

T. C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ
DANIŞMAN: DOÇ. DR. MÜNEVVER AÇIKKOL

ADLİ FARMAKOGENETİKTE CYP2D6
POLİMORFİZMİNİN ÖNEMİ

FEN BİLİMLERİ ANA BİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

SELDA MERCAN

Biyolog

İSTANBUL, 2012

İstanbul, 22 Mayıs 2012

**İ.Ü.ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA**

Lisansüstü Öğretim Yönetmeliğinin 35.maddesi uyarınca Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nın doktora öğrencisi Selda MERCAN'ın

"Adli Farmakogenetikte CYP2D6 Polimorfizminin Önemi"

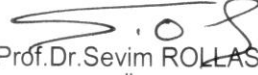
Adlı tezi jürimizce tetkik edilmiş ve kendisine tez savunması yaptırılmıştır.

Yukarıda adı geçen tezin ve tez savunmasının kabul edilmesine oy birliğiyle karar verilmiştir.

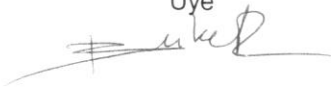
Prof.Dr.Salih ÇENGİZ
Jüri Başkanı



Prof.Dr.Sevim ROLLAS
Üye



Prof.Dr.Buket ALPERTUNGA
Üye



Doç.Dr.Münevver AÇIKKOL
Danışmanı



Yard.Doç.Dr.E.Hülya YÜKSELOĞLU
Üye



T. C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ
DANIŞMAN: DOÇ. DR. MÜNEVVER AÇIKKOL

ADLİ FARMAKOGENETİKTE CYP2D6
POLİMORFİZMİNİN ÖNEMİ

FEN BİLİMLERİ ANA BİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

SELDA MERCAN

Biyolog

İSTANBUL, 2012

Bu tez projesi İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 4764

İÇİNDEKİLER

ÖZSÖZ	i
Kısaltmalar Listesi	iii
Şekil Listesi	v
Tablo Listesi	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Sitokrom P450 (CYP450) Enzim Sistemi	3
2.2. CYP2D6 Enzimi	6
2.2.1. CYP2D Lokusunun Yapısı.....	7
2.2.2. CYP2D6 Enzim Aktivitesi ve Polimorfizmi.....	8
2.2.3. CYP2D6 Polimorfizmi ile İlgili Çalışmalar.....	12
2.3. Biyotransformasyon	14
2.3.1. Biyotransformasyonda bilinmesi gereken temel kavramlar.....	15
2.3.2. Ksenobiyotiklerin Biyotransformasyon Mekanizması.....	16
2.4. Polimorfizm ve Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP)	19
2.5. Farmakogenetiğin tarihçesi	20
2.6. Advers İlaç Reaksiyonu (ADR) ve farmakogenetik	22
2.7. Farmakogenetiğe Adli ve Klinik Yaklaşım	23
2.8. Bireye Özgü Tedavi Yaklaşımı	27
2.9. Farmakovijilans	32
2.10. Psikiyatrik Bozukluklar	33
2.10.1. Şizofreni ve psikotik bozukluk	33
2.10.2. Duygudurum bozuklukları	35
2.11. Antipsikotik ilaçlar	36
2.11.1. Çalışmaya dahil edilen psikiyatrik ilaçlar	38
2.12. Gen Anlatımı (Ekspresyonu)	46
2.12.1. Transkripsiyon	47
2.13. Sıvı-sıvı özütleme (SSÖ) yöntemi	50
2.14. Sıvı Kromatografisi	51
2.15. Kütle Spektrometresi	53
2.15.1. Ardışık Kütle Spektrometresi (MS/MS).....	56
2.16. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	57

2.16.1. Gerçek Zamanlı - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	60
2.16.2. Real Time PCR Tekniğinde TaqMan Problar ve Özellikleri.....	62
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	64
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN GEREÇLER.....	64
3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE KİTLER	66
3.3. KAN VE İDRAR ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI.....	68
3.4. ÇALIŞMAYA KATILAN BİREYLERE AİT BİLGİLER	69
3.5. ÇALIŞMANIN GENETİK BASAMAKLARI.....	72
3.5.1. GEN EKSPRESYONU ÇALIŞMASI (CYP2D6 Intron 6, Ekson 9 ve Albümin 12).....	77
3.5.2. CYP2D6*3 VE *4 ALELLERİNİN BELİRLENMESİ.....	82
3.6. ÇALIŞMANIN KROMATOĞRAFİK VE SPEKTROMETRİK BASAMAKLARI.....	88
3.6.1. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	88
3.6.2. İdrar Örneklerini Hazırlama Prosedürü.....	91
3.6.3. Kan Örneklerini Hazırlama Prosedürü.....	91
3.6.4. Kromatografik ve Spektrometrik Analiz Koşulları.....	92
3.6.5. Seçicilik çalışmaları	96
3.6.6. Doğrusallık Çalışmaları	96
3.6.7. En Düşük Belirleme Limiti (LOD) ve En Düşük Hesaplama Limiti (LOQ) Çalışmaları	97
3.6.8. Geri Kazanım Çalışmaları.....	97
3.6.9. Kesinlik-Tekrar Edilebilirlik Çalışmaları	98
3.6.10. Doğruluk Çalışmaları (%Hata)	98
3.6.11. Hastalara ait kan ve idrar örneklerinin LC-MS/MS ile analizi	99
3.7. Çalışmanın Bilgi ve Bulgularının Değerlendirilmesi	99
4.BULGULAR	101
4.1. Genetik çalışmaların sonuçları.....	101
4.1.1 CYP2D6*3 ve *4 Allel frekansları ve genotipleri.....	101
4.1.2. Gen ekspresyonu çalışmasının sonuçları	109
4.2. Kromatografik ve Spektrometrik Analiz Bulguları.....	115
4.2.1. Metanolde, Kanda ve İdrarda Seçicilik çalışması	115
4.2.2. Doğrusallık.....	124
4.2.3. En Düşük Belirleme Limiti (LOD) ve En Düşük Hesaplama Limiti (LOQ)	132
4.2.4. Kanda ve İdrarda Geri Kazanım	133
4.2.5. Kesinlik Çalışması	136

4.2.6. Doğruluk (% Hata) Çalışması	138
4.3. Hasta bulgularının değerlendirilmesi	139
5.TARTIŞMA	145
6.SONUÇ	161
7.ÖZET	164
8.SUMMARY	167
9. ÖZGEÇMİŞ.....	170
10.KAYNAKLAR.....	172
11.EKLER.....	190
Ek 1. CYP2D6 enziminin protein dizini	190
Ek 2. Advers Etki Bildirim Formu	191
Ek 3. Etik Kurul Onay Yazısı.....	192
Ek 4. “Bilgilendirilmiş Onay Formu” Örneği.....	193
Ek 5. “Hasta Bilgi Formu” Örneği.....	194
Ek 6 – Ki-Kare (X^2) dağılımı değerleri.....	195

ÖZSÖZ....

Her ne kadar tez sahibi bir kişi olsa da bu uzun ve zorlu süreçte pek çok insan farkında olarak ya da olmayarak önemli katkılarda bulunur... Sadece sayabildiklerim aşağıdadır...

Akademik hayatımın başından beri bana güvenen ve yol gösteren; samimi, özverili, bilgi ve görgüsünü asla esirgemeyen çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Münevver Açikkol'a;

Çalışma hayatımda ve bilimsel hayatta pek çok tecrübe edinmemi sağlayan, bilgisini cömertçe paylaşan kıymetli hocam Prof. Dr. Salih Cengiz'e;

Çalışmamın başından beri beni ilgi ile takip eden, değerli yorumlarını ve katkılarını esirgemeyen çok değerli hocam Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sevim Rollas'a;

Çatısı altında çalışmaktan gurur duyduğum ve her türlü laboratuvar olanaklarından faydalandığım İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü adına, Enstitü müdürüm Sayın Prof. Dr. İmdat Elmas'a;

Çalışmama yön verirken İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Psikiyatri Anabilim Dalı Servislerinin kapılarını açan, dönemin Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Müfit Uğur'a; yardımları ve ilgisi için Dr. Ayşe Sakallı'ya;

Çalışmamın genetik analizlerini yapmama olanak tanıyan İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Kenan Midilli'ye ve Dr. Mert Ahmet Kuşkucu'ya;

Akademik yolda birlikte yürüdüğüm, bana her konuda destek olan sevgili dostum Araş. Gör. Dr. Zeynep Türkmen'e,

Laboratuar çalışmalarım boyunca tüm enerjisi ve samimiyeti ile her zaman yanımda olan Uzm. Biyolog F. Eylem Yediay'a, Lab. Tek. Murat Yayla'ya, Lab. Tek. Muhammed Aydın'a, Laborant Gülten Rayimoğlu'na ve Araş. Gör. Fatma Çavuş'a;

Genetik bulguların değerlendirilmesinde sağladıkları katkılardan ötürü Sayın Elif Akyayla'ya ve Sayın Mehmet Demirci'ye,

Hastalarla iletişim kurmamı sağlayan, biyolojik örneklerin alınmasında yardımcı olan başta Şaziye Hemşire ve Ebru Hemşire olmak üzere Psikiyatri servisinin kıymetli hemşirelerine ve çalışanlarına;

Her türlü yardımı ve pozitif enerjisi için Sayın Elvan Emral Uğur'a;

Dinlendirici çayları için Semiha Hanım'a, leziz kahveleri için Huriye Hanım'a;

İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü bünyesinde çalışan, doğrudan veya dolaylı olarak hayatımı kolaylaştıran herkese;

İçten ve karşılıksız sevgileri ile tüm yorgunluğumu gideren yeğenlerim Eyüpcan, Elifnaz ve Rabia'ya;

*Hiç kuşkusuz hayatımın her anında koşulsuz yanımda olan sevgili Babama, Anneme, tüm aileme **minnet ve teşekkürü bir borç bilirim.***

Bilim dünyasına ışık tutabilecek bir çalışma olması dileğimle...

Araş. Gör. Selda Mercan

Kısaltmalar Listesi

μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
Cp	Eşik döngü (crossing point)
CYP2D6	Sitokrom P450 2D6
CYP450	Sitokrom P450
dak	Dakika
DCM	Diklorometan
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EM	Normal metabolizör
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
FMN	Flavin Mono Nükleotid
g	Gram
GC-MS	Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrometresi
H_2BO_3	Borik asit
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
ICD-10	International Classification of Diseases - Uluslararası Hastalık Sınıflandırması (Versiyon 10)
IM	Orta hızlı metabolizör
Kat. No.	Katolog Numarası
kb	Kilo baz
kDa	Kilo Dalton
L	Litre
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografi-Ardışık Kütle Spektrometresi
LOD	En düşük belirleme limiti
LOQ	En düşük hesaplama limiti
mg	Miligram
mL	Mililitre
MS	Kütle Spektrometresi

MS/MS	Ardışık Kütle Spektrometresi
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
ng	Nanogram
nmol	Nanomol
No.	Numara
°C	Santigrat derece
OLZ	Olanzapin
ort	Ortalama
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>p</i> Ka	Disosiyasyon Katsayısı
PLP	Paliperidon (9-OH Risperidon)
PM	Zayıf metabolizör
psi	Pounds per square inch (basınç birimi)
r	Korelasyon katsayısı
RBK	Reboksetin
RSD	Bağıl Standart Sapma
RSP	Risperidon
Rt	Alıkonma zamanı
RT-PCR	Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SD	Standart Sapma
sn	Saniye
SPE	Katı faz ekstraksiyon
SRT	Sertralin
SSÖ	Sıvı Sıvı Özütleme
UM	Ultra hızlı metabolizör
US FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
UV	Ultraviyole (Mor ötesi)
v/v	Hacim/hacim
w/v	Kütle/hacim
wt	Yabani tip (wild type)

Şekil Listesi

- Şekil 2.1.** Karbon monoksit bağı CYP450' nin absorbans eğrisi.
- Şekil 2.2.** CYP450 sisteminin reaksiyon basamakları
- Şekil 2.3.** CYP2D lokusunda bulunan genler
- Şekil 2.4.** CYP2D6*2 alelinin gen duplikasyonu ve UM oluşumu
- Şekil 2.5.** İlaç etken maddelerinin Faz I ve Faz II reaksiyonları sonucu olası atılım şekilleri
- Şekil 2.6.** Hasta ile ilaç arasındaki ilişkiyi etkileyen faktörler
- Şekil 2.7.** Risperidonun CYP2D6 enzimi ile metabolizasyonu sonucu oluşan metabolitler
- Şekil 2.8.** Transkripsiyonun üç aşamasının şekilsel görüntüsü
- Şekil 2.9.** Protein sentezinin aşamalarının ve bileşenlerinin şekilsel görüntüsü
- Şekil 2.10.** Bir HPLC sisteminin ana bileşenlerinin şematik görüntüsü
- Şekil 2.11.** Bir kütle spektrometresinin temel bileşenleri
- Şekil 2.12.** Ardışık kütle spektrometresinin şematik görüntüsü
- Şekil 2.13.** Polimeraz Zincir Reaksiyonunun şematik görüntüsü
- Şekil 2.14.** Bir PCR döngüsünün basamakları ve sıcaklıkları.

- Şekil 2.15.** Real-time PCR yönteminin 3 ana fazında çoğalmanın fluoresans yanıtına göre izlenmesi
- Şekil 2.16.** TaqMan prob yönteminin şematize görüntüsü
- Şekil 3.1.** Genetik çalışmaların gerçekleştirildiği Roche LightCycler 1.2 RT-PCR sisteminin görüntüsü.
- Şekil 3.2.** LightCycler[®] kapiler tüp adaptörünün ve içinde bulunduğu soğutma bloğunun görüntüsü
- Şekil 3.3.** RT-PCR sisteminin sıcaklık programının ve erime eğrilerinin (CYP2D6*3) yazılımda bir arada görüntüsü.
- Şekil 3.4.** Çalışmanın gerçekleştirildiği Zivak Tandem Gold LC-MS/MS sisteminin toplu görüntüsü
- Şekil 4.1.** İzolasyon sonrasında elde edilen DNA örneklerinin %2 Agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü
- Şekil 4.2.** CYP2D6*4 genotipini belirleme sistemine ait kontrol DNA örneklerinin erime eğrileri ve erime piklerinin bir arada görüntüsü (NK= Negatif kontrol)
- Şekil 4.3.** CYP2D6*4 aleli için *4/wt genotipi taşıyan bir hastaya ait RT-PCR erime eğrisi ve erime piki görüntüsü
- Şekil 4.4.** CYP2D6*4 aleli için wt/wt genotipi taşıyan bir hastaya ait RT-PCR erime eğrisi ve erime piki görüntüsü.

- Şekil 4.5.** CYP2D6*4 aleli için *4/*4 genotipi taşıyan bir hastaya ait RT-PCR erime eğrisi ve erime piki görüntüsü
- Şekil 4.6.** CYP2D6*3 aleli için *3/wt genotipi taşıyan bir hastaya ait RT-PCR erime eğrisi ve erime piki görüntüsü
- Şekil 4.7.** CYP2D6*3 aleli için wt/wt genotipi taşıyan bir hastaya ait RT-PCR erime eğrisi ve erime piki görüntüsü.
- Şekil 4.8.** Albümin intron 12 gen ekspresyon bulgularının bir arada görünüşü.
- Şekil 4.9.** İtron 6 için örnek bir hasta bulgusunun negatif kontrol ile birlikte görüntüsü
- Şekil 4.10.** Örneklerin gen kopya sayılarının $R=2^{-\Delta\Delta C_p}$ formülüne göre Microsoft Excel programında hesaplanmasının görüntüsü.
- Şekil 4.11.** TaqMan RT-PCR yönteminin sonuçlarına göre hasta grubu için ekson 9'un beklenen ve bulunan gen oranlarının ortalaması \pm standart sapması
- Şekil 4.12.** TaqMan RT-PCR yönteminin sonuçlarına göre hasta grubu için intron 6'nın beklenen ve bulunan gen oranlarının ortalaması \pm standart sapması
- Şekil 4.13.** TaqMan RT-PCR yönteminin sonuçlarına göre kontrol grubu için ekson 9'un beklenen ve bulunan gen oranlarının ortalaması \pm standart sapması

- Şekil 4.14.** TaqMan RT-PCR yönteminin sonuçlarına göre kontrol grubu için intron 6'nın beklenen ve bulunan gen oranlarının ortalaması \pm standart sapması
- Şekil 4.15.** Boş metanol, idrar ve kan örnekleri ile 25 ng/mL RBK iç standardı içeren metanol, idrar ve kan örneklerinin LC-MS/MS kromatogramlarının üst üste görüntüsü.
- Şekil 4.16.** Boş metanol çözücüsü ile 0,5 ng/mL konsantrasyondaki SRT (a), OLZ (b), RSP (c) ve PLP (d) etken maddelerini içeren metanolün LC-MS/MS kromatogramlarının üst üste görüntüsü.
- Şekil 4.17.** Boş idrar örneği ile 5 ng/mL konsantrasyondaki SRT (a), OLZ (b), RSP (c) ve PLP (d) etken maddelerini içeren idrar örneğinin LC-MS/MS kromatogramlarının üst üste görüntüsü.
- Şekil 4.18.** Boş kan örneği ile 5 ng/mL konsantrasyondaki, SRT (a), OLZ (b) RSP (c) ve PLP (d) etken maddelerini içeren kan örneğinin LC-MS/MS kromatogramlarının üst üste görüntüsü.
- Şekil 4.19.** Sertralin (SRT) etken maddesinin MS/MS spektrumları.
- Şekil 4.20.** Olanzapin (OLZ) etken maddesinin MS/MS spektrumları.
- Şekil 4.21.** Risperidon (RSP) etken maddesinin MS/MS spektrumu.
- Şekil 4.22.** Paliperidon (PLP) etken maddesinin MS/MS spektrumu.
- Şekil 4.23.** Reboksetin (RBK) iç standardının MS/MS spektrumu.

- Şekil 4.24.** Metanol çözücüsündeki SRT (a), OLZ (b), RSP (c) ve PLP (d) maddelerinin RBK iç standardına göre kalibrasyon eğrilerinin görünümü.
- Şekil 4.25.** Kanda Sertralin etken maddesinin RBK iç standardına göre doğrusallık eğrisi (5-250 ng/mL)
- Şekil 4.26.** Kanda Olanzapin etken maddesinin RBK iç standardına göre doğrusallık eğrisi (1-50 ng/mL)
- Şekil 4.27.** Kanda Risperidon etken maddesinin (soldaki) ve Paliperidon metabolitinin (sağdaki) RBK iç standardına göre doğrusallık eğrileri (0,5-100 ng/mL).
- Şekil 4.28.** İdrarda Sertralin etken maddesinin RBK iç standardına göre doğrusallık eğrisi (1-250 ng/mL)
- Şekil 4.29.** İdrarda Olanzapin etken maddesinin RBK iç standardına göre doğrusallık eğrisi (0,5-250 ng/mL)
- Şekil 4.30.** İdrarda Risperidon etken maddesinin (soldaki) ve Paliperidon metabolitinin (sağdaki) RBK iç standardına göre doğrusallık eğrileri (0,5-250 ng/mL)

Tablo Listesi

- Tablo 2.1.** CYP2D6 enzimi ile metabolize olan ilaç etken maddelerinden bazıları
- Tablo 2.2.** CYP2D6 enzimini inhibe eden bazı ilaç etken maddeleri
- Tablo 3.1.** Çalışmada kullanılan gereçlerin adları, marka-modelleri
- Tablo 3.2.** Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve kitlerin listesi
- Tablo 3.3.** Psikiyatri servisinde yatan ve çalışmaya katılan hastalara ait çeşitli bilgiler
- Tablo 3.4.** Çalışmaya katılan kontrol grubuna ait bilgiler (n=38)
- Tablo 3.5.** Çalışmaya dahil edilen hastaların kullandıkları ilaç etken maddelerinin günlük dozları, alınan biyolojik örnek türü
- Tablo 3.6.** Ekspresyon çalışmasında kullanılan primer ve probların dizinleri, hazırlama hacimleri (100 nmol için), erime sıcaklıkları.
- Tablo 3.7.** CYP2D6 İtron 6, Ekson 9 ve Albümin İtron 12 Gen ekspresyonu RT-PCR Programı
- Tablo 3.8.** CYP2D6 Ekson 9, İtron 6 ve Albümin İtron 12 bölgelerinin PCR ürünlerinin uzunlukları
- Tablo 3.9.** CYP2D6*3 ve *4 alellerinin SNP analizinde kullanılan RT-PCR koşulları

- Tablo 3.10.** Genotip belirlemede kullanılan erime sıcaklıkları
- Tablo 3.11.** CYP2D6*3 ve *4 alellerinin belirlenmesi için kullanılan problemlerin özellikleri
- Tablo 3.12.** Kalibrasyon çözeltisi hazırlanmasında kullanılan çözeltiler ve hacimleri.
- Tablo 3.13.** Etken maddeler için belirlenen MS/MS iyonları ve enerjileri
- Tablo 3.14.** Çalışmanın kromatografik (HPLC) koşulları
- Tablo 3.15.** Çalışmanın Spektrometrik (MS-MS) Analiz Koşulları
- Tablo 4.1.** Hasta ve kontrol grubuna ait CYP2D6*3 ve *4 allel frekansları
- Tablo 4.2.** Hasta ve kontrol grubu arasında CYP2D6*3 ve *4 allel frekanslarının Ki-Kare (X^2) uygunluk testi sonuçları
- Tablo 4.3.** Hasta ve kontrol grubunun CYP2D6*3 ve *4 alellerinin genotip bulguları
- Tablo 4.4.** Hasta ve kontrol grubu CYP2D6*3 ve *4 genotip frekanslarının ki-Kare (X^2) uygunluk testi sonuçları
- Tablo 4.5.** Gen kopya sayılarına göre bulunan hasta ve kontrol grubu kişi sayıları
- Tablo 4.6.** Çalışmada yer alan maddelerin alıkonma zamanları, standart sapmaları (n=15).

- Tablo 4.7.** Metanol çözücüsündeki doğrusallık denklemleri, doğrusal aralık, korelasyon katsayısı, %RSD, tekrar sayısı
- Tablo 4.8.** Kanda doğrusallık denklemleri, doğrusal aralık, korelasyon katsayısı, %RSD, tekrar sayısı (n)
- Tablo 4.9.** İdrarda doğrusallık denklemleri, doğrusal aralık, korelasyon katsayısı, %RSD, tekrar sayısı
- Tablo 4.10.** LOD ve LOQ hesaplamalarında kullanılan standart sapmalar ve bunlara ait konsantrasyonlar.
- Tablo 4.11.** SRT, OLZ, RSP ve PLP'nin kanda ve idrardaki LOD ve LOQ değerleri
- Tablo 4.12.** SRT etken maddesinin 5, 25 ve 100 ng/mL konsantrasyonda yapılan geri kazanım çalışmasının bulguları
- Tablo 4.13.** OLZ etken maddesinin 1, 5, 25 ve 100 ng/mL konsantrasyonda yapılan geri kazanım çalışmasının bulguları
- Tablo 4.14.** RSP etken maddesinin 0,5, 25 ve 100 ng/mL konsantrasyonda yapılan geri kazanım çalışmasının bulguları
- Tablo 4.15.** PLP etken maddesinin 0,5, 25 ve 100 ng/mL konsantrasyonda yapılan geri kazanım çalışmasının bulguları
- Tablo 4.16.** SRT etken maddesinin idrar ve kandaki kesinlik bulguları

- Tablo 4.17.** OLZ etken maddesinin idrar ve kandaki kesinlik bulguları
- Tablo 4.18.** RSP etken maddesinin idrar ve kandaki kesinlik bulguları
- Tablo 4.19.** PLP etken maddesinin idrar ve kandaki kesinlik bulguları
- Tablo 4.20.** İdrarda ve kanda doğruluk çalışmasının bulguları
- Tablo 4.21.** Hastaların kan ve idrarlarındaki madde miktarları.
- Tablo 4.22.** Hastaların kan ve idrarlarındaki birim doza karşılık madde miktarları (C/D) ile genetik sonuçlarının bir arada görüntüsü.
- Tablo 4.23.** CYP2D6*4 alleli taşıyan ve taşımayan hastaların kan ve idrarlarındaki RSP ve OLZ konsantrasyonlarının istatistiksel bulguları

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Genetik araştırmaların önemi anlaşıldıktan sonra sayısız bilimsel çalışma yapılmış ve bireye özgü tedavi gündeme gelmiştir. Tüm bu çabanın tek sebebi insan sağlığını korumak ve yaşamsal değerlerin kalitesini daimi tutmaktır. İlaç veya yabancı bir madde vücuda alındığında organizmada etkileşime uğramaktadır. Bu nedenle vücuda alınan herhangi bir maddenin etkileştiği yerde biyoloji, kimya, toksikoloji, farmakoloji, tıp bilimleri; kısacası insana ve maddeye özgü tüm bilim dalları devreye girmektedir ve maddenin insana etki ettiği süreçte meydana gelebilecek her türlü neticenin bilinmesi hedeflenmektedir. Günümüz bilim dünyasında nanobilim hızla ilerlemekte ve tüm yaşamsal faaliyetler, davranışlar dahi atalarımızla ilişkilendirilmeye çalışılmakta iken, madde-insan etkileşimi için de, genetikten söz etmemek mümkün olmamaktadır. Vücuda giren maddenin genetik farklılıklardan nasıl etkilendiği sorusuna yıllardır çözüm aranmaya çalışılmakta ve gen çeşitliliğinin sınırsızlığında yapılan bu çalışmalar, günümüzde de tüm hızı ile ilerlemeye devam etmektedir. İlaç etken maddeleri ile yapılan çalışmalar, insana dair yapılan incelemelerin önde gelenlerindedir. Gerek tedavi amaçlı kullanılan maddeler, gerekse istismar amaçlı kullanılan maddeler, organizmada pek çok farklı netice gösterebilmektedir (Leon, J. ve ark. 2006; Meyer U.A., 2000). Bu farklılık, başta genetik çeşitlilik olmak üzere, alınan doz, yaş, cinsiyet, patolojik ve çevresel koşullardan etkilenmektedir (Labbé, L.,ve ark. 2000). Kişiler arası farklılığı ortadan kaldırmak mümkün olamayacağından, maddenin insanda meydana getirdiği bireysel etkinin düzenlenmesi için, kişiye özgü tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Ancak, bireysel tedavi yöntemlerinin bütçesinin ve süresinin şimdilik

sınırlandırılması gerektiğinden, çalışmalar genellikle popülasyonlara yönelik olacak şekilde biçimlendirilmeye çalışılmaktadır. Böylelikle hem etkin tedavi hem de ekonomik koşullar sağlanmış olacaktır (Seeringer, A. ve ark. 2008).

Vücuda alınan bir maddenin biyotransformasyon sürecinde karşılaştığı enzimlerin başında CYP450 enzim ailesi gelmektedir. Bu ailenin en önemli enzimlerinden biri ise CYP2D6 enzimidir ve 100'ün üzerinde alt gruptan oluşmaktadır (Hasler, J.A. ve ark, 1999). Bu da kişilerin, aynı dozda maddeden, farklı şekilde etkilenebileceği anlamına gelmektedir. Etkinin anlaşılmasının yollarından birini genetik araştırmalar oluşturmaktadır; onu tamamlayan ve fenotipte meydana gelen etkiyi gözlemlemeyi sağlayan diğer disiplinlerden biri ise toksikolojidir.

Bu çalışmada yukarıda sözü edilen madde-insan etkileşimi, farmakogenetik boyutu ile irdelenecek ve genetik ile toksikoloji biliminin keşiştiği bir araştırma sunulacaktır.

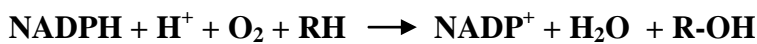
Çalışmanın amacı, CYP2D6 enzimi ile metabolize edilen risperidon, olanzapin ve sertralin ilaç etken maddelerini kullanan psikiyatrik hastaları gen kopya sayıları, CYP2D6*3 ve *4 tek nükleotid polimorfizmi, idrar ve kandaki madde ve metabolit konsantrasyonları yönünden inceleyerek farmakogenetiğin adli bilimlerle olan ilişkisini ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİ

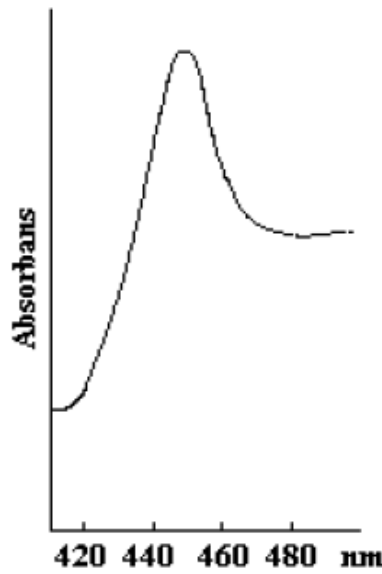
2.1. Sitokrom P450 (CYP450) Enzim Sistemi

CYP450, ilk kez, sıçan karaciğerinden mikrozoim fraksiyonları ile spektrofotometrik çalışmalar yapan Martin Klingenberg tarafından tanımlanmıştır. Sistem, katalitik fonksiyonları bilinmeden önce spektral özellikleri ile bilinmekteydi. Bu gruptaki proteinlerin, kendine has bir absorbans spektrumu vardır. Endoplazmik retikulum vesiküllerinden hazırlanan mikrozoim süspansiyonundan CO₂ gazı geçirildikten sonra indirgeyici bir ajan eklendiğinde spesifik bir absorbans spektrumu gözlenir. Bu işlem esnasında indirgenmiş “hem” proteinine CO₂ bağlanır ve 450 nm.’ de en yüksek absorbans elde edilir (Şekil 2.1). Ökaryotik hücrelerde P450’ lerin herbiri, demir-protoporfirin IX ile yaklaşık 500 amino asit içermektedir (Hasler, J.A. ve ark, 1999). Sitokrom P450 (CYP450) monooksijenaz enzim sistemi; steroidler, yağ asitleri, prostaglandinler ve diğer birçok doğal bileşiklerin olduğu kadar karsinojenlerin, ksenobiyotiklerin metabolize edilmesinden de sorumlu olan “heme-thiolate” yapısında enzimlerden oluşmaktadır ve genellikle elektron transport zincirinde terminal oksidaz olarak etki ederler (Nelson, D., 2003).

CYP450 enzimlerinin katalizlediği genel reaksiyon aşağıdaki gibidir;



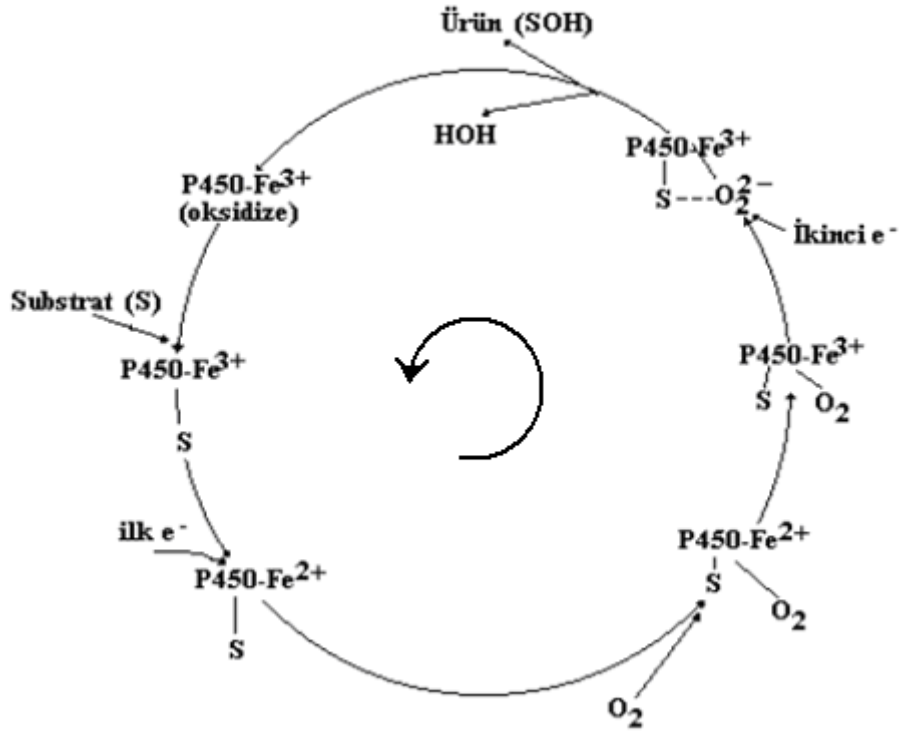
Bu reaksiyondaki substrat (R), bir steroid, yağ asidi, ilaç veya karsinojen olabilir. İki oksijen atomundan yalnızca biri substrata katıldığı için, bu reaksiyona monooksijenaz reaksiyonu ve bu enzimlere de CYP450 monooksijenaz enzimleri adı verilir (Hasler, J.A. ve ark 1999; Özerol, E., 1996; Nelson, D., 2003).



Şekil 2.1. Karbon monoksit bağlı CYP450' nin absorbans eğrisi, (Özerol, E. 1996).

CYP450 monooksijenaz enzimleri, ökaryotik P450 sistemlerinde iki bileşen halinde bulunmaktadır. Bunlar; FAD (Flavin Adenin Dinükleotid) ve FMN (Flavin Mono Nükleotid) içeren bir NADPH-P450 redüktaz ve CYP450 enzimleridir. CYP450 enzimine elektron akışı, NADPH-P450 redüktaz sistemi ile sağlanmaktadır. NADPH-CYP450 redüktaz enzimi membrana hidrofobik ucuyla bağlıdır. CYP450 enzimi ise endoplazmik retikulum membranına daha derin bağlanmıştır.

Monooksijenasyon reaksiyonunda toplam 2 elektron (e^-) gereklidir. Elektronlar CYP450 molekülüne tek tek transfer edilir. Hidroksilasyon (monooksijenasyon) reaksiyonunun gerçekleşmesi sırasında, oksijenin “hem” demirine bağlanabilmesi için hem’deki demir, ferri (Fe^{+3}) formundan ferro (Fe^{+2}) formuna indirgenmelidir. Moleküler oksijen atomlarından biri substrata bağlanırken, diğeri de suyu meydana getirir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. CYP450 sisteminin reaksiyon basamakları (Özerol, E. 1996).

2.2. CYP2D6 Enzimi

1970' lerde İngiltere'de ve Almanya'da iki ayrı araştırma grubu, sempatolitik antihipertansif bir ilaç olan debrisoquin ve antiaritmik bir ilaç olan sparteini kullanan bir grup hastanın ciddi yan etkiler gösterdiklerini gözlemlemişlerdir. Her iki ülkedeki araştırmalarda, kişilerdeki, ilacı okside etme kusurları ve metabolik kusurların, otozomal resesif olarak kalıtılan bir genin kontrolü altında olduğu görülmüştür. Kısa bir süre sonra her iki ilacın da metabolik kusurunun aynı genin mutasyonu sonucu oluşan enzime ait olduğu anlaşılmıştır. Daha sonra bufuralol ve metaprolol gibi diğer ilaçların da aynı kusurlu enzime sahip kişilerde metabolize edilemediği belirlenmiştir. İnsan karaciğer mikrozomlarıyla yapılan çalışmalar, zayıf metabolizör fenotipine sebep olan hasarlı CYP450 enzimlerinin varlığını göstermiştir. Spesifik olarak 50 kDa' lık proteinin zayıf kişilerin karaciğer örneklerinde bulunmayışı ile ispatlanmıştır. Bu biyokimyasal karakterizasyonları takiben Gonzales, 1988' de CYP2D ailesinin anlatım yapan üyesi olan ve CYP2D6 olarak adlandırılan lokusunu izole etmiştir. Biyokimyasal kanıtlara dayanarak 22q 13.1 kromozomunda lokalize olan 2D6 geni ile spartein oksidasyonunu kusurlu yapan enzimin geninin aynı gen olduğu doğrulanmış ve bunun 2D6 geninin polimorfizminden kaynaklandığı kanıtlanınca, sözkonusu mutasyonlar debrisoquin/spartein polimorfizmi olarak adlandırılmıştır, CYP2D6 enzimine de debrisoquin/spartein hidroksilaz enzimi denmiştir. 1989' da Kimura ve arkadaşları tarafından CYP2D lokusu izole edilerek dizini belirlenmiş ve mutasyonlu aleller, RFLP tekniği ile tespit edilmiştir (Kimura, S. ve ark. 1989; Daly, A.K., 2003; Zanger, U.M. ve ark. 2004). O dönemlerin modern biyomedikal laboratuvarlarının,

aranılan yeni tekniği haline gelmiş olan PCR teknolojisi ile birlikte, alele özgü ilk CYP2D6 PCR testleri Heim ve Meyer tarafından 1990' da gerçekleştirilmiştir (Heim, M. ve Meyer, U.A., 1990). Fonksiyonel olmayan protein ürünlerini veya artan/azalan fonksiyona sebep olan protein ürünlerini sentezleyen aleller, sonradan bulunmuştur. Genotip-fenotip ilişkisine dayalı çok sayıda çalışma ve ilaç metabolizasyonunun kişiler arası çeşitliliğini gösteren çalışmalar yapılmıştır (Ingelman-Sundberg, M. ve ark. 1999; Daly, A.K. 2003; Zanger, U.M. ve ark. 2004).

2.2.1. CYP2D Lokusunun Yapısı

İnsan CYP2 ailesi, 13 alt aileye; 16 normal, 16 psödogene sahiptir (Nelson, D. 2003). Bu 13 alt aileden biri olan CYP2D' nin bulunduğu CYP2D lokusu 1989'da Kimura ve ark. tarafından izole edilmiş ve baz dizini belirlenmiştir. Bu lokus, 22. kromozomun uzun kolu üzerinde, oldukça homolog üç gen içerir (Kimura, S. ve ark. 1989; Gaedigk, A. ve ark. 1991) (Şekil 2.3). CYP2D8P, CYP2D7P ve CYP2D6 diye adlandırılan bu genler 45 kb'lik bir bölgede bulunmaktadır (Kimura, S. ve ark. 1989). CYP2 gen ailesinin diğer üyeleri gibi 2D genleri de 9 ekson, 8 intron içerirler. CYP2D8P, pekçok delesyon ve insersiyonlar içeren gerçek bir psödogendir ve okuma çerçevesi kapalıdır. CYP2D7P geni ise, CYP2D8P' ye göre CYP2D6' ya daha benzerdir. İlk eksonunda sadece bir tane T138 insersiyonu içerir ve bu insersiyon okuma çerçevesini değiştirerek translasyonun erken sonlanmasına sebep olur. Dolayısı ile CYP2D7P de bir psödogen olarak kabul edilir. Şekil 2.3'de belirtildiği gibi, CYP2D8P ve CYP2D7P genleri psödogendir, CYP2D6 geni ise fonksiyonel bir genidir. Genin ürünü olan CYP2D6 enziminin protein dizini Ek 1'de gösterildiği gibidir.



Şekil 2.3. CYP2D lokusunda bulunan genler (Endrizzi, K. ve ark. 2002).

2.2.2. CYP2D6 Enzim Aktivitesi ve Polimorfizmi

CYP2D6, metabolize ettiği 70' in üzerinde ilaç olması sebebiyle önemli bir enzimdir ve belki de bu özelliği nedeniyle, en çok çalışılan enzimdir (Nelson, D. 2003). Opiatlar, nöroleptikler, antidepresanlar, β -blokerler v.b. maddeler, CYP2D6 enziminin başlıca substratlarıdır (Zackrisson, A.L. ve ark. 2004; McKinnon, R.A. ve Evans, A.M. 2000). CYP2D6 enziminin metabolize ettiği ilaçlardan bazıları Tablo 2.1'de görülmektedir (Açıkkol M. ve Mercan S., 2011; Bertilsson L., 2002).

Enzimi kodlayan genin 100' den fazla farklı allele sahip olduğu saptanmıştır ve konu ile gelişmeler, yeni alleller, araştırmalar "www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2d6.htm" adresinde bildirilmektedir. Bu alleller, bir veya daha fazla sayıda nokta mutasyonları, delesyon, insersiyon, duplikasyon ve multiduplikasyonlar içerebilir (Daly, A.K. ve ark. 1996a). Söz konusu mutasyonların, enzim aktivitesini engellemediği durumlar olduğu gibi, inaktif düşük veya yüksek aktiviteli enzim üretimi görülmesi de mümkündür. CYP2D6*3 aleli, 5. eksonda 2549 A delesyonu sebebiyle inaktif bir enzim üretimi yapar ve enzim fonksiyonunu yitirir. CYP2D6*4 aleli, genin, 4. eksonda 1846 G>A değişimine uğraması sonucu oluşan bir inaktif enzim üretir. CYP2D6*5 aleli, tüm genin delesyona uğradığı ve hiç enzimin üretilmediği bir aleldir. CYP2D6*6 ise, 3. eksonda 1707 T delesyonu sonucu inaktif enzim üretir ve

o da zayıf metabolizörlerin yer aldığı gruptadır. Ya da aktif allellerin birden fazla kopyası meydana gelebilir.

Tablo 2.1. CYP2D6 enzimi ile metabolize olan ilaç etken maddelerinden bazıları
(Açikkol M. ve Mercan S., 2011; Bertilsson L., 2002)

İlaç grubu	Substrat
Antidepresanlar	Paroksetin, Fluoksetin, Sitalopram, Sertralin, Venlafaksin, Amitriptilin, Mianserin, Klomipramin, Desipramin, İmipramin, Nortriptiline
Antipsikotikler	Klorpromazine, Haloperidol, Thioridazine, Zuclopenthiksol, Perphenazine, Risperidone, Olanzapin, Klozapin
β-Blokerler	Metoprolol, Propranolol, Timolol
Anti-aritmikler	Enkainid, Flekainid, Perfeksilen, Propafenon, Sparteın
Diğer	Ecstasy, Opioids, Codeine, Hydrocodone, Dihydrocodeine, Bupropion, Deksfenfluramine, Tramadol

Mutasyonların etkisine göre dört fenotip belirlenmiştir. Bunlar; zayıf metabolizörler (PM), orta hızlı metabolizörler (IM), normal metabolizörler (EM) ve hızlı metabolizörler (UM) olmak üzere dört gruptan oluşmaktadır (Zanger, U.M. ve ark. 2004; Meyer, U.A., 1994; Rogers, J.F. ve ark. 2002).

Zayıf Metabolizörler (PM): Beyaz popülasyonun ortalama %5-10' u yavaş metabolize eden enzim üreten alellere sahiptir. Bu grubun % 93-97.5' inin ise, CYP2D6 *3, *4, *5 ve *6 alellere sahip olduğu ifade edilmektedir (Marez, D. ve ark. 1997; Daly, A.K. ve ark. 1996a; Sachse, C., ve ark. 1997; Roberts, L.R. ve Kennedy, M.A. 2006). Beyaz popülasyonun zayıf metabolizörlerinin %23' ü CYP2D6*4 aleline sahiptir, % 4' ü ise *5 aleline sahiptir (Heim, M. ve Meyer, U.A. 1990). 208 kişi ile yapılan bir beyaz ırk popülasyonu çalışmasında, CYP2D6*5 alelinin sıklığı 0.038 bulunmuştur (Gaedigk A. 1999). Avrupa popülasyonunun yaklaşık % 5' inde ve Oryantal ırkın % 1' inde CYP2D6 enzimi inaktiftir (Daly, A.K., 2003). Zayıf metabolizörlerin, normal metabolizörlere göre, ilaç plazma seviyeleri daha yüksek görülür ve böyle kişiler ters ilaç etkisi göstermeye daha meyillidirler (Sachse, C. ve ark., 1997; Herken, H. ve ark. 2001).

Orta Hızlı Metabolizörler (IM): CYP2D6*9, *10, *17, *36, *41 alelleri içerdikleri mutasyonlara bağlı olarak düşük aktiviteli enzim üretirler. Ya da iki allelinden biri inaktif allel, diğer fonksiyonel allel ise; böyle fenotipler de IM olarak değerlendirilir (Zanger, U.M. ve ark 2004).

Normal Metabolizörler (EM): CYP2D6*1, enzimin hiçbir mutasyon içermeyen ve normal fonksiyonunu sürdüren alelidir. *2, *33, *35 alelleri ise bazı nokta mutasyonlar içerseler de enzim fonksiyonunda herhangi bir değişikliğe neden

olmazlar ve bu alellere sahip kişiler normal metabolizörler (EM) olarak adlandırılırlar.

Hızlı Metabolizörler (UM): Bu fenotipe sahip kişilerde CYP2D6 geninin birden fazla kopyası bulunmaktadır (Şekil 2.4). Gen duplikasyonu sayısının 12' ye kadar çıktığı görülmüştür Bir ailenin üç üyesi olan baba ve iki çocuğunda bu genin 12 kopyası tespit edilmiştir (Johansson, I. ve ark. 1993; Ingelman-Sundberg, M. 1999). Beyaz popülasyonda % 7 sıklıkta görülen bu enzimler, yüksek derecede aktivite gösterirler ve plazmadaki metabolit seviyeleri etkin dozun çok altında olduğundan, ilgili ilaç ya da madde beklenen etkiyi göstermez (Linda S.W. ve ark 1998; Zanger, U.M. ve ark 2004; Lovlie, R. ve ark. 1996).



Şekil 2.4. CYP2D6*2 alelinin gen duplikasyonu ve UM oluşumu (Ingelman Sundberg M., 2005).

CYP2D6 enzimi bazı ilaç etken maddeleri tarafından inhibe edilmektedir. Bu inhibitör maddelerden bazıları Tablo 2.2’de görülmektedir. CYP2D6 enzimini indükleyen herhangi bir madde bulunmamaktadır. Klinik çalışmalar depresyon hastalarına trisiklik antidepresan ile fluoksetinin aynı anda verilmesi durumunda, EM olan bir kişinin PM gibi davrandığını göstermiştir (Coutts, R.T. ve Urichuk, L.J., 1999).

Tablo 2.2. CYP2D6 enzimini inhibe eden bazı ilaç etken maddeleri (Coutts, R.T. ve Urichuk, L.J., 1999).

Enzimin adı	Enzim inhibitörleri
CYP2D6	Amitriptilin, Sitalopram, Klomipramin, Desipramin, Demetil-sitalopram, <i>O</i> -Demetilkuinidin, Dihidrokuinidin, Fluoksetin, Flovoksamin, 3-Hidroksikuinidin, Norfluoksetin, Paroksetin, Kuinidin, Sertralin

2.2.3. CYP2D6 Polimorfizmi ile İlgili Çalışmalar

Dünyanın pek çok ülkesinde CYP2D6 geninin polimorfizm çalışmaları yapılmış ve yapılmaktadır. İlaç metabolize eden enzimlerden, bugüne kadar en fazla çalışılanı CYP2D6 enzimidir (Meyer, U.A., 1994).

Hollanda’ da, 241 psikiyatri hastası ile yapılan çalışmada, hastaların % 2,5’ i UM, % 8,3’ ü ise PM olarak belirlenmiştir ve aynı çalışma, PM’ lerin tedavisinde kullanılan psikotrop maddeler için doz ayarlaması yapılırken dikkat edilmesi gerektiğini, zira bu kişilerde ilaçların etki süresinin uzadığını vurgulamaktadır (Tamminga, W. ve ark. 2003). Bir diğer çalışmada ise, İtalyan popülasyonunun % 53,3’ ü homozigot EM, %35’ i heterozigot EM (alellerinden biri mutant), %3,4’ ü PM ve % 8,3’ ü ise UM bulunmuştur (Scordo, G.M. ve ark. 2004). Zackrisson ve ark.’ nın İsveç’ de zehirlenerek ölen 236 kişi ve 281 kontrol grubu ile yaptığı bir çalışmanın sonucuna göre, zehirlenme vakalarında belirlenen zayıf metabolizör yüzdesi (% 4,7), kontrol grubuna göre (% 8,5) daha azdır. Ayrıca CYP2D6*4 aleline postmortem çalışmada anlamlı bir şekilde az rastlanmıştır (Zackrisson, A.L. ve ark. 2004).

Avrupa popülasyonundan 672 kişinin katıldığı bir çalışma neticesinde, 48 nokta mutasyonu belirlenmiş ve popülasyonun % 87’ sinin CYP2D6*1 (EM), CYP2D6*2 (EM), CYP2D6*4 (PM) ve CYP2D6*5 (PM) alellere sahip olduğu tespit edilmiştir (Marez, D. ve ark. 1997).

Otani K ve ark (2008) 202 Japon metamfetamin bağımlısı ve 337 Japon kontrol gurubu ile bir çalışma gerçekleştirmiş ve CYP2D6*1, *4, *5, *10 ve *14 allelerini genotiplendirmişlerdir, her iki çalışma grubunda da *4’e rastlamamışlardır ve sonuç olarak metamfetamin bağımlılığı ile CYP2D6 geni arasında anlamlı bir ilişki bulmuşlardır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bağımlıların daha az *10 ve *14 allelerine sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Bağımlılar arasında hiç zayıf metabolizör olmadığını ve orta hızlı metabolizörlerin sayısının da kontrol grubuna nazaran daha az olduğunu bulmuşlardır (Otani K. ve ark., 2008).

Ülkemizde, psikiyatri hastaları ile yapılan bir çalışma neticesinde, psikiyatrik tedavide kullanılan ve CYP2D6 ile metabolize edilen maddeler için hastaların % 1,45' i zayıf metabolizör olarak, % 10,29' u ise hızlı metabolizör olarak saptanmıştır (Herken, H. ve ark. 2001). Benzer bir çalışmada, Açikkol, M. ve Mercan, S. (2011) 49 opiyat bağımlısı ve 34 kontrol grubu ile yaptıkları çalışmada opiyat bağımlılarında CYP2D6*4 ve *6 allelerinin frekanslarını sırasıyla %8,2 ve %3,2; kontrol grubunda ise %10,5 ve %1,5 bulmuşlar (Açikkol, M. ve Mercan, S., 2011).

Bunun yanı sıra, ülkemizde 404 örnekle yapılan çalışmanın sonucunda, en sık rastlanan allelin CYP2D6*1 (EM) olduğu bulunmuştur. 0,37 olarak tespit edilen bu allel frekansının dışında, CYP2D6*2 (EM) allelinin sıklığı, 0,35 olarak tespit edilirken, CYP2D6*4 (PM), 0,11 sıklıkta gözlenmiş, CYP2D6*5 (PM) alleli ise % 1 sıklıkta görülmüştür. UM' lerin oranı ise, % 8,66 olarak belirlenmiştir (Aynacıoğlu, S.A. ve ark., 1999). Koseler A. ve ark. (2007) Türk popülasyonunda CYP2D6*4 allelinin en sık rastlanan mutant allel olduğunu bildirmiştir (Koseler A. ve ark., 2007). Aydın M. ve ark (2005) ise yaptıkları çalışmada Türkiye'de CYP2D6*4 frekansını %15; *3 frekansını %2,5 olarak bildirmişlerdir (Aydın M ve ark., 2005).

2.3. Biyotransformasyon

Çeşitli yollarla organizmaya giren her türlü yabancı maddeye ksenobiyotik denir. Ksenobiyotiklerin başında, ilaçlar, besinlerle alınan boya maddeleri, antioksidanlar, sigara dumanı, çevresel atıklar gelir. İlaçların ve herhangi bir yolla vücuda alınan yabancı maddelerin, enzimlerin etkisiyle kimyasal değişikliklere uğrayarak, yeni bileşiklere dönüşmesine biyotransformasyon (metabolizasyon) denir.

Biyotransformasyonun amacı, maddeleri, daha polar bileşikler haline getirerek, vücuttan atılımını kolaylaştırmaktır. Biyotransformasyon sonucu maddeler, genellikle daha az etkili veya etkisiz bileşikler haline getirildiğinden, reaksiyonların çoğuna genellikle biyoinaktivasyon veya detoksikasyon (zehirsizlenme) da denir. Ancak bazen ilaçlar biyotransformasyon sonucu daha etkili (kodein'in morfine dönüşmesi gibi), bileşikler haline dönüşebileceği için, bu reaksiyonlara detoksifikasyon reaksiyonları demek her zaman doğru olmayabilir. Biyotransformasyon ile maddelerin lipid/su partiyon katsayıları azalır ve sudaki çözünürlükleri artarak vücuttan daha kolay atılırlar. Biyotransformasyon yapan enzimlerin bazıları, az veya çok, tüm hücrelerde bulunur. Büyük kısmı ise spesifik olarak belirli organlarda (karaciğer, GİS mukoza ve lümeni, böbrek, akciğer ve diğer yapılarda) bulunurlar. Metabolizmada başrol oynayan organ karaciğerdir. Burada en önemli fraksiyon ise mikrozomal enzimlerdir (Murray, R.K. ve ark., 1993; Parkinson, A., 2001).

2.3.1. Biyotransformasyonda bilinmesi gereken temel kavramlar

Farmakokinetik: İlacın absorpsiyonu, dağılımı, metabolizasyonu ve atılım sürecinin kantitatif olarak araştırılması ve karakterizasyonudur. Bu, biyokimyasal proseslerin yoğunluğu ile terapötik ve advers etki süreleri arasındaki ilişki ile ilgilidir.

Biyoyararlanım: Sistemik dolaşıma ulaşan ilaç dozudur.

Dağılım: Bir ilacın merkezi kompartımandan periferik kompartımana, dokuya taşınma oranıdır.

Eliminasyon: Bir ilacın metabolizasyon oranıdır, genellikle yarılanma ömrü olarak belirtilir. Akciğer ve böbreklerde de ekstrahepatik metabolizasyon meydana gelmesine rağmen antipsikotikler için genellikle hepatiktir.

Kararlı durum (steady state): Günlük alınan ilaç miktarının elimine edilen günlük ilaç miktarına eşit olması durumudur (Sharif, Z.A., 2003).

2.3.2. Ksenobiyotiklerin Biyotransformasyon Mekanizması

Ksenobiyotiklerin metabolizasyon reaksiyonları, Faz I ve Faz II reaksiyonları olmak üzere iki genel grupta toplanırlar.

Faz I Reaksiyonları

Bu reaksiyonların amacı, moleküle hidroksil, karboksil, amino ve tiyol gibi polar bir fonksiyonel grup kazandırmaktır. Böylece maddeler daha polar bileşikler haline alır. Bu, hidroksilasyon reaksiyonlarında olduğu gibi, moleküle yeni bir fonksiyonel grup katmak veya var olan bir fonksiyonel grubu değiştirmek şeklinde olur. Bu şekilde, molekül daha polar ve daha kolay atılabilir hale gelir. Faz I reaksiyon metabolitleri, çoğunlukla Faz II reaksiyonları için substrat olarak kullanılırlar (Rollas, S., 1992; Vural, N.,1996 ; Murray, R.K. ve ark., 1993; Özyazgan, S., 2002; Parkinson, A., 2001).

Faz I Reaksiyonları;

- Oksidasyon
- Redüksiyon
- Hidroliz, olmak üzere üç ana gruba ayrılır.

Oksidasyon: Metabolizasyon reaksiyonlarının en önemlisi oksidasyondur. Oksidasyonu katalizleyen enzimler, oksidazlar, monooksijenazlar ve

dioksijenazlardır. Oksidasyonun gerçekleşmesi için, moleküler oksijen ve redüklenmiş nikotinamid adenosin dinükleotidfosfat (NADPH) gereklidir. Oksijenin bir atomu substrata bağlanırken diğeri ise, su oluşturmak üzere kullanılır.

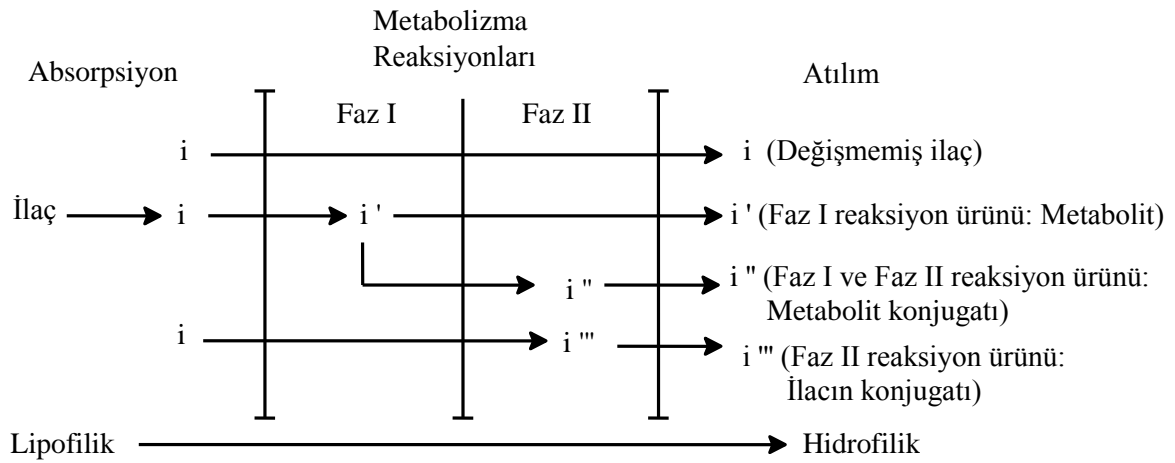
Redüksiyon: Fonksiyonel grup olarak karbonil, azo, disülfür, sülfoksit, alken ve nitro grubu içeren ksenobiyotiklerin biyoredüksiyonu ile alkol ve amin türevi metabolitler meydana gelir. İndirgenme reaksiyonları, bir ksenobiyotiğin detoksifikasyon yolu olabildiği gibi, çoğu kez daha toksik ve ara aktif metabolitler oluşmasına sebep olabilir.

Hidroliz: Ester veya amid, epoksit grubu taşıyan ilaçların, en önemli biyotransformasyon yollarıdır. Sonuçta, molekülde Faz II reaksiyonlarının yürüyebileceği alkol, fenol, karboksilli asit ve amin gibi fonksiyonel gruplar oluşur. Hidroliz, diğer detoksikasyon reaksiyonları ile yarışır. Hidroliz enzimleri hem mikrozomlarda hem de mitokondrielerde bulunurlar. Hidrolazlar; amidazlar, esterazlar, epoksit hidrolazlar ve DDT-klorinazlar olmak üzere sınıflandırılabilirler. Ayrıca karşılıklı olarak, amidazlar, esterleri; esterazlar da amidleri hidroliz edebilir (Rollas, S., 1992; Vural, N.,1996 ; Murray, R.K. ve ark., 1993; Özyazgan, S., 2002; Parkinson, A., 2001).

Faz II (konjugasyon) Reaksiyonları

Moleküle küçük, polar, iyonize olabilen grupların, enzimatik olarak katıldığı, bir anlamda sentez reaksiyonlarıdır. Bu reaksiyonları katalize eden enzimler, transferazlar olarak bilinirler. Reaksiyonlar sonucu oluşan konjugatlar (Faz II metaboliti), çoğunlukla idrarla atılırlar. Konjugasyonlar, genellikle Faz I reaksiyonları sonucu, moleküle kazandırılmış fonksiyonel gruplar üzerinden yürür ve

sonuçta suda çözünen, aktivite ve toksisitesini kaybetmiş ürünler oluşur. Konjugasyon reaksiyonları, kimyasal maddelerin organizmadaki glukuronik asit, amino asitler, metil grubu, sülfat ve asetil grubu taşıyan endojen maddelerle birleşmesi neticesinde oluşur. Hidroksil, amino, karboksil, epoksit veya halojen grubu içeren ksenobiyotikler, Faz I reaksiyonları sonucu oluşan metabolitler veya birçok doğal maddeler, konjugasyon reaksiyonları sonucu, daha polar özellik kazanarak atılıma uğrarlar. Ancak, her zaman bu mekanizma düzenli olarak işlemez. Bazı maddeler direkt Faz I sonucu atılıma uğrarken, bazıları her iki basamaktan da geçerek metabolize olur veya hiç Faz I' e uğramaksızın doğrudan konjugasyonla polar hale gelir ve atılır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. İlaç etken maddelerinin Faz I ve Faz II reaksiyonları sonucu olası atılım şekilleri

Konjugasyon reaksiyonları ve bu reaksiyonları gerçekleştiren enzimlerin genel sınıflandırması aşağıdaki gibidir:

Glukuronik asitle birleşme: UDP- glukuronil transferaz (UGT) enzimi aracılığıyla yapılır.

N- metilasyon: N- metil transferaz enzimleri tarafından yapılır.

O- metilasyon: O- metil transferaz enzimi ile yapılır.

N- asetilasyon: N- asetil transferaz (NAT) enzimleri tarafından yapılır.

Sülfat ile konjugasyon (sülfatasyon): Sülfotransferaz enzimi ile katalizlenir.

Glutation ile konjugasyon: Bu olay “glutation- S- transferaz “ enzimi ile katalizlenir.

Amino asitle konjugasyon: İlaçlar burada glisin veya glutamin ile konjuge edilirler.

Diğer konjugasyonlar: Purin ve pirimidin analogu ilaçlar, riboz ve riboz fosfatlarla ribonukleozid ve ribonukleotid konjugatlarına dönüştürülürler.

(Rollas, S., 1992; Vural, N.,1996 ; Murray, R.K. ve ark., 1993; Özyazgan, S., 2002; Parkinson, A., 2001).

2.4. Polimorfizm ve Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP)

İnsan genom projesi, insan genlerindeki polimorfizmin varlığı ile ilgili, daha çok bilgi edinilmesini sağlamıştır. İnsanın genetik polimorfizmine bakılarak, ilaç dozlarının kişiye göre belirlenmesi, gelecekte uygulanabilecek yöntemlerdendir. Diğer genlerle kıyaslandığında, ilaç ve ksenobiyotikleri metabolize eden enzimleri üreten genlerin polimorfizmi ve bunun fonksiyonel anlamı en yaygın, en iyi anlaşılanslardır. İnsan genom projesinin sonuçlanmasıyla, 30.000 dolayında gen ortaya konmuştur ve genom üzerinde ortalama bir hesapla her 2000-2500 nükleotitte

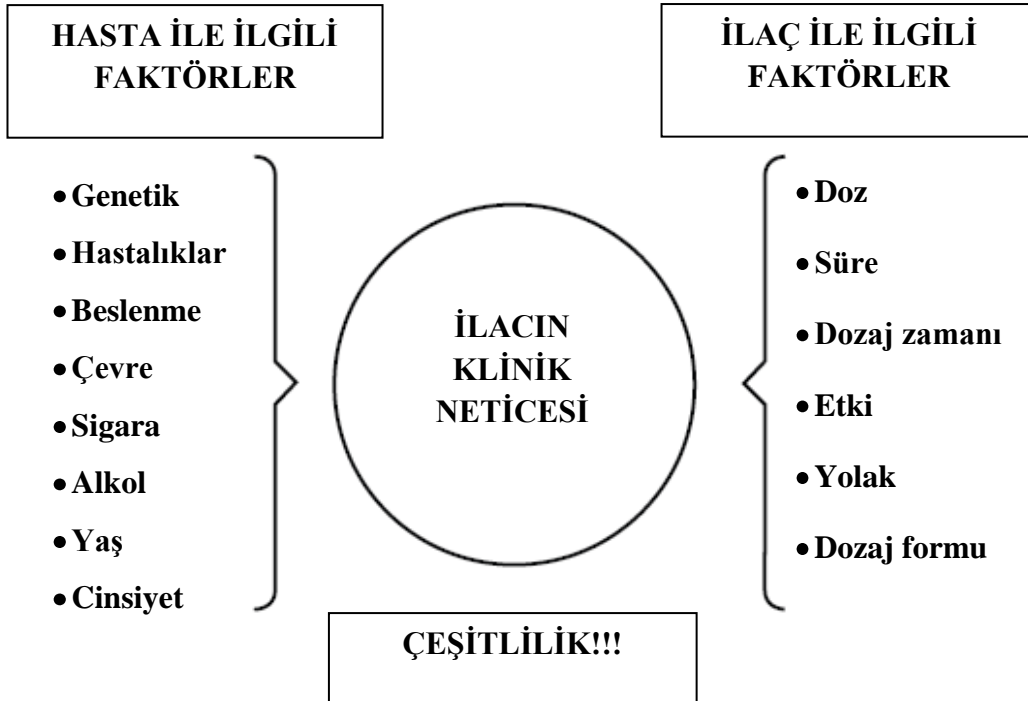
bir, bireyler arasında değişikliğe neden olan tek nükleotid polimorfizmi (SNP) bulunduğu öngörülmektedir (Ingelman-Sundberg, M., 2001).

Farmakogenetik alanında yaygın kabul gören şekliyle, normal popülasyonda bir karakter için iki veya daha fazla fenotip bulunuyorsa ve bu fenotiplerden her biri, %1'den daha büyük sıklıkta görülüyorsa, bu duruma genetik polimorfizm adı verilir (Ingelman-Sundberg M., 2001). Polimorfizmin büyük çoğunluğunu tek nükleotid polimorfizimleri (SNP' ler) oluşturmaktadır. 5- 15 milyon civarında olduğu düşünülen SNP' lerin yalnızca % 1' i fonksiyonel değişikliğe yol açar ve insanlararası çeşitliliği sağlar. Bu da 100.000 civarında polimorfik bölgeye karşılık gelmektedir (Sadée, W., 1999).

2.5. Farmakogenetiğin tarihçesi

Klinisyenlerin kendi ilaçlarını kendilerinin hazırladığı dönemlerde, Voltaire (1694-1778) "hastalığı hakkında hiçbir şey bilmeyen hastalara", kesin olarak "bilinmeyen hastalıkları" ile ilgili, "bilinmeyen ilaçların" verildiğini belirtmişti. Günümüzde 21. yüzyıla girmemizle birlikte bu durum, insan biyosisteminin verilen ilaca yüksek çeşitlilikteki yanıtını açıklamak üzere henüz mevcut biyomedikal bilgi olmadığı şeklinde açıklanmaktadır. Tüm hastaların ortalama %30'unun ilaç tedavisinden başarılı sonuç aldığı, %30'unun etki görmediği, %10'unun advers etki gösterdiği ve %30'unun ise ilaca uyumsuz olduğu bildirilmektedir (Mulder, H., 2007; Arıciöğlü, F. ve Çetin, M., 2010). Ayrıca, Amerika'da her yıl, reçete edilen ilaçların neden olduğu advers etkiler yüzünden 106.000 kişinin öldüğü, 2,2 milyon kişinin ise zarar gördüğü bildirilmektedir. Hollanda'da hastaneye başvuran hastaların başvuru nedeninin %5,6'sının ilaçlarla ilgili olduğu bilinmektedir. Bu rakamlar hastaların gösterdikleri

advers etkileri veya tedavi hatalarını açıklamayı amaçlayan araştırmaların önemini vurgulamaktadır (Mulder, H., 2007). Yaş, cinsiyet, sigara içme alışkanlığı, böbrek ve karaciğer fonksiyonları vb. hastaların iyileşme sürecini etkileyen etkenlerden bazılarıdır (Şekil 2.6). Ek olarak, genetik düzen de bu konunun en önemli alanlarından biridir. 1900'lü yılların başlarında Archibal Garrod enzim aktivitelerinin özel genler tarafından yönetildiğini bildirdi. II. Dünya Savaşı boyunca Afrikalı Amerikalı askerlerinin sıtma ilacı nedeniyle hemoliz sorunu yaşadıkları bildirilmiştir. Daha sonra bu advers etkilerin glikoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin genetik çeşitliliğinden kaynaklandığı ortaya çıkmıştır. 1950'lerde tüberküloz ilacı olan izoniyazidin bazı hastalarda periferel nöropati geliştirmiştir.



Şekil 2.6. Hasta ile ilaç arasındaki ilişkiyi etkileyen faktörler (Mulder, H., 2007).

Tüm bu advers etkilere genetik çeşitliliğin neden olduğu ile ilgili düşünceler ortaya çıkmış ve bu alana yönelen araştırmacıların sayısı artmıştır. Farmakogenetik terimini ilk kez 1959 yılında Frederich Vogel türetmiştir (Mulder, H., 2007). 1970' lerde bir antihipertansif ajan olan debrisoquin kullanan hastaların % 10' unda yan etkiler meydana gelmiştir. Werner Kalow ve diğer araştırmacılar bu yan etkilerin serum kolinesteraz, sitokrom P450, N-asetiltransferaz gibi enzimlerin genetik polimorfizminden kaynaklandığını göstermişlerdir. Bu bulguların ışığında, farmakogenetik çalışmalar gelişmeye devam etmiştir (Kalow, W., 2001).

2.6. Advers İlaç Reaksiyonu (ADR) ve farmakogenetik

Advers ilaç etkisi (ADR), ciddi hastalıklara sebep olabilen veya ölüme yol açabilen, maddi yükü de oldukça fazla olan, en temel klinik problemlerden biridir (Ingelman-Sundberg, M. 2001; Edwards, I.R. ve ark. 2000). ADR, Tip A ve Tip B olmak üzere genellikle iki ana gruba ayrılır; A tipi (tahmin edilebilir) reaksiyonlar, ilaç veya maddenin farmakolojik bilgilerine dayanarak önceden tahmin edilebilir ve ilacın veya maddenin, farmakolojik etkisine benzer, ancak, daha abartılı etkiler şeklinde görülür. B tipi ADR' de ise, pekçok farklı biçimlerde, doz-yanıt ilişkisine bağlı olmayan, ilacın farmakolojik özelliklerinden yola çıkıldığında, tahmin edilemeyen reaksiyonlar görülür (Pirmohamed, M. ve Park, K. 2003). Her iki tip ADR' nin oluşmasında da genetik yatkınlık olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (Pirmohamed, M. ve Park, K. 2001). ADR' ye sebep olan ilaçların büyük çoğunluğu, CYP450 enzimleri ile metabolize edildiğinden, yan etki oluşumu ile ilgili çalışmalar, genellikle CYP450 genleri ve bunların polimorfizmi üzerine yoğunlaşmıştır (Pirmohamed, M. ve Park, K. 2003). İngiltere' deki bir çalışmaya

göre her 25 hastane vakasından biri advers ilaç etkisine bağlıdır ve son yıllardaki çalışmalar göstermiştir ki; advers ilaç etkisinden yılda 106.000 insan ölmekte, 2,2 milyon insan ise zarar görmektedir (Wolf, C.R., 2000). Amerika Birleşik Devletleri'nde hastaneye yatırılan hastalarda, advers ilaç etkisi (ADR) oranı % 6,7; ölümcül ADR oranı % 0,32 olarak bulunmuştur. Bu oran ADR' yi, ABD'de ölüm nedenleri içerisinde 4. sıraya yerleştirmektedir (Ingelman-Sundberg, M., 2001).

Farmakogenetik çalışmalar bireyler arasında, ilaçların eliminasyonunun ve etkilerinin genetik farklılıklar nedeniyle değişmesini inceleyen çalışmalardır. Polimorfik Faz I enzimleri ile metabolize edilen ilaçların %56' sında ADR gözlenmektedir. Bu beklenmeyen reaksiyonların % 86' sından CYP450 enzimleri sorumludur (Ingelman-Sundberg, M., 2004; Ingelman-Sundberg, M., 2001). İlaç yanıtındaki bu genetik çeşitliliğin araştırma alanında yer alan farmakogenetik araştırmalar, iki ana grupta ele alınmaktadır: birincisi, spesifik geni belirlemek ve ilacın sebep olduğu yan etkinin gen ürünü ile ilişkisini kurabilmek; ikincisi ise, genlerin alelik çeşitliliğinin varolan ilaçların yanıtı ile ilgisini belirlemektir (Wolf, C.R., 2000). Beklenmeyen ilaç yan etkileri, zaman zaman hastane kayıtları ile ifade edilse de, bu konunun kalıtım kökenli sistematik çalışmaları 1950' lerde başlamıştır. Bazı hastalarda süksinil kolin alımından sonra süregelen bir respiratör musküler paraliz gelişmiştir (Sadée, W., 1999).

2.7. Farmakogenetiğe Adli ve Klinik Yaklaşım

CYP2D6 enziminin polimorfizminin insan üzerindeki etkisi pek çok klinik araştırma ile incelenmesinin yanı sıra adli olgular ile de değerlendirilmektedir.

Kalça ağrısı nedeni ile ağrı kesici (300 mg asetaminofen, 15 mg kafein, 30 mg kodein) tableti aldıktan sonra meydana gelen yan etkiler nedeni ile acil departmanına getirilen 14 yaşındaki Angelman sendromlu bir kız hastanın, bir gece önce aldığı ağrı kesici tabletten sonra şikayetlerinin gittikçe arttığının, ağrıları devam edince ertesi sabah bir tablet daha ağrı kesici aldığı ve sabah dozundan sonraki 30 dakika içinde hastanın kontrolsüz el-kol hareketleri yapmaya ve soluk almada güçlük çekmeye başladığının gözlemlendiği, acil servise getirilen hastaya 0,4 mg nalokson yapıldığı ve hasta rahatlayınca evine gönderildiği bildirilmektedir. Acil tıp klinisyeni, hastanın CYP2D6 gen duplikasyonu olduğunu düşünmüş, ancak, hastanın genotipinin CYP2D6 *4/*5 olduğu saptanmıştır. Bilindiği üzere CYP2D6*4 fonksiyonel olmayan enzim üretirken, CYP2D6*5 ise gen delesyonu olarak tanımlanmaktadır ve bu hasta zayıf metabolizördür. Bu durumda alınan kodein morfine dönüşemediğinden hastanın ağrısı kesilmemiştir ve kodeinden kaynaklı yan etkiler ortaya çıkmıştır. Yani sanılanın aksine hastada narkotik zehirlenme olmamıştır. Ayrıca hastanede uygulanan naloksona hastanın pozitif yanıt vermesi ise düşük dozda verilen naloksanın hastada opiyat analjejisini sağlayabileceği şeklinde açıklanmaktadır (Shaw, K.D. ve ark, 2012).

Kodein zehirlenmesi ile ilgili bir diğer olguda ise; 62 yaşında kronik lösemili olan hastada, öksürük şikayeti ile aldığı tek doz kodeinden sonra solunum depresyonu ve koma meydana gelmiştir. Kodein seviyesi 114 µg/L, kodein-glukuronid seviyesi 361 µg/L, morfin seviyesi 80 µg/L, morfin-3-glukuronid seviyesi 580 µg/L, morfin-6-glukuronid seviyesi ise 136 µg/L bulunmuş. Bu bulgulara göre morfin ve metabolitlerinin normal metabolizörlerde olması gereken seviyelerden çok daha

yüksek olduğu bildirilmiştir. CYP2D6 genotiplendirmesi sonucu hastanın UM olduğu tespit edilmiştir ve yüksek morfin seviyesinin nedeninin CYP2D6 polimorfizminden kaynaklandığı ispatlanmıştır (Gasche Y. ve ark. 2004).

Uzun dönem nöroleptik kullanımı tardif diskinezi (TD), akatizi, parkinsonizm gibi hastalıkları tetiklemektedir. Bazı raporlar TD'ye genetik eğilim olduğunu bildirmektedir. Andreassen ve ark. TD gösteren hastaların TD göstermeyen hastalara oranla 3 kat daha fazla PM olduğunu bildirmiştir. Genetik olarak bozulmuş CYP2D6 metabolizmasının, uzun dönem nöroleptik ilaç kullanan hastalarda TD gelişmesine neden olabilecek etkenlerden olduğu düşünülmektedir (Andreassen, O.A. ve ark. 1997).

Metadon ile tedavi edilen 10 madde bağımlısı hastaya ortalama 12 günlük bir periyotta günlük 20 mg paroksetin verilmeden önce ve verildikten sonra metadonun R ve S formlarının kararlı hal kan konsantrasyonları ölçülmüştür. Bu hastaların 8'i CYP2D6 EM iken diğer 2'si PM'dir. EM hastaların hepsinde paroksetinin, her iki formdaki metadon konsantrasyonunu anlamlı bir şekilde arttırdığı görülmüştür. Öte yandan PM'lerde sadece S formunun arttığı görülmüştür. Paroksetin güçlü bir CYP2D6 inhibitörüdür ve metadon metabolizmasında CYP2D6 aktif form olan R enansiyomeri için stereo-selektif olarak metabolizasyonda yer almaktadır (Begré, S. ve ark. 2002)

İspanya'daki bağımlılık genetiği çalışma grubu, eroin bağımlılığı tedavisi gören hastalardan CYP2D6 UM genotipine sahip bağımlıların metadon tedavisinden yeterli fayda sağlayamadıklarını bildirmişlerdir (Pérez de los Cobos, J. ve ark., 2007).

Araştırmalardan birinde, Roberts R.L. ve ark. (2004) CYP2D6 genotipinin yaradılış ve karakter oluşumunda etkili olduğunu, PM genotipine sahip kişilerin genotiplerinden dolayı zarardan kaçıman kişiler olduklarını tespit etmişlerdir. Bu kişilerin daha az yorulan, daha az belirsizlik korkusu çeken, daha az utangaç ve daha yenilikçi olduklarını bildirmişlerdir (Roberts R.L. ve ark., 2004).

Zackrisson ve ark. (2004) ölümlle sonuçlanan, morfin, sertralin, amitriptilin, nortriptilin, zolpidem, flunitrazepam, mirtazapin gibi maddelerin de yer aldığı 242 zehirlenme olgusunu 281 gönüllü ile yaptığı bir çalışma ile karşılaştırmışlar ve CYP2D6 PM genotipini post mortem olgularda %4,7; kontrol grubunda ise %8,5 bulmuşlar (Zackrisson A.L., 2004).

Bir diğer post-mortem çalışmada ise Koski A ve ark. (2006) 202 postmortem zehirlenme olgusunun CYP2D6 ve CYP2C19 genotipini belirlemiş ve bu olguların kanlarındaki amitriptilin ve metabolitlerinin konsantrasyonunu tayin etmişlerdir. Amitriptilinin hidroksilli metabolitlerinin miktarı ile CYP2D6 gen kopya sayısı arasında pozitif korelasyon tespit etmişlerdir. Femoral kanında 60 mg/L amitriptilin olan bir olgunun fonksiyonel CYP2D6 geninin olmadığını; 202 olgunun %6,7'sinin her iki CYP2D6 geninin de kusurlu olduğunu, CYP2D6*3 allel frekansının 0,033; CYP2D6*4 allel frekansının ise 0,138 olduğunu bulmuşlardır (Koski, A. ve ark. 2006).

Frost J. ve ark (2012) 2003-2011 yılları arasında meydana gelen 1444 post mortem zehirlenme olgusunun 111'inin femoral kanında kodein tespit etmiş, bunlardan 34'ünün dünya genelinde kabul edilen toksik sınırının üzerinde kodein

konsantrasyonuna sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu olguların CYP2D6 genotiplerine bakıldığında; ya UM genotipine rastlanmış ya da EM olan olgularda kodein ile birlikte başka ilaçlar aldıkları tespit edilmiştir (Frost, J. ve ark., 2012).

2.8. Bireye Özgü Tedavi Yaklaşımı

Günümüzde ilaç tedavisi hastalıkların giderilmesinde kaçınılmaz bir yöntemdir. Seçilen yöntem kişinin sağlığına zarar vermeksizin kısa sürede etkinlik sağlamalı, aynı zamanda da maliyeti düşük olmalıdır (Karamustafaloğlu, N. ve ark., 1997; Ingelman-Sundberg, M., 2005; Jenkins, A.J. ve ark., 2009; Üney, K. ve Traş, B., 2006). Bir hastalığın tedavisinde kullanılan ilaca organizmanın verdiği yanıt bireyler arası değişiklik göstermekte ve bu değişikliğe yol açan etkenlerin başında da genetik faktörler gelmektedir. İlaçları ve ksenobiyotikleri metabolize eden enzimlerin çoğu polimorfiktir ve bu polimorfizme bağlı olarak enzim aktivitesinin bireyler ve toplumlar arası farklılığa yol açması çeşitli sorunlarla karşılaşılmasını kaçınılmaz kılmaktadır (Karamustafaloğlu, N. ve ark., 1997; Üney, K. ve Traş, B., 2006; Arınç, E., 2010; Shimada, T. ve ark., 1994). Bu sorunlar arasında; yetersiz ilaç tedavisi, advers ilaç etkisi ya da toksik reaksiyonlar, farmakolojik etkinin uzaması ya da kısılması, ön ilaç (prodrug) aktivasyonunun olmaması, ilaç etkileşimleri, metabolizasyonun alternatif yollara kayması, bazı kronik hastalıkların ortaya çıkması, malpraktis gibi değerlendirilen olguların meydana gelmesi gibi konular sayılabilmektedir.

İnsanda enzim polimorfizminin saptanması; genotip belirlenmesi ile ve enzimin substratlarının metabolize edilme hızlarının belirlenerek fenotip tayin edilmesi

suretiyle karşılaştırmalı çalışmalar şeklinde gerçekleştirilebilmektedir. Fenotip çalışmaları, polimorfizmi araştırılan enzimin metabolize ettiği maddelerden birinin seçilerek ilaç/metabolit oranının belirlenmesi şeklinde olabilmektedir. Bu çalışmalar sayesinde elde edilen bilgiler, klinik gelişime ve adli bilimlere katkıda bulunmaktadır. Son yıllarda yaygınlaşmakta olan, etkin tedavi yolları arayışında önem arz eden farmakovijilans çalışmaları, farmakogenetik araştırmalar ile desteklenmekte ve gelişimini sürdürmektedir. Ayrıca advers ilaç etkilerinin, ilaç etkileşimlerinin, toksik reaksiyonların oluşması, çalışmanın adli bilimler yönünü de güçlendirmektedir. Advers ilaç etkisi görülen durumlarda genetik farklılığın etkisinin ortaya çıkması; beklenmeyen reaksiyonları ve ölümleri, yanlış doz ayarlanması sonucu meydana gelen kazara zehirlenmeleri, negatif otopsileri, hekim hatası olduğu varsayılan malpraktis vakalarını, uzun süren etkisiz ilaç tedavilerinin nedenini aydınlayabilecek bir araç olacaktır (Ingelman-Sundberg, M., 2005; Jenkins, A.J. ve ark., 2009; Marsh, S., 2008; Bondy, B. ve Spellman, I., 2007).

İlaç yanıtı ve toksisite ile ilgili bireyler arası çeşitliliği en çok en hasta popülasyonlar gösterir. Standart dozlarda verilse bile hastaların azımsanmayacak kısmı tüm majör ilaç grupları (opiyatlar, trisiklik antidepresanlar, serotonin geri alım inhibitörleri, ACE inhibitörleri, β -adrenoreseptör agonistleri, statinler vb.) için ilaca tepki göstermez, kısmen tepki gösterebilir veya advers drug reaksiyon gösterebilir. Aynı kiloda olan ve aynı dozda ilaç alan iki kişinin plazmasındaki ilaç konsantrasyonu önemli derecede farklılık gösterebilir. 4301 Hollandalı gönüllü ile yapılan çalışmada kadınlarda CYP2D6 aktivitesinin erkeklere oranla daha yüksek; CYP2C19 aktivitesinin ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Tamminga, W. J. ve ark. 1999).

Genelde ADR'lere ait potansiyel risk faktörleri hastanın yaşını, cinsiyetini, eşzamanlı hastalığını, eşzamanlı ilaç kullanımını, organ hasarını (özellikle karaciğer ve böbrekler) beslenme, sigara ve alkol gibi alışkanlıklarını kapsamaktadır. Ancak, bir ilacın absorpsiyonu, dağılımı, metabolizması ve hedef organla etkileşimi genellikle genetik farklılıklarla belirlenmektedir. Farmakokinetik ve farmakodinamik değişiklikler; ilaç metabolize eden enzimler, ilaç taşıyıcıları, ilaç hedefleri ve diğer biyomarkır genler düzeyinde görülebilmektedir.

Farmakokinetik değişikliklerin nedenlerinden biri olan ilaç metabolizmasında en çok görev yapan enzim ailelerinden CYP450 enzimlerinin genlerinden en az 60 tanesinin tanımlanmış olmasına rağmen yalnızca bir alt grup reçete edilen ve reçetesi temin edilen ilaçların büyük bir kısmının metabolizasyonundan sorumludur (CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C19, 2D6, 2E1 ve 3A4) (Musshoff, F. ve ark. 2010).

Zayıf metabolizörlerde (PM) aşırı doz ilaca bağlı advers ilaç reaksiyonu gösterme veya bir ön ilacın aktif metabolitine dönüşmesinde tedavi hatası riski artmaktadır. Bunun aksine UM kişilerde enzim aktivitesi anlamlı şekilde arttığından substrat, tedavi edici kan-ilaç seviyesinin altında kalabilir. Ön ilaç metabolizasyonunda ise aktif metabolit konsantrasyonu artmaktadır. Tüm bu etkilerin sonucu olarak ilaçla ilgili advers olaylar ve ölümler meydana gelebilir. İlaç biyotransformasyonunda rol alan ve farmakogenetiğin alanına dahil olan diğer bir grup ise ilaç taşıyıcı proteinlerdir. Bu taşıyıcılar ilaç etkileşimlerinin meydana gelmesine ve toksisiteye neden olabilir. Bu tip etkileşimler; inhibe edici, indükleyici veya her ikisi birlikte olabilir ve giriş ve çıkış taşıyıcılarını kapsayabilir. Eğer söz konusu ilacın eliminasyonu veya hedef dokuya dağılması, özellikle bir taşıyıcı tarafından

yapılıyorsa ve ilgili ilacın konsantrasyonundaki etkileşim bulguları etki bölgesinde ise o zaman taşıyıcının önemi çok büyüktür. Örneğin MDR1 geninin kodladığı ATP bağlanma bölgesine ait çıkış pompası olan p-glikoprotein (p-gk) ilaç-ilaç etkileşimlerine sebep olabilmektedir (Musshoff, F. ve ark. 2010).

Tramadol ile karşılaştırıldığında, ön ilaç olan kodeinin *O*-demetilasyon ile aktif metaboliti olan morfine dönüşmesi opioid aktivite açısından oldukça önemlidir. Bu yüzden CYP2D6 genotipi kodeinin etkinliğini ve meydana gelebilecek yan etkileri ciddi ölçüde etkilemektedir. 72 yaşındaki erkek hastada 3 günlük kodein tedavisinden sonra hayati tehlike arz eden bir solunum depresyonu gelişmiştir. Hastanın CYP2D6 için UM genotipe sahip olması; böbrek fonksiyonlarında azalma meydana gelmesi; eş zamanlı olarak aldığı diğer ilaçların (clarithromycin ve voriconazole) alternatif metabolizasyon yolağı olan CYP3A4'ün aktivitesini bloke etmesi bu duruma neden olarak bildirilmiştir. Bir diğer olguda ise; anne sütü ile beslenen 13 aylık bebeğin, annesinin kullanmakta olduğu kodein nedeni ile morfin zehirlenmesinden öldüğü bildirilmiştir. Bu olguda annenin UM olduğu ve kodeinin metaboliti olan morfinin süt yolu ile bebeğe geçtiği tespit edilmiştir (Musshoff, F. ve ark. 2010).

Her ne kadar günümüzde psikiyatri alanında ilaç seçeneklerinin artması ile birlikte hastanın durumuna özel ilaçlar seçilmeye çalışılsa da hastaların pek çoğunda istenen tedavi başarısı sağlanamamaktadır. Tedaviye cevap oranı %30-50 arasındadır. Doğru ilaç, uygun doz ve sürede doğru şekilde kullanılmasına rağmen bazen antipsikotik ilaçlara yanıt alınamamakta ya da tedaviye verilen cevap yetersiz kalmakta; hatta istenmeyen etkiler oluşabilmektedir. Bu tür durumların oluşmasında hastalık ile ilgili

faktörler ve hasta ile ilgili faktörler olmak üzere iki ana sebep vardır (Arıcıoğlu, F. ve Çetin, M., 2010).

İlaçların alınmasından atılmasına kadar geçen süreçte vücutta geçirdiği her aşamanın (enzimler, taşıyıcı proteinler, reseptörler; emilim, dağılım, metabolizma, atılım gibi) ilacın etki etmesinde rolü vardır. Psikiyatrik hastalıkların etiyolojilerinin çoğu poligeniktir. Bu yüzden bir hastalığın kökeninin araştırılmasında aday gen seçmek oldukça zordur. CYP sisteminin polimorfizminin bilinmesi, söz konusu ilacın o hasta için uygun dozunun seçilmesini sağlamakla kalmaz; advers ilaç reaksiyonlarının ve yan etkilerin azalmasını sağlar ki bu da rasyonel farmakoterapi adına önemli bir durumdur. Son 16 yılda, ADR nedeni ile 38 ilaç piyasadan çekilmiştir. PM'ler ile UM'lerin tedavisinde seçilmesi gereken dozlar arasında 15 kat fark olabileceği gösterilmiştir. Antipsikotik tedavisinde hastaların %30-40'ında etki görülmezken %70'inde ciddi yan etkiye rastlanmaktadır. Bunun sebeplerinden biri metabolik enzimlerin polimorfizmi veya ilacın hedefi olan reseptörlere bağlanma kapasitesinin değişmesi olabilir. Modern tıpta hasta olduktan sonraki tedaviden çok hastalığı önleme ve öngörme konusu vurgulanmaktadır. Bu amaçla genetik bilgiler hastalığın öngörülmesi aşamasında kullanılmaktadır. Bireye özgü tedavi aslında öngörülmesi tedaviyi ve kanıta dayalı tıbbı da beraberinde getirmektedir. Bu sayede artık kişilerde oluşabilecek advers ilaç reaksiyonunda öngörülebilir hale gelecektir. Etkin tedavi sürecinde yan etkinin yok edilmesini sağlayacak ve advers ilaç reaksiyonunun oluşmasını engelleyecek olan şey; herkese aynı yazılan reçete değil, kişiye özel yazılan reçete olacaktır. Tüm bu uygulamalar beraberinde etik, yasal, bilimsel düzenlemeleri de getirecektir. Bu süreçten sadece hastalar, hekimler değil ilaç

firmaları, sağlık sigortası kuruluşları da etkilenecektir (Arıcıoğlu, F. ve Çetin, M., 2010).

2.9. Farmakovijilans

Advers etkilerin ve beşeri tıbbi ürünlere bağlı diğer muhtemel sorunların saptanması, değerlendirilmesi, tanımlanması ve önlenmesi ile ilgili bilimsel çalışmalardır.

Türkiye'de Farmakovijilans Çalışmaları:

Türk İlaç Advers Etkilerini İzleme ve Değerlendirme Merkezi (TADMER) 1985 yılında kurulmuş olup, 1987 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Uluslararası İlaç İzleme İşbirliği Merkezi'ne 27. üye olarak kabul edilmiştir.

“Beşeri Tıbbi Ürünlerin Güvenliğinin İzlenmesi ve Değerlendirilmesi Hakkında Yönetmelik” 22.03.2005 tarihinde yayımlanmış ve 30.06.2005 tarihinde “Beşeri Tıbbi Ürün Ruhsatı Sahipleri için Farmakovijilans Kılavuzu” ile birlikte yürürlüğe girmiştir.

Yönetmeliğin yürürlüğe girmesi ile birlikte daha önce Türk İlaç Advers Etkilerini İzleme ve Değerlendirme Merkezi (TADMER) olan merkezin adı Türkiye Farmakovijilans Merkezi (TÜFAM) olarak değişmiştir.

(<http://www.iegm.gov.tr/Default.aspx?sayfa=tufama&lang=tr-TR>)

T.C. Sağlık Bakanlığı, İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü'nün sağlık çalışanlarına doldurmaları üzere bildirdiği, “Advers Etki Bildirim Formu” (Ek 2) ile ilgili tebliğde yapılan açıklamada; advers etki “ilacın kabul edilen normal dozlarda kullanımında ortaya çıkan zararlı ve amaçlanmamış etki” şeklinde ifade edilmekte ve bu etkilerin

yönetmelik gereği tüm sağlık mesleği mensuplarınca (hekim, eczacı, diş hekimi, hemşire) doldurulması gerekliliğinden bahsedilmektedir.

2.10. Psikiyatrik Bozukluklar

2.10.1. Şizofreni ve psikotik bozukluk

Şizofreni, halüsinasyon, hezeyan gibi psikotik semptomların görüldüğü ve fonksiyonel bozulmalara da yol açan geniş semptomlu bir akıl hastalığıdır. Düşünce, duygu ve davranış bozulmalarına sebep olduğundan kişinin günlük hayatını ve insan ilişkilerini doğrudan etkilemektedir.

Şizofreni, hastalık tarihi boyunca psikiyatri ve nörolojide en dikkat çeken hastalık tipidir. Amerika'da şizofrenini yaşam boyu tekraralama sıklığı ile ilgili çeşitli raporlar bulunmaktadır. Ulusal Akıl Hastalıkları Enstitüsü'nün bir raporuna göre bu sıklık yüzde 1-1,5'tir. Bir başka araştırma sonucuna göre ise 0,6-1,9'dur. Yaşamının herhangi bir yılında şizofreni nedeni ile tedavi gören kişilerin sıklığı toplam popülasyonda yüzde 0,025 ila 0,05'tir. Bu tedavi gören hastaların üçte ikisi hastaneye yatırılarak tedavi edilmeyi gerektirmektedir. Şizofreni kadın ve erkeklerde eşit oranda yaygındır. Ancak hastalığın ilk ortaya çıkışı ve gidişatı açısından farklıdır. Hastalığın ortaya çıkışı erkeklerde kadınlara göre daha erkendir. Hastalığın ilk ortaya çıkış yaşı erkeklerde 15-25 yaş iken; kadınlarda 25-35 yaşdır. Şizofreni hastalarının %90'ı 15-55 yaş arasındadır. Ayrıca kadın hastalar erkeklere göre sosyal etkinlik açısından daha aktiftir ve kadın hastaların tedavi neticeleri erkeklere göre daha iyidir. Şizofreni etiyolojisi ile ilgili çeşitli bilgi ve bulgular mevcuttur. Stres, genetik faktörler, çevre etkisi, patolojik nedenler gibi pek çok

neden olduğu ileri sürülmektedir. Hastalık hasta yakınlarının anlayamayacağı şekilde sinsi ve yavaş başlayabildiği gibi akut bir şekilde de başlayabilir. Bazı hastalarda, depresyon, obsesif davranışlar, halüsinasyonlar, aşırı mistik ve metafizik konulara eğilimlerle başlayabildiğinden tanı için belli bir süre hastayı izlemek gerekmektedir. Teşhis klinik görünümüne yani hikâyeye ve psikiyatrik muayeneye dayanmaktadır. Tüm dünyada halen yaygın ve geçerli olarak kullanılan teşhis kriterleri Uluslar arası Hastalık Sınıflandırması Versiyon 10 (ICD-10) ve Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı (DSM-IV) ölçekleridir. DSM-IV şizofreniyi; Paranoid, düzensiz (dezorganize), katatonik, ayrışmamış ve rezidüel şizofreni olmak üzere alt gruplara ayırmıştır: (Kaplan, H.I. ve Sadock, B.J., 1998).

Türkiye çapında yapılan bir derlemede, şizofreninin yaşam boyu yaygınlığı 1000 kişide 8,9 olarak saptanmıştır. Klinik yakınmalara yol açan psikotik belirti yaşam boyu yaygınlığı 1000 kişide 36,3'tür. Üniversite öğrencilerinden oluşan bir örneklemede psikotik bozuklukların bir yıllık yaygınlığının 1000 kişide 17,2 olduğu tespit edilmiştir. Erkek mahkûmlardan oluşan havuzlanmış örneklemede psikotik bozuklukların yaygınlığı 1000 kişide 14,9 olarak saptanmış. İstanbul'daki evsizler arasında bu yaygınlık 100 kişide 39,5'tir (Binbay T ve ark. 2010). Tümkaya, S. ve ark. (2005) 2002 yılı boyunca Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Polikliniği'ne başvuran hastaların %5.1'inin; Öyekçin, D.Y. (2008) ise 2006-2007 yılları arasında Erzincan Devlet Hastanesi Psikiyatri polikliniklerine başvuran hastaların %11.2'sinin psikotik bozukluğunun olduğunu bildirmiştir (Tümkaya, S., 2005; Öyekçin, D.Y., 2008).

2.10.2. Duygudurum bozuklukları

Duygu durum bozuklukları eski çağlardan beri tanımlanmakta olan durumlardır. Günümüzde bu konu ile ilgili hala kullanmakta olduğumuz tanımlamalar eski çağlara dayanmaktadır. Hipokrat ruhsal bozuklukları tarif etmek için “mani”, “melankoli” gibi terimleri kullanmıştır. Duygu durum; normal, yükseltilmiş ya da çökmüş olabilmektedir. Normalde insanlar bu durumların hepsini eşit düzeylerde yaşayabilmektedir. Ancak duygu durum bozukluklarında, kontrol duygusu ortadan kalkar. DSM-IV duygu durum bozukluklarını iki ana grupta toplar:

1. Depresif bozukluklar: Majör depresif bozukluk, distimik bozukluk gibi.

2. İki uçlu (bipolar) bozukluklar: Tip I, Tip II, siklotimik bozukluk gibi.

Majör depresif bozukluk kadınlarda yüzde 25’e kadar ulaşabilen, tüm yaşam boyunca yaklaşık yüzde 15 görülme sıklığı olan genel bir bozukluktur. Bipolar Tip I (depresif) bozukluk majör depresyondan daha az rastlanan bir bozukluktur. Bu kişiler çökkünlük halindedir, derin üzüntü duyarlar, düşünce konuşma ve devinimde yavaşlama, durgunlaşma, suçluluk hissi, güçsüzlük, isteksizlik yaşarlar. Yükseltilmiş duygu durumu olanlar Bipolar Tip II (manik) kişiler konuşkan olur, fikir uçuşması yaşarlar, daha az uyku ihtiyaçları olur, özgüvenleri artar, aşırı öfkeli, neşeli, coşkulu olurlar. Bazı araştırmacılar bu tip bozukluğu sınırda kişilik bozukluğu olarak sınıflandırmaktadır. Ancak bazı araştırmalar ise Tip II bozukluğun kendi başına bir hastalık olduğunu genetik bulgularla kanıtlamışlardır.

Tüm dünyada majör depresyon kültür ve ülkelerden bağımsız bir şekilde kadınlarda erkeklere oranla iki kat daha fazladır. Bu farkın hormonlara, çocuk doğurmaya,

psikosoyal durumlara bağlı olduğu düşünölmekle birlikte kesin bulgular bulunmamaktadır. Bipolar Tip I bozukluk ise erkeklerde ve kadınlarda neredeyse eşit oranda gözlenmektedir (Kaplan, H.I. ve Sadock, B.J., 1998).

Duygudurum bozuklukları, özellikle majör depresyon, dünya üzerindeki insanların ekonomik ve sosyal fonksiyonlarını etkileyen kronik veya tekrarlayan bir hastalıktır (Patel, B.N. ve ark. 2009).

2.11. Antipsikotik ilaçlar

Antipsikotik ilaçlar 1950 yıllarının başlarında tedaviye katılmış ve şizofreni tedavisini büyük ölçüde değiştirmiştir. Atipik antipsikotikler ise 1990'lı yılların başından beri kullanılmakta olup tipik antipsikotiklere göre daha az ekstrapiramidal sistem etkisi riski taşımaktadır (Yağcıoğlu, E.A., 2007).

Klozapin, piyasadaki ilk antipsikotiktir. Şizofreni ve intihar eğilimi tedavisinde kullanılır. Yarılanma ömrü yaklaşık 12 saattir. Pek çok ilaç gibi plazmada kararlı duruma ulaşması, 5 yarılanma ömrü kadar zaman alır. Klozapinin hastalar arası büyük çeşitlilik göstermesi yanında çeşitli ilaç-ilaç etkileşimleri de gösterdiği bilinmektedir. CYP 1A2, 2D6, 3A4 enzimleri ile metabolize edilir. 1A2 ve 2D6 inhibitörlerinden olan fluvoksamin ile birlikte kullanılması, klozapinin plazma seviyesini yükselir. Bu durumda klozapin dozunun yan etkilere göre azaltılması gerekebilmektedir. İnhibe eden ilaçlar olduğu kadar sigara gibi enzim aktivitesini indükleyen etkenler de vardır. Sigara içen hastalarda enzim aktivitesi daha da fazla olduğundan klozapinin plazmadaki seviyesi düşük olacaktır. Şizofreni hastalarının %78'inin sigara kullanıcısı olduğu düşünöldüğünde, kullanılan klozapin dozunun

arttırılması söz konusu olacaktır. Ancak, bu durum, zayıf metabolizörlerde ciddi advers etkilere neden olabilir (Sharif Z.A., 2003).

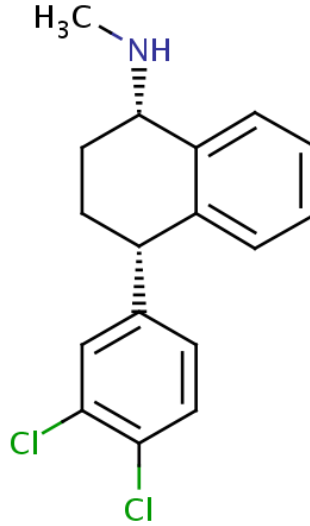
Atipik antipsikotiklerin uygun dozlarının belirlenmesi CYP450 yolu ile olan ilaç-ilaç etkileşimlerini de kapsayan bazı faktörlerin bir araya gelmesini gerektirir. Ayrıca klinisyen, hastanın kalıtsal hastalıklarını, yaşını, cinsiyetini de dikkate almalıdır. Örneğin genç insanlar, yaşlılara göre; erkekler kadınlara göre ilaçları daha hızlı metabolize etmeye yatkındır. Sigara içenler içmeyenlere göre olanzapin ve klozapini daha hızlı metabolize ederler. Ayrıca ilaçların farmakokinetiğini etkileyen CYP450 enzimleri de toplumlar arası farklılıklar göstermektedir. Örneğin Kafkas toplumunun %5-10'u CYP2D6 için zayıf metabolizörken, Japon ve Çin toplumunun %20'si CYP2C19'u için zayıf metabolizördür. Zayıf metabolizörlerde bazı ilaçların biyoyararlanımı artarken yan etkilere yatkınlıkları da artmaktadır. İlacın yarılanma ömrünü uzatan koşullar (yaş, cinsiyet, ilaç etkileşimleri) doz eşdeğerlemesini de yavaşlatarak kararlı durum sürecini uzatacaktır (Sharif, Z.A., 2003).

En çok reçete edilen antipsikotik ilaçlardan biri de yeni bir antipsikotik olan risperidondur ve letal etkileri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Bazı antipsikotik ajanların ortalama aşırı dozları ile ilgili ciddi komplikasyonlu fetal bulgular bildirilmiştir (Kopala, L.C., ve ark. 1998).

2.11.1. Çalışmaya dahil edilen psikiyatrik ilaçlar

a. Sertralin

Maddenin molekül yapısı:



Kapalı Formülü: $C_{17}H_{17}NCl_2$

Açık Formülü: (1S-cis)-4-(3,4-dichlorophenyl)-1,2,3,4-tetrahydro-N-methyl-1-naphthalenamine

Molekül Ağırlığı: 306.23 g/mol

Erime Noktası: 243-245°C

Disosiyasyon katsayısı (pKa): 9,48

Görünüm: Beyaz veya beyaza yakın kristal toz.

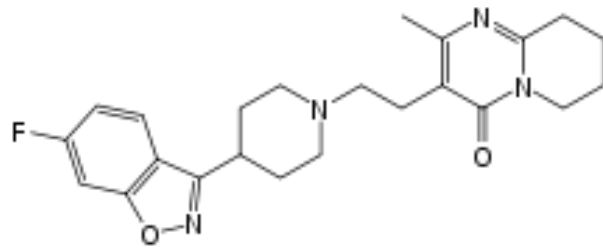
Çözünürlük: Suda ve sulu çözeltilerde, izopropil alkolde, aseton ve etil asetatda kısmen çözünür; metanol, kloroform, dimetil sülfoksit ve etil alkolde çözünür.

Sertralin, seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) sınıfına ait ikinci kuşak bir antidepresandır. US FDA tarafından depresyon, obsesif-kompulsif bozukluk, travma sonrası stres bozukluğu, sosyal anksiyete bozukluğu, post menopozal duygu durum

bozukluğu ve panik bozukluk tedavisi için kullanılması kabul edilmiştir. Yaklaşık bir haftadan sonra ulaşılan kararlı hal plazma konsantrasyonu ile, sertralin seçici olarak merkezi sinir sistemi nöronlarındaki serotoninin geri alınmasını inhibe eder. Proteine bağlanma oranı oldukça yüksektir (%98). Dokulara dağılımı oldukça fazladır. Gastrointestinal kanaldan yavaşça ve tamamen absorbe edilir. Pik plazma konsantrasyonu, 100 miligramlık tek dozun ağızdan alınmasından sonra 4.5 ila 8.5 saat arasında meydana gelir. Sertralinin plazmada yarılanması yaklaşık 26 saattir ve büyük bir kısmı keton ve alkol konjugatları olarak renal yoldan atılır. Farmakolojik olarak aktif metaboliti olan N-demetil sertraline dönüşmesi için CYP 3A4 enzimi ile ilk geçiş metabolizasyonuna girer. Metabolitin, ana ilaca göre yarılanma ömrü daha uzundur (60-100 saat), plazma konsantrasyonu daha yüksektir. CYP2D6 enzimi, metabolizasyon için ikinci yolaktır (Patel, B.N. ve ark. 2009).

b. Risperidon

Maddenin molekül yapısı:



Kapalı Formülü: C₂₃H₂₇FN₄O₂

Açık Formülü: 3-[2-[4-(6-Floro-1,2-benzisokzazol-3-il)piperidin-1-il]etil]-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-on

Molekül Ağırlığı: 410.5 g/mol

Erime Noktası: 170.0°C

Disosiyasyon katsayısı (pKa): 3.11; 8.24

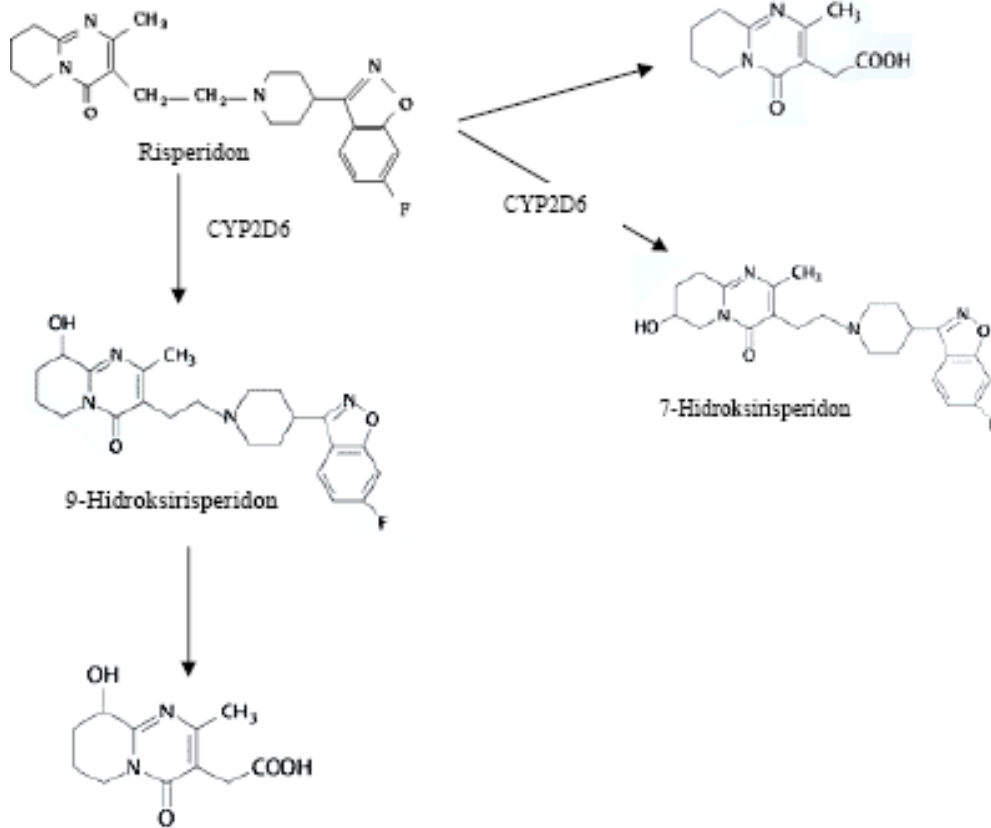
Görünümü: Beyaz-beyaza yakın toz.

Çözünürlüğü: Suda hemen hemen hiç çözünmez, metanol, metilen klorürde kolayca çözünür, etanolde kısmen çözünür. Seyreltik asit çözeltilerinde çözünür.

Risperidon, seçici bir monoaminerjik antagonisttir. Serotonerjik 5-HT₂ ve dopaminerjik D₂ reseptörlerine yüksek oranda bağlanır. Serotonin (5-HT₂) ve dopamin (D₂) reseptörlerindeki bu antagonistik etkilerin Risperidonun antipsikotik etkilerine aracılık ettiği düşünülmektedir. Risperidon ayrıca alfa₁-adrenerjik reseptörlere ve daha az oranda serotonin reseptörlerine, dopamin D₁ reseptörlerine, H₁-histaminerjik ve alfa₂-adrenerjik reseptörlere de bağlanır (Demiray, G., 2008).

Risperidon şizofrenide pozitif semptomları düzelten güçlü bir D₂ antagonisti olmakla birlikte, klasik nöroleptiklerle karşılaştırıldığında motor aktivede depresyona ve katelepsi oluşumuna daha az neden olur. Dengeli merkezi serotonin ve dopamin antagonizması, ekstrapiramidal yan etkilere neden olma eğilimini azaltabilir ve terapötik etkinliği, şizofreninin negatif ve afektif semptomlarını kapsayacak şekilde genişletebilir. Oral alımdan sonra tamamen emilir ve en yüksek plazma konsantrasyonlarına 1 ila 2 saat içinde ulaşılır. Risperidonun emilimi gıdalardan etkilenmez. Vücutta hızla dağılır. Görünür dağılım hacmi, vücut ağırlığı başına 1-2 litredir. Risperidon, albümin ve alfa₁-asit glikoproteinine bağlanmaktadır. Risperidonun plazma proteinlerine bağlanma oranı %88, 9-hidroksi risperidonun (Paliperidon) bağlanma oranı %77'dir. Risperidon başlıca CYP2D6 aracılığıyla hidroksilasyon sonucu, farmakolojik aktivitesi risperidona benzeyen aktif metaboliti

9-hidroksi-risperidona (Paliperidon) metabolize olur (Şekil 2.7). Risperidon ve 9-hidroksi-risperidon, birlikte aktif antipsikotik fraksiyonu oluşturur (Çiloğlu, E., 2008). Daha az önemli olan metabolizma yollarından biri de N-dealkilasyondur ve CYP3A4 ve 3A5 enzimlerinin görev aldığı metabolizasyon yollarıdır (Leon, J. ve ark. 2010; Dorado, P. ve ark., 2006). Psikotik hastalarda oral yoldan uygulanmasının ardından risperidonun eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 3 saattir. Aktif antipsikotik fraksiyonun eliminasyon yarı ömrü 24 saattir. Bu süreler risperidon ve 9-Hidroksirisperidon için; UM'lerde sırasıyla 3 (CV=%30) ve 21 saat (CV=%20), PM'lerde ise sırasıyla 20 (CV=%40) ve 30 saattir (CV=%25). Kararlı durum plazma konsantrasyonuna, ilacın 4-5 gün düzenli kullanımı ile ulaşılır. Yaşlılarda ve böbrek yetmezliği olan hastalarda yarılanma süresi uzamaktadır. Böbrek yetmezliği ve azalan kreatin klirensi olan durumlar 9-hidroksirisperidonun düşük renal klirensi ile karakterizedir, yarılanma ömrü uzar ve plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi altında kalan alan (AUC) artar. Risperidon plazma konsantrasyonu, terapötik doz aralığında doza bağımlıdır. Uygulamadan bir hafta sonra, dozun %70'i idrar ve %14'ü dışkıda atılır. İdrarda, risperidon ve 9-hidroksi-risperidon, uygulanan dozun %35-45'ini oluşturur. Kalan fraksiyonu inaktif metabolitlerdir. Sanal dağılım hacmi 1,2 L/kg'dır (Moffat, A.C. ve ark. 2004; Çiloğlu, E., 2008).



Şekil 2.7. Risperidonun CYP2D6 enzimi ile metabolizasyonu sonucu oluşan metabolitler (Demiray, G., 2008)

Psikotik ilaçların plazma konsantrasyonları rutin terapötik ilaç izlemede bireyler arası büyük değişiklik gösterir. Standart doz uygulamaları düşük olasılıkla bireysel kararlı durum plazma konsantrasyonu gösterir. Ancak yine de, etki ve yan etki aktif ilaç maddesinin terapötik plazma konsantrasyonuna bağlıdır. Kararlı durum plazma konsantrasyonunu etkileyebilen iki ana etken yaş ve cinsiyettir.

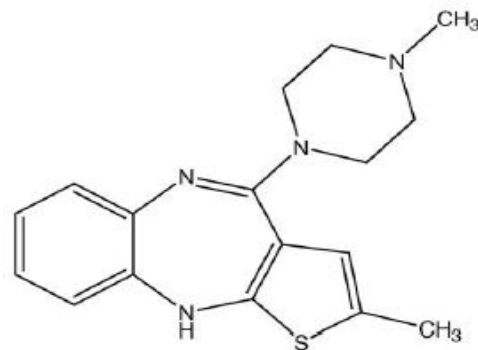
Risperidon psikotik hastalarda iyi bilinen klinik yararlarından ötürü yaygın şekilde kullanılan bir antipsikotik ajandır. Risperidonun karakteristik özellikleri haloperidol gibi tipik antipsikotiklerden daha az ekstrapiramidal yan etkiden sorumludur.

Risperidonun insan plazmasındaki ana metaboliti 9 pozisyonundaki tetrahidropiridopirimidon halkasının hidroksilasyonu ile meydana gelen 9-hidroksirisperidonudur. 7-hidroksilasyon ve N-dealkilasyon ise minör metabolik yollardır. İnsanda risperidonun hidroksilasyonunda CYP2D6 ve CYP3A4 enzimleri anahtar rol oynarlar. Risperidon ve 9-hidroksirisperidonun farmakolojik etkisinin (=total plazma konsantrasyonu) benzer olması beklenir ve bu durum “aktif moiety (pay)” olarak adlandırılır (Moffat, A.C. ve ark. 2004).

Risperidon demanslı yaşlı hastalarda psikotik ve davranışsal semptomlar için sıkça kullanılır. Klinik uygulamada yaşlı hastalar için dikkatli doz belirlenmesi genel bir yaklaşımdır. Bunun nedeni bu yaş grubunda advers etkilerin görülme sıklığının daha fazla olmasıdır. CYP2D6 ve CYP3A4 enzimlerindeki cinsiyete bağlı potansiyel farkları tanımlayan çok kısıtlı veri vardır. Bazı veriler 3A4 aktivitesinin kadınlarda daha yüksek olduğunu, bazıları da hamile ve menopoz öncesi dönemdeki kadınlarda 2D6 aktivitesinin arttığını göstermektedir. Kadınlarda risperidon ve 9-hidroksirisperidonun kandaki konsantrasyonunda tıpkı olanzapindeki gibi fark tespit edilmiştir (Aichhorn, W. ve ark. 2005; Demiray, G., 2008).

c. Olanzapin

Maddenin molekül yapısı:



Kapalı Formülü: C₁₇H₂₀N₄S

Açık formülü: 10H-Thieno[2,3-b][1,5]benzodiazepine, 2-methyl-4-(4-methyl-1-piperazinyl)

Molekül Ağırlığı: 312.45 g/mol

Erime Noktası: 195°C

Disosiyasyon katsayısı (pKa): 5.0; 7.4

Görünüm: Beyazımsı toz.

Çözünürlük: Suda çözünmez; asetonitrilde ve etil asetatda biraz çözünür, kloroformda çözünür.

LD50 (rat): 177 mg/kg

Olanzapin, gastro-intestinal yolda en iyi şekilde emilir; konjugasyon ve oksidasyon yolları ile ilk geçiş metabolizmasında fazlaca elimine edilir. Sistemik döngüye erişmeden önce yaklaşık dozun %40'ı metabolize olur. Yiyecekler, emilimin hızını veya yayılımını etkilemez. Yaygın şekilde vücutta dağılır ve metabolize edilir. Oldukça fazla metabolize edildiğinin belirtisi olarak dozun %7'si değişmeden idrar atılır. Yaklaşık dozun %57'si idrar ile ve %30'u feçes ile metaboliti olarak atılır. (Moffat, A.C. ve ark. 2004)

Olanzapin, CYP1A2, CYP2D6 ve glukuronidasyon ile metabolize edilir, en az 10 metaboliti bulunur, bunlar arasında en genel yollar; *N*-glukuronidasyon, alilik hidroksilasyon, *N*-oksidasyon, *N*-demetilasyondur (Dorado P. ve ark., 2006). Fluvoksamin, fluoksetin, paroksetin, yüksek doz sertralin, fazla miktarda greyfurt suyu, sigara kullanımı olanzapinin plazmadaki seviyesini değiştirebilmektedir. Ancak, olanzapin seviyesindeki bu CYP sisteminin inhibisyonu veya indüksiyonu

yolu ile meydana gelen bu tür değişiklikler klinik önemi açısından istenmeyen bir durumdur. Sadece bazı faktörler olanzapin ile bir arada bulunduğunda bir doz ayarlaması yapılması gerekmektedir. Örneğın; genç, erkek ve sigara içen bir hastaya terapötik etkiyi sağlaması için 20mg/gün veya daha fazla olanzapin gerekebilmekteyken; daha yaşlı, sigara içmeyen bir kadına 5 mg/gün olanzapin yeterli olabilmektedir (Sharif, Z.A., 2003).

Olanzapin yaygın olarak kullanılmakta olan atipik antipsikotik ilaçlardan biridir. Şizofreninin hem pozitif hem de negatif semptomlarına karşı etkilidir ve klasik nöroleptiklere yanıt vermeyen hastalarda sıklıkla kullanılır. Klasik nöroleptikler kadar ekstrapiramidal yan etkiye yol açmazlar, nispeten iyi tolere edilebilir. Son yıllarda Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (US FDA) olanzapinin akut-mani tedavisinde kullanılmasını onaylamıştır. Atipik antipsikotik ilaçlar oldukça aktif olduğundan düşük günlük dozlarda verilir ve bu nedenle hasta plazmasındaki seviyeleri de düşüktür (ng/mL düzeyinde). Olanzapin genellikle düşük dozlarda verilir (2-20 mg/gün) ve plazmadaki seviyesi doza bağılı olarak 8-47 ng/mL gibi düşük seviyelerde tespit edilir. Bu nedenle düşük miktarlarda bile doğru sonuç verebilen analitik yöntemlerin geliştirilmesi bir ihtiyaç haline gelmiştir (Nirogi, R.V. ve ark. 2006).

Olanzapinin sağlıklı bireylerde ortalama yarılanma ömrü 21 ila 54 saat aralığında değişmekle birlikte 33 saattir (Callaghan, J.T. ve ark. 1999). Bu nedenle günde bir doz alınması yeterli olabilmektedir, ancak kararlı duruma ulaşması bir hafta sürmektedir (Sharif, Z.A., 2003).

2.12. Gen Anlatımı (Ekspresyonu)

Genetik materyal, ait olduğu organizmanın bütün karakterlerinin meydana gelmesinden sorumlu olan moleküldür. Bir bireyin tüm karakterlerine ait bilgi onun genetik materyalindeki gen adı verilen birimlerde şifreli biçimde yazılıdır. Bir gen bir polipeptidin yapısını (aminoasit dizisini) tayin eden nükleotid dizisidir. Bir gendeki nükleotid dizisinin genel kural olarak, tek bir ürünü şifrelemesi özelliği çift sarmal DNA’da bir genin bulunduğu bölgedeki sadece bir zincirin bu genetik bilgiyi taşıması gerekliliğini ortaya çıkarır. Buna göre, genin ürününe ait genetik bilgiyi taşıyan zincire anlamlı (şifreleyici) zincir adı verilir. O zincirin tamamlayıcı zincirine ise karşı anlamlı (karşı şifreleyici) zincir denir.

Ökaryotik organizmalarda bazı genlerin ürünlerine ait şifrelemeyi yapan dizilerin arasında şifreleme yapmayan diziler taşıdıkları bilinmektedir. Böyle genlere parçalı gen denir ve parçalı genlerin şifreleme yapan dizilerine **ekson**; şifreleme yapmayan bölgelerine ise **intron** denir.

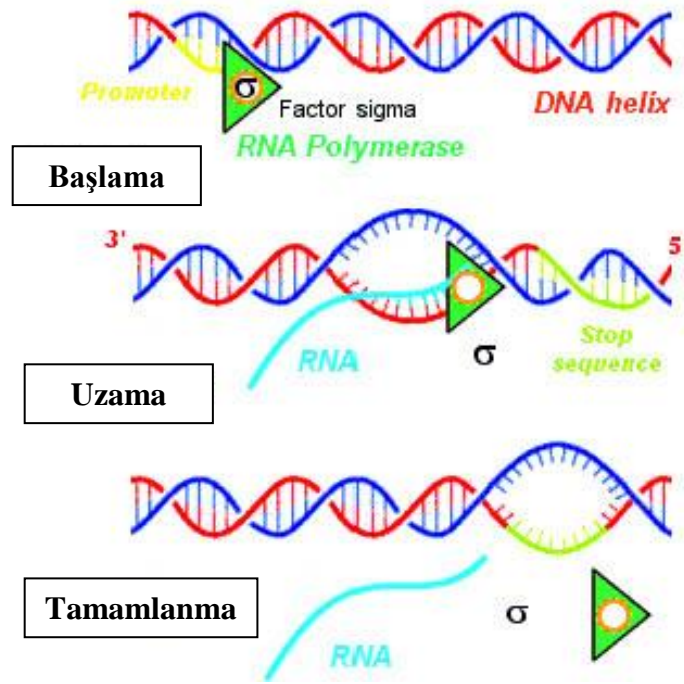
Gen anlatımı (ekspresyonu), genlerde şifrelenmiş olan genetik bilginin bireyin fenotipinde ortaya çıkmasıdır. Gen anlatımı DNA’da şifrelenmiş bilginin önce RNA ve daha sonra da protein ürünleri halinde okunmasıyla ilgili süreci ifade eder. Genlerdeki bilginin fenotipte belirmesi protein sentezi denen olay dizisi sonucu meydana gelir. Yapısal gendeki bilgi doğrudan doğruya, polipeptid molekülüne haline gelmez; önce haberci (messenger) RNA (mRNA) halinde kopyası çıkarılır (transkripsiyon); daha sonra bir protein sentezi olayı ile polipeptid biçimine çevrilir (translasyon). Sentezlenen polipeptid zincirleri ikincil, üçüncül ve bazen de dördüncül yapılarını kazanarak aktif protein moleküllerini oluşturur. Sentez edilen

proteinler ya yapı, ya salgı proteinleridir ya da enzimlerdir. Ortaya çıkan gen ürünü ne tür bir protein olursa olsun neticede hücrenin yapı ve fonksiyonlarını tayin eder. Protein sentezi mekanizmasına mRNA'nın yanı sıra transfer RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA) da katılır (Temizkan G, 1999).

2.12.1. Transkripsiyon

Transkripsiyon mekanizması 3 aşamadan oluşur (Şekil 2.8):

1. Başlama: RNA sentezinin başlama öncelikle RNA polimerazın kalıp DNA'ya bağlanmasını gerektirir. DNA molekülü üzerinde, RNA polimerazın transkripsiyonu başlatmak üzere tanıdığı ve bağlandığı promotör denen özel işaretler vardır. RNA polimeraz promotöre bağlanır.
2. Uzama: RNA polimerazın DNA boyunca hareket ettiği ve sentezlendiği RNA zincirinin boyunun uzadığı evreyi belirler. Bu aşamada RNA polimeraz, DNA'daki nükleotid dizisinin doğru biçimde kopyasını çıkarır. RNA zinciri sentez edilirken bir yandan da kalıp zincirin kullanılması için devamlı olarak DNA'da bölgesel çözülmeler meydana gelir.
3. Tamamlanma: RNA polimeraz kalıp DNA üzerinde hareket ederek, aktivitesini durdurucu bir işaretle (terminatör) karşılaşınca kadar RNA sentezi yapar. Transkripsiyonun tamamlanması, uzama olayının DNA kalıbı üzerindeki bir noktada durması ve sentez edilen RNA ile enzimin birbirinden ve DNA'dan ayrılmasıyla meydana gelir. DNA çift zincirli yapısını yeniden kazanır.



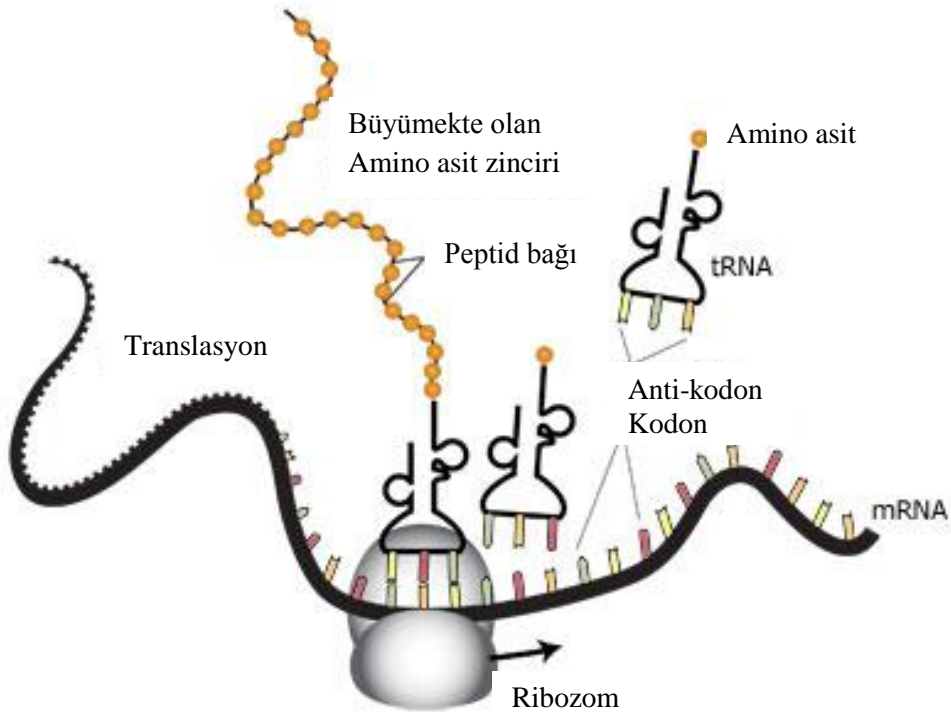
Şekil 2.8. Transkripsiyonun üç aşamasının şekilsel görüntüsü
(http://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Transcription)

Transkripsiyon ürünü olan RNA türleri mRNA, tRNA ve rRNA'dır ve bu ürünler translasyonda görev yapmadan önce işlenirler.

DNA molekülünün yapı taşları olan nükleotidlerde değişken olan kısımlar bazlar olduğuna göre, bu şifreleme farklı bazlara sahip nükleotidlerin değişik sayı ve biçimlerde dizilenmesine bağlıdır. Proteinlerin primer yapılarının DNA molekülündeki genlerin nükleotid dizileri tarafından tayin edilmesi ile ilgili şifreye genetik şifre (kod) denir. Kod, DNA'nın nükleotid dizisi ile amino asit dizisi arasındaki ilişkidir. Genetik şifre üçlü nükleotid grupları olarak okunur ve bu üçlü diziyeye kodon denir (Temizkan G, 1999).

2.12.2. Translasyon (Protein sentezi)

Gen anlatımında mRNA halinde kopyası çıkarılan genetik bilgiye göre polipeptid moleküllerinin sentez edilmesine translasyon denir. Bu aşamada RNA'da kopyalanan bilgi, proteinlerin primer yapısını oluşturan polipeptidleri oluşturur. Esas bilgi mRNA'da taşınmakla birlikte bu bilginin proteine dönüşmesinde tRNA ve rRNA da görev alır. Protein sentezi *N* uçlu bir amino asitle başlar, *C* uçlu bir amino asitle sona erer. mRNA'daki kodonların tamamlayıcısı olan antikodona sahip tRNA'lar translasyonu gerçekleştirir. tRNA'ların taşıdığı özgül amino asitler kodona uygun biçimde sıraya dizilir ve aralarında peptid bağı oluşur (Şekil 2.9). Hücre çekirdeğindeki genlerin tayin ettiği protein sentezi sitoplazmadaki ribozomlar üzerinde gerçekleşir. Organellerdeki genlerin belirlediği protein sentezi ise o organeldeki ribozomlarda gerçekleşir. Protein sentezi ribozomlarda meydana geldiğinden ribozomların yapı taşı olan rRNA'lar da bu sürece katılırlar. rRNA'lar herhangi bir genetik bilgi taşımazlar ancak sentez boyunca alt birimleri bir arada tutarak sentezin sorunsuz gerçekleşmesini sağlarlar. Translasyon da tıpkı transkripsiyon gibi başlama, uzama ve tamamlanma basamaklarından oluşur. Protein sentezinin tamamlanması sonucu meydana gelen polipeptid zincirleri amino asitleri yani protein yapı taşlarını meydana getirmiş olur (Temizkan G, 1999).



Şekil 2.9. Protein sentezinin aşamalarının ve bileşenlerinin şekilsel görüntüsü

(www.mustafaaltinisik.org.uk/0809-1-4-07GenIfadesi.ppt)

2.13. Sıvı-sıvı özütleme (SSÖ) yöntemi

İlacı/maddeyi biyolojik örnekten (matriksten) izole etmekte kullanılan geleneksel yöntemdir. Birbirine karışmayan iki sıvı arasında meydana gelen faz farkından yararlanır. Biyolojik örnek sulu faz olarak kabul edilirken, çözücü ise organik faz olarak adlandırılır. Analitin yüksüz (non-iyonize) olduğu pH'da izolasyon gerçekleştirilir. Asidik ilaçlar için sulu faz asitleştirilmelidir, bazik ilaçlar için sulu faz bazikleştirilmelidir. Sıvı-sıvı özütlemeye organik faz olarak genellikle etil asetat,

kloroform, toluen, diklorometan, butil asetat, dietil eter kullanılmaktadır. Bu çözücülerin özütlenme gücü özütlenen maddeye göre değişmektedir (Sturm, S., 2005).

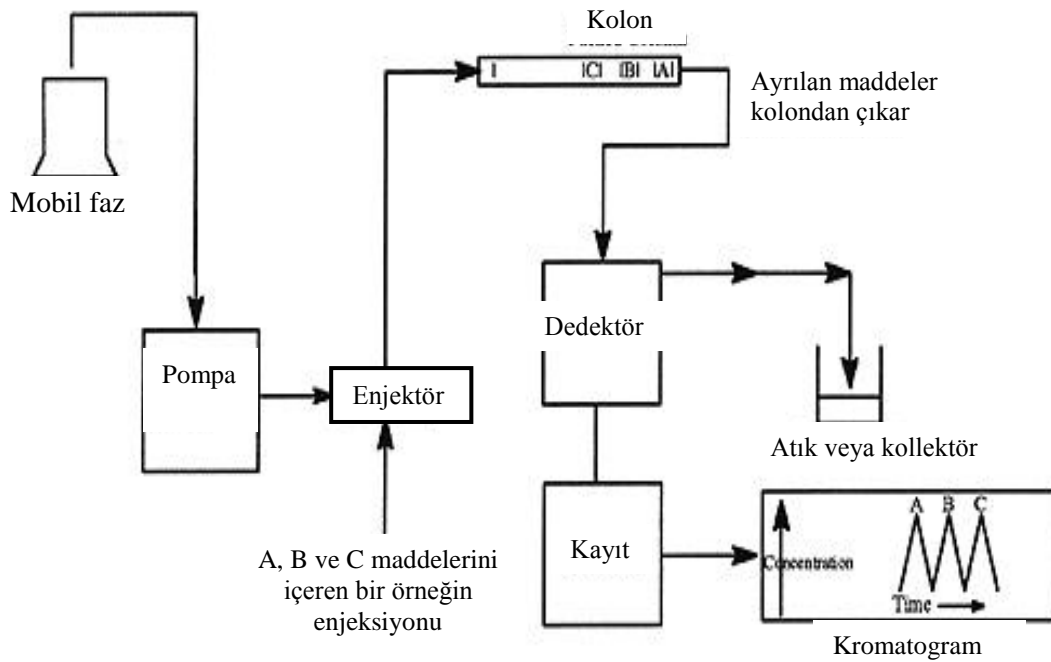
2.14. Sıvı Kromatografisi

Kromatografi, gaz veya sıvı özellikteki hareketli bir fazla (mobil faz) sıvı ya da katı olabilen sabit bir faz (durağan faz) arasında maddelerin dağılması esasına dayanan ayırma yöntemidir. Kalitatif (nicel) ve kantitatif (nitel) analize olanak sağlar.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılan yöntemdir. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri, duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan ve/veya yüksek sıcaklıkta kolaylıkla bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygun olması ve pek çok bilim dalının ilgilendiği maddelere uygulanabilir olmasıdır. Bu maddelere örnek olarak; amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal-organik türler, psikotrop maddeler sayılabilir.

Ayrılması istenen ve bir sıvıda çözülmüş halde bulunan bileşenler, genellikle 2-10 µm tanecik boyutlu bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ve hareketli sıvı faz ile farklı etkileşmelere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerleyerek, kolonu farklı zamanlarda terkederler ve böylece birbirlerinden ayrılmış olurlar. Burada taşıyıcı faz olan sıvı, pompalarla kolona iletiildiğinden yüksek akış hızındadır. Bu nedenle ayırma daha kısa sürede ve tam olarak gerçekleşmektedir. Ayrılan bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tespit edilip konsantrasyonla orantılı bir şekilde çıkış zamanına göre kaydedilir. Sabit

faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin tanecik boyutunun çok küçük olması nedeni ile uygun akış hızına ulaşabilmek için yüksek pompa basınçlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu gereksinimin bir sonucu olarak yüksek hızda gerçekleştirilen ayırmaların yapıldığı sıvı kromatografi sistemlerine, Yüksek Basınç Sıvı Kromatografi (HPLC) denir. Dolgu maddelerinin tanecik boyutlarının küçülmesi sayesinde hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylelikle kolon verimliliği de artmış olur. Bir HPLC sistemi, Şekil 2.10'da görüldüğü gibi temel olarak pompa, enjektör, kolon (sabit faz) ve dedektör olmak üzere 4 ana bileşenden oluşmaktadır (Skoog D.A. ve ark. 1998).



Şekil 2.10. Bir HPLC sisteminin ana bileşenlerinin şematik görüntüsü

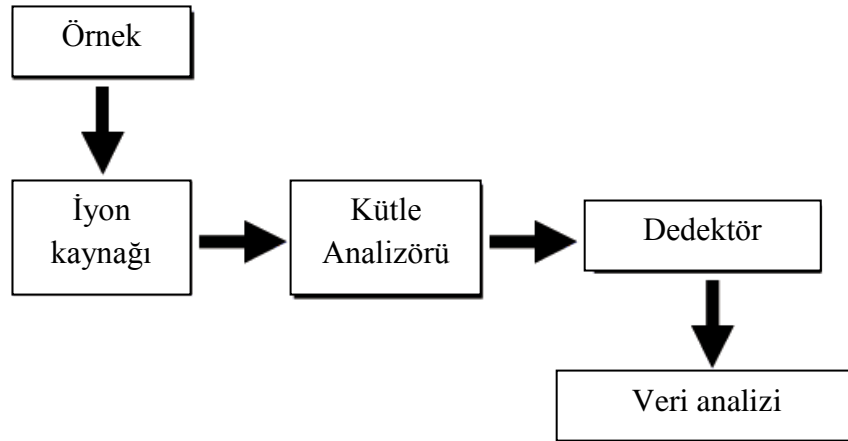
(<http://www.protein.iastate.edu/hplc.html>)

HPLC’de tampon ve çözeltiler pH’yı kontrol etmek ve sağlam ayırışmalar sağlamak için kullanılır. Asetik asit, formik asit, amonyum asetat, amonyum hidroksit ve Trifluoroasetik asit (TFA) gibi uçucu tamponlar LC-MS analizlerinde pH’yı kontrol etmek için sıklıkla kullanılır. Bu tamponların konsantrasyonları %0.1-1 aralığındadır (Cody, R.B., 2002).

2.15. Kütle Spektrometresi

Kütle spektrometresi elektriksel ya da manyetik alanda hareket eden yüklü parçacıkları diğer yüklü parçacıklardan kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayırarak analiz eden sistemlerdir. Moleküller normalde yüklü partiküller değildir ve kütle spektrometreleri iyonizasyon işlemi ile molekülleri uyararak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürürler. Yüklü moleküller stabil olmadıklarından başka moleküllerle veya bir yüzey ile çarpıştıklarında fragmentlerine parçalanırlar. Oluşan her bir iyon kendine özgü bir kütle/yük oranına sahiptir ve her bir bileşiğin spektrumu kendine özgüdür. Bir kütle spektrometresinin temel bileşenleri aşağıdaki şekilde gösterilmektedir (Şekil 2.11).

Örnek sisteme girdikten sonra gerçekleşen ilk işlem iyonlaştırma olayıdır. Kullanılacak iyon kaynağı incelenecek maddenin türüne ve çalışmaya göre değişmektedir. İyon kaynağının türü değişse de yüksek verimli ve küçük enerji dağılımı sağlayacak özellikte olması istenen bir özelliktir (Grauwiler, S.B., 2008).



Şekil 2.11. Bir kütle spektrometresinin temel bileşenleri

İyonlaştırma kaynakları prensipte iki ana gruba ayrılır (Ardrey, R.E., 2003):

- **Gaz faz iyon kaynakları:** Gaz faz iyon kaynaklarında numune önce buharlaştırılır daha sonra iyonize edilir. Gaz faz iyon kaynakları genellikle kaynama noktası 500 °C'nin altındaki ısıya dayanıklı numunelere uygulanmaktadır. Gaz faz iyon kaynaklarından elektron iyonizasyonu (EI) ve kimyasal iyonizasyon (CI) en sık kullanılan iyonlaştırma teknikleridir.
- **Desorpsiyon iyon kaynakları:** Desorpsiyon kaynaklarında ise numune sıvı veya katı halden direkt gaz fazında iyonlara dönüştürülür. Isıya dayanıksız ve uçucu olmayan bileşikler için daha uygundur. Desorpsiyon tipi iyon kaynaklarından; hızlı atom bombardımanı (FAB) polar ve çok yüksek moleküler ağırlıklı moleküllerin analizinde kullanılmaktadır. Elektrosprey iyonizasyon (ESI) ise polipeptitlerin, proteinlerin, ilaçların ve oligonükleotidlerin analizinde sıklıkla kullanılmaktadır. Matriks destekli lazer

desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI) ise özellikle peptitlerin analizinde kullanılmaktadır (Ardrey, R.E., 2003).

Isıya dayanıksız ve yüksek molekül ağırlıklı moleküller ESI ile analiz edilir. ESI iyonlaşabilen tüm polar bileşikleri analiz edebilir. Peptitler ve proteinler gibi (>100'000 amu) büyük moleküllerin analizine olanak tanır. Çözücünün akış hızı 1-1000 µL/dak.'dır. Eluent, sprej şeklinde bir kapiler borudan geçerek ESI kaynağı bölgesine gelir. Hava basıncıyla desteklenmiş gaz akışı ve yüksek sıcaklık ile örnek sprej şeklinde bir damlacık haline dönüşür. Damlacıklara kapiler alanında kapiler voltajı uygulandığında damlacıklar elektriksel olarak yüklenir, çözücü azot gazı eşliğinde buharlaşır. Örnek iyonları elektriksel alan yoluyla kütle spektrometresine doğru hareket eder. Bu süreç damlacık çapından, sıvı yüzey gerginliğinden, çözücünün uçuculuğundan, yüzey yükünden ve iyon çözünme gücünden etkilenir. İyi bir ESI sürecinde damlacıkların büyük olması, yüzey geriliminin yüksek olması, düşük çözücü uçuculuğu olması, güçlü iyon çözünme özelliği olması ve düşük yüzey yükü ve yüksek iletkenlik gerekmektedir (Ardrey, R.E., 2003).

Su, metanol ve asetonitril gibi genellikle ters faz HPLC için kullanılan çözücüler, ESI ile uyumludur. Diğer uyumlu çözücüler, diklorometan ve diklorometan-metanol karışımı, dimethyl sulfoxide (DMSO), isopropanol ve butanol gibi yüksek alkoller, tetrahydrofuran (THF), aseton, ve dimetil formamid (DMF)'dir. ESI için uygun olmayan çözücüler ise, hekzan gibi hidrokarbonlar, benzen gibi aromatikler ve karbontetraklorür gibi diğer polar olmayan çözücülerdir (Cody, R.B., 2002).

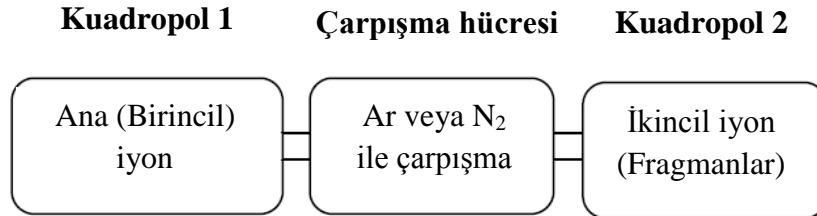
2.15.1. Ardışık Kütle Spektrometresi (MS/MS)

Ardışık kütle spektrometresinde numune karışımı birinci MS'nin iyon kaynağına verilir. Burada karışımın iyonizasyonu bileşiğin kendine ait iyonlarının oluşmasını sağlar. Bunlara ana iyonlar (birincil iyon) denir ve örnekteki karakteristik ana iyon seçilmiş ve tanımlanmış olur. Böylelikle incelenecek olan bileşiği karışımın içindeki diğer bileşenlerinden ayırır. Birinci MS'de ayrılmış olan ana iyon ikinci MS analizöre gönderilir ve burada parçalanarak ikincil iyon fragmentlerine ayrılır.

Bunlara ikincil iyon (daughter iyon) denir. Bu şekilde ana iyon ile ikincil iyonun birlikte taranması bileşiğin yüksek seçicilikte tanımlanmasını ve karışımdaki diğer bileşenlerden tamamen ayrılmasını sağlar. MS/MS tekniğinde, kuadropoldeki çarpışma hücresi ardışık kütle spektrometrelerinde en sık kullanılan iyon aktivasyon yöntemidir. MS/MS sistemi ana iyonu ayıran birinci kuadropol, çarpışma hücresi ve ikincil iyonu ayıran ikinci kuadropolden oluşmaktadır (Şekil 2.12). İkincil iyonun oluşması iyonizasyon basamağından ayrıdır. Birincil ve ikincil iyonlar birbirinden bağımsız şekilde m/z oranlarına göre karakterize edilir. İkincil iyonlar, birincil iyonların çarpışma hücresi içinde gaz molekülleri ile tekli veya çoklu çarpışmasından meydana gelir. Azot veya argon gibi hedef bir gaz ile birincil iyonun çarpışmasını iyonun kendi iç enerjisinin artması izler. Bu işlemler sonucunda yapısal olarak tanımlayıcı olan ikincil iyon oluşmuş olur (Grauwiler, S.B., 2008; Cody, R.B., 2002).

Doğrusal kuadropol kütle analizörü bir kütle filtresidir. Karşılıklı paralel olarak yerleşmiş dört hiperbolik silindir çubuktan oluşur. Çubuklara radyo-frekansı veya direkt voltaj uygulanır. İstenen iyonların kuadropol eksenini boyunca ilerlemesi için bir elektriksel alan meydana gelir. İstenmeyen m/z oranına sahip iyonlar çubuklara

çarpır. İyon geçişi boyunca pozitif iyonlar için voltaj negatifken, negatif iyonlar için ise voltaj pozitifdir (Grauwiler, S.B., 2008).



Şekil 2.12. Ardışık kütle spektrometresinin şematik görüntüsü

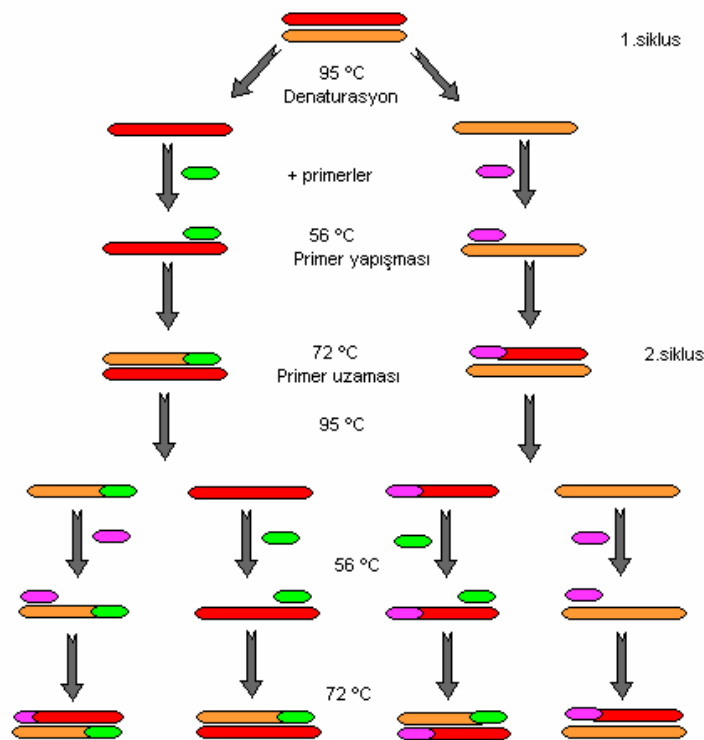
Kütle spektrometreleri iyon kaynağına giren bütün bileşikleri ayrıştırır ve iyonlaştırır. Organik bileşiklerin içerisinde çok fazla sayıda molekül mevcuttur ve hepsinin kütle fragmenti izlenir. Bu nedenle iyi bir spektrum elde etmek amacıyla belirli bir sürede sadece saf bir bileşiğin kütle spektrumunu almak gereklidir. Dolayısı ile kütle spektrometreleri gaz veya sıvı kromatografi gibi bir ayrıştırma işlemi ile birlikte kullanılması gerekir (Grauwiler, S.B., 2008).

2.16. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR, DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi in-vitro koşullarda çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. Yöntem, basit olarak, tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanır. PCR yöntemi, 1985 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan Cetus şirketine bağlı olarak çalışan Kary Mullis, Henry A. Erlich ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilmiştir. Araştırmalarda ve klinik laboratuvar tanısındaki uygulama

alanlarında büyük öneme sahip olan PCR'nin geliştirilmesindeki çalışmaları nedeniyle, K.Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülü' nü almaya hak kazanmıştır.

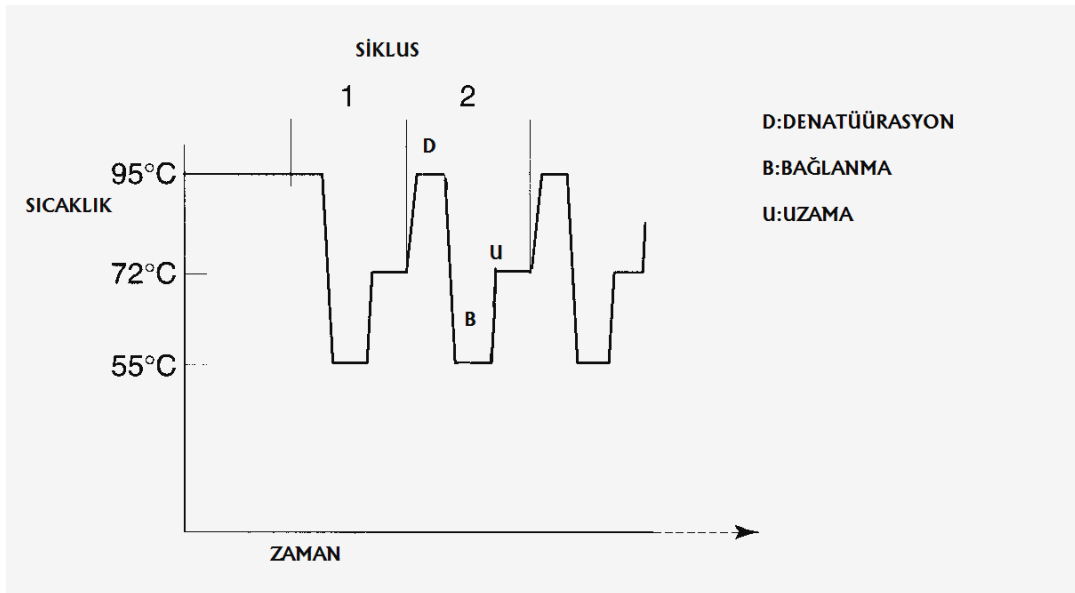
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) bir çeşit in vitro (canlı organizma dışındaki yapay ortam) klonlamadır. Her PCR, istenilen sayıda tekrarlanabilen döngülerden oluşur. Bir PCR döngüsü, sırasıyla, DNA iki zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması ("Denatürasyon"); sentetik oligonükleotidlerin (primerlerin) hedef DNA'ya bağlanması ("Primerin Bağlanması") ve zincirin yeni çift zincirli DNA'lar oluşturacak şekilde uzaması ("Uzama") aşamalarından meydana gelir (Şekil 2.13) (Dieffenbach, C.W. ve Dveksler G.S., 2003).



Şekil 2.13. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun şematik görüntüsü (Turhan H., 2008)

Sözö edilen bu aşamaların her biri farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilir (Şekil 2.14);

1. Denatürasyon (94°C-98°C)
2. Primerin bağlanması (37°C-65°C)
3. Uzama (72°C)



Şekil 2.14. Bir PCR döngüsünün basamakları ve sıcaklıkları.

PCR ile bir hedef DNA parçasından milyonlarca çoğaltmak mümkündür. PCR uygulamaları için ilgili gen bölgesine ait baz dizisinin bilinmesi gereklidir. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı olan, ortalama 18-30 baz uzunluğunda bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanılarak, bu iki primer ile sınırlandırılan bölgenin, enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. PCR'ın en önemli özelliği çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamasıdır. Bir PCR döngüsü için gerekli olan beş ana madde

vardır: DNA örneği, genelde genomik DNA; çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer; deoksi-nükleotit-trifosfatlar (dNTP); yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi; uygun pH ve iyon koşullarını (Mg^{+2}) sağlayan tampon karışımıdır. PCR yöntemi kolay uygulanabilir olması ve hızlı sonuç vermesi gibi avantajları nedeniyle, sağlık, tarım, veterinerelik, biyoloji gibi birçok farklı alanda kullanılabilir (Dieffenbach, C.W. ve Dveksler GS., 2003).

2.16.1. Gerçek Zamanlı - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

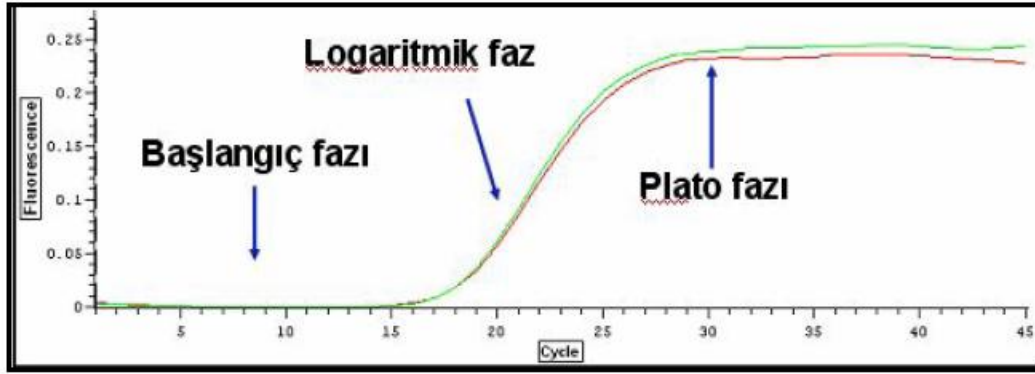
1988 yılında “thermus aquaticus” bakterisinden saflaştırılan, ısıya dayanıklı Polimeraz enziminin (taq polimeraz) kullanımı ile birlikte polimeraz zincir reaksiyonları için otomatik termal siklus cihazları geliştirilmeye başlanmıştır. Floresan ışımaya tekniklerinin de kullanıma girmesiyle Gerçek zamanlı-PCR (RT-PCR)’da bir devrim yaşanmıştır. Bu sayede birçok farklı alanda gen anlatımını sayısal bir değer olarak ölçmek mümkün olmuştur. Bu gelişim sayesinde artık gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek, erime eğrisi analizi gerçekleştirmek, multipleks analiz yapmak, devam eden PCR reaksiyonunu ekranda izleyerek ‘Real Time’ (gerçek zamanlı) olarak reaksiyonun gidişine müdahale etmek ve PCR döngülerinin sayısı ile oynayabilmek de mümkündür. RT-PCR, PCR amplifikasyonunu görünür hale getirir, monitörize eder. Gerçek zamanlı PCR’da ortaya çıkan ürünlerin analizi reaksiyon devam etmekte iken yapılmaktadır. Böylelikle PCR ürünlerini görünürleştirmek için kullanılan görüntüleme yöntemlerine harcanan zaman azalmış olur. Ayrıca reaksiyonu kısa sürede tanımlamak için yeni bir hızlı sıcaklık döngüsü kullanılmaktadır. PCR ürünlerini yeni erime eğrisi analiz programları kullanarak tespit ederek PCR uygulamalarında

optimum performansa ulaşabilmektedir. Floresan işaretli proplar (Hibridizasyon propları) veya doğrudan moleküle bağlanan interkalatör boyalar (Syber Green) kullanılır. Oluşan DNA ile doğru orantılı floresan ışımaya meydana gelir. Real-time PCR, Reaksiyon esnasında her bir PCR siklüsünde yeterli miktarda ürünün verdiği floresans ışığa göre çalışıp reaksiyonu aşama aşama sonuna kadar oluşan ürünü kontrol eden bir sistemdir. PCR sonuçları kantite edilebilir. PCR sonrası elektroforez gibi ilave tekniklere ihtiyaç yoktur. Multiplex PCR kullanımına uygundur. Konvansiyonel ölçümlerden çok daha az RNA veya DNA ile çalışabilir (Ginzinger, D.G., 2002).

RT-PCR prensibi, bir floresan raportörün kantitasyonu ve tanısı üzerine kuruludur, PCR ürünlerinin miktarındaki ilk önemli artış (CT - threshold cycle) hedef molekülün (DNA, RNA vb.) başlangıç miktarı ile orantılıdır.

Yöntemin 3 ana fazı vardır: Başlangıç fazı, Logaritmik faz, Plato fazı (Şekil 2.15).

Başlangıç fazında, ürün oluşmakta, ancak floresans taban (background) seviyesinin altında kalmaktadır. Logaritmik fazda, ürünün eksponansiyel birikimiyle floresans background seviyesinin üzerine çıkmaktadır. Floresans amplifiye olan ürün miktarıyla direkt orantılı olarak yükselmektedir. Plato fazında, DNA veya floresans miktarında reaksiyon bileşenlerinin (primer, taq polimeraz vs.) tükenmesinden dolayı anlamlı artış yoktur (Ginzinger, D.G., 2002).

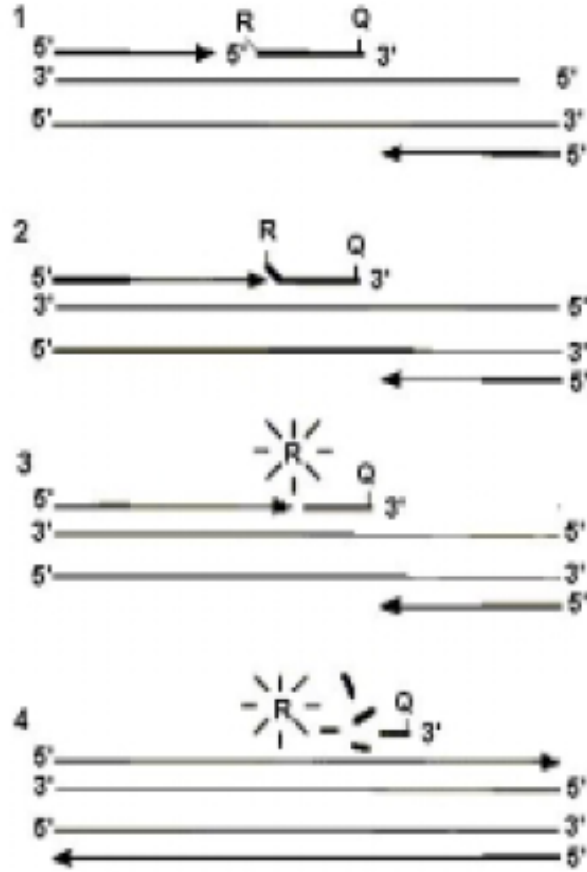


Şekil 2.15. Real-time PCR yönteminin 3 ana fazında çoğalmanın fluorensans yanıtına göre izlenmesi

2.16.2. Real Time PCR Tekniğinde TaqMan Probları ve Özellikleri

TaqMan prob yöntemi PCR siklusları esnasında oluşan spesifik PCR ürünü belirlemek ve eş zamanlı monitörize etmek amacıyla flürojenik bir prob kullanır. Prob ve hedef bölge arasındaki hibridizasyon floresans bir sinyal oluşturur. Taqman Probu ile özgüllük artar. TaqMan sisteminde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Prob'un 5' ucunda raportör florokrom (6-carboxyfluorescein =6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine =TAMRA) bulunmaktadır. Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması prob'un bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için *Taq* DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve

sinyal oluşturur (Şekil 2.16). Her siklusta üretilen ampikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır (Ginzinger, D.G., 2002).



Şekil 2.16. TaqMan prob yönteminin şematize görüntüsü (R= Raportör, Q= Baskılayıcı)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN GEREÇLER

Çalışma boyunca kullanılan tüm gereçler, bunların marka ve modelleri Tablo 3.1’de verildiği gibidir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan gereçlerin adları, marka-modelleri

Kullanılan gereç		Marka-Model
Otomatik pipet	0.1- 2.5 µL 2.5- 20 µL 10- 100 µL 100- 1000 µL	Eppendorf
Otoklav		Nüve
Buzdolabı (+4°C)		Sharp
Derin dondurucu (-20°C)		Arçelik
Derin Dondurucu (-86°C)		Hettich
Vorteks		Heidolph
Ultra saf su cihazı		Millipore Direct Q3
Etüv		Termal Laboratuar Malzemeleri
Santrifüj		Hettich
pH metre		Thermo Orion 3 Star
Elektronik hassas terazi		Precisa XB 220 A
Orbital Çalkalayıcı		GFL
Manyetik Karıştırıcı		IKA RH Basic KT/C
Ultrasonik su banyosu		Bandelin Sonorex

Tablo 3.1'in devamı	
Azot altında örnek zenginleştirme düzeneği	Techne Dri-Block DB-3D
DNA İzolasyon Kabini	Thermo Scientific Heraeus, HERAsafe KS12
RT-PCR (PCR bloğu, bilgisayar)	Roche LightCycler 1.5
LC-MS/MS (İkili pompa, degazer, kolon fırını, termostatlı otomatik örnekleyici, ardışık kütle spektrometresi, bilgisayar)	Zivak Tandem Gold
Kromatografik kolon	Phenomenex [Luna 3 μ , C18(2), 100 A, 150x2.00 mm, Ters Faz]
Koruyucu ön kolon	Security Guard Cartridge (C18 4x3.0 mm ID)

3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE KİTLER

Çalışmada kullanılan tüm kimyasal maddelerin ve kitlerin adları, marka ve özellikleri Tablo 3.2'deki gibidir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve kitlerin listesi

Malzemenin adı	Markası-Özelliği
Asetik asit	Riedel-de Haen (glasiyel % 100)
Metanol	Merck (HPLC)
İzopropanol	Merck
Etil Alkol	Merck (Mutlak)
Amonyak	Merck (%32, extra pure)
Etil Asetat	Merck (GR for analysis)
n-Heptan	Merck (extra pure)
Sodyum Hidroksit	Riedel de Haen
Sodyum Klorür	Merck (GR for analysis)
Borik asit	Sigma

Tablo 3.2'nin devamı	
Agaroz	Prizma
Etidyum Bromür	Sigma
Disodyum etilendiamin tetra asetik asit (EDTA)	Sigma
Tris hidroksil metil amino metan (Tris baz)	Sigma
6X Yükleme tamponu	Fermentas
Olanzapin (%99.9)	Abdi İbrahim
Risperidon (%99.9)	Sigma
Paliperidon (%99.9)	Sigma
Sertralin HCl (%99.9)	Sigma
Reboksetin Mesilat (%99.9)	Sigma
DNA izolasyon kiti	Roche
Gen ekspresyon kiti	LightCycler® TaqMan Master Kit
CYP2D6*3 ve*4 alel kitleri	LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe ve LightMix®

3.3. KAN VE İDRAR ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI

Çalışmanın Helsinki Bildirgesi'ne uygunluğu, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 24 Haziran 2009 tarihli ve 19174 sayılı yazı ile onaylandı (Ek 3). Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Psikiyatri Anabilim Dalı ve Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ile yapılan işbirliği çerçevesinde yürütüldü.

Çalışmanın genetik analiz basamakları Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda; kromatografik ve spektrometrik analiz basamakları ise Adli Tıp Enstitüsü, Toksikoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Psikiyatri Anabilim Dalı'nda tedavi görmekte olan ve "Bilgilendirilmiş Onay Formu"nu (Ek 4) imzalayarak çalışmaya katılmayı kabul eden hastalar arasından seçilmiş, psikoz ya da şizofreni ön tanısı / tanısı almış (Bkz. Ek 5. Hasta Bilgi Formu) 77 hastadan kan numuneleri toplandı. Bu hastalar arasından seçilmiş ve CYP2D6 enzimi ile metabolize edilen Olanzapin, Risperidon, Sertralin etken maddelerini içeren ilaç/ilaçlarını kullanmakta olan 39 hastadan kanın yanı sıra idrar numuneleri toplandı.

Kontrol grubu olarak ise; aralarında akrabalık ilişkisi olmayan ve herhangi bir psikiyatrik hastalık tanısı almamış, herhangi bir ilaç kullanmayan 38 sağlıklı bireyden Bilgilendirilmiş Onay Formu alınarak kan örnekleri toplandı. Kan numuneleri Antikoagulanlı (Na₂-EDTA) plastik tüplere (2 mLx2) alındı. İdrar numuneleri ise steril, plastik idrar kaplarına alındı ve koruyucu olarak NaF₂ (5mg/mL) ilave edildi. Kan ve idrar örnekleri analiz edilinceye kadar uygun koşullarda muhafaza edildi.

3.4. ÇALIŞMAYA KATILAN BİREYLERE AİT BİLGİLER

Çalışmaya katılan hasta ve kontrol grubuna ait çeşitli özellikler Tablo 3.3 ve Tablo 3.4'deki gibidir.

Tablo 3.3. Psikiyatri servisinde yatan ve çalışmaya katılan hastalara ait çeşitli bilgiler

Cinsiyet	Kadın: 34 (%42.5) Erkek: 46 (%57.5) (n=80)
Yaş ortalaması	37.6 (n=80)
Yaş aralığı	14-73
Alkol kullanıcıları	11 (%14.5) (n=76)
Sigara kullanıcıları	37 (%48.7) (n=76)
Psikotrop madde kullanıcıları	4 (%5.3) (n=76)

Tablo 3.4. Çalışmaya katılan kontrol grubuna ait bilgiler (n=38)

Cinsiyet	Kişi sayısı (%)	Yaş Aralığı	Yaş ortalaması
Kadın	22 (%57.9)	20-59	32.7
Erkek	16 (%42,1)		

Çalışmada yer almayı kabul etmiş ve ön tanı/tanı almış 80 hastanın 39'una psikoz veya şizofreni ön tanısı/tanısı, 14 hastaya bipolar bozukluk, 15 hastaya depresyon, bir kişiye madde bağımlısı, iki kişiye epilepsi ön tanısı/tanısı koyulmuş, dokuz kişiye henüz herhangi bir ön tanı/tanı koyulmamıştır. Genetik çalışmalara, kan vermeyen 3 hasta dışında, tüm hastalar dahil edildi, bu hastalar arasında Olanzapin, Risperidon ve Sertralin etken maddelerinden en az birini kullananların kullandıkları ilaç etken maddelerinin günlük dozları, alınan biyolojik örnek türü Tablo 3.5'de liste halinde verildi.

Tablo 3.5. Çalışmaya dahil edilen hastaların kullandıkları ilaç etken maddelerinin günlük dozları (mg/gün)

Hasta Kodu	Olanzapin	Risperidon	Sertralin
1		4	
4	10		
6		1	
7		3	
10	25		
11		50	
20	5		
21	20		
25	20		
26	10		
28		2	
29		6	
32		50	
33		50	
34		3	
35		8	
36	20		
38	10		100
39		4	
40	15		
42		8	
46	10		
47		8	
48	20		
49	5		
53	5		
55			100
56		50	
58	20		
59	20		
60	10		
61		3	
63		50	
64	20		
70	10		
74	10		
75		6	
76	20		
80	5		

Çalışmada üç ayrı deneysel işlem uygulandı. Birincisi; hasta ve kontrol kanları ile yapılan DNA izolasyonu sonrası CYP2D6*3 ve *4 alellerinin tek nükleotid polimorfizmini (SNP) belirlemek üzere RT-PCR ile yapılan erime eğrisi analizi; ikincisi, CYP2D6 gen kopya sayısını belirlemek için RT-PCR ile yapılan ekspresyon çalışmaları; üçüncüsü ise uygun özütleme ve analiz yöntemi kullanılarak hastaların kan ve idrarlarındaki etken madde ve/veya metabolit konsantrasyonlarını belirlemek üzere yapılan LC-MS/MS çalışmalarıdır. Tüm bu çalışmaların detayları aşağıdaki bölümlerde açıklandı.

3.5. ÇALIŞMANIN GENETİK BASAMAKLARI

i) DNA izolasyon kitinin içeriği:

- (1) Doku Lizis tamponu (Çalışmada doku olmadığından bu tampon kullanılmamıştır)
- (2) 20 mL Bağlanma tamponu
- (3) Liyofilize Proteinaz K (rekombinant PCR saflıkta)
- (4a) 33 mL İnhibitör Uzaklaştırıcı Tampon
- (4) 20 mL Yıkama Tamponu
- (5) 40 mL Elüsyon Tamponu

Ultra pure filtre tüpleri

2 mL hacimli toplama tüpleri

ii) DNA İzolasyon Kitinin ve örneklerin izolasyona hazırlanması

(3) numaralı Liyofilize Proteinaz K tüpünün içine 4.5 mL otoklavlanmış ultra saf su koyuldu ve vorteks yardımı ile iyice karıştırıldı. 1.5 mL hacimli ependorf tüplere porsiyonlar halinde dağıtıldı. -20°C'de muhafaza edildi. Çalışma öncesinde oda sıcaklığına getirildi.

(4a) numaralı 33 mL İnhibitör Uzaklaştırıcı Tampon çözeltisine 20 mL mutlak etil alkol ilave edildi, vorteks yardımı ile iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

(4) numaralı 20 mL Yıkama Tamponu üzerine 80 mL mutlak etil alkol ilave edildi, vorteks yardımı ile iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

(5) numaralı 40 mL Elüsyon Tamponu çalışma boyunca 70°C'de hazır bulunduruldu. Çalışılincaya kadar -86°C'de muhafaza edilen kan örnekleri bir gün önceden -20°C'ye alındı, çalışma öncesinde orbital karıştırıcıda 60 devir/dak. hızda homojen olarak çözülünceye kadar karıştırılarak oda sıcaklığına getirildi.

iii) Tam kandan DNA izolasyon protokolü

(High Pure PCR Template Preparation Kit, Versiyon Aralık 2008)

- 1.5 mL hacimli ependorf tüpünün içine:
 - 200 µL bağlanma tamponu
 - 200 µL tam kan
 - 40 µL Proteinaz K ilave edildi ve hızla karıştırılarak 70°C'de 10 dakika inkübe edilmek üzere bekletildi.

- Bu karışımın üzerine 100 µL izopropanol eklendi, iyice karıştırıldı.
- Bu karışım, daha önceden toplama tüplerinin içlerine yerleştirilen ve örnek sırasına göre etiketlenen filtre tüplerinin içerisine pipet yardımı ile boşaltıldı.
- 1 dak. boyunca 8000 x g hızda santrifüj edildi ve filtre tüpleri yeni toplama tüplerine yerleştirildi.
- Filtre tüplerinin içerisine 500 µL İnhibitör Uzaklaştırıcı Tamponu ilave edildi.
- 1 dak. boyunca 8000 x g hızda santrifüj edildi ve filtre tüpleri yeni toplama tüplerine yerleştirildi.
- Filtre tüplerinin içerisine 500 µL Yıkama Tamponu ilave edildi.
- 1 dak. boyunca 8000 x g hızda santrifüj edildi ve filtre tüpleri yeni toplama tüplerine yerleştirildi.
- Filtre tüpleri tamamen tampondan uzaklaştırılmak üzere son defa 10 saniye boyunca en yüksek devirde santrifüj edildi.
- Filtre tüpleri etiketlenmiş ependorf tüplerinin içine yerleştirildi.
- Filtre tüplerinin içerisine 70°C'de ısıtılmış elüsyon tamponundan 200 µL ilave edildi.
- 1 dak. boyunca 8000 x g hızda santrifüj edildi.
- Filtre tüpleri atıldı, DNA içeren ependorf tüpler ise parafinle sıkıca kapatılarak -20°C'de muhafaza edildi.

DNA izolatlarının görüntülenmesi

İzolasyonu yapılan DNA örneklerinin varlığı %2 agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

%2 agaroz jelin hazırlanması ve elektroforezin gerçekleştirilmesi:

- 2 g agaroz, 20 mL 1X TBE* tamponu ve 80 mL deiyonize su ilave edilerek hazırlandı.
- Agaroz karışımı, benmaride iyice eriyene kadar cam çubukla karıştırılarak kaynatıldı.
- Eriyen agarozun içine 10 µL Etidyum Bromür eklendi, tarak yerleştirilmiş jel kabına kabarcık oluşturmayacak şekilde döküldü.
- Jelleşmenin gerçekleşmesinin ardından jel kaptan alınıp elektroforez tankına yerleştirildi.
- Jel tankı 1X TBE tamponu ile dolduruldu.
- 3 µL yürütme tamponu ve 3 µL izolat karıştırılarak kuyucuğa yüklendi.
- Elektroforez 100 voltta, 20 dakika yürütüldü ve UV lamba altında izolatların veya PCR ürünlerinin varlığına bakıldı.

***TBE (Tris-Borik Asit- EDTA) tamponunun hazırlanması (10X) (pH=8.3)**

55 g Borik asit, 7.44 g EDTA, 107.8 g Tris baz bir miktar deiyonize suda manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırıldı. pH ayarı yapıldıktan sonra 1 L'ye tamamlandı.

1X TBE tamponunun hazırlanması:

10X TBE tampondan 100 mL alınıp, 1 L'ye tamamlandı.

Hazırlanan DNA örnekleri ile CYP2D6 gen ekspresyon çalışması ve CYP2D6*3 ve *4 allellerinin belirlenmesi için tek nükleotid polimorfizmi (SNP) belirleme çalışması RT-PCR sistemi ile gerçekleştirildi (Şekil 3.1).

CYP2D6 geninin iki bölgesi (İntron 6 ve Ekson 9) ve iç referans gen olarak Albümin geninin (İntron 12) gen ekspresyonu çalışması; bu gen bölgeleri için hazırlanmış olan primer/problarla ve LightCycler® TaqMan Master Kit kullanılarak yapıldı.

CYP2D6*3 ve *4 alellerinin belirlenmesi için yapılan erime eğrisi analizinde ise LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe ve LightMix® kiti kullanıldı.

Her iki çalışmaya ait protokoller ve RT-PCR (Gerçek zamanlı- Polimeraz Zincir Reaksiyonu) parametreleri aşağıda tarif edildi.



Şekil 3.1. Genetik çalışmaların gerçekleştirildiği Roche LightCycler 1.2 RT-PCR sisteminin görüntüsü.

3.5.1. GEN EKSPRESYONU ÇALIŞMASI (CYP2D6 Intron 6, Ekson 9 ve Albümin 12)

i) Gen Ekspresyonu Çalışmasında Kullanılan Primerlerin ve Probların Hazırlanması

Çalışmada kullanılan, liyofilize halde üretilmiş primer ve problar Tablo 3.6'da belirtilen hacimlerde Ultra saf su (USS) ile çözülerek 100 nmol stok konsantrasyonlar şeklinde hazırlandı. 100 nmol konsantrasyondaki stok primerler çalışmada 20 nmol/ μ L, problar ise 50 nmol/ μ L olacak şekilde seyreltildi.

Tablo 3.6. Ekspresyon çalışmasında kullanılan primer ve problemlerin dizinleri, hazırlama hacimleri (100 nmol için), erime sıcaklıkları.

Primer /probenun adı	Hazırlama hacmi (100 nmol için)	Erime Sıcaklığı T _m (°C)	Dizin
CYP2D6 Exon 9			
CYP2D6 ex9 f	872 µL	58.3	5'-CTT CAC CTC CCT GCT GCA G-3'
CYP2D6 ex9 r	891 µL	54.4	5'-TCA CCA GGA AAG CAA AGA CA-3'
CYP2D6 ex9 FAM (prob)	458 µL	61.9	5'-/56-FAM/CCG GCC CAG CCA TGG/36-TAMSp/-3'
CYP2D6 Intron 6			
CYP2D6 in6 f	949 µL	56.4	5'-TGA GCC CAT CTG GGA AAC A-3'
CYP2D6 in6 r	771 µL	56.6	5'-GGT GTC CCA GCA AAG TTC ATG-3'
CYP2D6 in6 FAM (prob)	130 µL	62.1	5'-/56-FAM/GAA GGG TAC AGG CGG GGG/36-TAMSp/-3'
Albumin			
Alb ex12 f	977 µL	55.7	5'-TGT TGC ATG AGA AAA CGC CA-3'
Alb ex12 r	678 µL	57.7	5'-GTC GCC TGT TCA ACC AAG GAT-3'
Alb ex12 FAM (prob)	314 µL	63.3	5'-/56-FAM/AAG TGA CAG AGT CAC CAA ATG CTG CAC AG/36-TAMSp/-3'

ii) **LIGHTCYCLER® TAQMAN MASTER KİTİN İÇERİĞİ VE HAZIRLANMASI** (Roche, Versiyon Nisan 2006)

Kit'in içeriği

- (1a) Taq DNA Polimeraz Enzimi
- (1b) Reaksiyon karışımı [Daha sonra (1) adı ile anılacak]
- (2) Su, PCR derece

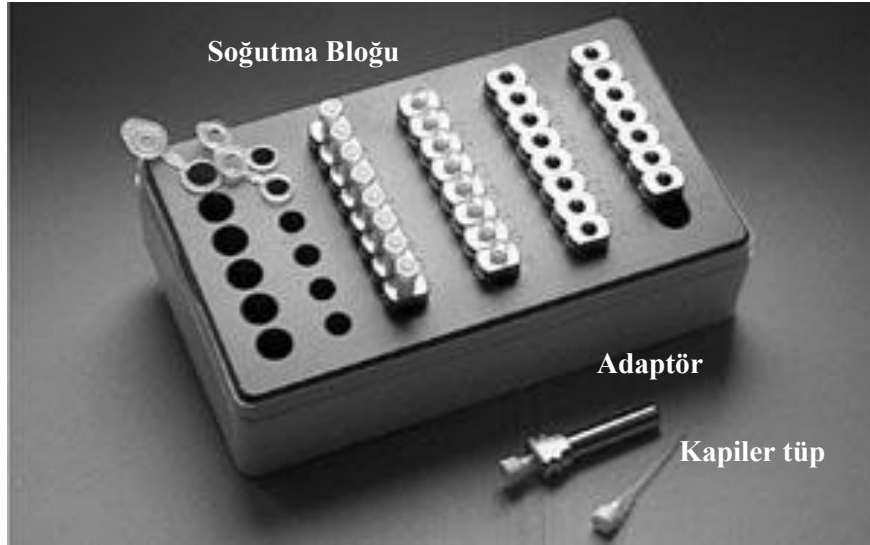
Kit' in hazırlanması

- (1a) numaralı Enzim tüpünden 10 μ L alındı, (1b) numaralı reaksiyon karışımına ilave edildi.
- Bu karışım (FastStart Taq DNA Polimeraz, reaksiyon tamponu, $MgCl_2$ ve dNTP karışımı içermektedir) (1) numaralı t p adını alarak yeniden etiketlendi.
- Hazırlanan karışım -15 ila -25 C'de muhafaza edildi ve 1 hafta içerisinde t kertilmesine  zen gösterildi.

iii) Gen ekspresyonu çalışma protokolü**CYP2D6 Intron 6, Exon 9 ve Albumin Exon 12'ye ait bir (1) reaksiyon için hazırlanan karışım**9.8 μ L Su0.5 μ L f primer0.5 μ L r primer0.2 μ L prob4 μ L master reaksiyon karışımı (1)5 μ L DNA örneği (50-200 ng)

Toplam hacim: 20 μ L (Bir reaksiyon için)

Analiz edilecek DNA izolatları önceden oda sıcaklığına getirildi. Analiz edilecek örnek sayısına göre karışımın toplam hacmi belirlendi. Hazırlanan karışım önceden soğutulmuş kapiler adaptörü üzerinde bulunan 20 μ L hacimli LightCycler[®] kapiler tüplerine (Şekil 3.2.) her bir kapiler tüpte 15 μ L olacak şekilde aktarıldı ve üzerine 5 μ L hedef DNA izolatu ilave edilerek tüpün kapağı kapatıldı. Kısa bir santrifüj yapılarak kapilerler çalışmaya hazır hale getirildi. Her çalışmada örneklerle eş zamanlı olarak kontaminasyon kontrolü için DNA örneği içermeyen bir negatif kontrol çalışıldı. LightCycler 1.2 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) RT-PCR sisteminde Tablo 3.7'de belirtilen koşullarda analiz edildi. CYP2D6 Ekson 9, İtron 6 ve Albümin İtron 12 bölgelerinin PCR ürünlerinin uzunlukları Tablo 3.8'de belirtildi. Elde edilen miktar tayinleri Cp (Eşik döngü) değeri şeklinde kaydedildi.



Şekil 3.2. LightCycler® kapiler tüp adaptörünün ve içinde bulunduğu soğutma bloğunun görüntüsü

Tablo 3.7. CYP2D6 İtron 6, Ekson 9 ve Albümin İtron 12 Gen ekspresyonu RT-PCR Programı

Program:		Denatürasyon	PCR			Soğuma
	Parametre					
Analiz Modu		Yok	Miktar Tayini			Yok
Döngü sayısı		1	45			1
Segment		1	1	2	3	1
Hedef sıcaklık (°C)		95	95	63	72	40
İkinci hedef sıcaklık (°C)		-	-	55	-	-
Bekleme süresi (dak:s)		10:00	00:10	00:40	00:01	00:30
Artış oranı (°C/s)		20	20	20	20	20
Mod		Yok	Yok	Yok	Tek	Yok

Tablo 3.8. CYP2D6 Ekson 9, İtron 6 ve Albümin İtron 12 bölgelerinin PCR ürünlerinin uzunlukları

Çoğaltılan bölgenin adı	Çoğaltılan bölgenin uzunluğu
CYP2D6 Ekson 9	89 bp
CYP2D6 İtron 6	78 bp
Albümin İtron 12	72 bp

3.5.2. CYP2D6*3 VE *4 ALELLERİNİN BELİRLENMESİ

i) **Lightcycler® Faststart DNA Master Hybprobe kit'inin içeriği** (Roche, Version Ocak 2006)

(1a) Taq DNA Polimeraz Enzimi

(1b) Reaksiyon karışımı [Daha sonra (1) adı ile anılacak]

(2) 25 mM MgCl₂ stok çözeltisi

(3) Su, PCR derece

ii) **Kit'in hazırlanması**

- (1b) numaralı reaksiyon karışımından 60 µL alındı, (1a) numaralı Enzim tüpüne ilave edildi.
- Bu karışım (FastStart Taq DNA Polimeraz, reaksiyon tamponu, MgCl₂ ve dNTP karışımı içermektedir) (1) numaralı tüp adını alarak yeniden etiketlendi.
- Hazırlanan karışım -20°C'de muhafaza edildi.

iii) Lightmix® kit'inin (TIB Molbiol) içeriği ve hazırlanması

- Bu kit liyofilize edilmiş primer ve probların karışımından oluşmaktadır.
- 16 reaksiyonluk tüpler halinde bulunan liyofilize haldeki Lightmix® kitinin her bir tüpüne 66 µL otoklavlanmış ultra saf su ilave edildi ve vorteks yardımı ile karıştırıldı.
- Hazırlanan karışım -20°C'de muhafaza edildi.

iv) CYP2D6 *3 ve *4 allelerinin belirlenmesinde bir (1) reaksiyon için hazırlanan karışım

7,4 µL	Su
1,6 µL	MgCl ₂
4 µL	Prob ve primer karışımı (Lightmix)
2 µL	Master reaksiyon karışımı (1)
5 µL	DNA örneği

Toplam hacim: **20 µL** (Bir reaksiyon için)

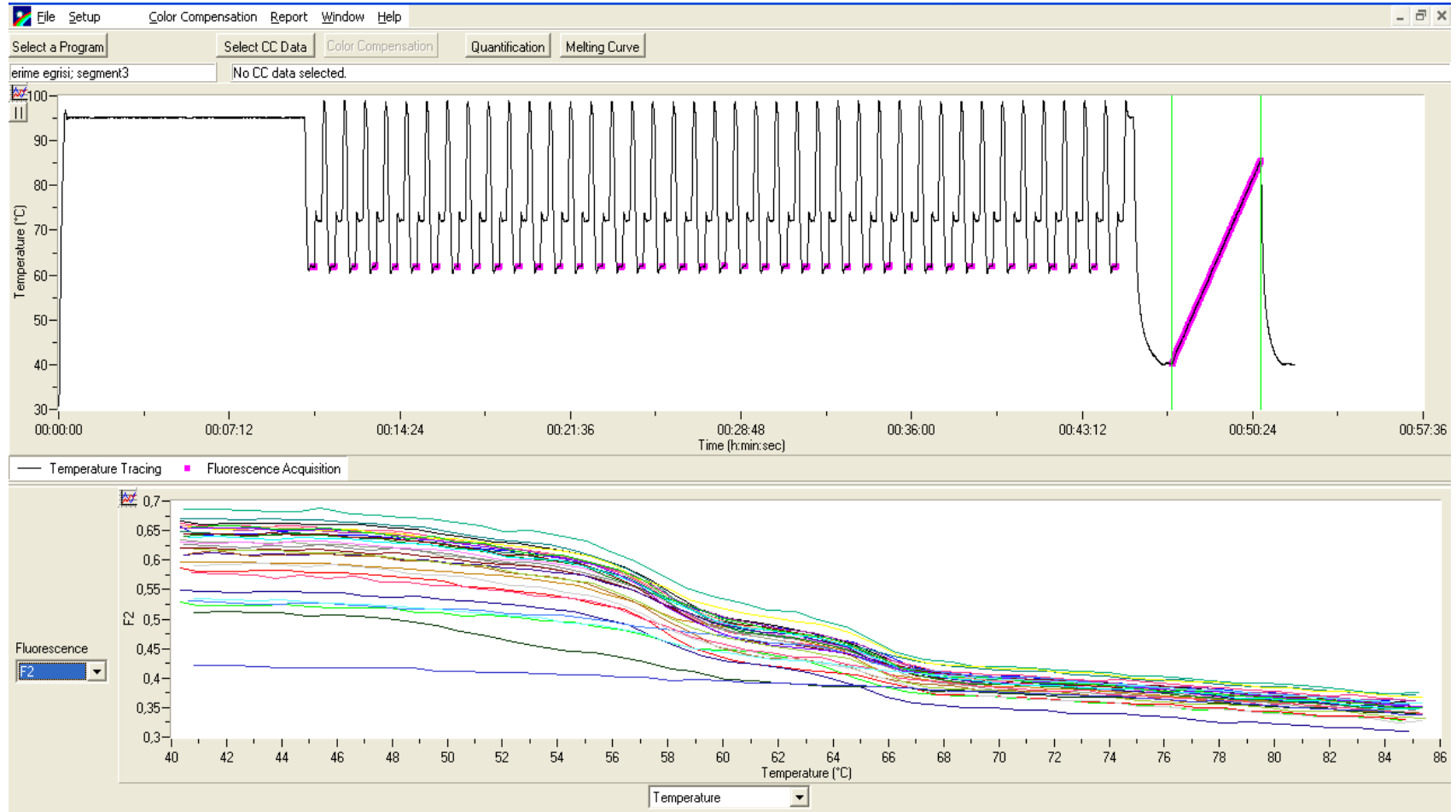
Analiz edilecek örnek sayısına göre karışımın toplam hacmi belirlendi. Hazırlanan karışım RT-PCR önceden soğutulmuş kapiler adaptörü üzerinde bulunan 20 µL hacimli LightCycler® kapiler tüplerine her bir kapiler tüpte 15 µL olacak şekilde aktarıldı ve üzerine 5 µL hedef DNA ilave edilerek tüpün kapağı kapatıldı. Kısa bir santrifüj yapılarak kapilerler çalışmaya hazır hale getirildi. Her çalışmada örneklerle eş zamanlı olarak kontaminasyon kontrolü için DNA örneği içermeyen bir negatif kontrol ve kitin içeriğinde bulunan bir homozigot mutant, bir heterozigot, bir de homozigot yabancı tip örnek çalışıldı. LightCycler 1.2 (Roche Diagnostics GmbH,

Mannheim, Germany) RT-PCR sistemi ile, Tablo 3.9’da çalışma koşulları belirtilen yöntemle, Roche LightCycler Software Version 3.5 yazılımı ile analiz edildi. Elde edilen erime eğrilerinde Tablo 3.10’deki erime sıcaklıklarına göre örneğın ilgili alelleri taşıyıp taşımadığı belirlendi. Yapılan RT-PCR analizinde Tablo 3.11’de türleri ve kanalları verilen problemler kullanıldı.

Şekil 3.3’te RT-PCR sisteminin sıcaklık programı ve erime eğrileri (CYP2D6*3) bilgisayar yazılımında bir arada görölmektedir.

Tablo 3.9. CYP2D6*3 ve *4 alellerinin SNP analizinde kullanılan RT-PCR koşulları

Program:		Denatürasyon	PCR			Erime			Soğuma
	Parametre								
	Analiz Modu	Yok	Miktar Tayini			Erime eğrisi			Yok
	Döngü sayısı	1	40			1			1
	Segment	1	1	2	3	1	2	3	1
	Hedef sıcaklık (°C)	95	95	62	72	95	40	85	40
	Bekleme süresi (dak:s)	10:00	00:05	00:10	00:15	00:20	00:20	00:00	00:30
	Artış oranı (°C/s)	20	20	20	20	20	20	0,2	20
	Mod	Yok	Yok	Tek	Yok	Yok	Yok	Sürekli	Yok



Şekil 3.3. RT-PCR sisteminin sıcaklık programının ve erime eğrilerinin (CYP2D6*3) yazılımda bir arada görüntüsü.

Tablo 3.10. Genotip belirlemede kullanılan erime sıcaklıkları

	Erime Sıcaklıkları (T_m)	
	(°C)	
	Mutant	Yabani tip (Wildtype)
Lightmix® CYP2D6*3	51.0	58.1
Lightmix® CYP2D6*4	64.3	56.0

Tablo 3.11. CYP2D6*3 ve *4 alellerinin belirlenmesi için kullanılan problemlerin özellikleri

	Fragman	Prob	Kanal
Lightmix® CYP2D6*3	378 bp	Red 640	640
Lightmix® CYP2D6*4	370 bp	Red 640	640
Lightmix® CYP2D6*5 ¹	171 bp		530

¹Hem CYP2D6*3 hem de *4 kitinin içeriğinde, olası gen delesyonunu belirlemek ve analizde yanlış yorumlamayı engellemek üzere, CYP2D6 tüm gen delesyonunun alleli olan *5'i belirlemek üzere 530 kanalında floresans sinyal veren Red 530 probu bulunmaktadır. Bu sayede tüm örnekler her iki allelin yanı sıra (*3 ve *4), CYP2D6*5 alleli açısından da değerlendirilmiş olur.

3.6. ÇALIŞMANIN KROMATOĞRAFİK VE SPEKTROMETRİK BASAMAKLARI

3.6.1. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

- **1mg/mL Stok çözeltilerin Hazırlanması**

RSP, PLP, SRT, RBK, OLZ standart maddelerin her biri elektronik hassas terazide 10 mg tartıldı ve 10 mL hacimli sertifikalı balon jöjelere aktarılarak metanol ile hacme tamamlandı. Her bir etken maddeye ait stok çözeltiler çalışma boyunca -20°C’de muhafaza edildi. İlaç etken maddeleri %99,9 saflıkta olduğundan safsızlıkları göz ardı edildi.

- **10 µg/mL Karışım Çözeltisinin Hazırlanması (RSP, PLP, SRT, OLZ, HLP)**

1 mg/mL konsantrasyonlu stok çözeltilerin her birinden (RSP, PLP, SRT, OLZ, HLP) 100 µL alındı, 10 mL hacimli sertifikalı balon jöjeye aktarılarak metanol ile hacme tamamlandı. Karışım çözeltisi çalışma boyunca -20°C’de muhafaza edildi.

- **500 ng/mL Karışım Çözeltisinin Hazırlanması (RSP, PLP, SRT, OLZ, HLP)**

10 µg/mL konsantrasyona sahip karışım çözeltisinden 500 µL alındı, 10 mL hacimli sertifikalı balon jöjeye aktarılarak metanol ile hacme tamamlandı. Karışım çözeltisi çalışma boyunca -20°C’de muhafaza edildi.

- **1 µg/mL İç Standart (RBK) Çözeltisinin Hazırlanması**

1 mg/mL konsantrasyonlu RBK stok çözeltisinden 10 µL alındı, 10 mL hacimli sertifikalı balon jöjeye aktarılarak metanolde hacme tamamlandı. İç standart çözeltisi çalışma boyunca -20°C’de muhafaza edildi.

- **Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması**

Kalibrasyon çözeltileri aşağıdaki tabloda belirtildiği şekilde 8 konsantrasyonda hazırlandı. Metanol ile 10 mL hacimde hazırlanan çözeltilere (son konsantrasyonu 25 ng/mL olacak şekilde) 1 µg/mL RBK çözeltisinden 250 µL ilave edildi (Tablo 3.12).

0,5, 1, 5, 10, ve 25 ng/mL olan konsantrasyonlar 500 ng/mL karışım çözeltisinden; 50,100 ve 250 ng/mL olan konsantrasyonlar 10 µg/mL karışım çözeltisinden hazırlandı.

Tablo 3.12. Kalibrasyon çözeltisi hazırlanmasında kullanılan çözeltiler ve hacimleri.

Konsantrasyon (ng/mL)	500 ng/mL Karışım Çözeltisi (µL)	10 µg/mL Karışım Çözeltisi (µL)	1 µg/mL İç Standart Çözeltisi (µL)	Toplam hacim (mL)
0,5	10	-	250	10
1	20	-	250	10
5	100	-	250	10
10	200	-	250	10
25	500	-	250	10
50	-	50	250	10
100	-	100	250	10
250	-	250	250	10

- **Borat Tamponunun Hazırlanması (pH=9.4)**

6.18 g (100 mmol) Borik asit bir miktar saf suda çözüldü ve üzerine 2 g NaOH (50 mmol) ilave edilerek pH=9.4'e ayarlandı, çözelti saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

- **0,1 M NaOH Çözeltisinin Hazırlanması**

2 g NaOH tartıldı, 500 mL suda çözülünceye dek iyice karıştırıldı. Çözelti çalışma boyunca oda sıcaklığında muhafaza edildi.

- **Mobil Faz A'nın Hazırlanması**

5mM Asetik Asit (pH=4.5)

500 mL'lik erlen mayerde 200 mL ultra saf su içine 450 µL Glasiyel Asetik asit eklendi. Manyetik karıştırıcı eşliğinde Amonyak ilave edilerek pH=4.5'e ayarlandı. Çözelti 500 mL cam mezüre aktarıldı ve üzeri hacme tamamlandı ve mobil faz şişesine alınarak ultrasonik su banyosunda 10 dakika boyunca degaze edildi.

- **Mobil Faz B: Metanol**

Kromatografik saflıktaki metanol mobil faz şişesine koyularak çalışmaya hazır hale getirildi.

- **İğne yıkama çözeltisi**

%1 Formik asit:Asetonitril:Metanol:izopropanol (25:25:25:25 w/w)

3.6.2. İdrar Örneklerini Hazırlama Prosedürü

1 mL idrar örneği 15 mL'lik plastik vida kapaklı test tüpüne koyuldu.

50 µL 1M NaOH çözeltisi ilave edildi (pH=10) ve vortekslendi.

Örnekler önceden 50°C'ye ısıtılmış su banyosunda 30 dakika boyunca hidroliz edildi.

1.5 mL Etil asetat: n-Heptan (2:1, v/v) ilave edildi.

5 dakika boyunca vortekslendi.

5000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.

Üst faz 5 mL'lik cam tüpe alındı.

Bu basamaklar 2 kez tekrarlandı, ikinci basamak öncesinde pH kontrolü yapıldı.

Cam tüp içindeki organik faz 40°C'de azot altında kuruluğa kadar uçuruldu.

Tüplerin içine 25 ng/mL RBK iç standart çözeltisinden 1 mL ilave edildi, vortekslendi.

3 dakika ultrasonik su banyosunda bekletildi.

Etiketlenmiş 1.5 mL'lik vida kapaklı cam şişeye alınarak LC-MS/MS sisteminde analiz edildi.

3.6.3. Kan Örneklerini Hazırlama Prosedürü

500 µL kan örneği 15 mL'lik plastik vida kapaklı test tüpüne koyuldu.

500 µL su ile seyreltildi.

0.15 g NaCl ilave edildi ve vortekslendi.

2 mL Borat tamponu (pH=9,4) ilave edildi ve vortekslendi.

2.5 mL Etil asetat: n-Heptan (2:1, v/v) ilave edildi.

5 dakika boyunca vortekslendi.

5000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.

Üst faz 5 mL'lik cam tüpe alındı.

Bu basamaklar 2 kez tekrarlandı, ikinci basamak öncesinde pH kontrolü yapıldı.

Cam tüp içindeki organik faz 40°C’de azot altında kuruluğa kadar uçuruldu.

Tüplerin içine 25 ng/mL RBK iç standart çözeltisinden 500 µL ilave edildi, vortekslendi.

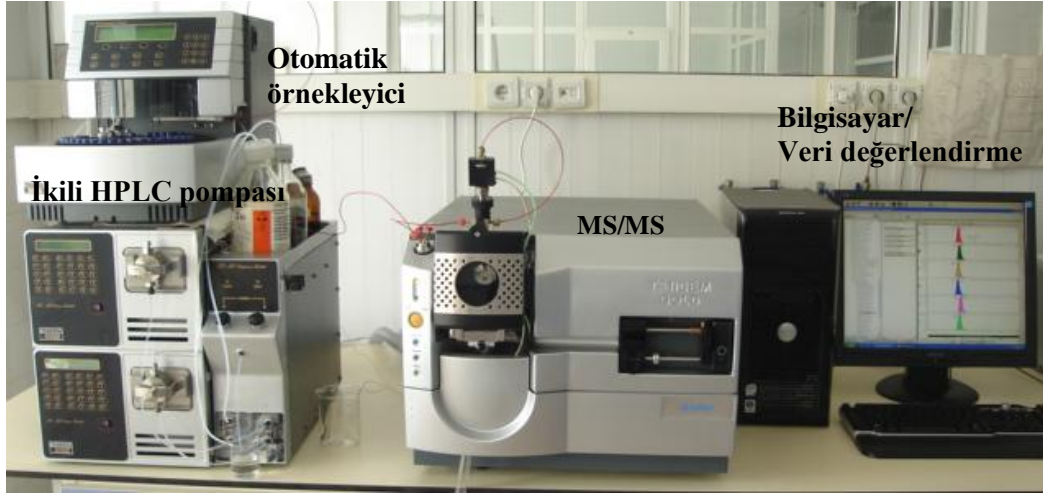
3 dakika ultrasonik su banyosunda bekletildi.

Etiketlenmiş 1,5 mL’lik vida kapaklı cam Şişeye alınarak LC-MS/MS sisteminde analiz edildi.

Etken madde miktarları, hastalara ait kan ve idrar rneklelerinin kalibrasyon eğrileri kullanılarak otomatik LC-MS/MS yazılımında kantitatif analizi yapıldı. Elde edilen sonuçların kalibrasyon aralığının üst sınırını geçmesi durumunda örnekle yeniden ztlenip 10 kat seyreltilerek analiz edildi ve miktarı belirlendi.

3.6.4. Kromatografik ve Spektrometrik Analiz Koşulları

Çalışmada kullanılan LC-MS/MS sisteminin bölümleri Şekil 3.4’de grlmektedir. Etken maddeler için belirlenen MS/MS iyonları ve enerjilerine ait bilgiler Tablo 3.13’de verilmektedir. Kromatografik ve spektrometrik koşullar sırasıyla Tablo 3.14 ve Tablo 3.15’deki gibidir.



Şekil 3.4. Çalışmanın gerçekleştirildiği Zivak Tandem Gold LC-MS/MS sisteminin toplu görüntüsü

Tablo 3.13. Etken maddeler için belirlenen MS/MS iyonları ve enerjileri

Madde adı	+ İyon (m/z) (Q1→ Q3)	Kapiler voltajı (V)	Çarpışma enerjisi (V)	Dwel time (sn)
SRT	306→159*	70	24	0,100
	306→275	70	11	0,100
OLZ	313→84	100	21	0,100
	313→256*	100	21	0,100
RBK	314→91	80	29	0,100
	314→176*	80	12	0,100
RSP	411→191	90	26	0,100
PLP	427→207	105	25	0,100

*Miktar tayini yaparken kullanılan iyonlar (ikincil iyon)

Tablo 3.14. Çalışmanın kromatografik (HPLC) koşulları

Analiz Parametresi		Koşul	
Yazılım		Varian MS Workstation System Control (Versiyon No: 6.9.1)	
Mobil Faz A:		5mM Asetik Asit (pH=4.5)	
Mobil Faz B:		Metanol	
Kolon Fırın Sıcaklığı:		50°C	
Otomatik Örnekleyici sıcaklığı:		4°C	
Kromatografik Kolon:		3µ, C18(2), 100 A, 150x2.00 mm, Analitik Ters Faz Kolon	
Koruyucu ön kolon:		C18 4x3.0 mm	
Enjeksiyon hacmi:		10 µL	
Analiz Süresi:		5 dak	
Pompa programı:			
Süre (dak)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)	Akış hızı (mL/dak)
0:00	8	92	0,23
1:30	8	92	0,23
1:31	8	92	0,3
2:29	8	92	0,3
2:30	8	92	0,23
5:00	8	92	0,23

Tablo 3.15. Çalışmanın Spektrometrik (MS-MS) Analiz Koşulları

Analiz Parametresi	Koşul
İyon Kaynağı:	Elektro Spray İyonlaştırma (ESI)
İyonlaştırma Türü:	Pozitif
Dedektör voltajı:	1305 V
Argon gazı (CID) basıncı:	2.4 V
ESI iğne voltajı:	5500 V
ESI shield (koruyucu kalkan) voltajı:	600 V
Kurutucu Gaz (Azot) Sıcaklığı:	400°C
Kurutucu Gaz (Azot) Basıncı:	30 psi
Nebulizer Gaz (Sisleştirici) basıncı:	55 psi
API gövde (housing) sıcaklığı:	65°C
Entegrasyon parametreleri	
Gürültü ölçümü:	Peak to peak
Kalibrasyon Tipi:	İç Standart
Ölçüm Tipi:	Pik Alanı
Entegrasyon aralığı:	±0,250 dak.

3.6.5. Seçicilik çalışmaları

Etken madde çözeltilerinin hazırlanmasında ve mobil faz B olarak kullanılan metanol çözücüsünün, özütlenmiş boş idrar ve boş kan örneklerinin LC-MS/MS kromatogramları ile etken maddeleri içeren metanol, kan ve idrar örneklerinin kromatogramları karşılaştırıldı, maddelerin alıkonma zamanları ile çakışan herhangi bir girişim olup olmadığına bakıldı.

3.6.6. Doğrusallık Çalışmaları

Doğrusallık çalışmasında etken madde karışımından hazırlanan ve Tablo 3.12’de bildirilen kalibrasyon çözeltileri önce buldukları metanol matrisinde analiz edildi. Otomatik yazılım programı ile her bir etken madde için kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Aynı kalibrasyon noktaları matris etkisini görmek için boş kan ve idrar örneklerinin özütlenmesinden elde edilen matrikse katılarak analiz edildi ve kalibrasyon eğrileri elde edildi. Burada boş kan ve boş idrar örnekleri çalışılmakta olan etken maddelerden herhangi birini içermediğinden emin olunan, herhangi bir ilaç kullanmayan kişilerden alınan örneklerdir.

Doğrusallık parametresinin kabul edilme değerleri; korelasyon katsayısı (r^2) için $\geq 0,999$ ve %RSD (Yanıt faktörünün bağıl standart sapması) için ise < 15 olarak belirlendi. Bu değerlerin dışındaki sonuçlar tekrar edildi.

3.6.7. En Düşük Belirleme Limiti (LOD) ve En Düşük Hesaplama Limiti (LOQ) Çalışmaları

LOD ve LOQ hesaplamaları aşağıdaki formül kullanılarak kan ve idrar için ayrı yapıldı (135th Guideline of FDA, 2005).

$$LOD = 3 \times \delta / S$$

$$LOQ = 10 \times \delta / S$$

Burada;

δ = Doğrusal aralığın en düşük konsantrasyonun en az 6 tekrarından elde edilen standart sapma

S = Kalibrasyon eğrisinin eğimi

3.6.8. Geri Kazanım Çalışmaları

Hem idrar hem de kan örnekleri için en az 3 ayrı konsantrasyonda her biri 6 tekrar olmak üzere geri kazanım çalışmaları yapıldı. Seçilen konsantrasyonlar doğrusal aralığın düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarını temsil eden noktalar olarak seçildi. Bu çalışmalarda kalibrasyon için hazırlanmış çözeltiler boş (blank) idrar ve kan örneklerine katılmak sureti ile yapıldı; idrar ve kan örnekleri prosedüre göre özütlendi. Kan ve idrarda hazırlanan kalibrasyon eğrileri ile elde edilen geri kazanım bulguları aşağıdaki formül yardımı ile hesaplandı. Geri kazanım bulguları için kabul değerleri %80 ile %120 arasındadır. Bu aralığın dışındaki sonuçlar tekrar edildi.

$$\%Geri\ Kazanım = \frac{\text{Bulunan konsantrasyon}}{\text{Eklenen konsantrasyon}} \times 100$$

3.6.9. Kesinlik-Tekrar Edilebilirlik Çalışmaları

Kesinlik çalışmalarında, aynı konsantrasyonlardaki idrar ve kan örnekleri farklı günlerde en az altı (6) kez tekrar edildi. Gün içi ve günler arası sonuçların ortalaması, standart sapması (SD) ve bağıl standart sapması (%RSD) hesaplandı. %15'in üzerindeki %RSD değerleri tekrar edildi.

3.6.10. Doğruluk Çalışmaları (%Hata)

Doğruluk çalışmaları kan ve idrar için 10 ve 100 ng/mL konsantrasyonlarından elde edilen sonuçların aşağıdaki formül ile hesaplatılması şeklinde yapıldı. Doğruluk parametresinin kabul değeri $\leq\%15$ 'dir. Bu değerden daha büyük hatalı sonuçlar tekrar edildi.

$$\text{Doğruluk (\%Hata)} = \frac{C_{\text{Bulunan}} - C_{\text{Beklenen}}}{C_{\text{Beklenen}}} \times 100$$

Burada;

C_{Bulunan} = Bulunan konsantrasyon

C_{Beklenen} = Beklenen konsantrasyon

3.6.11. Hastalara ait kan ve idrar örneklerinin LC-MS/MS ile analizi

CYP2D6*3 ve *4 allelerinin polimorfizmi ve gen ekspresyonu belirlenen ve OLZ, RSP ve SRT ilaçlarından en az birini kullanmakta olan 39 hastanın kan ve idrar örnekleri yukarıda detayları ile belirtilen ve geçerlilik çalışmaları yapılan yöntemler ile özütlenerak LC-MS/MS sisteminde belirtilen koşullarda analiz edildi.

3.7. Çalışmanın Bilgi ve Bulgularının Değerlendirilmesi

Çalışmanın genetik basamaklarının değerlendirilmesinde, gen kopya sayılarından elde edilen tüm verilerin normal dağılımlı olup olmadığı Kolmogorov-Smirnov testi ile test edildi. Anlamlı olarak farklı bulunan sonuçlar ($p < 0,05$) normal dağılımlı kabul edilmediğinden bu verilere parametrik olmayan testler uygulandı. Elde edilen gen kopya sayılarının bulguları hasta ve kontrol grupları arasındaki fark açısından Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi. Tüm bu testler SPSS istatistik programının 17.0 versiyonu ile yapıldı. %95 güven aralığında yapılan testlerde anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

CYP2D6*3 ve *4 allel ve genotip frekansları hesaplandı. CYP2D6*3 ve *4 allel ve genotip frekansları için hasta ve kontrol grubu arasındaki farkın anlamlı olup olmadığını belirlemek üzere Ki-kare (X^2) uygunluk testi uygulandı. Bu hesaplamalar Microsoft Office Excel 2007 programında gerçekleştirildi. %90 ve %95 güven aralığında yapılan bu testlerde anlamlılık düzeyi sırasıyla $p < 0,1$ ve $p < 0,05$ olarak kabul edildi (Ek 6).

Çalışmanın kromatografik ve spektrometrik basamaklarının değerlendirilmesinde etken maddelerin LC-MS/MS ile miktar tayinlerinde ve yöntemin analitik parametrelerinin

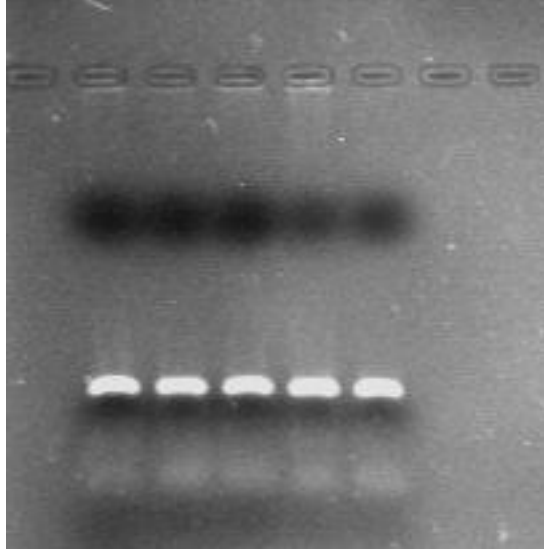
değerlendirilmesinde ortalama, standart sapma, bağıl standart sapma, varyans gibi değerler Microsoft Office Excel 2007 programında yapıldı, .

Hastaların kullandıkları ilaç dozları birbirinden farklı olduğundan; bu farklılığının ortadan kalkması için kan ve idrarlarındaki ilaç konsantrasyonları hastaların aldıkları günlük ilaç dozlarına bölündü. Böylelikle doz başına düşen ilaç konsantrasyonu ile CYP2D6 gen kopya sayısı ve CYP2D6*3 ve *4 allellerinin genotipleri karşılaştırıldı. Aralarındaki korelasyon Spearman's korelasyon testi ile değerlendirildi ($p < 0,05$).

4. BULGULAR

4.1. Genetik çalışmaların sonuçları

Çalışmada yer almayı kabul eden 77 hastadan ve 38 sağlıklı bireyden alınan kanların izolasyonundan elde edilen ve analiz edilinceye kadar +4°C’de muhafaza edilen DNA izolatları %2 Agaroz jel elektroforezinde yürütülerek izolasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. İzolasyon sonrasında elde edilen DNA örneklerinin %2 Agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü

4.1.1 CYP2D6*3 ve *4 Allel frekansları ve genotipleri

77 hasta ve 38 kontrol grubuna ait CYP2D6*3 ve*4 alellerinin frekansları Tablo 4.1’deki gibidir. Hasta ve kontrol grubunda CYP2D6*3 allel frekansları eşit iken (0,01); CYP2D6*4 için hasta frekansı 0,15 ve kontrol grubu için 0,04’tür. Allel frekanslarının Ki-Kare (X^2) uygunluk testi sonuçlarına göre (Tablo 4.2) hasta ve kontrol grubu

arasında allel *4 için anlamlı fark olduğu (%95 güven aralığında) bulundu ($p<0,05$). Allel *3 için bu fark tespit edilmedi ($p=0,609$).

Çalışmanın genotip bulguları ise Tablo 4.3'deki gibidir. Çalışmaya katılan 77 hastadan 21'inin CYP2D6*4 için en az bir mutant allel taşıdığı saptandı. Bunlardan yalnızca 2 hastanın homozigot mutant iken (*4/*4), diğer 19 hastanın heterozigot olduğu görüldü (wt/*4). Kontrol grubunda ise CYP2D6*4 için mutanat allel taşıyanların sayısının 3 olduğu ve hepsinin heterozigot olduğu tespit edildi. CYP2D6*3 için ne hasta grubunda ne de kontrol gurubunda homozigot mutant (*3/*3) bireye rastlanmadı; her iki grupta da heterozigot genotipler (*3/wt) olduğu saptandı. Her iki allel kitinin de içinde yer alan ve 530 kanalında tayin edilen CYP2D6*5 alleline ise hiçbir örnekte rastlanmadı.

Genotip frekanslarına yapılan Ki-Kare (X^2) testi sonuçları Tablo 4.4'de verildi. Bu testin sonuçlarına göre hastalar ile kontrol grubu arasında allel *4'ün genotip frekanslarında %90 güven aralığında anlamlı fark tespit edildi; ($p<0,1$); allel *3'ün genotip frekanslarında anlamlı fark tespit edilmedi ($p=0,873$).

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubuna ait CYP2D6*3 ve *4 allel frekansları

Alel adı	Allel frekansı	
	Toplam HastaAlleli (n=154) (77x2)	Toplam Kontrol Alleli (n=76) (38x2)
CYP2D6*3	0.01	0.01
CYP2D6*4	0.15	0.04

Tablo 4.2. Hasta ve kontrol grubu arasında CYP2D6*3 ve *4 allel frekanslarının Ki-Kare (X^2) uygunluk testi sonuçları

X^2 Test sonuçları	Gözlenen (Beklenen)	Gözlenen (Beklenen)	Bulunan X^2 değeri ^a	Bulunan p değeri (0,05 için)
CYP2D6 *3	*3	wt (yabani tip)		
Hasta (n=154)	1 (1,339)	153 (152,7)	0,262 (<3,84)*	0,609
Kontrol (n=76)	1 (0,661)	75 (75,339)		
CYP2D6*4	*4	wt (yabani tip)		
Hasta (n=154)	23 (17,408)	131 (136,6)	6,128 (>3,84)*	0,013
Kontrol (n=76)	3 (8,591)	73 (67,408)		

^a sd=serbestlik derecesi [(satur-1)*(sütun-1)] =1

* X^2 Dağılım tablosuna göre sd=1 için 3,84 kritik değer üzerindeki sonuçlar anlamlı olarak farklı; altındaki sonuçlar ise anlamsız bulunur (p<0,05 için).

Tablo 4.3. Hasta ve kontrol grubunun CYP2D6*3 ve *4 alellerinin genotip bulguları

Genotip adı	Genotip frekansı	
	Hasta (n=77)	Kontrol (n=38)
CYP2D6*3		
*3/*3	0,0 (0/77)	0,0 (0/38)
*3/wt	0,013 (1/77)	0,026 (1/38)
wt/wt	0,987 (76/77)	0,974 (37/38)
CYP2D6*4		
*4/*4	0,026 (2/77)	0,0 (0/38)
*4/wt	0,247 (19/77)	0,079 (3/38)
wt/wt	0,727 (56/77)	0,921 (35/38)

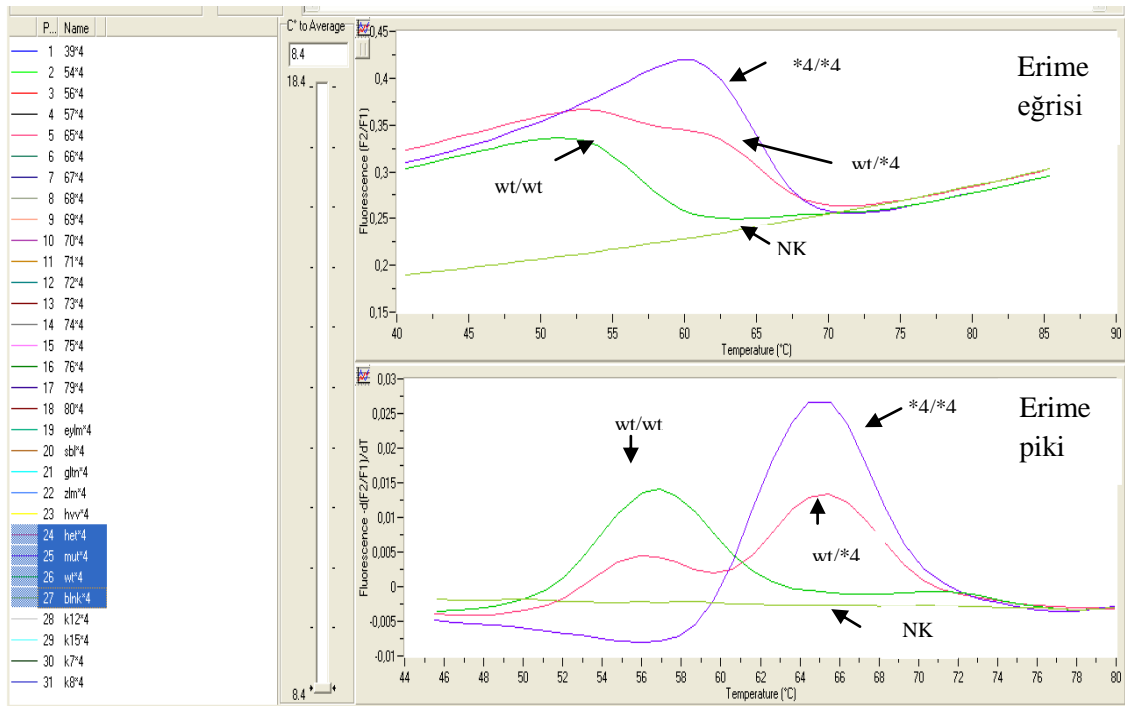
Tablo 4.4. Hasta ve kontrol gurubu CYP2D6*3 ve *4 genotip frekanslarının Ki-Kare (X^2) uygunluk testi sonuçları

X^2 Test sonuçları	Gözlenen (Beklenen)	Gözlenen (Beklenen)	Gözlenen (Beklenen)	Bulunan X^2 değeri ^a	Bulunan p değeri (0,1 için)
CYP2D6*3	*3/*3	*3/wt	wt/wt	0,272 (<4,61)*	0,873
Hasta (n=77)	0 (0)	1 (1,339)	76 (75,66)		
Kontrol (n=38)	0 (0)	1 (0,661)	37 (36,36)		
CYP2D6*4	*4/*4	*4/wt	wt/wt	5,940 (>4,61)*	0,051
Hasta (n=77)	2 (1,339)	19 (14,73)	56 (60,93)		
Kontrol (n=38)	0 (0,661)	3 (7,269)	35 (30,07)		

^a sd =serbestlik derecesi [(sıtr-1)*(sütun-1)] = 2

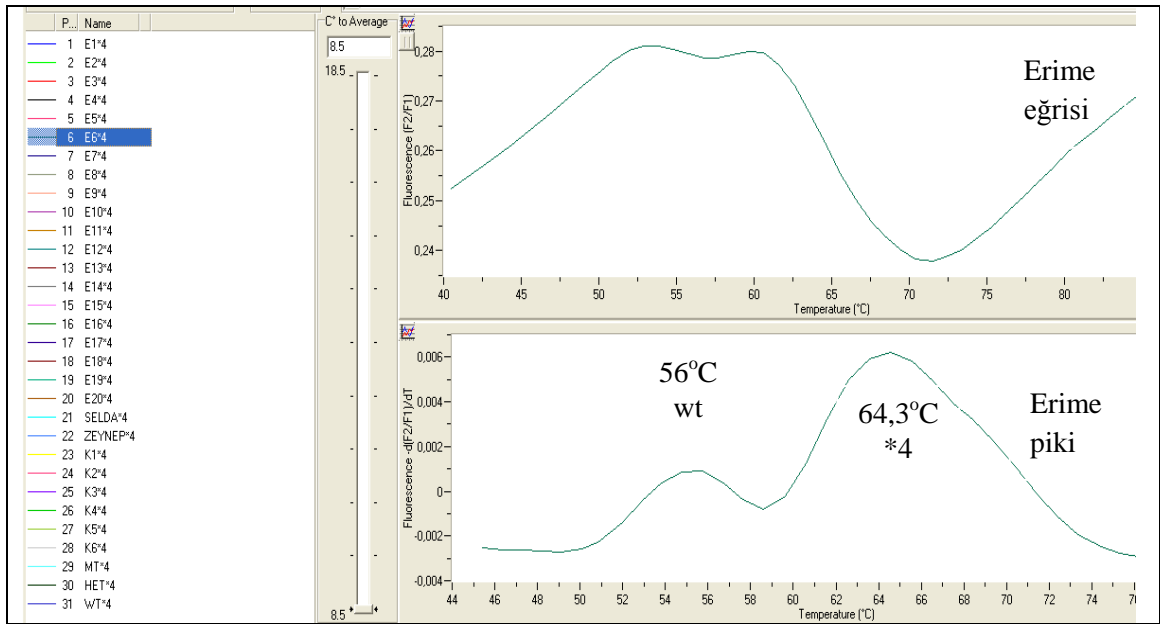
* X^2 Dağılım tablosuna göre $sd=2$ için 4,61 kritik değerin üzerindeki sonuçlar anlamlı olarak farklı; altındaki sonuçlar ise anlamsız bulunur ($p < 0,1$ için)

Genotip belirlerken her analiz setinin yanında homozigot mutant (örn. *4/*4), homozigot yabani tip (örn. wt/wt) ve heterozigot (örn. *4/wt) genotiplerden oluşan kontrol DNA örnekleri ve DNA içermeyen negatif kontrol (NK) örneği de çalışıldı. Böylelikle her analizde hem kontaminasyon takibi yapıldı hem de pozitif kontroller sayesinde çalışma gruplarının değerlendirilmesi yapıldı. Yapılan çalışmalar boyunca negatif kontrol örneklerinin hiçbirinde kontaminasyona rastlanmadı. Bu kontrol örneklerinin ve negatif kontrol örneğinin CYP2D6*4 için erime eğrileri ve erime pikleri Şekil 4.2’de verildi.

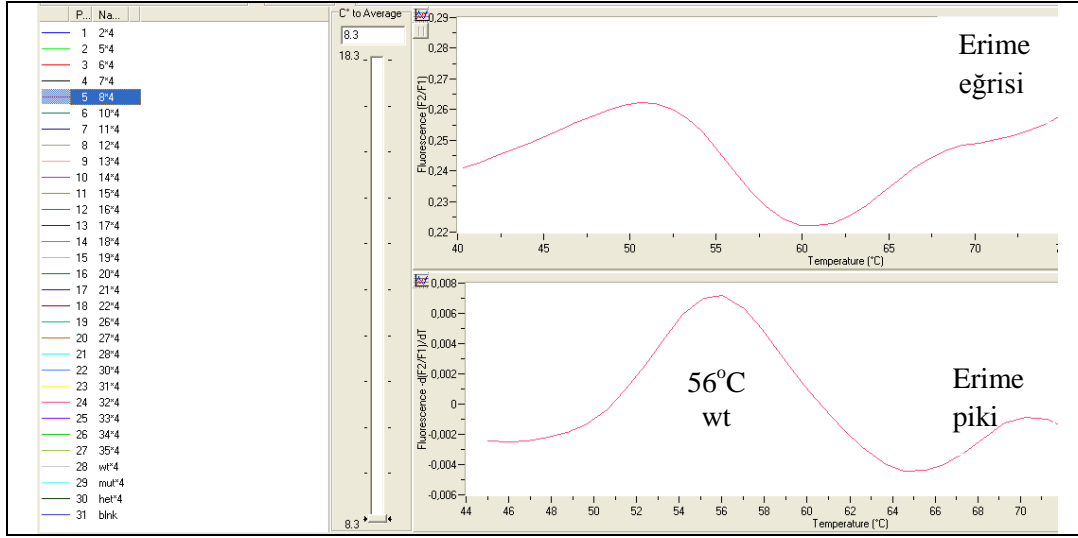


Şekil 4.2. CYP2D6*4 genotipini belirleme sistemine ait kontrol DNA örneklerinin erime eğrileri ve erime piklerinin bir arada görüntüsü (NK= Negatif kontrol)

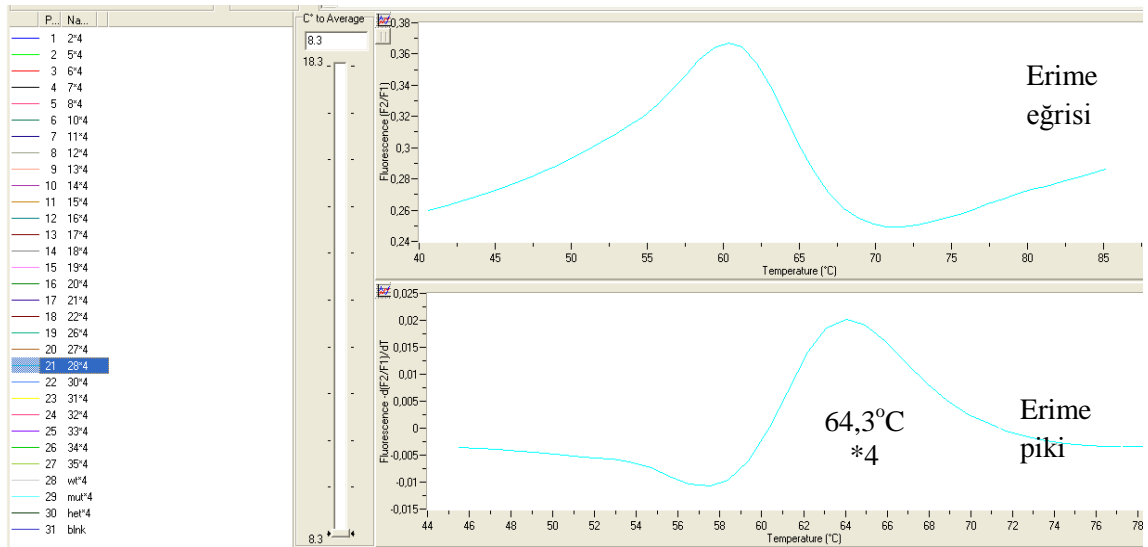
Çalışmada yer alan, CYP2D6*4 aleli için *4/wt genotipi, wt/wt genotipi ve *4/*4 genotipi taşıyan hastalardan birer örnek sırasıyla Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5’de gösterildi. CYP2D6*3 aleli için *3/wt genotipi, wt/wt genotipi taşıyan hastalardan birer örnek Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de gösterildi



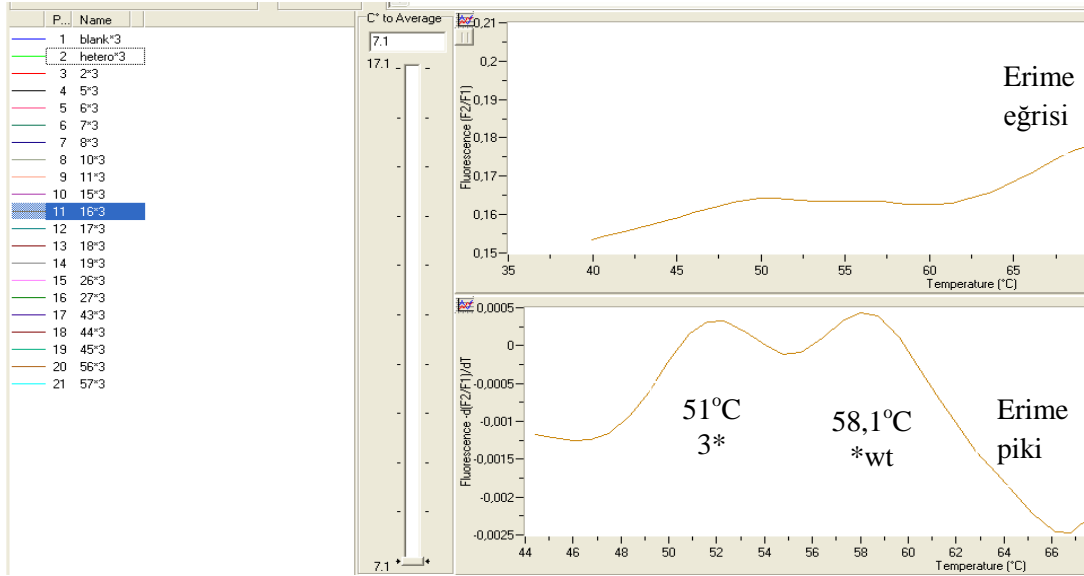
Şekil 4.3. CYP2D6*4 aleli için *4/wt genotipi taşıyan bir hastaya ait RT-PCR erime eğrisi ve erime piki görüntüsü



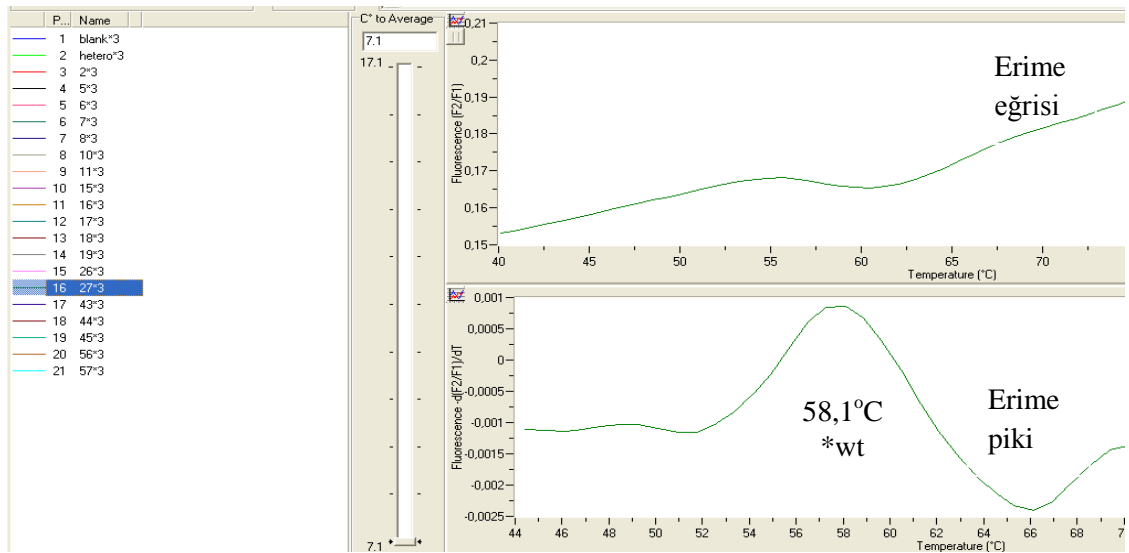
Şekil 4.4. CYP2D6*4 aleli için wt/wt genotipi taşıyan bir hastaya ait RT-PCR erime eğrisi ve erime piki görüntüsü.



Şekil 4.5. CYP2D6*4 aleli için *4/*4 genotipi taşıyan bir hastaya ait RT-PCR erime eğrisi ve erime piki görüntüsü



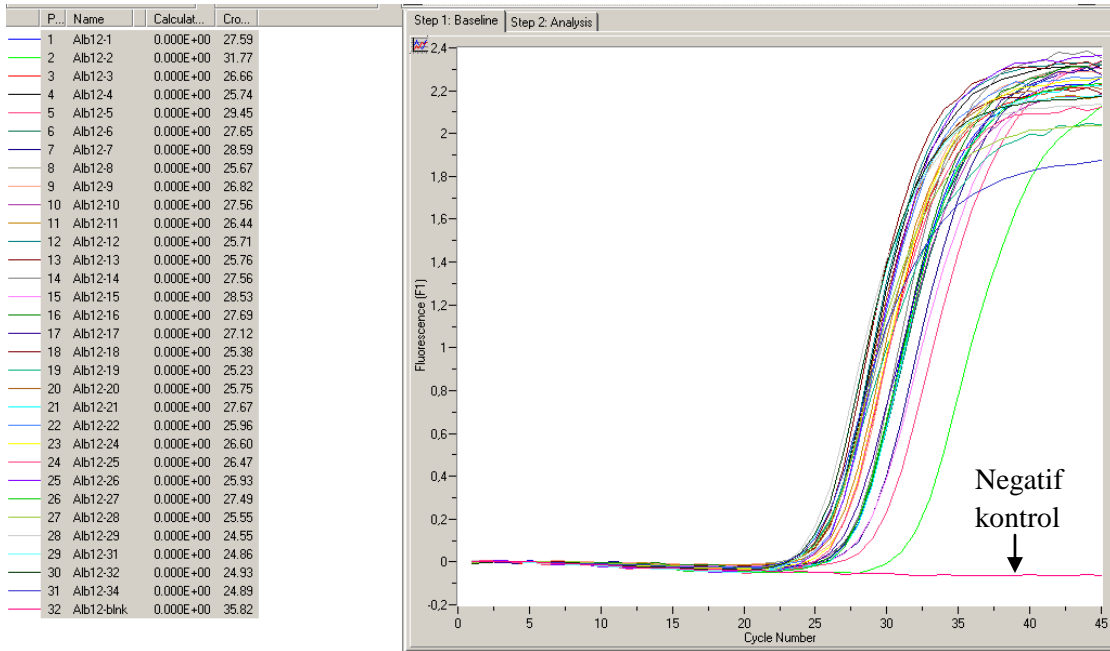
Şekil 4.6. CYP2D6*3 aleli için *3/wt genotipi taşıyan bir hastaya ait RT-PCR erime eğrisi ve erime piki görüntüsü



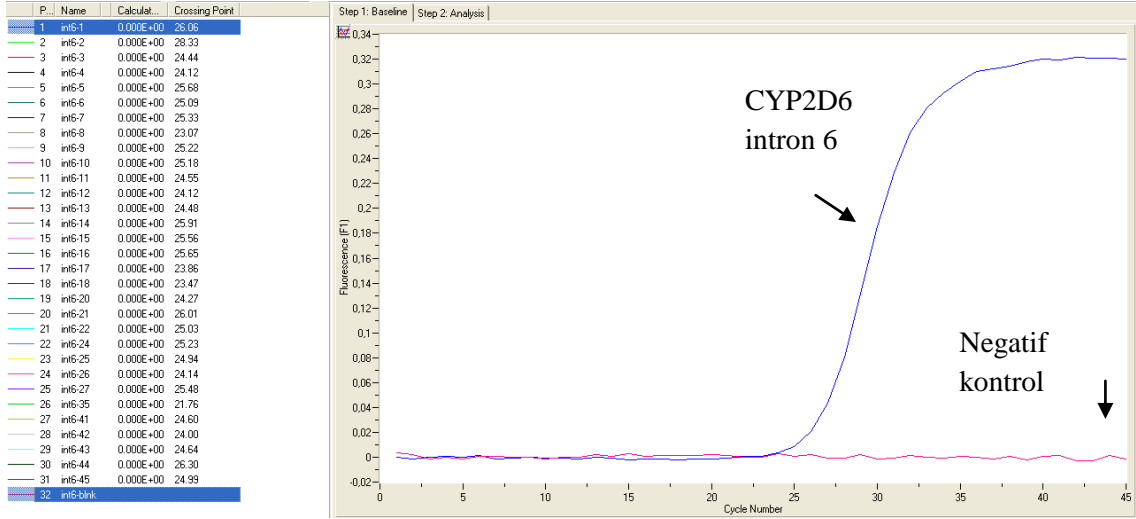
Şekil 4.7. CYP2D6*3 aleli için wt/wt genotipi taşıyan bir hastaya ait RT-PCR erime eğrisi ve erime piki görüntüsü.

4.1.2. Gen ekspresyonu çalışmasının sonuçları

Gen ekspresyonu çalışması 77 hasta ve 27 kontrol örneği ile gerçekleştirildi. Aşağıdaki şekilde RT-PCR sistemi ile yapılan albümin geni intron 12'nin ekspresyon bulgularından bir kısmı görülmektedir (Şekil 4.8). CYP2D6 intron 6 bölgesinin gen ekspresyon bulgusunun bir örneği negatif kontrol ile birlikte Şekil 4.9'da gösterildi. Gen ekspresyonu çalışmaları süresince negatif kontrolde herhangi bir kontaminasyona rastlanmadı.



Şekil 4.8. Albümin intron 12 gen ekspresyon bulgularının bir arada görünüşü.



Şekil 4.9. İntron 6 için örnek bir hasta bulgusunun negatif kontrol ile birlikte görüntüsü

RT-PCR sonucunda elde edilen Cp (Crossing Point) değerleri aşağıdaki logaritmik formül ile albümin referans genine göre hesaplatıldı ve gen oranı (R) hesaplanarak gen kopya sayısının belirlenmesi için bir gruplandırma yapıldı (Nguyen, D.L. ve ark., 2009; Livak, K.J. ve Schmittgen, T.D., 2001).

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_p}$$

Bu formülde;

$$\Delta\Delta C_p = \Delta C_p (\text{örnek}) - \Delta C_p (\text{kalibratör})$$

$$\Delta C_p = C_{p(CYP2D6)} - C_{p(\text{albümin})}$$

Şöyle ki; çalışma grubunun tüm Cp sonuçlarının içinde albümin ekspresyonu en düşük olan örnek “kalibratör” seçildi. Bu örneğin CYP2D6 ekspresyon bulgusu “ $C_{p(CYP2D6)}$ ” olarak kabul edilirken, albümin ekspresyon bulgusu ise “ $C_{p(\text{albümin})}$ ” olarak kabul edildi.

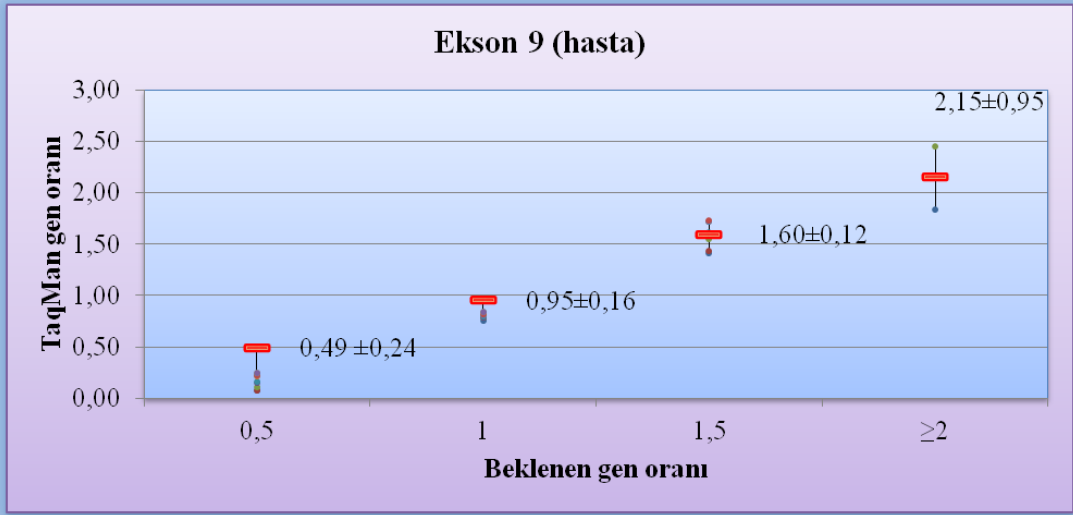
Yukarıdaki formülde gen oranı hesaplanacak her numune için bu kalibratör örneğin farkı “ $C_{p(CYP2D6)} - C_{p(albümin)}$ ” kullanıldı. Elde edilen sonuç, aşağıdaki formülde de görüldüğü şekilde “2”nin negatif kuvveti olarak alındı. Şekil 4.10’da hesaplama şekli görülmektedir. Burada 35 kodlu hasta en düşük albümin gen ekspresyonuna sahip olduğundan kalibratör olarak seçildi.

FTEST						
M	N	O	P	R	T	
				$R = 2^{-\Delta\Delta C_p}$	$R = 2^{-\Delta\Delta C_p}$	
				intron 6	ekson 9	
Hasta kodu	int6	ex9	alb12			
4	32	22,56	21,28	24,93	1,52	$=2^{-((O34-P34)-(O37-P37))}$
5	33	24,05	25,59	25,26	0,68	0,29
6	34	23,61	21,34	24,89	0,71	4,23
7	35	21,76	22,06	23,53	1,00	1,00
8	36	23,94	25,06	25,97	1,20	0,68
9	37	22,55	23,46	25,01	1,61	1,06
0	38	23,57	24,12	25,03	0,81	0,68
1	39	22,64	22,98	24,97	1,47	1,43
2	40	23,46	21,42	24,72	0,70	3,56

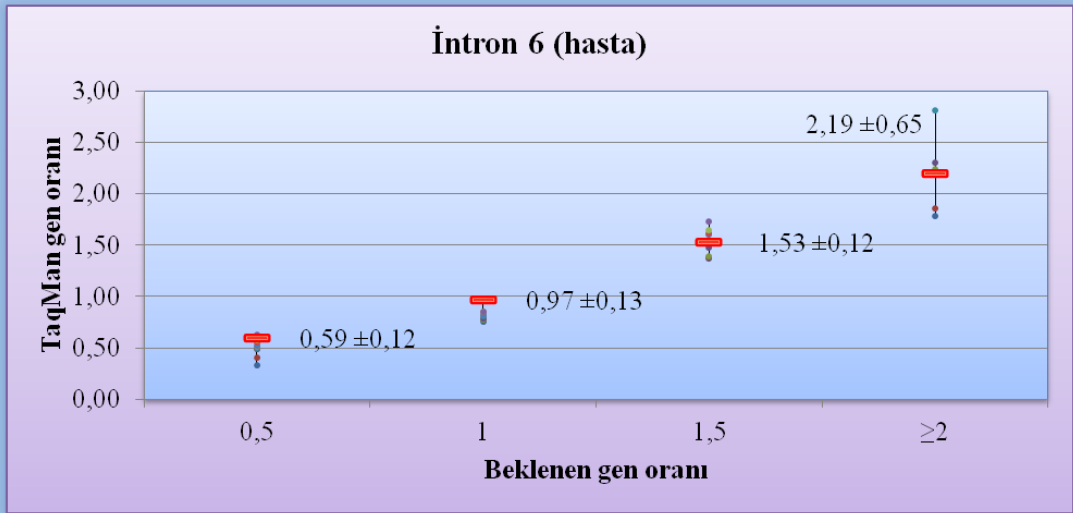
Şekil 4.10. Örneklerin gen kopya sayılarının $R = 2^{-\Delta\Delta C_p}$ formülüne göre Microsoft Excel programında hesaplanmasının görüntüsü.

Kalibratör olan örneğin ekspresyon bulguları normal, yani iki gen kopyası taşıdığı kabul edildiğinde R değeri 1 ($R=1$) olduğundan buna yakın değerler ($R=0,75-1,25$ arasındaki değerler) normal gen kopya sayısı yani 2 kopya kabul edildi. Bu değerlerin altında olan örnekler ($R<0,75$) ya tek allel olma olasılığı ya da düşük enzim aktivitesi olarak kabul edildi, bu değerlerin üzerindeki örnekler ise ($1,25 > R < 1,75$) gen kopyasının üç (3) olduğu ya da yüksek enzim aktivitesi şeklinde kabul edildi. $R=2$ ve üzeri ise 3’den fazla gen kopyası şeklinde kabul edildi. Bu hesaplama şekline göre çalışma ve kontrol grubu için yapılan gruplandırmayı, gen oranlarının ortalamasını ve standart sapmasını gösteren

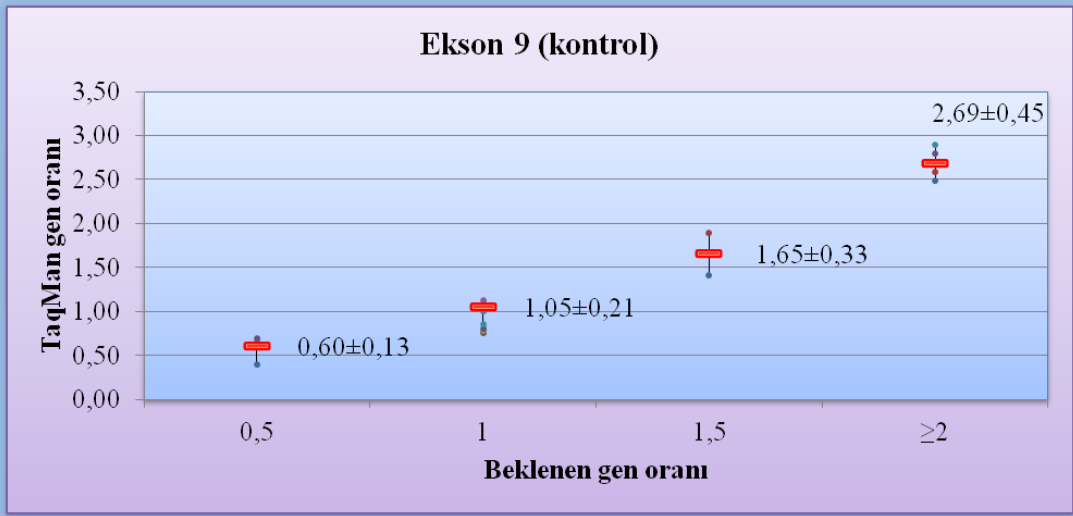
grafikler aşağıda gösterildi (Şekil 4.11, 4.12, 4.13, 4.14). Her gruptaki kişi sayılarını gösteren Tablo 4.5 ise aşağıdaki gibidir.



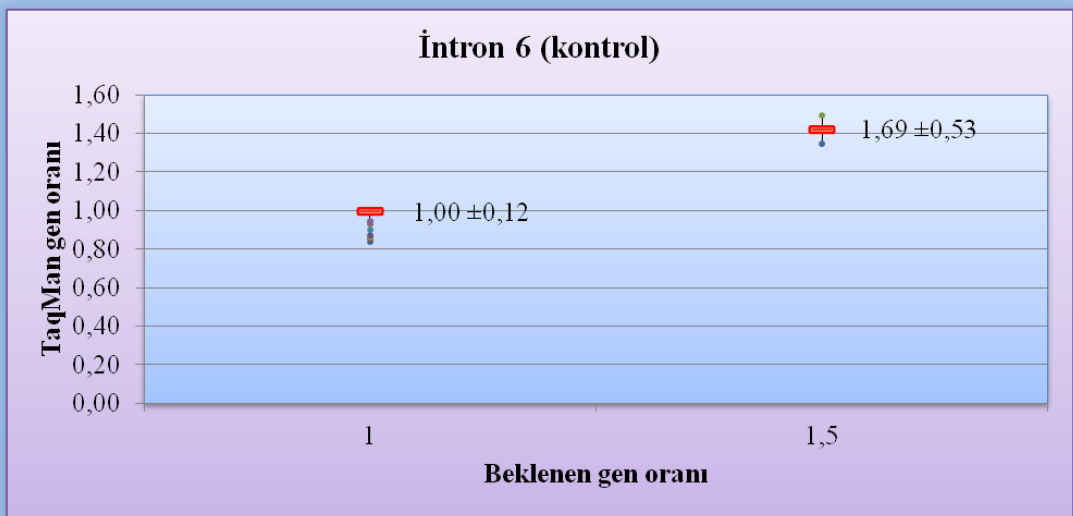
Şekil 4.11. TaqMan RT-PCR yönteminin sonuçlarına göre hasta grubu için ekson 9'un beklenen ve bulunan gen oranlarının ortalaması ± standart sapması



Şekil 4.12. TaqMan RT-PCR yönteminin sonuçlarına göre hasta grubu için intron 6'nın beklenen ve bulunan gen oranlarının ortalaması ± standart sapması



Şekil 4.13. TaqMan RT-PCR yönteminin sonuçlarına göre kontrol grubu için ekson 9'un beklenen ve bulunan gen oranlarının ortalaması ± standart sapması



Şekil 4.14. TaqMan RT-PCR yönteminin sonuçlarına göre kontrol grubu için intron 6'nın beklenen ve bulunan gen oranlarının ortalaması ± standart sapması

Tablo 4.5. Gen kopya sayılarına göre bulunan hasta ve kontrol grubu kişi sayıları

	Ekspresyon	R= 0.5	R= 1.0	R= 1.5	R= 2.0 ve >2.0
		Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Hasta (N=77)	CYP2D6 Int 6	18	38	10	11
	CYP2D6 Ekzon 9	36	25	8	8
Kontrol (N=27)	CYP2D6 Int 6	-	23	4	-
	CYP2D6 Ekzon 9	4	16	2	5

- Grup 1:* R=0,5 [Gen sayısı bir (1) veya gen aktivitesi düşük]
Grup 2: R=1 [Gen sayısı iki (2)]
Grup 3: R= 1,5 [Gen sayısı üç (3)]
Grup 4: R \geq 2,0 [Gen sayısı dört (4) ve üzeri]

Ekson 9 ve intron 6 bölgelerinin ekspresyon çalışmasından elde edilen gen kopya sayılarının dağılım hesaplaması için yapılan Kolmogorov Simirnov testi sonuçları anlamlı olarak farklı çıktığından ($p<0,05$) dağılımın normal olmadığına karar verildi.

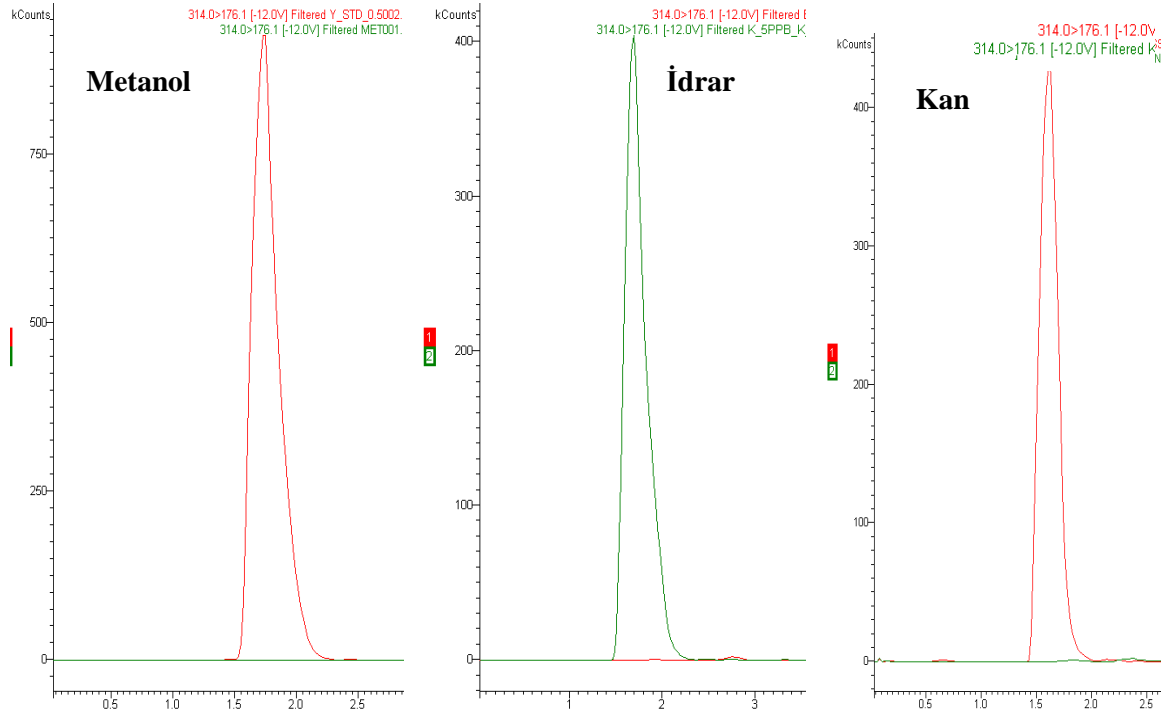
Bu sonuca göre hasta ve kontrol grubunun ekson 9 ve intron 6 gen ekspresyonundan elde edilen gen kopya sayılarının arasındaki farkın anlamlılığı parametrik olmayan Mann-Whitney *U* testi kullanılarak ölçüldü. Mann-Whitney *U* testinin sonuçlarına göre hasta grubunun ekson 9 için gen kopya sayıları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, %95 güven aralığına göre anlamlı ($p<0,05$) olarak düşük bulundu ($sd=102$). İntron 6 için gen kopya sayıları arasındaki farkın ise anlamlı olmadığı ($p=0,376$) bulundu ($sd=102$). İntron 6 ve ekson 9 bölgelerinden elde edilen gen kopya sayıları arasındaki korelasyon,

parametrik olmayan Spearman's korelasyon testi ile analiz edildi ve %95 güven aralığında anlamlı korelasyon tespit edildi ($p < 0.05$).

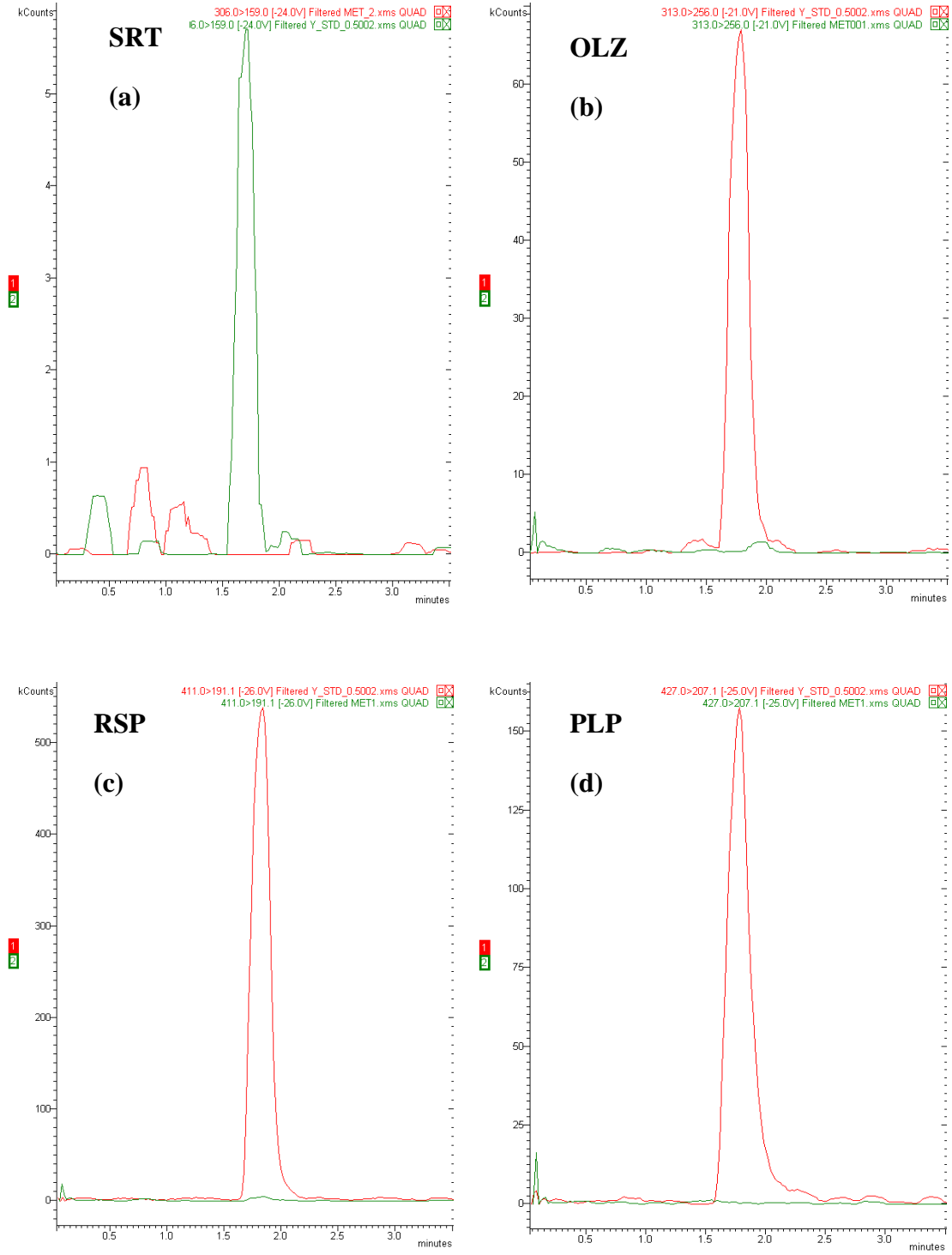
4.2. Kromatografik ve Spektrometrik Analiz Bulguları

4.2.1. Metanolde, Kanda ve İdrarda Seçicilik çalışması

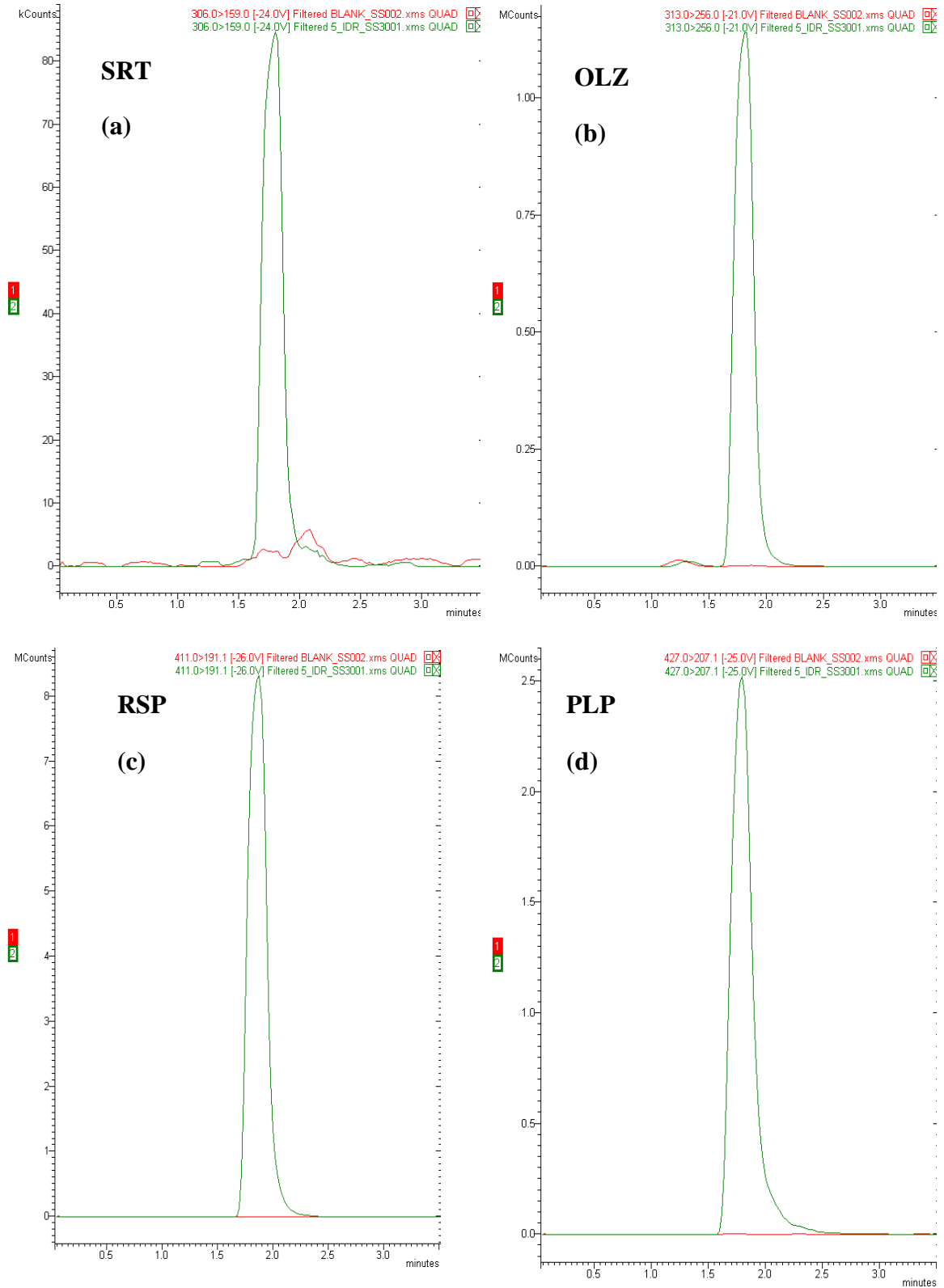
İdrar ve kanda SRT, OLZ, RSP ve PLP maddelerinin LC-MS/MS ile miktar tayini yönteminin başlangıcında yapılan seçicilik çalışmalarında; boş metanol, idrar ve kan örnekleri ile 25 ng/mL RBK iç standardı içeren metanol, idrar ve kan örneklerinin kromatogramları karşılaştırıldı ve herhangi bir girişim olmadığı görüldü (Şekil 4.15). Ayrıca, metanol, boş idrar ve boş kan kromatogramları ile standart madde katılmış metanol, idrar ve kan örneklerinin kromatogramları karşılaştırıldı bu çalışmanın bulguları sırasıyla Şekil 4.16, Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de gösterildi. Etken madde piklerinin elde edildiği alıkonma zamanlarında metanolden, idrardan ve kandan gelen herhangi bir girişim olmadığı gözlemlendi. SRT, OLZ, RSP, PLP ve RBK'nın MS/MS spektrumları da sırasıyla Şekil 4.19, 4.20, 4.21, 4.22 ve 4.23'de gösterildi.



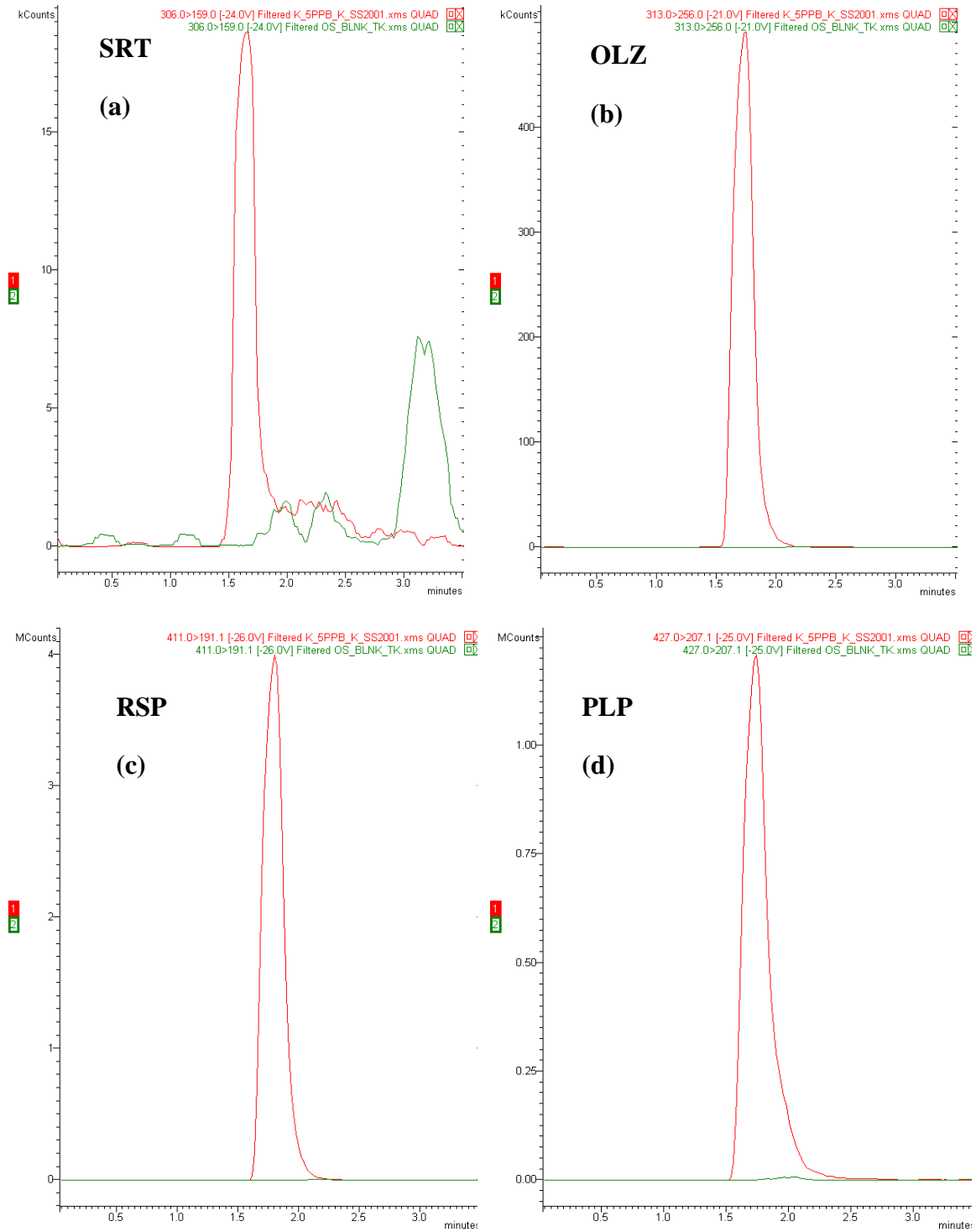
Şekil 4.15. Boş metanol, idrar ve kan örnekleri ile 25 ng/mL RBK iç standardı içeren metanol, idrar ve kan örneklerinin LC-MS/MS kromatogramlarının üst üste görüntüsü.



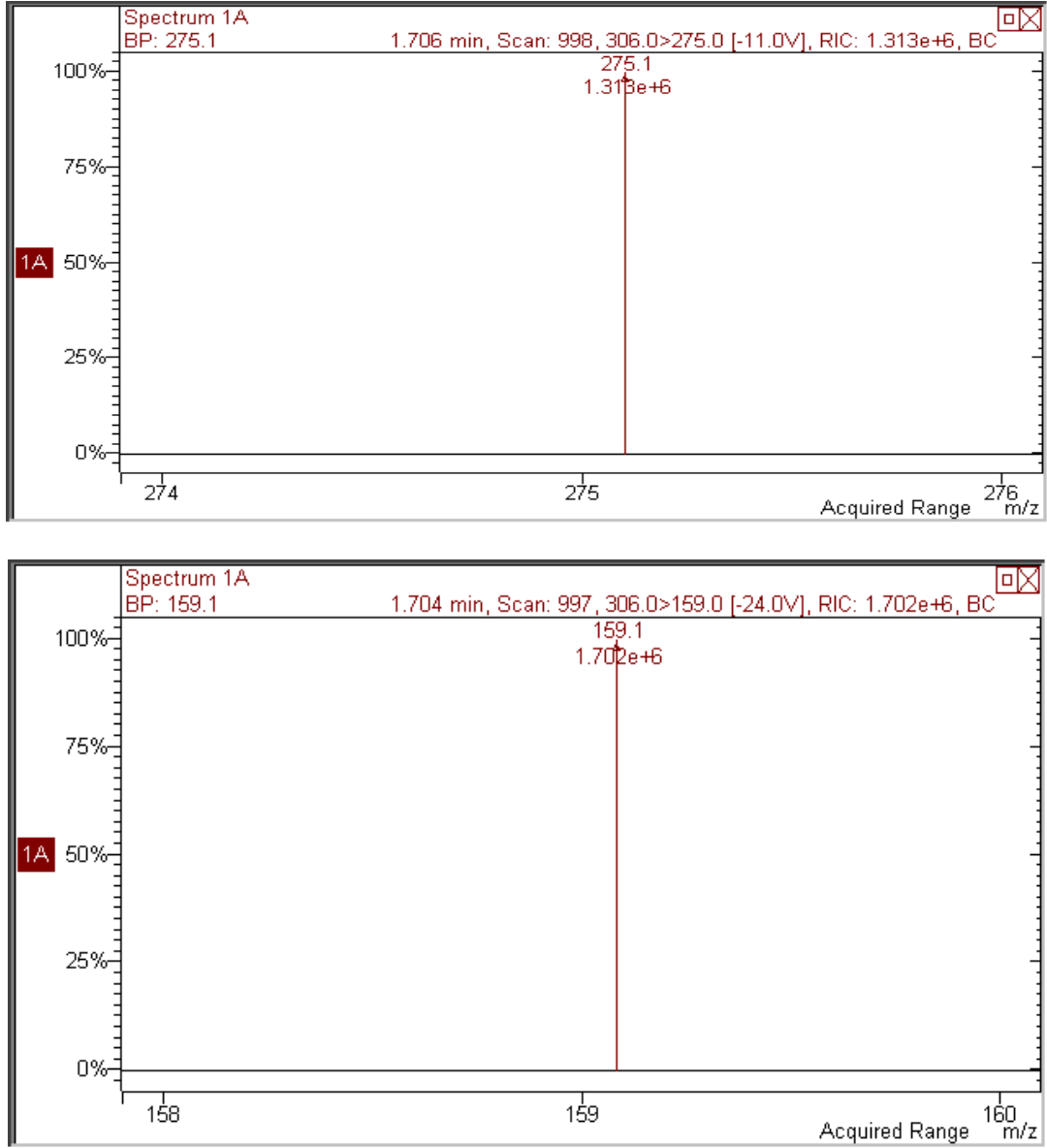
Şekil 4.16. Boş metanol çözücüsü ile 0,5 ng/mL konsantrasyondaki SRT (a), OLZ (b), RSP (c) ve PLP (d) etken maddelerini içeren metanolün LC-MS/MS kromatogramlarının üst üste görüntüsü.



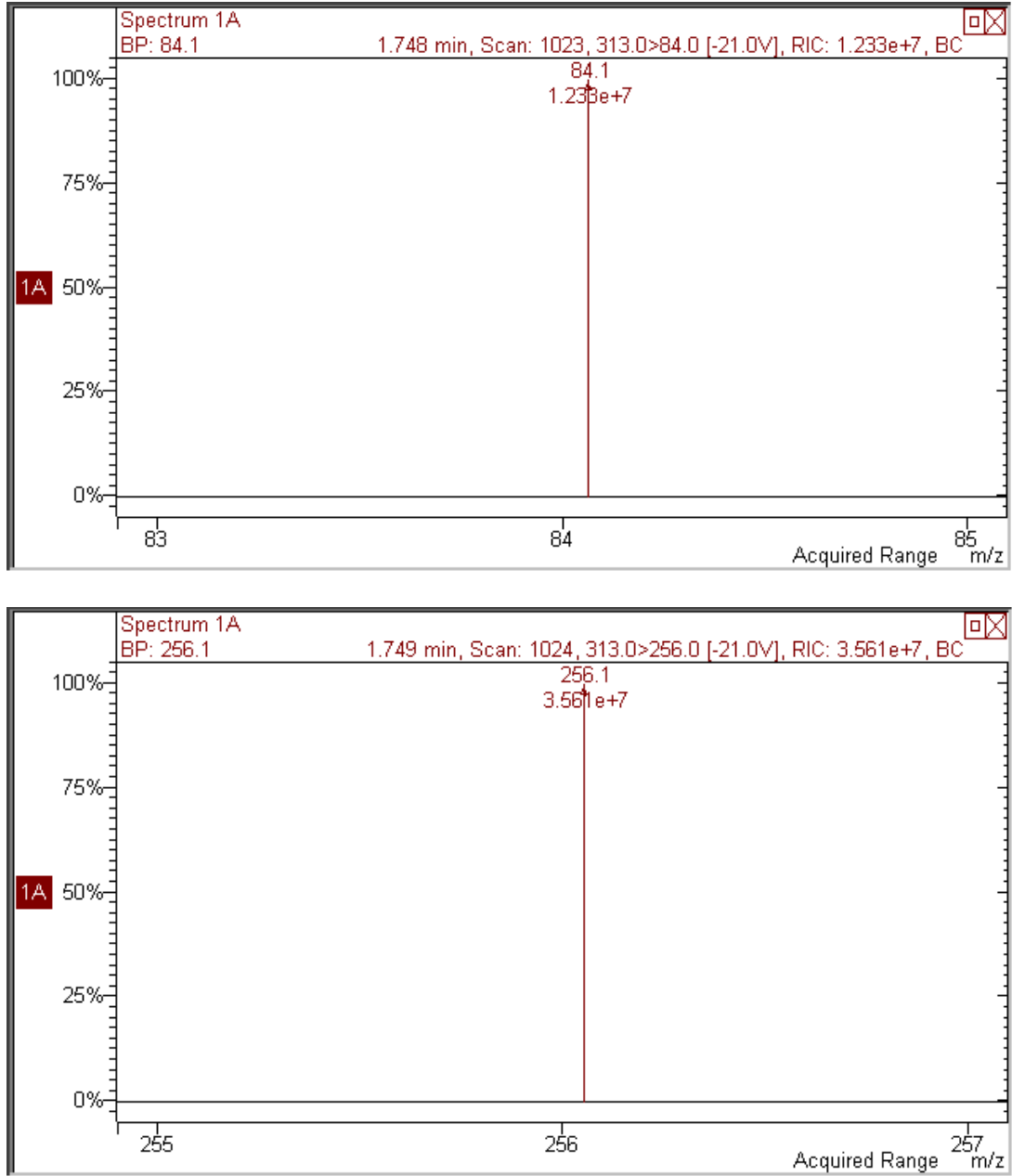
Şekil 4.17. Boş idrar örneği ile 5 ng/mL konsantrasyondaki SRT (a), OLZ (b), RSP (c) ve PLP (d) etken maddelerini içeren idrar örneğinin LC-MS/MS kromatogramlarının üst üste görüntüsü.



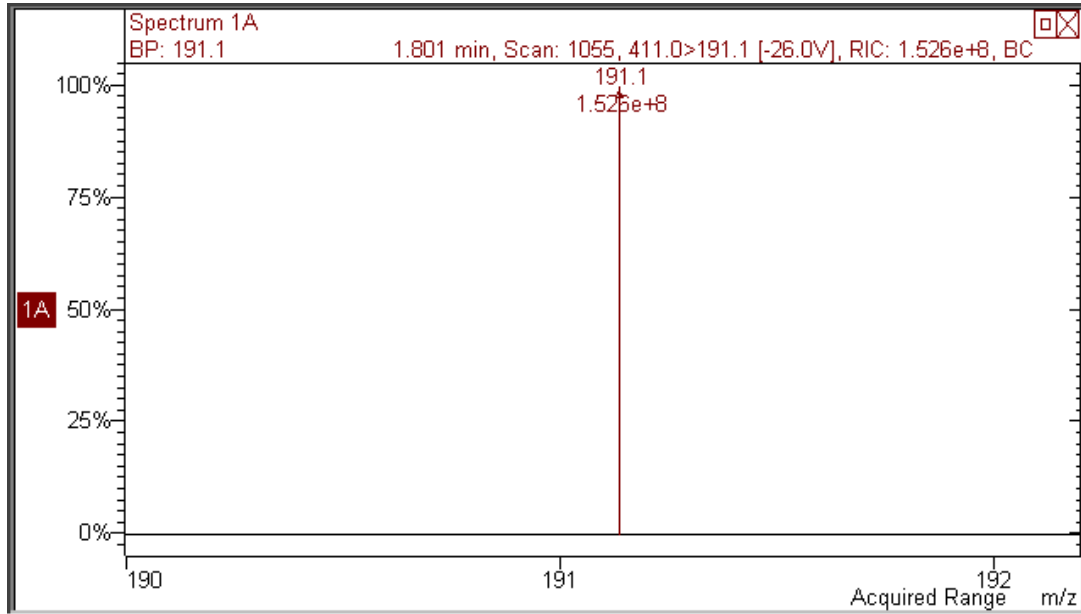
Şekil 4.18. Boş kan örneği ile 5 ng/mL konsantrasyondaki, SRT (a), OLZ (b) RSP (c) ve PLP (d) etken maddelerini içeren kan örneğinin LC-MS/MS kromatogramlarının üst üste görüntüsü.



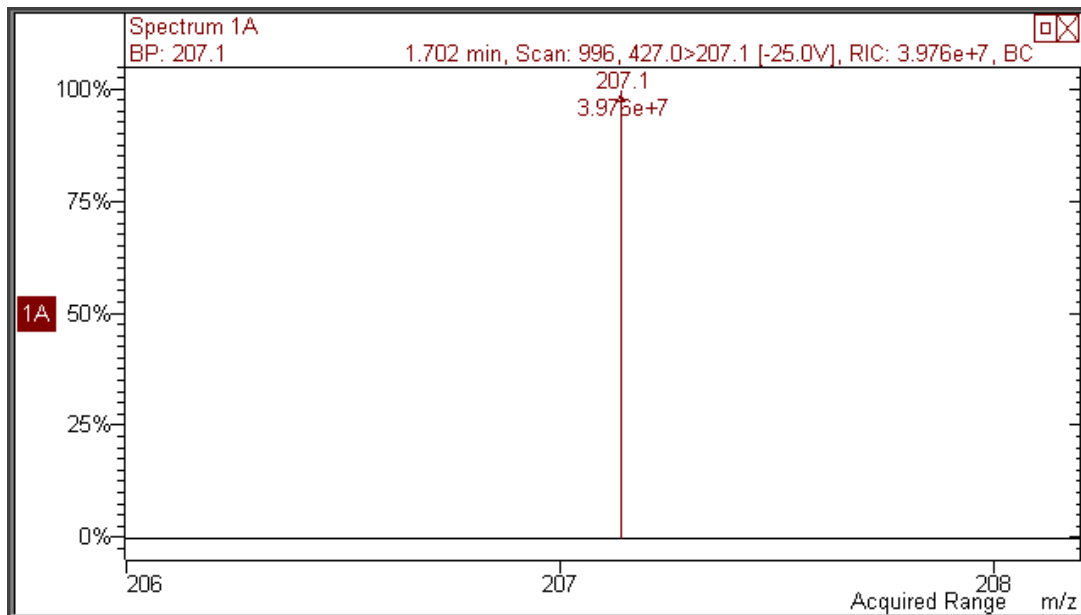
Şekil 4.19. Sertraline (SRT) etken maddesinin MS/MS spektrumları.



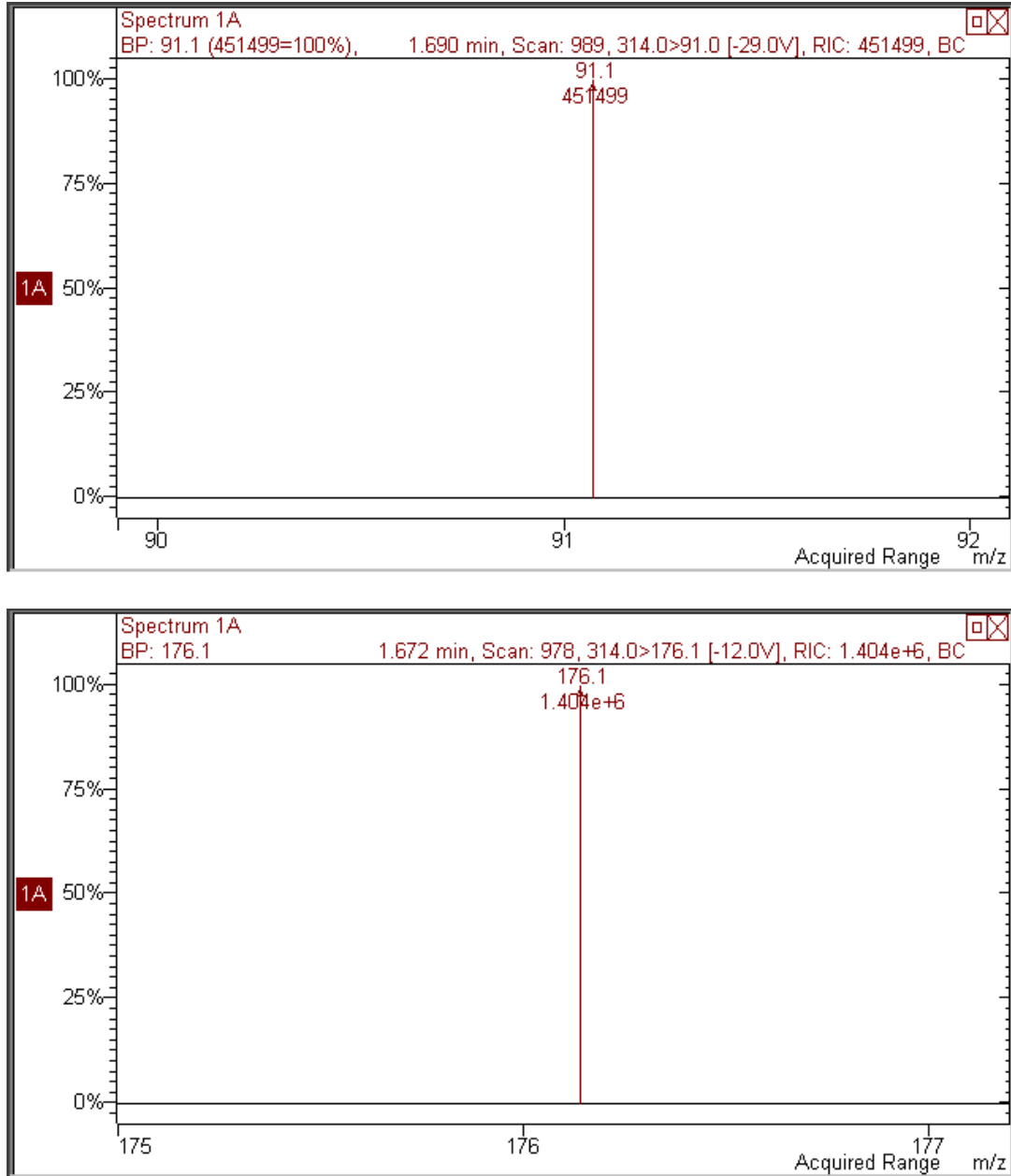
Şekil 4.20. Olanzapin (OLZ) etken maddesinin MS/MS spektrumları.



Şekil 4.21. Risperidon (RSP) etken maddesinin MS/MS spektrumu.



Şekil 4.22. Paliperidon (PLP) etken maddesinin MS/MS spektrumu.



Şekil 4.23. Reboksetin (RBK) iç standardının MS/MS spektrumu.

15 analizden elde edilerek hesaplanan SRT, OLZ, RSP ve PLP etken maddelerinin ve iç standardın (RBK) alıkonma zamanları, standart sapmaları aşağıdaki tabloda (Tablo 4.6) verildi.

Tablo 4.6. Çalışmada yer alan maddelerin alıkonma zamanları, standart sapmaları (n=15).

Madde adı	Alıkonma zamanı (dak.)	Standart Sapma
Sertralin	1,650	±0,006
Olanzapin	1,787	±0,008
Risperidon	1,841	±0,004
Paliperidon	1,767	±0,009
Reboksetin (IS)	1,702	±0,01

4.2.2. Doğrusallık

i. Metanol Çözücüsündeki Doğrusallık

SRT, OLZ, RSP ve PLP maddelerinin metanol çözeltisinde hazırlanmış 0,5 ila 250 ng/mL arasındaki konsantrasyonlarından, doğrusallık denklemi, korelasyon katsayısı, %RSD ve tekrar sayısı ise Tablo 4.7’de; kalibrasyon eğrileri aşağıdaki şekillerde (Şekil 4.24); gösterildi. Etken maddelerin tamamının 0,5-250 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusal ($r > 0,999$) olduğu bulundu.

Tablo 4.7. Metanol çözücüsündeki doğrusallık denklemleri, doğrusal aralık, korelasyon katsayısı, %RSD, tekrar sayısı

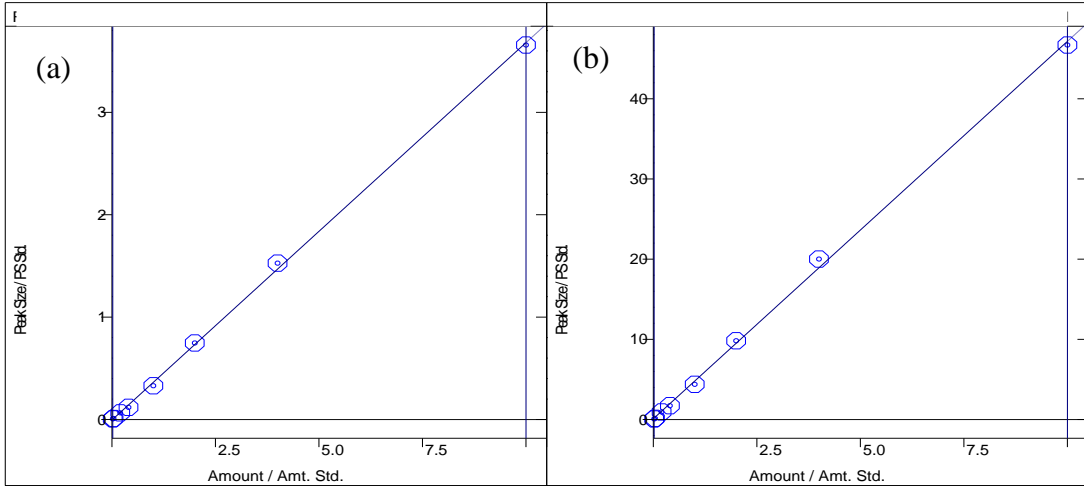
Madde adı	Doğrusallık denklemleri	Doğrusal Aralık (ng/mL)	Korelasyon katsayısı (r^2)	%RSD	n
Sertralin	$y=+0,3686x-0,0052$	0,5-250	0,9994	11,33	3
Olanzapin	$y=+4,7070x+0,0930$	0,5-250	0,9990	10,83	3
Risperidon	$y=+25,0208x-0,3927$	0,5-250	0,9998	9,994	3
Paliperidon	$y=+9,5038x+0,7470$	0,5-250	0,9998	7,50	3

SRT

Curve Fit: Linear, Origin: Ignore, Weight: None
 Resp. Fact. RSD: 11,33%, Coeff. Det.(r2): 0,999482
 $y = +0,3686x - 0,0052$

OLZ

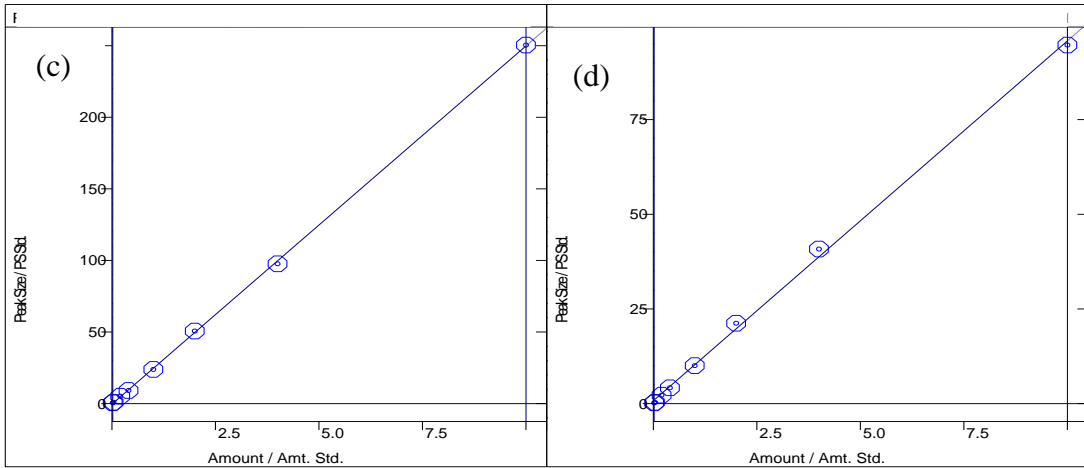
Curve Fit: Linear, Origin: Ignore, Weight: None
 Resp. Fact. RSD: 10,83%, Coeff. Det.(r2): 0,999032
 $y = +4,7070x + 0,0930$

**RSP**

Curve Fit: Linear, Origin: Ignore, Weight: None
 Resp. Fact. RSD: 9,994%, Coeff. Det.(r2): 0,999863
 $y = +25,0208x - 0,3927$

PLP

Curve Fit: Linear, Origin: Ignore, Weight: None
 Resp. Fact. RSD: 7,500%, Coeff. Det.(r2): 0,999899
 $y = +9,5038x + 0,7470$



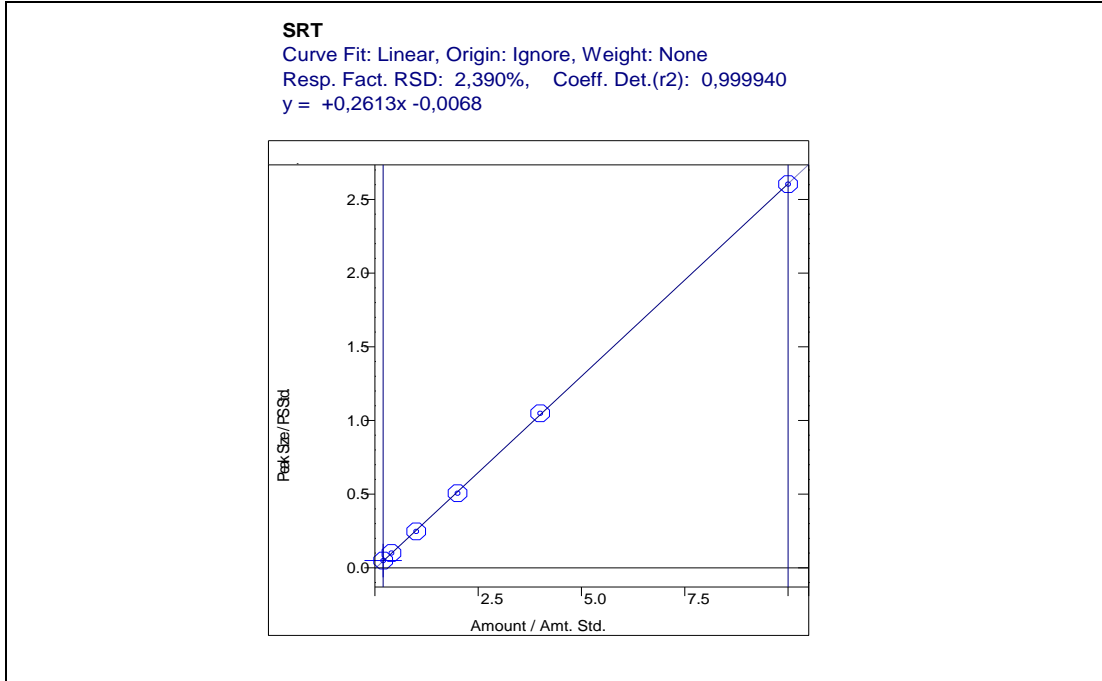
Şekil 4.24. Metanol çözücüsündeki SRT (a), OLZ (b), RSP (c) ve PLP (d) maddelerinin RBK iç standardına göre kalibrasyon eğrilerinin görünümü.

ii. Kanda Doğrusallık

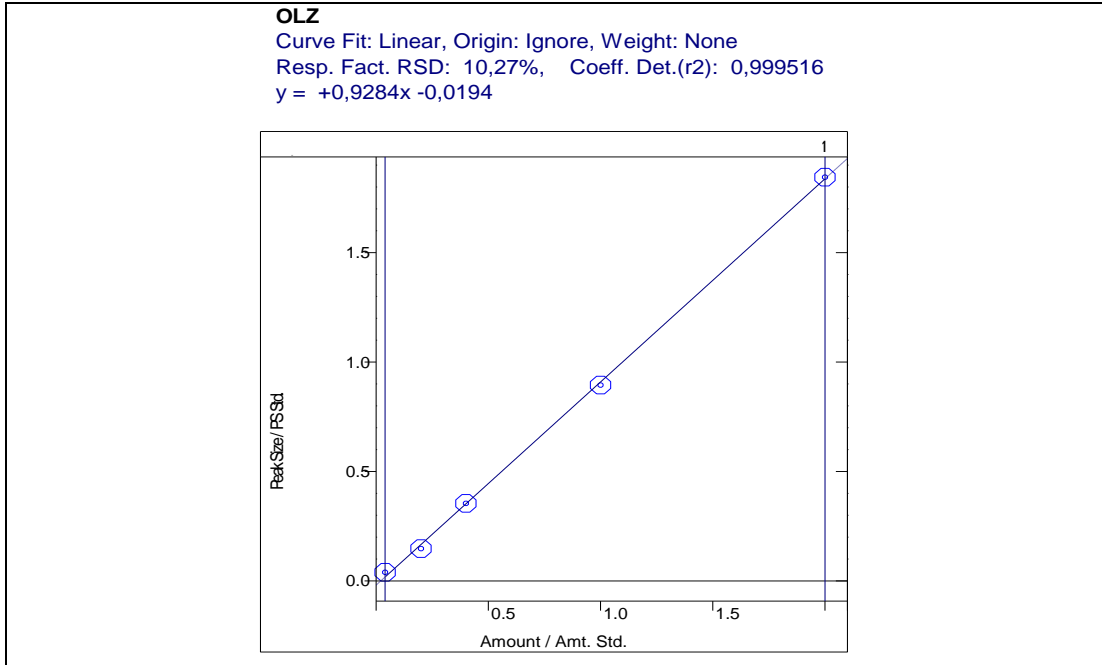
SRT, OLZ, RSP VE PLP maddelerinden hazırlanmış 0,5-250 ng/mL arasında artan konsantrasyonlardaki kalibrasyon çözeltilerinin kan ortamındaki doğrusallık verileri aşağıdaki şekillerde sırasıyla gösterildi (Şekil 4.25, 4.26, 4.27). Her bir kalibrasyon noktasından elde edilen veriler değerlendirilerek hesaplamalar otomatik olarak LC-MS/MS yazılımında gerçekleştirildi. Doğrusallık denklemi, korelasyon katsayısı, %RSD ve tekrar sayısı ise Tablo 4.8’de gösterildi. Etken maddelerin tamamının Tablo 4.8’de bildirilen konsantrasyon aralıklarında doğrusal ($r>0,999$) olduğu bulundu.

Tablo 4.8. Kanda doğrusallık denklemleri, doğrusal aralık, korelasyon katsayısı, %RSD, tekrar sayısı (n)

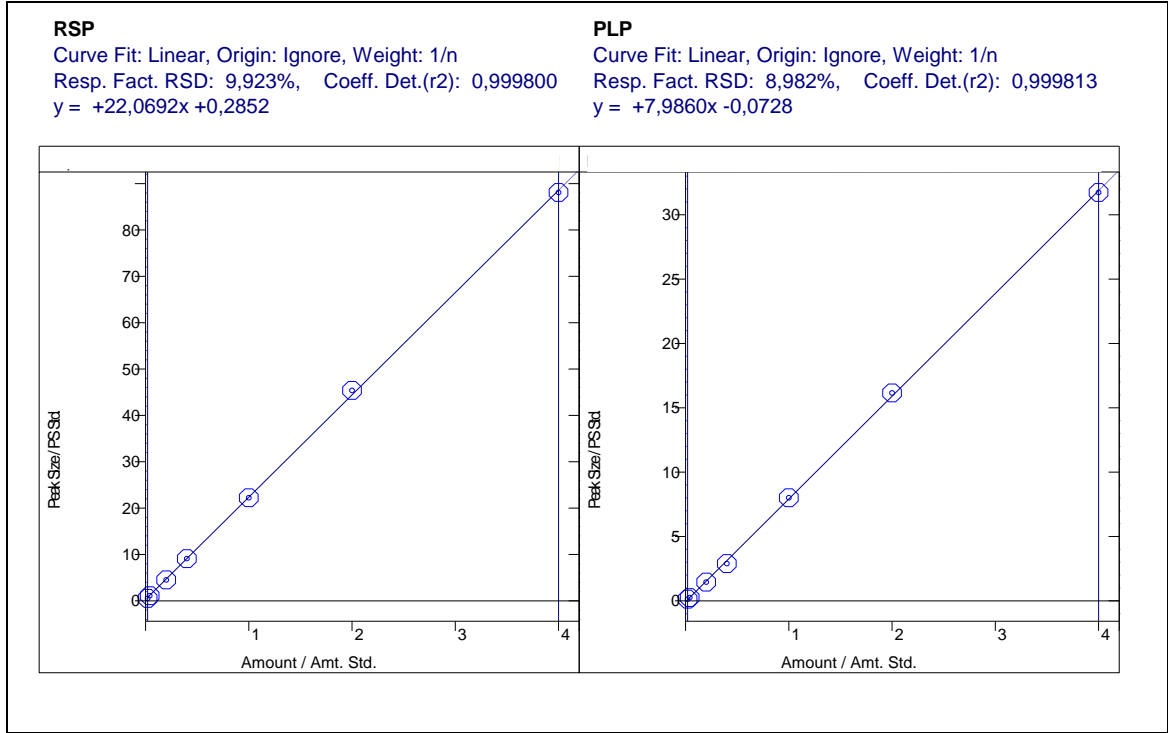
Madde adı	Doğrusallık denklemi	Doğrusal Aralık (ng/mL)	Korelasyon katsayısı (r^2)	%RSD	n
Sertralin	$y=+0,2613x-0,0068$	5-250	0,9999	2,390	5
Olanzapin	$y=+0,9284x-0,0194$	1-50	0,9995	10,27	3
Risperidon	$y=+22,0692x+0,2852$	0,5-100	0,9998	9,923	5
Paliperidon	$y=+7,9860x-0,0728$	0,5-100	0,9998	8,982	5



Şekil 4.25. Kanda Sertralin etken maddesinin RBK iç standardına göre doğrusallık eğrisi (5-250 ng/mL)



Şekil 4.26. Kanda Olanzapin etken maddesinin RBK iç standardına göre doğrusallık eğrisi (1-50 ng/mL)



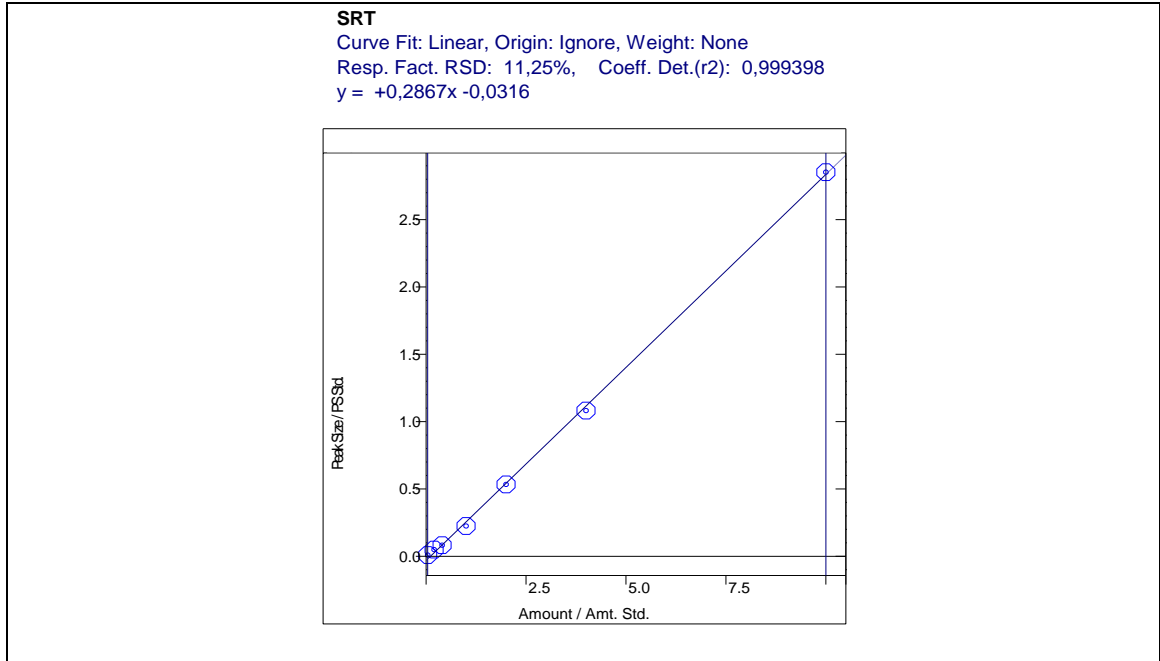
Şekil 4.27. Kanda Risperidon etken maddesinin (soldaki) ve Paliperidon metabolitinin (sağdaki) RBK iç standardına göre doğrusallık eğrileri (0,5-100 ng/mL).

iii. İdrarda Doğrusallık

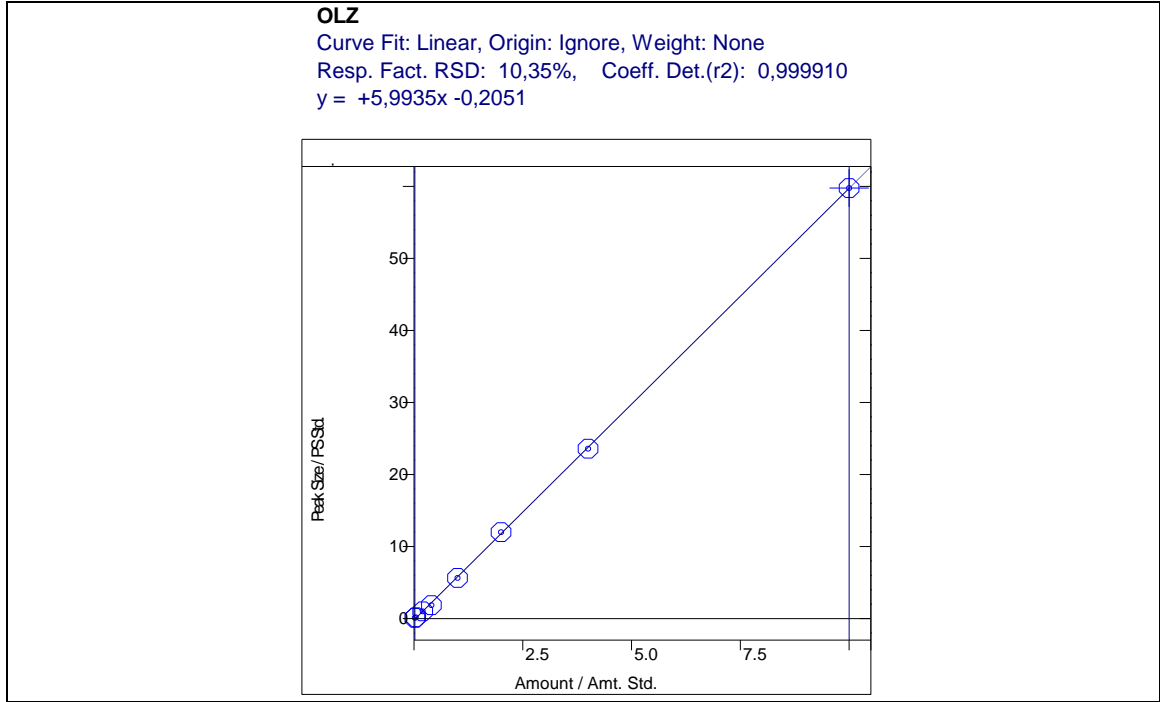
SRT, OLZ, RSP VE PLP maddelerinden hazırlanmış 0,5-250 ng/mL arasında artan konsantrasyonlardaki kalibrasyon çözeltilerinin idrar ortamındaki doğrusallık verileri aşağıdaki şekillerde verildi (Şekil 4.28, 4.29, 4.30). Her bir kalibrasyon noktasından elde edilen veriler değerlendirilerek hesaplamalar otomatik olarak LC-MS/MS yazılımında gerçekleştirildi. Doğrusallık denklemi, korelasyon katsayısı, %RSD ve tekrar sayısı ise Tablo 4.9'da gösterildi. Etken maddelerin tamamının Tablo 4.9'da bildirilen konsantrasyon aralıklarında doğrusal ($r > 0,999$) olduğu bulundu.

Tablo 4.9. İdrarda doğrusallık denklemleri, doğrusal aralık, korelasyon katsayısı, %RSD, tekrar sayısı

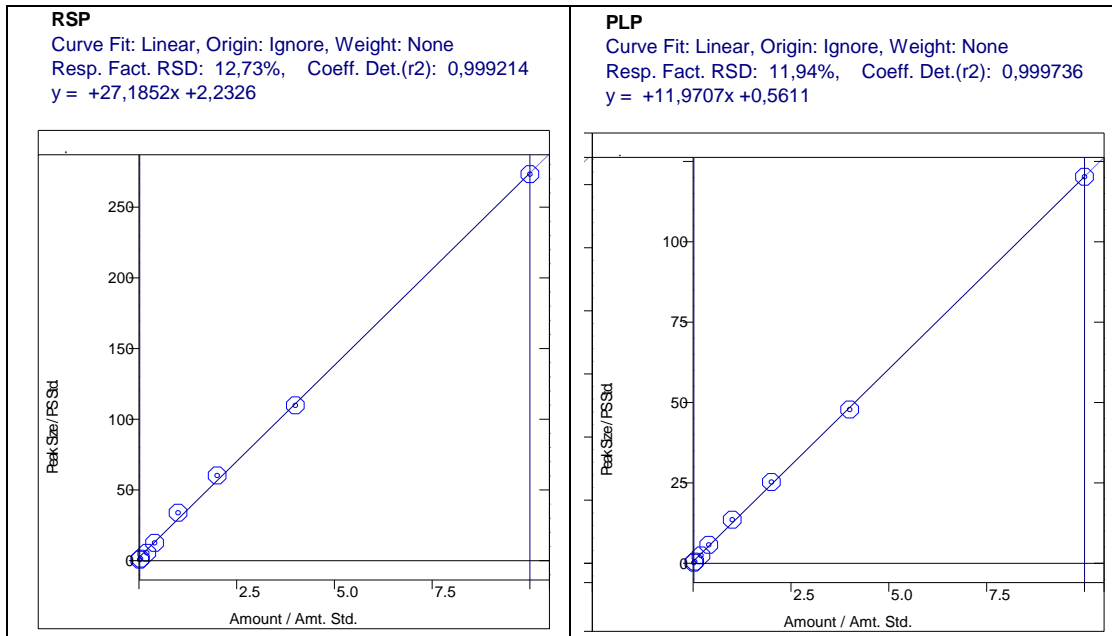
Madde adı	Doğrusallık denklemleri	Doğrusal Aralık (ng/mL)	Korelasyon katsayısı (r^2)	%RSD	n
Sertralin	$y=0,2867x-0,0316$	1,0-250	0,9993	11,25	5
Olanzapin	$y=5,9935x-0,2051$	0,5-250	0,9999	10,35	5
Risperidon	$y=27,1852x+2,2326$	0,5-250	0,9992	12,73	5
Paliperidon	$y=11,9707x+0,5611$	0,5-250	0,9997	11,94	5



Şekil 4.28. İdrarda Sertralin etken maddesinin RBK iç standardına göre doğrusallık eğrisi (1-250 ng/mL)



Şekil 4.29. İdrarda Olanzapin etken maddesinin RBK iç standardına göre doğrusallık eğrisi (0,5-250 ng/mL)



Şekil 4.30. İdrarda Risperidon etken maddesinin (soldaki) ve Paliperidon metabolitinin (sağdaki) RBK iç standardına göre doğrusallık eğrileri (0,5-250 ng/mL)

4.2.3. En Düşük Belirleme Limiti (LOD) ve En Düşük Hesaplama Limiti (LOQ)

LOD ve LOQ hesaplamalarında doğrusal aralığın en düşük konsantrasyonunun standart sapmaları kullanıldı, Tablo 4.10'da gösterilen bu standart sapmalar; Tablo 4.8 ve 4.9'daki doğrusallık denklemlerinin eğimi kullanılarak LOD ve LOQ hesaplandı, sonuçları Tablo 4.11'de gösterildi.

Tablo 4.10. LOD ve LOQ hesaplamalarında kullanılan standart sapmalar ve bunlara ait konsantrasyonlar.

		SRT (5 ng/mL)	OLZ (1ng/mL)	RSP (0,5 ng/mL)	PLP (0,5 ng/mL)
Kan	Standart sapma	0,313	0,084	0,041	0,051
İdrar	Standart sapma	0,338	0,123	0,056	0,048

Tablo 4.11. SRT, OLZ, RSP ve PLP'nin kanda ve idrardaki LOD ve LOQ değerleri

Madde adı	Örnek türü	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
SRT	Kan	3,59	11,85
	İdrar	3,54	11,67
OLZ	Kan	0,27	0,89
	İdrar	0,06	0,20
RSP	Kan	0,006	0,018
	İdrar	0,006	0,020
PLP	Kan	0,019	0,063
	İdrar	0,012	0,039

4.2.4. Kanda ve İdrarda Geri Kazanım

Geri kazanım çalışmaları doğrusal aralık içinde kalmak kaydı ile düşük, orta ve yüksek konsantrasyonları temsilen 3 noktada, en az 6 tekrar olacak şekilde çalışıldı. Elde edilen sonuçların % geri kazanım bulguları, %RSD değerleri ve tekrar sayıları, SRT, OLZ, RSP ve PLP için sırasıyla Tablo 4.12, 4.13, 4.14, 4.15'de gösterildi. Elde edilen sonuçlara göre SRT'nin geri kazanımı %85,49-%109,6 arasında, OLZ'nin geri kazanımı %80,45-%107,99 arasında, RSP'nin geri kazanımı %86,6-%105,51 arasında, PLP'nin geri kazanımı %84,41-%103,03 arasında bulundu. Tüm geri kazanım bulgularının kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu tespit edildi.

Tablo 4.12. SRT etken maddesinin 5, 25 ve 100 ng/mL konsantrasyonda yapılan geri kazanım çalışmasının bulguları

SRT (ng/mL)	Kan				İdrar			
	Katılan Miktar	Bulunan miktar	GK (%)	RSD (%)	n	Bulunan miktar	%GK	%RSD
5	4,28	85,7	7,31	11	5,48	109,6	6,17	5
25	21,37	85,49	9,28	11	24,69	98,76	3,53	5
100	96,63	96,63	4,24	12	102,64	102,64	5,32	5

Tablo 4.13. OLZ etken maddesinin 1, 5, 25 ve 100 ng/mL konsantrasyonda yapılan geri kazanım çalışmasının bulguları

OLZ (ng/mL)	Kan				İdrar			
	Katılan Miktar	Bulunan miktar	GK (%)	RSD (%)	n	Bulunan miktar	%GK	%RSD
1	0,82	82,12	10,19	5	1,03	103,12	12,00	11
5	4,62	92,31	5,79	7	4,46	89,22	12,19	5
25	26,99	107,99	3,22	5	23,97	95,88	4,95	5
100	—*				80,45	80,45	3,85	5

*100 ng/mL konsantrasyon kanda OLZ için doğrusal aralığın dışında olduğundan geri kazanım çalışması yapılmamıştır.

Tablo 4.14. RSP etken maddesinin 0,5, 25 ve 100 ng/mL konsantrasyonda yapılan geri kazanım çalışmasının bulguları

RSP (ng/mL)	Kan				İdrar			
	Bulunan miktar	GK (%)	RSD (%)	n	Bulunan miktar	%GK	%RSD	n
0,5	0,51	102,5	7,95	6	0,43	86,6	12,97	5
25	26,21	104,84	2,59	6	26,25	105,03	3,45	5
100	105,51	105,51	1,46	6	102,54	102,54	5,28	5

Tablo 4.15. PLP etken maddesinin 0,5, 25 ve 100 ng/mL konsantrasyonda yapılan geri kazanım çalışmasının bulguları

PLP (ng/mL)	Kan				İdrar			
	Bulunan miktar	GK (%)	RSD (%)	n	Bulunan miktar	%GK	%RSD	n
0,5	0,57	114,1	9,01	6	0,45	89,53	10,81	5
25	25,75	103,03	3,21	6	24,88	99,53	3,65	5
100	100,78	100,78	4,17	6	84,41	84,41	3,60	5

4.2.5. Kesinlik Çalışması

10 ve 100 ng/mL konsantrasyonları farklı günlerde idrarda ve kanda 3-6 kez tekrar edildi. Elde edilen sonuçların ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması (%RSD) hesaplatıldı. Gün içi ve günler arası kesinlik elde edilen %CV (Varyasyon katsayısı) değerleri olarak aşağıdaki tablolarda verildi (Tablo 4.16, 4.17, 4.18 ve 4.19). Gün içi ve günler arası kesinlik için elde edilen %CV değerleri; SRT için en yüksek 13,49; OLZ için 12,49; RSP için 7,91; PLP için 12,85 bulundu. Bu değerlerin %15'i geçmediği ve kabul edilebilir sınırlar dahilinde olduğu gözlemlendi.

Tablo 4.16. SRT etken maddesinin idrar ve kandaki kesinlik bulguları

SRT	Kesinlik (%CV)			
	İdrar (n=6)		Kan (n=3)	
	Gün içi	Günler arası	Gün içi	Günler arası
10 ng/mL	3,52	6,64	13,49	13,94
100 ng/mL	5,32	3,57	4,24	4,94

Tablo 4.17. OLZ etken maddesinin idrar ve kandaki kesinlik bulguları

OLZ	Kesinlik (%CV)			
	İdrar (n=6)		Kan (n=3)	
	Gün içi	Günler arası	Gün içi	Günler arası
10 ng/mL	10,15	12,49	2,82	6,96
100 ng/mL	3,85	1,89	3,22*	6,07*

*100 ng/mL konsantrasyonu kanda OLZ için doğrusal aralığın dışında olduğundan kesinlik çalışması 25 ng/mL ile yapılmıştır.

Tablo 4.18. RSP etken maddesinin idrar ve kandaki kesinlik bulguları

RSP	Kesinlik (%CV)			
	İdrar (n=6)		Kan (n=3)	
	Gün içi	Günler arası	Gün içi	Günler arası
10 ng/mL	7,12	6,45	6,58	7,91
100 ng/mL	5,28	2,46	1,47	1,57

Tablo 4.19. PLP etken maddesinin idrar ve kandaki kesinlik bulguları

PLP	Kesinlik (%CV)			
	İdrar (n=6)		Kan (n=3)	
	Gün içi	Günler arası	Gün içi	Günler arası
10 ng/mL	11,13	12,85	7,62	8,83
100 ng/mL	3,6	2,98	4,17	2,18

4.2.6. Doğruluk (% Hata) Çalışması

İdrarda ve kanda 6 tekrarlı 10 ve 100 ng/mL konsantrasyonları için yapılan ve Tablo 4.20’de verilen doğruluk (% hata) çalışmasının sonuçlarının 0,78 ile 14,86 arasında değiştiği görüldü ve %15’in altında kaldığından, bu bulgular kabul edilebilir sınırlarda değerlendirildi.

Tablo 4.20. İdrarda ve kanda doğruluk çalışmasının bulguları

Doğruluk (%Hata)	Konsantrasyon	SRT	OLZ	RSP	PLP
İdrar (n=6)	10 ng/mL	7,63	14,86	4,90	8,98
	100 ng/mL	2,64	4,85	2,54	5,66
Kan (n=6)	10 ng/mL	4,21	9,62	10,71	2,75
	100 ng/mL	3,38	7,99*	5,51	0,78

*100 ng/mL konsantrasyonu kanda OLZ için doğrusal aralığın dışında olduğundan doğruluk çalışması 25 ng/mL ile yapılmıştır.

4.3. Hasta bulgularının değerlendirilmesi

OLZ, RSP ve SRT etken maddelerinden en az birini kullanan ve kan ve/veya idrar örnekleri toplanan 39 hastanın etken madde miktarlarının tayini LC-MS/MS sisteminde gerçekleştirildi. Bu analizden elde edilen bulgular (ng/mL) Tablo 4.21’de gösterildiği gibidir. Doğrusal aralığın üzerinde bulunan örnekler on (10) kat seyreltilerek yeniden analiz edildi. Hastaların kan ve idrarlarındaki madde miktarları değişken olduğundan, kontaminasyonu engellemek için, örnek analiz listesine her örnekten sonra boş metanol çözücüsü eklendi ve analiz edildi. Çalışma sonunda her bir boş metanol çözücüsünden alınan kromatogram incelendi ve herhangi bir kontaminasyon olmadığı görüldü.

Kan ve idrardaki miktar tayinleri hastaların aldıkları etken madde dozuna göre değişiklik gösterdiğinden elde edilen derişimler hastaların aldıkları günlük ilaç dozlarına bölünerek dozdan bağımsız değerlendirildi (Murphy G.M. ve ark., 2001). Doz başına düşen madde derişimleri (C/D) Tablo 4.22.’de belirtildiği gibidir. PLP, RSP’nin metaboliti olduğundan; önce metabolit/etken madde (PLP/RSP) değerlendirilmesi yapıldı (Arneht, B. ve ark., 2009), ardından doz başına madde konsantrasyonu hesaplaması yapıldı. Tablo 4.22’de ayrıca yan yana değerlendirilme yapılabilmesi için; bu 39 hastaya ait gen kopya sayılarının sonuçları (*R*) ve CYP2D6*3 ve *4 allellerinin genotip bulguları da gösterildi.

PLP/RSP oranının doza bölümünden elde edilen sonuçlar ile gen kopya sayıları arasındaki ilişkiyi anlamak için parametrik olmayan Spearman’s Korelasyon testi uygulandı. Kandaki PLP/RSP oranının doza bölümünden elde edilen sonuçlar ile intron 6 arasında anlamlı bir sonuç elde edildi ($p < 0,05$).

Tablo 4.21. Hastaların kan ve idrarlarındaki madde miktarları.

Hasta Kodu	İdrar (ng/mL)				Kan (ng/mL)			
	Olanzapin	Risperidon	Paliperidon	Sertralin	Olanzapin	Risperidon	Paliperidon	Sertralin
1		113,9	1888,0			3,1	22,9	
4	471,4				30,5			
6		0,9	77,6			<LOQ	<LOQ	
7		297,5	194,0			11,0	10,2	
10	195,1				22,5			
11		9,9	57,6			2,1	11,3	
20	350,0				20,6			
21	320,0				42,6			
25	976,9				120,5			
26	387,0				1,2			
28		187,6	40,1			4,9	2,1	
29		114,6	752,2			9,1	28,0	
32		2,4	109,7			<LOQ	14,6	
33		<LOQ	3,8			<LOQ	<LOQ	
34		55,6	619,0			1,5	12,1	
35		44,2	1074,0			<LOQ	<LOQ	
36	22,1				33,1			
38	14,1			67,3	29,9			11,9
39		17,3	422,1			2,6	15,9	
40	321,4				13,3			
42		63,0	838,3			7,7	37,4	
46	*				2,9			

Tablo 4.21. devam								
Hasta Kodu	İdrar konsantrasyonu (ng/mL)				Kan konsantrasyonu (ng/mL)			
	Olanzapin	Risperidon	Paliperidon	Sertralin	Olanzapin	Risperidon	Paliperidon	Sertralin
47		*	*			9,8	31,8	
48	84,0				68,7			
49	21,5				27,5			
53	17,8				20,6			
55				47,3				12,0
56		<LOQ	<LOQ			<LOQ	<LOQ	
58	*				147,3			
59	585,7				71,3			
60	<LOQ				<LOQ			
61		4,3	39,6			1,6	10,8	
63		<LOQ	<LOQ			<LOQ	<LOQ	
64	367,7				40,3			
70	571,4				32,5			
74	10,7				37,9			
75		286,4	2084,0			<LOQ	<LOQ	
76	285,7				11,6			
80	<LOQ				47,0			

* 46, 47 ve 58 kodlu hastaları idrarları alınamayan hastalardır.

Tablo 4.22. Hastaların kan ve idrarlarındaki birim doza karşılık madde miktarları (C/D) ile genetik sonuçlarının bir arada görüntüsü.

Hasta Kodu	İdrar (konsantrasyon/doz)				Kan (konsantrasyon/doz)				CYP2D6 Alel		Ekspresyon	
	OLZ/D	PLP/RSP [†]	(PLP/RSP)/D	SRT/D	OLZ/D	PLP/RSP [†]	(PLP/RSP)/D	SRT/D	*3	*4	İntron 6	Ekzon 9
1		16,6	4,1			7,4	1,9		wt/wt	wt/wt	0,85	0,59
4	47,1				3,0				wt/wt	wt/wt	0,90	1,21
6		86,2	86,2			-	-		wt/wt	wt/wt	1,73	1,22
7		0,7	0,2			0,9	0,3		wt/wt	*4/wt	2,81	2,16
10	7,8				0,9				wt/wt	wt/wt	1,53	1,72
11		5,8	0,1			5,4	0,1		wt/wt	wt/wt	1,09	1,45
20	70,0				4,1				wt/wt	wt/wt	0,82	1,16
21	16,0				2,1				wt/wt	*4/wt	0,93	0,67
25	48,8				6,0				wt/wt	*4/wt	0,85	1,00
26	38,7				0,1				wt/wt	wt/wt	0,75	0,32
28		0,2	0,1			0,4	0,2		wt/wt	*4/*4	0,78	0,15
29		6,6	1,1			3,1	0,5		wt/wt	wt/wt	1,07	1,21
32		44,8	0,9			-	-		wt/wt	wt/wt	1,52	1,53
33			-			-	-		wt/wt	wt/wt	0,68	0,29
34		11,1	3,7			8,4	2,8		wt/wt	wt/wt	0,71	1,23
35		24,3	3,0			-	-		wt/wt	*4/wt	1,00	1,00
36	1,1				1,7				wt/wt	wt/wt	1,20	0,98
38	1,4			0,7	3,0			0,1	wt/wt	*4/wt	0,81	0,68
39		24,5	6,1			6,1	1,5		wt/wt	wt/wt	1,47	1,43
40	21,4				0,9				wt/wt	wt/wt	0,70	3,56
42		13,3	1,7			4,9	0,6		wt/wt	wt/wt	0,99	0,23
46	*				0,3				wt/wt	wt/wt	0,79	0,80
47		*	*			3,2	0,4		wt/wt	wt/wt	0,69	0,57

Tablo 4.22. devam

Hasta Kodu	İdrar (konsantrasyon/doz) (ng/mL)				Kan (konsantrasyon/doz) (ng/mL)				CYP2D6 Alel		Ekspresyon	
	OLZ/D	PLP/RSP [†]	(PLP/RSP)/D	SRT/D	OLZ/D	PLP/RSP [†]	(PLP/RSP)/D	SRT/D	*3	*4	İntron 6	Ekzon 9
48	4,2				3,4				wt/wt	wt/wt	0,49	0,78
49	4,3				5,5				wt/wt	*4/wt	1,06	0,55
53	3,6				4,1				wt/wt	wt/wt	0,41	0,26
55				0,5				0,1	wt/wt	*4/wt	0,82	0,95
56			-	-		-	-		wt/wt	*4/wt	0,63	0,76
58	*				7,4				wt/wt	wt/wt	0,33	0,81
59	29,3				3,6				wt/wt	wt/wt	0,51	0,84
60	-				-				wt/wt	wt/wt	0,87	0,35
61		9,3	3,1			6,6	2,2		wt/wt	wt/wt	0,93	0,68
63		-	-			-	-		wt/wt	wt/wt	0,77	0,80
64	18,4				2,0				wt/wt	wt/wt	1,05	0,81
70	57,1				3,3				wt/wt	*4/wt	2,23	1,74
74	1,1				3,8				wt/wt	wt/wt	1,93	1,41
75		7,3	1,2			-	-		wt/wt	wt/wt	1,18	1,11
76	14,3				0,6				wt/wt	wt/wt	1,60	1,39
80	-				9,4				wt/wt	wt/wt	0,77	0,96
Aralık	1,07-70,0	0,2-86,2	0,1-86,2	0,5-0,7	0,29-9,4	0,4-8,4	0,1-2,8	0,1				

[†] Hem kanda hem de idrarda konsantrasyon/doz oranısını kurmadan önce PLP ve RSP için metabolit/ilaç oranısı kuruldu.

* 46, 47 ve 58 kodlu hastaları idrarları alınamayan hastalardır.

CYP2D6*4 alleli taşıyan ve taşımayan hastaların kan ve idrarlarındaki OLZ ve RSP miktarlarının (günlük doz miktarına bölünmüş) ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak değerlendirildi. Dağılımın parametrik olmadığı kandaki RSP konsantrasyonu hariç diğer tüm gruplar bağımsız t-testi ile karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonuçları ve bulunan p değerleri Tablo 4.23’de gösterildi. Elde edilen sonuçlar, mutant CYP2D6*4 alleli taşıyan ve taşımayan gruplar arasında madde konsantrasyonu açısından anlamlı bir fark olmadığını gösterdi ($p>0,05$).

Tablo 4.23. CYP2D6*4 alleli taşıyan ve taşımayan hastaların kan ve idrarlarındaki RSP ve OLZ konsantrasyonlarının istatistiksel bulguları

Konsantrasyon/doz	Ortalama (CYP2D6*4 alleli taşımayanlar)	Ortalama (CYP2D6*4 alleli taşıyanlar)	p	sd
OLZ/D (idrar)	19,77	25,52	0,635	16
OLZ/D (kan)	3,02	3,98	0,458	16
(PLP/RSP)/D (idrar)	9,01	0,825	0,522	14
(PLP/RSP)/D (kan)	0,769	0,125	0,291*	15

* Ortalamalar arasındaki fark Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.

5. TARTIŞMA

Farmakogenetik, ilaç yanıtlarındaki değişkenliğe sebep olan genetik farklılıklarla ilgilenen bilim dalıdır.

Günümüzde terapötik hataların ve ağır advers ilaç etkilerinin genetik kaynaklı olabileceği gerçeği bilinmektedir. Zehirlenme olgularında en sık karşılaşılan ilaçlar psikiyatrik ilaçlardır. Bu ilaçların büyük çoğunluğunun CYP2D6 enzimi ile metabolize edildiği düşünöldüğünde, bu enzimin polimorfizminin hem klinik hem de adli bilimler alanında büyük önemi vardır.

Fonksiyonel CYP2D6 gen kopyaları pek çok önemli ilacın uzaklaştırılmasında önemli bir belirteçtir. PM'ler kadar UM'ler de ciddi ters ilaç reaksiyonları ile karşılaşabilirler ve terapötik etkinlik kaybına uğrayabilirler. CYP2D6 genotiplendirmesinin yanında gen kopya sayısının da belirlenmesi doğru fenotipi belirlemek için zorunludur (Bodin, L. ve ark. 2005).

CYP2D6 gen kopya sayısı, SNP genotiplendirme ile birlikte kullanıldığında CYP2D6 fenotipinin doğru şekilde tahmin edilmesini sağlamaktadır. Gen kopya sayılarını belirlemek için yapılmakta olan birçok yöntem vardır. Ancak bu yöntemler arasında rutin uygulamaya giren en uygun ve etkin yöntem TaqMan RT-PCR yöntemidir (Nguyen, D.L. ve ark 2009).

Psödogenleri olan CYP2D7 ve CYP2D8'e göre, CYP2D6 geni daha homolog olduğundan TaqMan RT-PCR için özel primer bölgeleri bulmak çok da zor değildir. Bu amaç için daha önceden iki bölge tanımlanmıştır. Birisi ekson 9 bölgesi (4091C-4179A); diğeri ise intron 6 (2951T-3027C) bölgesidir. Bu

bölgelerde bilinen herhangi bir mutasyon yoktur ve bu bölgeler özgün bölgelerdir. TaqMan RT-PCR yöntemlerinde iyi belirlenmiş albümin geni, iç referans olarak kullanılarak yeniden üretilebilirlik, doğruluk ve sapma açısından bulguları karşılaştırmak üzere esas oluşturmaktadır. Hedef DNA'nın ve referans genin PCR amplifikasyon verimliliğinin hesaplanması, istenildiği kadar stabil olmamasına karşın, $\Delta\Delta C_p$ gen oranı hesaplamasının kullanılması, bu farklılığı oldukça küçük düzeylere indirmiştir. Kalibratör kullanılarak çok çeşitli koşullarda güvenilir sonuçlar elde ederek bir düzeltme sağlanmış olur.

TaqMan yöntemleri kolay, hızlı ve nispeten ucuz yöntemlerdir. Pipetleme süresi yaklaşık 30 dakika, PCR süresi ise yaklaşık 60 dakikadır. Ortalama 90 dakikada 32 örnek aynı anda analiz edilir. Primerler, proplar, enzim ve DNA örnekleri +4°C standart saklama koşullarında stabildir.

CYP2D6 gen kopya sayısını belirlemek için kullanılan Southern blot, RFLP ve long-range PCR gibi geleneksel yöntemler iyi tanımlanmıştır ancak rutin kullanım için zahmetli ve yetersiz yöntemlerdir (Schaeffeler, E. ve ark. 2003; Bodin, L. ve ark. 2005).

İnsan albümin geni DNA ve RNA miktar tayini için iyi bir referans genidir. Gen kopya sayısını belirlemek için albümin ve CYP2D6 Cp verilerinin kullanıldığı analizin doğruluğu önceden gösterilmiştir (Schaeffeler, E. ve ark. 2003; Bodin, L. ve ark. 2005).

Antipsikotik ilaçlar şizofreni ve şizoefektif hastalıkların ortaya çıkardığı pek çok pozitif, negatif ve kognitif semptomlarının azalmasında yararlı etkilere sahiptir. Ancak yetersiz klinik etki ve ADR bu ilaç grubunun önemli kısıtlayıcılarından.

Iwahashi K (2004); olanzapin ile tedavi gören üç şizofreni hastasının açlık kan şekerinin olanzapin ile tedavi edilmesi sırasında yükseldiğini ve bu sırada her üç hastada da kilo artışı olduğunu bildirdiği çalışmasında, hastaların CYP1A2 ve/veya CYP2D6 enzimlerinin de yavaş çalıştığını tespit etmiştir. Çalışma kandaki yüksek olanzapin seviyesinin enzim polimorfizmine bağlı olabileceğini, ancak her zaman hiperglisemiye neden olmayabileceğini bildirmektedir. Sadece olanzapin seviyesinin değil aynı zamanda hastaların orta hızlı metabolizör oluşlarının da pankreatik beta-hücre fonksiyonlarında hasara yol açabileceğini ve kan-glukoz seviyesinin bu nedenlerle bozulabileceğini vurgulamıştır (Iwahashi K., 2004).

Kobylecki ve ark. (2009) çalışmalarında, yatarak antipsikotik tedavisi görmekte olan ve verilen ilacın doza göre en yüksek kararlı durum plazma konsantrasyonuna sahip olan, CYP2D6*3, *4, *5 ve *6 allellerinin genotipleme sonucuna göre PM olan 18 hastayı seçmiştir. Buna karşılık kontrol grubu olarak ise 18 IM, 18 EM olduğu bilinen hastayı seçmiş ve 3 grubu da yaş, cinsiyet, tanı ve yan etkilere göre karşılaştırmıştır. Tardif diskineziyi (TD) de kapsayan ekstrapiramidal yan etkilere PM grupta diğer iki gruba kıyasla anlamlı olarak daha sık rastlanmıştır. Bu da CYP2D6 enziminin aktivitesinin antipsikotik ajanlarla tedavi gören PM kişilerde advers etki görülme olasılığının yüksek olduğu gerçeğini bir kez daha açığa çıkarmıştır (Kobylecki C.J. ve ark., 2009).

Nguyen, D.L. ve ark. (2009) CYP2D6 genotipi bilinen 617 örnekle yaptıkları çalışmada TaqMan RT-PCR kantitasyon yöntemi kullanmışlar ve standart yöntemler ile karşılaştırıldığında ekson 9 yöntemi için %99,4; intron 6 için ise

%95,6 korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir. Yani bu kantitasyon yöntemleri ile elde edilen sonuçların doğruluğunu kanıtlamışlardır. Ayrıca her bir yöntemin tek başına da gen kopya sayısını belirleyecek hassasiyete ve özgüllüğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. (Nguyen, D.L. ve ark 2009).

Biz de çalışmamızda Nguyen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan yola çıkarak, (albümin intron 12 gen bölgesinin ekspresyonunu referans gen kabul ederek) ekson 9 ve intron 6 gen bölgelerindeki ekspresyonu TaqMan RT-PCR yöntemi ile belirleyip $2^{-\Delta\Delta C_p}$ yöntemine göre gen kopya sayılarını hesapladık. Hastalar ile kontrol grubu arasında ekson 9'a göre yapılan gen kopya sayılarında anlamlı fark olduğunu gördük.

Erime eğrisi analizi ile yaptığımız CYP2D6*3 ve *4 allelerinin tespitinde hasta ve kontrol grubu arasında *4 alleli için anlamlı fark bulduk. Hasta grubunun *4 frekansının, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olması, psikiyatrik hastalarda PM allellerinin görülme sıklığının daha yüksek olduğunu ve bu hastaların kullandıkları bir veya birden çok ilaç etken maddesinin kullanılması durumunda, advers ilaç reaksiyonu meydana gelme riskinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Erime eğrisi analizi ile ve gen ekspresyonu analizi ile elde edilen sonuçlara göre CYP2D6*3 ve *4 genotipleri ile gen kopya sayılarına bakıldığında, bazı hastalarda (örn. 7, 70 no'lu hastalar) sapmalar olduğu gözlenmektedir. Bu sapmanın öncelikli nedenlerinden biri genetik koşullardır. Çalışmamızda sadece *3 ve *4 allelerinin polimorfizmini belirledik. Ancak CYP2D6 geninin 100'ün üzerinde allelinin ve iki psödogeninin olduğu düşünüldüğünde (Daly, A.K. ve

ark., 1996a), her bir hastanın genotip sonucu ile gen kopya sayılarının tam olarak eşleşmemiş olması beklenebilir bir sonuçtur. Bunların dışında hibrit gen olma olasılığı da düşünölmelidir (Nguyen, D.L. ve ark., 2009).

Bunun dışında sapmaya neden olan bir etken de enzim indüksiyonu ve inhibisyonudur. Hastaya eş zamanlı olarak birden fazla ilaç tedavisi uygulandığı durumlarda, diğer etken maddelerden birinin enzim inhibisyonu veya indüksiyonuna neden olması sonucunda sözkonusu ilaç etken maddesinin kandaki konsantrasyonu değişebilir (Theisen, F.M. ve ark., 2006; LLerena, A. ve ark., 2003).

Gen ekspresyonu incelemelerinde önemli yer tutan RT-PCR analizinin bitiş noktası Cp veya eşik döngü olarak adlandırılır. Cp, döngü sayılarına karşılık PCR sinyallerinin şiddeti şeklinde belirlenen logaritmik bir eğriden elde edilir. Cp değeri doğrusal olmayan bir terim olduğundan, ham Cp değerini kullanarak herhangi bir istatistik değerlendirme yapmaktan kaçınılmalıdır. Bir iç kontrol ve/veya kalibratör örnek kullanarak hesaplanan bağıl PCR verisi sunmak en çok kullanılan yöntemdir. Kantitatif PCR deneylerinde; hem bağıl hem de mutlak miktar tayini kullanarak veri analizine ulaşılabilir. Mutlak kopya sayısı gerekliyse, mutlak yöntem kullanılmalıdır. Aksi taktirde bağıl gen kopya sayısı yetersiz kalacaktır. Bağıl gen kopya sayısı hesaplamak, mutlak olana kıyasla daha kolaydır, zira standart eğri oluşturmayı gerektirmez (Livak, K.J. ve Schmittgen, T.D., 2001). Bu bilgilerin ışığında, çalışmamızda Albümin geninin intron 12 bölgesinin ekspresyon sonuçlarını kullanarak test örneklerinde bağıl gen kopya sayısı (R) hesapladık ve logaritmik olan Cp değerlerini, $2^{-\Delta\Delta C_p}$ formülü ile

doğrusal forma dönüştürdük ve albümin genine göre normalize ettik. Böylelikle ham Cp verilerinin doğrudan değerlendirilmesi neticesinde oluşabilecek hatalı yorumlamalardan kaçınmış olduk.

Chiurillo, M.A. ve ark. (2009), Venezuela'da 110 gönüllü ile yaptıkları çalışma neticesinde CYP2D6 enziminin zayıf metabolize eden allellerinin toplam frekansını %19.5 olarak bulmuş ve bu allelerin varlığının postmortem farmakogenetik analiz açısından önemini vurgulamıştır (Chiurillo, M.A. ve ark., 2009).

Andreassen, O.A. ve ark. (1997) şizofrenik hastaların %18'inin *4, %0,5'inin *3 olduğunu ve 100 hastadan 5'inin CYP2D6*4/*4 olduğunu, bu hastaların diğerlerine oranla daha fazla yan etki gösterdiklerini ve bu yan etkilerin uzun dönem antipsikotik kullanımlarında kalıcı bir hal aldığını bildirmiştir. Biz de çalışmamızda hastaların %15'inin CYP2D6*4, %1'inin CYP2D6*3 allelini taşıdığını ve 77 hasta arasında CYP2D6*4/*4 olanların sayısının 2 olduğunu tespit ettik (Andreassen, O.A. ve ark., 1997).

Kawanishi, C. ve ark. (2004) yaptığı çalışmada, duygu durum bozukluğu olan ve CYP2D6 genotipi belirlenen 108 hasta arasında 81 hastanın antidepresan tedaviye direnç gösterdiğini ve bunların %10'ununda gen duplikasyonu olduğunu tespit etmiştir. Tespit edilen bu sıklığın, normal popülasyonda görülen %0,8-1,0 sıklığa oranla anlamlı olarak farklı olduğu bulunmuştur. Gen duplikasyonunun devamlı duygu durum bozukluğu gelişiminde olası bir neden olduğu kanısına varılmıştır (Kawanishi, C. ve ark., 2004). Bizim çalışmamızda, yaptığımız gen kopya sayısının bağıl hesaplamasına göre %20'nin üzerinde hastanın 2'den fazla gen

kopya sayısına sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Ancak bu gen duplikasyonlarından hangilerinin aktif genler oldukları tespit edilememiştir; bu tespit için Long-PCR gibi yöntemler ya da hastaların diğer allelelerini belirleyecek ek yöntemler gerekmektedir.

Farmakogenetik çalışmalar, sadece CYP450 enzimlerinin genleri ile sınırlı değildir. Bu alanda yapılan pek çok çalışma mevcuttur. Bunlar ilaç metabolize eden diğer enzim grupları, kan proteinleri, reseptörler, nörotransmitterler gibi pek çok taşıyıcı veya okside edici vücut bileşenlerinin genleri olabilir (Ozhan, G. ve ark., 2012; Kocabas, N.A. 2012).

Farmakogenetik analizler; adli düzenlemeler ve özellikle post-mortem toksikoloji alanlarında, günlük rutin analizlerin beraberinde yapılabilecek yeni bir analiz parametresi olarak ortaya çıkmaktadır. Bu yüzden adli toksikolojik analizlerin beraberinde moleküler analizlerin de geliştirilebilmesi yeni bir yaklaşım olacaktır. Özellikle post-mortem olgularda, makroskopik ve mikroskopik incelemelerin yanında bu yaklaşımlar, modern medikolegal incelemeler ile ilişkili olabilir. Dolayısı ile “moleküler otopsi”nin gelecekte adli tıp ve adli bilimler alanında yerini alacağı düşünülmektedir (Musshoff, F. ve ark., 2010).

CYP2D6 genotiplemesi, genetik polimorfizmin yan etkiler üzerindeki sorumluluğunu kanıtlaması yanında; kazara meydana gelen zehirlenmeleri de kanıtlar.

Çalışmamızın kromatografik sonuçlarına bakıldığında; OLZ, RSP, PLP ve SRT etken maddelerinin alıkonma zamanlarının birbirine çok yakın olduğu görüldü. Bu durum MS, Ultra Viyole, Floresans gibi dedektörler için sorun teşkil etse de

MS/MS dedektöründe bu durum bir sorun olmaktan çıkmaktadır. Zira çalışmamızda, ardışık kütle dedektörü ile analitin moleküler iyonunu parçalayarak; biri kantitatif ikincisi kalitatif tanımlamayı sağlayacak şekilde, iki iyon seçtik. MS/MS ile yapılan ve daha fazla sayıda ilaç etken maddesini aynı anda belirleyen çalışmalarda da alıkonma zamanlarının birbirilerine çok yakın olduğunu gördük (Kirchherr, H ve Kühn-Velten, W.N., 2006).

Vatassery, G.T. ve ark.'nın (1997) Sertralin için yaptığı çalışmada, tam kan ile yapılan çalışmanın geri kazanımı, plazmada yapılan geri kazanım çalışmalarından daha yüksek bulunmuştur (Vatassery, G.T. ve ark., 1997). Bizim çalışmamızda da sertralinin tam kandan yapılan geri kazanım sonuçları %85.5 ile %96.6 arasında bulunmuştur.

Çalışmamızda Sertralin kullanan hasta sayısı iki ile kısıtlı kalmıştır. 100 mg günlük doz ile tedavi edilen her iki hastanın da CYP2D6*4 alleli için bir mutasyon taşıdığı ve IM olduğu tespit edilmiştir. Hastaların gen ekspresyonlarına bakıldığında ise; 38 kodlu hastanın ekson 9'daki gen ifadesinin 55 kodlu hastaya oranla daha düşük olduğu ve idrarda sertralin düzeyinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Her iki hastanın da erkek olması ve yaşlarının da 26 ve 28 olması genetik farklılık dışındaki pek çok etkiyi ortadan kaldırmaktadır. Böylece bu iki hasta arasında görülen idrar-sertralin düzeyindeki fark; enzimin yavaş çalışması nedeni ile, metabolize edilmeden atılan madde miktarının fazla olduğunu göstermekte iken; kan-sertralin düzeylerinin aynı olması da hastaların sertralin tedavisinin devam etmesine bağlı olarak kararlı-hal kan konsantrasyonu ile yorumlanabilir.

Jain, D.S. ve ark. (2005) Katı faz özütlenme yöntemi kullanarak LC-MS/MS'de analiz ettikleri serumda 0,5-60 ng/mL doğrusal aralık içinde sertralin için %81 geri kazanım elde etmişlerdir (Jain, D.S. ve ark. 2005); çalışmamızda ise tam kanda sıvı-sıvı özütlenme ile 5-250 ng/mL doğrusal aralıkta %85,5-96,6 geri kazanım elde edilmiştir.

İdrar gibi biyolojik materyaller oldukça karmaşık yapıdadırlar. Genellikle ilgili analit ile girişim yapabilen protein, tuz, asit, baz, çeşitli organik bileşikler gibi maddeler içerirler. Örnek hazırlama, genellikle katı faz ekstraksiyon veya sıvı-sıvı ekstraksiyon, bazen de türevlendirme şeklinde yapılmaktadır. Ayrıca giderek çok düşük tayin limitlerine sahip, basit, ucuz, hızlı analitik yöntemlere eğilim artmaktadır (Bosch, M.E., ve ark. 2008). Biz de çalışmamızda günümüz teknolojisi ile uyumlu ve analitik cihazların en hassas, hızlı ve tekrar edilebilir olanlarından biri olan LC-MS/MS sistemini kullanarak, dünya çapında yapılan araştırmalar ile eşdeğer hassasiyette ve düşük ölçüm limitlerine ulaşan bir analiz yöntemi geliştirdik.

Theisen, F.M. ve ark. (2006) çocuk ve adolesanlarla yaptığı bir çalışmada kanda Olanzapin konsantrasyon/doz (C/D) oranı 0,8-5,5 aralığında ortalama 2.6 ng/mL (n=122) bulunmuştur (Theisen, F.M. ve ark., 2006). Bizim çalışmamızda ise bu aralık 0,29-9,4 arasındadır ve ortalama 3,25 ng/mL (n=20) bulunmuştur. İdrarda ise bu aralık 1,07-70,0 arasındadır ve ortalama 19,23 ng/mL bulunmuştur (n=20). Theisen, F.A. ve ark.'nın (2006) çalışması ile karşılaştırıldığında, bizim çalışmamızın ortalaması ve bulunan C/D aralığı daha yüksektir. Bu farkın, seçilen hasta grubunun genetik mutasyonlarından ya da ekspresyon hızlarından

kaynaklanacağı gibi; psikiyatrik hastalık durumundan, yaş grubundan veya OLZ'ye eşlik eden diğer ilaç terapilerinden de kaynaklanabilir olduğu kanısındayız. Zira OLZ tekli terapi ile karşılaştırıldığında OLZ'ye eşlik eden diğer ilaçlarla tedavi edilen hastalarda C/D oranının %38 daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Theisen, F.M. ve ark., 2006).

Zhou, Z. ve ark. (2004) plazmada yaptıkları çalışmada LC-MS/ESI ile; olanzapin için 0,4 ng/mL, risperidon için 1,0 ng/mL LOD tayin etmişlerdir. Bu çalışmada olanzapinin geri kazanımının ve hassasiyetin artırılması için özütlemenin iki basamakta yapılması gerekliliğinden bahsedilmiştir. Ayrıca Olanzapinin saklama koşullarına karşı stabilitesinin değişken olduğunu bildirmişlerdir. Oda sıcaklığında kalması olanzapinin stabilitesini büyük ölçüde etkilemektedir (Zhou, Z. ve ark., 2004).

Saar, V. ve ark. (2009) LC-MS/MS ile yaptıkları çalışmada kanda 19 antipsikotikğin belirlenmesi için, sıvı-sıvı ve katı faz özütleme yöntemlerinin etkinliğini karşılaştırmışlar ve üç ayrı set çalışma yapmışlardır. Birinci sette, standart etken maddeleri; ikinci sette, etken madde içermeyen kanı özütleyip, özütü standart madde ile alarak (matriks etkisini göstermek için); üçüncü sette ise etken madde içermeyen kanı standart madde ile kirletip sonra özütleyerek (özütleme etkinliğini göstermek için) çalışmışlardır. İkinci setin sonuçlarını ilk setin sonuçlarına göre değerlendirerek matriks etkisini ortaya koymuşlar, üçüncü setin sonuçlarını ise ikinci setin sonuçlarına göre değerlendirerek özütleme etkinliğini göstermişlerdir. Bu çalışmada ayrıca, etil asetatın kullanıldığı özütleme prosedüründe, olanzapinin matriks etkisinin oldukça yüksek olduğunu

bulmuşlardır (Saar, V. ve ark, 2009). Bizim çalışmamızda OLZ maddesinin kandaki LOD değeri 0,27 iken idrardaki 0,06 ng/mL; RSP maddesinin kandaki ve idrardaki LOD değerleri 0,006 ng/mL olarak bulundu. Elde ettiğimiz bu değerlerin hassasiyetinin, matriks etkisini ortadan kaldırmak üzere yaptığımız çalışmalar nedeniyle sağlandığı kanısındayız.

Uluslar arası rehberlere göre LC-MS yöntem validasyonunun en önemli parçası, özütleme etkinliğinin ve matriks etkisinin belirlenmesidir. Tuz içeriği yüksek çözeltilerin özütleme öncesi kana katılması, yüksek tuz içeriği etken maddenin kanda çözünmesini azalttığından, özütleme etkinliğini arttırmaktadır. Bu durum, kısmen lipofilik ilaçların, organik faza geçmesini kolaylaştırır ve böylece özütleme etkinliği artmış olur. Antipsikotik ilaçlar genellikle bazik özellik gösterdiğinden ve bazik pH, ilaçların kandaki çözünürlüğünü azaltarak organik faza geçmesini sağladığından, bu maddelerin sıvı-sıvı özütlemesi için kan, genellikle hafif bazik pH'ya getirilir (Saar, V. ve ark., 2009).

Biz de çalışmamızın özütleme aşamasında iki basamaklı bir yöntem uyguladık, pH'yı bazik hale getirerek ve ortamdaki tuz oranını arttırarak özütleme etkinliğini arttırdık. Özütleme çalışmaları sırasında karşılaştığımız en büyük sorunlardan biri ise OLZ pikinde kısmi bozulma gözlenmesiydi. Bu sorunu ortadan kaldırmak için özütlemenin ikinci basamağında yeniden pH kontrolü yaparak uygun pH ayarlaması gerçekleştirdik ve bu sayede problemi çözmüş olduk.

Clozapine, Olanzapine, Risperidone ve Quetiapinin plazmada birlikte tayin edildiği bir LC-MS/ESI yöntemi iki basamaklı eter özütlemesi ile gerçekleştirilmiş ve ortalama %80 geri kazanım elde edilmiştir. LOD değerleri

ise, Olanzapin 0,4 ng/mL, Risperidon için 0,3 ng/mL bulunmuştur (Zhou, Z., ve ark., 2004). Bizim çalışmamızda ise kanda geri kazanım Olanzapin ve Risperidon için sırasıyla ortalama %94 ve %104 bulunmuştur.

Ayrıca çalışmamızda iç standart tekniği kullanılarak; yüksek kesinlik elde edilmiş ve numune enjeksiyonu, akış hızı ve kolon şartlarındaki değişmelerle oluşan belirsizlikler en aza indirilmiştir.

Avustralya'da 2002-2008 yılları arasında yapılan bir çalışmaya göre, bu yıllar arasındaki 1123 ölümden 381'inin ilaca bağlı ölüm; 28'inin ise doğrudan serotonin toksisitesi ile ilişkili ölüm olduğu tespit edilmiştir. Bu ilaçlar arasında tramadol, sertralin, fluoksetin, paroksetin, sitalopram, venlafaksin ve MDMA bulunmaktadır (Pilgrim, J.L. ve ark., 2010). Serotonin toksisitesine neden olan bu ilaçların CYP2D6 ile metabolize ediliyor olması, bu olguların PM olup olmadıkları sorusunu akıllara getirmektedir.

Nortriptilin tedavisi gören 36 geriatri hastasında oligonükleotid mikroarray yöntemi ile CYP2D6 aktivitesini etkileyen 16 allel belirlenmiştir. Bozulmuş CYP2D6 aktivitesine sebep olan alleleri taşıyan hastaların, kandaki nortriptilin düzeylerinin anlamlı olarak yüksek olduğunu ve bu hastaların diğerlerine oranla daha düşük dozda ilaç aldıklarını bildirmişler. Birim doz başına düşen nortriptilin plazma konsantrasyonu ile kusurlu CYP2D6 alleleri arasında da anlamlı korelasyon bulunmuştur (Murphy, G.M. ve ark., 2001).

Çalışmamızda CYP2D6*4 alleli taşıyan ve taşımayan hastaların kan ve idrarlarındaki doz başına düşen OLZ ve RSP etken maddelerinin konsantrasyonlarının ayrı ayrı ortalamalarını karşılaştırdık. Her iki madde için de

kanda ve idrarda anlamlı fark bulmamış olsak da aralarındaki fark dikkate değerdir. OLZ/D değerleri CYP2D6*4 alleli taşıyan hastalarda taşımayanlara oranla daha yüksektir. Bu da OLZ etken maddesinin daha yavaş metabolize edildiği anlamına gelmektedir. Metabolit/etken madde oranı kurduğumuz PLP/RSP için ise durum tam tersidir. Yani CYP2D6*4 alleli taşıyan hastalarda metabolit oranlarının etken maddeye göre daha düşük olması, RSP etken maddesinin bu hastalarda daha yavaş metabolize edildiği ve kanda veya idrarda PLP maddesinin daha düşük düzeyde olması anlamına gelmektedir. Aralarındaki farkın anlamlı olmayışının nedeni hasta sayısının sınırlı olmasından kaynaklanabilir.

Herken, H. ve ark. (2001) Türk hastalara CYP2D6 enzimiyle metabolize edilen antipsikotik ve antidepresan veya bu enzimce metabolize edilen herhangi bir ilaç verildiğinde hastaların yaklaşık %10'unda etkili kan düzeyi elde edilemeyeceğini ve %1-2 hastada kan düzeylerinin aşırı yükselmesine bağlı olarak şiddetli yan etki görülebileceğini bildirmektedir. Antipsikotik ve antidepresanların kullanılmasından önce bir bireyin CYP2D6 enzim aktivitesinin tayin edilmesinin etki ve yan etkilerin öngörülebilmesi bakımından yararlı olacağını savunmaktadır (Herken, H. ve ark., 2001). Çalışmamızın sonucuna göre CYP2D6 ile metabolize edilen antipsikotik ve antidepresan ilaç kullanan psikiyatrik hastaların %15'inin en az bir PM allel taşıdığı düşünüldüğünde hastaların advers etki gösterme ihtimalinin daha da yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum, özellikli bir grup olan psikiyatrik hastaların kısa veya uzun vadede kullandıkları bu ilaçlardan olumsuz etkilenebileceklerini, eşzamanlı aldıkları diğer ilaç etken maddeler nedeni ile zarar görebileceklerini gözler önüne sermektedir. Ayrıca gen kopya

sayılarından elde ettiğimiz sonuçlardan, hastaların en az %20'sinin CYP2D6 gen ekspresyonlarının yüksek olduğu düşünüldüğünde, bu hastalarda etkin doza ulaşamayacağından tedavi sürelerinin uzaması ya da bir önilaç (pro-drug) almaları durumunda aktif metabolitin yan etkilerine maruz kalmaları söz konusu olacaktır.

Yaptığımız literatür araştırmasında, ülkemizde ve dünyada psikiyatrik hastaların CYP2D6 gen kopya sayılarını, CYP2D6*3 ve *4 allelerini ve bu enzim tarafından metabolize edilen ilaçların ve metabolitlerinin biyolojik örneklerdeki konsantrasyonlarını bir arada değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız bu anlamda oldukça geniş kapsamlıdır ve benzer araştırmalar için öncü olacaktır.

Çalışmamızın sekonder hedeflerinden biri de farmakovijilans çalışmaları hususunda bilgi edinilmesi idi. Ancak bu hedef açısından, bu çalışmada yok denecek kadar az sayıda bilgi edinilmiştir. Psikiyatri servislerinin kalabalık ve yoğun oluşu, klinisyen ve hemşire başına düşen hasta sayısının çokluğu ve en önemlisi klinisyen ve hemşirelerin bu konu hakkında yetersiz kayıt almaları nedeni ile hastaların hiçbirinin ilaçlara gösterdikleri yanıtlar, yan etkiler, toksik etkiler vb. hakkında bilgi edinilememiştir. Bu da ülkemizde yaygınlaştırılmaya çalışılan farmakovijilans hakkında klinisyen, hemşire ve hasta düzeyinde daha fazla farkındalık oluşturulması gerektiği fikrini akıllara getirmektedir.

Kişiler arası genetik farklılıkların her türlü ksenobiyotik metabolizasyonunda primer rol oynadığı gerçeği düşünüldüğünde, farmakogenetik çalışmaların, sağlık ile ilgili tetkiklerin arasında yer alması gerektiği kanısındayız. Her bir bireyin,

önemli ilaç etken maddelerini metabolize eden enzimleri hakkında genetik bilgi ve belgeye sahip olmaları, kişileri yaşamları boyunca advers etkilerden uzak tutacak, etkin tedaviye olanak tanıyacak bir kanıt olacaktır.

Riccardi, L.N. ve ark. (2009), CYP2D6 enziminin pek çok ilaç gibi pestisitleri de metabolize ettiğine ve zayıf metabolizörlerde pestisit maruziyetine bağlı olarak Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların görülebilme riskinin varlığına dikkat çekerek CYP2D6 polimorfizminin sadece bireysel tedavide değil, meslek hastalıkları alanında da önemli olduğunu vurgulamıştır (Riccardi, L.N. ve ark., 2009).

Farmakogenetik analizler; adli düzenlemeler ve özellikle post-mortem toksikoloji alanlarında günlük rutin analizlerin beraberinde yapılabilecek yeni bir analiz parametresi olarak ortaya çıkmaktadır. Bu yüzden adli toksikolojik analizlerin beraberinde, moleküler analizlerin de geliştirilebilmesi, yeni bir yaklaşım olacaktır. Özellikle post-mortem olgularda, makroskopik ve mikroskopik incelemelerin yanında farmakogenetik araştırmalar modern medikolegal incelemelerin bir parçası haline gelebilir. Dolayısı ile “moleküler otopsi”nin gelecekte adli tıp ve adli bilimler alanında yerini alacağı düşünülmektedir (Musshoff, F. ve ark. 2010). Bu konunun ülkemizde de yönetmelik ve uygulama düzeyinde ele alınması gerektiği kanaatindeyiz.

Bu sayede, hem klinikte rutin tedavi sürecinde kullanılan ilaç dozlarının sebep olabileceği adli olguların sayısının, hem de nedeni bilinmeyen post-mortem olgularının sayısının önemli ölçüde azalacağı düşünülmektedir. (Ingelman-

Sundberg, M., 2005; Jenkins, A.J. ve ark., 2009; Marsh, S., 2008; Bondy, B. ve Spellman, I., 2007).

Öte yandan adli bilimler alanında farmakogenetik biliminin daha yaygın şekilde bilinir ve uygulanabilir olması için bazı girişimlerde bulunulması gerektiğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda yer verdiğimiz ve adli bilimleri yakından ilgilendiren yan etkiler, toksik reaksiyonlar, ilaç etkileşimleri, zehirlenmeler, enzim inhibisyonu-indüksiyonu vb. konular düşünüldüğünde otopsi bulgularının ve toksikolojik bulguların yanında farmakogenetik analizlerin de yer alması gerektiği kanaatindeyiz. Böylelikle toksikolojik analizleri ve otopsi bulguları örtüşmeyen yahut anlamlı bir neticeye varılamayan durumlarda, genetik farklılığın varlığının gözden kaçmaması gereken olgular atlanmamış olacaktır. Öte yandan kişinin genetik farklılığı nedeni ile, tedavi dozuna gösterdiği toksik reaksiyon sonucu karşılaştığı ve hekim hatası olarak değerlendirilen, ölüme kadar varabilen advers etkilerin aslında bir malpraktis sonucu değil genetik mutasyon kaynaklı olduğu düşünüldüğünde, konunun mesleki adli olgulara da ışık tutması olasıdır. Bir diğer konu ise uzun süreli ilaç kullanımlarında, enzim polimorfizmine bağlı olarak gelişen advers etkilerin kronik birtakım hastalıklara (Tardif diskinezi, Parkinsonizm gibi) yol açmasıdır ve bu durum çalışmamızın adli bilimlerdeki önemini yanı sıra, klinik önemini de bir kat daha arttırmaktadır.

6. SONUÇ

Yaptığımız çalışmada; Olanzapin, Sertralin ve Risperidon etken maddelerinden en az birini kullanmakta olan psikiyatrik hastaların CYP2D6 enzimlerinin gen kopya sayılarını kontrol grubu ile birlikte TaqMan RT-PCR yöntemi ile belirledik; yine bu hastaların CYP2D6 genlerinin ülkemizde ve pek çok popülasyonda en sık rastlanan polimorfik allelerini (CYP2D6*3 ve *4) belirledik ve bu hastaların kan ve idrarlarındaki ilaç etken maddelerinin miktarlarını LC-MS/MS sistemi ile tayin ettik. Elde ettiğimiz bulguları hem ayrı ayrı hem de bir bütün şeklinde değerlendirerek çoğunluğu psikoz ve şizofreni tanısı alan hastaların CYP2D6 gen polimorfizminin kontrol grubuna göre farklılık gösterdiğini tespit ettik. Tüm hastaların etken maddelerinin kanda kararlı durum konsantrasyonlarda olmasına rağmen; konsantrasyon/doz oranısından elde edilen sonuçların geniş bir aralıkta olduğunu tespit ettik. Bu farklılığın nedenlerinden birinin genetik farklılık olduğunu yaptığımız çalışmalarla doğrulamış olduk.

Ülkemizde CYP2D6 gen kopya sayılarını, CYP2D6*3 ve *4 allelerini ve psikiyatrik hastaların kan ve idrarlarındaki ilaç ve metabolit miktarlarını aynı anda değerlendiren herhangi bir çalışma bulunmadığından; bu çalışma ile farmakogenetik biliminin adli bilimler ve klinik toksikoloji alanına girmesi gerekliliğini vurgulamış olduk.

Tüm alanlarda hızla gelişmekte olan moleküler çalışmalar günümüzde vazgeçilmez bir araç olmuştur. Tam kan ile yaptığımız OLZ, RSP, PLP ve SRT etken maddelerinin miktar tayini yönteminin bozulmamış post-mortem kan örneklerine de uygulanabileceği kanısındayız. Ayrıca LC-MS/MS sisteminin idrar

ve kan gibi biyolojik örneklerdeki ilaç etken maddelerini yan yana tayin etmede oldukça hızlı, hassas ve tekrar edilebilir bir sistem olduğunu; kullandığımız özütleme ve analiz yöntemlerinin ise oldukça hassas, doğru, hızlı ve ucuz yöntemler olduğunu, gen kopya sayısının belirlenmesi için kullandığımız TaqMan RT-PCR yönteminin de oldukça hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu düşünmekteyiz. Zira elde ettiğimiz CYP2D6*3 ve *4 allellerinin polimorfizmleri ve ilaç etken maddelerinin miktarları ile yaptığımız karşılaştırmalı değerlendirme sonucunda, birkaç sapma hariç, kullandığımız yöntemlerin birbirleri ile tutarlı, güvenilir ve yüksek doğrulukta olduğunu gördük.

Ülkemizde ortalama %5 polimorfik olduğu bilinen CYP2D6*4 allelinin yaptığımız çalışma ile belirlenen psikiyatrik hastalarda %15 gibi bir polimorfizme sahip olması özel popülasyonlarda (şizofrenik hastalar, kanser hastaları, yaşlılar, çocuklar vb.) ilaç metabolize eden enzimlerin polimorfizmlerinin önemini bir kez daha vurgulamaktadır. CYP2D6 gibi pek çok ilacın metabolizasyonunda sorumlu olan ve oldukça polimorfik olan enzimlerin özel popülasyonlardaki polimorfizmlerinin belirlenmesi için daha fazla çalışma yapılması gerektiği kanısındayız. Bu çalışmaların sonunda, ülkemizdeki özel popülasyonların farmakovijilans çalışmalarına daha fazla zaman ayrılması gerektiği kanısına vardık. Bu konuda sağlık mensuplarının bilinçlendirilmesi gerekmektedir. Genetik farklılıklardan kaynaklanan ciddi advers ilaç etkileri sonucunda meydana gelen ölümler göz ardı edilemeyeceğinden, bu çalışmanın adli bilimlere, “**farmakogenetik**” açısından yeni bir alan açmış olduğu kanısındayız. Dünyada yapılan çalışmalar gelecekte otopsilerin de moleküler düzeye ineceği yönünde olduğundan, farmakonetiğin diğer birçok bilim dalında olduğu gibi adli bilimlerin

bir parçası olması gerektiği kanısındayız. Nedeni belirlenemeyen ölümlerin aydınlanması; hekim hatası olarak algılanan, ilaç dozunun yetersiz ya da fazla olması nedeniyle meydana gelen, ancak hastanın genetik farklılığından kaynaklanan olguların aydınlatılması gibi durumlar farmakogenetiğin adli bilimlerdeki önemini vurgulamak için sadece birkaç örnektir.

CYP2D6 enziminin Türk popülasyonundaki polimorfizmini tespit etmek ve uygulanan dozların yeniden gözden geçirilmesini sağlamak, daha hızlı, etkin ve ucuz tedaviye katkı sağlayacak ve kişiler arası farklılıkların neden olduğu ve ölüme kadar varabilen advers etkiler azalmış olacaktır.

Farmakogenetik profilin incelenmesinin, psikiyatrik hastaların tedavi seçiminde ve sürecinde, advers etkinin en aza indirilmesinde faydalı olacağı açıktır. Yapılacak testler hastaya yaşamı boyunca uygulanacak ilaç terapisinin yolunu çizecek, deneme yanılma yöntemi ile uygun ilaç seçimi yöntemine başvurulmayacak, tamamen somut verilerle hareket edilecektir. Böylelikle hem zaman kaybı hem de bu sürecin beraberinde gelen masraflar en aza indirilecektir. Yapılacak olan farmakogenetik testlerin maliyeti ise; advers etkinin, başarısız tedavi sürecinin, pek çok uygun ilaç denemelerinin ve tetkiklerin, hatta ölümlerle sonuçlanabilecek durumların yanında önemini yitirecektir.

7. ÖZET

İlaçlar ile tedavi yüzyıllardır uygulanmakta olan bir yöntemdir. Ancak her insanın ilaçlara verdiği yanıt birbiri ile aynı değildir ve yanıtların değişkenliği advers ilaç etkisi şeklinde ya da ölüme kadar varabilen daha ciddi toksik reaksiyonlar şeklinde sonuçlanabilir. Bireyler ve toplumlar arası farklılıklar kişilerin yaş, beslenme, cinsiyet, eş zamanlı ilaç kullanımı ve fizyolojik durumuna bağlı olduğu kadar; ilaç etken maddelerini metabolize eden enzimlerin gen düzeyindeki farklılığına da bağlıdır.

Çalışmanın amacı, CYP2D6 enzimi ile metabolize edilen risperidon, olanzapin ve sertralin ilaç etken maddelerini kullanan psikiyatrik hastaları; CYP2D6 gen kopya sayıları, CYP2D6*3 ve *4 tek nükleotid polimorfizmi, idrar ve kandaki madde ve metabolit konsantrasyonları yönünden inceleyerek farmakogenetiğin adli bilimlerle olan ilişkisini ortaya koymaktır.

Bu çalışmada, 77 kişiden oluşan psikiyatrik hasta grubu ve 38 gönüllü kişiden oluşan kontrol grubu ile çalışıldı. Çalışmanın genetik basamakları olan gen kopya sayısının belirlenmesi ve allel polimorfizminin tayini Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile; kanda ve idrardaki ilaç ve metabolit düzeyi tayini ise Sıvı Kromatografi-Ardışık Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) sistemi ile gerçekleştirildi.

Elde edilen bulgulara göre, hasta ve kontrol grubunda CYP2D6*3 allel frekansları eşit iken (0,01); CYP2D6*4 için hasta frekansı 0,15 ve kontrol grubu için 0,04'tür. Her iki grubun *4 için gözlenen frekansları Hardy Weinberg eşitliğine göre farklı bulundu (Ki-Kare testi $p < 0,05$). 77 hastadan 21'inin CYP2D6*4 için

en az bir mutant allel taşıdığı saptandı. Bunlardan yalnızca 2 hastanın homozigot mutant (*4/*4) olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise CYP2D6*4 için mutant allel taşıyanların sayısının 3 olduğu ve hepsinin heterozigot olduğu tespit edildi. CYP2D6*3 için ne hasta grubunda ne de kontrol grubunda homozigot mutant (*3/*3) bireye rastlanmadı; her iki grupta da heterozigot genotipler (*3/wt) olduğu saptandı. Ki-Kare (X^2) testinin sonuçlarına göre hastalar ile kontrol grubu arasında allel *4'ün genotip frekanslarında %90 güven aralığında anlamlı fark tespit edildi; ($p<0,1$); allel *3'ün genotip frekanslarında anlamlı fark tespit edilmedi ($p=0,873$).

Gen ekspresyonu için yapılan DNA miktar tayini bulguları (Cp), $R= 2^{-\Delta\Delta C_p}$ formülünde, iç referans gen olan Albümine göre hesaplanarak bağıl gen oranları tayin edildi. Hasta ve kontrol grubunun ekson 9 için gen kopya sayıları arasındaki fark anlamlı ($p<0,05$) bulundu (sd=102). İntron 6 için gen kopya sayıları arasındaki farkın ise anlamlı olmadığı ($p=0,376$) bulundu (sd=102). İntron 6 ve ekson 9 bölgelerinden elde edilen gen kopya sayıları arasında anlamlı korelasyon tespit edildi ($p<0,05$).

LC-MS/MS sistemi ile kanda ve idrarda Sertralin, Olanzapin, Risperidon ve Paliperidon için yapılan miktar tayini yönteminde Reboksetin iç standart olarak kullanıldı. Tüm analitler için yöntemin, idrarda ve kanda doğrusal olduğu gözlemlendi ($r>0,999$). LOD değerleri; Sertralin için, kanda 3,59 ng/mL, idrarda 3,54 ng/mL; Olanzapin için kanda 0,27 ng/mL, idrarda 0,06 ng/mL; Risperidon için kanda ve idrarda 0,006 ng/mL, Paliperidon için kanda 0,019 ng/mL, idrarda 0,012 mg/mL bulundu. Kan ve idrardaki geri kazanım yüzdeleri; Sertralin için %85,5-109,6 arasında; Olanzapin için %80,45-107,9 arasında; Risperidon için %86,6-105,0 arasında; Paliperidon için %89,53-114,1 arasında bulundu ve tüm

maddelerin gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlikleri $\leq 13,94$ (%CV); doğruluk (% hata) çalışmasının sonuçları 0,78-14,86 arasında bulundu. Hastaların kan ve idrarlarındaki etken maddeler hastaların aldıkları günlük dozdan bağımsız olarak (konsantrasyon/doz) hesaplanarak değerlendirildi. Risperidon'un metaboliti olan Paliperidon'un konsantrasyonu Risperidon konsantrasyonuna bölünerek, aralarındaki orantı gen aktivitesi yönünden incelendi.

Sonuç olarak psikiyatrik hastaların CYP2D6*4 allel frekansı kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulundu. Ayrıca *4 alleli taşıyan hastaların kan ve idrarlarındaki olanzapin konsantrasyonunun *4 alleli taşımayanlara oranla daha yüksek olduğu; aynı şekilde Paliperidon/Risperidon oranının, *3 veya *4 mutasyonu olan hastaların kan ve idrarında daha düşük; normal metabolizörlerde ise daha yüksek olduğu görüldü.

Psikiyatrik hastalar oldukça uzun süren tedavi süreçleri ve eşzamanlı olarak aldıkları birçok antipsikotik ve antidepresan ilaç nedeni ile gerek adli bilimler gerekse farmakogenetik açıdan özel bir gruptur. Bireyler ve toplumlar arası farklılık günümüzde, bireye ve popülasyonlara özgü tedavi anlayışını gündeme getirmiştir. Çalışmamızın sonuçları bu gerçeği bir kez daha vurgulamıştır. Farmakogenetik araştırmalar sadece klinik yönden değil; adli bilimler yönünden de değerlendirilmesi gereken, bir alandır. Bireye ait farmakogenetik bilgi postmortem bulguların yorumlanmasını kolaylaştırabilir ve "Toksikolojik bulmaca"nın çözülmesine katkıda bulunabilir. Farmakogenetik biliminin adli bilimlerde uygulamaya girmesi gerektiği ve bunun için ülkemizde post-mortem düzeyde pilot bir çalışmaya ihtiyaç olduğu kanısındayız.

8. SUMMARY

Drug therapy method has been practiced for centuries. However responses to drug are variable for each individual and variation of responses may cause to adverse drug reactions or severe toxic reactions even that can lead to death. Differences inter- individuals and populations due to the polymorphism of drug metabolising enzymes as well as age, gender, nutrition, co-medication and physiological conditions.

The aim of the study was to determine CYP2D6 gene copy numbers and CYP2D6*3 ve *4 single nucleotide polymorphisms of psychiatric patients medicated by risperidone, olanzapine and sertraline active substances which metabolize by CYP2D6 enzyme and also to quantitate the concentrations of these drugs and their metabolites in urine and blood. By this way we aimed to emphasize the importance of the relationship of pharmacogenetic with forensic sciences.

This study consisted of 77 psychiatric patients and 38 control group. Genetic analysis parts of the study, such as determination of gene copy number and allele polymorphism were analyzed by Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) method, also quantitation of drug and metabolite levels in blood and urine were analyzed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) system.

According to obtained results, while CYP2D6*3 allele frequencies were identical for both patient and control group (0.01); CYP2D6*4 allele frequencies were 0.15 for patient and 0.04 for control group. According to Hardy Weinberg equilibrium,

the observed frequencies for allele *4 between groups were found statistically different (Chi-square test $p < 0,05$). It was determined that 21 of 77 patients had at least one mutant *4 allele. Only two of them were seen as homozygote mutant (*4/*4). It is also determined in control group that only 3 volunteers had mutant *4 allele and all were heterozygote. No homozygote mutant *3 allele were seen neither for patient nor control group; but heterozygote genotypes (*3/wt) were determined in both groups. According to the Chi-square test results; statistically significant difference with 90% confidence interval found for *4 genotype frequencies between groups ($p < 0,1$); but not for *3 genotype frequencies ($p = 0,873$).

DNA quantitation results (Cp) that analyzed for gene expression calculated with the formula of $R = 2^{-\Delta\Delta C_p}$ according to Albumin internal reference gene and gene ratios were determined. Gene copy numbers for Exon 9 between two groups were found statistically different ($p < 0,05$) (df=102), but not for Intron 6 ($p = 0,376$) (df=102). Difference between Exon 9 and Intron 6 for patients' gene copy number were statistically correlated ($p < 0,05$).

Sertraline, Olanzapine, Risperidone and Paliperidone quantitation from blood and urine by LC-MS/MS, Reboxetine were used as internal Standard. The method were found linear in blood and urine for all analytes ($r > 0,999$). LOD values were; 3,59 ng/mL in blood, 3,54 ng/mL in urine for Sertraline; 0,27 ng/mL in blood, 0,06 ng/mL in urine for Olanzapine; 0,006 ng/mL in blood and urine for Risperidone, 0,019 ng/mL in blood, 0,012 mg/mL in urine for Paliperidone. Recoveries in blood and urine were founded between 85,5-109,6% for Sertraline; 80,45-107,9% for Olanzapin; 86,6-105,0% for Risperidone; 89,53-114,1% for

Paliperidone. Inter and intra day repeatability for all analytes were $\leq 13,94$ (CV%); accuracy (Bias%) were between 0,78-14,86. Drug levels in blood and urine were interpreted by calculating independently from daily doses received by the patient (concentration/dose). Paliperidone (Metabolite of Risperidone) concentrations were divided to the concentration of Risperidone and evaluated in terms of gene activity.

As a result, CYP2D6*4 allele frequency of the psychiatric patients was found significantly higher than control group. In addition, concentration of olanzapine in blood and urine of the patients which had *4 allele were observed higher than the patients which had not *4 allele. Likewise it was concluded that Paliperidone/Risperidone ratio was lower in blood and urine samples of the patients with *3 and *4 mutation, but higher in normal metabolizers.

Since the psychiatric patients have long-lasting treatment process and receive many antipsychotic and antidepressant drugs simultaneously, they are special population both in forensic science and pharmacogenetic aspects. Recently, the differences between individuals and populations were brought into question understanding of specific treatment for the individual and populations. Results of our study was emphasized the fact that once. Pharmacogenetic research is field, which should be assessed not only in the clinical aspects but also in terms of forensic sciences. Additional information about an individual's pharmacogenetics may possibly facilitate the interpretation of the post-mortem result and contribute to solve the "toxicological puzzle". We believe that it is essential that the pharmacogenetics is needed to practice into forensic science and a pilot study with post-mortem levels to do so.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı: Selda Mercan
Doğum yeri, tarihi: İstanbul, 06.04.1980
Telefon: 212 414 30 00 / 22839
İş Adresi : İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, 34303, Cerrahpaşa – İstanbul
e-posta: mercans@istanbul.edu.tr
Yabancı Dil: İngilizce
Kullandığı programlar: MS Ofis 2007, SPSS 17.0,



EĞİTİM DURUMU

Doktora: İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, 2007-
Yüksek Lisans: İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, 2003-2006
Tez Konusu: Opiat bağımlılarında CYP450 2D6*3,*4,*5 ve *6 alellerinin tek nükleotid polimorfizmi (Danışman. Doç.Dr. Münevver Açikkol)
Lisans : İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 2003
Lise: İstanbul Şehremini Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi, 1999

İŞ DENEYİMİ

Araştırma Görevlisi: İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, Aralık 2005 - devam

BİLİMSEL FAALİYETLER

Kitap Bölüm Yazarlığı

Münevver Acikkol, **Selda Mercan**, Neylan Ziyalar, A Forensic and Social Approach to Drug Facilitated Crimes, Ed. Alexander D. Morina, Crime Rates, Types and Hot Spots, Nova Publishers, 2011, New York (ISBN:978-1-61324-682-5)

Uluslar Arası Yayınlar

Acikkol M, Semen S, Turkmen Z, **Mercan S**; Determination of α -Cypermethrin from Soil by Using HPTLC, *Journal of Planar Chromatography*, 25, 2012, 48–53.

Acikkol M, **Mercan S**; CYP2D6 Polymorphism of Opiate Addicts and Contributions to Forensic Sciences, *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 31(6), 2011, 1418-1424.

Acikkol M, **Mercan S**, Karadayi S; Simultaneous Determination of Benzodiazepines and Ketamine from Alcoholic and Nonalcoholic Beverages by GC-MS in Drug Facilitated Crimes; *Chromatographia* 70, 2009, 1295-1298.

Ulusal Yayınlar

Türkmen Z, **Mercan S**, Ziyalar N; Cinsel Suçluların Islahında Güncel Bir Yöntem: Kimyasal Kastrasyon; *Suç ve Ceza - Ceza Hukuku Dergisi*, 3, 2008, 142-149.

Türkmen Z, **Mercan S**, Cengiz S; Eroin, Morfin, Kokain Ve MDMA'nın Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi İle Eşzamanlı Tayini, *Adli Tıp Dergisi Journal of Forensic Medicine*, 22(1), 2008, 13-24.

Ödüller: İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından, yaptığı yüksek lisans tezi ile, Sağlık Bilimleri Alanında “Yılın Bilim İnsanı Ödülü” ne layık görüldü (2006).

10. KAYNAKLAR

Açikkol, M., Mercan, S. (2011) CYP2D6 Polymorphism of Opiate Addicts and Contributions to Forensic Sciences, *Turkiye Klinikleri J. Med. Sci.*, 31: 1418-1424.

Aichhorn, W., Weiss, U., Marksteiner, J., Kemmler, G., Walch, T., Zernig, G., Stelzig-Schoeler, R., Stuppaeck, C., Geretsegger, C. (2005) Influence of age and gender on risperidone plasma concentrations, *J. Psychopharmacol.*, 19 (4) : 395-401.

Andreassen, O.A., MacEwan, T., Gulbrandsen, A.K., McCreadie, R.G., Steen, V.M. (1997) Non-functional CYP2D6 alleles and risk for neuroleptic-induced movement disorders in schizophrenic patients, *Psychopharmacology*, 131 (2) : 174-9.

Ardrey, R.E., 2003, *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, England

Arıcioğlu, F. ve Çetin, M., (2010) Psikiyatride bireye özgü tedavi: Belki biraz eski veya biraz yeni, ama geleceğin tedavisi. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 20 (4) : 269-273.

Arınç E. (2010) The role of polymorphic P450 enzymes in drug design, development and drug interactions with a special emphasis on phenotyping, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64 (3) : 120-122.

Arneth, B., Shams, M., Hiemke, C., Härtter, S. (2009) Rapid and reliable genotyping procedure for detection of alleles with mutations, deletion, or/and duplication of the CYP2D6 gene, *Clin Biochem.* 42 (12) : 1282-1290.

Aynacıoğlu, A.S., Sachse, C., Bozkurt, A., Kortunay, S., Nacak, M., Schröder, T. Kayaalp, S.O., Roots, I., and Brockmöller, J. (1999) Low frequency of defective alleles of cytochrome P450 enzymes 2C19 and 2D6 in the Turkish population, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 66(2) :185-192.

Aydin, M., Hatirnaz, O., Erensoy, N., Ozbek, U. (2005) CYP2D6 and CYP1A1 mutations in the Turkish population, *Cell Biochem Funct.*, 23: 133-135.

Begré, S., von Bardeleben, U., Ladewig, D., Jaquet-Rochat, S., Cosendai-Savary, L., Golay, K.P., Kosel, M., Baumann, P., Eap, C.B. (2002) Paroxetine increases steady-state concentrations of (R)-methadone in CYP2D6 extensive but not poor metabolizers, *J Clin Psychopharmacol.*, 22 (2) : 211-215.

Bertilsson, L., (2002) Clinicalrelevance of the CYP2D6 polymorphism for the treatment of psychiatric disorders, *International Congress Series*, 1244: 11–20.

Binbay, T., Ulaş, H., Elbi H., Alptekin, K. (2010) Türkiye’de Psikoz Epidemiyolojisi: Yaygınlık Tahminleri ve Başvuru Oranları Üzerine Sistemantik Bir Gözden Geçirme, *Klinik Psikiyatri Dergisi* 21: 1-14.

Bodin, L., Beaunei, P.H., Lorient, M.A. (2005) Determination of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) gene copy number by real-time quantitative PCR, *J Biomed Biotechnol.* 2005 (3) : 248-53.

Bondy, B. ve Spellmann, I. (2007) Antipsikotiklerin farmakogenetik özellikleri: klinisyen açısından yararlı mı? *Current Opinion in Psychiatry*, Türkçe Baskı Cilt 3, Sayı 2, s66-72.

Bosch, M.E., Sánchez, A.J., Rojas, F.S., Ojeda, C.B. (2008) Analytical methodologies for the determination of sertraline, *J Pharm Biomed Anal.* 48 (5) : 1290-302

Callaghan, J.T., Bergstrom, R.F., Ptak, L.R., Beasley, C.M. (1999) Olanzapine: pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, *Clin. Pharmacokinet.* 37(3) : 177-193.

Chiurillo, M.A., Grimán, P., Morán, Y., Camargo, M.E., Ramírez, J.L. (2009) Analysis of CYP2D6 gene variation in Venezuelan population: Implications for forensic toxicology, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2: 483-484.

Cody, R.B. (2002) Electrospray Ionization Mass Spectrometry History, Theory, and Instrumentation in: *Applied Electrospray Mass Spectrometry Practical Spectroscopy Series*, (Ed. Pramanik, B.N.), Cilt 32, CRC Press.

Coutts, R.T., Urichuk, L.J. (1999) Polymorphic Cytochromes P450 and drugs used in psychiatry, *Cellular and Molecular Neurobiology*, 19: 325-354.

Çiloğlu, E. (2008) Risperidon içeren preparatlarda kantitatif analiz yöntemleri, Yüksek Lisans Tezi, Analitik Kimya ABD, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi.

Daly, A.K., Brockmoller, J., Broly, F., Eichelbaum, M., Evans, W.E., Gonzalez, F.J., Huang, J.D., Idle, J.R., Ingelman-Sundberg, M., Ishizaki, T., Jacqz-Aigrain, E., Meyer, U.A., Nebert, D.W., Steen, V.M., Wolf, C.R., Zanger, U.M. (1996a) Nomenclature for human CYP2D6 alleles, *Pharmacogenetics*, 6: 193-201.

Daly, A.K. (2003) Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 17:27-41.

Demiray, G. (2008) İnsan Plazmasında Risperidon ve Aktif Metaboliti 9-Hidroksirisperidonun Miktar Tayini Ve Yöntem Validasyonu, *Farmasötik Kimya YL Tezi*, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi, Ankara.

Dieffenbach CW. ve Dveksler GS., (2003) *PCR Primer A Laboratory Manual*, 2th edt., Section 1, pp5-75, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Dorado, P., Berecz, R., Peñas-Lledó, E.M., Cáceres, M.C., Llerena, A. (2006) Clinical implications of CYP2D6 genetic polymorphism during treatment with antipsychotic drugs. *Curr. Drug. Targets*, 7: 1671-1680.

Edwards, I.R., Aronson, J.K. (2000) Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management, *Lancet.*, 356: 1255-1259.

Endrizzi, K., Fischer, J., Klein, K., Schwab, M., Nussler, A., Neuhaus, P., Eichelbaum, M., Zanger, U.M. (2002) Discriminative quantification of cytochrome P4502D6 and 2D7/8 pseudogene expression by TaqMan real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction, *Anal. Biochem.*, 300: 121-131.

Frost, J., Helland, A., Nordrum, I.S., Slørdal L. (2012) Investigation of morphine and morphine glucuronide levels and cytochrome P450 isoenzyme 2D6 genotype in codeine-related deaths, *Forensic Science International*, In Press, Corrected Proof, Available online 28 January 2012.

Gaedigk, A., Blum, M., Gaedigk, R., Eichelbaum, M., Meyer, U.A. (1991) Deletion of the entire cytochrome P450 CYP2D6 gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism, *Am. J. Hum. Genet.*, 48: 943-950.

Gaedigk, A., Gotschall, R.R., Forbes, N.S., Simon, S.D., Kearns, G.L., Leeder, J.S. (1999) Optimization of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) phenotype assignment using a genotyping algorithm based on allele frequency data, *Pharmacogenetics*, 9: 669-682.

Gasche, Y., Daali, Y., Fathi, M., Chiappe, A., Cottini, S., Dayer, P., Desmeules, J. (2004) Codeine intoxication associated with ultrarapid CYP2D6 metabolism, *N. Engl. J. Med.*, 351: 2827-2831.

Ginzinger, D.G. (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream, *Exp Hematol.* 30 (6): 503-512.

Grauwiler, S.B. (2008) Development and application of a LC-MS/MS method for the analysis of plasma bioavailabilities of different cannabinoids after the administration of "Cannabis sativa L." extracts and Marinol™, Doktora Tezi, University of Basel, Faculty of Science.

Hasler, J.A., Estabrook, R., Murray, M., Pikuleva, I., Waterman, M., Capdevila, J., Holla, V., Helvig, C., Falck, J.R., Farrell, G., Kaminsky, L.S., Spivack, S.D., Boitier, E., Beaune, P. (1999) Human Cytochromes P450, *Mol. Aspects. Med.* 20: 1-137.

Heim, M., Meyer, U.A. (1990) Genotyping of poor metabolisers of debrisoquine by allele-specific PCR amplification, *Lancet*, 336: 529-532.

Herken, H., Aynacıoğlu, Ş., Esgi, K., Vırt, O. (2001) Psikiyatri Hastalarında Sitokrom P450 2D6 Yavaş ve Ultra Hızlı Metabolizör Sıklıkları, *Türk Psikiyatri Dergisi*, 12(2): 83-88.

Ingelman-Sundberg, M., Oscarson, M., McLellan, R.A. (1999) Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment, *Trends Pharmacol. Sci.* 20: 342-349.

Ingelman-Sundberg, M. (2001) Genetic and environmental causes for interindividual variability in drug pharmacokinetics, *International Congress Series*, 1220: 175–186.

Ingelman-Sundberg, M. (2004) Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future, *Trends Pharmacol. Sci.* 25:193-200.

Ingelman-Sundberg, M. (2005) Genetic polymorphisms of cytochrome P4502D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity, *The Pharmacogenomics Journal*, 5 : 6-13.

Iwahashi, K. (2004) Olanzapine metabolism by CYP1A2/CYP2D6 and hyperglycaemia, *Acta Neuropsychiatrica*, 16: 229-230.

Jain, D.S., Sanyal, M., Subbaiah, G., Pande, U.C., Shrivastav, P. (2005) Rapid and sensitive method for the determination of sertraline in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), *Journal of Chromatography B*, 829: 1-166.

Jenkins, A.J., Lavins, E.S., Hunek, C. (2009) Prevalence of dihydrocodeine in hydrocodone positive postmortem specimens, *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 16 : 64-66.

Johansson, I., Lundqvist, E., Bertilsson, L., Dahl, M.L., Sjöqvist, F., Ingelman-Sundberg, M. (1993) Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 11825-11829.

Kalow, W. (2001) Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and pharmacobiology, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 70 : 1-4.

Kaplan, H.I., Sadock, B.J. (1998) Kaplan and Sadock's Synopsis of Psychiatry, (Kaplan, H.I., Sadock, B.J. Eds), 8. Baskı, 456-563 s, Lippincott Williams & Wilkins, New York.

Karamustafalıoğlu, N., Karaman, H.E., Alpay, N. (1997) Sitokrom P450 Enzimleri ve Psikotrop İlaçlar, *Bulletin of Clinical Psychopharmacology*, VII (1-4) : 5-9.

Kawanishi, C., Lundgren, S., Agren, H., Bertilsson, L. (2004) Increased incidence of CYP2D6 gene duplication in patients with persistent mood disorders: ultrarapid

metabolism of antidepressants as a cause of nonresponse. A pilot study, *Eur J Clin Pharmacol.* 59: 803-807.

Kimura, S., Umeno, M., Skoda, R.C., Meyer, U.A., Gonzalez, F.J. (1989) The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene, *Am. J. Hum. Genet.* 45: 889-904.

Kirchherr, H., Kühn-Velten, W.N. (2006) Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: a multi-level, single-sample approach, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 843:100-13.

Kobylecki, C.J., Jakobsen, K.D., Hansen, T., Jakobsen, I.V., Rasmussen, H.B., Werge, T. (2009) CYP2D6 genotype predicts antipsychotic side effects in schizophrenia inpatients: a retrospective matched case-control study, *Neuropsychobiology*, 59 (4) : 222-226.

Kocabas, N.A. (2012) Catechol-O-Methyltransferase (COMT) Pharmacogenetics in the Treatment Response Phenotypes of Major Depressive Disorder (MDD), *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, 12 Apr 4, In press.

Kopala, L.C., Day, C., Dillman, B., Gardner, D. (1998) A case of risperidone overdose in early schizophrenia: a review of potential complications, *J. Psychiatry. Neurosci.* 23 (5) : 305-8.

Koseler, A., Ilcol, Y.O., Ulus, I.H., (2007) Frequency of Mutated Allele CYP2D6*4 in the Turkish Population, *Pharmacology* 79: 203-206.

Koski, A., Sistonen, J., Ojanperä, I., Gergov, M., Vuori, E., Sajantila, A. (2006) CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and amitriptyline metabolite ratios in a series of medicolegal autopsies, *Forensic Sci Int.*, 158: 177-183.

Labbé, L., Sirois, C., Pilote, S., Arseneault, Robitaille, N.M., Turgeon, J., Hamelin, B.A. (2000) Effect of gender, sex hormones, time variables and physiological urinary pH on apparent CYP2D6 activity as assessed by metabolic ratios of marker substrates, *Pharmacogenetics*, 10: 425-438.

Leon, J., Armstrong, S.C., Cozza, K.L., (2006) Clinical Guidelines for Psychiatrists for the Use of Pharmacogenetic Testing for CYP450 2D6 and CYP450 2C19, *Psychosomatics*, 47: 75–85.

Leon, J., Wynn, G., Sandson, N. (2010) The Pharmacokinetics of Paliperidone Versus Risperidone, *Psychosomatics*, 51: 80-88.

Linda, S.W. Steijns and Jan Van Der Weide (1998) Ultrarapid drug metabolism: PCR-based detection of CYP2D6 gene duplication, *Clinical Chemistry*, 44(5): 914-917.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, 25 (4) : 402-408.

LLerena, A., Berecz, R., Dorado, P., de la Garza, C.S., Norberto, M.J., Cáceres, M., Gutiérrez, J.R. (2003) Determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by liquid chromatography: application to the evaluation of

CYP2D6 drug interactions, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 783:213-219.

Lovlie, R., Daly, A.K., Molven, A., Idle, J.R., Steen, V.M. (1996) Ultrarapid metabolizers of debrisoquine: characterization and PCR-based detection of alleles with duplication of the CYP2D6 gene, *FEBS Lett.*, 392: 30-34.

Marez, D., Legrand, M., Sabbagh, N., Guidice, J.M., Spire, C., Lafitte, J.J., Meyer, U.A., Broly, F. (1997) Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution, *Pharmacogenetics*, 7: 193-202.

Marsh, S. (2008) Pharmacogenetics: global clinical markers, *Pharmacogenomics*, 9 (4) : 371-373.

McKinnon, R.A., Evans, A.M. (2000) Cytochrome P450: Clinically relevant drug interactions. *Aust J. Hosp Pharm.* 30: 102-105.

Meyer, U.A. (1994) Pharmacogenetics: the slow, the rapid, and the ultrarapid, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91 (6) : 1983-1984.

Meyer, U.A. (2000) Pharmacogenetics and adverse drug reactions, *Lancet*, 356: 1667-1671.

Moffat A.C., Osselton M.D., Coverley Clarke E.G., Widdop B. (2004) *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Pharmaceutical Press.

Mulder, H. (2007) CYP2D6 and HTR2C polymorphisms in psychiatric pharmacotherapy, Thesis, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Utrecht University, ISBN: 978-90-393-45658

Murphy, G.M., Pollock, B.G., Kirshner, M.A., Pascoe, N., Cheuk, W., Mulsant, B.H., Reynolds, C.F. (2001) CYP2D6 Genotyping with Oligonucleotide Microarrays and Nortriptyline concentrations in Geriatric Depression, *Neuropsychopharmacology*, 25: 737-743.

Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K., Rodwell, V.W., Çev: Menteş, G., Ersöz, B. (1993) Harper' in *Biyokimyası*, s 811-817, Appleton&Lange / Barış Kitabevi, istanbul.

Musshoff, F., Stamer, U.M., Madea, B. (2010) Pharmacogenetics and forensic toxicology, *Forensic Sci Int.* 203: 53-62.

Nelson, D. (2003) Cytochrome P450s in Humans, (web site) <http://drnelson.utmem.edu/cytochromeP450.html/> (Son Ulaşım; 25.01.2012).

Nguyen, D.L., Staeker J, Laika B, Steimer W. (2009) TaqMan real-time PCR quantification strategy of CYP2D6 gene copy number for the LightCycler 2.0., *Clin Chim Acta.*, 403 (1-2) : 207-211.

Nirogi, R.V., Kandikere, V.N., Shukla, M., Mudigonda, K., Maurya, S., Boosi, R., Yerramilli, A. (2006) Development and validation of a sensitive liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry assay for the quantification of olanzapine in human plasma, *J Pharm Biomed Anal.* 41: 935-42.

Otani, K., Ujike, H., Sakai, A., Okahisa, Y., Kotaka, T., Inada, T., Harano, M., Komiyama, T., Hori, T., Yamada, M., Sekine, Y., Iwata, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N., Kuroda, S. (2008) Reduced CYP2D6 activity is a negative risk factor for methamphetamine dependence, *Neurosci Lett.*, 434 (1) : 88-92.

Ozhan, G., Lochan, R., Leathart, J.B., Charnley, R., Daly, A.K. (2012) Cyclooxygenase-2 polymorphisms and pancreatic cancer susceptibility, *Pancreas*, 40:1289-1294.

Öyekçin, D.Y. (2008) Bir devlet hastanesi psikiyatri polikliniğine bir yıl içinde başvuran olguların sosyodemografik özellikleri ve psikiyatrik tanı dağılımı, *Anadolu Psikiyatri Dergisi*, 9: 39-43.

Özerol, E. (1996) Sitokrom P450 Monooksijenaz Enzim Sistemleri, *Journal of Turgut Özal Medical Center*, 3(3): 257-275.

Özyazgan, S. (2002) Toksikokinetik, İ.U. Cerrahpafla Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Zehirlenmeler, Sempozyum Dizisi No: 32 s. 9-19.

Parkinson, A. (2001) Biotransformation of Xenobiotics, Casarett&Doull' s *Toxicology The Basic Science of Poisons* (Klaassen C.D. ed.) 6th, Vol 6, pp 133-224, McGraw-Hill, New York.

Patel, B.N., Sharma, N., Sanyal, M., Shrivastav, P.S. (2009) Analysis of second-generation antidepressant drug, sertraline and its active metabolite, N-desmethyl sertraline in human plasma by a sensitive and selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry method, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*877: 221-229.

Pérez de los Cobos, J., Siñol, N., Trujols, J., del Río, E., Bañuls, E., Luquero, E., Menoyo, A., Queraltó, J.M., Baiget, M., Alvarez, E. (2007) Association of CYP2D6 ultrarapid metabolizer genotype with deficient patient satisfaction regarding methadone maintenance treatment, *Drug Alcohol Depend.* 89: 190-194.

Pilgrim, J.L., Gerostamoulos, D., Drummer, O.H. (2010) Deaths involving serotonergic drugs, *Forensic Science International*, 198 : 110-117.

Pirmohamed, M., Park, B.K. (2001) Genetic susceptibility to adverse drug reactions, *Trends Pharmacol. Sci.*, 22: 298-305.

Pirmohamed, M., Park, K. (2003) Cytochrome P450 enzyme polymorphisms and adverse drug reactions, *Toxicology*, 192: 23-32.

Riccardi, L.N., Bini, C., Ceccardi, S., Trane, R., Luiselli, D., Pelotti, S. (2009) CYP2D6 polymorphism studies: How forensic genetics helps clinical medicine, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2: 485-486.

Roberts R.L., Luty S.E., Mulder R.T., Joyce P.R., Kennedy M.A. (2004) Association between cytochrome P450 2D6 genotype and harm avoidance. *Am J Med Gen Part B*, 127B: 90–93.

Roberts, R.L., Kennedy, M.A. (2006) Rapid detection of common cytochrome P450 2D6 alleles in Caucasians, *Clinica Chimica Acta*, 366: 348 – 351.

Rogers, J.F., Nafziger, A.N., Bertino, J.S. (2002) Pharmacogenetics Affects Dosing, Efficacy, and Toxicity of Cytochrome P450-Metabolised Drugs, *Am. J. Med.*, 113: 746-750.

Rollas, S. (1992) *Biyotransformasyon Reaksiyonları, İlaçların metabolizması*, s 2-9, s 53-57, Marmara Ün. Yayınları, No: 525, İstanbul.

Saar, E., Gerostamoulos, D., Drummer, O.H., Beyler, J. (2009) Comparison of extraction efficiencies and LC-MS-MS matrix effects using LLE and SPE methods for 19 antipsychotics in human blood, *Anal. Bioanal. Chem.*, 393 (2): 727-34.

Sachse, C., Brockmoller, J., Bauer, S., Roots, I. (1997) Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences, *Am. J. Hum. Genet.*, 60: 284-295.

Sadée, W. (1999) Pharmacogenomics, *Brit. Med. J.*, 319:1286. Reprinted in: (1999) *Western J. Medicine*, 171: 328-332.

Schaeffeler, E., Schwab, M., Eichelbaum, M., Zanger, U.M. (2003) CYP2D6 genotyping strategy based on gene copy number determination by TaqMan real-time PCR, *22 (6)* : 476-485.

Scordo, M.G., Caputi, A.P., D'Arrigo, C., Fava, G., Spina, E. (2004) Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in an Italian population, *Pharmacol. Res.*, 50: 195-200.

Seeringer A., Kirchheiner J., (2008) Pharmacogenetics-guided dose modifications of antidepressants, *Clin Lab Med.* 28(4): 619-26.

Sharif, Z.A. (2003) Pharmacokinetics, metabolism, and drug-drug interactions of atypical antipsychotics in special populations. *Primary Care Companion. J Clin Psychiatry* 5 (suppl 6) : 22–25.

Shaw, K.D., Amstutz, U., Jimenez-Mendez, R., Ross, C., Carleton, B.C. (2012) Suspected Opioid Overdose Case Resolved by CYP2D6 Genotyping, *Therapeutic Drug Monitoring*, 34 (2) : 121-123.

Shimada T. Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y., Guengerich, F.P. (1994) Interindividual variation in human liver Cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 270 (1) : 414-423.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. (1998) *Enstrümantal Analiz İlkeleri*, Çeviri: Kılıç E., Köseoğlu F., Yılmaz H., 5.Baskı, s.940, Harcourt Brace & Company, USA.

Sturm, S. (2005) *A General Unknown Screening for Drugs and Toxic Compounds in Human Serum*, Doktora Tezi, University of Basel, Basel, Switzerland.

Tamminga, W.J., Wemer, J., Oosterhuis, B., Weiling, J., Wilffert, B., de Leij, L.F., de Zeeuw, R.A., Jonkman, J.H. (1999) CYP2D6 and CYP2C19 activity in a large population of Dutch healthy volunteers: indications for oral contraceptive-related gender differences, *Eur J Clin Pharmacol* 55: 177-184.

Tamminga W.J., Wemer J., Oosterhuis B., de Boer A., Vranckx S., Drenth B.F., de Zeeuw R.A., de Leij L.F., Jonkman J.H. (2003) Polymorphic drug metabolism

(CYP2D6) and utilisation of psychotropic drugs in hospitalised psychiatric patients: a retrospective study, *Eur J Clin Pharmacol*, 59(1):57-64.

Temizkan, G. (1999) Genetik II. Moleküler Genetik; Gen Anlatımı (Ekspresyonu), s 149-242; İ.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, ISBN: 975-404-429-9.

Theisen, F.M., Haberhausen, M., Schulz, E., Fleischhaker, C., Clement, H.W., Heinzl-Gutenbrunner, M., Renschmidt, H. (2006) Serum levels of olanzapine and its N-desmethyl and 2-hydroxymethyl metabolites in child and adolescent psychiatric disorders: effects of dose, diagnosis, age, sex, smoking, and comedication. *Ther. Drug Monit.* 28: 750-759.

Turhan, H., (2008) Mide Kanserli Hastalarda Periferik Kanda Telomeraz Mrna Ekspresyonunun Real Time Pcr Kullanılarak Belirlenmesi Ve Klinikopatolojik Özelliklerle İlişkisinin Saptanması (Uzmanlık tezi).

Tümkaya, S., Özdel, O., Değirmenci, T., Kalkan-Oğuzhanoglu N. (2005) Bir üniversite hastanesi psikiyatri polikliniği hastalarında psikiyatrik tanı ve tedavi: Bir yıllık geriye dönük araştırma, *Anatolian Journal of Psychiatry*, 6 : 36-40.

Üney, K. ve Traş, B. (2006) İlaç metabolizmasında rol oynayan enzimlerin aktivitelerinin belirlenmesinde in vivo prob ilaç kullanımı, *Genel Tıp Dergisi*, 16 (4) : 203-211.

Vatassery, G.T., Holden, L.A., Hazel, D.K., Dysken, M.W. (1997) Analysis of sertraline and desmethylsertraline in human plasma and red blood cells, *Clin. Biochem.*, 30: 565-568.

Vural, N. (1996) Toksikoloji, s 42-77, A.Ü. Eczacılık Fakültesi Yayınları, No:73, A.Ü. Basımevi, Ankara.

Wolf, C.R., Smith, G., Smith, R.L. (2000) Science, medicine, and the future pharmacogenetics, *British Medical Journal*, 320: 987-990.

Yağcıoğlu, E.A. (2007) The mechanisms of action of antipsychotic drugs: is atypicality superior in schizophrenia treatment?, *Turkish Journal of Psychiatry*, 18 (4) : 364-74.

Zackrisson, A.L., Holmgren, P., Gladh, A.B., Ahlner, J., Lindblom, B. (2004) Fatal intoxication cases: cytochrome P450 2D6 and 2C19 genotype distributions, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 60: 547-552.

Zanger, U.M., Raimundo, S., Eichelbaum, M. (2004) Cytochrom P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, 369: 23-37.

Zhou, Z., Li, X., Li, K., Xie, Z., Cheng, Z., Peng, W., Wang, F., Zhu, R., Li, H. (2004) Simultaneous determination of clozapine, olanzapine, risperidone and quetiapine in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 802 (2) : 257-62.

Web kaynakları

- www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2d6.htm
(Son erişim: 4 Şubat 2012)
- <http://www.ieg.gov.tr/Default.aspx?sayfa=tufama&lang=tr-TR>
(Son erişim: 20 Nisan 2012)
- (http://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Transcription)
(Son erişim: 16 Nisan 2012)
- (www.mustafaaltinisik.org.uk/0809-1-4-07GenIfadesi.ppt)
(Son erişim: 16 Nisan 2012)
- (<http://www.protein.iastate.edu/hplc.html>)
(Son erişim: 19 Mart 2012)

11. EKLER

Ek 1. CYP2D6 enziminin protein dizini

10 20 30 40 50 60
 MGLEALVPLA VIVAIFLLLV DLMHRRQRWA ARYPPGPLPL PGLGNLLHVD
 FQNTPYCFDQ

70 80 90 100 110 120
 LRRRFGDVFS LQLAWTPVVV LNGLAAVREA LVTHGEDTAD RPPVPITQIL
 GFGPRSQGVF

130 140 150 160 170 180
 LARYGPAWRE QRRFSVSTLR NLGLGKKSLE QWVTEEAACL CAAFANHSGR
 PFRPNGLLDK

190 200 210 220 230 240
 AVSNVIASLT CGRRFEYDDP RFLRLDLAQ EGLKEESGFL REVLNAVVPVL
 LHIPALAGKV

250 260 270 280 290 300
 LRFQKAFLTQ LDELLTEHRM TWDPAQPPRD LTEAFLAEME KAKGNPESSE
 NDENLRIVVA

310 320 330 340 350 360
 DLFSAGMVTI STTLAWGLLL MILHPDVQRR VQQEIDDVIG QVRRPEMGDQ
 AHMPYTTAVI

370 380 390 400 410 420
 HEVQRFGDIV PLGVTHMTR DIEVQGFRIK KGTTLITNLS SVLKDEAVWE KPFRFHPEHF

430 440 450 460 470 480
 LDAQGHFVKP EAFLPFSAGR RACLGEPLAR MELFLFFTSI LQHFSFSVPT
 GQPRPSHHGV

490
 FAFLVSPSPY ELCAVPR

[http://www.uniprot.org/blast/?about=P10635\[1-497\]](http://www.uniprot.org/blast/?about=P10635[1-497])

Ek 2. Advers Etki Bildirim Formu


**ADVERS ETKİ
BİLDİRİM FORMU**
Türkiye Farmakovijilans Merkezi

A. HASTAYA AİT BİLGİLER						2. Ciddiyet Kriteri (Uygun olanı işaretleyiniz)					
1. Hastanın Adı ve Soyadının Baş Harfleri:	2. Yaş:	2a. Doğum Tarihi:			3. Cinsiyet <input type="checkbox"/> Kadın <input type="checkbox"/> Erkek	4. Boy: _____ cm	5. Ağırlık: _____ kg	<input type="checkbox"/> Ölüm			
		Gün	Ay	Yıl			Gün	Ay	Yıl		
B. ADVERS ETKİ (LER)						<input type="checkbox"/> Hayati Tehdit Edici <input type="checkbox"/> Hastaneye Yatışa Sebep Olma ve/veya Yatış Süresini Uzatma (...gün) <input type="checkbox"/> Kalıcı veya Belirgin Sakatlığa veya İşgöremeziğe Neden Olma <input type="checkbox"/> Konjenital Anomali ve/veya Doğum Kusuru <input type="checkbox"/> Diğer					
1. Advers Etkiyi Tanımlayınız		Başlangıç Tarihi (Gün / Ay / Yıl)	Bitiş Tarihi (Gün/Ay/Yıl)	Sonuç		Hasta öldü ise ölüm nedeni:					
				<input type="checkbox"/> İyileşti/Düzelde <input type="checkbox"/> İyileşiyor/Düzeliyor <input type="checkbox"/> Sekel Bırakarak İyileşti /Düzelde <input type="checkbox"/> Devam Ediyor <input type="checkbox"/> Ölümle sonuçlandı							
				<input type="checkbox"/> Bilinmiyor <input type="checkbox"/> Diğer		Otopsi yapıldı mı? <input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır (Evet ise ilgili dökümanı ekleyin.)					
3. Laboratuvar Bulguları (Tarihleriyle birlikte - Gün / Ay / Yıl)											
4. İlgili Tıbbi Oykü / Eş Zamanlı Hastalıklar: (Örneğin: Alerji, hamilelik, sigara ve alkol kullanımı, hepatik/renal yetmezlik, diyabet, hipertansiyon...v.b) Konjenital anomaliler için gebelikte annenin aldığı tüm ilaçlar ve maruz kaldığı hastalıklar ile birlikte son menstruasyon tarihini de belirtiniz. (Gün / Ay / Yıl)											
C. KULLANILAN TIBBİ ÜRÜN(LER)											
1. Şüpheli Edilen İlacın Adı:	2. Veriliş Yolu:	3. Günlük Doz:	4. İlaça Başlama Tarihi(gün/ay/yıl)	5. İlacın Kesildiği Tarihi(gün/ay/yıl)	6. Endikasyon:	7. İlaç kesildi mi?	8. İlaç kesilince veya doz azaltılınca advers etki azaldı mı?	9. İlaç Yeniden Verildi mi?	10. İlaç Yeniden Verilince Advers Etki Tekrarladı mı?		
						<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/> Bilinmiyor	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/> Bilinmiyor	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/> Bilinmiyor	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/> Bilinmiyor		
						<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/> Bilinmiyor	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/> Bilinmiyor	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/> Bilinmiyor	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/> Bilinmiyor		
						<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/> Bilinmiyor	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/> Bilinmiyor	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/> Bilinmiyor	<input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır <input type="checkbox"/> Bilinmiyor		
11. Eş Zamanlı Kullanılan İlaç(lar): (Oluşan Advers Etkinin Tedavisi için Kullanılanlar Hariç)						12. Diğer Gözlemler ve Yorum:(Kullanılan Beşeri Tıbbi Ürünün Kalitesi ile İlgili Bir Sorundan Şüpheli Ediliyorsa, Lütfen Şüpheli Edilen Ürünün Seri Numarası ve Son Kullanma Tarihi ile Birlikte Bu Sorunu Belirtiniz.)					
13. Advers Etkinin Tedavisi:(tedavi için kullanılan ilaçlar ve kullanım tarih (gün/ay/yıl) leriyle birlikte)											
E. RUHSAT/İZİN SAHİBİNE AİT BİLGİLER (Yalnızca ruhsat/izin sahibi tarafından yapılan bildirimlerde doldurulacaktır):											
D. BİLDİRİM YAPAN KİŞİYE AİT BİLGİLER					İlaç Güvenliği Sorumlusu adı, soyadı, iletişim bilgileri						
1. Adı, Soyadı :		2. Meslek :		3. Tel. No:		1. Ruhsat/izin Sahibinin Adı :			3. Faks :		
4. Adresi :		5. Faks :		6. E-posta :		2. Tel. No:		4. Ruhsat/izin Sahibinin Adresi:		5. Rapor tipi:	
7. İmza :		8. Rapor firmaya da bildirildi mi? <input type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır						<input type="checkbox"/> İlk <input type="checkbox"/> Takip			
9. Rapor Tarihi:		10. Rapor tipi: <input type="checkbox"/> İlk <input type="checkbox"/> Takip		11. Medikal Kayıt No:		6. Ruhsat/izin Sahibinin rapor numarası:		7. Rapor Kaynağı : <input type="checkbox"/> Yabancı <input type="checkbox"/> Tüketicici <input type="checkbox"/> Gözlemsel Çalışma <input type="checkbox"/> Literatür <input type="checkbox"/> Sağlık mesleği mensubu a) Hekim b) Eczacı c) Diş Hekimi d) Hemşire <input type="checkbox"/> Kurum <input type="checkbox"/> Kurum dışı <input type="checkbox"/> Ruhsat sahibi <input type="checkbox"/> Diğer _____			
						8. Ruhsat/izin Sahibinin ilk haberdar olma tarihi:					
						9. Bu Raporun Tarihi:					

e-posta: TUFAM@saglik.gov.tr faks: 0(312)309 71 18 tel: 0(312) 309 53 97 Formu mümkün olduğunca tam doldurunuz. Forma sayfa ekleyebilirsiniz.

Ek 3. Etik Kurul Onay Yazısı

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI



Sayı : 19174
Konu :

İstanbul/...../.....
24 Haziran 2009

Adli Tıp Enstitüsü Müdürlüğüne

İLGİ: 09.06.2009 tarihli, 1155 sayılı yazınıza:

Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.MÜNEVVER AÇIKKOL'un danışmanlığında Doktora Öğrencisi SELDA MERCAN'ın yürüttüğü "Adli Farmakogenetikte CYP2D6 Polimorfizmanın Önemi" başlıklı Doktora Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 16 Haziran 2009 tarihinde toplanan Fakültemiz Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini saygılarımla rica ederim.

EKİ:
1 dosya

Prof.Dr. Özgün ENVER
Vekil Dekan ve Etik
Kurul Başkanı


MÜDÜR

T.C. İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ Adli Tıp Enstitüsü GELİN EYRAK
Sayı : 2009/1127
Tarili: 16.7.2009



Not: Yanıtlarda yazımın gün sayısının belirtilmesi rica olunur. Tel:(0212)4143000

Ek 4. “Bilgilendirilmiş Onay Formu” Örneği

Araştırmanın Yürütüldüğü Kuruluş: İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı

Araştırmanın Adı: Adli Farmakogenetikte CYP2D6 Polimorfizminin Önemi

Amaç:

Bu çalışmada psikiyatri kliniğinde tedavi görmekte olan CYP2D6 enzimi tarafından metabolize edilen ilaçları kullanan hastaların enzim polimorfizmini tespit etmek ve enzim aktivitesini belirlemek için kan ve idrar örnekleri alınacaktır. Toplumlar ve kişiler arası farklılık gösterdiği bilinen CYP2D6 enzim etkinliğinin belirlenmesi sayesinde kişiye özgü tedavi uygulanması, ilaç tedavisinde ortaya çıkabilecek risklerin azaltılması, adli boyut kazanan durumların çözülmesi, etkin ve hızlı tedavi olanağı sağlayabileceği öngörülmektedir.

Bu çalışma için hastadan idrar ve kan örneklerinin alınması esnasında, hastaya herhangi bir zarar vermesi ve tehlike oluşturması söz konusu değildir. Çalışma sırasında araştırma amacıyla yapılacak analiz giderleri için hastanın kendisinden veya bağlı olduğu sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret talep edilmeyecektir, hasta yazılı onay vermiş olsa da araştırmanın her hangi bir döneminde araştırmadan vazgeçmekte özgürdür, hastanın kimlik bilgileri ve tüm kayıtları saklı tutulacaktır.

Bu araştırmaya hiçbir baskı olmaksızın, kendi rızamla katıldığımı beyan ederim.

Hastanın;

Adı:

Soyadı:

İmzası:

Cinsiyeti:

Yaşı:

*Hasta reşit değilse yasal temsilcisinin;

*Adı:

*Soyadı:

*İmzası:

Tez Yürütücüsü: Araş. Gör. Selda Mercan

İmza:

Tanık Hastane Personeli

Adı Soyadı:

İmza:

Tel: 0212 414 30 00 / 22839

e-posta: mercans@istanbul.edu.tr

Ek 5. “Hasta Bilgi Formu” Örneği

“ADLİ FARMAKOGENETİKTE CYP2D6 POLİMORFİZMİNİN ÖNEMİ”
başlıklı doktora tezi için biyolojik örnek alınan hastaya ve kullandığı ilaç(lar)a özgü bilgiler:

Hastanın			
Adı Soyadı:			
Yaşı:			
Cinsiyeti:			
Teşhis:		Teşhis tarihi:	
Tedavi şekli:		Yatan: ()	
		Ayakta: ()	
Kullanmakta olduğu ilaçlar:			
İlacın adı:	Kullanım süresi:	Günlük dozu:	Hekimin Görüşü:
Psikiyatrik hastalık dışında sahip olduğu hastalık:			
Var:		Yok:	
		Varsa adı:	
Varsa kullandığı ilaçlar ve günlük dozu:			
<u>İlaç dışında kullandığı maddeler:</u>			
Sigara:			
Alkol:			
Uyutucu/Uyuşturucu:			
Diğer:			

İlaça özgü bilgiler:

İlacın adı:	Alındığı saat:	Alınma miktarı:

Alınan biyolojik örneğe özgü bilgiler:

Kan: () **Miktarı:**

İdrar: () **Miktarı:**

Ek 6 – Ki-Kare (X^2) dağılımı değerleri

df	α									
	0.995	0.99	0.975	0.95	0.9	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005
1	-	-	-	-	0.02	2.71	3.84	5.02	6.64	7.88
2	0.01	0.02	0.05	0.10	0.21	4.61	5.99	7.38	9.21	10.60
3	0.07	0.12	0.22	0.35	0.58	6.25	7.82	9.35	11.35	12.84
4	0.21	0.30	0.48	0.71	1.06	7.78	9.49	11.14	13.28	14.86
5	0.41	0.55	0.83	1.15	1.61	9.24	11.07	12.83	15.09	16.75
6	0.68	0.87	1.24	1.64	2.20	10.65	12.59	14.45	16.81	18.55
7	0.99	1.24	1.69	2.17	2.83	12.02	14.07	16.01	18.48	20.28
8	1.34	1.65	2.18	2.73	3.49	13.36	15.51	17.54	20.09	21.96
9	1.74	2.09	2.70	3.33	4.17	14.68	16.92	19.02	21.67	23.59
10	2.16	2.56	3.25	3.94	4.87	15.99	18.31	20.48	23.21	25.19
11	2.60	3.05	3.82	4.58	5.58	17.28	19.68	21.92	24.73	26.76
12	3.07	3.57	4.40	5.23	6.30	18.55	21.03	23.34	26.22	28.30
13	3.57	4.11	5.01	5.89	7.04	19.81	22.36	24.74	27.69	29.82
14	4.08	4.66	5.63	6.57	7.79	21.06	23.69	26.12	29.14	31.32
15	4.60	5.23	6.26	7.26	8.55	22.31	25.00	27.49	30.58	32.80
16	5.14	5.81	6.91	7.96	9.31	23.54	26.30	28.85	32.00	34.27
17	5.70	6.41	7.56	8.67	10.09	24.77	27.59	30.19	33.41	35.72
18	6.27	7.02	8.23	9.39	10.87	25.99	28.87	31.53	34.81	37.16
19	6.84	7.63	8.91	10.12	11.65	27.20	30.14	32.85	36.19	38.58
20	7.43	8.26	9.59	10.85	12.44	28.41	31.41	34.17	37.57	40.00
21	8.03	8.90	10.28	11.59	13.24	29.62	32.67	35.48	38.93	41.40
22	8.64	9.54	10.98	12.34	14.04	30.81	33.92	36.78	40.29	42.80
23	9.26	10.20	11.69	13.09	14.85	32.01	35.17	38.08	41.64	44.18
24	9.89	10.86	12.40	13.85	15.66	33.20	36.42	39.36	42.98	45.56
25	10.52	11.52	13.12	14.61	16.47	34.38	37.65	40.65	44.31	46.93
26	11.16	12.20	13.84	15.38	17.29	35.56	38.89	41.92	45.64	48.29
27	11.81	12.88	14.57	16.15	18.11	36.74	40.11	43.19	46.96	49.65
28	12.46	13.57	15.31	16.93	18.94	37.92	41.34	44.46	48.28	50.99
29	13.12	14.26	16.05	17.71	19.77	39.09	42.56	45.72	49.59	52.34
30	13.79	14.95	16.79	18.49	20.60	40.26	43.77	46.98	50.89	53.67
40	20.71	22.16	24.43	26.51	29.05	51.81	55.76	59.34	63.69	66.77
50	27.99	29.71	32.36	34.76	37.69	63.17	67.51	71.42	76.15	79.49
60	35.53	37.49	40.48	43.19	46.46	74.40	79.08	83.30	88.38	91.95
70	43.28	45.44	48.76	51.74	55.33	85.53	90.53	95.02	100.43	104.22
80	51.17	53.54	57.15	60.39	64.28	96.58	101.88	106.63	112.33	116.32
90	59.20	61.75	65.65	69.13	73.29	107.57	113.15	118.14	124.12	128.30
100	67.33	70.07	74.22	77.93	82.36	118.50	124.34	129.56	135.81	140.17

Not: Tablodaki değerler tek kuyrukludur.

Kaynak: Kmietowicz, Z. W., Yannoulis, Y. (1988). *Statistical tables for economic, business, and social studies* (2. basım). UK: Longman.