

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PERKÜTAN KORONER GİRİŞİM SONRASI KLOPİDOGREL
DİRENCİNİN CYP2C19, CYP3A4, CYP2B6, ABCB1, ITGB3 VE
PON1 GENLERİNDEKİ VARYASYONLAR İLE İLİŐKİŐİ**

DOKTORA TEZİ

FARUK SAYDAM

**DANIŞMAN
PROF. DR. İRFAN DEĞİRMENCİ**

OCAK 2014

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PERKÜTAN KORONER GİRİŞİM SONRASI KLOPİDOGREL
DİRENCİNİN CYP2C19, CYP3A4, CYP2B6, ABCB1, ITGB3 VE
PON1 GENLERİNDEKİ VARYASYONLAR İLE İLİŞKİSİ**

DOKTORA TEZİ

FARUK SAYDAM

DANIŞMAN

PROF. DR. İRFAN DEĞİRMENCİ

Proje No: 201011044 (ESOGÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu)

KABUL VE ONAY SAYFASI

Faruk SAYDAM'ın Doktora Tezi olarak hazırladığı "Perkütan Koroner Girişim Sonrası Klopidoğrel Direncinin CYP2C19, CYP3A4, CYP2B6, ABCB1, ITGB3 ve PON1 Genlerindeki Varyasyonlar ile İlişkisi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

22/01/2014

ÜYE: Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ



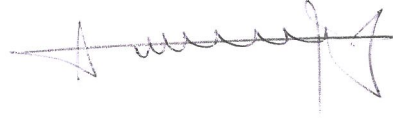
ÜYE: Prof. Dr. Hayat ERDEM YURTER



ÜYE: Prof. Dr. İrfan DEĞİRMENÇİ



ÜYE: Prof. Dr. Alparslan BİRDANE



ÜYE: Doç. Dr. Mahmut ÖZDEMİR



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
24/01/2014 tarih ve 987/4586 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Kazım ÖZDAMAR

Enstitü Müdürü

ÖZET

PERKÜTAN KORONER GİRİŞİM SONRASI KLOPIDOGREL DİRENCİNİN CYP2C19, CYP3A4, CYP2B6, ABCB1, ITGB3 VE PON1 GENLERİNDEKİ VARYASYONLAR İLE İLİŞKİSİ

Klopidogrel direnç mekanizmasını araştırdığımız çalışmamızda özellikle CYP2C19, CYP3A4, CYP2B6, ABCB1, ITGB3 ve PON1 genlerindeki varyasyonların bu mekanizma ile olan ilişkisini belirlemeyi amaçladık. Bu amacımızı gerçekleştirirken klopidogrelle dirençli bireylerin ve klopidogrel aktivitesi ile ilişkili varyasyonların sıklığını Türk toplumunda ortaya çıkarmak ulaşmak istediğimiz hedeflerimiz arasındaydı.

Çalışmamıza elektif veya acil stent implantasyonlu perkütan koroner girişim yapılan 223 hasta dahil edildi. En az 7 gün süreyle standart doz (75 mg/gün) klopidogrel kullanan hastalardan alınan kan örneklerinde VerifyNow P2Y12 kiti ile trombosit reaktivitesi (PRU) ve % inhibisyon ölçüldü. Farklı tüpe alınan kan örneklerinden izole edilen DNA'ların genetik varyasyon analizleri için Sequenom MassARRAY sistemi ile genotipleme protokolleri yürütüldü. Hastaların genetik varyasyon genotipleri, ilaç kullanım durumu, demografik ve klinik özellikleri trombosit reaktivitesine göre istatistiksel testler ile analiz edildi.

PRU değeri >208 olan hastalar klopidogrel tedavisine cevap vermeyen (klopidogrelle dirençli) bireyler olarak gruplandırıldığında 69 (%30,9) hastanın klopidogrelle dirençli, 154 (%69,1) hastanın ise klopidogrelle dirençsiz olduğu belirlendi. CYP2C19*2 (G636A) tek nükleotid polimorfizmi ile klopidogrel direnci arasında anlamlı düzeyde ilişki bulundu ($\chi^2=26,79$, $p<0,001$). Bu polimorfizmin A allelinin frekansı dirençli hastalarda yüksek olmakla birlikte odds oranı G alleleline göre 4,08'idi (%95 CI 2,39-6,96). CYP2C19*17 (C806T) tek nükleotid polimorfizminin CT genotiplerinin PRU değerleri CC genotiplerine göre daha düşük ($p=0,036$), % inhibisyon değerleri ise CC genotiplerine göre daha yüksekti ($p=0,025$). Diğer genetik varyasyonlardan hiçbiri istatistiksel açıdan klopidogrel direnci ve antitrombosit yanıt ile ilişkili bulunmadı. Hasta grubumuzda CYP2C19*4, CYP2C19*7 ve CYP2C19*8

varyasyon allellerinin herhangi birini taşıyan birey bulunmaz iken, CYP2C19*3 allelini taşıyanların oranı %0,9'du. Genetik dışı faktörler klopidogrel tedavisine cevap durumuna göre karşılaştırıldığında ise sadece ileri yaşın klopidogrel direnci ile ilişkili olduğu belirlendi ($p<0,001$).

CYP2C19*2 polimorfizminin klopidogrel direncine neden olduğu, CYP2C19*17 polimorfizminin ise klopidogrel antitrombosit aktivitesini artırdığı çalışmamız ile doğrulanmış oldu. Ayrıca, klopidogrel metabolizmasından yoksun olduğu bildirilen CYP2C19*4, CYP2C19*7 ve CYP2C19*8 varyasyonlarının tespit edilmemesi, Türk toplumuna ait yeni bir bulgu olması nedeniyle önemlidir.

Anahtar kelimeler: perkütan koroner girişim, klopidogrel, tek nükleotid polimorfizm, trombosit

SUMMARY

ASSOCIATION OF CLOPIDOGREL RESISTANCE WITH VARIATIONS IN CYP2C19, CYP3A4, CYP2B6, ABCB1, ITGB3 AND PON1 GENES AFTER PERCUTANEOUS CORONARY INTERVENTION

In this study in which we investigated clopidogrel resistance mechanism, we aimed to determine the association of variations in CYP2C19, CYP3A4, CYP2B6, ABCB1, ITGB3, and PON1 genes with this mechanism. While reaching this our objective, to reveal the prevalence of individuals resistant to clopidogrel and of variations related with clopidogrel activity in the Turkish population were among our targets.

223 patients who underwent elective or emergency percutaneous coronary intervention with stent implantation were included in our study. Platelet reactivity (PRU) and % inhibition were measured with VerifyNow P2Y12 in blood samples collected from patients that took a standard dose of clopidogrel (75 mg/day) for at least 7 days. For genetic variation analyses of DNAs isolated from blood samples collected in separate tubes, genotyping protocols were carried out with Sequenom MassARRAY system. Genetic variation genotypes, drug use statuses, demographic and clinical characteristics of patients were compared with platelet reactivity via statistical tests.

When grouped the patients with PRU values >208 as nonresponder to clopidogrel treatment (resistant to clopidogrel), it was determined that 69 (30,9%) patients were resistant to clopidogrel and 154 (69,1%) patients were nonresistant to clopidogrel. A significant association was found between CYP2C19*2 (G636A) single nucleotide polymorphism and clopidogrel resistance ($\chi^2=26,79$, $p<0,001$). A allele frequency of this polymorphism was high in patients with resistance, its odds ratio was 4,08 compared to G allele (95% CI 2,39-6,96). PRU values of CYP2C19*17 (C806T) single nucleotide polymorphism CT genotypes were lower ($p=0,036$) and % inhibition values of CT genotypes were higher compared to CC genotypes ($p=0,025$). None of the other genetic variations was found to be statistically associated with clopidogrel resistance and antiplatelet response. While individuals carrying any of CYP2C19*4, CYP2C19*7, CYP2C19*8 variation alleles were not present in our patient group, the rate of

individuals with CYP2C19*3 allele was 0,9%. When the non-genetic factors are compared with response to clopidogrel treatment, only the higher age was determined to be associated with clopidogrel resistance ($p<0,001$).

It was confirmed by our study that CYP2C19*2 polymorphism caused clopidogrel resistance and CYP2C19*17 polymorphism increased antiplatelet activity of clopidogrel. In addition, the fact that CYP2C19*4, CYP2C19*7, CYP2C19*8 variations reported to lack clopidogrel metabolism unable to be detected bears importance in the sense that it is a new finding on the Turkish population.

Keywords: percutaneous coronary intervention, clopidogrel, single nucleotide polymorphism, platelet

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLO DİZİNİ.....	xii
ŞEKİL DİZİNİ.....	xiv
GRAFİK DİZİNİ.....	xv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Ateroskleroz.....	4
2.1.1. Ateroskleroz Oluşum Hipotezleri.....	5
2.1.2. Ateroskleroz Patogenezi.....	6
2.1.3. Aterotromboz.....	9
2.2. Koroner Arter Hastalığı.....	12
2.2.1. Risk Faktörleri.....	14
2.2.2. Tedavi Yöntemleri.....	17
2.3. Klopidoğrel.....	19
2.3.1. Klopidoğrel Direnci.....	22
2.3.1.1. İlaç Tedavisine Uyumsuzluk.....	23

2.3.1.2. İlaç Etkileşimi.....	24
2.3.1.3. Genetik Polimorfizmler.....	25
2.4. Paraoksonaz Enzim Grubu.....	29
2.4.1. Paraoksonaz 1 Enzimi.....	30
2.4.2. Paraoksonaz 1 Geni.....	31
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	34
3.1. GEREÇ.....	34
3.1.1. Çalışma Grubu Bireyleri ve Örneklerin Toplanması.....	34
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	36
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler.....	36
3.2. YÖNTEM.....	39
3.2.1. Hematolojik ve Biyokimyasal Ölçümler.....	39
3.2.2. Antitrombosit Aktivite Ölçümü.....	40
3.2.3. DNA İzolasyonu ve Miktarının Belirlenmesi.....	45
3.2.4. Genotip Analizi.....	48
3.2.4.1. İplex GOLD SNP Genotipleme Prensibi.....	49
3.2.4.2. İplex GOLD SNP Genotipleme Protokolü.....	54
3.2.5. İstatistiksel Analiz.....	62
4. BULGULAR.....	64
5. TARTIŞMA.....	90
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	112

7. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	115
8. ÖZGEÇMİŞ.....	130

TABLO DİZİNİ

Tablo 3.1. Hastaların değerlendirilen demografik ve klinik özellikleri	35
Tablo 3.2. DNA amplifikasyonu için dizayn edilen oligonükleotid primer çiftleri	55
Tablo 3.3. Primer uzama reaksiyonu için dizayn edilen oligonükleotid primerler	56
Tablo 4.1. Klopidoğrel tedavisine cevap durumuna göre gruplandırılan hastaların PRU ve % inhibisyon değerlerinin istatistiksel analizi	65
Tablo 4.2. Hastaların demografik ve klinik özelliklerinin klopidoğrel tedavisine cevap durumuna göre dağılımları ve istatistiksel analizi.....	69
Tablo 4.3. Hastaların ilaç kullanım durumlarının klopidoğrel tedavisine cevaba göre dağılımları ve istatistiksel analizi	70
Tablo 4.4. Hastaların klinik parametrelerinin klopidoğrel tedavisine cevap durumuna göre dağılımı ve istatistiksel analizi	71
Tablo 4.5. Hastalarda genetik varyasyon genotiplerinin klopidoğrel tedavisine cevap durumuna göre dağılımı ve istatistiksel analizi	72
Tablo 4.5. Hastalarda genetik varyasyon genotiplerinin klopidoğrel tedavisine cevap durumuna göre dağılımı ve istatistiksel analizi (devamı)	73
Tablo 4.5. Hastalarda genetik varyasyon genotiplerinin klopidoğrel tedavisine cevap durumuna göre dağılımı ve istatistiksel analizi (devamı)	74
Tablo 4.6. CYP2C19*2 (G681A) genetik varyasyonunda atasal genotipe (GG) ve allele (G) göre risk durumu.....	76
Tablo 4.7. CYP2C19*2 ve CYP2C19*3 varyasyon allelerini barındırmayan hastalarda CYP2C19*17 (C806T) polimorfizmi genotiplerinin klopidoğrel tedavisine cevap durumuna göre dağılımı ve istatistiksel analizi	76

Tablo 4.8. CYP2C19*2 (G681A) polimorfizmi genotiplerinin PRU değer ortalamaları, % inhibisyon değer aralıkları ve istatistiksel analizi.....	77
Tablo 4.9. Genetik varyasyon genotiplerine göre gruplandırılan hastaların PRU, % inhibisyon değerleri ve istatistiksel analizi.....	80
Tablo 4.9. Genetik varyasyon genotiplerine göre gruplandırılan hastaların PRU, % inhibisyon değerleri ve istatistiksel analizi (devamı).....	81
Tablo 4.10. CYP2C19*2 ve CYP2C19*3 varyasyon allelerini barındırmayan hastalarda genetik varyasyon genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değer aralıkları ve istatistiksel analizi.....	84
Tablo 4.10. CYP2C19*2 ve CYP2C19*3 varyasyon allelerini barındırmayan hastalarda genetik varyasyon genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değer aralıkları ve istatistiksel analizi (devamı).....	85
Tablo 4.11. CYP2C19*2 ve CYP2C19*17 polimorfizmleri haplotiplerinin PRU ortalama±standart sapma değerleri ve istatistiksel analizi.....	87
Tablo 4.12. CYP2C19*2 ve CYP2C19*17 polimorfizmleri haplotiplerinin % inhibisyon değer aralıkları ve istatistiksel analizi.....	88

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Normal arter duvarı	6
Şekil 2.2. Endotel hasarı ve monositlerin göç etmesi.....	7
Şekil 2.3. Yağlı çizgi oluşumu.....	8
Şekil 2.4. Aterosklerotik plak oluşumu.....	9
Şekil 2.5. Trombüs oluşumunda trombositlerin fonksiyonu.....	10
Şekil 2.6. Trombosit aktivasyonunda görev alan uyarıcılar ve inhibitörleri.....	11
Şekil 2.7. Klopidoğrel in antitrombosit aktivitesinde görev alan enzim ve reseptörler...20	
Şekil 2.8. Klopidoğrel metabolizması.....	21
Şekil 2.9. Paraoksonaz enziminin üç boyutlu görünümü	30
Şekil 3.1. VerifyNow sistem cihazı ve kiti.....	41
Şekil 3.2. VerifyNow P2Y12 kitinin ölçüm fonksiyonu.....	42
Şekil 3.3. Sequenom MassARRAY® Sistemi.....	49
Şekil 3.4. İplex GOLD Reaksiyonu	50

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 3.1. 100 µl kandan izole edilen DNA'nın elüsyon hacmine göre konsantrasyon grafiği	45
Grafik 4.1. Klopidoğrel tedavisine cevap veren ve vermeyen hasta gruplarının PRU (VerifyNow P2Y12 Reaction Unit) değerlerinin box plot grafiği.....	65
Grafik 4.2. Klopidoğrel tedavisine cevap veren ve vermeyen hasta gruplarının % inhibisyon (VerifyNow P2Y12) değerlerinin box plot grafiği	66
Grafik 4.3. Klopidoğrel tedavisine cevap veren ve vermeyen hasta gruplarının PRU (VerifyNow P2Y12 Reaction Unit) değerlerine göre frekanslarının dağılımı	67
Grafik 4.4. CYP2C19*2 (G681A) polimorfizmi genotiplerinin PRU (P2Y12 Reaction Unit) değerlerinin error bar grafiği.....	78
Grafik 4.5. CYP2C19*2 (G681A) polimorfizmi genotiplerinin % inhibisyon değerlerinin box plot grafiği.....	78
Grafik 4.6. CYP2C19*17 (C806T) polimorfizmi genotiplerinin PRU (P2Y12 Reaction Unit) değerlerinin error bar grafiği.....	82
Grafik 4.7. CYP2C19*17 (C806T) polimorfizmi genotiplerinin % inhibisyon değerlerinin box blot grafiği.....	82
Grafik 4.8. CYP2C19*2 ve CYP2C19*17 (C806T) polimorfizmleri haplotiplerinin PRU değerlerinin error bar grafiği.....	87
Grafik 4.9. CYP2C19*2 (G681A) ve CYP2C19*17 (C806T) polimorfizmleri haplotiplerinin % inhibisyon değerlerinin box blot grafiği.....	89

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ADP	Adenozin difosfat
AKS	Akut koroner sendrom
ALBION	Assessment of the Best Loading Dose of Clopidogrel to Blunt Platelet Activation, Inflammation and Ongoing Necrosis
ApoA-1	Apolipoprotein A-I
BASE	Temel agregasyon
CABG	Koroner arter bypass greftleme
CYP	Sitokrom P450
DNA	Deoksiribonükleikasit
EKG	Elektrokardiyografi
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu
GRAVITAS	Gauging Responsiveness With a VerifyNow Assay: Impact on Thrombosis and Safety
GWAS	Genome-Wide Association Studies
HDL	Yüksek dansiteli lipoprotein
ITGB3	İntegrin, beta 3
iso-TRAP	Trombin Reseptörünü Aktive Edici Peptid

KAH	Koroner arter hastalığı
KKH	Koroner kalp hastalığı
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
LTA	Işık transmisyon agregometrisi
MALDI-TOF	Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi
MDR1	Multidrug resistance protein 1
NSTEMI	ST yükselmesiz miyokard infarktüsü
OCLA	Omeprazole Clopidogrel Aspirin
PAR	Proteaz ile aktive olan reseptör
PAR4-AP	PAR4 Aktive Edici Peptid
PCR	Polimerase Chain Reaction
PGE1	Prostaglandin E1
PIA1	Trombosit antijeni 1
PIA2	Trombosit antijeni 2
PKG	Perkütan koroner girişim
PON	Paraoksonaz
PON1	Paraoksonaz 1
PRU	P2Y12 reaksiyon birimi
ROC	Receiver Operating Characteristic
SAP	Shrimp Alkalen Fosfataz

SNP	Single nucleotide polymorphism
STEMI	ST yükselmeli miyokard infarktüsü
TEKHARF	Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri
TxA2	Tromboksan A2
VERITAS	VERIfy Thrombosis risk ASsessment
VLDL	Çok düşük dansiteli lipoprotein

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Arterlerde “aterom” veya “plak” olarak ifade edilen yapısal bozukluklara neden olan patolojiye ateroskleroz adı verilmektedir. Aterosklerotik plaklar, arter içerisine çıkıntı yaparak arter lümenini daraltır ve kan akışını sınırlandırır (113). İleri evrelerde arter lümenini tamamen tıkarayarak iskemik olaylara neden olur. Bu tıkanma, plak dejenerasyonu sonucu aterotromboz olayından da kaynaklanabilir. Aterotromboz, trombositlerin arterlerde endotel bir hasar nedeniyle agregasyonu sonucu trombus oluşturmalarıdır. Bu nedenle, trombositler kararlı bir aterosklerotik plağın kararsız bir lezyon haline dönüşümü sürecinde anahtar rol oynayan kan hücreleridir (38,60,122).

Aterosklerozun kalp kasını besleyen koroner arterlerde meydana gelmesi ile oluşan hastalığa koroner arter hastalığı (KAH) adı verilmektedir. Koroner arter hastalığında ateroskleroz ve aterotromboz sonucu kalp kasına kan akışı sınırlandırılır. Böylelikle, miyokard iskemisi meydana gelmektedir (69,86). Miyokard iskemisi semptomlarının oluşturduğu klinik durum, kararsız göğüs ağrısı (unstable angina) ve ST yükselmeli miyokard infarktüsü (STEMI) olarak ikiye ayrılır (9).

Avrupa Kardiyoloji Derneğinin 2012 yılında yayımladığı istatistiksel verilere göre; tek başına koroner arter hastalığı, Avrupa'daki ölümlerin en yaygın nedenidir (yılda 1.8 milyon ölüm) (90). Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı'nın 2012 sağlık istatistikleri yıllık mortalite raporlarına bakıldığında iskemik kalp hastalıklarının içinde bulunduğu dolaşım sistemi hastalıklar grubu, %37,93 oranla en yüksek ölüm nedeni olarak gösterilmiştir (52).

Miyokardın ihtiyacı olan normal kan akışını sağlayabilmek adına koronerlerdeki kan akışını sınırlandıran plaklara karşı en yaygın kullanılan fiziksel müdahale; koroner anjiyografi ile balon anjiyoplasti (PTCA-Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty) ve stent implantasyonudur. Balon anjiyoplasti ve stent implantasyonu, kardiyoloji uzmanları tarafından kan damarına sokulan bir kateter ile yapıldığından cerrahi olmayan işlemlerdir (22).

Balon anjiyoplasti ve stent implantasyonunun ilaç ile desteklenmesi bir zorunluluktur (14). Çünkü plak oluşumu nedeniyle arter dejenerasyonu ve koroner arterlerdeki kan akışını normal duruma getirmek için yapılan fiziksel müdahaleler, endotel altı ekstraselüler matriks bileşenlerini ortaya çıkarmaktadır. Bu bileşenlerden kollajen ve von Willebrand faktörü, trombositlerin arter duvarına yapışmasını sağlayan çok iyi iki yardımcıdır. Glikoprotein reseptörleri GPVI and GPIb/V/IX aracılığı ile endotel altı bileşenlere bağlanan trombositler için agregasyonun tetiği çekilmiş ve trombositlerden ADP, tromboksan A2 ve trombin gibi bir dizi lokal uyarıcının salınımı başlamış olur (60,80). Agregasyon sonucu oluşacak olan tromboz, ani ölümlere ve yeni iskemik olaylara neden olabilir. Bu nedenle, perkütan koroner girişim ile arter lümenini açmanın yanında antitrombosit veya antiagregan tedavinin uygulanması miyokard iskemisi geçiren hastalar için hayati önem taşımaktadır (14).

Klopidogrel ve aspirin ile antitrombosit tedavi, stent trombozunun azaltılması için invaziv kardiyoloji pratiğinin vazgeçilmezi, perkütan koroner girişim geçiren hastalar için hayati bir stratejidir (2,14). Büyük klinik çalışmalarda ikili antitrombosit tedavinin önemli yararları gösterilmiş olmasına rağmen, stent trombozunu içeren advers iskemik olayların meydana gelmesi ciddi bir klinik problem olmaya devam etmektedir (114). Aspirin direncinin yanısıra, klopidogrelin hastaların belirli bir kısmında antitrombosit bir etki sergilemediği birçok çalışmada gösterilmiş olup, bu durum klopidogrel direnci olarak tanımlanmıştır (41,42). Ayrıca, bu çalışmalar klopidogrel dirençli hastalarda artan kardiyovasküler riski ortaya çıkararak antitrombosit tedavinin mortaliteyi önleyici etkisini gözler önüne sermiştir (114).

Klopidogrel, trombosit hücre zarındaki P2Y12 reseptörünü seçici ve geri dönüşümsüz bloke etmesine bağlı olarak trombosit agregasyonunun etkili bir inhibitörüdür (100). Bir ön ilaç olan klopidogrelin barsaktan emilimi, ABCB1 geninin kodladığı bir barsak efluks P-glikoprotein pompası tarafından sınırlı şekilde gerçekleşmektedir (112). Klopidogrel gibi ön ilaçlar aktif metabolitleri için karaciğerde bulunan sitokrom P450 (CYP) enzimleri tarafından biyotransformasyona gereksinim duyarlar. Klopidogrelin iki basamaklı biyotransformasyonunda görev alan sitokrom P450 enzimleri CYP2C19, CYP2C9, CYP2B6, CYP3A4 ve CYP1A2'dir. Bu enzimleri

kodlayan genlerde oluşabilecek varyasyonların klopidogrel'in metabolizmasını etkileyeceği düşünülerek direnç gelişiminde genetik araştırmalar ön plana çıkmıştır (82,112,114).

Genetik araştırmaların sonucu olarak Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA), 12 Mart 2010 tarihinde klopidogrel direnci hakkında ciddi bir uyarı yayımladı. Uyarıda, CYP2C19*2 ve *3 varyasyonlarının klopidogrel'in işlevsel metabolizmasına sahip olmadığı, CYP2C19*4,*5,*6,*7,*8 varyasyonlarının da klopidogrel metabolizmasından yoksun olduğu, ancak bu allellere CYP2C19*2 ve CYP2C19*3'den daha az sıklıkta rastlandığını bildirildi (114).

Yakın bir zaman önce, bir grup araştırmacı sitokrom P450 enzimlerine ek olarak paraoksonaz 1 (PON1) enziminin klopidogrel metabolizmasında rol oynadığını ileri sürdüler. PON1 Q192R polimorfizminin aktif metabolit oran belirleyici etkisinin bulunduğunu bildirdiler (15). Bu çalışmaya cevap niteliğinde çalışmalar yapılmış, fakat farklı etnik gruplarda birbirlerini desteklemeyen sonuçlar elde edilmiştir (4,68,108).

Klopidogrel direnci, klopidogrel metabolizması ve trombosit agregasyonu ile ilgili genler üzerinde Türk popülasyonu dışındaki etnik gruplarda bir bütün olarak araştırılmış, fakat belirli varyasyonlar için farklı sonuçlar elde edilmiştir. Başlıca amacımız, tüm dünyada mortalite ve morbiditenin en önemli nedeni olan miyokard iskemisinde yaygın olarak kullanılan klopidogrel'in antitrombosit aktivite yetersizliğini Türk popülasyonunda ilk defa geniş bir gen profilinde araştırmaktır. Bu araştırmayı yaparken, Türk popülasyonundaki klopidogrel direnç sıklığını, bu dirence genetik yatkınlığın olup olmadığını, genetik yatkınlık var ise hangi varyasyonların rol oynadığını, diğer toplumlara göre varyasyon sıklığının değişiklik gösterip göstermediğini belirlemek ulaşmak istediğimiz hedeflerimizdir. Bunun için, CYP2C19*2 (rs4244285), CYP2C19*3 (rs4986893), CYP2C19*4 (rs28399504), CYP2C19*7 (rs72558186) CYP2C19*8 (rs41291556), CYP2C19*17 (rs12248560), ABCB1 (rs1045642), CYP3A4*1G (rs2242480), CYP2B6*9 (rs3745274), ITGB3 (rs5918), PON1 (rs662) ve PON1 (rs854560) varyasyonlarını hasta grubumuzda analiz ederek klopidogrel'in antitrombosit aktivitesi ile karşılaştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ATEROSKLEROZ

Ateroskleroz, arterlerde “aterom” veya “plak” olarak ifade edilen yapısal bozukluklara (lezyonlara) neden olan kronik inflamatuvar sistemik bir hastalıktır. Son yıllarda dünyada olduğu gibi ülkemizde de mortalite ve morbiditenin başlıca nedenidir (113). Yaygın olarak “damar sertleşmesi” olarak adlandırılan arteriyosklerozun bir türüdür. Periferik damar, serebrovasküler, kardiyovasküler hastalıkların ve özellikle koroner arter hastalığı (KAH)’nın altında yatan patoloji aterosklerozdur (29).

Arteriyoskleroz, arter duvarlarının kalınlaşp esnekliklerini kaybetmeleriyle sonuçlanan üç tür hastalığa verilen genel isimdir. Bunlardan, ateroskleroz orta ve büyük arterleri etkilemekle birlikte en yaygın ve ciddi olanıdır. Diğer arteriyoskleroz, arteriyol olarak isimlendirilen küçük arterlerin kalınlaşmasıdır ve daha çok böbrekleri etkilemektedir. Mönckeberg arteriyoskleroza ise küçük ve orta boy arterlerde görülür, damar duvarlarında kalsiyum birikmesine neden olur, sertleşme meydana getirir fakat arter duvarlarında daralma olmaz (29).

Ateroskleroz binlerce yıldır insalığın başına bela olmuş bir hastalıktır. Bunu Mısır uygarlığından günümüze ulaşan mummyalardaki aort, koroner ve periferik damarlarındaki dejeneratif bulgulara dayanarak rahatlıkla söyleyebiliriz (99). Eski mısırlılardaki lezyonların, günümüzdeki damar cerrahisi ve patoloji bulgularında gözlemlenenlerden farklı olmadığı tespit edilmiştir (78).

Araştırmacılar 19. yüzyılın başlarında vasküler değişikliklere daha yakından bakmaya başladılar. 1829 yılında Almanya doğumlu Fransız cerrah ve patalog Jean Lobstein “ateroskleroz” terimini tüm dünyaya tanıttı (78). Ateroskleroz, lezyonların içi yumuşak, dışı sert yapısından dolayı Yunanca athero- (lapa) ve -sclerosis (sertleşme) sözcüklerinden türetilmiştir (113).

19. yüzyılın ortalarında iki karşıt görüşlü patolog Berlin'den Rudolf Virchow ve Viyana'dan Carl von Rokitansky, aterosklerotik damar duvarlarında hücrel inflamatuvar değişiklikler olduğunu açıklamışlardır. Von Rokitansky bu değişikliklerin damarın doğal yapısından kaynaklandığını kabul etmesine rağmen, Virchow aterosklerozun gelişiminde birincil rol üstlendiğini savunmuştur. 1910 yılında Alman kimyager Windaus aterosklerotik plakların kalsifiye bağ dokudan ve kolesterolden meydana geldiğini göstermiştir. Anitschkow ve Chaltow ise kolesterol bulgusundan 3 yıl sonra tavşanları kolesterolce zengin diyet ile besleyerek aterosklerozu tetiklemeyi başarmışlardır (78).

2.1.1 Ateroskleroz Oluşum Hipotezleri

Aterosklerozun oluşum ve gelişimine katkı sağlayan birçok risk faktörü tanımlanmıştır. Bu nedenle birçok damar hastalığının altında yatan multifaktöriyel bir patolojidir. Ortaya konan risk faktörlerinin varlığına rağmen hastalığın kesin başlama nedeni hala belirsizdir. Günümüze kadar ateroskleroz oluşumuyla ilgili üç farklı hipotez ortaya atılmıştır (78). Bunlar;

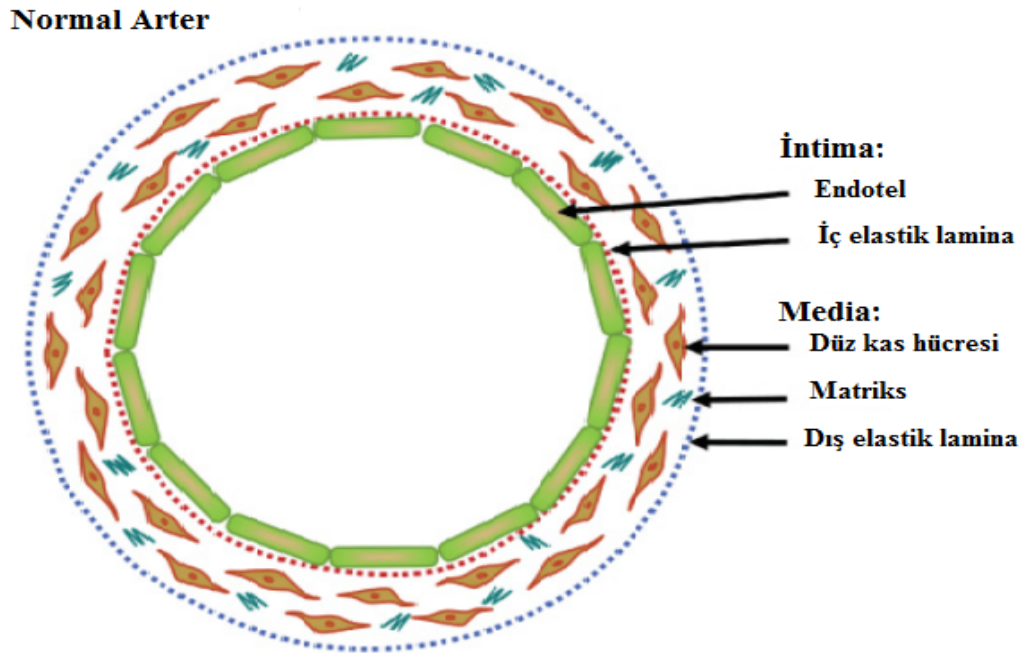
- a) Hasara yanıt hipotezi
- b) Değişikliğe uğramış lipoprotein hipotezi.
- c) Lipid birikimine yanıt hipotezi

Günümüzde de en fazla kabul gören görüş olan hasara yanıt hipotezi (response to injury) 1977 yılında ilk olarak Ross ve ark tarafından açıklanmıştır. Bu hipotezde başlıca neden endotel hasarıdır. Mekanik olaylara, toksinlere ve oksijen radikallerine bağlı olarak endotel ve intimadaki yapısal bozuklukların aterosklerozun tetiğini çektiği düşünülmektedir (98). Steinberg ve ark. tarafından savunulan değişikliğe uğramış lipoprotein hipotezi (altered lipoprotein hypothesis), oksidasyon geçirmiş düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) intimadaki köpük hücre oluşumunu başlatmasını birincil neden olarak göstermektedir (115). Lipid birikimine yanıt hipotezi (response to retention hypothesis) ise Ira Tabas ve Kevin Williams tarafından desteklenmiş, damar

duvarı içerisinde lipid ve lipoprotein birikimine karşı yanıtın aterosklerozun başlangıcı ve temel nedeni olduğu ileri sürülmüştür (134).

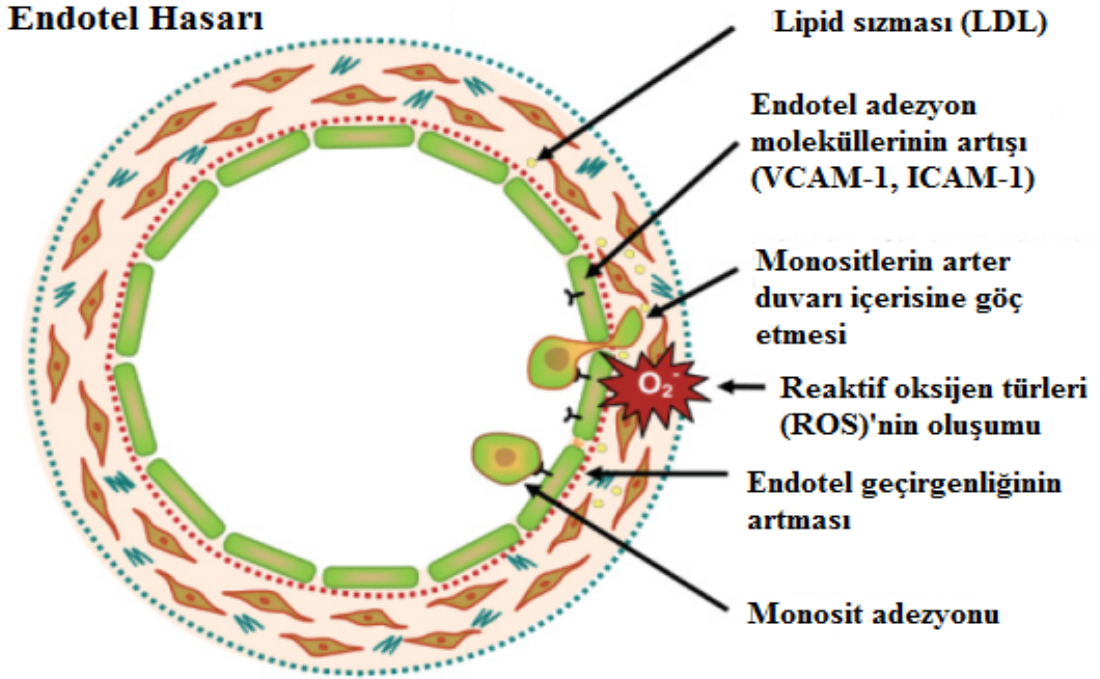
2.1.2 Aterosklerozun Patogenezi

Normal arter duvarı iki organize tabakadan oluşmaktadır: intima ve media (Şekil 2.1). İntima, kan ile temas eden bazal membran üzerine oturmuş tek tabakalı endotel hücreleri ve endotel hücreleri ile düz kas hücreleri arasındaki ekstraselüler matriks bileşeninden meydana gelmektedir. Endotel tabakası vasküler fonksiyonların normal bir şekilde yürüyebilmesinde temel rol oynamaktadır. Morfolojik yapısı ve stratejik anatomik pozisyonu nedeniyle seçici geçirgen bir bariyer olarak görev yapar. İntima tabakasındaki ekstraselüler matriks bileşeni iç elastik lamina olarak adlandırılmaktadır. İç elastik lamina altında bir orta tabaka olan media bulunur. Media, bazal membran ile çevrili ve ekstraselüler matriks içersine gömülü olan vasküler düz kas hücrelerinden meydana gelmektedir. Media tabakasının sınırını dış elastik lamina belirlemektedir (38).



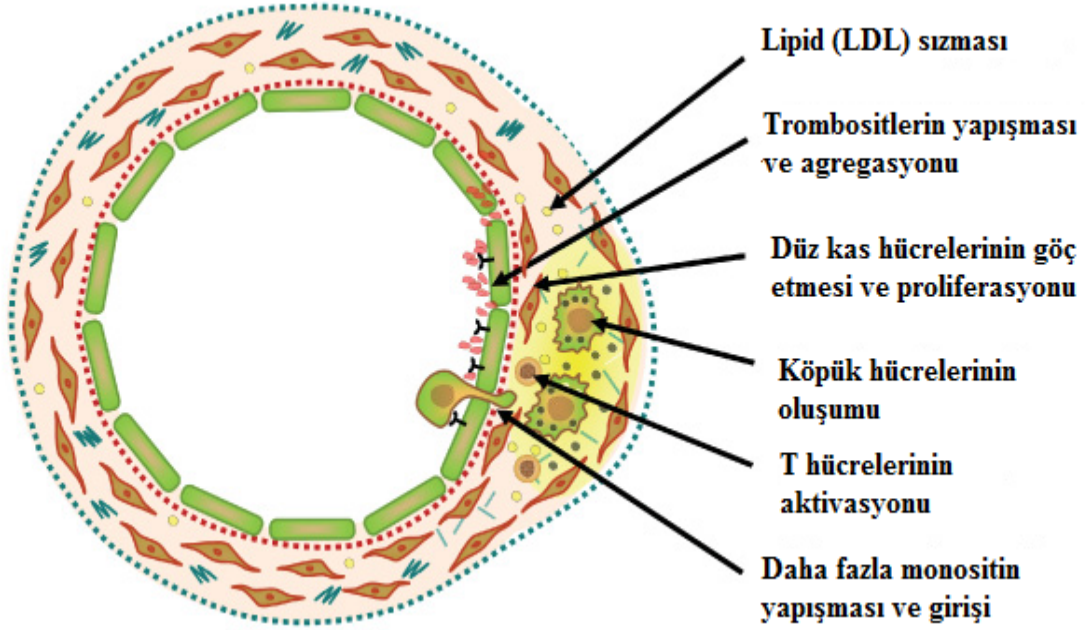
Şekil 2.1. Normal arter duvarı (38)

En kabul gören görüş olan Ross ve ark.'nın açıkladığı hipoteze göre risk faktörleri ile başlatılan endotel hasarı, lipidlerin ve inflamatuvar hücrelerin arter duvarı içerisine girişine izin vermektedir (98). Kan dolaşımındaki monositler arter duvarı içerisinde lipid yutan makrofajlara farklılaşmakta, köpük hücre makrofajları haline gelmektedir (Şekil 2.2). Bu durum yağlı çizgiler (fatty streaks) olarak ifade edilen lezyonların oluşumu ile sonuçlanır ve aterosklerozun başlangıcı olarak kabul edilir. Yağlı çizgiler küçük, intimada köpük hücre makrofajlarının odaksal birikimi nedeniyle hafifçe yükselmiş lezyonlardır (Şekil 2.3). Bu lezyonlar büyük aterosklerotik plakların öncüleri olduğu gibi küçülerek aterosklerotik plağa dönüşmeden de kalabilir. Yağlı çizgilerin daha karmaşık bir komplekse geçişi nekrotik bir çekirdek ve fibröz bir örtünün oluşmasıyla gerçekleşir (38).



Şekil 2.2. Endotel hasarı ve monositlerin göç etmesi (38)

Yağlı Çizgi Oluşumu

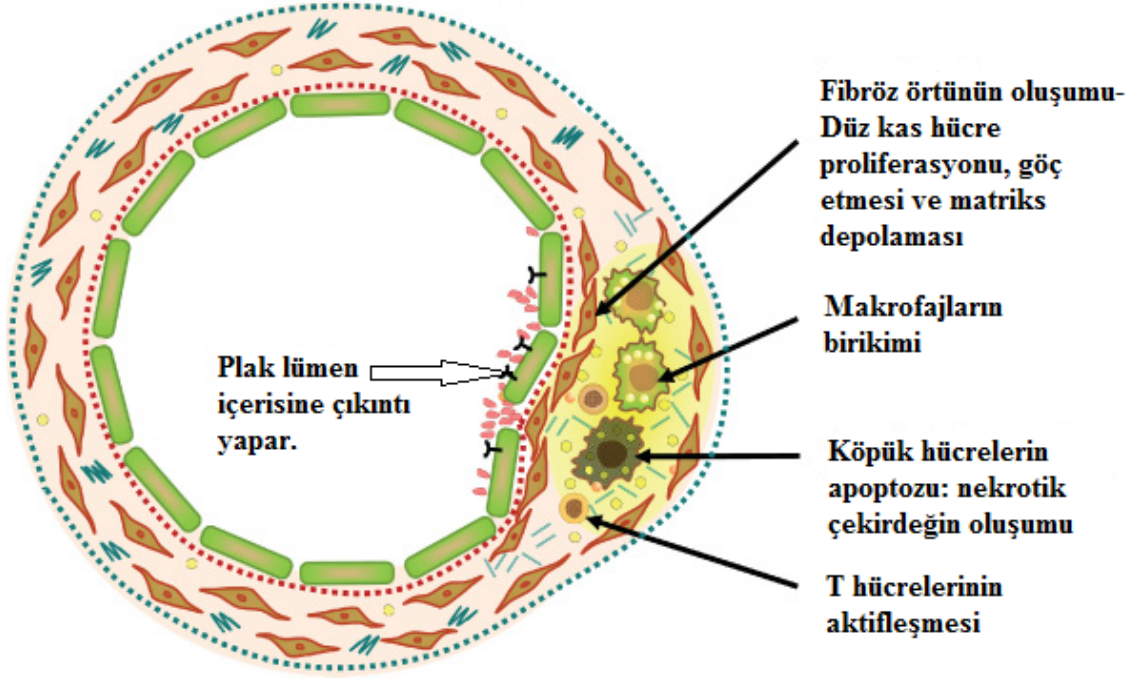


Şekil 2.3. Yağlı çizgi oluşumu (38)

Yağlı çizgi oluşumunda trombositler hasara uğramış endotel tabakaya yapışır ve granüllerini salgılamaya başlar. Bu olaya aterotromboz adı verilir. Makrofajlar arter duvarı içerisinde modifiye olmuş LDL'leri yutarak köpük hücre formuna dönüşür. Kemokinlerin ve büyüme faktörlerin salınımı inflamatuvar hücrelerin güçlenmesine, T hücrelerinin aktivasyonuna, düz kas hücrelerinin göç etmesine ve proliferasyonuna yol açar (38).

Lipid ile dolan ve tıkanan köpük hücreler ölmeye ve içindikileri serbest bırakmaya başlar (Şekil 2.4). Bu durum nekrotik bir çekirdek oluşumuna katkı sağlar. Köpük hücrelerin sitoplazmik içeriğinin salınımı inflamasyonu indükleyen ekstraselüler lipidlerin ve büyüme faktörlerinin birikimine neden olur. Daha sonra, düz kas hücreleri intima içerisinde göç edip çoğalarak ekstraselüler matriks birikimine yol açar ve fibröz bir örtünün oluşumunu sağlar. Hücre sayısının ve matriks miktarının artışı plak hacminin büyümesine neden olur. Büyüyen ve lümen içerisine çıkıntı yapan plak yapısı aterom olarak da isimlendirilir (38).

Aterosklerotik Plak



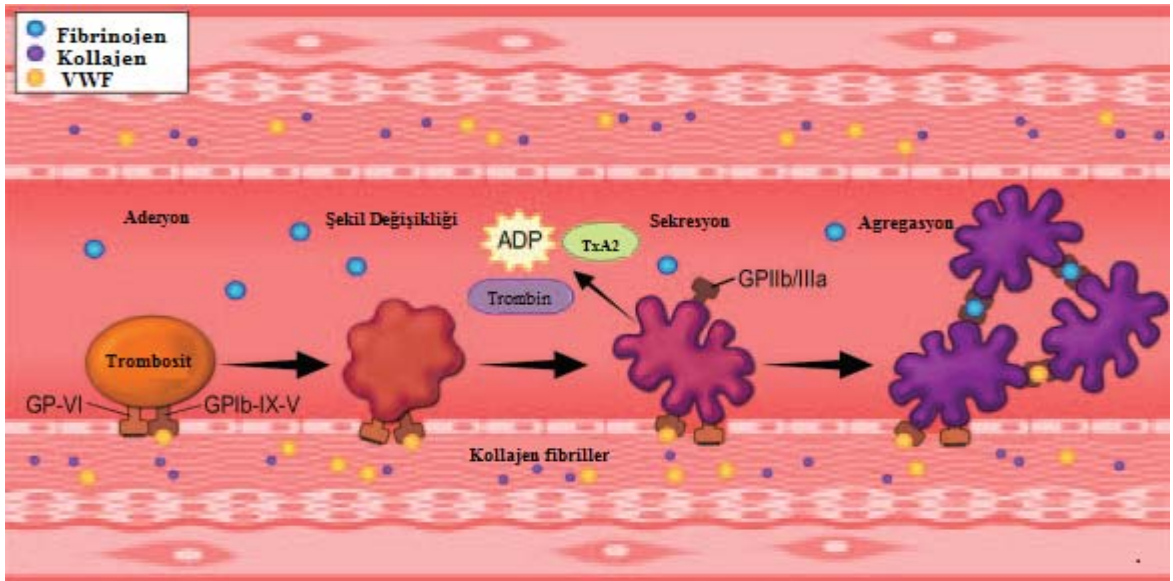
Şekil 2.4. Aterosklerotik plak oluşumu (38)

2.1.3. Aterotromboz

Aterosklerotik plakların dejenerasyonu ile tromboz meydana gelmesi olayına aterotromboz adı verilir. Tromboz, trombositlerin endotel bir hasar nedeniyle aktifleşip kümeleşmeleri (agregasyon) sonucu bir kitle (trombüs) oluşturmasıdır. Trombüs arterleri tıkayarak göğüs ağrısı, miyokard enfarktüsü, geçici iskemik ataklar ve felç gibi yaşamı tehdit eden tahmin edilemez klinik olaylara yol açar. Trombositler kararlı bir aterosklerotik plağın kararsız bir lezyon haline dönüşümü sürecinde anahtar bir rol oynamaktadır (130).

Trombositler, kemik iliğindeki megakaryositlerden periferik kana salınan hücre nükleusu olmayan, protein sentezleme kabiliyeti kısıtlı sitoplazmik fragmanlardır. Dolaşımdaki ortalama yaşam süreleri 7-10 gündür. Trombositler çok sayıda koagülasyonun ve inflamasyonun önemli aracı moleküllerinin ekspresyonunu yaparak salgılar (125).

Aterosklerotik plaklardaki hasara yanıt olarak kan dolaşımında bulunan trombositler endotel altı ekstraselüler matriks bileşenleri olan kollajen ve von Willebrand faktör ile etkileşime girerler (Şekil 2.5). Bu bağlanmayı kendi plazma zarlarındaki glikoprotein reseptörleri GPVI and GPIb/V/IX aracılığı ile gerçekleştirirler. Reseptörler ile matriks bileşenlerinin etkileşimi trombositlerde şekil değişikliğine neden olur; disk şeklindeki morfolojik yapıları yuvarlak, top halini alır. Şekil değişikliği ile birlikte çeşitli hücre içi sinyal reaksiyonları tetiklenir. Kararlı trombosit adezyonundan sorumlu anahtar integrin reseptörlerinden başlıcaları olan GPIIb/IIIa ve GPIa/IIa'nın aktivasyonu gerçekleşir. ADP, tromboksan A2 (TxA2) ve trombin gibi bir dizi lokal uyarıcının salınımı ve üretiminin uyarılması bu şekil değişikliği ile başlar (80). Bu agonistler trombositler üzerinde kendilerine ait G protein bağlı reseptörler aracılığı ile trombosit aktivasyonunu daha da artırır. Tromboksan A2, COX-1 yolağı ile araşidonik asit metabolizması tarafından üretilmektedir. ADP, yoğun trombosit granüllerinden serbest bırakılır. Üretilen trombin de trombosit yüzeyinde bir glikoprotein olan PAR (Proteaz ile aktive olan reseptör)'ları proteolitik olarak bölerek trombosit aktivasyonu artırır. Çevredeki trombositlerin hızlı şekilde toplanması ve aktivasyonu sonuçta trombüs oluşumuna neden olur. Bu oluşuma özellikle GPIIb/IIIa integrin proteini tarafından çapraz bağlanan fibrinojenler aracılık etmektedir (60).



Şekil 2.5. Trombüs oluşumunda trombositlerin fonksiyonu (80)

Antitrombotik amaçla en sık kullanılan ajan olan aspirin, trombositlerin siklooksijenaz enzimini geri dönüşümsüz olarak inhibe ederek etkisini gösterir. Aspirin TxA₂'nin oluşumunu engellerken tiyepiridin grubu ilaçlar (tiklopidin, klopidogrel, prasugrel, tikagrelor) ADP'ye bağlı trombosit agregasyonunu önlerler. Adenozin difosfat trombosit hücre zarı üzerindeki pürinerjik P₂Y₁ ve P₂Y₁₂ reseptörlerine bağlanır. Bu reseptörlerin kendilerine özgü sinyal yolları vardır. P₂Y₁ reseptörü trombositin şekil değişikliğinde ve geçici agregasyonunda rol alırken, P₂Y₁₂ reseptörü kalıcı agregasyonda rol oynar. Dolayısıyla, P₂Y₁₂ reseptörü aynı zamanda tiyepiridin grubu ilaçlarının hedef molekülüdür (26).

İki trombositin birbirine bağlanması GPIIb/IIIa integrin reseptörü ile olur. GPIIb/IIIa inhibitörlerinin hedefi olan GPIIb/IIIa integrin reseptörü, fibrinojen reseptörü gibidir ve iki trombositin bir fibrinojen molekülü ile bağlar (Bkz. Şekil 2.5). Fibrinojenin fibrine dönüşümünü sağlayan trombin, iki trombositin birbirine geri dönüşümsüz olarak bağlanmasını sağlar. Bu etkisiyle trombin, trombus oluşumunda esas rolü üstlenen ve tüm trombosit aktivatörleri (kollajen, ADP, TxA₂, trombin, vs.) arasında en etkili olanıdır. Trombin reseptör antagonistleri ve yeni P₂Y₁₂ inhibitörleri antitrombotik tedavide önemli yenilikler olarak kabul edilmektedir (2).

2.2. KORONER ARTER HASTALIĞI (KAH)

Ateroklerozun koroner arterlerde meydana gelmesi ile oluşan hastalığa koroner arter hastalığı (KAH) denilmektedir. Koroner kalp hastalığı (KKH) veya aterosklerotik kalp hastalığı olarak da adlandırılır. Koroner arterler ana atar damar olan aortadan aldıkları oksijence zengin temiz kanı kalp kası hücrelerine taşımakla görevlidirler. Kalbin epikardiyal bölgesinde seyrederek ve anadallardan çıkan daha küçük damarlarla kalp kası hücrelerine ulaşırlar (69,86).

Koroner arter hastalığında ateroskleroz sonucu oluşan plakların yıpranması ve yırtılması sonucu oluşan aterotromboz, koroner arteri fiziksel olarak tıkayarak veya arter yapısında ve fonksiyonunda bozukluklara neden olarak kalp kasına kan akışını sınırlandırır (86). Böylelikle miyokard iskemisi meydana gelmektedir. Miyokard iskemisi

semptomlarının oluşturduğu klinik durumu adlandırmak için akut koroner sendrom (AKS) terimi kullanılmaktadır. Akut koroner sendrom, belirgin iki ayrı klinik duruma ayrılmaktadır. Bunlar kararsız anjin (unstable angina) veya ST yükselmesiz miyokard infarktüsü (NSTEMI) ve ST yükselmeli miyokard infarktüsü (STEMI)'dür (9).

Akur koroner sendromun klinik türünün ayırımı elektrokardiyografi (EKG) bulgularına dayanmaktadır. Altta yatan fizyopatolojide ateroskleroz plağında çok büyük olmayan bir yaralanma ve bunun üzerinde tam tıkaçıcı olmayan bir beyaz trombus (trombosit bakımından zengin) var ise olgunun EKG'sinde değişiklikler görülmekte ancak bu değişiklikler ST yükselmesi biçiminde olmamaktadır. ST çökmesi, T dalgası negatifleşmesi ya da 20 dakikadan kısa süren ST yükselmesi biçimindeki farklılıklar görüldüğünde olgu "ST yükselmesiz miyokard infarktüsü" veya kararsız anjin olarak tanımlanmaktadır. Buna karşılık çekilen EKG'de ST yükselmesi görülmesi, lümeni tam tıkaayan fibrin bakımından zengin bir trombusun varlığına işaret eder ve olgu "ST yükselmeli miyokard infarktüsü" olarak adlandırılmaktadır (17).

Kardiyovasküler hastalıklar modern sanayileşmiş ülkelerde erken ölümlerin en sık nedenidir. Avrupa Kardiyoloji Derneği'nin 2012 yılında yayımladığı istatistiksel verilere göre kardiyovasküler hastalıklar Avrupa'da her yıl için 4 milyonun üzerinde ölümün sebebi olarak gösterilmektedir. Ayrıca gelişmekte olan ülkelerde de sayısı gittikçe artan ölümlerin nedenidir. Koroner arter hastalığı ve stroke, kardiyovasküler hastalığın başlıca iki formudur. Tek başına koroner arter hastalığı, Avrupa'daki ölümlerin en yaygın nedenidir (yılıda 1.8 milyon ölüm). Geniş bir coğrafyada yapılan araştırmaya göre KAH'nın mortalite oranlarında farklılıklar mevcuttur. Doğu ve Orta Avrupa'da en yüksek mortalite oranları, Fransa, İtalya ve Japonya'da ise en düşük mortalite oranları tespit edilmiştir. Ölüm oranları erkeklerde bayanlara göre çok daha yüksektir ve yaş ile birlikte artmaktadır. Coğrafi değişim ve cinsiyet farklılıklarına ek olarak, etnik köken ve sosyal sınıf KAH'nın mortalite oranlarını etkilemektedir (90).

Türkiye'de yapılan Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri (TEKHARF) çalışması, 2012 yılında yayınladığı makalede koroner kökenli ölüm nedenlerinin 21 yıllık uzun vadeli takip performansını değerlendirdi. Taranan kişilerde yaş aralığı 45-74'idi. Koroner arter hastalığı için bu yaş aralığındaki yıllık toplam

mortalite sıklığı 1000 kişi içerisinde 5.5 düzeyindeydi. Erkeklerde koroner arter hastalığı için yıllık mortalite 1000 kişi içerisinde 7.3, kadınlarda ise 1000 kişi içerisinde 3.7 seviyesinde olduğu rapor edildi. Bu çalışmada ortaya konan diğer bir sonuç ise yetişkinlerdeki koroner arter hastalığı için genel ölüm yaşının giderek daha yüksek yaşlara ertelendiğidir. Ayrıca, Karadeniz ve Marmara Bölgelerinin yüksek ölüm riskine, Güneydoğu Anadolu Bölgesinin ise düşük ölüm riskine sahip olduğu bildirilmiştir. (91).

2.2.1. Risk Faktörleri

Temelinde aterosklerozun yattığı KAH, birden fazla risk faktörünün etkisiyle ortaya çıkan multifaktöriyel bir hastalıktır. Risk faktörü kavramı yaşam biçimi, biyokimyasal ve fizyolojik faktörler gibi değiştirilebilen ve değiştirilemeyen kişisel özellikleri içerir. Risk faktörü kavramı ilk kez koroner arter hastalığı için kullanılmıştır. Sigara, hipertansiyon, hiperlipidemi ve diyabet değiştirilebilen risk faktörlerine, aile öyküsü, cinsiyet ve yaş ise değiştirilemeyen risk faktörlerine örnektir (93).

Toplumlarda koroner arter hastalığının oluşumunun altında yatan sebep olarak, batı yaşam kültürü olarak da bilinen doymuş yağlar bakımından zengin diyet, tütün kullanımı ve fiziksel inaktivitenin önemli rolü vardır. Bu yaşam biçimine bağlı faktörler, ateroskleroza yol açan biyokimyasal ve fizyolojik farklılıkları meydana getirirler. Genetik özellikler de ateroskleroza yatkınlıkta rol oynamaktadır. Uzun yıllar KAH riskinin %50'sinin risk faktörleriyle açıklanabildiği öne sürülmüştür. Ancak, son yıllarda yapılan çalışmalarda klasik risk faktörleri olarak bilinen sigara, yüksek kolesterol ve yüksek kan basıncının KAH riskinin %75'ini açıkladığı belirtilmektedir (93). INTERHEART adlı çok merkezli olgu kontrol çalışmasının sonuçları kullanılarak yapılan hesaplamalarda ise klasik risk faktörlerine eklenen diyabet, fiziksel inaktivite, obezite, beslenme tarzı gibi risk faktörleriyle birlikte KAH riskinin %90'nı açıklanabilmektedir (136)

Bir kişide KAH ortaya çıkarsa, değiştirilebilen risk faktörleri hastalığın ilerlemesine katkıda bulunmaya devam eder. Dolayısıyla hastalardaki tedavi

yaklaşımlarının merkezinde de risk faktörlerinin ortadan kaldırılması ya da kontrol altına alınması vardır.

KAH için risk faktörlerini aşağıdaki gibi sıralayabiliriz (136):

- Hipertansiyon
- Diyabet
- Yüksek LDL ve total kolesterol
- Düşük HDL (Yüksek dansiteli lipoprotein) kolesterol
- Ailede erken KAH hikayesi
- Sigara içiyor olmak
- Yaş ve cinsiyet
- Obezite
- Fiziksel inaktivite

Hipertansiyon KAH için çok önemli bir risk faktörüdür. Bütün aterosklerotik kardiyovasküler olayların %35'inden hipertansiyon sorumludur. KAH, hipertansiflerde normotansiflere göre 2-3 kat daha fazladır. Kan basıncında yükselme endotel fonksiyonlarında bozulmaya yol açarak ateroskleroz patogeneğinde rol almaktadır (136).

Birçok klinik çalışma ateroskleroz oluşumunda bir risk faktörü olarak diyabetin önemli bir yer aldığını göstermiştir. Diyabette sürekli hiperglisemi, ileri glikolize son ürünlerin üretiminde artışa yol açarak arteriyel inflamasyonu tetiklemektedir. Diyabetik hastalarda belirgin endotel ve düz kas hücre fonksiyon bozukluğu yanında lökositlerin endotele yapışmasında, trombosit agregasyonunda ve koagülasyon sisteminin aktivitesinde artış izlenmektedir (35).

Kan fizyolojisinde önemli bir yere sahip total kolesterol ve LDL seviyelerindeki artışın ateroskleroz ile ilişkili olduğu ve bu artmış seviyeler düşürülürse aterosklerozun azaldığını gösteren birçok çalışma yayımlanmıştır. LDL yüksekliği, endotel hasarı ve damar duvarındaki inflamatuvar yanıtta artışla yakından ilişkilidir. LDL ateroskleroz patogeneğinde başrolü oynayan bir lipoproteindir (62).

KAH için düşük HDL seviyelerinin bir risk faktörü, buna karşılık yüksek HDL seviyelerinin ise koruyucu bir faktör olduğu klavuzlarda vurgulanmıştır. HDL kolesterol damar duvarındaki kolesterolü toplayıp katabolizmasını hızlandırarak plak oluşumuna karşı koruyucu etki göstermektedir (16).

Ailede erken KAH hikayesi, KAH gelişimi için aterosklerozun her basamağında önemli bir bağımsız risk faktörüdür. Genetik faktörlerin KAH'a yol açtığına dair önemli kanıtlar vardır. Genetik etkiye bağlı gelişen KAH, genellikle poligeniktir ve sadece çok az bir hasta grubunda tek gen mutasyonları gözlenir. KAH için en güçlü aile hikayesi birinci derece akrabada erken yaşta koroner kalp hastalığı öyküsü olmasıdır. Birinci derece erkek akrabalarda 55 yaşından önce, birinci derece kadın akrabalarda 65 yaşından önce KAH gelişiminin olması, o kişide ateroskleroz gelişim riskini yaklaşık 2 kat arttırmaktadır (103).

Sigara sempatik sinir sistemini uyarır, kan basıncını artırır ve miyokard oksijen sunumunu azaltır. Bunun yanında aterotromboz üzerine de birçok etkileri vardır. Sigara LDL oksidasyonunu artırır ve endotel bağımlı vazodilatasyonu bozmaktadır. Sigara içiciliği KAH riskini 2-3 kat artırır ve diğer risk faktörleri ile etkileşerek riskin daha fazla artmasına neden olur (11).

KAH, yıllar boyu süren bir süreç olup bebeklik döneminden itibaren başlamaktadır. Hastalık boyutuna genelde dördüncü on yıldan sonra gelmektedir. Koroner arterlerdeki ateroskleroz yaş ilerledikçe artar. Erkeklerde 45 yaş, kadınlarda 55 yaş üzeri koroner kalp hastalığı için güçlü bir risk faktörüdür. Avrupa Kardiyoloji Derneği'nin 2012 yılında yayımladığı rapora göre ölüm oranları erkeklerde bayanlara göre çok daha yüksektir ve yaş ile birlikte artmaktadır. Bu durum erkek cinsiyetinin KAH gelişiminde önemli bir risk faktörü olduğunu göstermektedir (90).

Obezite, Avrupa Kardiyoloji Derneği tarafından KAH için önemli bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Vücutta yağlar karın bölgesinde yoğunlaştığı zaman aşırı kilonun olumsuz etkilerinin daha belirgin olarak görüldüğü rapor edilmiştir (90). Gelişmiş ülkelerde vücut kitle indeksinin (Body Mass Index-BMI) 21 kg/m^2 'den fazlasının KAH oluşumunda bir risk faktörü olduğu ayrıca belirtilmiştir (135).

Fiziksel olarak aktif olan insanlarda KAH riski daha azdır. Gelişmiş ülkelerdeki KAH'ın %20'den fazlasının fiziksel inaktivite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Düzenli fiziksel aktivite ile kilo azalmakta, LDL kolesterol ve trigliserid düzeyleri düşmekte, HDL kolesterol düzeyleri yükselmekte, insüline duyarlılık artmakta, kan basıncı düşmekte, endotele bağlı vazodilatasyon artmaktadır. Bu nedenle fiziksel inaktivite KAH için bağımsız bir risk faktörüdür (135).

2.2.2. Tedavi Yöntemleri

Koroner arter hastalığının en yaygın belirtisi anjindir (anjina pectoris). Anjin çoğu zaman göğüs ağrısı olarak tanımlanır. Aynı zamanda göğüs rahatsızlığı, ağırlık, darlık, baskı, ağrı, yanma, uyuşma, doluluk veya sıkıştırmayla tarif edilir. Hazımsızlık veya mide yanmasıyla karıştırılabilir. Anjin genellikle göğüste hissedilirken sol omuz, kollar, boyun, sırt veya çenede de hissedilebilir. Diğer belirtiler ise nefes darlığı, düzensiz kalp atışları, hızlı kalp atışları, baş dönmesi, bulantı, aşırı halsizlik ve terlemedir. Koroner arter hastalığının tanısında hastanın hikâyesi, EKG, efor testi, nükleer tıp tetkikleri, radyolojik tetkikler ve koroner anjiyografi kullanılmaktadır. Tanı yöntemleri içerisinde son aşama olan koroner anjiyografi, kesin tanıyı ve uygulanabilecek tedavi yöntemi hakkında uzmana gerekli fikri vermektedir. Koronerlerdeki kan akışını sınırlandıran plaklara karşı miyokardın ihtiyacı olan normal kan akışını sağlayabilmek adına o bölgeye fiziksel müdahale olarak görülen başlıca iki yöntem vardır. Bunlar; koroner anjiyografi ile balon anjiyoplasti ve stent yerleştirilmesi, diğeri ise koroner arter bypass greftleme'dir (119).

Balon anjiyoplasti (PTCA-Percutaneous transluminal coronary angioplasty) ve stent yerleştirilmesi, koroner arter hastalığının tedavisine yönelik yaygın girişimsel

işlemlerendir. Bu işlemler kardiyoloji uzmanları tarafından kan damarına sokulan bir kateter ile yapıldığından, cerrahi olmayan işlemlerdir. Damar duvarı içerisindeki plağın tedavisi için çok sayıda balon, stent ve kateter tipi bulunur. İşlem tipi, hastanın ihtiyaçlarına göre uzman tarafından seçilir (105,119).

Koroner arter hastalığındaki aterosklerotik plaklar koroner arterlerin birden fazla bölgesini tıkiyor ise hastanın ihtiyaçları ve uzman doktorların alacağı karara göre koroner arter bypass greftleme (CABG-coronary artery bypass graft) yapılabilir. Bu greftler genellikle hastanın göğüs, kol veya bacağındaki kendi arter ve venlerinden alınır. Greft, tıkanan arterin (veya arterlerin) etrafından dolaşarak kalbe oksijen zengini kanın akması için yeni yollar oluşturur (105).

Koroner arterlerdeki ateroskleroz invaziv müdahalenin yanında ilaç tedavisi günümüz kardiyoloji pratiğinin olmazsa olmazıdır. Yukarıda anlatılan müdahalelerin ilaç ile desteklenmesi gerekmektedir. Bunun yanında, müdahale olmadan antitrombotik ilaçlar kullanarak aterosklerozun çözüldüğü klinik durumlar mevcuttur (119).

Aspirin ile antitrombotik tedavinin riskli hastalarda inme, miyokard enfarktüsü ve ölüm sıklığını azalttığı gösterildiği gibi, akut olaylarda da mortaliteyi önemli oranda düşürdüğü gösterilmiştir. Kararsız anjin ve ST yükselmesiz miyokard enfarktüslü hastalarda aspirin uzunca süredir standart tedavidir (2).

Akut koroner sendromların tedavisinde kullanılan bir diğeri antitrombotik ilaç olan klopidogrel ise, adenosin difosfat P2Y₁₂ reseptörünü inhibe eden tienopiridin grubu ilaçların en sık kullanılan üyesidir. Klopidogrelin semptomatik aterosklerotik hastalıkta, perkütan koroner girişim (PKG) uygulanan hastalarda, kararsız anjin ve ST yükselmesiz miyokard enfarktüslü hastalarda ölüm ve iskemik komplikasyonları önlediği gösterilmiştir. Günde 75 mg tek doz klopidogrel kullanımının aspirine göre olumsuz kardiyovasküler olaylarda daha fazla azalma sağladığını gösteren CAPRIE (Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischaemic Events) çalışmasından sonra FDA tarafından günlük tek doz 75 mg klopidogrel kullanımı onaylanmıştır (19). Yüksek riskli hastalarda klopidogrelin yararını gösteren CAPRIE çalışmasından sonra, klopidogrelin aspirin ile birlikte kullanımı birçok geniş çaplı randomize kontrollü

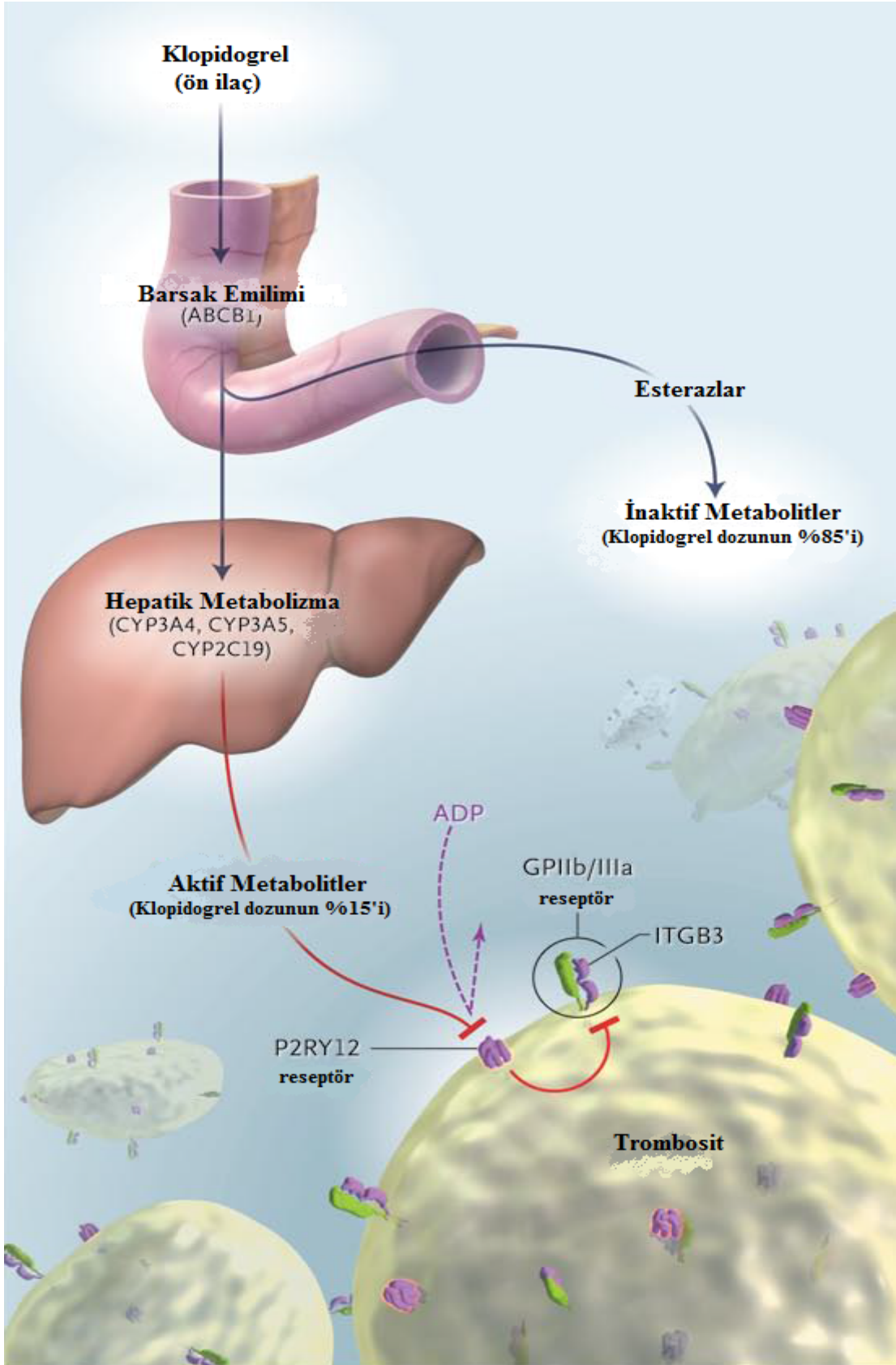
çalışmada ele alınmış ve özellikle akut koroner sendromlu hastalarda çarpıcı olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Böylelikle gerek akut koroner sendrom tedavisinde ve gerekse perkütan koroner girişimde aspirin ve klopidogrelin birlikte kullanımı kılavuzlara girmiştir (2).

Klopidogrelin etkinliğini gösteren birçok çalışmaya rağmen, yaygın direnç, etki başlangıcının uzun oluşu, ilaç etkileşimleri ve farmakogenetik etkiler gibi sorunlar araştırmacıları daha etkili ve güvenilir antitrombosit ilaçlar keşfetmeye yönlendirmektedir. Günümüzde birçok antitrombosit ilaç gelişim aşamasında olmakla beraber prasugrel, tikagrelor, kangrelor ve SCH 530348 (trombin reseptör antagonisti) yeni kullanıma başlanan ilaçlardandır (2).

2.3. KLOPIDOGREL

Tiyenopiridin grubu ilaçlar trombosit P2Y₁₂ reseptörünü geri dönüşümsüz olarak inhibe ederler. Bu grup ilaçlar koroner arter, periferik damar ve serebrovasküler hastalıkların tedavisinde antitrombotik ajan olarak kullanılmaktadır. Aterotrombozun önlenmesinde bilinen birkaç tane tiyenopiridin türevi ilaç vardır. Bunlardan en yaygın kullanılanlar tiklopidin ve klopidogreldir. Birinci jenerasyon bir tiyenopiridin olan tiklopidinin aspirinden daha üstün olduğu gösterilmiş olmakla birlikte, benzer etkinlik ve daha iyi yan etki profili sebebiyle klopidogrel daha yaygın kullanılmaktadır. Ayrıca tiklopidin kullanan hastalarda düzenli tam kan sayımı gereksinimi bu ilacın kullanımını önemli oranda azaltmıştır (100).

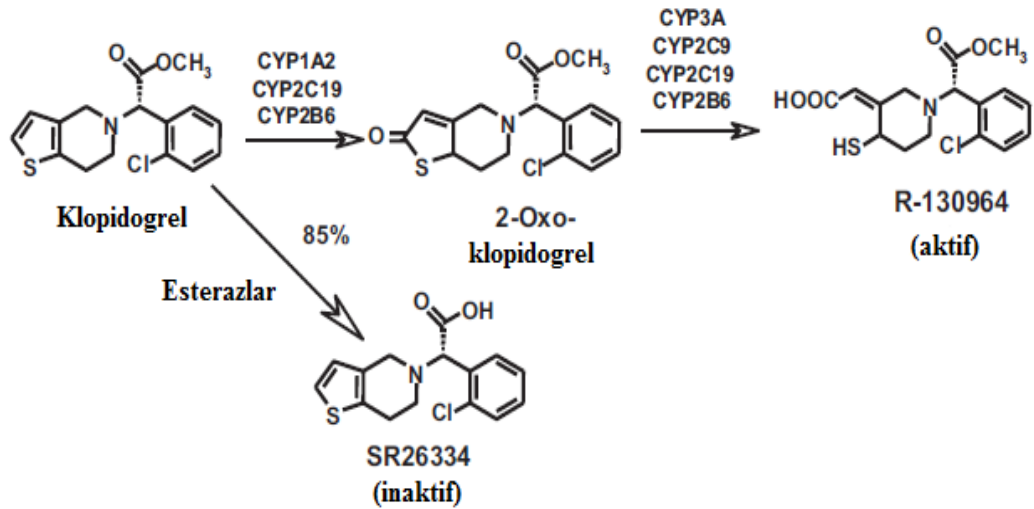
Klopidogrel en güvenli yan etki profiline (daha düşük komplikasyonlar) sahip, ADP reseptör antagonisti olarak etki gösteren ikinci jenerasyon bir tiyenopiridin türevi olarak kullanıma sunulmuştur. Bir ön ilaç olan klopidogrelin barsaktan emilimi ABCB1 (ATP-Binding Cassette Sub-Family B Member 1) geninin kodladığı bir barsak effluks P-glikoprotein pompası tarafından sınırlı şekilde gerçekleşmektedir. Klopidogrel gibi ön ilaçlar aktif metabolitleri için karaciğerde bulunan sitokrom P450 enzimleri tarafından biyotransformasyona gereksinim duyarlar. Ön ilaç dozunun çoğunluğu esterazlar tarafından inaktif metabolit haline dönüştürülür (Şekil 2.7) (112).



Şekil 2.7. Klopidogrelin antitrombosit aktivitesinde görev alan enzim ve reseptörler (112)

Hastaya FDA tarafından onaylanan günlük 75 mg klopidogrel uygulanması durumunda, tedavinin 2. gününden itibaren antitrombosit etki başlamakta fakat 4-7 gün içinde kararlı ve etkin bir düzeye ulaşmaktadır. Klopidogrel kesildikten sonra 4-8 gün süreyle antitrombosit etkiler devam etmektedir (125). Daha önce yapılmış olan çalışmalardan elde edilen veriler doğrultusunda, özellikle akut olaylarda en yüksek etkinliğe uygun sürede ulaşabilmek için, yükleme dozu rutin olarak verilmektedir. Yeni bulgular ise 300 mg yükleme dozu ile en yüksek etkinliğe ulaşmak için en az 4 ila 6 saatin gerektiğini, bu nedenle 600 mg yükleme dozunun özellikle akut olaylarda daha uygun olacağını göstermektedir (85).

Bir klopidogrel dozunun yaklaşık olarak %85'i esterazlar tarafından aktif olmayan bir metabolite hidroliz edilir. Geri kalan %15'lik kısım sitokrom P450 enzim sistemi tarafından oksitlenerek aktif metabolite (thiol türevi-R-130964) dönüştürülür (Bkz. Şekil 2.7.) (101). Bu dönüşüm iki basamakta gerçekleşir. CYP3A, CYP2C9 ve CYP1A2 enzimleri tek basamakta görev alırken, CYP2B6 ve CYP2C19 enzimleri ise her iki basamakta da rol oynamaktadır (Şekil 2.8). Bu aktif metabolitler geri dönüşümsüz olarak ADP reseptörünü (P2Y12) inhibe ederler. Böylelikle, trombosit agregasyonunda görev alan glikoprotein (GP) IIb/IIIa reseptörünü (ITGB3 [integrin, beta 3] geninin kodladığı) dolaylı yoldan inaktif duruma dönüştürmüş olurlar (82).



Şekil 2.8. Klopidogrel metabolizması (82)

CYP2C19 enziminin klopidogrel metabolizmasının ilk basamağının (2-oxo klopidogrel'in oluşumu) yaklaşık olarak %40'dan, ikinci veya son basamağın (aktif thiol metabolitinin meydana gelmesi) ise yaklaşık olarak %20'sinden sorumlu olduğu rapor edilmiştir (114).

2.3.1. Klopidogrel Direnci

Aspirin ve klopidogrel gibi etkinlikleri ispatlanmış güçlü antitrombosit ilaçları kullanan bazı bireylerde tekrarlayan kardiyovasküler olaylar ortaya çıkabilmektedir. Bu durum antitrombosit ilaç direnci kavramının doğmasına sebep olmuştur. Varlığı ve tanımı tartışmalı olmakla birlikte "klopidogrel direnci" iki ana başlık altında incelenebilir. Bunlardan birincisi laboratuvar klopidogrel direncidir ve klopidogrel'in yeterli in vitro antitrombosit etkisinin olmaması olarak tanımlanır. Diğer bir başlık ise klinik klopidogrel direncidir. Klinik direnç "tedavi yetersizliği" şeklinde değerlendirilebilir ve klopidogrel kullanımına rağmen tekrarlayan kardiyovasküler olayların görülmesi şeklinde tanımlanır (41). Klopidogrel direnci veya başka bir deyişle klopidogrel tedavisine cevap vermeyen hastaların sıklığı, klinik kullanım endikasyonları, doz, tedaviye başlama zamanı ve trombosit fonksiyonlarının değerlendirildiği test yöntemine bağlı olarak %4-30 aralığında değişmektedir (133). Kardiyovasküler hastalıklarda trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesi, oluşacak klinik sonuçların öngörülmesi ve antitrombosit ajanların etkinliğinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Örneğin; perkütan koroner girişim uygulanan hastalardan klopidogrel direnci bulunanlarda, akut veya subakut stent trombozu daha siktir. Bu durum önemli bir morbidite ve mortalite sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır.

Klopidogrel'e karşı direnç gelişiminde birçok mekanizma sorumlu tutulmuştur. Bu mekanizmalar dış ve iç olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. Dış mekanizmalar (genetik olmayan faktörler) klopidogrel biyoyararlılığının azalmasına neden olan tedaviye uyumsuzluk, düşük doz kullanımı, artmış vücut yüzey alanı nedeniyle yetersiz ilaç dozu, absorpsiyon ve metabolizmadaki değişiklikler ve ilacın biyotransformasyonunu etkileyen ilaç etkileşimidir. İç mekanizmalar (genetik faktörler)

ise klopidogrel'in barsaktan emilimini, metabolik ve biyolojik aktivitesini sağlayan reseptör ve enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfizmlerdir. Bilinen polimorfizmlerin bir kısmının klopidogrel'in antitrombosit aktivitesini etkilediği, bu etkiye bağlı olarak klopidogrelle verilen yanıtın bireyler arasında farklılıklar oluşturduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (41).

2.3.1.1. İlaç Tedavisine Uyumsuzluk

Muhtemel antitrombosit tedavi yetersizliğinin önemli nedenlerinden biri olmakla birlikte değerlendirilmesi güçtür. Bu nedenle, uygun yükleme ve idame dozun belirlenebilmesi için birçok çalışma yapılmıştır.

ALBION (Assessment of the Best Loading Dose of Clopidogrel to Blunt Platelet Activation, Inflammation and Ongoing Necrosis) çalışmasında perkütan koroner girişim uygulanan akut koroner sendromlu hastalarda 600 mg ve 900 mg'lık klopidogrel yükleme dozlarının 300 mg yükleme dozuna göre daha hızlı trombosit inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Kanama oranları ise her üç grupta benzer bulunmuştur. Her ne kadar 900 mg'lık dozla 600 mg'a göre daha yüksek oranda trombosit inhibisyonu sağlanmış görünse de bu fark, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca etkilerinin başlaması açısından her iki yüksek doz arasında anlamlı farklılık tespit edilememiştir (85). Diğer bir çalışmada ise 900 mg yükleme dozunun 600 mg'a göre ek trombosit inhibisyonu üstünlüğünün olmadığı rapor edilmiştir. Yazarlara göre 600 mg üzeri klopidogrel yükleme dozları gastrointestinal sistemden emiliminin yetersizliği sebebiyle ek bir üstünlük sağlamamaktadır (129).

Birçok çalışmanın desteklediği ve FDA'in onay verdiği günlük 75 mg klopidogrel tedavisi ile maksimum trombosit inhibisyonu 4-7 gün arasında sağlanmaktadır. Perkütan girişim öncesinde 300 mg klopidogrel yükleme dozu ile daha hızlı inhibisyon sağlamak için en az 4 saat öncesinde bu dozun hastaya verilmesi gerekmektedir. Yeni yapılan çalışmalarda ise 600 mg yükleme dozu ile 2 saat sonunda trombosit inhibisyonunun %80 oranında sağlandığı rapor edilmiştir. Bu nedenle, akut olaylarda 600 mg yükleme dozunun daha uygun olacağı bildirilmiştir (85).

2.3.1.2 İlaç Etkileşimi

Karaciğer klopidogrel metabolizmasında görev alan sitokrom P450 izoenzimlerinin aktivitelerini değiştirebilen ilaçlar klopidogrel'in etkinliğini azaltabilmektedir. Bu konuda özellikle lipofilik statinler, kalsiyum antagonistleri ve proton pompa inhibitörleri suçlanmaktadır. Klopidogrel'in aktif forma dönüşmesinde önemli bir görevi olan CYP3A4 enzimini bloke eden herhangi bir ilacın klopidogrel direncine neden olabileceği ileri sürülmüştür (41).

Statinler hidrosimetilglutaril-CoA redüktaz inhibitörleridir. Pravastatin hariç statinlerin çoğu lipofiliktir ve genellikle karaciğerde metabolize olurlar. Lovastatin ve simvastatin CYP3A4'ya orta derecede afinite gösterirlerken, atorvastatin düşük afinite gösterir. Fluvastatin ve rosuvastatin ise CYP2C9 substratıdır (124). Yaygın olarak kullanılan atorvastatin ise aktif asit formunda olmakla birlikte CYP3A4'un zayıf substratıdır. Ancak, bu form çeşitli enzimatik reaksiyonlarla lakton formuna dönüştürülerek CYP3A4'e yüksek afinite ile bağlanır (56).

Yapılan çalışmalarda, statinler ve klopidogrel etkileşimi ile ilgili farklı sonuçlar elde edilmiştir. Lau ve ark., perkütan koroner girişim uygulanan hastalarda 40 mg atorvastatinin doza bağımlı olarak klopidogrel'in antitrombosit etkisini azalttığını göstermişlerdir. Bu etki, stent takılması sonrasında 6. ve 7. günlere kadar önemli düzeyde devam etmekte iken, aynı ilişki pravastatin ile gözlenmemiştir (36). Ayrıca, fluvastatin ile etkileşimin az olduğu, pravastatin ve rosuvastatin ile etkileşimin olmadığı bildirilmiştir (2). Mitsios ve ark.'nın akut koroner sendrom nedeniyle hastaneye yatırılan 45 hastayı 10 mg atorvastatin ve 40 mg pravastatin ile randomize ettikleri çalışmalarında ne atorvastatinin ne de pravastatinin beş haftanın sonunda klopidogrel'in antitrombosit etkisini azaltmadığı saptanmıştır (84). Aspirin ve klopidogrel'den oluşan ikili antitrombosit tedavinin aspirin ve plaseboya karşı değerlendirildiği diğer bir çalışmada ise kullanılan statin tipi ile klopidogrel arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir (102).

Klopidogrel ile etkileşime giren diğer bir ilaç grubu proton pompa inhibitörleridir. Mide koruyucu olarak görev yapan proton pompa inhibitörleri iskemik kalp

hastalıklarında sık kullanılan ilaçlardandır. Klopidoğrelın aktif ilaç haline dönüşümünde rol oynayan sitokrom P450 enzimlerinden CYP2C19 enzimi, proton pompa inhibitörlerinin de değışen oranlarda metabolizmasından sorumludur. OCLA (Omeprazole CLOpidogrel Aspirin) çalışmasında, koroner stent takılan ve klopidoğrel ile birlikte omeprazol kullanan hastalarda klopidoğrelın P2Y12 reseptörü üzerine olan inhibitör etkisinin klopidoğrel ile birlikte plasebo kullanan hastalara göre azaldığı bulunmuştur (39). David ve ark., 13606 hastayı dahil ettikleri çalışmalarında akut miyokard infarktüs sonrası klopidoğrel ile proton pompa inhibitör kullanımının klopidoğrelın etkinliğini azaltarak yeniden infarktüs riskini arttırdığını, sadece pantoprazolun CYP2C19 enzimini inhibe etmediğini göstermişlerdir. Bu nedenle, mide koruyucu tedavi uygulanacak AKS hastalarında pantoprazol veya H₂-reseptör antagonistlerinin tercih edilmesinin en uygun yöntem olacağı bildirilmiştir (59).

Klopidoğrelın antitrombosit etkisini düşürdüğü bildirilen diğer bir ilaç grubu kalsiyum kanal blokerleridir. Kalsiyum kanal blokerleri, klopidoğrelın aktif metabolitinin oluşumunda önemli rol oynayan CYP3A4 enziminin inhibisyonuna neden olmaktadır (109). Bununla birlikte, kalsiyum kanal blokerleri ile klopidoğrel etkileşimini rapor eden çalışmalar çok azdır.

2.3.1.3. Genetik Polimorfizmler

Genetik polimorfizmler toplumda bulunma frekansı yüksek, bir gen veya DNA dizisindeki değışikliklerdir. DNA dizisindeki bu değışiklikleri mutasyondan ayıran özellik, en az 100 kişiden 1'nde bulunmasıdır. Genetik polimorfizmlerin en yaygın türü tek baz çifti varyasyonu içeren tek nükleotid polimorfizmleridir (104).

Tek nükleotid polimorfizmleri (Single nucleotide polymorphism; SNP) genomda tek bir nükleotidin (A,T,C veya G) bir başkasıyla yer değıştirdiğinde oluşan DNA dizi değışimleridir. Bu tek nükleotid değışimin SNP olarak ifade edilebilmesi için toplumun en az %1'inde görülmesi gerekir. Görülme sıklığı %1'den düşük ise bu varyasyon mutasyon olarak kabul edilir. SNP'ler transisyonlar [bir pürin bazının diğer bir pürin bazı ile (A→G, G→A), bir pirimidin bazının diğer pirimidin bazı ile (C→T, T→C)

değişimi] ve transversiyonlar (bir pürin bazının bir pirimidin bazı ile değişimi veya tersi) gibi baz değişimlerini içermektedir (128).

Bir ön ilaç olan klopidogrel'in iki basamaklı biyotransformasyonunda görev alan sitokrom P450 enzimleri CYP2C19, CYP2C9, CYP2B6, CYP3A4 ve CYP1A2'dir (Bkz. Şekil 2.8). Bu enzimleri kodlayan genlerde oluşabilecek polimorfizmlerin klopidogrel'in metabolizmasını etkileyeceği düşünülerek direnç gelişiminde polimorfizm çalışmaları ön plana çıkmıştır (82).

12 Mart 2010 tarihinde FDA, klopidogrel'in aktif formuna dönüştürülmesinde hasar oluşmuş hastalardaki klopidogrel'in azalmış etkisi hakkında ciddi bir uyarı yayımladı. Yapılan uyarıda, klopidogrel'in aktif metabolitinin oluşumundan öncelikle karaciğer enzimi olan CYP2C19'un sorumlu olduğu ve bu enzimin genotipine bağlı olarak ilaç düzeyinin ve antitrombosit etkilerin değişiklik gösterdiği vurgulandı. FDA'ye göre CYP2C19'un farklı allelleri ve etkileri şu şekildeydi: CYP2C19*1 alleli atasal tip olmakla birlikte klopidogrel'in tamamen işlevsel metabolizmasına sahiptir. CYP2C19*2 ve *3 klopidogrel'in işlevsel metabolizmasına sahip olmadıklarından metabolizmadan yoksun alleller olarak isimlendirilir. Bu iki allel, düşük fonksiyonlu allele sahip beyaz ırk kökenli (%85) ve Asya kökenli (%99) hastaların büyük çoğunluğunda bulunmaktadır. CYP2C19*4,*5,*6,*7 ve *8 allelleri klopidogrel metabolizmasından yoksun veya düşük klopidogrel metabolizmalı olabilirler, fakat bu allellere toplumlarda CYP2C19*2 ve CYP2C19*3'den daha az sıklıkta rastlanmaktadır. FDA yaptığı bu uyarı ile CYP2C19 fonksiyonundaki genetik farklılıklar göz önüne alınarak hastaların klopidogrel ile tedavi edilmesi gerektiğini vurgulamıştır (114).

Sitokrom P450 ailesinin bir üyesi olan CYP2C19, geniş yelpazedeki ilaç grubunu metabolize eden bir monoksijenazdır. İlaçların metabolik oranlarına bağlı olarak bireyler yüksek metabolizmalı (EM, extensive metabolizer), orta seviye (IM, intermediate metabolizer) metabolizmalı ve zayıf metabolizmalı (PM, poor metabolizer) olarak sınıflandırılır. Zayıf metabolizmalı bireyler, ilaçları oksitlemek için gerekli olan enzim seviyesi bakımından ortalama bir seviyeden daha düşük kapasiteye sahiptir. Bu bireylerde standart dozlarda istenmeyen kötü etkiler ile karşılaşılabilir (87).

Çok sayıda fonksiyonel allel tespit edilmiş ve İnsan Sitokrom P450 Allel İsimlendirme Komitesi (The Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee) tarafından isimlendirilmiştir (49,87). FDA tarafından fonksiyonsuz olduğu bildirilen CYP2C19*2 polimorfizmi, ekzon 5’de cDNA dizisinin 681. nükleotid pozisyonunda guaninin adenine değişimi (G→A) sonucu ortaya çıkan splicing hasar mutasyonudur (rs4244285). Bu değişiklik, 215. amino asit ile başlayan mRNA’nın okuma çerçevesini değiştirir ve 20 aminoasitlik downstream bölgede erken bir stop kodunu oluşturarak fonksiyonel olmayan bir protein meydana getirir (24). CYP2C19*2’den sonra en sık rastlanan diğer fonksiyonsuz allel CYP2C19*3, ekzon 4’de cDNA dizisinin 636. nükleotid pozisyonunda guaninin adenine değişimi (G→A) ile meydana gelir ve erken dur kodonuna neden olur (rs4986893) (23).

FDA’in bildirdiği diğer allellerden CYP2C19*4, atasal tip allelin cDNA dizisindeki başlama kodonu ATG’nin GTG’ye dönüşümü ile sonuçlanan varyasyondur. (rs28399504). Böylelikle protein kodlamanın başlaması engellenmektedir (28). CYP2C19*7 alleli, intron 5’in 5’ splicing bölgesinde korunmuş GT kısmındaki timinin adenine değişimi (T→A) ile meydana gelen bir nükleotid transversiyonudur (rs72558186). CYP2C19*8 alleli ise ekzon 3’de cDNA dizisinin 358. nükleotid konumundaki timinin sitozine değişimi (T→C) sonucu ortaya çıkmakta (rs41291556) ve aminoasit değişikliğine neden olmaktadır (Trp120Arg) (55).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, CYP2C19 enziminin aktivitesini artıran varyasyonlarında bulunduğunu göstermiştir. Bunlardan CYP2C19*17 (rs12248560) polimorfizmi, CYP2C19 geninin 5’ düzenleyici bölgesinde sitozinin timine değişimi (-806C→T) sonucu meydana gelmektedir. Bu değişiklik CYP2C19 geninin transkripsiyonel aktivitesini arttırmaktadır. Bu mutasyona sahip bireylerde CYP2C19 enzimi, atasal tip allele sahip bireylere göre ilaçların daha hızlı biyotransformasyonunu gerçekleştirmektedir (107,111).

Klopidogrel’in aktif metabolitine dönüşümünde önemli rol oynayan diğer bir sitokrom P450 enzimi CYP3A4’dür. Bu enzimin aktivitesini etkilediği ve dolayısıyla klopidogrel’in antitrombosit aktivitesini artırdığı rapor edilen varyasyon ise

CYP3A4*1G (rs2242480)'dir (6). CYP3A4*1G alleli genin 10. intronunda guaninin adenine değişimi (IVS10+12G→A) sonucu meydana gelmektedir (45).

CYP2B6 enzimi klopidogrel metabolizmasının her iki basamağında da görev alan bir sitokrom P450 üyesidir (şekil 2.8). Bu nedenle CYP2B6 enziminin düşük ekspresyonuna neden olan polimorfizmler klopidogrelin antitrombosit fonksiyonunu etkileyebilir. CYP2B6 enzimini kodlayan genin ekzon 4'de 15631. nükleotid pozisyonunda guaninin timine değişimi (15631G→T) sonucu ekzonik splicing hasar olmaktadır (63). CYP2B6*9 (rs3745274) olarak ifade edilen bu varyasyonun enzimi fonksiyonsuz hale getirdiği, her iki allelinde de CYP2B6*9 varyasyonunu taşıyan bireylerin klopidogrel metabolizmasından yoksun oldukları rapor edilmiştir (82).

Birçok ilacın ve özellikle tiyenopiridin grubu ilaçların absorpsiyonunda görevli anahtar bir protein olan P-glikoprotein effluks pompası, MDR1 (multidrug resistance protein 1/çoklu ilaç direnç geni) olarak ta bilinen ABCB1 geni tarafından kodlanmaktadır (Bkz. şekil 2.7). Kromozom 7'de yer alan bu genin ekzon 26'da 3435. nükleotid pozisyonunda sitozinin timine değişimi (3435C>T) sonucu meydana gelen varyasyonun genin ekspresyon seviyesini ve proteinin fonksiyonunu düşürdüğü rapor edilmiştir (46). Hücreleri toksik maddelerden ve metabolitlerden enerjiye bağımlı olarak koruyan bu zar integral proteini klopidogrel biyotransformasyonunda da görev almaktadır. Klopidogrelin aktif metabolitinin konsantrasyonunu düşürdüğü ve olumsuz klinik sonuçların artışına neden olduğu rapor edilmiştir (121,132).

Glikoprotein IIb/IIIa (GpIIb/IIIa), trombositler üzerinde bulunan bir integrin kompleksidir. Bu kompleks trombosit aktivasyonuna yardım eden, fibrinojenin bağlandığı bir reseptördür (şekil 2.6). Kompleks GpIIb ve GpIIIa'nın kalsiyuma bağımlı olarak birleşimi sonucu oluşur. Bu birleşim trombosit agregasyonu için gerekli bir basamaktır. İntegrin beta-3 proteini bu integrin kompleksinin GpIIIa kısmını oluşturmakta ve ITGB3 geninden sentezlenmektedir. GpIIIa, en sık rastlanan allelik izoformları trombosit antijeni 1 (PIA1) ve trombosit antijeni 2 (PIA2) ile yüksek bir polimorfik proteindir. PIA2 alleli, glikoprotein IIIa geninin 196. bazında timinin sitozine değişimi (T→C) sonucu meydana gelir (rs5918) (89). Bu değişim, glikoprotein IIIa proteininin 33. aminoasitindeki lösinin prolin ile yer değiştirmesine neden olur.

PIA1 alleli ise normal, atasal tip alleldir. Glikoprotein IIb/IIIa reseptörünün PIA2 allelinin klopidoğrelın antitrombosit etkisine tepkisi araştırılmış farklı sonuçlar elde edilmiştir (5,112).

2.4 PARAOKSONAZ ENZİM GRUBU

Paraoksonaz enzimi ilk olarak organofosfat zehirlenmelerine karşı koruyucu katalitik aktivitesinin bulunmasıyla tanımlanmıştır. 1946'da Abraham Mazur hayvan dokusunda organofosfat bileşiklerini hidroliz edebilen bir enzimin varlığını bildirerek bu tanımlamayı gerçekleştirmiştir (79). Organofosfatlar fosforik asit esterlerinin genel adı olmakla birlikte birçok böcek ilacının, sarin, tabun gibi sinir gazlarının ve tarım ilaçlarının temelini oluşturur. Memelilerde bu organofosfatların detofikasyonunun en önemli yolu serum ve karaciğer A-esterazlar tarafından dşuk toksisiteli metabolitlere hidrolizdir (126).

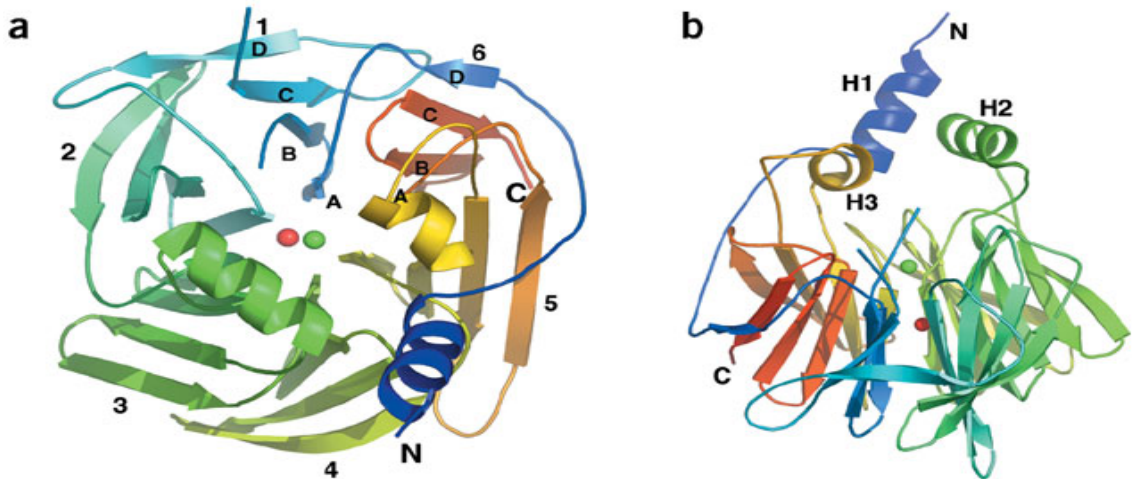
Paraoksonaz (PON) enzimi 1953 yılında Aldridge W.N. tarafından p-nitrofenil asetat, propiyonat ve btiratı hidroliz eden A-esteraz olarak teşhis edilmiştir. Esterazlar oldukça geniş bir enzim sınıfı olup, alifatik ve aromatik ester bağlarının yanında peptidleri ve amidleri hidrolize ederler. Esterazlar substratlarına göre 3 sınıfa ayrılır: A-esterazlar (arilesterazlar, paraoksonaz) organofosfatları, B-esterazlar (karbosilesterazlar) alifatik esterleri, C-esterazlar (asetilesterazlar) asetat esterlerini hidrolize ederler. PON enzimi, A grubu arildialkilfosfataz sınıfı bir ester hidrolaz enzimi olması nedeniyle sistematik adı arildialkilfosfatazdır (131). PON, son derece zehirli organofosfat tarım ilacı parationun toksik metaboliti paraoksonu (organofosfat substratı) geri dönüşümlü olarak bağlanıp hidroliz edebilmesinden dolayı bu ismi almıştır (27).

Mackness ve ark. 1985 yılında yaptıkları çalışmalar ile PON'un HDL molekülünde bulunduğunu (73), 1988' de PON'un HDL üzerinde yer alan apoA-I'e bağlı olarak aktivite gösterdiğini (75) ve 1991 yılında LDL zerindeki lipidperoksit birikimini azalttığını rapor etmişlerdir (72). Bu bulguların sonucunda, araştırmacılar özellikle kardiyovasküler hastalıklar ile PON arasındaki ilişkiyi araştırmaya yönelmişlerdir.

İnsanlarda 7. kromozomun uzun kolunda q21.3 ve q22.1 arasında yerleşmiş üç adet PON geni bulunmaktadır. PON1, PON2 ve PON3 genlerinin kodladığı esterazlarından oluşan paraoksonaz enzim grubu, aminoasit dizilimleri bakımından farklılık göstermekle birlikte kuşlar, balıklar ve eklembacaklılar dışında birçok hayvan türünde sentezlenmektedir. İmmünohistokimyasal yöntem ile PON1 ve PON3'ün karaciğer ve plazmada, PON2'nin ise karaciğer, beyin, böbrek, kalp, aortik düz kas hücreleri ve testis endotel tabakasında bulunduğu gösterilmiştir (66).

2.4.1. Paraoksonaz 1 Enzimi

Paraoksonaz 1 (PON1) enzimi, kalsiyum bağımlı, 354 aminoasitli, 43 kDalton ağırlığında glikoprotein yapısında, karaciğerde sentezlenen bir enzimdir (13). PON1'in biyokimyasal yapısı, 4 adet polipeptid zincirden meydana gelen 6 yapraklı β tabakadan oluşmaktadır (Şekil 2.9). Enzim 42. ve 353. sistein rezidüleri arasındaki disülfid köprüsü ile sonlanarak üç boyutlu yapısını kazanır. Amino (N) ve karboksil (C) uçlarının bu şekilde kovalent bağlanması, β tabakalı enzimlerde nadir görülür (43).



Şekil 2.9 Paraoksonaz enziminin üç boyutlu görünümü (a) β -kırmalı tabakalar ve (b) hidrofobik bölgelerin (H1, H2, H3) β -kırmalı tabakalara göre durumu (43)

PON1, organofosfat pestisitlerin aktif metaboliti olan oksonların, soman ve sarin gibi sinir gazlarının detoksifikasyonunda, LDL ve HDL'nin lipid peroksidlerinin hidrolizinde ve ilaç metabolizmasında görev yapmaktadır (27,72).

PON1, karaciğerde sentezlenip seruma salınır. Serumda spesifik olarak HDL'ye bağlanır. HDL, periferel hücrelerden kolesterolün taşınmasını sağlayan, üzerindeki PON1 ve PON3 gibi enzimler sayesinde LDL yükseltgenmesini önleyen lipoproteindir. PON1 sekresyonu önemlidir. Çünkü hücreden salınımını düzenleyen faktörler, enzimin serum seviyelerini de etkilemektedir. Lipoproteinlerin yokluğunda PON1'in kana çok az salındığı, HDL eklendiğinde ise enzimin kana salınımının arttığı gözlemlenmiştir. Kardiyovasküler hastalıklarda PON1'in önemli olması lipid peroksidasyonunu azaltarak aterosklerotik lezyonların gelişimini önlemesinden kaynaklanmaktadır. PON1'in LDL ile etkileşime girmemesine rağmen LDL'deki lipidlerin oksidasyonunu engellemesinin mekanizması kesinlik kazanmamış olup, çeşitli hipotezler üzerinde durulmaktadır (25).

PON1, bazı lakton ve karbonat esterlerini içeren ilaç ve ön ilaç maddelerinin metabolizmasında da görev almaktadır. Örneğin, diüretik bir ilaç olan spironolakton, 3-hidroksimetilglutaril-CoA redüktaz inhibitörleri olan mevastatin, lovastatin ve simvastatin PON1 tarafından hidroliz edilir. Bu hidroksimetil glutaril-CoA redüktaz inhibitörlerinin hidrolizlenmesi, ilk başlarda PON1 enziminin statinaz aktivitesi olarak tanımlanmıştır (12).

Yakın bir zaman önce, Bouman ve ark. karaciğerde ilaç metabolize eden enzimlerin mikrozomal ekspresyon sistemlerini araştırdıkları çalışmalarında bir esteraz olan PON1 enziminin klopidogrel metabolizmasında görev yaptığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, PON1'in klopidogrel'den tiol aktif metabolit oluşumunda oran belirleyici bir etkisinin bulunduğunu rapor etmişlerdir (15).

2.4.2. Paraoksonaz 1 Geni

İnsan PON gen ailesinin kromozom üzerindeki tam lokalizasyonu ilk olarak Humbert ve ark. tarafından 7. kromozomun uzun kolunda q21-q22 aralığında tespit

edilmiştir (54). Daha sonra, bu gen ailesinin PON1, PON2 ve PON3 üyelerinden meydana geldiğini Primo-Parma ve ark. rapor etmiştir. Bu ailenin üzerinde en çok çalışılan üyesi olan PON1 geni, 9 ekzondan meydana gelen yaklaşık olarak 136 kb uzunluğunda bir diziye sahiptir (97).

İlk olarak, 1973 yılında Von Mallinckrodt ve ark. PON1 enziminin genetik polimorfizm gösterdiğini bildirmiştir (37). Daha sonra, 1976 yılında Playfer ve ark. PON1'in insanlar arasında düşük, orta ve yüksek aktiviteye sahip polimorfik dağılım gösterdiğini daha detaylı olarak açıklamıştır (94). Bu aktivite polimorfizminin moleküler temelini PON1'in cDNA dizisindeki iki aminoasitin yer değiştirmesi olduğunu Humbert ve ark. göstermiştir (54).

İnsan PON1 enziminin cDNA dizisini ilk olarak Hassett ve ark. ile Adkins ve ark. belirleyerek üzerinde iki genetik polimorfizm tespit etmişlerdir. Bunlar; PON1'in kodlama bölgesindeki 192. kodonda glutaminin arjinine değişimi (A→G) ile 55. kodondaki metiyoninin lösinine (T→A) değişimidir. Kodon 192'de glutamin varlığında "A genotipi", arjinin varlığında "B genotipi" (bazı kaynaklarda A yerine Q, B yerine R genotipi kullanılmaktadır), 55. kodondaki lösin varlığında "L genotipi" ve metiyonin varlığında "M genotipi" oluşmaktadır (1,44,71). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda ise PON1 geninin ekzonlarında, intronlarında ve promoter bölgesinde 200'e yakın SNP tespit edilmiştir (40).

Paraokson, PON1_{192R} alloenzimi tarafından altı kat daha hızlı hidroliz edilir. PON1_{192Q} alloenzimi ise sarin, soman ve diazoksonu daha hızlı hidroliz etmektedir. Fenilasetat ve dihidrokumarinde ise farklılık görülmez (21). Tek bir aminoasitteki değişimin enzim aktivitesini bu kadar fazla etkilemesi enzimin yapısına bağlanmıştır. 192. pozisyondaki arjininin aktif bölgenin önemli bir yerindedir. Ayrıca, PON1_{192Q} alloenzimi yükseltgenmiş HDL ve LDL'nin metabolize edilmesinde PON1_{192R} alloenziminden daha etkilidir. Bu genetik polimorfizm serumdaki enzim konsantrasyonunu da etkiler. Homozigot R bireyler homozigot Q'ya göre daha yüksek enzim konsantrasyonuna sahiptir (8). PON1 M55L polimorfizmi substratla ilişkiyi değiştirmez, enzimin düşük serum aktivitesi ve konsantrasyonu ile ilişkilidir. M aleli taşıyanlarda PON1'in düşük mRNA seviyeleri bulunmuştur. L aleli taşıyanlar daha

kararlı ve proteolize daha dayanıklıdır. Bu durum, yüksek serum aktivitesine sahip olmalarını açıklayabilir (74).

Üzerinde en çok çalışılan, insidansları yüksek seviyelerde bulunan ve enzim aktivitesini değiştirdiği birçok çalışmada rapor edilen PON1 Q192R ve L55M polimorfizmleri, Türk toplumunda da çalışılmıştır. Aynacıoğlu ve ark. birbirleriyle ailesel bağları olmayan 381 Türk birey üzerinde yaptıkları çalışmalarında genotip insidansları QQ % 49, QR % 40, RR % 11 ve LL % 52, LM % 39, MM % 9 olarak bildirmişlerdir (10). Taşkiran ve ark. bu polimorfizmleri Türk hastalarda araştırmışlar, PON1 L55M polimorfizmi ile KAH arasında ilişki olduğunu, Q192R polimorfizminin ise KAH'a yatkınlıkta risk faktörü olmadığını bildirmişlerdir (120).

PON1 enziminin klopidogrel karaciğerdeki biyotransformasyonunda önemli rol oynayabileceği bulgusunu ilk olarak Bouman ve ark. yakın bir zaman önce bildirmiştir. In vitro metabolik profillemeye tekniklerini kullanarak PON1'in klopidogrel biyoaktivasyonu için önemli bir enzim olduğunu rapor etmişlerdir. Bununla birlikte, PON1 Q192R genotipinin aktif metabolit oran belirleyici etkisinin bulunduğunu, QQ genotipine sahip bireylerin RR genotipine göre stent trombozu bakımından yüksek seviyede riske sahip olduklarını bildirmişlerdir. Böylelikle, klopidogrel direnci üzerine yapılan çalışmalar farklı bir boyut kazanmıştır (15).

Sonrasında, Bouman ve ark.'nın çalışmasına cevap niteliğinde ve PON1 enziminin klopidogrel biyoaktivasyonundaki rolünü ortaya çıkarmak adına ilk olarak Sibbing ve ark. bir makale yayınlamıştır. PON1 Q192R polimorfizminin klopidogrel trombosit yanıtı veya klopidogrel ile tedavi edilen hastalarda stent tromboz riskini etkilemediğini rapor etmişlerdir (108). Li ve ark. ise birkaç ay önce yayınladıkları çalışmalarında PON1 Q192R ve CYP2C19*2 polimorfizmlerinin klopidogrel yanıtını etkilediğini ileri sürmüşlerdir (68). Buna karşın, yine aynı zaman diliminde yayınlanan makalede Acrenaz ve ark. in vitro çalışmalarında PON1'in klopidogrel biyoaktivasyonunu etkilemediği sonucunu ortaya koymuşlardır (4). Birbirlerini desteklemeyen bu sonuçlar özellikle farklı etnik gruplarda daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. GEREÇ

Çalışmamız için gerekli olan Etik Kurul onayı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 2011 yılı 60 karar numarası ile verilmiştir. Araştırmamızda ölçümü yapılacak olan parametreler ve analizi gerçekleştirilecek genetik polimorfizmler için gerekli malzemelerin sağlanabilmesi amacıyla çalışma proje önerisi haline getirilmiştir. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu 1 Haziran 2012 tarihinde 201211017 proje numarası ile proje önerimizi destekleme kararı almıştır.

3.1.1. Çalışma Grubu Bireyleri ve Örneklerin Toplanması

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalına başvuran, elektif veya acil stent implantasyonlu perkütan koroner girişim amacıyla 1 Haziran 2012 ile 1 Haziran 2013 tarihleri arasında hastaneye yatırılan 80 yaş altı 223 hasta çalışmamıza dahil edilmiştir. Çalışmanın içeriğiyle ilgili olarak tüm hastalara detaylı bilgi verilerek hastalardan imzalı onay formu alınmış, bilgilendirilmiş ayrıntılı onam formlarını imzalamayan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

Çalışmamızın dışlama kriterleri aşağıda belirtilmiştir:

- 30 yaşından küçük, 80 yaşından büyük olanlar
- Özgeçmişinde herhangi bir kanamalı hastalık bulunanlar
- Son 10 gün içinde trombositleri etkilediği bilinen aspirin dışında herhangi bir ilaç kullananlar
- Trombosit miktarı $<119000/\mu\text{l}$ olanlar
- Hematokrit değeri $<\%33$ olanlar

- Kreatinin >2,5 mg/dl olanlar
- Karaciğer fonksiyon bozukluğu bulunanlar

Stent implantasyonlu perkütan koroner girişim sonrası en az 1 yıl süre ile 75 mg/gün klopidogrel ve 100-300 mg/gün aspirin idame ilaç tedavisi bütün hastalar için kabul gören rutin uygulamadır. Kardiyoloji klavuzlarında ikili antitrombosit tedavi olarak geçmektedir. Literatürlere göre 75 mg/gün klopidogrel idame dozu alan hastada etkin antitrombosit aktivite 5-7. günde gerçekleşmektedir (114). Çalışmamıza en az 7 gün süre ile 75 mg/gün klopidogrel ve 150 mg/gün aspirin kullanan hastalar dahil edilmiştir. Her hastadan kan hücrelerinin sayımı ve genetik varyasyon analizi için EDTA'lı tüpe 2 ml, biyokimyasal parametrelerin ölçümü için jelli tüpe 2 ml ve antitrombosit aktivite tayini için sodyum sitratlı tüpe 2 ml venöz kan örneği alınmıştır.

Çalışmamıza dahil edilen bireylerin demografik ve klinik özellikleri hakkındaki bilgiler kendilerinden ve en son epikriz raporlarından elde edilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Hastaların değerlendirilen demografik ve klinik özellikleri

Demografik Özellikler
Cinsiyet
Yaş
Vücut kütle indeksi
Hastanın Klinik Özgeçmişi
Hipertansiyon
Hiperlipidemi
Diyabet
Sigara kullanımı
Koroner Arter Hastalığı için Aile Hikayesi
İlaç Kullanımı
Beta Blokeri Kullanımı
Statin Kullanımı
Proton Pompa İnhibitörü Kullanımı
Kalsiyum Kanal Blokeri Kullanımı
ACE İnhibitörü Kullanımı

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

1. Antitrombosit aktivite ölçüm cihazı (Verifynow System)
2. Mikrosantrifüj
3. Buzdolabı
4. Vorteks
5. Nano spektrofotometre
6. Derin dondurucu
7. PCR (Polimerase Chain Reaction) cihazı (Thermal Cycler)
8. Otomatik pipet seti
9. Elektronik pipetleme ve dağıtım seti (Eppendorf Repeater[®] Xstream Electronic Pipette)
10. Çeker ocak
11. MassARRAY Nanodispenser
12. MassARRAY Kütle Spektrometresi
13. Su banyosu
14. PCR plaka rotorlu santrifüj
15. PCR plaka döndürücü

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

1. Vacutainer kan toplama seti
2. Steril laboratuvar eldiveni

3. EDTA'lı mor kapaklı kan alma tüpü (2 ml)
4. Jelli sarı kapaklı kan alma tüpü (8 ml)
5. Sodyum sitratlı mavi kapaklı kan alma tüpü (2 ml)
6. Plastik pastör pipeti
7. Antitrombosit aktivite ölçüm kiti (Verifynow P2Y12)
8. % 98,9'luk Etil alkol
9. DNA izolasyon kiti (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit)
10. Polipropilen kapaklı steril mikrosantrifüj tüpü (2 ml, DNAaz ve RNAaz free)
11. Steril mikropipet ucu (100-1000 µl)
12. Steril mikropipet ucu (10-100 µl)
13. Steril mikropipet ucu (0,5-10 µl)
14. Vida kapaklı, contalı polipropilen yapıda mikrosantrifüj tüpü (2 ml, DNAaz ve RNAaz free)
15. DNA örneklerini saklama kutusu
16. CYP2C19*2 (rs4244285) varyantı için 30 bazlık primer çifti
17. CYP2C19*3 (rs4986893) varyantı için 30 bazlık primer çifti
18. CYP2C19*4 (rs28399504) varyantı için 30 bazlık primer çifti
19. CYP2C19*7 (rs72558186) varyantı için 30 bazlık primer çifti
20. CYP2C19*8 (rs41291556) varyantı için 30 bazlık primer çifti
21. CYP2C19*17 (rs12248560) varyantı için 30 bazlık primer çifti
22. ABCB1 (3435C>T) (rs1045642) varyantı için 30 bazlık primer çifti

23. CYP3A4*1G (rs2242480) varyantı için 30 bazlık primer çifti
24. CYP2B6*9 (rs3745274) varyantı için 30 bazlık primer çifti
25. ITGB3 L33P (rs5918) varyantı için 30 bazlık primer çifti
26. PON1 Q192R (rs662) varyantı için 30 bazlık primer çifti
27. PON1 L55M (rs854560) varyantı için 30 bazlık primer çifti
28. CYP2C19*2 (rs4244285) varyantı için 20 bazlık primer (Extension PCR için)
29. CYP2C19*3 (rs4986893) varyantı için 15 bazlık primer (Extension PCR için)
30. CYP2C19*4 (rs28399504) varyantı için 16 bazlık primer (Extension PCR için)
31. CYP2C19*7 (rs72558186) varyantı için 22 bazlık primer (Extension PCR için)
32. CYP2C19*8 (rs41291556) varyantı için 17 bazlık primer (Extension PCR için)
33. CYP2C19*17(rs12248560) varyantı için 19 bazlık primer (Extension PCR için)
34. ABCB1 (rs1045642) varyantı için 18 bazlık primer (Extension PCR için)
35. CYP3A4*1G (rs2242480) varyantı için 17 bazlık primer (Extension PCR için)
36. CYP2B6*9 (rs3745274) varyantı için 15 bazlık primer (Extension PCR için)
37. ITGB3 L33P (rs5918) varyantı için 15 bazlık primer (Extension PCR için)
38. PON1 Q192R (rs662) varyantı için 20 bazlık primer (Extension PCR için)
39. PON1 L55M (rs854560) varyantı için 18 bazlık primer (Extension PCR için)
40. Deiyonize su (dH₂O)
41. PCR reaksiyonları için ultra saflaştırılmış distile su
42. 384 kuyucuklu PCR plakası

43. 384 kuyucuklu PCR plakasına uygun steril optik yapışkan film
44. PCR Buffer (10X, 20 mM MgCl₂ içeren)
45. 25 mM Mg₂Cl
46. HotStarTaq DNA Polimeraz (5U/μl)
47. dNTP karışımı (Her birinden 25 mM)
48. Shrimp Alkalen Fosfataz Buffer (10X)
49. Shrimp Alkalen Fosfataz enzimi (1.7 U/μl)
50. iPLEX GOLD Buffer
51. iPLEX Termination Mix
52. iPLEX Enzim
53. Steril Rezin (Resin)
54. 3-point kalibrant
55. MassARRAY sistemine uygun çip (SpectroCHIP)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hematolojik ve Biyokimyasal Ölçümler

Çalışmamıza dahil edilen hastaların trombosit miktarını belirlemek için EDTA'lı tüplerdeki kan örnekleri kullanılarak ölçüm kalibrasyonu günlük yapılan otomatik hemositometreyle (Coulter LH 780, Coulter Corporation, Florida, Amerika) tam kan sayımı yapıldı.

Hastaların LDL, HDL, total kolesterol, trigliserit ve kreatinin değerlerini belirlemek için jelli sarı kapaklı tüplere alınan kan örnekleri kullanıldı. Jelli tüplerdeki

kan örnekleri koagülasyonun tamamlanması için 30 dk bekletildikten sonra 10 dk 3000 g'de +4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası her tüpün üst kısmında jel ile ayrılmış olan serum örneği ölçüm için kullanıldı.

Total kolesterol için CHOD-PAP (Cholesterol oxidase-phenol-aminophenazone) (3), HDL kolesterol için PEG-CHOD-PAP (Polyethylene glycol cholesterol oxidase-phenol-aminophenazone) (117), trigliserit için GPO-PAP (Glycerolphosphate oxidase-phenol-aminophenazone) (30), kreatinin için kreatininaz (58) enzimatik kolorimetrik yöntemini kullanan ticari kitler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) ile Roche/Hitachi MODULAR P otoanalizöründe ölçüm yapıldı.

Tüm hastaların trigliserit değerleri <400 mg/dl olduğu için VLDL (Çok düşük dansiteli lipoprotein) ve LDL kolesterol düzeyi Friedewald formülüyle hesaplandı (33):

$$\text{VLDL} = \text{Trigliserit}/5$$

$$\text{LDL Kolesterol} = \text{Total Kolesterol} - (\text{VLDL} + \text{HDL Kolesterol})$$

3.2.2. Antitrombosit Aktivite Ölçümü

Klopidogrel trombosit hücre zarı üzerindeki P2Y12 reseptörünü geri dönüşümsüz olarak inhibe etmektedir. Bu nedenle, antitrombosit aktivite P2Y12 reseptörüne spesifik olarak VerifyNow P2Y12 kiti (Accumetrics Inc., San Diego, Kaliforniya, ABD) ile VerifyNow sisteminde ölçülmüştür.

Ölçüm Prensipleri

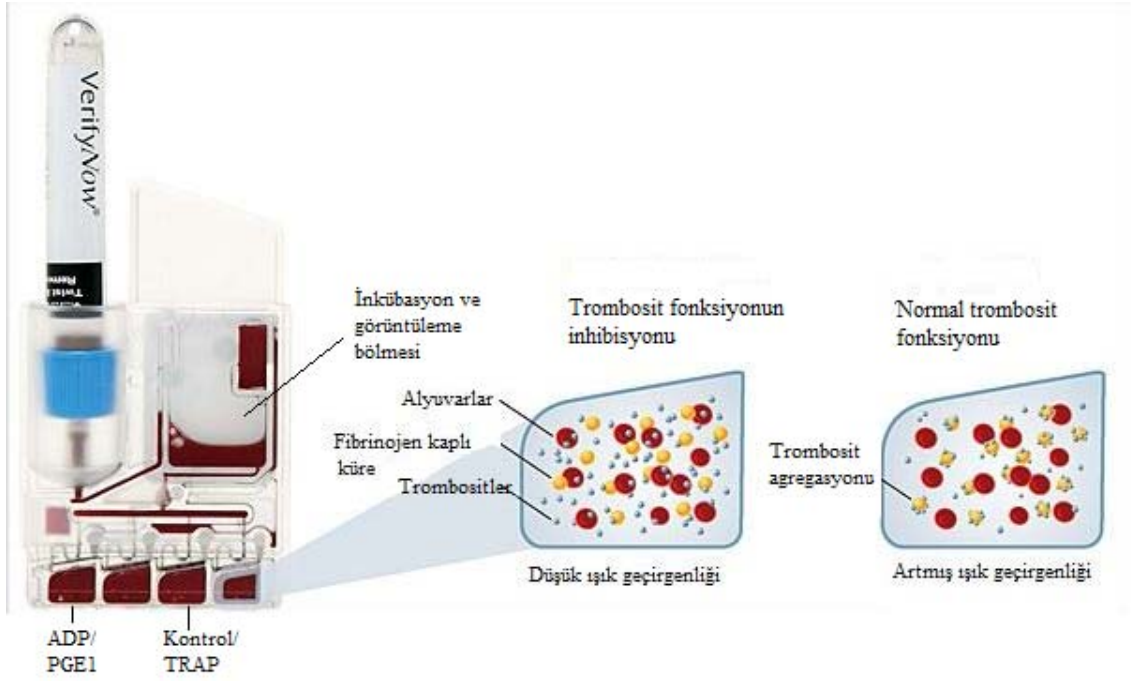
Trombosit fonksiyonlarının ve antitrombosit tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde in vitro olarak uygulanan ışık transmisyon agregometrisi (LTA-Light Transmission Aggregometry) testi halen altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak bu tekniğin tekrarlanabilirliğinin kısıtlı, hazırlık aşamasının zahmetli ve uzun zaman alışı yaygın kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle, son yıllarda trombosit fonksiyonlarının değerlendirilmesinde yeni sistemler geliştirilmiştir. Yapılan araştırmalarda, LTA ile en yakın uyum içinde olan yeni teknolojinin VerifyNow sistemi (Şekil 3.1) olduğu gösterilmiştir (92,127).



Şekil 3.1. VerifyNow sistem cihazı ve kiti

Önceden Ultegra RPFA (Rapid Platelet Function Analyzer) analizörü olarak bilinen VerifyNow sistemi, antitrombosit ajanların aktivitelerinin görüntülenmesi konusunda teşhis amaçlı kullanım için FDA'dan onay almış bir sistemdir. Tam kanda aktive olmuş trombositlerin fibrinojene bağlanma yeteneğine bağlı olarak optik algılama sisteminin türbidimetrik ölçüm yaptığı bu analizör, kan alma tüplerinin doğrudan iğnesine takılabildiği kitler sayesinde çalışmaktadır (76). Bu kitler çalışılacak ilaca özgüdür ve her hasta için tek kullanımlıktır. Tiklopidin, klopidogrel, prasugrel ve tikagrelor için VerifyNow P2Y12 kiti, aspirin için VerifyNow aspirin kiti, glikoprotein (GP) IIb/IIIa inhibitörleri için VerifyNow IIb/IIIa kiti kullanılmaktadır (48).

VerifyNow P2Y12 kiti, içeriğinde adenosin difosfat (ADP), prostaglandin E1 (PGE1), iso-TRAP (Trombin Reseptörünü Aktive Edici Peptid/ Thrombin Receptor Activating Peptide) ve PAR4-AP (PAR4 Aktive Edici Peptid/PAR4-Activating Peptide) barındırmaktadır. Bu reaktifler, test kitinin alt kısmında ölçümlerde belirleyici rolü üstlenen iki temel kuyucukta yer alır (Şekil 3.2). Her iki kuyucukta da liyofilize edilmiş insan fibrinojeni kaplı mikro boncuklar bulunmaktadır (48).



Şekil 3.2. VerifyNow P2Y12 kitinin ölçüm fonksiyonu

İlk kuyucukta mikro boncuklara ek olarak 20 μ M ADP ve 22 nM PGE1 bulunur. ADP tarafından trombosit aktivasyonu tromboz gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Aktive olmuş trombositlerin depo granüllerinden salınan ADP, dolaşımdaki diğer trombositleri P2Y1 ve P2Y12 reseptörleri aracılığı ile aktive eder. VerifyNow P2Y12 kiti, trombositleri aktive etmek için agonist olarak ilk kuyucukta ADP kullanır. Aynı kuyucukta PGE1 kullanmasının nedeni ise trombosit içi cAMP düzeyini artırarak kalsiyum düzeyini azaltmak, böylelikle P2Y1 reseptörünün trombosit aktivasyonuna katılımını düşürmektir. PGE1, VerifyNow P2Y12 kitini sadece klopidogrel'in bağlandığı P2Y12 reseptörünün aktivitesini ölçmek için daha spesifik hale getirmektedir. Böylelikle, VerifyNow sistemi ilk kuyucukta ADP ile aktive olmuş, PGE1 ile sadece P2Y12 reseptörüne bağlı bir aktivasyon sağlamış trombositlerin fibronojene bağlanma yeteneğine göre trombosit fonksiyonunu ölçmektedir (31). Fibrinojen kaplı mikro boncuklar, aktive olmuş trombositlerin GPIIb/IIIa reseptörlerinin miktarı oranınca tam kanda agregasyon yapmaktadır. Eğer klopidogrel beklenen antitrombosit etkisini meydana getirmiş ise, bu agregasyon miktarı azalacaktır. Eğer trombosit fonksiyonları inhibe olmuşsa düşük ışık geçirgenliği, trombosit fonksiyonları

normal ise yüksek ışık geçirgenliği ortaya çıkar. Işık geçirgenliği miktarına göre VerifyNow sistemi okuma yapmaktadır (Bkz. Şekil 3.2). İlk kuyucuktaki okuma sonucunu P2Y12 reaksiyon birimi (P2Y12 reaction unit/ PRU) olarak raporlamaktadır. PRU, ADP aracılığı ile gerçekleşen agregasyonun P2Y12 reseptörüne spesifik değeridir (48).

İkinci kuyucuk, P2Y12 reseptörlerinden bağımsız, spesifik olarak PAR-1 ve PAR-4 trombin reseptörleri ile meydana gelen temel agregasyon miktarını ölçmek için tasarlanmıştır. Diğer kuyucuktan farklı olarak PAR-1 ve PAR-4 reseptörlerini aktive etmek için sırasıyla iso-TRAP ve PAR4-AP ikinci kuyucukta yer alır. İlk kuyucuk ile benzer şekilde fibrinojen kaplı mikro boncuklar trombosit agregasyonu için ikinci kuyucukta da bulunmaktadır. VerifyNow sisteminin ışık geçirgenliğine bağlı olarak ikinci kuyucukta ölçtüğü agregasyon miktarı P2Y12 reseptöründen bağımsız temel agregasyondur (BASE) (48).

Sonuç olarak, ilk kuyucuktan alınan PRU değeri ile ikinci kuyucuktan alınan BASE değeri klopidoğrelin meydana getirdiği inhibisyonun yüzdelik olarak (% inhibisyon) aşağıdaki formül ile hesaplanmasını sağlar (48,76).

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(\text{BASE-PRU}) \times 100}{\text{BASE}}$$

Eğer BASE değeri 100'ün altında çıkıyor ise VerifyNow P2Y12 testi sonuçlarının geçersiz sayılması gerektiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Bununla birlikte, $\text{PRU} \leq 208$ olması P2Y12 inhibitörünün farmakodinamik antitrombosit bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, $\text{PRU} \leq 208$ değerinin azalmış tromboz oranları ile ilişkili olduğu yakın zaman önceki GRAVITAS (Gauging Responsiveness With a VerifyNow P2Y12 Assay: Impact on Thrombosis and Safety) çalışmalarında rapor edilmiştir. $\text{PRU} < 95$ değeri ise majör kanama için en yüksek riski ihtiva etmektedir (48,95).

VerifyNow P2Y12 kiti sonuçları farklı zamanlarda ölçülerek karşılaştırılmış, kan örneklerinin en uygun ölçüm zamanının 10 dakika ile 4 saat arasında olması gerektiği

kit protokülünde bildirilmiştir. Bireylerden kan alındıktan sonra örnekler buzdolabına konmadan oda sıcaklığında en az 10 dakika bekletilerek 4 saat geçmeden VerifyNow P2Y12 kiti ile ölçülmesi gerekmektedir. Ayrıca, ölçüm yapılacak kan tam kan olmalı ve yarısına kadar dolabilen, 2 ml'lik vakumlu, % 3.2'lik sodyum sitratlı tüplere alınmalıdır. Kan alınırken Vacutainer kan toplama seti kullanılmalı, kan doldurulacak ilk tüp 2 ml'lik boş tüp olmalı ve atılmalıdır. İkinci tüp, üzerinde ölçüm yapılacak % 3.2'lik sodyum sitratlı tüp olmalıdır. İlk tüpün atılmasının nedeni damara iğne ile girilmesi sırasında oluşabilecek trombosit aktivitelerini elemek içindir (48).

Ölçüm Yöntemi

Kan alımından sonra buzdolabına konmadan en az 10 dakika oda sıcaklığında bekletilen içinde tam kan bulunan sodyum sitratlı tüp 4 saat geçmeden antitrombosit aktiviteyi ölçmek için VerifyNow sisteminin yanına getirildi.

- Cihaz arka düğmesinden açıldıktan sonra üzerinde yatan hasta görüntüsü bulunan test tuşuna basıldı.
- Ortaya çıkan ekran görüntüsünde gerekli yerlere hasta numarası veya ismi girilip, ekrana kit işareti gelene kadar ilerleme tuşuna basıldı.
- Ekranı kit işareti geldikten sonra tek kullanımlık folyo poşetler içinde bulunan P2Y12 kiti hazır duruma getirildi. Kit sadece üst kısımdan tutularak iğne koruyucusu döndürülmeden çekilmek suretiyle yerinden çıkartıldı.
- Cihazın kapağı kaldırıldı. Kit cihaza klik sesi duyuluncaya kadar bastırılarak yerleştirildi ve kapak hemen kapatıldı.
- Ekranı tüp işareti geldiğinde içinde örneğimiz bulunan tüp, 5 defa yavaşça döndürülerek karıştırıldı.
- Tüp lastik tıpalı kapağı aşağı gelecek şekilde cihaz içerisinde bulunan kitin iğnesine yerleştirildi.

- Yaklaşık 3 dakika sonra, PRU değeri cihaz ekranında görüldü. Yüzdelerik işaretin bulunduğu tuşa basıldığında, BASE ve % inhibisyon değerleri de ortaya çıktı.

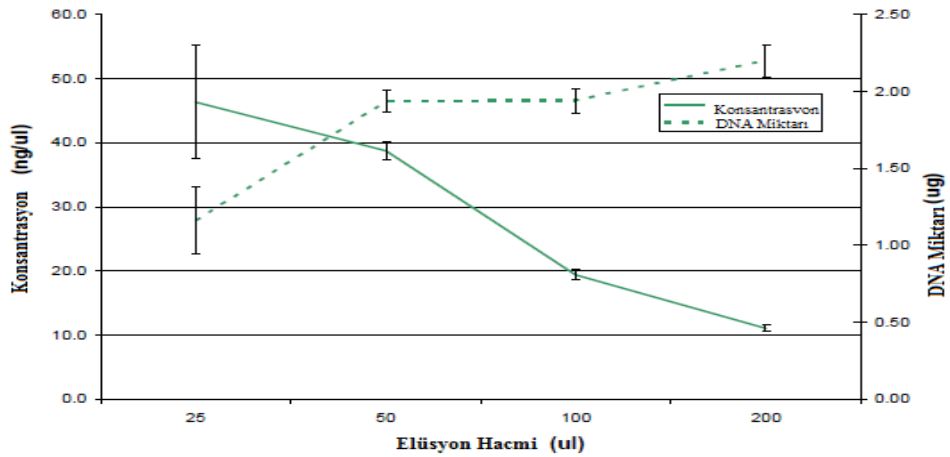
3.2.3 DNA İzolasyonu ve Miktarının Belirlenmesi

DNA izolasyonu için PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kaliforniya, ABD) kullanıldı.

İzolasyon Prensipleri

PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, spin atırılan kolon bazlı nükleik asit izolasyonu tekniğini kullanmaktadır. Bu teknik katı bir faz kullanarak nükleik asitlerin hızlı bir şekilde saflaştırılmasını sağlamaktadır. Nükleik asitlerin bağlandığı bu katı faz, genellikle silika bazlı bir zardan meydana gelmektedir (47).

PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, kaotropik tuzların varlığında silika bazlı zara DNA'yı seçici olarak bağlamaktadır. Guanidin hidroklorid tuzu kaotropik tuz olarak kit çözeltisinde kullanılmıştır. Kit kullanma klavuzu, izolasyon protokolü sonunda isteğe göre 25-200 µl aralığında elüsyon solüsyonu kullanılabileceğini bildirmiştir. 100 µl kan örneğinden saflaştırılan genomik DNA'nın kullanılan elüsyon solüsyonuna göre konsantrasyonu ve miktarı Grafik 3.1'te gösterilmiştir (47).



Grafik 3.1. 100 µl kandan izole edilen DNA'nın elüsyon hacmine göre konsantrasyon grafiği (47)

İzolasyon Protokolü

- Su banyosu 55°C olarak ayarlandı.
- EDTA'lı tüpe alınmış taze kandan steril 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 200 µl kondu. Eğer kan +4°C'de birkaç gün bekletilmiş ise yavaşça alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra tam kan halinde mikrosantrifüj tüpüne konuldu.
- Kit solüsyonları içerisinde bulunan proteinaz K'dan 20 µl, mikrosantrifüj tüpündeki örnek üzerine eklendi.
- Yine kit solüsyonları içerisinde bulunan RNAaz A'dan 20 µl, örnek üzerine eklendi. Karışım iyice vortekslendi. Daha sonra karışımın oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyonu yapıldı.
- Karışım üzerine kit solüsyonları içerisinde bulunan PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer'dan 200 µl eklenerek homojen bir solüsyon elde etmek için mikrosantrifüj tüpü iyice vortekslendi.
- Proteinlerin parçalanmasını teşvik etmek için karışım su banyosunda 55°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra lizat üzerine 200 µl %98,9'luk etil alkol eklendi. Homojen bir solüsyona ulaşmak için mikrosantrifüj tüpü 5 saniye iyice vortekslendi.
- Kit ambalajı içerisinde bir toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş PureLink™ Spin Column çıkarıldı.
- PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer ve etil alkol ile birlikte yaklaşık olarak 640 µl gelen lizat, mikrosantrifüj tüpünden alınarak PureLink™ Spin Column içerisine aktarıldı.
- İçerisinde lizat bulunan PureLink™ Spin Column, oda sıcaklığında 1 dakika 10.000 g'de santrifüj edildi.

- Santrifüj sonrasında içerisinde atık solüsyon bulunan toplama tüpü atıldı. PureLink™ Spin Column, kit ambalajı içerisinde bulunan yeni bir toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
- Yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiş PureLink™ Spin Column içerisine kit solüsyonları ile birlikte verilen ve protokol öncesinde etil alkol ile hazırlanmış 500 µl Wash Buffer 1 eklendi.
- PureLink™ Spin Column oda sıcaklığında 1 dakika 10.000 g'de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında içerisinde solüsyon biriken toplama tüpü atılarak PureLink™ Spin Column yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- PureLink™ Spin Column içerisine kit solüsyonları ile birlikte verilen ve protokol öncesinde etil alkol ile hazırlanmış 500 µl Wash Buffer 2 eklendi.
- PureLink™ Spin Column oda sıcaklığında maksimum hızda 3 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında içerisinde solüsyon biriken toplama tüpü atıldı. PureLink™ Spin Column, 2 ml'lik, kapağı koparılmış, steril mikrosantrifüj tüpü içerisine yerleştirilerek kapağı açıldı ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
- PureLink™ Spin Column içerisine 50 µl PureLink™ Genomic Elution Buffer eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
- PureLink™ Spin Column oda sıcaklığında maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında, PureLink™ Spin Column altında bulunan mikrosantrifüj tüpü saflaştırılmış genomik DNA içeren yaklaşık olarak 50 µl çözeltiliye sahipti.
- Üst kısımdaki PureLink™ Spin Column, DNA içeren mikrosantrifüj tüpünden çıkarılarak steril yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.

- PureLink™ Spin Column içerisine 50 µl PureLink™ Genomic Elution Buffer eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
- Yeni santrifüj tüpüne yerleşik PureLink™ Spin Column, oda sıcaklığında maksimum hızda 1,5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında PureLink™ Spin Column altında bulunan mikrosantrifüj tüpü saflaştırılmış genomik DNA içeren yaklaşık olarak 50 µl çözeltiliye sahipti.
- Saflaştırılmış genomik DNA içeren birinci ve ikinci santrifüj tüpleri birleştirilerek genotip analiz zamanına kadar -20'de saklandı.

İlk 50 µl'lik elüsyon muamelesi, silikaya bağlanmış DNA'nın yaklaşık olarak %80'ni elde etmekte, ikinci 50 µl'lik elüsyon muamelesi ise geri kalan kısmı yakalamayı sağlamaktadır (47).

DNA Miktarının Belirlenmesi

DNA izolasyon kiti ile elde edilen DNA örneklerinin miktarı ve saflık derecesi Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, ABD) spektrofotometresi ile ölçüldü.

Genotip analizlerin yapılacağı MassARRAY sistemi, fazla miktarda PCR amplikonlarına ihtiyaç duyduğu için kalıp genomik DNA'nın yüksek saflıkta olması gerekmektedir. Bu nedenle, Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 spektrofotometrenin 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçtüğü absorbans değerlerinin oranının (A_{260}/A_{280}) 1,7 ile 2,0 arasında olması şartı arandı. Bu aralıktaki oran değerleri en düşük protein kontaminasyonunu göstermektedir (51). Ölçümden sonra, DNA stok konsantrasyonu 50 ng/µL olacak şekilde örnekler elüsyon solüsyonu ile sulandırıldı.

3.2.4 Genotip Analizi

Çalışmamızda araştırmayı hedeflediğimiz ilgili genlerdeki varyasyonların genotipleri, Sequenom MassARRAY® System (Sequenom Inc., San Diego, Kaliforniya,

ABD) kullanılarak analiz edildi. Sequenom MassARRAY® sistemi hedefteki genetik materyalin ve/veya varyantın miktarının etkin ve hassas ölçümünün yapıldığı DNA analizi platformudur. Bu platform, MassARRAY Nanodispenser ve MassARRAY Analyzer cihazlarından oluşmaktadır (Şekil 3.3). MassARRAY Nanodispenser, SpectroCHIP array üzerine hızlı şekilde örnek transferini gerçekleştirmek için kullanılmaktadır. MassARRAY Analyzer ise özellikle genomik uygulamalar için dizayn edilmiş, masa üstü tam otomatik bir MALDI-TOF (Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi) kütle spektrometresidir (83).

Sequenom MassARRAY® sistemi, somatik mutasyon profileme, genotipleme, metilasyon analizi ve kantitatif gen ekspresyonu gibi çeşitli uygulamaların yapılmasına imkan tanımaktadır (83). Biz bu platformda İplex GOLD SNP genotiplemesini yürüttük.



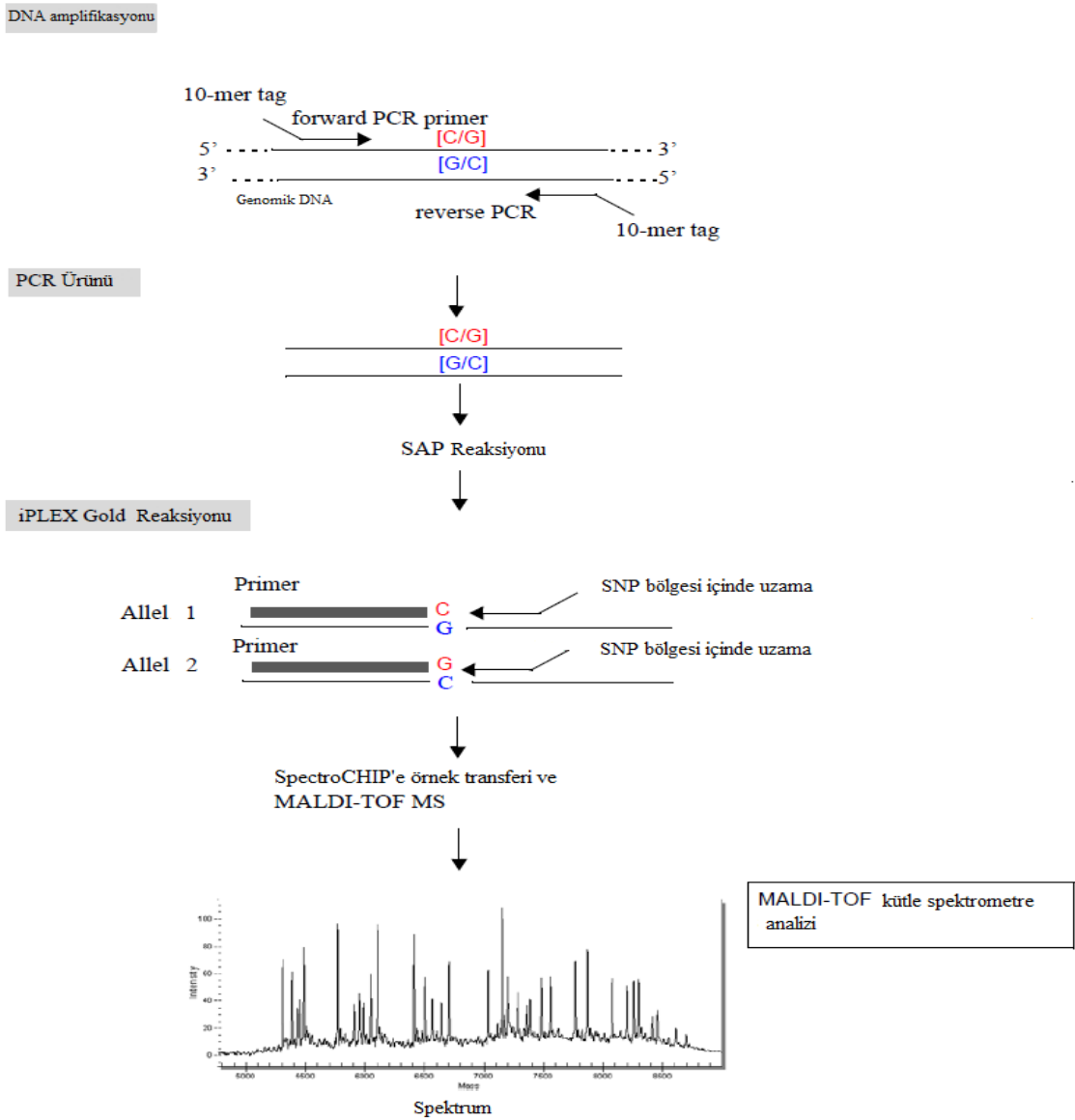
Şekil 3.3. Sequenom MassARRAY® Sistemi

3.2.4.1 İplex GOLD SNP Genotipleme Prensibi

İplex GOLD, SNP genotipleme için önde gelen bir teknolojidir. MassARRAY sistemi üzerinde yürütülen bu uygulama GWAS (Genome-Wide Association Studies) ve bağlantı analizi çalışmalarının doğru haritalandırılmasında ve validasyonunda, hatta ilgili alanlara yönelik SNP panelleri ile rutin genetik test olarak çok yaygın kullanılmaktadır (83).

İplex GOLD analizinin 36 adet SNP'nin aynı anda genotiplendirilmesi özelliği yüzlerce çalışmada kullanılmıştır. Rutin olarak istenilen bölgelere yönelik dizayn kapasitesi ile hem yüksek seviyede esnekliğe sahip, hem de her bir genotip için çok düşük maliyet sunmaktadır (34,83).

İplex GOLD reaksiyonu insersiyonlar, delesyonlar, yer değişimler ve diğer polimorfizmler için evrensel bir yöntemdir. DNA amplifikasyonu, SAP (Shrimp Alkalen Fosfataz) reaksiyonu, İplex GOLD reaksiyonu, rezin ile temizleme ve MALDI-TOF analizi aşamalarından oluşmaktadır (Şekil 3.4) (34).



Şekil 3.4. İplex GOLD Reaksiyonu (34)

İplex GOLD genotiplemesinde ilk önce, hedeflenen SNP veya mutasyonlar belirlenerek varyasyona uygun amplifikasyon ve uzama primerleri için dizayn yapılır. Bu analiz için varyasyon bölgesini içine alan en uygun ampikon uzunluk aralığı 80-120 bç'dir. Ampikonların 400 bç'den yukarı olmasından kaçınılmalıdır. Kütle spektrumundaki karışıklığı önlemek ve PCR performansını arttırmak için, amplifikasyon primerlerinin kütesinin uzama primerlerinden ve uzama ürünlerinden farklı olmasına dikkat edilmelidir. Primer dizaynı yaparken primer dimer oluşumuna dikkat etmek, özellikle multipleks reaksiyonlar için çok önemlidir. Amplifikasyon ve uzama primerlerinin dizaynının Sequenom Assay Designer v3.1 yazılımında yapılması en uygun olanıdır. Primerlerin kütlelerini arttırmak için amplifikasyon primerlerinin 5' uçlarına bir 10-mer tag dizisi (5'-ACGTTGGATG-3') eklenerek dizayn yapılır. Böylelikle bu primerler MALDI-TOF kütle spektrometresinin tespit aralığı dışında kalır (34)

Primerler dizayn edildikten sonra genotiplendirilecek DNA örnekleri miktarınca multipleks PCR reaksiyonu için primer karışımı hazırlanır. Sequenom Assay Designer v3.1 yazılımında aynı ortamda dimer oluşumuna neden olan primerler için PCR plakalarında farklı bir kuyucuk ve farklı bir primer karışımı uygulanmaktadır. PCR reaksiyonları için hasta kapasitesine ve analiz edilecek varyasyonların miktarına göre 384 kuyucuklu veya 96 kuyucuklu PCR plakaları seçilmektedir. Tek primer karışımı hazırlanacak ise her bir DNA örneği plaka üzerinde tek kuyucuğa, dimer oluşumu göz önüne alınarak birden fazla karışım hazırlanacak ise karışım sayısı miktarınca kuyucuğa DNA pipetlenmelidir. Negatif kontrol oluşturmak için primer karışım sayısı miktarınca plakanın ilk kuyucuklarına örnek pipetlemesi yapılmaz, buralara sadece PCR karışımı eklenmelidir. Kütle spektrometresinin analizi sırasında bu kuyucuklarda herhangi bir pik tespiti kontaminasyon olduğunu bize gösterir (34).

İplex GOLD reaksiyonu protokolünde bildirilen miktarlar uyarınca multipleks PCR karışımı ve PCR şartları belirlenir. Primer karışımı sayısınca PCR karışımı hazırlanarak PCR plakası üzerinde her biri önceden belirlenen DNA örneğinin bulunduğu yere pipetlenir. Daha sonra, protokolde bildirilen şartlara göre termal cyclers'da PCR reaksiyonu yürütülür (34).

İstenilen PCR bölgelerinin amplifikasyonu yapıldıktan sonra, SAP reaksiyonu için protokol oranlarına göre SAP karışımı hazırlanmaktadır. SAP reaksiyonu PCR amplifikasyonunda bağlanmamış dNTP'leri nötralize etmek için uygulanmaktadır. Nötralizasyon işlemi fosfat gruplarını kopararak (defosfarilasyon) gerçekleştirilir. Karidesten elde edilen bu enzim alkalen ortamda ve 37°C'de en etkin reaksiyonu gösterdiği için bu ismi almıştır. SAP karışımı, PCR plakasındaki amplifikasyonu yapılmış kuyucukların üzerine dağıtılmaktadır. Daha sonra PCR plakası, protokolde bildirilen şartlara göre termal cyclus cihazında yürütülür (34).

SAP reaksiyonundan sonra primer uzama reaksiyonu veya İplex GOLD reaksiyonu olarak adlandırılan PCR aşamasına geçilir. Primer uzama reaksiyonu, amplifikasyonu yapılmış DNA'da SNP'leri veya küçük insersiyon/delesyon polimorfizmlerini belirlemek için kullanılan evrensel bir yöntemdir. Bu reaksiyonda kullanılan primerler, 3' ucu polimorfik bölgeye bitişik şekilde tek uzama primeri olarak dizayn edilir. Uzama reaksiyonu için dizayn edilen primerler PCR karışımı hazırlanırken kütlelerine göre 2-4 arasında değişen gruplara ayrılır. Grup sayısına göre, PCR reaksiyonunda yer alacak primerlerin konsantrasyonları belirlenerek primer uzama reaksiyonu için multipleks primer karışımı hazırlanır. Daha sonra, İplex GOLD reaksiyonu protokolünde bildirilen miktarlarda PCR karışımı meydana getirilir. Bu reaksiyona özel kütlesi modifiye edilmiş ddNTP karışımı kullanılır (iPLEX Termination Mix). PCR karışımı, PCR plakaları üzerinde her örnek için ilgili konumdaki kuyucuğa yüklenir. Optimum duruma getirilmiş ve protokolde bildirilmiş PCR şartlarına göre plaka termal cyclus cihazında yürütülür (34).

Primer uzama reaksiyonundan sonra uzamış ürünlerin kütle spektrometre analizini optimize etmek için önemli bir temizlik aşaması gerçekleştirilir. Katyonik rezin maddesinin kullanıldığı bu aşamada amaç; katyonik rezinin iyonlar ile yer değiştirme özelliğini kullanarak Na⁺, K⁺, ve Mg⁺² iyonlarının ortadan kaldırılmasını sağlamaktır. MassARRAY sisteminin sunduğu bir düzenek sayesinde rezin bütün kuyucuklara aktarılır. Daha sonra, PCR plakasının döndürülerek oda sıcaklığında yaklaşık 15 dakika inkübasyonu yapılır (34).

Rezin ile temizleme yapıldıktan sonra en önemli ve son basamak kütle spektrometre analizidir. MassARRAY sisteminde bu analizi gerçekleştirebilmek için plakadaki PCR ve temizleme sonrası ürünlerin sistemin kendine spesifik çipi olan SpectroCHIP'e aktarılması gerekmektedir. PCR plakasında her bir kuyucuktaki ürünlerin çip üzerindeki kuyucuklara aktarım işlemini Nanodispenser RS1000 cihazı gerçekleştirmektedir (34).

Nanodispenser RS1000 cihazı, çip üzerinde nano boyutundaki kuyucuklara programlanabilir şekilde pipetleme yapabilen tam otomatik, kapalı robotik bir sistemdir. Kütle spektrometresinin kalibrasyonunu yapmak için, çip üzerinde önceden belirlenen bir kuyucuğa 3-point kalibrant solüsyonu pipetlemesi cihaz tarafından yükleme sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, çalışmaya başlamadan önce kalibrant bölmesine 3-point kalibrant eklenmelidir. Nanodispenser RS1000 cihazı üzerinde matriks spotları bulunan çip üzerindeki kuyucuklara pipetleme yapabilen iğneler ile yaklaşık olarak 20 nl PCR ürünü yüklemektedir (34).

PCR ürünlerinin analizini MassARRAY kütle spektrometresinde gerçekleştirmek için, SpectroCHIP cihaza gerekli şekilde yerleştirilir. MassARRAY, MALDI-TOF tekniğini kullanmaktadır. Sistem açıldıktan sonra, cihaza yerleştirilen çip üzerindeki matriks spotlar lazer sayesinde patlatılarak PCR ürünlerinin yüzey salınımı (desorpsiyon) ve iyonizasyonu gerçekleştirilir (MALDI). Lazer ışını, kütle spektrometresinde desorpsiyon ve iyonizasyon kaynağı olarak görev yapar. Matriks, lazer ışınının enerjisini absorbe ederek ve PCR ürünlerinin desorpsiyonunu sağlayarak bu teknikte önemli bir rol oynamaktadır. Lazer ışını etkisiyle hızla dağılan matriks kümesi, vakum ortamına PCR ürünlerini taşıyarak iyonizasyon aşamasına destek olur. Ayrıca, matriks molekülleri lazer enerjisinin tamamını absorbe ederek örnek zararını ve iyon fragmentasyonunu minimize etmektedir (34).

Uçurulan ve iyonize edilen örnek molekülleri elektrostatik olarak uçuş zamanlı bir kütle spektrometresi (TOF-MS) tüpü içine aktarılır. Burada matriks iyonlarından ayrıştırılan örnekler, kütle/yük oranlarına (m/z) göre ayrı ayrı tespit edilerek analiz edilir. Teorik olarak sınırsız kütle aralığı ile birlikte yüksek iletim ve duyarlılık TOF cihazının kendine has avantajları arasındadır. Tüp sonundaki bir iyonun analizi,

kütle/yük (m/z) oranının karekökü ile doğru orantılı olan uçuş zamanına dayanarak yapılmaktadır (34).

3.2.4.2 İplex GOLD SNP Genotiplleme Protokolü

Primer Dizaynı ve Primer Karışımı Hazırlanması

Çalışmamızda CYP2C19*2 (rs4244285), CYP2C19*3 (rs4986893), CYP2C19*4 (rs28399504), CYP2C19*7 (rs72558186) CYP2C19*8 (rs41291556), CYP2C19*17 (rs12248560), ABCB1 (3435C>T) (rs1045642), CYP3A4*1G (rs2242480), CYP2B6*9 (rs3745274), ITGB3 L33P (rs5918), PON1 Q192R (rs662) ve PON1 L55M (rs854560) varyasyonlarını analiz etmeyi amaçladık. Varyasyon bölgelerinin amplifikasyonu için dizayn edilen ve üretici firmadan temin edilen primer çiftleri Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Varyasyon bölgelerinin amplifikasyonundan sonra İplex GOLD reaksiyonu ile varyasyonun tespit edilmesine yardımcı olan uzama primerleri de dizayn edilerek üretici firmadan temin edildi (Tablo 3.3).

Yapılan primer dizaynı çalışması ile bütün primerlerin aynı karışım içerisinde multipleks PCR reaksiyonu için kullanılmasının dimer oluşumuna sebep olacağı belirlendi. Bu nedenle, dimer oluşumuna neden olmayacak şekilde 8 adet primer çiftinin PCR plakasında bir kuyucukta, 4 adet primer çiftinin ise farklı bir kuyucukta PCR reaksiyonuna sokulması planlandı. Uzama reaksiyonu primerleri de aynı plan çerçevesinde kullanıldı. Bu iki kuyucukta (Kuyucuk 1 ve 2) yer alacak primerler Tablo 3.2’de ve Tablo 3.3’de gösterilmiştir. İki farklı kuyucuk için iki farklı primer karışımı dolayısıyla iki farklı PCR karışımı hazırlanması planlandı.

Üretici firmadan temin edilen amplifikasyon primerleri 50 µM konsantrasyonda gönderilmişti. Kuyucuk 1 ve kuyucuk 2 için hazırlanacak primer karışımında her bir primer konsantrasyonu 0.5 µM, final hacminin ise distile su ile tamamlanarak 200 µl olacak şekilde hesaplaması yapıldı. Sonuç olarak, toplam hacmi 200 µl olan bir tanesinde 8 adet primer seti, diğerinde 4 adet primer seti bulunan iki ayrı primer karışımı hazırlanarak PCR amplifikasyonu için hazır duruma getirildi.

Tablo 3.2. DNA amplifikasyonu için dizayn edilen oligonükleotid primer çiftleri

Genetik Polimorfizm	Amplifikasyon için dizayn edilen primer çiftleri
CYP2C19*2 (rs4244285) (Kuyucuk 1)	Forward primer: 5'-ACG TTG GAT GGC AAT AAT TTT CCC ACT ATC-3' Reverse primer: 5'-ACG TTG GAT GAC TTT CTC CAA AAT ATC AC-3'
CYP2C19*3 (rs4986893) (Kuyucuk 1)	Forward primer: 5'-ACG TTG GAT GGA CTG TAA GTG GTT TCT CAG-3' Reverse primer: 5'-ACG TTG GAT GAA CAT CAG GAT TGT AAG CAC-3'
CYP2C19*4 (rs28399504) (Kuyucuk 1)	Forward primer: 5'-ACG TTG GAT GAG TGC AAG CTC ACG GTT GTC-3' Reverse primer: 5'-ACG TTG GAT GGA GCA CAA GGA CCA CAA AAG-3'
CYP2C19*7 (rs72558186) (Kuyucuk 1)	Forward primer: 5'-ACG TTG GAT GCA ACA ACC CTC GGG ACT TTA -3' Reverse primer: 5'-ACG TTG GAT GAC AAA TAC GCA AGC AGT CAC-3'
CYP2C19*8 (rs41291556) (Kuyucuk 2)	Forward primer: 5'-ACG TTG GAT GAT GAG GGA GAA ACG CCG GAT-3' Reverse primer: 5'-ACG TTG GAT GTC TCT TCC TGT TAG GAA TCG-3'
CYP2C19*17(rs12248560) (Kuyucuk 2)	Forward primer: 5'-ACG TTG GAT GGT CTT CTG ATG CCC ATC GTG-3' Reverse primer: 5'-ACG TTG GAT GCA AAG TTT TAG CAA ACG ATT-3'
ABCB1 (rs1045642) (Kuyucuk 1)	Forward primer: 5'-ACG TTG GAT GAC TGC AGC ATT GCT GAG AAC-3' Reverse primer: 5'-ACG TTG GAT GAA GGC ATG TAT GTT GGC CTC-3'
CYP3A4*1G (rs2242480) (Kuyucuk 1)	Forward primer: 5'-ACG TTG GAT GGC AGG AGG AAA TTG ATG CAG-3' Reverse primer: 5'-ACG TTG GAT GTA AGG TTT CAC CTC CTC CCT-3'
CYP2B6*9 (rs3745274) (Kuyucuk 2)	Forward primer: 5'-ACG TTG GAT GTT CTT CCT AGG GGC CCT CAT-3' Reverse primer: 5'-ACG TTG GAT GAT GGA GCA GAT GAT GTT GGC-3'
ITGB3 L33P (rs5918) (Kuyucuk 2)	Forward primer: 5'-ACG TTG GAT GGC ACA GTT ATC CTT CAG CAG-3' Reverse primer: 5'-ACG TTG GAT GTC TTT GGG CTC CTG TCT TAC-3'
PON1 Q192R (rs662) (Kuyucuk 1)	Forward primer: 5'-ACG TTG GAT GAG TAG ACA ACA TAC GAC CAC-3' Reverse primer: 5'-ACG TTG GAT GCC TGA GCA CTT TTA TGG CAC-3'
PON1 L55M (rs854560) (Kuyucuk 1)	Forward primer: 5'-ACG TTG GAT GGA GCT AAT GAA AGC CAG TCC-3' Reverse primer: 5'-ACG TTG GAT GTT TCT GGC AGA AAC TGG CTC-3'

Tablo 3.3. Primer uzama reaksiyonu için dizayn edilen oligonükleotid primerler

Genetik Polimorfizm	Primer uzama reaksiyonu için dizayn edilen primerler
CYP2C19*2 (rs4244285) (Kuyucuk 1)	Extension primer: 5'-AGT AAT TTG TTA TGG GTT CC-3'
CYP2C19*3 (rs4986893) (Kuyucuk 1)	Extension primer: 5'-TGT AAG CAC CCC CTG-3'
CYP2C19*4 (rs28399504) (Kuyucuk 1)	Extension primer: 5'-ACC ACA AAA GGA TCC A-3'
CYP2C19*7 (rs72558186) (Kuyucuk 1)	Extension primer: 5'-ACT AAG CTT TTG TTA ACA TTT T-3'
CYP2C19*8 (rs41291556) (Kuyucuk 2)	Extension primer: 5'-TCA GCA ATG GAA AGA GA-3'
CYP2C19*17(rs12248560) (Kuyucuk 2)	Extension primer: 5'-GTG TCT TCT GTT CTC AAA G-3'
ABCB1 (rs1045642) (Kuyucuk 1)	Extension primer: 5'-GTA CTT TGC TGC CCT CAC-3'
CYP3A4*1G (rs2242480) (Kuyucuk 1)	Extension primer: 5'-CCC TCC TTC TCC ATG TA-3'
CYP2B6*9 (rs3745274) (Kuyucuk 2)	Extension primer: 5'-GTT GGC GGT AAT GGA-3'
ITGB3 L33P (rs5918) (Kuyucuk 2)	Extension primer: 5'-AAC CGT ACG GGC CCT GCC TC-3'
PON1 Q192R (rs662) (Kuyucuk 1)	Extension primer: 5'-TTT TCT TGA CCC CTA CTT AC-3'
PON1 L55M (rs854560) (Kuyucuk 1)	Extension primer: 5'-GAA ACT GGC TCT GAA GAC-3'

Primer uzama reaksiyonu için dizayn edilen primerler, üretici firma tarafından 400 µM konsantrasyonda gönderilmişti. Toplamda her bir kuyucuk için 200 µl uzama primer karışımı hazırlamak adına primerler kütlelerine göre kendi kuyucukları içerisinde 4 gruba ayrıldı. Bu gruplandırma düşük kütle, orta kütle, yüksek ve en yüksek kütle olarak isimlendirildi.

Kuyucuk 1 için düşük kütleli olan 2 adet uzama primeri karışımında 7 µM, orta kütleli olan 2 adet uzama primeri karışımında 9.33 µM, yüksek kütleli olan 2 adet uzama primeri karışımında 11.66 µM, en yüksek kütleli olan 2 adet uzama primeri ise karışımında 14 µM olacak şekilde stok konsantrasyondan alınarak distile su ile 200 µl'ye tamamlandı.

Kuyucuk 2 için düşük kütleli olan 1 adet uzama primeri karışımında 7 µM, orta kütleli olan 1 adet uzama primeri karışımında 9.33 µM, yüksek kütleli olan 1 adet uzama primeri karışımında 11.66 µM, en yüksek kütleli olan 1 adet uzama primeri ise karışımında 14 µM olacak şekilde stok konsantrasyondan alınarak distile su ile 200 µl'ye tamamlandı.

DNA miktarının optimizasyonu ve pipetlenmesi

DNA izolasyonundan sonra DNA örneklerinin saflık derecesi ölçülmüş ve stok konsantrasyonu 50 ng/µL olarak ayarlanmıştı. Her bir İplex GOLD reaksiyonu için 5-10 ng/µL aralığında DNA miktarı gerekmektedir. Bu nedenle, DNA konsantrasyonu 10 ng/µL olacak şekilde stok solüsyonundan elüsyon solüsyonu ile sulandırma yapıldı.

Her bir DNA örneği için iki farklı kuyucukta PCR reaksiyonları yürütüleceğinden dolayı 384 kuyucuklu PCR plakasında önceden planlanan şekilde iki farklı kuyucuğa (kuyucuk 1 ve kuyucuk 2) 1'er µl DNA örneği pipetlendi. Üzerlerine PCR karışımları eklenene kadar, plaka optik yapışkan PCR filmi ile kapatılıp +4°C'de saklandı.

Multipleks DNA Amplifikasyonu

Multipleks DNA amplifikasyonu için PCR karışımı her bir kuyucukta DNA miktarı ile birlikte toplam 5 µl olacak şekilde planlandı. PCR karışımında yer alan reaktifler ve miktarları aşağıda gösterilmiştir. Kuyucuk 1 ve kuyucuk 2 için iki farklı

primer karışımımız bulunduğundan her bir örnek için iki farklı PCR karışımı oluşturuldu. Örnek miktarı ve negatif kontrol kuyucuğu düşünülerek toplam karışım hacmi hesaplandı. Daha sonra, iki farklı PCR karışımı 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine hazırlandı.

<u>Multipleks PCR Karışımı</u>	<u>Bir Örnek İçin</u>
0.5 µM Primer Mix	1.0 µl
25 mM dNTP Mix (Applied Biosystems®)	0.1 µl
10X PCR Buffer (20 mM MgCl ₂ içeren) (Qiagen GmbH)	0.5 µl
5 U/µl HotStarTaq DNA polimeraz (Qiagen GmbH)	0.2 µl
25 mM MgCl ₂ (Qiagen GmbH)	0.4 µl
Ultra saflaştırılmış su (Invitrogen™)	1.8 µl
<u>DNA</u>	<u>1.0 µl</u>
Toplam	5.0 µl

+4°C'de saklanan PCR plakası üzerindeki optik yapışkan PCR film çıkartılarak hazır duruma getirildi. Mikrosantrifüj tüplerine hazırlanan PCR karışımları ise vortekslenip hafif şekilde santrifüj edildi. Daha sonra, iki farklı PCR karışımı (kuyucuk 1 ve kuyucuk 2 için) elektronik pipetleme seti (Eppendorf Repeater® Xstream Electronic Pipette, Eppendorf AG, Hamburg, Almanya) yardımıyla önceden DNA pipetlenmiş kuyucuklara 4'er µl dağıtıldı. Her bir örnek plaka üzerinde kuyucuk 1 ve kuyucuk 2 olarak adlandırdığımız iki farklı kuyucuğa pipetlendi.

Pipetleme işlemi tamamlandıktan sonra PCR plakası yeniden optik yapışkan film ile kapatılarak vortekslendi. Sonrasında, 2000 rpm'de çok kısa bir süre santrifüj edilerek Veriti® Termal Cycler (Life Technologies Corporation, CA, ABD) cihazına yerleştirildi. PCR şartları aşağıdaki gibi ayarlanarak reaksiyon başlatıldı.

PCR Şartları

1. 95°C’de 2 dakika
 2. 95°C’de 30 saniye
 3. 56°C’de 30 saniye
 4. 72°C’de 60 saniye
 5. 72°C’de 5 dakika
 6. 4 °C’de bekleme
- } 45 Döngü

SAP (Shrimp Alkalen Fosfataz) reaksiyonu

SAP reaksiyonu için aşağıda belirtilen miktarlarda reaktifler kuyucuk miktarı kadar 2 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne eklenerek karışım hazırlandı. Daha sonra, termal cyclus cihazından çıkarılan PCR plakasının reaksiyon yürütülen bütün kuyucuklarına 2’şer µl bu karışımdan dağıtıldı.

SAP Karışımı Bir kuyucuk için

Ultra saflaştırılmış distille su (Invitrogen™)	1.53 µl
10X SAP Buffer (Sequenom Inc.)	0.17 µl
<u>1.7 U/µl SAP Enzim (Sequenom Inc.)</u>	<u>0.30 µl</u>
Toplam	2.00 µl

SAP karışımı, reaksiyon yürütülen bütün kuyucuklara pipetlendikten sonra PCR plakası optik yapışkan film ile kapatılarak vortekslendi. Sonrasında, plaka 2000 rpm’de çok kısa bir süre santrifüj edilerek termal cyclus cihazına yerleştirildi. SAP şartları aşağıdaki gibi ayarlanarak reaksiyon başlatıldı.

SAP Reaksiyonu Şartları

1. 37°C’de 40 dakika

2. 85°C’de 5 dakika
3. 4°C’de bekleme

Pimer Uzama Reaksiyonu (İplexGOLD Reaksiyonu)

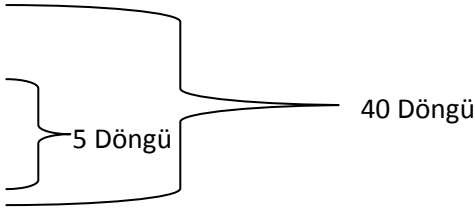
Primer uzama reaksiyonu veya İplexGOLD reaksiyonu olarak ifade edilen bu PCR aşaması için önceden iki primer karışımı (kuyucuk 1 ve kuyucuk 2 için) hazırlanmıştı. Bu nedenle, aşağıda miktarları belirtilen reaktiflerin bulunduğu ve iki farklı primer karışımının kullanıldığı her bir kuyucuk için toplamda 2 µl olan iki farklı PCR karışımı hazırlandı.

<u>İplexGOLD Reaksiyonu Karışımı</u>	<u>Bir kuyucuk için</u>
Ultra saflaştırılmış distile su (Invitrogen™)	0.619 µl
10X İplexGOLD Buffer (Sequenom Inc.)	0.200 µl
İplex Termination mix (Sequenom Inc.)	0.200 µl
Primer karışımı	0.940 µl
<u>İplex enzim (Sequenom Inc.)</u>	<u>0.041 µl</u>
Toplam	2.000 µl

Kuyucuk miktarına göre hesaplanan ve mikrosantrifüj tüplerine hazırlanan iki farklı PCR karışımı vortekslenip hafif şekilde santrifüj edildi. Daha sonra, elektronik pipetleme seti yardımıyla PCR plakası üzerindeki her bir örnek ve negatif kontrol için ayrılan kuyucuk 1 ve kuyucuk 2’ye 2’şer µl dağıtıldı.

Pipetleme işlemi tamamlandıktan sonra PCR plakası yeniden optik yapışkan film ile kapatılarak vortekslendi. Sonrasında, 2000 rpm’de çok kısa bir süre santrifüj edilerek termal cyclus cihazına yerleştirildi. PCR şartları aşağıdaki gibi ayarlanarak reaksiyon başlatıldı.

İplex GOLD Reaksiyonu Şartları

1. 94°C’de 30 saniye
 2. 94°C’de 5 saniye
 3. 52°C’de 5 saniye
 4. 80°C’de 5 saniye
 5. 72°C’de 3 dakika
 6. 4 °C’de bekleme
- 

Rezin ile Temizlik Aşaması

İplexGOLD reaksiyonu sonrasında termal cycler cihazından çıkartılan PCR plakasını rezin ile muamele edebilmek için ilk önce optik yapışkan film kaldırıldı. Daha sonra, rezinin daha iyi çözünüp istenilen sonucu verebilmesi adına reaksiyon yürütülen her bir kuyucuğa 16’şar µl ultra saflaştırılmış su eklendi. Su dağıtıldıktan sonra PCR plakasının üzeri yapışkan film ile kapatılarak kısa bir süre 2000 rpm’de santrifüj edildi.

PCR plakasındaki 384 kuyucuk için toz halinde, steril 6 mg rezin yeterlidir. Bu oran baz alınarak reaksiyon yürütülen bütün kuyucuklara rezin dağıtıldı. Rezin eklenmesi için üzerindeki yapışkan film çıkarılan PCR plakamız yeniden farklı bir yapışkan film ile kapatıldı. Sonrasında, PCR plaka döndürücü ile 35 dakika oda sıcaklığında inkübasyonu yapıldı.

SpectroCHIP üzerine PCR ürünlerinin aktarılması

Rezin ile temizlik aşamasından sonra PCR plakasının kuyucuklarında bulunan reaksiyon ürünlerini SpectroCHIP üzerine aktarma işlemine geçildi. Bunun için nano boyutunda pipetleme yapabilen MassARRAY™ Nanodispenser RS1000 cihazı kullanıldı.

İlk önce cihazın gerekli bölmelerine distile su, % 98.9’luk etil alkol, % 50’lik etil alkol ve 3-point kalibrant eklenerek sistemin hazırlığı yapıldı. Daha sonra, PCR plakamız ve SpectroCHIP cihaz içerisinde kendileri için ayrılan yerlerine oturtuldu.

Nanodispenser RS1000 cihazının kendisine ait ekranından PCR plakamızın 384 kuyucuklu olduğu, hangi kuyucuklarda hangi varyasyonların analiz edileceği ve plakadan pipetlenecek miktarın ne kadar olması gerektiği programlandı. SpectroCHIP üzerine aktarma işlemini başlatmadan cihazın kendini temizleme programı aktif hale getirildi. Cihaz pipetleme yapacağı iğnelerini yıkayarak hazır duruma geldi.

Cihaza başlama komutu verilerek üzerinde matriks spotlar bulunan SpectroCHIP'deki kuyucuklara her bir PCR ürününden yaklaşık olarak 12 nl pipetleme yapması sağlandı. Böylelikle, PCR ürünlerimiz yaklaşık olarak 10 cm X 10 cm boyutundaki SpectroCHIP üzerine yerleştirilmiş oldu.

Kütle Spektrometre Analizi

SpectroCHIP üzerine aktarılan PCR ürünlerimizi kütlelerine göre analiz etmek için MALDI-TOF kütle spektrometre tekniğini kullanan MassARRAY analizörü kullanıldı. Güç kaynağı düğmesi açılarak çalıştırılan analizörün çip koyulması için dizayn edilen bölmesine kendi örneklerimizi taşıyan SpectroCHIP yerleştirildi. Daha sonra bölme kapatılarak bilgisayar üzerindeki analizörün programından SpectroCHIP üzerindeki kuyucukların koordinatları girildi. Gerekli bilgiler girildikten sonra analiz işlemi başlatıldı. Böylelikle, analizör teker teker bütün kuyucukların matrikslerini lazer ile patlatarak içindeki PCR ürünlerinin kütlelerini analiz etmeye başladı. Kısa bir süre sonunda kütlelerine göre yaptığı analiz ile genotip sonuçlarının tamamını bilgisayar ekranında raporladı.

3.2.5 İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 20.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasında demografik, klinik, PRU ve % inhibisyon verileri bakımından fark olup olmadığını analiz etmek için öncelikle dağılımların normal dağılıma uygunlukları analiz edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğunun araştırılmasında Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri kullanıldı.

Gruplararası karşılaştırmalarda normal dağılım gösteren verilerin analizinde parametrik testlerden bağımsız örneklem t testi (independent-samples t-test) ve tek yönlü varyans analiz (Oneway ANOVA) testleri kullanıldı. Farklı grup ortalamalarının belirlenmesinde ise post-hoc testlerden Tukey testi kullanıldı. Normal dağılım gösteren parametrik veriler, ortalama±standart sapma (SD, standard deviation) olarak gösterildi.

Gruplararası karşılaştırmalarda normal dağılıma sahip olmayan verilerin analizinde parametrik olmayan testlerden Mann-Whitney U testi ve Kruskal-Walis testi kullanıldı. Farklı grupların belirlenmesinde ise Dunn testi ile analiz yapıldı. Normal dağılım göstermeyen bulgular, median ile birlikte 25.persentil-75.persentil olarak gösterildi.

Oluşturulan çapraz tabloların analizinde ki-kare analizleri (Pearson, Pearson exact, Yates ve Fisher's exact tests) kullanıldı. Klopidoğrel tedavisine cevap vermede ve cevapsızlıkta etkili olduğu düşünülen CYP2C19*2 polimorfizmi genotip ve allellerinin riskinin belirlenmesinde ise adımsal (stepwise) lojistik regresyon analizi kullanıldı.

$P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, istatistiksel anlamlılıkları belirtilerek tablo ve grafik olarak sunulmuştur.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz 223 hastada VerifyNow P2Y12 kiti ile klopidogrelin antitrombosit aktivitesi ölçülerek PRU, BASE ve % inhibisyon değer sonuçları alınmıştır. Yapılan çalışmalara ve kit klavuzuna uygun şekilde, PRU değeri için klopidogrel direnç sınırı 208 olarak belirlenmiştir. PRU değeri 208'e eşit veya büyük olan ($PRU > 208$) bireyler klopidogrel tedavisine cevap vermeyen, tromboz ve iskemik olaylar için yüksek riskli, PRU değeri 208'den küçük olan ($PRU \leq 208$) bireyler ise klopidogrel tedavisine cevap veren, tromboz ve iskemik olaylar için düşük riskli olarak gruplandırılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre her bir grupta yer alan bireylerin sayısı, yüzde değerleri, PRU ve % inhibisyon sonuçlarının medyan (25.persentil-75.persentil) olarak ifadesi Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

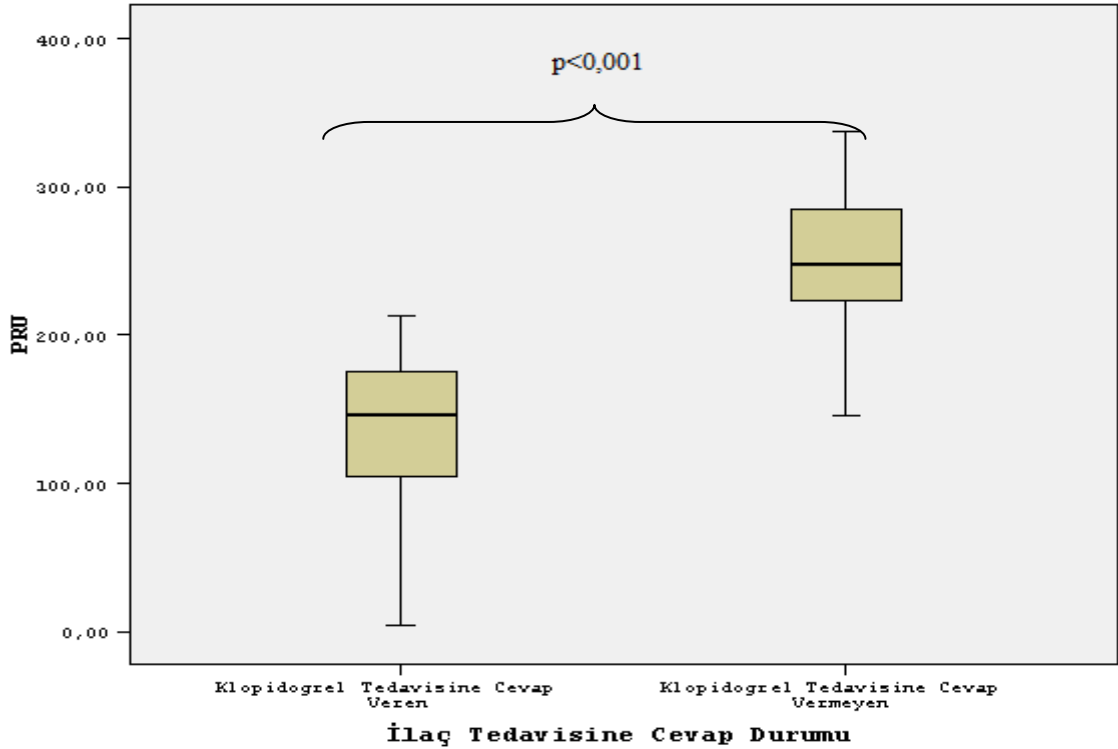
Tüm hastaların VerifyNow P2Y12 kiti ile trombosit reaktivitesini ölçtüğümüzde elde ettiğimiz PRU sonuçlara göre hastaların % 69,1'i klopidogrel tedavisine cevap veren bireyler, % 30,9'u ise klopidogrel tedavisine cevap vermeyen bireyler olarak tespit edildi. Klopidogrel direncinin genetik varyasyonlar ve diğer parametreler ile ilişkisini belirlemede oluşturduğumuz bu P2Y12 reseptörüne spesifik trombosit reaktivite sınıflamasının optimum seviyede olup olmadığını belirlemek adına her iki grubun PRU ve % inhibisyon değerleri karşılaştırıldı. Gruplardaki hastaların önce PRU değerleri karşılaştırıldığında, klopidogrel tedavisine cevap vermeyen hastaların değerleri tedaviye cevap verenlere göre önemli derecede yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,001$) (Grafik 4.1) (Tablo 4.1).

Aynı şekilde, % inhibisyon değerleri karşılaştırıldığında ise klopidogrel tedavisine cevap vermeyen hastaların % inhibisyon değerleri tedaviye cevap verenlere göre çok daha düşüktü. Bu iki grubun % inhibisyon değerlerinin arasındaki farkın istatistiksel analizi yapıldığında PRU değerlerine benzer seviyede anlamlı farkın ortaya çıktığı görüldü ($p < 0,001$) (Grafik 4.2) (Tablo 4.1).

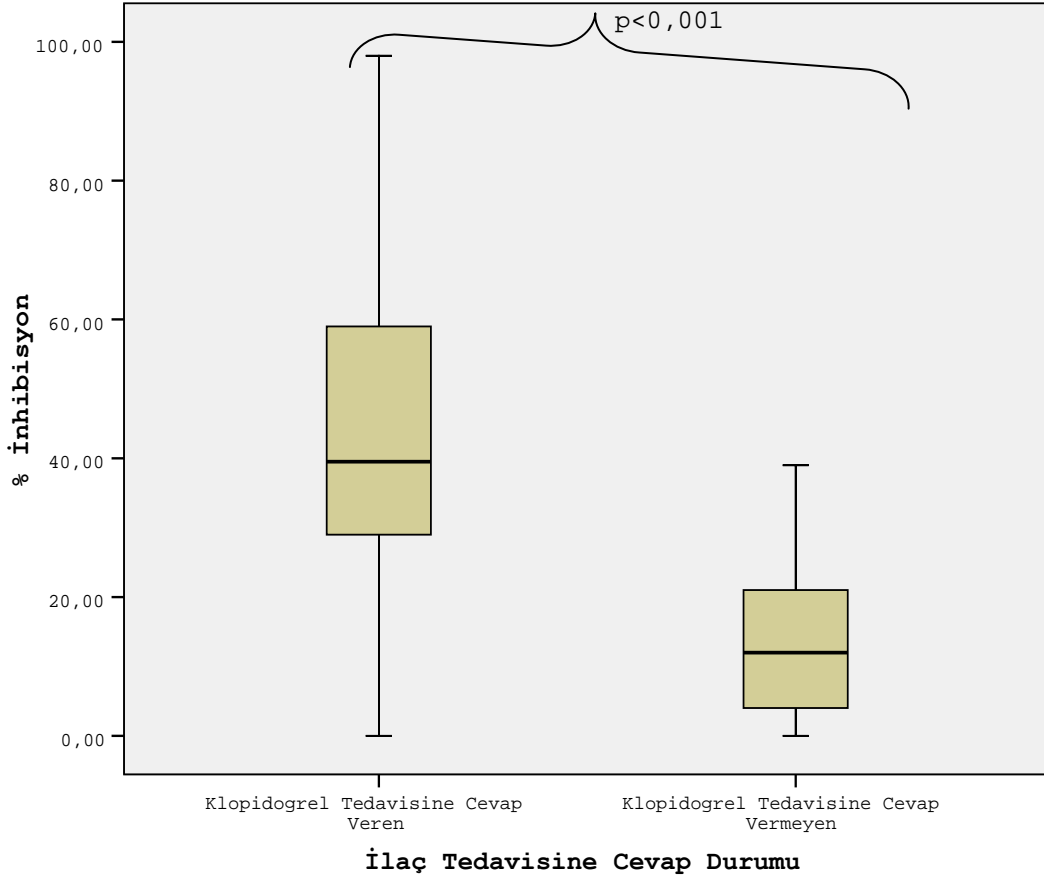
Tablo 4.1. Klopidogrel tedavisine cevap durumuna göre gruplandırılan hastaların PRU ve % inhibisyon değerlerinin istatistiksel analizi

Hasta Grubu	n (%)	PRU*	% İnhibisyon*
Klopidogrel tedavisine cevap veren (PRU≤208)	154 (69,1)	146 (104-175,5)	39,5 (29-59)
Klopidogrel tedavisine cevap vermeyen (PRU>208)	69 (30,9)	248 (222,5-288,5)	12 (4-21)
İstatistik		U=91,00 p<0,001	U=991,00 p<0,001

*PRU ve % İnhibisyon değerleri normal dağılım göstermediğinden medyan (25.persentil -75. persentil) olarak verildi.



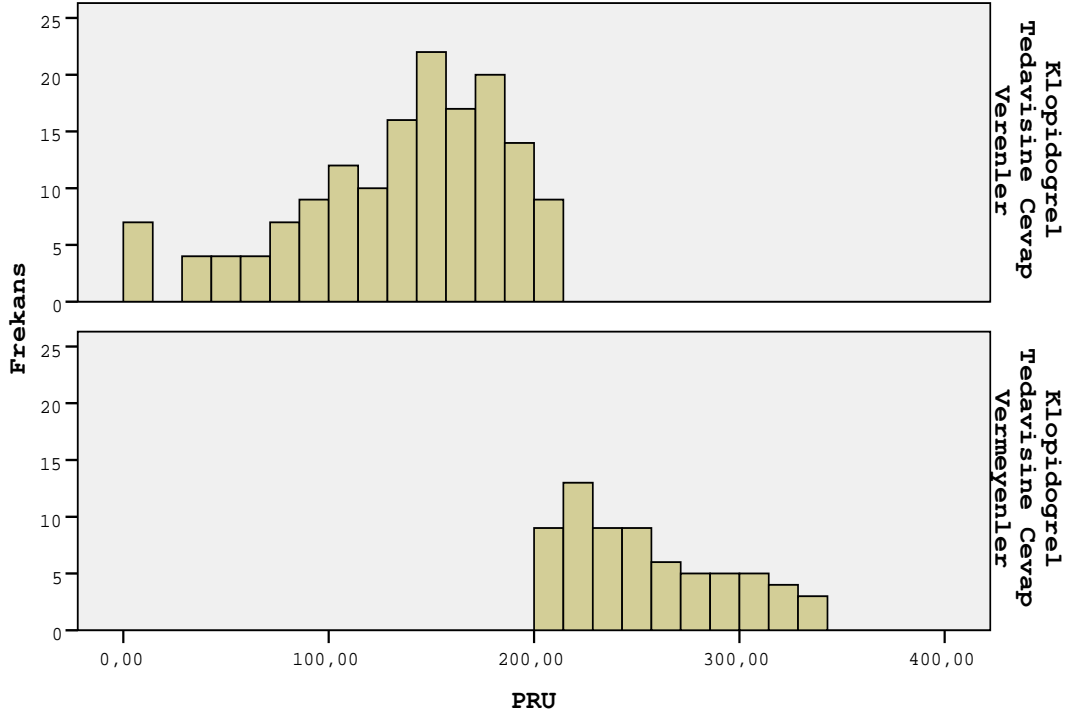
Grafik 4.1. Klopidogrel tedavisine cevap veren ve vermeyen hasta gruplarının PRU (VerifyNow P2Y12 Reaction Unit) değerlerinin box plot grafiği



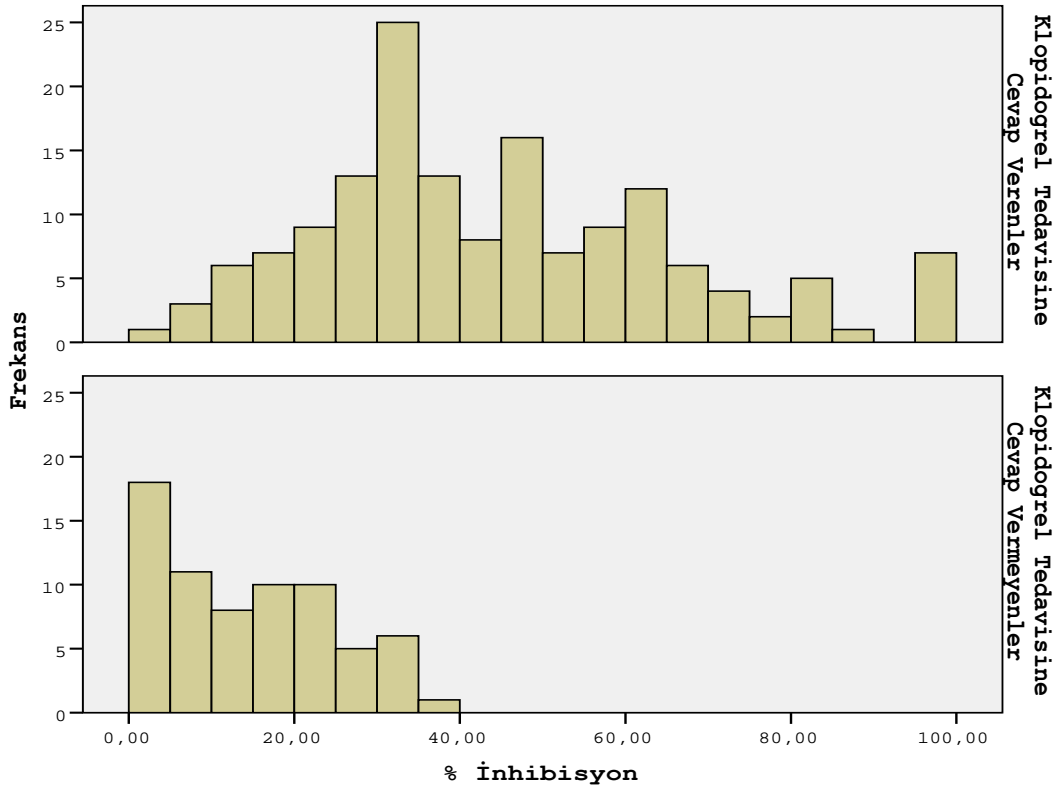
Grafik 4.2. Klopidogrel tedavisine cevap veren ve vermeyen hasta gruplarının % inhibisyon (VerifyNow P2Y12) değerlerinin box plot grafiği

Klopidogrel tedavisine cevap veren ve tedaviye cevapsız olarak ayırdığımız iki hasta grubunun PRU değerlerinin frekans dağılımını incelediğimizde; tedaviye cevap verenlerin çoğunlukla 100 ile 200 PRU değeri arasında, tedaviye cevapsız bireylerin ise çoğunlukla 200 ile 300 PRU değeri arasında dağılım gösterdiğini tespit ettik (Grafik 4.3).

İki hasta grubunun % inhibisyon değerlerinin frekans dağılımını incelediğimizde; klopidogrel tedavisine cevap verenlerin çoğunlukla 20 ile 60 % inhibisyon değeri arasında, klopidogrel tedavisine cevap vermeyenlerin ise 0 ile 20 % inhibisyon değeri arasında dağılım gösterdiğini belirledik (Grafik 4.4).



Grafik 4.3. Klopidogrel tedavisine cevap veren ve vermeyen hasta gruplarının PRU (VerifyNow P2Y12 Reaction Unit) değerlerine göre frekanslarının dağılımı



Grafik 4.4. Klopidogrel tedavisine cevap veren ve vermeyen hasta gruplarının % inhibisyon (VerifyNow P2Y12) değerlerine göre frekanslarının dağılımı

Klopidogrel tedavisine cevap durumuna göre gruplandırılan hastaların demografik ve klinik özellikleri ve bu özelliklerin gruplar arasında farkının olup olmadığının istatistiksel analizi Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Cinsiyet (p=0,197), sigara kullanımı (p=0,237), hipertansiyon (p=0,12), diyabet (p=0,23), hiperlipidemi (p=0,732), KAH için aile hikayesi (p=0,923) ve birden fazla PKG (p=0,15) gibi özelliklerin klopidogrel tedavisine cevap veren ve tedaviye cevap vermeyen hasta grupları arasında analizi sonucu istatistiksel bakımdan anlamlı fark bulunmadı.

İlaç etkileşiminin klopidogrelin antitrombosit aktivitesini farmakokinetik bakımdan etkileyebileceği bilindiğinden, klopidogrel tedavisine cevap veren ve tedaviye cevap vermeyen hasta gruplarının ilaç kullanım durumları Tablo 4.3’te değerlendirilmiştir. Beta blokeri (p=0,322), statin (p=0,844), proton pompa inhibitörü (p=0,905), kalsiyum kanal blokeri (p=0,819) ve ACE inhibitörü kullanımı (p=0,116) bakımdan yapılan değerlendirmede bu iki hasta grubu arasında istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark bulunmadı.

Klopidogrel direnç durumuna göre ayırdığımız iki hasta grubunun klinik parametre değer aralıkları ve bu değerlerin istatistiksel analizi Tablo 4.4’de gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analizde bu parametreler arasında sadece yaş bakımından iki hasta grubu arasında anlamlı bir fark bulundu (p<0,001). Klopidogrel tedavisine cevap vermeyen hastaların yaş değerleri, tedaviye cevap verenlere göre daha yüksekti. Özellikle, ilaçların farmakodinamik aktivitesini etkileyen vücut kütle indeksi değer aralıklarında ise iki hasta grubu arasında istatistiksel anlamlı bir farkı yoktu (p=0,612). Ayrıca, klopidogrel tedavisine cevap veren ve tedaviye cevap vermeyen hasta grupları arasında trombosit miktarı (p=0,936), trigliserit (p=0,961), total kolesterol (p=0,335), LDL kolesterol (p=0,620) ve HDL kolesterol (p=0,887) bakımından da istatistiksel anlamlı fark bulunmadı (Tablo 4.4).

Hastaların genetik varyasyon genotiplerinin klopidogrel tedavisine cevap durumuna göre dağılımı ve istatistiksel analizi Tablo 4.5’te gösterilmiştir. Genotip frekanslarının iki grup arasında karşılaştırıldığı analizde, sadece CYP2C19*2 (G681A) (rs4244285) tek nükleotid polimorfizminde yüksek derecede anlamlı istatistiksel bir fark bulundu (p<0,001). Klopidogrel tedavisine cevap vermeyen bireyler arasında GA ve AA genotip frekanslarının yüksek olduğu tespit edildi.

Tablo 4.2. Hastaların demografik ve klinik özelliklerinin klopidogrel tedavisine cevap durumuna göre dağılımları ve istatistiksel analizi

Demografik ve Klinik Özellikler	Tüm Hastalar (n=223)		Klopidogrel Tedavisine Cevap Verenler (n=154)		Klopidogrel Tedavisine Cevap Vermeyenler (n=69)		İstatistik	
	n	%	n	%	n	%		
Cinsiyet	Erkek	178	79,8	127	82,5	51	73,9	$\chi^2=1,66$ p=0,197
	Kadın	45	20,2	27	17,5	18	26,1	
Sigara kullanımı	Var	55	24,7	42	27,3	13	18,8	$\chi^2=1,39$ p=0,237
	Yok	168	75,3	112	72,7	56	81,2	
Hipertansiyon	Var	125	56,1	81	52,6	44	63,8	$\chi^2=2,41$ p=0,12
	Yok	98	43,9	73	47,4	25	36,2	
Diyabet	Var	103	46,2	67	43,5	36	52,2	$\chi^2=1,44$ p=0,23
	Yok	120	53,8	87	56,5	33	47,8	
Hiperlipidemi	Var	104	46,6	73	47,4	31	44,9	$\chi^2=0,11$ p=0,732
	Yok	119	53,4	81	52,6	38	55,1	
KAH için aile hikayesi	Var	64	28,7	45	29,2	19	27,5	$\chi^2=0,009$ p=0,923
	Yok	159	71,3	109	70,8	50	72,5	
Birden fazla PKG	Var	113	50,7	83	53,9	30	43,5	$\chi^2=2,069$ p=0,150
	Yok	110	49,3	71	46,1	39	56,5	

KAH: Koroner Arter Hastalığı, **PKG:** Perkütan Koroner Girişim

Tablo 4.3. Hastaların ilaç kullanım durumlarının klopidogrel tedavisine cevaba göre dağılımları ve istatistiksel analizi

İlaç Kullanım Durumları	Tüm Hastalar (n=223)		Klopidogrel Tedavisine Cevap Verenler (n=154)		Klopidogrel Tedavisine Cevap Vermeyenler (n=69)		İstatistik
	n	%	n	%	n	%	
Beta Blokeri Kullanımı	212	95,1	148	96,1	64	92,8	$\chi^2=0,322$ p=0,322
	11	4,9	6	3,9	5	7,2	
Statın Kullanımı	209	91,5	140	90,9	64	92,8	$\chi^2=0,039$ p=0,844
	19	8,5	14	9,1	5	7,2	
Proton Pompa İnhibitörü Kullanımı	193	86,5	133	86,4	60	87	$\chi^2=0,014$ p=0,905
	30	13,5	21	13,6	9	13	
Kalsiyum Kanal Blokeri Kullanımı	18	8,1	12	7,8	6	8,7	$\chi^2=0,052$ p=0,819
	205	91,9	142	92,2	63	91,3	
ACE İnhibitörü Kullanımı	150	67,3	98	63,6	52	75,4	$\chi^2=2,467$ p=0,116

Tablo 4.4. Hastaların klinik parametrelerinin klopidogrel tedavisine cevap durumuna göre dağılımı ve istatistiksel analizi

Klinik Parametreler*	Tüm Hastalar (n=223)	Klopidogrel Tedavisine Cevap Verenler (n=154)	Klopidogrel Tedavisine Cevap Vermeyenler (n=69)	İstatistik
Yaş	62 (56-70)	60,5 (54-68)	65 (61-72)	U=3722,00 p<0,001
Vücut Kitle İndeksi† (kg/m ²)	27 (25-30)	27 (25-30)	27 (25-31)	U=5088,00 p=0,612
Trombosit Miktarı (10 ³ /µl)	247000 (209000-280000)	247500 (205250-286250)	247000 (213000-272000)	U=5277,50 p=0,936
LDL Kolesterol (mg/dl)	113 (85000-139000)	117 (85,75-138,25)	109 (84-144)	U=5092,00 p=0,620
HDL Kolesterol (mg/dl)	41 (33-48)	41 (34,75-48)	41 (32-48,5)	U=5049,50 p=0,887
Total Kolesterol (mg/dl)	177 (149-213)	175,5 (146,75-212,25)	180 (153,5-214,5)	U=4883,50 p=0,335
Trigliserit (mg/dl)	150 (102-203)	146,5 (103,5-201,75)	155 (97-204,5)	U=5291,00 p=0,961
Kreatinin (mg/dl)	0,99 (0,83-1,15)	0,96 (0,83-1,12)	1,03 (0,87-1,25)	U=4696,00 p=0,166

*Klinik parametre değerleri normal dağılım göstermediğinden medyan (25. persentil -75. persentil) olarak verildi. †Vücut kitle indeksi (VKİ), vücut ağırlığının (kg), boy uzunluğunun metre cinsinden karesine bölünmesiyle hesaplandı.

İstatistiksel fark bulunan CYP2C19*2 polimorfizmi dışında CYP2C19 geni üzerindeki diğer genetik varyasyonları analiz ettiğimizde, tüm hastalarda CYP2C19*3 (G636A) (rs4986893) varyasyonunu barındıran sadece 2 hastayı heterozigot genotipli (GA) olarak belirledik. Bunlardan bir tanesi klopidogrel tedavisine cevap veren hasta grubunda, diğeri ise tedaviye cevap vermeyen hasta grubundaydı. Çalışmamıza dahil ettiğimiz hastaların hiçbirinde CYP2C19*4 (A1G) (rs28399504), CYP2C19*7 (T→A) (rs72558186) ve CYP2C19*8 (T→C) (rs41291556) genetik varyasyonları tespit edilmedi (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Hastalarda genetik varyasyon genotiplerinin klopidogrel tedavisine cevap durumuna göre dağılımı ve istatistiksel analizi

Genetik Varyasyon ve Genotipleri	Tüm Hastalar (n=223)		Klopidogrel Tedavisine Cevap Verenler (n=154)		Klopidogrel Tedavisine Cevap Vermeyenler (n=69)		İstatistik
	n	%	n	%	n	%	
CYP2C19*2 (G681A) (rs4244285)							$\chi^2=26,79$ p<0,001
GG	163	73,1	127	82,5	36	52,2	
GA	52	23,3	26	16,9	26	37,7	
AA	8	3,6	1	0,6	7	10,1	
CYP2C19*3 (G636A) (rs4986893)							
GG	221	99,1	153	99,4	68	98,6	
GA	2	0,9	1	0,6	1	1,4	
AA	0		0	0	0	0	
CYP2C19*4 (A1G) (rs28399504)							
AA	223	100	154	100	69	100	
AG	0	0	0	0	0	0	
GG	0	0	0	0	0	0	
CYP2C19*7 (T→A) (rs72558186)							
TT	223	100	154	100	69	100	
TA	0	0	0	0	0	0	
AA	0	0	0	0	0	0	

Tablo 4.5. Hastalarda genetik varyasyon genotiplerinin klopidogrel tedavisine cevap durumuna göre dağılımı ve istatistiksel analizi (devamı)

Genetik Varyant ve Genotipleri	Tüm Hastalar (n=223)		Klopidogrel Tedavisine Cevap Verenler (n=154)		Klopidogrel Tedavisine Cevap Vermeyenler (n=69)		İstatistik
	n	%	n	%	n	%	
CYP2C19*8 (T→C) (rs41291556)							
TT	223	100	154	100	69	100	
TC	0	0	0	0	0	0	
CC	0	0	0	0	0	0	
CYP2C19*17 (C806T) (rs12248560)							$\chi^2= 2,13$ p=0,344
CC	151	67,7	101	65,6	50	72,5	
CT	68	30,5	51	33,1	17	24,6	
TT	4	1,8	2	1,3	2	2,9	
ABCB1 (C3435T) (rs1045642)							$\chi^2= 0,8$ p=0,667
CC	62	27,8	45	29,2	17	24,6	
CT	116	52	80	51,9	36	52,2	
TT	45	20,2	29	18,8	16	23,2	
CYP3A4*1G (G→A) (rs2242480)							$\chi^2= 2,29$ p=0,282
GG	162	72,6	1105	74,7	47	68,1	
GA	59	26,5	37	24	22	31,9	
AA	2	0,9	2	1,3	0	0	

Tablo 4.5. Hastalarda genetik varyasyon genotiplerinin klopidogrel tedavisine cevap durumuna göre dağılımı ve istatistiksel analizi (devamı)

Genetik Varyant ve Genotipleri	Tüm Hastalar (n=223)		Klopidogrel Tedavisine Cevap Verenler (n=154)		Klopidogrel Tedavisine Cevap Vermeyenler (n=69)		İstatistik
	n	%	n	%	n	%	
CYP2B6*9 (G15631T) (rs3745274)							$\chi^2 = 0,37$ p=0,541
GG	0	0	0	0	0	0	
GT	129	57,8	87	56,5	42	60,9	
TT	94	42,2	67	43,5	27	39,1	
ITGB3 (T→C) (rs5918)							$\chi^2 = 0,98$ p=0,595
TT	176	78,9	120	77,9	56	81,2	
TC	40	17,9	28	18,2	12	17,4	
CC	7	3,1	6	3,9	1	1,4	
PON1 (A→G) (rs662)							$\chi^2 = 3,74$ p=0,154
AA	105	47,1	78	50,6	27	39,1	
AG	95	42,6	59	38,3	36	52,2	
GG	23	10,3	17	11	6	8,7	
PON1 (T→A) (rs854560)							$\chi^2 = 3,44$ p=0,178
TT	29	13	24	15,6	5	7,2	
TA	93	41,7	60	39	33	47,8	
AA	101	45,3	70	45,5	31	44,9	

CYP2C19 geni üzerindeki CYP2C19*17 (C806T) (rs12248560) polimorfizmi genotip frekanslarını klopidogrel tedavisine cevap durumuna göre ayırdığımız hasta grupları arasında analiz ettiğimizde; CC genotip frekansının klopidogrelle cevap vermeyen hastalarda arttığını, CT genotip frekansının ise azaldığını belirledik (Tablo 4.5). Fakat, bu artış ve azalış yaklaşık olarak %8 oranında olduğu için istatistiksel bakımdan anlamlı değildi ($p=0,344$).

Aynı şekilde, diğer genlerdeki varyasyonlar için yaptığımız karşılaştırmalarda, CYP3A4*1G (G→A) (rs2242480) varyasyonu GG genotip frekansı klopidogrel tedavisine cevap vermeyen hastalarda azalış, GA genotip frekansı ise artış gösterdi. Bu azalış ve artış oranı yaklaşık olarak %7 seviyesinde olduğu için istatistiksel bir fark bulunmadı ($p=0,282$). PON1 (T→A) (rs854560) varyasyonu TT genotip frekansı klopidogrel tedavisine cevap vermeyen hastalarda azalış, TA genotip frekansı ise artış gösterdi. Bu artış ve azalış oranları yaklaşık olarak %8 seviyesinde olduğu için yukarıdaki diğer genotip varyasyonlar gibi istatistiksel bir fark oluşturmadı ($p=0,178$) (Tablo 4.5).

Genotip frekanslarında düzgün korelasyon ve belirgin farklar göstermeyen diğer genetik varyasyonların istatistiksel analiz sonuçlarına baktığımızda, hepsinin p değerleri [ABCB1 (rs1045642) ($p=0,667$), CYP2B6*9 (rs3745274) ($p=0,37$), ITGB3 (rs5918) ($p=0,595$), PON1 (rs662) ($p=0,154$)] yüksek seviyelerdeydi (Tablo 4.5).

Klopidogrel tedavisine cevap veren ve tedaviye cevap vermeyen hastalar arasında genotip frekans dağılımı bakımdan istatistiksel olarak yüksek seviyede fark bulduğumuz CYP2C19*2 (G681A) polimorfizmi için risk durumunu istatistiksel olarak hesapladık (Tablo 4.6). GA genotipi GG genotipine göre klopidogrel tedavisine cevapsızlıkta 3,52 (Odds Oranı, OR) kat fazla riske sahip iken ($p<0,001$, %95 Güven Aralığı:1,82-6,80), AA genotipinin GG genotipine göre 24,69 (Odds Oranı, OR) kat daha fazla riskli olduğu bulundu ($p=0,003$, %95 Güven Aralığı: 2,94-207,32). A allelinin G alleleline göre farkına baktığımızda ise yine istatistiksel olarak yüksek fark ($p<0,001$) bulmakla birlikte klopidogrel direnci bakımından A allelinin G alleleline göre 4,08 (Odds Oranı, OR) kat daha fazla riskli olduğunu tespit ettik (%95 Güven Aralığı: 2,39-6,96) (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. CYP2C19*2 (G681A) genetik varyasyonunda atasal genotipe (GG) ve allele (G) göre risk durumu

Genotip ve Alleller	Klopidogrel Tedavisine Cevap Verenler		Klopidogrel Tedavisine Cevap Vermeyenler		p değeri	Odds Oranı (%95 Güven Aralığı)
	n	%	n	%		
GG	127	82,5	36	52,2		1,00
GA	26	16,9	26	37,7	p<0,001 ^a	3,52 (1,82-6,80)
AA	1	0,6	7	10,1	p=0,003 ^b	24,69 (2,94-207,32)
G	280	74,1	98	25,9		1,00
A	28	41,2	40	58,8	p<0,001 ^c	4,08 (2,39-6,96)

^aGA genotipinin GG genotipine göre farkı, ^bAA genotipinin GG genotipine göre farkı, ^cA allelinin G alleleine göre farkı

CYP2C19*2 ve CYP2C19*3 varyasyon allelerini barındırmayan 161 hastada CYP2C19*17 polimorfizmi genotip frekansları bakımından klopidogrel tedavisine cevap veren ve cevapsız hastalar arasında fark tespit edilmedi (p=0,438) (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. CYP2C19*2 ve CYP2C19*3 varyasyon allelerini barındırmayan hastalarda CYP2C19*17 (C806T) polimorfizmi genotiplerinin klopidogrel tedavisine cevap durumuna göre dağılımı ve istatistiksel analizi

Gruplar	n=161	CYP2C19*17 (C806T) Polimorfizminin Genotipleri					
		CC		CT		TT	
		n	%	n	%	n	%
Klopidogrel Tedavisine Cevap Verenler	126	79	62,7	45	35,7	2	1,6
Klopidogrel Tedavisine Cevap Vermeyenler	35	21	60	12	34,3	2	5,7
İstatistik		$\chi^2=1,92$ p=0,438					

Genetik varyasyonlar ile klopidogrel direnci arasındaki ilişkiyi her yönüyle doğru şekilde araştırmak için hastaları klopidogrel tedavisine cevap durumuna göre gruplandırmadan genotiplerin PRU ve % inhibisyon değerlerini karşılaştırdık. İlk olarak, CYP2C19*2 (G681A) polimorfizmi genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değerlerini analiz ettik (Tablo 4.8). GG, GA ve AA genotipleri arasında PRU değerlerini karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek fark bulduk ($p<0,001$). Bu genotiplerin % inhibisyon değerlerini analiz ettiğimizde ise aynı seviyede istatistiksel fark belirledik ($p<0,001$). PRU değeri bakımından genotipleri birbirleri arasında karşılaştırdığımızda; GG genotipinin GA genotipi ($p<0,001$) ve GG genotipinin AA genotipi ($p<0,05$) arasında istatistiksel bakımdan anlamlı fark vardı (Grafik 4.4). % inhibisyon değerleri açısından genotipleri birbirleri arasında karşılaştırdığımızda ise GG genotipinin GA genotipi ($p<0,001$) ve GG genotipinin AA genotipi ($p<0,05$) arasında istatistiksel olarak fark bulundu (Grafik 4.5). Fakat, GA genotipinin AA genotipi ile arasında hem PRU değeri ($p=0,680$) hem de % inhibisyon değeri ($p=0,519$) bakımından anlamlı bir fark tespit edilmedi (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. CYP2C19*2 (G681A) polimorfizmi genotiplerinin PRU değer ortalamaları, % inhibisyon değer aralıkları ve istatistiksel analizi

CYP2C19*2 (G681A) (rs4244285)	PRU*	% İnhibisyon†
GG	157,06±70,03	34 (21-58)
GA	209,92±64,01	21 (8,5-32)
AA	231,75±65,94	15,5 (4,25-21)
İstatistik	F=14,86 p<0,001 ^ap<0,001 ^bp=0,008 ^cp=0,680	$\chi^2=28,89 p<0,001$ ^ap<0,001 ^bp=0,002 ^cp=0,519

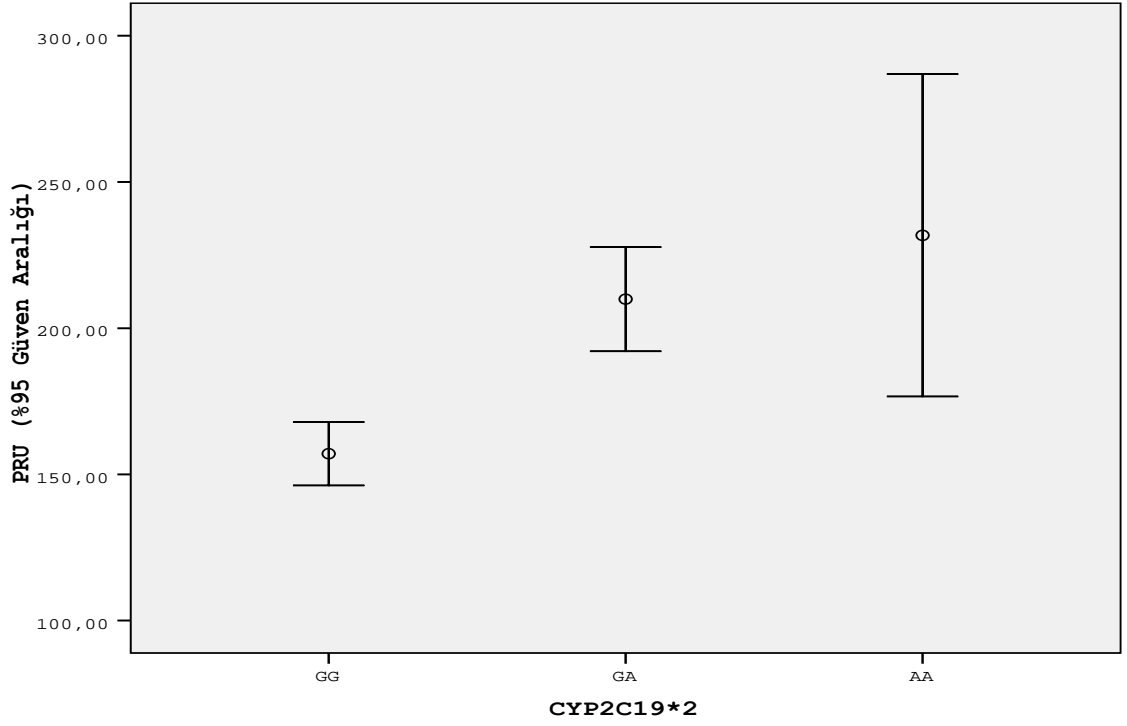
^aGA genotipinin GG genotipine göre farkı

^bAA genotipinin GG genotipine göre farkı

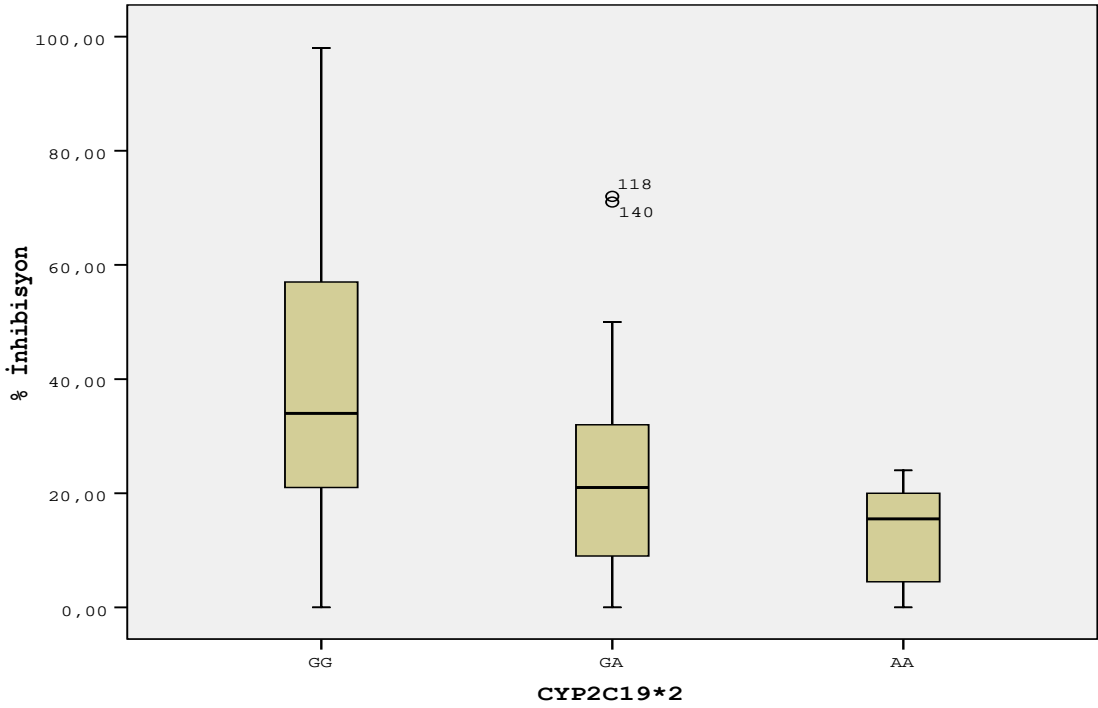
^cAA genotipinin GA genotipine göre farkı

* PRU değerleri ortalama±standart sapma (SD) olarak verildi.

†% inhibisyon değerleri düzgün dağılım göstermediğinden medyan (25.persentil -75. persentil) olarak verildi.



Grafik 4.4. CYP2C19*2 (G681A) polimorfizmi genotiplerinin PRU (P2Y12 Reaction Unit) değerlerinin error bar grafiği



Grafik 4.5. CYP2C19*2 (G681A) polimorfizmi genotiplerinin % inhibisyon değerlerinin box plot grafiği

Diğer varyasyon genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değerlerini karşılaştırdığımızda elde ettiğimiz istatistiksel sonuçlar ve her bir genotipin değer aralıkları Tablo 4.9'da gösterilmiştir. CYP2C19*3 varyasyonuna sadece iki hastamızda rastlandığından, CYP2C19*4, *7 ve *8 varyasyonları ise hastalarımızın hiçbirinde bulunmadığından dolayı bu varyasyonların PRU ve % inhibisyon değerlerini analiz edemedik. Bununla birlikte, ABCB1 (rs104542), CYP3A4*1G (rs2242480), CYP2B6*9 (rs3745274), ITGB3 (rs5918), PON1 (rs662) ve PON1 (rs854560) varyasyon genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değerlerini karşılaştırdığımızda ise istatistiksel anlamlı fark bulamadık (Tablo 4.9).

CYP2B6*9 polimorfizmi GG genotipi hastalarımızın hiçbirinde tespit edilmediğinden, CYP3A4*1G (G→A) polimorfizmi AA genotipi ise sadece iki hastada bulunduğundan dolayı bu genotiplerin değer aralıkları istatistiksel olarak değerlendirilmedi (Tablo 4.9).

CYP2C19*17 (C806T) polimorfizmi TT genotipini barındıran sadece 4 hasta bulunduğundan dolayı bu genotipin PRU ve % inhibisyon değerlerini istatistiksel olarak analiz etmedik. CC ve CT genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değerlerini karşılaştırdığımızda ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulduk. CT genotipinin PRU değer ortalaması CC genotipine göre daha düşük ($p=0,036$), % inhibisyon değer ortalaması ise CC genotipine göre daha yüksekti ($p=0,025$) (Tablo 4.9). Her iki genotipin PRU değerleri düzgün dağılımdan dolayı ortalama±standart sapma olarak verildiği için error bar grafiği ile gösterildi (Grafik 4.6). Her iki genotipin % inhibisyon değerleri ise düzgün dağılım göstermediğinden dolayı medyan (25.persentil -75.persentil) olarak verildiği için box blot grafiği ile gösterildi (Grafik 4.7).

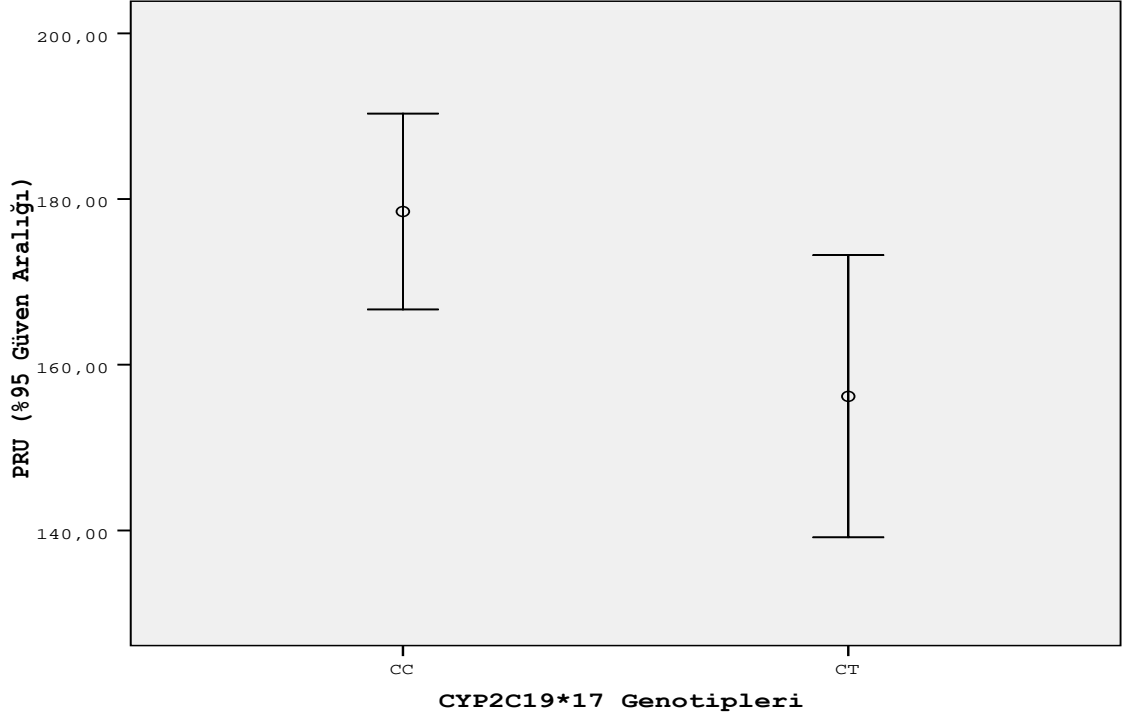
Çalışmamızda incelediğimiz genetik varyasyonlar arasında PRU ve % inhibisyon değerleri bakımından genotiplerinin her iki değer için de düzgün dağılım gösterdiği varyasyon ABCB1 (C3435T)'di. CC, CT ve TT genotiplerine sahip bireylerin PRU ($p=0,694$) ve % inhibisyonu değerleri ($p=0,693$) arasında istatistiksel anlamlı bir fark olmamasına rağmen, atasal genotipe (CC) göre CT ve TT genotipinin PRU değer ortalamalarında artış, % inhibisyonu değer ortalamalarında ise azalış belirlendi (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Genetik varyasyon genotiplerine göre gruplandırılan hastaların PRU, % inhibisyon değerleri ve istatistiksel analizi

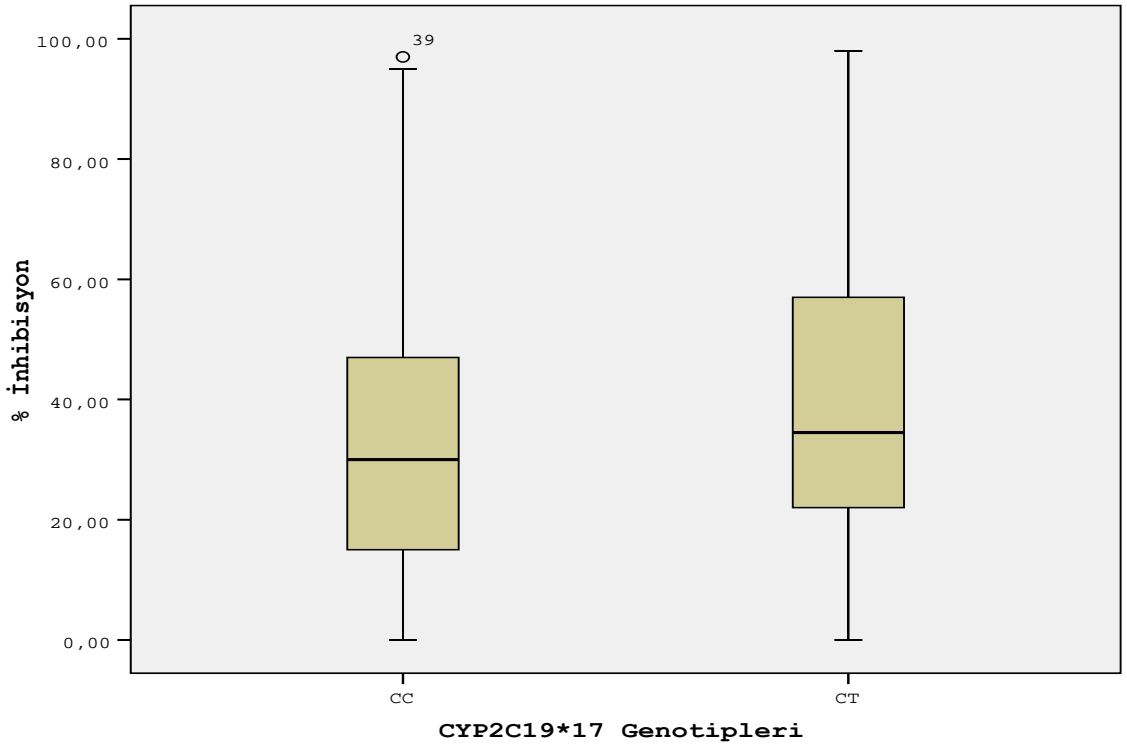
CYP2C19*17 (C806T) (rs12248560)	Tüm Hastalar (n=223)		PRU	% İnhibisyon
	n	%		
CC	151	67,7	178,49±73,48	30 (15-47)
CT	68	30,5	156,19±70,37	34,5 (21,5-57,5)
TT	4	1,8		
İstatistik			t=2,106 p=0,036	U=4159,3 p=0,025
ABCB1 (C3435T) (rs1045642)	Tüm Hastalar (n=223)		PRU	% İnhibisyon
	n	%		
CC	62	27,8	168,58±68,17	36,37±22,03
CT	116	52	172,40±74,65	34,36±25,22
TT	45	20,2	178,75±74,68	32,42±21,91
İstatistik			F=0,366 p=0,694	F=0,367 p=0,693
CYP3A4*1G (G→A) (rs2242480)	Tüm Hastalar (n=223)		PRU	% İnhibisyon
	n	%		
GG	162	72,6	170,89±68,70	32 (17-49)
GA	59	26,5	176,44±83,87	27 (17-52)
AA	2	0,9		
İstatistik			t=-0,499 p=0,618	p=0,473

Tablo 4.9. Genetik varyasyon genotiplerine göre gruplandırılan hastaların PRU, % inhibisyon değerleri ve istatistiksel analizi (devamı)

CYP2B6*9 (G15631T) (rs3745274)	Tüm Hastalar (n=223)		PRU	% İnhibisyon
	n	%		
GG	0	0	0	0
GT	129	57,8	174,72±73,09	29 (16,5-47)
TT	94	42,2	168,41±72,42	34 (18-53,25)
İstatistik			t=0,639 p=0,523	U=5399,00 p=0,163
ITGB3 (T>C) (rs5918)	Tüm Hastalar (n=223)		PRU	% İnhibisyon
	n	%		
TT	176	78,9	174,86±74,48	32 (17-48,75)
TC	40	17,9	162,22±64,16	27 (18,5-52,25)
CC	7	3,1	157,85±77,06	33 (17-54)
İstatistik			F=0,629 p=0,534	$\chi^2=0,058$ p=0,972
PON1 (A→G) (rs662)	Tüm Hastalar (n=223)		PRU	% İnhibisyon
	n	%		
AA	105	47,1	167,35±70,39	32 (18-52,50)
AG	95	42,6	181,11±74,98	30 (17-47)
GG	23	10,3	156,21±71,96	34 (14-54)
İstatistik			F=1,51 p=0,223	$\chi^2=0,977$ p=0,614
PON1 (T→A) (rs854560)	Tüm Hastalar (n=223)		PRU	% İnhibisyon
	n	%		
TT	29	13	148,24±67,08	33 (21-57,5)
TA	93	41,7	182,21±70,57	31 (17-43,5)
AA	101	45,3	169,56±75,02	29 (15-50)
İstatistik			F=2,558 p=0,08	$\chi^2=3,013$ p=0,222



Grafik 4.6. CYP2C19*17 (C806T) polimorfizmi genotiplerinin PRU (P2Y12 Reaction Unit) değerlerinin error bar grafiği



Grafik 4.7. CYP2C19*17 (C806T) polimorfizmi genotiplerinin % inhibisyon değerlerinin box blot grafiği

Genetik varyasyonların klopidogrel in antitrombosit aktivitesi üzerine etkilerini fonksiyonsuz allellerden etkilenmedikleri ortamda ortaya çıkarmak adına, CYP2C19*2 ve CYP2C19*3 varyasyon allelerini barındırmayan hastalarda varyasyon genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değer aralıklarını karşılaştırmak istedik. Tüm hasta grubumuz için bu sınırlamayı getirdiğimizde değerlendireceğimiz hasta sayısı 161'e düştü. 161 hasta içerisinde CYP2C19*17 (rs1224860), ABCB1 (rs104542), CYP3A4*1G (rs2242480), CYP2B6*9 (rs3745274), ITGB3 (rs5918), PON1 (rs662) ve PON1 (rs854560) varyasyon genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değerlerini karşılaştırdığımızda ise istatistiksel anlamlı bir fark bulamadık (Tablo 4.10).

CYP2C19*17 (C806T) polimorfizmi TT genotipine sahip bireylerin sayısı 4 olduğundan dolayı bu genotipin PRU ve % inhibisyon değerleri istatistiksel karşılaştırmaya dahil edilmedi. Aynı şekilde, CYP3A4*1G (G→A) polimorfizminin AA genotipini taşıyan sadece 1 hasta ve ITGB3 (rs5918) polimorfizminin CC genotipini taşıyan sadece 3 hasta bulunduğundan bu genotiplerin PRU ve % inhibisyon değerleri de istatistiksel olarak analiz edilmedi (Tablo 4.10).

CYP2C19*2 ve CYP2C19*3 varyasyon allelerini barındırmayan hastalar içerisinde CYP2C19*17 (C806T) polimorfizmi CC ve CT genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değerlerini karşılaştırdığımızda istatistiksel anlamlı fark bulunmadı. CT genotipi CC genotipine göre PRU değeri bakımından düşük, % inhibisyon değeri bakımından yüksek seviyede olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık yoktu (Tablo 4.10).

ABCB1 (C3435T) polimorfizmi genotiplerinin % inhibisyon değerleri tüm hasta grubumuzda düzgün dağılım göstermesine karşılık sınırlama getirilip hasta sayısı 161 olduğunda düzgün dağılım göstermedi. Bununla birlikte, genotiplerin % inhibisyon değerleri arasında birbiriyle uyumlu, gözle görülür belirgin bir fark gözlemlenmedi. ABCB1 (C3435T) polimorfizmi genotiplerinin PRU değerleri ise tüm hastalarda olduğu gibi 161 hastada da düzgün dağılıma sahip olduğu analiz edildi. Bu değerlerin birbirleri arasında belirgin bir fark oluşmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,595$). CC genotipine göre CT genotipinin ortalama±standart sapma PRU değeri daha yüksek, TT genotipinin ortalama±standart sapma PRU değeri ise CT genotipinden de daha yüksekti (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. CYP2C19*2 ve CYP2C19*3 varyasyon allelerini barındırmayan hastalarda genetik varyasyon genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değer aralıkları ve istatistiksel analizi

CYP2C19*17 (C806T) (rs12248560)	Değerlendirilen Hastalar (n=161)		PRU	% İnhibisyon
	n	%		
CC	100	62,12	159,39±68,76	33,5 (18,5-55,75)
CT	57	35,40	147,43±70,67	37 (23,5-60)
TT	4	2,48		
İstatistik			t= 1,037 p=0,301	p=0,293
ABCB1 (C3435T) (rs1045642)	Değerlendirilen Hastalar (n=161)		PRU	% İnhibisyon
	n	%		
CC	46	28,57	146,36±61,91	39,5 (30-56,5)
CT	87	54,04	156,45±71,55	32 (17-60)
TT	28	17,39	166,32±74,12	36 (28,25-49)
İstatistik			F=0,521 p=0,595	$\chi^2=1,680$ p=0,432
CYP3A4*1G (G>A) (rs2242480)	Değerlendirilen Hastalar (n=161)		PRU	% İnhibisyon
	n	%		
GG	121	75,15	158,98±66,23	34 (21-54)
GA	39	24,22	148,64±78,47	35 (21-58)
AA	1	0,63		
İstatistik			t=0,810 p=0,419	p=0,576

Tablo 4.10. CYP2C19*2 ve CYP2C19*3 varyasyon allelerini barındırmayan hastalarda genetik varyasyon genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değer aralıkları ve istatistiksel analizi (devamı)

CYP2B6*9 (G15631T) (rs3745274)	Değerlendirilen Hastalar (n=161)		PRU	% İnhibisyon
	n	%		
GG	0	0	0	0
GT	88	54,66	155,50±70,57	33 (21-58,75)
TT	73	45,34	156,93±67,98	36 (22,5-57)
İstatistik			t=-0,130 p=0,897	p=0,563
ITGB3 (T>C) (rs5918)	Değerlendirilen Hastalar (n=161)		PRU	% İnhibisyon
	n	%		
TT	129	80,12	157,50±68,78	34 (21,5-58)
TC	29	18,01	151,44±67,95	37 (20-57)
CC	3	1,87		
İstatistik			F=0,142 p=0, 868	$\chi^2=0,452$ p=0,798
PON1 (A>G) (rs662)	Değerlendirilen Hastalar (n=161)		PRU	% İnhibisyon
	n	%		
AA	82	50,9	157,32±65,78	33 (18-56,5)
AG	61	37,9	159,01±73,61	36 (25-58,5)
GG	18	11,2	141,05±71,05	44 (28,5-56,5)
İstatistik			F=0,489 p=0,614	$\chi^2=0,748$ p=0,688
PON1 (T>A) (rs854560)	Değerlendirilen Hastalar (n=161)		PRU	% İnhibisyon
	n	%		
TT	21	13,04	148,95±63,74	33 (19,5-57,5)
TA	68	42,23	162,89±63,69	34 (22,25-51,5)
AA	72	44,73	151,87±75,76	37,5 (21-59,5)
İstatistik			F=0,571 p=0,566	$\chi^2=0,528$ p=0,768

CYP2C19*2 ve CYP2C19*17 polimorfizmleri genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değerlerini birbirlerinden bağımsız olarak karşılaştırdığımızda atasal genotipe göre ters yönde istatistiksel anlamlı fark bulduğumuzdan dolayı bu iki polimorfizmi birlikte değerlendirmek istedik. Bu nedenle, 223 hastanın CYP2C19*2 (G681A) ve CYP2C19*17 (C806T) polimorfizmlerinin haplotiplerini oluşturarak PRU ve % inhibisyon değerlerini karşılaştırdık. 223 hasta içerisinde GG-TT haplotipine sahip sadece 4 birey bulunduğundan dolayı istatistiksel değerlendirmeye dahil edilmedi. GA-TT, AA-CT ve AA-TT haplotiplerine sahip bireyler ise hasta grubumuzda bulunmadığından PRU ve % inhibisyon değerleri ölçülemedi (Tablo 4.11, Tablo 4.12).

CYP2C19*2 (G681A) ve CYP2C19*17 (C806T) polimorfizmleri haplotiplerinin PRU değerleri düzgün dağılım gösterdiğinden dolayı Tablo 4.11’de ortalama±standart sapma olarak verildi. Her bir haplotipin ortalama±standart sapma değeri %95 güven aralığı ile birlikte error bar grafiğinde gösterildi (Grafik 4.8). Bu haplotiplerin PRU değerlerini karşılaştırdığımızda ise bağımsız değerlendirmeler ile aynı doğrultuda istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu (Tablo 4.11).

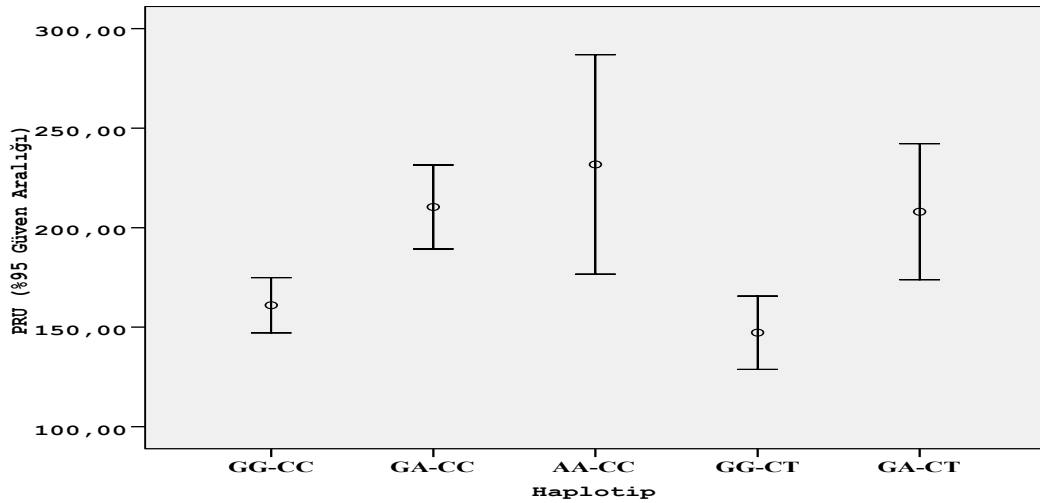
GG-CC haplotipine göre GA-CC ($p=0,001$) ve AA-CC ($p=0,044$) haplotipleri PRU değeri bakımından istatistiksel fark oluşturacak şekilde yüksekti. Aynı haplotipe göre GG-CT haplotipli bireylerin PRU değerleri düşük ($p=0,744$), GA-CT haplotipli bireylerin PRU değerleri ise daha yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,242$). GG-CT haplotipini barındıran bireylere göre GA-CC ($p<0,001$) ve AA-CC ($p=0,011$) haplotipli bireylerin PRU değerleri daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlıydı. Aynı haplotipe göre GA-CT haplotipli bireylerin PRU değerleri de yüksekti, fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,078$). AACC haplotipli bireylerin PRU değerleri, GA-CC ($p=0,929$) ve GA-CT ($p=0,950$) haplotipli bireylere göre daha yüksekti, fakat bu farkların istatistiksel olarak anlamlılığı yoktu (Tablo 4.11).

CYP2C19*2 (G681A) ve CYP2C19*17 (C806T) polimorfizmleri haplotiplerinin % inhibisyon değerleri düzgün dağılım göstermediğinden dolayı Tablo 4.12’de medyan (25.persentil -75. persentil) olarak verildi. Her bir haplotipin % inhibisyon değeri box blot grafiğinde gösterildi (Grafik 4.9).

Tablo 4.11. CYP2C19*2 ve CYP2C19*17 polimorfizmleri haplotiplerinin PRU ortalama±standart sapma değerleri ve istatistiksel analizi

Haplotip		n=223 (%)	PRU	İstatistik
CYP2C19*2 (G681A)	CYP2C19*17 (C806T)			
GG	CC	101(45,3)	161,01±70,35	
GG	CT	58 (26,0)	147,25±70,06	p=0,744 ^a
GG	TT	4 (1,8)		
GA	CC	42 (18,8)	210,38±67,79	p=0,001 ^a p<0,001 ^b p=1,000 ^e
GA	CT	10 (4,5)	208,00±47,74	p=0,242 ^a p=0,078 ^b p=0,950 ^d
GA	TT	0	0	
AA	CC	8 (3,6)	231,75±65,94	p=0,044 ^a p=0,011 ^b p=0,929 ^c
AA	CT	0	0	
AA	TT	0	0	

^aGG-CC haplotipine göre farkı, ^bGG-CT haplotipine göre farkı, ^cGA-CC haplotipine göre farkı, ^dAA-CC haplotipine göre farkı, ^eGA-CT haplotipine göre farkı



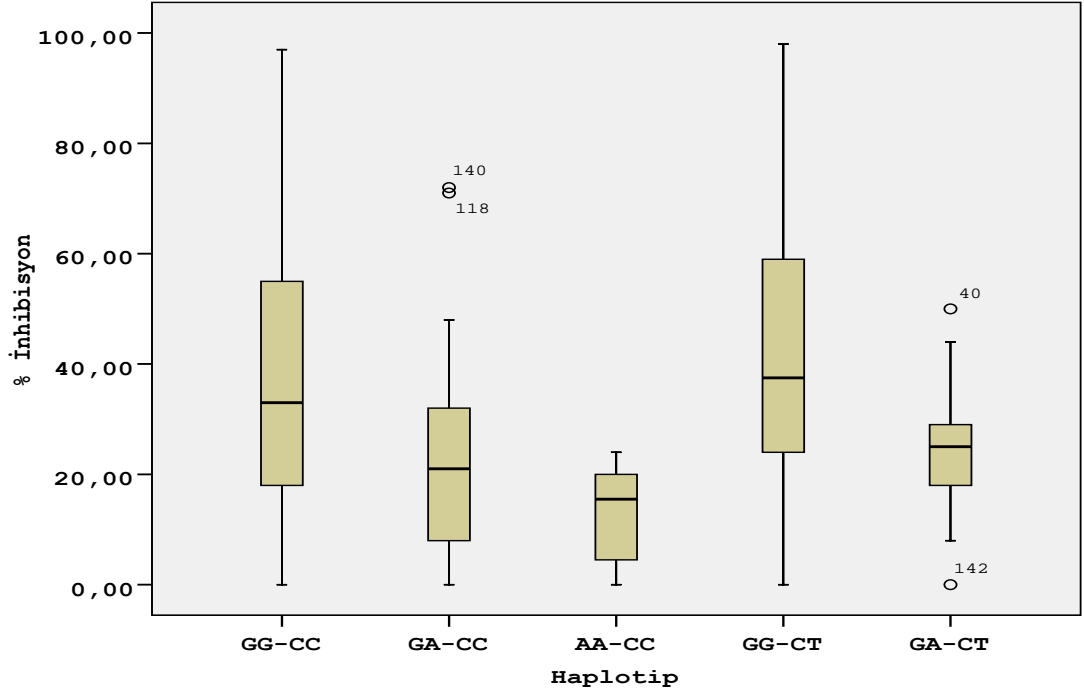
Grafik 4.8. CYP2C19*2 (G681A) ve CYP2C19*17 (C806T) polimorfizmleri haplotiplerinin PRU değerlerinin error bar grafiği

GG-CC haplotipine göre GA-CC (p=0,002) ve AA-CC (p=0,014) haplotipleri % inhibisyon değeri bakımından istatistiksel fark oluşturacak şekilde düşüktü. Aynı haplotipe göre GG-CT haplotipli bireylerin yüksek (p=1,000), GA-CT haplotipli bireylerin % inhibisyon değerleri ise daha düşük olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,894). GG-CT haplotipini barındıran bireylere göre GA-CC (p<0,001) ve AA-CC (p=0,003) haplotipli bireylerin % inhibisyon değerleri daha düşük ve istatistiksel olarak anlamlıydı. Aynı haplotipe göre GA-CT haplotipli bireylerin % inhibisyon değerleri de düşüktü, fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,285). AA-CC haplotipli bireylerin PRU değerleri GA-CC (p=1,000) ve GA-CT (p=1,000) haplotipli bireylere göre daha düşüktü, fakat bu farkların istatistiksel olarak anlamlılığı yoktu (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. CYP2C19*2 ve CYP2C19*17 polimorfizmleri haplotiplerinin % inhibisyon değer aralıkları ve istatistiksel analizi

Haplotip		n=223 (%)	% İnhibisyon	İstatistik
CYP2C19*2 (G681A)	CYP2C19*17 (C806T)			
GG	CC	101(45,3)	33 (18-55,5)	
GG	CT	58 (26,0)	37,5 (23,75-59,5)	p=1,000 ^a
GG	TT	4 (1,8)		
GA	CC	42 (18,8)	21 (8-32,25)	p=0,002^a p<0,001^b p=1,000 ^e
GA	CT	10 (4,5)	25 (15,5-32,75)	p=0,894 ^a p=0,285 ^b p=1,000 ^d
GA	TT	0	0	
AA	CC	8 (3,6)	15,5 (4,25-21)	p=0,014^a p=0,003^b p=1,000 ^c
AA	CT	0	0	
AA	TT	0	0	

^aGG-CC haplotipine göre farkı, ^bGG-CT haplotipine göre farkı, ^cGA-CC haplotipine göre farkı, ^dAA-CC haplotipine göre farkı, ^eGA-CT haplotipine göre farkı



Grafik 4.9. CYP2C19*2 (G681A) ve CYP2C19*17 (C806T) polimorfizmleri haplotiplerinin % inhibisyon değerlerinin box blot grafiği

5. TARTIŞMA

İlk değerlendirme basamağı olarak trombosit reaktivite sonuçlarına (PRU) göre 223 hastamızı klopidogrel tedavisine cevap veren (klopidogrele dirençsiz) ve vermeyen (klopidogrele dirençli) şeklinde sınıflandırdık. Bu gruplandırmayı yapmak klopidogrel direncinin genetik varyasyonlar ile ilişkisini belirleyebilmemiz için önemli ve gerekli bir basamaktı. Klopidogrele dirençli ve dirençsiz bireyleri tespit ederken PRU sınır değeri olarak 208'i referans aldık. PRU değeri ≤ 208 olan hastalar klopidogrel tedavisine cevap veren bireyler, PRU değeri >208 olan hastalar ise klopidogrel tedavisine cevap vermeyen bireyler olarak gruplandırıldı (18,95,116).

VerifyNow P2Y12 kiti ile ölçümlerimiz sonucunda 223 hastamızın %69.1'ini klopidogrel tedavisine cevap veren, % 30.1'ini ise klopidogrel tedavisine cevap vermeyen olarak belirledik. Bu iki hasta grubunun klopidogrel direnci ile genetik varyasyonlar arasındaki ilişkiyi belirlemede bize yol gösterecek verimli bir homojenliğe sahip olup olmadığını, PRU ve % inhibisyon değerlerini karşılaştırarak doğrulamak istedik. Klopidogrele cevap veren ve tedaviye cevap vermeyen bireyler arasında PRU değerleri bakımından yüksek seviyede istatistiksel fark bulduk ($p<0,001$). Klopidogrel tedavisine cevap vermeyen hastaların PRU değerleri belirgin şekilde yüksek, % inhibisyon değerleri ise düşüktü. Aynı şekilde, % inhibisyon değerlerinde de istatistiksel bakımdan aynı seviyede fark görülmesi ($p<0,001$), literatüre göre belirlediğimiz PRU sınır değerini doğrulamış ve bu sınır değerinin verimliliğini bize yeniden göstermiş oldu (Bkz. Tablo 4.1). Klopidogrel tedavisine cevap veren ve tedaviye cevap vermeyen hastaların PRU ve % inhibisyon değerleri arasındaki istatistiksel olarak hesaplanmış yüksek farklar box blot grafikleri ile de gözlemlendi (Bkz. Grafik 4.1 ve Grafik 4.2).

Malinin ve ark. 2007 yılında 147 gönüllüyü dahil ettikleri VERITAS (The VERIFY Thrombosis risk ASsessment) çalışmasında VerifyNow P2Y12 testini kullanarak trombosit inhibisyonunu gözlemlemişler. Bu bireylerde klopidogrel öncesi ve klopidogrel sonrası iki ölçüm yapılmış, ölçüm değer aralıkları ve dağılımları istatistiksel olarak analiz edilmiş. Klopidogrel tedavisi sonucunda ortalama olarak tüm bireylerde % inhibisyon değerinin $64\pm 25,3$ olduğu, %10'dan aşağı bir inhibisyonun olmadığı rapor edilmiş (76). Çalışma sonrası, testin üretici firması Accumetrics Inc. PRU değerlerine

ROC (Alıcı İşlem Karakteristiği-Receiver Operating Characteristic) eğri analizini uygulayarak sonuçları test klavuzunda yayınlamıştır. ROC analizi, tıbbi karar verme sürecinde testin ayırt ediciliğini veya sınır değerini belirlemek amacıyla yaygın kullanılan bir eğri yöntemidir. Malinin ve ark.'nın çalışmasındaki bireylerin PRU değerlerinin ROC eğri analizi sonucu olarak, ≤ 208 olan değerler klopidogrel'in farmakodinamik etkisinin varlığını göstermektedir (48).

Bununla birlikte, Campo ve ark. 2010 yılında elektif perkütan koroner girişim sonrası aspirin ve klopidogrele cevap verme durumuna dayanan uzun zamanlı klinik sonuçları yayınladıkları çalışmalarında bir yıllık sonlanım noktasını tahmin etmede VerifyNow P2Y12 testi için optimum sınır değerini bildirmişler. Toplamda 826 kişiyi bir sene boyunca gözlemledikleri çalışmalarında PRU sınır değeri olarak 208'in bir sene sonraki sonlanım noktası için fark oluşturduğunu ve $PRU \geq 208$ olan bireylerin daha çok risk içerdiğini rapor etmişler (18).

Price ve ark. 2011 yılında yayınladıkları GRAVITAS (Gauging Responsiveness With a VerifyNow P2Y12 Assay: Impact on Thrombosis and Safety) çalışmalarında 2796 hastanın trombosit reaktivite ve kardiyovasküler olaylarını değerlendirerek trombosit fonksiyon verisi ortaya koymuşlar. Bu çalışmada klopidogrel tedavisi sonrası $PRU < 208$ değerlerinin 60 günlük ve 6 aylık birincil sonlanım noktaları kardiyovasküler olaylar ile düşük ilişkili olduğu rapor edilerek daha geniş hasta kapasitesi ile PRU sınır değeri bir kez daha doğrulanmıştır. Ayrıca, Price ve ark. klopidogrel kullanan 5427 hastanın PKG sonrası 12 ile 24 saatleri arasında PRU değerlerini ölçtüklerinde 2737 hastanın (%50,4) PRU değerinin < 208 olduğunu tespit etmişler (95). Bizim çalışmamızda 7 gün boyunca idame doz kullanan bireylerde $PRU < 208$ olan bireylerin oranı %69,1'di. Price ve ark.'nın geniş çaplı hasta popülasyonuna bakıldığında 223 hastadan oluşan bizim çalışma grubumuza göre tromboz ve iskemik olaylar için risk ihtiva eden yüksek oranda bireyin bulunduğu söylenebilir.

Stone ve ark. çok merkezli 8583 hastayı değerlendirdikleri çalışmalarını 2013 yılının ağustos ayında yayınladılar. VerifyNow P2Y12 testini kullanarak yürüttükleri çalışmalarında trombosit reaktivitesi ile stent trombozu, majör kanama ve istenmeyen iskemik olaylar arasındaki ilişkiyi bir yıllık gözlem sonucunda belirlemeyi amaç

edinmişler. P2Y12 testi için 8449 hastadan aldıkları geçerli sonuçları değerlendirdiklerinde, 3610 (%42,7) hastanın PRU değerinin 208'den yüksek olduğunu tespit etmişler. Daha sonra, bu hastalar ile PRU değeri 208'den küçük olan hastalar (%57,3) arasında stent trombozu ve miyokardiyal enfarktüs gibi istenmeyen kardiyak olayları karşılaştırmışlar. Bir yıllık gözlem sonucunda, kesin stent trombozunun [p=0,0006, HR 3,05 (%95 CI 1,62-5,75)] ve miyokardiyal enfarktüsün [p=0,01, HR 1,42 (%95 CI 1,09-1,86)] PRU>208 olan hastalarda PRU≤208 hastalara göre yüksek seviyede fazla olduğunu belirlemişler (116). Stone ve ark.'nın çalışması ile bizim çalışmamızdaki PRU>208 olan hastaların frekanslarını kıyasladığımız zaman, iki frekansta birbirine yakın bir değer olmakla birlikte yaklaşık %10'luk bir fark gözükmekteydi.

Yukarıdaki çalışmaların sonuçlarına bakıldığında, PRU için sınır değeri 208 olarak belirlemedeki amacımız daha net görülmektedir. Ayrıca, yukarıdaki çalışmaların hasta kapasitesinin bizim çalışmamıza oranla çok yüksek olduğu görülmekle birlikte, tromboz ve iskemik olaylar için riskli bireylerin (PRU>208) frekansı da daha fazladır. Bu durum, Türk hastalarda yaptığımız çalışmamızın hasta sayısını arttırdığımız takdirde, PRU>208 olan bireylerin frekansının yükselebileceği fikrini akla getirmektedir.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz hastaların demografik ve klinik özelliklerini klopidogrel tedavisine cevap verip vermeme durumuna göre karşılaştırmak istedik. Buradaki amacımız, klopidogrel direncine başka genetik olmayan faktörlerin etkisini araştırmaktı. Çünkü yapılan önceki çalışmalarda genetik varyasyonlar dışında başka etkenlerin olabileceği ortaya konmuştu (41). Hastalarımızın cinsiyet, sigara kullanım, hipertansiyon, diyabet, hiperlipidemi, KAH için aile hikayesi ve birden fazla PKG durumlarına baktığımızda hiçbirinde klopidogrel tedavisine cevap açısından istatistiksel anlamlı fark bulamadık (Bkz. Tablo 4.2).

Stone ve ark. stent trombozuna göre cinsiyet, hipertansiyon, hiperlipidemi, sigara kullanım ve önceden PKG durumlarını karşılaştırmışlar ve istatistiksel fark bulamamışlar. Bununla birlikte, diyabet (p<0,05) ve periferik arter hastalığı hikayesi (p<0,05) açısından stent trombozu bulunan ve bulunmayan hastalar arasında anlamlı

istatistiksel fark belirlemişler. Stent trombozlu hastalarda bu iki özelliğin daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Stone ve ark. diğer bir sonuç olarak PRU>208 değerlerine sahip hastaları yüksek tromboz riskli olarak rapor etmişlerdir (116). Bizim PRU≤208 ve PRU>208 olan hastaları PKG durumuna göre karşılaştırdığımızda ilişki bulamamış olmamız, 8583 hastayı değerlendiren Stone ve ark.'na göre hasta kapasitemizin düşük olmasından kaynaklanabilir.

Price ve ark. perkütan koroner girişim sonrası standart ve yükleme dozunu karşılaştırdıkları çalışmalarında PRU sınır değeri olarak 230'u belirleyip, klinik özelliklerde fark olup olmadığına bakmışlar. Standart doz kullanan hastalardan PRU>230 olan bireylerin diyabet, hipertansiyon ve sigara kullanım durumu bakımından PRU<230 olan bireylere göre yüksek frekansa sahip olduklarını istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlar (p<0,001) (96). Price ve ark. 230 gibi yüksek PRU sınır değerine göre karşılaştırma yapmış olmalarına rağmen istatistiksel fark bulmaları önemli bir sonuçtur. Diyabet ve hipertansiyon gibi etyolojisinde oksidatif stres barındıran ve oksidatif strese neden olan sigara gibi özelliklerin fark oluşturması, oksidatif stresin trombosit reaktivitesini etkileyebileceğini akla getirmektedir. Ayrıca, diyabet ve hipertansiyona genetik olarak yatkınlığın olabileceği bulgusu birçok çalışmada rapor edilmişken trombosit reaktivitesine bu hastalıkların etkisi aynı nedene bağlanabilir. Bizim çalışmamızda klinik özelliklerde fark bulunmaması, hasta kapasitesimizin (223 hasta) Price ve ark.'kine (1691 hasta) göre çok az olmasından ve etnik köken farklılığından kaynaklanabilir.

İlaç etkileşiminin klopidogrel direncinde önemli bir rolünün olduğu önceki çalışmalarda bildirilmişti (7,41,118). Bu nedenle, hastalarımızın ilaç kullanım durumlarını da klopidogrel tedavisine cevaba göre istatistiksel olarak analiz ettik. Beta bloker kullanımı, statin kullanımı, proton pompa inhibitörü kullanımı, kalsiyum kanal blokeri kullanımı ve ACE inhibitörü kullanımlarına göre hastalarımızı karşılaştırdığımızda klopidogrel tedavisine cevap veren ve tedaviye cevap vermeyen hastalar arasında istatistiksel fark bulamadık (Bkz. Tablo 4.3). Zaten, hastalarımızın % 90'dan fazlası beta blokeri, statin ve proton pompa inhibitörü kullandığından bu ilaçlar

arasında fark bulunmaması normaldi. Diğer ilaçların kullanım oranları ise daha az olmakla birlikte iki hasta grubu arasında birbirine çok yakındı.

Karaciğerde sitokrom P450 izoenzimlerini klopidogel ile ortak kullanan diğer ilaçların klopidogrel'in etkinliğini azaltabileceği fikrinden yola çıkarak birçok çalışma yapılmıştır. Bu konuda özellikle lipofilik statinler, kalsiyum antagonistleri ve proton pompa inhibitörleri üzerinde durulmuştur (41). Klopidogrel direncinin tanımlandığı ilk yıllarda, atorvastatin ve simvastatin'in klopidogrel'in antitrombosit aktivitesini düşürdüğü sonucuna ulaşan çalışmalara rastlanmaktadır (65,88). Fakat daha sonraki yıllarda, statinler ile klopidogrel arasında böyle bir etkileşimin olmadığı ileri sürülmüştür (102). Klopidogrel ile birlikte omeprazol veya plasebo kullanan hastaların değerlendirildiği OCLA çalışmasında omeprazol kullanan hastaların daha düşük P2Y12 reseptörüne dayalı antitrombosit etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (39). Ayrıca, bütün proton pompa inhibitörlerinin değerlendirildiği diğer bir çalışmada ise klopidogrel ile kullanılacak en iyi ajanın CYP2C19 enzimini inhibe etmeyen pantoprazol olduğu ileri sürülmüştür (59). Kalsiyum antagonisti kullanımının da klopidogrel'in antitrombosit aktivitesini düşürdüğü rapor edilmiş olmasına rağmen bu konuda çalışma çok azdır (109).

Klopidogrel direncinde ilaç etkileşiminin rolünü değerlendirebilmek için önceden etkisi rapor edilmiş diğer faktörleri hastalarda sabit kılmak gereklidir. Ancak böyle bir çalışma ilaç etkileşimi konusunda bize doğru ve güvenilir sonuçları verebilir. Çalışmamızda ilaç etkileşimi konusunda verimli bulgular elde edebilmemiz için etken faktörleri sabit olan hastalar arasında karşılaştırma yapmamız en doğrusudur. Bununla birlikte, bu kritere uygun hasta miktarımıza bakıldığında en güvenilir sonuçlar için bizim çalışmamızın yeterli olmadığı söylenebilir, ancak öncü fikir vermesi ve ilaç etkileşim seviyesini bildirmesi açısından sonuçlarımız önemlidir. Daha geniş hasta kapasitesine sahip ve tüm etkenlerin birlikte analiz edildiği çalışmalara da ihtiyaç vardır.

Hastaların klinik parametrelerinin bulunduğu Tablo 4.4'ü istatistiksel olarak analiz ettiğimizde, sadece yaş bakımından klopidogrel tedavisine cevap veren ve cevap vermeyen hasta grupları arasında istatistiksel olarak yüksek seviyede anlamlı fark

bulduk ($p<0,001$). Klopidoğrelle cevapsız bireylerin yaş aralığı daha yüksekti. Bu bulgu, ileri yaşlardaki hastalarda klopidoğrel direncinin daha sık görülebileceği fikrini ortaya koymaktadır. Yaş ile birlikte bireyde hastalık sayısının artması, dolayısıyla daha fazla ilaç kullanımı ve aynı karaciğeri kullanan bu ilaçların birbirlerinin metabolizmasını etkilemesi sonucu bu bulgunun ortaya çıktığı söylenebilir. Ayrıca, yaşa bağılı olarak ortaya çıkabilen, fakat klinik olarak tespit edilememiş karaciğer fonksiyonunda ve barsak emilimindeki bozuklukların klopidoğrel direncine katkıda bulunduğu düşünülebilir.

Correll ve ark. yakın bir zaman önce yayımladıkları çalışmalarında klopidoğrel tedavisine cevap vermeyen hasta grubunda yaş ortalamasının bizim çalışmamıza benzer şekilde yüksek olduğunu bulmuşlar ($p<0,001$) (20). İleri yaşlardaki hastalarda daha sık klopidoğrel direnci görülmesi yaşa bağılı olarak artan komplikasyonlardan kaynaklanabilir. Örneğin, karaciğer fonksiyonundaki düşüşler sitokrom P450 enzim sistemini etkileyerek klopidoğrel metabolizmasını azaltabilir.

Diğer klinik parametreler analiz edildiğinde ise vücut kitle indeksi, trombosit miktarı, LDL kolesterol, HDL kolesterol, total kolesterol, trigliserit ve kreatinin değerleri açısından iki hasta grubu arasında istatistiksel fark yoktu (Bkz. Tablo 4.4). Kolesterol tipi parametrelerinde fark olmaması ateroskleroz patolojisine neden olan bu faktörlerin klopidoğrel direncinde etkisinin olmadığını göstermektedir. Kreatinin değerlerinde fark olmaması ise klopidoğrelle dirençli ve dirençsiz bireyler arasında böbrek fonksiyonları açısından fark olmadığına işaret etmektedir. Böylelikle, direnç oluşumunu etkileyecek muhtemel fizyolojik etkenler bu parametrelerin eşitliği ile elenebilir. Vücut kitle indeksi ve trombosit miktarı, bizim fark bulabileceğimizi tahmin ettiğimiz parametrelerdi. Çünkü, belirli sınırları aşan vücut kitle indeksi değerlerinin tedavi yetersizliğine neden olduğu farmakoloji uzmanları tarafından bildirilmiştir. Bu teoriyi destekleyici şekilde, Stone ve ark. düzenli olarak klopidoğrel kullanan hastalarda yürüttükleri çalışmalarında; stent trombozu tespit edilmeyen hastaların vücut kitle indeksi ortalamasının stent trombozlu hastaların vücut kitle indeksi ortalamalarına göre daha düşük olduğunu tespit etmişler ($p<0,05$). (116). Buna karşın biz, klopidoğrel tedavisine cevap veren hastalarımız ile tedaviye cevapsız hastalarımızın vücut kitle

indeksleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulamadık ($p=0,612$). Bu sonuç, vücut kitle indeksine bağlı bir tedavi yetersizliğinden kaynaklanan klopidogrel direncinin hasta grubumuzda bulunmadığını bize göstermektedir.

Klopidogrel tedavisindeki temel amaç trombosit reaktivitesini azaltmak olduğundan yüksek seviyelerdeki trombosit miktarının tedavi yetersizliğine neden olacağı, dolayısıyla klopidogrel direnci ile aynı sonucu doğuracağı bilinen bir hipotezdir. Li ve ark. bu hipotezden yola çıkarak, yakın bir zaman önce yayınladıkları çalışmalarında trombosit miktarının ve hacminin klopidogrel direnci ile ilişkili olmadığını bildirdiler (67). Li ve ark. çalışmasına benzer şekilde, bizim çalışmamızda da klopidogrel tedavisine cevap ve cevapsızlık ile trombosit miktarı arasında ilişki yoktu ($p=0,936$).

Hastalarımızın genetik varyasyon genotip dağılımlarını klopidogrel tedavisine cevap durumuna göre istatistiksel olarak analiz ettiğimizde, sadece CYP2C19*2 (G681A) tek nükleotid polimorfizminde yüksek derecede anlamlı istatistiksel bir fark bulduk ($p<0,001$). Klopidogrel tedavisine cevap vermeyen bireyler arasında GA ve AA genotip frekanslarının yüksek olduğunu tespit ettik. Tüm hastalar içerisinde CYP2C19*3 (G636A) varyasyonunu barındıran sadece 2 hasta bulunmakla birlikte, hastaların hiçbirinde CYP2C19*4 (A1G), CYP2C19*7 (T→A) ve CYP2C19*8 (T→C) genetik varyasyonlarını taşıyan birey yoktu (Bkz. Tablo 4.5).

12 Mart 2010 tarihli Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA)'nın ciddi uyarısında CYP2C19*2 ve *3 allellerinin klopidogrel'in işlevsel metabolizmasından yoksun olduğu, bu allellerin fonksiyonsuz allele sahip beyaz ırk kökenli hastaların %85'inde ve Asya kökenli hastaların %99'unda bulunduğu bildirilmişti (50). FDA'nın 2010 yılında bildirdiği bu yüksek oranlara bakıldığında klopidogrel tedavisine cevapsızlığın ciddi seviyelerde olduğu düşünülebilir. Fakat, sadece belirli toplumlara ve bölgelere odaklı çalışmaların daha fazla yer tuttuğu bu alanda, farklı toplumlardaki çalışmalar yeni pencereler açabilir. Bizim çalışmamız, bu eksikliği gidermek adına Asya ile Avrupa arasında köprü oluşturan Türk toplumu üzerinde yapılan bir araştırma olarak yeni bulguların ortaya çıkması için planlanmıştır.

FDA, CYP2C19*2 ve *3 varyasyon allellerinin toplumlarda etkin klopidogrel metabolizması için taranması gerektiğine işaret etmiş, klopidogrel metabolizmasından yoksun bireylerin etnik köken altyapısına bağlı olarak toplumlarda %2 ile %14 arası bir oranda bulunabileceğini bildirmiştir (50). Çalışmamızdaki sonuçlara bakıldığında, CYP2C19*2 (G636A) polimorfizminin GA ve AA genotipleri tüm hastalarımızda sırasıyla %23,3 ve %8 oranında bulunuyordu. Ayrıca, fonksiyonsuz CYP2C19*3 (G636A) varyasyon allelini barındıran sadece iki hasta vardı. FDA'nın bildirdiği oranlara bakıldığında, Türk hastalarımızın CYP2C19*2 (G636A) varyasyonu için allel frekansı yüksek olmasına karşın, CYP2C19*3 (G636A) allel frekansı yok denecek kadar azdı. Klopidogrel tedavisine cevapsız olarak nitelendirdiğimiz bireyler (PRU>208) tüm hasta grubumuzda %30,9 oranında bulunuyordu. FDA'in bildirdiği %2-%14 aralığı, klopidogrel metabolizmasından yoksun bireylerin oranıdır. Çalışmamızdaki klopidogrel tedavisine cevapsız bireylerin oranı (%30,9) ise bireylerin klopidogrel metabolizması düzgün olsa bile tedavinin sonuçsuz kalma durumunu göstermektedir. Ayrıca, bu oran klopidogrel metabolizmasından sonra ortaya çıkabilecek başka faktörlerin tedavi yetersizliği ile ilişkisine işaret etmektedir. Tartışmalı olan ve belirli toplumları içeren klinik sonuç odaklı sürekli yeni çalışmaların yayımlandığı bu alanda, çalışmamız moleküler anlamda Türk toplumu için yeni bir bulgu ortaya koymaktadır. Toplumumuzda klopidogrel tedavisi yetersizliği, % 30,9 gibi yüksek bir oranda bulunması ciddi tedbirlerin alınması gerekliliğine işaret etmektedir.

FDA, klopidogrel için yoksun veya düşük metabolizmaya sahip olduğu düşünülen CYP2C19*4,*7 ve *8 varyasyonlarının toplumlarda daha az sıklıkta rastlandığını bildirmiştir (50). Türk hastalarımızda bu varyasyonları analiz ettiğimizde ise hiçbir hastamızda CYP2C19*4,*7 ve *8 varyasyonlarına rastlayamadık. Genel bir ifade ile Türk toplumunda bu varyasyonların yokluğundan söz edilebilir.

Fonksiyonsuz bir protein kodlayan CYP2C19*2 polimorfizminin toplumdaki dağılımının etnik farklılığına bakıldığında, yaklaşık olarak Çinlilerin %50'si, Afrika kökenli Amerikalıların %34'ü, beyaz ırkın %25'i, Meksika kökenli Amerikalıların %19'unun düşük fonksiyonlu CYP2C19*2 allelinin en az bir kopyasını taşıdığı gösterilmiştir (114). Luo ve ark.'nın farklı etnik gruplarda CYP2C19*2 ve CYP2C19*3 allel frekanslarını karşılaştırdıkları çalışmalarında; beyaz ırkta allel frekanslarının

sırasıyla %12,7 ve %0,9, doğu asyalılarda ise bu oranın artarak %28,9 ve %9,6 seviyelerinde olduğu bildirilmiştir (70). Man ve ark. yakın bir zaman önce sitokrom P450 enzimlerindeki varyasyon frekansları bakımından üç Doğu Asya toplumunu beyaz ırkla ve Afrikalılar ile karşılaştırmışlar; CYP2C19*2 allel frekansının beyaz ırkta %15, Afrikalılarda %19,2, Japonlarda %30,3, Çinlilerde %30,7 ve Korelilerde %28,6 olduğunu rapor etmişler. CYP2C19*3 allel frekansının ise beyaz ırkta %0,1, Afrikalılarda %0,2, Japonlarda %13,1, Çinlilerde %4,5 ve Korelilerde %7,4 olduğunu bildirmişler. CYP2C19*4 ve CYP2C19*8 varyasyonlarını analiz edip karşılaştırdıklarında ise sadece beyaz ırkta her iki varyasyonun %0,1 oranında bulunduğunu, diğer etnik topluluklarda bu varyasyonlara rastlanmadığını rapor etmişler (77).

Asya ve Afrika kökenli toplumlarda yüksek seviyelerdeki CYP2C19*2 polimorfizmi frekansının batı toplumlarında daha düşük seviyelerde olduğu görülmektedir. Asya ile Avrupa arasında bir köprü konumunda olan Türk toplumunun bizim çalışmamızdaki frekansına baktığımızda ise en az bir kopyayı taşıyan hastaların frekansı %26,9 seviyesindeydi. Önceki çalışmaları destekleyici şekildeki bu bulgu, Asya ile Avrupa toplumu frekanslarının ortalaması gibidir. Çalışmamızdaki CYP2C19*3 frekansı % 0,9 olmakla birlikte, bu oran bizi beyaz ırka daha yakın bir konuma oturtmaktadır. Çünkü Asyalılarda CYP2C19*3 allel frekansının yaklaşık olarak % 10 seviyelerinde olduğu görülmektedir (70). CYP2C19*4 ve CYP2C19*8 varyasyonlarında ise beyaz ırkta çok az miktarda frekans görülürken bizim çalışmamızda olduğu gibi bu varyasyonlara Asyalılarda rastlanmamıştır (77) (Bkz. Tablo 4.5). Çok nadir görülen bu varyasyonlar bakımından Asya toplumlarına benzediğimiz görülmektedir. Sonuç olarak, klopidogrel direnç araştırmalarının en çok yapıldığı batı toplumlarına göre Türk toplumu daha fazla risk taşımaktadır.

Mega ve ark. 2009 yılında yayımladıkları çalışmalarında sitokrom P-450 polimorfizmlerinin klopidogrel cevabına olan etkisini Amerika'da araştırarak iki protokol yürütmüşler. İlk olarak, 162 sağlıklı bireyde sitokrom P-450 genlerindeki fonksiyonel genetik varyasyonlar ile aktif ilaç metaboliti ve klopidogrel cevabındaki trombosit inhibisyonu arasındaki ilişkiyi araştırmışlar. Daha sonra, bu varyasyonlar ile

klopidogrel ile tedavi edilen 1477 hastanın kardiyovasküler sonlanımları arasındaki ilişkiyi incelemişler. Klopidogrel ile muamele edilen sağlıklı bireyler arasında en az bir tane düşük fonksiyonlu CYP2C19*2 alleli taşıyanlar (yaklaşık olarak sağlıklı bireylerin %30'u) ile taşımayanlar karşılaştırılmış. Alleli taşıyanlarda klopidogrel'in aktif metabolitine maruz kalmada yaklaşık olarak %32,4'lük bir düşüşün olduğu, maksimum trombosit agregasyonundaki klopidogrel'e cevap olarak mutlak bir azalmada ise %9'lük bir azalışın meydana geldiği tespit edilmiş ($p < 0,001$). Hasta bireyler arasında en az bir tane düşük fonksiyonlu CYP2C19*2 alleli taşıyanların miyokardiyal enfarktüs veya stroke gibi kardiyovasküler nedenlerden kaynaklanan ölüm riskinde %53'lük bir artışa sahip olduğu belirlenmiş (81).

Klopidogrel tedavisine cevap vermeyen hastalarda yüksek oranda bulunan CYP2C19*2 (G681A) polimorfizminin genotipleri arasındaki risk durumuna baktığımızda GA genotipinin GG genotipine göre klopidogrel tedavisine cevapsızlıkta 3,52 (Odds Oranı, OR) kat daha fazla riske sahip olduğunu ($p < 0,001$, %95 Güven Aralığı: 1,82-6,80) belirledik. Güven aralığımızın sınırlarının birbirine yakın olması bulduğumuz odds oranının güvenilir olduğunu bize göstermektedir. Aynı istatistiksel analizi AA genotipi için yaptığımızda yüksek odds oranı bulmamıza rağmen güven aralığımız çok geniş (%95 Güven Aralığı: 2,94-207,32) olduğu için sonucumuz güvenilir değildi. Bu sonuç, AA genotipine sahip toplam hasta sayımızın çok düşük olmasından kaynaklanmaktadır. A allelinin G alleleline göre farkına baktığımızda ise yine istatistiksel olarak yüksek fark ($p < 0,001$) bulmakla birlikte klopidogrel direnci bakımından A allelinin G alleleline göre 4,08 (Odds Oranı, OR) kat daha fazla riskli olduğunu tespit ettik (%95 Güven Aralığı: 2,39-6,96). A alleli ile G alleli arasındaki istatistiksel analizin güven aralığı, bize risk oranımızın güvenilir bir değer olduğunu göstermektedir (Tablo 4.6).

Geisler ve ark. bizim çalışmamıza benzer şekilde 237 hastanın trombosit reaktivitelerini perkütan girişim sonrası agrometri cihazı ile ölçmüşler, hastaları yüksek ve düşük trombosit reaktiviteli olarak gruplandırmışlar. Bu iki grup arasında CYP2C19*2 polimorfizmi genotiplerinin frekans dağılımlarını karşılaştırdıklarında CYP2C19*2 polimorfizmi taşıyıcılarının artmış trombosit agregasyonu ile anlamlı

şekilde ilişkili olduğunu bulmuşlar ($p < 0,001$). CYP2C19*2 polimorfizmi taşıyıcılarının atasal genotipli hastalara göre 4,6 kat (OR) riskli olduğunu (%95 Güven Aralığı: 2,5-8,7) bildirmişler (36). Bu oran bizim G allel için bulduğumuz risk oranına yakın bir sonuçtur. Bulgularımız Alman kökenli bireylerde yürütülen Geisler ve ark.'nın çalışmasını doğrulamaktadır. Hasta sayımızın Geisler ve ark.'nın çalışması ile hemen hemen aynı olduğu göz önüne alınırsa klopidogrel direnç sıklığı bakımından Alman toplumuna benzediğimiz de söylenebilir.

Önceden de klopidogrel aktivitesini düşürücü etkisi birçok çalışmada rapor edilen CYP2C19*2 polimorfizmi bizim çalışmamız ile Türk toplumunda doğrulanmış oldu. Fakat asıl soru; klopidogrel tedavisine cevapsızlıkta tek faktör bu polimorfizm miydi? Bu sorunun cevabı için ilk olarak, CYP2C19*2 polimorfizmi genotip frekanslarının klopidogrelle dirençli bireyler ile ne kadar örtüştüğüne baktık. Hasta grubumuz içerisinde % 26,9 oranında bulunan heterozigot ve homozigot mutant genotipli hastaların yarısı klopidogrelle dirençli iken diğer yarısı klopidogrelle dirençsizdi. Bu sonuç, CYP2C19*2 polimorfizmi dışında klopidogrel direnç mekanizmasında rol oynayan başka faktörlerin varlığını göstermektedir.

Klopidogrel tedavisine cevap durumuna göre gruplandığımız hastalar arasında CYP2C19*17 (C806T) polimorfizminin genotip frekanslarını karşılaştırdığımızda istatistiksel anlamlı bir fark bulamadık ($p=0,344$). Fakat, CT genotip frekansının klopidogrel tedavisine cevap vermeyenlerde belirgin bir seviyede düşük olduğu görüldü (Bkz. Tablo 4.5). Bu durum, klopidogrel direnci ile ilişkili bulunan CYP2C19*2 ve CYP2C19*3 varyasyon allellerinin CYP2C19*17 polimorfizminin etkisini örtbileceğini akla getirdi. Bu nedenle, CYP2C19*2 ve CYP2C19*3 varyasyon allellerini barındırmayan hastalarda CYP2C19*17 polimorfizm genotip frekanslarını karşılaştırdık. Yine klopidogrel tedavisine cevap veren ve tedaviye cevap vermeyen hastalar arasında CYP2C19*17 polimorfizmi genotip frekansları bakımından istatistiksel fark yoktu ($p=0,438$). Simon ve ark. ise Fransız toplumunda perkütan koroner girişim sonrası klopidogrel kullanan 2164 hastanın CYP2C19*17 polimorfizmi genotip frekanslarını değerlendirmişler. 2164 hastayı klopidogrel sonrası kardiyovasküler olay yaşayan ve yaşamayan olarak grupladıklarında, bu iki grup

arasında CYP2C19*17 polimorfizmi genotiplerinin frekansları bakımından istatistiksel anlamlı fark bulmamışlardır ($p=0,18$) (112). Simon ve ark. çalışmasında ve bizim karşılaştırmalarımızda istatistiksel ilişki bulunmaması başka genetik varyasyonların CYP2C19*17 polimorfizminin etkisini örttüğü fikrini akla getirmektedir.

Çalışmamızın diğer bir basamağında hastalarımızı klopidogrel tedavisine cevap durumuna göre gruplandırmadan genetik varyasyon genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değerlerini karşılaştırmak istedik. Buradaki amacımız genetik varyasyonların klopidogrel direnci ile ilişkisinden ziyade bu varyasyonların klopidogrel antitrombosit aktivitesine etkisinin olup olmadığını belirlemektir. Çünkü herhangi bir genetik varyasyonun bu hasta kapasitesinde klopidogrel direnci ile ilişkisi belirlenemeyebilir, fakat klopidogrel antitrombosit aktivitesi üzerine etkisi tespit edilebilirdi. Bu hipotezimiz doğrultusunda CYP2C19*17 polimorfizminin CC ve CT genotipleri arasında hem PRU ($p=0,036$) hem de % inhibisyon ($p=0,025$) değerleri bakımından istatistiksel anlamlı fark bulduk (Bkz. Tablo 4.9). Zira CYP2C19*17 polimorfizmi, gruplar arasındaki genotip frekansları karşılaştırmalarında klopidogrel tedavisine cevap ile ilişkili değildi. Sonuç olarak, genetik varyasyon genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değer karşılaştırmalarında sadece CYP2C19*2 ve CYP2C19*17 polimorfizmleri için istatistiksel fark vardı.

CYP2C19*2 (G681A) polimorfizmi GG, GA ve AA genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değerlerini karşılaştırdığımızda hem PRU ($p<0,001$) hem de % inhibisyon değerleri ($p<0,001$) arasında yüksek fark bulduk (Bkz. Tablo 4.8). AA ve GA genotipleri GG genotipine göre istatistiksel olarak yüksek PRU ile düşük % inhibisyon değerine sahipti. Bu bulgu, A allelinin klopidogrel antitrombosit aktivitesini düşürücü bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. CYP2C19*2 polimorfizmi A allel taşıyıcılarının atasal genotipe göre PRU ve % inhibisyon değerleri bakımından yüksek farka sahip olmaları ilk analizimizin bulgularını da doğrulamaktadır. Diğer bir ifade ile ilk analizimizde klopidogrel tedavisine cevap durumunu belirlemek için kullandığımız PRU sınır değerinin ($PRU \leq 208$) güvenilirliğini bize göstermektedir.

Kreutz ve ark. CYP2C19*2 polimorfizmi taşıyıcıları ile atasal genotipe sahip olanların PRU ve % inhibisyon değerlerini karşılaştırdıklarında bizim çalışmamıza

benzer şekilde istatistiksel farklar bulmuşlar. CYP2C19*2 polimorfizmi A alleli taşıyıcılarının atasal genotipe göre yüksek PRU ($p=0,027$) ile düşük % inhibisyonu ($p=0,013$) değerine sahip olduklarını belirlemişler. Kreutz ve ark.'nın çalışmasına göre bizim sonuçlarımızdaki istatistiksel farkların daha yüksek olduğu görülmektedir (61).

Shuldiner ve ark.'da perkütan koroner girişim sonrası klopidogrel kullanan 227 hastanın trombosit fonksiyonları ile CYP2C19*2 polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırmışlar. CYP2C19*2 polimorfizminin düşük klopidogrel tedavi etkinliği ile ilişkili olduğunu belirlemişler ($p=0,02$) (106). Sonuç olarak, CYP2C19*2 polimorfizminin klopidogrel aktivitesini düşüren bir etkiye sahip olduğunu vurgulayan çalışmaları Türk toplumunda yürütülen bir araştırma olarak doğrulamış olduk.

CYP2B6, klopidogrel metabolizmasının her iki basamağında da görev alan bir karaciğer enzimidir (Bkz. Şekil 2.8). Bu nedenle, Mega ve ark. CYP2B6 geni üzerinde enzimin fonksiyonunu değiştirebilecek bir varyasyonun klopidogrel metabolizmasını etkileyebileceğini düşünerek bu ilişkiyi araştırmışlar. En az bir kopyasında CYP2B6*9 (rs3745274) varyasyon alleleline sahip hastalardaki kardiyovasküler olay durumunu, bu allele sahip olmayanlardaki kardiyovasküler olay durumu ile karşılaştırdıklarında istatistiksel bir fark bulmamışlar ($p=0,78$). Biz ise kardiyovasküler olay durumu yerine CYP2B6*9 (rs3745274) varyasyon genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değerlerini karşılaştırdık. Herhangi bir istatistiksel fark bulamayarak Mega ve ark.'nın kardiyovasküler olaylar ile ilişkilendirdiği bulgularını desteklemiş olduk. Çalışma sonuçlarına bakıldığında, CYP2B6 enziminin klopidogrel metabolizmasının her iki basamağında görev almasına karşın aktif metabolit oluşum oranını etkilemediği düşünülebilir.

Simon ve ark. Fransa'da yürüttükleri çalışmalarında akut miyokard enfarktüs ile başvuran ve klopidogrel tedavisi alan 2208 hastayı değerlendirmişler. Bu hastalarda klopidogrel barsaktan emilimi (ABCB1), metabolik aktivasyonu (CYP3A5 ve CYP2C19) ve biyolojik aktivitesi (P2Y12 ve ITGB3) ile ilgili genlerdeki allelik varyasyonların bir yıl izlenim sonundaki kardiyovasküler ölüm riski ile ilişkisini analiz etmişler. P2Y12, ITGB3 ve CYP3A5 genlerinin hiçbirinde kötü sonlanım riski ile ilişkili bir varyasyon tespit etmemişler. Bununla birlikte, Simon ve ark. ABCB1 geninde

iki varyasyon alleleline sahip hastaların (3435 nükleotid pozisyonunda TT) bir yıl süresince atasal tip genotipli hastalara göre (3435 nükleotid pozisyonunda CC) yüksek oranda kardiyovasküler olaya sahip olduğunu rapor etmişler. Perkütan koroner girişim sonrası, CYP2C19 geninin her iki allelinde fonksiyondan yoksun alleli (CYP2C19*2, *3, *4 ve *5) taşıyanların sahip olduğu kardiyovasküler olayların taşımayanlara göre 3,58 kat fazla olduğunu bildirmişler (%95 Güven Aralığı, 1,71-7,51) (112).

Angiolillo ve ark. koroner trombozda önemli bir rol oynadığı düşünülen ITGB3 (PIA, GPIIIa) (T→C, rs5918) polimorfizmini perkütan koroner sonrası yükleme dozu (300 mg) klopidogrel alan hastalarda GPIIb/IIIa aktivasyonu ve antitrombosit etki ile karşılaştırmışlar. PIA2 alleli taşıyanların (TC, CC) yüksek seviyede GPIIb/IIIa aktivasyonuna (p=0,05) ve düşük bir antitrombosit etkiye (p<0,05) sahip olduklarını rapor etmişler (5). Simon ve ark. bu çalışmayı referans olarak ITGB3 (T→C, rs5918) polimorfizmini kardiyovasküler ölüm riski ile ilişkisini analiz ettiklerinde anlamlı bir istatistiksel fark bulamamışlar (112). Bizim çalışmamızda ise, ITGB3 (T→C, rs5918) polimorfizm genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değerleri karşılaştırıldığında Simon ve ark.'nın sonuçlarına benzer şekilde istatistiksel bir fark yoktu (Bkz. Tablo 4.5, Tablo 4.10). Angiolillo ve ark. gibi antitrombosit etki ile karşılaştırma yapmamıza rağmen farklı sonuç almamız hasta kapasitesinden kaynaklanabilir. Çünkü, Angiolillo ve ark.'nın bulduğu istatistiksel fark 38 hasta üzerinde yapılmış bir çalışma olması nedeniyle kısıtlı bir güvenilirliğe sahiptir.

Simon ve ark. CYP2C19 geninde CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*4, CYP2C19*5 ve CYP2C19*17 varyasyon genotiplerini analiz ederek bir yıllık gözlem sonundaki kardiyovasküler olaylar ile karşılaştırmışlar. Fakat, hiçbir varyasyon genotipinin kardiyovasküler olaylar ile ilişkisini istatistiksel olarak belirleyememişler. Kardiyovasküler bir olay yaşamayanlarda en az bir kopya CYP2C19*2 varyasyonu alleleline sahip bireylerin oranı yaklaşık olarak %28 iken, kardiyovasküler olay yaşayanlarda bu oranın %25 olduğunu belirlemişler. En az bir kopya CYP2C19*3 varyasyon alleleline sahip bireyler kardiyovasküler olay yaşayanlarda bulunmazken, yaşamayanlarda %1'in altında olduğu tespit edilmiş. En az bir kopya CYP2C19*4 varyasyon alleleline sahip olanların her iki grupta %1 oranında bulunduğu, CYP2C19*5

varyasyon allelini ise 2208 hasta içerisinde sadece bir kişinin taşıdığı belirlenmiş. CYP2C19*17 varyasyon allelini taşıyanların ise her iki grupta ortalama olarak %30 seviyesinde olduğu rapor edilmiş (112).

Simon ve ark., CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*4 ve CYP2C19*5 varyasyon allellerini birlikte değerlendirdiklerinde ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulmuşlar ($p=0,045$) (112). Bizim çalışmamızda ise CYP2C19*2 varyasyon allelinin en az bir kopyasını taşıyan bireyler klopidogrel tedavisine cevap vermeyen hastalar içerisinde yaklaşık olarak %48 seviyesindeydi. Bu oran klopidogrel tedavisine cevap veren hastalara göre yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,001$). Simon ve ark.'nın CYP2C19*3 varyasyon alleli için tespit ettiği oran, bizim bildirdiğimiz orana çok yakındı. Fakat, Fransız toplumunda yaptıkları bu çalışmada en az bir kopya CYP2C19*4 ve CYP2C19*5 varyasyonu allellerine sahip birey frekansı %1 seviyelerinde iken bizim çalışmamızda bu varyasyon allellerine sahip birey yoktu (Bkz. Tablo 4.5).

Simon ve ark. ABCB1 (C3435T) polimorfizmi allel frekansının kardiyovasküler olay yaşayan bireylerde yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak farklı olduğunu bulmuşlar ($p=0,04$) (112). Biz ise ABCB1 (C3435T) polimorfizmi genotiplerinin frekanslarını klopidogrel tedavisine cevap veren ve tedaviye cevap vermeyen olarak karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak fark bulamadık ($p=0,667$) (Bkz. Tablo 4.5). Fakat, ABCB1 (C3435T) polimorfizmi genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değerlerini karşılaştırdığımızda istatistiksel anlamlı farklar olmamasına rağmen atasal genotip CC'ye göre CT ve TT genotipinin PRU değer ortalamalarında artış ($p=0,694$), % inhibisyon değer ortalamalarında ise azalış ($p=0,693$) göze çarpmaktaydı. Hasta sayımızı artırdığımız takdirde bu farkın istatistiksel anlamlılığa dönüşebileceği ileri sürülebilir. Bu bulgu, ABCB1 (C3435T) polimorfizminin klopidogrel direncinden ziyade klopidogrel antitrombosit aktivitesine etkisinin bulunduğu işaret etmektedir. Bizim çalışmamızda klopidogrel farmakodinamik sonucuna göre, Simon ve ark.'nın çalışmasında ise klinik sonuca göre ilişkilendirme yapılmıştır. Bu nedenle, klopidogrel direncini belirlemede farmakokinetik bulgularında eklenerek hepsinin birlikte değerlendirildiği çalışmalara ihtiyaç vardır.

Tiroch ve ark. Almaya’da akut miyokardiyal enfarktüsle 928 hasta üzerinde yürüttükleri çalışmalarında ABCB1 (C→T) T, CYP2C19*2 (G→A) A ve CYP2C19*17 (C→T) T allellerinin birincil (yeniden koronerde tıkanma meydana gelmesi) ve ikincil (ölüm ve miyokardiyal enfarktüs) sonlanım noktaları ile ilişkisini incelemişler. CYP2C19*17 polimorfizminin T allelini taşıyan hastalarda artmış klopidogrel aktivasyonu ile birlikte birincil sonlanım insidansında % 37’lik ($p=0,002$) ve ikincil sonlanım insidansında ise %22’lik bir nispi azalma ($p=0,04$) olduğunu tespit etmişler. ABCB1 (C→T) T ve CYP2C19*2 (G→A) A allellerinde ise sonlanım noktaları ile ilgili bir ilişki bulamamışlar. Böylelikle, CYP2C19*17 polimorfizmi T alleli taşıyıcılarının klopidogrel’in artmış bir aktivitesine sahip olduklarını bildirmişler (123).

Frere ve ark. Fransa’da akut koroner sendromlu 598 hasta üzerinde yürüttükleri çalışmalarında CYP2C19*4, CYP2C19*5, CYP2C19*6 ve CYP2C19*17 varyasyonlarının trombositlerin klopidogrel’e cevabına olan etkisini araştırmışlar. Genotiplerin trombosit reaktivitelerini karşılaştırarak bu etkiyi belirlemeyi hedefledikleri çalışmalarında CYP2C19*5 varyasyon alleline sahip birey tespit edememişler. CYP2C19*4 ve CYP2C19*6 varyasyon allellerine sahip hastaların oranlarının ise sırasıyla %1,3 ve %0,2 olduğunu bildirmişler (32). Türk hastalarda tespit edemediğimiz CYP2C19*4 varyasyon allelinin Fransa toplumunda %1’in üzerinde olduğu görülmektedir. FDA tarafından nadir olarak bildirilen bu varyasyonların daha çok Avrupa toplumlarında bulunduğu söylenebilir. Türk toplumunu yansıtan bizim bulgularımızda CYP2C19*17 tek nükleotid polimorfizmi alleline sahip hastaların oranı %32 seviyesinde iken Ferre ve ark.’nın Fransa toplumunda yürüttükleri çalışmalarında bu oranı %36’ydı (32). CYP2C19*17 polimorfizminin sıklığı bakımından sonuçlarımızın Fransa toplumuna yakın olduğu görülmektedir.

Ferre ve ark. diğer varyasyonların nadir bulunmasından dolayı sadece CYP2C19*17 (C806T) polimorfizmi genotiplerinin trombosit reaktivitelerini karşılaştırabilmişler. CT ve TT genotiplerinin atasal genotip olan CC’ye göre düşük trombosit reaktiviteye sahip olduğunu tespit etmişler ($p=0,007$) (32). Biz ise hasta grubumuzda TT genotipini barındıran sadece 4 hasta bulunduğundan TT genotipli hastaları değerlendirme dışı bırakarak CT ve TT genotipli hastaların PRU ve %

inhibisyon değerlerini karşılaştırdık. CT genotipinin PRU değer ortalaması CC genotipine göre daha düşük ($p=0,036$), % inhibisyon değer ortalaması ise CC genotipine göre daha yüksek ($p=0,025$) (Bkz. Tablo 4.9). Bulduğumuz bu sonuç Tiroch ve ark. ile Ferre ve ark.'nın bulgularını doğrulamakta, CYP2C19*17 polimorfizmi T allelinin klopidogrel antitrombosit aktivitesini güçlendirici etkisine işaret etmektedir. Klopidogrel aktivitesini düşürücü etkiye sahip olduğu bildirilen CYP2C19*2 ve *3 varyasyonlarına sahip hastaları dışlayarak aynı genotiplerin PRU ve % inhibisyon değerlerini karşılaştırdığımızda ise istatistiksel fark bulamadık (Bkz. Tablo 4.10). Bunun nedeni, hasta sayısının 223'den 161'e düşmesinden ve daha az hasta üzerinde değerlendirme yapılmış olmasından kaynaklanabilir. CYP2C19*2 ve *3 varyasyon allellerini barındırmayan hastaları içeren daha yüksek hasta kapasiteli çalışmalarda daha net istatistiksel sonuçlar elde edilebilir. CYP2C19*17 polimorfizmi T allelinin CYP2C19*2 polimorfizmi A allele göre ters etkiye sahip olması klopidogrel tedavisine cevapta farklı sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilir. Bu durum, klopidogrel direnci ile ilişkili bulduğumuz CYP2C19*2 polimorfizmini tek başına genotiplendirmenin direnç tespitinde yanılıtcı olabileceğini göstermektedir.

CYP3A4 enziminin metabolik aktivitesinin klopidogrel tedavisine cevap değişkenliği ile ilişkili olduğu, trombosit agregasyon ve enzim aktivite karşılaştırmaları ile gösterilmişti. Klopidogrel tedavisi sonrası bireyler arasında trombosit inhibisyonundaki farklılığın CYP3A4 enziminin metabolik aktivitesi ile korelasyon içinde olduğu tespit edilmişti (64). Angiolillo ve ark., bu bulgudan yola çıkarak planladıkları çalışmalarında trombositlerin aktivasyonunda görev alan GP IIb/IIa reseptörü aktivitesini ve trombosit agregasyonunu CYP3A4*1B, CYP3A4*3, IVS7+258A→G, IVS7+894C→T ve IVS10+12G→A varyasyonları ile karşılaştırmışlar. Sadece CYP3A4 (IVS10+12G→A) polimorfizmi için istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit etmişler. Bu polimorfizm allelini taşıyan hastaların daha düşük GP IIb/IIa reseptörü aktivitesine ($P<0,025$), dolayısıyla artmış trombosit inhibisyonuna sahip olduğunu ($p=0,006$), fakat trombosit agregasyon profilinde istatistiksel bir farkın bulunmadığını bildirmişler (6).

En az bir kopyasında CYP3A4 (IVS10+12G→A) polimorfizm allelini taşıyan bireylerin oranı İspanyol toplumunda yürütülen Angiolillo ve ark.'nın çalışmasında ortalama olarak %20 iken bizim çalışmamızda %27 seviyesindeydi (6). Bu bulgulara göre CYP3A4 (IVS10+12G→A) polimorfizmi sıklığı bakımından Avrupa toplumuna yakın olduğumuz söylenebilir.

CYP3A4 (IVS10+12G→A) polimorfizm genotiplerinin hem PRU değerlerini hem de % inhibisyon değerlerini karşılaştırdığımızda istatistiksel bir fark bulamadık (Bkz. Tablo 4.9). Fonksiyonsuz varyasyon allelleri CYP2C19*2 ve *3'e sahip hastaları dışlayarak aynı karşılaştırmayı yaptığımızda ise yine istatistiksel fark yoktu (Bkz. Tablo 4.10). Bulgularımız CYP3A4 (IVS10+12G→A) polimorfizminin klopidogrel antitrombosit aktivitesi ve trombosit reaktivitesi üzerine bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Angiolillo ve ark.'nın 82 hasta ile yürüttükleri çalışmalarının hasta kapasitesine baktığımızda bizim çalışmamızın güvenilirlik değerinin yüksek olduğu söylenebilir. Bununla birlikte, Angiolillo ve ark.'nın çalışması CYP3A4 (IVS10+12G→A) polimorfizminin moleküler anlamda tüm yönleriyle klopidogrel antitrombosit aktivitesi üzerine etkisini incelemesi açısından önemli bir değere sahiptir.

Jinnai ve ark., Angiolillo ve ark.'nın çalışmasından yola çıkarak Japon toplumunda CYP3A4 (IVS10+12G>A) polimorfizmi genotiplerini trombosit agregasyon inhibisyonu değerleri ile karşılaştırmışlar. Bizim çalışmamıza benzer şekilde, GG ve GA genotipleri arasında trombosit agregasyon inhibisyonu değeri bakımından istatistiksel anlamlı bir fark bulamamışlar ($p=0,26$) (57). Böylelikle, Jinnai ve ark.'nın çalışmasını daha geniş bir hasta kapasitesi ile doğrulamış olduk.

Klopidogrel tedavisine cevapsızlıkta rol oynadığı düşünülen genetik faktörlerin farklı çalışmalarda farklı sonuçlarının görülmesi araştırmacıları klopidogrel metabolizmasındaki yeni arayışlara sürüklemiştir. Bouman ve ark., 2011 yılında in vitro metabolomik profilleme tekniklerini kullanarak yaptıkları çalışmada, PON1'in klopidogrel bioaktivasyonu için önemli olduğunu ilk olarak ileri sürmüşler, PON1 Q192R polimorfizminin ise klopidogrel aktif metabolit oluşum oranını belirlediğini rapor etmişlerdir (15). Buna karşılık, Sibbing ve arkadaşları 2011 yılının Nisan ayında yayınladıkları makalelerinde klopidogrel ile tedavi edilen hastalarda PON1 Q192R

polimorfizminin klopidogrelin antitrombosit aktivasyonunu ve hastalardaki stent trombozunu etkilemediğini bildirmişlerdir (108).

Li ve ark. idame doz klopidogrel kullanan 180 Çinli hasta üzerinde yürüttükleri çalışmalarında PON1 Q192R genotiplerinin trombosit inhibisyonlarını karşılaştırarak birkaç ay önce yayınladılar. Çalışmalarında QR ve RR genotiplerini taşıyan bireylerin daha düşük trombosit inhibisyonuna sahip olduğunu bildirmişler ($p=0,01$) (68). Buna karşın, Kreutz ve ark. karışık etnik kökene sahip 150 hastayı değerlendirdikleri çalışmalarında VerifyNow P2Y12 testi ile PON1 Q192R polimorfizmi genotiplerinin trombosit reaktivitesini (PRU) ve % inhibisyonunu karşılaştırmışlar, bizim bulgularımıza benzer şekilde istatistiksel fark bulamamışlar (61). Hulot ve ark. ise ek olarak PON1 L55M polimorfizmi genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değerlerini 106 hastada karşılaştırmışlar, istatistiksel anlamlı bir fark tespit etmemişler (53).

Bouman ve ark.'nın PON1 enziminin klopidogrel aktivitesi üzerine etkisi konusundaki ilk raporundan bu zamana kadar yukarıdaki çalışmalar gibi birbiriyle örtüşmeyen bulgular elde edilmiştir. Biz de PON1 enzimi konusundaki fikirlerin netlik kazanması, bizden önceki bulguları farklı ve geniş ölçekli bir kohort çalışma ile doğrulamak adına PON1 Q192R ve PON1 L55M polimorfizmlerin klopidogrel direnci üzerine etkisini araştırdık. 223 hastayı ilk önce klopidogrel tedavisine cevap durumuna göre gruplandırıp bu polimorfizm genotiplerinin frekanslarını karşılaştırdığımızda istatistiksel anlamlı fark bulamadık (Bkz. Tablo 4.5). Bu ilk bulgumuz, Sibbing ve ark.'nın çalışmasına benzer şekilde PON1 Q192R ve PON1 L55M polimorfizmlerinin klopidogrel direnci ile ilişkisinin olmadığını göstermektedir. Daha sonra, PON1 Q192R ve PON1 L55M polimorfizmi genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değerlerini karşılaştırarak yaptığımız analizlerde ise yine istatistiksel anlamlı bir fark yoktu (Bkz. Tablo 4.9). Bu polimorfizmlerin klopidogrel antitrombosit aktivitesine üzerine etkisinin olmadığına işaret eden bu sonucumuz Kreutz ve ark. (61) ile Hulot ve ark. (53)'nin çalışmalarını doğrular nitelikteydi.

Klopidogrel metabolizmasında ve aktivitesinde birçok proteinin görev alması ve her birinin kendi içinde genetik varyasyon göstermesi genetik varyasyonların birbirlerinin etkilerini örtebileceğini akla getirmektedir. Bu nedenle, fonksiyonsuz

varyasyon allelleri CYP2C19*2 ve *3'e sahip hastaları dışlayarak PON1 Q192R ve PON1 L55M polimorfizm genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değerlerini karşılaştırdığımızda yine istatistiksel fark bulamadık (Bkz. Tablo 4.10). Klopidoğrel direnci üzerine PON1 enziminin etkisinin olduğunu ilk ortaya atan Bouman ve ark., in vitro ortamda mikrozomal ekspresyon sistemlerini ve stent trombozunu karşılaştırarak bu sonuca ulaşmışlardı. Bu bulgular moleküler ve klinik anlamda önemli olmakla birlikte klopidoğrel sonrası trombosit reaktivite üzerine etkiyi tam yansıtmamaktadır. Sonuç olarak, bizim bulgularımız PON1'in klopidoğrel antitrombosit aktivitesi üzerine etkisinin olmadığını rapor eden diğer çalışmaları destekleyerek Türk hastalarda önemli bir sonucu ortaya koymaktadır.

Klopidoğrel antitrombosit aktivitesi üzerine etkisi ile istatistiksel olarak ilişkili bulduğumuz CYP2C19*2 ve CYP2C19*17 polimorfizmlerinin haplotip analizini yaparak bulgularımızı hem doğrulamak hem de birbirlerini etkileyip etkilemediklerini belirlemek istedik. Çünkü CYP2C19*2 polimorfizmi klopidoğrel aktivitesini düşürücü etki gösterirken CYP2C19*17 polimorfizmi artırıcı etki göstermişti. Haplotip analizi sonuçlarımız da genotip karşılaştırma bulgularımızı doğruladı. CYP2C19*2 polimorfizmi A allelinin PRU değerini yükselttiği, % inhibisyon değerini ise düşürdüğü tespit edildi. Bu etkiye zıt şekilde, CYP2C19*17 polimorfizmi T allelinin PRU değerini düşürdüğü, % inhibisyon değerini ise yükselttiği belirlendi. Haplotipler arasında istatistiksel açıdan en yüksek fark GG-CT haplotipi ile GA-CC haplotipi arasında bulundu ($p < 0,001$). GA-CC haplotipinde A allelinin bulunması PRU değerini artırırken T allelinin bulunmaması bu artışı ikiye katlamaktadır. Aynı şekilde, A allelinin varlığı % inhibisyon değerini düşürürken T allelinin yokluğu bu düşüşe bir kat daha destek vermektedir. Diğer haplotiplerin PRU ve % inhibisyon karşılaştırmalarında da bu iki allelin varlığına veya yokluğuna göre fark oluştuğu belirlenmiştir (Bkz. Tablo 4.11 ve Tablo 4.12).

Holmes Jr ve ark. 2010 yılında Amerikan Kardiyoloji Koleji Vakfı (ACCF) ve Amerikan Kalp Cemiyeti (AHA) adına klinik bir rapor yayınladı. Bu raporun temel konusu, 12 Mart 2010 tarihli Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA)'nun ciddi uyarısıydı. Holmes Jr ve ark., klopidoğrel direncinin CYP2C19 genindeki

polimorfizmlerden kaynaklandığını ve bu direncin hastalardaki durumunun tespit edilmesi gerektiğini bildiren FDA'nın uyarısını güncel çalışmalar ile birlikte tüm yönleriyle ele almışlar. Bu raporun sonucu olarak, CYP2C19 polimorfizmlerinin klopidogrel antitrombosit aktivitesindeki değişkenliğin yaklaşık olarak %12'sinden sorumlu olduğunu, fakat perkütan koroner girişim geçiren akut koroner sendromlu hastalardaki fonksiyondan yoksun CYP2C19 genetik polimorfizmlerin oranının %12 ile %20 arasında değiştiğini bildirmişler. CYP2C19 polimorfizmleri dışında genetik ve genetik olmayan faktörlerin de bu değişkenlikte rol oynadığını rapor etmişler. Bu nedenle, antrombosit tedavi alan hastalarda oluşabilecek kardiyovasküler olayları tahmin etmek için geleneksel demografik, klinik, protokol ile ilgili risk faktörlerine, genetik ve biyolojik bilgilere dayanan küresel bir risk değerlendirme skorunun geliştirilmesi gerektiğini bildirmişler (114). Çalışmamızın bulguları da Holmes Jr ve ark. çıkardığı sonucu doğrular nitelikteydi. En az bir kopyasında klopidogrel aktivitesini düşürücü etkiye sahip allelleri (CYP2C19*2 ve *3) taşıyan hastalarımızın oranı %27,8 iken klopidogrel tedavisine cevap vermeyen hastalarımızın oranı %30,9'du (Bkz. Tablo 4.1 ve Tablo 4.5) CYP2C19*2 polimorfizmi dışında klopidogrel direnci ile ilişkisini tespit ettiğimiz varyasyon bulunmadığına göre klopidogrel tedavisine cevapsızlıkta başka faktörlerin de rol oynadığını veya varyasyonların birbirlerinin etkilerini nötralize ettiği söylenebilir. Çünkü çalışmamızın diğer önemli bulgusu CYP2C19*17 polimorfizminin klopidogrel antitrombosit aktivitesini artırıcı etki göstermesiydi. Bu nedenle, klopidogrel direncinin ortaya çıkarılmasında genetik testlerin tek başlarına rutin olarak kullanımının uygun olmadığı, ancak en iyi ilaç tedavi yönteminin belirlenmesine ışık tutacağı açıktır. Perkütan koroner girişim sonrası klopidogrel tedavisi almak zorunda kalan hastalarda trombosit reaktivite sonuçlarının takip edilmesi ve kardiyovasküler olaylar ile birlikte klopidogrel direncini etkileyebilecek bütün faktörlerin birlikte değerlendirilmesi tedavi sürecinde en uygun yolun bulunmasına yardımcı olacaktır.

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı'nın 2012 sağlık istatistikleri yılı mortalite raporlarına bakıldığında iskemik kardiyovasküler hastalıkların ne kadar yüksek bir paya sahip olduğu görülmektedir. Bu raporda, 2012 yılında Türkiye'de ölüm nedenlerinin dağılımı ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and

Related Health Problems, 1999 sürümü) ana tanı gruplarına göre sınıflandırılmış, iskemik kardiyovasküler hastalıkların içinde bulunduğu dolaşım sistemi hastalıkları %37,93 oranla ilk sırada gösterilmiştir. Dolaşım sistemi hastalıklarından sonra ölüm nedeni olarak %21,58 oranla kanser hastalıkları gelmektedir (52). Ülkemizde böyle bir yüksek mortaliteye sahip hastalığın ilaç tedavisinde en önde gelen antitrombosit ajanlardan birisi olan klopidogrel, çalışmamızdaki hastaların %30,9'unda tedavi yetersizliğine neden olması ciddi bir problem olarak durmaktadır. Genetik faktörlerin baş aktör olarak rol oynadığı klopidogrel tedavi yetersizliği veya direnci Türk toplumunda çok az araştırılmıştır. Tespit ettiğimiz bulguların bu alandaki eksikliğin giderilmesine destek olarak antitrombosit tedavisinde yeni ufuklara ışık tutacağını ümit ediyoruz.

Amerika ve Avrupada klopidogrel direncinin üstesinden gelebilmek için bizim de burada bahsettiğimiz gibi birçok çalışma yapılmış ve hala yapılmaya devam edilmektedir. Bu çalışmaların sonucu olarak, karaciğerde daha az basamakta metabolize olan ve daha hızlı etki gösteren 3. nesil antitrombosit ajanlar prasugrel ve tikagrelor faz çalışmalarını tamamlayarak kullanıma sunulmuştur. Ülkemizde ise yakın zaman önce Sağlık Bakanlığı tarafından ruhsatlandırılarak geri ödeme listesine alınan bu ilaçların majör kanama riskleri içerdiği yeni çalışmalar ile ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak, klopidogrel direncine çözüm olarak sunulan yeni jenerasyon ilaçların beraberinde ölümcül sonuçlar doğuran yeni problemler getirdiği görülmektedir. Bu nedenle, daha uzun süre klopidogrel'in yaygın olarak kullanılacağı bir gerçektir.

Sonuç olarak, antitrombosit bir ajan olan ve bireyler arasında tedavi farklılıkları sonucunu doğuran klopidogrel'in antitrombosit aktive durumunun takip edilmesi bir zorunluluk olarak durmaktadır. Yeni nesil ajanlar kullanıma sunulmuş olsa bile, araştırmalar ile doğrulanmış bu ajanlardaki majör kanama riskleri trombosit reaktivite sonuçlarının hastalarda takibinin gerekliliğini göstermektedir (110). Perkütan koroner girişim sonrası antitrombosit tedavi zorunluluğu yaşayan hastalarda yüksek ve düşük trombosit reaktivitesinin ölümcül sonuçlara neden olacağı bir gerçektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Perkütan koroner girişim sonrası en az 7 gün düzenli olarak standart doz (75 mg/gün) klopidogrel kullanan 223 hastamızın trombosit reaktiviteleri için PRU, trombosit inhibisyonları için % inhibisyon değerlerini VerifyNow P2Y12 testi ile belirledik. En son güncellenen test klavuzuna ve literatürdeki güncel makalelere göre PRU değeri 208'den büyük hastaları klopidogrel tedavisine cevap vermeyenler (klopidogrele dirençli), 208'e eşit veya küçük olan hastaları klopidogrel tedavisine cevap verenler (klopidogrele dirençsiz) olarak nitelendirdik. Sonuçta, çalışmaya dahil ettiğimiz hastaların %30,9'unu klopidogrele dirençli, %69,1'ini ise klopidogrele dirençsiz olarak belirledik. Türk hastalarda %30,9'luk klopidogrel direnç durumu, ölümle sonuçlanan tromboz kaynaklı iskemik olaylar düşünüldüğünde önlem alınması gereken ciddi bir problem olarak görünmektedir.

Klopidogrel cevabını etkileyebilecek genetik olmayan faktörler olarak demografik ve klinik özellikleri, klinik parametleri ve ilaç etkileşimini araştırdık. Klopidogrel tedavisine cevap veren ve tedaviye cevap vermeyen hasta grupları arasında sadece yaş bakımından istatistiksel fark bulduk. Klopidogrele dirençli hastalarda yaş ortalamasının anlamlı düzeyde yüksek olduğunu belirledik. Bu bulgu, ileri yaştaki hastalarda klopidogrel direnç takibinin daha gerekli olduğuna işaret etmektedir.

Klopidogrel direncinde ilaç etkileşiminin rol oynadığı önceden rapor edilmiş olmasına rağmen bizim çalışmamızda istatistiksel anlamlı bir ilişki tespit edilmedi. Farklı ilaçlar kullanan daha yüksek sayıdaki hasta grubunda istatistiksel anlamlı sonuçlar elde edilebilir.

Genetik varyasyonların rolünü analiz ettiğimizde CYP2C19*2 (G681A) (rs4244285) tek nükleotid polimorfizmi ile klopidogrel direnci arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulduk. Hem PRU sınır değerine göre gruplandırdığımız hastaların CYP2C19*2 polimorfizmi genotip ve allel frekansları arasında ($p < 0,001$), hem de aynı genotip ve allellerin PRU, % inhibisyon değerleri arasında aynı seviyede yüksek fark belirledik ($p < 0,001$). Regresyon analizi sonuçlarımıza bakıldığında ise A alleli atasal allel olan G'ye göre 4,08 kat daha fazla risk içeriyordu. Klopidogrel direnci açısından

yüksek oranda risk barındıran CYP2C19*2 polimorfizmi A alleli taşıyıcılarının oranı %26,9'dı. Bu bulgular, klopidogrel direncine CYP2C19*2 polimorfizmi aracılığı ile genetik yatkınlığın Türk toplumunda yüksek seviyede olduğunu göstermektedir.

Klopidogrel direnci ile ilişkili bulmadığımız CYP2C19*17 (C806T) polimorfizmi genotiplerinin PRU ve % inhibisyon değerleri arasında istatistiksel anlamlı fark belirledik. CC genotipli hastalara göre CT genotipli hastaların PRU değer ortalaması daha düşük ($p=0,036$), % inhibisyon değer ortalaması ise daha yüksekti ($p=0,025$). Bulgularımız CYP2C19*17 polimorfizmi T allelinin klopidogrel antitrombosit aktivitesinin artışı ile ilişkili olduğunu gösterdi. CYP2C19*17 polimorfizmi T allelinin CYP2C19*2 polimorfizmi A allele göre ters etkiye sahip olması birbirlerini nötralize etmelerine ve beklenen sonuçların ortaya çıkmamasına neden olabileceğinden CYP2C19*17 ve CYP2C19*2 polimorfizmi haplotiplerinin PRU ve % inhibisyon değerlerini karşılaştırdık, bulgularımızı doğrular nitelikte istatistiksel farklar elde ettik. Haplotip analizi sonuçlarımız tek bir polimorfizm analizinin klopidogrel direnç teşhisinde yanıltıcı olabileceğini göstermektedir.

Diğer genetik varyasyonların klopidogrel direnci ve antitrombosit aktivite ile ilişkisini tespit edemedik. Bunun nedeni klopidogrel tedavisine yanıtta birden fazla proteinin rol oynaması ve bu proteinlerin her birinin bireysel değişkenlik göstermesi olarak açıklanabilir. Daha yüksek hasta kapasitesine sahip çalışmalar ile bu ilişkinin araştırılması gerekmektedir.

FDA tarafından toplumlarda düşük frekanslı ve klopidogrel metabolizmasından yoksun oldukları bildirilen CYP2C19*3, CYP2C19*4, CYP2C19*7 ve CYP2C19*8 varyasyonlarını tüm hasta grubumuzda analiz ettiğimizde sadece CYP2C19*3 varyasyon allelini tespit ettik. En az bir kopyasında CYP2C19*3 varyasyon allelini taşıyan bireylerin oranı %0,9'du. Batı toplumlarında nadirde olsa bulunan bu varyasyonların bizim çalışmamızdaki genotip sonuçları Türk toplumuna ait yeni bir bulgu olması açısından önemlidir.

Gelişmiş batı toplumlarında antitrombotik tedavi cevapsızlıkları konusunda ciddi önlemler alınarak uzmanları bilinçlendirme çalışmaları yürütülürken, Türkiye gibi

gelişmekte olan ülkelerde klopidogrel çok yaygın olarak kullanılmakta, fakat sınırlı sayıda ihtisas hastaneleri dışında bu sorunun takibi yapılmamaktadır. Ülkemizde trombosit reaktivitesinin ve inhibisyonunun rutin takibi yüksek maliyetli olduğu için önerilmesene bile en azından yüksek riskli hastalarda uygulanabilir. Sonuçlara göre uygun doz ve ilaç seçilebilir. Hastaya göre ilaç seçimi en ideal yaklaşımdır. Ülkemizde bu bilincin kazanılmasına çalışmamızın katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Farmakogenetik, organizmanın genetik altyapısı ile ilacın farmakokinetiği ve farmakodinamiğini ilişkilendiren yeni bir bilim dalıdır. Kolay uygulanabilen, düşük maliyetli genotipleme yöntemleri tedavinin bireyselleştirilmesinde önemli rol oynayacaktır. Bunun için, farklı genotiplerin mevcut tedaviye ve uzun dönem prognoza, farklı tedavi seçeneklerinin farklı genotiplerdeki durumuna ve genetik dışı faktörlerin tedaviye etkilerinin değerlendirilmesi şarttır. Farmakogenetik bir çalışma olarak bulgularımızın bu alana katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Adkins, S., Gan, K.N., Mody, M., La Du, B.N., 1993, Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes, *Am J Hum Genet*, 52, 3, 598-608 p.
2. Agirbasli, M., Guvenc, H., Cincin, A., 2010, [Novel agents in antiplatelet therapy], *Turk Kardiyol Dern Ars*, 38, 5, 369-378 p.
3. Allain, C.C., Poon, L.S., Chan, C.S., Richmond, W., Fu, P.C., 1974, Enzymatic determination of total serum cholesterol, *Clinical Chemistry*, 20, 4, 470-475 p.
4. Ancrenaz, V., Desmeules, J., James, R., Fontana, P., Reny, J.L., Dayer, P., Daali, Y., 2012, The paraoxonase-1 pathway is not a major bioactivation pathway of clopidogrel in vitro, *Br J Pharmacol*, 166, 8, 2362-2370 p.
5. Angiolillo, D.J., Fernandez-Ortiz, A., Bernardo, E., Alfonso, F., Sabate, M., Fernandez, C., Stranieri, C., Trabetti, E., Pignatti, P.F., Macaya, C., 2004, PIA polymorphism and platelet reactivity following clopidogrel loading dose in patients undergoing coronary stent implantation, *Blood Coagul Fibrinolysis*, 15, 1, 89-93 p.
6. Angiolillo, D.J., Fernandez-Ortiz, A., Bernardo, E., Ramirez, C., Cavallari, U., Trabetti, E., Sabate, M., Hernandez, R., Moreno, R., Escaned, J., Alfonso, F., Banuelos, C., Costa, M.A., Bass, T.A., Pignatti, P.F., Macaya, C., 2006, Contribution of gene sequence variations of the hepatic cytochrome P450 3A4 enzyme to variability in individual responsiveness to clopidogrel, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, 8, 1895-1900 p.
7. Arat Ozkan, A., 2013, [Clopidogrel resistance and genetic factors], *Turk Kardiyol Dern Ars*, 41, 5, 386-388 p.
8. Aviram, M., Hardak, E., Vaya, J., Mahmood, S., Milo, S., Hoffman, A., Billicke, S., Draganov, D., Rosenblat, M., 2000, Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities, *Circulation*, 101, 21, 2510-2517 p.
9. Ayala, T.H. and Schulman, S.P., 2006, Pathogenesis and early management of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes, *Cardiol Clin*, 24, 1, 19-35 p.
10. Aynacioglu, A.S., Cascorbi, I., Mrozikiewicz, P.M., Nacak, M., Tapanyigit, E.E., Roots, I., 1999, Paraoxonase 1 mutations in a Turkish population, *Toxicol Appl Pharmacol*, 157, 3, 174-177 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

11. Bazzano, L.A., He, J., Muntner, P., Vupputuri, S., Whelton, P.K., 2003, Relationship between cigarette smoking and novel risk factors for cardiovascular disease in the United States, *Annals of Internal Medicine*, 138, 11, 891-897 p.
12. Billecke, S., Draganov, D., Counsell, R., Stetson, P., Watson, C., Hsu, C., La Du, B.N., 2000, Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters, *Drug Metab Dispos*, 28, 11, 1335-1342 p.
13. Blatter, M.C., James, R.W., Messmer, S., Barja, F., Pometta, D., 1993, Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase, *Eur J Biochem*, 211, 3, 871-879 p.
14. Boden, W.E., O'Rourke, R.A., Teo, K.K., Hartigan, P.M., Maron, D.J., Kostuk, W.J., Knudtson, M., Dada, M., Casperson, P., Harris, C.L., Chaitman, B.R., Shaw, L., Gosselin, G., Nawaz, S., Title, L.M., Gau, G., Blaustein, A.S., Booth, D.C., Bates, E.R., Spertus, J.A., Berman, D.S., Mancini, G.B., Weintraub, W.S., Group, C.T.R., 2007, Optimal medical therapy with or without PCI for stable coronary disease, *N Engl J Med*, 356, 15, 1503-1516 p.
15. Bouman, H.J., Schomig, E., van Werkum, J.W., Velder, J., Hackeng, C.M., Hirschhauser, C., Waldmann, C., Schmalz, H.G., ten Berg, J.M., Taubert, D., 2011, Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy, *Nat Med*, 17, 1, 110-116 p.
16. Brewer, H.B., Jr., 2004, Increasing HDL Cholesterol Levels, *N Engl J Med*, 350, 15, 1491-1494 p.
17. British Cardiac Society, G., Medical Practice, C., Royal College of Physicians Clinical, E., Evaluation, U., 2001, Guideline for the management of patients with acute coronary syndromes without persistent ECG ST segment elevation. British Cardiac Society Guidelines and Medical Practice Committee and Royal College of Physicians Clinical Effectiveness and Evaluation Unit, *Heart*, 85, 2, 133-142 p.
18. Campo, G., Fileti, L., de Cesare, N., Meliga, E., Furgieri, A., Russo, F., Colangelo, S., Brugaletta, S., Ferrari, R., Valgimigli, M., Investigators, T.R., 2010, Long-term clinical outcome based on aspirin and clopidogrel responsiveness status after elective percutaneous coronary intervention: a 3T/2R (tailoring treatment with tirofiban in patients showing resistance to aspirin and/or resistance to clopidogrel) trial substudy, *J Am Coll Cardiol*, 56, 18, 1447-1455 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

19. Committee, C.S., 1996, A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee, *Lancet*, 348, 9038, 1329-1339 p.
20. Correll, M., Johnson, C.K., Ferrari, G., Brizzio, M., Mak, A.W., Quackenbush, J., Shaw, R.E., Zapolanski, A., Grau, J.B., 2013, Mutational analysis clopidogrel resistance and platelet function in patients scheduled for coronary artery bypass grafting, *Genomics*, 101, 6, 313-317 p.
21. Davies, H.G., Richter, R.J., Keifer, M., Broomfield, C.A., Sowalla, J., Furlong, C.E., 1996, The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin, *Nat Genet*, 14, 3, 334-336 p.
22. Dawkins, K.D., Gershlick, T., de Belder, M., Chauhan, A., Venn, G., Schofield, P., Smith, D., Watkins, J., Gray, H.H., Joint Working Group on Percutaneous Coronary Intervention of the British Cardiovascular Intervention, S., the British Cardiac, S., 2005, Percutaneous coronary intervention: recommendations for good practice and training, *Heart*, 91 Suppl 6, vi1-27 p.
23. De Morais, S.M., Wilkinson, G.R., Blaisdell, J., Meyer, U.A., Nakamura, K., Goldstein, J.A., 1994, Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese, *Mol Pharmacol*, 46, 4, 594-598 p.
24. de Morais, S.M., Wilkinson, G.R., Blaisdell, J., Nakamura, K., Meyer, U.A., Goldstein, J.A., 1994, The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans, *J Biol Chem*, 269, 22, 15419-15422 p.
25. Deakin, S.P. and James, R.W., 2004, Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1, *Clin Sci (Lond)*, 107, 5, 435-447 p.
26. Dorsam, R.T. and Kunapuli, S.P., 2004, Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation, *Journal of Clinical Investigation*, 113, 3, 340-345 p.
27. Draganov, D.I. and La Du, B.N., 2004, Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 369, 1, 78-88 p.
28. Ferguson, R.J., De Morais, S.M., Benhamou, S., Bouchardy, C., Blaisdell, J., Ibeanu, G., Wilkinson, G.R., Sarich, T.C., Wright, J.M., Dayer, P., Goldstein, J.A., 1998, A new genetic defect in human CYP2C19: mutation of the initiation

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- codon is responsible for poor metabolism of S-mephenytoin, *J Pharmacol Exp Ther*, 284, 1, 356-361 p.
29. Fishbein, G.A. and Fishbein, M.C., 2009, Arteriosclerosis: rethinking the current classification, *Arch Pathol Lab Med*, 133, 8, 1309-1316 p.
 30. Fossati, P. and Prencipe, L., 1982, Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide, *Clinical Chemistry*, 28, 10, 2077-2080 p.
 31. Fox, S.C., Behan, M.W., Heptinstall, S., 2004, Inhibition of ADP-induced intracellular Ca²⁺ responses and platelet aggregation by the P2Y₁₂ receptor antagonists AR-C69931MX and clopidogrel is enhanced by prostaglandin E₁, *Cell Calcium*, 35, 1, 39-46 p.
 32. Frere, C., Cuisset, T., Gaborit, B., Alessi, M.C., Hulot, J.S., 2009, The CYP2C19*17 allele is associated with better platelet response to clopidogrel in patients admitted for non-ST acute coronary syndrome, *J Thromb Haemost*, 7, 8, 1409-1411 p.
 33. Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S., 1972, Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge, *Clinical Chemistry*, 18, 6, 499-502 p.
 34. Gabriel, S., Ziaugra, L., Tabbaa, D., 2009, SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform, *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 2, Unit 2 12 p.
 35. Gaede, P., Vedel, P., Larsen, N., Jensen, G.V., Parving, H.H., Pedersen, O., 2003, Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes, *N Engl J Med*, 348, 5, 383-393 p.
 36. Geisler, T., Schaeffeler, E., Dippon, J., Winter, S., Buse, V., Bischofs, C., Zuern, C., Moerike, K., Gawaz, M., Schwab, M., 2008, CYP2C19 and nongenetic factors predict poor responsiveness to clopidogrel loading dose after coronary stent implantation, *Pharmacogenomics*, 9, 9, 1251-1259 p.
 37. Geldmacher-von, M., Lindorf, H.H., Petenyi, M., Flugel, M., Fischer, T., Hiller, T., 1973, [Genetically determined polymorphism of human serum paraoxonase (EC 3.1.1.2)], *Humangenetik*, 17, 4, 331-335 p.
 38. George, S.J. and Johnson, J., Pathogenesis of Atherosclerosis, 2010, In S. J. George & J. Johnson (Eds.), *Atherosclerosis Molecular and Cellular Mechanisms* (pp. 1-20), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

39. Gilard, M., Arnaud, B., Cornily, J.C., Le Gal, G., Lacut, K., Le Calvez, G., Mansourati, J., Mottier, D., Abgrall, J.F., Boschat, J., 2008, Influence of omeprazole on the antiplatelet action of clopidogrel associated with aspirin: the randomized, double-blind OCLA (Omeprazole CLopidogrel Aspirin) study, *J Am Coll Cardiol*, 51, 3, 256-260 p.
40. Gupta, N., Singh, S., Maturu, V.N., Sharma, Y.P., Gill, K.D., 2011, Paraoxonase 1 (PON1) polymorphisms, haplotypes and activity in predicting cad risk in North-West Indian Punjabis, *PLoS One*, 6, 5, e17805 p.
41. Guray, Y., Guray, U., Korkmaz, S., 2009, [Clopidogrel resistance], *Anadolu Kardiyol Derg*, 9, 3, 231-237 p.
42. Gurbel, P.A., Bliden, K.P., Hiatt, B.L., O'Connor, C.M., 2003, Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity, *Circulation*, 107, 23, 2908-2913 p.
43. Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J.L., Tawfik, D.S., 2004, Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes, *Nat Struct Mol Biol*, 11, 5, 412-419 p.
44. Hassett, C., Richter, R.J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J.W., Omiecinski, C.J., Furlong, C.E., 1991, Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence, *Biochemistry*, 30, 42, 10141-10149 p.
45. He, B.X., Shi, L., Qiu, J., Tao, L., Li, R., Yang, L., Zhao, S.J., 2011, A functional polymorphism in the CYP3A4 gene is associated with increased risk of coronary heart disease in the Chinese Han population, *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 108, 3, 208-213 p.
46. Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., Arnold, H.P., Brockmoller, J., Johne, A., Cascorbi, I., Gerloff, T., Roots, I., Eichelbaum, M., Brinkmann, U., 2000, Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 7, 3473-3478 p.
47. http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_man.pdf, (2013-30-11).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

48. http://www.accumentrics.com/dmdocuments/P2Y12/14464C-VN-P2Y12_Test-PI_EN.pdf, (2013-30-11).
49. <http://www.cypalleles.ki.se/>, (2013-30-11).
50. <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientandProviders/ucm203888.htm>, (2010-03-10).
51. <http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>, (2013-30-11).
52. <http://www.saglik.gov.tr/TR/dosya/1-87578/h/istaturk2012.pdf>, (2013-30-11).
53. Hulot, J.S., Collet, J.P., Cayla, G., Silvain, J., Allanic, F., Bellemain-Appaix, A., Scott, S.A.,Montalescot, G., 2011, CYP2C19 but not PON1 genetic variants influence clopidogrel pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical efficacy in post-myocardial infarction patients, *Circ Cardiovasc Interv*, 4, 5, 422-428 p.
54. Humbert, R., Adler, D.A., Disteché, C.M., Hassett, C., Omiecinski, C.J.,Furlong, C.E., 1993, The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism, *Nat Genet*, 3, 1, 73-76 p.
55. Ibeanu, G.C., Blaisdell, J., Ferguson, R.J., Ghanayem, B.I., Brosen, K., Benhamou, S., Bouchardy, C., Wilkinson, G.R., Dayer, P.,Goldstein, J.A., 1999, A novel transversion in the intron 5 donor splice junction of CYP2C19 and a sequence polymorphism in exon 3 contribute to the poor metabolizer phenotype for the anticonvulsant drug S-mephenytoin, *J Pharmacol Exp Ther*, 290, 2, 635-640 p.
56. Jacobsen, W., Kuhn, B., Soldner, A., Kirchner, G., Sewing, K.F., Kollman, P.A., Benet, L.Z.,Christians, U., 2000, Lactonization is the critical first step in the disposition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor atorvastatin, *Drug Metab Dispos*, 28, 11, 1369-1378 p.
57. Jinnai, T., Horiuchi, H., Makiyama, T., Tazaki, J., Tada, T., Akao, M., Ono, K., Hoshino, K., Naruse, Y., Takahashi, K., Watanabe, H., Kita, T.,Kimura, T., 2009, Impact of CYP2C19 polymorphisms on the antiplatelet effect of clopidogrel in an actual clinical setting in Japan, *Circ J*, 73, 8, 1498-1503 p.
58. Junge, W., Wilke, B., Halabi, A.,Klein, G., 2004, Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffe method, *Clin Chim Acta*, 344, 1-2, 137-148 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

59. Juurlink, D.N., Gomes, T., Ko, D.T., Szmítko, P.E., Austin, P.C., Tu, J.V., Henry, D.A., Kopp, A., Mamdani, M.M., 2009, A population-based study of the drug interaction between proton pump inhibitors and clopidogrel, *CMAJ*, 180, 7, 713-718 p.
60. Kaplan, Z.S. and Jackson, S.P., 2011, The role of platelets in atherothrombosis, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011, 51-61 p.
61. Kreutz, R.P., Nystrom, P., Kreutz, Y., Miao, J., Desta, Z., Breall, J.A., Li, L., Chiang, C., Kovacs, R., Flockhart, D.A., Jin, Y., 2012, Influence of paraoxonase-1 Q192R and cytochrome P450 2C19 polymorphisms on clopidogrel response, *Clin Pharmacol*, 4, 13-20 p.
62. Lamarche, B., Lemieux, I., Despres, J.P., 1999, The small, dense LDL phenotype and the risk of coronary heart disease: epidemiology, patho-physiology and therapeutic aspects, *Diabetes Metab*, 25, 3, 199-211 p.
63. Lamba, V., Lamba, J., Yasuda, K., Strom, S., Davila, J., Hancock, M.L., Fackenthal, J.D., Rogan, P.K., Ring, B., Wrighton, S.A., Schuetz, E.G., 2003, Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression, *J Pharmacol Exp Ther*, 307, 3, 906-922 p.
64. Lau, W.C., Gurbel, P.A., Watkins, P.B., Neer, C.J., Hopp, A.S., Carville, D.G., Guyer, K.E., Tait, A.R., Bates, E.R., 2004, Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance, *Circulation*, 109, 2, 166-171 p.
65. Lau, W.C., Waskell, L.A., Watkins, P.B., Neer, C.J., Horowitz, K., Hopp, A.S., Tait, A.R., Carville, D.G., Guyer, K.E., Bates, E.R., 2003, Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction, *Circulation*, 107, 1, 32-37 p.
66. Li, H.L., Liu, D.P., Liang, C.C., 2003, Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases, *J Mol Med (Berl)*, 81, 12, 766-779 p.
67. Li, L., Han, J.L., Li, H.Y., Qiao, R., Yu, H.Y., Zhang, J., Gao, W., 2013, [Clopidogrel resistance of patients with coronary artery disease and its correlation with platelet count and mean platelet volume], *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 93, 12, 916-920 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

68. Li, X., Zhang, L., Chen, X., Qu, F., Li, J., Ma, C., Yang, J., Xu, B., Wang, H., Xu, Q., Zhang, Y., Li, Y., Lu, C., Yin, T., 2013, PON1 Q192R genotype influences clopidogrel responsiveness by relative platelet inhibition instead of on-treatment platelet reactivity, *Thromb Res*, p.
69. Libby, P. and Theroux, P., 2005, Pathophysiology of coronary artery disease, *Circulation*, 111, 25, 3481-3488 p.
70. Luo, H.R., Poland, R.E., Lin, K.M., Wan, Y.J., 2006, Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C19 in Mexican Americans: a cross-ethnic comparative study, *Clin Pharmacol Ther*, 80, 1, 33-40 p.
71. Lurie, G., Wilkens, L.R., Thompson, P.J., McDuffie, K.E., Carney, M.E., Terada, K.Y., Goodman, M.T., 2008, Genetic polymorphisms in the Paraoxonase 1 gene and risk of ovarian epithelial carcinoma, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17, 8, 2070-2077 p.
72. Mackness, M.I., Arrol, S., Durrington, P.N., 1991, Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein, *FEBS Lett*, 286, 1-2, 152-154 p.
73. Mackness, M.I., Hallam, S.D., Peard, T., Warner, S., Walker, C.H., 1985, The separation of sheep and human serum "A"-esterase activity into the lipoprotein fraction by ultracentrifugation, *Comp Biochem Physiol B*, 82, 4, 675-677 p.
74. Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P.N., Connelly, P.W., Hegele, R.A., 1996, Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins, *Curr Opin Lipidol*, 7, 2, 69-76 p.
75. Mackness, M.I. and Walker, C.H., 1988, Multiple forms of sheep serum A-esterase activity associated with the high-density lipoprotein, *Biochem J*, 250, 2, 539-545 p.
76. Malinin, A., Pokov, A., Spergling, M., Defranco, A., Schwartz, K., Schwartz, D., Mahmud, E., Atar, D., Serebruany, V., 2007, Monitoring platelet inhibition after clopidogrel with the VerifyNow-P2Y12(R) rapid analyzer: the VERIFY Thrombosis risk ASsessment (VERITAS) study, *Thromb Res*, 119, 3, 277-284 p.
77. Man, M., Farmen, M., Dumauual, C., Teng, C.H., Moser, B., Irie, S., Noh, G.J., Njau, R., Close, S., Wise, S., Hockett, R., 2010, Genetic variation in metabolizing enzyme and transporter genes: comprehensive assessment in 3

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- major East Asian subpopulations with comparison to Caucasians and Africans, *Clin Pharmacol*, 50, 8, 929-940 p.
78. Mayerl, C., Lukasser, M., Sedivy, R., Niederegger, H., Seiler, R., Wick, G., 2006, Atherosclerosis research from past to present - on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow, *Virchows Archiv*, 449, 1, 96-103 p.
 79. Mazur, A., 1946, An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates, *J Biol Chem*, 164, 271-289 p.
 80. Meadows, T.A. and Bhatt, D.L., 2007, Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation, *Circ Res*, 100, 9, 1261-1275 p.
 81. Mega, J.L., Close, S.L., Wiviott, S.D., Shen, L., Hockett, R.D., Brandt, J.T., Walker, J.R., Antman, E.M., Macias, W., Braunwald, E., Sabatine, M.S., 2009, Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel, *N Engl J Med*, 360, 4, 354-362 p.
 82. Mega, J.L., Close, S.L., Wiviott, S.D., Shen, L., Hockett, R.D., Brandt, J.T., Walker, J.R., Antman, E.M., Macias, W.L., Braunwald, E., Sabatine, M.S., 2009, Cytochrome P450 genetic polymorphisms and the response to prasugrel: relationship to pharmacokinetic, pharmacodynamic, and clinical outcomes, *Circulation*, 119, 19, 2553-2560 p.
 83. Millis, M.P., 2011, Medium-throughput SNP genotyping using mass spectrometry: multiplex SNP genotyping using the iPLEX(R) Gold assay, *Methods Mol Biol*, 700, 61-76 p.
 84. Mitsios, J.V., Papathanasiou, A.I., Rodis, F.I., Elisaf, M., Goudevenos, J.A., Tselepis, A.D., 2004, Atorvastatin does not affect the antiplatelet potency of clopidogrel when it is administered concomitantly for 5 weeks in patients with acute coronary syndromes, *Circulation*, 109, 11, 1335-1338 p.
 85. Montalescot, G., Sideris, G., Meuleman, C., Bal-dit-Sollier, C., Lellouche, N., Steg, P.G., Slama, M., Milleron, O., Collet, J.P., Henry, P., Beygui, F., Drouet, L., Investigators, A.T., 2006, 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*, 48, 5, 931-938 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

86. Nabel, E.G. and Braunwald, E., 2012, A tale of coronary artery disease and myocardial infarction, *N Engl J Med*, 366, 1, 54-63 p.
87. Nakamoto, K., Kidd, J.R., Jenison, R.D., Klaassen, C.D., Wan, Y.J., Kidd, K.K., Zhong, X.B., 2007, Genotyping and haplotyping of CYP2C19 functional alleles on thin-film biosensor chips, *Pharmacogenet Genomics*, 17, 2, 103-114 p.
88. Neubauer, H., Gunesdogan, B., Hanefeld, C., Spiecker, M., Mugge, A., 2003, Lipophilic statins interfere with the inhibitory effects of clopidogrel on platelet function--a flow cytometry study, *Eur Heart J*, 24, 19, 1744-1749 p.
89. Newman, P.J., Derbes, R.S., Aster, R.H., 1989, The human platelet alloantigens, P1A1 and P1A2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing, *Journal of Clinical Investigation*, 83, 5, 1778-1781 p.
90. Nichols, M., Townsend, N., Luengo-Fernandez, R., Leal, J., Gray, A., Scarborough, P., Rayner, M., *European Cardiovascular Disease Statistics 2012*, 2012, European Heart Network, Brussels, European Society of Cardiology, Sophia Antipolis.
91. Onat, A., Aydin, M., Koroglu, B., Ornek, E., Altay, S., Celik, E., Karagoz, A., 2012, [TARF Survey 2011: mortality and performance in the long-term follow-up], *Turk Kardiyol Dern Ars*, 40, 2, 117-121 p.
92. Paniccia, R., Antonucci, E., Gori, A.M., Marcucci, R., Giglioli, C., Antonucci, D., Gensini, G.F., Abbate, R., Prisco, D., 2007, Different methodologies for evaluating the effect of clopidogrel on platelet function in high-risk coronary artery disease patients, *J Thromb Haemost*, 5, 9, 1839-1847 p.
93. Pasternak, R.C., Grundy, S.M., Levy, D., Thompson, P.D., 1996, 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*, 27, 5, 978-990 p.
94. Playfer, J.R., Eze, L.C., Bullen, M.F., Evans, D.A., 1976, Genetic polymorphism and interethnic variability of plasma paroxonase activity, *J Med Genet*, 13, 5, 337-342 p.
95. Price, M.J., Angiolillo, D.J., Teirstein, P.S., Lillie, E., Manoukian, S.V., Berger, P.B., Tanguay, J.F., Cannon, C.P., Topol, E.J., 2011, Platelet reactivity and cardiovascular outcomes after percutaneous coronary intervention: a time-dependent analysis of the Gauging Responsiveness with a VerifyNow P2Y12

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- assay: Impact on Thrombosis and Safety (GRAVITAS) trial, *Circulation*, 124, 10, 1132-1137 p.
96. Price, M.J., Berger, P.B., Teirstein, P.S., Tanguay, J.F., Angiolillo, D.J., Spriggs, D., Puri, S., Robbins, M., Garratt, K.N., Bertrand, O.F., Stillabower, M.E., Aragon, J.R., Kandzari, D.E., Stinis, C.T., Lee, M.S., Manoukian, S.V., Cannon, C.P., Schork, N.J., Topol, E.J., Investigators, G., 2011, Standard- vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention: the GRAVITAS randomized trial, *JAMA*, 305, 11, 1097-1105 p.
 97. Primo-Parmo, S.L., Sorenson, R.C., Teiber, J., La Du, B.N., 1996, The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family, *Genomics*, 33, 3, 498-507 p.
 98. Ross, R., Glomset, J., Harker, L., 1977, Response to injury and atherogenesis, *Am J Pathol*, 86, 3, 675-684 p.
 99. Sandison, A.T., 1962, Degenerative vascular disease in the Egyptian mummy, *Med Hist*, 6, 77-81 p.
 100. Savi, P. and Herbert, J.M., 2005, Clopidogrel and ticlopidine: P2Y₁₂ adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis, *Semin Thromb Hemost*, 31, 2, 174-183 p.
 101. Savi, P., Pereillo, J.M., Uzabiaga, M.F., Combalbert, J., Picard, C., Maffrand, J.P., Pascal, M., Herbert, J.M., 2000, Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel, *Thromb Haemost*, 84, 5, 891-896 p.
 102. Saw, J., Brennan, D.M., Steinhubl, S.R., Bhatt, D.L., Mak, K.H., Fox, K., Topol, E.J., Investigators, C., 2007, Lack of evidence of a clopidogrel-statin interaction in the CHARISMA trial, *J Am Coll Cardiol*, 50, 4, 291-295 p.
 103. Scheuner, M.T., 2003, Genetic evaluation for coronary artery disease, *Genet Med*, 5, 4, 269-285 p.
 104. Shenfield, G.M., 2004, Genetic polymorphisms, drug metabolism and drug concentrations, *Clin Biochem Rev*, 25, 4, 203-206 p.
 105. Shoulders-Odom, B., 2008, Management of patients after percutaneous coronary interventions, *Crit Care Nurse*, 28, 5, 26-41; quiz 42 p.
 106. Shuldiner, A.R., O'Connell, J.R., Bliden, K.P., Gandhi, A., Ryan, K., Horenstein, R.B., Dancott, C.M., Pakyz, R., Tantry, U.S., Gibson, Q., Pollin, T.I., Post, W.,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Parsa, A., Mitchell, B.D., Faraday, N., Herzog, W., Gurbel, P.A., 2009, Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy, *JAMA*, 302, 8, 849-857 p.
107. Sibbing, D., Koch, W., Gebhard, D., Schuster, T., Braun, S., Stegherr, J., Morath, T., Schomig, A., von Beckerath, N., Kastrati, A., 2010, Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement, *Circulation*, 121, 4, 512-518 p.
108. Sibbing, D., Koch, W., Massberg, S., Byrne, R.A., Mehilli, J., Schulz, S., Mayer, K., Bernlochner, I., Schomig, A., Kastrati, A., 2011, No association of paraoxonase-1 Q192R genotypes with platelet response to clopidogrel and risk of stent thrombosis after coronary stenting, *Eur Heart J*, 32, 13, 1605-1613 p.
109. Siller-Matula, J.M., Lang, I., Christ, G., Jilma, B., 2008, Calcium-channel blockers reduce the antiplatelet effect of clopidogrel, *J Am Coll Cardiol*, 52, 19, 1557-1563 p.
110. Siller-Matula, J.M., Trenk, D., Schror, K., Gawaz, M., Kristensen, S.D., Storey, R.F., Huber, K., Epa, 2013, Response Variability to P2Y12 Receptor Inhibitors: Expectations and Reality, *JACC Cardiovasc Interv*, 6, 11, 1111-1128 p.
111. Sim, S.C., Risinger, C., Dahl, M.L., Aklillu, E., Christensen, M., Bertilsson, L., Ingelman-Sundberg, M., 2006, A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants, *Clin Pharmacol Ther*, 79, 1, 103-113 p.
112. Simon, T., Verstuyft, C., Mary-Krause, M., Quteineh, L., Drouet, E., Meneveau, N., Steg, P.G., Ferrieres, J., Danchin, N., Becquemont, L., French Registry of Acute, S.T.E., Non, S.T.E.M.I.I., 2009, Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events, *N Engl J Med*, 360, 4, 363-375 p.
113. Singh, R.B., Mengi, S.A., Xu, Y.J., Arneja, A.S., Dhalla, N.S., 2002, Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process, *Exp Clin Cardiol*, 7, 1, 40-53 p.
114. Society for Cardiovascular, A., Interventions, Society of Thoracic, S., Writing Committee, M., Holmes, D.R., Jr., Dehmer, G.J., Kaul, S., Leifer, D., O'Gara, P.T., Stein, C.M., 2010, 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*, 122, 5, 537-557 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

115. Steinberg, D. and Witztum, J.L., 1990, Lipoproteins and atherogenesis. Current concepts, JAMA, 264, 23, 3047-3052 p.
116. Stone, G.W., Witzentichler, B., Weisz, G., Rinaldi, M.J., Neumann, F.J., Metzger, D.C., Henry, T.D., Cox, D.A., Duffy, P.L., Mazzaferri, E., Gurbel, P.A., Xu, K., Parise, H., Kirtane, A.J., Brodie, B.R., Mehran, R., Stuckey, T.D., Investigators, A.-D., 2013, Platelet reactivity and clinical outcomes after coronary artery implantation of drug-eluting stents (ADAPT-DES): a prospective multicentre registry study, Lancet, 382, 9892, 614-623 p.
117. Sugiuchi, H., Uji, Y., Okabe, H., Irie, T., Uekama, K., Kayahara, N., Miyauchi, K., 1995, Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated alpha-cyclodextrin, Clinical Chemistry, 41, 5, 717-723 p.
118. Sugunraj, J.P., Palaniswamy, C., Selvaraj, D.R., Chaitanya Arudra, S.K., Sukhija, R., 2010, Clopidogrel resistance, Am J Ther, 17, 2, 210-215 p.
119. Task Force for, D., Treatment of Non, S.T.S.E.A.C.S.o.E.S.o.C., Bassand, J.P., Hamm, C.W., Ardissino, D., Boersma, E., Budaj, A., Fernandez-Aviles, F., Fox, K.A., Hasdai, D., Ohman, E.M., Wallentin, L., Wijns, W., 2007, Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes, Eur Heart J, 28, 13, 1598-1660 p.
120. Taskiran, P., Cam, S.F., Sekuri, C., Tuzun, N., Alioglu, E., Altintas, N., Berdeli, A., 2009, [The relationship between paraoxanase gene Leu-Met (55) and Gln-Arg (192) polymorphisms and coronary artery disease], Turk Kardiyol Dern Ars, 37, 7, 473-478 p.
121. Taubert, D., von Beckerath, N., Grimberg, G., Lazar, A., Jung, N., Goeser, T., Kastrati, A., Schomig, A., Schomig, E., 2006, Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption, Clin Pharmacol Ther, 80, 5, 486-501 p.
122. Thim, T., Hagensen, M.K., Bentzon, J.F., Falk, E., 2008, From vulnerable plaque to atherothrombosis, J Intern Med, 263, 5, 506-516 p.
123. Tiroch, K.A., Sibbing, D., Koch, W., Roosen-Runge, T., Mehilli, J., Schomig, A., Kastrati, A., 2010, Protective effect of the CYP2C19 *17 polymorphism with increased activation of clopidogrel on cardiovascular events, Am Heart J, 160, 3, 506-512 p.
124. Transon, C., Leemann, T., Dayer, P., 1996, In vitro comparative inhibition profiles of major human drug metabolising cytochrome P450 isozymes (CYP2C9,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- CYP2D6 and CYP3A4) by HMG-CoA reductase inhibitors, *Eur J Clin Pharmacol*, 50, 3, 209-215 p.
125. Umman, B., 2006, [Antiplatelet therapy in acute coronary syndromes without ST segment elevation], *Anadolu Kardiyol Derg*, 6 Suppl 1, 13-19 p.
 126. van Himbergen, T.M., van Tits, L.J., Roest, M., Stalenhoef, A.F., 2006, The story of PON1: how an organophosphate-hydrolysing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine, *Neth J Med*, 64, 2, 34-38 p.
 127. van Werkum, J.W., van der Stelt, C.A., Seesing, T.H., Hackeng, C.M., ten Berg, J.M., 2006, A head-to-head comparison between the VerifyNow P2Y12 assay and light transmittance aggregometry for monitoring the individual platelet response to clopidogrel in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention, *J Thromb Haemost*, 4, 11, 2516-2518 p.
 128. Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., Eggen, A., 2002, A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics, *Genet Sel Evol*, 34, 3, 275-305 p.
 129. von Beckerath, N., Taubert, D., Pogatsa-Murray, G., Schomig, E., Kastrati, A., Schomig, A., 2005, Absorption, metabolism, and antiplatelet effects of 300-, 600-, and 900-mg loading doses of clopidogrel: results of the ISAR-CHOICE (Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen: Choose Between 3 High Oral Doses for Immediate Clopidogrel Effect) Trial, *Circulation*, 112, 19, 2946-2950 p.
 130. Vorchheimer, D.A. and Becker, R., 2006, Platelets in atherothrombosis, *Mayo Clin Proc*, 81, 1, 59-68 p.
 131. Walker, C.H. and Mackness, M.I., 1983, Esterases: problems of identification and classification, *Biochem Pharmacol*, 32, 22, 3265-3269 p.
 132. Wallentin, L., James, S., Storey, R.F., Armstrong, M., Barratt, B.J., Horrow, J., Husted, S., Katus, H., Steg, P.G., Shah, S.H., Becker, R.C., investigators, P., 2010, Effect of CYP2C19 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on outcomes of treatment with ticagrelor versus clopidogrel for acute coronary syndromes: a genetic substudy of the PLATO trial, *Lancet*, 376, 9749, 1320-1328 p.
 133. Wang, T.H., Bhatt, D.L., Topol, E.J., 2006, Aspirin and clopidogrel resistance: an emerging clinical entity, *Eur Heart J*, 27, 6, 647-654 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

134. Williams, K.J. and Tabas, I., 1995, The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15, 5, 551-561 p.
135. World Health, O., 2003, The World Health report 2002, *Midwifery*, 19, 1, 72-73 p.
136. Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., McQueen, M., Budaj, A., Pais, P., Varigos, J., Lisheng, L., Investigators, I.S., 2004, Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study, *Lancet*, 364, 9438, 937-952 p.

8. ÖZGEÇMİŞ

Bireysel bilgiler

Adı Soyadı : Faruk SAYDAM
Doğum Tarihi, Yeri : 03.09.1979, SAMSUN
Uyruğu : T.C.
Medeni Durumu : Bekar
Telefon : 0 505 241 92 32
Email : faruk.saydam@gmail.com

Eğitim Durumu

İlköğretim : 1986-1991, Seyfi Demirsoy İlkokulu, Samsun
Ortaöğretim : 1991-1994, İlkadım Ortaokulu, Samsun
Lise : 1994-1998, Tülay Başaran Anadolu Lisesi, Samsun
Üniversite : 1998-2003, Fatih Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Bölümü (İngilizce)
Doktora (Bütünleşik) : 2008- ,Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık
Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Mesleki Deneyim:

2003-2007 :Gül-Med Medikal Sağlık Hizmetleri Ltd. Şti.

2009-..... :Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD.

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:

Türk Biyoloji ve Genetik Derneği

Tıbbi Genetik Derneği

Yayınlar:

Makaleler

1. **Saydam F.**, Degirmenci I., Güneş H.V., 2011, MikroRNA'lar ve Kanser, Dicle Med J, 38, 1, 113-120p.
2. Turgut Coşan D., **Saydam F.**, Ozbayer C., Doğaner F., Soyocak A., Güneş H.V., Değirmenci I., Kurt H., Üstüner M.C., Bal C., 2013, Impact of tannic acid on blood pressure, oxidative stress and urinary parameters in L-NNA-induced hypertensive rats, Cytotechnology, doi 10.1007/s10616-013-9661-4.
3. Özdemir M., **Saydam F.**, Kurt E., Değirmenci İ., Tuncel T., Çilingir O., Güneş H. V., Artan S., 2014, Is there a genetic predisposition for Turkish patients with sarcoidosis in the 329-bp region containing the BTNL2 rs2076530 polymorphism?, Turk J Med Sci, 44, doi:10.3906/sag-1306-16.

Poster Bildiriler

1. Üstüner M.C., Doğaner F., Özbayer C., Değirmenci İ., **Saydam F.**, Güneş H.V., Karaciğer Hepatositlerinde Mitokondriyal Lipid Peroksit ve Süperoksit Dismutaz Seviyeleri. XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Bildiri Kitabı s. 127-128, Bodrum, Türkiye, 28-31 Ekim 2009.
2. **Saydam F.**, Turgut C.D., Soyocak A., Doğaner F., Özbayer C., Güneş H.V., Değirmenci İ., Üstüner M.C., Kurt H., Bal C., N (omega)-nitro-L-arjinin uygulanan sıçanlarda tannik asitin sistolik kan basıncı, böbrek dokusundaki oksidatif stres ve bazı idrar parametreleri üzerine etkisi, XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Türkiye Klinikleri, Tıp Bilimleri Derg. (Supp), 31(6):130, 2011 Antalya, 27 - 30 Ekim 2011.
3. Soyocak A., Turgut C.D., Doğaner F., Özbayer C., **Saydam F.**, Değirmenci İ., Güneş H.V., Kurt H., Üstüner M.C., Bal C., Doğal Bir Bileşen olan Tannik Asit Hipertansiyonda Etkili midir?, XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, , Türkiye Klinikleri, Tıp Bilimleri Derg. (Supp), 31(6):130, Antalya, 27 - 30 Ekim 2011.
4. Sarı G., Kurt E., **Saydam F.**, Değirmenci İ., Güneş H.V., Association of the angiotensin converting enzyme (ACE) gene I/D polymorphism with sarcoidosis in Turkish patients, European Human Genetics Conference, European Journal of Human Genetics, Volume 20, Supplement 1, pp 413, Nürnberg, Germany, June 23 - 26, 2012.
5. Özbayer C., Turgut Coşan D., **Saydam F.**, Soyocak A., Doğaner F., Değirmenci İ., Güneş H.V., Kurt H., Üstüner M.C., Bal C., The Effect of Tannic Acid on Liver Damage Mediated by Chronic Nitric Oxide Inhibitor, 4nd International

Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, Cell Membranes and Free Radical Research, Volume 4, Number 1, pp 41-41, 2012, Isparta, Turkey, 2012.

6. Doğaner F., Turgut Coşan D., Özbayer C., **Saydam F.**, Soyocak A., Değirmenci İ., Güneş H.V., Kurt H., Üstüner M.C., Bal C., The Effects of Tannic Acid on Heart Tissue and Blood in Experimental Hypertension, . 4nd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, Cell Membranes and Free Radical Research, Volume 4, Number 1, pp 61-61, Isparta, Turkey, 2012.
7. Özdemir M., **Saydam F.**, Kurt E., Değirmenci İ., Tuncel T., Çilingir O., Artan S., Güneş H.V., Butyrophilin-like 2 (BTNL2) geni rs2076530 polimorfizmi sarkoidozlu Türk hastalarda genetik bir risk faktörü müdür?, 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Bildiri Özetleri Kitabı, sf 113, Bursa, Türkiye, 9-23 Aralık 2012.
8. Tuncel T., Özdemir M., Kurt E., **Saydam F.**, Çilingir O., Güneş H.V., Artan S., Değirmenci İ., Sequencing of 306 bp region including ANXA11 rs1049550 polimorphism for sarcoidosis susceptibility in Turkish Patients, European Human Genetics Conference, European Journal of Human Genetics, Volume 21, Supplement 2, pp 522, Paris, France, June 8-11, 2013.
9. Soyocak A., Kurt H., Özdemir Z., **Saydam F.**, Çalış İ.U., Kolaç U., Turgut Coşan D., Değirmenci İ., Şahin Mutlu F., Güneş H.V., Formalin indüklü pençe ödeminde tannik asidin miyeloperoksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi, XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Kongre Bildiri Özetleri Kitabı, sf 292-293, Pine Bay Otel, Kuşadası, Aydın, 27-30 Ekim 2013.
10. Çalış İ.U., Turgut Coşan D., **Saydam F.**, Kolaç U., Soyocak A., Özdemir Z., Kurt H., Güneş H.V., Şahin Mutlu F., Değirmenci İ., Monosodyum glutamat kan glukozu ve tannik asit, XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Kongre Bildiri Özetleri Kitabı, sf 344, Pine Bay Otel, Kuşadası, Aydın, 27-30 Ekim 2013.
11. **Saydam F.**, Değirmenci İ., Birdane A., Ulus T., Özbayer C., Özdemir M., Bal C., Ata N., Güneş H.V., Impact of CYP2C19 Variants on the Antiplatelet Effect of Clopidogrel in Turkish Patients with Acute Coronary Syndrome, Erişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalıklar Sempozyumu, Sempozyum Kitapçığı, sf 28, MS Baltalimanı Kemik Hastalıkları Hastanesi, İstanbul, 06-07 Aralık 2013.
12. Özbayer C., Değirmenci İ., **Saydam F.**, Üstüner D., Ak G., Üstüner M.C., Metintaş M., Güneş H.V., Divalent metal taşıyıcı 1 IVS4+44C>A polimorfizmi ve akciğer kanser riski, Erişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalıklar Sempozyumu, Sempozyum Kitapçığı, sf 18-19, MS Baltalimanı Kemik Hastalıkları Hastanesi, İstanbul, 06-07 Aralık 2013.

Projeler (araştırmacı)

1. Türk Toplumunda CYP2C19, CYP3A4, CYP2B6, ABCB1, ITGB3 ve PON1 Gen Polimorfizmlerinin Klopidoğrel'in Antitrombosit Aktivitesi Üzerine Etkileri, 20121117, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2012- Devam ediyor.
2. DNA Metiltransferaz ve Metil Bağlayan Bölge Proteinlerini Hedefleyen miRNA Gen Polimorfizmlerinin Akciğer Kanseri İle İlişkisinin Belirlenmesi, 201241020, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2012- Devam ediyor.
3. Esansiyel hipertansiyonda paraoksonaz aktivitesi ve PON1 polimorfizmleri, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2013-262, 2013-Devam ediyor.

Kongre, Kurs

1. Adli Tıp Seminerleri 2003, Fatih Üniversitesi, İstanbul, 6 Haziran 2003.
2. Programlı Hücre Ölümü Sempozyumu, İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, 9 Nisan 2008.
3. Winter School on Frontiers in Nanomedicine and Nanobiotechnology, Bilkent Üniversitesi, Ankara, 10-13 Ocak 2010.
4. II. Kök Hücre Kursu ve VI. Kök Hücre Sempozyumu, Türkiye Bilimler Akademisi, Ankara, 24-25 Haziran 2011.
5. Moleküler Biyolojide Yeni Teknolojiler Kursu, Porto Bello Hotel, Antalya, 26 Ekim 2011.
6. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Porto Bello Hotel, Antalya, 27-30 Ekim 2011.
7. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Bilgilendirme ve Eğitim Semineri, Eskişehir, 9 Ocak 2012.
8. European Human Genetics Conference 2012, Nürnberg Convention Center Ost, Nürnberg, Almanya, 23-26 Haziran 2012.
9. 4th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 26-29 Haziran 2012.
10. 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Uludağ Üniversitesi Prof. Dr. M. Mete Cengiz Kültür Merkezi, Bursa, 19-23 Aralık 2012.
11. European Human Genetics Conference 2013, Palais des Congres, Paris, Fransa, 8-11 Haziran 2013.

12. Genom Dizisinden Gen Fonksiyonuna Kursu, Pine Bay Hotel, Kuşadası, Aydın, 26 Ekim 2013.

13. XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Pine Bay Hotel, Kuşadası, Aydın, 27-30 Ekim 2013

14. Erişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalıklar Sempozyumu, Metin Sabancı Baltalimani Kemik Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, 6-7 Aralık 2013.