

158028

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜBERKÜLOZ  
TEDAVİSİ GÖREN HASTALARDA  
N-ASETİLTRANSFERAZ 2  
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Biyolog. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ

DANIŞMAN: Yard. Doç. Dr. Zuhal EROĞLU

İZMİR  
(2004)

## ÖNSÖZ

Tez çalışmamda yaptığı katkılar ve yardımları için tez danışmanım Sayın Yard. Doç. Dr. Zuhâl Eroğlu' na,

Tez süresince birlikte çalıştığımız Göğüs Hastalıkları Hastanesi doktorları; Sayın. Doç. Dr. Serir Aktoğu, Dr. Onur Erer ve Dr. İlker Özdemir'e,

Yüksek lisans eğitimimde katkıları olan ve tez çalışmam süresince de bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nejat Topçuoğlu' na ve diğer öğretim üyeleri; Sayın Doç. Dr. Cumhur Gündüz' e ve Yard. Doç. Dr. Berna Yılmaz' a,

Yüksek lisans eğitimime başlamam için beni teşvik eden ve eğitimim süresince bana her konuda destek veren Sayın Yard. Doç. Dr. Buket Kosova' ya,

Yüksek lisans süresince paylaştığımız herşey için, Anabilim Dalımızdaki arkadaşlarıma,

Beni özveriyle bugünlere getiren aileme,

Her zaman desteğini esirgemeyen sevgili eşim Bora Çetintaş' a,

Tez çalışmam süresince benimle birlikte olan ve bana hiç problem çıkarmayan sevgili oğlum Alp' e,

TEŞEKKÜR EDİYORUM.

*İZMİR / 2004*

*Biyolog. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ*

**DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ**

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



**(Danışman)**

**Üye** : Prof. Dr. Nejat Topçuoğlu



**Üye** : Prof. Dr. Meral Sakızlı



Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: 25.08.2004

# İÇİNDEKİLER

## 1. BÖLÜM

<b>1.1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>1.2. GENEL BİLGİLER</b> .....	4
1.2.1. FARMAKOGENETİĞE GİRİŞ VE TARİHÇE.....	4
1.2.2. POLİMORFİZMLER.....	10
1.2.2.1. Tek Nükleotid Polimorfizmleri.....	12
1.2.3. TÜBERKÜLOZ.....	14
1.2.4. N-ASETİLTRANSFERAZLAR.....	20
1.2.4.1. N-Asetiltransferaz Farmakogenetiğinin Başlangıcı.....	20
1.2.4.2. N-Asetiltransferaz İzoenzimleri.....	21
1.2.4.3. N-Asetiltransferaz'ın Moleküler Genetiği .....	22
1.2.4.3.1. NAT1 Allelik Varyantları.....	23
1.2.4.3.2. NAT2 Allelik Varyantları.....	23
1.2.4.4. Genotip/Fenotip İlişkisi.....	26
1.2.4.5. NAT2 Polimorfizmlerinin Farklı Toplumlardaki Dağılımı.....	27
1.2.4.6. N-Asetiltransferaz Polimorfizmleri ve Kanseri.....	28
1.2.5. NAT2 POLİMORFİZMLERİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER.....	30
1.2.5.1. Restriksiyon Enzimi Uzunluk Polimorfizmleri.....	30
1.2.5.2. Reverse Line Blot Hibridizasyon.....	31
1.2.5.3. LightCycler Sistemi.....	32
1.2.5.3.1. Birden Fazla Floresan Boya Kullanılarak Analiz Yapılması.....	37
1.2.5.3.2. Erime Eğrisi Analizi.....	38
1.2.5.3.3. Çift Boya Kullanılarak İki Nokta Mutasyonunun Analizi.....	40
1.2.5.3.4. Erime Eğrisi Analizi ve FRET Yönteminin Avantajları.....	41

## 2. BÖLÜM

<b>2.1. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	43
2.1.1. Kontrol ve Çalışma Grubu.....	43
2.1.2. Çalışma Dışında Bırakılan Hastalar.....	43
2.1.3. Tüberküloz Tedavisi.....	44
2.1.4. İlaça Bağlı Hepatotoksisitenin Teşhisi.....	44
2.1.5. NAT2 Polimorfizmleri Analizi.....	45
2.1.5.1. Kullanılan cihazlar.....	45
2.1.5.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	45
2.1.5.2.1. High Pure PCR DNA İzolasyon Kiti İçeriği.....	45

2.1.5.2.2. LC NAT2 Mutasyon Belirleme Kiti İçeriği.....	46
2.1.6. NAT2 Polimorfizmlerinin Analizi İçin Çalışma Protokolü.....	48
2.1.6.1. DNA İzolasyonu Aşamaları.....	48
2.1.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	49
2.1.6.3. Termal profil.....	50
2.1.6.3.1. Denatürasyon.....	50
2.1.6.3.2. Amplifikasyon.....	50
2.1.6.3.3. Erime Eğrisi Analizi.....	51
2.1.6.3.4. Soğutma.....	51
2.1.6.4. Master Miks Hazırlanması.....	51
2.1.7. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	52
2.1.8. İstatistiksel Analiz Yöntemleri.....	54

### 3. BÖLÜM

3.1. BULGULAR.....	56
3.1.1. Kontrol ve Çalışma Gruplarının Genel Özellikleri ve İstatistiksel Analiz.....	56
3.1.1.1. Kontrol Grubu.....	56
3.1.1.2. Çalışma Grubu.....	56
3.1.1.3. İstatistiksel Analiz.....	57
3.1.2. Hepatotoksisite ile İlgili Bulgular.....	58
3.1.3. NAT2 Polimorfizmleri ile İlgili Bulgular.....	59
3.1.3.1. NAT2*5A Analiz Sonuçları.....	59
3.1.3.1.1. Kontrol Grubu.....	60
3.1.3.1.2. Çalışma Grubu.....	60
3.1.3.1.3. İstatistiksel Analiz.....	60
3.1.3.2. NAT2*6A Analiz Sonuçları.....	61
3.1.3.2.1. Kontrol Grubu.....	61
3.1.3.2.2. Çalışma Grubu.....	61
3.1.3.2.3. İstatistiksel Analiz.....	62
3.1.3.3. NAT2*7A/B Analiz Sonuçları.....	66
3.1.3.3.1. Kontrol Grubu.....	66
3.1.3.3.2. Çalışma Grubu.....	67
3.1.3.3.3. İstatistiksel Analiz.....	67
3.1.3.4. NAT2*14A Analiz Sonuçları.....	68
3.1.4. Bileşik Heterozigot Genotipler.....	70
3.1.4.1. Heterozigot NAT2*5A ve NAT2*6° Genotipi.....	71
3.1.4.2. Heterozigot NAT2*5A, NAT2*6A ve NAT2*7A/B Genotipi.....	71
3.1.4.3. Heterozigot NAT2*6A ve NAT2*7A/B Genotipi.....	71
3.1.5. NAT2 Fenotipi.....	71
3.1.5.1. İstatistiksel analiz.....	73

<b>4. BÖLÜM</b>	
<b>4.1. TARTIŞMA</b> .....	78
<b>5. BÖLÜM</b>	
<b>5.1. SONUÇ ve ÖNERİLER</b> .....	89
<b>6. BÖLÜM</b>	
<b>6.1. ÖZET</b> .....	91
<b>6.2. ABSTRACT</b> .....	93
<b>7. BÖLÜM</b>	
<b>7.1. YARARLANILAN KAYNAKLAR</b> .....	95
<b>7.2. KISALTMALAR</b> .....	116
<b>7.3. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	118



## Tablolar, şekiller, grafikler, resimler dizini

<b><u>Tablo No</u></b>	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Tablo 1:</b> Son çalışmalarda ilaç yanıtı ile ilişkili bulunmuş ilaç hedefleri / hedef proteinler.....	8
<b>Tablo 2:</b> Son çalışmalarda ilaç yanıtı ile ilişkili bulunmuş ilaç metabolizması enzimleri ve diğer proteinler.....	9
<b>Tablo 3:</b> Tüberküloz ilaçlarının yan eklileri.....	16
<b>Tablo 4:</b> İnsan NAT2 alelleri.....	24
<b>Tablo 5:</b> Farklı populasyonlar arasında NAT2 alel sıklıklarının karşılaştırılması.....	27
<b>Tablo 6:</b> Erime piklerinin değerlendirildiği sıcaklık dereceleri .....	53
<b>Tablo 7:</b> Kontrol ve çalışma grubunun genel özellikleri.....	57
<b>Tablo 8:</b> Hepatotoksisite tekrarı, başlangıç günleri, süreleri ve biyokimyasal testlerin ortalama pik değerleri.....	59
<b>Tablo 9:</b> NAT2*5A analiz sonuçları.....	60
<b>Tablo 10:</b> NAT2*6A analiz sonuçları.....	62
<b>Tablo 11:</b> NAT2*7A/B analiz sonuçları.....	67
<b>Tablo 12:</b> Kontrol ve çalışma grubunda NAT2*5A ve NAT2*6A bileşik heterozigot genotipinin görülme oranları.....	71
<b>Tablo 13:</b> Kontrol ve çalışma grubundaki hızlı, orta ve yavaş asetilatör oranları.....	72
<b>Tablo 14:</b> Kontrol ve çalışma grubunun cinsiyete göre asetilatör Fenotipleri.....	73
<b>Tablo 15:</b> İlaça bağlı hepatotoksisite gelişen hastaların yaşları, asetilatör durumları ve biyokimyasal testlerinin en yüksek değerleri.....	74
<b>Tablo 16:</b> Kontrol grubu ile ilgili veriler ve polimorfizm analiz sonuçları.....	75
<b>Tablo 17:</b> Çalışma grubu ile ilgili veriler ve polimorfizm analiz sonuçları.....	77
<b><u>Şekil No</u></b>	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Şekil 1:</b> Karaciğerde izoniazid metabolizması.....	18
<b>Şekil 2A:</b> Denatürasyon fazı sırasında hibridizasyon problemleri ve DNA zinciri .....	33

<b>Şekil 2B:</b> Hibridizasyon problemlerinin DNA'ya baş-kuyruk pozisyonunda amplifikasyonu ve FRET .....	34
<b>Şekil 2C:</b> Elongation fazı sırasında hibridizasyon problemlerinin DNA' dan ayrılışı .....	35
<b>Şekil 2D:</b> Bir PCR döngüsü sonunda çift zincirli DNA molekülü ve DNA'dan ayrılmış olan hibridizasyon problemleri.....	36
<b>Şekil 3:</b> Hibridizasyon problemlerinin wild type ve mutant DNA zincirine hibridizasyonları.....	39
<b>Şekil 4:</b> Tek primer ve iki hibridizasyon çifti kullanılarak, ApoE genindeki 2 ayrı mutasyon bölgesinin analizi.....	41
<b>Şekil 5:</b> NAT2 geninin 2 primer çifti ile amplifiye edilen bölgeleri; 191., 481., 590., 857. pozisyonlardaki 4 polimorfizmin belirlenmesi için dizayn edilmiş oligonükleotid hibridizasyon problemlerinin gen üzerindeki yerleri ve problemleri işaretlemek için kullanılan floresan boyalar .....	47
<b>Şekil 6:</b> Kanal 2 ve 3' te, NAT2 geninin pozisyon 191, pozisyon 481, pozisyon 590 ve pozisyon 857' de görülebilecek sekiz muhtemel genotipinin erime eğrisi analizi sonuçları .....	52
<b>Şekil 7:</b> NAT2*5A ve NAT2*6A için wild type genotip sonucu.....	63
<b>Şekil 8:</b> Negatif kontrol, pozitif kontrol ve H.26.K numaralı olgu sonucu.....	64
<b>Şekil 9:</b> Mutant NAT2*5A ve wild type NAT2*6A genotip sonucu .....	65
<b>Şekil 10:</b> NAT2*5A için wild type, NAT2*6A için mutant genotip sonucu.....	66
<b>Şekil 11:</b> NAT2*7A/B ve NAT2*14A için wild type genotip sonucu.....	69
<b>Şekil 12:</b> NAT2*7A/B için heterozigot, NAT2*14A için wild type genotip.....	70

### **Grafik No**

### **Sayfa No**

<b>Grafik 1:</b> Lightcycler cihazının optik kanallarının ölçüm yapılan dalga boyları, kanallar arası etkileşimler ve kullanılan floresan boyalar.....	37
<b>Grafik 2:</b> Kontrol ve çalışma grubunun NAT2*5A analiz sonuçlarının karşılaştırılması.....	61
<b>Grafik 3:</b> Kontrol ve çalışma grubunun NAT2*6A analiz sonuçlarının karşılaştırılması.....	62
<b>Grafik 4:</b> Kontrol ve çalışma grubunun NAT2*7A/B analiz sonuçlarının karşılaştırılması.....	68



**Grafik 5:** Kontrol ve çalışma grubundaki hızlı, orta ve yavaş  
asetilatör oranları.....72

**Resim No**

**Sayfa No**

**Resim 1:** LightCycler cihazı.....33



## 1.1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüberküloz bütün dünyada halk sağlığını tehdit eden tehlikeli bir hastalıktır. Tedavisi mümkün olmakla birlikte hastaların uzun süre ilaç kullanmaları gerekmektedir. Buna bağlı olarak, kullanılan ilaçlarda ciddi yan etki sorunlarıyla karşılaşılmaktadır. Tüberküloz tedavisi sırasında ortaya çıkan en önemli yan etki hepatotoksisitedir (107, 109). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda yaş, cinsiyet, viral enfeksiyonlar, karaciğer hastalıkları, albümin düzeyi, alkol kullanımı gibi risk faktörlerinin advers (ters) reaksiyonlar için yatkınlık oluşturup oluşturmadığı araştırılmış, fakat kesin sonuçlar elde edilememiştir (138, 152). Genetik bilimindeki son gelişmeler ile kalıtım ve ilaç yanıtı arasında önemli bağlantılar olduğunun saptanması yeni bir bakış açısı getirmiş ve farmakogenetik bilimini ortaya çıkarmıştır.

Farmakogenetik alanındaki umut verici çalışmalar, kalıtım ve ilaç yanıtındaki bireysel farklılıklar arasında ilişki kurmak ve her hasta için doğru ilaç, doğru doz ve tedavi şeklini belirlemek amacı ile yapılmaktadır. Terapötik ajanlara yanıt ve ilaç toksisitesindeki bireysel farklılıklara klinikte çok sık rastlanmaktadır. Örneğin; şizofreni tedavisi gören hastaların %30' unun antipsikotik ilaç tedavisine, beta ( $\beta$ )-blokör kullanan kalp hastalarının ise %35' inin ilaca yanıt vermediği görülmüştür. Diğer yandan, multipli skleroz' lu hastaların ancak üçte biri interferon tedavisine yanıt vermektedir (22).

Yaşam tarzı, beslenme, çevresel faktörler gibi birçok etken ilaç yanıtını etkilese de anahtar faktör bireyler arası genetik farklılıklar, yani genetik polimorfizmlerdir. İlaç metabolizmasındaki enzimler, taşıyıcılar, reseptörler ve diğer ilaç hedeflerini kodlayan genlerdeki polimorfizmler, tedavi amaçlı kullanılan birçok ilacın etkinliği ve toksisitesindeki bireysel farklılıklar ile ilişkili

bulunmuştur (34, 89). Bunlardan dolayı, bireyler arasındaki genetik farklılıkların belirlenmesiyle, ilaç etkinliğini en üst düzeye çıkartıp, yan etkilerini en aza indirmek farmakogenetiğin en temel amacı olmuştur.

Tüberküloz tedavisinde *Mycobacterium tuberculosis* basillerinin duyarlı olduğu en az üç ilaç kombine olarak kullanılmalı ve ilaçlar en az altı ay düzenli alınmalıdır (69, 108). Yeni antitüberküloz ilaçların keşfi ve kombine tedavilerin kullanımı ilaç toksisitesi sorununu da beraberinde getirmiştir. Tedavide kullanılan üç temel ilaç; izoniazid, rifampisin ve morfozinamid' dir. Ancak bu ilaçlar karaciğer üzerinde toksik etki yaparak hepatotoksisite gelişmesine neden olurlar. Bu etki tüberküloz tedavisinde en sık karşılaşılan ve en ciddi ilaç yan etkisidir (106). Hepatotoksisitenin derecesi geçici transaminaz yüksekliğinden öldürücü yaygın karaciğer nekrozuna kadar varabilen geniş bir klinik spektrum içinde gözlenebilir.

N-asetiltransferaz 2 (NAT2), ilaç metabolizmasındaki önemli enzimlerden birisidir. Tüberkülozun temel ilaçlarından izoniazid, NAT2 enzimi ile asetillenir ve ilacın üriner metaboliti olan asetilizoniazid' e dönüştürülür. Populasyonda NAT2 enzim düzeyi polimorfik olarak değişmekte ve buna bağlı olarak asetilleme oranı da bireyler arasında farklılıklar göstermektedir. NAT2 genindeki polimorfizmler, enzimin yapısında değişiklik yaparak hızlı, yavaş yada orta asetilleyici fenotipin oluşmasına neden olurlar (95). Polimorfik NAT2 asetilatör durumu ile antitüberküloz ilaç kaynaklı hepatotoksisite arasındaki ilişki tartışma konusu olmaktadır.

Bu alışmada, N-asetiltransferaz 2 polimorfizmlerinin, antitüberkölöz ilaç kaynaklı hepatotoksisite gelişimine etkisini değerlendirmek amacı ile Ege Bölgesinde tüberkölöz tedavisi gören hastalarda, asetilatör fenotipinin antitüberkölöz ilaç kaynaklı hepatototoksisite için risk faktörü oluşturup oluşturmadığı araştırılmıştır.



## 1.2. GENEL BİLGİLER

İlaçların her hastada aynı etkiyi göstermemeleri nedeniyle meydana gelen advers ilaç reaksiyonları (Adverse Drug Reaction = ADR) klinikte çok sık karşılaşılan bir problemdir. Özellikle terapötik indeksi dar olan bir ilacın tedavi edici dozu, bir hastaya iyi gelirken bir başka hastada toksik etki yapabilmektedir.

ADR' larının görülme sıklığı birçok çalışmada istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Örneğin, 1973 yılında, hastaneye yatırılan hastaların %28' inde 1979 yılında ise hastaneye yatırılan çocuk hastaların % 17' sinde ADR geliştiği rapor edilmiştir. 1994 yılında Lazarou ve arkadaşları hastaneye yatırılan hastalarda 2.216.000 ciddi ADR meydana geldiğini belirtmişlerdir. 1995' te Jonhson & Bootman firması olaya mali açıdan bakarak bir araştırma yapmış ve 1949 -1956 yılları arasında ADR' ler ile ilgili olarak kaybedilen paranın 76.6 milyar dolar gibi ciddi bir rakam olduğunu açıklamıştır (115).

ADR' ları morbidite ve mortalite nedenlerinin yanında, ilaçların etkinliğini azaltarak tedavi başarısızlıklarına ve sağlık harcamalarının artmasına neden olmaktadır. Bütün bu kayıplar gözönünde bulundurulduğunda, bireyler arasındaki gen varyasyonlarının araştırılarak, ilaç etkinliğinin önceden belirlenmesi ve kişiye özel reçetelerin yazılmasını amaç edinen farmakogenetik biliminin önemi daha da artmaktadır.

### 1.2.1. FARMAKOGENETİĞE GİRİŞ VE TARİHÇE

Bireyler arasında dışarıdan alınan maddelere karşı farklı yanıtların oluşabileceği ilk kez antik dönemde rapor edilmiştir. M.Ö. 510' da Pythagoras bakla tüketiminin bazı insanlar için tehlikeli olduğunu gözlemlemiş ve bu kişilerin bakla yememelerini tavsiye etmiştir (130). Günümüzde ise, bakla

tüketiminden sonra gelişen ciddi hemolitik anemiden anti-oksidan bir enzim olan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) eksikliği sorumlu tutulmaktadır.

1919 yılında Marshall, beyaz ırkla siyah ırkı karşılaştırdığında, siyah ırkın hardal gazına daha dirençli olduğunu gözlemleyip rapor etmiştir (130). II. Dünya savaşı sırasında, antimalaryal ilaçların Afrika ve Amerikalı' larda, beyaz ırka göre daha çok hemolitik anemiye yol açtığı görülmüştür (21). 1956 yılında yine G6PDH eksikliğinin, antimalaryal ilaç alımından sonra hemolitik anemi oluşturan ana neden olduğu saptanmıştır (15). Bu gözlemlerden sonra, farmakogenetiğin esasları ilk 1957 yılında Arno Motulsky tarafından ifade edilmiştir. Motulsky, antimalaryal ilaç primakin' e ve kas gevşetici süksinilkolin' e hassasiyetin temelinde genetik farklılıkların yattığını öne sürmüştür (98).

Farmakogenetik alanında yapılan ilk çalışmalardan birisi, debrizokin zayıf metabolizleyici fenotip örneğidir. Debrizokin, vücutta hızlı bir şekilde inaktif metabolitlerine ayrılan ve idrar ile atılan bir ilaçtır. 1970' li yıllarda, Mahgoub, Londra' da St.Mary' s Hastanesinde debrizokin metabolizması üzerinde çalışmaya başlamıştır. Mayıs 1977' de laboratuvar başkanı Roberth Smith de dahil olmak üzere beş çalışma arkadaşı deney yapmak amacı ile debrizokin içmişlerdir. Birkaç saat içinde, Smith' te baş dönmesi ve oryante olamama ile birlikte hipotansiyon gelişmiştir. Ayrıca, Smith' in idrarında debrizokin' nin inaktif metabolitleri bulunamamıştır. Deney Smith' in aile üyelerine kadar uzatılmış ve aileden bazı kişilerde de aynı belirtiler görülmüştür.

Bu çalışma, debrizokin metabolizmasından esas sorumlu gen olan Sitokrom P450 subfamilyasından IID polipeptid 6, yani CYP2D6' nın

moleküler klonlanmasına öncülük etmiş ve CYP2D6 aktivitesini elimine eden polimorfizm olarak karakterize edilmiştir. Bu örnekler farmakogenetiğin gelişmesine temel oluşturmuştur.

Yapılan ilk genetik çalışmalarla adverse ilaç etkileşimlerinin, ilaç metabolizmasındaki kolinesteraz (70), Sitokrom P450 (128) ve N-asetiltransferaz (33) gibi enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfizmlerden kaynaklandığı gösterilmiştir.

Son yıllardaki çalışmalarla ilaç metabolizmasındaki enzimleri ve reseptörleri kodlayan genlerin çoğunda enzimatik aktiviteyi etkileyen polimorfizmler saptanmıştır. Bu polimorfizmlere örnekler ve ilaç yanıtına etkileri Tablo 1 ve Tablo 2' de özetlenmiştir.

Bu örnekler, ilaç yanıtındaki farklılıklar ile ilgili olarak çalışılabilecek hedef gen gruplarını açıkça göstermektedir. İlk sıradaki hedef genler, ilaç metabolizmasındaki enzimleri ve ilaç taşıyıcılarını kodlayan yani ilaç metabolizmasının farmakokinetik özelliklerini oluşturan genler; ikinci grup hedef genler ise, ilaç metabolizmasının farmakodinamiğini etkileyen, ilaç hedeflerini kodlayan genler olarak sınıflandırılabilir.

Moleküler genetik çalışmaların ilerlemesi ile ilaç transportunun da ilaç metabolizmasındaki enzimler kadar önemli olduğu anlaşılmıştır. İlaçlar özel taşıyıcılar ile vücut içinde ve vücut dışına hareket halindedirler. Örneğin, Serotonin transporter (SLC6A4) geninin promoter bölgesinde insersiyon (ins) veya delesyon (del) sonucu meydana gelen polimorfizm, fluoksetin ve paroksetin ilaçlarına yanıtı etkiler. ins/ins genotipini taşıyanlar bu ilaçlara del/del genotipini taşıyanlardan daha iyi yanıt verirler (Tablo 1).

İlaçlar mutlaka hedeflerine fiziksel olarak bağlanmak zorundadırlar. Hareketlerini modüle etmek için reseptörlere veya enzimlere bağlanırlar. Bundan dolayı, bağlanma prosesindeki proteinleri kodlayan önemli bazı genler de ilaç yanıtında farklılıklar oluşturabilmektedirler. Örneğin, Bradikinin B<sup>2</sup> reseptör geninin 58. pozisyonundaki sitozin bazının timin' e değişmesi sonucu oluşan bir tek nükleotid polimorfizmi tanımlanmıştır (Tablo 1). Bu değişiklik genin promotor bölgesine düşmektedir (kodlanmayan bölge, silent polimorfizm). C58T polimorfizmini taşıyan bireylerde bradikinin reseptör sayısı azaldığından bradikinin' e karşı duyarlılık da azalır ve Angiotensin Converting Enzim (ACE) inhibitörlerinin neden oldukları öksürüğün görülme sıklığı artar (100).

Sonuç olarak, farmakogenetik çalışmaların artırılması ile daha etkili ilaçlar geliştirilebilecek ve hastalara ilk seferde doğru tedaviler uygulanabilecektir. Böylece uygun ilaç dozunun belirlenmesi için; hastanın yaşı ve kilosu yerine genetik profili göz önüne alınarak, advers etkiler elimine edilirken iyileşme hızıda artacaktır. İlaçların geliştirilmesi ve onaylanması prosesindeki gelişmeler yanında ilaç harcamalarında da genel bir düşüş sağlanacaktır.



**Tablo 1: Son çalışmalarda ilaç yanıtı ile ilişkili bulunmuş ilaç hedefleri / hedef proteinler (41) (Del: delesyon, Ins: insersiyon, UTR: Translasyona uğramayan bölge (untranslated region), VNTR: Değişken tandem tekrar sayısı (variable number of tandem repeats), wt: wild type)**

<b>GEN</b>	<b>İSİM</b>	<b>ALEL</b>	<b>İLGİLİ FENOTİP</b>
<b>ACE</b>	Angiotensin-1 converting enzim	Ins/Del	Del/Del genotipi, renal hastalıkların ACE inhibitörleri ile tedavisi sırasında proteinürinin azalmasına neden olur
<b>ADRB1</b>	$\beta$ -1 adrenerjik reseptör	Arg389Gly	Arg/Arg homozigot kişilerde $\beta$ -adrenerjik reseptör antagonistlerine yanıt çok fazla gelişir
<b>ADRB2</b>	$\beta$ -2 adrenerjik reseptör	Arg16Gly	Gly aleli albuterol ve salbutamol'e yanıtın azalmasına sebep olur
<b>AGT</b>	Angiotensinojen	Met235Thr	Thr aleli antihipertansif tedavide kan basıncının düşmesi ve sol ventriküler kütleinin azalmasına neden olur
<b>AGTR1</b>	Angiotensin-II reseptör tip 1	A1166C	C aleli angiotensin-II reseptör antagonistlerine yanıtı artırır
<b>ALOX5</b>	Araşidonat 5-lipoksigenaz	Promoter VNTR (wt=5; non wt=3, 4 yada 6)	Non-wt homozigot kişilerde 5-lipoksigenaz inhibitörlerine ve lökotrien reseptör antagonistlerine yanıt azalır
<b>BDKRB2</b>	Bradikinin reseptör B2	C58T	T aleli ACE inhibitörleri kaynaklı öksürüğe neden olur
<b>CETP</b>	Kolesterol ester transfer protein	TagIB polimorfizm B1/B2	B1/B1 genotipi pravastatin ve atorvastatin'e yanıtı artırır
<b>DRD2</b>	Dopamin D2 reseptör geni	3' UTR Tag1A A1/A2	A1 aleli antipsikotik haloperidol ve nemonaprid'e yanıtın olumlu cevap vermesi ile ilgilidir
<b>DRD3</b>	Dopamin D3 reseptör geni	Ser9Gly	Klozapin'e yanıt Gly alelinde yoktur fakat, Ser/Ser genotipinde vardır
<b>DRD4</b>	Dopamin D4 reseptör geni	Exon3 VNTR 2-7 arası tekrarlar	4/4 homozigot kişilerde nöroleptik ilaçlara yanıt daha iyidir
<b>GNB3</b>	Guanin Nukleotid Binding Protein	Exon 10 C825T	CC genotipi antidepresanlara yanıt ile ilgilidir
<b>GRIN2B</b>	Glutamatreseptör, ionotropik, N-metil D aspartat 2B	C2664T	CC genotiplilere şizofreni tedavisinde klozapin'in yüksek dozda verilmesi gerekir
<b>HTR2A</b>	5-hidroksitriptamin (serotonin) reseptör 2A	T102C	CC yada C antipsikotik tedavi sırasında tardif dizkinezi' ne neden olur

<b>GEN</b>	<b>İSİM</b>	<b>ALEL</b>	<b>İLGİLİ FENOTİP</b>
<b>HTR2A</b>	5-hidroksitriptamin (serotonin) reseptör 2A	His452Tyr	Tyr aleli antipsikotik ilaç klozapin ile tedavide ilaç yanıtını azaltır
<b>LIPC</b>	Hepatik lipaz	C-514T	CC genotipinde statinlere yanıt artar
<b>MTHFR</b>	5, 10-metilen-tetra hidrofolat redüktaz	C677T	TT genotipli kişilerde methotrexate ile tedavi sırasında ilaç toksisitesi artar
<b>SLC6A3</b>	Dopamin transporter	3' VNTR 10 tekrar aleli	10/10 genotipi metilfenidat' a yanıtı azaltır
<b>SLC6A4</b>	Serotonin transporter (5-HTT)	Promoter ins/del (uzun/kısa)	ins/ins genotipliler fluoksetin yada paroksetin' e, del/del genotiplilere göre daha iyi yanıt verirler
<b>TPH1</b>	Triptofan hidroksilaz 1	A218C	Antidepresan ilaçlara yanıt ile ilgilidir
<b>TYMS</b>	Timidilat sentaz	TSER*2/*3	5-Fluorourasil tedavisine *2 aleli, *3 den daha iyi yanıt verir, *3/*3 için daha yüksek dozda ilaç kullanmak gerekir

**Tablo 2: Son çalışmalarda ilaç yanıtı ile ilişkili bulunmuş ilaç metabolizması enzimleri ve diğer proteinler (41)**

<b>GEN</b>	<b>İSİM</b>	<b>ALEL</b>	<b>İLGİLİ FENOTİP</b>
<b>ADD1</b>	Adducin 1 ( $\alpha$ )	Gly460Trp	Trp aleli, hipertansiyonun diüretiklerle tedavisinde ilaç yanıtını artırır
<b>APOE</b>	Apolipoprotein E	E4	E4 aleli statinlere yanıtı azaltır
<b>BCHE</b>	Bütirikolinesteraz	Asp70Gly Ala539Thr	Süksinilkolin ile tedavide advers reaksiyonlar ile ilgilidir
<b>COMT</b>	Catechol O-metiltransferaz	Val108/ 135Met	Met alelinde, günlük nöroleptik dozunun yüksek verilmesi gerekir
<b>CYP 2C19</b>	Sitokrom p450 2C19	*2, *3	Omeprazol tedavisinde ilaç yanıtının azalması ile ilgilidir
<b>CYP 2C9</b>	Sitokrom p450 2C9	*2, *3	Non-wt genotiplilerde varfarin'in günlük dozu azaltılmalıdır
<b>CYP 2D6</b>	Sitokrom p450 2D6	*3, *4 ve *5 gibi birçok inaktif alel	Non-wt alelleri antipsikotik tedavide tardif dizkinezi' ne neden olur
<b>DPYD (DPD)</b>	Dihidroprimidin dehidrogenaz	DPYD*2A	5-Fluorourasil ile tedavide *2A genotipli kişilerde ciddi toksisiteler görülebilir

<b>GEN</b>	<b>İSİM</b>	<b>ALEL</b>	<b>İLGİLİ FENOTİP</b>
<b>GSTM1</b>	Glutasyon S-transferaz M1	GSTM1-null	Null taşıyıcıların cisplatin ve paklitaksel ile ovaryum kanseri tedavisi hayatta kalma süresini arttırır, lösemnin sitotoksik tedavisinde relapse riski azalır
<b>GSTP1</b>	Glutasyon S-transferaz- $\pi$	Ile105Val	Val genotiplilerde kolorektal kanserin 5-Fluorourasil ve oksaliplatin ile tedavisi hayatta kalma süresini arttırır
<b>GSTT1</b>	Glutasyon S-transferaz- $\eta$ 1	GSTT1-null	GSST1, tacrine ve troglitazone hepatotoksitesisi ile ilişkilidir
<b>HLA-B</b>	Major histocompatibility complex class I-B	HLA-B*5701	Abakavir' e hipersensitivitenin artması ile ilgilidir
<b>IL10</b>	Interlokin 10	A-1082G	GG genotipi lösemili hastalarda prednisolon' a, kronik hepatit C hastalarında antiviral tedaviye daha iyi yanıt sağlar
<b>NAT2</b>	N-asetil transferaz 2	Yavaş asetilatör NAT2*5B, *6A, *7A/B, 14A/B	Yavaş asetilatör fenotipi anti tüberküloz ilaç kaynaklı hepato toksisite için risk faktörüdür
<b>TNF</b>	Tümör nekroz faktörü	G-308A	A aleli, aplastik anemi tedavisinde immunsupressif terapiye iyi yanıt sağlar
<b>TPMT</b>	Tiyopürin metiltransferaz	TPMT*2, *3A, *3C	Homozigot non-wt aleli tiyopürin tedavisinden sonra ciddi hematopoietik toksisite için yüksek risk taşır
<b>UGT1A1</b>	UDP-glukuronosil transferaz 1A1	UGT1A1*28	*28, irinotekan tedavisi sırasında diare ve lökopeni gelişme riskini arttırır
<b>XRCC1</b>	DNA tamir proteini XRCC1	Arg399Gln	Gln alleli, 5-Fluorourasil ve oksaliplatin kemoterapisine direnç ile ilgilidir; Gln/Gln genotipliler tedavi ile ilgili akut myeloblastik lösemi gelişmesine daha az yatkındırlar

### 1.2.2. POLİMORFİZMLER

Tüm insan genlerini içeren insan genomundaki baz dizisi değişiklikleri mutasyon olarak tanımlanır. Mutasyonlar bir gen bölgesinin dışında oluşabildikleri gibi, gen bölgesinin içinde de meydana gelebilirler ve aminoasit sırasını ve/veya kodlanan proteinin yapısını değiştirebilirler. Bir mutasyon genin tek bir noktasını değiştiriyorsa, nokta mutasyonu veya tek gen

mutasyonu olarak isimlendirilir. Marfan sendromu, kistik fibrozis, nörofibromatozis gibi genetik hastalıklar nokta mutasyonlar sonucu oluşmaktadırlar. Bu hastalıkları taşıyan kişilerin hayatta kalma şansları düşük olduğundan, nokta mutasyonların toplumda görülme sıklığı % 1' den daha azdır.

Tek gen mutasyonları, değişen bir baz ve mutasyonun gen üzerindeki pozisyonu ile belirlenir. Örneğin; Anjiotensinojen geninin T704C mutasyonunda 704. pozisyonundaki timin sitozine dönüşür. Bu mutasyon, polipeptid zincirinin 235. pozisyonundaki metionin aminoasidinin threonine değişmesine neden olur ve (Met235Thr) şeklinde gösterilir.

Polipeptid yapısında değişikliklere neden olmayan mutasyonlar, sessiz (silent) mutasyon olarak adlandırılırlar. Genellikle gen kodlamayan bölgelerde meydana gelmelerine rağmen yine de önemli sonuçlar doğurabilirler. Örneğin, Anjiotensin II reseptör genindeki polimorfizmde silent mutasyonların ilaç etkisi ile ilgili olabileceği gösterilmiştir. Anjiotensin II reseptörünü kodlayan genin 3. kromozoma lokalize olduğu ve genin 1166. pozisyonundaki adenin bazının sitozinle yer değiştirmesi ile karakterize silent bir polimorfizmi tanımlanmıştır (56). Bu polimorfizmin homozigot formu (CC), diğer iki genotip ile karşılaştırılıp (AA ve AC) aorta elastikiyetinin azalması ile bağlantılı olduğu rapor edilmiştir (7, 8). ACE inhibitörleri ile tedavi, CC veya AC genotipine sahip olanlarda aortanın elastik özelliğini geliştirirken, AA genotiplilerde aynı etkiyi göstermez. Bunun tersine, kalsiyum kanal blokörleri AA genotiplilerde aort elastik özelliğini geliştirirlerken, AC ve CC genotiplilerde etkili değildir (6). Bunlardan başka, bir Anjiotensin II reseptör blokörü olan losartan ile

tedavide AC ve CC genotipine sahip bireylerde arteriyal kan basıncında belirgin bir düşüş sağlanmıştır (90).

DNA baz dizisindeki değişiklikler her zaman ciddi bir sendroma neden olmazlar ve bir popülasyondaki genetik varyasyonları oluştururlar. Eğer belirli bir genetik varyasyon bir toplumda % 1' den daha sık görülüyorsa **polimorfizm**' den söz edilir . Polimorfizmler deri ve göz rengi özelliklerinin, eritrosit antijen özelliklerinin ve aynı zamanda farmakolojik yanıt özelliklerinin belirlenmesinde rol oynarlar (122).

Polimorfizmler, tek baz değişimi sonucu oluşurlarsa tek nükleotid polimorfizmi (**Single Nucleotid Polymorphism, SNP**) olarak isimlendirilirler.

#### **1.2.2.1. Tek Nükleotid Polimorfizmleri**

Tek nükleotid polimorfizmleri, genom dizisi içerisinde (A, T, C yada G) bazlarından birisinin değişmesiyle meydana gelen DNA dizi farklılıklarıdır. Örneğin, AAGGCTAA dizisinin ATGGCTAA dizisi şekline dönüşmesi ile bir SNP oluşur. Belirli bir SNP popülasyonun en az % 1' inde görülmektedir. İnsanlar arasında genetik farklılıkların % 90' ını oluşturan SNP' ler genomdaki yaklaşık her bin bazda bir meydana gelirler (131, 153). İnsan haploid genomunun yaklaşık 3 milyar bazdan oluştuğu düşünülecek olunursa, total SNP sayısının 3 milyon civarında olduğu hesaplanabilir.

Her üç SNP' den ikisi C ve T bazlarının değişmesiyle meydana gelir. SNP' lerin dağılımı % 63 T/C, % 17 T/G, % 8 CG, % 4 AT ve % 8 insersiyon/delesyon şeklinde belirtilmiştir (91).

DNA dizisindeki farklılıkların bakteri, virüs, toksinler, kimyasallar ve ilaçlar gibi çevresel etkenlere ve hastalıklara verilen yanıt üzerinde büyük etkisi vardır. Bu yüzden SNP' ler biyomedikal araştırmalarda ve farmakolojik

ürünlerin geliştirilmesinde büyük önem taşırlar. SNP' lerin evrim sırasında stabil kalmaları, yani jenerasyonlar arası geçişte fazla değişmemeleri, populasyon çalışmalarının kolay izlenmesini sağlamaktadır.

İnsan genomunun SNP haritasının çıkarılması konusunda dünyada çok sayıda grup çalışmaktadır. Bu gruplar içinde en önemli olanlar U.S. Human Genome Project (HGP) ve SNP Konsorsiyumu' dur (TSC project).

SNP Konsorsiyumu, Şubat 1999' da insan genomunda eşit dağılım gösteren ~300.000 SNP' nin tanımlanması ve "fikri mülkiyet" sınırlaması olmaksızın bilginin halka aktarımını sağlamak amacı ile kurulmuş bir organizasyondur. Hedefi iki yıl içerisinde 300.000 SNP' nin tanımlanması olan SNP Konsorsiyumu' nun 2001 yılı sonunda yayımlanan raporunda 1.4 milyon SNP açıklanmıştır (121).

SNP haritalarının kanser, diyabet, vasküler hastalıklar gibi poligenik kalıtım gösteren hastalıkların çözümlenmesinde çok faydalı olacağı düşünülmektedir.

SNP' ler genellikle hastalıklara neden olmazlar, fakat belirli hastalıkların gelişmesine yatkınlık kazandırabilirler. Örneğin; Alzheimer hastalığı ile ilgili bulunmuş genlerden birisi olan Apolipoprotein E yada Apo E geni, SNP' lerin hastalık gelişimine nasıl etki ettiğine dair iyi bir örnektir.

Apolipoprotein E, lipid metabolizmasında gerekli bir plazma proteindir ve genetik olarak polimorfik bir gendir (86). Apo E geni 112. ve 158. kodonlarında 2 adet SNP içerir ve sonuç olarak bu gen için 3 muhtemel genotip oluşabilir; E2, E3 ve E4 (139, 145). Her alel birbirinden bir DNA bazı ve her protein ürünü ise birbirinden bir aminoasit farklılığı ile ayrılır. 112. ve

158. kodonlarda, E2 aleli TGC/TGC (Cys/Cys), E3 aleli TGC/CGC (Cys/Arg), E4 aleli ise CGC/CGC (Arg/Arg) içerir.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda E3 aleli bütün populasyonlarda yaygın olarak bulunmuştur. E4 aleli total serum kolesterol düzeyinin yükselmesine neden olur ve koroner kalp hastalıklarına yatkınlık oluşturur (148). Ayrıca E4 alelini taşıyan kişilerin, Alzheimer hastalığının gelişmesine daha yatkın olduğu da belirtilmiştir (18). E2 alelinin ise Alzheimer hastalığına karşı koruyucu olduğu ve uzun yaşam sağladığı gösterilmiştir (127).

Hatırlanması gereken bir başka husus, SNP' lerin her zaman hastalıkların gelişmesinde tek başlarına kesin belirleyici olmamalarıdır. E4 aleline sahip bireyde Alzheimer hastalığı oluşmayabilir yada E2 aleline sahip bir birey Alzheimer hastası olabilir. Alzheimer, toplumda sık görülen diyabet, kanser ve kalp hastalıklarında olduğu gibi birçok genin bir arada etken olduğu bir hastalıktır. Bu hastalıkların poligenik kalıtımla oluşması, tanımlanmaları için genetik testlerin geliştirilmesini zorlaştırmaktadır.

### 1.2.3. TÜBERKÜLOZ

Tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis* basili tarafından oluşturulan ve hava yolu ile yayılan bulaşıcı bir hastalıktır (26). Son zamanlarda birçok ülkede tüberküloz hastalığının kontrolden çıkıp yeniden atak yaptığı bildirilmektedir (27). Dünya nüfusunun üçte biri tüberküloz basili ile enfekte olmakta ve bir yılda tüberkülozdan yaklaşık 2 milyon insan ölmektedir. Tanı konulan her 4 hastadan birinin ölüyor olması, dünyada tüberküloz hastalarının yeterince tedavi edilemediklerini açık bir şekilde ortaya koymaktadır. Tüberküloz hasta sayılarındaki artışlar ve tüberküloz kontrolü

abalarının yeterince başarı sağlayamaması nedeniyle, Dünya Sağlık Örgütü 1993 yılında tüberküloz için acil durum ilan etmiştir.

Dünyadaki tüberküloz hastalarının % 80' inin bulunduğu başlıca ülkeler Hindistan, Çin, Bangladeş, Filipinler ve Güney Afrika'dır (73).

Türkiye' de 1950' li yıllara kadar tüberküloz ölümlerinin bütün ölüm nedenleri içinde birinci sıradada olduğu, hastalık insidansı açısından değerlendirildiğinde, başarılı kontrol programı uygulamış ülkeler ile kötü program uygulamış ülkeler arasında bir konumda olduğu görülmektedir. 2000 yılında Verem Savaş Dispanserlerindeki kayıtlı hastalara göre, tüberküloz hastalık insidansı yüz binde 27' dir. Bu oran Avrupa ülkelerinin çoğunda yüz binde 20 iken, Hindistan, Çin, Bangladeş gibi ülkelerde yüz binde 100' ün üstünde, hatta yüz binde 200' ün üstündedir (146).

Tüberküloz tedavisinde en önemli faktörün ilaçlar olup, dinlenme, iklim ve beslenme gibi faktörlerin etkilerinin önemsiz olduğu gösterilmiştir (38). Tedavinin başlangıcında basil sayısı en yüksek düzeyde olduğundan dirençli mutant suşların ortaya çıkma olasılığı da çok yüksektir. Ülkemizde olduğu gibi izoniazid direncinin % 4' ten yüksek olduğu yerlerde, başlangıç döneminde dört ilaç kullanılmalı ve idame döneminde ise en az iki ilaç ile devam edilmelidir (108). Bu tedavide ilaçların düzenli olarak ve yeterli süre kullanılması çok büyük önem taşımaktadır; aksi halde ilaçlara direnç geliştirmekte ve tedavi başarısızlığı ortaya çıkmaktadır.

Tüberkülozun temel ilaçları izoniazid (INH), rifampisin, pirazinamid (morfozinamid) ve streptomisindir. Bu ilaçların, basilleri hızla öldürücü, ilaç direnci gelişimini önleyici ve basilleri sterilize edici etkileri vardır. Ancak bu



etkiler için, özellikleri olan bir dizi ilaç birarada ve yeterli sürede kullanılırsa, hastada kür sağlanır ve hastalığın tekrar etme olasılığı azalır.

Tüberküloz tedavisi için oldukça etkili ilaçların keşfedilmesine rağmen, bazı hastalarda advers reaksiyonlara neden olmaları, bu ilaçların kullanımını sınırlamakta ve tedavinin aksamasına neden olmaktadır (Tablo 3) (31, 35, 60, 64, 80, 109, 136,149, 150, 156). Minör ve majör yan etkiler olmak üzere 2 grup altında toplanan bu reaksiyonlar genellikle tedavinin ilk üç ayı içinde görülmektedirler (40).

**Minör yan etkiler:** Cilt reaksiyonları, periferik nöropatiler, artralji, grip benzeri tablo ve vücut sıvılarının kırmızı/turuncu renk alması

**Majör yan etkiler:** Hipersensitivite (aşırı duyarlılık) reaksiyonları, görme bozukluğu, hepatotoksisite, baş dönmesi, işitme kaybı, hemolitik anemi, akut böbrek yetmezliği, şok ve trombositik purpura

**Tablo 3: Tüberküloz ilaçlarının yan etkileri (31)**

İLAÇLAR	YAN ETKİLERİ
<i>Isoniazid</i>	Hepatotoksisite, periferik nöropati, cilt lezyonları, eozinofili
<i>Rifampisin</i>	Hepatotoksisite, immun reaksiyonlar (şok, trombositopeni, akut böbrek yetmezliği), kırmızı idrar, bulantı, kusma
<i>Pirazinamid</i>	Hepatotoksisite, artralji, hiperürisemi, bulantı, kusma, cilt lezyonları
<i>Ethambutol</i>	Optik nörit, cilt lezyonları
<i>Streptomisin</i>	Ototoksisite, nefrotoksisite, cilt lezyonları

Isoniazid, rifampisin ve pirazinamid ilaçlarının karaciğere toksik etkileri olduğundan tüberküloz tedavisinde en sık rastlanan yan etki hepatotoksisitedir (107, 109). Antitüberküloz ilaç kaynaklı hepatotoksisitenin görülme sıklığı farklı tedavi şekillerine bağlı olarak % 1 ile % 36 arasında değişmektedir (35, 60, 64, 109, 136, 149, 150, 156). Toksisite semptomları

bulantı, kusma, karın ağrısı ve sarılık olabilir. Tedavi sırasında, transaminazlarda hafif bir artış normalde de görülebilir. Ancak normalin üst sınırının üç katından fazla yada başlangıç değerinin 5 katından fazla artış varsa veya bilirubin yüksekliği varsa hepatotoksisite lehine değerlendirilir. Bu enzimlerin normal değerleri; ALT: 0-40 U/L, AST: 5-45 U/L, total bilirubin: 0.2-1.6 mg/dL' dir.

Hepatotoksisite gelişen hastaların ilaçlarının tamamı hemen kesilir ve viral hepatit yönünden araştırılır. İlaça bağlı hepatotoksisite ise karaciğer fonksiyonları düzeldikten sonra yine aynı ilaçlara aynı dozlarda başlanır.

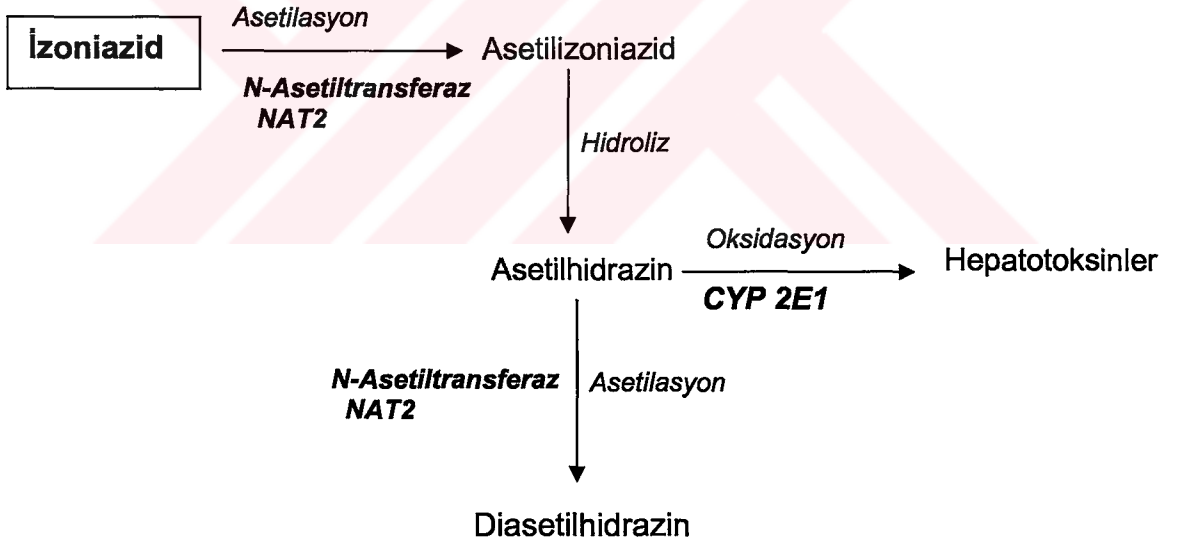
Hepatotoksisiteye neden olan risk faktörleri olarak ileri yaş, cinsiyet, beslenme durumunda bozulma, tüberkülozun yaygınlığı, karaciğer hastalığı, uygunsuz ilaç kullanımı, diabetes mellitus (DM), kronik enfeksiyonlar, hepatit B taşıyıcılığı, hepatit C (HCV) enfeksiyonu, ve yoğun alkol alımı gösterilmiştir (35, 60, 64, 109, 136, 138, 149, 150, 152, 156,). Ancak bu risk faktörlerinin hiç birisi kesin olarak kanıtlanmamış ve hepatotoksisite mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Antitüberküloz ilaçların içinde hepatotoksisite gelişmesine neden olan ana ilaç izoniazid' dir (35, 60, 64, 80, 109, 136, 149, 150, 156). Bu ilaç, 1950' li yılların başlarında tüberküloz hastalığının tedavisi için kemoterapotik ajan olarak geliştirilmiştir. Oral yolla alınan, ucuz ve hastalar tarafından kolayca tolere edilen, standart ve kısa süreli tedavide sıklıkla kullanılan sentetik bir ilaçtır (53). Üreyen basillere bakterisit, üremeyen basillere bakteriostatik etkilidir. *M. tuberculosis* dışındaki bakterilere ise etkisizdir. Etki mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, hücre duvarının bütünlüğünü ve pirodoksal

fosfat metabolizmasını bozmak suretiyle etki ettiği, ayrıca basil duvarında bulunan lipidleri ve DNA' yı da etkilediği düşünülmektedir.

Hepatotoksisite nedeni olarak izoniazid metabolizmasının ara bileşikleri gösterilmiştir (35, 60, 64, 80, 109, 136, 149, 150, 156). Bu yüzden, izoniazid metabolizmasının iyi anlaşılması, hepatotoksisitenin altında yatan mekanizmanın anlaşılmasına ve oluşumunun engellenmesine yardımcı olabilir.

İzoniazid ilk olarak karaciğerde NAT2 enzimi ile metabolize edilerek inaktif N-asetilizoniazid (AcINH)' e dönüştürülür (Şekil 1) (94). N-asetil izoniazid' in hidrolizi ile asetilhidrazin oluşur. Asetilhidrazin, Sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) enzimi ile hepatotoksik ara bileşiklere okside edilir (35, 120).



**Şekil 1:** Karaciğerde izoniazid metabolizması

Şekil 1' de görüldüğü gibi, NAT2 ve CYP2E1 izoniazid metabolizmasında gerekli iki enzimdir. Bu enzimlerin her ikisi içinde

polimorfizmler tanımlanmıştır. Bizim çalışmamızda *NAT2* polimorfizmlerinin hepatotoksisite ile ilişkisi araştırılmıştır.

Izoniazidin N-Asetilasyonu genetik olarak belirlenir ve Mendel kurallarına göre kalıtım gösterir. Populasyon *NAT2* enziminin metabolik aktivasyonu göz önünde bulundurularak; hızlı, orta ve yavaş asetilatör olarak üç fenotipe ayrılmıştır (132). Toplumda sık görülen hızlı asetilatör fenotipidir ve bu fenotipin oluşmasını sağlayan wild type *NAT2* aleli, *NAT2\*4A* olarak isimlendirilmiştir (43).

Farmakogenetik çalışmalarla, hızlı veya yavaş asetilatör durumunun *NAT2* genindeki polimorfizmlere bağlı olarak değiştiğinin keşfedilmesi ile kalıtım ve advers reaksiyonlar arasındaki ilişki araştırılmaya başlanmıştır. Asetilatör fenotipi ve izoniazidin yan etkileri arasında ilişki olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Hızlı asetilatör enzimini taşıyanların, yavaş asetilatör enzimini taşıyanlara göre daha yüksek dozda ilaç almaları gerektiği (29), ve yavaş asetilatör enzimini taşıyanların periferal nörit, hepatotoksisite, sistemik lupus eritematozus gibi advers reaksiyonların gelişmesi açısından daha çok risk altında oldukları rapor edilmiştir (3, 28, 32, 66). Risk faktörlerinin tanımlanması ve advers reaksiyonların görülebileceği hastaların önceden belirlenmesi ile, bu hastalar daha sık ve dikkatli izlenerek tüberküloz tedavileri sorunsuz bir şekilde tamamlanabilir.

Bu örnek yine kişiye özel tedavi şekillerinin belirlenmesi açısından farmakogenetik çalışmaların gerekliliğini vurgulamaktadır.

#### 1.2.4. N-ASETİLTRANSFERAZLAR

N-asetiltransferazlar, asetil-CoA' dan bir asetil grubunu, arilaminler, arilhidrazinler ve arilhidroksilaminler gibi substratların terminal nitrojenine ekleyen bir grup enzimdir. Substratları izoniazid, sülfametazin ve *p*-amino salisik asit gibi farmakolojik ilaçlar yada 4-aminobifenil, 2-naftilamin, benzidin ve pişmiş ette oluşan heterosiklik aminler gibi çevresel kaynaklı bileşiklerdir (49).

##### 1.2.4.1. N-Asetiltransferaz Farmakogenetiğinin Başlangıcı

Yaklaşık 50 yıl önce antitüberküloz ilaç izoniazidin geliştirilmesi ve klinikte kullanılmaya başlanılmasından sonra keşfedilen asetilatör durumu, ilaç yanıtını etkilediği belirlenen ilk kalıtsal özelliktir.

İzoniazid ilk kez Şubat 1952' de tüberküloz tedavisi için hastaneye yatırılan hastalarda kullanılmaya başlandı. İzoniazid tedavisine başlandıktan bir hafta sonra hastalarda kilo alma, iştah açılması, güçlenme gibi iyileşme belirtileri başlıyor ve ateşleri normale dönüyordu. Birkaç hafta sonra tüberküloz basili balgamda menfileşiyor ve 8 ay içinde röntgende belirgin değişiklikler görülüyordu. Fakat, ilacın çok iyi tedavi edici etkilerinin yanında, hastaların % 3.5-17' si parmaklarında ve dillerinde hissizlik ve uyuşmadan şikayet ediyorlardı ve ilaçları kesiliyordu. Bu durum birçok günlük gazeteye de yansıyor manşetlerde dramatik advers ilaç reaksiyonlarından bahsetmelerine neden olmuştu (48).

Gelişen bu olaylar insan metabolik özelliklerinin ve kalıtımın ilaç yanıtına etkisinin araştırılmasına öncülük etti (142, 143).

Hughes ve arkadaşları, hayvanlar üzerinde yaptıkları çalışmalardan çıkardıkları sonuçlarla problemi çözmeye başladılar (62). Çalışmalarının

sonucunda asetilizoniazid' in insanlarda esas üriner metabolit olduğunu ve advers reaksiyon görülen hastalarda ilacı asetilleme kapasitesine göre düşük yada yüksek salgılandığını gördüler. Bu ipucunu takip ederek advers reaksiyon görülenlerde izoniazidin asetil-izoniazid formuna daha az dönüştüğünü buldular. Daha sonra yapılan ikiz ve aile çalışmalarıyla ilacın kandaki konsantrasyonu ölçüldü ve genetik olarak belirlenen 2 alt grup ortaya çıkarıldı (112). Asetilizoniazid serum düzeyi düşük olanlar izoniazid için 'hızlı inaktivatör', yüksek olanlar ise 'yavaş inaktivatör' olarak sınıflandırıldı. Biyokimyasal çalışmalardan sonra, ilaç düzeylerindeki farklılıkların N-asetil transferaz aktivitesinden kaynaklandığı anlaşıldı ve "inaktivatör" terimi "asetilatör" terimi ile değiştirildi (141). Asetilasyon polimorfizminin keşfini, NAT aktivitesinin kalıtım modellerinin ve farklı etnik gruplardaki sıklığının ele alındığı çalışmalar izledi.

#### **1.2.4.2. N-Asetiltransferaz İzoenzimleri**

İlk olarak, izoniazid ve sülfametazin gibi ilaçların N-asetilasyonunun gözlemlenmesi ile populasyon hızlı, orta ve yavaş asetilatör olarak 3 fenotipe ayrıldı. *P*-aminosalisik asit gibi ilaçların N-asetilasyonu ise normal (monomorfik) dağılım gösteriyordu (67). Bu gözleme dayanarak, izoniazid ve sülfametazin gibi ilaçlar, N-asetilasyon için "polimorfik" substratlar, *p*-amino salisik asit gibi ilaçlar ise "monomorfik" substratlar olarak tanımlandılar. Bu sonuçlar biyokimyasal olarak değerlendirildiğinde, substrat özgüllüğü ve moleküler genetiği farklı iki N-asetiltransferaz izoenzimi olduğu anlaşıldı.

N-asetiltransferazlar terapötik substratları göz önünde bulundurularak 2 gruba ayrıldı;

**1- NAT1:** *p*-aminosalisik asit, *p*-aminobenzoik asit (PABA) ve *p*-amino benzolglutamat gibi monomorfik substratları asetiller.

**2- NAT2:** İzoniazid ve sülfametazin gibi polimorfik substratları asetiller. Ayrıca yiyeceklerle alınan heterosiklik aminlerin N, O- asetilasyonunda da gereklidir (49).

NAT ekspresyonu dokuya özgüdür. NAT1 aktivitesi hem erken gelişim dönemlerinde, hem de yetişkin döneminde birçok dokuda gösterilmiştir (147). NAT2 aktivitesi ise daha çok karaciğer ve ince bağırsak epitelinde gözlenmiştir (55, 68).

NAT1 ve NAT2 enzimleri ksenobiotiklerin N-asetilasyon (detoksifikasyon), O-asetilasyon ve N, O-asetiltransfer reaksiyonlarını gerçekleştirebilirler. N-asetilasyonun bileşikleri inaktive ederken, O-asetilasyonun aktive ettiği düşünülmektedir.

#### **1.2.4.3. N-Asetiltransferaz' ın Moleküler Genetiği**

İnsanlarda 8. kromozomun p22 bölgesinde 170-360 kb' lık üç NAT lokusu *PreNAT*, *NAT1* ve *NAT2* olarak belirlenmiştir (39, 88).

*PreNAT* bir psödogen olup prematüre bir "stop" kodonu içermesi nedeniyle okunmaz (10). *NAT1* ve *NAT2* ise 870 baz çiftlik, intronsuz birer açık okuma çerçevesinden oluşurlar ve fonksiyonel olarak 34 kDa' luk aktif bir protein kodlarlar (10, 104). *NAT1* ve *NAT2* gen düzeyinde % 87 ve protein düzeyinde % 81 homoloji gösterdikleri halde dokulardaki dağılımları, substrat özgüllükleri ve gelişim boyunca ekspresyon düzeyleri farklıdır (113).

*NAT* genleri oldukça polimorfiktir, 26 *NAT1* ve 36 *NAT2* aleli belirlenmiştir (58). *NAT1\*4* ve *NAT2\*4* wild type alelleridir ve hızlı asetilatör fenotipini oluştururlar (43).

**1.2.4.3.1. NAT1 Allelik Varyantları:** NAT1 geninin hem kodlayan bölgesinde hem de kodlayan bölgesinin dışında SNP' ler tanımlanmıştır. NAT1\*10, wild type alelinden sonra ikinci sık görülen aleldir ve 3'-transkribe edilmeyen ucunda iki SNP, T1088A ve C1095A içerir. Son çalışmalarda NAT1\*10 polimorfizminin enzim aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir ve bu konudaki çalışmalar halen devam etmektedir (5).

Kodlanan bölgedeki polimorfizmlerden NAT1\*15' te, C559T değişikliği ile polipeptid dizisinin 187. pozisyonundaki arjinin aminoasidi yerine 'stop' kodonu (61, 63) ve NAT1\*19' da, C97T değişikliği ile polipeptid dizisinin 33. pozisyonundaki arjinin aminoasidi yerine yine 'stop' kodonu kodlanır (84). Erken stop kodonlarının oluşması nedeniyle N-asetilasyon aktivitesinden yoksun, ucu kesilmiş NAT enzimi meydana gelir. Enzim aktivitesinin azalması ile ilgili bulunan diğer polimorfizmler G560A (Arg187Gln), C190T (Arg64Try) ve A752T (Asp251Val)' dir (61, 111).

**1.2.4.3.2. NAT2 Allelik Varyantları:** NAT1' in tersine, NAT2 genindeki tüm SNP' ler kodlanan bölgede bulunmuştur. SNP' lerin genotip/fenotip ilişkisi iyi belirlenmiş ve asetilasyon üzerindeki kesin etkileri karakterize edilmiştir. Aminoasit değişikliği ile oluşan ve sık görülen 4 SNP (NAT2\*5A, NAT2\*6A, NAT2\*7A ve NAT2\*14A) yavaş asetilleyici fenotipini meydana getirirler (129). İnsan NAT2 geninde tanımlanmış SNP' lerdeki nükleotid ve aminoasit değişiklikleri Tablo 4' te özetlenmiştir (58).



**Tablo 4: İnsan NAT2 alelleri (58)** (<http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html>. sitesinden alınmıştır. Son değişiklikler 5. Haziran. 2003 tarihinde yapılmıştır.)

<b>NAT2 aleli</b>	<b>Değişen Nükleotid</b>	<b>Değişen Aminoasit</b>
<b>NAT2*4</b>	Yok	Yok
<b>NAT2*5A</b>	T <sup>341</sup> C C <sup>481</sup> T	Ile <sup>114</sup> → Thr
<b>NAT2*5B</b>	T <sup>341</sup> C, C <sup>481</sup> T A <sup>803</sup> G	Ile <sup>114</sup> → Thr Lys <sup>268</sup> → Arg
<b>NAT2*5C</b>	T <sup>341</sup> C, A <sup>803</sup> G	Ile <sup>114</sup> → Thr Lys <sup>268</sup> → Arg
<b>NAT2*5D</b>	T <sup>341</sup> C	Ile <sup>114</sup> → Thr
<b>NAT2*5E</b>	T <sup>341</sup> C G <sup>590</sup> A	Ile <sup>114</sup> → Thr Arg <sup>197</sup> → Gln
<b>NAT2*5F</b>	T <sup>341</sup> C, C <sup>481</sup> T C <sup>759</sup> T, A <sup>803</sup> G	Ile <sup>114</sup> → Thr Lys <sup>268</sup> → Arg
<b>NAT2*5G</b>	C <sup>282</sup> T, T <sup>341</sup> C, C <sup>481</sup> T, A <sup>803</sup> G	Ile <sup>114</sup> → Thr Lys <sup>268</sup> → Arg
<b>NAT2*5H</b>	T <sup>341</sup> C, C <sup>481</sup> T A <sup>803</sup> G, T <sup>859</sup> C	Ile <sup>114</sup> → Thr Lys <sup>268</sup> → Arg Ile <sup>287</sup> → Thr
<b>NAT2*5I</b>	T <sup>341</sup> C, A <sup>411</sup> T C <sup>481</sup> T, A <sup>803</sup> G	Ile <sup>114</sup> → Thr Lys <sup>268</sup> → Arg Leu <sup>137</sup> → Phe
<b>NAT2*5J</b>	C <sup>282</sup> T, T <sup>341</sup> C G <sup>590</sup> A	Ile <sup>114</sup> → Thr Arg <sup>197</sup> → Gln
<b>NAT2*6A</b>	C <sup>282</sup> T, G <sup>590</sup> A	Arg <sup>197</sup> → Gln
<b>NAT2*6B</b>	G <sup>590</sup> A	Arg <sup>197</sup> → Gln
<b>NAT2*6C</b>	C <sup>282</sup> T, G <sup>590</sup> A A <sup>803</sup> G	Arg <sup>197</sup> → Gln Lys <sup>268</sup> → Arg

<b>NAT2 aleli</b>	<b>Değişen Nükleotid</b>	<b>Değişen Aminoasit</b>
<b>NAT2*6D</b>	T <sup>111</sup> C, C <sup>282</sup> T G <sup>590</sup> A	Arg <sup>197</sup> → Gln
<b>NAT2*6E</b>	C <sup>481</sup> T, G <sup>590</sup> A	Arg <sup>197</sup> → Gln
<b>NAT2*7A</b>	G <sup>857</sup> A	Gly <sup>286</sup> → Glu
<b>NAT2*7B</b>	C <sup>282</sup> T, G <sup>857</sup> A	Gly <sup>286</sup> → Glu
<b>NAT2*10</b>	G <sup>499</sup> A	Glu <sup>167</sup> → Lys
<b>NAT2*11A</b>	C <sup>481</sup> T	Yok
<b>NAT2*11B</b>	C <sup>481</sup> T 859 Del	S 287 Frameshift
<b>NAT2*12A</b>	A <sup>803</sup> G	Lys <sup>268</sup> → Arg
<b>NAT2*12B</b>	C <sup>282</sup> T, A <sup>803</sup> G	Lys <sup>268</sup> → Arg
<b>NAT2*12C</b>	C <sup>481</sup> T, A <sup>803</sup> G	Lys <sup>268</sup> → Arg
<b>NAT2*12D</b>	G <sup>364</sup> A, A <sup>803</sup> G	Asp <sup>122</sup> → Asn Lys <sup>268</sup> → Arg
<b>NAT2*13</b>	C <sup>282</sup> T	Yok
<b>NAT2*14A</b>	G <sup>191</sup> A	Arg <sup>64</sup> → Gln
<b>NAT2*14B</b>	G <sup>191</sup> A, C <sup>282</sup> T	Arg <sup>64</sup> → Gln
<b>NAT2*14C</b>	G <sup>191</sup> A, T <sup>341</sup> C C <sup>481</sup> T, A <sup>803</sup> G	Arg <sup>64</sup> → Gln Ile <sup>114</sup> → Thr Lys <sup>268</sup> → Arg
<b>NAT2*14D</b>	G <sup>191</sup> A, C <sup>282</sup> T, G <sup>590</sup> A	Arg <sup>64</sup> → Gln Arg <sup>197</sup> → Gln
<b>NAT2*14E</b>	G <sup>191</sup> A A <sup>803</sup> G	Arg <sup>64</sup> → Gln Lys <sup>268</sup> → Arg
<b>NAT2*14F</b>	G <sup>191</sup> A, T <sup>341</sup> C A <sup>803</sup> G	Arg <sup>64</sup> → Gln Ile <sup>114</sup> → Thr Lys <sup>268</sup> → Arg
<b>NAT2*14G</b>	G <sup>191</sup> A, C <sup>282</sup> T A <sup>803</sup> G	Arg <sup>64</sup> → Gln Lys <sup>268</sup> → Arg

<b>NAT2 aleli</b>	<b>Değişen Nükleotid</b>	<b>Değişen Aminoasit</b>
<b>NAT2*17</b>	A <sup>434</sup> C	Gln <sup>145</sup> → Pro
<b>NAT2*18</b>	A <sup>645</sup> C	Lys <sup>268</sup> → Arg Lys <sup>282</sup> → Thr
<b>NAT2*19</b>	C <sup>190</sup> T	Arg <sup>64</sup> → Trp

#### 1.2.4.4. Genotip / Fenotip İlişkisi

Rekombinant ekspresyon sistemleri kullanılarak, *NAT1* ve *NAT2* genlerindeki nükleotid değişikliklerinin asetiltransferaz katalitik aktivitesine etkisi araştırılmaktadır. *NAT1* ve *NAT2* polimorfizmleri, substrat affinitesinin, katalitik aktivitenin ve enzimin protein stabilitesinin azalmasına neden olurlar. Örneğin; *NAT2\*5*, *NAT2\*6*, *NAT2\*7* ve *NAT2\*14* genotiplerinde katalitik aktivite azalır ve yavaş asetilleyici fenotip oluşur. *NAT2\*12* ve *NAT2\*13* genotiplerinin, N-, O- ve N, O- asetiltransferaz aktivitesi ise *NAT2\*4* wild type genotipininki ile karşılaştırılabilir düzeydedir (50, 51). O. Neil ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada da bu desteklenmiş ve *NAT2\*13* genotipinin hızlı asetilatör fenotipini oluşturduğu bulunmuştur (102).

Rekombinant *NAT2* proteinlerinin intrinsik stabiliteleri de birbirinden farklıdır. Örneğin, *NAT2\*6*, *NAT2\*7*, *NAT2\*14* ve *NAT2\*18* proteinlerinin stabiliteleri diğerlerinden daha azdır (36, 43, 51, 82). *NAT2\*7B* alloenzimi, sülfametazin ve dapson ilaçları için diğerlerinden yüksek affiniteye sahip iken (54), 2-aminofluoren için affinitesi düşüktür (51, 54). Sonuç olarak asetilatör fenotipi farklı substratlara göre de değişmektedir.

N-asetiltransferaz aktivitesinin azalmasında çok sayıda mekanizmanın etkili olması nedeniyle, asetilatör fenotipinin ayırt edilmesi oldukça

komplekstir. Fenotip diyet, hastalıklar ve ilaç tedavisi gibi birçok faktörden etkilenmektedir. En büyük etki ise oldukça polimorfik olan *NAT2* geninden kaynaklanmaktadır.

#### 1.2.4.5. N-Asetiltransferaz 2 Polimorfizmlerinin Farklı Toplumlardaki Dağılımı

Farklı toplumlarda *NAT2* polimorfizmlerinin dağılımı konusunda yapılan çalışmalarda, alel sıklıklarının etnik gruplar arasında belirgin farklılıklar gösterdiği rapor edilmiştir (20). Örneğin, *NAT2\*5* Kanada, Amerika ve Afrika' da oldukça sık görülürken, Doğu ülkelerinde çok nadir bulunur. Diğer yandan, *NAT2\*7B* aleli Doğu ülkelerinde sık görülürken, beyaz ırkta çok nadir ortaya çıkar. *NAT2\*14* hem Amerika' lı hem Afrika yerlilerinde sık görülürken, diğer etnik gruplarda çok nadir görülür. Diğer etnik gruplar ve alel sıklıkları Tablo 5' de özetlenmiştir.

**Tablo 5:** Farklı populasyonlar arasında *NAT2* alel sıklıklarının karşılaştırılması (43)

<b>Etnik Gruplar</b>	<b>Hızlı Asetilatör Alelleri</b>	<b>Yavaş Asetilatör Alelleri</b>			
		<b><i>NAT2*14A</i> <i>G191A</i></b>	<b><i>NAT2*5A</i> <i>T341C</i></b>	<b><i>NAT2*6A</i> <i>G590A</i></b>	<b><i>NAT2*7A</i> <i>G857A</i></b>
Kanada	0.240	0	0.470	0.230	0.060
Amerika	0.240	0	0.430	0.310	0.020
Avrupa	0.263	0	0.455	0.264	0.018
İndia	0.257	0	0.330	0.380	0.033
Afrikan-Amerikalı	0.347	0.083	0.295	0.230	0.045
Afrika Gabon	0.270	0.086	0.404	0.221	0.019
Afrika Dogon	0.250	0.050	0.300	0.370	0.030
Hispanic	0.403	0.007	0.275	0.180	0.135
Panama	0.740	0	0.021	0	0.239
Kolombia	0.653	0	0.104	0.035	0.208
Kore	0.681	0.011	0.018	0.180	0.110
Japon	0.671	0	0.014	0.220	0.095
Çin	0.582	0	0.051	0.296	0.121
Filipinler	0.395	0	0.065	0.360	0.180
Polinezya	0.600	0	0.040	0.340	0.020

#### 1.2.4.6. N-Asetiltransferaz Polimorfizmleri ve Kanser

Sigara dumanı 4-aminobifenil gibi aromatik ve heterosiklik aminleri içermektedir. Ayrıca, kırmızı ette piştiği sırada heterosiklik aminler meydana gelmektedir. Hayvan deneylerinde aromatik ve heterosiklik amin karsinojenlerinin tümör gelişimine neden olduğu görülmüştür fakat, DNA'ya zarar vermeleri ve karsinogenezisi başlatmaları için metabolik aktivasyonları gerekmektedir. N-hidroksi aromatik ve heterosiklik aminlere N-oksidasyonlarından sonra NAT enzimleri ile O-asetilasyon yoluyla, asetoksi ara bileşiklere aktive edilirler. Asetoksi ara bileşikleri kendiliğinden DNA ile reaksiyona girerek DNA bileşikleri oluştururlar (49). Bu yüzden, *NAT1* ve *NAT2* asetilasyon polimorfizmleri ve aromatik yada heterosiklik aminlere maruz kalma sonucu meydana gelen kanser arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır.

*NAT1* ve *NAT2* asetilasyon polimorfizmlerinin popülasyonda oldukça sık görülmesi ve aynı zamanda aromatik ve heterosiklik aminlere çok fazla maruz kalınması kanser tetikleyicisi olarak bu enzimlerin önemini arttırmaktadır (47).

İngiltere' de kimyasal boyalar ile çalışan ve aromatik amin karsinojenlere maruz kalan işçilerle yapılan bir çalışmada mesane kanseri ve yavaş asetilatör fenotipi arasında dikkati çeken bir ilişki bulunmuştur (16). Daha sonra yapılan araştırmalarla da bu bulgu desteklenmiştir (37, 46, 116).

*NAT2* asetilatör fenotipi ve göğüs kanseri ile ilişkisi üzerine de birçok çalışma yapılmıştır. Fakat sonuçlar arasında bazı uyumsuzluklar saptanmıştır. Örneğin, farklı gruplar tarafından yürütülen üç çalışmada göğüs kanseri ve asetilatör fenotipi arasında ilişki belirlenmemişken (65, 76, 144),

yapılan iki çalışmada da hızlı asetilatör fenotipinin göğüs kanseri riskini arttırdığı bulunmuştur (12, 124).

Sigara içen homozigot NAT2 hızlı asetilatör fenotipine sahip kişilerde yapılan bir çalışmada, bu genotipin akciğer kanseri için yüksek risk oluşturduğu rapor edilmiştir (17). Benzer şekilde, Nyberg ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada sigara içen hızlı asetilleycilerde akciğer kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir (101). Diğer taraftan, yapılan başka iki çalışmada ise akciğer kanseri ve NAT2 asetilatör durumu arasında bir ilişki bulunamamıştır (11, 87).

Sigara dumanı ve baş ve boyun kanserleri arasında kuvvetli bir ilişki bulunmaktadır. Bundan dolayı, birçok çalışmada sigara içenlerde NAT polimorfizmleri ve baş-boyun kanserleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Yavaş asetilatör fenotipinin beyaz ırkta baş ve boyun kanseri, Japonlarda özefagus ve larinks kanseri gelişimine etkisi olduğu gösterilmiştir (25, 42, 96, 97).

İnsanlarda yavaş asetilatör fenotipinin moleküler mekanizması oldukça komplekstir ve henüz tam olarak anlaşılammıştır. NAT1 ve NAT2 asetilasyon polimorfizmleri ve çeşitli kanser türleri arasında ilişki gösterilmişse de sonuçlar henüz tartışmalıdır. Sonuçlardaki tutarsızlık karsinogenlere maruz kalmadaki farklılığa, genotip/fenotip çalışma metodlarına ve yetersiz örnek sayısına bağlı olabilir. Asetilasyon polimorfizmleri ve kanser arasındaki kesin ilişkinin açıklanabilmesi için daha geniş epidemiyolojik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

## 1.2.5. NAT2 POLİMORFİZMLERİNİN BELİRLENMESİNDE

### KULLANILAN YÖNTEMLER

NAT2 polimorfimlerinin belirlenmesinde kullanılan ilk yöntem Restriksiyon Enzimi Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism = RFLP) yöntemidir ve günümüzde hala yaygın olarak kullanılmaktadır (60). Daha sonra, Kaufhold ve arkadaşları Reverse Line Blot (RLB) hibridizasyon yöntemini geliştirmişlerdir (71). Son olarak da, LightCycler (LC) gibi gerçek zamanlı PCR cihazlarının ve floresan boyalarla işaretli hibridizasyon problemlerinin geliştirilmesi ile Floresans Rezonans Enerji Transferi (FRET) yöntemi kullanılmaya başlanmıştır.

#### 1.2.5.1. RESTRİKSİYON ENZİMİ UZUNLUK POLİMORFİZMLERİ

Restriksiyon enzimleri (RE), çift sarmal DNA' yı özgün parçalara kesen ve bu şekilde DNA ile çalışılmasını mümkün kılan çok önemli enzimlerdir. Bakterilerin büyük bir bölümü bir veya birkaç türde RE sentezlerler. Asıl görevleri, bakteriye dışarıdan giren yabancı genetik materyalleri ayrıştırarak mutasyonları önlemek ve böylece bakteri DNA' sını korumaktır. Bakteriye özgü olan bu enzimler, çift iplikli DNA (dsDNA) üzerinde özgün bir bölgeyi tanırlar ve dsDNA' nın her iki zincirindeki fosfo-diester bağına keserek DNA' yı tanıdıkları kesim noktalarından parçalara ayırırlar. Günümüzde 500' e yakın RE değişik mikroorganizmalardan elde edilmektedir. İsimleri izole edildikleri bakterinin ilk üç harfi, aynı bakteriden birkaç enzim elde edildi ise de ek olarak Roma rakamı ile belirtilir (1).

RFLP yönteminde, örnek DNA bir veya daha fazla RE ile kesildikten sonra, fragmentler moleküler büyüklüklerine göre jel elektroforezinde ayrıştırılırlar. Moleküler ağırlık standardı (marker) yardımıyla fragmentlerin

moleküler ağırlıkları belirlenir. Jel, Ethidium bromide maruz bırakıldıktan sonra fragmentler UV (260 nm) ışık altında görünür hale gelir ve incelenir.

Yi-Shin Huang ve arkadaşları 3 farklı RE (*KpnI*, *TagI* ve *BamHI*) kullanarak *NAT2* genindeki polimorfizmleri (*NAT2\*4*, *NAT2\*5*, *NAT2\*6*, *NAT2\*7*) araştırmışlardır (60).

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

#### 1.2.5.2. REVERSE LINE BLOT HİBRİDİZASYON

İlk kez Kaufhold ve arkadaşları tarafından tanımlanan RLB hibridizasyon yöntemi, DNA örneklerinin farklı oligonükleotid proplar ile nonradyoaktif hibridizasyonuna dayanır (71). *NAT* genlerinin PCR ürünleri membrana bağlı gene özgül oligonükleotid proplar ile hibridize edilirler. Daha sonra membran ışığa duyarlı filme maruz bırakılır ve hibridizasyonun kemilüminesans ölçümü yapılır.

Bunschoten ve arkadaşları RLB hibridazyon yöntemi ile *NAT1* ve *NAT2* gen polimorfizmlerini incelemişlerdir (13).

RLB hibridizasyonu *NAT2* alellerinin genotiplendirilmesi için hızlı, sağlam ve güvenilir bir yöntemdir. Bunschoten ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, sonuçlar alel-spesifik PCR ve PCR-RFLP metodları ile tamamen uyumlu bulunmuştur (13).

RLB hibridizasyonda gerekli ekipmanların ve reaktiflerin ucuz olması nedeniyle PCR ve hibridizasyonun yapılabildiği bütün laboratuvarlarda



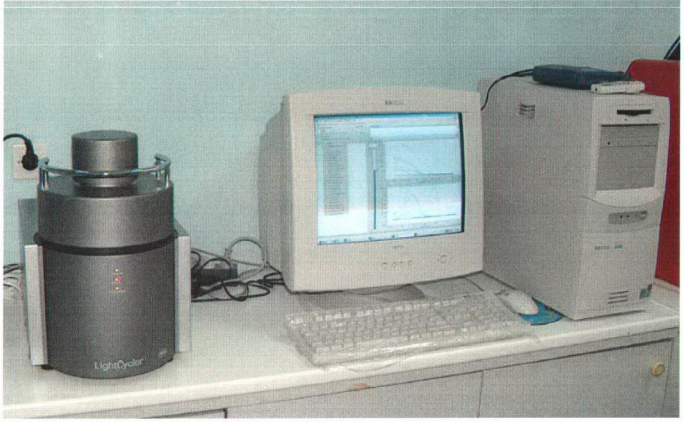
uygulanabilmesi en büyük avantajıdır. Diğer yandan örnekler arasında çapraz hibridizasyonların meydana gelebilmesi ve genotiplendirmenin yapılamaması yöntemin dezavantajıdır.

RLB hibridizasyon LC cihazı ile karşılaştırıldığında, manuel işlemlerin çok fazla olduğu zaman alıcı bir yöntemdir. Aynı zamanda, yine manuel işlemlerin fazla olması nedeniyle kontaminasyon riski ve hata payı artar ve çalışmanın optimizasyonu zorlaşır. Ancak maliyeti düşük bir yöntem olması nedeniyle ile maddi olanakları düşük laboratuvarlarda kullanılabilir.

### 1.2.5.3. LIGHTCYCLER SİSTEMİ

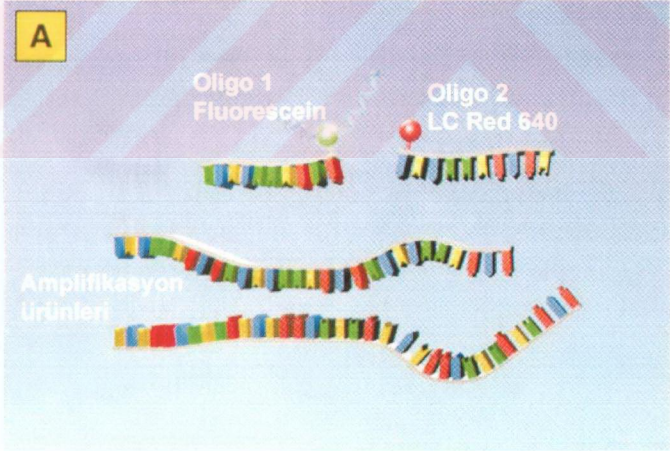
LightCycler gerçek zamanlı (real-time) bir PCR cihazıdır (Resim 1). Bu cihazda amplifikasyon ürünlerinin artışı online olarak takip edilebilir. Ultra hızlı ısıtma ve soğutma kapasitesi sayesinde 30-40 PCR siklusu 20-30 dakika içinde yapılabilir. Ayrıca sistemdeki erime eğrisi analizi mutasyonların ve SNP' lerin belirlenmesi ve genotiplendirilmesi için çok uygundur (85). Erime eğrisi analizi boyunca diziye özgül hibridizasyon problemlerinin tek zincirli DNA' ya hibridizasyonu izlenebilir. PCR' dan sonra herhangi ek bir manuel işleme ihtiyaç yoktur ve buna bağlı olarak kontaminasyon riski de en aza indirgenmiştir (83).

Hibridizasyon problemlerinin bir tanesi potansiyel mutasyon bölgesini kapsar ve *mutasyon probu* olarak adlandırılır. Diğer prob ise *anchor probu* (bağlanma probu) olarak isimlendirilir (Şekil 4). Mutasyon ve anchor problemleri, DNA zincirine baş-kuyruk pozisyonunda hibridize olacak şekilde dizayn edilirler.



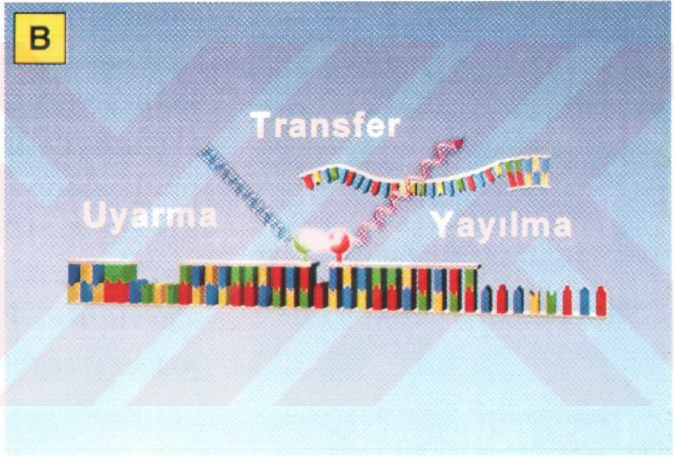
**Resim 1:** LightCycler cihazı

Araştırılan gen bölgesi, o bölgeye özgü iki primer ile amplifiye edildikten sonra, oluşan amplicon bir sonraki döngünün annealing aşamasında özgül hibridizasyon problemleri ile tesbit edilir.



**Şekil 2A:** Denatürasyon fazı sırasında hibridizasyon problemleri ve DNA zinciri (83)

Şekil 2A' da hibridizasyon probleminin bir PCR döngüsü süresince nasıl davrandıkları gösterilmiştir. Hibridizasyon probu olarak floresan boyalar ile işaretlenmiş iki farklı oligonükleotid ve amplifikasyon ürünü bulunmaktadır. Oligo 1, 3' ucundan fluorescein (donör boya) ile, oligo 2 ise, 5' ucundan LC Red 640 (alıcı boya) ile işaretlenmiştir. PCR' in denatürasyon aşaması boyunca hibridizasyon olmadığından bu fazda floresan ölçülmeyecektir.



**Şekil 2B:** Hibridizasyon probleminin DNA'ya baş-kuyruk pozisyonunda amplifikasyonu ve FRET (83)

Annealing aşamasında iki oligonükleotid, DNA fragmentine baş-kuyruk pozisyonunda bağlanırlar. Oligonükleotidler bu pozisyonda hibridize olduklarında iki floresan boya birbirine çok yaklaşmış olur. Fluorescein ile işaretli 1.oligo, LC cihazının ışık kaynağından (LED- Light Emitting Diode) yayılan 470 nm' deki mavi ışık ile uyarılır ve uzun dalga boyunda (530 nm)

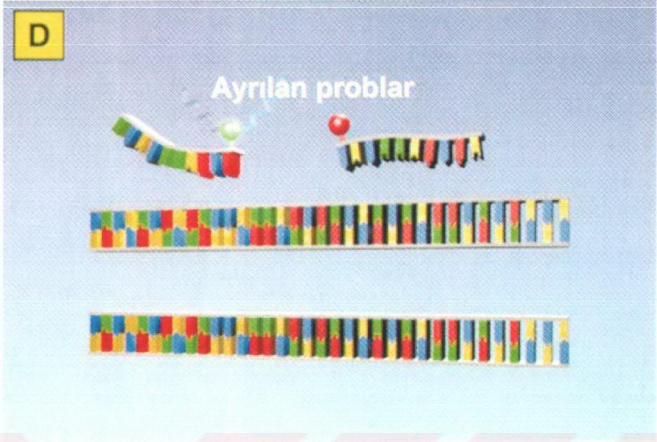
yeşil floresan ışık yayar. İki probun birbirlerine çok yakın buldukları annealing aşamasında 530 nm' den yayılan enerji ikinci hibridizasyon probuna aktarılarak onu uyarır ve farklı bir dalga boyunda (640 nm) kırmızı floresan ışık yayılmasına neden olur. İki prob arasındaki bu enerji transferi, **F**loresans **R**ezonans **E**nerji **T**ransferi yani FRET olarak tanımlanır (Şekil 2B).

Enerji transferinin etkili olması için iki boya molekülü arasındaki mesafenin çok az olması gerekmektedir (1-5 nükleotid arası). Bu yüzden oligonükleotidlerin baş-kuyuk pozisyonundaki amplifikasyonu çok önemlidir. LC Red 640, LC cihazının optik ünitesinin ikinci kanalında (F2) ölçülür. Ölçüm maksimum ışımının olduğu annealing fazının sonunda yapılır.



**Şekil 2C:** Elongation fazı sırasında hibridizasyon problemlerinin DNA'dan ayrılışı (83)

Annealing fazından sonra, sıcaklık artar ve hibridizasyon problemleri başlayan uzama (elongation) aşaması sırasında amplikondan ayrılırlar (Şekil 2C).



**Şekil 2D:** Bir PCR döngüsü sonunda çift zincirli DNA molekülü ve DNA' dan ayrılmış olan hibridizasyon probları (83)

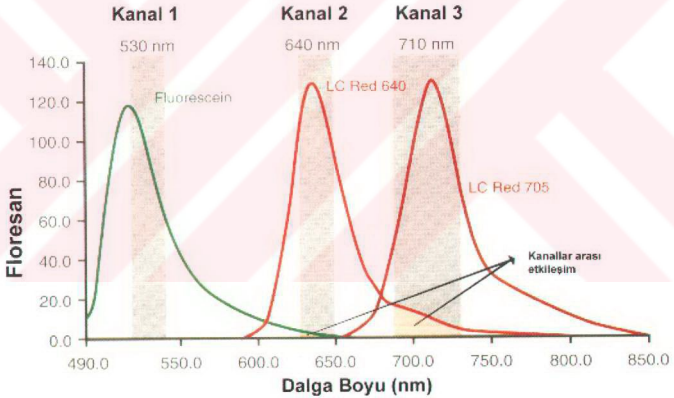
Elongation aşamasından sonra oluşan ampliconlar çift zincirli olduklarından hibridizasyon probları ile hibridize olamazlar. Bu durumda, iki prob birbirlerinden uzakta ve serbest halde oldukları için FRET gerçekleşemez (Şekil 2D).

PCR döngüleri boyunca ölçülen floresan miktarının artışı, DNA miktarının artışı ile orantılıdır.

Donör prob daima fluorescein ile işaretlenirken, alıcı prob LC Red 640 veya LC Red 705 ile işaretlenebilir. LC Red 705 aynı LC Red 640 gibi fluorescein' in yaydığı 530 nm' deki yeşil ışık ile uyarılabilirken, ondan farklı olarak 705 nm' de kırmızı ışık yaymaktadır (123).

### 1.2.5.3.1. Birden fazla floresan boya kullanılarak analiz yapılması

LC cihazının optik ünitesi floresanı 3 ayrı kanaldan ölçebilmektedir. Optik üniteye filtre seçimi, kullanılan floresan boyaya bağlıdır. Kanal 1 (F1), floresanı 530 nm' den ölçmektedir ve SYBR Green ile fluorescein boyaları için kullanılmaktadır. Kanal 2 (F2), 640 nm' den ölçüm yapmaktadır ve LC Red 640 boyasından gelen sinyalleri ölçmek için kullanılmaktadır. Kanal 3 (F3) ise 710 nm' den ölçüm yapar ve LC Red 705 boyası için kullanılır (52). LC optik ünitesinin ölçüm yaptığı kanallar, dalga boyları ve kullanılan boyalar Grafik 1' de özetlenmiştir.



**Grafik 1:** LC cihazının optik kanallarının ölçüm yaptığı dalga boyları, kanallar arasındaki etkileşimler ve kullanılan floresan boyalar (52)

LC cihazının önemli avantajlarından birisi, birden fazla optik kanalın kullanılabilmesi ile aynı örnekten farklı hedef bölgeler seçilerek, birden fazla mutasyonun aynı çalışmada analiz edilebilmesidir.

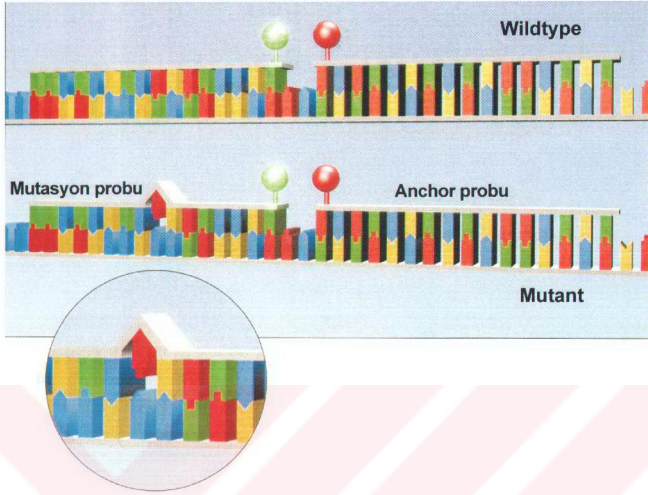
LC Red 640/LC Red 705 ve LC Red 640/LC Red 530 kanalları arasında minimum bir etkileşim oluşur (Şekil 3' te sarı renkte işaretli bölgeler). LC color compensation software kullanılarak, her boyanın floresanı ayrı ayrı bütün optik kanallardan ölçülür. Kanallar arasında etkileşim düzeyleri belirlenir ve birden fazla kanalın kullanıldığı bir çalışmada cihaz tarafından otomatik olarak düzeltilir (52).

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

LC cihazı kullanılarak, SNP' lerin genotiplendirilmesi ve mutasyonların analizi oldukça hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılabilmektedir. Erime eğrisi (melting curve) analizi ile diziyeye özgül hibridizasyon problemlerinin tek zincirli DNA' ya sıcaklığa bağlı hibridizasyonu izlenebilmektedir.

Her çift zincirli DNA (dsDNA) molekülünün, kendine özgül bir erime sıcaklığı (T<sub>m</sub>) vardır. Erime sıcaklığı DNA molekülünün % 50' sinin tek zincirli hale geldiği sıcaklık olarak tanımlanabilir.

T<sub>m</sub>' nin bağımlı olduğu üç önemli parametre vardır. Birincisi, dsDNA molekülünün uzunluğudur. Molekülün uzunluğu arttıkça T<sub>m</sub> de artar. İkincisi, DNA molekülünün içerdiği Guanin (G) ve Sitozin (C) bazlarının oranıdır. GC miktarı arttıkça T<sub>m</sub> artar. Çünkü, G ve C bazları arasında 3 hidrojen bağı, A ve T bazlarının arasında ise 2 hidrojen bağı vardır. Hidrojen bağlarının fazla olması T<sub>m</sub>' yi artırır. Son olarak DNA molekülünün iki zinciri arasındaki homoloji yani eşleşme düzeyidir. Zincirlerden birinin farklı bir baz içermesi T<sub>m</sub> sıcaklığını düşürür (114).



**Şekil 3:** Hibridizasyon problemlerinin wild type ve mutant DNA zincirine hibridizasyonları (114)

Hibridizasyon probu, herhangi bir baz değişikliğinin söz konusu olmadığı durumda, DNA kalıbı ile tam olarak eşleşir. Fakat, DNA kalıbı bir mutasyon taşıdığı anda ortaya çıkan baz değişikliği nedeniyle hibridizasyon probu ile tam olarak eşleşemez (Şekil 3). Bu yüzden baz değişikliği içermeyen, mutasyonsuz DNA kalıbı daha yüksek bir Tm değerine sahiptir. İki Tm değeri arasındaki sıcaklık farkı kullanılarak DNA molekülünün mutasyon taşıyıp taşımadığı analiz edilebilir (114).

Mutasyon analizi PCR tamamlandıktan sonra yapılır. PCR işleminde, floresan boyalar ile işaretli diziye özgül problemler ve amplifikasyonu sağlayacak primerler ile hedef gen bölgesi amplifiye edilir. Bu aşamada mutasyon ile ilgili bir bilgiye henüz ulaşılamaz. Ancak PCR işlemi tamamlandıktan sonra, erime



eğrisi analizine geçilir. Oluşan ampikon yavaş yavaş ısıtılır ve floresandaki değişiklikler sürekli ölçülür.

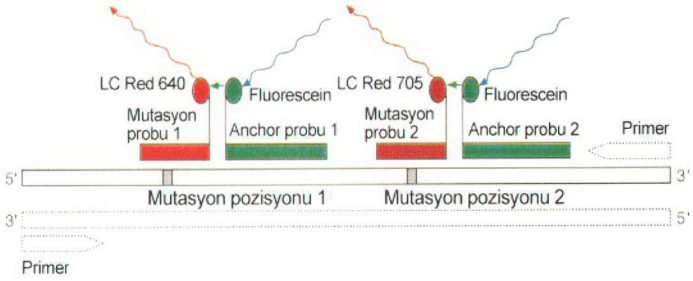
Mutasyon probu ile ampikon arasında tek bazlık bir eşleşmenin olmadığı bir durumda bile açıkta kalan hidrojen bağları nedeniyle Tm sıcaklığı aniden belirgin bir şekilde düşmektedir.

Erime eğrisi analizi sonucunda elde edilen erime eğrisi hangi sıcaklıkta floresan şiddetinde düşme olduğu açısından değerlendirilir ve buna göre hastanın o geni için genotiplendirilmesi yapılabilir. Ayrıca, bir gen bölgesi içinde birden fazla prob kullanılarak birden fazla mutasyon tek bir reaksiyonda çalışılabilir.

RFLP, RLB Hibridizasyon ve Alel Spesifik Amplifikasyon (ASO) gibi standart mutasyon belirleme analizleri, PCR basamağından sonra ek bir mutasyon belirleme basamağını içermektedirler. LC cihazında hibridizasyon problemleri ve erime eğrisi analizi yöntemi ile amplifikasyon ve genotiplendirme aynı kapiller tüp içerisinde yapılabilmektedir. Bu sayede kontaminasyon riski oldukça azaltılır ve 32 örnek, bir saat gibi kısa bir sürede çalışılabilir.

#### **1.2.5.3.3. Çift boya kullanılarak iki nokta mutasyonunun analizi**

*ApoE* ve *NAT2* genlerinde olduğu gibi aynı ampikon içerisinde bulunan birden fazla mutasyon, aralarındaki mesafenin uzun olması nedeniyle tek bir hibridizasyon probu çifti ile çalışılmamaktadır. Bunun nedeni, hibridizasyon problemlerinin maksimum 25-30 baz uzunlukta olmalarıdır. Daha uzun problemler bağlanma özgülüğünü azaltılmaktadır. Ancak, iki çift hibridizasyon probu kullanılarak birbirine uzak iki mutasyon bölgesi tek reaksiyonda, aynı anda incelenebilir. Bunun için, LC Red 640 / fluorescein ve LC Red 705 / fluorescein boya çiftleri kullanılır (Şekil 4).



**Şekil 4:** Tek primer ve iki hibridizasyon çifti kullanılarak, ApoE genindeki 2 ayrı mutasyon bölgesinin analizi (85). LC Red 640 için F2 okuma kanalı, LC Red 705 için ise F3 okuma kanalı seçilir ve erime derecelerine göre genotip değerlendirilmeleri yapılır.

#### 1.2.5.3.4. Erime Eğrisi Analizi ve FRET Yönteminin Avantajları

LC cihazında FRET yöntemi ile erime eğrisi analizi sayesinde, RFLP ve RLB hibridizasyon' da olduğu gibi, genotiplendirme için PCR sonrası zaman alıcı işlemlere gerek kalmamaktadır. Pipetleme ve jele yükleme gibi manuel işlemler de en aza indirgenmiştir.

Sonuçların yorumlanması oldukça kolaydır. Ayrıca, sonuçlar LC cihazının hard diskinde saklanabilir ve istenildiği zaman buradan eski bilgilere ulaşılabilir.

Her olası genotip için ayrı problemlerin kullanılmasına gerek yoktur. Tek bir prob çifti kullanılarak homozigot (yabani tip, mutant tip) ve heterozigot genotipler analiz edilebilir.

Nokta mutasyonların veya polimorfizmlerin belirlenmesinde, yalnızca o bölgeyi kapsayan bir prob çiftinin ve amplifikasyonu sağlayacak primerlerin dizayn edilmesi yeterlidir.

Kompleks enzimatik reaksiyonlara gerek kalmadan sadece heterodubleksin erime sıcaklığının tam tesbiti ile genotiplendirme yapılabilir.

## 2.1. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1.1. Kontrol ve Çalışma Grubu

Aralık 2003-Nisan 2004 tarihleri arasında İzmir Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi tüberküloz servislerinde, aktif akciğer tüberkülozu teşhisi konmuş, 24 kadın ve 66 erkek toplam 100 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların 70' i tedavileri sırasında hepatotoksisite görülmeyen kişilerden seçilmiş ve kontrol grubu olarak sınıflandırılmıştır. 30 hasta ise tedavileri sırasında hepatotoksisite yan etkisi gelişen kişilerden seçilmiş ve çalışma grubu olarak sınıflandırılmıştır. Hastalar çalışmaya katılmayı onaylamış ve 4 ml EDTA' lı kan örnekleri alınmıştır. Ayrıca bu kişilere tıbbi özgeçmişleri ve sigara, alkol gibi alışkanlıkları ile ilgili sorular sorulmuş ve bilgileri kaydedilmiştir.

Çalışma protokolümüz Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu tarafından 20.02.2004 tarihli ve 03-12/2M-73 sayılı karar ile onaylanmıştır.

### 2.1.2. Çalışma Dışında Bırakılan Hastalar

Aşağıdaki koşulları taşıyan hastalar çalışma dışında bırakılmıştır.

1. Pozitif serum hepatit B virusu yüzey antijeni (HbsAg), hepatit C virus antikoru (Anti HCV), yada hepatit A virusu immunglobulin M antikoru taşıyan hastalar
2. Alkolik karaciğer hastaları
3. Karaciğer fonksiyon bozukluğuna neden olabilecek herhangi bir hepatik yada sistemik hastalığı olan hastalar

4. Antitüberküloz tedaviye başlamadan önce anormal serum ALT, AST veya bilirubin düzeyi olan hastalar

### **2.1.3. Tüberküloz Tedavisi**

Aktif akciğer tüberküloz' u teşhisi konmuş hastalara ilk iki ay boyunca; izoniazid (5 mg/kg), rifampisin (10 mg/kg), morfozinamid (40 mg/kg) ve ethambutol (20 mg/kg) ilaçları belirtilen dozlarda verilmiştir. İkinci ayın sonunda hastalar taburcu edilip, idame tedavileri için oturdukları bölgelerin Verem Savaş Dispanserlerine yönlendirilmişlerdir. Ayrıca antitüberküloz tedaviye başlamadan önce hastaların karaciğer fonksiyon testleri (KCFT); serum alanin transaminaz (ALT/SGPT), aspartat transaminaz (AST/SGOT) ve total bilirubin düzeyleri ölçülmüştür. Bu testlerin normal değerleri; ALT: 0-40 U/L, AST: 5-45 U/L, total bilirubin: 0.2-1.6 mg/dL olarak kabul edilmiştir.

### **2.1.4. İlaça Bağlı Hepatotoksisitenin Teşhisi**

Hastalar tedavileri sırasında bulantı, kusma, sarılık, karın ağrısı gibi toksisite belirtileri yönünden sürekli takip edilmişlerdir. Karaciğer fonksiyon testlerinin normalin üst sınırının üç katından fazla yada başlangıç değerinin beş katından fazla artması, veya bilirubin yüksekliği hepatotoksisite olarak değerlendirilmiştir. Bu belirtileri gösteren hastaların ilaçlarının tamamı hemen kesilmiş ve viral hepatitin ekarte edilmesi için Anti HAV IgM, HbSAg, Anti HCV testleri çalışılmıştır. Ayrıca, üst batin ultrasonlarına bakılarak organik nedenler de ekarte edildikten sonra hastalara, ilaca bağlı hepatotoksisite teşhisi konmuştur. Karaciğer fonksiyon testleri normale döndükten sonra aynı ilaçlara aynı dozlarda yeniden başlanmıştır.

### 2.1.5. NAT2 Polimorfimleri Analizi

Çalışmamızın amacına uygun olarak seçilen hasta ve kontrol grubunda LC cihazı kullanılarak NAT2 polimorfizmleri analiz çalışmasına geçilmiştir.

#### 2.1.5.1. Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı	Siemens
Derin dondurucu (-20°C)	Uğur
LightCycler real-time PCR cihazı	Roche
Otoklav	Aesculap
Otomatik mikropipetler	Eppendorf (10, 20, 100, 200, 1000 µl' lik)
Mikrosantrifüj	Heraus
Termomikser	Eppendorf
Benmary	Electro-mag
Vorteks	Asons
Elisa cihazı	Beckman
Biyokimya cihazı	Olympus

#### 2.1.5.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

DNA İzolasyon Kiti (High pure PCR template preparation kit)	Roche
Ethanol	J. T. Baker
İsopropanol	AppliChem
NAT2 Mutasyon Belirleme Kiti (LightCycler NAT2 mutation detection kit)	Roche

##### 2.1.5.2.1. 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
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 filtre tüpleri
7. Collection tüpler

#### **2.1.5.2.2. Lightcycler NAT2 Mutasyon Belirleme Kiti İçeriği:**

**1.NAT2 mutasyon belirleme karışımı:** İnsan NAT2 geneine özgül primerleri ve hibridizasyon problemleri karışımını içerir. Hibridizasyon problemleri ve taşıdıkları boyalar Şekil 5' de gösterilmiştir.

**Primerler:** İnsan genomik DNA' sından, NAT2 geninin 342 bp ve 479 bp' lık iki fragmentinin amplifiye edilmesi için özgül iki primer çiftini içerir

**Hibridizasyon probu 1:** NAT2 geninin 191. pozisyonundaki nükleotide (NAT2\*14A) özgül mutasyon probudur. 5'-ucundan LC Red 705 boyası ile işaretlenmiş ve 3'-ucundan fosforillenmiştir.

**Hibridizasyon probu 2:** NAT2 geninin 481. pozisyonundaki nükleotide (NAT2\*5A) özgül mutasyon probudur. 5'-ucundan LC Red 640 ile işaretlenmiş ve 3'- ucundan fosforillenmiştir.

**Hibridizasyon probu 3:** NAT2 geninin 590. pozisyonundaki nükleotide (NAT2\*6A) özgül mutasyon probudur. 5'- ucundan LC Red 640 ile işaretlenmiş ve 3'- ucundan fosforillenmiştir.

**Hibridizasyon probu 4:** NAT2 geninin 857. pozisyonundaki nükleotide (NAT2\*7A/B) özgül mutasyon probudur. 5'-ucundan LC Red 705 ile işaretlenmiş ve 3'- ucundan fosforillenmiştir.

**Hibridizasyon probu 5, 6, 7 ve 8:** 191., 481., 590. ve 857. pozisyonundaki nükleotidlere özgül anchor problemleridir. 3'-uçlarından fluorescein ile işaretlenmişlerdir.

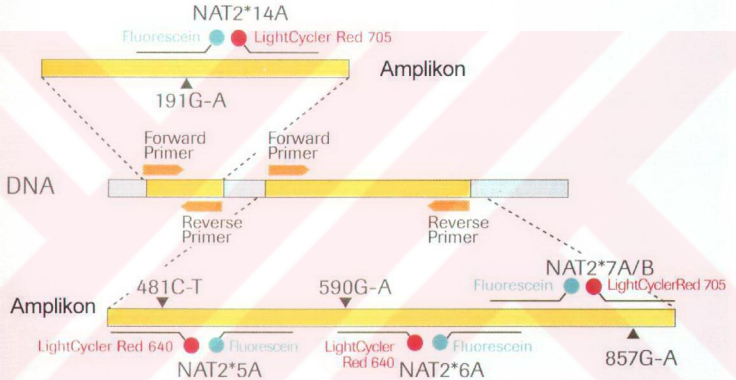
**2.NAT2 enzim solüsyonu:** Taq polimeraz enzimi içerir

**3.NAT2 reaksiyon karışımı:** Taq polimeraz reaksiyon karışımı, dNTP'leri içerir.

**4.NAT2 sinyal güçlendiricisi:** Floresan sinyalleri güçlendirir.

**5.Kontrol örneği:** 191., 481., 590. ve 857. pozisyonlardaki nükleotid değişikliklerini içeren heterozigot plazmid DNA' sıdır.

**6.H2O:** PCR derecesindeki saf su



**Şekil 5:** NAT2 geninin 2 primer çifti ile amplifiye edilen bölgeleri; 191., 481., 590., 857. pozisyonlardaki 4 polimorfizmin belirlenmesi için dizayn edilmiş oligonükleotid hibridizasyon problemlerinin gen üzerindeki yerleri ve problemleri işaretlemek için kullanılan floresan boyalar şematik olarak gösterilmektedir (117).



## **2.1.6. NAT2 Polimorfizmlerinin Analizi İçin Çalışma Protokolü**

### **2.1.6.1. DNA izolasyonu Aşamaları:**

1. 200 ml EDTA' lı kan örneği steril bir eppendorf tüp içerisine alınır.
2. Üzerine 200 ml Binding Buffer ve 40 ml Proteinaz K pipetlenir.
3. Karışım mix edildikten sonra 72°C' de 10 dakika inkübasyona bırakılır.
4. İnkübasyonun sonunda karışıma 100 ml isopropanol eklenir ve pipetaj ile iyice karıştırılır.
5. Karışım bir 'collection' tübünün içine yerleştirilmiş 'filtre' tübünün içine pipetlenir.
6. 8000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
7. Altta biriken sıvı collection tüp ile birlikte atılır. Filtre temiz bir collection tüp içerisine yerleştirilir.
8. Filtre tübünün üzerine 500 ml inhibitör removal buffer pipetlenir.
9. 8000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
10. Altta biriken sıvı collection tüp ile birlikte atılır, filtre temiz bir collection tüp içerisine yerleştirilir.
11. Filtre tübüne 500 ml wash buffer pipetlenir.
12. 8000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
13. Altta biriken sıvı collection tüp ile birlikte atılır. Filtre temiz bir collection tüp içerisine yerleştirilir.
14. Filtre tübüne tekrar 500 ml wash buffer pipetlenir.
15. 8000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
16. Collection tübünde biriken sıvı dökülür ve filtre aynı collection tüp içerisine yerleştirilir.
17. 14.000 rpm' de 10 saniye santrifüj edilir.

18. Collection tüp atılır, filtre túbü steril bir eppendorf tüp içine yerleştirilir.
19. Önceden 70°C' de ısıtılmış elution buffer' dan 200 ml filtre túbüne pipetlenir.
20. 8000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.
21. Filtre túbü atılır. İzole DNA içeren eppendorf tüp üzerine hasta adı-soyadı ve numarası yazılır.

**2.1.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu:** Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaktion = PCR), herhangi bir organizmaya ait genomik DNA' daki dizisi bilinen herhangi bir bölgenin çoğalmasına (amplifikasyon) olarak veren *in vitro* DNA sentezi yöntemidir. PCR' ın prensibi tekrarlanan 3 basamağa dayalı olarak yapılmaktadır.

1. Çoğaltılacak DNA' nın yüksek sıcaklıkta denatürasyonu (92 – 95°C)
2. Özgül hibridizasyona olanak verecek sıcaklıkta (Tm değerinin 3-5°C altındaki sıcaklık), primerlerin hedef bölgelere bağlanmaları (annealing)
3. Taq DNA polimeraz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği 72°C sıcaklıkta, primerlerden itibaren zincirin uzaması (elongation)

Primerler, genomik DNA' daki hedef bölge ile hibridize olabilen, 15-20 nükleotidden oluşan sentetik oligonükleotidlerdir.

Zincirin uzama reaksiyonunu gerçekleştiren Taq DNA polimeraz enzimi, *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen, polimerizasyon aktivitesini 72°C' de gösteren ve 94°C' de bile aktivitesini kaybetmeyen bir enzimdir.

### **2.1.6.3. Termal profil:**

NAT2 mutasyon belirleme kitinin içinde bulunan termal profil; denatürasyon, amplifikasyon, erime eğrisi analizi ve soğutma parametrelerinin ayarları LightCycler cihazına işlenmiştir.

#### **2.1.6.3.1. Denatürasyon:**

<b>PARAMETRE</b>	<b>DEĞER</b>
<i>Döngü Sayısı</i>	1
<i>Analiz Modu</i>	Yok
	1.Segment
<i>Hedef Isısı (°C)</i>	95
<i>İnkubasyon zamanı [dk]</i>	10
<i>Isı geçiş oranı [°C/sn]</i>	20
<i>İkincil Hedef Isısı (°C)</i>	0
<i>Basamak Büyüklüğü (°C)</i>	
<i>Basamak Geciktirmesi (döngü)</i>	0
<i>Okuma modu</i>	Yok

#### **2.1.6.3.2. Amplifikasyon:**

<b>PARAMETRE</b>	<b>DEĞER</b>		
<i>Döngü Sayısı</i>	45		
<i>Tipi</i>	Kantitasyon		
	1.Segment	2.Segment	3.Segment
<i>Hedef Isısı (°C)</i>	95	55	72
<i>İnkubasyon zamanı [sn]</i>	10	10	20
<i>Isı geçiş oranı [°C/sn]</i>	20	20	3
<i>İkincil Hedef Isısı (°C)</i>	0	0	0
<i>Basamak Büyüklüğü (°C)</i>	0	0	0
<i>Basamak Geciktirmesi (döngü)</i>	0	0	0
<i>Okuma modu</i>	Yok	Tek	Yok

### 2.1.6.3.3. Erime Eğrisi Analizi:

PARAMETRE	DEĞER		
Döngü Sayısı	1		
Tipi	Erime Eğrileri		
	1.Segment	2.Segment	3.Segment
Hedef Isısı (°C)	95	40	80
İnkubasyon zamanı [dk]	1	1	0
Isı geçiş oranı [°C/sn]	20	20	0.1
İkincil Hedef Isısı (°C)	0	0	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0	0	0
Basamak Geciktirmesi (döngü)	0	0	0
Okuma modu	Yok	Yok	Devamlı

### 2.1.6.3.4. Soğutma:

PARAMETRE	DEĞER
Döngü Sayısı	1
Analiz Modu	Yok
	1.Segment
Hedef Isısı (°C)	40
İnkubasyon zamanı [sn]	30
Isı geçiş oranı [°C/sn]	20
İkincil Hedef Isısı (°C)	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0
Basamak Geciktirmesi (döngü)	0
Okuma modu	Yok

### 2.1.6.4. Master mix hazırlanması:

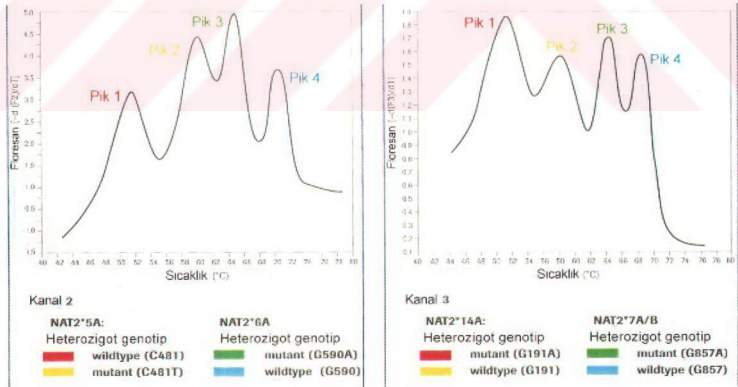
NAT2 mutasyon belirleme karışımı	1 µl
NAT2 enzim solüsyonu	0.65 µl
NAT2 reaksiyon karışımı (dNTP karışımı)	1 µl
NAT2 sinyal güçlendiricisi	1 µl
PCR derecesindeki saf su	+ 3.6 µl
Master mix hacmi	7.5 µl
İzole DNA	+2.5 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>10.0 µl</b>

Her bir hasta örneği yukarıdaki karışıma göre hazırlandıktan sonra, LightCycler cihazına ait özel camdan yapılmış kapiller tüp içerisine kondu. Kapiller tüpler 3000 rpm' de 10 saniye santrifüj edildi. Reaksiyon karışımının herbir kapiller tüpün dibine çöktüğü kontrol edildi. Tüpler önce reaksiyon tepsinde dizildikten sonra tepsi ile LightCycler cihazına yerleştirildi. Real-time online PCR' a başlandı ve yaklaşık bir saat sonra sonuçlar elde edildi.

Her çalışma grubunda reaktifin kontrolü için pozitif DNA kontrolü ve kontaminasyonun kontrolü için de negatif kontrol olarak saf su çalışıldı.

### 2.1.7. Sonuçların Değerlendirilmesi

Çalışmanın sonucunda oluşan erime eğrisi piklerinin derecelerine göre homozigot (wild type yada mutant) ve heterozigot genotipler ayırt edildi (Şekil 8, Tablo 6). *NAT2\*5A* ve *NAT2\*6A*' nın ölçümü kanal 2' den, *NAT2\*14A* ve *NAT2\*7A/B*' nin ölçümü ise kanal 3' den yapıldı.



**Şekil 6 :** Kanal 2 ve 3' te, *NAT2* geninin pozisyon 191, pozisyon 481, pozisyon 590 ve pozisyon 857' de görülebilecek sekiz muhtemel genotipinin

erime eğrisi analizi sonuçları (117). Bu sonuçlar bütün genotipler için heterozigot olan pozitif DNA kontrolü çalışılarak elde edildi.

Heterozigot genotip iki farklı sıcaklık derecesinde erime piklerine sahiptir. Homozigot (mutant veya wildtype) genotiplerde ise tek sıcaklık derecesinde erime piki oluşmaktadır.

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

<b>KANAL 2 (F2) NAT2*5A ve NAT2*6A Genotiplendirmesi</b>			
<b>Hedef DNA</b>	<b>Erime Piki Sayısı</b>	<b>Erime Piklerinin Tm Değeri</b>	<b>Pikler Arasındaki ΔT</b>
<b>Wildtype genotip NAT2*5A</b>	1 (NAT2*5A için)	49.0°C	-
<b>Heterozigot genotip NAT2*5A</b>	2 (NAT2*5A için)	49.0°C + 57.5°C	8.5°C
<b>Mutant genotip NAT2*5A</b>	1 (NAT2*5A için)	+ 57.5°C	-
<b>Wildtype genotip NAT2*6A</b>	1 (NAT2*6A için)	67.5°C	-
<b>Heterozigot genotip NAT2*6A</b>	2 (NAT2*6A için)	62.0°C +67.5°C	5.5°C
<b>Mutant genotip NAT2*6A</b>	1 (NAT2*6A için)	62.0°C	-

<b>KANAL 3 (F3) NAT2*14A ve NAT2*7A/B Genotiplendirmesi</b>			
<b>Hedef DNA</b>	<b>Erime Piki Sayısı</b>	<b>Erime Piklerinin Tm Değeri</b>	<b>Pikler Arasındaki ΔT</b>
<b>Wildtype genotip NAT2*7A/B</b>	1 (NAT2*7A/B için)	66.0°C	-
<b>Heterozigot genotip NAT2*7A/B</b>	2 (NAT2*7A/B için)	62.0°C + 66°C	4.0°C
<b>Mutant genotip NAT2*7A/B</b>	1 (NAT2*7A/B için)	62.5°C	-
<b>Wildtype genotip NAT2*14A</b>	1 (NAT2*14A için)	55.5°C	-
<b>Heterozigot genotip NAT2*14A</b>	2 (NAT2*14A için)	47.5°C +55.5°C	8.0°C
<b>Mutant genotip NAT2*14A</b>	1 (NAT2*14A için)	47.5°C	-

### 2.1.8. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Tüberküloz tedavisi gören hastalarda NAT2 polimorfizmlerinin LC cihazı ile analizi yapıldıktan sonra elde edilen bulguların değerlendirilmesinde kullanılan istatistiksel analiz testleri; Ki-kare Testi ve ANOVA yöntemidir.

Ki-kare Testi, sağlık araştırmalarında en güvenilir bulunan ve sıklıkla kullanılan bir analiz yöntemidir. Ki-kare analizi, grupları çapraz tablo gözlerindeki gözlenen değerler ile beklenen değerler arasındaki farkı dikkate alarak karşılaştıran bir testtir. Anlamlılık değeri  $p < 0.05$ ' dir.

ANOVA da sağlık araştırmalarında sıklıkla kullanılan tek yönlü, iki yönlü, üç yönlü vb. şeklinde bir varyans analizi yöntemidir. Tek yönlü tek değişkenli varyans analizinde tek bağımsız değişken (faktör) ve tek bağımlı değişken yer almaktadır. Bağımlı değişken sayısı tek kalmak üzere, bağımsız

değişken sayısı iki olduğunda iki-yönlü ANOVA olarak tanımlanır. Anlamlılık değeri yine  $p < 0.05$ ' dir.



## 3.1. BULGULAR

### 3.1.1. Kontrol ve Çalışma Grubunun Genel Özelliklerinin Karşılaştırılması ve İstatistiksel Analiz:

Kontrol ve çalışma gruplarına ayrılmış olan toplam 100 hastanın tüberküloz tedavisine başlamadan önce karaciğer fonksiyon testleri ve bilirubin düzeyleri ölçülmüştür. Ayrıca, hepatotoksositeye neden olabilecek diğer faktörlerin de değerlendirilmesi amacı ile hastalara tıbbi özgeçmişleri ile ilgili sorular sorularak bilgileri kaydedilmiştir. Çalışmamızın laboratuvar kısmında, hastalardan alınan ETDA' lı kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra NAT2 geninin dört polimorfizmi NAT2\*5A, NAT2\*6A, NAT2\*7A/B ve NAT2\*14A, LightCycler cihazında analiz edilmiştir. Kontrol ve çalışma grupları ile ilgili genel bilgiler, elde ettiğimiz bulgular ve istatistiksel analizleri aşağıda sıralanmaktadır.

**3.1.1.1. Kontrol Grubu:** Tüberküloz tedavisi sırasında hepatotoksosite gelişmeyen hastalar arasından rastgele seçilerek kontrol grubuna dahil edilen 70 (% 70.00) kişinin yaş ortalaması  $37.30 \pm 14.01'$  dir. Tedavinin başlangıcında KCFT ve bilirubin düzeyleri normal olan bu hastaların 51' i erkek, 19' u kadındır. Kontrol grubunda sigara kullanan hasta sayısı 71 (% 59.00), alkol kullanan hasta sayısı ise 5 (% 7.00) olarak belirlenmiştir. Ayrıca kontrol grubunda 8 (% 11.42) diabetes mellitus (DM) hastası bulunmaktadır.

**3.1.1.2. Çalışma Grubu:** Tüberküloz tedavisi sırasında ilaca bağlı hepatotoksosite gelişen hastalardan oluşturulan bu gruptaki 30 (% 30.00) kişinin yaş ortalamaları  $39.80 \pm 14.70'$  dir. 15' i erkek ve 15' i kadın hastadır.

Tedavi başlangıcında KCFT ve bilirubin düzeyleri normal sınırlarda bulunmuştur. Sigara kullanan hasta sayısı 14 (% 46.60), alkol kullanan hasta sayısı ise 4 (% 13.30) olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu gruptaki kişiler arasında 2 (% 6.66) DM hastası bulunmaktadır.

Kontrol grubundaki 70 hasta ve hepatotoksisite gelişen 30 hastanın genel özellikleri Tablo 7' de gösterilmektedir. Ayrıca kontrol ve çalışma grubundaki olgulara ait veriler ve polimorfizm analiz sonuçları Tablo 16 ve Tablo 17' de verilmektedir.

**Tablo 7:** Kontrol ve çalışma grubunun genel özellikleri

	KONTROL GRUBU	ÇALIŞMA GRUBU
<b>CİNSİYET</b>		
ERKEK	51 (% 72.86)	15 (% 50.00)
KADIN	19 (% 27.14)	15 (% 50.00)
<b>YAŞ ORTALAMASI</b>	37.3±14.01	39.8±14.70
35<	30 (% 42.86)	12 (% 40.00)
>35	40 (% 57.14)	18 (% 60.00)
<b>SİGARA KULLANAN</b>	42 (% 60.00)	14 (% 46.70)
<b>ALKOL KULLANAN</b>	5 (% 7.10)	4 (% 13.30)
<b>KRONİK HASTALIK</b>		
DM	8 (% 11.40)	2 (% 6.70)
<b>Toplam</b>	70 (% 100.00)	30 (% 100.00)

**3.1.1.3. İstatistiksel Analiz:** Hepatotoksisite gelişiminde yaş faktörünün etkisinin olup olmadığının değerlendirilmesi amacı ile, kontrol ve çalışma grubundaki hastaların yaşları istatistiksel olarak karşılaştırılmış ancak aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $X^2=31.034$ ,  $p>0.05$ ).

Kontrol ve çalışma grubunu oluşturan hastaların özgeçmişleri incelendiğinde çoğunluğunun yıllardır sigara içtiği, bir kısmının da düzenli

olarak alkol kullandığı belirlenmiştir. Kontrol grubunda 42 kişinin (% 60.00) sigara içtiği, 5 (% 70.00) kişinin ise düzenli alkol aldığı saptanmıştır. Çalışma grubunda ise 14 (% 46.70) kişinin sigara, 4 (% 13.30) kişinin alkol kullanma alışkanlığı olduğu belirlenmiştir. Sigara ve alkol kullanma alışkanlığı ve hepatotoksisite arasındaki ilişki karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Sigara için:  $X^2=1.515$ ,  $p>0.05$ , Alkol için:  $X^2=0.983$ ,  $p>0.05$ ).

Diğer hastalıkların hepatotoksisite gelişimine etkisini değerlendirmek amacı ile alınan özgeçmiş bilgilerinden, hastaların bir kısmında DM olduğu saptanmıştır. Kontrol grubunda 8 (% 11.40), çalışma grubunda ise 2 (% 6.70) olgunun DM hastası olduğu belirlenmiştir. DM ve hepatotoksisite arasındaki ilişki karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $X^2=0.529$ ,  $p>0.05$ ).

### **1.1.2. Hepatotoksisite İle İlgili Bulgular**

Hepatotoksisite gelişen hastalarda KCFT veya bilirubin yüksekliği tedavi başlangıcından ortalama  $14.96\pm 7.73$  gün sonra ortaya çıkmış, tedavisine ara verilen bu hastaların ortalama  $10.76\pm 10.34$  gün sonra enzim düzeyleri normale dönmüştür. Bu gruptaki hastaların 25' inde (% 83.30) bir kez, 4' ünde (% 13.30) iki kez ve 1' inde (% 3.30) üç kez hepatotoksisite gelişmiştir. Hepatotoksisite tekrarları ve başlangıç günleri Tablo 8' de özetlenmiştir.

**Tablo 8:** Hepatotoksisite tekrarı, başlangıç günleri, süreleri ve biyokimyasal testlerin ortalama pik değerleri (ortalamalar standart sapmalar ile birlikte verilmiştir).

Ht tekrarı	Kişi Sayısı	Başlangıç Günü	Süresi (Gün)	AST (U/L)	ALT (U/L)	T.Bilirubin (mg/dL)
1	25 (%83.30)	14.96±7.7	10.76±10.3	201.6±143	204.46±198	0.8±1.28
2	4 (%13.30)	35±9.8	8±3.6	171.6±101	210.8±130	0.63±0.53
3	1 (% 3.30)	39	3	156	132	0.32

Ht: Hepatotoksisite

Çalışma grubunda bulunan H.02.E numaralı 61 yaşındaki erkek olguda tedavinin 10. gününde hepatotoksisite gelişmiş ve tüberküloz tedavisine ara verilmiştir. Hepatotoksisite sırasında hastada KCFT yüksekliği ile beraber bilirubin yüksekliği de saptanmıştır (AST pik: 135 U/L, ALT pik: 123 U/L, Total Bilirubin pik: 7 md/dL). Laboratuvar çalışmasında olgunun NAT2\*5A ve NAT2\*6A polimorfimleri için heterozigot, NAT2\*7A/B ve NAT2\*14A polimorfizmleri için wild type genotipte olduğu belirlenmiştir.

Olgunun enzim düzeyleri ancak 42 gün sonra normale dönmüştür. Tedavisine aynı ilaç ve aynı dozlarda yeniden başlandıktan 5 gün sonra ise hasta kaybedilmiştir.

### 3.1.3. NAT2 Polimorfizmleri İle İlgili Bulgular

#### 3.1.3.1. NAT2\*5A Analiz Sonuçları

NAT2\*5A polimorfizmi için wild type genotip erime eğrisi analizinde 49.0 °C' de tek pik oluşması ile belirlenmiştir. Mutant genotipi meydana

getiren NAT2 geninin 481. nükleotidindeki C → T transisyonu, 57.5 °C' de pik oluşması ile saptanmıştır. Heterozigot genotip ise 49.0° ve 57.5 °C' lerde iki pik oluşması ile belirlenmiştir. NAT2\*5A polimorfizmi için normal, heterozigot ve mutant genotipli hasta örneklerinin sonuçları Şekil: 7, 8, 9 ve 10' da gösterilmektedir.

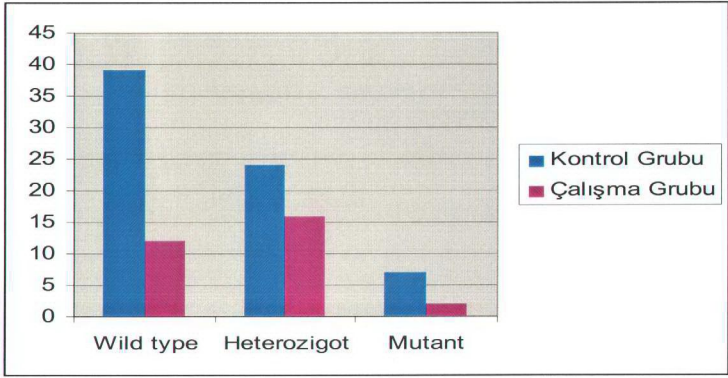
**3.1.3.1.1. Kontrol Grubu:** Bu grupta NAT2\*5A polimorfizmi için 39 (% 55.70) kişinin wild type (CC), 24 (% 34.30) kişinin heterozigot (CT), 7 (% 10.00) kişinin ise homozigot mutant (TT) genotipte oldukları saptanmıştır.

**3.1.3.1.2. Çalışma grubu:** Hepatotokisite gelişen 30 hastadan 12' sinin (% 40.00) wild type (CC), 16' sının (% 53.30) heterozigot (CT) ve 2' sinin (% 6.70) homozigot mutant (TT) genotipte oldukları belirlenmiştir. Kontrol ve çalışma grubunun NAT2\*5A sonuçları Tablo 9 ve Grafik 2' de özetlenmiştir.

**3.1.3.1.3. İstatistiksel Analiz:** Kontrol ve çalışma grubundaki kişiler NAT2\*5A polimorfizmi taşıyıcılığı açısından karşılaştırıldıklarında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $\chi^2=3.181$ ,  $p>0.05$ ).

**Tablo 9:** NAT2\*5A analiz sonuçları

<b>NAT2*5A (C481T)</b>	<b>KONTROL GRUBU (n=70)</b>	<b>ÇALIŞMA GRUBU (n=30)</b>
<b>Wild type (CC)</b>	39 (% 55.70)	12 (% 40.00)
<b>Heterozigot (CT)</b>	24 (% 34.30)	16 (% 53.30)
<b>Homozigot Mutant (TT)</b>	7 (% 10.00)	2 (% 6.70)



**Grafik 2:** Kontrol ve çalışma grubunun NAT2\*5A analiz sonuçlarının karşılaştırılması

### 3.1.3.2. NAT2\*6A Analiz Sonuçları

NAT2\*6A için wild type genotipi erime eğrisi analizinde 67.5 °C' de tek pik oluşması ile belirlenmiştir. Mutant genotipi meydana getiren NAT2 geninin 590. nükleotidindeki G → A transisyonu, 62.0°C' de tek pik oluşturması ile saptanmıştır. Heterozigot genotip ise 62.0° ve 67.5 °C' lerde iki pik oluşması ile belirlenmiştir. NAT2\*6A için normal, heterozigot ve mutant genotip örneklerinin sonuçları Şekil 7, 8, 9 ve 10' da gösterilmektedir.

**3.1.3.2.1. Kontrol Grubu:** Hepatotoksisite gelişmeyen 70 hastadan 41' inin (% 58.60) wild type (GG), 26' sının (% 37.10) heterozigot (GA) ve 3' ünün (% 4.30) homozigot mutant (AA) NAT2\*6A genotipi taşıdığı belirlenmiştir.

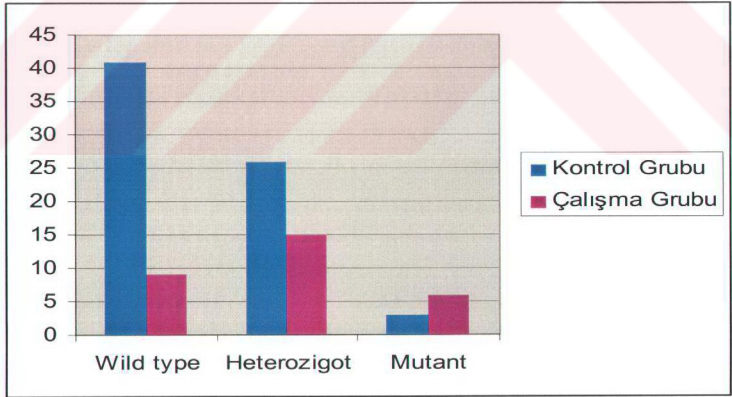
**3.1.3.2.2. Çalışma grubu:** Bu gruptaki hastaların 9' u (% 30) NAT2\*6A için wild type (GG), 15' i (% 50.00) heterozigot (GA) ve 6' sı (% 20.00)

homozigot mutant (AA) olarak genotiplendirilmiştir. NAT2\*6A analiz sonuçları Tablo 10 ve Grafik 3' de gösterilmektedir.

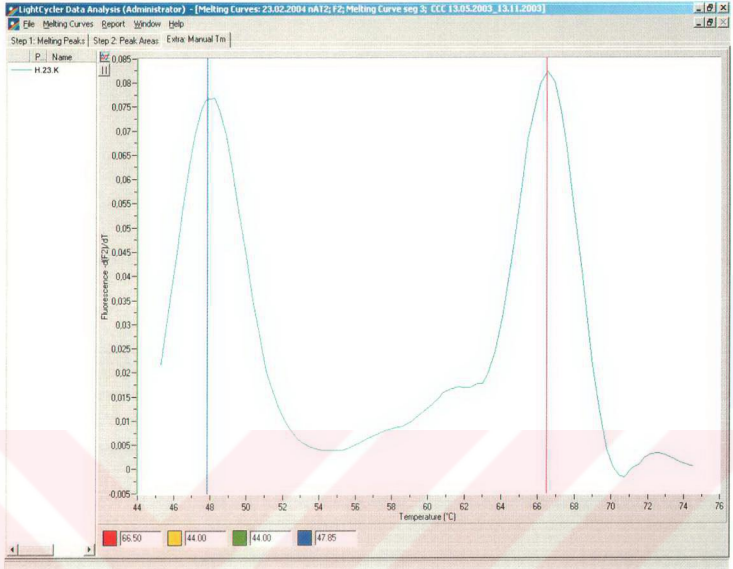
**3.1.3.2.3. İstatistiksel Analiz:** Kontrol ve çalışma grubunu oluşturan hastalar NAT2\*6A polimorfizmi taşıyıcılığı açısından karşılaştırıldıklarında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ( $\chi^2=0.007$ ,  $p<0.05$ ). Çalışma grubunda heterozigot ve homozigot mutant genotiplerin kontrol grubundan daha yüksek olduğu dikkati çekmektedir.

**Tablo 10:** NAT2\*6A analiz sonuçları

NAT2*6A (G590A)	KONTROL GRUBU (n=70)	ÇALIŞMA GRUBU (n=30)
Wild type (GG)	41 (% 58.60)	9 (% 30.00)
Heterozigot (GA)	26 (% 37.10)	15 (% 50.00)
Homozigot Mutant (AA)	3 (% 4.30)	6 (% 20.00)

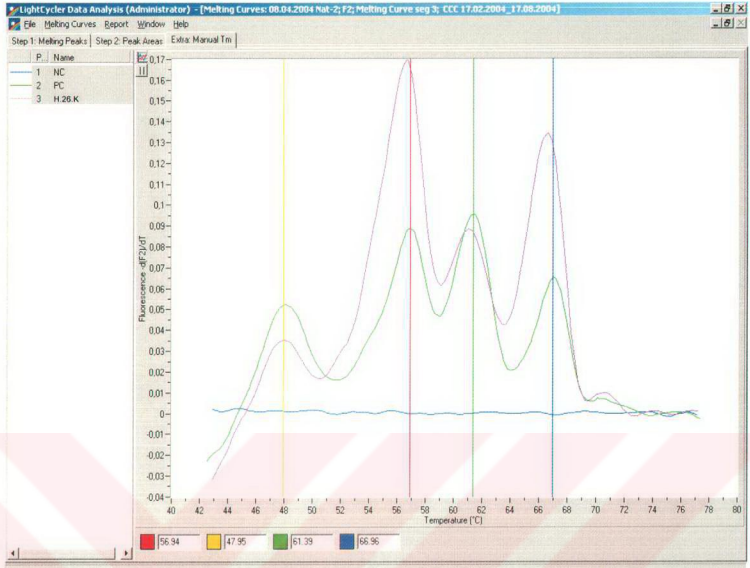


**Grafik 3:** Kontrol ve çalışma grubunun NAT2\*6A analiz sonuçlarının karşılaştırılması



**Şekil 7:** NAT2\*5A ve NAT2\*6A polimorfizmleri için wild type genotip sonucu. 47.85°C' deki mavi dikey çizgi ile işaretlenmiş ilk pik wild type NAT2\*5A, 66.50°C' deki kırmızı dikey çizgi ile işaretlenmiş ikinci pik wild type NAT2\*6A genotipini göstermektedir. (Hasta No: H.23.K)

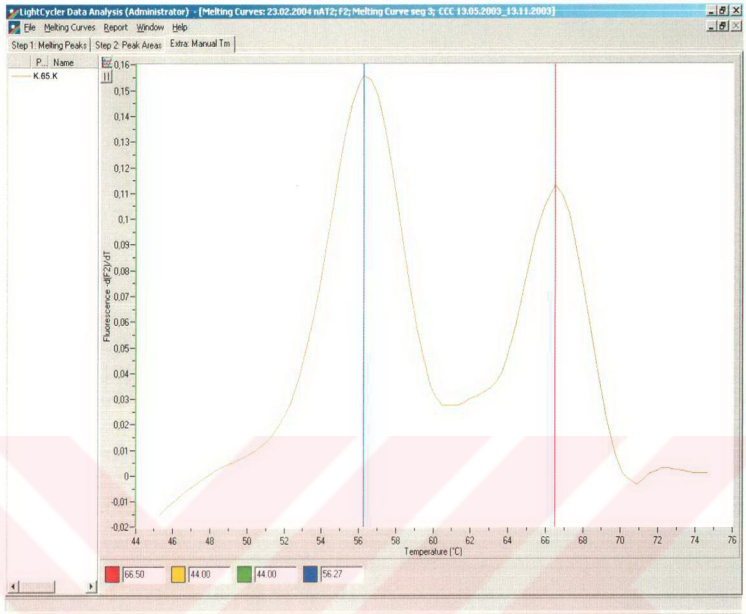




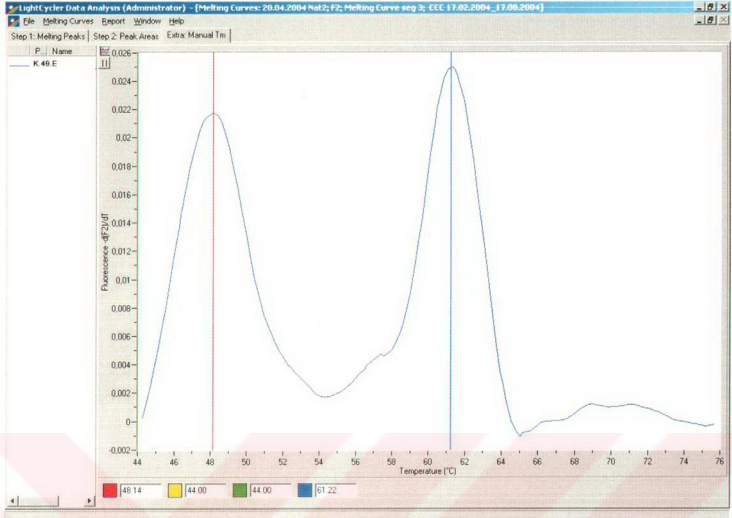
**Şekil 8:** Negatif Kontrol, Pozitif kontrol ve H.26.K numaralı olgu sonucu

Negatif Kontrol ( $H_2O$ ) mavi renkteki erime eğrisi ile, pozitif kontrol ise yeşil renkteki eğri ile gösterilmiştir.  $47.95^{\circ}C$  ve  $56.94^{\circ}C$ ' lerdeki, sarı ve kırmızı dikey çizgiler ile işaretlenmiş ilk iki pik heterozigot NAT2\*5A,  $61.39^{\circ}C$  ve  $66.96^{\circ}C$ ' lerdeki mavi ve yeşil çizgiler ile işaretlenmiş son iki pik heterozigot NAT2\*6A genotipini göstermektedir.

Mor renk, NAT2\*5A ve NAT2\*6A için heterozigot genotipte bulunan H.26.K numaralı olgu sonucudur.



**Şekil 9:** Mutant NAT2\*5A ve wild type NAT2\*6A genotip sonucu. 56.27°C' deki ilk pik mutant NAT2\*5A, 66.50 °C' deki ikinci pik wild type NAT2\*6A sonucunu göstermektedir. (Hasta No: K.65.K)



**Şekil 10:** NAT2\*5A için wild type, NAT2\*6A için mutant genotip sonucu. 48.14°C' deki ilk pik wild type NAT2\*5A, 61.22°C' deki ikinci pik mutant NAT2\*6A sonucunu göstermektedir. (Hasta No: K.49.E)

### 3.1.3.3. NAT2\*7A/B Analiz Sonuçları

NAT2 genininin 857. pozisyonundaki guanin bazının adenin' e dönüşmesi (G→ A) sonucu oluşan NAT2\*7A/B polimorfizmi için wild type genotip (GG), erime eğrisi analizinde 66.0°C' de tek pik oluşması ile belirlenmiştir. Homozigot mutant genotip (AA) 62.0°C' de tek pik oluşması ile saptanmıştır. Heterozigot genotip (GA) ise 62.0° ve 66.0°C' lerede iki pik oluşması ile ayırt edilmiştir. NAT2\*7A/B için normal ve heterozigot genotip örneklerinin sonuçları Şekil 11 ve 12' de gösterilmektedir.

**3.1.3.3.1. Kontrol Grubu:** Hepatotoksisite gelişmeyen 70 hastadan 65' inin (%92.90) NAT2\*7A/B polimorfizmi için wild type (GG), 4' ünün

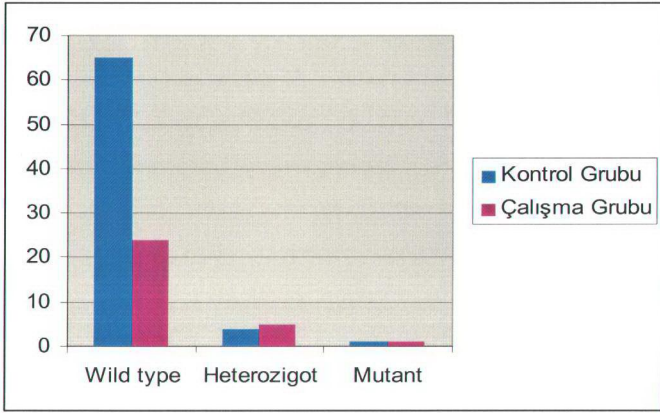
(% 5.70) heterozigot (GA) ve 1' inin (% 1.40) homozigot mutant (AA) genotipte olduğu belirlenmiştir.

**3.1.3.3.2. Çalışma grubu:** Hepatotokisite gelişen 30 hastadan 24' ünün (% 80.00) NAT2\*7A/B için wild type (GG), 5' inin (% 16.70) heterozigot (GA) ve 1' inin (% 3.30) ise homozigot mutant (AA) genotipte oldukları belirlenmiştir. NAT2\*7A/B polimorfizmi analiz sonuçları Tablo 11 ve Grafik 4' de gösterilmektedir.

**3.1.3.3.3. İstatistiksel Analiz:** Kontrol ve çalışma grubundaki kişiler NAT2\*7A/B polimorfizmi taşıyıcılığı açısından karşılaştırıldıklarında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $X^2=3.570$ ,  $p>0.05$ ).

**Tablo 11:** NAT2\*7A/B Analiz sonuçları

NAT2*7A/B (G857A)	KONTROL GRUBU (n=70)	ÇALIŞMA GRUBU (n=30)
Wild type (GG)	65 (%92.90)	24 (% 80)
Heterozigot (GA)	4 (%5.70)	5 (%16.70)
Homozigot Mutant (AA)	1 (% 1.40)	1 (3.30)

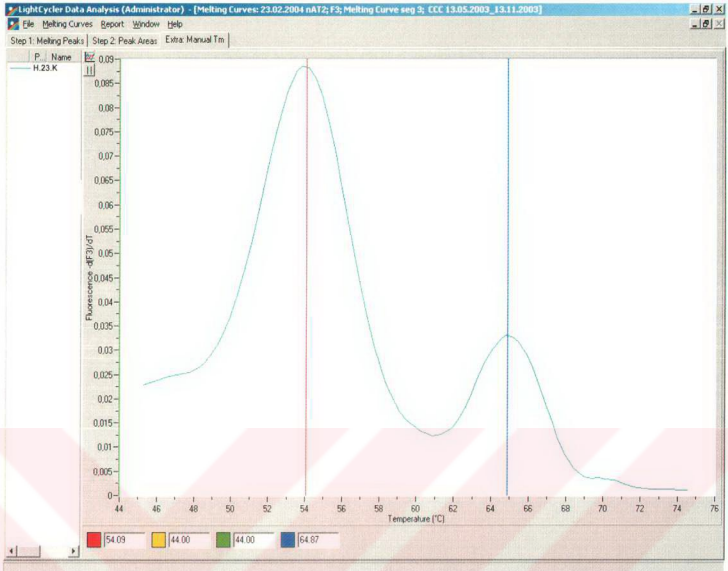


**Grafik 4:** Kontrol ve çalışma grubunun NAT2\*7A/B analiz sonuçlarının karşılaştırılması

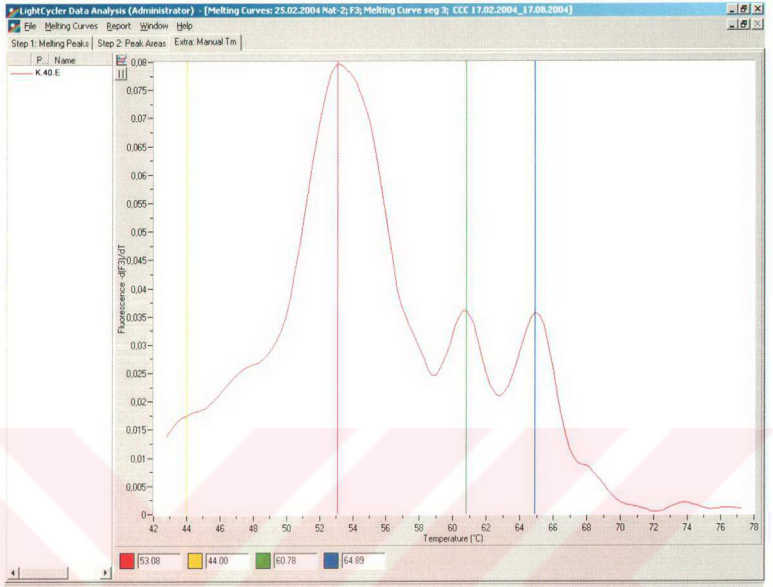
#### 3.1.3.4. NAT2\*14A Analiz Sonuçları

NAT2\*14A polimorfizmi, NAT2 geninin 191. pozisyonundaki guanin bazının adenin'e transisyonu (G→A) sonucu oluşmaktadır. Çalışmamızda bütün örnekler wild type (GG) genotipinde bulunmuş, heterozigot ve homozigot mutant genotiplere rastlanılmamıştır. Wild type genotip örneği sonucu Şekil 11 ve 12' de gösterilmektedir.

Her çalışmada kullanılan pozitif kontrolün pozitif sonuç vermesi ile polimorfizmi saptamada problem olmadığı test edilmiştir.



**Şekil 11:** NAT2\*7A/B ve NAT2\*14A polimorfizmleri için wild type genotip sonucu. 64.87°C' deki ikinci pik wild type NAT2\*7A/B, 54.09 °C' deki ilk pik ise wild type NAT2\*14A sonucunu göstermektedir. (Hasta No: H.23.K)



**Şekil 12:** NAT2\*7A/B için heterozigot, NAT2\*14A için wild type genotip sonucu. 53.08°C' deki ilk pik wild type NAT2\*14A, 60.78°C ve 64.89°C'lerdeki iki pik heterozigot NAT2\*7A/B genotipini göstermektedir. (Hasta No: K.40.E)

### 3.1.4. Bileşik Heterozigot Genotipler

Çalışmanın DNA analizi bölümü tamamlandığında, Ege Bölgesinde NAT2\*5A, NAT2\*6A ve NAT2\*7A/B polimorfizmlerinin oldukça sık görüldüğü ve hastaların çoğunun en az bir polimorfizm için heterozigot , bazılarının iki polimorfizm için de heterozigot, hatta bazı hastaların üç polimorfizm için de heterozigot genotipte olduğu belirlenmiştir. Bu bileşik heterozigot genotiplerinin hepatotoksisiteye etkisini incelemek amacı ile istatistiksel analiz yapılmış ve aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

**3.1.4.1. Heterozigot NAT2\*5A ve NAT2\*6A Genotipi:** Kontrol grubunda 7 (% 10.00), çalışma grubunda ise 12 (% 40.00) kişinin her iki polimorfizm için de heterozigot genotipte olduğu belirlenmiştir (Tablo 12). Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde aralarında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ( $X^2=12.281$ ,  $p<0.05$ ). Çalışma grubunda bileşik heterozigot genotip oranının kontrol grubundan daha yüksek olduğu dikkati çekmektedir.

**Tablo 12:** Kontrol ve çalışma grubunda NAT2\*5A ve NAT2\*6A bileşik heterozigot genotipinin görülme oranları

	<b>NAT2*5A ve NAT2*6A Bileşik Heterozigot</b>	<b>Diğer</b>
<b>KONTROL</b>	7 (% 10.00)	63 (% 90.00)
<b>ÇALIŞMA</b>	12 (% 40.00)	18 (% 60.00)

**3.1.4.2. Heterozigot NAT2\*5A, NAT2\*6A ve NAT2\*7A/B Genotipi:** Çalışma grubundan 2 kişinin üç polimorfizm için de heterozigot genotipte olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubunda her üç alel içinde heterozigot genotipli hastaya rastlanmadığından istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır.

**3.1.4.3. Heterozigot NAT2\*6A ve NAT2\*7A/B Genotipi:** Kontrol grubunda 1 (% 1.43) hastanın, çalışma grubunda ise 3 (% 10.00) hastanın NAT2\*6A ve NAT2\*7A/B polimorfizmleri için heterozigot genotipte olduğu saptanmıştır. Olgu sayısının az olması nedeniyle istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır.

### **3.1.5. NAT2 Fenotipi**

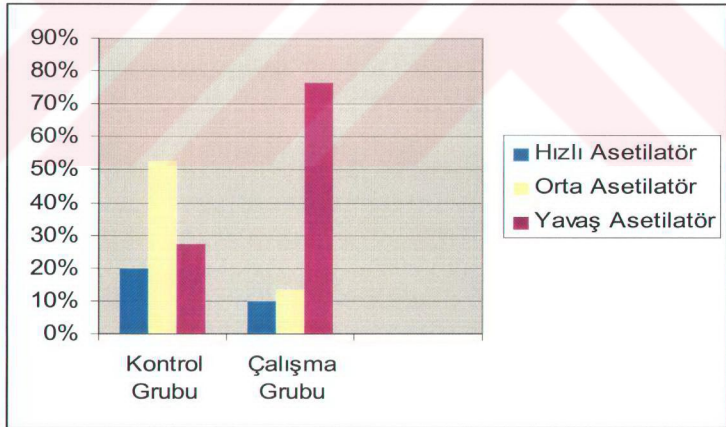
NAT2 polimorfizmlerinden herhangi birisini taşımayan hastalar "hızlı asetilatör", birisi için heterozigot hastalar "orta asetilatör" ve homozigot mutant hastalar ise "yavaş asetilatör" olarak fenotiplendirilmiştir. Buna göre



kontrol grubundaki hastaların 14' ü (% 20.00) hızlı, 37' si (% 52.85) orta ve 19' u (% 27.10) yavaş asetilatör olarak bulunmuştur. Çalışma grubunun ise 3' ü (% 10.00) hızlı, 4' ü (% 13.30) orta ve 23' ü (% 76.60) yavaş asetilatör olarak belirlenmiştir. Kontrol ve çalışma grubunun asetilatör fenotipleri Tablo 13 ve Grafik 5' de gösterilmektedir.

**Tablo 13:** Kontrol ve çalışma grubundaki hızlı, orta ve yavaş asetilatör oranları

	KONTROL GRUBU (n=70)	ÇALIŞMA GRUBU (n=30)
<b>Asetilatör Fenotipi</b>		
<b>Hızlı</b>	14 (% 20.00)	3 (% 10.00)
<b>Orta</b>	37 (% 52.90)	4 (% 13.30)
<b>Yavaş</b>	19 (% 27.10)	23 (% 76.70)



**Grafik 5:** Kontrol ve çalışma grubundaki hızlı, orta ve yavaş asetilatör oranları

**3.1.5.1. İstatistiksel Analiz:** Kontrol ve çalışma grubundaki hızlı, orta ve yavaş asetilatör fenotipleri ile hepatotoksisite arasındaki ilişki karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu bulunmuştur ( $X^2=21.499$ ,  $p<0.05$ ). Hepatotoksisite oranının yavaş asetilleyici fenotipte daha yüksek olduğu dikkati çekmektedir.

Bunun yanında, kadın ve erkeklerde asetilatör fenotipine göre hepatotoksisite görülme oranı karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu bulunmuştur ( $X^2=17.947$ ,  $p<0.05$ ). Kadınlarda yavaş asetilatör fenotipi oranının yüksek olması dikkati çekmektedir. Cinsiyete göre asetilatör fenotipleri ile hasta ve kontrol grubunun karşılaştırılması Tablo 14' de gösterilmektedir.

**Tablo 14:** Kontrol ve çalışma grubunun cinsiyete göre asetilatör fenotipleri

	KADIN		ERKEK	
	Kontrol (n=19)	Çalışma (n=15)	Kontrol (n=51)	Çalışma (n=15)
<b>Hızlı Asetilatör</b>	1 (% 5.30)	3 (% 20.00)	13 (% 25.50)	-
<b>Orta Asetilatör</b>	10 (% 52.60)	1 (% 6.70)	27 (% 52.90)	3 (% 20.00)
<b>Yavaş Asetilatör</b>	8 (% 42.10)	11 (% 73.30)	11 (% 21.60)	12 (% 80.00)

Hepatotoksisite sırasında yükselmiş olan karaciğer fonksiyon testlerinin ortalama pik değerleri asetilatör fenotipi ile karşılaştırıldığında, ALT için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuşken; AST, total bilirubin ve yaş için anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bulgular Tablo 15' de özetlenmiştir.

**Tablo 15:** İlaça bağlı hepatotoksisite gelişen hastaların yaşları, asetilatör durumları ve biyokimyasal testlerinin en yüksek değerleri (ortalamalar standart sapmalar ve dağılım aralığı ile birlikte verilmiştir)

	<b>Yavaş Asetilatör (n=23)</b>	<b>Orta Asetilatör (n=4)</b>	<b>Hızlı Asetilatör (n=3)</b>	<b>p</b>
<b>AST Pik (U/L)</b>	209.08±32.08 (77-745)	135.75±26.8 (59-184)	232±81 (149-394)	0.607
<b>ALT Pik (U/L)</b>	185.34±36.57 (40-744)	115.75±27.03 (70-183)	469.33±187.47 (98-700)	0.035
<b>Total Bilirubin Pik (mg/dL)</b>	0.87±0.30 (0.01-7.1)	0.49±0.10 (0.24-0.69)	0.65±0.13 (0.42-0.89)	0.848
<b>Yaş</b>	39.47±3.10 (16-67)	37.75±7.20 (27-59)	45±10.53 (33-66)	0.804

**Tablo 16: Kontrol grubu ile ilgili veriler ve polimorfizm analiz sonuçları**

(WT: wild type, Het.: Heterozigot, Mut.: Mutant )

Asetilatör Fenotipi	Olgu	Yaş	NAT2*5A	NAT2*6A	NAT2*7A/B	NAT2*14A	AST	ALT	T.Bilirubin
Hızlı	K.6.E	43	WT	WT	WT	WT	24	22	0.81
Hızlı	K.9.E	25	WT	WT	WT	WT	22	22	0.42
Hızlı	K.10.E	32	WT	WT	WT	WT	12	20	0.26
Hızlı	K.11.E	52	WT	WT	WT	WT	10	13	0.21
Hızlı	K.12.E	41	WT	WT	WT	WT	19	22	0.85
Hızlı	K.13.E	42	WT	WT	WT	WT	8	9	0.43
Hızlı	K.14.E	33	WT	WT	WT	WT	28	43	0.32
Hızlı	K.16.E	57	WT	WT	WT	WT	6	13	0.35
Hızlı	K.17.E	31	WT	WT	WT	WT	22	20	0.27
Hızlı	K.19.E	72	WT	WT	WT	WT	20	16	0.62
Hızlı	K.23.E	51	WT	WT	WT	WT	10	5	0.10
Hızlı	K.35.E	48	WT	WT	WT	WT	17	25	0.43
Hızlı	K.38.E	47	WT	WT	WT	WT	17	12	0.72
Hızlı	K.63.K	30	WT	WT	WT	WT	11	8	0.68
Orta	K.1.E	62	Het.	WT	WT	WT	6	12	0.43
Orta	K.2.E	37	WT	Het.	WT	WT	23	22	0.55
Orta	K.3.E	61	WT	Het.	WT	WT	16	16	0.16
Orta	K.4.E	46	Het.	WT	WT	WT	10	18	0.24
Orta	K.5.E	42	WT	Het.	WT	WT	28	30	0.88
Orta	K.7.E	38	WT	WT	Het.	WT	12	15	0.22
Orta	K.8.E	26	WT	Het.	WT	WT	23	26	0.41
Orta	K.18.E	18	WT	WT	Het.	WT	10	10	0.70
Orta	K.20.E	47	WT	Het.	WT	WT	12	11	0.59
Orta	K.21.E	54	WT	WT	Het.	WT	16	17	0.48
Orta	K.22.E	53	WT	Het.	WT	WT	16	28	0.24
Orta	K.24.E	39	Het.	WT	WT	WT	13	11	0.64
Orta	K.25.E	27	Het.	WT	WT	WT	12	12	0.27
Orta	K.26.E	21	Het.	WT	WT	WT	19	14	0.46
Orta	K.27.E	22	WT	Het.	WT	WT	24	24	0.16
Orta	K.28.E	44	Het.	WT	WT	WT	13	11	0.41
Orta	K.29.E	44	WT	Het.	WT	WT	14	9	1,55
Orta	K.30.E	22	WT	Het.	WT	WT	12	6	0.42
Orta	K.31.E	34	WT	Het.	WT	WT	12	20	0.32
Orta	K.33.E	38	Het.	WT	WT	WT	18	21	0.18
Orta	K.42.E	55	WT	Het.	WT	WT	17	16	0.34
Orta	K.43.E	26	Het.	WT	WT	WT	27	19	0.41
Orta	K.44.E	36	Het.	WT	WT	WT	12	10	0.25
Orta	K.45.E	51	Het.	WT	WT	WT	20	22	0.12
Orta	K.46.E	22	Het.	WT	WT	WT	14	20	0.42

<i>Asetilatör Fenotipi</i>	<i>Olgu</i>	<i>Yaş</i>	<i>NAT2*5A</i>	<i>NAT2*6A</i>	<i>NAT2*7A/B</i>	<i>NAT2*14A</i>	<i>AST</i>	<i>ALT</i>	<i>T.Bilirubin</i>
Orta	K.47.E	22	WT	Het.	WT	WT	18	9	0.05
Orta	K.50.E	45	WT	Het.	WT	WT	17	16	0.36
Orta	K.52.K	17	Het.	WT	WT	WT	9	14	0.14
Orta	K.54.K	21	WT	Het.	WT	WT	9	13	0.41
Orta	K.57.K	41	Het.	WT	WT	WT	11	12	0.33
Orta	K.59.K	71	Het.	WT	WT	WT	10	9	0.56
Orta	K.60.K	50	Het.	WT	WT	WT	11	15	0.18
Orta	K.61.K	50	Het.	WT	WT	WT	19	9	0.38
Orta	K.64.K	36	WT	Het.	WT	WT	18	12	0.39
Orta	K.66.K	33	Het.	WT	WT	WT	17	14	0.60
Orta	K.68.K	21	WT	Het.	WT	WT	14	14	0.95
Orta	K.70.K	35	WT	Het.	WT	WT	23	25	0.09
Yavaş	K.15.E	32	Het.	Het.	WT	WT	16	34	0.41
Yavaş	K.32.E	50	Het.	Het.	WT	WT	14	10	0.37
Yavaş	K.34.E	66	WT	Het.	Mut.	WT	30	20	0.34
Yavaş	K.36.E	58	Het.	Het.	WT	WT	8	9	0.58
Yavaş	K.37.E	33	Mut.	WT	WT	WT	16	16	0.05
Yavaş	K.39.E	59	Mut.	WT	WT	WT	16	11	0.33
Yavaş	K.40.E	44	WT	Het.	Het.	WT	10	18	0.24
Yavaş	K.41.E	40	Mut.	WT	WT	WT	44	23	0.39
Yavaş	K.48.E	53	Het.	Het.	WT	WT	32	33	0.62
Yavaş	K.49.E	22	WT	Mut.	WT	WT	42	39	0.4
Yavaş	K.51.E	32	Het.	Het.	WT	WT	12	13	0.26
Yavaş	K.53.K	27	Het.	Het.	WT	WT	11	14	0.10
Yavaş	K.55.K	17	Mut.	WT	WT	WT	11	17	0.4
Yavaş	K.56.K	21	Het.	Het.	WT	WT	11	15	0.44
Yavaş	K.58.K	27	Mut.	WT	WT	WT	10	20	0.46
Yavaş	K.62.K	22	WT	Mut.	WT	WT	19	14	0.29
Yavaş	K.65.K	24	Mut.	WT	WT	WT	35	49	0.42
Yavaş	K.67.K	56	Mut.	WT	WT	WT	19	13	0.01
Yavaş	K.69.K	28	WT	Mut.	WT	WT	21	11	0.32

**Tablo 17: Çalışma grubu ile ilgili veriler ve polimorfizm analiz sonuçları**

(WT: wild type, Het.: Heterozigot, Mut.: Mutant)

Asetilator Fenotipi	Olgu	Yaş	NAT2*5A	NAT2*6A	NAT2*7A/B	NAT2*14A	AST	ALT	T.Bilirubin
Hızlı	Ç.16.K	66	WT	WT	WT	WT	15	25	0.57
Hızlı	Ç.23.K	33	WT	WT	WT	WT	17	15	0.06
Hızlı	Ç.27.K	36	WT	WT	WT	WT	12	24	0.38
Orta	Ç.08.E	31	Het.	WT	WT	WT	31	31	0.41
Orta	Ç.12.E	34	Het.	WT	WT	WT	13	17	0.41
Orta	Ç.15.E	27	Het.	WT	WT	WT	11	35	0.26
Orta	Ç.29.K	59	Het.	WT	WT	WT	11	22	0.21
Yavaş	Ç.01.E	45	Het.	Het.	WT	WT	32	44	0.89
Yavaş	Ç.02.E	61	Het.	Het.	WT	WT	33	14	0.42
Yavaş	Ç.03.E	27	WT	Mut.	WT	WT	27	29	0.55
Yavaş	Ç.04.E	49	Mut.	WT	WT	WT	19	19	0.35
Yavaş	Ç.05.E	42	WT	Mut.	Mut.	WT	39	22	0.96
Yavaş	Ç.06.E	23	Het.	Het.	Het.	WT	25	33	0.54
Yavaş	Ç.07.E	40	Het.	Het.	WT	WT	20	30	0.85
Yavaş	Ç.09.E	54	Het.	Het.	WT	WT	30	27	0.63
Yavaş	Ç.10.E	39	WT	Mut.	WT	WT	14	20	0.69
Yavaş	Ç.11.E	55	WT	Mut.	WT	WT	11	19	0.23
Yavaş	Ç.13.E	34	Het.	Het.	WT	WT	17	15	0.63
Yavaş	Ç.14.E	67	Het.	Het.	WT	WT	11	19	0.22
Yavaş	Ç.17.K	54	WT	Het.	Het.	WT	49	49	0.69
Yavaş	Ç.18.K	54	Mut.	WT	WT	WT	9	21	0.25
Yavaş	Ç.19.K	47	WT	Mut.	WT	WT	20	30	0.22
Yavaş	Ç.20.K	38	Het.	Het.	WT	WT	12	18	0.45
Yavaş	Ç.21.K	17	Het.	Het.	WT	WT	24	27	0.46
Yavaş	Ç.22.K	38	WT	Het.	Het.	WT	30	25	0.73
Yavaş	Ç.24.K	24	WT	Het.	Het.	WT	32	32	0.34
Yavaş	Ç.25.K	20	WT	Mut.	WT	WT	14	20	0.51
Yavaş	Ç.26.K	16	Het.	Het.	WT	WT	31	22	0.30
Yavaş	Ç.28.K	45	Het.	Het.	WT	WT	22	31	0.23
Yavaş	Ç.30.K	19	Het.	Het.	Het.	WT	34	28	0.49

## 4.1. TARTIŞMA

Farmakogenetik biliminin amacı, kalıtsal risk faktörlerinin advers ilaç reaksiyonlarının oluşumununa etkisini incelemek ve advers reaksiyonların meydana gelebileceği hastaları önceden belirleyerek bu hastalar için risksiz tedaviler düzenlenmesini sağlamaktır.

ADR' ler sık görülmekle beraber mali yönden de ciddi masraflara neden olmaktadır. Özellikle tüberküloz, epilepsi ve kanser gibi tedavisi uzun süren hastalıklar için ADR' ler büyük problem oluşturmaktadırlar. Amerika' da 1969-1996 yılları arasında yapılan 39 çalışmada advers ilaç reaksiyonları görüme sıklığı ortalama % 6.7 olarak bulunmuş ve ADR' leri sebebiyle hastane masraflarının % 15 arttığı belirlenmiştir (78).

Tüberküloz tedavisinde birden fazla ilacın kombine olarak uzun süre kullanılması ve bu ilaçların karaciğer üzerine toksik etkilerinin olmaları nedeniyle meydana gelen ilaca bağlı hepatotoksisite tedaviyi aksatan ciddi bir problemdir. İlaçların neden olduğu hepatotoksisite mekanizmasının iyi anlaşılması ve risk faktörlerinin belirlenmesi, ciddi reaksiyonlara neden olan karaciğer hastalıklarının önlenmesine yardımcı olabilir. Bu konuda yapılan birçok çalışmada, hepatotoksisiteye neden olan risk faktörleri; asetilatör fenotipi, yaş, cinsiyet, vücut ağırlığı, alkol alımı, hastalığın derecesi ve hepatit B enfeksiyonu olarak rapor edilmiştir (9, 14, 23, 35, 44, 45, 64, 74, 93, 94, 109, 110, 125, 136, 149, 151). Bu risk faktörlerinin arasında en önemli asetilatör fenotipidir ve hepatotoksisiteye etkisi yıllardır tartışılmaktadır (23, 45, 64, 93, 94, 109, 110, 125, 151).

Hepatotoksositeye en çok neden olan antitüberküloz ilaç izoniazid karaciğerde önce NAT2 enzimi ile astilizoniazid' e dönüştürülür (94) ve burada hızla monoasetilhidrazin' e hidrolizlenir. Daha sonra Sitokrom P450 2E1 enzimi ile asetildiazen, asetilonium ion, asetilradikal ve keten gibi toksik ara bileşiklere okside edilir (35, 120). Bu ara bileşiklerin hepatotoksositeye neden oldukları düşünülmektedir (30, 77, 94). Yavaş asetilatör fenotindeki NAT2 enzimlerinde monoasetil hidrazinin çok yavaş asetillenmesi nedeniyle toksik metabolitler birikir. İlaç metabolizmasındaki bu proses, daha önceki çalışmalarda rapor edilmiş olan yavaş asetilatörlerin ilaca bağlı hepatotoksosite gelişmesine yatkın olmaları görüşünü desteklemektedir (23, 44, 109, 110, 125).

NAT2 fenotipi yaş, cinsiyet, diyet, alkol ve sigara alışkanlığı, çevresel kirleticiler, karaciğer fonksiyonları, ilaç kullanımı ve comorbid hastalıklardan etkilenebilmektedir (81, 105, 118, 119, 154, 155). Dapsone ile asetilasyon aktivitesi ölçülerek, günden güne yaklaşık % 10 farklılık gösterdiği rapor edilmiştir (118). Zielinska ve arkadaşları, trimethoprim-sulfamethoksazol' e hipersensivitenin belirlenmesi için NAT2 genotiplemesinin fenotip analizinden daha iyi olduğunu göstermişlerdir (155). Farklı fenotipleme methodları arasında farklı cut off noktalarının bulunması sebebiyle doğruluklarının karşılaştırılması oldukça zordur (23, 44, 45, 64, 93, 94, 109, 110, 125, 151). NAT2 genotiplemesi yapılarak asetilatör fenotipinin belirlenmesi bu zorlukların giderilmesini sağlayabilir.

Mitchell ve arkadaşları ile Yamamoto ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda hızlı asetilatörlerin antitüberküloz ilaç kaynaklı hepatotoksosite gelişmesine daha yatkın oldukları belirtilmiştir (93, 94, 151). Fakat yapılan



diğer çalışmalarda hızlı asetilleyicilerin yerine yavaş asetilleyicilerin hepatotoksisite gelişmesine daha yatkın oldukları rapor edilmiştir (23, 44, 109, 110, 125). Asetilatör durumu ve antitüberküloz ilaç kaynaklı hepatotoksisite arasındaki ilişkinin anlaşılması ciddi sonuçlara neden olabilen hepatotoksisitenin önlenmesine yardımcı olabilir. Ancak anlaşılması güç olan bu konu hala belirsizliğini korumaktadır.

Hein ve arkadaşları, 16 farklı insan rekombinant NAT2 alelinin N-asetilasyon, N-hidroksiarilamin O-asetilasyon ve N-hidroksiarilamid N, O-asetilasyon katalitik aktivitelerini *Escherichia coli* bakterisinin ekspresyon sisteminde çalışmışlardır. Sonuçta, NAT2\*5A, \*5B ve \*5C (T341C) alellerinin rekombinant NAT2 alloenzimlerinin sentezlenmesine neden olarak, O- ve N, O-asetilasyon yolu ile N-hidroksiarilaminlerin ve N-hidroksiarilamidlerin metabolik aktivasyonunu oldukça azalttığını belirlemişlerdir. NAT2\*14A, \*14B (G191A) ve NAT2\*6A, \*6B (G590A) alellerinin ise enzim aktivitesi hafiflemiş NAT2 alloenzimlerinin sentezlenmesine neden olduğunu; NAT2\*7A/B alelinin sentezlediği rekombinant enzimin aktivitesinde ise çok az fakat dikkate değer bir düşüş olduğunu belirlemişlerdir (50).

Huang ve arkadaşları NAT2\*5A, NAT2\*6A, NAT2\*7A polimorfizmlerini analiz ederek yaptıkları çalışmanın sonucunda, yavaş asetilatörlerin % 26.4'ünde, hızlı asetilatörlerin ise % 11.1'inde hepatotoksisite geliştiğini rapor etmişlerdir (p=0.13). Bu çalışmada en az 2 mutant alelin varlığı yavaş asetilatör, 1 yada 2 wild type alelin varlığı hızlı asetilatör olarak sınıflandırılmıştır. Orta asetilatör sınıflandırması yapılmamıştır (60).

Ohno M. ve arkadaşlarının yine NAT2\*5A, NAT2\*6A, NAT2\*7A polimorfizmlerini saptayarak yaptıkları bir çalışmada da hızlı asetilatör fenotip

ile karşılaştırıldığında, hepatotoksisite riski orta asetilatörlerde 4.0 (95% CI 1.94-6.06), yavaş asetilatörlerde ise 28.0 (95% CI 26.0-30.0) olarak saptanmıştır (103).

Bu sonuçlara benzer olarak, Hiratsuka ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, advers ilaç reaksiyonu görülme sıklığı yavaş asetilatörlerde % 83.30, orta asetilatörlerde % 2.40 ve hızlı asetilatörlerde % 0 bulunmuştur ve bu yüzden yavaş asetilatörlerde izoniazidin standart dozunun (300 mg/gün) kullanılmasının ilaca bağlı toksisite gelişmesi açısından yüksek risk taşıdığı rapor edilmiştir (57).

Bizim çalışmamızda NAT2\*5A, NAT2\*6A, NAT2\*7A/B ve NAT2\*14A polimorfizmlerinin tek başlarına hepatotoksisiteye etkisi değerlendirildiğinde, sadece NAT2\*6A için istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Ancak dört polimorfizm de göz önünde bulundurularak asetilasyon fenotipleri belirlendiğinde ve fenotipler ile hepatotoksisite arasındaki ilişki karşılaştırıldığında sonuçlar oldukça anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Yavaş asetilleyici fenotipte hepatotoksisite oranı diğer fenotiplere göre oldukça yüksek saptanmıştır (Yavaş Asetilatör: % 76.60, Orta Asetilatör: % 13.30, Hızlı Asetilatör: % 10.00). Bu oranlar Hiratsuka ve arkadaşlarının bulunduğu sonuçlarla uyum göstermektedir (57).

Çalışmamızda mutant polimorfizme sahip olduğu halde hepatotoksisite gelişmeyen olgular belirlenmiştir. Kontrol grubundaki 70 hastadan 11' inde (% 15) mutasyon saptanmış fakat hepatotoksisite gelişmemiştir. Bunun sebebi oldukça polimorfik olan NAT2 genindeki diğer polimorfizmlerin hızlı asetilatör fenotipi oluşturmuş olabileceği ile açıklanabilir. Bunun farklı polimorfizmlerden kaynaklanıp kaynaklanmadığının belirlenmesi için diğer

polimorfizmlerin de araştırılması yerinde olacaktır. Örneğin, *NAT2\*12* ve *NAT2\*13* genotiplerinin, N-, O- ve N, O- asetiltransferaz aktivitelerinin oldukça yüksek olduğu ve hızlı asetilatör fenotipini oluşturdukları belirlenmiştir (50, 51, 102). Mutant *NAT2\*5A*, *NAT2\*6A* veya *NAT2\*A/B* genotipine sahip olduğu halde hepatotoksisite gelişmeyen hastalarda *NAT2\*12* ve *NAT2\*13* polimorfizmleri wild type genotipte olabilir.

Asetilasyon fenotipi birçok faktörden etkilenebilen oldukça kompleks bir prosestir. İzoniahid metabolizmasında görevli diğer enzim sitokrom P450 2E1' inde hepatotoksisite gelişiminde etken olabileceği Huang ve arkadaşlarının bir çalışmasında rapor edilmiştir (59). Bu çalışmada homozigot wild type CYP2E1 (c1/c1) genotipinde hepatotoksisite gelişme riskinin arttığı saptanmıştır. CYP2E1 genotipi ile NAT2 asetilatör fenotipinin birlikte hepatotoksisite gelişimine etkisi incelendiğinde; CYP 2E1 c1/c2 yada c2/c2 genotipi ile NAT2 hızlı asetilatör fenotipinin birlikteliğinde hepatotoksisite riski 3.94 bulunmuşken, CYP 2E1 c1/c1 genotipi ile NAT2 hızlı asetilatör fenotipinin birlikteliğinde bu risk 7.43 olarak belirlenmiştir.

Huang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada AST, ALT ve total bilirubin değerlerinin, yavaş asetilleiyici fenotipe sahip hepatotoksisiteli hastalarda daha çok arttığı gözlenmiştir (60).

Çalışmamızda hepatotoksisite sırasında yükselmiş olan karaciğer fonksiyon testlerinin ortalama pik değerleri, hızlı, orta ve yavaş asetilatör fenotipleri arasında karşılaştırıldığında, ALT için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuşken, AST, total bilirubin ve yaş için anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Daha önce yapılmış çalışmalarda bileşik heterozigot genotipinin hepatotoksisite gelişimine etkisi tartışılmamıştır. Ancak bizim çalışmamızda 4

polimorfizm arasında bileşik heterozigotluk bulunmasında hepatotoksisiteye yatkınlık oluşturduğu düşünölmüştür. Kontrol grubunda 7 (% 10.00), hasta grubunda ise 12 (% 40.00) kişinin *NAT2\*5A* ve *NAT2\*6A* polimorfizmleri için heterozigot genotipte olduğu belirlenmiştir ve hepatotoksisite ile ilişkisi karşılaştırıldığında sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

Bununla birlikte, çalışma grubundan 2 kişinin *NAT2\*5A*, *NAT2\*6A* ve *NAT2\*7A/B* polimorfizmleri için heterozigot genotipte olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubunda ise her üç alel içinde heterozigot genotipli hasta bulunmamıştır. Ancak üç heterozigot polimorfizmin bulunmasının hepatotoksisiteye neden olduğunun söylenebilmesi için hasta sayısının artırılması gerekmektedir.

Tüberküloz tedavisi gören hastalarda hepatotoksisitenin izoniazid tedavisinin 4-8. haftasında ortaya çıktığı bildirilmektedir (92, 133). Yurdakul ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada enzim yüksekliğinin tedavi başlangıcından ortalama 11 gün sonra ortaya çıktığı ve ortalama 11 gün sonrada normale döndüğü saptanmıştır (152).

Ursavaş ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, tedavinin başlangıcı ile hepatotoksisite gelişmesi arasında geçen süre  $11.9\pm 7.6$  (5-20) gün, transaminazların normale dönme süresi ise  $8.25\pm 5.13$  (2-20) gün olarak saptanmıştır. Ayrıca, olguların % 80' inde hepatotoksisitenin tedavinin ilk 15 günü içerisinde geliştiğı belirlenmiştir (138).

Yapılan çalışmalarda tedavi başlangıcı ile hepatotoksisite gelişmesi arasında geçen süre 13-21 gün arasında değişirken, tekrar tedaviye dönme süresi 17.5-18.8 gün arasında bulunmuştur (72, 107, 134).

Bizim çalışmamızda, hepatotoksisitenin tedavi başlangıcından ortalama  $14.96 \pm 7.73$  gün sonra ortaya çıktığı ve tedavisi kesilen bu hastaların ortalama  $10.76 \pm 10.34$  gün sonra enzimlerinin normale döndüğü saptanmıştır. Elde ettiğimiz bu sonuçlar yapılan diğer çalışmalarla uyum göstermektedir.

Hepatotoksisite gelişmesinde risk faktörlerinden biri olarak ileri yaş gösterilmektedir. Bunun nedeni, özellikle 50 yaşın üzerinde, sitokrom P450 aktivitesinin, renal fonksiyonların ve ilaçların yarılanma ömrünün azalmasına bağlanmaktadır (109, 133).

Yurdakul ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma da yaş ve hepatotoksisite gelişmesi arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır (152).

Bizim çalışmamızda hepatotoksisite gelişmeyen grupta yaş ortalaması  $37.3 \pm 14.01$ , hepatotoksisite gelişen grupta ise  $39.8 \pm 14.70$  olarak bulunmuştur ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır.

Bu konu ile ilgili değişik bir sonuç elde edilen Ungo ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise 35 yaşın altında hepatotoksisite oranının daha fazla olduğu görülmüş ve bu durum HIV enfeksiyonu ile birlikteliğe bağlanmıştır (137).

Cinsiyet ve hepatotoksisite riski arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, kadınlarda hepatotoksisitenin daha sık görüldüğü çalışmalar bildirilmiştir (2, 24, 99, 126, 135). Bunun nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, oral kontraseptiflere ve postmenapoz döneminde olmalarına bağlanmıştır. Utkaner ve arkadaşlarının çalışmasında hepatotoksisite ile yaş ve cinsiyet arasında ilişki saptanamamıştır (140). Ortaköylü ve arkadaşlarının çalışmasında ise hepatotoksisite sıklığı kadınlarda anlamlı olarak daha yüksek bulunurken, yaş

ile hepatotoksisite arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (107). Yapılan diğer çalışmalarda da hepatotoksisitenin kadınlarda daha sık görüldüğüne ilişkin bulgu yoktur (109, 134).

Bizim çalışmamızda ise fenotipi hızlı asetilleyici olan erkeklerde hiç hepatotoksisite olgusuna rastlamadığımız halde, hızlı asetilatör fenotipindeki kadın hastaların 3' ünde (% 20) hepatotoksisite gelişmiştir. Hızlı asetilleyici oldukları halde hepatotoksisite gelişen bu üç kadın hastadan H.16.K numaralı 66 yaşındaki olguda, tedavinin 15 ve 38. günlerinde iki kez hepatotoksisite gelişmiştir. H.23.K numaralı 33 yaşındaki ikinci kadın olguda tedavinin 30. gününde başlayan hepatotoksisite tam 50 gün devam etmiş ve serum ALT değeri normalin 13 katına kadar yükselmiştir. Hastanın hepatit markerları ve tüm batin ultrasonu değerlendirilerek toksik hepatite neden olabilecek viral ve organik nedenler ekarte edilmiş ve ilaca bağlı hepatotoksisite teşhisi konmuştur. Hızlı asetilleyici fenotipe sahip olduğuna halde hepatotoksisite gelişen H.27.K numaralı olguda tedavinin 6. günü başlayan hepatotoksisite yalnızca 6 gün sürmüştür ve tekrarlamamıştır. Bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, kadınlarda asetilasyon fenotipininin çevresel etkenlerden veya başka faktörlerden daha çok etkilendiği düşünülebilir.

Cross ve arkadaşlarının geniş serili bir çalışmasında alkol kullananlarla kullanmayanlar arasında hepatotoksisite gelişmesi açısından herhangi bir fark olmadığı, tedavi öncesinde ve tedavi boyunca, tedavide herhangi bir değişikliğe neden olmayacak AST yükseklikleri görüldüğü belirtilmiştir (19). Yurdakul ve arkadaşları yaptıkları çalışmada alkol kullanan ve kullanmayan hastalar arasında, hem hepatotoksisite gelişmesi açısından hem de KCFT yüksekliği açısından herhangi bir fark olmadığı rapor edilmiştir (152).

Bizim yaptığımız çalışmada da alkol kullanımı ile hepatotoksisite gelişme riski arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Tüberküloz tedavisi sırasında hepatotoksisite görülmesi malnütrisyon, geçirilmiş hepatit öyküsü, kronik karaciğer hastalığı ve DM gibi bazı viral ve metabolik hastalıklara da bağlanmıştır (2, 19, 72, 75, 92, 99, 109, 137). Yurdakul ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada DM' li olduğu saptanan toplam 17 hastanın 2' sinde (% 11.8), DM saptanmayan 168 hastanın 19' unda (% 11.3) hepatotoksisite gelişmiştir ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (152).

Bizim çalışmamızda da Yurdakul ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmayı destekleyen sonuçlar elde edilmiş, DM ve hepatotoksisite gelişme riski karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

Delomenie ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada NAT2\*5A polimorfizminin Kanada, Amerika ve Afrika' da oldukça sık görülürken, Doğu ülkelerinde çok nadir bulunduğu, diğer yandan, NAT2\*7B alelinin Doğu ülkelerinde sık görülürken, beyaz ırkta çok nadir ortaya çıktığı, NAT2\*14' ün ise hem Amerika' lı hem Afrika yerlilerinde sık görülürken, diğer etnik gruplarda çok nadir görüldüğü bildirilmiştir (20).

Kore popülasyonunda 1000 kişide NAT2\*5A, \*5B, \*5C, \*6A, \*6B, \*7A, \*7B, \*12A, \*12C, \*13, ve \*19 polimorfimleri analiz edilerek yapılan bir çalışmada asetilatör oranları; hızlı % 42.8, orta % 46.9, yavaş % 9.6 olarak belirlenmiştir. Beyaz ırkta oldukça sık görülen (% 40-46) NAT\*5A, \*5B alelleri Kore popülasyonunda % 1.5 olarak bulunmuştur. Buna karşılık beyaz ırkta

oldukça az görülen (%1-5) *NAT2\*7A* alelinin Kore populasyonunda ki sıklığı %11.5 olarak rapor edilmiştir (79).

Daha önce Türk toplumunda *NAT2* polimorfizmlerinin sıklığı konusunda yayınlanmış çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Aynacıoğlu ve arkadaşlarının 1997 yılında Güney Doğu Anadolu Bölgesi' nde 303 hastada yaptıkları bir çalışmada, *NAT2\*5A*: % 1.3, *NAT2\*6A*: % 30.5, *NAT2\*7B*: % 4.5, olarak bulunmuştur. Yavaş asetilasyona neden olduğu düşünölen genotip oranı ise % 57.40 olarak rapor edilmiştir (4).

Bizim çalışmamızda ise *NAT2\*5A*: % 49, *NAT2\*6A*: % 50, *NAT2\*7A/B*: % 11 ve *NAT2\*14A*: % 0.0 olarak bulunmuştur. Türk toplumunda yapılmış bu iki çalışmada özellikle *NAT2\*5A* polimorfizm sıklığının oldukça farklı bulunduğu görölmektedir. Bu farklılığın, çalışmanın yapıldığı Ege ve Güney Doğu Anadolu populasyonlarının farklı coğrafik bölgelerden gelen göçler ile oluşmasından kaynaklandığı düşünölmektedir. Çünkü Güney Doğu Anadolu Bölgesi populasyonunun büyük çoğunluğu Orta Asya' dan gelen göçlerle, Ege Bölgesi populasyonu ise daha çok Yunanistan ve Bulgaristan gibi batıdan gelen göçlerle oluşmuştur. Delomenie ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da *NAT2\*5A* polimorfizminin doğu ölkelerinde daha az göröldüğu belirtilmiştir (20).

*NAT2\*14A* polimorfizmine hiç rastlayamamış olmamızın, genel populasyonda tahmin edilen sıklığının azlığı veya çalışmamızdaki örnek sayısının azlığı nedeniyle olduğu düşünölmektedir.

*NAT2\*5A*, *NAT2\*6A*, *NAT2\*7A* ve *NAT2\*14A* polimorfizmlerinin Ege Bölgesindeki oranlarının tam olarak belirlenmesi ve bulgularımızın daha net



vurgulanması için hasta sayısının artırılmasının gerekli olduğu düşünölmektedir.



## 5.1. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda, Ege Bölgesi' nde tüberküloz tedavisi gören 100 hastada N-asetiltransferaz 2 polimorfizmlerinden *NAT2\*5A*, *NAT2\*6A*, *NAT2\*7A/B* ve *NAT2\*14A*' nın hepatotoksisite gelişimine etkisi araştırılmıştır.

Elde edilen bulguların değerlendirilmesi ile aşağıda belirtilen sonuçlara ulaşılmıştır:

*NAT2\*5A* ve *NAT2\*6A* polimorfizmlerinin Ege Bölgesinde yaşayan bireylerde oldukça sık görüldüğü saptanmıştır.

*NAT2\*14A* polimorfizmi ise bu bölgede yaşayan bireylerde hiç saptanamamıştır. Bu durumun çalıştığımız hasta sayısının az olmasına veya bu polimorfizmin sıklığının Ege Bölgesinde oldukça az olmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

*NAT2* genotiplenmesi sonuçlarına göre hastaların fenotipleri çıkarıldığında, orta asetilatör fenotipinin Ege Bölgesinde yaygın olabileceği belirlenmiştir. Ancak çalıştığımız polimorfizmler için orta asetilatör fenotipini taşıyanlarda hepatotoksisite oranının yüksek olmaması nedeniyle, bu fenotipin asetilasyon aktivitesinin çok fazla etkilenmediği sonucuna varılmıştır. Konunun tam olarak aydınlatılması için *NAT2* genotiplenmesi ile birlikte direkt fenotipleme yöntemlerinden birinin kullanılarak çalışmamızın desteklenmesi gerekmektedir.

Hepatotoksisite gelişen hastalarda yavaş asetilatör fenotip oranı kontrollere göre oldukça yüksek sıklıkta görülmekte ve *NAT2* polimorfizmlerini hepatotoksisite gelişiminde önemli bir kalıtsal risk faktörü olarak ortaya koymaktadır.

Yaş, diabetes mellitus, alkol ve sigara kullanımının hepatotoksisite gelişmesi ile ilişkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Çalışmamız, hepatotoksisite gelişme riski yüksek olan hastaların önceden belirlenebilmesi için NAT2 polimorfizmleri analizinin klinik alanda uygulanabilirliğini göstermektedir. Ayrıca, bu anlamda klinisyenlere tedaviye başlanmasıyla birlikte polimorfizm analizlerinin yapılmasının, hepatotoksisite gelişme riski konusunda oldukça anlamlı bir fikir vereceğini vurgulamıştır.



## 6.1. ÖZET

İlaç kullanımına bağlı olarak gelişen en yaygın karaciğer hastalığı, antitüberküloz ilaç kaynaklı hepatotoksisitedir. Hepatotoksisite nedeni olan başlıca ilaç izoniazid, NAT2 enzimi ile metabolize olmaktadır. Bununla birlikte, polimorfik NAT asetilatör durumu ve antitüberküloz ilaç kaynaklı hepatotoksisite arasındaki ilişki hala tartışılmaktadır.

Asetilatör durumunun antitüberküloz ilaç kaynaklı hepatotoksisite için risk faktörü olup olmadığının belirlenmesi için, tüberküloz tedavisi gören 100 hastada *NAT2\*5A*, *NAT2\*6A*, *NAT2\*7A/B* ve *NAT2\*14A* polimorfizmleri çalışılmıştır.

Tüberküloz tedavisi gören hastalardan, tedavi sırasında yan etki olarak hepatotoksisite gelişen 30 kişi çalışma grubu, diğer 70 kişi de kontrol grubu olarak sınıflandırılmıştır.

NAT2 polimorfizmleri analiz sonuçlarına göre hastalar üç fenotipe ayrılmıştır. Dört polimorfizm için de wild type genotipte olanlar hızlı asetilatör, polimorfizmlerden birisi için heterozigot genotipte olanlar orta asetilatör, birden fazla polimorfizm için heterozigot veya herhangi birisi için mutant genotipte olanlar yavaş asetilatör olarak sınıflandırılmışlardır.

Kontrol grubunda 14 (% 20) hastanın hızlı, 37 (% 52.85) hastanın orta ve 19 (% 27.10) hastanın yavaş asetilatör fenotipte olduğu belirlenmiştir. Çalışma grubundaki 30 hastadan 3' ünün (% 10) hızlı, 4' ünün (% 13.30) orta ve 23' ünün (% 76.60) yavaş asetilatör fenotipinde olduğu belirlenmiştir.

Kontrol ve çalışma grubu, hızlı, orta ve yavaş asetilatör fenotipleri açısından karşılaştırıldığında, aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı

olduğu ve çalışma grubunda yavaş asetilatör fenotipinin oldukça yüksek olduğu bulunmuştur.

Sonuç olarak, NAT2 genindeki polimorfizmler nedeniyle meydana gelen yavaş asetilatör fenotipi antitüberkölöz ilaç kaynaklı hepatotoksisite için risk faktörüdür. Yavaş asetilatörler hızlı asetilatörlere oranla ciddi hepatotoksik reaksiyonlara daha yatkındırlar. Bu nedenlerle, tüberkölöz tedavisi gören yavaş asetilatör fenotipindeki hastaların serum aminotransferaz düzeylerinin düzenli olarak takip edilmeleri gerekmektedir.



## 6.2. ABSTRACT

Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity is one of the most prevalent drug-induced liver injuries. Isoniazid is the major drug incriminated in this hepatotoxicity. Isoniazid is metabolized by N-acetyltransferase 2. However, the association of polymorphic NAT acetylator status and antituberculosis drug-induced hepatotoxicity is debatable.

To determine whether acetylator status is a risk factor for antituberculosis drug-induced hepatotoxicity, we genotyped *NAT2\*5A*, *NAT2\*6A*, *NAT2\*7A/B* and *NAT2\*14A* polymorphisms in 100 patients who received antituberculosis treatment.

Of the 100 patients with tuberculosis, 70 patients who didn't develop hepatotoxicity were classified as control group, and 30 patients who were diagnosed with antituberculosis-drug induced hepatotoxicity were classified as working group.

*NAT2* polymorphisms divided into three phenotypic groups according to the obtained analytical results. Patients who were genotyped as wild type for all of the four polymorphisms were classified as rapid acetylators. Whereas who were heterozygous for one of the polymorphisms were classified as intermediate acetylators, and those who were genotyped as mutant or heterozygous for more than one of the polymorphisms were classified as slow acetylators.

Among the 70 patients constituting the control group, 14 (% 20) patients were found as rapid, 37 (% 52.85) as intermediate and 19 (% 27.10) as slow acetylators. In contrast, among the patients constituting the working group, 3

(% 10) patients were found as rapid, 4 (% 13.3) as intermediate and 23 (% 76.7) as slow acetylators.

When the two groups were compared for their acetylator status, it was found that the difference was statistically significant. The percentage of the slow acetylator phenotype was very higher in the working group.

In conclusion, the slow acetylator status of NAT2 is a significant susceptibility risk factor for antituberculosis drug induced hepatotoxicity. Additionally, slow acetylators are prone to develop more severe hepatotoxicity than rapid acetylators. Regular monitoring of serum aminotransferase levels is mandatory in patients receiving antituberculosis treatment, especially in slow acetylators.

## 7.1. YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Akar, N. (1995). Klinik Moleküler Patolojiye Giriş, Antıp A.Ş., Ankara, 143-162
2. Aktoğlu, S., Yorgancıoğlu, A., Çırak, K. et. al. (1996). Clinical spectrum pulmonary and pleural tuberculosis: A Report of 5480 case, *Eur. Respir. Dis.*, 9: 2031-2035
3. Alarcon-Segovia, D., Fishbein, E., Alcala, H. (1971). Isoniazid acetylation rate and development of antinuclear antibodies upon isoniazid treatment, *Arthritis Rheum.*, 14: 748-752
4. Aynacıoğlu, A.Ş., Cascorbi, I., Mrozikiewicz, P.M., Roots, I. (1997). Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) genotypes in a Turkish population, *Pharmacogenetics*, 7: 327-331
5. Belli, D.A., Badawi, A.F., Lang, N.P., Ilett, K.F., Kadlubar, F.F., Hirvonen, A. (1995). Polymorphisms in the NAT1 Polyadenilation Signal, *Cancer Res.*, 55: 5226-5229
6. Benetos, A., Cambien, F., Gautier, S., Ricard, S., Safar, M., Laurent, S. et al. (1996). Influence of Angiotensin II type 1 Receptor Gene Polymorphism on the Effects of Peridnopril and Nitredipine on Arterial Stiffness in Hypertensive Individuals, *Hypertension*, 28: 1081-1084
7. Benetos, A., Gautier, S., Ricard, S., Topouchian, J., Asmar, R., Poirier, O. et al. (1996). Influence of Angitensin Converting Enzyme and Angiotensin II type 1 Receptor Gene Polymorphisms on Aortic Stiffness in Normotensive and Hypertensive Patients, *Circulation*, 94: 698-703



8. Benetos, A., Topouchian, J., Ricard, S., Gautier, S., Bonnardeaux, A., Asmar, R., et al. (1995). Influence of Angiotensin II type 1 Receptor Gene Polymorphisms on Aortic Stiffness in Never Treated Hypertensive Patients, *Hypertension*, 26: 44-47
9. Black, M., Mitchell, J.R., Zimmerman, H.J., Ishak, K.G., Epler, G.R. (1975). Isoniazid associated hepatitis in 114 patients, *Gastroenterology*, 69: 289-302
10. Blum, M., Grant, D.M., McBride, W., Heim, M., Meyer, U.A. (1990). Human Arylamine N-acetyltransferase Genes: Isolation, Chromosomal Localization and Functional Expression, *DNA Cell Biol.*, 9: 193-203.
11. Bouchardy, C., Mitrunen, K., Wikman, H., Husgafvel-Pursiainen, K., Dayer, P., Benhamou, S., Hirvonen, A. (1998). N-acetyltransferase NAT1 and NAT2 Genotypes and Lung Cancer Risk, *Pharmacogenetics*, 8: 291-298
12. Bulovskaya, L.N., Krupkin, R.G., Bochina, T.A., Shipkova, A.A., Pavlova, M.V. (1978). Acetylator Phenotype in Patients with Breast Cancer, *Oncology*, 35: 185-188
13. Bunschoten, A., Tiemersma, E., Schouls, L., Kampman, E. (2000). Simultaneous Determination of Polymorphism in N-Acetyltransferase 1 and 2 Genes by Reverse Line Blot Hybridization, *Analytical Biochemistry*, 285: 156-162
14. Byrd, C.R.B., Horn, B.R., Solomon, D.A., Griggs, G.A. (1979). Toxic effects of isoniazid in tuberculosis chemoprophylaxis: role of biochemical monitoring in 1,000 patients, *JAMA*, 241: 1239-1241

15. Carson, P.E.F., Flannagan, C.L., Ickes, C.E., Alving, A.S. (1956). Enzymatic Deficiency in Primaquine-Sensitive Erythrocytes, *Science*, 124: 484-485
16. Cartwright, R.A., Gkashan, R.W., Rogers, H.J., Ahmad, R.A., Barham-Hall, D., Higgins, E., Kahn, M.A. (1982). A role of N-acetyltransferase Phenotypes in Bladder Carcinogenesis: A Pharmacogenetic Epidemiological Approach to Bladder Cancer, *Lancet*, 2: 842-846
17. Cascorbi, I., Brockmoller, J., Mrozikiewicz, P.M., Bauer, S., Loddenkemper, R., Roots, I. (1996). Homozygous Rapid Arylamine NAT2 Genotype as a Susceptibility Factor for Lung Cancer, *Cancer Res.*, 56: 3961-3966
18. Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W. et al. (1993). Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer' s Disease in Late Onset Families, *Science*, 261: 921-3
19. Cross, F.S., Long, M.W., Banner, A.S., Snider, D.E. (1980). Rifampicine isoniazid therapy of alcoholic and nonalcoholic tuberculosis patients in U.S. Public Health Service cooperative therapy trial, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 122: 349-53
20. Delomenie, C., Sica, L., Grant, D.M., Krishnamoorthy, R., Dupret, J.M. (1996). Genotyping of the Polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) Gene Locus in Two Native African Populations, *Pharmacogenetics*, 6: 177-185
21. Dern, R.J., Beutler, E., Alving, A.S. (1954). The Hemolytic Effect of Primaquine, *J. Lab. Clin. Med.*, 44: 171-176

22. Destenaves, B., Thomas, F. (2000). New Advances in Pharmacogenomics, *Current Opin. Chem. Biol.*, 4: 440-4
23. Dickinson, D.S., Bailey, W.C., Hirschowitz, B.I., Soong, S.J., Eidus, L., Hidgkin, M.M. (1981). Risk factors for isoniazid induced liver dysfunction, *J. Clin. Gastroenterol.*, 3: 271-279
24. Dossing, M., Wilcke, J.T.R., Askgaard, D.S., Nybo, B. (1996). Liver injury during antituberculosis treatment: An 11 year study, *Tubercul. and Lung Disease*, 77: 335-40
25. Drodz, M., Gierek, T., Jesdryczko, A., Pilch, J., Piekarska, J. (1987). N-acetyltransferase Phenotype of Patients with Cancer of the Larynx, *Neoplasma*, 34: 481-484
26. Duguid, J. (1946). Expulsion of Pathogenic Organisms from the Respiratory Tract, *Br. Med. J.*, 1: 245
27. Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V., Raviglione, MC. (1999). Global Burden of Tuberculosis: Estimated Incidence, Prevalance and Mortality by Country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA*, 282: 677-686
28. Eichelbaum, M., Kroemer, H.K., Mikus, G. (1992). Genetically determined differences in drug metabolism as a risk factor in drug toxicity, *Toxicol. Lett.*, 64/65: 115-122
29. Ellard, G.A. (1976). Variations between individuals and populations in the acetylation of isoniazid and its significance for the treatment of pulmonary tuberculosis, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 19: 610-625
30. Ellard, G.A., Gammon, P.T. (1976). Pharmacokinetics of isoniazid metabolism in man, *J. Pharmacokinet. Biop.*, 4: 83-113

31. Erturan, S. (1999). Tüberküloz Hastasının İzlenmesi, *Erişkin ve Çocukta Tüberküloz Sempozyumu, İstanbul*
32. Evans, D.A. (1989). N-acetyltransferase, *Pharmac. Ther.*, 42: 157-234
33. Evans, D.A.P., Manley, K.A., McKusick, V.A. (1960). Genetic Control of Isoniazid Metabolism in Man, *BMJ.*, 2: 485-91
34. Evans, W.E., Relling, M.V. (1999). Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics, *Science*, 286:487-91
35. Farrel, G.C. (1994). Drug-Induced Acute Hepatitis, Edinburg: Churchill Livingstone, 247-299
36. Ferguson, R.J., Doll, M.A., Rustan, T.D., Gray, K., Hein, D.W. (1994). Cloning, Expression and Functional Characterization of two Mutant (NAT2 191 and NAT2 341/803) and wild type Human Polymorphic N-acetyltransferase (NAT2) Alleles, *Drug Metab. Dispos.*, 22: 371-376
37. Filliadis, I.F., Georgiou, I., Alamanos, Y., Kranas, V., Giannakopoulos, X., Lolis, D. (1999). Genotypes of NAT2 and Risk of Bladder Cancer: a Case Control Study, *J. Urol.*, 161: 1672-1675
38. Fox, W., Mitchison, D.A. (1975). Short-Course Chemotherapy for Pulmonary Tuberculosis, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 111: 325-353
39. Franke, S., Klawitz, I., Schnakenberg, E., Rommel, B. (1994). Isolation and Mapping a Cosmid Clone Containing the Human NAT2 Gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199: 52-55
40. Girling, D.J. (1982). Adverse Effects of Antituberculosis Drugs, *Drugs*, 23: 56-74
41. Goldstein D.B., Tate, S.K., Sisodiya, S.M. (2003). Pharmacogenetics Goes Genomic, *Nature Reviews/Genetics*, 4: 937-947

42. Gonzalez, M.V., Alvarez, V., Pello, M.F., Menendez, M.J., Suarez, C., Cota, E. (1998). Genetic Polymorphism of NAT2, GST-M1 and CYP P450IIE1 and P450IIB in the Susceptibility to Head and Neck Cancer, *J. Clin. Pathol.*, 51: 294-298
43. Grant, D.M., Hughes, N.C., Janezic, S.A., Goodfellow, G.H., Chen, H. J., Gaedigk, A. et al. (1997). Human Acetyltransferase Polymorphisms, *Mut. Res.*, 376: 61-70
44. Gronhagen-Riska, C., Hellstrom, P.E., Froseth, B. (1978). Predisposing factors in hepatitis induced by isoniazid-rifampicin treatment of tuberculosis, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 118: 461-466
45. Gurumurthy, P., Krishnamurthy, M.S., Nazareth, O., Parthasarathy, R., Sarama, G.R., Somasundaram, P.R., Tripathy, S.P. et al. (1984). Lack of relationship between hepatic toxicity and acetylator phenotype in three thousand south Indian patients during treatment with isoniazid for tuberculosis, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 129: 58-61
46. Hayes, R.B., Bi, W., Rothman, N., Broly, F., Caporaso, N., Feng, P., You, X., Yin, S., Woosley, R.S., Meyer, U.A. (1993). N-acetylation Phenotype and Genotype and Risk of Bladder Cancer in Benzidine-Exposed Workers, *Carcinogenesis*, 14: 675-678
47. Hein, D.W. (2002). Molecular Genetics and Function of NAT1 and NAT2: Role in Aromaticamine Metabolism and Carcinogenesis, *Mutation Research*, 506: 65-77
48. Hein, D.W., Charlene, Mcqueen, A., Grant, D.M., Goodfellow, G.H., Kadlubar, F.F., Weber, W.W. (2000). Pharmacogenetics of the

Arylamine N-Acetyltransferases, *Drug Metabolism and Disposition*, 28:  
1425-1432

49. Hein, D.W., Doll, M.A., Fretland, A.J., Leff, M.A., Webb, S.J., Xiao, G.H., Devanaboyina, U.S., Nangju, N.A., Feng, Y. (2000). Molecular Genetics and Epidemiology of the NAT1 and NAT2 Acetylation Polymorphisms, *Cancer Epidemiol., Biomark. Prev.*, 9: 29-42
50. Hein, D.W., Doll, M.A., Rustan, T.D., Ferguson, R.J. (1995). Metabolic Activation of N-hydroxyarylamines and N-hydroxyarylamides by 16 Recombinant Human NAT2 Allozymes: Effects of 7 Specific NAT2 Nucleic Acid Substitutions, *Cancer Res.*, 55: 3531-3536
51. Hein, D.W., Ferguson, R.J., Doll, M.A., Rustan, T.D., Gray, K. (1994). Molecular Genetics of Human Polymorphic N-acetyltransferase: Enzymatic Analysis of 15 Recombinant Human Wild type, Mutant and Chimeric NAT2 Allozymes, *Hum. Mol. Genet.*, 3: 729-734
52. Heindl, D., Huber, A., Marz, H. (2001). Labeling Hybridization Probes for LightCycler Applications, *Biochemica*, 1: 8-10
53. Herzog, H. (1998). History of Tuberculosis, *Respiration*, 65: 5-15
54. Hickman, D., Palamanda, J.R., Unadkat, J.D., Sim, E. (1995). Enzyme Kinetic Properties of Human Recombinant Arylamine N-acetyltransferase 2 Allotypic Variants Expressed in Escherichia Coli, *Biochem. Pharmacol.*, 50: 697-703
55. Hickman, D., Pope, J., Patil, S.D. et al. (1998). Expression of Arylamine N-acetyltransferase in Human Intestine, *Gut*, 42: 402-409

56. Hingorani, A.D., Brown, M.J. (1995). A Simple Molecular Assay for the C1166 Variant of the Angiotensin II type 1 Receptor Gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 347: 94-95
57. Hiratsuka, M., Kishikawa, Y., Takekuma, Y., Matsuura, M., Narahara, K., Inoue, T., Hamdy, S.I., Endo, N., Goto, J., Mizugaki, M. (2002). Genotyping of the NAT2 polymorphism in the prediction of adverse drug reactions to isoniazid in Japanese patients, *Drug Metabol. Pharmacokin.*, 17(4): 357-362
58. <http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html>.
59. Huang, Y.S., Chern, H.D., Su, W.J., Wu, J.C., Chang, S.C., Chiang, C.H., Chang, F.Y., Lee, S.D. (2003). Sitokrom P450 2E1 Genotype and the Susceptibility to Antituberculosis Drug-Induced Hepatitis, *Hepatology*, 37: 924-930
60. Huang, Y.S., Chern, H.D., Su, W.J., Wu, J.C., Lai, S.L., Yang, S.Y., Chang, F.Y., Lee, S.D. (2002). Polymorphism of the N-acetyl transferase 2 Gene as a Susceptibility Risk Factor for Antituberculosis Drug-Induced Hepatitis, *Hepatology*, 35: 883-889
61. Hubbard, A.L., Moyes, C., Wyllie, A.H., Smith, C.A., Harrison, D.J. (1995). NAT1 : Two Polymorphisms in Coding Sequence Identified in Colorectal Cancer Patients, *Br. J. Cancer*, 77: 913-916
62. Hughes, H.B., Biehl, J.P., Jones, A.P., Schmidt, L.H. (1954). Metabolism of Isoniazid in Man as Related to the Occurrence of Peripheral Neuritis, *Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.*, 70: 212-216
63. Hughes, N.C., Janezic, S.A., McQueen, K.L. et al. (1998). Identification and Characterization of Variant Alleles of Human

- Acetyltransferase NAT1 with Defective Function Using p-amino salicylate as an *in vivo* and *in vitro* Probe, *Pharmacogenetics*, 8: 55-56
64. Hwang, S.J., Wu J.C., Lee C.N., Yen, F.S., Lu, C.J., Lin, T.P., Lee, S.D. (1997). A Prospective Clinical Study of Isoniazid-Rifampicin-Pyrazinamide Induced Liver Injury in an Area Endemic for Hepatitis B, *Gastroenterol. Hepatol.*, 12: 87-91
65. Ilett, K.F., Detchon, P., Ingram, D.M., Castelden, W.M. (1990). Acetylation Phenotype is not Associated with Breast Cancer, *Cancer Res.*, 50: 6649-6651
66. Ishizaki, T., Horai, Y., Koya, G., Matsuyama, K., Iguchi, S. (1981). Acetylator phenotype and metabolic disposition of isoniazid in Japanese patients with systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.*, 24: 1245-1254
67. Jenne, J. (1965). Partial Purification and Properties of the Isoniazid Transacetylase in Human Liver: Its Relationship to the Acetylation of p-aminosalicylic acid, *J. Clin. Investig.*, 44: 1992-2002
68. Jenne, J.W. (2002). Partial Purification and Properties of the Isoniazid Transacetylase in Human Liver: Its Relationship to the Acetylation of p-aminosalicylic Acid, *J. Clin. Invest.*, 5: 24-29
69. Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society. Chemotherapy and Management of the Tuberculosis in the United Kingdom: Recommendations of the Joint Tuberculosis Committee of The British Thoracic Society. (1990). *Thorax*, 45: 403-408



70. Kalow, W., Staron, N., (1957). On Distribution and Inheritance of Atypical Forms of Human Serum Cholinesterase, as Indicated by Dibucaine Number, *Can. J. Biochem.*, 35: 1306-17
71. Kaufhold, A., Podbielski, A., Baumgarten, G., Blokpoel, M., Top, J. and Schouls, L. (1994). Rapid Typing of Group A Streptococci by the use of DNA Amplification and Non-Radioactive Allele-Specific Oligonucleotide Probes, *FEMS Microbiol. Lett.*, 119: 19-25
72. Kiter, G., Coşkunol, İ., Alptekin, S. ve ark. (2000). Tüberküloz tedavisi alan hastalarımızda karaciğer toksisitesi araştırması: 5 yıllık retrospektif değerlendirme, *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 48: 20-25
73. Kochi, A. (1991). The Global Tuberculosis Situation and the New Control Strategy of the World Health Organization, *Tubercle*, 72: 1-6
74. Kopanoff, D.E., Snider, D.E., Caras, G.J. (1978). Isoniazid related hepatitis A: US public health service cooperative surveillance study, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 117: 991-1001
75. Kumar, A., Misra, P.K., Mehotra, R. et. al. (1991). Hepatotoxicity of rifampicine and isoniazid. Is it all drugs induced hepatitis, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 143: 1350-1352
76. Ladero, J.M., Fernandez, M.J., Palmeiro, R., Munoz, J.J., Jara, C., Lazaro, C., Periz-Manga, G. (1987). Hepatic Acetylator Polymorphism in Breast Cancer Patients, *Oncology*, 44: 341-344
77. Lauterburg, B.H., Smith, C.V., Todd, E.L., Mitchell, J.R. (1985). Pharmacokinetics of the toxic hydrazine metabolites formed from isoniazid in humans, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 235: 566-570

78. Lazarou, J., Pomeranz, B., Corey, P. (1998). Incidence of adverse drug reactions in hospitalised patients: a metaanalysis of prospective studies, *J. Am. Med. Assoc.*, 279: 1200–1205
79. Lee, S.Y., Lee, K.A., Ki, C.S., Kwon, O.J., Kim, H.J., Chung, M.P., Suh, G.Y., Kim, J.W. (2002). Complete Sequencing of a Polymorphism in NAT2 in the Korean Population, *Clinical Chemistry*, 48: 775-777
80. Lee, WM. (1995). Drug-Induced Hepatotoxicity, *N. Engl. J. Med.*, 333: 1118-1127
81. Leeder, J.S., Kearn, G.L. (1997). Pharmacogenetics in pediatrics. Implications for practice, *Pediatr. Clin. North. Am.*, 44: 55-77
82. Leff, M.A., Fretland, A.J., Doll, M.A., Hein, D.W. (1999). Novel Human N-acetyltransferase 2 Alleles that Differ in Mechanism for Slow Acetylator Phenotype, *J. Biol. Chem.*, 274: 34519-34522
83. LightCycler System, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim/Germany
84. Lin, H.J., Probst-Hensch, N.M., Hughes, N.C. et al. (1998). Variants of NAT1 and a Case-Control Study of Colorectal Adenomas, *Pharmacogenetics*, 8: 269-281
85. Lohmann, S., Lehmann, L., Tabiti, K. (2000). Fast and Flexible Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Detection with the LightCycler System, *Biochemica*, 4: 23-28
86. Mahley, R.W. (1988). Apolipoprotein E: Cholesterol Transport Protein with Expanding Role in Cell Biology (Review), *Science*, 240: 622-630

87. Martinez, C., Agundez, J.A.G., Olivera, M., Martin, R., Ladero, J.M., Benitez, J. (1995). Lung Cancer and Mutations at the Polymorphic NAT2 Gene Locus, *Pharmacogenetics*, 5: 207-214
88. Matas, N., Thygesen, P., Stacey, M., Risch, A., Sim, E. (1997). Mapping AAC1, AAC2 and AACP, the Genes for Arylamine N-acetyl transferases, Carcinogen Metabolizing Enzymes on Human Chromosome 8p22, a Region Frequently Deleted in Tumors. *Cytogenet. Cell Genet.*, 77: 290-295
89. McLeod, H.L., Evans, W.E. (2001). Pharmacogenomics: Unlocking the Human Genom for Better Drug Therapy, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 41: 101-21
90. Miller, J.A., Thai, K., Scholey, J.W. (1999). Angiotensin II type 1 Receptor Gene Polymorphism Predicts Response to Losartan and Angiotensin II, *Kid. Int.*, 56: 2173-2180
91. Miller, R.D.P., Taillon-Miller, and P.Y. Kwok. (2001). Regions of Low Single-Nucleotide Polymorphism Incidence in Human and Orangutan Xq: Deserts and Recent Coalescences, *Genomics*, 71: 78-88
92. Mitchell, I., Wendon, J., Fitt, S., Williams, R. (1995). Anti tuberculosis therapy and acute liver failure, *Lancet*, 345: 555-556
93. Mitchell, J.R., Thorgeirsson, U.P., Black, M., Timbrell, J.A., Snodgrass, W.R., Potter, W.Z., Jollow, D.J. et al. (1975). Increased incidence of isoniazid hepatitis in rapid acetylators: possible relation to hydrazine metabolites, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 18: 70-79
94. Mitchell, J.R., Zimmerman, H.J., Ishak, K.G., Thorgeirsson, U.P., Timbrell, J.A., Snodgrass, W.R., Nelson, S.D. (1976). Isoniazid Liver

Injury: Clinical Spectrum, Pathology and Probable Pathogenesis, *Ann. Intern. Med.*, 84: 181-192

95. Mitchell, K.R., Warshawsky, D. (2003). Xenobiotic Inducible Regions of the Human Arylamin N-acetyltransferase 1 and 2 Genes, *Toxicology Letters*, 139: 11-23
96. Morita, S., Yano, M., Tasujinaka, T., Ogawa, A., Taniguchi, M., Kaneko, K., Shiozaki, H., Doki, Y., Inoue, M., Monden, M. (1998). Association Between Genetic Polymorphism of GST-P1 and NAT2 Susceptibility to Squamous-Cell Carcinoma of the Esophagus, *Int. J. Cancer*, 79: 517-520
97. Morita, S., Yano, M., Tasujinaka, T., Taniguchi, M., Kaneko, K., Miki, H., Fujii, T., Yoshino, K., Kusuoka, H., Monden, M. (1999). Genetic Polymorphisms of Drug-Metabolizing Enzymes and Susceptibility to Head and Neck Squamous-Cell Carcinoma, *Int. J. Cancer*, 80:685-688
98. Motulsky, A.G. (1957). Drug Reactions, Enzymes, and Biochemical Genetics, *J. Am. Med. Assoc.*, 165: 835-837
99. Moulding, T.S., Redeker, A.G, Kanel, G.J. (1989). Twenty isoniazid associated deaths in one state, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 140: 700-705
100. Mukae S, Aoki S, Itoh S, Iwata T, Ueda H, Katagiri T. (2000). Bradykinine receptor gene polymorphism is associated with ACE inhibitor related cough, *Hypertension*, 36: 127-137
101. Nyberg, F., Hou, S.M., Hemminki, K., Lambert, B., Pershagen, G. (1998). Glutathione S-transferase M1 and NAT2 Genetic Polymorphisms and Exposure to Tobacco Smoke in Nonsmoking and Smoking Lung

- Cancer Patients and Population Controls, *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 7: 291-298
102. O'Neil, W.M., Drobitch, R.K., MacArthur, R.D., Farrough, M.J., Doll, M.A., Fretland, A.J., Hein, D.W., Crane, L.R., Svensson, C.R. (2000). Acetylator Phenotype and Genotype in Patients HIV: Discordance Between Methods for Phenotype Determination and Genotype, *Pharmacogenetics*, 10(2): 171-182
103. Ohno, M., Yamaguchi, I., Yamamoto, I., Fukuda, T., Yokota, S., Maekura, Ito, M., Yamamoto, Y., Ogura, T., Maeda, K., Komuta, K., Igarashi, T., Azuma J. (2000). Slow N-acetyltransferase 2 genotype affects the incidence of isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 5(1): 99-100
104. Ohsako, S., Deguchi, T. (1990). Cloning and Expression of cDNAs for Polymorphic and Monomorphic Arylamine N-acetyltransferases from Human Liver, *J. Biol. Chem.*, 265: 4630-4634
105. Olsen, H., Mørland, J. (197). Ethanol-induced increase in drug acetylation in man and isolated rat liver cells, *Br. Med. J.*, 2: 1260-62
106. Ormerod, L.P. (1996). Hepatotoxicity of Antituberculosis Drugs, *Thorax*, 51: 111-113
107. Ortaköylü, G., Baloğlu, İ., Bahadır, A. ve ark. (1999). Tüberküloz tedavisi sırasında ortaya çıkan hepatotoksisite, *Tüberküloz Toraks*, 47:68-72
108. Özkara, Ş., Aktaş, Z. (1999). Türkiye'de Tüberkülozun Kontrolü İçin Kılavuz, *Ankara*, 21-32

109. Pande, J.N., Singh, S.P.N., Khilnani, G.C. et al. (1996). Risk factors for hepatotoxicity from antituberculosis drugs: A case-control study, *Thorax*, 51: 132-136
110. Parthasarathy, R., Sarma, G.R., Janardhanam, B., Ramachandran, P., Santha, T., Sivasubramanian, S., Somasundaram, P.R., et al. (1986). Hepatic toxicity in South Indian patients during treatment of tuberculosis with short-course regimens containing isoniazid, rifampicin and pyrazinamide, *Tubercle.*, 67: 99-108
111. Payton, M.A., Sim, E. (1998). Genotyping Human Arylamin NAT1: the Identification of Two Novel Allelic Variants, *Biochem. Pharmacol.*, 55: 361-366
112. Price Evans, D.A., Manley, K.A., McKusick, V.A. (1960). Genetic Control of Isoniazid Metabolism in Man, *Br. Med.*, 2: 485-491
113. Pompeo, F., Akane, E.B., Mushtaq, K.A., Sim, E. (2002). The Pharmacogenetics of NAT: Structural Aspects, *Pharmacogenomics*, 3 (1): 19-30
114. Reiser, A., Geyer, M., Miltenburg, R., Nauck, M., Tabiti, K. (1999). Mutation Detection Using Multi-color Detection on the Lightcycler System, *Biochemica*, 2: 12-15
115. Renegar, G., Rieser, P., Manasco, P. (2001). Pharmacogenetics: the Rx Perspective, *Expert Rev. Mol. Disgn.*, 1(3): 255-256
116. Risch, A., Wallace, D.M., Bathers, S., Sim, E. (1995). Slow N-acetylation Genotype is a Susceptibility Factor in Occupational and Smoking Related Bladder Cancer, *Hum. Mol. Genet.*, 4: 231-236

117. Roche Molecular Biochemicals. (2001). Lightcycler NAT2 Mutation Detection Kit: Pharmacogenetic Research, *Biochemica*, 1: 15-16
118. Rothman, N., Hayes, R.B., Bi, W., Caporaso, N., Broly, F., Woosley, R.L., Uin, S. et al. (1993). Correlation between *N*-acetyltransferase activity and *NAT2* genotype in Chinese males, *Pharmacogenetics*, 3:250-255
119. Rothman, N., Stewart, W., Caporaso, N.E., Hayes, R.B. (1993). Misclassification of genetic susceptibility biomarkers: implications for casecontrol studies and cross-population comparisons, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2: 299-303
120. Ryan, D.E., Ramanathan, L., Iida, S., Thomas, P.E., Haniu, M., Shively, J.E., Lieber, C.S. et al. (1985). Characterization of a Major form of Rat Hepatic Microsomal Cytochrome P-450 Induced by Isoniazid, *J. Biol. Chem.*, 260: 6385-6393
121. Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S., Kakol, J., Stein, L., Marth, G., Sherry, S., Mullikin, J., Mortimore, B., Willey, D., Hunt, S., Cole, C., Coggill, P., Rice, C., Ning, Z., Rogers, J., Bentley, D., Kwok, P., Mardis, E., Yeh, R., Schultz, B., Cook, L., Davenport, R., Dante, M., Fulton, L., Hillier, L., Waterston, R., McPherson, J., Gilman, B., Schaffner, S., Van Etten, W., Reich, D., Higgins, J., Daly, M., Blumenstiel, B., Baldwin, J., Stange-Thomann, N., Zody, M., Linton, L., Lander, E. and Altshuler, D. The International SNP Map Working Group. (2001). A Map of Human Genome Sequence Variation Containing 1.42 Million Single Nucleotide Polymorphisms., *Nature*, 409: 928–933

- 122.**Sadee, W. (1999). Pharmacogenomics, *BMJ.*, 319:1286
- 123.**Sagner, G., Goldstein, C., Miltenburg, R. (1999). Detection of Multiple Reporter Dyes in Real-time, On-line PCR Analysis with the LightCycler System, *Biochemica*, 2: 7-11
- 124.**Sardas, S., Cok, I., Sardas O.S, Ilhan. O., Karakaya, A.E. (1990). Polymorphic N-acetylation Capacity in Breast Cancer Patients, *Int. J. Cancer*, 46: 1138-1139
- 125.**Sarma, G.R., Immanuel, C., Kailasam, S., Narayana, A.S., Venkatesan, P. (1986). Rifampicine-induced release of hydrazine from isoniazid. A possible cause of hepatitis during treatment of tuberculosis with regimens containing isoniazid and rifampicine, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 133: 1072-1075
- 126.**Schaberg, T., Rebhen, K., Lode, H. (1996). Risk factors for side effect of isoniazid, rifampicine and pyrazinamide in patients hospitalized for pulmonary tuberculosis, *Eur. Respir. J.*, 9: 2026-2030
- 127.**Schachter, F., Faure-Delanef, L., Guenot, F., Rouger, H., Froguel, P., Lesueur-Ginot, L. et al. (1994). Genetic Associations with Human Longevity at the APOE and ACE Loci, *Nat. Genet.*, 6: 29-32
- 128.**Schmid, B., Bircher, J., Preisig, R., Kupfer, A. (1985). Polymorphic Dextromethorphan Metabolism: Co-segregation of Oxidative O-demethylation with Debrisoqin Hydroxylation, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 38: 618-24
- 129.**Smelt, V.A., Mardon, H.J., Sim, E. (1998). Placental Expression of Arylamin N-acetyltransferases: Evidence for Linkage Disequilibrium Between NAT1\*10 and NAT2\*A Alleles of the Two Human Arylamine



N-acetyltransferase Loci NAT1 and NAT2, *Pharmacol. Toxicol.*,  
83:149-157

130. Stakos, A.D., Bououlas, H. (2002). Pharmacogenetics and Pharmacogenomics in Cardiology (Editorials), *Hellenic J. Cardiol.*,  
43:1-15

131. Stoneking, M. (2001). Single Nucleotide Polymorphisms. From the Evolutionary Past, *Nature*, 15: 821-822

132. Sunahara, S., Urano, M., Ogawa, M. (1961). Genetical and geographic studies on isoniazid inactivation, *Science*, 134: 1530-1531

133. Tahaoğlu, K. (1998). Tüberküloz tedavisinde gelişen hepato toksisiteye klinik yaklaşım, *ANKEM*, 12: 378-83

134. Tahaoğlu, K., Ataç, G., Sevim, T. et al. (2001). The management of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*,  
5: 65-69

135. Thompson, N.P., Caplin, M.E., Hamilton, M.I. et al. (1995). Antituberculosis medication and the liver: dangers and recommendations in management, *Eur. Respir. J.*, 8: 1384-1388

136. Thompson, N.P., Hamilton, C.M.I., Gillespie, S.H., Clarke, S.W., Burroughs, A.K., McIntyre, N. (1995). Anti-tuberculosis medication and the liver: dangers and recommendations in management, *Eur. Respir. J.*, 8: 1384-1388

137. Ungo, R.J., Jones, D., Ashkin, D. et al. (1998). Antituberculosis Drug induced Hepatotoxicity, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157: 1871-1876

138. Ursavaş, A., Uzaslan, E.K., Ediger, D., Coşkun, F., Sağlam, A., Rodoplu, E., Yıldız, F., Ege, E., Özyardımcı, N. (2003). Tüberküloz

Tedavisinde Hepatotoksisiteyi Arttıran Risk Faktörlerinin Belirlenmesi,  
*Akciğer Arşivi*, 4: 202-206

- 139.Utermann, G., Langenbeck, U., Beisiegel, U., Weber, W. (1980). Genetics of the Apolipoprotein E System in Man, *Am. J. Hum. Genet.*, 32: 339-347
- 140.Utkaner, G., Yılmaz, U., Yalnız, E. ve ark. (1999). İzoniazid, rifampisin ve morfozinamid hepatotoksisitesinin yaş ve cinsiyet ile ilişkisi, *Tüberküloz Toraks Dergisi*, 47: 329-35
- 141.Vatsis, K.P. and Weber, W.W. (1994). Human Acetyltransferases, Conjugation-Deconjugation Reactions in Drug Metabolism and Toxicity, *Springer-Verlag, Berlin*, 109-130
- 142.Vatsis, K.P. and Weber, W.W. (1997). Acetyltransferases, *Comprehensive Toxicology*, 3: 385-399
- 143.Weber, W.W. (1987). The Acetylator Genes and Drug Response, *Oxford University Press, New York*
- 144.Webster, D.J., Flook, D., Jenkins, J., Hutchings, A., Routledge, P.A. (1989). Drug Acetylation in Breast Cancer, *Br. J. Cancer*, 60: 236-237
- 145.Weisgraber, K.H., Rall, S.C., Jr. Mahley, R.W. (1981). Human E Apolipoprotein Heterogeneity. Cysteine-Arginine Interchanges in the Aminoacid Sequence of the Apo E Isoforms, *J. Biol. Chem.*, 256: 9077-9083
- 146.WHO. (2002). Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing. Communicable Diseases, World Health Organization, Geneva, WHO/CDS/TB/2002.295

147. Williams, J.A., Stone, E.M., Fakis, G. et al. (2001). N-acetyl transferases, Sulfotransferases and Heterocyclic Amine Activation in the Breast, *Pharmacogenetics*, 11: 373-388
148. Wilson, P.W., Schaefer, E.J., Larson, M.G., Ordovas, J.M. (1996). Apolipoprotein E Alleles and Risk of Coronary Disease. A Meta Analysis, *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, 16: 1250-1255
149. Wong, W.M., Wu, P.C., Yuen, M.F., Cheng, C.C., Yew, W.W., Wong, P.C., Tam, C.M. et al. (2000). Antituberculosis drug-related liver dysfunction in chronic hepatitis B infection, *Hepatology*, 31: 201-206
150. Wu, J.C., Lee, S.D., Yeh, P.F., Chan, C.Y., Wang, Y.J., Huang, Y.S., Tsai, Y.T. et al. (1990). Isoniazid-Rifampicin Induced Hepatitis in Hepatitis B Carriers, *Gastroenterology*, 98: 502-504
151. Yamamoto, T., Suou, T., Hirayama, C. (1986). Elevated serum aminotransferase induced by isoniazid in relation to isoniazid acetylator phenotype, *Hepatology*, 6: 295-298
152. Yurdakul, A.S., Çalışır, H.C., Taci, N., Çelik, N., Öğretensoy, M. (2003). Tüberküloz Tedavisi Sırasında Gelişen Hepatotoksisite, *Toraks Dergisi*, 4: 016-020
153. Zhou, G., Kamahori, M., Okano, K., Chuan, G., Harada, K., Kambara, H. (2001). Quantitative Detection of Single Nucleotide Polymorphisms for a Pooled Sample by a Bioluminometric Assay Coupled with Modified Primer Extension Reactions (BAMPER), *Nucleic Acids Res.*, 29: E93
154. Zielinska, E., Bodalski, J., Niewiarowski, W., Bolanowski, W., Matusiak, I. (1999). Comparison of acetylation phenotype with

genotype coding for *N*-acetyltransferase (NAT2) in children, *Pediatr. Res.*, 45: 403-408

**155.**Zielinska, E., Niewiarowski, W., Bodalski, J., Rebowski, G., Skretkowicz, J., Mianowska, K., Sekulska, M. (1998). Genotyping of the arylamine *N*-acetyltransferase polymorphism in the prediction of idiosyncratic reactions to trimethoprim-sulfamethoxazole in infants, *Pharm. World Sci.*, 20: 123-130

**156.**Zimmerman, H.J. (1999). Hepatic Injury from the Treatment of Infectious and Parasitic Disease, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 589-637



## 7.2. KISALTMALAR

**A:** Adenin

**ACE:** Angiotensin Converting Enzim

**ADR:** Adverse Drug Reaction

**ALT:** Alanin Transaminaz

**Arg:** Arjinin

**Asn:** Asparajin

**ASO:** Alel Spesifik Oligonükleotid

**Asp:** Aspartik asit

**AST:** Aspartat Transaminaz

**bp:** Baz çifti

**C:** Sitozin

**Cys:** Sistein

**Del:** Delesyon

**DM:** Diabetes Mellitus

**DNA:** Deoksirionükleik asit

**dsDNA:** Çift iplikli DNA

**EDTA:** Etilen Diamin Tetraasetik Asit

**FRET:** Fluorescence Rezonans Enerji Transferi

**G:** Guanin

**Gln:** Glisin

**Glu:** Glutamin

**G6PDH:** Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz

**HCV:** Hepatit C Virüsü

**İns:** İnsersiyon

**Ile:** İzolösin

**kb:** Kilobaz

**KCFT:** Karaciğer Fonksiyon Testleri

**LC:** LightCycler

**LED:** Light Emitting Diode

**Leu:** Lösin

**Lys:** Lizin

**NAT:** N-Asetiltransferaz

**PCR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**Phe:** Fenilalanin

**Pro:** Prolin

**RE:** Restriksiyon Enzimi

**RFLP:** Restriction Fragment Length Polymorphism

**RLB:** Reverse Line Blot

**SNP:** Single Nükleotid Polymorphism

**T:** Timin

**Thr:** Threonin

**Tm:** Erime Sıcaklığı

**Trp:** Triptofan

**Val:** Valin