

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KALP KAPAĞI REPLASMANI SONRASINDA ANTİKOAGÜLAN
TEDAVİDE CYP2C9 GEN POLİMORFİZMİNİN ROLÜ**

Hatice YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Lülüfer TAMER

MERSİN – 2006

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KALP KAPAĞI REPLASMANI SONRASINDA ANTİKOAGÜLAN
TEDAVİDE CYP2C9 GEN POLİMORFİZMİNİN ROLÜ**

Hatice YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Lülüfer TAMER

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP SBE
BK (HY) 2004-1 YL kodlu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:57

MERSİN – 2006

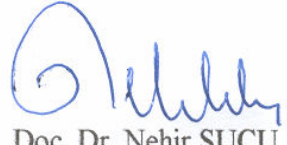
Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Kalp Kapağı Replasmanı Sonrasında Antikoagülan Tedavide CYP2C9 Gen Polimorfizminin Rolü” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.


Tez Savunma Tarihi 27/01/2006


Prof. Uğur ATIK
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Jüri Başkanı


Doç. Dr. Lülüfer TAMER
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Jüri Üyesi


Doç. Dr. Nehir SUCU
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun...15.02.2006...tarih ve.....2006/34.....sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Murat DİKMENGİL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans danışman hocam Sn. Doç. Dr. Lülüfer TAMER'e yüksek lisansa başladığım günden bugüne kadar engin bilgi birikiminden zaman ve mekan tanımaksızın faydalanmamı sağladığı, her konudaki destek ve yardımları için teşekkür ederim.

Biyokimya Anabilim Dalı Başkanımız Sn. Prof. Uğur ATİK, Öğretim Üyeleri Sn. Doç. Dr. Gürbüz POLAT, Sn. Doç. Dr. Gülçin ESKANDARİ ve Sn. Yrd. Doç. Dr. Burak ÇİMEN'e yüksek lisans eğitimim boyunca yaptıkları akademik katkılardan dolayı teşekkür ederim.

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Doç. Dr. Nehir SUCU'ya katkı ve yardımlarından dolayı, hasta grubunun toplanması sırasındaki yardımlarından dolayı tüm Kalp ve Damar Cerrahisi Asistanlarına, tezimin istatistikleri ve bulguların değerlendirilmesinde yardımlarından dolayı Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Yrd. Doç. Dr. Handan ÇAMDEVİREN'e, çalışmam sırasında fikirleri ve her türlü destekleri ile katkıda bulunan tüm çalışma arkadaşlarıma ve Biyokimya Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu çalışmam sırasında da beni her zaman destekleyen aileme sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kalp Kapaklarının Anatomisi.....	4
2.2. Kapak Replasmanı Gerektirebilecek Kalp Kapak Hastalıkları.....	4
2.2.1. Mitral Kapak Hastalıkları.....	5
a) Mitral Darlığı.....	5
b) Mitral Yetmezliği.....	5
2.2.2. Aort Kapak Hastalıkları.....	6
a) Aort Darlığı.....	6
b) Aort Yetmezliği.....	7
2.2.3. Triküspit Kapak Hastalıkları.....	7
a) Triküspit Yetmezliği.....	7
b) Triküspit Darlığı.....	8
2.3. Yapay Kalp Kapakları.....	8
2.3.1. Biyolojik kapaklar.....	8
1) Ksenoenogreftler.....	8
2) Homogreftler.....	9
3) Otogreftler.....	9
2.3.2. Mekanik Kapaklar.....	9
2.3.3. Kapak Seçiminde Major Kriterler.....	11
2.4. Yapay Kalp Kapaklarına Bağlı Komplikasyonlar.....	12
2.4.1. Protetik Kapak Endokarditi.....	12

2.4.2. Hemoliz.....	13
2.4.3. Perivalvüler kaçak.....	13
2.4.4. Tromboembolizm.....	14
2.5.Hemostaz ve Koagülasyon Sistemi Elemanları.....	15
2.5.1.Hemostaz.....	15
1) Primer Hemostaz.....	15
2) Sekonder Hemostaz.....	16
2.6. Antikoagülan İlaçlar.....	20
a) Heparin.....	20
b) Antiagreganlar.....	20
c) Oral Antikoagülanlar.....	21
1) Coumarin Grubu İlaçlar.....	21
a) Bishidroksicoumarin (Dicoumarol).....	21
b) Warfarin Na (Coumadin).....	21
2.7. Sitokrom P450 Monooksijenaz Enzim Sistemleri	25
2.7.1. CYP450'nin Yapısı.....	27
2.7.2. CYP2C9.....	29
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	35
3.1. Çalışma Grubu ve Örnek Alımı.....	35
3.1.1.Hasta Grubuna ait Coumadin Tedavi Şeması.....	35
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	36
3.3. Kullanılan Aletler.....	36
3.4. Kullanılan Cihazlar.....	37
3.5. Kullanılan Kitler.....	37
3.6. Yöntemler.....	37
3.6.1. Tam Kandan DNA İzolasyonu.....	37
3.6.2. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	39
3.6.3. CYP2C9 PCR Protokolü ve Melting Curve Analizi.....	41
3.6.4. PTZ Ölçümü ve INR Hesaplanması	44
3.7. İstatistiksel Analiz.....	44
4. BULGULAR.....	45
4.1. Çalışma Grubuna Ait Demografik Veriler.....	45

4.2. CYP2C9 Genotip Dağılımı.....	45
4.3. Kalp Kapağı Replasmanı Sonrasında Coumadin Kullanan Hastalarda CYP2C9*2 ve CYP2C*3 Genotiplerine Göre Coumadin Dozu.....	46
4.3.1. CYP2C9*2 Genotipine Göre Coumadin Dozu.....	46
4.3.2. CYP2C9*3 Genotipine Göre Coumadin Dozu.....	46
4.4. Kalp Kapağı Replasmanı Sonrasında Coumadin Kullanan Hastalarda CYP2C9*2 ve CYP2C*3 Genotiplerine Göre INR Düzeyleri.....	47
4.4.1. CYP2C9*2 Genotipine Göre INR Düzeyleri.....	47
4.4.2. CYP2C9*3 Genotipine Göre INR Düzeyleri.....	48
4.5. CYP2C9 Genotipleri ile Coumadin Dozu ve INR Düzeyleri Arasındaki Kombine İlişki.....	48
5. TARTIŞMA.....	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	56
7. KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Kalp kapakları	4
Şekil 2.2 Pıhtılaşma kaskadı	19
Şekil 2.3 Coumadinin yapısı (warfarin sodyum).....	22
Şekil 2.4 Gla rezidüsü oluşumu.....	22
Şekil 2.5 CYP2C9 geninin kromozomal yerleşimi.....	30
Şekil 3.1 CYP2C9*2 (C430T) PCR çalışma sonucu	43
Şekil 3.2 CYP2C9*3 (A1075C) PCR çalışma sonucu.....	43
Şekil 4.1 CYP2C9*2 genotipi ile coumadin dozu ve INR düzeylelerinin kombine ilişkisi	49
Şekil 4.2 CYP2C9*3 genotipi ile coumadin dozu ve INR düzeylelerinin kombine ilişkisi	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Kan koagülasyonunda görev alan faktörler ve fonksiyonları.....	17
Çizelge 2.2	Diğer koagülasyon sistemi elemanları.....	17
Çizelge 3.1	Coumadin tedavi şeması.....	36
Çizelge 3.2	DNA izolasyon kit içeriği.....	38
Çizelge 3.3	CYP2C9 mutasyon belirleme kit içeriği ve kullanılan miktarlar....	41
Çizelge 3.4	CYP2C9 için PCR protokolü.....	42
Çizelge 4.1	Hastaların tanıları ve cinsiyetleri.....	45
Çizelge 4.2	CYP2C9 Genotip dağılımı.....	45
Çizelge 4.3	CYP2C9*2 genotipli hastalarda ortalama coumadin dozu.....	46
Çizelge 4.4	CYP2C9*3 genotipli hastalarda ortalama coumadin dozu.....	47
Çizelge 4.5	CYP2C9*2 genotipli hastalarda ortalama INR değerleri.....	47
Çizelge 4.6	CYP2C9*3 genotipli hastalarda ortalama INR değerleri	48
Çizelge 4.7	CYP2C9*2, CYP2C9*3 genotipli hastalarda ortalama doz ve ortalama INR değerleri.....	49

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	:Adenozin difosfat
AVR	:Aort valv replasmanı
bp	:Baz çifti
Ca⁺⁺	:Kalsiyum
CYP450	:Sitokrom P450
Da	:Dalton
DAG	:Diasilgliserol
DNA	:Deoksiribonükleik asit
dNTP	:Deoksiribonükleotid trifosfat
e⁻	:Elektron
EDTA	:Etilendiamintetraasetik asit
Fe²⁺	:Ferro demir
Fe³⁺	:Ferrik demir
FRET	:Floresan rezonans enerji transferi
G+C	:Guanin+Sitozin
Gla rezidüsü	:Gama-karboksiglutamik asid rezidüsü
gp Ib	:Glikoprotein Ib
HMWK	:Yüksek moleküler ağırlıklı kininojen
INR	: Uluslararası Normalize Oran
IRP	:Uluslararası Referans Preparat
ISI	:Uluslararası Duyarlılık Endeksi
KABC	:Koroner arter bypass cerrahisi
LDH	:Laktat Dehidrogenaz
mg	:Miligram
MgCl₂	:Magnezyum klorür
mV	:Milivolt
MVR	:Mitral valv replasmanı
NADPH	:Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
nm	:Nanometre

HNF-1	:Hepatik nüklear faktör
HPF-1	:HepG2-spesifik faktör-1
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PVK	:Vitamin K eksikliği nedeniyle indüklenen proteinler
PK	:Prekallikren
PTZ	:Protrombin zamanı
RFLP	:Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
SC	:Subkutan
SSCP	:Tek zincir konformasyon polimorfizmi
SNP	:Tek nükleotid değişim polimorfizmi
Tm	:Erime Isısı
TF	:Doku faktörü
U	:Ünite
WHO	:Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

KALP KAPAĞI REPLASMANI SONRASINDA ANTİKOAGÜLAN TEDAVİDE CYP2C9 GEN POLİMORFİZMİNİN ROLÜ

Kalp kapağı hastalıklarında bazı durumlarda kapak replasmanı kaçınılmazdır. Biyoprotezler erken kalsifik dejenerasyon nedeniyle kısa ömürlü olmaktadır. Mekanik kapaklar uzun ömürlü olmasına karşın tromboembolik komplikasyonlar nedeniyle antikoagülan kullanımını gerektirmektedir. Mekanik kalp kapağı replasmanı sonrasında tromboembolik komplikasyonları önlemek için antikoagülan ajan olarak coumadin kullanılmaktadır. Coumadinin en önemli yan etkisi kanamaya eğilimi artırmasıdır. Bu nedenle coumadin dozunun iyi ayarlanması gerekir. Bu ayarlama günümüzde Uluslararası Normalize Oran (INR) ile yapılmaktadır. Coumadin, sitokrom P450 CYP2C9 ile metabolize edilir. Wild tip (CYP2C9*1) alleleline ek olarak CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 iki allelik varyant tanımlanmıştır. CYP2C9*2 alleli kodon 144'de arjininin sistein ile yer değiştirmesiyle oluşurken, CYP2C9*3 alleli kodon 359'da izolösünün lösün ile yer değiştirmesiyle oluşur. CYP2C9'daki genetik polimorfizmler coumadinin metabolize edilmesini azaltmakta bu durumda kanama riskini arttırabilmektedir.

Çalışmamızda, kalp kapağı replasmanı sonrasında coumadin kullanan hastalarda CYP2C9 gen polimorfizminin rolünü saptamayı amaçladık. Çalışma grubumuzu, kalp kapağı replasmanı yapılan 74 hasta oluşturmaktadır. Kan örneklerinden DNA'lar elde edildi. CYP2C9*2, CYP2C9*3 alelleri LightCycler-CYP2C9 mutasyon belirleme kiti kullanılarak LightCycler cihazında real time PCR yöntemi ile saptandı.

Çalışmamızda CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 heterozigot hastaların wild tip genotipi olan hastalara göre daha az coumadin dozuna ihtiyaç duydukları saptanmıştır (CYP2C9*2 $p=0.029$, CYP2C9*3 $p=0.022$). Ayrıca CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 genotipleri ile coumadin dozu ve INR düzeyleri arasındaki kombine ilişki incelenmiş ve her iki genotipi (CYP2C9*2/*3) için heterozigot olanların daha az coumadin dozuna gereksinim duydukları saptanmıştır ($p=0.001$).

Bulgularımız kapak replasmanı yapılan hastalarda antikoagülan tedaviye başlamadan önce CYP2C9 genotiplemesinin yapılmasının coumadin tedavisi için iyi bir yol gösterici ve özellikle doz ayarlama protokollerinin geliştirilmesi için kullanışlı olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kapak replasmanı, mekanik kalp kapağı, CYP2C9, coumadin.

ABSTRACT

THE ROLE OF CYP2C9 GENE POLYMORPHISMS AFTER HEART VALVE REPLACEMENT WITH ANTICOAGULANT THERAPY

Valve replacement with valvular heart disease inevitable in certain conditions. Because of early calcific degeneration biological heart valves have a short life time. Despite the mechanical valves have a long life time, anticoagulant must be used because of thromboembolic complications. Coumadin is an anticoagulant agent used for the prevention of thromboembolic complications after heart valve replacement. Bleeding is major adverse effect of coumadin. For this reason, coumadin dose must be adjusted very well. Presently, the International Normalized Ratio (INR) is used for coumadin dose adjustment. Coumadin is metabolized by cytochrome P450 CYP2C9. In addition to the wild-type allele (CYP2C9*1), two allelic variants CYP2C9*2 and CYP2C9*3 have been identified. CYP2C9*2 is the result of cysteine substitution at arginine codon 144 and CYP2C9*3 is the result of a leucine substitution at isoleucine codon 359. Gene polymorphisms of CYP2C9 decrease coumadin metabolism so would increase the bleeding risk.

The aim of the present study was to investigate the role of CYP2C9 gene polymorphisms after heart valve replacement in group of patients who are taking coumadin. The study subjects were consisted of 74 patient with heart valve replacement. DNA was extracted from blood samples. CYP2C9*2, CYP2C9*3 alleles were detected by using LightCycler-CYP2C9 mutation detection kit by real time PCR method with LightCycler instrument.

The results of our show that CYP2C9 genotype is associated with the mean maintenance dose of warfarin. In our study, we found that patients having CYP2C9*2 and CYP2C9*3 genotype have lower dose of coumadin according to patients having wild type genotype (CYP2C9*2 $p=0.0296$, CYP2C9*3 $p=0.022$). In addition to combine association of CYP2C9*2 and CYP2C9*3 genotype coumadin dose and INR levels were investigated and we found that patients having both forms of CYP2C9*2 and CYP2C9*3 heterozygous (CYP2C9*2/*3) require lower coumadin dose than patients having wild type genotype ($p=0.001$).

Our results showed that CYP2C9 genotyping before anticoagulant therapy can be a guideline in the patients with valve replacement for coumadin therapy and it may be useful for developing dosing protocols particularly at the onset of therapy.

Key Words: Valve replacement, mechanic heart valve, CYP2C9, coumadin.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Charles Hufnagel'in 1952 yılında aort yetmezliği olan bir hastanın inen aortasına prostetik kalp kapağını yerleştirmesi, 1954 yılında da kalp akciğer makinesinin kalp cerrahisine girmesi, kalp kapağı replasmanı bekleyen hastaların yaşamlarında bir dönüm noktası olmuştur. 1960 yılından itibaren yaygın olarak takılmaya başlanan protez kalp kapaklarının 1967 yılından itibaren sınıflandırılmasına gidilmiş, karşılaşılan komplikasyonlar belirtilmiştir. O zamandan beri protez kalp kapaklarının gelişimi devamlılık göstermektedir (1, 2, 3).

İlk takılan kapaklar kaba tasarımlı, test edilmemiş sentetik maddelerden yapılmış olup dayanıklılık süresi oldukça sınırlıydı. 1960 yılında başarılı bir mitral kapak replasmanı yapılan 44 yaşındaki bayan hasta 3 ay yaşayabilmişti. Sonrasında Harken aortik pozisyonda yerleştirdiği toplu-kafesli küçük kapaklar bildirmiştir. 1961 yılından itibaren Albert Starr ve Lowell Edwards yeni yapılmış silikon toplu-kafesli kapaklarla uzun süreli iyi sonuçlar almışlardır. Bir yıl sonra homogreftler (kadavradan alınan kapaklar), 2 yıl sonra ksenogreftler (hayvandan alınan kapaklar) kullanılmaya başlamıştır. 1967 yılında Donald Ross, hastanın pulmoner kapağını aortik ve mitral pozisyonlarda kullanmış ve otogreft kapak (kişinin kendisinden alınan kapaklar) uygulamasını başlatmıştır (4, 5, 6, 7, 8, 9).

1980'li yılların ortalarına kadar mekanik ve biyoprotez kalp kapaklarıyla ilgili çalışmalarda yaşanan problemler çözümlenmeye çalışılmıştır. Öncelikle kapakların kolayca yerleştirilmesi sağlanmış ve kanın kapaktan geçişi esnasında oluşan basınç farkının en aza indirilmesi için kapakların anatomik yerleşimi, boyutu, şekli değiştirilmiştir. Bu değişimler hastaların kardiyak hemodinamilerini düzeltmiş ve şikâyetlerinin ortadan kalkmasını sağlamıştır. Cerrahi mortalite ve morbidite bu dönemde önemli ölçüde azalmıştır. Bununla beraber yeni kapakların yaşam üzerine etkileri ve bu süreçte oluşacak komplikasyonlar için uzun bir zaman geçmesi gerekmiştir. Bu zaman içinde oluşan yapısal bozukluklar ve tromboembolik komplikasyonların, geliştirilen mekanik ve biyoprotez kapaklarla üstesinden gelinilmeye çalışılmıştır. Dünyada çok sayıda yapılan kapak ameliyatlarının geriye ve ileriye dönük analizleriyle mitral ve aort kapak pozisyonundaki biyoprotezler ve

mekanik kapakların komplikasyonları hakkında aşağıdaki veriler elde edilmiştir (10, 11, 12, 13, 14,15).

	Aort mekanik (%hasta-yıl)	Aort Biyolojik (%hasta-yıl)	Mitral Mekanik (%hasta-yıl)	Mitral Biyolojik (%hasta-yıl)
Yapısal bozukluk	0	0.3-4.3	0	1.2-2.0
Kapak trombozu	0-0.2	0-0.2	0.2-0.8	0-0.2
Emboli	1.4-2.0	0.7-2.2	1.8-3.3	0.8-2.4
Kanama	0.9-2.3	0.2-1.3	1.1-2.2	0.4-1.2
Endokardit	0.4-0.5	0.2-1.3	0.2-0.7	0-1.0
Reoperasyon	0.4-1.5	0.3-5.1	0.6-1.4	2.1-4.1
Yapısal olmayan fonksiyon bozukluğu	0.4-0.8	0.05-0.2	0.4-1.4	0-1.5

Yukarıdaki verilere bakarak mekanik kapakların uzun süre dayanmasına karşın, antikoagülan kullanımı ile ilgili tromboemboli ve kanama komplikasyonlarının daha sık yaşandığını görmekteyiz. Biyolojik kapaklar ise antikoagülan kullanımı gerektirmez, ancak en önemli sorun erken dönemde gelişen kalsifik dejenerasyona bağlı kapak fonksiyon bozukluğudur. Bu olumsuzluklar karşısında araştırmacılar kapakta tamir yöntemini gündeme getirmişler ve uygun vakalarda mitral ve triküspit kapaklarda son derece iyi sonuçlar almışlardır. Ancak aort kapak sonuçları yüz güldürücü olmamıştır. Ayrıca biyolojik kapaklarda erken dönemde gelişen kalsifik dejenerasyonla ilgili çok geniş çalışmalar yapılmış, klinik uygulamada bu tam yerini bulmamıştır (16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23).

Mekanik kapakların en önemli komplikasyonu olan tromboembolik olayların kontrolü için coumadin (warfarin sodyum) kullanılmaktadır. Coumadin tromboembolik bozuklukları önlemek ve kontrol etmek için kullanılan antikoagülan bir ilaçtır. Coumadin antikoagülan etkisini, karaciğerde yapılan ve K vitaminine bağımlı pıhtılaşma faktörleri olan protrombin, faktör VII, faktör IX ve faktör X'un sentezinin son basamağı olan karboksillenme basamağını önlemek suretiyle gösterir. Coumadin aynı zamanda K vitaminine bağımlı non-enzimatik antikoagülan faktör olan protein C

ve protein S'in (protein C'nin kofaktörü) karaciğerde sentezini ve glutamil rezidülerinin karboksillenmesi ile aktivasyonunu da bozar (24, 25, 26).

Coumadinin en önemli yan etkisi doz ayarlaması yapılmadığında kanamaya eğilimi artırmasıdır. Coumadinin kanamaya yol açmayacak ve pıhtı oluşumunu azaltacak dozlarda kullanılması gerekmektedir. Bu nedenle coumadin dozunun çok iyi düzenlenmesi gerekir. Bu düzenleme günümüzde International Normalized Ratio (INR) ile yapılmaktadır. Normal koşullarda INR'nin mekanik aort kapak replasmanı yapılan hastalarda 2-3, mekanik mitral kapak replasmanı yapılan hastalarda 2.5-3.5 arasında tutulması önerilmektedir. Ancak hastanın sol atrium büyüklüğü, ritmi ve ventrikülün anatomofizyolojik durumuna göre INR oranlarında yeni bir düzenlemeye gidilebilir. Bununla beraber coumadin kullanan hastalarda zaman zaman uygun INR düzeyleri sağlanamamaktadır. Düşük dozlarda yüksek INR değerlerine ulaşılırken, yüksek dozlarda INR düzeyi istenilen değerin çok altında kalmaktadır (26, 27).

Coumadin, monooksijenazlar adı verilen sitokrom P450 enzim ailesinin CYP2C9 izoformu ile metabolize edilmektedir. Sitokrom P450 enzimleri ilaç biyotransformasyonu ve metabolizması için en önemli sistemlerdendir. Bu sistem induksiyon veya inhibisyon gibi mekanizmalarla değişime uğrayabilir ve bireyler arasında oldukça farklı formları ortaya çıkabilir (26, 27).

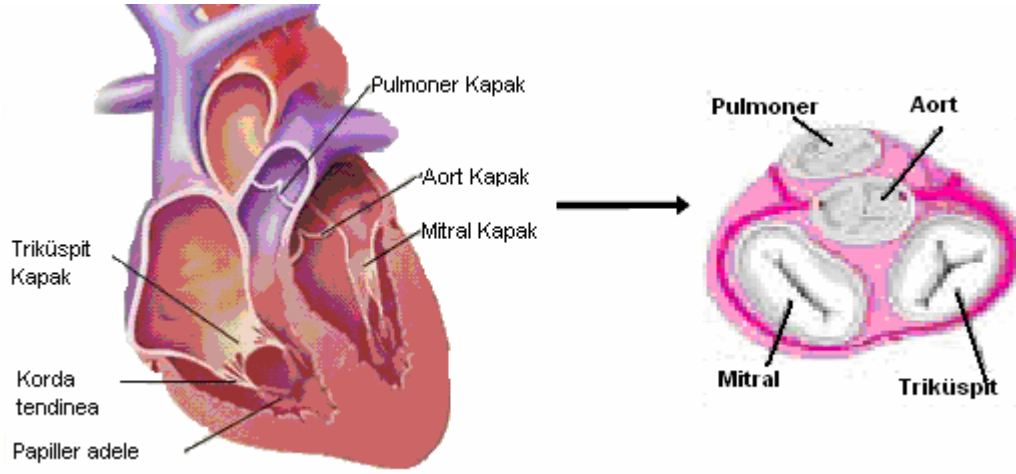
CYP2C9 geninde oluşan genetik polimorfizmler enzim aktivitesi üzerinde oldukça önemlidir. Wild tip allele (CYP2C9*1), ek olarak CYP2C9 geninde nokta mutasyonlar sonucu CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 allelik varyantları oluşur. CYP2C9 genindeki allelik varyantlar coumadinin metabolize edilmesini azaltmakta, dolayısıyla coumadinin daha etkili olmasını sağlamaktadır. Bu ise coumadine bağlı INR düzeylerinin neden kişiden kişiye değiştiğini açıklayabilir (26, 27).

Çalışmamızda, mekanik kalp kapağı replasmanı sonrasında coumadin kullanan hastalarda CYP2C9 gen polimorfizminin INR sonuçları üzerine olan etkisini saptamayı hedefledik. Bu çalışmada coumadin kullanan hastalarda CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 varyant allellere bakılarak, uygun doz ayarlamasına katkıda bulunulmasını ve antikoagülasyondan beklenen yararlar sağlanırken kanama riskinin de en aza indirilmesinin sağlanması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalp Kapaklarının Anatomisi

Kalbin 4 kapağı; mitral, aort, triküspit ve pulmoner, kendi anuluslarına ya da kapak halkasına yapışıktır. Şekil 2.1’de gösterildiği gibi, bunlar kalbin tabanında birleşerek kalbin fibröz iskeletini oluşturur. Merkezde bulunan aort kapağı iskeletin en önemli yapısıdır ve 3 kapakla bağlantısı vardır. Kalbin iskeletini membranöz septum, aortik intervalvüler sağ ve sol fibroz trigonlar oluşturur. Aort ve mitral kapak arasındaki devamlılık bu trigonlarla sağlanır. Central fibroz body olarak bilinen sağ fibroz trigon aort, mitral, triküspit kapağı birbirine bağlar. Bu yakın anatomik ilişkiden dolayı bir kapağı etkileyen patoloji diğer kapakları da etkileyebilir (Şekil 2.1) (25).



Şekil 2.1: Kalp kapakları

2.2. Kapak Replasmanı Gerektirebilecek Kalp Kapak Hastalıkları

Kalp kapaklarının genetik, dejeneratif, infiltratif, infeksiyöz, iskemik hastalıklar ve travmadan etkilenmesi hastaların karşımıza kapakta darlık ve/veya yetmezlik bulgularıyla gelmesine neden olmaktadır. Romatizmal ateşin çoğunlukla mitral kapağı,

dejeneratif kalsifikasyonun ise aort kapağı etkilediği bilinmektedir. Triküspit kapakta oluşan yetmezlik ise genellikle pulmoner hipertansiyona bağlı gelişir. Pulmoner kapakta ise konjenital stenotik lezyonlar görülmektedir (28, 29).

2.2.1. Mitral Kapak Hastalıkları

a) Mitral Darlığı: Mitral kapakların diyastolda yeterince açılmaması sonucu daralmış kapaktan kanın yeterince sol atriumdan sol ventriküle geçememesi söz konusudur (29).

Mitral darlığı etiolojisinde ana etken, nadir konjenital lezyonlar ve atrial miksoma hariç, romatizmal ateştir. Hastalığın seyrinde komissural füzyon, kapakçıklarda fibrozis, kalınlaşma, kordalarda ve papiller adalelerde kısılma, yapışıklık oluşur. Bu lezyonlar ileri derecede kalsifikasyonla sonuçlanabilir. Ancak hastaların %55'inde akut eklem romatizması öyküsü vardır. Olguların %50-60'ında yalnız mitral kapak tutulur, mitral ve aort kapak lezyonları beraber sadece %10 oranında görülür. Triküspit kapak tutulumu mitral veya aort hastalığı ile birlikte olguların %10'unda görülmektedir. Pulmoner kapak çok nadiren etkilenir (30, 31).

Mitral darlığında normalde 4-6 cm² olan mitral kapak alanının 2.5 cm² ye düşünceye kadar belirtisiz bir dönemi vardır. Kapak alanı 1.5 cm² den küçükse ciddi semptomlar ortaya çıkar. 1 cm² mitral kapak alanı çok ileri mitral darlığını gösterir, kritik darlık 0.5 cm²'dir (29, 30).

b) Mitral Yetmezliği: Ventrikülün sistolik ejeksiyonu sırasında mitral kapağın yetersizliği nedeni ile kanın sol atriuma kaçması durumudur (30, 31).

Mitral yetmezliğinde etiyolojik nedenler daha çoktur. Olguların hemen yarısında romatizmal kalp hastalığı söz konusudur. Mitral yetmezliğinin nedenleri; romatizmal ateş, mitral valv prolapsusu (Barlow Send.,floppy mitral), koroner arter hastalığı (Papiller adale disfonksiyonu), mitral annülüs kalsifikasyonu, mitral annülüs dilatasyonu, konnektif doku hastalığı, endokarditis, korda rüptürü veya papiller adale rüptürü (Akut mitral yetmezliği), sol atrial miksomalar olarak sıralanabilir (29, 30).

Mitral kapaktaki yetmezlik ile kanın atriüma regürjitasyonu sol ventrikülde volüm yüklenmesine neden olur. Sol ventrikülün atım hacmi yükselir ancak bu hacmin bir kısmı düşük rezistanslı sol atriüm ve pulmoner venlere kaçar. Sol ventrikülün sistol süresi kısalır. Zamanla sol ventrikül fonksiyonları bozulur ve yüksek debili bir kalp yetmezliği gelişir. Sol ventrikül end-diastolik basıncı yükselmiştir. Sol atriüm zamanla genişler.

Akut mitral yetmezliği ise daha dramatik seyreder. Zamanında girişim yapılmazsa ölümlü sonuçlanma olasılığı çok yüksektir. Enfeksiyon, kardiyak travma veya iskemiye bağlı papiller adele rüptürü, korda rüptürü gibi nedenlerle gelişebilir. Acil cerrahi müdahale gerektirir (29, 30).

2.2.2. Aort Kapak Hastalıkları

a) Aort Darlığı: Sol ventrikül çıkışında obstrüksiyona neden olur. Aort darlığı etiolojisinde konjenital ve dejeneratif nedenler ilk sırayı alırken romatizmal ateş sonra gelir (29, 30).

Kapakçıklar başlangıçta ödemlidir, fibrozis ile kalınlaşır ve deforme hale gelir. Kommissüral füzyon ile kapak alanı daralır. %50'den fazla daralma klinik bulguların çıkmasına neden olur. Sol ventrikül içi basıncı aort basıncının üzerine çıkar ve bir gradient oluşur. Zamanla sol ventrikülde konsantrik hipertrofi gelişir. Artmış sol ventrikül içi basıncı ve hipertrofi myokardın oksijen tüketimini artırır ve subendokardial alanlarda perfüzyon azalır. Sonuçta aritmiler, göğüs ağrısı ve ani ölümlere sebep olur. Aorta darlığının kardinal semptomları dispne, senkop, angina pectorisdir. Aorta kapak alanı 2.5-3.5 cm²'dir. Hastaların semptomatik hale gelmesi kapak alanının 1cm²'nin altına inmesi ile oluşur (29, 30).

Aort valv replasmanı (AVR) semptomatik hastalarda açıkça endikedir. Asemptomatik hastalarda tedavi tartışmalıdır. Veriler sınırlı olmasına karşın cerrahi olmaksızın hangi hastalar yüksek risk altındadır bunun tespit edilmesi son derece mantıklı olacaktır. Şiddetli aort darlığı olan semptomlu veya semptomsuz hastalar koroner arter bypass cerrahisine (KABC) giderken AVR de yapılmalıdır. Orta derecede aort darlığı (MP>30 mmHg) KABC'e alındığında AVR yapılmalıdır, fakat aort

darlığının daha hafif formunda bu tartışmalıdır. Aort darlığında kapak tamirlerinde erken dönemde tekrar darlık geliştiği için kapak replasmanı tercih edilmektedir (29, 30).

b) Aort Yetmezliği: Aort yetmezliğinde kanın diyastolde sol ventriküle geri kaçması ana patolojiyi meydana getirir. Aort yetmezliğinin nedenleri arasında akut eklem romatizması anuloaortik ektazi, endokardit, konjenital aort kapak hastalığı ve iyatrojenik nedenler sayılabilir (30).

Aort yetmezliğinde atılan kanın bir kısmı sol ventriküle geri döner. Sol ventrikül diyastol sonu volümü yükselir. Diyastol döneminde aortadaki kanın bir kısmının geri kaçması diyastolik arter basıncını düşürür. Sol ventrikülün volüm yüklenmesi sol ventrikülün zamanla genişlemesine neden olur. Bu hemodinamik gelişmeler zamanla sol kalp yetmezliğine, sol atrial basıncın, pulmoner ven ve arter basınçlarının yükselmesi de sağ kalp yetmezliğine neden olabilir (30).

2.2.3. Triküspit Kapak Hastalıkları

a) Triküspit Yetmezliği: Akkiz triküspit kapak hastalıkları sık değildir. Triküspit yetmezliği genellikle aort veya mitral kapak lezyonlarına bağlı olarak gelişen pulmoner hipertansiyonun neden olduğu triküspit anulus dilatasyonuna bağlı olarak gelişir. Bu fonksiyonel triküspit yetmezliği olarak isimlendirilir. Ayrıca triküspit yetmezliği romatizmal ateşe, endokardite, travmaya ve karsinoid tümöre bağlı olarak gelişebilir. Klinik tabloda genellikle sol kalpteki mitral veya aort kapağı hastalığına bağlı bulgular ön plandadır. Hastalarda splenik konjesyona bağlı olarak iştahsızlık, bulantı, kusma gibi gastro-intestinal belirtiler ve karaciğer konjesyonu nedeniyle sağ üst kadranda ağrı olur. Staza bağlı olarak alt ekstremitelerde ödem, asit vardır. Bunda karaciğer fonksiyonlarının bozukluğuna bağlı hipoproteineminin de etkisi vardır (30).

b) Triküspit Darlığı: Triküspit darlığı ise genellikle romatizmal ateş sonrası gelişir. Diğer kapakların tutulumu vardır. Olay komissüral füzyon ve kapakçıklarda kalınlaşma şeklindedir. Kalsifikasyon genellikle yoktur. Karsinoid sendrom,

fibroelastozis, endomyokardial fibrozis, lupus eritomozus, sağ atrial miksuma diğer nadir sebeplerdir (30).

Yukarıda belirtilen kapak hastalıklarında, hastaların acil cerrahi tedaviye alınması gerekmektedir.

2.3. Yapay Kalp Kapakları

Yapay kalp kapakları ile ilgili çalışmalar 1960 yıllarında başlamış ve inanılması g bir gelişme göstermiştir. Bugün binlerce kapak hastası halen yapay kapaklarla yaşamaktadır (29).

Günümüzde çok gelişmiş teknolojiyle yapılan kapaklar eskiye oranla daha az trombojenite meydana getirmekle birlikte bu sorun tamamen zlmş değildir (29).

Yapay kalp kapakları, biyolojik kapaklar (biyoprotezler) ve mekanik kapaklar olarak ikiye ayrılırlar (30).

2.3.1. Biyolojik kapaklar

Domuz, sığır ya da insan vericilerden alınabilir. Mekanik kapaklara göre daha kolay dejenere olurlar, fakat antikoagülan kullanılmasını gerektirmezler (30).

Biyolojik kapaklar

- 1- Ksenogreftler (hayvandan alınan)
- 2- Homogreftler (kadavradan alınan)
- 3- Otogreftler (kişinin kendisinden alınan)'dir.

1) **Ksenogreftler:** Glutaraldehitte bekletilmiş sığır kapağı veya sığır-domuz perikardından yapılmış protezlerdir. Dayanıklılık süreleri sınırlıdır. 10 yılda yaklaşık %50'si değiştirilmek zorunda kalınır. Kapakıklarda yırtılmalar sonucu yetmezlik ve kireçlenme sonucu darlık oluşabilir. Zamanla kapakların üzerinde fibrin, platelet, lökosit ve kalsiyum depolanması ile fonksiyonlarını yitirirler. Hemodinamileri çok iyi olmayıp hamile kalmak isteyen kadınlarda, 65 yaşının üzerinde olan, antikoagülan

kullanamayan, kanama diyatezi olan ve endokarditli hastalarda tercih edilirler. Tromboemboli insidansı daha düşük olup antikoagülan kullanılmasını gerektirmezler (30).

2) Homogreftler: Kadavradan çıkartılıp çeşitli işlemlerden sonra kullanılan kapaklardır. Antibiyotikli solusyonlarda bekletilerek taze kullanıldığı gibi cryoprezervasyon tekniği ile dondurulduktan sonra da takılabilirler. Uzun süreli dayanıklılığı çok kısıtlı olup 15 yıllık dayanıklılık %11-15'dir. Avantajları ve dezavantajları diğer biyoprotezler gibidir. Komplike olmuş prostetik valv endokarditlerinde özellikle tercih edilirler. Verici sıkıntısı çekilmesi başlıca dezavantajdır (25, 30).

3) Otogreftler: Otogreftler implante edildikleri hastaların kendilerinden alınmış greftlerdir. Klinik olarak ilk defa aort kapak için pulmoner otogreftle replasman 1967'de Donald Ross tarafından gerçekleştirilmiştir. Bundan dolayı bu ameliyat şekline Ross ameliyatı adı verilmiştir. Nadiren hastalıklı mitral kapak için de pulmoner otogreft kullanılabilir. Ameliyatta pulmoner kapak için biyoprotez veya homogreft bir kapak kullanılır. Burada tercih edilen kapak pulmoner homogreft kapak olmalıdır. Hastaya canlı, immünolojik problemi olmayan aort pozisyonunda büyüme potansiyeli olan bir kapağın (kendi pulmoner kapağı) takılması, bu işlemin ana avantajıdır. Diğer avantajları ise mekanik ve biyoprotez kapaklarla ilgili olarak sözü edilen negatif özelliklerin hiçbirini taşımasıdır (30).

2.3.2. Mekanik Kapaklar

Kafesli-toplu, Diskli ve Bileaflet olmak üzere üç tipi vardır. Günümüzde en çok kullanılan kapaklardır. Önceleri kafesli tipleri kullanılırken zamanla bu kapakların yerini diskli kapaklar almış ve sonra da bileaflet (iki yapraklı) kapaklar kullanıma girmiştir (25, 30).

Mekanik kapaklar genelde kanamaya eğilimi olmayan, 65 yaşından küçük, hamile kalmayacak kadın, ve sosyokültürel durumu antikoagülan tedaviyi takip

edebilecek düzeyde olan hastalarda tercih edilir. Mekanik kapakların dayanıklılığı hasta ömründen uzun olup bazı problemler dışında değiştirilmelerine gerek yoktur (29).

Artık kullanılmayan toplu-kafesli kapaklarda türbülant akım fazla dolayısıyla hemoliz ve tromboemboli yüksek orandadır. Bunların üç orifisi olup primer orifis büyüdükçe tersiyer orifisin küçülmesi dezavantaj oluşturmaktadır. Hemodinamileri iyidir ve regürjitasyon azdır. Yüksek hemoliz ve tromboemboli insidansı nedeniyle günümüzde hemen hemen terkedilmiş bir kapaktır (29).

Diskli kapaklarda (mono leaflet veya tilting disk de denir) obstruksiyon daha az olmaktadır ancak bu kapakların açılma açılarının küçüklüğü gradiyent oluşmasına neden olur. Bunların iki orifisi olup büyük orifisin aortada büyük kurvatura doğru açılması hemolizi azaltır. Regürjitasyon bu kapaklarda daha fazla olmaktadır. Kafesli tiplere göre hemoliz daha azdır (29).

Bileaflet kapaklar hemoliz oranı düşük, daha az gradiyent yapan daha az antikoagülasyon gerektiren günümüzde en çok tercih edilen kapaklardır. Akut tıkanma durumlarında bir kapakçığın çalışıyor olması hastanın hastaneye yetiştirilebilmesine ve müdahaleye olanak tanır (29).

Yapay kapak şu özellikleri taşımalıdır:

1. İyi bir hemodinami sağlanmalı
2. Non trombojenik olmalı
3. Dejenere olmamalı, dayanıklı olmalı
4. Kan elemanlarını tahrip etmemeli (hemoliz)
5. Kolaylıkla takılabilmeli
6. Sessiz çalışmalı, sesi hastayı rahatsız etmemelidir (28).

Bugün kullanılmakta olan yapay kalp kapakları çeşitli derecelerde bu özellikleri taşımaktadırlar. En ideal yapay kapağa ulaşabilmek için çalışmalar halen sürdürülmektedir (28).

2.3.3. Kapak Seçiminde Major Kriterler

Mekanik kapakların avantajı yıpranmaya karşı dayanıklı olması ve genç hastalara uzun ömür sağlamasıdır. Dezavantajı kanama ve kullanılan ilaçların maliyetidir. Biyolojik kapaklarda antikoagülan tedaviye ihtiyaç yoktur. Ayrıca biyoprotezlerde 65 yaş sonrası hasar 65 yaş öncesine göre daha azdır (28, 30)

Biyoprotezlerde dejenerasyonu hızlandıran faktörler:

- 1-Adolesen hastalar
- 2-Hemodiyaliz hastaları
- 3-Hiperkalsemi

Gebelikte coumadin ve heparinin gebe ve fötüs üzerine olan etkisi nedeniyle biyoprotezler tercih nedenidir (28, 30).

BİYOLOJİK KAPAK SEÇENEKLERİ

Klas 1:

- 1-Coumadin tedavisi alamayacak olan hastalar
- 2-65 yaş üzeri AVR gereken tromboembolizm riski olmayan hastalar

Klas 2A:

- 1-Coumadine uyum problemi düşünülen hastalar
- 2-70 yaş üzerinde olan MVR (Mitral valv replasmanı) gerektiren hastalar (Tromboembolizm riski olmayacak)

Klas 2 B:

- 1-Mekanik kapak tromboz ile beraberse
- 2-Hastalar 65 yaş üzerinde ise (28, 29)

MEKANİK PROTEZ SEÇENEKLERİ

Klas 1:

- 1-Uzun yaşam beklenen hastalar
- 2-Diğer takılmış olan kapağın mekanik olması.

Klas 2A:

- 1-Kronik böbrek yetmezliği, hemodiyaliz veya hiperkalsemi bulunması
- 2-Tromboembolizm riski nedeniyle coumadin kullanan hastalar
- 3-Hasta AVR için 65 yaşından küçük ise MVR için 70 yaşından küçük olması

Klas 2B:

- 1-Trombüs nedeniyle değiştirilen biyolojik kapaklar (29, 30).

2.4. Yapay Kalp Kapaklarına Bağlı Komplikasyonlar

2.4.1. Prostetik Kapak Endokarditi:

Bu komplikasyon sık olmayan ancak ciddi bir prostetik kapak komplikasyonudur. Prostetik kalp kapağının takılmasından sonraki dönemde enfeksiyonun ortaya çıkış süresine göre iki ayrı gruba ayrılarak incelenir. Genel olarak insidans %1.9 oranındadır (28, 30).

A. Erken Prostetik Kapak Endokarditi: Operasyondan sonraki ilk iki ay içerisinde görülen enfeksiyondur. Ortalama %78 oranında görülür. Mortalitesi ortalama olarak %72'dir. En önemli nedenleri arasında ameliyathane havasının kirli olması, yara enfeksiyonu, pnömoni, acil reoperasyon, üriner kanallarda enfeksiyon ve özellikle kontamine intravasküler kateterlerin kullanılması sayılabilir. Ayrıca prostetik kalp kapağının aktif kapak endokarditi döneminde takılması da erken prostetik kapak endokarditi nedenlerindedir. Erken prostetik kapak endokarditinden sorumlu ajanların başında stafilokoklar ve gram negatif basiller gelir (28).

B. Geç Prostetik Kapak Endokarditi: Operasyondan iki ay sonraki dönemde ortaya çıkan enfeksiyondur. Operasyondan sonra 6. ayda görülme oranı %1.1

civarındadır. Mortalite ortalama olarak %45 civarındadır. Bu komplikasyonda enfeksiyonun bulaşması operasyon öncesinde veya operasyon sırasında olabileceği gibi operasyon sonrası dönemde genito-üriner kanal cerrahi tedavileri, dış manipulasyonları veya çekimi, primer cilt enfeksiyonları, üst solunum yolu enfeksiyonları veya travma nedeniyle de olabilir. Bu komplikasyondan sıklıkla sorumlu ajanlar streptokoklar ve stafilokoklardır. Her iki durumda da değişen oranlarda difteroidler, diğer bakteriler ve mantarlar da enfeksiyondan sorumlu olabilirler (28).

2.4.2. Hemoliz

Kapak yüzey alanı ve türbülansla orantılıdır. Genellikle hafif seyirlidir ve klinik olarak anemiye sebep olmaz. Bu durumda serum haptoglobulinin plazmadaki hemoglobin ile satüre olma oranı artar, retikülosit sayısı artar, serbest hemoglobin düzeyi yükselir, LDH (Laktat Dehidrogenaz) yükselir ve eritrosit yarı ömrü azalır (28, 29).

Kontrol altına alınamayan ciddi hemoliz olaylarında rereplasman gerekebilir. Bunun dışındaki kapağa bağlı hemoliz olaylarında konservatif tedavi uygulanır (Demir preparatları, kan transfüzyonu v.s.) (28,30).

2.4.3. Perivalvüler kaçak

Prostetik kapağın implantasyonundan sonra kapak çevresinde kanın geri kaçmasıdır. En önemli sebepler; sütür tekniğinin iyi olmaması, anüler kalsifikasyon olması ve enfeksiyon olmasıdır. Kapağın supraannüler pledgetli matress sütürlerle implantasyonu kaçak insidansını azaltmaktadır. Tedavi prostetik kapağın rereplasmanı ile mümkündür (28).

2.4.4.Tromboembolizm

Kanın subendotelial bağ dokusu ve hemen hemen tüm yapay yüzeylerle olan temasında temas yerinde platelet birikimi olur ve bu durum kanın pıhtılaşma mekanizmasını harekete geçirerek bu bölgede trombüs oluşumuna neden olur. Günümüzde kullanılan yapay materyallerin hemen hepsi trombojenik özelliktedirler. Buna rağmen yüksek akış, düz yüzeylerin kullanılması, sentetik yüzeylerin minimal tutulması, tromboresistan maddelerin kullanılması ve fibrinolitik aktivite, protezlerin tromboembolik olaydan kabul edilebilir düzeyde etkilenmesini sağlar. Mekanik kapakların kullanıldığı hastalarda coumadin ile ömür boyu antikoagülan tedavi gereklidir. Mekanik kapaklara bağlı erken ve geç ölümlerin ve komplikasyonların %75'i tromboembolizm ve antikoagülan tedaviye bağlıdır. İnsidansı düşük olmasına rağmen doku kapağı olan hastalarda da tromboembolizm ve antikoagülan tedavi pek çok geç komplikasyona ve ölüme sebep olabilir (30, 31).

Yapay kapakların fonksiyonlarını bozmayan trombüsler genellikle operasyon veya otopside ortaya çıkarılırlar. Pek çok tromboemboli tespit edilememektedir. Saptanan embolilerin %80'den fazlası serebraldir. Kalp kapak protezinin pozisyonundan bağımsız olarak tromboembolik olayların %12-14'ü fatal seyirlidir. Kanama olaylarının ise %13-19'u fatal seyirlidir. Tromboembolik komplikasyonların insidansını etkileyen en önemli faktörlerden bir tanesi de antikoagülan tedavinin yeterli olup olmadığıdır. Antikoagülasyonun geçici olarak dahi kesilmesi tromboemboli riskini altı kat artırır. Hastaların %40'ının antikoagülan tedavinin yeterli düzeyde olmadığı saptanmıştır. Özellikle atrial fibrilasyon, atrial pıhtı, dilate sol atrium ve geçirilmiş emboli hikayesi olan hastalarda mutlaka antikoagülan tedavi uygulanmalıdır (28).

2.5.Hemostaz ve Koagülasyon Sistemi Elemanları

2.5.1.Hemostaz

Hemostazis vasküler bütünlüğün bozulmasının ardından kanamanın durmasıdır. Kanın pıhtılaşmasını kapsar, hem pıhtılaşma hem de pıhtının çözülmesine neden olan kan damarları, trombositler ve plazma proteinleri ile ilişkilidir (31).

1) Primer Hemostaz

Kanın kapiller, küçük arteriel ve venüllerden damar dışına çıkmasını önler. Damar zedelendiğinde kan subendotelial dokulara temas edince trombositler subendotelial kollejene yapışarak, trombosit tıkaçını oluşturur. Meydana gelen trombosit tıkaçı, kanamanın durmasını sağlar. Primer hemostaz saniyeler içerisinde gelişir ve sonuçlanır. Primer hemostazda üç safha vardır. Adezyon, Granül salınımı ve Trombosit agregasyonu (31).

a) Adezyon

Trombositler damar zedelenmesini takip eden birkaç saniye içinde subendotelial kollojen liflerine glikoprotein Ia ve IIa ile yapışırlar. Von willebrand faktörü bu birleşmeyi trombositlerdeki glikoprotein Ib (gp Ib) ile kollojen lifleri arasında köprü oluşturarak stabilize eder (31).

b) Trombosit Aktivasyonu ve Granül Salınımı

Kollojen, epinefrin veya trombinle uyarılan trombositler aktive olurlar. Aktive trombositlerin membranlarında bulunan fosfolipaz C ve fosfolipaz A2 enzimleri aktifleşir ve araşidonik asit salınımına neden olur. Başlangıçta oluşan az miktarda tromboksan A₂'de fosfolipaz C'yi aktive eder. Sonuç olarak fosfatidil inositol 4-5 bifosfat, diasilgliserol (DAG) ve inositol trifosfata dönüşür. İnositol trifosfat kalsiyumun (Ca⁺⁺) hücreye girişini kolaylaştırır ve miyozin hafif zincirinin fosforilasyonunu sağlar. Miyozin de aktinle birleşerek trombositlerin şekil değişikliğine neden olur. Bu reaksiyon esnasında oluşan DAG protein kinaz C'yi aktive ederek 47000

Da ağırlığında olan plekstrin denilen proteini fosforile ederek granül sekresyonunu sağlar. Bu granüllerden aşağıdaki maddeler salgılanır (31).

1.Lizozomlardan; endoglikozidaz ve heparin parçalayıcı enzim

2.Yoğun granüllerden; kalsiyum, serotonin ve adenzin difosfat (ADP)

3. Alfa granüllerden; von willebrand faktörü, fibronektin, trombospondin, heparin nötralize edici faktör ve trombosit büyüme faktörü salgılanır (31).

Trombositlerden salgılanan ADP molekülü trombosit yüzeyinde modifikasyon yapmaktadır. Böylece trombosit tıkaçı meydana gelerek primer hemostaz tamamlanmaktadır (31).

2) Sekonder Hemostaz

Sekonder hemostaz esnasında fibrinojen fibrine dönüşerek pıhtı meydana gelmektedir. Pıhtılaşma mekanizması sırasında adı geçen faktörler ve fonksiyonları çizelge 2.1 ve 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Kan koagülasyonunda görev alan faktörler ve fonksiyonları

Faktör	Adı	Fonksiyonu
I	Fibrinojen	Fibrine dönüşüm
II	Protrombin	Trombine dönüşüm
III	Doku Faktörü (TF)	Faktör X'un aktivasyonu
IV	Kalsiyum İyonu	Birçok reaksiyon için kofaktör
V	Proakselerin	Trombin oluşumu
VII	Prokonvertin	Faktör X aktivasyonu
VIII	Antihemofilik globülin	Faktör X aktivasyonu, kofaktör
IX	Plazma tromboplastin öncüsü veya christmas faktörü	Faktör VIII'in oluşumu
X	Stuart-Power faktörü	Trombin oluşumu
XI	Plazma tromboplastin öncüsü	Faktör IX aktivasyonu
XI	Hageman faktör	Kontak aktivasyonu
XIII	Fibrin stabilize edici faktör (fibrinolitikaz)	Fibrin çapraz bağlanmaları

Çizelge 2.2. Diğer koagülasyon sistemi elemanları

Prekallikrein
Yüksek moleküler ağırlıklı kininojen (HMWK)
Protein C
Protein S
Antitrombin III
Heparin Faktör II
Von Willebrand Faktör
Trombositler

Pıhtılaşma olayını üç kısımda inceleyebiliriz (31).

1.Faktör X'un aktivasyonu

2.Protombinden trombinin yapımı

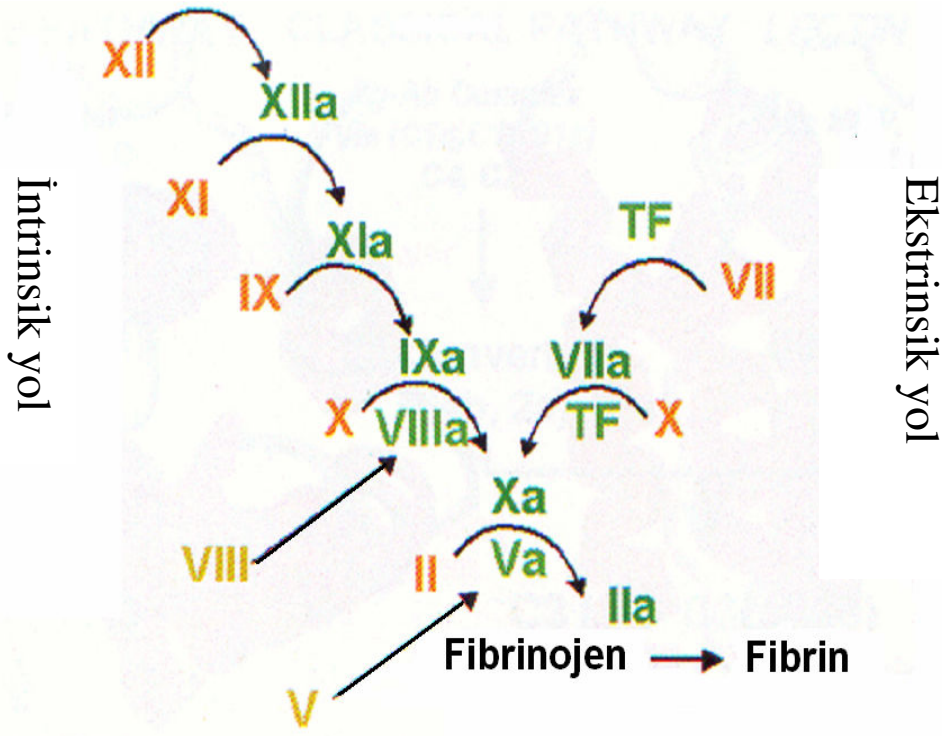
3. Trombinin fibrinojene etkisi sonucu fibrin oluşumu

Pıhtılaşma olayı şekil 2.2'de verildiği gibi intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki yoldan olabilmektedir.

1- İntrinsik pıhtılaşma mekanizması: İntrinsik pıhtılaşma mekanizmasından önce kontak faz vardır. Faktör XII, yüksek moleküler ağırlıklı kininojen (HMWK) ve prekallikren (PK) subendotelial dokuya yapışarak bir kompleks meydana getirir (32).

Bu fazda aşağıdaki reaksiyonlar olur.

HMWK faktör XII ile birleşerek faktör XII'yi aktif proteaz haline sokar (faktör XIIa). Diğer taraftan meydana gelen faktör XIIa, PK'ya etki ederek kallikrein meydana getirir. Meydana gelen kallikrein de inaktif faktör XII'yi aktifleştirebilir. Aktifleşen faktör XII (XIIa), faktör XI'e etki ederek onu aktifleştirir. Meydana gelen faktör XIa'da faktör X'u aktifleştirir (şekil 2.2) (31).



Şekil 2.2: Pıhtılaşma kaskadı

2- Ekstrinsik yolda ise doku faktörü ve faktör VII rol oynar. Doku faktörü (TF), faktör VII ile Ca⁺⁺ varlığında birleşir ve faktör VII'yi aktif hale getirir (faktör VIIa) (31, 32).

Faktör X'un aktifleşmesi aşağıdaki şekilde olur.

- İntrinsik yoldan faktör X'un aktifleşmesi: İntrinsik yolda rol oynayan ve aktif hale geçmiş bulunan faktör IXa faktör VIIIa ve Ca⁺⁺ ile beraber faktör X'u aktif hale getirir (31).
- Ekstrinsik yoldan faktör X'un aktifleşmesi: Faktör X, faktör VIIa ve doku faktörünün varlığında faktör X aktive olur (31).

Böylece meydana gelen faktör Xa, faktör Va ve Ca⁺⁺ ile beraber protrombine etki ederek trombin meydana getirir. Oluşan trombin, fibrinojeni fibrine çevirir. Trombinin diğer faktörlere de etkisi vardır (faktör V, faktör VIII'i aktive eder) (şekil 2.2). Aynı

zamanda trombosit agregasyon ve sekresyonunu stimüle etmektedir. Trombinin, fibrinojene etkisi sonucunda fibrino peptid A ve B parçaları ayrılır, böylece fibrin monomerlerini meydana getirir. Bunlar birleşerek fibrin polimerleri oluşur. Fibrin polimerleri faktör XIIIa'nın etkisi ile stabilize olur (31, 32).

2.6. Antikoagülan İlaçlar

Etkilerini çeşitli kademelerde koagülasyon mekanizmasını etkileyip kanın pıhtılaşmasını engelleyerek gösterirler (33).

a) Heparin: Sülfatize bir mukopolisakkarittir. Vücutta karaciğer, barsak, akciğer mast hücrelerinde bulunur. Kanda normalde bulunmaz ancak mast hücre degranülasyonuna sebep olacak herhangi bir olayda kanda heparin düzeyi yükselebilir. Etki mekanizması; protrombinden trombin, fibrinojenden fibrin oluşumunu engeller. Etkisini plazmadaki antitrombin 3 kofaktörünün aktivitesini arttırmak yolu ile bu kofaktör üzerinden gösterir. Böylece faktör IX, faktör X, faktör XII aktive olamaz ve pıhtılaşma başlamaz. Oral yolla gastrointestinal sistemden absorbe olmaz. Yarıömrü 1-2 saat olup etkisi 3-4 saattir. Dozaj 6 saatte bir 50-100 mg (5000-10000 U) intravenöz ve 8-12 saatte bir 100-200 mg subkutan (SC)'dır. Bunların dışında 500 ml izotonik (%0,9 sodyum klorür) içinde 10-15mg/dk gidecek şekilde intravenöz verilir. İntramuskular kullanımı absorpsiyonunun düşük, hematoma oluşturma riskinin yüksek olması nedeniyle sakıncalıdır. İlacın etki takibi pıhtılaşma zamanı normalin 2-3 kat üstünde, protrombin zamanı normalin 1.5-2.5 katı kalacak şekilde yapılır. Prostetik kapaklı gebelerde ilk üç ay ve son üç haftada teratojenik ve fetal hemorajenik etkisinden dolayı oral antikoagülanlar kontraendikedir, bu durumda bu dönemlerde heparin verilir. Pulmoner emboli profilaksisi ve flebotrombozda heparin kullanılır. Aterosklerotik kalp hastalarında anginası olan hastalarda kullanımı tartışmalıdır (33).

b) Antiagreganlar: Aspirin düşük dozda trombosit salınım fonksiyonunu inhibe eder, prostaglandin G₂, H₂ ve tromboksan A₂ gibi endojen agregan maddelerin sentezini bloke eder. 250-300 mg aspirin dozu antiagregan etki, 2-4 gr/gün ise

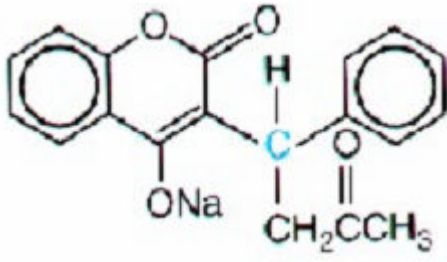
postperikardiyotomide antiinflamatuvar etki için kullanılır. Dypridamol trombosit adhezyonu, agregasyonu ve salınım fonksiyonunu inhibe eder. (33).

c) Oral antikoagülanlar: K vitaminine bağlı faktör II, VII, IX, X'un sentezini azaltırlar. Etki göstermesi için genellikle faktör VII'nin belli bir düzeyin altına düşmesi gerekir. Bu da 24-48 saatlik bir süredir. İlaç kesildikten birkaç gün sonra tekrar eski düzeylerine dönerler. Doz, faktör VII kan seviyesi ve/veya protrombin zamanı (PTZ) ölçülerek ayarlanır (33).

1) Coumarin Grubu İlaçlar:

a) Bishidroksicoumarin (Dicoumarol): Pratik bir ilaçtır. Birinci gün 300 mg, ikinci gün 200 mg idame olarak da 50-100 mg verilir. Oral antikoagülanların dozunu karaciğer fonksiyon bozukluğu, K vitamin emilim düzensizliği, bağırsak flora değişikliği, beslenme düzensizliği ve karaciğer enzim indüksiyonu yapan ilaçlar etkiler. Yan etkileri purpura, ekimoz, sistem kanamaları, fetus ve yenidoğanda vaskulit, fetal hemoraji, agranülositoz, akkomodasyon bozukluğu, renal hepatik toksisite, bulantı kusma, diyare, ürtiker ve alopesidir (33).

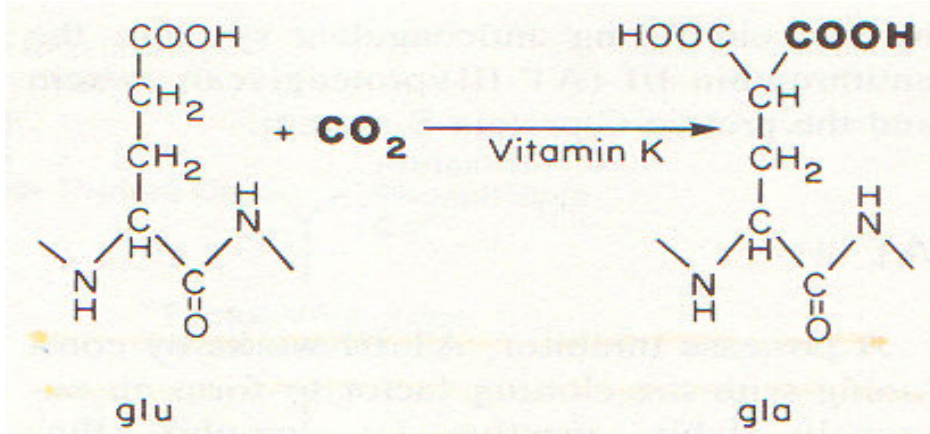
b) Warfarin Na (Coumadin): Yapısı şekil 2.3'de verilen coumadin tromboembolik bozuklukları önlemek ve kontrol etmek için kullanılan antikoagülan bir ilaçtır. Coumadin, antikoagülan etkisini, karaciğerde yapılan pıhtılaşma faktörleri olan protrombin, faktör VII, IX ve X'un sentezinin esas olarak son (karboksillenme) basamağını önlemek suretiyle gösterir, ayrıca bu faktörlerin sentezlenen miktarlarında da terapötik dozlarda %30-50 oranında azalmaya yol açar (24).



Şekil 2.3: Coumadinin (warfarin sodyum) yapısı

Coumadin R ve S olmak üzere iki enantiomerin rasemik karışımından oluşmuştur. S-coumadin, R-coumadinden farmakolojik olarak daha aktiftir (26).

Protrombin ve diğer üç pıhtılaşma faktörünün fonksiyonel duruma gelebilmeleri için, moleküllerinde N-ucundaki belirli glutamik asit rezidülerinin, ribozomlardaki çeviri sırasında veya daha sonra karboksillenmek suretiyle bir mikrozomal enzimle gama-karboksilglutamik asit rezidüsü (Gla rezidüsü) şekline dönüşmeleri gerekir (Şekil 2.4) (24).



Şekil 2.4: Gla rezidüsü oluşumu

Karboksillenme, protrombinin Ca^{++} 'a ve trombosit fosfolipidine afinitesini yükseltir ve onlarla bağlanma yeteneği kazanmasını sağlar; aynı şekilde diğer faktörlerin de Ca^{++} ile bağlanmasına ve böylece etkin hale gelmesine olanak sağlar. Karboksillenme olayı, karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumunda, indirgenmiş K vitamininin, aktif metaboliti olan K vitamini epoksidine dönüşmesi olayına kenetlenmiş bir biçimde meydana gelir. Adı geçen K vitamini türevi, dönüşmeyi yapan

hepatik enzimlerin kofaktörüdür. Bu kenetlenmiş olay çiftinin devamlı olarak meydana gelebilmesi için K vitamini epoksidinin indirgenmiş K vitaminine dönüştürülmesi gerekir. Oral antikoagülanlar bu siklusu bozarlar. K vitamini epoksidini K vitaminine indirgeyen epoksid redüktaz enzimini inhibe ederler. Bu ilaçlarla tedavi edilenlerde plazmada, koagülasyon faktörlerinin karboksillenmemiş öncüllerinden oluşan ve PIVKA (Vitamin K eksikliği nedeniyle indüklenen proteinler) denilen proteinler ortaya çıkar (24).

Oral antikoagülanlar, K vitaminine bağımlı non-enzimatik bir faktör (antikoagülan faktör) olan protein C'nin ve protein S'in de (protein C'nin kofaktörü) karaciğerde sentezini ve glutamil rezidülerinin karboksillenmesi ile aktivasyonunu da bozar. Ancak oral antikoagülanların bu etkisinin, nadir görülen protein C eksikliği olgularının dışında pratik bir öneminin olmadığı düşünülmektedir (24).

Moleküllerin belirli yerlerinde glutamil rezidüleri içeren ve fonksiyonel duruma gelebilmeleri (Ca^{++} bağlayabilmeleri) için bunların karboksillenmesi gereken K vitaminine bağımlı proteinler sadece bu prokoagülan veya antikoagülan proteinler değildir. Kemik ve diğer kalsifiye dokulardaki osteokalsin ve matrix Gla proteini de aynı özelliğe sahiptir; bunlar mineralizasyonda rol oynar. Ayrıca trakeobronşiyal mukozanın doğal sürfaktan maddesinin fonksiyonu için gerekli bir diğer protein de aynı özelliğe sahiptir (24).

Coumadinin en önemli yan etkisi fazla miktarda alındığı zaman kanamaya eğilimi artırmasıdır. Bu nedenle coumadinin kanamaya yol açmayacak ve pıhtı oluşumunu azaltacak dozlarda kullanılması gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda coumadin kullanan hastaların %7.6 - %16.5 arasında kanama olaylarına rastlanırken, hastaların %1.3-%2.7 arasında ise kanamaya bağlı ölüm olaylarına rastlanmıştır. Coumadinin antikoagülan etkisi doza bağımlı olarak gelişir. Antikoagülan etkinin ve dolayısı ile dozun yeterli olup olmadığı plazmada protrombin zamanı (PTZ) ve INR (International Normalized Ratio) ile değerlendirilir (34).

Protrombin Zamanı (PTZ), koagülasyonun ekstrinsik yolunun fonksiyonunu ölçer ve coumadin tarafından etkilenen K vitamini bağımlı pıhtılaşma faktörlerine (faktör II, VII, IX, X) son derece duyarlıdır. Coumadin tedavisinin erken evrelerinde, PTZ primer olarak azalmış faktör VII düzeyleri nedeniyle uzar, ancak tedavinin devamı halinde azalmış faktör II ve X seviyelerinden de etkilenir. PTZ'yi saptamak için,

plateletten fakir plazmaya doku fosfolipid-protein extreleri (tromboplastin) ilave edilir ve pıhtılaşma Ca^{+2} ilavesiyle başlatılır. Fibrin liflerinin görülmesi pıhtılaşmanın son aşamaya geldiğinin işaretidir. Bu manuelvisel, elektromekanik, fotooptik, nefalometrik, viskoelastisite, vs. teknikleri ile ölçülür. Sonra saniye olarak veya laboratuvar ortalama normal kontrolüne bir oran (PTR- protrombin ratio) olarak rapor edilir. PTZ'da kullanılan tromboplastin karakteristiğine kritik düzeyde bağımlıdır. Tromboplastinin iki komponenti, doku faktörü ve fosfolipid, faktör X'un faktör VII tarafından aktivasyonu için gereklidir. Değişik tromboplastin preparasyonları azalmış pıhtılaşma faktörlerinin mevcudiyetinde koagülasyonu başlatma yeteneklerinde dikkat çekici farklılık gösterir. Örneğin, "responsive" tromboplastinler "unresponsive" tromboplastinlere göre faktör X'un daha az hızlı aktivasyonuna neden olurlar. Bu durumda K vitaminine bağımlı faktörlerin azalmasıyla relatif olarak daha fazla PTZ uzamasıyla sonuçlanır. PTZ sonucu aynı zamanda testte kullanılan cihaz, plazma standart, ilaç-ilaç etkileşimi, ilaç-gıda etkileşimi ve diğer faktörler tarafından da etkilenir. Mevcut tromboplastin reaktifleri ile, otomatik pıhtılaşma testi ile saptanan PTZ'nın normal sınırları 8,8-11,6 saniyedir. Normal sınırlar end-point taramadaki diğer teknikleri kullanan cihazlar için farklı olabilir. Protrombin zamanı tayinlerinin standardize edilmesi ve dolayısıyla farklı tromboplastinler ile elde edilen sonuçların doğrudan karşılaştırılabilmesi amacıyla INR (International Normalized Ratio) tavsiye edilmektedir (34, 35).

INR, 1980'lerin başında WHO (Dünya Sağlık rgt) tarafından standardize PTZ sonuçlarının bir ifadesi olarak ortaya atılmıştır. Değişik insan ve tavşan beyin ekstreleri ile oluşturulan protrombin zamanı oranlarının logaritmaları arasında lineer bir ilişki olduğu için, herhangi bir PTR'nin bir WHO standardı ile ilişkilendirilmesi için bir kalibrasyon sistemi geliştirilmiştir. Bu amaçla, insan beyin ekstrelerinin çok "responsive" bir tipi ilk uluslararası referans preparat (IRP) olarak kabul edilmiş ve bir düzeltme faktörü olan uluslar arası duyarlılık endeksi (ISI) ticari tromboplastin preparatlarının sensitivitesini IRP ile ilişkilendirmek için geliştirilmiştir. Buna göre, İlk IRP'nin ISI değerı 1.0'dir. INR, verilen bir PTR lmnn IRP ile karşılaştırılması için ortaya çıkarılmıştır. Böylece, eğer testte reaktif olarak IRP kullanılmışsa INR bulunabilecek PTZ'nı yansıtır. "Responsive" tromboplastinler "unresponsive" tromboplastinlerden daha düşük ISI değerlerine sahiptirler ve daha uzun PT değerleri ortaya çıkarılırlar. Düşük bir

ISI değeri istenilen bir reaktif özelliğidir. Düşük ISI değerli bir reaktif kullanıldığında PTZ'nın analitik doğruluğu artar, normal ve coumadin tedavisi alan hastaların diskriminasyonu daha iyidir, klinisyenlerin antikoagülan dozajını daha iyi ayarlamasına yardımcı olacak şekilde daha geniş terapötik aralık değerlerine ulaşılır. Yeni çalışmalar göstermiştir ki ABD'de kullanılan tromboplastinlerin ISI değerleri 0,8-2,24 arasında değişir. Bir çalışma, ne var ki, en yeni yüksek sensitiviteli tromboplastin reaktiflerinin (ISI<1,2) PTZ değerlerinin doğru standardizasyonunu başarmada yetersiz olduğunu düşündürmektedir. Ticari tromboplastin preparatlarının üreticileri her reaktif cinsi ile ISI değerini vermektedir. ISI değeri biliniyorsa INR kolaylıkla şu formül ile hesaplanır:

$$INR=(HASTA PTZ / ORTALAMA NORMAL PTZ)^{ISI}=(PROTROMBİN ORANI)^{ISI}$$

Ortalama (geometrik ortalama), normal PTZ değeri sağlıklı bireylerden alınan 20 tane plazma örneğinden elde edilir. Formülün logaritmik versiyonu ise:

$$INR= \text{antilog}(ISI \times \log PR)$$

INR aynı zamanda eğer PR ve ISI biliniyorsa grafik nomogramlarından direkt okunabilir (34).

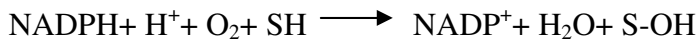
2.7. Sitokrom P450 Monooksijenaz Enzim Sistemleri

Sitokrom P450 (CYP450) monooksijenaz enzim sistemleri, matür eritrosit ve iskelet kası hücreleri dışında tüm memeli hücre tiplerinde ve prokaryotlarda bulunan hem-protein ailesidir. Bu enzimler, yapısal olarak farklı çeşitli bileşiklerin oksidasyonunu katalize ederler. Endojen sentezlenen birçok bileşik, CYP450 enzimlerinin substratı olarak görev yapar. Bu bileşikler: prostaglandin ve lökotrienler dahil yağ asitleri, steroidler, yiyecek katkı maddeleri, ilaçlar olup ayrıca besinlerle, enjeksiyonla, havadan inhalasyonla ya da deriden absorpsiyonla vücuda giren endüstriyel maddelerdir. Sitokrom P450 enzimleri, ilaç biyotransformasyonu ve metabolizması için en önemli sistemlerden biridir. Bu sistem indüksiyon veya inhibisyon gibi sayısız mekanizmalarla değişime uğrayabilir ve bireyler arasında oldukça farklı formları ortaya çıkabilir. CYP450 enzimleri, 400-530 aminoasitten yapılmış proteinlerdir. Baz dizilimi

benzerliklerine göre, P450 sistemi 40 farklı aile içinde sınıflandırılır. CYP450 sisteminin tıpta çok önemli etkileri vardır: Bunlar; a) terapötik maddeleri inaktive veya aktive etme, b) kimyasal maddeleri oldukça yüksek derecede reaktif moleküllere dönüştürme ve istenmeyen hücre hasarı, hücre ölümü veya mutasyon gibi olaylara neden olma, c) steroid hormon sentezindeki bazı adımlara katılma ve d) yağ asidi ve bunların türevlerinin metabolizması gibi olaylardır (36, 37).

CYP450 sistemi katalitik fonksiyonları bilinmeden önce spektral özellikleri ile tanımlanan proteinlerden oluşmuştur. Bu gruptaki proteinlerin benzersiz bir absorbands spektrumu vardır. Genellikle mikrozom olarak adlandırılan endoplazmik retikulum veziküllerinden hazırlanan süspansiyondan karbondioksit gazı geçirildikten sonra sodyum dithionate gibi indirgeyici bir ajan eklenince spesifik bir absorbands spektrumu elde edilir. Bu işlem sırasında indirgenmiş hem proteinine CO bağlanır ve 450 nm'de pik yapan absorbands spektrumu elde edilir. Bu pigmentlere P450 adı, 450 nm'de absorbands gösterdiği için verilmiştir. Spesifik CYP450 formları, 446 ile 452 nm arasında maksimum absorbands veren dalga boylarına sahiptir. Karaciğerde bir çok CYP450 enzimleri bulunmakta ve CYP450 enzimleri baz dizilimi benzerliklerini kontrol eden gen ailelerine veya substrat spesifikliğine göre sınıflandırılmaktadırlar (36).

CYP450 enzimleri ile katalizlenen genel reaksiyon aşağıdaki gibidir.



Buradaki substrat (S), bir steroid, yağ asidi, ilaç yada oksijen bağlama yeri olarak görev yapan alkan, alken, aromatik halka veya heterosiklik halka ekleri olan diğer kimyasal maddeler olabilir. Substrata iki oksijen atomundan sadece biri katıldığı için bu reaksiyona monooksijenasyon reaksiyonu ve bu enzimlere de sitokrom P450 monooksijenaz enzimleri adı verilmektedir (36).

2.7.1. CYP450'nin Yapısı

CYP450 proteinlerinde bir tek demir protoporfirin IX prostetik grubu bulunur ve oluşan hem proteininde hem bir oksijen molekülünün hem de substratların bağlanabileceği yerler vardır. Bilinen tüm CYP450'lerdeki hem demiri, porfirin halkasındaki 4 pirol nitrojen atomuna ve iki aksiyal liganda bağlıdır. Aksiyal ligandların birinde molekülün karboksil ucuna yakın yerleşmiş bir sistein kalıntısında bir sülfidril grubu bulunur. Hem demiri, hekza yerleşimde düşük spinli demir ve penta yerleşimde yüksek spinli olmak üzere iki farklı spin durumunda bulunabilir. Düşük ve yüksek spinli durumlar demir atomunu çeviren elektronik kalkınlar olarak tanımlanır ve hemdeki demir atomunu hekza yerleşimli durumdan penta yerleşimli duruma çevirir. CYP450 molekülü bir substrata bağlanınca, bu elektronik kalkanda irritasyon meydana gelir ve hemdeki demir atomu hekza yerleşimden penta yerleşime geçer. Substrata bağlı, penta koordine durum (-170 mV), substrata bağlanamayan hekza koordine duruma (-270 mV) göre daha fazla pozitif indirgenme potansiyeline sahip olduğu için CYP450, NADPH'dan elde edilen elektronlarla indirgenebilir. Hidroksilasyon (monooksijenasyon) reaksiyonunun meydana gelmesi sırasında oksijenin hem demirine bağlanabilmesi için hemdeki demir ferrik (Fe^{3+}) durumundan ferro (Fe^{2+}) durumuna indirgenmelidir. Monooksijenasyon reaksiyonunda toplam 2 elektron (e^-) gerekir. Elektronlar CYP450 molekülüne tek tek transfer edilir. İlk önce oksijen bağlanır ve daha sonra substratın reaksiyona katılabilmesi için aktif oksijen türleri oluşturarak ayrılır (36).

CYP enzimlerinin özellikleri

1. Birçok dokuda işlev görür
2. Hepatositlerde en yüksek derişimde bulunurlar
3. Primer olarak oksidatif metabolizmayı düzenler
4. Hücre içinde bulunduğu yere göre: Mitokondride bulunan streoidojenik CYP enzimleri ve endoplazmik retikulumda bulunan ksenobiyotik CYP enzimleri olmak üzere iki grupta incelenir (37, 38).

Streoidojenik CYP enzimleri

1. Tek hücreli organizmaların hücre zarı bütünlüğünü sağlarlar
2. Farklılaşmış organizmaların gelişiminin hormonal düzenleyicileridir
3. Etki ettiği maddeler konusunda özgündürler
4. Tüketilen maddelerin biyolojik kullanım yapılarına dönüştürülmesini sağlarlar (steroidler, safra asitleri, kolesterol, prostaglandin sentezi) (37, 38).

Ksenobiyotik CYP enzimleri

1. Bitki-hayvan farklılaşması döneminde streoidojenik CYP enzimlerinden türemişler
2. Transferaz enzimleriyle eş zamanlı türemişler
3. Bitkilerin oluşturduğu diyet toksinlerini yıkarlar
4. Eliminasyon için ilaçları biyotransformasyona uğratırlar
5. Tüketilen maddelerin detoksifikasyonunda görev alırlar (toksinler, karsinojenler, ilaçlar, mutajenler) (37, 38).

Sitokrom P450 enzimleri hepatositlerde en yüksek derişimde bulunmakla birlikte, başka dokularda da görülebilirler. Tiplerine göre hücrenin mitokondrisinde veya endoplazmik retikulumunda bulunabilirler (37, 38).

Spesifik CYP enzimlerini kodlayan genin izole edilmesiyle bu enzimlerin aminoasit dizilimleri belirlenebilmiştir. Bu bilgi kullanılarak, farklı enzimler aminoasit dizilimine göre sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmada enzimler hem yapı hem fonksiyonel olarak birbirlerine yakın enzimlerdir. CYP enzimleri ilk numaradan itibaren ailelere ayrılmıştır. Bu ailedeki bütün enzimler aminoasit dizilimi yönünden en az %40 bir benzerlik gösterenler aynı aile içine alınmaktadır. Alfabetik harfler ile alt grup ailelere ayrılmaktadır. Aynı alt aile grubunda ise aminoasit dizilim homolojisi en az %55 olmaktadır. En son numara ise enzimi kodlayan genin numarasıdır (37, 39, 40).

Örnek;

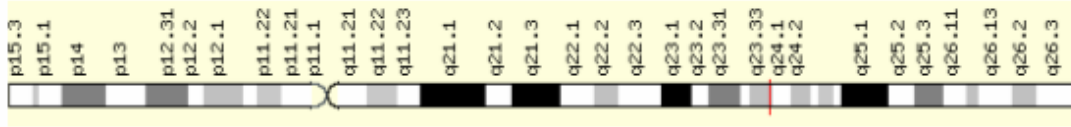
CYP	+	numara	+	harf	+	numara
		(aile)		(alt aile)		(gen)
CYP		2		C		9

Sitokrom P450 aminoasit benzerliklerine göre sınıflandırılırlar. En önemli CYP450 izoenzimleri CYP3A4 (CYP450 ilaç metabolizmasının %50'sini oluşturur), CYP2D6 (%20), CYP2C9 ve CYP2C19'dur (beraber %15) (39, 40).

2.7.2. CYP2C9

CYP2C gen alt ailesi kromozomun 10q24 kolu üzerinde yer alan CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 ve CYP2C19 genlerinden oluşur. CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 ve CYP2C19 genleri %82'den fazla aminoasit dizi benzerliğine sahip olmalarına rağmen, oldukça az substrat spesifitesi gösterirler. Bu altailenin bütün üyeleri polimorfiktir. CYP2C9'un kodladığı protein 490 aminoasit içermekte olup CYP2C19 ile %92 oranında homologdur ve 490 amino asitten sadece 43'ü farklıdır. (41, 42).

CYP2C9 geni kromozomun 10. bölgesinde yaklaşık 55 kb uzunluğunda ve 9 ekzondan oluşmuştur (Şekil 2.5). CYP2C9'da diğer P450 enzimleri gibi substratlarının dealkilasyon, demetilasyon ve hidroksilasyonundan sorumludur. Ayrıca diğer P450 enzimleri gibi CYP2C9'un metabolize ettiği substratlar arasında endojen bileşiklerde yer almaktadır. CYP2C9 karaciğer araşidonik asitini tek başına metabolize eder (41).



10.Kromozom (10q24.1)

Şekil 2.5: CYP2C9 geninin kromozomal yerleşimi

CYP2C9 birçok ilacın metabolize edilmesine katılır ve bu gendeki polimorfizm ilaçların etkisini değiştirebilir veya toksisitesini artırabilir (43).

CYP2C9 için en iyi bilinen ilaç substratları yapılarında karboksilik grup içeren zayıf asitlerdir. Tolbutamid gibi oral hipoglisemik ajanlar, fenitoin gibi antiepileptik ilaçlar, oral antikoagülan coumadin, ibuprofen gibi nonsteroidal anti-inflamasyon ilaçlar ve losartan gibi angiotensin II blokerleri CYP2C9 tarafından metabolize edilir (43, 44)

CYP2C9’da oluşan genetik polimorfizm enzim aktivitesi üzerinde önemlidir. Wild tip allele (CYP2C9*1) ek olarak CYP2C9’da nokta mutasyonlar sonucu iki allelik varyant oluşur. CYP2C9*2 exon 3’de 144. kodonda arjininin sistein ile yer değiştirmesiyle, CYP2C9*3 exon 7’de 359. kodonda izolösünün lösün ile yer değiştirmesiyle oluşur (42, 43, 44).

CYP2C9 İtronik ve 3’-Untranslated Bölge Varyantları

İntron 1, 2 ve 6’da 3 yeni intronik varyant ve 3’ untranslated bölgede de 3 yeni varyant tanımlanmıştır (Tablo 2.1). 3’ UTR 1582 C>G dönüşümü 3 kişide görülmüştür ve CYP2C9*2 alleli ve 169-14 G>C intronik varyantı ile güçlü bir bağlantı gösterir (45,46).

Varyant	Çinli	Malezyalı	Hintli	Beyaz Irk
3’UTR 1582C>G	0	0	1 (%3.8)	2 (%66.7)
3’UTR 1694A>G	2 (%3.4)	0	0	0
3’UTR 1739del AT	1 (%1.7)	0	0	0
169-14G>C	0	0	1 (%3.8)	2 (%66.7)
332-99T>C	1 (%1.7)	0	7 (%26.9)	2 (%66.7)
962-32T>C	0	0	1 (%3.8)	0

Tablo 2.1 : Asya Populasyonunda CYP2C9 İtronik ve 3’ UTR varyantlarının özeti

CYP2C9 Promoter Bölgesi Varyantları

Gen ekspresyonunun kontrolü ilk olarak transkripsiyon seviyesinde olur. CYP2C9 geninin 2.2 kb'lık 5' flanking bölgesinde glukokortikoid cevap elementi, ayrıca Barbie kutusu, TATA kutusu, CAAT kutusu, hepatik nükleer faktör-1 (HNF-1), HepG2-spesifik faktör-1 (HPF-1), AP-1 ve C/EBP gibi transkripsiyon faktörlerinin bağlanması için çok sayıda konsensus dizi vardır. Bu bölge insanlarda oldukça polimorfik olup Zhao ve ark.'nın yaptığı çalışmada çeşitli Asya ülkelerinde 13 tane tek nükleotid değişim polimorfizmi (SNP) tespit edilmiştir. Bunlardan bazıları eş zamanlı bulunmaktadır ve toplam 6 dizi modeli ile sonuçlanır. Lusiferaz reporter geni incelemesi sırasında model 2'nin, model 1'e oranla (wild tip olarak dizayn edilmiştir) % 40 aktivite gösterdiği belirlenmiştir ve model 2'yi taşıyan kişilerde fenitoinin vücuttan atılımının model 1'e oranla %38 azalmış olduğu tespit edilmiştir. T1912C polimorfizmi (model 2) karaciğere spesifik gen ekspresyonu için transkripsiyon faktörü olan HNF-1 bağlanma dizisi motifinde lokalize olmuştur. Bu durum HNF-1'in CYP2C9 transkripsiyonel aktivitesinde rol oynadığını düşündürmektedir. Japonlar tarafından yapılan bir çalışmada, promoter bölge polimorfizmi olan model 2 ile kodlanan bölge polimorfizmi olan CYP2C9*3 allelik varyantının güçlü bağlantı (linkage disequilibrium) içinde olduğu gösterilmiştir. CYP2C9 aktivitesinin artmasından sorumlu olan HNF-1'den farklı olarak CYP2C9'un 1. eksonunda yeni 27 kb'lık bir regülatör element [6 bp'lik direk tekrarlardan (5'-cttgtg-3') oluşan fonksiyonel silencer] tanımlandı ve transkripsiyonel supresyon ile ilişkili olduğu tespit edildi (45,46, 47, 48).

CYP2C9 geninin delesyonel analizleri translasyon başlama kodonu (ATG) ile -155. nükleotid arasında az sayıda promotörün yer almakta olduğunu göstermiştir, bunlardan biri HNF-1 konsensus dizi motifidir. Ayrıca -362 ile -144'e kadar olan fragment AP-1, C/EBP ve HPF gibi transkripsiyonel faktörler için potansiyel bağlanma bölgeleri içerir ve bağlanma motifinin delesyonu promotör aktivitede iki kat azalmaya yol açmaktadır. Aksine -155 ile -144 arasındaki bölgenin delesyonu promotör aktivitesinin 7-8 kat azalmasına yol açmaktadır. Dolayısıyla bilinmeyen transkripsiyonel kontrol elementi bu fragmentte yer alıyor olabilir. Nadir A-162G mutasyonu, model 3 olarak refere edilmektedir. Model 1'e oranla % 50 aktivite gösterir. CYP2C9 gen transkripsiyonunun altında yatan temel mekanizma ve karaciğer spesifik ekspresyonu henüz aydınlatılamamıştır (45,48).

CYP2C9 Kodlanan Bölge Polimorfizmleri

Artmakta olan kanıtlar CYP2C9 geninin oldukça polimorfik olduğunu göstermektedir. İlk tanımlanan ve en yaygın allelik varyant CYP2C9*2 olup Arg¹⁴⁴ (CGC), Cys¹⁴⁴(TGC) amino asit değişimi ekson 3'de C₄₃₀T transisyonu sonucu oluşmaktadır. Varyant allelde (CYP2C9*2) Ava II restriksiyon enzimi tanıma bölgesi (ggact) ortadan kalkmıştır. Ava II restriksiyon enzimi wild-tip CYP2C9*1 allelindeki ggacc dizisini tanır. Böylece; CYP2C9*2 varyant alleli polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ürününün Ava II tarafından kesilip kesilmemesine göre belirlenebilir (46, 49).

İkinci yaygın allelik varyant CYP2C9*3, ekson 7'deki A₁₀₇₅C değişiminin İle³⁵⁹ (ATT)→ Leu³⁵⁹ (CTT) amino asit değişimine yol açması sonucu oluşmaktadır. CYP2C9*3 varyant alleli bilinen bir restriksiyon enzimi kesim bölgesi oluşmasına veya ortadan kaldırılmasına yol açmadığından, PCR temelli RFLP (Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi) yöntemi ile bu allelik varyantın belirlenmesi güçtür. Bu nedenle İle³⁵⁹ veya Leu³⁵⁹, u belirlemek için her iki PCR reaksiyonunda aynı reverse primerler kullanılarak iki farklı mismatched PCR forward primeri başlangıç olarak dizayn edilmiştir. CYP2C9*3 allelik varyantında Nsi I restriksiyon kesim bölgesi yokken, mismatched nükleotit (G₁₀₇₃) ile birlikte CYP2C9*3'ün wild-tip alleli dizi içinde (A₁₀₇₅) NsiI restriksiyon kesim bölgesi yaratır. Böylece, sadece İle³⁵⁹ u içeren kodon Nsi I tarafından kesilebilir. Başka bir mismatched PCR forward primeri Leu³⁵⁹, u belirlemek için kullanılabilir, dizideki mutasyonlu nükleotid C₁₀₇₅ mismatched baz G₁₀₇₁ ile kombine edilir ve bu da Kpn restriksiyon bölgesi ortaya çıkarır, CYP2C9*3'ün wild-tip allelinde Kpn I restriksiyon bölgesinin kaybı ile sonuçlanırken, sadece CYP2C9*3 varyantını taşıyan örnekler Kpn I ile kesilebilir. Alternatif olarak, mismatched reverse primer kullanılarak SmlI restriksiyon tanıma bölgesi (cttgaG) oluşturulabilir ve Leu³⁵⁹ (CTT) varyantını taşıyan PCR ürününün kesilmesinde kullanılabilir (50, 51, 52).

Yapılan son çalışmalarda aynı kromozomdaki Cys¹⁴⁴ varyantı ile Leu³⁵⁹ varyantı arasında nadir bir bağlantı olduğu bildirilmiştir (50).

CYP2C9*4 varyantı nadir bir missense mutasyon olan ekson 7'de T₁₀₇₆→C nükleotid değişimini içerir bu da İle³⁵⁹(ATT), Thr³⁵⁹ (ACT) değişimi ile sonuçlanır ve Japonya'da epilepsi hastası 32 bireyden sadece bir tanesinde saptanmıştır. Afrikalı-Amerikalılarda, İspanyalı Amerikalılarda, Kanadalı yerli Hintlilerde, Eskimolarda, Çinde, Kafkaslarda veya sağlıklı Japonlarda görülmemiştir. CYP2C9*3 varyantında olduğu gibi CYP2C9*4 varyant allelinde de restriksiyon enzimi kesim bölgesi olmadığından mismatched PCR temelli RFLP geliştirilmiştir. Ekson 7'de 2bp'lik mismatched forward primer kullanılarak mutant allel CYP2C9*4 için ApaLI restriksiyon enzimi kesim bölgesi (GtGcac) oluşturulur (52).

CYP2C9*5, ekson 7'deki C₁₀₈₀→ transversiyonu Asp³⁶⁰ (GAC)'nin Glu³⁶⁰ (GAG)'e dönüşümü ile sonuçlanır. Afrikalı-Amerikalılarda ve İspanyalı-Amerikalılarda bulunmuştur, Kafkaslarda ve Çin'de görülmemiştir. İlginç olarak CYP2C9*3, *4 ve *5 allelik varyantları ekson 2'de birbirine oldukça yakın (5'...aga tac A₁₀₇₅/CT₁₀₇₆/Ct gaC₁₀₈₀/G ctt... 3') ve substrat tanıma bölgesi 5 olarak bilinen bölgenin içinde yer almaktadırlar. Bu bölge CYP ailesinde substrat bağlanması için önemli bir bölgedir. Bu mutasyonların bir araya gelmesi bize PCR temelli single strand conformation polymorphism (SSCP) metodu kullanarak CYP2C9*3, *4 ve *5 polimorfizmlerinin aynı zamanda belirlenmesine olanak sağlar (52, 53).

CYP2C9*6, 818delA olduğundan CYP2C9'un null allelidir. Normal dozda fenitoin alan Afrikalı-Amerikan bir kişide ilaç toksisitesinin meydana gelmesi ile tanımlanmıştır. Bu nadir tek nükleotid değişimi 5. eksonun 3'sonuna yakın yer almakta olup MnlI için tanıma bölgesi oluşturur. Varyant allelde MnlI için kesim noktası varken wild tipte yoktur (54).

Ayrıca Çinlilerde ekson 4'te 4 yeni polimorfizm daha tanımlanmıştır. Bunlardan biri Val²⁰⁸ (G⁶⁰⁸TG) → Leu²⁰⁸ (I⁶⁰⁸TG) değişimi olup Val²⁰⁸ allelini taşıyanların Leu²⁰⁸ taşıyanlara oranla daha düşük coumadin dozuna ihtiyaç duydukları belirlenmiştir. Aksine, diğer bir varyant Leu¹⁸¹ (C⁵²⁷TT) allelini taşıyanlar homozigot İle¹⁸¹ (A⁵²⁷TT) allelini taşıyanlara oranla daha yüksek dozda coumadine ihtiyaç duyarlar. Bu dört allelde birbirine bağlıdır ve bunların belirlenmesine kullanılan geleneksel metod PCR-temelli SSCP'dir. Her allelik varyantın fonksiyonel önemi ile ilgili daha fazla in vivo ve in vitro çalışmalara ihtiyaç vardır. Ancak bu veriler yanlış primer dizaynından dolayı

hatalı olabilir. Nitekim, Japonlarda olduğu gibi Beyaz Irk ve Afrikalı-Amerikalılarda ekson 4'de yeni bir polimorfizm tanımlanmamıştır (45, 49).

Türk populasyonunda ise sadece CYP2C9*1, CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 allelleri bulunurken frekans sıklığı Beyaz Irk ile benzerlik gösterir (55, 56).

Coumadin Metabolizmasında CYP2C9 Genotipleri

CYP2C9 *1/*1 genotipi: Wild tip olarak bilinen, enzimin tam kapasite ile çalıştığı ve her iki allelede de mutasyon görülmeyen formdur. Bu genotipi taşıyan bireyler "hızlı metabolizör" olarak adlandırılır (35, 40, 57).

CYP2C9 *1/*2 ya da *2/*2 genotipi: CYP2C9 *2 genotipini heterozigot (CYP2C9 *1/*2) ya da homozigot (CYP2C9 *2/*2) olarak taşıyan, bir ya da her iki allellinde de mutasyon olan bireylerdir. CYP2C9 Cys144Arg (C430T) olarak da bilinen bu genotipe sahip bireylerde enzim %12 kapasite ile çalışır (35, 40, 57).

CYP2C9 *1/*3 ya da *3/*3 genotipi: CYP2C9 *3 genotipini heterozigot (CYP2C9*1/*3) ya da homozigot (CYP2C9 *3/*3) olarak taşıyan, bir ya da her iki allellinde de mutasyon olan bireylerdir. CYP2C9 Ile359Leu (A1075C) olarak da bilinen bu genotipe sahip bireylerde CYP2C9 enzimi %5 kapasite ile çalışır (35, 40, 56).

CYP2C9 *2/*3 genotipi: Her iki mutant alleli de taşıyan "compound heterozigot" bireylerdir. CYP2C9 *1/*2, *2/*2, 1/*3, *3/*3 ve *2/*3 genotiplerini taşıyan bireylerde "yavaş metabolizör" olarak adlandırılır (35, 40, 57).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu ve Örnek Alımı

Bu çalışma 27.01.2004-01.06.2005 tarihleri arasında yapılmıştır. Çalışma grubumuzu, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kalp-Damar Cerrahisi polikliniğine başvuran mekanik kapak replasmanı yapılmış ve coumadin kullanan 46'sı kadın ve 28'i erkek 74 kapak replasmanı hastası oluşturmaktadır. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan alınan onaydan (karar no: 1/3, 26.01.2004) sonra çalışma gruplarından %3.8 (1/9) sitrat içeren ve %7.5 etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) içeren tüplere kan örnekleri alınmıştır. Sitratlı tüpe alınan kanın 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmesiyle elde edilen plazma örneklerinde PTZ düzeyleri aynı gün içinde çalışılmıştır ve INR düzeyleri hesaplanmıştır. Ayrı EDTA'lı tüplere alınan tam kan örnekleri ise Deoksiribonükleikasit (DNA) izolasyonu yapılmıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.1. Hasta Grubuna Ait Coumadin Tedavi Şeması

Mekanik kapak replasmanı yapılmış ve coumadin kullanan hastaların haftalık ve aylık coumadin tedavi şeması çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Coumadin tedavi şeması

Hasta sayısı (n)	Günlük Doz (mg)	Haftalık Doz (mg)
1	5 gün 2.5, 2 gün 1.25	15
5	her gün 2.5	17.5
2	3 gün 2.5, 1 gün 5	20
3	3 gün 5, 4 gün 2.5	25
3	2 gün 2.5, 2 gün 5	25
9	1 gün 5, 1 gün 2.5	27.5
7	3 gün 2.5, 4 gün 5	27.5
9	3 gün 5, 2 gün 7.5	30
6	2 gün 5, 1 gün 2.5	30
3	2 gün 5, 2 gün 2.5	32.5
2	3 gün 5, 1 gün 2.5	32.5
14	her gün 5	35
1	3 gün 5, 1 gün 7.5	37.5
1	5 gün 5, 2 gün 7.5	40
1	4 gün 5, 3 gün 7.5	42.5
1	1 gün 5, 1 gün 7.5	42.5
1	3 gün 5, 2 gün 7.5	30
1	5 gün 7.5, 2 gün 5	47.5
1	2 gün 2.5, 2 gün 5	47.5
2	5 gün 5, 2 gün 7.5	50
1	her gün 7.5	52.5

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Mutlak etil alkol	Merck (Almanya)
2-propandiol	Merck (Almanya)
Coumadin 5 mg	Eczacıbaşı (Türkiye)

3.3. Kullanılan Aletler

Soğutmalı santrifüj (Sigma 3K30, Almanya)
Santrifüj (Nüve NF 800, Sigma Ultrasantrifüj, Almanya)
Etüv (Nüve EN 500, Almanya)
Derin dondurucu (Uğur derin dondurucu, Türkiye)
Soğutucu (Bosch, Danimarka)

Eppendorf tüpü (1,5 ml'lik, İsolab)
5 ml'lik EDTA'lı cam tüp (%7,5'lik)
5 ml'lik sitratlı cam tüp (%3.8'lik)
Otomatik pipet (Medisis)

3.4. Kullanılan Cihazlar

BCS, Behringer Coagulation System (Dade Behring, Almanya)
Light Cycler Real Time PCR (Roche, Almanya)

3.5. Kullanılan Kitler

High Pure PCR Template Kit (Katalog no. 1 796 828, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)
LightCycler-CYP2C9 Mutation Detection Kit (Katalog no. 3 266 982, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)
Thromborel S (Kod no. OUHP G29 E4841 R 1, Dade Behring Marburg GmbH, Germany)

3.6. Yöntemler

3.6.1. Tam Kandan DNA İzolasyonu

Hücreler, tüm nükleazları hemen inhibe eden bir koatropik tuz (guanidin-HCl) varlığında proteinaz K ile kısa bir inkübasyon sonunda parçalanır. Hücresel nükleik asitler çok saf pürifikasyon filtre tüplerinde bulunan özel fiber glas yapıya seçici olarak bağlanır. Bağlı nükleik asitler kontamine edici hücresel elemanlardan hızlı yıkama ve çevirme işlemleri ile arındırılır. Özel bir inhibitör temizleyici tampon ile bu işlem

gerçekleştirilir. Son olarak düşük yoğunluklu tuz elüsyonu ile nükleik asitlerin fiber glastan ayrılmasını sağlar.

DNA İzolasyonunda Kullanılan Ayraçların Hazırlanması

DNA izolasyonu için high pure PCR template kiti kullanılmıştır. Kit içeriği çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2: DNA izolasyon kit içeriği

Kimyasal	Miktarı	İçeriği
Binding (bağlayıcı) tampon	20 ml	6 M guanidine-HCl, 10 mM üre, 10 mM Tris-HCl, %20 Triton X-100 (v/v), pH:4.4
Proteinaz K	90 mg	Liyofilize proteinaz K
İnhibitör uzaklaştırıcı tampon	33 ml	5 M guanidine-HCL, 20 mM Tris-HCl, pH:6.6
Yıkama tamponu	20 ml	20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH:7.5
Elüsyon tamponu	40 ml	10 mM Tris, pH:8.5

Yukarıda kit içeriğinde verilen DNA izolasyon setinde bulunan Proteinaz K, inhibitör uzaklaştırıcı tampon, yıkama tamponu DNA izolasyon kitinin prospektüsünde verilen bilgiler doğrultusunda aşağıda verilen şekilde işlemlere tabi tutulmuştur.

Proteinaz K: Liyofilize proteinaz K’ya 4.5 ml bidistile su eklenir ve çalışma gününe kadar 500’er µl’lik porsiyonlara ayrılarak –20⁰C’de saklanmıştır.

İnhibitör uzaklaştırıcı tampon: 33 ml tampona 20 ml mutlak etil alkol eklenmiştir.

Yıkama tamponu: 20 ml yıkama tamponuna 80 ml mutlak etil alkol eklenmiştir.

DNA izolasyon protokolü:

1. Ependorf tüpüne, 200 µl EDTA'lı tam kan konur ve üzerine sırasıyla 200 µl binding tampon ve 40 µl proteinaz K eklenir ve vortexlenir.
2. 10 dakika 72 °C'de inkübe edilir.
3. Tüpe 100 µl izopropanol eklenir, vortexlenir ve karışım özel filtre tüplerine aktarılır.
4. 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir, filtreden geçen karışım atılır.
5. Filtre tüpün içine 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı tampon eklenir.
6. 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir, filtreden geçen karışım atılır.
7. Filtre tüpün içine 500 µl yıkama tamponu eklenir.
8. 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir, filtreden geçen karışım atılır.
9. İkinci kez filtre tüpün içine 500 µl yıkama tamponu eklenir.
10. 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir, filtreden geçen karışım atılır.
11. Filtre tüp boşaltıldıktan sonra 10 saniye 8000 rpm'de santrifüj edilir.
12. Filtre tüpü, yeni bir ependorf tüpü içine yerleştirilir. 72 °C'de bekletilmiş olan elüsyon tampondan 200 µl, filtre tüpe pipetlenir.
13. 1 dakıda 8000 rpm'de santrifüj sonunda, filtre tüpten ayrılan, saf DNA elde edilmiş olur.

3.6.2.Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Real Time PCR hedef DNA'daki nükleotid dizisi bilinen nokta mutasyon yada delesyon içeren bir bölgesinin amplifiye edilerek mutasyonun tespit edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Analiz denatürasyon, amplifikasyon, melting ve cooling olmak üzere dört basamakta yapılmaktadır. Çalışmaya başlamadan önce Taq polimeraz, iki primer ve prob, dört çeşit deoksiribonükleotid fosfat (dNTP), belirli derişimde magnezyum klorür (MgCl₂) ve üzerinde çalışılacak DNA'dan oluşan karışım hazırlanır.

Denatürasyon basamağında sıcaklık arttırılır ve DNA zincirindeki nükleotidler arasındaki bağlar koparılarak amplifikasyon işlemine hazır hale getirilir. DNA denatüre edildikten sonra oligonükleotid yapısındaki primerler sentezlenecek hedef bölgeyi belirleyecek şekilde ayrılan DNA zincirlerine yapışırlar. Termofilik bir bakteri olan

Thermus aquaticus'dan saflaştırılan Taq polimeraz enzimi yardımıyla belirlenen bölge dört çeşit dNTP kullanılarak sentezlenir. Annealing (uzama) adı verilen sentez işlemi sırasında mutasyon olan diziyeye uygun olarak sentezlenmiş olan mutasyon probu (mutation probe) mutasyon bölgesine, diğer prob olan çapa probu (anchor probe) ise mutasyon probunun 5' ucu tarafına ve arada en fazla 5 nükleotidlik mesafe kalacak şekilde yerleşir. Amplifikasyon işlemi ortalama 40-50 kez tekrar edilerek yaklaşık 2^{40-50} sayıda ürün elde edilmiş olur.

Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu Melting Curve Analizi ile Genotip Belirlenmesi:

Bir DNA molekülünün erime ısı (Melting temperature: T_m) içerdiği G+C (guanin+sitozin) miktarına, uzunluğuna ve iki zincir arasında gösterdiği homolojiye bağlı olarak değişmektedir.

Melting curve analizi ile genotip belirlenmesi iki hibridizasyon probu kullanılarak yapılmaktadır. Hibridizasyon problemlerinden ilki mutasyon olan diziyeye bağlanan ve 5' ucundan LightCycler-Red (LC-Red) fluorophore (LC-Red 640 yada LC-Red 705) ile işaretlenmiş olan mutasyon probudur. Diğer hibridizasyon probu ise 3' ucundan fluorescein ile işaretlenmiş olan çapa probudur. İki hibridizasyon probu hedef dizilere yapıştıktan sonra verici prob olan çapa probundaki fluorescein maddesi LightCycler cihazının ışık kaynağı tarafından eksite edilir ve eksitasyon enerjisinin bir kısmı mutasyon probunda bulunan LC-Red'e transfer edilir (Fluorescence Resonance Transfer Energy: FRET). LC-Red tarafından saçılan floresan LightCycler cihazı tarafından ölçülür. Melting basamağında sıcaklık yavaş yavaş ($0.1 \text{ sn}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}$) artırılır. Mutasyon probunun bağlandığı bölgede mutasyon varsa nükleotidlerin eşleşmesi tam olarak gerçekleşmediği için T_m daha düşük olacak ve prob bağlandığı yerden daha düşük sıcaklıkta ayrılacaktır. Eğer mutasyon yoksa prob daha yüksek sıcaklıkta ayrılacaktır.

Mutasyon probunun bağlandığı diziden kopmasıyla iki prob arasındaki FRET gerçekleşmez, cihaz tarafından ölçülen floresan düzeyi azalır ve ekrana bir pik olarak yansır.

3.6.3.CYP2C9 PCR Protokolü ve Melting Curve Analizi

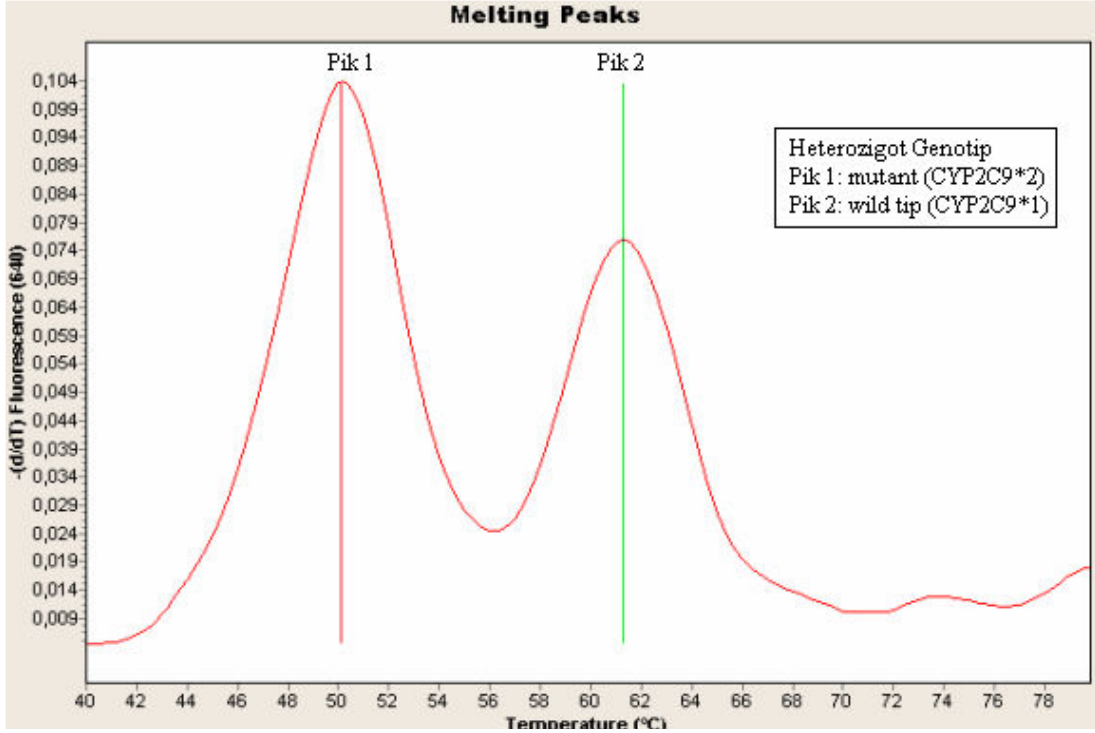
PCR ve mutasyon görüntüleme için, LightCycler-CYP2C9 Mutasyon Belirleme Kiti kullanılmıştır, kit içeriği ve örnek başına kullanılan miktarlar çizelge 3.3’de, uygulanan PCR protokolü çizelge 3.4’de verilmiştir. CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 melting curve analizleri Şekil 3.1 ve şekil 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. CYP2C9 mutasyon belirleme kit içeriği ve kullanılan miktarlar

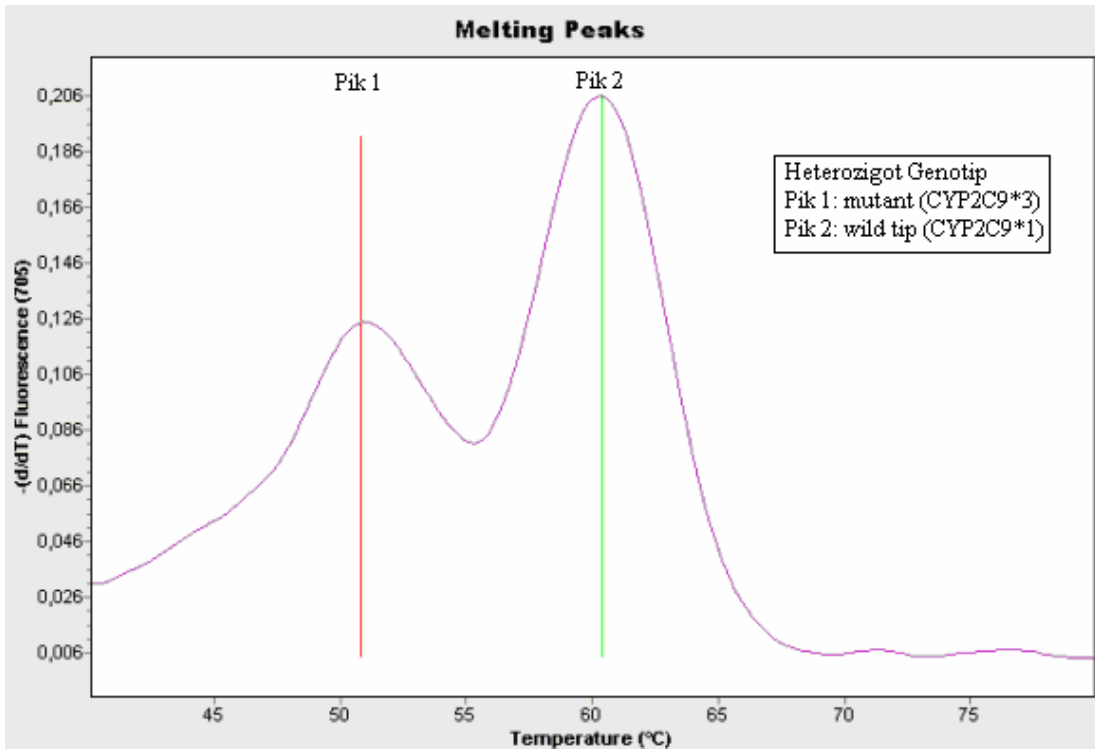
Karışımlar	İçerikleri	Bir örnek için harcanan miktar (µl)
LC-CYP2C9 Mutasyon Belirleme Karışımı	Primer, hibridizasyon probu	2
LC-CYP2C9 Reaksiyon Karışımı	Fast Start Taq polimeraz reaksiyon karışımı, dNTP karışımı	2
LC-CYP2C9 Enzim Solusyonu	Fast Start Taq polimeraz	0.3
Kontrol Templat	Heterezigot Plazmit DNA’sı	5
Steril Su	PCR grade steril distile su	10.7

Çizelge 3.4. CYP2C9 için PCR protokolü

Denatürasyon			
Siklus	1		
Hedef sıcaklık(C^0)	95		
İnkübasyon süresi(sn)	600		
Sıcaklık değişim oranı(C^0/sn)	20		
Amplifikasyon			
Siklus	45		
	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Hedef sıcaklık(C^0)	95	55	72
İnkübasyon süresi(sn)	10	10	10
Sıcaklık değişim oranı(C^0/sn)	20	20	3
Melting Curve analizi			
Siklus	1		
	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Hedef sıcaklık(C^0)	95	40	80
İnkübasyon süresi(sn)	60	60	0
Sıcaklık değişim oranı(C^0/sn)	20	20	0.1
Cooling			
Siklus	1		
Hedef sıcaklık(C^0)	40		
İnkübasyon süresi(sn)	30		
Sıcaklık değişim oranı(C^0/sn)	20		



Şekil 3.1: CYP2C9*2 (C430T) heterozigot genotip örneğinin melting curve analiz sonucu.
Pik 1: mutant, T_m 50.0 ± 2.5 °C; Pik 2: wild tip, T_m 61 ± 2.5 °C.



Şekil 3.2: CYP2C9*3 (A1075C) heterozigot genotip örneğinin melting curve analiz sonucu.
Pik 1: mutant, T_m 52.0 ± 2.5 °C; Pik 2: wild tip, T_m 60 ± 2.5 °C.

3.6.4. PTZ Ölçümü ve INR Hesaplanması

BCS kullanılarak plazmaya tromboplastin (Tromborel-S) ilave edilir ve pıhtılaşma Ca^{+2} ilavesiyle başlatılır. Ekstrinsik koagülasyon yolu (faktör VII) aktive edilir ve pıhtı oluşma süresi ölçülür. Fibrin liflerinin görülmesi pıhtılaşmanın son aşamaya geldiğinin işaretidir. Oluşan pıhtı 405 nm'de değerlendirilerek PTZ saptanır. Sonra saniye olarak laboratuvar ortalama normal kontrolüne bir oran olan INR olarak rapor edilir.

$$INR=(HASTA PTZ / ORTALAMA NORMAL PTZ)^{ISI}$$

Tromborel-S: Human plasental tromboplastin (doku faktörü), kalsiyum klorür içerir.

ISI= Uluslararası Duyarlılık İndeksi (Bu değer her kitle beraber veriliyor)

3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences, version 11.5) paket programı kullanılarak yapıldı.

Yaş, cinsiyet, Body Mass Index (BMI), CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 allellerinin doz ve INR üzerine etkilerini belirlemede faktoriyel covariance kullanılmıştır.

Elde edilen sonuçlarda $p<0.05$ ise fark veya ilişki istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grubuna Ait Demografik Veriler

Kalp kapağı replasmanı sonrasında coumadin kullanan hastalarda CYP2C9 gen polimorfizminin INR düzeyleri üzerine olan etkisinin araştırıldığı bu çalışmadaki araştırma grubumuz; yaşları 13 ile 74 (49.55 ± 15.95) arasında değişen 46'sı kadın ve 28'i erkek mekanik kapak replasmanı hastasından oluşmaktadır. Hastaların tanılarına göre cinsiyet dağılımı çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Hastaların tanıları ve cinsiyetleri

Tanı	Kadın n(%)	Erkek n(%)
AVR	10 (%21.7)	15 (%53.6)
MVR	30 (%65.2)	10 (%35.7)
AVR+MVR	6 (%13.0)	3 (%10.7)
Toplam	46 (%62.2)	28 (%37.8)

n: hasta sayısı

4.2. Kalp Kapağı Replasmanı Sonrasında Coumadin Kullanan Hastalarda CYP2C9 Genotip Dağılımı

Kalp kapağı replasmanı sonrasında coumadin kullanan hastalarda CYP2C9 genotip dağılımı çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. CYP2C9 Genotip dağılımı

Genotip	Wild n (%)	Heterozigot n(%)	Mutant n (%)
CYP2C9*2	55 (%74.3)	19 (%25.7)	0 (%0.0)
CYP2C9*3	48 (%65.9)	26 (%35.1)	0 (%0.0)

n: hasta sayısı

4.3. Kalp Kapağı Replasmanı Sonrasında Coumadin Kullanan Hastalarda CYP2C9*2 ve CYP2C*3 Genotiplerine Göre Coumadin Dozu

4.3.1. CYP2C9*2 Genotipine Göre Coumadin Dozu

Kalp kapağı replasmanı sonrasında coumadin kullanan hastalarda CYP2C9*2 genotipi ile ortalama doz (mean), standart sapma (standart deviation: SD) değerleri ve %95 güven aralığı (95% confidence interval) çizelge 4.3’de verilmiştir.

CYP2C9*2 wild genotip taşıyan hastaların, heterozigot genotipe sahip hastalara göre daha fazla coumadin dozuna gereksinim duydukları saptanmıştır (p=0.0296).

Çizelge 4.3. CYP2C9*2 genotipli hastalarda ortalama coumadin dozu

Genotip	n	Ortalama Doz±SD (mg)	%95 Güven Aralığı		Minimum	Maximum
			Alt Değer	Üst Değer		
Wild	55	33.18±7.24	31.22	35.13	17.5	52.5
Heterozigot	19	24.47±5.17	21.97	26.96	15.0	35.0
p	0.0296					

n: hasta sayısı, SD: standart sapma, %95 CI: güven aralığı, p: gruplar arasındaki farkın anlamlılık derecesi

4.3.2. CYP2C9*3 Genotipine Göre Coumadin Dozu

Kalp kapağı replasmanı sonrasında coumadin kullanan hastalarda CYP2C9*3 genotipi ile ortalama doz (mean), standart sapma (standart deviation: SD) değerleri ve %95 güven aralığı (95% confidence interval) çizelge 4.4’de verilmiştir.

CYP2C9*3 wild genotip taşıyan hastaların, heterozigot genotipe sahip hastalara göre daha fazla coumadin dozuna gereksinim duydukları saptanmıştır (p=0.022).

Çizelge 4.4. CYP2C9*3 genotipli hastalarda ortalama coumadin dozu

Genotip	n	Ortalama Doz±SD (mg)	%95 Güven Aralığı		Minimum	Maximum
			Alt Değer	Üst Değer		
Wild	48	33.90±7.25	31.79	36.01	17.5	52.5
Heterozigot	26	25.48±5.33	23,32	27.63	15.0	35.0
p	0.022					

n: hasta sayısı, SD: standart sapma, %95 CI: güven aralığı, p: gruplar arasındaki farkın anlamlılık derecesi

4.4. Kalp Kapağı Replasmanı Sonrasında Coumadin Kullanan Hastalarda CYP2C9*2 ve CYP2C*3 Genotiplerine Göre INR Düzeyleri

4.4.1. CYP2C9*2 Genotipine Göre INR Düzeyi

Kalp kapağı replasmanı sonrasında coumadin kullanan hastalarda CYP2C9*2 genotipi ile ortalama INR (mean), standart sapma (standart deviation: SD) değerleri ve %95 güven aralığı (95% confidence interval) çizelge 4.5’de verilmiştir.

CYP2C9*2 heterozigot genotipe sahip hastalarda wild tipe göre daha yüksek INR düzeyleri görülmesine rağmen, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0.736).

Çizelge 4.5. CYP2C9*2 genotipli hastalarda ortalama INR değerleri

Genotip	n	Ortalama INR±SD	%95 Güven Aralığı		Minimum	Maximum
			Alt Değer	Üst Değer		
Wild	55	2.39±0.58	2.23	2.55	1.4	4.3
Heterozigot	19	2.84±0.80	2.45	3.23	1.6	4.8
p	0.736					

n: hasta sayısı, SD: standart sapma, %95 CI: güven aralığı, p: gruplar arasındaki farkın anlamlılık derecesi

4.4.2. CYP2C9*3 Genotipine Göre INR Düzeyi

Kalp kapağı replasmanı sonrasında coumadin kullanan hastalarda CYP2C9*3 genotipi ile ortalama INR (mean), standart sapma (standart deviation: SD) değerleri ve %95 güven aralığı (95% confidence interval) çizelge 4.6’da verilmiştir.

CYP2C9*3 heterozigot genotipe sahip hastalarda wild tipe göre daha yüksek INR değerleri saptanmıştır. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.002).

Çizelge 4.6. CYP2C9*3 genotipli hastalarda ortalama INR değerleri

Genotip	n	Ortalama INR±SD	%95 Güven Aralığı		Minimum	Maximum
			Alt Değer	Üst Değer		
Wild	48	2.32±0.57	2.15	2.48	1.64	4.3
Heterozigot	26	2.86±0.80	2.58	3.14	1.6	4.8
p	0.002					

n: hasta sayısı, SD: standart sapma, %95 CI: güven aralığı, p: gruplar arasındaki farkın anlamlılık derecesi

4.5. CYP2C9 Genotipleri ile Coumadin Dozu ve INR Düzeyleri Arasındaki Kombine İlişki

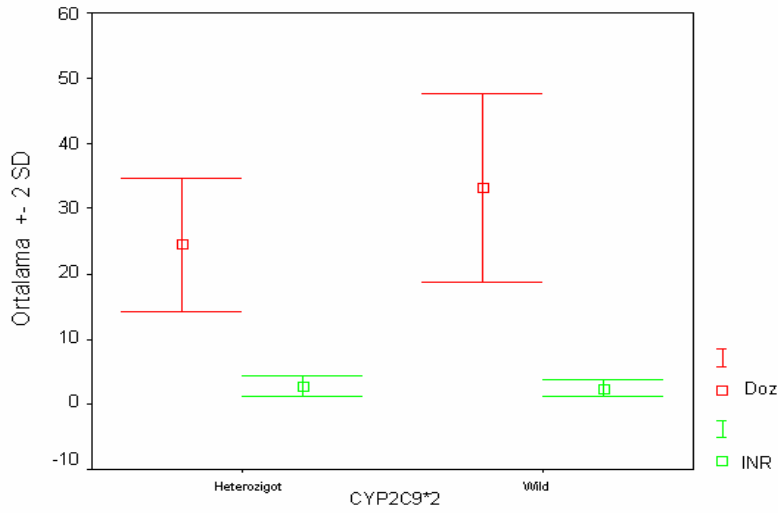
CYP2C9*2, CYP2C9*3 genotipleri ile ortalama doz, ortalama INR, standart sapma (SD) değerleri çizelge 4.7’de verilmiştir. CYP2C9*2, CYP2C9*3 genotipleri ile coumadin dozu ve INR düzeylerinin kombine ilişkisi ise şekil 4.1 ve 4.2’de gösterilmektedir

CYP2C9’un her iki genotipi heterozigot olan hastalar, her iki genotipi wild tip olan hastalara göre daha düşük coumadin dozuna gereksinim duymalarına karşılık (p=0.001), yüksek INR değerlerine sahiptirler (p=0.008).

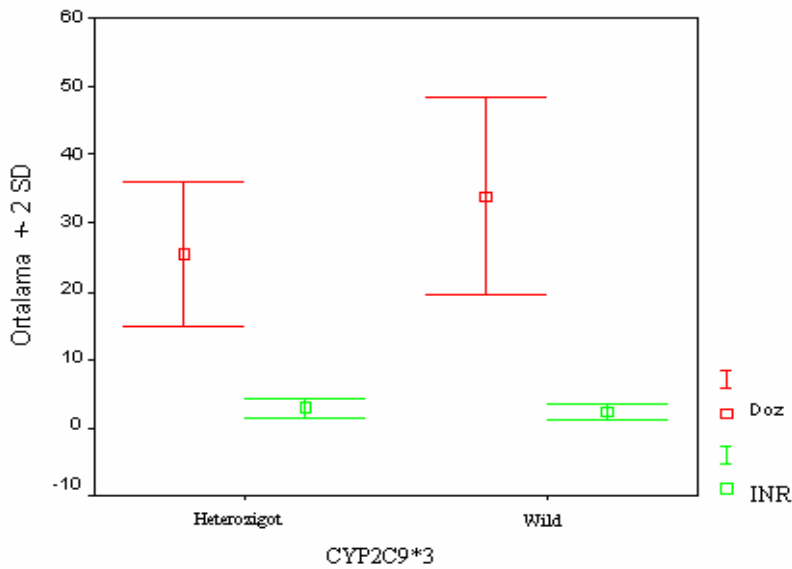
Çizelge 4.7. CYP2C9*2, CYP2C9*3 genotipli hastalarda ortalama doz ve ortalama INR değerleri

GENOTİP		n	DOZ (mg)	INR
CYP2C9*2	CYP2C9*3		Ortalama±SD	Ortalama ±SD
Wild	Wild	48	33.90±7.25	2.32±0.57
Wild	Heterozigot	7	28.21±5.14	2.71±0.29
Heterozigot	Heterozigot	19	24.47±5.17	2.84±0.80

n: hasta sayısı, SD: standart sapma



Şekil 4.1. CYP2C9*2 genotipi ile coumadin dozu ve INR düzeylerinin kombine ilişkisi



Şekil 4.2. CYP2C9*3 genotipi ile coumadin dozu ve INR düzeylerinin kombine ilişkisi

5. TARTIŞMA

Kalp kapağı hastalıklarında bazı durumlarda kapak replasmanı kaçınılmazdır. Burada karşımıza çıkan en büyük sorun kapak seçimidir. Bilimsel çalışmalar özellikle 60 yaşından küçük hastalarda ya da mitral pozisyonu için bütün yaşlardaki hastalarda mekanik kapakların biyoprotezlerden daha üstün olduğunu göstermiştir. Mekanik kapaklar aynı zamanda aort içinde tercih edilen olup aort kapağı değişimi ameliyatlarının %60'dan fazlasında kullanılmaktadır. ABD'de şu anda gerçekleştirilen mitral kapak değiştirme ameliyatlarının %60'ının, İngiltere'de ise %68'inin mekanik kapak kullanılarak yapıldığı bildirilmektedir. Az gelişmiş ülkelerde 20 yıllık bir sürede ikinci ameliyatın riskini almak yerine antikoagülasyonu izlemek tercih edildiğinden mekanik kapaklar halen ilk tercih olarak kullanılmaktadır. Mitral kapak için biyoprotezlerde reoperasyon sıklığı çok yüksek olduğundan 20 yıllık bir sürede mekanik kapağın daha dayanıklı olması beklenmektedir. Mekanik kapağın dezavantajları arasında antikoagülan tedaviye bağlı küçük kanama riskidir. Bu riske karşı biyoprotezlerde 7-15 yıl içinde reoperasyon ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır (28, 29).

Biyoprotezler erken kalsifik dejenerasyon nedeniyle kısa ömürlü olmakta, bu yüzden coumadinin kontraendike olduğu hastalarda tercih edilmektedir. Diğer yandan mekanik kapaklar uzun ömürlü olmasına karşın tromboembolik komplikasyonlar nedeniyle coumadin kullanımını gerektirmektedir. Ancak coumadin bu hastalarda yılda % 2.3-3.4 oranında kanamaya yol açmakta, bunların 1/3'i kanama nedeniyle kaybedilmektedir. Bu durum mekanik kapakların kullanımına sınırlama getiren en önemli faktörlerden bir tanesidir (28, 29).

Antikoagülan tedavide kullanılan coumadin, CYP2C9 enzim sistemiyle metabolize edilmektedir. Ancak bu sistemde mutasyon sonucu oluşan CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 varyant alellerinin enzim aktivitesini azaltması sonucu coumadinin metabolize edilemediği ve kanama riski olduğu düşünülmektedir. Oral antikoagülanların vücuttan atılımı daha az olan hastalar yan etkilere daha duyarlı olurlar. Özellikle coumadin tedavisine ilk başladığında kişinin optimal cevabı için gerekli doz bilinmez. Yetersiz antikoagülasyon tromboemboli veya kapak trombozu gibi sonuçlar doğurabilir. Yüksek dozda uygulanan antikoagülasyonda ise kanama ile

ilgili komplikasyonlar görülebilir. Bu yüzden hasta INR değeri ile sık aralıklarla değerlendirilerek uygun coumadin dozu belirlenmelidir (24, 25, 26).

Aynı zamanda coumadin tedavisi başlangıcı sırasında yüksek oranda kanama ve uzun süre hastanede yatma CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 taşıyıcılarında bildirilen komplikasyonlardır. Stabil doza ulaşına kadar uzun bir zaman geçer, ayrıca ciddi ve hayatı tehdit edici kanama riskide oldukça yüksektir (26).

Tromboembolizmde kumarin türevleriyle tedavi gören hastalarda INR'nin tedavi aralığında olması gerekir. Kumarin türevlerine karşı oluşan bu cevap yaş, cinsiyet, diyet, ilaç etkileşimleri, etnik faktörler ve genetik faktörlere göre değişmektedir. Enzimatik aktiviteyi CYP2C9*2 (Arg144Cys) %30 ve CYP2C9*3 (Ile359Leu) %80 azaltarak coumadin atılımını yavaşlatır, antikoagülan etki artar; bu ise kanama komplikasyonları için bir risk oluşturur. CYP2C9 varyantları oral antikoagülan tedavi devam ederken coumadin dozunun ayarlanmasını gerektirir bu da kendini INR değişikliğiyle gösterir (57).

Bir ilacın klinikte kullanılabilmesi için öncelikle bilinmesi gereken, klinik etkinliği ve güvenilirliğidir. Ancak, ilaçların her hasta üzerinde aynı derecede etkili ve güvenli olması beklenemez. İlaçların eşdeğer dozları bazı bireylerde yeterli etkinlik göstermeyebilir ve diğer bir kısım hastalarda toksisiteye bağlı önemli sağlık problemlerine yol açabilir. İlaç yanıtındaki bu tür farklılıklar, bireylerin farklı fizyolojik durumlarından, hastalık derecelerinden, ilaç etkileşimlerinden veya hastalıkla birlikte bulunan diğer bazı bozukluklardan kaynaklanabileceği gibi çevresel etmenlerden de büyük oranda etkilenir. Etkasite ve toksisite farklılıklarının oluşmasında önemli yeri olan bir diğer faktör bireyler arasındaki genetik farklılıklardır. Genetik faktörler ilaç yanıtındaki bireyler arasındaki değişkenliğin en az %20-40'ından ve yan etkilerin yaklaşık %50'sinden sorumlu tutulmaktadır (50, 59).

Farklı etnik gruplar arasında CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 allel frekansının anlamlı derecede farklılık gösterdiği bildirilmiştir. CYP2C9*2 alleli Doğu Asya popülasyonunda bulunmamaktadır (Çin, Japonya, Kore). Afrikalı-Amerikalılarda ve Etiyopyalılarda, CYP2C9*2 allel frekansı %3.2'dir. Çeşitli Beyaz Irk popülasyonlarında CYP2C9*2 allel frekansı açısından anlamlı derecede heterojenite vardır. CYP2C9 allel frekansının dağılımı %8 ile 19 arasında değişmektedir. ABD'de yaşayan İspanyol veya

Latin Amerika kökenli kişilerde CYP2C9*2 allel frekansı Beyaz Irk ile benzerdir ancak zencilerden daha yüksektir (46, 49, 54, 58).

CYP2C9*3 için allel frekansı, Korelilerde %1.1, Japonlarda %2.2 ve Çinlilerde %3.3'tür. 3 genotipleme çalışması diğerleri ile çok büyük heterojenite gösterdiği için çıkarılmıştır. Zencilerde allel frekansı %1.3 olup, Beyaz Irk CYP2C9*3 alleli açısından geniş bir dağılım ile (%3.3-16.2) anlamlı derecede heterojenite görülmektedir. ABD'de yaşayan İspanyol veya Latin Amerika kökenli kişilerde CYP2C9*3 allel frekansı Çinliler ile benzerdir ancak Beyaz Irk'dan daha düşüktür. İlginç olarak Kanadalı yerli Inuitlerin (Aborjinler, CNI) Asya kökenli olduğu düşünülmesine rağmen CYP2C9*2 ve *3 bu popülasyonda görülmemiştir (49, 54, 55, 58).

Yukarıdaki yaygın CYP2C9 varyant allellere ek olarak CYP2C9*5 Afrikalı-Amerikalılarda (%0.2-1.7) ve ABD'de yaşayan İspanyol veya Latin Amerika kökenli kişilerde (%0-0.5) tanımlanmıştır. Ancak Beyaz Irk, Çin ve Japonya'da yoktur veya oldukça nadir bulunmaktadır. Ayrıca, CYP2C9*6 yaygın olarak bulunmaz ve orta Tennessee'de yaşayan Afrikalı Amerikalılarda allel frekansı %0.6 ile 1.5 arasındadır ve Fransız Beyaz Irkında ve Çinlilerde oldukça nadirdir veya yoktur (46, 55, 58).

Türk popülasyonunun da ise CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 allel frekansı Beyaz Irk popülasyonuna benzer şekilde olup, üçte ikisinin wild tip genotip ve üçte birinin CYP2C9*1/*2 veya CYP2C9*1/*3 genotipi ve %2,5'inden azının da CYP2C9*2/*2, CYP2C9*3/*3 genotipinde olduğu görülmüştür (55, 56).

Yapılan çalışmalara göre, varyant bir genotip taşımanın klinik sonuçları önemli olabilmektedir. Hastalar arasında düşük doz warfarine gereksinim duyanların, antikoagülasyonda hedef INR değerine ulaşmak ve korumak için standart doz alanlara göre allel çeşitliliğinin daha sık rastlandığı görülmüştür. Varyant allel taşıyıcılarının pek çoğunda yüksek sıklıkla kanama olayları meydana gelmiş ve özellikle tedavi başlangıcında INR'nin aşırı yükseldiği görülmüştür. Genetik veya çevresel faktörler warfarinin atılım oranı ya da prohemorajik durumlara bağlı warfarin duyarlılığını etkilemektedir (60).

İn vitro yapılan çalışmalarda CYP2C9 geni allelik varyantlarının genellikle Km değerini (substrata afinitesini azaltarak) arttırarak ve/veya maksimum metabolizma oranını azaltarak katalitik aktiviteyi azalttığını göstermiştir (61,62).

İn vivo farmokokinetik çalışmalarda ise CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 polimorfizminin 17 ilaç üzerindeki etkileri belirlenmiştir. CYP2C9*2/*2 ve *3/*3 homozigot taşıyıcılar en belirgin etki göstermelerine rağmen bu alleller için homozigot olan birey sayısının az olmasından dolayı birçok ilaç için farmokokinetik tahminler tamamen heterozigot taşıyıcılarla (*1/*2 ve *1/*3) belirlenmiştir. *2/*2 genotip taşıyıcılarında *1/*1 taşıyanlara oranla S-acenocoumaral ve S-warfarinin total atılım değeri sırasıyla %21 ve %32 olarak saptanmıştır. Ancak fenitoin, tolbutamid, ibuprofen, nateglinit, fluvastatin ve fenoprokomon da atılım %68 ile %90 arasında değişmektedir. Heterozigot taşıyıcılarda losartan atılımı sadece %58'dir fakat *2/*2 homozigot genotip taşıyıcıları için klinik farmokogenetik etki ile ilgili yayınlanmış veri bulunmamaktadır. CYP2C9*3 allelinde ise farmakogenetik parametrelerde oldukça büyük farklılıklar görülmektedir. Substratların çoğu için heterozigot taşıyıcılarda bile wild tipe oranla S-warfarin, tolbutamid, selecoxib, fluvostatin, fenitoin, glimepirit, candesartan ve tenoxicama gibi ilaçların atılım oranı ortalama %50'dir (61, 62).

Warfarin ile yapılan klinik çalışmaların çoğunda ortalama günlük doz ile veya uluslararası normalize edilmiş oranla (INR) CYP2C9 genotiplerinin ilişkisi değerlendirilmiştir. *1/*2 ve *2/*2 taşıyıcılarında farmakogenetik temelli indirgenmiş doz sırasıyla % 80 ve 32, klinik INR temelli doz ayarlamasına göre indirgenmiş doz sırasıyla % 87 ve %82'dir. *1/*3 ve *2/*3 ve *3/*3 için farmakokinetiğine göre doz % 56, 23 ve 9, klinik etkilerine göre % 68, 57 ve 33'tür bundan dolayı farmakokinetik çalışmalarla genotip bağımlı doz ayarlaması yapıldığında klinik veriler ile desteklenmelidir (61, 62).

Spreafico ve ark.'na (63) göre, in vivo warfarin atılımının azalması antikoagülan etkiyi artırdığını ve terapötik aralığı sürdürmek için ortalama günlük doz gereksinimini azalttığını bulmuşlardır. *1/*2 heterozigot, *2/*2 homozigot, *1/*3 heterozigot ve *3/*3 homozigot genotipe sahip bireylerde ortalama günlük warfarin dozu wild tipe göre %19, %30, %42 ve %87 daha azdır. *2/*3 heterozigot genotipi ise %51 daha düşük doz gerektiriyordu. Sonuç olarak CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 varyantları antikoagülan tedavinin sürdürülmesi süresince warfarin doz ayarlamasında etkilidir.

Çalışma grubumuzda CYP2C9*2, CYP2C9*3 ve CYP2C9*2/*3 genotip sıklıklarını %25.7, %35.1 ve %25.67 bulduk. CYP2C9*2 heterozigot, CYP2C9*3 heterozigot ve her iki genotipi de heterozigot (CYP2C9*2/*3) hastalarda ortalama

haftalık coumadin dozunu 24.47, 25.48, 24.47 olarak bulurken, ortalama INR değerlerini 2.84, 2.86, 2.84 olarak bulduk. Bu sonuçlara göre, CYP2C9*2 heterozigot ve CYP2C9*3 heterozigot hastaların wild tip genotipi olan hastalara göre daha az coumadin dozuna gereksinim duydukları saptanmıştır (CYP2C9*2 p=0.0296; CYP2C9*3 p=0.022). Ayrıca CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 genotipleri ile coumadin dozu ve INR düzeyleri arasındaki kombine ilişki incelenmiş ve her iki genotipi (CYP2C9*2/*3) için heterozigot olanların daha az coumadin dozuna gereksinim duydukları saptanmıştır (p=0.001).

Furuya ve ark. (44), CYP2C9*2 genotipinin antikoagülan kullanan hastaların %38'inde ortaya çıktığını, CYP2C9*2 wild tip ile karşılaştırıldığında warfarin dozunun yaklaşık olarak 6mg veya %20 azaltılması ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır.

Taube ve ark. (44), CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 genotip sıklıklarını %11 ve %5 olarak bulmuşlar ve bununda warfarin dozunu %39 kadar azalttığını bildirmişlerdir. Takahashi ve ark. (63), japon hastalarda CYP2C9*3 allelinin warfarin atılımını azalttığını ve dşuk doz warfarin tedavisinin sürdürülmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Steward ve ark. (63), CYP2C9*3 homozigot hastaların warfarin terapisine hassas olduğunu, standart başlama dozu alındıktan sonra doz aşımının tehlikeli olduğunu bildirmişlerdir.

Aithal ve ark'a (27) göre CYP2C9 genotipi ve warfarin hassasiyeti arasında güçlü bir ilişki vardır. Genel populyasyon ile karşılaştırıldığında warfarinin metabolize edilmesinin bozukluğunda bir yada daha fazla varyant allel taşıyan bireylerin 6 kat daha fazla dşuk doz warfarin kullanması gereklidir.

Rusya'da yapılan bir çalışmada, CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 taşıyıcıları haftalık olarak daha dşuk sürekli doza ihtiyaç duyarlar. En dşuk sürekli doz ise CYP2C9*3 alleli taşıyan hasta grubunda görülür. Warfarin tedavisi başlangıcında, tedavi edici INR'yi belirlemek için geçen zaman wild tip genotiplerde varyant allel taşıyıcılarına oranla daha yüksektir. Tedavinin ilk gününden başlayarak, tüm araştırma periyodu süresince CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 allel taşıyıcılarının INR değerinin çok yüksek oranda olduğu ve wild tip allel taşıyıcıları ile karşılaştırıldığında st hedef sınırından daha yüksek olduğu görülmüştür. CYP2C9*3 alleli taşıyan hastaların yarısından fazlasında INR değeri 4.5 kat daha yüksektir. Tedavinin ilk iki gününde dört hastada INR 4.5'in altındadır. Tüm bu hastalar CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 allelleri için

heterozigot taşıyıcıdırlar. Kanama komplikasyonu gelişmemiştir. Çalışma sonucunda Rusya popülasyonundaki bireylerin üçte biri CYP2C9*2 ve/veya CYP2C9*3 allelleri için taşıyıcı olduğu belirlenmiştir (55).

Linder ve ark'a (40) göre, warfarin dozunun hedef INR'de sürdürülmesi CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 varyant allellerinin warfarin atılımını azaltmasının bir fonksiyonu olarak bireyler arasında farklılık vardır. CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 allelleri warfarin dozunun azaltılmasıyla ilişkilidir.

Scordo ve ark'nın (63) yaptıkları çalışmada, İtalyan hastalarda CYP2C9 gen polimorfizmi warfarin atılımını ve warfarin doz gereksinmesini etkilemektedir.

Sonuç olarak çalışmamız diğer çalışmalarla paralellik göstermekte olup, CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 allelerine sahip mekanik kalp kapağı olan bireylerde düşük doz coumadin kullanımı gerekmektedir. CYP2C9 polimorfizmi coumadin tedavisine hassasiyeti etkiler, genotipleme coumadin dozunun izlenmesi ve aşırı veya yetersiz antikoagülasyonda oluşan problemlerin azaltılmasında yararlı olabilir. Aynı zamanda genotipleme coumadin tedavisinde komplikasyon riski olan hastaları belirlemede kullanılabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde en yaygın olarak kullanılan protez kapaklar mekanik ve biyoprotez kapaklardır. Mekanik kapaklar diğer protez kapaklara oranla çok daha uzun dayanıklılık süreleri nedeniyle özellikle yaşam beklentisi uzun hastalarda en çok tercih edilen kapak tipidir. Mekanik kapakların en önemli dezavantajı tromboza eğilim yaratmaları nedeniyle yaşam boyu coumadin ile antikoagülasyon zorunluluğudur. Bazı durumlarda coumadin dozunu ayarlamak için, hastayı denetleme ve komplikasyonları önleme açısından hastanın uzun süreli hastane yatırılması gerekmektedir.

Yaptığımız çalışmada, CYP2C9 gen polimorfizmini mekanik kapak replasmanı sonrasında coumadin kullanan hastalarda doz üzerindeki etkilerini inceledik. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 allelik varyantlarını taşıyan bireyler daha az coumadin dozuna gereksinim duymaktadır. Coumadin duyarlılığındaki hastalararası çeşitlilik metabolik kapasitedeki kalıtsal farklılıklara bağlı görünüyor. Coumadin dozu bireylerin farklı metabolik profillerine göre belirlenerek bu problemler çözülebilir.

Sonuç olarak:

1. Tedaviden önce CYP2C9 varyantlarının bilinmesi başlama dozunun belirlenmesi açısından önemli olabilir.
2. CYP2C9 varyantlarının saptanması, klinisyenlere doz protokolünün ayarlanması ve coumadin kullanan hastalarda ilaca karşı oluşan reaksiyon riskinin azaltılması yönünde yardımcı olabilir.
3. CYP2C9 varyantlarının belirlenmesiyle, tıbbi tedavi yaklaşımında denemeyanılma yöntemi yerine bireye özgü ilaç ve doz seçimi benimsenir. Bu yaklaşım, tedavi etkinliğini artıracak gibi önemli bir risk olan kanamanın azaltılması açısından önemlidir.

7. KAYNAKLAR

1. **Hufnagel CA, Harwey WP, Rabil PJ, McDermott TF.** In the beginning. Surgical correction of aortic insufficiency. *Ann Thorac Surg*, **1954**; 47(3): 475-476.
2. **Gibbon JH Jr.** Application of a mechanical heart and lung apparatus in cardiac surgery. *Minn Med*, **1954**; 37: 171-176.
3. **Lynch PR, Bove AA.** Patterns of blood flow through the intact heart and its valves. In: LA Brewer III (ed). *Prosthetic Heart Valves*. Charles C Thomas, Springfield, DL **1969**; 2: 133-140.
4. **Braunwald NS, Cooper T, MorrowAG.** Complete replacement of the mitral valve. *J Thorac Surg*, **1960**; 40: 1-11.
5. **Harken DE, Soroff HS, Taylor WJ.** Partial and complete prostheses in aortic insufficiency. *J Thorac Cardiovasc Surg*. **1960**;40:744-753
6. **Tarr A, Edwards LM.** Mitral replacement: clinical experience with a ball valve prosthesis. *Ann Surg*, **1961**; 154: 726-740.
7. **Heimbecker RO, Baird RJ, Lajos RJ.** Homograft replacement of the human valve: a preliminary report. *Can Med Assoc J*, **1962**; 86: 805-809.
8. **Binet JP, Carpentier A, Langlois T.** Implantation of heterogenic valves in the treatment of aortic cardiopathies. *CR Acad Sci*, **1965**; 26(12): 5733-5734.
9. **Ross DN.** Replacement of aortic and mitral valves with a pulmonary autograft. *Lancet*, **1967**; 2: 956-958.
10. **Edmunds Lh Jr, Clark RE, Cohn LH.** Guidelines for reporting morbidity and mortality after cardiac valvular operations. *J Thorac Cardiovasc Surg*, **1988**; 96: 351-353.
11. **Fann JI, Miller DC.** Porcine valves: Hancock and Carpentier-Edwards aortic prostheses. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, **1996**; 8: 259-268.
12. **Godje OL, Fischlein T, Adelhard K.** Thirty –year results of Starr-Edwards prostheses in the aortic and mitral position. *Ann Thorac Surg*, **1997**; 63: 613-619.

13. **Edwards TJ Livesey SA, Simpson IA.** Biological valves beyond fifteen years: the Wessex experience. *Ann Thorac Surg*, **1995**; 60 :211-215.

14. **Deloche A, Jebara VA, Relland JY.** Valve repair with Carpentier techniques, The second decade. *J thorac Cardiovasc Surg*, **1990**; 99: 990-995.

15. **Sand ME, Naftel DC, Blackstone EH.** A comparison of repair and replacement or mitral valve incompetence. *Thorac Cardiovasc Surg*, **1987**; 94: 208-219.

16. **Czer LS, Maurer G, Bolger A.** Tricuspid valve repair: operative and follow-up evaluation with Doppler color flow mapping. *J Thorac Cardiovasc Surg*, **1989**; 98: 101-110.

17. **Duran CMG, Gometza B, Kumar N.** From aortic cusp extension to valve replacement with stentless pericardium. *Ann Thorac Surg*, **1995**; 60: 428-432.

18. **Hirsch D, Drader J, Thomas T J, Schoen F J, Levy J T, Levy R J.** Inhibition of calcification of glutaraldehyde pretreated porcine aortic valve cusps with sodium dodecyl sulfate: preincubation and controlled release studies. *J Biomed Mater Res*, **1993**; 27:1477-1484.

19. **Shen M, Mostefa A K, Chen L, Daudon M, Thevenin M, Lacour B, Carpentier A.** Effect of ethanol and ether in the prevention of calcification of bioprostheses. *Ann Thorac Surg*, **2001**; 71: 413-416.

20. **Webb C L, Benedict J J, Schoen F J, Linden J A, Levy R J.** Inhibition of bioprosthetic heart valve calcification with aminodiphosphonates covalently bound to residual aldehyde groups. *Ann Thorac Surg*, **1988** ; 46: 309-316.

21. **Vasudev SC, Chandy T, Sharma CP, Monathy M, Umasankar PR.** Synergistic effect of released aspirin/ heparin for preventing bovine pericardial calcification. *Artificial Organs*, **2000**; 24: 129-136.

22. **Weissenstein C, Human P, Bezuidenhout D, Zilla P.** Glutaraldehyde detoxification in addition to enhanced amine cross-linking dramatically reduces bioprosthetic tissue calcification in the rat model. *J Heart Valve Dis*, **2000**; 9: 230-240.

23. **Edmunds LH.** Results of expert meetings: Antithrombotic therapy after prosthetic cardiac valve implantation: Improving postoperative, long-term patient management. *American Heart Journal*, **2001**;141: 849-855.

24. **Kayaalp O.** *Tıbbi Farmakoloji*. 10. baskı. Cilt I, **2002**, 583-599.
25. **Fuster V, Alexander RW, O'Rourke RA.** *The Heart*, McGraw-Hill Medical Publishing Division, 1.Baskı 3.cilt, **2002**; 1745-1781.
26. **Taube J, Halsall D, Baglin T.** Influence of cytochrome P450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over anticoagulation in patients. *Blood*, **2000**; 96(5): 1816-1819.
27. **Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ L, Dally AK.** Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet*, **1999**; 353: 717-719.
28. **Gök H,** *Klinik Kardiyoloji*, Nobel tıp kitabevi 2. Baskı, Ankara, **2002**; 377-383.
29. **Paç Mustafa, Akçevin A, Aka SA, Büket S, Sarıoğlu T.** *Kalp Cerrahisi*, 1. Baskı, Ankara, **2004**; 615-622.
30. **Özgen AG.** *Kalp Cerrahisi*, 1. Baskı, Diyarbakır, **1999**; 177-237.
31. **Müftüoğlu E,** *Klinik Hematoloji*. 4.Baskı, Diyarbakır, **1995**; 501-503.
32. **Montgomery R, Conway TW, Spektor AA.** Biyokimya olgu sunumlu yaklaşım. 6. Baskıdan Çeviri, çeviri editörü; **Altan N,** palme yayıncılık, **2000**; 356-383.
33. <http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/ichastaliklari/files/Dersler/Aytromed.doc>
34. http://www.gata.edu.tr/temel_bilimler/biyokimya/seminer/INR.doc
35. **Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, Wittkowsky AK, Srinouanprachanh SL, Farin FM, Rettie AE.** Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA*, **2002**; 287(13):1690-1698.
36. **Özerol E,** Cytochrome P450-containing monooxygenase enzyme systems, *Journal of Turgut Özal Medical Center*; **1996**; 3(33): 257-275.
37. **Çetin M.** Drug Interactions in Psychiatric Practice. *Bull Clin Psychopharmacol*, **1999**; 9(2): 78-92
38. **Nemeroff CB, DeVane CL, Pollack BV.** Newer antidepressants and the cytochrome P450 system. *Am J Psychiatry*, **1996**; 153: 311-320.

39. **Rogers JF, Nafziger AN, Bertino JS.** Pharmacogenetics affects dosing, efficacy and toxicity of cytochrome P450 metabolised drugs. *Am J Med*, **2002**; 113: 746-750.
40. **Linder MW, Looney S, Adams JE, Johnson N, Antonino-Green D, Lacefield N, Bukaveckas BL, Valdes R Jr.** Warfarin dose adjustments based on CYP2C9 genetic polymorphisms. *J. Thromb Thrombolysis*, **2002**; 14(3): 227-232.
41. **Tassies D, Freire C, Pijoan J, Maragall S, Monteaguda J, Ordinas A, Reverter JC.** Pharmacogenetics of acenocoumarol: cytochrome P450 CYP2C9 polymorphisms influence dose requirements and stability of anticoagulation. *Haematologia*, **2002**; 87(11): 1185-1191.
42. **Herman D, Dolzan V, Breskvar K:** Genetic polymorphism of Cytochrome P450 2C9 and 2C19 in Slovenian population. *Zdrav Vestn*, **2003**; 72: 347-51
43. **Ablin J, Cabili S, Eldor A, Lagziel A, Peretz H.** Warfarin therapy is feasible in CYP2C9*3 homozygous patients. *European Journal of Internal Medicine*, **2004**; 15: 22– 27.
44. **Tabrizi AR, Zehnbauer BA, Borecki IB, McGrath SD, Buchman TG, Freeman BD.** The Frequency and Effects of Cytochrome P450(CYP) 2C9 Polymorphisms in Patients Receiving Warfarin. *J Am Coll Surg*, **2002**; 194: 267–273.
45. **Xiang S, Parsons HK, Murray M.** Identification of a novel transcriptional silencer in the protein-coding region of the human CYP2C9 gene. *Gene*, **1998**; 209(1-2):123-129.
46. **Xie HG, Prasad HC, Kim RB, Stein CM.** CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional Significance. *Adv Drug Deliv Rev*, **2002**; 54(10): 1257-1270.
47. **Shintani M, Ieiri I, Inoue K, Mamiya K, Ninomiya H, Tashiro N, Higuchi S, Otsubo K.** Genetic polymorphisms and functional characterization of the 5'-flanking region of the human CYP2C9 gene: in vitro and in vivo studies. *Clin Pharmacol Ther*, **2001**; 70(2): 175-82.
48. **Ibeanu GC, Goldstein JA.** Transcriptional regulation of human CYP2C genes: functional comparison of CYP2C9 and CYP2C18 promoter regions. *Biochemistry*, **1995**; 34: 8028–8036.
49. **Wang SL, Huang J, Lai MD, Tsai JJ.** Detection of CYP2C9 polymorphism based on the polymerase chain reaction in Chinese. *Pharmacogenetics*. **1995**; 5(1): 37-42.
50. **Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Brancaccio V, Ciampa A, Grandone E, Di Minno G.** Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin, *Thromb. Haemost*, **2000**; 84: 775–778.
51. **Hiratsuka M, Agatsuma Y, Mizugaki M.** Rapid detection of CYP2C9*3 alleles by real-time fluorescence PCR based on SYBR Green. *Mol Genet Metab*, **1999**; 38: 357-362.

52. **Imai J, I. Ieiri K, Mamiya K, Miyahara S, Furuumi H, Nanba E, Yamane M, Fukumaki Y, Ninomiya H, Tashiro N, Otsubo K, Higuchi S.** Polymorphism of the cytochrome CYP2C9 P450 (CYP) 2C9 gene in Japanese epileptic patients: genetic analysis of the *CYP2C9* locus. *Pharmacogenetics*, **2000**;10: 85–89.
53. **Ieiri I., Tainaka H, Morita T, Hadama A, Mamiya K, Hayashibara M, Ninomiya H, Ohmori S, Kitada M, Tashiro N, Higuchi S, Otsubo K.** Catalytic activity of three variants (Ile, Leu, and Thr) at amino acid residue 359 in genotyping primers, human *CYP2C9* gene and simultaneous detection using single-strand conformation polymorphism analysis. *Ther Drug Monit*, **2000**; 22:237–244.
54. **Kidd RS, Curry TB, Gallagher S, Edeki T, Blaisdell J, Goldstein JA.** Identification of a null allele of *CYP2C9* in an African-American exhibiting toxicity to phenytoin. *Pharmacogenetics*, **2001**; 11(9): 803–808.
55. **Pchelina SN, Sirotkina OV, Taraskina AE, Vavilova TV, Shwarzman AL, Schwartz EI.** The frequency of cytochrome P450 2C9 genetic variants in the Russian population and their associations with individual sensitivity to warfarin therapy *Thromb Res*, **2005**; 115(3): 199-203. 57
56. **Aynacioglu AS, Brockmoller J, Bauer S, Sachse C, Guzelbey P, Ongen Z, Nacak M, Roots I.** Frequency of cytochrome P450 CYP2C9 variants in a Turkish population and functional relevance for phenytoin. *Br J Clin Pharmacol*, **1999**; 48(3): 409-415.
57. **Spreatico M, Peyvandi F, Pizzotti D, Moia M, Mannucci PM.** Warfarin and Acenocoumaroldose requirements according to CYP2C9 genotyping in North-Italian Patients. *J Thromb Haemost*, **2003**; 1(10): 2252-2253.
58. **Leung AY, Chow HC, Kwong YL, Lie AK, Fung AT, Chow WH, Yip AS, Liang R.** Genetic polymorphism in exon 4 of cytochrome P450 CYP2C9 may be associated with warfarin sensitivity in Chinese patients. *Blood*, **2001**; 2584–2587. 57
59. **Linder MW.** Genetic mechanisms for hypersensitivity and resistance to the anticoagulant Warfarin. *Clin Chim Acta*, **2001**; 308(1-2): 9-15.
60. **Freeman BD, Zehnbaauer BA, McGrath S, Borecki I, Buchman TG.** Cytochrome P450 polymorphisms are associated with reduced warfarin dose. *Surgery*, **2000**; 128(2): 281-285.
61. **Kirchheiner J, Brockmoller J.** Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther*, **2005**; 7(1): 1-16.
62. **Lee CR.** CYP2C9 genotype as a predictor of drug disposition in humans. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, **2004**; 26(6): 463-472.
63. **Scordo MG, Pengo V, Spina E, Dahl ML, Gusella M, Padrini R.** Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on warfarin maintenance dose and metabolic clearance. *Clin Pharmacol Ther*, **2002**; 72(6): 702-710.

ÖZGEÇMİŞ

20.11.1979 yılında Adana'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Mersin'de tamamladı. 2001 yılında Hacettepe Üniversitesi Biyoloji bölümünden mezun oldu. Eylül 2002'de Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.

Halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.