

T.C.  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİMDALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANTİKOAGÜLAN KULLANIM ENDİKASYONU OLAN  
HASTALARDA *VKORC1* C1173T VE G-1639A GEN  
POLİMORFİZMLERİNİN FARMAKOGENETİK ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI

**Filiz ÇETİNKAYA**

Danışman Öğretim Üyesi  
**Doç. Dr. Ahmet Rüçhan AKAR**

ANKARA  
Eylül, 2010

## **Antikoagülan Kullanım Endikasyonu Olan Hastalarda VKORC1 C1173T ve G-1639A Gen Polimorfizmlerinin Farmakogenetik Etkisinin Araştırılması**

### **ÖZET**

Kumarin türevi bir antikoagülan olan varfarin, tüm dünyada tromboembolik olayların tedavisinde ve önlenmesinde kullanılan bir ilaçtır. Kumarin türevi olan varfarin, antikoagülan etkinliğini vitamin-K-epoksi-redüktaz enzim sentezini inhibe ederek göstermekte, sonuç olarak K vitaminine bağımlı olarak  $\gamma$ -karboksilasyona uğrayan II, VII, IX, X gibi koagülasyon faktörlerinin üretimi engellenmektedir. Varfarin tedavi sürecinde bireyler arası ilaç yanıt farklılıkları, varfarine özgü dar terapötik pencere ve ilaç etkisinin nötralize edilmesindeki zorluklarla karşılaşmakta ve hastalar tedavi sürecinde kanama veya tromboemboli gibi ciddi komplikasyonlarla karşı karşıya kalabilmektedir. Bu çalışmanın amacı, vitamin K epoxide redüktaz kompleks alt ünite-1 (VKORC1 [G-1639A, C1173T]), Faktör V Leiden G1691A (FVL), Prothrombin/Faktör II (G20210A) ve Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR C677T) genlerindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin oluşturduğu farmogenetik bilginin warfarin yanıtı ve klinik sonuçları üzerindeki etkisinin araştırılmasıdır.

Bu çalışmaya terapötik hedef INR değeri 2.5-3.5 arasında değişen toplam 120 hasta dahil edilmiştir. Varfarin endikasyonu 90 hastada kardiyak nedenlerle (mekanik kapak replasmanı, atriyal fibrilasyon), 30 hastada ise vasküler nedenlerle (derin ven trombozu, pulmoner tromboemboli) konmuştur. Tüm çalışma grubu için günlük ortalama warfarin dozu 4,54 mg'dır. Periferal kan EDTA içeren vakumlu tüplere toplanmıştır. DNA izolasyonundan sonra, *FVL*, *FII*, *MTHFR* ve *VKORC1* polimorfizmlerini tespit etmek için eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ve erime eğrisi analizleri yapılmıştır.

Hasta grubunda, trombotik risk allel frekansı verileri: *FVL* G-A %23.3 (28), A-A %3.4 (4); *FII* (G20210A) G-A %10 (12), A-A 0% (0); *MTHFR* (C677T) C-T %46.6 (56), T-T %5.9 (7)-olarak belirlenmiştir. Hastaların %40'ında *VKORC1* (G-1639A) için AA genotipi ve *VKORC1* (C1173T) için TT genotipi bulunmuştur. Antikoagülasyon ve hemorajik komplikasyon riski (%10.8), *VKORC1* genetik varyantlarına sahip hastalarda yüksek bulunmuş, bu varyantların taşıdığı A ve T alleleleri arasında tam bağlantı bulunmuştur. Varfarin gereksinimi olan hasta grubunda *FVL* polimorfizmini taşıma oranı sağlıklı birey prevelansına göre yüksek bulunmuştur.

**Anahtar Sözcükler:** Antikoagülasyon, *VKORC1* (Vitamin K epoksi redüktaz)

## **Investigation of pharmacogenetic effects of VKORC1 C1173 and G-1639A gene polymorphisms in patients with indications for the use of anticoagulant drugs**

### **ABSTRACT**

Warfarin, a coumarin derivative, is an oral anticoagulant used for prevention and treatment of thromboembolic cases all over the world. Warfarin, a coumarin derivative, produces an anticoagulant effect by interfering with the vitamin K 2,3 epoxide reductase (VKOR) enzyme and  $\gamma$ -carboxylation of vitamin K-dependent clotting factors such as II, VII, IX, and X. However, management of warfarin therapy is complicated with inter individual differences in drug response, delayed onset of action, difficulty with reversal and a narrow therapeutic window leading to increased risk of life-threatening hemorrhagic adverse events or thromboembolism. The objective of this study was to investigate the relative impact of pharmacogenetic information including vitamin K epoxide reductase complex subunit-1 (VKORC1 [G-1639A, C1173T]), factor V gene G1691A (FVL), prothrombin/factor II (G20210A) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T) single nucleotide polymorphisms (SNP) on warfarin response and clinical outcome.

A total of 120 patients with therapeutic INR values ranging between 2.5 and 3.5 were included in the study. Warfarin therapy were started in 90 patient due to cardiac disorders (mechanical heart valve replacement, atrial fibrillation), and 30 patient due to vascular disorders (deep vein thrombosis and pulmonary thromboembolism). For the entire cohort, daily mean dose of warfarin was 4.54 mg. Peripheral blood was collected into evacuated tubes containing EDTA. After DNA isolation, Real-time PCR and melting curve analysis were performed to detect *FVL*, *FII*, *MTHFR* and *VKORC1* polymorphisms .

Among 120 individuals, the data showed that thrombotic risk allele frequencies – Factor V Leiden (G1691A) G-A 23.3% (28), A-A 3.4% (4), FII (G20210A) G-A 10% (12), A-A 0% (0), MTHFR (C677T) C-T 46.6% (56), T-T 5.9% (7). The risk of over-anticoagulation and hemorrhagic complications (10.8%) were higher in patients with VKORC1 genetic variants carrying this A and T alleles showing complete linkage had . Patients started warfarin therapy shows FVL polymorphism carrying patient higher prevalence than normal patient.

**Keywords:** Anticoagulation, *VKORC1* (Vitamin K epoxide reductase)

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde beni destekleyen, yönlendiren, tez çalışmalarımın her aşamasında bilimsel ve manevi katkılarını esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Ahmet Rüçhan Akar'a en içten dileklerle teşekkür ederim. Tez çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen ve değerli fikirleriyle çalışmamda katkıda bulunan Ankara Üniversitesi Pediatrik Genetik Bilim Dalı başkanı sayın hocam Prof. Dr. Nejat Akar'a ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü öğretim üyesi Doç. Dr. Hilal Özdağ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın deneysel aşaması için her türlü imkan ve olanakları sağlayan Moleküler Patoloji ve Genetik laboratuvarı'na ve başta sıcacık gülümsemesi ile yardımını benden esirgemen Uzm. Bio. Yonca Eğin'e, desteği ve yardımları için Bio. Emel Uslu'ya, Dilek Çetin'e ve tüm laboratuvar çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca bilimsel tecrübelerini benimle paylaşan Dr. Serkan Durdu'ya, Uzm. Kimyager Günseli Çubukçuoğlu Deniz'e, Dr. Yeşim Alakoç'a ve istatistiksel analiz için Zeynep Özkeseerli'ye, çalışmalara başladığım ilk günden beri yanımda olan Kalp Merkezi hemşiresi Döne Delkhah'a, desteğini ve yardımlarını benden hiç esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Dr. Çağın Zaim'e, Uzm. Bio. Aynur Karadağ'a, Bio. Seda Uysal'a, Uzm. Bio. Arın Doğan'a, tüm Biyoteknoloji ekibine ve Kalp Merkezi çalışanlarına teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yüreğimde hissedeceğim babama, sevgisiyle sarıp sarmalayan birtanecik anneme, canım kardeşime, kalbinin attığı andan beri uğur getiren ve yanımdan hiç ayıramadığım Kuzey'ime, yaşama umutla bakabilmemi sağlayan hayat arkadaşşıma teşekkür ederim.

Filiz Çetinkaya,  
Ankara, Eylül 2010

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vii
SİMGELER DİZİNİ .....	viii
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1. Antikoagülan Tedavi .....	4
2.2. Oral Antikoagülan Endikasyonları .....	4
2.3. Varfarin .....	7
2.4. Varfarin Farmakodinamiği .....	8
2.5. Varfarin Farmakokinetiği ve Farmakodinamikleri.....	10
2.6. Varfarin ve Diğer İlaç Etkileşimleri.....	12
2.7. Varfarin ve Diet ile K-Vitamini Alımı .....	14
2.8. Varfarin Farmakogenetiği .....	15
2.8.1. Vitamin K epoksi redüktaz alt birim 1 ( <i>VKORC1</i> ) .....	16
2.9. Antikoagülasyon Yoğunluğunun Monitorizasyonu .....	17
2.9.1. PTZ (protrombin zamanı) ve INR (international normalized ratio).....	17
2.10. Varfarin İlişkili Komplikasyonların Tanımlanması .....	19
2.10.1. Tromboembolizm .....	19
2.10.2. Kanama veya hemorajik olay .....	20
2.11. Varfarin Doz Ayarlaması .....	22
2.12. Koagülasyon.....	23
2.12.1. İntrensek yolak .....	24
2.12.2. Ekstrensek yolak .....	25
2.12.3. Ortak yolak.....	25
2.13. Trombofili ile İlişkilendirilmiş Genler ve Polimorfizmleri.....	26
2.13.1. Faktör V Leiden gen mutasyonu .....	26
2.13.2. Protrombin G20210A gen mutasyonu.....	27
2.13.3. MTHFR C677T gen mutasyonu.....	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	29
3.1. Kullanılan Sarf, Kimyasal ve Reaktifler .....	29
3.2. Hasta Kohortu .....	30
3.3. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri.....	31
3.4. Çalışmadan Dışlanma Kriterleri.....	32
3.5. Kan Örneklerinin Toplanması .....	32
3.6. Dna İzolasyonu.....	32
3.7. Eş Zamanlı Pzr ile Polimorfizmlerin Tespit ve Tanımlanması .....	33
3.7.1. Faktör V Leiden gen mutasyon tespiti .....	34
3.7.2. Protrombin G20210A gen mutasyon tespiti.....	36
3.7.3. MTHFR C677T gen mutasyon tespiti.....	38
3.7.4. <i>VKORC1</i> G-1639A ve C1173T polimorfizmlerinin tespiti.....	41
3.8. İstatiksel Analiz.....	45
4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....	46
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	55
5.1. Türk Populasyonunda Yapılmış Diğer Çalışmalar.....	61
5.2. Sonuç ve Öneriler.....	62

KAYNAKLAR.....	64
ÖZGEÇMİŞ .....	73

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Varfarin Molekülünün 3 Boyutlu Modeli .....	8
Şekil 2.2. Vitamin K bağımlı gama karboksilasyon sistemi .....	9
Şekil 2.3 Varfarin'in Etki Mekanizmasının Özetlenmesi .....	10
Şekil 2.4. Varfarin Metabolizmasının Özetlenmesi .....	11
Şekil 2.5. <i>VKORC1</i> geninin gösterimi .....	16
Şekil 2.6. Koagülasyon Yolakları .....	24
Şekil 3.1. FVL Gen Mutasyonunun Eş Zamanlı PZR Analizindeki Görüntüsü .....	36
Şekil 3.2. Protrombin Gen Mutasyonunun Eş Zamanlı PZR Analizindeki Görüntüsü.....	38
Şekil 3.3. MTHFR Eş Zamanlı PZR Analizindeki Görüntüsü .....	41
Şekil 3.4. SimpleProb ve Hibridizasyon Prob Teknikleri .....	42
Şekil 3.5. <i>VKORC1</i> C1173T ve G-1639A Polimorfizmlerinin Eş Zamanlı PZR Analizindeki Görüntüleri .....	42
Şekil 3.6. Çalışma Akış Diyagramı .....	45
Şekil 3.7. <i>VKORC1</i> (G-1639A) ile FVL arasındaki ilişkinin gösterimi.....	52
Şekil 3.8. <i>VKORC1</i> (G-1639A) ile Protrombin arasındaki ilişkinin gösterimi.....	52
Şekil 3.9. <i>VKORC1</i> (G-1639A) ile MTHFR arasındaki ilişkinin gösterimi.....	53

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Varfarinin Etkinliğini Artıran İlaçlar .....	12
Çizelge 2.2. Varfarin Metabolizmasını İndükleyen İlaçlar .....	13
Çizelge 2.3. Vitamin K İçeren Gıdaların Özetlenmesi .....	14
Çizelge 2.4. Varfarin Kullanım Endikasyonlarında Hedef INR Aralıkları .....	19
Çizelge 2.5. Tromboembolizm Derecelendirmesi .....	20
Çizelge 2.6. Tromboembolizm Sınıflandırılması.....	20
Çizelge 2.7. Kanama Derecelendirmesi .....	21
Çizelge 2.8. Ciddi Kanama Sınıflandırılması .....	21
Çizelge 3.1. Olguların Demografik Özellikleri ve Klinik Bulgular ile İlgili Veri Seti ve Varfarin Endikasyonuna Göre Dağılımı.....	30
Çizelge 3.2. FVL Gen Mutasyon Reaksiyon Karışımının Hazırlanması .....	34
Çizelge 3.3 FVL Gen Mutasyon Tespitinde Sıcaklık Prosedürü .....	35
Çizelge 3.4. Protrombin Gen Mutasyon Reaksiyon Karışımının Hazırlanması .....	36
Çizelge 3.5. Protrombin Gen Mutasyon Tespitinde Sıcaklık Prosedürü .....	37
Çizelge 3.6. MTHFR Gen Mutasyon Reaksiyon Karışımının Hazırlanması .....	39
Çizelge 3.7. MTHFR Gen Mutasyon Tespitinde Sıcaklık Prosedürü .....	40
Çizelge 3.8. <i>VKORC1</i> G-1639A ve C1173T Reaksiyon Karışımının Hazırlanması.....	43
Çizelge 3.9 <i>VKORC1</i> G-1639A ve C1173T Tespitinde Sıcaklık Prosedürü.....	44
Çizelge 3.10. Hasta popülasyonunun Hardy-Weinberg dengesinde olduğunun gösterimi.....	46
Çizelge 3.11. Olguların Genotip Frekansları ile İlgili Veri Seti.....	47
Çizelge 3.12. Olguların Klinik Takiplerinde <i>VKORC1</i> , G-1639A Genotipine Göre Karşılaştırılması.....	48
Çizelge 3.13. Olguların Klinik Takiplerinde <i>FVL</i> , 169 Genotipine Göre Karşılaştırılması....	49
Çizelge 3.14. Olguların Klinik Takiplerinde Protrombin Genotipine Göre Karşılaştırılması..	50
Çizelge 3.15. Olguların Klinik Takiplerinde MTHFR Genotipine Göre Karşılaştırılması .....	51
Çizelge 3.16. <i>VKORC1</i> (G-1639A) ile trombojenik gen polimorfizmlerinin arasında ilişkinin sorgulanması.....	53
Çizelge 3.17. Varfarin Kullanan Hastalarda <i>FVL</i> , Protrombin ve MTHFR gen mutasyonlarının Varfarin Kullanmayan Sağlıklı Bireylerle Karşılaştırılması .....	54
Çizelge 3.18. Çalışmamızda Tespit Edilen <i>VKORC1</i> G-1639A Gen Polimorfizm Oranlarının Diğer Popülasyonlarla Kıyası.....	62



## SİMGELER DİZİNİ

<b>AF</b>	Atriyal Fibrilasyon
<b>aPTT</b>	Aktive Parsiyel Protrombin Zamanı
<b>ASA</b>	Asetil salisilik asit
<b>DVT</b>	Derin Ven Trombozu
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraasetikasit
<b>FV</b>	Faktör V
<b>FVL</b>	Faktör V Leiden
<b>HBV</b>	Hepatit B virüsü
<b>HCV</b>	Hepatit C virüsü
<b>INR</b>	International Normalized Ratio (Uluslar arası standardize protrombin testi)
<b>ISI</b>	International Sensitivity Index (Uluslararası sensitivite indeksi)
<b>PZR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PTE</b>	Pulmoner tromboemboli
<b>PTZ</b>	Protrombin Zamanı
<b>PTZO</b>	Protrombin Zamanı Oranı
<b>RBC</b>	Red Blood Cell (Kırmızı kan hücresi)
<b>mcg</b>	mikrogram
<b>MD</b>	Mitral darlık
<b>mg</b>	Miligram
<b>MTHFR</b>	Metilentetrahidrofolat Redüktaz
<b>NSR</b>	Normal sinüs ritmi
<b>SAA</b>	Sol atriyal apendiks
<b>SE</b>	Sistemik embolizasyon
<b>SEK</b>	Sitemik eko-kontrastı
<b>TNP</b>	Tekli Nükleotit Polimorfizm
<b>WHO</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>VKOR</b>	Vitamin K epoksid Redüktaz Enzimi
<b>VKORC1</b>	Vitamin K epoksid redüktaz alt ünite 1 geni
<b>VTE</b>	Venöz tromboemboli
<b>µl</b>	mikrolitre

## 1. GİRİŞ

Günümüzde oral antikoagulanlar içinde en sık reçete edilen ilaç varfarindir. Varfarin, tüm kardiyovasküler hastalıkları ilgilendiren ilaçlar içerisinde de reçete edilme oranları açısından Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde 4. sırada yer almaktadır (Horton and Bushwick 1999). Varfarin ve diğer vitamin K antagonistleri, tromboz oluşumunu ve genişlemesini önlemek amacıyla 60 yıldır klinik uygulama alanı bulmuşlardır. Varfarin, bir vitamin K antagonistidir ve koagülasyon faktörlerinden II, VII, IX ve X'un gama karboksilasyonunu engelleyerek aktivasyonlarını önlemektedir. Varfarin, doz yanıtında bireyler-arası farklılıklar ve dar terapötik pencere nedeniyle klinik kullanımında ciddi güçlüklerle karşılaşmaktadır. Varfarin ile tedavi sürecinde hedef INR düzeylerinden sapma ile kanama veya tromboemboli gibi önemli komplikasyonlarla karşı karşıya kalınabilmektedir. Atriyal fibrilasyon (AF), mekanik kalp kapak replasmanı, sol atriyal trombüs, miyokard infarktüsü sonrası gelişen sol ventrikül trombüs, derin ven trombozu (DVT) ve pulmoner tromboemboli (PTE) gibi kalp, damar ve solunum sistemini ilgilendiren patolojilerde (Hirsh *et al.* 2001) ve ortopedik cerrahi uygulanan hastalarda (Prandoni *et al.* 2002) tromboembolizmi önlemek amacıyla antikoagülan tedavi önerilmektedir. Bu tip klinik durumlarda antikoagülan tedavinin amacı trombüs oluşumunu ve tromboembolik olay gelişimini azaltmaktır.

Vitamin-K antagonisti etkisiyle güçlü bir oral antikoagülan olan varfarin, dar terapötik indeks, bireylerarası geniş doz-yanıt değişkenliği ile karakterizedir (Voora *et al.* 2005). Artan antikoagülan etki kanama, düşük antikoagülan etki ise tromboembolizm gibi ciddi komplikasyonların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Bu yelpazedeki karşıt riskler arasındaki dengeyi kurmak çok dikkatli bir tedavi yönetimi gerektirmektedir. Oral antikoagülan tedavinin, vitamin-K bağımlı pıhtılaşma faktörleri üzerine olan etkisinin yeterli olduğunu göstermek için yoğun bir şekilde monitorize edilmesi gerekmektedir. Varfarin kullanımı için gerekli yıllık harcamalar ABD'de 500 milyon dolar olarak hesaplanmıştır. Varfarin'in bu yaygın kullanımına rağmen Sağlık Hizmetleri Kalite ve Araştırma Dairesi, ABD'de varfarin kullanım oranlarının olması gerekenden düşük kaldığını rapor etmektedir. Bunun ana nedeni ise klinisyenlerin bu ilacı reçete etmeleri halinde kanama komplikasyonlarından çekinmeleri olarak belirlenmiştir (Evans *et al.* 2002).

Atriyal trombüse bağlı olarak ortaya çıkan sistemik embolizasyon hem paroksizmal ve kronik atriyal fibrilasyon hem de spontan veya kardioversiyonla ilişkili olarak oluşabilir. PTE,

trombüs ya da birden fazla lokalizasyonda yerleşmiş olan trombüslerin sistemik dolaşımdan pulmoner vasküler yatağa göçünü ifade eden, sıklıkla alt ekstremitelerde derin venlerinden kaynaklanan ve tedavi edilmezse ölümlü sonuçlanabilen ciddi bir klinik sorundur. Pulmoner embolizm ve DVT aynı patogenezin ayrılmaz bir parçası olarak görülmekte ve venöz tromboemboli (VTE) olarak da ifade edilmektedir (Savaş 2009). Klinik, radyolojik ve fonksiyonel olarak ciddi bir probleme yol açmayan fibrin-trombosit agregasyonundan, vasküler yatağın tam oklüzyonu sonucunda fatal seyredebilen bir tabloyla da karşımıza çıkabilmektedir (Gage *et al.* 1995, van WC *et al.* 2002). Bu nedenlerle VTE ve PTE geçirmiş hastalarda antikoagülasyon tedavisi kılavuzlarca önerilmektedir.

AF'deki hastaları iskemik inmeden (Gage *et al.* 1995, van WC *et al.* 2002) ve bazı akut koroner sendrom hastalarında, miyokard enfarktüsünden (Hurlen *et al.* 2002, van Es *et al.* 2002) koruduğunu gösteren randomize klinik çalışmalar bulunmaktadır. Aynı zamanda venöz tromboemboli hikayesi olan hastaları, derin ven trombozu ve pulmoner emboliden korumakta (Francis *et al.* 2002, Ridker *et al.* 2003), ortopedik cerrahi uygulanan ve mobilizasyonlarında güçlükler bulunan hastalarda da varfarin ile antikoagülasyon tedavisi önerilmektedir (Prandoni *et al.* 2002).

Tromboemboli riski oluşturan kardiyovasküler hastalıklarda varfarinin etkin düzeyde tutulması (genellikle hedef INR: 2.5-3.5) tedavi etkinliği açısından önem taşımaktadır. INR düzeyinin 2.5 seviyesinin altında olması trombüs formasyonu ve tromboemboli riskinde artışa neden olmaktadır. Diğer yandan INR düzeyinin terapötik seviyelerin üzerinde olması beyin kanaması, gastrointestinal sistem kanaması gibi ölümcül kanama riskini beraberinde getirmektedir.

Bu yüksek lisans çalışmasının amaçlarından birisi, varfarin metabolizmasından sorumlu vitamin-K-epoksi-redüktaz (VKOR) enzimidaki gen polimorfizmlerinin prevalansını varfarin kullanım endikasyonu olan Türk hastalarda araştırmaktır. Çalışmadan elde edilecek bulgularla Türk popülasyonunda *VKORC1* polimorfizmleri prevalansının belirlenmesine katkı sağlanması amaçlanmaktadır. İkincil olarak bu gen polimorfizmini taşıyan hastalarda INR düzeyleri, tromboembolik ya da hemorajik komplikasyonların takibi yapılarak varfarin doz-yanıt ilişkileri araştırılacak ve normal bireylerle karşılaştırılacaktır. Diğer bir deyişle çalışmada varfarin kullanım endikasyonu olan Türk hastalarda *VKORC1* genindeki C1173T ve G-1639A tekli nükleotid polimorfizmlerinin, varfarin duyarlılığı ile olan korelasyonunun sorgulanması hedeflenmiştir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda trombozla ilişkilendirilmiş çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır. Klinik rutin kullanıma da giren bu polimorfizmlerin en sık analiz edilenleri arasında Faktör V Leiden (FVL), Metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR), Protrombin *G20210A* mutasyonları yer almaktadır. Bu tez çalışmasının bir diğer amacı, *VKORC1* polimorfizmlerinin yanında, tanımlanan bu trombojenik gen polimorfizmleri ile etkileşimleri de araştırmaktır.

Sonuçta bu çalışma ile incelenecek olan *VKORC1* polimorfizmleri ile trombojenik gen polimorfizmlerinin oluşturduğu profilin varfarin endikasyonu olan hastalarda kanama ve tromboz riski ile ne ölçüde korele olduğunun belirlenmesi hedeflenmektedir. Ortaya çıkacak olan sonuçların hastaların varfarin tedavisinin etkin bir şekilde idamesinin sağlanmasına katkısı olup olmayacağı da değerlendirilecektir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Antikoagülan Tedavi

Antikoagülan tedavi, tromboz gelişimini engellemek amacıyla, DVT, akut PTE, inme ve iskemik kalp hastalığı gibi tromboembolik hastalıklarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Aguilar and Goldhaber 1999, Van Aken *et al.* 2001).

Günümüzde antikoagülan tedavi için başlıca iki grup ilaçtan yararlanılmaktadır. Bunlar kullanımları 60 yılı aşkın bir süreyle söz konusu olan heparin ve varfarindir. Heparin ve türevleri parenteral uygulamalarla hızlı etkinlik sağlarken, kronik antikoagülasyon gerektiğinde oral bir antikoagülan olan varfarin tercih edilmektedir. Varfarin, etkinliğini vitamin-K bağımlı proteinlerin sentezini engelleyerek antikoagülan etki gösterirken, heparin pıhtılaşma faktörlerini inaktive ederek etki göstermektedir. Varfarinin, heparine göre en büyük üstünlüğü ağız yoluyla alınmasıdır (Kayaalp 2002).

### 2.2. Oral Antikoagülan Endikasyonları

AF insidansı yaşla artan, en sık rastlanılan kalp ritim bozukluğudur. AF, kardiyak, pulmoner, metabolik, toksik, endokrin hastalıklarda veya genetik anormalliklerle birlikte görülebilir. Prevalansı 60 yaşın üzerinde %6 düzeylerine ulaşmaktadır. AF'de kalma süresinin artışı tromboemboli riskinde artışı da beraberinde getirmektedir. Önceden geçici iskemik atak, sistemik emboli, inme, hipertansiyon hikayesi, kalp kapak hastalığı, kalp yetmezliği, tiroid hastalıkları, 75 yaşın üzerinde olanlar AF açısından yüksek risk altındadır. AF'li hastalarda tromboembolizm kaynaklı inme ve ölümleri önlemede oral antikoagülan tedavinin etkili olduğu gösterilmiştir (Fuster *et al.* 2006). Kardiyovasküler risk faktörlerini ilk kez tanımlayan ve ileriye dönük 10 yıllık kalp ve damar hastalığı riskini belirlemek amacıyla yapılan Framingham çalışmasına göre, kronik AF'li hastalarda klinik olarak tanımlanmış embolizasyon olay riski her yıl için %5 civarındadır (Wang *et al.* 2003). Serebrovasküler embolizasyon riski AF'li hastalarda %28 iken, sinüs ritimli hastalarda %7 civarındadır. Varfarin belirgin bir şekilde AF'li hastalarda iskemik inme riskini azalttığı için, bu hastalara hedef INR aralığı 2.0-3.0 (van *et al.* 2002, Hurlen *et al.* 2002) olacak şekilde varfarin tedavisi önerilmektedir.

Kronik AF'de, inme ve tromboembolik komplikasyonların önlenmesi için ilk basamak tedavide önerilen etkinliği kanıtlanmış ilaçlar varfarin ve asetil salisilik asit (ASA). Varfarin

ve plasebonun karşılaştırıldığı çalışmalarda, varfarinin plaseboya göre inme riskini anlamlı oranda azalttığı gösterilmiştir. Kronik AF'ye bağlı gelişen inme ve tromboembolinin önlenmesinde varfarin kullanımı bugün için tartışılmaz üstünlüğe sahiptir (Fuster *et al.* 2006).

Varfarin ile oral antikoagülan tedavisi %68 oranında iskemik inme riskini azaltmaktadır ancak eş zamanlı olarak majör hemorajik komplikasyonların riskini de artırmaktadır (Atrial Fibrillation Investigators 1994). Varfarin almayan AF'li hastalarda iskemik inme oranları her yıl için %12 düzeyindedir (Atrial Fibrillation Investigators 1994, The European Atrial Fibrillation Trial Study Group 1995). Diğer yandan AF'la ilişkili iskemik inme sonrası önemli fonksiyonel sakatlığı olan hastaların oranı %59 oranlarında seyretmektedir (Hylek *et al.* 2003). Varfarin tedavisinde olmayan hastalarda tromboembolizm oranı genel ATRIA kohortunda her 100 kişide yıllık 2.5 oranındadır (Go *et al.* 2003) ve diğer kohortlarda bu oran daha da yüksektir (Wang *et al.* 2003, Atrial Fibrillation Investigators 1994, Gage *et al.* 2001, Hart *et al.* 1999). Yüksek tromboembolizm riski varfarin tedavisiyle %50 düzeylerinde azaltılmıştır (Go *et al.* 2003, Singer *et al.* 2004). Bu fayda, varfarin ilişkili intrakraniyal hemorajinin (varfarin tedavisindeki her 100 kişide yıllık 0.47 oranı, varfarin tedavisiz her 100 kişide yıllık 0.29 oranıyla karşılaştırıldığında) ek riskini aşmaktadır (Go *et al.* 2003, Fang *et al.* 2006). Kalıcı AF'deki bir hasta için risk dengesi varfarin kullanımı lehinedir (Atrial Fibrillation Investigators 1994). Buna rağmen varfarin kullanımında birey ve popülasyon seviyelerinde optimizasyon yapılması gerekmektedir.

Mekanik kalp kapak replasmanı sonrası gelişen tüm komplikasyonların yaklaşık %75'ini antikoagülan ilişkili kanama veya tromboembolizm oluşturmaktadır (Kortke *et al.* 2001). Kanama veya tromboembolizm komplikasyonlarının önemli bir bölümü kalp kapak replasmanı sonrasındaki ilk 6 ayda gözlenmektedir. Uzun dönem takiplerde hastalarda gözlenen INR düzeylerindeki değişkenlikler antikoagülan-ilişkili komplikasyon riskini de artırmaktadır. Örneğin kanama veya tromboembolizm gözlenen hastaların %60'ında INR değerlerinin hedef terapötik aralığın dışında olduğu tespit edilmiştir (Butchart 1992). Mekanik prostetik kalp kapağı olan hastalarda, tromboemboli riski çok yüksektir ve uygun antikoagülasyon kullanımına rağmen yıllık inme riski %2- 4 arasında seyretmektedir (Kuntze *et al.* 1989, Saour *et al.* 1990). Biyoprostetik kalp kapağı olan hastalarda, özellikle ilk 3 ay içerisinde yüksek tromboemboli riski bulunmaktadır. Bu risk daha sonraki dönemlerde, mekanik kalp kapağı olan hastalara göre daha düşüktür ve ilk 3 ay yüksek tromboemboli riski nedeniyle antikoagülasyon tedavisi önerilmektedir. Tromboembolik olaylara yönelik

profilaksi amacıyla antikoagülan tedavinin mitral pozisyonunda biyoprotetik kalp kapağı bulunan, atriyal fibrilasyonlu, sol atriyumunu genişlemiş (>5.5 cm), atriyal trombüs veya geçirilmiş tromboemboli hikayesi olan hastalarda da ömür boyu sürdürülmesi önerilmektedir. Bu hastalarda varfarin kullanımında takip edilen INR değeri 3.0-4.5 arasında olması gerekebilmektedir.

Kalp kapak protezinin pozisyonundan bağımsız olarak tromboembolik olayların %12-14'ü ölümcül seyirlidir. Kanama olaylarının ise %13-19'u ölümcül seyirlidir. Tromboembolik komplikasyonların insidansını etkileyen en önemli faktörlerden bir tanesi de antikoagülan tedavinin yeterli olup olmadığıdır. Antikoagülasyonun geçici olarak dahi kesilmesi tromboemboli riskini altı kat artırır. Hastaların %40'ında antikoagülan tedavinin yeterli düzeyde olmadığı saptanmıştır. Özellikle atriyal fibrilasyon, atriyal pıhtı, dilate sol atriyum ve geçirilmiş emboli hikayesi olan hastalarda mutlaka antikoagülan tedavi uygulanmalıdır (Gök 2002).

Sol atriyum ve özellikle sol atriyal apendiks, mitral kapak yetmezliği veya darlığı olan hastalarda trombüs gelişiminin en sık olduğu anatomik yerleşimlerdir. Trombüs varlığı ise, embolik olay riskini artırmaktadır. Mitral darlığı (MD) ve AF, trombüs gelişme riskini artıran patolojiler arasında yer alır. AF ve MD, sol atriyum içinde trombüs oluşumu ve klinik olarak sistemik embolizasyon riskinin yüksek olduğu iki önemli patoloji olup, bunların birlikte bulunması söz konusu riski daha da artırmaktadır. MD ve AF'da sol atriyum içinde kan akımının belirgin derecede yavaşlaması ve pıhtılaşma eğiliminin artması ekokardiyografik olarak spontan eko kontrastı (SEK) olarak tanımlanan eritrositlerde rulo formasyonu ve trombüs oluşumu ile sonuçlanır. AF olgularında sol atriyal trombüslerin %50 ile %75 arasında değişen bir bölümü sol atriyal apendiks içinde ortaya çıkmakta olup, nonvalvüler AF olgularında görülen trombüslerin tamamına yakın bir bölümü sol atriyal apendiks yerleşimlidir. Kalp ve damar boşluklarında SEK ve trombüs oluşumu için lümen içindeki kan akım hızının ve "shear stresinin" kritik bir düzeyin altına düşmesi gerektiği gösterilmiştir. Sol atriyal mekanik fonksiyonunun bir göstergesi olan akım hızlarının azalışı, trombüs oluşumunu ve sistemik embolizasyon riskini artırmaktadır (Fuster *et al.* 2006).

Solunum sistemi patolojisi olan PTE, trombüs ya da multiple trombüslerin sistemik venöz sirkülasyondan pulmoner vasküler yatağa göçünü ifade etmektedir ve bu durum sıklıkla alt ekstremitelerde derin venlerden kaynaklanmaktadır. Pulmoner embolizm ve derin ven trombozu (DVT) aynı patogenezin ayrılmaz bir parçası olarak görülmekte ve venöz tromboemboli

(VTE) olarak da ifade edilmektedir. Trombüs oluştuktan sonra, kopan trombüs parçaları venöz sirkülasyon yolu ile %25'i sağ akciğer, %10'u sol akciğer ve %65'i her iki akciğer pulmoner dolaşımına iletilmektedir. VTE'li olguların %30' unda klinik olarak aşikar PTE gelişmekte ve %40'ında emboli radyolojik olarak görüntülenebilmektedir (Savaş 2009). VTE olgularında uygulanan varfarin tedavisinde hedef INR aralığı 2.0-3.0 arasında olması önerilmektedir.

PTE'nin heparin veya düşük molekül ağırlıklı heparin tedavisi sonrasında idamesinde oral antikoagülanlar ve en sık olarak da varfarin kullanılmaktadır. İlk PTE atağı geçiren hastalarda antikoagülan tedavi süresinin en az 6 ay olması önerilmektedir. Antifosfolipit antikor sendromu veya FVL mutasyonu olan hastalarda ise en az 12 ay antikoagülan tedavi gerekebilmektedir. Tekrarlayan VTE atağı geçiren hastalarda risk-yarar oranını değerlendirilmesi sonucunda ömür boyu tedavi önerilmektedir (van ES 2002).

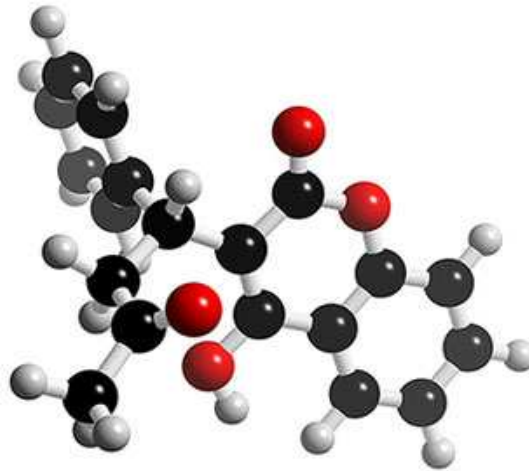
### 2.3. Varfarin

1920'li yılların başlarında Kuzey Amerika'da (North Dakota ve Alberto) ve Kanada'da bir tür yonca ("*sweet clover*"; taş yoncası) çeşidini yiyen sığırlarda kanama ve hematomlar oluşması üzerine yapılan incelemeler sonucunda, bu sığırlarda kanamaya yol açan maddenin dikumarol ("*dicoumarol*") olduğu 1940 yılında Dr. Karl Paul Link tarafından tespit edilmiştir. Link tarafından izole edilen bishidroksikumarin maddesinin sentetik bir türevi olan varfarin bu şekilde bilim dünyasının kullanımına girmiştir (Link 1959, Hunter 1961). Sentezlenen hidroksikumarinlerden biri olan varfarin ismi akronim olup, "**warf**" çalışmaları destekleyen (patent sahibi) "**Wisconsin Alumanuae Resarch Foundation**" isimli vakfın ilk harflerinden oluşmakta "**arin**" ise *sulfix-arin* ("**coumarin**")'den gelmektedir (Link 1959, Hunter 1961). Önceleri fare zehiri olarak kullanılan bu madde daha sonra kan sulandırıcı özelliğinden faydalanılarak oral antikoagülan olarak tedavide yer almaya başlamıştır. Oral antikoagülasyon olarak varfarin kullanımı, insanda ilk defa Wisconsin Üniversitesi'nde Meyer tarafından uygulanmış ve Şubat 1941'de tebliğ edilmesine rağmen Ekim ayında yayınlanmıştır (Bingham *et al.* 1941). Haziran 1941'de bu konudaki ilk yayın yapılmıştır (Butt *et al.* 1941). *Varfarin*'in klinik kullanım için uygun hale getirilmesinde Dr. Link'in "Endo Laboratuvarları"nda görevli olan arkadaşı, Gordon'un çalışmaları önemli rol oynamıştır. Endo Laboratuvarları ilacı, "*Coumadin*" adı ile piyasaya sürmüştür (Wright *et al.* 1948, Report of the Working Party on Anticoagulant Therapy in Coronary Thrombosis to the Medical Research Council 1969). 1970'lerde varfarin kullanımı, eşlik eden aşırı kanama



komplasyonları yüzünden tedirginlik yaratsa da, PTZ testlerinin INR ile standardizasyonu sonrasında tekrar kullanılmaya başlanmıştır. Halen varfarin tedavisinin güvenliğini artırmaya yönelik çabalar yoğun bir şekilde sürmektedir.

Ticari olarak varfarin levo ve dekstro rasemik şekillerde bulunur ve yarılanma ömrü 36 saattir. Tedavi edici konsantrasyonu uygulanan hasta grubunun belirlenen hedef INR değerlerine göre belirlenmektedir. Varfarinin fonksiyonel etkinliği koagülasyon testi olan PTZ ile kontrol edilir. PTZ, doku tromboplastini ve kalsiyum varlığında plazmanın pıhtılaşma süresini ölçmekte kullanılır. Bu değer aynı zamanda ekstrensik ve ortak koagülasyon yolunu değerlendirmede kullanılmaktadır. PTZ, ekstrensik ve ortak koagülasyon yollarında (Şekil 2.6.) bulunan pıhtılaşma faktörlerinin (Faktör I, II, V, VII, X) düzeylerinden etkilenen bir parametredir. Test sırasında kullanılan tromboplastinin pıhtılaşmayı aktive etme özelliğine göre test sonuçları laboratuvarlar arası değişkenlik gösterebilir. Bu konuda standardizasyon sağlanması amacıyla INR hesaplaması yapılmaktadır. Malabsorpsiyon görülen, tedaviye uyumsuzluk gösteren veya ilaca konjenital olarak dirençli olan bireylerde protrombin zamanının daha sıklıkla ölçülmesi gerekmektedir.



**Şekil 2.1.** Varfarin Molekülünün 3 Boyutlu Modeli

([www.3dchem.com/molecules.asp?ID=207](http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=207))

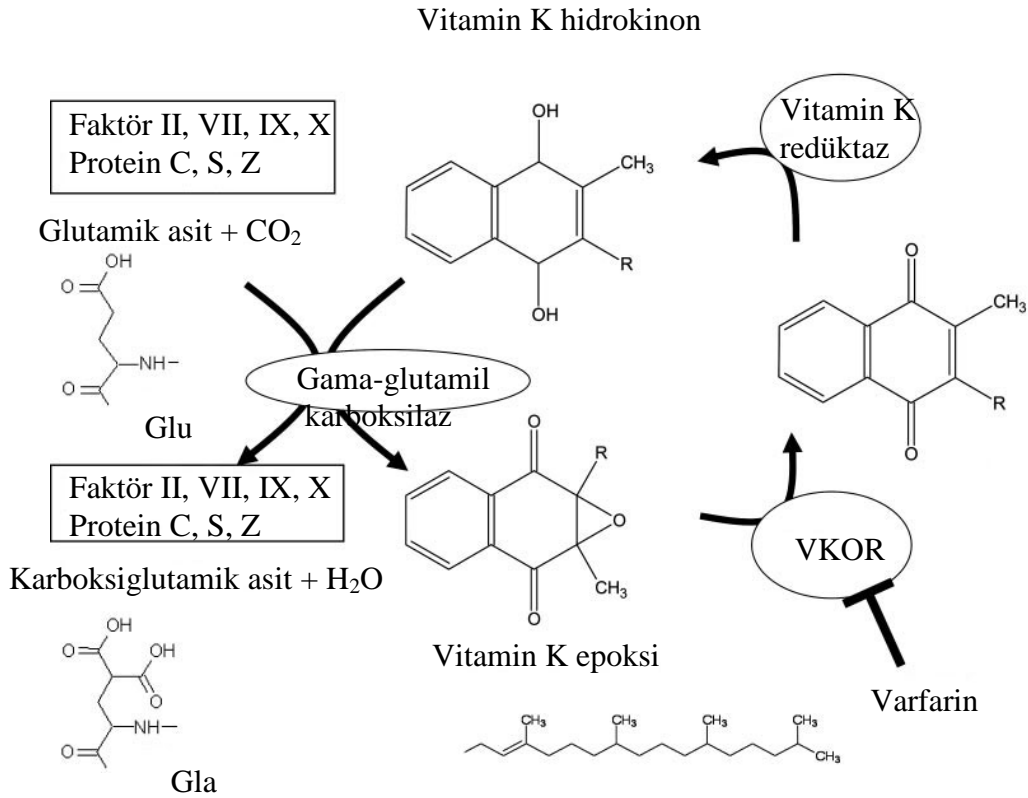
#### **2.4. Varfarin Farmakodinamiği**

Varfarin, K vitamininin antagonisti olarak işlev görür. K vitamini, pıhtılaşma etmenlerinin amino ucunda yer alan özgül glutamik asit rezidülerine bir karboksil grubu ekleyen

karaciğerin bir enzimi olan *gama-karboksilaz*'ın ko-faktörüdür. Pıhtılaşma faktörleri II, VII, IX ve X ile doğal endojen antikoagulanlar olan protein C, S, ve Z karboksil grubu eklenmiş glutamik asit rezidüeleri içerirler (Berkner 2005, Suttie 1985).

Vitamin K-bağımlı *gama-karboksilaz* endoplazmik retikulumda yer alır ve vitamin K-bağımlı proteinlerin sekresyonu sırasında karboksillenmelerini sağlar. Vitamin K-bağımlı proteinlerin optimum fonksiyonu için tüm glutamik asit rezidülerinin *gama-karboksilasyonu* gereklidir. Sonuçta, hücre yüzeyinde yer alan fosfolipitlere kalsiyum bağlanması ile kan koagülasyonu veya ekstraselüler matrikste hidroksiapatit molekülleri oluşur. *Gama-glutamil karboksilaz* hemen tüm insan dokularında bulunur ve otozomal genin ürünü olan tek karboksilaz da vitamin K-bağımlı proteinlerin (koagülasyon faktörlerinden II, VII, IX ve X ile antikoagulan faktörlerden protein C ve protein S) modifikasyonundan sorumludur (Wallin *et al.* 2002, Wallin and Hutson 2004).

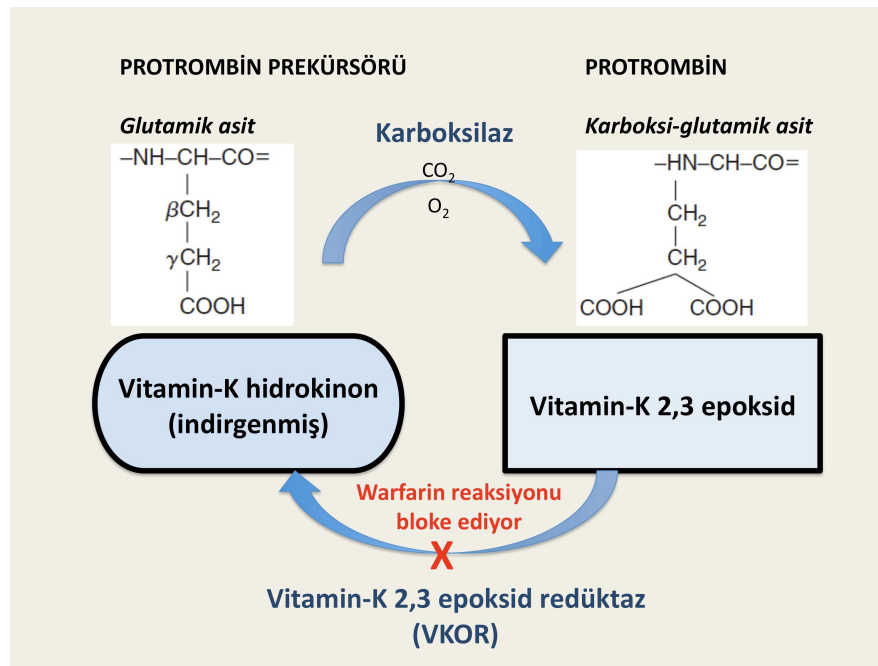
*Gama-glutamil karboksilaz* aktivitesi için K-vitamini kinonun (naftokinon) indirgenmiş biçimi ko-faktör olarak gereklidir. Vitamin K ile varfarin'in yapısal benzerliklerine bakılacak olursa antikoagulan etkisinin vitamin K ile nasıl antagonist etki oluşturduğu anlaşılabilir.



**Şekil 2.2.** Vitamin K bağımlı *gama* karboksilasyon sistemi (Krynetskiy and

McDonnell 2007)

Karboksilaz, K-vitamini hidrokinonu, Vitamin K 2,3-epoksite (Vitamin-K epoksit) oksidize eder. Vitamin K'nın indirgenmiş haline dönüşümü varfarin tarafından VKOR enzimi bloke edilerek inhibe edilir (Şekil 2.3.). VKOR'un inhibisyonu geridönüşümlüdür. İlacın kesilmesi veya K vitamini verilmesi ile kumarin ürünlerinin etkileri nötralize edilebilir. Diğer yandan yüksek dozlarda K vitamini verilmesi (>5 mg) ile karaciğerde biriken K vitamininin VKOR enzimini baypas etmesi nedeniyle bir haftayı geçkin süreyle varfarin rezistansına neden olabilir.



**Şekil 2.3.** Varfarin'in Etki Mekanizmasının Özetlenmesi. Vitamin-K hidrokinon protrombin jenerasyonunda ko-faktör olarak görev yapar (Vitamin-K 2,3 epoksid'e oksidize olarak). Vitamin K'nın indirgenmiş haline dönüşümü Varfarin tarafından VKOR enzimi bloke edilerek inhibe edilir. (futuremedicine.com/doi/pdf/10.2217)

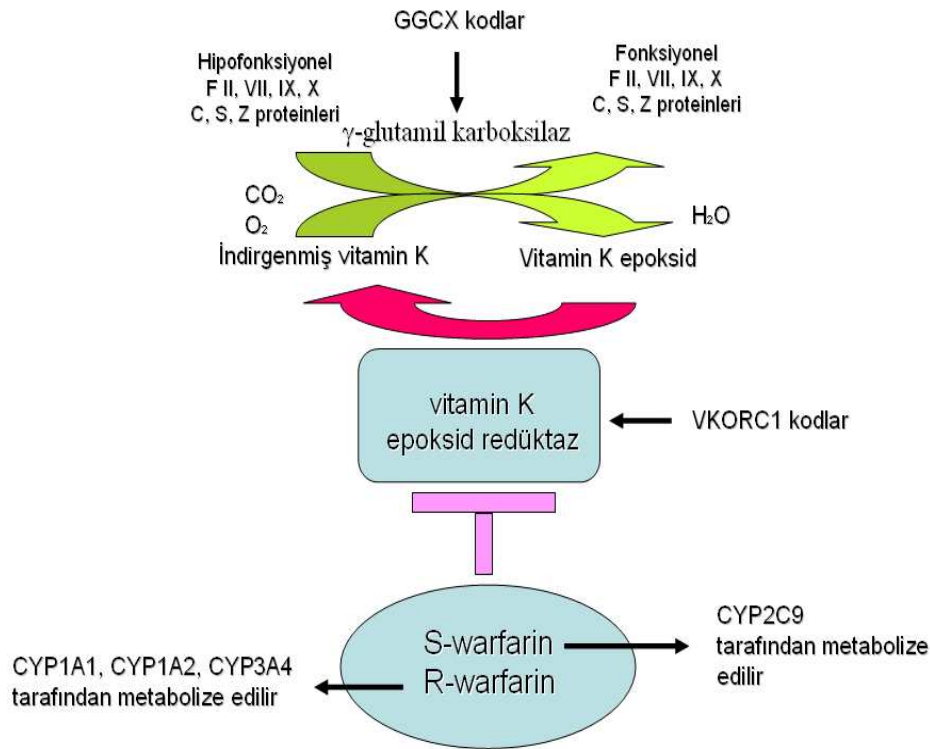
## 2.5. Varfarin Farmakokinetiği ve Farmakodinamikleri

Varfarin'in tedavi amaçlı kullanımında iki enantiyomerdan (R-varfarin ve S-varfarin) oluşan rasemik bir karışımdır. Varfarinin S-izomeri, R-izomerine göre 3-5 kat daha etkin bir şekilde VKOR enzimini inhibe eder (Choonara *et al.* 1986). Varfarin üst gastrointestinal sistemden hızla absorbe olur; biyoyararlanımı yüksektir. Sağlıklı bireylerde oral yolla varfarin verilmesinden yaklaşık 90 dakika sonra maksimal kan düzeylerine erişilir (Breckenridge 1978, Kelly *et al.* 1979). Rasemik varfarin'in yarı ömrü 36-42 saattir (O'Reilly 1987).

Albümin ve asit glukoproteinlerden orosomukoid-1 ve orosomukoid-2'ye bağlanarak dolaşıma katılır (Otagiri *et al.* 1987, Palareti *et al.* 1996).

R-varfarin ve S-varfarin enantiomerleri farklı şekillerde metabolize olur. S-varfarinin, inaktif 6-hidroksi ve 7-hidroksi metabolitlerine dönüşüm reaksiyonunu katalizleyen esas enzim "sitokrom P450 (CYP) 2C9"dur. Bunun yanında R-varfarin'in oksidatif metabolizması başlıca *CYP3A4* ile olur ancak *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C18*, *CYP2C19* enzimleri de eşlik eder (Tham *et al.* 2006). Varfarin metabolizması Şekil 2.4.'de özetlenmiştir. Varfarinin metabolik ürünlerinin eliminasyonu ise esas olarak böbrekler yolu ile olur (Horton and Bushwick 1999).

S-varfarin, R izomerine göre yaklaşık 5 kat daha potent olması nedeniyle S-izomerinin metabolizmasının inhibisyonu daha önemli klinik sonuçlar doğurur. Fenilbutazon, sülfonpirazon, metronidazol, ve trimetoprim-sulfamethoksazol S-varfarin metabolizmasını inhibe ederler ve varfarin etkisini ciddi olarak artırır. Amiodaron ise hem S- hem de R-izomerin de metabolizmasını inhibe ederek varfarin etkisini önemli düzeylerde artırır (O'Reilly *et al.* 1987).



Şekil 2.4. Varfarin Metabolizmasının Özetlenmesi (Yin and Miyata 2007)

## 2.6. Varfarin ve Diğer İlaç Etkileşimleri

Varfarin kullanılan pek çok ilaçla etkileşmektedir (Desta *et al.* 2001, Holbrook *et al.* 2005). Ayrıca vitamin K'nın diyetle alımı ve depolaması, karaciğer fonksiyonu, hastalığa eşlik eden başka tıbbi hastalık ve ilaç alımı uygulamalarından etkilenmektedir (Çizelge 2.1. ve 2.2.). Varfarin dozu hastanın klinik tablosuna göre belirlenecek olan hedef INR değerine ulaşmak üzere ayarlanır. Karaciğer hastalarında doz azaltılır. *VKORC1* genine bağlı olarak varfarine duyarlılık yarattığı belirlenmiş tekli nükleotid polimorfizmlerinin varlığına bağlı olarak yine varfarin doz ayarlanmasının yapılması artık standart prosedüre girmiş durumdadır. Bağırsakta vitamin K sentezleyen florayı ortadan kaldıran geniş spektrumlu antibiyotik verilenlerde duyarlılık artmaktadır.

**Çizelge 2.1.** Varfarinin Etkinliğini Artıran İlaçlar.

<b>Varfarin Etkinliğini Artıran İlaçlar</b>	<b>Varfarin Üzerine Varsayılan Etki</b>	<b>İlaç Metabolize Eden Primer Enzim</b>
<b>ANTİBİYOTİK / ANTİFUNGAL AJANLAR</b>		
Siprofloksasin	1A2, 3A4 inhibisyonu	3A4
Kotrimaksazol		
Eritromisin	1A2, 3A4 inhibisyonu	3A4
Flukanazol	2C9, 2C19, 3A4 inhibisyonu	
İzoniiazid	2C9, 1A2 inhibisyonu	
Metranidazol	2C9, 3A4 inhibisyonu	
Mikonazol	3A4 inhibisyonu	
Vorikanazol	3A4, 2C9 inhibisyonu	
<b>KARDİYOVASKÜLER İLAÇLAR</b>		
Amiodaron	2C9, 1A2, 3A4 inhibisyonu	3A4, 2D6
Klofibrat		
Diltiazem	1A2, 3A4 inhibisyonu	3A4
Fenofibrat		
Prapofenon		2D6
Propranolol		1A2, 2D6, 3A4
Sülfinpirazon	2C9 inhibisyonu, 3A4 indüksiyonu	
<b>ANTİ-İNFLAMATUAR İLAÇLAR</b>		

Fenilbutazon	2C9 inhibisyonu, 3A4 indüksiyonu	2C9
Piroksikam		2C9
<b>SANTRAL SİNİR SİSTEMİ</b>		
Sitalopram		2C19
Entakapon		
Sertralin	2C9, 3A4 inhibisyonu	3A4
<b>GASTROİNTESTİNAL SİSTEM İLAÇLARI</b>		
Simetidin	2C9, 2C19, 3A4, 1A2 inhibisyonu	
Omeprazol	1A2 indüksiyonu, 2C19 inhibisyonu	2C19
<b>BİTKİSEL DESTEKLİYİCİLER</b>		
Boldo-fenugreek		
Qulinggao		
Anabolik steroidler		3A4 (testesteron)
Zileuton		1A2

**Çizelge 2.2.** Varfarin Metabolizmasını İndükleyen İlaçlar.

<b>İlaç İnhibitörleri</b>	<b>İlaç Sınıfı</b>	<b>Varfarin Üzerine Varsayılan Etki</b>	<b>İlaç Metabolize Eden Primer Enzim</b>
Griseofulvin	Anti-infektif	3A4 indüksiyonu	
Nafsilin		1A2 indüksiyonu	
Ribavirin			
Rifampin		2C9, 1A2, 3A4, 2C19 indüksiyonu	
Kolestiramin	Kardiyovasküler		
Mesalamin	Antiinflamatuvar		
Barbitüratlar	Santral sinir sistemi ilaçları	3A4, 2C19 indüksiyonu	
Karbamazapin		2C9, 2C19, 3A4 indüksiyonu	3A4
Merkaptopürin	Diğer ilaçlar		
Yüksek içerikli besinler	Vitamin K	VKOR baypası	

## 2.7. Varfarin ve Diyet ile K-Vitamini Alımı

Günlük K vitamini ihtiyacı erişkin için 80-120 (ortalama 100) mcg arasındadır. Diyetle alınan K vitamininin önemli bir kısmı bitkilerde bulunan filokinonlardan sağlanır (O'Reilly 1980, Suttie *et al.* 1988). Varfarin kullanan hastaların normal sınırlarda K vitamini almasında sakınca görülmemektedir. Ancak yüksek dozlarda K vitamini içeren gıdaların alınması varfarin etkisinde inhibisyona neden olmaktadır. K vitamini içeren gıdaların diyetten tamamen çıkarılması ise mümkün değildir. Genel uygulamalarda hastaların beslenme planlarında günlük K vitamini alım oranlarını sabit tutmaya çalışmaları öngörülmektedir. K vitamini içeren gıdalar Çizelge 2.3.'de özetlenmiştir.

GIDA KATEGORİ	Vit. K (mcg/verilen ölçüm)	Ağırlık gram	Yaygın ölçüm
<b>SEBZELER</b>			
Lahana (donmuş, pişmiş, kaynamış, kurutulmuş, tuzsuz)	1,147	130	1 kupa
Lahana (pişmiş, kaynamış, kurutulmuş, tuzsuz)	1,062	130	1 kupa
Ispanak (donmuş, pişmiş, kaynamış, kurutulmuş, tuzsuz)	1,027	190	1 kupa
Ispanak (konserve, kurutulmuş)	988	214	1 kupa
Ispanak (pişmiş, kaynamış, kurutulmuş, tuzsuz)	889	180	1 kupa
Yeşil şalgam (donmuş, pişmiş, kaynamış, kurutulmuş, tuzsuz)	851	164	1 kupa
Şeker pancarı (pişmiş, kaynamış, kurutulmuş, tuzsuz)	697	144	1 kupa
Yeşil şalgam (pişmiş, kaynamış, kurutulmuş, tuzsuz)	529	144	1 kupa
Yeşil hardal (pişmiş, kaynamış, kurutulmuş, tuzsuz)	419	140	1 kupa
Brüksel lahanası (donmuş, pişmiş, kaynamış, kurutulmuş, tuzsuz)	300	155	1 kupa
Brokoli (pişmiş, kaynamış, kurutulmuş, tuzsuz)	220	156	1 kupa
Brüksel lahanası (donmuş, pişmiş, kaynamış, kurutulmuş, tuzsuz)	219	156	1 kupa
Soğan, taze yeşil soğan (çiğ)	207	100	1 kupa
Brokoli (donmuş, doğranmış, kaynamış, kurutulmuş, tuzsuz)	183	184	1 kupa
Ispanak sufle	172	136	1 kupa
Maydonoz (çiğ)	164	10	10 dal
Ispanak (çiğ)	145	30	1 kupa
Kuşkonmaz (donmuş, pişmiş, kaynamış, kurutulmuş, tuzsuz)	144	180	1 kupa
Lahana turşusu (konserve, katı ve sıvı)	135	236	1 kupa
Marul, kıvırcık, iceberg (çiğ)	130	539	1 baş
Brokoli (çiğ)	89	88	1 kupa
Bamya (donmuş, pişmiş, kaynamış, kurutulmuş, tuzsuz)	88	184	1 kupa
Lahana (pişmiş, kaynamış, kurutulmuş, tuzsuz)	73	150	1 kupa
Bamya (pişmiş, kaynamış, kurutulmuş, tuzsuz)	64	160	1 kupa
Börülce (donmuş, kaynamış, kurumuş, tuzsuz)	63	170	1 kupa
Lahana (kaynamış, kurumuş, tuzsuz)	58	170	1 kupa
Marul (çiğ)	57	56	1 kupa
Kereviz (pişmiş, kaynamış, kurutulmuş, tuzsuz)	57	150	1 kupa
Salatalık (kabuklu, çiğ)	49	301	1 büyük
Bezelye (soyulmuş yiyecekler, donmuş, kaynamış, kurutulmuş, tuzsuz)	48	160	1 kupa
Ispanak (çiğ)	48	10	1 yaprak
Lahana, kıvırcık, kış lahanası (çiğ)	48	70	1 kupa
Börülce (kaynamış, kurumuş, tuzsuz)	44	165	1 kupa
Lahana (çiğ)	42	70	1 kupa
<b>DİĞER</b>			
Galet unu (kuru, rendelenmiş, baharatlı)	55	120	1 kupa
Lahana salatası	56	99	3/4 kupa
Erişte, şehriye, yumurta, ıspanak pişmiş	162	160	1 kupa
Erik, kuru erik, hoşaf (şeker eklenmeden)	65	248	1 kupa
Kızarmış börek, pasta çeşitleri, tarife göre hazırlanmış, kraker fırında pişmiş	59	239	1 tane

**Çizelge 2.3.** Vitamin K İçeren Gıdaların Özetlenmesi. Yüksek K vitamini içeren gıdalar (>300 mcg) sarı ile belirgin hale getirilmiştir. (Booth and Suttie 1998, Booth and Centurelli 1999)

## 2.8. Varfarin Farmakogenetiği

Tromboembolinin ve gelişebilecek inme riskinin önlenmesinde bugün için varfarinin tartışılmaz üstünlüğüne karşın, klinik uygulamalarda antikoagülan etkinliğinin düzenli laboratuvar takibi ile kontrol gereksinimi, dar terapötik penceresi, öngörülemez ve değişken olabilen farmakolojik yanıtı, anti-trombotik etkisinin geç başlaması, pek çok ilaç ve yiyeceklerle etkileşimi, genetik geçişli varfarin direnci gibi sınırlılıkları söz konusudur. Varfarinin terapötik cevabı, protrombin zamanının “International Normalised Ratio” (INR) parametresiyle ölçülmektedir (van den Besselaar 1985). Doz ihtiyacı, kişiler arasında 20 kat varyasyon gösterebildiği için varfarin dozunu ayarlamak zordur (Takahashi and Echizen 2003). Yanlış dozaj, özellikle tedavinin başlangıcında ortaya çıkan, yüksek kanama veya tromboemboli riski taşımaktadır. Varfarin tedavisi sırasında oluşan hemorajik komplikasyonlar, ilaç ilişkili ölümlerde ilk sırayı almaktadır (Landefeld and Beyth 1993, Runciman *et al.* 2003). Her birey, genleri ile çevresinin etkileşiminin bir ürünüdür. Böylece varfarin dozunun gerekli terapötik cevabı verebilecek şekilde ayarlanmasında çevresel ve genetik faktörler etkilidir. Doz ayarlanmasında kişinin farmakolojik ajanlara verdiği cevabı, taşıdığı genetik polimorfizmler etkileyebilmektedir.

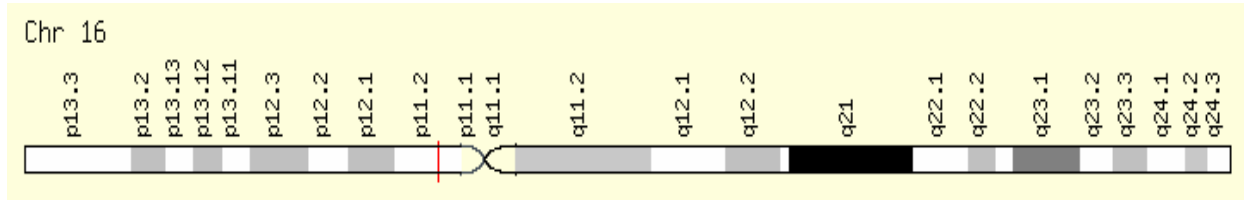
Farmakogenetik; hastaların ilaçlara verdiği cevapların oluşmasında temel bir rol oynayan genetik faktörlerin incelenmesidir. İlaça verilen yanıtın genetik temeli, moleküler düzeyde incelenmektedir. İlaç cevabında genetik çeşitlilik; ilaç metabolize edici enzimlerde, ilaç hedef/reseptörlerinde ve ilaç transport proteinlerinde moleküler alterasyonlar şeklinde karşımıza çıkmaktadır (Ensom *et al.* 2001). Bugünkü farmakogenomik bilginin büyük kısmı; ilaç-metabolize edici enzimleri, ilaç transport proteinleri, reseptörleri ve ilaç-sinyal yollarındaki proteinleri kodlayan genlerdeki polimorfizmleri tarayan assosiyasyon çalışmalarına dayanmaktadır. Her bireyin ayrı bir genetik yapısının olması nedeniyle kişiye özel ilaç tedavisini öngören bir bilim dalı olan farmakogenetik, bireye doğru ilacın, doğru hastaya, doğru zamanda ve doğru dozda verilmesini amaçlamaktadır.

Bir kumarin türevi olan oral antikoagülan olarak sıklıkla kullanılan “varfarin”in etkili ve güvenli dozunun belirlenebilmesi için de farmakogenetik-temelli tedavilerin kullanılması gerekmektedir. Klinisyenlerin hasta için en uygun varfarin dozunu belirleyebilmesi için *VKORC1* genindeki varfarin duyarlılığını etkileyebilecek tekli nükleotit polimorfizmler (TNP) belirlenmiştir.



### 2.8.1. Vitamin K epoksi redüktaz alt birim 1 (*VKORC1*)

Varfarin, karaciğerdeki vitamin K siklusuna etki ederek, indirgenmiş vitamin K'nın rejenerasyonunu kısıtlamaktadır ve böylece inaktif pıhtılaşma faktörlerinin aktifleşmesini engellemektedir. Varfarinin hedefinin “Vitamin K epoksit redüktaz (VKOR)” enzimi olduğu 30 yıl önce tanımlanmıştır (Bell *et al.* 1972, Bell 1978). Varfarin farmakodinamiğine etki eden *VKORC1* geni vitamin K epoksi redüktaz (VKOR) enzimini kodlamaktadır. İnsanda 16. kromozomda 16p11.2 bölgesinde lokalize olmuş, yaklaşık 5 kb DNA büyüklüğündedir (Li *et al.* 2004, Stafford 2005) (Şekil 2.2.). VKOR enzimi de 163 amino asitten oluşan, 3 transmembran domaini olan bir integral membran proteindir. VKOR'ın amino ucu endoplazmik retikulum lümenine, karboksil ucu ise sitoplazmaya uzanmaktadır (Stafford 2005).



Şekil 2.5 *VKORC1* geninin gösterimi ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

VKOR enzimi, Vitamin K 2,3-epoksit'in Vitamin K hidrokinon'a indirgenme reaksiyonunu katalizlemektedir. İndirgenmiş Vitamin K ( Vitamin K hidrokinon); koagülasyon faktörlerinin (II, VII, IX, X), endojen antikoagülan protein C, S, Z ve diğer Vitamin K bağımlı proteinlerin glutamik asit rezidülerinin  $\gamma$ -karboksilglutamata karboksilasyonu için gerekli bir kofaktördür. Bu vitamin K bağımlı proteinler glutamat düzeyinde  $\gamma$ -karboksillenme ile fonksiyonel şekle dönüşmektedir (Rost *et al.* 2005).

## 2.9. Antikoagülasyon Yoğunluğunun Monitorizasyonu

### 2.9.1. PTZ (protrombin zamanı) ve INR (international normalized ratio)

Oral antikoagülan tedavinin monitorizasyonu için en sık kullanılan test protrombin zamanıdır (PTZ). PTZ, K vitamini bağımlı prokoagülan pıhtılaşma faktörlerinin üçünden etkilenir (Faktör II, VII ve X). Varfarin tedavisinin ilk günlerinde PTZ, yarı ömrü 6 saat kadar kısa olan faktör VII'nin azalmasından etkilenir. Daha sonraki günlerde ise faktör X ve II'nin azalmasıyla PTZ uzar. PTZ kan plazmasında ölçülür ve bu amaçla kan sitratlı kan tüpüne alınır. Santrifüjlenen kanda kan hücreleri plazmadan ayrılır. Bu testte ekstrinsik yoldan fibrin pıhtısı oluşana kadar geçen süre ölçülmektedir. PTZ ölçümü, sitratlı plazmaya kalsiyum ve tromboplastin eklenerek yapılır (Hirsh *et al.* 2003). Tromboplastin klasik anlamıyla akciğer, beyin, plasenta gibi dokulardan elde edilen fosfolipid-protein ekstraktını ifade eder. Bu ekstrakt faktör VII aracılığı ile faktör X'u aktive eden doku faktörü ve fosfolipid içerir. Farklı dokulardan elde edilen tromboplastinlerin varfarinin antikoagülan etkisine verdiği yanıtlar içerdikleri fosfolipid miktarına, elde edildikleri doku ve hazırlanış yöntemlerine göre farklı farklıdır. Tromboplastinin yanıt verme yeteneği uluslararası sensitivite indeksi (International Sensitivity Index (ISI)) ile belirlenir. Her bir üretici ürettiği her doku faktörü için ISI değeri belirler. Bu ISI değeri herhangi bir doku faktörünün uluslararası standardize edilmiş bir örnek ile nasıl karşılaştırıldığı ortaya koymaktadır. ISI değeri genellikle 1.0 ile 2.0 arasında değişir. Ölçüm hatalarını asgariye indirmek için düşük ISI değeri olan tromboplastinlerin kullanılması önerilmektedir. Son yıllarda ISI değeri 0.9-1 arasında değişen rekombinant insan doku faktörleri üretilmeye başlanmıştır (Tripodi *et al.* 1994).

PTZ ölçümünde pıhtı oluşuncaya dek geçen süre optik olarak ölçülür. Protrombin zamanı oranı (PTZO) ise bir hastanın protrombin zamanının normal kontrol plazmadan elde edilen sonuca bölünmesi ile elde edilen değerdir. Ancak varfarin tedavisindeki hastalarda yalnızca PTZ veya PTZO ölçümleri, farklı tromboplastinlerin varfarine farklı yanıt verme eğilimlerinden dolayı hatalara neden olabilmektedir. Bu yüzden oral antikoagülan tedavisindeki hastalarda monitorizasyon güvenliğini artırmak için 1982'de INR kalibrasyon modeli kullanılmaya başlanmıştır. 1983 yılında da Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün sunduğu 1983 yılında sunduğu raporda PTZ'nin standardize edilmiş halinin INR olduğu bildirilmiştir (Stern *et al.* 1997).

$$\text{INR} = (\text{PTZ}_{\text{hasta}} / \text{PTZ}_{\text{ortalama normal}})^{\text{ISI}} \text{ veya}$$

$$\log \text{INR} = \text{ISI} (\log \text{gözlenen PTZO})$$

INR ile üreticilerin kullandıkları farklı doku faktörleri nedeniyle oluşacak hataların asgariye indirilmesi ve standardizasyonu hedeflenmiştir. PTZ'nin referans aralığı genellikle 12-15 saniye iken, INR'nin normal aralığı 0.8–1.2'dir.

Düşük doz antikoagülan tedavide hedef INR 2.0-3.0 arasındadır. Prostetik kalp kapağı olanlar ve tekrarlayan tromboemboli profilaksisinde INR değerinin 2.5-3.5 arasında olması önerilir. Antifosfolipid sendromunda ise daha yüksek dozlar önerilmektedir.

Uzun süreli varfarin alan bazı hastalarda tedaviyi sürdürmek zor olabilir, çünkü bu hastalar doz-cevap ilişkisinde beklenmeyen dalgalanmalar gösterebilirler. Bu beklenilmeyen dalgalanmalar birçok nedene bağlı olarak ortaya çıkabilir ki, bunlar arasında; PTZ testinde yanlışlıklar, vitamin K1 alımında değişiklikler, varfarin metabolizmasında değişiklikler, K1 vitaminine bağımlı pıhtılaşma faktörlerinin sentezinin birlikte kullanılan ilaçlar tarafından etkilenmesi sayılabilir.

Otoantikörlerin hücre membranındaki fosfolipid ve proteinlerle birleşmesiyle ortaya çıkan ve pıhtılaşma faktörlerinin hücre membranı ile etkileşimini etkileyerek tromboz için bir risk faktörü olarak ortaya çıkan lupus antikoagülanlı hastalarda oral antikoagülan tedavisinin gözlenmesinde kullanılacak diğer teknikler; protrombin aktivitesinin ölçülmesi, nativ protrombin konsantrasyonu, protrombin ve prokanvertin testleridir. Bireyler bu ilacı yavaş ya da hızlı metabolize ettiklerinden doz durumu bireyselleştirilmelidir. Bu nedenle başlangıçta sık INR takibi gerekir. Venöz tromboemboli (VTE) olaylarında INR değerinin 2.0-3.0 arasında olması gerekirken, bileaflet mekanik kalp kapağı olan hastalarda bu değer 2.5-3.5 arasında olması gerekir. Antikoagülan etki ve varfarin doz gereksinimi stabil olduktan sonra INR haftada bir izlenebilir. Varfarine karşı bir yanıtı neden olabilecek faktörlerin, örneğin birlikte verilen ilaç tedavilerinin varlığında, INR daha sık izlenmelidir.

**Çizelge 2.4.** Varfarin Kullanım Endikasyonlarında Hedef INR Aralıkları  
(<http://www.gpnotebook.co.uk/simplepage.cfm?ID=1617625155>)

ASA: Asetil salisilik asit, NSR: normal sinüs ritmi

---

**Hedef INR ARALIĞI    ENDİKASYON**  
**/ ASA 75-100mg**

---

1.8-2.5	DVT'nin profilaktik tedavisi Aortik pozisyonda biyolojik kapak replasmanı (normal ejeksiyon fraksiyonu ve kalp boyutları, NSR), ASA (3 ay süreyle)
2.0-3.0	VTE Kardiyoversiyon Periferel arteryel tromboz Koroner arteryel tromboz Miyokard enfarktüsü sonrası sistemik emboli Emboli ile seyreden mitral darlığı Aortik pozisyonda biliflet mekanik kapak replasmanı ve herhangi trombotik risk faktörü (süresiz) Aortik pozisyonda biyoprotez, herhangi trombotik risk faktörü (3 ay süreyle) Mitral kapak onarımı (3 ay süreyle) Mitral kapak onarımı (1 yıl süreyle) (eğer cerrahi sırasında AF veya sol atriyal trombüs saptanmışsa) AF
2.5-3.5	Tekrar eden DVT, PTE Mitral pozisyonda biliflet mekanik kapak replasmanı, yüksek risk (süresiz) Aort ve Mitral pozisyonlarda çift mekanik kapak replasmanı (süresiz)

---

## **2.10. Varfarin İlişkili Komplikasyonların Tanımlanması**

### **2.10.1. Tromboembolizm**

Enfeksiyonun olmaması koşulu ile peri-operatif dönem dahil herhangi bir tromboembolik olayın gelişmesi olarak tanımlanmıştır (Edmunds *et al.* 1996). Damar veya kalp içerisinde kan elementlerinin anormal bir şekilde pıhtılaşmasıyla tromboz ve oluşan pıhtıya da trombüs denilmektedir. Meydana gelen trombüsün bağlı olduğu yerden kopmasıyla dolaşımda serbest şekilde hareket etmesi tromboemboli olarak adlandırılmaktadır (Handin 2001).

Yapılan geniş ölçekli çalışmalarda tromboembolizm gelişme riski; replase edilen kapak sayısı, implante edilen kalp kapak protez tipi, aort kapak replasmanına oranla mitral kapak replasmanı, atriyal fibrilasyon, sol atriyal genişleme, düşük kalp debisi, INR düzeylerinin terapötik hedef aralığında bulunmaması ve ASA veya dipiridamol gibi antiagregan ilaçların antikoagülan tedaviye eklenmesi ile ilişki göstermektedir (Saour *et al.* 1990). Klinikte tromboembolizm derecelendirmesi ve sınıflaması Çizelge 2.5. ve 2.6.'da özetlenmiştir (Kulik *et al.* 2006).

**Çizelge 2.5. Tromboembolizm Derecelendirmesi**

1. Derece:	Medikal tedavi gerektirmeyen baş dönmesi gibi sorgulanan olayların geçirilmesi
2. Derece	Kalıcı fonksiyonel bozukluk yaratmayan, poliklinikte tedavisi mümkün olan yetersiz antikoagülasyona bağlı semptomların varlığı
3. Derece	Kalp kapak protez trombozu, hastaneye yatırılmayı gerektiren ciddi tromboembolizm (geçici-transiyel iskemik atak dahil) veya kalıcı nörolojik defisit gelişmesi

**Çizelge 2.6. Tromboembolizm Sınıflandırılması**

1.	Ekokardiyografi ile protez kapak komşuluğunda obstrüksiyona neden olmayan trombüs varlığının gösterilmesi;
2.	Dokümanite edilmiş periferik ekstremite veya solid organ embolizasyonu;
3.	Dokümanite edilmiş santral sinir sistemi embolizasyonu (transiyel iskemik atak veya serebro-vasküler olay);
4.	Protez kapak trombozu, trombolitik tedavi veya acil operasyon gerektiren durumlar;
5.	Ölümcül tromboemboli.

### **2.10.2. Kanama veya hemorajik olay:**

Hemorajik olay, cerrahi veya endoskopik girişim gereksinimi nedeniyle hastaneye yatırılma gerekliliği doğuran veya kan transfüzyonu gerektiren kalıcı hasar veya ölüm riski taşıyan herhangi bir majör internal veya eksternal kanama olayı olarak tanımlanır. Klinikte

karşılaşılan kanama komplikasyonunun derecelendirmesi Çizelge 2.7. özetlenmiştir (Kulik *et al.* 2006).

### Çizelge 2.7. Kanama Derecelendirmesi

1. Derece:	Medikal tedavi gerektirmeyen hafif kanama (diş eti kanaması gibi);
2. Derece	Poliklinikte tedavisi mümkün olan; cerrahi veya endoskopik girişim gerektirmeyen kanamalar;
3. Derece	Hastaneye yatırılmayı gerektiren (kan transfüzyonu; cerrahi veya endoskopik girişim gereksinimi) ciddi kanamalar.

Ciddi kanama sınıflaması ise Çizelge 2.8.'de özetlenmiştir (Kulik *et al.* 2006).

### Çizelge 2.8. Ciddi Kanama Sınıflandırılması

1.	Tekrarlayan epistaksis veya periodontal kanamalar (ikiden fazla) veya transfüzyon/hospitalizasyon gerektirmeyen gastrointestinal kanama;
2.	Dokümanite edilmiş geniş perikardiyal effüzyon (ekokardiyografide >1 cm.'den geniş);
3.	Hospitalizasyon, kan transfüzyonu, cerrahi veya endoskopik girişim gerektiren gastrointestinal kanama;
4.	Girişim gerektiren kardiyak tamponad; retroperitoneal kanama
5.	Dokümanite edilmiş santral sinir sistemi hemorajisi (serebro-vasküler olay);
6.	Ölümcül kanama.

Varfarin tedavisi gören ve 5 antikoagülasyon kliniğince izlenen 928 hastanın 1950 hasta/yıl takip ederek hemorajik komplikasyonların araştırıldığı çalışmada kümülatif ölümcül kanama insidansının tedavi sürecinin 3. yılında %2 seviyelerine ulaştığı gözlenmiştir (Evans *et al.* 2002). Takip süresinin 8. yılında ise hayatı tehdit eden kanama oranları hastaların %9'unda tespit edilmiş, hastaların %40'ında ise ciddi kanama komplikasyonu ile karşılaşmıştır. Hylek ve Singer'in varfarin tedavisi gören hastalarda intraserebral kanama açısından risk değerlendirme çalışmasına göre sayısal olarak INR düzeylerindeki her 1.0'lik artış intraserebral kanama riskini iki katına çıkarmaktadır (Hylek and Singer 1994). Diğer

çalışmalarda ise hastalardaki INR düzeylerinde hedef değerlerden sapmaların, ortalama INR oranlarından bağımsız olarak kanama komplikasyonlarını arttırdığı gösterilmiştir (Anonymous 1996, Casais *et al.* 2000, Fihn *et al.* 1993). Food and Drug Administration (FDA) kılavuzlarında siyah etiketli uyarılardan biri de INR düzeylerinin 4.0'ın üzerine çıkması halinde yaşamı tehdit edecek kanama riskinin bulunacağı yönündedir.

### 2.11. Varfarin Doz Ayarlaması

Oral antikoagulan olarak kullanılan vitamin K antagonistleri içinde en sıklıkla tercih edilen ilaç varfarindir. Ancak varfarinin biyolojik etkisindeki değişkenlik, dar terapötik indeks aralığı, hastalarda uygun varfarin dozunun belirlenmesinde önemli güçlükler arz etmektedir. Yanlış doz uygulamaları ise kanama veya tromboembolizm gibi ciddi komplikasyonların gelişmesi için bağımsız bir ciddi risk faktörüdür. Tarihsel perspektifte, antikoagülasyon klinikleri bu ciddi komplikasyonların önlenebilmesi için kurulmuştur. Antikoagülasyon kliniklerince takip edilen hastalarda kanama komplikasyonlarının oranı azalmakla birlikte, ortalama yıllık majör kanama oranlarının % 0.9-% 2.7 ve ortalama yıllık ölümcül kanama oranlarının ise % 0.07 - % 0.7 düzeylerinde olduğu gösterilmiştir (Cannegieter *et al.* 1995, Palareti *et al.* 1996, van Der Meer *et al.* 1993). Yakın geçmişte ise hasta-lcml ve hasta-kontrollü tedavi modelleri ile bu zorluklar aşılmaya çalışılmıştır. Daha sonraki süreçte ise bilgisayar-aracılı Varfarin doz ayarlama programları geliştirilmiştir (Dawn AC; 4S Information Systems, Cumbria, İngiltere) (Hirsh *et al.* 2003).

Avrupa'da ve Amerika Birleşik Devletleri'nde uygun varfarin doz ayarlama ve uygulamaları için hastaya özel klinik, demografik ve genetik faktörlerin dikkate alınarak oluşturulduğu algoritmalar geliştirilmekte ve bu konuda daha verimli stratejilerin geliştirilmesi için yoğun çalışmalar sürdürülmektedir (Budnitz *et al.* 2007, Klein *et al.* 2009). Günümüzde Türkiye'de, INR monitorizasyonu ve varfarin doz ayarlamasının hasta ile primer ilgili doktorlarca yapılması genel klinik standart olmaya devam etmektedir. Doktorların karar verici olduğu sistemlerde hastaların INR testi için hastane veya en yakın laboratuvara gitme gereksinimleri mevcuttur. INR testi sonuçlandığında ise hastanın ilgili doktora veya antikoagülasyon kliniğine aynı gün başvurması veya ulaşması gerekmektedir. Yakın geçmişte gerçekleştirilen prospektif randomize çalışmalarda yeterli eğitim sonrasında hasta-lcml ve hasta-kontrollü tedavi modelleri ile doktor veya antikoagülasyon kliniği tabanlı modellere göre daha etkin INR terapötik aralığına ulaşılabilmemiştir (Ansell *et al.* 1995, Hasenkam *et al.* 1997, Koertke *et al.* 2000).

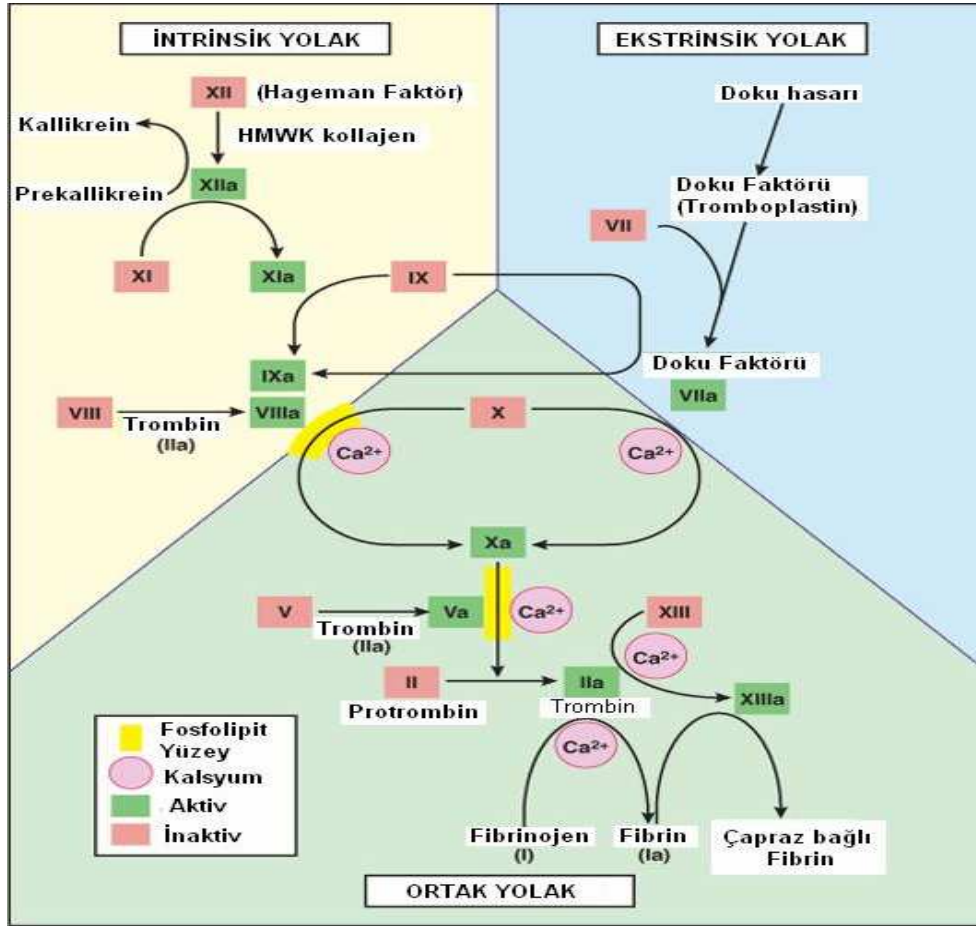
Uluslararası Varfarin Farmakogenetik Konsorsiyumu tarafından yürütülen bir çalışmada varfarin dozunun belirlenmesinde hastalar arasındaki genetik değişkenliğin önemli bir rol oynadığı ancak çeşitli ve geniş popülasyonlarda bu kapsamdaki genetik bilgiyi kullanmak üzere pratik metotların geliştirilmemiş olduğu tespit edilmiştir. Bu amaçla söz konusu çalışmada konsorsiyum uygun varfarin dozunu öngörmek için geniş bir nüfus tabanından, hem genetik ve hem klinik verilere dayanan bir algoritma geliştirmiştir. Çalışmada 4043 hastanın klinik ve genetik verileri kullanılarak doz algoritması oluşturulmuştur. Algoritma, klinik değişkenlere ve klinik durumdaki değişikliklerin eklendiği genetik bilgilere dayanmaktadır. 1009 örneklemlili validasyon grubu olarak, gerçek stabil terapötik dozun % 20'si içerisinde varfarin dozu tahmin edilen hastaların yüzdesi hesaplanarak, her bir algoritmanın potansiyel klinik değeri değerlendirilmiştir. Çalışmada farmakogenetik algoritmanın sonuçları klinik algoritma ve sabit doz yaklaşımı ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Sonuçta bu çalışmada uygun varfarin başlangıç dozu tahmin edilebilmesi için farmakogenetik algoritmanın kullanılması tavsiye edilmiştir. Farmakogenetik algoritma, sabit doz yaklaşımından veya klinik algoritmadan elde edilen doza göre gerekli stabil terapötik doza önemli ölçüde daha yakın bulunmuştur (Klein *et al.* 2009).

## **2.12. Koagülasyon**

Koagülasyon; protrombinin proteolitik bir enzim olan trombine dönüşümüdür. Trombin, fibrinojen molekülüne bağlanarak trombosit plaklarına bağlanır ve stabil fibrin oluşumunu sağlar. Fibrin pıhtı intrinsek, ekstrinsek ve ortak yolda görev alan pıhtılaşma faktörlerinin birlikte iş görmeleri ile şekillenmektedir. Koagülasyona karışan ve dolaşımda inaktif proenzim şeklinde bulunan birçok proteaz vardır. Bu proteazların aktivasyonu ile meydana gelen koagülasyonda iki yol vardır.

Koagülasyon yolları Şekil 2.6.'da özetlenmiştir.





Şekil 2.6. Koagülasyon Yolakları ([www.medscape.com/viewarticle/409675\\_2](http://www.medscape.com/viewarticle/409675_2))

### 2.12.1. İntrensek yolak

İntrensek yolak kanda bulunan komponentleri içerir. Hasarlı bir damar yüzeyi ile temasa geçen faktör XII (Hageman faktör), subendotel kollajene bağlanır ve aktif hale geçerek intrensek yolu başlatır. Yüzeyde, yüksek molekül ağırlıklı kininojen, prekallikrein, faktör XII ve faktör XI bir araya gelmektedir. Faktör XII; XI, IX, X ve II faktörlerinin sırasıyla aktivasyonunu gerçekleştirmektedir. Öncelikle Faktör XII'nin yapısında oluşan kimyasal değişimle faktör XIIa (aktive edilmiş faktör XII) haline dönüşmektedir (Kayaalp 2002). Faktör XIIa, faktör XI'i uyarmaktadır (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 (Canan and Derviş 2002, Pekçelen 2003). "Parsiyel tromboplastin zamanı" (PTT) intrensek pıhtılaşma zamanını gösterir. Pıhtılaşma mekanizmasının intrensek yolu Şekil 2.6.'da gösterilmektedir.

### 2.12.2. Ekstresek yolak

Ekstresek yolak doku lipopro-teinleri tarafından başlatılan bir yolaktır. Travma ile tetiklenen yol, doku fosfolipidlerinden açığa çıkan tromboplastin, faktör VII ile reaksiyona girerek bu yolu aktiveştirir. Bu durum, faktör VII'nin aktif hale geçmesine ve kan damarlarından doku faktörü adı verilen bir lipoproteininin salınımına neden olmaktadır. Kanda var olan faktör VII, doku faktörü ile karşılaştığında başlayan ekstresek yolda doku faktörüne ve faktör VII'ye kalsiyumunda katılmasıyla bir kompleks oluşmaktadır (Şekil 2.6.). Sonuç olarak faktör VII aktive edilir (faktör VIIa). Faktör VIIa, aynı zamanda doku faktörü ile birlikte, faktör IX'u da aktifleyerek endojen ve ekzojen yollar arasında bir bağlantı sağlamaktadır. İntrensek yol ile ekstresek yol, faktör X'un uyarılması ile (faktör Xa) beraber ortak yolda buluşurlar (Canan and Derviş 2002). Doku faktörünün faktör VIIa'ya bağlanmasıyla faktör X aktivasyonunu yaklaşık olarak otuz bin kat arttırmaktadır. Ekstresek yol ile pıhtılaşma zamanının ölçülmesi PTZ'yi göstermektedir ve klinikte kumarin grubu ilaçların doz ayarlamasında kullanılmaktadır (Kitchen and Preston 1999, <http://www.pathology.vcu.edu/clinical/coag/PT%20INR.pdf> ).

### 2.12.3. Ortak yolak

Pıhtılaşma mekanizmasının ortak kısmında, faktör Xa, kalsiyumun, faktör Va'nın ve trombosit kaynaklı fosfolipitler yardımı ile protrombini (faktör II), trombine (faktör IIa) dönüştürür. Trombin, fibrinojenin (faktör I) fibrine dönüşmesi olayını başlatır (Şekil 2.6.). Fibrinojen, farklı uzunlukta olan alfa, beta ve gama çift zincirlerinden oluşan dimerik bir proteindir ve karaciğerde sentezlenir. Trombin, her bir alfa ve beta segmentinin amino uçlarından bir peptid segmenti kopararak fibrinojeni fibrin monomerlerine dönüştürmektedir ve faktör XIIIa, fibrini kovalent çapraz bağlar ile sıkılaştırılmış hale getirmektedir (Pekçelen 2003).

## 2.13. Trombofili ile İlişkilendirilmiş Genler ve Polimorfizmleri

### 2.13.1. Faktör V Leiden gen mutasyonu

Faktör V (FV), koagülasyon sistemindeki ortak yolun en önemli proteinlerden biridir. FV, aktive edilmiş protein C'nin kofaktörü olarak işlev göstermektedir ve aktive protein C ile birlikte faktör VIIIa'yı inaktive etmektedir (Jenny *et al.* 1987). FV, koagülasyon sisteminin prokoagülan yönde değişimine neden olarak tromboz eğilimini attırmaktadır (Akar *et al.* 1998). Aktive edilmiş protein C, FVa ve FVIIIa'ı inaktive ederek kanın pıhtılaşmasını düzenleyen bir serin proteaz enzimidir. Aktif protein C, FVa proteinini 679, 506 ve 306'daki Arjinin bölgelerinden keserek inaktive eder. FVa ilk önce 506'dan daha sonra 306'dan kesilerek inaktive olur.

FVL mutasyonunda; genin 10. ekzonunda 1691. nükleotidinde yer alan Guanin, Adenin bazına dönüşmektedir (Dahlbäck 1995). Bu da 506 Arginin aminoasitinin Glisin olmasıyla sonuçlanır. Böylece 506. pozisyondaki kesim engellenmiş olur. Özetle FVL mutasyonunda FV molekülünde aktive protein C'ye dolayısıyla proteolitik inaktivasyona rezistans vardır. Mutant FV, 306'dan kesilmesiyle yine inaktive olabilir fakat bu durum da normale göre yaklaşık 10 kat daha yavaştır. FVL mutasyonu olduğunda trombin oluşumunda artış, buna bağlı olarakta hiperkoagülasyon meydana gelir ve FV prokoagülant olmaya devam eder (Bertina *et al.* 1994). FVL mutasyonu; Arg506Gln, Gln-506-faktör V, G1691A, R506Q veya Q faktör V olarak da adlandırılmaktadır (Dahlbäck 1995). FVL heterozigot (G/A) bireylerde tromboz riski 5-10 kat, homozigot (A/A) bireylerde ise risk 50-100 kat artmaktadır. Aktive edilmiş protein C rezistansının normal bireylerdeki prevalansı %3-5 iken tromboz öyküsü olan hastalarda %50 civarındadır (Williamson *et al.* 1998). FV Leiden mutasyonu otozomal dominant olarak kalıtılmaktadır ve bu patolojinin frekansı toplumlar arasında değişkenlik göstermektedir. Türk toplumunda taşıyıcılık oranı yaklaşık %9'dur. Böyle bir mutasyon için heterozigot bireylerde cerrahi girişim sonrasında, kadınlarda oral kontraseptif kullanımı sırasında ve postpartum döneminde derin ven trombozu görülme riskini arttırdığı saptanmıştır. FVL'in venöz tromboza risk oluşturması üzerine yapılan birçok çalışma bulunmasına rağmen arteriyel tromboza etkisi üzerine yapılan araştırmalar yeterli değildir. FVL mutasyonu olan genç kadın ve erkeklerde koroner tromboz oranı yüksek bulunmuştur. Bu hastalarda bağlı risk oranı 1.4 olup özellikle sigara kullanımı başta olmak üzere, obezite, hipertansiyon ve diyabet varlığında 4-32 kat artmaktadır (Inbal *et al.* 1999). FVL mutasyonu olan hastalarda gözlenen

bir diğ er arteriyel tromboz serebral arterlerde ortaya çı kmaktadır. Bu nedenle özellikle genç yaş ta ortaya çıkan ve kendini inme ile gösteren klinik tablo da FVL mutasyonu da düşün ülmelidir. Tüm bu bilgilere rağmen FVL mutasyonu ile arteriyel tromboz arasındaki iliş ki venöz tromboz ile oldu ğ u kadar açıkl ığ a kavuş mamıştır (Major *et al.* 2000). FVL mutasyonunun sıklığı toplumlar ve ırklar arası farklılık göstermektedir. Avrupa popülasyonunda %4-5 oranında bu mutasyon saptanmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda en yüksek prevalans Kıbrıs Rum toplumunda (%13.3) ve İsveç'te (%14.7), en düşük prevalans ise Hollanda (%2.9) ve İtalya'da (%2.5) saptanmıştır (De *et al.* 1998). Ülkemiz ise mutasyonun en sık görüldü ğ ü yerler arasındadır ve sağlıklı bireylerdeki prevalansı %7.1 - %9.1 civarındadır (Akar *et al.* 1997, Gurgey *et al.* 1997, Ozbek *et al.* 1997). Buna karş ın Afrika popülasyonunda mutasyon tespit edilmemiştir ve Asya ülkeleri veya Asya kökenli oldukları düşün ülen etnik grupların birçoğ unda da mutasyon saptanamamıştır. Ortadoğ u popülasyonunda ise Avrupa popülasyonuna yakın oranlar tespit edilmiştir. Tüm bunlar mutasyonun tek orijinli oldu ğ unu düş ündürmektedir (Rees *et al.* 1995, Rees 1996).

### **2.13.2. Protrombin G20210A gen mutasyonu**

Otozomal dominant kalıtım gösteren protrombin G20210A, 1996'da keş fedilmiştir (Poort *et al.* 1996). Protrombin geninin translasyona uğ ramayan 3'-ucunda 20210 pozisyonunda oluşan guaninden adenine baz de ğ iş imi protrombin düzeylerinde artış ile sonuç lanmaktadır. Hatta heterozigot bireylerdeki protrombin konsantrasyonunun normal bireylere göre daha fazla oldu ğ u saptanmıştır. Protrombin G20210A mutasyonu, trombotik riski yaklaşık olarak üç kat artırır. Bu mutasyonun genel dünya popülasyonunda %1-5 arasında de ğ iş en prevalansta oldu ğ u tespit edilmiştir (Makris *et al.* 1997, Tosoetto *et al.* 1999). Türkiye'de sağlıklı bireylerde yapılan prevalans çalış masında ise %1.2 oranında oldu ğ u görülmüştür (Akar *et al.* 1998, Ayyıldız *et al.* 2004). Protrombin 20210G>A mutasyonu ve VTE arasındaki iliş ki bir çok çalış mada gösterilmiştir (Smirnov *et al.* 1999). Yapılan bazı çalış malarda, protrombin 20210G>A allelinin, FVL ve/veya homozigot mutant MTHFR 677C>T mutasyonları ile birlikte oldu ğ u durumlarda, tromboz riskinin arttığı gözlenmiştir (Bovill *et al.* 2000).

### **2.13.3. MTHFR C677T gen mutasyonu**

MTHFR enziminin koroner arter hastalığı ile ilişk ili oldu ğ unu ilk olarak 1991'de Kang ve arkadaşları tarafından tespit edilmiştir (Kang *et al.* 1991). MTHFR enzimi, 5,10-metilen tetrahidrofolatın 5-metiltetrahidrofolata indirgenmesini katalizlemektedir. 5-

metiltetrahidrofolat, folat döngüsünde majör karbon vericisi olarak homosisteinin metiyonine remetilasyonu reaksiyonunda karbon kaynağı olarak görev yapmaktadır. Folat metabolizmasında önemli bir rol oynayan MTHFR, DNA sentezi ve metilasyon reaksiyonları arasındaki dengeyi sağlamaktadır. Ayrıca kardiyovasküler hastalıkların etmeni olan plazmadaki homosistein seviyesini etkilemektedir (Schwahn and Rozen 2001). Bir vitamin olan folat ise homosisteinin metilasyonu ve nükleotid sentezi gibi pek çok biyokimyasal yolakta görev yapmaktadır (Roiben and Ulrich 2003).

MTHFR geninin 677. nükleotidinde Sitozin bazı yerine Timin bazının gelmesi sonucunda 222. kodondaki Alanin aminoasiti Valine dönüşmektedir (Frosst *et al.* 1995). Bu değişim sonucunda enzimin termolabilitesi artmakta ve aktivitesi %50 oranında azalmaktadır (Ma *et al.* 1996). MTHFR 677 C→T polimorfizmi ile enzim aktivitesinde yabanıl tipe (CC) göre azalma gözlenmiştir. Böylece metilen tetrahidrofolat ürününde azalmasıyla birlikte homosisteininin metiyonine dönüşümü de azalmaktadır (Roiben and Ulrich 2003, Botto and Yang 2000). Plazmadaki homosistein seviyesi artarak hiperhomosisteinemi meydana gelmektedir. Homosistein düzeyindeki artış özellikle erken yaşlarda ortaya çıkabilen ve hayati tehlike riski taşıyan damar tıkanıklığına neden olabilmektedir. Plazmada orta dereceli homosistein seviyesindeki artış, koroner kalp hastalıklarında, miyokard enfarktüsünde, iskemik inme saptanmıştır ve venöz trombozda risk faktörü olduğu bulunmuştur (Rothenbacher *et al.* 2002, Wu *et al.* 2001, Rigamonti *et al.* 2002). Türk popülasyonunda heterozigot ve homozigot sıklığı yaklaşık olarak % 47.4 ve % 9.6'dır (Sazcı *et al.* 2005).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Sarf, Kimyasal ve Reaktifler

Factor V Leiden Kit (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA)

Factor II (PROTHROMBIN) G20210A Kit (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA)

Fenol/Kloroform (Merck, Almanya)

Etanol (Merck, Almanya)

İzoamilalkol (Merck, Almanya)

LightMix<sup>®</sup> MTHFR C677T (TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Germany)

LightMix<sup>®</sup> VKORC1 C1173T, G-1639A kit (TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Germany)

LightCycler<sup>®</sup> FastStart DNA Master Hybridization Probe (Roche Applied Science, Penzberg, Almanya)

Proteinaz K enzimi (Fermentas, Litvanya)

Red Blood Cell lizis solüsyonu (155 mM Amonyum Klorür, AppliChem, Almanya)

Sodyum Asetat (Sigma, ABD)

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS, Merck, Almanya)

Sodyum tris EDTA

EDTA'lı Tüp ( BD Vacutainer Tubes, ABD; katalog no: 368861)

Ependorf Tüp (Grenier Bio – One, Basel, İsviçre)

LightCycler<sup>®</sup> kapiller tüp (Roche Applied Science, Penzberg, Almanya)

LightCycler<sup>®</sup> Real-Time PZR Cihazı (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA)

Pipet takımı (Gilson, ABD)

Soğutmalı santrifüj (Hettich, Almanya)

Su banyosunda (Kotterman, Almanya)

Vorteks (İka, Almanyakatalog; no:3340000)

### 3.2. Hasta Kohortu

Çalışmamız Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi ve Ankara Üniversitesi Pediatrik Moleküler Patoloji ve Genetik Birimi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Genombilim Biriminin ortak projesi olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma öncesinde Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi yerel etik kurulundan çalışma ile ilgili izin 29 Haziran 2009 tarihinde 154-4913 nolu karar ile alınmıştır. Tüm araştırmacılar, çalışma öncesinde çalışma hakkında bilgilendirilmiştir. Çalışma öncesinde bilgilendirilmiş onam formu alındıktan sonra hastalar çalışmaya dahil edilmiştir.

Haziran 2009 ve Temmuz 2010 tarihleri arasında 120 hasta çalışmaya alınmıştır. Varfarin endikasyonu 90 hastada (ortalama yaş;  $54.4 \pm 13.2$ , 33E / 57K) kardiyak nedenlerle (mekanik kapak replasmanı, AF), 30 hastada (ortalama yaş;  $47.5 \pm 14.2$ , 14E / 16K ) ise vasküler nedenlerle (DVT, PTE) konmuştur. Hastaların demografik verileri Çizelge 3.1.'de özetlenmiştir.

**Çizelge 3.1.** Olguların demografik özellikleri ve klinik bulguları ile ilgili veri seti ve varfarin endikasyonuna göre dağılımları (n = 120).

Değişkenler	Hasta Grubu (n = 120)	Varfarin Endikasyonu- Kardiyak * (n = 90)	Varfarin Endikasyonu- Vasküler ‡ (n = 30)
Yaş (yıl), ortalama±SD, (Alt ve üst sınır)	$52.7 \pm 13.7$ (18-80)	$54.4 \pm 13.2$ (19-80)	$47.5 \pm 14.2$ (18-76)
Cinsiyet,			
Erkek	47 (39)	33 (37)	14 (47)
Kadın	73 (61)	57 (63)	16 (53)
Ağırlık (kg)	$72.7 \pm 11.2$	$71.7 \pm 11.5$	$75.6 \pm 9.7$
Boy (cm)	$162.1 \pm 16.6$	$161.4 \pm 18.7$	$163.8 \pm 6.8$
Vücut yüzey alanı	$1.80 \pm 0.16$	$1.79 \pm 0.17$	$1.84 \pm 0.13$
Vücut kitle indeksi	$27.2 \pm 3.9$	$26.8 \pm 3.9$	$28.3 \pm 3.7$
Diabetes mellitus	19 (15.8)	16 (17.7)	3 (10.0)
Hipertansiyon	25 (20.8)	23 (25.5)	2 (6.6)
KOAH	10 (8.3)	10 (11.1)	–
Hiperlipidemi	18 (15.0)	15 (16.6)	3 (10.0)
Aktif sigara kullanımı	20 (16.6)	13 (14.4)	7 (23.3)
Sigara kullanımını bırakanlar	50 (41.6)	39 (43.3)	11 (36.6)
Serebrovasküler hastalık	4 (3.3)	3 (3.3)	1 (3.3)
Periferik Arter Hastalığı	4 (3.3)	2 (2.2)	2 (6.6)

Kreatinin düzeyi (mg/dL, çalışmaya alındığı tarihte)	0.91 ± 0.4	0.90 ± 0.3	0.93 ± 0.6
Serum Albümin düzeyi (mg/dL, çalışmaya alındığı tarihte)	0.42 ± 4.2	0.40 ± 4.2	0.49 ± 4.2
Böbrek yetmezliği	2 (1.7)	1 (1.1)	1 (3.3)
Ortalama NYHA fonksiyonel sınıflama	2.63 ± 0.7	–	–
NYHA ≥ 3	59 (58.4)	–	–
SVEF (ekokardiyografi, %)	47.2 ± 11.1	47.1 ± 11.1	–
SVSSÇ (mm)	34.4 ± 8.2	34.5 ± 8.2	33.25 ± 8.8
SVDSÇ (mm)	52.1 ± 10.5	50.8 ± 9.7	50.75 ± 8.3
Sol atriyum çapı (mm)	47.8 ± 9.5	48.9 ± 8.7	34 ± 3.2
Sol atriyel trombüs	10 (8.3)	8 (8.9)	–
Sistolik pulmoner arter basıncı (mmHg)	38.7 ± 11.3	42.3 ± 14.1	29.5 ± 4.9
Sitokrom P450 enzim indükleyici kullanımı Φ	–	–	–
Amiodaron kullanımı	11 (9.2)	11 (12.2)	–
Varfarin dozu (mg/hafta)	31.8 ± 11.4	32.31 ± 11.4	30.6 ± 10.8
(Alt ve üst sınır)	11.3 - 70	11.3 - 70	12.3 - 52.5

\* Varfarin Endikasyonu-Kardiyak grup, Kalp kapak replasmanı ve atriyel fibrilasyon grubunu oluşturmaktadır;  
‡ Varfarin Endikasyonu-Vasküler grup ise, geçirilmiş derin ven trombozu ve/veya pulmoner emboli grubunu oluşturmaktadır  
Φ Sitokrom P450 enzim indükleyici kullanımı olarak fenitoin, karbamazepin, ve rifampin kullanımı kastedilmiştir.  
SS, Standart sapma; NYHA, New York Kalp Cemiyeti; KOAH, Kronik obstrüktif akciğer hastalığı; SVEF, sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu; SVSSÇ-sol ventrikül sistol sonu çapı, SVDSÇ-sol ventrikül diyastol sonu çapı.

### 3.3. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

En az 6 ay süreyle varfarin kullanım endikasyonu olan;

1. Kalıcı atriyal fibrilasyon/flutter olguları,
2. Ekokardiyografi ile tespit edilmiş intra-kardiyak trombüs (sol atriyel veya sol ventriküler) olguları,
3. Dokümanate edilmiş derin ven trombozu olguları,
4. Dokümanate edilmiş pulmoner emboli olguları,
5. Mekanik kalp kapak protezi olan olgular,
6. Biyolojik kalp kapak protezi ve atriyel fibrilasyonu olan olgular,
7. Romatizmal kalp hastalığı nedeniyle oral antikoagulan endikasyonu olan olgular,
8. İskemik inme nedeniyle oral antikoagulan endikasyonu olan olgular,
9. Periferik arter hastalığı nedeniyle oral antikoagulan endikasyonu olan olgular,
10. Kardiyomiyopati nedeniyle oral antikoagulan endikasyonu olan olgular.



### **3.4. Çalışmadan Dışlanma Kriterleri**

1. Gastrointestinal kanama veya peptik ülser öyküsü,
2. Ciddi karaciğer hastalığı riski (transaminazların normal sınırların 3 katı olması), aktif hepatit veya kronik HBV ve HCV enfeksiyonu,
3. Kontrolsüz hipertansiyon,
4. Malabsorbsiyon sendromu veya kronik diyare hikayesi,
5. Çalışmaya alınma öncesi 15 gün içinde viral veya bakteriyel enfeksiyon öyküsü,
6. Aktif veya geçirilmiş infektif endokardit,
7. Hastaneye yatış süresince sepsisemi, mediastinit, pnömoni gibi nedenlerle hastanede kalışın 30 günün üzerinde olması,
8. Kardiyak kaşeksi,
9. Morbid obezite,
10. Gebelik beklentisi, gebelik ve laktasyon,
11. Psikiyatrik hastalık öyküsü (Majör depresif bozukluk, bipolar affektif bozukluk, şizofreni, madde bağımlılığı öyküsü gibi)
12. Geçirilmiş malignite öyküsü olan hastalar yada mevcut malignite öyküsü nedeniyle 1 yıllık yaşam beklentisi sorgulanan hastalar,
13. Hastanın yazılı onam vermemesi.

### **3.5. Kan Örneklerinin Toplanması**

Çalışmaya dahil edilme kriterleri doğrultusunda hastaların en az 6 ay süreyle varfarin kullanım endikasyonu olup olmadığı belirlendikten sonra, hastalardan Helsinki deklarasyonu çerçevesinde bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır. Genetik analizler için hastalardan iki adet etilendiamintetraasetikasilili (EDTA) tüpe 5'er ml. ve bir adet sitratlı koagülasyon tüpüne 3 ml. kan alınmıştır.

### **3.6. Dna İzolasyonu**

Çalışmaya dahil edilen hastalardan iki adet EDTA'lı (EDTA, Sigma, ABD) tüp içerisine 5 ml kan örneği alınmıştır. Alınan kan örnekleri falkon tüp içerisine aktarılır ve üzerine alınan kanın 2.5 katı kadar RBC (Red Blood Cell) lizis solüsyonu (155 mM Amonyum Klorür, AppliChem, Almanya) eklenir. Daha sonra 10 dakika çalkalanır ve 20 dakika buz içerisinde bekletilir. +4°C'de 4000 rpm'de 20 dakika boyunca soğutmalı santrifüjde (Hettich, Almanya)

santrifüj edilir. Bu işleme lökositler çökene kadar devam edilir. Çöken lökositler pellet oluşturur ve pellet üzerindeki süpernatant kısım dökülür. Elde edilen lökositlerin üzerine 1000µl RBC Lizis solüsyonu eklenir ve homojen hale gelene kadar vortekslenir. Karışımın 800µl'si stok olarak saklanmak üzere ependorf tüpe alınır. Geriye kalan 200µl'lik kısım ependorf tüpe alınır ve üzerine 20 µl Proteinaz K enzimi (Fermentas, Litvanya), son konsantrasyon % 0.5 olacak şekilde % 10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS, Merck, Almanya)'tan 30µl, 500µl sodyum tris EDTA ve 5µl internal kontrol (Roche Diagnostics, ABD) eklenerek en az 16 saat 56°C'de sıcak su banyosunda (Kotterman, Almanya) bekletilir.

İşlemin ikinci gününde, 1:1 oranında Fenol/Kloroform (Merck, Almanya), İzöamilalkol (Merck, Almanya) eklenerek 10 dakika çalkalanır. Buz içerisinde 20 dk bekletilerek +4°C 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Karışım iki faza ayrılır, üst kısmı başka bir ependorf tüpe alınarak üzerine toplam hacmin 1/10'u kadar 3 M Sodyum Asetat (Sigma, ABD) ve 1000µl %95'lik alkol (etanol) eklenir. Ependorf tüp, altüst edilerek DNA görünür hale getirilir ve tüp üzerine DNA miktarı yazılır. Daha sonra -20°C'de bir gece bekletilir.

İşlemin üçüncü gününde, DNA çöktürülür. Bunun için +4°C 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilir. Oluşan süpernatant dökülür ve tüpe 500µl %70'lik alkol eklenir. Daha sonra +4°C 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonunda alkol dökülerek, tüp kurutulmaya bırakılır. Tüp kurutulduktan sonra tüpün içerisine, ikinci gün tüp üzerine yazılan DNA miktarı kadar Tris-EDTA (10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA) solüsyonu eklenip 37°C'de gece boyunca bekletilerek DNA'nın çözülmesi sağlanır. İzole edilen DNA +4°C'de saklanır.

### **3.7. Eş Zamanlı Pzr ile Polimorfizmlerin Tespit ve Tanımlanması**

Eş zamanlı PZR, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesi ilkesine dayanan kısa sürede kalitatif sonuç veren bir yöntemdir. FVL gen mutasyonu, Protrombin G20210A gen mutasyonu, MTHFR C677T polimorfizmi ve *VKORC1* -1639G>A ve 1173C>T gen polimorfizmleri en güvenilir yöntemlerden biri olan eş zamanlı PZR tekniği ile taranmıştır. Örneklerden DNA izolasyonu ile elde edilen DNA materyali, bu şekilde floresan raportörün kantitasyonuna ve tespit edilmesine dayanan eş zamanlı (Real time) PZR yöntemiyle polimorfizmler tespit edilmiştir. Floresan sinyallerin algılanmasına dayanan sistemde sinyaller Light Cycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Almanya) cihazı ile tespit ve analiz edilmektedir.

Çalışmaya dahil edilme kriterlerine uyan endikasyonlarda rutin olarak gerçekleştirilen trombofili panelinden FVL, Protrombin G20210A ve MTHFR (677C>T) genotipik verilerinin eş zamanlı PZR yöntemi ile tespit edilen sonuçları, hastanın tedavisinden sorumlu doktorlara bildirilmiştir. Tüm hastalar en az 6 ay süreyle çalışma kapsamında takibi yapılmıştır. Hastaların ortalama günlük ve haftalık varfarin dozları ve INR değerleri eş-zamanlı olarak takip edilmiştir.

### 3.7.1. Faktör V Leiden gen mutasyon tespiti

FV genindeki 222 baz çifti uzunluğundaki bölge spesifik primerler ile amplifiye edilmektedir. Kit prosedürüne göre reaksiyonun hazırlanması:

Kit içeriğinde, primer ve problemleri içeren sarı kapaklı mutasyon ölçüm karışımı, kırmızı kapaklı reaksiyon karışımı, mor kapaklı pozitif kontrol ve renksiz kapaklı PZR grade su bulunmaktadır.

#### Parametre-spesifik reaktiflerin hazırlanması:

Çalışılacak reaksiyon sayısı (bir başka deyişle, örnek DNA'ları, negatif ve pozitif kontroller) artı ek bir reaksiyon ile çarparak Master Mix hazırlanır. Buz üzerindeki 1.5ml'lik bir reaksiyon tüpüne Çizelge 3.2.'de özetlendiği şekilde hazırlanır.

Reaktifler-çalışma solüsyonu (Tek Reaksiyon için)	Hacim/ Reaksiyon
PZR grade su (renksiz kapaklı tüp)	11 µl
Mutasyon tespit karışımı (sarı kapaklı tüp)	2 µl
Reaksiyon karışımı (kırmızı kapaklı tüp)	2 µl
Toplam	15 µl

**Çizelge 3.2.** FVL gen mutasyonu reaksiyon karışımının hazırlanması

Hazırlanan master mix karışımı yavaşça karıştırılır ve önceden soğutulmuş her bir LightCycler® Kapilerin içerisine 15 µl Master Mix pipetlenir. İzole edilen örnek DNA'dan 5µl veya pozitif kontrolden (mor kapaklı tüp) 5µl veya negatif kontrol olarak PZR grade sudan (renksiz kapaklı tüp) 5µl hazırlanan master mix karışımının üzerine eklenir. Son reaksiyon hacmi 20µl olmaktadır. Kapilerin kapakları kapatılır. Negatif kontrolü içeren kapileri Light-Cycler® Karuselinde pozisyon 1'e ve pozitif kontrolü içeren kapileri pozisyon 2'ye yerleştirilir. Örnek DNA içeren kapileri, pozisyon 3'ten başlayarak Light-Cycler®

Karuseline yerleştirilir. Yerleştirilen kapilerler santrifüjde 3000 rpm (735x g) hızda 30 saniye santrifüjlenir. Daha sonra Light-Cycler® eş zamanlı PZR cihazına aktarılır.

### Programlama:

Protokol dört program basamağı içermektedir.

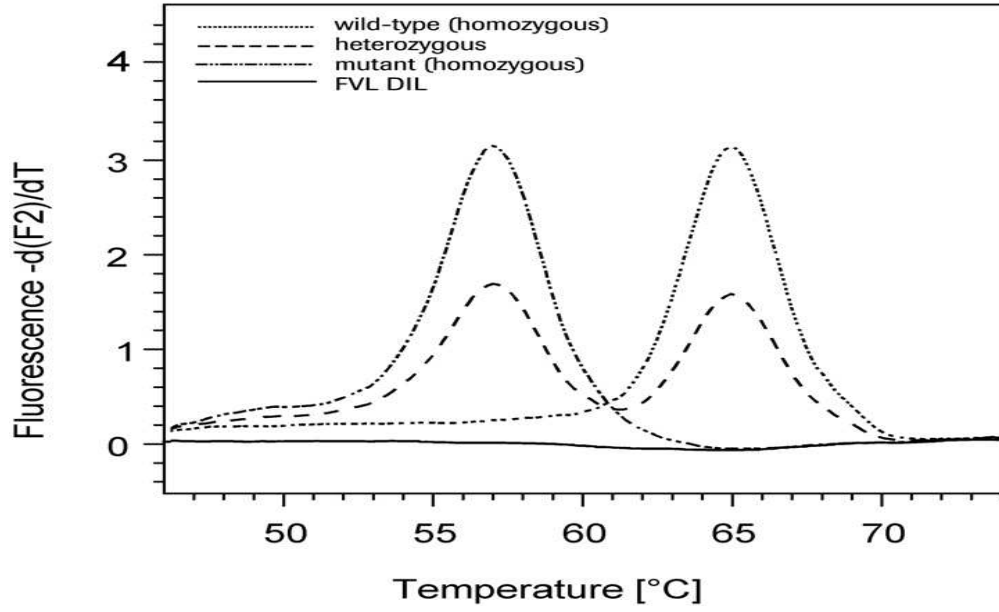
- 1: Denatürasyon: Örneklerin denatürasyonu ve enzim aktivitesi
- 2: Döngü: Hedef DNA' nın PCR- amplifikasyonu
- 3: Erime Analizi (Melting): Hedef DNA' dan çoğalan PCR ürünlerinin tanımlanması için erime eğrisi analizi
- 4: Soğutma: Cihazın soğuması

FVL polimorfizmini belirleme kiti (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA) protokolüne göre sıcaklık prosedürü; denatürasyon için 95°C' de 30 saniye, çoğaltma için 95°C' de 0 saniye, 55°C' de 10 saniye, 72°C' de 5 saniye tutulur ve döngü 45 kez tekrarlanır. Erime eğrisi için 95°C' de 0 saniye, 45°C' de 60 saniye tutulur ve 0.1°C' lik artışla 80°C' ye kadar ısıtır; kısa bir soğutma prosedürü için 40°C' de 30 saniye tutulur. Sıcaklık prosedürü Çizelge 3.3.'de özetlenmiş şekilde gösterilmektedir.

Program	Denatürasyon	Döngü			Erime (Melting)			Soğuma
Parametre								
Analiz Modu	None	Ölçme Modu			Erime Eğrisi Modu			None
Döngü	1	45			1			1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1
Hedef Sıcaklık (°C)	95	95	55	72	95	45	80	40
Tutulma Süresi (sa:dk:sn)	00:00:30	00:00:00	00:00:10	00:00:05	00:00:00	00:00:60	00:00:00	00:00:30
Ramp Oranı [°C/sn]	20	20	20	20	20	20	0.1	20

### Çizelge 3.3. FVL Gen Mutasyon Tespitinde Sıcaklık Prosedürü

Yabanıl genotipe sahip örnekler hibridizasyon problemleri ile tam bir eşleşme sağlamaktadır. Yabanıl genotip mevcutsa tam bir eşleşme gerçekleşir ve FVL pozitif kontrolün ikinci piki 65°C ± 2.5°C aralığında elde edilir. Eğer mutant genotip mevcut ise prob ile tam bir eşleşme gerçekleşmez ve FVL pozitif kontrolün ilk piki olan 57°C ± 2.5°C aralığında pik verir. Örnekler heterozigot genotipe sahipse hem 57°C hem de 65°C de 2 adet pik elde edilir (Şekil 3.1.).



**Şekil 3.1.** FVL Gen Mutasyonunun Eş Zamanlı PZR Analizindeki Görüntüsü

### 3.7.2. Protrombin G20120A gen mutasyon tespiti

Protrombin genindeki 165 baz çifti uzunluğundaki bölge spesifik primerler ile amplifiye edilmektedir.

Kit içeriğinde, primer ve problemleri içeren sarı kapaklı mutasyon ölçüm karışımı, kırmızı kapaklı reaksiyon karışımı, mor kapaklı pozitif kontrol ve renksiz kapaklı PZR grade su bulunmaktadır.

#### Parametre-spesifik reaktiflerin hazırlanması:

Çalışılacak reaksiyon sayısı (bir başka deyişle, örnek DNA'ları, negatif ve pozitif kontroller) artı ek bir reaksiyon ile çarparak Master Mix hazırlanır. Buz üzerindeki 1.5ml'lik bir reaksiyon tüpüne Çizelge 3.4.'de özetlendiği şekilde hazırlanır.

Reaktifler-çalışma solüsyonu (Tek Reaksiyon için)	Hacim/ Reaksiyon
PZR grade su (renksiz kapaklı tüp)	11 µl
Mutasyon tespit karışımı (sarı kapaklı tüp)	2 µl
Reaksiyon karışımı (kırmızı kapaklı tüp)	2 µl
Toplam	15 µl

**Çizelge 3.4.** Protrombin gen mutasyonu reaksiyon karışımının hazırlanması

Hazırlanan master mix karışımı yavaşça karıştırılır ve önceden soğutulmuş her bir LightCycler® Kapilerin içerisine 15µl Master Mix pipetlenir. İzole edilen örnek DNA'dan 5µl veya pozitif kontrolden (mor kapaklı tüp) 5µl veya negatif kontrol olarak PZR grade sudan (renksiz kapaklı tüp) 5µl hazırlanan master mix karışımının üzerine eklenir. Son reaksiyon hacmi 20µl olmaktadır. Kapilerin kapakları kapatılır. Negatif kontrolü içeren kapileri Light-Cycler® Karuselinde pozisyon 1'e ve pozitif kontrolü içeren kapileri pozisyon 2'ye yerleştirilir. Örnek DNA içeren kapileri, pozisyon 3'ten başlayarak Light-Cycler® Karuseline yerleştirilir. Yerleştirilen kapilerler santrifüjde 3000 rpm (735x g) hızda 30 saniye santrifüjlenir. Daha sonra Light-Cycler® eş zamanlı PZR cihazına aktarılır.

### Programlama:

Protokol dört program basamağı içermektedir.

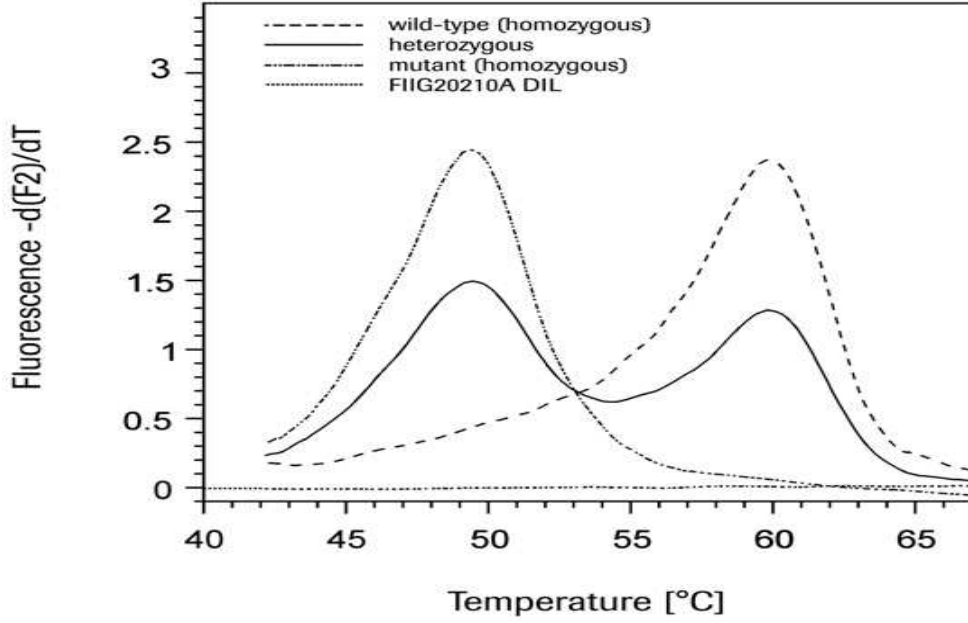
- 1: Denatürasyon: Örneklerin denatürasyonu ve enzim aktivitesi
- 2: Döngü: Hedef DNA' nın PCR- amplifikasyonu
- 3: Erime Analizi (Melting): Hedef DNA' dan çoğalan PCR ürünlerinin tanımlanması için erime eğrisi analizi
- 4: Soğutma: Cihazın soğuması

Protrombin polimorfizmini belirleme kiti (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA) protokolüne göre sıcaklık prosedürü; denatürasyon için 95°C'de 30 saniye, çoğaltma için 95°C'de 0 saniye, 55°C'de 10 saniye, 72°C'de 5 saniye tutulur ve döngü 45 kez tekrarlanır. Erime eğrisi için 95°C'de 60 saniye, 55°C'de 30 saniye, 45°C'de 30 saniye, 40°C'de 120 saniye tutulur ve 0.1°C'lik artışla 70°C'ye kadar ısıtır; kısa bir soğutma prosedürü için 40°C'de 30 saniye tutulur (Çizelge 3.5.).

Program	Denatürasyon	Döngü			Erime (Melting)					Soğuma
Parametre										
Analiz Modu	None	Ölçme Modu			Erime Eğrisi Modu					None
Döngü	1	45			1					1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	4	5	1
Hedef Sıcaklık (°C)	95	95	55	72	95	55	45	40	70	40
Tutulma Süresi (sa:dk:sn)	00:00:30	00:00:00	00:00:10	00:00:05	00:00:60	00:00:30	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Ramp Oranı [°C/sn]	20	20	20	20	20	20	20	20	0.1	20

**Çizelge 3.5.** Protrombin G20210A Gen Mutasyon Tespitinde Sıcaklık Prosedürü

Yabanıl genotipe sahip örnekler hibridizasyon problemleri ile tam bir eşleşme sağlamaktadır. Yabanıl genotip mevcutsa tam bir eşleşme gerçekleşir ve Protrombin G20210A pozitif kontrolünün ikinci piki olan  $59^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$  aralığında pik verir. Eğer mutant genotip mevcut ise prob ile tam bir eşleşme gerçekleşmez ve Protrombin G20210A pozitif kontrolünün ilk piki olan  $49^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$  aralığında pik verir. Örnekler heterozigot genotipe sahipse hem  $49^{\circ}\text{C}$  hem de  $59^{\circ}\text{C}$ 'de 2 adet pik elde edilir.



**Şekil 3.2.** Protrombin G20210A Gen Mutasyonunun Eş Zamanlı PZR Analizindeki Görüntüsü

### 3.7.3. MTHFR C677T gen mutasyon tespiti

MTHFR genindeki 233 baz çifti uzunluğundaki bölge spesifik primerler ile amplifiye edilmektedir.

Kit prosedürüne göre reaksiyonun hazırlanması:

Kit içeriğinde, her biri 16 reaksiyonluk karıştırılmış ve liyofilize edilmiş primerler ve hibridizasyon probu içeren 6 adet kırmızı kapaklı tüp bulunmaktadır. İnsan MTHFR C677T genotipini (yabanıl tip, heterozigot, mutant) içeren 6 adet renksiz kapaklı kontrol DNA tüpü kit içerisinde yer almaktadır.

**Parametre-spesifik reaktiflerin hazırlanması (16 reaksiyon):**

Kırmızı kapaklı bir reaktif tüpü, 16 reaksiyonluk çalışmanın gerçekleşmesi için gereken tüm primer ve problemleri içermektedir. Reaktif tüpüne 66µl PZR-grade suyundan ilave edilir, solüsyon vorteks ile karıştırılır ve santrifüj ile spin edilir.

\* 20µl'lik bir PZR reaksiyonu için 4µl reaktif kullanılır.

**Kontrol DNA'nın hazırlanması:**

Renksiz kapaklı tüpe 40µl PZR-grade suyu ilave edilir. İzole edilmiş olan DNA 10 kez pipetaj yapılarak solüsyona karıştırılır.

\* 20 µl'lik bir PCR reaksiyonu için 5µl kontrol DNA kullanılır.

Reaksiyon karışımının hazırlanması Çizelge 3.6.'de özetlenmiştir.

Tek reaksiyon	Bileşenler
7.4 µl	Su, PCR-grade (renksiz kapak, Roche FastStart kit ile birlikte sağlanmaktadır)
1.6 µl	25 mM Mg <sup>2+</sup> solüsyonu (mavi kapaklı, Roche FastStart kit ile birlikte sağlanmaktadır)
4.0 µl	Reaktif miksi (primer ve problemleri içeren parametre spesifik reaktifler)
2.0 µl	Enzim Miksi (FastStart mix- kırmızı kapaklı)

15 µl Toplam reaksiyon hacmi

**Çizelge 3.6. MTHFR C677T reaksiyon karışımının hazırlanması****Reaksiyon karışımının hazırlanması:**

Soğutulan reaksiyon tüpünde, tek bir reaksiyon için reaktiflerin her birinden ekleyip hacmini reaksiyon sayısı kadar çoğaltarak, reaksiyon karışımı hazırlanır.

Hazırlanan karışım, santrifüjde spin ettirilir ve kapilerlere her bir reaksiyon için 15µl reaksiyon karışımından transfer edilir. Her bir kapilere 5µl örnekten ilave edilerek son hacim 20µl olarak elde edilir.



### Programlama:

Protokol dört program basamağı içermektedir.

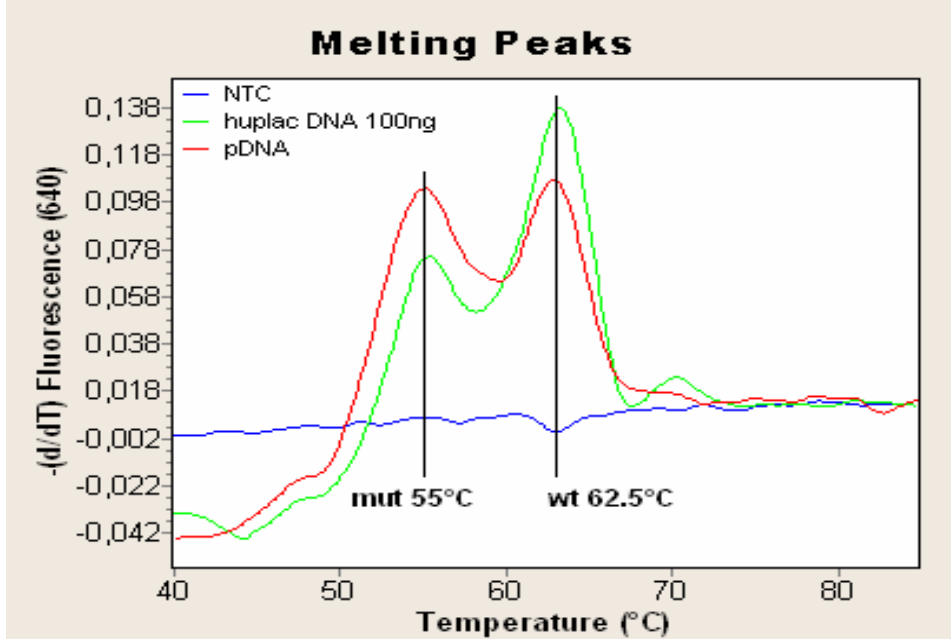
- 1: Denatürasyon: Örneklerin denaturasyonu ve enzim aktivitesi
- 2: Döngü: Hedef DNA' nın PCR- amplifikasyonu
- 3: Erime Analizi (Melting): Hedef DNA' dan çoğalan PCR ürünlerinin tanımlanması için erime eğrisi analizi
- 4: Soğutma: Cihazın soğuması

MTHFR polimorfizmini belirleme kiti (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA) protokolüne göre sıcaklık prosedürü; denatürasyon için 95°C' de 10 dakika, çoğaltma için 95°C'de 5 saniye, 55°C'de 10 saniye, 72°C'de 15 saniye tutulur ve döngü 45 kez tekrarlanır. Erime eğrisi için 95°C'de 20 saniye, 40°C'de 20 saniye tutulur ve 0.2°C'lik artışla 85°C'ye kadar ısıtır; kısa bir soğutma prosedürü için 40°C'de 30 saniye tutulur (Çizelge 3.7.).

Program	Denatürasyon	Döngü			Erime (Melting)			Soğuma
Parametre								
Analiz Modu	None	Ölçme Modu			Erime Eğrisi Modu			None
Döngü	1	45			1			1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1
Hedef Sıcaklık (°C)	95	95	55	72	95	40	85	40
Tutulma Süresi (sa:dk:sn)	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:15	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30
Ramp Oranı [°C/sn]	20	20	20	20	20	20	0.2	20

**Çizelge 3.7.** MTHFR Gen Mutasyon Tespitinde Sıcaklık Prosedürü

Yabancıl genotipe sahip örnekler hibridizasyon problemleri ile tam bir eşleşme sağlamaktadır. Yabancıl genotip mevcutsa tam bir eşleşme gerçekleşir ve MTHFR C677T pozitif kontrolünün ikinci piki olan 62.5°C ± 2.5°C aralığında pik verir. Eğer mutant genotip mevcut ise prob ile tam bir eşleşme gerçekleşmez ve MTHFR 677 pozitif kontrolünün ilk piki olan 55°C ±2.5°C aralığında pik verir. Örnekler heterozigot genotipe sahipse hem 55°C hem de 62.5°C'de 2 adet pik verirler (Şekil 3.3.).



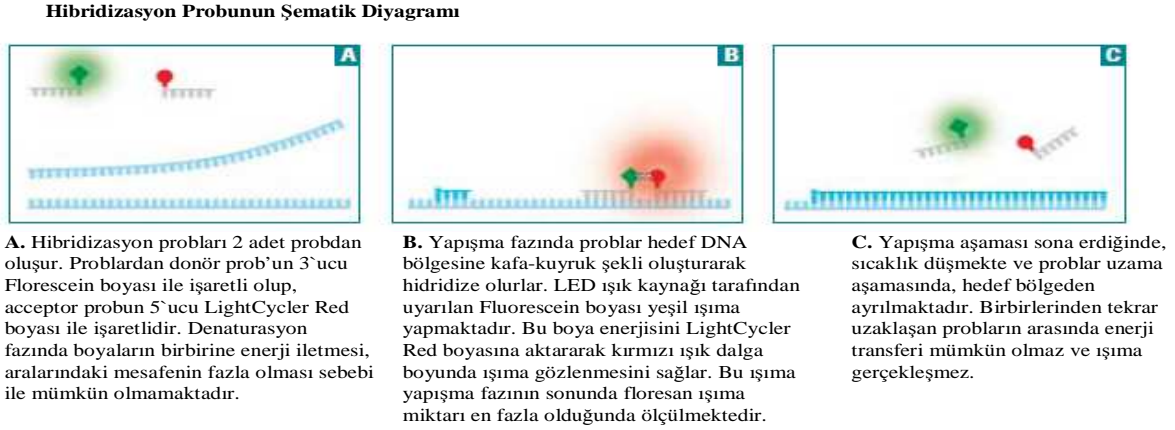
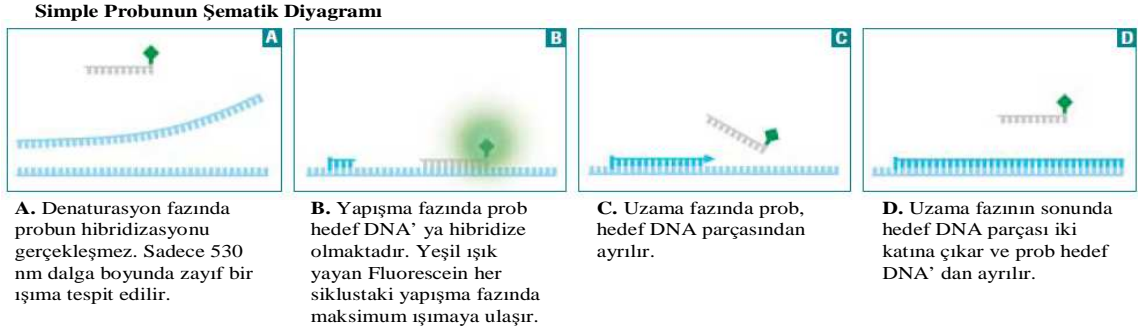
Şekil 3.3. MTHFR Eş Zamanlı PZR Analizindeki Görüntüsü

#### Sonuç ve Değerlendirme:

LightCycler® eş zamanlı PZR cihazında “Color Compensation” (renk dengeleme) modu açılır. LightCycler® cihazının kullanım kitapçığında tanımlandığı gibi veri analizi yapılmaktadır. MTHFR C677T genotipi, spesifik erime noktalarında (T<sub>m</sub>) Melting Curve Modunda (LightCycler® 1.x cihazı) veya “T<sub>m</sub> Calling” Analiz modunda (LightCycler® 2.0/ 480 cihazı) çalışmasıyla tanımlanmaktadır. Yabani tip MTHFR C677T, 62.5°C’lik erime noktasında Kanal 640’da analiz edilmektedir. Allel varyantı MTHFR C677T 55.0°C’lik erime noktasında Kanal 640’da ortaya çıkmaktadır.

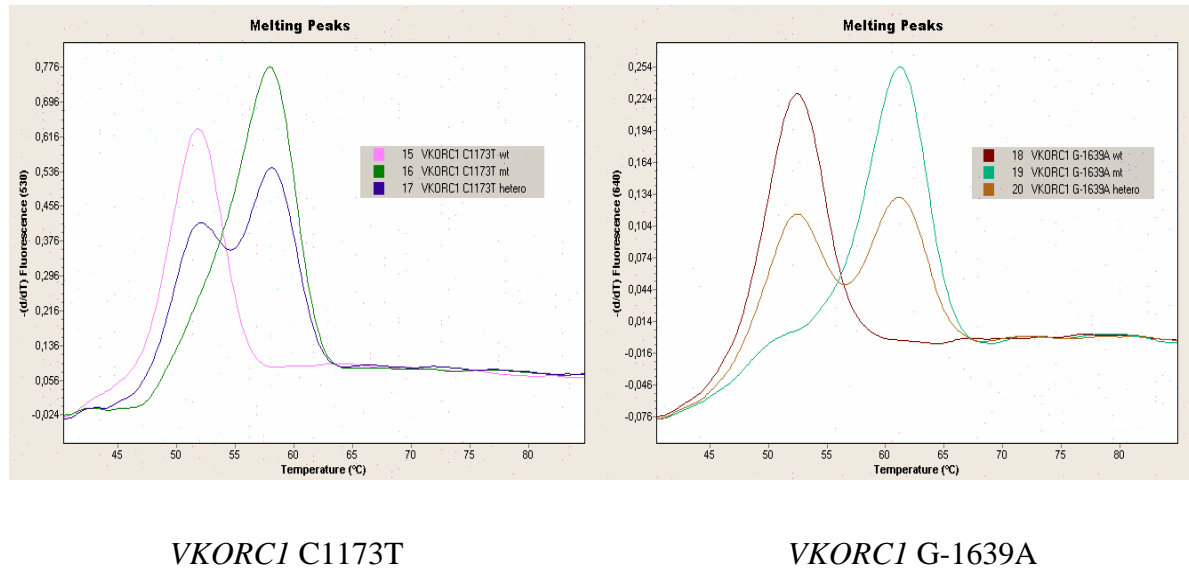
#### 3.7.4. VKORC1 G-1639A ve C1173T polimorfizmlerinin tespiti

VKORC1 geninin 176 ve 289 baz çifti uzunluğundaki araştırılan polimorfizmleri içeren kısımları spesifik primerler vasıtasıyla çoğaltılarak sırasıyla VKORC1 C1173T Simpleprobe ile tespit edilirken, VKORC1 G-1639A ise hibridizasyon probu tekniği (Şekil 3.4.) ile tespit edilmektedir.



**Şekil 3.4.** SimpleProb ve Hibridizasyon Prob Teknikleri.

*VKORC1* polimorfizmler “LightMix<sup>®</sup> for detection of human *VKORC1* C1173T and *VKORC1* G-1639A” kit (TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Germany) prosedürüne uygun şekilde tespit edilmiştir (Şekil 3.5.).



**Şekil 3.5.** *VKORC1* C1173T ve G-1639A Polimorfizmlerinin Eş Zamanlı PZR Analizindeki Görüntüleri.

Kit prosedürüne göre reaksiyonun hazırlanması:

Kit içeriğinde, her biri 16 reaksiyonluk karıştırılmış ve liyofilize edilmiş primerler ve hibridizasyon probu içeren 6 adet kırmızı kapaklı tüp bulunmaktadır. İnsan *VKORC1* C1173T ve *VKORC1* G-1639A genotiplerini (yabanıl tip, heterozigot, mutant) içeren 6 adet renksiz kapaklı kontrol DNA tüpü kit içerisinde yer almaktadır.

**Parametre-spesifik reaktiflerin hazırlanması (16 reaksiyon):**

Kırmızı kapaklı bir reaktif tüpü, 16 reaksiyonluk çalışmanın gerçekleşmesi için gereken tüm primer ve problemleri içermektedir. Reaktif tüpüne 66µl PZR-grade suyundan ilave edilir, solüsyon vorteks ile karıştırılır ve santrifüj ile spin edilir.

\* 20µl'lik bir PZR reaksiyonu için 4µl reaktif kullanılır.

**Kontrol DNA'nın hazırlanması:**

Renksiz kapaklı tüpe 40µl PZR-grade suyu ilave edilir. İzole edilmiş olan DNA 10 kez pipetaj yapılarak solüsyona karıştırılır.

\* 20 µl'lik bir PCR reaksiyonu için 5µl kontrol DNA kullanılır.

Reaksiyon karışımının hazırlanması Çizelge 3.8.'de özetlenmiştir.

Tek reaksiyon	Bileşenler
8.2 µl	Su, PCR-grade (renksiz kapak, Roche FastStart kit ile birlikte sağlanmaktadır)
0.8 µl	25 mM Mg <sup>2+</sup> solüsyonu (mavi kapaklı, Roche FastStart kit ile birlikte sağlanmaktadır)
4.0 µl	Reaktif miksi (primer ve problemleri içeren parametre spesifik reaktifler)
2.0 µl	Enzim Miksi (FastStart mix- kırmızı kapaklı)
15 µl	Toplam reaksiyon hacmi

**Çizelge 3.8.** *VKORC1* C1173T ve G-1639A reaksiyon karışımının hazırlanması

### Reaksiyon karışımının hazırlanması:

Soğutulan reaksiyon tüpünde, tek bir reaksiyon için reaktiflerin her birinden ekleyip hacmini reaksiyon sayısı kadar çoğaltarak, reaksiyon karışımı hazırlanır.

Hazırlanan karışım, santrifüjde spin ettirilir ve kapilerlere her bir reaksiyon için 15µl reaksiyon karışımından transfer edilir. Her bir kapilere 5µl örnekten ilave edilerek son hacim 20µl olarak elde edilir.

### Programlama:

Protokol dört program basamağı içermektedir.

- 1: Denatürasyon: Örneklerin denaturasyonu ve enzim aktivitesi
- 2: Döngü: Hedef DNA' nın PCR- amplifikasyonu
- 3: Erime Analizi (Melting): Hedef DNA' dan çoğalan PCR ürünlerinin tanımlanması için erime eğrisi analizi
- 4: Soğutma: Cihazın soğuması

Sıcaklık prosedürü denatürasyon için 95°C' de 10 dakika, çoğaltma için 95°C' de 5 saniye, 60°C' de 10 saniye, 72°C' de 15 saniye tutulur ve döngü 45 kez tekrarlanır. Erime eğrisi için 95°C' de 20 saniye, 40°C' de 20 saniye tutulur ve 0.2°C' lik artışla 85°C' ye kadar ısıtır; kısa bir soğutma prosedürü için 40°C' de 30 saniye tutulur (Çizelge 3.9.).

Program	Denatürasyon	Döngü			Erime (Melting)			Soğuma
Parametre								
Analiz Modu	None	Ölçme Modu			Erime Eğrisi Modu			None
Döngü	1	45			1			1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1
Hedef Sıcaklık (°C)	95	95	60	72	95	40	85	40
Tutulma Süresi (sa:dk:sn)	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:15	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30
Ramp Oranı [°C/sn]	20	20	20	20	20	20	0.2	20

### Çizelge 3.9. VKORC1 G-1639A ve C1173T Tespitinde Sıcaklık Prosedürü

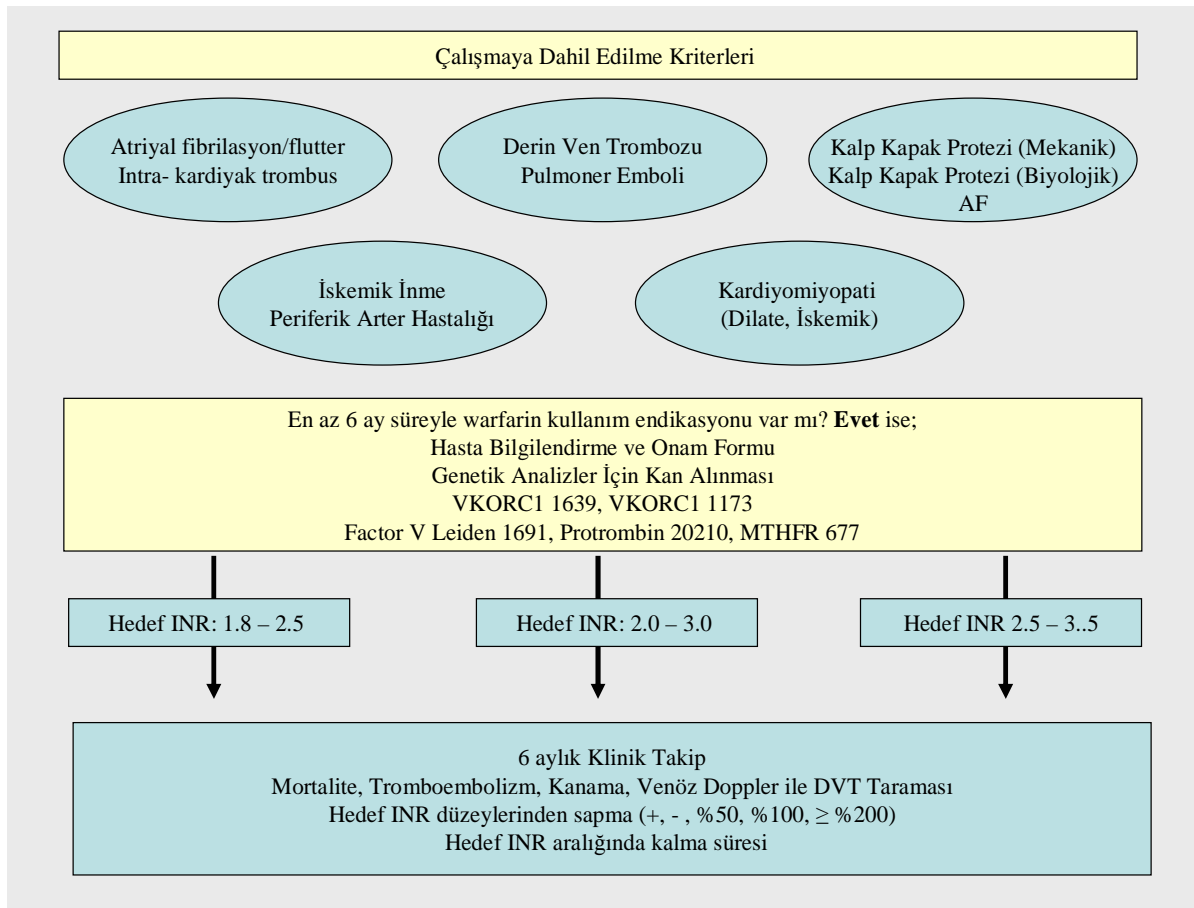
#### Sonuç ve Değerlendirme:

LightCycler® eş zamanlı PZR cihazında “Color Compensation” (renk dengeleme) modu açılır. LightCycler® cihazının kullanım kitapçığında tanımlandığı gibi veri analizi yapılmaktadır. VKORC1 C1173T ve VKORC1 G-1639A genotipleri, spesifik erime noktalarında (Tm)

Melting Curve Modunda (LightCycler® 1.x cihazı) veya “Tm Calling” Analiz modunda (LightCycler® 2.0/ 480 cihazı) çalışmasıyla tanımlanmaktadır. Yabancıl tip *VKORC1* C1173T, 51.8 °C’lik erime noktasında Kanal 530’da, yabancıl tip *VKORC1* G-1639A ise 52.6 °C’lik erime noktasında Kanal 640’da analiz edilmektedir. Allel varyantı *VKORC1* C1173T, 51.8°C’lik erime noktasında Kanal 530’da, allel varyantı *VKORC1* G-1639A ise 61.3°C’lik erime noktasında Kanal 640’da ortaya çıkmaktadır.

### 3.8. İstatiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS istatistik programı (SPSS version 13.0; SPSS Inc;Chicago, Illinois) kullanılarak yapıldı. Kategorik değişkenler gruptaki hasta sayısı ve yüzde değeri olarak ifade edildi.



Şekil 3.6. Çalışma Akış Diyagramı

AF, atriyal fibrilasyon; *VKORC1*, vitamin K epoksi redüktaz enzimini kodlayan gen; INR, uluslararası normalize oran

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'nda tedavi görmekte olan 120 varfarin kullanan olguda genotip dağılımının belirlenmesi amacıyla *VKORC1* G-1639A ve trombojenik faktörler (FVL, Protrombin ve MTHFR) eş zamanlı PZR yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Çalışmaya katılan 120 hastanın 47'si erkek, 73'ü kadın olup yaş ortalamaları ise  $52.7 \pm 13.7$  olarak saptanmıştır.

Çalışmadaki genotip oranlarına göre yapılan Hardy-Weinberg Dengesinin kontrolünde varfarin kullanan hasta popülasyonu dengede bulunmuştur. Hardy-Weinberg Dengesi, Ki-Kare testiyle kontrol edilmiştir (Çizelge 3.10.).

Polimorfizmler	$\chi^2$ değeri	p-değeri
VKORC1 G-1639A	4.71	0.09
FVL (G1691A)	0.87	0.64
Protrombin (G20210A)	0.03	0.86
MTHFR (C677T)	2.01	0.37

**Çizelge 3.10.** Hasta popülasyonunun Hardy-Weinberg Dengesinde olduğunun gösterimi.

*VKORC1* G-1639A ve C1173T polimorfizmleri incelendiğinde, -1639 AA genotipine sahip bireylerin 1173 TT genotipiyle, -1639 GA genotipine sahip bireylerin 1173 CT genotipiyle ve -1639 GG genotipine sahip bireylerin 1173 CC genotipiyle ilişkili olduğunu bulunmuştur. Literatürde daha önceden rapor edilmiş olan *VKORC1* G-1639A ve C1173T polimorfizmleri arasındaki tam bağlantı (%100) bu çalışma hasta grubunda da tespit edilmiştir. Hasta grubunda *VKORC1* -1639 polimorfizm için yabancı tip (GG) olgu sayısı 39 (%32.5), GA heterozigot olgu sayısı 48 (%40) ve AA homozigot olgu sayısı 33 (%27.5) olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.11.).

Hasta grubunda incelenen FVL (G1691A) gen mutasyonu için yabancı tip (GG) 88 (%73.3) olguda tespit edilirken GA ve AA genotipleri sırasıyla 28 (%23.3) ve 4 (%3.4) olguda tespit edilmiştir. Protrombin (G20210A) gen mutasyonunun hasta grubu içerisindeki dağılımı GG genotipi için 108 (%90) ve GA genotipi için 12 (%10)' dir. Protrombin AA genotipi ise tespit

edilememiştir. MTHFR (C677T) gen mutasyonunda CC, CT ve TT genotip dağılımı sırasıyla 57 (%47.5), 56 (46.6) ve 7 (5.9) olarak bulunmuştur (Çizelge 3.11.). Varfarin kullanan hasta grubunda FVL polimorfizminin taşınması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Ki-Kare testine göre p=0,0004).

**Çizelge 3.11.** Olguların genotip frekansları ile ilgili veri seti (n = 120).

Değişkenler	Hasta Grubu (n = 120)	VE-Kardiyak* (n = 90)	VE-Vasküler ‡ (n = 30)	ρ değeri	Estimate	CI (%95)
<b>VKORC1</b>						
G-1639A, n (%)						
GG	39 (32.5)	30 (33.3)	9 (30.0)	0.736	1.167	0.476-2.857
GA	48 (40.0)	37 (41.1)	11 (36.7)			
AA	33 (27.5)	23 (25.6)	10 (33.3)			
<b>Factor V Leiden (G1691A), n (%)</b>						
GG	88 (73.3)	72 (80.0)	16 (53.4)	0.005	3.500	1.446-8.471
GA	28 (23.3)	18 (20.0)	10 (33.3)			
AA	4 (3.4)	–	4 (13.3)			
<b>Prothrombin (G20210A), n (%)</b>						
GG	108 (90.0)	83 (92.2)	25 (83.3)	0.169	2.371	0.692-8.127
GA	12 (10.0)	7 (7.8)	5 (16.7)			
AA	–	–	–			
<b>MTHFR (C677T), n (%)</b>						
CC	57 (47.5)	41 (45.6)	16 (53.4)	0.822	0.824	0.151-4.483
CT	56 (46.6)	44 (48.9)	12 (40.0)			
TT	7 (5.9)	5 (5.5)	2 (6.6)			

#### VE, Varfarin Endikasyonu

Değerler sayı ve yüzde olarak ifade edilmiştir.

\*Varfarin Endikasyonu-Kardiyak grup, Kalp kapak replasmanı ve atriyel fibrilasyon grubunu oluşturmaktadır.

‡ Varfarin Endikasyonu-Vasküler grup ise, geçirilmiş derin ven trombozu ve/veya pulmoner emboli grubunu oluşturmaktadır.

P değeri, estimate ve CI (%95 güven aralığı) verileri Mantel-Haenszel testi kullanılarak hesaplanmıştır.

Bu çalışmada, *VKORC1* G-1639A polimorfizmini taşıyan, varfarin kullanan hastaların %10.8'inde kanama komplikasyonu ve %5'inde tromboembolizm tespit edilmiştir. AA genotipine sahip 33 olguda yapılan toplam 198 INR ölçümünde 20 (%10.10) defa hedef INR değerinden sapma tespit edilmiştir. GG ve GA genotiplerine sahip bireylerde ise hedef INR değerinden sapma oranı sırasıyla %6.41 ve %6.59 olarak tespit edilmiştir.



*VKORC1* genotipleri açısından normal genotipe (-1639 GG) sahip olguların günlük doz gereksinimi, heterozigot (-1639 GA) ve homozigot (-1639 AA) genotipe sahip bireylere göre daha fazladır ( $p=0,015$ ). Aynı şekilde *VKORC1* geni için homozigot mutant (-1639 AA) olgularda günlük varfarin doz gereksinimi 3.6 mg olup normal olgulara göre 1.7 mg daha az olarak bulunmuştur (Çizelge 3.12.). Varfarin kullanan hasta grubunda hemoraji komplikasyonu ile *VKORC1* mutasyonu taşımasının ilişkili (Ki- kare testine göre  $p=0,013$ ) olduğu tespit edilmiştir.

**Çizelge 3.12.** Olguların klinik takiplerinde *VKORC1*, G-1639A genotipine göre karşılaştırılması.

<i>VKORC1</i> , G-1639A	GG genotipi (n = 39)	GA genotipi (n = 48)	AA genotipi (n = 33)	$\rho$ değeri
Kanama*	3 / 39 (7.7)	2 / 48 (4.2)	8 / 33 (24.2)	0.013
Tromboembolizm §	2 / 39 (5.1)	3 / 48 (6.3)	1 / 33 (3.0)	0.807
Kanama ve TE	5 / 39 (12.8)	5 / 48 (10.4)	9 / 33 (27.3)	0.102
Hedef INR değerinden sapma	15 / 234 (6.41)	19 / 288 (6.59)	20 / 198 (10.1)	0.127
Haftalık varfarin dozu (mg)	37.3 ± 13.6	31.7 ± 7.8	25.2 ± 9.2	0.015

TE, Tromboembolizm

\* Takiplerde kanama komplikasyonunun (hemorajik olay) gelişmesinin dokümanite edilmesi için; tekrarlayan epistaksis veya periodontal kanamalar (ikiden fazla) veya transfüzyon /hospitalizasyon gerektirmeyen gastrointestinal kanama, dokümanite edilmiş geniş perikardiyal effüzyon (ekokardiyografide >1 cm.'den geniş), hospitalizasyon, kan transfüzyonu, cerrahi veya endoskopik girişim gerektiren gastrointestinal kanama, girişim gerektiren kardiyak tamponad, retroperitoneal kanama, dokümanite edilmiş santral sinir sistemi hemorajisi (serebro-vasküler olay) ve ölümcül kanama şeklinde kategorize edilerek tanımlanmıştır.

§ Takiplerde tromboembolizm gelişmesinin dokümanite edilmesi için; ekokardiyografi ile protez kapak komşuluğunda obstrüksiyona neden olmayan trombüs varlığının gösterilmesi, dokümanite edilmiş periferik ekstremitte veya solid organ embolizasyonu, dokümanite edilmiş santral sinir sistemi embolizasyonu (transiyel iskemik atak veya serebro-vasküler olay), protez kapak trombozu, trombolitik tedavi veya acil operasyon gerektiren durumlar ve ölümcül tromboemboli şeklinde kategorize edilerek tanımlanmıştır.

Φ Hastaların 6-aylık takiplerinde her hasta için en az 6 kez INR değeri ölçülmüştür. Medikal endikasyon mevcut ise her hasta için 6'dan fazla ölçüm gerçekleştirilmiştir.

Hasta grubunda kanama ve tromboembolizm komplikasyonlarının FVL, Protrombin ve MTHFR gen mutasyonlarına göre karşılaştırılması Çizelge 3.13., 3.14. ve 3.15.'de özetlenmiştir.

**Çizelge 3.13.** Olguların klinik takiplerinde FVL (G1691A) genotipine göre karşılaştırılması.

	FVL (G1691A)			p değeri
	GG genotipi (n = 88)	GA genotipi (n = 28)	AA genotipi (n = 4)	
Kanama *	10 / 88 (11.4)	3 / 28 (10.7)	0 / 4 (0.0)	0.774
Tromboembolizm §	6 / 88 (6.8)	0 / 28 (0.0)	0 / 4 (0.0)	0.317
Kanama ve TE	16 / 88 (18.2)	3 / 28 (10.7)	0 / 4 (0.0)	0.434
Hedef INR değerinden sapma	43 / 528 (8.1)	10 / 168 (5.9)	1 / 24 (4.2)	0.556
Haftalık varfarin dozu (mg)	30.9 ± 10.8	35.7 ± 13.7	30.0 ± 0.0	

TE, Tromboembolizm

\* Takiplerde kanama komplikasyonunun (hemorajik olay) gelişmesinin dokümanite edilmesi için; tekrarlayan epistaksis veya periodontal kanamalar (ikiden fazla) veya transfüzyon /hospitalizasyon gerektirmeyen gastrointestinal kanama, dokümanite edilmiş geniş perikardiyal effüzyon (ekokardiyografide >1 cm.'den geniş), hospitalizasyon, kan transfüzyonu, cerrahi veya endoskopik girişim gerektiren gastrointestinal kanama, girişim gerektiren kardiyak tamponad, retroperitoneal kanama, dokümanite edilmiş santral sinir sistemi hemorajisi (serebro-vasküler olay) ve ölümcül kanama şeklinde kategorize edilerek tanımlanmıştır.

§ Takiplerde tromboembolizm gelişmesinin dokümanite edilmesi için; ekokardiyografi ile protez kapak komşuluğunda obstrüksiyona neden olmayan trombüs varlığının gösterilmesi, dokümanite edilmiş periferik ekstremitte veya solid organ embolizasyonu, dokümanite edilmiş santral sinir sistemi embolizasyonu (transiyel iskemik atak veya serebro-vasküler olay), protez kapak trombozu, trombolitik tedavi veya acil operasyon gerektiren durumlar ve ölümcül tromboemboli şeklinde kategorize edilerek tanımlanmıştır.

Φ Hastaların 6-aylık takiplerinde her hasta için en az 6 kez INR değeri ölçülmüştür. Medikal endikasyon mevcut ise her hasta için 6'dan fazla ölçüm gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 3.14.** Olguların klinik takiplerinde Protrombin (G20210A) genotipine göre karşılaştırılması.

	Protrombin (G20210A)		
	GG genotipi (n = 108)	GA genotipi (n = 12)	ρ değeri
Kanama *	11 / 108 (10.2)	2 / 108 (1.8)	0.493
Tromboembolizm §	6 / 108 (5.5)	0 / 108 (0.0)	0.402
Kanama ve TE	17 / 108 (15.7)	2 / 108 (1.8)	0.934
Hedef INR değerinden sapma	49 / 648 (7.6)	5 / 72 (6.9)	0.998
Haftalık varfarin dozu (mg)	32.3 ± 11.6	29.2 ± 11.3	

TE, Tromboembolizm

\* Takiplerde kanama komplikasyonun (hemorajik olay) gelişmesinin dokümanite edilmesi için; tekrarlayan epistaksis veya periodontal kanamalar (ikiden fazla) veya transfüzyon /hospitalizasyon gerektirmeyen gastrointestinal kanama, dokümanite edilmiş geniş perikardiyal effüzyon (ekokardiyografide >1 cm.'den geniş), hospitalizasyon, kan transfüzyonu, cerrahi veya endoskopik girişim gerektiren gastrointestinal kanama, girişim gerektiren kardiyak tamponad, retroperitoneal kanama, dokümanite edilmiş santral sinir sistemi hemorajisi (serebro-vasküler olay) ve ölümcül kanama şeklinde kategorize edilerek tanımlanmıştır.

§ Takiplerde tromboembolizm gelişmesinin dokümanite edilmesi için; ekokardiyografi ile protez kapak komşuluğunda obstrüksiyona neden olmayan trombüs varlığının gösterilmesi, dokümanite edilmiş periferik ekstremitte veya solid organ embolizasyonu, dokümanite edilmiş santral sinir sistemi embolizasyonu (transiyel iskemik atak veya serebro-vasküler olay), protez kapak trombozu, trombolitik tedavi veya acil operasyon gerektiren durumlar ve ölümcül tromboemboli şeklinde kategorize edilerek tanımlanmıştır.

Φ Hastaların 6-aylık takiplerinde her hasta için en az 6 kez INR değeri ölçülmüştür. Medikal endikasyon mevcut ise her hasta için 6'dan fazla ölçüm gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 3.15.** Olguların klinik takiplerinde MTHFR (C677T) genotipine göre karşılaştırılması.

	MTHFR (C677T)			p değeri
	CC genotipi (n = 57)	CT genotipi (n = 56)	TT genotipi (n = 7)	
Kanama *	5 / 56 (8.9)	6 / 56 (10.7)	2 / 56 (3.5)	0.282
Tromboembolizm §	2 / 56 (3.6)	4 / 56 (7.1)	0 / 56 (0.0)	0.555
Kanama ve TE	7 / 56 (12.5)	10 / 56 (17.8)	2 / 56 (3.5)	0.457
Hedef INR değerinden sapma	24 / 342 (7.0)	28 / 336 (8.3)	2 / 42 (4.8)	0.775
Haftalık varfarin dozu (mg)	30.9 ± 9.8	33.5 ± 11.8	29.8 ± 20.7	

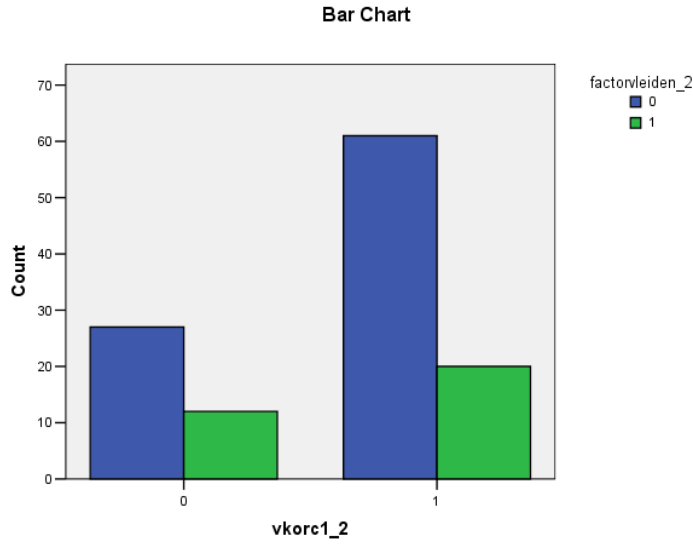
TE, Tromboembolizm

\* Takiplerde kanama komplikasyonun (hemorajik olay) gelişmesinin dokümanite edilmesi için; tekrarlayan epistaksis veya periodontal kanamalar (ikiden fazla) veya transfüzyon /hospitalizasyon gerektirmeyen gastrointestinal kanama, dokümanite edilmiş geniş perikardiyal effüzyon (ekokardiyografide >1 cm.'den geniş), hospitalizasyon, kan transfüzyonu, cerrahi veya endoskopik girişim gerektiren gastrointestinal kanama, girişim gerektiren kardiyak tamponad, retroperitoneal kanama, dokümanite edilmiş santral sinir sistemi hemorajisi (serebro-vasküler olay) ve ölümcül kanama şeklinde kategorize edilerek tanımlanmıştır.

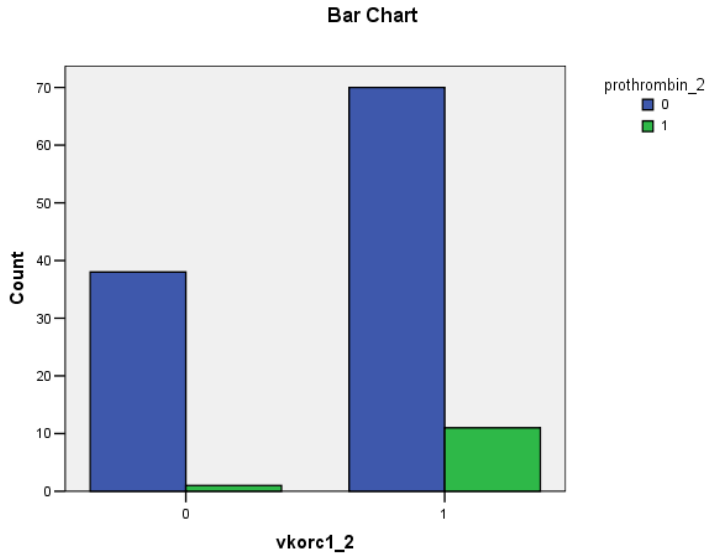
§ Takiplerde tromboembolizm gelişmesinin dokümanite edilmesi için; ekokardiyografi ile protez kapak komşuluğunda obstrüksiyona neden olmayan trombüs varlığının gösterilmesi, dokümanite edilmiş periferik ekstremitte veya solid organ embolizasyonu, dokümanite edilmiş santral sinir sistemi embolizasyonu (transiyel iskemik atak veya serebro-vasküler olay), protez kapak trombozu, trombolitik tedavi veya acil operasyon gerektiren durumlar ve ölümcül tromboemboli şeklinde kategorize edilerek tanımlanmıştır.

Φ Hastaların 6-aylık takiplerinde her hasta için en az 6 kez INR değeri ölçülmüştür. Medikal endikasyon mevcut ise her hasta için 6'dan fazla ölçüm gerçekleştirilmiştir.

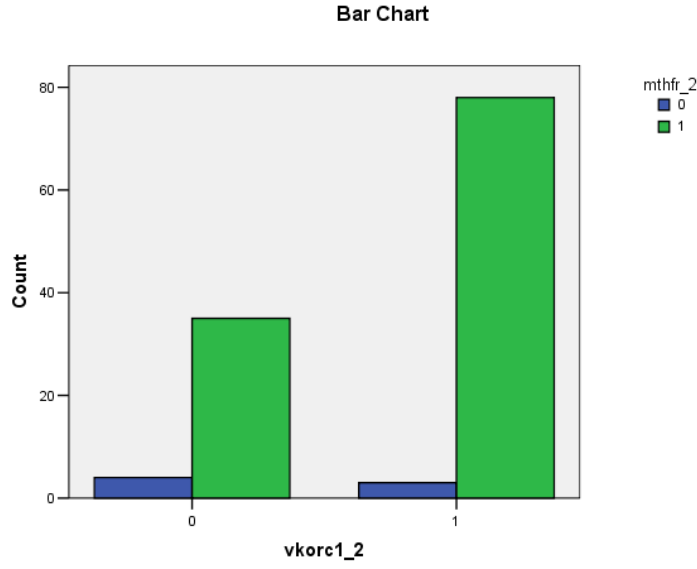
Hasta popülasyonunda *VKORC1* (G-1639A) gen polimorfizminin trombojenik gen polimorfizmleri (FVL, Protrombin ve MTHFR) ile olan etkileşiminin, hastaların 6 aylık takiplerinde görülen tromboz ve hemoraji komplikasyonları ile ilişkilendirilmesine açısından incelendiğinde aralarında bir ilişki kurulamamış ve birbirinden bağımsız oldukları bulunmuştur (Şekil 3.7., 3.8. ve 3.9.).



**Şekil 3.7.** *VKORC1* (G-1639A) ile FVL arasındaki ilişkinin gösterimi  
0: FVL yabancı tip bireyler, 1: FVL heterozigot ve homozigot bireyler



**Şekil 3.8.** *VKORC1* (G-1639A) ile Protrombin arasındaki ilişkinin gösterimi  
0: Protrombin yabancı tip bireyler, 1: Protrombin heterozigot ve homozigot bireyler



**Şekil 3.9.** *VKORC1* (G-1639A) ile MTHFR arasındaki ilişkinin gösterimi  
0: MTHFR yabani tip bireyler, 1: MTHFR heterozigot ve homozigot bireyler

Polimorfizm	Odds Ratio	%95 CI	$\rho$ değeri
VKORC1 & FVL	0.74	[0.3162; 1.7208]	0.48
VKORC1 & Prothrombin	5.97	[0.7423; 48.0310]	0.09
VKORC1 & MTHFR	2.97	[0.6312; 13.987]	0.17

**Çizelge 3.16.** *VKORC1* (G-1639A) ile trombojenik gen polimorfizmlerinin arasındaki ilişkinin sorgulanması

Varfarin kullanan hastalarda FVL, Protrombin ve MTHFR gen mutasyonlarının varfarin kullanmayan sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında hasta grubunda FVL gen mutasyonunun sağlıklı bireylere göre taşıma oranının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (%20.8; p=0.05).

	Varfarin Kullanan Hastalar (n=120)	Varfarin Kullanmayan Sağlıklı Bireyler (n=154)	OR	%95 CI	P değeri
<b>FVL</b>					
AA + GA	32 (20.8)	26 (16.9)	1.79	[0.9979; 3.2113]	0.05
GG	88 (57.1)	128 (83.1)			
<b>Protrombin</b>					
AA + GA	12 (7.8)	12 (7.8)	1.31	[0.5685; 3.0406]	0.52
GG	108 (70.1)	142 (92.2)			
<b>MTHFR</b>					
TT + CT	7 (4.5)	17 (11.0)	2.0	[0.8024; 5.0]	0.14
CC	113 (73.4)	137 (89.0)			

**Çizelge 3.17.** Varfarin Kullanan Hastalarda FVL, Protrombin ve MTHFR gen mutasyonlarının Varfarin Kullanmayan Sağlıklı Bireylerle Karşılaştırılması

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Farmakogenetik tanımlamalardaki ilerlemelerin paralelinde kişiye özgü ilaç ve doz şekillendirmesi son yıllarda ön plana çıkmıştır. Varfarin tedavisi sırasında oluşan hemorajik veya tromboembolik komplikasyonların tam anlamıyla kontrol altına alınması farmakogenetik alanındaki ilerlemelere bağlıdır. Bu çalışmada varfarin gereksinimi olan hastalarda INR düzeyleri, tromboembolik ya da hemorajik komplikasyonların takibi yapılarak tanımlanmış varfarin metabolizmasından sorumlu *VKORC1* genindeki G-1639A ve C1173T TNP'lerinin hasta gruplarında varfarin duyarlılığı ile olan korelasyonunun sorgulaması hedeflenmiştir.

Klinikte rutin kullanıma giren, trombozla ilişkilendirilmiş polimorfizmlerin en sık analiz edilenleri Faktör V Leiden, *MTHFR* 677C>T ve Protrombin G20210A mutasyonlarıdır. Bu çalışmada varfarin metabolizmasına etki eden *VKORC1* genindeki polimorfizmlerinin yanında, aynı hasta grubunda tanımlanan trombojenik gen polimorfizmlerinin de incelenmesi ile varfarin tedavisine olan etkilerini belirlemek amaçlanmıştır. Çalışmada, varfarin farmakogenetiği ile birlikte trombojenik panelin etkisini de beraber sorgulanmaktadır. Çalışmada farmakogenetik bilgilerin klinik uygulamalarda kullanılması amaçlanmıştır; bu sayede genotip kılavuzlu hastaya özel etkin tedavi protokollerinin oluşturulması hedeflenmiştir.

Bu hedef doğrultusunda *VKORC1* gen polimorfizmlerinin iki tanesi ve trombozla ilişkilendirilmiş klinik rutin kullanıma da giren polimorfizmlerin en sık analiz edilenleri FVL, *MTHFR* 677C>T, Protrombin G20210A, piyasada mevcut eş zamanlı PZR yöntemine dayalı tanı kitleri ile taranmıştır.

Çalışmada 120 varfarin kullanan olguda genotip dağılımının belirlenmesi amacıyla *VKORC1* G-1639A ve trombojenik faktörler (FVL, Protrombin ve *MTHFR*) eş zamanlı PZR yöntemi kullanılarak incelenmiştir. *VKORC1* ve trombojenik gen polimorfizmleri araştırılacak hastaların en az 6 ay süreli klinik takipleri gerçekleştirilmiştir.

Bugüne kadar yapılmış olan varfarin farmakogenetiği ile ilgili çalışmalarda varfarin ile ilişkili yaklaşık 30 gen bildirilmiştir. Bu genler arasında varfarin farmakodinamiğinde önemli bir rol oynayan *VKORC1*'in varfarin ilaç hedefi olarak tanımlanma çabaları (Li *et al.* 2004) varfarin kullanım dozu üzerindeki etkisini anlamak için teşvik edilmektedir. Varfarin, antikoagülan



etkisiyle tromboembolik olayların tedavisinde ve önlenmesinde tüm dünyada geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak ilaca karşı yanıt ilişkisi açısından bireyler arasında değişkenlik dikkat çekicidir ve varfarin tedavisinin uygulanması ve idaresi zordur (Rettie and Tai 2006, Rieder *et al.* 2005, Rost *et al.* 2004). Varfarin, karaciğerdeki vitamin K siklusuna etki ederek, indirgenmiş vitamin K'nın rejenerasyonunu kısıtlamaktadır ve böylece inaktif pıhtılaşma faktörlerinin aktifleşmesini engellemektedir. Varfarinin hedefinin "Vitamin K epoksit redüktaz (VKOR)" enzimi olduğu 30 yıl önce tanımlanmıştır (Bell *et al.* 1972, Bell 1978).

### **VKORC1 G-1639A ve C1173T Polimorfizmleri Arasında Tam Bağlantı Bulunmaktadır**

*VKORC1* G-1639A ve C1173T polimorfizmlerini incelendiğinde, -1639 AA genotipine sahip bireylerin 1173 TT genotipiyle, -1639 GA genotipine sahip bireylerin 1173 CT genotipiyle ve -1639 GG genotipine sahip bireylerin 1173 CC genotipiyle ilişkili olduğunu bulunmuştur. Literatürde daha önceden rapor edilmiş olan *VKORC1* G-1639A ve C1173T polimorfizmleri arasındaki tam bağlantı (%100) bu çalışmadaki hasta grubunda da tespit edilmiştir.

### **VKORC1 G-1639A ve C1173T Polimorfizmleri Hemoraji Komplikasyonu ile İlişkilidir**

Bu çalışmada varfarin endikasyonu 90 hastada kardiyak nedenlerle (mekanik kapak replasmanı, AF), 30 hastada ise vasküler nedenlerle (DVT, PTE) konan toplam 120 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta grubunda *VKORC1* -1639 polimorfizm için yabancı tip (GG) olgu sayısı 39 (%32.5), GA heterozigot olgu sayısı 48 (%40) ve AA homozigot olgu sayısı 33 (%27.5) olduğu bulunmuştur. Varfarin kullanan hasta grubunda hemoraji komplikasyonu ile *VKORC1* mutasyonu taşımasının ilişkili (Ki- kare testine göre  $p=0,013$ ) olduğu tespit edilmiştir.

Hasta popülasyonunda *VKORC1* (G-1639A) ile trombojenik gen polimorfizmleri (FVL, Protrombin ve MTHFR) arasında bir ilişki olup olmadığına bakıldığında aralarında bir ilişki kurulamamıştır ve birbirinden bağımsız oldukları bulunmuştur.

FV, koagülasyon sisteminin prokoagülan yönde değişimine neden olarak tromboz eğilimini attırmaktadır (Akar *et al.* 1998). FVL mutasyonunun sıklığı toplumlar ve ırklar arası farklılık göstermektedir. Avrupa popülasyonunda %4-5 oranında bu mutasyon saptanmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda en yüksek prevalans Kıbrıs Rum toplumunda (%13.3) ve İsveç'te (%14.7), en düşük prevalans ise Hollanda (%2.9) ve İtalya'da (%2.5) saptanmıştır (De *et al.* 1998). Ülkemiz ise mutasyonun en sık görüldüğü yerler arasındadır ve sağlıklı

bireylerdeki prevalansı %7.1 - %9.1 civarındadır (Akar *et al.* 1997, Gurgey *et al.* 1997, Ozbek *et al.* 1997). Yaptığımız çalışmada hasta grubunda incelenen FVL (G1691A) gen mutasyonu için yabancı tip (GG) 88 (%73.3) olguda tespit edilirken GA ve AA genotipleri sırasıyla 28 (%23.3) ve 4 (%3.4) olguda tespit edildi. **Varfarin gereksinimi olan hasta grubunda FVL polimorfizmini taşıması anlamlı bulunmuştur (Ki-Kare tetine göre p=0,0004).**

Otozomal dominant kalıtım gösteren Protrombin G20210A mutasyonu (Poort *et al.* 1996), trombotik riski yaklaşık olarak üç kat artırır. Bu mutasyonun genel dünya popülasyonunda %1-5 arasında değişen prevalansta olduğu tespit edilmiştir (Makris *et al.* 1997, Tosetto *et al.* 1999). Türkiye’de sağlıklı bireylerde yapılan prevalans çalışmasında ise %1.2 oranında olduğu görülmüştür (Akar *et al.* 1998, Ayyıldız *et al.* 2004). Bu çalışmada Protrombin (G20210A) gen mutasyonunun hasta grubu içerisindeki dağılımı GG genotipi için 108 (%90) ve GA genotipi için 12 (%10)’ dir. Protrombin AA genotipi tespit edilemedi. **Varfarin gereksinimi olan hasta grubunda Protrombin G20210A mutasyonunu taşıması açısından anlamlı bulunmamıştır (Ki-Kare testine göre p=0.160).**

MTHFR genindeki aminoasit değişimi sonucunda genin ifadesi olan enzimin termolabilitesi artmakta ve aktivitesi %50 oranında azalmaktadır (Ma *et al.*1996). MTHFR 677 C→T polimorfizmi ile enzim aktivitesinde yabancı tipe (CC) göre azalma gözlenmiştir. Böylece metilen tetrahidrofolat ürününde azalmasıyla birlikte homosisteininin metiyonine dönüşümü de azalmaktadır (Roiben and Ulrich 2003, Botto and Yang 2000). Plazmadaki orta dereceli homosistein seviyesindeki artış, koroner kalp hastalıklarında, miyokard enfarktüsünde, iskemik inme saptanmıştır ve venöz trombozda risk faktörü olduğu bulunmuştur (Rothenbacher *et al.* 2002, Wu *et al.*2001, Rigamonti *et al.*2002). Çalışmamızda MTHFR (C677T) gen mutasyonunda CC, CT ve TT genotip dağılımı sırasıyla 57 (%47.5), 56 (46.6) ve 7 (5.9) olarak bulundu. **Varfarin gereksinimi olan hasta grubunda MTHFR C677T mutasyonunu taşıması açısından anlamlı bulunmamıştır (Ki-Kare testine göre p=0.69).**

Bu çalışmada elde edilen bulguların literatür ile karşılaştırıldığında uyumlu olduğu görülmüştür. Günümüzde varfarin doz algoritmalarının çoğunluğunda genetik değişkenlik veya yaş, boy ve ağırlık gibi klinik bulguları göz ardı edildiği halde, potansiyel olarak yararlı bir doz algoritması belirleyebilmek için Sconce grubu genetik değişkenlikleri ve klinik karakteristikleri içine alan, 297 olgunun dahil edildiği bir retrospektif çalışma gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada yaşın ilerlemesi ile birlikte varfarin doz gereksiniminin

azaldığı, doz gereksinimin vücut ağırlığı, boy ve vücut yüzey alanı ile artış gösterdiği ifade edilmiştir. 20 ile 90 yaş arasında her 10 yılda bir ortalama varfarin günlük doz ihtiyacı 0.5 ile 0.7 mg arasında düşüş gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmada *VKORC1* -1639 ve 1173 polimorfizmlerinin genotip analizlerinin güçlü bir "*linkage disequilibrium*" olduğunu göstermişlerdir. *VKORC1* -1639 G>A genotiplendirmesinde G-1639 allel frekansı 0.57 ve A-1639 allel frekansı 0.43 olarak bulunmuştur. *VKORC1* -1639 G/G genotip frekansı %25, G/A genotip frekansı %56 ve A/A frekansı %19 olarak saptanmıştır. Ortalama varfarin doz ihtiyacı *VKORC1* G-1639A yabanıl (GG) genotipe göre AA genotipine sahip olgularda daha düşüktür (Sconce *et al.* 2005). Tez çalışmasında *VKORC1* G-1639A ve C1173T polimorfizmleri arasındaki tam bağlantı hasta grubunda da tespit edilmiştir. *VKORC1* genotip frekansları tez çalışmamızla uyumluluk göstermektedir.

*VKORC1* genindeki tekli nükleotid değişimleri (TNP), bireyler arasındaki varfarin doz değişkenliğiyle ilişkilidir. Avrupa, Asya ve Afrika kökenli hastalar arasındaki doz farklılığı *VKORC1* genindeki 1173C>T değişimiyle ilişkilidir (Bodin *et al.* 2005, D'Andrea *et al.* 2005, Geisen *et al.* 2005, Loebstein *et al.* 2007, Rieder *et al.* 2005, Veenstra *et al.* 2005, Yuan *et al.* 2005). Ortalama günlük varfarin doz 1173 CC formu taşıyan hastalarda yaklaşık 6 mg, CT formu taşıyan hastalarda yaklaşık 5 mg, TT formu taşıyan hastalarda yaklaşık 3 mg olarak belirlenmiştir (Rieder *et al.* 2005). Ortalama günlük varfarin doz bakımından karşılaştırıldığında çalışmamız ile uyumludur.

Promotor bölge polimorfizmi, *VKORC1*'in upstream bölgesinde -1639G>A polimorfizminin -1639. pozisyonda AA homozigot olan varfarin duyarlı hastalarda varfarine duyarlılıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Aksine, varfarin dirençli hastalarda heterozigot AG veya homozigot GG bulunmaktadır. AA genotipine sahip hastalarda düşük doz gereksinimi bulunduğu (ortalama: 1.19 mg/gün, aralık 0.71–1.50 mg/gün), heterozigot AG genotipi orta doz (ortalama: 8.04 mg/gün, aralık 6.07–10 mg/gün) ve homozigot GG genotipi yüksek doz (ort. 9.11 mg/gün, aralık 8.57–10 mg/gün) gereksinimine ihtiyaç olduğu gösterilmiştir (Yuan *et al.* 2005). Çalışmamızdaki veriler günlük varfarin doz gereksinimi açısından bu çalışma ile uyumlu değildir.

Zhu ve arkadaşları 2007 yılında *CYP2C9* ve *VKORC1* polimorfizmlerinin varfarin idame dozlarına etkisini değerlendiren bir retrospektif çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışmaya 65 beyaz hasta dahil edilmiş olup hepsi AF nedeni ile varfarin kullanmaktadır. Hedef INR değeri 2-3'tü. Çalışmada *VKORC1* G-1639A genotiplerinde günlük varfarin dozlarında anlamlı

farklılık bulmuşlardır: G/G genotipisi için (doğal tip) 6,3 mg, GA genotipisi için 4,3 mg ve AA genotipisi için 2,7 mg. Bu bulgu AA genotipisinin doğal tip genotipe göre daha az *VKORC1* eksprese ettiğini ve bu nedenle daha düşük idame dozları gerektirdiğini destekliyordu. Çalışmada *VKORC1* geninde G-1639A polimorfizmi genotip frekansları, GG için %52.3, AA için %35.4 ve AA için %12.3 olarak saptanmıştır (Zhu *et al.* 2007). **Bizim çalışmamızda *VKORC1* G-1639A GA genotip frekansı daha yüksek bulunmuştur.**

Geisen ve arkadaşları tarafından 200 sağlıklı kan vericisinde *VKORC1* haplotipinin kompozisyonu ve sıklığı değerlendirilmiştir. Aynı zamanda 50 kişilik hasta grubunda kumadin dirençli ve duyarlı hastalar analiz edilmiştir. Avrupa popülasyonunda üç haplotip, *VKORC1* genindeki genetik çeşitlilikle örtüşmektedir. Haplotip *VKORC1*\*2 düşük doz kumadin haplotip A ile ve haplotip *VKORC1*\*3 ve \*4 yüksek doz kumadin haplotip B ile ilişkilidir (Beyaz ırkta dağılımı *VKORC1*\*2 %42, *VKORC1*\*3 %38, *VKORC1*\*4 %20). Alman popülasyonunda yapılan bu çalışmada, 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 (Geisen *et al.* 2005). **Tez çalışmamızda elde ettiğimiz *VKORC1* genotip frekansları sonuçları ile belirgin bir fark görülmektedir.**

Haplotip *VKORC1*\*2 içerisinde yer alan -1639G>A polimorfizmi ile güçlü bir "*linkage disequilibrium*" (Bodin *et al.* 2005) olan -1173C>T polimorfizmi D' Andrea ve arkadaşları tarafından düşük doz varfarin gereksinimi ile birlikte tanımlanmıştır (D'Andrea *et al.* 2005). 1173C>T polimorfizminin fonksiyonel anlamı tanımlanamamasının aksine -1639G>A polimorfizmi anlamlı ölçüde promotör aktiviteyi azalttığı görülmüştür (Yuan *et al.* 2005). Bu nedenle haplotip *VKORC1*\*2' e etkisi yansıyan -1639G>A, kumadin gereksiniminde etnik gruplar arası farklılığın bir kısmını açıklamada ilgili TNP ile fonksiyonel olarak görünmektedir. Haplotip dağılımı, beyaz ırk ile karşılaştırılan, rapor edilen düşük-varfarin doz gereksinimiyle uyumlu olan Çinli örneklerde *VKORC1*\*2 için %95 insidansı göstermektedir (Geisen *et al.* 2005, Rieder *et al.* 2005, Oldenburg *et al.* 2007). Bunun tersine Afrika popülasyonunda yüksek ortalama varfarin gereksinimi Avrupa veya Çin popülasyonu ile karşılaştırıldığında, varfarin-duyarlı *VKORC1*\*2 haplotipinin frekansı daha azdır. Varsayılan eski alleller (*VKORC1*\*1 haplotipi) yalnız Afrika popülasyonunda var olduğu görülmektedir (Geisen *et al.* 2005, Loebstein *et al.* 2007, Rieder *et al.* 2005, Veenstra *et al.* 2005, Yuan *et al.* 2005, Rost *et al.* 2004, Oldenburg *et al.* 2007). *VKORC1* genindeki kumadin-duyarlı allellerinin hastadaki kombinasyonu antikoagülasyon kullanımında riski arttırmaktadır

(Schalekamp *et al.* 2006). **Tez çalışmamızda VKORC1 genindeki G-1639A polimorfizmi hasta grubunda %10.8 hemoraji komplikasyonu ile antikoagülasyon kullanımında riski arttırdığı tespit edilmiştir.**

2005 yılında MJ. Rieder ve arkadaşları tarafından yayınlanan bir çalışmada 10 genel kodlanmayan VKORC1 TNP (tekli nükleotid değişimi) ve ilişkili 5 önemli haplotip tanımlanmıştır. Uzun dönem varfarin tedavisi alan Avrupa-Amerikalı hastalarda düşük doz haplotip grubunu (A; H1 ve H2; yaklaşık 3 mg/gün) ve yüksek doz haplotip grubunu (B; H7, H8 ve H9; yaklaşık 6 mg/gün) tanımlamışlardır. Üç haplotip grup kombinasyonu arasında sürdürülen varfarin dozunda önemli farklılıklar gösterilmiştir (A/A: 2.7±0.2 mg/gün, A/B: 4.9±0.2 mg/gün, B/B: 6.2±0.3 mg/gün). Çalışmaya göre H1 ve H2 haplotipi daha düşük; H7, H8 ve H9 haplotipine sahip hastalar daha yüksek varfarin dozuna ihtiyaç duymaktadır. VKORC1 haplotip A ve B grupları varfarin doz değişkenliğinin yaklaşık %25'ini açıklamaktadır. Asyalı Amerikalılar yüksek oranda A grup haplotipine sahipken Afrikalı Amerikalılar B grup haplotipine sahiptir (Rieder *et al.* 2005). Hong Kong Çin popülasyonunda bireyler arasındaki varfarin doz değişkenliğinin, VKORC1 genotipinin dominant genetik etkisi olduğu vurgulanmıştır (Veenstra *et al.* 2005).

Leung ve arkadaşları tarafından toplam 35 hastanın katılımıyla yapılan çalışmada, FVL (n:15), Protrombin G20210A mutasyonu (n: 18) ve her iki gen mutasyonunu taşıyan (n:2) bireylerde VKORC1 G-1639A ve CYP2C9\*2, \*3 polimorfizmleri invader polimorfizm analizi yöntemi ile çalışılmıştır. VKORC1 -1639 polimorfizmi 5 hastada AA (FVL n:3 ve Protrombin n:2), 22 hastada GA (FVL n:9, Protrombin n:11 ve her ikisini taşıyan n:2) genotipi bulunmuştur. 35 hastanın 29'unda (%83) CYP2C9\*2 C/T, CYP2C9\*3 A/C, VKORC1 -1639 G/A ve/ veya A/A genotipleri tespit edilmiştir. Bu genotipleri taşıyan bireylerde varfarin hassasiyeti ve düşük doz ilaç gereksinimi bulunmaktadır (Leung *et al.* 2007). **Tez çalışmamız VKORC1 G-1639A ile FVL, Protrombin ve MTHFR gen mutasyonları arasında bir ilişki tespit edilememiştir.**

## 5.1. Türk Populasyonunda Yapılmış Diğer Çalışmalar

Türk populasyonunda daha önce yapılmış çalışmada *CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3*, *CYP2C9\*4*, *CYP2C9\*5* ve *VKORC1 -1639G>A* polimorfizmleri ile varfarin dozu ilişkilendirilmiştir. Varfarin tedavisi alan 205 hastada yapılan çalışmada *CYP2C9\*2* (Arg144Cys), *CYP2C9\*3* (Ile359Leu), *CYP2C9\*4* (Ile359Thr) and *CYP2C9\*5* (Asp360Glu) ve *VKORC1 3673G>A* polimorfizmleri pyrosequencing yöntemiyle genotiplendirilmiştir. Polimorfizmler ile hastanın aldığı varfarin dozu ilişkilendirilmiştir. Buna göre, *VKORC1 3673 AA* (homozigot) genotipi olan hastalarda haftada ortalama doz gereksinimi 25.83 mg olurken GG (yabani tip) genotipi olan bireylerde haftalık doz gereksinimi 43.18 mg olmaktadır (P<0.0001). Heterozigot (GA) genotipe sahip bireylerde haftalık ortalama doz 33.78 mg.'dır. Türk populasyonunda araştırılan polimorfizmlerin allel frekansları *VKORC1 3673 A* %50, *CYP2C9\*2* %13, *CYP2C9\*3* %10 ve *CYP2C9\*4* %1.0 olarak belirtilmiştir. Çalışılan hasta grubunda *CYP2C9\*5* tespit edilememiştir. Elde edilen allel frekans sıklıkları diğer populasyonlarla karşılaştırılmıştır (Öner *et al.* 2008). **Tez çalışmamız *VKORC1 -1639G>A* genotip frekansları ile benzerlik göstermektedir.**

Yapılmış olan diğer bir çalışmada da, hem sağlıklı hem de varfarin kullanan toplam 434 bireyde *VKORC1 -1639G>A* ve *CYP2C9 430 C>T* ve *1075 A>C* polimorfizmleri PZR-RFLP yöntemiyle tespit edilerek varfarin tedavisinde bu genlerin etkinliğini araştırılmıştır. Elde edilen *VKORC1* geni -1639 G>A polimorfizminin genotip dağılımı %27.6 GG, %48.4 GA ve %24 AA olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, varfarin kullanan olgularda ortalama günlük varfarin doz miktarı ile *VKORC1* ve *CYP2C9* genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunduğu, bu genlerdeki polimorfizmlerin ve yaş faktörünün bireylerarasında %29 oranında varfarin doz değişkenliğinde etkili olduğu istatistiksel olarak tespit edilmiştir (Atlı 2008). Tez çalışmamız *VKORC1 -1639G>A* genotip frekansları ile benzerlik göstermektedir.

**Çizelge 3.18.** Çalışmamızda Tespit Edilen *VKORC1* G-1639A Gen Polimorfizm Oranlarının Diğer Popülasyonlarla Kıyası

Araştırmacı/Yıl	Popülasyon	VKORC1 G-1639A		
		GG (%)	GA (%)	AA (%)
Yuan ve arkadaşları/2005	Avrupa	39.1	46.7	14.2
Sconce ve arkadaşları/2005	Avrupa	25	56	19
Geisen ve arkadaşları/2005	Avrupa	34	48	18
Zhu ve arkadaşları/2007	Avrupa	52.3	35.4	12.3
Özgen ve arkadaşları/2008	Türkiye	28.8	42.4	28.8
Atlı 2008	Türkiye	27.6	48.4	24
Tez Çalışmamız	Türkiye	32.5	40.0	27.5

## 5.2. Sonuç ve Öneriler

Bireysel tıp bağlamında “*kişisel ilaç terapisi dönemi*”ne girmeye başladığımız çok az sürenin kaldığı bugünlerde, hastaya verilecek en iyi ilaç seçiminin yanı sıra hasta için en etkili ve güvenli dozajın da ayarlanabilmesi amacıyla yapılan çalışmalar hızla sürmektedir. Dünyada oral antikoagülan ilaçlar içinde sıklıkla tercih edilen ilaç varfarindir. Varfarin kullanım endikasyonu olan hastalarda ilaç doz/yanıt değişkenlik faktörü toplumlara göre 10-20 arasında değişmektedir. Uygun olmayan doz ayarlamalarının sonuçları ise katastrofik olabilmektedir. Hastaya erken dönemde ve idamesinde uygun varfarin dozunun belirlenmesinde, INR düzeylerinin terapötik tedavi aralığında en uzun süreyle kalmasının sağlanmasında genetik düzeyde moleküler bilgilere gereksinim duyulmaktadır. *VKORC1* genindeki varfarine duyarlılık veya direnç yarattığı belirlenmiş tekli nükleotid polimorfizmlerinin varlığına bağlı olarak yine varfarin doz ayarlanmasının yapılması için genomik bileşenleri de içeren doz algoritmalarının oluşturulmasına imkan sağlayacaktır. Bu nedenle Türk popülasyonunda etkin varfarin dozunun belirlenmesi için antikoagülan kullanım öncesinde kişinin direnç veya duyarlılıkla ilgili olan gen bölgesi tespit edilmelidir, farmakogenetikteki gelişmelerin paralelinde, gen bölgelerindeki direnç ve duyarlılıktan sorumlu polimorfizmlere özgün üretilecek tanı testleri, kişiye özel tedavide hızlı, kolay ve etkili bir yöntem geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Stabil varfarin dozu ve etkin antikoagülan etki sağlamak amacıyla mevcut kişiye özgü doz algoritması modellerindeki eksiklikler giderilerek güvenli ve etkin

varfarin kullanımını sağlayacaktır.

Farmakogenomik konusunda yapılan çalışmalar sayesinde, ilaca yanıt verenler/vermeyenleri, ters etki oluşan/oluşmayanları gösterebilen, sırasıyla etkinliğe ve güvenliğe yönelik testler oluşturmak üzerinde yoğunlaşılmıştır. Yapılan çalışmalar ışığında varfarin direncinden ve hassasiyetinden sorumlu tekli nükleotid polimorfizmlerinin tanımlanması sonrasında, ilerleyen sreğ içerisinde varfarin direncini ve hassasiyetini tanımlamaya yönelik biyoteknoloji tanı panellerinin ortaya konulması mümkün olabilecektir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda trombozla ilişkilendirilmiş çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır. Klinik rutin kullanıma da giren bu polimorfizmlerin en sık analiz edilenleri FVL, *MTHFR* 677C>T ve Protrombin G20210A mutasyonlarıdır. Halen sürdürülmekte olan varfarin ilişkili farmakogenotip çalışmalarında trombojenik genotip bilgilerinin araştırılmadığı gözlenmiştir. Bu ihtiyaç göz önüne alınarak yapılan çalışmamızda trombojenik faktörlerin *VKORC1* geni ile olan ilişkisi araştırılarak anlamlı bir ilişki aranmıştır. Diğer taraftan *VKORC1* genindeki G-1639A ve C1173T polimorfizmleri hemoraji komplikasyonu ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Böylece varfarin kullanım gereksinimi olan hastalarda yapılan testler sonucunda hemoraji komplikasyonu ile ilişkili polimorfizmler saptandığında hastaya daha düşük doz varfarin başlatılabilir. Sonuçta farmakogenetik bilgilerin klinik uygulamalarda kullanılmaya başlaması ile hastaların klinik tedavi ve takiplerinde yaşanan zorluklara yardımcı olunabilecektir.



## KAYNAKLAR

- Akar, N., Akar, E., Dalgin, G., Sozuoç, A., Omurlu, K., Cin, S. 1997. Frequency of Factor V (1691 G --> A) mutation in Turkish population. *Thromb Haemost*, 78(6):1527-1528.
- Akar, N., Akar, E., Mısıroğlu, M., Avcu, F., Yalçın, A., Cin, S. 1998. Searching for Genetic Factors Favoring Thrombosis in Turkish Population. *Thrombosis Research*, 92:79-82.
- Aguilar, D., Goldhaber, SZ. 1999. Clinical uses of low-molecular-weight heparins. *Chest*, 115:1418-1423.
- Anonymous. 1996. Adjusted-dose warfarin versus low-intensity, fixed-dose warfarin plus aspirin for high-risk patients with atrial fibrillation: Stroke Prevention in Atrial Fibrillation III randomised clinical trial. *Lancet*, 348(9028):633-638.
- Ansell, JE., Patel, N., Ostrovsky, D., Nozzolillo, E., Peterson, AM., Fish, L. 1995. Long-term patient self-management of oral anticoagulation. *Arch Intern Med*, 155(20):2185-2189.
- Atlı, E. 2008. Warfarin Kullanan Olgularda CYP2C9 ve VKORC1 Genlerindeki Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin (SNP) İncelenmesi.
- Atrial Fibrillation Investigators. 1994. Risk factors for stroke and efficacy of antithrombotic therapy in atrial fibrillation: analysis of pooled data from five randomized controlled trials. *Arch Intern Med*, 154, 1449-1457.
- Bell, RG., Sadowski, JA., Matschiner, JT. 1972. Mechanism of action of warfarin. Warfarin and metabolism of vitamin K 1. *Biochemistry*, 11(10):1959-1961.
- Bell, RG. 1978. Metabolism of vitamin K and prothrombin synthesis: anticoagulants and the vitamin K-epoxide cycle. *Fed Proc*, 37(12):2599-2604.
- Berkner, KL. 2005. The vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev Nutr*, 25:127-149.
- Bingham, JB., Meyer, OO., Pohle, FJ. 1941. Studies on the hemorrhagic agent 3,3<sup>1</sup> methylene bis (4-hydroxy coumarin): I Its effect on the prothrombin and coagulation time of the blood of dogs and humans. *Am J Med Soc*, 202:563.
- Bodin, L., Verstuyft, C., Tregouet, DA., Robert, A., Dubert, L., Funck-Brentano, C., *et al.* 2005. Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood*, 106(1):135-140.
- Booth, SL., Centurelli MA. 1999. Vitamin K: a practical guide to the dietary management of patients on warfarin. *Nutr Rev*, 57: 288-96.
- Booth, SL., Suttie, JW. 1998. Dietary Intake and Adequacy of Vitamin K<sup>1</sup>. *The Journal of Nutrition*, 128(5), 785-788.
- Botto, LD., Yang, Q. 2000. 5,10-Methylen tetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: HuGE review. *American Journal of Epidemiology*, 151:862-877.

- Breckenridge, A. 1978. Oral anticoagulant drugs: pharmacokinetic aspects. *Semin. Hematol.*, 15(1):19-26.
- Budnitz, DS., Shehab, N., Kegler, SR., Richards, CL. 2007. Medication use leading to emergency department visits for adverse drug events in older adults. *Ann. Intern. Med.*, 147(11):755-765.
- Butchart, EG. 1992. Prosthesis-specific and patient-specific anticoagulation. In: Butchart EG, Bodnar E, eds. *Thrombosis, Embolism and Bleeding*. ICR Publishers, London, 293-317.
- Butt, HR., Allen, EV., Bollman, JL. 1941. Preparation from spoiled sweet clover 3,3<sup>1</sup> Metthylene- bis (4-Hydroxy coumarin) wich prolongs the coagulation and protombin time of blood: releminary report of experimental and clinical studies. *Proc. Staff. Meet. Mayo. Clin.*, 166:388
- Canan, İ., Derviş, O. 2002. *Kardiyoloji, Antip A.Ş. Yayınları, Ankara*
- Cannegieter, SC., Rosendaal, FR., Wintzen, AR., van Der Meer, FJ., Vandenbroucke, JP., Briet, E. 1995. Optimal oral anticoagulant therapy in patients with mechanical heart valves. *N. Engl. J. Med.*, 333(1):11-17.
- Casais, P., Luceros, AS., Meschengieser, S., Fondevila, C., Santarelli, MT., Lazzari, MA. 2000. Bleeding risk factors in chronic oral anticoagulation with acenocoumarol. *Am. J. Hematol.*, 63(4):192-196.
- Choonara, IA., Cholerton, S., Haynes, BP., Breckenridge, AM., Park BK. 1986. Stereoselective interaction between the R enantiomer of varfarin and cimetidine. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 21(3):271-277.
- Dahlbäck, B. 1995. Inherited thrombophilia: resistance to activated prptein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism. *Blood*, 85:607-614.
- D'Andrea, G., D'Ambrosio, RL., Di, PP., Chetta, M., Santacrose, R., Brancaccio, V., *et al.* 2005. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of varfarin. *Blood*, 105(2):645-649.
- De, SV., Chiusolo, P., Paciaroni, K., Leone, G. 1998. Epidemiology of factor V Leiden: clinical implications. *Semin. Thromb. Hemost.*, 24(4):367-379.
- Desta, Z., Soukhova, NV., Flockhart, DA. 2001. Inhibition of cytochrome P450 (CYP450) isoforms by isoniazid: potent inhibition of CYP2C19 and CYP3A. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(2):382-392.
- Edmunds, LH., Jr., Clark, RE., Cohn, LH., Grunkemeier, GL., Miller, DC., Weisel, RD. 1996. Guidelines for reporting morbidity and mortality after cardiac valvular operations. Ad Hoc Liaison Committee for Standardizing Definitions of Prosthetic Heart Valve Morbidity of The American Association for Thoracic Surgery and The Society of Thoracic Surgeons. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 112(3):708-711.
- Ensom, MH., Chang, TK., Patel, P. 2001. Pharmacogenetics: the therapeutic drug monitoring of the future?. *Clin Pharmacokinet*, 40(11):783-802.

- Evans, A., Davis, S., Kilpatrick, C., Gerraty, R., Campbell D., Greenberg P. 2002. The morbidity related to atrial fibrillation at a tertiary centre in one year: 9.0% of all strokes are potentially preventable. *J Clin Neurosci*, 9(3):268-272.
- Fang, MC., Go, AS., Hylek, EM., Chang, Y., Henault, LE., Jensvold, NG., *et al.* 2006. Age and the risk of varfarin-associated hemorrhage: the anticoagulation and risk factors in atrial fibrillation study. *J Am Geriatr Soc*, 54(8):1231-1236.
- Fihn, SD., McDonell, M., Martin, D., Henikoff, J., Vermes, D., Kent, D., *et al.* 1993. Risk factors for complications of chronic anticoagulation. A multicenter study. Varfarin Optimized Outpatient Follow-up Study Group. *Ann Intern Med*, 118(7):511-520.
- Francis, CW., Davidson, BL., Berkowitz, SD., Lotke, PA., Ginsberg, JS., Lieberman, JR., *et al.* 2002. Ximelagatran versus varfarin for the prevention of venous thromboembolism after total knee arthroplasty. A randomized, double-blind trial. *Ann Intern Med*, 137(8):648-655.
- Frosst, P., Blom, HJ., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, CA., Matthews, RG., Boers, GJ., Den Heijer, M., Kluijtmans, LA., van den Heuvel, LP., Rozen, R. 1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet*, 10; 111-113
- Fuster, V., Ryden, LE., Cannom, DS., Crijns, HJ., Curtis, AB., Ellenbogen, KA., *et al.* 2006. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation-executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation). *Eur Heart J*, 27(16):1979-2030.
- Gage, BF., Cardinalli, AB., Albers, GW., Owens, DK. 1995. Cost-effectiveness of varfarin and aspirin for prophylaxis of stroke in patients with nonvalvular atrial fibrillation. *JAMA*, 274(23):1839-1845.
- Gage, BF., Waterman, AD., Shannon, W., Boechler, M., Rich, MW., Radford, MJ. 2001. Validation of clinical classification schemes for predicting stroke: results from the National Registry of Atrial Fibrillation. *JAMA*, 285(22):2864-2870.
- Geisen, C., Watzka, M., Sittlinger, K., Steffens, M., Daugela, L., Seifried, E., *et al.* 2005. VKORC1 haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-ethnic variability of oral anticoagulation. *Thromb Haemost*, 94(4):773-779.
- Go, AS., Hylek, EM., Chang, Y., Phillips, KA., Henault, LE., Capra, AM., *et al.* 2003. Anticoagulation therapy for stroke prevention in atrial fibrillation: how well do randomized trials translate into clinical practice?. *JAMA*, 290(20):2685-2692.
- Gök, H. 2002. *Klinik Kardiyoloji*, Nobel tıp kitabevi 2. Baskı, Ankara, 377-383.
- Gurgey, A., Mesci, L. 1997. The prevalence of factor V Leiden (1691 G-->A) mutation in Turkey. *Turk J Pediatr*, 39(3):313-315.

- Handin, RI. 2001 Bleeding and Thrombosis, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill Company. New York, 15th Ed. (1): 339-45.
- Hart, RG., Pearce, LA., McBride, R., Rothbart, RM., Asinger, RW. 1999. Factors associated with ischemic stroke during aspirin therapy in atrial fibrillation: analysis of 2012 participants in the SPAF I-III clinical trials. The Stroke Prevention in Atrial Fibrillation (SPAF) Investigators. *Stroke*, 30(6):1223-1229.
- Hasenkam, JM., Kimose, HH., Knudsen, L., Gronnesby, H., Halborg, J., Christensen, TD. 1997. Self management of oral anticoagulant therapy after heart valve replacement. *Eur J Cardiothorac Surg*, 11(5):935-942.
- Hirsh, J., Dalen, J., Anderson, DR., *et al.* 2001. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest*, 119, 8S-21S
- Hirsh, J., Fuster, V., Ansell, J., Halperin, JL. 2003. American Heart Association/American College of Cardiology Foundation guide to warfarin therapy. *J Am Coll Cardiol*, 41(9):1633-1652.
- Holbrook, AM., Pereira, JA., Labiris, R., McDonald, H., Douketis, JD., Crowther, M., *et al.* 2005. Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions. *Arch Intern Med*, 165(10):1095-1106.
- Horton, JD., Bushwick, BM. 1999. Warfarin Therapy: Evolving Strategies in Anticoagulation, *American Family Physician*
- Hunter, RB. 1961. Review of the action of oral anticoagulant on the coagulation mechanism Symposium on Anticoagulant Therapy, Report of the Proceeding. Havery & Bylthe Ltd, London.
- Hurlen, M., Abdelnoor, M., Smith, P., Erikssen, J., Arnesen, H. 2002. Warfarin, aspirin, or both after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 347(13):969-974.
- Hylek, EM., Singer, DE. 1994. Risk factors for intracranial hemorrhage in outpatients taking warfarin. *Ann Intern Med*, 120(11):897-902.
- Hylek, EM., Go, AS., Chang, Y., Jensvold, NG., Henault, LE., Selby, JV., *et al.* 2003. Effect of intensity of oral anticoagulation on stroke severity and mortality in atrial fibrillation. *N Engl J Med*, 349(11):1019-1026.
- Inbal, A., Freimark, D., Modan, B., Chetrit, A., Matetzky, S., Rosenberg, N., *et al.* 1999. Synergistic effects of prothrombotic polymorphisms and atherogenic factors on the risk of myocardial infarction in young males. *Blood*, 93(7):2186-2190.
- Jenny, R., Pitman, D., Toole, J., Kriz, RW., Aldape, RA., Hewick, RM., *et al.* 1987. Complete cDNA and derived amino acid sequence of human FV. *Proc Natl Acad Sci.*, 84: 4846-50.
- Kang, SS., Wong, PW., Susmano, A., Sora, J., *et al.* Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet*, 48:536-545.

- Kayaalp, SO. 2002. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Dokuzuncu baskı, Hacettepe-Taş Kitapçılık, Ankara
- Kelly, JG., O'Malley, K. 1979. Clinical pharmacokinetics of oral anticoagulants. *Clin Pharmacokinet*, 4(1):1-15.
- Kitchen, S., Preston FE. 1999. Standardization of prothrombin time for laboratory control of oral anticoagulant therapy. *Semin. Thromb. Hemost.*, 25: 17-25.
- Klein, TE., Altman, RB., Eriksson, N., Gage, BF., Kimmel, SE., Lee, MT., *et al.* 2009. Estimation of the varfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med*, 360(8):753-764.
- Koertke, H., Minami, K., Bairaktaris, A., Wagner, O., Koerfer, R. 2000. INR self-management following mechanical heart valve replacement. *J Thromb Thrombolysis*, 9 Suppl 1:S41-S45.
- Kortke, H., Korfer, R. 2001. International normalized ratio self-management after mechanical heart valve replacement: is an early start advantageous?. *Ann Thorac Surg*, 72(1):44-48.
- Kulik, A., Rubens, FD., Wells, PS., Kearon, C., Mesana, TG., van, BJ., *et al.* 2006. Early postoperative anticoagulation after mechanical valve replacement: a systematic review. *Ann Thorac Surg*, 81(2):770-781.
- Kuntze, CE., Ebels, T., Eijgelaar, A., Homan van der Heide, JN. 1989. Rates of thromboembolism with three different mechanical heart valve prostheses: randomised study. *Lancet*, 1(8637):514-517.
- Landefeld, CS., Beyth, RJ. 1993. Anticoagulant-related bleeding: clinical epidemiology, prediction, and prevention. *Am J Med*, 95(3):315-328.
- Leung, A., Huang, CH., Muto, R., Liu, Y., Pan, Q. 2007. CYP2C9 and VKORC1 Genetic Polymorphism Analysis Might be Necessary in Patients With Factor V Leiden and Prothrombin Gene G2021A Mutation(s). *Diagn Mol Pathol*, 16:184-186.
- Li, T., Chang, CY., Jin, DY., Lin, PJ., Khvorova, A., Stafford, DW. 2004. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature*, 427(6974):541-544.
- Link, KP. 1959. The discovery of dicoumarol and its sequels. *Circulation*, 19-97.
- Loebstein, R., Dvoskin, I., Halkin, H., Vecsler, M., Lubetsky, A., Rechavi, G., *et al.* 2007. A coding VKORC1 Asp36Tyr polymorphism predisposes to varfarin resistance. *Blood*, 109(6):2477-2480.
- Ma, J., Stampfor, MJ., Hennekens, JH., Frost, P., Selhub, J., Horsford, J., *et al.* 1996. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisim plasma folate, homocysteine and risf of myocardial infarction in US physicians. *Circulation*, 94(10):2410-6.

- Majerus Pw, Broze GJ Jr : Miletich JP, Tollefsen DM. 1990. Anticoagulant thrombotic and antiplatelet drugs. In Pharmacological Basis of Therapeutics. Eight Ed. New York, Pergamon Press Inc, 1317.
- Major, DA., Sane, DC., Herrington, DM. 2000. Cardiovascular implications of the factor V Leiden mutation. *Am Heart J*, 140(2):189-195.
- Oldenburg, J., Watzka, M., Rost, S., Muller, CR. 2007. VKORC1: molecular target of coumarins. *J Thromb Haemost*, 5 Suppl 1:1-6.
- Oner, OG., Langae, TY., Feng, H., Buyru, N., Ulutin, T., Hatemi, AC., *et al.* 2008. VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms are associated with warfarin dose requirements in Turkish patients. *Eur J Clin Pharmacol*, 64(9):889-894.
- O'Reilly, RA., Rytand, DA. 1980. "Resistance" to warfarin due to unrecognized vitamin K supplementation. *N Engl J Med*, 303(3):160-161.
- O'Reilly, RA. 1987. Warfarin metabolism and drug-drug interactions. *Adv Exp Med Biol*, 214:205-212.
- O'Reilly, RA., Trager, WF., Rettie, AE., Goulart, DA. 1987. Interaction of amiodarone with racemic warfarin and its separated enantiomers in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 42(3):290-294.
- Otagiri, M., Maruyama, T., Imai, T., Suenaga, A., Imamura, Y. 1987. A comparative study of the interaction of warfarin with human alpha 1-acid glycoprotein and human albumin. *J Pharm Pharmacol*, 39(6):416-420.
- Ozbek, U., Tangun, Y. 1997. Frequency of factor V Leiden (Arg506Gln) in Turkey. *Br J Haematol*, 97(2):504-505.
- Palareti, G., Legnani, C. 1996. Warfarin withdrawal. Pharmacokinetic-pharmacodynamic considerations. *Clin Pharmacokinet*, 30(4):300-313.
- Palareti, G., Leali, N., Coccheri, S., Poggi, M., Manotti, C., D'Angelo, A., *et al.* 1996. Bleeding complications of oral anticoagulant treatment: an inception-cohort, prospective collaborative study (ISCOAT). Italian Study on Complications of Oral Anticoagulant Therapy. *Lancet*, 348(9025):423-428.
- Rees, DC., Cox, M., Clegg, JB. 1995. World distribution of factor V Leiden. *Lancet*, 346(8983):1133-1134.
- Rees, DC. 1996. The population genetics of factor V Leiden (Arg506Gln). *Br J Haematol*, 95(4):579-586.
- Pekçelen, Y. 2003. Hemostaz bozuklukları. In: Dinçol G, Pekçelen Y, Atamer T, Sargın D, Nalçacı M, Aktan M, Beşışık S, ed(s). *Klinik Hematoloji*. Birinci baskı, İstanbul: Nobel Tıp, 347-392.
- Report of the Working Party on Anticoagulant Therapy in Coronary Thrombosis to the Medical Research Council. 1969. Assessment of short-term anticoagulant administration after cardiac infarction. *Br Med J*, 1:335.

- Rettie, A.E., Tai, G. 2006. The pharmacogenomics of warfarin: Closing in on personalized medicine, *Molecular Interventions* 6: 223-227
- Ridker, PM., Goldhaber, SZ., Danielson, E., Rosenberg, Y., Eby, CS., Deitcher, SR., *et al.* 2003. Long-term, low-intensity warfarin therapy for the prevention of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med*, 348(15):1425-1434.
- Rieder, MJ., Reiner, AP., Gage, BF., Nickerson, DA., Eby, CS., McLeod, HL., *et al.* 2005. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med*, 352(22):2285-2293.
- Rigamonti, A., Carriero, MR., Boncoraglio, C., Leone, M., Bussone, G. 2002. Cerebral vein thrombosis and mild hyperhomocysteinemia: three new cases. *Neural Sci*, 23:225-227.
- Roiben, K., Ulrich, CM. 2003. 5,10-Methylen tetrahydrofolate reductase polymorphisms and Leukemia Risk. *American Journal of Epidemiology*, 157(7): 571-82.
- Rost, S., Fregin, A., Ivaskevicius, V., Conzelmann, E., Hortnagel, K., Pelz, HJ., *et al.* 2004. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*, 427(6974):537-541.
- Rost, S., Fregin, A., Hunerberg, M., Bevans, CG., Muller, CR., Oldenburg, J. 2005. Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC1: evidence that highly conserved amino acids define structural requirements for enzymatic activity and inhibition by warfarin. *Thromb Haemost*, 94(4):780-786.
- Rothenbacher, D., Fischer, HG., Hoffmeister, A., Hoffman, MM., Marz, W., Bode, G., Rosenthal, J., Koenig, W., Brenner, H. 2002. Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase genotype: association with risk of coronary heart disease and relation to inflammatory haemostatic and lipid parameters. *Atherosclerosis*, 162: 193-200.
- Runciman, WB., Roughead, EE., Semple, SJ., Adams, RJ. 2003. Adverse drug events and medication errors in Australia. *Int J Qual Health Care*, 15 Suppl 1:i49-i59.
- Saour, JN., Sieck, JO., Mamo, LA., Gallus, AS. 1990. Trial of different intensities of anticoagulation in patients with prosthetic heart valves. *N Engl J Med*, 322(7):428-432.
- Savas, I. 2009. Göğüs Hastalıkları 2009, Bölüm 15, 978-605-4145-03-4.
- Sazcı, A., Ergul, E., Kaya, G., Kara, I. 2005. Genotype and allele frequencies of the polymorphic methylenetetrahydrofolate reductase gene in Turkey. *Cell Biochem Funct*, 23:51-4.
- Schwahn, B., Rozen, R. 2001. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: clinical consequences. *Am J Pharmacogenomics*, 1:189-201.
- Singer, DE., Albers, GW., Dalen, JE., Go, AS., Halperin, JL., Manning, WJ. 2004. Antithrombotic therapy in atrial fibrillation: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*, 126(3 Suppl):429S-456S.

- Smirnov, MD., Safa, O., Esmon, CT. 1999. Inhibition of activated protein C anticoagulant activity by prothrombin, *Blood*, 94: 3839-46.
- Sconce, EA., Khan, TI., Wynne, HA., Avery, P., Monkhouse, L., King, BP., Wood, P., Kesteven, P., Daly, AK., Kamali, F. 2005. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon varfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen, *Blood*. 106:2329-2333
- Stafford, DW. 2005. The vitamin K cycle. *J Thromb Haemost*, 3(8):1873-1878.
- Stern, R., Karlis, 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.
- Suttie, JW. 1985. Vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev Biochem*, 54:459-477.
- Suttie, JW., Mummah-Schendel, LL., Shah, DV., Lyle, BJ., Greger, JL. 1988. Vitamin K deficiency from dietary vitamin K restriction in humans. *Am J Clin Nutr*, 47(3):475-480.
- Takahashi, H., Echizen, H. 2003. Pharmacogenetics of CYP2C9 and interindividual variability in anticoagulant response to varfarin. *Pharmacogenomics J*, 3(4):202-214.
- Tham, LS., Goh, BC., Nafziger, A., Guo, JY., Wang, LZ., Soong, R., *et al.* 2006. A varfarin-dosing model in Asians that uses single-nucleotide polymorphisms in vitamin K epoxide reductase complex and cytochrome P450 2C9. *Clin Pharmacol Ther*, 80(4):346-355.
- The European Atrial Fibrillation Trial Study Group. 1995. Optimal oral anticoagulant therapy in patients with nonrheumatic atrial fibrillation and recent cerebral ischemia. *N Engl J Med*, 333(1):5-10.
- Tripodi, A., Chantarangkul, V., Braga, M., Poller, L., ten Cate, JW., van den Besselaar, AM., *et al.* 1994. Results of a multicenter study assessing the status of standardization of a recombinant thromboplastin for the control of oral anticoagulant therapy. *Thromb Haemost*, 72(2):261-267.
- Wallin, R. *et al.* 2002. Vitamin K 2,3-epoxide reductase and the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. *Thromb. Res.* 108, 221–226.
- Wallin, R., Hutson, SM. 2004. Varfarin and the Vitamin K-Dependent –Carboxylation System. *Trends in Molecular Medicine*, Vol.10 No.7
- Wang, TJ., Massaro, JM., Levy, D., Vasan, RS., Wolf, PA., D'Agostino, RB., *et al.* 2003. A risk score for predicting stroke or death in individuals with new-onset atrial fibrillation in the community: the Framingham Heart Study. *JAMA*, 290(8):1049-1056.
- Williamson, D., Brown, K., Luddington, R., Baglin, C., Baglin, T. 1998. Factor V Cambridge: a new mutation (Arg306-->Thr) associated with resistance to activated protein C. *Blood*, 91(4):1140-1144.



- Wright, IS., Marple, CD., Beck, DE. 1948. Report of the committee for evaluation of anticoagulants in the treatment of coronary thrombosis with myocardial infarction. *Am Heart J*, 38:801-15.
- Wu, Y., Tomon, M., Sumino, K. 2001. Methyltetrahydrofolate reductase gene polymorphism and ischemic stroke: sex difference in Japanese. *Kobe J Med Sci*, 47:255-262.
- Van Aken, H., Bode, C., Darius, H., *et al.* 2001. Anticoagulation: the present and future. *Clin Appl Thromb Hemost*, 7:195–204.
- van den Besselaar, AM. 1985. Standardization of the prothrombin time in oral anticoagulant control. *Haemostasis*, 15(4):271-277.
- van Der Meer, FJ., Rosendaal, FR., Vandenbroucke, JP., Briet, E. 1993. Bleeding complications in oral anticoagulant therapy. An analysis of risk factors. *Arch Intern Med*, 153(13):1557-1562.
- van Es, RF., Jonker, JJ., Verheugt, FW., Deckers, JW., Grobbee, DE. 2002. Aspirin and coumadin after acute coronary syndromes (the ASPECT-2 study): a randomised controlled trial. *Lancet*, 360(9327):109-113.
- van, WC., Hart, RG., Singer, DE., Laupacis, A., Connolly, S., Petersen, P., *et al.* 2002. Oral anticoagulants vs aspirin in nonvalvular atrial fibrillation: an individual patient meta-analysis. *JAMA*, 288(19):2441-2448.
- Veenstra, DL., You, JH., Rieder, MJ., Farin, FM., Wilkerson, HW., Blough, DK., *et al.* 2005. Association of Vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) variants with warfarin dose in a Hong Kong Chinese patient population. *Pharmacogenet Genomics*, 15(10):687-691.
- Voora, D., McLeod, HL., Eby, C., Gage, BF. 2005. The pharmacogenetics of coumarin therapy. *Future Med*, 6:503-513.
- Yin, T and Miyata, T. 2007. Warfarin dose and the pharmacogenomics of *CYP2C9* and *VKORC1* – Rationale and perspectives. *Trombosis Research*, 120(1): 1-10
- Yuan, HY., Chen, JJ., Lee, MT., Wung, JC., Chen, YF., Charng, MJ., *et al.* 2005. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Hum Mol Genet*, 14(13):1745-1751.
- 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

## **ÖZGEÇMİŞ**

**Adı Soyadı** : Filiz Çetinkaya

**Doğum Yeri** : Mersin

**Doğum Tarihi** : 01.08.1982

**Medeni Hali** : Evli

**Yabancı Dil** : İngilizce

**Eğitim Durumu** :

**Lise** : Eryaman Süper Lisesi (1996-2000)

**Lisans** : Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü (2000-2004)