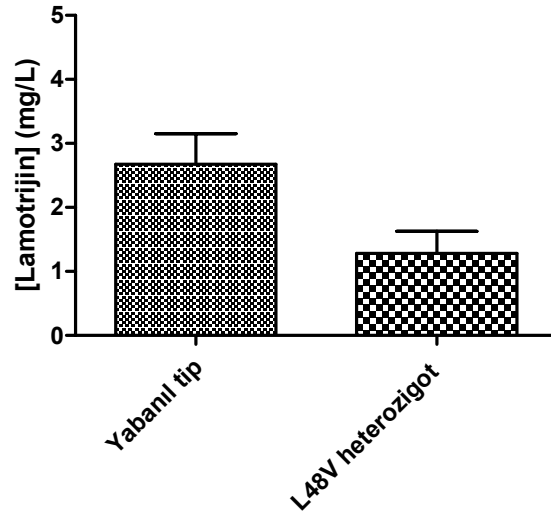
Bu grupta yer alan 35 hastanın 11'inde UGT1A4 enziminin L48V polimorfizmi heterozigot olarak pozitif bulunmuştur. UGT1A4*3 alelini homozigot olarak, ayrıca P24T polimorfizmini yansıtan UGT1A4*2 alelini homozigot ya da heterozigot olarak taşıyan hastaya bu grupta rastlanmamıştır.

Heterozigot olan hastaların 8'inin kadın, 3'ünün ise erkek hasta olduğu tespit edilmiştir. Lamotrijin kullanım dozunun heterozigot olan hastalarda 1,3 – 4,6 mg/kg/gün arasında değişmekte olduğu görülmüştür. Ortalama plazma lamotrijin konsantrasyonunun heterozigot olan 11 hastada 2,4 mg/L olduğu, geri kalan yabanıl tipte UGT1A4 enzimine sahip olan hastalarda ise 3,4 mg/L olduğu tespit edilmiştir (Tablo 12). Ancak hastalardan heterozigot alel taşıyanlardan 4'ünün, yabanıl tipte olanlardan ise 6'sının sigara içme alışkanlığı olduğu dikkate alınarak, sigara içmeyen hastalardan heterozigot olanlar ile yabanıl tipte alel taşıyanların plazma lamotrijin konsantrasyonları karşılaştırılmıştır. Ayrıca günlük lamotrijin dozu 4 mg/kg'ın üzerinde olan hastalar da bu karşılaştırmaya dahil edilmemiştir. Heterozigot UGT1A4*3 alelinin plazma lamotrijin konsantrasyonu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düşürücü etkisi olduğu gösterilmiştir (Şekil 17). Karşılaştırma Student'in t testi ile analize edilmiş ve istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır. Sigara içmeyen yabanıl tiplerin kontrol grubu olarak kabul edildiği bir diğer karşılaştırmada ise sigara içmeyen heterozigot ve sigara içen heterozigot grubu ile kontrol grubunun karşılaştırması tek yönlü varyans analizi ve Dunnett testi uygulandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,01$) (Şekil 18).

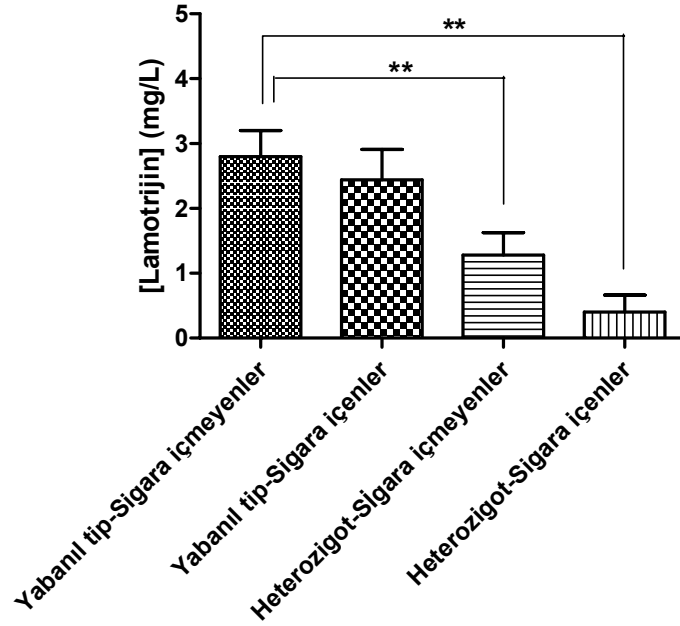
Kullanılan lamotrijin dozu ile ölçülen plazma lamotrijin konsantrasyonu arasındaki ilişki sadece yabanıl tip olan hastalarda gösterilmiştir. Yapılan lineer regresyon analizinde heterozigot hasta sonuçlarının analizden çıkarılması ile fenotipleme sonuçları başlığı altında gösterilen doz konsantrasyon ilişkisinin değiştiği ve elde edilen r^2 değerinin 0,62'den 0,78'e çıktığı tespit edilmiştir (Şekil 19).

Tedavi şekli	Yabanıl alel (mg/L)	Varyant alel L48V (mg/L)	Varyant alel P24T (mg/L)
Monoterapi	3,4	2,4	-
Lamotrijin + Valproik asit	6,1	4,5	3,8
Lamotrijin + DAE	4,3	4,1	3,1

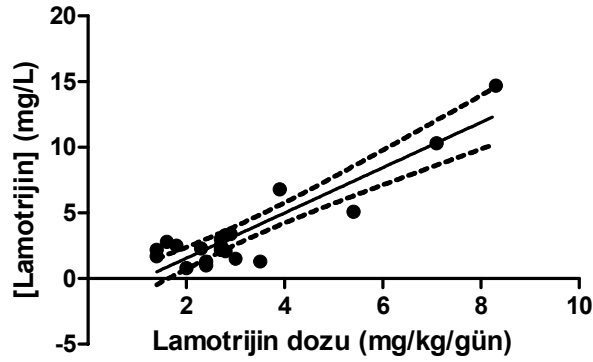
Tablo 12. Yabanıl tip UGT1A4 ve varyant UGT1A4 enzimi taşıyan monoterapi ve politerapi hastalarında plazma lamotrijin konsantrasyonunun ortalama değeri mg/L olarak gösterilmektedir. Günlük lamotrijin dozları ve sigara içme alışkanlığı dikkate alınmamıştır. Son grupta yer alan hastaların günlük lamotrijin dozları çoğunlukla 3 mg/kg'dan yüksektir. DAE: Diğer antiepileptikler



Şekil 17. Tek başına lamotrijin kullanmakta olan hastaların plazma lamotrijin konsantrasyonlarının heterozigot UGT1A4*3 aleli taşıma durumlarına göre karşılaştırılması gösterilmektedir. Sigara içen hastalar dahil edilmemiştir.



Şekil 18. Sigara içiminin UGT1A4 enziminin heterozigot L48V alelini taşıyan hastalarda plazma lamotrijin konsantrasyonu üzerindeki etkisi gösterilmektedir. Sigara içmeyen yabanıl tip grubu ile her iki heterozigot grubu arasında istatistiksel anlamlılık bulunmuştur.



Şekil 19. Yabanıl tip alel taşıyan monoterapi hastalarında lamotrijin dozu ile plazma lamotrijin konsantrasyonu arasındaki ilişki gösterilmektedir. Korelasyon analizi Pearson testi uygulanmıştır ($r^2=0,78$, $p < 0,001$).

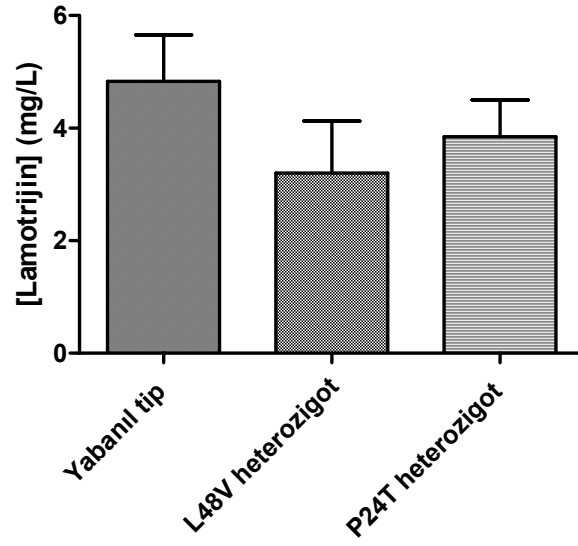
4.2.2. Lamotrijin ile birlikte valproik asit kullanan hastalar (Politerapi)

Bu grupta yer alan 38 hastadan 3'ü erkek, 4'ü kadın olmak üzere, 7'sinin UGT1A4*3 alelini heterozigot olarak, 1 erkek hastanın ise bu aleli homozigot olarak taşıdığı saptanırken, UGT1A4*2 aleli heterozigot olarak 3 kişide tespit edilmiştir.

UGT1A4*3 alel polimorfizmi açısından heterozigot olan hastaların günlük lamotrijin dozları 1'i hariç 1-3 mg/kg olarak belirlenmiş, ölçülen ortalama plazma lamotrijin konsantrasyonları 4,5 mg/L olarak hesaplanmıştır. Ayrıca bu hastalardan 2'sinin sigara içme alışkanlığı olduğu tespit edilmiştir. Günlük lamotrijin dozu 3-5 mg/kg arasında olan bir homozigot hastanın ise örnekleme zamanı 7,5 saat olarak belirlenen plazma lamotrijin konsantrasyonu 18,6 mg/L olarak ölçülmüştür.

UGT1A4*2 alelini heterozigot olarak taşıyan 3 kadın hastanın günlük lamotrijin dozlarının 1-3 mg/kg olduğu ve sigara içme alışkanlıklarının bulunmadığı saptanmış, ortalama plazma lamotrijin konsantrasyonları 6,8 mg/L olarak ölçülmüştür. Ancak içlerinden birinin örnekleme zamanı 4 saat olduğu için ölçülen plazma lamotrijin düzeyi yüksek çıkmıştır. Diğer iki kişinin ortalaması ise 3,8 mg/L olarak hesaplanmıştır.

Her iki polimorfizmin plazma lamotrijin konsantrasyonu üzerindeki etkisi Şekil 20'de gösterilmiştir. Sigara içen hastalar dahil edilmemiştir. Tek yönlü varyans analizi ve uygulanan Dunnett testi sonucu kontrol grubu olan lamotrijin ve valproik asit kullanan yabani tipteki hastaların plazma lamotrijin düzeyleri ile UGT1A4*2 ve UGT1A4*3 alelini heterozigot olarak taşıyan hastaların sonuçları arasında bir anlamlılık bulunamamıştır. Özellikle L48V heterozigot olan hastalarda plazma lamotrijin düzeyinde bir düşme eğilimi olduğu izlenmektedir.



Şekil 20. L48V ve P24T polimorfizmlerinin plazma lamotrijin konsantrasyonu üzerindeki etkisi lamotrijin ile birlikte valproik asit kullanan ve günlük lamotrijin dozları 1-3 mg/kg olan hastalarda gösterilmiştir. Sigara içen ve L48V heterozigot olan 2 hastanın sonuçları dahil edilmemiştir.

4.2.3. Lamotrijin ile birlikte diğer antiepileptik ilaçları kullanan hastalar

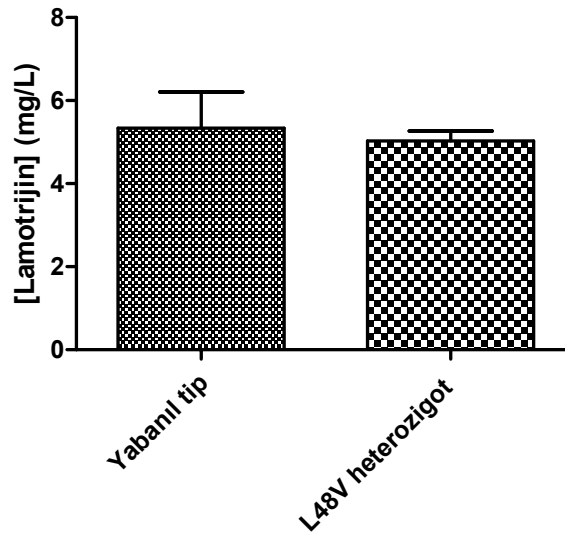
(Politerapi)

Bu grupta 2'si erkek, 8'i kadın olmak üzere, toplam 10 kişinin UGT1A4*3 alelini heterozigot, 1 hastanın ise homozigot olarak taşıdığı saptanmıştır. Heterojen olan hastaların lamotrijin dozları 3,1-5,4 mg/kg/gün arasında değişirken, ortalama lamotrijin plazma düzeyleri sigara içme alışkanlığı olan 3 kişinin ölçüm düzeyi katılmaksızın 6,3 mg/L olarak hesaplanmıştır.

UGT1A4*3 aleli homozigot olan 1 kişinin ise sigara içme alışkanlığı olan bir kadın olduğu belirlenmiş, 3,7 mg/kg/gün olarak kullandığı lamotrijinin örnekleme zamanı 8 saat olarak belirlenen plazma düzeyi 0,4 mg/L olarak saptanmıştır.

Ayrıca P24T polimorfizmi heterozigot olan 1 kişinin aynı zamanda L48V polimorfizmini de heterozigot olarak taşıdığı tespit edilmiştir. Bu kişinin de sigara içme alışkanlığı olduğu saptanmış, örnekleme zamanı 5 saat olarak belirlenen plazma lamotrijin düzeyi 3,1 mg/L olarak ölçülmüştür.

L48V polimorfizminin lamotrijin ile birlikte diğer antiepileptik ilaçları (valproik asit dışında) da kullanan hastalarda plazma lamotrijin konsantrasyonu üzerindeki etkisine bakılmış ve istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır. Ayrıca hasta sayısı polimorfizm olan grupta sigara içenleri ve örnekleme zamanı 5 saat olan 1 kişiyi de çıkarınca çok az olduğu için sağlıklı bir sonuca varılamamış, polimorfik enzim sahibi olan hastalarda lamotrijin düzeyinin çok küçük bir düzeyde düşüş gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 21).



Şekil 21. Lamotrijin ile birlikte diğer antiepileptik ilaçları da kullanan hastalarda L48V polimorfizminin plazma lamotrijin konsantrasyonu üzerindeki etkisi gösterilmektedir. Yapılan Student'in t testi sonucu istatistiksel bir anlamlılık elde edilmemiştir.

4.2.4. Lamotrijin ile birlikte valproik asit ve diğer antiepileptik ilaçları kullanan hastalar (Politerapi)

Hastalardan yalnızca 1 kişinin hem L48V hem de P24T polimorfizmlerini heterozigot olarak taşıdığı belirlenmiştir. Geri kalan tüm hastalar yabancı tiptedir. Günlük lamotrijin dozu 3,4 mg/kg olan kadın hastanın örnekleme zamanı 5 saat olan plazma lamotrijin konsantrasyonu 11,2 mg/L olarak ölçülmüştür. Hastanın sigara içme alışkanlığının olduğu da belirlenmiştir.

Bu grupta yetersiz hasta sayısı olduğu için UGT1A4 enziminin alellerinin plazma lamotrijin konsantrasyonu üzerindeki etkileri değerlendirilememiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Çalışmamızda epilepsi nöbetlerinin profilaksisinde kullanımı giderek artış göstermekte olan lamotrijin ilacının metabolizmasının büyük bir bölümünden sorumlu olan UGT1A4 enziminin P24T ve L48V polimorfizmleri araştırılmış ve Türk toplumundaki sıklığı belirlenmiştir. Ayrıca plazma lamotrijin konsantrasyonları ölçülerek, monoterapi hastalarında ya da politerapi hastalarında polimorfik enzimlerin lamotrijinin plazma konsantrasyonu üzerindeki fonksiyonel etkileri değerlendirilmiştir.

5.1. Genotipleme sonuçları ve polimorfik enzimlerin aktivitesi:

Elde ettiğimiz sonuçlara göre UGT1A4 enziminin L48V polimorfizmi olarak adlandırılan UGT1A4*3 aleli hastalarımızın % 22,4'ünde heterozigot olarak, % 1,5'inde homozigot olarak saptanırken, P24T polimorfizmini yansıtan UGT1A4*2 aleli ise yalnızca heterozigot olarak % 3,8 oranında tespit edilmiştir.

Polimorfik alel taşıyanlar ile taşımayanların plazma lamotrijin konsantrasyonlarının karşılaştırılması, polimorfik olan UGT1A4 enziminin aktivitesi hakkında bilgi edinmemizi sağlamıştır. Heterozigot UGT1A4*3 alelinin yüksek bir oranda saptanması ise özellikle heterozigot L48V polimorfizminin fonksiyonel etkisini net bir şekilde belirleyebilmemize neden olmuştur. Buna göre; heterozigot L48V polimorfik olan UGT1A4 enzimlerinin plazma lamotrijin konsantrasyonu üzerinde düşürücü bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Tek başına lamotrijin kullanan ve sigara içme alışkanlığı olmayan grupta, plazma lamotrijin düzeyleri, L48V polimorfizmi açısından karşılaştırıldığında, polimorfik grubun plazma lamotrijin konsantrasyonunda 0,5 katı kadar bir düşme olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca doz-konsantrasyon eğrisinde uygulanan lineer regresyon analizi ile doz-konsantrasyon arasındaki ilişkinin doğrusallığı genotipleme çalışmalarından sonra farklılık göstermiştir. Böylece UGT1A4 enziminin özellikle L48V genetik polimorfizminin lamotrijin ilacının glukuronidasyonu üzerindeki yüksek aktiviteli etkisi kanıtlanmıştır.

Sigara içmeyen yabanıl tiplerin kontrol grubu olarak kabul edildiği monoterapi hastalarında, sigara içmeyen heterozigot ve sigara içen heterozigot grubu

ile kontrol grubunun karşılaştırması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca politerapi hastalarında da polimorfik olan UGT1A4*3 alelini heterozigot taşıyan hastaların plazma lamotrijin düzeyleri yabani tip enzim içerenlere göre daha düşük olarak ölçülmüştür.

UGT1A4*3 alelini homozigot olarak taşıyan 2 kişi saptanmıştır. Ancak bu hastalardan birinin lamotrijin (3,7 mg/kg/gün) ile birlikte valproik asit kullanıyor olması, diğerinin ise lamotrijin (3,2 mg/kg/gün) beraberinde indükleyici antiepileptikleri kullanıyor olması ve sigara içmesi homozigot olan L48V alelinin fonksiyonel etkisini değerlendiremememize yol açmıştır. Bu hastaların örnekleme zamanları sırasıyla 7,5 saat ve 8 saat olarak belirlenirken, plazma lamotrijin düzeyleri 18,6 mg/L ve 0,4 mg/L olarak ölçülmüştür.

UGT1A4*2 aleli sadece 5 hastada heterozigot olarak polimorfik bulunmuştur. Bu hastalardan 2 tanesi beraberinde L48V polimorfizmini de heterozigot olarak taşımaktadır. UGT1A4*2 aleli için monoterapi olarak lamotrijin kullanan hastanın olmaması ve kullanılan lamotrijin dozlarının geniş bir aralıkta seyretmesi nedeni ile net bir aktivite değerlendirmesi yapılamamıştır. Ancak lamotrijin ile birlikte valproik asit kullanan 2 hastanın plazma lamotrijin düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düşme olduğu gösterilmiştir. Yine beraberinde valproik asit kullanan üçüncü heterozigot hasta ise örnekleme zamanı 4 saat olduğu için değerlendirmeye katılamamıştır.

Her iki polimorfizmi de heterozigot olarak barındıran 2 hastanın plazma lamotrijin konsantrasyonlarındaki olası değişiklik ise hastalardan birinin lamotrijin (3,4 mg/kg/gün) beraberinde valproik asit ve diğer antiepileptikleri, diğer hastanın ise lamotrijin (3,1 mg/kg/gün) beraberinde barbeksaklon ve levetirasetam kullanıyor olması nedeni ile değerlendirilememiştir. Bu hastaların örnekleme zamanları 5 saat olup, plazma lamotrijin düzeyleri sırasıyla 11,2 mg/L ve 3,1 mg/L'dir.

Genotip bir kişinin tüm lokuslardaki veya tek bir lokustaki genetik yapısını oluşturan aleller kümesi olarak ifade edilmektedir. İlaç metabolizmasını etkileyen en önemli faktörlerden biri, “genetik polimorfizm” olarak adlandırılan genetik yapıdaki farklılıklardır. Polimorfizm iki alt gruba ayrılmakta ve enzim aktivitesi yüksek olan kişilerden oluşan grup ‘çok hızlı metabolizör’, enzim aktivitesi düşük olan grup ise ‘yavaş metabolizör’ olarak tanımlanmaktadır. Birinci grupta

istenmeyen etkiler daha az izlenirken ilacın etkisizliği gözlenebilmekte, ikinci grubu oluşturan bireyler ise istenmeyen etkilere daha duyarlı olup, ilacın toksik etkileri daha sık olarak ortaya çıkabilmektedir (Yamazaki ve diğ., 2000). Bizim sonuçlarımız ile özellikle L48V polimorfizmi saptanan hastalarda izlenen düşük plazma lamotrijin konsantrasyonu, bu kişilerde enzim aktivitesinin ‘çok hızlı metabolize edici grup’ arasında olabileceğini göstermektedir.

Farmakogenetik çalışmalar arasında ilaç metabolizmasında görevli olan enzimlerin fonksiyonel etkileri geniş bir yer tutmaktadır. Polimorfik izozimleri yapılan bir çok çalışma ile ortaya konmuş olan karaciğer mikrozomal enzimleri, CYP2C9, CYP2C19 ve CYP2D6, ilaçların metabolizmasının % 40’ndan sorumlu olduğu bilinmekte olan enzimlerdir (Ingelman ve Sundberg, 2004). Bizim çalışmamızda ise farmakogenetik çalışmalar içinde nadiren karşılaştığımız UGT enzimlerinden biri olan UGT1A4 enzimi yer almıştır.

UGT1A4 enziminin fonksiyonel polimorfizmleri ilk olarak 2004 yılında Ehmer ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Ehmer ve diğ., 2004). Çalışmalarında UGT1A gen bölgesinde yer alan UGT1A3, UGT1A4, UGT1A8, UGT1A9 ve UGT1A10 enzimlerinin polimorfizmlerini polimeraz zincir reaksiyonu ve sekans analizi yöntemlerini kullanarak ortaya çıkarmışlardır. Soyları Kafkaslardan gelen Almanlarla yapılan çalışmada, UGT1A4 enziminin P24T ve L48V polimorfizmlerini sırasıyla % 8 ve % 9 oranında saptamışlardır. Ayrıca özellikle her iki polimorfizmin çoğunlukla aynı hasta üzerinde gözlendiğini belirtmişlerdir. Bu iki varyantın ksenobiyotikler (β -naftilamin ve benzidin) ve steroidlerin (trans-androsteron ve dihidrotestosteron) glükuronidasyonunu düşürdüğü ancak substrata bağlı olarak varyant enzim aktivitesinin değişkenlik gösterdiğini de tespit etmişlerdir. UGT1A4 L48V varyant enziminin özellikle steroidlerin, UGT1A4 P24T varyantının ise ksenobiyotiklerin glükuronidasyonu için önemini vurgulamışlardır. Bizim çalışmamızda homozigot olarak P24T polimorfizmine rastlanmazken, L48V polimorfizmi homozigot olarak % 1,5, heterozigot olarak ise % 22,4 oranında gözlenmiştir. Her iki polimorfizm yalnızca 2 hastada birliktelik göstermiştir. Ayrıca her iki varyant enzim aktivitesinin lamotrijin glükuronidasyonunda önem taşıdığı, özellikle L48V polimorfizminin plazma lamotrijin düzeyinde düşmeye yol açtığı gösterilmiştir.

Literatürde lamotrijin ve UGT1A4 enzimi genetik çalışması ile ilgili olan sadece 1 adet çalışma yer almaktadır (Kim ve diğ., 2006). Lamotrijin kullanımı sırasında en sık karşılaşılan istenmeyen etki olan döküntünün, UGT1A4 gen polimorfizmi ile ilişkisinin sorgulandığı bu çalışmada, epilepsili Kore’li hastalar yer almış ve L48V ile P24T polimorfizimleri saptanmıştır. Döküntülü hastalarda anlamlı bir farklılık olmaksızın, L48V varyant enziminin kontrol grubunda homozigot olarak % 11,9, heterozigot olarak ise % 30,9 oranında olduğunu göstermişlerdir.

Japonlarla yapılan bir diğer çalışmada ise UGT1A4 enziminin 1. ekzonunda 19 farklı genetik varyasyon tespit edilmiştir (Saeki ve diğ., 2005). UGT1A4 L48V polimorfizmi % 12 oranında saptanırken, P24T polimorfizmine hiç rastlanmaması bu iki polimorfizm açısından etnik farklılıkların olabileceği durumunu ortaya çıkarmıştır. Bir başka Japon grubun yaptığı çalışma ile P24T polimorfizmi hiç saptanmazken, L48V polimorfizmi % 16 oranında bulunmuştur (Mori ve diğ., 2005). Varyant enzimlerin aktivitesi klozapin, trans-androsteron, imipiramin ve siproheptadin için yüksek olarak bulunurken, tigogenin glükuronidasyonu açısından düşük olarak hesaplanmıştır. Antipsikotik bir ilaç olan klozapinin glükuronidasyonu varyant enzimlerle iki katına çıkmıştır. L48V varyant enziminin glükuronidasyon üzerindeki aktivitesinin değişiklik gösterebileceği üzerinde durmuşlardır. Bu çalışmada ayrıca UGT1A4 enziminin L150L ve P268P olarak isimlendirilen sessiz transisyonları (geçiş) da % 15 ve % 16 oranlarında tespit edilmiştir.

UGT1A4*3 alelinin aktivitesini değerlendiren çalışmalarda, kinetik parametre ölçümleri yapılmış ve enzim aktivitesinin maksimum hızı ve etkililiği hesaplanmıştır. Bizim çalışmamızda varyant enzim aktivitesinin kinetik parametreleri hesaplanmazken, ölçülen plazma lamotrijin düzeylerinin ortalama değerleri yabanıl tip enzim ile varyant enzim arasında aktivite yönünden nasıl bir fark olduğu konusunda bilgi sağlamıştır. Sigara içme alışkanlığı olmayan monoterapi hastalarında, yabanıl tip enzim ile glükuronidasyona uğrayan lamotrijin (ortalama plazma konsantrasyonu: 2,67 mg/L) ve varyant olan enzim ile metabolizmaya uğrayan lamotrijin (ortalama plazma konsantrasyonu: 1,28 mg/L) plazma ölçümleri karşılaştırıldığında, UGT1A4 enzim aktivitesinin % 52 oranında arttığı gösterilmiştir.

Kafkaslardan oluşan karaciğer kanseri hastaları grubunda yer alan sağlıklı gönüllülerde P24T varyant enzim sıklığının (% 13), L48V varyantına göre daha

yüksek olduğu rapor edilmiş, hasta grubu ile kontrol grubu arasında bir fark bulunmamıştır. Yine aynı çalışmada P24T varyant enziminin bütün içinde bulunan prokanserojen 4(-metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-butanon maddesinin glükuronidasyonu üzerindeki etkinliği istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ölçülmüştür.

Literatürdeki çalışmalarla karşılaştırdığımızda, çalışmamızın genotipleme sonuçlarının ve bu sonuçların fonksiyonel etkilerinin şu ana kadar yapılmış olan az sayıdaki çalışma ile uyumlu olduğunu görmekteyiz. UGT1A4*2 aleli için % 3,8 ve UGT1A4*3 aleli için % 25,6 olarak hesapladığımız alel frekanslarımız özellikle Japon grupların araştırma sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. Ancak hasta sayısının artırılması gerekmektedir. Özellikle UGT1A4*2 alelinin aktivite değerlendirmesi için polimorfik olan hasta sayısı arttırılmalıdır. Ayrıca homozigot olan hastalar her iki polimorfik alel için de sayı olarak yok denecek kadar az çıkmıştır. Çalışmamızda yalnızca L48V heterozigot polimorfizminin fonksiyonel etkisi net olarak değerlendirilebilmiş ve polimorfik enzimin lamotrijinin glükuronidasyonunu arttırarak plazma düzeyinin düşmesine sebep olduğu ortaya çıkmıştır.

Polimorfik olan enzimlerin fonksiyonlarının değerlendirmesi için plazma lamotrijin düzeyleri kullanılmıştır. Lamotrijinin glükuronidasyonu sonucunda primer olarak ortaya çıkan 2-N glükuronid metabolitinin ölçümü yapılamamıştır. Bu metabolitin ölçümü için bizim plazma lamotrijin düzeylerini ölçmekte kullandığımız HPLC yerine sıvı kromatografisi-kütle spektrofotometresi gibi yöntemler kullanılmaktadır (Öhman ve diğ., 2008). Plazma lamotrijin konsantrasyonunun metabolit düzeyine oranı enzim aktivitesi değerlendirmesi için daha güvenli sonuçlanacaktır. Bir diğer seçenek ise çeşitli farmakokinetik parametrelerin ölçülebilmesidir. Literatüre baktığımız zaman polimorfizm araştıran ve polimorfik genlerin aktivitesini ölçen çalışmalarda genellikle hız derecesini gösteren Vmaks (birim zamanda oluşan ürünün mol sayısının maksimum olduğu reaksiyon hızı) ve Km (Henri-Michaelis-Menten sabitesi-maksimum hızın yarısındaki substrat derişimi) gibi çeşitli farmakokinetik parametre hesaplamaları aktivite göstergesi olarak kullanılmaktadır (Mori ve diğ., 2005). Bu durum çalışmamız açısından

kısıtlayıcı bir faktör olarak değerlendirilebilir bir nitelik taşısa da, L48V polimorfizmi açısından sonuçlarımız açık olarak gözükmektedir.

5.2. Fenotipleme sonuçları:

Çalışmamızda HPLC yöntemi kullanılarak ölçülen plazma lamotrijin konsantrasyonları fenotipleme sonuçları olarak değerlendirilmiştir. Fenotipleme sonuçları hastaların lamotrijin ile birlikte diğer antiepileptik ilaçları kullanıp kullanmamalarına göre sınıflandırılmıştır. Fenotip bir genotipin morfolojik, klinik, biyokimyasal veya moleküler özellik olarak gözlenebilen ekspresyonudur (Nelson ve diğ., 2005).

Monoterapi hastalarında ortalama lamotrijin konsantrasyonu 3,2 mg/L olarak belirlenmiştir. Valproik asitin tedaviye eklendiği hastalarda plazma lamotrijin konsantrasyonu daha yüksek bulunurken, mikrozomal enzimleri indüklemeye özelliği olan antiepileptik ilaçların ve sigara içme alışkanlığının plazma lamotrijin düzeyini düşürdüğü saptanmıştır. Plazma lamotrijin düzeyleri açısından erkek ve kadın hastalarda bir fark gözlenmezken, yirmi yaş ve altındaki hastalarda lamotrijin konsantrasyonu yirmi yaşın üzerinde olanlarla kıyaslandığında plazma lamotrijin konsantrasyonunun yaşla birlikte artma eğiliminde olduğu gözlenmiştir.

Doz-konsantrasyon ilişkisi yabanıl tip ve varyant tip enzimleri içeren plazma lamotrijin konsantrasyonu sonuçları ile ifade edildiğinde kullanılan lamotrijin dozu ile uyumsuz olan ya da farklılık gösteren plazma ölçümlerinin fazlaca olduğu izlenmiştir. Sadece yabanıl tip enzim olan grubun sonuçları ise daha anlamlı ve daha doğrusal bir eğri ile sonuçlanmıştır.

Lamotrijinin kronik kullanımı ile sağlanan antikonvülsan etkinin 100-400 mg/kg/gün dozlarında gerçekleştiği ve ortalama plazma konsantrasyonunun 1-3 mg/L arasında değiştiği lamotrijinin farmakokinetik özellikleri ve güvenliği ile ilgili araştırmalarda yer almıştır (Cohen ve diğ., 1987; Ramsay ve diğ., 1991). Lamotrijinin diğer antiepileptik ilaçlarla birlikte eş zamanlı kullanımı enzim indüksiyonu ya da enzim inhibisyonu nedeni ile plazma lamotrijin konsantrasyonunun etkilenmesine yol açmaktadır. İndüksiyon sonucunda enzimin sentezi artmakta, dolayısıyla bu enzimle metabolize olan ilacın biyotransformasyonu artarak, plazma düzeyi düşmektedir. İndüksiyonu meydana getirecek olan enzim

sentezinin artması için gereken süre iki gün olabileceği gibi bir haftadan daha uzun da olabilmektedir. İndüksiyon süresi ise indükleyen ilacın yarılanma ömrü ile bağlantılıdır. İndüksiyonun tersine, enzim inhibisyonu çok hızlı oluşmakta ve ilacın kan düzeyi hızla yükselip, farmakolojik etkileri artmakta, istenmeyen etkileri ortaya çıkabilmektedir (Yamazaki ve diğ., 2008).

Lamotrijin klirensi karaciğer mikrozomal enzimlerini indükleyen ya da inhibe eden ilaçlar tarafından etkilenmektedir. Fenitoin, karbamazepin, fenobarbital, metsüksimid, okskarbazepin gibi mikrozomal enzimleri indükleyen diğer antiepileptik ilaçların ya da epileptik olmayan rifampisin, asetaminofen, sertralin ve simetidin gibi ilaçların enzim indüksiyonu yaparak lamotrijin klirensini arttırdığı ve plazma konsantrasyonunu düşürerek etkisinin çabuk bitmesine neden olduğu Garnett (2002) tarafından belirtilmiştir. Lamotrijin plazma konsantrasyonunun doza olan oranının monoterapi hastalarında yaşla birlikte arttığı, enzim indüktörü ilaçlarla birlikte kullanımında ise yaşla birlikte azaldığı gösterilmiştir (Armijo ve diğ., 1999). Yine aynı oranın karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada ise karbamazepin, fenitoin ve fenobarbitalde konsantrasyon/doz oranı düşerken, valproik asitle lamotrijini birlikte kullanan hastalarda üç kat daha fazla olarak hesaplanmıştır (Bottinger ve diğ., 1999). Monoterapi hastalarında 43,2 ml/saat/kg olarak ölçülen ortalama lamotrijin klirensinin fenitoin ile birlikte lamotrijin kullanan hastalarda 101,3 ml/saat/kg'a yükseldiği, valproik asitle birlikte ise 16,9 ml/saat/kg'a düştüğü gösterilmiştir (Weintraub ve diğ., 2005). Yine aynı çalışmada 25,4-32,8 saat arasında değişen lamotrijin eliminasyon yarılanma ömrünün, valproik asit kullananlarda 48,3-70,3 saate kadar yükseldiği, enzim indükleyici diğer antiepileptik ilaçlarla ise 12,6-14,4 saate kadar düştüğü belirtilmiştir.

Bizim sonuçlarımız literatürde yer alan çalışmalarla uyumlu olup, plazma lamotrijin konsantrasyonları karşılaştırma için kullanılmıştır. Buna göre, valproik asit kullananlarda ortalama lamotrijin düzeyinin monoterapilerin 1,9 katı oranında arttığı, enzim indükleyici antiepileptikler arasında tanımlanan karbamazepin, barbeksaklon ya da fenitoin ile birlikte kullanıldığında ise 2,1 oranında düştüğü tespit edilmiştir. Levitirasetam ya da topiramati beraberinde kullanan hastaların lamotrijin düzeylerinde bir değişiklik görülmezken, okskarbazepin alan ve günlük lamotrijin dozu 1,3 mg/kg ve 1,2 mg/kg olan 2 hastanın plazma lamotrijin düzeyi yüksek

çıkıştır. Ortalama plazma lamotrijin düzeyi 10,05 mg/l olan bu iki kişi dışında lamotrijin dışında okskarbazepin ve fenobarbital kullanan bir hastanın lamotrijin düzeyi enzim indükleyici özelliği olan fenobarbitale rağmen yüksek bulunmuştur. Bu konuda hasta sayısı arttırılıp daha geniş bir çalışma planlanmalıdır. Literatürde bu konuyla ilgili net bir görüş bulunmamaktadır (Sidhu ve diğ., 2004).

CYP1A1/1A2, CYP2A1/2A2, CYP2B1/2B2 ve CYP2E1 mikrozomal enzimleri ve ayrıca UGT1A9 ve UGT2B7 mikrozomal enzimleri üzerindeki indükleyici etkisi bilinen tütün ve nikotinin bu etkisi çalışmamızda da göz önüne alınmıştır. Sigara içme alışkanlığı olan hastalar ayrı bir grup olarak değerlendirilmiş ve böylece bu alışkanlığın plazma lamotrijin konsantrasyonu üzerindeki etkisi hem monoterapi, hem politerapi, hem de polimorfizm açısından irdelenmiştir. Her ne kadar lamotrijinin metabolizması büyük ölçüde UGT1A4 enzimi tarafından gerçekleşiyorsa da, UGT2B7 ile glükuronidasyona uğrayan küçük bir bölümü nikotinin etkisine maruz kalıp, plazma düzeylerini etkileyebilir düşüncesinden yola çıkılmıştır. Monoterapi olarak lamotrijin kullanan epilepsili bir grup hastada yapılan çalışmada, sigara içme alışkanlığı olan hastalarda plazma lamotrijin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük çıkılmıştır (Reinsberger ve diğ., 2008). UGT2B7 enziminin indüklendiğini ya da altta yatan başka mekanizmaların rol oynadığını ve plazma lamotrijin düzeyleri üzerinde düşmeye neden olduklarını belirtmişlerdir.

Sonuçlarımız sigara içme alışkanlığının hem monoterapi hem de politerapi hastalarında plazma lamotrijin düzeyleri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Valproik asitin plazma lamotrijin düzeyini yükseltici etkisi sigara içme alışkanlığı olanlarda daha az oluyor gibi gözükmemtedir. İndükleyici diğer antiepileptik ilaçları kullanan hastalarda ise, lamotrijin düzeyleri daha da düşük çıkılmıştır. Lamotrijin kullanan hastalarda doz ayarlaması yapılırken sigara kullanma alışkanlığı göz önüne alınmalıdır.

Enzim indüksiyonu ilacın kendi metabolizma enziminin indüklemesi ile oluyorsa otoindüksiyondan bahsedilmektedir. Lamotrijinin enzim indükleyici özelliğinin olmamasına rağmen sadece başlangıç dozunda görülebilen otoindüksiyon yapıcı bir etkiye sahip olduğuna dair literatürde çok kısıtlı sayıda çalışma yer almaktadır. Bu etkinin 3-4 hafta sonra ortadan kalktığını ya da böyle bir etkisinin

olmadığını vurgulayan çalışmalar yer almaktadır (Cohen ve diğ., 1987; Peck, 1991). Hussein ve Posner'in (1997) yaptığı çalışmada monoterapi olarak lamotrijin kullanan hastalar yer almıştır. Lamotrijin klirensinin 48. hafta sonunda % 17,3 oranında arttığını ve klinik olarak çok önemli olmayan bir derecede otoindüksiyon özelliği olduğunu göstermişlerdir. Bir diğer çalışmada günlük dozu 150 mg olan monoterapi hastalarında lamotrijin klirensinin % 37 oranında arttığı ve lamotrijinin minimal bir otoindüksiyon etkisi olduğu görüşü yer almaktadır (Biton, 2006). Bu çalışmalara ek olarak plazma lamotrijin konsantrasyonunun % 17 oranında düştüğü ve otoindüksiyon etkisinin 2 hafta sonunda bittiğini gösteren bir çalışma da mevcuttur (Patsalos, 1999). Bizim çalışmamızda kullanım süresi 6 aydan daha az olan monoterapi hastalarında ortalama lamotrijin düzeyi 1,66 mg/L iken 6 ay ile 3 yıl arasında olanlarda 2,5 mg/L ve 3 yıldan daha fazla kullananlarda ise 3,2 mg/L olarak ölçülmüştür. Elde ettiğimiz plazma lamotrijin konsantrasyonları lamotrijinin otoindüksiyon açısından değerlendirildiğinde lamotrijin kullanım süresi arttıkça plazma lamotrijin düzeyinde bir artış eğilimi olduğu gözlenmiştir. Bu durum lamotrijinin kullanılmaya başladığı ilk dönemlerde bir otoindüksiyon yapıcı etkisi olabileceğini göstermiştir. Ancak veriler detaylı olarak ve polimorfizm açısından da incelendiği zaman bazı hastaların UGT1A4*3 aleli taşıdığı ve bu hastalarda lamotrijin düzeylerinin daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durumda polimorfik genlerin etkisinin, lamotrijinin otoindüksiyon özelliğinin, ya da her ikisinin birlikteliğinin bu şekilde bir sonuca yol açma olasılığı düşünülmüş, net bir sonuca ulaşılamamıştır. Yalnızca yabancıl tipteki enzimlerin glükuronidasyonu ile elde edilen ölçümler ise otoindüksiyon özelliğini değerlendirmek için yeterli olmamıştır.

Çalışmaya katılan hastaların farklı dozlarda lamotrijin kullanması, lamotrijini düzenli olarak alıp almadıklarının bilinmemesi, örnekleme zamanlarının bazı hastalarda son dozdan hemen önce olmaması, lamotrijin ile birlikte diğer antiepileptik ilaçların farklı dozlarda tedavi protokollerinde yer alması çalışmamız açısından kısıtlayıcı faktörler olmuştur. Sonuçları değerlendirirken gruplandırmalarımız bu faktörleri olabildiğince standardize etmeye yönelik bir şekilde yapılmaya çalışılmıştır.

Elde ettiğimiz tüm bu verilerin ışığında, lamotrijin ilacının metabolizmasından sorumlu olan UGT1A4 enzimi polimorfizminin plazma

lamotrijin düzeyleri üzerinde etkili olabileceğini söyleyebiliriz. Heterozigot L48V polimorfizminin Türk toplumunda % 22,4 gibi azımsanmayacak bir oranda görülmesi lamotrijin plazma düzeyleri takibinin hem monoterapi hem de politerapi alan hastalarda önemli olduğunu, tedaviye başlamadan önce elde edilecek polimorfizm sonucu ile doz ayarlaması yapılmasının gerekli olabileceğini, ya da istenilen etkinin görülmediği durumlarda UGT1A4*3 alelinin kontrol edilebileceğini göstermektedir. Kısıtlayıcı faktörler göz önüne alınarak standardizasyonu sağlanmış daha büyük popülasyonlu çalışmalar planlanmalı ve ileri çalışmalarda farmakokinetik parametrelerin ve ayrıca metabolitlerin ölçülmesi ile sadece L48V polimorfizminin değil P24T polimorfizminin fonksiyonel etkileri de aydınlatılmalıdır. Böylece daha etkili ve daha güvenli bir tedavi ile hem hastaların hayat kalitesi artacak, hem de tedavi maliyetleri en aza indirilmiş olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Anderle P, Huang Y, Sadee W. Intestinal membrane transport of drugs and nutrients: genomics of membrane transporters using expression microarrays. *Eur J Pharm Sci* 2004;21:17-24.
- Armijo JA, Bravo J, Cuadrado A. Lamotrigine serum concentration-to-dose ratio: influence of age and concomitant antiepileptic drugs and dosage implications. *Ther Drug Monit* 1999;21:183-190.
- Aynacıoğlu AŞ, Sachse C, Bozkurt A, Kortunay S, Nacak M, Schroder T. Low frequency of defective alleles of cytochrome P450 enzymes 2C19 and 2D6 in the Turkish population. *Clin Pharmacol Ther* 1999a;66:185-92.
- Aynacıoğlu AŞ, Brockmöller J, Bauer S, Güzelbey P, Öngen Z, Nacak M, Roots I. Frequency of cytochrome P 450 CYP2C9 variants in Turkish population and functional relevance for phenytoin. *Br J Clin Pharmacol* 1999b;48:409-415.
- Barbaros H. Polimeraz Zincir Reaksiyonu. *Klin Tıp Bilimleri*. 1992;12:49-58.
- Bechi E. Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs: comparison of two recent guidelines. *Lancet Neurol* 2004;3:618-621.
- Benedetti MS. Enzyme induction and inhibition by new antiepileptic drugs: a review of human studies. *Fundam Clin Pharmacol* 2000;14(4):301-319.
- Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8170-8174.
- Bialer M, Johannessen SI, Kupferberg HJ, Levy RH, Loiseau P, Perucca E. Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Sixth Eilat Conference (EILAT VI). *Epilepsy Res* 2002;51(1-2):31-71.
- Birbeck GL, Hays RD, Cui X. Seizure reduction and quality of life improvements in people with epilepsy. *Epilepsia* 2002;43:535-538.
- Biton V. Pharmacokinetics, toxicology and safety of lamotrigine in epilepsy. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2006;2(6):1009-1018.

- Bock KW, Forster A, Gschaidmeier H, Bruck M, Munzel P, Schareck W, Fournel-Gigleux S, Burchell B. Paracetamol glucuronidation by recombinant rat and human phenol UDPglucuronosyltransferases. *Biochem Pharmacol* 1993;45:1809-1814.
- Bock KW, Kohle C. UDP-glucuronosyltransferase 1A6: structural, functional, and regulatory aspects. *Methods Enzymol* 2005;400:57-75.
- Bosma PJ, Chowdhury JR, Huang TJ, Lahiri P, Elferink RP, Van Es HH, Lederstein M, Whittington PF, Jansen PL, and Chowdhury NR, Mechanisms of inherited deficiencies of multiple UDP-glucuronosyltransferase isoforms in two patients with Crigler-Najjar syndrome, type I. *FASEB J* 1992;10:2859-2863.
- Bosma PJ, Seppen J, Goldhoorn B, Bakker C, Oude Elferink RP, Chowdhury JR, Chowdhury NR, Jansen PL. Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J Biol Chem* 1994;269:17960-17964.
- Bottinger Y, Svensson JO, Stahle L. Lamotrigine drug interactions in a TDM material. *Ther Drug Monit* 1999;21:71-174.
- Brodie MJ, Yuen AW: Lamotrigine substitution study: evidence for synergism with valproate? 105 Study Grup. *Epilepsy Res* 1997;26:423-432.
- Buck ML. Lamotrigine in the Treatment of Seizures during Childhood. *Pediatric Pharmacotherapy*. 1999;5(3).
- Burchell B. Genetic variation of human UDP-glucuronosyltransferase. Implications in disease and drug glucuronidation. *Am J Pharmacogenomics* 2003;3:37-52.
- Cassandra E I S, Mark N, Julie M W, David G, Samuel F B, Terrence J OB, Les J S. Update on pharmacogenetics in epilepsy: a brief review. *Lancet Neurol* 2006;5:189-196.
- Christian E, Schmidt D. Modern management of epilepsy: a practical approach. *Epilepsy & behavior* 2008;12(4):501-539.
- Christian P, Strassburg, Sandra Kalthoff, and Ursula Ehmer. Variability and function of family 1-uridine-5-diphosphate-glucuronosyltransferases (UGT1A). *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2008;45(6):485-530.

- Chung WH, Hung SI, Hong HS. Medical genetics: a marker for Stevens-Johnson syndrome. *Nature* 2004;428:486.
- Ciotti M, Marrone A, Potter C, and Owens IS, Genetic polymorphism in the human UGT1A6 (planar phenol) UDP glucuronosyltransferase: pharmacological implications. *Pharmacogenetics* 1997;7:485-495.
- Cohen AE, Land GS, Breimer DD, Yuen WC, Winton C, Peck AW. Lamotrigine, a new anticonvulsant: Pharmacokinetics in normal humans. *Clin Pharmacol Ther* 1987;42:535-541.
- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia* 1981;22:489-501.
- Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 1989;30:389-399.
- Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, Walker MC. Adult Epilepsy. *Lancet* 2006;367:1087-1100.
- Dutton GJ, Storey ID. The isolation of a compound of uridine diphosphate and glucuronic acid from liver. *Biochem J* 1953;53:37-38.
- Dutton GJ. The mechanism of glucuronide formation. *Biochem Pharmacol* 1961;6: 65-71.
- Kim DW, Kim M, Lee SK, Kang R, Lee SY. Lack of Association between L48V Polymorphism in the UGT1A4 Gene and Lamotrigine-induced Rash. *J Korean Epilep Soc* 2006;10(1):31-34.
- Ehmer U, Vogel A, Schütte JK, Krone B, Mannos MP, Strassburg CP, Variation of hepatic glucuronidation: Novel functional polymorphisms of the UDP-Glucuronosyltransferase UGT 1A4. *Hepatology* 2004;39(4): 970-977.
- Elwes RDC, Binnie CD. Clinical pharmacokinetics of newer antiepileptic drugs: lamotrigine, vigabatrin, gabapentin and oxcarbazepine. *Clin Pharmacokinet* 1996;30:403-415.
- Erichsen TJ, Ehmer U, Kalthoff S, Lankisch TO, Müller TM, Munzel PA, Manns MP, Strassburg CP. Genetic variability of aryl hydrocarbon receptor (AhR)-

- mediated regulation of the human UDP glucuronosyltransferase (UGT) 1A4 gene. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2008;230:252-260.
- Escayg A, Heils A, MacDonald BT, Haug K, Sander T, Meisler MH. A novel SCN1A mutation associated with generalized epilepsy with febrile seizures plus—and prevalence of variants in patients with epilepsy. *Am J Hum Genet* 2001;68:866-73.
- Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: Translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999;286:487-491.
- Fang JL, Lazarus P. Correlation between the UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1) TATAA box polymorphism and carcinogen detoxification phenotype: significantly decreased glucuronidating activity against benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol(-) in liver microsomes from subjects with the UGT1A1*28 variant. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13: 102-109.
- Ferraro TN, Buono RJ, The relationship between the pharmacology of antiepileptic drugs and human gene variation: An overview. *Epilepsy and Behavior* 2005;7:18-36.
- Fisher RS, Boas WE, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE) *Epilepsia* 2005;46(4):470-472.
- Fitos, J. Visy, F. Zsila, Z. Bikadi, G. Mady and M. Simonyi, Specific ligand binding on genetic variants of human alpha1-acid glycoprotein studied by circular dichroism spectroscopy, *Biochem Pharmacol* 2004;67: 679-688.
- Forsgren L, Beghi E, Oun A. The epidemiology of Epilepsy in Europe-a systematic review, *Eur J Neurology* 2005;12:245-253.
- Gaitatzis A, Sander JW. The mortality of epilepsy revisited, *Epileptic Disord* 2004;6(1):3-13.
- Garnett WR. Lamotrigine, Interaction with other drugs. In: *Antiepileptic drugs fifth edition* 2002;5:380-388.
- Gastaut H. Classification of the epilepsies. Proposal for an international classification. *Epilepsia* 1969;10:14-21.

- Girard H, Villeneuve L, Court MH, Fortier LC, Caron P, Hao Q, von Moltke LL, Greenblatt DJ, Guillemette C. The novel UGT1A9 intronic I399 polymorphism appears as a predictor of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin glucuronidation levels in the liver. *Drug Metab Dispos* 2006;34:1220-1228.
- Green MD, Tephly TR. Glucuronidation of amines and hydroxylated xenobiotics and endobiotics catalyzed by expressed human UGT1.4 protein. *Drug Metab Dispos* 1996;24:356-363.
- Guberman A, Bruni J. *Essentials of Clinical Epilepsy*. Butterworth- Heineman, U.S.A, 1999.
- Guillemette C, Ritter JK, Auyeung DJ, Kessler FK, and Housman DE, Structural heterogeneity at the UDP-glucuronosyltransferase 1 locus: functional consequences of three novel missense mutations in the human UGT1A7 gene. *Pharmacogenetics* 2000;10:629-944.
- Harvey A.R., Champe P.C., Mycek M.J.: *Antiepileptic Drugs*. Lippincott's illustrated reviews, Pharmacology, 1997;2nd Edition:146-147.
- Heaney DC, MacDonald BK, Everitt A. Socioeconomic variation in incidence of epilepsy: prospective community based study in South east England. *BMJ* 2002;325:1013-1016.
- Hiller A, Nguyen N, Strassburg CP, Li Q, Jainta H, Pechstein B, Ruus P, Engel J, Tukey RH, Kronbach T. Retigabine N-glucuronidation and its potential role in enterohepatic circulation. *Drug Metab Dispos* 1999;27:605-612.
- Huang YH, Galijatovic A, Nguyen N, Geske D, Beaton D, Green J, Green M, Peters WH, and Tukey RH, Identification and functional characterization of UDP-glucuronosyltransferases UGT1A8*1, UGT1A8*2 and UGT1A8*3. *Pharmacogenetics* 2002;12:287-297.
- Hussein Z, Posner J. Population pharmacokinetics of lamotrigine monotherapy in patients with epilepsy: retrospective analysis of routine monitoring data. *Br J Clin Pharmacol* 1997;43:457-465.
- Ingelman M, Sundberg, Pharmacogenetics of cytochrome P450 and applications in drug therapy the past, present and future. *TRENDS in pharmacological Sciences* 2004;25:4.

- Iwai M, Maruo Y, Ito M, Yamamoto K, Sato H, and Takeuchi Y, Six novel UDP glucuronosyltransferase (UGT1A3) polymorphisms with varying activity. *J Hum Genet* 2004;49:123-128.
- Jefferys JG. Models and mechanisms of experimental epilepsies. *Epilepsia* 2003;44(12):44-50.
- Jinno H, Saeki M, Tanaka-Kagawa T, Hanioka N, Saito Y, Ozawa S, Ando M, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, et al. Functional characterization of wild-type and variant (T202I and M59I) human UDP-glucuronosyltransferase 1A10. *Drug Metab Dispos* 2003;31:528-532.
- Kalow W. Historical Aspects of Pharmacogenetics. In *Pharmacogenomics*, Editors: Kalow W, Meyer UA, Tyndale RF 2001;113:1-10.
- Kasai N, Sakaki T, Shinkyo R, Ikushiro S, Iyanagi T, Ohta M, Inouye K. Metabolism of 26,26,26,27,27,27-F6-1 α ,23S,25-trihydroxyvitamin D3 by human UDPglucuronosyltransferase 1A3. *Drug Metab Dispos* 2005;33:102-107.
- Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 8. baskı 1998;1:148-156.
- Kayaalp O. Tıbbi Farmakoloji 11. baskı 2005;1:116-117.
- Kerb R, Aynacioglu AS, Brockmoller J, Schlagenhauser R, Bauer S, Szekeres T, Hamwi A, Fritzer-Szekeres M, Baumgartner C, Ongen HZ, Guzelbey P, Roots I, Brinkmann U. The predictive value of MDR1, CYP2C9, and CYP2C19 polymorphisms for phenytoin plasma levels. *Pharmacogenomics J* 2001;1:204-210.
- Kragh-Hansen U, Campagnoli M and Dodig S. Structural analysis and fatty acid-binding properties of two Croatian variants of human serum albumin. *Clin Chim Acta* 2004;349:105-112.
- Krishnaswamy S, Duan SX, Von Moltke LL, Greenblatt DJ, Court MH. Validation of serotonin (5-hydroxytryptamine) as an in vitro substrate probe for human UDP-glucuronosyltransferase (UGT)1A6. *Drug Metab Dispos* 2003;31:133-139.
- Kuehl P, Zhang J, Lin Y. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001;27:383-91.

- Kuo CC. A common anticonvulsant binding site for phenytoin, carbamazepine and lamotrigine in neuronal Na channels. *Mol Pharmacol* 1998;54:712-721.
- Kwan P, Brodie MJ. Epilepsy after the first drug fails: substitution or add-on? *Seizure* 2000;9:464-68.
- Kwan P, Brodie M. Early identification of refractory epilepsy. *New Engl J Med* 2003;42:314-319.
- Lankisch TO, Vogel A, Eilermann S, Fiebeler A, Krone B, Barut A, Manns MP, Strassburg CP. Identification and characterization of a functional TATA box polymorphism of the UDP glucuronosyltransferase 1A7 gene. *Mol Pharmacol* 2005;67:1732-1739.
- Levesque E, Beaulieu M, Green MD, Tephly TR, Belanger A, and Hum DW, Isolation and characterization of UGT2B15 (Y85): a UDP-glucuronosyltransferase encoded by a polymorphic gene. *Pharmacogenetics* 1997;7:317-325.
- Levesque E, Beaulieu M, Hum DW, and Belanger A, Characterization and substrate specificity of UGT2B4 (E458): a UDP-glucuronosyltransferase encoded by a polymorphic gene. *Pharmacogenetics* 1999;9:207-216.
- Lhatoo SD, Johnson AL, Goodridge DM. Mortality in epilepsy in the first 11 to 14 years after diagnosis: multivariate analysis of a long-term, prospective, population-based cohort, *Ann Neurol* 2001;49(3):336-44.
- Löscher W, Potschka H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog Neurobiol* 2005;76:22-76.
- Löscher W, Klotz U, Zimprich F, Schmidt D. The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy. *Epilepsia* 2008;1-23.
- Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro SI, Iyanagi T, Miners JO, Owens IS and Nebert DW. Nomenclature Update for the Mammalian UDP Glycosyltransferase (UGT) Gene Superfamily. *Pharmacogenetics and Genomics* 15: 677-685, 2005a.
- Mackenzie PI, Gregory PA, Lewinsky RH, Yasmin SN, Height T, McKinnon RA, Gardner-Stephen DA. Polymorphic variations in the expression of the chemical detoxifying UDP glucuronosyltransferases. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 207: 77-83, 2005b.

- Mamiya K, Ieiri I, Shimamoto J, Yukawa E, Imai J, Ninomiya H, Yamada H, Otsubo K, Higuchi S, Tashiro N. The effects of genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 on phenytoin metabolism in Japanese adult patients with epilepsy: studies in stereoselective hydroxylation and population pharmacokinetics. *Epilepsia* 1998;39:1317-1323.
- Marson AG, Al Kharusi AM, Alwaidh M, Appleton R, Baker GA, Chadwick DW, Cramp C, Cockerell OC, Cooper PN, Doughty J, Eaton B, Gamble C, Goulding PJ, Howell SJ, Hughes A, Jackson M, Jacoby A, Kellett M, Lawson GR, Leach JP, Nicolaides P, Roberts R, Shackley P, Shen J, Smith DF, Smith PE, Smith CT, Vanoli A, Williamson PR. The SANAD study of effectiveness of valproate, lamotrigine, or topiramate for generalised and unclassifiable epilepsy: an unblinded randomised controlled trial. *Lancet* 2007a;369:1000-1015.
- Maruo Y, Nishizawa K, Sato H, Doida Y, and Shimada M, Association of neonatal hyperbilirubinemia with bilirubin UDP-glucuronosyltransferase polymorphism. *Pediatrics* 1999;103:1224-1227.
- Maruo Y, Nishizawa K, Sato H, Sawa H, and Shimada M, Prolonged unconjugated hyperbilirubinemia associated with breast milk and mutations of the bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase gene. *Pediatrics* 2000;55:126-132.
- Matsuo F. Lamotrigine. *Epilepsia* 1999;40(5):30-36.
- Meech R, Mackenzie PI. Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases. *Clin and Exp Pharmacol and Physiol* 1997;24: 907-915.
- Meesenheimer JA, Guberman AH. Rash with lamotrigine: dosing guidelines. *Epilepsia* 2000;41:488.
- Meyer UA, Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet* 2000;356:1667-71.
- Miller AA, Sawyer DA, Ruth B. Lamotrigine. In Meldrum BS, Porter RJ. New anticonvulsant drugs. London: John Libbey 1986;165-177.
- Miners OJ, Mckinnon RA, Mackenzie PI, Genetic polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferases and their functional significance. *Toxicology* 2002;181-182:453-456.

- Mojarrabi B, Butler R, Mackenzie PI. cDNA cloning and characterization of the human UDP glucuronosyltransferase, UGT1A3. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;225:785-790.
- Mori A, Maruo Y, Iwai M, Sato H, Takeuchi Y, UDP-glucuronosyltransferase 1A4 polymorphisms in a Japanese population and kinetics of clozapine glucuronidation. *Drug metabolism and Disposition* 2005;33:672-675.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman M.R, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P 450 superfamily: update on new Sequence, genemapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogen* 1996;6:1-42.
- Nilsson L, Farahmand BY, Persson PG Risk factors for sudden unexpected death in epilepsy: a case-control study, *Lancet* 1999;353(9156):888-93.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Polimeraz Zincir Reaksiyonu. Thompson and Thompson-Tibbi Genetik 6. baskı 2005;4:44-46.
- Ouzzine M, Barre L, Netter P, Magdalou J, and Fournel-Gigleux S. The Human UDP- Glucuronosyltransferases: Structural Aspects and Drug Glucuronidation. *Drug metabolism reviews* 2003;35(4):287-303.
- Öhman I, Luef G, Tomson T. Effects of pregnancy and contraception on lamotrigine disposition: New insights through analysis of lamotrigine metabolites. *Seizure* 2008;17(2):199-202.
- Parsons DN, Dickins M, Morley TJ. Lamotrigine: absorption, distribution and excretion. In: Levy RH, Mattson RH, Meldrum OS. *Antiepileptic drugs*, 4th edn. New York: Raven Pres 1995;877-881.
- Patsalos PN. New antiepileptic drugs. *Ann Clin Biochem.* 1999;36:10-19.
- Pattern CJ. New Technologies for assesing UDP-glucuronosyltransferase (UGT) metabolism in drug discovery and development. *Drug Discovery Today: Technologies* 2006;3(1):73-78.
- Peck AW. Clinical pharmacology of lamotrigine. *Epilepsia* 1991;32(2):9-12.
- Perucca E. Principles of drug treatment, in: S.D. Shorvon, F. Dreifus, D. Fish, D. Thomas (Eds), *The treatment of epilepsy*. Blackwell, Oxford, 1996;152-168.

- Perucca E. The new generation antiepileptic drugs: advantages and disadvantages. *Br. J. Clin. Pharmacol* 1996;42(5):531-543.
- Perucca E. Patient-tailored antiepileptic drug therapy: predicting response to antiepileptic drugs. *International Congress Series* 2002;1244:93-103.
- Potschka H, Fedrowitz M, Loscher W. Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306:124-31.
- Radomska-Pandya A, Czernik PJ and Little JM. Structural and functional studies of UDP Glucuronosyltransferases. *Drug metabolism reviews* 1999;31(4): 817-899.
- Rambeck B, Wolf P. Lamotrigine clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 1993;25:433-443.
- Ramsay RE, Pellock JM, Garnet WR; Sanchez RM, Valakas AM, Wargin WA, Lai AA, Hubbell J, Chern WH, Allsup T, Otto V. Pharmacokinetics and safety of lamotrigine (Lamictal) in patients with epilepsy. *Epilepsy Res* 1991;10:191-200.
- Reinsberger C, Dorn T, Kramer G. Smoking reduces serum levels of lamotrigine. *Seizure* 2008;17:651-653.
- Ritter JK, Crawford JM, Owens IS. Cloning of two human liver bilirubin UDPglucuronosyltransferase cDNAs with expression in COS-1 cells. *J Biol Chem* 1991;266:1043-1047.
- Rowland A, Eliot DJ, Williams JA, Mackenzie PI, Dickinson RG and Miners JO. In vitro characterization of lamotrigine N2-glucuronidation and the lamotrigine-valproic acid interaction. *Drug Metab Dispos* 2006;34(6):1055-1062.
- Sadler M. Lamotrigine associated with insomnia. *Epilepsia* 1999;40:322-325.
- Saeki M, Saito Y, Jinno H, Sai K, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Ozawa S, Sawada J. Three novel single nucleotide polymorphisms in UGT1A9. *Drug Metab Pharmacokinet* 2003;18:146-149.
- Saeki M, Saito Y, Jinno H, Sai K, Hachisuka A, Kaniwa N, Ozawa S, Kawamoto M, Kamatani N, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Komamuro

- K, Kotake T, Morishita H, Kamakura S, Kitakaze M, Tomoike H, Sawada J. Genetic variations and haplotypes of UGT 1A4 in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005;20(2):SNP13 144- SNP20 151.
- Sander JW. The epidemiology of epilepsy revisited. *Cur Opin Neurol* 2003;16:165-170.
- Sander JW, The use of antiepileptic drugs-principles and practice. *Epilepsia* 2004a;45(6):28-34.
- Sander JW. Infectious agents and epilepsy. In: Knobler S, O'Connor S, Lemon SM, Najafi M. The infectious etiology of chronic diseases: defining the relationship, enhancing the research and mitigating the effects. Washington: The National Academies Press 2004b;93-99.
- Schlienger RG, Oh PI, Knowles SR, Shear NH. Quantifying the costs of serious adverse drug reactions to antiepileptic drugs. *Epilepsia* 1998;39(7):27–32.
- Schmidt D, Löscher W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia* 2005;46:858-877.
- Semah F, Picot MC, Adam C, Broglin D, Arzimanoglou A, Bazin B, Cavalcanti D, Baulac M. Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology* 1998;51:1256-1262.
- Shipkova M, Wieland E. Glucuronidation in therapeutic drug monitoring. *Clinica Chimica Acta* 2005;358(1-2):2-23.
- Shorvon S, Perucca E, Fish D, Dodson E: The Treatment Of Epilepsy. Second edition, Blackwell, London, 2004.
- Sidhu J, Ascher J, Job S, et al. Absence of pharmacokinetic drug interaction between lamotrigine and oxcarbazepine in healthy volunteers. *Epilepsia* 2004;45(3): 82.
- Srichaiya A, Longchoopol C, Oo-Puthinan S, Sayasathid J, Sripalakit P and Viyoch J. Bioequivalence of Generic Lamotrigine 100-mg Tablets in Healthy Thai Male Volunteers: A Randomized, Single-Dose, Two-Period, Two-Sequence Crossover Study. *Clinical Therapeutics* 2008;30(10):1844-1851.
- Stefan H, Halasz P, Gil-Nagel A, Shorvon S, Bauer G, Ben-Menachem E, Perruca E, Wieser HG, Steinlein O. Recent advances in the diagnosis and treatment of epilepsy. *Eur J Neurol* 2001;8(6):519-39.

- Stefan H, Feuerstein TJ. Novel anticonvulsant drugs. *Pharmacology and Therapeutics* 2007;113:165-183.
- Stefani A, Hensworth A, Spadoni F, Bernardi G. The lamotrigine analogue 619 C 89 has been shown to inhibit sodium channels and cloned N typed calcium channels. *Br J Pharmacol* 1998b;125(5):1058-1064.
- Stefani A, Spadoni F, Bernardi G. Differential inhibition by riluzole, lamotrigine and phenytoin of sodium and calcium currents in cortical neurons: implications for neuroprotective strategies. *Exp Neurol* 1997;147(1):115-122.
- Strassburg CP, Oldhafer K, Manns MP, Tukey RH. Differential expression of the UGT1A locus in human liver, biliary, and gastric tissue: identification of UGT1A7 and UGT1A10 transcripts in extrahepatic tissue. *Mol Pharmacol* 1997;52:212–220.
- Strassburg CP, Manns MP, Tukey RH. Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon. Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8. *J Biol Chem* 1998a; 273: 8719–8726.
- Strassburg CP, Nguyen N, Manns MP, Tukey RH. Polymorphic expression of the UDPglucuronosyltransferase UGT1A gene locus in human gastric epithelium. *Mol Pharmacol* 1998b;54:647–654.
- Strassburg CP, Nguyen N, Manns MP, Tukey RH. UDP-glucuronosyltransferase activity in human liver and colon. *Gastroenterology* 1999a;116:149–160.
- Strassburg CP, Strassburg A, Nguyen N, Li Q, Manns MP, Tukey RH. Regulation and function of family 1 and family 2 UDP-glucuronosyltransferase genes (UGT1A, UGT2B) in human oesophagus. *Biochem J* 1999b;338:489–498.
- Strassburg CP, Kneip S, Topp J, Obermayer-Straub P, Barut A, Tukey RH, Manns MP. Polymorphic gene expression and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine. *J Biol Chem* 2000;275:36164-36171.
- Strassburg CP, Vogel A, Kneip S, Tukey, RH, Manns MP. Polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A7 gene in colorectal cancer. *Gut* 2002;50:851-856.

- Strassburg CP, Kalthoff S, Ehmer U. Variability and function of family 1 uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransferases (UGT1A). *Critical Reviews in Clin Lab Sciences* 2008;45(6):485-530.
- Sun D, Chen G, Dellinger RW, Duncan K, Fang JL, Lazarus P. Characterization of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen glucuronidation by human UGT1A4 variants. *Breast Cancer Res* 2006;8:R50.
- Tan NC, Mulley JC, Berkovic SF. Genetic association studies in epilepsy: "the truth is out there". *Epilepsia* 2004;45:1429-442.
- Temizkan G, Arda N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevleri. 2. Baskı, 2004;5:101-120.
- Thomas SS, Li SS, Lampe JW, Potter JD, Bigler J, Genetic variability, haplotypes, and htSNPs for Exons 1 at the human UGT 1A4 locus. *Human mutation* 2006;903.
- Tomalik-Scharte D, Lazar A, Fuhr U, Kirchheiner J. The clinical role of genetic polymorphisms in drug metabolizing enzymes. *The Pharmacogenomics Journal* 2008;8:4-15.
- Tricker AR. Nicotine metabolism, human drug metabolism polymorphisms, and smoking behaviour. *Toxicology* 2003;183:151-173.
- Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyl transferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:58-616.
- Turgeon D, Carrier JS, Lévesque E, Hum DW and Bélanger A. Relative Enzymatic Activity, Protein Stability, and Tissue Distribution of Human Steroid-Metabolizing UGT2B Subfamily Members. *Endocrinology* 2001;142(2):778-787.
- Ulrich K. The role of pharmacogenetics in the metabolism of antiepileptic drugs pharmacokinetic and therapeutic implications. *Clinic Pharmacokinetic* 2007;46(4):271-279.
- Uvebrant P, Bauzine R. Intractable epilepsy in children: the efficacy of lamotrigine treatment including non-seizure related benefit. *Neuropediatrics* 1994;25: 284-289.
- Vogel M. Moderne probleme der humangenetik. *Ergeb Inn Med Kinderheilkunde*, 1959;12:52-125.

- Walker MC, Fisher A. Mechanisms of antiepileptic drugs. In: Shorvon S, Fish DR, Dodson E, Perruca E. The treatment of epilepsy. Oxford: Blackwells 2004;96-11.
- Weintraub D, Buchsbaum R, Resor SR. Effect of antiepileptic drug comedication on lamotrigine clearance. Arch Neurol 2005;62:1432-1436.
- White HS. Comparative anticonvulsant and mechanistic profile of the established and newer antiepileptic drugs. Epilepsia 1999;40(5): 2-10.
- Wiener D, Doerge DR, Fang JL, Upadhyaya P, Lazarus P. Characterization of N-glucuronidation of the lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) in human liver: importance of UDP-glucuronosyltransferase 1A4. Drug Metab Dispos 2004;32:72-79.
- Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. N Engl J Med 2005;352:2211-2221.
- Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR, and Simon E. Ball. Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: A pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUCI/AUC) ratios. Drug metabolism and Disposition 2004;32(11):1201-1208.
- Wolf P. Lamotrigine: preliminary clinical observations on pharmacokinetics and interactions with traditional antiepileptic drugs. J Epilepsy 1992;5:73-79.
- World Health Organisation. Fact sheet 2001;165.
- Yamazaki H, Asahi S, Gillam EMJ, Guengerich FP, Nakajima M, Yokohi T. Formation of a dihydroxy metabolite of phenytoin by human liver microsomes 7 cytosol: Roles of cytochrome P450 2C9, 2C19 and 3A4. Drug Metab Dispos 2000;28:1361-1368.
- Yau MK, Wargin WA, Wolf KB. Effect of valproate on the pharmacokinetics of lamotrigine at steady state. Epilepsia 1992;33(3):82.
- Yueh MF, Nguyen N, Famourzadeh M, Strassburg CP, Oda Y, Guengerich FP, Tukey RH. The contribution of UDP-glucuronosyltransferase 1A9 on CYP1A2-mediated genotoxicity by aromatic and heterocyclic amines. Carcinogenesis 2001;22:943-950.

- Yuen AW, Land G, Weatherley BC. Sodium valproate acutely inhibits lamotrigine metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 1992;33:511-513.
- Yuen WC, Peck AW. Lamotrigine pharmacokinetics: oral and i.v. infusion in man. *Br J Clin Pharmacol* 1988;26:242.
- Zaccara G, Franciotta D, Perruca E. Idiosyncratic adverse reactions to antiepileptic drugs. *Epilepsia* 2007;48:1223-1244.

7. EKLER

EK 1- GÖNÜLLÜLERİN BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

Sayın Bayan/Bay,

‘EPİLEPSİLİ HASTALARDA LAMOTRİJİN TEDAVİSİ İLE GENETİK POLİMORFİZM İLİŞKİSİ’ başlıklı projeye katılmak üzere davet edilmiş bulunuyorsunuz. Bu çalışmada epilepsi hastalığının tedavisi nedeniyle kullanmakta olduğunuz lamotrijin adlı ilacın büyük bir kısmının vücuttan uzaklaştırılmasından sorumlu olan enzimin sizde bulunan genetik tipinin saptanması amaçlanmıştır. Epilepsi tedavisinde kullanılan ilaçların metabolizmalarını sağlayan bu enzimlerin bireyler arası farklılık göstermesi, ilaçların plazma konsantrasyonlarının bireyden bireye değişmesine neden olmaktadır. Bu durum sizin ilaca vermiş olduğunuz tedavi yanıtını değiştirmekte ve bazen mutad dozunun üstünde ilaç dozu kullanılması durumu ile karşılaşılmasına ya da mutad ilaç dozu ile toksik kan düzeylerine ulaşılmasına yol açmaktadır. Sizin bu çalışmaya katılmanız, Türk toplumundaki enzim dağılımının belirlenmesine katkıda bulunacak ve sizin tedavinizdeki durumunuzun belirlenmesini de sağlayacaktır. Çalışmaya katılıp katılmama konusunda tamamen özgürsünüz. Bu çalışmaya katılmamak sizin tedavinizi veya almakta olduğunuz hizmeti etkilemeyecektir. Katıldığınız takdirde, bu çalışma ile ilgili herhangi bir ücret ödemeyeceksiniz ve size ait olan bilgiler, kimliğiniz açıklanmadan, bilimsel amaçlar için kullanılacaktır. Bu çalışma kapsamında kullanmakta olduğunuz lamotrijin adlı ilaç tedavisi ile ilgili herhangi bir değişiklik yapılmayacak ve sizden sadece 10 cc kan örneği alınacaktır.

Yukarıda bana açıklaması yapılan çalışmayı okudum, anladım, katılmayı kabul ediyorum.

Adı ve Soyadı

İmza

Tarih

Hasta

Doktor

Tanık

EK 2- HASTA TAKİP FORMU

- 1. Tarih**
- 2. Hastanın Adı Soyadı**
- 3. Yaşı**
- 4. Doğum Yeri**
- 5. Boyu / Kilosu**
- 6. Lamotrijini Kullanma Süresi**
- 7. Lamotrijin Dozu (mg/gün)**
- 8. Örneklem Zamanı**
- 9. İlaç Düzeyi**
- 10. DNA, Genotip**
- 11. Karaciğer Fonksiyonları SGPT / SGOT Değerleri**
- 12. Böbrek Fonksiyonları BUN / Kreatinin Değerleri**
- 13. Serum Albumin / Total Protein Değeri**
- 14. Hastayı izleyen doktor**
- 15. Hastanın telefon numarası**
- 16. Tanısı**
- 17. Epilepsi Etyolojisi**
- 18. Epilepsi Tipi**
- 19. Nöbet Tipi**
- 20. Rezistan Epilepsi?**
- 21. Kaç yıldır epilepsi hastası olduğu**
- 22. Nöbet Sıklığı - Ayda kaç nöbet geçirdiği**
- 23. Son nöbet tarihi**
- 24. Lamotrijine yanıtı**
- 25. İlacı kesme nedeni**
- 26. Alışkanlıkları (sigara/alkol/diğer)**
- 27. Kullandığı diğer antiepileptik ilaçlar**
- 28. Diğer ilaçları**
- 29. Aile öyküsü**
- 30. Diğer hastalıkları**
- 31. Akrabalık, Notlar**

EK 3- ETİK KURUL ONAY FORMU

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ARAŞTIRMA ETİK KURULU

Sayı : B.30.2.MAR.0.01.02/AEK/1040
Konu :

Sayın Prof.Dr. Filiz ONAT

MAR-YÇ-2007-0159 protokol nolu "Epilepsili hastalarda Lamotrijin tedavisi ile genetik polimorfizm ilişkisi" isimli projeniz Fakültemiz Araştırma Etik Kurulu tarafından incelenerek onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hacer DİRESKENELİ
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Araştırma Etik Kurul Başkanı