

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Lokman AYAZ

**PERKÜTAN KORONER GİRİŞİM SONRASI
KLOPIDOGREL DİRENCİNİN CYP2C9 VE CYP2C19
GENLERİNİN KOPYA SAYISI VARYASYON (CNV) İLE
İLİŞKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Seyhan ŞAHİN

Referans no: 10128327

EDİRNE-2019

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Lokman AYZ

**PERKÜTAN KORONER GİRİŞİM SONRASI
KLOPIDOGREL DİRENCİNİN CYP2C9 VE CYP2C19
GENLERİNİN KOPYA SAYISI VARYASYON (CNV) İLE
İLİŞKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Seyhan ŞAHİN

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2016/264

Tez No:

EDİRNE-2019

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç.Dr Lokman AYZ danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Seyhan Şahin tarafından tezbaşığı “Perkütan koroner girişim sonrası klopidogrel direncinin CYP2C9 ve CYP2C19 genlerinin kopya sayısı varyasyon (CNV) ile ilişkisi” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 13/05/2019 tarihinde yapılarak aşğıdaki jüri üyeleri tarafından “**Yüksek Lisans Tezi**” olarak kabul edilmiştir.

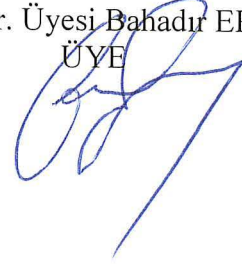


Doç. Dr. Lokman AYZ
JÜRİ BAŞKANI



Prof. Dr. Suat ERDOĞAN
ÜYE

Dr. Öğr. Üyesi Bahadır ERCAN
ÜYE



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü V.



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin ve tez çalışmam boyunca yardımını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalı öğretim üyesi danışman hocam sayın Doç. Dr. Lokman AYZ' a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Mustafa A. YILMAZTEPE' ye ve Asistan Dr. arkadaşlara yardım ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Ayrıca bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip olan aileme ve desteklerinden dolayı TÜBAP birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
KORONER ARTER HASTALIĞI	3
KOPYA SAYISI VARYASYONU	12
GEREÇ VE YÖNTEM	14
BULGULAR	21
TARTIŞMA	26
SONUÇ	29
ÖZET	31
SUMMARY	32
KAYNAKLAR	33
ŞEKİLLER LİSTESİ	40
ÖZGEÇMİŞ	42
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

KAH	: Koroner Arter Hastalığı
PKG	: Perkütan Koroner Girişim
CYP450	: Cytochrome P450
CNV	: Copy number variation
LDL	: Low-density lipoprotein
ADP	: Adenozin difosfat
MI	: Miyokard Infarktüsü
AKŞ	: Açlık Kan Şekeri
KZ	: Kapanma Zamanı
cAMP	: cyclic AMP
HDL-K	: High-density lipoprotein-Kolesterol
LDL-K	: Low-density lipoprotein-Kolesterol
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PKA	: Platelet fonksiyon analizer
RT-PZR	: Real Time Polimeraz zincir reaksiyonu
OD	: Optik dansite
ΔCt	: Delta Ct

GİRİŞ ve AMAÇ

Aterosklerozun koroner arterlerde meydana gelmesi ile oluşan hastalığa koroner arter hastalığı (KAH) denilmektedir. Ateroskleroz, arterlerde “aterom” veya “plak” olarak adlandırılan, damarların içyapısında meydana gelen bozukluklara (lezyonlara) neden olan kronik bir hastalıktır (1,2). Plaklardaki bu dejenerasyon ile tromboz meydana gelir, bu olaya da aterotromboz denilmektedir. Oluşan trombüsler sonucunda göğüs ağrısı, geçici iskemik ataklar, miyokart infarktüsü (MI) ve felç gibi klinik durumlar gerçekleşebilmektedir (3). Yaşamsal sonuçlar oluşturan bu trombüsü engellemek için belli yolakları hedefleyen ve anti-trombosit ilaçlar kullanan, bazı tıbbi tedavi yöntemleri geliştirilmiş ve halen geliştirilmeye devam edilmektedir (4).

Koronerlerdeki kan akımını engelleyen plaklara karşı, kalbin gereksinimi olan kan akışını temin edebilmek için başlıca iki yöntem vardır. Bunlar; koroner anjiyografi ile balon anjiyoplasti sonrası stent yerleştirilmesi, diğeri ise koroner arter bypass greftleme'dir (5). Agregasyonun yol açacağı tromboz, yeni iskemik olaylara ve ani ölümlere neden olabilir. Bundan dolayı, perkütan koroner girişim (PKG) ile arteri açmanın yanında antiagregan ya da antitrombosit uygulanması yaşamsal önem taşımaktadır (6). PKG geçiren hastalarda antitrombosit tedavi için klopidogrel ve aspirin kullanılması stent trombozunun azaltılması önemli bir stratejidir (6,7).

Klopidogrel, tiyenopiridin grubu bir ilaç olup, trombositlerdeki P2Y12 reseptörünü irrevesibl olarak seçici bloke etmektedir (8).

Bir pro-ilaç olan klopidogrelin bağırsaktan emilimi, P-glikoprotein pompası tarafından sınırlı şekilde oluşmaktadır. Klopidogrel aktif metabolitine dönüşmek için karaciğerdeki sitokrom P450 (CYP450) enzimleri, tarafından biyotransformasyona uğrayarak

aktif formuna dönüştürülür (9).

Bu transformasyon iki basamakta gerçekleşir. İlk basamakta CYP2B6, CYP2C9 ve CYP1A2 enzimleri yer alırken, CYP2B6, CYP3A4/5, CYP2C9 ve CYP 2C19 enzimleri ise ikinci basamakta yer almaktadır. Bu enzimleri kodlayan genlerde olası varyasyonların klopidogrel metabolizmasını etkileyebileceği düşünülerek, direnç gelişiminde genetik araştırmalar ön plana çıkmıştır (9, 10-12).

Klopidogrel karşı direnç oluşmasında iki mekanizma sorumlu tutulmuştur. Bu mekanizmalar iç ve dış olarak iki gruba ayrılır. Dış mekanizmalar (genetik olmayan faktörler) klopidogrel biyoyararlılığının azalmasına neden olan düşük doz kullanımı, tedaviye uyumsuzluk, yetersiz ilaç dozu, ilaç emilimi ve metabolizmadaki değişiklikler ve ilacın biyodönüşümünü etkileyen ilaç etkileşimleridir. İç mekanizmalar (genetik faktörler) ise, klopidogrel biyolojik ve metabolik aktivitesini sağlayan enzim ve reseptörleri kodlayan genlerdeki polimorfizm olabilir. Yapılan çalışmalarda, bazı polimorfizmlerin klopidogrel antitrombotik aktivitesini etkilediği, bu etkiye bağlı olarak bireyler arasında klopidogrel yanıtın farklılıklar oluşturduğu gösterilmiştir (13).

Copy number variation (CNV), iki veya daha fazla genom ile karşılaştırıldığında kopya sayısı değişikliği gözlenen DNA bölgeleri olarak adlandırılmaktadır (14). CNV'lerin insan genomunun neredeyse %12'sini oluşturduğu ve bunların hastalıklara neden olduğu düşünülmektedir (14). Bazı çalışmalarda, CNV'ler bağışıklık, enfeksiyon, nöropsikiyatrik ve kardiyovasküler gibi yaygın hastalıklarla ilişkilendirilmiş. Kopya sayısı değişikliklerinin birçok hastalığa neden olduğu gösterildiği gibi bazı hastalıklar için de risk faktörü olduğu bildirilmiştir (15,16). Bazı farmokogenetik genler CNV'lerin ilaç etkinliği ve toksisite üzerinde önemli rol oynamaktadır (17). CNV'lerin ilaç etkinliği ve toksisitesi üzerindeki etkinliği farklı etnik popülasyonlardaki prevanlası bulunmaktadır (14). Yapılan literatür taramasında şimdiye kadar CYP CNV ile klopidogrel ilaç metabolizması üzerinde ilişkisi araştırılmamıştır. Bu çalışmada, PKG ile başvuran hastalarda platelet fonksiyon analizer (PFA)-100 innovance P2Y kiti kullanılarak klopidogrel ilaç direnci oluşan ve oluşmayan bireylerdeki CYP2C9 ve CYP2C19 genlerin CNV arasındaki ilişki ortaya konulacaktır.

GENEL BİLGİLER

KORONER ARTER HASTALIĞI

Kalbi besleyen koroner arterlerin, beslediği bölgelere yeterli kan taşıyamaması sonucu, miyokartta oluşan iskemi ve nekrozun derecesine göre gelişen hastalıklar ve bunların komplikasyonları KAH başlığı altında incelenmektedir. KAH'nın esas nedeni ateroskleroz sonucu koroner arterlerin daralması ve tıkanması olduğundan KAH'nı belirtmek için genellikle aterosklerotik 'koroner kalp hastalığı' ifadesi de kullanılmaktadır (2,18).

Ateroskleroz

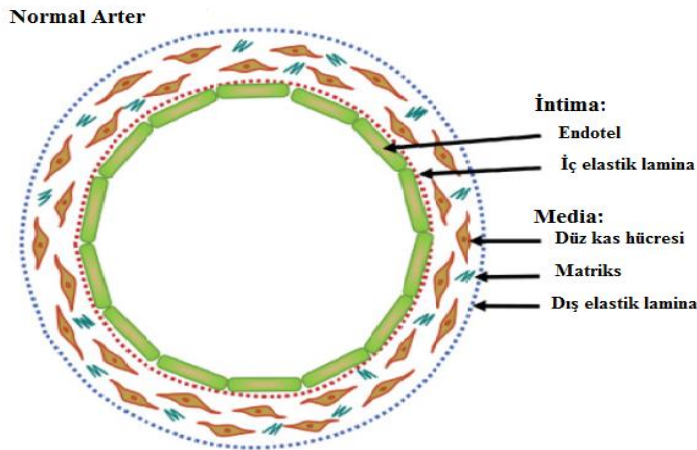
Ateroskleroz, arterlerde "aterom" veya "plak" olarak adlandırılan, damarların iç yapısında meydana gelen bozukluklara (lezyonlara) neden olan kronik hastalığa verilen addır (1). Plaklardaki bu dejenerasyon ile tromboz meydana gelir, bu olaya da aterotromboz denilmektedir. Oluşan trombüsler sonucunda göğüs ağrısı, geçici iskemik ataklar, MI, ve felç gibi durumlar ortaya çıkmaktadır a neden olmaktadır (3). Günümüzde damar sertleşmesi olarak bilinen ateroskleroz KAH'nın bir çeşididir (19).

Ateroskleroz, arter duvarlarının kalınlaşıp elastikiyetlerini kaybetmesi ile sonuçlanan ve üç çeşit hastalığa verilen bir isimdir. Bunlardan birincisi; büyük ve orta arterleri etkilemekte olup hastalığın en yaygın olanıdır. İkincisi, küçük arter duvarlarının kalınlaşması ile sonuçlan ve böbrekler üzerinde daha fazla etkili olmaktadır. Son olarak Mönckeberg arteriyoskleroza ise, küçük ve orta arterlerin duvarlarında görülür. Damarların iç kısmında biriken kalsiyum nedeniyle sertleşme olur ve arter duvarlarında herhangi bir daralma olmaz (19). Ateroskleroz uzun yıllardan beri insanlarda görülen ve insanların yaşamlarını zorlaştıran bir hastalık olmuştur. Geçmişte Mısır uygarlığından günümüze kadar ulaşan mumyalar incelendiğinde de bunların üzerinde; aort, koroner ve periferik damarlar üzerinde bulunan

dejeneratif bulgulara dayanılarak anlaşılmış (20).

Eski Mısırlılardaki lezyonlar incelendiğinde, bugünkü patolojik bulguların, gözlemlenenlerden farklı olmadığı tespit edilmiştir. 19. yüzyılın başlarında araştırmacılar kardiyovasküler hastalıkları daha yakından incelemeye başladılar. 1829 yılında ateroskleroz terimi ilk kez, bir cerrah ve patolog olan Jean Lobstein tarafından bütün dünyaya tanıtılmıştır (21). 19. yüzyılda farklı görüşlere sahip iki patolog Carl von Rokitansky ve Rudolf Virchow, aterosklerotik damar çeperlerinde hücresel bazı farklılıklar olduğunu gözlemlemişler ve açıklamışlardır. Von Rokitansky ise bu değişimlerin damarların doğal yapısından dolayı ortaya çıktığını söylese de, Virchow aterosklerozun oluşumunda bu değişikliklerin primer rol oynadığı görüşünü desteklemiştir. 1910'da ise Windaus, aterosklerotik plakların kolesterolden ve kalsifiye bağ dokudan oluştuğunu gözlemlemiştir. Kolesterol bulgusundan 3 yıl sonra ise, Anitschkow ve Chaltow tavşan deneklerini kolesterolden zengin bir diyet ile besleyerek, tavşanlarda deneysel olarak aterosklerozu oluşturmayı başarmışlardır (21).

Aterosklerozun patogenezi: Arter duvarı, iç içe bulunan iki katman olan media ve intima'dan oluşmaktadır (Şekil 1). Lümeni çevreleyen en içteki tabaka intima'dır. İntima yan yana sıra biçiminde dizilmiş endotel hücreleri, bunları destekleyen subendotelyal matriks ve bazal membrandan oluşur. Diğer memelilerden farklı olarak, insan intimasına özel olarak az sayıda düz kas hücresi de bulunmaktadır. Endotel tabakası, kardiyovasküler fonksiyonların olağan akışında ilerlemesini sağlamaktadır. İntimanın anatomik durumu ve morfolojik yapısı sayesinde, selektif geçirgen-engel olarak görev yapmaktadır. İntima tabakasında bulunan ekstraselüler matriks bileşeni de, iç elastik lamina olarak isimlendirilmektedir. İç elastik laminanın alt kısmında media bulunur ve orta tabaka olarak görev yapar. Arter duvarının ikinci tabakası olan media, intimadan internal elastik membran ile ayrılan orta tabakadır (22).

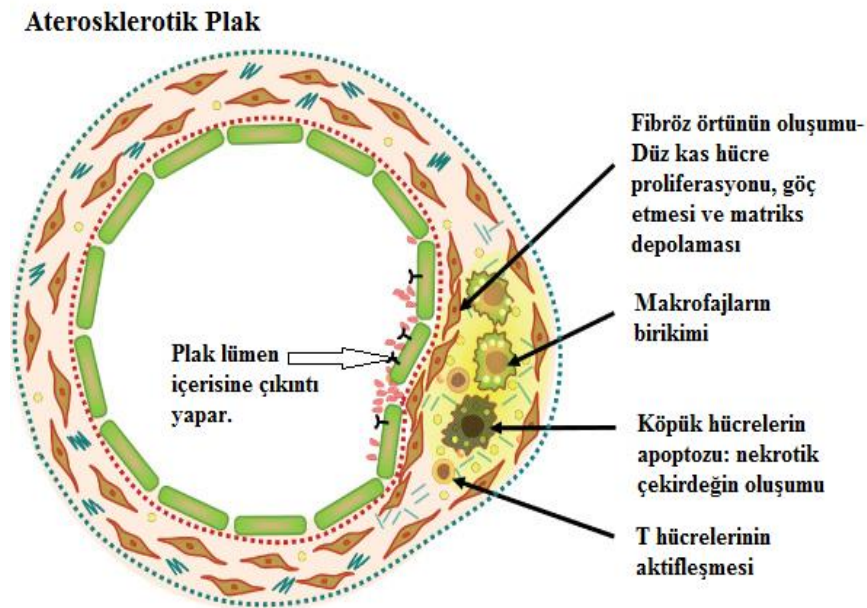


Şekil 1. Normal arter duvarı (22).

Yaygın olarak kabul edilen varsayımlara göre, çeşitli risk faktörleriyle başlatılan endotel hasar lipitlerin ve inflamatuvar hücrelerinin arter duvarına girişini sağlamaktadır (2). Dolaşımındaki monosit hücreler arter duvarı içinde bulunan ve lipitleri yutan makrofajlara farklılaşarak köpük hücreler oluşturmaktadır. Bunun sonucunda, yağlı çizgiler olarak ifade edilen lezyonlar meydana gelmektedir. Bu durum aterosklerozun başlangıcı olarak kabul edilmektedir. Bu lezyonlar, aterosklerotik plakların oluşumuna öncülük edebildiği gibi, ufalarak aterosklerotik plaklara dönüşmeyebilir (22).

Yağlı çizgilerin oluşmasında, trombositlerin hasarlı endotel katmana yapışması ve granüllerini salgılamaya başlamaktadır ve bu arotromboz olarak adlandırılır. Makrofajlar ise arter duvarı içerisindeki okside low-density lipoproteinleri (LDL) içine alarak köpük hücreye dönüşmektedir (22).

Lipit miktarının artmasıyla tıkanan köpük hücreleri, ölmeye ve içindeki sıvıyı salmaya başlar. Bunun sonucunda nekrotik bir çekirdek oluşumu desteklenmiş olur. Köpük hücrelerin sitoplazmik içeriğinin salınımı proinflamatuvar ekstraselüler lipitlerin ve büyüme faktörlerinin toplanmasına yol açar. Bundan sonra, düz kas hücreleri intima içerisine taşınması ile çoğalarak ekstraselüler matriks birikimine neden olur ve fibröz bir başlığın meydana gelmesini uyarır. Lipit çekirdek ve onun etrafında yer alan fibröz başlıktan oluşan bu ilerlemiş aterosklerotik lezyona “fibroaterom” adı verilmektedir (22). Aterosklerotik plak oluşumu Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2. Aterosklerotik plak oluşumu (22).

Aterosklerotik plakların farklılaşması ile tromboz oluşmasına aterotromboz denir. Tromboz ise endotel hücre hasarı sebebiyle trombositlerin uyarılıp bir araya gelerek kümeleşmeleri (agregasyon) sonucunda bir kitle (trombüs) meydana getirmesidir. Meydana gelen bu trombüsler, arterleri tıkayarak anjina, felç, MI gibi olaylara neden olabilirler (3).

KAH Gelişiminde Rol Alan Risk Faktörleri

KAH'da önemli bir yer tutan "Framingham Kalp Çalışması"nın epidemiyolojik kohort verileri sonucunda da "kardiyovasküler risk faktörleri" ilk kez belirlenmiştir. Bunlar aterosklerozun başlamasını, ilerlemesini ve komplike şekle dönüşmesini kolaylaştırmakta ve aynı zamanda yan yana geldikleri zaman vasküler olayları arttıran etkenlerdir (23).

Koroner arter hastalığı, birçok risk faktörüyle oluşan multifaktöriyel bir hastalıktır. Risk faktörü kavramı ise yaşam şekli, fizyolojik ve biyokimyasal olayları kapsamaktadır (24).

KAH'da önemli rol alan aterosklerozun etyopatolojisi tam olarak açıklanamamıştır. Ancak gelişiminde rol oynayan bazı kritik risk faktörleri belirlenmiştir (25). KÂH gelişiminde rol oynayan; aile öyküsü, yaş ve cinsiyet gibi değiştirilemeyen ve sigara, obezite, sedanter yaşam, diabetes mellitus, hipertansiyon ve hiperkolesterolemi gibi değiştirilebilen risk faktörleri mevcuttur. Bunun dışında doku plazminojen aktivatörü, plazminojen aktivatör inhibitör-1, LDL, apo-B, homosistein, lipoprotein-a, high sensitif C-reaktif protein ve miyeloperoksidaz gibi yeni risk faktörleri de kullanılmaya başlanmıştır (26). Toplumlarda KAH'nın oluşumunun altında yatan sebepler içersinde doymuş yağ içeren besinler alımı, sigara kullanımı ve fiziksel aktivitenin olmayışı da vardır. Aynı zamanda genetik özellikler de ateroskleroza yatkınlıkta önemli bir faktör olarak yer almaktadır (27).

Koroner Arter Hastalığının Tanısı

Koroner arter hastalığının en yaygın belirtisi anjina pektoristir. KAH'nın tanısında hastanın öyküsü, elektrokardiyografi, nükleer tıp, efortesti, koroner anjiyografi ve radyodiagnostik testler kullanılmaktadır. Bu testler arasında koroner anjiyografi, kesin teşhisi ve ihtiyaç duyulan tedavi hakkında gerekli bilgiyi sağlamaktadır (5).

Koroner arter hastalığında koroner anjiyografi: KAH'a tanı koymak için çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Günümüzde bunlardan en çok kullanılanı koroner anjiyografidir. Koroner anjiyografi, koroner arterlerde plak varlığını anatomik olarak ortaya çıkaran güvenilir metottur. İlk kez 1959 yılında Dr. Mason Sones ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır (28).

Koroner anjiyografi, periferik bir artere yerleştirilen kateterlerin koroner arterin merkezine kadar ilerletilmesi ve içerisinden radyopak maddeler verilerek, damarın X-ray altında lümen anatomisinin radyografik olarak görüntülenmesidir. Koroner anjiyografide ortaya çıkarılan lezyonların yorumlanması genellikle uzman deneyimine göre subjektif olarak değerlendirilmektedir. Lezyonlar sol ön inen, sağ koroner ve sol sirkumfleks arterlerde darlık > %70 ve sol ana koroner arterde darlık > %50'den büyükse tıkanıklığın kritik olduğu kabul edilir (29).

Tedavi Yöntemleri

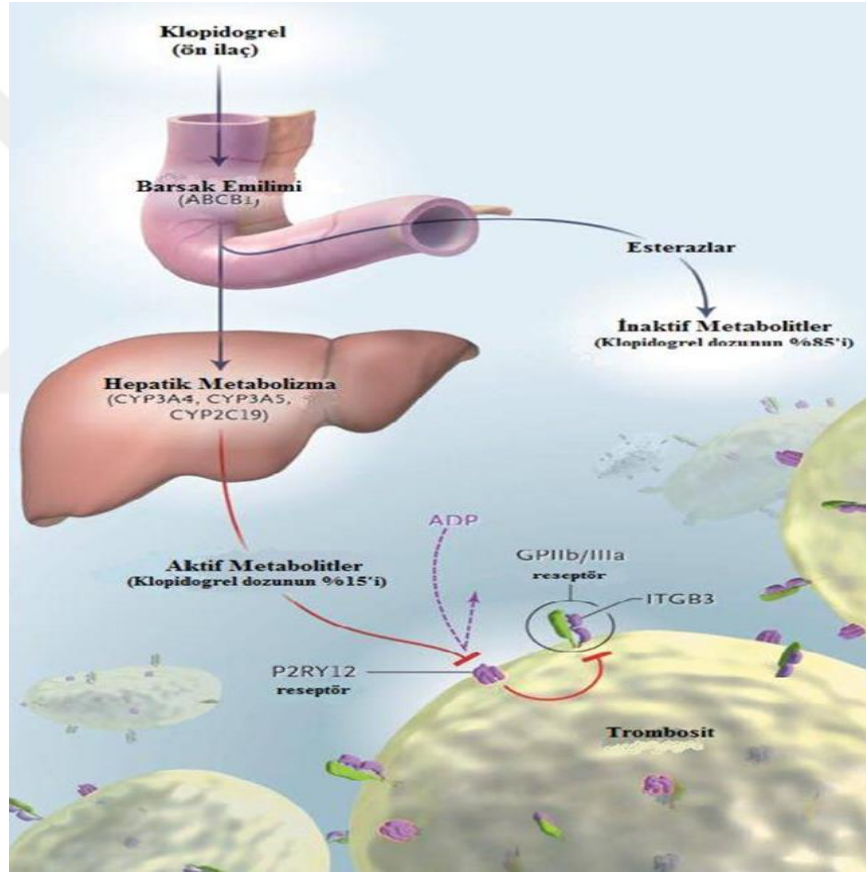
Koronerlerdeki kan akımını engelleyen plaklara karşı, kalbin ihtiyacı olan kan akışını sağlayabilmek için o bölgeye fiziksel müdahale olarak görülen başlıca iki yöntem vardır. Bunlar; koroner anjiyografi ile balon anjiyoplasti sonrası stent yerleştirilmesi, diğeri ise koroner arter bypass greftleme'dir (5).

Balon anjiyoplasti (Perkütanöz translüminal koroner anjiyoplasti): Balon anjiyoplasti ve stent implantasyonu ilaç ile desteklenmesi gerekmektedir. Çünkü bu PKG gibi fiziksel müdahaleler, endotel altı ekstraselüler matriks bileşenlerini ortaya çıkarmakta ve kollajen ve Von-Willebrand faktörü gibi bileşenler trombositlerin arter duvarına yapışmasını sağlamaktadır. Glikoprotein reseptörleri olan GPVI ve GPIb/V/IX aracılığı ile endotel altı bileşenlere bağlanan trombositler için agregasyonun başlatma sinyali verilir. Buda trombositlerden adenosin difosfat (ADP), tromboksan A2 ve trombin gibi bir dizi lokal uyarıcının salınımı başlatmış olur (4, 30).

Agregasyonun yol açacağı tromboz, yeni iskemik olaylara ve ani ölümlere neden olabilir. Bundan dolayı, PKG ile arteri açmanın yanında antiagregan ya da antitrombosit uygulanması yaşamsal önem taşımaktadır (6). PKG geçiren hastalarda antitrombosit tedavi için klopidogrel ve aspirin ile kullanılması stent trombozunun azaltılması yaşamsal bir stratejidir (6, 7). Aspirin, anti-trombotik olarak en fazla kullanılan bir ilaç olup, trombositlerdeki siklooksijenaz enzimini irrevesibl olarak bloke ederek etkisini göstermekte ve tromboksan A2'nin sentezini engellemektedir. Klopidogrel ise ADP'ye bağlı trombosit agregasyonunu önlemektedir. Bunu da P2Y12 reseptörüne bağlanarak geri dönüşümsüz agregasyonda rol alır (7). Aterotrombozun önlenmesinde en yaygın olarak kullanılan ilaç klopidogreldir. Diğer ilaçlara nisbeten daha iyi olduğu, aynı zamanda etkinliğinin benzer ve yan etki diğerlerine göre daha az olmasından dolayı klopidogrel tercih edilmektedir (31).

Klopidogrel: Klopidogrel, tıyenopiridin grubu bir ilaç olup, trombosit P2Y12

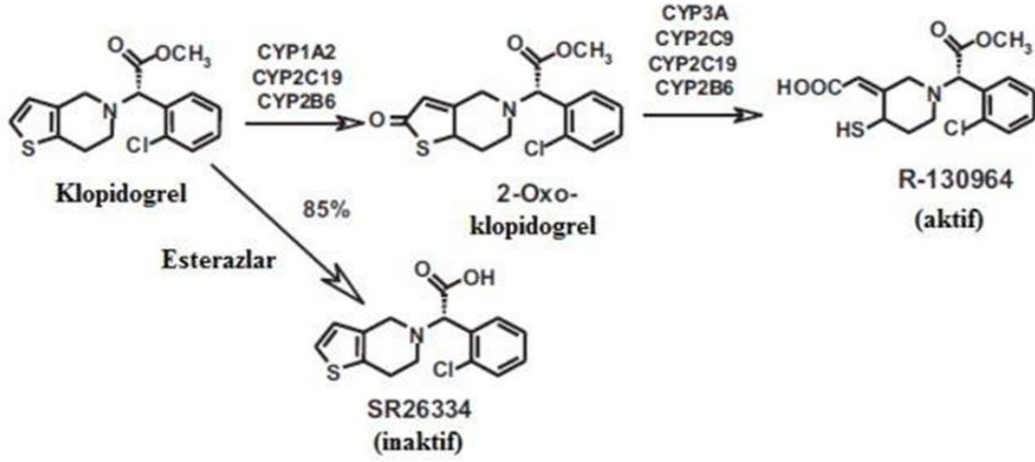
reseptörünü irrevesibl olarak bloke etmektedir. Bu grup ilaçlar KAH, periferik damar ve serebrovasküler gibi hastalıkların tedavisinde antitrombotik ajan olarak kullanılmaktadırlar (8). Klopidoğrel ADP reseptör antagonisti olarak etki gösteren ikinci jenerasyon bir tiyenopiridin türevi olarak üretilmiştir. Klopidoğrel'in barsaktan emilimi, P-glikoprotein pompası tarafından sınırlı şekilde oluşmaktadır. Bir pro-ilaç olan klopidoğrel aktif metabolitine dönüşmek için karaciğerdeki CYP450 enzimleri, tarafından biyotransformasyona uğrayarak aktif formuna dönüştürülür (9). Klopidoğrel dozunun yaklaşık %85'i esterazlar tarafından inaktif bir metabolitine parçalanırken, geri kalan %15'lik kısmı ise CYP450-araçlı enzim sistemi ile oksitlenerek aktif metabolitine dönüştürülür (Şekil 3) (31).



Şekil 3. Klopidoğrel metabolizması (9).

Bu transformasyon iki basamakta gerçekleşir. İlk basamakta CYP1A2, CYP2C9 ve CYP2B6 enzimleri yer alırken, ikinci basamakta ise CYP3A4/5, CYP2B6, CYP2C19 ve CYP2C9 enzimleri rol oynar (Şekil 4). CYP2C19 enzimi klopidoğrel metabolizmasının ilk basamağının (2-okso klopidoğrel'in meydana gelmesi) yaklaşık %40'dan, ikinci basamağın (aktif tiyol metabolitinin oluşması) ise yaklaşık %20'sinden görev aldığı bildirilmiştir (11).

Bu aktif metabolitler geri dönüşümsüz olarak P2Y12 inhibe ederler (10).

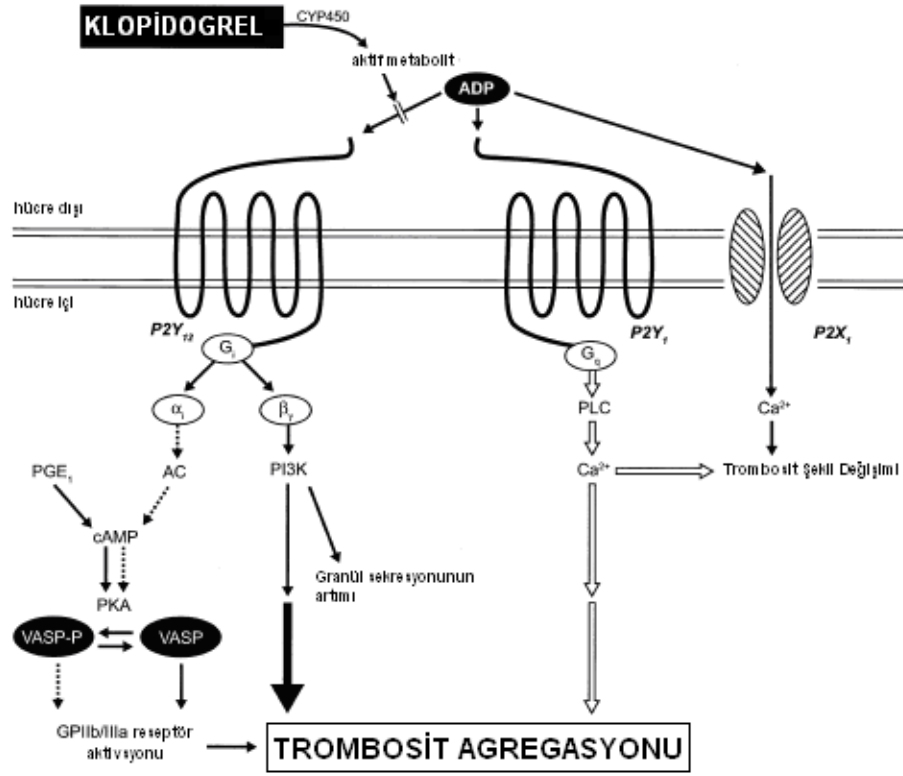


Şekil 4. Klopidoğrelin metabolitlerine dönüşümünde rol alan enzim sistemleri (10).

Klopidoğrel'in etki mekanizması: Tienopiridin türevidir olan klopidoğrel trombosit agregasyonunu irreversible şekilde trombositlerin yüzeyinde yer alan P2Y12 reseptörlerine bağlanması ile glikoprotein IIb/IIIa yolağını bloke eder. Bu yolla trombosit agregasyonu ve fibrin ile bağlanmayı sağladığından yaşamsal öneme sahiptir (32, 33).

ADP ve reseptörü: ADP, trombositlerdeki katyon kanalı aracılı reseptörle (P2X1) ve iki adet G proteini aracılı reseptörüne (P2Y1 ve P2Y12) bağlanarak etki gösterir. ADP ile P2Y1'in aktive olması sonucunda trombositlere geçici ve hızlı bir Ca^{+2} girişine sebep olmakta, ancak bu trombosit agregasyonunda rolü önemli değildir. Ancak agregasyon için daha zayıf etkinliğe sahiptir ve P2Y12 etkinliği için gereklidir (34).

P2Y12 reseptörü G_i aracılı olup, ADP'nin bağlanması ile G_i proteinine bağlı olan $\alpha\beta$ alt subunitlerinin α ve $\beta\gamma$ olarak birimlerine ayrılır. $\beta\gamma$ birimi trombosit granüllerinden sekresyonu artırırken, α birimi ise adenilat siklaza bağlanarak onun inhibisyonuna ve dolayısı ile cAMP düzeylerini azaltmasına yol açar. cAMP düzeylerindeki azalma, protein kinazların inaktive olmasına yol açmaktadır. Protein kinazların inaktive olması sonucu vazodilatör uyarıcı fosfoprotein fosforillemesi engellenir. Vazodilatör uyarıcı fosfoprotein fosforilasyonu ise glikoprotein IIb-IIIa reseptör aktivasyonu için büyük bir öneme sahiptir. $\beta\gamma$ ünitesi ise; fosfotidilinositol-3 kinaz aktivasyonu ile P2Y12 aracılı trombosit granülasyonuna ve glikoprotein IIb-IIIa reseptör aktivasyonunu sağlamaktadır. Klopidoğrel G_i aracılı P2Y12 reseptöre bağlanarak ADP aracılı trombosit agregasyonunu engeller (Şekil 5) (35).



Şekil 5. Klopidoğrel etki mekanizması ve ADP reseptörleri (36).

Klopidoğrel farmakokinetiği: Amerikan gıda ve ilaç dairesi tarafından onaylanan klopidoğrel'in günlük dozu 75 mg olarak uygulandığında, 2. günden itibaren antitrombosit etki başlamakta ve 4 ile 7 gün arasında etkin bir seviyeye ulaşmaktadır. Klopidoğrel tedavisi kesilmesine rağmen bu etki 4 ile 8 gün arasında antitrombosit etkileri devam ettiği bildirilmiştir (37). Daha önce yapılmış olan çalışmalardan elde edilen bulgular doğrultusunda, akut olaylarda en yüksek etkinliğe en uygun zamanda varmak için yükleme dozu rutin olarak verilmektedir. Yeni bulgulara göre 300 mg yükleme dozu ile en yüksek etkinliğe ulaşmak için en az 4-6 saatin gerektiğini, bundan dolayı 600 mg yükleme dozunun akut olaylarda daha uygun olacağı gösterilmiştir (38,39). Klopidoğrel'e yanıtın, doz ve zaman ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Klopidoğrel'in standart 75 mg dozu ile ADP-aracılı trombosit agregasyonunun yaklaşık %50'sini inhibe etmektedir. 300 mg yükleme dozu dört saatte yaklaşık %40 trombosit agregasyon inhibisyonuna neden olurken, 600 mg yükleme dozu ise yaklaşık %55-59 inhibisyon sağladığı belirlenmiştir (39).

Klopidoğrel'in PKG'de kullanılması: Clopidogrel Aspirin Stent International Cooperative Study çalışması, PKG'de klopidoğrel kullanımının etkin faydasının gösterildiği en önemli ve kapsamlı çalışmadır. PKG sonrası stent takılan 1020 hastaya, klopidoğrel veya tiklopidin tedavisi randomize edilmiştir. Hastaların tümüne 325 mg/gün aspirin tedavisi

buna ek olarak tedaviye tienopiridine (250 mg/gün günde iki kez tiklopidin, 75 mg/gün klopidogrel veya 300 mg klopidogrel yükleme dozu ve 75 mg/gün idame dozu) eklenmiştir. Üç grupta da benzer antitrombosit tedavi etkinliği göstermesine karşın, klopidogrel tiklopidine göre daha güvenilir ve daha iyi tolere edildiği görülmüştür (40).

Klopidogrel direnci: Etkinlikleri kanıtlanmış olan klopidogrel ve aspirin gibi anti-trombosit ilaçları kullanan bazı hastalarda tekrarlayan kardiyovasküler olayların geliştiği gözlemlenmiştir. Bu durum anti-trombosit ilaç direnci kavramının oluşmasına yol açmıştır. Tanımı ve varlığı tartışmalı olmakla beraber “klopidogrel direnci” iki başlık altında incelenmektedir. Bunlardan ilki “laboratuvar klopidogrel direnci”dir. Bu direnç klopidogrelin *in vitro* olarak yeterli miktarda antitrombosit etkisinin olmaması olarak tanımlanmaktadır. Diğeri ise “klinik klopidogrel direnci”dir. Bu direnç “tedavi yetersizliği” şeklinde değerlendirilebilir ve klopidogrel kullanımına rağmen kardiyovasküler olayların tekrar görülmesi şeklinde tanımlanmaktadır (41). Trombosit fonksiyonlarının değerlendirildiği test yöntemine bağlı olarak klopidogrel direncin %4-30 arasında değiştiği belirtilmiştir (42).

Klopidogrelle karşı direnç oluşmasında iki mekanizma sorumlu tutulmuştur. Bu mekanizmalar iç ve dış olarak iki gruba ayrılır. Dış mekanizmalar (genetik olmayan faktörler) klopidogrel biyoyararlılığının azalmasına neden olan düşük doz kullanımı, tedaviye uyumsuzluk, yetersiz ilaç dozu, ilaç Emilimi ve metabolizmadaki değişiklikler ve ilacın biyodönüşümünü etkileyen ilaç etkileşimleridir. İç mekanizmalar (genetik faktörler) ise, klopidogrelin biyolojik ve metabolik aktivitesini sağlayan enzim ve reseptörleri kodlayan genlerdeki polimorfizm olabilir. Yapılan çalışmalarda, bazı polimorfizmlerin klopidogrelin antitrombosit aktivitesini etkilediği, bu etkiye bağlı olarak bireyler arasında klopidogrel yanıtın farklılıklar oluşturduğu gösterilmiştir (41).

Genetik varyasyon ve CYP gen polimorfizminin klopidogrel metabolizması üzerine etkisi: Lau ve ark. (43) 200 yılında yaptıkları bir çalışmada klopidogrelle yanıtın CYP3A4 enzimin aktivitesi ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle trombosit inhibisyonu yeterli olmayan bireylerde, klopidogrel aktif şekline dönüştüren CYP3A4 enzim aktivite düzeylerin azalma olduğu belirlenmiştir.

Bir pro-ilaç olan klopidogrelin biyotransformasyonunda görev alan CYP450 enzimleri CYP1A2, CYP3A4, CYP2B6, CYP2C19 ve CYP2C9’dir. Bu enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfizmler, klopidogrelin metabolizmasını etkileyeceği için ilaç direnç oluşumunda polimorfizm çalışmaları ön plana çıkmıştır (12).

Klopidogrel yanıtı için CYP450 enzim sistemi içerisinde CYP2C19 en çok çalışılmış

enzimlerden biridir. Bu enzim klopidogrel metabolizmasındaki birinci basamağının %45'inde; diğer basamağın ise %20'sinden görev almaktadır. Sağlıklı kişilerde yapılan farmokogenetik bir çalışmada, klopidogrel yanıtının CYP2C19 genetik durumundan etkilendiği saptanmıştır (10). Yapılan çalışmalar, CYP2C19 enziminin aktivitesini artıran varyasyonlar da saptanmıştır. Bunlardan CYP2C19*17 (rs12248560) polimorfizmi, bu geninin transkripsiyonel aktivitesini arttırmaktadır. Bu mutasyona sahip kişilerde CYP2C19 enzimi atasal tip allele sahip kişilere göre ilaçların daha hızlı metabolize olduğu gözlenmiştir (44,45).

Frere ve ark.(46) 600'den fazla ST elevasyonsuz MI'lü olgularda CYP2C19, CYP3A4 ve CYP3A5 polimorfizminin klopidogrel yanıtına etkisini incelemişlerdir. CYP2C19*2 allelin CYP3A4*1B ve CYP3A5*3 allelerine göre ADP'ye daha fazla trombosit yanıtı oluşturduğunu göstermiştir.

Klopidogrelle yanıtız hastalarda stent trombozu daha fazla görüldüğü belirlenmiştir. KAH nedeni ile elektif PKG yapılan 105 hastada ilaca yanıtızlık %5 ile 11 oranında iken yanıtta azalma %9 ile 26 arasında saptanmıştır (47). Aynı zamanda, subakut stent trombozunun ilaca yanıtız hastalarda 2 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (48, 49).

KOPYA SAYISI VARYASYONU

İnsan genom projesi ile tüm genom dizisinin bitirilmesi normal bireylerin genom topografyalarında yapısal farklılıklar olduğu ortaya çıkarılmıştır. Genomda popülasyonlar arasında 0-13 gen kopyası içeren alleler rapor edilerek bunlara “Kopya Sayısı Varyantları veya copy number variaton” (CNV) olarak tanımlanmıştır. Duplikasyon, inversiyon, delesyon, insersiyon veya kompleks rekombinasyonlar sonucunda bireyler arasında bir kilobazdan birkaç megabaza kadar değişken bölgeler (segment) CNV'lar olarak tanımlanmıştır (8). Diğer bir tanımda da CNV; iki veya daha çok genom ile karşılaştırıldığında kopya sayısı değişikliği gözlenen DNA bölgeleri olarak adlandırılmaktadır (8).

CNV'lerin insan genomunun neredeyse %12'sini oluşturduğu ve bu CNV'lerin hastalıklara sebep olduğu düşünülmektedir (14).

Yeni gelişen array teknolojileri DNA dizisinde farklılık olmadan bireyler arasında ilgili gen bölgelerinde segmental sayısal değişiklikler olduğu gösterilmiştir. CNV referans genom ya da genomlarla karşılaştırıldığında bir DNA segmentindeki kopya sayısı değişiklikleridir (50).

Bazı çalışmalarda, CNV'ler bağışıklık, enfeksiyon, nöropsikiyatrik ve kardiyovasküler

gibi yaygın hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (15,16). Kopya sayısı değişikliklerinin birçok hastalığa neden olduğu gösterildiği gibi bazı hastalıklar için de risk faktörü olduğu bildirilmiştir. Örneğin, 15q13.3 mikrodelsiyon sendromu; otizm, epilepsi ve zihinsel yetersizlik ile ilişkilendirilmiştir (17,51).

Klinik olarak, CYP2D6'da ilaç etkinliği ile ilişkili CNV'ler CYP2D6 ağırlıklı olarak insan karaciğerinde eksprese edilir ve şu anda klinikte kullanılan ilaçların %25'inde metabolize olur (17). CYP2D6 çok polimorfiktir ve popülasyonlar içinde ve arasında gözlemlenen enzim aktivitesindeki varyasyonun çoğunluğunu varyantları oluşturmaktadır. Bugüne kadar, Human CYP540 Allel Tanımlama veritabanında 75' den fazla CYP2D6 alleli belgelenmiştir. Fonksiyonel olmayan ve azaltılmış aktivite allellerinin fonksiyonel polimorfizmleri, enzim aktivitesini değiştiren eklem kusurları, eş anlamlı olmayan aminoasit değişiklikleri veya çerçeve kaymaları ortaya koymaktadır. Buna ek olarak, normal, işlevsiz ve indirgenmiş aktivite CYP2D6 allellerinin CNV'leri gözlenir ve bunlar ayrıca *in vivo* CYP2D6 enzim aktivitesini değiştirebilir (52).

GEREÇ VE YÖNTEM

ARAÇ VE GEREÇLER

Kimyasal Madde ve Çözücüler

- ✓ Bidistile su
- ✓ EDTA'lı mor kapaklı kan alma tüpü (2 ml)
- ✓ Jelli sarı kapaklı kan alma tüpü (8 ml)
- ✓ Sodyum sitratlı mavi kapaklı kan alma tüpü
- ✓ % 98,9'luk etil alkol (Merck)

Alet ve Gereçler

- ✓ -20 °C Derin dondurucu (Arçelik, Türkiye)
- ✓ -80 °C Derin dondurucu (SCANCOOL Classic)
- ✓ +4 °C Soğutucu (Arçelik, Türkiye)
- ✓ PFA-100 cihazı (INNOVANCE®, PFA-100 ve Dade®, Siemens Healthcare Diagnostic, Almanya)
- ✓ Mikrosantrifüj (Hermle, Almanya)
- ✓ Vorteks (WiseMix, Almanya)
- ✓ Nanodrop (NanoDrop™ 1000, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, ABD)
- ✓ RT-PZR (Applied biosystems, Almanya)
- ✓ Otomatik pipet seti (Eppendorf, Almanya)

- ✓ Elektronik pipetleme ve dağıtım seti (Eppendorf Repeater® Xstream Electronic Pipette, Almanya)
- ✓ PZR plaka rotorlu santrifüj (Hermle, Z326K, Almanya)
- ✓ Isı bloğu (MB-102, Çin)
- ✓ Polipropilen kapaklı steril mikrosantrifüj tüpü (2 ml, DNAaz ve RNAaz free)
- ✓ Steril mikropipet ucu (100-1000µl)
- ✓ Steril mikropipet ucu (10-100 µl)
- ✓ Steril mikropipet ucu (0,5-10 µl)

Kullanılan Kitler

- ✓ Innovance PFA P2Y kiti (Siemens Healthcare Diagnostic, Almanya)
- ✓ DNA izolasyon kiti (PureLink Genomic DNA izolasyon Mini Kit, Invitrogen)
- ✓ CYP2C9 ve CYP2C19 TaqMan CNV assay kiti (Applied biosystems, Almanya)

ÇALIŞMA GRUBU BİREYLERİ ve ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalına başvuran, elektif veya acil stent implantasyonlu PKG amacıyla 01 Aralık 2016- 01 Aralık 2017 tarihleri arasında hastaneye yatırılan hastalara ve 600 mg klopidogrel yüklemesi yapıp, takiben 75 mg/gün idame tedaviye geçilen ve en az 5 gün boyunca bu tedaviyi almış, 18-80 yaş arası erkek ya da kadın hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Bu hastalardan 5 gün boyunca tedavi almış ve devam edenlerden sitratlı kan örneği alınıp PFA-100 P2Y kartuş ile klopidogrel direnci değerlendirilmiştir, cihazın kanama zamanı (KZ) >106 sn büyük olanlara dirençli, KZ ≤ 106 küçük olanlar ise klopidogrel dirençsiz olarak kabul edilmiş ve iki alt gruba ayrılmıştır.

Çalışma Edirne Klinik Araştırmalar Etik Kurulun 05.10.2016 ve 13 no'lu kararınca onaylanmıştır (Ek-1). Çalışmanın detayları ile ilgili olarak tüm hastalar bilgilendirilerek, imzalı onay formu alınmış, bilgilendirilmiş ayrıntılı onay formlarını (Ek-2) kabul etmeyerek imzalamayan hastalar ise çalışmaya dahil edilmemiştir.

Çalışmamızın dışlama kriterleri aşağıdaki gibidir;

1. Özgeçmişinde herhangi bir şekilde kanamalı hastalık bulunanlar,
2. Son 10 gün içinde trombositleri etkilediği bilinen aspirin dışında herhangi bir ilaç kullananlar,
3. Malignite öyküsü olan hastalar,
4. Aktif enfeksiyon hastalığı olan hastalar,

5. İlerlemiş karaciğer hastalığı olanlar,
6. Kortikosteroid tedavisi alan hastalar,
7. Aşkar hipotiroidi ve hipertiroidisi olan hastalar,
8. İleri kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan hastalar çalışma dışı bırakılmıştır.

YÖNTEMLER

Hematolojik Ölçümler

Çalışmamıza katılan hastaların trombosit miktarını belirlemek için EDTA'lı tüplerdeki kan örnekleri kullanılarak ölçüm kalibrasyonu günlük yapılan otomatik hemositometreyle (Sysmex XE-2100™ Automated) tam kan sayımı ile yapılmıştır.

Antitrombosit Aktivite Ölçümü ve PFA-100 Cihazı ile Klopidoğrel İlaç Direnci Belirleme

PFA sistemleri vasküler bir hasar sonrasında trombositlerdeki adezyon ve agregasyon sürecinin *in vitro* koşullarda stimüle edildiği bir cihaz ve test kartuşlarından oluşmaktadır. INNOVANCE® PFA P2Y, trombosit P2Y12 reseptörü blokajı ile tetiklenen trombosit fonksiyonu bozukluğunu tespit etmek için kullanılır (53).

Yöntem prensibi: PFA-100 sistemi (Şekil 6) primer hemostazı oldukça hızlı ve kolay bir biçimde değerlendiren tek kullanımlık farklı kartuşları vardır. PFA sistemleri, INNOVANCE® PFA P2Y ile birlikte küçük antikoagüle tam kan örneklerinde trombosit ADP reseptörü blokajının tespit edilmesini mümkün kılar. INNOVANCE® PFA P2Y, PFA Sistemlerinde kullanılan, bir kapiler, örnek rezervuarı ve ortasında daire şeklinde bir açıklık olan biyokimyasal olarak aktif bir membran içeren çeşitli entegre parçalardan oluşan tek kullanımlık bir test kartuşudur. Sitratlı tam kan, kapiler ve açıklık aracılığıyla örnek rezervuarından çekilerek, trombositleri yüksek parçalayıcı akış koşullarına maruz bırakır. Membran, ADP reseptörü yolu (özellikle P2Y1 ve P2Y12) aracılığıyla trombositleri etkinleştiren bir fizyolojik agonist olan ADP ile kaplıdır. Ayrıca diyagnostik performansı iyileştirmek için membran iyonik kalsiyum ve prostaglandin E1 ile kaplıdır. Bir PFA testinin başlangıcında, Dade® PFA tetikleme solüsyonu membran üzerinde dağıtılarak, ADP, kalsiyum ve prostaglandin E1 olmak üzere üç reaktifin çözünmesini sağlar. Test sırasında, trombositler yüksek parçalama koşulları altında membrana tutunur. Daha sonra, membran ve çözünmüş reaktifler ile etkileşimin neticesinden trombositler aktif hale gelir, granül içeriklerini salar ve agregasyon başlar. Bu trombosit agregasyonu süreci sonucunda açıklıkta

bir trombosit trombüsü oluşur ve kan akımını yavaş yavaş azaltarak sonunda tamamen engeller. PFA Sistemleri, testin başlangıcından açıklığın kapanmasına kadar olan süreyi belirleyerek, bu zaman aralığını KZ olarak rapor eder. KZ, analiz edilen tam kan numunesindeki trombosit fonksiyonunun bir göstergesidir (53).



Şekil 6. Siemens innovance® PFA-100 cihazı (53).

Prosedür: INNOVANCE® PFA P2Y Test Kartuşunun Hazırlanması:

INNOVANCE® PFA P2Y test kartuşlarını içeren poşeti açmadan önce 15 ile 25 °C sıcaklığa kadar ısınması için yaklaşık 15 dakika beklendi. Daha sonra üstteki folyoyu test kartuşundan çıkartıldı. Test kartuşu PFA-100 sisteminin kasetine A kısmına yerleştirildi ve kartuş yerine emniyetli bir şekilde oturana kadar itildi.

Örnek yükleme: %3,2 tamponlu sodyum sitratlı tüpe alınan kan örnekleri 3 ile 4 defa hafifçe ters çevirerek kan numunesini karıştırıldı. Test kartuşunu içeren kaset düz bir yüzey üzerinde tutulurken, iç yüzeylerden biri boyunca yavaşça dağıtarak 800 µL kan test kartuşunun küçük açıklığına (örnek haznesi açıklığı) pipetlendi. Döner taşıyıcı yüzeyine yaslanması için, kaseti test kartuşu A pozisyonuna gelecek şekilde PFA sistemlerinin inkübasyon haznesine yerleştirdi ve test başlatıldı. INNOVANCE® PFA P2Y'nin sonuçları, PFA sistemleri tarafından saniye (sn) biriminden kapanma zamanı (KZ) olarak rapor edilir. INNOVANCE® PFA P2Y test prosedürünün arından, elde edilen KZ, ölçülen örnekte P2Y12 reseptör blokajı olup olmadığını gösterir. Genelde, INNOVANCE® PFA P2Y KZ ≤106 sn kapanma zamanları “normal” olarak kabul edilir ve 106 sn değerini aşanlar “anormal” olarak kabul edildi (54-56).

DNA İzolasyonu ve Miktarının Belirlenmesi

Çalışmaya alınan hastaların DNA izolasyonları Invitrogen Purelink Genomik DNA kiti ile dondurulmuş tam kandan yapılmıştır.

DNA izolasyonunda kullanılan kit içeriği ve hazırlık aşaması: Invitrogen Purelink Genomik DNA kit içeriği; RNase, proteinaz K, purelink genomik liziz/bağlama solüsyonu, elution buffer, yıkama solüsyonu ve toplama tüpünden oluşmaktadır. Başlamadan önce, DNA izolasyon kiti içerisindeki yıkama solüsyonları, her etiketin üstündeki yönergelere uygun olarak %96-100 etanol eklenerek hazırlandı.

a. Kan örneklerinden lizat: Dondurulmuş kan örnekleri buzdolabından çıkarıldı ve oda sıcaklığında çözülmeye kadar beklendi. Daha sonra, ısı bloğu 55°C'ye ayarlandı. 200 µl taze dondurulmuş kan örneği steril bir mikrosantrifüj tüpü içine alındı. Örnek içine kit ile sağlanan proteinaz K'dan 20 µl eklendi. Daha sonra örnek içine yine kit ile sağlanan RNaz A'dan 20 µl eklendi, vortekslenerek iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi ve üzerine 200 µl purelink genomik liziz/bağlama solüsyonu eklendi ve homojen bir solüsyon oluşuncaya kadar vorteksleyerek iyice karıştırıldı. Protein parçalanmasını başlatmak için 55°C'deki ısı bloğunda 10 dk. inkübe edildi. Lizata 200 µl %96-100 etanol eklendi. Homojen bir solüsyon elde etmek için vorteksleyerek 5 sn iyice karışması sağlandı. Daha sonra DNA'ya bağlanma aşamasına geçildi.

b. DNA'ya bağlanma: Koleksiyon tüpü içinde sağlanan spin kolonu paketten çıkarıldı. Genomik liziz/bağlama solüsyonu ve etanol ekli lizatı (640 µl) purelink spin kolona eklendi. Kolon, 1 dakika oda sıcaklığında 10.000 g'de santrifüj edildi. Koleksiyon tüpünü atılarak kit ile sağlanan yeni bir koleksiyon tüpü içine yerleştirildi. DNA yıkama aşamasına geçildi.

c. DNA yıkama aşaması: Kolona, etanol ile hazırlanan yıkama solüsyonu I'den 500 µl eklendi. Kolonu 1 dakika oda sıcaklığında 10.000 g'de santrifüj edildi. Koleksiyon tüpünü atılarak kolon, kit ile sağlanan yeni bir purelink koleksiyon tüpü içine yerleştirildi. Kolona etanol ile hazırlanan yıkama solüsyonu II'den 500 µl eklendi ve oda sıcaklığında maksimum hızda 3 dk. santrifüj edildikten sonra toplama tüpü ayılarak DNA elüsyon aşamasına geçildi.

d. DNA elüsyon aşaması: Kolonu steril bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüp içine konuldu. Üzerine 50 µl elüsyon çözeltisi eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra, oda sıcaklığında maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüpte toplanan purifiye genomik DNA -20°C'de saklandı.

Elde edilen DNA'nın konsantrasyon ve kalitesinin tayini: Çalışmamızda DNA saflığı ve miktarı spektrofotometrik olarak Nanodrop cihazı kullanılarak saptandı.

Spektrofotometrik olarak, 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu belirlendi. 50µg/ml çift iplikçik DNA içeriğinin 260 nm dalga boyunda 1 optik dansite (OD) verdiği kabul edilmektedir. 260 nm'deki ölçüm değeri aşağıdaki formüle uygulanarak DNA konsantrasyonu hesaplandı.

DNA Konsantrasyonu: $OD_{260} \times 50 \mu\text{g/ml}$

DNA örneklerinin saflığı OD_{260}/OD_{280} oranı kullanılarak belirlendi. Yeterince iyi saflıkta kabul edilen DNA'nın OD_{260}/OD_{280} değeri yaklaşık 1,8'dir. Ortamda fenol veya protein mevcutsa bu oran 1,8'den küçük olacaktır. OD_{260}/OD_{280} değeri 2'den büyükse ortamda DNA bulunduğu anlamına gelir.

RT-PZR ile CNV Belirleme

CYP2C9 ve CYP2C19 kopya sayıları spesifik Taqman primer-prop yöntemiyle (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak, RT- PZR ile tespit edildi. FAM işaretli genleri ile VIC işaretli Ribonükleaz P (RNaseP) referans belirteç kullanılarak gerçekleştirildi.

Tüm örnekler, 10 ng DNA kullanıldı ve 384 kuyucuklu plakalar üzerinde toplam reaksiyon hacmi 10 µl olacak şekilde yapıldı.

1X TaqMan universal miksin içinde, her 10 µl'lik çözeltide 10 ng DNA, referans gen olan RNaseP için her biri 900 nM forward ve reverse primerler ve hedef gen için her biri 250'şer nm olan VIC (referans) boyası ve FAM (hedef) işaret-boyalı gene özel prob içerecek şekilde hazırlandı.

Termal cyclus koşulları: 50 °C 2 dakika, 95 °C 10 dakika, daha sonra 40 döngü olarak 95 °C 15 sn ve 60 °C 60 sn şeklinde uygulandı.

Her kopya, bir delta Ct (ΔCt) elde etmek için RNase P'ye normalize edildi ve sonra her bir örnek için bir ΔCt değeri hesaplandı. Daha sonra $\Delta\Delta\text{Ct}$ belirlemek için tüm örneklerle bir kalibratör numuneye normalize edilecek. Relative quantity $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ve kopya sayısında 2x Relative quantity olarak belirlendi. RT-PZR ile elde edilen Ct verileri daha sonra CopyCaller™ software (v2.1 Applied Biosystems) programı kullanılarak relative CNV hesaplandı. 1,6-2,1 arasındaki kopya numarası aralığı, CYP2C19 geni için normal diploid kopya numarası olarak kabul edildi.

Çalışmamızda aşağıdaki ekson ve intronlardaki CYP özel dizayne edilmiş primer ve proplar ile RT-PZR yöntemi ile bu genleri CNV değerlendirildi;

CYP2C19 (Hs05148033_cn): Intron 1- Exon 2

CYP2C19 (Hs02932336_cn): Intron 6

CYP2C19 (Hs05107177_cn): Intron 8

CYP2C9 (Hs05167737_cn): Intron 7

CYP2C9 (Hs05165291_cn): Intron 5

CYP2C9 (Hs05187541_cn): Intron 3

İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

İstatistiksel analizler için SPSS 17 (Statistical Package for Social Sciences version) paket programı kullanılmıştır. Açlık kan şekeri (AKŞ), KZ, trombosit sayısı, protrombin zamanı, total kolesterol, high-density lipoprotein-Kolesterol (HDL-K), Low-density lipoprotein-Kolesterol (LDL-K), ve yaş değerlerinin normal dağılım gösterip göstermedikleri Shapiro-Wilk testi ile incelenmiş, test sonucuna göre tüm değerlerinin normal dağılım göstermedikleri bulunmuştur. Bu sonuçlara AKŞ, KZ, trombosit sayısı, protrombin zamanı, total kolesterol, HDL-K, LDL-K, yaş ve klopidogrel direnci bakımından grubunun karşılaştırılması için bağımsız iki grup karşılaştırma testlerinden Mann-Whitney U testi kullanılmış ve değerleri ortalama±standart sapma cinsinden verilmiştir. CYP2C9 ve CYP2C19, CNV olası riskleri binary lojistik regresyon analiz modeli kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar için $p < 0.05$ anlamlılık değeri olarak belirlenmiştir.

BULGULAR

ÇALIŞMA GRUBUNU OLUŞTURAN BİREYLERİN TANIMLAYICI BİLGİLERİ

Çalışma grubumuzu, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalına başvuran, elektif veya acil stent implantasyonlu PKG amacıyla 01 Aralık 2016 ile 01 Aralık 2017 tarihleri arasında hastaneye yatırılan hastalara; 600 mg klopidogrel yüklemesi yapıp, takiben 75 mg/gün idame tedaviye geçilen ve en az 5 gün boyunca 75 mg/gün klopidogrel almış hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. 123'ü erkek ve 53'ü kadın olmak üzere toplam 176 hastadan oluşmuştur. Çalışmadaki hastaların tümü KAH hastası olup, %26'sında diyabet, %93,2'sinde hipertansiyon, %57,8'sinde sigara kullanımı ve %45'inde ise alkol kullanımı mevcuttur (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmaya dahil edilen tüm hastalara ait demografik özellikler

		N (Örnek sayısı)	% (yüzde değeri)
Yaş		66,79±12,01	
Cinsiyet	Erkek	123	69,9
	Kadın	53	30,1
Diyabet	Yok	47	81,8
	Var	129	26,7
Hipertansiyon	Yok	12	6,8
	Var	164	93,2
MI öyküsü	Yok	149	84,7
	Var	27	15,3
Sigara	Yok	73	42,2
	Var	100	57,8
Alkol	Yok	95	54,9
	Var	78	45,1

MI: Miyokard infarktüs.

ÇALIŞMA GRUPLARINA AİT BİYOKİMYASAL PARAMETRELER

Çalışmaya dahil edilen hastalardan klopidogrel tedavisini en az 5 gün boyunca alan ve devam eden hastalardan sitratlı kan örneği alınıp PFA-100 P2Y kartuş ile klopidogrel direnci değerlendirildi. KZ 106 sn büyük olanlara klopidogrel direnci var, 106 küçük olanlar ise klopidogrel direnci yok olarak kabul edildi ve iki alt gruba ayrıldı. Çalışmamızda 97 (%55,11) bireyde klopidogrel ilaç direnci yok iken (normal grup), 79 (%44,89) bireyde ise klopidogrel ilaç direnci var (klopidogrel direnç grubu) geliştiğini gözlemledik.

Gruplardaki erkek hasta sayısını benzer iken, klopidogrel dirençsiz grupta kadın hasta sayısı dirençli gruba göre neredeyse iki kat fazla olduğunu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p= 0.032$). Diyabet, hipertansiyon, alkol ve sigara gibi demografik veriler arasında ise gruplar arasında istatistiksel bir anlamlılık belirlemedik ($p> 0.05$) (Tablo 2).

Tablo 2. Klopidoğrel direnci olan ve olmayan bireylerin demografik verilerin istatistiği

		Klopidoğrel Direnci (N:176)		P değeri
		Yok N (%)	Var N (%)	
Yaş		67,23± 12,02	66,24 ±12,06	0,587
Cinsiyet	Kadın	36 (37,1)	17 (21,5)	0,032
	Erkek	61 (62,9)	62 (78,5)	
Diyabet (tip 2)	Yok	26 (26,8)	21 (26,6)	0,558
	Var	71 (73,2)	58 (73,4)	
Hipertansiyon	Yok	9 (9,3)	3 (3,8)	0,230
	Var	88 (90,7)	76 (96,2)	
Sigara kullanımı	Yok	43 (45,7)	30 (38)	0,355
	Var	51(54,3)	49 (62)	
MI Öyküsü	Yok	79 (81,4)	70 (88,6)	0,213
	Var	18 (18,6)	9 (11,4)	
Alkol kullanımı	Yok	54 (57,4)	41(51,9)	0,540
	Var	40 (42,6)	38 (48,1)	

Klopidoğrel direnci olan ve olmayan tüm bireylerin KZ, AKŞ, total kolesterol, LDL-K, HDL-K, protrombin zamanı ve trombosit düzeylerine ait değerler tablo 3'te verilmiştir.

KZ düzeyleri klopidoğrel dirençli grubun olmayan gruba oranla yüksek saptanmıştır ($p<0.05$). AKŞ, total kolesterol, LDL-K, HDL-K, protrombin zamanı ve trombosit düzeyleri açısından her iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 3. Klopidoğrel direnci olan ve olmayan bireylerin biyokimyasal verilerin istatistiği

	Klopidoğrel Direnci (N:176)			P değeri
	Tüm hastalar (176)	Yok (ortalama±ss)	Var (ortalama± ss)	
KZ (sn)	141,65±94,02	71±18,51	228,41±75,22	0,001
Total Kolesterol (mg/dL)	170,51±46,36	170,09± 48,63	171,01± 43,72	0,523
HDL-K (mg/dL)	39,15±8,98	40,29 ± 9.86	37,76± 7,61	0,063
LDL-K (mg/dL)	94,16±26,9	93,1± 24,17	95,47± 30,02	0,822
AKŞ (mg/dL)	136,24±55,61	134,81±61,14	100.6±48,31	0,256
Protrombin zamanı (sn)	13,98±1,46	14,07±1,67	13,87±1,16	0,471
Trombosit sayısı (IU/ml)	233,03±71,36	235,62±73,13	229,85±69,47	0,660

AKŞ: Açlık kan şekeri; **KZ:** kapanma zamanı

CNV'İN KLOPİDOĞREL DİRENCİ ÜZERİN ETKİSİ

Çalışmamızda dirençli grubundaki CYP2C9 (Hs0518754), CYP2C9 (Hs05165291) ve CYP2C9 (Hs05165291), CYP2C19 (Hs02932336) ve CYP2C19 (Hs05148033) CNV açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamadık ($p>0.05$).

Aynı zamanda CYP2C19 (Hs05107177- intron 8) kopya sayısı azaldıkça klopidoğrel direnç için 4,91 kat relatatif risk sahip olduğu, kopya sayısı 3 olanların ise ilaç direnç için 3,57 kat riske sahip olduğunu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu saptadık ($p=0.011$, Tablo 4).

Tablo 4. Klopidoğrel direnci olan ve olmayan grupların CYP450 genlerin CNV dağılımı ve oluşturdukları riskler

	Kopya Sayısı	Klopidoğrel Direnci (N:176)			Relatif Risk (Odd's Oranı)	Güven Aralığı (%95)	P değeri
		Tüm hastalar (176)	Yok N (%)	Var N (%)			
CYP2C9 (Hs0518754)	1	6	4 (4,3)	2 (2,6)	1,187	0,11-3,40	0,863
	2	157	86 (91,5)	71 (92,2)	Referans	-	-
	3	8	4 (4,3)	4 (5,2)	1,33	0,29-5,01	0,699
CYP2C9 (Hs05165291)	1	3	2 (2,2)	1 (1,3)	1,11	0,05-6,82	0,944
	2	157	86 (92,5)	71 (92,2)	Referans	-	-
	3	10	5 (5,4)	5 (6,5)	1,146	0,34-4,35	0,836
CYP2C9 (Hs05167737)	1	9	6 (6,4)	3 (3,9)	0,377	0,15-2,57	0,390
	2	148	82 (87,2)	66 (85,7)	Referans	-	-
	3	14	6 (6,4)	8 (10,4)	1,146	0,55-5,01	0,399
CYP2C19 (Hs05107177)	1	4	1 (1,1)	3 (3,9)	4,91	0,47-46,2	0,186
	2	141	86 (90,5)	55 (72,4)	Referans	-	-
	3	26	8 (8,4)	18 (23,7)	3,57	1,43-8,64	0,011
CYP2C19 (Hs02932336)	1	10	4 (4,3)	6 (7,8)	1,88	0,51-6,91	0,345
	2	153	85 (92,4)	68 (88,3)	Referans	-	-
	3	6	3 (3,3)	3 (3,9)	0,729	0,24-6,39	0,789
CYP2C19 (Hs05148033)	1	9	7 (7,4)	2 (2,5)	0,203	0,07-1,71	0,16
	2	150	82 (86,3)	68 (87,2)	Referans	-	-
	3	14	6 (6,3)	8 (10,3)	1,30	0,53-4,86	0,684

TARTIŞMA

Çalışmamızda, PKG uygulanan ve 600 mg klopidogrel yüklemesi yapıp, takiben 75 mg/gün idame tedavi alan ve en az 5 gün boyunca bu tedavi dozunu devam eden 176 hastamız KZ sonuçlarına göre klopidogrel direnci olmayan ve olan (klopidogrel dirençli) şeklinde gruplandırdık. Bu ayırma, $KZ > 106$ sn olan hastalar klopidogrel direnci var, $KZ \leq 106$ ise yok olarak kabul edildi ve iki gruba ayrıldı. Çalışmamızda 97 (%55,11) bireyde klopidogrel ilaç direnci yok iken (normal grup), 79 (%44,89) bireyde ise klopidogrel ilaç direnci (klopidogrel direnç grubu) olduğunu saptadık.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz hastaların demografik özelliklerinin klopidogrel direnci olup olmamasına göre karşılaştırdık. Bunu yapmamızdaki amaç, klopidogrel direncinin oluşmasına diğer genetik olmayan faktörlerin etkisini araştırmaktı. Çünkü yapılan önceki çalışmalarda genetik varyasyonlar dışında başka etkenlerin olabileceği ortaya konulmuştu (41). Çalışmaya dâhil edilen bu hastaların sigara kullanım, hipertansiyon, diyabet, hiperlipidemi, MI öyküsü açısından gruplar arasında hiçbirinde istatistiksel anlamlı fark bulamadık (Bkz. Tablo 2). Ancak cinsiyet açısından gruplar arasında anlamlı bir fark olduğunu saptadık ($p=0,032$). Klopidogrel direnci olan bu hastaların %21,5 iken olmayanları ise %37,1 olarak gözlemledik. Kadınların klopidogrel direnci oluşmasına daha az olduğunu ve koruyucu etkilere sahip olabileceğini düşünüyoruz.

Kanda total kolesterol ve LDL-K düzeyleri yükseldikçe kardiyovasküler risk artmaktadır. KAH'nın birçoğunda yalnız LDL-K yükselmesi değil, HDL-K azalması, trigliserid, artması da lipit risk faktörlerinin bir kümesi söz konusudur. Total kolesterol, trigliserid ve LDL-K yükselmesi koroner ateroskleroz gelişmesinde belirgin rolleri olduğunu göstermektedir.

Diğer klinik parametreler analiz edildiğinde ise AKŞ, LDL-K, HDL-K ve total

kolesterol değerleri açısından iki grup arasında istatistiksel fark saptanmadı ($p > 0,05$, Bkz. Tablo 3). Kolesterol tipi parametrelerinde anlamlı bir farkın olmaması KAH patolojisine neden olan bu faktörlerin klopidogrel direncinde etkisinin olmadığını göstermediğini düşünmekteyiz. Aynı zamanda çalışmaya dâhil tüm hastalar KAH olduğu için bu farkın istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmaması normal olduğu göstermektedir.

Klopidogrel tedavisindeki temel hedef trombosit reaktivitesini azaltmak olduğundan yüksek düzeylerdeki trombosit sayısı tedavi yetersizliğine yol açacağı, bundan dolayı klopidogrel direnci ile benzer durumları doğuracağı bilinen bir hipotezdir. Li ve ark. Yaptıkları bir çalışmalarında trombosit miktarının ve hacminin klopidogrel direnci ile ilişkili olmadığını bildirmişlerdir (57). Benzer şekilde, çalışmamızda da klopidogrel direnci olan ve olmayanların trombosit miktarı arasında anlamlı ilişki olmadığını saptamışlardır ($p=0,660$). Jang ve ark. (58) PKG yapılan ve 600 mg klopidogrel yüklemesi yapılan ve 75 mg/gün idame doz alan 225 hastanın 48 saat sonraki INNOVANCE® PFA P2Y yöntemi ile belirledikleri klopidogrel direnç prevalansını %14,5 olarak saptadılar. Grđinic ve ark. (59) yaptıkları benzer bir çalışmada klopidogrel direnç prevalansını %30 olarak gözlemlemişler. Tsantes ve ark. (60) yaptıkları başka bir benzer çalışmada klopidogrel direncini %34,4 olarak rapor etmişlerdir. Saydam ve ark. (61) Tük toplumunda yaptıkları benzer bir çalışmada VerifyNow P2Y₁₂ yöntemi le klopidogrel direnci geliştiren hastaların %30 olduğunu belirlediler (61). Çalışmamızda ise direnç gelişen hastaların prevalansını ise %44,89 olarak saptadık. Klopidogrel yanıtızlığının prevalansının %5 ile 44 arasında olduğu bildirilmiştir. Prevalanstaki bu geniş dağılım temel dozlamadan kaynaklanmaktadır. Çeşitli tanımlar, laboratuvar yöntemleri ve kan örneklerinin cevap verme süresi açısından değerlendirildiği zamanla daha az ilgilidir (62-67).

Gününüzde literatürde antitrombosit ilaç olan klopidogrel ile ilgili farklı doz kullanımı yaklaşımları bulunmaktadır. Bu farklı yaklaşımın nedeni olarak mutasyonlar ön plana çıkmaktadır. Klopidogrel ilacının aktif metabolitine dönüşümü, CYP P450 enzimleri tarafından karaciğerde yapılmakta olup çeşitli enzimler yer almakta birlikte en etkili olanlar CYP2C9 ve 19'dur.

CYP2C19 omeprazol, lansoprazol, imipramin, propranolol, diazepam ve klopidogrel gibi ilaçların metabolizması için ana rol oynamaktadır. CYP2C19'deki bazı genetik varyanslar fonksiyonel olmayan alleller oluşturabilir ve dolayısıyla enzim aktivitesi kalmaz bu ilaçları doğru şekilde metabolize etmeyebilir (68).

Bu genetik varyanların frekansları bölgesel değişkenlik göstermektedir. Örneğin,

CYP2C19*2 alelinin İran, İsveç, Alman, Etiyopya, Zimbabwe, Çin-Tayvanlı, Filipin ve Malezyalı popülasyonlarda sırasıyla %21,4, %14,4, %15, %13,6, % 13,1, % 23,% 32, % 39 ve >% 75'dir (68).

Saydam ve ark (61) PKG uygulanan ve 600 mg klopidogrel yüklemesi yapıp 75 mg ideme dozu alan hastaların klopidogrel direnç ile CYP2C19 polimorfizmi arasındaki ilişkiyi ortaya koydukları bir çalışmada, klopidogrel tedavisine cevap vermeyen hastalarda yüksek oranda bulunan CYP2C19*2 (G681A) polimorfizminin genotipleri arasındaki risk durumuna göre GA genotipinin GG genotipine göre klopidogrel direncinin 3,52 kat daha fazla riske sahip olduğunu ($p<0,001$) belirlediler.

PKG sonrası hastalarda, hastalığın tekrarlanmaması ve uzun vadede iyileştiği sonucu için, bakım aşamasında, doğru ilaca ve doğru doza bağlıdır.

Çalışmamızda, CYP2C19 (Hs05107177- intron 8) kopya sayısı azaldıkça (delesyon) klopidogrel direnç için 4,91 kat relatif risk sahip olduğu, kopya sayısı 3 olanların (duplikasyon) ise ilaç direnç için 3,57 kat riske sahip olduğunu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu saptadık ($p=0.011$, Tablo 4).

Hastaların değiştirilmiş klopidogrel metabolizmasını tanımlamak için farmakogenetik testler sonucunda yüksek bir klopidogrel dozu, ilaca verilen düşük yanıtın düzelmesini sağlayabilir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada bireyler arasında normal ve anormal grup diye ayırdığımız hastaların, stent takıldıktan sonra kişiye verilen antitrombosit etkili ilaç dozunun kişi üzerinde ne gibi etkileri olduğunu, ne şekilde kullandığında en etkin işlev görür diye baktığımızda 600 mg yükleme dozunun arttırılmasının ilaç tedavisinde etkili olduğu görülmüştür.

SONUÇ

Çalışmamızın sonucunda;

- ✓ Çalışmaya katılan gruplardaki erkek hasta sayıları benzer iken, klopidogrel direnci oluşmayan grupta kadın hasta sayısı dirençli gruba göre neredeyse iki kat fazla olduğunu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p= 0.032$). Kadın cinsiyetin klopidogrel direnci oluşmasında daha az etkilendiğini gözlemledik.
- ✓ Diyabet, hipertansiyon, MI öyküsü, alkol ve sigara kullanımı gibi demografik verilerini klopidogrel direnci üzerine etkisini olmadığını belirledik.
- ✓ LDL-K, HDL-K ve total kolesterol gibi lipideminin klopidogrel direnci üzerine etkisini olmadığını belirledik.
- ✓ Çalışmamızda klopidogrel ilaç direnci %44,89 olduğunu saptadık.
- ✓ Bu çalışmada, CYP2C19 (Hs05107177- intron 8) kopya sayısı azaldıkça klopidogrel direnç için 4,91 kat relatif risk sahip olduğu, kopya sayısı 3 olanların ise ilaç direnç için 3,57 kat riske sahip olduğunu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu saptadık ($p=0.011$).

Yukarıda sıraladığımız sonuçlar doğrultusunda, CYP2C19 (Hs05107177- intron 8) kopya sayısının azalması klopidogrel ilaç metabolizması etkili olan CYP2C19 enzim aktivitesini azalmasına dolayı, CYP2C19 (Hs05107177- intron 8) CNV klopidogrel direnci için genetik risk faktörü olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

Çalışmamız kapsamında bu ilişkinin ortaya konması klopidogrel tedavisinde yeni yaklaşımlar oluşturulmasına katkıda bulunacaktır. Genetik yatkınlığı olan hastaların erken alınacak önlemler ile klopidogrel direncinin azaltılması açısından önemlidir.

Yeni bir çalışmada, daha ileri ve daha geniş çalışma grubu ile KAH hastalarında klopidogrel ile CYP2C19 arasındaki prevalansı saptanarak ilaç direnci gelişiminde major risk oluşturup oluşturmadığı belirlenebilir.



ÖZET

Bu çalışmadaki amacımız klopidogrel metabolizmasında etkili olan CYP2C9 ve CYP2C19 genlerin CNV'leri ile klopidogrel direnç mekanizması arasındaki ilişkiyi incelemektir.

Araştırmaya elektif veya acil stent implantasyonlu PKG yapılan 176 hasta dahil edildi. 600 mg klopidogrel yükleme dozu alan ve en az 5 gün süreyle standart doz (75 mg/gün) klopidogrel kullanan hastalardan alınan kan örneklerinde PFA-100 P2Y12 kiti ile KZ ölçüldü. KZ değeri >106 sn olan hastalar klopidogrel dirençli, ≤106 sn ise klopidogrelle dirençsiz olarak gruplandırıldı. Hastaların DNA'ları Purelink Genomic DNA izolasyon kiti kullanılarak dondurulmuş tam kandan izole edildi. CYP2C9 ve CYP2C19 genlerin CNV'leri TaqMan kopya sayısı analiz kiti kullanılarak RT-PCR ile tespit edildi.

Çalışmamızda %55,11 bireyde klopidogrel direnci yok iken, %44,89 bireyde ise klopidogrel direnci olduğunu saptadık. Bu çalışmada, CYP2C9 (Hs0518754), CYP2C9 (Hs05165291), CYP2C9 (Hs05165291), CYP2C19 (Hs02932336) ve CYP2C19 (Hs05148033) CNV ile klopidogrel direnci arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p>0.05). CYP2C19 (Hs05107177-intron 8) iki kopyaya sahip bireylerin bir ve iki kopyaya sahip bireylere göre sırası ile 4.91 ve 3,57 kat daha fazla klopidogrel ilaç direnci geliştirme riskine sahip olduğu belirlendi.

Sonuçlarımız, CYP2C19 (Hs05107177- intron 8) CNV'lere sahip bireylerin klopidogrel direnci gelişme riskinin daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kopya sayısı varyasyon, CYP, klopidogrel direnci, Perkütan koroner girişim

THE RELATIONSHIP OF CYP2C9 AND CYP2C19 GENES WITH COPY NUMBER VARIATION (CNV) AFTER PERCUTANEOUS CORONARY INTERVENTION

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the relationship between clopidogrel resistance mechanism and the CNVs of CYP2C9 and CYP2C19 genes which is effective in clopidogrel metabolism.

176 patients who underwent elective or emergency percutaneous coronary intervention with stent implantation were included in our study. CT were measured with PFA-100 P2Y12 in blood samples taken from patients using clopidogrel with standard dose (75 mg/day) for at least 5 days after 600 mg clopidogrel loading dose. The patients were divided into two groups CT values >106 s as resistant to clopidogrel, ≤ 106 s were nonresistant to clopidogrel. DNA of patients was isolated from the frozen whole blood by a using PureLink Genomic DNA isolation kit. CNVs in CYP2C9 and CYP2C19 genes were detected by using TaqMan copy number assays kit in a RT-PCR.

In our study, while clopidogrel resistance was not found in 55, 11% of the patients, 44, 89% of the patients were found clopidogrel resistance. This study, no statistically significant relationship was found between CNVs of CYP2C9 (Hs0518754), CYP2C9 (Hs05165291), CYP2C9 (Hs05165291) CYP2C19 (Hs02932336) and CYP2C19 (Hs05148033) genes and clopidogrel resistance. It was determined that individuals with the two copies of CYP2C19 (Hs05107177) have a 3.165 and 3,57 fold increase risk of developing clopidogrel drug resistance compared to the one and three copy, respectively.

Our results suggest that CYP2C19 (Hs05107177) CNVs have higher risk of developing clopidogrel resistance.

Keywords: Copy number variation, CYP, clopidogrel resistance, Cutaneous coronary intervention

KAYNAKLAR

1. Singh RB, Mengi SA, Xu YJ, Arneja AS, Dhalla NS, Pathogenesis of atherosclerosis. A multifactorial process *Exp Clin Cardiol* 2002;7(1):40-53.
2. Libby P, and Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005; 111(25):3481-88.
3. Vorchheimer DA, and Becker R. Platelets in atherothrombosis. *Mayo Clin Proc* 2006;81(1):59-68
4. Meadows TA, and Bhatt DL. Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation. *Circ Res* 2007;100(9):1261-75.
5. Bassand JP, Hamm CW, Ardissino D, Boersma E, Budaj A, Fernandez-Aviles F, Fox KA, Hasdai D, Ohman EM, Wallentin L, Wijns W. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2007;28(13):1598-1660.
6. Boden WE, O'Rourke RA, Teo KK, Hartigan PM, Maron DJ, Kostuk WJ, Knudtson M, Dada M, Casperson P, Harris CL, Chaitman BR, Shaw SL, Gosselin G, Nawaz S, Title LM, Gau G, Blaustein AS, Booth DC, Bates ER, Spertus JA, Berman DS, Mancini GB, Weintraub WS, Group CTR. Optimal medical therapy with or without PCI for stable coronary disease. *N Engl J Med* 2007;356(15):1503-16.
7. Agirbasli M, Guvenc H, Cincin A. Novel agents in antiplatelet therapy. *Turk Kardiyol Dern Ars* 2010;38(5):369-78.
8. Savi P, and Herbert Jm. Clopidogrel and ticlopidine: P2Y₁₂ adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2005;31(2):174-83.
9. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Meneveau N, Steg PG, Ferrieres J, Danchin N, Becquemont L. French Registry of Acute, STE Non, STEMI. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2009;360(4):363-75.

10. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, Walker JR, Antman EM, Macias WL, Braunwald E, Sabatine MS. Cytochrome P450 genetic polymorphisms and the response to prasugrel: relationship to pharmacokinetic, pharmacodynamic, and clinical outcomes. *Circulation* 2009;119(19):2553-60.
11. Holmes DR Jr, Dehmer, GJ, Kaul S, Leifer D, O'Gara P, Stein CM. ACCF/AHA Clopidogrel clinical alert: approaches to the FDA "boxed warning": a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the American Heart Association. *Circulation* 2010;122:537-57.
12. Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, Ikeda T, Kurihara A. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos* 2010;38:92-9.
13. Wiviott SD, and Antman EM. Clopidogrel resistance: a new chapter in a fast-moving story. *Circulation* 2004;109:3064-7.
14. He Y, Hoskins J, McLeod HL. Copy Number Variants in pharmacogenetic gene. *Trends Mol Medicine* 2011;17(5):244-51.
15. McCarroll SA, Hadnott TN, Perry GH, Sabeti PC, Zody MC, Barrett JC, Dallaire S, Gabriel SB, Lee C, Daly MJ, Altshuler DM. Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nature Genet* 2016;38:86-92.
16. The Wellcome Trust Case Control Consortium, Craddock N, Hurles ME, Cardin N, Pearson RD, Plagnol V, et al. Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2010;464:713-20.
17. Johansson I, Ingelman-Sundberg M. CNVs of human genes and their implication in pharmacogenetics. *Cytogenet Genome Res* 2008;123:195-204
18. Nabel EG, and Braunwald E. A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *N Engl J Med* 2012;366(1):54-63.
19. Fishbein GA, and Fishbein MC. Arteriosclerosis: rethinking the current classification. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133(8):1309-16.
20. Sandison AT. Degenerative vascular disease in the Egyptian mummy. *Med Hist* 1962;6:77-81.
21. Mayerl C, Lukasser M, Sedivy R, Niederegger H, Seiler R, Wick G. Atherosclerosis research from past to present on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. *Virchows Arch* 2006;449(1):96-103.
22. George SJ, and Johnson J. Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanisms. In: George SJ and Lyon C (Eds.), *Pathogenesis of Atherosclerosis*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co; 2010. p. 1-20.
23. Yalçın R, Cemri M, Boyacı B, Timurkaynak T, Akata D, Ünlü M. *Gazi Tıp Dergisi* 2006;17:1-2.

24. Pasternak RC, Grundy SM, Levy D, Thompson PD. 27th Bethesda Conference: matching the intensity of risk factor management with the hazard for coronary disease events. Task Force 3. Spectrum of risk factors for coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 1996;27(5):978-90.
25. Yılmaz Y, Öngen Z. Lipid dışı risk faktörlerinin aterosklerozda önemi: C-reaktif protein odaklı bir değerlendirme. *Türk Kardiyol Dern Arş* 2009;37: 7-13.
26. Topol EJ, Nissen SE. Our preoccupation with coronary luminology. The dissociation between clinical and angiographic findings in ischemic heart disease. *Circulation* 1995;92: 2333-42.
27. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004;364(9438):937-52.
28. Sones FM Jr, Shirey EK. Cinecoronary arteriography. *Mod Concepts Cardiovasc Dis* 1962;31:735-738
29. Ertaş FS. Koroner anjiyografi. Candan İ, Oral D (Editörler). *Kardiyoloji*. Ankara Üniv Tıp Fak AŞ. 2002; p.229- 61.
30. Kaplan ZS, and Jackson SP. The role of platelets in atherothrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;51-61.
31. Dorsam RT, and Kunapuli SP. Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *Journal of Clinical Investigation* 2004;113(3):340-5.
32. Savi P, Nurden P, Nurden AT, Levy-Toledano S, & Herbert JM, Clopidogrel: A review of its mechanism of action. *Platelets* 1998;9:251-5.
33. Marteau F, Le Poul E, Communi D, Labouret C, Savi P, et al. Pharmacological characterization of the human P2Y12 receptor. *Mol Pharmacol* 2003;64(1):104-12.
34. Kunapuli SP, Dorsam RT, Kim S, Quinton TM. Platelet purinergic receptors. *Curr Opin Pharmacol* 2003;3: 175-80.
35. Geiger J, Brich J, Honig-Liedl P, et al. Specific impairment of human platelet P2Y(AC) ADP receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19: 2007-11.
36. Nguyen TA, Diodati JG, & Pharand C. Resistance to clopidogrel: A review of the evidence. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(8):1157-64.
37. Umman, B. Antiplatelet therapy in acute coronary syndromes without ST segment elevation. *Anadolu Kardiyol Derg* 2006;6(1): 13-19.
38. Montalescot G, Sideris G, Meuleman C, Bal-dit-Sollier C, Lellouche N, Steg PG, Slama M, Milleron O, Collet JP, Henry P, Beygui F, Drouet L. A randomized comparison of high clopidogrel loading doses in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: the ALBION (Assessment of the Best Loading Dose of Clopidogrel to Blunt

- Platelet Activation, Inflammation and Ongoing Necrosis) trial. *J Am Coll Cardiol* 2006;48(5):931-8.
39. Müller I, Seyfarth M, Rüdiger S, Wolf B, Pogatsa-Murray G, Schömig A, et al. Effect of a high loading dose of clopidogrel on platelet function in patients undergoing coronary stent placement. *Heart* 2001;85(1):92-3.
 40. Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, et al. Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting: The Clopidogrel Aspirin Stent International Cooperative Study (CLASSICS). *Circulation* 2000;102:624-9.
 41. Guray Y, Guray U, Korkmaz S. Clopidogrel resistance. *Anadolu Kardiyol Derg* 2009;9(3):231-7.
 42. Wang TH, Bhatt DL, Topol EJ. Aspirin and clopidogrel resistance: an emerging clinical entity. *Eur Heart J* 2006;27(6):647-54.
 43. Lau WC, Gurbel PA, Watkins PB, Neer CJ, Hopp AS, Carville DG, et al. Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance. *Circulation* 2004;109:166-71.
 44. Sibbing D, Koch W, Gebhard D, Schuster T, Braun S, Stegherr J, Morath T, Schomig A, von Beckerath N, Kastrati A. Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation* 2010;121(4):512-8.
 45. Sim SC, Risinger C, Dahl ML, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin Pharmacol Ther* 2006;79(1):103-13.
 46. Frere C, Cuisset T, Morange PE, Quilici J, Camoin-Jau L, Saut N, et al. Effect of cytochrome P450 polymorphisms on platelet reactivity after treatment with clopidogrel in acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 2008;101(8):1088-93.
 47. Müller I, Besta F, Schulz C, Massberg S, Schönig A, Gawaz M. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost* 2003;89:783-7.
 48. Wenaweser P, Dorffler-Melly J, Imboden K, Windecker S, Togni M, Meier B et al. Stent thrombosis is associated with an impaired response to antiplatelet therapy. *J Am Coll Cardiol* 2005;45: 1748-52.
 49. Weinshilboum R. Inheritance and Drug Response. *N Engl J Med* 2003;348:529-37.
 50. Feuk L, CR Marshall, RF Wintle, and SW Scherer. Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Hum Mol Genet* 2006;15 (1):57-66.

51. Jähn JA, von Spiczak S, Muhle H, Obermeier T, Franke A, Mefford HC, Stephani U, Helbig I. Iterative phenotyping of 15q11.2, 15q13.3 and 16p13.11 microdeletion carriers in pediatric epilepsies. *Epilepsy Res* 2014;108(1):109-16.
52. Zhou SF. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clin Pharmacokinet* 2009; 48:689-723.
53. <https://usa.healthcare.siemens.com/hemostasis/systems/pfa-100>. Erişim tarihi 24.04.2018
54. Stegnar M, Mojca Bozic M, Sollner M, et al. Utility of PFA closure time vs. optical aggregometry in assessing the efficacy of platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa antagonists in vitro. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1542-8.
55. Fressinaud E, Veyradier A, Sigaud M, et al. Therapeutic monitoring of von Willebrand disease: interest and limits of a platelet function analyzer at high shear rates. *Brit J Haematol* 1999;106:777-83.
56. Koscielny J, Ziemer S, Radtke H, et al. A practical concept for preoperative identification of patients with impaired primary hemostasis. *Clin Appl Thrombosis/Hemostasis* 2004;10:195-204.
57. Li, L. Han, J.L. Li, H.Y. Qiao, R. Yu, H.Y., Zhang, J., Gao, W. Clopidogrel resistance of patients with coronary artery disease and its correlation with platelet count and mean platelet volume. *Zhonghua Yi Xue Za Zh* 2013;12:916-20.
58. Jang J, Lim J, Chang K, Kim Y, Kim M, Park HI, Kim J, Shin S. A comparison of INNOVANCE® PFA P2Y and VerifyNow P2Y12 assay for the assessment of clopidogrel resistance in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *J Clin Lab Anal* 2012;26(4):262-15.
59. Grdinic A, Vojvodic D, Djukanovic N, Colic M, Grdinic AG, Ignjatovic V, Majstorovic I, Ilic V, Magic Z, Obradovic S, Ostojic M, Dolijanovic SP. PCI and clopidogrel: antiplatelet responsiveness and patient characteristics. *Acta Cardiol* 2011;66(3):333-40.
60. Tsantes A, Ikonomidis I, Papadakis I, Kottaridi C, Tsante A, Kalamara E, Kardoulaki A, Kopterides P, Kapsimali V, Karakitsos P, Lekakis J, Travlou A. Evaluation of the role of the new INNOVANCE PFA P2Y test cartridge in detection of clopidogrel resistance. *Platelets* 2012;23(6):481-9.
61. Saydam F, Değirmenci İ, Birdane A, Özdemir M, Ulus T, Özbayer C, Çolak E, Ata N, Güneş HV. The CYP2C19*2 and CYP2C19*17 Polymorphisms play a Vital Role in Clopidogrel Responsiveness after Percutaneous Coronary Intervention: A Pharmacogenomics Study. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2017;121(1):29-3.
62. Jaremo P, Lindahl TL, Fransson SG, Richter A. Individual variations of platelet inhibition after loading doses of clopidogrel. *J Intern Med* 2002;252:233-8.
63. Muller I, Besta F, Schulz C, Massberg S, Schonig A, Gawaz M. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost* 2003;89:783-7.

64. Mobley JE, Bresee SJ, Wortham DC, Craft RM, Snider CC, Carroll RC. Frequency of nonresponse antiplatelet activity of clopidogrel during pretreatment for cardiac catheterization. *Am J Cardiol* 2004;93: 456-8.
65. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, et al. Identification of low responders to a 300-mg clopidogrel loading dose in patients undergoing coronary stenting. *Thromb Res* 2005;115:101-8.
66. Dziewierz A, Dudek D, Heba G, Rakowski T, Mielecki W, Dubiel JS. Inter-individual variability in response to clopidogrel in patients with coronary artery disease. *Kardiol Pol* 2005;62:108-17.
67. Lev EI, Patel RT, Maresh KJ, et al. Aspirin and clopidogrel drug response in patients undergoing percutaneous coronary intervention: The role of dual drug resistance. *J Am Coll Cardiol* 2006;47: 27-33.
68. Dehbozorgi M, Kamalidehghan B, Hosseini I, Dehghanfard Z, Sangtarash MH, Firoozi M, Ahmadipour F, Meng GY, Houshmand M. Prevalence of the CYP2C19*2 (681 G>A), *3 (636 G>A) and *17 (-806 C>T) alleles among an Iranian population of different ethnicities. *Mol Med Rep* 2018;17(3):4195-4202.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Normal arter duvarı.....	4
Şekil 2. Aterosklerotik plak oluşumu.....	5
Şekil 3. Klopidoğrel metabolizması.....	8
Şekil 4. Klopidoğrel'in metabolitlerine dönüşümünde rol alan enzim sistemleri.....	9
Şekil 5. Klopidoğrel etki mekanizması ve ADP reseptörleri.....	10
Şekil 6. Siemens innovance® PFA-100 cihazı.....	17

TABLÖLAR

Tablo 1. Çalışmaya dahil edilen tüm hastalara ait demografik özellikler.....	22
Tablo 2. Klopidoğrel direnci olan ve olmayan bireylerin demografik verilerin istatistiğı.....	23
Tablo 3. Klopidoğrel direnci olan ve olmayan bireylerin biyokimyasal verilerin istatistiğı.....	24
Tablo 4. Klopidoğrel direnci olan ve olmayan bireylerin CYP450 genlerin CNV dağılımı ve oluşturdukları riskler.....	25

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Tekirdağ 'da doğdum. İlk ve ortaöğretimimi Tekirdağ 'da tamamladım. 2010 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde lisans eğitimime başladım. 2015 yılında Kimya Bölümü'nden mezun oldum. 2015 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Eczacılık Bilimleri A.D. Yüksek Lisans programına başladım.

EKLER

Ek-1: Edirne Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kararı



EDİRNE KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: 54

05.10.2016

Sayın Doç. Dr. Lokman AYAZ,
Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

Sorumlu araştırmacılığını ve yürütücülüğünü üstlendiğiniz EKAEK 2016/10 protokol numaralı ve “**Perkütan Koroner Girişim Sonrasında Klopidoğrel Direncinin CYP2C9 ve CYP2C19 Genlerinin Kopya Varyasyon Sayısı (CNV) ile İlişkisi**” başlıklı araştırma başvurunuz kurulumuzun 05.10.2016 tarih ve 13 sayılı toplantısında değerlendirilmiş ve Etik Kurul kararı ekte sunulmuştur.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hasan C. ÜMIT
Başkan

Ek: Edirne Klinik Araştırmalar Etik Kurul Karar Formu (2 Sayfa)

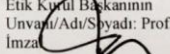
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Perkütan Koroner Girişim Sonrası Klopidogrel Direncinin CYP2C9 ve CYP2C19 Genlerinin Kopya Sayısı Varyasyon (CNV) ile İlişkisi
ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	EKAEK 2016/10

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUNUN ADI	Edirne Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ	Trakya Üniversitesi Balkan Yerleşkesi Tıp Fakültesi Temel Bilimler Bloğu kat 3, Edirne
	TELEFON	284 235 75 79
	FAKS	284 235 75 79
	E-POSTA	kaek@trakya.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Lokman AYAZ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyokimya			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	Yoktur			
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	Yoktur			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	Yoktur			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input checked="" type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma		<input type="checkbox"/>			
Diğer ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

EĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	03.10.2016	1.0
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	03.10.2016	1.0	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU		-	Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input checked="" type="checkbox"/>	Akış şeması-Prof. Dr. A. Muzaffer DEMİR, Doç. Dr. Lokman AYAZ, Yrd. Doç Dr. M. Adem YILMAZTEPE ve Seyhan ŞAHİN'e ait özgeçmişler- Literatürler		

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Hasan C. ÜMİT
İmza: 


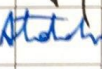
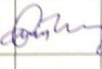
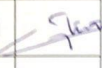

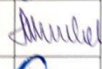




Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

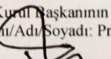
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Perkütan Koroner Girişim Sonrası Klopidogrel Direncinin CYP2C9 ve CYP2C19 Genlerinin Kopya Sayısı Varyasyon (CNV) ile İlişkisi
ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	EKA/EK 2016/10

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:13/5	Tarih: 05.10.2016
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmannın/çalışmanın gerekeçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmannın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.	

EDİRNE KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Hasan C. ÜMIT

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. Hasan C. ÜMIT	İç Hastalıkları	Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Y. Atakan SEZER	Genel Cerrahi	Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA	Tıp Tarihi ve Etik	Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Koray ELTER	Kadın Hastalıkları ve Doğum	Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLI
Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK	Fizyoloji	Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLI
Prof. Dr. Necdet SÜT	Biyoistatistik	Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLI
Doç. Dr. Tefvik AKTOZ	Üroloji	Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Alkin ÇOLAK	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Işık GÖRKER	Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR	Tıbbi Genetik	Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLI
Yrd. Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ	Tıbbi Farmakoloji	Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Esin SEÇGİN SAYHAN	Halk Sağlığı	Edirne Halk Sağlığı Müdürlüğü	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Av. Aydın BALKAN	Hukuk	Serbest	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLI
Em. Öğr. Sinan SEÇKİN	Sağlık Meslek Mensubu Olmayan Üye	Emekli	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

* Araştırma İle İlişki
** :Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Hasan C. ÜMIT
İmza: 

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.



TC Sağlık Bakanlığı
Türkiye İlaç ve
Tıbbi Cihaz Kurumu

HİZMETE ÖZEL

T.C
SAĞLIK BAKANLIĞI
Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu

NORMAL

Sayı : 93189304-514.99-152998
Konu : Klinik Araştırma [16-AKD-118]

18.11.2016

Sayın Doç Dr Lokman Ayaz
Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Edirne

İlgi : a) Kurum evrak kayıt 07.10.2016 tarihli, 251584 sayılı yazımız,
b) Kurum evrak kayıt 20.10.2016 tarihli, 262779 sayılı yazımız.

Doç Dr Lokman Ayaz sorumluluğunda yapılması planlanan “Perkütan Koroner Girişim Sonrası Klopidoğrel Direncinin CYP2C9 ve CYP2C19 Genlerinin Kopya Sayısı Varyasyon (CNV) ile İlişkisi” konulu araştırma ile ilgili olarak;

Bahsi geçen çalışmanın 15.05.1987 tarih ve 19461 sayılı resmi gazetede yayımlanan “Sağlık Hizmetleri Temel Kanunu”nda 06.04.2011 tarihi ile kabul edilen Ek Madde-10 “Herhangi bir tedavi yöntemi veya araçlarının veyahut ruhsat veya izin alınmış olsa dahi ilaç ve terkiplerinin, tıbbi ve biyolojik ürünler, bitkisel ürünler, kozmetik ürünler ve hammaddeleri ile tıbbi cihazların bilimsel araştırma amacıyla insanlar üzerinde kullanılabilmesi için Sağlık Bakanlığı veya bağlı kuruluşlarından izin alınması” kapsamına girmemesi nedeni ile çalışmanın sadece ilgili etik kurul kararı doğrultusunda yürütülmesi tarafımızca uygun bulunmuştur. Gönüllülerden bilgilendirilmiş gönüllü olur formu alınması gerekmektedir.

Yazımızın bir örneğinin ilgili etik kurula iletilmesi hususunda bilginizi ve gereğini rica ederim.

Dr. Ecz. Elif İnci SOMUNCUOĞLU
Kurum Başkanı a.
Daire Başkanı V.

Söğütözü Mahallesi, 2176.Sokak No:5 06520 Çankaya/ANKARA
Tel: (0 312) 218 30 00- Fax : (0 312) 218 34 60 www.titck.gov.tr

Bilgi için: Berna KÖSEKAYA
Unvan: Eczacı

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu uyarınca elektronik olarak imzalanmıştır. Doküman
<http://ebs.titck.gov.tr/Basvuru/Elmza/Kontrol> adresinden kontrol edilebilir. Güvenli elektronik imza aslı ile aynıdır.
Dokümanın doğrulama kodu : Z1AxQ3NRRG83Q3NRZW56YnUy

**Ek-2: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu
Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur form**

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU**

Bir araştırma projesine davet edilmektesiniz. Bu araştırmanın yürütülmesi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Araştırmaya katılmaya karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını anlamanız çok önemlidir.

Araştırmaya katılım tamamen gönüllülük ilkesine bağlı olup katılmayı reddetmeniz herhangi bir cezaya ya da elde edilecek herhangi bir yararın kaybedilmesine kesinlikle yol açmayacaktır.

Aynı şekilde araştırmaya katılmayı kabul ettikten sonra da araştırmanın herhangi bir yerinde hiçbir neden göstermeksizin herhangi bir zarar ya da elde edilmesi beklenen bir yarar kaybına yol açmadan araştırmadan çekilebilirsiniz.

Araştırma kapsamında yapılan işlemlerin mali giderleri araştırmacılar ya da destekleyici (TÜBİTAK) tarafından karşılanacak olup size ya da sosyal güvenlik kurumunuza hiçbir mali yük getirmeyecektir.

Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun ve araştırmaya katılmak isteyip istemediğinize karar vermek için lütfen biraz düşünün.

Araştırmanın bilimsel adı: Perkütan Koroner Girişim Sonrası Klopidoğrel Direncinin CYP2C9 ve CYP2C19 Genlerinin Kopya Varyasyon Sayısı (CNV) ile ilişkisi

- **Araştırmanın anlaşılabilir basit adı:** Stent takılan hastalarda ilaç metabolizmasında etkili olan CYP genlerin kopya sayısının ilaç direnci ile ilişkisini araştırmak
- **Sorumlu Araştırmacının adı ve görev yeri:** Doç. Dr Lokman AYAZ, T.Ü. Eczacılık Fakültesi Biyokimya AD

Araştırmanın amacı: Bu çalışmada, hastaneye Akut koroner sedromu tanısı başvurusu ve elektif veya acil perkütan koroner girişim (PKG) uygulanan, 300 veya 600 mg/gün klopidoğrel doz yüklenen, en az 7 gün süreyle standart doz (75 mg/gün) klopidoğrel kullanan hastalardan alınan kan örneklerinde PFA-100 İnnovance P2Y kiti ile ilaç direnci oluşan ve oluşmayan bireylerdeki klopidoğrel metabolizmasında etkili olan CYP2C19 ve CYP2C9 genlerini CNV klopidoğrel direnç mekanizması ile arasındaki ilişkiyi incelemeyi amaçlamaktayız.

Bu projede; 1. Hastanemizde klopidoğrel direnç prevlansı ortaya konulacaktır

2. Birçok ilaç metabolizmasında görevli olan belirli CYP genlerin CNV belirlenecek

3. PKG hastalardaki oluşan klopidoğrel direnci ile bu ilacın metabolizmasında rol oynayan CYP genlerin CNV ile ilişkisi ortaya konulacaktır.

- **Araştırmanın niteliği (klinik, laboratuvar, epidemiyolojik, tez çalışması vb.):** Tez çalışması
- **Araştırmanın başlama tarihi ve öngörülen süresi:** 01.12.2016, 12 ay
- **Araştırmaya katılması beklenen gönüllü sayısı:** 200
- **Araştırma sırasında uygulanacak olan invaziv yöntemler dahil olmak üzere gönüllüye uygulanacak yöntem, girişim ve tedavilerin tümü:** ? Hastaneye akut koroner sedromu tanısı ile gelen ve elektif veya acil PKG uygulanan hastalardan 5 ml kan örneği alınacaktır.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu (TÜ_BAEK)
Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu
14 Nisan 2014 v1.0

Gönüllünün/Vasisinin imzası:

Sayfa 1/4

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Herhangi bir tedavi veya girişim olmayacaktır, sadece rutin tanı ve tedavi protokolü PKG uygulanan hastalardan CNV çalışması için kan örneği alınacaktır.

- **Araştırmanın deneysel kısımları:** Bu çalışmaya katılan gönüllü üzerinde farklı bir tedavi uygulanmayacaktır, doktorunuz her zamanki gibi tedavinizi sürdürecektir. Bu çalışma için, doktora gittiğinizde doktorunuz sizi muayene edecek ve gerekli gördüğü takdirde rutin analiz için en fazla 5 ml (yaklaşık 1 çorba kaşığı kadar) kan vermenizi isteyecektir. Alınacak kan örneğinden genetik yapınıza ait CNV düzeyleri çalışılacaktır.
- **Farklı uygulama ve girişimler için gönüllülerin araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığı:** Farklı uygulama yok, PKG uygulanan hastalar alınacaktır
- **Katılımcının araştırmaya dahil edilme nedeni:** PKG sonrası tedavi amacı ile kullanılan klopidoğrel ilaç direncin CYP genlerin CNV ile ilişkisini ortaya koymak için dahil edilecektir
- **Araştırmadan doğrudan gönüllü için beklenen yarar:** Eğer bu genler ile ilaç direnci arasında bir ilişki bulunursa, ilacın dozunu ayarlayabilme olasılığı bulunabilir.
- **Gönüllünün sorumlulukları:** Herhangi bir sorumluluğu bulunmamaktadır.
- **Gönüllünün (araştırma hamilelerde veya lohusalarda yapılacaksa ise embriyo, fetüs veya süt çocuklarının da) maruz kalabilecekleri riskler veya rahatsızlıklar:** Bu hastalar çalışmaya dahil edilmeyecektir.
- **Risklere karşı alınan önlemler:** Bu çalışmanın herhangi bir riski yoktur, rutin yapılan PKG sonrası sadece rutin olarak verdiği tam kan örneği alınacaktır.
- **Gönüllüye alternatif olarak uygulanabilecek olan diğer yöntemler ve bunların olası yarar ve zararları:** Herhangi bir alternatif yöntem uygulanmayacaktır.
- **Araştırmaya bağılı olarak bir zarar oluştuğunda verilecek tazminat ve sağlanacak tedaviler:** Siz bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Araştırmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Araştırmaya katıldığımız için size ek bir ödeme yapılmayacak ve siz de talep edemeyeceksiniz. Siz araştırmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekme hakkına sahipsiniz. Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, size her türlü tıbbi müdahale sağlanacaktır.
- **Gönüllülere yapılacak ulaşım, yemek gibi masraflara ilişkin ödemeler:** Araştırmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Araştırmaya katıldığımız için size ek bir ödeme yapılmayacak ve siz de talep edemeyeceksiniz
- **Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler:** Yeterli sayıda hastaya ulaştığında veya projenin süresi bittiğinde
- **Araştırma sonunda gönüllülere bilgi verilecek mi?** İsteyen gönüllülere araştırma sonuçları verilebilir.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

- Gönüllülerin araştırma hakkında, kendileri hakkında ya da araştırmayla ilgili herhangi bir beklenmedik olay hakkında daha fazla bilgi edinebilmesi için temasa geçebileceği kişi ve kendisine günün 24 saatinde erişebileceği telefon numarası:

Yrd.Doç Dr Mustafa Adem YILMAZTEPE, T.Ü Kardiyoloji AD;
Tel; 05335205712

- Gönüllülerden elde edilecek olan biyolojik materyallerin hangi amaçlarla kullanılacağı: CYP genleri için CNV analizi için kullanılacaktır.
- Gönüllülerden elde edilecek biyolojik materyaller üzerinde genetik araştırma yapılabilmesi için onay:

“Perkütan Koroner Girişim Sonrası Klopidoğrel Direncinin CYP2C9 ve CYP2C19 Genlerinin Kopya Varyasyon Sayısı (CNV) ile ilişkisi” araştırması kapsamında alınan tam kan örneğimin;

Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.

İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.

Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Yukarıda açıkça tanımlanan çalışmanın ne amaçla, kimler tarafından ve nasıl gerçekleştirileceği anlayabileceğim bir ifade ile bana anlatıldı.

Bu araştırmadan elde edilen bilgilerin bana ve başka insanlara sağlayacağı yararlar bana anlatıldı.

Araştırma sırasında meydana gelebilecek riskler ve rahatsızlıklar bana anlayabileceğim bir dille anlatıldı.

Araştırma sırasında oluşabilecek zarar durumunda gerçekleştirilecek işlemler bana anlatıldı.

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ve haklarım konusunda 24 saat bilgi alabileceğim bir yetkilinin adı ve telefonu bana verildi.

Araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik ve testler ile tıbbi bakım hizmetleri için benden ya da bağı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyeceği bana anlatıldı.

Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.

Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.

Sorumlu araştırmacı / hekime haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.

Bu çalışmaya katılmayı reddetmem ya da sonradan çekilmem halinde hiçbir sorumluluk altına girmedeğimi ve bu durumun şimdi ya da gelecekte gereksinim duyduğum tıbbi bakımı hiçbir biçimde etkilemeyeceğini biliyorum.

Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı / hekim ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmali nedeniyle, benim onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabileceğini biliyorum.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun gerekli gördüğünde, gizliliğimin korunması ilkesine uygun olarak, araştırma konusuyla ilişkili orijinal tıbbi kayıtlarıma doğrudan erişimde bulunabileceğini biliyorum

İlgili yasal düzenlemeler gereğince kimliğimi ortaya çıkaracak kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanmayacağı; araştırma sonuçlarının bilimsel toplantılarda sunulabileceği ya da yayımlanabileceği, ancak, bu tür durumlarda kimliğimin kesin olarak gizli tutulacağı bana açıklandı.

Araştırma konusuyla ilgili olarak, çalışmaya devam etme isteğimi etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde bana ya da yasal temsilcime zamanında bilgilendirme yapılacağı bana açıklandı.

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu adlı metni kendi anadilimde okudum.

Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanıdım ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım.

Yukarıda konusu belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı.

Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu'nun tam imzalı bir kopyasını aldım.

• **Gönüllünün; (El yazısı ile)**

Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya faks numarası):

.....
.....

Tarih:

• **Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için; (El yazısı ile)**

Veli ya da Vasisin Adı- Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Adresi (varsa telefon ve/veya faks numarası):

.....
.....

Tarih:

• **Açıklamaları yapan araştırmacının**

Unvanı, Adı- Soyadı: (El yazısı ile)

Görev yaptığı bölüm:

İmzası:

Tarih: