

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**VARFARİN KULLANAN HASTALARDA
VİTAMİN K EPOKSİT REDUKTAZ 1 GEN
POLİMORFİZMLERİ VE VARFARİN DOZ İLİŞKİSİ**

GÜLAY ÖNER ÖZGÖN

**DANIŞMAN
PROF DR TURGUT ULUTİN**

**GENETİK ANABİLİM DALI/GENETİK ORTAK
PROGRAMI**

İSTANBUL-2007

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak — *Doktora* — tezi olarak kabul edilmiştir.

03/07/2007

Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Genetik
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☐ Doktora ☒
Anabilim Dalı : DETAE
Tez Sahibi : Gülay ÖZGÖN
Tez Başlığı : Varfarin Kullanan Hastalarda Vitamin K Epoksit Reduktaz 1 Gen Polimorfizmleri ve Varfarin Doz İlişkisi
Sınav Yeri : İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D
Sınav Tarihi : 25 / 06 / 2007

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1.Prof.Dr.Turgut ULUTİN

2.Prof.Dr.Nur BUYRU

3.Prof.Dr.Nihan ERGİNEL ÜNALTUNA - *Düzeltilme önerileri şerhi ile*

4.Prof.Dr.Ece GENÇ

5.Prof.Dr.Aydın BARLAS

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Gülay  ner  zg n

Sevgili ELA'ya

TEŞEKKÜR

Daha Tıp Fakültesi Öğrencisi iken, içimde Genetik Tutkusunu uyandıran Saygıdeğer Hocam Prof Dr Asım Cenani'ye

Yine öğrenciliğim ve doktora eğitimim süresince bana destek veren ve güvenen Sayın Danışmanım Prof Dr Turgut Ulutin'e, Tez çalışmamın önemli bir bölümünü laboratuvarında yapmama izin veren, duruşu ve davranışıyla örnek aldığım Hocam Prof Dr Nur Buyru'ya,

Doktora eğitimimde 4 yıl süresince birlikte çalışmaktan, tartışmaktan ve ekibinden olmaktan gurur duyduğum, Tez konumu öneren Prof Dr Uğur Özbek'e, tez jürimde bulunan Prof Dr Nihan Erginel-Ünaltuna'ya

Eğitimim süresince bilgileri ile örnek aldığım, ve eksiklerimi tamamlamak için çaba gösteren Sayın Hocalarım Prof Dr Memnune Yüksel Apak, Prof Dr Hülya Kayserili, Prof Dr Beyhan Tüysüz ve Prof Dr Adnan Yüksel'e,

DNA bankasını oluştururken ilgisini ve bilgisini esirgemeyen Prof Dr Aksel Siva'ya,

İstatistik bilgisini esirgemeyen her zaman ağabey olan Prof Dr Öner Süzer'e

DETAM'da çalıştığım sürece, bilgilerini esirgemeyen Sevgili Meslektaşlarıma,

Laboratuardaki deneyimlerine ortak eden Yard Doç Duran Üstek, Dr Sema Sırma, Dr Neslihan Abacı ve Dr Fahri Akbaş'a, Sevgili Asiye Kasapoğlu'na,

Her zaman Kardeşçe ve Dostlukla sarılacağım Sevgili Uz Biyo Filiz Güçlü'ye;

Herzaman desteğim olan Anneme, Babama ve Kardeşlerime;

Benim için bir Rüya olan Genetik eğitimimi almam için hiçbir maddi ve manevi destekten kaçınmadan, bu tez için benimle dünyanın öteki ucuna dahi gelen Sevgili Eşim Uz Dr Mustafa Özgön'e

Teşekkür ve Şükranlarımı Sunarım....

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-890/02062006

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Pıhtılaşma (Koagülasyon)	3
Pıhtılaşma testleri	4
Doğal Antikoagulan Mekanizmalar.....	4
Trombus Oluşması.....	5
2.2. Antikoagülan ilaçlar.....	6
Varfarinin vücutta dağılımı ve K vitaminin hepatik alımı.....	9
K vitamini Siklusu	9
VKORC1 geninin tanımlanması	12
2.3. Farmakogenetik nedir?.....	16
Farmakokinetik'in Genetik Olarak tanımlanması	20
Kodlamayan bölge Varyantları	23
Değişken İlaç Transportu	23
Farmakodinamik'in Genetik Olarak Tanımlanması	27
İlaç Hedefini Kodlayan Genlerdeki Değişiklik.....	27
İlacın etki ettiği biyolojik içeriğin değişkenliği	27
İlaç Yanıtının Tanımlanması.....	28
İlaç Yanıtını Değiştiren Genlerin Tanımlanması ile İlgili Gelişen Yaklaşımlar.....	28
Hastalık Fenotipleri	29
Genom Taramaları.....	29

Bulguların Kliniğe Yansıması	29
2.4. CYP2C9	30
2.5. MDR1 (ABCB; P-gp)	34
Moleküler yapısı.....	34
Gen Yapısı.....	34
2.6. VKORC1	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1. Gereçler.....	37
Hastaların Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri	37
Hastaların kullandıkları ilaçların değerlendirilmesi	37
VKORC1 SNP Seçimi	38
Katılımcılar için Bilgilendirilmiş Onam Formu	38
BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU	40
HASTA BİLGİ FORMU	41
Kimyasallar	42
Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	43
3.2. Yöntemler.....	45
Periferik kandan Kit ile DNA izolasyonu.....	45
DNA konsantrasyonu ve Saflığının Ölçümü.....	45
PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	46
Agaroz Jel Elektroforezi	49
Pyrosequencing	50
Dizileme Analizi.....	54
4. BULGULAR.....	59
4.1. DEMOGRAFİK VERİLER	59
4.2. VKORC1 G3673A sonuçları ve varfarin doz ilişkisi	61
4.3. CYP2C9 Polimorfizmleri Sonuçları ve Varfarin Doz ilişkisi	65
4.4. MDR1 C3435T Genotipleri ve Varfarin Doz ilişkisi	71
4.5. Kanama Yan etkisinin Genotiple İlişkisi	74
4.6. Tromboemboli Yan etkisinin Genetik polimorfizmler ile İlişkisi	74
4.7. İdame Varfarin Dozu için Multipl Linear regresyon analizi.....	75
4.8. VKORC1 3' ucu Dizileme Sonuçları	76
5. TARTIŞMA	81

KAYNAKLAR	87
FORMLAR	99
Varfarin Farmakogenetiği araştırmasında hasta bilgi toplama formu	102
ETİK KURUL KARARI	103
ÖZGEÇMİŞ	104
Ulusal Kongrelerdeki sözlü Sunumlar	106

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.2-1: Tromboemboliye yatkınlık yaratan risk faktörleri	6
Tablo 2.2-2: Varfarin tedavisinde hastaların VKORC1 polimorfizmi ve doz	11
ilişkisini gösteren çalışmalara örnekler	
Tablo 2.4-1 CYP2C9 polimorfizmlerinin etnik farklılıkları.....	33
Tablo 2.6-1 CYP2C9 substrat, inhibitör ve indükleyicilerine örnekler.....	36
Tablo 3.2-1 Kullanılan primer dizileri ve bağlanma ısıları.....	47
Tablo 3.2-2 PZR reaksiyon koşulları.....	48
Tablo 3.2-3 Kullanılan primerlerin ilgili dizilerde gösterilmesi.....	57
Tablo 4.1-1 Demografik veriler.....	60
Tablo 4.1-2 Birlikte kullanılan ilaçların etkileşim açısından değerlendirilmesi.....	60
Tablo 4.1-3 Hastalarda varfarin dozları ve INR.....	61
Tablo 4.2-1 VKORC1 3673 polimorfizmleri ve ortalama varfarin doz ilişkisi.....	64
Tablo 4.2-2 VKORC1 genotipleri ile varfarin doz ilişkisinin karşılaştırılması.....	65
Tablo 4.3-1 CYP2C9 polimorfizmleri ve ortalama varfarin doz ilişkisi.....	70
Tablo 4.3-2 CYP2C9 genotiplerinin varfarin doz ilişkisinin karşılaştırılması.....	70
Tablo 4.4-1 MDR1 polimorfizmleri ve varfarin doz ilişkisi.....	73
Tablo 4.5-1 Kanama yan etkisi ile genotip ilişkisi.....	74
Tablo 4.7-1 Ortalama haftalık varfarin dozunun 3 bağımsız değişkenle ilişkisi.....	75
Tablo 4.8-1 VKORC1 3' G/A polimorfizminin haftalık varfarin dozu ile ilişkisi.....	79
Tablo 4.8-2 VKORC1 3' G/A polimorfizminin INR ile ilişkisi.....	79

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.2-1 Varfarin molekülü.....	7
Şekil 2.2-2 Varfarin metabolizması ve K vit siklusu.....	10
Şekil 2.2-3 Pıhtılaşma Kaskadı.....	14
Şekil 2.2-4 Prokoagülan faktörlerin molekül yapısı.....	15
Şekil 2.2-5 Fibrinolitik faktörlerin molekül yapısı.....	15
Şekil 2.2-6 Şekillerin açıklaması.....	16
Şekil 2.3-1 Farmakokinetik ve farmakodinamiğin şema şeklinde gösterilmesi.....	18
Şekil 2.3-2 Farmakokinetikte yer alan metabolizma enzimlerinin dağılımı.....	19
Şekil 2.3-3 Taşıyıcıların hücre içinde yerleşimleri ve hücrede çalıştıkları yön.....	24
Şekil 2.3-4 ABC ailesinin korunma ve homoloji gösteren bölgeleri.....	25
Şekil 2.3-5 ABC ailesinin hücre membranında şematik olarak yerleştirilmeleri.....	27
Şekil 2.4-1 CYP2C9 gen yapısı.....	30
Şekil 2.4-2 CYP2C9 polimorfizmleri şeması.....	32
Şekil 2.6-1 VKORC1 gen yapısı.....	35
Şekil 3.2-1 Ppilerin açığa çıkması.....	51
Şekil 3.2-2 Nukleotid bağlanmalarının ışığa dönüşmesi.....	52
Şekil 3.2-3 Apiraz enziminin bağlanmayan nukleotidleri degrade etmesi.....	52
Şekil 3.2-4 Eklenen nukleotidlerin ekrandan izlenmesi.....	52
Şekil 3.2-5 CYP2D6'nın Pyrosequencing ile incelenmesi.....	53
Şekil 2.1-1 VKORC1 3673 polimorfizmi için PCR sonrası jel görüntüsü (197bp).....	62
Şekil 4.2-2 VKORC1 3673 SNP G/A.....	62
Şekil 4.2-3 VKORC1 3673 GG.....	63
Şekil 4.2-4 VKORC1 3673 AA.....	64
Şekil 2.1-1 CYP2C9*2 PZR sonrası jel görüntüsü (455 BÇ;100bp DNA Ladder PROMEGA).....	65
Şekil 4.3-2 CYP2C9*2 CT	66
Şekil 4.3-3 CYP2C9*2 CC.....	67
Şekil 4.3-4 CYP2C9*2 TT.....	67

Şekil 4.3-5 CYP2C9*3 GG, *4 AA, *5 TT.....	68
Şekil 4.3-6 CYP2C9*3 GG, *4 AG, *5 TT.....	68
Şekil 4.3-7CYP2C9*3 GG, *4 AA, *5 GG.....	69
Şekil 4.3-8 CYP2C9*3 GG, *4 AA, *5 TG.....	69
Şekil 4.4-1 MDR1 3435 CT.....	72
Şekil 4.4-2 MDR1 3435 CC.....	72
Şekil 4.4-3 MDR13435 TT.....	73
Şekil 2.1-1 VKORC1 3' ucu PZR ve purifikasyon sonrası jel görüntüsü	74
Şekil 2.1-1 626. pozisyonda G/A nukleotid değişikliği.....	77
Şekil 2.1-3 VKORC1 3' bölgesinde saptanan polimorfik örnekler.....	77
Şekil 2.1-4 VKORC1 3' bölgesinde saptanan polimorfik örnekler.....	78
Şekil 2.1-5 VKORC1 3' bölgesinde saptanan polimorfik örnekler.....	78

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

CYP450: Sitokrom 450 enzim sistemi

VKORC1: Vitamin K Epoksit Reduktaz

ABC: ATP Binding Cassette

MDR1: Multidrug Resistance 1

aPTZ: Aktive edilmiş parsiyel tromboplastin zamanı

PZ: Protrombin Zamanı

INR: International Normalized Ratio

İSİ: Tromboplastinin uluslararası duyarlılık testi

APOE: Apolipoprotein E

NAT1: N-asetiltransferaz 1

NAT2: N-asetiltransferaz 2

UGT: UDP-glukuronozil transferaz

GST: Glutatayon S transferaz

TPMT: Thiopurine metiltransferaz

KCNH2: Potasyum voltaj kapılı kanal, H alt ailesi subfamily H, 2. üyesi

KCNJ11: Potasyumu içeri taşıyan kanal, J alt ailesi, 11. üyesi

P-gp: P-glycoprotein

Ppi: Pirofosfat

PZR: polimerize zincir reaksiyonu

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

ÖZET

Özgön Öner G.

Varfarin Kullanan Hastalarda Vitamin K Epoksit Reduktaz Gen Polimorfizmleri ve Varfarin doz İlişkisi.

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2007

Giriş ve Amaç: Terapötik aralığı dar olan Varfarin, tedavi esnasında bireylerarası çok farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklardan varfarin metabolizmasını, transportunu ve etki mekanizmasını etkileyen genlerin fonksiyonel varyantlarının sorumlu olduğu bilinmektedir. Bu çalışmanın temel amacı Türk toplumunda VKORC1, CYP2C9 ve MDR1 genlerinin polimorfizmlerinin varfarin dozu ile ilişkisini saptamaktır.

Metod: Stabil dozlarda varfarin alan hastalar (n=205) peşpeşe 3 vizit sonrasında çalışmaya kabul edildi. Kabul edilen tüm hastaların kullandıkları ilaçlar, var olan kronik hastalıkları, varfarin kullanılırken kanama veya emboli geçirme hikayeleri kaydedildi ve DNA örnekleri alınarak 205 kişilik DNA bankası oluşturuldu. Bu banka kullanılarak VKORC1, CYP2C9 ve MDR1 gen polimorfizmleri pyrosequencing metodu ile genotiplendirildi. Ortalama varfarin doz ihtiyacında genetik ve genetik olmayan bağımsız etkileri tanımlamak için regresyon analizi kullanıldı.

Sonuçlar: VKORC1 3673 polimorfizminin ortalama haftalık varfarin dozu ile ilişkisi GG genotipi için 43.18 mg/hafta, GA genotipi için 33.78 mg/hafta ve AA genotipi için 25.83 mg/hafta ($p<0.0001$) olarak saptandı. VKORC1 ve CYP2C9 varyantlarını taşıyan kişilerde %40 oranında daha az haftalık varfarin ihtiyacı olduğu belirlendi. VKORC1 3673 AA genotip ($p<.0001$), VKORC1 3673 GA genotip ($p<.0001$), CYP2C9 allelin 1 varyantı ($p<.0001$), CYP2C9 allelin 2 varyantları($p<.0001$), MDR1 3435'in heterozigot varyantları ($p<.036$), ve yaş($p<.0001$) düşük doz varfarinin birlikte olduğu değişkenler olarak saptandı.

Tartışma: Varfarinin hedef molekülünde ve varfarin metabolize eden enzimlerin genlerindeki polimorfizmlere ek olarak, ilaç etkileşimleri, yaş ve vücut yüzey alanının varfarin doz ihtiyacını tanımlamada önemlidirler.

Anahtar Kelimeler :Varfarin Farmakogenetiği, VKORC1, MDR1, CYP2C9, pyrosequencing metodu

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-890/02062006

ABSTRACT

Özgön Öner G.

Polimorphisms of Vitamine K epoxide reductase 1 gene and warfarin dose relations in warfarin treated patients.

İstanbul University, Institute of Health Science, Istanbul University, Institute of Health Science, Genetics Common Programme, Istanbul, 2007

Introduction: Warfarin has a narrow therapeutic range and wide interindividual dosing requirements that may be related to functional variants of genes affecting warfarin metabolism, transportation and activity. The primary objective of this study was to determine whether variability in warfarin dose requirements is determined by polymorphisms in VKORC1, CYP2C9 and MDR1 in Turkish population.

Method: Patients (n=205) receiving stable doses of warfarin at 3 consecutive visits were enrolled, they asked for all medicine, chronic illness, warfarin related bleeding or thromboemboli and a deoxyribonucleic acid sample was collected. Samples were genotyped for polymorphisms in VKORC1, CYP2C9 and MDR1. A linear regression analysis was used to determine the independent effects of genetic and nongenetic factors on mean warfarin dose requirements.

Results: VKORC1 3673 polymorphisms were associated with weekly mean warfarin dose; for GG genotype 43.18 mg/wk, GA genotype 33.78 mg/wk and for AA genotype 25.83 mg/wk ($p<0.0001$). It is observed that, patients who had VKORC1 and CYP2C9 variants, they need 40% less mean weekly warfarin dose respect to wild types. Variables associated with lower warfarin dose requirements were VKORC1 3673 AA genotype ($p<0.0001$), VKORC1 3673 GA genotype ($p<0.0001$), 1 variant CYP2C9 allele ($p<0.0001$), 2 variants of CYP2C9 alleles ($p<0.0001$) and heterozygous variants of MDR1 3435 ($p<0.005$), age ($p<0.0001$).

Conclusion: Polymorphisms in warfarin drug target and metabolizing enzyme genes, in addition to nongenetic factors, were important determinants of warfarin dose requirements.

Key Words: Warfarin Pharmacogenetics, VKORC1, MDR1, CYP2C9, pyrosequencing

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. T-890/02062006

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan genom projesinin tamamlanması ile birlikte, güncel tıp bireysel tedavi önerme yolunda ilerlemektedir. (1). Farmakogenetik, reçete edilecek ilaçların seçiminde genetik bilginin kullanılması, klinisyenler, bilim adamları ve özellikle kronik ilaç kullanan hastalar için umut kaynağı olmuştur. Farmakogenetik ile birlikte, reçetelenecek ilacın terapötik yanıtı arttırılmaya çalışarak hastaya ilacın verebileceği zarar en aza indirilmeye çalışılır. Farmakogenetik, kavram olarak bilim adamlarının ilgisini çok çekiyor olmasına rağmen, çevre ve davranış farklılıklarında ilacın etkilerinin ortaya çıkmasında önemli faktörler olduğunu unutmamak gerekir. Bu yeni genomik sürede, farmakogenomik birçok genin etkisi ile hastanın ilaca verdiği yanıtın etkilerini değerlendirilir (2-4).

Farmakogenetik kavramı literatüre 1950’lerde girdiği halde, son 10 yılda özellikle moleküler tıptaki gelişmelerle, ve kronik ilaç kullanılan hastalıklarda tedaviyi modifiye etmek açısından ümit olmuştur.

Varfarin venöz ve arteryel tromboembolik bozuklukların tedavi ve profilaksisinde dünyada en yaygın olarak kullanılan oral antikoagulan maddedir (5). Atrial fibrilasyon, tekrarlayan inme, derin ven trombozu, pulmoner emboli ve kalp kapağı protezinde profilaksi amacıyla kullanılır (6). Varfarinin terapötik aralığının dar olması ve etkisinin bireylerarası çok farklılık gösterdiğinden ötürü, tedaviye devam etmek oldukça güçtür (7). Uygun olmayan dozlarda, özellikle tedavinin başlangıç dönemlerinde, ağır kanamalara yol açması veya tromboemboliyi engellemede yetersiz korunmaya neden olabilir. Kişiler arası bu kadar farklı etkinin nedenleri arasında, cinsiyet, yaş, vitamin K alımı, eşzamanlı hastalık ve eşzamanlı ilaçlar sayılırken, son yıllarda ilacın farmakokinetiğinde ve farmakodinamiğindeki bireysel farklılıklar, ve bu farklılıkların ana nedeninin genetik değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Varfarinin CYP450 enzim sisteminden metabolize olduğunun keşfinden sonra, bu enzimdeki polimorfik değişikliklerin ilaç yanıtında ve hatta yan etkilerinde ilişkili olduğu gösterilmiştir. Özellikle varfarinin daha aktif formu S-varfarinin

%80-85 oranında metabolizmasından sorumlu olan CYP2C9 enziminin polimorfik yapılarının varfarinin metabolizmasını yavaşlattıkları gösterilmiştir (8-9). Varfarin duyarlılığı gösteren hastaların, ancak %10'unun varfarin doz ilişkileri CYP2C9 polimorfizm leri ile açıklanabilmektedir (10). Yapılan araştırmalar sonunda varfarin doz ayarlanmasında, varfarinin farmakolojik etkisini gösterdiği proteinlerin etkili olduğu düşünülmüştür.

Varfarinin hedef molekülünün 2004 yılında Vitamin K Epoksit Reduktaz proteini olduğu keşfedildikten sonra VKORC1 geni, tanımlandı (11-12). VKORC1 geninin sık rastlanan polimorfizmleri saptanarak bu polimorfizmlerin değişen varfarin doz ihtiyacı ile ilişkisi olduğu gösterildi (13-17). Yapılan çalışmalarda VKORC1 ve CYP2C9 polimorfizmlerinin birlikte değerlendirildiğinde, hastaların varfarin dozlarının %50'sinden fazlasının öngörülebildiği gösterilmiştir (17-18).

Varfarin farmakogenetiğinde rol aldığı düşünülen bir diğer basamak ise, varfarinin transportundan sorumlu ATP Binding Cassette (ABCB) grubundan MDR1'dir ki daha önce Wadelius M ve ark'nın yaptığı çalışmada, MDR1 C3435T polimorfizminin düşük doz varfarin dozu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak bu ilişki şimdiye kadar tek bir çalışmada gösterildiğinden, tekrar çalışılması ve olası ilişkinin gösterilmesi gerektiği diğer araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır (19-20).

Bununla birlikte, farklı toplumlarda yapılan çalışmalarda farklı sonuçlarda elde edilmiştir. Bu çalışma ile amacımız, Türk toplumunda varfarin kullanan hastaların, VKORC1, CYP2C9 ve MDR1 polimorfizmleri ve varfarin dozu, kanama eğilimleri, tromboemboli geçirme riski ve INR ile olan ilişkilerini saptamak ve ilgili polimorfizmleri Türk popülasyonunda frekanslarını bildirmektir. Bu çalışma kliniğe bire bir yardımcı olması açısından oldukça önem taşımaktadır. Bu testlerin yaygınlaşması, özellikle varfarin tedavisine alınmadan önce hastanın genotipine göre ilaç dozunun öngörülmesi hastanın hem kanama riskini hem de tromboemboli riskini azaltacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pıhtılaşma (Koagülasyon)

Pıhtılaşma; kanamanın durması (hemostaz) sırasında damar dışında, tromboz sırasında ise damar içinde meydana gelir. Pıhtılaşma; trombositlerin aktive edilmesine ve onlarla birlikte, çoğu plazmada bulunan pıhtılaşma faktörleri adlı özel proteinlerin etkileşmesine bağlı kompleks bir olaylar zinciridir. Hemostaz sırasında zedelenen damar çeperinde aktive edilen trombositler primer tıkaç oluştururken, plazma koagülasyon faktörlerini o bölgede aktive ederek lokal pıhtılaşma olayını başlatırlar (21)

Pıhtılaşma faktörlerinin önemli bir bölümü (faktör II, VII, IX, X, XI, XII ve prekallikrein) fonksiyonel bakımdan serin proteazlardır. Bu faktörler pıhtılaşma dışında plazmada inaktif prekürsör yani zimojen şeklinde bulunurlar. Faktör II, VII, IX ve X'un N ucuna yakın kısmında 9-12 adet glutamat rezidüsü, karaciğerdeki biyosentezinden sonra gamma karboksilasyona uğramasına neden olarak, faktörlerin Ca^{+2} bağlayarak pıhtılaşma için aktifleşmelerine müsaade eder. Bu faktörlerin aktivasyonu için diğer faktörlerden farklı olarak Ca^{+2} ve K vitaminine ihtiyaçları vardır. Faktör II'nin aktivasyonu sonucu trombin oluşur (22).

Faktör V, VIII ve doku faktörü ise non enzimatik protein kofaktörleridir. Faktör V plazmada serbest olarak ve trombositler içinde bulunurken, Faktör VIII damar endotelinde sentez edilip von Willebrand faktörüne bağlanmış olarak bulunur. Trombin faktör V ve faktör VIII'i aktive ederek faktör IX'un etkinliğini arttıırırlar. Bir diğer non enzimatik faktör ise, yüksek molekül ağırlıklı kininojendir. İn vivo değil in vitro tromboplastin testlerinde faktör XII'nin kofaktörü olarak pıhtılaşmaya katkıda bulunur (23).

In vivo pıhtılaşma ekstrinsik yolla başlarken in vitro pıhtılaşma intrinsik yolla başlar ve her ikisinde ortak yolla devam eder. Intrinsik yolla faktör IX, X, XI ve XII'yle başlayıp ortak yolla devam ederken; ekstrinsik yolla ise damar zedelenmesi ile başlayıp, faktör VII ve X'un aktivasyonu ile devam eder ve ortak yolla fibrin oluşmasını takip eder.

Pıhtılaşma yolağının ortak kısmı ise faktör Xa, Ca^{+2} , faktör Va ve trombosit kaynaklı fosfolipid miçellerinin yardımı ile protrombini trombine dönüştürerek başlar. Trombin fibrinojeni fibrine dönüştürür, trombosit aggregasyonunu uyarır (21).

Pıhtılaşma testleri

Plazmanın pıhtılaşma fonksiyonunun yeterli olup olmadığını kontrol etmek için iki in vitro test kullanılır:

Aktive edilmiş parsiyel tromboplastin zamanı: (aPTZ) kalsiyum şelatörü (disodyum EDTA veya sodyum sitrat) bir madde ile pıhtılaşmaz hale getirilmiş kana; tüp içinde rekalsifiye ettikten sonra sefalin veya benzeri negatif yüklü fosfolipid ve partiküllü bir madde (kaolin) ilave etmek suretiyle yapılır. Koagülasyonun intrinsek yolağını, faktör XII, HMW-K, prekallikrein, XI, IX ve VIII'in yeterli olup olmadığını gösterir.

Protrombin Zamanı (PZ): Bir kalsiyum şelatörü ile pıhtılaşmaz hale getirilmiş kanın rekalsifikasyonundan sonra 'tromboplastin' ilave edilerek yapılır. Doku faktörüne bağımlı yolağın yani ekstrinsek yolağın kontrolünü yapmak için uygulanır. Çeşitli ülkelerde farklı tromboplastin kaynağı kullanıldığında PZ'yi değerlendirmek, hastaların takibi açısından, zor olduğundan International Normalized Ration (INR) kavramı Uluslararası Trombofili derneğince kabul edilmiştir.

INR: (İlaç alan hastadaki PZ/ortalama normal kontrol PZ)^{isi}

İSİ: tromboplastinin uluslararası duyarlılık indeksi, ne kadar düşükse pıhtılaşma faktörlerine duyarlılığı okadar yüksektir.

Oral antikoagulan alanlarda, hastanın ilaca verdiği yanıtı izlemenin en iyi yolu PZ tayini ve INR takibidir (21).

Doğal Antikoagulan Mekanizmalar

Kanda sadece pıhtılaşmaya yol açan faktör ve mekanizmalar değil; onları baskılayıp dengeleyen antikoagulan mekanizmalarda vardır. Bu sayede normal ve bütünlüğü bozulmamış damarlar içinde tromboz olmaz. Antikoagulan mekanizmalar, damar endotelinden kaynaklanan antikoagulan

maddelere ve plazmada bulunan karaciğer kaynaklı antikoagülan faktörlere (proteinlere) bağlıdır. Plazmada bulunan antikoagülanların başlıcaları; antitrombin III (A III), protein C ve lipoproteine-eşlik eden koagülasyon inhibitörüdür. AIII ; trombin, faktör Xa, IXa ve XIIa ile kallikrein gibi intrinsek ve ortak yolağa katılan pıhtılaşma faktörlerini inaktive eder. Protein C, pıhtılaşma faktörlerine yapıca benzeyen ve sentezi için K vitaminine bağımlıdır. Kofaktörü de yine K vitaminine bağımlı olan protein S'dir. Herediter protein C defekti görülenlerde venöz tromboz riski artmaktadır (23).

Trombus Oluşması

Damar içinde trombus eğiliminin belirlenmesinde veya trombozun meydana gelmesinde, damar çeperinin durumu yanında, trombositlerin aktivasyonu, pıhtılaşma faktörleri rol oynar. Trombusun oluşumu; pıhtılaşma ve hemostaz olayına benzer ancak damar içinde olur. Trombusun bileşimini belirleyen faktör, olduğu yerdeki kan akımının niteliğidir. Venlerde ve arterlerde oluşan trombuslarda, oluşma mekanizması, bileşim ve diğer nitelikler bakımından önemli farklar vardır ve bu farklar yüzünden venöz ve arteriyel trombusun tedavileri de farklıdır. Venöz trombus, kan akımının yavaş olduğu büyük ven dallarının çeperlerinde, pıhtılaşma faktörlerinin eksikliğine bağlı olarak gelişir. Venöz trombus fibrinden zengindir, ve damara yapışan kısmından başka, lumende sarkan tarafla da akciğere veya başka damarlarda emboliye neden olabilir. Kalp boşluklarında oluşan trombozlarda venöz tipe benzediğinden, aynı emboli riskleri kalp trombuslarındada mevcuttur. Arteriyel trombus ise, endotel disfonksiyonu ve arter çeperinin bozulması sonucu trombositlerin aktivasyonu sonucu oluşur. Arteriyel trombuslar daha çok küçük damarları tıkayıcı olurlar; en sık da serebral trombuslarına neden olurlar (24).

Son yıllarda, tromboza ve embolizme duyarlı kişilerde yapılan genetik çalışmalar, hemostazda rol alan faktörlerin mutasyonlarının tromboemboliye yol açabildiği saptanmış, bu mutasyonları taşıyan kişilerin tromboemboli profilaksisine alınmaları tedavi protokollerine girmiştir.

2.2. Antikoagulan ilaçlar

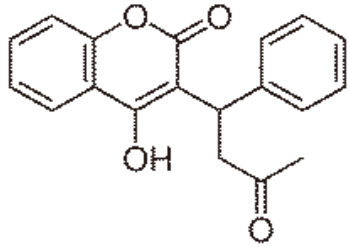
Antikoagulan faktör etkinliğini artırarak pıhtılaşma faktörlerinin etkinliğini veya sentezini bozarak pıhtılaşmayı inhibe eden ve böylece kanın koagülasyon yeteneğini azaltan ilaçlardır. Özellikle venöz trombuslarda etkilidirler, arteriyel trombozlarda etkinlikleri sınırlıdır. Antikoagulan ilaçlar etki mekanizmalarındaki farka göre ikiye ayrılırlar:

Table 2.2-1: Tromboemboliye yatkınlık yaratan risk faktörleri (22)

Kazanılmış risk faktörleri	Kalıtsal risk faktörleri
Postoperatif veya posttravmatik immobilizasyon	Faktör V mutasyonları
Konjestif kalp yetmezliği, Miyokard enfarktüsü, konstriktif perkardit	Protein C eksikliği
Sepsis	Protein S eksikliği
Kanser	Disfibrinojemi
Yaşlılık	Plazminojen bozuklukları
Daha önce geçirilmiş tromboembolizm	Kardiyak ritm problemleri
Östrojen tedavisi	Long QT sendromları
Lupus antikoagulan varlığı	
Polistemia vera	

Heparin: Antitrombin III etkinliğini arttırarak ve bazı pıhtılaşma faktörlerini inaktive ederek dolaysız etki yapar.

Oral Antikoagulanlar: Bu grupta, ensık kullanılan ilaç varfarindir, Kuzey Amerika ve Avrupa’da tromboembolik tedavi için en sık reçetelenen ilaçdır (25). Karaciğerde K vitaminine bağımlı olarak yapılan faktörlerin (Faktör II, VII, IX ve X) sentezinin esas olarak son basamağını bozarak dolaylı etki yaparlar. Ağız yoluyla alınmaları günümüzde en sık kullanılan antikoagülan olmalarını sağlamaktadır. Ancak koagülasyonun hemen inhibe edilmesi gereken durumlarda işe yaramazlar; etkileri tedaviye başladıktan sonra en az 24 saatlik latent sürenin ardından belirlemeye başlar. Vitamin K’nın sentezini etkilediğinden ötürü, aynı şekilde tedaviye son verdikten sonra bile ilacın etkisi birkaç gün devam eder.



varfarin

Figure 2.2-1Varfarin molekülü

Atrial Fibrilasyon, tekrarlayan inme, derin ven trombozu, pulmoner emboli ve kalp kapağı protezi taşıyan hastalarda kullanılır (6,26). Terapötik aralığı dar olan bir ilaç olduğu için, terapötik cevabının belirli aralıklarla protrombin zamanı veya INR ile takip edilmesi gerekmektedir (27). Özellikle tedavi başlangıcında, doğru olmayan dozlar kanama veya tromboemboli riski taşımaktadır (28).

Klinik olarak kullanılan varfarin kimyasal karışımdır; (S) varfarin (R) varfarinden 5 kez daha kuvvetli bir antikoagülandır ve günümüzde

kullanılan varfarin bu iki kimyasaldan oluşmuştur (29). (S) varfarin insanlarda sitokrom P450 ailesinden IIC alt ailesinin, 9. polipeptidi (CYP2C9) tarafından 7 hidroksile formuna dönüşmektedir (9). Günümüze kadar CYP2C9'un 50'den fazla varyantı tanımlanmıştır (30). Varfarin etkisini, vitamin K'ya bağımlı olan Faktör II, VII, IX ve X'un gamma karboksilasyonuna yol açan, vitamin K'nın 2,3-epoksidini azaltarak vitamin K'nın rejenerasyonunu etkileyerek gösterir. Tam olarak etkisini vitamin K epoksit redüktaz'a gösterir ki; bu enzim vitamin K epoksit reductaz complex subunit 1 tarafından kodlanır (11-12). Varfarin resistansı veya vitamin K'ya bağımlı faktörlerde bozukluğu olan ailelerde yapılan çalışmalarda VKORC1 proteininde aminoasit değişikliğine yol açan ve genel popülasyonda rastlanmayan mutasyonlar tesbit edilmiştir (11,31). Son olarak, bazı gruplar ise VKORC1 genindeki non kodlamayan SNP'lerin varfarin duyarlılığını etkilediklerini göstermişlerdir (14-17). Tüm bu veriler ise, CYP2C9 ve VKORC1 genetik farklılıkları varfarin duyarlılığını ve varfarin doz ihtiyacındaki değişkenliği kuvvetli olarak desteklemektedir.

Varfarinin oral kullanımından sonra, tamamı emilir ve %99'u plazmada albumine ve alfa-1 asit glikoproteine bağlanır. Albumine bağlı olmayan, serbest varfarin biyolojik olarak aktif olacağı karaciğer tarafından alınır ve sitokrom P450 (CYP) enzim sistemi ile metabolize olur. S-enantiomeri CYP2C9 tarafından 7 hidroksi varfarine dönüştürülüp safraya atılırken, R enantiomeri CYP1A1, CYP1A2 ve CYP3A4 ile metabolize edilerek inaktif alkole dönüştürülerek idrarla atılır (32). CYP2C9'un yabani tip allel için homozigot olan hastalarda (CYP2C9*1) S-warfarinin metabolize edilmesi sonucunda, INR'nin orta derecede artışı gözlenmiştir. Bu duruma karşıt olarak, bu gende iki SNP varlığında, S-varfarin metabolizması değişmektedir. Exon 3'te var olan SNP (CGT>TGT) CYP2C9*2 olarak isimlendirilirken, ekzon 7'de (ATT>CTT) olan SNP ise CYP2C9*3 olarak isimlendirilir. Bu iki SNP'in birini veya ikisini taşıyan hastaların varfarin doz ihtiyacının azaldığı ve varfarin başlarken oluşabilecek yan etkilerin 2-3 kat arttığı gösterilmiştir (33-35).

İnhibisyon çalışmalarında, varfarinin hücre membranından geçişi, örneğin karaciğerde, ABCB1 tarafından kodlanan p-glycoprotein (P-gp; multidrug resistance protein 1) aracılık ettiği gösterilmiştir. Böyle bir taşınma olmasına rağmen varfarinin biyoyararlanımının iyi olması da tezat yaratmaktadır. ABCB1 polimorfizmlerinin mRNA ve protein ekspresyonu değişiklikleri ve farklı ilaçların farmakokinetik değişiklikleri ile ilgili olduğu gösterilmiştir (36). En yaygın olarak çalışılan varyantı ekzon 26'daki C3435T'nın, ilaç etkinliklerine etkisi ile ilgili yapılan birçok çalışmada birbiriyle çelişen sonuçlar elde edilmiştir (36-39). Wadelius M ve arkının yaptığı çalışmada C3435T varyantının daha az varfarin dozuna ihtiyaç duyan hastalarda overekspresse olduğu gösterilmiştir (6).

Varfarinin vücutta dağılımı ve K vitaminin hepatik alımı

Varfarin karaciğerdeki vitamin K epoksit reduktaz kompleksini hedeflediği için vitamin K siklusu ile etkileşmektedir. Çok yüksek miktarlarda yağda çözünebilen k vitaminin alınması varfarin etkisini geri döndürebilir ve diyetle alınan vitamin K miktarına dikkat edilmemesi antikoagülasyonun iyi kontrol edilememesi ile sonuçlanır (40). Diyetteki yağ ile birlikte vitamin K1 ince barsaklardan emilir, şilomikronlarla kana taşınır ve karaciğerde APOE reseptörleri aracılığı ile temizlenir (41-43). Şilomikronların ve dolayısıyla da K vitaminin karaciğerde farklı APOE alleleri tarafından alınma oranları farklıdır. APOE alleleri ve varfarin dozlamı arasında ilişki açısından birçok çalışma yapılmış ve özellikle İsveçli çalışmacıların yaptığı çalışmada APOE*4 için homozigot olanların daha yüksek varfarine ihtiyaç duydukları gösterilmiştir (44). Visser ve arkının yaptığı çalışmada yine isveç grubu ile aynı sonuçları bulmuşlardır (46). Ancak aynı çalışmayı italyanlar yaptığında E4 alleli seyrek olduğu için varfarin doz ihtiyacı ile bir ilişki saptanmamıştır (44).

K vitamini Siklusu

K vitamini siklusunda yer alan genlerin varfarine yanıtta önemli rol oynadıkları gösterilmiştir. VKORC1 geninin keşfedilmesinden sonra, yapılan birçok çalışmalar VKORC1 genindeki bazı SNP'lerin, bazı toplumlarda varfarin sürdürme dozu ile ilişkili bulunmuşlardır.

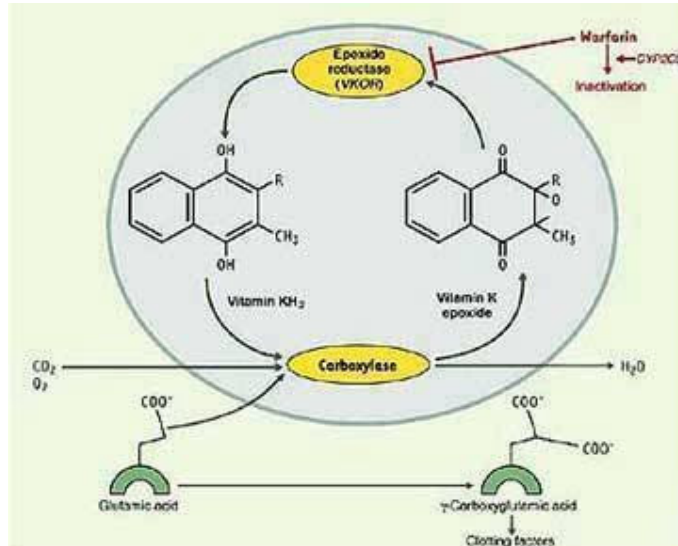


Figure 2.2-2 Varfarin Metabolizması ve K vitamini siklusu

Table 2.2-2 Varfarin tedavisinde hastaların VKORC1 polimorfizmi ve doz ilişkisini gösteren çalışmalara örnekler

Kaynak	Hasta popülasyonu	N	Varfarin doz ihtiyacı	Yan etki riski
Rost ve ark (11)	Varfarin dirençli	6	Kodlayan bölgedeki polimorfizmler varfarin rezistansında doz ihtiyacını artırarak	Çalışılmamış
D'Andrea ve ark (14)	İtalyan beyaz	147	1173C>T dozlam ile ilişkili	Çalışılmamış
Harrington ve ark (31)	Varfarin dirençli	4	Kodlayan bölge polimorfizmleri varfarin dirençlilerde doz artırıyor	Çalışılmamış
Wadelius ve ark (15)	İsveç beyaz ırk	201	-1639G>A, 1173C>T, 2255C>T varfarin dozu ile ilişkili	Çalışılmamış
Reider ve ark (13)	Amerikan beyaz ırk	554	-4451C>A, 497T>G, 1542G>C ve 3730G>A dozla ilişkili	Çalışılmamış
Sconce ve ark (17)	İngiliz beyaz ırk	335	-1639G>A dozla ilişkili	Çalışılmamış
Geisen ve ark (45)	Avrupalı varfarin dirençli	12	-1639G>A ve 1173C>T varfarin dirençlilerde dozla ilişkili bulunmuş	Çalışılmamış
Vecsler ve	İsrail	100	1542G>C dozla ilişkili	Çalışılmamış

ark (46)			bulunmuş	
Mushiroda ve ark (47)	Japon	828	-1639G>A,1173 C>T, 1542G>C, 2255C>T, ve 3730G>A dozla ilişkili	Çalışılmamış
Takahashi ve ark (48)	Amerikan beyaz %47 Japon %26 Afrika-amerika %26	243	1173C>Tdozla ilişkili	Çalışılmamış
Lee ve ark (49)	Singapore çinli %53 Malezyalı %31 Hintli %16	275	-4931T>C,-639G>A, 1173C>T, 1542G>C, 2255C>T dozla ilişkili	Çalışılmamış
Aquilante ve ark (18)	Amerikan beyaz %91 Afro-amerikan %7 Hispanik%1Asya kökenli %0.3	350	-1639G>A dozla ilişkili	Çalışılmamış

VKORC1 geninin tanımlanması

Varfarinin etki mekanizması ile ilgili ilk çalışmalar, kemirgenler üzerinde yapılmıştır. Varfarin kemirgenleri kanamadan öldürmek amacıyla kullanılırken, varfarinin bu etkisine direnç gösteren kemirgenlerde yapılan bağlantı analizi çalışmalarında VKOR bölgesinde önemli bir toplanma görülmüştür. Kohn ve Pulz bunun üzerine, varfarin direnci gösteren sıçanlarda yaptıkları bağlantı analizinde, mikrosatellit markırların yanında

Rw'ye bağlantılı olduğu gösterilmiştir (50). Böylece, Rw için insan kromozomunda biri 16. kromozomun kısa kolunda olmak üzere, lokalizasyon için 3 aday bölge gösterilmiştir. Bu alanda ikinci önemli çalışma, ailesel çoklu koagülasyon eksikliği gösterilen bir ailede VKORC1 lokalizasyonu tesbit edilmiştir. Bu hastalık oldukça nadir görülen, otozomal resesif, faktör II, VII, IX ve X'un yetersiz gama karboksilasyonu sonucu kanama ile karakterizedir. Fregin ve ark bir ailede, kanama bozukluğu olan iki kardeşte yaptıkları bağlantı analizi çalışmaları sonunda, 16p12-q21 lokalizasyonunu tarif etmişlerdir (51) İki bindört yılında, Rost ve ark'nın yaptıkları fonksiyonel çalışmalarda VKORC1 bölgesini tanımlayıp elde ettikleri geni hücre kültürüne transfekte etmişlerdir (11). Geni tanımlamak için, 2 hastadan ve 4 varfarin direnci olan akraba olmayan kişilerden aldıkları DNA örneklerini, kromozom 16 üzerindeki 4 Mb'lık kısmını direkt dizilemişlerdir. 5126 baz çiftlik , 163 aminoasitlik protein kodlayan 3 ekzonlu geni bulmuşlardır (NC 000016gi: 51511732). Bu geni VKORC1 olarak adlandırmışlardır. Northern blotlama ile karaciğer ve kalp hücrelerinde ekspresyonlarının yüksek olduğu gösterilmiştir.

Varfarinin terapötik aralığının dar olması, ilaç ve besin etkileşimlerinin sık olması nedeniyle, son yıllarda antikoagülan olarak yeni moleküllerin arayışları başlamıştır. Bu moleküllere verilebilecek en iyi örnek Ximelagran (direkt trombin inhibitörü) olmuştur ki, Food Drug Administration'dan ruhsat aldıktan kısa bir süre sonra ağır yan etkilerinden ötürü 2006 Haziran'da piyasadan çekilmiştir.

Yeni molekül arayışlarının da olumsuz sonuçlanması ile varfarin tedavisinde farmakogenetik testlerin uygulanması, hastanın tedavisini izlemek açısından daha güvenli görülmüş ve bu alandaki çalışmalar 2006 yılından sonra artmıştır.

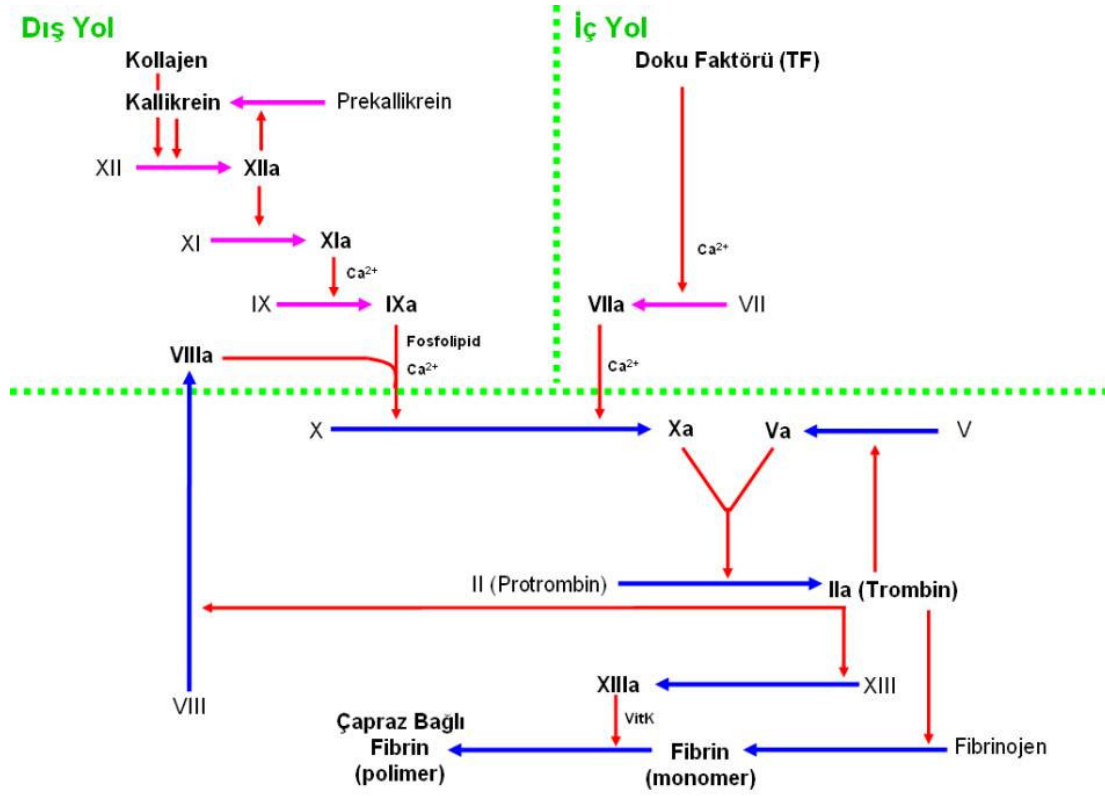


Figure 2.2-3 Pıhtılaşma kaskadı

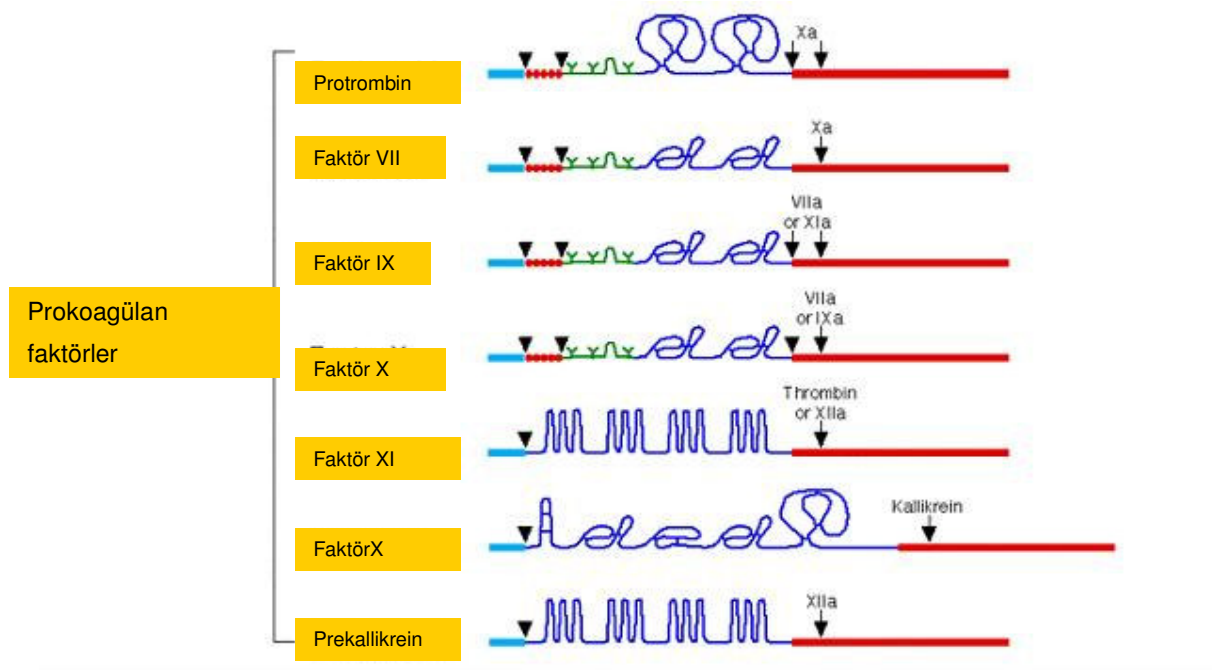


Figure 2.2-4 Prokoagulan faktörlerin moleküler

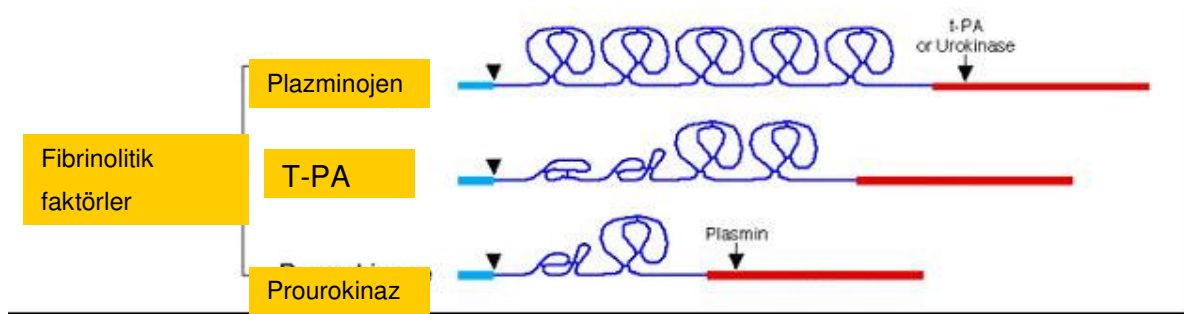


Figure 2.2-5 Fibrinolitik faktörlerin moleküler yapısı

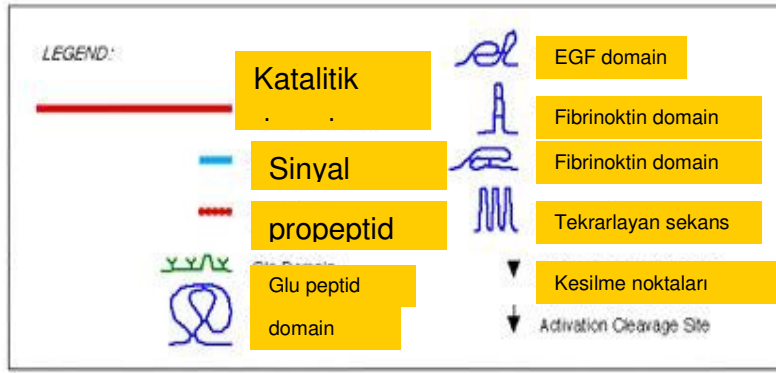


Figure 2.2-6 Şekillerin açıklaması

2.3. Farmakogenetik nedir?

İlaç tedavisinin bireylerarası farklılık gösterdiği 20. yüzyıldan beri bilinmektedir (52). Klinik Farmakoloji çerçevesinde bu değişikliği açıklayabilecek birçok tanımlar yapılmış ve bu tanımların daha kolay anlaşılması açısından iki geniş sınıfa ayırmışlardır: farmakokinetik ve farmakodinamik. Farmakokinetik, kısaca vücudun ilaca ne yaptığıyla ilgilenir. Bu süreçte organizma ilacı metabolitlerine ayırıştırır ve ilacın plazma konsantrasyonunu oluşturarak, ilacın dokulara dağılmasına neden olur. Farmakodinamik ise, ilacın vucuda yaptığıyla ilgilenir. İlacın etki ettiği bölgeden başlayarak, genellikle reseptör ve reseptör sonrası olayları inceler. Tıbbın bütün diğer alanlarında olduğu gibi, bu mekanizmaların hipotetize edilmesi ve moleküller üzerinde gösterilmesi yaklaşık 20 yılı almıştır. Böylece, 19. yüzyılın sonlarında ilaca yanıtın genetik olarak belirlenebileceği düşünülürken ,1950'lerin sonlarında farmakogenetik terimi doğmuştur (52). Ancak bu tarihten sonra geçtiğimiz 10 yıl içinde spesifik genetik defektlerin ilaç yanıtlarını değiştirdikleri gösterilmiştir. İnsan genomunda polimorfizmler hakkındaki bilgiler arttıkça, ilaçların etkilerinin bireylerarası farklılıklarını genomik seviyede açıklamak mümkün olmaktadır. Genomik bilgilerle ilaç etkilerinin açıklanması sonuçta başka bir alanı: farmakogenomiks'i ortaya çıkarmıştır. Biyomedikal bilimlerin diğer

dalları gibi genomikte son gelişmelerle güç kazanmaya devam ederken, kişileştirilmiş tedavinin etkinliğini ve güvenliğinin artırılması önünde çalışmaların artmasına ışık tutmaktadır. Bu yeni gelişmeler farmakogenomiks kavramı doğmuştur.

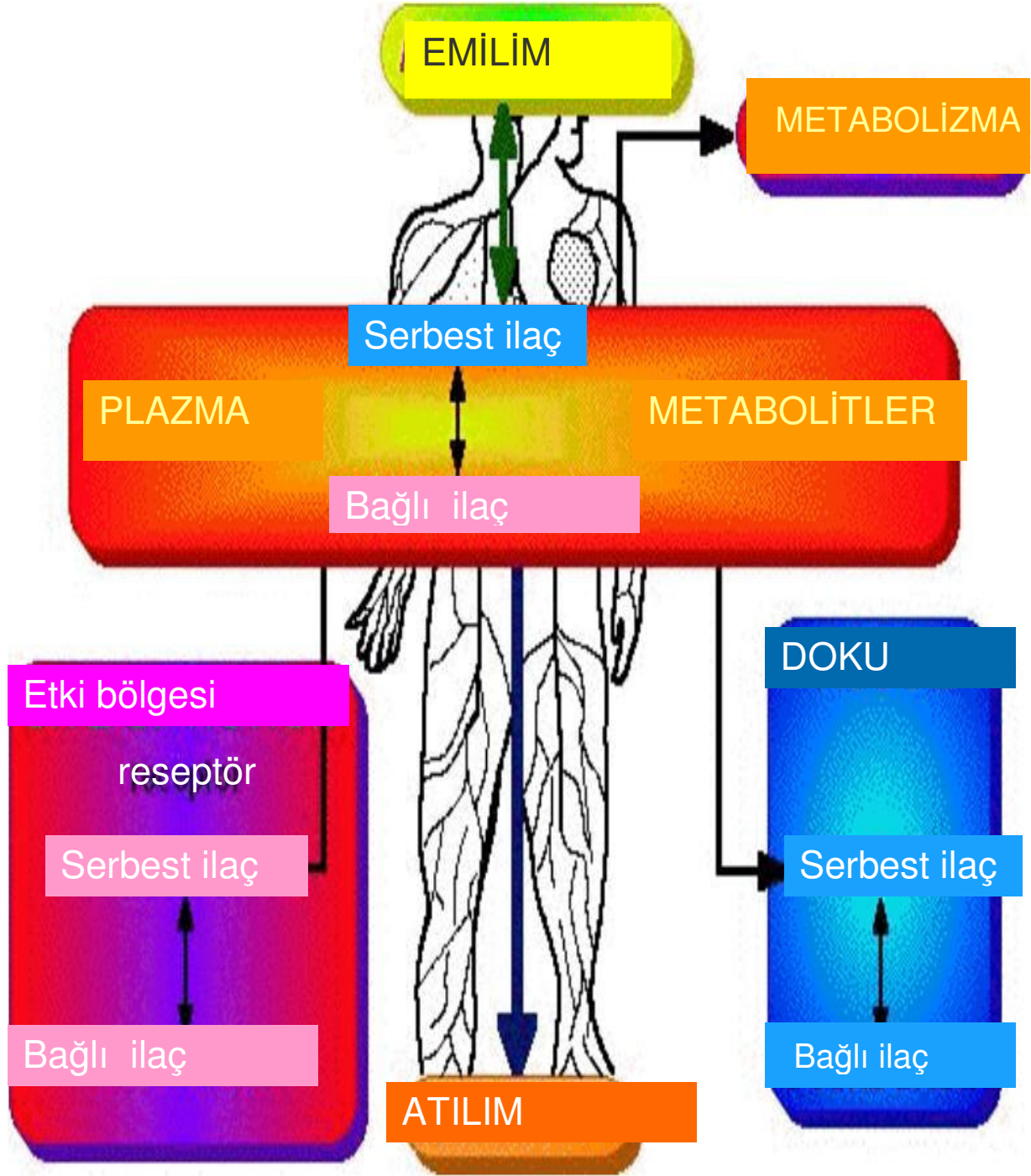
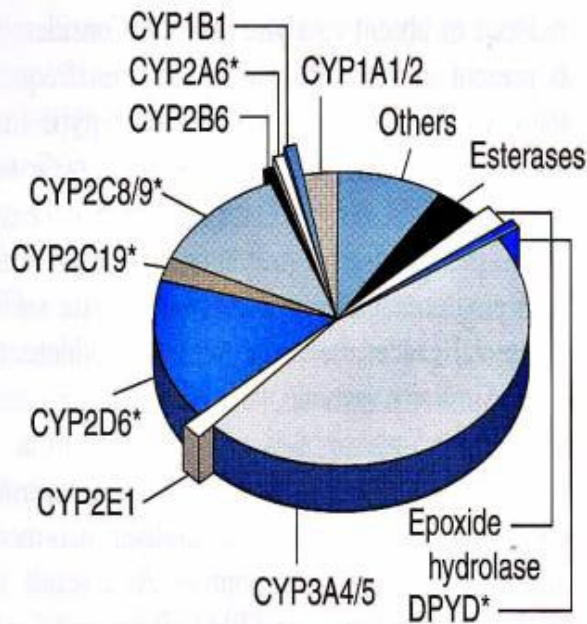


Figure 2.3-1 Farmakokinetik ve Farmakodinamiğin şema halinde gösterilmesi

Farmakokinetik

FAZ I



FAZ II

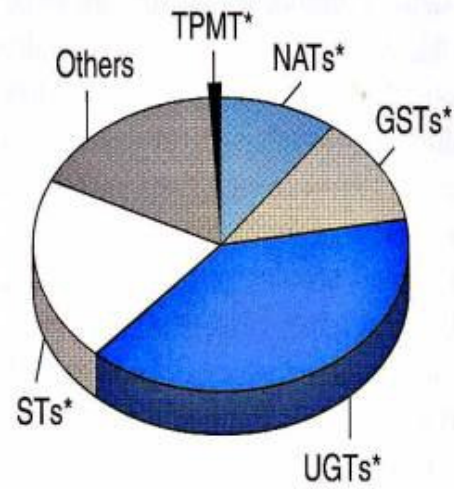


Figure 2.3-2 Farmakokinetikte yer alan metabolizma enzimlerinin dağılımı (Evans WE, 1999'dan alınmıştır)

Bireylerarası tedavi farklılıkları klinik gözlemlerle tanımlanırken artık, klinik gözlemler ve araştırmalar bu farklılıkları açıklamaya yetmemiş ve moleküler biyoloji ve moleküler farmakolojinin gelişmesi ile farmakokinetik ve farmakodinamik kavramlarla tıpta farklı uygulama alanları ortaya çıkmıştır. Yeni moleküllerin tedavide ilaç olarak kullanılmaya başlanması ile tedavide görülen etki ve yan etkilerin farklılıkları, tedavi etkinliklerinin farklılıkları ilaca verilen yanıtında bireylerarası değiştiğini ve bu değişikliğin nedenin de hastalığın ağırlığı, tedaviyi alanın yaşı ve ırkı, ilaçların metabolizmalarında görevli organların fonksiyonları, eşzamanlı alınan ilaç tedavisi, ilaç etkileşimleri ve eşlik eden hastalıklar olabileceği 1950'lerden beri düşünülen farmakogenetik kavramıyla geniş bir zemine oturmuştur. Bütün bu faktörlerin yanı sıra ilacın vücutta geçirdiği metabolizma ve dağılım süreçlerinde kalıtsal farklılıklar ve ilaç tedavisinin hedef aldığı bölgedeki (örneğin reseptörler) genetik polimorfimlerin ilaç etki ve toksisitesinde daha büyük etkileri vardır. İlaç etkilerinin kalıtsal farklılıkları olduğuna dair ilk yayınlar 1950'lerde (53-55) yapılmış ve bu çalışmalar günümüzde farmasötik endüstri ve geniş bir akademik çevre tarafından yeniden tanımlanan farmakogenetik/farmakogenomik alanının ilk çalışmaları olarak kabul edilmiştir (56).

Farmakogenetik, ilaca yanıtın kalıtsal farklılıklarını inceleyen bilim dalıdır. Bireyler arası ve ilaçlar arası yanıt farklılıklarını açıklamaya çalışan ve bu farklılıkların genetik temelini araştırır. Kavram olarak, ilk ortaya çıktığında bireyler arası farklılığı incelerken, geliştikçe populasyonlar arası farklılıkla da ilgilenmeye başlamıştır.

Farmakokinetik'in Genetik Olarak tanımlanması

1950'lerde, ilaç tedavisinin sonuçlarında iki defekt olduğu daha önce tanımlanmıştır. İlk tanımlanan, süksinilkolinin yıkılmasından sorumlu olan psödokolinesterazı ailesel defektli olan kişilerde, süksinil kolin uygulanmasından sonra uzamış paralizidir (57). İkinci tanımlanan ise yavaş N-asetilasyona bağlı izoniazit nörotoksitesinin artmasıdır (58). 1990'lı

yıllarda N-asetilasyonun moleküler temeli tanımlanmıştır. Güncel bilginiz ile N-asetiltransferazın iki enzimle NAT1 ve NAT2 yapıldığını ve NAT1'in yapısal olarak eksprese olduğu, NAT1 enzimi eksikliğinin hiçbir bireyde tanımlanmazken, NAT2 enziminde genetik var yantlar tanımlanmıştır. NAT2'deki genetik varyantlar yavaş asetilasyona sebep olarak aktivitesinin kaybolmasına yol açtığı gösterilmiştir (59). Bu örnekler gibi erken veriler farmakogenetikte, ilaç metabolize eden enzimleri kodlayan genlerdeki varyasyonlar ilgili ilaçların yanıtlarının değiştiğini göstermiştir. İlaç yanıtlarının en fazla, metabolize olunan yolak tek olduğunda ve o yoldan başka bir metabolik yol olmadığında bozulduğu gösterilmiştir (60).

Günümüzde, ilaçların vücuda uygulandıkları andan itibaren çeşitli enzimlerin etkisine maruz kaldıkları bilinmektedir. İlaçların bu şekilde enzimlerle biyotransformasyona uğramasının amacı ilacı metabolitlerine ayırarak, vücuttan atılacak hale getirmektir. 4 ana grupta toplanır:

1. Oksidasyon
2. İndirgenme
3. Kopma
4. Konjugasyon

Bunlardan ilk üç reaksiyona birinci faz reaksiyonları, dördüncüye ise ikinci faz reaksiyonları denir. Birinci faz reaksiyonları sitokrom P450 grubu enzimler oluştururken, İkinci faz reaksiyonları NAT, UGT, GST gibi enzimlerden oluşmaktadır.

Sitokrom P450 enzim grubu öncelikle karaciğer ve barsak mukozasında bulunan bir enzim gurubudur. Ancak daha sonra akciğerlerde, böbrek ve beyinde daha düşük oranda bulunmuştur. Hem halkası içeren büyük bir aileyi oluştururlar (61-62). Sitokrom enzimleri 4 aileden, 5 alt aileden ve 25 izoenzimden oluşur. Bu enzimlerin özellikleri ilaç etkileşimlerine açık olmaları ve bu enzimlerin polimorfizmleriyle ilaç metabolizmasında bireylerarası değişkenliğe yol açmalarıdır. İlaç etkileşimlerine çoklu ve kronik ilaç kullanımında rastanır. Alınan ilaç bir

enzimin substratı iken bir diğ er ilaç ise aynı enzimin inhibitörü ise ilaçların etkileri beklenenden farklı ortaya çıkmaktadır.

CYP450 gen ailesindeki değişkenlik iki ana kısımda incelenebilir: yapısal ve regülatör. Farmakogenetik  alı malar geleneksel olarak, P450 genelerinin kodlayan bölge değişiklikleri üzerine yapılır. Kodlayan bölgedeki değişiklikler, kodlanan enzimin yapısını ve enzim aktivitesini değiştirirler. Yapılan son  alı malar, P450 genlerinin regülatuar bölgelerindeki değişikliklerinde bireysel ilaç metabolizmasında önemli rol oynadıklarını göstermiştir (30). İnsanda yaklaşık olarak, fonksiyonel 50 P450 geni bulunmuştur. Bu kadar geniş aileye rağmen, ilaçların büyük çoğunluğu çok küçük bir enzim grubu tarafından metabolize edilirler. En fazla ilaç metabolize eden enzimler; CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 ve CYP3A4. Bu enzimlerin hepsinde de genetik değişkenlik söz konusudur.

Kodlayan bölge varyantları

Protein kodlayan bölgedeki DNA sekansındaki değişiklikler öncelikle amino asit sekans ve protein fonksiyon değişikliğine yol açarlar. Buna en iyi örnek, klinik kullanıma girmiş olan, tiopurine metiltransferase (TPMT) genidir ki, bu genin proteini azatiopurin veya merkaptopurin gibi gibi tiopurinelerin bioinaktivasyonundan sorumludur (4,63). Çok seyrek olarak, bazı kişilerde bu varyantlar homozigot olarak bulunduğunda, standart doz tedavilerinde kemik iliği aplazisi gelişme riskleri çok yüksek olduğundan, bu kişilere daha düşük dozla tedavi edilir. İnsanların % 10’u anormal allelin birini taşıma ihtimali olduğundan, kemik iliği toksisitesi ile kar ıla ma riskleri yüksektir (56,64).

İlaç eliminasyonunun en sık yolu sitokrom P450 (CYP) ailesinin  yeleri ile olan metabolizmadır. İlaç eliminasyonunu ve ilaca yanıtı etkileyen en sık görülen kodlayan bölge CYP varyantları tarif edilmiştir. Bazı varyantların sıklıkları etnik kökene göre değişmektedir, ve buda belki etnik özelliğe göre ilaç cevabını belirleyen bir faktördür. Beyaz ve Afrika-Amerikalılarının %10’undan fazlası bir sitokrom P450 izoformu olan, CYP2D6 için fonksiyon kaybettirici varyantı taşımaktadırlar. Bu şekilde

zayıf metabolizatör olan hastalar bazı antidepresanları aldıklarında, ilaç birikimine bağlı yan etkileri ortaya çıkmaktadır (65). Buna ek olarak, yavaş metabolizatör olan kişilere, aynı zamanda codeinin de aktif metaboliti olan morfine dönüştüremedikleri için yeterli analjezi sağlanamaz. Bu polimorfizmle ilgili olan bir başka gelişme ise, bu enzimle metabolize olduğu bilinen geliştirilmekte olan ilaçlarla ilgili çalışmalar durdurulmuştur.

Kodlamayan bölge Varyantları

İnsan genomunun yalnızca çok az bir kısmı kodlamaktadır. Kodlamayan DNA'nın önemli görevlerinden biri, transkripsiyona uğrayan mRNA'nın miktarını bazal durumda veya çevre uyarılarına karşı regüle etmektir. İlaç cevabı anormal görünen bazı durumlarda yapılan çalışmalarda, regülatör bölgelerde sekans varyantları bulunmuştur. En iyi örnek, bilirubin ve bazı ilaçların konjugasyonundan sorumlu olan glukuronosiltransferaz, UGT1A1 geninin, promoterinde olan tekrar polimorfizmidir.

UGT1A1*28, en sık rastlanan hipofonksiyonel allelidir ve genin regülatör bölgesine 2 ekstra baz çiftinin (TA) insersiyonu ile protein ekspresyonun azalmasıyla sonuçlanır. Bu mekanizmadan bilirubin atılımında yavaşladığından Gilbert sendromu oluşmaktadır.

Değişken İlaç Transportu

İlacın hücreye girişi ve hücreden çıkışı genellikle aktif bir olaydır ve özel ilaç transport molekülleri eşlik eder (66,67). Taşıyıcıları (transporter) kodlayan genlerdeki varyantlar ilaç yanıtında farklılığa yol açmaktadır. Son yıllarda, pasif diffüzyondan başka transport mekanizmalarınında verilen maddelerin biyolojik membranları aşmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu spesifik transporterların genleri/proteinleri ve moleküler karakteristikleri, düzenlenmelerindeki faktörlerin içeriği henüz yeni anlaşılmıştır.

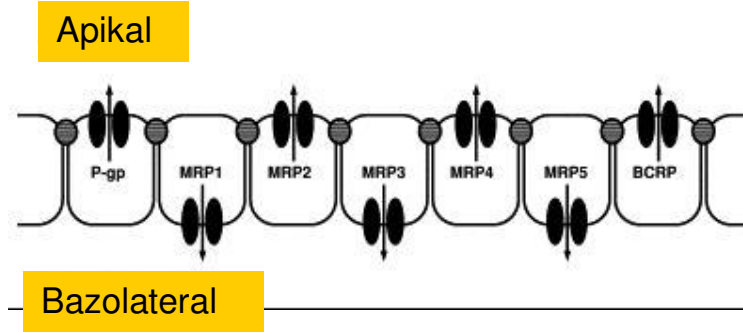


Figure 2.3-3 Taşıyıcıların hücre içinde yerleşimleri ve hücrede çalıştıkları yönleri.

Taşıyıcılar bir maddenin tek yönlü taşınmasına aracılık ederek antiporter gibi görev yapar. Bir kısım taşıyıcı iki maddeyi aynı yöne taşıyarak kotransport yapar, bazıları ise iki maddeyi farklı yönlerde taşıyarak simport taşımacılığı yapar. Taşıyıcıların genellikle maddenin alımında yada atılımında aracılık eden domainleri hücre membranında eksprese olurlar. Domainler maddelerin kandan hepatosite ve safraya atılımını kolaylaştırırlar. Karaciğerde barsak veya böbreklerde bulunan taşıyıcı gen/proteinleri beyin gibi diğer dokularda da bulunabilir. Anyonik, katyonik amfoterik ksenobiyotiklerin uptake ve efluksunda aracılık eden bazı proteinler ilaçların absorpsiyonun, distribusyon ve ekskresyonunda önemlidir.

Taşıyıcılar, ilaçların (ksenobiyotiklerin) ve konjuge ilaçların transportunda rol alır;

1. Antijen tanıyarak görev yapan taşıyıcılar (TAP)
2. MDR1 (p glikoprotein)
3. MDR
4. Safra tuzu taşıyıcı pompası (P glikoprotein kardeşi)
5. Multidrug resistance'a eşlik eden protein (MRP)
6. Meme kanser rezistance proteini (BCRP)

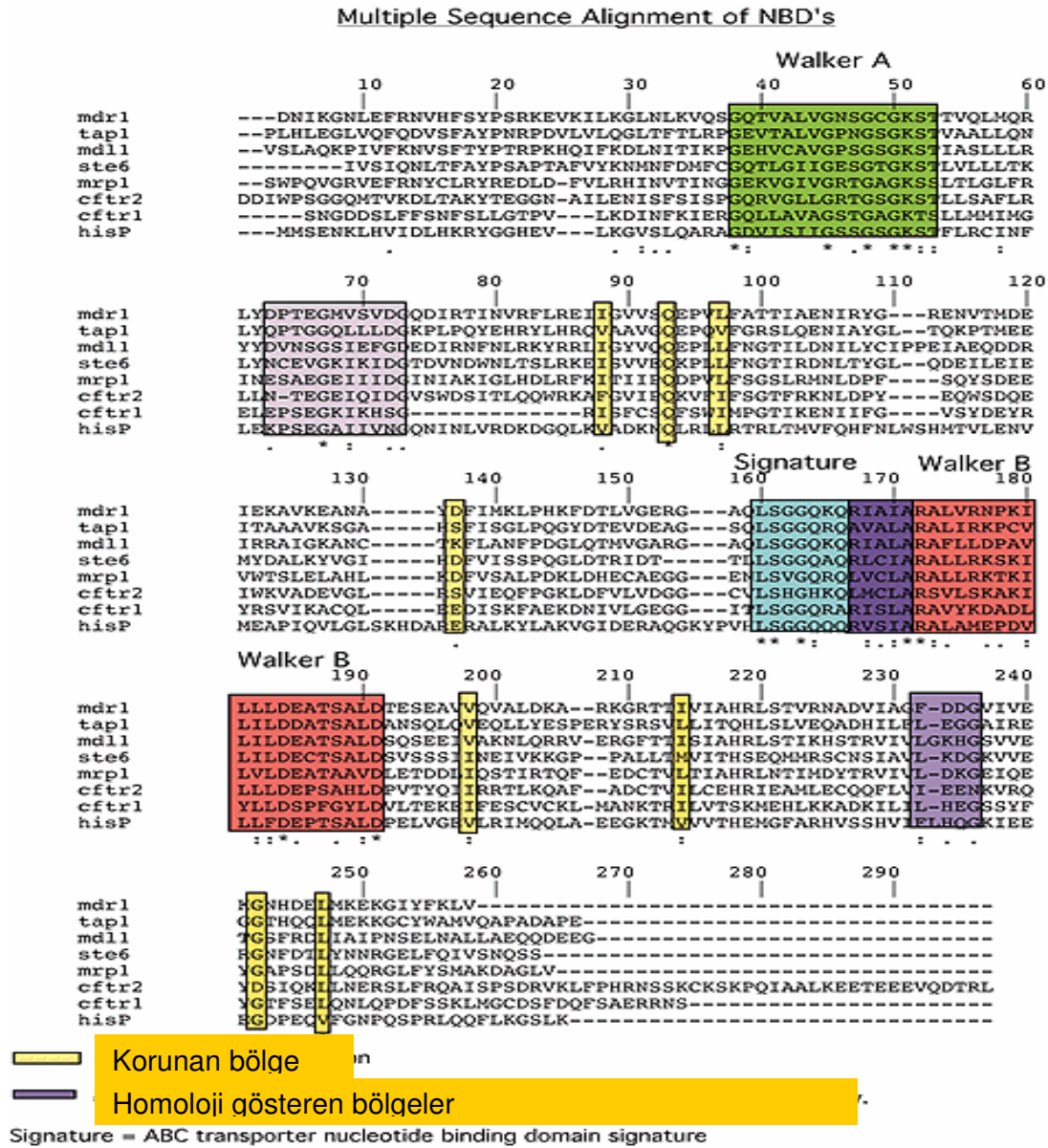


Figure 2.3-4 ABC ailesinin korunma ve homoloji gösteren bölgeleri

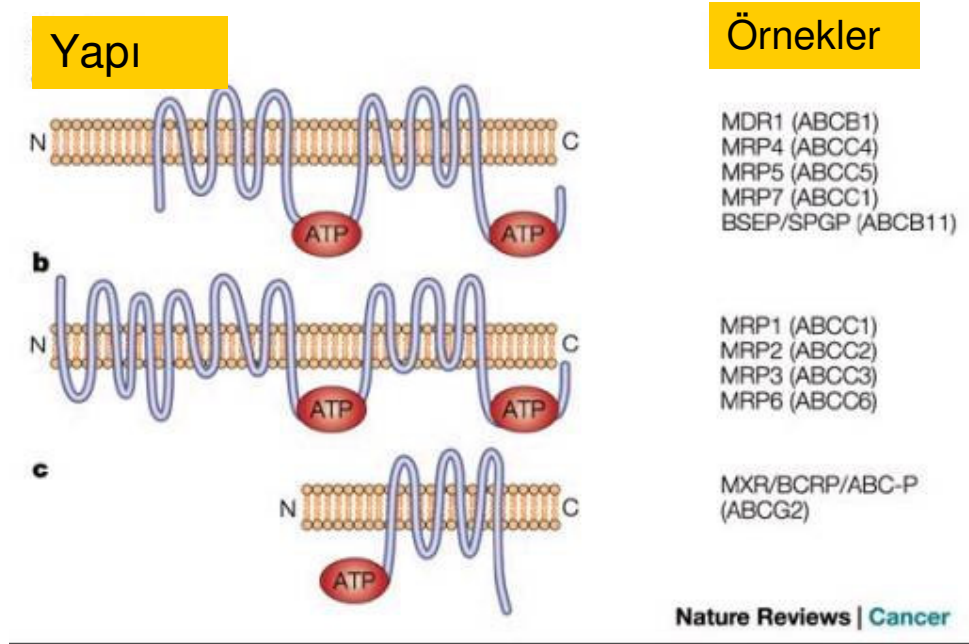


Figure 2.3-5ABC ailesinin hücre membranında şematik olarak yerleşmeleri

Bütün ATP ilaç efflux taşıyıcıları plazma membranında yer alırlar ve birçok yapısal çeşitliliği olan ilaçlarla etkileşirler. Dışa atım aktif bir olaydır, ATP bağımlıdır ve konsantrasyon gradyentine karşı işlem görür. Bu olay için gerekli enerji ATP hidrolizi ile karşılanır.

ATP Binding Cassette genleri transmembran proteinlerinin geniş bir ailesidir;50 üyesi vardır. Bu proteinler ATP bağlar ve çeşitli molekülleri hücre dışına atmak için enerji kullanırlar. Proteinler nukleotid bağlama bölgesi olarak da bilinen, ATP bağladıkları domaine göre sınıflandırılırlar. Nukleotid bağlama bölgelerinin Walker A ve B isimli karakteristik motifleri vardır.

B (ABCB;MDR1) grubu ailesinin ilaç direnci ile olan ilişkisi saptanmıştır. İlk defa Juliano ve Ling 1976 yılında antrasiklin, vinka alkaloidlerine dirençli hücrelerde p- glikoproteini tarif etmişlerdir. P-gp'nin beyin damarları, adrenal bez, böbrek, karaciğer ve gastrointestinal yolak gibi birçok normal dokuda yüksek miktarlarda ekspresyonu vardır. P-

glikoprotein kan beyin bariyerine eşlik eder, hormonları taşır ve besinlerle alınan ksenobiyotikleri detoksifiye eder (68).

P-gp yaklaşık 170 kD ağırlığında herbiri 6 transmembran segment içeren 2 zincirden oluşur. MDR1'in değişik populasyonlarda birçok polimorfizmi tanımlanmıştır fakat en sık tanımlanan 26 ekzonda 3435'deki CT değişimidir.

Farmakodinamik'in Genetik Olarak Tanımlanması

İlaç Hedefini Kodlayan Genlerdeki Değişiklik

İlacın hedef bölgesindeki konsantrasyon değişkenliği, ilacın etkisini değiştirmektedir. Bu farmakodinamik değişiklik, ilaç veya hastalığa spesifik olmaktadır. Farmakodinamik değişikliğe yol açan en önemli unsur ilaç hedeflerini kodlayan genlerdeki değişikliklerdir. Astım tedavisinde beta 2 agonistlerine cevabı değiştiren beta reseptörlerini kodlayan genlerin polimorfizmleri olduğu gösterilmiştir (69). Bu konuda en önemli çalışmalar angiotensin reseptör polimorfizmleri ve antihipertansifler arasındaki ilişki ile yapılmıştır.

İlacın etki ettiği biyolojik içeriğin değişkenliği

İlaç etkilerinin değişkenliği yalnızca ilacın metabolizması ve ilaç hedef bölgesindeki genetik değişikliklerden kaynaklanmaz, ama aynı zamanda ilacın etkileşime girdiği, biyolojik komplekste bulunan hedef molekülleriyle de etkileşir. Bu etkileşime en önemli örneklerden biri, ilaca bağlı QT intervalinin uzaması ve ventrikül taşikardisi dolayısı ile torsades de pointes'e yatkınlığının artmasıdır ki buda ilaç bırakılmasının veya değiştirilmesi için önemli bir nedendir (70). QT aralığının uzamasının bazı iyon kanalları ve diğer genlerle ilişkileri olduğu gösterilmiştir. Özellikle HERG (KCNH2) QT uzatan ilaçlar için hedeftir, yeni ilaç araştırmalarında ilaçlar geliştirilirken rutin olarak KCNH2 bloke eden aktiviteleri varmı diye taranıyorlar (71). İlaç kaynaklı torsades pointeslerin tek kaynağı KCNH2 mutasyonları olmadığı ama QT aralığını kontrol eden diğer genlerinde mutasyonlarının buna sebep olabileceği gösterilmiştir (72,73).

İlaç Yanıtının Tanımlanması

Farmakogenetik çalışmalarda, tedaviye yanıt veren ve vermeyen hastaları ayırmak altın adımdır. Bu aşamada yapılan yanlışlık bunu izleyen genetik çalışmalarında yanlış yapılmasına neden olur. Önemli olan klinik olarak tansiyon değişimi, tumor boyutunun değişimi, ilaç konsantrasyonu veya dozunun değişimi ile ölüm veya biyomarker gibi hedef noktaları arasındaki ilişkinin belirlenmesidir. Biyomarkerların veya hedef noktaların daha geniş belirlenmesi ara fenotiplerinde hastalık ve ilaçla olan ilişkilerini tanımlamakta önemlidir. Bütün bu verilerin değerlendirilmesinde fenotipik verilerin uniform bir şekilde toplanması informatik açıdan değerlendirilmesi zorluk taşımaktadır.

İlaç Yanıtını Değiştiren Genlerin Tanımlanması ile İlgili Gelişen Yaklaşımlar

Güncel tıp bilgisinde farmakogenetiğe, farmakokinetik ve farmakodinamik bilgileri ışığında yaklaşım en önemli yaklaşımdır. Farmakokinetiği ve farmakodinamiği etkileyen genlerin ilaç etkisini belirlediği tanımlanmaktadır. Bu aday genlerin varyantları ve biyolojik aktiviteleri taranır. Bu ‘genotipten fenotipe’ yaklaşımı yalnızca ilişkilendirmeyi değil aynı zamanda bu proteinlerin fonksiyonel varyantlarının ilaç yanıtı ile olan ilişkisini belirler (74). Bunun tersi olan yaklaşım ise ‘fenotipten genotipe’dir ve bu yaklaşımda önce değişken ilaç yanıtı fenotipleri belirlenir, ve ilaç etki yollarından veya genoma etkilediği yerlerden bir gen seçilerek, tek gen üzerinde çalışmalar yapılır.

İlk farmakogenetik çalışmalar, daha çok ilaç yanıtını etkileyen farmakokinetik ve farmakodinamikde yer alan az sayıda genlerle çalışılmıştır. Son yaklaşımlar ise hastalıklarında ilaç yanıtını değiştirebileceği olduğu için yeni çalışmalarda hastalık patofizyolojilerine yol açan genetik bozukluklar ile ilaç yanıtı ilişkilerine de bakılmaktadır.

Hastalık Fenotipleri

Kanser, aritmi, astım gibi sık görülen hastalıkların tedavi değişkenlikleri olduğu ve bu değişikliklerin hastalığın patofizyolojisindeki moleküler farklılıktan ortaya çıktığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (75-77). Bazı olgularda, hastalığın patogenezinin monogenik olduğunun anlaşılması tedavinin de mantıksal bir çerçeveye oturmasına yardım eder, örneğin, yenidoğan diabetinde KCNJ11 gen mutasyonlarının sebep olduğunun bilinmesi ve bu genin sulfonilüre-sensitif potasyum kanalı olduğunun bilinmesi ile hastalık sulfonilüre ilaç grubuyla tedavi edilmeye başlanmıştır (78,79). Hastalığa eşlik eden genetik varyantlar, kalıtılmış olabildikleri gibi kanserde bulunan somatik hücre mutasyonları daha sonrada kazanılmış olabilirler ve bu genetik değişiklikler ilaç yanıtının değişmesinde rol alabilirler. Örneğin tirozin kinaz mutasyonlarında tedaviye yanıt bu şekilde moleküler testlerle takip edilmektedir.

İlaç yanıtı ve hastalık arasındaki genetik ilişkiyi gösteren bir başka örnekte , miyokart enfarktüsü ve inme için risk oluşturan 5-lipooksigenaz geninin spesifik alleleri ile yapılan çalışmadır. Elde edilen ilk bulgularla 5-lipooksigenazı inhibe edip proteini aktive eden ilaç geliştirilmiş ve ilk klinik araştırmalar genetik risk taşıyan hastalar seçilmiştir (80,81).

Genom Taramaları

Yeni teknolojilerin gelişmesi ile birlikte, tüm genomda bulunan tek nükleotid değişikliklerinin (SNP) yatkınlık oluşturabilecekleri hastalıklar, ve hastalık yollarındaki olası rolleri üzerine yapılan çalışmalar artmıştır. Bu genom yaklaşımı, ilaç yanıtındaki değişiklikleri açıklayacak yeni lokusların tanımlanmasında da oldukça değerlidirler.

Bulguların Kliniğe Yansımaları

Genetik varyantlar ile ilaç yanıtının ilişkilerinin anlaşılması güncel tıbbi zenginleştirmekte ve farklı yaklaşımlar getirmektedir. Bulguların rutin kullanıma geçebilmesi için, yalancı pozitif sonuçların dışlanabilmesi için

farklı topluluklarda çalışmaların tekrar edilmesi gerekmektedir. Amaç, benzer tanı yaklaşımlarını benzer prediktif testlerle onaylamaktır.

2.4. CYP2C9

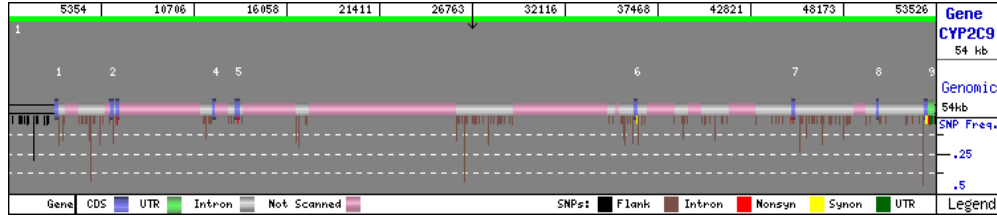


Figure 2.4-1 CYP2C9 gen yapısı

İnsan CYP2C ailesi, karaciğer’de oksidasyon fonksiyonu olan sitokrom P450 enzim sisteminin üyesidir, vücuttaki ksenobiyotiklerin ve ilaçların metabolizmasında rol alır. Dört fonksiyonel gen grubu içermektedir; CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 ve CYP2C19. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda en çok polimorfik genler; CYP2C9 ve CYP2C19 olduğu görülmüştür. Mikrozomal enzimlerinin genetik varyantları ilaç yanıtının oluşmasında oldukça önemlidir. İlaç metabolizmasındaki genetik değişkenlik, in vivo olarak enzim aktivitelerinde bimodal değişikliğe yol açar. CYP2C9’un ekspresyonunda genetik polimorfizmin önemi fazladır ve beyaz ırkın %1-3’ü bu enzim için fonksiyonu olmaya polimorfik yapıyı içermektedir.

CYP2C9 polimorfik bir enzimdir, ve başlıca oral antikoagülanlar, oral antidiyabetikler, fenitoin gibi terapötik penceresi dar olan ilaçlar ve pek çok non steroid antiinflamatuvar molekülün faz 1 metabolizmasından sorumludur (82).CYP2C9 substratlarından bazı ilaçların dozaj ayarlama problemleri olabilir, çünkü genellikle bu yolla metabolize olan ilaçların terapötik aralıkları dardır. CYP2C9 inhibitörleri varlığında, ilaç-ilâç etkileşimleri enzimin aktivitesinin azalmasından ötürü oldukça sık görülür. (83). CYP2C9 aktivitesinde ve bu enzim ile metabolize edilen ilaçların klinik etkisinde bireyler arasında genetik kökenli farklılıklar bilinmektedir. İnhibitörleri ve indükleyicileri ile birlikte kullanıldıklarında, genellikle olası

ilaç etkileşimleri tahmin edilerek doz ayarlamaları yapılabilir. Bu gen başka P450 ailesinden genlerle birlikte 10q24'de lokalizedir. CYP2C9 9 ekzonlu, 55 kb uzunluğunda, 1847 bazçiftli transkripsiyonlu ve 490 aminoasidden oluşur.

Yapılan çalışmalar CYP2C9 ailesinde 7 allelin enzimin aktiviteini değiştirdiğini göstermektedir. (*2, *3, *4, *5, *6, *11 ve *13). Son yıllarda yapılan çalışmalar yine CYP2C9 geninin intron/ekzon, promoter bölgelerinin yapılarını ortaya çıkarmıştır (84-87).

En sık rastlanan allele CYP2C9 *1 olarak gösterilir ve yabanıl tip olarak kabul edilmiştir (88,89); 3. Ekzonda, 430 nukleotidin sitozinin timine transversiyonu ile gerçekleşir ve 144. aminoasidin Arg Cys'e dönüşmesine neden olarak *2 allelini oluşturur. Ekzon 7'de 1075. nukleotidde adenin yerine transversiyonla 359. aminoasit löisine değişmesi *3 alleli olarak isimlendirilir. Yine 7. ekzonda 1076. nukleotidde timin yerine sitozin gelmesi ile aminoasit thr'e dönüşerek *4 allelini oluşturur. Ekzon 7'de 1080.nukleotidde sitozin yerine guanin gelmesi ile 360. aminoasidin glutamata dönüşmesi ise *5 allele adını alır (88-91). *6 alleli ise 818. nukleotidde adenin baz çiftinin silinmesi ile tarif edilmiştir. Bu genetik polimorfizmlerin keşfedilmesi, bu genotiplerin enzim aktivitelerinin araştırılması yönünde ilk adım olmuşlardır. Bu metabolik çalışmaların sonucunda, polimorfik değişikliklerin enzim aktivitesinin değiştirdiğini gösterdiğinden, etnik kökene dayalı çalışmalar, bu polimorfizmlerin toplumlararası sıklık farklılıklarını göstermiştir. En sık rastlanan 3 polimorfizmin toplumlar arası sıklık farklılıkları tabloda gösterilmiştir.

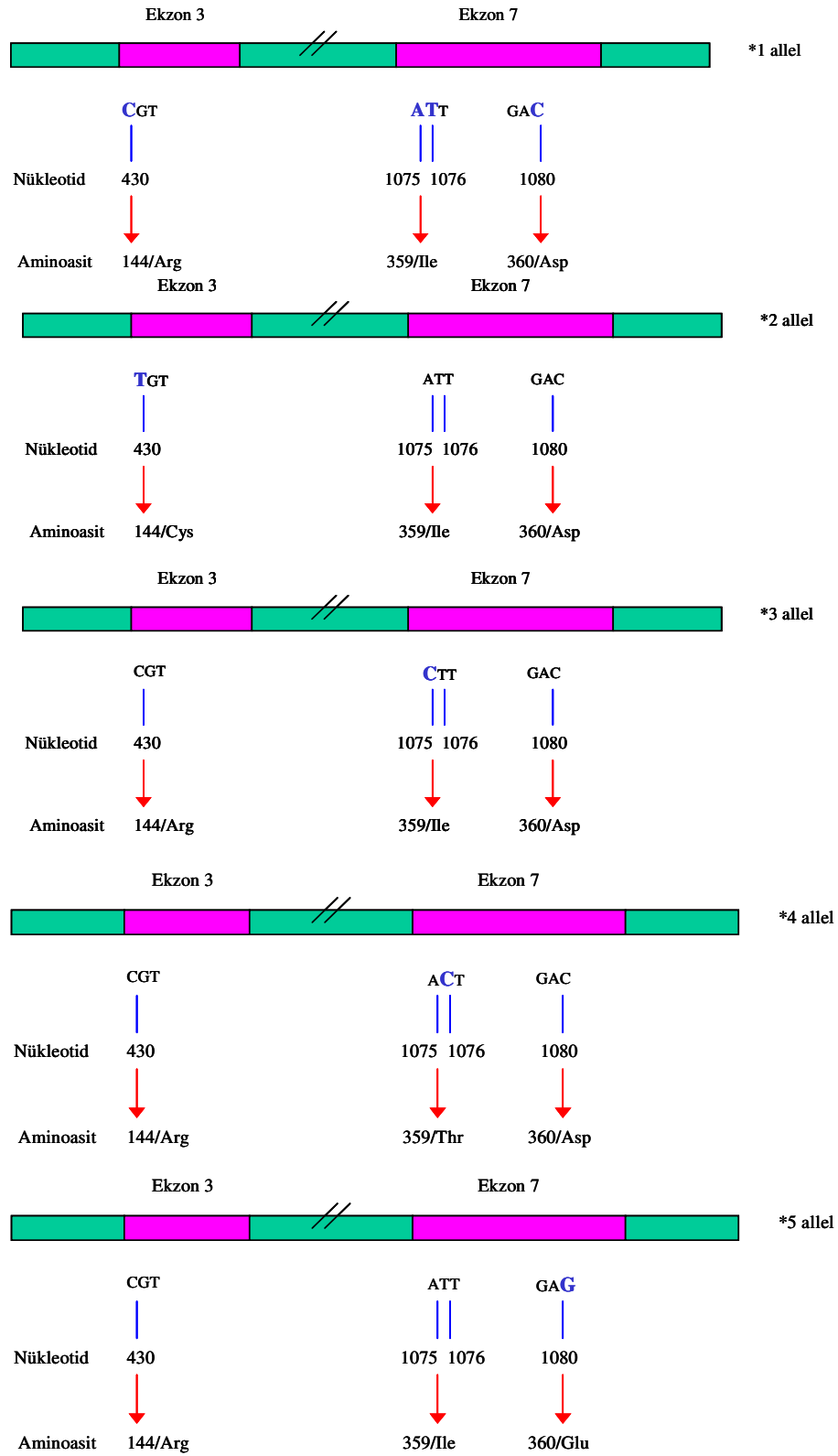


Figure 2.4-2CYP2C9 polimorfizmleri şeması

Table 2.4-1 CYP2C9 polimorfizmlerinin etnik farklılıkları

Etnik köken	Kaynak	*1 *1	*1 *2	*1 *3	*2 *2	*2 *3	*3 *3	N
Beyaz ırk	Scordo ve ark (25)	102	24	22	4	3	2	157
	Margaglione ve ark(35)	88	62	28	0	2	0	180
	Yasar ve ark (93)	287	80	50	2	8	3	430
Afrikan/ Amerikan	Sullivan-Klose ve ark (89)	97	2	1	0	0	0	100
Türk	Aynacioglu ve ark (94)	80	90	86	5	6	4	499
Japon	Nasu ve ark (95)	209	0	9	0	0	0	218
Kore	Yoon ve ark (96)	561	0	13	0	0	0	574

2.5. MDR1 (ABCB; P-gp)

İnsan ABCB1 geni ilk defa multipl kanser ilaçlarına kazanılmış çapraz reaksiyonu sonucu, kanserli hücre kültürlerinde overekspresyonu sonucu tanımlanmıştır. İlk başta P-glycoprotein denme nedeni ilaçların hücre geçirgenliğine (Permeabiliy) etki ettiği düşünüldüğündendi, ancak daha sonra hidrofobik ilaçlar için ATP bağımlı efflux pompası olduğu gösterilmiştir (97-98). Ekspresyonu dokular arasında değişirken, ekspresyonunun derecesi substratlarının farmakokinetiğini etkilemektedir (99). Böbrek ve karaciğer gibi atılımla ilgili dokularda bulunması ksenobiyotiklerin ve ilaç metabolitlerinin idrara ve safraya atılmasında rol aldıklarını düşündürmektedir. Barsağın apikal membranında bulunması ilacın barsaktan emilmesini sınırlamaktadır. Knockout modellerinin oral biyoyararlanımı sınırladığı ve bazı maddelerin kan-beyin bariyerinden geçişini sınırladığı gösterilmiştir (100-101).

Hoffmeyer ve ark MDR1’de 15 polimorfizm bildirmişler, bunların 12’si protein sekansını değiştirmezler. Bunlarda 26 ekzonda C3435T klinikle ilişkili bulunan polimorfizm olmuştur. T alleli duodenumda düşük ekspresyona neden olur (102).

Moleküler yapısı

1280 aminoasitli membran proteininden oluşur. İki homolog halkadan oluşur; bu halkalardan herbiri N-terminal, hidrofobik, nukleotid bağlanma bölgesinden meydana gelmiştir. Her iki halkanın plazma membranında, herbirini intrasellüler bağlanma bölgesinin takip ettiği 6 transmembran domaininden oluşur. Moleküler ağırlığı bulunduğu hücre tipine göre 130-180 kDa arasında değişir.

Gen Yapısı

7q21’de lokalizedir. 29 ekzon ve 1280 aminoasit içermektedir.

2.6. VKORC1

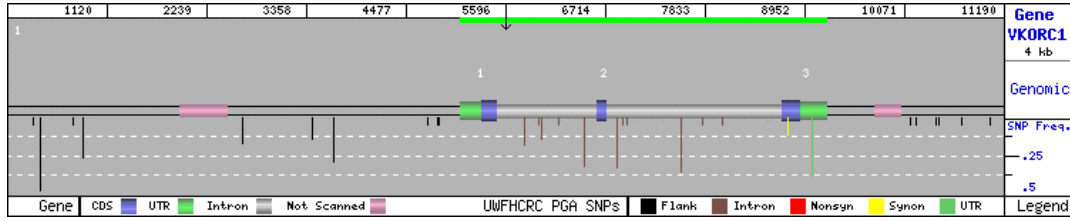


Figure 2.6-1VKORC1 gen yapısı

16p11.2’de lokalize, 4,1 kb uzunluğunda olup 3 ekzonu vardır. 2004 yılında Rost ve ark tarafından tanımlanmıştır. Vitamin K epoksit reduktaz enzimini kodlar, bu enzim vitamin K’yı indirgeyerek vitamin K’ya bağımlı faktörlerin gama karboksilasyonunu sağlar. Aminoasit değişikliğine yol açan mutasyonlar ilk kez varfarin rezistansı gösteren hastalarda saptanmıştır (11). Varfarin rezistansına neden olan mutasyonların bireylerarası varfarin doz farklılığını açıklamadığı gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, VKORC1 geninin genetik varyantlarının varfarin antikoagulan dozunda ve cevabında etkili olduğu gösterilmiştir (13-15). VKORC1 SNPleri ile ilgili yapılan çalışmada, varfarin dozu ile ilişkili SNPlerin kuvvetli bağlantılı oldukları ve aslında birbirlerinden farklı bilgi vermedikleri gösterilmiştir (13,15,48). VKORC1 polimorfizmlerinin nasıl bir moleküler mekanizmayla varfarin yanıtını değiştirdiği hala çözülememiştir. Promoter polimorfizmi olan 3673’ün transkripsiyonel seviyede değişiklik yaparak mRNA seviyelerini azalttığı düşünülmektedir.

Bununla birlikte, zaten genin tanımlanmasından sonra, enzimin nasıl reduktaz aktivitesi gösterdiğide açık değildir. VKORC1 endoplazmik retikulumda bulunmaktadır ve mikrozomal epoksit hidrolazla kompleks yaparak vitamin k epoksit reduksiyonu için gerekli multiprotein kompleksi oluşturur (103,104).

Table 2.6-1CYP2C9 substrat, inhibitör ve indükleyicilerine örnekler

Tip	İlaç
İndükleyici	Rifampin, barbitüratlar, St John Wort
İnhibitörler	Amiodaron, fenofibrat, fluconazol, fluvastatin, fluvoksamin, izoniazit, lovastatin, probenesit, zafirlukast, sulfametaksazol, tenipozit, vorikonazol
Substratlar	Amitriptilin, bazı anjiotensin reseptör antagonistleri (losartan, irbesartan), ibuprofen, meloxicam, naproxen, fenitoin, rosiglitazon, sulfonilüreler, tamoksifen, glibenklamid, glipizid, tamoksifen, varfarin, canniboidler

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulundan Helsinki Deklerasyonu uyarınca izin aldıktan sonra tüm hastalara bilgilendirme formu okutulup, aydınlatılmış onam formu imzalatıldı. Çalışmaya kabul edilen 205 hasta, VKV Amerikan Hastanesi 'ne INR kontrol amaçlı gelen hastalardan seçilmişlerdir.

Hastaların Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

Hastaların en az 8 hafta varfarin tedavisi alıyor olmaları ve bu 8 hafta içinde 3 kez INR ölçümlerinin yapılmış olması birincil koşul olarak saptandı. Üçüncü INR ölçümü indeks ölçüm olarak kabul edilip hastanın bilgi formu dolduruldu. Bu formda hastanın cinsiyeti, boy ve kilosu, varfarin kullanma endikasyonu, kullandığı süre içerisinde herhangi emboli geçirip geçirmediği, kanama bozukluğu, kullandığı tüm ilaçlar, varolan diğer hastalıkları (kronik veya akut) sorgulandı. Hasta dosyasından hastanın uygunluğuna karar verildikten ve hasta bilgilendirildikten sonra hastadan DNA örneği için 10 ml venöz kan örneği vakumlu steril EDTA'lı tüpe alındı. Toplanan kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapılarak DNA bankası oluşturuldu. Üçüncü vizitte hedef INR'ye ulaşmamış hastalar, indeks vizitinden 4 hafta önce herhangi bir nedenle hastaneye yatış yapan hastalar ve indeks vizitinden 2 hafta öncesine kadar ateşli hastalık geçirmiş olan hastalar çalışmaya dahil edilmemişler. Çalışmaya dahil edilen her hasta için kimlik bilgilerinin, sağlık bilgilerinin ayrıntılı sorulduğu bilgi formu dolduruldu.

Hastaların kullandıkları ilaçların değerlendirilmesi

İlaç etkileşimleri, ilaç olarak kullanılan moleküllerin sayısının artması, hastalıkların patogeneziyle birlikte ilaçların kinetik ve dinamikleri anlaşılması ile güncel tıbbin içinde önemli yer tutmaya başlamıştır. Varfarin CYP2C9 yoluyla metabolize olması, ve P-gp ile hücre içine taşınmasından dolayı öncelikle hastaların kullandıkları ilaçlar, ilgili enzimlerin substratları, inhibitörleri ve indükleyicileri yönünden gruplandı.

VKORC1 SNP Seçimi

Bu çalışmanın başlangıç amacı, VKORC1 genin için literatürde bildirilen bütün SNP'lerin varfarin dozu ile ilişkisini Türk toplumunda taramaktı, ancak yapılan son çalışmalarda sadece G3673A, -1639G>A polimorfizmlerinin çalışılmasının yeterince bilgi verdiği gösterilmiştir. Literatürde bildirilen diğer SNP'lerin birbirleriyle kuvvetli bağlantı gösterdikleri bildirilmiştir. Bu nedenle çalışmaya G3673A, -1639G>A polimorfizmlerinin taranmasıyla devam edilmiştir. Ayrıca farklı populasyonlarda yapılan çalışmalarda VKORC1 geninin 3' ucunda polimorfik olduğu bildirilmiştir. Bu doğrultuda VKORC1 3' ucu da incelenmiştir.

Katılımcılar için Bilgilendirilmiş Onam Formu

Proje Yürütücüsü: Dr Gülay Öner Özgön

VKV Amerikan Hastanesi Nişantaşı/İstanbul

Tel:212 31120 00/ 8707

Proje Başlığı: Türk populasyonunda varfarin dozu ile VKORC1 gen haplotip ilişkisi

Proje Konusu: Varfarin (coumadin), kardiyovasküler hastalıklarda ilk seçenek ilaçlardan biridir. Bununla birlikte, varfarin dozunu tedavi aralığında tutmak oldukça zordur. Hastaların bu tedavi aralığında olması için INR ile takip edilmesi gerekmektedir. Son yıllarda, genetik alanındaki gelişmeler farmakoloji alanındaki gelişmelerle birleştirildiğinde, hastaların günlük tedavilerinde kullanabilecekleri yararlı adımlar atılmıştır. Varfarin kullanan hastalarda yapılan birçok çalışmada bir çok genin çeşitliklerinin (polimorfizmlerinin) varfarinin etkilerini değiştirdiğini göstermiştir. Bu çalışmalardan en sonuncusu vitamin k epoksit kompleks 1 gen çeşitliliklerinin varfarin dozunu etkilediğini göstermiştir. Böyle bir ilişki

varlığında, varfarin kullanacak kişilere öncelikle bu gen analizleri yapıp, gen analizi sonuçlarına göre varfarin dozu başlanabilecektir.

Araştırmayı kabul ettiğiniz takdirde sizden on mililitre kan alınacaktır. İsimleriniz tamamen gizli tutulacaktır. Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır.

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır ; ayrıca, bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

Yapmak istediğimiz çalışmanın size bir risk getirmesi beklenmemektedir. Kan aldırmanın genelde hiçbir zararı olmamasına karşın, kolunuzda nadiren ve çok az kanama veya morarmaya yol açabilir. Araştırmanın sonucunda aranan bilgi elde edildiğinde size sonuçlar verilecektir.

Bu formu imzalamadan önce veya imzaladıktan sonra çalışma ile ilginiz varsa lütfen aşağıda adı yazılı kişilere sorularınızı sorun:

Dr Gülay Özgön (Amerikan Hastanesi, Klinik Farmakoloji, Tel 212 31120 00/8707)

Prof Dr Aksel Siva (Amerikan Hastanesi Nöroloji kliniği, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nöroloji AbD)

Bana anlatılanları ve yukarda yazılanları anladım. Bu formun bir kopyasını aldım. Çalışmaya katılmayı kabul ediyorum.

Katılımcı ismi ve imzası:

Tarih:

Şahit İsmi ve imzası

Araştırmacı ismi ve imzası:

BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

Ben....., genetik
çalışmada kullanılmak üzere şahsımdan kan örneği alınmasına kendi rızamla
onay veriyorum.

Genetik çalışmanın kapsamıyla ilgili olan bilgi formunu okudum ve
araştırmanın temel amacının kullandığım ilaçın bana yaptığı etkileri ile ilgili
bir genin incelemesi olduğunu anladım.

Adı Soyadı

İmza

Tarih:

Kabul ediyorum.

Tarih.

İmza:

İsim soyisim.

Tel:

Tanik ismi/ imzasi

Araştırmacı/hekim ismi imzasi:

HASTA BİLGİ FORMU

Adı Soyadı	
Hasta no	
Doğum yeri /yılı	
Boy/kilo	
Cinsiyeti	
Varfarin kullanma endikasyonu	
Eş zamanlı kullandığı ilaçlar	
Varolan diğer hastalıklar	
Varfarin dozu (INR ölçümü yapıldığında, haftalık)	
INR , Rutin biyokimya (tarihi ile)	
Geçirilmiş kanama hikayesi	
Geçirilmiş SVO veya emboli (INR sabit iken)	
Doktor imzası	
Haplotip Sonuçları	

Kimyasallar

Agaroz
Bromo fenol blue
Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)
Etidium bromid
Etil alkol
Mineral yağ
Tris – HCl

Kullanılan Cihazlar

PZR cihazı (Teche, Biorad)
Yatay elektroforez aleti (Bio-Rad)
Güç kaynağı (EC Appatus corporation)
CCD kamera- bilgisayar donanımı (Mitsubishi, Macintosh centis
650)
UV-transilluminatör (Bio-Rad)
Spektrofotometre (Nanodrop)
Çalkalamalı su banyosu (Mettler)
Çeker ocak (Kermanlar)
Hassas Terazî (Shimadzu)
Mikropipetler (Gilson, Eppendorf)
Vorteks (Kermanlar)
Masüstü mini santrifüj (Eppendorf)
Buzdolapları ve dondurucular (+4°C ve -20°C) (Uğur, arçelik)
Distile su cihazı (Milipore)
Hibridizasyon fırını (Techne)
Soğutmalı santrifüj (Heraus)

Pyrosequencing HS 96A System (Biotage AB)

Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Agaroz Jel Elektroforez Çözeltileri

Etidyum Bromür

Steril distile su ile 10 mg/ml olacak şekilde stok hazırlandı.

6X Agaroz Jel Yükleme Tamponu (10 ml)

10 ml steril distile su içinde %0,25 bromofenol mavisi, %30 Gliserol olacak şekilde 6X konsantrasyonda hazırlandı ve oda ısısından muhafaza edildi.

50X TAE (Tris-asetat EDTA) (1000 ml)

292 gr Tris base, 57,1 ml glasiyal asetik asit ve 100 ml 0,5 M EDTA distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak otoklavlandı ve oda ısısında muhafaza edildi.

PZR Reaksiyonu için Kullanılan Çözeltiler

Taq DNA polimeraz (rekombinant) (5U/ µl) MBI Fermentas. -20 °C'de muhafaza edilir.

PZR Tampon (10X)

100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, %0,8 nonidet P40. -20 °C'de muhafaza edilir.

MgCl₂ (25 mM) -20 °C'de muhafaza edilir.

dNTP 100 mM'lık deoksi-nükleotid trifosfatların her birinden 10 mM içerecek şekilde stok karışım hazırlanır. -20 °C'de muhafaza edilir.

Primerler Hazır liyofilize şekildeki primerler, 100 µM stok çözelti hazırlanacak şekilde otoklavlanmış filtreden geçirilmiş distile su içerisinde vorteks ile çözülür.

-20 °C'de muhafaza edilir.

Kullanılan Kitler**1) DNA izolasyon kiti (Roche Maxi Kit)**

Eritrosit parçalama çözeltisi (RBL)

1 g KHCO₃, 200 µl 0,5 M EDTA, 8,74 g NH₄Cl pH 7.4

Lökosit parçalama çözeltisi (WBL)

10 ml 4M NaCl, 20 ml 0,5 M EDTA

Protein Çökeltme solusyonu

Etanol

TE (Tris-EDTA) solüsyonu; 1 ml 1M Tris-HCl ve 2 ml 0,5 M EDTA

2) PZR Purifikasyon Kiti (Roche)

Bağlama solüsyonu: (Binding Buffer)

3M guaninidine-thiocyanate, 10 mM Tris-HCl, % 5 Etanol, pH 6,6

Yıkama solüsyonu: (Wash Buffer) :

% 20 Etanol, 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5

Elisyon solüsyonu : (Elution Buffer)

10 mM Tris-HCl, pH 8,5

3) Pyrosequencing dizileme kiti

3.2. Yöntemler

Periferik kandan Kit ile DNA izolasyonu

10 ml periferik kan 50 ml'lik falkon tüpüne aktarılarak üzerine 30 ml eritrosit parçalama solüsyonu (RBL) eklendi. 10 dk oda ısısında tüpler sallandı. + 4°C'de 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı atıldı ve pellet kısmı vortekslendi. 37°C'de 15 dk kristalizasyonu engellemek için bekletilmiş WBL solüsyonundan peletin üzerine 5ml oranında eklendi, karışım kırmızı/kahverengi olana kadar vortekslendi, lysisden eritrosit hücre membranının parçalanmasını hızlandırmak için 37°C'de 15-30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 2.6 ml protein presipitasyon solüsyonu eklendi ve her bir örnek yaklaşık 25 sn vortekslendi. 4500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası süpernatant kısmı steril 50 ml'lik falkon tüpe alınarak üzerine 1:2 oranında %100 etanol eklendi ve DNA'nın toplanması beklendi. Toplanan DNA steril 1.5'lik eppendorf tüpe aktarılarak 56 °C de ısıtıcı bloklara konularak kalan alkolün uçması sağlandı.

Elde edilen DNA'nın miktarına göre 100-300 µl TE (Tris-EDTA) tamponu eklenerek DNA'nın çözünmesi için 56 °C'de 1 saat bekletildi ve DNA + 4°C'de saklandı 10 ml periferik kan 50 ml'lik falkon tüpüne aktarılarak üzerine 30 ml eritrosit parçalama solüsyonu (RBL) eklendi. 10 dk tüpler ters yüz edildi. + 4°C'de 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

DNA konsantrasyonu ve Saflığının Ölçümü

İzole edilen DNA'ların konsantrasyon ve saflıkları ölçüldü. Stok DNA örneğinden 10 µl örnek 0.5 ml'lik eppendorf tüpüne konuldu. Üzerine 190 µl TE tamponu eklenerek örneğimiz 1/20 oranında sulandırıldı. Hazırlanan örneğin spektrofotometrede 260 ve 280 nm ultraviyole dalga boyundaki absorpsiyon değerleri ölçüldü.

DNA miktarı ve saflığı formüle göre hesaplandı:

Konsantrasyon = 20 (dilüsyon oranı) x 50 (sabit) x OD 260=ng/ μ l
DNA

DNA'nın saflığı;

OD 260/280 > 1.8 RNA,

OD 260/280 < 1.8 protein, kontaminasyonu olarak değerlendirildi.

PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

VKORC1 geninin daha önceki çalışmalarda adı geçen G3673A polimorfizminin bulunduğu promotor bölgesini amplifiye etmek için AY 587020 numaralı DNA dizisi, üzerinden "FastPCR" (Microsoft Visual Studio 6.0, Visual Basic 6.0 SP6) primer dizayn programı kullanılarak forward ve reverse primer çiftleri dizayn edildi. Dizayn edilen primerlerin "BLAST" programı ile Gen Bankasındaki insana ait diğer genlerdeki homolojisi araştırıldı ve başka genlere uymadığı saptandı.

CYP2C9 geninin * 2, *3, *4, *5 polimorfik bölgeleri için uygun primerler (AY341248; NM000771) Aquilante ve ark'nın çalışmasındakiler "BLAST" programı ile Gen Bankasındaki insana ait diğer genlerdeki homolojisi araştırılarak ve istenen bölgeye uygun oldukları görülerek kullanıldı.

MDR1 geninin 26. ekzonundaki C3435T polimorfizmi için uygun primerler Wadelius ve ark'nın yaptığı çalışmadakiler "BLAST" programı ile Gen Bankasındaki insana ait diğer genlerdeki homolojisi araştırılarak ve istenen bölgeye uygun oldukları görülerek kullanıldı.

VKORC1 geninin 3' ucu bölgesinin amplifikasyonu için yine AY 587020 numaralı DNA dizisi, üzerinden "FastPCR" (Microsoft Visual Studio 6.0, Visual Basic 6.0 SP6) primer dizayn programı kullanılarak forward ve reverse primer çiftleri dizayn edildi. Dizayn edilen primerlerin "BLAST" programı ile Gen Bankasındaki insana ait diğer genlerdeki homolojisi araştırıldı ve başka genlere uymadığı saptandı. Varfarin kullanan hastalara ait genomik DNA'lar tabloda belirtilen primer çiftleri ile amplifiye edildikten sonra, VKORC1 G3673A, CYP2C9 *2, *3, *4 ve *5, MDR1

C3435T dizilenmeleri için pyrosequencing metodu ile çalışıldı. VKORC1 3' ucu ise ticari dizilemeye gönderildi.

Table 3.2-1Kullanılan primer dizileri ve bağlanma ısısı

Primer 5' →3'	Bağlanma ısısı
VKORC1 3673 G/A PCR forward: biotin-CACAGACGCCAGAGGAAGA PCR reverse: TGTTGGCCAGGCTTGTCTTA Sequencing: GCGTGAGCCACCGCA	56 °C
MDR1 3435 C/T PCR forward: GCTGGTCCTGAAGTTGATCTGTG PCR reverse biotin TGCCACATGCTCCCAGGCTGTTT Sequencing: C/TGTGAGGGC	62 °C
CYP2C9*2 PCR forward: GTATTTGGCCTGAAACCCATA PCR reverse: biotin-CACCCTTGGTTTTTCTCAACTC Sequencing: GGGAAGAGGAGCATTGAGGC	55 °C
CYP2C9*3 PCR forward: biotin-TGCACGAGGTCCAGAGAT PCR reverse: GATACTATGAATTTGGGACTTC Sequencing: GGGAAGAGGAGCATTGAGGC	55 °C
CYP2C9*4 PCR forward: biotin-TGCACGAGGTCCAGAGAT PCR reverse:GATACTATGAATTTGGGACTTC Sequencing: GGGAAGAGGAGCATTGAGGC	55 ° C

CYP2C9*5 PCR forward: biotin-TGCACGAGGTCCAGAGAT PCR reverse:GATACTATGAATTTGGGACTTC Sequencing: GGGAAGAGGAGCATTGAGGC	55
VKORC1 3' PCR Forward: CAGGCTGACCTCATCTGCTT PCR Reverse: CAGGCTGACCTCATCTGCTT Sequencing: TTCCAGGTGTGTGCTCAGCCTT	60

Table 3.2-2 PZR reaksiyon koşulları

PZR Reaksiyon içeriği	Miktar	PZR reaksiyon koşulları		
VKORC1 G3673A (pyrosequencing öncesi)				
Go Taq Green Master mix	6.25 µl	Predenatürasyon	95 °C	2'
H2O	3.25 µl	Denatürasyon	95 °C	30''
Forward primer	0.50µl	Bağlanma (Anneling)	56 °C	30''
Revers Primer	0,5 µl	Uzama (Elangasyon)	72 °C	1'
Dimetilsulfoksit	1.5 µl	Tamamlanma	72 °C	7
DNA (20 ng)	2 µl	Döngü sayısı	45	
CYP2C9 *2, *3, *4, *5 (pyrosequencing öncesi)				
Go Taq Green Master mix	6.25 µl	Predenatürasyon	95 °C	2'
H2O	3.25 µl	Denatürasyon	95 °C	30''
Forward primer	0.50µl	Bağlanma (Anneling)	55°C	30''
Revers Primer	0,5 µl	Uzama (Elangasyon)	72 °C	1'
Dimetilsulfoksit	1.5 µl	Tamamlanma	72 °C	7
DNA (20 ng)	2 µl	Döngü sayısı	40	
MDR1 C3435T (pyrosequencing öncesi)				

Go Taq Green Master mix	6.25 µl	Predenatürasyon	95 °C	2'
H2O	3.25 µl	Denatürasyon	95 °C	30''
Forward primer	0.50µl	Bağlanma (Annealing)	62°C	30''
Revers Primer	0,5 µl	Uzama (Elangasyon)	72 °C	1'
Dimetilsulfoksit	1.5 µl	Tamamlanma	72 °C	7
DNA (20 ng)	2 µl	Döngü sayısı	40	
VKORC1 3' (dizileme öncesi) (50µl)				
10X tampon	5 µl	Predenatürasyon	94 °C	2'
dNTP's	4 µl	Denatürasyon	94 °C	1'
Primerler	2µl	Bağlanma (Annealing)	60 °C	30''
MgCl ₂	4 µl	Uzama (Elangasyon)	72 °C	30''
Taq polimeraz (MBI)	0,5µl	Tamamlanma	72 °C	10'
DNA (100ng)	1 µl	Döngü sayısı	35	

Agaroz Jel Elektroforezi

Toplam 25 µl volümde gerçekleştirilen PZR ile çoğaltılmış bölgenin kontrolü amacı ile 10 µl örnek alınarak 6X agaroz yükleme tamponu ile karıştırıldı. %2'lik agaroz jele Puc-Mix (MBI) size marker ile birlikte yüklenen PZR ürünleri, 95 miliamper akımda yaklaşık 1 saat yürütüldü. UV ışık altında CCD kamera ile görüntüler bilgisayara aktarıldı.

Agaroz Jelin Hazırlanması

% 2 konsantrasyonda agaroz jel hazırlanması için 1 g agaroz tartılarak 50 ml TAE solüsyonu içinde bir beherde çözündürüldü. Karışım mikrodalga fırında homojenize olana dek kaynatıldı. Takiben 56⁰C'ye kadar soğutularak içerisine 10mg/ml stok olarak hazırlanmış etidyum bromür solüsyonundan 1 µl çeker ocak altında eklendi. Sıvı haldeki agaroz elektroforez tepsisine döküldü. Taraklar yerleştirildi ve jelin donması için beklendi. Tepsi 1X TAE solüsyonu içeren yatay elektroforez tankına yerleştirildi.

Agaroz Jelin Yüklmesi- Elektroforezi- Görüntülenmesi

Daha önce hazırlanan agaroz jeli, içinde yürütme tamponu TAE bulunan yürütme tankına, kuyular negatif kutba yakın olacak şekilde yerleştirildi. PZR ürünlerinin jeldeki kuyucuklara çökmesini sağlamak amacıyla 6X brom fenol mavisi içeren yükleme tamponundan 1µl, PZR ürününden 10 µl örnek karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Bütün örnekler ve Puc-Mix (MBI) size marker yüklenmesini takiben tankın elektrotları güç kaynağına takıldı ve 80-90 V akımda örnekler yaklaşık 15-30 dakika yürütüldü. İşlem sonunda jel UV ışığı altında CCD kamera ile görüntüldü. Görüntüler bilgisayara aktarıldı ve thermal kağıda bilgisayar çıktıları alındı.

Pyrosequencing

Pyrosequencing, DNA sentezi esnasında salınan pirofosfatların yakalanması esasına dayanan bir tekniktir. Enzimatik reaksiyonlar kaskadı ile eklenen nükleotidlerin görülebilir ışığa çevrilmesi ile karakterizedir. Bu kaskat polimeraz tarafından bir nükleotidin eklenmesi sonucu inorganik pirofosfatın (Ppi) salınması ile başlar. Salınan PPI luciferaz enzimi ile ATP ile birleşip ışığa dönüştürülür. Eklenen nükleotidin bilinmesi ile birlikte, çalışılan örneğin sekansıda belirlenmektedir. Kolay uygulanabilmesi, gereksiz nükleotid, primer harcanmaması, nispeten daha kolay, ucuz ve otomatize edilmesi nedeniyle, son yıllarda özellikle farmakogenetik çalışmalarda tercih edilen bir metoddur. Bu metodun, mutasyonların taranmasında, cDNA analizlerinde, hastalık ile ilişkili genlerin tekrar dizilenmesinde, mikrobiyal tiplmede ve tek nükleotid polimorfizmlerinin analizlerinde uygun olduğu gösterilmiştir (105).

Günümüzde pyrosequencing’de kullanılan dört farklı kimyasal vardır ve bunlar polimeraz, sulfiraz, lusiferaz ve apiraz enzimlerini içermektedir. Bu dört enzimin bulunduğu otomatize sistemde apiraz enzimi sayesinde dizileme esnasında kullanılmayan nükleotidler ortamdan uzaklaştırılır. Otomatize olmayan metodlarda bu enzimin işini manuel olarak yıkama ile yapıldı (106).

Sekanslama işlemi, dizilenecek bölümün PZR ile çoğaltılması ile başlar. Bu metodda PZR ile çoğaltılmış bölgeler streptavidin kaplı sefaroz tanecikleri ile kaplanarak örnek tek zincirli hale getirilir ve böylece dizileme tek zincir üzerinden çalışır.

Elde edilen sinyaller sinyalin gücüne göre tasarlanmış bir software ile değerlendirilmektedir. Aynı zamanda eğri altında kalan alanlarda değerlendirmede kullanılmaktadır.

Pyrosequencing metodunun diğer genotipleme teknolojileri ile kıyaslanması

RFLP, Sanger DNA dizileme, Taqman, SSCP ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarında pyrosequencing metodunun %99 daha güvenilir, uygulama kolaylığı ve daha ucuz olduğu saptanmıştır (107-110).

Pyrosequencing Teknolojisinin Esasları

1. Adım; Sekanslama primeri, PZR ile çoğaltılmış ve tek zincir haline getirilmiş hedef bölgesine, DNA polimeraz, ATP sulfiraz, lusiferaz ve apirazla, adenozin 5'fosfosulfat ve lusiferin substratlarıyla hibridize edilir (Şekil 3.2-2).

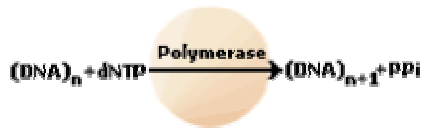


Figure 3.2-1 Ppilerin açığa çıkması (www.pyrosequencing.com)

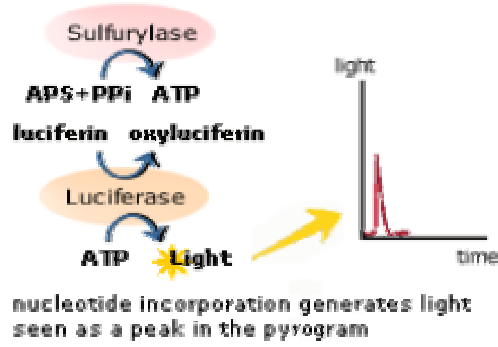


Figure 3.2-2 Nukleotid bağlanmalarının ışığa dönüşmesi
(www.pyrosequencing.com)



Figure 3.2-3 Apiraz enziminin bağlanmayan nukleotidleri degrade etmesi
(www.pyrosequencing.com)

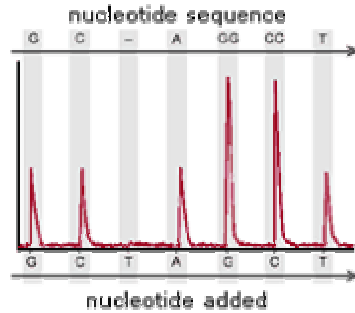


Figure 3.2-4 Eklenen nukleotidlerin ekrandan izlenmesi (www.pyrosequencing)

2. Adım; Öncelikle 4 nukleotidden biri reaksiyona katılır . DNA polimeraz nukleotidin DNA zincirine entegre olmasını sağlar DNA polimeraz her sağladığı birleşmeden pirofosfat salınmasına neden olur.

3. Adım; Salınmış pirofosfatları ATP sulfurilaz adenozin 5' monofosfat varlığında ATP'ye dönüştürür. Bu salınan ATP ise lusiferaz

aracılığı ile lusiferini oksilusiferine dönüştürerek ışığın oluşmasına neden olur. Bu ışık CCD kamerası ile pikograma dönüştürülür (Şekil 3.2-2).

4. Adım; Nukleotid degradasyonu sağlayan apiraz enzimi, sürekli birleşmeyen dNTP'leri degrade eder. Degradasyon bittiğinde ise diğer dNTP eklenir (Şekil 3.2-3).

5. Adım; dNTP eklenmesi sırayla yapılır. Eklenen nukleotidler ekranda izlenebilir (Şekil 3.2-4).

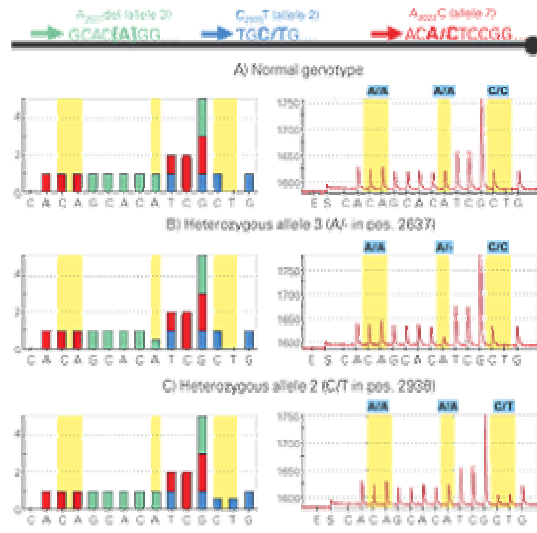


Figure 3.2-5 CYP2D6'nin Pyrosequencing ile incelenmesi. Şeklin üstünde PCR parçaları 3 farklı renkte gösterilmiş. Polimorfik bölgeler sarı olarak gösterilmiştir. A) Normal genotip B) Heterozigot allele C) heterozigot allele (www.pyrosequencing.com)

Pyrosequencing Metodun Uygulanması

Bağlanma solüsyonu, su ve beads'in 15 ml'lik santrifüj tüpünde karıştırılır ve vortekslenir.

PZR platelerine bu karışımdan 72ul konulur.

PZR ürününü 3 ul, karışıma eklenir

Platein üzeri plate örtüsü ile kapatılır.

100 pmol/ul stok konsantrasyonunda hazırlanan dizileme primerleri pyrosequencing için gerekli olan 5 pmol primer konsantrasyonu için 1.5 mikrolitrelik PZR tüpünde 1:20 oranında sulandırılır. Hazırlanan primerlere

primer bağlanma solüsyonu eklenir, bu karışımdan her bir örnek için 12 ul Pyrosequencing plateine konulur.

PZR ürününün olduğu PZR plate DNA zincirlerinin ayrılması için vakumlanır. Vakum esnasında, öncelikle 2 dk suyu vakumlayarak vakumun filtrelerinin temizlenmesi ve PZR plateninde sallayıcıya konulması gerekir. Daha sonra sırasıyla distile su, %70 etanol, denaturasyon sıvısı ve yıkama solüsyonu vakumlanır. Vakum kapatılır. Vakum filtreleri dikkatlice dizileme primerlerinin bulunduğu pyrosequencing plateine emdirilir. Sonrasında ısıtıcı blokta 3 dk ekletilir. Böylece sekanslama primerleri tek zincirli DNA ile bağlanır. Plate ısıtıcı blokdan kaldırılıp 5 dk oda ısısında bekletilir. Bu arada software'in diziye uygun verdiği sayılarla nükleotidler, enzim ve substratlar cihazın tüplerine konulur. Örneklerin isimleri kaydedilerek analiz için cihaz başlatılır. Öncelikle enzim arkasından substrat PZR örneklerinin bulunduğu platelere akar, ardısıra salınan nükleotidler tek zincirli DNA'ya bağladıkları zaman pikogramları ekrandan izlenir ve bu şekilde sentez edilen DNA dizisi analiz edilir.

Dizileme Analizi

Dizilenecek Örneklerin Seçimi

VKORC1 geninin diğer popülasyonlardan farklı ve varfarin dozu ile ilişkili olabilecek 3' bölgesinin Türk toplumundaki polimorfik özelliklerini görmek amacıyla dizi analizi yapıldı. Ekonomik yetersizliklerden ötürü 205 hastadan 100 tanesi rastgele seçilerek dizileme analizine gönderildi.

Dizilenecek Örneklerin Purifikasyonu (saflaştırılması)

Dizilemeye gönderilecek DNA örneklerine 50µl'lik PZR yapıldı. PZR ürünlerinin saf ve temiz olması gerektiğinden, ortamda kalan PZR bileşenlerini uzaklaştırmak amacıyla , ürünler purifikasyon kiti (Roche) kullanılarak saflaştırıldı.

100 ml PZR ürününe 500 ml bağlanma solüsyonu eklendi. Örnekle solüsyon homojenize olması için iyice karıştırıldı. Karışım toplama tüplerinin içine yerleştirilen filtreli tüplere aktarıldı ve 13.000 rpm'de 30-60

saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak yeni toplama tüpü içine filtreli tüplere aktarılıp, 500 ml yıkama solüsyonu eklendi ve 13.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası aynı işlem tekrar edilerek 200 ml yıkama solüsyonu eklendi ve 13.000 rpm’de 1dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında filtreli tüpler steril 1,5ml’lik eppendorf tüplerine aktarıldı ve üzerine 100 ml elisyon solüsyonu eklenerek, 13.000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi. Bu aşamanın sonrasında örnekler saf halde elde edildi. Saflaştırılan ürünler %’2lik agaroz jel elektroforezinde Φ X174 markerıyla yürütülerek yoğunlukları hesaplandı ve dizileme analizine gönderildi. Örnekler dizileme analizine kadar +4 °C’de saklandı. Ticari dizileme ABI PRISM 310 Genetic Analyzer’de DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham) kullanılarak yapıldı.

Dizileme Örneklerinin Bilgisayar Analizleri

Dizileme sonuçları Chromas MFC Application 2.3.0.0 ve Sequencher 4.0 Software kullanılarak analiz edildi.

İstatistiksel Değerlendirme

Temel demografik verileri değerlendirmek için bioallelik sisteme dayalı Hardy Weinberg testi Chi Square gibi tanımlayıcı istatistik metodları kullanıldı. Her bir hasta için günlük ortalama dozu yazılarak, ortalama INR elde edildi. Ortalama varfarin dozu toplam antikoagülasyon tedavi altında kaldığı günlerle hesaplandı. Ortalama INR değeri ise eldeki bütün INR'lerin toplamı vizit sayısına bölünmesi ile elde edildi.

Haftalık ortalama varfarin dozunun her bir polimorfizm (yaş faktörünü de kapsayarak) ile karşılaştırılması Bonferroni lineer modelle yapıldı. Kanama ve inme riskinin genetik ilişkisini bulmak için ise lojistik regresyon yapıldı. VKORC1, MDR1 ve CYP2C9 bu modelde yaş varyantı ile birlikte kullanılmışlardır. Varfarin idame dozuna etki eden genetik ve genetik olmayan bağımsız etkileri tanımlamak için stepwise modelle birlikte multipl linear regresyon analizi $p=0.01$ kriteri ile uygulandı. Genetiğin dominant model olduğu varsayılarak; genetik faktörler aşağıdaki gibi formatlanmıştır:

VKORC13673: AA ve AG ile yabancı genotip olan GG

CYP2C9: *1 / *2, *1 / *4, *1 / *5, *2 / *2, *5 / *5 ve *2 / *5 ile yabancı tip olan *1 / *1

MDR 3435: TT ve CT ile wild genotip olan CC

Genetik olmayan faktörler ise, yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi, aspirin kullanımı, CYP2C9 veya CYP3A4 inhibitörleri, kalp kapakcığı replasmanı, varfarin kullanma endikasyonu, ortalama INR, kanama veya en az bir kez inme, miyokart enfarktüsü veya geçici iskemik atak geçirmiş olmak olarak tanımlandı.

Önceden gerekli varfarin dozunu ayarlamak için kategorik bir yaklaşım uygulandı. Çalışmada ortalama haftalık dozun 25. persantili alınarak iki farklı doz grubu oluşturuldu. 25mg/hafta'dan az olan dozlar düşük doz olarak sınıflandırılırken, 40 mg/hafta'dan fazla olanlar yüksek doz olarak tanımlandı. Multipl regresyon analizinde aynı olan 13 bağımsız değişken, ortalama haftalık varfarin dozunu öngörmek amacıyla lojistik

regresyon modelinde kullanıldı. Sonuçta, backward modeliyle en doğru öngörü ile optimize edildi.

VKORC1 geninin 3' ucu bölgesinin dizi analizi sonuçlarında bulunan polimorfimlerin haftalık varfarin dozu ile ilişkisi One way ANOVA ile araştırıldı.

Table 3.2-3 Kullanılan primerlerin ilgili dizilerde gösterimi

VKORC1 G3673A polimorfizmi için primerler (promotor bölge NC 000016)

ATGCAGGGACATCTTTGGTGACCATTATTCTGTCTACCACACTCTCTAGAA
GAGAGTAGATGTGAGAAACAGCATCTGGAGAGGGAGGAGCCAGCAGGAGAG
GGAAATATCACAGACGCCAGAGGAAGAGAGTTCCCAGAAGGGTAGGTGCAA
CAGTAAGGGATCCCTCTGGGAAGTCAAGCAAGAGAAGACCTGAAAAACAAC
CATTGGCCGGGTGCGGTGGCTCACGCCTATAATCCTAGCATTTTGGGAGGC
CGAGGTGGGTGGATCACTTGAGGTCAGGAGTTTAAGACAAGCCTGGCCAAC
ATGGTGAAACCCTGTCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCAGACATGGTG
GCAGGCACCTGTAGTCCAACTACTTGGGAGGCTGAGGCACGAGAACCCT
TGAACCCTGGAG

CYP2C9*2primerleri (3.Ekzon)

GAAATATTTGAAGCCTGTGTGGCTGAATAAAAGCATACAAATACAATGAAA
ATATCATGCTAAATCAGGCTTAGCAAATGGACAAAATAGTAACTTCGTTTG
CTGTTATCTCTGTCTACTTTCCCTAGCTCTCAAAGGTCTATGGCCCTGTGTT
CACTCTGTATTTTGGCCTGAAACCCATAGTGGTGCTGCATGGATATGAAGC
AGTGAAGGAAGCCCTGATTGATCTTGAGAGGAGTTTTCTGGAAGAGGCAT
TTTCCCCTGGCTGAAAGAGCTAACAGAGGATTTGGTAGGTGTGCATGTGC
CTGTTTCAGCATCTGTCTTGGGGATGGGAGGATGGAAAACAGAGACTTAC
AGAGCTCCTCGGGCAGAGCTTGGCCCATCCACATGGCTGCCAGTGTGAGC
TTCTCTTTCTTGCTGGGATCTCCCTCCTAGTTTTCGTTTCTCTTCTGTT
AGGAATTGTTTTAGCAATGGAAGAAATGGAAGGAGATCCGGCGTTTCTC
CCTCATGACGCTGCGGAATTTTGGGATGGGGAAGAGGAGCATTGAGGACCG
TGTTCAAGAGGAAGCCCGCTGCCTTGTGGAGGAGTTGAGAAAAACCAAGGG
TGGGTGACCCTACTCCATATCACTGACCTTACTGGACTACTATCTTCTCTA
CTGACATTCTTGAAACATTTAGGGGTGGCCATATCTTTCATTATGAGTC
CTGGTTGTTAGCTCATGTGAAGCGGGGGTTTGAAGC

CYP2C9*3*4*5 Primerleri (7. ekzon)

CATCCTCTCTTTAAGTTTGCATATACTTCCAGCACTATAATTTAAATTTAT
 AATGATGTTTGGATACCTTCATGATTCATATAACCCCTGAATTGCTACAACA
 AATGTGCCATTTTTCTCCTTTTCCATCAGTTTTTACTTGTGTCTTATCAGC
 TAAAGTCCAGGAAGAGATTGAACGTGTGATTGGCAGAAACCGGAGCCCCTG
 CATGCAAGACAGGAGCCACATGCCCTACACAGATGCTGTGGTGCACGAGGT
 CCAGAGATACATTGACCTTCTCCCCACCAGCCTGCCCATGCAGTGACCTG
 TGACATTAAATTCAGAACTATCTCATTCCCAAGGTAAGTTTGTTTCTCCT
 AACTGCAACTCCATGTTTTTGAAGTCCCAAATTCATAGTATCATTTTTA
 AACCTCTACCATCACCGGGTGAGAGAAGTGCATAACTCATAT

MDR1 C3435T Primerleri

AAATTTTAATCACACAACTTTTCTTAATCTCACAGTAACTTGGCAGTTT
 CAGTGTAAGAAATARTGATGTTAATTGTGCTACATTCAAAGTGTGCTGGTC
 CTGAAGTTGATCTGTGAACCTCTGTTTTTCAGCTGCTTGATGGCAAAGAAAT
 AAAGCGACTGAATGTTTCAGTGGCTCCGAGCACACCTGGGCATCGTGTCCCA
 GGAGCCCATCTGTTTGACTGCAGCATTGCTGAGAAATTGCTTATGGAGAC
 AACAGCCGGGTGGTGCACAGGAAGAGATTGTGAGGGCAGCAAAGGAGGCC
 AACATACATGCCTTCATCGAGTCACTGCCTAATGTAAGTCTCTCTTCAAAT
 AAACAGSCTGGGAGCATGTGGCAGCCTCTCTGGCCTATAGKTTGATTTATA
 AGGGGCTGGTYTCCCAGAAGTGAAGAGAAATTAGCAACCAAATCACACCCT
 TACCTGTATACAAGCATCTG

VKORC1 3' Primerleri

GCCCTCAACCCAAGCCAGGCTGACCTCATCTGCTTTGCTTTGGCATGTGAG
 CCTTGCCTAAGGGGGCATATCTGGGTCCCTAGAAGGCCCTAGATGTGGGGC
 TTCCTAGATTACCCCTCCTCCTGCCATAACCCGCACATGACAATGGACCAA
 TGTGCCACACGCTCGCTCTTTTTTACACCCAGTGCCCTCTGACTCTGTCCCC
 ATGGGCTGGTCTCCAAAGCTCTTTCCATTGCCAGGGAGGGAAGGTTCTGA
 GCAATAAAGTTTCTTAGATCAATCAGCCAAGTCTGAACCATGTGTCTGC C
 ATGGACTGTGGTGCTGGGCCTCCCTCGGTGTTGCCTTCTCTGGAGCTGGGA
 AGGGTGAGTCAGAGGGAGAGTGGAGGGCCTGCTGGGAAGGGTGGTTATGGG
 TAGTCTCATCTCCAGTGTGTGGAGTCAGCAAGGCCTGGGGCACCATTGGCC
 CCCACCCCCAGGAAACAGGCTGGCAGCTCGTCTCTGCTGCCACAGGAGCC
 AGGCCTCCTCTCCTGGGAAGGCTGAGCACACACCTGGAAGGGCAGGCTGCC
 CTTCTGGTTCTGTAAATGCTTGCTGGGAAGTTCTTCCTTG

Kırmızı bölümler ekzonları, **siyah bölümler** intronları **mavi bölümler** primerleri, **yeşil**

bölümler sık rastlanan SNPleri göstermektedir.

4. BULGULAR

Çalışmada, 205 varfarin kullanan hastanın haftalık varfarin dozunu öngörebileceğimiz genetik polimorfizmlerin, varfarin dozu, INR, varfarin yan etkileri, ilaç etkileşimleri, vücut kitle indeksi, yaş, cinsiyet arasındaki ilişkiyi saptamak amacıyla yapılmıştır. Hasta grubu, VKV Amerikan Hastahanesi Nöroloji, Kardiyoloji ve Kardiyovasküler Cerrahi birimlerine gelen varfarin kullanan hastalardan, hedef INR'ye ulaşabilmiş, en az 8 hafta varfarin tedavisi altında olan, peşpeşe 3 ziyaret sonuçlarına ulaşılabilen hastalar seçildi. Hastalardan 10 ml venöz kan örneği alınarak DNA izolasyonu ile DNA bankası oluşturuldu. 205 hastada VKORC1 G3673A, MDR1 C3435T, CYP2C9 *2, *3, *4, *5 çalışılırken, VKORC1 geninin 3' ucunun dizilenmesi ise 100 hastada yapıldı.

4.1. DEMOGRAFİK VERİLER

Çalışmaya katılan 205 hastanın yaş ortalaması 58.09 ± 15.92 , % 46'sı erkektir. Varfarin endikasyonunda birinci sırayı %52.19 ile kalp kapağı replasmanı sonrası profilaksi, % 19.03 ile ikinci sırayı geçirilmiş tromboemboli ve üçüncülüğü ise %17.56 ile atriyal fibrilasyon veya profilaksisinde kullanımı oldu. Varfarin metabolizmasından ötürü ilaç etkileşimlerine maruz kalabilen bir ilaç olduğu için, hastaların birlikte kullandığı ilaçlar CYP2C9, CYP3A4 ve MDR1 substrat, inhibitör ve indükleyicileri de varfarin dozunu etkileyen farklı varyantlar olarak ayrılmışlardır. En fazla CYP3A4 substratı (%22.10) ve CYP2C9 substratı (%17.60) olduğu saptandı.

Hastaların %74.51'inin hedef INR'sinin 2-3 arasında, % 25.49'unun ise 1.5-2.5 olduğu saptandı.

Hastaların %26.80'inde ise yan etki olarak varfarin kullanırken kanama şikayetinin olduğu saptandı.

Table 4.1-1 Demografik veriler

Demografik Özellik	Tüm hastalar-205 (%)
Yaş (yıl)	58.09±15.92
Erkek	95 (46.30)
Kadın	110 (52.70)
Vücut kitle indeksi (ortalama, SD)	25.84(3.95)
Hedef INR	
1.5-2.5	52(25.49)
2-3	153(74.51)

Table 4.1-2 Birlikte kullanılan ilaçların etkileşim açısından değerlendirilmesi

Birlikte kullanılan ilaçlar	Sayı (%)
CYP2C9	
Substrat	36(17.60)
İnhibitör	5(2.50)
İndüktör	22(10.80)
CYP3A4	
Substrate	45(22.10)
İnhibitör	5(2.50)
İndüktör	11 (5.40)
MDR1	
Substrat	29(14.20)
İnhibitör	1(0.50)

Table 4.1-3 Hastalarda varfarin dozları ve INR

Özellik	Tüm hastalar (n=205)	Hedef 1.5-2.5 INR'si olan hastalar (n=52)	Hedef 2.0-3.0 INR'si olan hastalar (n=153)
Ortalama doz (mg/hafta) ±SD	34.20±16.78	29.93±14.26	35.65±17.35
Medyan doz ve aralığı (mg/hafta)	32.50(6.25-125.00)	28.75(6.25-77.50)	35.00(7.50-125.00)
Ortalama INR±SD	2.33±1.55	1.89±0.61	2.48±1.73
Medyan INR ve aralığı	2.13(1.02-20.70)	1.81(1.02-3.83)	2.22(1.15-20.70)
Ortalama doz/INR±SD	16.85±9.89	17.15±9.76	16.75±9.97

VKORC1 geninin 3' ucunun incelenmesi için seçilen 100 hastanın 47'si kadın 53'ü erkek, yaş ortalaması 56.02±12.94 ve haftalık ortalama varfarin dozları 34.20 mg olarak saptandı.

4.2. VKORC1 G3673A sonuçları ve varfarin doz ilişkisi

VKORC1 geninin G3673A bölgesini içerecek şekilde promotor bölgesi uygun primerler ve uygun koşullarla PZR ile çoğaltıldı. PZR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. PZR ile çoğaltılan bölge, polimorfik bölgeye uygun sequencing primerleri ile pyrosequencing metodu ile incelendi. İncelen 205 hastanın 59'u yabanıl tip olan GG, 87'si heterozigot polimorfizm taşıyıcısı GA ve 59'u ise homozigot polimorfik

olarak saptandı. Ortalama kullandıkları varfarin dozu ile ilgili polimorfizmler anlamlı bulundu ($p<0.0001$)

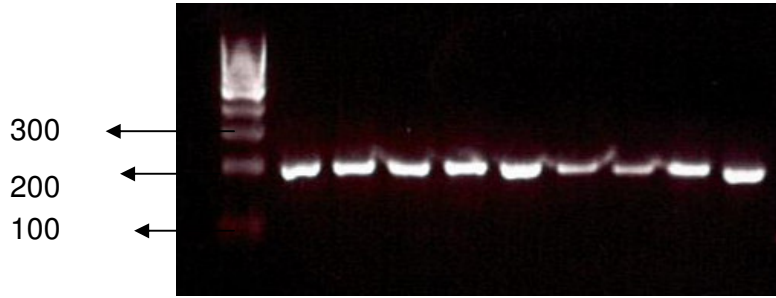


Figure 4.2-1 VKORC1 3673 polimorfizmi için PCR sonrası jel görüntüsü (197bp)

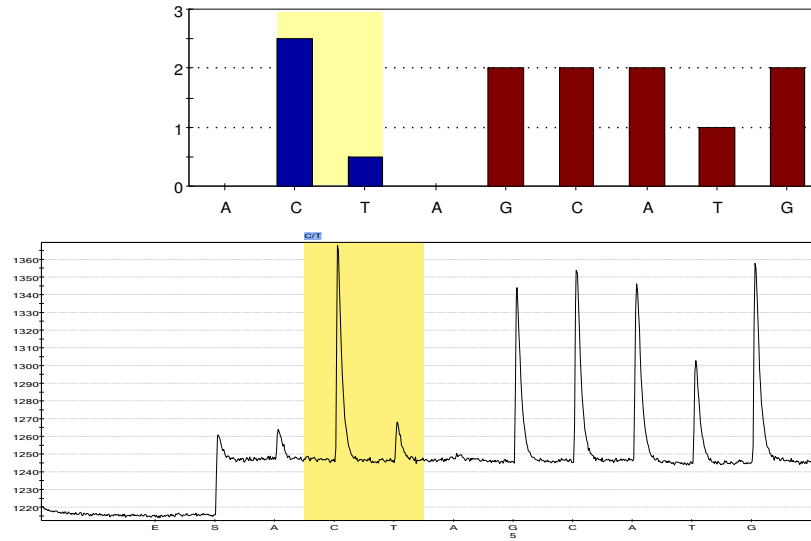


Figure 4.2-2 VKORC1 3673 SNP G/A

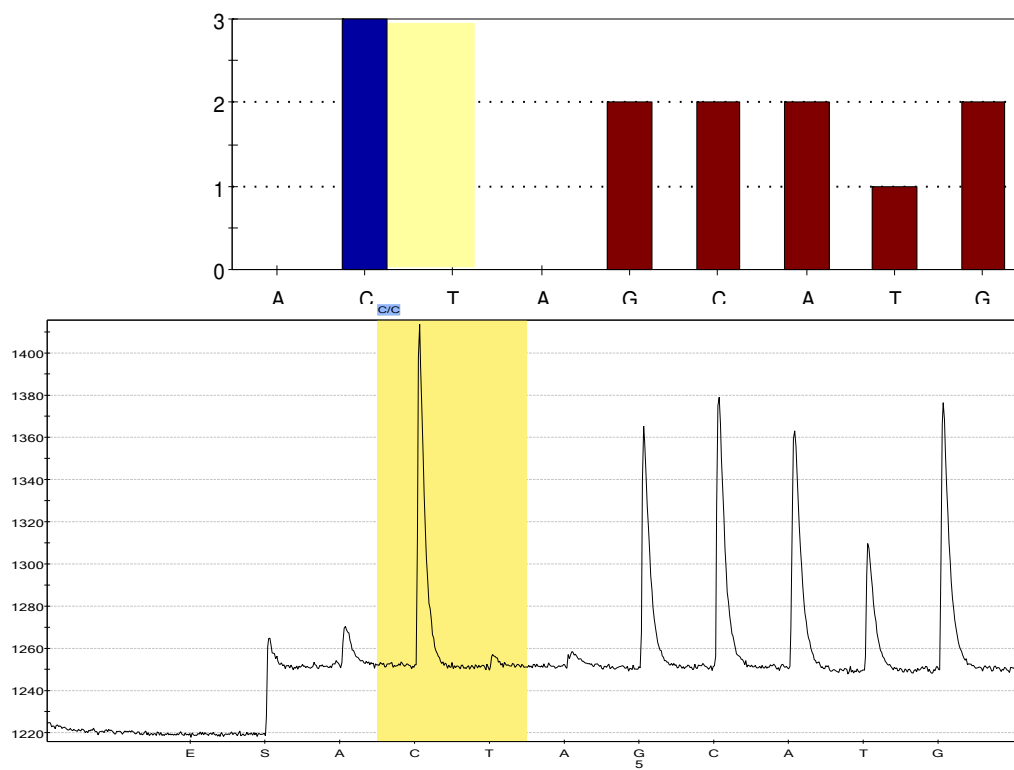


Figure 4.2-3 VKORC13673 GG

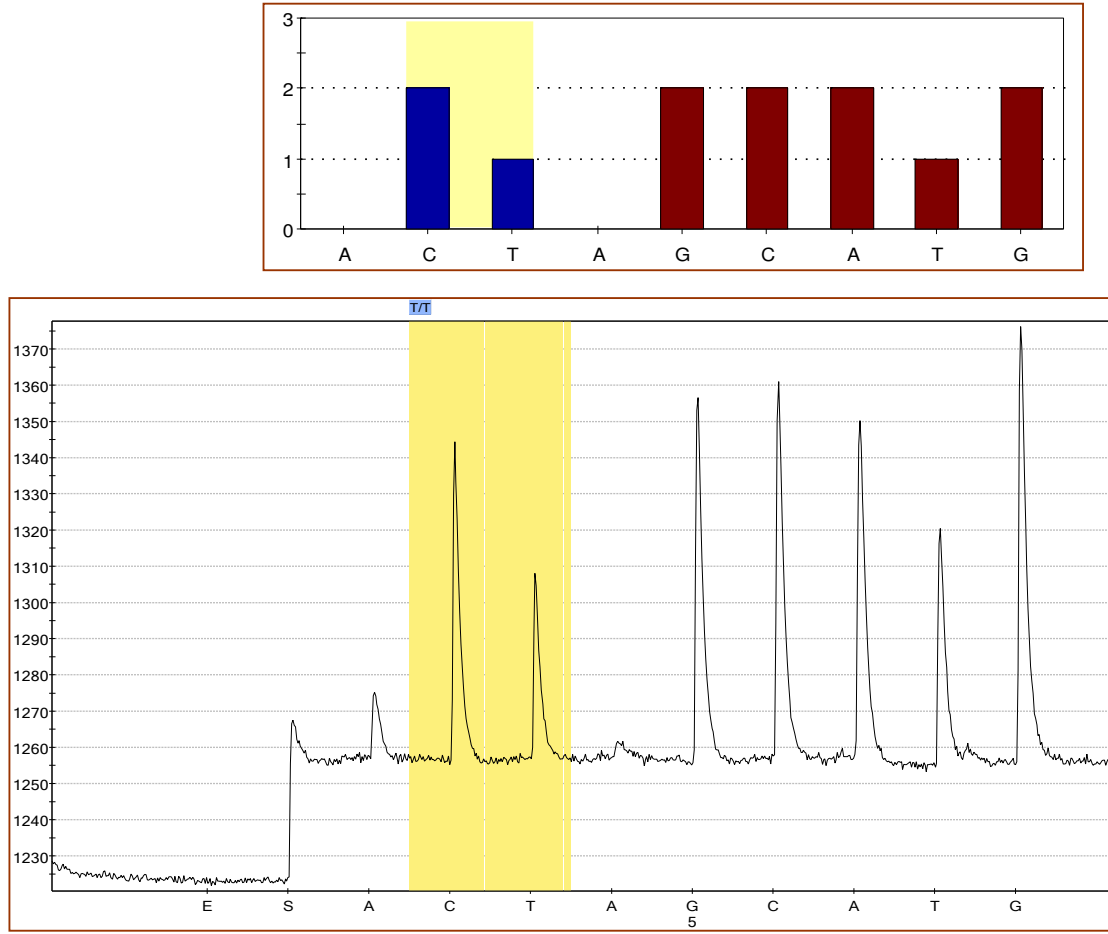


Figure 4.2-4 VKORC1 3673 G/G

Table 4.2-1 VKORC1 3673 polimorfizmleri ve ortalama varfarin doz ilişkisi

VKORC1 3673 genotip	Ortalama Varfarin doz±SD (mg/hafta)	P değeri
GG (n=59)	43.18±22.78	<0.0001
GA (n=87)	33.78±11.19	
AA (n=59)	25.83±11.46	

Table 4.2-2 VKORC1 genotipleri ile varfarin doz ilişkisinin karşılaştırılması

VKORC1	VKORC1	Ortalama fark	Std hata	P
GG	GA	9.226	2.527	0.001
	AA	16.781	2.763	0.001
GA	AA	7.555	2.529	0.009

Bağımlı değişken haftalık varfarin dozu, Anlamlılık 0.05 seviyesindedir

4.3. CYP2C9 Polimorfizmleri Sonuçları ve Varfarin Doz ilişkisi

CYP2C9'un *2, *3, *4 ve *5 polimorfizmleri uygun primerlerle çoğaltılıp uygun koşullarla PZR ile çoğaltıldı. PZR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. PZR ile çoğaltılan bölge, polimorfik bölgeye uygun sequencing primerleri ile pyrosequencing metodu ile incelendi. İncelenen 205 hastanın 123'ü yabancı tip olan *1/*1, 69'u 1/5, 1/2, 1/4 olmak üzere heterozigot ve 13'ü 2/5, 5/5 ve 2/2 olmak üzere homozigot olarak tesbit edildi. *3 polimorfizmi hiçbir hastada bulunmadı.) Çalışmamızda ise, *1/*1 frekansı % 60, *2/*1 frekansı %22.43, *2/*2 frekansı %1,46, *4/*1 %1,46, 5/1 frekansı % 17,56 ve *5/*5 frekansı % 0.98 olarak saptandı. Çalışma grubumuzda *3 allelini taşıyan hastaya rastlanmadı.

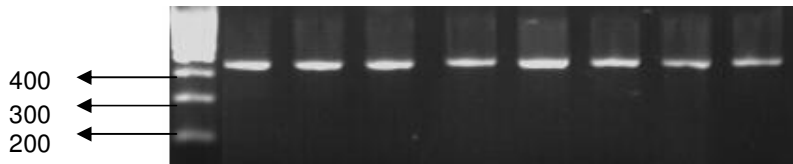


Figure 4.3-1 CYP2C9*2 PZR sonrası jel görüntüsü (455 BÇ;100bp DNA Ladder PROMEGA)

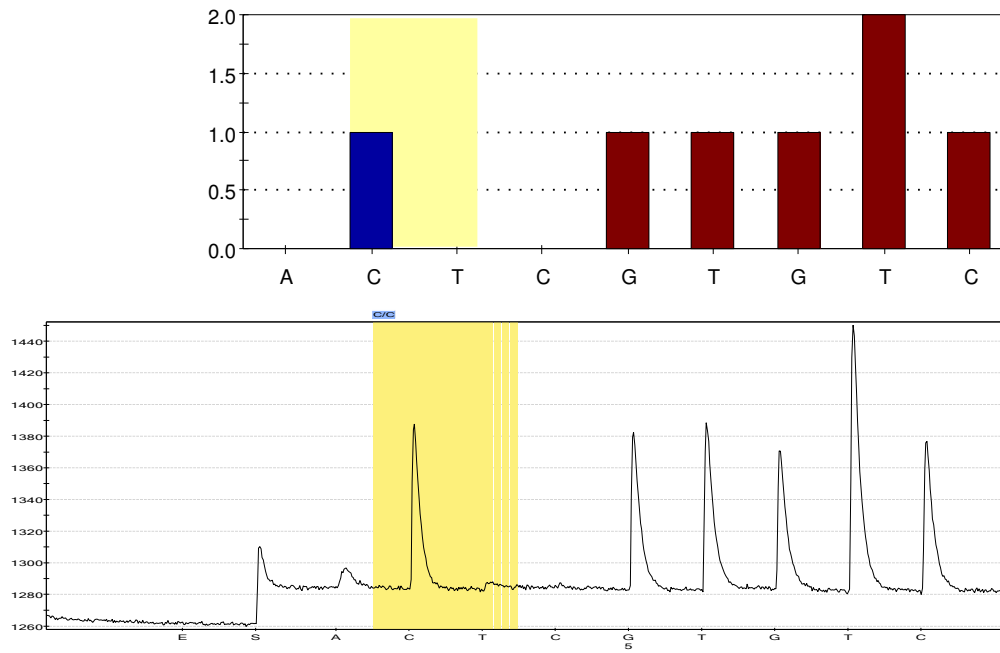


Figure 4.3-3: CYP2C9*2 C/C

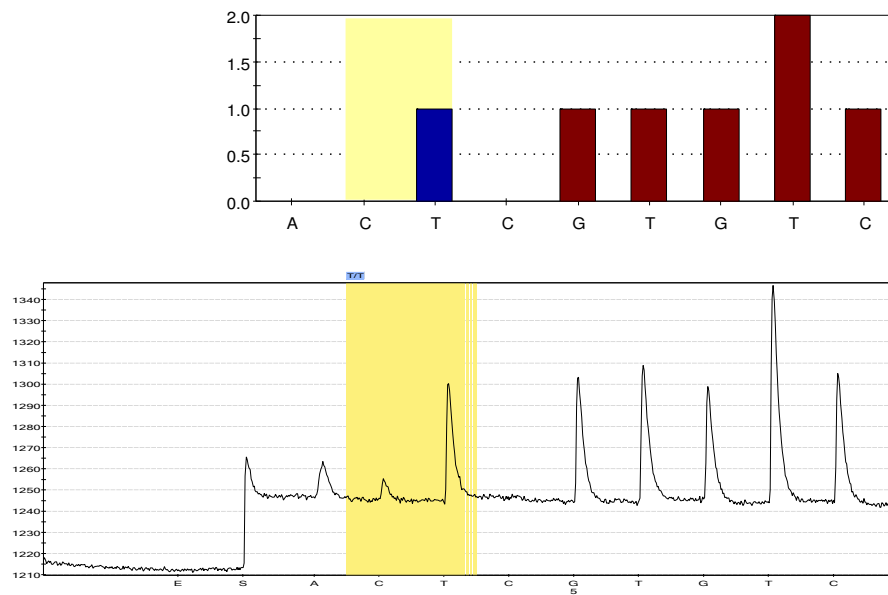


Figure 4.3-4: CYP2C9*2 T/T

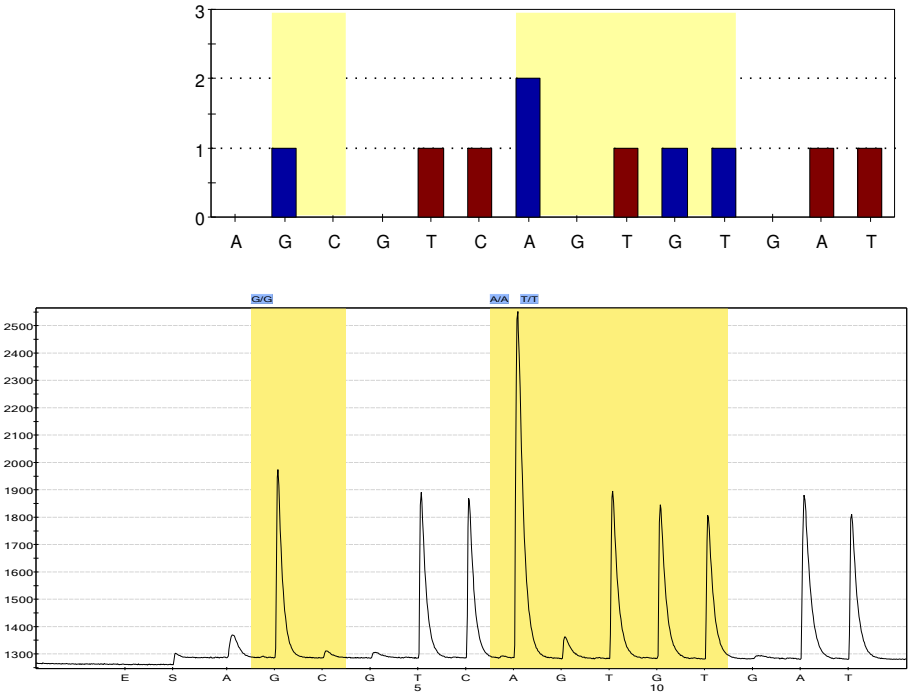


Figure 4.3-5: CYP2C9*3 G/G *4 A/A *5 T/T

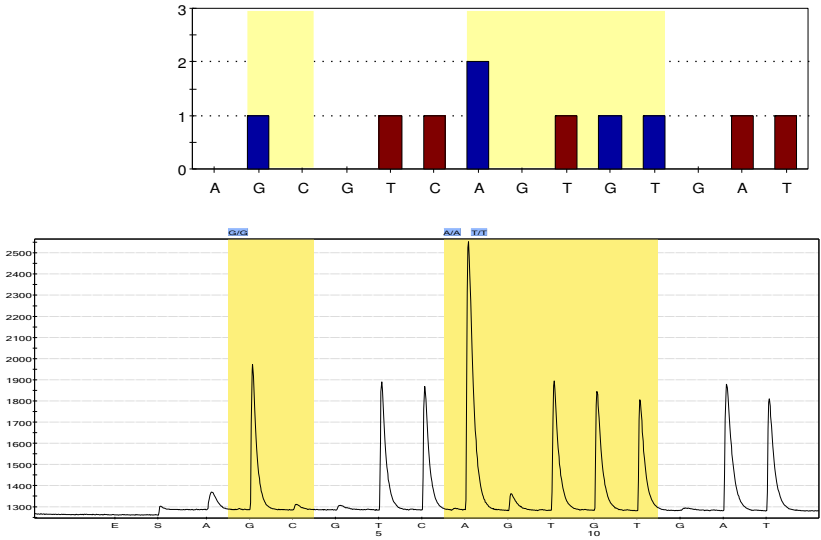


Figure 4.3-6: CYP2C9*3 G/G *4 A/G *5 T/T

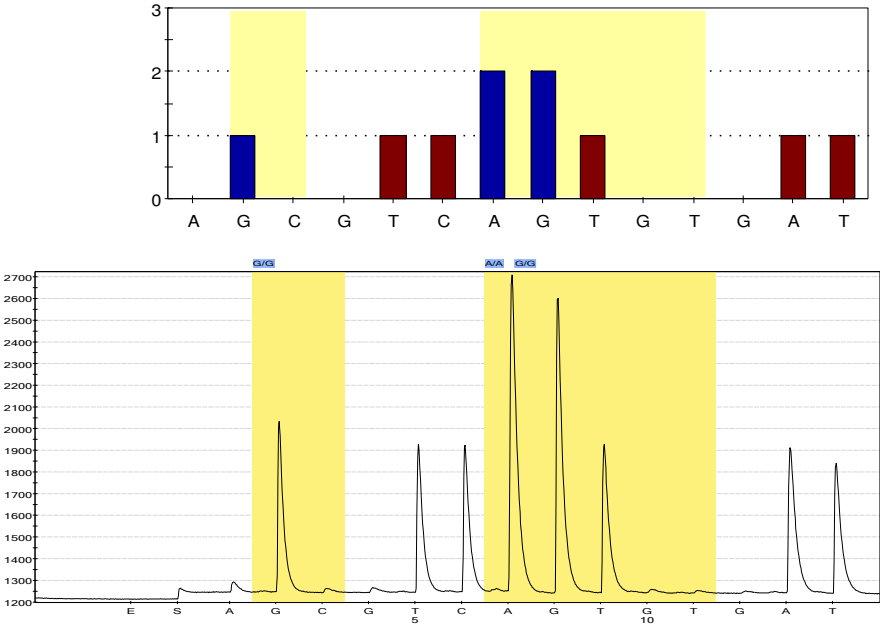


Figure 4.3-7: CYP2C9*3 G/G *4 A/A *5 G/G

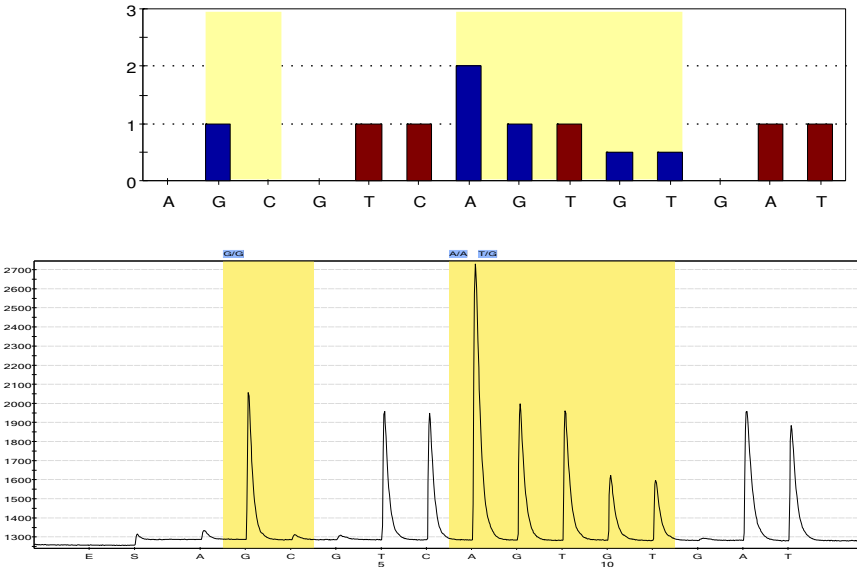


Figure 4.3-8 CYP2C9*3 G/G *4 A/A *5 T/G

Table 4.3-1 CYP2C9 Polimorfizmleri ve ortalama varfarin doz ilişkisi

Genotip	Varfarin Ortalama dozu $\pm$ SD(mg/hafta)	P değeri
* 1/ *1(n=123)	37.80 $\pm$ 18.23	<0.0001
Heterozigot varyantlar (n=69)	29.82 $\pm$ 12.84	
Homozigot varyantlar (n=13)	23.37 $\pm$ 9.97	

*1 / *5, *1 / *2, *1 / *4 olmak üzere heterozigot *2/ *5, *5/ *5 ve *2/ *2 homozigot

Table 4.3-2 CYP2C9 genotiplerinin varfarin doz ilişkisinin karşılaştırılması

CYP2C9 CYP2C9	Ortalama Fark	Std hata	P değeri
Heterozigot	5.483	4.732	0.744
Homozigot *1 / *1	8.170	2.351	0.002
Homozigot * 1 / * 1	-13.654	4.462	0.009

Anlamlılık 0.05 seviyesindedir.

*1 / *5, *1 / *2, *1 / *4 heterozigot; *2/ *5, *5/ *5 ve *2/ *2 homozigot

4.4. MDR1 C3435T Genotipleri ve Varfarin Doz ilişkisi

MDR1 3435. pozisyonundaki polimorfizm incelenmesi için uygun primerlerle ve uygun koşullarla PZR ile ilgili bölge ogaltıldı. PZR rnleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. PZR ile ogaltılan bölge, polimorfik bölgeye uygun sequencing primerleri ile pyrosequencing metodu ile incelendi. İncelenen 205 hastanın 63' CC, 102'si CT ve 40'ı CT olarak saptandı.

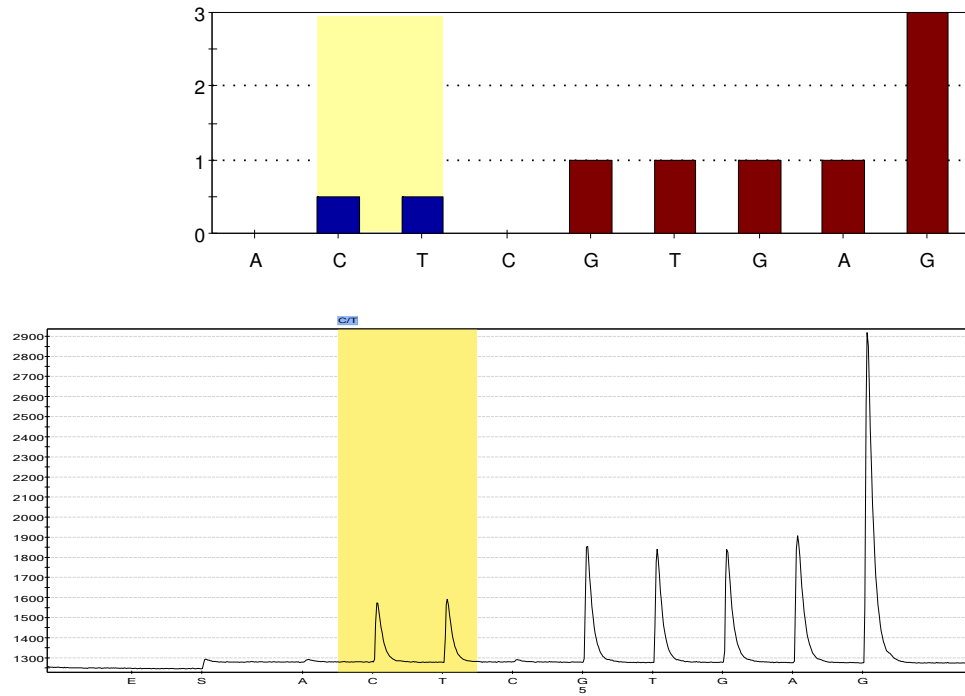


Figure 4.4-1: MDR1 3435 C/T

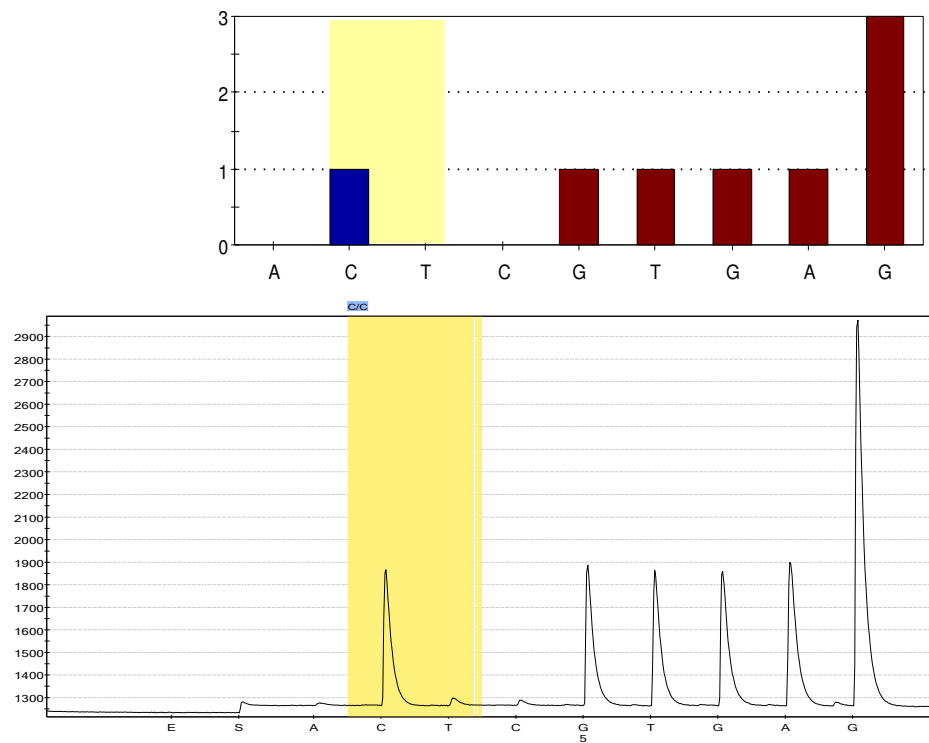


Figure 4.4-2 MDR1 3435 C/C

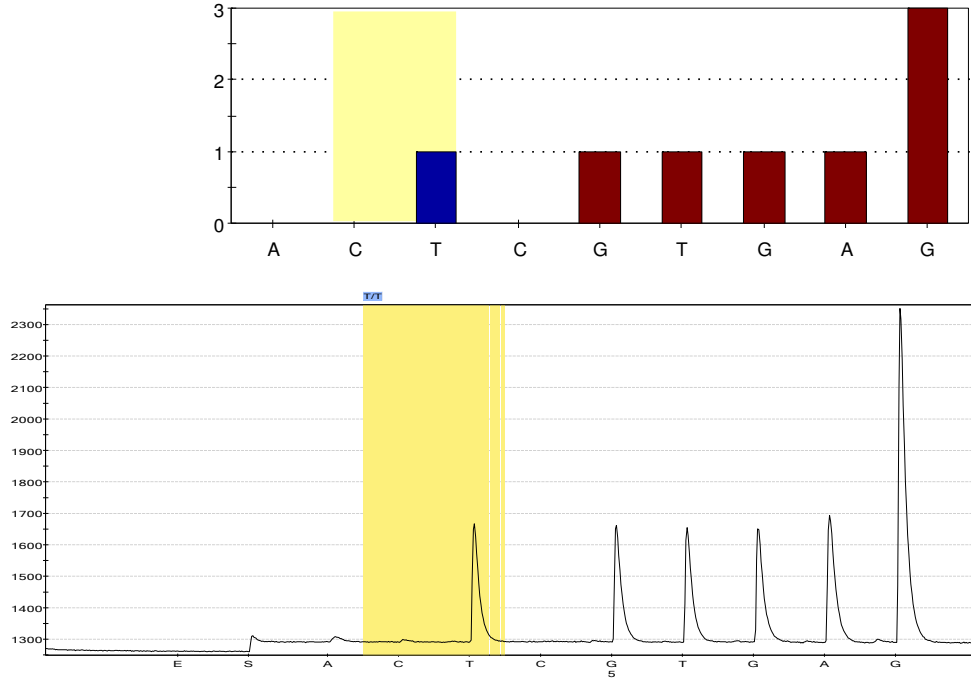


Figure 4.4-3: MDR1 3435 T/T

Table 4.4-1MDR1 Polimorfizmleri ve varfarin doz ilişkisi

Genotip	Ortalama Varfarin dozu±SD(mg/hafta)	P değeri
CC (n=63)	31.87±15.39	0.113
CT n=102)	36.67±18.84	
TT (n=40)	31.56±12.02	

Ortalama varfarin dozunun heriki homozigot gruptan daha yüksek olduğu için varfarin doz ve MDR1 ilişkisini araştırmak için over dominant model kullanılarak CC+TT/CT karşılaştırılması yapıldı. Heterozigotların homozigotlardan anlamlı olarak daha yüksek varfarin dozuna gereksinimleri olduğu saptandı (p=0,037).

4.5. Kanama Yan etkisinin Genotiple İlişkisi

Çalışmaya katılan 205 hastanın, 55'inde kanama öyküsü mevcuttu. Bu hastaların çalışılan genotiple ilişkisi incelendiğinde, kanaması olan hastaların VKORC1 polimorfizmi 10 hastada GG, 27 hastada GA, 18 hastada AA ($p=0.12$); MDR1 Polimorfizmi 55 hastanın 24'ünde CC, 21'inde CT, 10'unda TT ($p=0.05$) ve CYP2C9 ise 31 hastada *1/*1, 19 hastada heterozigot varyantlar ve 5 hastada homozigot varyantlar ($p=0.56$) olduğu saptandı.

Table 4.5-1 Kanama yan etkisi ile genotip ilişkisi

Gen	Polimorfizm	Genotip	Kanama var	Kanama yok	P değeri
VKORC1	G3673A	GG	10	49	0.12
		GA	27	60	
		AA	18	41	
MDR1	C3435T	CC	24	39	0.05
		CT	21	81	
		TT	10	30	
CYP2C9	*2 *4 *5	*1 / *1	31	92	0.56
		Heterozigot varyantlar	19	50	
		Homozigot varyantlar	5	8	

*1 / *5, *1 / *2, *1 / *4 heterozigot; *2/ *5, *5/ *5 ve *2/ *2 homozigot

4.6. Tromboemboli Yan etkisinin Genetik polimorfizmler ile ilişkisi

Çalışılan 205 hastanın 22'sinde tromboemboli rastlandı. VKORC1 genotiplemesi 7 hastada GG, 9 hastada GA ve 6 hastada AA ($p=0.94$); MDR1 genotipleri 7 hastada CC, 11 hastada CT, 4 hastada TT ($p=0.97$) ve

CYP2C9 polimorfizmleri ise 14 hastada *1 / *1, 8 hastada heterozigot varyantlar (p=0.94) saptandı. Hiçbir grupta tromboemboli geçirme arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı.

4.7. İdame Varfarin Dozu için Multipl Linear regresyon analizi

Linear regresyon analizi yapılırken genetik ve genetik olmayan bağımsız faktörler tanımlanmış ve p=0.01 seçme kriteri olarak alınmıştır. Genetik faktörler olarak; VKORC1 genotipleri, MDR1 ve CYP2C9 genotipleri alınırken; genetik olmayan faktörler olarak ise, yaş, cinsiyet, aspirin, CYP2C9 veya CYP3A4 inhibitörleri, varfarin kullanma endikasyonu olarak kalp kapakcığı ameliyatı, ortalama INR, kanama öyküsü, tromboemboli öyküsü ve hedef INR alındı.

Uygulanan bu model, üç bağımsız değişken ile ortalama haftalık varfarin dozunu öngörebilecek bir tablo ortaya koymuştur.

Table 4.7-1 Ortalama haftalık varfarin dozunun 3 bağımsız değişkenle ilişkisi

Bağımsız değişkenler	Katsayı	SH	T	P değeri
VKORC13673 için A taşıyıcısı	-13.609	2.329	3.723	<0.0001
CYP2C9 varyant taşıyıcısı	-10.018	2.153	-4.652	<0.0001
Yaş	-0.290	0.066	-4.368	<0.0001
Vücut yüzeyi alanı	13.432	5.479	2.451	0.015

Sonuçta bu model, VKORC3673’de A taşıyıcısı olmanın, CYP2C9 varyantını taşıyor olması, yaşlı olmak ve vücut yüzey alanının küçük olması düşük doz varfarin ile ilişkilidir.

4.8. VKORC1 3' ucu Dizileme Sonuçları

VKORC1 3' ucu en fazla polimorfik bölgenin bulunduğu 550 bazçiftini içerecek şekilde, uygun primerlerle ve uygun koşullarla PZR ile çoğaltıldı. PZR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. PZR ürünleri dizilemeye gönderilmeden önce Qiagen purifikasyon kiti ile purifiye edildi. Purifiye edilen PZR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

İncelenen 100 hastanın 14'ünde homozigot, 6'sında ise heterozigot olarak ATG başlangıç kodonundan sonra 626. nukleotidde G/A değişimi saptanmıştır. Bu bölge polimorfizmi daha önce tesbit edilmiş ve veritabanında bulunmaktadır.

Saptanan bu nukleotid değişikliğinin mRNA yapısına etkisini www.genebee.msus.edu internet sitesine iki farklı diziyle elde edilen mRNA yapısını karşılaştırdığımızda anlamlı bir değişiklik yapmadığını saptadık.

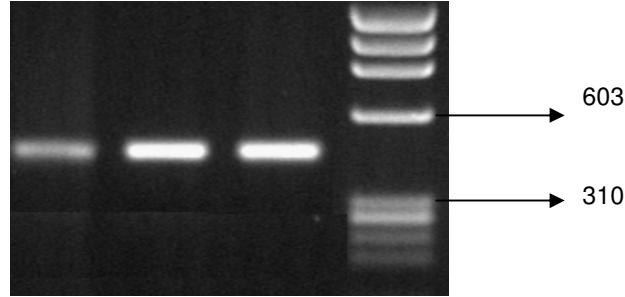


Figure 4.8-1 VKORC1 3' ucu PZR ve purifikasyon sonrası jel görüntüsü .(584 bç ΦX 174 marker fermentas)

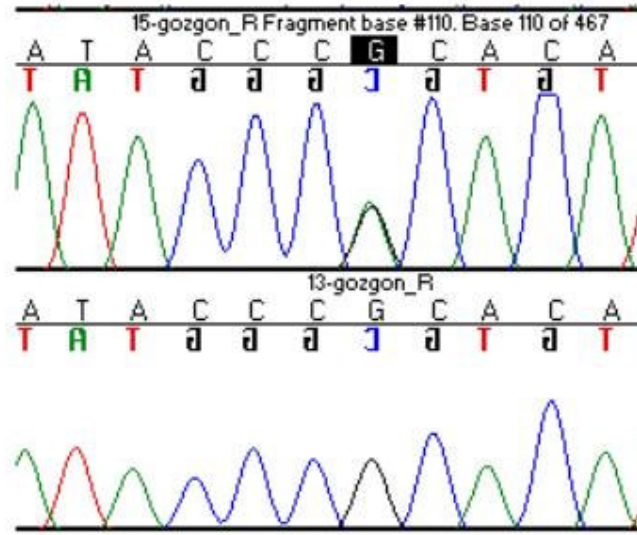


Figure 4.8-3 VKORC1 3' bölgesinde saptanan polimorfik örnekler

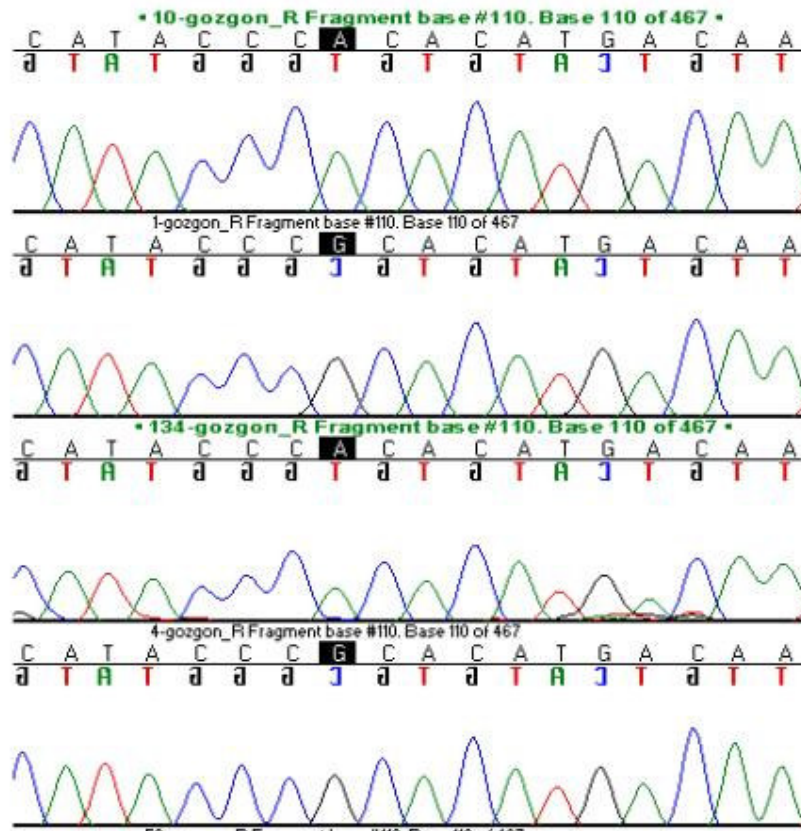


Figure 4.8-4 VKORC1 3' bölgesinde saptanan polimorfik örnekler

Saptadığımız polimorfizmin haftalık varfarin dozu ve INR ile olan ilişkisine baktığımızda, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Table 4.8-1 VKORC1 3' G/A polimorfizminin haftalık varfarin dozu ile ilişkisi

	N	Ortalama	Std sapma	Std hata	Ortalama için % 95 güvenlik aralığı
Doz GG	80	33.1625	20.3836	2.2790	28.62-37.69
GA	6	41.2500	19.9292	1.9927	30.25-38.15
AA	14	37.1429	21.0208	4.5532	19.19-63.31

P=0.534

Table 4.8-2 VKORC1 3' G/A polimorfizminin INR ile ilişkisi

	N	Ortalama	Std sapma	Std hata	Ortalama için % 95 güvenlik aralığı
INR GG	80	2.3584	2.1768	0.2434	2.87-2.84
GA	6	2.1783	0.5081	0.2074	1.64-2.71
AA	14	1.8171	1.9664	0.1411	1.51-2.12

P=0.637

VKORC1 626. pozisyonundaki G/A değişiminin kanama ve tromboemboli geçirme gibi varfarinin yan etkileri ile ilişkisi saptanmadı.

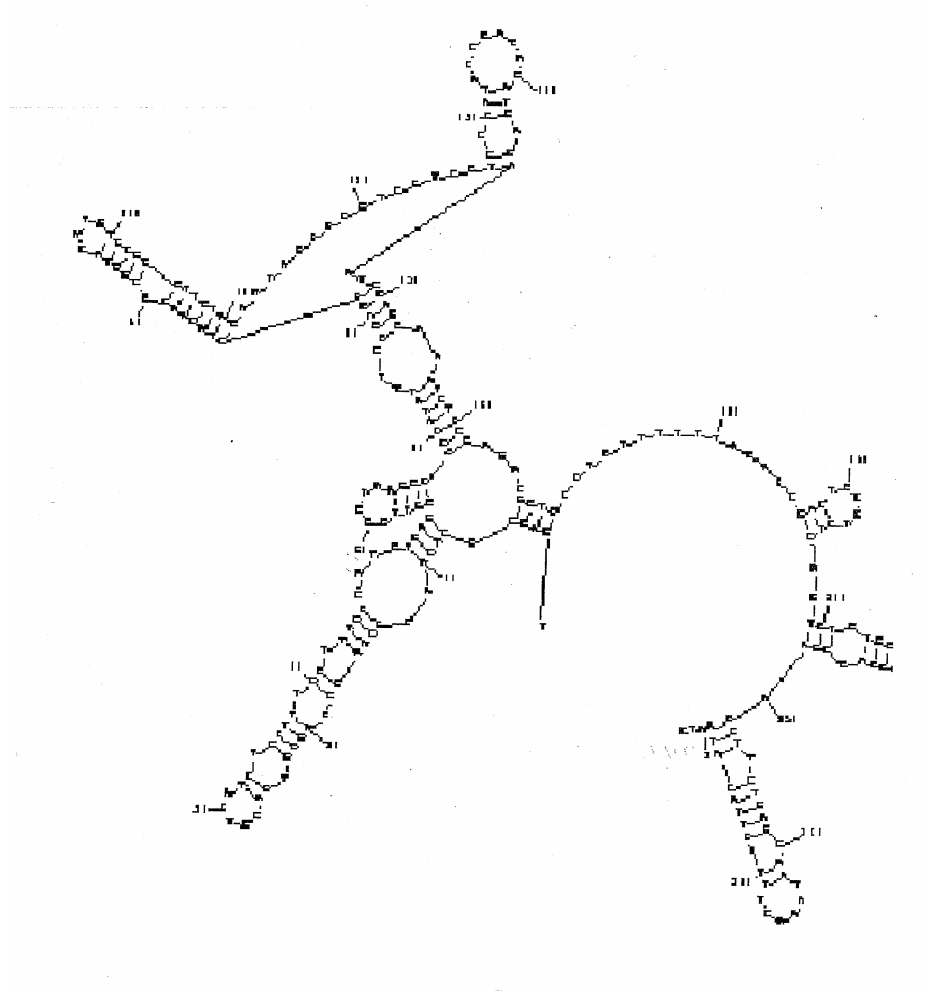


Figure 4.8-5 VKORC1 626 pozisyonundaki nükleotidin mRNA'daki değişim.

5. TARTIŞMA

Varfarin, Amerika Birleşik Devletlerinde ve Avrupa’da en sık kullanılan antikoagulan ajandır, venöz ve arteryal trombusun önlenmesinde kullanılır. Ancak terapötik aralığının dar olması kullanılması açısından birçok zorluklar içermektedir. Bu yüzden varfarin tedavisi izlemi PT ve INR takibi ile yapılmaktadır. Bu tez kapsamında, başta varfarin tedavisinde ve tedavinin idamesinde önemli markerlar olabilecek VKORC1 3673 polimorfizminiyle birlikte varfarinin etki mekanizmasında rol alan, CYP2C9 *2, *3, *4 ve *5 ve MDR1 3435 polimorfizmlerinin varfarin haftalık dozu ve INR arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Varfarinin bireylerarası değişken cevabı yüzünden varfarin için önerilen sabit bir doz yoktur.Varfarin K vitamini üzerinden etki ettiği için, alınan besinlerin bile K vitamini yoğunluğu açısından varfarine verilen yanıtı etkilemektedir. Bununla birlikte, varfarin metabolizması ile ilgili in vitro çalışmalar arttıkça, varfarinin metabolize olduğu enzimler tanınmış ve bu enzimlerin hem polimorfizmlerinin hemde bu enzimlerin substrat, inhibitör ve indüktörleri vasıtasıyla metabolizmasının değiştiği birçok çalışma ile gösterilmiştir. CYP2C9 polimorfizmi taşıyanlar ve CYP2C9 inhibitörü alan hastaların daha yüksek doz varfarine ihtiyaç duydukları gösterilmiştir (26;33;35;111;112;113). Diğer yandan, varfarin dozunu etkileyen başka faktörler hala bilinmeyen veya az bilinen olarak kalmaya devam etmektedir. Varfarinin başlangıç ve idame dozunun önceden tahmin edilebilmesi için, varfarin dozunu etkileyen bütün faktörlerin biliniyor olması gerekmektedir.

Bir ilacın etkisini oluşturan faktörler; ilacın vücutta uğradıkları değişiklikler (farmakokinetik), ilacın vücutta oluşturduğu değişiklikler (farmakodinamik), ilacın hücre içine taşınma mekanizmaları, beslenme şekilleri, ilaç etkileşimleri, kronik hastalıkların varlığı ve genetik faktörler sayılabilir. Son yıllardaki gelişmelerle ilaçları metabolize eden enzimlerin yalnız ırklararası değil toplumlararası da farklılıklar içerdiği

saptanmıştır. Türk toplumu birçok etnik kökenden oluştuğu ve dolayısıyla saf bir ırktan bahsedilmeyeceği için, toplumumuzda özellikle farmakogenetik alanında popülasyon çalışmaları büyük önem kazanmaktadır. Etnik özellik varfarin doz ayarlamasında önemli bir özellik olarak ortaya çıkmaktadır. Amerika Birleşik Devletlerinde, Çin’de, Japonya’da yapılan etnik ağırlıklı çalışmalarda; Japon, Çin ve malezyalı insanların beyaz ırktan %30-40 oranında daha az varfarine ihtiyaç duydukları saptanmıştır (114-115).

2004 yılında VKORC1 geni keşfedildikten sonra, o tarihe kadar yalnızca varfarinin farmakokinetiğinde rol alan genler çalışılıyorken, bu genin ve tek nükleotid değişikliklerinin de varfarin dozu ile ilişkisi olduğu gösterildikçe, farmakodinamiğinde rol alan genler de çalışılmaya başlanmıştır.

VKORC1 haplotiplerinin varfarin dozu ile ilişkisini gösteren ilk çalışma Reider ve ark (2005) yaptığı çalışmadır (13) Bu çalışmada 10 farklı SNP çalışılmış ve bunların varfarin dozu ile ilişkisi gösterilmiştir. Ancak daha sonra bu çalışılan SNP’lerin kuvvetli bağlantı analizleri gösterdiği ve bir tanesinin çalışılmasının yeterli olduğu belirtilmiştir.

Bu çalışmada 205 hastada VKORC1 G3673A polimorfizmini çalıştık ve bu polimorfizmin varfarin dozunu predikte etmekte önemli bir belirteç olduğunu gördük. VKORC genotipleri ve ortalama varfarin dozu ilişkisine baktığımızda, AA ve GA allelerini (33.78mg/hafta ve 25.83mg/hafta) taşıyan hastaların GG (43.18 mg/hafta) allelerini taşıyan hastalardan daha az varfarin dozuna ihtiyacı oldukları saptandı. Biz bu çalışma için örnek toplarken, başka araştırmacılar da VKORC1 ve varfarin doz ilişkisini araştırmışlar ve bu çalışmaların çoğu ilişkilendirme ile sonuçlanmıştır (13;14;18) Reider ve ark. Ortalama günlük varfarin dozunda en yüksek ve en düşük dozda VKORC1’da haplotipler belirlemişlerdir. (günlük ortalama varfarin dozları 2.7 mg ve 4.9 mg) (13). Haplotip gruplarında 3673 pozisyonundaki SNP gruplarla kuvvetli bağlantılı olduğu saptanmıştır. Bu SNP’in varfarin dozuyla ilişkili olduğu ve diğer varfarin dozuyla ilişkili olan SNP’lerle kuvvetli bağlantılı olduğu doğrulanmıştır.

Bazı çalışmalarda, aynı SNP, VKORC1 referans sekansının translasyon başlangıç bölgesinden başlayarak numaralandırılmasından ötürü -1639 olarak belirtilmiştir. Sconce ve ark yaptıkları çalışmada, VKORC1 –1639 AA ve GA genotiplerinin yabancı tip olan GG genotipinin gerektirdiği varfarin dozu ile kıyaslandığında %50.8 ve %15.5 oranında daha az varfarine ihtiyaçları olduğu saptanmıştır (17). Buna benzer olarak Aquilante ve ark'nın yaptığı çalışmada ise, VKORC1 3673 AA ve GA genotiplerinin yabancı genotip olan GG genotipine oranla %50.45 ve %29.4 oranında daha az haftalık varfarin dozuna ihtiyaçları oldukları saptanmıştır (18). Bir diğer çalışmada ise, D'Andrea ve ark intron 1 polimorfizmi olan 1173CT'nin 3673 ile kuvvetli bağlantıda olduğunu ve varfarin dozu ile anlamlı ilişkide olduğunu göstermişlerdir (14). 1173 TT veya CT genotipli olan hastaların yabancı genotipe oranla %47.1 ve %27.5 oranla daha az varfarin dozuna ihtiyaç duydukları gösterilmiştir. Çin popülasyonunda yapılan çalışmada ise Yuan ve ark VKORC1 geninin in vitro fonksiyonel analizlerini tanımlamışlar ve promotor polimorfizmi olan 3673'ün yabancı alleli olan G'nin A'ya göre daha büyük aktivitesi olduğu saptanmıştır (yuan ve ark). Bu araştırma, VKORC1 3673 polimorfizminin bireylerarsı varfarin doz değişkenliğinde önemini vurgulamaktadır. Bizim çalışmamızdaki sonuçlarda, varfarin dozu ve VKORC1 arasındaki ilişki diğer çalışmalardaki gibidir (14;17).

VKORC1 geni izole edilmeden önce varfarin dozu üzerine CYP2C9 polimorfizmlerinin etkisi olduğu biliniyordu (6). Yapılan popülasyon çalışmalarında toplumun yaklaşık %39'unun CYP2C9 varyant alleli taşıdığı gösterilmiştir. Varfarin kullanan hastalarda yapılan çalışmalarda ise ortalama 1 varyant allel taşıyan hastalar, *2,*4 veya *5 homozigot yabancı tipe (*1/*1) oranla %21 oranında daha az haftalık varfarin dozuna ihtiyaç duydukları gözlenmiştir. İki variant allele sahip olan hastalar ise homozigot yabancı allel taşıyan hastalara kıyasla %40 daha az varfarine ihtiyaç duyarlar (17). Bu çalışma, Türk toplumunda *4 ve *5'in çalışıldığı ilk çalışma olması ile önemlidir. Bu çalışmada, *3 varyantını taşıyan hasta tesbit edilmemiş ve *1, *2 varyantlarının frekansları ise daha önceki Türk popülasyon çalışmaları farklı bulunmuştur. Aynacıoğlu ve ark Türk toplumunda *1 / *1

frekansını %61.7, * 2/* 1 frekansını %18, * 2 / * 2 frekansını %1, 3 / 1 frekansını %17,2 ve *3 / * 3 %0.8 olarak tesbit etmişlerdir. (Aynacıoğlu et al) Bizim çalışmamızda ise, * 1/* 1 frekans % 60, * 2/* 1 frekans %22.43, *2 / *2 frekans %1,46, *4/ *1 %1,46, 5 /1 frekans % 17,56 ve * 5/ * 5 frekans % 0.98 olarak saptandı. Çalışma grubumuzda *3 allelini taşıyan hastaya rastlanmadı. CYP2C9 varyantların prevalansı diğer popülasyonların prevalanslarından farklı bulundu. Ortalama haftalık varfarin dozu ile varyantların ilişkisine baktığımızda, diğer toplumlarda yapılan çalışmalardan farklı bulunmamıştır. Yabancı tiple diğer varyantlar karşılaştırıldığında, heterozigot varyantların %22 , homozigot varyantların ise %38.2 oranında daha az haftalık ortalama varfarin dozuna ihtiyaç oldukları saptandı.

Ortalama haftalık varfarin dozu ile ilişkili olan bir diğer SNP'in ise MDR1 C3435T olduğu Wadelius ve ark'nın çalışması ile ortaya konmuştur (6). Wadelius ve ark'ın P-gp'nin varfarinin hücre içine taşınmasında rol aldıklarını ve ekspresyonunun değiştiren 3435C/T polimorfizmi ile birlikte varfarin cevabının değişeceğini savunmuşlardır. Çalışmalarında bu polimorfizmin düşük doz varfarin dozu ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. Daha önce, Kerb ve ark'nın Türk toplumunda yaptıkları MDR1 frekans sonuçlarıyla bizim sonuçlarımız uyumlu çıkmıştır (116). CC allelin frekans %30,73, CT allel frekans %49,76 ve TT allel frekansını ise %19,51 olarak tesbit ettik. Ancak, bizim çalışmamızda heterozigot variant (CT) alleli taşıyanların homozigot alleli (CC ve TT) taşıyanlara kıyasla %15 oranında daha fazla varfarin dozuna ihtiyaç duydukları saptandı.

Genetik olmayan faktörlerin değerlendirilmesinde ise Aquilante ve ark'nın yaptığı çalışmaya benzer olarak, ilaç etkileşimlerinin, vücut yüzeyinin ve yaşın varfarin doz yanıtını etkilediği görülmektedir (18). CYP2C9 varfarin ana metabolik yolu olması ve CYP3A4'ünde varfarin metabolizmasında minor yollardan biri olması nedeni ile bu iki enzimin substrat ve inhibitörleri ile birlikte alındıklarında varfarinin metabolizması, ilgili enzimlerinde polimorfizmi varsayıldığında, öngörülemez şekilde değişmektedir. Bizim çalışmamızda, genetik olmayan faktörlerin arasında

en önemli ve istatistiksel olarak en anlamlı sırayı yaş faktörünün ($p<0.0001$) aldığı görüldü.

VKORC1 geninin 3' ucunun dizilemesi sonucunda, varfarin haftalık dozu ile olan ilişkisinin araştırılmasında anlamlı bulguya rastlanmazken, daha önce bildirilmiş polimorfizmin bizim toplumumuzda da % 20 oranında rastlandığı görüldü.

Varfarin tedavisi esnasında oluşan yan etkilerin, çalışılan polimorfizmler ile ilişkisine bakıldığında ise anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Bundan önce yapılmış hiçbir çalışmada bu ilişki sorgulanmadığı içinde çalışmamız literatürde bu konuda ilktir.

Bu çalışmamız sonuçta, varfarin doz ihtiyacının değişkenliğinin yaklaşık %50 nedeninin genetik ve genetik olmayan faktörlerin kombinasyonu ile açıklanabilir. Bu çalışma ile amaç, ilaç cevap değişkenliğinin nedenlerinin farmakogenetik olarak açıklanmasına, ve varfarin farmakogenetiğinde rol alan genlerin polimorfizm frekanslarının Türk toplumundaki dağılımını ve ilaç yanıtına etkisini göstermektir. Bu çalışmanın, varfarin doz ayarlaması yapılmasında klinik yararlılığa yönelik yeni modeller oluşturmaya katkıda bulunacağına inanıyoruz. Çalışmayı değerlendirirken kullandığımız linear regresyon model farklı toplumlarda deneyerek, güncel varfarin dozu hesaplanabilir. Bizim modelimize benzer bir model uygulanan çalışmada (18) da olduğu gibi, prediktif varfarin dozunun hesaplandıktan sonra genotipleri aynı olan hastaların seçilip tedavilerin yapılacağı, klinik araştırmalara ihtiyaç vardır. Ancak böyle bir klinik çalışmadan sonra bu testler varfarin tedavisi başlama aşamasında güvenilir olarak kullanılabilir.

Özetle, haftalık varfarin dozunun değişkenliğinde 3 farklı genin polimorfizmleri etkili olmaktadır. MDR1 C3435T polimorfizminin heterozigot varyantlarının % 15 oranında haftalık doz ihtiyacını arttırdığı saptanmıştır. Daha önce literatürde de belirtildiği gibi, VKORC1 , CYP2C9 ve ilaç etkileşimleri, vücut yüzeyi ve yaş gibi genetik olmayan faktörler varfarin doz ihtiyacının öngörülmesinde Türk toplumunda da anlamlı faktörler olduğu gösterilmiştir. Bu genetik belirteçlerin kanama ve

tromboemboli atağı geçirme riski ile herhangi bir ilişkisi saptanmamıştır. Varfarin tedavisine başlamadan önce bu testin prediktif olarak kullanılabilmesi için geniş hasta sayılı klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Guttmacher AE and Collins FS. Wellcome to genomic era. *N ENG J Med* 2003 Sep 4;349(10):996..
2. Johnson JA. . Pharmacogenetics: potential for individualized drug therapy through genetics. *Trends Genet* 2003 Nov;19(11):660-6
3. Evans WE, Mcleod HL. Pharmacogenomics-drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 2003 Feb 6;348(6):538-49
4. Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *N Eng J Med* 2003 Feb 6; 348(6): 529-37
5. Hirsch J, Dalen J, Anderson DR, Poller L, Bussey H, Ansell J et al. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest* 2001;119:8S-21S
6. Wadelius M, Sorlin K, Wallerman O, Karlsson J, Yue QY; Magnusson PK, Wadelius C, Melhus H. Warfarin sensitivity related to CYP2C9, CYP3A5, ABCB1 (MDR1) and other factors. *Pharmacogenomics J*, 2004, (1): 40-48
7. Landefeld C, Beyth R. Anticoagulant-related bleeding: clinical epidemiology, prediction and prevention. *Am J Med* 1993; 95:315-328.
8. Takahashi H, Kashima T, Nomoto S, Iwade K, Tainaka H, Shimizu T et al. Comparisons between in vitro and in vivo metabolism of (S) warfarin: catalytic activities of cDNA expressed CYP2C9 its Leu359 variant and their mixture versus unbound clearance in patients with the corresponding CYP2C9 genotypes. *Pharmacogenetics* 1998;8:365-73
9. Rettie AE, Korzekwa KR, Kunze Kl, Lawrence Rf, Eddy AC, Aoyama T et al. Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P-450: a role for P-4502C9 in the etiology of (S)-warfarin-drug interactions. *Chem Res Toxicol* 1994; 5: 54-59.

10. Gage BF, Eby CS. Pharmacogenetics and anticoagulant therapy. *J Thromb Trombolysis* 2003; **16**: 73-78.
11. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelman E, Hortnagel K, Pelz HJ, et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 2004;**427**: 537-541.
12. Li T, Chang CY, Jin DY, Lin PJ, Khvorova A, Stafford DW. Identification of gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 2004;**427**(6974): 541-544.
13. Reider MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, Mcleod HL, et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med* 2005; **352**:2285-93.
14. D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M, Santacroce R, Brancacio V, et al. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* 2005; **105**: 645-9.
15. Wadelius M, Chen LY, Downes K, Ghori J, Hunt S, Eriksson N, et al. Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose. *Pharmacogenomics J* 2005; **5**:262-70.
16. Yuan HY, Chen JJ, Lee MT, Wung JC, Chen YF, Charng MJ et al. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with interindividual and interethnic differences in warfarin sensitivity. *Hum Mol Genet* 2005;**14**:1745-51.
17. Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood* 2005; **106**:2329-33.
18. Aquilante CL, Langaee T, Lopez LM, Yarandi HN, Tromberg JS, Mohuczy D, Gaston KL, et al. Influence of coagulation factor, vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, and cytochrome P450 2C9 gene polymorphisms on warfarin dose requirements. *Clin Pharmacol Therapeu* 2006; **79**:4:291-302

19. Wadelius M and Pirmohamed M. Pharmacogenetics of warfarin: current status and future challenges. *The pharmacogenomics Journal* (2006)1-13.
20. Gage BF. Pharmacogenetics–Based coumarin therapy. *American Society of Hematology, Workshop book*, 2006.
21. Dahlback B. Blood. Coagulation . *Lancet*. 2000;**355**:1627.
22. Kayaalp O. *Tibbi Farmakoloji*, **2002**;583-600.
23. Katzung BG. *Basic & Clinical Pharmacology*, 9 edition, 2004;543-559.
24. American Heart Association:Guidelines 2000 for Cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care. *Circulation* 2000;**102**:1-172.
25. Scordo MG, Pengo V, Spina E, Dahl M-L, Gusella M, Padrini R. Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on warfarin maintenance dose and metabolic clearance. *Clin Pharmacol Ther* 2002;**72**:702-10
26. Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 1999; **353**:717-9.
27. van den Besselaar AM. Standardization of the prothrombin time in oral anticoagulant control. *Haemostasis* 1985; **15**: 271-277.
28. Landefeld C, Beyth R. Anticoagulant-related bleeding: clinical epidemiology, prediction and prevention. *Am J Med* 1993; **95**:315-328.
29. Breckenridge A, Orme M, Rowland M, Shearer M, Lewis RJ. Proceedings: Alterations in the response to warfarin. *Acta Pharm Suec*. 1974 Dec;11(6):652-3.
30. www.imm.ki.se/CYPalleles
31. Harrington DJ, Underwood S, Morse C, Shearer MJ, Tuddenham EG, Mumford AD. Pharmacodynamic resistance to warfarin associated with a Val 66 Met substitution in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1. *Thromb Haemost* 2005 ; **93**: 23-26

32. Redman AR. Implications of cytochrome P450 2C9 polymorphism on warfarin metabolism and dosing. *Pharmacotherapy*. 2001 Feb;21(2):235-42.
33. Higashi M, Veenstra D, Kondo L, Wittkowsky A, Srnouanprachanh S, Farin F et al. Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulant-related outcomes during warfarin treatment. *JAMA* 2002; **287**:1690-1698.
34. Voora D, Eby C, Linder MW, Milligan PE, Bukaveckas BL, McLeod HL, Maloney W, Clohisey J, Burnett RS, Grosso L, Gatchel SK, Gage BF. Prospective dosing of warfarin based on cytochrome P-450 2C9 genotype. *Thromb Haemost*. 2005 Apr;93(4):700-5.
35. Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Brancaccio V, Ciampa A, Grandone E. Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thromb Haemost* 2000; **84**: 775-778.
36. Ishikawa T. The 24th International Symposium of Sapporo Cancer Seminar "Pharmacogenomics in Cancer Chemotherapy: Recent Advances in ABC Transporters and Genome Analyses". Hokkaido University Conference Hall, Sapporo, Japan, June 20-22, 2004. *J Exp Ther Oncol*. 2004 Oct;4(3):253-7.
37. Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, DeYoung J, Taylor T, Carlson EJ, Herskowitz I, Giacomini KM, Clark AG. Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics*. 2003 Aug;13(8):481-94.
38. Fisher V, Einolf HJ, Cohen D. Efflux transporters and their clinical relevance. *Mini Rev Med Chem* 2005; **5**:183-195.
39. Chowbay B, Li H, David M, Cheung YB, Lee EJ. Meta-analysis of the influence of MDR1 C3435T polymorphism on digoxin pharmacokinetics and MDR1 expression. *Br J Clin Pharma* 2005; **60**:159-171.
40. Sconce E, Khan T, Mason J, Noble F, Wynne H, Kamali F. Patients with unstable control have a poorer dietary intake of vitamin K

- compared to patients with stable control of anticoagulation. *Thromb Haemost.* 2005 May;93(5):872-5.
41. Kohlmeier M, Salomon A, Saupe J, Shearer MJ. Transport of vitamin K to bone in humans. *J Nutr.* 1996 Apr;126(4 Suppl):1192S-6S.
 42. Berkner KL, Runge KW. The physiology of vitamin K nutriture and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis *J Thromb Haemost.* 2004 Dec;2(12):2118-32
 43. Lamon-Fava S, Sadowski JA, Davidson KW, O'Brien ME, McNamara JR, Schaefer EJ. Plasma lipoproteins as carriers of phyloquinone (vitamin K1) in humans. *Am J Clin Nutr.* 1998 Jun;67(6):1226-31.
 44. Kohnke H, Sorlin K, Granath G, Wadelius M. Warfarin dose related to apolipoprotein E (APOE) genotype *Eur J Clin Pharmacol.* 2005 Jul;61(5-6):381-8. Epub 2005 Jun 11.
 45. Geisen C, Watzka M, Sittinger K, Steffens M, Daugela L, Seifried E, Müller CR, Wienker TF, Oldenburg J. VKORC1 haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-ethnic variability of oral anticoagulation. *Thromb Haemost* 2005;94:773-9
 46. Vecsler M, Loebstein R, Almog S, et al. Combined genetic profiles of components and regulators of the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system affect individual sensitivity to warfarin. *Thromb Haemost.* 2006;95:205-211.
 47. Mushiroda T, Ohnishi Y, Saito S, Takahashi A, Kikuchi Y, Saito S et al. Association of VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms with warfarin dose requirements in Japanese patients. *J Hum Genet* 2006;51:249-253.
 48. Takahashi H, Wilkinson GR, Nutescu EA, Morita T, Ritchie MD, Scordo MG et al. Different contributions of polymorphisms in VKORC1 and CYP2C9 to intra-and inter-population differences in maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African-Americans. *Pharmacogenet Genomics* 2006;16:101-10.

49. Lee SC, Ng SS, Oldenburg J, Chang PY, Rost S, Guo JY, Yap HL, Rankin SC, Khor HB, Yeo TC, Ng KS, Soong R, Goh BC. Interethnic variability of warfarin maintenance requirement is explained by VKORC1 genotype in Asian population. *Clin Pharmacol Ther* 2006; **79**:197-205.
50. Kohn MH, Pelz HJ, Wayne RK. Locus-specific genetic differentiation at R_w among warfarin-resistant rat (*Rattus norvegicus*) populations *Genetics*. 2003 Jul;164(3):1055-70.
51. Fregin A, Rost S, Wolz W, Krebsova A, Muller CR, Oldenburg J. Homozygosity mapping of a second gene locus for hereditary combined deficiency of vitamin K-dependent clotting factors to the centromeric region of chromosome 16. *Blood*. 2002 Nov 1;100(9):3229-32.
52. Weber WW *Pharmacogenetics*. Oxford Univ. Press, New York and Oxford 1997.
53. Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE, Alving AS. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* 1956; **124**:484-85
54. Hughes HB, Biehl JP, Jones AP, Schmidt LH. Metabolism of isoniasid in man as related to occurrence of peripheral neuritis. *Am Rev Tuberc*. **70**:266-73
55. Kalow W. Familial incidence of low pseudocholinesterase level. *Lancet*, 1956; **211**:576-77.
56. Evans WE and Johnson JA. Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001. **2**:9-39
57. Forbat A, Lehmann H, Silk E. Prolonged apnoea following injection of succinylcholine. *Lancet*. 1953 Nov 21; **265**(6795):1067-8.
58. Price-Evans DA, Manley FA, McKusick VA. Genetic control of isoniasid metabolism in man. *Br Med J* 1960; **2**:485-91.
59. Grant DM, Blum M, Meyer UA. Polymorphisms of N-acetyltransferase genes. *Xenobiotica* 1992; **22**:1073-81

60. Roden DM. Proarrhythmia as a pharmacogenomic entity: a critical review and formulation of a unifying hypothesis. *Cardiovasc Res.* 2005;**67**:419-25.
61. Spear BB, Heath-Chiozzi M, Huff J. Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol Med.* 2001 May;**7**(5):201-4.
62. Spear BB. Pharmacogenetics and antiepileptic drugs. *Epilepsia.* 2001;**42 Suppl 5**:31-4.
63. Evans WE, Horner M, Chu YQ, Kalwinsky D, Roberts WM. Altered mercaptopurine metabolism, toxic effects, and dosage requirement in a thiopurine methyltransferase-deficient child with acute lymphocytic leukemia. *J Pediatr.* 1991 Dec;**119**(6):985-9.
64. Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Krynetski EY et al. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J Natl Cancer Inst.* 1999;**91**:2001-8.
65. Dahl ML, Bertilsson L. Genetically variable metabolism of antidepressants and neuroleptic drugs in man. *Pharmacogenetics.* 1993;**3**:61-70.
66. Kim RB. Transporters and xenobiotic disposition. *Toxicology.* 2002;**181-182**:291-7
67. Zhang L, Brett CM, Giacomini KM. Role of organic cation transporters in drug absorption and elimination. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;**38**:431-60.
68. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1976 Nov **455**(1):152-62.
69. Drysdale CM, McGraw DW, Stack CB, Stephens JC, Judson RS, Nandabalan K, et al. Complex promoter and coding region beta 2 adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:10483-8
70. Roden DM. Human genomics and its impact on arrhythmias. *Trends Cardiovasc Med.* 2004 Apr;**14**(3):112-6.

71. Shah RR. Drug-induced QT interval prolongation: regulatory perspectives and drug development *Ann Med.* 2004;36 *Suppl 1*:47-52.
72. Sesti F, Abbott GW, Wei J, Murray KT, Saksena S, Schwartz PJ, Priori SG, Roden DM, George AL Jr, Goldstein SA. A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Sep 12;97(19):10613-8.
73. Yang P, Kanki H, Drolet B, Yang T, Wei J, Viswanathan Pc et al. Allelic variants in long-QT disease genes in patients with drug associated torsades de pointes. *Circulation.* 2002;105:1943-8
74. Leabman MK, Huang CC, DeYoung J, Carlson EJ, Taylor TR, de la Cruz M et al. Natural variation in human membrane transporter genes reveals evolutionary and functional constraints. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5896-901.
75. Fox CS, Parise H, D'agostino RB Sr, Lloyd-Jones DM, Vasan RS, Wang TJ et al. Parental atrial fibrillation in offspring. *JAMA* 2004;291:2851-5.
76. Spooner PM, Albert C, Benjamin EJ, Boineau R, Elston RC, George AL Jr, et al. Sudden cardiac death, genes, and arrhythmogenesis: consideration of new population and mechanistic approaches from a national heart, lung, and Blood Institute workshop, Part II. *Circulation.* 2001;103:2447-52.
77. Raby BA, Van Steen K, Celedon JC, Litonjua AA, Lange C, Weiss ST, et al. Paternal history of asthma and airway responsiveness in children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:552-8.
78. Sagen JV, Raeder H, Hathout E, Shehadeh N, Gudmundsson K, Baevre H et al. Permanent neonatal diabetes due to mutations in KCNJ11 encoding Kir6.2: patient characteristics and initial response to sulfonylurea therapy. *Diabetes.* 2004;53:2713-8.
79. Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, et al. Activating mutations in the gene encoding the ATP sensitive potassium channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Eng J Med* 2004;350:1838-49.

80. Helgadóttir A, Manolescu A, Thorleifsson G, Gretarsdóttir S, Jonsdóttir H, Thorsteindóttir U et al. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet.* 2004;**36**:233-9.
81. Hakanarson H, Thorvaldsson S, Helgadóttir A, Gudbjartsson D, Zink F, Andresdóttir, et al. Effects of a 5-lipoxygenase-activating protein inhibitor on biomarkers associated with risk of myocardial infarction: randomized trial. *JAMA* 2005;**293**:2245-56.
82. Miners JO, Birkett DJ. Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 1998;**45**:525-538.
83. Mather GG, Levy RH. *Anticoagulants*. Philadelphia: Lippincott Williams& Williams;**2000**.
84. Blaisdell J, Jorge-Nebert LF, Coulter S, Ferguson SS, Lee SJ, Chanas B, et al. Discovery of new potentially defective alleles of human CYP2C9. *Pharmacogenetics* 2004; **14**:527-37.
85. Shintani M, Ieiri I, Inoue K, Mamiya K, Ninomiya H, Tashiro N, et al. Genetic polymorphisms and functional characterization of the 5'-flanking region of the human CYP2C9 gene: in vitro and in vivo studies. *Clin Pharmacol Ther* 2001;**70**:175-82.
86. King BP, Khan TI, Aithal GP, Kamali F, Daly AK. Upstream and coding region CYP2C9 polymorphisms: correlation with warfarin dose and metabolism. *Pharmacogenetics* 2004;**14**:813-22.
87. Morin S, Bodin L, Lorient MA, Thijssen HH, Robert A, Strabach S, et al. Pharmacogenetics of acenocoumarol pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* 2004;**75**:403-14.
88. Stubbins MJ, Harries LW, Smith G, Tarbitt MH, Wolf CR. Genetic analysis of the human cytochrome P450 CYP2C9 locus. *Pharmacogenetics* 1996;**6**:429-439.
89. Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA, Zhang ZY, Kaminsky LS, Shenfield GM et al. The role of the CYP 2C9-Leu³⁵⁹ allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics* 1996;**6**:341-349.

90. Bhasker CR, Miners JO, CoS, Birkett DJ. Allelic and functional variability of cytochrome P4502C9. *Pharmacogenetics* 1997;**7**:51-58.
91. Imai J, Ieiri I, Mamiya K, Miyahara S, Furuumi H, Nanba E. Polymorphism of the cytochrome P450 (CYP)2C9 gene in Japanese epileptic patients genetic analysis of the CYP2C9 locus. *Pharmacogenetics* 2000;**10**:85-89.
92. Dickman LJ, Rettie AE, Kneller MB, Kim RB, Wood AJJ, Stein CM, et al. Identification and functional characterization of a new CYP2C9 variant (CYP2C9*5) expressed among African-Americans. *Mol Pharmacol* 2001;**60**:382-387.
93. Yasar U, Oscarson M, Eliasson E, Sjöqvist F. Mutations of the CYP2C9 gene and the response to warfarin. *Surgery*. 2000 Aug;**128**(2):281-5.
94. Aynacioğlu AS, Brockmöller J, Bauer S, Sachse C, Guzelbey P, Ongen Z, et al. Frequency of cytochrome P450 CYP2C9 variants in Turkish population and functional relevance for phenytoin. *Br J Clin Pharmacol* 1999;**48**:409-415
95. Nasu K, Kubota T, Ishizaki T. Genetic analysis of CYP2C9 polymorphism in a Japanese population. *Pharmacogenetics*. 1997 Oct;**7**(5):405-9.
96. Yoon YR, Shon JH, Kim MK, Lim YC, Lee HR, Park JY, Cha IJ, Shin JG. Frequency of cytochrome P450 2C9 mutant alleles in a Korean population. *Br J Clin Pharmacol*. 2001 Mar;**51**(3):277-80.
97. Ling V. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **40**,S3-S8 (1997).
98. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;**39**:361-98.
99. Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug

- transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2001 Mar;**69**(3):169-74.
100. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Nov;**84**(21):7735-8.
 101. Borst P. Multidrug resistant proteins. *Semin Cancer Biol.* 1997 Jun;**8**(3):131-4.
 102. Cain D, Hutson SM, Wallin R. Assembly of the warfarin-sensitive vitamin K 2,3-epoxide reductase enzyme complex in the endoplasmic reticulum membrane . *J Biol Chem* 1997;**272**:29068-29075.
 103. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmüller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000 Mar 28;**97**(7):3473-8.
 104. Reitsma PH, Heijden JF, Groot AP, Rosendaal FR, Buller HR. A C1173T dimorphism in the VKORC1 gene determines coumarin sensitivity and bleeding risk. *Plos Med* 2005;**2**:e312.
 105. Memişoğlu A, *Pharmacogenomics*, GSAS Harvard Biotechnology Club.
 106. Langaee T, Ronaghi M. Genetic variation analyses by Pyrosequencing. *Mutation research* 2005;**573**:96-102.
 107. Nordfords L, Jansson M, Sandberg G, Lavebratt C, Sengul S, Schalling M, Arner P. Large scale genotyping of single nucleotide polymorphisms by pyrosequencing trade mark and validation against the 5' nuclease (Taqman(R)) assay, *Hum. Mutat.* 2002;**19**:395-401.
 108. Aquilante CL, Lobmeyer MT, Langaee TY, Johnson JA. Comparison of cytochrome P450C9 genotyping methods and implications for the clinical laboratory, *Pharmacotherapy* . 2004;**24**:720-726.

- 109.Saeki M, Saito Y, Jinno H, Tohkin M, Kurose K, Kaniwa N, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Ozawa S, Sawada J. Comprehensive UGT1A1 genotyping in a Japanese population by pyrosequencing. *Clin Chem.* 2003;**49**:1182-1185
- 110.Nilsson TK, Johansson CA. A novel method for diagnosis of adult hypolactasia by genotyping of the –13910 C/T polymorphism with pyrosequencing technology. *Scand J Gastroenterol.* 2004;**39**:287-290.
- 111.Gage BF, Eby CS. The genetics of vitamin K antagonists. *Pharmacogenomics J.* 2004;**4**(4):224-5.
- 112.Taube J, Halsall D, Baglin T. Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long term treatment. *Blood* 2000; **96**: 1816-1819.
- 113.Joffe HV, Xu R, Johnson FB, Longtine J, Kucher N, Goldhaber SZ. Warfarin dosing and cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Thromb Haemost.* 2004 Jun;**91**(6):1123-8.
- 114.Takahashi H, Ieiri I, Wilkinson GR, Mayo G, Kashima T, Kimura S, et al. 5' Flanking region polymorphisms of CYP2C9 and their relationship to S-warfarin metabolism in white and Japanese patients. *Blood* 2004;**76**:210-9.
- 115.Zhao F, Loke C, Rankin SC, Guo JY, Lee HS, Wu TS, et al. Novel CYP2C9 genetic variants in Asian subjects and their influence on maintenance warfarin dose. *Clin Pharmacol Ther* 2004; **76**:210-9..
- 116.Kerb R, Aynacioglu AS, Brockmoller J, Schlagenhauser R, Bauer S, Szekeres T, Hamwi A, Fritzer-Szekeres M, Baumgartner C, Ongem HZ, Guzelbey P, Roots I, Brinkmann U. The predictive value of MDR1, CYP2C9, and CYP2C19 polymorphisms for phenytoin plasma levels. *Pharmacogenomics J.* 2001;**1**(3):204-10.

FORMLAR

Katılımcılar için Bilgi ve Olur Formu

Proje Yürütücüsü: Dr Gülay Öner Özgön

VKV Amerikan Hastanesi Nişantaşı/İstanbul

Tel:212 31120 00/ 8707

Proje Başlığı: Türk populasyonunda varfarin dozu ile VKORC1 gen haplotip ilişkisi

Proje Konusu: Varfarin (coumadin), kardiyovasküler hastalıklarda ilk seçenek ilaçlardan biridir. Bununla birlikte, varfarin dozunu tedavi aralığında tutmak oldukça zordur. Hastaların bu tedavi aralığında olması için INR ile takip edilmesi gerekmektedir. Son yıllarda, genetik alanındaki gelişmeler farmakoloji alanındaki gelişmelerle birleştirildiğinde, hastaların günlük tedavilerinde kullanabilecekleri yararlı adımlar atılmıştır. Varfarin kullanan hastalarda yapılan birçok çalışmada bir çok genin çeşitliklerinin (polimorfizmlerinin) varfarinin etkilerini değiştirdiğini göstermiştir. Bu çalışmalardan en sonuncusu vitamin k epoksit kompleks 1 gen çeşitliliklerinin varfarin dozunu etkilediğini göstermiştir. Böyle bir ilişki varlığında, varfarin kullanacak kişilere öncelikle bu gen analizleri yapıp, gen analizi sonuçlarına göre varfarin dozu başlanabilecektir.

Araştırmayı kabul ettiğiniz takdirde sizden on mililitre kan alınacaktır. İsimleriniz tamamen gizli tutulacaktır. Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır.

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır ; ayrıca, bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

Yapmak istediğimiz çalışmanın size bir risk getirmesi beklenmemektedir. Kan aldırmanın genelde hiçbir zararı olmamasına karşın, kolunuzda nadiren

ve çok az kanama veya morarmaya yol açabilir. Araştırmanın sonucunda aranan bilgi elde edildiğinde size sonuçlar verilecektir.

Bu formu imzalamadan önce veya imzaladıktan sonra çalışma ile ilginiz varsa lütfen aşağıda adı yazılı kişilere sorularınızı sorun:

Dr Gülay Özgön (Amerikan Hastanesi, Klinik Farmakoloji, Tel 212 31120 00/8707)

Prof Dr Aksel Siva (Amerikan Hastanesi Nöroloji kliniği, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nöroloji AbD)

Dr Genco Yücel (Amerikan Hastanesi, Kardiyoloji Kliniği)

Doç Dr Teoman Dal (Amerikan Hastanesi, Başhekimlik)

Bana anlatılanları ve yukarda yazılanları anladım. Bu formun bir kopyasını aldım. Çalışmaya katılmayı kabul ediyorum.

Katılımcı ismi ve imzası:

Tarih:

Şahit İsmi ve imzası

Araştırmacı ismi ve imzası:

BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

Ben....., genetik
çalışmada kullanılmak üzere şahsımdan kan örneği alınmasına kendi rızamla
onay veriyorum.

Genetik çalışmanın kapsamıyla ilgili olan bilgi formunu okudum ve
araştırmanın temel amacının kullandığım ilaçın bana yaptığı etkileri ile ilgili
bir genin incelemesi olduğunu anladım.

Adı Soyadı

İmza

Tarih:

Kabul ediyorum.

Tarih.

İmza:

İsim soyisim.

Tel:

Tanık ismi/ imzasi

Araştırmacı/hekim ismi imzasi:

Varfarin Farmakogenetiği araştırmasında hasta bilgi toplama formu

Adı Soyadı	
Hasta no	
Doğum yeri /yılı	
Boy/kilo	
Cinsiyeti	
Varfarin kullanma endikasyonu	
Eş zamanlı kullandığı ilaçlar	
Varolan diğer hastalıklar	
Varfarin dozu (INR ölçümü yapıldığında, haftalık)	
INR , Rutin biyokimya (tarihi ile)	
Geçirilmiş kanama hikayesi	
Geçirilmiş SVO veya emboli (INR sabit iken)	
Doktor imzası	
Haplotip Sonuçları	

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI



Sayı : 5445

Konu :

İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
Müdürlüğüne

İstanbul, 10 Mart 2006 / /

İLGİ: 13.02.2006 tarihli, 153 sayılı yazınıza:

Bölümünüze bağlı Genetik Anabilim Dalında görevli **Doktora Öğr. Dr.GÜLAY ÖZGÖN'ün** yürüteceği "Varfarin Kullanan Hastalarda VKORC1 Haplotipleri ve Varfarin Doz İlişkisi" başlıklı proje hakkındaki ilgi yazınız ve ekleri **07 Mart 2006** tarihinde toplanan Fakültemiz Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteğinin alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgileriniz durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini saygılarımla rica ederim.

Eki:
1 dosya

Prof.Dr. Halil YANARDAĞ
Dekan Yardımcısı ve Etik
Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gülay	Soyadı	Öner Özgön
Doğ.Yeri	Elazığ	Doğ.Tar.	1971
Uyruğu	TC	TCKim No	23981097784
Email	gulayozgon@yahoo.com	Tel	0 532 6080766

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Farmakoloji uzmanlığı	2003
Yük.Lis.		
Lisans	İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	1997
Lise	Özel İtalyan Lisesi	1990

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Klinik Farmakoloji Uzmanı	VKV Amerikan Hastanesi	2005-2007
2.	Genetik Doktora öğrencisi	İ.Ü. DETAE Ens	2002-2005
3.	Farmakoloji Uzmanlık Öğrencisi	İ. Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	1999-2002

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜD S Puanı	(Diğer) Puanı
İtalyanca	İyi	Çok iyi	İyi	89	
İngilizce	İyi	İyi	Orta	65	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	55		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
World	İyi
Power Point	İyi
Excell	Orta

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Ödüller

1. Türk Epilepsi ile Savaş Derneği Proje Yarışması, Temel bilimler birincilik ödülü, 2000.
2. Türk Epilepsi ile Savaş Derneği, Temel Bilimler Birincilik Ödülü, 2002

Uluslararası Yayınlar

1. Resistance to propagation of amygdaloid kindling seizures in rats with genetic absence epilepsy. Eskazan E, Onat FY, Aker R, Oner G. *Epilepsia*. 2002 Oct;43(10):1115-9.
2. Lack of association of MDR1 polymorphisms and drug resistance in epileptic patients with carbamazepine treatment (European J Neurology, accepted) Ozgon Oner G, Bebek N, Cine N, Gul G, 2007.

Uluslararası Kongrelerdeki Sunumlar

1. A retrospective Study Comparing Antiepileptic Drugs Blood Levels of Outpatient Clinic and Referral Patients'
2. **Öner G**, Eskazan AE, Akkan AG, Eskazan E. 4th *European Congress on Epileptology, Florence, 2000*
3. Diagnostic and Therapeutic Mistakes During The Management of an Epileptic Patient **Öner G.**, Eskazan E. 24th *International Epilepsy Congress, Buenos Aires, 2001*
4. Antiepileptic Drugs effects on Isole Rats Heart. **Öner G.**, et al 5th *European Congress on Epileptology, Barcelona, Spain, 2002*
5. Predictive value of C3435T polymorphisms in MDR1 gene for carbamazepine plasma levels. **Özgön Öner Gülay¹**, et al. . 6th *European Congress on Epileptology, Vienna, Austria, 2004*
6. ICU patients: how to deal with medication interference to nutritional treatment?, The European Society For Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN) Congress, 20 Ekim 2006, İstanbul
7. Drug selection on the patient safety. I international patient safety congress, 28-31 March 2007, Chair person

Ulusal Kongrelerdeki sözlü Sunumlar

1. A retrospective Study Comparing Antiepileptic Drugs Blood Levels of Outpatient Clinic and Referral Patients. **Öner G**, Eskazan AE, Akkan AG, Eskazan E. 2nd National Epilepsy Congress, Istanbul, 1999
2. Antiepileptic Drugs effects on Isole Rats Heart. **Öner G.**, Suzer O, Gursoy N, Eskazan E. 3rd National Epilepsy Congress, Trabzon 2002
3. Predictive C3435T polymorphism in the MDR1 for carbamazepine plasma levels. **G. Öner**, et al. 39. National Congress of Neurology 22-26 October 2003, Antalya.
4. Evaluation of the genotype and allele frequency of MDR-1 gene (multidrug resistance gene-MDR-1) polymorphism in Turkish Population. **N. Bebek**, N. Çine, G. Öner, U. Özbek. VI. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi. 21-24 Nisan 2004. Belek-Antalya.
5. Investigation of EPM2A mutation in Turkish Lafora body Disease. *, **N. Bebek, *B. Baykan, ***F. Madia, , **N. Çine, ****G. Öner**, *C. Gürses, ****E. Eşkazan, ****A. Dervent, *A. Gökyiğit, **U. Özbek, Study group on genetics of epilepsies and ***F. Zara. 4th National Congress of Turkish League Against Epilepsy, Ankara-2004.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

İlaç etkileşimleri

Farmakogenetik/Farmakogenomiks

Yeni hastalık genleri taranması

Epilepsi genetiği