

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METHOTREXATE TEDAVİSİ GÖREN ROMATOİD ARTRİTLİ  
HASTALARDA METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ (MTHFR) GEN  
POLİMORFİZMLERİNİN İLAÇ TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Araş. Gör. Aslı TETİK

İZMİR

(2006)

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METHOTREXATE TEDAVİSİ GÖREN ROMATOİD ARTRİTLİ  
HASTALARDA METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ (MTHFR) GEN  
POLİMORFİZMLERİNİN İLAÇ TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Araş. Gör. Aslı TETİK

DANIŞMAN: Yard. Doç. Dr. Zuhal EROĞLU

İZMİR

(2006)



DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

**Başkan** : Yard. Doç. Dr. Zuhâl Eroğlu

**(Danışman)**

**Üye** : Prof. Dr. Nejat Topçuoğlu

**Üye** : Doç. Dr. Cumhuri Gündüz

**Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:** 22.08.06

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimime başladığım andan itibaren bana her konuda destek veren, beni her konuda yüreklendiren ve tez çalışmam sırasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan tez danışmanım Sayın Yard. Doç. Dr. Zuhâl Eroğlu' na,

Yüksek lisans eğitimime başlamamda ve çalışma sürecinde gösterdiği ilgi ve destekten ötürü Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Nejat Topçuoğlu' na, tez çalışmamın başlangıcından itibaren çalışmanın devamında yaptığı yönlendirmelerle çalışmayı yakından ilgiyle takip eden Sayın Yard. Doç. Dr. Buket Kosova' ya, istatistiksel bilgilerinin elde edilmesi aşamasında tecrübe ve bilgilerini benimle paylaşıp yardımını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Cumhuri Gündüz' e,

Çalışmamın her aşamasıyla ilgilenip göstermiş olduğu yardım ve destekten ötürü Sayın Araş. Gör. Vildan Bozok Çetintaş' a, gerekli olan hasta grubunun temin edilmesinde yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Gökhan Keser' e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Vedat İnal' a ve Romatoid Artrit polikliniğinde görevli olan doktorlara, Yüksek lisans eğitimim boyunca paylaştığımız herşey için Sayın Araş. Gör. Rukiye Özel' e ve bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Anabilim Dalı' ndaki diğer tüm çalışanlara ve arkadaşlarıma,

Beni bugünlere getiren, her zaman yanımda olduklarını hissettiren, sevgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme,

TEŞEKKÜR EDİYORUM.

İZMİR / 2006

Ar. Gör. Aslı TETİK

# İÇİNDEKİLER

## 1. BÖLÜM

1.1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1.2. GENEL BİLGİLER.....	5
1.2.1. ROMATOİD ARTRİT.....	5
1.2.1.1 EPİDEMİYOLOJİ.....	5
1.2.1.2 ETİYOLOJİ.....	6
1.2.1.3 PATOLOJİ.....	7
1.2.1.4 KLİNİK BULGULAR.....	9
1.2.1.5 LABORATUAR BULGULARI.....	13
1.2.1.6 RADYOLOJİK BULGULAR.....	13
1.2.1.7 ROMATOİD ARTRİTİN TEDAVİSİ.....	14
1.2.2. FARMAKOGENETİĞE GİRİŞ.....	17
1.2.3. POLİMORFİZMLER.....	23
1.2.3.1. Tek Nükleotid Polimorfizmleri.....	23
1.2.4. METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ .....	25
1.2.4.1. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Enziminin Yapısı ve Görevi.....	25
1.2.4.2. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Geninin Yapısı ve Özellikleri.....	27
1.2.4.2.1. Metilentetrahidrofolat Geninin Diğer Allelik Varyantları.....	28
1.2.4.3.2.MTHFR C677T Gen Polimorfizmi .....	30
1.2.4.3.3.MTHFR A1298C Gen Polimorfizmi .....	32
1.2.5. MTHFR POLİMORFİZMLERİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER.....	33
1.2.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Restriksiyon Enzimi Uzunluk Polimorfizmleri.....	33
1.2.5.2. Real-Time PCR.....	38
1.2.5.2.1. LightCycler Sistemi için Kullanılan Floresan Boyalar ve Ölçüm Yapılan Kanallar.....	41
1.2.5.3.2. Erime Eğrisi Analizi.....	42

## 2. BÖLÜM

2.1. GEREÇ VE YÖNTEM.....	45
2.1.1. Kontrol ve Çalışma Grubu.....	45
2.1.2. Romatoid Artrit Tedavisi.....	45
2.1.3. İlaça Bağlı Totoksisitenin Teşhisi.....	46
2.1.4. MTHFR Polimorfizmleri Analizi.....	46

2.1.4.1.DNA izolasyonu ve Gen polimorfizmlerinin	
Analizleri için Kullanılan cihazlar.....	47
2.1.4.2.DNA izolasyonu ve Gen polimorfizmlerinin	
Analizleri için Kullanılan kimyasal maddeler.....	47
2.1.4.3. DNA İzolasyonu ve Gen Polimorfizmlerinin	
Analizi Sırasında Kullanılan Hazır Kitler.....	47
2.1.4.3.1. High Pure PCR DNA	
İzolasyon Kiti İçeriği.....	47
2.1.4.3.2. LightCycler MTHFR C677T	
Mutasyon belirleme Kit İçeriği.....	48
2.1.4.3.3. Lightcycler MTHFR A1298C LightMix	
Mutasyon Belirleme Kit İçeriği.....	49
2.1.5. MTHFR C677T ve A1298C Polimorfizmlerinin Analizi İçin	
Çalışma Protokolü.....	49
2.1.5.1. DNA İzolasyonu Aşamaları.....	49
2.1.5.2. Termal profil.....	54
2.1.5.2.1. MTHFR C677T Termal Profili.....	51
2.1.5.2.1.1. Denatürasyon.....	51
2.1.5.2.1.2. Amplifikasyon.....	52
2.1.5.2.1.3. Erime Eğrisi Analizi.....	52
2.1.6.2.1.4. Soğutma.....	53
2.1.5.2.2. MTHFR A1298C Termal Profii.....	53
2.1.5.2.2.1. Denatürasyon.....	53
2.1.5.2.2.2. Amplifikasyon.....	54
2.1.5.2.2.3. Erime Eğrisi Analizi.....	54
2.1.6.2.2.4. Soğutma.....	55
2.1.5.3. MTHFR C677T Polimorfizmi için Master	
mix hazırlanması.....	55
2.1.5.4. MTHFR A1298C Polimorfizmi için Master	
mix hazırlanması.....	59
2.1.6. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	57
2.1.6.1 MTHFR C677T Analiz Sonucu.....	57
2.1.6.2 MTHFR A1298C Analiz Sonucu.....	58
2.1.7. İstatistiksel Analiz Yöntemleri.....	60
<b>3. BÖLÜM</b>	
<b>3.1. BULGULAR</b> .....	61
3.1.1. Kontrol ve Çalışma Gruplarının Genel Özellikleri ve İstatistiksel	
Analiz.....	61
3.1.1.1. Kontrol Grubu.....	61
3.1.1.2. Çalışma Grubu.....	62
3.1.1.3. İstatistiksel Analiz.....	64
3.1.2. Yan Etki Gelişimi ile İlgili Bulgular.....	64
3.1.3. MTHFR Polimorfizmi Analiz Bulguları.....	64

3.1.3.1. MTHFR C677T Analiz Sonuçları.....	65
3.1.3.1.1. Kontrol Grubu.....	65
3.1.3.1.2. Çalışma Grubu.....	65
3.1.3.1.3. İstatistiksel Analiz.....	65
3.1.3.2. MTHFR A1298C Analiz Sonuçları.....	68
3.1.3.2.1. Kontrol Grubu.....	68
3.1.3.2.2. Çalışma Grubu.....	68
3.1.3.2.3. İstatistiksel Analiz.....	70
3.1.4. MTHFR C677T ve A1298C Haplotip Analizleri.....	71
3.1.4.1. Kontrol Grubu.....	71
3.1.4.2. Çalışma Grubu.....	71
3.1.4.3. MTHFR C677T ve A1298C Haplotip Analizi .....	71
<b>4. BÖLÜM</b>	
<b>4.1. TARTIŞMA.....</b>	<b>76</b>
<b>5. BÖLÜM</b>	
<b>5.1. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>83</b>
<b>6. BÖLÜM</b>	
<b>6.1. ÖZET.....</b>	<b>84</b>
<b>6.2. ABSTRACT.....</b>	<b>86</b>
<b>7. BÖLÜM</b>	
<b>7.1. YARARLANILAN KAYNAKLAR.....</b>	<b>88</b>
<b>7.2. KISALTMALAR.....</b>	<b>99</b>
<b>7.3. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>102</b>



## Tablolar, şekiller, grafikler, resimler dizini

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
<b>Tablo1:</b> RA' te Sınıflama Kriterleri.....	11
<b>Tablo 2:</b> Romatoid Artritte eklem dışı bulgular.....	12
<b>Tablo 3:</b> MTHFR geninin farklı allelik Varyantları.....	30
<b>Tablo 4:</b> DNA İzolasyonu ve Gen Polimorfizmlerinin Analizi Sırasında Kullanılan Cihazlar.....	47
<b>Tablo 5:</b> DNA İzolasyonu ve Gen Polimorfizmlerinin Analizi Sırasında Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	47
<b>Tablo 6:</b> Erime eğrilerinin değerlendirildiği sıcaklık dereceleri .....	59
<b>Tablo 7:</b> MTX Tedavisi Gören RA' li Olguların Özellikleri.....	62
<b>Tablo 8:</b> Kontrol ve çalışma grubunun yaş,cinsiyet ve homosistein Özellikleri.....	63
<b>Tablo 9:</b> Kontrol ve Çalışma Grubundaki MTHFR C677T Analiz Sonuçları.....	66
<b>Tablo 10:</b> Çalışma Grubundaki Yan Etki Gözlenen ve Yan Etki Gözlenmeyen Gruptaki MTHFR C677T Analiz Sonuçları .....	67
<b>Tablo 11:</b> MTHFR A1298C Analiz Sonuçları.....	68
<b>Tablo 12:</b> Çalışma Grubundaki Yan Etki Gözlenen ve Yan Etki Gözlenmeyen Gruptaki MTHFR A1298C Analiz Sonuçları.....	69
<b>Tablo 13:</b> C677T ve A1298C Gen Polimorfizmleri için Haplotip Analizi.....	72
<b>Tablo 14:</b> C677T ve A1298C Gen Polimorfizmleri için Bileşik Haplotip Analizi.....	73
<b>Tablo 15:</b> Kontrol grubu ile ilgili veriler ve polimorfizm analiz sonuçları.....	74
<b>Tablo 16:</b> Çalışma grubu ile ilgili veriler ve polimorfizm analiz sonuçları.....	75

<b><u>Şekil No</u></b>	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Şekil 1:</b> RA hastalığında eklem hatlarında meydana gelen Değişiklikler.....	5
<b>Şekil 2:</b> Romatoid ele ait Metakarpofalengeal eklem tutulumu.....	10
<b>Şekil 3:</b> Romatoid ele ait Metakarpofalengeal eklem tutulumu.....	10
<b>Şekil 4:</b> Methotrexate Hücresel Metabolizması.....	21
<b>Şekil 5:</b> MTHFR enziminin rolünü gösteren mekanizma. Enzim iki kol arasında metil transferinde rol oynar.....	26
<b>Şekil 6:</b> LightCycler Cihazı.....	38
<b>Şekil 7A:</b> Denatürasyon fazında Hibridizasyon problemleri ve DNA zinciri.....	39
<b>Şekil 7B:</b> Hibridizasyon problemlerinin DNA'ya amplifikasyonu ve FRET.....	40
<b>Şekil 7C:</b> Elongation fazında hibridizasyon problemlerinin DNA'dan ayrılışı.....	41
<b>Şekil 7D:</b> Bir PCR döngüsünün sonunda çift zincirli DNA molekülü ve DNA'dan ayrılmış olan hibridizasyon problemleri.....	41
<b>Şekil 8:</b> LC cihazının optik kanallarının ölçüm yaptığı dalga boyları, kanallar arasındaki etkileşimler ve kullanılan floresan boyalar.....	42
<b>Şekil 9:</b> Hibridizasyon problemlerinin wild type ve mutant DNA ipliğine hibridizasyonları.....	49
<b>Şekil 10:</b> Kanal 2' de C677T polimorfizmi için MTHFR geninin 677. pozisyonunda görülebilecek üç muhtemel genotipinin erime eğrisi analiz sonuçları.....	57
<b>Şekil 11:</b> Kanal 2' de A1298C polimorfizmi için MTHFR geninin 1298. pozisyonunda görülebilecek üç muhtemel genotipinin erime eğrisi analiz sonuçları.....	58

<b><u>Grafik No</u></b>	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Grafik 1:</b> Kontrol ve Çalışma Grubundaki MTHFR C677T Gen Polimorfizminin Genotipe göre Dağılımı .....	66
<b>Grafik 2:</b> Yan Etki Gözlenen ve Gözlenmeyen Hasta Grubundaki MTHFR C677T Gen Polimorfizminin Genotipe göre Dağılımı .....	67

<b>Grafik 3:</b> Kontrol ve Çalışma Grubundaki MTHFR A1298C Gen Polimorfizminin Genotipe göre Dağılımı.....	69
<b>Grafik 4:</b> Yan Etki Gözlenen ve Gözlenmeyen Hasta Grubundaki MTHFR A1298C Gen Polimorfizminin Genotipe göre Dağılımı .....	70
<b>Grafik 5:</b> Kontrol ve çalışma grubunda MTHFR C677T gen polimorfizmi için yapılan haplotip analiz dağılımı.....	72
<b>Grafik 6:</b> Kontrol ve çalışma grubunda MTHFR A1298C gen polimorfizmi için yapılan haplotip analiz dağılımı.....	73

## 1.1. GİRİŞ VE AMAÇ

Romatoid artrit tüm dünya popülasyonunun % 0,5-1' ini etkileyen, bireylerde çalışma kaybı, eklemlerde ağrı, depresyon ve hareket kısıtlılığı gibi önemli komplikasyonlara neden olan kronik bir hastalıktır (40, 56). Son yıllarda yaşam süresini kısaltan bir hastalık olarak da kabul edilmektedir. Kesin tedavisi bulunmayan kronik bir hastalık olması nedeniyle hastalara etkin bir tedavi uygulamak gerekmektedir (22). Romatoid Artrit tedavisinde sıklıkla Methotrexate, Leflunomide, Sulfasalazin gibi ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilaçlar bazı hastalarda mide ağrısı, kusma, diyare şeklinde ortaya çıkan gastrointestinal sistem komplikasyonları ve karaciğer fonksiyon değerlerindeki artış sonucu hepatotoksisite gelişimi gözlemlendiği durumlarda tedavinin kesilmesi önerilmektedir (5, 47, 70). Genel olarak bireyler ilaç tedavilerine karşı farklı yanıtlar vermektedirler. Bu farklı yanıt verme nedenleri arasında, hastanın yaşı, ırkı, cinsiyeti, çevre, ilaç etkileşimleri, eşlik eden başka hastalıklar ve hastanın eş zamanlı aldığı tedaviler gibi pek çok neden sayılabilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla ilaçlara karşı oluşan yanıt farklılıklarında bu nedenlerin yanında bireyler arasındaki genomik farklılıkların da önemli oranda etkili oldukları belirtilmektedir (2, 10). İlaç tedavilerinde bu bireysel farklılıklarının araştırılma gerekliliğinin doğması Farmakogenetik biliminin önem kazanmasına neden olmuştur. Farmakogenetik; bireylerin, genetik yapılarındaki değişkenliğe bağlı olarak ilaç metabolizmalarına karşı verdikleri yanıt ile birey üzerinde oluşabilecek farklı etkileri inceleyen bir bilim dalıdır (34). 1990 yılında başlayan ve 2003 yılında 30.000 genin varlığının ortaya konduğu İnsan Genom Projesi' nin

amaçlarından biri de bireyler arasındaki genetik farklılıkların esas alınarak hastalıkların tedavilerinde en etkili, en düşük yan etkiye sahip ve bireylerin genotip yapılarına en uygun ilaçların seçilmesi olmuştur. Genetik alanında meydana gelen bu gelişmelerle Farmakogenetik biliminde yeni bir çağır açılmıştır. Diğer bazı hastalıklarda görüldüğü gibi Romatoid artrit hastalarına uygulanan ilaç tedavilerinde beklenen yanıtın görülmemesi veya toksisite gelişmesinin nedenlerinden birisinin bireylerin genetik farklılıklarından kaynaklanabileceği yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Yakın gelecekte tedavide kullanılan hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlarla, metabolizmadaki enzimler arasındaki ilişkinin belirlenmesi ile oluşabilecek etki veya yan etkilerin rapor edilebileceği ve RA tedavisinde Farmakogenetiğin uygulanabileceği belirtilmektedir (13, 54, 64).

Romatoid artrit tedavisinde kullanılan ilaçları; non steroid antiinflamatuvar ilaçlar, hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlar ve kortikosteroidler olarak üç gruba ayırmak mümkündür (24). Methotrexate (MTX), son yıllarda Romatoid artrit tedavisinde en yaygın olarak kullanılan hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlardan [disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs)] biridir (4, 70, 71). MTX, güvenilir antiromatik ilaç olarak kabul edilmektedir (12). MTX, diğer hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlara oranla nispeten daha hızlı etkiye ve en iyi etki / toksisite oranına sahip olması nedeniyle daha yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak bunun yanında MTX kullanılan bazı Romatoid Artrit hastalarında, MTX kullanımına bağlı olarak gelişen birtakım komplikasyonlar nedeniyle tedaviye devam edilemediği gözlenmiştir (71, 77). Kapsamlı araştırmalara rağmen MTX' in etki mekanizmasının bugün hala tam olarak

bilinmemesi nedeniyle, MTX tedavisinden hangi hastaların yararlanacağı, hangi hastalarda yan etkilerin görülebileceği önceden tahmin edilememektedir. MTX, homosistein-metionin yolağında bulunan birçok metabolik yolakta etkili olan folik asit antagonisti olarak hücre metabolizmasında, dihidrofolat redüktazı inhibe etmesi yanında, 5,10-metilentetrahidrofolatın (5,10-metilen THF) irreversible olarak 5-metil tetrahidrofolata (5-metil THF) dönüşümünü engelleyebilir (70). Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) enzimi folat metabolizmasının en önemli enzimlerinden biri olup, 5,10-metilen THF irreversible olarak 5-metil THF dönüştürür (11). Bugüne kadar yapılan çalışmalarla bu enzimi kodlayan MTHFR geninde birçok mutasyon ve polimorfizm tanımlanmıştır (52, 62). MTHFR geninde tanımlanan en önemli polimorfizmlerden biri MTHFR C677T polimorfizmidir. İlk defa 1995 yılında tanımlanan bu genetik değişiklik 1997 yılına kadar mutasyon olarak, sonrasında ise toplumlarda %1 den fazla sıklıkla gözlenmesi nedeniyle polimorfizm olarak tanımlanmıştır (14, 63). Bu polimorfizm, MTHFR enzim aktivitesinin azalmasına neden olmakta, azalan enzim aktivitesi sonucunda 5-metil THF düzeyi azalmakta, 5,10-metilen THF miktarı ve plazma homosistein düzeyi ise artmaktadır. Yapılan çalışmalarla, MTHFR C677T gen polimorfizminin enzim aktivitesini etkilemesi nedeni ile kardiyovasküler hastalıklar, serebrovasküler hastalıklar ve neural tüp defektlerin gelişiminde önemli bir genetik risk faktörü olduğu ileri sürülmektedir (11). MTHFR geninde 1998 yılında tanımlanan ve yaygın olarak görülen diğer bir polimorfizm A1298C polimorfizmidir (73). A1298C polimorfizmi de C677T polimorfizmine benzer etki göstererek enzim aktivitesini azaltmaktadır. Bu azalan enzim aktivitesinin nöral tüp defektleri,

prostat kanseri ve kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörü oluşturduğu belirlenmiştir (11, 27, 36). Çeşitli araştırmalarla, MTX tedavisi gören bazı kanser ve Romatoid artritli hastalarda C677T ve A1298C polimorfizmlerine bağlı olarak toksisite gelişebildiği belirtilmiştir (4, 70).

Bu çalışma ile Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Bilim Dalı'nda Methotrexate tedavisi gören 50 Romatoid Artrit tanılı hasta ile 50 sağlıklı kontrol grubu karşılaştırarak MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmlerinin ilaç toksisite gelişimi üzerinde etkili olup olmadığının araştırılarak, gen polimorfizmlerinin toksisite gelişimi üzerinde etkili bulunması halinde, toksisite gelişme riski yüksek olan hastaların önceden belirlenip hastalarda oluşabilecek yan etkilerin en aza indirilmesini ve etkin bir tedavinin sağlanmasını amaçladık.

## 1.2 GENEL BİLGİLER

### 1.2.1 ROMATOİD ARTRİT

Romatoid artrit (RA), etiyojisi tam olarak belli olmayan, sistemik bulgular gösteren, özellikle de eklemleri tutan ve deformitelerle seyreden bir otoimmün hastalıktır. Hastalık eklem sinovyasında yangıya ve çoğalmaya neden olarak başlar. Eklem hattı kalınlaşır ve eklemde ısı artışı, şişme ve ağrıya yol açabilir. Hastalık zamanla sinovya da pannüs formasyonu oluşturarak kıkırdak, kemik doku ve komşu diğer dokularda yıkıma ve sonuçta eklem deformasyonuna neden olabilmektedir (22) (Şekil 1).



**Şekil 1:** RA hastalığında eklem hatlarında meydana gelen değişiklikler

#### 1.2.1.1 EPİDEMİYOLOJİ

RA tüm dünya popülasyonunun % 0,5-1' ini etkileyen kronik bir hastalıktır (56). Bir çok romatolojik hastalıkta olduğu gibi RA' nın kesin nedeni bilinmemekte; ancak immünogenetik, hormonal ve çevresel birtakım faktörlerin rolü olduğu kabul edilmektedir. Hastalık tüm dünya popülasyonunda görülmesine rağmen bu faktörlerin etkisiyle, hastalığın



görülme sıklığı ülkeler ve toplumlar arasında değişmektedir (21). RA, diğer otoimmün hastalıklarda olduğu gibi kadınlarda erkeklere oranla 3 kat daha sık rastlanmaktadır. Hastalık her yaşta görülebilmekle beraber sıklıkla 40 ve 50' li yaşlarda başlar (6).

RA hasta popülasyonunda mortalite oranının genel popülasyona oranla daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun nedeni hızlanan arteroskleroz sonucu kardiyovasküler hastalıkların gelişmesi olduğu ileri sürülmektedir (6).

### **1.2.1.2 ETİYOLOJİ**

RA, etiyojisi bugüne kadar tam olarak anlaşılmamış, klinik septomlarına göre sınıflandırılan Artrit hastalıklarından biri olarak kabul edilmektedir (6, 48).

RA' in genetik yatkınlığının araştırılması amacıyla yapılan aile çalışmalarında, RA' in birinci dereceden akrabalarda genel popülasyondan 3-4 kat daha sık görüldüğü belirtilmektedir ve bu oran %10 olarak tespit edilmiştir. İkizler üzerinde yapılan çalışmalarda tek yumurta ikizleri arasında hastalığın görülme sıklığı %30, çift yumurta ikizleri arasında %5 olarak saptanmıştır (6, 21).

Genetik çalışmalar sonucunda 6. kromozomda, RA oluşumunda İnsan genomunda çok sayıda polimorfik genleri içeren major histokompatibilite kompleksinde yer alan (major histocompatibility complex =MHC) HLA-DR (İnsan Lökosit Antijen ) sistem genlerinin etkili olduğu bildirilmektedir (24, 66). HLA alellerinin tanımlanması ile belirli hastalıkların spesifik HLA antijenleri veya haplotipleri arasındaki ilişki ortaya konabilmektedir. HLA-hastalık

ilişkilerinin büyük çoğunluğunun etiyolojik yapısı henüz tam bilinmemektedir (67). HLA-DR4 ile RA arasındaki ilişkinin tanımlanmasından sonra hastalığa neden olan genetik faktörlerle ilgili bilgiler hızla artmıştır (44). Yapılan çalışmalarda HLA-DR4 alelleri ile Romatoid artrit arasında belirgin bir ilişki olduğu belirtilmektedir (7, 35). Yapılan çalışmalarda, HLA-DR4 alelinin sık görüldüğü etnik topluluklarda, RA riskinin 3-6 kat daha arttığı ortaya konmuştur. DR4 alel sıklığının düşük olduğu topluluklarda DR1, DR6 ve DR10 alt gruplarındaki aleller incelenmiş ve bu alellerin RA için risk oluşturduğu ileri sürülmüştür (44). DR4 aleli, bir otoantikor olan romatoid faktörün (Rf) pozitif olduğu olgularda % 60-70 oranında bulunurken, normal toplumlarda yaklaşık % 25 oranında bulunmaktadır. Romatoid Artrit ile ilişkili bulunan DR alellerin hepsinin yapısında, benzer amino asit dizilimi gösteren bir bölge olduğu görülmektedir. Ortak epitop olarak adlandırılan bu bölgenin tek başına Romatoid Artrit' i başlatmadığı fakat hastalığa genetik yatkınlık yaratıp hastalığın ciddiyetini arttıran faktör olduğu kabul edilmektedir (21, 24, 83). Romatoid Artrit' in oluşumuna neden olan bu genetik faktörlerin yanında, çevresel faktörler arasından da enfeksiyonlar en etkili olanlarıdır (24).

### **1.2.1.3 PATOLOJİ**

RA, eklem içinde sinovyumda primer inflamasyon ile başlaması nedeniyle primer sinovite yol açan bir hastalıktır. Anatomik olarak, normal sinovya eklem aralığına bakan 1-2 hücreden oluşan bazal membransız ince intimal tabakası ile, az sayıda hücre ve daha çok damarsal yapılar içeren subintimal tabakadan oluşur. Bu iki tabaka ortak olarak çalışarak glikozaminoglikanların yapımı ile vasküler yapılara filtrasyonunu sağlarlar.

Subintimal matrikste daha çok kollojen, glikozaminoglikan ve fibronektin bulunur. İntimal tabakadaki sinovyal hücreler, makrofajlara özgü davranışlara sahip olup T-hücrelerinin mediyatörleri olarak görev yaparlar. Ayrıca, normal sinovya romatoid sinovyaya dönüştüğünde allojenik T-hücre aktivasyonunda son derece etkili olurlar (22).

Ayrıntılı yapısal çalışmalarla, sinovyal hücrelerin makrofaj veya fibroblast yapısında hücreler olduğu ortaya konmuştur. Köken olarak kemik iliği kaynaklı ve makrofaj yapısında olan sinovyositler, Fc reseptörleri içerirler ve fagositoz yapma yeteneğindedirler. Bu hücreler ayrıca, yüzeylerinde HLA sınıf 2 moleküllerini de taşırlar. Fibroblast yapısında olanlar ise mezenşimal kökenlidirler ve diğer hücre tipindeki yapısal özellikleri göstermezler. RA sinovyumda bu iki hücre tipi başlangıçta birlikte artmakla beraber, kronikleştikçe fibroblast tipi olan sinovyositlerin artışı gözlenir. Bu hücreler pannüsün esas hücre grubunu oluştururlar. Romatoid sinovyumda histopatolojik olarak inflamatuvar yapı incelendiğinde, mononükleer hücreler; T-lenfositler, makrofajlar ve plazma hücreleri ilk bakışta dikkati çekerler. Anjiogenez başlangıçtan itibaren vardır. Anjiogenez uyarılmasında makrofajlar, fibroblastlar ve lenfositlerden salınan büyüme faktörleri rol oynarlar. Sonuç olarak kısa zamanda sinovya hücrelerinde artış gözlenir ve villöz oluşumlar meydana gelir (22).

Bu prolifer olmuş sinovyal oluşumlara pannüs denir. Bunlar eklemin anatomisinin bozulmasında ve deformatelerin oluşmasında birinci derecede rol oynarlar. Pannüslerin etkili olduğu alan, kıkırdakla kemiğin birleştiği bölgedir. Büyüme etkili sitokinlerden TGF- $\beta$ ' nın (Transforme edici büyüme faktörü- $\beta$ ) pannüs oluşumunda rolü olduğu kabul edilmektedir. RA' li

olgularda sinovyal zarda en fazla görülen T-hücre grubunu daha çok CD4+ yardımcı T-hücreleri oluşturur (22).

#### **1.2.1.4 KLİNİK BULGULAR**

Romatoid artritinin klinik belirtileri sistemik iltihap (halsizlik, amiloidoz), serozit (sinovit, perikardit, plörezi), granülomlar (deri altı ve iç organlarda nodül gelişimi) ve vaskülitlerdir (deri, sinir ve iç organ). Hastalığın başlangıcında halsizlik, terleme ve hafif kilo kaybı görülür ve bu belirtiler zaman zaman eklem yakınmalarının önüne geçebilir (24). Hastalık, olguların % 75' inde yavaş ve sinsi olarak başlar ve haftalar veya aylar süren bir süreçte; artraljiler, sabah tutukluğu ve eklemlerde şişkinlikle seyrederek. Tutulan eklem sayısı da yavaş yavaş artar. Hastaların % 25 kadarı, akut veya subakut başlangıç gösterir. Olguların büyük bir çoğunluğunda hastalık, simetrik poliartritle el küçük eklemlerini (Metakarpofalanjial=MKF ve Proksimal interfalanjial=PİF) ve el bileklerini tutarak başlar. (21, 22) (Şekil 2, 3). Bunlara çoğu kez metatarsofalanjial (MTF) eklemleri de eşlik eder. Ancak çok değişik başlangıç tipleri de görülebilmektedir. Örneğin, 2 dirsek ve 2 diz eklemine tutularak da başlayabilir. Hatta Temporal mandibüler (TM) eklem tutulması hastalığın başlangıcını oluşturabilir (22).

Hastalığın hızlı ve ağrılı olan bu tiplerinin yanında, epizodik ataklarla seyreden ve yıllar geçtikçe kalıcı şekil alarak yerleşen başlangıç formları da vardır. Yineleyen, non-destrüktif seyirli, birkaç saat içinde ağrılı olarak tek eklem tutulmasıyla seyreden palindromik romatizmalı olguların yaklaşık yarısı zamanla tipik RA klinik belirtileri verirler. Uzun süre normal klinik ve

laboratuar bulgularını taşıyan hastaların 1/3' i Rf pozitif görülüyorken bazı Rf negatif olan hastalarda da RA gelişebildiği bildirilmiştir(22).

En çok tutulan eklemlerin başında MKF, el bilekleri ve PİF eklemler gelir (% 70-90 arasında). Dizler, dirsekler ve MTF eklemler de % 60' ların üzerinde etkilenirler. Kalça ve omuzlar, ayak bilekleri ve servikal bölgede özellikle C1 ve C2 % 40-50 oranında tutulan eklemler arasındadır. RA hastalarında dorsal ve lomber vertebraların, sakroiliak eklemlerin ve distal interfalanjial (DİF) eklemlerin tutulması olağan değildir. Kalça eklemleri de seyrek olarak tutulan bölgelerdendir. TM eklem tutuluşunun kısmen düşük oranda görülmesi hastaların yanlış kliniğe başvurmalarına yol açabilir (22).



**Şekil 2:** Romatoid ele ait Metakarpofalengeal eklem tutulumu



**Şekil 3:** Romatoid ele ait Metakarpofalengeal eklem tutulumu

Çok yönlü bir hastalık olan RA tanısının konmasını kolaylaştırmak ve bir standarda bağlamak amacıyla 1987 yılında Amerikan Romatizma Derneği'nin (American Rheumatism Association=ARA) yaptığı sınıflandırma kriterleri oldukça yol gösterici olmuştur (Tablo1). Bir hastayı Romatoid artrit olarak sınıflandırmak için tabloda sayılan kriterlerden 4 tanesinin bulunması gerekmektedir. Eğer 1-4 arasında kriter bulunuyorsa, hastalardaki bu şikayetlerin 1-6 haftadır devam ediyor şartı aranmaktadır. Bu kriterlerin kullanılması ile Romatoid Artrit tanısında % 90 oranında duyarlılık, % 89 oranında özgüllük sağlanabilir (21).

**Tablo 1 : RA' te Sınıflama Kriterleri**

KRİTERLER	TANIMLAMA
1. Sabah tutukluğu	Eklemlerde ve eklem çevresinde 1 saatten fazla süren sabah tutukluğu
2. Üç veya daha fazla eklemden artrit	Hekim tarafından sağ ve sol 14 eklem bölgesinde (PIF, MKF, el bilek, el dirsek, ayak bileği, MTF) tarafından gözlenebilen yumuşak doku şişliği-ARTRİT
3. El eklemlerinde artrit	En az bir bilek, MKF, PIF eklemlerinde şişlik
4. Simetrik artrit	Sağ ve sol taraf eklem bölgelerinde aynı anda tutulma
5. Romatoid nodüller	Doktor tarafından gözlenen kemik çıkıntıları veya bası bölgeleri üzerinde subkütan nodüller
6. Romatoid faktör pozitifliği (Rf )	Herhangi bir metotla anormal miktarda romatoid faktör pozitifliği
7. Tipik radyolojik değişiklikler	Ön-arka-el-bilek grafilerinde erezyonlar, eklem çevresi bölgede dekalsifikasyon (periartiküler osteopeni)

RA, eklem tutulmalarının yanısıra diğer bazı sistemleri de etkileyen bulgular verir. RA' in eklem dışı bulguları Tablo 2' de gösterilmiştir.

Tablo 2: Romatoid Artritte eklem dışı bulgular

Deri tutuluğu:	Romatoid nodüller, Palmar eritem, Vaskülitik deri lezyonları
Solunum sistemi	Plörezi, İnterstisyel akciğer fibrozu, Nodüller, Bronşiolit, Pulmoner hipertansiyona yol açan artrit
Dolaşım sistemi	Perikardit, Mitral valvülopati, İleti bozuklukları, Miyokardit, Koroner vaskülit
Gz tutuluğu	Keratokonjonktivit Sikka, Skelerit, Episkelerit, Skeleromalasi perforans
Nörolojik tutuluğu	Bası nöropatileri, Periferel nöropati, Mononrit multipleks
Musküler tutuluğu	Gcszlk ve artrofi
Hematolojik tutuluğu	Felty sendromu, Anemiler, Lenfoma
Diğerleri	Amiloidoz, Psikosomatik yakınmalar

### **1.2.1.5 LABORATUVAR BULGULARI**

RA hastalarında biyokimyasal parametrelerden Eritrosit Sedimentasyon Hızı (ESH) 0-20 mm/saat ve C-reaktif protein (CRP) 0-0.5 IU/ml normal değerlerinin üstünde saptanmaktadır. Bu değerler özgül olmasalar bile hastalığın aktivite derecesini yansıtırlar.

Aktif RA' li olgularda sıklıkla saptanan bir başka bulgu kronik aneminin oluşmasıdır. Hasta remisyona gittikçe anemi düzelir.

RA hastalarında önemli olan diğer bir parametre Romatoid Faktör' dür (Rf). Rf, IgG' nin Fc fragmanındaki antijenik determinantlara karşı oluşan bir antikordur ve 0-40 IU/ml normal değerler olarak kabul edilmektedir.

### **1.2.1.6 RADYOLOJİK BULGULAR**

Konvansiyonel radyolojik bulgular RA tanısının konmasında ayrı bir öneme sahiptirler. Periost reaksiyonunun olmaması ve osteofitlerin bulunmaması ana radyolojik özelliklerdendir. Ancak RA' teki esas lezyonu erozif değişiklikler oluşturur. Bilindiği gibi, sinovyal eklemlerde hiyalin kartilaj eklem yüzeylerini örter. Eklemi çevreleyen ve fibröz dokuda oluşan kapsülün eklem bakan yüzünü sinovyal zar kaplar. Ancak, kemiğin birleştiği yerde kemik dokuya yapışarak biter. İnflamatuvar olaylarda görülen ana değişiklik,

sinovya da hipertrofiye yol açılmasıdır. Bu hipertrofi, pannüs formasyonu adı verilen ve erozif değişikliklere yol açabilen sinovyal hipertrofi



şeklinde dir. Eroziv değişikliklere yol açılan bölgede de sinovyanın kemik dokusu ile kartilaj doku arasında birleşme yeri oluşabilir. Çünkü, bu bölgede sinovyanın bir kısmı doğrudan kemik yapı ile karşı karşıyadır. Böylece RA' e özgü marjinal erezyonlar ortaya çıkar. MKF, PİF, MTF, karpal kemikler, ulna stiloidi ve radius başı bu erezyonların en çok saptandıkları eklemlerdir. Erezyonlar, multipl, marjinal ve simetrik olarak görülebilirler. Ayrıca, erezyonlar subkondral kistler oluşturur. Bu kistik yapılar sinovyal membranın subkondral bölgeye invazyonu ile açıklanır (22).

RA radyolojisinde inflamatuvar bir artrit in klasik gidiş i zaman içinde belirlenir. Diğer inflamatuvar artritlerde olduğu gibi RA' de gözlenen ilk bulgu, tutulan eklemlerin çevresinde oluşan doku şişkinliğinin saptanmasıdır. Yumuşak doku şişkinliğinin nedeni olarak inflamasyon sonucu ortaya çıkan mediyatörler görülmektedir. Başlangıçta lokal olarak periartiküler bölgede saptanan osteoporoz, hastalık ilerledikçe yaygın hale gelir. Eklemlerin yeterince kullanılamaması sonucu osteoporoz gelişimi ve ağrı artar (22).

### **1.2.1.7 ROMATOİD ARTRİTİN TEDAVİSİ**

Yakın zamana kadar Romatoid artrit tedavisi "piramid prensibi" olarak isimlendirilen bir yaklaşıma göre yapılmaktaydı. Bu tedavide hastalar bir süre sadece birinci basamakta yer alan nonsteroid anti inflamatuvar ilaçlar ile, daha sonra ikinci basamağı oluşturan hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlar ile tedavi edilmekteydiler. Genel olarak birinci basamak ilaçların temelini oluşturan nonsteroid ilaçlar, eklem ağrısı ve sabah tutukluğunu giderilmesinde etkili olduğu, sadece alındıkları süre ile kısıtlı olup

sedimentasyon, CRP gibi akut faz yanıtlarını baskılayamadıkları ve eklem hasarının gelişmesini engelleyemedikleri ileri sürülmekteydi. Aralarında büyük bir fark olmayan bu ilaçların seçimi, ilaçların yarılanma süreleri, yan etki oluşturup oluşturmamaları, hasta uyumu ve fiyat gibi etkenler göz önünde tutularak yapılmaktaydı. İkinci basamak ilaçlar ise, uygun şekilde kullanıldıklarında, erozyonların ortaya çıkışlarını önledikleri veya yavaşlattıkları nedeniyle hastalığın seyrini değiştiren ilaçlar olarak değerlendirilmekteydi (DMARD = Disease Modifying Anti Rheumatic Drugs). Bu ilaçların etkileri nispeten geç ortaya çıkmakla birlikte non steroid ilaçlara nazaran, tedavinin bitiminden sonra bile etkilerini bir süre daha devam ettirmeleri nedeniyle birinci basamak ilaçlardan farklılık göstermektedirler (24). Bu tedavi yaklaşımı, o zamanki bilgilere göre Romatoid artrit'in selim bir hastalık olarak kabul edilmesi ve bu ilaçların, yeni kullanılan ilaçlara göre daha etkili ve daha az toksisite oluşturması nedeniyle tercih edilmekteydi. Hastaların uzun süreli takiplerindeki elde edilen olumsuz sonuçlar, araştırmacıları piramit stratejisinin yeniden gözden geçirilmesine yönlendirmişti (21). Ancak yapılan klinik araştırmalar sonucunda, ikinci basamak ilaçlarının kullanılmasına geç kalındığı düşünülerek "piramid prensibi" tedavisinden uzaklaşıldı. Günümüzde ise Romatoid artrit' te erken ve daha yoğun bir tedavi anlayışı benimsenmiştir. Günümüzde bu ilaçların kullanımına hastalığın teşhisinden hemen sonra başlanması önerilmekle birlikte, hastalığın klinik seyrinin hastadan hastaya çok farklılık göstermesi nedeniyle hastalara standart bir yaklaşımda bulunmak mümkün olmamaktadır. Tedavi seçiminde hastalığın evresi, prognozu ve yaş gibi faktörler önemli rol oynamaktadırlar (24).

Son 10 yıldır, RA tedavisindeki geleneksel nihilist bakış yerini uygun tedavinin kanıta dayalı tutumu ile değiştirmiştir. Bu değişim, hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlar olarak bilinen ilaçların en etkili şekilde kullanılmaya başlanması, DMARDs' ların erken dönemde ve kombinasyonlu olarak kullanılması ayrıca biyolojik DMARDs' ları içeren yeni hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçların geliştirilmesi ile olmuştur. Örneğin Monoterapide kullanılan Methotrexate, TNF inhibitörleri ile kombinasyonlu olarak kullanıldığında RA için etki oranı artmaktadır (43).

Bugün mortalite modifiye edici ilaçların (DMARDs) kullanılmasıyla birlikte Romatoid artrit hastalarında gözlenen deformite, güçsüzlük ve tutulmalar azalmaya başlamıştır (4). Bu ilaçlardan en önemlisi olan Methotrexate ilk kez 1940 yılında kanser hastalarında kullanılmak üzere geliştirilen folik asitin spesifik antagonistidir (8). 1972' de ilk kez romatolojik hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmış, rutin tedaviye ancak 1980' lerden sonra girmiştir. RA hastalarının yarısından fazlasının MTX tedavisi görmesi ve yaygın olarak kullanılması, MTX' ı en sık kullanılan hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaç haline getirmektedir (15, 32, 56, 58, 84). MTX ile tedavi edilen RA hasta oranının 1985 yıllarında % 10' dan 2000 yıllarında % 76' lara kadar yükseldiği belirtilmektedir. Bu artışa neden monoterapide hastalık aktivitesini ve eklem erozyonlarının oranını azaltması yanında uzun dönem mortalitede azalmaya neden olmasıdır. Bu hayatta kalma şansı, diğer ilaçlardan olan sulfasalazine, hydroxychloroquine, altın ve penicillamine tarafından sağlanamamaktadır. Düşük doz haftalık MTX' in güvenli profili diğer seçeneklerle karşılaştırıldığında, 1980 yılından itibaren pratiğe dayanan geniş dağılımlı kullanımı ile tamamen kabul görmektedir (43). Ancak, MTX kullanımını sınırlandıran bazı etmenler olduğu ve bunlardan en önemlisinin

bazı hastalarda toksisite gelişimine neden olduğu bildirilmektedir. Kimi araştırmalarla, RA hastalarının yaklaşık % 10-30' unda toksisite gelişimi nedeniyle MTX tedavisine devam edilemediği gözlenmektedir (56, 58, 71).

Son yıllarda yapılan ilaç araştırmalarıyla, ilaca verilen bireysel yanıtta, çevre, diyet, yaş, cinsiyet, kilo, ilaç etkileşimlerinin yanısıra genetik faktörlerin de önemli olduğu ortaya konmuştur. Bireyin ilaç metabolize edici enzimleri, transport proteinleri ve reseptörlerinin genetik şifreleri ve bu şifrelerde meydana gelen değişiklikler göz önünde bulundurularak, en uygun ilaç ve doz seçimine olanak sağlayan farmakogenetik yaklaşım, bireye özgü tedavilerin geliştirilmesinde giderek önem kazanmaktadır.

### **1.2.2 FARMAKOGENETİĞE GİRİŞ**

Bir ilacın klinikte kullanılabilmesi için öncelikle bilinmesi gereken hususlar klinik etkinliği ve güvenilirliğidir. Ancak ilaçların her hasta üzerinde aynı derecede etkili ve güvenli olması beklenemez. İlaçların eşdeğer dozları bazı bireylerde yeterli etkinlik göstermezlerken, bazı hastalarda toksisiteye bağlı önemli sağlık problemlerinin gelişmesine neden olabilmektedirler (79). Bireyin ilaçlara verdiği yanıtta çevre, diyet, yaş, yaşam stili, sağlık durumu gibi etmenlerin yanısıra genetik yapısına bağlı olarak da farklılıkların olduğu bilinmektedir (2). Genetik faktörler ilaç yanıtında, bireyler arasındaki değişkenliğin en az % 20- 40' indan ve yan etkilerin % 50' sinden sorumlu tutulmaktadır. Genetik biliminde meydana gelen gelişmelerle kişiler veya toplumlar arasında ilaçlara karşı farklı tip ve derecelerde yanıt verilmesine neden olan genetik değişkenliklerle ilgili araştırmalar Farmakogenetik bilimini

doğurmuştur (79). Farmakogenetik bilimi, ilaçların yarar ve yan etkileri üzerinde genlerin etkileşimini tanımlamaktadır (82). Bu alandaki ilk önemli çalışma, 1950 yıllarında insan biyokimyasal genetiğinin ortaya çıkmasıyla başlamıştır (46). Genetik şifremizin belirlenmesiyle birlikte ilaçların metabolik yollarındaki genetik farklılıklarının (polimorfizmlerinin) incelenmesi ilaç tedavilerinde yeni bir çığır açmıştır.

Bireyler arasındaki genetik farklılıkları ortaya koyan genetik polimorfizmler, klinik uygulamada ilaçların metabolizmasında yer alan enzimleri kodlayan genlerde meydana gelen değişikliklerin saptanmasına da olanak sağlarlar. Süksinilkolin apnesi ilk saptanan örneklerdendir. Birçok ilaç grubunun oksidasyonundan sorumlu olan sitokrom P450 (CYP) enzimlerini ve Faz II metabolizmasından sorumlu yollardaki proteinleri kodlayan gen mutasyonlarının ortaya konması, önemli ilaç gruplarının tedavide kullanılma şekillerini değiştirebilmektedir. Örn: Tiopürinler, pürin analogu olarak etki gösteren antineoplastik kemoterapötiklerdir. Bu ilaçlardan; 6-merkaptopürin, çocuklarda akut lenfoblastik lösemi tedavisinde; 6-tioguanin, akut myeloblastik lösemi tedavisinde; azotiopürin ise solid organ transplantasyonunda, romatizmal, dermatolojik hastalıklarda immünsupresif olarak kullanılmaktadır ve Azotiopürin etkisini 6-merkaptopürine çevrilerek göstermektedir. Bu ilaçlar ön ilaçlardır ve önce HGPRT (hipoksantin guanin fosforibozil transferaz) gibi bazı enzimler tarafından aktif hale getirilmeleri gerekmektedir. Bu reaksiyonlarla oluşan tioguanin nükleotidleri DNA' nın, RNA' nın yapısına katılarak ve pürin nükleotid sentezini engelleyerek etkilerini göstermektedirler. Ayrıca bu ilaçlar ksantin oksidaz ile okside

edilerek ya da tiopürin metil transferaz (TPMT) aracılığıyla metilasyona uğrayarak inaktive edilirler. TPMT polimorfizmi bu ilaçların terapötik etkinliği ve toksisiteleriyle yakından ilişkilidir. Çeşitli çalışmalar, TPMT eksikliği olan hastaların tiopürinlerin konvansiyonel dozları ile tedavi edildiklerinde ciddi hematopoetik toksisite riskine sahip olduklarını göstermektedir. Bir çalışmada, Romatizmal hastalıkları nedeniyle azotiopürin alan 67 hastada, (mutant) TPMT alelleri için heterozigot olan 6 hastadan 5' i tedavinin başlangıcından 1 ay sonra lökopeni nedeniyle tedaviyi bırakmak zorunda kaldıkları, altıncı hastanın ise tedaviyi tolere edemeyip tedaviyi daha başlangıç aşamasında bıraktığı bildirilmektedir. Wild type alele sahip olan hastalar ise ortalama 39 hafta boyunca komplikasyon ortaya çıkmaksızın tedaviye devam edebilmişlerdir (34)

Sonuç olarak, son yıllarda genetik alanındaki gelişmeler ile hastaların genetik yapısı belirlenerek, yan etki gelişimine neden olabilecek hastanın yaşı, sağlık durumu, kullandığı diğer ilaçlar da göz önüne alınarak bireye en etkili ve en az yan etkiye sahip en uygun ilaç seçimi ve dozların ayarlanması ile en doğru tedavi şekli uygulanmaya çalışılmaktadır. Böylece hastalara yüksek doz uygulamalarında yan etki oluşması ve ayrıca düşük doz uygulamalarında ise etkin olmayan tedavinin önüne geçilebilmesi mümkün olmaktadır.

Methotrexate (MTX), kemik erezyonlarının gelişimini stabilize ettiği veya geciktirdiği ve hastalık aktivitesini azalttığı ispatlanmış olan ve RA tedavisinde yaygın olarak kullanılan hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçtır (33).

Romatoid artritinin baskılanması için gerekli olan MTX dozunun, Romatoid Artritli bazı hastalar arasında farklılıklar oluşturabileceği bazı durumlarda ise MTX tedavisinin etkisiz kalabileceği belirtilmektedir. Sonuç olarak, bazı hastalarda MTX kullanıma bağlı olarak yan etki oluşumu gözlenirken, bazı hastalarda gözlenmediği belirtilmektedir (70).

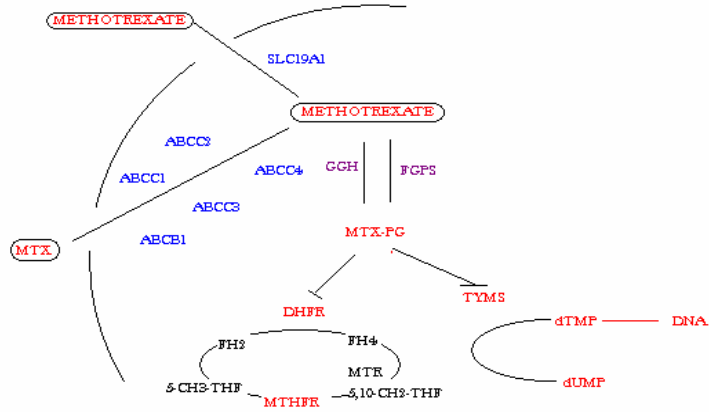
Yapılan birçok çalışmada, MTX kullanımına bağlı olarak nodül (% 8), alerjik pneumonit (% 2-5), merkezi sinir sisteminde gözlenen toksisite (% 1-35), doz sonrası reaksiyonlar (% 10), mide bulantısı, kusma, karın ağrısı ve diyare gibi gastrointestinal komplikasyonlar (GI) (% 60), transaminazların yükselmesi ile karaciğer iltihabı (% 20-58), hematolojik anomaliler (% 1-2), vücutta kızarıklık oluşması (% 1-2) ve kellik (% 5) gibi birçok toksisitenin ortaya çıktığı rapor edilmektedir (56, 58).

MTX tedavisi uygulanan RA' li hastalarda, günde 1-5 mg dozlarda folik asit alınımının MTX' in anti-inflamatuar etkisini azaltmadan toksik etki oluşumunu önleyebildiği ancak yüksek dozlarda toksik etki oluşumunu etkilemesi yanında ilaç etkisini engelleyebildiği belirtilmektedir (8). Yapılan bir çalışmada düşük doz MTX tedavisi gören RA' li hastalarda folik asit yada folinik asit alınımının MTX ile ilişkili mukozal ve gastrointestinal yan etki gelişimini azalttığı bildirilmiştir (50).

## **Methotrexate' in Hücresel Metabolizması**

Methotrexate' in Romatoid artrit ve diğer inflamatuvar hastalıklar üzerindeki etki mekanizması henüz tam olarak anlaşılmamakla birlikte, folik asit metabolizması ve toksisite gelişmesi üzerindeki etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir (56, 71). Methotrexate, ATP-bağlayıcı kaset (ATP-binding cassette=ABC) ve çözünen taşıyıcıların (Solute carrier=SLC) bütün üyeleri tarafından regüle edilen aktif transport mekanizması ile hücre içine girer ve MTX poliglutamata sentaz (FPGs) enzimi tarafından poliglutamata formuna dönüştürülür. Bu işlem gama glutamil hidrolaz (GGH) tarafından tersine çevrilebilir. Poliglutamata formu; MTX' in hücre içinde saklanma, dihidrofolatı tetrahidrofolata (THF) indirgeyerek dihidrofolat redüktazı (DHFR) inhibe etme özelliğine sahiptir. THF, homosisteinden metioninin sentezlenmesi ve poliaminlerin sentezi için gerekli olan 5-metil THF gibi aktif folat kofaktörlerinin yapımı için önemlidir. MTX' in poliglutamata formu ayrıca *de novo* pirimidin biyosentetik yolağında deoksiüredilat' ı deoksitimidilat' a dönüştüren timidilat sentetazı (TYMS) inhibe eder. Folik asit yolağında önemi olan metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi, MTX tarafından direkt olarak inhibe olmaz. MTX' in dihidrofolat redüktazı inhibe etmesine bağlı olarak homosisteinin metionine dönüşümünü engelleyerek, MTX'in intraselüler folat havuzu üzerindeki etkileri nedeniyle *MTHFR* enziminin etkilediği belirtilmektedir ( 57, 58, 70) ( Şekil 4).





**Şekil 4:** Methotrexate' in Hücresel Metabolizması

MTX' in, Romatoid artritli hastalar arasında gözlenen farklı etki ve toksisite oluşturma nedenleri tam olarak açıklanamamasına rağmen, folat metabolizmasında yer alan enzimlerde meydana gelebilecek olası polimorfizmlerin bu farklılıklara neden olabileceği belirtilmektedir (70).

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi, folat metabolizmasının önemli bir enzimi olup Methotrexate metabolizmasında da gerekli olan enzimlerden biridir (11, 54). MTHFR enzimi, homosisteinin remetilasyon döngüsünde homosistein, transsülfürasyon ve remetilasyon yollarını kullanarak metabolize olur (11). Günümüze kadar yapılan araştırmalarla MTHFR geninde birçok polimorfizm (677C→T, 1298A→C, 1711C→T, 1727C→T, 1762A→T, 1768G→A, 1134G→A, 1793G→A) tanımlanmıştır (52, 61). Bu polimorfizmlerden en çok çalışılan polimorfizmler C677T ve A1298C polimorfizmleri olmuştur (11, 52, 62).

Gen varyasyonları veya polimorfizmler, genel olarak populasyonun %1' inden daha yüksek oranda görülen DNA dizi değişiklikleri olarak tanımlanırlar.

Bireyler arasındaki genetik varyasyonlar, DNA dizisindeki tek baz farklılıklarından meydana gelirler. Bunlara tek nükleotid polimorfizmleri veya SNPs (**S**ingle **N**ucleotid **P**olymorphisms) denir (2). Bireylerin genotiplerinde oluşan bu nükleotid değişiklikleri, fenotipe yansiyarak hastalıklara karşı oluşan ilaç yanıtlarını önemli oranlarda değiştirebilmektedirler.

### **1.2.3 POLİMORFİZMLER**

Genetik kararlılık hücre bölünmesinden önce, doğru replikasyon ve bu replikasyon sırasında istenmeden meydana gelebilecek hataların doğru mekanizmalarla tamiriyle sağlanabilir. Tamir mekanizmalarının bozulduğu yada yeterince fonksiyon görmediği durumlarda, organizmada bazı değişiklikler meydana gelir. Herhangi iki insanın DNA dizisi %99.9 özdeştir. Bireyler arasında DNA dizilerinin küçük bir kısmı farklıdır; ki bu, insanlar arasında genetik olarak belirlenen çeşitlilikten sorumludur. Şüphesiz DNA dizilerindeki bazı farklılıklar, az olmakta ve fenotipi etkilememektedirler; halbuki diğer farklılıklar doğrudan hastalıktan sorumludurlar. İki birey arasındaki genomik farklılığın, DNA'daki yaklaşık her 100-300 baz çiftinden birinde ortaya çıktığı ileri sürülmektedir (67).

#### **1.2.3.1 TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMİ**

İnsanlar arasındaki fenotipik farklılıkların çoğu, DNA'da meydana gelen değişimlerden kaynaklanmaktadır. Genellikle tek nükleotid baz çiftinde görülen bu farklılıklar "tek nükleotid polimorfizmleri (SNP)" olarak tanımlanırlar (31). Biyomedikal araştırmalar için büyük öneme sahip olan tek nükleotid polimorfizmleri (SNP), bireyler arasındaki genomda tek nükleotidde

(A, T, C ve G) meydana gelen değişim sonucu oluşan DNA dizi varyasyonlarının en yaygın şeklidirler (30, 31). Örneğin SNP, AAGGCTAA DNA dizisi ATGGCTAA şeklinde değişebilir. Varyasyonun SNP olduğunun düşünölebilmesi için, popülasyonun en az % 1' inde bulunması gerekmektedir. SNP, 3-milyar bazlık insan genomunda her 100-300 bazda bir meydana gelebilir. SNP' ler insan genetik varyasyonlarının % 90' ını oluştururlar. Genelde her üç SNP' den ikisi Sitozin' in (C) Timin' e (T) değişimini içermektedir. SNP' ler genomun bütün kodlayan (gen) bölgelerinde veya kodlanmayan bölgelerinde meydana gelebilir.

DNA dizisindeki varyasyonlar insanların hastalıklara; bakteri, virüs, toksin ve kimyasallar gibi çevresel etkenlere, ilaç ve diğer terapilere verdikleri yanıt üzerinde büyük etkiye sahip olabilirler. Bu yaklaşımdan yola çıkılarak, SNP' ler biyomedikal araştırmalarda ve farmakolojik ürünlerin geliştirilmesinde büyük önem taşımaktadırlar. SNP' lerin evrim sırasında stabil kalmaları, yani kuşaklar arası geçişte fazla değişmemeleri, popülasyon çalışmalarının kolay izlenmesini sağlamaktadır (30).

Genel genomik bilginin sağlanması amacı ile 1999 yılında SNP Konsorsiyumu (The SNP Consortium Ltd.) organize olmuştur. SNP Konsorsiyumu' nun misyonu insan genomunun başından sonuna kadar düzenli bir şekilde dağılmış olan 300.000 SNP' nin ortaya çıkarılmasıdır. 1999 yılında başlayan ve 2001 yılında tamamlanan araştırma sonucunda planlanandan çok daha fazla olmak üzere toplam 1.5 milyon SNP tanımlanmıştır (31).

## 1.2.4 METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ

### 1.2.4. 1METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ (MTHFR)

#### ENZİMİNİN YAPISI VE GÖREVİ

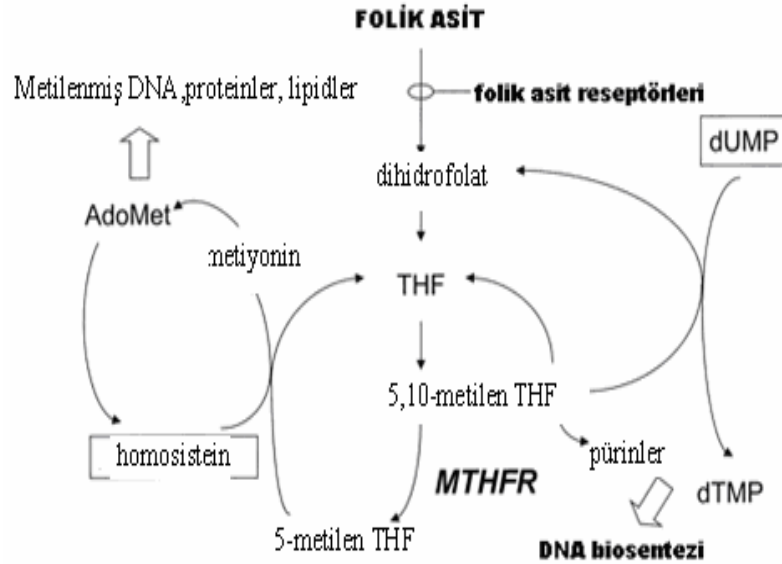
5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi (*MTHFR*), bir flavoprotein olup MTHFR familyasının bir üyesidir.

Memelilerde *MTHFR*' in yapısı hakkındaki ilk bilgiler, domuz karaciğer enziminin saflaştırılması ile elde edilmiştir. Enzim sitoplazmik bir enzim olup, iki alt birimden oluşan homodimer yapıdadır. İnsanlarda yapılan Western Blot analizleri sonucunda 2 izoformu bulunduğu açıklanmıştır. Bu izoformlar dokulara özgü olup, 70 kDa' luk küçük alt birimlere sahip izoform karaciğerden, 77 kDa'luk büyük alt birimlere sahip izoform ise diğer dokulardan izole edilmiştir. Enzim tripsinle proteolize uğratıldığında, 77 kDa' luk alt birim 40 kDa ve 37 kDa' luk kısımlara ayrılmaktadır. Bu ayrılma sonucunda S-adenozil metiyonin (SAM) inhibisyonu ortadan kalkar, ancak enzimin katalitik aktivitesi değişmez. Yapılan çalışmalar sonucunda katalitik bölge olan 40 kDa' luk N-terminal bölgenin substrat ve koenzim bağlama kısımlarına sahip olduğu, regülatör bölge olan 37 kDa' luk C-terminal bölgesinin ise, SAM bağlanma kısmına sahip olduğu gösterilmiştir. Memeli enzimi kendisine nonkovalent olarak bağlı bulunan FAD koenziminini içerir. Bu koenzim, NADPH' in metilentetrahidrofolata (MTHF) transferini sağlar (11).

*MTHFR*, folat metabolizmasının düzenleyici bir enzimi olarak homosisteinin metionine, B<sub>12</sub>-bağımlı remetilasyonunda metil-grup donörü, 5,10-metilentetrahidrofolatın 5-metiltetrahidrofolata değişimini katalizleyerek homosistein metabolizmasında önemli rol oynar (20, 49).

*MTHFR*, 5,10-metilen THF geri dönüşsüz olarak 5-metil THF dönüştürür (Şekil 5).

5-metil tetrahidrofolat; DNA metilasyonu ve metiyonin sentezi için metil grubu sağlar. Bunun için 5-metil THF, metil grubunu vererek homosisteinin değişiminde rol oynar. 5,10-metilen THF ise deoksiüridilatın timidilata dönüşümünde kullanılırken bir taraftan da pürin sentezi için 10-formil THF' a okside olmaktadır (11).



**Şekil 5:** MTHFR enziminin rolünü gösteren mekanizma. Enzim iki döngü arasında metil transferinde rol oynar.

#### 1.2.4.2 METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ (MTHFR) GENİNİN YAPISI VE ÖZELLİKLERİ

İnsan *MTHFR* geninin, kromozom 1p36.3' de lokalize olduğu bulunmuştur (52). Bu genin N-terminal ucunun yapısı tamamen açıklanamamış, promotör bölgesinin transkripsiyon faktörlerinin bağlanması için belirli konsensus dizilerine sahip olduğu ancak TATA kutusu içermediği belirlenmiştir. *MTHFR* geninin 1. ekzonunda alternatif kaynaşma (splicing) bölgesi bulunmakta ve meydana gelen bu alternatif splicing olayları sonucunda değişik dokularda, farklı *MTHFR* transkriptleri (3 transkript) oluşmaktadır (11, 17). Bu genin kompleks gen regülasyonu ile ilişkili olabilecek uzun UTR dizileri bulunduğu saptanmıştır.

İnsan genomik klonunun (17 kb), 2.2 kb uzunluğundaki *MTHFR* cDNA sekansının tamamını içerdiği belirlenmiştir. Bu *MTHFR* cDNA, her biri 102-432 bç uzunluğunda toplam 11 ekzon ve 250 bç' den 1,5 kb' a kadar değişen farklı uzunluklardaki intronlardan oluşmuştur. Ekzon 1, ATG başlama kodonunu taşır ayrıca 5' ve 3' kaynaşma bölgelerinde GT ve AG dinükleotidlerinden oluşan konsensus dizileri yer alır. Ekzon 11' in 3' ucu, cDNA' da poliadenilasyon bölgesiyle sonlanır. Poliadenilasyon sinyali (AACCTA), bu bölgenin 15 bç önünde yer alır (20).

İnsan ve fare *MTHFR* geni üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, *MTHFR* geninde 15 farklı mutasyon ve polimorfizm belirlenmiştir. Bu mutasyonlardan en çok çalışılanlardan vasküler hastalıklar, nöral tüp defektleri ve kolon kanseri ile yakından ilişkili olduğu açıklanan C677T

polimorfizmi enzimin katalitik bölgesinde ve özellikleri nöral tüp defektlerinde etkili olan A1298C polimorfizminin ise enzimin regülatör bölgesinde yer aldığı bildirilmiştir (11).

#### **1.2.4.2.1. MTHFR Geninin Diğer Allelik Varyantları**

##### **MTHFR ARG184TER**

Goyette ve arkadaşları (1994) (19), MTHFR eksikliği görülen bir hastada 559. nükleotidde C→T değişimi sonucu, 184. pozisyondaki Arg→Stop kodonuna dönüştüren ARG184TER varyantını tanımlamıştır (29) (Tablo 3) .

##### **MTHFR ARG158GLN**

Goyette ve arkadaşları (1994) (19), MTHFR eksikliğine bağlı olarak gelişen Homosisteinüri gelişen hastalarda 482. nükleotidde G→A değişimi sonucu, 158. pozisyondaki Arg →Glu değişikliğini ARG158GLN varyantı olarak tanımlamıştır (29) (Tablo 3).

##### **MTHFR 983A-G, ASN324SER**

Hyland ve arkadaşları (1988) (26) ve Wendel ile Bremer (1984) (76), Kluijtmans ve arkadaşları (1998) (37) tarafından şiddetli MTHFR enzim eksikliği gözlenen Greek/Macedonian soyundan bir hasta kadında, *MTHFR* geninde 324. nükleotidde Asn→ Ser' e değişimi sonucu oluşan homozigot 983 A→G mutasyonunu tanımlamıştır (29) (Tablo 3).

##### **MTHFR 1027T-G, TRP339GLY**

Kluijtmans ve arkadaşları (1998) (37), MTHFR eksikliği gözlenen Türk soyundan bir çocukta *MTHFR* geninde 1027. nükleotidde T→G değişimi

tanımlanmıştır. Bu mutasyon triptofan kalıntısını glisine dönüştürmektedir (29) (Tablo 3).

#### **MTHFR 1084C-T**

Hyland ve arkadaşları (1988) (26), Kluijtmans ve arkadaşları (1998) (37) kan bağı olan sağlıklı türk ailesinin bir erkek çocuğunda MTHFR cDNA' da 1084. nükleotidde C→T değişimi sonucu, Arg→ TGA (stop) kodonuna değişikliği ile MTHFR 1084C-T varyantını tanımlamışlardır (29) (Tablo 3).

#### **MTHFR, 1711C-T**

Kluijtmans ve arkadaşları (1998) (37), MTHFR geninde 1711. nükleotidde C→T değişimi sonucu, Arg→ TGA (stop) kodonuna değişimini MTHFR 1711C-T varyantı olarak tanımlamıştır (29) (Tablo 3).

#### **MTHFR, 1081C-T**

Tonetti ve arkadaşları (2000) (68), serum ve kırmızı hücrelerde düşük folat seviyesi ile ilişkili olarak oluşan hiperhomosisteinemi' li ve hipometioninemi 4 kardeş çocukta ekzon 6' da 1081. nükleotitte C→T değişimi sonucu Arg→Cys değişikliğini MTHFR, 1081C-T varyantı olarak tanımlamıştır (29) (Tablo 3).

#### **MTHFR, MET581ILE**

Beckman ve arkadaşları (1987) (3), MTHFR eksikliği olan hastada 1755. nükleotiddeki G→A değiştiği bir polimorfizmi tanımlamıştır. Selzer ve arkadaşları (2003) (61) ise bu mutasyonun azalmış enzim fonksiyonu ile ilişkili olan MTHFR 677C-T ve 1298A-C polimorfizmleri ile birlikte kalıtıldığını göstermiştir (29) (Tablo 3).



**Tablo 3: MTHFR geninin farklı allelik Varyantları**

<b><i>Değişen Nükleotid</i></b>	<b><i>Değişen Aminoasit</i></b>
C <sup>559</sup> T	Arg <sup>184</sup> →Ter
G <sup>482</sup> A	Arg <sup>158</sup> →Gln
C <sup>677</sup> T	Ala <sup>222</sup> →Val
A <sup>1298</sup> C	Glu <sup>429</sup> →Ala
A <sup>983</sup> G	Asn <sup>324</sup> →Ser
T <sup>1027</sup> G	Trp <sup>339</sup> →Gly
C <sup>1084</sup> T	Arg→STOP
C <sup>1711</sup> T	Arg→STOP
C <sup>1081</sup> T	Arg→Cys
G <sup>1755</sup> A	MeT <sup>581</sup> →Ile

#### 1.2.4.3.2 Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) C677T Gen

##### Polimorfizmi

MTHFR C677T polimorfizminde, MTHFR proteinin N-terminal katalitik bölgesini etkileyen 4. ekzonda 677. nükleotid olan C (Sitozin) → T (Timin)' e değişimi sonucu bir nokta mutasyonu oluşmaktadır. Bu mutasyon, genin ürünü olan proteinin 226. pozisyonunda Ala→Val aminoasit değişimine neden olmaktadır. Bunun sonucu MTHFR aktivitesi azalmakta, bu da 5-metil tetrahidrofolat seviyesinde azalmaya ve bunun sonucu olarak da homosisteinin metiyonine dönüşmemesi nedeniyle plazma homosistein seviyesinde artışa neden olmaktadır.

MTHFR C677T polimorfizminde, CC (Alanin/Alanin) homozigot normal, CT (Alanin/Valin) heterozigot ve TT (Valin /Valin) homozigot mutant genotipler görülmektedir.

MTHFR' ın C677T polimorfizminin, kardiyovasküler hastalıklar, nöral tüp defekti, inme, Down sendromu, meme ve endometrial kanser gibi hastalıklarda görülen bir genetik risk faktörü olduğu bilinmektedir. Yapılan çeşitli araştırmalarda, MTHFR 677TT genotipli bireylerin akut lösemi, kolorektal ve akciğer kanserlerine yakalanma riskinin azaldığı, endometrial kanserlerine yakalanma riskinin ise arttığı ileri sürülmektedir.

MTHFR aktivitesini homozigot mutant 677TT genotipine sahip bireylerde heterozigot 677CT ve homozigot normal 677CC genotipine sahip bireylere nazaran azalırken, homosistein seviyesinde önemli oranda artış gösterdiği görülmektedir. MTHFR eksikliğinde, homosisteinden metiyonin oluşumundaki bozukluk, organizmada hem metiyonin (ve S-adenozilmetiyonin) azalmasına hem de homosistein birikiminden kaynaklanan toksik etkilerin ortaya çıkmasına zemin hazırlar (11).

Yapılan bir çalışmada, MTHFR C677T polimorfizminin metabolik ve hastalıklar üzerindeki etkileri ile ilaç tedavisi üzerindeki etkisinin önemi yeniden gözden geçirilmiştir (69).

### **Metabolik etkileri**

#### Homosistein ve Folat

Birçok çalışmada T alelinin, yüksek plazma homosistein konsantrasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmektedir. Total homosistein

konsantrasyonun etkileri, homozigot TT bireylerde düşük folat konsantrasyonlarıyla ifade edilmektedir. 0.5-2.0 mg günlük dozlarda alınan folik asitin, TT genotipli bireylerde total homosistein miktarının azalmasına neden olduğuna işaret etmektedir.

## **İlaç**

Birçok ilaç folat seviyesine etki ederek total homosistein seviyesini arttırabilmektedir. Bu ilaçlar arasında öncelikle klasik antifolat methotrexate, trimethoprim ve ayrıca sulfasalazin, phenytoin carbamazepine, valproic asit antiepileptic gibi ilaçlar bulunur.

Methotrexate veya sulfasalazin ile tedavi edilen Romatoid Artritli ve anticonvulsat tedavisi gören epilepsi hastalarında, TT genotipli bireylerin CC genotipine sahip bireylerden daha yüksek homosistein konsantrasyonuna sahip oldukları belirtilmektedir.

### **1.2.4.3.3.Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) A1298C Gen Polimorfizmi**

MTHFR geninde meydana gelen bir diğer polimorfizm ise enzimi kodlayan genin 7. ekzondaki 1298. nükleotid olan A (Adenin)' in, C (Sitozin)' e değişimi sonucu, MTHFR proteinindeki Glu → Ala amino asit değişimine neden olan polimorfizm olup, enzimin C-terminal regülatör bölgesini etkilemektedir. Bu polimorfizmde yine MTHFR aktivitesi azalır. A1298C polimorfizminin, plazma homosistein konsantrasyonundaki artışını C677T

polimorfizmi kadar etkilemediği ileri sürülse de, tam olarak ne ölçüde etkilediği açıklanamamaktadır (11).

### **1.2.5 MTHFR POLİMORFİZMLERİNİN BELİRLENMESİNDE**

#### **KULLANILAN YÖNTEMLER**

MTHFR gen polimorfizmlerinin belirlenmesinde, diğer polimorfizmlerin belirlenmesinde olduğu gibi, çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. MTHFR gen polimorfizmlerinin analiz edilmesinde ilk defa uygulanan ve hala günümüzde yaygın olarak kullanılmakta olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu/ Restriksiyon Enzimi Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism = RFLP) yöntemidir. Günümüzde bu yöntemin yanı sıra LightCycler (LC) gibi gerçek zamanlı PCR (realtime-PCR) cihazları ve floresan boyalarla işaretli hibridizasyon problemlerinin geliştirilmesi ile Floresan Rezonans Enerji Transferi (FRET) yöntemi de kullanılmaya başlanmıştır.

#### **1.2.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu/ Restriksiyon Enzimi Uzunluk Polimorfizmi (PCR/RFLP)**

**POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU:** Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction = PCR), herhangi bir organizmaya ait genomik DNA' da dizisi bilinen herhangi bir bölgenin *in vitro* şartlarda enzimatik olarak çoğalmasına (amplifikasyon) olanak veren DNA sentez yöntemidir. PCR, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere uygun oligonükleotid primerlerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. PCR, tekrarlanan 3 basamaktan oluşan bir yöntemdir.

Bu basamaklar:

1. oğaltılmak istenen DNA' nın yüksek sıcaklıkta denatüre edilerek tek zincirli hale getirilmesi (denatürasyon) (90 - 95 °C)
2. Özgöl hibridizasyonun gerçekleşmesini sağlayacak sıcaklıkta (Tm değeri nin 3 – 5 °C altındaki sıcaklık), primerlerin hedef bölgeye bağlanması (annealing ) (37 - 65 °C)
3. *Taq* DNA polimeraz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği 72 °C de zincirin primerlerden itibaren uzama (elongation) (70 -75°C) basamaklarından oluşur.

**PCR' da gerekli olan bileşenler;**

**PCR Reaksiyonu için**

1. Amplifiye edilecek hedef DNA dizisini içeren kalıp DNA,
2. Çoğaltılacak DNA molekülündeki hedef dizilere hibridize olabilen, 15 – 20 nükleotidden oluşan sentetik oligonükleotid primer çifti,
3. Zincirin uzama reaksiyonunu gerçekleştiren DNA polimerazın ısıya dayanıklı bir şekli olan *Taq* DNA polimeraz enzimine ihtiyaç duyulmaktadır.

Polimeraz zincir reaksiyonu, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere uygun iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanmaktadır. Oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde

kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere hibridize olurlar. Bu nedenle hedef bölgeye özgül uygun primer çiftinin seçimi çok önemlidir. Primerlerin özgül olarak hedef diziye bağlanmaları düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşmektedir. Denatürasyonu ardışık primerin bağlanması aşamasındaki  $T_m$ /bağlanma sıcaklığının oranının saptanması, PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi açısından büyük bir öneme sahiptir.

$$T_m = [4^\circ\text{C}(\text{G}+\text{C}) + 2^\circ\text{C}(\text{A}+\text{T})]$$

Zincirin uzama reaksiyonu, *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen, optimal  $72^\circ\text{C}$  sıcaklıkta aktivite gösteren ve  $94^\circ\text{C}$ ' de hala aktivitesini kaybetmeyen *Taq* DNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. DNA polimeraz enzimi,  $\text{MgCl}_2$  ve dört çeşit deoksiribonükleotid trifosfat (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlamaktadır.  $\text{Mg}^{2+}$  iyonları dNTP' ler ile çözünebilir kompleksler oluşturmakta, polimeraz aktivitesini stimüle etmekte ve çift iplikli DNA' nın  $T_m$  derecesini arttırmaktadır. Bu nedenle  $\text{MgCl}_2$ , PCR' in özgülüğü ve ürün verimi üzerinde önemli bir etki göstermektedir.

Düşük  $\text{Mg}^{2+}$  konsantrasyonu, azalan ürün oluşumuna, yüksek  $\text{Mg}^{2+}$  konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün artışına neden olmaktadır. Zincirin uzama aşamasının tamamlanmasından sonra tek iplikli DNA, çift iplikli DNA haline gelmektedir. 1. döngü sonunda 2 yeni DNA zinciri oluşmakta ve her döngü sonunda DNA miktarı 2 katına çıkmaktadır. Böylece, 30-45 döngü sonunda hedef DNA' nın milyonlarca kopyası oluşturulmuş olacaktır (65).

## Restriksiyon Enzimi Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Bu yöntem ile tek nükleotid polimorfizmlerinin genotiplendirilmesi iki basamakta gerçekleştirilmektedir. İlk basamak DNA bölgesindeki SNP çevresindeki yaklaşık 200 baz çiftinin milyarlarca kez PCR ile amplifiye edilerek, polimorfik bölgenin genotiplenmesi amacı ile PCR ürününün sekanslanmasına veya jel elektroforezinin ardından enzimle kesilmesine dayanmaktadır (59). RFLP' de DNA' nın enzimatik kesimi restriksiyon endonükleaz enzimlerinin (RE) kullanımı ile gerçekleştirilmektedir. 1950' li yılların başlarında varlıkları saptanan restriksiyon endonükleazlar, çift iplikli sarmal DNA' da özel nükleotid dizilerini tanıyan ve DNA' nın her iki ipliğini kesen enzimlerdir. Bakterilerde bulunan bu enzimler DNA' daki özgün dizileri tanıyarak kesme işlemini, tanıma bölgesinde veya bu bölgenin dışında başka özel bir dizide gerçekleştirirler. Günümüzde 500' den fazla RE ticari olarak üretilmektedir (65). İsimleri izole edildikleri bakterinin ilk üç harfi ile bazen ise aynı bakteriden birkaç enzim elde edilmesi halinde ise ek olarak Roma rakamları ile isimlendirilirler. Örn; ilk tanımlanan restriksiyon enzimlerinden bir tanesi olan *EcoRI* enzimi *E.coli*' den elde edilmektedir.

RFLP, Genomik DNA' nın spesifik bir restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesi ve DNA segmentlerinin agarozda ayrıştırılmasıyla oluşturulan, DNA profillerinin incelenmesine olanak tanıyan bir yöntemdir (1). Çoğu DNA polimorfizmi, tek baz çifti değişimlerini içerir. Bu değişimler restriksiyon enziminin tanıma bölgesini ortadan kaldıran veya yeni bir tanıma bölgesi oluşturan değişimlerdir. Enzim kesimiyle oluşan fragmentlerin boyut

farklılıkları, restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmleri (RFLP) olarak isimlendirilirler. RFLP' ler dialelik olduklarından heterozigositeleri % 50 civarındadır (80).

RFLP yönteminde, örnek DNA bir veya daha fazla restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildikten sonra, elde edilen DNA fragmentlerinin moleküler büyüklükleri göre jel elektroforezinde koşturularak moleküler ağırlık standardı (marker) yardımıyla belirlenebilmektedir. Jel, ethidium bromid ile muamele edildikten sonra fragmentler UV ışık altında görünür hale getirilerek incelenebilmektedir.

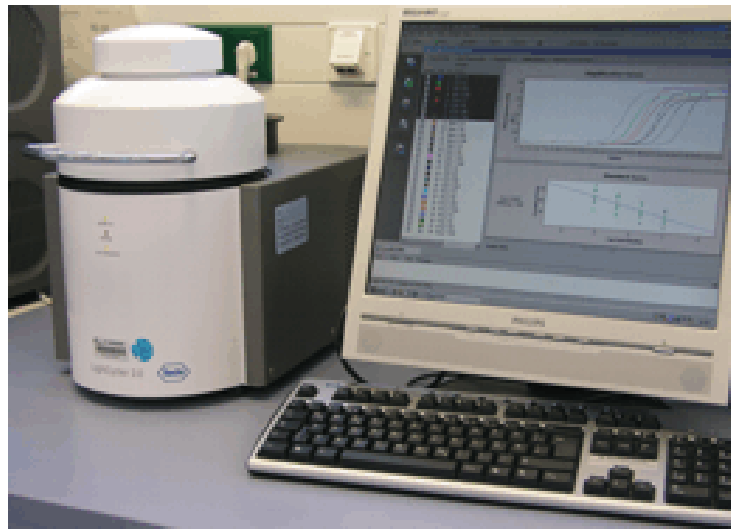
MTHFR gen polimorfizmlerin araştırılma çalışmalarında en sık RFLP yöntemi kullanılmaktadır. *MTHFR* geninde meydana gelen C677T ve A1298C polimorfizmlerinin belirlenebilmesi için 2 farklı restriksiyon enzimi (C677T için *Hinfl*, A1298C için *MbolI* veya *Fnu4HI* ) kullanılmaktadır. (16, 25, 49, 51, 52).

Jele dayalı RFLP yöntemi güvenilir bir yöntem olmakla birlikte çok sayıda örneğin analiz edilmesi gerektiğinde oldukça zaman alıcı bir yöntem olması nedeniyle tercih edilmemektedir. Bu yüzden LC cihazı ile günde yaklaşık 200 örnek çalışılabilirken, RFLP ile günde maksimum 20 örnek çalışılabilmektedir. Bu nedenle geniş epidemiyolojik çalışmalar için RFLP uygun bir yöntem değildir.



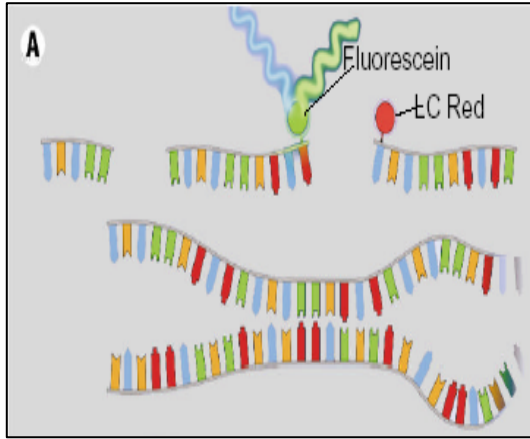
### 1.2.5.2 Gerçek- Zamanlı PCR (Real-Time-PCR)

LightCycler cihazı (Şekil 6), kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PCR reaksiyonu, moleküler genetikte bir reaksiyonda polimorfik DNA bölgelerinin kantifikasyonunun ve tek nükleotid polimorfizm genotiplendirilmelerinin yapılabildiği yeni bir tekniktir (59). Bu teknik kullanılarak nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalinin ölçülmesiyle kısa sürede kantitatif değerler elde edilebilmektedir. Hızlı ısıtma ve soğutma özelliğine sahip olan LightCycler cihazı, 20-30 dakika içinde 30-40 PCR döngü gerçekleştirdiğinden çalışmalarda oldukça avantaj sağlamaktadır (42,59). Gerçek zamanlı-PCR cihazı yüksek hızı yanında, kontaminasyon riskini de minimuma indirmektedir. Ayrıca, amplifikasyon işlemi eş zamanlı olarak bilgisayarda görüntülenebildiği için PCR döngüsü başarısız olduğunda, reaksiyon çok geçmeden sonlandırılabilen veya döngü artışı yapılabilmektedir (59). Elektroforeze gerek kalmadan amplifikasyon ürünlerinin gözlenmesi en büyük kolaylığı sağlamaktadır.



**Şekil 6:** LightCycler Cihazı

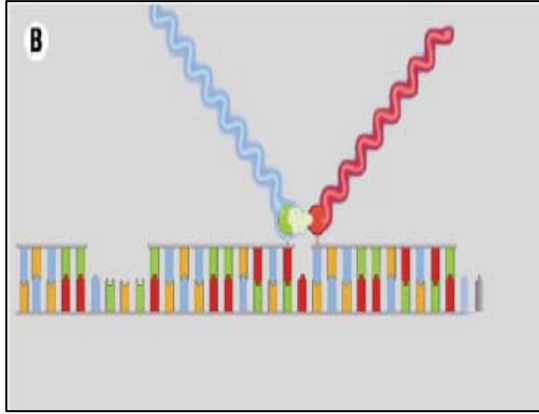
LightCycler cihazı ile genotipleme çalışlarında özgün primerlerin yanında testin özgüllüğünü arttırmak amacıyla hedefe özgü hibridizasyon problemleri kullanılmaktadır. Bu hibridizasyon problemleri, Floresans boyalarla işaretlenen diziyeye özgü oligonükleotid problemleridir. DNA zincirine baş ve kuyruk pozisyonunda hibridize olacak şekilde dizayn edilen bu problemler, DNA zincirindeki polimorfik bölgeyi örten *sensor hibridizasyon probu* ile bu proba yakın bir bölgeye bağlanan *anchor problemlerden* oluşmaktadır (Şekil 7A) (59).



Şekil 7A) Bu hibridizasyon problemlerinden sensor prob 3' ucundan Fluorescein (donör boya) ile anchor prob ise 5' ucundan LC Red 640 (alıcı boya) ile işaretlenmiştir. Denatürasyon basamağında hibridizasyon problemleri solüsyon içerisinde ayrı ayrı durmaktadırlar.

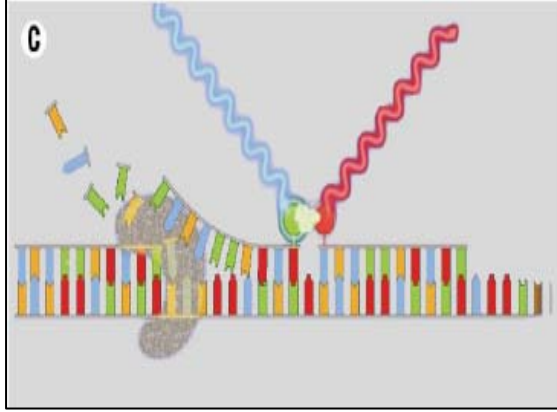
Hibridizasyon problemleri amplifikasyon süresi boyunca DNA segmentine bağlıdırlar. Problemler hedef DNA dizisi üzerinde birbirine 1-5 nükleotit uzaklıktaki mesafede bağlanmakta ve floresan boya ile işaretlenmiş uçlar yan yana gelmektedir. LC cihazının ışık kaynağından (LED= Light Emitting Diode) yayılan 470 nm' deki mavi ışık, fluorescein ile işaretlenmiş olan sensor probunu uyararak daha uzun dalga boyundaki (530 nm) yeşil floresans ışığın yayılmasına neden olmaktadır.

İki floresan boya ile işaretlenmiş olan problemlerin yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji, ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmakta ve yeşil ışığın enerjisi LC Red 640 boyası içinde farklı bir dalga boyundaki (640 nm) kırmızı floresan ışığın yayılmasına neden olmaktadır. İki prob arasında meydana gelen bu enerji transferi, “**Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)**”, olarak adlandırılmaktadır. Bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine diğer bir ifadeyle PCR siklusu süresince oluşan ampliconların miktarına bağlı olarak artmaktadır (73). LC cihazının optikle ilgili birimi olan F2 kanalı, 640 nm’deki kırmızı ışığın yoğunluğunu ölçmektedir. Ölçüm, ışımamanın maksimum olduğu annealing fazı sonunda yapılabilmektedir (Şekil 7B).



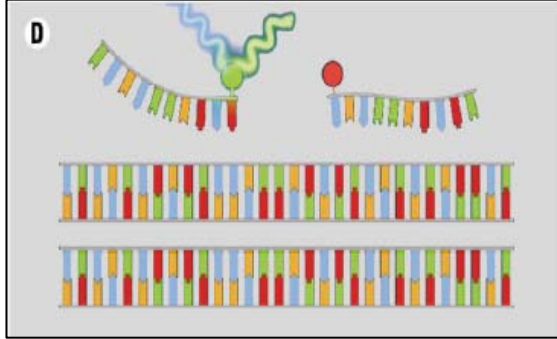
Şekil 7B) Annealing basamağında, problemler hedef DNA dizisine yan yana bağlanır. Birinci boyanın emisyon enerjisi ikinci boyayı eksite eder. Eksite olan ikinci boya da emisyon enerjisi yayar.

Annealing fazından sonra, sıcaklık artar ve hibridizasyon problemleri başlayan uzama (elongation) aşaması sırasında amplicondan ayrılırlar (Şekil 7C).



Şekil 7C) Annealing basamağından sonra gerçekleşen elongation (uzama) basamağının başlamasıyla sıcaklık artışı gerçekleşmekte ve sıcaklık artışıyla hibridizasyon problemleri hedef DNA dizisinden ayrılmaya başlamaktadır.

Elongation aşamasından sonra oluşan ampliconlar çift iplikli olduklarından hibridizasyon problemleri ile hibridize olamazlar. Bu durumda, iki prob birbirlerinden uzakta ve serbest halde oldukları için FRET gerçekleşemez (Şekil 7D).

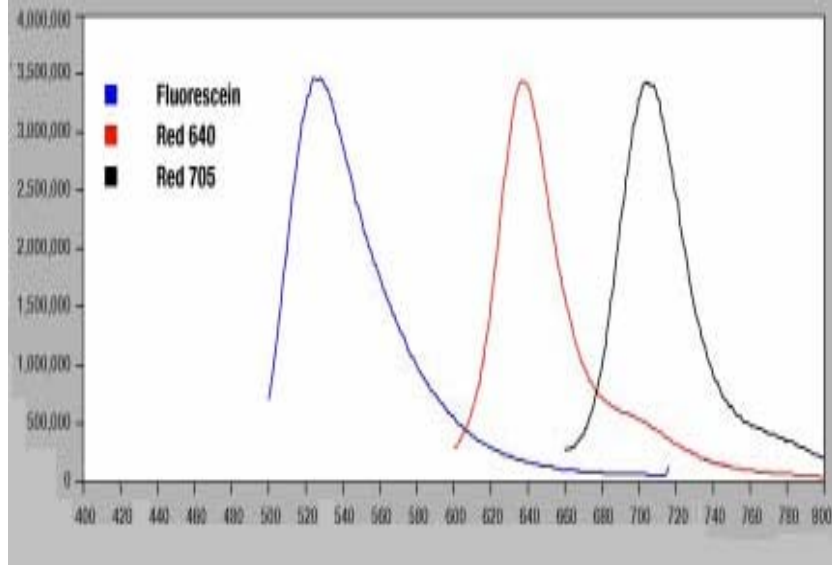


Şekil 6D) Uzama basamağının ardından çift iplikli ampliconların oluşmasıyla hibridizasyon problemleri serbest hale gelmekte ve birbirlerinden uzakta bulunmaktadır.

#### 1.2.5.2.1. LightCycler Sistemi için Kullanılan Floresan Boyalar ve Ölçüm Yapılan Kanallar

LC cihazının optik ünitesi, 3 farklı kanal ile aynı zamanda floresans ölçümü yapabilmektedir. 530 nm' de Kanal 1 (F1) SYBR Green I ve fluorescein boyaalarını kullanılarak, 640 nm' de LC Red 640 boyasını

kullanılarak Kanal 2' de (F2), 705 nm' de LC Red 705 boyası kullanılarak Kanal 3' de (F3) sinyalleri ölçer (Şekil 8) (60).



Dalga boyu (nm)

**Şekil 8:** LC cihazının optik kanallarının ölçüm yaptığı dalga boyları, kanallar arasındaki etkileşimler ve kullanılan floresan boyalar.

#### **1.2.5.3.2 ERİME EĞRİSİ ANALİZİ**

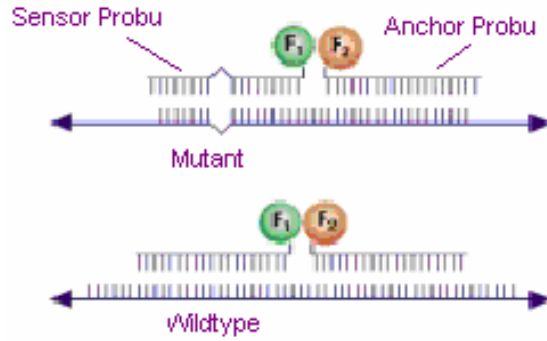
Amplifikasyon metodunun online olarak görüntülenmesine ek olarak amplifikasyondan sonra erime eğrisi analizi aşamasında diziyeye özgü hibridizasyon problemlerinin tek iplikli DNA'ya hibridizasyonu ile mutasyonların, SNP'lerin belirlenmesini ve online olarak görüntülenmesi gerçekleştirilmektedir.

Her çift sarmal DNA (dsDNA), kendine özgü % 50' sinin tek zincirli hale geçmesi için gerekli olan erime sıcaklığı (melting temperature= $T_m$ ) değerine sahiptir. Bu erime sıcaklıkları öncelikle çift sarmal DNA'nın uzunluğuna (Zincirin uzunluğu arttıkça  $T_m$  sıcaklığı artar), GC içeriğinin derecesine (GC'den zengin fragmentlerde  $T_m$  sıcaklığı yüksektir), zincirler arasındaki

bütünlüğün derecesine (Zincirlerden bir tanesinin farklı bir baz içermesi  $T_m$  sıcaklığını düşürür) bağlı olarak belirlenmektedir (80).

Bu aşamada sıcaklık yavaş yavaş  $40^{\circ}$  den  $75^{\circ}\text{C}$ ' ye yükselir. Hibridizasyon problemlerinin DNA zincirine hibridizasyonunu sağlayan kritik sıcaklık ( $T_m$ ), mutasyon veya SNP' nin var olup olmadığının belirleyicisidir (59).

Herhangi bir baz değişikliğinin oluşmadığı bir durumda, hibridizasyon probu DNA kalıbı ile tam olarak eşleşir. Baz değişikliğinin söz konusu olduğu durumlarda ise hibridizasyon probu DNA kalıbı ile tam olarak eşleşemez (Şekil 9). İki eşleşme karşılaştırıldığında baz değişikliğini içermeyen DNA kalıbı, baz değişikliğini içeren DNA kalıbına göre daha yüksek erime sıcaklığı derecesine sahip olmaktadır. İki  $T_m$  derecesi arasındaki fark ile DNA zincirinde mutasyon olup olmadığı belirlenebilmektedir.



**Şekil 9:** Hibridizasyon problemlerinin wild type ve mutant DNA ipliğine hibridizasyonları

Bu erime eğrisi analizi sonucunda, floresan şiddetinin düşüşüne neden olan sıcaklık derecesine göre değerlendirilerek hastanın o gen için genotiplendirilmesi yapılmaktadır. Buna göre homozigot wild type genotipler

yüksek sıcaklıkta tek pik, homozigot mutant genotipler düşük sıcaklıkta tek pik, ve heterozigot genotipler ise düşük ve yüksek sıcaklıkta 2 pik oluşturmasına göre 3 farklı genotip belirlenebilmektedir.

## 2. BÖLÜM

### 2.1. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 2.1.1. Kontrol ve Çalışma Grubu

Kontrol grubu, 32' si kadın, 18' i erkek olmak üzere toplam 50 sağlıklı bireyden; çalışma grubu ise 1990-2005 yılları arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Bilim Dalı Polikliniğinde Romatoid Artrit tanısı almış ve en az 1 yıl Methotrexate (MTX) tedavisi görmüş 35' i kadın, 15' i erkek birey olmak üzere toplam 50 olgudan oluşturulmuştur.

Çalışmaya katılanlar "Gönüllü Olur Formunu " nu imzalayarak çalışmaya katılmayı kabul etmişlerdir. Olguların her birinden EDTA' lı tüplere 3' er ml (2 tüp) kan örneği alınmıştır. Tedavisi takip edilen her olguya hastalık süresi, folik asit kullanımı, kullandığı ilaçlar, ilaç kullanımına bağlı olarak herhangi bir yan etki gelişimi gözlenip gözlenmediği gibi tıbbi özgeçmişleri ile ilgili sorular sorulmuş ve bilgiler kaydedilmiştir.

Çalışma protokolümüz Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu tarafından 28.11.2005 tarihli ve 05-10/7 sayılı karar ile onaylanmıştır.

#### 2.1.2. Romatoid Artrit Tedavisi

Romatoid Artrit tanısı alan hastalara, hastalığın seyrine bağlı olarak, 5-12,5 mg/hafta arasında değişen dozlarda MTX tedavisi uygulanmaktadır.



MTX tedavisi sırasında hastalara yan etki oluşumunun en aza indirilebilmesi için 1-6 mg dozunda folik asit verilmiştir. Tedavinin başlangıcında tüm biyokimyasal parametreler (CRP, Rf, ALT/SGPT, AST/SGOT, homosistein) değerlendirilmiş ve daha sonra tedavi süresi boyunca hastalara 3 ayda bir karaciğer fonksiyon testleri (KCFT); serum alanin transaminaz (ALT/SGPT) ve aspartat transaminaz düzeyleri ölçülmüştür. Takip edilen hastalarda ALT: 0-40 U/L, AST: 5-45 U/L ve homosistein : 5-15 mg/dL normal değerleri olarak kabul edilmiştir.

### **2.1.3. İlaça Bağlı Toksisitenin Teşhisi**

Tedavi süresince hastalar gelişebilecek bulantı, kusma, karın ağrısı, diyare, dispepsi gibi gastrointestinal komplikasyonların etkileri ve karaciğer fonksiyon testlerinin normalin üst sınırının 2 katından yüksek olması gibi durumlar göz önünde bulundurularak sürekli takip edilmişlerdir. Gastrointestinal komplikasyonların geliştiği ve karaciğer fonksiyon testlerinin yüksek çıktığı durumlarda ilaç dozu azaltılmış yada tamamen kesilmiştir .

### **2.1.4. MTHFR Gen Polimorfizmlerinin Analizi**

Çalışma amacımıza uygun olarak seçilmiş olan hasta ve kontrol grubundan elde edilen kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra LC cihazı kullanılarak real-time online PCR yöntemi ile MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmlerinin analizleri gerçekleştirilmiştir.

### 2.1.4.1.DNA İzolasyonu ve Gen Polimorfizmlerinin Analizi Sırasında

#### Kullanılan Cihazlar (Tablo 4)

**Tablo 4: Kullanılan Cihazlar**

Buzdolabı	Siemens
Derin dondurucu (-20°C)	Uğur
LightCycler real-time PCR cihazı	Roche
Otomatik mikropipetler	Eppendorf (10, 20, 100, 200, 1000 µl' lik)
Mikrosantrifüj	Heraus
Termomikser	Eppendorf
Biyokimya Cihazı	Olympus

### 2.1.4.2.DNA İzolasyonu ve Gen Polimorfizmlerinin Analizi Sırasında

#### Kullanılan Kimyasal Maddeler (Tablo 5)

**Tablo 5: Kimyasal Malzemeler**

DNA İzolasyon Kiti (High pure PCR template preparation kit)	Roche
Ethanol	J. T. Baker
İsopropanol	AppliChem
MTHFR A1298C LightMix Mutasyon Belirleme Kiti (LightCycler MTHFR mutation detection kit)	TıbMol Biol
MTHFR C677T Mutasyon Belirleme Kiti (LightCycler MTHFR mutation detection kit)	Roche

### 2.1.4.3. DNA İzolasyonu ve Gen Polimorfizmlerinin Analizi

#### Sırasında Kullanılan Hazır Kitler

##### 2.1.4.3.1. High Pure PCR DNA İzolasyon Kiti İçeriği:

1. Binding Buffer: 4M urea, 200 mM NaCl, 200 mM EDTA, pH 7.4, 25°C
2. Proteinaz K (sulandırıldıktan sonra -20 °C' de saklanmıştır)

3. Inhibitor Removal Buffer: 5 M guanidine-HCL, 20 mM Tris-HCL, pH 6.6, 25°C (20 ml ethanol ilave edildikten sonra kullanılmıştır)
4. Wash Buffer: 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25°C (80 ml ethanol ilave edildikten sonra kullanılmıştır)
5. Elution Buffer: 10 mM Tris, pH 8.5, 25°C
6. High Pure filtreli tüpler
7. Collection tüpler

#### **2.1.4.3.2. LightCycler MTHFR C677T Mutasyon belirleme karışımı:**

MTHFR geninin C677T polimorfizmine özgül primerleri ve hibridizasyon prob karışımını içermektedir.

##### **Primerler:**

Forward: 5' - CGAAGCAGGGAGCTTTGAGGCTG -3' (23 mer)

Reverse: 5' - AGGACGGTGCGGTGAGAGTG -3' (20 mer)

##### **Problar:**

Fluorescein: 5' -GACCTGAAGCACTTGAAGGAGAAGGTGTC -F3' (30 mer)

LCRed640: 5' LCRed640 - CGGGAGCCGATTTTCATCAT -P3' (19 mer)

2. LightCycler-DNA Master Hibridizasyon Probu

3. MgCl<sub>2</sub>

4. H<sub>2</sub>O

5. Pozitif Kontrol

6. Negatif Kontrol

### 2.1.4.3.3. Lightcycler MTHFR A1298C LightMix Mutasyon Belirleme

#### Kiti İçeriği

**1.MTHFR A1298C LightMix mutasyon belirleme karışımı:** *MTHFR* geninin A1298C polimorfizmine özđül primerleri ve hibridizasyon prob karışımını içermektedir.

**Primerler:** Genomik DNA' dan, MTHFR geninin 312 bp ve 275 bp' lık iki fragmentinin amplifiye edilmesi için özđül iki primer çiftini içerir.

**Hibridizasyon probu:** MTHFR geninin 1298. pozisyonundaki nükleotide özđül mutasyon probudur. 5'-ucundan LC Red 640 boyası ile işaretlenmiş ve 3'-ucundan fosforillenmiştir.

2.FastStart DNA Master Hibridizasyon Probu

3.MgCl<sub>2</sub>

4.H<sub>2</sub>O

5.Pozitif Kontrol

6.Negatif Kontrol

### 2.1.5. MTHFR C677T ve A1298C POLİMORFİZMLERİNİN ANALİZİ İÇİN ÇALIŞMA PROTOKOLÜ

#### 2.1.5.1. DNA İZOLASYON AŞAMALARI

1. EDTA' lı tüp içersine alınan kan örneğinden 200 µl steril bir eppendorf tüp içersine alınır.
2. Üzerine 200 µl Binding Buffer ve 40 µl Proteinaz K pipetlenir.

3. Karışım, pipet ile iyice karıştırıldıktan sonra daha önce 72°C' ye getirilmiş olan 'thermomixer' cihazında 10 dakika inkübasyona bırakılır.
4. İnkübasyonun sonunda karışıma 100 µl isopropanol eklenir ve pipet ile iyice karıştırılır.
5. Karışım bir 'collection' tüpün içine yerleştirilmiş 'filtreli' tüp içine pipetlenir.
6. 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
7. Altta biriken sıvı collection tüp ile birlikte atılır. Filtre temiz bir collection tüp içine yerleştirilir.
8. Filtreli tüpün üzerine 500 µl inhibitör removael buffer pipetlenir.
- 8.00 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
9. Altta biriken sıvı collection tüp ile birlikte atılır. Filtre temiz bir collection tüp içine yerleştirilir. Filtreli tüpün üzerine 500 µl wash buffer pipetlenir.
10. 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
11. Altta biriken sıvı collection tüp ile birlikte atılır. Filtre temiz bir collection tüp içine yerleştirilir.
12. Filtreli tüpün üzerine tekrar 500 µl wash buffer pipetlenir.
13. 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
14. Collection tüpte biriken sıvı dökülür ve filtreli tüp aynı collection tüp içine yerleştirilir.
15. 8.000 rpm' de 10 saniye santrifüj edilir.
16. Altta biriken sıvı collection tüp ile birlikte atılır. Filtre temiz bir eppendorf tüp içerisine yerleştirilir.

17. Önceden Thermomixer' de 72°C' de ısıtılmış elution buffer' dan 200 µl filtreli tüp içine pipetlenir.

18. 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.

19. Filtreli tüp atılır. İzole DNA içeren eppendorf tüp üzerine hasta adı-soyadı ve numarası yazılır.

#### **2.1.5.2. Termal profil:**

MTHFR C677T ve A1298C mutasyon belirleme kitlerinin içinde bulunan termal profil; denatürasyon, amplifikasyon, erime eğrisi analizi ve soğutma programlarından oluşmaktadır ve LightCycler cihazının software' ine çalışma protokolü olarak kaydedilmiştir.

#### **2.1.5.2.1 MTHFR C677T TERMAL PROFİLİ**

##### **2.1.5.2.1.1 Denatürasyon:**

<b>PARAMETRE</b>	<b>DEĞER</b>
Döngü Sayısı	1
Analiz Modu	Yok
	1.Segment
Hedef Isı (°C)	94
İnkübasyon Zamanı [sn]	120
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0
İkinci Hedef Isı (°C)	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0
Okuma Modu	yok

### 2.1.5.2.1.2 Amplifikasyon:

<b>PARAMETRE</b>	<b>DEĞER</b>		
Döngü Sayısı	40		
Analiz Modu	Kantitasyon		
	<b>1.Segment</b>	<b>2.Segment</b>	<b>3.Segment</b>
Hedef Isı (°C)	94	55	72
İnkübasyon Zamanı [sn]	0	10	15
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0	20.0	20.0
İkinci Hedef Isı (°C)	0	0	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0	0.0	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0	0	0
Okuma Modu	Yok	Tek	Yok

### 2.1.5.2.1.3 Erime Eğrisi Analizi:

<b>PARAMETRE</b>	<b>DEĞER</b>		
Döngü Sayısı	1		
Analiz Modu	Erime Eğrileri		
	<b>1. Segment</b>	<b>2.Segment</b>	<b>3.Segment</b>
Hedef Isı (°C)	94	40	80
İnkübasyon Zamanı [sn]	0	5	0
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	0.0	20.0	0.6
İkinci Hedef Isı (°C)	0	0	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0	0.0	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0	0	0
Okuma Modu	Yok	Yok	Basamaklı

#### 2.1.5.2.1.4 Soğutma:

PARAMETRE	DEĞER
Döngü Sayısı	1
Analiz Modu	Yok
	<b>1.Segment</b>
Hedef Isı (°C)	40
İnkübasyon Zamanı [sn]	30
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0
İkinci Hedef Isı (°C)	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0
Okuma Modu	Yok

#### 2.1.5.2.2 MTHFR A1298C TERMAL PROFİLİ

##### 2.1.5.2.2.1 Denatürasyon:

PARAMETRE	DEĞER
Döngü Sayısı	1
Analiz Modu	Yok
	<b>1.Segment</b>
Hedef Isı (°C)	95
İnkübasyon Zamanı [dk]	10
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0
İkinci Hedef Isı (°C)	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0
Okuma Modu	Yok



### 2.1.5.2.2.2 Amplifikasyon:

PARAMETRE	DEĞER		
Döngü Sayısı	40		
Analiz Modu	Kantitasyon		
	1.Segment	2.Segment	3.Segment
Hedef Isı (°C)	95	62	72
İnkübasyon Zamanı [sn]	5	10	6
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0	20.0	20.0
İkinci Hedef Isı (°C)	0	0	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0	0.0	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0	0	0
Okuma Modu	Yok	Tek	Yok

### 2.1.5.2.2.3 Erime Eğrisi Analizi:

PARAMETRE	DEĞER		
Döngü Sayısı	1		
Analiz Modu	Erime Eğrileri		
	1.Segment	2.Segment	3.Segment
Hedef Isı (°C)	95	40	85
İnkübasyon Zamanı [sn]	20	20	0
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0	20.0	0.2
İkinci Hedef Isı (°C)	0	0	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0	0.0	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0	0	0
Okuma Modu	Yok	Yok	Devamlı

#### 2.1.5.2.2.4 Soğutma:

PARAMETRE	DEĞER
Döğü Sayısı	1
Analiz Modu	Yok
	<b>1.Segment</b>
Hedef Isı (°C)	40
İnkübasyon Zamanı [sn]	30
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0
İkinci Hedef Isı (°C)	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0
Okuma Modu	Yok

#### 2.1.5.3 MTHFR C677T Polimorfizmi için Master mix hazırlanması

H <sub>2</sub> O	5.4 µl
MgCl <sub>2</sub>	0.6 µl
Forward Primer 'F'	0.5 µl
Reverse Primer 'R'	0.5 µl
Fluorescein Probe 'X'	0.5 µl
LCRed640 Probe 'LC'	0.5 µl
LightCycler-DNA Master Hybridizasyon Probu	<u>+1.0 µl</u>
<b>Master mix hacmi</b>	<b>9.0 µl</b>
Genomik DNA	<u>+ 1.0 µl</u>
<b>Toplam hacim</b>	<b>10 µl</b>

#### 2.1.5.4 MTHFR A1298C Polimorfizmi için Master mix hazırlanması

H <sub>2</sub> O	7,4 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,6 µl
LightMix	4,0 µl
LightCycler-DNA FastStartHybridizasyon Probu	<u>+2.0 µl</u>
<b>Master mix hacmi</b>	<b>15.0 µl</b>
Genomik DNA	<u>+ 5.0 µl</u>
<b>Toplam hacim</b>	<b>20 µl</b>

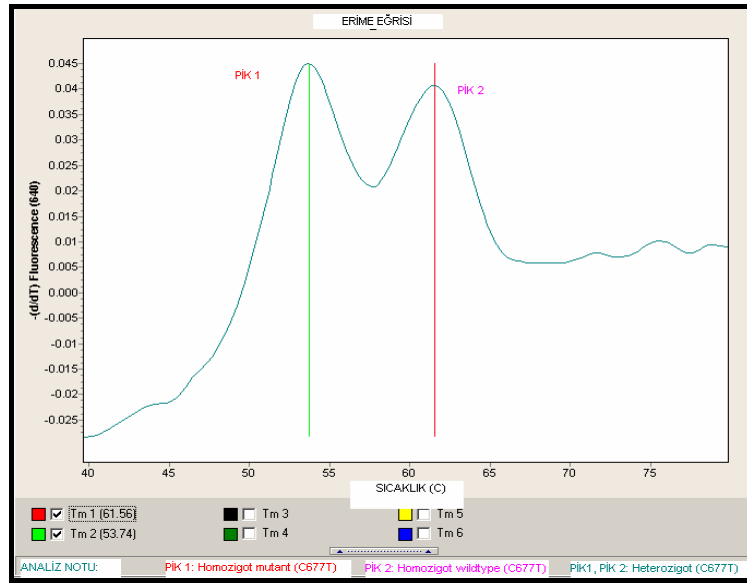
Her bir hasta örneği MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerini belirlemek için yukarıdaki karışımlara göre ayrı ayrı hazırlandıktan sonra, farklı zamanlarda LightCycler cihazına ait özel camdan yapılmış 20 µl' lik kapiller tüp içerisine kondu. Kapiller tüpler 4.000 rpm' de 10 saniye santrifüj edildi. Reaksiyon karışımının her bir kapiller tüpün dibine çöktüğü kontrol edildi. Tüpler reaksiyon tepsisine dizildikten sonra tepsi ile birlikte LightCycler cihazına yerleştirildi. Real-time online PCR' a başlandı ve yaklaşık bir saat sonra sonuçlar elde edildi. MTHFR C677T ve MTHFR A1298C polimorfizmlerinin belirlenmesi için yapılan çalışmada kanal 2' den floresan ölçümü yapıldı.

## 2.1.6 Sonuçların Değerlendirilmesi

Çalışma sonunda oluşan erime eğrisi pik derecelerine göre hasta ve kontrol grubuna ait bireylerin genotiplendirilmeleri homozigot wild type, homozigot mutant ve heterozigot olarak belirlendi.

### 2.1.6.1 MTHFR C677T ANALİZ SONUCU

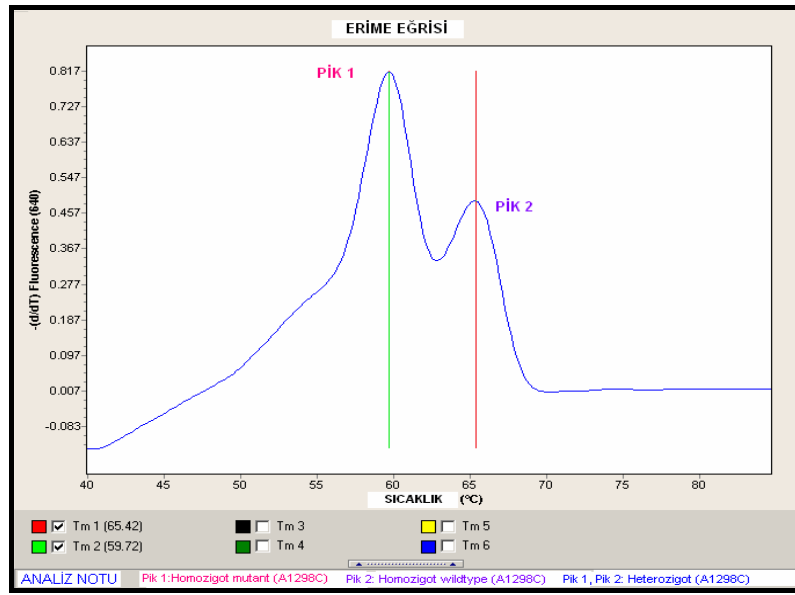
MTHFR 677CC Homozigot Wild type (61.56 °C) ve Homozigot Mutant genotiplerde ( 53.74 °C ) tek sıcaklık derecesinde erime piki oluşurken, Heterozigot genotipde (53.74 °C ve 61.56 °C) ise iki farklı sıcaklık derecesinde erime piki oluşmaktadır (Şekil 10, Tablo 6).



**Şekil 10:** Kanal 2' de C677T polimorfizmi için MTHFR geninin 677. pozisyonunda görülebilecek üç muhtemel genotipinin erime eğrisi analiz sonuçları

### 2.1.6.1 MTHFR A1298C ANALİZ SONUCU

MTHFR 1298AA Homozigot Wild type (65,42 °C) ve Homozigot Mutant genotiplerde ( 59,72 °C ) tek sıcaklık derecesinde erime piki oluşurken, Heterozigot genotipde (59,72 °C ve 65,42°C) ise iki farklı sıcaklık derecesinde erime piki oluşmaktadır (Şekil 11, Tablo 6).



**Şekil 11:** Kanal 2' de A1298C polimorfizmi için MTHFR geninin 1298. pozisyonunda görülebilecek üç muhtemel genotipinin erime eğrisi analiz sonuçları

**Tablo 6:** Erime eğrilerinin değerlendirildiği sıcaklık dereceleri ve genotipler

<b>KANAL 2 (F2) MTHFR C677T ve A1298C Genotiplendirmesi</b>			
<b>Hedef DNA</b>	<b>Erime Piki Sayısı</b>	<b>Erime Piklerinin Tm Değeri</b>	<b>Pikler Arasındaki <math>\Delta T</math></b>
<b>Wildtype Genotip MTHFR C677T</b>	<b>1  (MTHFR 677CC için)</b>	<b>63.1 °C</b>	<b>-</b>
<b>Heterozigot Genotip MTHFR C677T</b>	<b>2  (MTHFR 677CT için)</b>	<b>63.1 °C ve 55.2°C</b>	<b>7,9°C</b>
<b>Mutant Genotip MTHFR C677T</b>	<b>1  (MTHFR 677TT için)</b>	<b>55.2 °C</b>	<b>-</b>
<b>Wildtype Genotip MTHFR A1298C</b>	<b>1  (MTHFR 1298AA için)</b>	<b>65 °C</b>	<b>-</b>
<b>Heterozigot Genotip MTHFR A1298C</b>	<b>2  (MTHFR 1298AC için)</b>	<b>65 °C ve 59 °C</b>	<b>6°C</b>
<b>Mutant Genotip MTHFR A1298C</b>	<b>1  (MTHFR 1298CC için)</b>	<b>59 °C</b>	<b>-</b>

### 2.1.7 İstatistiksel Analiz Yöntemleri

MTX tedavisi gören Romatoid Artritli hastalarda MTHFR polimorfizmlerinin LC cihazı ile analizleri yapıldıktan sonra elde edilen bulguların değerlendirilmesinde istatistiksel olarak Ki-kare Testi ve ANOVA analiz testleri kullanılmıştır.

**Ki-Kare Testi;** Bağımsız grup oranlarının karşılaştırılmasında, uygunluk, varyans, homojenlik ve bağımlı grup testlerinde sıklıkla ve iki veya daha fazla veri seti arasında önemli farkın olup olmadığını belirlemede kullanılan bir istatistiksel analiz yöntemidir. Bu yöntemde gözlenen değerler ile beklenen değerler kıyaslanır. Anlamlılık değeri  $p < 0.05$ ' dir.

**ANOVA Testi;** İki'den çok bağımsız grup verilerinin değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi kullanılmaktadır. Buradaki tek yön ifadesi, grupları birbirinden ayıran tek özellik olduğu, ya da grupların tek değişkeninin değerleri ile ayrıldığı anlamına gelmektedir. Anlamlılık değeri  $p < 0.05$ ' dir.

### 3.1.BULGULAR

#### 3.1.1. Kontrol ve Çalışma Gruplarının Genel Özelliklerinin Karşılaştırılması ve İstatistiksel Analizleri:

Kontrol grubu, aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan 50 sağlıklı olgu; çalışma grubu ise E.Ü.T.F İç hastalıkları A.B.D. Romatoloji Bilim Dalı' nda Romatoid Artrit tanısı konmuş ve en az 1 yıl Methotrexate ( MTX) tedavisi gören 50 olgudan oluşturulmuştur. Araştırma sırasında MTX' in yan etkilerinin takip edilmesi açısından kontrol ve çalışma grubuna ait bireylerin plazma homosistein seviyeleri ve üç ayda bir olmak üzere karaciğer fonksiyon testleri (KFCT) gerçekleştirilmiştir. Yan etkilere neden olabilecek faktörlerin göz önünde bulundurulması amacıyla hasta ve tedaviyi takip eden doktorlardan tıbbi hasta özgeçmişleri ile ilgili veriler toplanmıştır. Laboratuvar aşamasında, kontrol ve hasta grubuna ait bireylerden, EDTA' lı tüplere alınmış olan periferik kan örneklerinden DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra MTHFR C677T ve A1298C polimorfizm analizi Real-time online PCR yöntemi kullanılarak LightCycler cihazında gerçekleştirilmiştir. Çalışma ve kontrol grubuna ait elde edilmiş olan tüm genel veriler, bulgular ve istatistiksel analiz sonuçları sırasıyla aşağıda belirtilmiştir.

##### 3.1.1.1. Kontrol Grubu

Sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubunu oluşturan toplam 50 olgu yaş açısından incelendiğinde yaş ortalaması  $48,88 \pm 15,5$  olarak saptanmıştır. 32' si kadın olan bu olguların yaş ortalaması  $47,22 \pm 12,80$ , 18 erkek olgunun ise  $51,83 \pm 11,5$  olarak hesaplanmıştır. Bu gruba ait olguların homosistein düzeylerinin sonuçları toplanmış ve ortalaması  $8,652 \pm 2,11$  olarak belirlenmiştir.



### 3.1.1.2. Çalışma Grubu

Romatoid Artrit tanısı almış ve MTX kullanan çalışma grubuna ait toplam 50 olguda görülen hastalık süresi ortalama  $148,76 \pm 95,86$  ay, MTX tedavi görme sürelerinin ortalamaları  $67,14 \pm 40,86$  ay olarak belirlenmiştir. Tedavi gören bu olguların aldıkları MTX doz miktarı ortalamasının ise  $10,75 \pm 1,25$  mg/hafta olduğu gözlenmiştir. Bu bilgiler Tablo 7' de özetlenmiştir.

**Tablo 7:** MTX Tedavisi Gören RA' li Olguların Özellikleri

Ortalama Hastalık süresi (n=50)	$148,76 \pm 95,86$ ay
Ortalama MTX Tedavisi (n=50)	$67,14 \pm 40,86$ ay
Ortalama MTX Dozu (n=50)	$10,75 \pm 1,25$ mg/hafta

MTX tedavisi süresince 50 olgunun hepsine, MTX yanında yan etki oluşumunu azaltmak amacıyla, 1-5 mg/hafta dozlarda folat preparatları verildiği bilgisine ulaşılmıştır. Ancak bu hastalardan 35' inin folat preparatlarını kullandığı, geri kalan 15 hastanın ise kullanmadığı görülmüştür. Ayrıca folat kullanan 35 olgunun 31' i, folat alınımına MTX tedavisiyle eş zamanlı olarak başladıklarını diğer 4 olgu ise tedavi sırasında başladıklarını belirtmişlerdir.

Çalışma grubunu oluşturan 50 olgunun yaş ortalaması  $56,68 \pm 12,98$  iken bu gruptaki 35 kadın olguların yaş ortalaması  $55,47 \pm 13,44$ , 15 erkek olgunun ise  $59,53 \pm 11,38$  olarak saptanmıştır.

MTX kullanımına bağlı olarak çalışma grubundaki 50 olgunun 15' inde tedavi sırasında yan etki gelişimi gözleendiği belirtilmiştir. Yan etki oluşumu gözlenen 15 olgunun 1' inde diyare, 4' ünde mide bulantısı, 5' inde mide ağrısı ve 5' inde ise KFCT düzeylerinde normalin 2 katından fazla artış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu grubu oluşturan olguların homosistein düzeylerinin ortalaması  $9,278 \pm 3,14$  olarak belirlenmiştir.

Kontrol grubundaki 50 sağlıklı birey ve MTX tedavisi gören Romatoid Artritli 50 olgudan oluşan çalışma grubunun genel özellikleri yaş, cinsiyet ve homosistein düzeyleri bakımından karşılaştırılarak Tablo 8' de özetlenmiştir. Ayrıca kontrol ve çalışma grubundaki olgulara ait veriler ve polimorfizm analiz sonuçları Tablo 15 ve Tablo 16' da verilmektedir.

**Tablo 8:** Kontrol ve çalışma grubunun yaş, cinsiyet ve homosistein özellikleri

	Kontrol Grubu n=50	Çalışma Grubu n=50
<b>Cinsiyet</b>		
Kadın	35 (% 70)	32 (% 64)
Erkek	15 (% 30)	18 (% 36)
<b>Yaş ortalaması</b>	$48,88 \pm 15,5$	$56,68 \pm 12,98$
Kadın	$47,22 \pm 12,80$	$55,47 \pm 13,44$
Erkek	$51,83 \pm 11,5$	$59,53 \pm 11,38$
<b>Homosistein Seviyesinin Ortalaması</b>	$8,652 \pm 2,11$	$9,278 \pm 3,14$

### **3.1.1.3. İstatistiksel Analiz:**

Tedavi sırasında plazma homosistein seviyesinin yan etki gelişimi üzerinde etkili olup olmadığının belirlenmesi amacı ile kontrol ve çalışma grubunun plazma homosistein seviyeleri karşılaştırılmış ancak aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $X^2=1,340$ ,  $p>0.05$ ). Ayrıca çalışma grubuna ait kadın ve erkek hastalar arasında plazma homosistein düzeyleri açısından da farklılık gözlenmemiştir ( $X^2=1,092$ ,  $p>0.05$ ).

### **3.1.2. Yan Etki Gelişimi İle İlgili Bulgular**

Çalışmamızın başlangıcından itibaren MTX tedavisi gören hastaların KFCT sürekli olarak takip edilmiş ve normal değerlerden sapma gösterip göstermediği kontrol edilmiştir. Hastalığın ilk tanısının konmasından itibaren tıbbi özgeçmişlerine bakılarak 50 olgunun 15' inde mide ağrısı, mide bulantısı, diyare ve KCFT artışı gibi yan etki gelişimi gözleendiği saptanmıştır. KCFT artışı gözlenen 5 olguda ilaç dozu düşürülerek yada tedaviye son verilerek KCFT düzeylerinin normale dönmesi sağlanmıştır. Mide ağrısı ve mide bulantısı gözlenen bazı olgularda tedaviye devam edilirken, bazı olgular tedaviyi bırakmışlardır. Diyare gözlenen bir olguda ise tedaviye devam edilememiştir.

### **3.1.3. MTHFR Polimorfizm Analiz Bulguları**

Realtime online PCR yöntemi kullanılarak kontrol ve çalışma gruplarında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin analizleri yapılmıştır.

### **3.1.3.1. MTHFR C677T Analiz Sonuçları**

*MTHFR C677T* polimorfizmi için wild type genotip erime eğrisi analizinde (CC) 63.1 °C' de tek pik, homozigot genotipi (TT) 55.2 °C' de tek pik ve heterozigot genotip (CT) 63.1 °C ve 55.2°C' lerde iki piki oluşması ile belirlenmiş ve Şekil 8' de gösterilmiştir.

**3.1.3.1.1. Kontrol Grubu:** Bu grupta *MTHFR C677T* polimorfizmi için 28 (% 56) olgunun wild type (CC), 21 (% 42) olgunun heterozigot (CT), 1 (% 2) olgunun homozigot (TT) genotipte oldukları saptanmıştır.

**3.1.3.1.2. Çalışma grubu:** Bu grupta ise 20 (% 40) olgunun wild type (CC), 23 (% 46) olgunun heterozigot (CT), 7 (% 14) olgunun homozigot (TT) genotipe sahip oldukları belirlenmiştir (Tablo 9, Grafik 1).

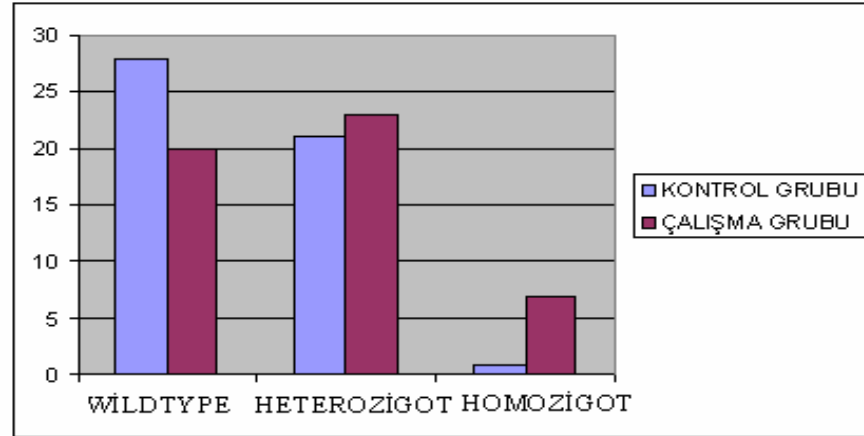
Yan etki gelişimi gözlenen 15 olgudan 6' sının (% 40.00) wild type (CC), 7' sinin (% 46,7) heterozigot (CT) ve 2' sinin (% 13,3) homozigot (TT) genotipte oldukları belirlenmiştir. Yan etki gözlenmeyen 35 olgudan 14' ünün (% 40.00) wild type (CC), 16'sının (% 45,7) heterozigot (CT) ve 5' inin (% 14,3) homozigot (TT) genotipe sahip bireyler oldukları görülmüştür (Tablo 10, Grafik 2).

**3.1.3.1.3. İstatistiksel Analiz:** Kontrol ve çalışma grubundaki olgular *MTHFR C677T* polimorfizmi taşıyıcılığı açısından karşılaştırıldıklarında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $X^2=5,924$   $p>0,05$ ). Çalışma grubunda yan etki gözlenen ve gözlenmeyen gruplar arasında *MTHFR C677T* polimorfizm taşıyıcılığı açısından değerlendirme yapıldığında yine istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır ( $X^2=5,938$   $p>0,05$ ). Ayrıca aynı gruplardaki bireylerin homosistein seviyeleri ve *MTHFR C677T* polimorfizmleri arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığı araştırıldığında aralarında istatistiksel

olarak anlamlı bir fark olduğu gözlenmemiştir ( $X^2=9,797$   $p>0,05$ ). Bunun yanında folik asit kullanan ve kullanmayan gruplar arasında C677T polimorfizm taşıyıcılığı ve homosistein seviyesi karşılaştırıldığında istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir ( $X^2=9,944$   $p>0,05$ ).

**Tablo 9:** Kontrol ve Çalışma Grubundaki MTHFR C677T Analiz Sonuçları

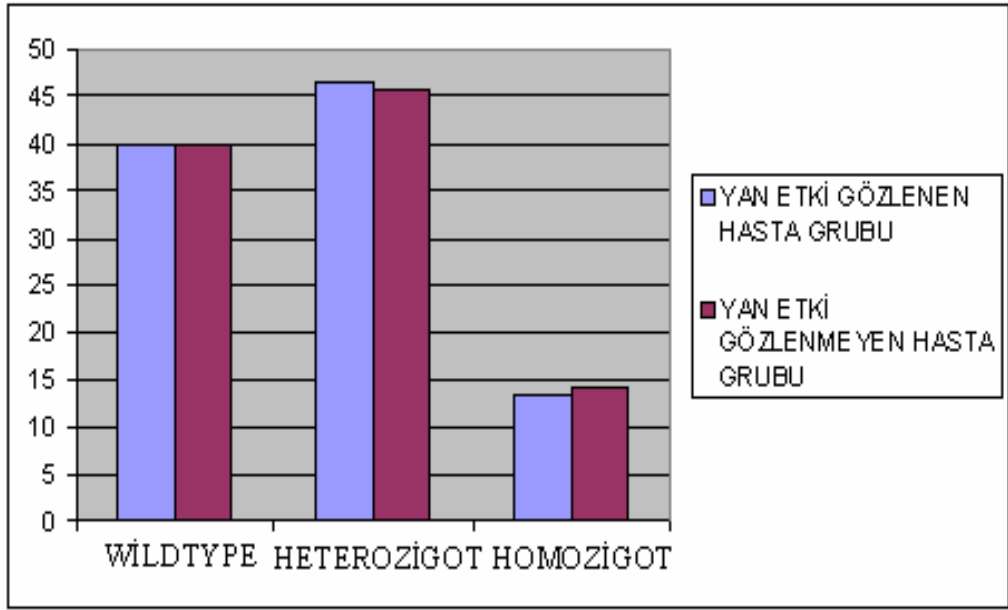
MTHFR C677T	KONTROL GRUBU n=50 (% 100)	ÇALIŞMA GRUBU n=50 (% 100)
WİLDTYPE (CC)	28 (% 56)	20 (% 40)
HETEROZİGOT (CT)	21 (% 42)	23 (% 46)
MUTANT (TT)	1 (% 2)	7 (% 14)



**Grafik 1:** Kontrol ve Çalışma Grubundaki MTHFR C677T Gen Polimorfizminin Genotipe göre Dağılımı

**Tablo 10:** Çalışma Grubundaki Yan Etki Gözlenen ve Yan Etki Gözlenmeyen Gruptaki MTHFR C677T Analiz Sonuçları

MTHFR C677T	Yan Etki Gözlenen Grup n=15 (% 100)	Yan Etki Gözlenmeyen Grup n=35 (% 100)
WİLDTYPE (CC)	6 (% 40)	14 (% 40)
HETEROZİGOT (CT)	7 (% 46,7)	16 (% 45,7)
MUTANT (TT)	2 (% 13,3)	5 (% 14,3)



**Grafik 2:** Yan Etki Gözlenen ve Gözlenmeyen Hasta Grubundaki MTHFR C677T Gen Polimorfizminin Genotipe göre Dağılımı

### 3.1.3.2. MTHFR A1298C Analiz Sonuçları

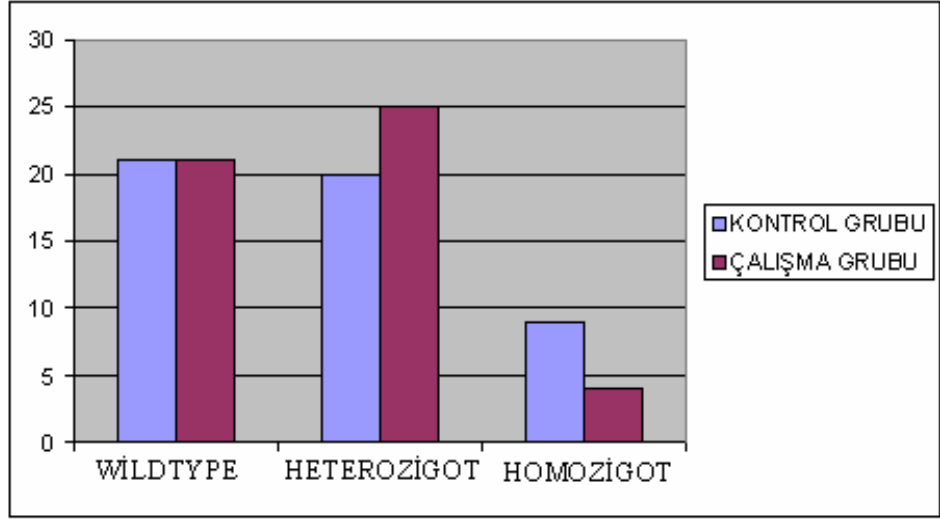
MTHFR A1298C polimorfizm genotiplendirmesi için LightCycler cihazında yaptığımız real-time online PCR sonuçları Şekil 9' da gösterildiği gibi wildtype genotip erime eğrisi 65 °C' de tek pik, homozigot genotip 59 °C' de tek pik ve heterozigot genotip 63.1 ° ve 55.2 °C' lerde iki pik oluşturmalarına göre genotipleri değerlendirilmiştir.

**3.1.3.2.1. Kontrol Grubu:** Bu gruptaki olguların 21' i (% 42) wildtype (AA), 20' si (% 40) heterozigot (AC), 9' u (% 18) ise homozigot (CC) genotipte oldukları saptanmıştır.

**3.1.3.2.2. Çalışma grubu:** Çalışma grubunda ise 21' i (% 42) wild type (AA), 25' i (% 50) heterozigot (AC), 4' ü (% 8) ise homozigot (CC) genotipte oldukları saptanmıştır (Tablo 11, Grafik 3). Yan etki gelişimi gözlenen 15 olgunun 6' sı (% 40.00) wild type (AA), 8' i (% 53.3) heterozigot (AC) ve 1' i (% 6.70) homozigot (CC) genotipe sahip oldukları belirlenmiştir. Yan etki gözlenmeyen 35 olgunun 15' inin (% 40.00) wild type (AA), 17' sinin (% 46,7) heterozigot (AC) ve 3' ünün (% 8,6) homozigot (CC) genotipte oldukları belirlenmiştir (Tablo 12, Grafik 4).

**Tablo 11:** MTHFR A1298C Analiz Sonuçları

MTHFR A1298C	KONTROL GRUBU n=50 (% 100)	ÇALIŞMA GRUBU n=50 (%100)
WİLDTYPE (AA)	21 (% 42)	21 (% 42)
HETEROZİGOT (AC)	20 (% 40)	25 (% 50)
MUTANT (CC)	9 (% 18)	4 (% 8)

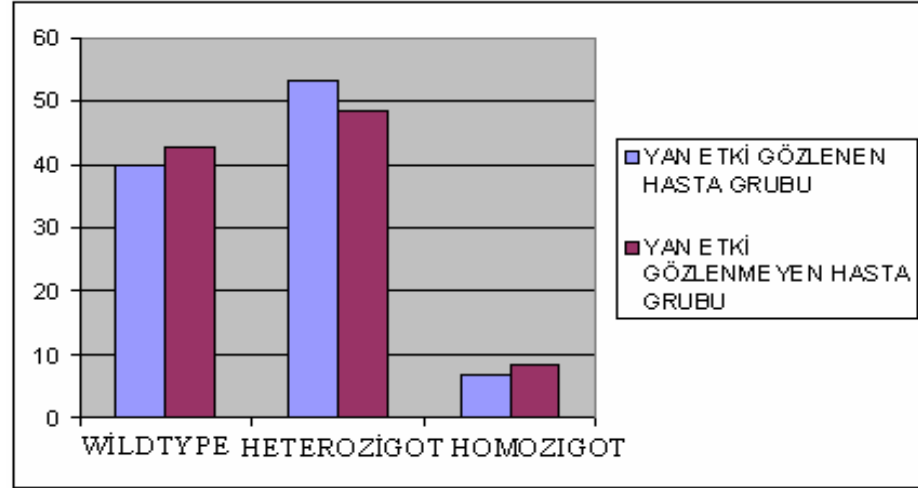


**Grafik 3:** Kontrol ve Çalışma Grubundaki MTHFR A1298C Gen Polimorfizminin Genotipe göre Dağılımı

**Tablo 12:** Çalışma Grubundaki Yan Etki Gözlenen ve Yan Etki Gözlenmeyen Gruptaki MTHFR A1298C Analiz Sonuçları

MTHFR A1298C	Yan Etki	Yan Etki
	Gözlenen Grup n=15 (% 100)	Gözlenmeyen Grup n=35 (%100)
WILDTYPE (AA)	6 (% 40)	15 (% 42,9)
HETEROZİGOT (AC)	8 (% 53,3)	17 (% 48,6)
MUTANT (CC)	1 (% 6,7)	3 (% 8,6)





**Grafik 4:** Yan Etki Gözlenen ve Gözlenmeyen Hasta Grubundaki MTHFR A1298C Gen Polimorfizminin Genotipe göre Dağılımı

**3.1.3.2.3. İstatistiksel Analiz:** MTHFR A1298C polimorfizmi taşıyıcılığı açısından kontrol ve çalışma grubundaki olgular karşılaştırıldıklarında, elde edilen bulguların sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $X^2=2,479$ ,  $p>0.05$ ). Çalışma grubunda yan etki gözlenen ve gözlenmeyen gruplar arasında da MTHFR A1298C polimorfizm taşıyıcılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $X^2=2,581$   $p>0,05$ ). Kontrol ve çalışma grubundaki bireylerin homosistein seviyeleri ve MTHFR A1298C polimorfizmi taşıyıcılığı analiz edildiğinde istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmüştür ( $X^2=9,797$   $p>0,05$ ). Folik asit kullanan ve kullanmayan gruplar arasında A1298C polimorfizm taşıyıcılığı ve homosistein seviyesi karşılaştırılması yapıldığında da istatistiksel bir fark gözlenmemiştir ( $X^2=9,944$   $p>0,05$ ).

### **3.1.4. MTHFR C677T VE A1298C Haplotip Analizleri**

Çalışma sonucunda *MTHFR C677T* ve *A1298C* polimorfizminin haplotip ve bileşik haplotip analizleri gerçekleştirilmiştir.

**3.1.4.1. Kontrol Grubu:** *MTHFR C677T* polimorfizmi için gerçekleştirilen haplotip analizinde gruptaki 50 olgunun alellerinin 77' sinin (% 77) Sitozin (C), 23' ünün (% 23) Timin (T) olduğu saptanmıştır. *MTHFR A1298C* polimorfizmi için analiz edildiğinde ise 62' sinin (% 62) Adenin (A), 38' inin (% 38) Sitozin (C) olduğu belirlenmiştir (Tablo13, Grafik 5).

**3.1.4.2. Çalışma Grubu:** Çalışma grubunda 50 olguya ait *C677T* haplotip analizinde ise 63' ünün (% 63) Sitozin (C), 37' sinin (%37) ise Timin (T) allellerini taşıdıklarını saptanmıştır. *A1298C* polimorfizmi için analiz edildiğinde ise 67' sinin (% 67) Adenin (A), 33' ünün (% 33) ise Sitozin (C) allelini taşıdığı belirlenmiştir (Tablo 13, Grafik 6).

#### **3.1.4.1.MTHFR C677T ve A1298C Haplotip Analizi**

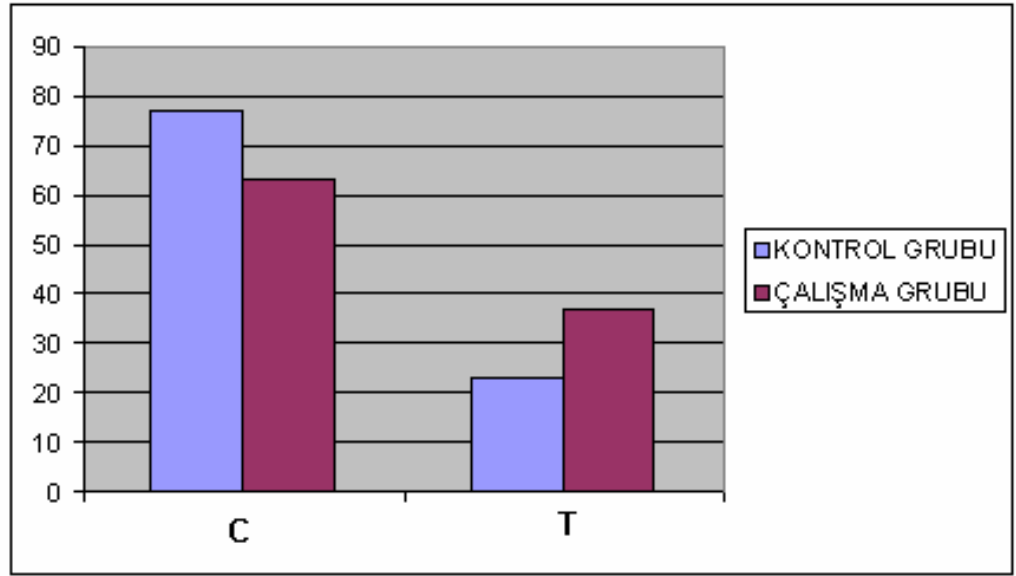
Çalışma grubu ve kontrol grubunda gerçekleştirilen *C677T* haplotip analizi sonucunda, çalışma grubunda *677T* alel sıklığının kontrol grubundan daha yüksek oranda bulunduğu diğer bir deyişle hasta grubunda artış gösterdiği saptanmıştır ( $X^2=4,891$   $p=0,03$ ). Aynı gruplar arasında yapılan *A1298C* haplotip analizi sonucunda *1298C* alelinin kontrol grubunda daha sıklıkla bulunduğu belirlenmiştir. Homosistein seviyesindeki artış ile karşılaştırılması yapıldığında *1298C* alleli ile homosistein seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Kontrol ve çalışma grubu arasında *C677T* haplotipleri ile *A1298C* haplotiplerin analizleri karşılaştırıldıklarında gruplar arasında gözlenen bileşik

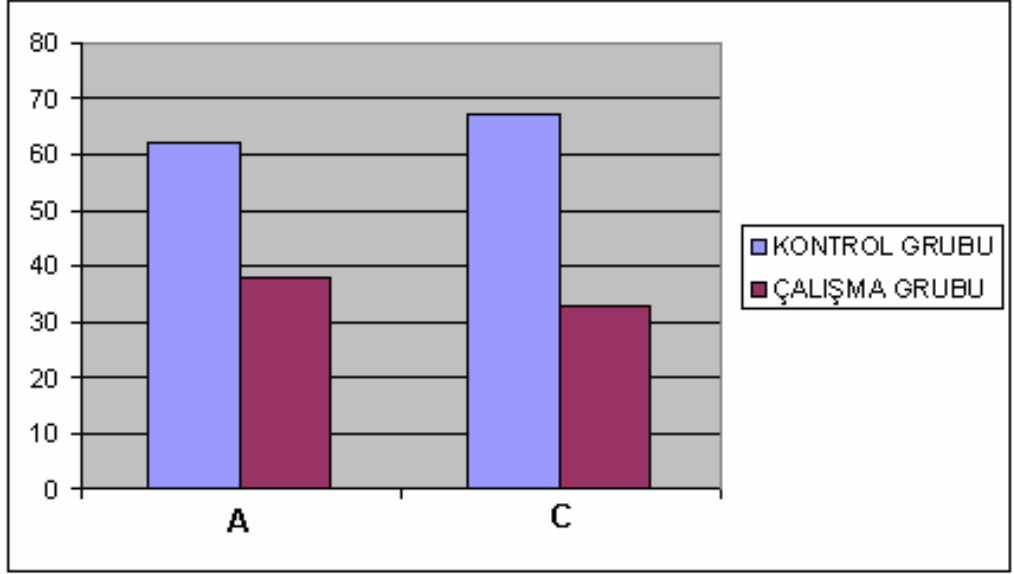
haplotip frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $X^2=0,08$   $p=0,96$ ).

**Tablo13:** C677T ve A1298C Gen Polimorfizmleri için Haplotip Analizi

	C677T		A1298C	
	C	T	A	C
Kontrol Grubu	77 (% 77)	23 (% 23)	62 (% 62)	38 (% 38)
Çalışma Grubu	63 (% 63)	37 (% 37)	67 (% 67)	33 (% 33)



**Grafik 5:** Kontrol ve çalışma grubunda MTHFR C677T gen polimorfizmi için yapılan haplotip analiz dağılımı



**Grafik 6:** Kontrol ve çalışma grubunda MTHFR A1298C gen polimorfizmi için yapılan haplotip analiz dağılımı

**Tablo 14:** C677T ve A1298C Gen Polimorfizimleri için Bileşik Haplotip Analizi

Haplotip		Çalışma Grubu		Kontrol Grubu	
<i>MTHFR</i> (C677T)	<i>MTHFR</i> (A1298C)	N	Bileşik Haplotip Frekansı	N	Bileşik Haplotip Frekansı
C	A	63	0.63	62	0.62
C	C	0	0	15	0.15
T	A	4	0.04	0	0
T	C	33	0.33	23	0.23
<b>Total</b>		<b>100</b>	<b>1.0</b>	<b>100</b>	<b>1.0</b>

**Tablo 15:** Kontrol Grubu ile İlgili Veriler ve Polimorfizm Sonuçları

<i>Olgu</i>	<i>Cinsiyet</i>	<i>Yaş</i>	<i>Homosistein</i>	<i>C677T</i>	<i>A1298C</i>
K.1.	E	61	7,4	WT	Het.
K.2.	K	48	8,2	Het.	WT
K.3.	E	45	10,5	WT	Het.
K.4.	E		10,3	WT	WT
K.5.	K	39	2,6	WT	Het.
K.6.	E		10,4	WT	Hom.
K.7.	E	39	6,9	Het.	Het.
K.8.	K	52	7,8	WT	WT
K.9.	E	46	10	Het.	Hom.
K.10.	E	72	8,6	WT	Het.
K.11.	K	65	7,2	WT	WT
K.12.	K	67	6,9	Het.	Het.
K.13.	E	38	10,9	WT	Hom.
K.14.	K	50	9,2	WT	Het.
K.15.	E	56	8,5	Het.	WT
K.16.	E	56	11,2	WT	Het.
K.17.	K	63	13,2	WT	Hom.
K.18.	E	39	8,1	Het.	Het.
K.19.	K	37	5,6	WT	Hom.
K.20.	K	48	9,2	WT	Het.
K.21.	K	30	6,4	Het.	WT
K.22.	K	63	6,5	WT	Het.
K.23.	K	45	12,8	Hom.	WT
K.24.	K	53	9,6	Het.	Het.
K.25.	K	65	10	Het.	Het.
K.26.	E	62	10,2	Het.	WT
K.27.	E	54	9,9	WT	Het.
K.28.	K	77	7,6	WT	WT
K.29.	K	48	6,4	Het.	WT
K.30.	E	57	12,4	WT	Hom.
K.31.	K	72	8,7	Het.	WT
K.32.	K	48	6,5	WT	Hom.
K.33.	K	44	10,8	Het.	Het.
K.34.	E	45	10,2	WT	Het.
K.35.	E	76	5	WT	WT
K.36.	E	49	12,1	WT	WT
K.37.	K	43	6,7	Het.	Het.
K.38.	E	38	9,7	WT	WT
K.39.	K	55	6,3	Het.	WT
K.40.	K	41	10,1	Het.	WT
K.41.	K	35	9,3	WT	Hom.
K.42.	K	45	6,5	Het.	Hom.
K.43.	K	45	5,9	Het.	WT
K.44.	K	34	7,6	Het.	Het.
K.45.	K	36	8,1	Het.	WT
K.46.	K	37	7,2	WT	Het.
K.47.	K	32	8,9	WT	Het.
K.48.	K	32	10,1	WT	WT
K.49.	K	32	8,7	WT	WT
K.50.	K	30	9,7	Het.	WT

**Tablo 16:** Çalışma Grubu ile İlgili Veriler ve Polimorfizm Sonuçları

<i>Olgu</i>	<i>Cinsiyet</i>	<i>YAŞ</i>	<i>Homosistein</i>	<i>C677T</i>	<i>A1298C</i>
Ç.1.	K	71	5,7	<i>Hom.</i>	<i>WT</i>
Ç.2.	E	51	10,1	<i>Het.</i>	<i>WT</i>
Ç.3.	K	76	17,1	<i>WT</i>	<i>Hom.</i>
Ç.4.	E	67	10,2	<i>Het.</i>	<i>WT</i>
Ç.5.	K	25	9,6	<i>WT</i>	<i>WT</i>
Ç.6.	K	43	8,5	<i>Het.</i>	<i>Het.</i>
Ç.7.	K	40	12,1	<i>WT</i>	<i>Het.</i>
Ç.8.	E	62	13	<i>Het.</i>	<i>WT</i>
Ç.9.	K	62	13,4	<i>Hom.</i>	<i>Hom.</i>
Ç.10.	K	54	7,4	<i>WT</i>	<i>Het.</i>
Ç.11.	K	61	11,3	<i>Het.</i>	<i>Het.</i>
Ç.12.	K	52	6,9	<i>Het.</i>	<i>Het.</i>
Ç.13.	K	48	3,9	<i>WT</i>	<i>WT</i>
Ç.14.	K	76	7,8	<i>Het.</i>	<i>Het.</i>
Ç.15.	K	51	7,5	<i>Het.</i>	<i>Het.</i>
Ç.16.	K	70	6,4	<i>WT</i>	<i>Het.</i>
Ç.17.	E	48	9,3	<i>Het.</i>	<i>Het.</i>
Ç.18.	K	45	5,9	<i>Hom.</i>	<i>WT</i>
Ç.19.	K	59	9,2	<i>Hom.</i>	<i>WT</i>
Ç.20.	E	45	8,5	<i>WT</i>	<i>Hom.</i>
Ç.21.	K	74	11,4	<i>WT</i>	<i>WT</i>
Ç.22.	K	62	13,4	<i>Het.</i>	<i>WT</i>
Ç.23.	E	48	9,1	<i>Het.</i>	<i>WT</i>
Ç.24.	K	41	10,8	<i>WT</i>	<i>WT</i>
Ç.25.	E	77	11,2	<i>Hom.</i>	<i>WT</i>
Ç.26.	K	33	11,3	<i>WT</i>	<i>Het.</i>
Ç.27.	K	41	5,6	<i>Het.</i>	<i>WT</i>
Ç.28.	E	71	5,9	<i>WT</i>	<i>Het.</i>
Ç.29.	E	76	6,2	<i>Het.</i>	<i>Het.</i>
Ç.30.	K	54	3,3	<i>WT</i>	<i>Het.</i>
Ç.31.	K	70	7,8	<i>Het.</i>	<i>Het.</i>
Ç.32.	K	49	8,2	<i>Het.</i>	<i>Het.</i>
Ç.33.	K	56	5,1	<i>Het.</i>	<i>Het.</i>
Ç.34.	K	61	4,9	<i>Het.</i>	<i>WT</i>
Ç.35.	K	53	8,4	<i>Hom.</i>	<i>WT</i>
Ç.36.	E	44	8,8	<i>WT</i>	<i>Het.</i>
Ç.37.	E	51	6,5	<i>Het.</i>	<i>WT</i>
Ç.38.	K	51	10,5	<i>WT</i>	<i>Het.</i>
Ç.39.	E	73	14,8	<i>Het.</i>	<i>Het.</i>
Ç.40.	K	41	8,5	<i>WT</i>	<i>Het.</i>
Ç.41.	K	65	5,9	<i>Het.</i>	<i>WT</i>
Ç.42.	K	75	5,1	<i>Het.</i>	<i>Het.</i>
Ç.43.	K	51	7,9	<i>WT</i>	<i>Het.</i>
Ç.44.	E	57	11	<i>WT</i>	<i>Het.</i>
Ç.45.	K	50	12,5	<i>Het.</i>	<i>WT</i>
Ç.46.	K	86	13,6	<i>Hom.</i>	<i>WT</i>
Ç.47.	E	54	11,4	<i>WT</i>	<i>Het.</i>
Ç.48.	K	49	14,5	<i>WT</i>	<i>Het.</i>
Ç.49.	K	46	12,6	<i>Het.</i>	<i>WT</i>
Ç.50.	E	69	13,9	<i>WT</i>	<i>Hom.</i>

## 4.1 TARTIŞMA

Farmakogenetik, bireylerin genetik yapılarındaki değişkenliğe bağlı olarak ilaç metabolizmalarına karşı verdikleri yanıt ile birey üzerinde oluşabilecek farklı etkileri inceleyen bir bilim dalıdır (34). Farmakogenetik araştırmalarla ilk olarak hastalıklarla ilişkilendirilen özgül gen ve gen ürünlerinin tanımlanması, ikinci olarak ilaca verilen yanıtı etkileyen genlerin ve alelik varyantlarının tanımlanması ve son olarak bu tanımlamalardan elde edilen bilgilerle en uygun ilaç ve doz seçiminin yapılması ve bireye özgü tedavilerin geliştirilmesi hedeflenmektedir (78).

Eklem tutulmalarıyla başlayan, uzun süren ve tedavisine erken başlanması gereken bir immün hastalık olan RA, son yıllarda yaygın olarak hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçtan biri olan MTX ile tedavi edilmeye başlanmıştır (85). MTX, haftalık doz uyarlamaları yapılarak yıllarca kullanılabilmesi açısından da önemlidir (28). Hastalık süresi, haftalık ilaç dozu, cinsiyet, yaş, obezite, folik asit kullanımı, vücut kütle indeksi ve son yıllarda Farmakogenetik çalışmalarla MTX' in metabolik yolağında yer alan enzimlerde meydana gelebilecek genetik farklılıklar gibi etmenlerin MTX kullanımına bağlı olarak gelişebilen hepatotoksisite ve gastrointestinal komplikasyonların oluşmasında risk faktörleri arasında olduğu rapor edilmiştir (23, 28, 33, 56, 72, 75). Bu belirtilen risk faktörleri arasında üzerinde en çok durulan faktör, bireyler arasındaki tek nükleotid değişikliği ( SNP) ile ortaya çıkan genetik farklılıklardır.

Son yıllarda yapılan araştırmalarla, MTX' in etki ve toksisite oluşturma özelliği üzerinde genetik faktörlere bağlı olan farklılıkların nedenleri tam olarak belirlenememesine rağmen, folat metabolizmasında yer alan enzimlerde meydana gelebilecek polimorfizmlerin bu farklılığın ortaya çıkmasına neden olabileceği rapor edilmektedir (39). MTHFR enziminin folat metabolizmasında yer alması ve homosisteinin metiyonine remetilasyonunu sağlayan enzimlerden bir tanesi olması nedeniyle MTX' in etkilerinin düzenlenmesinde güçlü bir aday olduğu belirtilmektedir (39, 70). Bugüne kadar MTX tedavisi gören RA' li hastalarda, MTHFR geninde en sık görülen C677T ve A1298C polimorfizmlerinin toksisite gelişmesi üzerine olan etkilerinin araştırılması amacıyla birçok çalışma yapılmış ancak farklı farklı sonuçlar elde edilmiştir (23, 33, 39, 56, 57, 70, 71, 72, 75).

Bizde bu çalışmamızda, MTX tedavisi gören RA' li hastalarda uygulanan ilaç tedavisi sonucu oluşabilecek yan etkilerin en aza indirilmesini ve etkin bir tedavinin sağlanmasına katkıda bulunmak amacıyla yan etki gelişimi üzerinde, güçlü bir aday olduğu belirtilen, MTHFR enziminde meydana gelebilecek C677T ve A1298C gen polimorfizmlerinin analizlerini gerçekteştirdik.

Annelies E. van Ede ve arkadaşlarının (72) MTX ile tedavi edilen RA hastalar üzerinde MTHFR C677T polimorfizminin ilaç etkisi ve toksisite etkisini araştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada, bu gen polimorfizminin MTX tedavisine bağlı olarak toksisite gelişme ve tedavinin sonlanma riskinin arttığını ileri sürülmüştür. Ayrıca elde ettikleri bulgularla folik veya folinik asit



alınımının, MTX tedavisinden kaynaklanan toksisite insidansını azalttığı bildirmişlerdir.

Başka bir çalışma da Wako Urano ve arkadaşları (70) MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmlerin, MTX etki ve toksisitesi ile ilişkili olup olmadığını araştırmışlar ve toksisite gelişiminin 677T aleline sahip hastalarda (% 26.9) 677C (% 8,6) aleline göre daha sıklıkla görüldüğünü ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, A1298C polimorfizminin toksisite oluşumunda etkili olmadığını belirtmişlerdir. Haplotip analizi yaptıklarında 677C-1298C haplotipine sahip hastalarda diğerlerine göre daha düşük dozlarda MTX kullanıldığını, 677T-1298A haplotipli bireylerde de yan etki oranının daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda yapılan haplotip analizi sonucunda, 677T alelinin çalışma grubunda (% 37) kontrol grubundan (% 23) daha yüksek frekansta olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturduğu saptanmıştır ( $X^2=4,891$   $p=0,03$ ). Kontrol ve çalışma gruplarında yapılan bileşik haplotip analizinde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $X^2=0,08$   $p=0,96$ ) (Tablo 13).

Haagsma ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, MTX tedavisinin başlangıcından 1 yıl sonra C677T polimorfizmi için heterozigot genotipe sahip hastaların yüksek homosistein konsantrasyonuna sahip olduklarını bulmuşlar ve RA' li hastalarda MTX tedavisinde MTHFR genotipinin homosistein artışıyla ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır (57). Bizim çalışmamızda ise homosistein konsantrasyon artışının farklı 3 genotip ile yan etki gelişimi arasında farklılık göstermediği saptanmıştır. Y Berkun ve arkadaşları (4), RA' li hasta ve kontrol grubunda, MTHFR A1298C alel ve genotip dağılımını analizi ettiklerinde 1298CC genotipini hasta grubunda %

27,4, kontrol grubun da ise % 12,8 olarak belirlemişler ve aralarında belirgin bir farklılık olduğunu bildirmişlerdir. Ancak iki grup arasında allel frekansı bakımından farklılık bulamamışlar ve A ve C alelerinin dağılımının benzer olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada ayrıca 677TT genotipinin homosistein konsantrasyonu ve meydana gelen yan etki üzerinde etkili olmadığını belirtmişlerdir.

Kazuhiko Kumagai ve arkadaşları MTX kullanan ve kullanmayan 2 grup arasında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerini allel frekansları incelediklerinde benzer bulmuşlar ve bu polimorfizmler ile toksisite gelişimi arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır (39).

Bizim çalışmamızda Kazuhiko Kumagai ve arkadaşlarının elde ettikleri sonuçlara benzer sonuçlar elde edilmiş ile çalışmamızda yer alan kontrol ve RA' li hasta grupları MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmleri açısından karşılaştırıldığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulmadık ( $p>0,05$ ). C677T polimorfizmi için çalışma grubundaki 50 olgunun 7' sinde (% 17) homozigot genotip (TT) belirlenirken bunlardan yalnızca 2 olguda yan etki gelişimi gözlenmiştir. A1298C polimorfizmi için ise 50 olgunun 4' ünde (% 8) homozigot genotip (CC) saptanırken sadece 1 olguda yan etki gelişimi gözlenmiştir. Yan etki gözlenen ve gözlenmeyen hasta grupları arasında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri araştırılmış ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı saptanmıştır ( $p>0,05$ ).

Kontrol ve çalışma grupları arasında haplotip analizleri yapıldığında C677T polimorfizminde 677T alelinin hasta grubunda artış gösterdiği bulunmuştur ( $p<0,05$ ). A1298C polimorfizminde ise 1298C alelinin kontrol grubunda arttığı belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Bu alelin oranının yüksek olmasına

rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p>0,05$ ). Çalışma grubunda bu allelin homosistein seviyesini arttırmış olmasına rağmen yan etki oluşumunda risk faktörü olarak iş görmediği sonucuna varılmıştır ( $p>0,05$ ).

A. E. Van Ede ve arkadaşlarının (71) yaptıkları çalışmada plazma homosistein değişimi ile MTX tedavisinde gözlenen toksisite gelişimi arasında bir ilişki bulunmamıştır. Aynı analiz sadece MTX ve MTX ile birlikte folik asit yada folinik asit kullanan alt gruplarda da yapıldığında, bütün MTX ile birlikte folik asit yada folinik asit kullanan alt gruplarda plazma homosistein konsantrasyonundaki değişimin toksisite gözlenen ve gözlenmeyen hastalar arasında bir farklılık olmadığını belirtmişlerdir. MTX tedavisi sırasında plazma homosistein konsantrasyonunun değişimi C677T polimorfizmi varlığında ya da yokluğundan etkilenmediğini, diğer taraftan folat alınımının homosistein konsantrasyonundaki artışı önlediğini belirtmişlerdir.

Bizim çalışmamızda da A. E. Van Ede ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçları destekleyen sonuçlar elde edilmiştir. Kontrol grubu ve çalışma grupları plazma homosistein seviyesi ve MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmleri açısından analiz edildiklerinde iki grubun genotip dağılımları ile homosistein düzeyleri arasında belirgin bir farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Ayrıca folik asit kullanan ve kullanmayan RA' li hastalarda, homosistein seviyesi ile polimorfizmler karşılaştırıldığında homosistein konsantrasyonunun değişmediği görülmüş ve bu yüzden aralarında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Yaptığımız bu çalışmada MTX tedavisi süresince plazma homosistein konsantrasyonunun değişiminin MTHFR geninde meydana gelen C677T polimorfizminin var olup olmamasından

etkilenmediği bulunmuştur. Bu ilişkinin belirlenebilmesi için 677TT genotipine sahip hasta sayısının az olmasından kaynaklandığı bu ilişkinin belirlenebilmesi için hasta sayısının arttırılması gerektiği düşünülmektedir. Sonuç olarak yapılan çalışmalarla MTX tedavisinin folik asit yada folinik asit alınımıyla önlenebilen hiperhomosisteinemi ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. MTHFR C677T gen polimorfizmin var olup olmasının bu etkiyi düzenlemediği belirtilmektedir. Hiperhomosisteinemi kalp hastalıkları ve serebrovasküler hastalıklarla ilişkili olması, MTX tedavisinde folat alınımının başka bir tartışma konusu olduğu belirtilmektedir.

Bu çalışmalara ek olarak MTX kullanımında yan etki oluşumu ve önlenmesi konusunda ayrıca folik asit yolağındaki Timidilat sentaz enziminde veya MTX tarafından etkilenen diğer yolaklardaki diğer genlerde meydana gelebilecek farklı polimorfizmlerinde bu fenotiplere etkisi olup olmadığının araştırılmasının önemli olduğu belirtilmektedir (39, 56).

Araştırmamızda, çalışma grubunda yan etki oluşumunda yer alan 677T ve 1298C alellerinin her ikisinin birlikte bulunma sıklığının çok düşük olarak saptanması ve ayrıca homosistein seviyelerinde herhangi bir artışın görülmemesi nedeniyle hastalarda hepatotoksisite veya gastrointestinal komplikasyonların oluşmadığı düşünülmüştür. Ayrıca tedavi başlangıcından itibaren çalışma grubumuzu oluşturan 50 olgudan sadece 15 olguda yan etki gelişiminin gözlenmesi nedeniyle toksisite gelişimine neden olduğu belirtilen literatürleri destekleyen sonuçlar elde edilmemiştir. Bu nedenle daha büyük hasta toplulukları üzerinde MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin ilaç toksisitesi üzerinde etkili olup olmadığının belirlenebilmesi için hasta

grubunun genişletilmesinin gerekli olduğu düşünölmektedir. Araştırmanın devam edilmesine ve hasta grubunun büyütölmesine karar verilmiştir.

## 5.1. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Bilim Dalı'nda Methotrexate tedavisi gören 50 Romatoid Artrit tanılı olguda, MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmlerinin ilaç toksisite gelişimi üzerinde etkili olup olmadığı araştırılarak, MTX uygulanan ilaç tedavilerinde oluşabilecek yan etkilerin en aza indirilmesi ve etkin bir tedavinin sağlanması amaçlanmıştır .

Elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmleri için yapılan genotipleme sonuçlarına göre kontrol ve çalışma grupları arasında toksisite geliştirme açısından belirgin bir farklılığın olmadığı saptanmıştır. Ayrıca hasta grubunda 677T-1298C alellerinin birlikte bulunma oranının düşük olması ve homosistein seviyelerinde artışın gözlenmemesinin, hepatotoksisite veya gastrointestinal komplikasyonların oluşmasına engel olabilecek diğer etmenler olabileceği düşünülmüştür.

Çalışma grubumuzdaki yan etki gözlenen ve gözlenmeyen olgular arasında MTHFR genotiplendirmeleri yapıldığında, bu iki grup arasında MTX'in etki veya toksisite gelişimi üzerinde etkili olmadığı saptanmıştır.

Çalışmamızdaki yan etki gözlenen olguların sayılarının artırılarak çalışmamızın genişletilmesi ve buna bağlı olarak çalışma sonuçlarının tekrardan değerlendirilmesi düşünülmektedir.

## 6.1.ÖZET

Romatoid Artrit (RA) populasyonlarda % 0,5-1 sıklıkla görülen, eklemlerde ağrı, depresyon ve hareket kısıtlılığı gibi komplikasyonlarla ortaya çıkan kronik, sistemik, inflamatuvar bir hastalıktır. RA, son yıllarda yaygın olarak hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlardan olan Methotrexate ile tedavi edilmeye başlanmıştır. Folik asit antagonisti olan MTX'in kullanımında, çevresel nedenler yanında bireyin genetik yapısındaki değişkenliklerin etki ve toksisite gelişimine neden olabileceği bildirilmektedir. Folat metabolizmasında yer alan enzimlerde meydana gelen polimorfizmler, farklı etkilerle ilişkili olabilir. MTHFR, MTX ile tedaviye yanıtta yer aldığı için, MTX'in etkilerini düzenlemek için kuvvetli bir adaydır.

MTX kullanımına bağlı olarak ilaç kaynaklı toksisite ve yan etki oluşumunda, MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmlerindeki risk faktörü olup olmadığının araştırılması amacıyla hasta ve kontrol grubu olmak üzere toplam 100 hasta çalışılmıştır.

Kontrol ve çalışma grubunda sırasıyla *MTHFR C677T* (%56 CC, %42 CT, %2 TT) (%40 CC, %46 CT, %14 TT) ve *A1298C* (%42 AA, %40 AC, %18 CC) (% 42 AA, %50 AC, %8 CC) genotipleri açısından analiz edildiğinde aralarında istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir.

Çalışma grubunda yan etki gözlenen grupta ve yan etki gözlenmeyen gruplarda sırasıyla MTHFR C677T (% 40 CC, % 46,7 CT % 13,3 TT), (% 40 CC, % 45.7 CT, % 14.3 TT) ve A1298C (% 40 AA, % 53.3 CT % 6.7 TT), (% 42.9 AA, % 48.6 AC, % 8.6 CC) genotipleri açısından analiz edildiğinde

aralarında istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir. Ayrıca folik asit kullanan ve kullanmayan çalışma grubundaki olgularda, homosistein seviyeleri ve MTHFR C677T ve A1298C genotipleri karşılaştırılmış ve aralarında anlamlı bir sonuç bulunamamıştır.

Sonuç olarak, MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmlerinin MTX tedavisi gören Romatoid Artrit hastalarında yan etki gelişimi için risk faktörü oluşturmadığı saptanmıştır. Ancak hasta ve yan etki gözlenen grubun küçük olması nedeniyle araştırmamızın genişletilesinin uygun olacağı düşünülmüştür.



## 6.2 ABSRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, systemic and inflammatory disease, affects about % 0,5-1 of the general population world wide and develops complications such as pain in joints, depression, and limitations in function. From 1980, RA begin to treat with MTX which is one of the most widely used disease modifying antirheumatic drug. It is announced that in treatment with MTX which is a folic acid antagonist, behind the environmental factors, variabilities in the structure of individuals can contribute developing efficacy and toxicity. It is possible that polymorphisms in enzymes involved in folate metabolisms may be related to these differential effects. MTHFR is a strong candidate for mediating the effects of MTX, because it is involved in the response to treatment with MTX.

To determine whether the MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms are risk factor for the Methotrexate induced toxicity and side effects, we genotyped MTHFR C677T and A1298C polymorphisms in 100 patients which were classified as working group and control group. In control and working group in order *MTHFR C677T* (%56 CC, %42 CT, %2 TT) (%40 CC, %46 CT, %14 TT) and *A1298C* (%42 AA, %40 AC, % 18 CC) (% 42 AA, %50 AC, %8 CC) genotypes were analyzed respectively and no statistically difference was observed.

In working group, in occurred side effect and didn' t occur side effect groups in order *MTHFR C677T* (% 40 CC, %46,7 CT % 13,3 TT), (%40 CC, % 45.7CT, % 14.3 TT) and *A1298C* (% 40 AA, %53.3 CT % 6.7 TT), (%42.9 AA, % 48.6 AC, % 8.6 CC) analysed in terms of genotypes, no statistically

difference was observed. Also in folic acid supplemented and not supplemented working group, homocysteine concentrations and MTHFR C677T and A1298C genotypes were compared and there were not find a significant result between them.

In conclusion, MTHFR C677T and A1298C polymorphisms were not found as a risk factor for developing side effects in patients with rheumatoid arthritis who were treated with MTX treatment. But the number of patients and case who has side effect groups may have been too small for such interactions to be observed, because of this we thought that the investigation of our study is acceptable to enlarge.

## 7.1 YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Aaçhan B. (2003) Kalıtsal hastalıklara Moleküler Tıp Açısından Bakış Sempozyumu;s:179-206
2. Akhtar S. (2002). Pharmacogenomics: Are Pharmacists. Ready for Genotyped Prescribing ? The pharmaceutical journal (Vol 268)
3. Beckman, D. R.; Hoganson, G.; Berlow, S.; Gilbert, E. F. (1987) Pathological findings in 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase deficiency. Birth Defects Orig. Art. Ser. 23: 47-64
4. Berkun Y., Levartovsky D., Rubinow A., Orbach H., Amar S., Grenader T., Abou Atta I., Mevorach D., Friedman G. and Ben-Yehuda A. (2004). Methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis are associated with the A1298C polymorphism of the MTHFR gene. Annals of the Rheumatic Diseases;63:1227-1231
5. Bettembourg-Brault I, Gossec L, Pham T, Gottenberg JE, Damiano J, Dougados M. (2006). Leflunomide in rheumatoid arthritis in daily practice: treatment discontinuation rates in comparison with other DMARDs. Clin Exp Rheumatol. Apr;24(2):168-171
6. BUCH M., Emery P. (2002) Hospital Pharmacist; Vol 9
7. J. H. Nepom, G.T. (2002). Genetics of rheumatoid arthritis: is there a scientific explanation for the human leukocyte antigen association? Current Opinion in Rheumatology. 14(3):254-259
8. Chan E. S. L. and Cronstein B. N. (2002). Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases Arthritis Research, 4:266-273
9. Cronstein B. N. (2004). *Pharmacogenetics in the rheumatic diseases. Annals of the Rheumatic Diseases; 63:ii25-ii27*

- 10.** Daar A. S. and Singer P. A. (2005). Pharmacogenetics and geographical ancestry: implications for drug development and global health *Nature Reviews| Genetics* Volume 6 | 241-246
- 11.** DİKMEN M. (2004). Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Enziminin Moleküler Biyolojisi ve Hastalıklarla İlişkisi, *Kocatepe Tıp Dergisi The Medical Journal of Kocatepe* 5
- 12.** Franse J., Laan R. F. J. M., van der Laar M. A. ff., Huizinga T. W. J. and van Riel P. L. C. M. (2004). Influence of guideline adherence on outcome in a randomised controlled trial on the efficacy of methotrexate with folate supplementation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*;63;1222-1226
- 13.** Ferraccioli G. De Santis M., Tolusso B. (2004). Pharmacogenetics/pharmacogenomics and antirheumatic drugs in rheumatology. *Pharmacogenomics*.;5(8):1107-16
- 14.** Frosst P., Blom HJ., Milos R., Goyette P., Sheppard CA., Matthews RG., Boers GJ., den Heijer M., Kluijtmans LA., van den Heuvel LP., et al. (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*.;10(1):111-3.
- 15.** Gaffney L.A. Y. N., and Scott D. G. I.(2005). Methotrexate-induced pancytopenia: serious and under-reported? Our experience of 25 cases in 5 years. *Rheumatology*;44:1051-1055
- 16.** GAŠPAROVIČ J., RAŠLOVÁ K., BAŠISTOVÁ Z., ZACHAROVÁ M., WSÓLOVÁ L., AVDIČOVÁ M., BLAŽÍČEK P., LIETAVA J., SIVÁKOVÁ D. (2004). Effect of C677T Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphism on Plasma Homocysteine Levels in Ethnic Groups. *Physiol. Res.* 53: 215-218

- 17.** GOS M., SZPECHT-POTOCKA A. (2002). Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine
- 18.** Metabolism. J. Appl. Genet. 43(4), , pp. 511-524
- 19.** Goyette, P.; Sumner, J. S.; Milos, R.; Duncan, A. M. V.; Rosenblatt, D. S.; Matthews, R. G.; Rozen, R.(1994). Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genet.* 7: 195-200
- 20.** Goyette P., Pai A., Milos R., Frosst P., Tran P., Chen Z., Chan M., Rozen R. (1998) Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) Mamm Genome.;9(8):652-6
- 21.** Göksoy T. (2002). Romatizmal Hastalıkların Tedavisi. ISBN: 975-411-263-0. 421-450
- 22.** Gümüşdiş G., Doğanavşargil E. (1999). Klinik Romatoloji. ISBN:975-483-397-4. 269-278
- 23.** Haagsma CJ, Blom HJ, van Riel PL, van't Hof MA, Giesendorf BA, van Oppenraaij-Emmerzaal D, van de Putte LB. (1999). Influence of sulphasalazine, methotrexate, and the combination of both on plasma homocysteine concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.*;58(2):79-84
- 24.** Hamuryudan V. (2003). Romatoid Artrit. U. Cerrahpafla Tıp Fakultesi Surekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Romatolojik Hastalıklar Sempozyum Dizisi No: 34 •; s. 19-29
- 25.** Hanson N. Q., Aras Ö., Yang F and Tsai M. Y. (2001). C677T and A1298C Polymorphisms of the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: Incidence and Effect of Combined Genotypes on Plasma Fasting and Post-

Methionine Load Homocysteine in Vascular Disease *Clinical Chemistry*;47:661-666.)

**26.** Hyland, K.; Smith, I.; Bottiglieri, T.; Perry, J.; Wendel, U.; Clayton, P. T.; Leonard, J. V. (1998). Demyelination and decreased S-adenosylmethionine in 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Neurology* 38: 459-462

**27.** Heijmans B.T., Boer J.M., Suchiman H.E., Cornelisse C.J., Westendorp R.G., Kromhout D., *et al* (2003) A common variant of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (1p36) is associated with an increased risk of cancer. *Cancer Res* 63: 1249-1253

**28.** Hoekstra M., E van Ede A., Haagsma C. J., van de Laar M. A. F. J., Huizinga T. W. J., Kruijsen M. W. M., and Laan R. F. J. M. (2003). Factors associated with toxicity, final dose, and efficacy of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*; 62(5): 423 - 426.

**29.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>

**30.** [http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/faq/snps.shtml#risks](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/faq/snps.shtml#risks)

**31.** <http://snp.cshl.org/>

**32.** Fresko İ. (1999). ROMATİZMAL HASTALIKLARDA TEDAVİ İ.Ü. Cerrahpafla Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Romatizmal Hastalıklar Sempozyumu 25, istanbul, s. 45-54

**33.** Judith A. M. Wessels, Jeska K. de Vries-Bouwstra, Bas T. Heijmans, P. Eline Slagboom, Yvonne P. M. Goekoop-Ruiterman, Cornelia F. Allaart, Pit J. S. M. Kerstens, Derkjen van Zeben, Ferdinand C. Breedveld, Ben A. C. Dijkmans, Tom W. J. Huizinga, and Henk-Jan Guchelaar. (2006). Efficacy

and Toxicity of Methotrexate in Early Rheumatoid Arthritis Are Associated With Single-Nucleotide Polymorphisms in Genes Coding for Folate Pathway Enzymes. *ARTHRITIS& RHEUMATISM* Vol. 54, No. 4,. pp 1087-1095

**34.** KARAKURT Ö., MELLİ M.( 2005). Antineoplastik Kemoterapinin Bireyselleştirilmesi ve Farmakogenetik, uluslar arası HEMATOLOJİ-ONKOLOJİ DERGİSİ, UHOD Sayı / Number: 3 Cilt / Volume: 15

**35.** Khan MA, Kushner I, Weitkamp LR. (1983). Genetics of HLA-associated disease; rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*;22(3):182-5

**36.** Kimura F., Franke KH., Steinhoff C., Golka K., Roemer HC., Anastasiadis AG., *et al.* (2000) Methyl group metabolism gene Polymorphisms and susceptibility to prostatic carcinoma. *Prostate* 45: 225-231

**37.** Kluijtmans, L. A. J.; Wendel, U.; Stevens, E. M. B.; van den Heuvel, L. P. W. J.; Trijbels, F. J. M.; Blom, H. J. (1998). Identification of four novel mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Europ. J. Hum. Genet.* 6: 257-265

**38.** Kubista M., Andrade J. M. , Bengtsson M., Forootan A., Jona´k J, Lind K., Sindelka R., Sjo¨back R., Sjo¨green B., Stro¨mbom L., Sta¨hlberg A., Zoric N. (2006). The real-time polymerase chain reaction *Molecular Aspects of Medicine* 27 95–125

**39.** Kumagai K., Hiyama K., Oyama T., Maeda H., Kohno N. (2003). Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med.*;11(5):593-600

**40.** Lee D. M., Weinblatt M. E. (2001). *Rheumatoid arthritis. Lancet*; 358: 903-11

- 41.** Lim A. Y. N., Gaffney and Scott D. G. I. (2005). Methotrexate-induced pancytopenia: serious and under-reported? Our experience of 25 cases in 5 years. *Rheumatology*;44:1051-1055
- 42.** Lohmann S., Lehmann L., Tabiti K. (2000). Fast and Flexible Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Detection with the LightCycler System, *Biochemica*,. 4: 23-28
- 43.** Lynden J. R., Leslie G. C, Ranjeny T. And Ssanna M. P. (2006). Early Combination disease modifying antirheumatic drug treatment for rheumatoid arthritis. *MJA*; 184 (3): 122-125
- 44.** Maini RN., Feldmann M. (1998). Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. In
- 45.** Maddison P, Isenberg D, Woo P, Glass D (eds). *Oxford Textbook of Rheumatology*, Oxford University Press p: 983-1004
- 46.** MOTULSKY A.G., Ming Q.I.(2006). Pharmacogenetics, pharmacogenomics and ecogenetics. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* ISSN 1673-1581
- 47.** Mundo A., Pedone V., Lamanna G., Cervini C. (1997). Sulfasalazine: side effects and duration of therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Ter.*;148(1-2):7-13.
- 48.** Mukundan G. A., Mandar N. D. and Ashok R. A. (2004) Functional Genomics Approaches in Arthritis. *Am J Pharmacogenomics*; 4 (1): 29-43
- 49.** *Narayanan S., McConnell J., Little J., Sharp L., Piyathilake C. J. , Powers H., Basten and Duthie S. J. (2004). Associations between Two Common Variants C677T and A1298C in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Measures of Folate Metabolism and DNA Stability (Strand Breaks,*



*Misincorporated Uracil, and DNA Methylation Status) in Human Lymphocytes*  
*In vivo Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention Vol. 13, 1436-1443,*  
*September*

**50.** Ortiz Z, Shea B, Suarez-Almazor ME, Moher D, Wells GA, Tugwell P. (1998). The efficacy of folic acid and folinic acid in reducing methotrexate gastrointestinal toxicity in rheumatoid arthritis. A metaanalysis of randomized controlled trials. *J Rheumatol.* Jan;25(1):36-43.

**51.** PENG F., LABELLE L. A., RAINEY B.J. and TSONG G. J. (2001). Single nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are common in US Caucasian and Hispanic American populations. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE* 8: 509-511

**52.** Radha Rama Devi A., Govindaiah V., Ramakrishna G. and Naushad S. M. (2004). Prevalence of methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism in South Indian population *CURRENT SCIENCE, VOL. 86, NO. 3*

**53.** Rady P. L., Szucs S., Grady J., Hudnall S. D, Kellner L. H., Nitowsky H., Tying S. K. and Matalon R. K. (2002). Genetic Polymorphisms of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Methionine Synthase Reductase (MTRR) in Ethnic Populations in Texas; a Report of a Novel MTHFR Polymorphic Site, G1793A *American Journal of Medical Genetics* 107:162±168

**54.** Ranganathan P. (2005). Pharmacogenetics of therapies in rheumatoid arthritis *Drugs Today (Barc).* Dec;41(12):799-814

**55.** Ranganathan P., Culverhouse R., Marsh S., Ahluwalia R., Shannon WD., Eisen S., McLeod HL. (2004). Single nucleotide polymorphism profiling

across the methotrexate pathway in normal subjects and patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*;5(5):559-69

**56.** Ranganathan P., Eisen S., Yokoyama W. M. and McLeod H. L. (2003). *Will pharmacogenetics allow better prediction of methotrexate toxicity and efficacy in patients with rheumatoid arthritis? Annals of the Rheumatic Diseases*;62:4-9

**57.** Ranganathan P., Eisen S. (2004). *Pharmacogenomic approaches to therapies in rheumatic diseases. Drug Dev. Res. 62:161-171*

**58.** Ranganathan P. and McLeod H. L. (2006). Methotrexate Pharmacogenetics The First Step Toward Individualized Therapy in Rheumatoid Arthritis *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 54, No. 5, pp 1366–1377

**59.** Reuter M. , K üpper Y ., Schmitz A ., Breuer J . P., Wend U. , Hennig J. (2005). Detection of new single nucleotide polymorphisms by means of real time PCR *Journal of Genetics*, Vol. 84, No. 3

**60.** Sagner G., Goldstein C., and van Miltenburg R. (1999). Roche Molecular Biochemicals, Penzberg, Germany Detection of Multiple Reporter Dyes in Real-time, On-line PCR Analysis with the LightCycler System *BIOCHEMICA* · No. 2 n; 7-11

**61.** Selzer, R. R.; Rosenblatt, D. S.; Laxova, R.; Hogan, K. (2003). Adverse effect of nitrous oxide in a child with 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *New Eng. J. Med.* 349: 45-50

**62.** Sibani S., Christensen B., O'Ferrall E., Saadi I., Hiou-Tim F., Rosenblatt D. S., and Rozen R. (2000) Characterization of Six Novel Mutations in the

Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene in Patients With Homocystinuria HUMAN MUTATION 15:280.287

**63.** Stevenson RE., Schwartz CE., Du YZ., Adams MJ. Jr. (1997) Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between Whites and Blacks. *Am J Hum Genet.*;60(1):229-30

**64.** Tanaka E, Taniguchi A., Urano W., Yamanaka H., Kamatani N. (2004). *Pharmacogenetics of disease-modifying anti-rheumatic drugs.*;18(2):233-47

**65.** Temizkan G., Arda N. (2004). *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler.* ISBN : 9754203474. 73-111

**66.** Turesson C. and Matteson E. L. (2006). Genetics of Rheumatoid Arthritis *Mayo Clin Proc.* ;81(1):94-101

**67.** Tunçbilek E. (2005). *Tıbbi Genetik Kitabı* ;73-93

**68.** Tonetti, C.; Burtcher, A.; Bories, D.; Tulliez, M.; Zittoun, J. (2000) Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency in four siblings: a clinical, biochemical, and molecular study of the family. *Am. J. Med. Genet.* 91: 363-367

**69.** Ueland P.M., Hustad S., Schneede J., Refsum H., Vollset S.E. (2001). *Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism.* *Trends Pharmacol Sci.*;22(4):195-201

**70.** Urano W., Taniguchi A., Yamanaka H., Tanaka E., Nakajima H., Matsuda Y., Akama H., Kitamura Y., Kamatani N. (2002). *Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses.* *Pharmacogenetics.* Apr;12(3):183-90.

71. van Ede A. E., Laan R. F. J. M. , Blom H. J., Boers G. H. J., Haagsma C. J., Thomas C. M. G., de Boo T. M. and van de Putte L. B. A. (2002). *Homocysteine and folate status in methotrexate-treated patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology; 41: 658-665*
72. van Ede A.E., Laan R.F., Blom H.J., Huizinga T.W., Haagsma C.J., Giesendorf B.A., de Boo T.M., van de Putte L.B. (2001). The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a genetic risk factor for methotrexate-related elevation of liver enzymes in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.;44(11):2525-30*
73. van der Put N. M. J., Gabreeÿls F., Stevens E. M. B., Smeitink J. A. M., Trijbels F. J. M., . Eskes T. K. A. B, van den Heuvel L.P. and Blom H. J. (1998). *A Second Common Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: An Additional Risk Factor for Neural-Tube Defects? Am. J. Hum. Genet. 62:000–000*
74. [web.inonu.edu.tr/~iozerol/rdurmaz/UygMolMikr/035.pdf](http://web.inonu.edu.tr/~iozerol/rdurmaz/UygMolMikr/035.pdf)
75. Weisman MH., Furst DE., Park GS., Kremer JM., Smith KM., Wallace DJ., Caldwell JR., Dervieux T. (2006). *Risk genotypes in folate-dependent enzymes and their association with methotrexate-related side effects in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum;54(2):607-12.*
76. Wendel, U.; Bremer, H. J. (1984). Betaine in the treatment of homocystinuria due to 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Europ. J. Pediat. 142: 147-150,*
77. Whittle S. L. and Hughes R. A.. (2004). Folate supplementation and methotrexate treatment in rheumatoid arthritis: a review, *Rheumatology; 43: 267-271*

78. Wolf C. R., Smith G. and Smith R. L. (2000). Science, medicine, and the future: Pharmacogenetics BMJ;320;987-990
79. <http://www.ctf.edu.tr/farma/tfd/mbabaoglu.pdf>
80. [http://www.klimik.org.tr/pdfs/tuberkuloz/Riza\\_Durmaz.pdf](http://www.klimik.org.tr/pdfs/tuberkuloz/Riza_Durmaz.pdf)
81. [https://www.roche-applied-science.com/sis/lighttyper/lt\\_frames/frame\\_technology.jsp](https://www.roche-applied-science.com/sis/lighttyper/lt_frames/frame_technology.jsp)
82. [http://www.roche.com/pages/facets/22/pharmacogen\\_e.pdf](http://www.roche.com/pages/facets/22/pharmacogen_e.pdf)
83. Yazıcı Y., Erkan D., İce A. (2004). Romatoloji ve Klinik Ortopedi El Kitabı. ISBN: 975-420-315-6. 192-229
84. Yazıcı Y., Soka T., Kautiainen H., Swearingen C., Kumlan I. and Pincus T. (2005). *Long term safety of methotrexate in routine clinical care: discontinuation is unusual and rarely the result of laboratory abnormalities.* *Ann Rheum Dis*;64;207-211
85. Yılmaz L., Aslan G., Bodur H. (2003). Romatoid Artritli Hastalarda ikinci basamak ilaç kullanımı, Romatizma, Cilt:18, Sayı:3

## 7.2 KISALTMALAR

**A:** Adenin

**ABC:** ATP-binding cassette

**Ala:** Alanin

**ALT:** Alanin Transaminaz

**ARA:** American Rheumatism Association

**Arg:** Arjinin

**Asn:** Asparajin

**AST:** Aspartat Transaminaz

**bp:** Baz çifti

**C:** Sitozin

**cDNA:** komplementer DNA

**CRP:** C-reaktif protein

**Cys:** Sistein

**DHFR:** Dihidrofolat redüktaz

**DİF:** Distal interfalanjial

**DMARDs:** Disease-modifying anti-rheumatic drugs

**dsDNA:** Çift iplikli DNA

**EDTA:** Etilen Diamin Tetraasetik Asit

**ESH:** Eritrosit Sedimentasyon Hızı

**FRET:** Fluorescence Rezonans Enerji Transferi

**FPGs:** MTX poliglutamat sentaz

**G:** Guanin

**GGH:** Gama glutamil hidrolaz

**GI:** Gastrointestinal

**Gln:** Glutamik asit

**Glu:** Glutamin

**Gly:** Glisin

**HGPRT:** Hipoksantin guanin fosforibozil transferaz

**HLA:** İnsan Lökosit Antijen

**Ile:** İzolösin

**KCFT:** Karaciğer Fonksiyon Testleri

**LC:** LightCycler

**LED:** Light Emitting diyote

**Met:** Metionin

**MTX:** Methotrexate

**MHC:** Major Histocompatibility Complex

**MKF:** Metakarpofalanjial

**MTHFR:** Metilentetrahidrofolat Redüktaz

**MTF:** Metatarsofalanjial

**PCR:** Polymerase Chain Reaction

**PİF:** Proksimal interfalanjial

**RA:** Romatoid Artrit

**RE:** Restriksiyon Enzimi

**Rf:** Romatoid faktör

**RFLP:** Restriction Fragment Length Polymorphism

**RT-PCR:** Real Time PCR

**Ser:** Serin

**SNP:** Single Nucleotid Polymorphism

**SLC:** Solute carrier

**T:** Timin

**Ter:** Terminal

**THF:** Tetrahidrofolat

**TGF- $\beta$ :** Transforme edici büyüme faktörü-  $\beta$

**Tm:** Erime Sıcaklığı

**TM:** Temporal mandibüler

**TPMT:** Tiopürin metil transferaz

**Trp:** Triptofan

**TYMS:** Timidilat sentetazi

**Val:** Valin

**5,10-metilen THF:** 5,10 metilentetrahidrofolat

**5-metil THF:** 5-metil tetrahidrofolat



### 7.3 ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Niğde Ortaköy' de doğdum. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimimi Samsun' da tamamladım.1997 yılında Samsun Anadolu Lisesi' nden (İngilizce) mezun oldum. 1999-2000 öğretim yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü' nde Üniversite öğrenimime başladım ve 2004 yılında bu bölümün Zooloji opsiyonundan mezun oldum. 01.07.2003-01.08.2003 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı' nda staj yaptım.. 2004-2005 öğretim yılında Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' nda yüksek lisans eğitimime başladım.