

T.C.
İstanbul Üniversitesi
Adli Tıp Enstitüsü
Fen Bilimleri Anabilim Dalı
Danışman : Doç. Dr. Münevver AÇIKKOL

**OPIAT BAĞIMLILARINDA SİTOKROM P450-2D6
(CYP2D6) *3, *4, *5 VE *6 ALELLERİNİN TEK
NÜKLEOTİD POLİMORFİZMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Selda MERCAN

Biyolog

İSTANBUL-2006

T.C.
İstanbul Üniversitesi
Adli Tıp Enstitüsü
Fen Bilimleri Anabilim Dalı
Danışman : Doç. Dr. Münevver AÇIKKOL

**OPIAT BAĞIMLILARINDA SİTOKROM P450-2D6
(CYP2D6) *3, *4, *5 VE *6 ALELLERİNİN TEK
NÜKLEOTİD POLİMORFİZMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Selda MERCAN
Biyolog

İSTANBUL-2006

Bu tez çalışması, İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği tarafından desteklenmiştir.

Proje No: T-649/17032005

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı Adli Tıp Enstitüsü Laboratuvarı' nda yapmama olanak tanıyan Adli Tıp Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. İmdat ELMAS' a ve Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr.Salih Cengiz' e,

Çalışmayı büyük ilgi ile yöneten, derin bilgilerinden her zaman faydalandığım ve her koşulda desteğini arkamda hissettiğim çok değerli danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Münevver AÇIKKOL' a,

Bilgisinden daima yararlandığım, çalışmama büyük emeği geçen kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Ersi ABACI KALFOĞLU' na,

Laboratuvar çalışmalarına katkıda bulunan, Yard. Doç. E.Hülya YÜKSELOĞLU, Ş. Şebnem ÖZCAN, Gavril PETRİDİS ve Gülten RAYİMOĞLU'na,

Tezimin yazılmasında emeği geçen ve beni yürekte desteklediklerine inandığım değerli meslektaşlarım, Zeynep TÜRKMEN, Şükriye KARADAYI ve Elif BAYKARA' ya,

Sancılı çalışma dönemlerimde her türlü desteklerini esirgemeyen tüm İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü mensuplarına,

Her türlü kopyalama ve kırtasiye ihtiyaçlarımı gideren sevgili enişterime,

Ve bana yürekte inanan tüm aileme, sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Araş. Gör. Selda MERCAN

KISALTMALAR:

ADR; Advers Drog Reaksiyonu, Ters İlaç Etkisi

AGE; Agaroz Jel Elektroforezi

APS; Amonyum Persülfat

Bç; baz çifti

CYP450, P450; Sitokrom P450

CYP2D6; Sitokrom P4502D6

DMSO; Dimetil Sülfoksit

DNA; Deoksiribo Nükleik Asit

EM; Normal Metabolizör (Extensive Metabolizer)

ER; Endoplazmik Retikulum

EtBr; Etidyum Bromür

FAD; Flavin Adenin Dinükleotid

FMN; Flavin Mono Nükleotid

GIS; Gastro İntestinal Sistem

IM; Orta Metabölizör (Intermediate Metabolizer)

Kb; kilo baz

MALDI-TOF-MS; Matriks Destekli Lazer Dezorpsiyon- İyonizasyon-Uçuş Zamanlı

Kütle Spektrofotometrisi

mL; mililitre

NADPH; Redüklenmiş Nikotinamid Adenosin Dinükleotid Fosfat

PAGE; Poliakrilamid Jel Elektroforezi

PCR; Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PM; Zayıf Metabolizör (Poor Metabolizer)

pmol; pikomol

RFLP; Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi

RT-PCR; Real Time-PCR

SNP; Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polimorphism)

SSRI; Selektif Serotonin Gerilim İnhibitörleri

UM; Hızlı Metabolizör (Ultra rapid Metabolizer)

µL; mikrolitre

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Opiatlar ve Opiat Bağımlılığı	3
2.1.1. Bağımlılıkla İlgili Temel Kavramlar.....	3
2.2. Biyotransformasyon	8
2.2.1. Ksenobiyotiklerin Biyotransformasyon Mekanizması.....	8
2.2.1.1. Faz I Reaksiyonları.....	8
2.2.1.2. Faz II Reaksiyonları.....	10
2.3. Polimorfizm ve SNP	11
2.4. ADR ve Farmakogenetik	12
2.5. Sitokrom P450 (CYP450) Enzim Sistemi	15
2.5.1. CYP450 Enzim Sisteminin Evrimi.....	15
2.5.2. CYP450 Enzim Sisteminin Adlandırılması.....	18
2.6. CYP2D6 Enzimi ve Polimorfizmi	19
2.6.1. CYP2D6' nın Keşfi	19
2.6.2. CYP2D Lokusunun Yapısı.....	20
2.6.3. CYP2D6 Enzim Aktivitesi ve Polimorfizmi.....	21
2.6.4. CYP2D6 Polimorfizmi ile İlgili Çalışmalar.....	24
2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	25
2.8. Elektroforez Yöntemi	28
2.8.1. Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	29
2.8.2. Agaroz Jel Elektroforezi.....	29
2.9. Gelişmekte Olan Teknikler	30
2.9.1. MALDI-TOF-MS.....	30
2.9.2. AmpliChip CYP450 Test.....	31
2.9.3. Real Time PCR (RT-PCR).....	31
2.9.4. "Microarray=Gene chips" Teknolojisi.....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Çalışmada Kullanılan Gereçler	33
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	34
3.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	35

3.4. Yöntemin Uygulanması.....	37
3.4.1. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu.....	37
3.4.2. DNA ‘nın Çoğaltılması.....	38
3.4.2.1. Tek Tüpte 4 Primerli PCR Yöntemi.....	38
3.4.2.1.1. CYP2D6*3 Alelinin PCR Parametreleri.....	38
3.4.2.1.2. CYP2D6*4 Alelinin PCR Parametreleri.....	39
3.4.2.1.3. CYP2D6*6 Alelinin PCR Parametreleri.....	40
3.4.2.2. Tek Tüpte 4 Primerli PCR Yönteminin Basamaklandırılması.....	42
3.4.2.2.1. CYP2D6*3 Alelinin İnternal Kontrolü İçin PCR Parametreleri.....	42
3.4.2.2.2. CYP2D6*3 Alelinin Kontrol Parçasından Yapılan Alele Özgü Amplifikasyon.....	43
3.4.2.2.3. CYP2D6*4 ve *6 Alellerinin İnternal Kontrolü İçin PCR Parametreleri.....	44
3.4.2.2.4. CYP2D6*4 Alelinin Kontrol Parçasından Yapılan Alele Özgü Amplifikasyon.....	45
3.4.2.2.5. CYP2D6*6 Alelinin Kontrol Parçasından Yapılan Alele Özgü Amplifikasyon.....	46
3.4.2.3. Multiplex Long-PCR Yöntemi.....	47
3.4.2.3.1. CYP2D6*5 Alelinin PCR Parametreleri.....	47
3.4.3. Elektroforez.....	48
3.4.3.1. Gümüş Boyama Yöntemi İle Görünürleştirilen Denatüre Poliakrilamid Jelin Hazırlanması ve Yürütülmesi.....	48
3.4.3.2. Etidyum Bromürlü Agaroz Jelin Hazırlanması ve Yürütülmesi.....	50
4. BULGULAR.....	52
4.1. DNA İzolatları.....	52
4.2. CYP 2D6 *3, *4, *5 ve *6 Alellerinin Saptanması.....	52
4.2.1. CYP2D6*3 Alelinin Saptanması.....	53
4.2.2. CYP2D6*4’ Alelinin Saptanması.....	54
4.2.3. CYP2D6*6 Alelinin Saptanması.....	54
4.3. Tek tüpte 4 primerli PCR Yönteminin Basamaklandırılmasına Ait Bulgular.....	55
4.4. CYP2D6*5 Alelinin Multiplex Long-PCR Yöntemi ile Saptanması.....	57
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	60
6. ÖZET.....	67
7. SUMMARY.....	68
8. KAYNAKLAR.....	69
9. EKLER	

- 9.1.** CYP2D6' nın Amino Asit, Baz Dizini ve Gen Bankası Verileri
9.2. Rıza Formu

10. ÖZGEÇMİŞ

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ksenobiyotik (organizmaya giren her türlü yabancı madde) metabolizmasındaki ve ilaç yanıtındaki kişiler arası çeşitlilik, kapsamlı bir konudur (Ingelman-Sundberg, M. 2005). İki kişinin plazmalarındaki ilaç seviyeleri 1000 kattan fazla çeşitlilik gösterebilir. Bu çeşitliliğin sebebi, genetik, fizyolojik, patofizyolojik ve çevresel kökenli olabilir. Son yıllarda genetik faktörlerin, bu çeşitlilikteki önemi çok daha etkin bir şekilde çalışılmaktadır. Sitokrom P450, pekçok ksenobiyotiğin ve ilacın metabolize edilmesinden sorumludur (Ingelman-Sundberg, M., 2004). Karsinojenlerin ve çevresel toksinlerin, kişilerde oluşturduğu bireysel hassasiyetleri değişkendir, ve CYP450, bunların biyoaktivasyonunda anahtar rol oynar. Sitokrom P450 monooksijenaz (CYP450) enzimleri, ilaç ve/veya ksenobiyotiklerin metabolizmasında görev alan ve Faz I reaksiyonlarının % 86' sını gerçekleştiren (Ingelman-Sundberg, M. 2005) önemli bir enzim grubudur. Bu grubun başlıca üyelerinden biri olan Sitokrom P450- 2D6 (CYP2D6) enzimi, **opiatların**, çeşitli nöroleptiklerin, selektif serotonin geri alım inhibitörlerinin (SSRI), trisiklik antidepressanların, β - blokerlerin v.b. metabolizmasında görev alan bir enzimdir (Zackrisson, A.L. ve ark. 2004; Tanaka, E. 2001). Yapılan çalışmalar, bu enzimlerin genetik polimorfizm gösterdiğini, dolayısıyla ilaç ve/veya ksenobiyotiklerin metabolize edilme hızlarında, bireyler ve populasyonlar arası farklılıklar bulunduğunu belirtmektedir (Meyer 2000; Daly 2003). CYP450' lerin polimorfik formları, ters ilaç etkisi oluşumundan da sorumludur (Ingelman-Sundberg, M. 2004).

Opiat bağımlılığı, dünyada ve ülkemizde giderek yaygınlaşan, insan hayatını tehdit eden ciddi bir sorundur. CYP2D6 enziminde görülen polimorfizm, opiat bağımlılarını da

yakından ilgilendirmektedir. Sahip olunan metabolizasyon bozukluklarına göre, bu maddelere bağımlı kişilerde, ani ölümlerin veya ciddi toksik etkilerin görülebildiği göz ardı edilmemelidir (Verrecas, M. ve ark.,2004; Bailey, B. ve ark 2000; Druid, H. ve ark, 1999).

Adli olguların bir bölümünü oluşturan madde- opiat bağımlılığı ve buna bağlı olan, ani ölüme kadar varabilen olguların aydınlatılmasına katkısı olacağı düşüncesiyle bu çalışmada, opiat bağımlılarında CYP2D6 *3, *4, *5 ve *6 alellerinin *tek nükleotid polimorfizmi* (SNP) araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. OPIATLAR VE OPIAT BAĞIMLILIĞI

(Saferstein, R. 2001; Akçasu, A. 1992; Şanyüz, Ö. 2006)

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) tanımlamasına göre madde bağımlılığı; psikotrop bir madde ile merkezi sinir sistemi arasındaki etkileşimden doğan, maddenin keyif arttırıcı psişik etkilerini duyumsamak veya ilacın yokluğunun oluşturacağı huzursuzluktan sakınmak için ilacı sürekli olarak alma dürtüsünün çeşitli davranış şekillerinin ve diğer reaksiyonların eşlik ettiği psişik ve fizyolojik bir durumdur. Psikotrop (psikoaktif) maddeler, genellikle 5 sınıfta toplanmaktadır:

1. **Opiatlar (Narkotik maddeler);** morfin, kodein, eroin, metadon vs.
2. **Depresanlar;** barbitüratlar, benzodiazepinler, alkol vs.
3. **Uyarıcılar;** amfetamin, kokain, nikotin, kafein, fenetilin vs.
4. **Halüsinojenler;** LSD, esrar, fensiklidin, meskalin vs.
5. **İnhalasyon yolu ile alınanlar;** toluen, metil etil keton, trikloro etilen vs.

2.1.1. Bağımlılıkla İlgili Temel Kavramlar

Yoksunluk Sendromu

Fazla ve uzun süreli kullanılan, bağımlılık yapan bir maddenin alımının sonlandırılması veya azaltılması sonucu gelişir. Maddeye özgü, ruhsal veya fiziksel belirtilerin ortaya çıkması ve rahatsızlık veren bu durumdan kurtulmak için, madde alma gereksiniminin duyulması ile belirli bir durumdur. Yoksunluk sendromunun şiddetine göre bağımlılık

derecesi belirlenir. Güçlü opiatlarda, ilacın alımının kesilmesinden 8-10 saat sonra yoksunluk sendromu başlar, belirtiler 48-72 saat sonra en üst seviyelere ulaşır ve daha sonra giderek azalır.

Tolerans

İstenen etkiyi sağlamak için, daha çok maddeye gereksinim duyma, ya da aynı miktar maddenin devamlı kullanımı nedeniyle, etkisinde azalma görülmesidir. Dolayısı ile kişi, her seferinde, aynı hazzı duymak için dozu arttırma yolunu seçer. İlacın hoşça gitmeyen yan etkilerine karşı (bulantı, kusma, çarpıntı, baş dönmesi gibi) tolerans gelişmesi de söz konusudur ve çoğu kez, ilacın devamlı kullanılmasını pekiştirir. Ayrıca aynı grup maddelerden birine karşı tolerans gelişmişse, gruptaki diğer ilaca karşı da tolerans gelişebilir. Buna **çapraz tolerans** denir. Opiatlar gibi, merkezi sinir sistemini deprese eden maddelere karşı, fiziksel bağımlılıkla beraber tolerans gelişimi de paralel meydana gelir.

Fiziksel (Fizyolojik) Bağımlılık

Tolerans ve/veya yoksunluk bulgularının görüldüğü bağımlılık tipidir. Psişik bağımlılığa eşlik eder, maddenin etkilediği nöronların, bir süre maddeye maruz kalması sonucu meydana gelir ve madde kesilmediği sürece de gizli kalır. Madde alımı kesilince yoksunluk sendromu ile ortaya çıkan bir nöroadaptasyon halidir. Yoksunluk belirtileri, bağımlı olunan maddenin cinsine bağlıdır. Bazısında ölüme varabilecek kadar şiddetli olurken, bazılarında tedavi ile iyileştirilir. Yoksunluk sendromu, maddeyi tekrar almak suretiyle ortadan kalkar. Bağımlılık yapan maddenin, kullanılmaya başlama süresi ile fiziksel bağımlılık oluşturma süresi, alınan maddeye göre değişir. Örneğin, narkotik analjeziklere karşı, erken fiziksel bağımlılık oluşurken, alkole karşı geç oluşur. Aynı gruptaki maddelerin oluşturduğu fiziksel bağımlılığın derecesi farklı olabilir (morfin ve kodeinde olduğu gibi).

Psikolojik (Psişik) Bağımlılık

Bazı maddeler belirli bir süre kullanıldığı zaman, kullanıcıda bu maddeyi bulmaya ve kullanmaya yönelik şiddetli istek oluşur. Bu durum, ilaca karşı psişik bir özlemin sonucudur. Bu durumda kişi, ilaç arayışına girer, sinirli ve öfkeli olur, bazen de madde kişiyi kontrolü altına alır, kişisel irade yok olur. Psişik bağımlılığın derecesi, maddeye ve kişinin kendisine göre değişir. Opiatlar, kokain, sigara güçlü psikolojik bağımlılık oluşturan maddelerdir.

Fizyolojik ve psişik bağımlılık yapan maddelerin başında opiatlar gelmektedir. İnsanlar tarafından çok eskiden beri bilinen ve çeşitli amaçlarla kullanılan afyon bitkisinden elde edilen doğal maddelere **opiatlar** veya **afyon alkaloidleri** denir. Şekil 1 (a)' da *Papaver somniferum* (afyon) bitkisinin kapsülü, Şekil 1 (b)' de ise bu haşhaş kapsülünün çizilmesi sonucu akan reçinenin toplanmasıyla elde edilen koyu kahverengi afyon sakızının (ham afyon) görülmektedir.



(a)



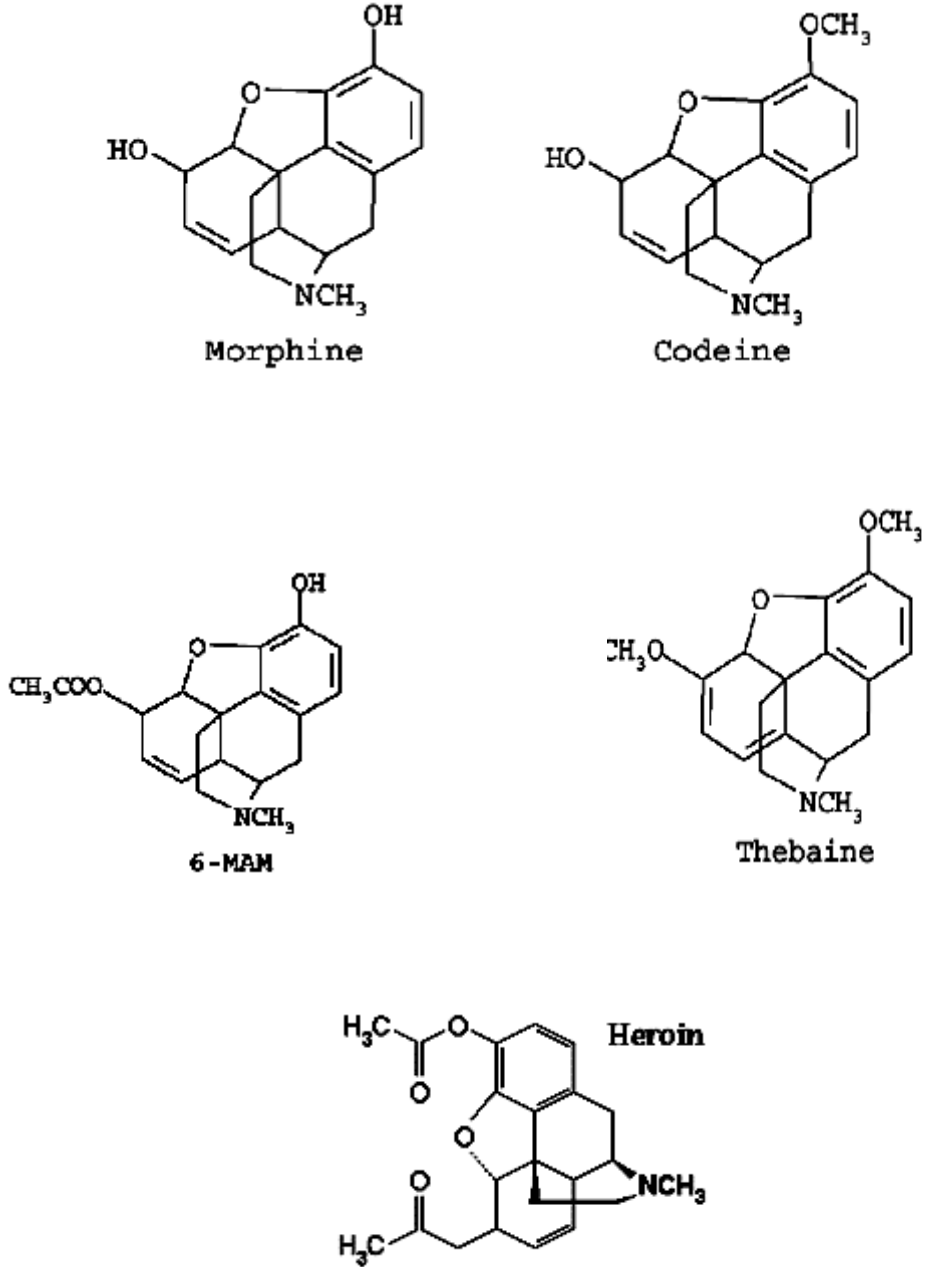
(b)

Şekil 1. *Papaver somniferum* (Haşhaş) bitkisinin kapsülünün (a) ve afyon sakızının (b) görüntüsü.

Afyon alkaloidleri içinde, morfin, kodein, tebain, papaverin, noskapin gibi maddeler sayılabilir. Afyon alkaloidlerinin yüzde oranları yaklaşık olarak, morfin için % 4-21, kodein için % 0,7-3, tebain için % 0,2-1, Papaverin için % 0,5-1,3, Noscapin(Narkotin) için % 2-8'dir. Bunlar arasında papaverin ve noskapin, diğerleri gibi fenantren halka yapısı taşımadığından, bağımlılık yapma özelliği yoktur, öksürük ilacı olarak kullanılır. Eroin (diasetilmorfin) ise, morfinin iki kez asetillenmesiyle oluşan, yarı sentetik bir opiatdır. Yasadışı kullanımı en yaygın olan psiko trop maddelerden bir tanesidir, bağımlılık yapıcı etkisi morfine oranla çok daha fazladır. 6-MAM (6- mono asetil morfin) ise, eroinin metabolitidir (Şekil 2).

Çok güçlü aneljezik etkiye sahip opiatların en eski ve önemlisi morfindir. Morfin ve kodein, çok etkili öksürük ilacı, ağrı kesici etkileri nedeniyle, kontrollü olarak tedavide kullanılmaktadır. Ayrıca, uyuklama, mizaç bulanıklığı da meydana getirir. Opiatların aşırı dozda alımı, solunum depresyonu, derin bir sedasyon hali ve depresyon, kabızlık, epileptik nöbetler, polinöropati, pulmoner ödem, eroin nefropatisi, kemik iliği supresyonu, fetusta bağımlılık ve yoksunluk oluşturur. Opiatların yoksunluk durumunda, klinik belirtileri, gribe benzer. Anksiyete, göz yaşarması, burun akıntısı, esneme, terleme, insomnia, sıcak-soğuk basması, kramp, kas ağrıları, pupilla genişlemesi, tremor, bulantı-kusma izlenir. Bu tür maddelerin, tedavi amaçlı kullanımlarında dahi, aşırı doz etkisi ya da ilaç yan etkisi, kişiden kişiye değişen oranlarda, görülebilir. Opiatlar, fiziksel ve psişik bağımlılık yapma özelliklerinden dolayı, toksikoloji ve adli tıp için önem taşımaktadırlar. Adli Tıp Kurumu Başkanlığı Morg İhtisas Dairesi'nin 2000 - 2004 tarihleri arasında yaptığı toplam 15640 otopsi olgusundan 245'inin (%1.6) ölüm nedeni uçucu, uyarıcı, uyuşturucu madde zehirlenmesi olarak tespit edilmiştir. Bu olguların da 230 tanesi opiatlar, türevleri ve opiatlarla aynı anda alınan diğer psiko trop maddelerden ötürü meydana gelmiştir. 245

olgudan 55' i (% 1.9) 2000 yılına, 63' ü (%2.2) 2001 yılına, 31' i (%1.01) 2002 yılına, 44' ü (%1.34) 2003 yılına ve 52' si (%1.5) ise 2004 yılına aittir.



Şekil 2. Opiatların kimyasal yapısı (Lewis, R.J. ve ark., 2005)

2.2. BİYOTRANSFORMASYON

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

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 suda 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 yapılardır) bulunurlar. Metabolizmada başrol oynayan organ karaciğerdir. Burada en önemli fraksiyon ise mikrozomal enzimlerdir.

2.2.1. Ksenobiyotiklerin Biyotransformasyon Mekanizması

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

2.2.1.1. Faz I Reaksiyonları

Bu reaksiyonların amacı, moleküle hidroksil, karboksil, amino ve tiyol gibi polar bir fonksiyonel grup kazandırmaktır. Böylece maddeler daha polar bileşikler halini 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.

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.

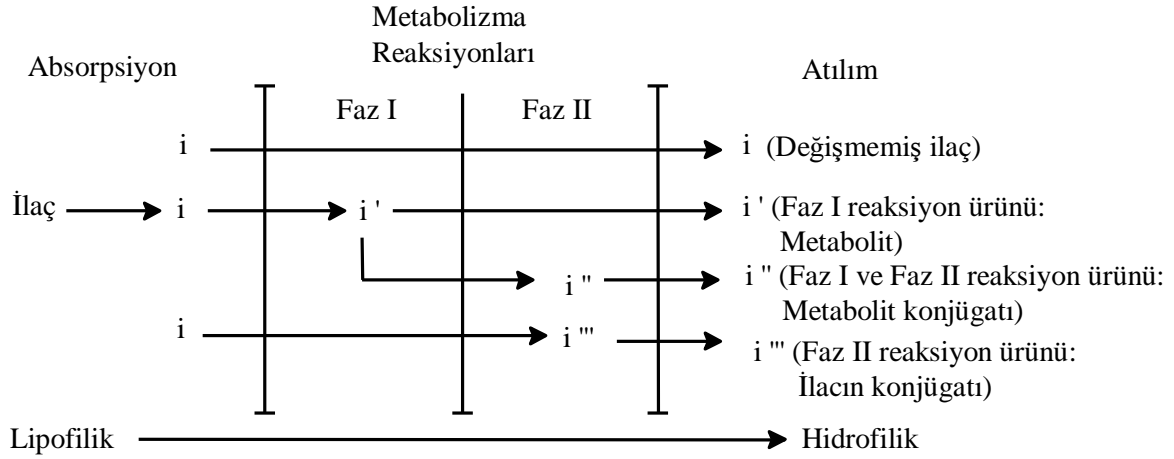
Hidroliz: Ester veya amid, epoksit grubu taşıyan ilaçların, en önemli biyotransformasyon yollarıdır. Sonuçta, molekülde Faz II reaksiyonlarının yürüyebileceği alkol, fenol, karboksilli asit ve amin gibi fonksiyonel gruplar oluşur. Hidroliz, diğer detoksikasyon reaksiyonları ile yarışır. Hidroliz enzimleri hem mikrozomlarda hem de mitokondrilerde bulunurlar. Hidrolazlar; amidazlar, esterazlar, epoksit hidrolazlar ve DDT-klorinazlar olmak üzere sınıflandırılabilirler. Ayrıca karşılıklı olarak, amidazlar, esterleri; esterazlar da amidleri hidroliz edebilir.

2.2.1.2. Faz II (konjügasyon) 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

Faz I Reaksiyonları

atılırlar. Konjügasyonlar, 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 3).



Şekil 3 : İlaçların Faz I ve Faz II reaksiyonları sonucu olası atılım şekilleri

Konjugasyon reaksiyonları ve bu reaksiyonları gerçekleştiren enzimler genel hatları ile 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 fosfat**larla ribonukleozid ve ribonukleotid konjugatlarına dönüştürülürler.

Biyotransformasyon, her zaman aynı hızda gerçekleşmez. Genetik faktörlerin yanı sıra, insan organizmasında, hayatın başlangıcından sonuna kadar biyokimyasal fonksiyonlarda bir takım değişiklikler meydana gelir. Bu değişikliklerin sebebi kimi zaman yaş, beslenme,

hastalık, olarak karşımıza çıkar, kimi zaman ise ilaç-ilaç etkileşimleri veya enzim inhibisyonu/indüksiyonu, biyotransformasyon hızını etkiler. Böylelikle, vücuda alınan maddenin metabolize olma hızı değişkendir.

2.3. POLİMORFİZM VE SNP

İnsan genom projesi, insan genlerindeki polimorfizmin varlığı ile ilgili, daha çok bilgi edinilmesini sağlamıştır. İnsanın genetik polimorfizmine bakılarak, ilaç tanımlanmasının, 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 anlaşılanlardır.

Farmakogenetik alanında yaygın kabul gören şekliyle, normal populasyonda 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 polimorfizmi* denen '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. Bu SNP' lerin yalnızca küçük bir kısmı, ilaç yanıtı ile ilişkilidir (Sadee, W., 1999).

2.4. ADR VE FARMAKOGENETİK

Ters 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 ters 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).

Bireyler arasında, ilaçların eliminasyonunun ve etkilerinin genetik farklılıklar nedeniyle değişmesini inceleyen çalışmalar, **farmakogenetik/genomik** çalışmalar olarak adlandırılır. İnsan genom projesinin sonuçlanmasıyla, 30.000 dolayında gen ortaya konmuştur ve genom üzerinde ortalama bir hesapla her 2000-2500 nükleotide bir, bireyler arasında değişikliğe neden olan tek nokta mutasyonu (SNP, *single nucleotide polymorphism*) bulunduğu öngörülmektedir (Ingelman-Sundberg, M.2001). Polimorfik Faz I enzimleri ile metabolize edilen ilaçların %56' sında ADR gözlenmektedir. Bu beklenmeyen reaksiyonların % 86' sından CYP450 enzimleri sorumludur (Ingelman-Sundberg, M. 2004). Amerika Birleşik Devletleri'nde hastaneye yatırılan hastalarda, ters 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). İlaç yanıtındaki bu genetik çeşitliliğin araştırma alanı olan 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). 1970' lerde bir antidepresan 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 (Kalow, W. 2001). Bu bulguların ışığında, farmakogenetik çalışmalar gelişmeye devam etmiştir. Birçok ilacın metabolize edilmesinden sorumlu olduğu için P450 genleri, en çok ilgi çeken ve çalışılan grubu oluşturur. CYP 450 alt tiplerinden CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4 belli başlı birçok ilacın biyotransformasyonunda kritik rol oynar (Ingelman-Sundberg, M. 2002). Santral sinir sistemini etkileyen ve kan-beyin bariyerini geçen lipofilik ilaçlar için P450 sistemi özellikle önemlidir. Çünkü renal atılım minimum düzeyde iken, P450 sistemi bu ilaçların eliminasyonunda oldukça etkilidir. SNP' lerden hangilerinin farmakogenetik açıdan önemli olduğu, fenotipik veya klinik korelasyonu inceleyen araştırmalar sonucu ortaya konabilir (Lovlie, R. ve ark. 1996). İnsanda genetik polimorfizm gösteren enzimler ve reseptörlerin tedavi sürecinde bilinmesi, tedavinin uygunluğunu sağlama açısından önemli olabilir; bu bilgi terapötik yanıtın öngörülmesine veya tedavinin bireyselleştirilmesine olanak sağlayabilir. Özellikle, terapötik penceresi dar olduğu bilinen fenitoin, 6-merkaptopürin, azatiyoprin ve varfarin gibi ilaçların, yaşamı tehdit eden yan etkilerini önlemek için, yavaş metabolizör olan bireylerde, düşük dozda kullanılması gerektiği, farmakogenetik çalışmalar sonucunda ortaya konmuştur (Herken, H., ve ark. 2001). Genetik polimorfizmlerin varlığını tedavi öncesinde saptayarak, verilecek dozu ayarlama, dünyada bazı hastanelerde rutin uygulamaya girmiştir. Örneğin, kanserli hastalarda 6-merkaptopürin veya azotioprin tedavisi başlatılmadan önce

bu ilaçları yıkan tiyopürin-S-metiltransferaz enzim aktivitesi belirlenmektedir. Böylece, enzim aktivitesi düşük bulunan hastalarda tedavi, kemoterapötik ilacın dozu düşürülerek yapılmaktadır. Bu tür bir uygulamanın hastaya en önemli yararı, kemoterapötiye bağlı kemik iliği baskılanması veya sekonder tümör oluşması riskini, önemli ölçüde azaltmasıdır. Fenotipleme, o enzim aktivitesinin, birey üzerinde gözlenen tüm faktörlerin katkısıyla ortaya çıkan sonuçtur (Wolf, C.R. 2000). Bu yüzden farmakogenetik, çoğunlukla, genotipleme ve fenotiplemeyle birlikte ele alınır. Farmakogenetik profillemeye, benzer diğer alanlara göre, hızla gelişmektedir. P450 enzimlerine göre, doz ayarlaması ile, toksistenin azaltılması ve etkisinin artırılması gereken, birçok ilaç vardır. Polimorfizmin varlığını gösterecek ve hızla sonuç verecek yöntemler geliştirilerek, genotip belirleyebilmek ve her birey için ilaç seçimi ve doz ayarlaması yapmak, yakın gelecekte mümkün hale gelecektir ve rutin tedavilerde yerini alacaktır (Daly, A.K. 2003; Rogers, J.F. ve ark. 2002).

Farmakogenetik çalışmalardan toplanan bilgiler, genomik, fenotip ve klinik bilgiler PharmGKB (The Pharmacogenetics Knowledge Base) adı altında bir internet sitesinde toplanmaktadır (<http://www.pharmgkb.org>). 150' nin üzerinde çalışılmakta olan genle ilgili bilgi içeren PharmGKB, Nisan 2000' de başlayan bir projedir ve internet üzerinden ilk bilgilere Şubat 2001' de ulaşılabildiği (Hewett, M. ve ark. 2002).

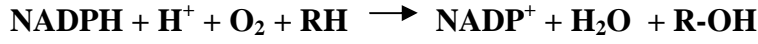
2.5. SİTOKROM P450 (CYP450) ENZİM SİSTEMİ

2.5.1. CYP450 Sisteminin Evrimi

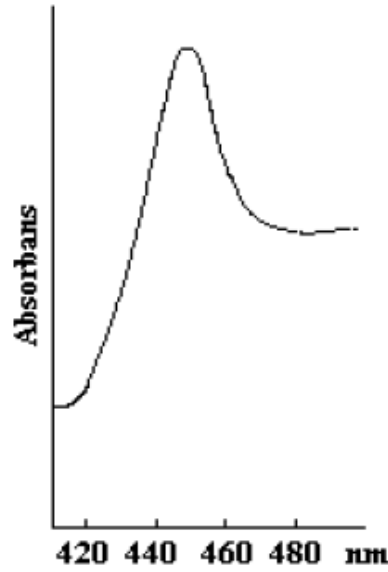
CYP450, ilk kez, sıçan karaciğerinden mikrozom fraksiyonları ile spektrofotometrik çalışmalar yapan Martin Klingenberg tarafından tanımlanmıştır. Sistem, katalitik fonksiyonları bilinmeden önce spektral özellikleri ile bilinmekteydi. Bu gruptaki proteinlerin, kendine has bir absorban spektrumu vardır. Endoplazmik retikulum vesiküllerinden hazırlanan mikrozom süspansiyonundan CO₂ gazı geçirildikten sonra

indirgeyici bir ajan eklendiğinde spesifik bir absorbands spektrumu gözlenir. Bu işlem esnasında indirgenmiş “hem” proteinine CO₂ bağlanır ve 450 nm.’ de en yüksek absorbands elde edilir (Şekil 4). 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 bir çok 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.

CYP450 enzimlerinin katalizlediği genel reaksiyon aşağıdaki gibidir;

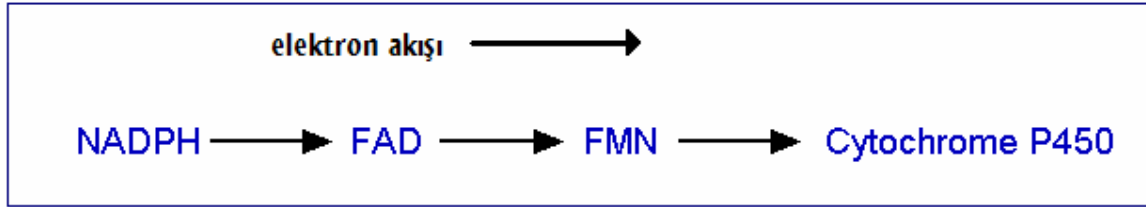


Bu reaksiyondaki substurat (R), bir steroid, yağasidi, ilaç, karsinojen olabilir. İki oksijen atomundan yalnızca biri substurata katıldığı için, bu reaksiyona monooksijenaz reaksiyonu ve bu enzimlere de **CYP450 monooksijenaz enzimleri** adı verilir (Hasler, J.A. ve ark 1999; Özerol, E. 1996; Nelson,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

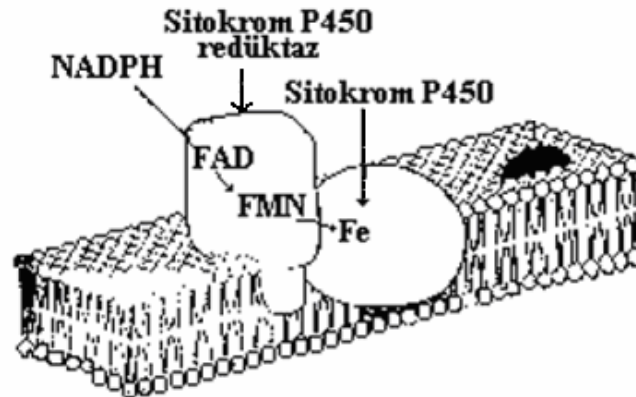


Şekil 4. Karbon monoksit bağlı CYP450’ nin absorbands eğrisi, (Özerol, E. 1996).

CYP450 monooksijenaz enzimleri, ökaryotik P450 sistemlerinde iki komponent halinde bulunmaktadır. Bunlar; FAD (Flavin Adenin Dinükleotid) ve FMN (Flavin Mono Nükleotid) içeren bir NADPH-P450 redüktaz ve CYP450 enzimleridir. CYP450 enzime elektron akışı, NADPH-P450 redüktaz sistemi ile sağlanmaktadır (Şekil 5). NADPH-CYP450 redüktaz enzimi membrana hidrofobik ucuyla bağlıdır. CYP450 enzimi ise ER membranına daha derin bağlanmıştır (Şekil 6).

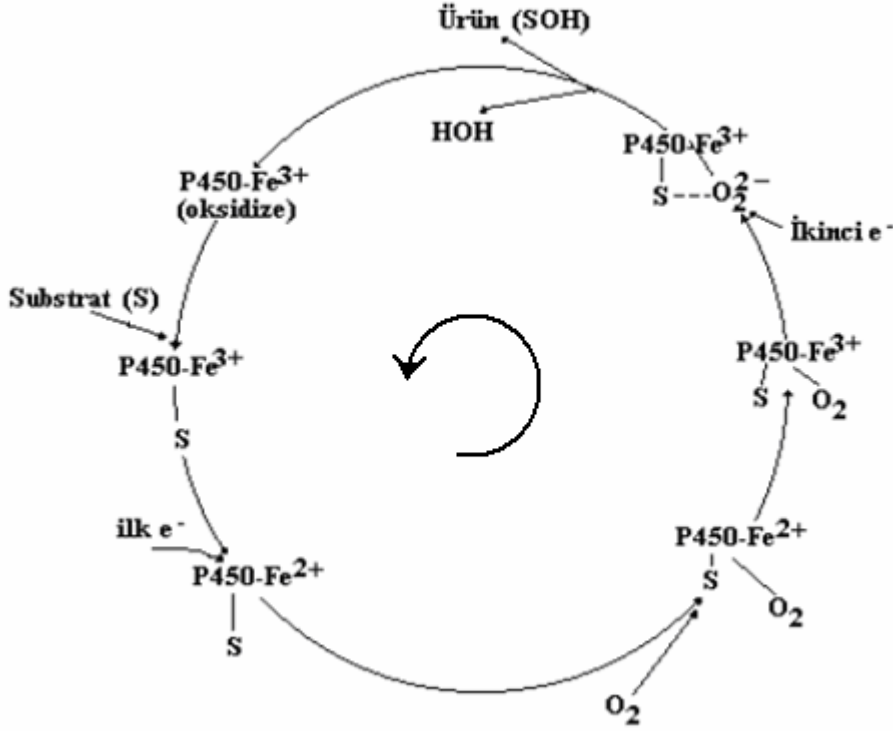


Şekil 5. CYP450 monooksijenaz reaksiyonundaki elektron akışı.



Şekil 6. Endoplazmik Retikulum' da CYP450 komponentleri (Özerol, E. 1996).

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 7).



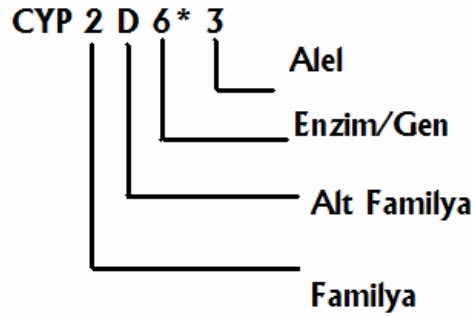
Şekil 7. CYP450 sisteminin reaksiyon basamakları (Özerol, E. 1996).

2.5.2. CYP450 Enzim Sisteminin Adlandırılması

Igelman-Sundberg, M., Daly, AK., Nebert DW.’nin editörlüğünü yapmakta olduğu “CYP450 Alel Terminoloji Komitesi”nin internet sayfasında CYP450 alellerinin tümü, adları ve mutasyonları ile birlikte belirtilmektedir (<http://www.cypalleles.ki.se/>). CYP’den sonra gelen rakam (Örn. CYP2) enzimin/genin hangi familyadan olduğunu, harf (Örn. CYP2D), alt familyayı, yani lokusu, harfi takip eden rakam ise (Örn. CYP2D6)

enzimin/genin adını belirtir. CYP2D6' ya ait tüm adlandırma ve mutasyon bilgilerine <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm> adresinden ulaşılabilir.

Daha önceleri her yeni keşfedilen alel, mutasyonu bulan kişinin isteğine bağlı olarak öngördüğü bir isim almaktayken (Örn. CYP2D6A), daha sonraları, alel sayısı arttıkça bu adlandırma sistemi yetersiz kalmış ve konu ile ilgili sistematik bir terminoloji geliştirilmiştir. Genotip-fenotip ilişkileri de göz önüne alınarak uluslararası kabul gören yeni terminoloji kılavuzu oluşturulmuştur. Yeni terminolojiye göre, tüm aleller CYP2D6' yı takip eden bir yıldız (*) ile birbirinden ayrılır (Daly, A.K. ve ark. 1996a) (şekil 8). Ortak mutasyona sahip alelin farklı dizin değişikliğine sahip olan her bir alt üyesi ise alel numarasının yanına gelen bir harf ile birbirinden ayrılır (Örn. CYP2D6*4A) (Ingelman-Sundberg, M. ve Oscarson, M. 2002).



şekil 8. CYP450 genlerinin adlandırılması.

2.6. CYP2D6 ENZİMİ VE POLİMORFİZMİ

2.6.1. CYP2D6 Geninin Keşfi

1970' lerde İngiltere'de ve Almanya'da iki ayrı araştırma grubu, sempatolitik antihipertansif bir ilaç olan debrisoquini 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 grlmştir. 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 yesi 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 enzime 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., 1989; Daly, A.K. 2003; Zanger, U.M. ve ark. 2004). O dönemlerin modern biyomedikal laboratuvarlarının, aranan yeni tekniği haline gelmiş olan PCR teknolojisi ile birlikte, alele özgü ilk CYP2D6 PCR testleri Heim ve Meyer tarafından 1990' da gerçekleştirilmiştir (Heim ve Meyer 1990). Fonksiyonel olmayan protein rnnlerini veya artan/azalan fonksiyona sebep olan protein rnnlerini sentezleyen aleller, sonradan bulunmuştur. Genotip-fenotip ilişkisine dayalı çok sayıda çalışma ve ilaç metabolizasyonunun polimorfizmi ile ilgili, kişiler arası çeşitliliği gösteren çalışmalar yapılmıştır (Ingelman-Sundberg, M. ve ark. 1999; Daly, A.K. 2003; Zanger, U.M. ve ark. 2004).

2.6.2. 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 edilen ve baz dizini belirlenen bu lokus, 22. kromozomun uzun kolu üzerinde, oldukça homolog üç gen içerir (Kimura, S. ve ark. 1989; Geadigk, A. ve ark. 1991) (Şekil 9). 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 9' da belirtildiği gibi, CYP2D8P ve CYP2D7P genleri psödogendir, CYP2D6 geni ise fonksiyonel bir genidir.



Şekil 9. CYP2D lokusunda bulunan genler (Endrizzi, K. ve ark. 2002).

2.6.3. CYP2D6 Enzim Aktivitesi ve Polimorfizmi

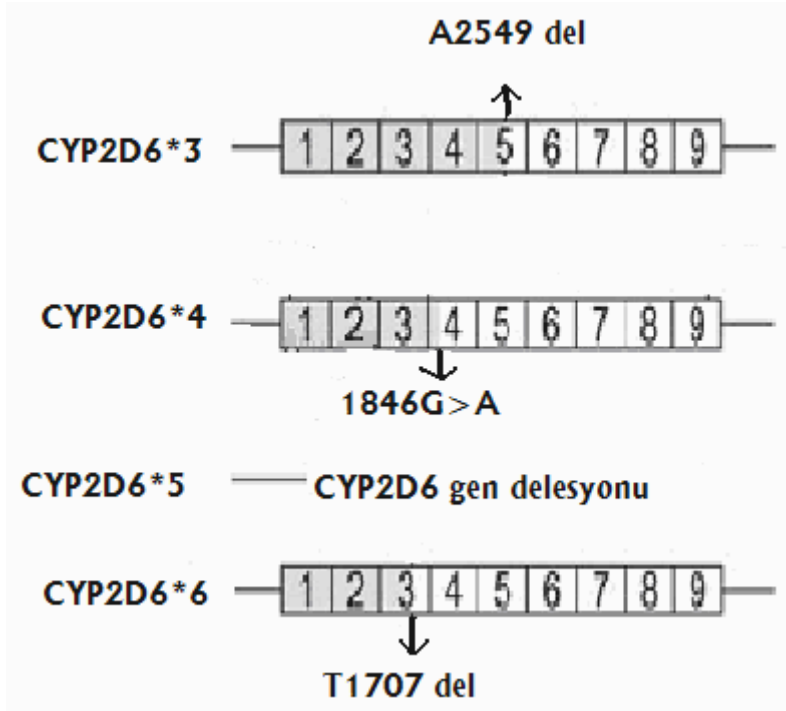
CYP2D6, metabolize ettiği 70' in üzerinde ilaç olması sebebiyle önemli bir enzimdir ve belki de bu özelliği nedeniyle, en çok çalışılan enzimdir (Nelson, D. 2003). Opiatlar, nöroleptikler, β -blokerler v.b. maddeler, CYP2D6 enziminin başlıca substratlarıdır

(Zackrisson, A.L. ve ark. 2004; McKinnon, R.A. ve Evans, A.M. 2000). Enzimi kodlayan genin 100' den fazla farklı alele sahip olduğu saptanmıştır (www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2d6.htm). Bu aleller, 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 (Şekil 10). Mutasyonların etkisine göre dört fenotip belirlenmiştir. Bunlar; **yavaş 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).

Yavaş Metabolizörler (PM)

Beyaz popülasyonun %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 (Geadigk 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).



Şekil 10. CYP2D6 *3, *4, *5 ve *6 alelleri ve enzim aktivasyonları.

Orta Hızlı Metabolizörler (IM)

CYP2D6*9, *10, *17, *36, *41 alelleri içerdikleri mutasyonlara bağlı olarak düşük aktiviteli enzim üretirler.

Normal Metabolizörler (EM)

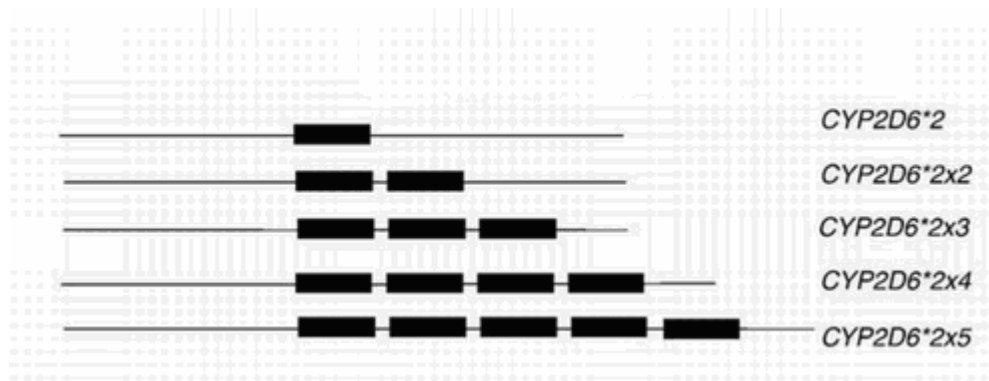
CYP2D6*1, enzimin hiçbir mutasyon içermeyen ve normal fonksiyonunu sürdüren alelidir.

*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 11). Gen duplikasyonu sayısının 12' ye kadar çıktığı görülmüştür Bir ailenin üç üyesi olan baba ve iki çocuğunda bu genin 12 kopyası tesbit 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 11 . CYP2D6*2 alelinin gen duplikasyonu ve UM oluşumu (Magnus-Ingelman S., 2005).

2.6.4. CYP2D6 Polimorfizmi ile İlgili Çalışmalar

Dünyanın pek çok ülkesinde CYP2D6 geninin polimorfik çalışmaları yapılmış ve yapılmaktadır. Bu çalışmaların ışığında farmakogenetik alanda ilerleme kaydedilmesi öngörülmektedir. 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 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 idantifiye edilmiştir ve popülasyonun % 87’ sinin CYP2D6*1 (EM), CYP2D6*2 (EM), CYP2D6*4 (PM) ve CYP2D6*5 (PM) alellerine sahip olduğu tesbit edilmiştir (Marez, D. ve ark. 1997).

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). Bunun yanı sıra, ülkemizde 404 örnekle yapılan çalışmanın sonucunda, en sık rastlanan alelin CYP2D6*1 (EM) olduğu bulunmuştur. 0.37 olarak tespit edilen bu alel frekansının dışında, CYP2D6*2 (EM) alelinin sıklığı, 0.35 olarak tesbit edilirken, CYP2D6*4 (PM), 0.11 sıklıkta gözlenmiş, CYP2D6*5 (PM) aleli ise % 1 sıklıkta görülmüştür. UM lerin oranı ise, % 8.66 olarak belirlenmiştir (Aynacıoğlu, S.A. ve ark. 1999).

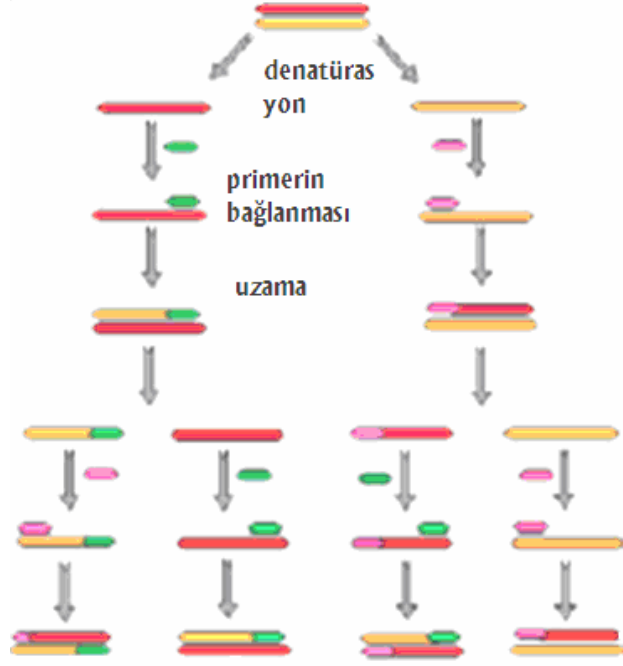
2.7. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

(Dieffenbach, C.W. ve Gabriela, S.D. , 2003; <http://www.gazete.itu.edu.tr/mart/4genetik>)

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 12).

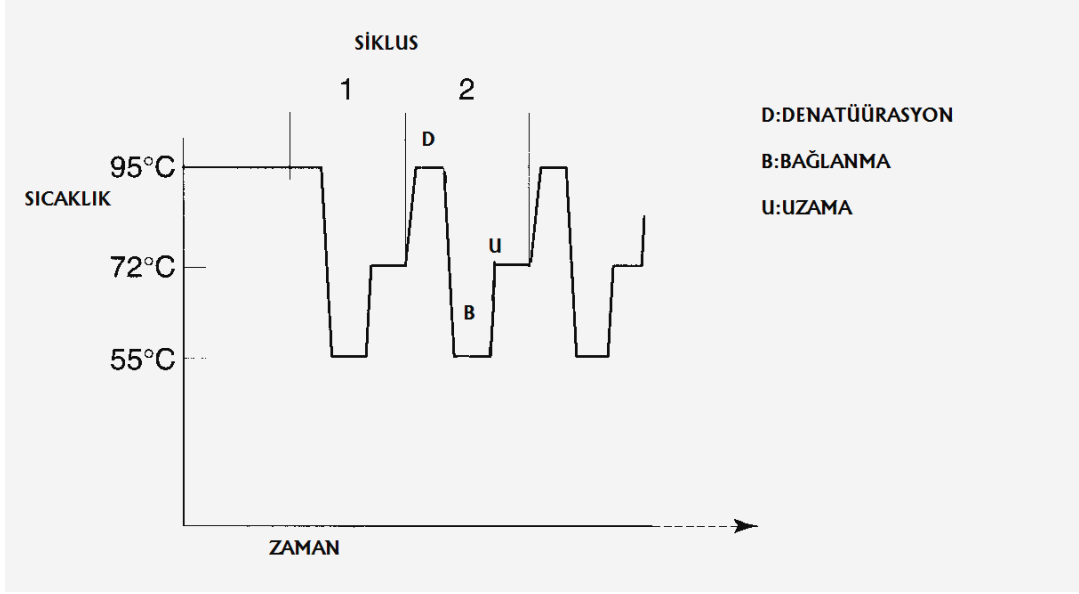


Şekil 12. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun şematik görüntüsü

(<http://www.gazete.itu.edu.tr/mart/4genetik>).

Sözü edilen bu aşamaların her biri farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilir (Şekil 13);

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



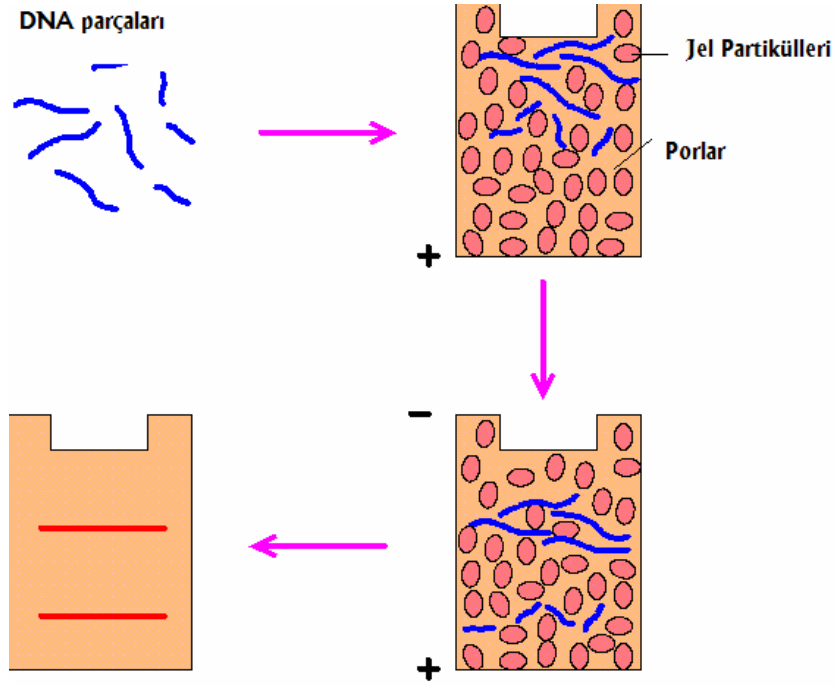
Şekil 13. Bir PCR döngüsünün basamakları ve sıcaklıkları.

PCR ile bir hedef DNA parçasından milyonlarca çoğaltmak mümkündür. Reaksiyon başlatılmadan önce istenen sayıda döngünün tekrarlanması sağlanabilir. 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 (Mg²⁺) sağlayan tampon karışımıdır. PCR yöntemi kolay uygulanabilir olması ve hızlı sonuç vermesi gibi avantajları nedeniyle, birçok farklı alanda kullanılabilir.

2.8. ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ

(Westermeier, R. 2001)

Elektroforez yöntemi, moleküllerin, sahip oldukları elektrik yüklerine bağlı olarak, bir elektriksel alan içinde göç etmelerine dayanan bir yöntemdir. Yöntemde, bir hareketli, bir de sabit faz vardır. Sabit faz olarak kağıt, asetat, selüloz, poliakrilamid, agaroz gibi dolgu maddeleri kullanılır. Sabit ortamdaki en önemli özellik, moleküllerin kolaylıkla geçmesini sağlayan porlardan oluşmasıdır.



Şekil 14. Elektroforez yönteminin şematik görüntüsü.
(<http://www.webbooks.com/MoBio/Free/Ch9C.htm>).

Elektroforezin diğer yöntemlerden farkı, bir elektriksel alan yaratılmasıdır. Moleküller, bu elektriksel alanda farklı hızlarla, bir elektrottan diğerine hareket ederek, molekül

ağırlıklarına ve taşıdıkları elektrik yüklerine göre birbirlerinden ayrılırlar (Şekil 14). Ayrılan moleküller çeşitli boyama yöntemleri ile görünür hale getirilirler.

2.8.1. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

En yaygın kullanım alanı olan elektroferez tipidir. Jel, sentetik bir madde olan akrilamid ile akrilamid türevi olan N-N'-metilen bisakrilamidin polimerleşmesiyle oluşturulur ve örnekler, bu jel üzerinde yürütülür. Protein, DNA ve RNA elektroforezi için kullanılabilir. Akrilamid miktarı ve akrilamid/bisakrilamid oranı jelin ayrıştırma kapasitesini belirler. Polimerleşme reaksiyonunda, akrilamid molekülleri yanyana bağlanarak düz zincirler oluştururlar. Bisakrilamid molekülleri ise, iki akrilamid zinciri arasında çapraz bağlanmalar yapar ve böylece ağımsı bir yapı meydana gelir. Polimerleşme derecesi; sıcaklık, pH, amonyum per sülfat (APS) ve N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED) miktarına göre farklılık gösterir. Polimerleşme için serbest radikal oluşumuna sebep olan APS, katalizör olarak ise reaksiyon başlatıcı TEMED kullanılır.

2.8.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jellerin ayırma gücü, poliakrilamid jellere oranla daha düşük olmakla birlikte, ayırabildikleri DNA parçacıklarının uzunlukları 50 kilo baza (kb) kadar çıkabilir. Agaroz jeldeki örnekler, genellikle yatay pozisyonda, sabit güç ve yöndeki elektriksel alanda yürütülmektedir. Agaroz, deniz yosunlarından elde edilen, dallanmamış zincirli bir polimerdir. Büyük moleküller, sürtünmenin büyük olması ve jeldeki porlar arasında daha zor yol bularak ilerlemelerinden ötürü, daha yavaş hareket ederler. Molekülün hızını belirleyen bir diğer faktör ise, agaroz konsantrasyonudur. Belirli büyüklükteki doğrusal bir DNA molekülü, değişik agaroz konsantrasyonlarındaki jellerde farklı hızlarla ilerlerler. DNA' nın elektroforetik hareketliliğinin logaritması ile jel konsantrasyonu arasında da bir ilişki olduğundan, değişik konsantrasyonlardaki jellerin kullanılmasıyla çok farklı boyutlardaki DNA' ları ayırmak mümkündür. Agaroz jelde DNA' yı görünür hale

getirmenin en uygun yolu, floresan özellikteki Etidium bromür (EtBr) boyasını kullanmaktır. EtBr, DNA bazları arasında girer ve ultraviyole ışık altında flüoresan ışık yayar. Bu madde jelin içine agaroz eritilirken eklenebilir veya elektroforez sonrası jel, EtBr içeren bir solüsyonda bekletilebilir. Böylece jeldeki DNA görünür hale gelir. EtBr kuvvetli bir mutajendir ve oldukça toksiktir, analizi yapan kişinin, çalışma esnasında, boya ile temastan sakınması gerekmektedir.

DNA'nın elektroforetik analizinin temeli, bu molekülün elektriksel bir alanda, jel üzerindeki göçüne dayanır. Bu göç hızı, molekülün büyüklüğüne, yapısına, jelde kullanılan maddenin konsantrasyonuna, iyonik kuvvete ve uygulanan akıma bağlı olarak değişmektedir (Westermeier, R. 2001).

2.9. GELİŞMEKTE OLAN YENİ TEKNİKLER

2.9.1. MALDI-TOF-MS

MALDI-TOF-MS (Matriks Destekli Lazer Dezorpsiyon- İyonizasyon-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrofotometrisi), nükleik asit gibi mol kütlesi büyük olan biyopolimerlerin analizinde kullanılmakta olan yeni bir tekniktir. Bu teknik ilk kez, 1988 yılında ortaya çıkmıştır ve protein, peptid, nükleik asit analizinde yaygın olarak kullanılmıştır. Genom projesinin tamamlanmasıyla hakkında daha derin bilgi sahibi olduğumuz binlerce farklı SNP lokusunun hızlı ve güvenilir tespiti için, son yıllarda MALDI-TOF-MS yönteminden yararlanılmaktadır (Timothy, J. ve ark. 2000; Boom, D. ve ark. 2004; Sobrino, B. ve ark. 2005; Tang, K. 2003).

2.9.2. AmpliChip CYP450 Test

CYP450 enzim polimorfizminin belirlenmesi için hizmet vermesi öngörülen bir testtir. ADR' yi en aza indirmek ve en etkin tedavi dozunu ayarlayabilmek üzere geliştirilmiş olan

bu test, Food And Drug Administration (FDA) tarafından kabul görmüştür ancak, şu an için yalnızca CYP2D6 ve CYP2D19 enzimleri için bazı kliniklerde rutin olarak kullanılır. AmpliChip CYP450 Test, henüz yaygınlaşmamış olmakla beraber tam olarak hangi sağlık departmanlarında ve ne şekilde kullanılacağı konusunda da kesin sonuçlara ulaşılamamıştır (Juran B.D. ve ark. 2006; Leon J. ve ark. 2006; Sadée, W. 1999).

2.9.3. Real Time PCR (RT-PCR)

Geleneksel PCR ve sonrasında yapılan görünürleştirme yöntemlerinin yanı sıra, son yıllarda yeni bir teknik geliştirilmiştir. RT-PCR, anında izlenebilen bir çoğaltma yöntemidir. Bu yöntem, hedef bölgeye bağlanan ve çeşitli yollarla sinyal elde edilebilen primerler sayesinde, çoğalmayı bu sinyallere bağlı olarak takip etme olanağı tanır. Böylece geleneksel PCR ile çoğaltma işleminden sonraki görünürleştirme basamakları ve bu basamaklarda artan kontaminasyon riski de ortadan kalkmış olur. Ayrıca, EtBr gibi toksik maddelerin kullanımına gerek kalmadığından çalışan kişinin sağlığı korunmuş olur (Sobrinio ve ark 2005, Stamer ve ark 2002). Son yıllarda, CYP2D6 alellerinin tesbitinde de bu yönteme başvurulmaktadır (Borlak, J. 2003; Endrizzi, K. 2002).

2.9.4. “Microarray=Gene chips” Teknolojisi

DNA microarray, bir lam üzerine binlerce DNA dizisinin bağlanmasıyla oluşturulan, DNA değişimlerini (mutasyonlar) ve gen ifadesindeki (genden proteine geçiş) değişimleri melezlemeyle saptayan bir yöntemdir. Mutasyonların hızlı ve etkin şekilde saptanmasına olanak sağlar. Bu yöntem, SNP profillerini hızla tespit edebilen, proteomik ve farmakogenetik çalışmalarında da son zamanlarda tercih edilen bir yöntem olmaya başlamıştır (Sobrinio, B. ve ark 2005; Murphy, G.M. ve ark. 2001).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, İstanbul Balıklı Rum Hastanesi Anatolia Kliniği' ne, tedavi olmak üzere başvuran ve aralarında akrabalık ilişkisi olmayan, 29 opiat bağımlısının kanı kullanıldı. Kontrol grubu olarak ise daha önce bağımlılık yapıcı herhangi bir madde kullanmamış ve aralarında akrabalık bulunmayan çalışmaya katılmayı kabul eden 22 kişiden alınan kan örnekleri kullanıldı. Kanlar EDTA' lı tüplere alınarak -20°C ' de muhafaza edildi. Kanlardan DNA izole edilerek, PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile hedef bölgeler çoğaltıldı. Poliakrilamid jel elektroforezi ve agaroz jel elektroforezi ile PCR ürünlerinin birbirinden ayrılması sağlandı. Görünürleştirme, poliakrilamid jel için, gümüş boyama tekniği ile; agaroz jel için ise, etidyum bromür (EtBr) ile gerçekleştirildi.

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN GEREÇLER

Otomatik pipet	0.1- 2.5 μL 2.5- 20 μL 10- 100 μL 100- 1000 μL	Eppendorf
Otoklav		Nüve
Buzdolabı ($+4^{\circ}\text{C}$)		Arçelik
Derin dondurucu (-20°C)		Arçelik
Vorteks		Nejat Coşkuner
Distile su cihazı		Nejat Coşkuner
Etüv		Nüve
Santrifüj		Heraeus
Isı döngü aleti		Techne Genius
pH metre		Schott

Elektronik hassas terazi	Scaltec
Çalkalayıcı	Nüve
Dikey elektroforez tankı	CBS-Scientific
Güç kaynağı	Bio- Rad
Yatay elektroforez tankı	Biometra
UV Transillüminatör	Biometra
Manyetik Karıştırıcı	Sartorius
Ben-Mari (su banyosu)	-----

3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Agaroz	Prizma
Akrilamid	Ambresco
Amonyum persülfat	Sigma
Asetik asit (glasiyel % 100)	Riedel-de Haen
Bind silane (Methacryloxypropyltrimetoxysilane)	Sigma
Borik asit	Sigma
Formaldehit(%37)	Merck
Disodyum etilendiamin tetra asetik asit 2.H ₂ O (EDTA)	Sigma
Etanol (%95)	Merck
Etidyum bromür	Sigma
N,N,N,N, tetra etilen diamin (TEMED)	Sigma
Tris hidroksi metil amino metan (Trisma- base)	Sigma
Üre	Sigma
Nitrik asit (%65)	Merck
Sodyum karbonat	Merck

Gümüş nitrat	Merck
N,N metilen bisakrilamid	Sigma
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma
6X yükleme tamponu	Fermentas
DNA izolasyon kiti	Qiagen
Taq DNA polimeraz	Fermentas
dNTP mix	Fermentas
MgCl ₂	Fermentas
10X PCR Tamponu	Fermentas
Primerler	Thermo Electron GmbH
DNA standardı	Fermentas
Long PCR enzim mix	Fermentas

3.3. ÇALIşMADA KULLANILAN ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

DNA İzolasyon özeltileri

AW1 özeltisi: 95 mL AW1 + 125 mL etanol (%98) karıştırılarak oda sıcaklığında saklandı.

AW2 özeltisi: 66 mL AW2 + 160 mL etanol (%98) karıştırılarak oda sıcaklığında saklandı.

Akrilamid: Bis (19:1) (%40) (1 litre için)

380 gr. Akrilamid

20 gr. Bisakrilamid

Deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı

Amonyum persülfat (APS) (%10)

2 gr. Amonyum persülfat

20 ml. Deiyonize su

1000' er µl'lik ependorf tüplerine dağıtılarak -20⁰C' de saklandı.

Asetik asit (%10)

100 ml. Asetik asit

Deiyonize su ile 1 lt.' ye tamamlandı.

Bind silane (1ml)

3 µl bind silane
1 ml. Etanol-asetik asit ile karıştırıldı.

Etanol- asetik asit çözeltisi (200 ml)

199 ml etanol (%95)
1 ml asetik asit ile karıştırılarak hazırlandı.

Gümüş nitrat çözeltisi (%2) (1 litre için)

2 gr. Gümüş nitrat
Deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı.
Alüminyum folyoya sarılarak muhafaza edildi.

Sodyum karbonat çözeltisi (1 litre için)

29.6 gr. Sodyum karbonat
1 ml formaldehit (%37)
Deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı.

Nitrik asit çözeltisi (1 litre için)

15 ml HNO₃ (%65)
Deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı.

10 X TBE (Tris- borik asit- EDTA) tamponu (pH 8.3) (1 litre için)

55 gr. Borik asit
7.44 gr. EDTA
107.8 gr. Tris baz
Deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı. Uzun süreli kullanımlar için +4⁰C' de saklandı.

1X TBE tamponu (1 litre için)

100 ml 10X TBE tamponu
Deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı.

0.5 X TBE tamponu (1 litre için)

50 ml 10X TBE tamponu
Deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı.

Etidyum Bromür

10 mg. EtBr
1 mL. distile su
Vortekslenerek, alüminyum folyoya sarılarak +4⁰C' de saklandı.

3.4. YÖNTEMİN UYGULANMASI

3.4.1. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Kan örneklerinden Qiagen QIAmp DNA Mini Kit ile DNA çekitlenmesi (QiAmp DNA Blood Mini Kit Handbook, 2003)

Hazırlık

1. Örnekler oda sıcaklığına (15-25 °C) getirildi
2. Etüv 56 °C' ye getirildi.
3. AE tamponu oda sıcaklığına getirildi.
4. AL tamponunda çökelme görüldüğü takdirde 56° C' de inkübe edildi.
5. Santrifüjler oda sıcaklığında yapıldı.

İzolasyon

1. 1.5 mL lik ependorf tüpüne 20 µL Proteinaz K koyuldu.
2. 200 µL kan örneği pipetleme yaparak tüpe ilave edildi.
3. 200 µL AL tamponu pipetleme yaparak eklenip 15 saniye vortekslendi.
4. 56 °C' de 10 dk. inkübe edildi.
5. Kısa bir santrifüj yapılarak tüpün etrafına bulaşan maddelerin toplanması sağlandı.
6. 200 µL etanol eklenerek 15 saniye vortekslendi ve kısa bir santrifüj yapıldı.
7. Tüpteki tüm madde dikkatlice alınarak spin kolona taşındı.
8. 8000 devirde 1 dk. santrifüjlendi, spin kolonun altındaki toplama tüpü yenisiyle değiştirildi.
9. Kolonun ağzı dikkatlice açılarak 500 µL AW1 tamponu eklendi.
10. 8000 devirde 1 dk. santrifüjlendi, spin kolonun altındaki toplama tüpü yenisiyle değiştirildi.
11. Kolonun ağzı dikkatlice açılarak 500 µl AW2 tamponu eklendi.
12. 14000 devirde 3 dk. santrifüjlendi.
13. Spin kolon 1.5 mL lik ependorf tüpüne alınıp 100 µL AE tamponu eklendi ve 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.

14. 8000 devirde 1 dk. santrifüjlendikten sonra spin kolon tüpten çıkarıldı ve tüpün üzeri etiketlenerek ağzı parafilmle kapatıldı.
15. Örnekler uzun süreli, güvenilir bekletmeler göz önünde tutularak -20 °C' de muhafaza edildi.

İzolasyon işlemi süresince pipet ucunun tüpün kenarına değmesinden kaçınıldı.

3.4.2. DNA'NIN ÇOĞALTILMASI

3.4.2.1. Tek Tüpte 4 Primerli PCR Yöntemi (Hersberger, M. ve ark. 2000)

3.4.2.1.1. CYP2D6*3 Alelinin PCR Parametreleri

PCR Karışımının Hazırlanması

10X Taq buffer	2.5 µL
25mM MgCl ₂	2.5 µL
1.25 mM dNTPmix	1 µL
BSA	0.5 µL
P ₃	1 µL
P _{4new}	1 µL
A _{wt}	4 µL
P ₆	4 µL
Taq DNA polimeraz (5u/ µL)	1 µL
DNA örneği (~62 ng/ µL)	2.5 µL
Steril deiyonize su	10 µL
Toplam hacim:	30 µL

PCR döngü parametreleri

<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>	<u>Döngü sayıları</u>
94 °C	10 dakika	1
95 °C	0.5 dakika	30
63 °C	0.5 dakika	
72 °C	1 dakika	

95 °C	0.5 dakika	
53 °C	0.5 dakika	30
72 °C	1 dakika	
72 °C	7 dakika	1

3.4.2.1.2. CYP2D6*4 Alelinin PCR Parametreleri

PCR karışımının hazırlanması

10X Taq buffer	2.5 µL
25mM MgCl ₂	2.5 µL
1.25 mM dNTPmix	1 µL
BSA	0.5 µL
1 _{new}	1 µL
2 _{new}	1 µL
B _{mut}	5 µL
P ₇	5 µL
Taq DNA polimeraz (5u/ µL)	1 µL
DNA örneği (~62 ng/ µL)	2.5 µL
Steril deiyonize su	8 µL
Toplam hacim:	30 µL

PCR döngü parametreleri

<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>	<u>Döngü sayıları</u>
94 °C	10 dakika	1
95 °C	0.5 dakika	
63 °C	0.5 dakika	30
72 °C	1 dakika	
95 °C	0.5 dakika	
53 °C	0.5 dakika	30
72 °C	1 dakika	

72 °C 7 dakika 1

3.4.2.1.3. CYP2D6*6 Alelinin PCR Parametreleri

PCR karışımının hazırlanması

10X Taq buffer	2.5 µL
25mM MgCl ₂	2.5 µL
1.25 mM dNTPmix	1 µL
BSA	0.5 µL
1 _{new}	1 µL
2 _{new}	1 µL
P ₁₁	5 µL
T _{mut}	5 µL
Taq DNA polimeraz (5u/ µL)	1 µL
DNA örneği (~62 ng/ µL)	2.5 µL
Steril deiyonize su	8 µL
Toplam hacim:	30 µL

PCR döngü parametreleri

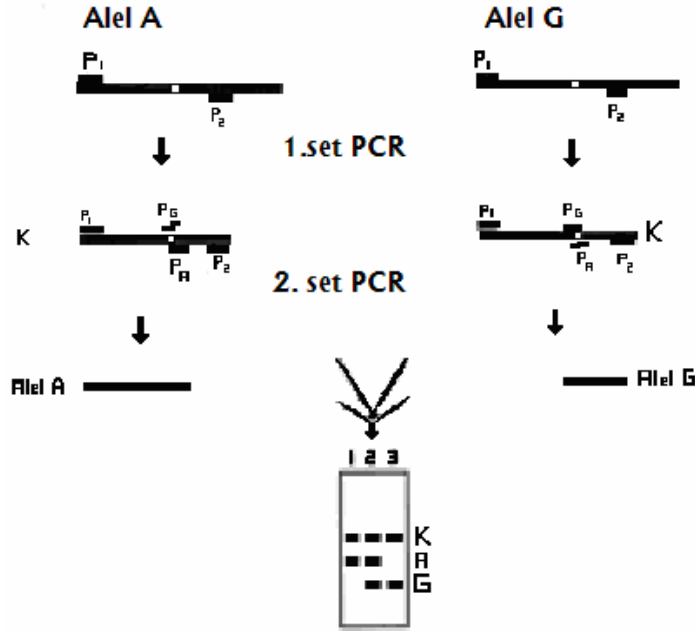
<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>	<u>Döngü sayıları</u>
94 °C	10 dakika	1
95 °C	0.5 dakika	30
63 °C	0.5 dakika	
72 °C	1 dakika	
95 °C	0.5 dakika	30
53 °C	0.5 dakika	
72 °C	1 dakika	
72 °C	7 dakika	1

Çalışmada, Hersberger ve ark. (2000)' nın makalelerinde belirttiği primer dizinleri (bkz. Tablo 1) kullanılarak, ve herbir alel için ayrı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gerçekleştirilerek hedef bölgeler çoğaltıldı. Orijinal ambalajında, toz halde bulunan primerler, hazırlama talimatına uygun bir şekilde 100 pmol. lük stoklar halinde hazırlandı ve -20°C ' de saklandı. CYP2D6 *3 (2549 A>del), *4 (1846 G>A), *6 (1707 T>del) (Daly ve ark. 1996a) alellerinin herbiri için tek tüpte, dört primerin de bulunduğu bir amplifikasyon gerçekleştirildi.

Tablo 1. CYP2D6*3, *4, *5 ve *6 alellerinin belirlenmesi için kullanılan primer dizinleri.

Alelin adı	Primerin adı	5'-3' primer dizini
CYP2D6*3	P ₃ P _{4new} A _{wt} P ₆	GCG GAG CGA GAG ACC GAG GA GGT CCG GCC CTG ACA CTC CTT CT TCC CAG GTC ATC CT GCT AAC TGA GCA CG
CYP2D6*4	1 _{new} 2 _{new} B _{mut} P ₇	TCC CAG CTG GAA TCC GGT GTC G GGA GCT CGC CCT GCA GAG ACT CCT TCT CCC ACC CCC AA CGA AAG GGG CGT CC
CYP2D6*5	D _{low} D _{up} DPK _{up} DPK _{low}	CAG GCA TGA GCT AAG GCA CCC AGA C CAC ACC GGG CAC CTG TAC TCC TCA GTT ACT CCA GAA GGC TTT GCA GGC TTC A GCC GAC TGA GCC CTG GGA GGT AGG TA
CYP2D6*6	1 _{new} 2 _{new} T _{mut} P ₁₁	TCC CAG CTG GAA TCC GGT GTC G GGA GCT CGC CCT GCA GAG ACT CCT GTC GCT GGA GCA GG TCC TCG GTC ACC CA

Tek tüpte 4 primerli PCR uygulaması ile ilgili açıklamalar Şekil 15. de yapılmıştır.



Şekil 15. Tek tüpte 4 primerli PCR uygulamasının şematik görünümü (K: kontrol, A: Alel A, G: Alel G). Şekilde görüldüğü gibi, bu primerlerden ikisi (P_1 ve P_2 primerleri), gen bölgesine özgü primerlerdir ve bu 1.set, döngününün kontrol parçasını çoğaltmış olur. Oluşan ürün, PCR' nin 2. seti için kalıp DNA olarak kullanılır, aynı zamanda reaksiyonun gerçekleştiğinin de kanıtıdır. Alele özgü amplifikasyon aşamasında ise diğer iki primer (P_A ve P_G primerleri) devreye girer (Hersberger ve ark. 2000). Şekilde sembolize edildiği gibi kişinin genotipi A ise, P_1 ve P_A primerleri alel A' ya özgü parçayı çoğaltır. Kişinin genotipi G ise, P_2 ve P_G primerleri alel G' ye özgü parçayı çoğaltır. Oluşan PCR ürünleri, agaroz ve poliakrilamid jelde görünür hale getirilir.

3.4.2.2. Tek Tüpte 4 Primerli PCR Yönteminin Basamaklandırılması

3.4.2.2.1. CYP2D6*3 Alelinin İnternal Kontrolü İçin PCR Parametreleri

PCR karışımının hazırlanması

10X Taq buffer 2.5 μ L

25mM $MgCl_2$ 2.5 μ L

BSA	0.5 µL
1.25 mM dNTP mix	0.75 µL
Taq DNA Polimeraz(5u/ µL)	0.5 µL
P ₃	0.5 µL
P _{4new}	0.5 µL
DNA örneği (~62 ng/ µL)	2.5 µL
Steril distile su	14.75 µL
Toplam hacim	25 µL

PCR döngü parametreleri

<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>	<u>Döngü sayıları</u>
94 °C	10 dakika	1
95 °C	0.5 dakika	30
63 °C	0.5 dakika	
72 °C	1 dakika	
72 °C	7 dakika	1

Çoğalan parçanın uzunluğu 1106 bp

3.4.2.2.2. CYP2D6*3 Alelinin Kontrol Parçasından Yapılan Alele Özgü Amplifikasyon

PCR Karışımının hazırlanması

10 X Taq buffer	2.5 µL
25 mM MgCl ₂	2.5 µL
BSA	0.5 µL
1.25 mM dNTP mix	1 µL
P ₃	0.5 µL
P _{4new}	0.5 µL
A _{wt}	4 µL
P ₆	4 µL

Taq DNA Polimeraz (5u/ μ L)	1 μ L
PCR ürünü (1106 bç)	4 μ L
Steril distile su	9.5 μ L
Toplam hacim:	30 μL

PCR döngü parametreleri

<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>	<u>Döngü sayıları</u>
94 $^{\circ}$ C	10 dakika	1
94 $^{\circ}$ C	0.5 dakika	30
53 $^{\circ}$ C	0.5 dakika	
72 $^{\circ}$ C	1 dakika	
72 $^{\circ}$ C	7 dakika	1

3.4.2.2.3. CYP2D6*4 ve *6 Alellerinin İnternal Kontrolü İçin PCR Parametreleri

PCR karışımının hazırlanması

10 X Taq buffer	2.5 μ L
25 mM MgCl ₂	2.5 μ L
BSA	0.5 μ L
1.25 mM dNTP mix	0.75 μ L
P _{1new}	1 μ L
P _{2new}	1 μ L
Taq DNA Polimeraz (5u/ μ L)	0.5 μ L
DNA örneği (~62 ng/ μ L)	2.5 μ L
Steril distile su	13.75 μ L
Toplam hacim	25 μL

PCR döngü parametreleri

<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>	<u>Döngü sayıları</u>
------------------------	--------------------	------------------------------

94 °C	10 dakika	1
95 °C	0.5 dakika	
63 °C	0.5 dakika	30
72 °C	1 dakika	
72 °C	7 dakika	1

Çoğalan parçanın uzunluğu 750 bç

3.4.2.2.4. CYP2D6*4 Alelinin Kontrol Parçasından Yapılan Alele Özgü Amplifikasyon

PCR Karışımının hazırlanması

10 X Taq buffer	2.5 µL
25 mM MgCl ₂	2.5 µL
BSA	0.5 µL
1.25 mM dNTP mix	1 µL
P _{1new}	0.5 µL
P _{2new}	0.5 µL
B _{mut}	4 µL
P ₇	4 µL
Taq DNA Polimeraz (5u/ µL)	1 µL
PCR ürünü (750 bç)	4 µL
Steril distile su	9.5 µL
Toplam hacim:	30 µL

PCR döngü parametreleri

<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>	<u>Döngü sayıları</u>
94 °C	10 dakika	1
94 °C	0.5 dakika	
53 °C	0.5 dakika	30
72 °C	1 dakika	
72 °C	7 dakika	1

3.4.2.2.5. CYP2D6*6 Alelinin Kontrol Parçasından Yapılan Alele Özgü Amplifikasyon PCR Karışımının hazırlanması

10 X Taq Buffer	2.5 µL
25 mM MgCl ₂	2.5 µL
BSA	0.5 µL
1.25 mM dNTP mix	1 µL
P _{1new}	0.5 µL
P _{2new}	0.5 µL
T _{mut}	4 µL
P ₁₁	4 µL
Taq DNA Polimeraz (5u /µL)	1 µL
PCR ürünü (750 bç)	4 µL
Steril distile su	9.5 µL
Toplam hacim:	30 µL

PCR döngü parametreleri

<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>	<u>Döngü sayıları</u>
94 °C	10 dakika	1
94 °C	0.5 dakika	30
53 °C	0.5 dakika	
72 °C	1 dakika	
72 °C	7 dakika	1

Bu yöntemde, *tek tüpte 4 primerli PCR yöntemi* ile elde edilen parçalar, iki ayrı PCR basamağı ile çoğaltıldı. Önce CYP2D6*3, *4, *6 alellerinin birinci setinde çoğaltılan kontrol parçaları (CYP2D6*3 için 1106, CYP2D6*4 ve *6 için 750 bç), yukarıda belirtilen

parametrelerle çoğaltıldı, ardından, elde edilen internal kontrol parçaları kalıp DNA olarak kullanıldı ve ikinci basamakta alele özgü çoğalma işlemi gerçekleştirildi.

3.4.2.3. **MULTİPLEX LONG-PCR YÖNTEMİ** (Hersberger, M. ve ark. 2000)

3.4.2.3.1. **CYP2D6*5 Alelinin PCR Parametreleri**

PCR karışımının hazırlanması

Long PCR tamponu	5 µL
25 mM MgCl ₂	5 µL
DMSO	5 µL
BSA	2 µL
1.25 mM dNTP mix	5 µL
D _{up}	0.75 µL
D _{low}	0.75 µL
DPK _{up}	1.5 µL
DPK _{low}	1.5 µL
Long-PCR enzim mix	0.75 µL
DNA örneği (~62 ng/ µL)	4 µL
Steril deiyonize su	18.75 µL
Toplam hacim:	50 µL

PCR döngü parametreleri

<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>	<u>Döngü sayıları</u>
94 °C	2 dakika	1
94 °C	1 dakika	35
65 °C	0.5 dakika	
68 °C	5 dakika	
68 °C	7 dakika	1

CYP2D6*5 (CYP2D6 del) (Daly, A.K. ve ark. 1996a) alellinin saptanmasında *multipleks long-PCR* yöntemi uygulandı (Hersberger, M. ve ark. 2000). Bu yöntemde kullanılan primerlerden bir çifti (D_{up} ve D_{low} primerleri), gen delesyonunu belirlemeye özgüdür ve 3.2 kb. lik bir ürün oluşturur. Diğer çifti ise, (DPK_{up} ve DPK_{low} primerleri) CYP2D6 geninin varlığını gösteren 5.1 kb. lik parçayı oluşturur. Bu çalışmada oluşan ürünlerin boyutlarının büyük olmasından dolayı, *multipleks long- PCR* ye uygun ‘Enzyme-Mix’ kullanıldı (Hersberger, M. ve ark. 2000).

3.4.3. ELEKTROFOREZ

PCR ürünlerinin görünürleştirilmesi iki şekilde yapıldı:

- Gümüş boyama tekniğine dayanan denatüre poliakrilamid jel elektroforezi.
- Etidyum Bromür’ lü agaroz jel elektroforezi.

3.4.3.1. GÜMÜŞ BOYAMA YÖNTEMİ İLE GÖRÜNÜRLEŞTİRİLEN DENATÜRE POLİAKRİLAMİD JELİN HAZIRLANMASI VE YÜRÜTÜLMESİ

Bu çalışmada kullanılan 33 cm.x 42 cm.x 0.4 cm. (genişlik x yükseklik x kalınlık) ebatlarındaki cam plakalar, aşağıdaki yol izlenerek hazırlandı.

- Cam plakalar etanol (%95) ile yıkanıp kurulandı.
- U ağızlı, kısa cam plakaya yeni hazırlanmış bind silane çözeltisinden 15 μ L koyularak alkollü kağıt havlu yardımı ile tüm yüzeye yayıldı.
- Bind silane çözeltisinin kurumması için 5 dk. beklendi ve cam plaka yeniden 3 kez etanol (%95) ile silindi, kurutuldu.
- Düz, uzun camın kenarlarına 0.4 mm. kalınlığında ayırıcı şeritler (spacer) koyularak jelin kalınlığı ayarlandı. Kısa cam, uzun camın üzerine oturtularak jel sandiviçi kenarlarından kışkaçlarla iyice sıkıştırıldı.
- Aşağıdaki formüle göre istenilen konsantrasyonlarda akrilamid çözeltisi hazırlandı.

	<u>%4</u>	<u>%5</u>	<u>%6</u>
Üre	12.6 g	12.6 g	12.6 g
Deiyonize su	16.0 mL	15.250 mL	14.5 mL
10X TBE	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL
% 40 akrilamid : bis (19:1)	3.0 mL	3.750 mL	4.5 mL

- Hazırlanan akrilamid çözeltisine % 10' luk amonyum per sülfat (APS) ' tan 200 µL ve TEMED' den 20 µL eklenerek karıştırıldı.
- Akrilamid çözeltisi, iki cam plaka arasına hızlıca ve hava kabarcığı oluşmasına meydan vermeden döküldü, tarak camlar arasına yerleştirildi.
- Polimerizasyon için en az 1 saat beklendi.

ÖN ELEKTROFOREZ

- Jel polimerize olduktan sonra kısıkaçlar çıkarıldı, camlar su ile temizlenerek kurutuldu.
- Tarak jelden dikkatlice çıkarıldı.
- Elektroforez cihazının alt ve üst tankları 0.5X TBE tamponu ile dolduruldu.
- Jel sandiviçinin kısa cam tarafı tank bölmesine gelecek şekilde yerleştirildi.
- Kuyucuklar bir enjektör kullanarak 0.5X TBE tamponu ile yıkandı.
- Güç kaynağı 30 watt' a ayarlanarak yaklaşık yarım saat jel yüzeyinin ısınması için ön yürütme yapıldı.

ÖRNEK HAZIRLAMA VE YÜKLEME

- Üzerleri kodlanmış olan 0.5 µL' lik mikrosantrifüj tüplerine 2.5 µL yükleme tamponu ve 2.5 µL PCR ürünü koyuldu.
- Aynı işlem standart hazırlamak için de gerçekleştirildi.
- Karışım, ısı döngü cihazında 95 °C' de 5 dakika denatüre edildi.
- Denatüresyon sonrası örnekler hemen buzun üstüne alındı.
- Jel kuyucukları, yeniden 0.5X TBE tampomu ile yıkandı.
- Kuyucuklara her örnekten 2.5 µL yüklendi.
- Her 3 örnekten sonra bir standart yüklendi.

Yükleme işleminin mümkün olduğunca kısa olmasına (15 dakikadan az) dikkat edildi.

ELEKTROFOREZ

- Yüklem tamamlandıktan sonra güç kaynağı 26 watt' a ayarlanarak elektroforeze devam edildi.
- Yüklem tamponundaki iki boya (bromofenol mavisi ve ksilen siyanol), göç özelliği bilinen boyalar olduğundan, yürütülen alellerin boyutları ile boyanın göç hızı kıyaslanarak elektroforez istenilen zamanda durduruldu.

GÜMÜŞ BOYAMA

- Elektroforez tamamlandıktan sonra jel sandiviçi elektroforez tankından alındı.
- İki cam plaka, sivri uçlu bir pens yardımı ile birbirinden ayrılarak jelin bulunduğu U ağızlı kısa cam boyama yapma üzere bir kuvvet içine yerleştirildi.
- Jel, aşağıda belirtilen çözeltiler içinde, belirtilen sürelerde bekletildi.

Çözelti

- Nitrik asit (% 1)
- Deiyonize su
- Gümüş nitrat (%2)
- Deiyonize su
- Sodyum bikarbonat
- Asetik asit (%10)
- Deiyonize su

Süre

- 3 dakika
- 30 saniye (3 kez)
- 20 dakika
- 20 saniye (3 kez)
- Aleller görünene kadar
- 3 dakika
- 2 dakika

Boyama işlemi bittikten sonra örneklerin genotipleri standart yardımı ile belirlendi.

3.4.3.2. ETİDYUM BROMÜRLÜ AGARUZ JELİN HAZIRLANMASI VE YÜRÜTÜLMESİ

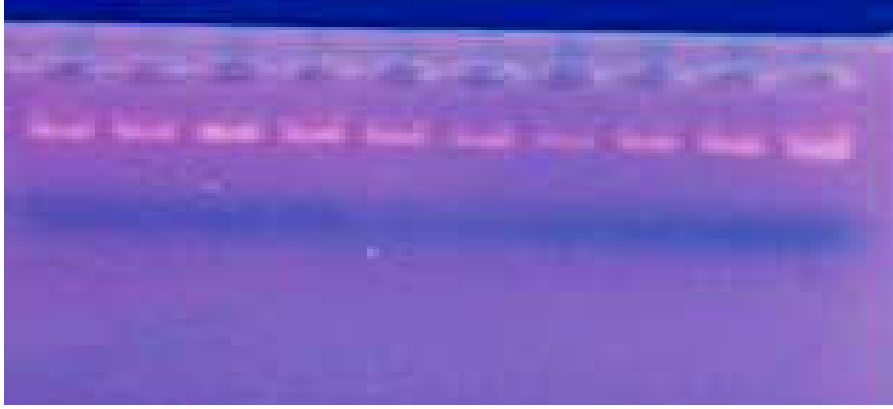
- % 2' lik agaroz jel, 2 g agaroz, 20 mL 1X TBE ve 80 mL deiyonize su ilavesiyle hazırlandı.
- Ben mari' de agaroz iyice eriyene kadar (~20 dk.) kaynatıldı.
- Jel kabı deiyonize su ile yıkanıp kurulandıktan sonra tarak yerleştirildi.
- Eriyen agarozun içine 10 µL EtBr eklenerek, jel kabına kabarcık oluşturmayacak şekilde döküldü ve 1 saat jelleşmesi için beklendi.
- Jelleşme gerçekleştikten sonra jel kabı tanka yerleştirildi ve jel tankı 1X TBE tamponu ile dolduruldu.
- 3 µL yüklem tamponu ile 3 µL PCR ürünü karıştırılarak kuyucuğa yüklendi.

- Örnekler 100 volta, 40-50 dakika yürütüldü.
- Yürüme tamamlandıktan sonra jelin UV lamba altında fotoğrafları çekildi ve genotip yorumlamaları yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. DNA İZOLATLARI

Bu çalışmada, İstanbul Balıklı Rum Hastanesi Anatolia Kliniği' ne tedavi olmak üzere başvuruda bulunan ve çalışmada yer almayı kabul eden (bkz Ek 2 Rıza Formu), aralarında akrabalık ilişkisi olmayan, 29 opiat bağımlısı ve 22 kontrol grubunun kanından, 3.4.1. de anlatıldığı şekilde hazırlanan DNA izolatları elde edildi. İzolatların varlığının kontrolü, agaroz jel elektroforezi ile yapıldı (şekil 16).



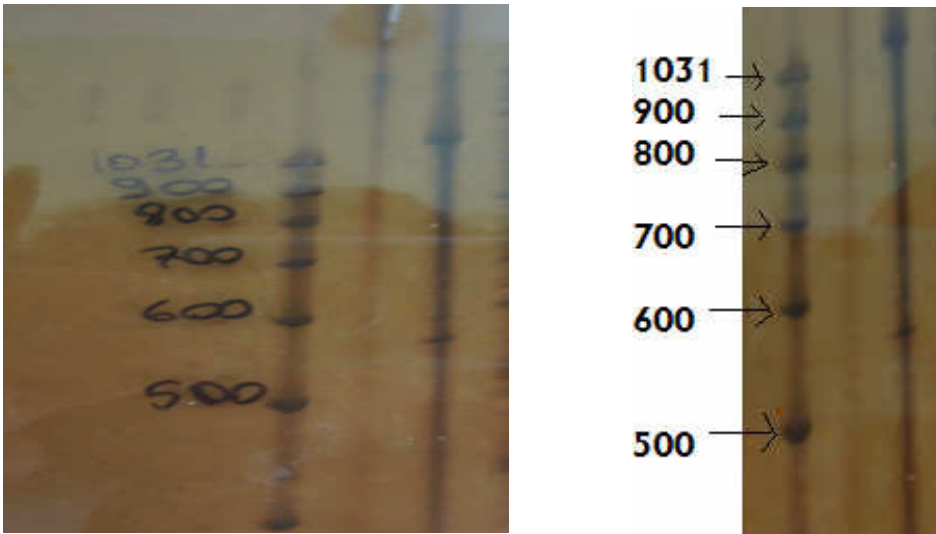
Şekil 16. Kan örneklerinden silika esaslı (Qiagen) DNA izolasyon kiti ile çekitlenen DNA izolatlarının agaroz jeldeki görünümü.

4.2. CYP 2D6 *3, *4, *5 ve *6 ALELLERİNİN SAPTANMASI

DNA izolasyonunun ardından, CYP2D6 *3, *4, *5, ve *6 alellerinin PCR ile çoğaltılması gerçekleştirildi ve PCR ürünleri poliakrilamid ve agaroz jelde yürütülerek görünür hale

gelmeleri sağlandı. CYP2D6' nın *3, *4 ve *6 alelleri için *tek tüpte 4 primerli PCR* prosedürü (Hersberger, M. ve ark. 2000) uygulandı. Sözü edilen tüm aleller için kullanılan primerlerden, 2. set için kullanılan, alele özgü primerlerin konsantrasyonu, 1. sette kullanılan primer konsantrasyonlarından 8 veya 10 kat fazla kullanıldığında, daha başarılı sonuçlar elde edildi (Ye, S. ve ark. 1992). CYP2D6*5 aleli için ise, *multiplex long-PCR* yöntemi uygulandı. Tüm genin delesyonlu olduğu bu alelin belirlenmesi için, tek tüp içinde, iki long-PCR yöntemi birlikte denendi.

4.2.1. CYP2D6*3 alelinin saptanması: CYP2D6*3 alleli için yapılan *tek tüpte 4 primerli PCR* çalışmalarında, P₃ ve P_{4new} primerleri 1106 bç. lik bölgeyi çoğalttı. Çoğalan bu parça, PCR' nin ikinci seti olan alele özgü amplifikasyonun kalıp DNA' sını oluşturdu. Amplifikasyonun 2. setinde ise, alele özgü primerlerin (P₆ ve A_{wt} primerleri), kan örneği çalışılan kişinin, taşıdığı alele göre, CYP2D6*3'e özgü 580 bç. lik parçayı ve/veya yabancı tipe özgü olan 553 bç. lik PCR ürününü çoğalttığı, %4' lük poliakrilamid jel elektroforezi ile gözlemlendi (Şekil 17).



Şekil 17. CYP2D6*3' ün poliakrilamid jeldeki görüntüleri.

4.2.2. CYP2D6*4' alelinin saptanması: CYP2D6*4 alelinin *tek tüpte 4 primerli PCR* çalışmalarında P_{1new} ve P_{2new} primerlerinin, ilk setin ürünü olan 750 bç. lik parçayı çoğalttığı görüldü. Çoğalan bu parça, PCR' nin ikinci seti olan alele özgü amplifikasyonun kalıp DNA' sını oluşturdu. B_{mut} primeri, mutant aleli gösteren 217 bç. lik parçayı, P₇ primeri ise, yabani tip aleline özgü 560 bç. lik parçayı çoğalttı. Alele özgü amplifikasyonu gerçekleştiren B_{mut} ve P₇ primerlerinin konsantrasyonları, P_{1new} ve P_{2new}' in konsantrasyonlarından 10 kat fazla kullanıldığında daha iyi sonuçlar elde edildi (Ye, S. 1992). PCR ürünleri, %2' lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 18).



Şekil 18. CYP2D6*4 alelinin %2' lik agaroz jeldeki görüntüsü.

4.2.3. CYP2D6*6 alelinin saptanması: CYP2D6*6 alelinin *tek tüpte 4 primerli PCR* çalışmalarında, P_{1new} ve P_{2new} primerlerinin CYP2D6*4 aleli için de ortak olan 750 bç. lik kontrol parçasını çoğalttığı görüldü. Reaksiyonun 2. setinde alele özgü amplifikasyonu gerçekleştiren primerlerden P₁₁ primerinin, yabani tipi gösteren 421 bç. lik parçayı, T_{mut} primerinin ise mutant olan kişilerde 356 bç. lik parçayı çoğalttığı %2' lik agaroz jel elektroforezi ile görünürleştirildi. Alele özgü primerlerin (P₁₁ ve T_{mut} primerleri)

konsantrasyonu, kontrol parçasını çoğaltan primer (P_{1new} ve P_{2new} primerleri) konsantrasyonlarından 8 kat fazla kullanılarak daha iyi sonuçlara ulaşıldı (Ye, S. ve ark. 1992) (Şekil 19).

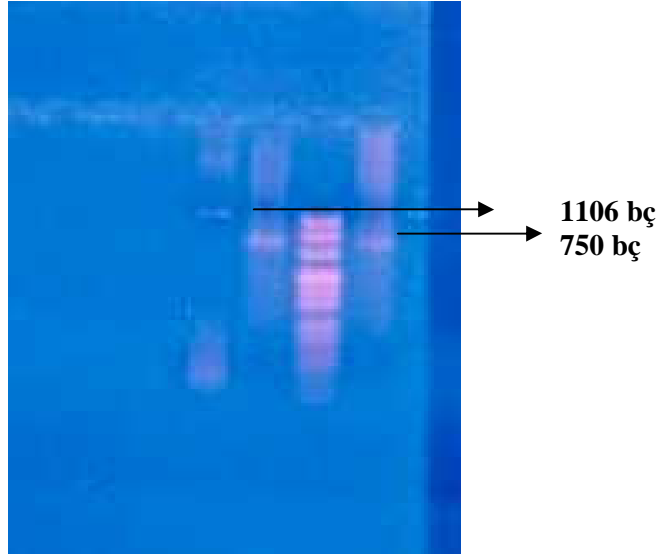


Şekil 19. CYP2D6*6 Alelinin %2' lik agaroz jeldeki görüntüsü.

4.3. Tek tüpte 4 primerli PCR Yönteminin Basamaklandırılmasına Ait Bulgular

Tek tüpte 4 primerli PCR' ye ek olarak, CYP2D6*3, *4 ve *6 alellerinin çoğaltma işlemi iki basamak şeklinde gerçekleştirildi. Bu işlemde, PCR' nin ikinci seti için kalıp olarak kullanılan ve reaksiyonun gerçekleştiğinin kanıtı olan (internal kontrol) parçalar, iki primer kullanılarak çoğaltıldı. CYP2D6*3 aleli için kontrol parçası olan 1106 bç.' lik PCR ürünü P_3 ve P_{4new} primerleri ile çoğaltıldı (Şekil 20, Şekil 21a). CYP2D6*4 ve *6 için ortak kontrol ürünü olan 750 bç.' lik parça ise P_{1new} ve P_{2new} primerleri ile çoğaltıldı ve agaroz jelde görüntüleri elde edildi (Şekil 20, Şekil 21b). Elde edilen birinci basamak PCR ürünlerinin, ayrı tüplerde, gerekli olan primerlerin eklenmesiyle, alele özgü amplifikasyonu gerçekleştirildi. CYP2D6*3 aleli için ikinci setin primerleri olan P_6 ve A_{wt} primerleri,

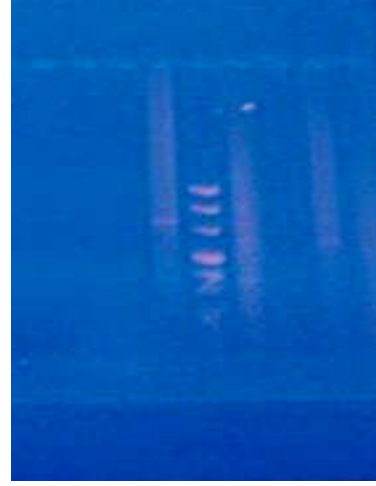
CYP2D6*4 aleli için ikinci setin primerleri olan B_{mut} ve P₇ primerleri, CYP2D6*6 aleli için ikinci setin primerleri olan P₁₁ ve T_{mut} primerleri eklenerek yapılan, alele özgü amplifikasyon reaksiyonu sonucunda, **tek tüpte 4 primerli PCR** yöntemi ile aynı bulgular elde edildi. Böylece, tek tüpte dört primerle çoğaltılmış olan PCR ürünlerinin, ayrı basamaklar şeklinde çoğaltılabileceği de görüldü.



Şekil 20 . CYP2D6*3' ün internal kontrol parçası (1106 bç.), CYP2D6*4 ve *6' nın ortak olan internal kontrol parçaları (750 bç.).



a)



b)

Şekil 21. CYP2D6*3 alelinin kontrol parçası, 1106 bç. (a), CYP2D6*4 ve *6 alellerinin ortak kontrol parçası 750 bç. (b)

4.4. CYP2D6*5 Alelinin *Multiplex Long-PCR* Yöntemi ile Saptanması:

İki *long-PCR* ürününün birlikte çoğaltıldığı bu reaksiyonda 3200 bç. lik CYP2D6*5 alelinin varlığını gösteren ürün, D_{up} ve D_{low} primerleri ile çoğaltılmak üzere çeşitli denemler yapıldı. 5100 bç. lik yabancı tipin varlığını gösteren parça ise DPK_{up} ve DPK_{low} primerleri ile çoğaltılmak üzere farklı primer konsantrasyonları ve sıcaklık parametreleri üzerinde çeşitli modifikasyonlar yapılarak denemeler yapıldı, ancak bu alele özgü PCR' de kesin sonuca ulaşamadı.

29 opiat bağımlısı ve 22 kişilik kontrol grubu ile yapılan çalışmanın sonuçları ve alel frekansları Tablo 2, Tablo 3, Tablo 4, Tablo 5 ve Tablo 6' da belirtildiği gibidir.

Tablo 2. Kontrol grubu ile yapılan çalışmanın sonuçları.

Alelin adı	Homozigot Mutant (kişi sayısı)	Heterozigot (kişi sayısı)	Homozigot Yabani tip (kişi sayısı)
CYP2D6*3	0	0	1
CYP2D6*4	3	1	11
CYP3D6*6	0	1	5

Tablo 3. Kontrol grubu ile yapılan çalışmanın alel sayıları ve frekansları.

Alelin adı	Mutant alel sayısı	Yabani tip alel sayısı	Toplam alel sayısı	Mutant Alel frekansı
CYP2D6*3	0	2	2	0
CYP2D6*4	7	23	30	0.233
CYP3D6*6	1	11	12	0.083

Tablo 4. Opiat bağımlıları ile yapılan çalışmanın sonuçları.

Alelin adı	Homozigot Mutant (kişi sayısı)	Heterozigot (kişi sayısı)	Homozigot Yabani tip (kişi sayısı)
CYP2D6*3	0	0	0
CYP2D6*4	3	2	7
CYP3D6*6	0	3	14

Tablo 5. Opiat bağımlıları ile yapılan çalışmanın alel sayıları ve frekansları.

Alelin adı	Mutant alel sayısı	Yabani tip alel sayısı	Toplam alel sayısı	Mutant Alel frekansı
CYP2D6*3	0	0	0	-
CYP2D6*4	8	16	24	0.333
CYP3D6*6	3	31	34	0.088

Tablo 6. Çalışma gruplarının alel frekanslarının karşılaştırması.

	Mutant alel sayısı	Toplam alel sayısı	Mutant alel frekansı
Kontrol grubu	8	44	0.181
Opiat bağımlıları	11	58	0.189

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sitokrom P450 monooksijenaz (CYP450) enzimleri, ksenobiyotiklerin ve ilaçların metabolizasyonunda önemli rolü olan bir enzim grubudur (Ingelman-Sundberg, M. 2004). Bu grup içinde Sitokrom P450-2D6 (CYP2D6) enzimi önemli yer tutar. Bir insanda CYP2D6 enziminin aktivitesi, CYP2D6 alellerinin genotipteki kombinasyonuna bağlıdır. 100' ün üzerinde belirlenmiş olan alellerden 28 tanesi inaktif enzim üreten gen dizinine sahiptir (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>). CYP2D6*3 aleli, 5. eksonda 2549 A delesyonu, CYP2D6*4 aleli, 4. eksonda 1846 G>A değişimi, CYP2D6*6 aleli, 3. eksonda 1707 T delesyonu içermesi sebebiyle inaktif bir enzim üretimi yapar, CYP2D6*5 aleli ise tüm genin delesyona uğradığı ve hiç enzimin üretilmediği bir aleldir (Zanger, U.M. ve ark. 2004). CYP2D6 enziminin metabolize ettiği başlıca maddeler, β -blokerler, trisiklik antidepressanlar, çeşitli nöroleptikler, opiatlar, selektif serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) vb. dir (Zackrisson, A.L. ve ark 2004, Tanaka, E. 2001). Yapılan çeşitli çalışmalara göre, bu enzimlerin, genetik polimorfizm gösterdiği, buna bağlı olarak, bireyler ve populasyonlar arasında, ksenobiyotik ve ilaç metabolizasyonunda farklılıklar bulunduğu bildirilmektedir (Meyer, U.A. 2000; Daly, A.K. 2003).

Bu farklılıklara neden olan mutasyonlara göre, yavaş metabolizörler (PM), orta hızlı metabolizörler (IM), normal metabolizörler (EM) ve hızlı metabolizörler (UM) olmak üzere dört fenotip belirlenmiştir (Rogers, J.F. ve ark. 2002; Zanger, U.M. ve ark. 2004; Daly, A.K. ve ark. 1996; Tanaka, E. 1999). Bu fenotiplerden UM' lerde, CYP2D6 geninin, birden fazla kopyasının bulunduğu ve gen duplikasyon sayısının 12' ye kadar çıktığı gözlenmiştir

(Johansson, I. ve ark. 1993). Bu grupta, kullanılan ilaç, çok hızlı metabolize olduğundan, maddenin veya ilacın beklenen etkisi görülemez (Zanger, U.M. ve ark. 2004). EM' ler, hiç mutasyon içermeyen veya enzim fonksiyonunu etkilemeyecek mutasyonlara sahip olan kişilerdir (McKinnon, R.A., ve Evans, A. 2000). IM' ler sahip oldukları alellerin mutasyonlarına bağlı olarak, düşük aktiviteli enzim üretirler ve madde metabolize etme hızları EM' lere göre daha yavaştır. Beyaz ırkın % 5-10' unu oluşturan PM' lerin ise, ortalama %95' inin CYP2D6*3, *4 *5 ve *6 aleline sahip oldukları ve çok düşük aktiviteli enzim ürettikleri ifade edilmektedir. Bu fenotipe sahip kişilerde, kullanılan madde veya ilacın metabolizasyonu, çok yavaş olduğundan, maddenin plazmadaki konsantrasyonu yüksek seviyededir ve toksik etkiler ile ters ilaç etkileri yaygın olarak ortaya çıkar (Vendel, P. ve ark. 1999; Marez, D. ve ark. 1997; Dally, A.K. ve ark. 1996a; Sachse, C. Ve ark. 1997). Öte yandan PM fenotipine sahip kişiler, opiatları, aktif metabolitine çevirmede yetersiz kaldıklarından, bu kişilerin opiat bağımlılığına karşı, koruma altında olabileceği düşüncesini savunan çalışmalara rastlanmaktadır (Meyer, U.M. 2000). Tamminga ve arkadaşlarının, Hollanda' da, 241 psikiyatri hastası ile yaptığı çalışmada, hastaların % 2.5' i UM, % 8.3' ü ise PM olarak belirlenmiştir ve aynı çalışmada, PM' lerin tedavisinde kullanılan psikotrop maddeler için doz ayarlaması yapılırken dikkat edilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Tamminga, W. ve ark. 2003).

Amerika' da 22 gönüllü ile yapılan çalışmada CYP2D6*3 aleline sahip kimse tespit edilememiştir. %14' ü ise CYP2D6*4 olarak tespit edilmiştir (Schur, B.C. ve ark. 2001).

2004' de, İtalyan popülasyonu ile yapılan bir çalışmanın sonucuna göre, popülasyonun % 53.3' ü homozigot EM, %35' i heterozigot EM (alellerinden biri mutant), %3.4' ü PM ve % 8.3' ü ise UM olarak bulunmuştur (Scordo, G.M. ve ark. 2004).

Benzer çalışmalar ülkemizde de yapılmıştır. Aynacıoğlu ve ark. nın 404 sağlıklı birey üzerinde yapmış olduğu çalışma sonucunda, en sık rastlanan alelin CYP2D6*1 (EM)

olduğu bulunmuştur. 0.37 olarak tespit edilen bu alel frekansının dışında, CYP2D6*2 (EM) alelinin sıklığı, 0.35 olarak bulunmuştur, CYP2D6*4 (PM), 0.11 sıklıkta gözlenirken, CYP2D6*5 (PM) alelinin görölme sıklığı % 1' dir. UM lerin oranı ise, % 8.66 olarak belirlenmiştir. PM' lerin toplam yüzde frekansı ise, % 1.5 olarak saptanmıştır (Aynacıoğlu, S.A. ve ark. 1999).

Gaziantep Üniversitesi' nde, psikiyatri hastaları ile yapılan çalışmaya göre, 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).

Gelişen teknoloji ve bu alanda kaydedilen ilerlemeler, Adli Bilimlere de olumlu bir şekilde yansımıştır. Adli olgular içinde, kasıtlı veya kasıtsız zehirlenmeler, madde bağımlılığı olguları ve bunlara bağlı ölümler, önemli bir yer tutmaktadır. Otopsi bulgularına veya zehirlenme şüphelerine göre, toksikolojik analize tabi tutululan postmortem örnekler de, genetik faktörlerin zehirlenmeye olan etkisinin ölçölmesi açısından karmaşık ve önemlidir. Zehirlemelerde, kişisel risk faktörlerinin ve kişinin sahip olduğu genotipin ciddi bir etkisi vardır. alışmalar, genetik faktörlerin ilaç metabolizasyonundaki baskın rolünün, post mortem süreçte de belirlenebildiğini göstermektedir (Ogawa, K. ve ark 2003; Levo, A. ve ark., 2003; Druid, H. ve ark, 1999).

Beklenmeyen ters ilaç etkilerinin, bu etkilere bağlı zehirlenmelerin, madde bağımlılarının ani ölümlerinin aydınlatılmasında; yapılan ve yapılmakta olan farmakogenetik çalışmalar büyük katkı sağlayacaktır. 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 (Zackrisson, A.L. ve ark. 2004).

Amerika’ da yapılan bir çalışma, ters ilaç etkisinin, yılda 100 000’ den fazla ölümden sorumlu olduğunu göstermektedir ve bu rakam, ölüm nedenleri arasında 4. sırada yer almaktadır (Pirmohamed, M. ve Park, B.K. 2001).

Adli bilimler içerisinde önemli bir yere sahip olan adli toksikoloji, temelde ölüm sebebi ve ölüm şeklinin tayinine ve yorumlanmasına katkıda bulunur. Ölüme yol açan ilaç zehirlenmelerinin birçoğu, aşırı dozla ilgilidir. Ancak, son yıllarda, kronik yüksek doz da dikkat çeken bir konu olmuştur (Druid, H. ve ark 1999; Verrecas, M. ve ark.,2004). Plazmadaki metabolit seviyesinin ana drogdan yüksek olması, her zaman aşırı dozdan ölüm vakalarını akıllara getirirse de, bu durum, maddeyi metabolize eden CYP450 enzimlerinin aktivasyonundaki değişiklikten kaynaklanabileceği gibi, ilaç etkileşimleri sonucu ortaya çıkan bir tablo da olabilir. (Verrecas, M. ve ark. 2004; Bailey, B. ve ark. 2000; Druid, H. ve ark. 1999).

CYP2D6 enzimini yüksek oranda inhibe eden, kinidin, paroksetin, fluoksetin, bupropion gibi maddeleri kullanan EM fenotipine sahip kişilerin, bu tür maddelerle tedavi oldukları süre içinde, PM fenotipine sahipmiş gibi davranabildikleri gözlenmiştir (Susce, M.T. ve ark. 2006). Ayrıca, aynı enzimle metabolize olan ilaçlarla tedavi görmekte olan kişilerde ortaya çıkan ilaç etkileşimleri nedeniyle, söz konusu kişilerin, bu enzim için PM olabildiği literatürde kayıtlıdır (Druid, H. ve ark. 1999). Ölümle sonuçlanan ilaç zehirlenmelerinde bu konu da gözardı edilmemelidir.

Farmakogenetik alanında yapılan çalışmaların uzun vadede pekçok fayda sağlayacağı öngörülmektedir. Bunlar arasında; tedavi sürecinde hızlanma, genetik özelliğe göre doz ayarlama, gelecekteki hastalığın bilinerek takip ve tedavisinin planlanması, kullanılacak ilaç sayısında azalma, ilaç keşfinin ve ruhsatlanmasının hızlanması vb. sayılabilir.

Kişilerin P450 enzimlerine göre, birçok ilaç için, doz ayarlaması yapılarak, toksisitesinin azaltılıp, etkisinin artırılması için çalışmalar yapılması gerektiği vurgulanmakta ve

farmakogenetik profillemenin, benzer diğer alanlara göre hızla gelişme kaydettiği ifade edilmektedir (Daly, A.K. 2003).

Ancak, tüm bu gelişmelerin önünde birtakım engeller de bulunmaktadır. Genetik farklılıklar karmaşık bir mekanizmadır. Ayrıca tedavi öncesi, kişiye özgü ilaç tedavisi yapabilmek için klinisyenler genotipleme istemek zorundadırlar ki bu, hem zaman alıcı hem de masraflı bir uygulama olacaktır. Adli bilimlerde, farmakogenetik çalışmaların yerleşik hale getirilmesi de, CYP450 ailesinin genişliği düşünüldüğünde, maliyeti yükseltecektir. Bazı hızlı tarama kitleri olmasına rağmen, henüz, genotip belirlenmesinin standardize edilememiş olması da bir diğer problemdir.

Bu çalışmada, yaptığımız literatür incelemelerinde, ülkemizde, opiat bağımlılarında CYP2D6 polimorfizminin incelenmesi çalışmalarına rastlamadığımızdan, opiat bağımlılarında CYP2D6*3, *4, *5 ve *6 alellerinin *tek nükleotid polimorfizmini* araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda uyguladığımız *tek tüpte 4 primerli PCR* yöntemi, PCR-RFLP gibi geleneksel, çok basamaklı yöntemler kullanılmadan, tüm reaksiyonların tek tüpte yapıldığı bir yöntemdir. Transfer basamaklarını ortadan kaldırdığı için kontaminasyon riskini azaltan, zaman kazandıran, maliyeti düşük bir yöntemdir ve ilk basamakta çoğalan parçayı ikinci aşamada kalıp olarak kullanmanın yanı sıra, PCR' nin gerçekleştiğini de kontrol eden bir internal kontrol aşamasını da gerçekleştirmiş olmakla, bu yöntem, güvenilirliğini ortaya koymaktadır. Öte yandan çoğaltma reaksiyonuna 4 primer eşlik ettiği için, primerler arasında sıcaklık ve konsantrasyon ayarlamasının yapılması, çalışmanın en hassas ve zaman alıcı kısmını teşkil etmektedir. Herseberger ve ark.' nin yaptığı çalışmada belirttikleri PCR parametreleri ile çeşitli modifikasyonlar yapılarak denemeler yürütüldü. Bir çok denemenin ardından Ye S. ve ark.' nin belirttiği primer konsantrasyonları ile beklenen sonuçlar elde edildi. PCR' nin 2. setinin primer konsantrasyonları 1.setin primer konsantrasyonlarının 8

katı fazla olarak alındığında (Ye S. ve ark. 1992) daha iyi sonuçlar elde edildi. *Tek tüpte 4 primerli PCR*’ yi geçerli kılan bir diğer kriter ise yöntemin ayrı basamaklar şeklinde yapıldığında da aynı neticeleri vermiş olmasıdır. Aynı tüpte gerçekleştirilen PCR basamakları, ayrı ayrı çoğaltıldı ve aynı sonuçlara ulaşıldı, ancak iki ayrı reaksiyon şeklinde yürütülmesi, bu iki basamaklı yöntemin süresinin artması ve transfer aşamalarının fazlalığı anlamına geldiğinden, analizin uzun sürdüğü ve kontaminasyon riskini arttırdığı görülmüştür.

29 opiat bağımlısı ve 22 kişilik kontrol grubu ile yapılan çalışma sonucunda, CYP2D6*4 aleli için, opiat bağımlılarından 3’ ünün homozigot mutant, 2’ sinin heterozigot , 7 kişinin ise homozigot yabani tip alele sahip olduğu; CYP2D6*6 aleli için, 3 opiat bağımlısının heterozigot , geri kalan 14 kişinin ise homozigot yabani tip olduğu görülmüştür (Tablo 4). Kontrol grubunda ise, CYP2D6*3 aleli için 1 kişinin homozigot yabani tip alele sahip olduğu belirlenmiştir; CYP2D6*4 aleli için, 3 homozigot mutant, 1 heterozigot, 11 homozigot yabani tipte sonuca ulaşılırken; CYP2D6*6 aleli için , 1 kişi heterozigot olarak, geri kalan 5 kişi ise homozigot yabani tip olarak saptanmıştır (Tablo 2). CYP2D6*4 alelinin frekansı, bağımlılarda 0.333 (Tablo 5), kontrol grubunda ise 0.233 (Tablo 3); CYP2D6*6 alelinin frekansı ise, bağımlılarda 0.088 (Tablo 5), kontrol grubunda 0.083 (Tablo 3) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, PM’lerin toplam alel frekansı, opiat bağımlıları için 0.189; kontrol grubu için ise 0.181 olarak saptanmıştır (Tablo 6).

Burada öncelikle vurgulanması gereken, araştırmamızın, Türkiye’ de bu konuda yapılan ilk çalışma olması ve buna bağlı olarak elde ettiğimiz bulguları karşılaştırma olanağının bulunamamasıdır.

Diğer taraftan, çalışma süresince, sistemden dolayı yaşadığımız bazı sorunlar nedeniyle, hedeflediğimiz kontrol grubu ve bağımlı kişi sayısına ulaşamadığımızdan, yalnızca, opiat

bağımlılarında CYP2D6*3, *4 ve *6 alellerinin SNP analizi için yöntem uygulaması gerçekleştirilmiş oldu.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz bilgi ve bulgulara göre, opiat bağımlısı olan PM'lerin, ölüme kadar varabilecek, "ters ilaç etkisi" olarak tanımlanan riski taşıdıklarını söyleyebiliriz.

Ülkemizde ve dünyada, yılda % 5-10 oranında karşılaşılan, (<http://martimex.sitemynet.com/olum2.html>), negatif otopsi olarak adlandırılan, sebebi bilinmeyen ölümlerin; hekim hatasından kaynaklandığı düşünülen, yanlış tedavi olarak değerlendirilebilen ölüm olgularının ve opiat bağımlılarının ani ölümlerinin aydınlatılmasında, CYP450 enzimlerinin polimorfizminin de düşünülmesi gerekmektedir.

CYP2D6 polimorfizminin araştırılmasına yönelik olan bu çalışmanın, daha önce de ifade ettiğimiz şekilde, ülkemizdeki opiat bağımlıları ile yapılan ilk çalışma olması nedeniyle, örnek sayısını arttırarak yapılacak yeni çalışmalarla desteklenmesi gerektiği kanısındayız.

6. ÖZET

CYP450 enzimleri, vücuda alınan bir çok maddenin metabolize edilmesinden sorumlu olan ve polimorfik formları bulunan, geniş bir enzim ailesidir. Bu enzim ailesinin bir üyesi olan, 100' den fazla alele sahip CYP2D6 enzimi ise, opiatlar gibi, adli bilimler için önem arz eden madde ve/veya ilaçları metabolize eder. Ancak bazı mutasyonlar, bu enzimin aktivitesine zarar vermekte ve alınan ilacı ve/veya maddeyi metabolize etmesini güçleştirmektedir. Bunun sonucunda, beklenmeyen ters ilaç etkileri meydana gelerek, ölüme kadar varabilen sonuçlarla karşılaşılabilir.

Ülkemizde CYP2D6 polimorfizmine yönelik birtakım çalışmalar olmasına rağmen, adli olgular içinde önemli bir yer tutan opiat bağımlılığının, CYP2D6 enzim polimorfizmi ile ilişkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlamadığımızdan, çalışmamızda, Opiat bağımlılarında CYP2D6*3, *4, *5 ve *6 alellerinin *tek nükleotid polimorfizminin* (SNP) belirlenmesi amaçlandı. *Tek tüpte 4 primerli PCR* tekniği kullanarak 29 opiat bağımlısı ve 22 kişilik kontrol grubu ile yapılan bu çalışmada, CYP2D6*4 alelinin frekansı 0.333, CYP2D6*6 alelinin frekansı 0.088 olarak belirlendi. Zayıf metabolizörlerin toplam alel frekansı ise, 0.189 olarak saptandı. Sonuçlar, Adli Bilimler açısından değerlendirildi ve CYP2D6 geninin *tek nükleotid polimorfizmi* (SNP) incelemelerinin, opiat bağımlılarının ani ölümlerine ışık tutabileceği düşünüldü. Bu araştırmanın, ülkemizde bu konuda, opiat bağımlıları ile yapılan ilk çalışma olması nedeniyle, daha fazla sayıda örnek ile desteklenmesi gerektiği kanısına varıldı.

7. SUMMARY

CYP450 enzymes constitute a widespread polymorphic enzyme family which is responsible for the metabolism of many substances taken to the body. A member of this family, CYP2D6, with its gene having more than 100 alleles metabolizes the substances and/or drugs such as opiates, which have great importance in forensic sciences.

However, some mutations damage the activity of this enzyme and lead to difficulties in metabolism of the taken drugs which may lead to unexpected adverse drug reactions, even to the death .

Although many studies have been done related to CYP2D6 polymorphism in our country, there was no research on the relationships of CYP2D6 enzyme polymorphism with opiate dependence, which is an important area in forensic cases. For this reason we aimed to investigate the *single nucleotide polymorphism* (SNP) of CYP2D6*3, *4, *5 and *6 alleles. In our study, on 29 opiate addicts and 22 individuals as a control group, by using the *tetra-primer PCR technique in single tube*, CYP2D6*4 and CYP2D6*6 alleles frequencies were determined as 0.333 and 0.088, respectively. The total allele frequency for poor metabolizers was determined as 0.189.

The results were evaluated from the forensic perspective. Following the investigations of SNP of the CYP2D6 gene, it was concluded that it may clarify the sudden deaths of opiate addicts. This is the first study in our country and we ensured that this study has to be supported with extended researches by increasing the individual numbers.

8. KAYNAKLAR

Akçasu, A. (1992) Opioid Analjezikler, Farmakoloji ilaç uygulamalarında temel kavramlar, (Dökmeci, İ., edt.), s 407-430, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.

Akçasu, A. (1992) Amaç Dışı Madde Kullanımı, Farmakoloji ilaç uygulamalarında temel kavramlar, (Dökmeci, İ., ed.), s 431-443, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.

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.

Bailey, B., Daneman, R., Daneman, N., Mayer, J.M., Koren, G. (2000) Discrepancy between CYP2D6 phenotype and genotype derived from post-mortem dextromethorphan blood level, *Forensic Sci. Int.* **110**: 61-70.

Boom, D., Beaulieu, M., Oeth, P., Roth, R., Honisch, C., Nelson, M.R., Jurinke, C., Cantor, C. (2004) MALDI-TOF MS: a platform technology for genetic discovery, *International Journal of Mass Spectrometry*, **238**: 173–188.

Borlak, J., Hermann, R., Erb, K., and Thum, T. (2003) A Rapid and Simple CYP2D6 Genotyping Assay—Case Study With the Analgetic Tramadol, *Metabolism*, **52** (11): 1439-1443.

Ceyhan, CO., (2005), İTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Kulübü, www.gazete.itu.edu.tr.

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

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.

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

Dökmeci, İ. (1992) İlaçların Biyotransformasyonu, Farmakoloji ilaç uygulamalarında temel kavramlar, (Dökmeci, İ., edt.), s 35-52431-443, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.

Druid, H., Holmgren, P., Carlsson, B., Ahlner, J. (1999) Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) genotyping on postmortem blood as a supplementary tool for interpretation of forensic toxicological results, *Forensic Sci. Int.*, **99**: 25-34.

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.

Gaedigk, A., Gotschall, R.R., Forbes, N.S., Simon, S.D., Kearns, G.L., Leeder, J.S. (1999) Optimization of cytochrome P4502D6 (CYP2D6) phenotype assignment using a genotyping algorithm based on allele frequency data, *Pharmacogenetics*, **9**: 669-682.

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.

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., Vırit, O. (2001) Psikiyatri Hastalarında Sitokrom P450 2D6 Yavaş ve Ultra Hızlı Metabolizör Sıklıkları, *Türk Psikiyatri Dergisi*, **12(2)**: 83-88.

Hersberger, M., Marti-Jaun, J., Rentsch, K., Hanseler, E. (2000) Rapid detection of the CYP2D6*3, CYP2D6*4, and CYP2D6*6 alleles by tetra-primer PCR and of the CYP2D6*5 allele by multiplex long PCR, *Clin. Chem.* **46**: 1072-1077.

Hewett, M., Oliver, D.E., Rubin, D.L., Easton, K.L., Stuart, J.M., Altman, R.B., Klein, T.E. (2002) PharmGKB: the Pharmacogenetics Knowledge Base, *Nucleic Acid Research*, **30 (1)**: 163-165.

Home Page of the Human Cytochrome p450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. Available at <http://www.imm.ki.se/cypalleles/> (Son Ulaşım; 20.09.2006).

Ingelman-Sundberg, M. (2005) The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research, *Toxicol Appl Pharmacol.*, **207**: 52-56.

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. (2002) Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity, *Toxicology*, **181-182**: 447-452.

Ingelman-Sundberg, M., Oscarson, M. (2002) Human CYP allele database: submission criteria procedures and objectives, *Methods Enzymol.*, **357**: 28-36.

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

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.

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.

Juran, B.D., Egan, L.J., Lazaridis, K.N. (2006) The AmpliChip CYP450 Test: Principles, Challenges, and Future Clinical Utility in Digestive Disease, *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **4(7)**: 822-830 (Abs).

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

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.

Leon, J., Susce, M.T., Murray- Carmichael, E. (2006) The AmpliChip CYP450 genotyping test: Integrating a new clinical tool, *Mol. Diagn. Ther.*, **10(3)**: 135-151 (Abs).

Levis, R.J., Johnson, R.D., Hatstrup R.A. (2005) Simultaneous analysis of Thebaine, 6-MAM and six abused opiates in postmortem fluids and tissues using Zymark® automated solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, **822**: 137-145.

Levo, A., Koski, A., Ojanperae, I., Vuori, E., Sajantila, A. (2003) Post-mortem SNP analysis of CYP2D6 gene reveals correlation between genotype and opioid drug (tramadol) metabolite ratios in blood, *Forensic Sci Int.*, **135**: 9-15.

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.

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.

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

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

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.

Nelson, D. (2003) Cytochrome P450s in Humans, (web site) <http://drnelson.utmem.edu/cytochromeP450.html/> (Son Ulaşım; 25.09.2006).

Ogawa, K., Suno, M., Shimizu, K., Yoshida, M., Awaya, T., Matsubara, K., Shiono, H. (2003) Genotyping of cytochrome p450 isoform genes is useful for forensic identification of cadaver, *Leg. Med.* **5**: 132-138.

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. edt.) 6th, Vol 6, pp 133-224, McGraw-Hill, New York.

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

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

QiAmp DNA Blood Mini Kit Handbook, (2003).

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) Biotransformasyon Reaksiyonları, İlaçların metabolizması,; s 2-9, s 53-57, Marmara Ün. Yayınları, No: 525, İstanbul.

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.

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

Saferstein, R. (2001) *Criminalistics An Introduction to Forensic Science*, 7th ed., Chapter 9, pp 228-254, Prentice Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey 07458.

Schur, B.C., Bjerke, J., Nuwayhid, N., Wong, S.H. (2001) Genotyping of cytochrome P450 2D6*3 and *4 mutations using conventional PCR, *Clin. Chim. Acta.*, **308**:25-31.

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.

Sobrino, B., Brion, M., Carracedo, A. (2005) SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies, *Forensic Sci Int.*, **154**: 181-194.

Stamer, U.M., Bayerer, B., Wolf, S., Hoeft, A., Stuber, F. (2002) Rapid and reliable method for cytochrome P450 2D6 genotyping, *Clin. Chem.*, **48**: 1412-1417.

Susce, M.T., Murray-Carmichael, E., Leon, J. (2006) Response to hydrocodone, codeine and oxycodone in a CYP2D6 poor metabolizer, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **30**: 1356–1358.

Şanyüz, Ö., Şenel, B., Üzün, İ., Şam, B. (2006) İstanbul'da 2000-2004 yılları arasında gerçekleşen uyuşturucu madde ölümleri, 7.Adli Bilimler Kongresi, Konya, Türkiye, Mayıs 11-14.

Tamminga, W.J., Wemer, J., Ooesterhuis, B., DeBoer, A., Wranckx, S., Drenth, B.F., DeZeeuw, R.A., DeLeij, 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**: 57-64.

Tanaka, E., (2001) Polymorphism of Drug Metabolising Enzymes in Humans, *Sepsis*, **4**: 247-254.

Tanaka, E. (1999) Update: genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes in humans, *J. Clin. Pharm. Ther.*, **24**: 323-329.

Tang, K., Opalsky, D., Abel K., Boom, D., Yip, P., Mistro, G.D., Braun, A., Cantor C.R. (2003) Single nucleotide polymorphism analyses by MALDI-TOF MS, *International Journal of Mass Spectrometry*, **226**: 37-54.

Timothy, J., Griffin and Lloyd M.S. (2000) Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry, *Tibtech*, **18**: 77-83.

Vandel, P., Haffen E., Vandel, S., Bonin, B., Nezelof, S., Sechter, D., Broly, F., Bizouard, P., Dalery, J. (1999) Drug extrapyramidal side effects. CYP2D6 genotypes and phenotypes, *Eur J Clin Pharmacol*, **55**: 659-665.

Verrecas, M., Knaepen K., Glissen, A., Cassiman, J.-J., Decorte, R. (2004) Forensic Toxicology: development of an SNP-assay for genotyping CYP2D6 and CYP2C19 variants, *International Congress Series*, **1261**: 583-585.

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

Westermeier, R. (2001) Electrophoresis in Practice, 3th ed., Part I, pp7-40, WILEY-VCH Wienheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto.

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

Ye, S., Humphries S., Green, F. (1992) Allele specific amplification by tetra-primer PCR, *Nucleic Acids Research*, **20(5)**: 1152.

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.

<http://martimex.sitemynet.com/olum2.html> (Son Ulaşım 09.10.2006).

<http://www.webbooks.com/MoBio/Free/Ch9C.htm> (Son Ulaşım 21.09.2006).

9. EKLER

9.1. CYP2D6' NIN AMİNO ASİT, BAZ DİZİNİ VE GEN BANKASI VERİLERİ

M33388. Human cytochrome ...[gi:181303]

LOCUS HUMCYP2D6 9432 bp DNA linear PRI 22-NOV-1994

DEFINITION Human cytochrome P450 IID6 (CYP2D6) gene, complete cds.

ACCESSION M33388

VERSION M33388.1 GI:181303

KEYWORDS cytochrome P450; cytochrome P450 IID6.

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 9432)

AUTHORS Kimura,S., Umeno,M., Skoda,R.C., Meyer,U.A. and Gonzalez,F.J.

TITLE The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and
identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and
a pseudogene

JOURNAL Am. J. Hum. Genet. 45 (6), 889-904 (1989)

PUBMED 2574001

COMMENT Original source text: Human DNA, clone lambda2D-18/2.

Draft entry and computer-readable sequence for [Am. J. Hum. Genet.
45, 889-904 (1989)] kindly submitted
by S.Kimura, 29-MAR-1990.

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..9432

/organism="Homo sapiens"

/mol_type="genomic DNA"

/db_xref="taxon:9606"

/map="22q13.1"

gene join(1532..1799,2503..2674,3225..3377,3466..3626,
4060..4236,4427..4568,4776..4963,5418..5559,5658..5909)
/gene="CYP2D6"

mRNA join(1532..1799,2503..2674,3225..3377,3466..3626,
4060..4236,4427..4568,4776..4963,5418..5559,5658..5909)
/gene="CYP2D6"

/product="cytochrome P450 IID6"

/note="G00-132-127"

exon 1532..1799

/gene="CYP2D6"

/note="cytochrome P450 IID6; G00-132-127"

/number=1

CDS join(1620..1799,2503..2674,3225..3377,3466..3626,
4060..4236,4427..4568,4776..4963,5418..5559,5658..5836)
/gene="CYP2D6"

/codon_start=1

/product="cytochrome P450 IID6"

/protein_id="AAA53500.1"

/db_xref="GI:181304"

/db_xref="GDB:G00-132-127"

/translation="MGLEALVPLAVIVAIFLLLVDLMHRRQRWAARYPPGPLPLPGLG"

NLLHVDFQNTPYCFDQLRRRFGDVFSLQLAWTPVVVLNGLAAVREALVTHGEDTADRP
PVPITQILGFGPRSQGVFLARYGPAWREQRRFSVSTLRNLGLGKKSLEQWVTEEAACL
CAAFANHSGRPFRPNGLLDKAVSNVIASLTCGRRFEYDDPRFLRLDLAQEGLKEESG
FLREVLNAVVPVLLHIPALAGKVLRFQKAFLTQLDELLTEHRMTWDPAPPRDLTEAFL
AEMEKAKGNPESSFNDENLRIVVADLFSAGMVTSTTLAWGLLLMLHPDVQRRVQQE
IDDVIGQVRRPEMGDQAHMPYTTAVIHEVQRFGDIVPLGVTHMTRSRIEVQGFRIKPG
TTLITNLSSVLKDEAVWEKPFRLFHPEHFLDAQGHFVKPEAFLPFSAGRRAACLGEPLAR

MELFLFFTSLLQHFSFSVPTGQPRPSHHGVFAFLVSPSPYELCAVPR"

intron 1800..2502
/number=1

exon 2503..2674
/number=2

intron 2675..3224
/number=2

exon 3225..3377
/number=3

intron 3378..3465
/number=3

exon 3466..3626
/number=4

intron 3627..4059
/number=4

exon 4060..4236
/number=5

intron 4237..4426
/number=5

exon 4427..4568
/number=6

intron 4569..4775
/number=6

exon 4776..4963
/number=7

intron 4964..5417
/number=7

exon 5418..5559
/number=8

intron 5560..5657
/number=8

exon 5658..5909
/number=9

ORIGIN

1 gaattcaaga ccagcctgga caacttgaa gaaccgggc tctacaaaa atacaaatt
61 agctgggatt ggggctggg gctcatgct ataatcccag cactttggga gcctgaggtg
121 ggtggatcac ctgaagttag gattcaaga ctgacctggc caacatggtg aaacctatc
181 tctactgaaa atacaaaaag ctgacgtgg tggcacacac ctgtaatccc agctacttag
241 gaggtgagg caggagaatt gctgaagcc tagaggtgaa ggtttagtg agccgagatt
301 gcatcattgc acaatggagg ggagccacca gcctgggcaa caagaggaaa tctccgtctc
361 caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaagaattag gctgggtggt gcctgtatgc ccagctactt
421 gggaggcagg ggggtccactt gatgtcgaga ctgcagttag ccatgatcct gccactgcac
481 tccggcctgg gcaacagagt gagaccctgt ctaagaaaa aaaaaataaa gcaacatac
541 ctgaacaaag gatcctccat aacgttcca ccagatttct aatcagaaac atggaggcca
601 gaaagcagtg gagggagacg acctcaggc agcccgggag gatgtgtca caggctgggg
661 caagggcctt ccggctacca actgggagct ctgggaacag cctgttgca acaagaagc
721 catagcccgg ccagagccca ggaatgtggg ctgggctggg agcagcctct ggacaggagt
781 ggtcccatcc aggaacctc cggcatggtt gggaagtggg gtacttggg ccgggtctgt
841 atgtgtgtg gactggtgtg tgtgagagag aatgtgtgcc ctaagtgtca gtgtgagtct
901 gtgtatgtg gaatattgtc tttgtgtgg tgattttct cgtgtgtaat cgtgtccctg
961 caagtgtgaa caagtggaca agtgtctggg agtggacaag agatctgtgc accatcaggt
1021 gtgtcatag cgtctgtgca tgtcaagagt gcaaggtgaa gtgaaggac caggcccatg
1081 atgacctca tcatcaggag ctctaaggcc ccaggtagt gccagtgaca gataagggtg
1141 ctgaagtca ctctggagt ggaggtggg ggtagggaaa gggcaaggcc atgttctgga
1201 ggaggggtg tgactacatt aggtgtatg agcctagctg ggaggtggat ggccgggtcc
1261 actgaaacc tggttatccc agaaggttt gcaggcttca ggagcttga gtggggagag
1321 ggggtgactt ctcgaccag gccctccac cggcctacc tgggtaaggg cctggagcag
1381 gaagcagggg caagaacctc tggagcagcc cataccgcc ctggcctgac tctgccactg
1441 gcagcacagt caacacagca ggttactca cagcagaggg caaaggccat catcagctc
1501 cttataagg gaaggctcac gcgctcgtg tctgagagt gtcctgcctg gtcctctgtg
1561 cctggtgggg tgggggtgcc aggtgtgtcc agaggagccc atttggtagt gaggcaggtg
1621 tggggctaga agcactggtg ccctggccc tgatagtggc catcttctg ctctgtgtg
1681 acctgatga ccggcgcaca cgtgggctg cacgctacc accaggcccc ctgacctgc
1741 ccgggctggg caacctgctg catgtggact tccagaacac accatactgc ttcgaccag
1801 tgagggagga ggtcctggg ggcggcagag gtgctgagg tccctacca gaagcaaca
1861 tggatggtg gtgaaaccac aggtggacc agaagccagg ctgagaagg gaagcaggtt
1921 tgggggact cctggagaag ggcattata catgcatga aggactggat ttccaagg
1981 ccaaggaaaga gtagggcaag ggcctggagg tggagctgga ctggcagtg ggcagcaag
2041 cccattgggc aacatatgtt atggagtaca aagtccttc tctgacacc agaaggaaag
2101 gccttgggaa tggagatga gtagtctg agtccgtt aaatcacgaa atcagagatg
2161 aaggggtgag agtaccgg tcaaacctt ttgactgtg ggtcctggg cctcactgcc
2221 taccggcat ggaccatcat ctgggaatgg gatgtaact gggcctctc ggcaattttg
2281 gtgactctg caagtcata cctgggtgac gcatccaaac tgatttctc catcacagaa
2341 ggtgtgacc cccccgcg cccacgatca ggaggtggg tctctctt ccacctgctc
2401 actcctgta gccccgggg tctccaagg tcaaatagg actaggacct gtatctggg
2461 gtgactctg ctgacaaga gccctgacc ctccctctg agttggcgg ccgctcggg
2521 gactgttca gcctcagct gccctggacg ccggtggtg tctcaatgg gctggcggc
2581 gtgcgcagg cgctggtgac ccacggcag gacaccgcc accgcccgc tgtcccac
2641 accagatcc tgggttccg gccgcgtcc caagcaagc agcgggtggg acagagacag
2701 attccgtgg gaccgggtg ggtgatgacc gtagtccgag ctgggcagag agggcgcggg
2761 gctgtgaca tgaacaggc cagcagtggt ggacagcggg ccaagaaacc acctgacta
2821 gggaggtgtg agcatgggga cgagggcggg gctgtgacg agtgggcggg gccactgcc
2881 agacctgga ggagccaat ggtgagcgt ggcgatttc ccagctgga tccggtgtg
2941 aagtggggc ggggaccga cctgtctgt aagctcagt tgggtggcg gggcccgcg
3001 ggtcttccc tgagtcaaa ggcggtcagg gtggcagag acgaggtgg gcaaagcctg
3061 cccagccaa gggagcaagg tggatgcaca aagagtggc cctgtgacca gctggacaga
3121 gccagggact gcgggagacc agggggagca tagggttga gtgggtgtg gatgtgggg
3181 ctaatgcctt catggccacg cgcactgccc cgtcccacc ccaggggtg tctggcgcg

3241 ctatgggccc gcgtggcgcg agcagaggcg cttctccgtg tccacctgc gcaacttggg
3301 cctgggcaag aagtcgctgg agcagtgggt gaccgaggag gccgcctgcc tttgtcccg
3361 cttcgccaac cactccggtg ggtgatgggc agaagggcac aaagcgggaa ctgggaaggc
3421 gggggacggg gaaggcgacc ccttaccgc atctcccacc cccaggacgc cctttcgc
3481 ccaacggtct cttggacaaa gccgtgagca acgtgatcgc ctcccacc tgcgggcgc
3541 gcttcgagta cgacgacct cgcttctca ggctgctgga cctagctcag gagggactga
3601 aggaggagtc gggcttctg cgcgaggtgc ggagcgagag accgaggagt cctgcaggg
3661 cgagctccc agaggtgccg gggctggact ggggcctcgg aagagcagga tttgcataga
3721 tgggtttggg aaaggacatt ccaggagacc cactgtaag aaggcctgg aggaggagg
3781 gacatctcag acatggctgt ggagaggtg tgcccgggtc agggggcacc aggagaggcc
3841 aaggactctg tacctctat ccacgtcaga gatttcgatt ttaggttct cctctgggca
3901 aggagagagg gtggaggctg gcaactgggg agggacttgg tgaggtcagt ggtaaggaca
3961 ggcaggccct gggctacct ggagatggct ggggcctgag acttctccag gtgaacgcag
4021 agcacaggag ggattgagac cccgttctgt ctggtgtagg tgctaatgc tgccccgc
4081 ctctgcata tcccagcgt ggctgcaag gtctacgct tcaaaaaggc tttctgacc
4141 cagctggatg agctgtaac tgagcacagg atgacctggg acccagccca gccccccga
4201 gacctgactg aggccttct ggagagatg gagaaggtga gagtggctgc cacggtgggg
4261 ggcaagggtg gtgggtgag cgtcccagga ggaatgaggg gaggctgggc aaaaggttg
4321 accagtgcac caccggcga gccgcatctg ggctgacagg tgcagaattg gaggtcattt
4381 gggggctacc ccgtctgct ccgagtatgc tctggcct gctcaggcca aggggaacc
4441 tgagagcagc tcaatgatg agaacctgc catagtgtg gctgacctg tctctccgg
4501 gatgtgacc acctgacca cgctggcctg gggcctcctg ctcatgatcc tacatccga
4561 tgtgcagcgt gagccatct ggaaacagt gcaggggccc agggaggaag ggtacaggcg
4621 ggggcccag aactttgctg ggacaccgg ggtccaagc acaggcttga ccaggatct
4681 gtaagcctga cctctccaa cataggaggc aagaaggagt gtcagggccc gaccctgg
4741 gtgctgacc attgtggga cgcattctg tccaggcctg gtccaacagg agatcgacga
4801 cgtgatagg caggtgcggc gaccagagat gggtagacc gctcacatgc cctacacc
4861 tgccgtgatt catgaggtgc agcgtttgg ggacatcgtc ccctgggtg tgaccatata
4921 gacatcccgt gacatgaa tacagggctt ccgcatcct aaggtaggcc tggcgcctc
4981 ctcacccag ctcagacca gcacctgtg atagcccag catggctact gccaggtggg
5041 cccactctag gaacctggc cacctagtc tcaatgccac cacactgact gtccccactt
5101 ggggtggggg tccagatg atggcaggct ggctgtcca tccagagccc ccgtctagt
5161 gggagacaaa ccaggacctg ccagaatgt ggaggacca acgctgcag ggagaggggg
5221 cagtgtgggt gcctctgaga ggtgtgactg cgcctgctg tggggtcggg gaggtactg
5281 tggagcttct cgggcgagg actagttgac agagtccagc tgtgtgccag gcagtgtgtg
5341 tccccgtgt gtttggggc aggggtccca gcatcctaga gtccagtccc cactctacc
5401 ctgcatctcc tgcccaggga acgacactca tccaacct gctatcgtg ctgaaggatg
5461 agccgtctg ggagaagccc tccgctcc acccgaaca cttctggat gccaggggc
5521 acttttgaa gccggaggcc tctgctt tctcagcagg tgcctgtggg gagcccgt
5581 cctgtcccc tccgtggag tcttcaggg gataccca ggagccaggc tactgacgc
5641 cctccccct cccacaggcc gccgtgatg cctcggggag ccctggccc gcatggagct
5701 cttctctt ttaacctcc tctgcagca cttcagctt tgggtccca ctggacagcc
5761 ccgcccagc caccatgtg tctttgctt cctggtgag ccatcccc atgagctttg
5821 tctgtgccc cgctagaat gggtacctg tcccagcct gctcctagc cagagctct
5881 aatgtacaat aaagcaatg gtagttcca actcgggtc cctgctcag ccctgttg
5941 gatcactc ctagggcaa cccacctc gcctatcc tcttaccac accgctggc
6001 cgcatttgag acaggggtac gttgaggctg agcagatgc agttaccct gccataatc
6061 ccatgtccc cactgacca actctgactg ccagattgg tgacaaggac tacattgtcc
6121 tggcatgtg ggaaggggccc agaatgggt gactagaggt gctagtcagc cctggatgtg
6181 gtggagaggg caggactcag cctggaggcc catattcag gctaactca gcccacca
6241 catcagggac agcagtctc ccagcaccat cacaacagtc acctccctc atatatgaca
6301 cccaaaacg gaagacaaat catggcgtca gggagctata tgccagggt acctacctc
6361 cagggtcag tggcaggtg ccagaactt ccctgggaag gcccattga agcccaggac
6421 tgagccacca cctcagcct cgtcacctca ccacaggact ggctacctct ctgggcctc
6481 agggatgctg ctgtacagac ccctgaccag tgacgagttc gactcaggc ccaggctggc

6541 gctggaggag gacacttgtt tggtccaac ctaggtacc atcctcccag tagggatcag
6601 gcagggccca caggcctgcc ctaggacag gactcaacct tggaccata aggcactggg
6661 gcgggcagag aaggaggagg tggcatgggc agctgagagc cagagacct gaccctagt
6721 ctgtctctgc cattaccccg tgtgaccccg ggcccacct tccccacct tccccaccc
6781 ggctctctgt ttcttctgc caacgagaag gctgctcac ctgccccag tctgtcttc
6841 ctgtctgcc ttctggggct gtggccctg ctggcctgga gcccacaacca agggcagggg
6901 ctgtctctcc ccactgtgt cctcaccgac ataatgggct gggtgggca cacaggcagt
6961 gcccagagt ttctaatgag catatgatta cctgagtctt gggcagacct tcttagggaa
7021 cagcctggga cagagaacca cagacactct gaggagccac cctgaggcct cttttgccag
7081 aggacctac agcctcctg gcagcagttc cggcagcatt tctgtaaatg ccctcatgcc
7141 aggggtcggc ccggctgtca gcacgagagg gacgttggc tgtcccctgg caccgagtca
7201 gtcagaaggg tggccagggc cccttgggc cctccagag acaatccact gtggtcacac
7261 ggctcgggtg caggaagtgc tgttctgca gctgtgggga cagggagtgt ggatgaagcc
7321 aggctgggtt tgtctgaaga cggaggcccc gaaaggtggc agcctggcct atagcagcag
7381 caactcttg attattgga aagatttct tcacggttct gactctggg ggtgttagag
7441 gctcagaacc agtccagcca gagctctgtc atgggcacgt agaccggtc ccagggcctt
7501 tgctcttgc tgtctcaga gcctctgca aagtagaac aggcagcctt gtgagtcccc
7561 tctggggagc aaccaacct ccctctgaga tgccccgggg ccaggtcagc tgtggtgaaa
7621 ggtagggatg cagccagctc agggagtggc ccagagtcc tggccacca aggaggctcc
7681 caggaagtc aaggacctg actcctgggc tcttccctc ccctccctc ccaggtcag
7741 gaagtgggg aagggctggg gtgtctgta ccctggcagt cactgagaag cagggtgga
7801 gcagccccct gcagcacgt ggtcagtggt tcttaccaga tggatacga gcaacttct
7861 tttgaacct tttatttcc tggcaggaag aagaggatc cagcagtgag atcaggcagg
7921 ttctgtgtg cacagacagg gaaacaggct ctgtccacac aaagtgggtg gggccaggat
7981 gagccccagt ctgttcacac atggctgctg cctctcagct ctgcacagac gtctcgtc
8041 ccctgggatg gcagctggc ctgtgtgtt tggggtgag ccagcctcca gactgcctc
8101 cctgccctgc tgcctccac tctcagtgct tccatggctg ctcagttgga cccagctgg
8161 agacgttcag tgaagcccc gggctgtct tactcccag tctgggtac ctgccacct
8221 ctgtcagca ggaatggggc taggtgcttc ctcccctggg gacttacct gctcctc
8281 ctgggataag acggcagct cctcctggg ggcagcagca ttcagctc caggtctct
8341 gggggtcgtg acctgcagga ggaataagag ggcagactgg gcagaaaggc ctcagagca
8401 cctcatctc ctgtctcac actggggtgt cacagtctg ggaagtctt cttttcagt
8461 tgagctgtg taacctgtg agtttctgg agggggcctg cactacct tggactccc
8521 tgccgtgtg ctgggtctaa ctgagctctg aaaggagaga gcccagccc tgggccttc
8581 aggggaagcc ttacctcaga ggttggctt tctactct tgaattgctg tctctcaga
8641 gggaggtggg aggggtgaca caacctgac acccacta tgagtatga gtagtctgc
8701 cccagctggc cactccttc caggtcagct ccccttact gtgtctgcca agggtgccag
8761 cacagccgc cactccagg ggaagaggag tccagcctt taccactga gtgggcacag
8821 ttagcattt atcattagc cccacactg gctgacct ctcccctgtg ggctgcatg
8881 caaggagaga gaacaggctg aggtgagagc tactgtcaac acctaacct aaaaaatca
8941 taattgggt gggcaggggt gctcagcct gtaatcccag cactttggga ggccgagatg
9001 ggtggatcac ctgaggtcag atgtcagaga ccagcctggc caacatggtg aaacccctc
9061 tctactaaaa atacaaaaa ttactgggc gtggtgggtg gtgctgtaa tccagctac
9121 tcaggaggct gaggcaggag aattgctga acctgggagg cagaggctgc agtgagccga
9181 gatgcatca ttgactcca gcctggtcaa caagagtga actgtctaa aaaaaaatc
9241 tataattgat atcttagaa agataaaact ttgattcat gaaataagaa taggagggtc
9301 taaataaaa atgttcaaac acccaccacc actaattct gacaaaaata tagtctgggt
9361 gcctagctc atgctgtaa tccagcatt ttggagggt aaggcaggag gattgttga
9421 gcctaggaat tc

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&cmd=Search&term=M33388,M19697&doptcmdl=GenBank#sequence_181303, SON ULAŞIM 11.08.2006)

9.2. RIZA FORMU

Madde Bağımlılığı ve Popülasyon Genetiği Çalışması

Anket Formu

Çalışma NO :

1. Yaş
2. Cinsiyeti Kadın Erkek
3. Doğum Yeri :
4. Annesinin Doğum Yeri :
5. Babasının Doğum Yeri
6. Eğitim düzeyi : Eğitim görmemiş İlk okul Mezun Lise
 Üniversite (Lisans) Y. Lisans Doktora
7. Medeni Durumu :
Bekar, hiç evlenmemiş Evli Boşanmış Ayrı yaşıyor
 Dul Diğer Belirtiniz
8. Mesleki durumu :

Vasıfsız işçi <input type="checkbox"/>	Vasıflı İşçi <input type="checkbox"/>	Memur (Kamu çalışanı) <input type="checkbox"/>
Özel sektör çalışanı <input type="checkbox"/>	Öğrenci <input type="checkbox"/>	Profesyonel (Mühendis, doktor, hukukçu vb.) <input type="checkbox"/>
Hiçbiri <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	Belirtiniz

9. Kullandığı Madde :

Madde Tipi	a) Hiç Kullanmış mı		b) İk Kullanmış Veya	c) Son 12 ayda kullanmış mı	
	Hayır	Evet		Hayır	Evet
1.1 Esrar (Marihuana, hışı)					
1.2 Eroin					
1.3 Afyon					
1.4 Diğer Opıyatlar (Aldolan, Fentanıl, Morfin, vb. Belirtiniz)					
1.5 Kokain					
1.6 Metamfetamin					
1.7 Ekstani					
1.8 Barbituratlar					
1.9 Benzodiazepinler belirtiniz					
1.10 Halüsinojenler (LSD, PCP)					
1.11 Uçucular (Tiner, baki, ulu vb.)					
1.12 Diğer (belirtiniz)					

10. Ailesinde başka madde bağımlısı var mı? Belirtiniz :

11. Şimdiye kadar hangi maddeler için tedavi gördünüz ?

Esrar (Marihuana, hışı)	<input type="checkbox"/>	Eroin	<input type="checkbox"/>
Afyon	<input type="checkbox"/>	Diğer Opıyatlar (Aldolan, Fentanıl, Morfin, vb.) (belirtiniz)	<input type="checkbox"/>
Kokain	<input type="checkbox"/>	Metamfetamin	<input type="checkbox"/>
Ekstani Tipi	<input type="checkbox"/>	Barbituratlar	<input type="checkbox"/>
Benzodiazepinler (belirtiniz)	<input type="checkbox"/>	Halüsinojenler (LSD, PCP vb.)	<input type="checkbox"/>
Uçucular (tiner, baki, ulu, ulu vb.)	<input type="checkbox"/>	Diğer (belirtiniz)	<input type="checkbox"/>

12. Herhangi bir madde sorunu nedeniyle ilk kez kaç yaşında tedavi gördünüz ?

13. Toplam olarak, hayatınız boyunca kaç kez madde sorunu nedeniyle tedavi gördünüz ?

(Şu an tedavinizi saymayınız)

kez

10. ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: Selda Mercan
DOĞUM TARİHİ: 06.04.1980
DOĞUM YERİ: İstanbul

EĞİTİM

EĞİTİM KURUMU	DERECE	YIL	BRANŞ
İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	Lisans	2003	Biyoloji
İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü	Y. Lisans Tez Aşamasında	2006	Adli Fen Bilimleri

AKADEMİK ÜNVANLAR

EĞİTİM KURUMU	DERECE	YIL	BRANŞ
İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü	Araştırma Görevlisi	2005	Adli Fen Bilimleri

MESLEK DENEYİMİ

2003-Bugün	İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü, Yüksek lisans öğrencisi
2005	İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü, Öğrenci İşçi
2005- Bugün	İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü, Araştırma Görevlisi