

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

VARFARİN KULLANAN OLGULARDA CYP2C9 VE VKORC1
GENLERİNDEKİ TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİNİN
(SNP) İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENGİN ATLI

DANIŞMAN

DOÇ. DR. M. HAMZA MÜSLÜMANOĞLU

EYLÜL 2008

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TİBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

VARFARİN KULLANAN OLGULARDA CYP2C9 VE VKORC1
GENLERİNDEKİ TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİNİN (SNP)
İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENGİN ATLI

DANIŞMAN

DOÇ. DR. M. HAMZA MÜSLÜMANOĞLU

KABUL VE ONAY SAYFASI

Engin ATLI'nın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "*Varfarin Kullanan Olgularda CYP2C9 ve VKORC1 Genlerindeki Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin (SNP) İncelenmesi*" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

06.10.2008

Üye: Prof.Dr. Sevilhan ARTAN


Üye: Doç.Dr. M.Hamza MÜSLÜMANOĞLU

Üye: Yrd.Doç.Dr. Mahmut ÖZDEMİR

Üye: Yrd.Doç.Dr. Muhsin ÖZDEMİR

Üye: Yrd.Doç.Dr. Oğuz ÇİLİNGİR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15/10/2008 tarih ve 762/3537 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof.Dr.Ferruh YÜCEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Varfarin, tromboembolik olayların tedavisinde ve önlenmesinde tüm dünyada geniş bir şekilde kullanılan oral antikoagülandır. Varfarine karşı cevap bireyler arasında çok değişkenlik göstermekte ve bu ilaca bağlı ciddi kanama olayları gerçekleşmektedir. Varfarin farmakogenetiği ile ilgili majör genler CYP2C9 ve VKORC1 genleridir. Varfarin tedavisinde genetik ve çevresel faktörlerin bir arada değerlendirilmesi tedavinin bireyselleştirilmesi ve daha güvenli bir şekilde uygulanması açısından yardımcı olmaktadır.

Bursa Uludağ Üniversitesi Kardiyoloji Ana Bilimdalı'nda tedavi görmekte olan 234 varfarin kullanan olguda bireylerarası varfarin doz değişkenliğinin belirlenmesi ve ayrıca Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Ana Bilimdalı'nın belirlemiş olduğu 200 sağlıklı bireyinde çalışmaya dâhil edilmesiyle, Türk populasyonu genotip dağılımının belirlenmesi amacıyla CYP2C9 ve VKORC1 gen polimorfizmleri PCR-RFLP yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

Çalışmamıza katılan 434 bireyde, VKORC1 geni -1639 G>A polimorfizmi genotip dağılımları G/G için %27,6, G/A için %48,4 ve A/A için %24 olarak bulunmuştur. CYP2C9 geni 430 C>T ve 1075 A>C polimorfizmlerine göre CYP2C9 genotip varyant frekansları, *1*1 frekansı %59,4, *1*2 frekansı %19,8, *1*3 frekansı %13,8, *2*2 frekansı %3,7, *2*3 frekansı %2,8 ve *3*3 frekansı ise %0,5 olarak saptanmıştır. Varfarin kullanan olgularda ortalama günlük varfarin doz miktarı ile CYP2C9 ve VKORC1 genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur. CYP2C9, VKORC1 ve yaş faktörlerinin bireylerarası varfarin doz değişkenliği üzerine %29 etkisi olduğu istatistiksel olarak saptanmıştır.

Çalışmamız, Türk populasyonunda bireylerarası varfarin doz değişkenliğinin belirlenmesi ve klinikte olguların varfarin dozaj tespitinde yardımcı genetik faktörler olarak kullanılabilmesi açısından tedavide uygulanabilirliği olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Varfarin, farmakogenetik, CYP2C9, VKORC1, PCR-RFLP

SUMMARY

Warfarin is a widely used oral anticoagulant in the world to prevent and treat thromboembolic cases. Response to warfarin differ very much between individuals and serious bleedings may occur due to this drug. Major genes about warfarin pharmacogenetics are CYP2C9 and VKORC1. Evaluating genetic and environmental factors together in treatment protocols assist in application of treatment more safely and individualization of treatment.

234 patients using warfarin from Cardiology Department Bursa Uludağ University were analyzed for CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms to determine warfarin dose variations among patients and 200 healthy controls selected in Medical Genetics Department in Eskişehir Osmangazi University were analyzed for CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms to determine frequencies of the genotypes in Turkish population PCR-RFLP technique was used in study.

For 434 cases included our study, frequencies of VKORC1 gene -1639 G>A are, %27,6, %48,4, %24 for G/G, G/A, A/A genotypes respectively. For CYP2C9 gene 430 C>T and 1075 A>C polymorphisms CYP2C9 genotype variant frequencies are %59,4, %19,8, %13,8, %3,7, %2,8, %0,5 for *1*1,*1*2,*1*3,*2*2,*2*3,*3*3 variants respectively. A statistically significant relation was determined among average daily warfarin dose and CYP2C9 and VKORC1 genotypes in cases using warfarin. It was statically found that CYP2C9, VKORC1 and age factors has %29 effect on warfarin dose variations among cases.

Our study emphasizes importance of genetic factors in determining warfarin dose variations among cases in Turkish Population and to using these genetic factors to help warfarin dose determination in clinical cases.

Key words: Warfarin, Farmacogenetics, CYP2C9, VKORC1, PCR-RFLP

İÇİNDEKİLER

Kabul Ve Onay Sayfası	iv
Özet	v
Summary	vi
İçindekiler	vii
Şekiller Dizini	xi
Resimler Dizini	xii
Grafikler Dizini	xiii
Çizelgeler Dizini	xiv
Simgeler Ve Kısaltmalar Dizini	xvi
1. Giriş Ve Amaç	1
2. Genel Bilgiler	3
2.1. Farmakogenetik	3
2.2. Pıhtılaşma Mekanizması	5
2.2.1. Pıhtılaşmanın interinsek (plazma içinde) yolu	6
2.2.2. Pıhtılaşmanın eksterinsek (plazma dışında) yolu	6
2.2.3. Pıhtılaşmanın ortak yolu	6
2.3. Antitrombik İlaçlar	8
2.3.1. Antikoagülan ilaçlar	8
2.3.1.1. Oral antikoagülan ilaçlar	8
2.3.1.1.1. Varfarin	9
2.3.1.1.1.1. Varfarin farmakolojisi	10
2.3.1.1.1.2. Varfarin ve K vitamini gama-karboksilasyonu	10
2.3.1.1.1.3. Varfarin farmakokinetiği ve farmakodinamiği	11
2.3.1.1.1.4. Varfarinin Tedavisinin Takibi İçin Uygulanan Laboratuar Testleri ..	11
2.3.1.1.1.4.1. Protrombin zamanı	12
2.3.1.1.1.4.2. INR (International Normalized Ratio)	12
2.3.1.1.1.5. Varfarin tedavisi ve varfarin kullanan hasta grupları	14
2.3.1.1.1.6. Varfarin tedavisinde karşılaşılan en önemli komplikasyonlar	14
2.3.1.1.1.6.1. Kanama (Hemorajik) komplikasyonları	14

2.3.1.1.1.7. <i>Varfarin ve ilaç etkileşimleri</i>	15
2.3.1.1.1.8. <i>Varfarin ile gıda etkileşimleri</i>	18
2.3.1.1.1.9. <i>Varfarinin Ekonomik Boyutu</i>	18
2.4. Sitokrom P450 Monooksijenaz Enzim Sistemleri.....	19
2.4.1. <i>Sitokrom P4502C (CYP2C) Alt Ailesi</i>	23
2.4.2. <i>Sitokrom P4502C9 (CYP2C9) yapısı</i>	23
2.4.3. <i>Sitokrom P4502C9 (CYP2C9) gen yapısı ve polimorfizmleri</i>	24
2.5. K Vitamini.....	25
2.5.1. <i>K vitamininin fizyolojik önemi</i>	25
2.5.2. <i>K vitamini epoksid redüktaz (VKOR)</i>	26
2.5.3. <i>K vitamini epoksid redüktaz kompleks alt ünite 1 geni (VKORC1) ve polimorfizmleri</i>	27
2.6. Varfarin Farmakogenetiği	28
2.7. İnsan Genetik Çeşitliliği.....	30
2.7.1. <i>Genetik polimorfizm kavramı</i>	30
2.7.2. <i>Restriksiyon fragmentinin uzunluk polimorfizmleri</i>	30
2.7.3. <i>Polimorfik markırların genotiplemesinde PCR'ın kullanımı</i>	31
3. Gereç Ve Yöntemler.....	33
3.1. Gereçler.....	33
3.1.1. <i>Kullanılan gereçler</i>	33
3.1.2. <i>Kullanılan kimyasal malzemeler</i>	34
3.2. Yöntemler.....	35
3.2.1. <i>Mobio ultraclean DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak periferik kandan DNA izolasyonu</i>	35
3.2.2. <i>İzole edilen DNA örneklerinin PCR ile amplifikasyonu</i>	36
3.2.3. <i>VKORC1 geni için kullanılan amplifikasyon şartları</i>	38
3.2.4. <i>CYP2C9 Ekzon 3 için kullanılan amplifikasyon şartları</i>	38
3.2.5. <i>CYP2C9 Ekzon 7 eksternal nested-PCR basamağı için kullanılan amplifikasyon şartları</i>	38
3.2.6. <i>VKORC1 geni için kullanılan primerler</i>	39
3.2.7. <i>CYP2C9 Ekzon 3 için kullanılan primerler</i>	39
3.2.8. <i>CYP2C9 Ekzon 7 için kullanılan primerler</i>	39

3.2.9. Amlifikasyon ürünlerinin restriksiyon endonükleazlarla kesimi	40
3.2.9.1. VKORC1 Geni promotor bölgesinin AsuC2 I enzimi ile kesimi	40
3.2.9.2. CYP2C9 Ekzon 3 bölgesinin Bme18 I enzimi ile kesimi	40
3.2.9.3. CYP2C9 Ekzon 7 bölgesinin Zsp2 I enzimi ile kesimi.....	40
3.2.10. Enzim kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile ayrılması	41
3.2.11. Jelin görüntüleme cihazı ile değerlendirilmesi.....	41
3.2.12. VKORC1 Geninin AsuC2 I enzimi ile kesim sonucu.....	42
3.2.13. CYP2C9 Ekzon 3 bölgesinin Bme18 I enzimi ile kesim sonucu.....	42
3.2.14. CYP2C9 Ekzon 7 bölgesinin Zsp2 I enzimi ile kesim sonucu.....	43
3.2.15. Kullanılan çözeltiler.....	44
3.2.15.1. Agaroz jel elektroforezi çözeltileri	44
3.2.16. İstatistiksel analizler	45
4. Bulgular	46
4.1. Varfarin Kullanan Olgulara Ait Bulgular	46
4.1.1. Varfarin kullanan olgulara ait endikasyonlar.....	47
4.2. Çalışmanın İstatistiksel Bulguları.....	48
4.2.1. Varfarin kullanan olgularda VKORC1 genotipleri ve CYP2C9 genotip varyant frekansları.....	49
4.2.2. Varfarin kullanan olgularda CYP2C9 genotip varyantları ve VKORC1 genotiplerinin, olguların INR bilgilerine göre dağılımları.....	50
4.2.3. Varfarin kullanan olgularda CYP2C9 ve VKORC1 genotip dağılımlarına göre ortalama günlük varfarin doz miktarı değerleri.....	53
4.2.4. Varfarin kullanan olgularda gözlenen endikasyonlar ile VKORC1, CYP2C9 genotip varyantları ve günlük varfarin dozuna göre dağılımları.....	55
4.2.5. Kanama komplikasyonu gerçekleşen olgularda VKORC1, CYP2C9 genotip varyantları ve günlük varfarin dozu bilgilerine göre bulgular	56
4.2.6. Varfarin tedavisi sırasında aspirin kullanan olguların VKORC1 genotip ve CYP2C9 genotip varyantları bilgilerine göre bulgular	57
4.2.7. Günlük varfarin doz gereksinimi ile çalışma olgularına ait demografik özellikler arasındaki ilişkiyi belirlemek için çoklu lineer regresyon modellenmesi	58
4.3. Çalışmaya Katılan Sağlıklı Bireylere Ait Bulgular	58

5. Tartışma	61
5.1. CYP2C9 Geninin Nested PCR-RFLP Yöntemi Sonuçları ile Literatür Bilgilerinin Genotip Frekansları Açısından Karşılaştırılması.....	62
5.2. VKORC1 Geni -1639 G/A Polimorfizmi PCR-RFLP Yöntemi Sonuçları ile Literatür Bilgilerinin Genotip Frekansları Açısından Karşılaştırılması.....	65
5.3. Varfarin Kullanan Olgularda VKORC1 ve CYP2C9 Genotiplerinin Sonuçları ile Her İkisinin Çalışıldığı Literatür Bilgilerinin, Olguların Demografik Özellikleri Açısından Karşılaştırılması.....	69
5.4. Varfarin Dozu ile CYP2C9 ve VKORC1 Genotipleri Arasındaki İlişki	70
5.5. Olgularda Bulunan INR ve Hedef INR Değerleri ile CYP2C9 ve VKORC1 Genotipleri Arasındaki İlişki	72
5.6. Varfarin Doz Gereksinimini Etkileyen Faktörlerin Regresyon Analizleri	73
6. Sonuç	76
7. Kaynakça	78
8. Özgeçmiş	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1:	Bir fibrin pıhtısının oluşmasında intrinsek ve ekstrinsek yollar	7
Şekil 2.2:	Sodyum varfarin kimyasal yapısı	9
Şekil 2.3 :	CYP2C9 geni majör polimorfizmleri	23
Şekil 2.4 :	K vitamini döngüsü ve varfarin metabolizması.....	26
Şekil 2.5 :	Varfarin biyotransformasyonu ve K vitamini aktivitesi üzerine etkili olan genler.....	29
Şekil 2.6 :	Polimorfik markırların genotiplemesinde PCR'ın kullanımı.....	32

RESİMLER DİZİNİ

- Resim 3.1:** AsuC2 I enzimi ile VKORC1 geni kesim sonuc.....42
- Resim 3.2:** Bme18 I enzimi ile CYP2C9 geni Ekzon 3 bölgesinin kesim sonucu.....43
- Resim 3.3:** Zsp2 I enzimi ile CYP2C9 geni Ekzon 7 bölgesinin kesim sonucu.....44

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 4.1 : CYP2C9 genotiplerinde ortalama günlük varfarin doz miktarları.....54

Grafik 4.2 : VKORC1 genotiplerinde ortalama günlük varfarin doz miktarları.....54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Endikasyonlar ve istenen INR değerleri	13
Çizelge 2.2	Desteklenmiş Kanıt Seviyelerine Göre Varfarinle Olan İlaç Etkileşimleri	16
Çizelge 2.3	Majör insan karaciğer sitokrom P450 enzimlerinin özellikleri	20
Çizelge 2.4	Majör substratlarına göre insan CYP450 enzimlerinin sınıflandırılması	21
Çizelge 4.1 ve 4.2	Çalışma olgularının cinsiyet, yaş, INR düzeyi, hedef INR düzeyi ve kullandığı varfarin dozu bilgilerine göre dağılımları	47
Çizelge 4.3	Çalışma olgularının hedef INR ve hedef INR değer aralıklarında bulunma durumlarına göre dağılımları	47
Çizelge 4.4	Çalışma olgularına ait endikasyon dağılımları	48
Çizelge 4.5 ve 4.6	Çalışma olgularının varfarin tedavisi sırasında kullandığı diğer ilaçlar ve olgularda bulunan diğer hastalıkların dağılımları	48
Çizelge 4.7	Çalışmaya katılan varfarin kullanan olgularda CYP2C9 genotip frekans dağılımları	49
Çizelge 4.8	Çalışmaya katılan varfarin kullanan olgularda VKORC1 genotip frekans dağılımları	49
Çizelge 4.9	Varfarin kullanan olgularda VKORC1 ve CYP2C9 genotiplerinin kombine frekansları	50
Çizelge 4.10 ve 4.11	Çalışma olgularında CYP2C9 ve VKORC1 genotiplerine göre ortalama INR değerleri dağılımı	51
Çizelge 4.12	VKORC1 genotiplerine göre hedef INR değerleri dağılımları	51
Çizelge 4.13	Çalışma olgularında CYP2C9 genotipleri ile Hedef INR değerleri dağılımları	51
Çizelge 4.14	CYP2C9 genotipleri ile olguların hedef INR değer aralığında bulunma durumlarına göre dağılımları	52
Çizelge 4.15	VKORC1 genotipleri ile olguların hedef INR değer aralığında bulunma durumlarına göre dağılımları	52
Çizelge 4.16	Çalışma olgularında CYP2C9 genotip varyantlarına göre ortalama günlük varfarin dozu dağılımları	53

ÇİZELGELER DİZİNİ (DEVAM EDİYOR)

Çizelge 4.17	Çalışma olgularında VKORC1 genotiplerine göre ortalama günlük varfarin dozu dağılımları	53
Çizelge 4.18	Çalışma olgularında gözlenen endikasyonlar ile CYP2C9 ve VKORC1 genotipleri arasında dağılımları	55
Çizelge 4.19	Çalışma olgularında kanama komplikasyonu bilgilerine göre CYP2C9 genotip varyant dağılımları	56
Çizelge 4.20	Çalışma olgularında kanama komplikasyonu bilgilerine göre VKORC1 genotip dağılımları	56
Çizelge 4.21	Çalışma olgularının varfarin tedavisi sırasında aspirin kullanma durumları ile CYP2C9 genotipleri dağılımları	57
Çizelge 4.22	Çalışma olgularının varfarin tedavisi sırasında aspirin kullanma durumları ile VKORC1 genotip dağılımları	57
Çizelge 4.23	Çalışma olgularında bireylerarası varfarin doz değişikliği üzerine yaş, CYP2C9 genotip varyantları ve VKORC1 genotiplerinin etkisi	58
Çizelge 4.24	Çalışmaya katılan sağlıklı bireylerde cinsiyet ve yaş dağılımları	59
Çizelge 4.25	Çalışmaya katılan sağlık bireylerde VKORC1 genotip ve CYP2C9 genotip varyantları dağılımları	59
Çizelge 4.26	Çalışmaya katılan sağlık bireylerde VKORC1 genotip ve CYP2C9 genotip varyantları kombine dağılımları	60
Çizelge 4.27	Çalışmaya katılan varfarin kullanan olgular ve sağlıklı bireylerin tümüne ait VKORC1 genotip ve CYP2C9 genotip varyantlarının dağılımları	60
Çizelge 5.1	Çalışmalarda elde edilen CYP2C9*2, CYP2C9*3 genotip varyantları ve VKORC1 -1639 G>A polimorfizmi genotip dağılımları	68
Çizelge 5.2	Çalışmalarda elde edilen CYP2C9 genotip varyantları ve VKORC1 -1639 G>A polimorfizmi genotip dağılımı sonuçları ile olgulara ait özelliklerin varfarin dozu üzerine etkisi bakımından literatür verileri ile karşılaştırılması	75

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
AF	Atriyal Fibrilasyon
CYP450	Sitokrom P450
DVT	Derin Ven Trombozu
EKG	Elektrokardiyogram
Gla	Gama-karboksilglutamat rezidüleri
INR	International Normalized Ratio (Uluslar arası Standardize protrombin testi)
ISI	Uluslararası duyarlılık indeksi
ml	mililitre
PC	Protein C
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PE	Pulmoner Embolizm
PS	Protein S
PT	Protrombin Zamanı
aPTT	Aktive Parsiyel Protrombin Zamanı
RE	Restriksiyon Enzimi
RFLP	Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
TBE	Tris-Borik EDTA
TF	Doku Faktörü
VKOR	Vitamin K epoksid Redüktaz Enzimi
VKORC1	Vitamin K epoksid redüktaz alt ünite 1 geni
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
µl	Mikrolitre

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bir ilacın klinikte kullanılabilmesi için öncelikle ilacın klinik etkinliği ve güvenliğinin bilinmesi gerekmektedir. İlaçların eşdeğer dozları bazı bireylerde yeterli etkinliğe ulaşamazken, bazı bireylerde ise çeşitli toksik etkiler gösterebilmektedir (3). İlaç kinetiğinin ve ilaçlara karşı kişinin verdiği cevabın genetik yapıya göre bireyler arasında değişmesi ve buna bağlı olarak ilaç etkinliğinin interetnik değişmesi ile uğraşan bilim dalına farmakogenetik denilmektedir (1). Genetik faktörler; ilaca yanıtta bireysel farklılıkların %20–40 kadarından, yan etkilerin %50'sinden sorumludur (6).

Varfarin günümüzde yaygın olarak kullanılan oral antikoagülanlardan biridir (28). Varfarinin klinikte kullanılmaya başlanması 1950'li yıllara dayanmakta ve uzun süreli oral antikoagülan tedavisi için kullanılmaktadır (22,56). Varfarinin etki mekanizması, karaciğerde K vitaminine bağımlı koagülasyon faktörlerinin (faktör II, VII, IX, X) ve protein C (PC) ile protein S (PS)'deki çeşitli glutamat rezidülerinin gama-karboksilasyonunu bloke etmektir (73).

Varfarin, atriyal fibrilasyon, kalp kapağı replasmanı ve venöz tromboembolizm gibi kronik trombojenik durumda olan hastalarda tromboembolik olayları önlemek amacıyla yaygın olarak kullanılan bir oral antikoagülandır (17). Varfarin tedavisinde hastaların takibinde günümüzde en yaygın olarak INR (International Normalized Ratio) testi kullanılmaktadır. Bu test protrombin zamanı (PT) testinin standardize edilmiş yöntemidir (16). Varfarin tedavisinin en yaygın komplikasyonu yıllık oranı %6–39 arasında değişen kanama olaylarıdır (28). Kanama olayının tedavinin başlangıç periyodunda ve yüksek dozda varfarin kullanımında gerçekleşmesi daha muhtemeldir (29).

Varfarin dozunun tam olarak doğru bir şekilde tespiti ile ilgili farmakogenetik çalışmalara karşı ilgi bir hayli artmış durumdadır. Bu konuyla ilgili son yıllarda yapılan birçok çalışma mevcut olup; şimdiye kadar varfarin aktivitesi ile ilgili yaklaşık 30 gen tespit edilmiştir (15).Varfarin metabolizması üzerine CYP2C9 ve VKORC1 gen polimorfizmlerinin önemli bir etkisi olduğu belirlenmiştir (56). CYP2C9 geninin

regülatör ve kodlayan bölgelerinde 50'den fazla polimorfizm tanımlanmıştır. Ancak bu polimorfizmlerden CYP2C9*2 (430 C>T) ve CYP2C9*3 (1075 A>C)'ün varfarinle ilgili en önemli polimorfizmler olduğu görülmüştür (17). VKORC1 geninde bugüne kadar toplam 28 polimorfizm saptanmış ve -1639 G>A polimorfizminin bireylerarası doz değişkenliği üzerine etkisi yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (47).

Bu çalışmada, Türk populasyonunda CYP2C9*2, CYP2C9*3 ve VKORC1 geni -1639 G>A polimorfizmlerinin genotip frekanslarının belirlenmesi, varfarin kullanan hastalarda bireylerarası varfarine karşı cevabın değişkenliği ve bu değişkenliğin klinikte yardımcı etmenler olarak kullanılabilmesine ışık tutması amaçlanmıştır

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Farmakogenetik*

Toplumda bazı kişilerde genetik yapıdaki değişikliğe bağlı olarak belirli protein tiplerinin, bu arada enzimlerin, yapısının bozulduğu ya da eksik oldukları ve bunun sonucu bazı metabolizma hastalıklarını oluşturduğu eskiden beri bilinmektedir. İlaç kinetiğinin ve ilaçlara karşı kişinin verdiği cevabın genetik yapıya göre bireyler arasında değişmesi ve buna bağlı olarak ilaç etkinliğinin interetnik değişmesi ile uğraşan bilim dalına farmakogenetik denilmektedir (39).

Farmakogenetik kavramı yaklaşık elli yıl öncesine dayanmaktadır. İlk zamanlarda yapılan farmakogenetik araştırmaların alanı ilaç metabolizma enzimleri ile sınırlı kalmaktaydı. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, ilaç taşıyıcıları, reseptörleri ve ilaca cevabı düzenleyen hedefler üzerinde ilerlemektedir (7). Farmakogenetik, genetik varyasyonlara bağlı olarak ilacın vücutta emilimi (yavaş- hızlı), metabolize edilmesi (yavaş-hızlı-çok hızlı), ilacın etki yeri reseptörleri (tam-yetersiz), ilacı ve metabolitlerini atma (yavaş-hızlı) yeteneğindeki farklılıkları inceler (50).

Bir ilacın klinikte kullanılabilmesi için öncelikle bilinmesi gereken, klinik etkinliği ve güvenliğidir. Ancak, ilaçların her hasta üzerinde aynı derecede etkili ve güvenli olması beklenemez. İlaçların eşdeğer dozları bazı bireylerde yeterli etkinlik göstermeyebilir ve diğer bir kısım hastalarda toksisiteye bağlı önemli sağlık problemlerine yol açabilir (36). Genetik faktörler; ilaca yanıtta bireysel farklılıkların %20–40 kadarından, yan etkilerin %50'sinden sorumludur. İlaç-ilaç ve ilaç-besin etkileşimleri de çevresel faktörler olarak rol oynar. Tüm farmakogenetik farklılıklar, poligenik ve multifaktöriyel özelliklerdir. Yani en az iki majör gen, yüzlerce modifiye edici gen ve çevresel faktörler söz konusudur (50).

Bireyler arasındaki farmakokinetik veya farmakodinamik varyasyonların tümü genetik farklılıklar olarak yorumlanır. Farmakokinetik, ilaçların absorpsiyon (emilim), dağılım, metabolizma veya atılımının vücudu ne şekilde etkilediğini inceler. Tüm bunları içeren süreçlerdeki genotipik varyasyonlar, ilaç kullanımında değişikliklerle sonuçlanabilir. Farmakokinetik, ilacın veya onun metabolitlerinin konsantrasyon seviyelerindeki varyasyonlara yol açan polimorfizmlerle ilgilidir. Farmakodinamik, ilaçların biyokimyasal ve fizyolojik etkileri ile onların etki mekanizmalarını inceler. İlacın hedefindeki genetik varyasyonlar bir organizmanın bir ilaca cevabında ölçülebilir farklılıklara neden olabilir. Bu varyasyonlar bir veya daha çok gen ile ilişkili olabilir (50).

Farmakogenetiğin önemi şu başlıklarda sıralanabilir;

- Daha etkili ilaçlar; İlaç firmaları, hastalıklar ve genlerle ilgili bilgiler ışığında proteinler, enzimler ve RNA moleküllerinin esasına dayalı ilaçlar üretebilecektir. Bu ilaç keşfini kolaylaştıracak ve spesifik hastalıkların tedavisini hedefleyen ilaçların yapılmasına izin verecektir. Bu durum yalnızca tedavi etkilerini en üst düzeye çıkarmakla kalmayacak sağlıklı hücrelerin hasarlanma olasılığını da azaltacaktır.
- İlk uygulamada, daha iyi, daha güvenli ilaçlar; Standart uygulanan deneme-yanılma metodunun yerine, hastaların tedavinin başlangıcında doğru ilaçlarla karşılaşması sağlanacaktır; doktorlar hastaların genetik yapısını analiz edebilecek ve başlangıçtan itibaren en uygun ilacı reçete edebilecektir. Bu durum, yalnızca tahmin ile doğru ilacı bulmak yerine, tedaviye doğru ilaçla başlama şansını doğuracaktır. Böylece iyileşme süreci kısalmak ve yan etki olasılığı da ortadan kalkacaktır.
- Uygun ilaç dozajlarını belirlemenin en doğru metodları; Şu anda uygulanan ağırlık ve yaşa dayalı dozaj belirleme, yerini bireylerin vücudunun ilacı işleme

ve metabolize etme sürecine dayalı genetik yapılarına uygun dozajlara bırakabilir. Bu durum tedavinin değerini arttırırken; aşırı doz olasılığını da azaltacaktır.

- Hastalık için gelişmiş tarama; Bireylerin genetik kodunu bilmek; erken yaşta uygun yaşam stili ve çevresel değişiklikler yapmasına izin verebilecek, genetik hastalıkların etkisini azaltacak veya ortaya çıkışını önleyebilecektir. Ayrıca, belirli bir hastalığa yatkınlığın olduğunun bilinmesi, dikkatli izleme ve tedavi etmeyi sağlayabilecektir (50).

2.2. Pıhtılaşma Mekanizması

Pıhtılaşma, kanamanın durması sırasında damar dışında ve tromboz sırasında damar içinde meydana gelir. Pıhtılaşma; trombositlerin aktive edilmesine ve onlar ile, çoğu plazmada bulunan pıhtılaşma faktörleri adı verilen özel proteinlerin etkileşmesine ve ayrıca pıhtılaşma faktörlerinin kendi aralarında belirli bir düzene göre etkileşimlerine bağlı kompleks bir olaylar zinciridir. Kanamanın durması sırasında trombositler primer tıkaç oluştururlar ve kanamayı durdururlar (39). Trombositler tarafından oluturulan tıkaç başlangıçta kanamayı durdurmak için önemli; ancak yetersiz bir adımdır. Sadece fibrin pıhtısının oluşumu dayanıklı tıkaç oluşumunu sağlar (10).

Pıhtılaşma yolları, klasik olarak intrensek ve ekstrinsek olarak iki başlıkta açıklanmaktadır. Ancak bu iki yolun arasında önemli bağlantılar olduğu ve ekstrinsek yoldaki doku faktörü (TF)' nün fizyolojik hemostazın temel elemanı olduğu anlaşılmıştır. Pıhtılaşma mekanizması aslında tek sistem olarak çalışmaktadır, ancak açıklama kolaylığı açısından iki alt gruba ayrılır (10).

2.2.1. Pıhtılaşmanın intrinsek (plazma içinde) yolu

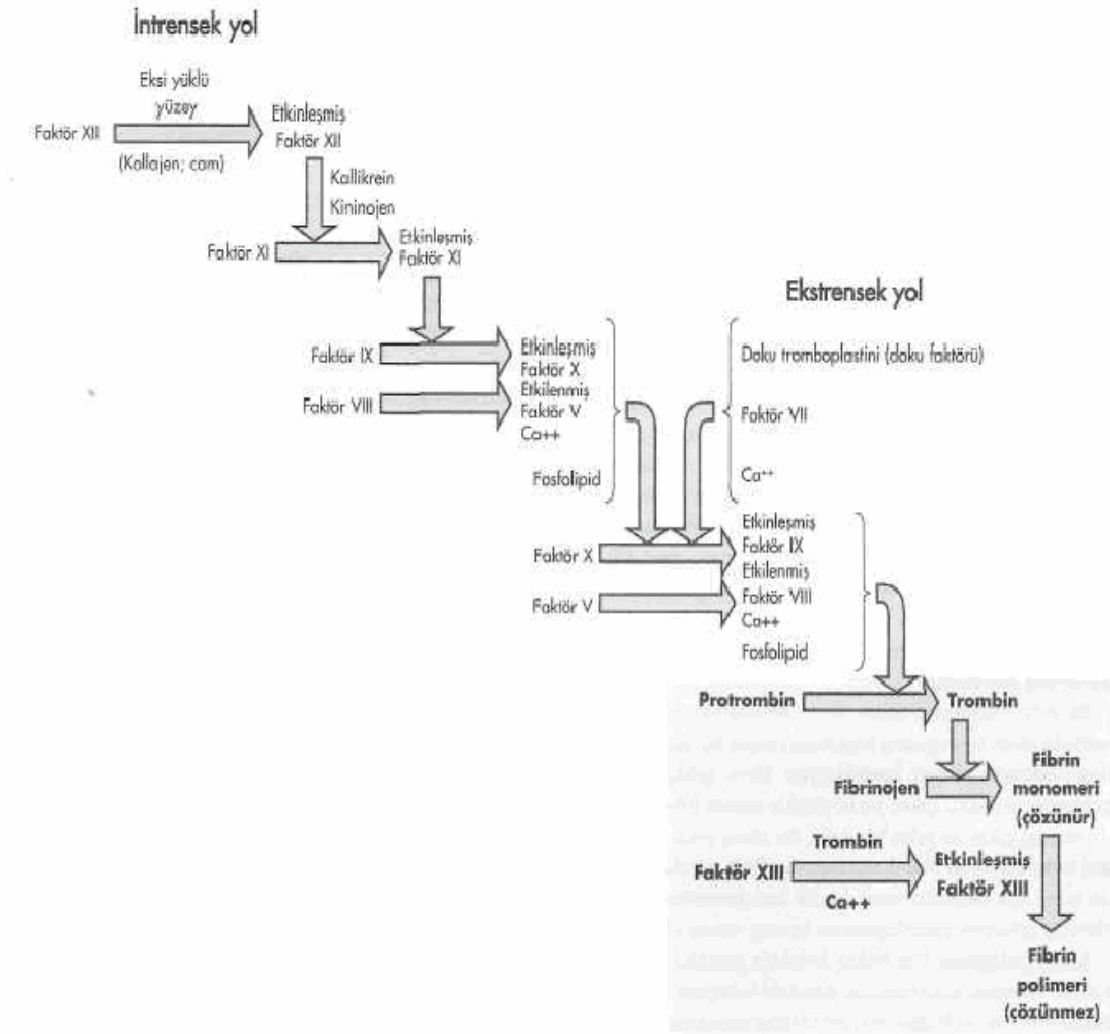
Negatif yüklü bir yüzeyde; yüksek molekül ağırlıklı kininojen, prekallikrein, faktör XII ve faktör XI'in yan yana gelmesi ile intrinsek yol başlatılır (10). Sonuçta Faktör XII'nin bir kısmı, kimyasal yapısının değişmesi sonucu faktör XIIa (aktive edilmiş faktör XII) haline geçer (39). Faktör XIIa, faktör XI'i uyarır (faktör XIa). Bu da faktör IX'u aktive eder (faktör IXa). Faktör IXa, kofaktörü olan faktör VIIIa, kalsiyum ve fosfolipid bir yüzeyle beraber faktör X'u aktive eder (faktör Xa). Böylece faktör Xa, kofaktörü olan faktör Va, kalsiyum ve fosfolipid bir yüzeyle beraber protrombin (faktör II) kompleksini oluştururlar (10). Pıhtılaşma mekanizmasının intrinsek yolu Şekil 2.1'de gösterilmektedir (8).

2.2.2. Pıhtılaşmanın ekstrinsek (plazma dışında) yolu

Kanda varolan faktör VII, TF ile karşılaştığında ekstrinsek yol çalışmaya başlar (Şekil 2.1). TF, kalsiyum ve faktör VII ile bir kompleks oluşturur. Sonuçta faktör VII aktive edilir (faktör VIIa). TF- faktör VIIa ilişkisi, faktör X'u uyararak ortak yola katılırlar. İntrensek yol ile ekstrinsek yol, faktör X'un uyarılması ile (faktör Xa) beraber ortak yolda buluşurlar (10). TF bu dönüşümün hızını yaklaşık otuzbin kez artırır. İntrensek yol üzerinde oluşan pıhtılaşma dakikalarca sürdüğü halde, ekstrinsek yol üzerinden oluşan saniyelerle ölçülecek kadar kısa bir zamanda tamamlanır (39).

2.2.3. Pıhtılaşmanın ortak yolu

Pıhtılaşma mekanizmasının ortak kısmında, faktör Xa, kalsiyumun, faktör Va'nın ve trombosit kaynaklı fosfolipit miçellerinin yardımı ile protrombini (faktör II), trombine (faktör IIa) dönüştürür. Trombin, fibrinojenin (faktör I) fibrine dönüşmesi olayını başlatır (Şekil 2.1). Fibrinojen, farklı uzunlukta olan ikişer çift α - β ve γ zincirlerinden oluşan dimerik bir proteindir ve karaciğerde sentezlenir. Trombin, her bir α segmentinin ve her bir β segmentinin N- uçlarından ufak bir peptid segmenti kopararak fibrinojeni fibrin monomerlerine dönüştürür; böylece jel görünüşünde bir pıhtı oluşur (39).



Şekil 2.1. Bir fibrin pıhtısının oluşmasında intrensek ve ekstrensek yollar

(Berne, R.M., Levy, M.N., Koeppen B.M., Stanton, B.A., 2008, Fizyoloji, Güneş Tıp Kitapevleri, Öncü Basımevi, Ankara kitabından alınmıştır).

2.3. Antitrombotik İlaçlar

Arterlerin ve venlerin çeperinde ve içinden kan dolaşan yapay yüzeylerde trombus (damar-içi pıhtı) oluşmasını ve gelişmesini engelleyen ilaçlara ve oluşmuş

pıhtıyı eriten ilaçlara antitrombotik ilaçlar denilir (39). Antitrombotik ilaçlar tromboembolizm durumlarında yaygın bir şekilde kullanılan ilaç grubudur (58).

Antitrombotik tedavi üç ayrı gruptan oluşmaktadır.

- Antikoagülan tedavi,
- Antitrombotik tedavi,
- Trombolitik tedavi (58)

2.3.1. Antikoagülan ilaçlar

Antikoagülan faktör etkinliğini artırarak ve pıhtılaşma faktörlerinin etkinliğini ve ya sentezini bozarak pıhtılaşma olayını engelleyen ve böylece kanın koagülasyon yeteneğini azaltan ilaçlardır (39).

Antikoagülan ilaçlar etki mekanizmalarına göre ikiye ayrılırlar.

- Heparin
- Oral Antikoagülanlar (39)

2.3.1.1. Oral antikoagülanlar

Pıhtılaşma faktörlerinin fonksiyonunu değil, onların karaciğerde yapılanlarının sentezini bozarlar ve bu şekilde dolaylı antikoagülan etki yaparlar. Heparine göre üstünlükleri ağız yolundan alınmaları ve sentez suretiyle yapıldıklarından nispeten ucuz olmalarıdır. Heparinden bir diğer farkları tüp içindeki kana katıldıklarında etkisiz olmaları, sadece in vivo durumda koagülasyonu önleyebilmeleridir (39). Karaciğerde yapılan K vitaminine bağımlı pıhtılaşma faktörleri olan protrombin, faktör VII, IX ve X'un sentezini bozarak etki oluştururlar (74).

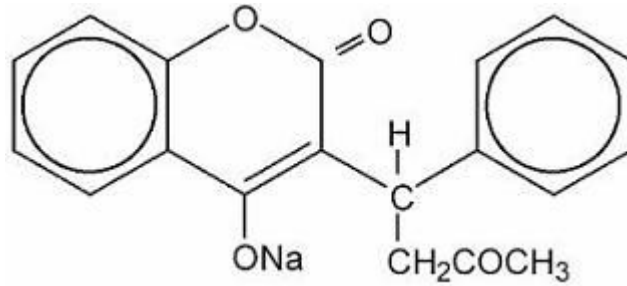
Kimyasal yapılarına göre iki alt gruba ayrılırlar;

- Kumarin türevleri; varfarin, dikumarol, etilbiskumasetat ve fenprokuman
- İndandion türevleri; fenindion, difenindion (74)

Bu grupta en iyi biyoyararlanma ve en az ciddi yan etkiye sahip olması nedeniyle en çok kullanılan varfarindir (74).

2.3.1.1.1. Varfarin

Varfarin, ilk defa 1948 yılında Wisconsin'de Karl Link tarafından bir tür zehir olarak kullanılan dikumarol yapısındaki rodentisiti geliştirmek için yaptığı çalışmalar sırasında keşfedilmiştir. Klinikte kullanılmaya başlanması ise 1950'li yıllara dayanmaktadır (62). Varfarin, tüm dünyada en fazla sıklıkta kullanılan oral antikoagülandır(46). Varfarin uzun süreli oral antikoagülasyon için kullanılmaktadır (11). Kristalize yani piyasada ilaç olarak kullanılan varfarinin kimyasal olarak açılımı 3-(α -asetonilbenzil)-4-hidroksikumarin ve ampirik formülü ise $C_{19}H_{15}NaO_4$ şeklindedir (12). Sodyum varfarinin kimyasal yapısı Şekil 2.2'de gösterilmektedir (35).



Şekil 2.2. Sodyum varfarin kimyasal yapısı

(<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/image.cfm> sitesinden alınmıştır.)

2.3.1.1.1 Varfarin Farmakolojisi

Vitamin K antagonisti olan kumarinler antikoagülan etkilerini vitamin K ve epoksit 2-3 arasındaki döngüye etki ederek gösterirler (30). K vitamini antimetaboliti olan kumarinler karaciğerde K vitaminine bağlı olan pıhtılaşma faktörlerinin sentezini inhibe ederler (65). Varfarinin etki mekanizması, karaciğerde K vitaminine bağımlı koagülasyon faktörlerinin (faktör II, VII, IX, X) ve PC ile PS'deki çeşitli glutamat rezidülerinin gama-karboksilasyonunu bloke etmektir (73). İlk kez 1960'da antikoagülan etkisi tanımlanan, K vitaminine bağımlı bir protein olan PC, pıhtılaşma sisteminin önemli bir doğal inhibitörüdür. PC, pıhtılaşma önleyici etkisini Protein S ile birlikte faktör Va ve faktör VIIIa'yı inaktive ederek gösterir. Böylece ortak yoldaki FX'un aktivasyonunu azaltır (66). PS karaciğer ve endotelden yapılır. PC'nin faktör Va'yı inaktive etmesini potansiyalize eder (6). Bu faktörler ve proteinler glutamik asit rezidüelerinin karboksilasyonu olmadan biyolojik olarak inaktiftir (32).

2.3.1.1.2. Varfarin ve K vitamini gama-karboksilasyonu

Karboksilasyon oluşumu, K vitamininin düşük formu olan K vitamini 2–3 epoksite (vitamin KH₂) kofaktör olarak ihtiyaç duyar (32). Karboksilasyon, K vitamini bağımlı proteinlerin fosfolipit yüzeylere tutunmasını sağlar ve böylece kanın pıhtılaşması hızlandırılmış olur. Varfarin, K vitamininin düşük formunun oluşumunu K vitamini epoksit redüktaz enzimini engelleyerek durdurur ve bu sayede K vitamini bağımlı pıhtılaşma faktörlerinin gama-karboksilasyonunu kısıtlar (29). K vitamini antagonizmi ve ya bu vitaminin yokluğu bu faktörlerin ve proteinlerin üretim oranını düşürür ve buna bağlı olarak antikoagülasyon durumu meydana gelir. Varfarinin terapötik dozu vitamin K bağımlı pıhtılaşma faktörlerinin üretimini %30–50 arası düşürür. Karboksilasyondaki azalmayla birlikte %10–40 arası pıhtılaşma faktör ürünlerinin salgılanışı da azalır ve pıhtılaşma faktörlerinin biyolojik olarak aktivasyonu düşer. Sonuç olarak, pıhtılaşma mekanizması fonksiyonel olarak kaybolur (32).

2.3.1.1.1.3. Varfarin farmakokinetiği ve farmakodinamiği

Varfarinin farmakokinetiğinin bilinmesi tedavinin başlangıcındaki cevabın anlaşılmasına yardımcı olur. Varfarin ağız yoluyla alınımından sonra plazmada ilk bir saat içinde gözlenir ve en yüksek seviyesine 2–8 saat içinde ulaşır. Varfarin hızlı bir şekilde ve %100 biyoyararlanım göstererek mideden ve üst mide-barsak sisteminden emilir. Varfain S- ve R- izomerlerinin bir karışımıdır ve alınımından sonra %99'u plazmada albumine bağlanır. S- izomeri R- izomerine göre 3–5 kat daha fazla aktiftir (76). Bu ilaç karaciğerde ve böbreklerde metabolize olur. Daha sonradan oluşan ürünler ise idrar ve dışkı yoluyla atılır. Plazmadaki yarılanma ömrü yaklaşık 40 saattir ve etkisini 2 ila 5 gün içerisinde gösterir. Yani varfarin maksimum etkisini alınımından 48 saat sonra gösterir ve etkisi süregelen 5 gün içerisinde devam eder (32).

2.3.1.1.1.4. Varfarinin Tedavisinin Takibi İçin Uygulanan Laboratuvar Testleri

Varfarin tedavisinin izlenmesi ve uygulanması karmaşık bir iştir (42). Tarihsel olarak klinisyenler tarafından antikoagölan seviyelerini değerlendirmek için protrombin zamanı (PT), aktive parsiyel tromboplastin zamanı (PTT) standart olarak kullanılmıştır (71).

2.3.1.1.1.4.1. Protrombin zamanı

Protrombin Zamanı (PT), pıhtılaşmanın ekstrinsik ve ortak yolunu değerlendirmede kullanılan bir testtir. PT testi, sitrat plazmaya kalsiyum ve tromboplastinin eklenmesi ile gerçekleştirilir (29). Bu testte, ekstrinsik yoldan fibrin pıhtısı oluşana kadar geçen süre ölçülür. Ekstrinsik yolda bulunan faktör VII ile ortak yolda bulunan faktör X, V, II ve fibrinojen düzeylerinin normal olması durumunda PT normal bulunacaktır. Bu faktörlerin düzeyi normalin %10'undan daha aşağı düşene kadar PT uzaması görülmez. Tek başına PT uzaması kalıtsal nedenlerden sadece faktör VII eksikliğinde görülür. Karaciğer hastalığı, vitamin K eksikliği ve faktör VII'ye karşı inhibitör varlığında da PT uzaması görülür (72).

2.3.1.1.1.4.2. INR (International Normalized Ratio)

Tromboplastin belirteçlerindeki çeşitlilik farklı PT değerlerinin alınmasına sebep olabilir (71). INR, PT testinde kullanılan farklı tromboplastinlerin sebep olduğu değişik sonuçları dengelemek için PT'nin standardize edilmiş metodudur (42). Tromboplastinlerdeki değişim yavaş olmaktadır ve duyarlılığındaki düşüş gözden kaçmaktadır. 1983 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün sunduğu teknik raporunda INR'yi, PT'nin standardize edilmiş şekli olarak bildirmiştir (71). WHO insan beyin tromboplastinlerini diğer tromboplastinlerle karşılaştırma açısından uluslararası standart olarak belirlemiştir.

Uluslararası duyarlılık indeksi (ISI) tromboplastinlerin duyarlılığını ölçmek için saptanan birimdir ve insan beyin tromboplastinleri değeri 1 olarak belirlenmiştir (71).

INR değeri şu şekilde formülize edilir:

INR : (Hastanın PT değeri / Kontrol PT değeri)^{ISI} (71).

Bu formülden de görüldüğü gibi INR değeri tromboplastinin ISI değerine göre değişiklik gösterebilir. Daha çok duyarlı olan tromboplastinler (ISI değeri 1,0–1,2 arasında) PT testinde hassaslığı düşük olan tromboplastinlere göre daha yüksek doğruluk oranı sağlar ve PT testinde tedavi aralığındaki büyük farkları engellerler. Aksine daha az duyarlı belirteçlerle daha uzun PT süresi tespit edilebilir. INR, varfarin tedavisi için daha güvenilir ve daha duyarlı bir testtir çünkü bu test hastadan alınan kana, kullanılan tromboplastine ve belirlenen ISI değerine bağlıdır (71).

Genelde kabul edilen yaklaşım, başlangıçta haftada iki kez, sonra haftalık, ardından her iki ile üç hafta arayla ve sonra da aylık kontrollerdir. INR sabit ve terapötik kaldığı zaman bir sonraki izlem aşamasına geçme kararı verilebilir. INR uzun süre sabit olsa bile aylık kontroller yapılmalıdır. Doz ayarlaması haftalık toplam dozun

% 5 ile 20 oranında arttırılması ya da azaltılması ile olur. Aşırı INR değerleri varfarin dozuna ara verilmesi hatta K vitamini uygulamasını gerektirebilir (74). Hastalarda endikasyon durumlarına göre istenen INR değerleri Çizelge 2.1’de verilmiştir (10).

Çizelge 2.1. Endikasyonlar ve istenen INR değerleri (10)

Endikasyon	INR
Atriyal Fibrilasyon	2–3
Derin Vena Trombozu	2–3
Pulmoner Emboli	2–3
<i>Protez Kapak</i>	
1. Mekanik kapak	2.5–3,5
2. Biyoprotez	2–3

2.3.1.1.1.5. Varfarin tedavisi ve varfarin kullanan hasta grupları

Varfarin, atriyal fibrilasyon, kalp kapağı replasmanı ve venöz tromboembolizm gibi kronik trombojenik durumda olan hastalarda tromboembolik olayları önlemek amacıyla yaygın olarak kullanılan bir oral antikoagülandır (52).

2.3.1.1.1.6. Varfarin tedavisinde karşılaşılan en önemli komplikasyonlar

Varfarin tedavisinde karşılaşılan yan etkiler, kanama (hemoraji), purpura, ekimoz, hematüri, alopesi, dermatit, ürtiker, diyare, bulantı, kusma ve lökopenidir (58). Varfarin tedavisinde aşırı doza bağlı olarak gelişen en ciddi yan etki kanama olaylarıdır.

2.3.1.1.6.1. Kanama (Hemorajik) komplikasyonları

Varfarin tedavisinin en yaygın komplikasyonu yıllık oranı %6-39 arasında değişen kanama olaylarıdır. Diğer antikoagülanlarda olduğu gibi, varfarin kullanımı ile birlikte kanama riski artmaktadır (53).

Varfarin tedavisi uygulanan hastalarda majör kanama oranı yıllık % 0,9 ila 2,7 arası, fatal ölümlle sonuçlanan kanama oranı ise %0,07 ile 0,7 arasında değişmektedir. İntrakraniyal kanamalar rapor edilen hemorajik durumların yüzde ikisini oluşturmakta, ölümlle sonuçlanan kanamaların ise %10-68'i bu kanama türünden kaynaklanmaktadır (32).

Risk hastadan hastaya ve aynı hastada eşlik eden diğer hastalık durumlarına ve yaşa bağlı olarak değişebilir. Yapılan randomize kontrollü çalışmalarda özellikle 75 yaş üzerinde kanama riskinin arttığı belirtilmiştir. Bununla birlikte tüm hastalar ele alındığında kanama riskindeki artış yılda %1'den daha azdır (61). Kanama olayının tedavinin başlangıç periyodunda ve yüksek dozda varfarin kullanımında gerçekleşmesi daha muhtemeldir. Kanama için, yüksek yoğunlukta antikoagülasyon (INR > 4,0), yaşın 65 ya da daha yüksek olması, yüksek oranda değişkenlik gösteren INR değerleri, gastrointestinal kanama, hipertansiyon, serebrovasküler hastalık, ciddi kalp rahatsızlıkları, anemi, malignensi, travma (sarsıntı), böbrek yetmezliği öykülerinin olması, beraberinde alınan ilaçların etkileri ve uzun dönem varfarin tedavisi uygulanması risk faktörleri olarak sayılabilir (12). İki ya da daha çok risk faktörlerine sahip olan hastalarda varfarine bağlı gelişen kanama olayları hiç risk faktörü olmayan ya da bunlardan birine sahip olan hastalara göre çok daha yüksek ihtimalle gerçekleşebilir (4).

Hastalar, kanama riskini minimum seviyede tutmak için eğitilmeli ve kanama ile ilgili semptomlar hemen doktoruna bildirilmelidir (12).

2.3.1.1.1.7. Varfarin ve ilaç etkileşimleri

Varfarin ve ilaç etkileşimleri ile ilgili olarak ilk çalışma 1994 yılında yapılmıştır (31). Oral antikoagülanlarla ortaya çıkan ilaç etkileşimleri farmakokinetik ve farmakodinamik şekilde olabilir. Farmakokinetik olarak enzim indüksiyonu ve inhibisyonu ayrıca plazma proteinlerine bağlanmanın azalması şeklinde ortaya çıkabilir. Farmakodinamik olarak etkileşim sinerjizma ve K vitamini ile olduğu gibi yarışmalı antagonizmadır (65).

Varfarinle ilgili en ciddi etkileşim antikoagülan etkinin artması ve kanama olmasıdır. En önemli etkileşim fenilbutazon ve sülfipirazon gibi ilaçlarla ortaya çıkan farmakokinetik etkileşimlerdir. Bu ilaçlar hem varfarinin metabolizmasını inhibe edip hem de plazma proteinlerine bağlanmasını azaltmaktadırlar (65).

Antikoagülan etkiyi arttıran ilaçlar INR değerini yükseltir, azaltan ilaçlar ise INR değerini düşürürler. Desteklenmiş kanıt seviyelerine göre varfarinle olan ilaç etkileşimleri Çizelge 2.2’de gösterilmiştir (65).

Aspirin, varfarinin plazma proteinlerine bağlanmasını engelleyerek ve plazma protrombin seviyelerini azaltarak INR değerlerini yükseltmektedir. Yüksek dozda aspirin ve varfarin tedavisi uygulanan hastalarda kanama riski çok yüksektir. Bununla beraber, düşük dozlarda aspirin kullanımıyla (75–100 mg/gün) birlikte orta veya düşük doz varfarin tedavisi sırasında da kanama riski ihmal edilemeyecek düzeydedir. Kumarin türevi antikoagülan alan hastalarda aspirin yerine ağrı kesici olarak asetaminofen ve ya dekstropoksifen kullanılabilir (39).

Çizelge 2.2. Desteklenmiş Kanıt Seviyelerine Göre Varfarinle Olan İlaç Etkileşimleri (65)

Desteklenmiş Kanıt Derecesi	Potansiyalizasyon	İnhibisyon	Etki yok
1	Alkol (birlikte karaciğer hastalığı varsa), amiodaron, simetidin, klofibrat, ko-trimaksazol, eritromisin, flukonazol, izoniazid, metronidazol, mikonazol, omeprazol, fenilbutazon, piroksikam, propafenon, propranolol, sülfipirazon	Barbitüratlar, karbamazepin, klordiazepoksid, kolestiramin, nafsilin, griseofulvin, rifampin, sukralfat, Yüksek K vitaminli diyet,	Alkol, Antiasitler, atenolol, bumetanid, diflunisal, enoksasin, rifampin, famotidin, felodipine, fluoksetin, ketorolak, metoprolol, morikizin, naproksen, nitrazepam, nizatidine, psiliryum, ranitidin
2	Asetaminofen, anabolik steroidler, Aspirin, kloralhidrat, siprofloksasin, dekstropropofen, disulfiram, itrakonazol, kinidin, fenitoin, simvastatin, tamoksifen, etrasiklin, grip aşısı	Dikloksasilin	İbuprofen, ketokonazol, ketoprofen
3	Disopramid, 5-florurasil, ifosfamid, lovastatin, metolazone, nalidiksik asit, norfloksasin, ofloksasin, topikal salisilatlar, sulindak, tolmetin	Azothiopurin, Siklosporin, etretinat, trazodon	
4	Sefamandol, sefazolin, gemfibrozil, heparin, indometazin, sulfizoksazol		Diltiazem, Tütün, Vankomisin

2.3.1.1.1.8. Varfarin ile gıda etkileşimleri

Kronik oral antikoagülan tedavi alan hastalarda, varfarinin metabolizması ve etki mekanizması nedeniyle diyetle alınan K vitamini önemlidir. Gıda içeriğindeki K vitamini oranına bağlı olarak INR seviyelerinde dalgalanmalar ortaya çıkabilmektedir. Daha da önemlisi, bu hastalarda hayatı tehdit edici kanama veya trombozlar görülebilmektedir. Vitamin K1 olarak bilinen filakinonun 1-10 mg/gün dozunda kullanımı varfarinin etkisini bloke eder. Her ne kadar diyetle alınması gereken K vitamini miktarı konusunda yeterli bilgi olmasa da, varfarin tedavisi alan hastalarda 65-80 µg/gün dozunda filakinon alımı önerilmektedir (24).

Varfarin-gıda etkileşmesi üç değişik formda karşımıza çıkabilmektedir. Bunlar varfarin kullanan hastanın:

1. Çok yüksek oranda K vitamininden zengin diyetle beslenmesine bağlı gelişen kazanılmış, geçici varfarin rezistansı.
2. Yüksek oranda K vitamini diyetine bağlı düşük antikoagülan etki.
3. Düşük oranda K vitamini diyetine bağlı yüksek antikoagülan etki olarak sıralanabilir (24).

Bu sınıflandırmada görüldüğü üzere varfarin gıda etkileşmesi tedavide ciddi sorunlar olarak karşımıza çıkabilir. Sonuç olarak, varfarin tedavisi sırasında hastaların beslenme rejimine dikkat edilmelidir. Hastaların ilaç-ilaç ve ilaç-gıda etkileşmeleri konusunda yeterince bilgilendirilmeleri gerekmektedir (24).

2.3.1.1.1.9. Varfarinin Ekonomik Boyutu

Varfarin, Amerika Birleşik Devletleri'nde en çok kullanılan oral antikoagülan, bir kardiyovasküler ajan olarak en çok kullanılan 4. ilaç, tüm ilaçlar arasında en çok kullanılan 11. ilaç olmakla birlikte, bu ülkede yıllık ekonomik tutarı yaklaşık 500 milyon doları bulmaktadır (32). İngiltere'de 2007 yılında varfarin kullanan yaklaşık

950.000 hastanın olduğu tahmin edilmekte ve bu sayı atriyal fibrilasyonlu hastaların da eklenmesiyle her sene %10'luk bir artış göstermektedir (13).

Varfarin kullanımına bağlı olarak gelişen kanama olaylarında mortalite ve morbidite olaylarının yanı sıra ekonomik açıdan son zamanlarda yapılan çalışmalar göstermektedir ki, bir hastada kanama olayının gerçekleşmesi sonucu o hasta için harcanan 6 günlük tedavi masrafı ortalama 15.988 Dolar (2707 \$– 64.446 \$) kadardır (76).

2.4. Sitokrom P450 Monooksijenaz Enzim Sistemleri

CYP450 monooksijenaz enzim sistemi; steroidler, yağ asitleri, prostaglandinler, lökotrienler ve diğer birçok doğal bileşiklerin olduğu kadar karsinojenlerin, mutajenlerin ve ilaçların oksidatif metabolizmasına katılan 'hemothiolate' yapısında protein enzimlerden oluşur. Genellikle multikomponentli elektron transport zincirlerinde terminal oksidaz olarak etki eder ve P450 içeren monooksijenaz sistemleri olarak adlandırılırlar (59).

İki tip ilaç metabolize eden enzim grubu vardır;

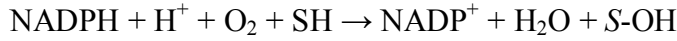
1- Faz I enzimleri: Öncelikli olarak oksidasyon, redüksiyon, hidroksilasyon ve demetilasyon işlemlerini yaparlar. Bu işlemlerle yabancı maddeler metabolizma yolunda faz II' ye hazırlanmış olur.

2- Faz II enzimleri: Glukronat veya sülfat ile konjugasyon ve asetilasyon işlemlerini yaparlar (79).

Faz I metabolizması büyük ölçüde P450 enzimleri ile gerçekleşir (79). CYP450 sistemi, katalitik fonksiyonları bilinmeden önce spektral özellikleri ile tanımlanan proteinlerden oluşmuştur. Bu gruptaki proteinlerin benzersiz bir absorpsiyon spektrumu

vardır (59). "450" rakamı; "heme" içeren karaciğer pigmentlerinin, karbonmonoksit bağlandıktan sonra absorbe ettiği ışığa ait dalga boyunun nanometre olarak en yüksek değerini ifade eder (79). Spesifik CYP450 formları, 446 ile 452 nm arasında maksimum absorban veren dalga boylarına sahiptir. CYP450 enzimleri çoğunlukla karaciğerde bulunurlar ancak barsak, akciğer, beyin gibi diğer organlarda da mevcuttur (9). CYP450 enzimleri baz dizilimi benzerlikleri, kontrol eden gen ailelerine veya substrat spesifikliğine göre sınıflandırılmaktadır (59).

CYP450 enzimleri ile katalizlenen genel reaksiyon şu şekilde gösterilir;



Buradaki substrat (S), bir steroid, yağ asidi, ilaç ve ya oksijen bağlanma yeri olarak görev yapan alkan, alken, aromatik alkan, aromatik halka veya heterosiklik halka ekleri olan diğer kimyasal maddeler olabilir.

Substrata, iki oksijen atomundan sadece biri katıldığı için bu reaksiyona monooksijenasyon reaksiyonu ve bu enzimlere de sitokrom P450 monooksijenaz enzimleri adı verilmektedir.

Sitokrom P450 enzimleri, ilaç biyotransformasyonu ve metabolizması için en önemli sistemlerden biridir. Bu sistem induksiyon ve inhibisyon gibi sayısız mekanizmalarla değişime uğrayabilir ve bireyler arasında oldukça farklı formları ortaya çıkabilir. CYP450 enzimleri 400- 530 amino asitten yapılmış proteinlerdir. Baz dizilimi benzerliklerine göre P450 sistemi 40 farklı aile içinde sınıflandırılır. İnsanda karaciğerde bulunan CYP450 enzimlerinin özellikleri Çizelge 2.3'te gösterilmektedir (59).

P450 enzimlerinin düzey ve aktivitelerini; substratlar, bilginin iletimi, mRNA düzeyi vb. gibi birçok etken belirlemektedir. Enzimler amino asit sıralamasındaki benzerliklere göre gruplandırılırlar. Örneğin CYP2 grubu içinde aminoasit sırasındaki benzerlik en az %40'dır. CYP2D grubunda ise bu oran %55 kadardır. Bazen iki enzimin

aminoasit sırası birbirine o kadar benzer ki bunları ayırmak zor olabilir. Örneğin CYP3A3 ve 3A4 arasındaki benzerlik %98 kadardır (79).

Çizelge 2.3. Majör insan karaciğer sitokrom P450 enzimlerinin özellikleri (59)

Enzim	Substratları	İndükleyicileri	İnhibitörleri
CYP1A2	Asetaminofen, teofilin, Kafein, fenasetin, trikarboksilik asidin demetilasyon yolu	Sigara içme, Kızartma yiyecekler, Omeprazol	Siprofloksasin, enoksasin, norfloksasin, fluvoksamin
CYP2C	Dapson, diazepam, S-varfarin, tolbutamid, Fenitoin	Deksametason, fenobarbital	Amiodaron, simetidin, sertralin
CYP2D6	Beta blokerler, debrisoquine, omeprazol, dekstrometorfan, trisiklik antidepressanlar		Klomipramin, desipramin, fluoksetin, paroksetin, kinidin, sertralin, tioridazin
CYP2E1	Asetaminofen, etanol	Etanol, isoniazid	Disulfiram
CYP3A4	Sisaprid, kortikosteroidler, siklosporin, dapson, dekstrometorfan, diazepam, diltiazem, enalapril, itrakonazol, ketokonazol, lovastatin, makrolidler, midazolam, nifedipine, kinidin, gonadal hormonlar, takrolimus (FK506), terfenadine, teofilin, triazolam, verapamil, R-varfarin	Karbamazepin, glukokortikoidler fenobarbital, fenitoin, rifampin	Simetidin, itrakonazol, ketokonazol, makrolidler, nifedipin, verapamil, sertralin, fluoksetin

Günümüzde insanda, toplam 57 CYP450 geni ve 29 fonksiyonu olmayan psödogen tanımlanmıştır (48). Bu genler Çizelge 2.4'te gösterilmektedir (25). Yapılan son çalışmalara göre bu genlerden 15'i normalde vücutta bulunmayan ilaçlar gibi ksenobiyotik kimyasalların, 14'ü steroidlerin, 9'u yağ asitlerinin ve ekosanoidlerin metabolizmasıyla ve dördünün ise yağda çözünebilen vitaminlerin oksitlenmesiyle ilişkili olduğu belirlenmiştir (26).

CYP gen ve enzimlerinin sayısının bu kadar fazla olmasına rağmen içlerinden sadece CYP1, CYP2 ve CYP3 ailelerine ait enzimlerin ilaç metabolizmasında majör rol oynadıkları belirlenmiştir. Diğer CYP ailelerin ara metabolizmalarda esansiyel rolleri vardır (18).

Çizelge 2.4. Majör substratlarına göre insan CYP450 enzimlerinin sınıflandırılması (25)

Steroidler	Ksenobiyotik	Yağ Asitleri	Eicosanoid	Vitamin	Bilinmeyen
1B1	1A1	2J2	4F2	2R1	2A7
7A1	1A2	4A11	4F3	24A1	2S1
7B1	2A6	4B1	4F8	26A1	2U1
8B1	2A13	4F12	5A1	26B1	2W1
11A1	2B6		8A1	26C1	3A43
11B1	2C8			27B1	4A22
11B2	2C9				4F11
17A1	2C18				4F22
19A1	2C19				4V2
21A2	2D6				4X1
27A1	2E1				4Z1
39A1	2F1				20A1
46A1	3A4				27C1
51A1	3A5				
	3A7				

2.4.1. Sitokrom P4502C (CYP2C) Alt Ailesi

CYP2C alt ailesi, karaciğer mikrozomlarında bulunan CYP'lerin yaklaşık %18'ini oluşturmakta ve günümüzde piyasada bulunan ilaçların yaklaşık %20'sinin CYP aracılığıyla gerçekleşen metabolizma reaksiyonlarında katalizör olarak işlev görmektedir (44). CYP2C alt ailesinin insanda esas olarak karaciğerde bulunan CYP2C8, 2C9, 2C18 ve 2C19 olmak üzere bilinen dört üyesi vardır (20).

CYP2C alt ailesi enzimleri S-mefenitoin, fenitoin, tolbutamid, S-varfarin ve nonsteroid antiinflamatuvar ajanlar gibi birçok bileşiklerin metabolizmasından sorumludur (57). CYP2C alt ailesinin üyeleri %82 civarında aminoasit özdeşliği göstermektedir. Bu yüksek derecedeki dizilim benzerliğine rağmen, CYP2C izoformlarında substrat spesifikliğıindeki örtüşmeler nispeten daha azdır (49).

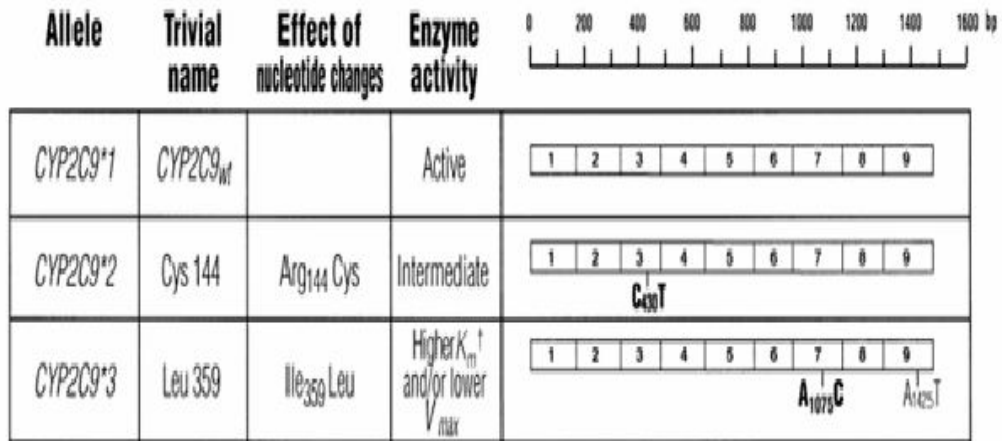
2.4.2. Sitokrom P4502C9 (CYP2C9) yapısı

CYP2C9 proteini insan karaciğer mikrozomlarından pürifiye edilmiş ve farklı sayıda CYP2C9 cDNA'sı izole edilmiştir. CYP2C9 cDNA'sı 490 aminoasitlik ve moleküler ağırlığı 55.6 KDa olan proteinler kodlamaktadır. CYP2C9 proteini üzerinde 6 adet substrat bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Bu bölgeler proteinin diğer kısımlarıyla fazla benzerlik göstermeyen; CYP2C9 proteini üzerinde 96–117, 198–205, 233–240, 286–304, 359–369 ve 470–477 aminoasit bölgelerini kapsamaktadır. Kimerik proteinlerle ve site-directed mutagenез yöntemleri ile yapılan çalışmalarda CYP2C9 ve bu genle yakından ilgili diğer izoformların, substratları metabolize etme yetenekleri substrat bağlanma bölgeleri içindeki küçük bir kısım hatta tek bir amino asit tarafından belirlenebilir. Örnek olarak, 5. substrat bağlanma bölgesindeki Ile359Leu değişimi diklofenak hidroksilasyonunda bir etki göstermezken, tolbutamid ve fenitoin hidroksilasyonunda belirgin bir azalmaya sebep olur (49).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda CYP2C9 geninin insanda ilaç metabolizmasından sorumlu olan en önemli enzimlerden biri olduğu belirtilmektedir (49).

2.4.3. Sitokrom P450C9 (CYP2C9) gen yapısı ve polimorfizmleri

İnsanda CYP2C9 proteinini kodlayan gen 10q24.1 bölgesinde haritalanmıştır ve 50.71 kb uzunluğundadır. CYP2C9 geni 9 ekzon içermektedir (34). CYP2C9 geninin regülatör ve kodlayan bölgelerinde 50'den fazla polimorfizm tanımlanmıştır. Avrupa populasyonlarında en yüksek frekansa sahip olan aleller %12,2 (9,7-15,0%) görülme sıklığı ile CYP2C9*2 (Arg144Cys, 430 C>T) ve 7,9% (6,5-9,7%) ile CYP2C9*3 (Ile359Leu, 1075 A>C) varyantlarıdır. Bu varyantların her ikisi de enzim aktivitesini düşürürler (52). CYP2C9 geni üzerinde önemli polimorfizmler Şekil 2.3'te gösterilmektedir (7). Bunlara ek olarak çeşitli çalışmalarda daha az sıklıkta CYP2C9*4 (T1076C, Ile359Thr), CYP2C9*5 (Asp360Glu, 1080 C>G) ve CYP2C9*6 (818delA) alelik varyantları tanımlanmıştır. Ancak CYP2C9*5 ve *6 varyantları Avrupa populasyonlarında şimdiye kadar bildirilmemiştir (52).



Şekil 2.3. CYP2C9 geni majör polimorfizmleri

(Becquemont, L., 2003, Clinical relevance of pharmacogenetics, Drug Metabolism Review; 35(4): 280'den modifiye edilerek alınmıştır.)

2.5. K Vitamini

K vitamini 1930 yılından önce Danimarka'lı biyokimyacı Henrik Dam tarafından keşfedilmiştir (14). 2-Metil-1, 4 -naftakinon- grubu içeren ve poliizopreneid bir zincirle substitüe edilmiş olan çeşitli naftakinon türevleri K vitamini etkinliğini gösterirler. Bu vitamin en fazla sayıda vitamere sahip bir vitamin olarak kabul edilebilir (39).

K₁ vitamini (fitonadion veya filakinon), yukarıdaki ana gruba bağlanmış olarak fitil grubu içerir. Bu vitamer, yeşil bitkilerin yapraklarında sentez edilir, yeşil bitkilerde fotosentez olayında ve ona eşlik eden fosforilasyon süreçlerinde rol oynar. İlaç olarak tercih edilen K vitamini türüdür (39).

K₂ vitamini (menakinon), mikrobik kaynaklıdır, fermentasyon yapan mikroorganizmalar tarafından ve insanda terminal ileum ve kolonda yerleşmiş olan barsak florası bakterileri ve diğer bazı bakteriler tarafından sentez edilir. Naftakinon grubuna eklenmiş olarak difarnesil grubu içerir. Barsak florasında yapıpıp absorbe edilen K₂ vitamini normal durumda gereksinimi karşılar (39).

K vitamini serisinin ana ürünlerinden olan menadion (vitamin K₃) , sentetik bir maddedir; doğal olarak bulunmamaktadır; organizmaya verildiğinde in vivo ortamda menakinonlardan birine alkile olmaktadır (39).

2.5.1. K Vitamininin Fizyolojik Önemi

K vitaminlerinin temel fonksiyonunun, karaciğer hücrelerinde ve kemiklerdeki osteoblastlar gibi karaciğer dışı hücrelerde fonksiyonel önemi olan proteinlere bağlı glutamat rezidüelerinin, gama-karboksiglutamata(Gla) dönüştürülmesi olduğuna inanılmaktadır. Bu dönüşüm glutamat rezidüesinin gama-hidrojeni yerine karboksil (-COOH) grubu getirmek suretiyle yapılır. Bu olay gama-karboksilaz enzimi tarafından katalize edilir. Gereken enerji, hidrokinin formunun K vitamini hidrokinon formunun K

vitamini epoksid formuna dönüşmesi ile sağlanır. İlk bulunan, Gla'lanmış protein, protrombin'dir (39).

Proteinlerdeki Gla rezidülerinin bilinen tek etkisi kalsiyum bağlamalarıdır. Bu bağlama protein molekülünde biyolojik etkinlik için gerekli konformasyonel değişikliği sağlar.

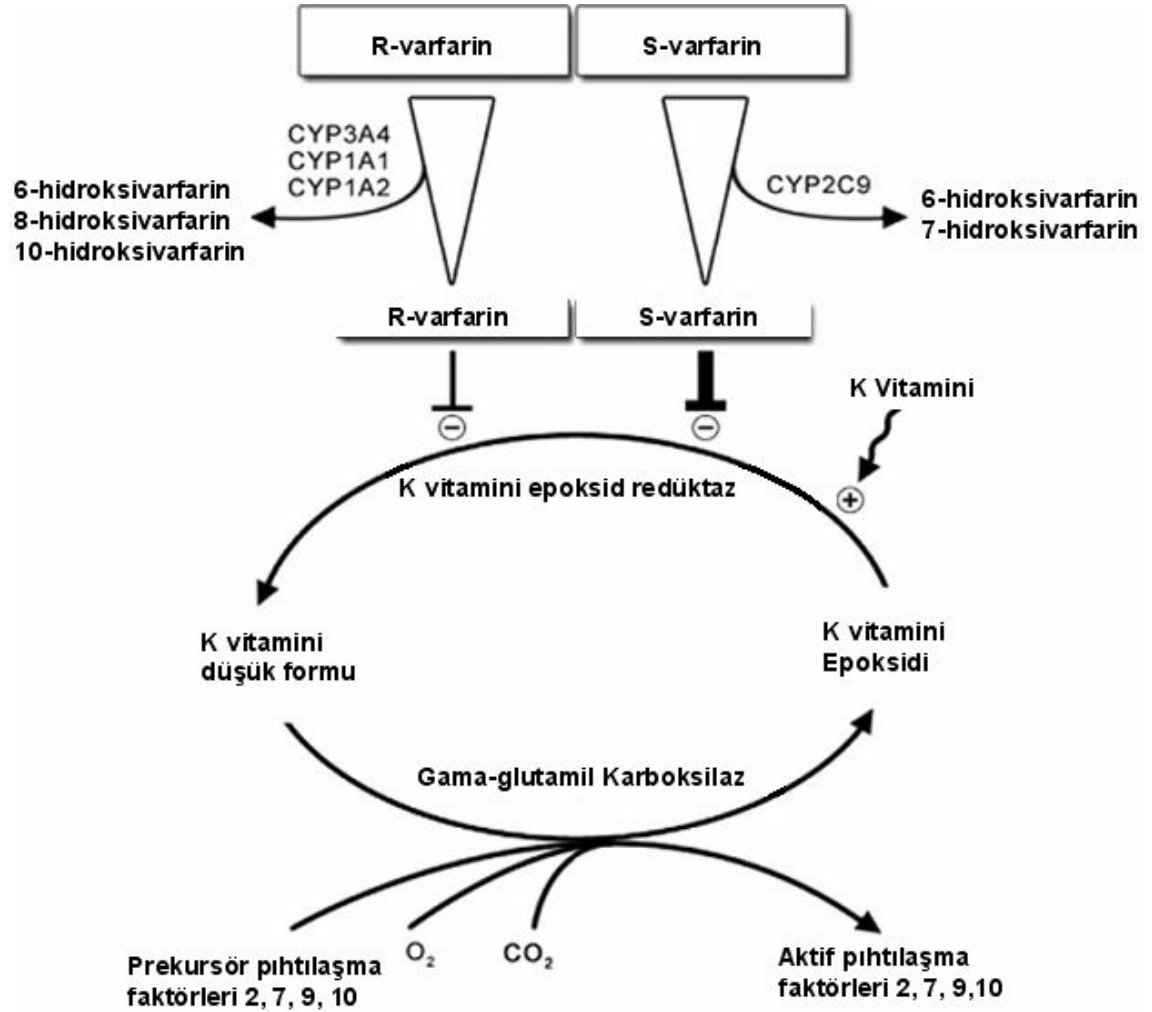
K vitamini, kanın pıhtılaşmasında önemli bir faktördür ve son çalışmalara göre ayrıca kemik metabolizmasında da kofaktör rolü oynar. K vitamini kan pıhtılaşmasında, plazma proteinlerinden faktör II, VII, IX, X ve bunların yanında PC, PS ve protein Z'nin post-translasyonel modifikasyonunda kofaktör olarak işlev görmektedir (43). Protrombin ve sayılan diğer faktörlere, K vitaminine bağımlı pıhtılaşma faktörleri adı verilir (39).

2.5.2. K Vitamini epoksid redüktaz (VKOR)

Son zamanlarda K vitamininin, karaciğer hücrelerinde fizyolojik önemi bulunan K vitamini epoksidi adlı metabolite dönüştüğü gösterilmiştir. Bu metabolit aynı hücrelerde epoksid redüktaz enzimi tarafından tekrar K vitaminine (hidrokinon formuna) dönüştürülür (39). K vitamininin işlevselliğini gösterebilmesi için K vitamini 2-3 epoksid redüktaz, endoplazmik retikulum membranında K vitamini epoksid redüktaz (VKOR) enzimi tarafından indirgenmeye ihtiyaç duyar. K vitamini epoksid redüktaz (VKOR) enzimi, gama-karboksilasyon için kofaktör olan K vitaminine indirgenmeyi sağlar (23). Bu olaya, yani K vitamini ile K vitamini 2-3 epoksidi geri dönüşümüne, K vitamini döngüsü denilmektedir (39). K vitamini döngüsü Şekil 2.4'te gösterilmektedir (67).

K vitamini döngüsündeki bu olayların molekül düzeyinde nasıl gerçekleştiği henüz tam olarak bilinmemektedir (77). Oral antikoagülanlar esas olarak, K vitamini

epoksidinden K vitamini hidrokinonun rejenarasyonu inhibe etmek suretiyle pıhtılaşma faktörlerinin sentezini bozarlar. K vitamininin, K vitamini 2–3 epoksidinden tekrar dönüşümü gerçekleşmeyen hastalarda kanama olayı görülür (39).



Şekil 2.4. K vitamini döngüsü ve varfarin metabolizması

(Schwarz U.I., Stein C.M., 2006, Genetic determinants of dose and clinical outcomes in patients receiving oral anticoagulants, Clin. Pharmacol. Ther.; 80 (1): sayfa 9'dan modifiye edilerek alınmıştır.)

2.5.3. K vitamini epoksid redüktaz kompleks alt ünite 1 geni (VKORC1) ve polimorfizmleri

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla birlikte K vitamini döngüsüyle ilgili bilgilerin atması doğrultusunda bu döngüyü uygun kılan VKOR enzimini kodlayan gen bölgesi de keşfedilmiştir (51). 2004 yılında Rost ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada yeni bir gen olan VKORC1 genini bulmuşlar ve genin fonksiyonunu hücre dizilerine transfer ederek tespit etmişlerdir. Northern Blot yöntemi ile genin karaciğer ve kalp hücrelerinde yüksek ekspresyonu gözlenmiştir (64). VKORC1 geni insanda 16p11.2 bölgesinde bulunmakta ve 3 ekzon bölgesi içermektedir. VKORC1 geni 163 aminoasitlik ve 18,6 kDa molekül ağırlığında protein kodlamaktadır (45).

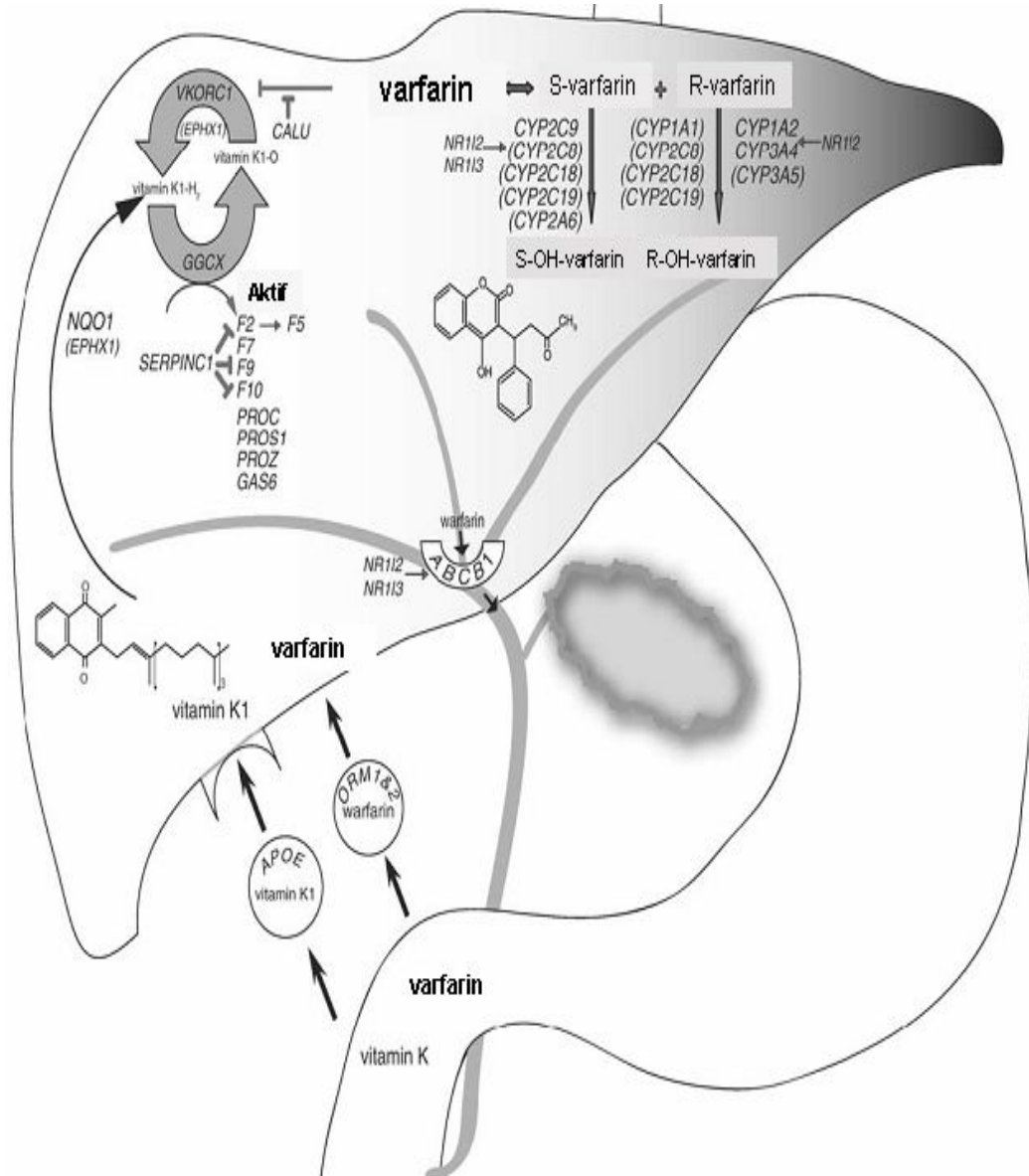
VKORC1 geninde bugüne kadar toplam 28 polimorfizm saptanmış ve VKORC1'in hemen hemen tüm genetik varyasyonlarıyla ilgili 3 ana haplotip tespit edilmiştir. Çeşitli yayınlarda VKORC1 gen polimorfizmleri için farklı sınıflandırmalar yapılmıştır. Yapılan çeşitli yayınlarda VKORC1*2 haplotipi, oral antikoagülanlara karşı genin değişkenliğiyle en çok ilgili haplotip olarak belirtilmiştir. -1639 G>A polimorfizmi VKORC1*2 haplotipini belirlemektedir (51). VKORC1 genindeki polimorfizmler Avrupa, Afrika, Çin ve Japon populasyonlarıyla yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (55).

2.6. Varfarin Farmakogenetiği

Varfarinin klinikte kullanımı, ilaca karşı cevaptaki bireysel çeşitlilik, terapötik aralığının sınırlı olması ve ilaca bağlı kanama riski bulunmasından dolayı zordur. Varfarin doz gereksinimi, antikoagülasyon stabilitesi ve kanama riski; K vitamini alınımı, hastalıklar, yaş, cinsiyet, beraberinde kullanılan ilaçlar ve kütle-ağırlık indeksi gibi çevresel faktörlere ve genetik faktörlere bağlıdır. Varfarin tedavisinde fayda-zarar profilini geliştirmek için bütün bu sayılan faktörlerin göz önünde tutulması gereklidir.

Varfarin dozunun tam olarak doğru bir şekilde tespiti ile ilgili farmakogenetik çalışmalara karşı ilgi bir hayli artmış durumdadır. Bu konuyla ilgili son yıllarda yapılan

birçok çalışma mevcut olup; şimdiye kadar varfarin aktivitesi ile ilgili yaklaşık 30 gen tespit edilmiştir. Bu genler üzerinde binlerce fonksiyonu bilinmeyen tek nokta polimorfizmleri bulunmuştur. Aynı zamanda protein işlevini değiştiren 100'ün üzerinde genetik varyant tanımlanmıştır. Varfarin aktivitesi ile ilgili genler Şekil 2.5'te gösterilmektedir (76).



Şekil 2.5. Varfarin biyotransformasyonu ve K vitamini aktivitesi üzerine etkili olan genler

(Wadelius, M., Pirmohamed, M., 2006, Pharmacogenetics of warfarin: current status and future challenges, Pharmacogenomics J., 7 (2): s. 4'ten modifiye edilerek alınmıştır.)

2.7. İnsan Genetik Çeşitliliği

Mutasyonların çoğu zararlı değildir ancak seçici olarak nötral oldukları da düşünülmektedir. Anne babanın birinin genomunda olmayan baz çifti değişikliklerinin, her bir yeni zigotta 100 kadar olacağı beklenmektedir. Bu değişimlerin çoğu kodlayan dizilerde değildir. Kromozomların kodlamayan bölgelerinde meydana gelirler. Evrim yönü sırasında, nükleotid değişimlerinin sabit akımı, genetik çeşitliliği ve bireyselliği sağlamaktadır (54).

2.7.1. Genetik polimorfizm kavramı

Dünyadaki birçok bireyin kromozomlarında aynı yerde bulunan DNA dizileri birbirine benzerlik gösterir. Populasyonda iki farklı birey arasında DNA'nın yaklaşık 1000 bp uzunluğundaki herhangi bir kısmı ortalama sadece bir baz çifti değişimi içerir. Bir genin belli bir lokusta yer alan alternatif kopyalarından her birine allel denir. Allellerin genel populasyonda kromozomlarda %1 den fazla bulunması genetik polimorfizm olarak tanımlanmaktadır. İntronlarda ve genler arasında sınırlandırılmış olmuş DNA dizilerinde değişim gösteren bazı alleller vardır. Kodlanan dizi farklılıkları protein çeşitliliğine ve farklı fenotiplerin ortaya çıkmasına sebep olurlar. Genetik hastalığa sebep olan zararlı mutasyonların birçoğu nadir değişimlerdir. Ağır hastalığa neden olan mutant alleller genetik çeşitliliğin bir sonucudur. Birçok proteinin, farklı populasyonlarda nisbeten yaygın ve ayrılabilen şekillerde olduğu tesbit edilmiştir (70).

2.7.1.1. Restriksiyon fragmentinin uzunluk polimorfizmleri

Restriksiyon enzimler, DNA'daki dizileri özgül olarak tanır ve sonuç olarak genomik DNA'da dizi değişiklikleri, belirli kesim bölgeleri yaratır veya onları yok eder. Bu nedenden dolayı boyutları değişen bir veya birden fazla DNA fragmenti Southern blot ve klonlanmış DNA probu ile hibridizasyondan sonra görünür hale gelir. 1970'lerin sonunda genom analizi için Southern blot tekniğinin uygulanmasından kısa bir süre sonra, restriksiyon enzim bölgelerinin dağılımının bütün insanlarda tam olarak aynı olmadığı keşfedilmiştir. Her ne kadar bazı nükleotid değişikliklerinin varlığı, mutasyon ve protein polimorfizmleri hakkındaki bilgiler vasıtası ile saptanabildiyse de, Southern

blotting tekniğiyle belirlenen değişim derecesi bir sürpriz olarak ortaya çıkmıştır. Southern blot ile belirlenen enzim kesim yerlerindeki DNA değişimleri, Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) olarak adlandırılır (54).

Belirli restriksiyon endonükleaz kesilme bölgelerindeki değişimlerden oluşan RFLP'ler, tek nükleotid polimorfizmleri (Single Nucleotide Polymorphism) olarak bilinirler. Tek nükleotid polimorfizmleri genetik haritalar için belirleyici olarak kullanılabilir. Kompleks hastalıklardan sorumlu belirli genlerin kalıtımını incelemek için tek nükleotid polimorfizmlerine gerek vardır.

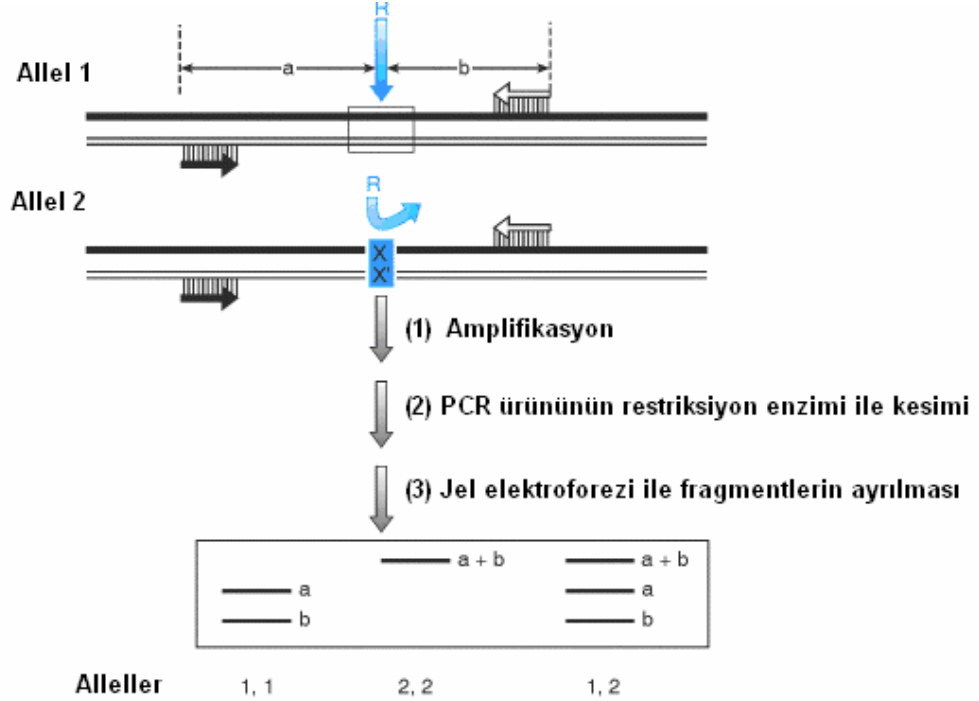
DNA sarmalı özgül restriksiyon enzimleri ile kesildiği zaman farklı uzunluklarda fragmentler oluşur ve bu fragmentler, elektroforetik davranışlarındaki farklılıklar ile jel elektroforezinde gözlemlenebilirler (54).

2.7.1.2. Polimorfik Markırların Genotiplmesinde PCR'ın Kullanımı

Tek nükleotid polimorfizmleri Southern blot ile ortaya konabildiği gibi, polimeraz zincir reaksiyonunun ardından restriksiyon enzim kesimi yöntemi kullanılarak da belirlenebilir (Şekil 2.6). Bunun için polimorfik bölgeyi içine alan primerler kullanılarak PCR aracılığıyla bölge çoğaltılır. Uygun restriksiyon enzimi ile PCR ürününün kesiminin ardından elde edilen fragmentler agaroz jel elektroforezinde yürütölür ve analiz edilir (70).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), herhangi bir DNA örneğinde istenen bölgenin çoğaltılmasını sağlayan hızlı bir in vitro yöntemdir. PCR, elde bulunan DNA örneklerinde seçici olarak istenen bölgenin çoğaltılmasını sağladığı için, çoğaltılacak bölge hakkında önceden bilgi sahibi olunmasını gerektirmektedir. Bu bilgi, istenen bölgeyi çoğaltmak için gereken, 15-25 nükleotid arasında değişen uzunluklarda bir çift primerin belirlenebilmesi için şarttır. Denatüre edilen kalıp DNA içerisine primerler eklendikten sonra, bu primerler tamamlayıcı dizilerine bağlanırlar. Uygun bir polimeraz enzimini ve dört çeşit deoksinükleozid trifosattan (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) yeterli

miktarda bulunması halinde, primerler hedef DNA'nın komplementlerinin sentezlenmesini sağlarlar (70).



Şekil 2.6. Polimorfik markırların genotiplemesinde PCR'ın kullanımı.

(Strachan, T., Read, A.P., 1999, Human Molecular Genetics 2, 2nd Edition, BIOS Scientific Publishers, Ltd., Oxford, UK,'den modifiye edilerek alınmıştır.)

PCR, bir zincir reaksiyonudur, çünkü, yeni sentezlenen DNA dalları, ardışık döngülerde sentezlenecek diğer DNA'lar için kalıp görevi yapmaktadırlar. Isı ile bozulmayan polimeraz enzimlerinin kullanımı gerekmektedir çünkü PCR ısı değişimlerine dayanan üç temel basamaktan oluşmaktadır:

- Denatürasyon : Yaklaşık 93-95⁰C'de gerçekleşir. DNA tek dal haline gelmektedir.
- Bağlanma : 50-70⁰C arasında gerçekleşen ve primerlerin hedef DNA'ya bağlanmasının gerçekleştiği basamaktır
- Uzama : 70-75⁰C arasında gerçekleşir ve yeni DNA dallarının elde edildiği aşamadır (70).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamıza, Bursa Uludağ Üniversitesi Kardiyoloji Anabilim Dalı'nda tedavi görmekte olan 234 varfarin kullanan olguda bireylerarası varfarin doz değişkenliğinin belirlenmesi ve ayrıca Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nın belirlemiş olduğu 200 sağlıklı birey üzerinde Türk popülasyonu genotip dağılımının belirlenmesi amacıyla CYP2C9 ve VKORC1 gen polimorfizmleri PCR-RFLP yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Varfarin kullanan olguların demografik özellikleri hasta takip formlarından temin edilmiştir. Çalışmamıza dâhil ettiğimiz sağlıklı bireylere ait yaş ve cinsiyet bilgileri hasta dosyalarından alınmıştır.

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan gereçler

PCR aleti (thermal cycler) (PE GenAmp PCR System 9700)

Jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi (Gene Genius)

Elektroforez aleti (Consort E844)

Elektroforez için güç kaynağı (EKR)

Hassas terazi (Setra)

Pipet takımı (Gilson)

Manyetik karıştırıcı (ısıtıcılı) (Heidolph)

Mikrosantrifüj (Eppendorf)

Pastör pipeti

Su banyosu (Nüve)

Vorteks (Heidolph)

Mezür (100'lük 1000'lik)

Beher (250'lik, 500'lük)

Deep-freeze (Arçelik)

Mikrodalga fırın (Arçelik)

Buzdolabı (Arçelik)

Falkon tüpü (50'lik)
Ependorf Tüpü (1,5 ml'lik)
PCR tüpleri (strip) (Perkin Elmer)
Toplama tüpü (QIAGEN)
Spin kolonu (QIAGEN)
Mini soğutucu
Enjektörlük bidistile su
EDTA'lı tüp

3.1.2. Kullanılan kimyasal malzemeler

Rutin Agaroz (Invitrogen)
Borik asit (Sigma)
dNTP seti (Biotools)
Etanol (95%) (Tekel)
Etidyum Bromid (Sigma)
Proteinaz K (Mobio UltraClean)
TrismaBase (Sigma)
MgCl₂ (PCR için) (Biotools)
10XPCR buffer (Biotools)
Buffer B2 Solüsyonu(Mobio UltraClean)
Buffer B3 Solüsyonu (Mobio UltraClean)
Buffer B4 Solüsyonu (Mobio UltraClean)
Buffer B5 Solüsyonu (Mobio UltraClean)
Moleküler Weight Marker (Promega, GibcoBRL)
Taq DNA polimeraz (Biotools, AppliedBiosystems)
6X Jel yükleme tamponu (Sigma)
Zsp2 I restriksiyon enzimi (SibEnzyme)
AsuC2 I restriksiyon enzimi (SibEnzyme)
Bme18 I restriksiyon enzimi (SibEnzyme)

3.2. Yöntemler

3.2.1. *Mobio ultraclean DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak periferik kandan DNA izolasyonu*

- Olgulardan 4–6 cc taze kan, EDTA'lı tüplere alınmıştır.
- 1.5 ml'lik Ependorflara 20 µl Proteinaz K eklenmiştir.
- 200 µl'lik kan örneği tüp içerisine eklenip 15 saniye vortekslenmiştir.
- 65 santigrat derecede 10 dakika inkübe edilmiştir.
- 1.5 ml'lik ependorf tüpünün kapağında oluşan damlacıkların düşmesi için kısa süreli santrifüj yapılmıştır.
- 200 µl B2 solüsyonu eklenmiştir.
- Dikkatli bir şekilde tüm karışım ependorf tüpünden kit ile birlikte gelen filtreli tüpe (2ml lik toplama tüpünün içerisinde bulunan) aktarılmıştır ve 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Filtreli tüp 2 ml'lik temiz başka bir toplama tüpü içerisine alınmıştır.
- Filtreli tüpün kapağı açılıp üzerine 500 µl B3 solüsyonu eklenmiştir. Kapağı kapatılıp 13.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.
- Filtratl tüp dikkatli bir şekilde toplama tüpü içerisinden çıkarılmış toplama tüpü içerisindeki süzüntü dökülmüş ve filtreli tüp tekrar toplama tüpüne yerleştirildikten sonra üzerine 500 µl B4 solüsyonu eklenmiştir.
- Filtreli tüp kapağı kapatılıp 13.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.
- Filtratl tüp atılmıştır ve filtreli tüp 1,5 ml'lik temiz ependorf tüpleri içerisine yerleştirildikten sonra üzerine 200 µl B5 solüsyonu eklenmiştir. 65 derecede 5 dakika inkübe edildikten sonra 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Filtreli tüp 1,5 ml'lik ependorf tüpünden çıkarılmış ve elde edilen DNA ependorf tüpünde -20 derecede saklanmıştır.

3.2.2. İzole edilen DNA örneklerinin PCR ile amplifikasyonu

AsuC2 I enzimi ile kesim için VKORC1 geni amplifikasyon karışımı;

ddH ₂ O	30.8 µl
10xPCR buffer	5 µl
dNTP mix	1 µl
primer 1	2 µl
primer 2	2 µl
Taq pol	0.2 µl
DNA	5 µl
MgCl ₂	4 µl
	+

	50 µl

Bme18 I enzimi ile kesim için CYP2C9 Ekzon 3'ün amplifikasyon karışımı;

ddH ₂ O	31.8 µl
10xPCR buffer	5 µl
dNTP mix	1 µl
primer 1	1.5 µl
primer 2	1.5 µl
Taq pol	0.2 µl
DNA	5 µl
MgCl ₂	4 µl
	+

	50 µl

Zsp2 I enzimi ile kesim için CYP2C9 Ekzon 7'nin Nested PCR eksternal basamağı amplifikasyon karışımı;

ddH ₂ O	28.25 µl
10xPCR buffer	5 µl
dNTP mix	1 µl
primer 1	2 µl
primer 2	2 µl
Taq pol	0.25 µl
DNA	7.5 µl
MgCl ₂	4 µl
	+

	50 µl

Zsp2 I enzimi ile kesim için CYP2C9 Ekzon 7'nin Nested PCR internal basamağı amplifikasyon karışımı;

ddH ₂ O	33.8 µl
10xPCR buffer	5 µl
dNTP mix	1 µl
primer 1	2 µl
primer 2	2 µl
Taq pol	0.2 µl
Eksternal PCR ürünü	2 µl
MgCl ₂	4 µl
	+

	50 µl

3.2.3. *VKORC1* geni için kullanılan amplifikasyon şartları

94 °C de 2 dakika → Başlangıç denatürasyonu

94 °C de 20 saniye denatürasyon
58 °C de 20 saniye bağlanma
72°C de 30 saniye uzama

} 35 döngü

En sonunda 72°C de 5 dakika tutularak ürünün arttırılması sağlanmıştır.

3.2.4. *CYP2C9* Ekzon 3 için kullanılan amplifikasyon şartları

94 °C de 2 dakika → Başlangıç denatürasyonu

94 °C de 20 saniye denatürasyon
65 °C de 20 saniye bağlanma
72°C de 30 saniye uzama

} 35 döngü

En sonunda 72°C de 5 dakika tutularak ürünün arttırılması sağlanmıştır.

3.2.5. *CYP2C9* Ekzon 7 eksternal nested-PCR basamağı için kullanılan amplifikasyon şartları

94 °C de 2 dakika → Başlangıç denatürasyonu

94 °C de 20 saniye denatürasyon
60 °C de 20 saniye bağlanma
72°C de 30 saniye uzama

} 35 döngü

En sonunda 72°C de 5 dakika tutularak ürünün arttırılması sağlanmıştır.

3.2.6. VKORC1 geni için kullanılan primerler

AsuC2 I için;

F - 5'- GCCAGCAGGAGAGGGAAATATC - 3'

R - 5' - CCAAGACGCTAGACCCAATGG - 3'

3.2.7. CYP2C9 Ekzon 3 için kullanılan primerler

Bme18 I için;

F- 5' – GGA GGA TGG AAA ACA GAG ACT TA – 3'

R– 5' – TGA GCT AAC AAC CAG GAC TCA T – 3'

3.2.8. CYP2C9 Ekzon 7 için kullanılan primerler

Zsp2 I için;

Cyp Ext. F1 - 5'- CCATCCAGGTCAGTAACAGGTCAG – 3

Cyp Int. F2 - 5' – TGCACGAGGTCCAGAGATGC - 3'

Cyp Ext. R1 – 5' – CTGGAGAACACACACTGCCAGAC - 3'

Cyp Int. R2 – 5'- GATACTATGAATTTGGGACTTCG – 3'

3.2.9. Amlifikasyon ürünlerinin restriksiyon endonükleazlarla kesimi

3.2.9.1. VKORC1 Geni promotor bölgesinin AsuC2 I enzimi ile kesimi

8 ml'lik PCR ürününe 2 ml enzim buffer ve 0.3 ml enzim eklenmiş, 37 °C 16 saat inkübe edilerek kesim yapılmıştır.

AsuC2 I Buffer	→ 2 ml	}	37 °C de 16 saat inkübasyon
AsuC2 I enzim	→ 0.3 ml		
ddH ₂ O	→ 9.7 ml		
PCR ürünü	→ 8 ml		

3.2.9.2. CYP2C9 Ekzon 3 bölgesinin Bme18 I enzimi ile kesimi

10 ml'lik PCR ürününe, 1 ml enzim buffer ve 1 ml enzim eklenmiş, 37 °C'de 16 saat inkübe edilerek kesim yapılmıştır.

Bme18 I Buffer	→ 1 ml	}	37 °C de 16 saat inkübasyon
Bme18 I enzim	→ 1 ml		
ddH ₂ O	→ 8 ml		
PCR ürünü	→ 10 ml		

3.2.9.3. CYP2C9 Ekzon 7 bölgesinin Zsp2 I enzimi ile kesimi

8 ml'lik PCR ürününe 2 ml enzim buffer ve 0.4 ml enzim eklenmiş, 37 °C'de 16 saat inkübe edilerek kesim yapılmıştır.

Zsp2 I Buffer	→ 2 ml	}	37 °C de 16 saat inkübasyon
Zsp2 I enzim	→ 0.4 ml		
ddH ₂ O	→ 9.6 ml		
PCR ürünü	→ 8 ml		

3.2.10. Enzim kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile ayrılması

PCR örneklerinin Zsp2I, Bme18I ve AsuC2I restriksiyon enzimleri ile kesimlerinden sonra oluşan ürünlerin incelenmesi için %2 lik agaroz jeli hazırlanarak örnekler agaroz jel elektroforezi yöntemine tabi tutulmuştur. %2 lik agaroz jel için hazırlanan agaroz mikrodalga fırın kullanılarak yüksek ısıda 1XTBE solüsyonu içinde çözüldürülmüştür. Çözeltinin soğuması beklenerek içerisine konsantrasyonu 0.5 µl/ml olacak şekilde etidyum bromür eklenmiştir.

-Elektroforeze başlamadan önce tank, taraklar ve jel yatağı temizlenip, tankın benç üzerindeki dengesi ayarlanmış, tarak ve jel küveti tanka yerleştirilip, hazırlanan jel küvete dökülmüştür. Jel donduktan sonra tank 1×TBE çözeltisi ile doldurulmuştur.

-20 µl PCR ürünü alınıp, üzerine 2.5 µl 6X lik yükleme tamponundan konarak karıştırılmış ve jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir [Her jelin ilk ve son kuyusuna marker yüklenmiştir].

-Yükleme işlemi bittikten sonra elektrodlar yerleştirilerek 120 voltta yürütülmüştür.

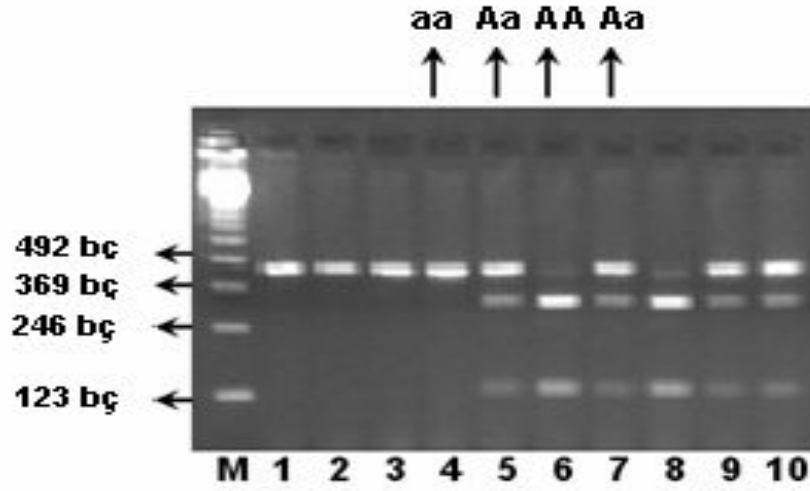
-Elektroforez tamamlandıktan sonra jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi ile incelenerek görüntüsü alınmıştır.

3.2.11. Jelin görüntüleme cihazı ile değerlendirilmesi

Kesilen DNA örnekleri agaroz jel elektroforeziyle ayrılmış ve jel görüntüleme sistemi yardımı ile AA, Aa, aa, BB, Bb, bb ve ZZ, Zz, zz genotipleri tanımlanmıştır. Sonuçlara göre bireyler homozigot dominant, heterozigot ve homozigot resesif olarak adlandırılmıştır.

3.2.12. *VKORC1* Geninin *AsuC2 I* enzimi ile kesim sonucu

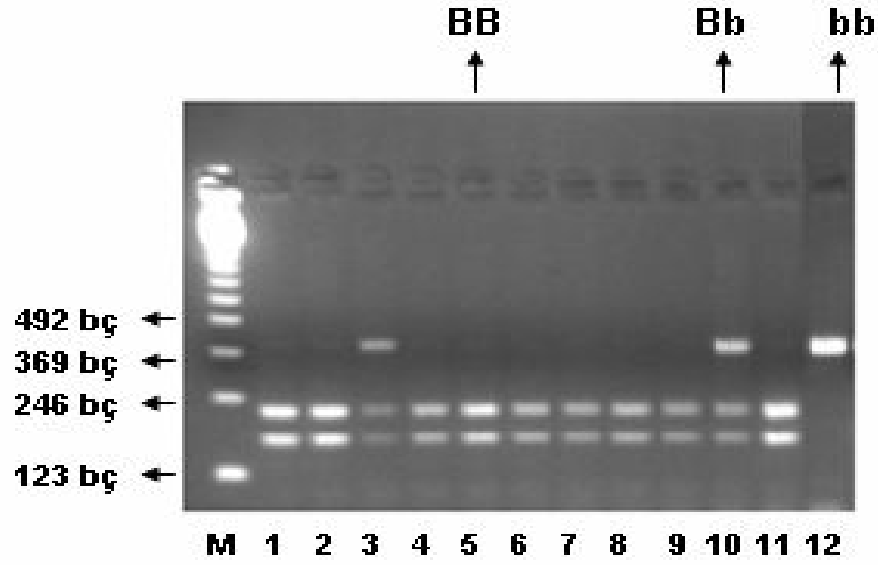
449 bç'lik PCR ürününün *AsuC2 I* RE ile kesimi sonucu, kesim bölgesinin olup olmamasına ve kesim sonucu oluşan fragmentlerin büyüklüğüne göre bireyler AA (326 bç ve 123 bç), Aa (449 bç, 326 bç, 123 bç) ve aa (449 bç) olarak adlandırılmıştır.



Resim 3.1. *AsuC2 I* enzimi ile *VKORC1* geni kesim sonucu (M: marker, 1–10 örnekler)

3.2.13. *CYP2C9* Ekzon 3 bölgesinin *Bme18 I* enzimi ile kesim sonucu

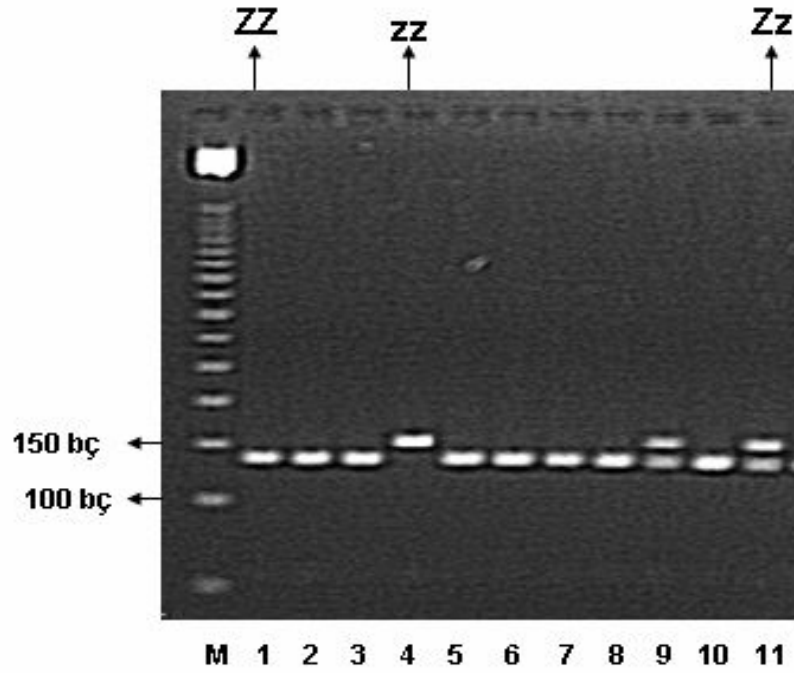
396 bç'lik PCR ürününün *Bme18 I* RE ile kesimi sonucu, kesim bölgesinin olup olmamasına ve kesim sonucu oluşan fragmentlerin büyüklüğüne göre bireyler BB (223 bç ve 173 bç), Bb (396 bç, 223 bç, 173 bç) ve bb (396 bç) olarak adlandırılmıştır.



Resim 3.2. Bme18 I enzimi ile CYP2C9 geni Ekzon 3 bölgesinin kesim sonucu (M: Marker, 1-12: örnekler)

3.2.14. CYP2C9 Ekzon 7 bölgesinin Zsp2 I enzimi ile kesim sonucu

Nested PCR sonucu oluşan 797 bç'lik eksternal PCR ürününden, ikinci PCR sonucu 156 bç uzunluğunda internal PCR ürünü elde edilmiştir. 156 bç'lik internal PCR ürününün Zsp2 I RE ile kesim sonucu, kesim bölgesinin olup olmamasına ve kesim sonucu oluşan fragmentlerin büyüklüğüne göre bireyler ZZ (137 bç ve 19 bç), Zz (156 bç, 137 bç ve 19 bç), zz (156 bç) olarak adlandırılmıştır. %2'lik agaroz jel kullanılarak yapılan elektroforez işleminde 19 bç fragmenti görülememekle birlikte, kesim sonucu oluşan diğer iki fragmete göre yeterli değerlendirme yapılabilmektedir.



Resim 3.3. Zsp2 I enzimi ile CYP2C9 geni Ekzon 7 bölgesinin kesim sonucu (M: Marker, 1-11: örnekler)

3.2.15. Kullanılan çözeltiler

3.2.15.1. Agaroz jel elektroforezi çözeltileri

-%2'lik Agaroz jel Hazırlanması:

- 6 gram agaroz tartılıp bir beher içinde 1XTBE solüsyonu ile 300 ml ye tamamlanmış ve mikrodalga fırında %100 lük güçten %10 luk güce kadar kademeli olarak azaltılarak 5 dakika kaynatılmıştır.

- 20X TBE Stok Solüsyonunun Hazırlanması;

121 gr Tris (1M), 61.7 gr borik asit (1M) ve 7.44 gr EDTA(20mM) tartılarak, 1000 ml distile su içerisinde karıştırıcı yardımı ile çözündürülmüştür.

3.2.16 İstatistiksel analizler

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 16.0 istatistik programı kullanılmıştır. Olgulara ait demografik özellikler ile CYP2C9 genotip varyantları ve VKORC1 genotip frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunup bulunmaması ANOVA testi ile değerlendirilmiştir. Varfarin kullanan olgulara ait parametrelerin, bireylerarası varfarin doz değişkenliği üzerine etkisini belirlemek için regresyon analizi uygulanmıştır.

4. BULGULAR

Bursa Uludağ Üniversitesi Kardiyoloji Anabilim Dalı'nda tedavi görmekte olan 234 varfarin kullanan olguda bireylerarası varfarin doz değişkenliğinin belirlenmesi ve ayrıca Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nın belirlemiş olduğu 200 sağlıklı birey üzerinde Türk populasyonu genotip dağılımının belirlenmesi amacıyla CYP2C9 ve VKORC1 gen polimorfizmleri PCR-RFLP yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

Varfarin tedavisi gören olguların cinsiyet, yaş, kullandığı günlük varfarin dozu, INR düzeyi, varfarin kullanmasını gerektiren endikasyon, varfarinle birlikte kullandığı diğer ilaçlar ve sahip olduğu diğer endikasyonlar olgular için hazırlanmış olan hasta takip formundan temin edilmiştir. Türk populasyon taraması amacıyla çalışmaya katılan 200 sağlıklı bireyin cinsiyet ve yaş bulguları hasta dosyalarından temin edilmiştir.

4.1. Varfarin Kullanan Olgulara Ait Bulgular

Çalışmaya katılan olguların 118'i erkek, 116'sı kadın olup yaş ortalaması ise $56.38 \pm 12,6$ olarak saptandı. Olguların kullandığı günlük varfarin dozu, INR düzeyi, hedef INR düzeyi ve hedef INR değer aralığında bulunma durumları, varfarin kullanmasını gerektiren endikasyonu, varfarinle birlikte kullandığı diğer ilaçlar ve sahip olduğu diğer endikasyonlarına ait demografik özellikler çizelgelerde ayrıntılı bir şekilde verilmektedir.

Çizelge 4.1 ve 4.2. Çalışma olgularının cinsiyet, yaş, INR düzeyi, hedef INR düzeyi ve kullandığı varfarin dozu bilgilerine göre dağılımları

Demografik özellikler	n: 234	%
Cinsiyet		
Kadın	116	49.6
Erkek	118	50.4
Hedef INR Düzeyi		
1.5-2,5 arası	62	26.5
2-3 arası	172	73.5

Demografik özellikler (n: 234)	Ortalama
INR Düzeyi	2.75 ± 0.84
Günlük Varfarin Dozu (mg/gün)	4.85 ± 2.09
Yaş	56.38 ± 12,6

Çizelge 4.3. Çalışma olgularının hedef INR ve hedef INR değer aralıklarında bulunma durumlarına göre dağılımları

Hedef INR	n	%	Hedef INR	N	%
1,5 - 2,5	62	26,5	İç	88	37,6
2 - 3	172	73,5	Dış	146	62,4
Toplam	234	100	Toplam	234	100

4.1.1. Varfarin kullanan olgulara ait endikasyonlar

Çalışmaya katılan olguların varfarin tedavisi için sahip olduğu endikasyonlar çizelge 4.4'te belirtilmiştir. Çizelge 4.4'te, kapak replasmanı yapılan hastalar (n: 72), atriyal fibrilasyon (n: 40), venöz tromboembolizm (derin ven trombozu: 6 ve pulmoner emboli: 6), hem kapak replasmanı yapılan hem de atriyal fibrilasyon endikasyonu bulunan olgular (n: 72) ve diğer endikasyonlara sahip olguların (serebro vasküler olay: 18 olgu, dilate kardiyomyopati: 20 olgu) dağılımları belirtilmiştir.

Çizelge 4.4. Çalışma olgularına ait endikasyon dağılımları

Endikasyon	n	%
Kapak Replasmanı	72	30.8
Atriyal Fibrilasyon	40	17
Venöz Tromboembolizm	12	5.1
Kapak Replasmanı ve Atriyal Fibrilasyon	72	30.8
Diğer	38	16.3
Toplam	234	100

Çizelge 4.5 ve 4.6. Çalışma olgularının varfarin tedavisi sırasında kullandığı diğer ilaçlar ve olgularda bulunan diğer hastalıkların dağılımları

İlaçlar	n	%
Aspirin	50	21.7
Kinidin	8	3.4
Diğer İlaçlar	4	1.7
Kullanmayan	176	73.2
Toplam	234	100

Diğer endikasyonlar	n	%
Kollajen doku hastalığı	6	2.5
Hipertiroidi	2	0.85
Malignite	6	2.5
Karaciğer fonksiyon bozukluğu	4	1.7
Diğer endikasyonu bulunmayan	216	92.3
Toplam	234	100

4.2. Çalışmanın İstatistiksel Bulguları

Çalışmada olgu grupları ile sağlıklı bireylerde belirlenen parametreler ve genotip frekanslarının istatistiksel analizleri SPSS 16.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Belirlenen parametreler çizelgelerde (Ç 1-6) ayrıntılı bir şekilde verilmiş olup, bu parametrelerle genotip frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunup bulunmaması ANOVA testi ile değerlendirilmiştir. Varfarin kullanan

olgulara dozaj algoritmi oluşturmak için VKORC1, CYP2C9 genotip varyantları ve yaş parametreleri kullanılarak SPSS 16.0 istatistik programı kullanılarak lineer regresyon analizi uygulanmıştır.

4.2.1. Varfarin kullanan olgularda VKORC1 genotipleri ve CYP2C9 genotip varyant frekansları

Çizelge 4.7. Çalışmaya katılan varfarin kullanan olgularda CYP2C9 genotip frekans dağılımları

Varfarin kullanan olgular		
CYP2C9 genotip varyantları	N	%
CYP2C9 *1/*1	138	59
CYP2C9 *1/*2	46	19,7
CYP2C9 *2/*2	12	5,1
CYP2C9 *1/*3	34	14,5
CYP2C9 *2/*3	4	1,7
CYP2C9 *3/*3	0	0
Toplam	234	100,0

Çizelge 4.8. Çalışmaya katılan varfarin kullanan olgularda VKORC1 genotip frekans dağılımları

Varfarin kullanan olgular		
VKORC1 genotipleri	n	%
-1639 GG	68	29,1
-1639 GA	112	47,9
-1639 AA	54	23,1
Toplam	234	100,0

Çizelge 4.9. Varfarin kullanan olgularda VKORC1 ve CYP2C9 genotiplerinin kombine frekansları

VKORC1 genotipleri	CYP2C9 genotip varyantları					Toplam
	*1/*1	*1/*2	*2/*2	*1/*3	*2/*3	
-1639 GG	36 (15,4)	20 (8,5)	6 (2,55)	6 (2,55)	0	68 (29,1)
-1639 GA	70 (29,9)	20 (8,5)	6 (2,55)	14 (6)	2 (0,85)	112 (47,9)
-1639 AA	32 (13,7)	6 (2,55)	0	14 (6)	2 (0,85)	54 (23,1)
Toplam	138 (59)	46 (19,7)	12 (5,1)	34 (14,5)	4 (1,7)	234 (100)

4.2.2. Varfarin kullanan olgularda CYP2C9 genotip varyantları ve VKORC1 genotiplerinin, olguların INR bilgilerine göre dağılımları

Çalışmamızda aldığımız verilere göre, varfarin kullanan olgularda saptanan ortalama INR değeri dağılımları ile CYP2C9 genotip varyantları (P=0.156) ve VKORC1 genotipleri (P=0.087) arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır. Ayrıca olguların hedef INR değerleri ve bu değer aralığında bulunma durumlarına göre CYP2C9 ve VKORC1 genotipleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (CYP2C9 genotip varyantları için sırasıyla P=0,785 ve P=0,93; VKORC1 genotipleri için P=0,99 ve P=0,33).

Çizelge 4.10 ve 4.11. Çalışma olgularında CYP2C9 ve VKORC1 genotiplerine göre ortalama INR değerleri dağılımı

CYP2C9 genotip varyantları	Ortalama INR Değeri
*1/*1	2.85
*1/*2	2.53
*2/*2	2.80
*1/*3	2.51
*2/*3	3.65
Toplam (n=234)	2,75

VKORC1 genotipleri	Ortalama INR Değeri
-1639 GG	2,58
-1639 GA	2,71
-1639 AA	3,03
Toplam (n=234)	2,75

Çizelge 4.12. VKORC1 genotiplerine göre hedef INR değerleri dağılımları

Hedef INR	VKORC1 genotipleri			
	-1639 GG	-1639 GG	-1639 GG	-1639 GG
P=0,99				
1,5 - 2,5	18	30	14	62
2 – 3	50	82	40	172
Toplam	68	112	54	234

Çizelge 4.13. Çalışma olgularında CYP2C9 genotipleri ile Hedef INR değerleri dağılımları

Hedef INR	CYP2C9 genotip varyantları					
	*1/*1	*1/*2	*2/*2	*1/*3	*2/*2	Toplam
P=0,785						
1,5 - 2,5	34	10	4	12	2	62
2 – 3	104	36	8	22	2	172
Toplam	138	46	12	34	4	234

Çizelge 4.14. Çalışma olgularında CYP2C9 genotipleri ile olguların Hedef INR değer aralığında bulunma durumlarına göre dağılımları

Hedef INR	CYP2C9 genotip varyantları					Toplam
	*1/*1	*1/*2	*2/*2	*1/*3	*2/*3	
P=0,93						
Dış	54	14	4	14	2	88
İç	84	32	8	20	2	146
Toplam	138	46	12	34	4	234

Çizelge 4.15. VKORC1 genotipleri ile olguların hedef INR değer aralığında bulunma durumlarına göre dağılımları

Hedef INR	VKORC1 genotipleri			Toplam
	-1639 GG	-1639 GA	-1639 AA	
P=0,33				
İç	20	42	26	88
Dış	48	70	28	146
Toplam	68	112	54	234

4.2.3. Varfarin kullanan olgularda CYP2C9 ve VKORC1 genotip dağılımlarına göre ortalama günlük varfarin doz miktarı değerleri

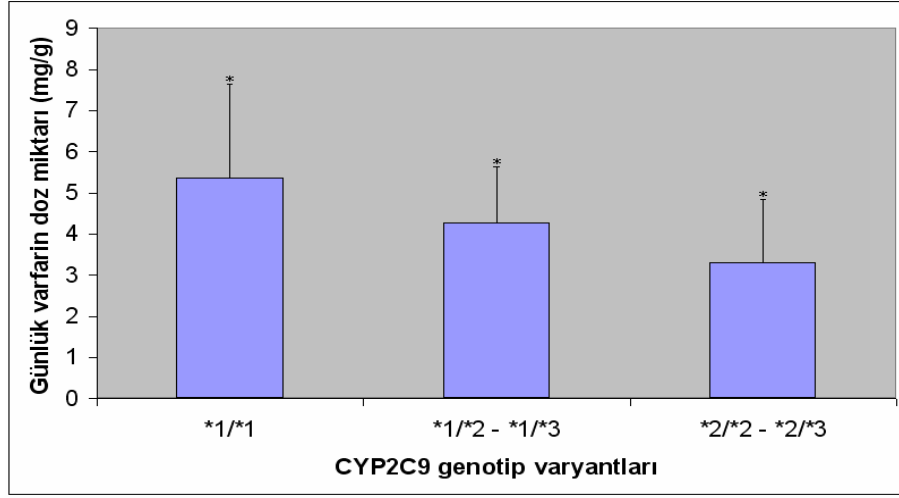
Çizelge 4.16. Çalışma olgularında CYP2C9 genotip varyantlarına göre ortalama günlük varfarin dozu dağılımları

CYP2C9 genotip varyantları	Ortalama günlük varfarin doz miktarı
*1/*1 (138)	5,36 mg/g
*1/*2 (46)	4,69mg/g
*2/*2 (12)	3,69 mg/g
*1/*3 (34)	3,71 mg/g
*2/*3 (4)	2,14 mg/g
Toplam (n=234)	4,85 mg/g

Çizelge 4.17. Çalışma olgularında VKORC1 genotiplerine göre ortalama günlük varfarin dozu dağılımları

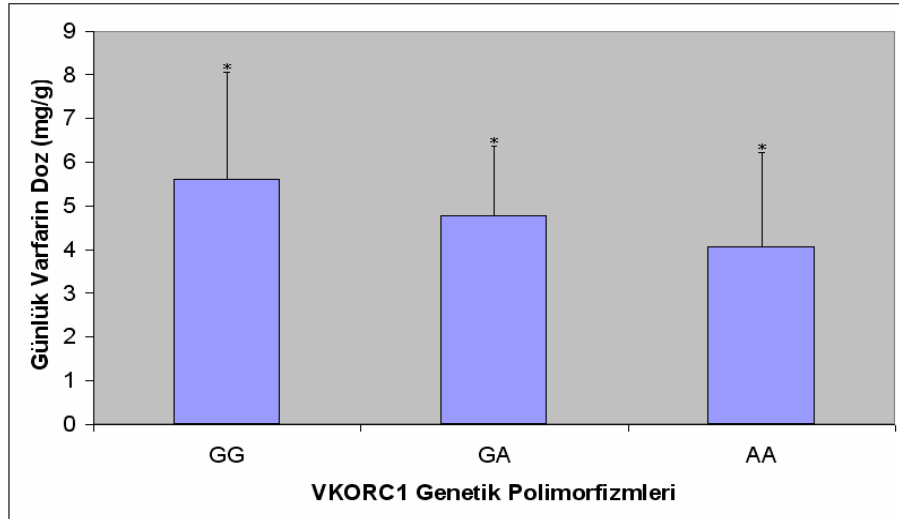
VKORC1 genotipleri	Ortalama günlük varfarin doz miktarı
-1639 GG	5,60 mg/g
-1639 GA	4,77 mg/g
-1639 AA	4,06 mg/g
Toplam	4,85 mg/g

CYP2C9 geni için heterozigot varyant genotiplerini taşıyan hastalarda (*1/*2 ve *1/*3) günlük varfarin dozu gereksinimi 4.28 mg/g olarak saptanırken, normal olgularda (*1/*1) bu miktar 5.36 mg/g olarak tespit edilmiştir (P=0.019). Aynı şekilde CYP2C9 genotipleri açısından homozigot mutant ve birleşik heterozigot mutant varyant genotiplerini taşıyan hastalarda (*2/*2 ve *2/*3) günlük varfarin doz gereksinimi 3.30 mg/g olarak belirlenmiş ve normal olgulara göre 2.05 mg/g daha az doz gereksinimi gösterdikleri saptanmıştır (P= 0.017). Varfarin dozu ile CYP2C9 genotip varyantları arasındaki ilişki şekil 4.1’de gösterilmiştir



Grafik 4.1. CYP2C9 genotiplerinde ortalama günlük varfarin doz miktarı grafiği

VKORC1 genotipleri açısından normal genotipe (-1639 GG) sahip olgulara göre günlük varfarin doz gereksinimi heterozigot genotipe (-1639 GA) sahip bireylerde 0.83 mg/g daha az değerde bulunmuştur (P=0.138). Aynı şekilde VKORC1 geni için homozigot mutant (-1639 AA) olgularda günlük varfarin doz gereksinimi 4.06 mg/g olup normal olgulara göre 1.54 mg/g daha az olarak bulunmuştur (P=0.01) (Şekil 4.2).



Grafik 4.2. VKORC1 genotiplerinde ortalama günlük varfarin doz miktarı grafiği

4.2.4. Varfarin kullanan olgularda gözlenen endikasyonlar ile VKORC1, CYP2C9 genotip varyantları ve günlük varfarin dozuna göre dağılımları

Varfarin kullanan olgularda gözlenen endikasyonlar ile CYP2C9 genotip varyantları, VKORC1 genotipleri ve günlük varfarin dozu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (P=0.247, P=0.523 ve P=0.455).

Çizelge 4.18. Çalışma olgularında gözlenen endikasyonlar ile CYP2C9 ve VKORC1 genotipleri arasında dağılımları

CYP2C9 Genotip varyantları (P=0.247)	Kapak replasmanı	Atriyal Fibrilasyon	Kapak replasmanı ve Atriyal Fibrilasyon	Venöz Tromboembolizm	Diğer
*1/*1	46 (19,7)	20 (8,5)	40 (17)	6 (2,6)	26 (11,1)
*1/*2	14 (6)	8 (3,4)	14 (6)	2 (0,85)	8 (3,4)
*2/*2	6 (2,6)	0	4 (1,7)	0	2 (0,85)
*1/*3	6 (2,6)	10 (4,3)	12 (5,1)	4 (1,7)	2 (0,85)
*2/*3	0	2 (0,85)	2 (0,85)	0	0
VKORC1 genotipleri (P=0.523)	Kapak replasmanı	Atriyal Fibrilasyon	Kapak replasmanı ve Atriyal Fibrilasyon	Venöz Tromboembolizm	Diğer
-1639 GG	18 (7,7)	16 (6,8)	22 (9,5)	4 (1,7)	8 (3,4)
-1639 GA	30 (12,8)	12 (5,1)	40 (17)	8 (3,4)	22 (9,5)
-1639 AA	24 (10,3)	12 (5,1)	10 (4,3)	0	8 (3,4)
Varfarin Dozu (mg/g) (P=0.455)	4.72	4.38	5.15	4.01	5.27
Toplam (n=234)	72 (30,8)	40 (17)	72 (30,8)	12 (5,1)	38 (16,3)

4.2.5. Kanama komplikasyonu gerçekleşen olgularda VKORC1, CYP2C9 genotip varyantları ve günlük varfarin dozu bilgilerine göre bulgular

Kanama komplikasyonu görülen çalışma olguları ile CYP2C9 genotip varyantları, VKORC1 genotipleri ve günlük varfarin dozu arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (P=0.702, P=0.260, P=0.728, P>0.05).

Çizelge 4.19. Çalışma olgularında kanama komplikasyonu bilgilerine göre CYP2C9 genotip varyant dağılımları

Kanama komplikasyonu	CYP2C9 genotip varyantları					
	*1/*1	*1/*2	*2/*2	*1/*3	*2/*3	Toplam
(P=0.702)						
Var	16 (6,85)	2 (0,85)	0	2 (0,85)	0	20 (8,5)
Yok	122 (52,1)	44 (18,8)	12 (5,1)	32 (13,7)	4 (1,7)	214 (91,5)
Toplam (n=234)	138 (59)	46 (19,6)	12 (5,1)	34 (14,5)	4 (1,7)	234 (100)

Çizelge 4.20. Çalışma olgularında kanama komplikasyonu bilgilerine göre VKORC1 genotip dağılımları

Kanama komplikasyonu	VKORC1 genotipleri			
	-1639 GG	-1639 GA	-1639 AA	Toplam (n=234)
(P=0.260)				
Var	2 (0,85)	10 (4,3)	8 (3,4)	20 (8,5)
Yok	66 (28,2)	102 (43,6)	46 (19,7)	214 (91,5)
Toplam (n=234)	68 (29,1)	112 (47,9)	56 (23,1)	234 (100)

4.2.6. Varfarin tedavisi sırasında aspirin kullanan olguların VKORC1 genotip ve CYP2C9 genotip varyantları bilgilerine göre bulgular

Çalışmaya katılan olgularda, varfarin tedavisi sırasında aspirin kullanma durumları ile CYP2C9 genotip varyantları ve VKORC1 genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Çizelge 4.21. Çalışma olgularının varfarin tedavisi sırasında aspirin kullanma durumları ile CYP2C9 genotipleri dağılımları

İlaçlar	CYP2C9 Genotip varyantları					Toplam (n=234)
	*1/*1	*1/*2	*2/*2	*1/*3	*2/*3	
(P=0.248)						
Varfarin	116 (49,6)	34 (14,5)	6 (2,6)	26 (11,1)	2 (0,85)	184 (78,6)
Varfarin ve Aspirin	22 (9,4)	12 (5,2)	6 (2,6)	8 (3,4)	2 (0,85)	50 (21,4)
Toplam (n=234)	138 (59)	46 (19,7)	12 (5,2)	34 (14,5)	4 (1,7)	234 (100)

Çizelge 4.22. Çalışma olgularının varfarin tedavisi sırasında aspirin kullanma durumları ile VKORC1 genotip dağılımları

İlaçlar	VKORC1 genotipleri			Toplam (n=234)
	-1639 GG	-1639 GA	-1639 AA	
(P=0.073)				
Varfarin	60 (25,6)	78 (33,3)	46 (19,7)	184 (78,6)
Varfarin ve Aspirin	8 (3,4)	34 (14,5)	8 (3,4)	50 (21,4)
Toplam (n=234)	68 (29,1)	112 (47,9)	56 (23,1)	234 (100)

4.2.7. Günlük varfarin doz gereksinimi ile çalışma olgularına ait demografik özellikler arasındaki ilişkiyi belirlemek için çoklu lineer regresyon modellemesi

Günlük varfarin doz gereksinimi ile olguların yaş, cinsiyet, boy, endikasyonlar, VKORC1 genotipleri ve CYP2C9 genotip varyantları arasında çoklu regresyon modellemesi yapılmıştır. Bu modellemeye göre düşük varfarin dozu gereksinimi ile ilerleyen yaş durumu, VKORC1 genotipleri ve CYP2C9 genotip varyantları arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Günlük varfarin dozu ile olgulara ait genetik ve demografik özellikler arasında yapılan çoklu regresyon analizi sonucuna göre cinsiyet (P=0,58), boy (P=0,2), varfarinle birlikte aspirin kullanma durumu (P=0,22) ve endikasyonlar (P=0,55) arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Çalışma olgularının düşük varfarin doz gereksinimi ile anlamlı ilişki gösteren özellikleri Çizelge 4.23'te ayrıntılı olarak belirtilmiştir. Regresyon modellemesine göre yaş, CYP2C9 genotip varyantları ve VKORC1 genotiplerinin günlük varfarin doz miktarı üzerine %29 etkisi olduğu istatistiksel olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.23. Çalışma olgularında bireylerarası varfarin doz değişikliği üzerine yaş, CYP2C9 genotip varyantları ve VKORC1 genotiplerinin etkisi

Faktörler	P	R²değeri (%)
Yaş	0.003	7.6
CYP2C9 Genotip varyantları	0.001	10
VKORC1 Genotipleri	0.003	7.3

4.3. Çalışmaya Katılan Sağlıklı Bireylere Ait Bulgular

Çalışmada Türk populasyonunda VKORC1 ve CYP2C9 gen polimorfizmlerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan 200 sağlıklı bireyde yaş ve cinsiyet bilgilerinin dağılımları çizelge 4.24.'te belirtilmiştir.

Çizelge 4.24. Çalışmaya katılan sağlıklı bireylerde cinsiyet ve yaş dağılımları

Demografik özellikler			
Cinsiyet	n	%	Ortalama
Kadın	88	%44	-----
Erkek	112	%56	-----
Yaş	-----	-----	32.95± 17.48
Kadın	-----	-----	27.77±12.29
Erkek	-----	-----	37.01±19.84
Toplam	200	100	-----

4.3.1. Çalışmaya katılan sağlıklı bireylerde VKORC1 genotip ve CYP2C9 genotip varyant frekansları

Çizelge 4.25. Çalışmaya katılan sağlık bireylerde VKORC1 genotip ve CYP2C9 genotip varyantları dağılımları

Sağlıklı bireyler		
CYP2C9 genotip varyantları	n	%
CYP2C9 *1/*1	120	60
CYP2C9 *1/*2	40	20
CYP2C9 *2/*2	4	2
CYP2C9 *1/*3	26	13
CYP2C9 *2/*3	8	4
CYP2C9 *3/*3	2	1
VKORC1 genotipleri	n	%
-1639 GG	52	26
-1639 GA	98	49
-1639 AA	50	25
Toplam	200	100

Çizelge 4.26. Çalışmaya katılan sağlık bireylerde VKORC1 genotip ve CYP2C9 genotip varyantları kombine dağılımları

VKORC1 genotipleri	CYP2C9 genotip varyantları						Toplam
	*1/*1	*1/*2	*2/*2	*1/*3	*3/*3	*2/*3	
-1639 GG	34	12	0	4	0	2	26
-1639 GA	60	14	4	12	2	6	98
-1639 AA	26	14	0	10	0	0	50
Toplam	120	40	4	26	2	8	200

4.3.2. Çalışmaya katılan bütün bireylerde VKORC1 genotip ve CYP2C9 genotip varyant frekansları

Çizelge 4.27. Çalışmaya katılan varfarin kullanan olgular ve sağlıklı bireylerin tümüne ait VKORC1 genotip ve CYP2C9 genotip varyantlarının dağılımları

Sağlıklı bireyler ve varfarin kullanan olgular		
CYP2C9 genotip varyantları	n	%
CYP2C9 *1/*1	258	59,4
CYP2C9 *1/*2	86	19,8
CYP2C9 *2/*2	16	3,7
CYP2C9 *1/*3	60	13,8
CYP2C9 *2/*3	12	2,8
CYP2C9 *3/*3	2	0,5
VKORC1	n	%
-1639 GG	120	27,6
-1639 GA	210	48,4
-1639 AA	104	24,0
Toplam	434	100

5. TARTIŞMA

Kumarin türevi bir antikoagülan olan varfarin, tromboembolik olayların tedavisinde ve önlenmesinde tüm dünyada geniş bir şekilde kullanılan ilaçtır. Ancak varfarinin dar bir terapötik aralığı olması, ilaca karşı cevabın bireyler arasında çok değişken olması ve tedaviye bağlı ciddi kanama olaylarının görülmesi riskinden dolayı tedavinin uygulanması ve idaresi zordur (62,75). Varfarin doz gereksinimindeki bu çeşitlilik multifaktöriyeldir. Genetik ve çevresel faktörlerin varfarin tedavisinde birlikte değerlendirilmesi, gerekli olan doz uygulamasının bireyselleştirilmesinde ve uzun süreli antikoagülan tedavinin daha güvenli bir şekilde sürdürülebilmesi açısından yardımcı olmaktadır (37).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda varfarin farmakogenetiği ile ilgili yaklaşık 30 gen bildirilmiştir. Ancak bu genler üzerinde daha çok araştırma yapılması gerekliliği kaçınılmazdır. Bu genler arasında varfarin aksiyonu ile ilgili bulunan en önemli genler CYP2C9 ve VKORC1 genleridir. CYP2C9 geni varfarin farmakokinetiği, VKORC1 geni ise varfarin farmakodinamiğinde majör genler olarak rol oynamaktadırlar (76).

Çalışmamızda varfarin kullanan 234 olguda ve 200 sağlıklı bireyde CYP2C9 ve VKORC1 genetik polimorfizmlerinin incelenmesi ve varfarin tedavisinde bu genlerin etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmaya katılan tüm bireylerde CYP2C9 geninin 3. ekzonunda bulunan C430T (CYP2C9*2) polimorfizmi ve 7. Ekzonda bulunan A1075C (CYP2C9*3) polimorfizmi incelenmiştir. Aynı zamanda VKORC1 geninde bir promotor bölge polimorfizmi olan -1639 G/A (3673 G/A) hem varfarin kullanan olgularda hem de sağlıklı bireylerde incelenmiştir.

5.1. CYP2C9 Geninin Nested PCR-RFLP Yöntemi Sonuçları ile Literatür Bilgilerinin Genotip Frekansları Açısından Karşılaştırılması

CYP2C9 geni insanda 10. kromozomunun 10q24.2 bölgesinde bulunmaktadır. 9 ekzon içerir ve yaklaşık 55 kb uzunluğundadır (51). 490 aminoasitlik ve 55,4 KDa ağırlığında protein kodlamaktadır.

Bugüne kadar CYP2C9 geni üzerine farklı yöntemler kullanılarak yapılan birçok çalışma mevcut olup bu çalışmalarda farklı populasyonlarda CYP2C9 genotip frekanslarının belirlenmesi ve bu bulguların çeşitli ilaçlarla fenotipe etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda Türk populasyonunda CYP2C9 genotip frekanslarını belirlemek ve bu genotipik varyantların varfarin kullanan olgularda fenotipe etkisini araştırmak amaçlanmıştır.

Babaoğlu ve arkadaşlarının 2004 yılında yapmış oldukları çalışmada Türk populasyonuna ait 93 bireyde CYP2C9 alelik varyantlarını belirlemek amacıyla ve bu alelik varyantların fenotipe etkisini losartan kullanarak PCR-RFLP yöntemi ile incelemişlerdir (3). Çalışmanın sonuçlarına göre CYP2C9*1/*1 varyant frekansı %68,2 ve diğer varyantların (*1/*2, *1/*3, *2/*2, *2/*3 ve *3/*3) frekansları %31,8 olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda, CYP2C9*1/*1 varyantına sahip olgular sağlıklı 200 bireyde %60, çalışmaya katılan 434 bireyde ise %59,4; diğer varyantların frekansı ise sağlık bireylerde %40, çalışmaya katılan tüm bireylerde %41,6 olarak tespit edilmiştir.

Babaoğlu ve arkadaşlarının çalışmalarına göre bizim yaptığımız çalışmada diğer genotipik varyantlar açısından daha yüksek bir oran bulunmuştur. Ancak bunun sebebi olarak Babaoğlu ve arkadaşlarının çalışmasında kullanılan olgu sayısının yaptığımız çalışmaya göre sınırlı sayıda olmasından kaynaklandığı ve çalışmamızın Türk populasyonda CYP2C9 genetik varyantları açısından daha belirleyici olduğunu düşünmekteyiz.

Aynacıoğlu ve arkadaşlarının 1999 yılında PCR-RFLP yöntemini kullanılarak yapmış oldukları çalışmada Güneydoğu Anadolu Bölgesine (Gaziantep) ait toplam 499

bireyde CYP2C9 genotip varyant frekanslarını belirlemek ve bireylerden 101'inde bu genotip varyantların fenitoin üzerine etkisinin bulunup bulunmadığını incelemiştir (2). Çalışmada, Türk popülasyonunda CYP2C9 *1/*1 varyant frekansı %61,72, diğer genotip varyantlarının frekansı ise (*1/*2 için %18,04, *2/*2 için %1, *1/*3 için %17,23, *2/*3 için %1,1 ve *3/*3 için %0,8) %38,28 olarak saptanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları ile bizim yapmış olduğumuz çalışmada elde ettiğimiz frekans değerleri benzerlik göstermektedir. Yılmaz ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları çalışmada, yine Güneydoğu Anadolu Bölgesine (Gaziantep) ait 64 sağlıklı birey üzerinde CYP2C9 genotip varyantlarını belirlemek ve bu varyantların serum tümör markırlar ve sitokinler üzerine etkisini PCR-RFLP yöntemi kullanarak incelemiştir (78). Çalışmanın sonuçlarına göre CYP2C9 *1/*1 varyant frekansı %64, diğer varyantların frekansları ise %36 olarak saptanmıştır. Bu iki çalışmanın ve bizim çalışmamızın sonuçlarına göre Türk popülasyonu açısından bölgeler arası belirli bir genotipik fark bulunmadığı gözlenmektedir.

Özgön ve arkadaşlarının 2008 yılında PCR-RFLP yöntemini kullanarak yapmış oldukları çalışmada Türk popülasyonuna ait 205 bireyde CYP2C9 genotip varyantlarının frekansları, *1/*1 için %60 ve diğer varyantlar için %38,5 olarak saptanmıştır (60). Çalışmamızda aldığımız sonuçlar CYP2C9 genotip varyant dağılımları açısından bu çalışmayla uyumludur.

Bugüne kadar Türk popülasyonunda CYP2C9 genotip varyant frekansları açısından yeterli derecede çalışmanın mevcut olduğu ve bölgeler açısından belirgin bir fark bulunmadığı, çalışmaların CYP2C9*2 ve *3 genotiplerinin ilgili olduğu çeşitli ilaç aktivitelerinin fenotiplere etkisinin aydınlatılması açısından yardımcı olacak özellikte oldukları düşünülmektedir.

Scordo ve arkadaşlarının 2001 yılında yapmış oldukları çalışmada İtalyan popülasyonuna ait 157 bireyde ve Etiyopya popülasyonuna ait 150 bireyde CYP2C9 genotipleri PCR-RFLP yöntemi kullanılarak incelenmiştir (69). Çalışmanın sonuçlarına göre İtalya popülasyonuna ait bireylerde CYP2C9 *1/*1 varyant frekansı %65, diğer

varyantların frekansı ise %35 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada Etiyopya popülasyonunda bu değerler sırasıyla %86,7 ve %13,3 olarak saptanmıştır ve *2/*2,*2/3* ve *3/3 varyantları tespit edilmemiştir.

Garcia-Martin ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları çalışmada İspanya popülasyonuna ait bireylerde CYP2C9 *1/*1 frekansı %69,5 ve diğer varyantların frekansı %30,5 olarak saptanmıştır (19). Kamali ve arkadaşlarının beyaz popülasyona ait 297 bireyde gerçekleştirdikleri çalışmada CYP2C9 *1/*1 varyant frekansı %56 ve diğer varyant frekansları %44 olarak saptanmıştır (38). Çalışmamızın sonuçlarına göre saptadığımız CYP2C9 genotip frekansları, “caucasian” olarak adlandırılan Avrupa popülasyonları ile uyumlu olarak bulunmuştur.

Kimura ve arkadaşlarının 1998 yılında yapmış oldukları çalışmada Japon popülasyonunda CYP2C9 *1/*1 genotip varyant frekansı %94,4, diğer varyantların frekansı ise %5,6 olarak saptanmıştır (41). Bae ve arkadaşlarının 2005 yılında yapmış oldukları çalışmada Kore popülasyonuna ait 358 bireyde CYP2C9 genotip varyantları PCR-RFLP yöntemi kullanılarak incelenmiştir (5). Çalışmanın sonuçlarına göre *1/*1 varyant frekansı %86,9 olarak bulunmuştur. *1/*2 varyantı çalışmada tespit edilmemiş, *1/*3 varyant frekansı %12 olarak bulunmuştur. Ayrıca çalışmada 2. ekzonda bulunan CYP2C9*13 (T296C) genotip varyantı 4 hastada tespit edilmiştir (%1,1). Asya popülasyonuna ait çalışmalarda *1/*1 genotip varyant frekansı bizim çalışmamıza göre oldukça yüksek değerlerde bulunmaktadır.

Moridani ve arkadaşları 2006 yılında Multipleks PCR-RFLP yöntemini kullanarak yapmış oldukları 87 Avrupa kökenli, 44 Asya kökenli ve 47 Afrika kökenli Amerikalı bireyin dahil edildiği çalışmada CYP2C9 *1/*1 genotip varyantları frekansı sırasıyla %58,6, %95,5 ve %93,6 olarak bulmuşlardır (52). Bu çalışmaya göre Asya ve Afrika kökenli Amerikan popülasyonlarında CYP2C9 frekansları arasında büyük benzerlik bulunmakta ancak sonuçlar bizim çalışmamızla uyumluluk göstermemektedir.

Dünyada farklı popülasyonlar üzerine CYP2C9 genotip frekanslarının belirlenmesi amacıyla yapılan birçok çalışma mevcuttur (Çizelge 5.1). CYP2C9*2 ve

CYP2C9*3 genotip frekansları etnik gruplar arasında oldukça yüksek oranda değişiklik göstermektedir (69). Bizim çalışmamız ve daha önce Türk populasyonunda yapılan çalışmalara göre CYP2C9*2 ve *3 genotip frekansları açısından en yakın benzerlik Avrupa populasyonları ile görülmektedir.

5.2. VKORC1 Geni -1639 G/A Polimorfizmi PCR-RFLP Yöntemi Sonuçları ile Literatür Bilgilerinin Genotip Frekansları Açısından Karşılaştırılması

Çalışmamızda 200 sağlıklı bireyde VKORC1 genotip frekansları -1639 G/G normal genotip için %26, -1639 G/A heterozigot mutant genotip için %49 ve -1639 A/A homozigot mutant genotipe sahip bireyler için ise % 25 olarak saptanmıştır. Aynı zamanda çalışmaya katılan varfarin kullanan olgular ve sağlıklı bireylerin tümü için VKORC1 genotip frekansları sırasıyla %27,6, %48,4 ve %24 olarak saptanmıştır. Sağlık bireylerle, varfarin kullanan olgular arasında VKORC1 genotip frekansları açısından bir fark saptanmamıştır.

Özgön ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmanın sonuçlarına göre, Türk populasyonunda VKORC1 genotip frekansları -1639 G/G normal genotipe sahip bireylerin frekansı %28,8, -1639 G/A heterozigot genotipe sahip bireylerin frekansı %42,4 ve -1639 A/A homozigot mutant genotipe sahip bireylerin frekansı %28,8 olarak saptanmıştır (60). Bu çalışma Türk populasyonunda VKORC1 genotipleri üzerine ilk çalışma niteliği taşımaktadır. Özgön ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma ile bizim çalışmamızın VKORC1 genotip frekansları açısından dağılımları oldukça yakın benzerlik göstermektedir. Bizim çalışmamıza katılan tüm bireyler açısından değerlendirme yapıldığında toplam 434 bireyde VKORC1 genotip dağılımları belirlenmiştir. Çalışmamız Türk populasyonunda VKORC1 geni için yapılmış olan en kapsamlı çalışma özelliği taşımakta ve VKORC1 genotip frekansları açısından toplumumuzda belirleyici bir özelliğe sahip olduğunu düşünmekteyiz.

Yuan ve arkadaşlarının 2005 yılında yapmış oldukları çalışmada, Çin populasyonuna ait 95 bireyde ve Avrupa populasyonuna ait 92 birey üzerinde VKORC1

genotip frekansları -1639 G/G, G/A ve A/A için sırasıyla Avrupa popülasyonunda %39,1, %46,7 ve %14,2 olarak saptanmıştır (80). Çin popülasyonunda ise -1639 A/A homozigot mutant frekansı %82,1 ve diğer bireylerde ise sadece -1639 G/A heterozigot mutant genotipi saptanmıştır (%17,9). Çalışmada, Avrupa ve Çin popülasyonlarında VKORC1 genotip frekansları oldukça farklı bulunmuştur. Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre Türk popülasyonu ile Çin popülasyonu arasında VKORC1 genotip frekansları açısından çok farklı bir dağılım gözlenmektedir. Aynı çalışmaya göre Avrupa popülasyonu VKORC1 -1639 G/A heterozigot genotip frekansı açısından benzerlik göstermektedir ancak -1639 A/A genotip frekansı çalışmamıza göre daha düşük tespit edilmiştir.

Kimura ve arkadaşlarının 2007 yılında Japon popülasyonuna ait toplam 93 birey üzerinde yapmış oldukları çalışmada -1639 A/A homozigot mutant genotip frekansı %86, -1639 G/A heterozigot mutant genotip frekansı ise %14 olarak saptanmıştır (40). Çalışmada -1639 G/G normal genotip tespit edilmemiştir. Bu çalışmanın sonuçları Yuan ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada Çin popülasyonunda -1639 G>A polimorfizm frekansları ile oldukça yüksek oranda uyumluluk göstermektedir. Bu iki çalışmanın sonuçlarına göre Asya popülasyonunda VKORC1 geni -1639 G>A polimorfizmi açısından genotipik olarak beyaz ırkla ve bizim çalışmamızla çok farklı dağılım göstermektedir.

Zhu ve arkadaşlarının 2007 yılında beyaz popülasyona ait 65 bireyde yaptıkları çalışmada VKORC geninde -1639 G/A polimorfizmi genotip frekansları, -1639 G/G için %52,3, -1639 G/A için %35,4 ve -1639 A/A için %12,3 olarak saptanmıştır (81). Bizim çalışmamızda -1639 A/A genotip frekansı daha yüksek bulunmuştur.

Sconce ve arkadaşlarının 2005 yılında İngiltere’de 297 birey üzerinde yapmış oldukları çalışmada VKORC1 geni -1639 G/G genotip frekansı %25, -1639 G/A genotip frekansı %56 ve -1639 A/A frekansı %19 olarak saptanmıştır (68). VKORC1 genotip frekansları bizim çalışmamızla uyumluluk göstermektedir.

Geisen ve arkadaşlarının 2005 yılında yapmış oldukları çalışmada Alman popülasyonuna ait 200 sağlıklı bireyde VKORC1 geni -1639 G>A polimorfizmi için G/G genotip frekansı %34, G/A genotip frekansı %48 ve A/A genotip frekansı %18 olarak saptanmıştır (21). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz VKORC1 genotip frekansları sonuçları ile belirgin bir fark görülmemektedir.

VKORC1 geni -1639 G>A polimorfizmi üzerine yapılmış pek çok çalışma mevcuttur (Çizelge 5.1). Ancak Türk popülasyonu ile VKORC1 genotipleri açısından yapılan çalışma sayısı bizim çalışmamızla birlikte sadece iki adettir. Çalışmamızın bu nedenle ilgili polimorfizmin Türk popülasyonu için en kapsamlı çalışma olması ve VKORC1 geni ile ilgili çeşitli substratlarla ilerde yapılması planlanan çalışmalarda yardımcı olacağını düşünmekteyiz.

Çizelge 5.1. Çalışmalarda elde edilen CYP2C9*2, CYP2C9*3 genotip varyantları ve VKORC1 -1639 G>A polimorfizmi genotip dağılımları

Araştırmacı/Yıl	Populasyon	CYP2C9 genotip varyantları		VKORC1 -1639 G>A		
		*1/*1	Diğer	GG (%)	GA (%)	AA (%)
Kimura ve arkadaşları 1998	Asya	94,4	5,6	–	–	–
Aynacıoğlu ve arkadaşları 1999	Türkiye	61,7	38,3	–	–	–
Yılmaz ve arkadaşları 2000	Türkiye	64	36	–	–	–
Scordo ve arkadaşları 2001	Avrupa	65	35	–	–	–
Scordo ve arkadaşları 2001	Afrika	86,7	13,3	–	–	–
Garcia-Martin ve arkadaşları 2001	Avrupa	69,5	30,5	–	–	–
Babaoğlu ve arkadaşları 2004	Türkiye	68,2	31,8	–	–	–
Kamali ve arkadaşları 2004	Avrupa	56	44	–	–	–
Bae ve arkadaşları 2005	Asya	86,9	13,1	–	–	–
Yuan ve arkadaşları 2005	Asya	–	–	–	17,9	82,1
Yuan ve arkadaşları 2005	Avrupa	–	–	39,1	46,7	14,2
Elizabeth ve arkadaşları 2005	Avrupa	–	–	25	56	19
Geisen ve arkadaşları 2005	Avrupa	–	–	34	48	18
Moridani ve arkadaşları 2006	Avrupa	63,6	36,4	–	–	–
Kimura ve arkadaşları 2007	Asya	–	–	–	15,1	85,9
Zhu ve arkadaşları 2007	Avrupa	–	–	52,3	35,4	12,3
Özgön ve arkadaşları 2008	Türkiye	60	40	28,8	42,4	28,8
Bizim çalışmamız	Türkiye	59,4	40,6	27,6	48,4	24

5.3. Varfarin Kullanan Olgularda VKORC1 ve CYP2C9 Genotiplerinin Sonuçları ile Her İkisinin Çalışıldığı Literatür Bilgilerinin, Olguların Demografik Özellikleri Açısından Karşılaştırılması

Çalışmamızda elde ettiğimiz VKORC1 ve CYP2C9 genotiplerinin dağılımları ile olguların çeşitli parametreleri ilişkilendirilmeye çalışılmıştır. Bu parametreler, Günlük varfarin dozu, INR, hedef INR, hastaların endikasyonları, varfarin tedavisi sırasında aspirin kullanımı, kanama komplikasyonu gerçekleşen durumlardır. Çalışma olgularında uygun varfarin doz algoritmi oluşturmak için, CYP2C9 ve VKORC1 genotipleri ile genetik olmayan faktörler ile varfarin dozu arasında regresyon modellemesi yapılmıştır.

Çalışmamızın sonuçlarına göre, CYP2C9 *1/*1 genotip varyantına sahip olgular ile *1/*2 ve *1/*3 heterozigot varyant tiplerini taşıyan olgular arasında günlük varfarin dozu bakımından anlamlı bir farklılık saptanmıştır (P= 0.019). Aynı şekilde CYP2C9 *1/*1 genotip varyantı taşıyan olgular ile homozigot mutant ve bileşik heterozigot mutant varyant genotiplerini taşıyan olgularda (*2/*2 ve *2/*3) günlük varfarin dozu bakımından anlamlı bir farklılık saptanmıştır (P= 0.017). VKORC1 geni için normal genotipe sahip bireylerle heterozigot mutant genotipe sahip olgular arasında anlamlı bir farklılık gözlenmezken (P=0.138), homozigot mutant genotipe sahip bireyler arasında günlük varfarin dozu açısından anlamlı bir farklılık saptanmıştır (P=0.01).

Çalışma olgularında CYP2C9 genotip varyantları ile INR, olgularda istenen hedef INR ve hedef INR aralığında bulunup bulunmama durumları arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (P=0.156,P=0.785 ve P=0.93). VKORC1 genotipleri ile aynı parametreler değerlendirilmiş ve anlamlı bir fark saptanmamıştır (P=0.087, P=0.99 ve P=0.33).

Çalışmaya katılan olguların sahip olduğu endikasyonlarla CYP2C9 ve VKORC1 genotipleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (P=0.247 ve P=0.523). Çalışma olgularında bildirilen kanama komplikasyonu oranı %8,5 (20 olguda) olup CYP2C9 ve VKORC1 genotipleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (P=0.702 ve P=0.26). Varfarin tedavisi sırasında varfarin ile birlikte aspirin kullanma oranı %21,4 (50 olgu) olup CYP2C9 ve VKORC1 genotipleri arasında anlamlı bir fark belirlenmemiştir (P=0.248 ve P=0.073).

Çalışmamızda bireylerarası varfarin doz değişkenliği üzerine bireylerin demografik özelliklerinin etkisinin belirlenebilmesi amacıyla lineer regresyon analizi yapılmış ve günlük varfarin dozu üzerine yaş, CYP2C9 genotip varyantları ve VKORC1 genotiplerinin %29 oranında etkili olduğu belirlenmiştir.

5.4. Varfarin Dozu ile CYP2C9 ve VKORC1 Genotipleri Arasındaki İlişki

Özgön ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, olguların ortalama haftalık varfarin dozu ile VKORC1 ve CYP2C9 genotipleri ilişkilendirilmiştir (60). VKORC1 ve CYP2C9 genotiplerinden polimorfik alelleri taşıyan olgularda ortalama haftalık varfarin dozları normal genotipe sahip bireylerden daha düşük seviyede gözlenmiştir. Her iki geninde bireyler arası varfarin doz değişkenliği açısından önemli genler olduğu ifade edilmiştir. Bizim çalışmamızda aldığımız sonuçlar bu çalışmayla uyumluluk göstermektedir.

Sconce ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada CYP2C9 genotip varyantları arasında normal genotiple karşılaştırıldığında ortalama varfarin doz kullanımı bakımından anlamlı farklılıklar saptanmıştır (68). CYP2C9 *3/*3 varyantı sadece bir olguda tespit edilmiş ve bu olguya varfarin dozunun daha dikkatli bir şekilde uygulanması gerektiği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda varfarin kullanan olgularda *3/*3 varyantı bulunmamış ve varfarin dozu ile ilişkisi belirlenememiştir. Çalışmada VKORC1 -1639 G>A polimorfizmi de çalışılmış ve -1639 G/A ve -1639 A/A

genotiplerine sahip olguların normal genotipe (-1639 G/G) sahip olgulara göre daha düşük varfarin dozu gereksinimi gösterdiği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda benzer sonuçlar elde edilmiş, Sconce ve arkadaşlarının çalışmasıyla sonuçlarımız uyumlu bulunmuştur.

Yuan ve arkadaşlarının çalışmasında VKORC1 ve CYP2C9 genotipleri ile varfarin dozu arasında belirgin farklar olduğu bildirilmiştir (80). VKORC1 geni -1639 G>A polimorfizmi açısından, -1639 A/A homozigot mutant genotipe sahip bireylerde günlük varfarin doz kullanımı 2.61 mg olarak bulunurken -1639 G/A ve -1639 G/G genotipine sahip bireylerde bu miktar 3.81 mg olarak bildirilmiştir (P=0,0002, P>0,0001). Çalışmada CYP2C9 genotip varyantları Çin popülasyonuna ait olgularda %5,4- %7,3 arasında tespit edilmiş, varfarin dozu ile CYP2C9*2 ve *3 genotip varyantlarının çalışma gruplarında anlamlı bir sonuç için yeterli frekans değerlerinde olmadığı ve Çin popülasyonunda bu genin varfarin metabolizmasında majör rol oynamadığı öngörülmüştür. Bizim çalışmamızla VKORC1 genotip frekansları açısından önemli derecede uyumsuz bulunmasına rağmen varfarin doz gereksinimi açısından uyumlu sonuçlar göstermektedir. Çalışmanın sonuçları CYP2C9 genotip varyantlarının varfarin dozu üzerine etkisi açısından çalışmamızla uyumlu bulunmamıştır. Bunun sebebi olarak CYP2C9 genotip varyantlarının etnik gruplar arasında büyük farklılıklar göstermesi olarak açıklanabilir.

Obayashi ve arkadaşları CYP2C9 ve VKORC1 geni Japon popülasyonunda dizileme yöntemini kullanılarak çalışmışlardır (55). Çalışmaya katılan tüm olgularda, -1639 G>A, 1173C>T ve 1542 G>C polimorfizmlerinin dengesiz bağlantı (linkage disequilibrium) gösterdikleri belirtilmiştir. Bu polimorfizmler haplotiplerine göre 3 grup altında toplanmış (M1, M2, M3) ve ortalama günlük varfarin dozu bakımından sırasıyla 5 mg, 4.55 mg ve 2.94 mg olarak bulunmuşlardır. Japon popülasyonu için majör VKORC1 genotip grubunun M3(-1639 G>A) olduğunu ve kendi popülasyonlarında beyaz popülasyonlara göre daha düşük varfarin dozu gerektirdiğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda VKORC1 genotip frekansları bu çalışmayla çok büyük farklılıklar gösterse de varfarin doz gereksinimi bakımından VKORC1

genotiplerinin etnik grup fark etmeksizin aynı etkinlikte olduğunu söyleyebiliriz. Aynı çalışmada CYP2C9 genotip varyantlarından sadece homozigot normal *1/*1 varyantı (%94,6) ve heterozigot *1/*3 varyantı (%5,6) bulunmuştur. *1/*3 varyantı bulunan olgularda ortalama günlük varfarin doz kullanımı *1/*1 varyantı ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş göstermektedir. Bizim çalışmamızda da bu varyantlar arasında varfarin dozu bakımından anlamlı farklılık mevcut olup bu çalışma ile uyumluluk göstermektedir. Ancak CYP2C9 genotiplerinin etnik gruplar arası farklılık göstermesinden dolayı diğer varyantlarla bir karşılaştırma yapılamamıştır.

Zhu ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, VKORC1 geni -1639 G/A polimorfizmi GG, GA ve AA genotipleri ortalama günlük varfarin doz miktarları sırasıyla 6,7 mg, 4,3 mg ve 2,7 mg olarak bulunmuş ve genotipik gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğu belirtilmiştir (81). Linder ve arkadaşları aynı olgu grubunda CYP2C9 genotiplerini çalışmışlar ve CYP2C9 varyantları ile düşük varfarin dozu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptamışlardır (47). Her iki çalışmada aynı olgu grubu kullanılmış ve sonuçlar bizim çalışmamızla uyumlu bulunmuştur.

5.5. Olgularda Bulunan INR ve Hedef INR Değerleri ile CYP2C9 ve VKORC1 Genotipleri Arasındaki İlişki

Özgön ve arkadaşlarının çalışmasında, VKORC1 ve CYP2C9 genotipleri olguların hedef INR aralığında bulunma durumları ile karşılaştırılmış ve her iki gen içinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç saptamamışlardır (60). Obayashi ve arkadaşlarının çalışmasında CYP2C9 genotiplerinden *1/*1 ve *1/*3 arasında ve VKORC1 genotipleri arasında ortalama INR değerleri açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (55). Yuan ve arkadaşlarının çalışmasında, 104 olguda VKORC1 genotipleri ve 16 olguda CYP2C9 genotip varyantları arasında ortalama INR değerleri açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (80).

Bizim çalışmamızda CYP2C9 ve VKORC1 genotipleri arasında ortalama INR ve Hedef INR değerleri açısından anlamlı bir farklılık saptanmamış ve diğer çalışmalarla sonuçlarımız uyumlu bulunmuştur.

5.6. Varfarin Doz Gereksinimini Etkileyen Faktörlerin Regresyon Analizleri

Özgön ve arkadaşlarının çalışmasında genetik ve genetik olmayan faktörler kullanılarak çoklu regresyon analizi yapılmış ve bunun sonucunda ileri yaş durumu, VKORC1 ve CYP2C9 genotipleri ile venöz tromboembolizm tanısı konulmamış olgularda varfarin tedavisi uygulanan düşük doz varfarin gereksinimi ile anlamlı bir ilişki gösterdiği belirlenmiştir (60). VKORC1 geni -1639 G>A polimorfizminin bireylerarası varfarin doz değişkenliğinde önemli bir varyasyon olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında bu 4 faktörün varfarin dozu değişkenliği üzerinde %34 etkisi olduğunu bildirmişlerdir.

Sconce ve arkadaşlarının çalışmasında varfarin dozu üzerine etki gösteren en önemli faktörlerin yaş, VKORC1, CYP2C9 genotipleri ve boy faktörleri olduğunu belirtmişlerdir (68). Bu 4 faktörün bireylerarası varfarin doz değişkenliği üzerine %55 etkisi olduğunu belirtmişlerdir.

Kimura ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, bireylerarası varfarin doz değişkenliği ile yaş, cinsiyet, kilo, VKORC1 -1639 G>A polimorfizmi, GGCX 8016 G>A polimorfizmi ve CYP2C9*3 varyantı çoklu regresyon analizi ile anlamlandırılmıştır (40). Yaş(%1,7), VKORC1 -1639 G>A (%5,9) ve CYP2C9*3 varyant (%5,2) faktörlerinin toplam etkisi % 12,8 olarak belirtmişlerdir. Diğer faktörlerle beraber toplam %33 varfarin doz değişkenliğinin açıklanabileceğini belirtmişlerdir.

Zhu ve arkadaşlarının çalışmasında, yaş, cinsiyet, kilo, VKORC1 -1639 G>A varyasyonu ve CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 varyantları kullanılarak çoklu regresyon analizleri yapılmış ve bu faktörlerin bireylerarası varfarin dozu değişkenliği üzerinde %61 etkili olduğu bildirilmiştir (81).

Obayashi ve arkadaşlarının çalışmasında, regresyon analizleri sonucunda VKORC1 geni -1639 G>A polimorfizminin varfarin değişkenliğinin açıklanmasında %16,5, CYP2C9 genotip varyantlarının %13,4 etkili olduğu bildirilmiştir (55). -1639 G>A polimorfizminin PCR-RFLP yöntemiyle uygulanıp varfarin tedavisinde bir marker olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Rieder ve arkadaşlarının çalışmasında (63) VKORC1 geninde 10 yaygın polimorfizm saptanmış ve bu polimorfizmlerin varfarin dozu değişkenliğinde %23 etkisi olduğu belirtilmiştir. Bu polimorfizmlerden özellikle -1639 G>A ve 1173 C>T polimorfizmlerinin varfarin tedavisinde önemli yeri oldukları, bu iki polimorfizmin dengesiz bağlantı gösterdikleri belirtilmiştir. -1639 GA genotipine göre, GG genotipinin varfarin dozunda %35'lik yükselmeye, AA genotipinin ise %32'lik azalmaya ilgili olduğu belirtilmiştir. Higayashi ve arkadaşlarının aynı olgu grubunda yapmış oldukları çalışmada (27) CYP2C9 varyantlarının varfarin doz değişkenliği üzerinde %6-10 arasında bir etkisi olduğunu bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda varfarin doz algoritmi oluşturmak için yaş, cinsiyet, boy, INR değerleri, endikasyonlar, VKORC1 genotipleri ve CYP2C9 genotip varyantları kullanılarak univaryans ve multivaryans regresyon analizleri yapılmış ve günlük varfarin dozu üzerine yaş (%7,6), CYP2C9 genotip varyantları (%10) ve VKORC1 genotiplerinin (%7,3) %29 oranında etkili olduğu belirlenmiştir. Diğer çalışmalarda regresyon analizlerinde VKORC1 genotiplerinin bireylerarası varfarin doz değişkenliği üzerinde çalışmamıza göre daha yüksek oranda etkili olduğu gözlenmektedir. CYP2C9 genotip varyantları ve yaş faktörlerinin etkileri ise benzer sonuçlar vermektedir (Çizelge 5.2). Yapılan diğer çalışmalarda, düşük seviyede varfarin gereksinimi üzerine cinsiyet, boy, kilo gibi fenotipik özelliklerin de etkisinin olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda, regresyon analizi sonuçlarına göre varfarin kullanan olguların boy, cinsiyet, INR değerleri, endikasyonlar ve varfarinle birlikte aspirin kullanma faktörleri ile düşük seviyede varfarin dozu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Çizelge 5.2. Çalışmalarda elde edilen CYP2C9 genotip varyantları ve VKORC1 -1639 G>A polimorfizmi genotip dağılımı sonuçları ile olgulara ait özelliklerin varfarin dozu üzerine etkisi bakımından literatür verileri ile karşılaştırılması

Araştırmacı/Yıl	Populasyon	Bireylerarası varfarin doz değişkenliği üzerine etki	
		Faktörler	Frekans
Özgön ve arkadaşları 2008	Türkiye	CYP2C9 ve VKORC1 genotipleri ile yaş ve venöz tromboembolizm faktörleri	34
Kimura ve arkadaşları 2007	Asya	CYP2C9 ve VKORC1 genotipleri ile yaş faktörleri	12,8
Zhu ve arkadaşları 2007	Avrupa	CYP2C9 ve VKORC1 genotipleri	61
Obayashi ve arkadaşları 2006	Avrupa	CYP2C9 ve VKORC1 genotipleri	29,9
Sconce ve arkadaşları 2005	Avrupa	CYP2C9 ve VKORC1 genotipleri ile yaş ve boy faktörleri	55
Rieder ve arkadaşları 2005	Avrupa	VKORC1 genotipleri	23
Higayashi ve arkadaşları 2002	Avrupa	CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 genotip varyantları	6-10 arası
Bizim çalışmamız	Türkiye	CYP2C9 ve VKORC1 genotipleri ile yaş faktörleri	29

6. SONUÇ

Çalışmamızda 234 varfarin kullanan olguda ve 200 sağlıklı bireyde CYP2C9*2 CYP2C9*3 ve VKORC1 genotipleri PCR-RFLP yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bu polimorfizmlerin varfarin kullanan olgularda bireylerarası varfarin doz değişkenliği üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamıza varfarin kullanmayan 200 sağlıklı birey dâhil edilerek Türk populasyonunda CYP2C9 ve VKORC1 genotip frekanslarının ve bu frekansların etnik gruplar arası farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızın sonuçlarına göre;

- a. Çalışmaya dahil edilen tüm bireyler açısından, Türk populasyonunda VKORC1 geni -1639 G>A polimorfizmi genotip dağılımları G/G için % 27,6, G/A için %48,4 ve A/A için %24 olarak saptanmıştır.
- b. Türk populasyonunda CYP2C9 geni 430 C>T ve 1075A>C genetik polimorfizmlerine göre CYP2C9 genotip varyant frekansları, *1*1 için %59,4, *1*2 için %19,8, *1*3 için %13,8, *2*2 için %3,7, *2*3 için %2,8 olarak saptanmıştır. CYP2C9*3*3 varyantı varfarin kullanan olgu grubunda saptanmamıştır ancak çalışmaya katılan 2 sağlıklı bireyde %0,5 frekansı ile tespit edilmiştir.
- c. Türk populasyonda bu polimorfizmlerin genotip dağılımları etnik gruplar arasında en yakın benzerliği Avrupa populasyonlarıyla göstermektedir.
- d. Varfarin kullanan olgularda ortalama günlük varfarin dozu ile CYP2C9 genotip varyantları ve VKORC1 genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır. Bu polimorfizmlerin Türk populasyonunda bireylerarası varfarin doz değişkenliğinin belirlenmesinde ve klinikte

olguların varfarin dozaj tespitine yardımcı bir etken olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

- e. Varfarin kullanan olgularda belirlenen INR değerleri, Hedef INR değerleri, endikasyonlar, kanama komplikasyonları, varfarinle birlikte aspirin kullanma durumları ile CYP2C9*2, CYP2C9*3 genotip varyantları ve VKORC1 genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır.

7. KAYNAKÇA

1. Ahlström, M.M., Ridderström, M., Zamora, I., 2007, CYP2C9 Structure-Metabolism Relationships: Substrates, Inhibitors, and Metabolites, *J. Med. Chem.*, 50 (22), 5382 -5391
2. Aynacioglu, A.S., Brockmöller, J., Bauer, S., Sachse, C., Güzelbey, P., Ongen, Z., Nacak, M., Roots, I., 1999, Frequency of CYP2C9 variants in a Turkish population and functional relevance for phenytoin, *Br. J. Clin. Pharmacol.*; 48 (3): 409-15.
3. Babaoğlu, M., Yasar, U., Sandberg, M., Eliasson, E., Dahl, M.L., Kayaalp S.O., Bozkurt, A., 2004, CYP2C9 genetic variants and losartan oxidation in a Turkish population, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*; 60 (5): 337-42.
4. Baker, R., Coughlin, P.B., Gallus, A.S., Harper, P.L., Salem, H., Wood, E.M., 2004, Warfarin reversal: consensus guidelines, on behalf of the Australasian Society of Thrombosis and Haemostasis, *MJA*; 181: 492-497
5. Bae, J., Kim, H., Kim, J., Yang, S., Kim, M., Jang, C., Park, Y., Lee, S., 2005, Allele and genotype frequencies of CYP2C9 in a Korean population, *Br. J. Clin. Pharmacol.*; 60(4): 418-422.
6. Baykal, Y., Işık, A.T., Sağlam, K., Erikçi, S., Koçar, İ.H., *Antikoagulan Ve Trombolitik Tedavi, Ayın Kitabı*
7. Becquemont, L., 2003, Clinical relevance of pharmacogenetics, *Drug Metabolizm Review*; 35 (4): 277-85.
8. Berne, R.M., Levy, M.N., Koeppen B.M., Stanton, B.A., 2008, *Fizyoloji, Güneş Tıp Kitapevleri, Öncü Basımevi, Ankara*
9. Bhupinder, S.K., Cytochrome P450 enzyme isoforms and their therapeutic implications: an update, 2007, *Indian Journal of Medical Sciences*, Vol. 61, No. 2, 102-116
10. Canan, İ., Derviş, O., 2002, *Kardiyoloji, Antıp A.Ş. Yayınları; Ankara*
11. Chern H.D., Ueng T.H., Fu Y.P., Cheng C.W., 2006, CYP2C9 polymorphism and warfarin sensitivity in Taiwan Chinese, *Clinica Chimica Acta* 367, 108-113.

7. KAYNAKÇA (devam ediyor)

12. Coumadin Tablets Anticoagulant (Warfarin Sodium Tablets, Usp) Crystalline Coumadin For Injection (Warfarin Sodium For Injection, Usp), Bristol-Myers Squibb Company, NDA 9-218/S-105
13. Connock, M., Stevens, C., Fry-Smith, A., Jowett, S., Fitzmaurice, D., Moore, D., Song, F., 2007, Clinical effectiveness and cost-effectiveness of different models of managing long-term oral anticoagulation therapy: a systematic review and economic modelling, *Health Technology Assessment*, Vol. 11: No. 38
14. Cranenburg E.C., Schurgers L.J., Vermeer C., 2007, Vitamin K: The coagulation vitamin that became omnipotent, *Thromb. Haemost.* 98: 120–125
15. D'Andrea, G., D'Ambrosio, R., Perna, L.P., Chetta, M., Santacrose, R., Brancaccio, V., Grandone, E., Margaglione M., 2005, A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin, *Blood.*; 105: 645-649
16. Demir, M., Venoz Tromboembolizm: Tanı Cephesinde Yeni Ne Var?, XXX. Ulusal Hematoloji Kongresi, III. Hematoloji İlk Basamak Kursu, Van
17. Ekim, N., 1998, Pulmoner Tromboembolizm, *Akciğer Hastalıkları Cep Kitabı*, Birinci baskı, Atlas Kitabevi, s. 309–328, Ankara
18. Frye, R.F., 2004, Probing the world of Cytochrome P450 enzymes, Volume 4, Issue 3, *Molecular Interventions*; 4 (3):157-62
19. Garcia-Martin E., Martinez C., Ladero J.M., 2001, High frequency of mutations related to impaired CYP2C9 metabolism in a Caucasian population, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 57:47.
20. Gardiner, S.J., E.J., Begg, 2006, Pharmacogenetics, Drug-Metabolizing Enzymes, and Clinical Practice, *Pharmacol. Rev.*58: 521–590
21. Geisen, C.M., Watzka, K., Sittinger, M., Steffens, L., Daugela, E., Seifried, C.R. Müller, T.F. Wienker, Oldenburg, J., 2005, VKORC1 haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-ethnic variability of oral anticoagulation, *Thromb. Haemost.* 94: 773–9

7. KAYNAKÇA (devam ediyor)

22. Goldstein, J.A., 2001, Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily, *Br. J. Clin. Pharmacol*, 52, 349-355
23. Goodstadt L., Ponting C.P., 2004, Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism, *Trends Biochem. Sci.*; 29 (6): 289-92
24. Göz, M., 2006, Varfarin-gıda etkileşmesi: Olgu sunumu ve literatürün gözden geçirilmesi, *Turkish J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 14 (4): 320-324
25. Guengerich, P., 2006, Cytochrome P450s and Other Enzymes in Drug Metabolism and Toxicity, *The AAPS Journal*; 8(1),
26. Guengerich, P., 2003, Cytochromes P450, *Drugs and Diseases, P450s: From Knowledge to Exploitation, Molecular Interventions, Volume 3, Issue 4*
27. Higashi, M.K. Veenstra, D.L., Kondo, L.M., Wittkowsky, A.K., Srinouanprachanh, S.L., Farin, F.M., Rettie, A.E., 2002, Association Between CYP2C9 Genetic Variants and Anticoagulation-Related Outcomes During Warfarin Therapy, *JAMA*; 287:1690-1698
28. Hines, R.N., McCarver, D.G., 2002, The Ontogeny of Human Drug-Metabolizing Enzymes: Phase I Oxidative Enzymes, *JPET*, 300: 355–360
29. Hirsh, J., Fuster, V., Ansell, J., Halperin, J.L., 2003, *American College of Cardiology Foundation Guide to Warfarin Therapy*, American Heart Association;107:1692
30. Hirsh, J., Dalen, J.E., Anderson, D.R., Poller, A., Bussey, H., Ansell, J., Deykin, D., 2001, Oral Anticoagulants: Mechanism of Action, Clinical Effectiveness, and Optimal Therapeutic Range, *Sixth ACCP Consensus Conference on Antithrombotic Therapy*, , *CHEST*; 119:8S–21S
31. Holbrook A.M., Pereira, Labiris, R., H., McDonald, Douketis, J.D. Crowther, M., Wells, P.S., 2005, Systematic Overview of Warfarin and Its Drug and Food Interactions, *Arch. Intern. Med.*;165:1095-1106
32. Horton, J.D., Bushwick, B.M., 1999, Warfarin Therapy: Evolving Strategies in Anticoagulation, *American Family Physician*
33. <http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/ichastaliklari/files/kitaplar/152.pdf>

7. KAYNAKÇA (devam ediyor)

34. <http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/fiche.php?n=7393>
35. <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/image.cfm>
36. Ingelman-Sundberg, M., 2001, Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy, *J. Intern. Med.* 250, 186-200.
37. Kamali, F., Pirmohamed, M., 2006, The future prospects of pharmacogenetics in oral anticoagulation therapy *Br. J. Clin. Pharmacol.* 61: 674-675
38. Kamali F, Khan T.I., King B.P., et al., 2004, Contribution of age, bodysize and CYP2C9 genotype to anticoagulant response to warfarin. *Clin. Pharmacol. Ther.*; 75: 204-212
39. Kayaalp, S.O., 2002, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Dokuzuncu baskı, Hacettepe-Taş Kitapçılık, Ankara
40. Kimura, R., Miyashita, K., Kokubo, Y., Akaiwa, Y., 2007, Genotypes of vitamin K epoxide reductase, γ -glutamyl carboxylase, and cytochrome P450 2C9 as determinants of daily warfarin dose in Japanese patients, *Thrombosis Research* 120, 181-186.
41. Kimura M., Ieiri I., Mamiya K., et al., 1998, Genetic polymorphism of cytochrome P450s, CYP2C19, and CYP2C9 in a Japanese population, *Ther. Drug. Monit.* 20: 243.
42. Kjeldsen, J., Lassen, J.F., Petersen, P.H., Brandslund, I., 1997, Biological variation of International Normalized Ratio for prothrombin times, and consequences in monitoring oral anticoagulant therapy: computer simulation of serial measurements with goalsetting for analytical quality, *Clinical Chemistry* 43: 2175-2182
43. Lamson D.W, Plaza S.M., 2003, The Anticancer Effects of Vitamin K, *Altern. Med. Rev.*; 8 (3): 303-18
44. Lee C.R., Goldstein J.A., Pieper J.A., 2002, Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data, *Pharmacogenetics.*;12 (3): 251-63.

7. KAYNAKÇA (devam ediyor)

45. Li, T., Lange, L.A., Li X.L., Susswein, B., Bryant, R., Malone, E.M., Lange, T.Y., Huang, D.W., Stafford, J.P., Evans, 2006, Polymorphisms in the VKORC1 gene are strongly associated with warfarin dosage requirements in patients receiving anticoagulation, *J. Med. Genet.* 43: 740–744
46. Libby, P., Bonow , R.O., Zipes, D.P., Mann, D.L., Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, Volume 2, Seventh Edition, Saunders Elseiver
47. Linder M.W., Looney, S., Adams, J.E., Johnson, N., Antonino-Green, D., Lacefield, N., 2002, Warfarin dose adjustments based on CYP2C9 genetic polymorphisms. *J. Thromb. Thrombolysis*, 14: 227–32.
48. McFadyen M.C., Melvin W.T., Murray G.I., 2004, Cytochrome P450 enzymes: Novel options for cancer therapeutics, *Mol. Cancer. Ther.*, 3 (3): 363–371]
49. Miners, J.O., Birkett, D.J., 1998, Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 45: 525–538
50. Mised, issn 1303-2550, 2007, Fersa Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara
51. Montes, R., Gaona, E.R., Martinez-Gonzalez, M.A., Alberca, I., Hermida, J., 2006, The c.)1639G > A polymorphism of the VKORC1 gene is a major determinant of the response to acenocoumarol in anticoagulated patients, *British Journal of Haematology*, 133, 183–187
52. Moridani, M., Fu, L., Selby, R., Yun, F., Sukovic, Wong, T., B., Cole, D., 2006, Frequency of CYP2C9 polymorphisms affecting warfarin metabolism in a large anticoagulant clinic cohort, *Clin Biochem.* Jun;39(6):606-12
53. Nural, M.S., Baydın, A., Karataş, A.D., Elmalı, M., 2006, Yüksek Doz Warfarin Kullanımı Sonucu Gelişen Yaygın Alveoler Hemoraji, *Toraks Dergisi*; 7 (1): 68-71
54. Nussbaum, R.L., Mcinnes, R.R., Willard, H.F., Cornelius, F.B.III., 2005, Thompson &Thompson Tıbbi Genetik, 6. Baskı, Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Saunders

7. KAYNAKÇA (devam ediyor)

55. Obayashi, K., Nakamura, K., Kawana, J., Ogata, H., Hanada, K., Kurabayashi, M., Hasegawa, A., Yamamoto, K., Horiuchi, R., 2006, VKORC1 gene variations are the major contributors of variation in warfarin dose in Japanese patients, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 80: 169-78.
56. Obayashi, K., Nakamura, K., Kawana, J., Ogata, H., Hanada, K., Kurabayashi, M., Hasegawa, A., Yamamoto, K., Horiuchi, R., 2006, VKORC1 gene variations are the major contributors of variation in warfarin dose in Japanese patients, *Clin. Pharmacol. Ther.* 80: 169-78.
57. Omiecinski C.J., Remmel R.P., Hosagrahara V.P., 1999, Concise review of the cytochrome P450s and their roles in toxicity, *Toxicol Sci.*, 48 (2): 151-6
58. Özcanlı, D., 2006, Antithrombotic Treatment and Nursing Functions, *Yoğun Bakım Hemşireliği Dergisi*; 10 (1-2): 36-41
59. Özerol, E., 1996, Sitokrom P450 Monooksijenaz Enzim Sistemleri, *Journal of Turgut Özal Medical Center*, 3, No:3
60. Özgön, G.O., Langae , T. Y. Feng H., Buyru, N.T., Ulutin, Hatemi A.C., Siva, A., Saip, S., Johnson, J.A., 2008, VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms are associated with warfarin dose requirements in Turkish patients, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*; 64 (9): 889-94
61. Özkan, M., Uzun, Ş., Uzun, M., Kırılmaz, A., Vural, H., Erinç, K., Baysan, O., Demirtaş, E., 2003, Atriyal Fibrilasyonlu Hastalarda Warfarin Kullanımı: Yeteri Kadar Kullanılıyor Mu?, *Gülhane Tıp Dergisi* 45 (1): 64-66
62. Rettie, A.E., Tai, G., 2006, The pharmacogenomics of warfarin: Closing in on personalized medicine, *Molecular Interventions* 6: 223-227
63. Rieder, M.J., Reiner, A.P., Gage, B.F., Nickerson, D.A., Eby, C.S., McLeod, H.L., Blough, D.K., Thummel, K.E., Veenstra, D.L., Rettie, A.E., 2005, Effect of VKORC1 Haplotypes on Transcriptional Regulation and Warfarin Dose, *N. Engl. J. Med.*; 352: 2285-93.

7. KAYNAKÇA (devam ediyor)

64. Rost S., Fregin A., Ivaskevicius V., 2004, Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2, *Nature*; 427: 537-541.
65. Sağ, C., Baysan, O., 2007, Varfarin Kullanımı ve İlaç Etkileşimleri, İ.Ü. Kardiyol. Enst. Derg, 6(2): 26–32
66. Saynalp, N., Koagülasyonun ABC'si: Protein C, 6. İlk Basamak Kursu (http://www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/6_IBK_04.pdf)
67. Schwarz U.I., Stein C.M., 2006, Genetic determinants of dose and clinical outcomes in patients receiving oral anticoagulants, *Clin. Pharmacol. Ther.*; 80 (1): 7-12
68. Sconce E.A., Khan T.I., Wynne H.A., Avery P., Monkhouse L., King B.P., Wood P., Kesteven P., Daly A.K., Kamali F., 2005, The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen, *Blood*. 106:2329-2333
69. Scordo, M.G., Aklillu, E., Yasar, U., Dahl, M., Spina, E., Ingelman-Sundberg, M., 2001, Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in a Caucasian and a black African population, *Br. J. Clin. Pharmacol*, 52, 447-450
70. Strachan, T., Read, A.P., *Human Molecular Genetics 2*, 2nd Edition, BIOS Scientific Publishers, Ltd., Oxford, UK, (1999).
71. Stern, R., Karls, V., Kinney, L., Glickman, R., 1997, Using the international normalized ratio to standardize prothrombin time, *J. Am. Dent. Assoc.*, Vol 128, No:8, 1121-1122.
72. Şencan, M., Cerrahi İşlem Öncesi Koagülasyon Testleri Bozuk Olan Hastada Ne Yapmalıyım?, XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi, IV. Hematoloji İlk Basamak Kursu
73. Ünverir, P., Dağ, T., Peynirci, H., Demir, E., Canbay, C., Kaya, A., Yanturalı, S., 2006, Acil Serviste Varfarin Kullanımına Bağlı Kanama Komplikasyonlarının incelenmesi, *Türkiye Acil Tıp Dergisi*, 6 (3): 117-121

7. KAYNAKÇA (devam ediyor)

74. Töbü, M., Antikoagülan Tedavi, Türk Hematoloji Derneği - Temel Hemostaz Tromboz Kursu
75. Wadelius, M., Chen, L.Y., Eriksson, N., 2007, Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism, *Hum. Genet.*; 121 (1): 23–34.
76. Wadelius, M., Pirmohamed, M., 2006, Pharmacogenetics of warfarin: current status and future challenges, *Pharmacogenomics J.*, 7 (2): 99-111
77. Wallin, R., Sane, D.C., Hutson, S.M., 2003, Vitamin K 2,3-epoxide reductase and the vitamin K-dependent γ -carboxylation system, *Thrombosis Research* 108, 221– 226
78. Yılmaz, N., Erbağcı, A.B., Aynacıoğlu, A.S., 2001, CYP2C9 genotype in Southeast Anatolia and possible relation with some serum tumour markers and cytokins, *Acta. Biochim. Pol.*; 48 (3): 775-82.
79. Yüksel, N., Sitokrom P450 Enzim Sistemi ve İlaç Etkileşimleri, 35. Ulusal Psikiyatri Kongresi, Ankara
80. Yuan H., , Jin-Jer Chen^{1,2}, M.T. Michael Lee¹, Ju-Chieh Wung¹, Ying-Fu Chen³, A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity, *Human Molecular Genetics*, 2005, Vol. 14, No. 13
81. Zhu, Y., Shennan, M., Reynolds, K.K., Johnson, N.A., M.,R. Herrnberger, Valdes,R., Linder, M.W., 2007, Estimation of Warfarin Maintenance Dose Based on VKORC1 (-1639 G/A) and CYP2C9 Genotypes, *Clinical Chemistry* 53: 7 1199–1205

8. ÖZGEÇMİŞ

ENGİN ATLI

Doğum Tarihi : 08.04.1983
Doğum Yeri : Çorum
Uyruğu : T.C.

Eğitim Durumu :

2005 – 2008 **Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (Eskişehir)**
Sağlık Bil. Enst. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans
2001 – 2005 **Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (Eskişehir)**
Biyoloji Bölümü
1994 – 2001 **Çorum Anadolu Lisesi**
Lise
1989 – 1994 **Salim Akaydın İlköğretim Okulu**
İlköğretim

Yabancı Diller :

İngilizce
(İyi Seviyede)

Uluslar Arası Toplantılarda Sunulan Yazılı Bildiriler

1. O. Çilingir, M. H. Müslümanoğlu, G. Bademci, M. O. Akay, E. Atlı, E. Tepeli, Z. Gülbaş, S. Artan, “Analysis of JAK2(V617F) Mutation in Turkish Patients with Myeloproliferative Disorders, European Society of Human Genetics, June 16-19, 2007

Ulusal Toplantılarda Sunulan Yazılı Bildiriler

1. M. H. Müslümanoğlu, E. Tepeli, A. Uludağ, D. Uzun, E. Atlı, S. Artan “Tekrarlayan Gebelik Kaybı Olan Hastalarda C677T ve A1298C Polimorfizminin Değerlendirilmesi”, VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi
2. E. Tepeli, S. Demir, M. H. Müslümanoğlu, E. Atlı, D. Uzun, M. Turgut, “ Türk Populasyonunda MTHFR Geni A1298C ve C677T Polimorfizmlerinin Prostat Kanseri ile İlişkisinin İncelenmesi”, VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi
3. O. Çilingir, M. H. Müslümanoğlu, M. O. Akay, E. Tepeli, E. Atlı, B. Durak, Z. Gülbaş “Myeloproliferatif Hastalıklarda JAK2 Geni V617F Mutasyon Analizi” XXXII. Ulusal Hematoloji Kongresi, 2006

Ulusal Yayınlar

1. E. Tepeli, M. H. Müslümanoğlu, A. Uludağ, E. Atlı, D. Uzun, S. Artan, “Eskişehir İlinde İdiyopatik Tekrarlayan Gebelik Kayıpları ile Metilentetrahidrofolat Reduktaz(MTHFR) C677T ve A1298C Polimorfizmleri Arasındaki İlişki” Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Dergisi

Katıldığı Ulusal Bilimsel Toplantılar

1. VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, 2006
2. I. Ulusal Ege Sempozyumu, 2006