

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALARINDA TİOPURİN METİLTRANSFERAZ VARYANTLARI

Amin DAEMİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Zafer YÖNDEN

ADANA-2024

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

İNFLAMATUAR BAĞIRSAK HASTALARINDA TİOPURİN METİLTRANSFERAZ VARYANTLARI

Amin DAEMİ

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Zafer YÖNDEN**

**Bu proje çalışması Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonunun TTU-2023-15551 numaralı
projesiyle desteklenmiştir.**

ADANA-2024

TEŞEKKÜR

Sayın ve Değerli Danışmanım Doç. Dr. Zafer YÖNDEN'e en derin teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Sizi tanıdığım ve sizinle çalışmaya başladığım ilk günden beri, harika bilimsel kişiliğinizi, mükemmel disiplininizi ve uluslararası düzeydeki hocalığınızı takdir ediyorum. Tüm çabalarınız, değerli eğitimleriniz ve iyi insan karakteriniz için, yeni bakış açıları kazanmamı sağlayan, ayrıca bizim için örnek bir hoca olmanız dolayısıyla size çok teşekkür ederim. Motive edici yaklaşımıyla tezimin yönlendirilmesinde ve hazırlama sürecinde her zaman destek olan ve tez danışmanım olduğu için kendimi şanslı hissettiğim değerli hocam Doç. Dr. Zafer YÖNDEN'e minnettarım.

Ders eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Tamer Cevat İNAL, Prof. Dr. Mehmet Akif ÇÜRÜK, Prof. Dr. Abdullah TULİ, Prof. Dr. Özlem GÖRÜROĞLU ÖZTÜRK ve Öğr. Gör. Dr. Ebru DÜNDAR YENİLMEZ'e

Ders döneminde bilimsel çalışmalarda ve tezimin her aşamasında bana her zaman yardımcı olan ve destekleyen Değerli arkadaşım Dr Yusuf Döğüş 'e ve Tezimin laboratuvar çalışmalarında destekleyen Uzman Dr Tuğba Polat 'e

En çok da her zaman yanımda olduğu gibi tez süresi boyunca sevgi dolu ve huzurlu bir ortam sağlayan, sonsuz sabırla beni destekleyen, büyük hedeflere ulaşma yolunda beni cesaretlendiren ve mutluluğumu ön planda tutan sevgili canım eşim Seyyedehtouran HOSSEİNİ'e sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Hayatım boyunca sevgilerini ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, bugünün mimarı kıymetli annem ve babama, en içten dileklerle teşekkür ederim.

Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'nın (YTB) bursu ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne, doktora eğitimim için uygun bir ortam sağladıkları için, ayrıca BAP'a (Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi) projeme sağladıkları finansal destekten dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

Amin DAEMİ

Adana, 2024

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
KISALTMALAR	vi
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Farmakogenomik	2
1.2. Tiyopürin Metiltransferaz (TPMT)	8
1.3. Amaçları, Hipotezleri ve Soruları	11
1.3.1. Ana Amaç:	11
1.3.2. İkincil Amaçlar:	11
1.3.3. Ana Hipotez:	12
1.3.4. İkincil Hipotezler:	12
1.3.5. Ana Sorular:	12
1.3.6. İkincil Sorular:	13
2. GENEL BİLGİLER	15
2.1. Teorik Çerçeve	15
2.2. TPMT genotipi ve fenotipi arasındaki bağlantı	19
2.3. NUDT15 Genotipi ve Fenotipi Arasındaki Bağlantı	20
2.4. Literatür taraması	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Araştırma tasarımı:	28
3.2. Örneklem büyüklüğünün belirlenmesi	29
3.2.1. Örneklem Yöntemi:	29
3.2.2. Kan Örneklem Yöntemi:	30
3.2.2.1. Kan örneği toplama	30
3.2.2.2. Hastaların hazırlanması	30

3.2.2.3. Hastaların tanımlanması.....	31
3.2.3. Genomik DNA'nın İzolasyonu.....	31
3.2.4. DNA Miktarı ve saklama:	34
3.2.5. Primer Tasarımı:	34
3.2.6. DNA Amplifikasyonu:	36
3.2.7. PCR Amplifikasyonu:	36
3.2.7.1. Çözeltiler	36
3.2.8. Yüksek Çözünürlüklü Eritme Analizi (HRMA):	37
3.2.8.1. HRMA kit Özellikleri :	39
3.2.9. HRMA adımların Özeti.....	42
3.2.10. Paraklinik Testlerin çalışıldığı cihaz ve yöntemler.....	43
3.2.11. İstatistiksel Analiz:.....	44
4. SONUÇLAR VE BULGULAR.....	46
5. TARTIŞMA.....	57
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	65
KAYNAKLAR:	68
EKLER	75
Ek-1. Etik Kurul Kararı.....	75

TABLO LİSTESİ

Tablo No:

Sayfa No:

Tablo 1. Tiyopürin toksisitesi ile ilişkili en önemli genetik varyantlar	7
Tablo 2. HRMA yüksek çözünürlüklü erime analizi, F ileri (forward), R ters (reverse) primerler	36
Tablo 3. HOT FIREPol#EvaGreen#HRMA Kiti Kullanarak HRM Analizi için Tavsiye Edilen PCR Kurulumu	41
Tablo 4. Crohn ve Ülseratif Kolit Hastalarının Cinsiyet ve Yaşa Göre İstatistiksel Dağılımı.....	46
Tablo 5. IBD Hastaları ve Kontrol Grubunda TPMT Genotiplerinin Dağılımı	47
Tablo 6. IBD'de Lökopeni ile ve Lökopenisiz TPMT Genotipi Prevalansı	50
Tablo 7. IBD Hastalarında Pankreatit ile Birlikte TPMT Genotipinin Prevalansı.....	51
Tablo 8. TPMT gen varyantlarının her birinde biyokimyasal sonuçlar	53
Tablo 9. TPMT Genotiplerinin Biyokimyasal Parametreler Üzerindeki Etkileri: Referans Aralıklar ve Değerlendirmeler.....	54

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. İnsan TPMT Yapısı	3
Şekil 2. İnsan TPMT'nin topolojisi, sekonder yapıları ve dizilimi.....	5
Şekil 3. Tiopürinlerin basitleştirilmiş metabolik yolları.	7
Şekil 4. IBD hastalarında sitotoksositeye neden olan potansiyel Genler	8
Şekil 5. Bu araştırmanın amaçları	11
Şekil 6. Bu araştırmanın Hipotezleri.....	12
Şekil 7. Bu araştırmanın Ana Soruları	13
Şekil 8. Tiopürin S-metiltransferaz geni	18
Şekil 9. TPMT genotipi ve fenotipinin bağlanması	19
Şekil 10. NUDT15 genotipi ve fenotipinin bağlanması.....	20
Şekil 11. DNA İzolasyonu kiti.....	33
Şekil 12. RT-PCR HRMA ile TPMT Genotiplerinin Belirlenmesi	38
Şekil 13. HRMA kit ve kullandığımız Cihaz	40
Şekil 14. Çeşitli TPMT mutasyonlarını araştırmak için yüksek çözünürlüklü erime eğrisi.....	42
Şekil 15. IBD Hastaları ve Kontrol Grubunda TPMT Genotiplerinin Dağılımı	48

KISALTMALAR

İBH	: İnflamatuvar bağırsak hastalığı
CH	: Crohn hastalığı
ÜK	: ülseratif kolit
TPMT	: Tiopürin metiltransferaz
HRMA	: High-Resolution Melting Analysis
TP	: Tiopürinlerin
AZA	: Azatiyoprinin
MP	: Merkaptopürin
MPS	: Metilasyon profili skorları
MMP	: Metil merkaptopürin
TUA	: Tiyürik asit
HPRT	: Hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz
TIMP	: Tiosin monofosfat
5-IMPDH	: 5-inosin monofosfat dehidrogenaz
TGMP	: Tioguanin monofosfat
TGDP	: Tioguanin difosfat
TGTP	: Tioguanin trifosfat
TG	: Tioguanin
TGN'ler	: Tioguanin nükleotidleri
XO	: ksantin oksidaz
NUDT15	: Nudix hidrolaz 15
FOT	: Alfa-ketoglutarat bağımlı dioksijenaz
ITPA	: Inozin trifosfat pirofosfataz
GETECCU	: Crohn ve Ülseratif Kolit üzerine İspanyol Çalışma Grubu
ECCO	: Avrupa Crohn ve Kolit Organizasyonu
VEO-İBH	: Çok erken başlangıçlı inflamatuvar bağırsak hastalığı
CpG	: Cytosine-phosphate-guanine
QALY	: Kalite düzeltilmiş yaşam yılları
ADR	: Advers ilaç reaksiyonları
6-MP	: 6-merkaptopürin

6-TGN	: 6-tioguanin nükleotitleri
ALL	: Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi
ORF	: Açık okuma çerçevesi
6-MMP	: 6-metil merkaptopürin
RBC'ler	: Kırmızı kan hücreleri
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi
BMI	: Vücut kitle indeksi
SNP	: Spesifik tek nükleotid polimorfizmini
RFLP	: Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi
GWAS	: Genom çapında ilişki çalışmaları
EWAS	: Ekzom çapında ilişki çalışmaları
IRB	: Kurumsal Denetleme Kurulu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
Tm	: Erime sıcaklığı
ΔH	: Entalpi
ΔS	: Entropi
K	: Kelvin
dNTP'ler	: Deoksinükleotid trifosfat
TRAЕ	: TPMT genotipleri ile tiopürinle ilişkili advers olaylar
UIBC	: Doymamış demir bağlama kapasitesi
TIBC	: Total Demir Bağlama Kapasitesi
HbA1C	: Glikozile hemoglobin
GGT	: Gama glutamil transferaz
AST	: Aspartat Aminotransferaz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
BUN	: Üre Azotu
TSH	: Tiroid uyarıcı hormon
Crp	: C-reaktif protein
Hb	: Hemoglobin
RBC	: Kırmızı kan hücresi
WBC	: Beyaz kan hücreleri

MCV	: Ortalama eritrosit hacmi
PLT	: Trombosit testi
TIG antikoru	: Tetanoz immün globulin antikoru
FOBT	: Gizli dışkı kan testi
MRE	: Manyetik Rezonans Enterografi
BT	: Bilgisayarlı Tomografi



ÖZET

İnflamatuvar Bağırsak Hastalarında TPMT Gen Varyantları

Amaç: İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı (İBH) hastaları tedavi için sıklıkla tiopürin ilaçları almaktadır, ancak yanıt ve yan etkiler büyük ölçüde değişmektedir. Bu çalışma, İBH popülasyonlarında TPMT varyantlarının yaygınlığını, tiopürin metabolizması, tedavi yanıtı ve advers reaksiyonlar üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçlamaktadır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmadaki klinik araştırma yöntemi bir kesitsel (cross-sectional) çalışma tasarımı içermektedir. Bu çalışmanın istatistiksel popülasyonu inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) olan kişilerdir. Katılımcılar, demografik ve hastalık özellikleri açısından mümkün olduğunca çeşitli bir yelpazeyi temsil edecek şekilde kesitsel bir yöntem kullanılarak seçilmiştir. Katılımcılar hastalık şiddeti ve TPMT genotipine göre katmanlaştırılmıştır. Çalışma süreçleri arasında genomik DNA izolasyonu, numune hazırlama, DNA amplifikasyonu, Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (HRMA), veri analizi ve teşhisi, istatistiksel analiz ve nihai yorumlama yer almaktadır.

Bulgular: İBH hastalarında en yaygın olarak tespit edilen TPMT genotipi, vakaların %90'ini oluşturan doğal tip (wild type) TPMT1/1'dir. İBH hastalarında görülen TPMT2/2, TPMT1/2, TPMT1/3B, TPMT1/3A, ve TPMT1/3C genotipleri sırasıyla %3, %4, %1, %1 ve %1 prevalans ile daha nadir görülmektedir. Özellikle, TPMT2 genotipi yüksek advers olay (lökopeni ve pankreatit) insidansı (%100) dikkat çekmektedir, bu durum tedavi öncesi genetik taramanın önemini artırmaktadır.

Sonuç: Bu çalışma, TPMT genotiplerinin IBD hastalarında farklı biyokimyasal ve klinik sonuçlar doğurduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle, TPMT2, TPMT1/2, ve TPMT3A genotipleri lökopeni ve pankreatit gibi ciddi advers olaylarla güçlü bir ilişki göstermektedir. Bu genotiplerle ilişkili yüksek TRAE insidansı, bu hastalar için özelleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesinin kritik önem taşıdığını göstermektedir. TPMT2, TPMT3B ve TPMT3A genotipleri, bazı biyokimyasal parametrelerde farklı değerlere sahip olup, bu farklılıkların ilgili parametrelerin metabolizması üzerindeki etkilerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak, genetik faktörlerin IBD tedavisinde dikkate alınması, hem terapötik yanıtın optimize edilmesi hem de potansiyel yan etkilerin minimize edilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: TPMT, Gen Varyantları, İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı, Biyokimyasal Markerler, Advers Olaylar, Lökopeni, Pankreatit

ABSTRACT

TPMT Gene Variants in Inflammatory Bowel Disease Patients

Objective: Patients with Inflammatory Bowel Disease (IBD) frequently use thiopurine drugs for treatment, yet responses and side effects vary significantly. This study aims to investigate the prevalence of TPMT variants in IBD populations and their impact on thiopurine metabolism, treatment response, and adverse reactions.

Materials and Methods: This clinical research employed a cross-sectional study design. The statistical population comprised individuals with inflammatory bowel disease (IBD). Participants were selected using a cross-sectional method to represent a diverse range of demographic and disease characteristics. They were stratified by disease severity and TPMT genotype. The study processes included genomic DNA isolation, sample preparation, DNA amplification, High-Resolution Melting Analysis (HRMA), data analysis and interpretation, statistical analysis, and final interpretation.

Results: The most common TPMT genotype found in IBD patients was the wild type (TPMT1/1), accounting for 90% of cases. The TPMT2/2, TPMT1/2, TPMT1/3B, TPMT1/3A, and TPMT1/3C genotypes were less frequent, with prevalences of 3%, 4%, 1%, 1%, and 1%, respectively. Specifically, the TPMT2 genotype stands out with a high incidence of adverse events (leukopenia and pancreatitis) at 100%, underscoring the importance of genetic screening prior to treatment.

Conclusion: This study reveals that different TPMT genotypes result in distinct biochemical and clinical outcomes in IBD patients. Specifically, the TPMT2, TPMT1/2, and TPMT3A genotypes are strongly associated with severe adverse events such as leukopenia and pancreatitis. The high incidence of TRAEs associated with these genotypes underscores the critical need for personalized treatment strategies. The TPMT2, TPMT3B, and TPMT3A genotypes exhibit different values in certain biochemical parameters, which may be attributed to their impact on the metabolism of these respective parameters. In conclusion, considering genetic factors in IBD treatment is essential for optimizing therapeutic responses and minimizing potential side effects.

Keywords: TPMT, Gene Variants, Inflammatory Bowel Disease, Biochemical Markers, Adverse Events, Leukopenia, Pancreatitis

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH), gastrointestinal kanal etkileyen esas olarak Crohn hastalığı (CH) ve ülseratif kolit (ÜK) olmak üzere iki kronik durumu kapsar ve dünya çapında yaygındır (1). İBH'nin tıbbi tedavisi, 5-aminosalisilatlar, kortikosteroidler, immünomodülatörler (Azatiyoprin ve metotreksat gibi tiopürinler) ve biyolojik ürünler de dahil olmak üzere çeşitli ilaçların kullanımını içerir (2).

Tiopürinler (özellikle azatiyoprin, merkaptopürin ve tioguanin), purinlerin metabolizması ile müdahale eden bileşiklerdir ve yarım yüzyıldan fazla bir süredir İBH tedavisinin temel bir bileşeni olmuştur. Ancak, uzun süreli kullanımlarına rağmen, belirli klinik senaryolarda etkinlikleri konusunda sağlam bir kanıt eksikliği devam etmektedir (3)

Başlangıç olarak, tedavi rehberleri tiopürinlerin (TP) ilk tedavi olarak kullanılmasını önermez (4). Crohn hastalığı (CH) söz konusu olduğunda, mevcut kanıtların çoğu azatiyoprinin (AZA) bir plasebo ile karşılaştırıldığı çalışmalardan türetilmiştir. AZA'nın biyolojik tedavi (infliksimab) ile karşılaştırıldığı yalnızca bir randomize kontrollü çalışma bulunmakta ve bu çalışma AZA'nın daha az etkili olduğu sonucuna varmıştır. Benzer şekilde, AZA'nın ülseratif kolit (ÜK) için bir indüksiyon terapisi olarak destekleyici kanıtlar da yetersizdir (5).

Remisyonun korunması söz konusu olduğunda, Cochrane İncelemeleri hem Crohn hastalığı (CH) hem de ülseratif kolit (ÜK) için randomize kontrollü çalışmalarını değerlendirmiştir. Bu incelemeler, AZA'nın bir plasebodan daha etkili olduğunu göstermektedir; ancak, özellikle ÜK'de kanıtların kalitesi sınırlıdır (6).

Tiopürinlerin başka bir yaygın kullanımı, ameliyat sonrası nüksün önlenmesidir. Plasebo üzerinde üstünlük belirtileri olmasına rağmen, bu alandaki çalışmaların tasarımları geniş ölçüde farklılık göstermektedir. AZA ile biyolojik ürünlerin (adalimumab) karşılaştırıldığı küçük bir randomize çalışmada, iki tedavi arasında etkinlik açısından bir fark bulunamamış, bir diğer çalışmada ise adalimumab tercih edilmiştir (7).

Son olarak, AZA ve biyolojik ürünlerin dahil olduğu kombinasyon tedavisini destekleyen kanıtlar, esas olarak kombinasyon tedavisinin hem CH hem de ÜK'de monoterapiye üstünlüğünü gösteren iki prospektif çalışmaya dayanmaktadır (9, 15). Bununla birlikte, kombinasyon tedavisinin uygun süresi belirsizliğini korumaktadır (8).

Çözümlememiş etkinlik endişelerinin yanı sıra, güvenlik sorunları da klinik pratikte TP'nin kullanımını sınırlayabilir. Bazı çalışmalarda advers olaylar vakaların %25'ine kadarında meydana gelmekte ve bu da hastaların yaklaşık %20'sinde tedavinin kesilmesine yol açmaktadır (9). Periyodik kan testleri, genetik polimorfizm değerlendirmeleri ve metabolit ölçümleri gibi stratejiler, miyelotoksisite gibi belirli yan etkilerin riskini azaltmaya yardımcı olabilir, ancak bunları tamamen önleyemez ve bu advers olaylar tedavi sırasında herhangi bir noktada meydana gelebilir (10).

Etkililik endişeleri, potansiyel toksisite riskleri ve alternatif tedavilerin mevcudiyetine rağmen, TP kullanımını optimize etmek lehine argümanlar bulunmaktadır. Öncelikle, İBH'nin epidemiyolojisi evrim geçirmekte olup, bazı Batı ülkelerinde pediatrik başlangıçlı vakaların insidansında artış görülmektedir (11). Bu, söz konusu hastaların ömür boyu farklı İBH tedavileri gerektirebileceğini önermektedir, özellikle hastalığın potansiyel olarak daha agresif seyri göz önüne alındığında (12). İBH için birçok terapötik seçenek mevcut olmasına rağmen, nihayetinde cerrahiye ihtiyaç duyabilecek dirençli hastalar hala bulunmaktadır (13).

Bu nedenle, daha invaziv seçenekleri düşünmeden önce tıbbi tedaviyi optimize etmek makul bir yaklaşımdır. Ayrıca, Batı ülkelerinde İBH'nin artan prevalansının, İBH birimlerindeki hasta sayılarının artmasına ve buna bağlı olarak tedaviyle ilişkili maliyetlerin artmasına yol açması beklenmektedir (14).

TP, biyolojik ürünlerden genellikle daha az maliyetlidir ve bazı ülkelerde, biyolojik ürünlerin piyasaya sürülmesinden önce ilaç maliyetleri İBH bakım maliyetlerinin %25'ini oluştururken, bu oran sonrasında %30-70'e yükselmiştir (15).

Sonuç olarak, TP, uzun yıllar boyunca genel etkililiğini kanıtlamıştır ve bu ilaçlara yanıt veren hastalar genellikle uzun remisyon dönemleri sürdürmektedir (16). TP ile klinik deneyim, çoğu yan etkiyi yönetmeye yardımcı olur ve hayatı tehdit eden yan etkiler nadirdir.

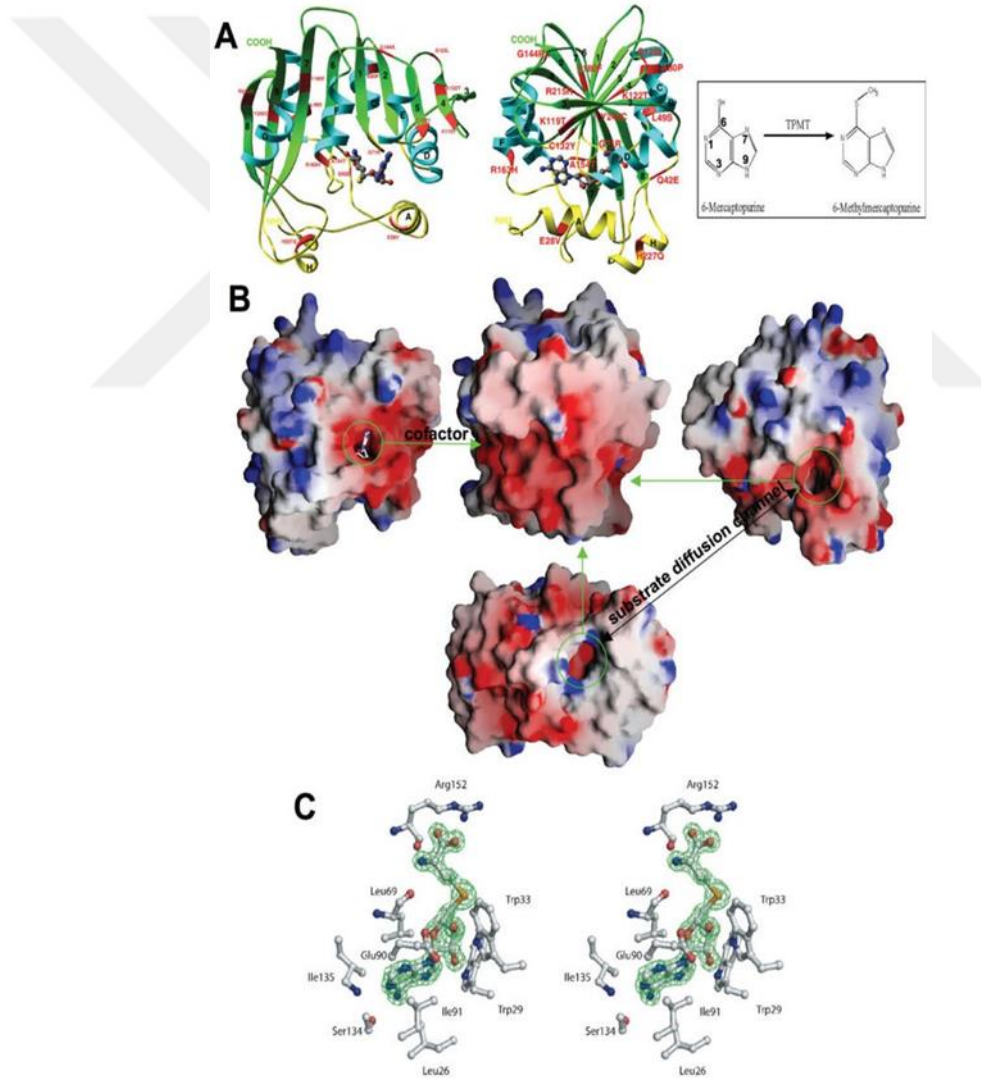
1.1. Farmakogenomik

Tiopürin S-metiltransferaz (TPMT; EC 2.1.1.67), azatiopürin, 6-merkaptopürin ve tioguaninin metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bu enzim, S-adenozilmetiyonin (SAM) kullanarak sülfür atomlarının metilasyonunu katalize eder ve tiopürin ilaçlarını inaktive ederek toksik olmayan metabolitler oluşturur. TPMT

reaksiyonu, S-adenozil-L-metiyonin (adoMet) ile iki substratı metil donörü olarak kullanarak, S-adenozil-L-homosistein (AdoHcy) ve metillenmiş ürünler üretir(17 , 18)

İnsan TPMT yapısı (1) doğal olarak oluşan amino asit dizilimindeki değişimler yapının her tarafında tespit edilmiştir. (2) Değişen amino asitler intra-moleküler yapıda yer alan van der Waals bağlarının oluşumunu etkileyerek, fonksiyonunda birçok etkisi olmaktadır(19).

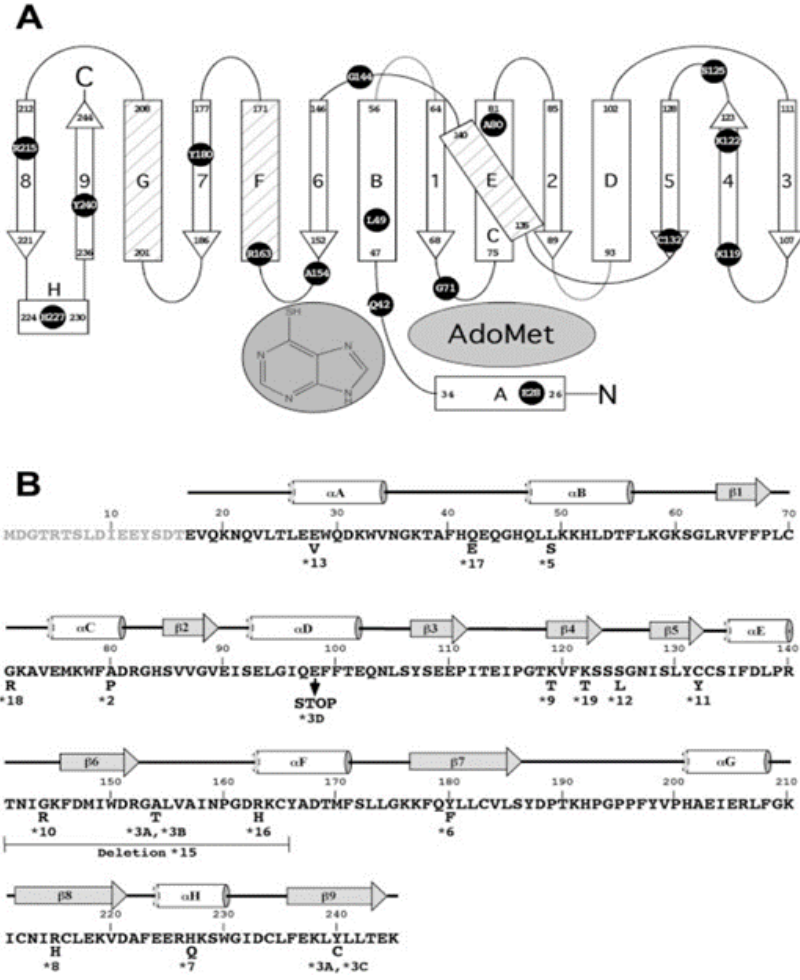
TPMT klasik Sınıf-I metiltransferaz (MTaz) katlanması ile tek domain proteindir. Domain, her bir ucunda 3 heliks [bir uca αB , αC , αD , ve diğer uca αE , αF , αG ; Şekil 1.



Şekil 1. İnsan TPMT Yapısı

- (A) TPMT'nin iki farklı açıdan şerit modelinde görünümü. İplikler yeşil, heliksler camgöbeği renkte gösterilmiştir. Ek olarak, N-terminal heliks (αA) ve $\beta 8$ ile $\beta 9$ iplikleri arasındaki yerleştirme heliksi (αH) sarı renktedir. Doğal olarak meydana gelen nokta mutasyonlar kırmızı renkte gösterilmiştir. Bağlanmış AdoHcy, geleneksel renkleme ile top-çubuk modelinde gösterilmiştir (karbon atomları gri, azot mavi, oksijen kırmızı, kükürt sarı). Kutuda, 6-MP'nin kimyasal yapısı ve TPMT tarafından gerçekleştirilen metilasyon reaksiyonu gösterilmiştir. (B) TPMT'nin yüzey modelinde dört farklı görünümü, kofaktör bağlanma cebini ve potansiyel substrat difüzyon kanalını gösterir. Yüzey, pozitif bölgeler için mavi, negatif bölgeler için kırmızı ve nötr bölgeler için beyaz renkte boyanmıştır. Bağlanmış AdoHcy çubuk modelinde gösterilmiştir. (C) TPMT-AdoHcy etkileşimlerinin yakınlştırılmış stereo görünümü. AdoHcy için elektron yoğunluğu haritası $1.5\sigma'$ 'da konturlanmıştır(19).
- (B) açık mavi renk] ile bağlı 9 iplikli β -tabaka [Şekil 1 (A) daki yeşil] içermektedir. İkik heliks [Şekil 1 (A) da sarı] MTaz katlanmasının arasına yerleşmiştir: $\beta 8$ ve $\beta 9$ hairpin ipliği arasındaki N-terminal heliks αA ve heliks αH 'dir. Diğer MTazlarla karşılaştırıldığında, AdoHcy nükleotid bağlayıcı bölgenin belirgin özelliği $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\beta 5$ paralelipliklerin karboksil ucuna bağlanmaktadır. N-terminal bölgesi, asidik cepte AdoHcy'nin [Şekil 1 (B)] bağlanmasını zorlamaya yardım etmektedir. Heliks αA ve çevreleyici ilmek AdoHcy bağlayıcı alana [Şekil 1(C)] bir aromatik kapak formasyonunu dört rezidü (L26, W29, W33 ve F40) ile sağlanmaktadır(19).

β -tabaka, simetrik olarak merkezi iplik olan $\beta 1$ (Şekil 2) ile bağlı olan, her birinin ucunda bir çift antiparalel β -hairpin ile 5 paralel iplikten ($8\downarrow 9\uparrow 7\downarrow 6\downarrow 1\downarrow 2\downarrow 5\downarrow 4\uparrow 3\downarrow$) oluşmaktadır. Bu simetri ilk olarak DNA-adenozil ve AdoMet-adenozil bağlayıcı bölgelerin yapısal olarak karşılaştırılmasıyla DNA MTaz'larında fark edilmiştir(19).



Şekil 2. İnsan TPMT'nin topolojisi, sekonder yapıları ve dizilimi

- (A) İnsan TPMT'nin topolojisi. Heliksler silindirler olarak (harflerle belirtilmiş) ve iplikler geniş oklar olarak (numaralarla belirtilmiş) gösterilmiştir. Kalıntı numaraları, sekonder yapı elemanlarının sınırlarını gösterir. Doğal olarak meydana gelen amino asit dizilimindeki değişiklikler, siyah arka plan üzerine beyaz harflerle daire içine alınmıştır. Heliksler αB , αC ve αD β -tabakanın bir tarafında, αE , αF ve αG (çizgili) ise diğer tarafında yer almaktadır.
- (B) İnsan TPMT'nin dizilimi. Heliksler için harfler (A–G) ve iplikler için numaralar (1–9) sekonder yapı elemanlarını belirtir. Kalıntı numaraları dizilimin üzerinde gösterilmiştir. Doğal olarak meydana gelen amino asit dizilimindeki değişiklikler ve TPMT varyant allellerinin isimleri dizilimin altında gösterilmiştir. Kristalizasyon işlemine dahil edilmeyen N-terminal kalıntıları 1–16 yer almamaktadır. (19).

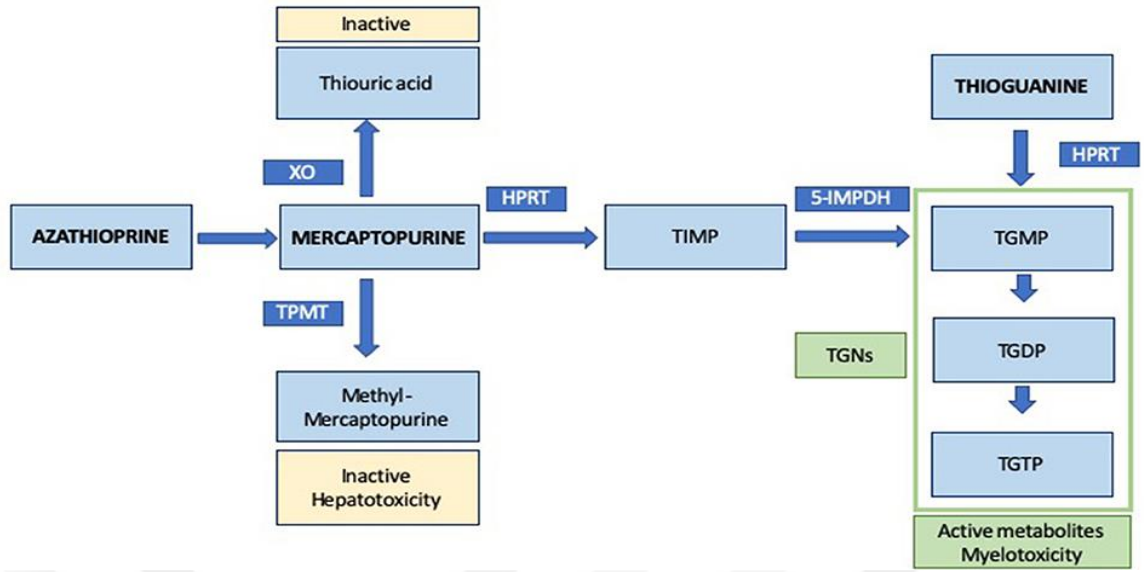
AZA bir prodürdür ve non-enzimatik bir dönüşüm sonrasında, %88'i merkaptopürin (MP)'e dönüşür. Şekil 1'de gösterildiği gibi, bu da aktif ve inaktif metabolitler oluşturmak üzere çeşitli metabolik yollardan geçebilir (20).

Tiopürin metiltransferaz enzimi (TPMT), esas olarak hepatotoksisite ile ilişkilendirilen inaktif bir metabolit olan metil merkaptopürin (MMP)'e dönüşür. MP, ayrıca ksantin oksidaz tarafından başka bir inaktif bozunma ürünü olan tiyürik asit (TUA)'e oksitlenebilir.

Ancak, MP, hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz (HPRT) tarafından tiosin monofosfat (TIMP)'e dönüştürülebilir ve bu da 5-inosin monofosfat dehidrogenaz (5-IMPDH) aracılığıyla tioguanin monofosfat (TGMP)'e dönüşebilir. TGMP daha sonra tioguanin difosfat (TGDP) ve trifosfat (TGTP)'e dönüştürülebilir (21).

Tioguanin (TG) ayrıca HPRT tarafından TGMP'ye metabolize edilebilir. TGMP, TGDP ve TGTP birlikte tioguanin nükleotidleri (TGN'ler) olarak bilinir ve bunlar, TP'nin etkinliği ve miyelotoksisitesinden sorumlu aktif metabolitlerdir. Bu TGN'ler, vücudun doğal purinleri ile müdahale eder ve hücrel RNA ve DNA'ya entegre olur, hücre proliferasyonunu inhibe eder. Bir başka etki mekanizması, Rac1 aktivasyonunu inhibe etmeyi ve CD28'ı uyarak T-hücresi apoptozunu (hücre ölümünü) tetiklemeyi içerir (22).

TPMT enziminin temel rolü, MP, TG, TIMP ve TGMP'yi metilleyerek onları inaktif hale getirmek, TGN sentezini azaltmak ve sonuç olarak TP'nin etkinliğini azaltmaktır (23). Etkililik ve yan etkiler, TP'nin aktivasyon ve inaktivasyon yolları arasındaki hassas bir denge sonucudur ve bu konuda bireyler arasında önemli değişkenlikler vardır (24).

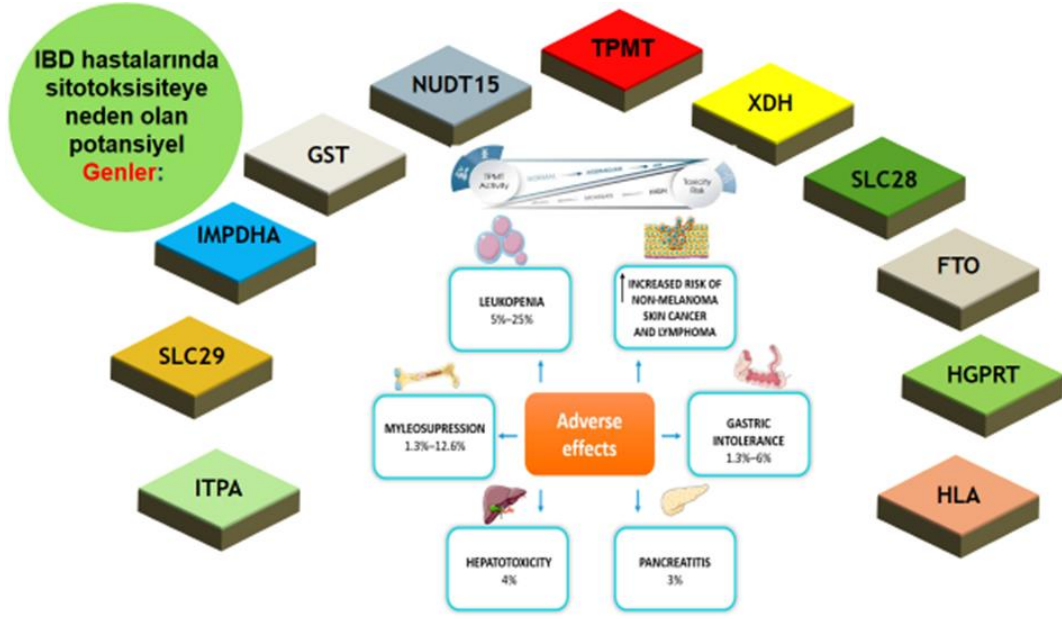


Şekil 3. Tiopürinlerin basitleştirilmiş metabolik yolları. XO, ksantin oksidazı temsil eder; TPMT, tiopürin metiltransferazı; HPRT, hipoksantin-guanin fosforibozil transferazı; 5-IMPDPH, 5-inosin monofosfat dehidrogenazı; TIMP, 6-Tiosin 5'-monofosfatı; TGN'ler kolektif olarak tioguanin nükleotidlerini ve özellikle TGMP, tioguanin monofosfatı; TGDP, tioguanin difosfatı; ve TGTP, tioguanin trifosfatı ifade eder.

Günümüzde, sayısı her geçen gün artan araştırmalarda, tiopürinlerin etkinliğini artırmada farmakogenomiğin önemini vurgulamaktadır (25). TPMT, Nudix hidrolaz 15 (NUDT15), alfa-ketoglutarat bağımlı dioksijenaz (FOT), sınıf II HLA ve inozin trifosfat pirofosfat (ITPA) gibi genlerdeki varyasyonlar, advers olayları deneyimleme olasılığının arttığı ile ilişkilendirilmiştir (Tablo 1) ve Şekil 2.

Tablo 1. Tiopürin toksisitesi ile ilişkili en önemli genetik varyantlar

Genetik varyant	Fonksiyonel sonuç	Klinik sonuç
TPMT*2 (rs1800462)	Düşük TPMT enzim aktivitesi	Miyelotoksosite riski
TPMT*3C (rs1142345)	Düşük TPMT enzim aktivitesi	Miyelotoksosite riski
TPMT*3A: *3B (rs1800460) ve *3C (rs1142345) içerir	Düşük TPMT enzim aktivitesi	Miyelotoksosite riski
NUDT15 p.Arg139Cys veya cd15C>T (rs116855232)	Düşük NUDT15 enzim aktivitesi	Miyelotoksosite riski
NUDT15 p.Val18_Val19insGlyVal aleli	Düşük NUDT15 enzim aktivitesi	Miyelotoksosite riski
Sınıf II HLA polimorfizmi (rs2647087)	Belirsiz	Pankreatit riski
ITPA 94C>A (rs1127354)	Düşük enzim aktivitesi	Yan etki riskinde artışla ilgili belirsiz veriler
FTO Ala134Thr (rs79206939)	Düşük enzim aktivitesi	Lökopeni



Şekil 4. İBH hastalarında sitotoksisteye neden olan potansiyel Genler

1.2. Tiopürin Metiltransferaz (TPMT)

TPMT aktivitesi yüksek bireyler sıkça "hiper metilatörler" veya "yanıt vermeyenler" olarak adlandırılırlar çünkü onlar çoğunlukla AZA'dan metillenmiş ve inaktive edilmiş ürünler üretirler, aktif metabolitlerin çok düşük seviyelerini içerirler (26).

Buna karşılık, TPMT geninin her iki alelinde de düşük aktiviteye sahip olanlar, artan IMPDH yolları aracılığıyla aktif metabolitler üretme eğilimindedirler, bu da onları özellikle miyelotoksikite olmak üzere ciddi yan etkilere karşı risk altına sokar. TPMT alelleri işlevsel (1) veya işlevsiz (2, 3A, 3B, 3C, 4) formlara ayrılabilir. Çeşitli polimorfizmler düşük TPMT aktivitesi ile ilişkilendirilmiş olsa da, TPMT2, TPMT3A ve TPMT3C özellikle önemlidir, çünkü bunlar çoğu popülasyonda eksik alellerin çoğunluğunu (%60–95) temsil eder (27).

Hastaların genotiplerine bağlı olarak, yüksek aktiviteli aleller için homozigot (iki veya daha fazla işlevsel alele sahip), ara aktiviteli heterozigot (bir işlevsel ve bir işlevsiz alel) veya düşük aktiviteli aleller için homozigot (iki işlevsiz alel) olarak sınıflandırılabilirler. Kafkasyalılar, %0.3'ü düşük aktiviteli aleller için homozigot, %11'i heterozigot ve %89'u yüksek aktiviteli aleller için homozigottur (28). Önerilen dozaj, hastanın genotipine bağlıdır; yüksek aktiviteli homozigotlar için tam TP dozu, heterozigotlar için %50 doz indirimi ve düşük aktiviteli homozigotlar için tedaviden kaçınılması önerilir (29).

TPMT aktivitesi, kırmızı kan hücrelerindeki fenotip veya düşük TPMT aktivitesi ile ilişkili polimorfizmlerin analizi temelinde genotip aracılığıyla değerlendirilebilir (30). Genotip testi, heterozigotları daha iyi tanımladığı için fenotipten daha doğru görünmektedir, TPMT defektlerinin yanlış sınıflandırılmasını önler (31). Ancak, TPMT fenotipinin, genotipe göre bir avantajı, tek bir genotip içinde bile fenotiplerde önemli varyasyonların olabilmesi, dozajın daha da bireyselleştirilmesine olanak tanınmasıdır.

Çalışmalar, ara TPMT aktivitesine sahip hastaların %30-60'ının tam bir TP dozu ile miyelotoksisite yaşayacağını öne sürmektedir. Bu nedenle, rehberler TPMT aktivitesine dayanarak heterozigotlarda doz indirimi önermektedir. Ancak, tedavi yalnızca TPMT aktivitesine göre yönlendirilirse, hastaların %40'ı yetersiz tedavi alabilir (32,33). Ayrıca, miyelosupresyon vakalarının sadece %25'i TPMT eksikliğine atfedilebilir (31). Rutin TPMT testlerinin değeri belirsizliğini korumaktadır (34,35).

Diğerleri, Crohn ve Ülseratif Kolit üzerine İspanyol Çalışma Grubu (GETECCU) ve Avrupa Crohn ve Kolit Organizasyonu (ECCO) gibi, bu öneriyi desteklemekle birlikte, tedaviye başlamadan önce bunu zorunlu olarak görmemektedirler (36) ancak, Amerikan Gastroenteroloji Derneği (37) ve İngiliz Gastroenteroloji Derneğinin (6) rehberleri, kanıtların sınırlı kalitesine rağmen, TP tedavisinden önce TPMT testi yapılmasını önermektedir.

Rutin TPMT testlerinin maliyeti ile ilgili olarak, bazı çalışmalar bunun maliyet-etkin olduğunu öne sürerken, diğerleri genotipleme maliyetinin nötr olduğu sonucuna varmaktadır. Karar, belirli popülasyonlardaki homozigot ve heterozigotların yaygınlığına bağlı olabilir (38). Bununla birlikte, miyelotoksisite riski devam ettiğinden tedavi sırasında periyodik kan testleri zorunludur (39).

Selvestrel ve ark. (2023), çok erken başlangıçlı inflamatuvar bağırsak hastalığı (VEO-İBH) olan çocuklarda TPMT geninin DNA metilasyonu ve azatiyoprin farmakokinetiği üzerindeki etkisini inceledikleri bir çalışma yürüttüler. Azatiyoprin metabolizması için hayati öneme sahip olan TPMT enziminin, VEO-İBH hastalarında İBH olan ergenlere kıyasla daha aktif olduğunu keşfettiler.

Çalışma, VEO-İBH ve İBH hastaları arasında periferik kanda TPMT geni DNA metilasyonu ve azatiyoprin farmakokinetiği farklarını değerlendirmeyi amaçlamaktaydı. Ayrıca, yaş ile DNA metilasyon modelleri arasındaki ilişkiyi, hastaların bir pilot grubunu kullanarak incelediler ve bulgularını, kamu işlevsel genomik veri havuzunda mevcut üç

hasta kohortundan elde edilen verilerin meta-analizi ile doğruladılar. Ek olarak, çalışma, TPMT genindeki belirli CpG sitelerinin etkilerini pirosekanslama kullanarak doğruladı.

Sonuçlar, TPMT geninin akış aşağısında yer alan belirli bir CpG yeri olan cg22736354'ün, yaş ile ilişkili olarak farklı metilasyon seviyelerine sahip olduğunu, VEO-İBH hastalarında İBH hastalarına kıyasla daha düşük metilasyon gözlemlendiğini gösterdi. Cg22736354'ün azaltılmış metilasyonu, hem VEO-İBH hem de İBH hastalarında daha düşük azatiyoprin inaktivasyonu ve TGN olarak bilinen azatiyoprin metabolitlerinin daha yüksek konsantrasyonları ile ilişkilendirildi.

Özetle, çalışma, TPMT geninin cg22736354 sitesinde DNA metilasyonundaki farklılıkların, azatiyoprin metabolizması ve TGN seviyelerindeki varyasyonlarla ilişkili olduğunu, VEO-İBH hastalarının, İBH hastalarına göre farklı metilasyon modelleri sergilediğini buldu (40).

Reinier ve meslektaşlarının 2019 yılındaki çalışmalarında, İBH olan hastalarda tiopürin ilaçlarının genotip kılavuzluğundaki dozajlamasının ek sağlık hizmetleri maliyetlerine yol açıp açmadığı veya hayat kalitelerini etkileyip etkilemediği belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışma, 30 Hollanda hastanesi boyunca yürütülen randomize kontrollü bir deneme olan İnflamatuar Bağırsak Hastalığı Kliniklerinde Farmakogenetik Test ile Tiopürin Yanıtının Optimizasyonu denemesinin bir parçasıydı. En az 18 yaşında olan İBH hastaları, ya ön tedavi genotiplendirmesi alan (müdahale grubu) ya da almayan (kontrol grubu) olarak rastgele atanmıştır.

Araştırmacılar, sağlanan sağlık hizmetlerinin toplam maliyetlerini ve 20 hafta boyunca EuroQol-5D3L fayda puanlarına dayanarak hastaların kalite düzeltilmiş yaşam yılları (QALY) üzerindeki etkisini değerlendirdiler. Ortalama artımsal maliyet tasarruflarını ve QALY'leri istatistiksel bootstrap teknikleri kullanarak hesapladılar. Çalışma, müdahale grubunda 381 hastayı ve kontrol grubunda 347 hastayı içeriyordu.

Genotipe dayalı tiopürin tedavisinin sonuçları, TPMT varyantlarına sahip hastalarda advers ilaç reaksiyonları (ADR) riskini azalttığını, genel sağlık hizmetleri maliyetlerini artırmadan göstermiştir. Ayrıca, hastaların yaşam kalitesi, standart tedavi alanlarla karşılaştırılabilir seviyede kalmıştır. Duyarlılık analizleri, tarama maliyetlerindeki potansiyel varyasyonlar, biyolojik ilaç giderleri ve üretkenlik kaybıyla ilişkili maliyetler dikkate alındığında bile bu bulguların sağlamlığını göstermiştir.

Özetle, İBH hastalarında genotipe yönelik tiopürin dozajı, ADR'leri azaltmada etkili olmuş, ek sağlık hizmeti maliyetlerine yol açmamış ve hastaların yaşam kalitesi üzerinde standart tedaviye kıyasla olumsuz bir etki oluşturmamıştır (41).

1.3. Amaçları, Hipotezleri ve Soruları

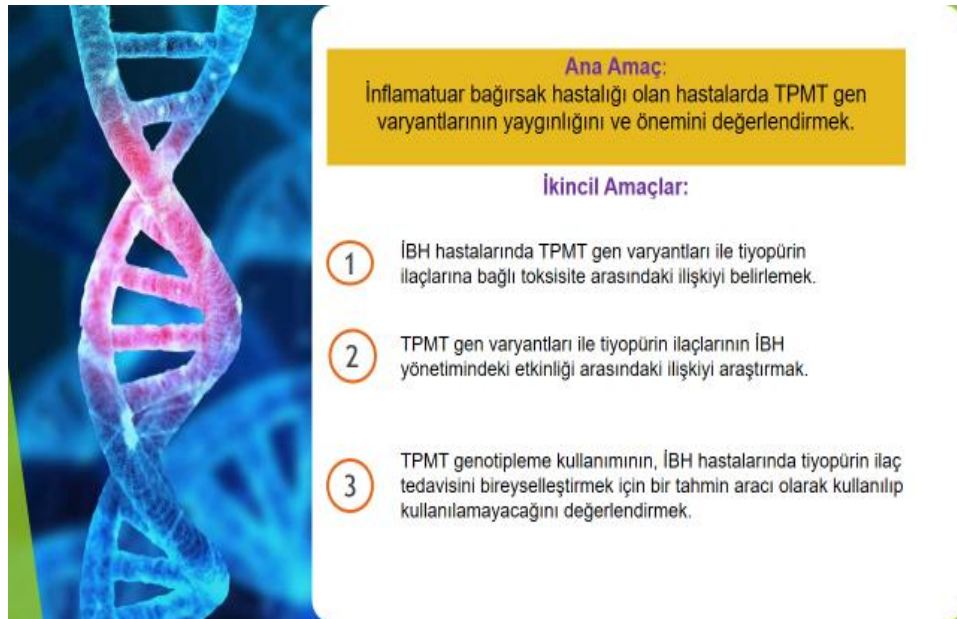
Bu araştırmanın amaçları, hipotezleri ve soruları şunlardır:

1.3.1. Ana Amaç:

İnflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastalarda TPMT gen varyantlarının yaygınlığını ve önemini değerlendirmek.

1.3.2. İkincil Amaçlar:

1. İBH hastalarında TPMT gen varyantları ile tiopürin ilaçlarına bağlı toksisite arasındaki ilişkiyi belirlemek.
2. TPMT gen varyantları ile tiopürin ilaçlarının İBH yönetimindeki etkinliği arasındaki ilişkiyi araştırmak.
3. TPMT genotipleme kullanımının, İBH hastalarında tiopürin ilaç tedavisini bireyselleştirmek için bir tahmin aracı olarak kullanılıp kullanılamayacağını değerlendirmek (Şekil 3).



Şekil 5. Bu araştırmanın amaçları

1.3.3. Ana Hipotez:

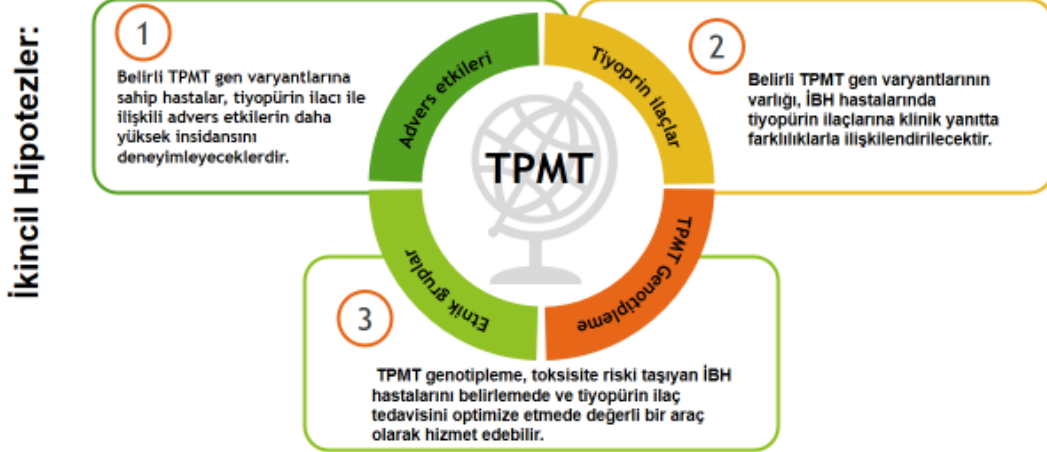
Belirli TPMT gen varyantlarının varlığı, inflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastalarda tiopürin ilacı ile ilişkili toksisite ve tedavi yanıtındaki varyasyonlarla ilişkilidir.

1.3.4. İkincil Hipotezler:

1. Belirli TPMT gen varyantlarına sahip hastalar, tiopürin ilacı ile ilişkili advers etkilerin daha yüksek insidansını deneyimleyeceklerdir.
2. Belirli TPMT gen varyantlarının varlığı, İBH hastalarında tiopürin ilaçlarına klinik yanıtta farklılıklarla ilişkilendirilecektir.
3. TPMT genotipleme, toksisite riski taşıyan İBH hastalarını belirlemede ve tiopürin ilaç tedavisini optimize etmede değerli bir araç olarak hizmet edebilir (Şekil 4).

Ana Hipotez:

Belirli TPMT gen varyantlarının varlığı, inflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastalarda tiyopürin ilacı ile ilişkili toksisite ve tedavi yanıtındaki varyasyonlarla ilişkilidir.



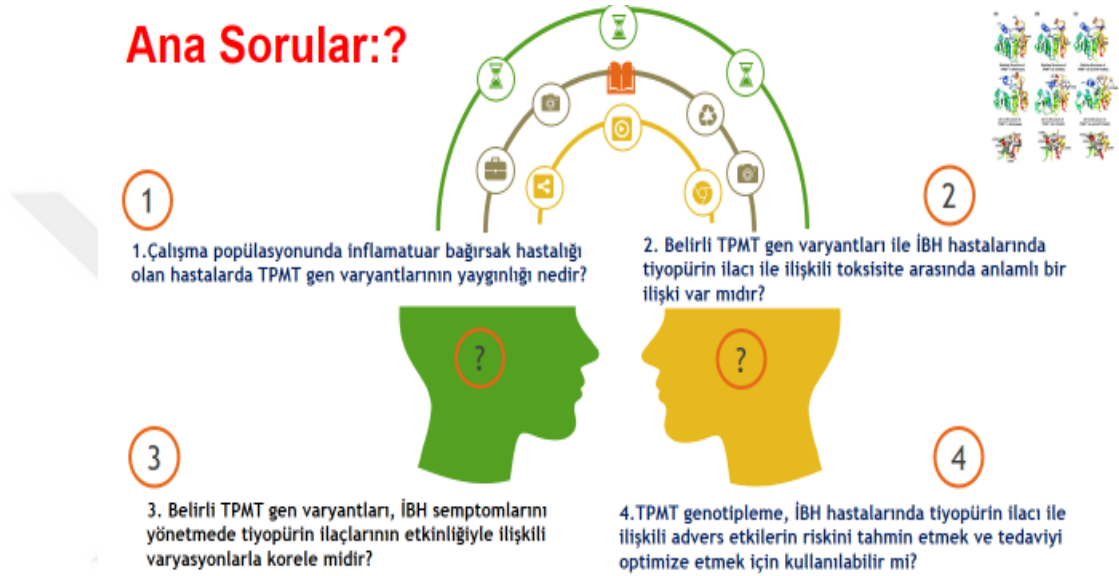
Şekil 6. Bu araştırmanın Hipotezleri

1.3.5. Ana Sorular:

1. Çalışma popülasyonunda inflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastalarda TPMT gen varyantlarının yaygınlığı nedir?

2. Belirli TPMT gen varyantları ile İBH hastalarında tiopürin ilacı ile ilişkili toksisite arasında anlamlı bir ilişki var mıdır?
3. Belirli TPMT gen varyantları, İBH semptomlarını yönetmede tiopürin ilaçlarının etkinliğiyle ilişkili varyasyonlarla korele midir?
4. TPMT genotiplleme, İBH hastalarında tiopürin ilacı ile ilişkili advers etkilerin riskini tahmin etmek ve tedaviyi optimize etmek için kullanılabilir mi? (Şekil 5).

Ana Sorular:?



Şekil 7. Bu araştırmanın Ana Soruları

1.3.6. İkincil Sorular:

1. TPMT gen varyantları ile tiopürin ilacı ile ilişkili toksisite arasındaki ilişkiyi etkileyen ek genetik veya klinik faktörler var mıdır?
2. Belirli TPMT gen varyantları ile ilişkilendirilen spesifik advers etkiler veya tedavi yanıtları nelerdir?
3. Çalışma popülasyonundaki farklı etnik popülasyonlar arasında TPMT gen varyantlarının dağılımındaki varyasyonları açıklayabilecek herhangi demografik veya klinik özellikler var mıdır?

4. İBH hastalarının tiopürin tedavisi alırken klinik yönetiminde TPMT genotipleme uygulamasının pratik etkileri nelerdir?

Bu amaçlar, hipotezler ve sorular, inflamatuvar bağırsak hastalığı bağlamında TPMT gen varyantları üzerine yapılan araştırmayı yürütmek için net bir çerçeve sağlar, çalışmanın tasarımını, veri toplama ve analizini yönlendirir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Teorik Çerçeve

TPMT, 6-TG'nin S-metilasyonu yoluyla detoksifikasyonu için gereklidir (42). Bu nedenle, tiopürin dozu bir bireyin TPMT aktivite seviyesine dayanarak verilmezse, TPMT eksikliğinden kaynaklanan toksisite tedavi kesintisine yol açabilir (43). Buna karşın, normalden yüksek bir TPMT aktivitesi, hastaları AZA'nın geleneksel dozlarına refrakter hale getirebilir (44).

Böylece, TPMT, tiopürinlerin metabolizmasında önemli bir rol oynar, düşük TPMT aktivitesi, değişik tiopürin metabolizması, sitotoksik metabolitlerin aşırı üretimi ve miyelosupresyon ile ilişkilendirilir. İBH hastalarında, tedavi risklerini değerlendirmek için tedavi öncesinde TPMT genotipleme yapılabilir; ancak, bu, hastaların tiopürinlere tahammül edip etmeyeceğini dışlamaz. Güncel tiopürin tedavi rehberleri, lökopeniyi tespit etmek için düzenli hematolojik izlemeyi zorunlu kılmaktadır (45).

Pürin analogları olan azatiyoprin (AZA) ve 6-merkaptopürin (6-MP), inflamatuvar bağırsak hastalığının (İBH) tedavisinde kullanılan en yaygın immünsüpresan ilaçlardır ve remisyonu indüklemekte ve sürdürmekte etkilidirler (46).

Son kanıtlar, azatiyoprinin Crohn hastalığı (CH) ve ülseratif kolit (ÜK)'de aktif iltihabı kontrol altına alabildiğini, nüksü önleyebildiğini, steroid bağımlılığını azaltabildiğini ve CH'de remisyonu indükleyip sürdürebildiğini göstermiştir. Bu yararlı etkilerin birçoğu, AZA'nın T-hücresi apoptozisini indükleyebilme yeteneğine atfedilmiştir (47). Ancak, hastaların üçte birinde, ya toksisite (gastrointestinal intolerans, pankreatit ve hastaların %9-28'inde kemik iliği baskılanması) ya da klinik yanıtın eksikliği (%15 vakada) nedeniyle AZA tedavisi kesilmektedir (48).

AZA ve 6-MP'nin metabolizması karmaşıktır. AZA bir pro-ilacıdır, plazmaya emilir ve glutatyon bağımlı bir süreçle hızla 6-MP'ye dönüştürülür. 6-MP, ksantin oksidaz (XO) ve tiopürin-metil-transferaz (TPMT) tarafından inaktive edilebilir veya çok enzimatik bir süreç aracılığıyla sitotoksik 6-tioguanin nükleotitleri (6-TGN)'ne dönüştürülebilir (49).

TPMT veya XO eksikliği, 6-MP'nin 6-TGN'lere, ilacın etkinliği ile ilişkili baskın aktif metabolitlere, daha fazla dönüşümüne neden olur, ancak bu dönüşüm aynı zamanda toksisiteyi de indükler. Düşük TPMT aktivitesine sahip hastalar, standart AZA dozları ile

tedavi edildiklerinde daha yüksek 6-TGN seviyeleri gösterir ve miyelosupresyon riski artar. Ancak, yüksek TPMT aktivitesine sahip hastalar genellikle tiopürinlere dirençli olur veya etkinlik elde etmek için daha yüksek bir doza ihtiyaç duyar, bu da hepatotoksisite riskini artırır (50).

Ancak, hastalar arasında TPMT aktivitesindeki büyük değişkenlik, TPMT gen polimorfizmlerine atfedilmiştir (51). TPMT geni, 6p22.3 kromozomunda lokalize edilmiştir. Toplamda 24 TPMT genetik polimorfizmi tanımlanmıştır; bu polimorfizmler, enzimatik aktivite seviyelerinde azalmayla ve/veya tiopürin ilaç kaynaklı toksisite ile ilişkilendirilmiştir. Bu aktiviteler genetik olarak belirlenmiş olup Kafkas popülasyonda trimodal bir dağılım gösterir: Bireylerin %88.6'sı normal veya yüksek TPMT aktivitesine yol açan iki alel tipi taşır (TPMT 1), %0.3'ü düşük aktivite alellerine homozigot olup algılanabilir TPMT aktivitesine sahip değildir ve %11.1'i heterozigot olup ara aktivite sergiler (52). TPMT genetik polimorfizmleri ile belirli fenotipler arasındaki genel uyum oranı %98.4'tür (53).

Üç mutant alel, TPMT 2, 3A ve 3C, bugüne kadar incelenen tüm insan popülasyonunda varyant alellerin çoğunu oluşturur. Orta veya düşük TPMT aktivitesi, en sık bu alel polimorfizmleri ile ilişkilendirilir (54). Bu alellerin dağılımı, özellikle 3A ve 3C genotipleri arasında, etnik popülasyonlar arasında önemli ölçüde farklılık gösterir (55). Bu çalışma, Brezilyalı İBH hastaları grubunda TPMT gen polimorfizmlerinin yaygınlığını belirlemeyi ve bu polimorfizmler ile tiopürin ilişkili toksisite ve tedavi yanıtı arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçlamaktadır.

TPMT genetik polimorfizmi, tiopürin ilaçlarının toksisitesi üzerinde önemli klinik etkiye sahiptir. Genotipleme temelinde toksisite geliştirme riski yüksek olan hastaların belirlenmesinin, ilaç tedavisini kişiselleştirmek için kullanılabileceği öne sürülmüştür (56).

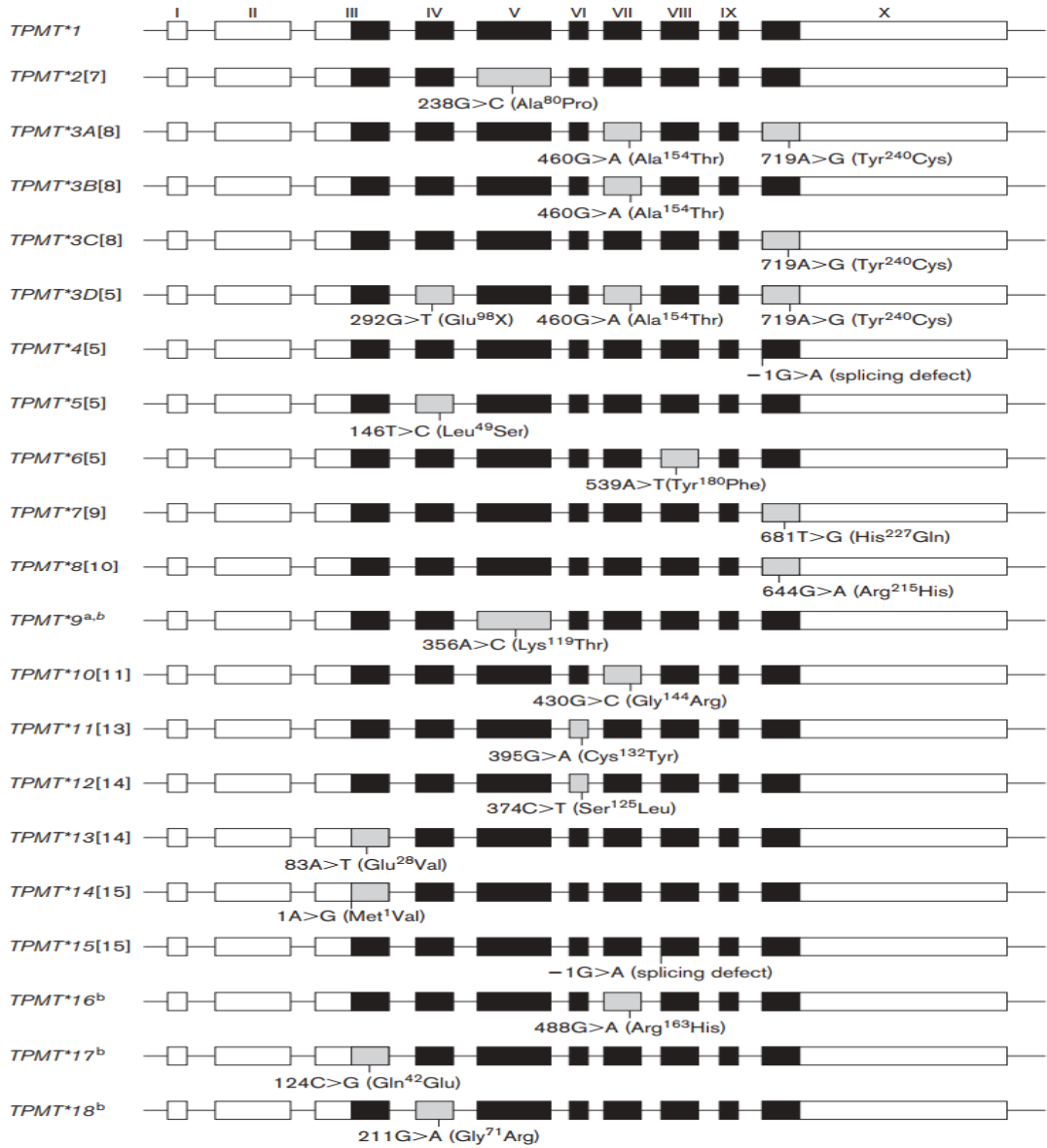
TPMT, hücrelerin sitozolünde bulunan bir enzimdir. Birincil işlevi, 6-merkaptopürin, 6-tioguanin ve azatiyoprin gibi çeşitli aromatik ve heterosiklik sülfhidril bileşiklerinde S-metilasyon sürecini kolaylaştırmaktır.

Bu belirli tiopürin ilaçları, çeşitli tıbbi durumlar için standart tedavi protokollerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu durumlar arasında çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi (ALL), romatizmal hastalıklar ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları

bulunur ve aynı zamanda organ nakli geçiren hastalarda immünsüpresanlar olarak da kullanılırlar (57) (Şekil 2).

İnsanlardaki TPMT enzimi aktivitesi, TPMT lokusunda bulunan yaygın bir genetik varyasyon tarafından düzenlenir. Yaklaşık olarak 300 bireyden biri belirgin derecede azalmış TPMT aktivitesi gösterirken, %11'inde ara TPMT aktivitesi bulunur ve çoğunluk, %89'u normalden yüksek TPMT aktivite seviyelerine sahiptir. TPMT eksikliğine yol açan inaktif edici mutasyonlar tanımlanmış olup, bunlar homozigot veya bileşik heterozigot şeklinde meydana gelir. Şu anda, TPMT2'den TPMT15'e kadar adlandırılan 17 farklı varyant TPMT aleli bilinmektedir (58).

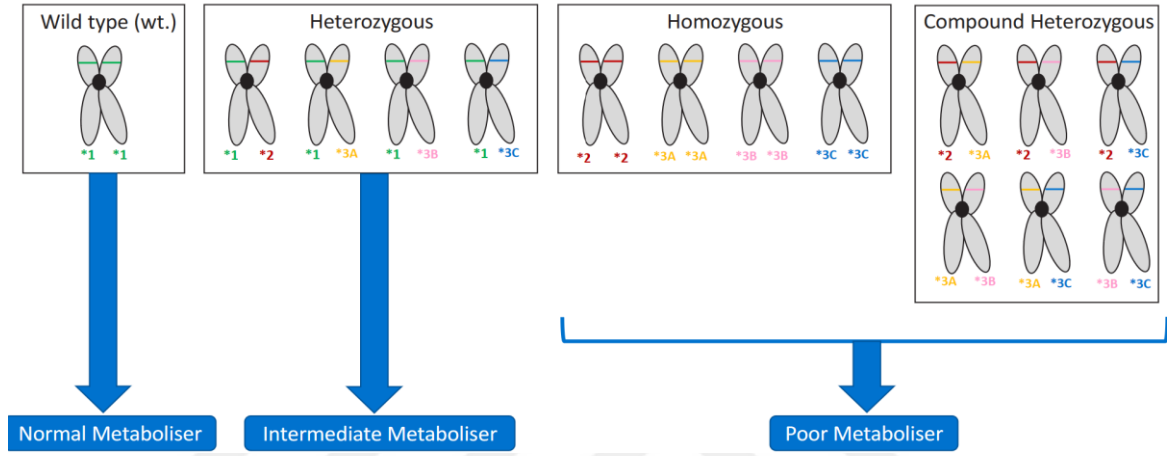




Şekil 8. Tiopürin S-metiltransferaz geni (TPMT) içinde şu anda tanınan mutant alellerin bir derlemesi sunulmaktadır. Bu derleme, hem önceden belgelenmiş hem de güncel çalışmada tanımlanan yeni keşfedilen TPMT mutant alellerinin pozisyonlarını gösterir. Bu temsilde, açık okuma çerçevesi (ORF) dizilerini kodlayan eksonlardan sorumlu siyah kutular, ORF dışında bulunan eksonları temsil eden beyaz kutularla gösterilir. Eksonların oranları, göreceli uzunluklarına göre doğru bir şekilde tasvir edilmiş olup, intron boyutları ölçeklendirilmemiştir. Parantez içindeki referanslar, "a" R. Weinshilboum'dan kişisel iletişimi, "b" ise güncel çalışmayı kaynak olarak belirtir (59).

2.2. TPMT genotipi ve fenotipi arasındaki bağlantı

Her birey TPMT geni için iki alele sahiptir. TPMT enzim ifadesi, bir bireyin taşıdığı alellerin (Diplo-tip) kombinasyonuna bağlı olan kodominant bir özelliktir. Bir birey, aynı alellere sahip olduğunda homozigot; farklı alellere sahip olduğunda heterozigot olabilir. TPMT genindeki fonksiyonel varyantlar, üç farklı enzim aktivitesi seviyesi sonucunu doğurur: normal, ara ve düşük (Şekil 4).



Şekil 9. TPMT genotipi ve fenotipinin bağlanması

Azatiyoprin (AZA) ve 6-merkaptopürin (6-MP) gibi tiopürin ilaçları, akut lenfoblastik lösemi ve inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi otoimmün hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli durumların tedavisinde kullanılır (60). AZA, 6-MP'ye dönüştürülür ve ardından birkaç metabolik yola girer. Hipoksantin guanin fosforibosil transferaz (HPRT) gibi enzimler ve diğerleri, 6-MP'yi 6-tioguanin nükleotitleri (6-TGN) olarak bilinen aktif sitotoksik bileşiklere dönüştürmede rol oynar.

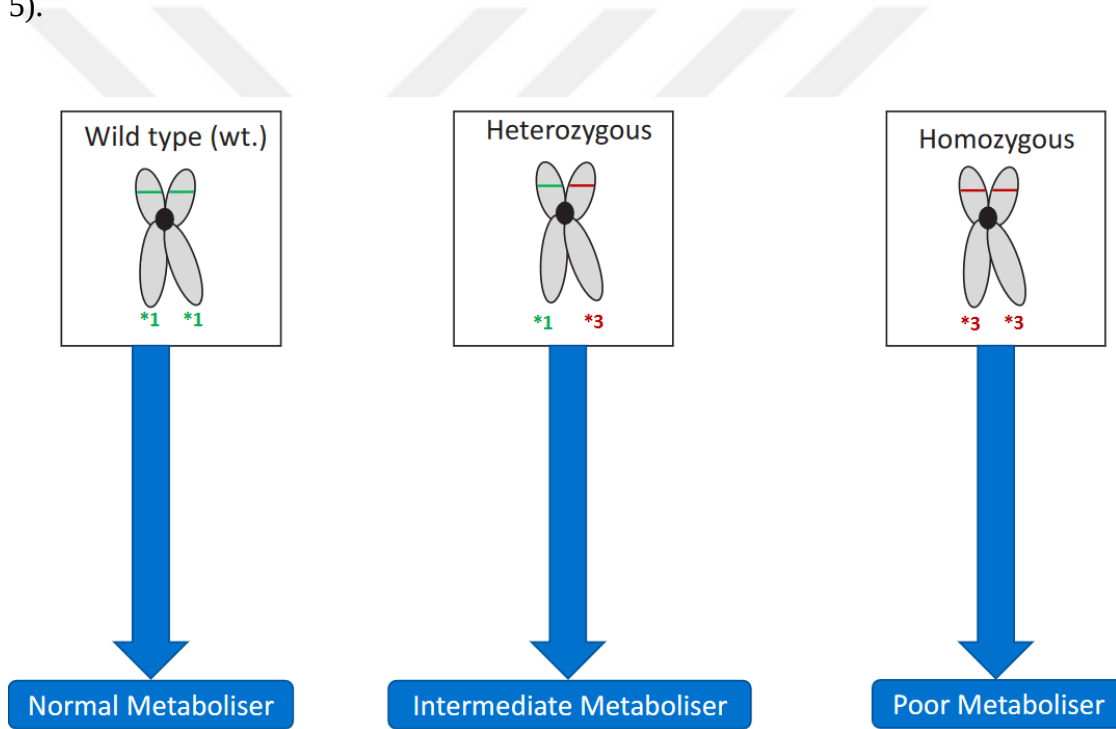
Ayrıca, tiopürin S-metiltransferaz (TPMT) ve ksantin oksidaz (XO) gibi enzimler, 6-MP'yi iki inaktif metabolit olan 6-tiourik asit ve 6-metil merkaptopürin (6-MMP)'e dönüştürür, 6-MMP ve türevleri potansiyel olarak karaciğerle ilgili sorunlara neden olabilir. Çok düşük TPMT aktivitesine sahip bireylerde, sitotoksik 6-TGN seviyelerinin artması nedeniyle miyelosupresyon geliştirme riski yükselir (61).

Enzim NUDT15, 6-TGN'leri inaktif formlara dönüştürmede rol oynar ve azalmış NUDT15 aktivitesine sahip bireyler miyelosupresyon yaşayabilir. Hem etkinlik ile ilgili endişeler hem de potansiyel yan etkiler nedeniyle, sağlık hizmeti sağlayıcıları genellikle tiopürin tedavisine başlamadan önce TPMT ve NUDT15 genotiplerini, aynı zamanda

TPMT enzimatik aktivitesini göz önünde bulundurur (62). Tiopürin ilaçlarının terapötik sonuçları ve toksisite riskleri, TPMT ve NUDT15 aktivitesi tarafından önemli ölçüde etkilenir, bu enzimlerin, özellikle akut lenfoblastik lösemili çocuklarda tiopürin ilaç toksisitesinin önemli bir kısmını açıklamadaki rollerini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (63).

2.3. NUDT15 Genotipi ve Fenotipi Arasındaki Bağlantı

Bireyler, NUDT15 geni için iki alele sahip olacaklar. Bir birey, özelliğe göre homozigot (iki aynı alel) veya heterozigot (iki farklı alel) olabilir. Arg139Cys amino asit değişimi, neredeyse hiç enzimatik aktivitesi olmayan kararsız bir protein oluşturur (Şekil 5).



Şekil 10. NUDT15 genotipi ve fenotipinin bağlanması

Tiopürin ilaç tedavisini, etkinliğini optimize ederek ve yan etkileri en aza indirgeyerek dengelemek için, hastaların örneklerindeki tiopürin nükleotitlerinin 6-TGN ve 6-MMPN konsantrasyonlarını izlemek kritik öneme sahiptir. Ancak, 6-TGN için dar terapötik aralık ve hastalar arasında tiopürin ilaç metabolizmasındaki varyasyonlar nedeniyle bu süreç karmaşık olabilir (64). Tiopürin nükleotid konsantrasyonlarını etkin bir şekilde ölçmek için, yıkanmış kırmızı kan hücreleri (RBC'ler) kullanılır çünkü bunlar

nükleer hücrelerdeki intraselüler tiopürin nükleotid konsantrasyonlarının göstergesi olarak hizmet eder (65).

RBC'lerde tiopürin nükleotidlerini ölçme yöntemleri, pürin bazlarını (6-TG ve 6-MMP) serbest bırakmak için onları hidrolize etmeyi ve ardından bunları sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) kullanarak analiz etmeyi içerir (66). Uygun örnek hazırlığı ve işlenmesinin, tam kan örneklerinde tiopürin nükleotidlerinin zayıf depolama stabilitesi nedeniyle hayati öneme sahip olduğunu belirtmek gerekir (67).

Son zamanlarda, Bajaj ve meslektaşları (2022), tiopürin ilaç tedavisi gören hastalarda yan etkileri önlemeyi amaçlayan klinik uygulamada tiopürin metabolit konsantrasyonlarını izlemek için yeni bir yaklaşım tanıttılar. Yöntemleri, özellikle kırmızı kan hücrelerinde (RBC'ler) iki ana bileşik olan 6-tioguanin (6-TG) ve 6-metil merkaptopürin (6-MMP)'i niceliklendirmek için Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) kullanır.

Bu teknik, RBC'leri tam kan örneklerinden ayırmak ve ardından izole edilen RBC'leri yıkamak için otomatik bir hücre yıkayıcı kullanımını içerir. Yöntemin kantifikasyon alt sınırı, 6-TG için yaklaşık $50 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC'ye}$ eşdeğer $0.2 \text{ } \mu\text{mol/L}$ ve 6-MMP için yaklaşık $1.000 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC'ye}$ eşdeğer $4 \text{ } \mu\text{mol/L}$ olarak belirlendi. Analiz, %3.0'dan daha az bir toplam hata payı sergiledi. 6-TG ve 6-MMP için üst sınırlar sırasıyla $7.5 \text{ } \mu\text{mol/L}$ ve $150 \text{ } \mu\text{mol/L}$ olarak belirlendi. Ayrıca, tiopürin metabolitlerinin çeşitli ön ve son analitik koşullar altındaki stabilitesi değerlendirildi.

Yaklaşımlarını doğrulamak için Bajaj ve ark. yöntemlerini üç farklı laboratuvarında kullanılan doğrulanmış LC-MS/MS teknikleriyle karşılaştırdı. Yöntemleri, doğrulanmış yöntemlerle iyi bir düzeyde uyum gösterirken, yöntemlerden biri 6-MMP niceliklendirmesinde yaklaşık %40 daha düşük bir yanlılık sergiledi.

Araştırmacılar, tiopürin S-metiltransferaz (TPMT)'in fenotipik ve genotipik varyasyonları ile 6-TG ve 6-MMP konsantrasyonları arasındaki ilişkiyi de incelediler. Analizleri, normal ve orta düzeyde 6-MMP aktivitesine sahip TPMT grupları arasında tiopürin metabolit konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı farklar ortaya koydu ($p < 0.0001$). Ancak, 6-TG konsantrasyonlarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p = 0.096$). Dikkat çekici bir şekilde, normal TPMT aktivitesine sahip örnekler

arasında, pediatrik örnekler yetişkin örneklere kıyasla daha yüksek 6-MMP konsantrasyonları sergiledi ($p = 0.015$) (68).

2.4. Literatür taraması

Tiopürin ilaçları onlarca yıldır inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) tedavisinde temel bir rol oynamıştır. Uzun tarihlerine rağmen, etkinlikleri ve güvenlikleri hakkındaki endişeler, özellikle miyelosupresyon ve lenfoproliferatif bozukluklar gibi ciddi yan etkilerin riski konusunda devam etmektedir. Biyolojik terapilerin yükselişi, İBH'nin tedavisinde tiopürinlerin rolünün yeniden değerlendirilmesine yol açmıştır, ancak maliyet etkinlikleri ve yaygın erişilebilirlikleri, özellikle kaynakları sınırlı olan ve İBH vakalarının arttığı bölgelerde hala onları geçerli bir seçenek yapmaktadır. Ayrıca, farmakogenomik alanı, tiopürin metabolizmasındaki ana enzimlerin genetik testini içeren kişiselleştirilmiş yaklaşımlar aracılığıyla tiopürin tedavisini optimize etmeye yönelik bir ilgi uyandırmıştır.

Tiopürin metiltransferaz enzimi (TPMT) varyasyonları, özellikle Kafkasyalılarda miyelotoksisite riskiyle bağlantılıyken, Asyalılar arasında Nudix hidrolaz15 (NUDT15) varyasyonları toksisite için daha önemli olarak kabul edilir. Yaş da kritik bir faktördür, yaşlı hastaların komplikasyon riski daha yüksektir (69).

Yukarıda bahsedildiği gibi, Tiopürin ilaçları bazen genetik farklılıklar nedeniyle zararlı olabilir. TPMT adı verilen belirli bir enzimdeki genetik varyasyonlar, neden yarından fazla hastanın tiopürin ilaçlarıyla ilgili sorunlar yaşadığını açıklamaz. Şaşırtıcı bir şekilde, Asyalılar bu ilaçların yan etkilerine daha savunmasız olmalarına rağmen daha az TPMT varyasyonuna sahiptir. 2014'ten bu yana, birçok Asya ülkesinde yapılan araştırmalar, tiopürinlerin neden olduğu ciddi yan etkilerin riskiyle NUDT15 adlı genetik bir varyasyonu ilişkilendirmiştir.

Desai ve ekibinin 2023'te yaptığı yakın tarihli bir çalışma, hem Asyalı hem de Asyalı olmayan kişilerde tiopürin tedavisine başlamadan önce NUDT15 ve TPMT testlerinin faydalarını inceledi. Araştırmaları, NUDT15 genetik farklılığının Asyalı ve Hispanik nüfusların %27'sinde bulunduğunu ve bu varyasyona sahip bireylerin üçte birinin kanla ilgili yan etkiler yaşadığını buldu. Bu nedenle, özellikle Asyalı ve Hispanik gruplarda NUDT15 için test yapmak, TPMT testinden daha maliyet etkin olma ihtimali yüksektir.

Buna karşılık, NUDT15 varyasyonları Kuzey Avrupa dışı Avrupalı nüfuslarda yaygın değildir, ancak TPMT varyasyonlarıyla birlikte olduğunda yan etki riskini artırır. Bu nedenle, Avrupa ve Kuzey Amerika'daki Asyalı göçmenlerde ve tiopürinlerden yan etki yaşayan Kafkas bireylerde de NUDT15 için test yapmak iyi bir fikirdir (70).

Tiopürinlerin neden olduğu kan hücresi sayılarının baskılanması, özellikle beyaz kan hücrelerinin (lökopeni) azalması, inflamatuvar bağırsak hastalığının (İBH) tedavisinde zorluklara yol açabilir. Chang ve meslektaşları (2020), tiopürin kaynaklı lökopeni ile ilişkili genetik varyasyonların tedavi öncesi analiziyle doz ayarlamalarına ihtiyaç duyabilecek hastaların belirlenip belirlenemeyeceğini araştı.

Çalışma, genotip analizi yapılan grupta 12 hastanın (%16,7) ve genotip analizi yapılmayan grupta 33 hastanın (%35,9) mielosupresyon (kan hücresi sayısında azalma) yaşadığını ortaya koymuştur. Çok değişkenli analiz, vücut kitle indeksi (BMI) 21 kg/m²'den yüksek olan, tedavi öncesi genotip analizi yapılan ve daha yüksek maksimum tiopürin dozu alan hastalarda mielosupresyon gelişme olasılığının daha düşük olduğunu göstermiştir.

Tedavi öncesi genetik test, poliklinik ziyaretlerinin sayısını ve hastaların ilaç dozlarını durdurmak veya azaltmak zorunda kaldığı durumları azaltmıştır. Özetle, tiopürin tedavisi alan İBH hastalarına yönelik bu randomize kontrollü çalışmada, tedavinin genetik olarak ilişkili risk faktörlerine göre uyarlanması tedavi sırasında mielosupresyon oluşumunu önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur(71).

Matsuoka ve meslektaşları, 2020 yılında yaptıkları çalışmada, Tiopürin ilaçlarının inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) olan hastalarda remisyonu sürdürmek ve monoklonal antikor tedavisine karşı antikor oluşumunu azaltmak için de kullanıldığını ortaya koymuştur. Bununla birlikte, lökopeni (beyaz kan hücresi sayısında azalma) gibi yan etkiler nedeniyle tiopürin kullanımı kısıtlanmıştır.

Tiopürin S-metiltransferaz (TPMT) genindeki varyantlar Batı popülasyonlarında tiopürin kaynaklı lökopeni ile bağlantılı olsa da, bu risk alelleri Asyalılar arasında nadirdir. Yakın zamanda, Nudix Hidrolaz 15 (NUDT15) genindeki spesifik bir varyasyonun (R139C, c.415C>T) Asya popülasyonlarında şiddetli erken başlangıçlı lökopeni ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. NUDT15, 6-tio-(deoksi) guanozin trifosfat (6-T(d)GTP) adı verilen bir molekülü 6-tio-(deoksi)guanozin monofosfata (6-T(d)GMTP) dönüştürmekten sorumlu bir enzimdir. R139C varyantı NUDT15 proteininin

stabilitesini bozar ve sırasıyla 6-TGTP ve 6-TdGTP'nin RNA ve DNA'ya dâhil edilmesinin artmasına yol açarak lökopeni ile sonuçlanır.

Doğu Asya popülasyonlarında, C/C, C/T ve T/T genotiplerinin sıklıkları sırasıyla yaklaşık %80, %20 ve %1'dir. C/C genotipine sahip hastaların %3'ünden azında erken başlangıçlı lökopeni gözlenirken, C/T genotipine sahip olanlarda bu oran yaklaşık %20 ve T/T genotipine sahip olan hastaların neredeyse tamamında gözlenmektedir. NUDT15 R139C varyantının test edilmesi, tiopürin tedavisinin güvenliğini önemli ölçüde artırabilir ve İBD bağlamında kişiselleştirilmiş tıbbın başarılı bir örneği olarak hizmet eder (72).

Kahlin ve arkadaşları tarafından 2019 yılında yürütülen başka bir çalışmada, araştırma, tiopürin ilaçlarıyla tedavi öncesi veya sırasında örneklenen 12.663 hastadan oluşan İsveç kohortunda TPMT geni yaygın varyasyonları için genetik testin ve TPMT enzim aktivitesinin gerçek ölçümü arasındaki uyumu değerlendirmeye odaklanmıştır.

Çalışma, TPMT genotipi ile enzim aktivite seviyeleri arasında %94,5 oranında bir uyum ile yüksek bir uyum seviyesi bulmuştur. Ancak, hastaların küçük bir kısmında (%4.6), ilk TPMT enzim aktivitesi ölçümü, genotip sonuçlarına kıyasla beklenmedik şekilde düşük çıkmıştır. Bu tutarsızlığı anlamak için araştırmacılar, genotip ile fenotipin uyuşmadığı bireylerde TPMT geninin tüm kodlayan bölgelerinin detaylı bir analizini gerçekleştirmiştir.

Bu çaba, nadir ve daha önce bilinmeyen TPMT gen varyantlarının tanımlanmasına yol açmıştır. Özellikle, bu analiz nadir veya yeni TPMT genotiplerine sahip 15 bireyin (%0.1) tespit edilmesini sağlamıştır. Ayrıca, çalışma TPMT42, 43 ve 44 olarak adlandırılan üç yeni TPMT alelini tanıtmış ve karakterize etmiştir. Önemli olarak, sadece en yaygın TPMT gen varyantları incelenseydi, bu 15 hasta alışılmadık TPMT genotiplerine sahip olarak tespit edilemeyecekti.

Özetle, bu çalışma, TPMT genetik testi ve enzim aktivite ölçümlerinin rutin testlerde birleştirilmesinin avantajlarını vurgulamaktadır. Bunu yaparak, sağlık hizmeti sağlayıcıları daha kesin dozaj önerileri sunabilir, potansiyel olarak tiopürin tedavisi sırasında advers reaksiyonların ve tedavi başarısızlıklarının meydana gelme olasılığını azaltabilir (73).

2020 yılında Zalizko tarafından yapılan bir çalışmada, Letonya'da inflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH) olan yetişkin hastalar arasında tiopürin S-metiltransferaz

(TPMT) geninde genetik varyasyonlar incelendi. Çalışma, Letonya'dan İBH hastaları grubunda TPMT gen polimorfizmlerine odaklandı. 244 İBH hastasından DNA örnekleri toplandı ve üç spesifik tek nükleotid polimorfizmini (SNP) belirlemek için kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) yapıldı: rs1800462, rs1800460 ve rs1142345.

Üç yaygın işlevsiz TPMT aleli, yani TPMT2, 3B ve 3C, kadınlar (%51) ve erkekler (%49) arasında neredeyse eşit bir dağılım ile tespit edildi. TPMT alelik varyantları 2, 3A, 3B ve 3C için qPCR sonuçları, restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (RFLP) analizi ile elde edilen verilerle tutarlıydı.

Çalışma ayrıca, hastaların %78'inin ülseratif kolit, %22'sinin ise Crohn hastalığı tanısı aldığını ortaya koydu. Hastaların çoğunluğu (%93.9) vahşi tip homozigot TPMT1/1 genotipine sahipti, buna karşın %6.1'i heterozigot genotiplere sahipti. En sık gözlenen polimorfizmler TPMT1/3A (%5.3, TPMT3B ve TPMT3C'nin iki türünü içerir), TPMT1/3C (%0.4) ve TPMT1/2 (%0.4) idi. Hiçbir hastada TPMT3B polimorfizmi gözlenmedi ve tanımlanan TPMT varyantlarının hiçbirisi için homozigot olan hasta bulunmadı (74).

Banerjee (2020), Hint inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) olan hastalarda azatiyoprin kaynaklı lökopeniyi öngörmeye NUDT gen varyasyonlarının TPMT ile karşılaştırmalı prediktif değerini araştıran bir çalışma yürüttü. Azatiyoprinin advers etkileri, tedavi süresi ve azatiyoprinin başlangıç ve maksimum tolere edilen dozları hakkında bilgi içeren geniş bir İBH kaydından toplanan veriler analiz edildi (75).

NUDT15 genotipinin lökopeni ve nötropeni ile ilişkisini araştırmak için, yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş sağlıklı gönüllülerden kan örnekleri bir biyorepozitörden alındı ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak analiz edildi. Lökopeni olan hastalarda TPMT genotipleme de gerçekleştirildi.

Çalışmadaki 1014 hastadan 79'u yetersiz kan örnekleri nedeniyle çalışma dışı bırakıldı. Geriye kalan 935 hastanın 81'i (%9) lökopeni, 70'i (%7.5) nötropeni yaşadı. "T" alelinin (heterozigot CT veya homozigot TT formunda) vahşi tip "CC" aleline kıyasla lökopeni riskini 19 kat, nötropeni riskini ise 21 kat daha fazla artırdığı güçlü bir şekilde ilişkilendirildi (76, 77).

Walker ve meslektaşları (2019), inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) olan hastalarda tiopürin kaynaklı miyelosupresyon ile NUDT15 genindeki genetik varyasyonlar arasındaki bağlantıyı araştırdı. İBH için tiopürin ilaçlarına maruz kalan 961

Avrupa kökenli hastanın tüm-ekzom dizisi verilerini kullanarak bir çalışması yürüttüler. Çalışma, tiopürin kaynaklı miyelosupresyon riskini artıran NUDT15 geninde üç kodlayıcı varyant, özellikle belirli bir 6 baz çifti çerçeve içi silme, tespit etti.

Tiopürinlerin miyelosupresyon riski taşıdığı ve bu durumun İBH tedavisinde kullanımlarını sınırlayabileceği bilinmektedir. Yaygın kullanılan TPMT farmakogenetik testi, Avrupa kökenli risk altındaki hastaların sadece %25'ini tanımlamada etkilidir. Buna karşın, NUDT15 varyantları, Doğu Asya kökenli hastalarda tiopürin kaynaklı miyelosupresyon ile ilişkilendirilmiştir.

Avrupa kökenli İBH hastalarında tiopürin kaynaklı miyelosupresyon ile ilişkili genetik faktörleri tanımlamak için çalışma, miyelosupresyon yaşayan 491 hasta (vakalar) ve tiopürine tolerans gösteren 679 hasta (kontroller) dahil edildi. Bu popülasyonda genom çapında ilişki çalışmaları (GWAS) ve ekzom çapında ilişki çalışmaları (EWAS) yürütüldü. Bulgular daha sonra 73 vaka ve 840 kontrolü içeren bir replikasyon kohortunda doğrulandı.

GWAS sonuçları, TPMT'nin (rs11969064) tiopürin kaynaklı miyelosupresyon ile ilişkisini doğruladı. Ancak, EWAS analizi, NUDT15'te bir çerçeve içi silme (rs746071566) ve miyelosupresyon arasında önemli bir ilişki ortaya çıkardı. Bu ilişki ayrı bir kohortta da tekrarlandı.

Üç kodlayıcı NUDT15 varyantının herhangi birine sahip olmak, TPMT genotipi ve tiopürin dozu bağımsız olarak, tiopürin kaynaklı miyelosupresyon riskinin artmasıyla güçlü bir şekilde ilişkilendirildi. Bu bulgular, NUDT15 genotipleme işleminin, Avrupa kökenli İBH hastalarında tiopürin tedavisine başlamadan önce değerli bir düşünce olabileceğini önermektedir. Ancak, bu sonuçları doğrulamak için bağımsız kohortlarda ek doğrulama içeren daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (78).

Pashazadeh ve arkadaşları (2019), inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) olan hastalarda Tiopürin Metiltransferaz (TPMT) genetik polimorfizmleri, TPMT aktivitesi ve azatiyoprinin (AZA) metabolik ürünlerini araştırmayı amaçladı. 50 alakasız İBH hastasından kan örnekleri alındı ve analizleri için çeşitli moleküler teknikler kullanıldı.

Çalışma, yabani tip alele sahip bireylerde mutant varyantlara (1/2 ve 1/3C) kıyasla TPMT enzim aktivitesinin daha yüksek olduğunu gözlemledi. Enzim aktivitesindeki bu fark, AZA'nın bir metaboliti olan 6-tioguanin (6-TG) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı varyasyonlarla ilişkilendirildi. Özellikle, çalışma mutant TPMT varyantlarına

(1/2 ve 1/3C) sahip İBH hastalarında 6-TG seviyelerinin önemli ölçüde daha yüksek olduğunu buldu. Bu, TPMT polimorfizmlerinin, AZA kullanan hastalarda 6-TG seviyeleriyle bağlantılı olduğunu göstermektedir.

Bu bulgulara dayanarak, çalışma AZA dozajının bir hastanın TPMT genotipi doğrultusunda özelleştirilebileceğini önermektedir. Ayrıca, 6-TG gibi metabolit seviyelerini değerlendirmek, bireysel hastalar için ilacın güvenli ve etkili bir dozajını belirlemeye yardımcı olabilir (79).

Gutiérrez ve meslektaşları (2023), sistematik bir gözden geçirme ve meta-analiz yoluyla inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) tedavisinde tiopürin ilaçlarının etkinliği ve güvenliği üzerine farmakogenomiğin rolünü araştırdı. Bulguları, TPMT ve NUDT15 genlerindeki mutasyonların, hastaları tiopürin tedavisinden kaynaklanan advers etkilere daha duyarlı hale getirdiğini gösterdi. Ayrıca, bir hastanın genotipine dayalı olarak tedaviyi özelleştirmenin, özellikle Asya popülasyonlarında NUDT15 geni göz önüne alındığında, bu tiopürin kaynaklı yan etkileri önlemede önemli bir rol oynayabileceğini belirttiler (80).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırma tasarımı:

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'na başvuran toplam 200 birey üzerinde kesitsel (cross-sectional) bir yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem, katılımcıların demografik ve hastalık özellikleri açısından tüm popülasyonu temsil edecek şekilde dengeli bir dağılım sağlamak için kullanılmıştır. Araştırmada, hastalık şiddeti, TPMT genotipi ve diğer ilgili faktörler göz önünde bulundurularak katmanlaştırma yapılmıştır.

1. Araştırma sorusu tanımı: Çalışma, kesitsel tasarım kullanılarak inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) süreçlerini ve bu süreçlerde TPMT genotipinin rolünü araştırmayı amaçlamaktadır.
2. Katılımcı seçimi: Araştırmada, hastalık şiddeti ve genetik özellikler gibi değişkenler temel alınarak, katılımcılar belirlenmiş ve katmanlaştırılmıştır.
3. Çalışma popülasyonunun tanımı: Topluluk, Çukurova bölgesinde yaşayan ve gastroenteroloji kliniğine başvuran bireylerden oluşmaktadır.
4. Veri toplama: Katılımcılardan alınan bilgiler, tıbbi kayıtlar ve genetik test sonuçları üzerinden toplanmıştır.
5. Etik onay: Çalışmanın etik onayı, Ç.Ü. Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 01.10.2021 tarihinde verilmiştir. Tüm katılımcılardan bilgilendirilmiş onay alınmıştır.
6. Veri analizi: Elde edilen veriler, istatistiksel yazılımlar kullanılarak analiz edilmiştir. Analizde, demografik özellikler ve genetik veriler gibi potansiyel karıştırıcılar kontrol altına alınmıştır.
7. Sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanması: Analiz sonuçları, İBH süreçleri ve TPMT genotipi arasındaki ilişkileri ortaya koymak üzere değerlendirilmiştir.
8. Sonuçların iletişimi: Araştırma bulguları, akademik dergilerde ve konferanslarda sunulmuş ve ilgili tıbbi topluluklarla paylaşılmıştır.

Crohn ve Ülseratif Kolit tanısı konmuş hastalar, Balcalı Hastanesi Gastroenteroloji Bölümü'nde endoskopi, kolonoskopi, biyopsi, Manyetik Rezonans Enterografi (MRE), Bilgisayarlı Tomografi (BT) ve çeşitli laboratuvar testleri gibi yöntemlerle teşhis edilmiştir.

3.2. Örneklem büyüklüğünün belirlenmesi

Bu çalışmada örneklem büyüklüğü, istatistiksel güç ve anlamlılık düzeyi (0,05) temel alınarak belirlenmiştir. Beklenen etki büyüklüğünün hesaplanmasında, İBH popülasyonundaki TPMT tiplerinin çeşitliliği ve çalışmanın istenen gücü (genellikle %80 veya daha yüksek) dikkate alınmıştır.

Örneklem büyüklüğünü belirlemek için kullanılan formül, araştırma tasarımı, istenen güven düzeyi (genellikle alfa olarak belirtilir, sıkça 0,05 olarak ayarlanır), istenen istatistiksel güç (sıkça 0,80 veya 0,90 olarak ayarlanır), beklenen etki büyüklüğü ve incelenen popülasyonun değişkenliği gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Örneklem büyüklüğü belirlemede yaygın olarak kullanılan formüller, oranların, ortalamaların tahmin edilmesi veya grupların karşılaştırılması (örn., t-testleri veya ki-kare testleri) için olanlardır.

Genellikle, 0,05 anlamlılık düzeyi (alfa) kullanırız ve %80 veya daha yüksek bir güç hedefleriz. Güç, varsa gerçek bir etkinin tespit edilme olasılığını temsil eder. Uygun örneklem büyüklüğü formülü, $n = NX / (X + N - 1)$ şeklindedir, burada, $X = Z\alpha/2^2 p (1 - p) / MEK^2$, ve $Z\alpha/2$, Normal dağılımın $\alpha/2$ 'deki kritik değeridir (örn. %95 güven düzeyi için α 0,05 ve kritik değer 1,96'dır), MEK hata payıdır, p örnek oranıdır ve N popülasyon büyüklüğüdür.

Bu çalışma için istatistiksel popülasyon, inflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH) tanısı almış bireyler olacaktır. Araştırma odaklığına bağlı olarak, popülasyonu Crohn hastalığı ve ülseratif kolit hastaları gibi kategorilere daha da ayırabiliriz.

3.2.1. Örneklem Yöntemi:

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'na başvuran toplam 200 birey üzerinde gerçekleştirilmiştir. Araştırma katılımcılarının seçimi, demografik ve hastalık özellikleri açısından tüm İBH popülasyonunu temsil edecek şekilde dengeli bir temsil sağlamak amacıyla kesitsel (cross-sectional) bir yöntem kullanılarak yapılmıştır. Araştırma kapsamında, hastalık şiddeti, TPMT genotipi ve diğer ilgili faktörler göz önünde bulundurularak katmanlaştırılmıştır. Çalışmanın etik onayı, Ç.Ü. Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 01.10.2021 tarihli ve 115 numaralı toplantıda verilmiştir. Kan örnekleri alınmadan önce tüm katılımcılara bilgi verilmiş ve Hasta Rıza Formu imzalatılmıştır.

3.2.2. Kan Örnekleme Yöntemi:

Seçilen katılımcılardan, TPMT tiplerini analiz etmek için kan örnekleri toplandı. Örneklerin bütünlüğünü korumak için kan toplama, işleme ve saklama işlemlerinde standart prosedürlere uyulandı. Toplanan kan örneklerinde TPMT tiplerini belirlemek için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) veya DNA dizileme gibi uygun yöntemler de kullanıldı. Genomik DNA'nın kan örneklerinden amplifikasyonu ve yüksek çözünürlüklü erime analizi (HRMA), belirli eksonlardaki varyantları tanımlamak için kullanılan sürecin adımlarını ayırdı.

Sürece dahil olan adımlar aşağıda özetlenmiştir

3.2.2.1. Kan örneği toplama

EDTA tüpleri kullanılarak pıhtılaşmayı önlemek ve DNA'yı korumak amacıyla tam kan örnekleri toplandı. Kan örneği toplama, teşhis testleri, tıbbi değerlendirmeler ve genetik çalışmalar dahil olmak üzere birçok tıbbi ve araştırma prosedüründe kritik bir adımdır. Doğru kan örneğinin toplanması, doğru ve güvenilir sonuçlar elde etmek için hayati önem taşır. Kan toplama süreci sırasında standart protokollere uyulması ve steril ve aseptik bir ortamın korunması da, kontaminasyon riskini en aza indirmek ve hasta güvenliğini sağlamak için önemlidir.

Kan örneği toplamanın genel adımları:

- Gerekli malzemeler toplandı
- Gerekli malzemelerin hazırlanması:
 - ❖ Spesifik test veya analiz için uygun olan steril kan toplama tüpleri (EDTA tüpleri, serum tüpleri veya heparin tüpleri gibi).
 - ❖ Alkol pedleri veya dezenfektan mendiller.
 - ❖ Yapışkan bant veya pamuk topları.
 - ❖ Eldivenler ve kişisel koruyucu ekipmanlar (varsa).

3.2.2.2. Hastaların hazırlanması

İşlem, hastaya açıklandı, yaşayabilecekleri rahatsızlık veya hisler dahil. Hastanın rahat bir pozisyonda, genellikle oturarak veya yatarken olmasını sağlandı.

3.2.2.3. Hastaların tanımlanması

Hastanın kimliği, en az iki hasta tanımlayıcısı (örn., isim, doğum tarihi, tıbbi kayıt numarası) kullanılarak doğrulandı.

3.2.3. Genomik DNA'nın İzolasyonu

Kan örneğinden hazır bir DNA izolasyon kiti kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapıldı.

Roche (Kat No:11796828001, USA) kit, etkili DNA ekstraksiyonu için kullandı. Bu kitin yönergelerine göre miktarlar ve boyutlar belirlendi. Genomik DNA izolasyonu, moleküler biyoloji ve genetik araştırmalarında temel bir adımdır.

Biyolojik örneklerden genomik DNA izole etme sürecine genel bir bakış aşağıda verilmiştir:

Malzemeler ve ekipmanlar:

- Biyolojik örnek (kan)
- Lizis tamponu (deterjanlar ve proteaz enzimleri içerir)
- Proteinaz K
- RNaz
- NaCl
- Etanol
- İzopropanol
- Fenol: kloroform: İzamil alkol (25:24:1)
- Santrifüj Cihazı
- Mikrosantrifüj tüpleri
- DNA çökeltme tüpleri (1,5 ml Mikrosantrifüj tüpleri)
- DNA arıtma sütunları ve kitleri
- Pipetler ve uçlar
- Vorteks mikseri
- Mikrosantrifüj

Araştırma yöntemi

Kit içindeki reaktifler prosedüre uygun olarak hazırlandı.

- 1) Proteinaz K: 4.5ml distile suda çözüldü.
- 2) İnhibitör Removal Buffer: Tampon içerisine 20 ml mutlak etanol eklendi.
- 3) Wash buffer: Tampon içerisine 80 ml mutlak etanol eklendi.

➤ Örnek hazırlığı:

- Genomik DNA içeren kan ile çalışıldı.
- Örnekler DNAların yıkılmasını engelleyerek uygun şartlarda saklandı.

➤ Hücre lizisi:

- Biyolojik örnek, mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- Örneğe uygun hacimde lizis tamponu eklendi. Lizis tamponu, hücre zarlarını ve proteinleri parçalayan deterjanlar ve proteaz enzimleri içerir.
- Örnek, tüpü sallayarak veya ters çevirerek nazikçe karıştırıldı.
- Hücre lizisi ve proteaz enzimleriyle protein sindiriminin gerçekleşmesi için uygun bir sıcaklıkta (37°C) belirli bir süre inkübe edildi (genellikle 1-2 saat).

➤ Proteinin çökeltme ve uzaklaştırılması: Fenol: kloroform: İzooamil alkol lizata eklendi. Bu organik çözelti, DNA'yı proteinler ve diğer hücresel bileşenlerden ayırır.

- Örnek, vorteks ile şiddetle karıştırıldı.
- Karışım, sulu fazın (üstte) DNA'yı içerdiği organik fazdan (altta) proteinleri ve lipitleri içeren ayrılması için santrifüj edildi.
- Sulu faz (DNA içeren) dikkatlice yeni bir tüpe aktarıldı ve organik faz iyi geçildi.

➤ DNA çökeltme:

- Sulu faza, DNA çökeltene kadar eşit hacimde soğuk izopropanol eklendi.
- Tüp, nazikçe ters çevirilerek karıştırıldı.
- DNA pelletini oluşturmak için tüp yüksek hızda santrifüj edildi (10.000-12.000 x g, 10-15 dakika).
- Supernatan dikkatlice alındı, DNA pelleti bozulmadan.

➤ DNA yıkama:

- DNA pelleti, arta kalan tuzları ve kontaminantları gidermek için soğuk %70 etanol ile yıkandı.
- Tekrar yüksek hızda santrifüj edildi ve etanol dikkatlice alındı.

➤ DNA'nın yeniden süspansiyonu:

- DNA pelleti birkaç dakika hava kurumasına bırakıldı (veya etanol kokusu algılanamayınca kadar).
- DNA pelleti, aşağı akış uygulamaları için uygun hacimde steril su veya uygun bir tampon ile yeniden süspansiyona alındı.
- DNA çözünmesine yardımcı olmak için DNA solüsyonu düşük bir sıcaklıkta (örn. 4°C) kısa bir süre inkübe edildi.



Şekil 11. DNA İzolasyonu kiti (Roche Kat No:11796828001, USA).

➤ Kit (Roche Kat No:11796828001, USA) Proserürü : Adımların özeti

- 1) Ependorf içerisine 200µl Binding buffer, 40 µl proteinaz K, 200 µl tam kan eklendi. Karıştırıldıktan sonra 10 dakika 70°C de inkübasyona bırakıldı.
- 2) İnkübasyondan alınan ependorf tüplerine 100 µl izopropanol eklendi, vorteks ile karıştırıldı. Daha sonra başka bir ependorf içerisindeki filtre üzerine eklendi ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- 3) Filtreli ependorfun altında biriken çözelti döküldü. Filtreli ependorf üzerine 500 µl inhibitör removal buffer eklendi, 1 dakika 8000 rpm de santrifüj edildi.
- 4) Filtre yeni bir ependorf üzerine konuldu. Daha sonra üzerine 500 µl Wash Buffer eklendi, 1 dakika 8000 rpm de santrifüj edildi.

- 5) Tekrar Filtre yeni bir ependorf üzerine konuldu. Daha sonra üzerine 500 µl Wash Buffer eklendi ve 1 dakika 8000 rpm de santrifüj edildi.
- 6) Filtreli ependorfun altında biriken çözelti döküldü, boş olarak filtreli ependorf 10 saniye 13.000g de santrifüj edildi.
- 7) Fitre yeni bir ependorf üzerine konuldu. Daha sonra üzerine önceden 700C'de olan 200 µl Elution buffer eklendi, 1 dakika 8000 rpm de santrifüj edildi.
- 8) Filtreli ependorfun filtresi atıldı ve ependorfun içinde toplanan genomik DNA çalışma gününe kadar +4 OC de saklandı.

3.2.4. DNA Miktarı ve saklama:

- İzole edilen genomik DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı, bir spektrofotometre kullanılarak ölçüldü.
- DNA, PCR, DNA dizileme veya genotipleme gibi aşağı akış uygulamaları için uzun süreli saklama amacıyla -20 veya -80°C'de saklandı. Genel olarak, üreticinin talimatları takip edildi ve protokoller bu araştırmanın özel ihtiyaçlarına göre uyarlandı.

3.2.5. Primer Tasarımı:

Hedef ekzonların amplifikasyonu için özel çift primerler (5 pmol/µL) tasarlanmış ve kitin üreticisi tarafından sağlanmıştır. Bu primerler, kit üreticisinin ve primer tasarımcısının talimat talimatlarına göre DNA'da istenilen bölgelere bağlanacak şekilde tasarlanmış (**Tablo 2**).

Primerlerinizin erime sıcaklığını (T_m) hesaplamak, primerlerin PCR sırasında hedef DNA dizisine özgü olarak bağlanmasını sağlamak açısından önemli bir adımdır. T_m hesaplamak için çeşitli formüller ve yazılım araçları mevcuttur. T_m hesaplamak için en yaygın kullanılan formül en yakın komşu yöntemidir. İşte bu yöntem kullanılarak T_m hesaplamak için adımlar: En Yakın Komşu Yöntemi ile T_m Hesaplama:

- Primer dizisini topladık ve T_m'sini hesaplamak istediğimiz primer dizisini aldık.
- Primeri daha küçük bölümlere ayırdık: Primer, 2-4 nükleotidlik kısa örtüşen bölümlere ayrıldı.

- Termodinamik değerlerin ataması: Her bölüme, en yakın komşu kurallarına göre termodinamik değerler atandı. Bu değerler, DNA dubleks oluşumu için entalpi (ΔH) ve entropi (ΔS) değerlerini içerir. Termodinamik tablolar ve parametreler çeşitli literatür kaynaklarında bulunabilir veya bu parametreleri içeren yazılımlar kullanılabilir.
- ΔH ve ΔS 'nin Hesaplanması: Her parça için, atanan değerlere göre entalpi değişimi (ΔH) ve entropi değişimi (ΔS) hesaplandı.
- ΔG 'nin Hesaplanması: Her parça için Gibbs serbest enerji değişimi (ΔG) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$
 - ΔH , entalpi değişimidir.
 - T , Kelvin (K) cinsinden sıcaklıktır.
 - ΔS , entropi değişimidir.
- T_m 'nin Hesaplanması: Primerin erime sıcaklığı (T_m), en yüksek ΔG değerine sahip bölüm tarafından belirlenir. Bu bölüm için T_m hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılabilir: $T_m = \Delta H / (\Delta S + R \ln(C_t / 4))$
 - ΔH ve ΔS , en yüksek ΔG 'ye sahip bölüm için hesaplanan değerlerdir.
 - R , gaz sabitidir (yaklaşık 1.987 cal/(molK)).
 - C_t , reaksiyondaki primer ve tuz iyonlarının toplam molar konsantrasyonudur.
- Santigrat'a Dönüştürme: Gerekirse, T_m değerini Kelvin'den çıkararak 273.15 Santigrat'a dönüştürdük (Tablo 2).

Tablo 2. HRMA yüksek çözünürlüklü erime analizi, F ileri (forward), R ters (reverse) primerler TPMT*2 (c.238G>C), TPMT3A, 3B (c.460G>A), TPMT3C (c.719A>G).

Primer Dizileri (5'→3')		PCR product length
TPMT*2 _F	CCCTCTATTTAGTCATTTGAAAACA	241 bp
TPMT*2 _R	AAAACCTTTTGTGGGGATATGGA	
TPMT3A, 3B _F	TGTTGAAGTACCAGCATGCAC	173 bp
TPMT3A, 3B _R	CTTACCATTTGCGATCACCTG	
TPMT3C _F	GAATCCCTGATGTCATTCTTCA	213 bp
TPMT3C _R	CCTCAAAAACATGTCAGTGTGA	

OligoAnalyzer yazılımı, Tm hesaplaması ve çeşitli moleküler biyoloji analiz paketleri için kullanıldı.

3.2.6. DNA Amplifikasyonu:

DNA amplifikasyonu için bir master karışım hazırlandı. Temel bileşim genellikle DNA polimeraz, dNTP'ler (deoksinükleotid trifosfat) ve tampon bileşenlerini içerdi.

İzole edilen genomik DNA'dan 50 ng, çift primerler (5 pmol/μL) ve master karışım ile bir PCR tüpünde birleştirildi.

3.2.7. PCR Amplifikasyonu:

PCR amplifikasyonu aşağıdaki sıcaklık döngüsü protokolü kullanılarak gerçekleştirildi:

- Ön inkübasyon: 95°C'de 5 dakika (ilk denatürasyon)
- Döngü (40 döngünün tekrarı): - Denatürasyon: 95°C'de 10 saniye - Annealing: 55 derece Celsius'ta 30 saniye - Uzatma: 72°C'de 10 saniye

3.2.7.1. Çözeltiler

1. 10X Tris Tamponu

2M KCl	1.25mL
1M Tris.HCl (pH 8.3)	0.5 mL

1M MgCl ₂	75 µL
Jelatin	5 mg
Steril distile su	3.2 mL Jelatinin erimesi için 37°C'de bekletilir.

2. Spermidin 1 M

3. PCR Karışımı (4 mL)

10X Cetus tamponu	500 µL
-------------------	--------

Steril distile su 2700 µL 1.25mM dNTP karışımı 800 µL Spermidin 1M 4 µL dNTP'lerin (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) her birinden (100 mM'lık stoktan) 60 µL alınıp üzerine 4740 µL steril distile su eklenerek 1.25 mM'lık çözelti hazırlanır.

Yöntem

Gen amplifikasyonu, Thermal Cycler ile ısıya dayanıklı mikrotüpler içerisinde yapılır. Amplifikasyon tüplerinin yerleştirildiği bir ısı bloğu ve ısı değişimlerini kısa sürede gerçekleştiren bir mikro işlemciden oluşan bu alette termal döngü protokolleri önceden belirlenerek uygulanabilir.

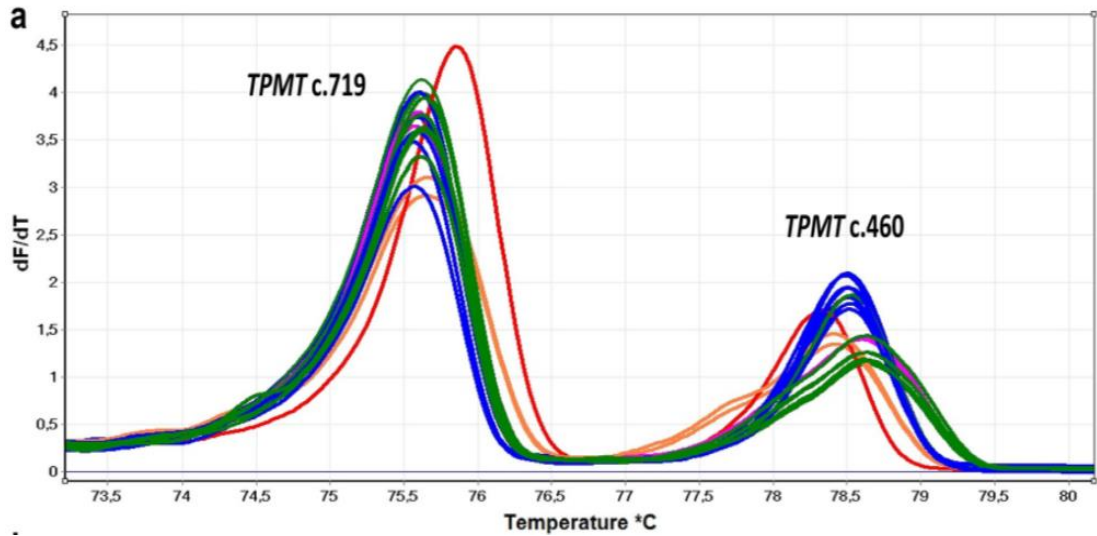
3.2.8. Yüksek Çözünürlüklü Eritme Analizi (HRMA):

HRMA kapalı tüp sisteminde, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR: PCR) sonrasına dayalı genetik varyasyonları belirlemek için kullanılan yeni bir yöntemdir. HRM'nin çalışma prensibi nükleik asit örneklerinin erime davranışına dayanmaktadır. Çift zincirli DNA'nın denatürasyonu erime sıcaklığının artmasıyla oluşan floresan değişikliklerinin saptanmasıyla belirlenir. Wild type (yaban tipi) ve heterozigot örneklerinin farklılıkları erime grafiklerinde kolaylıkla saptanabilmektedir. Bu yöntemde erime eğrisi analiziyle daha fazla bilgi ve detay elde edilebilmektedir. HRM analizi, örneklerin sekans, uzunluk, guanin sitozin (GC) içeriğine göre ayrımını yapabilmektedir. Popülasyonda yaygın görülen tek nükleotit değişikliklerinin (SNP) tespiti, hastalıklarla ilişkili gen mutasyon taramaları ve DNA metilasyon analizleri HRM yöntemi ile hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanabilmektedir. PZR ürünlerindeki nükleotit dizi değişimleri ve çeşitli varyasyonlar DNA erime eğrisi şekilleriyle HRM yönteminde saptanabilmektedir. Kombine yeni nesil DNA boyaları ve geliştirilen gen tarama yazılımları sayesinde güçlü analiz yapabilme kapasitesinin yanı sıra kolay

uygulanabilirliği ve düşük maliyetli olma özelliği ile gerçek zamanlı HRM yöntemi pek çok klinik uygulamada ön plana çıkmaktadır.

PCR döngüleri gerçekleştirdikten sonra, DNA dizilerini erime sıcaklığına (T_m) göre ayırt etmek için HRMA gerçekleştirdik. - 70°C'den 90°C'ye kadar saniyede 0.1°C oranında sıcaklığı yavaşça artırırken floresansı izledik. - HRMA, bize DNA dizilerini T_m profillerine göre ayırt etme imkanı sunar. Ekzonlardaki varyantlar veya mutasyonlar, vahşi tip dizilime kıyasla farklı T_m değerlerine neden olur.

Veri Analizi ve Tanı: - Örnekler arasındaki erime sıcaklığı (T_m) farklarını belirlemek için HRMA verilerini analiz et. - T_m 'deki fark, hedef ekzonlarda dizi tiplerinin veya mutasyonların varlığını gösterebilir. - Örneklerinizin T_m profilleri, çalıştığınız koşullarla ilişkili değişiklikleri tanımlamak için bilinen standartlar veya kontroller ile karşılaştırılır. - Tanı, erime sıcaklığındaki fark ve tanımlanan özgül genetik tiplere dayanarak yapıldı (Şekil 6).



Şekil 12. RT-PCR HRMA ile TPMT Genotiplerinin Belirlenmesi Bu süreç, genellikle çeşitli genetik çalışmalarda ve tanılarda genotipleme ve mutasyon tespiti için kullanılır. Doğru sonuçlar elde etmek için, HRMA reaktifleri ve cihazları için üreticinin talimatlarını kesinlikle takip ettiğinizden emin olun. Ayrıca, sonuçları doğrulamak için deneylerde uygun pozitif ve negatif kontroller de dahil edildi.

3.2.8.1. HRMA kit Özellikleri :

5x HOT FIREPol® EvaGreen® HRM Mix, HRM analizi için optimize edilmiş, EvaGreen® boyası içeren hazır kullanıma uygun bir çözümdür.

Bu, qPCR ve HRM Analizi yapmak için gerekli tüm bileşenleri içerir: HOT FIREPol® DNA Polimerazı, ultra saf dNTP'ler, MgCl₂ ve EvaGreen® boyası. Kullanıcı sadece su, şablon ve primer eklemesi yapmalıdır.

HOT FIREPol® DNA Polimerazı, 95°C'de 12 dakikalık bir inkübasyon adımıyla aktive edilir. Bu, özgül olmayan şekilde eşleşen primerlerin ve primer-dimerlerin uzamasını önler.

Özellikler

Hot-start: Evet, başlangıç aktivasyonu 12 dakikada

- Tespit tipi: Boya tabanlı, EvaGreen® araçları içerir
- Referans boya: Yok
- Uyumlu gerçek zamanlı cihazlar: ROX referans boyası gerektirmeyen Çevrimciler. Cihazınızı kontrol edin!
- Karışım Bileşenleri
- HOT FIREPol® DNA polimerazı: Sıcak başlangıçlı olarak çalışan kimyasal olarak modifiye edilmiş FIREPol® DNA Polimerazı
- EvaGreen® qPCR tamponu ile 12.5 mM MgCl₂, 1x PCR çözeltisi – 2.5 mM MgCl₂
- dNTP'ler: dATP, dCTP, dGTP ve dTTP
- EvaGreen® boyası
- qPCR reaksiyonunu artırmak için Bovin serum albumini (BSA)
- EvaGreen Boyası

EvaGreen®, qPCR için SYBR® Green I'e üstün bir alternatif yapan birçok özelliğe sahip bir DNA bağlayıcı boyadır. Benzer spektral özelliklere sahip olmanın yanı sıra, EvaGreen®'in SYBR® Green I'den ayıran üç önemli özelliği vardır: EvaGreen®'in çok daha az PCR inhibisyonu, son derece stabil bir boyası olması ve mutajenik veya sitotoksik olmadığı gösterilmiştir. EvaGreen®, tüm yaygın gerçek zamanlı PCR çevirmenleri ile uyumludur.



Şekil 13. HRMA kit ve kullandımız Cihaz

Tablo 3. HOT FIREPol#EvaGreen#HRMA Kiti Kullanarak HRM Analizi için Tavsiye Edilen PCR Kurulumu. (Katalog numarası: 08-33-00001)

Component	Volume (µL/rxn)
Master Mix	10
Magnesium Chloride Solution, 25 mM	Variable
Forward Primer, 5 µM	1.2
Reverse Primer, 5 µM	1.2
SYTO® 9 Dye, 50 µM *	0.6
gDNA (5 ng/µL)	5
Deionized Water	Variable
Total Reaction Mix Volume	20

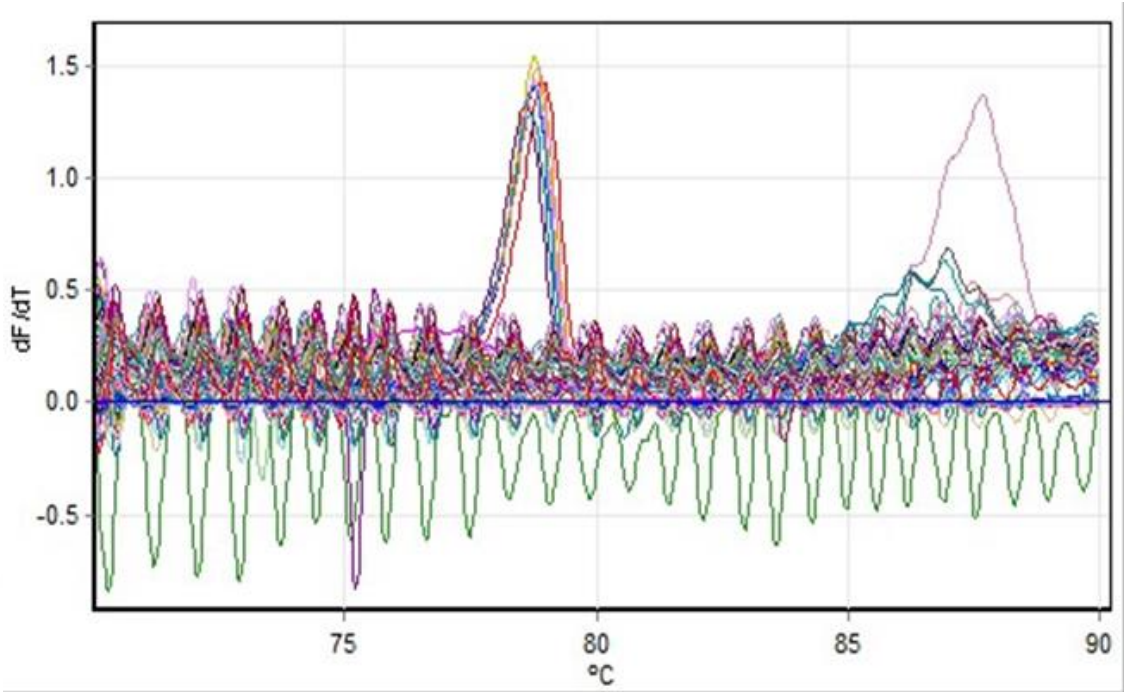
Erime Raporu

Digital Filter	Light
Imported Analysis Settings	
Sample Page	Page 1
Temp. Threshold	0°C
Threshold	0.

Deney Bilgileri

Erime Bilgisi

Run Name	HRM Test 2023-09-15 (1).rex Amin Tez
Run Start	9/15/2023 9:30:51 AM
Run Finish	9/15/2023 11:20:19 AM
Operator	
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene Q Software 2.3.5.1
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain HRM	-1.67
Machine Serial No.	1218123



Şekil 14. Çeşitli TPMT mutasyonlarını araştırmak için yüksek çözünürlüklü erime eğrisi

Çalışmanın çoğu, PCR primerlerinin, reaktiflerinin ve reaksiyon koşullarının optimize edilmesiyle ilgilidir

3.2.9. HRMA adımların Özeti

Adım 1. Enstrüman Kalibrasyonu

PCR amplifikasyonu ve HRM analizi için kullanılan enstrümanın her altı ayda bir kalibre edilmesi önerilir. Bu adım, bir arka plan, özel boya ve HRM kalibrasyon plakasının çalıştırılmasını içerir .

Adım 2. PCR Tasarımı ve Optimizasyonu.

Bu adım en fazla dikkat gerektirir. Primer setlerinin dikkatli bir şekilde tasarlanmasını, PCR reaktiflerinin, HRM boyalarının ve reaksiyon kontrollerinin seçilmesini ve test edilmesini içerir.

Adım 3. PCR.

Amplifikasyon için gerçek zamanlı bir PCR sistemi kullanılması önerilir, özellikle bir deneyin optimize edilmesi veya sorun giderilmesi durumunda, çünkü PCR amplifikasyonu gerçek zamanlı olarak izlenebilir, ampikon kalitesi hakkında bilgi sağlar.

Veriler ayrıca erime analizi uygunluğu için kontrol edilebilir ve uygun dosya biçiminde kaydedilebilir . Gerçek zamanlı PCR sistemi kullanıldığında, Adımlar 3, 4 ve 5 aynı enstrümanda tamamlanabilir. Alternatif olarak, PCR bir standart PCR termal çeviricisi üzerinde gerçekleştirilir ve ardından HRM için bir gerçek zamanlı PCR sistemi üzerine transfer edilir.

Adım 4. Örnek Erime.

Gerçek zamanlı bir PCR sisteminde, örnekler eritilir ve veriler toplanır. PCR için standart bir termal çevirici kullanıldığında, örnekler HRM erime eğrisi verilerini toplamak üzere tasarlanmış bir gerçek zamanlı PCR enstrümanına aktarılmalıdır.

Adım 5. Veri Analizi.

PCR veri dosyası HRM analiz yazılımına aktarılır ve veriler analiz edilir.

HRM Analizi ve Reaktif Optimizasyonu

Başarılı bir analiz için, deneyin HRM için optimize edildiğinden emin olmak için deney geliştirme konusunda dikkatli olunmalıdır. Erime eğrilerindeki küçük farklar, dizi dışı kaynaklar gibi, genomik DNA (gDNA) kalitesi, ekstraksiyon kalıntılarının taşınması, ampikon uzunluğu, primer tasarımı, boya seçimi ve PCR reaktifi seçimi gibi faktörlerden kaynaklanabilir.

3.2.10. Paraklinik Testlerin çalışıldığı cihaz ve yöntemler

Vitamin B12, folat, TSH, T4, T3, ferritin; Beckman Coulter DXI 800 cihazında kemilüminesans yöntem ile ölçülmüştür.

Glukoz, demir, TIBC, UIBC, ALT, AST, Ürik asit, total protein, BUN, Kreatinin, Mg, total bilirubin, direkt bilirubin, albumin testleri Beckman Coulter AU5800 cihazında fotometrik yöntem ile ölçülmüştür.

GGT Beckman Coulter AU5800 cihazında enzimatik yöntemle ölçülmüştür.

CRP; IMAGE 800 cihazında nefelometrik yöntem ile ölçülmüştür.

D vitamini; Thermo Dionex cihazında HPLC yöntemi ile ölçülmüştür.

HbA1c; HPLC yöntemi ile Premier Hb9210 cihazında ölçülmüştür.

Total IgG; immünotürbidimetrik yöntemle Beckman Coulter AU5800 cihazında ölçülmüştür.

Total IgE; IMAGE 800 cihazında nefelometrik yöntemle ölçülmüştür.

Sedimentasyon ALIFAX cihazında çalışılmıştır.

3.2.11. İstatistiksel Analiz:

1. Tanımlayıcı istatistikler, TPMT, yaş, cinsiyet, hastalık süresi ve diğer ilgili değişkenlerin sıklıkları dahil olmak üzere çalışma popülasyonunun özelliklerini özetlemek için kullanılır.

2. TPMT Tipleri ile İBH veya Klinik Özellikleri Arasındaki İlişki:

- Kullanılan Yöntem: Chi-Square Testi
- Açıklama: Chi-Square testleri, TPMT tipleri ile İBH (İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı) veya klinik özellikleri arasındaki ilişkiyi analiz etmek için kullanılır. Bu testler, iki grup arasındaki oran farklarını analiz etmek için kullanılır.

Aşağıda belirtilen istatistiksel yöntemler, farklı bağlamlarda TPMT genotiplerinin İBH (İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı) hastaları ve kontrol grubu üzerindeki etkilerini incelemek için kullanılmıştır:

1. İBH Hastaları ve Kontrol Grubunda TPMT Genotiplerinin Dağılımı:

- Kullanılan Yöntem: Tanımlayıcı İstatistik Yöntemleri
- Açıklama: Bu yöntemler, İBH hastaları ve kontrol grubundaki TPMT genotiplerinin frekans ve dağılımını özetlemek için kullanılır. İstatistikler arasında ortalamalar, standart sapmalar, medyanlar ve frekans dağılımları bulunur.

2. İBH'de Lökopeni ile ve Lökopenisiz TPMT Genotipi Prevalansı:

- Kullanılan Yöntem : Chi-Square Testi
- Açıklama: Chi-Square testi, lökopeni görülen ve görülmeyen İBH hastaları arasında TPMT genotiplerinin prevalans oranlarını karşılaştırmak için kullanılır. Bu test, iki oran arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını belirlemeye yardımcı olur.yardımcı olur.

3. İBH Hastalarında Pankreatit ile Birlikte TPMT Genotipinin Prevalansı:

- Kullanılan Yöntem: Chi-Square Testi
- Açıklama: Bu Chi-Square testi, pankreatitli İBH hastalarında TPMT genotiplerinin prevalansını, pankreatitsiz hastaların prevalansı ile karşılaştırır. Bu, genotipin pankreatit gelişimi üzerindeki potansiyel etkisini değerlendirmek için kullanılır.

4. TPMT Gen Varyantlarının Her Birinde Biyokimyasal Sonuçlar:

- Kullanılan Yöntem: Tanımlayıcı İstatistik Yöntemleri
- Açıklama: Tanımlayıcı istatistikler, farklı TPMT gen varyantlarına sahip grupların biyokimyasal parametrelerini özetlemek için kullanılır. Bu yöntem, genotiplerin biyokimyasal markerlar üzerindeki etkilerini değerlendirmek için kullanılır.

Her bir yöntem, belirli bir araştırma sorusuna yanıt vermek ve TPMT genotiplerinin İBH üzerindeki etkilerini daha iyi anlamak için dikkatlice seçilmiştir. Bu yöntemler, genetik bilimlerde yaygın olarak kullanılan güçlü istatistiksel araçlardır ve sağlam sonuçlar elde etmek için bir araştırmacının kullanabileceği metodolojik çeşitliliği göstermektedir.

4. SONUÇLAR VE BULGULAR

Bu bölümde, bu araştırmanın hedeflerine ulaşmak için yapılan laboratuvar verileri ve klinik bulgular aşağıdaki sırayla sunulmaktadır:

Aşağıdaki tablolar, belli TPMT gen varyantlarına sahip hastaların, özellikle lökopeni ve pankreatit olmak üzere, tiopürinle ilişkili yan etkiler geliştirme riskinin önemli ölçüde daha yüksek olduğunu açıkça göstermektedir

Tablo 4. Crohn ve Ülseratif Kolit Hastalarının Cinsiyet ve Yaşa Göre İstatistiksel Dağılımı

Cinsiyet	Toplam Sayı	Crohn Hastası Sayısı	Ülseratif Kolit Hastası Sayısı	Crohn Hastası Yaş Ortalaması	Ülseratif Kolit Hastası Yaş Ortalaması
Erkek	46	15	29	26	49
Kadın	54	29	27	24	41

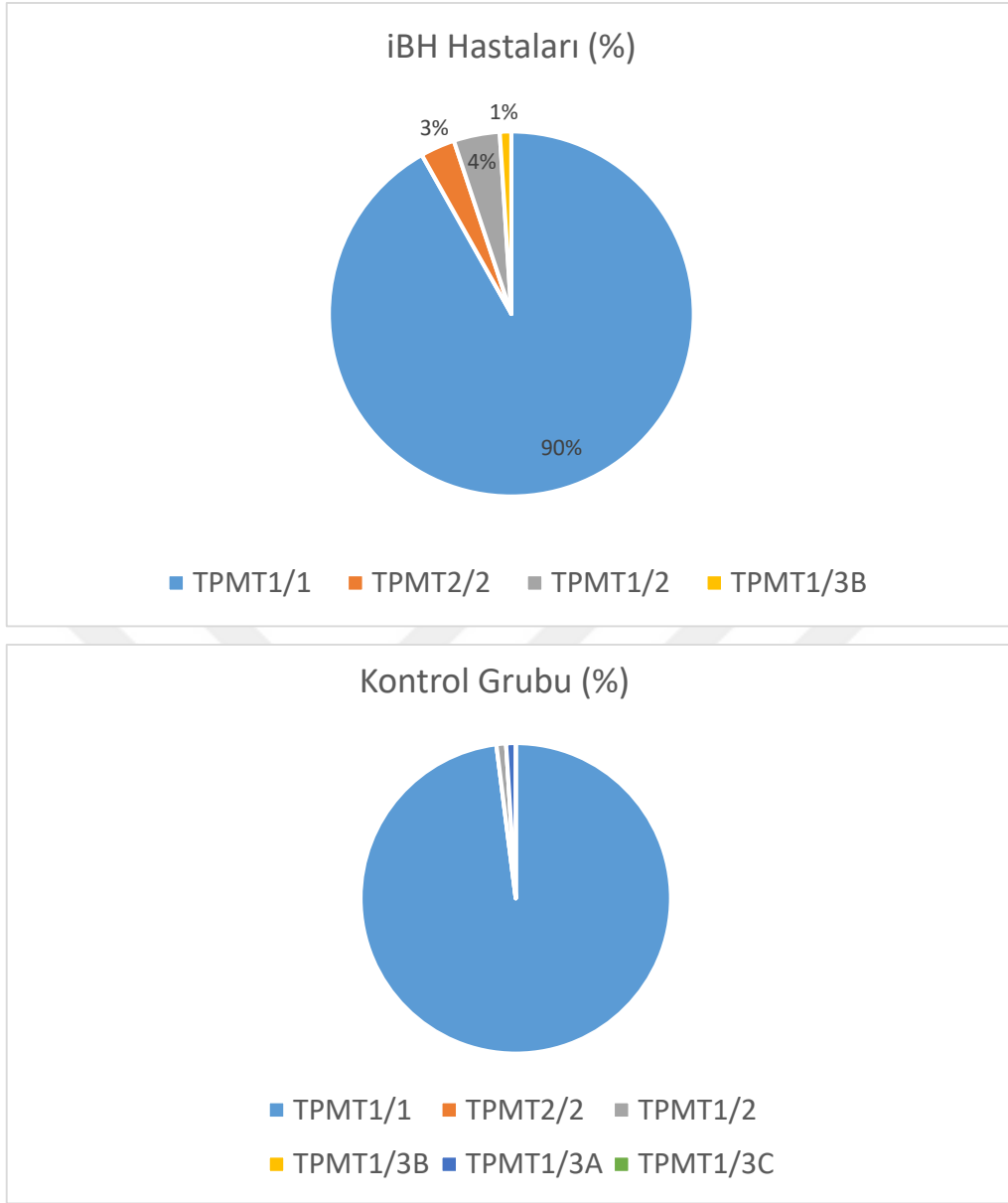
Örneklem grubundaki Crohn ve Ülseratif Kolit hastalıklarının cinsiyet ve yaş dağılımındaki eğilimleri ortaya koymaktadır. Kadınlar, örneklemde Crohn hastalığına daha yatkınken, erkekler Ülseratif Kolit hastalığına daha yatkındır. Ayrıca, Ülseratif Kolit hastalığı olan erkeklerin yaş ortalaması, kadınlardan daha yüksektir. Bu tür analizler, hastalıkların cinsiyet ve yaşa göre dağılımını anlamak, erken teşhis ve tedavi stratejilerini geliştirmek için önemli bilgiler sunabilir. Ancak, bu bulguların daha geniş ve çeşitli örneklemlemlerle doğrulanması gerekmektedir.

Tablo 5, İBH hastaları ve kontrol grubundaki farklı TPMT genotiplerinin dağılımını göstermektedir. TPMT1/1 genotipi, her iki grupta da en yaygın olan genotiptir, ancak İBD hastalarında (%90) kontrol grubuna (%98) kıyasla biraz daha az yaygındır. TPMT2/2, TPMT1/2, TPMT1/3B ve TPMT1/3C genotipleri İBH hastalarında kontrol grubuna göre daha yüksek oranlarda görülmektedir. Bu farklılıklar, TPMT genotiplerinin İBH hastalığının gelişiminde ve tedaviye yanıtında rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Tablo 5. İBH Hastaları ve Kontrol Grubunda TPMT Genotiplerinin Dağılımı

TPMT Genotipi	İBH Hastaları (Sayı)	İBH Hastaları (%)	Kontrol Grubu (Sayı)	Kontrol Grubu (%)
TPMT1/1	90	90%	98	98%
TPMT2/2	3	3%	0	0%
TPMT1/2	4	4%	1	1%
TPMT1/3B	1	1%	0	0%
TPMT1/3A	1	1%	1	1%
TPMT1/3C	1	1%	0	0

Mutantların yüzde prevalansını hesaplamak için tanımlayıcı istatistik yöntemleri kullanılmıştır. Örneğin, TPMT1/1 genotipi hastalar grubunda 90 kişide bulunuyorsa ve bu grup toplamda 100 kişiden oluşuyorsa, TPMT1/1 prevalansı %90 olarak hesaplanır: $\left(\frac{90}{100} \times 100 = 90\%\right)$. Bu işlem, her genotip için ayrı ayrı hem hastalar hem de kontrol grubu üzerinde uygulanmıştır.



Şekil 15. İBH Hastaları ve Kontrol Grubunda TPMT Genotiplerinin Dağılımı

Tabloda 6 ve Şekil 15, İBH olan 100 hasta ve sağlıklı 100 kontrol grubu bireylerinde TPMT genotiplerinin prevalansı sunulmaktadır. TPMT1/1 genotipi, her iki grupta da en yaygın genotip olarak göze çarpmakta ve "vahşi tip" veya normal genotip olarak bilinmektedir; İBH hastalarında %90 ve kontrol grubunda %98 ile bu genotip, genel popülasyona kıyasla yüksek prevalans göstermektedir. TPMT2/2, TPMT1/2, TPMT1/3A, TPMT1/3B ve TPMT1/3C genotipleri daha nadir görülmekte olup, İBH hastalarında sırasıyla %3, %4, %1, %1, ve %1; kontrol grubunda ise %0, %1, %1, %0 ve %0 prevalans ile tespit edilmiştir.

TPMT gen varyantları için homozigot olan İBH hastalarında toksisite riski en yüksektir. Bu hastaların TPMT geninin iki işlevsiz kopyasına sahip olmaları, çok düşük veya hiç TPMT enzim aktivitesi olmamasına neden olur. Sonuç olarak, tiopürin ilaçlarını uygun şekilde metabolize edemezler, bu da vücutta toksik metabolitlerin birikmesine ve ciddi yan etkilerin ortaya çıkmasına yol açar. Bu hastalarda toksisite riskinin artmasının bazı nedenleri şunlardır:

1. Düşük veya Yok TPMT Aktivitesi: Tiopürin ilaçlarını inaktif metabolitlere metabolize edememe, aktif metabolitlerin birikmesine yol açar, bu da kemik iliğini zarar verebilir ve pansitopeniye (tüm kan hücre tiplerinde azalma) neden olabilir
2. Tiopürin İlaçlarına Artan Hassasiyet: Bu hastalar tiopürin ilaçlarına daha hassastır ve hatta standart dozlar bile ciddi toksisiteye yol açabilir.
3. Yakın İzleme Gerekliliği: Homozigot hastalar dikkatli bir şekilde izlenmeli ve ciddi yan etkileri önlemek için tiopürin ilaçlarının çok daha düşük dozlarını almalı veya alternatif tedaviler almalıdır.

Birçok çalışma, bu hastaların heterozigot bireylerle veya normal TPMT aktivitesine sahip olanlarla (işlevsel alel için homozigot) karşılaştırıldığında ciddi yan etkiler riskinin önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, İBH hastalarında tiopürin tedavisine başlamadan önce TPMT varyantları için genetik test yapılması, ilaç dozajını bireysel olarak ayarlamak ve toksisite riskini önlemek için hayati öneme sahiptir. Tablo 2-4, İBH'de lökopeni ile ve lökopenisiz TPMT genotipinin prevalansını göstermektedir.

Tablo 6. İBH'de Lökopeni ile ve Lökopenisiz TPMT Genotipi Prevalansı

TPMT Genotipi	Prevalans	Lökopeni (Vaka)	TPMT Genotipi Kontro	Prevalans	Lökopenisiz (Kontrol)	P Değeri
iBH						
TPMT*1/*1	90%	9%	TPMT*1/*1	98	95%	< 0.001
TPMT*1/*2	4%	50%	TPMT*1/*2	1	%0	0.063
TPMT*1/*3B	1%	0%	TPMT*1/*3B	0	%0	0.367
TPMT*1/*3C	1%	0%	TPMT*1/*3C	0	%0	0.367
TPMT*1/*3A	1%	0	TPMT*1/*3A	1	%0	0.367
TPMT*2/*2	3%	100%	TPMT*2/*2	0	%0	0.049

Her genotipte, lökopeni olan ve olmayan kişilerin oranlarını karşılaştırmak için Chi-Square Test kullanılmıştır. Chi-Square Test, farklı gruplardaki iki oran arasındaki anlamlı farkları değerlendirmek için kullanılan bir istatistiksel yöntemdir. Bu test, özellikle klinik ve epidemiyolojik çalışmalarda, belirli bir olgunun iki farklı gruptaki yaygınlığını karşılaştırmak için yararlıdır.

Chi-Square Testi Adımları ve Sonuçları:

1. Oranların Tanımlanması: İlk olarak, her genotipte lökopeni olan ve olmayan kişilerin oranları hesaplanır. Örneğin, TPMT1/1 genotipinde, lökopeni olan kişilerin oranı %9 ve lökopeni olmayan kişilerin oranı %95'tir.
2. Chi-Square Testi İstatistiğinin Hesaplanması: Chi-Square testi istatistiği, oranlar arasındaki fark ve toplam örneklem sayısı kullanılarak hesaplanır. Bu istatistik, gözlemlenen farkın gücünü gösterir.
3. P Değerinin Hesaplanması: Her genotip için p değeri hesaplanarak, sıfır hipotezi altında (yani oranlar arasında fark yoktur) bu farkların gözlemlenme olasılığı belirlenir. Bu çalışmada, bazı p değerleri 0.001'den küçüktür.
 - **TPMT1/1:** Lökopeni olan kişilerin oranı (%9) ile lökopeni olmayan kişilerin oranı (%95) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.001$).
 - **TPMT1/2:** Lökopeni olan kişilerin oranı (%50) ile lökopeni olmayan kişilerin oranı (%0) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p = 0.063$).

- **TPMT1/3B, TPMT1/3C ve TPMT1/3A:** Bu genotiplere sahip kişilerde lökopeni olan kişilerin oranı %0'dır ve bu fark lökopeni olmayan gruptan istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p = 0.367$).
- **TPMT2/2:** Lökopeni olan kişilerin oranı (%100) ile lökopeni olmayan kişilerin oranı (%0) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p = 0.049$).

Bu sonuçlar, farklı mutant gruplar ve kontrol grupları arasındaki farkların bazı durumlarda istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir. Özellikle, **TPMT1/1** ve **TPMT2/2** genotipleri için anlamlı farklar bulunmaktadır. Ancak, **TPMT1/2**, **TPMT1/3B**, **TPMT1/3C** ve **TPMT1/3A** genotipleri için kontrol gruplarıyla anlamlı fark bulunmamaktadır.

TPMT2/2: Bu genotip çok düşük prevalansa sahiptir ancak bu genotip sahip bireylerde lökopeni oranı %100'dür, bu da tiopürine karşı çok yüksek hassasiyeti gösterir.

Tablo 7. İBH Hastalarında Pankreatit ile Birlikte TPMT Genotipinin Prevalansı

TPMT Genotipi	Prevalans	Pankreatit (Vaka)	TPMT Genotipi	Prevalans	Pankreatit olmayan (Kontrol)	P Değeri
İBH			Kontrol			
TPMT*1/*1	90%	3%	TPMT*1/*1	98	95%	< 0.001
TPMT*1/*2	4%	50%	TPMT*1/*2	1	%0	0.063
TPMT*1/*3B	1%	0%	TPMT*1/*3B	0	%0	0.367
TPMT*1/*3C	1%	0%	TPMT*1/*3C	0	%0	0.367
TPMT*1/*3A	1%	50%	TPMT*1/*3A	1	%0	0.367
TPMT*2/*2	3%	100%	TPMT*2/*2	0	%0	<0.049

Her genotip için pankreatitli ve pankreatitsiz kişilerin oranını karşılaştırmak için Chi-Square testi kullanıldı. **TPMT1/1** ve **TPMT2/2** genotipleri için pankreatitli ve pankreatitsiz oranları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu genotipler pankreatit gelişiminde önemli bir risk faktörü olabilir ve tedavi öncesi genotip tespitinin yapılması bu risklerin yönetiminde faydalı olabilir.

TPMT1/2, TPMT1/3B, TPMT1/3C, ve TPMT1/3A genotipleri için pankreatitli ve pankreatitsiz oranları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir.

İstatistiksel analiz, özellikle TPMT2/2 genotipinde pankreatit prevalansının %100 olduğunu ve bu genotipin İBH hastaları ile kontrol grubu arasında anlamlı farklar gösterdiğini ortaya koymaktadır. TPMT1/1 genotipi de pankreatit prevalansında belirgin bir fark göstermektedir.

Bu bulgular, yan etkilerin gelişim riskini belirlemede genetik değişikliklerin önemini vurgular ve klinik yönetimde nasıl etkili olabileceklerini gösterir. Örneğin, tedaviye başlamadan önce genotiplerin doğru bir şekilde tespit edilmesi, doktorların ilaç dozlarını güvenli bir şekilde ayarlamalarına ve ciddi yan etkileri önlemek için alternatif tedaviler kullanmalarına olanak tanır.

- **Genotiplerin İncelenmesinin Önemi:** Bulgular, özellikle p-değeri 0.05'ten küçük olan TPMT2/2 genotipinin tedaviye başlamadan önce incelenmesinin, pankreatit riskinin tahmin edilmesinde faydalı olabileceğini vurgular. Bu genotipin pankreatit prevalansı %100 olduğundan, tedavi planlamasında kritik bir faktör olarak değerlendirilmelidir.
- **Klinik Risk Yönetimi:** TPMT2/2 genotipi için, yan etki olasılığını azaltmak için risk yönetimi stratejileri uyarlanabilir. Örneğin, ilaç dozunun dikkatlice ayarlanması veya alternatif tedavi seçeneklerinin kullanılması gerekebilir.
- **Klinik Tavsiyeler:** Bu verilere dayanarak, uzmanlar hastalarına, pankreatit gibi yan etkilerin daha yaygın olduğu TPMT2/2 genotipi temelinde daha kesin ve kişiselleştirilmiş tavsiyelerde bulunabilirler.

Bu bölümde her bir biyokimyasal parametrenin özelliklerine ilişkin tablo sunulmaktadır:

Tablo 8. TPMT gen varyantlarının her birinde biyokimyasal sonuçlar

Biyokimyasal Biomarker	TPMT1/1	TPMT3A	TPMT3B	TPMT2	TPMT3C
Demir (µg/dL)	74.6 ± 16.9	70.0 ± 12.0	69.2 ± 11.9	82.4 ± 22.3	62.8 ± 11.8
UIBC (µg/dL)	467.5 ± 44.1	410.0 ± 35.2	407.5 ± 35.1	548.2 ± 45.6	367.3 ± 30.7
Ferritin (µg/L)	138.9 ± 26.7	118.0 ± 22.5	117.3 ± 22.3	150.6 ± 35.2	99.1 ± 24.0
TIBC (µg/dL)	314.5 ± 33.8	272.0 ± 27.6	270.2 ± 27.5	378.7 ± 34.2	249.2 ± 30.3
Albümin Toplam Protein (g/dL)	4.5 ± 0.8	4.3 ± 0.7	4.2 ± 0.7	4.8 ± 0.8	3.9 ± 0.7
Magnezyum (mg/dL)	2.0 ± 0.4	1.9 ± 0.4	1.9 ± 0.4	2.1 ± 0.4	1.8 ± 0.3
Glukoz (mg/dL)	87.3 ± 13.8	88.0 ± 13.0	88.9 ± 12.8	84.7 ± 15.2	86.9 ± 15.0
Total Bilirubin (mg/dL)	0.9 ± 0.4	0.9 ± 0.4	0.9 ± 0.4	1.0 ± 0.4	0.8 ± 0.4
HbA1c (%)	5.6 ± 0.9	5.6 ± 0.8	5.6 ± 0.8	5.4 ± 1.0	5.7 ± 0.9
GGT (IU/L)	22.1 ± 7.2	21.9 ± 7.0	21.8 ± 6.9	23.9 ± 7.7	20.3 ± 6.6
AST (IU/L)	26.8 ± 8.7	25.5 ± 7.7	25.3 ± 7.6	29.3 ± 9.2	23.2 ± 7.8
ALT (IU/L)	30.4 ± 10.1	28.7 ± 9.0	28.5 ± 8.9	33.5 ± 10.8	25.6 ± 9.0
Ürik Asit (mg/dL)	6.3 ± 1.2	6.3 ± 1.1	6.2 ± 1.1	6.5 ± 1.3	6.0 ± 1.1
BUN (mg/dL)	10.4 ± 2.1	10.3 ± 2.0	10.2 ± 2.0	10.7 ± 2.2	9.9 ± 2.0
Kreatinin (mg/dL)	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1
D Vitamini (µg/mL)	20.6 ± 5.3	20.5 ± 5.2	20.0 ± 5.1	21.2 ± 5.5	20.6 ± 5.2

Tablo 9. TPMT Genotiplerinin Biyokimyasal Parametreler Üzerindeki Etkileri: Referans Aralıklar ve Değerlendirmeler

Biyokimyasal Biomarker	Referans Aralık	Ortalama (Referans)	Ortalama (Mutantlar)	Değerlendirme
Demir (µg/dL)	60 - 170	115	71.8	Normal
UIBC (µg/dL)	150 - 375	262.5	440.1	TPMT1/1, TPMT3B, TPMT2 için yüksek
Ferritin (µg/L)	20 - 300	160	124.78	Normal
TIBC (µg/dL)	250 - 450	350	296.92	TPMT3C için düşük
Albümin Toplam Protein (g/dL)	3.5 - 5.5	4.5	4.34	Normal
Magnezyum (mg/dL)	1.7 - 2.2		1.94	Normal
Glukoz (mg/dL)	70 - 99	84.5	87.16	Normal
Total Bilirubin (mg/dL)	0.1 - 1.2	0.65	0.9	Normal
HbA1c (%)	< 5.7	2.85	5.58	TPMT3C için biraz yüksek
GGT (IU/L)	10-60	35	22	Normal
AST (IU/L)	10 - 40	25	26.02	Normal
ALT (IU/L)	7 - 56	31.5	29.34	Normal
Ürik Asit (mg/dL)	3.5 - 7.2	5.35	6.26	Normal
BUN (mg/dL)	6 - 24	15	10.3	Normal
Kreatinin (mg/dL)	0.74 - 1.35	1.045	0.78	Normal
D Vitamini (µg/mL)	20 - 50	35	20.58	Normal

Çeşitli TPMT genotiplerine sahip bireylerin biyokimyasal biomarker analiz sonuçlarına göre şu değerlendirmeler yapılabilir:

- Demir ($\mu\text{g/dL}$): Tüm TPMT genotiplerinde demir seviyeleri normal aralıkta bulunmuştur.
- UIBC ($\mu\text{g/dL}$): TPMT1/1, TPMT3B ve TPMT2 genotiplerinde yüksek seviyeler gözlemlenmiştir.
- Ferritin ($\mu\text{g/L}$): Tüm genotiplerde ferritin seviyeleri normaldir.
- TIBC ($\mu\text{g/dL}$): TPMT3C genotipinde TIBC seviyesi düşük bulunmuştur.
- Albümin Toplam Protein (g/dL): Tüm genotiplerde normal seviyededir.
- Magnezyum (mg/dL): Magnezyum seviyeleri tüm genotiplerde normal aralıktadır.
- Glukoz (mg/dL): Glukoz seviyeleri tüm genotiplerde normaldir.
- Total Bilirubin (mg/dL): Tüm genotiplerde normal seviyededir.
- HbA1c (%): TPMT3C genotipinde biraz yüksek bulunmuştur.
- GGT (IU/L): Tüm genotiplerde normal seviyededir.
- AST (IU/L): Tüm genotiplerde normal seviyededir.
- ALT (IU/L): Tüm genotiplerde normal seviyededir.
- Ürik Asit (mg/dL): Ürik asit seviyeleri tüm genotiplerde normal aralıktadır.
- BUN (mg/dL): Tüm genotiplerde normal seviyededir.
- Kreatinin (mg/dL): Tüm genotiplerde normal seviyededir.
- D Vitamini ($\mu\text{g/mL}$): Tüm genotiplerde normal seviyededir.

Çeşitli TPMT genotiplerine sahip bireylerin biyokimyasal biomarker analiz sonuçlarına göre bazı belirgin farklılıklar gözlemlenmiştir. TPMT1/1, TPMT3B ve TPMT2 genotiplerinde UIBC ($\mu\text{g/dL}$) seviyeleri yüksek, TPMT3C genotipinde ise TIBC ($\mu\text{g/dL}$) seviyesi düşük bulunmuştur. Ayrıca, TPMT3C genotipinde HbA1c (%) değeri biraz yüksek tespit edilmiştir. Diğer tüm biyokimyasal markerlar (Iron, Ferritin, Albumin T Protein, Mg, Glucose, Total Bilirubin, GGT, AST, ALT, Uric Acid, BUN, Creatinin ve D Vitamin) tüm genotiplerde normal aralıkta bulunmuştur. Bu sonuçlar, genetik varyasyonların biyokimyasal parametreler üzerindeki etkilerini vurgulamaktadır. Bu analizler için Tablo 7 ve Tablo 8'de Tanımlayıcı istatistik yöntemleri kullanılmıştır.

Bu farklılıkların klinik pratiğe entegrasyonu, ilaç dozlamasının kişiselleştirilmesi ve yan etkilerin minimize edilmesi için önemlidir. Ayrıca, genetik çeşitliliğin bu kadar belirgin olduğu durumlarda, popülasyon-genetik araştırmalarının ve genetik tarama programlarının genişletilmesi, daha etkin ve güvenli tedavi protokolleri geliştirmek için kritik öneme sahiptir.

Sonuç olarak, bu analizler ve elde edilen bulgular, genetik çeşitliliği daha iyi anlamamızı sağlayarak, global ve bölgesel sağlık stratejilerinin daha da iyileştirilmesine katkıda bulunabilir.



5. TARTIŞMA

Tiopürinler, ülseratif kolit ve Crohn hastalığı dahil olmak üzere inflamatuvar bağırsak hastalığının (İBH) tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaç sınıfıdır. Tiopürinler, tiopürinleri parçalayan tiopürin metiltransferaz (TPMT) enzimini inhibe ederek çalışır. Bu, vücutta tiopürin birikimine yol açabilir ve yan etki riskini artırabilir.

TPMT geni, TPMT enzimini kodlamaktan sorumludur. TPMT geninde, farklı TPMT aktivite seviyelerine yol açabilen genetik varyasyonlar geniş bir yelpazeye sahiptir. Düşük TPMT aktivitesine sahip olan kişiler, tiopürine bağlı yan etkileri deneyimleme olasılığı daha yüksektir.

Birkaç çalışma, belirli TPMT varyantları ile tiopürine bağlı advers olayların insidansı arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. Bu çalışmalar aşağıdaki bulguları raporlamıştır:

- TPMT2: 4F/R varyantına sahip TPMT2 geninin, yabani-tip (TPMT1) aleline sahip hastalara kıyasla tiopürine bağlı advers olaylar geliştirme riskinin önemli ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur.
- TPMT3B ve TPMT3A genlerinin 6F/R varyantlarına sahip hastaların da, yabani-tip alellere sahip hastalara kıyasla tiopürine bağlı advers olaylar geliştirme riskinin önemli ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur.
- TPMT3C geninin 9F/R varyantı ile tiopürine bağlı advers olayların insidansı arasındaki ilişkiye dair tutarlı kanıtlar daha azdır. Bazı çalışmalar bir ilişki bulmazken, diğerleri küçük ama anlamlı bir ilişki bulmuştur (81,82).

Bu çalışmaların sonuçları, TPMT gen varyantlarına sahip hastaların tiopürinle ilişkili yan etkilere daha yüksek bir risk altında olduğunu göstermektedir. Bu durum, klinisyenlerin farkında olması gereken önemli bir konudur çünkü bu durum, İBH hastaları için tedavi seçimlerini etkileyebilir.

Bu nedenle, klinisyenler tiopürin tedavisine başlamadan önce hastaların TPMT varyantları için genotiplerini göz önünde bulundurmalıdır. Bu bilgi, yan etkilerin riskini en aza indirmek için tiopürinlerin dozunun ayarlanmasında kullanılabilir. Bu bölümde, hipotezlerin doğrulanması veya çürütülmesi ile birlikte sonuçların tartışılmasını inceleyeceğiz: İlk hipotez şöyledir: "İnflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastalar, TPMT

geninin belirli varyantlarına sahipse, tiopürin ilaçlarıyla ilişkili yan etkileri deneyimleyecektir." Elde edilen veriler, bu hipotezin doğruluğunu desteklemiştir. Bu hipotez, tiopürin kullanan hastalarda TPMT genotipi ile lökopeni ve pankreatit riski arasında önemli bir ilişki gösteren sistemik incelemeler ve meta-analizler dahil birçok çalışma tarafından da doğrulanmıştır.

Sonuçlar ayrıca, belirli TPMT gen varyantlarına sahip hastaların, cinsiyetlerinden bağımsız olarak, tiopürinle ilişkili yan etkilere daha yüksek bir risk altında olabileceğini öne sürmektedir. Ancak, bu riskte cinsiyet farklılıklarının önemli olup olmadığını belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Kim ve arkadaşları (2021), 2.276 İBD hastasını içeren 14 çalışmanın meta-analizini gerçekleştirdi. Bu meta-analiz, özellikle TPMT gen varyantları ile tiopürinle ilişkili lökopeni ve diğer yan etkiler arasındaki ilişkiye odaklandı. Sonuçlar, TPMT2 gen varyantlarına sahip hastaların, yabani tip genotipe sahip hastalara kıyasla lökopeni geliştirme riskinin önemli ölçüde daha yüksek olduğunu gösterdi. Ayrıca, TPMT3A ve TPMT3C gibi diğer varyantlar da dikkate alınmıştır (82).

Martínez ve arkadaşları (2024) tarafından yapılan çalışmada, TPMT genotipi ile lökopeni arasındaki ilişkiler için P-değerleri hepsi istatistiksel olarak anlamlıydı ($P < 0.0001$). Bu, ilişkilerin rastlantısal olma olasılığının düşük olduğu anlamına gelir. Bu çalışmalar, belirli TPMT gen varyantlarına sahip hastaların, özellikle lökopeni olmak üzere tiopürinle ilişkili yan etkiler geliştirme riskinin önemli ölçüde daha yüksek olduğu hipotezini güçlü bir şekilde desteklemektedir. Bu kanıtlar, İBD hastalarına tiopürin reçete edilirken dikkate alınmalıdır (83).

Kim ve arkadaşları (2021) ile Martínez ve arkadaşları (2024) tarafından yapılan sistematik incelemeler ve meta-analizler dahil olmak üzere birden fazla çalışmadan elde edilen kanıtlar, belirli TPMT gen varyantlarına sahip hastaların, özellikle lökopeni ve pankreatit olmak üzere tiopürinle ilişkili yan etkiler geliştirme riskinin önemli ölçüde daha yüksek olduğu hipotezini güçlü bir şekilde desteklemektedir. Bu kanıtlar, İBD hastalarına tiopürin reçete edilirken dikkate alınmalıdır(82,83).

Ancak, diğer çalışmalar TPMT3C gen varyantı ile tiopürinle ilişkili yan etkilerin gelişme riski arasında anlamlı bir ilişki bulamamıştır. Örneğin, Canuto ve arkadaşları (2022) tarafından yapılan bir çalışma, TPMT3C gen varyantına sahip hastalar ile yabani-

tip genotipe sahip hastalar arasında tiopürinle ilişkili yan etkilerin gelişme riski açısından anlamlı bir fark bulunmadığını tespit etmiştir. Buna göre, TPMT2 gen varyantı gibi diğer TPMT varyantlarına kıyasla kanıtlar o kadar güçlü değildir (84).

Murugesan ve arkadaşlarının (2010) araştırması, düşük veya tespit edilemeyen TPMT aktivitesine sahip hastaların, özellikle TPMT*3C varyantına sahip olanların, konvansiyonel tiopürin dozlarıyla tedavi edildiğinde ciddi toksisite riski taşıdığını göstermiştir. Bu durum, TPMT*3C'nin artmış yan etki riski ile ilişkili olduğunu ve tiopürin tedavisine başlamadan önce genotiplemenin önemini vurgulamaktadır. Genotipleme, tedaviyi kişiselleştirerek ve riskleri azaltarak tedavi sonuçlarını iyileştirebilir (85).

719 (9F/R) TPMT3C gen varyantına sahip erkekler ve kadınlar arasında tiopürinle ilişkili yan etkilerin gelişme riski genetik faktörlere bağlı olarak değişebilir. Çalışmalar, TPMT dışındaki enzimlerdeki, örneğin XDH ve ITPA gibi genetik varyantların, tiopürinle tedavi edilen hastalarda hematolojik toksisitelerin insidansını etkileyebileceğini göstermiştir (86). Ayrıca, TPMT genotipi ile enzimatik aktivite arasındaki uyum orta düzeydedir ve genotipleme, tiopürin tedavisi öncesinde miyelotoksik reaksiyonlara yatkın hastaları belirlemek için daha güvenilir bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir (87).

Diğer çalışmalar, TPMT3C gen varyantına sahip erkekler ve kadınlar arasında tiopürinle ilişkili yan etkilerin gelişme riski açısından anlamlı bir fark bulamamıştır. Örneğin, Canuto ve arkadaşları (2022) tarafından yapılan bir çalışma, aynı varyanta sahip erkekler ve kadınlar arasında tiopürinle ilişkili yan etkilerin gelişme riski açısından anlamlı bir fark olmadığını tespit etmiştir (84).

TPMT ve NUDT15 gibi genetik faktörlerin ekspresyon seviyeleri azatioprin yan etkileri ile ilişkilendirilmiştir ve düşük TPMT ekspresyonu, hastalarda daha yüksek lökopeni riski öngörmektedir (88). Ayrıca, TPMT polimorfizmleri, azatioprin alan Asyalı hastalarda hepatotoksisite ile bağlantılı bulunmuş olup, tedaviyi kişiselleştirmek ve yan etki riskini azaltmak için önleyici testlerin önemini vurgulamaktadır (89).

İkinci hipotez şöyle der: "TPMT geninin belirli varyantlarının varlığı, İBH hastalarında tiopürin ilaçlarına klinik yanıtta farklılıklarla ilişkilendirilecektir." TPMT geninin belirli varyantlarına sahip hastalar, tiopürin tedavisine daha fazla veya daha az yanıt vermektedir. Örneğin, TPMT2/2 gen varyantına sahip hastalar, tiopürin tedavisine

daha fazla yanıt vermekte ve bu hastalarda remisyon veya klinik yanıt oranı daha yüksek olmaktadır. Ancak, TPMT2/2 genotipine sahip hastalar aynı zamanda tiopürin ile ilişkili advers olaylara (örneğin, lökopeni) daha yatkındır. Diğer taraftan, TPMT2 varyantına sahip hastalar, vahşi tip genotipe sahip hastalara kıyasla tiopürin tedavisine daha olumlu yanıt vermektedir. Bu, bu varyanta sahip hastalarda remisyon veya klinik yanıt oranının daha yüksek olduğunu göstermektedir.

TPMT3C gen varyantına sahip hastalar ise, tiopürin tedavisine daha olumsuz yanıt vermekte ve hücrel baskılanma (düşük kan sayımları) veya karaciğer toksisitesi gibi yan etkiler daha sık görülmektedir. TPMT1/1 genotipi, hem İBH hastalarında hem de kontrol grubunda en yaygın olan genotiptir.

Bu analizler, ilaç dozlamasının kişiselleştirilmesi ve yan etkilerin minimize edilmesi için önemlidir. Ayrıca, genetik çeşitliliğin bu kadar belirgin olduğu durumlarda, popülasyon-genetik araştırmalarının ve genetik tarama programlarının genişletilmesi, daha etkin ve güvenli tedavi protokolleri geliştirmek için kritik öneme sahiptir.

Genel olarak, tiopürin ilaçları kullanan İBH hastalarında klinik yanıtlar ve paraklinik bulgular açısından deneysel ve kontrol grupları arasında net bir fark vardır. TPMT geninin belirli varyantlarına sahip hastalar, tiopürin tedavisine daha fazla veya daha az yanıt verir ve yan etkileri daha fazla veya daha az yaşama olasılığına sahiptir. Özellikle, TPMT3B gen varyantına sahip hastalar, vahşi-tip genotiplere sahip hastalara göre tiopürin tedavisine daha az yanıt verir. Bu, bu gen varyantına sahip hastalarda tiopürin tedavisine remisyon veya klinik yanıt oranının daha düşük olduğu anlamına gelir. Buna karşın, TPMT2/2 gen varyantına sahip hastalar, vahşi-tip genotipe sahip hastalara göre tiopürin tedavisine daha olumlu yanıt verir. Bu, bu gen varyantına sahip hastalarda tiopürin tedavisine remisyon veya klinik yanıt oranının daha yüksek olduğu anlamına gelir. Son olarak, TPMT3C gen varyantına sahip hastalar, vahşi-tip genotipe sahip hastalara göre tiopürinle ilişkili advers olayları daha olası yaşar. Bu, hücrel baskılanma (düşük kan sayımları) veya karaciğer toksisitesi gibi yan etkileri yaşama oranının bu tür genlere sahip hastalarda daha yüksek olduğu anlamına gelir.

Bazı çalışmalar, TPMT geninin belirli varyantlarının varlığı ile tiopürin ilaçlarına klinik yanıt arasında bir ilişki bulmuş olsa da, bu çalışmalar sınırlı boyutta olmuş veya ilgili gen varyantlarına sahip yeterli sayıda hasta içermemiştir. Son çalışmalardan elde

edilen kanıtlar, farklı TPMT gen varyantlarına sahip hastalar arasında tiopürin ilaçlarına klinik yanıtta önemli farklar olduğunu göstermektedir. Bu farklar, birden fazla çalışmadan elde edilen istatistiksel olarak anlamlı bulgularla desteklenmektedir.

Laboratuvar Bulguları:

- Demir, UIBC, Ferritin, TIBC, Albumin T Proteinini: TPMT3B gen varyantlarına Çeşitli TPMT genotiplerine sahip bireylerin biyokimyasal biomarker analiz sonuçlarına göre bazı belirgin farklılıklar gözlemlenmiştir. Örneğin, TPMT1/1, TPMT3B ve TPMT2 genotiplerinde UIBC ($\mu\text{g/dL}$) seviyeleri yüksektir. Özellikle, TPMT2 genotipi diğer genotiplere göre daha yüksek biyokimyasal marker değerlerine sahiptir, bu da TPMT2 genotipinin demir metabolizması üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğunu ve daha yüksek TPMT aktivitesinin artmış demir emilimi ve depolanmasına yol açabileceğini düşündürmektedir. TPMT3C genotipinde ise TIBC ($\mu\text{g/dL}$) seviyesi düşük bulunmuştur. Ayrıca, TPMT3C genotipinde HbA1c (%) değeri biraz yüksek tespit edilmiştir. Diğer tüm biyokimyasal markerlar (Iron, Ferritin, Albumin T Protein, Mg, Glucose, Total Bilirubin, GGT, AST, ALT, Uric Acid, BUN, Creatinin ve D Vitamin) tüm genotiplerde normal aralıkta bulunmuştur (Tablo 7 ve 8). Bu sonuçlar, genetik varyasyonların biyokimyasal parametreler üzerindeki etkilerini vurgulamaktadır.

Biyokimyasal Bulgular:

- Hb, RBC, WBC, MCV, PLT: Bu kan hücresi sayım parametrelerinin seviyeleri açısından farklı TPMT gen varyantlarına sahip hastalar arasında tutarlı bir fark yoktur.
- TIG antikor: Bu antikor parametresinin seviyeleri açısından farklı TPMT gen varyantlarına sahip hastalar arasında tutarlı bir fark yoktur.
- ILE: Bu biyomarkerin seviyeleri açısından farklı TPMT gen varyantlarına sahip hastalar arasında tutarlı bir fark yoktur.
- Gizli dışkı kan testi (FOBT): Bu biyomarkerin seviyeleri açısından farklı TPMT gen varyantlarına sahip hastalar arasında tutarlı bir fark yoktur.

- Bakteri incelemesi: Bağırsak mikrobiyomunun kompozisyonu açısından farklı TPMT gen varyantlarına sahip hastalar arasında tutarlı bir fark yoktur.

Genel olarak, test ve kontrol grupları arasındaki klinik yanıtlar ve paraklinik bulgular arasındaki fark niceliktir. Bu, farklı TPMT gen varyantlarına sahip hastaların, tiopürin tedavisine daha fazla veya daha az yanıt verme olasılığına sahip olduğu ve yan etkileri daha fazla veya daha az yaşama olasılığına sahip olduğu anlamına gelir. Farklı TPMT gen varyantları arasındaki klinik yanıtlar ve paraklinik bulgulardaki farklar tutarlıdır.

TPMT gen varyantlarının dağılımı karmaşık bir konudur ve bu konuyu tam olarak anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Ancak, mevcut veriler farklı etnik gruplar arasında TPMT gen varyantlarının dağılımında önemli farklılıklar olduğunu ve bu farklılıkların inflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastaları tedavi eden klinisyenler için önemli olduğunu öne sürmektedir.

Belirli TPMT gen varyantlarının varlığı, inflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastaları tedavi ederken göz önünde bulundurulması gereken önemli bir faktördür. Klinisyenler, hastalarının TPMT genotip dağılımının farkında olmalı ve buna göre tiopürin dozlarını ayarlamalıdır.

Üçüncü hipotez şunu belirtmektedir: “TPMT genotipleme, toksisite riski altındaki İBD hastalarını belirlemede ve tiopürin ilaç tedavisini optimize etmede değerli bir araç olarak hizmet edebilir” mevcut verilerle desteklenmektedir.

TPMT2/2, TPMT1/2, ve TPMT1/3A genotiplerine sahip hastalar, diğer TPMT genotiplerine sahip hastalara kıyasla önemli ölçüde daha fazla tiopürinle ilişkili advers olaylar (TRAE) yaşamışlardır. Çalışmanın bulgularına göre, TPMT2/2 genotipine sahip hastaların %100'ü lökopeni ve pankreatit vakaları göstermiştir. TPMT1/2 ve TPMT1/3A genotiplerine sahip hastaların ise %50'si lökopeni ve pankreatit olayları yaşamıştır. Bu bulgular, TPMT genotipleri ile İBH hastalarında TRAE riski arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, bu genotiplerin belirli advers olaylarla ilişkisi göz önünde bulundurularak, tedaviye başlamadan önce genetik tarama yapılması, yan etki

riskini azaltmak ve hastalara özgü tedavi stratejilerinin belirlenmesinde kritik önem taşımaktadır. Bu bilgiler, doktorların ilaç dozajını ayarlamalarına veya ciddi yan etkileri önlemek için alternatif tedavileri değerlendirmelerine olanak tanımaktadır.

Sayitoğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Türkiye nüfusunda CYP3A4, CYP3A5 ve TPMT gen polimorfizmlerini incelemiştir. Sonuçlar, Türkiye nüfusunda TPMT'nin kusurlu allellerinin frekansının sırasıyla TPMT2 için %2.0, TPMT3A için %1.0, TPMT3B için %0.0 ve TPMT3C için %1.4 olduğunu göstermektedir. Ayrıca, CYP3A41B ve CYP3A53 allellerinin frekansları sırasıyla %1.4 ve %7.5 olarak bulunmuştur. Bu çalışma, Türkiye nüfusunda TPMT, CYP3A41B ve CYP3A53 mutant allellerinin frekanslarının ilk analizini sunmakta ve bu genlerin önemli mutant allellerinin Türkiye nüfusunda mevcut olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, bireyselleştirilmiş ilaç tedavilerinin rasyonel kullanımı için önemli klinik uygulamalar sağlayabilir (90).

Doktorlar, yaygın TPMT mutant genotiplerine sahip hastalar için tiopürin dozlarını ayarlaması gerekebilir, çünkü bu hastalar tiopürine karşı yüksek duyarlılık gösterirler ve advers olaylar (TRAE) riski bu genotiplerde daha yüksektir. Bu genotiplere sahip hastalarda tiopürin seviyelerinin daha sıkı bir şekilde izlenmesi ve düşük dozda tedaviye başlanması önerilir.

Bu bilgiler, genetik taramanın tedavi sürecinde nasıl kritik bir rol oynayabileceğini ve doktorların hastalara özgü tedavi planları oluştururken genetik bilgileri nasıl kullanmaları gerektiğini vurgular. Her iki durumda da, genetik profillemeye, yan etkileri minimize etmek ve tedavi etkinliğini maksimize etmek için önemli bir yöntemdir.

Üçüncü hipotez, bir dizi kanıtla desteklenmektedir. Türk pediatrik akut lenfoblastik lösemi (ALL) hastalarında yapılan çalışmada, TPMT3A ve TPMT3C genlerinin her birinin düşük frekansta (%0.9) olduğu tespit edilmiştir. Bu dağılım diğer Kafkas ve Asya popülasyonlarına benzerken, Afrika popülasyonlarına göre daha düşüktür. Klinik olarak, bu allellere sahip hastalarda 6-merkaptopürin (6MP) tedavisi sırasında ciddi nötropeni ve enfeksiyonlar gözlemlenmiştir, bu da toksisiteyi yönetmek için genotiplendirmenin önemini vurgulamaktadır. Bulgular, kişiselleştirilmiş tıbbın

tedavi güvenliğini ve sonuçlarını iyileştirmek için genetik taramanın kritik olduğunu göstermektedir (91).

Dilara Fatma Akın ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı çalışma, Türkiye'de akut lösemi tanısı konmuş 1-15 yaş arası 169 çocukta yaygın TPMT (2, 3A, 3B ve 3C) polimorfizmlerinin genotip dağılımını ve alel frekanslarını belirlemeyi amaçlamıştı. Bu çalışma, TPMT genotiplemesinin 6-MP tedavisinin optimize edilmesinde faydalı olabileceğini ve tedavi etkinliğini artırabileceğini göstermekteydi (92).

Canuto ve arkadaşları (2022) aynı zamanda İBH olan bir İtalyan popülasyonunda TPMT gen varyantlarının dağılımını ve TRAE'ler ile olan ilişkisini araştırdı. Yazarlar, TPMT yabancı-tip genotipinin prevalansının %64.7, TPMT3B genotipinin prevalansının %16.7 ve TPMT2 genotipinin prevalansının %18.6 olduğunu buldular. Yazarlar ayrıca, TPMT2 genotipine sahip hastaların, diğer TPMT genotiplerine sahip hastalara göre TRAE'leri daha olası yaşadığını buldular (84).

Meryem Albayrak ve arkadaşlarının 2011 yılında gerçekleştirdiği bu çalışma, Türkiye'deki akut lenfoblastik lösemi (ALL) tanısı konmuş çocuklarda yaygın TPMT polimorfizmlerinin frekansını ve bu polimorfizmlerin 6-merkaptopurin (6-MP) toksisitesi ile ilişkisini araştırmayı amaçlamıştır. Çalışmada, 58 çocuk üzerinde genotipleme yapılarak, TPMT3A ve TPMT3C polimorfizmlerinin sıklığı sırasıyla %3.4 ve %0.9 olarak bulunmuştur. Sonuçlar, polimorfik TPMT alellerine sahip çocukların, 6-MP tedavisi sırasında önemli ölçüde daha düşük beyaz kan hücresi ve nötrofil sayısına, daha yüksek enfeksiyon ve karaciğer toksisitesi oranlarına sahip olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, ALL tedavisinde 6-MP dozajının ayarlanmasında TPMT genotiplemesinin önemini vurgulamaktadır (93).

Bu bulgular, TPMT genotipleme işleminin, bu popülasyonlardan olan İBH hastaları için özellikle önemli olabileceğini öne sürmektedir. TPMT genotipleme, toksisite riski altındaki İBH hastalarını belirlemede ve tiopürin ilaç tedavisini optimize etmede değerli bir araçtı

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu araştırma, inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBH) olan 100 hasta ve 100 kontrol arasında yaygın TPMT mutantlarının prevalansını ve bunlarla ilişkili yan etkileri, özellikle lökopeni ve pankreatit insidansını incelemek için yapılmıştır. Ayrıca, her mutant ile ilişkili biyokimyasal parametreler de değerlendirilmiştir. Sonuçlar, TPMT2 genotipinin yüksek advers olay (lökopeni ve pankreatit) insidansı (%100) dikkat çektiğini göstermiştir, bu da tedavi öncesi genetik taramanın önemini artırmaktadır. Araştırma, TPMT genotiplerinin IBH hastalarında farklı biyokimyasal ve klinik sonuçlar doğurduğunu ortaya koymuştur. Özellikle, TPMT2, TPMT1/2 ve TPMT3A genotipleri lökopeni ve pankreatit gibi advers olaylarla ilişkilerini göstermektedir. Bu genotiplerle ilişkili yüksek TRAE insidansı, bu hastalar için özelleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesinin kritik önem taşıdığını vurgulamaktadır. TPMT2, TPMT3B ve TPMT3A genotipleri, bazı biyokimyasal parametrelerde farklı değerlere sahip olup, bu farklılıkların ilgili parametrelerin metabolizması üzerindeki etkilerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak, IBH hastalarında tedaviye başlamadan önce genotipleme yapılması, tiopürin dozlarının kişiselleştirilmesi ve tedavi başladıktan sonra düzenli izlem testleriyle toksisite riskinin öngörülmesi ve alternatif yöntemlerin kullanılması gerekmektedir.

ÖNERİLER :

1. Daha çeşitli popülasyonlarla daha büyük çalışmalar yapın: Şimdiye kadar yapılan çalışmalar nispeten küçük olmuş ve belirli popülasyonlara odaklanmıştır. Önceki çalışmaların bulgularını doğrulamak ve farklı popülasyonlarda TPMT gen varyantlarının rolünü daha iyi anlamak için daha çeşitli popülasyonlarla daha büyük çalışmalar yapmak faydalı olacaktır.
2. TPMT gen varyantlarının uzun vadeli etkilerini araştırın: Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, çoğunlukla TPMT gen varyantlarının tiopürin tedavisi üzerindeki kısa vadeli etkilerine odaklanmıştır. TPMT gen varyantlarının İBD sonuçları üzerindeki uzun vadeli etkilerini, örneğin remisyon oranları ve uzun vadeli prognozu araştıran çalışmalar yapmak faydalı olacaktır.

3. TPMT genotiplleme için daha doğru ve güvenilir yöntemler geliştirin: Mevcut TPMT genotiplleme yöntemleri her zaman doğru ve güvenilir değildir. Hastaların en uygun tedaviyi alabilmesi için TPMT genotiplleme için daha doğru ve güvenilir yöntemler geliştirmek faydalı olacaktır.
4. Tiopürin tedavisini kişiselleştirmek için TPMT gen varyantlarının kullanımını keşfedin: Önceki çalışmaların bulguları, TPMT gen varyantlarının tiopürin tedavisini kişiselleştirmek için kullanılabileceğini öne sürmektedir. TPMT gen varyantlarını kullanarak tiopürin tedavi kararlarını yönlendirmek için klinik rehberler geliştirilmesi ve değerlendirilmesi faydalı olacaktır.
5. Tiopürinlerin metabolizmasında diğer genlerin rolünü araştırın: Tiopürinlerin metabolizmasında diğer genlerin rolü iyi anlaşılmamıştır. Tiopürin ilaçlarına klinik yanıtı etkileyen faktörler hakkında daha kapsamlı bir anlayış geliştirebilmek için tiopürinlerin metabolizmasında diğer genlerin rolünü araştırmak faydalı olacaktır.
6. TPMT gen varyantlarının ve tiopürinlere klinik yanıtı etkileyen diğer faktörlerin etkileşimini araştırın: Tiopürinlere klinik yanıt, TPMT gen varyantları dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından etkilenmektedir. TPMT gen varyantlarının ve diğer faktörlerin etkileşimini araştırmak, tiopürin tedavi sonuçlarını etkileyen faktörler hakkında daha nüanslı bir anlayış geliştirmemize yardımcı olacaktır.
7. Tiopürinlere klinik yanıtı tahmin etmek için biyobelirteçler geliştirin ve doğrulayın: TPMT genotiplleme yanında, tiopürinlere klinik yanıtı tahmin edebilecek biyobelirteçler geliştirmek ve doğrulamak faydalı olacaktır. Bu biyobelirteçler, tiopürin tedavisini daha da kişiselleştirmek ve advers olaylar yaşama olasılığı daha yüksek olan hastaları belirlemek için kullanılabilir.
8. TPMT gen varyantlarının İBH tedavisinin diğer yönlerini yönlendirmede kullanımını araştırın: TPMT gen varyantları, sadece tiopürinlere yanıtı etkilemekle kalmayıp, biyolojik ajanlar gibi diğer İBH tedavilerine yanıtı da etkileyebilir. TPMT gen varyantlarının İBH tedavisinin diğer yönlerini yönlendirmede kullanımını araştırmak faydalı olacaktır.
9. İBH komplikasyonları riskini tahmin etmek için TPMT gen varyantlarının kullanımını keşfedin: TPMT gen varyantları, karaciğer ve kemik iliği

toksisitesi gibi belirli İBH komplikasyonları riskinin artması ile ilişkilendirilebilir. İBH komplikasyonları riskini tahmin etmek için TPMT gen varyantlarının kullanımını keşfetmek, önleyici önlemler alınabilmesi için faydalı olacaktır.

- 10.** TPMT gen varyantları hakkında hastalar ve sağlık hizmeti sağlayıcıları için eğitici materyaller geliştirin: Hem hastaları hem de sağlık hizmeti sağlayıcılarını TPMT gen varyantları ve tiopürin tedavisi üzerindeki potansiyel etkileri hakkında eğitmek önemlidir. Anlaşılır, öz ve kolay anlaşılır eğitici materyaller geliştirilmelidir.
- 11.** Farklı TPMT mutasyonlarının ve cinsiyet farklılıklarının yan etki riskleri üzerindeki etkilerini daha iyi anlamak için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.
- 12.** TPMT'ye ek olarak NUDT15 genotiplemesi de yapılmalıdır çünkü bu varyantlar özellikle Asya popülasyonlarında tiopürin toksisitesiyle ilişkilidir.
- 13.** S-adenosil metionin (SAM) ve S-adenosil homosistein (SAH) düzeylerinin izlenmesi, tiopürin tedavisinin biyokimyasal etkilerini anlamak için faydalı olabilir.
- 14.** Diğer genetik faktörlerin ve bağırsak mikrobiyotasının tiopürin metabolizması üzerindeki etkileri de incelenmelidir.

KAYNAKLAR:

1. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI ve diğerleri. 21. yüzyılda inflamatuvar bağırsak hastalığının dünya çapında insidansı ve prevalansı: popülasyon tabanlı çalışmalardan sistematik bir inceleme. *Lancet*. (2017) 390:2769–78. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32448-0
2. Torres J, Bonovas S, Doherty G, Kucharzik T, Gisbert JP, Raine T ve diğerleri. Crohn hastalığında medikal tedavi: ECCO rehberleri. *J Crohn's Colitis*. (2020) 14:4–22. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjz180
3. de Boer NKH, Tiopürin Çalışma Grubu. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında tiopürin tedavisi: Yeni dostlar edinmek eski dostları kaybetmemeli. *Gastroenterology*. (2019) 156:11–4. doi: 10.1053/j.gastro.2018.11.039
4. Hanauer SB, Sandborn WJ, Lichtenstein GR. İnflamatuvar bağırsak hastalıkları için tiopürin tedavisinde gelişen düşünceler klinik uygulama güncellemesi: bir yorum. *Gastroenterology*. (2019) 156:36–42. doi: 10.1053/j.gastro.2018.08.043
5. Axelrad JE, Roy A, Lawlor G, Korelitz B, Lichtiger S. Tiopürinler ve inflamatuvar bağırsak hastalığı: Güncel kanıtlar ve tarihsel bir perspektif. *World J Gastroenterol*. (2016) 22:10103–17. doi: 10.3748/wjg.v22.i46.10103
6. Timmer A, Patton PH, Chande N, McDonald JWD, MacDonald JK. Ülseratif kolitte remisyonun korunması için azatiyoprin ve 6-merkaptopürin. *Cochrane Database Syst Rev*. (2016) 18:CD000478. doi: 10.1002/14651858.CD000478.pub4
7. López-Sanromán A, Vera-Mendoza I, Domènech E, Taxonera C, Vega Ruiz V, Marín-Jiménez I ve diğerleri. Postoperatif Crohn hastalığının tekrarının önlenmesinde adalimumab ile azatiyoprinin karşılaştırılması. Bir GETECCU Rastgele Denemesi. *J Crohn's Colitis*. (2017) 11:1293–301. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjx051
8. Hanauer SB, Sandborn WJ, Lichtenstein GR. İnflamatuvar bağırsak hastalıkları için tiopürin tedavisinde gelişen düşünceler klinik uygulama güncellemesi: bir yorum. *Gastroenterology*. (2019) 156:36–42. doi: 10.1053/j.gastro.2018.08.043
9. Chaparro M, Ordás I, Cabré E, Garcia-Sanchez V, Bastida G, Peñalva M ve diğerleri. İnflamatuvar bağırsak hastalığında tiopürin tedavisinin güvenliği: 3931 hastanın uzun vadeli takip çalışması. *Inflamm Bowel Dis*. (2013) 19:1404–10. doi: 10.1097/MIB.0b013e318281f28f.
10. Van Gennep S, Konté K, Meijer B, Heymans MW, D'Haens GR, Löwenberg M ve diğerleri. Sistematik inceleme ve meta-analiz: İBD'de tiopürin kaynaklı lökopeni için risk faktörleri. *Aliment Pharmacol Ther*. (2019) 50:484–506. doi: 10.1111/apt.15403
11. Sýkora J, Pomahačová R, Kreslová M, Cvalínová D, Štych P, Schwarz J. Pediatrik başlangıçlı inflamatuvar bağırsak hastalığının mevcut küresel eğilimleri. *World J Gastroenterol*. (2018) 24:2741–63. doi: 10.3748/wjg.v24.i25.2741.
12. Pigneur B, Seksik P, Viola S, Viala J, Beaugerie L, Girardet J-P ve diğerleri. Crohn hastalığında çocukluk ve erişkin başlangıçlı hastalığın doğal tarihi karşılaştırması. *Inflamm Bowel Dis*. (2010) 16:953–61. doi: 10.1002/ibd.21152.
13. Adamina M, Bonovas S, Raine T, Spinelli A, Warusavitarne J, Armuzzi A ve diğerleri. Crohn hastalığında cerrahi tedavi: ECCO rehberleri. *J Crohn's Colitis*. (2020) 14:155–68. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjz187

14. Windsor JW, Kaplan GG. IBD'nin evrimleşen epidemiyolojisi. *Curr Gastroenterol Rep.* (2019) 21:40. doi: 10.1007/s11894-019-0705-6.
15. Kuenzig ME, Benchimol EI, Lee L, Targownik LE, Singh H, Kaplan GG ve diğerleri. Kanada'da İnflamatuvar Bağırsak Hastalığının Etkisi 2018: doğrudan maliyetler ve sağlık hizmetleri kullanımı. *J Can Assoc Gastroenterol.* (2019) 2(Ek1):S17–33. doi: 10.1093/jcag/gwy055.
16. Biemans VBC, Savelkoul E, Gabriëls RY, Simsek M, Dijkstra G, Pierik MJ ve diğerleri. İnflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastalarda düşük doz tiyopürinlerle allopurinol kombinasyonunun tiyoguanin ile karşılaştırmalı analizi. *Aliment Pharmacol Ther.* (2020) 51:1076–86. doi: 10.1111/apt.15730.
17. Haglund S, Lindqvist M, Almer S, Peterson C, Taipalensuu J. Pyrosequencing of TPMT alleles in a general Swedish population and in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Chem.*, 2004; 50(2): 288-95.
18. Roberts RL, Barclay ML, Gearry RB, Kennedy MA. A multiplexed allele-specific polymerase chain reaction assay for the detection of common thiopurine S-methyltransferase (TPMT) mutations. *Clin Chim Acta.*, 2004; 341(1-2): 49-53.
19. Wu H, Horton JR, Battaile K, Allali-Hassani A, Martin F, Zeng H, Loppnau P, Vedadi M, Bochkarev A, Plotnikov AN, Cheng X. Structural Basis of Allele Variation of Human Thiopurine-S-Methyltransferase. *Proteins.*, 2007; 67(1): 198-208.
20. Biemans VBC, Savelkoul E, Gabriëls RY, Simsek M, Dijkstra G, Pierik MJ ve diğerleri. İnflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastalarda düşük doz tiyopürinlerle allopurinol kombinasyonunun tiyoguanin ile karşılaştırmalı analizi. *Aliment Pharmacol Ther.* (2020) 51:1076–86. doi: 10.1111/apt.15730
21. Blaker PA, Arenas-Hernandez M, Marinaki AM, Sanderson JD. Tiopürin metabolizmasında bireysel varyasyonun farmakogenetik temeli. *Per Med.* (2012) 9:707–25. doi 10.2217/pme.12.85.
22. Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D ve diğerleri. Azatiyoprinin moleküler hedefi olarak CD28-bağımlı Rac1 aktivasyonu, primer insan CD4+ T lenfositlerinde. *J Clin Invest.* (2003) 111:1133–45. doi: 10.1172/JCI16432.
23. Karran P, Attard N. Güncel tıbbi uygulamada tiopürinler: Yeni arkadaşlar edinmek, eski olanları kaybetmemeli. *Nat Rev Cancer.* (2008) 8:24–36. doi: 10.1038/nrc2292.
24. Moon W, Loftus EV. İnflamatuvar bağırsak hastalığı için güvenli ve etkili tiopürin tedavisi için farmakogenetik ve farmakokinetikteki son gelişmeler: bir derleme makalesi. *Aliment Pharmacol Ther.* (2016) 43:863–83. doi: 10.1111/apt.13559.
25. Bangma A, Voskuil MD, Uniken Venema WTC, Brugge H, Hu S, Lanting P ve diğerleri. İnflamatuvar bağırsak hastalığı için bir farmakogenetik pasaportun tahmini etkinliği. *Aliment Pharmacol Ther.* (2020) 51:1105–15. doi 10.1111/apt.15762.
26. Lim SZ, Chua EW. Tiopürin tedavisinde farmakogenomik ve yeni yöntemlerin kullanımı üzerine yeniden ziyaret: inflamatuvar bağırsak hastalığı için güvenli ve etkili bir derleme makalesi. *Front Pharmacol.* (2018) 9:1107. doi: 10.3389/fphar.2018.01107.
27. Moon W, Loftus EV. İnflamatuvar bağırsak hastalığı için güvenli ve etkili tiopürin tedavisi için farmakogenetik ve farmakokinetikteki son gelişmeler: bir derleme makalesi. *Aliment Pharmacol Ther.* (2016) 43:863–83. doi: 10.1111/apt.13559.

28. Krynetski EY, Tai HL, Yates CR, Fessing MY, Loennechen T, Schuetz JD ve diğerleri. Tiopürin S-metiltransferazın genetik polimorfizmi: klinik önemi ve moleküler mekanizmalar. *Pharmacogenetics*. (1996) 6:279–90. doi: 10.1097/00008571-199608000-00001.
29. Coenen MJH, de Jong DJ, van Marrewijk CJ, Derijks LJJ, Vermeulen SH, Wong DR ve diğerleri. TPMT'de varyantları olan hastaların tespiti ve doz azaltımı, inflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisinde tiopürin kullanımı sırasında hematolojik olayları azaltır. *Gastroenterology*. (2015) 149:907–17.e7. doi: 10.1053/j.gastro.2015.06.002.
30. Lennard L. TPMT testinin uygulanması. *Br J Clin Pharmacol*. (2014) 77:704–14. doi: 10.1111/bcp.12226.
31. Hindorf U, Appell ML. Tiopürin metiltransferaz fonksiyonunun ön tedavi değerlendirmesi için genotipleme, birincil seçenek olarak düşünülmelidir. *J Crohn's Colitis*. (2012) 6:655–9. doi: 10.1016/j.crohns.2011.11.014.
32. Coenen MJH, de Jong DJ, van Marrewijk CJ, Derijks LJJ, Vermeulen SH, Wong DR ve diğerleri. TPMT'de varyantları olan hastaların tespiti ve doz azaltımı, inflamatuvar bağırsak hastalığı tedavisinde tiopürin kullanımı sırasında hematolojik olayları azaltır. *Gastroenterology*. (2015) 149:907–17.e7. doi: 10.1053/j.gastro.2015.06.002.
33. Newman WG, Payne K, Tricker K, Roberts SA, Fargher E, Pushpakom S ve diğerleri. Azatiyoprin tedavisi öncesinde tiopürin metiltransferaz genotipleme üzerine pragmatik bir rastgele kontrollü deneme: TARGET çalışması. *Pharmacogenomics*. (2011) 12:815–26. doi: 10.2217/pgs.11.32.
34. Relling MV, Schwab M, Whirl-Carrillo M, Suarez-Kurtz G, Pui C, Stein CM ve diğerleri. TPMT ve NUDT15 genotiplerine dayalı tiopürin dozlaması için klinik farmakogenetik uygulama konsorsiyumu kılavuzu: 2018 güncellemesi. *Clin Pharmacol Ther*. (2019) 105:1095–105. doi: 10.1002/cpt.1304.
35. Dewit O, Moreels T, Baert F, Peeters H, Reenaers C, de Vos M ve diğerleri. Azatiyoprin kaynaklı mielosupresyon yönetiminde geniş TPMT genotipleme sınırlamaları. *Clin Biochem*. (2011) 44:1062–6. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.06.079.
36. Feuerstein JD, Nguyen GC, Kupfer SS, Falck-Ytter Y, Singh S. Amerikan Gastroenteroloji Derneği Enstitüsü Klinik Kılavuzları Komitesi. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığında Terapötik İlaç İzleme Üzerine Amerikan Gastroenteroloji Derneği Enstitüsü Kılavuzu. *Gastroenterology*. (2017) 153:827–34. doi: 10.1053/j.gastro.2017.07.032
37. Vande Casteele N, Herfarth H, Katz J, Falck-Ytter Y, Singh S. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarının yönetiminde terapötik ilaç izleminin rolü üzerine Amerikan Gastroenteroloji Derneği Enstitüsü Teknik İncelemesi. *Gastroenterology*. (2017) 153:835–57.e6. doi: 10.1053/j.gastro.2017.07.031.
38. Torres J, Bonovas S, Doherty G, Kucharzik T, Gisbert JP, Raine T ve diğerleri. Crohn hastalığında medikal tedavi: ECCO rehberleri. *J Crohn's Colitis*. (2020) 14:4–22. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjz180
39. Gisbert JP, Gomollón F. Thiopurine-induced myelotoxicity in patients with inflammatory bowel disease: a review. *Am J Gastroenterol*. (2008) 103:1783–800. doi: 10.1111/j.1572-0241.2008.01848.x.
40. Vande Casteele N, Herfarth H, Katz J, Falck-Ytter Y, Singh S. American Gastroenterological Association Institute Technical Review on the role of therapeutic drug monitoring in the management of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. (2017) 153:835–57.e6. doi: 10.1053/j.gastro.2017.07.031.
41. Selvestrel D, Stocco G, Aloï M, Arrigo S, Cardile S, Cecchin E, ... & Bramuzzo M. (2023). DNA methylation of the TPMT gene and azathioprine pharmacokinetics in children with very early onset inflammatory bowel disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 157, 113901.

42. Sluiter, R. L., Van Marrewijk, C., De Jong, D., Scheffer, H., Guchelaar, H. J., Derijks, L., ... & Coenen, M. J. (2019). Genotype-guided thiopurine dosing does not lead to additional costs in patients with inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, 13(7), 838-845.
43. Burchard PR, Abou Tayoun AN, Lefferts JA, et al. Development of a rapid clinical TPMT genotyping assay. *Clin Biochem* 2014; 47: 126–129.
44. Roy LM, Zur RM, Uleryk E, et al. Thiopurine S-methyltransferase testing for averting drug toxicity in patients receiving thiopurines: a systematic review. *Pharmacogenomics* 2016; 17: 633–656.
45. Cuffari C, Dassopoulos T, Turnbough L, et al. Thiopurine methyltransferase activity influences clinical response to azathioprine in inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 410–417.
46. Zalizko, P., Stefanovics, J., Sokolovska, J., Paramonova, N., Klavina, E., Erts, R., ... & Pukitis, A. (2020). Thiopurine S-methyltransferase genetic polymorphisms in adult patients with inflammatory bowel diseases in the Latvian population. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 13, 1756284820937426.
47. Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College Of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol*. 2010;105:501–23; quiz 524.
48. Roblin X, Peyrin-Biroulet L, Phelip JM, Nancey S, Flourie B. A 6-thioguanine nucleotide threshold level of 400 pmol/8 x 10⁸ erythrocytes predicts azathioprine refractoriness in patients with inflammatory bowel disease and normal TPMT activity. *Am J Gastroenterol*. 2008; 103:3115–3122.
49. Bär F, Sina C, Fellermann K. Thiopurines in inflammatory bowel disease revisited. *World J Gastroenterol*. 2013;19:1699–1706.
50. Roblin X, Peyrin-Biroulet L, Phelip JM, Nancey S, Flourie B. A 6-thioguanine nucleotide threshold level of 400 pmol/8 x 10⁸ erythrocytes predicts azathioprine refractoriness in patients with inflammatory bowel disease and normal TPMT activity. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:3115–3122.
51. Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV, Seidman EG, Kam LY, Abreu MT, Targan SR, Vasiliauskas EA. 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002;122:904–915.
52. Hakooz N, Arafat T, Payne D, Ollier W, Pushpakom S, Andrews J, Newman W. Genetic analysis of thiopurine methyltransferase polymorphism in the Jordanian population. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010;66:999–1003.
53. González-Del Angel A, Bermúdez-López C, Alcántara-Ortigoza MA, Vela-Amieva M, Castillo-Cruz RA, Martínez V, Torres-Espíndola L. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) genetic polymorphisms in Mexican newborns. *J Clin Pharm Ther*. 2009;34:703–708.
54. Souza MH, Troncon LE, Rodrigues CM, Viana CF, Onofre PH, Monteiro RA, Passos AD, Martinelli AL, Meneghelli UG. [Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in a university hospital in southeastern Brazil] *Arq Gastroenterol*. 2002;39:98–105.
55. Hakooz N, Arafat T, Payne D, Ollier W, Pushpakom S, Andrews J, Newman W. Genetic analysis of thiopurine methyltransferase polymorphism in the Jordanian population. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010;66:999–1003.
56. Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV, Seidman EG, Kam LY, Abreu MT, Targan SR, Vasiliauskas EA. 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002;122:904–915.

57. **Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, Wernet D, Moerike K, Eichelbaum M, Zanger UM, Schwab M.** Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics*. **2004** Jul;14(7):407-17. doi: 10.1097/01.fpc.0000114745.08559.db. PMID: 15226673.
58. **Krynetski E, Evans WE.** Drug methylation in cancer therapy: lessons from the TPMT polymorphism. *Oncogene* **2003**; 22:7403–7413.
59. **Lindquist M, Haglund S, Almer S, Peterson C, Taipalensu J, Hertervig E, et al.** Identification of two novel sequence variants affecting thiopurine methyltransferase enzyme activity. *Pharmacogenetics* **2004**; 14: 261–265.
60. **Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, Wernet D, Moerike K, Eichelbaum M, Zanger UM, Schwab M.** Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics*. **2004** Jul;14(7):407-17. doi: 10.1097/01.fpc.0000114745.08559.db. PMID: 15226673.
61. **Sandborn, W. J. (2009).** The Future of Inflammatory Bowel Disease Care. *Rev. Gastroenterol. Disord.* 9 (3), E69–E77.
62. **Moriyama, T., Nishii, R., Perez-Andreu, V., Yang, W., Klussmann, F. A., Zhao, X., et al. (2016).** NUDT15 Polymorphisms Alter Thiopurine Metabolism and Hematopoietic Toxicity. *Nat. Genet.* 48 (4), 367–373. doi:10.1038/ng.3508
63. **Relling, M. V., Gardner, E. E., Sandborn, W. J., Schmiegelow, K., Pui, C. H., Yee, S. W., et al. (2011).** Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Thiopurine Methyltransferase Genotype and Thiopurine Dosing. *Clin. Pharmacol. Ther.* 89 (3), 387–391. doi:10.1038/clpt.2010.320
64. **Yang, J. J., Landier, W., Yang, W., Liu, C., Hageman, L., Cheng, C., et al. (2015).** The inherited NUDT15 Variant Is a Genetic Determinant of Mercaptopurine Intolerance in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 33 (11), 1235–1242. doi:10.1200/jco.2014.59.4671
65. **Gearry, R. B., and Barclay, M. L. (2005).** Azathioprine and 6-mercaptopurine Pharmacogenetics and Metabolite Monitoring in Inflammatory Bowel Disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 20 (8), 1149–1157. doi:10.1111/j.1440-1746.2005.03832.x
66. **Vikingsson, S., Almer, S., Peterson, C., Carlsson, B., and Josefsson, M. (2013).** Monitoring of Thiopurine Metabolites - a High-Performance Liquid Chromatography Method for Clinical Use. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 75, 145–152. doi:10.1016/j.jpba.2012.11.027
67. **Cangemi, G., Barabino, A., Barco, S., Parodi, A., Arrigo, S., and Melioli, G. (2012).** A Validated HPLC Method for the Monitoring of Thiopurine Metabolites in Whole Blood in Paediatric Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Int. J. Immunopathol Pharmacol.* 25 (2), 435–444. doi:10.1177/039463201202500213
68. **Yoo, I. Y., Lee, K., Ji, O. J., Woo, H. I., and Lee, S. Y. (2018).** Evaluation of Stability of Thiopurine Metabolites Using a Validated LC-MS/MS Method. *Ann. Lab. Med.* 38 (3), 255–260. doi:10.3343/alm.2018.38.3.255
69. **Bajaj, A. O., Kushnir, M. M., Kish-Trier, E., Law, R. N., Zuromski, L. M., Molinelli, A. R., ... & Johnson-Davis, K. L. (2022).** LC-MS/MS Method for Measurement of Thiopurine Nucleotides (TN) in Erythrocytes and Association of TN Concentrations With TPMT Enzyme Activity. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 836812.

70. Gargallo-Puyuelo, C. J., Laredo, V., & Gomollón, F. (2021). Thiopurines in Inflammatory Bowel Disease. How to optimize thiopurines in the biological era? *Frontiers in Medicine*, 8, 681907.
71. Desai, D., Jena, A., Sharma, V., & Hibi, T. (2023). Time to incorporate preemptive NUDT15 testing before starting thiopurines in inflammatory bowel disease in Asia and beyond a review. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 16(7), 643-653.
72. Chang, J. Y., Park, S. J., Jung, E. S., Jung, S. A., Moon, C. M., Chun, J., ... & Cheon, J. H. (2020). Genotype-based treatment with thiopurine reduces the incidence of myelosuppression in patients with inflammatory bowel diseases. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 18(9), 2010-2018.
73. Matsuoka, K. (2020). NUDT15 gene variants and thiopurine-induced leukopenia in patients with inflammatory bowel disease. *Intestinal Research*, 18(3), 275-281.
74. Kahlin, A. Z., Helander, S., Skoglund, K., Söderkvist, P., Mårtensson, L. G., & Appell, M. L. (2019). A comprehensive study of thiopurine methyltransferase genotype, phenotype, and genotype-phenotype discrepancies in Sweden. *Biochemical Pharmacology*, 164, 263-272.
75. Zalizko, P., Stefanovics, J., Sokolovska, J., Paramonova, N., Klavina, E., Erts, R., ... & Pukitis, A. (2020). Thiopurine S-methyltransferase genetic polymorphisms in adult patients with inflammatory bowel diseases in the Latvian population. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 13, 1756284820937426.
76. Banerjee, R., Ravikanth, V. V., Pal, P., Bale, G., Avanthi, U. S., Goren, I., ... & Reddy, D. N. (2020). NUDT15 C415T variant compared with TPMT genotyping in predicting azathioprine-induced leucopenia: prospective analysis of 1014 inflammatory bowel disease patients in India. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 52(11-12), 1683-1694.
77. Ribaldone, D. G., Adriani, A., Caviglia, G. P., De Nicolò, A., Agnesod, D., Simiele, M., ... & Astegiano, M. (2019). Correlation between thiopurine S-methyltransferase genotype and adverse events in inflammatory bowel disease patients. *Medicina*, 55(8), 441.
78. Eltantawy, N., El-Zayyadi, I. A. E. H., Elberry, A. A., Salah, L. M., Abdelrahim, M. E., & Kassem, A. B. (2023). Association of genetic polymorphism of NUDT15, TPMT, and ITPA gene in the toxicity and efficacy of azathioprine-based regimen in Egyptian inflammatory bowel disease patients. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 12(1), 14.
79. Walker, G. J., Harrison, J. W., Heap, G. A., Voskuil, M. D., Andersen, V., Anderson, C. A., ... & IBD Pharmacogenetics Study Group. (2019). Association of genetic variants in NUDT15 with thiopurine-induced myelosuppression in patients with inflammatory bowel disease. *Jama*, 321(8), 773-785.
80. Pashazadeh, P., Marjani, A., Asadi, J., & Khoshnia, M. (2019). Thiopurine methyltransferase genetic polymorphisms and activity and metabolic products of azathioprine in patients with inflammatory bowel disease. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 19(4), 541-547.
81. Gutiérrez-Valencia, M., Leache, L., Saiz, L. C., Beloqui, J. J., Barajas, M., Vicuña, M., & Erviti, J. (2023). Role of pharmacogenomics in the efficacy and safety of thiopurines in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 57(7), 671-685.
82. Kim, H., You, S., Park, Y., Choi, J. Y., Ma, Y., Hong, J., et al. (2021). Interplay between IL6 and CRIM1 in thiopurine intolerance due to hematological toxicity in leukemic patients with wild-type NUDT15 and TPMT. *Scientific Reports*, 11, 12345. doi: 10.1038/s41598-021-88963-5. PMID: 33958640; PMCID: PMC8082176.

83. **Martínez, E., Céspedes, V., Robles-Alonso, L., Castellote, D., et al. (2024).** P798 Study of the concordance between the enzymatic activity of Thiopurine S-methyltransferase and polymorphisms in the TPMT gene in patients with Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's and Colitis*. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjad212.0928.
84. **Canuto, G., Corazza, G., Ciccocioppo, R., et al. (2022).** Thiopurine-methyltransferase polymorphisms and thiopurine-related adverse events in Italian patients with inflammatory bowel disease: A nationwide study. *Inflammatory Bowel Diseases*, 28(10), 3353-3363.
85. **Murugesan R, Vahab SA, Patra S, Rao R, Rao J. , et al.** Thiopurine S-methyltransferase alleles, TPMT(*)2, (*)3B and (*)3C, and genotype frequencies in an Indian population. *Exp Ther Med*. 2010 Jan;1(1):121-127. doi: 10.3892/etm_00000021. Epub 2010 Jan 1. PMID: 23136604; PMCID: PMC3490340.
86. **Ali., Awol, Haileyesus, Adam., Daniel, Hailu., Ephrem, Engidawork., et al. (2023).** Genetic variants of genes involved in thiopurine metabolism pathway are associated with 6-mercaptopurine toxicity in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients from Ethiopia. *Frontiers in Pharmacology*, doi: 10.3389/fphar.2023.1159307
87. **Martínez., E., Céspedes, V, Robles-Alonso., L., Castellote., D., et al. (2024).** P798 Study of the concordance between the enzymatic activity of Thiopurine S-methyltransferase and polymorphisms in the TPMT gene in patients with Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, doi: 10.1093/ecco-jcc/jjad212.0928
88. **Davis., Alyssa, Alyson, L, Dickson., Laura, L., Daniel., Puran. , et al. (2023).** Association Between Genetically Predicted Expression of TPMT and Azathioprine Adverse Events. *Research square*, doi: 10.21203/rs.3.rs-2444787/v1
89. **Sheu., Heh-Shiang, Yi, Ming, Chen., Yi-Ju, Liao., Chia-Yi. , et al (2022).** Thiopurine S-Methyltransferase Polymorphisms Predict Hepatotoxicity in Azathioprine-Treated Patients with Autoimmune Diseases. *Journal of Personalized Medicine*, doi: 10.3390/jpm12091399
90. **Sayıtoğlu MA, Yıldız İ, Hatırnaz Ö, Özbek U.** Common Cytochrome p4503A (CYP3A4 and CYP3A5) and Thiopurine S-Methyl Transferase (TPMT) Polymorphisms In Turkish Population. *Turkish Journal of Medical Sciences* 2006; 36: 11-15.
91. **Tümer T, Çetingül N, Akar N, Cin Ş.** The low frequency of defective TPMT alleles in Turkish population: A study on pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *American Journal of Hematology* 2007; 82: 906–910. doi:10.1002/ajh.20949.
92. **Akın DF, Aşlar-Öner D, Kürekçi E, Akar N.** Frequency of thiopurine S-methyltransferase gene variations in Turkish children with acute leukemia. *Turk J Pediatr* 2018; 60: 147-152.
93. **Albayrak M, Konyssova U, Kaya Z, Gursel T, Guntekin S, Percin EF, Kocak U.** Thiopurine methyltransferase polymorphisms and mercaptopurine tolerance in Turkish children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 68: 1155–1159. doi:10.1007/s00280-011-1599-7.

EKLER

Ek-1. Etik Kurul Kararı

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Sayısı		Tarih
115		1 Ekim 2021

KARAR NO 19- Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda, Doç. Dr. Zafer Yönden yönetiminde, Araş. Gör. Yusuf Doğuş'un katkılarıyla, Doktora Öğrencisi Amin Daemi tarafından yürütülmesi öngörülen, "İnflamatuvar Bağırsak Hastalarında Tiopurin Metiltransferaz Varyantları" başlıklı doktora tez projesi araştırma etiği yönünden değerlendirildi. Toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

BAŞKAN	Prof Dr Selim Kadioğlu Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	
ÜYELER	Prof Dr Davut Alptekin Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
	Prof Dr Dinçer Yıldızdaş Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	
	Prof Dr Gülşah Seydaoğlu Biyoistatistik Anabilim Dalı	
	Prof Dr Gürhan Sakman Genel Cerrahi Anabilim Dalı	
	Doç Dr Zehra Hatipoğlu Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı	
	Doktor Öğretim Üyesi Yasemin Saygıdeğer Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	
	Av Simay Sönmezates Hukukçu Üye	Toplantıya Katılmadı
	Dr Neşe Kayrın Kurum Dışı Üye	Toplantıya Katılmadı

Teşekkürler

Bu tez, birçok bireyin destek ve rehberliği olmadan mümkün olmazdı. Araştırma yolculuğum boyunca bana gösterdikleri sarsılmaz destek, teşvik ve içgörülü geri bildirimler için danışmanım Doç. Dr. Zafer YÖNDEN'na en derin minnettarlığımı ifade etmek isterim. Yeteneklerime olan inançları ve bu tezi mevcut formuna şekillendirmedeki rehberlikleri için minnettarım.

Komite üyelerim Prof. Dr. Mehmet Akif ÇÜRÜK ve Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ'na tezime yaptıkları değerli katkılardan dolayı teşekkür ederim. Araştırma konusunu anlamamı şekillendirmede ve bulgularımın sunumunu iyileştirmede uzmanlıkları ve içgöruları önemli olmuştur.

Tez sınav jürilerim olan Prof. Dr. Tamer C. İNAL, Prof. Dr. Bertan Yılmaz, Prof. Dr. Oğuzhan Özcan, Doç. Dr. Zafer Yönden ve Öğr. Üyesi Dr. Hamdi Oğuzman'a, tezimi değerlendirdikleri ve değerli bilimsel yorumlarıyla katkıda bulundukları için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Araştırma protokolümün dikkatli incelemesi ve onayı için Etik Kurul ve Araştırma Etik Komitesi'ne de minnettarım. Araştırmanın etik yürütülmesini sağlamadaki özenleri, bilimsel araştırmanın bütünlüğü için hayati öneme sahiptir.

Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'nın (YTB) bursu ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne, doktora eğitimim için uygun bir ortam sağladıkları için, ayrıca BAP'a (Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi) projeme sağladıkları finansal destekten dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmama zamanlarını ve verilerini katkıda bulunarak izin veren çalışmamın katılımcılarına da minnettarım. Bu cömertlik, TPMT genotiplerinin İBD ve tiopürin tedavisi üzerindeki etkileri hakkında değerli içgörüler kazanmama olanak tanımıştır.

Bu araştırma için maddi destek sağlayan BAP(Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi) 'a da minnettarım. Fonları, bu çalışmayı gerçekleştirmeme ve bulgularımı daha geniş bilimsel topluluğa yaymama olanak tanımıştır.

Akademik yolculuğum boyunca bana gösterdikleri sarsılmaz destek için aileme ve arkadaşlarıma da teşekkür ederim. Onların teşviki ve bana olan inançları, güç ve motivasyon kaynağı olmuştur.

ÖZGEÇMİŞ

Amin I
ortaoku
2005 ya
mezun
alanında
recomb
vaccine
Bolhass
arasında
araştırm
Biyokin
eğitimi
Çukuro
eğitimin