



**KOLON KANSERİ TEDAVİSİNDE İRİNOTEKAN İLAÇ CEVABINI
ETKİLEYEN FARMAKOGENETİK VE FARMAKOEPİGENETİK
FAKTÖRLER**

Doktora Tezi
Duygu ABBASOĞLU
Eskişehir 2018

**KOLON KANSERİ TEDAVİSİNDE İRİNOTEKAN İLAÇ CEVABINI
ETKİLEYEN FARMAKOGENETİK VE FARMAKOEPİGENETİK
FAKTÖRLER**

Doktora Tezi
Duygu ABBASOĞLU
Eskişehir 2018

Doktora Programı/Biyoloji Anabilim Dalı/Moleküler Biyoloji Bilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Hülya SİVAS
İkinci Danışman: Dr. Candan HİZEL

Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Ocak 2018

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1406F319 no.lu proje kapsamında kısmen desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Duygu Abbasoğlu'nun "Kolon Kanseri Tedavisinde İrinotekan İlaç cevabını Etkileyen Farmakogenetik ve Farmakoepigenetik Faktörler" başlıklı tezi 04/01/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyoloji Anabilim dalında Doktora yeterlilik tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı Adı Soyadı

İmza

Prof. Dr. Hülya SİVAS :

Prof. Dr. Cengiz YAKICIER :

Prof. Dr. Kevser EROL :

Doç. Dr. Emel ERGENE :

Yard. Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU:

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ersin YÜCEL

ÖZET

KOLON KANSERİ TEDAVİSİNDE İRİNOTEKAN İLAÇ CEVABINI ETKİLEYEN FARMAKOGENETİK VE FARMAKOEPİGENETİK FAKTÖRLER

Duygu ABBASOĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı
Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2018

Danışman: Prof. Dr. Hülya SİVAS
(İkinci Danışman: Dr. Candan HİZEL)

Metastazik kolon kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan ön ilaç irinotekanın aktif metaboliti, UGT1A1 tarafından metabolize edilen SN-38'dir. Genetik ve epigenetik faktörlerin ilaç yanıtı üzerindeki etkisi ilaçların akılcı kullanımını öne çıkarmaktadır. Bu çalışmada, UGT1A1 ifadesini etkileyebilecek genetik ve epigenetik faktörlerin irinotekan ilaç yanıtındaki çıktıları hakkında öngörüsül veri sahibi olunması hedeflenmiştir. Çalışmamızda irinotekan tedavisi alan kolon kanserli 48 hasta ile çalışılmıştır. En sık diyare, mukozit ve nötropeni olmak üzere %66,6'sında toksik etki görülmüştür. UGT1A1 1*/1* yaygın yabancıl genotip %72,98, UGT1A1 28*/28* çekinik genotip %6,5 bulunmuştur. Epigenetik analizleri için 9 hastaya ait kan örneği ve 8 hastaya ait 13 adet kolon doku kesiti ile çalışılmıştır. UGT1A1 transkripsiyon başlama noktasının yukarısındaki 3., 4., 28., 29. ve 30. CpG dinükleotidlerinin metilasyon profili incelenmiştir. Promotor bölgede -4 CpG ve enhancerdaki -28 CpG ve -29 CpG dinükleotidlerinin metillendiği saptanmıştır. Kan örneklerinde doku örneklerine kıyasla tüm bölgelerde yüksek metilasyon profiline rastlanmıştır. UGT1A1 genotipleri, hasta yaşam biçimi, demografik faktörler, kombine ilaç kullanımları ve UGT1A1 CpG dinükleotid metilasyonları çoklu veya ikili lojistik regresyon modeli ile incelenmiştir. Bu faktörler arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bu çalışma kan örneklerinde UGT1A1 için metilasyon paterninin çalışıldığı ilk çalışma olup, UGT1A1'in dokuya özgü metillenerek epigenetik regülasyonunun olabileceğini göstermiştir. Ayrıca Türkiye'de irinotekan farmakoepigenetiği ile yapılan ilk araştırmadır.

Anathar Kelimeler: Farmakogenetik, Farmakoepigenetik, UGT1A1, İrinotekan

ABSTRACT

PHARMACOGENETIC AND PHARMACOEPIGENETIC FACTORS FOR IRINOTECAN DRUG RESPONSE IN COLON CANCER TREATMENT

Duygu ABBASOĞLU

**Department of Biology
Programme in Molecular Biology
Anadolu University, Graduate School of Science, January, 2018**

**Supervisor: Prof. Dr. Hülya SİVAS
(Co-Supervisor): Dr. Candan Hızıl**

SN-38 is the active metabolite of the pro-drug irinotecan which is metabolized by which is commonly used in the treatment of metastatic colon cancer. Genetic and epigenetic factors that affect enzyme activity put forward the rational use of drugs. In this study, it is aimed to have predictive data about the outcomes of the genetic and epigenetic factors that may affect UGT1A1 expression on irinotecan drug. This study comprises a total of 48 patients treated with irinotecan. Toxic effect, most commonly diarrhea, mucositis and neutropenia was observed in 66,6% of the patients. The distribution of the genotypes was as follows: 72,98% of them wild type UGT1A1 1*/1* and 6,5% of them recessive UGT1A1 28*/28*. Blood samples of 9 patients and 13 colon tissue samples of 8 patients were collected for epigenetics studies. The methylation profiles of 3rd, 4th, 28th, 29th, and 30th CpG dinucleotides located upstream of transcription start site was investigated. The methylation of -4 CpG dinucleotide in promoter region and -28 CpG and -29 CpG dinucleotides in distal enhancer were detected. Blood samples showed high methylation profiles in all regions compared to tissue samples. UGT1A1 genotypes, patient lifestyle, demographic factors, combined drug use and UGT1A1 CpG dinucleotide methylations were examined by multiple or binary logistic regression model. There was no significant relationship between these factors. This is the first study for the methylation pattern for UGT1A1 in blood samples showing epigenetic regulation might be by tissue-specific methylation of UGT1A1. It is also the first study with irinotecan pharmacoeigenetic so far in Türkiye.

Keywords: Pharmacogenetics, Pharmacoeigenetics, UGT1A1, Irinotecan

TEŞEKKÜR

Tezin gerçekleşmesini sağlayan tez danışmanım Prof. Dr. Hülya Sivas’a, bana çalışma fikrini veren ve desteğini hep yanımda hissettiğim Dr. Candan Hızıl’e, çalışmadaki örneklerin teminindeki özenli yardımları için Dr. Meral Günaldı’ya, örneklerin patolojik değerlendirmeleri için Dr. Damlanur Sakız’a, genotiplendirme analizleri için bize laboratuvar olanaklarını sağlayan Prof. Dr. Cengiz Yakıcıer’e çok teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmamın proje ve deney aşamasında bilgi ve becerileri ile bana yardım eden değerli laboratuvar emekçileri Güven Yenmiş, Hatice Genç, Oęuzhan Karaosmanoęlu, Ceren Yavuz, Erhan Aslan ve Zeynep Yıldız’a teşekkürlerimi sunarım.

İstatistiki analizlerde danıştığım, araştırma verilerini bilgiye dönüştüren çok değerli bilimsanı Dr. Ayşe Abbasoğlu Özgören’e teşekkür ederim.

Zor zamanlarda destek vermekten çekinmeyen sendikam EğİTİM-SEN’e teşekkür ederim.

Hep yanımda olan ve gerektiğinde bilimsel önerileri ve tecrübelerini benimle paylaşılan aileme çok teşekkür ederim.

Duygu Abbasoğlu

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Duygu Abbasoğlu

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
GÖRSELLER DİZİNİ.....	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
1.GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. Öngörüşel ve Bireye Özgü Tedavi Kavramları.....	3
2.2. Genetik Polimorfizm ve Farmakogenetik/Farmakogenomik Kavramlar.....	6
2.3. Epigenetik-Farmakoepigenetik.....	10
2.3.1. Epigenetik mekanizmalar.....	11
2.3.1.1. DNA metilasyonu.....	11
2.3.1.2. Histon modifikasyonları.....	12
2.3.1.2.1. Histon asetilasyonu.....	13
2.3.1.2.2. Histon metilasyonu.....	14
2.3.1.2.3. Histon fosforilasyonu.....	15
2.3.1.2.4. Histon ubikutinasyonu.....	15

	<u>Sayfa</u>
2.3.1.3. <i>RNA ile gen susturulması</i>	15
2.3.1.4. <i>ATP-bağımlı kromatin yapılandırma modeli</i>	16
2.3.2. İlaç metabolizmasında epigenetik regülasyon.....	17
2.4. Kanser Farmakogenetiği.....	18
2.4.1. Kolon kanseri.....	20
2.4.2. Kolon kanseri evreleri ve tedavisi.....	24
2.4.3. Kolon kanseri tedavisinde irinotekan.....	27
2.4.4. İrinotekan aktivitesi.....	29
2.5. İrinotekanı Metabolize eden enzim: UGT1A1.....	30
2.5.1. UGT1A1 enzim seviyesini etkileyen faktörler.....	30
2.5.1.1. <i>UGT1A1 polimorfizmi</i>	30
2.5.1.2. <i>UGT1A1'in epigenetik regülasyonu</i>	32
2.6. Araştırma Hipotezi.....	34
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	35
3.1 Materyal.....	35
3.1.1 Örnekler ve veri toplanması.....	35
3.1.1.1. <i>Kan örnekleri</i>	35
3.1.1.2. <i>Doku örnekleri</i>	35
3.1.1.3. <i>Anket verileri</i>	37
3.1.2. Kullanılan kitler ve cihazlar.....	44
3.1.2.1. <i>Genotiplendirme analizleri</i>	44
3.1.2.2. <i>Bisülfıt DNA dizi analizi</i>	45
3.1.2.3. <i>Protein analizleri</i>	45
3.1.3. Çözeltiler.....	47
3.1.4. Primerler.....	48

	<u>Sayfa</u>
3.2. Yöntem.....	49
3.2.1. UGT1A1 genotiplendirme analizleri.....	49
3.2.1.1. <i>DNA izolasyonu.....</i>	<i>50</i>
3.2.1.2. <i>Genomik DNA'nın UGT1A1 genotiplendirmesi için PZR amplifikasyonu.....</i>	<i>50</i>
3.2.1.3. <i>Autogenomics INFINITI plus sistemi ile analiz.....</i>	<i>51</i>
3.2.2. Bisülfıt genomik DNA dizi analizi.....	51
3.2.2.1. <i>DNA izolasyonu.....</i>	<i>51</i>
3.2.2.1.1. <i>Kandan genomik DNA izolasyonu.....</i>	<i>51</i>
3.2.2.1.2. <i>FFPE'den genomik DNA izolasyonu.....</i>	<i>52</i>
3.2.2.1.3. <i>Nanodrop yöntemi.....</i>	<i>53</i>
3.2.2.2. <i>Bisülfıt ile DNA dönüşümü.....</i>	<i>53</i>
3.2.2.3. <i>PZR amplifikasyonu.....</i>	<i>55</i>
3.2.2.3.1. <i>Promotor CpG bölgeleri için nested PZR..</i>	<i>57</i>
3.2.2.3.2. <i>Enhancer CpG bölgeleri için nested PZR..</i>	<i>58</i>
3.2.2.4. <i>Agaroz jel elektroforezi.....</i>	<i>58</i>
3.2.2.5. <i>DNA temizleme ve DNA dizi analizi.....</i>	<i>59</i>
3.2.3. UGT1A1'in protein seviyesinin belirlenmesi.....	59
3.2.3.1. <i>FFPE'de protein izolasyonu.....</i>	<i>59</i>
3.2.3.2. <i>Protein miktarı analizi.....</i>	<i>60</i>
3.2.3.2.1. <i>Qubit yöntemi.....</i>	<i>60</i>
3.2.3.2.2. <i>Dot blot yöntemi.....</i>	<i>60</i>
3.2.3.3. <i>Western blot analizi.....</i>	<i>61</i>
3.2.4. İstatistiki analizler.....	62
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	63
4.1. UGT1A1 genotiplendirme sonuçları.....	63

	<u>Sayfa</u>
4.1.1. UGT1A1 polimorfizmi ve irinotekan tedavisinde toksik etkilerin ilişkilerinin değerlendirilmesi.....	67
4.2. UGT1A1 bisülfıt genomik DNA dizi analizlerine ait bulgular.....	70
4.2.1. UGT1A1 promotor CpG bölgelerine ait metilasyon sonuçları.....	71
4.2.2. UGT1A1 enhancer CpG bölgelerine ait metilasyon sonuçları.....	77
4.2.3. CpG dinükleotidleri arasında korelasyon.....	81
4.3. UGT1A1 protein ifadesi analizleri.....	82
4.3.1. Protein izolasyonu Qubit sonuçları.....	82
4.3.2. Dot blot sonuçları.....	84
4.3.3. Western blot sonuçları.....	85
4.4. UGT1A1 ifadesini etkileyebilecek faktörlerin değerlendirilmesi..	87
5. SONUÇ.....	93
KAYNAKÇA.....	95
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. İlaç biyotransformasyonda rol alan enzimler.....	8
Çizelge 3.1. Hastalara ait FFPE örnekleri.....	36
Çizelge 3.2. DNA izolasyonu ve Protein izolasyonu yapılan FFPE örnekleri ve örneklerin tümör oranları.....	37
Çizelge 3.3. Hasta bilgileri.....	38
Çizelge 3.4. Hasta tedavi ve ters ilaç reaksiyonu (AIR) bilgileri.....	39
Çizelge 3.5. Hasta anket verileri.....	43
Çizelge 3.6. Western blot analizinde kullanılan antikorlar.....	46
Çizelge 3.7. DNA metilasyonu analizinde kullanılan primerler	49
Çizelge 3.8. UGT1A1 genotiplendirme analizi PZR karışımı.....	50
Çizelge 3.9. UGT1A1 genotiplendirme analizi PZR koşulları.....	51
Çizelge 3.10. Kandan izole edilen DNA örnekleri için bisülfıt modifikasyon karışımı.....	53
Çizelge 3.11. FFPE'den izole edilen DNA örnekleri için bisülfıt modifikasyon karışımı.....	53
Çizelge 3.12. Termal döngü cihazında uygulanan bisülfıt DNA dönüşümü koşulları.....	54
Çizelge 3.13. CpG dinükleotidlerinin sitozinin metilasyonunun incelenmesi için uygulanan PZR'ın karışımı.....	56
Çizelge 3.14. CpG dinükleotidlerinin sitozinin metilasyonunun incelenmesi için uygulanan PZR'ın koşulları.....	57
Çizelge 4.1. Hastalara ait UGT1A1 polimorfizm sonuçları ve beklenen UGT1A1 enzim aktivitesi.....	65
Çizelge 4.2. UGT1A1 genotipine ve cinsiyete göre yan etkilerin dağılımı, yan etkilerin dereceleri ve yan etki dağılım yüzdeleri.....	69
Çizelge 4.3. DNA örneklerine ait nanodrop sonuçları.....	70
Çizelge 4.4. Kan örneklerinden UGT1A1 -3 ve -4 CpG bölgelerine ait metilasyon paterni.....	75

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.5. Kolon doku örneklerinden UGT1A1 -3 ve -4 CpG bölgelerine ait metilasyon paterni.....	76
Çizelge 4.6. Kan örneklerinden UGT1A1 -30 -29 ve -28 CpG bölgelerine ait metilasyon paterni.....	78
Çizelge 4.7. Kolon doku örneklerinden UGT1A1 -30, -29 ve -28 CpG bölgelerine ait metilasyon paterni.....	79
Çizelge 4.8. Kolon doku örneklerine ait CpG bölgelerinin metilasyon profilinin korelasyonu.....	81
Çizelge 4.9. Protein izolatlarının Qubit Sistemi'ndeki değerleri.....	83
Çizelge 4.10. Western blot analizi sonucu görüntülenebilen UGT1A1 miktarları karşılaştırılması.....	86
Çizelge 4.11. CpG metilasyon paternleri ile yaş, cinsiyet, UGT1A1 polimorfizmi ve irinotekan tedavisindeki toksik etki	88
Çizelge 4.12. Toksik etki olmasını belirleyenler (olmamasına göre olma odds oranları).....	89
Çizelge 4.13. Çoklu (multinomial) veya ikili (binary) lojistik regresyon modeli sonuçları.....	90

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Öngörüşel ve bireye özgü tedavi.....	3
Şekil 2.2. Genetiğe dayalı bireysel yaklaşım.....	6
Şekil 2.3. Normal epitelyumdan kolon kanserinin gelişimi.....	22
Şekil 2.4. İrinotekan metabolizması.....	29
Şekil 3.1. UGT1A1 promotor ve enhancer bölgeleri (a) ve 1. döngü PZR’da çoğaltılacak bölge (b).....	55
Şekil 3.2. UGT1A1 geni CpG bölgeleri ve PZR amplifikasyonunda çoğaltılan bölgeler.....	56
Şekil 3.3. Proksimal promotorda çoğaltılan gen bölgesi.....	57
Şekil 3.4. Distal enhancer’da çoğaltılan gen bölgesi.....	58
Şekil 4.1. Autogenomics Infinity cihazı tarafından verilen hasta genotiplendirme sonuçları.....	64
Şekil 4.2. İrinotekan tedavisinde görülen en yaygın üç yan etkinin kesişimlerine göre yüzde dağılımı.....	67
Şekil 4.3. Distal enhancerda gtPBREM kompozitinin modülleri ve CpG dinükleotidlerinin yer aldığı bölgeler.....	80
Şekil 4.4. Protein izolatlarının miktarı.....	83
Şekil 4.5. Ponceau boyası ile dot blot analizi yapılan proteinlerin Image J programı ile değerlendirilmesi.....	85

GÖRSELLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Görsel 2.1. <i>Camptotheca acuminata</i> (Mutluluk ağacı)	28
Görsel 4.1. DNA dizi analizi yapılan kolon doku örneklerine ait 289 bç'lik F2R2 PZR ürünleri.....	72
Görsel 4.2. DNA dizileme sonuçlarının NCBI-Blast ile hizalanması.....	73
Görsel 4.3. HN 35 kan örneği için -3 ve -4 CpG dinükleotidlerinde yer alan metilenmiş sitozinler.....	74
Görsel 4.4. DNA dizi analizi yapılan kan örneklerine ait 363 bç'lik F4R4 PZR ürünleri.....	77
Görsel 4.5. Ponceau boyası ile dot blot analizi yapılan proteinlerin görüntüsü.....	84
Görsel 4.6. UGT1A1 ve β -aktin Western blot görüntüsü.....	85

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
°C	: Derece Santigrat
5-FU	: 5- fluorourasil
∞	: Sonsuz
AİR	: Advers İlaç Reaksiyonu
APC	: Adenomatöz Polipozis Koli
ATP	: Adenozin trifosfat
bç	: Baz çifti
BSA	: Bovine serum albumin (Sığır Serum Albümini)
CIN	: Kromozomal kararsızlık
CpG	: Sitozin-fosfat-guanin
CYP	: Sitokrom
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleikasit
DNMT	: Deoksiribonükleikasit metiltransferaz
DNTP	: Dinükleotidtrifosfat
DPD	: Dihidropirimidin dehidrogenaz
DPYD	: Dihidropirimidin dehidrogenaz
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FAP	: Ailesel Adenomatöz Polipozis
FDA	: Food Drug Adminstration (Gıda ve İlaç Dairesi)
FFPE	: Formalin-fixed Paraffin-embedded (Formaline Sabitlenmiş ve Parafine Gömülü)
gr	: Gram
HAT	: Histon Asetiltransferaz
HNPCC	: Kalıtsal Nonpolifozit Kolorektal Kanser
HRP	: Horseradish Peroxidase (Bayır Turpu peroksidazı)
IgG	: İmmun Globulin G
kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton

lt	: Litre
M	: Molar
mA	: Miliamper
MBD	: Metil Cpg Bağlanma Domainleri
miRNA	: Mikro Ribon�kleikası
mRNA	: Mesajcı Ribon�kleikası
MSI	: Mikrosatellit Kararsızlığı
n	: Sayı
N/A	: Tespit edilemeyen
nm	: Nanometre
PVDF	: Polivinilidin diflorit
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RISC	: RNA-ind�kleyici baskılama kompleksi
RNA	: Ribon�kleikası
RNAi	: Ribon�kleikası interferansı
rpm	: Round per minute (Dakikada d�n�ş hızı)
s	: Saat
SDS	: Sodyumdodesil S�lfat
siRNA	: small interfering RNA (k���k interferans RNA)
SN-38	: 7-Etil-10-hidroksikamptotesin
TA	: Timin-Adenin
TAE	: Tris asetat etilendiamin tetra asetik asit
TBS-T	: Tris-buffered saline with Tween 20 (Tuz ve Tween 20 ile tamponlanmış Tris)
TNP	: Tek n�kleotid polimorfizmi
TPMT	: Thiop�rin metiltransferaz
UGT	: Urinidin difosfat glukuronosiltransferaz
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
W	: Watt
�	: Mikro

1. GİRİŞ

İlaç kullanımının taşıdığı çeşitli sorunlar arasında ilaçların yan etkileri, temel bir halk sağlığı problemidir. Kişilerin ilaca verecekleri yanıtta, kalıtsal genetik farklılıkları etkili olabilmektedir. Tedavi süreçlerinin en büyük sorunlarından biri, Advers İlaç Reaksiyonları (AİR)'dir. Bildirilen klinik verilerden daha fazla AİR vakası vardır (Greener, 2017). İleri yaştaki hastalarda AİR görülme riski %78 daha fazladır (Davies ve O'Mahony, 2015). Senede 2 milyondan fazla ciddi AİR vakası ve 100.000'e yakın AİR kaynaklı ölüm olduğu rapor edilmiştir (Kohn, Corrigan ve Donaldson, 2000). Özellikle kolon kanseri tedavisinde olmak üzere, akciğer ve pankreas kanseri tedavisinde de kullanılan irinotekan ilacı için hastaların %36'sında toksik etkinin görülmesi, bu ilacın kemoterapide kullanımı açısından zorluk çıkarmaktadır (Agrawal, 2002; Fuchs vd., 2003). İrinotekan tedavisinde toksik etkilerin öngörülebilmesi için ilaç üreticisi firma (Camptosar), 1998 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)'nin de önerisi üzerine, ilacın prospektüsüne "kemoterapi öncesi ilacın metabolizmasında önemli rol alan UGT1A1 enzimi için genotiplendirme analizinin yapılması, UGT1A1*28 homozigot bireylerde doz ayarlaması yapılması gerektiği" bilgilendirmesini koymuştur.

İrinotekan tedavisinde UGT1A1 enzimi, aktif metabolit 7-etil-10-hidroksikamptotesin (SN-38)'e glukuronidil grubu bağlayarak SN-38'in biyotransformasyonunu gerçekleştirmektedir. SN-38'in UGT1A1 enzim aktivitesindeki azalma ile vücutta birikmesi, toksik sendromlara (nötropeni, diyare gibi) neden olmaktadır (Mathijssen vd., 2001). UGT1A1'in enzim ifadesinin azalması veya artması glukuronidasyon aktivitesini doğrudan etkilediği için kleransı bu yolla gerçekleşen ilaçların metabolizması da dolaylı yoldan etkilenmektedir (Xu vd., 2016).

UGT1A1 geni insanlarda polimorfik olarak bulunmaktadır ve bu durum enzim aktivitesi üzerinde etkilidir. *UGT1A1* gen bölgesindeki I. ekzonda yer alan promotorda bulunan timin-adenin (TA) tekrarları, enzim aktivitesindeki değişimlerden sorumlu genetik polimorfizmlerdir (Iyer vd., 2002). Bu tekrarlarla bağlı olarak genotiplendirme analizleri için irinotekan tedavisinde etkili olabilecek enzimin genotipleri tanımlanmıştır. Buna göre; UGT1A1 aktivitesinin düşük olduğu UGT1A1*28 (rs8175347), *37 ve yüksek olduğu UGT1A1*36 ve de doğal tip olan enzim aktivitesinin normal olduğu polimorfik UGT1A1*1 genotipleri vardır (Palomaki vd., 2009). UGT1A1 allelik frekanslar etnik gruplar arasında farklılıklar göstermektedir;

UGT1A1 28* allelik frekansı en düşük Asya popülasyonunda (%16), en sık ise Afrika (%43) ve Avrupa (%36) popülasyonlarında saptanmıştır (Innocenti vd., 2003). Türkiye’de UGT1A1 allel frekansı konusunda kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır.

UGT1A1 enziminin aktivitesi üzerinde etkili olan bir başka faktör, *UGT1A1* geninin DNA metilasyonu yoluyla epigenetik regülasyonudur. *UGT1A1* geninde transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı öngörülen promotor bölgenin 3,5 kb’lık üst akış yönünde yer alan sitozin-fosfat-guanin (CpG) dinükleotidlerinin ve transkripsiyon başlama noktasından 5 kb yukarıdaki CpG adasının metilasyonu incelenmiştir. *UGT1A1*’in promotor bölgesindeki CpG dinükleotidlerinin metilasyonunun *UGT1A1* regülasyonunu pozitif veya negatif etkilediği tartışmalı bir konudur. DNA metilasyonunun transkripsiyon faktörlerinin bağlanması etkili olup UGT1A1 transkripsiyonunda hem baskılayıcı (repressör) hem de artırıcı (enhancer) görev üstlenebilecekleri önerilmiştir (Yaşar vd., 2013). Diğer yandan; UGT1A1’in DNA metilasyonunun dokuya özgü bir paterne sahip olduğu ve negatif regüle edildiği ileri sürülmüştür (Gagnon vd., 2006; Oda vd., 2013). Epigenetik düzenlemelerin UGT1A1 seviyesi ile ilişkisi dokuya özgü olsa da hala belirsizliğini korumaktadır. Ayrıca bu güne kadar epigenetik düzenlemeler, irinotekan tedavisi yanıtı ve genetik polimorfizm ile doğrudan ilişkilendirilmemiştir.

Bu araştırmanın amacı, ilk kez Türkiye’de irinotekan tedavisi alan kolon kanseri hastalarının farmakogenetik, farmakoepigenetik ve ilaca verilen fenotipik yanıt analizlerinin yapılarak irinotekan tedavisine bağlı toksisitelerin ve de tedavi etkinliğini bireye özgü yaklaşım ile açıklamaktır. Bunun için Türkiye coğrafyasında yaşayan kolon kanseri hastalarının irinotekan tedavisinde etkin olan UGT1A1 enzimi için *UGT1A1* geninin polimorfik durumu ele alınmıştır. Buna bağlı olarak beslenme, yaşam tarzı gibi çevresel koşullar, UGT1A1 enzimi için epigenetik düzenlemeler ve genetik polimorfizmler arasındaki ilintiler araştırılmıştır. Bu çalışma ile Türkiye’de irinotekan tedavisi için hasta genetik profili oluşturulurken, epigenetik faktörlerin irinotekan tedavisini nasıl etkileyeceği konusunda öngörüsül veri sahibi olunması hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Öngörüşel ve Bireye Özgü Tedavi Kavramları

Öngörüşel ve bireye özgü tıp bireyin tüm yaşamınca devam eden bir kavramdır ve her hastanın kendisine ait özel bir biyolojik yapısı olduğu felsefesiyle, bireyin sadece genetik yapısına ait bilgilerle değil beslenme gibi yaşam tarzı ve çevre etmenleri ile birlikte incelenmesine dayanmaktadır. Birey, genleri vasıtasıyla çevresiyle sürekli olarak etkileşim içinde bir “açık sistem” gibi düşünülebilir (Prigogine, 1961). Öngörüşel ve bireye özgü tedavi kavramı, genlerle biyolojik veya psikolojik çevre koşullarının etkileşimi sonucuna dayanmaktadır (gen-çevre etkileşimi). Bu etkileşimler ortaya çıkabilecek hastalıkların ve Adverse İlaç Reaksiyonları (AİR)’nın belirlenmesinde yardımcı olmaktadır (Şekil 2.1). Buna ek olarak, biyoistatistik ve informatik yaklaşımlar bu etkileşimlere bağlı olarak ortaya çıkabilecek göreceli risklerin saptanmasında çok önemli rol oynamaktadır. Böylece hasta, yaşadığı farklı çevre koşullarında (beslenme alışkanlıkları, farmakolojik ve ekolojik etkiler) biyolojik yapısını daha iyi tanımakta ve bu çevreye bilinçli olarak uyumunu sağlamaktadır (Thorn vd., 2010; Hizel vd., 2017).



Şekil 2.1. Öngörüşel ve bireye özgü tedavi

Gen-çevre etkileşimi yeni bir kavram olmayıp ilk olarak 1965 Nobel Fizyoloji ve Tıp ödüllü Fransız bilim adamı Jacques Monod “Le Hasard et la nécessité” (1970; Rastlantı ve Zorunluluk) adlı denemesinde irdlemiştir. 1980'de Nobel Fizyoloji ve Tıp ödüllü Fransız bilim adamı Jean Dausset, meşhur “Önceden tespit etmek, tedavi etmekten daha iyidir” sözü ile ilk defa “Öngörüşel Tıp” terimini kullanmıştır (Charron, 2009). Jacques Ruffié 1993 yılında, "Naissance de la Médecine Prédictive" (Öngörüşel Tıbbın Doğuşu) adlı kitabında felsefî bir yaklaşımla bu terimi daha kapsamlı bir şekilde açıklamıştır. Gelişen yüksek dereceli gen teknolojileri ile birlikte, günümüzde “Öngörüşel Tıp”, bu terimi tamamlayan “Bireye Özgü Tıp” terimi ile birlikte kullanılarak daha açıklık ve kesinlik kazanmıştır (Aydın Son vd., 2013; Joyner ve Paneth, 2015).

1953 yılında DNA'nın J. Watson ve F. Crick tarafından keşfinden tam 50 yıl sonra Uluslararası İnsan Gen Projesi'nin (İGP) 2003 yılında tamamlanmasıyla birlikte gelişen genetik bilgiler genlerdeki farklılıkların ilaçlara verilen tepkiler üzerinde etkili olduğunu ortaya koymuştur ([http-1](http://1)). Genetik yapıdaki mutasyonların ciddi yan etkilere ve/veya tedavide başarısızlıklara neden olabildiği öngörülmektedir. Genlerdeki bu farklılıkların sonucu olarak, her kişinin vücudu değişik maddeleri farklı şekillerde metabolize etmektedir, bu da her kişinin ilaç kombinasyonlarına ve beslenme şekillerine farklı tepkiler verdiği anlamına gelmektedir. Bu yüzden, farklı bireylerde iyi sonuç veren bir ilaç başka bir birey için iyi olmayabileceği gibi zararlı dahi olabilmektedir. Genetik analizlerin ilaçlara verilen yanıtları bilimsel verilere dayanarak önceden saptayabileceği önerilmektedir (Hızel vd., 2009; Brittain vd. 2017).

İGP'nin tamamlanması ve moleküler tıbbın, özellikle genetiğin ve bilgisayar teknolojisinin hızlı bir şekilde gelişmesi sayesinde modern tıpta ve eczacılık biliminde çok önemli ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, günümüzde doktorların ilaç dozajını hala “deneme-yanılma” metoduyla saptadığı ve bu metodun birçok hastada önemli ilaç reaksiyonlarına yol açtığı bilinmektedir (Hızel vd., 2009; Aydın Son vd., 2013). Birçok ülkede ilaç kullanımı çeşitli sorunları birlikte taşıdığından, ilaçların yan etkileri günümüzdeki tedavi süreçlerinin en büyük sorunlarından biri olarak temel bir halk sağlığı problemidir. Aynı zamanda; yetersiz ve yanlış ilaç tedavisi ülke ekonomilerini olumsuz yönde etkilemekle birlikte milyonlarca kişi bu yetersiz ve yanlış ilaç tedavisi sonucunda ortaya çıkan önemli ilaç reaksiyonları yüzünden hastaneye gitmekte ve hatta yaşamlarını kaybetmektedir (Budnitz vd., 2006; Pardo Cabello vd., 2016). Örneğin,

1966 ile 1996 yılları arasında yayınlanan ve 39 araştırma raporunu kapsayan bir meta-analiz çalışmasına göre; Amerika Birleşik Devletleri'nde ve Avrupa'da yanlış ve yetersiz ilaç tedavisi senede ülke ekonomisine yaklaşık 1 milyar dolara mal olmakta, senede 2 milyonun üstünde kişi yanlış ilaç tedavisi yüzünden hastaneye yatmakta ve 100 binin üstünde kişi AİR gibi önlenebilecek sebeplerden dolayı hayatını kaybetmektedir (Lazarou vd., 1998). Yapılan başka bir araştırmaya göre, yavaş metabolizör olan psikiyatrik hastalarda antipsikotik veya antidepresör tedavisi hızlı metabolizör olan hastalara göre sağlık sistemine 4.000 ile 6.000 dolar zarara neden olmaktadır (Chou vd., 2000). AİR'nin 1998 ve 2005 yılları arasında 30.000-90.000 kadar yükseldiğini, buna karşılık aynı dönemde reçete sayısının yaklaşık %25 artmış olduğu gösterilmiştir (Moore vd., 2007; Nakamura, 2008). Amerika'nın Massachusetts eyaletinde altı hastanede yapılan bir çalışmada AİR'nin hastane yatış süresini 3,1 gün daha artarak 3.000 dolar maliyet artışına neden olduğu saptanmıştır (Hug vd., 2012). Özellikle kanser tedavisi gibi pahalı ilaçların kullanıldığı süreçlerde AİR'ler gibi beklenmedik durumlar tedavi maliyetini arttırmaktadır (Fojo vd., 2014).

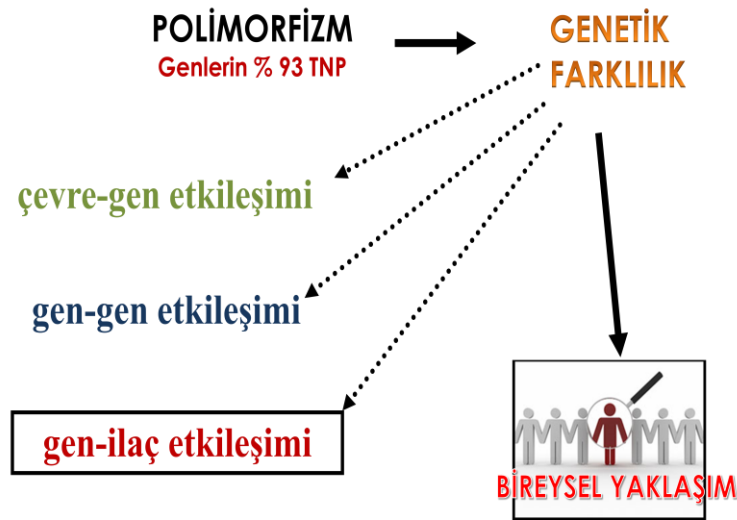
İlaç tedavisinin istenen etkinliğe ulaşmasında veya istenmeyen yanıtı engellemede enzim polimorfizimlerinin önemi bilindiği halde, bunun kliniğe yeterince yansıtılamamasının ilaç reaksiyonlarındaki artışta rolü büyüktür (Haga ve Burke, 2004; Sardaş ve Akıcı 2007; Khan, 2016). İlaç reaksiyonlarına bağlı ölümler, doğal olmayan ölüm nedenleri arasında 4. ve 6. sıralarda yer almaktadır (Lazarou vd., 1998; Moore vd., 2007; Shepherd vd., 2012). Genetik faktörler ilaç yanıtındaki bireyler arasındaki genetik farklılıkların en az %20-40'ından ve advers ilaç reaksiyonlarının yaklaşık %50'sinden sorumlu tutulmaktadır (Meyer, 2000; Phillips vd., 2001)

Bireye özgü tedavinin uygulamaları hasta için yorucu ve yıpratıcı bir süreç olan deneme-yanılma sürecini ve bu süreç içerisinde oluşabilen AİR'lerin getirdiği olumsuz etkileri de en aza indirmeyi amaçlamaktadır. Bireye özgü tedavinin önemli bir yapı taşı olan farmakogenetik, bireye özgü genetik-metabolik profilin ilaç kullanımı üzerindeki etkisini, değişik ilaçlara karşı cevabını ve bunlara bağlı olarak gelişebilecek toksisitelerin, reaksiyonların veya ilaca karşı dirençliliğin nedenlerini inceleyen bilim alanıdır Diğer bir deyişle bir ilaca doğru yanıt verenler ile doğru yanıt vermeyen kişilerin belirlenmesinde yardımcı olmaktadır. Kısacası; farmakogenetik, olumsuz ilaç yanıtlarının sonucundan yola çıkarak, bu olumsuz cevapların genetik sebeplerini

araştırıp kişinin genetik yapısına göre doğru kişi için doğru dozda doğru ilaç seçimini kolaylaştırılmasını araştıran bir bilim dalıdır (Hızel, 2010; Aydın Son vd., 2013; Khan, 2016).

2.2. Genetik Polimorfizm ve Farmakogenetik/Farmakogenomik Kavramlar

Genetiğe bağlı bireye özgü yaklaşım “herkes birbirinden farklıdır” cümlesiyle özetlenebilir ki bu kavram da genetik farklılığı yansıtmaktadır. Bu genetik farklılık genlerin %93’den fazlasında bulunan tek nükleotit polimorfizmlerinden (TNP veya SNP) kaynaklanmaktadır. TNP’lerin her 2000-2500 nükleotitte bulunduğu tahmin edilmektedir (The 1000 Genomes Project Consortium, 2010). Genetik farklılıktan ötürü bireyleri çevre şartlarına uyumu, ilaçlara yanıtı ve hastalıklara duyarlılık kapasiteleri aynı değildir. Bu nedenle polimorfizmlerin özellikle TNP’lerin saptanması farklı kişilerin farklı metabolik özelliklerinin belirlenebilmesini sağlamaktadır. “Yeni genetik” kavramı polimorfizm olgusu esasına dayanmakta ve günümüzde bu olgu rutin bireye özgü tedavi yaklaşımında kullanılmaktadır (Şekil 2.2) (Chaudhary vd., 2015).



Şekil 2.2. Genetiğe dayalı bireysel yaklaşım

Farmakogenetik, eski bir bilim dalı olup bu konudaki ilk gözlemler 1950’lerde kas gevşetici süksametonyum klorür ve N-asetiltransferaz aracılığı ile metabolize olan ilaçlar üzerinde yapılan çalışmalara dayanmaktadır. Farmakogenetiğin Kalow tarafından

yapılan ilk tanımlarından birine göre bu disiplin, “dışarıdan alınan ksenobiyotiklere karşı doğuştan oluşabilecek farklı cevapları” incelemektedir (Kalow, 1962).

Günümüzde farmakogenetik ve farmakogenomik terimleri pratikte eşanlamli kullanılmalarına rağmen farmakogenetik; kişilerdeki genetik farklılığın ilaçlara olan farklı yanıtları üzerinde çalışmaktadır. Farmakogenomiğin amacı ise daha geniş ve terapötik amaçlar için kullanılabilecek yeni molekül modellerinin bulunmasında yardımcı olmaktadır. Farmakogenetik, farmakogenomiğin kapsamında yer alan bir bilim dalıdır. Kısacası, farmakogenetik olumsuz ilaç yanıtlarının sonucundan yola çıkarak yanıtların genetik nedenlerini araştırmaktadır; Farmakogenomik öncelikle genom ilişkili analizler ile toplumdaki genetik farklılıkları araştırmaktan başlamakta ve farklılıklara bağlı olarak ilaçlara olan değişik yanıtların (etkinlik ve toksisite) nedenlerini açıklamaya çalışmaktadır. Sonuç olarak, farmakogenetik, kişilerin genetik yapılarında varolan varyasyonlar nedeni ile ilaçlara verdikleri yanıtlardaki değişiklikleri incelemektedir. İlaç yanıtında birden fazla gen ürününün rol aldığına ortaya konması, incelemelerin gen boyutundan genom boyutuna kaymasına ve farmakogenetik yerine farmakogenomik teriminin kullanılmaya başlanmasına yol açmaktadır (Ortega ve Meyers, 2014; Everett, 2016).

İlaç farmakokinetiğinde, genetik faktörlere bağlı değişikliklerin ana nedeni enzimlerin sentez hızının ve/veya niteliğinin genetik polimorfizm göstermesidir:

- i. Enzim kodlayan gen eksik/eksik veya inaktif ise ilaç metabolize olmamaktadır
- ii. Enzimin genetik polimorfizmi sonucu substrata özgüllüğü değişmektedir

Enzim sentez hızına göre bireyler ilaç farmakokinetiğinde yavaş metabolizör, hızlı metabolizör, normal metabolizör, çok hızlı metabolizör olarak sınıflandırılmaktadır. (Zanger ve Schwab, 2013).

İlaçlar vücuda girdikten sonra biotransformasyon (detoksifikasyon) sistemi ile elimine edilmektedir. İlaç metabolizması, özellikle karaciğerde farmasötik substratların özel enzimler tarafından biyotransformasyon sürecini kapsamaktadır. İlaç metabolizması üç ayrı faza sınıflandırılmıştır. Faz 1, oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz modifikasyon reaksiyonlarını içermektedir. Bu fazda CYP P450 enzimleri (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4/5), alkol dehidrogenaz (ADH), aldehit dehidrogenaz (ALDH) ve dihidropirimidin dehidrogenaz

(DPYD) gibi enzimler görev almaktadır. Faz 2, daha çok transferaz enzimleri tarafından gerçekleştirilen konjugasyon reaksiyonunu içermektedir. Faz 2 metabolik enzimlerine örnek olarak UDP-glukuronosiltransferaz (UGT1A1), tiyopürin S-metiltransferaz (TMPT), sülfotranferaz (SULT1A1), glutatyon tranferaz (GSTM) ve N-asetiltransferaz-2 (NAT2) verilebilir. Faz 3, ilaçların ve metabolitlerinin taşıyıcıları tarafından alımı ve atılımıdır. Bu fazdaki ilaç transportörleri olan P-glikoprotein ve ATP bağlayıcı kaset (ABC) superailisi, alıcı ve effluks taşıyıcıları olarak işlev görür (Çizelge 2.1) (Xu vd., 2005).

Çizelge 2.1. İlaç biyotransformasyonda rol alan enzimler

Biyotransformasyon			
Metabolik enzimler	I. evre	II. evre	III. evre
	CYP450 enzimleri • CYP1A2 • CYP2B6 • CYP2C8 • CYP2C9 • CYP2C19 • CYP2D6 • CYP2E1 • CYP3A4/5	• UDP-glukuronosiltransferaz (UGT1A1) • tiyopürin S-metiltransferaz (TMPT) • sülfotranferaz (SULT1A1) • glutatyon tranferaz (GSTM) • N-asetiltransferaz-2 (NAT2)	• P-glikoprotein • ATP bağlı (ABC) superailisi

İlaç metabolizmasında bireyler arası değişen fenotiplere (ilaçları farklı biçimde metabolize edebilme yetisine) ilaç metabolizasyonunda görev alan ana enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfizmler yol açmaktadır. İlaç metabolize eden enzimlerin ve taşıyıcıların ifadesini ve fonksiyonunu etkileyen faktörler, ilacın metabolik süreci ve terapötik yanıt açısından önemlidir. Metabolizma tipleri bireylerin ilaçları metabolize edebilme yetenekleri (fenotipleri), enzimlerin aktivitesiyle belirlenebilmektedir. Polimorfik durumlara bağlı olarak enzimlerin aktivitesi azalabilmekte veya artabilmekte; bu azalma ve artmaya göre kişiler ilaçları yavaş, hızlı, orta hızlı veya çok (ultra) hızlı metabolize etmektedir (Xu vd., 2005; Guengerich, 2006; Jancovaa vd., 2010).

İlaç metabolizmasını kontrol eden enzim aktivitesi yalnızca genetik faktörlerin kontrolü altında değildir. Karaciğer, böbrek hastalıkları, bireyin metabolik profili ve bağırsak mikrobiyotası, cinsiyet, yaş, yaşam biçimi (beslenme, alkol, sigara, fiziksel aktivite) gibi etmenler ilaç tedavisine farklı yanıt verilmesine (fenotip) sebep olabilmektedir (Wilson, 2009; Everett, 2016). Aynı şekilde DNA dizisindeki değişikliklerden kaynaklanmayan, ama aynı zamanda kalıtsal olabilen bireyler arasında farklılık gösterip çevre faktörlerinden de etkilenebilen epigenetik faktörler de ilaç metabolizmasını önemli ölçüde etkileyebilmektedir (Majchrzak-Celińska ve Baer-Dubowska, 2017). Son yapılan çalışmalar ilaç metabolizmasında farklı yanıtların oluşmasına neden olan DNA yapısındaki değişikliğin yanısıra mikroRNA'nın (miRNA) CYP enzimlerinin ekspresyonunu değiştirip bireylerin ilaçları farklı biçimde metabolize etmesine yol açtığını göstermektedir (Rupaimoole vd., 2011; Yu vd., 2016; Chen vd. 2017; Zeng vd., 2017).

Farmakogenetik testleri “genotipleme” yani ilaç metabolizmasında değişik fenotiplere (ilaçları metabolize etme yetisi) yol açan metabolik enzimleri şifreleyen genlerindeki veya ilaç hedef molekülleri (reseptörler), iyon kanallarını şifreleyen genlerdeki mutasyonların ve polimorfizimlerin belirlenmesi esasına dayanmaktadır ve “herkese uyan tek beden yaklaşımı” ile “deneme-yanılma” yöntemine göre daha güvenilir bir servistir. Bu testler ufak bir kan veya tükürük örnekleri ile çalışılıp yaşam süreci içinde bir defaya mahsus olmak üzere yapılmaktadır. Güvenlik nedeniyle hastaların tedaviye başlamadan önce özellikle varfarin, klopidoğrel, irinotekan, tamoksifen, 5-FU, tiopurinler, antipsikotikler gibi bazı ilaçlar için farmakogenetik test yaptırmaları durumunda, yanlış ilaç kullanımı nedeni ile meydana gelebilecek tüm komplikasyonlar en az yüzde %80 oranında azaltılabilmektedir (Schroth vd., 2009; Epstein vd., 2010). İlaçların biyotransformasyonunda etkili olan enzimlerin transkripsiyonunu arttıran veya azaltan genetik varyasyonların tespiti ile hasta için en az yan etkili ve en etkin tedavi yöntemi seçilebilmektedir. Bu sayede, hasta için doğru tedavinin öngörülmesi en kısa sürede sağlanabilmektedir. Kanseri gibi erken teşhis ve tedavinin önemli olduğu durumlarda yapılacak bir genotipleme analizi tedavinin etkinliği açısından çok önemlidir (Wheeler vd., 2013).

Bir insanın genom dizisi analizi maliyeti, 2001 yılında 300.000.000 Amerikan doları iken 2011 yılında 5.000 ve 2014 yılında 1.000 Amerikan doları olmuştur. Dizi analizi masraflarının ilerleyen zamanlarda çok daha düşeceği öngörülmektedir

(Personalized Medicine Coalition, 2011). Bunun yanı sıra bireye özgü tedavide kullanılan ilaç, tedavi ve tanısal veri hakkında bilgi birikimi, son yıllarda bu konuya olan ilginin bilim insanlarının da ilgisini çekmesi ile hızlı bir şekilde artmıştır. Genetik testler, tedaviyi optimize etmek amaçlı piyasadaki ilaçların %10'u için uygulanabilmektedir (http-2). Hastaların %30-40'ının etkisiz ilaç kullandığı bilinmektedir. Ayrıca, yan etkiler ve gecikmiş müdahaleler tedavi masrafını, hastaların yaşam standardını ve ölümlülüğü arttırmaktadır. Terapötik yanıt gelişiminin olmaması en sık kanserde görülmektedir (Spear vd., 2001; Housman vd., 2014). Özellikle kanser tedavisinde kemoterapiye başlamadan önce genetik testlerin uygulanması önerilmektedir. Genetik testler hem sağlık hem de ekonomik açıdan kişi ve toplum açısından çok önemli kazançlar sağlayacak imkanlar sunmaktadır (Personalized Medicine Coalition, 2011).

2.3. Epigenetik-Farmakoepigenetik

Epigenetik, genler ve ürünleri arasındaki ilişkilerin nedensel özelliklerini ve ortaya çıkan fenotipi inceleyen bilim dalıdır. Doğrudan gen dizisindeki değişikliklerden kaynaklanmayan gen ifadesindeki farklılıkları incelemektedir. Bu farklılıklar epigenetik olarak kromatin organizasyonunda, DNA ve protein modifikasyonları gibi mekanizmalar aracılığı ile transkripsiyon aktivasyonuna veya gen susturulmasına neden olabilmektedir (Weinhold, 2006). Farmakogenetik, kişilerdeki genetik farklılığın ilaçlara karşı yanıtı üzerinde çalışırken, farmakoepigenetik ilaç metabolizmasında veya yan etkilerin oluşumunda etkili olan genlerin ifadesini etkileyen epigenetik değişimler ile yeni ilaç hedeflerinin keşfi ile ilgilenmektedir (Peedicayil, 2008). Genetik bileşenlerle birlikte epigenetik kavramı, bireye özgü tedavi yaklaşımının ve 'hassas tıp' kavramının önemli bir parçasını oluşturmaktadır (Hızel vd., 2017). Genotip yalnızca bireyler arasında değişebildiği gibi, epigenotipler de bireyler arasında, hücre tipinde ve de gelişme ve yaşlanma gibi durumlarda değişebilmektedir (Bjornsson vd., 2008). Epigenotip, farmakolojik ajanlar da dahil olmak üzere, çevresel koşullar/yasam biçimi gibi etkenlerdeki değişimlere duyarlıdır (Stamatoyannopoulos ve Dunham, 2008). İlaç metabolizasyon enzimlerini, ilaç taşıyıcılarını ve ilaç hedef molekülleri kodlayan genlerin regülasyonu epigenetik kontrol altında olabileceğinden, epigenetik değişiklikler ilaç yanıtını etkileyebilmektedir (Ingelman-Sundberg vd., 2007; Ingelman-Sundberg ve Cascorbi, 2016). Bu bağlamda farmakoepigenetik yeni bir disiplin olup

bireylerin ilaçlara karşı oluşturdıkları farklı yanıtların ve AİR'ların epigenetik sebeplerini araştırmaktadır (Baer-Dubowska vd., 2011; Kacevska vd, 2011; Gündüz vd., 2013).

2.3.1. Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik mekanizmalar, transkripsiyonel veya postranskripsiyonel olarak gerçekleşebilmektedir. DNA metilasyonu, posttranslasyonal histon modifikasyonları, miRNA'lar ve kromatin modelleme gibi farklı epigenetik düzenleme mekanizmaları mevcuttur (Hamm ve Costa, 2011).

2.3.1.1. DNA metilasyonu

İnsanlarda en yaygın çalışılmış epigenetik modifikasyon sitozin metilasyonudur. DNA metilasyonunun neredeyse tamamı CpG (Sitozin-fosfat-Guanin) dinükleotidlerinde oluşmaktadır. DNA metilasyonunda metil grubu, DNA'nın sitozin bazının pirimidin halkasının 5 numaralı karbonuna eklenmektedir. Metil vericisi olarak S-Adenozil Metiyonin (SAM) görev yapmaktadır (Moore vd., 2013).

Memeli genomlarında CpG dinükleotidleri nadirdir (~%1). CpG adaları, genomda 200 bazdan büyük, %50'den fazlası CG içeriğine sahip bölgelerdir. İnsanda gen promotorlarının %70 kadarı CpG adaları ile ilişkilidir ve genellikle kanserli hücrelere kıyasla normal hücrelerde metillenmemiştir (Issa, 2004; Saxonov vd., 2006; Baylin, 2015). %6 kadarı doku özgü olarak gelişim sırasında veya doku farklılaşmasında metillenmektedir. Genellikle CpG adalarının metillenmesi, gen susturulması ile ilgilidir (Mohn vd., 2008; Deaton ve Bird, 2011). DNA metilasyonu genomik ifadede, iki ebeveyn allelinden birinin monoallelif ifadesinin hipermetilasyonunda da önemli bir rol oynamaktadır. Benzer bir gen düzenlenmesi dişilerde X kromozomu inaktivasyonunda görülmektedir. DNA metilasyonunun X-kromozomu inaktivasyonu, genomik imleme, karsinogenezis, tekrarlayan ve sentromerik DNA dizilerinin susturulmasında başlıca rolü vardır (Shen vd., 2007; Weber vd., 2007; Fouse vd., 2008; Mohn vd., 2008; Meissner vd., 2008; Mikeska ve Craig 2014; Van Tongelen vd., 2017).

DNA metilasyonu, DNA metiltransferazlar tarafından gerçekleştirilen bir modifikasyondur. Eklenmiş olan metil grubu baz eşleşmesini etkilememekte fakat metil gruplarının dışarı doğru çıkıntı yapması DNA-protein etkileşimlerini

etkileyebilmektedir. Ökaryotlarda DNA metiltransferazların iki farklı tipi tanımlanmıştır. De nova metiltransferazlar -Dnmt3a ve Dnmt3b gibi- metillenmemiş DNA'yı substrat olarak kullanmaktadır. Bakım yapan metiltransferazlar, -Dnmt1 gibi- replikasyonla oluşan yarı metillenmiş DNA'yı metillemektedir (Jin ve Robertson, 2011). Bakım metilasyonu kalıp DNA iplikçığının varolan metilasyon paternini yeniye sentezlenmiş olana kopyalamaktadır. Bu nedenle DNA metilasyonu kalıtılabilmekte ve epigenetik bir işaret olarak nesiller boyunca mitotik ve mayotik hücre bölünmeleriyle transfer edilebilmektedir (Schübeler, 2015; Edwards vd., 2017).

DNA metilasyonu, gen ifadesini çeşitli mekanizmalarla inhibe edebilmektedir. Metillenmiş DNA, proteinlerin metil CpG bağlanma domainlerini (MBD) indüklemektedir. MBD ailesi üyeleri metillenmiş bölgelerde histon modifikasyonlarına ve kromatin modellemelerine olanak sağlamaktadır. DNA metilasyonu aynı zamanda DNA bağlanma proteinlerinin hedef bölgelerinde meydana gelerek proteinlerin bağlanmalarına engel olmakta ve transkripsiyonu doğrudan inhibe etmektedir (Phillips, 2008; Du vd., 2015; Schübeler, 2015). DNA metilasyonu başka epigenetik mekanizmalarla beraber çalışmaktadır. Tümörlerin epigenetik düzenlemesi sırasında gen transkripsiyonu ve gen anormal susturulması sürecinde DNA metilasyonu ile histon modifikasyonları arasında karşılıklı etkileşme olduğu ileri sürülmüştür (Vaissière vd., 2008)

2.3.1.2. Histon modifikasyonları

Çekirdekte DNA, histon proteinleri ile paketlenmiş kromatin denilen sıkı bir yapı içerisinde bulunmaktadır. Histonlardan H2A, H2B, H3 ve H4 “öz histonlar”, H1 ve H5 ise “linker (bağlayıcı) histonlar” olarak bilinmektedir. Histonlar enzimler tarafından transkripsiyon sonrası asetilasyon, metilasyon ve fosforilasyon gibi modifikasyonlara tabi tutulmaktadır. Bu transkripsiyon sonrası modifikasyonlar, histonların DNA ve çekirdek proteinleri ile ilişkisini değiştirmektedir (Bannister ve Kouzarides, 2011). “Histon Kodu” hipotezi ile kromatin fonksiyonunun epigenetik işaretleme sistemi kullanarak histon modifikasyon paternlerinin farklı kombinasyonlarında spesifik ve belirgin işlevsel özellikleri düzenlendiğini önerilmektedir (Kim vd., 2009).

İki tip histon modifikasyonu vardır. İlki, DNA'nın üzerinde histonun lokalizasyonunu etkileyen, DNA'nın histon proteinleri ile etkileşimine öncülük eden

kovalent olmayan modifikasyondur. İkincisi, kovalent modifikasyonlardır. Bunlar da özellikle H3 ve H4'de olduğu üzere N-terminal uçlardaki modifikasyonla histon pozisyonunu etkilemektedir (Rando, 2012; İzmirli, 2013). Kovalent olmayan modifikasyonlar; Kromozom içi ya da kromozomlar arası etkileşimler, histon takasları, kromatin tamiri, nonkoding RNA (siRNA, miRNA) ile etkileşim nonkovalent histon modifikasyonları olarak sayılabilmektedir. Kovalent modifikasyonların pek çok tipi vardır. Transkripsiyonu etkileyen başlıca tipleri; Asetilasyon, metilasyon ve fosforilasyondur. Bu modifikasyonlar ve onları tanıyan proteinler arası etkileşimler histon kodunu oluşturmaktadır. Modifiye olmuş farklı varyasyonlar genlerin transkripsiyonunun aktive edilmesini veya baskılamasını belirlemektedir. Ubikütinasyon, sumolasyon ve ribozilasyon da transkripsiyonda rol oynayan histon modifikasyonlarıdır (Kim vd., 2009; Bannister ve Kouzarides, 2011, Zhao ve Garcia, 2015).

2.3.1.2.1. *Histon asetilasyonu*

Histonlar, histon asetiltransferaz (HAT) veya histon deasetilaz (HDAC) tarafından asetile ve deasetile edilebilmektedir. Negatif yüklü asetil grubunun histonun pozitif yükünü nötralize ettiği ve böylece histonun DNA ile etkileşimini azalttığı tespit edilmiştir. Yaygın olarak histon asetilasyonu H3 ve H4'de meydana gelmektedir. HAT bir asetil grubunu asetil CoA'dan ϵ -N-asetil lizine dönüştürerek histon proteinleri üzerindeki korunmuş lizin aminoasitlerini asetile eden enzimdir (Bannister ve Kouzarides, 2011).

Transkripsiyonel ko-aktivatör proteinler gen transkripsiyonu kontrolünde moleküler anahtarlar olarak görev yapar ve tümü intrinsek HAT aktivitesine sahiptir. Histon modifikasyonlarına yol açan koaktivatörlerin toplanması bromodomainlere sahip (yani H3 ve H4 histonların N-terminal kuyruklarındaki asetile lizinleri tanıyan) başka proteinlerin modifikasyonları tanıyıp bağlanmasına yol açmaktadır. Histon kuyruklarının asetilasyonunun her aminoasit için olmadığı ve lizin ve arjininlere özgü olduğu bilinmektedir (Cluntun vd., 2015). H3K9 (Histon 3 lizin 9) gibi belirli aminoasitler birden fazla şekilde modifiye edilebilmektedir. H3K9 asetile edilebildiği gibi metilasyona da uğrayabilir fakat ikisi birden aynı anda olamamaktadır. H3K9'un asetilasyonu kromatinin açılması ve aktif transkripsiyon ile ilişkilendirilirken,

metilasyonu heterokromatin yapı ve transkripsiyon yokluğu ile ilişkilendirilmiştir (Morinière vd., 2009).

Asetilasyonun diğer histon modifikasyonları ile birlikteliği -ubikutinasyon varlığında olduğu gibi (ubikutinasyon+asetilasyon) - transkripsiyonun aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Ancak bu her zaman böyle olmayabilir; H4K12 (Histon 4 lizin 12) asetilasyonu, K23 (lizin 23)'ün asetilasyonu gibi durumlarda, kromodomainlerin transkripsiyonun baskılanmasını sağlayan metillenmiş lizinlere bağlanma kabiliyetini ve seçiciliğini etkileyebilmektedir (Dion vd., 2005). Ek olarak özel rezidülerin fosforilasyonu (fosforilasyon+asetilasyon) gibi başka modifikasyonlar sadece belirli rezidüler asetilasyona ve metilasyona uğramış ise gerçekleşebilmektedir. Modifiye olmuş rezidülerin farklı kombinasyonları histon kodunu oluşturmaktadır (Bannister ve Kouzarides, 2011; Zhang vd., 2015).

2.3.1.2.2. Histon metilasyonu

Histon metilasyonu, gen ifadesinin epigenetik düzenlenmesinde diğer önemli bir epigenetik modifikasyondur. Histon metiltransferaz enzimleri tarafından histon proteinlerinde bulunan aminoasitlere 1, 2 veya 3 tane metil grubu (trimetilasyon) eklenmektedir. Histon metilasyonu aynı zamanda dsDNA tamiri için de gereklidir (Ayrapetov vd., 2014). Histon metilasyonunun büyük bir kısmı H4 ve H3 moleküllerinin N-terminal kuyruklarında meydana gelirken H2A'nın N-terminal kuyruğunda da gözlenebilmektedir. Özel lizin ve arjinin rezidüleri metillenir ancak bazı rezidülerin modifikasyonları, metillenmeye karşı koruma sağlamaktadır. Histon metilasyonu promotora transkripsiyon faktörlerinin temini için gerekli olabilmektedir. Metillenmiş lizinler, heterokromatin proteini 1 (HP1)'e bağlanabilme özelliğine sahiptir, bu da işaretli bölgede heterokromatin formasyonuna neden olmaktadır. Bu nedenle histon metilasyonu, transkripsiyonun aktivasyonu, baskılanması ve güçlendirilmesi için gerekli olabilmektedir (Jones, 2012). Metilin fonksiyonu, modifiye edilmiş rezidüye özgü olduğundan histon metilasyonu "histon kod"un bir parçasıdır. (Bannister ve Kouzarides, 2011; Greer ve Shi, 2012).

2.3.1.2.3. Histon fosforilasyonu

Fosforilasyon, protein kinazlar (PK) ve protein fosfatazlar (PP) tarafından gerçekleştirilen bir reaksiyondur. Fosfatlar, histon deasetilazlara serin, treonin ve tirozin rezidülerinden bağlanmaktadır (Bannister ve Kouzarides, 2011). Histon fosforilasyonunun birincil bölgesi H3'ün N-terminalindeki Ser10 rezidüsüdür. Ser10'un fosforilasyonu transkripsiyon aktivitesi ile olduğu kadar mitoz sırasındaki kromatin yoğunluğu ile ilişkilendirilmiştir. Fosforillenmiş Ser10, H3 Lys14'ün asetilasyonunu indüklemekte ve Lys9'un metilasyonunu inhibe etmektedir (Sawicka ve Seiser, 2012). H2B'nin Ser33'ü transkripsiyon aktivasyonu ile ilişkili olarak fosforillenmektedir. Histon H2AX'in fosforilasyonu DNA çift zincir kırıklarının tamirinde önemli bir rol oynamaktadır. Fosforillenmiş H2AX tamir için gerekli olan mekanizmaya olanak sağlamaktadır (Foster ve Downs, 2005).

2.3.1.2.4. Histon ubikütinasyonu

Ubikutin (Ub) lizin rezidüsü ile bağlanabilen küçük bir proteindir. Histonlar en fazla ubikütinasyona uğrayan proteinler olduğundan, transkripsiyon, kromatin yapısının bakımı ve DNA tamiri gibi birçok süreçlerinde ubikütinasyonun önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Tek bir ubikütinasyon parçasının H2A histonuna veya H2B histonuna eklenmesi kıyaslandığında çok farklı çıktılarla sonuçlanmaktadır. Buna bağlı olarak, farklı histonlardan ubikütinin eklenmesi ve uzaklaştırılmasına aracılık eden ayrı enzimler bulunmaktadır. H2A ubikütinasyonu baskılayıcı bir işaret olarak kabul edilebilirken H2B ubikütinasyonunun hem transkripsiyon aktivasyonu hem de susturmasında rolü vardır (Weake ve Workman, 2008; Cao ve Yan, 2012).

2.3.1.3. RNA ile gen susturulması

İnsan genomunun yaklaşık %98'inin kodlamayan DNA'lardan oluştuğu ve bu bölgelerde proteinlerin kodlanmamasına rağmen işlevsel RNA'lar üretildiği bilinmektedir (Mattick, 2004; Rinn ve Chang, 2012). Bu kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar) gen düzenlemesinde önemli işlevleri olan mikroRNA'lar (miRNA), küçük nükleer RNA'lar (snRNA), Piwi etkileşimli RNA'lar (piRNA), küçük nükleolar RNA'lar (snoRNA), uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA)'dan oluşmaktadır (Palazzo ve Lee, 2015).

Post-transkripsiyonel gen susturulması, mRNA üzerinden protein sentezinin engellenmesiyle sağlanmaktadır. Bu mekanizmaya RNA interferansı (RNAi) denmektedir. RNAi’de gen susturulması, çift zincirli bir RNA molekülü (dsRNA) ile gerçekleşmektedir. dsRNA molekülü sitoplazmada veya çekirdek içerisinde Dicer ve Drosha enzimleriyle kesilerek gen susturma ajanları olan siRNA ve miRNA (small interfering RNA ve microRNA) dönüştürülmektedir. Bu siRNA’lar daha sonra, bir multiprotein-RNA nükleaz kompleksi olan, RNA-indükleyici baskılama kompleksine (RISC) bağlanmaktadır. RISC, siRNA’ları komplementer mRNA’yı bulmak için kullanmakta ve hedef mRNA’yı endonükleolitik olarak kesmektedir. Sonuç olarak özel mRNA’nın azalması sentezlenecek protein(ler)in azalmasına yol açmakta veya oluşan oligonükleotit, ilgilenilen gen bölgesini protein haline getirecek olan mRNA molekülünü parçalamakta ve gen susturulması sağlanmış olmaktadır (Bodur ve Demirpençe, 2010; Rinn ve Chang, 2012). miRNA’lar epigenetik regülasyonda da görev almaktadır. Memeli hücrelerinde çekirdekte RNA susturulması gen ifadesini DNA seviyesinde ve kromatin seviyesinde düzenlemektedir. Transkripsiyonel gen susturulması, hedef promotor bölgelere doğrudan epigenetik bir modifikasyon olacak şekilde gen promotorlarına tamamlayıcı sekanslara sahip siRNA’lar tarafından indüklenmektedir. İnsan hücre hatlarındaki promotorlara karşı gelecek şekilde tasarlanan ekzojen siRNA’lar, 200 bç içinde bilinen transkripsiyon başlama bölgelerine yakın olan promotor sekanslarını hedeflemektedir (Fabian ve Sonenberg, 2012).

İnsan hücrelerinde siRNA ilişkili transkripsiyonel gen susturmanın ilk bulgularında, gen susturmanın DNA metilasyonunun hedef promotor bölgelerinde meydana geldiği önerilmiştir. Ancak daha sonraki gözlemler transkripsiyonel susturmanın promotor DNA yokluğunda da olabildiğini göstermiştir (Grewal ve Elgin, 2007). Memeli hücrelerinde bir promotor bölgesini sekans hedefleyen siRNA’lar, kromatin seviyesinde gen ifadesinin baskılayan epigenetik modifikasyonlara öncülük etmektedir. H3K9me2 ve H3K27me3’ün siRNA hedefi olan promotor bölgeleri ile doğru orantılı olduğu tespit edilmiştir. Bu gibi bulgular, siRNA’ların memeli hücrelerinde H3K9me2 ve H3K27me3 için karakteristik epigenetik susturma işareti olan histon deasetilaz ve histon metiltransferazları çalıştırarak sekans komplementer promotorunda “histon kodu” düzenlediğini belirtmektedir (Grewal ve Elgin, 2007; Gaur ve Rossi, 2009).

2.3.1.4. ATP-bağımlı kromatin yapılandırma modeli

Nükleozomlar kaydırılarak histon değiştirme, histon çıkarma ve DNA dalgası yaratma ile kromatin yeniden modellenmektedir. Bu değişiklik için ATP'den gelen enerji nükleozomların yapısını değiştirmek üzere kullanılmaktadır ve böylece DNA ulaşılabilir hal almaktadır. Kromatin modellemesinde çalışan proteinler bağımsız çalışmayıp birbirleri ile etkileşime geçerek daha yüksek kromatin yapıları düzenleyecek büyük protein kompleksleri oluşturmaktadır. Bu kompleksler DNA hipermetilasyonu ve histon deasetilasyonu arasında bağlar kurarak transkripsiyonel baskılamayı oluşturmaktadır. Kromatin modelleme enzimleri ATP hidrolizinden aldığı enerjiyi nükleozomal DNA'nın superhelikal dönüşüne katılmak için kullanmaktadır. Bu tür nükleozomal DNA'da geçici konformasyonel değişimler kromatine çeşitli transkripsiyonu, DNA replikasyonunu, rekombinasyonu ve diğer biyolojik süreçleri kontrol eden kromatin proteinlerinin erişebilirliğini etkilemektedir (Li, 2002; Rinn ve Chang 2012; Güngör ve Ünal 2015).

2.3.2. İlaç metabolizmasında epigenetik regülasyon

Epigenetik ve epigenomik alanında yapılan çalışmaların farmakoloji ile ilişkilendirilip ilaç yanıtında değişikliklere sebep olacak epigenetik temelleri incelemesi, farmakoepigenetik alanının gelişmesine neden olmaktadır. İlaç metabolizmasında görev alan ana enzimlerin ve taşıyıcıların ifadesinde etkili olan epigenetik düzenlemeler, ilaç yanıtını etkileyebilmektedir. Aynı zamanda, ilaç veya başka ksentibiyotikler epigenetik modifikasyona sebep olabilmektedir. Farmakoepigenetik araştırmaların ilerlemesi ile epigenetik biyomarkerların ilaç tedavisinde yardımcı olabileceği öngörülmektedir (Kacevska vd., 2011; Ivanov vd., 2014).

DNA metilasyonu en bilinen epigenetik regülasyondur ve ilaç metabolize eden genlerde tanımlanan epigenetik düzenlemenin büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır. Bunun bir nedeni, kanserleşme ile DNA metilasyonu paterninin değişimidir. Tümör hücrelerinde DNA metilasyon paterninin değişimi ile ilaç metabolize eden enzimlerin ifadesindeki değişimlerin ilişkili olduğu öne sürülmüştür. İlaç metabolizmasından sorumlu genlerin kanser ilişkili DNA metilasyonu ile regüle edilebildiği, ilaç metabolizmasının üç fazında da gösterilmiştir (Kwon vd., 2006; Olsson vd., 2007; Yu vd., 2007; Kim vd., 2008; Sharma vd., 2010; Chen vd., 2013). İlaç metabolizmasında

yer alan genlerin DNA metilasyonu ile regülasyonunda, kanserleşme dışında durumlar da etkili olmaktadır. Parkinson hastalığında *CYP2E1* gen bölgesinde azalmış DNA metilasyonu, *CYP2E1*'in artan ifadesi ile ilişkilendirilmiştir (Kaut vd., 2012). Yaşam tarzı gibi faktörler de ilaç metabolize eden enzimler üzerinde etkili olabilmektedir. Örneğin sigara kullanımının akciğerde *CYP1A1* hipometilasyonuna neden olarak *CYP1A1* indüklediği gösterilmiştir (Anttila vd., 2003). Aynı zamanda DNA metilasyonu doku özgü gen ifadesi ile ilişkilidir. İlaç metabolize eden enzimlerin dokular arası farklı ifade ve metilasyon paternlerine sahip olduğu gösterilmiştir (Vieira vd., 1998; Oda vd. 2013).

İlaç metabolize eden genlerin epigenetik regülasyonundaki bir başka etkin mekanizma histon modifikasyonlarıdır. İnsan prostat kanseri hücrelerinde, *CYP24A1* promotorunun artan DNA metilasyonu ve artan histon H3K9me2, azalmış histon H3K9ac ve H3K4me2 modifikasyonları ile beraber *CYP24A1* gen ifadesinin baskılanmasında rol almaktadır (Luo vd., 2010). Aynı zamanda gelişimsel regülasyonda histon metilasyonlarının, ilaç metabolizasyonundan sorumlu gen ifadelerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Li vd. 2009).

Yukarıdaki epigenetik mekanizmalardan farklı olarak, miRNA'lar transkripsiyonel regülasyon yerine post-transkripsiyonel aşamada ilaç metabolize eden genlerin ifadesini etkiler. DNA metilasyonu ile benzer olarak kanserleşme sonucu miRNA'larda da değişim yaşanmaktadır. Kanserli dokularda miR-27b ve *CYP1B1* üzerinde yapılan bir araştırmada miR-27b ve *CYP1B1* proteininin ekspresyon seviyeleri arasında önemli bir ters orantı gösterilmiştir (Tsuchiya vd. 2006). miR-27b'nin birden fazla sitokromla (*CYP1B1*, *CYP3A4*) doğrudan ilişkili olduğu saptanmıştır (Pan vd., 2009; Li vd., 2014). Faz 2 enzimleri de miRNA'lar tarafından epigenetik regülasyona maruz kalmaktadır. UGT gen ailesinin miR-491-3p tarafından regüle edildiği gösterilmiştir (Dluzen vd. 2014).

İlaç metabolizmasında yer alan enzimler üzerindeki epigenetik regülasyonların anlaşılması ile gelecekte, farmakoepigenetik kavramının farmakoloji ve klinik tıpta daha etkin bir şekilde kullanılacağı öngörülmektedir. Aynı zamanda kanser tedavisinde anormal epigenetik değişikliklerin tersine çevrilmesi açısından potansiyel bir strateji olarak terapötik epigenetik gittikçe önem kazanmaktadır (Johansson ve Ingelman-Sundberg, 2011; Sissung vd., 2012; Gündüz vd., 2013; Peng ve Zhong, 2015).

2.4. Kanser Farmakogenetiği

Farmakogenetik ve farmakogenomik gelişmeler, ilaç yanıtlarındaki bireyler arası farklılıkların genetik temelini ortaya koymuştur. FDA, elliden fazla genle ilişkili 120'nin üzerinde ilaç için farmakogenetik değerlendirme önermiştir ([http-3](http://3)). Bu ilaçların çoğu kanser, kardiyovasküler, enfeksiyöz ve psikiyatrik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Weng vd., 2013).

Farmakogenetikte antikanser ilaçlarının en aktif ve güncel şekilde çalışılan alanlardan biri olduğu bilinmektedir. Bunun bir nedeni dar terapötik endekslerinden dolayı diğer tedavilere kıyasla kemoterapötiklerin genellikle daha ciddi ve bazen hayatı tehdit eden toksisiteler göstermesidir. Bu nedenle, bu toksisiteler için risk altındaki hastaları önceden tanımlamak önemli ve gereklidir. Ayrıca antikanser tedavisine özgü, tedavi etkinliğini arttırmak ve toksisiteyi azaltmak için birbiriyle ilişkili ancak farklı genomik sistemler üzerinde çalışılması gerekmektedir (Weng vd., 2013; Hertz ve Rae, 2015).

Kanser tedavisi toksisitenin yüksek olabileceği bir tedavi süreci olduğu için AİR'leri en aza indirmek üzere stratejiler belirlenmektedir. Bireye özgü kanser tedavisinde, somatik mutasyonlar, yaş, cinsiyet ve ailedeki kanser hikayeleri ile tedavide hangi yolların test edileceği konularına odaklanılmaktadır (Wheeler vd., 2013). Onkoloji ve hematoloji alanında farmakogenomikler, hastalık riskinin belirlenmesinde, sağaltımda kullanılacak ajanların seçiminde ve ilaç doz uygulamalarında kullanılmaktadır (Baskın ve Çalıbaşı, 2011). Klinik onkolojide kullanılan genetik temelli farmakolojik testler (genotiplendirme) iki grupta incelenebilir:

- Kemoterapötiklerin [İrinotekan, 5-florourasil (5-FU), tiopürin vb.] uygulanmasına bağlı toksisitelerin belirlenmesinde kullanılan testler [UGT1A1, dihidropirimidin dehidrogenaz (DPD), tiopürin metiltransferaz (TPMT) vb.]
- Moleküler terapötiklere yanıtı belirleyen genetik testler (imatinib-*ABL*, rituksimab-*FCGR3A*, gefitinib-*EGFR*, cetuximab - *EGFR/KRAS* gen mutasyonları, trastuzumab-HER2 ifadesi, vb.) (Sayitoğlu, 2007).

Kanser tedavisinde kullanılan geleneksel kemoterapi rejimlerinde hastaya verilecek ilaç miktarı vücut yüzey alanın göre hesaplanmaktadır. Bu uygulama bir çok kanser türünde kemoterapi rejiminin yanıtı kalması, ya da beklenenden daha fazla toksisite gözlenmesi ve bazen bu yüzden tedavinin kesilmesini gerektirebilmektedir. Tümör genetik yapısını, eş zamanlı ilaç kullanımını ve de bireyin ilaç metabolizmasını (ilaç metabolizasyon enzimleri, ilaç transportörleri, ilaç hedef molekülleri) etkileyen genetik polimorfizmlerin tespiti ile bireysel ilaç dozaj farklılıklarının belirlenmesi ve yan etkilerin azaltılması sağlanabilmektedir (Bertholee vd., 2017).

Kanser tedavisi, ilaç etkinliğini arttırmak ve tedaviye karşı olumsuz yanıtları azaltmak için giderek daha fazla bireyselleşmektedir. Kemoterapi tedavisi öncesinde, tedavi verilecek hastalara uygulanacak farmakogenetik tarama, hastaların önerilen ilaçlara karşı sadece duyarlı veya dirençli olmasını tanımlamamakta, aynı zamanda hastaların tedaviye karşı şiddetli toksisite eğimli olup olmadığını öngörebilmektedir. *DPYD*, *TPMT* ve *UGT*deki polimorfizmlerin, sırasıyla 5-FU, merkaptopurin ve irinotekan farmakokinetiğini ciddi şekilde etkileyebileceğini bilinmektedir (Patel ve Papachristos, 2015; Toffoli vd., 2015; Bhavsar vd., 2017). Kanser hastalarının tedavisinde bu genlerde fonksiyonel polimorfizm taşıyan hastalarda bu üç ilacın kullanımında ciddi toksisite olduğu göz önüne alındığında, bu hastaların tedavinin başlamasından önce farmakogenetik taranması tercih edilebilir. Bununla birlikte, çoğu kemoterapötik ilaç için, gen mutasyonlarının ve farmakokinetiklerin ilişkisi kesin bir belirginlik taşımamaktadır. Bu durum diyet, kombine ilaç, sağlık durumu ve böbrek ve karaciğer fonksiyonu gibi genetik olmayan faktörlerin genetik faktörlere kıyasla tedavi üzerindeki etkisinin daha fazla olmasından kaynaklı olabilir. Bu ajanlar bireye özgü tedavide, terapötik ilaç izleme gibi fenotip temelli bir yaklaşımla ele alınabilir (Ai vd., 2017; Bertholee vd., 2017).

2.4.1.Kolon kanseri

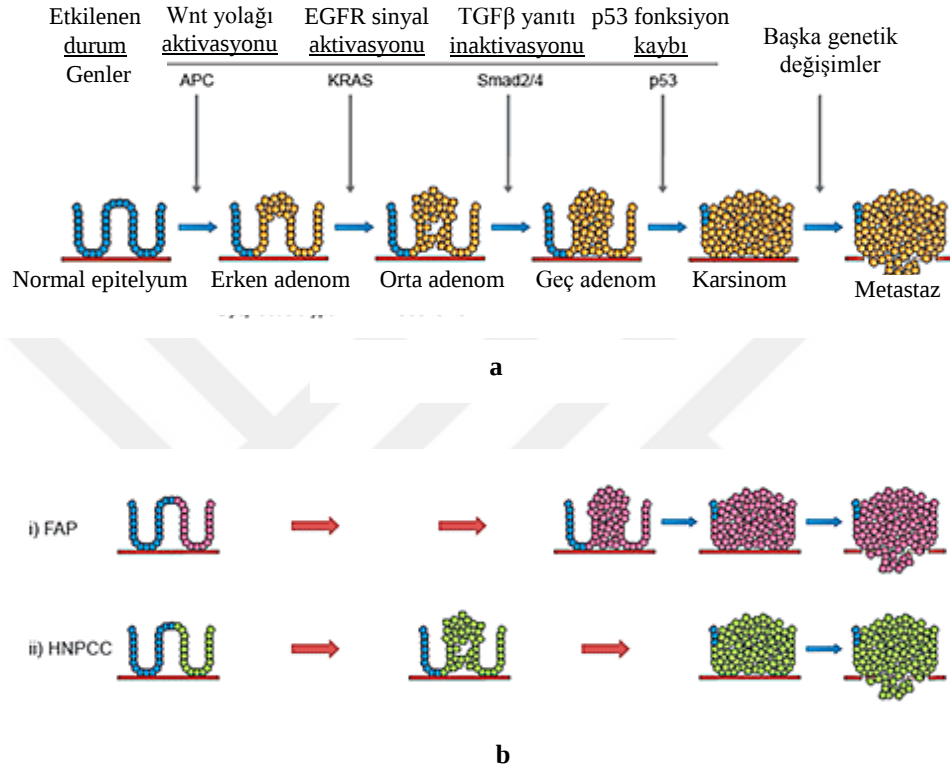
Kolon kanseri, sindirim sisteminin son parçası olan kalın bağırsakta oluşan bir kanserdir. Çoğu vakada adenomatöz polip olarak adlandırılan küçük, kanserli olmayan (iyi huylu) hücre yığınları olarak başlayan süreç, bu poliplerin kanser hücrelerine dönüşmesi ile sonlanır. Genetik nedenlere bağlı olmakla beraber birçok kolorektal kanser, yaş ve beslenme, obezite, sigara ve hareketsizlik gibi yaşam tarzı faktörleri ile

de ilişkilendirilmektedir. Tanı konan hastaların %90'ı 50 yaşın üzerindedir. (Liang vd., 2009; Fedirco vd., 2011; Lansdorp-Vogelaar vd., 2012; Ma vd., 2013; Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2014; Colorectal Cancer Prevention, 2017). Türkiye'de kolon kanseri tanısı konan hastaların ortalama yaşı 62'dir. Kolon kanserinin erkeklerde görülme sıklığı, kadınlara oranla daha fazladır. Akciğer ve meme kanserinden sonra % 7,7 ile üçüncü sıklıkta görülen kanser türüdür (T.C Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı, 2003).

Kolon kanseri, kolon epitelyum hücrelerinin tümör baskılayıcı genlerinde ve protoonkogenlerinde oluşan bir seri genetik mutasyonların birikimi sonucu oluşmaktadır. Kolon kanseri, kromozomal kararsızlık (CIN), CpG adası metilasyon fenotipi (CIMP) ve mikrosatellit kararsızlığı (MSI) mekanizmalarının biri veya üçünün kombinasyonu ile oluşabilmektedir. Fearon ve Vogelstein'nin 1990 yılında oluşturdukları modele göre kolon kanserinin moleküler mekanizması, kolon kanseri CIN yolağında, *adenomatöz polipozis koli (APC)*'de mutasyon birikimlerinin onkogen *KRAS*'ta mutasyona yol açması ve tümör baskılayıcı gen *TP53*'ün inaktivasyonuna neden olması ile gerçekleşmektedir. CIMP yolağında ise, *MGMT* ve *MLH1* başta olmak üzere çeşitli tümör baskılayıcı genlerin promotorlarında hipermetilasyon gerçekleşmektedir. Bu hipermetilasyonlar genellikle *BRAF* mutasyonu ve mikrosatellit kararsızlığı ile ilişkilendirilmiştir (Weisenberger vd., 2006; Kanwal ve Ghias, 2016). Kolon kanseri MSI yolağı aracılığı ile kısa tekrar dizilerdeki genetik değişimlerin inaktivasyonu sonucu oluşmaktadır. Bu durum kolon kanserinde DNA onarım genlerinde gerçekleşmektedir (East vd., 2008). Mikrosatellit kararsızlık, DNA replikasyonu sırasında oluşan hataları düzeltmekten sorumlu DNA tamir genlerindeki değişimlerin engellenmesi ile oluşmaktadır (Kunkel ve Erie, 2005).

Kolon kanser vakalarının yaklaşık %75-80'i, aile geçmişi veya genetik yatkınlığın olmadığı sporadik türdedir. Sporadik türde kolon kanserinin %84 kadarı, kromozom sayısında ve yapısında değişiklikler ile gerçekleşen CIN ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 2.3-a). Sporadik türde kolon kanserinin %13-16'sı ise hipermutasyon ve MSI ile gerçekleşmektedir. Sporadik türde kolon kanserinde erken adenom gelişiminden sorumlu APC mutasyonu, WNT sinyal yolağını aktive etmektedir. Bunu takiben oluşan *KRAS* mutasyonu, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) sinyal aktivasyonuna neden olarak orta adenom evresine geçişten sorumludur. Bu evrede meydana gelen *Smad2* ve *Smad4* mutasyonları TGF β yanıtının inaktivasyonuna sebep olmakta ve

hastalığı geç adenom evresine taşımaktadır. İleri evrede meydana gelen tümör baskılayıcı gen olan p53'ün mutasyonu sonucu karsinom gelişmektedir. Karsinom evresindeki çeşitli genetik değişimler metastaza yol açmaktadır (Davies vd., 2005; Müller vd., 2016).



Şekil 2.3. Normal epitelyumdan kolon kanserinin gelişimi; a. Sporadik kolon kanseri, b. Ailesel kolon kanseri, Normal progresyon, Hızlı progresyon (Davies, R. J., vd., 2005)

Kolorektal kanserlerin yaklaşık %5 ila 10'u kalıtsal olarak gerçekleşmektedir (Şekil 2.3-b). En sık görülen kalıtsal kolon kanseri vakaları Lynch sendromu olarak adlandırılan kalıtsal nonpolipozit kolorektal kanser (HNPCC) ve ailesel adenomatöz polipozis (FAP)'dir (Jackson-Thompson vd., 2006; Haggard ve Boushey, 2009). Kolon kanseri hastalarının %2 ila 6'sı HNPCC'ye sahiptir. HNPCC'den sorumlu olarak DNA onarım yolunda yer alan *MLH1* ve *MSH2* genleri tanımlanmıştır. Bu mutasyonlara sahip kişilerin kolorektal kansere yakalanma riski %70 ila 80 daha fazladır. Hastalık tanısı bu bireylere genelde 40'lı yaşların ortasında konmaktadır (Papadopoulos vd., 1994; World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research, 2007; Jeter vd., 2006; Al-Sukhni vd., 2008). FAP ise kolon kanser vakalarının %1'den daha azı için

geçerli bir durumdur. Yalnızca birkaç adenom gelişimi görülen HNPCC'li bireylerden farklı olarak, FAP'lı bireylerde yüzlerce polip gelişimi gözlenmekte ve bu adenomların bir veya daha çoğu birey 20 yaşına gelene kadar malin dönüşüm geçirmektedirler. FAP'a, gastrointestinal sistemde kolon veya rektumda yer alan epitelyum hücrelerinin WNT sinyal yolağındaki sinyalizasyon aktivitesini arttıran mutasyonlar neden olmaktadır. Bu mutasyonlar kalıtılabilen veya oluşabilmektedir. Kolon kanserinde en sık mutasyona uğrayan gen, APC proteinini üreten tümör baskılayıcı gen APC'dir. APC proteini, β -katenin proteininin birikimini engellemektedir. APC olmadan, β -katenin yüksek seviyelerde birikerek ve proto-onkojenlerin transkripsiyonunu aktive etmektedir. Bu durum kanserleşmeye neden olmaktadır. APC bağımlı polipozis, otozomal dominant bir şekilde kalıtsaldır. APC bağımlı polipozis tanısı konmuş bireylerin yaklaşık %75-80'i bu mutasyonu taşıyan bir ebeveyne sahiptir. Aile üyesinde hastalığa neden olan bu mutasyon tespit edilirse prenatal test ve preimplantasyon genetik teşhisi mümkün olabilmektedir (Wilmink, 1997; Davies vd., 2005; World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research, 2007; Lynch vd., 2008).

WNT sinyal yolağındaki mutasyonların dışında p53 proteinini üreten TP53 genindeki mutasyonlar da kolon kanseri oluşumundan sorumlu tutulmaktadır (Ionov vd., 1993; Markowitz vd., 2009). p53 proteini DNA hasarı, DNA tamiri ve apoptozda önemli rolleri olan bir proteindir. p53 mutasyonlarının tümörlerin patolojik sürecinde adenoma-karsinom dönüşümlerinde etkili bir role sahip olduğu bilinmektedir. Kolon kanserinde, adenomlarda görülmezken karsinomların %50-70'inde görülmektedir. Bu durum p53 mutasyonlarının kolon kanserinin ileri evrelerinde gerçekleştiğini göstermektedir. p53 mutasyonları, apoptotik mekanizmanın çöküşü ve hücre çoğalmasının kontrolsüzlüğü ile genomik kararsızlık ve malin tümör dönüşümüne yol açmaktadır. p53, kanserde en sık mutasyon geçiren gendir (Kandoth vd. 2013). Kolon kanserinde p53 mutasyonları, proksimal kolon tümörlerinin %34'ünde ve distal kolon tümörlerinin %45'inde bulunmaktadır. Bu mutasyonların büyük bir çoğunluğu, p53 proteininin DNA bağlanma bölgesinde yer alan aminoasitleri etkiler. Bunun sonucunda p53 proteini DNA'ya spesifik olarak bağlanamaz ve aktivitesini yitirir (Ryan vd, 2001; Russo vd., 2005; Zandi vd., 2011; López vd., 2012). Farklı p53 mutasyonları, invazif derinlik, metastatik bölge ve hatta hastalığın seyri gibi kolon kanserinin biyolojik davranışı hakkında bilgi vermektedir. p53 mutasyonuna sahip kolon kanseri

hastalarında daha fazla kemoterapi direnci ve bu mutasyona sahip olmayanlara göre daha kötü prognoz süreci gözlenmektedir (Iacopetta vd., 2003, Li vd., 2015).

Kolon kanserinden sorumlu önemli başka bir mutasyon, EGFR yolağındaki sinyal kaskadında erken aşamalarda rol alan *KRAS* onkogeninin mutasyonudur. Mutant *KRAS* geni (p21) EGFR yolağını sürekli uyarır ve hücre çoğalmasına yol açmaktadır. Bu mutasyon APC mutasyonundan sonra olması durumunda kolon tümör oluşumuna yol açmaktadır (Tan ve Du, 2012).

Smad2 veya Smad4 mutasyonları da kolon kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Bir büyüme faktörü olan TGF β , epitelyal hücrelerde anti-proliferatif bir faktör olarak görev yapmaktadır. Proliferasyonu durdurmak, farklılaşmaya neden olmak ve SMAD sinyal yolağı aracılığıyla apoptozu indüklemek için hücre döngüsünü durdurabilmektedir. SMAD proteinleri, hücre yüzeyindeki TGF β ligandlarından çekirdeğe sinyal göndererek apoptozu tetikleyen genlerin transkripsiyonunu aktive etmektedir. TGF β sinyal yolunun bileşenleri olan Smad2 ve/veya Smad4 mutasyona uğradığında, hücre proliferasyonu kontrol altına alınamamakta ve kanserli tümörlerin gelişimine neden olabilmektedir (Bellam ve Pasche, 2010).

2.4.2. Kolon kanseri evreleri ve tedavisi

Kolon kanseri tedavisi, hastalığın evresi ile ilişkilidir. Cerrahi operasyon, kolon kanserinde primer tedavi yöntemidir. Kolon kanserlerinin yarısından fazlasına (yaklaşık %65) cerrahi operasyon yapılabilir. Hastaların %10'unda lokal yayılma sebebiyle cerrahi operasyon uygulanamamaktadır. Vakaların %20'sinde de teşhis sırasında uzak metastaz saptanmaktadır. Hastaların küçük bir bölümünde ileri derecede yaşlı ve hasta olduklarından dolayı cerrahi tedavi uygulanamamaktadır (Labianca vd., 2013; Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program, 2013). Kolon kanserinde uygulanan tedavi yöntemleri cerrahi müdahale, radyoterapi, kemoterapi ve/veya hedefe yönelik tedavidir. Hedefe yönelik tedavide kullanılan ilaçlar, tümörü hedeflemek adına kemoterapiden farklı bir mekanizma ile çalışmaktadır. Hedefe yönelik tedavi, hastalığın seyrine özel bir şekilde kanserleşmeyi engelleyecek yaklaşımlarla gerçekleştirilmektedir. Hedefe yönelik tedavi büyüme sinyalinin inaktivasyonu, bağışıklık sistemi güçlendirici, kanser hücrelerinin beslenmesini bloke edecek hedefler vb. gibi uygulamalarla kemoterapi etkinliğini arttırmaktadır. İlerlemiş

kolon kanserinde hedefe yönelik tedavide kullanılan ilaçlar; Bevasizumab (Altuzan®), Panitumumab (Vectibix®) ve Setuksimab (Erbix®)'dir. Panitumumab ve Setuksimab, EGFR'yi hedeflemekte ve kanser gelişimini yavaşlatmaktadır. Bevasizumab ise anjiyogenezi uyaran vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'i bloke ederek kanser hücrelerinin beslenmesini inhibe etmektedir. Bu tarz hedefe yönelik tedaviler, sıklıkla ileri kolon kanseri tedavisinde olmak üzere kemoterapi kombinasyonlarında uygulanmaktadır (Giantonio vd., 2007; Bastos vd., 2010; Gustavsson vd., 2015).

Kolon kanserinde Evre 0, kolonun iç duvarının ötesinde gelişim göstermediği için, tedavide cerrahi operasyon yeterlidir. Çoğu vakada bu evrede polip çıkarılmaktadır (Habr-Gama vd., 2004). Evre I'de kolon kanseri, kolon duvarının iç katmanlarına doğru büyümekte ama kolon duvarının (veya yakındaki lenf düğümlerinin) dışına yayılmamaktadır. Evre I, bir polipden gelişen kanserleri içermektedir. Kolonoskopi sırasında polip tamamen çıkarıldıysa, başka bir tedavi uygulamasına ihtiyaç olmayabilmektedir. Polip tamamen çıkarılamadığında veya birçok polip çıkartılması gerekiyorsa birden daha fazla ameliyat yapılması gerekebilmektedir. I. evre kolon kanserinde mortalite oldukça düşüktür. Hastaların %90'ı, sadece cerrahi müdahale ile tedavi edilmektedir (Labianca vd., 2013).

Evre II kolon kanseri, kalın bağırsağın duvarı ve yakındaki dokuya kadar çoğalmış ancak lenf düğümlerine henüz yayılmamıştır. Bu aşamada cerrahi tedavi olarak kanseri ihtiva eden kolon doku, yakındaki lenf düğümleri ile birlikte çıkarılabilmektedir (kısmi kolektomi). II. evre kolon kanserinde cerrahi müdahale sonrasında hastaların %25-40'ında karsinom tekrarlamaktadır. Bu nedenle cerrahi müdahale sonrası kanserin tekrar etme riskine karşı kemoterapi (adjuvan kemoterapi) uygulanabilmektedir. Evre II'de adjuvan kemoterapi tedavisi bazı riskli durumlarda verilmektedir. Mikroskop altında yüksek derecede kanserleşme görüldüyse, kanser kan veya lenf düğümlerine sıçramışsa, kanserleşme kolonu tıkamışsa vb. bulguların bulunduğu durumlarda adjuvan kemoterapi uygulanabilmektedir. II. evre kolon kanserinin tedavi yöntemleri cerrahi müdahale, radyoterapi, kemoterapi ve/veya hedefe yönelik tedavidir. Evre II'de kemoterapi tedavisi genellikle 5-FU ve lökovorin, oksaliptatin veya kapesitabin (veya kombinasyonları) şeklinde verilmektedir (Bastos vd., 2010).

Evre III kolon kanseri, yakınlardaki lenf bezlerine yayılmakla beraber vücudun diğer bölümlerine henüz yayılmamıştır. Bu evrede uygulanan standart tedavi, kanserli

kolon kesiti ve yanında lenf nodları (kısmi kolektomi) çıkaran cerrahi operasyon, ve ardından adjuvan kemoterapi uygulamasıdır. Kemoterapi için FOLFOX (5-FU, lökovorin ve oksaliptatin) veya CapeOx (kapesitabin ve oksaliptatin) kombinasyonları en sık kullanılandır. Bu evrede cerrahi operasyonu kaldıramayacak hastalar için doğrudan radyoterapi ve/veya kemoterapi uygulanabilmektedir (Gill vd., 2004; Bastos vd., 2010).

Evre IV kolon kanseri, kolon dışında organlara ve dokulara yayılmıştır. Kolon kanseri çoğunlukla ilk karaciğere yayılmaktadır. Ancak akciğerler, beyin veya uzak lenf düğümleri gibi diğer bölgelere de yayılabilmektedir. Cerrahi operasyonların bu aşamada kanseri tedavi etme olasılığı düşüktür. Bununla birlikte, karaciğer veya akciğerlerde kanser bölgelerin yayılımı (metastaz) çok az ve kolon kanseriyle beraber operasyon ile alınabiliyorsa, cerrahi müdahale uygulanabilmektedir. Kemoterapi bu evredeki hastalarda, ameliyat öncesi ve/veya sonrası verilmektedir. Metastazlar çok büyük veya çok fazla olduğu için cerrahi operasyonla çıkarılamıyorlarsa, tümörleri küçültmek için kemoterapi verilebilmektedir (neoadjuvan kemoterapi). Eğer tümörler küçülürse cerrahi operasyon uygulanabilmektedir. Kemoterapi cerrahi operasyon sonrasında da uygulanabilmektedir. Başka organlardaki tümörler ablasyon veya embolizasyon yolu ile ortadan kaldırılabilir. Eğer kanser cerrahi müdahale ile tedavi edilemeyecek kadar çok yayılmışsa, tedavi olarak kemoterapi uygulanmaktadır. Yine de kanserleşme kolonu tıkamışsa cerrahi operasyona ihtiyaç duyulabilmektedir. Evre IV kolon kanseri hastalarının kemoterapi kombinasyonları hastalığın geçmişi ve sağlık durumları gözetilerek uygulanmaktadır (Verhoe vd., 2011; Lee vd., 2016). Bu evrede en çok kullanılan kemoterapi kombinasyonları FOLFOX (leucovorin, 5-FU ve oksaliptatin), FOLFIRI (leucovorin, 5-FU, ve irinotekan), CapeOX: (capecitabine (Xeloda) ve oksaliptatin), FOLFOXIRI (leucovorin, 5-FU, oksaliptatin ve irinotekan)'dir. Bu kemoterapi kombinasyonlarından biri etkili olmazsa veya direnç gelişirse bir diğer kombinasyon uygulanmaktadır. İrinotekanın diyare ve nötropeni gibi AİR'leri nedeniyle immün sistemi düşük hastalarda kullanımları zor olmakla birlikte özellikle 5-FU ile kombine tedavide olumlu sonuçlar alınmaktadır (Palaghia vd., 2014; Cremolini vd., 2015).

Kolon kanseri aynı hastada tekrardan ortaya çıkabilmektedir. Kanserinin tekrar ortaya çıkması kolonda lokal olarak (başlangıç tümörünün bölgesi yakınında) veya uzak organlarda olabilmektedir. Eğer tekrarlanma lokal olarak gerçekleşmişse cerrahi

müdahale ve/veya kemoterapi uygulanmaktadır. Tekrarlayan kanser, başka organlarda ortaya çıkmışsa (çoğunlukla karaciğer), cerrahi müdahale tercih edilebilmektedir. Bazı durumlarda kemoterapi tümörleri küçültmek için uygulandıktan sonra cerrahi müdahale gerçekleştirilmektedir. Ablasyon veya embolizasyon teknikleri bazı karaciğer tümörlerini tedavi etmek için uygulanmaktadır. Kanser cerrahi operasyon ile tedavi edilemeyecek kadar fazla yayılmışsa, kemoterapi uygulanmaktadır. Olası kemoterapi kombinasyonları evre IV kolon kanseri için uygulananlarla aynıdır (Hellinger ve Santiago, 2006; Vogel vd., 2017). Kolon kanseri tedavisinde oluşan yan etkilerden ötürü, hastaların hepsi etkin bir tedavi süreci geçirememektedirler. Hastanın immün sistemine bağlı olarak kemoterapi uygulanabilmektedir. Oluşacak AİR riskinden ötürü ileri yaştaki hastalara etkin kemoterapi tedavisi verilememektedir. Yapılan bireye özgü değerlendirmelerle hastalara optimal tedavi uygulanmaya çalışılmaktadır (Sanoff vd., 2012; McCleary vd., 2013; American Cancer Society, 2017).

2.4.3. Kolon kanseri tedavisinde irinotekan

Kanser hastalarının tedavisinde kullanılan irinotekan ilacı için hastaların %36'sında toksik etkinin görülmesi bu ilacın kemoterapide kullanımı açısından zorluk çıkarmaktadır (Fuchs vd., 2003). İrinotekan, Wall ve arkadaşları tarafından 1966 yılında *Camptotheca acuminata* bitkisinden izole edilmiş anti-tümör aktivite gösteren kamptotesin alkaloitinin bir analogudur (Wall vd., 1966) (Görsel 2.1). Kamptotesin, topoizomeraaz I ve DNA kompleksine bağlanarak üçlü bir yapı oluşturur ve bu yapıyı stabilize ederek DNA ligasyonunun gerçekleşmesini engeller ve DNA hasarı ile apoptoza yol açar (Redinbo vd., 1998). 1980'lerde yapılan çalışmalar kamptotesinin suda çözülebilir analogları üzerinde yoğunlaşmıştır. İrinotekan kamptotesin maddesinin antitümör aktivite gösteren suda çözülebilir bir analogudur ve FDA tarafından 1996 yılında tümör yanıtının faz II verilerine dayanarak hayati tehlikesi bulunan metastatik kolon kanseri hastalarının tedavisinde klinik kullanım için kabul edilmiştir (Kunimoto vd., 1987; http-4). İrinotekan 1998 yılında Avrupa'da faz III çalışmalarının tamamlanması ile FDA tarafından tamamen onaylanmıştır (FDA Review Letter, 1998). Daha sonra irinotekan 5-FU kombinasyonu ile kolorektal kanserinin birinci basamak tedavisinde, başka kemoterapötikler ile kombinasyonu ikinci basamak tedavilerinde ve aynı zamanda başka kanser tedavilerinde de yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Camptosar NY: Pfizer Incorporated 2005; Douillard vd., 2000).

Kolon kanseri tedavisinde irinotekan, monoterapi ve kombine terapilerde farklı zaman aralıkları ve konsantrasyonlarında uygulanmaktadır. Monoterapide haftalık 90 dakikanın üzerinde 125 mg/m^2 veya üç haftada bir 30-90 dk arası 350 mg/m^2 dozda 4 enjeksiyonluk iki farklı rejimle verilmektedir. Kombinasyon terapide ise yine iki farklı rejim uygulanabilmektedir. Birincisi 6 haftalık (1, 15, 29 ve 43. günler) 5-FU ve lökovorin ile beraber 30-90 dk arası 180 mg/m^2 dozda 4 enjeksiyonluk rejimdir. İkincisi ise 6 haftalık (1, 8, 15. ve 22. günler) 5-FU ve lökovorin ile beraber 30-90 dk arası 125 mg/m^2 dozda 4 enjeksiyonluk rejimdir (http-6).

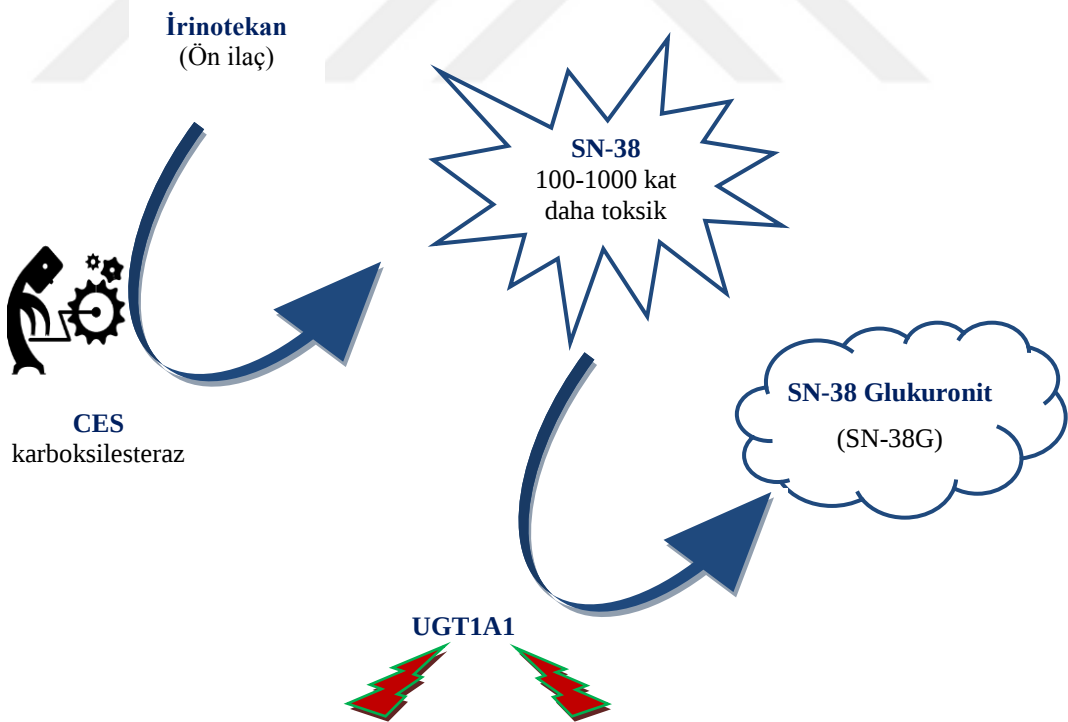


Görsel 2.1. *Camptotheca acuminata* (Mutluluk ağacı), a) *Camptotheca acuminata* ağacı, b) *Camptotheca acuminata* çiçeği, c) *Camptotheca acuminata* meyvesi (http-5)

2.4.4. İrinotekan aktivitesi

İrinotekan, kanser tedavisinde kullanılan bir topoizomerez 1 inhibitörüdür. Metaboliti olan SN-38, ön ilaç olan irinotekandan yaklaşık olarak 100-1000 kat daha sitotoksiktir. İrinotekan antitümör aktivitesinden dolayı klinik olarak kanser hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılır. İrinotekanın konjugasyon yolu ile metabolize edilmesinde etkin olan enzim üridin difosfat glukuronoziltransferaz (UGT1A1)'dır. İrinotekan tedavisinde başlıca görülen toksisite diyare ve nötropenidir. İrinotekan tedavisindeki toksik durumlar, irinotekanı metabolize eden enzim UGT1A1'in aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir (Mathijssen vd 2001).

İrinotekanın biyotransformasyonu karboksilesterazlar tarafından sitotoksik olan SN-38 aktif metabolite metabolize olması ile gerçekleştirilir. İrinotekanın metaboliti SN-38'in eliminasyon yolağı ise SN-38'in aktif formunun UDP-glukuronosiltransferaz enzimleri tarafından inaktif SN-38 glukuronide konjugasyonu ile gerçekleşir (Şekil 2.4.) (Iyer vd., 1998).



Şekil 2.4. İrinotekan metabolizması

2.5. İrinotekanı Metabolize eden enzim: UGT1A1

Glukuronosiltransferaz (UGT) super ailesinin irinotekan dahil olmak üzere pek çok ilacın biyotransformasyonunda önemli rolü vardır. 18 fonksiyonel UGT enziminin 9 tanesini kodlayan UGT gen kompleksi, insanda 2. kromozomun uzun kolunda 37. pozisyonunda (2q37) 234,668,918'den 234,681,944. baz çiftine kadar olan alanda yer alır. UGT gen kompleksinin içinde dokuz adet farklı ekzon 1 ve dört ortak ekzon olmak üzere 5 ekzon bulunur. Her UGT'nin 1.ekzonu kendi promotoruna ve güçlendiriciye (enhancer) sahiptir (Canu vd., 2014).

UGT ailesindeki genler, glukuronik asidi üridin difosfat glukuronik asit molekülünden limitli bir şekilde endojenik substratlara ve bilirubin gibi ksenobiyotiklere dönüşümünü gerçekleştiren glukuronidasyondan sorumlu enzimleri kodlamaktadır. Bu substratların glukuronidasyonu, substratları daha suda çözülebilir hale getirir ve eliminasyon ile vücuttan atımını kolaylaştırmaktadır. UGT1A glukuronidasyon aktivitesi en çok karaciğerde meydana gelir ama UGT enzimleri bağırsaklarda, böbreklerde, beyinde, midede, akciğerde ve deride de bulunabilmektedir (King vd., 2000). Glukuronidasyon aktivitesinde UGT1A ailesindeki asıl etkili olan enzim polimorfik olan UGT1A1'dir ama diğerlerinin de (UGT1A 6, 7, 9, 10) aktivitesi vardır. Ayrıca UGT1A1, bilirubini glukuronide eden tek enzimdir. Bu nedenle azalmış UGT1A1 glukuronidasyon enzim aktivitesi Gilbert Sendromu ve Crigler-Najjar sendromuna neden olabilmektedir (Nagar ve Blanchard 2006).

2.5.1. UGT1A1 Enzim Seviyesini Etkileyen Faktörler

UGT1A1 polimorfik bir enzimdir. UGT1A1 varyasyonlarının enzim aktivitesi üzerinde etkisi olabileceği önerilmiştir. Aynı zamanda UGT1A1 transkripsiyonu üzerinde epigenetik regülasyonların etkisi güncel bir araştırma konusudur.

2.5.1.1. UGT1A1 polimorfizmi

UGT1A1 enzim aktivitesini UGT1A1 polimorfizmlerinin etkilediği gösterilmiştir. *UGT1A1* geninin 5' promotor bölgesinde TA tekrarlarına bağlı olarak enzim aktivitesinde artış veya azalış olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Iyer vd., 1998).

UGT1A1 geni için pek çok varyant tanımlanmıştır ama bunlardan bazıları UGT enzim aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Bunlardan başlıcaları; UGT1A1 gen

bölgesinin 1. ekzonunda yer alan promotor bölgesinde 7 adet TA tekrarı içeren ((TA)7TAA) UGT1A1*28, 5 adet TA tekrarı içeren ((TA)5TAA) UGT1A1*36, 8 adet TA tekrarı içeren ((TA)8TAA) UGT1A1*37 ve baskın tip olan 6 adet TA tekrarı içeren ((TA)6TAA) UGT1A1*1 olarak gösterilen varyantlardır (Beutler vd., 1998). Bunlara ilaveten; UGT1A1 geninde meydana gelen 211G>A (rs4148323) tek nükleotid polimorfizminin (TNP) neden olduğu UGT1A1*6 ve 686C>A tek nükleotid polimorfizminin (TNP) neden olduğu UGT1A1*27 olarak gösterilen varyantların da UGT enzim aktivitesini etkilediği düşünülmektedir. Buna göre; UGT1A1*1 normal enzim aktivitesi gösterirken, UGT1A1*36 yüksek, UGT1A1*28, UGT1A1*37, UGT1A1*27 ve UGT1A1*6 düşük UGT aktivitesi göstermektedir (Iyer vd., 2002). Genotipe bağlı olarak azalmış UGT aktivitesi olan kişilerde Gilbert Sendromu ve tip II Crigler-Najjar sendromu gözlenebilmektedir (Kadakol vd., 2000). Doğal tip olan UGT1A1*1'in irinotekan tedavisinde advers ilaç reaksiyon gösterme riskinin diğer varyantlara göre daha düşük olduğu, UGT1A1*28 ve UGT1A1*37'nin ise glukuronidasyon aktivitesini düşürerek toksik etkilere yol açan yüksek SN-38 konsantrasyonuna neden olduğu önerilmiştir (Ando vd., 2000; Massacesi vd 2006; Pangilinan vd., 2008).

İrinotekan genellikle tolere edilebilir ama UGT1A1 genotiplerine göre dozaj ayarlaması yapılması gerekebilmektedir. İrinotekan tedavisi alan hastalarda toksik etkilerin gözlenmesi %36, genel olarak görülen $\frac{3}{4}$ derece toksisitenin oranı ise %60'ın üzerindedir (Fuchs vd., 2003). Kemoterapide oluşan bu toksik etkinin azaltılması için 2005 yılında ilaç üreticisi Camposar, FDA'nın önerisi üzerine irinotekan için UGT1A1*28 için homozigot hastalarda doz ayarlaması yapılmasının dikkate alınması ve bu hastaların belirlenmesi için genetik testin uygulanmasında hekimlere yardımcı olunması gerektiğini ilacın prospektüsünde belirtmiştir (<http://www.camposar.com>).

Tedavide kullanılan irinotekan tolere edilemediğinde, advers ilaç reaksiyonları (yaygın olarak diyare ve nötrojeni) gözlemlenmektedir. Bu tolerans, başlıca UGT1A1'in sorumlu olduğu UGT glukuronidasyon aktivitesine bağlı olarak irinotekan aktif metaboliti olan SN-38'in kleransı ile ilişkilidir. Doğrudan enterik hasara yol açan SN-38'in glukuronidasyonu toksik etkilerin inhibisyonunu sağlamaktadır (Mathijssen vd., 2001). Iyer ve arkadaşlarının 2002 yılında irinotekan tedavisi alan 20 hasta ile yaptıkları çalışmada toksik etkiler ile genotipler arasında bir ilişki bulunmamıştır. Buna ilaveten *28/*28 genotipli hastaların nötrofil sayıları diğer genotipli hastalara (*1/*1 ve

*1/*28) göre anlamlı derece düşük olduğu görülmüştür. Innocenti ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2004) ise irinotekan tedavisi gören 66 hastadan %46,2'sinin *1/*1, %38,5'inin *1/*28, %9,2'sinin *28/*28 genotipinde olduğu tanımlanmıştır. Hastaların genelinde 4. derece nötropeni %9,5 seviyesinde gözlenmiştir. Genotiplere göre oranlandığında; *28/*28 polimorfizmine sahip olan hastaların %50'sinde, *1/*28 polimorfizmine sahip olan hastaların %12,5'inde nötropeni görülürken *1/*1 polimorfizmine sahip olan hastalarda bu oran %0 olarak tespit edilmiştir. Her iki çalışmada da genetik polimorfizmin mutlak nötrofil sayısı (ANC-absolute neutrophil count) üzerinde etkisi olduğunu göstermektedir. Toffoli ve arkadaşları 2006 yılında irinotekan, 5-FU ve leucovorin alan 250 hasta ile yaptıkları çalışmada hastaların *1/*1 ve *1/*28 genotipe sahip olanlarının oranını %45,6 bulurken *28/*28 genotipe sahip olanların oranını %8.8 bulmuşlardır ve sadece ilk kemoterapi kurunda *28/*28 homozigot genotipli hastaların *1/*1 homozigot genotipli hastalara göre, $\frac{3}{4}$ derece hematolojik toksisite geliştirebilme oranının sekiz kat daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Yine *28/*28 homozigot genotipli hastaların *1/*1 homozigot genotipli hastalara göre tedaviye yanıtının daha yüksek olduğunu önermişlerdir.

UGT1A1 *28 alelinin frekansı etnik gruplar arasında farklılıklar göstermektedir; en düşük Asya popülasyonunda (%16) en sık ise Afrika (%43) ve Avrupa (%36) popülasyonlarında saptanmıştır, Birleşmiş Devletler'de UGT1A1 *28/*28 homozigot genotipli hastaların oranı %10 bulunmuştur (Beutler vd., 1998; Innocenti vd., 2003). Türkiye'de UGT1A1 *28 homozigot genotip frekansı farklı çalışmalarda sadece yenidoğanlarda çalışılmış olup frekansları %0,6, %7,5, %9 ve %10 ve %5,8 bulunmuştur (Ulgenalp vd., 2003, Babaoglu vd., 2006, Muslu vd., 2007, Kilic vd., 2007, Ergin vd., 2010).

2.5.1.2. UGT1A1'in epigenetik regülasyonu

UGT1A1 aktivitesi üzerinde yapılan son çalışmalarda UGT1A1 geninin promotor bölgesine yakın yukarı akış yönünde yer alan CpG bölgelerinin ve 1.5 kb yukarı akış yönünde yer alan CpG adasının DNA sitozin metilasyon yolu ile epigenetik düzenlenmesi incelenmektedir. Gagnon ve arkadaşları 2006 yılında yayınladıkları çalışmada, UGT1A1 promotorunun başlama kodonunun en az 3.3 kb yukarı akış yönünü kapsayacağını göz önünde bulundurarak en az 5 kb'lık alanı metilasyon

profilleri için çalışmıştır. Altı kolon kanseri hücre hattı bu bölgeler için incelenmiş ve yüksek ile düşük UGT1A1 ifadelerinde promotörü içeren birinci ekzondaki 5 CpG bölgelerinin (+21→+233 / -330→-4 / -513→-432 / -704→-642 / -1157→-892) metilasyon oranları karşılaştırıldığında anlamlı bulunmuştur. Özellikle +21→+233, -330→-4 ve 704→-642 bölgelerinin anlamlılığın yüksek olduğu görülmüş bu durum da transkripsiyon faktörlerinin bu bölgeye bağlanıyor olabilmelerinden ötürü metilasyonun UGT1A1 transkripsiyonunu engellediği önerilmiştir. Promotorun 1.5 kb yukarı akış yönünde yer alan CpG adasının (-5000→-4885) kolon kanseri hücre hatlarının hepsinde hipermetilasyona uğradığı görülmüştür. Bu bağlamda CpG adasının metilasyonunun kanserleşme ile ilişkisi olduğu önerilmiştir. Aynı zamanda HCT116 hücre hattında yapılan demetilasyon çalışması sonrasında SN-38'in inaktivasyonunda artış gözlemlenmiştir. Bu da metilasyonun UGT enzimlerinin ifadesinde rol aldığı ve irinotekan tedavisinde yanıtı etkileyebileceği hipotezini desteklemektedir. Bélanger ve arkadaşları 2010 yılında kolon kanseri hücrelerinde CpG dinükleotidlerinin metilasyonunun UGT1A1 proksimal promotorunda transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engelleyip engellemediği üzerine bir çalışma yapmıştır. UGT1A1 transkripsiyonu için sekans spesifik Hepatosit Nüklear Faktör 1- alfa (HNF1-alfa) ve USF1/2 (upstream stimulatory factor 1/2) transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasının gerekli olduğu ve UGT1A1 proksimal promotorunda -99. pozisyonda bulunan CpG dinükleotidinin metilasyonunun bu bağlanmaları engelleyerek UGT1A1 ifadesi üzerinde negatif etkisi olduğunu önermişlerdir. Yaşar ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı çalışmada ise Tufts Üniversitesi, Moleküler Psikoloji ve Farmakoloji Bölümü insan karaciğer bankasından alınan 46 sağlıklı karaciğer örnekleri üzerinde UGT1A1 aktivitesi ve ifadesinin metilasyon ile ilişkisi ve genotip ile çevresel koşulların etkisi çalışılmıştır. UGT1A1 protein seviyesinin ve aktivitesinin *28/*28 genotip grubunda (%13), *1/*1 (%52.2) ve *1/*28 (%34.8) gruplarına göre anlamlı derecede daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada Yaşar ve arkadaşları 5 CpG dinükleotidinin (-69 / -100 / -3319 / -3341 / -3436) ve CpG adasının (-4834→-5309) metilasyonunu incelemiştir. Diğer çalışmaların aksine Yaşar ve arkadaşları çalışmalarında, USF transkripsiyon faktörünün bağlandığı öngörülen -100 bç'deki sitozinin metilasyonunun UGT1A1 ifadesini arttırdığı sonucunu çıkarmıştır. Ama diğer çalışmalar kolon hücrelerinde yapılmışken bu çalışmanın karaciğer hücrelerinde yapılmış olduğunu unutmamak gerekir. Bu durum sonucunda UGT1A1'in ifadesinin düzenlenmesinde

transkripsiyon faktörlerinin hem represör hem de enhancer olarak görev yapabileceği hipotezi öne sürülmüştür. Ayrıca CpG adasının bütün karaciğer dokularında hipermetilasyona uğradığı ve CpG adasının metilasyonunun UGT1A1 ifadesi üzerinde etkisi olmayabileceğini önerilmiştir. Aynı çalışmada Yaşar ve arkadaşları cinsiyet, yaş, etnik grup, sigara kullanımı ve alkol kullanımı ile UGT1A1 genotipi ilişkisi arasındaki ilintiyi de incelemiş, anlamlı bir ilişki bulmamışlardır. Araştırmanın sonucu olarak, UGT1A1 protein ifadesinde *28/*28 genotipinin azaltıcı, -100 bç'deki sitozinin metilasyonunun arttırıcı, alkol kullanımının arttırıcı etki yaptığını tespit etmişlerdir.

Farklı dokularda farklı DNA metilasyon oranları olması olasıdır. Oda ve arkadaşlarının 2013 yılında UGT1A1 için metilasyonunun doku özgünlüğü için yaptıkları bir araştırmada karaciğer ve böbrekteki UGT1A1 promotor bölgesindeki -113'den +111'e kadar olan bölge CpG dinükleotidinin metilasyonu için karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Sonuç olarak 84 CpG bölgesinden karaciğer için %37, böbrek için %83 metilasyon oranı tespit edilmiştir. Böylece böbreklerde UGT1A1'in DNA metilasyonu ile epigenetik şekilde baskılandığını önermişlerdir.

2.6. Araştırma Hipotezi

Başarılı bir tedavi, yan etkilerin en aza indirgenerek terapötik etkinliğin artırılması ile olmaktadır. Metastazik kolon kanserinde yaygın olarak kullanılan irinotekan ilacı, etkili bir antitümör ajanı olmasına rağmen toksisitesi yüksek olduğu için tedavide sıkıntılar ortaya çıkarabilmektedir. Bu durum irinotekanı metabolize eden enzim UGT1A1 ifadesinde doğrudan ya da dolaylı etkili olabilecek mekanizmalar ile ilişkilendirilebilir. Bu mekanizmalar, bireye özgü genetik polimorfizmler, epigenetik düzenlemeler, demografik etkenler, kombine terapiler vb. olabilmektedir. İlaç tedavisinde bireye özgü tedavi yaklaşımı, bütün bu etkenlerin beraber değerlendirilmesini, hastalık odaklı değil hastaya yönelik farmakogenetik ve farmakoepigenetik analizlerin klinik uygulamasını gerektirmektedir. Bu çalışmada, Türkiye'de irinotekan tedavisi alan hastalarda UGT1A1 ifadesini etkileyebilecek genetik ve epigenetik faktörleri araştırılarak, irinotekan ilaç uygulamasının klinik çıktıları hakkında öngörülse veri sahibi olunması hedeflenmiştir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışma öncesi, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan (TİTCK) Gözlemsel İlaç Çalışmaları etik kurul onayı (14 Mayıs 2015, sayı 26247029-514-05-01) ve Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Tıp Fakültesi etik kurul onayı (18 Mart 2015, sayı 80558721/126) alınmıştır (EK-1a, EK-1b).

Kan örnekleri, İstanbul, Bakırköy, Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin Onkoloji Birimi'nde Dr. Meral Günaldı tarafından sağlanmıştır. Aynı zamanda hasta bilgileri, hasta doktoru olan Dr. Meral Günaldı tarafından değerlendirilmiş ve takip edilmiştir. Aynı hastalara ait kolon doku (parafine gömülü kesitler halinde biyopsi veya rezeksiyon) örnekleri ise, patoloji biriminde, Dr. Damlanur Sakız tarafından değerlendirilmiş ve tarafımıza sağlanmıştır.

3.1.1. Örnekler ve veri toplanması

Hastaların hepsinden kan örnekleri anket verileri toplanmıştır. Operasyon geçirenlerden doku örnekleri temin edilebilmiştir.

3.1.1.1. Kan örnekleri

Mayıs 2017 itibari ile hastalardan kan örneği toplanması sonlandırılmıştır. Kan örnekleri hastane personeli tarafından 2 ml kadar mor kapaklı EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit)'lı tüplere alınmış ve + 4 °C'de saklanmıştır. Toplam kan örneği sayısı 48'dir.

3.1.1.2. Doku örnekleri

48 hastanın 17'sine ait 60 adet formalinle sabitlenmiş ve parafine gömülü (FFPE) biyopsi veya rezeksiyon kolon doku örnekleri toplanmıştır. FFPE örneklerine ait tümör oranları Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde Uzman Patolog Dr. Damlanur Sakız tarafından ışık mikroskobu altında değerlendirilmiştir. Hastalara ait FFPE örneklerinin tümör oranları ve arşiv numaraları (kesit no) Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Hastalara ait FFPE örnekleri

Hasta No	Kesit sayısı	Kesit No	Tümör oranı
3	1	21258/14 (biyopsi)	% 80
		6498/14/8	% 70
4	3	6498/14/9	% 50
		6498/14/12	% 70
11	10 (5X2)	46963	Tümör oranı bilinmiyor
		45740/T1	% 90
12	4	45740/T2	% 90
		45740/T3	% 100
		45740/T4	% 90
13	1	44610/14 (kons 6295-5/14)	% 95
		48753/14 (kons 222276/14) T1	% 90
14	3	48753/14 (kons 222276/14) T2	% 80
		48753/14 (kons 222276/14) T3	% 40
15	1	22109 (kons 11043623) (biyopsi)	% 100
		40541/14/1	% 80 + % 20 polip
16	3	40541/14/3	% 70 + % 30 polip
		40541/14/4	% 40 + % 60 polip
19	2	36037/2	0 (normal)
		36037/6	% 90
24	1	13148/15	% 80
27	1	9101/14 (kons 34/07/13)	% 100
		28811/1	Oransız
32	6 (3X2)	28811/7	% 30 + % 70 musinoz adenokarsinom)
		28811/9	% 50
34	6 (3X2)	41504/8 (rezeksiyon)	% 50
		41504/11(rezeksiyon)	% 60
		31049 (biyopsi)	% 100
35	6 (3X2)	29809/2 (biyopsi)	displazi
		29809/3 (biyopsi)	0 (normal)
		29809/4 (biyopsi)	displazi
37	4 (2X2)	22987/6	% 40
		22987/11	% 40
38	4 (2X2)	38973/5	% 10
		38973/8	% 15
43	4 (2X2)	42012/12 (rezeksiyon)	% 30
		42012/26	% 60

48 hasta ile yapılan çalışmada hepsinin FFPE örneklerinin bulunmaması nedeni ile 8 hastaya ait 11 kesit ile UGT1A1 DNA metilasyonu sonuçları ve kolon UGT1A1 protein seviyesi değerlendirilmiştir. Bunların arasından bir hastanın (Hasta no 3) sadece UGT1A1 DNA metilasyonu için analizi yapılabilmektedir. Hangi kesitler ile çalışılacağı seçilirken tümör yüzdeleri, hasta genotipleri ve örnek miktarı gibi özellikler göz önünde bulundurulmuştur. Aynı örneğin hem protein hem DNA analizinin yapılabilmesi için - örnek yeterli ise- kesitin yarısı ksilen yıkaması sonrasında kazınarak ayrı tüplere alınmıştır. Kesitin yarısı ile DNA bisülfid sekans analizleri için DNA izolasyonu yapılırken, diğer yarısı ile Western blot için protein izolasyonu yapılmıştır. Kesitlerden 13'ünün DNA izolasyonu gerçekleştirilirken 11 kesitin protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunların 7'si aynı kesitlere aittir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. DNA izolasyonu ve protein izolasyonu yapılan FFPE örnekleri ve örneklerin tümör oranları

Hasta No	Tümör yüzdesi (% T)	FFPE Kesit No	İzolasyon	
			DNA	Protein
3	% 80 T	21258/15	+	
4	% 50 T	6498/9	+	+
4	% 70 T	6498/12	+	
12	% 90 T	T1+T2		+
12	% 100 T	T3	+	
12	% 90 T	T4	+	
32	% 50 T	28811/9	+	+
34	% 50 T	41504/8	+	+
34	% 100 T	31049	+	+
35	displazi	29809/2	+	
35	% 0 T – normal	29809/3	+	+
35	displazi	29809/4		+
37	% 40 T	22987/6	+	+
38	% 10 T	38973/5		+
38	% 15 T	38973/8	+	
43	% 30 T	42012/12		+
43	% 60 T	42012/26	+	+
Toplam (9 hasta)	17 kesit		13 DNA, 11 Protein izolasyonu	

3.1.1.3. Anket verileri

Hasta ve hastalık bilgileri hasta doktoru tarafından sağlanmıştır (Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4). AİR en az görüldenden (1) en fazla görülene (3) göre derecelendirilmiştir.

Çizelge 3.3. Hasta bilgileri

Hasta No	Cinsiyet		Menapoz	Yaşadığı bölge	Doğum yeri/yılı	Ailede kolon kanseri	Kolon kanseri evresi
	♀	♂					
1		X		Balıkesir	Bayburt/1950	-	4A
2		X		İstanbul	Tokat/1953	-	4B
3		X		İstanbul	Malatya/1961	-	4
4		X		İstanbul	Bulgaristan/1957	-	4
5	X		+	İstanbul	Bulgaristan/1955	-	4
6	X		-	İstanbul	İstanbul /1975	-	4B
7	X		+	İstanbul	Ardahan/1962	-	4A
8		X		İstanbul	İstanbul /1969	-	4A
9	X		+	Düzce	Düzce/1961	-	4A
10	X			İstanbul		-	4
11	X			İstanbul			4B
12	X		+	İstanbul	Ordu/1958		4
13	X		+	İstanbul		-	4A
14		X		İstanbul	Silivri	-	4B
15		X		İstanbul			4B
16		X		İstanbul	İstanbul		4B
17	X		-	İstanbul	Bitlis/1982		4
18		X		İstanbul		-	4A
19		X		İstanbul	İstanbul/1959	-	4
20		X		İstanbul	Bulgaristan/Razgard/1957		4
21		X		İstanbul	İstanbul/1938	-	4
22		X		İstanbul	İstanbul/1948	-	4
23	X		+	İstanbul	Artvin/1955		4
24		X		İstanbul	Sivas/1949	-	4
25		X		İstanbul	Elazığ/1976	-	4
26		X		İstanbul	Giresun/1955	-	4
27		X					4
28		X					4
29	X		-	İstanbul	Trabzon/1973	-	4
30	X		+	İstanbul	Samsun/1956	+	4
31		X		İstanbul	İstanbul/1942		4
32	X		+	İstanbul	İstanbul/1951	+	4
33		X		Sinop	Sinop/1958	-	4
34	X		+	İstanbul	Kastamonu/1959	+	4
35		X		İstanbul	Ankara/1956	-	4
36		X					4
37		X		İstanbul	Saraybosna/ 1950	-	4
38	X		-	Sinop	Sinop/1973	-	4
39	X		+				4

Çizelge 3.3. (Devam) Hasta bilgileri

40		X		İstanbul	Kastamonu /1955	+	4
41		X		İstanbul	Antalya/1960	-	4
42		X		Gümüşhane	Gümüşhane/1953	-	4
43		X					4
44	X		+	İstanbul			4
45	X		+	İstanbul	Denizli/1941	-	4
46	X		+	İstanbul	Zenica-Bosna/1951	-	4
47	X		+	İstanbul		-	4
48		X		İstanbul		-	4

Çizelge 3.4. Hasta tedavi ve AİR bilgileri (5 FU; 5-Flurourasil, N; nötröpeni, T; Trombositopeni, EX; hayatını kaybetme)

Hasta No	Kullanılan ilaçlar		AİR			
	KK	Diğer	Dişare	Mukozit	Miyelosupresyon	Diğer
1	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	-	2			
2	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	-	2		N-1 T-3	EX
3	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	-	2	3	N-4	EX
4	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	-	1	3		Cilt toksisitesi-1
5	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	- Ayra tablet (Hipertan.)				Tümör progresyonu
6	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	-			N-1	Tümör progresyonu
7	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	-	1			
8	- İrinotekan - Bevacizumab	- Karbamazepin türevi (antiepileptik)	1			
9	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Panitumumab	-			N-2	

Çizelge 3.4. (Devam) Hasta tedavi ve AİR bilgileri (5 FU; 5-Flurourasil, N; nötröpeni, T; Trombositopeni, EX; hayatını kaybetme)

10	- İrinotekan - Bevacizumab	- Antiepileptik				
11	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	-				
12	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Panitumumab	-		2		
13	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Panitumumab	- antihipertansiyon	3	2		
14	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Bevacizumab	-				
15	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	-	2			
16	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Bevacizumab	-	1			
17	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan	-			N-3	Anemi- EX
18	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	-				
19	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	- Metformin - Diamicron - Antidepresan		1		Cilt toksisite-2
20	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Oksaliplatin	-				unstabil
21	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Bevacizumab	-	1	2	N-3	
22	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan	-	2	2		
23	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Bevacizumab	-			N-1	progresyon
24	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Bevacizumab	-		3		

Çizelge 3.4. (Devam) Hasta tedavi ve AİR bilgileri (5 FU; 5-Flurourasil, N; nötröpeni, T; Trombositopeni, EX; hayatını kaybetme)

25	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	-		1		Cilt toksisitesi-1
26	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	- Valproik asit-depakin - (antiepileptik)				Cilt toksisitesi-1
27	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	-				
28	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	-			N-4	EX
29	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	-		3	N-3	
30	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Oksaliplatin	-		3		
31	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	-	1			
32	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Bevacizumab	- diabetes mellitus				Tümör progresyonu
33	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan	- Keppra - Cipralex - Pankreoflat - Kardexa	3		N-1	
34	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	-	2			
35	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	- diabetes mellitus - Hipertansiyon			N-4	EX
36	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan	-				
37	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Bevacizumab	-	3			
38	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	-				

Çizelge 3.4.(Devam) Hasta tedavi ve AİR bilgileri (5 FU; 5-Flurourasil, N; nötröpeni, T; Trombositopeni, EX; hayatını kaybetme)

39	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	-				
40	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab/ - Bevacizumab	- Metformin - (2X1000gr)				Tümör progresyonu
41	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Bevacizumab	-				
42	- İrinotekan - cisplatin	-			N-1	
43	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Cetuximab	-				
44	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Bevacizumab	-	2			
45	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan	-				
46	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Panitumumab	- Hipertansiyon	1		N-2	
47	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Bevacizumab	-				
48	- 5 FU - Leucovorin - İrinotekan - Bevacizumab	-			T-1	

Hastalara ait yaşam alışkanlıklarını içeren anket Çizelge 3.5.'te verilmiştir. Buna göre sigara içme kategorileri içmeme, pasif içici, günde 10'dan az ve günde 10'dan çok olmak üzere 4 kategoride değerlendirilmiştir. Alkol kullanımı hiç kullanmama, ayda birkaç kez ve her gün tüketime göre sınıflandırılmıştır. Kafein tüketimi ise hiç tüketmemek ile haftada en az 4 gün, her gün ve günde 1'den fazla tüketime göre analiz edilmiştir. Beş hastaya (HN27, HN28, HN36, HN39, HN44) ait yaşam alışkanlıkları verilerine ulaşılamamıştır.

Çizelge 3.5. Hasta anket verileri

Hasta No	Sigara				Alkol			Et				Sebze				Kafein			
	Hiç yok	Pasif İçici	Günde 10'dan az	Günde 10'dan fazla	Hiç kullanmıyor	Ayda birkaç kez	Her gün (en az 2 bardak)	Hiç tüketmiyor	Ayda en az 3 gün	Haftada en az 3 gün	Her gün	Hiç tüketmiyor	Ayda en az 3 gün	Haftada en az 3 gün	Her gün	Hiç tüketmiyor	Haftada en az 4 gün	Her gün	Günde 1'den fazla
1			X		X				X				X				X		
2	X				X				X					X			X		
3	X						X			X				X				X	
4				X			X			X				X				X	
5				X		X			X						X				X
6	X				X					X					X		X		
7	X				X				X					X				X	
8				X	X					X				X				X	
9	X				X					X				X			X		
10	X				X					X				X			X		
11	X				X					X				X			X		
12	X				X					X					X			X	
13	X				X					X					X		X		
14			X		X					X				X		X			
15	X				X				X					X			X		
16	X				X					X				X			X		
17	X				X					X				X		X			
18				X	X					X					X			X	
19	X				X					X					X			X	
20	X					X				X				X			X		
21	X				X					X				X			X		
22	X				X						X				X	X			
23	X				X					X				X		X			
24			X			X				X				X				X	
25	X				X					X				X			X		
26	X				X				X					X				X	
29	X				X					X				X				X	
30	X				X				X				X				X		
31	X					X				X					X		X		
32	X				X					X					X				X
33	X					X				X					X			X	
34	X				X					X				X			X		
35	X				X					X				X				X	
37			X		X					X					X			X	
38	X				X					X					X			X	
40				X	X					X					X			X	
41				X	X					X					X			X	
42				X	X						X				X				X
43	X				X					X				X				X	
45	X				X			X					X			X			
46	X				X					X					X			X	
47	X				X					X					X			X	
48	X				X					X					X			X	

3.1.2. Kullanılan kitler ve cihazlar

Genotiplendirme analizleri İstanbul, Acıbadem Üniversitesi Merkez Laboratuvar'da gerçekleştirilirken, bisülfıt DNA dizi analizi ve protein analizleri için yapılan işlemler Eskişehir, Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Kitlerde bulunmayan ksilen (Merck, ürün kodu 108297), etanol (Sigma ürün kodu 32205) ve β -merkaptetanol (Sigma, Ürün kodu M6250) Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'ndan sağlanmıştır.

3.1.2.1. Genotiplendirme analizleri

Genotiplendirme analizlerinde sırası ile DNA izolasyonu, PZR ve Autogenomics Infinity Sistemi ile genotiplendirme işlemleri yapılmıştır. DNA izolasyonunda Qiagen, QIAamp DNA Mini Kit (Ürün kodu 51304) kullanılmıştır. Kan örneklerinden izolasyonu gerçekleştirilen DNA'ların UGT1A1 genotiplendirmesi için Autogenomics Infinity Sistemi'nin önerdiği Infinity UGT1A1 amplifikasyon karışımı (PZR Tamponu, $MgCl_2$, dNTP, UGT1A1 için PZR primer seti) (Autogenomics Ürün kodu 03-3050-02) ile PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR'da polimeraz enzim olarak Titanyum Taq DNA Polimeraz (Clontech, Ürün kodu 639276) kullanılmıştır. PZR amplifikasyonu için PZR termal döngü (Bioer Technology, XP Cyclex, ürün kodu TC-XP BYQ6020101B) cihazı kullanılmıştır.

Autogenomics Infinity Sistemi'nde analiz için Acıbadem Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı'nda yer alan Infinity Plus Analiz (AutoGenomics Ürün kodu 10-0020-99) cihazında çalışılmıştır. UGT1A1 modülleri (Autogenomics Ürün kodu 03-2050-02: INFINITY UGT1A1 Intellipac® Reagent Module) cihaza yerleştirilmiştir. Her modülde yer alan 24 test içeriğinde 1 ml ASPE Master Karışımı (PZR Tamponu, dNTPs, ASPE Primerler) ve 6 ml Hibridizasyon Tamponu (SSC (NaCl + Sodyum sitrat), Hibridizasyon Pozitif Kontrol, Sodyum Azit Koruyucu % 0.08) bulunmaktadır. Örnekler ve modüller Autogenomics infinity Plus Analyzer cihazına yerleştirildikten sonra UGT1A1 hibridizasyon çipleri (Autogenomics ürün kodu 03-1050-02: INFINITY UGT1A1 BioFilmChip® Microarray Magazine) konulmuştur. Cihazın çalışabilmesi için öncesinde, cihazın içi yıkama tamponu (Autogenomics, ürün kodu 12-0330-00) ile otomatik sistemde yıkanmıştır.

3.1.2.2. Bisülfıt DNA dizi analizi

Genomik DNA izolasyonu için Nucleospin Tissue (Macherey-Nagel ürün kodu 740952.50) kitinin, parafine gömülü dokular ve kan örnekleri için desteklenen protokolleri ayrı ayrı (sırasıyla; Genomik DNA izolasyonu için Nucleospin Tissue kiti kullanım kılavuzu sy 23, sy 21) uygulanmıştır. İzole edilen DNA'nın bisülfıt modifikasyonu için EpiTect Bisulfite Kit, Qiagen (Ürün kodu, 59104) kullanılmıştır. Üreticinin önerisi üzerine, FFPE örneklerinden izole edilmiş genomik DNA ve kandan izole edilmiş genomik DNA için ayrı protokoller (sırasıyla EpiTect Bisulfite Kit kullanım kılavuzu syf 26, syf 21) uygulanmıştır.

Bisülfıt dönüşümü gerçekleştirilmiş DNA'ların *UGT1A1* geninde istenen bölgeleri nested PZR ile çoğaltılmıştır. Nested PZR'ın iki döngüsünde de ZymoTaq™ PreMix (Ürün kodu E2003) karışımı kullanılmıştır. PZR ürünleri agaroz jelde yürütölüp, görüntölleme cihazında (Bio-rad, Gel Doc EZ Imager, Ürün kodu 1708270) UV ışımaya yapan tepside (Bio-rad, Ürün kodu 1708271) görüntölennmiştir. Görüntölleme için Image Lab programı (Bio-rad, Ürün kodu 1709691) kullanılmıştır. Agaroz jelde örnekler yüklenirken 6X örnek yükleme boyası (New England Biolabs, Ürün kodu 50994905) ve 1000 bp'lik marker kullanılmıştır (Thermo, Ürün kodu SM0373). Görüntöl alabilmek için agaroz jele etidyum bromid (Invitrogen™, Ürün kodu 15585011) eklenmiştir. Bisülfıt DNA dizi analizi için yapılan işlemlerde Anadolu Üniversitesi, Fen Faköltesi, Biyoloji Bölümü'nde bulunan mikrosantriföl (Spectrafuge™ 16M, Ürün kodu C0160), ısıtma bloöl (Bennett-scientific, Ürün kodu BH-1/Dig), vorteks (Velp Scientifica ZX3, Ürün kodu 1266456-W18), termal döngöl (Core Life Sciences, Ürün kodu 070- Basic), güç kaynaöl (Consort, Ürün kodu E86) ve yatay jel elektroforez tankı (Thermo Scientific™ Owl™ EasyCast™, Ürün kodu B2) cihazları kullanılmıştır.

3.1.2.3. Protein analizleri

FFPE'den protein izolasyonu için Qiagen, Qproteome FFPE Tissue Kit (Ürün kodu 37623) kullanılmıştır. İzole edilen proteinlerin miktar tayini için Qubit protein analiz kiti (Thermo, Ürün kodu Q33211) ile Qubit cihazında (Thermo, Ürün kodu Q33226) çalışılmıştır.

Western blot analizleri iblot yöntemi ile yapılmıştır. Örnek hazırlanmasında Bolt örnek indirgeyici madde (Thermo, Ürün kodu B0009) ve Bolt LDS örnek tamponu (Thermo, Ürün kodu NP0004) kullanılmıştır. 15 kuyuluk % 4-12 Bis-Tris jeller (Thermo, Ürün kodu NW04125BOX) ile çalışılmıştır. Tampon olarak MES Tamponu (Thermo, Ürün kodu B0002) kullanılmıştır. Marker olarak 11-250 kDa'luk Cell Signaling, Colorcoded Prestained Marker (Ürün kodu 14208S) uygulanmıştır. Elektroforez Thermo dikey jel koşturma tankında (Ürün kodu B4478641) Thermo güç kaynağı (Ürün kodu PS0090) ile yapılmıştır. Proteinlerin membrana emdiriminde iblot-2 jel transfer cihazında (Thermo, Ürün kodu IB21001) iblot mini PVDF Transfer Stack, (Thermo, Ürün kodu IB401002) kullanılmıştır. Protein analizlerinde kullanılan birincil ve ikincil antikorlar Çizelge 3.6'da verilmiştir. Western blot sonuçlarının görüntülenmesi için membran üzerine HRP substratı olarak Luminata Forte Western HRP substrat (Ürün kodu WBLUF0100) uygulanmıştır. Membran C-digit sisteminde görüntülenmiştir. Protein miktarını görüntülemek için Dot blot yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde nitroselüloz membran (Biorad, Ürün kodu 1620115) ile çalışılmıştır. Ponceau (Sigma, Ürün kodu P7170) uygulaması yapılmıştır. Western blot ve dot blot analizlerinin sonuçları Image Studio Digits programı (LI-COR Biosciences, NE) programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.6. Western blot analizinde kullanılan antikorlar

Antikor	Kaynak Organizma	Moleküler Ağırlık
Birincil Antikor UGT (cell signaling, Ürün kodu4371)	Tavşan	55-60 kDa
Birincil Antikor b aktin (cell signaling, Ürün kodu4970S)	Tavşan IgG izotipi	43 kDa
İkincil HRP (Horse Radish Peroksidan) - bağlı Antikor (cell signaling, Ürün kodu7074S)	Anti- Tavşan IgG	

3.1.3. Çözeltiler

Analizlerde kullanılan çözeltilerin içerikleri aşağıda verilmiştir.

- 50 X Tris Asetat EDTA (TAE) pH 8.0 1 lt

242 gr Tris Base (Sigma, Ürün kodu T6066)

57,1 ml Glasial asetik asit (Sigma, Ürün kodu 537020)

37,2 gr NaEDTA.2H₂O (Sigma, Ürün kodu E5134)

800 ml dH₂O ilave edilip, pH ayarlandıktan sonra 1 lt'ye tamamlanmıştır.

- % 2'lik Agaroz Jel 30 ml

0,6 gr Agaroz (Lonza, Ürün kodu 50004)

600 µl 50X TAE

1 µl Etidyum Bromid (Invitrogen™, Ürün kodu 15585011)

0,6 gr agaroz 600 µl 50X TAE tamponundan eklenip, 30 ml'ye dH₂O ile tamamlanmıştır. Agaroz ısıtılarak tampon içinde çözüldükten sonra, donmayacak kadar soğuması beklenmiş ve dökülmeden önce, 1 µl etidyum bromid eklenmiştir.

- Tris EDTA Tamponu pH 8.0 100 ml

10 mM Tris Base (pH=8.0) (Sigma, Ürün kodu T6066)

1 mM EDTA (pH=8.0) (Sigma, Ürün kodu E9884)

1 ml 1 M Tris Base (1,215 gr Tris Base, 10 ml dH₂O'da) ve 0,2 ml 0,5 M EDTA (0,372 gr EDTA, 2 ml dH₂O'da) 100 ml'ye tamamlanmıştır.

- 10 X Tween 20 içeren Tris (TBST) Tamponu pH 7.6 1 lt

24,2 gr Tris Base (Sigma, Ürün kodu T6066)

80 gr NaCl (Sigma, Ürün kodu 13423)

10 ml Tween 20 (Sigma, Ürün kodu P1379)

800 ml dH₂O ilave edilip, pH ayarlanmıştır. Sonra 10 ml Tween 20 eklenip, 1 lt'ye tamamlanmıştır.

- Strip Tamponu pH 6.8 1 lt

6,1 gr Tris Base, (Sigma, Ürün kodu T6066)

20 gr SDS (Thermo, Ürün kodu BP166-100)

7,8 ml β -merkaptoetanol, (Sigma, Ürün kodu M6250)

800 ml dH₂O ilave edilip, pH ile ayarlanmıştır. Sonra 7,8 ml β -merkaptoetanol eklenip, 1 lt'ye tamamlanmıştır.

- 10 M HCl 10 ml

41,6 ml derişik HCl (%37) (Merck, Ürün kodu 100317)

8,4 ml dH₂O

- 10 M NaOH 100 ml

40 gr NaOH (Sigma, Ürün kodu S8263)

100 ml dH₂O içinde çözülür.

- Bloklama tamponu (% 5) 100 ml

5 gr Bovin serum albümün (BSA) (VWR, Ürün kodu 0332)

100 ml TBST (1X)

3.1.4. Primerler

UGT1A1'in CpG dinükleotidlerindeki sitozinin metilasyonunun incelenmesi için bisülfide maruz bırakılmış DNA'ların, Çizelge 3.7'de verilen primerlerle nested PZR uygulaması gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.7. DNA metilasyonu analizinde kullanılan primerler

Nested PZR	Dizi (5' - 3')	Hedef bölge	Alan	Referans
F1 İlk döngü	TGG ATT TTG AGG TTT TGG AAG T	-277, +85	-3 CpG, -4 CpG	Yaşar vd., 2013
R1	CTT CCC AAC ATA AAA CAC CAC TAA			
F2 İkinci döngü	GAG GTT TTG GAA GTA TTT TGT TGT G	-269, +20		
R2	CCC TAA AAC TCC ACA ACC ATA A			
F3 İlk döngü	GGG ATA AAT ATG GGA TGT AGT GAT	-3650, -3198	-28CpG, -29CpG, -30 CpG	
R3	CCT CTT ACC CTC TAA CCA TTC TAA			
F4 İkinci döngü	TGG GGG GAT TTT TTT TGA GAT TTG AG	-3588, -3225		
R4	CCT TAC TAT TCC CCA AAC TTC CTT TAA T			

3.2. Yöntem

3.2.1. UGT1A1 genotiplendirme analizleri

UGT1A1 genotiplendirme analizleri Autogenomics INFINITI Sistemi ile yapılmıştır. Test protokolü üç temel süreç üzerine kurulmuştur; (i) DNA izolasyonu, (ii) DNA'nın PZR amplifikasyonu, (iii) Autogenomics INFINITI plus sistemi ile analiz. Son aşama olan Autogenomics INFINITI plus sistemi ile analizde sırası ile PZR ürünlerinin etiketlenmesi (primer uzatılmasının tespiti), etiketlenmiş PZR ürünlerinin mikroarraylerde izotermal koşullar altında zip kod / anti-zipkod problemlerinin uyuşmasına göre hibridizasyonu, mikroarray'in taranması ve sinyal tespit ve analizi (*UGT1A1* geninin belirlenmesi) gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1. DNA izolasyonu

Kan örneklerinden DNA'nın izolasyonu sırasında, Qiagen QIAamp DNA Mini Kit (Ürün kodu 51304) kullanılmıştır. 200 µl kan örneğine, kitten çıkan AL Buffer (Liziz solüsyonu)'dan 200 µl eklenmiştir. Üzerine yine kitin içinden çıkan 20 µl Proteinaz K konmuş vorteks ile karıştırılmış ve 10 dk 56 °C'de bekletilmiştir. Sonra 200 µl etanol eklenerek ve vortekslenmiş ve filtreli tüplere transfer edilmiştir. 10.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildikten sonra alttaki tüp atılmış, yenisi konmuş ve üstteki filtreli tüpe 500 µl AW1 solüsyonu (yıkama solüsyonu 1) eklenmiştir. Tekrar 10.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiş ve alt tüp atılarak yenisi konmuştur. Üstteki filtreli tüpe 500 µl AW2 solüsyonu (yıkama solüsyonu 2) eklenerek ve 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Filtreli tüpe 200 µl AE solüsyonu (elüsyon solüsyonu) eklenerek 1 dk bekletildikten sonra 10.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında filtreli tüp atılarak, alt tüpte biriken örnek üzerine hasta no yazılarak – 20 °C'de saklanmıştır.

3.2.1.2. Genomik DNA'nın UGT1A1 genotiplendirmesi için PZR amplifikasyonu

DNA izolasyonu sonrası Acıbadem Merkez Laboratuvarı'nda PZR (BioerXPCycler) işlemi gerçekleştirilmiştir. Kan örneklerinden izole edilen genomik DNA'nın PZR'ı, UGT1A1 analizi için Autogenomics INFINITI kitine göre üreticinin önerilerine uyularak yapılmıştır. UGT1A1 için PZR karışımı (her örnek için) Çizelge 3.8'de gösterildiği gibi hazırlanmış ve reaksiyon Çizelge 3.9'da gösterildiği gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.8. UGT1A1 genotiplendirme analizi PZR karışımı

Reaktif bileşeni	Miktar (µl)
INFINITI UGT1A1 amplifikasyon karışımı	17.875
Kandan izole edilen DNA örneği	2
Titanyum Taq DNA Polimeraz (Clontech, Ürün kodu 639276)	0.125
Toplam	20

Çizelge 3.9. UGT1A1 genotiplendirme analizi PZR koşulları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
1	94	2 dk	N/A
2	94	20 sn	40
	54	30 sn	
	72	30 sn	
3	4	∞	1

3.2.1.3. Autogenomics INFINITI plus sistemi ile analiz

UGT1A1 polimorfizm analizleri için PZR ürünleri 8 kuyulu striplere konmuştur ve Autogenomics INFINITI cihazında çalışılmıştır. Stripler plakaya yüklenmiş ve plak kapağı çıkarılarak üzerine metal kapak konulmuştur. Cihaza UGT1A1 için kitin içinden çıkan mikropaneler ve solusyon kutusu yerleştirilmiştir. Programa gerekli bilgiler girilip cihaz çalıştırılmıştır. Sonuçlar her hasta için PDF formatında cihaz tarafından verilmiştir. Genotiplendirme panelleri 48’liktir ve açıldığı tarihten itibaren 6 ay kullanma ömrüne sahiptir. O nedenle analizler toplu olarak yapılmıştır.

3.2.2. Bisülfıt genomik DNA dizi analizi

Bisülfıt genomik DNA dizi analizi için sırası ile kandan ve dokudan ayrı protokollerde olmak üzere DNA izolasyonu (i), izole edilen DNA’nın bisülfıt modifikasyonu (ii), -3 ve -4 CpG bölgeleri için ve -28, -29, -30 CpG bölgeleri için ayrı ayrı olmak üzere nested PZR (iii), agaroz jel elektroforezi (iv) ve DNA dizi analizi (v) işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. DNA izolasyonu

Kandan ve FFPE örneklerinden genomik DNA izolasyonu için Nucleospin Tissue (Macharey-Nagel) kiti ayrı protokollerde kullanılmıştır.

3.2.2.1.1 Kandan genomik DNA izolasyonu

Kan örneklerinden genomik DNA izolasyonunda, Nucleospin Tissue (Macharey-Nagel) kitinin kan örneklerinden genomik DNA için desteklenen protokolü uygulanmıştır. Her bir hasta kan örneğinden 200 µl alınmış ve 25 µl Proteinaz K eklenmiştir. Üzerine 200 µl B3 tamponundan konup 10 ila 20 sn arası vortekslenmiştir. İyice karıştıktan sonra oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra 15 dk 70 °C’de liziz işlemi gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda hafifçe vortekslenerek 210 µl etanol eklenmiştir. Örnekler tekrar vortekslenerek kolonlara alınarak altına toplama tüpleri yerleştirilmiş ve 1 dk 11 000 g’de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünde biriken alttaki sıvı atılarak kolona 500 µl BW tamponu uygulanmış ve 1 dk 11 000 g’de santrifüj edilmiştir. Alttaki sıvı tekrar atılmış, kolona 600 µl B5 tamponu uygulanarak 1 dk 11 000 g’de santrifüj edilmiş ve kolon temiz tüpe alınmıştır. 70 °C’de ısıtılmış 100 µl BE tamponu kolon membranının üzerine gelecek şekilde 50 µl eklenmiş ve 1 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda 1 dk 11000 g’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda izole edilen DNA örnekleri -20 °C’de saklanmıştır.

3.2.2.1.2. FFPE’den genomik DNA izolasyonu

FFPE örneklerinden genomik DNA izolasyonu için Nucleospin Tissue (Macharey-Nagel) kitinin parafine gömülü dokular için desteklenen protokolü uygulanmıştır. Lamların üzerindeki fikse edilmiş örnekler steril jilet ile kazınarak temiz 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. Örneklerin üzerine 1 ml ksilen eklenip 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda örnekler 11000 g’de 3 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz atılıp 1 ml etanol eklenmiştir. Bu işlem 2 kez tekrar edilmiştir. Etanolü uzaklaştırmak için örnekler 37 °C’de 20 dk tüplerin kapakları açık şekilde bekletilmiştir. Süre sonunda 180 µl T1 tamponu ve 25 µl proteinaz K eklenmiştir. Örnekler vortekslenip 56 °C’de gece boyunca liziz olmak üzere inkübasyona bırakılmıştır.

Liziz sonrasındaki aşamalar, kandan genomik DNA izolasyonundaki liziz sonrası aşamalarla aynı olarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA örnekleri -20 °C’de saklanmıştır.

3.2.2.1.3. Nanodrop yöntemi

ND-1000 programından nükleik asit sekmesi seçilmiştir. Önce cihaza 2 µl çözücünden konarak cihaz sıfırlanmıştır. Sonra 2 µl DNA örneğinden koyularak 260/280 nm’de ölçüm yapılmıştır.

3.2.2.2. Bisülfite ile DNA dönüşümü

DNA’ları bisülfide maruz bırakmak için EpiectBisulfite Kit (Qiagen) kullanılmıştır. Deneye başlamadan tampon BW’ye 30 ml, BD’ye 27 ml etanol eklenmiştir. Her örnek için 620 µl BL tamponuna 6,2 µl taşıyıcı RNA çözeltisi eklenmiştir. Uygulamadan önce bütün çözeltiler oda sıcaklığına getirilmiştir.

Kandan izole edilen DNA örnekleri ile FFPE’den izole edilen DNA örnekler için ayrı ayrı protokoller uygulanmıştır. Kandan izole edilen DNA örnekleri için Çizelge 3.10’da gösterildiği gibi bisülfite modifikasyon karışımları PZR tüplerinde hazırlanmıştır. FFPE’den izole edilen DNA örnekleri için Çizelge 3.11’de gösterildiği gibi bisülfite modifikasyon karışımları PZR tüplerinde hazırlanmıştır.

Çizelge 3.10. Kandan izole edilen DNA örnekleri için bisülfite modifikasyon karışımı

Karışım bileşeni	Miktar (µl)
DNA	35
RNase free dH ₂ O	5
Bisulfite karışımı	85
DNA koruma çözeltisi	15
Toplam	140

Çizelge 3.11. FFPE’den izole edilen DNA örnekleri için bisülfite modifikasyon karışımı

Karışım bileşeni	Miktar (µl)
DNA	20
Bisulfite karışımı	85
DNA koruma çözeltisi	35
Toplam	140

Bundan sonraki işlemler bütün izolatlar için aynı aşamalarla ilerlemiştir. Hazırlanan bisülfite modifikasyon karışımlarlarını içeren tüplerdeki örneklerin bisülfite DNA dönüşümü, Çizelge 3.12’de belirtilen koşullarda termal döngü cihazına yerleştirilip gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.12. Termal döngü cihazında uygulanan bisülfite DNA dönüşümü koşulları

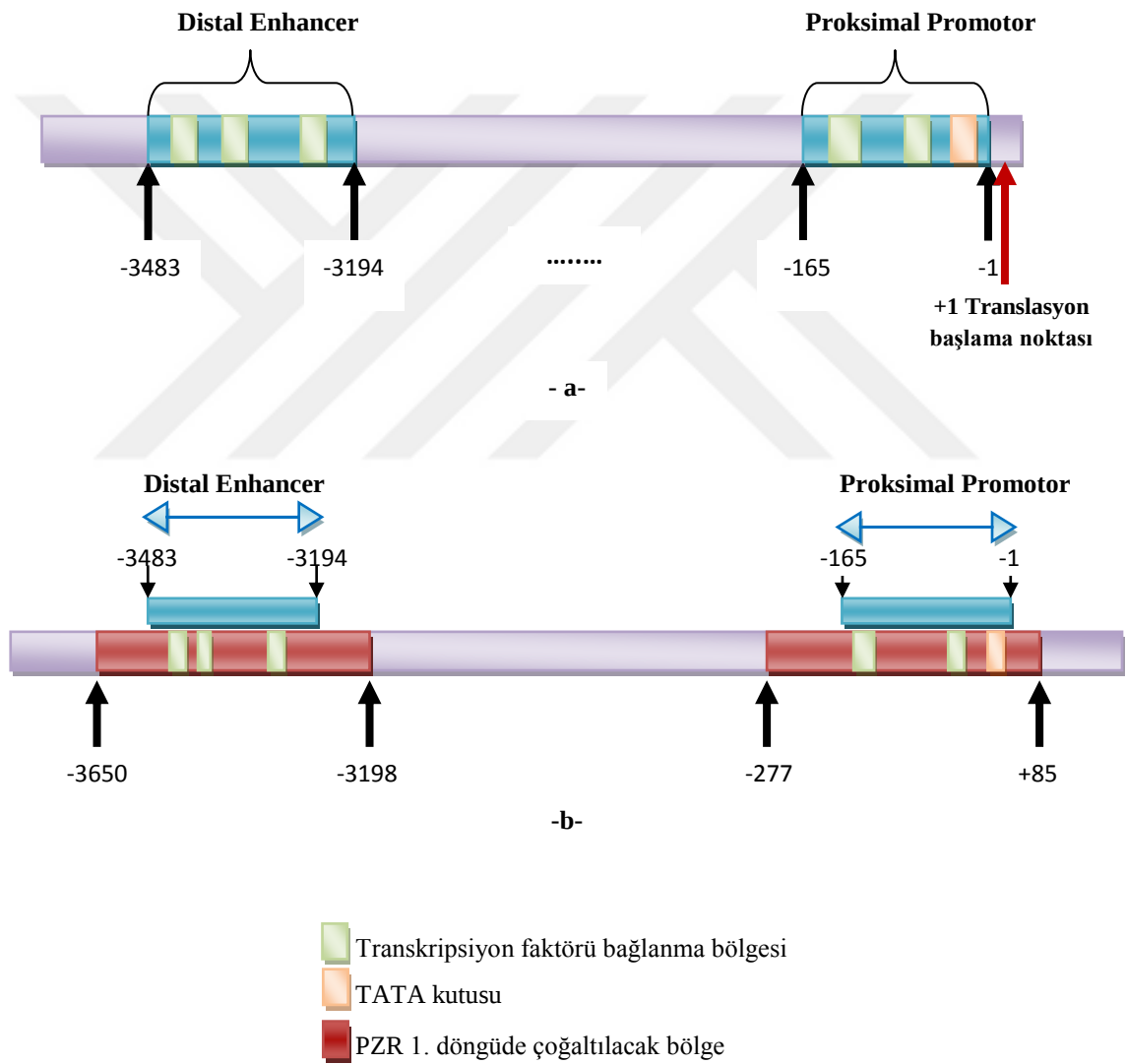
Sıcaklık	Süre
95 °C	5 dk
60 °C	25 dk
95 °C	85 dk
60 °C	5 dk
95 °C	175 dk
60 °C	5 dk
20 °C	∞

Bisülfite maruz bırakılmış DNA’nın temizlenmesi için kısa bir santrifüj (5 000 rpm, 15 sn) işlemi ardından örneklerden 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Her örnek için 10 µl/ml taşıyıcı RNA içeren 560 µl BL tamponu eklenmiştir. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 30 sn 5 000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Örnekler Epitect Bisulfite Kit (Qiagen)’ten çıkan kolonlara alınmıştır. Kolonların altına toplama tüpleri yerleştirilerek 1 dk 14 000 rpm’de santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonunda toplama tüpündeki sıvı atılmış, kolona 500 µl BW tamponu uygulanmış ve tekrar aynı koşullarda santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılarak kolona 500 µl BD tamponu eklenmiştir ve örnekler 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda örnekler 1 dk 14 000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda toplama tüpleri boşaltılıp 500 µl BW tamponu uygulanmış ve tekrar aynı koşullarda santrifüj edilmiştir. Bu işlem 1 kez daha tekrar edilmiştir. Alınan örnekler boş toplama tüplerine konulmuştur. Son bir kez daha atık sıvılardan arındırmak için santrifüj işlemi uygulanmıştır. Son santrifüj sonrası örnekler, kalan sıvıların da buharlaştırılması amacıyla, toplama tüpü atılıp yerine yeni mikrosantrifüj tüpü konularak 56 °C’de kapağı açık şekilde 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda 20 µl EB tamponu membranın üzerine gelecek

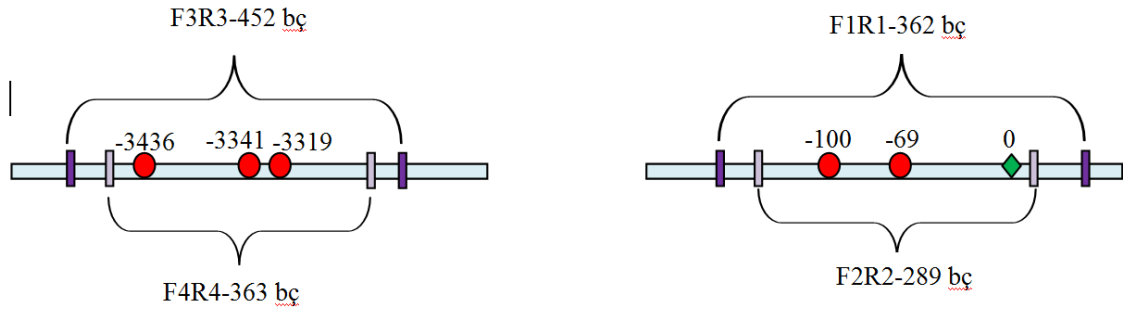
şekilde kolonlara uygulanmış ve 1 dk 12 000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Miktarı arttırmak için bu işlem 2 kez yapılmıştır. 40 µl bisülfıt modifikasyonu gerçekleştirilmiş örnekler daha sonraki analizleri yapılmak üzere -20 °C’de saklanmıştır.

3.2.2.3. PZR amplifikasyonu

UGT1A1 translasyonundan sorumlu olabilecek *UGT1A1* geninin proksimal promotor ve enhancer lokasyonundaki CpG bölgelerini çoğaltmak için 2 bölgeye ayrı ayrı nested PZR uygulaması gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *UGT1A1* promotor ve enhancer bölgeleri (a) ve 1. döngü PZR’da çoğaltılacak bölge (b)



Şekil 3.2. *UGT1A1* geni CpG bölgeleri ve PZR amplifikasyonunda çoğaltılan bölgeler, ●; CpG dinükleotidi, ◆; translasyon başlama noktası (0), ■; PZR 1. Döngü, □; PZR 2. Döngü

İlgili CpG dinükleotidlerinin yer aldığı bölgeler translasyon başlama noktası (+1) esas alınarak -3 CpG (-69 bp) ve -4 CpG (-100 bp) ve -28 CpG (-3319 bp), -29 CpG (-3341 bp) ve -30 CpG (-3436 bp) olarak adlandırılmıştır. -3 CpG ve -4 CpG proksimal promotorda, -28 CpG, -29 CpG ve -30 CpG enhancer bölgede yer almaktadır. Bu bölgelerdeki CpG dinükleotidlerinin sitozinin metilasyonunun incelenmesi için bisülfide maruz bırakılmış DNA'ların, ayrı ayrı nested PZR uygulaması gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).

PZR karışımları her bölge ve döngü için çizelgede belirtilen standart koşullarda uygulanmıştır. Birinci döngülerde doğrudan bisülfite modifiye DNA kullanılırken, ikinci döngülerde DNA örneği olarak ilk döngüye ait PZR ürünü 1/50 seyreltilerek kullanılmıştır. PZR karışımları Çizelge 3.13'de gösterildiği miktarlarda uygulanmıştır. Bütün PZR koşulları (her iki bölge için birinci döngü ve ikinci döngü) Çizelge 3.14'da gösterilen aynı programda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.13. *CpG dinükleotidlerinin sitozinin metilasyonunun incelenmesi için uygulanan PZR'ın karışımı*

PZR karışımı	Miktar
ZymoTaq™ PreMix	12,5 µl
İleri primer (10 mM)	1 µl
Geri primer (10 mM)	1 µl
dH ₂ O	5,5 µl
DNA	5 µl
Toplam	25 µl

Çizelge 3.14. CpG dinükleotidlerinin sitozinin metilasyonunun incelenmesi için uygulanan PZR'ın koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
1	95 °C	10 dk	N/A
2	93 °C	30 sn	20
	65-45 °C	30 sn	
	72 °C	1 dk	
3	93 °C	30 sn	20
	45 °C	30 sn	
	72 °C	1 dk	
4	72 °C	10 dk	1
5	4 °C	∞	1

3.2.2.3.1. Promotor CpG bölgeleri için nested PZR

-3 CpG ve -4 CpG dinükleotidleri proksimal promotorda yer almaktadır. Bu CpG dinükleotidlerindeki sitozinin metilasyonunun tespiti için bisülfide maruz bırakılmış DNA'ların *UGT1A1* genine ait – 277 ve + 85 arası 362 bp'lik bölgesi F1-R1 primerleri ile çoğaltılmıştır. F1-R1 primerlerine ait PZR ürünleri Tris EDTA tamponu ile 1/50 seyreltilmiş ve F2-R2 primerleri ile ikinci döngü -269 ve +20 arası 289 bp'lik bölgeyi çoğaltmak üzere PZR'a alınmıştır (Şekil 3.3).

F1R1 (362 bp / chr2: 233,760,010 - 233,760,374)

F2R2 (289 bp / chr2: 233,760,001 - 233,760,307)

TGGATCCTGAGGTTCTGGAAGTACTTTGCTGTGTTCACTCAAGA
ATGTGATTTGAGTATGAAATTCCAGCCAGTTCAACTGTTGTTGCCT
ATTAAGAAACCTAATAAAGCTCCACCTTCTTTATCTCTGAAAGTGA
ACTCCCTGCTACCTTTGTGGACTGACAGCTTTTTATAGTCACCGTGA
CACAGTCAAATAACTTGGTGTATCGATTGGTTTTTGCATATATATA
TATAAGTAGGAGAGGGCGAACCTCTGGCAGGAGCAAAGGCGCGG
CTGTGGAGTCCCAGGGCGGACGCCCACTTGTCCTGGGCCTGCTGCT
GTGTGTGCTGGGCCCAGTGGTGTCCGCTGGGAAGAT

Şekil 3.3. Proksimal promotorda çoğaltılan gen bölgesi. Koyu renkle yazılan bölge PZR 1. döngü primerlerinin, altı çizili belirtilen bölge PZR 2. döngü primerlerinin bağlandığı alan, koyu renkli-italik-altı çizili CG dinükleotidleri metilasyonu bakılan sırası ile -4 ve -3 CpG dinükleotidleri

3.2.2.3.2. Enhancer CpG bölgeleri için nested PZR

-28, -29 ve -30 CpG enhancer bölgede yer almaktadır. Bu CpG dinükleotidlerindeki sitozinin metilasyonunun tespiti için bisülfide maruz bırakılmış DNA'ların *UGT1A1* genine ait – 3650 ve - 3198 arası 452 bç'lik bölgesi F3-R3 primerleri ile çoğaltılmıştır. F3-R3 primerlerine ait PZR ürünleri Tris EDTA tamponu ile 1/50 seyreltilmiş ve F4-R4 primerleri ile ikinci döngü -3588 ve -3225 arası 363 bç'lik bölgeyi çoğaltmak üzere gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4)

F3R3 (452 bp / chr2: 233,756,642- 233,757,090)

F4R4 (363 bp / chr2: 233,760,001 - 233,760,307)

**GGGATAAAGGGATGCAGTGATTATTTCCGCTAGAACTGCTATAT
AATGACGATGAATTTTGGGGGGACTTTTTTTGAGATCTGAGTTCTC
TTCACCTCCTCCTTATTCTCTTTTTGACACTGGATTCTTTGCTTTGA
TAAATTGTGGGGCAATACTAGTAAAGGTCCTCAATTCCAAGG
GGAAAATGATTAACCAAAGAATCTAA**CG**GTAAAGGGTATTAGG
TGTAATGAGGATGTGTTATCTCACCAGAACAACTTCTGAGTTTA
TATAACCTCTAGTTAAACCTGAAACCC**CG**GACTTGGCACTTGGTAA
GC**CG**CAATGAACAGTAGTAAGCTGGCCAAGGGTAGAGTTCAGT
TTGAACAAAGCAATTTGAGAA**CAAAGGAAGTTTGGGGAACAGCA**
AGGGATCCAGAATGGCTAGAGGGTAAGAGG**

Şekil 3.4. Distal enhancerda çoğaltılan gen bölgesi. Koyu renkle yazılan bölge PZR 1. döngü primerlerinin, altı çizili belirtilen bölge PZR 2. döngü primerlerinin bağlandığı alan, koyu renkli-italik-altı çizili CG dinükleotidleri metilasyonu bakılan sırası -30 CpG, -29 CpG ve -28 CpG dinükleotidleri

3.2.2.4. Agaroz jel elektroforezi

İzole edilen DNA'lar ve PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde 1 µl 6X yükleme boyası (Biolabs #B7021S) eklenerek 150 W, 250 mA, 100 voltta 20 dk örnekler yürütülmüştür. Jeldeki örnekler UV ışık altında görüntülenmiştir.

3.2.2.5. DNA temizleme ve DNA dizi analizi

Bu aşamada ARDİ Medikal'den hizmet alınmıştır. PZR ürünleri firmaya soğuk zincirle gönderilmiş, firma saflaştırıp dizi analizini gerçekleştirmiştir. Dizi analizleri Finchtv programında değerlendirilmiş, -3, -4, -28, -29 ve -30 CpG dinükleotidlerindeki timine dönüşmeyen sitozinler metillenmiş, timin ve sitozin pikleri beraber tespit edilmişse o CpG dinükleotidi için kısmi metillenmiş, timine dönüşmüşse metillenmemiş sitozinler olarak yorumlanmıştır.

3.2.3. UGT1A1'in protein seviyesinin belirlenmesi

UGT1A1 protein varlığı kolon doku örneklerinde incelenmiştir.

3.2.3.1. FFPE'de protein izolasyonu

Patoloji bölümünden alınan parafine gömülü hasta dokularının kesitlerinin fiske edildiği lamlardan Qproteome FFPE Tissue Kit (Qiagen) ile protein izolasyonu yapılmıştır. Lam örnekleri iki kez saf ksilende 10'ar dk bekletilmiştir. Ksilenden alınan lamlar 2 kez %100'lük etanole yatırılıp 10'ar dk bekletilmiştir. Aynı işlem 2 kez 10'ar dk %96'lık etanol ile tekrar edilmiştir. Yine aynı işlem 2 kez 10'ar dk %70'lik etanol ile tekrar edilmiştir. Son işlemden sonra örnekler 30 sn ultra saf suda bekletilmiştir. Sudan çıkarılan lam önce temiz bir havlu kağıt üzerine yerleştirilerek suyunun akması sağlanmıştır. Örneklerin üzeri hala ıslakken enjektör iğnesi veya jilet ile kazınarak doku parçaları kitin içinden çıkan santrifüj tüplerine alınmıştır. Her lamdaki kesitler için ayrı tüp kullanılmıştır, aynı lamdaki kesitler aynı tüplere konmuştur.

Daha sonra Western blot analizi yapılacağından “western blot için protein izolasyonu” şeklinde protokole devam edilmiştir. Her örnek için tüplere 100 µl saflaştırma tamponu EXB Plus (94 µl saflaştırma tamponu EXB Plus + 6 µl merkaptotanol) eklenmiş ve vortekslenmiştir. Santrifüj tüplerinin kapakları kitten çıkan kelepçelerle kapatılmıştır. Örnekler buzda 5 dk inkübe edilmiş ve vortekslenmiştir. Sonrasında 100 °C'de, 750 rpm'de 20 dk inkübe edilmiştir. 2 saat sonunda örnekler 1 dk +4 °C'de bırakılmıştır. Örnekler 14 000 g'de 15 dk +4 °C'de santrifüj edilmiştir, santrifüj sonunda üstfaz alınmıştır. Protein örnekleri Western analizi yapılana kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.3.2. Protein miktarı analizi

Toplam protein miktarı analizi için Qubit ve dot-blot yöntemleri kullanılırken, UGT1A1 analizleri için Western blot yöntemi uygulanmıştır.

3.2.3.2.1. Qubit yöntemi

İzolasyonu yapılan FFPE'den izole protein örneklerinin florimetrik miktar tayini için Qubit protein analiz kiti kullanılmıştır. Western blot analizi yapılacak protein örneklerinden her biri için 199 µl Qubit tamponu ve her örnek için 1 µl Qubit reaktif karıştırılarak çalışma tamponu hazırlanmıştır. 3 adet standardın her biri için çalışma tamponundan 190 µl, her örnek için çalışma tamponundan 199 µl 1 ml'lik santrifüj tüplerine alınmıştır. Standartlardan 10 µl, örneklerden 1 µl çalışma tamponu ile karıştırılarak son hacim 200 µl'ye tamamlanmıştır. Standartlar önce, örnekler sonra olmak üzere Qubit cihazına yerleştirilip okutulmuştur. Örnek yoğunlukları µg/ml cinsinden değerlendirilip ana stok konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.2.3.2.2. Dot blot yöntemi

Nitroselüloz membran üzerine damlatma yapılacak yerleri gösteren işaretler kurşun kalemle işaretlenmiştir. İzolasyonu yapılan toplam protein örneklerinden 2 µl'lik miktarlar damlatma yöntemi ile membran üzerine bırakılmıştır. Membran kuruyunca tekrar damlatılmıştır. Damlatma işlemi 4 kez tekrar edilmiştir. Protein damlatma işlemi sonrasında kuruyan membran 1XTBST tamponunda çözölmüş % 5'lik BSA ile yaklaşık 45 dk boyunca muamele edilmiştir. Süre sonunda, membran 1:1000 dilüsyonlu %5 BSA'da hazırlanmış UGT1A1 birincil antikoruna alınmıştır. Birincil antikorda 30 dk inkübe edildikten sonra 3 kez 1X TBST ile yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra membran 1:500 dilüsyonlu %5 BSA'da hazırlanmış ikincil HRP-bağlı antikorda 30 dk bekletilmiştir. Süre sonunda, tekrar 3 kez 1X TBST ile yıkanmıştır. Ardından Ponceau S boyası membran üzerine uygulanmıştır. Membran üzerinde protein damlatılan bölgelerde ponceau boyasının etkisiyle oluşan pembe bölgeler, protein ifadesi olarak yorumlanmıştır.

3.2.3.3. Western blot analizi

FFPE'den saflaştırılan toplam protein izolatlarında UGT1A1 protein varlığının analizi için Western blot uygulaması yapılmıştır. Western blot uygulaması; sırasıyla örnek hazırlanması, dikey elektroforez, membrana emdirim, bloklama, antikor bağlanması ve görüntüleme aşamalarından oluşmaktadır.

Her 19 µl protein örneği için Bolt LDS örnek tamponundan 7,5 µl ve Bolt örnek indirgeyici maddeden 3 µl eklenmiştir. Örneklerin bulunduğu santrifüj tüplerinin kapakları enjektör iğne ile delinmiştir. Karışım 5 dk kaynar suda (100 °C'de) bekletilmiştir. Süre sonunda örnekler buza alınmıştır.

Western blot için MES tampon kullanılmıştır. Tampondan (MES tamponu) alınan 20 ml, ultra saf su ile 400 ml'ye tamamlanmıştır. 15 kuyuluk % 4-12 Bis-Tris jel kaseti ambalajından çıkarıldıktan sonra tanka yerleştirilmeden tarak ve aşağısındaki bant çıkarılmıştır. Jel kaseti tanka yerleştirilmiş ve jel tamamen tamponun içinde kalacak şekilde MES tamponu konmuştur.

FFPE'den izole edilen protein miktarları düşük olduğu için maksimum miktarda 20 µl örnek kuyulara yüklenmiştir. Colorcoded Prestained Marker'dan 5 µl kuyuya konmuştur. Örnekler yüklendikten sonra sistem güç kaynağına bağlanmış ve 165 V'da elektroforez başlatılmıştır. Mavi boya jelin sonuna yürüyene kadar –yaklaşık 45 dk- elektroforez işlemi devam ettirilmiştir. Elektroforez işleminden sonra güç kaynağı durdurulmuş ve tanktan alınan jel kasetinin alt tarafındaki kısım spatül ile kesilmiştir. Jel, kasetin içerisinden spatül yardımı ile ayrılmış ve saf suya yatırılmıştır. Bu aşamada membrana emdirim sırasında hava kabarcığı bırakmaması için kuyular ve jelin alt kısmı spatül yardımı ile kesilerek uzaklaştırılmıştır. SDS jelindeki proteinlerin membrana emdirimi için iblot 2 Gel transfer cihazı kullanılmıştır. Sandviç sistemi şeklinde jel, anot ve katot aktarıcılarının arasına konmuştur. iBlot® 2 Transfer Stacks'den anot olanı alt kısımda kalacak şekilde sandviç sisteminin yer aldığı plastik hazne cihaza yerleştirilmiştir. Jel, membranın üzerine konmuştur. Filtre kağıdı ıslatılarak jelin üzerine yerleştirilmiş ve hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmiştir. Daha sonra kahverengi kısmı yukarıda kalacak şekilde katot stack yine hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirilmiştir. En son olarak sünger kağıt (sponge) konmuş ve iletim noktalarının temas halinde olduğu kontrol edilmiştir. Cihazın kapağı kapatılarak 20 V, 7 dk olan P3 programı seçilip çalıştırılmıştır.

Membrana emdirim süresi sonunda membran sistemden alınmıştır. Süre sonunda membran 1 kez 1X TBST'de 5 dk yıkanmıştır. Yıkama işlemi bitince, membran TBST'de çözülmüş %5'lik BSA içerisinde ve oda sıcaklığında çalkalayıcıda 75 dk bloklanmıştır. Bloklama sonunda membran 3 kez 5'er dk TBST (1X)'te yıkanmıştır. Bloklanan membran yıkama işleminden sonra 1 gece (14-16 s) boyunca +4 °C'de %5'lik BSA'da hazırlanmış birincil antikorla muamele edilmiştir. Birincil antikor olarak UGT1A1, 1:5000 dilüsyon ile β -aktin ise 1:1000 dilüsyon ile kullanılmıştır. Süre sonunda membran 3 kez 5'er dk TBST (1X)'te yıkanmıştır. İkincil antikor olarak 1:500 dilüsyonlu taze %5'lik BSA'da hazırlanmış HRP bağlı anti-rabbit IgG kullanılmıştır. Membran oda sıcaklığında, HRP bağlı anti-rabbit IgG ile çalkalayıcıda 60 dk muamele edilmiş ve membran yine 3 kez 5'er dk TBST (1X)'te yıkanmıştır.

Görüntüleme için Luminata™ Forte Western HRP Substrat membrana üzerine kapatacak şekilde uygulanmıştır. Oda sıcaklığında, ışık almayacak şekilde yaklaşık 5 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra membran proteinler tabakaya bakacak ve hava kalmayacak şekilde C-digit cihazına yerleştirilmiştir. Image Studio Digits Programı kullanılarak membran görüntülenmiştir.

UGT1A1 proteini için görüntüleme işlemi yapıldıktan sonra membran strip tamponu ile muamele edilmiş (30 dk, 15 dk, 10 dk ve 5 dk süreler ile) ve antikorlar uzaklaştırılmıştır. Membran %5 BSA ile 1 saat tekrardan bloklanmış ve daha sonra β -aktin primer antikor uygulanmıştır. Sonrasında, yine UGT1A1 antikor bağlanmasında olduğu gibi aynı işlemler gerçekleştirilerek görüntüleme yapılmıştır.

3.2.4. İstatistiki analizler

İstatistiki analizler için IBM SPSS Statistics 21 programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *UGT1A1* genotiplendirme sonuçları

İrinotekan metabolizmasından sorumlu ana enzim olan *UGT1A1* enziminin polimorfik durumunun irinotekan ilaç yanıtı üzerinde etkisi olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Innocenti vd., 2004; Toffoli vd., 2006; Liu vd., 2017; Takano ve Sugiyama, 2017). Çalışmamızda, hastalarda tedavi sırasında oluşan toksik etkiler ile *UGT1A1* polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmak için hastalara ait kan örneklerinden *UGT1A1* genotiplendirme çalışmaları yapılmıştır. Sonuçlar hastaların *UGT1A1* geni için; *1 ((TA)6TAA), *28 ((TA)7TAA), *36 ((TA)5TAA) ve *37 ((TA)8TAA) alelik polimorfizmlerine göre Autogenomics Infinity cihazı tarafından sınıflandırılıp, pdf formatında sunulmuştur (Şekil 4.1). Buna göre; 48 hastadan 35 hasta 1*/1* homozigot, 3 hasta 28*/28* homozigot ve 10 hasta 1*/28* heterozigot olarak gruplandırılmıştır (Çizelge 4.1).

İrinotekan ilaç yanıtında toksik etkilerin görülmesi *UGT1A1*'in glukuronidasyon aktivitesi ile doğrudan ilişkilidir. *UGT1A1* aktivitesinin düşük olması irinotekan aktif metaboliti SN-38'in glukuronidasyonunu yavaşlatarak SN-38'in vücutta birikmesine ve bunun sonucunda toksik etkilere yol açabilmektedir (Mathijssen vd., 2001). İrinotekan tedavisi alan hastalar *UGT1A1* enzim aktivitesi ile ilgili *UGT1A1* 1*/1* genotipi için hızlı metabolizör, *UGT1A1* 1*/28* genotipi için orta hızlı metabolizör ve *UGT1A1* 28*/28* genotipi için yavaş metabolizör olarak sınıflandırılmıştır. Buna bağlı olarak irinotekan tedavisinde *UGT1A1* polimorfizmine bağlı olarak toksik etki görülme riski hızlı metabolizörler için düşükken, yavaş metabolizörler için yüksek ve orta hızlı metabolizörler için orta riskte belirtilmiştir (Çizelge 4.1).



UGT1A1

Intell.Lot:20438G13N		SampleID:HASTA3	Aug 22,2014	
Magz.Lot:03011520437G12N		RunID: 100006	16:34	
SNo	Analyte	Analysis	RFU	Ratio
1	*1	*28/*28 Homozygote	1.00	3351.00
2	*28		3351.00	0.00
3	*36		1.00	0.00
4	*37		1.00	0.00
5	HYBC		1000.00	0.00
6	BKGD		155.25	0.00

Analyte calls are not dependent on absolute RFU values.

-a-



UGT1A1

Intell.Lot:20438G13N		SampleID:hasta10	Feb 12,2015	
Magz.Lot:03011520437G12N		RunID: 100016	21:27	
SNo	Analyte	Analysis	RFU	Ratio
1	*1	*1/*1 Homozygote	7656.50	7656.50
2	*28		1.00	0.00
3	*36		1.00	0.00
4	*37		1.00	0.00
5	HYBC		1000.00	0.00
6	BKGD		231.00	0.00

Analyte calls are not dependent on absolute RFU values.

-b-



UGT1A1

Intell.Lot:20438G13N		SampleID:hasta12	Feb 12,2015	
Magz.Lot:03011520437G12N		RunID: 100016	21:38	
SNo	Analyte	Analysis	RFU	Ratio
1	*1	*1/*28 Heterozygote	4355.50	1.24
2	*28		3521.00	0.00
3	*36		1.00	0.00
4	*37		1.00	0.00
5	HYBC		1000.00	0.00
6	BKGD		274.50	0.00

Analyte calls are not dependent on absolute RFU values.

-c-

Şekil 4.1. Autogenomics Infiniti cihazı tarafından verilen hasta genotiplendirme sonuçları
(a. Hasta no 3, b. Hasta no 10, c. Hasta no 12)

Çizelge 4.1. Hastalara ait UGT1A1 polimorfizm sonuçları ve beklenen UGT1A1 enzim aktivitesi

Hasta No	UGT1A1 genotip	UGT1A1 enzim aktivitesi	İrinotekan toksik etki görülme riski
1	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
2	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
3	28*/28* homozigot	yavaş metabolizör	Yüksek
4	1*/28* heterozigot	orta hızlı metabolizör	Orta
5	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
6	1*/28* heterozigot	orta hızlı metabolizör	Orta
7	1*/28* heterozigot	orta hızlı metabolizör	Orta
8	1*/28* heterozigot	orta hızlı metabolizör	Orta
9	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
10	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
11	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
12	1*/28* heterozigot	orta hızlı metabolizör	Orta
13	1*/28* heterozigot	orta hızlı metabolizör	Orta
14	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
15	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
16	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
17	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
18	1*/28* heterozigot	orta hızlı metabolizör	Orta
19	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
20	1*/28* heterozigot	orta hızlı metabolizör	Orta
21	1*/28* heterozigot	orta hızlı metabolizör	Orta
22	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
23	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
24	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
25	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
26	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük

Çizelge 4.1. (Devam) Hastalara ait UGT1A1 polimorfizm sonuçları ve beklenen UGT1A1 enzim aktivitesi

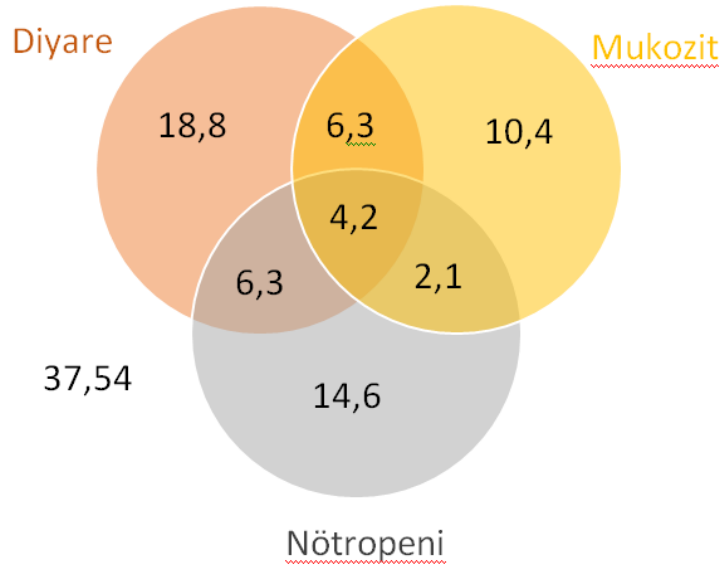
27	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
28	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
29	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
30	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
31	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
32	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
33	1*/28* heterozigot	orta hızlı metabolizör	Orta
34	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
35	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
36	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
37	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
38	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
39	28*/28* homozigot	yavaş metabolizör	Yüksek
40	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
41	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
42	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
43	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
44	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
45	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
46	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük
47	28*/28* homozigot	yavaş metabolizör	Yüksek
48	1*/1* homozigot	hızlı metabolizör	Düşük

Türkiye’de yenidoğanlarla yapılan bir çalışmada; UGT1A1 28*/28* homozigot çekinik genotipin popülasyondaki frekansı %7,5 olarak bulunmuştur (Babaoglu vd., 2006). Çalışmamızda irinotekan tedavisi alan 48 hastaya ait örnekleme UGT1A1 28*/28* homozigot çekinik genotip frekansı %6,5 olarak saptanmıştır. Yaygın olan UGT1A1 1*/1* homozigot baskın polimorfik genotipin frekansı %72.98 iken UGT1A1

1*/28* heterozigot genotip frekansı %20.83 olarak tespit edilmiştir. Gözlemlenen sonuçlar literatür verilerinden çok farklı olmasa da örneklem küçük olduğu için populasyon genetiği analizleri için daha büyük örneklemelere ihtiyaç vardır.

4.1.1. UGT1A1 polimorfizmi ve irinotekan tedavisinde toksik etkilerin ilişkilerinin değerlendirilmesi

UGT1A1 polimorfizmi *28/*28 olan kişilerin irinotekan tedavisinde advers ilaç reaksiyonlarına karşı yüksek risk taşıdığı belirtilmektedir (Innocenti vd., 2004). Çalışmamızda, hastaların UGT1A1 polimorfizmi ile toksik etkiler arasında anlamlı bir istatistiki değer bulunamamıştır. Bunun önemli bir nedeni olarak örneklem küçük olması gösterilebilir. Hasta genotipleri ile toksik etkilerin dereceleri Çizelge 4.2’de verilmiştir. İrinotekan tedavisi alan hastalarda en sık karşılaşılan advers ilaç reaksiyonu diyare (n=17) olmakla beraber, mukozit (n=11) ve nötropeni (n=13) de yoğun olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). Hastaların %43,8’i bu üç yaygın toksik etkilerden sadece birine sahipken, % 14,7’si ikisine, %4,2’si ise üçüne sahiptir. Çalışmamızda hastaların %33,3’ünde hiçbir toksik etki görülmezken %62,46’sında tedavi sırasında bu üç yaygın toksik etki görülmüştür.



Şekil 4.2. İrinotekan tedavisinde görülen en yaygın üç yan etkilerinin kesişimlerine göre yüzde dağılımı

Toksik etkileri değerlendirilen hastaların 3 tanesi dışında hepsi florourasil (5-FU) ve irinotekan kombine kemoterapi tedavisi görmektedir. 5-FU tedavisinde görülen diyare, n troteni, cilt toksitesi gibi yan etkiler irinotekan tedavisinde görülen yan etkiler ile aynıdır. Bu bağlamda, hastalarda görülen yan etkilerin hepsinin irinotekan kaynaklı olduğu kesin olarak saptanamamaktadır.



Çizelge 4.2. UGT1A1 genotipine ve cinsiyete göre yan etkilerin dağılımı, yan etkilerin dereceleri ve yan etki dağılım yüzdeleri

		Diyare				Mukozit				Nötropeni					Trombositopeni				Cilt toksisitesi			Tümör progresyonu	EX
		1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	4	T	1	2	3	T	1	2	T		
Genotip	1*/1* n=35	3	6	1	10	2	1	3	6	3	2	2	2	9	1	0	1	2	2	1	3	4	4
	1*/28* n=10	4	0	2	6	0	3	1	4	2	0	1	0	3	0	0	0	0	1	0	1	1	0
	28*/28* n=3	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Cinsiyet	Kadın	2		2				1				5				0			2			2	4
	Erkek	5		5				2				12				2			2			3	7
	%			35,41				22,92				27,08				4,16			8,33			10,41	10,41
Toplam	n=48	7	7	3	17	2	4	5	11	5	2	3	3	13	1	0	1	2	3	1	4	5	5

4.2. UGT1A1 bisülfıt genomik DNA dizi analizlerine ait bulgular

UGT1A1 enziminin DNA metilasyonu ile epigenetik olarak düzenlendiğine dair yapılan çalışmalar bu genin doku özgü olarak hipermetile veya hipometile edildiğini önermektedir (Oda vd., 2013). Aynı zamanda, transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgesi olan proksimal promotor ve UGT1A1 ifadesi üzerinde etkisi olan distal enhancer bölgelerindeki CpG dinükleotidlerinin metilasyonunun UGT1A1 ifadesi üzerine pozitif veya negatif etki edebileceği düşünülmektedir (Gagnon vd., 2006). Çalışmamızda; hastalara ait kan ve kolon doku örneklerinden ayrı ayrı proksimal promotor ve distal enhancerda yer alan CpG dinükleotidlerinin DNA metilasyonları incelenmiştir. Bu amaçla, ilk olarak DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA metilasyon analizinde kullanılan DNA izolatlarının nanodrop sonuçları Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. DNA örneklerine ait nanodrop sonuçları

Sayı	Hasta No	Örnek	DNA konsantrasyonu (ng/µl)
1	HN 3	Kan örneği	3,5
2	HN 4	Kan örneği	12,3
3	HN 12	Kan örneği	8,2
4	HN 32	Kan örneği	12,7
5	HN 34	Kan örneği	8,4
6	HN 35	Kan örneği	22,1
7	HN 37	Kan örneği	9,1
8	HN 38	Kan örneği	11,9
9	HN 43	Kan örneği	16,2
10	HN 3	Doku örneği 21258/14	0,9
11	HN 4	Doku örneği 6498/14/9	24,2
12	HN 4	Doku örneği 6498/14/12	15,2
13	HN 12	Doku örneği 45740/T3	52,5
14	HN 12	Doku örneği 45740/T4	18

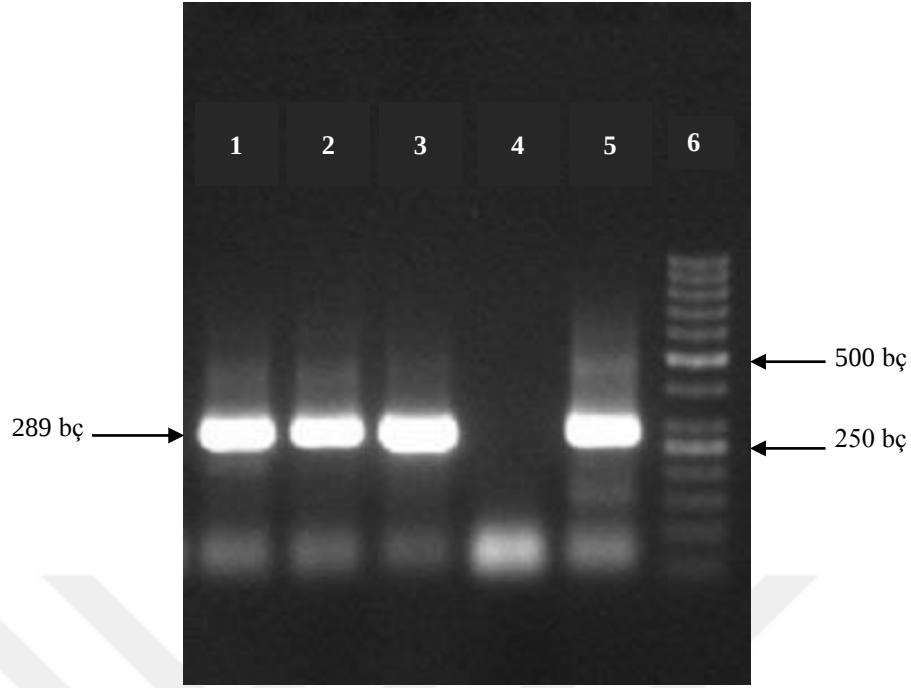
Çizelge 4.3. (Devam) DNA örneklerine ait nanodrop sonuçları

15	HN 32	Doku örneği 28811/9	7,6
16	HN 34	Doku örneği 41504/8	40
17	HN 34	Doku örneği 31049	35,2
18	HN 35	Doku örneği 29809/2	29,7
19	HN 35	Doku örneği 29809/3	28,3
20	HN 37	Doku örneği 22987/6	68,3
21	HN 38	Doku örneği 38973/8	91,3
22	HN 43	Doku örneği 42012/26	54,3

İzole edilen genomik DNA'lar bisülfite modifikasyona maruz bırakılmıştır. Bisülfite modifikasyon ile genomdaki metillenmemiş sitozinler timine dönüşürken metillenmişler sitozin olarak kalmıştır. Bisülfite modifiye DNA'lar proksimal promotordaki -3, - 4 CpG bölgeleri ve distal enhancerdaki -28, -29 ve -30 CpG bölgeleri için ayrı ayrı PZR amplifikasyonu ile çoğaltılmış ve DNA dizi analizi yapılarak yorumlanmıştır.

4.2.1. UGT1A1 promotor CpG bölgelerine ait metilasyon sonuçları

UGT1A1 enziminin DNA metilasyonu yolu ile epigenetik düzenlenmesinde, translasyon başlama noktasından (0), 69 bp üst akış yönünde yer alan 3. CpG ve 100 bp üst akış yönünde yer alan 4. CpG dinükleotidleri incelenmiştir. Bu dinükleotidlerin transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasında etkili olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışmamızda kan ve doku örneklerine ait genomik DNA'lar bisülfide maruz bırakıldıktan sonra nested PZR ile bu bölge çoğaltılmıştır. Nested PZR'ın 2. döngüsünün sonunda 289 bp'lık PZR ürünleri agaroz jelde görüntülenmiş, görüntülenemeyenler tekrar edilmiştir (Görsel 4.1).



Görsel 4.1. DNA dizi analizi yapılan kolon doku örneklerine ait 289 bp'lik F2R2 PZR ürünleri. Sırasıyla; 1; HN4-12, 2; HN12-T3, 3; HN12-T4, 4; HN32 (tekrar edildi), 5; HN34-8, 6; M

PZR ürünleri doğrudan saflaştırılıp DNA dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizleri bisülfite modifikasyona uğramamış UGT1A1 gen bölgesi ile karşılaştırılmıştır (http-8) (Görsel 4.2).

Aynı zamanda FinchTV programı ile DNA dizi sonuçlarının sitozin sinyalleri her örnek için ayrı ayrı değerlendirilmiştir (Görsel 4.3).

Kan örneklerinden yapılan DNA dizi analizi sonucunda 9 hastaya ait kan örneklerinin hepsinde -4 CpG ve -3 CpG dinükleotidlerinin metile olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4).



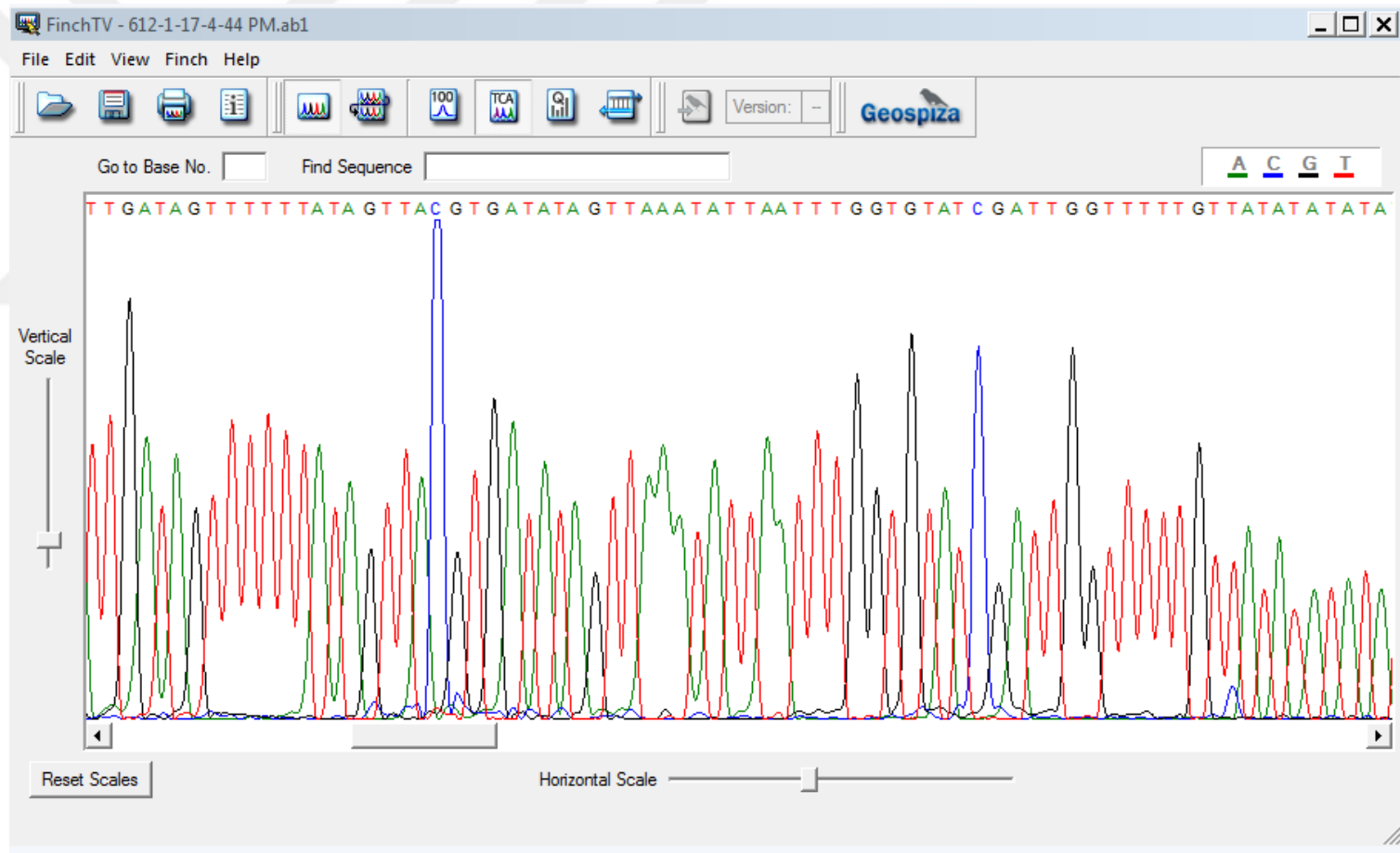
Homo sapiens UDP glucuronosyltransferase family 1 member A1 (UGT1A1), RefSeqGene (LRG_733) on chromosome 2
Sequence ID: [NG_033238.1](#) Length: 20027 Number of Matches: 1

Range 1: 4782 to 5024 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

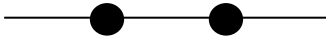
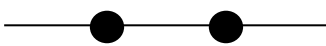
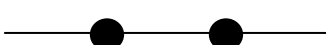
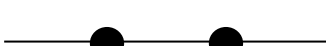
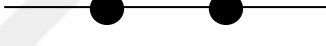
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
145 bits(160)	5e-31	183/243(75%)	10/243(4%)	Plus/Plus
Query 7	AACGTGATTTGAGT-TGACTTT--AGTTAgtttat-tgttggtggttatta-gat---tt	58		
Sbjct 4782	AATGTGATTTGAGTATGAAATTCAGCCAGTTCACCTGTTGTTGCCTATTAAGAAACCTA	4841		
Query 59	ataaagttttatccccctt-atTTTTgaa-gtgaattttttgttatttttgtggattgata	116		
Sbjct 4842	ATAAAGCTCCACCTTCTTATCTCTGAAAGTGAACCTCCCTGCTACCTTTGTGGACTGACA	4901		
Query 117	gttttttatAGTTACGTGATATAGTTAAATATTAATTTGGTGTATCGATTGGTTTTTGTt	176		
Sbjct 4902	GCTTTTATAGTCACGTGACACAGTCAAACATTAACCTGGTGTATCGATTGGTTTTTGCC	4961		
Query 177	atatatatatatatatGTAGGAGAGCGCGTATTTTAGGTAGGAGTAAACGCGTTATGGTT	236		
Sbjct 4962	ATATATATATATATAAGTAGGAGAGGGCGAACCTCTGGCAGGAGCAAAGGCGCCATGGCT	5021		
Query 237	GTG 239			
Sbjct 5022	GTG 5024			

Görsel 4.2. DNA dizileme sonuçlarının NCBI-Blast ile hizalanması



Görsel 4.3. HN 35 kan örneği için -3 ve -4 CpG dinükleotidlerinde yer alan metilenmiş sitozinler, mavi sinyal sitozini göstermektedir

Çizelge 4.4. Kan örneklerinden *UGT1A1* -3 ve -4 CpG bölgelerine ait metilasyon paterni

Sayı	Hasta No	Örnek	-4 ve -3 CpG metilasyonu
1	HN 3	Kan örneği	
2	HN 4	Kan örneği	
3	HN 12	Kan örneği	
4	HN 32	Kan örneği	
5	HN 34	Kan örneği	
6	HN 35	Kan örneği	
7	HN 37	Kan örneği	
8	HN 38	Kan örneği	
9	HN 43	Kan örneği	

Kolon doku örneklerinden *UGT1A1* gen bölgesi -4 ve -3 CpG dinükleotidlerinin metilasyon analiz sonuçları Çizelge 4.5’de verilmiştir. -4 CpG dinükleotidinin bütün kolon doku örneklerinde ya tamamen metillendiği ya da kısmen metillendiği tespit edilmiştir. -3 CpG dinükleotidinin kolon doku örneklerinde 13 örnekten 4’ünde metillenmediği, 4’ünde kısmen metillendiği, 5’inde ise metillendiği görülmüştür. Aynı hastalara ait farklı kolon doku örneklerinde kısmi metillenmeler dışında farklılık görülmemiştir. Kolon doku örneklerinden yapılan analiz, 9 hastanın toplamda 13 doku örneğine ait -4 CpG dinükleotidinin 3 tanesinin kısmen metillenmesi dışında, hepsinin tamamen metillenmesi bu bölgenin kolon dokuda kontrollü olarak metillendiğini ve gen ifadesinde rol aldığını göstermektedir.

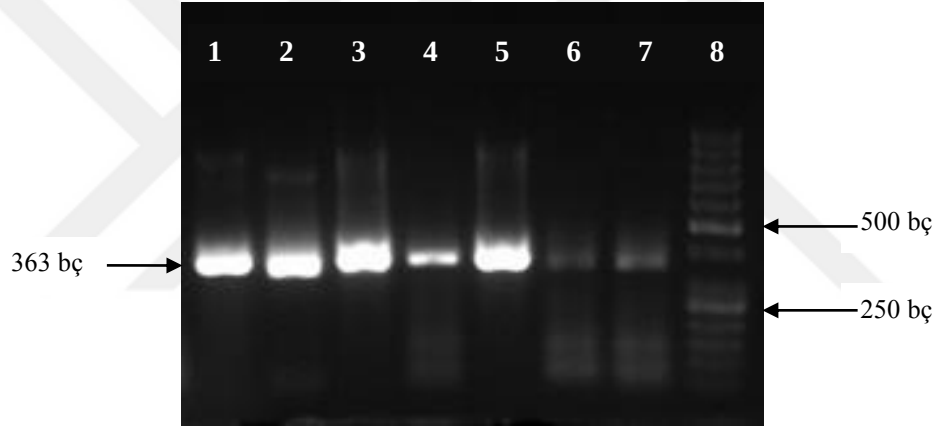
Çizelge 4.5. Kolon doku örneklerinden *UGT1A1* -3 ve -4 CpG bölgelerine ait metilasyon paterni

Sayı	Hasta No	Örnek	-4 ve -3 CpG metilasyonu
10	HN 3	Doku kesiti – 21258	
11	HN 4	Doku kesiti – 6498/9	
12	HN 4	Doku kesiti – 6498/12	
13	HN 12	Doku kesiti – T3	
14	HN 12	Doku kesiti – T4	
15	HN 32	Doku kesiti – 28811/9	
16	HN 34	Doku kesiti – 41504/8	
17	HN 34	Doku kesiti - 31049	
18	HN 35	Doku kesiti – 29809/2	
19	HN 35	Doku kesiti – 29809/3	
20	HN 37	Doku kesiti – 22987/6	
21	HN 38	Doku kesiti – 38977/8	
22	HN 43	Doku kesiti – 42012/26	

Proksimal promotorda -4 ve -3 CpG dinükleotidleri için yaptığımız DNA metilasyon analizleri bu dinükleotidlerin doku özgü metillendiğini düşündürmüştür. *UGT1A1*'in kan plazmasında ifadesi bulunmamaktadır (http-9). Literatürde, *UGT1A1* için kan örneklerinden DNA metilasyonu incelemesi yapılmamıştır. 9 hastanın hepsinin kan örneklerinde iki dinükleotid için de metilasyonun bulunması proksimal promotor bölgesinin hipermetile olup DNA metilasyonu ile epigenetik olarak gen ifadesinin susturulduğunu düşündürmektedir.

4.2.2. UGT1A1 enhancer CpG bölgelerine ait metilasyon sonuçları

UGT1A1 enziminin DNA metilasyonu yolu ile epigenetik düzenlenmesinde, distal enhancerda translasyon başlama noktasının (0), 3329 bç üst akış yönünde yer alan 28. CpG, 3341 bç üst akış yönünde yer alan 29. CpG ve 3436 bç üst akış yönünde yer alan 30. CpG dinükleotidlerinin metilasyonu incelenmiştir. Çalışmamızda kan ve doku örneklerine ait genomik DNA'lar bisülfide maruz bırakıldıktan sonra nested PZR ile bu bölge çoğaltılmıştır. Nested PZR sonunda 2. döngü PZR ürünleri agaroz jelde görüntülenmiş, görüntülenemeyenler tekrar edilmiştir (Görsel 4.4). 2. döngü sonunda 363 bç'lik PZR ürünlerinin sekans analizi yapılmıştır.



Görsel 4.4. DNA dizi analizi yapılan kan örneklerine ait 363 bç'lik F4R4 PZR ürünleri. Sırasıyla; 1; HN12, 2; HN32, 3; HN34, 4; HN35, 5; HN37, 6; HN38, 7; HN43, 8; M.

DNA dizi analizi sonucunda 9 hastaya ait kan örneklerinin distal enhancer bölgesinde yer alan -30 CpG, -29 CpG ve -28 CpG dinükleotidlerinin metilasyon sonucu Çizelge 4.6'da verilmiştir (Çizelge 4.6). Hasta kan örneklerinin hepsinde -29 CpG ve -28 CpG dinükleotidi için metilasyon tespit edilmiştir. -30 CpG dinükleotidi için 2 örnek metillenmemiş ve 1 örnek kısmi metilenmişken diğer örneklerin hepsi metillenmiştir.

Çizelge 4.6. Kan örneklerinden *UGT1A1* -30 -29 ve -28 CpG bölgelerine ait metilasyon paterni

Sayı	Hasta No	Örnek	-30, -29 ve -28 CpG metilasyonu
23	HN 3	Kan örneği	
24	HN 4	Kan örneği	
25	HN 12	Kan örneği	
26	HN 32	Kan örneği	
27	HN 34	Kan örneği	
28	HN 35	Kan örneği	
29	HN 37	Kan örneği	
30	HN 38	Kan örneği	
31	HN 43	Kan örneği	

Kolon doku örneklerinden *UGT1A1* gen bölgesi -30 -29 ve -28 CpG dinükleotidlerinin analiz sonuçları Çizelge 4.7’de verilmiştir. -28 CpG dinükleotidi için kolon doku örneklerinden HN38-38977/8’in kısmi metillenmesi dışında bütün örnekler metillenmiştir. -29 CpG dinükleotidi için 13 doku örneğinden 3’ünün (HN 4-6498/9, HN 35-29809/3 ve HN 38-38977/8) kısmi metillenmesi dışında hepsi metillenmiştir. -30 CpG dinükleotidi için 8 örnek kısmi metillenirken 2 örnek metillenmiş ve 3 örnek metillenmemiştir.

Çizelge 4.7. Kolon doku örneklerinden *UGT1A1* --28, -29 ve -30 CpG bölgelerine ait metilasyon paterni

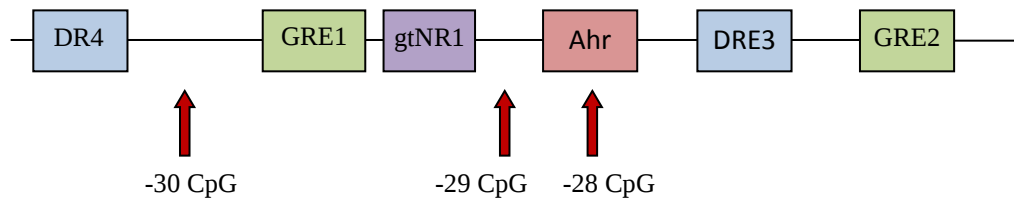
Sayı	Hasta No	Örnek	-30, -29 ve -28 CpG metilasyonu
32	HN 3	Doku kesiti – 21258	
33	HN 4	Doku kesiti – 6498/9	
34	HN 4	Doku kesiti – 6498/12	
35	HN 12	Doku kesiti – T3	
36	HN 12	Doku kesiti – T4	
37	HN 32	Doku kesiti – 28811/9	
38	HN 34	Doku kesiti – 41504/8	
39	HN 34	Doku kesiti - 31049	
40	HN 35	Doku kesiti – 29809/2	
41	HN 35	Doku kesiti – 29809/3	
42	HN 37	Doku kesiti – 22987/6	
43	HN 38	Doku kesiti – 38977/8	
44	HN 43	Doku kesiti – 42012/26	

Kan örneklerinde CpG dinükleotidleri için yüksek metilasyon profili olması *UGT1A1* proteininin kanda ifadesinin olmaması ile ilişkilendirilebilir. Aynı şekilde kolonda düşük enzim aktivitesi gösteren *UGT1A1* için kolon dokuda DNA metilasyonu ile kontrollü bir epigenetik düzenleme olduğu önerilebilir. Kan örneklerinde analiz edilen CpG dinükleotidlerine oranla kolon dokudaki örneklerde transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri olan proksimal promotordaki CpG’lerin bir kısmının metile olup bir kısmının olmaması bu epigenetik düzenlemeye işaret etmektedir.

UGT1A1 geninde proksimal promotorda -4 CpG ve -3 CpG dinükleotidleri arasında bağlanan hepatosit nükleer faktör 1 α (HNF1 α), *UGT1A1*’in transkripsiyonunu arttırmakla kalmayıp enhancer bölgesindeki fenobarbital duyarlı enhancer modülünün (gtPBREM kompoziti) bağlanmasını pozitif yönde etkilemektedir. -4 CpG ve -3 CpG dinükleotidlerindeki metilasyonun HNF-1 transkripsiyon faktörünün bağlanmasını

etkileyerek UGT1A1 ifadesinde rol alabileceği önerilmektedir (Sugatani, 2008). Çalışmamızda kolon dokuda -3 CpG dinükleotidinde örnekler arası çeşitli sonuçlar görülürken -4 CpG dinükleotidinde metilasyon tespit edilmesi kolon dokuda UGT1A1 ifadesinin proksimal promotorda bu bölgeden kontrol edilebileceğini düşündürmektedir. UGT1A1 transkripsiyonu gerçekleşmeyen kan örneklerinde promotor bölgedeki -4 CpG ve -3 CpG dinükleotidlerinin tamamen metile olması bu bölgede metilasyonun HNF-1 transkripsiyon faktörünün bağlanmasını engelleyerek UGT1A1 ifadesini negatif regüle ettiği teorisini desteklemektedir.

Enhancer bölgesindeki gtPBREM kompoziti, konstitütif androstan reseptörü (CAR) ve pregnan X reseptörü (PXR) tarafından regüle edilmektedir. Bu enhancer bölgesinin transkripsiyonu sonucu HNF-1'in promotor bölgeye bağlanmasının iki kat arttığı gösterilmiştir (Sugatani, 2008). gtPBREM kompoziti altı adet nükleer reseptör motiften (DR4 elementi (CAR), gtNR1 (CAR, PXR), DR3 element (CAR, PXR), glukokortisoid reseptör 1 ve 2 (GRE1 ve GRE2) ve aril hidrokarbon reseptörü (Ahr)) oluşmaktadır (Sugatani vd., 2005; Yueh vd., 2003). Yapılan çalışmalarda gtPBREM kompozitinde enhancer bölgeye DR3'ün en güçlü bağlandığı ve buradaki değişimlerin UGT1A1 transkripsiyonunda etkili olabileceği önerilmiştir. -30 CpG dinükleotidi DR4 ve GRE1'nin bağlanma bölgeleri arasında bulunurken, -29 CpG dinükleotidi DR3 ve Ahr bağlanma bölgeleri arasında yer almaktadır. -28 CpG dinükleotidi ise Ahr bağlanma bölgesi üzerindedir (Sugatani, 2008) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Distal enhancerda gtPBREM kompozitinin modülleri ve CpG dinükleotidlerinin yer aldığı bölgeler

Çalışmamızda kan ve kolon doku örneklerinin hepsinde -28 CpG bölgesinin metillenmiş olması, enhancer bölgesindeki gtPBREM kompozitinin regülasyonunda Ahr-ilişkili bir epigenetik düzenleme olabileceğine işaret etmektedir. Aynı şekilde -29

CpG bölgesinin kan örneklerinde tamamen metillenmiş ve kolon doku örneklerinde 3 kısmi metillenme dışındaki örneklerde tamamen metillenmiş olması DR3 ilişkili bir negatif yönde epigenetik düzenleme olabileceğini düşündürmüştür.

Yapılan analizler sonucunda - 30 CpG dinükleotidi için UGT1A1 regülasyonunda etkin bir rol aldığı söylenememekle beraber bu dinükleotidin doku özgü metillenmeye maruz kaldığı önerilebilir.

4.2.3. CpG dinükleotidleri arasında korelasyon

Kan örneklerine ve kolon doku örneklerine ait 5 CpG dinükleotidi için SPSS Programında Spearman korelasyon analizi yapılmıştır. Kan örneklerinde çoğu bölgeler metilasyon pozitif olduğu için korelasyon katsayısı hesaplanamamıştır. Doku örneklerinde yapılan analize ait Spearman korelasyon katsayıları ve anlamlılık değerleri Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Kolon doku örneklerine ait CpG bölgelerinin metilasyon profilinin korelasyonu

		-3 CpG metilasyon	-4 CpG metilasyon	-28 CpG metilasyon	-29 CpG metilasyon	-30 CpG metilasyon
-3 CpG metilasyon	Korelasyon katsayısı	1.000	0.078	0.368	0.052	0.467
	Sig. (2-tailed)		0.801	0.216	0.867	0.107
	N	13	13	13	13	13
-4 CpG metilasyon	Korelasyon katsayısı	0.078	1.000	-0.158	-0.300	-0.056
	Sig. (2-tailed)	0.801		0.606	0.319	0.855
	N	13	13	13	13	13
-28 CpG metilasyon	Korelasyon katsayısı	0.368	-0.158	1.000	0.527	0.444
	Sig. (2-tailed)	0.216	0.606		0.064	0.129
	N	13	13	13	13	13
-29 CpG metilasyon	Korelasyon katsayısı	0.052	-0.300	0.527	1.000	0.225
	Sig. (2-tailed)	0.867	0.319	0.064		0.461
	N	13	13	13	13	13
-30 CpG metilasyon	Korelasyon katsayısı	0.467	-0.056	0.444	0.225	1.000
	Sig. (2-tailed)	0.107	0.855	0.129	0.461	
	N	13	13	13	13	13

Kan örnekleri ve kolon doku örneklerindeki 5 CpG dinükleotidi arasında yapılan korelasyon sonuçları istatistiki olarak anlamsız çıkmıştır ($p<0.05$). Doku örneklerinde -28 ve -29 CpG dinükleotidleri arasında zayıf bir pozitif korelasyon tespit edilmiştir (sig. 0.064, $p<0.1$). Metilasyon çalışmalarında korelasyon analizlerinin yapılabilmesi için CpG dinükleotidlerinin metilasyon yüzdeleri çıkartılmalıdır. Çalışmamızda kullanılan yöntemde metilasyon sonuçları pozitif, kısmi ve negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle CpG dinükleotidleri arasında korelasyon analizleri verimli olmamıştır.

4.3. UGT1A1 protein ifadesi analizleri

UGT1A1 enzim aktivitesinin en yoğun gerçekleştiği yer karaciğerdir. UGT1A1 aynı zamanda karaciğerdeki kadar aktif olmasa da böbreklerde, kolonda ve beyinde de ifade edilmektedir (http-9). Çalışmamızda irinotekan tedavisi alan hastaların Patoloji Birimi'ndeki örneklerinden UGT1A1'in kolon dokudaki protein ifadesi incelenmiştir.

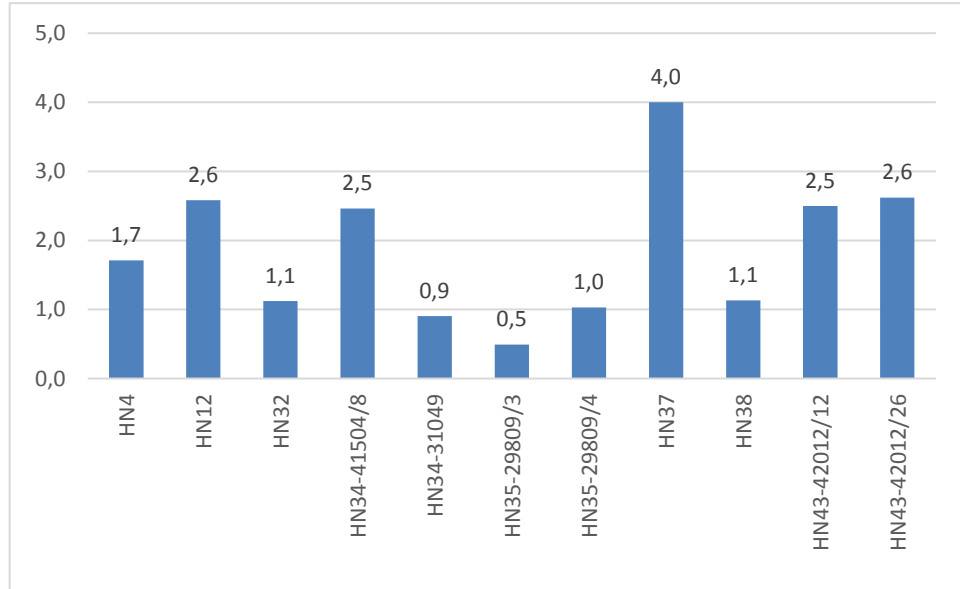
4.3.1. Protein izolasyonu Qubit sonuçları

Kolon dokudaki UGT1A1 epigenetik düzenlemesini araştırmak için hastaların kolonlarından alınan FFPE örneklerinde UGT1A1 seviyesi analiz edilmiştir. Bu bağlamda hastaların Patoloji Birimi'nden sağlanan örneklerinden protein izolasyonu gerçekleştirilmiş ve izole edilen toplam proteinlerin miktarı Qubit Sistemi'nde ölçülmüştür (Çizelge 4.9).

Qubit Sistemi'nde ölçülen toplam protein miktarları, biyopsi örnekleri ile çalışılan HN34-31049, HN35-29809/3 ve HN35-29809/4 kesitlerinden çok az protein izole edilebildiğini göstermiştir (Şekil 4.4). Bu da bu tarz protein çalışmalarında biyopsi yerine rezeksiyon kesitlerinin daha verimli olacağına işaret etmektedir.

Çizelge 4.9. Protein izolatlarının miktarı

Sayı	Hasta No	Kesit No	Qubit tüp konsantrasyonu (µg/µl)
1	HN4	6498/9	1,71
2	HN12	T1+T2	2,58
3	HN32	28811/9	1,12
4	HN34	41504/8	2,46
5	HN34	31049	0,902
6	HN35	29809/3	0,49
7	HN35	29809/4	1,03
8	HN37	22987/6	4,00
9	HN38	38973/5	1,13
10	HN43	42012/12	2,5
11	HN43	42012/26	2,62

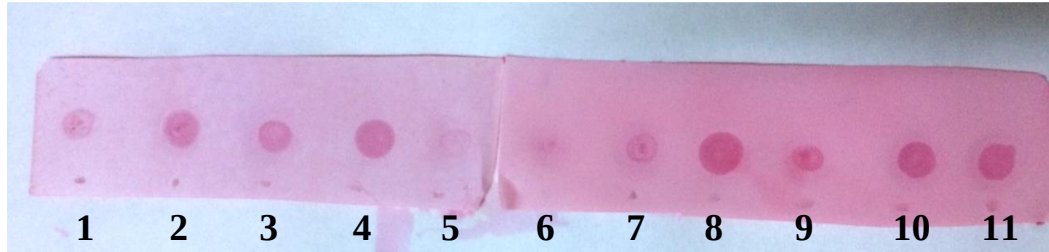


Şekil 4.4. Protein izolatlarının Qubit sistemindeki değerleri (µg/µl)

FFPE doku örneklerinden toplam protein izolasyonu sırasında proteinlerde yüksek seviyede kovalent çapraz bağlanmaları ve degradasyon olabilmektedir. Proteinlerin izolasyonu sırasında kolon doku kesitlerinin formalinde bekletilme süresi, kesitlerin uzun zaman saklanması, örneklerin kesit boyutu, lamdan kazıma gibi süreçler her örnek için değişkenlik göstermekle beraber proteinlere zarar vermiş olabilir. Bu nedenle protein analizlerinde düşük protein miktarları ile çalışılabilmektedir. Çalışmamızda toplam protein miktarı en düşük üç örnek (HN34-31049, HN35-29809/3 ve HN35-29809/4) biyopsi örnekleridir. Bunun yanı sıra HN4-6498/9, HN32-28811/9, HN35-29809/3, HN37-22987/6 ve HN43-42012/26 no'lu örnekler için elimizdeki kesitlerin yarısından protein izolasyonu yapılmış, diğer yarısı DNA analizlerinde kullanılmıştır.

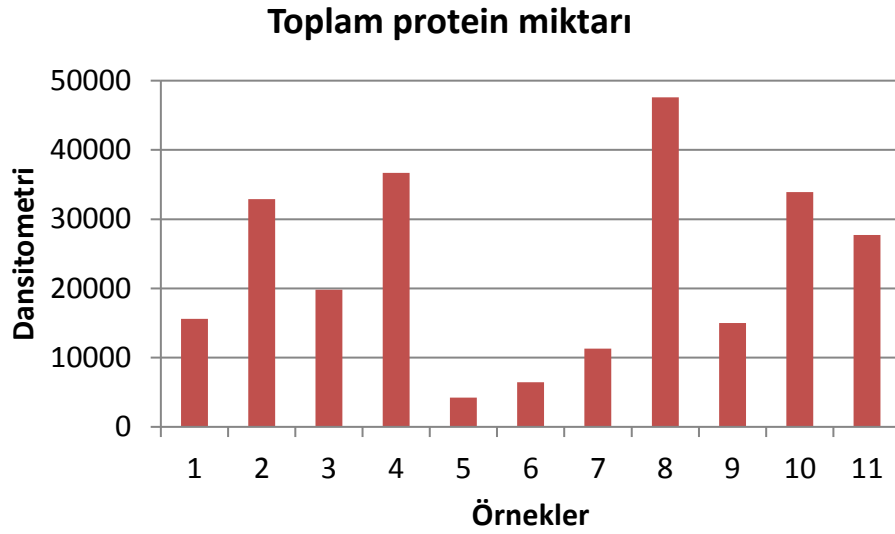
4.3.2. Dot blot sonuçları

İzole edilen toplam protein örnekleri nitroselüloz membrana damlatılmıştır. Daha sonra membran yıkanıp ponceau boyası ile boyandığında proteine bağlanan yerler çıplak gözle görülebilmektedir (Görsel 4.5).



Görsel 4.5. Ponceau boyası ile dot blot analizi yapılan proteinlerin görüntüsü; 1; HN4-6498/9, 2; HN12-T1+T2, 3; HN32-28811/9, 4; HN34-41504/8, 5; HN34-31049, 6; HN35-29809/3, 7; HN35-29809/4, 8; HN37-22987/6, 9; HN38-38973/5, 10; HN43-42012/12, 11; HN43-42012/26

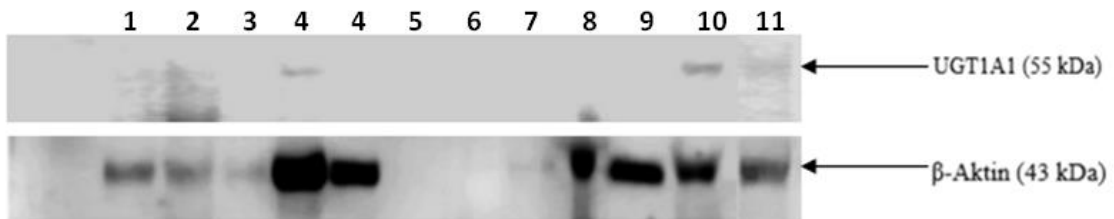
Dot blot sonuçları Image J programında dansitometrik olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.5). Buna göre Qubit sistemindeki toplam protein yoğunluğu ile dot blot sonuçları doğrulanmıştır.



Şekil 4.5. Ponceau boyası ile dot blot analizi yapılan proteinlerin Image J programı ile değerlendirilmesi; 1; HN4-6498/9, 2; HN12- T1+T2, 3; HN32-28811/9, 4; HN34-41504/8, 5; HN34-31049, 6; HN35-29809/3, 7; HN35-29809/4, 8; HN37-22987/6, 9; HN38-38973/5, 10; HN43-42012/12, 11; HN43-42012/26

4.3.3. Western blot sonuçları

UGT1A1 geni için DNA metilasyon analizi yapılan hastaların kolon doku örneklerinde de *UGT1A1* protein ifadesini araştırmak üzere Western blot analizi yapılmıştır. FFPE örneklerden izole edilen toplam proteinler az miktarda olduğu için maksimum hacimde (20 µl) kuyulara uygulanmıştır. İlk önce *UGT1A1* birincil antikoruna ile çalışılmış, daha sonra aynı membranlar striplenip β -aktin birincil antikoruna ile çalışılmıştır. Her örneğin kendi içinde β -aktin seviyeleri esas alınarak normalizasyonu gerçekleştirilmiştir. Western blot analizlerinde kolon doku biyopsi örnekleri olan HN34-3104 ve HN35-29809/3'den β -aktin antikoruna için hiç sinyal alınamaması (Görsel 4.6), bu örneklerin protein miktarının western blot analizi için yetersiz olduğunu göstermektedir. Aynı sorun HN37-22987/6 örneği için de söylenebilir.



Görsel 4.6. *UGT1A1* ve β -aktin Western blot görüntüsü; 1; HN4-6498/9, 2; HN12- T1+T2, 3; HN32-28811/9, 4; HN34-41504/8, 5; HN34-31049, 6; HN35-29809/3, 7; HN35-29809/4, 8; HN37-22987/6, 9; HN38-38973/5, 10; HN43-42012/12, 11; HN43-42012/26

Diğer örneklerin UGT1A1 antikoru ile muamelesi sonucu sadece toplam protein miktarı yoğun olanlarda düşük konsantrasyon sinyali verebilen silik bantlar elde edilebilmiştir (Görsel 4.6, Çizelge 4.10). Bunun nedeni olarak baskılanmış UGT1A1 ifadesi dışında FFPE örneklerden protein izolasyonunun hassas ve verimsiz bir süreç olduğu gösterilebilir.

Çizelge 4.10. Western blot analizi sonucu görüntülenebilen UGT1A1 miktarları karşılaştırılması

	HN4- 6498/9	HN12- T1+T2	HN34- 41504/8	HN43- 42012/12	HN43- 42012/26
UGT1A1/β-aktin densitometri	0,044	0,1	0,14	0,03	0,6
Toplam Protein miktarı (µg/20 µl)	34,2	51,6	49,2	50	52,4
% UGT1A1	0,129	0,193	0,284	0,77	1,145

Western blot sonuçlarında 5 örneğe (HN4-6498/9, HN12- T1+T2, HN34-41504/8, HN43-42012/12, HN43-42012/26) ait UGT1A1 proteini görüntülenebilmiştir. Örnekleri kendi aralarında kıyasladığımızda UGT1A1 1*/28* heterozigot genotipine sahip HN4-6498/9 ve HN12- T1+T2’de, diğer 1*/1* homozigot genotipine sahip HN34 ve HNA43 örneklerine göre daha az UGT1A1 ifadesi tespit edilmiştir.

Kolon doku örneklerinde metilasyon profili ve UGT1A1 ifadesi ilişkisi değerlendirildiğinde HN34 ve HN43’deki metilasyon profilinin HN4 ve HN12’dekine göre daha demetile olduğu görülmektedir. Bu veriler ile DNA düzeyinde CpG metilasyonunun UGT1A1 ifadesi için baskılayıcı bir faktör olduğu önerilebilse de teoremin anlamlılık kazanması için daha fazla örneklerle çalışılmalıdır.

HN43’e ait 2 adet 42012/12 ve 42012/26 kolon doku örneklerinde tümör oranları sırasıyla % 30 ve % 60’dır. UGT1A1 protein seviyesindeki farklılığı doğrudan bu tümör oranına bağlanması için yetersiz kanıt olsa da kanserleşmenin savunma enzimleri üzerine etkisinin daha ileri analizlerle araştırılması gerekmektedir.

Western blot analizleri sırasında yaşanan teknik zorluklar (protein miktarının az olması, degradasyon vb) nedeniyle sonuçları değerlendirirken örneklem içerisinde

genelleme yapılması doğru değildir. UGT1A1 proteini görüntülenemeyen örnekler için UGT1A1 ifadesinin olmadığı yönünde bir tespit yanlış olur.

4.4. UGT1A1 ifadesini etkileyebilecek faktörlerin değerlendirilmesi

Kan ve kolon doku CpG metilasyon paterni ile yaş, cinsiyet, UGT1A1 polimorfizmi ve irinotekan tedavisindeki toksik etki arasında anlamlı bir ilişki bulunmamasına rağmen CpG metilasyon bölgelerinin doku özgü bir metilasyona uğradığı önerilebilir (Çizelge 4.11). İrinotekan biyotransformasyonu UGT1A1 tarafından karaciğerde gerçekleştirildiği için kanda ve kolon dokuda analiz edilen UGT1A1 seviyesi ve bu seviyeyi etkileyen faktörleri doğrudan ilaç yanıtı ile ilişkilendirmek doğru olmaz.

Kolon dokudan yapılan analizler UGT1A1'in promotor bölgede özellikle -4 CpG ve distal enhancerda -28 CpG ve -29 CpG metilasyonu ile negatif şekilde regüle edilebileceğini göstermiştir. Bu bağlamda bu bölgeler için metilasyon pozitif örneklerle kolon kanseri tedavisinde hedefleme yolu ile irinotekan verilmesi stratejik bir tedavi yolu olmayacaktır. Çünkü kolon dokuda UGT1A1 ifadesi olsa da metilasyon yolu ile baskılanmaktadır.

Çizelge 4.11. CpG metilasyon paternleri ile yaş, cinsiyet, UGT1A1 polimorfizmi ve irinotekan tedavisindeki toksik etki

Hasta no	Doku- Tümör yüzdesi (-30, -29, -28, -4, -3 CpG)	Kan (-30, -29, -28, -4, -3 CpG)	Cinsiyet	Genotip	Yaş	Toksik etki
HN 3	Doku kesiti – 21258 - % 80 		E	28*/28*	54	+
HN 4	Doku kesiti – 6498/9 - % 50 Doku kesiti – 6498/12 - % 70 		E	1*/28*	58	+
HN 12	Doku kesiti – T3 - % 100 Doku kesiti – T4 - % 90 		K	1*/28*	57	+
HN 32	Doku kesiti – 28811/9 - % 50 		K	1*/1*	64	-
HN 34	Doku kesiti – 41504/8 - % 50 Doku kesiti – 31049 - % 100 		K	1*/1*	56	+
HN 35	Doku kesiti – 29809/2 – Displazi Doku kesiti – 29809/3 – 0 		E	1*/1*	59	+
HN 37	Doku kesiti – 22987/6 - % 40 		E	1*/1*	65	+
HN 38	Doku kesiti – 38977/8 - % 10 		K	1*/1*	42	-
HN 43	Doku kesiti – 42012/26 - % 60 		E	1*/1*	57	-

DNA metilasyonu analizi yapılan hastaların biri dışında hepsinin İstanbul dışı doğumlu olması bölgesel popülasyon analizlerindeki verilerin bölge insanı ile doğrudan ilişkilendirilemeyeceğini göstermektedir. Sigara, alkol, kafein, et ve sebze tüketimi ile UGT1A1 CpG metilasyonları ve irinotekan ilaç cevabı arasında çoklu (multinomial) veya ikili (binary) lojistik regresyon analizi yapılmış ve bir ilişki bulunamamıştır (Çizelge 4.12 ve Çizelge 4.13). Odds oranlarının (tahmini rölatif risk) hiçbirisi istatistiki olarak anlamlı değildir.

	Odds oranı	%95 güven aralığı
Cinsiyet		
Kadın	1,000	
Erkek	1,324	(0,209-8,371)
Sigara		
Yok	1,000	
Orta	0,590	(0,028-12,327)
Çok	0,089	(0,005-1,672)
Alkol		
Yok	1,000	
Az	1,018	(0,066-15,649)
Orta	2363137203,617	(0,000-.)
Kafein		
Yok	1,000	
Az	1,056	(0,050-22,274)
Orta	1,217	(0,053-27,828)
Çok	0,000	(0,000-.)
Et		
Yok	1,000	
Az	2808045502036880000,000	(0,000-.)
Orta	10631602920,122	(0,000-.)
Çok	3290829981708340000000000000000	(0,000-.)
	0000000,000	
Sebze		
Az	2,784	(0,000-.)
Orta	0,921	(0,134-6,321)
Çok	1,000	
Nagelkerke R ²	0,470	
-2 LogLikelihood	41,271	

Çizelge 4.13. Çoklu (multinomial) veya ikili (binary) lojistik regresyon modeli sonuçları, *** $p \leq 0.000$. Diğer durumlarda anlamlı değildir, referans kategoriler italik yazıyla gösterilmiştir.

	Multinomial model: -3 metilasyon (referans kategori 3): Metilasyonun olmamasına göre olması (3'e göre 1)		Binary model: - 4 metilasyon (referans kategori 2): Metilasyonun kısmi olmasına göre tam olması (2'ye göre 1)		- 28 metilasyon (değişmediği için model oluşturulamamıştır)		Binary model: 29metilasyon (referans kategori 2): Metilasyonun kısmi olmasına göre tam olması(2'ye göre 1)		Multinomial model: 30metilasyon (referans kategori 3): Metilasyonun olmamasına göre olması(3'e göre 1)	
	Odds oranı	%95 güven aralığı	Odds oranı	%95 güven aralığı	Odds oranı	%95 güven aralığı	Odds oranı	%95 güven aralığı	Odds oranı	%95 güven aralığı
Yaş										
42-57	1,000		1,000				1,000		1,000	
58-65	6863893019968 72,000	(0,000-.)	1,000	(0,000-.)			1,000	(0,000-.)	1,000	(0,000-.)
Cinsiyet										
<i>Kadın</i>	1,000		1,000				1,000		1,000	
Erkek	0,000	(0,000-.)	807737310,728	(0,000-.)			807737397 ,947	(0,000-.)	36556017, 446	(0,000-.)
Sigara										
<i>Yok</i>	1,000		1,000				1,000		1,000	
Orta	0,000	(0,000-.)	0,000	(0,000-.)			1,000	(0,000-.)	1,000	(0,000-.)
Çok	0,281	(0,000-.)	1,000	(0,000-.)			1,000	(0,000-.)	0,979	(0,000-.)
Alkol										
<i>Yok</i>	1,000		1,000				1,000		1,000	
Orta	1,000	(0,000-.)	1,000	(0,000-.)			1,000	(0,000-.)	1,000	(0,000-.)
Kafein										
Az	4,820	(0,000-.)	0,000	(0,000-.)			1,000	(0,000-.)	0,000	(0,000-.)
Orta	28347783,877	(0,000-.)	0,000	(0,000-.)			0,000	(0,000-.)	0,000	(0,000-0,000)
<i>Çok</i>	1,000		1,000				1,000		1,000	
Et										
<i>Orta</i>	1,000		1,000				1,000		1,000	
Sebze										
<i>Orta</i>										
<i>Çok</i>	1,000		1,000				1,000		1,000	

Çizelge 4.13. (Devam) Çoklu (multinomial) veya ikili (binary) lojistik regresyon modeli sonuçları, *** $p \leq 0.000$ diğer durumlarda anlamlı değildir, referans kategoriler italik yazıyla gösterilmiştir.

	Multinomial model: metilasyonun 2 olması (referans kategori 3): Metilasyonun olmamasına göre kısmi olması		4metilasyon		28metilasyon		29metilasyon		Multinomial model: metilasyonun 2 olması (referans kategori 3): Metilasyonun olmamasına göre kısmi olması	
	Odds oranı	%95 güven aralığı	Odds oranı	%95 güven aralığı	Odds oranı	%95 güven aralığı	Odds oranı	%95 güven aralığı	Odds oranı	%95 güven aralığı
Yaş										
42-57	1,000								1,000	
58-65	354347 29,947	(0,000-.)							1,000	(0,000-.)
Cinsiyet										
<i>Kadın</i>	1,000								1,000	
Erkek	0,000	(0,000-.)							24552140,717	(0,000-.)
Sigara										
<i>Yok</i>	1,000								1,000	
Orta	354347 30,402	(0,000-.)							1,000	(0,000-.)
Çok	680978 2,132	(0,000-.)							71597747,462	(0,000-.)
Alkol										
<i>Yok</i>	1,000								1,000	
Orta	1,000	(0,000-.)							1,000	(1,000, 1,000)
Kafein										
Az	354347 29,647*	(703114.426, 1785797613.95 6)							1,000	(0,000-.)
Orta	354347 29,647	(35434729.647, 35434729.647)							0,000	(0,000-.)
<i>Çok</i>	1,000								1,000	

Çizelge 4.13. (Devam) Çoklu (multinomial) veya ikili (binary) lojistik regresyon modeli sonuçları, *** $p \leq 0.000$. Diğer durumlarda anlamlı değildir, referans kategoriler italik yazıyla gösterilmiştir.

Et										
<i>Orta</i>	<i>1,000</i>								<i>1,000</i>	
Sebze										
<i>Orta</i>										
<i>Çok</i>	<i>1,000</i>								<i>1,000</i>	
Nagelkerke R ²	0,805		0,661				0,526		0,753	
-2 LogLikelihood	5,781		6,592				3,819		4,394	

5. SONUÇ

İrinotekan tedavisinde ilacın biyotransformasyonunu gerçekleştiren ana enzim UGT1A1'in enzim aktivitesi ilaca verilen yanıt açısından önem taşımaktadır. Çalışmamızda irinotekan tedavisi alan kolon kanseri hastalarda UGT1A1 enzim aktivitesini etkileyebilecek faktörler araştırılmıştır. Bu bağlamda kanda ve kolon dokuda UGT1A1'in transkripsiyonunda etkili olabilecek CpG dinükleotidlerinin metilasyonları, UGT1A1 genotipleri, hasta ilaç yanıtları, hasta yaşam biçimi, tümör yüzdeleri ve doku örneklerinde UGT1A1 seviyeleri arasındaki ilişkiler incelenmiştir. Daha önce UGT1A1 için kan örneklerinden proksimal bölgede ve enhancerda CpG dinükleotidleri için metilasyon incelemesi yapılmamıştır. Aynı zamanda bu güne kadar Türkiye'de ilaç yanıtı üzerinde farmakogenetik ve farmakoepigenetik faktörleri beraber inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

İrinotekan biyotransformasyonundan sorumlu enzim UGT1A1, en fazla karaciğerde ifade edilir Kolon dokuda da düşük miktarda ifade edildiği bilinmektedir. Ancak kanda protein ifadesi gerçekleşmemektedir. Kan örneklerinde yüksek metilasyon profili tespit edilmiştir. Bu durum *UGT1A1*'in DNA seviyesinde hipermetilasyon ile epigenetik olarak düzenlendiğini göstermektedir. Aynı zamanda kan ve kolon örneklerindeki farklı metilasyon paterni UGT1A1'in doku özgü metillendiğini belirtmektedir.

Çalışmamızda irinotekan tedavisi alan 48 hastaya ait hasta örnekleminde en sık karşılaşılan advers ilaç reaksiyonu diyare, mukozit ve nötropenidir. İrinotekan tedavisi alan hastaların %66,6'sında toksik etki görülmüştür. Hastaların 3'ü dışında hepsinin florourasil (5-FU) ve irinotekan kombine kemoterapi tedavisi almasından dolayı toksik etkiler doğrudan irinotekan ile ilişkilendirilememiştir. Kolon kanser tedavisinde 5-FU ile kombine uygulamada 5-FU'yu metabolize eden enzim DPD için de öngörülse farmakogenetik testler uygulanması gerekmektedir.

UGT1A1 genotipi, gen bölgesindeki I. ekzonda yer alan promotorda bulunan TA tekrarlarına göre sınıflandırılmıştır. Buna göre baskın tip 6 adet TA tekrarı içeren homozigot UGT1A1 1*/1* genotipinin frekansı %72.98, çekinik tip 7 adet TA tekrarı içeren homozigot UGT1A1 28*/28* genotipinin frekansı %6,5 olarak saptanmıştır. Daha büyük örneklemler ile yapılacak çalışmalarda, hastaların tedavideki ilaç yanıtları üzerinde farmakogenetik testlerle etkili olabilecek enzimlerin (CYP3A4, DPD gibi)

polimorfik durumları analiz edilebilir. Bu bağlamda tedavi öncesinde toksik etkilerin oluşma riski öngörülerek tedavi seçenekleri değerlendirilebilir.

UGT1A1 ifadesinde proksimal promotordaki -4 CpG ve distal enhancerdaki -28 ve -29 CpG bütün kan ve doku örneklerinde metilasyona uğramıştır. Bu durum bu bölgelerdeki metilasyonun UGT1A1 için negatif yönde epigenetik düzenleme olabileceğini düşündürmüştür.

UGT1A1'in kolon dokuda ifadesini araştırmak için hastaların kolon doku FFPE örneklerinden protein analizi yapılmıştır. FFPE örneklerinden yapılan analizlerde alınan sonuçlara göre heterozigot (1*/28*) bireylerde baskın homozigot (1*/1*) bireylere göre daha düşük UGT1A1 ifadesi olduğu belirlenmiştir. UGT1A1 ifadesi üzerinde polimorfizmin belirleyici etkisinden dolayı UGT1A1 ifadesi ve metilasyon ilişkisi incelenememiştir. Dokudan yapılacak analizlerde taze veya dondurulmuş doku örnekleri ile çalışılması protein analizleri için daha fazla analiz yapılmasına imkan sağlayabilir. Aynı zamanda posttranskripsiyonel analizler için mRNA seviyelerinin belirlenmesi gerekmektedir. UGT1A1 metilasyon profilinin irinotekan ilaç yanıtı üzerinde etkisi karaciğer dokuda incelendiğinde daha anlamlı sonuçlar elde edilebilir.

UGT1A1 enziminin epigenetik regülasyonu, çalışmamızda DNA metilasyonu mekanizması ile ele alınmıştır. Epigenetik regülasyonun tam olarak aydınlatılması için histon modifikasyonları, mRNA seviyeleri, DNA metil transferaz aktiviteleri de araştırılmalıdır. Aynı zamanda UGT1A1'in transkripsiyonunda aktif görev alan transkripsiyon faktörlerinin mekanizmasının ve DNA metilasyonu ilişkisinin UGT1A1 transkripsiyonu üzerinde etkisi incelenmelidir. Bu veriler UGT1A1 protein ifadesi hakkında bilgi verirken, aktivitesi ile ilgili bilirubin konsantrasyonları ve irinotekan ilaç yanıtı ile ilgili SN-38 terapötik ilaç izlenimi (TDM) analizleri yapılabilir. Aynı zamanda karboksilesterazlar da irinotekan metabolizmasında görev aldığından ilaç yanıtını etkileyebilecek enzimlerdir. Bu enzimlerin aktivitelerinin de irinotekan ilaç yanıtında ki etkisi incelenmelidir.

Tedavilerde kullanılan ilaçların olumsuz yan etkileri sonucu oluşan manevi ve maddi kayıpların en aza indirgenmesi için, ilaçları metabolize eden enzim aktiviteleri üzerindeki etkin faktörler çok yönlü araştırılmalıdır. Araştırmamız ileriki çalışmalar için önemli bir basamak niteliğinde olup farklı araştırma konuları için soru sormaya teşvik edicidir.

KAYNAKÇA

- Agrawal, S., Kandimalla, E.R., Yu, D., Ball, R., Lombardi, G., Lucas, T., Dexter, D.L., Hollister, B.A., Chen, S.F. (2002). GEM 231, a second-generation antisense agent complementary to protein kinase A RI α subunit, potentiates antitumor activity of irinotecan in human colon, pancreas, prostate and lung cancer xenografts. *Int. J Oncol.*, 21 (1), 65-72.
- Ai Z-P, Gao X-L, Li J-F, Zhou, J.R., Wu, J.F. (2017). Changing trends and influencing factors of the quality of life of chemotherapy patients with breast cancer. *Chin Nurs Res.* 4, 18-23.
- Al-Sukhni, W., Aronson, M. and Gallinger, S. (2008). Hereditary colorectal cancer syndromes: familial adenomatous polyposis and lynch syndrome. *Surg. Clin. North. Am.*, 88(4), 819–844.
- Ando, Y., Saka, H., Ando, M., Sawa, T., Muro, K., Ueoka, H., Yokoyama, A., Saitoh, S., Shimokata, K., ve Hasegawa, Y., (2000). Polymorphisms of UDP-Glucuronosyltransferase Gene and Irinotecan Toxicity: A Pharmacogenetic Analysis. *Cancer Res.*, 60, 6921-6926.
- Anttila, S., Hakkola, J., Tuominen, P., Elovaara, E., Husgafvel-Pursiainen, K., Karjalainen, A., Hirvonen, A., Nurminen, T. (2003). Methylation of cytochrome P4501A1 promoter in the lung is associated with tobacco smoking. *Cancer Res*, 63, 8623–8.
- Aydin Son, Y., Tüzmen, Ş. and Hizel, C. (2013). Designing and Implementing Pharmacogenomics Study. D. Barh vd. (eds.), *Omics for Personalized Medicine*, 97 DOI 10.1007/978-81-322-1184-6_6, © SpringerIndia.
- Ayrapetov, M.K., Gursoy-Yuzugullu, O., Xu, C., Xu, Y., Price, B.D. (2014). DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin. *PNAS*, 111 (25), 9169-9174.
- Babaoglu, M.O., Yigit S., Aynacioglu, A.S., Kerb, R., Yurdakok, M., Bozkurt, A. (2006). Neonatal jaundice and bilirubin *UDP glucuronosyltransferase 1A1* gene polymorphism in Turkish patients. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 98, 377-380.

- Baer-Dubowska, W., Majchrzak-Celińska, A. and Cichocki, M. (2011). Pharmacoeugenetics: a new approach to predicting individual drug responses and targeting new drugs. *Pharmacol. Rep.*, 63 (2), 293-304.
- Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*, 21 (3), 381–395.
- Baskın, Y. ve Çalıbaşı, G. (2011). Kanser hastalarında farmakogenetik uygulamaları ve farmakoekonomi. *Turk. Hij. Den. Biyol. Derg.*, 68 (3), 152-64.
- Bastos, D.A., Ribeiro, S.C., Freitas, D., Hoff, P.M. (2010). Combination therapy in high-risk stage II or stage III colon cancer: current practice and future prospects. *Ther. Adv. Med. Oncol.*, 2 (4) 261-272.
- Baylin, S.B. (2015). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 2, 4–11.
- Bélanger, A.S., Tojcic, J., Harvey, M., Guillemette, C., (2010). Regulation of UGT1A1 and HNF1 transcription factor gene expression by DNA methylation in colon cancer cells. *BMC Mol. Bio.*, 11 (9), 1-11.
- Bellam, N. and Pasche, B. (2010). Tgf-beta signaling alterations and colon cancer. *Cancer Treat. Res.*, 155, 85-103.
- Bertholee, D., Maring, J.G., and van Kuilenburg, A.B.P. (2017). Genotypes Affecting the Pharmacokinetics of Anticancer Drugs. *Clin. Pharmacokinet.*, 56 (4), 317–337.
- Beutler, E., Gelbart, T. and Demina, A. (1998). Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 8170-8174.
- Bhavsar, A., Gunaretnam, E., Li, Y., Carleton, B., Ross, C. (2017). Pharmacogenetic Variants in TPMT Alter Cellular Responses to Cisplatin In Vitro. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 88 (2), 168-169.
- Bjornsson, H.T., Sigurdsson, M.I., Fallin, M.D., Irizarry, R.A., Aspelund, T., Cui, H., Yu, W., Rongione, M.A., Ekström, T.J., Harris, T.B., Launer, L.J., Eiriksdottir, G., Leppert, M.F., Sapienza, C., Gudnason, V., Feinberg, A.P. (2008). Intra-

- individual change over time in DNA methylation with familial clustering. *JAMA*, 299 (24), 2877–2883.
- Bodur, E. ve Demirpençe, E. (2010) Kodlamayan RNA’lar ve gen susturumu. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 41, 82-89.
- Brittain, H.K., Scott, A.R. and Thomas, E. (2017) The rise of the genome and personalised medicine. *Clin. Med.*, 17 (6), 545–51.
- Budnitz, D.S., Pollock, D.A., Weidenbach, K.N., Mendelsohn, A.B., Schroeder, T.J., Annett, J.L. (2006) National surveillance of emergency department visits for out patient adverse drug events. *JAMA*, 296, 1858-1866.
- Canu, G., Minucci, A., Zuppi, C., Capoluongo, E. (2014). Gilbert and Crigler Najjar syndromes: an update of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) gene mutation database. *Blood Cells Mol Dis.*, 50 (4), 273-80.
- Cao, J. and Yan, Q. (2012). Histone Ubiquitination and Deubiquitination in Transcription, DNA Damage Response, and Cancer. *Front. Onco.*, 2, 26.
- Charron, D. J. (2009). Jean Dausset (1916–2009). *Vox Sang.*, 97, 279–280.
- Chaudhary, R., Singh, B., Kumar, M., Gakhar, S.K., Saini, A.K., Parmar, V.S., Chhillar, A.K. (2015). Role of single nucleotide polymorphisms in pharmacogenomics and their association with human diseases. *Drug Metab. Rev.*, 47 (3), 281-90.
- Chellappan, P., Xia, J., Zhou, X., Gao, S., Zhang, X., Coutino, G., Vazquez, F., Zhang, W., Jin, H. (2010). siRNAs from miRNA sites mediate DNA methylation of target genes. *Nucleic Acids Res.*, 38(20), 6883–6894.
- Chen, L., Hong, C., Chen, E.C., Yee, S.W., Xu, L., Almof, E.U., Wen, C., Fujii, K., Johns, S.J., Stryke, D., Ferrin, T.E., Simko, J., Chen, X., Costello, J.F., Giacomini, K.M. (2013). Genetic and epigenetic regulation of the organic cation transporter 3, SLC22A3. *Pharmacogenomics J*, 13, 110–20.
- Chen, Y., Zeng, L., Wang, Y., Tolleson, W.H., Knox, B., Chen, S., Ren, Z., Guo, L., Mei, N., Qian, F., Huang, K., Liu, D., Tong, W., Yu, D., Ning, B. (2017). The expression, induction and pharmacological activity of CYP1A2 are post-

- transcriptionally regulated by microRNA hsa-miR-132-5p. *Biocheml Pharmacol*, 145, 178-191.
- Chou, W.H., Yan, F.X., de Leon, J., Barnhill, J., Rogers, T., Cronin, M., Pho, M., Xiao, V., Ryder, T.B., Liu, W.W., Teiling, C., Wedlund, P.J. (2000). Extension of a pilot study: impact from the cytochrome P450 2D6 polymorphism on outcome and costs associated with severe mental illness. *J Clin. Psycho. Pharmacol.*, 20 (2), 246-51.
- Cluntun, A.A., Huang, H., Dai, L., Liu, X., Zhao, Y., Locasale, J.W. (2015). The rate of glycolysis quantitatively mediates specific histone acetylation sites. *Cancer & Metabolism*, 3, 10.
- Cremolini, C., Loupakis, F., Antoniotti, C., Lupi, C., Sensi, E., Lonardi, S., Mezi, S., Tomasello, G., Ronzoni, M., Zaniboni, A., Tonini, G., Carlomagno, C., Allegrini, G., Chiara, S., D'Amico, M., Granetto, C., Cazzaniga, M., Boni, L., Fontanini, G., Falcone, A. (2015). FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *The Lancet Oncology*, 16 (13), 1306-1315.
- Davies, E.A. and O'Mahony, M.S. (2015). Adverse drug reactions in special populations – the elderly. *BJCP*, 80 (4), 796–807.
- Davies, R.J., Miller, R. And Coleman, N. (2005). Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nat. Rev. Cancer*, 5, 199–209.
- Deaton, A.M. and Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.*, 25, 1010–1022.
- Dion, M. F., Altschuler, S. J., Wu, L. F. and Rando, O. J. (2005). Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 102 (15), 5501–5506.
- Dluzen, D.F., Sun, D., Salzberg, A.C., Jones, N., Bushey, R.T., Robertson, G.P., Lazarus, P. (2014). Regulation of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 expression and activity by microRNA 491-3p. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 348, 465–77.

- Douillard, J.Y., Cunningham, D., Roth, A.D., Navarro, M., James, R.D., Karasek, P., Jandik, P., Iveson, T., Carmichael, J., Alakl, M., Gruia, G., Awad, L., Rougier, P. (2000). Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicenter random is editorial. *Lancet*, 355, 1041–1047.
- Du, J., Johnson, L.M., Jacobsen, S.E., Patel, D.J. (2015). DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, 16, 519–532.
- East, J.E., Saunders, B.P. and Jass, J.R. (2008). Sporadic and syndromic hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colon: classification, molecular genetics, natural history, and clinical management. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, 37 (1), 25-46.
- Edwards, J.R., Yarychkivska, O., Boulard, M., Bestor, T.H. (2017). DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenet. Chromatin*, 10 (23), 1-10.
- Epstein, R.S., Moyer, T.P., Aubert, R.E., O'Kane, D.J., Xia, F., Verbrugge, R.R., Gage, B.F., Teagarden, J.R. (2010). Warfarin genotyping reduces hospitalization rates, results from the MM-WES (Medco-Mayo Warfarin Effectiveness study). *J Am. Coll. Cardiol.*, 55 (25), 2804–2812.
- Ergin, H., Bican, M. ve Atalay Ö. E. (2010). A causal relationship between UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoter polymorphism and idiopathic hyperbilirubinemia in Turkish newborns. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 52, 28-34.
- Everett, J.R. (2016). From Metabonomics to Pharmacometabonomics: The Role of Metabolic Profiling in Personalized Medicine. *Front Pharmacol.*, 7, 297.
- Fabian, M.R. and Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 19, 586–593.
- Fearon, E.R. and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61 (5), 759–767.
- Fedirco, V., Tramacere, I., Bagnardi, V., Rota, M., Scotti, L., Islami, F., Negri, E., Straif, K., Romieu, I., La Vecchia, C., Boffetta, P., Jenab, M. (2011). Alcohol

- drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann. Oncol.*, 22 (9), 1958-1972.
- Fojo, T., Mailankody, S. and Lo, A. (2014). Unintended consequences of expensive cancer therapeutics—the pursuit of marginal indications and a me-too mentality that stifles innovation and creativity: the John Conley Lecture. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.*, 140 (12), 1225-36
- Foster, E.R. and Downs, J.A. (2005). Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *FEBS J*, 272 (13), 3231-40.
- Fouse, S.D., Shen, Y., Pellegrini, M., Cole, S., Meissner, A., Van Neste, L., Rudolf J., Fan, G. (2008). Promoter CpG methylation contributes to ES cell gene regulation in parallel with Oct4/Nanog, Polycomb binding and histone H3 lys4/lys27 trimethylation. *Cell Stem Cell*, 2 (2), 160–169.
- Fuchs, C.S., Moore, M.R., Harker, G., Villa, L., Rinaldi, D., Hecht, J.R. (2003). Phase III comparison of two irinotecan dosing regimens in second-line therapy of metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol*, 21 (5), 807–814.
- Gagnon, J.F., Bernard, O., Villeneuve, L., Têtu, B., Guillemette, C. (2006). Irinotecan Inactivation Is Modulated by Epigenetic Silencing of UGT1A1 in Colon Cancer. *Clin. Cancer Res.*, 12, 1850-1858.
- Gaur, R.K. and Rossi J.J. (2009). Regulation of Gene Expression by Small RNA's, CRC Press
- Giantonio, B.J., Catalano, P.J., Meropol, N.J., O'Dwyer, P.J., Mitchell, E.P., Alberts, S.R., Schwartz, M.A., Benson A.B. (2007). Bevacizumab in Combination With Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin (FOLFOX4) for Previously Treated Metastatic Colorectal Cancer: Results From the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin. Oncol.*, 25 (12) 1539-1544.
- Gill, S., Loprinzi, C.L., Sargent, D.J., Thomé, S.D., Alberts, S.R., Haller, D.G., Benedetti, J., Francini, G., Shepherd, L.E., Francois Seitz, J., Labianca, R., Chen, W., Cha, S.S., Heldebrant, M.P., Goldberg, R.M. (2004). Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin. Oncol.*, 15 (22), 1797-806.

- Greener, M. (2017). Adverse drug reactions: prescribing's twilight zone. *J Prescribing Medi Man*, 28 (1), 27–31.
- Greer, E.L. and Shi, Y. (2012). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat. Rev. Gen.*, 13, 343–357
- Grewal, S.I. and Elgin, S.C. (2007). Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature*, 447 (7143), 399-406.
- Guengerich, F.P. (2006). Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *The AAPS Journal*, 8 (1), 101–111.
- Gustavsson, B., Carlsson, G., Machover, D., Petrelli, N., Roth, A., Schmoll, H.J., Tveit, K.M., Gibson, F. (2015). A Review of the Evolution of Systemic Chemotherapy in the Management of Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, 14 (1), 1-10.
- Gündüz, M., Acar, M., Erdogan, K., Cetin, E.N., Gunduz, E. Pharmaco-epigenomics, Bölüm 4, D. Barh (Eds.), *Omics for Personalized Medicine*, © Springer 2013, 97-122.
- Güngör, Ö.F. ve Ünal, N. (2015). Epigenetik ve genomik baskılanma. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.*, 55 (2), 73-81.
- Habr-Gama, A., Perez, R.O., Nadalin, W., Sabbaga, J., Ribeiro, U., Silva e Sousa, A.H., Campos, F.G., Kiss, D.R., Gama-Rodrigues, J. (2004). Operative Versus Nonoperative Treatment for Stage 0 Distal Rectal Cancer Following Chemoradiation Therapy: Long-term Results. *Ann. Surg.*, 240 (4), 711–718.
- Haga, S.B. and Burke, W. (2004). Using pharmacogenetics to improve drug safety and efficacy. *JAMA*, 291 (23), 2869-71.
- Haggar, F.A., and Boushey, R.P. (2009). Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Clin. Colon Rect. Surg.*, 22 (4), 191–197.
- Hamm, C.A. and Costa, F.F. (2011). The impact of epigenomics on future drug design and new therapies. *Drug Discov. Today*, 16 (13–14), 626–635.
- Hellinger, M.D. and Santiago, C.A. (2006). Reoperation for Recurrent Colorectal Cancer. *Clin. Colon Rect. Surg.*, 19 (4), 228–236.

- Hertz, D.L. and Rae, J. (2015). Pharmacogenetics of Cancer Drugs. *Annu. Rev. Med.*, 66, 65-81
- Hızel, C. (2010). Kanıta Dayalı, Öngörüşel ve Bireye Özgü Tıp, Yeni Genetik ve Uygulamaları. *İKU*, 24, 7-18.
- Hızel, C., Gök, S., Sardas, S., Bernard-Gallon, D., Maugard, C., Genç, E. (2009). Personalized and Predictive Medicine in Turkey: A Symposium Report of the Istanbul Working Group on Personalized Medicine, Istanbul, Turkey. *Curr. Pharmacogenomics Person. Med.*, 7 (4), 297-301.
- Hızel, C., Tremblay, J., Bartlett, G., Hamet, P. (2017). Introduction-Every Individual is Different and the Precision Medicine Offers options for Disease Control and Treatment” Bölüm 1, M.Verma ve D. Barh (ed.), Progress and Challenges in Precision Medicine, San Diego, ElsevierPress,1-33.
- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., Sarkar, S. (2014). Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers*, 6 (3), 1769–1792.
- http-1:** http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/project/about.shtml (Erişim tarihi: 17.03.15)
- http-2:** http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/appletter/1998/20571s8ltr.pdf (Erişim tarihi: 19.12.17)
- http-3:** <https://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ucm572698.htm> (Erişim tarihi: 25.12.17)
- http-4:** <http://www.nytimes.com/1996/06/18/science/new-cancer-drug-approved.html> (Erişim tarihi: 19.12.17)
- http-5:** <http://southeastgarden.com/camptotheca.html> (Erişim tarihi: 27.12.17)
- http-6:** <https://emedicine.medscape.com/article/2005487-overview> (Erişim tarihi: 25.01.17)
- http-7:** http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2005/020571s026lbl.pdf (Erişim tarihi: 03.12.2014)
- http-8:** <http://ghr.nlm.nih.gov/geneFamily/ugt#description> (Erişim tarihi: 13.12.17)

- http-9:** <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000241635-UGT1A1/tissue> (Erişim tarihi: 16.07.17)
- Hug, B.L., Keohane, C., Seger, D.L., Yoon, C., Bates, D.W. (2012). The Costs of Adverse Drug Events in Community Hospitals. *Jt. Comm. J Qual. Patient Saf.*, 38 (3), 120–126.
- Iacopetta, B. (2003). TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum. Mutat.*, 21, 271-276.
- Ingelman-Sundberg, M. and Cascorbi, I. (2016). Pharmacogenomic or -epigenomic biomarkers in drug treatment: Two sides of the same medal? *Clin. Pharmacol. Ther.*, 99 (5), 478-80.
- Ingelman-Sundberg, M., Sim, S.C., Gomez, A., Rodriguez-Antona, C. (2007). Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol. Ther.*, 116 (3), 496-526.
- Innocenti, F., Grimsley, C., Das, S., Ramírez, J., Cheng, C., Kuttub-Boulos, H., Ratain, M.J., Di Rienzo, A. (2003). Haplotype structure of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoter in different ethnic groups. *Pharmacogenetics*, 12, 725-733.
- Innocenti, F., Undevia, S.D., Iyer, L., Chen, P.X., Das, S., Kocherginsky, M., Karrison, T., Janisch, L., Ramírez, J., Rudin, C.M., Vokes, E.E., Ratain, M.J. (2004). Genetic variants in the *UDP-glucuronosyltransferase 1A1* gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin. Oncol.*, 22, 1382–1388.
- Ionov, Y., Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Shibata, D., Perucho, M. (1993). Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*, 363 (6429), 558–61.
- Issa, J.P. (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 4 (12), 988–993.
- Ivanov, M., Barragan, I. and Ingelman-Sundberg, M. (2014). Epigenetic mechanisms of importance for drug treatment. *Trends Pharmacol*, 35, 384–96.
- Iyer, L., Das, S., Janisch, L., Wen, M., Ramírez, J., Karrison, T., Fleming, G.F., Vokes, E.E., Schilsky, R.L., Ratain, M.J. (2002). UGT1A1*28 polymorphism as a

- determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics J*, 2, 43–47.
- Iyer, L., King, C.D., Whittington, P.F., Green, M.D., Roy, S.K., Tephly, T.R., Coffman, B.L., Ratain, M.J. (1998). Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. *J Clin. Invest.*, 101, 847–854.
- İzmirli, M. (2013). Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar. *Van Tıp Dergisi*, 20 (1), 48-51.
- Jackson-Thompson, J., Ahmed, F., German, R.R., Lai, S.M., Friedman, C. (2006). Descriptive epidemiology of colorectal cancer in the United States, 1998-2001. *Cancer*, 107 (5), 1103–1111.
- Jancovaa, P., Anzenbacherb, P. and Anzenbacherovaa, E. (2010). Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*, 154 (2), 103–116.
- Jeter, J.M., Kohlmann, W. and Gruber, S.B. (2006). Genetics of colorectal cancer. *Oncology*, 20 (3), 269–276.
- Jin, B., Li, Y. and Robertson, K.D. (2011). DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer*, 2 (6), 607-17.
- Johansson, I. and Ingelman-Sundberg, M. (2011). Genetic polymorphism and toxicology—with emphasis on cytochrome p450. *Toxicol. Sci.*, 120, 1–13.
- Jones, P.A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Rev. Gen.*, 13, 484–492.
- Joyner, M.J. and Paneth, N. (2015). Seven Questions for Personalized Medicine. *JAMA*, 314(10), 999–1000.
- Kacevska, M., Ivanov, M. and Ingelman-Sundberg, M. (2011). Perspectives on epigenetics and its relevance to adverse drug reactions. *Clin. Pharmacol.*, 89, 902–907.

- Kadacol, A., Ghosh, S.S., Sappal, B.S., Sharma, G., Chowdhury, J.R., Chowdhury, N.R. (2000). Genetic lesions of bilirubinuridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase (UGT1A1) causing Crigler-Najjar and Gilbert syndromes: correlation of genotype to phenotype. *Hum. Mutat.*, 16 (4), 297-306.
- Kalow, W. (1962). *Pharmacogenetics: Heredity and the Response to Drugs*. W. B. Saunders, Philadelphia.
- Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., Leiserson, M.D.M., Miller, C.A., Welch, J.S., Walter, M.J., Wendl, M.C., Ley, T.J., Wilson, R.K., Raphael, B.J., Ding, L. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 502, 333–339.
- Kanwal, T. and Ghias, K. (2016). Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol. Med.* 13 (1), 120–135.
- Kaut, O., Schmitt, I. and Wüllner, U. (2012). Genome-scale methylation analysis of Parkinson's disease patients' brains reveals DNA hypomethylation and increased mRNA expression of cytochrome P450 2E1. *Neurogenetics*, 13, 87–91.
- Khan, D.A. (2016). Pharmacogenomics and adverse drug reactions: Primetime and not ready for primetime tests. *J Allergy Clin. Immunol.*, 138 (4), 943–955.
- Kilic, I., Cakaloz, I. and Atalay, E. (2007). Frequency of UDP glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) gene promoter polymorphisms in neonates with prolonged and pathological jaundice in the Denizli region of Turkey. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 45, 475-476.
- Kim, J.K., Samaranayake, M. and Pradhan, S. (2009). Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol. Life Sci.*, 66, 596 – 612.
- Kim, S.J., Kang, H.S., Chang, H.L., Jung, Y.C., Sim, H.B., Lee, K.S., Ro, J., Lee, E.S. (2008). Promoter hypomethylation of the N-acetyltransferase 1 gene in breast cancer. *Oncol. Rep.*, 19, 663–8.
- King, C.D., Rios, G.R., Green, M.D., Tephly, T.R. (2000). UDP-glucuronosyltransferases. *Curr. Drug Metab.*, 1 (2), 143-161.

- Kohn, L.T., Corrigan, J.M. and Donaldson, M.S., (2000). *To Err is human: building a safer health system*. Washington, D.C: National Academy Press; ISBN 0-309-06837-1
- Kunimoto T., Nitta, K., Tanaka, T., Uehara, N., Baba, H., Takeuchi, M., Yokokura, T., Sawada, S., Miyasaka, T., Mutai, M. (1987). Antitumor Activity of 7-Ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonyloxy camptothecin, a Novel Water-soluble Derivative of Camptothecin, against Murine Tumors. *Cancer Res.*, 47, 5944-5947.
- Kunkel, T.A. and Erie, D.A. (2005). DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 681-710.
- Kwon, M.S., Kim, S.J., Lee, S.Y., Jeong, J.H., Lee, E.S., Kang, H.S. (2006). Epigenetic silencing of the sulfotransferase 1A1 gene by hypermethylation in breast tissue. *Oncol. Rep.*, 15, 27–32.
- Labianca, R., Nordlinger, B., Beretta, G.D., Mosconi, S., Mandalà, M., Cervantes, A., Arnold, D. (2013). Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Onco.*, 6 (1), 64–72.
- Lansdorp-Vogelaar, I., Kuntz, K.M., Knudsen, A.B., van Ballegooijen, M., Zauber, A.G., Jemal A. (2012). Contribution of screening and survival differences to racial disparities in colorectal cancer rates. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 21 (5), 728-36.
- Lazarou, J., Pomeranz, B. and Corey, P. (1998). Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients. *JAMA*, 279, 1200-1205.
- Lee, K.C., Ou, Y.C., Hu, W.H., Liu, C.-C., Chen, H.H. (2016). Meta-analysis of outcomes of patients with stage IV colorectal cancer managed with chemotherapy/radiochemotherapy with and without primary tumor resection. *Oncotargets. Ther.*, 9, 7059–7069.
- Li, E. (2002). Chromatin Modification and Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development. *Nature Reviews*, 3 (9), 662-673.
- Li, M.M., Wang, W.P., Wu, W.J., Huang, M., Yu, A.M. (2014). Rapid production of novel pre-microRNA agent hsa-mir-27b in *Escherichia coli* using recombinant

- RNA technology for functional studies in mammalian cells. *Drug Metab. Dispos.*, 42 (11), 1791-5.
- Li, X.L., Zhou, J., Chen, Z.R., Chng, W.J. (2015). p53 mutations in colorectal cancer-molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol.*, 21 (1), 84-93.
- Li, Y., Cui, Y., Hart, S.N., Klaassen, C.D., Zhong, X.B. (2009). Dynamic patterns of histone methylation are associated with ontogenic expression of the Cyp3a genes during mouse liver maturation. *Mol. Pharmacol.*, 75, 1171–9
- Liang, P.S., Chen, T.Y. and Giovannucci, E. (2009). Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Int. J Cancer*, 124 (10), 2406-15.
- Liu, X.-H., Lu, J., Duan, W., Dai, Z.-M., Wang, M., Lin, S., Yang, P., Tian, T., Liu, K., Zhu, Y., Zheng, Y., Sheng, Q., Dai, Z.-J. (2017). Predictive Value of UGT1A1*28 Polymorphism In Irinotecan-based Chemotherapy. *J Cancer*, 8 (4), 691–703.
- López, I., Oliveira, L., Tucci, P., Alvarez-Valín, F., Coudry, R.A., Marín, M. (2012). Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer. *Gene*, 499, 81-87.
- Luo, W., Karpf, A. R., Deeb, K. K., Muindi, J. R., Morrison, C. D., Johnson, C. S., Trump, D. L. (2010). Epigenetic Regulation of Vitamin D 24-Hydroxylase/CYP24A1 in Human Prostate Cancer. *Cancer Research*, 70 (14), 5953–5962.
- Lynch, H.T., Lynch, J.F., Lynch, P.M., Attard, T. (2008). Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam. Cancer*, 7 (1), 27–39.
- Ma, Y., Yang, Y., Wang F, Zhang, P., Shi, C., Zou, Y., Qin, H. (2013). Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *PLoS One*, 8 (1):e53916. doi: 10.1371/journal.pone.0053916

- Majchrzak-Celińska, A. and Baer-Dubowska, W. (2017). Pharmacoepigenetics: an element of personalized therapy? *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 13 (4), 387-398.
- Markowitz, S.D. and Bertagnolli, M.M. (2009). Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med*, 361 (25), 2449–60.
- Massacesi, C., Terrazzino, S., Marcucci, F., Rocchi, M.B., Lippe, P., Bissoni, R., Lombardo, M., Pilone, A., Mattioli, R., Leon, A. (2006). Uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 promoter polymorphism predicts the risk of gastrointestinal toxicity and fatigue induced by irinotecan-based chemotherapy. *Cancer*, 106 (5), 1007-16.
- Mathijssen, R.H.J., van Alphen, R.J., Verweij, J., Loos, W.J., Nooter, K., Stoter, G., Sparreboom, A. (2001). Clinical Pharmacokinetics and Metabolism of Irinotecan (CPT-11). *Clin. Cancer Res.*, 7, 2182-2194.
- Mattick, J.S. (2004). RNA regulation: a new genetics? *Nat. Rev. Genet.*, 5 (4), 316–323.
- McCleary, N.J., Meyerhardt, J.A., Green, E., Yothers, G., Gramont, A., Cutsem, E., O'Connell, M., Twelves, C.J., Saltz, L.B., Haller, D.G., Sargent, D.J. (2013). Impact of Age on the Efficacy of Newer Adjuvant Therapies in Patients With Stage II/III Colon Cancer: Findings From the ACCENT Database. *J Clin. Oncol.*, 31 (20), 2600-2606.
- Meissner, A., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., Zhang, X., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Jaffe, D.B., Gnirke, A., Jaenisch, R., Lander, E. S. (2008). Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*, 454 (7205), 766–770.
- Meyer, U.A. (2000). Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet*, 356 (9242), 1667-1671.
- Mikeska, T. and Craig, J.M. (2014). DNA methylation biomarkers: cancer and beyond. *Genes*, 5 (3), 821-64.
- Mohn, F., Weber, M., Rebhan, M., Roloff, T.C., Richter, J., Stadler, M.B., Bibel, M., Schübeler, D. (2008). Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA

- methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol. Cell.*, 30, 755–766.
- Monod, J. (1970). *Rastlantı ve Zorunluluk* (çev. Elodie Eda Moreau). İstanbul: Alfa Basım Yay.
- Moore, L.D., Le, T. and Fan, G. (2013). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacol.*, 38 (1), 23–38.
- Moore, T.J., Cohen, M.R. and Furberg, C.D. (2007). Serious adverse drug events reported to the Food and Drug Administration, 1998-2005. *Archintern. Med.*, 167, 1752-1759.
- Morinière, J., Rousseaux, S., Steuerwald, U., Soler-López, M., Curtet, S., Vitte, A.L., Govin, J., Gaucher, J., Sadoul, K., Hart, D.J., Krijgsveld, J., Khochbin, S., Müller, C.W., Petosa, C. (2009). Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature*, 461 (7264), 664-8.
- Muslu, N., Turhan, A.B., Eskandari, G., Atici, A., Ozturk, O.G., Kul, S., Atik, U. (2007). The frequency of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoter region (TA)7 polymorphism in newborns and its relation with jaundice. *J Trop. Pediatr.*, 53, 64-68.
- Müller, M.F., Ibrahim, A.E.K. and Arends, M.J. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch.*, 469, 125–134.
- Nagar, S. and Blanchard, R.L. (2006). Pharmacogenetics of uridine diphospho glucuronosyltransferase (UGT)1A family members and its role in patient response to irinotecan. *Drug Metab. Rev.*, 38, 393– 409.
- Nakamura, Y., (2008). Pharmacogenomics and drug toxicity. *N. Engl. J Med.*, 359, 856.
- National Cancer Institute, PDQ® Screening and Prevention Editorial Board, PDQ Colorectal Cancer Prevention (2017). Bethesda, MD: National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/types/colorectal/hp/colorectal-prevention-pdq> (Erişim tarihi, 12.05.2017)
- Oda, S., Fukami, T., Yokoi, T., Nakajima, M. (2013). Epigenetic Regulation Is a Crucial Factor in the Repression of UGT1A1 Expression in the Human Kidney. *Drug Metab. Dispos.*, 41, 1738–1743.

- Olsson, M., Gustafsson, O., Skogastierna, C., Tolf, A., Rietz, B.D., Morfin, R., Rane, A., Ekström, L. (2007). Regulation and expression of human CYP7B1 in prostate: overexpression of CYP7B1 during progression of prostatic adenocarcinoma. *Prostate*, 67, 1439–46.
- Ortega, V. E., and Meyers, D. A. (2014). Pharmacogenetics: Implications of Race and Ethnicity on Defining Genetic Profiles for Personalized Medicine. *J Allergy Clin. Immunol.*, 133 (1), 16–26.
- Palaghia, M., Prelipcean, C.C., Cotea, E., Vlad N., Leneschi, L., Bejan, V., Perianu, L., Vasilescu, A., Târcoveanu, E. (2014). Metastatic Colorectal Cancer: Review of Diagnosis and Treatment Options. *JS*, 10, 249-256.
- Palazzo, A.F. and Lee, E.S. (2015). Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Front. Genet.*, 6, 2.
- Palomaki, G.E., Bradley, L.A., Douglas, M.P., Kolor, K., Dotson, W.D. (2009). Can UGT1A1 genotyping reduce morbidity and mortality in patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan? An evidence-based review. *Genet. Med.*, 11 (1), 21-34.
- Pan, Y.Z., Gao, W. and Yu, A.M. (2009). MicroRNAs regulate CYP3A4 expression via direct and indirect targeting. *Drug Metab. Dispos.*, 37 (10), 2112-7.
- Pangilinan, J., Khan, G. and Zalupski, M. (2008). Irinotecan pharmacogenetics: an overview for the community oncologist. *Commun. Oncol.*, 5 (2), 99–103.
- Papadopoulos, N., Nicolaides, N.C., Wei, Y.F., Ruben, S.M., Carter, K.C., Rosen, C.A., Haseltine, W.A., Fleischmann, R.D., Fraser, C.M., Adams, M.D., Venter, J.C., Hamilton, S.R., Petersen, G.M., Watson, P., Lynch, H.T., Peltomaki, P., Mecklin, J.P., De la Chapelle, A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1994). Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science*, 263 (5153), 1625-1629.
- Pardo Cabello, A., Del Pozo Gavilán, E., Gómez Jiménez, F., Mota Rodríguez, C., Luna Del Castillo, J., Puche Cañas, E. (2016). Drug-related mortality among inpatients: a retrospective observational study. *Eur. J Clin. Pharmacol.*, 72, 731-736.
- Patel, J.N. and Papachristos, A. (2015). Personalizing chemotherapy dosing using pharmacological methods. *Cancer Chemother Pharmacol*, 76, 879–896.

- Peedicayil, J. (2008). Pharmacoepigenetics and pharmacoepigenomics. *Pharmacogenomics*, 9 (12), 1785-1786.
- Peng, L. and Zhong, X. (2015). Epigenetic regulation of drug metabolism and transport. *Acta Pharm. Sinica B*, 5 (2), 106–112
- Personalized Medicine Coalition (2011). The Case for Personalized Medicine; Nature doi:10.1038/nature.2014.14530
- Phillips, K.A., Veenstra, D.L., Oren, E., Lee, J.K., Sadee, W. (2001). Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review. *JAMA*, 286 (18), 2270–2279.
- Phillips, T. (2008). The role of methylation in gene expression. *Nature Education*, 1 (1), 116.
- Rando, O.J., (2012). Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 22 (2), 148-155.
- Redinbo, M.R., Stewart, L., Kuhn, P., Champoux, J.J., Hol, W.G. (1998). Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science*, 279 (5356), 1504-13.
- Rinn, J.L. and Chang, H.Y. (2012). Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu. Rev. Biochem.*, 81, 145-66.
- Rupaimoole, R., Han, H.D., Lopez-Berestein, G., Sood, A.K. (2011). MicroRNA therapeutics: principles, expectations, and challenges. *Chin. J Cancer*, 30 (6), 368-70.
- Russo, A., Bazan, V., Iacopetta, B., Kerr, D., Soussi, T., Gebbia, N. (2005). The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin. Oncol.*, 23, 7518-7528.
- Ryan, K.M., Phillips, A.C. and Vousden, K.H. (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13, 332-337.
- Sanoff, H.K., Carpenter, W.R., Stürmer, T., Goldberg, R.M., Martin, C.F., Fine, J.P., McCleary, N.J., Meyerhardt, J.A., Niland, J., Kahn, K.L., Schymura, M.J.,

- Schrag, D. (2012). Effect of Adjuvant Chemotherapy on Survival of Patients With Stage III Colon Cancer Diagnosed After Age 75 Years. *Clinical Oncology*, 30, 2624-2634.
- Sardaş, S. and Akıcı, A. (2007). Advers ilaç reaksiyonlarında farmakogenomiğin kliniğe yansımaları. *İKU*, 18, 34-38.
- Sawicka, A. and Seiser, C. (2012). Histone H3 phosphorylation – A versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie.*, 94 (11), 2193–2201.
- Saxonov, S., Berg, P. and Brutlag, D.L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 1412–1417.
- Sayitoğlu, M. (2007). Kanser Tedavisine Farmakogenetik Yaklaşım. *Türkiye Klinikleri J Med. Sci.*, 27 (3), 434-441.
- Schroth, W., Goetz, M.P., Hamann, U., Fasching, P.A., Schmidt, M., Winter, S., Fritz, P., Simon, W., Suman, V.J., Ames, M.M., Safgren, S.L., Kuffel, M.J., Ulmer, H.U., Boländer, J., Strick, R., Beckmann, M.W., Koelbl, H., Weinshilboum, R.M., Ingle, J.N., Eichelbaum, M., Schwab, M., Brauch, H. (2009). Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *JAMA*, 302 (13), 1429–36.
- Schübeler, D. (2015). Function and information content of DNA methylation. *Nature*, 517, 321–326.
- Sharma, R., Panda, N.K. and Khullar, M. (2010). Hypermethylation of carcinogen metabolism genes, CYP1A1, CYP2A13 and GSTM1 genes in head and neck cancer. *Oral Dis.*, 16, 668-73.
- Shen, L., Kondo, Y., Guo, Y., Zhang, J., Zhang, L., Ahmed, S., Shu, J., Chen, X., Waterland, R.A., Issa, J.P.J. (2007). Genome-Wide Profiling of DNA Methylation Reveals a Class of Normally Methylated CpG Island Promoters. *PLoS Genetics*, 3 (10), 2023-2036.
- Shepherd, G., Mohorn, P., Yacoub, K., May, D.W. (2012). Adverse drug reaction deaths reported in United States vital statistics, 1999-2006. *Ann. Pharmacother.*, 46 (2), 169-75.

- Sissung, T.M., Troutman, S.M., Campbell, T.J., Pressler, H.M., Sung, H., Bates, S.E. (2012). Transporter pharmacogenetics: transporter polymorphisms affect normal physiology, diseases, and pharmacotherapy. *Discov. Med.*, 13, 19–34.
- Spear, B.B., Heath-Chiozzi, M. and Huff, J. (2001). Clinical application of pharmacogenetics. *Trends. Mol. Med.*, 7 (5), 201-204.
- Stamatoyannopoulos, J.A. and Dunham, I. (2008). Epigenomics at the tipping point. Foreword. *Pharmacogenomics*, 9 (12), 1781–1783
- Sugatani, J., Nishitani, S., Yamakawa, K., Yoshinari, K., Sueyoshi, T., Negishi, M., Miwa, M. (2005). Transcriptional regulation of human UGT1A1 gene expression: activated glucocorticoid receptor enhances constitutive androstane receptor/pregnane X receptor-mediated UDP-glucuronosyltransferase 1A1 regulation with glucocorticoid receptor-interacting protein 1. *Mol. Pharmacol.*, 67 (3), 845-55.
- Sugatani, J., Osabe, M., Wada, T., Yamakawa, K., Yamazaki, Y., Takahashi, T., Ikari, A., Miwa, M. (2008). Comparison of enzymatically synthesized inulin, resistant maltodextrin and clofibrate effects on biomarkers of metabolic disease in rats fed a high-fat and high-sucrose (cafeteria) diet. *Eur. J Nutr.*, 47(4), 192-200.
- Surveillance Research Program (2013). National Cancer Institute. SEER*Stat Versiyon 8.1.2. Bethesda, MD: National Cancer Institute.
- T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı, (2003). Yayın No:582
- Takano, M., and Sugiyama, T. (2017). UGT1A1 polymorphisms in cancer: impact on irinotecan treatment. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 10, 61–68.
- Tan, C. and Du, X. (2012). *KRAS* mutation testing in metastatic colorectal cancer. *WJG*, 18 (37), 5171–5180.
- The 1000 Genomes Project Consortium (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467, 1061–1073
- Thorn, C.F., Klein, T.E. and Altman, R.B. (2010). Pharmacogenomics and bioinformatics: PharmGKB. *Pharmacogenomics*, 11 (4), 501–505.

- Toffoli, G., Cecchin, E., Corona, G., Russo, A., Buonadonna, A., D'Andrea, M., Pasetto, L.M., Pessa, S., Errante, D., De Pangher, V., Giusto, M., Medici, M., Gaion, F., Sandri, P., Galligioni, E., Bonura, S., Boccalon, M., Biason, P., Frustaci, S. (2006). The role of UGT1A1*28 polymorphism in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin. Oncol.*, 24, 3061–3068.
- Toffoli, G., Giodini, L., Buonadonna, A., Berretta, M., De Paoli, A., Scalone, S., Miolo, G., Mini, E., Nobili, S., Lonardi, S., Pella, N., Lo Re, G., Montico, M., Roncato, R., Dreussi, E., Gagno, S., Cecchin, E. (2015). Clinical validity of a DPYD-based pharmacogenetic test to predict severe toxicity to fluoropyrimidines. *Int. J Cancer*, 137 (12), 2971-2980.
- Tsuchiya, Y., Nakajima, M., Takagi, S., Taniya, T., Yokoi, T. (2006). microRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1. *Cancer Res.*, 66, 9090–8.
- Ulgenalp, A., Duman, N., Schaefer, F.V., Whetsell, L., Bora, E., Gülcan, H., Kumral, A., Oren, H., Giray, O., Erçal, D., Ozkan, H. (2003). Analyses of polymorphism for UGT1*1 exon 1 promoter in neonates with pathologic and prolonged jaundice. *Biol. Neonate.*, 83, 258-262.
- Vaissière, T., Sawan, C. and Herceg, Z. (2008). Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat. Res.*, 659 (1-2), 40-8.
- Van Tongelen, A., Lorient, A., De Smet, C. (2017). Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germline genes. *Cancer Lett.*, 396, 130-137.
- Verhoe, C., Wilt, J.H., Burger, J.W.A., Verheij, H.M.V., Koopman, M. (2011). Surgery of the primary in stage IV colorectal cancer with unresectable metastases. *Eur. J Cancer*, 47, 61-66.
- Vieira, I., Pasanen, M., Raunio, H., Cresteil, T. (1998). Expression of CYP2E1 in human lung and kidney during development and in full-term placenta: a differential methylation of the gene is involved in the regulation process. *Pharmacol. Toxicol.*, 83, 183–7.

- Vogel, A., Hofheinz, R.D., Kubicka, S., Arnold, D. (2017). Treatment decisions in metastatic colorectal cancer – Beyond first and second line combination therapies. *Cancer Treat. Rev.*, 59, 54–60.
- Wall, M.E., Wani, M.C., Cook, C.E., Palmer, K.H., McPhail, A.T., Sim, G.A. (1966) Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecine, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J Am. Chem. Soc.*, 88, 3888–3890.
- Watson, J.D. and Crick, F.H.C. (1953). A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171, 737–738.
- Weake, V.M. and Workman, J.L. (2008). Histone Ubiquitination: Triggering Gene Activity. *Molecular. Cell*, 29, 653-663.
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M., Schübeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet.*, 39, 457–466.
- Weinhold, B. (2006). Epigenetics: The Science of Change. *Environ. Health Persp.*, 114 (3), A160–A167.
- Weisenberger, D.J., Siegmund, K.D., Campan, M., Young, J., Long, T.I., Faasse, M.A., Kang, G.H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., Koh, H., Simms, L., Barker, M., Leggett, B., Levine, J., Kim, M., French, A.J., Thibodeau, S.N., Jass, J., Haile, R., Laird, P.W. (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat. Genet.*, 38 (7), 787-93.
- Weng, L., Zhang, L., Peng, Y., Huang, R.S. (2013). Pharmacogenetics and Pharmacogenomics: A Bridge to Individualized Cancer Therapy. *Pharmacogenom*, 14 (3), 15-24.
- Wheeler, H.E., Maitland, M.L., Dolan, M.E., Cox, N.J., Ratain, M.J. (2013). Cancer pharmacogenomics: strategies and challenges. *Nat. Rev. Genet.*, 14 (1), 23–34.
- Wilmink, A.B.M. (1997). Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Dis. Colon. Rectum*, 40 (4), 483–493.

- Wilson, I.D. (2009). Drugs, bugs, and personalized medicine: pharmacometabonomics enters the ring, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106 (34), 14187-14188.
- World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research, (2007). Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington, DC: American Institute for Cancer Research
- World Health Organization, World Cancer Report, 2014. pp. Chapter 5.5. ISBN 9283204298.
- Xu, C., Li, C.Y. and Kong, A.N. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res.*, 28 (3), 249-68.
- Xu, C., Tang, X., Qu, Y., Keyoumu, S., Zhou, N., Tang, Y. (2016). *UGT1A1* gene polymorphism is associated with toxicity and clinical efficacy of irinotecan-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 78, 119-130.
- Yasar, U., Greenblatt, D.J., Guillemette C., Court, M.H. (2013). Evidence for regulation of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 protein expression and activity via DNA methylation in healthy human livers Royal Pharmaceutical Society. *J Pharm. Pharmacol.*, 65, 874–883.
- Yu, A.-M., Tian, Y., Tu, M.-J., Ho, P.Y., Jilek, J.L. (2016). MicroRNA Pharmacoeigenetics: Posttranscriptional Regulation Mechanisms behind Variable Drug Disposition and Strategy to Develop More Effective Therapy. *Drug Metab. Dispos.*, 44 (3), 308–319.
- Yu, J., Zhu, T., Wang, Z., Zhang, H., Qian, Z., Xu, H., Gao, B., Wang, W., Gu, L., Meng, J., Wang, J., Feng, X., Li, Y., Yao, X., Zhu, J. (2007). A novel set of DNA methylation markers in urine sediments for sensitive/specific detection of bladder cancer. *Clin. Cancer Res.*, 13, 7296–304.
- Yueh, M.F., Huang, Y.H., Hiller, A., Chen, S., Nguyen, N., Tukey, R.H. (2003). Involvement of the xenobiotic response element (XRE) in Ah receptor-mediated induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1. *J Biol. Chem.*, 278 (17), 15001-6.

- Zandi, R., Selivanova, G., Christensen, C.L., Gerds, T.A. Willumsen, B.M., Poulsen, H.S. (2011). PRIMA-1Met/APR-246 induces apoptosis and tumor growth delay in small cell lung cancer expressing mutant p53. *Clin. Cancer Res.*, 17, 2830-2841.
- Zanger, U.M. and Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Therapeut.*, 138 (1), 103-141.
- Zeng, L., Chen, Y., Wang, Y., Yu, L.R., Knox, B., Chen, J., Shi, T., Chen, S., Ren, Z., Guo, L., Wu, Y., Liu, D., Huang, K., Tong, W., Yu, D., Ning, B. (2017). MicroRNA hsa-miR-370-3p suppresses the expression and induction of CYP2D6 by facilitating mRNA degradation. *Biocheml Pharmacol*, 140, 139-149.
- Zhang, T., Cooper, S. and Brockdorff, N. (2015). The interplay of histone modifications – writers that read. *EMBO reports*, 16, 1467-1481.
- Zhao, Y. and Garcia, B.A. (2015). Comprehensive Catalog of Currently Documented Histone Modifications. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7, a025064

EK-1a. TİTCK Etik kurul onay



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu

Giden Evrak Servisi
Giden Evrak No: 60669
Giden Evrak Tarihi: 14.05.2015
Güvenlik Kodu: 350121
İşlem Takip No: 1644679

Sayı : 26247029-514-05-01
Konu : Gözlemsel Çalışma [2014-PMS-62]

Sayın Dr. Meral GÜNALDI
Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim Araştırma Hastanesi
Tıbbi Onkoloji
İSTANBUL

İlgi : Bakanlık evrak kayıt 20.03.2015 tarihli, 0057112 sayılı ve 1644679 e-takip numaralı yazınız.

Dr. Meral GÜNALDI sorumluluğunda yapılması planlanan ve aşağıda bilgileri verilen çalışma başvuru dosyası ilgili mevzuat gereğince incelenmiş olup;
Bakanlık evrak giriş 15.10.2014 tarihli ve 193620 sayılı yazı ekinde belirtilen merkezlerde çalışmanın başlaması uygun bulunmuştur.

Araştırmanın Adı :	Kolon kanseri tedavisinde irinotekan ilaç cevabını etkileyen farmakogenetik ve farmakoepigenetik faktörler
Koordinatör Merkez:	Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim Araştırma Hastanesi Tıbbi Onkoloji
Koordinatör /Sorumlu Araştırmacı:	Dr. Meral GÜNALDI

Çalışmanın güncel Helsinki Bildirgesine ve Gözlemsel İlaç Çalışmaları Kılavuzuna uygun olarak yürütülmesi,

Çalışmaya, hakkında bilgi toplanan etkin maddeyi içeren tüm müstahzarların dahil edilmesi,

Standart tıbbi bakımın dışında gerekli olabilecek tüm işlemlerin destekleyici, destekleyici yoksa koordinatör hekim (tek merkezli çalışmalarda katılımcı hekim) tarafından karşılanması,

Hasta çalışmaya dahil edilmeden önce tedavisine başlanmış olması,

Çalışma kamuya açık bir veritabanına kaydedilmeli, uluslararası kamuya açık bir veritabanına kaydedilecekse, kaydedilen bilgiler ile Türkiye’de onay almış çalışma bilgilerinin birbiri ile uyumlu olması,

Çalışmanın başlamaması, iptali veya sonlandırılması halinde tarafınıza bilgi verilmesi,

Çalışma süresince ortaya çıkan advers olayların/reaksiyonların, ilgili mevzuata göre bildirilmesi,

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu uyarınca elektronik olarak imzalanmıştır.
Doküman <https://e-islemler.titck.gov.tr/eimza/eimzkontrol.aspx> adresinden kontrol edilebilir.
Güvenli elektronik imzalı aslı ile aynıdır.



Sığırçın Mahallesi, 2176. Sokak No:5 06520 Çankaya/ANKARA
Tel: (0 312) 218 30 00- Fax : (0 312) 218 33 54
www.iegsm.gov.tr



14.05.2015 08:27:19 Tarih Ve 60669 Sayılı Yazının Devamıdır/Bildir

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu

Çalışmanın sonucunun ve yıllık bildirim formunun tarafınıza gönderilmesi,
Çalışmanın kişisel verilerin gizliliğine riayet edilmek kaydıyla kamuya açık bir veri tabanına kaydedilmesi, uluslararası kamuya açık bir veritabanına kaydedilecekse, kaydedilen bilgiler ile Türkiye'de onay almış çalışma bilgilerinin birbiri ile uyumlu olması gerekmektedir.
Yazınızın bir örneğinin ilgili etik kurula iletilmesi hususunda bilginizi ve gereğini rica ederim.

Dr. Hakkı GÜRSÖZ
Kurum Başkanı a.
Başkan Yardımcısı

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu uyarınca elektronik olarak imzalanmıştır.
Doküman <https://e-islemler.ttdk.gov.tr/eimza/eimzkontrol.aspx> adresinden kontrol edilebilir.
Güvenli elektronik imzalı aslı ile aynıdır.



Söğütözü Mahallesi, 2176. Sokak No:5 06520 Çankaya/ANKARA
Tel: (0 312) 218 30 00– Fax : (0 312) 218 33 54
www.iegm.gov.tr

EK-1b ESOĞÜ Tıp Fakültesi Etik Kurul Onayı



ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BAŞKANLIĞI

Prof. Dr.Selma METİNTAŞ
(Başkan)
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Halk Sağlığı Anabilim Dalı

Prof. Dr.Fatma Saltan KILIÇ
(Başkan Yardımcısı)
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Asy.Gör.Dr.Nâif DEĞİRSOY
(Raporör)
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı

Prof. Dr.Yardımar AKGÜN
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr.Özkan ALATAŞ
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Prof. Dr.Cengiz ÇETİN
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Plastik Rekonstrüktif ve
Estetik Cerrahi Anabilim Dalı

Prof.Dr.Özma BÖK
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve
Hastalıkları Anabilim Dalı

Prof. Dr.Nâif ERKASAP
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Bülent GÜRENEK
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Kardiyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Birgül YELKEN
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Anesteziyoloji ve Reanimasyon
Anabilim Dalı

Doç.Dr. Emre MEMCÜ
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Dış Hekimliği Fakültesi

Yrd.Doç.Dr. Nazmiye ÖZENBAŞ
BOYDAĞ
Anadolu Üniversitesi
Halk Sağlığı

Dr.Ecz.Gülçen YAZ GÜZEY
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Sağlık, Uyg. ve Arş.Hst. Enstitüsü

Başmühür Müsteza YEZEL
TÜLÜMSAŞ Genel Müdürlüğü

Varol Çiğit ULUDAĞ
Eskişehir Yurt Müdürlüğü
Müdür Yardımcısı

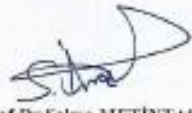
Sayı: 80558721/ 126
Konu: Etik Kurul Kararı

18 Mart 2015

Sayın, Uzm.Dr.Meral GÜNALDI
Bakırköy Dr.Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Tıbbi Onkoloji Bölümü

Tarafınızdan yürütülmekte olan *"Kolon kanseri tedavisinde irinotekan ilaç cevabını etkileyen farmakogenetik ve farmakopigenetik faktörler"* başlıklı proje hakkında alınan karar ilâzıkte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini saygı ile rica ederim.



Prof.Dr.Selma METİNTAŞ
Etik Kurul Başkanı
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Etik Kurul Sekreterliği
Ayşen SERTTAŞ
Tel: 0 222 239 29 79 / 4650



ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BAŞKANLIĞI

GÖRÜŞ FORMU

13 Nisan 2013 tarih ve 28617 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmeliğin "MADDE 26 - (1) Etik kurullar gönüllülerin hakları, güvenliği ve esenliğinin korunması amacıyla araştırma ile ilgili diğer konuların yanı sıra gönüllülerin bilgilendirilmesinde kullanılacak yöntem ve belgeler ile bu kişilerden alınacak olurlar hakkında bilimsel ve etik yönden değerlendirme yapmak amacıyla, üyelerinin çoğunluğu doktora veya tıpta uzmanlık seviyesinde eğitilmiş sağlık meslek mensubu olan, en az yedi ve en çok on beş üyeden oluşurlar" ve "MADDE 26 - (4) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu, biyoyararlanım-biyoeşdeğerlik çalışmaları dışındaki araştırmaları bilimsel ve etik yönden değerlendirmek için kurulur." maddeleri gereği Etik Kurul, çalışmaları "bilimsel ve etik yönden" inceler.

"Kolon kanseri tedavisinde irinotekan ilaç cevabını etkileyen farmakogenetik ve farmakoepigenetik faktörler" başlıklı proje ile ilgili etik kurulumuzun görüşü aşağıdadır.

Araştırma Projesinin Yürütücüsü: Bakırköy Dr.Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Onkoloji Bölümü – Uzm.Dr.Meral GÜNALDI

Danışman: Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü – Prof.Dr.Hülya SİVAS (Doktora Tez Danışmanı), Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi – Yrd.Doç.Dr.Candan HİZEL (Doktora Tez Eş Danışmanı)

Diğer Çalışmacılar: Bakırköy Dr.Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Kliniği – Doç.Dr.Damlanur SAKIZ, Bakırköy Dr.Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi – Dr.Süleyman BÜYÜKAŞIK, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi – Uzm.Duygu ABBASOĞLU (Doktora Tez Sahibi)

25 Aralık 2014 tarih ve 21 sayılı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Görüşü:

Bakırköy Dr.Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Onkoloji Bölümü Uzm.Dr.Meral GÜNALDI tarafından yürütülen *"Kolon kanseri tedavisinde irinotekan ilaç cevabını etkileyen farmakogenetik ve farmakoepigenetik faktörler"* başlıklı çalışmanın görüş ve öneriler doğrultusunda yapılmasının uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir. Çalışmaya başlamadan önce Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. Çalışmanızda başarılar dileriz.

Uzm.Duygu ABBASOĞLU'nun (Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi) 18.02.2015 tarihli yazısı

"Kolon kanseri tedavisinde irinotekan ilaç cevabını etkileyen farmakogenetik ve farmakoepigenetik faktörler" başlıklı çalışmamız için Sağlık Bakanlığı'ndan gelen yazı ve ilgili yazı gereğince yapılan değişiklikler ekte gönderilmiştir. Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BAŞKANLIĞI
KARAR FORMU

Karar Tarihi: 19 Şubat 2014

Karar Sayısı: 35

Bekirköy Dr.Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Onkoloji Bölümü Uzm.Dr.Meral GÜNALDI tarafından yürütülen *"Kolon kanseri tedavisinde irinotekan ilaç cevabını etkileyen farmakogenetik ve farmakoepigenetik faktörler"* başlıklı çalışmanın görüş ve öneriler doğrultusunda yapılmasının uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir.

Çalışmaya başlamadan önce Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.

Çalışmanızda başarılar dileriz.

ACL: GİDİDİR



KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

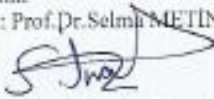
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	<i>Kolon kanseri tedavisinde irinotekan ilaç cevabını etkileyen farmakogenetik ve farmakoepigenetik faktörler</i>
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu - Eskişehir
	TELEFON	0 222 239 29 79 – Dahili: 4690
	FAKS	0 222 239 37 72
	E-POSTA	etikkurul@ogu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ

KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Uzm.Dr.Meral GÜNALDI			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Onkoloji			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Bakırköy Dr.Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Onkoloji Bölümü			
VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-			
DESTEKLEYİCİ	Üniversite			
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alınlar için)	- Prof.Dr.Hülya SİVAS (Doktora Tez Danışmanı) - Yrd.Doç.Dr.Candan HİZEL (Doktora Tez Eş Danışmanı)			
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	Prof.Dr.Hülya SİVAS			
ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
	FAZ 2	☐		
	FAZ 3	☐		
	FAZ 4	☐		
	Gözetimsel ilaç çalışması	☒		
	Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
	In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
	İlaç dışı klinik araştırma	☐		
Diğer ise belirtiniz: Doktora Tezi				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Selma METİNTAŞ
İmza:



Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer alınmadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	<i>Kolon kanseri tedavisinde irinotekan ilaç cevabını etkileyen farmakogenetik ve farmakoepigenetik faktörler</i>
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	17.12.2014 22.12.2015	- 3	Türkçe ☒	İngilizce ☐
	BELGELENDİRİLMİŞ GÖVDELİ OLUR FORMU	17.12.2014 25.12.2014	- 2	Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	17.12.2014 25.12.2014	- 2	Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	-	-	Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Açıklama
		SGORTA
	ARAŞTIRMA BÜLTESİ	☒ Araştırma Belge Formu
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐
	ILAN	☐
	YILLIK BİLDİRİM	☐
	SONUÇ RAPORU	☐
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐
	Diğer:	☒ 1- Çalışma Akış Şeması 2- Irinotekan Hidroklorür Ekst. Maddesi İçeren İlaçlar Listesi 3- İyi Klinik Uygulamalar: Tashihnamesi (İmza) 4- Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi (İmza) 5- Lisanslar 6- Özgürlük Formları

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:38	Tarih: 19.02.2015
Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/palyasyonun gerekece, amaç, yoldaçımı ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiştir ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/palyasyonun başvuru dosyasında belirtilen maddelerde gerektirilenlerde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplanmış bütün etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/palyasyonlar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kanunu'ndan izin alınması gerekmektedir.		

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Selma METINTAŞ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kararı	Onay	Araştırma ile ilgili	Katılım *	İmza
Prof.Dr.Selma METINTAŞ	Halk Sağlığı	Eskişehir Osmangazi Univ. Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr. Fazme Sultan KILIÇ	Tıbbi Farmakoloji	Eskişehir Osmangazi Univ. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Arş.Gör.Dr.Nihal DEMİRİSOY	Tıp Tarihi ve Etik	Eskişehir Osmangazi Univ. Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr. Yurdanur AKGÖN	Tıbbi Mikrobiyoloji	Eskişehir Osmangazi Univ. Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Özkan ALATAŞ	Tıbbi Biyokimya	Eskişehir Osmangazi Univ. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr. Cengiz ÇETİN	Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi	Eskişehir Osmangazi Univ. Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

Etik Kurul Başkanı

Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Selma METINTAŞ

İmza:

Açık Etik Kurul Kararı: Araştırmanın var olduğu bir şekilde izin alınmıştır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	<i>Kolon kanseri tedavisinde irinotekan ilaç cevabını etkileyen farmakogenetik ve farmakopigenetik faktörler</i>
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

Prof.Dr.Osman BÖR	Çocuk Sağ. Ve Hast.	İskenderiye Üniversitesi Ünv. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	E ☒	K ☐	H ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof.Dr.Niğmet ERKASAP	Fizyoloji	İskenderiye Üniversitesi Ünv. Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	E ☐	K ☒	H ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof.Dr.Bakır GÖRENEK	Kardiyoloji	İskenderiye Üniversitesi Ünv. Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı	E ☒	K ☐	H ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof.Dr.Birgül YELKEN	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	İskenderiye Üniversitesi Ünv. Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Rean. Anabilim Dalı	E ☐	K ☒	H ☐	H ☒	E ☐	H ☒
Doç.Dr.Erhan MUMCU	Diş Hekimliği	İskenderiye Üniversitesi Ünv. Diş Hekimliği Fakültesi Pratik Ders Ted. Anabilim Dalı	E ☒	K ☐	H ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Yrd.Doç.Dr. Nazmiye ÇİZENBAŞ BOYDAĞ	Hukuk	Assadeh Üniversitesi Hukuk Fakültesi	E ☐	K ☒	H ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Dr.Ecz.Gökçe YAZ GÜZLEY	Farmakoloji	İskenderiye Üniversitesi Ünv. Tıp Fakültesi Sağlık, Uyg. ve Ağız Hb. Enstitüsü	E ☐	K ☒	H ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Başkanlık Mustafa TÜRÜK	Materyal	TULUMBAŞ Genel Müdürlüğü	E ☒	K ☐	H ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Medik Yrd. Nuri Ünal ULUDAĞ	İşletme	KYE İskenderiye Yurdu	E ☒	K ☐	H ☐	H ☒	E ☒	H ☐

*Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Selma METINTAŞ
İmza:

Not: Etik kurul başkanının imzasının ve oturduğu her sayfa için imza zorunludur.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Duygu Abbasoğlu

Yabancı Dil : İngilizce

Doğum Yeri ve Yılı : Ankara/1984

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2012-2016, Uzman, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Toksikoloji Anabilim Dalı
- 2011-2012, Uzman, Anadolu Üniversitesi, BİBAM
- 2007-2009, MSc, Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı
- 2002,2007, Lisans, Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü

Yayınları ve/veya Bilimsel/Sanatsal Faaliyetleri:

- 2009-2011, Proje, Genetic Nature of Multi Drug Resistance in *Salmonella enterica* Subspecies *enterica* Serovar Infantis, Ankara Üniversitesi
- Abbasoglu, D., Akcelik, M. (2011). Phenotypic and genetic characterization of multidrug-resistant *Salmonella* Infantis strains isolated from broiler chicken meats in Turkey. *Biologia*, vol.66/3:1, 406-410
- Onurdağ, F.K., Özgen, S., Abbasoğlu, D. (2010). Microbiological Investigation of Used Cosmetic Samples. *Hacettepe Üniversitesi Journal of the Faculty of Pharmacy*, 30(1), 1-16.
- Onurdağ, F.K., Özgen, S., Abbasoğlu, D, Kasaplar, S. (2006). Microbiological Analysis of Chicken Met Served for Consumption in Ankara Region. *The Journal of Veterinary Medical Microbiology*, 6 (1-2), 33-39.