

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**ALKOL YOKSUNLUĞUNDA SİTOKROM P450 CYP1A2,
CYP2D6, CYP2E1 VE CYP3A4 GEN EKSPRESYONLARININ
VE POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Nazife TAŞÇIOĞLU**

**Danışman
Doç.Dr.Çetin SAATÇİ**

Doktora Tezi

**Aralık 2011
KAYSERİ**

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**ALKOL YOKSUNLUĞUNDA SİTOKROM P450 CYP1A2,
CYP2D6, CYP2E1 VE CYP3A4 GEN EKSPRESYONLARININ
VE POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Nazife TAŞÇIOĞLU**

**Danışman
Doç.Dr.Çetin SAATÇİ**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TSD-09-974 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Aralık 2011
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Nazife TAŞÇIOĞLU

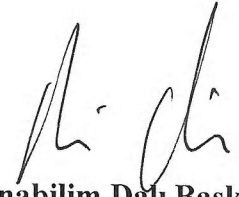
İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Alkol Yoksunluğunda Sitokrom p450 CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1 ve CYP3A4 Gen Ekspresyonlarının ve Polimorfizmlerinin Araştırılması” adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Nazife TAŞÇIOĞLU


Danışman
Doç.Dr.Çetin SAATÇİ

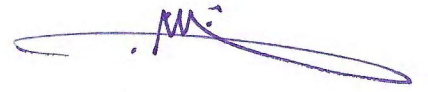

Anabilim Dalı Başkanı
Prof.Dr.Munis DÜNDAR

Doç.Dr.Çetin SAATÇİ danışmanlığında **Nazife TAŞÇIOĞLU** tarafından hazırlanan “**Alkol Yoksunluğunda Sitokrom p450 CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1 ve CYP3A4 Gen Ekspresyonlarının ve Polimorfizimlerinin Araştırılması**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Genetik** Anabilim Dalı’nda **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

28/12/2011

JÜRİ**İmza**

Danışman : Doç.Dr.Çetin SAATÇİ (Tıp Fak.Tıbbi Genetik AD)



Üye : Prof.Dr.Munis DÜNDAR (Tıp Fak.Tıbbi Genetik AD)



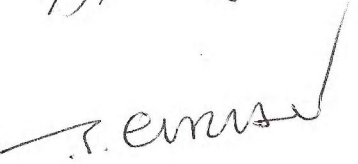
Üye : Prof.Dr.Ertuğrul EŞEL (Tıp Fak.Psikiyatri AD)



Üye : Prof.Dr.Hamiyet D. ALTUNTAŞ (Tıp Fak.Tıbbi Biyoloji AD)



Üye : Yrd.Doç.Dr.A.Bülent TURHAN (Selçuk Ün.Tıbbi Biy.AD)

**ONAY**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana her zaman yol gösterici olan, yardımlarını esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Munis Dünder'a ve Prof. Dr. Yusuf Özkul'a ve doktora tez çalışmamın etkin yürütülmesinde tecrübesi ve desteği ile her zaman yanımda olan tez danışmanım Doç. Dr. Çetin SAATÇI'ye, tezimdaki hastaların toplanması ve değerlendirme aşamalarında yardımcı olan sayın Prof. Dr. Ertuğrul EŞEL'e, tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Yard.Doç.Dr.Serpil Taheri ve Uzm. Hilal Akalın'a, manevi desteği ile benimle birlikte olan değerli arkadaşım Araş.Gör.Nazmiye Bitgen'e, verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde yardımcı olan Araş. Gör. Gökmen ZARARSIZ'a, teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca yanımda olan, emeklerini ve desteklerini hiç eksik etmeyen aileme teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitim yapmaya beni teşvik eden ve her zaman maddi, manevi destekleri ve fedakarlıklarıyla yanımda olan değerli eşim Mehmet Emin TAŞÇIOĞLU'na ve hayatımın anlamı olan çocuklarıma teşekkür ederim.

ALKOL YOKSUNLUĞUNDA SİTOKROM P450 CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1 VE CYP3A4 GEN EKSPRESYONLARININ VE POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI
Nazife TAŞÇIOĞLU

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Doktora, Aralık 2011
Danışman: Doç. Dr. Çetin SAATÇİ
KISA ÖZET

Alkol dünya genelinde en yaygın olarak kullanılan ve bağımlılık yapan bir maddedir. Halk sağlığında mortalite, morbidite ve sosyal maliyet terimlerine etkisi oldukça büyüktür. Alkolizmin genetik temelini anlaşılmaması yeterli korunma stratejileri ve kişisel tedaviler geliştirmek için önemli bir basamaktır. Bu amaç için, alkolizme kişisel meyil genlerinin, alkol tüketimine aracılık eden ılımlı genlerin, klinik tedaviye cevabın hangi genler aracılığıyla etkilendiğinin ayrıca genler arası ve çevresel faktörlerle etkileşim mekanizmasının tanımlanması önemlidir.

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı'ndan ve Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi AMATEM'den tedavi için yatan alkol bağımlısı erkek hasta (n=50) ve kontrol erkek bireylerin (n=23) kan örnekleri alındı.

Çalışmamızda iki farklı yöntem (RFLP ve Ekspresyon analizi) kullanarak söz konusu genlerin alkol bağımlılığı üzerine etkileri araştırıldı. Bunlardan polimorfizm çalışmaları için *Ki* Kare testi yapıldı. Gruplar arası hasta ve kontrol örneklerinin ekspresyon verilerinin karşılaştırılmasında beden kitle indeksi, yaş, sigara içme süresi ve sigara içme adedi faktörlerinden arındırılarak Kovaryans analizi ve ayrıca bağımsız iki örneklem T testi uygulandı. Hastaların tedavi öncesi ve sonrası kan örneklerindeki ekspresyon verilerinin karşılaştırılmasında ise beden kitle indeksi, yaş, sigara içme süresi ve sigara içme adedi, alkol içme süresi ve alkol içme miktarı faktörlerinden arındırılarak Kovaryans analizi ve ayrıca bağımlı iki örneklem T testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapıldı.

Alkol bağımlısı hasta grupları ve kontrol gruplarında CYP1A2*1F, CYP 2D6*4, CYP 2D6*6, CYP 2E1 c1/c2, CYP3A4*V gen polimorfizmleri çalışılmıştır. CYP1A2 geni *1F polimorfizmi hasta ve kontrol grupları arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Buna göre kontrol grubunda CYP1A2 geni *1F polimorfizmi hasta grubuna göre anlamlı olarak artmıştır.

Alkol bağımlısı hasta ve kontrol bireylerinde CYP1A2, CYP 2D6, CYP2E1, CYP3A4 genlerinin ekspresyonları çalışılmıştır. İnternal kontrol olarak Beta Aktin geni kullanılmıştır. CYP1A2 geni mRNA ekspresyonu sadece alkol bağımlısı hasta grubunda 2 örnekte tesbit edilmiştir, kontrol grubunda ekspresyon bulunamamıştır. Bu yüzden istatistiksel olarak değerlendirilememiştir. CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 genlerinin ekspresyon seviyelerinin alkol bağımlısı hasta ve kontrol grupları arasındaki ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Ayrıca hasta grubunda tedavi öncesi ve sonrası ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Bu genlerin polimorfizmlerinin ve ekspresyonlarının gerçek etkilerini görmek için daha fazla hasta sayısı ile çalışılan ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: alkol, bağımlılık, gen, ekspresyon, polimorfizm

ALCOHOL WITHDRAWAL INVESTIGATION OF CYTOCHROME P450 CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1 AND CYP3A4 EXPRESSION AND GENE POLYMORPHISM

Nazife TAŞÇIOĞLU

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Medical Genetic

PhD. Thesis, December 2011

Supervisor: Assoc. Prof. Çetin SAATÇI

ABSTRACT

Alcohol is the most widely used worldwide, and an addictive substance. Public health mortality, morbidity and social cost terms the effect is quite large. Understanding the genetic basis of alcoholism treatments to develop adequate prevention strategies and personal treatments is an important step. For this purpose, a personal inclination to alcoholism genes, genes that moderate alcohol consumption emerged, clinical response to treatment, through which genes and between genes and environmental factors that affect the mechanism of interaction is important to identify.

We enrolled this study in Erciyes University Medical Faculty for Psychiatry Department and Kayseri Education and Research Hospital AMATEM. Blood samples of the patient with alcohol dependent male patients (n=50) and male control individuals (n=23) were collected.

In our study we used two different methods (RFLP and expression analysis) to investigate the effect on the genes of alcohol dependence. *Chi* Square test was performed for the polymorphism of these studies Patient and control samples for comparison of expression data between groups body mass index, age, duration of smoking and number of smoking, adjusted for General Linear Model and also the number of independent two-sample *t*-test were performed. Expression data from blood samples of patients were compared before and after treatment body mass index, age, smoking duration and number of smoking, amount of alcohol drinking and alcohol drinking time-dependent factors, were cleared of General Linear Model and also two-sample *t*-test were performed using the statistical evaluation.

Alcohol-dependence patient groups and control groups, CYP1A2 *1F, CYP2D6 *4, CYP 2D6 *6, CYP 2E1 c1/c2, CYP3A4 *V gene polymorphism studied. The distribution of CYP1A2 *1F gene polymorphisms between patient and control groups were significant ($p < 0.05$). Accordingly, the gene CYP1A2 *1F polymorphism in the control group increased significantly compared with the patient group. Alcohol dependence patients and control members of CYP1A2, CYP 2D6, CYP2E1, CYP3A4 expression of the genes were studied. Beta actin gene was used as an internal control. CYP1A2 gene mRNA expression was detected only two patients in alcohol-dependence group, not found expression in the control group. Therefore, this could not be evaluated statistically. Compare with CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 expression levels of genes in alcohol dependence patients and control groups, statistically significant difference was not found ($p > 0.05$). In addition, the comparison of expression levels of the group of patients before and after treatment a statistically significant difference was not found ($p > 0.05$). Further studies with large number of patients are needed to reveal the real impact of these polymorphisms and the expression levels of the genes.

Key words: alcohol, dependency, gene expression, polymorphism

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar LİSTESİ	xi
KISALTMALAR	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.ALKOL VE MADDE BAĞIMLILIĞI	3
2.2.ALKOL METABOLİZMASI	5
2.3.ALKOL BAĞIMLILIĞININ GENETİK VE EPİGENETİK YÖNÜ	7
2.3.1 Alkol Bağımlılığının Genetiği	7
2.3.1.1.Alkol Dehidrogenaz (ADH) ve Aldehit Dehidrogenaz (ALDH)	8
2.3.1.2.Dopaminerjik Sistem.....	8
2.3.1.3.GABAerjik Sistem	9
2.3.1.4.Glutamaterjik Sistem.....	9
2.3.1.5.Opioid Sistem	10
2.3.1.6.Serotonerjik Sistem	10
2.3.1.7.Tüm Genomun İncelenmesi.....	10
2.3.1.8.Bağımlılıkta Epigenetik.....	11
2.4.FARMAKOGENETİK	12
2.5.BİYOTRANSFORMASYON	13
2.5.1.Ksenobiyotik Metabolizma Enzimleri.....	14
2.5.2.İlaçların Biyotransformasyonlarını Etkileyen Faktörler	15

	<u>Sayfa no</u>
2.5.2.1.İndüksiyon	16
2.5.2.2.İnhibisyon	16
2.5.2.3.Genetik Polimorfizm	17
2.5.2.3.1.Enzim Polimorfizmlerinin Moleküler Temeli	18
2.5.2.4.Hastalık durumu	18
2.5.2.5.Yaş.....	18
2.5.2.6.Cinsiyet.....	19
2.5.2.7.Beslenme	19
2.5.2.8.İlaçlararası metabolik etkileşimler	20
2.6.SİTOKROM P450 SİSTEMİ	20
2.6.1.CYP1 Ailesi.....	22
2.6.1.1.CYP1A2	23
2.6.1.2.1 CYP1A2'nin Substrat ve İnhibitörleri	24
2.6.2.CYP2 AİLESİ.....	25
2.6.2.1.CYP2D6	25
2.6.2.1.1.CYP2D6'nın Substrat ve İnhibitörleri	28
2.6.2.2.CYP2E1	29
2.6.2.2.1.CYP2E1'in Substratları ve İnhibitörleri	30
2.6.3.CYP3 Ailesi.....	31
2.6.3.1.CYP3A4.....	31
2.6.3.1.1. CYP3A4'ün Substrat ve İnhibitörleri.....	32
2.7. MOLEKÜLER YÖNTEMLER.....	34
2.7.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PZR).....	34
2.7.2. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)	34
2.7.3. Kantitatif Real-Time PZR Yöntemi	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. GEREÇLER	36
3.1.1 Demirbaş Malzemeler	36
3.1.2 Sarf Malzemeler ve Kimyasal Maddeler	37
3.2.KAN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI.....	38
3.3.GEN POLİMORFİZM ÇALIŞMALARI.....	38
3.3.1. CYP1A2 Geni *1F Polimorfizmi.....	38
3.3.2. CYP 2D6*4 1934 (G/A) ve CYP 2D6*6 1795(1 bç del) Polimorfizmleri.....	40

	<u>Sayfa no</u>
3.3.3.CYP 2E1 c1/c2 (<i>Rsa</i> +/ <i>Pst</i> +)Polimorfizmi	41
3.3.4.CYP 3A4*V Polimorfizmi	43
3.4.PZR ve RFLP Ürünlerinin Elektforezi	45
3.4.1.Agaroz Jel Hazırlanması	46
3.4.1.1.Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması.....	46
3.4.1.2. PZR ve RFLP Ürünlerinin Agaroz Jele Yüklmesi	46
3.5. GEN EKSPRESYONU ÇALIŞMA YÖNTEMİ.....	47
3.5.1.RNA İzolasyonu	47
3.5.2.cDNA Sentezi	47
3.5.3.Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu	48
3.5.3.1.Real-Time PZR Reaksiyon Protokolü	49
3.6.İSTATİSTİK ANALİZLER	50
4. BULGULAR	52
4.1.POLİMORFİZM BULGULARI.....	52
4.1.1.CYP1A2*1F Polimorfizm Bulguları.....	52
4.1.2.CYP 2D6*4 1934 (G/A) ve CYP 2D6*6 1795(1 bç del) Polimorfizm Bulguları	54
4.1.3 CYP 2E1 c1/c2 (<i>Rsa</i> +/ <i>Pst</i>) Polimorfizm Bulguları.....	55
4.1.4 CYP 3A4*V Polimorfizm Bulguları.....	56
4.2.EKSPRESYON BULGULARI	58
4.2.1. Beta Aktin Geni Ekspresyon Bulguları	58
4.2.2.CYP1A2 Geni Ekspresyon Bulguları.....	60
4.2.3.CYP2D6 Geni Ekspresyon Bulguları.....	60
4.2.4.CYP2E1 Geni Ekspresyon Bulguları	62
4.2.5.CYP3A4 Geni Ekspresyon Bulguları.....	63
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	69
6.KAYNAKLAR.....	79
EKLER	
HASTA VE KONTROL BİLGİLERİ	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO, ŞEKİL VE GRAFİK LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. CYP1A2'nin substrat ,inhibitör ve indükleyicileri	24
Tablo 2.2. CYP2D6'nın varyant alleleri ve enzim aktiviteleri.....	26
Tablo 2.3. CYP2D6'nın substrat, inhibitör ve indükleyicileri	28
Tablo 2.4. CYP2E1'in substrat, inhibitör ve indükleyicileri.....	30
Tablo 2.5. CYP3A4'ün substrat, inhibitör ve indükleyicileri	32
Tablo 3.1. Çalışılan polimorfizmlerin restriksiyon enzimleri ve bant boyutları.....	43
Tablo 3.2. Ekspresyonları çalışılan genlerin gen bank numaraları ve primer dizileri.....	48
Tablo 4.1. Gruplararası CYP1A2*1F polimorfizm sonuçları	51
Tablo 4.2. Gruplararası CYP2D6*4 polimorfizm sonuçları	53
Tablo 4.3. Gruplararası CYP2D6*6 polimorfizm sonuçları	53
Tablo 4.4. Gruplararası CYP2E1 geni c1\c2 polimorfizm sonuçları.....	54
Tablo 4.5. Gruplararası CYP3A4*V polimorfizm sonuçları.....	55
Tabo 4.6. Kontrol grubu polimorfizm bulguları.....	56
Tablo 4.7. Hasta grubu polimorfizm bulguları.....	57
Tablo 4.8. Kontrol grubu ekspresyon verileri	62
Tablo 4.9. Hasta grubu ekspresyon verileri	63
Tablo 4.10. Ekspresyon verilerinin istatistiksel tablosu	66
Şekil 2.1. Alkol metabolizması	6
Şekil 2.2. Etanol metabolizması.....	6
Şekil 2.3. İlaç Metabolizmasının iki fazı	15

Sayfa No

Şekil 2.4.	İlaç metabolizması enzimlerinin aktivitelerinin belirlenmesinde genetik ve epigenetik faktörler.....	19
Şekil 2.5.	CYP'lerin farklı ailelerinin ilaç metabolizmasındaki oranları	21
Şekil 3.1.	Beta-Aktin geni standartlarının Real-Time PZR görüntüsü	47
Şekil 4.1.	CYP1A2*1F polimorfizmi agaroz jel görüntüsü	51
Şekil 4.2.	CYP1A2*1F polimorfizmi grafiksel gösterimi	52
Şekil 4.3.	CYP2D6*4/*6 polimorfizmi agaroz jel görüntüsü	53
Şekil 4.4.	CYP2E1 geni c1/c2 polimorfizmi agaroz jel görüntüsü.....	54
Şekil 4.5.	CYP3A4*V polimorfizmi agaroz jel görüntüsü	55
Şekil 4.6.	ACTB geni ekspresyonunun Real-Time PZR görüntüsü	57
Şekil 4.7.	ACTB geni ekspresyon verimliliği	57
Şekil 4.8.	CYP1A2 geni ekspresyonunun Real-Time PZR görüntüsü.....	58
Şekil 4.9.	CYP1A2 geni ekspresyon verimliliği	58
Şekil 4.10.	CYP2D6 geni ekspresyonunun Real-Time PZR görüntüsü.....	59
Şekil 4.11.	CYP2D6 geni ekspresyon verimliliği	59
Şekil 4.12.	CYP2E1 geni ekspresyonunun Real-Time PZR görüntüsü.	60
Şekil 4.13.	CYP2E1 geni ekspresyon verimliliği.....	60
Şekil 4.14.	CYP3A4 geni ekspresyonunun Real-Time PZR görüntüsü.....	61
Şekil 4.15.	CYP3A4 geni ekspresyon verimliliği	61

KISALTMALAR

ACTB	: Beta Aktin
ADH	:alkol dehidrogenaz
ALDH	: aldehit dehidrogenaz
bç	: baz çifti
BDNF	: brain-derived nörotropik faktör
CYP	: sitokrom p450
DMSO	: dimetil sülfoksit
dNTP	: deoksiribonükleozid trifosfat
DNA	: deoksiribo nükleik asit
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
ER	: Endoplazmik Retikulum
MEOS	: mikrozomal etil alkol oksitleyici sistem
NMDA	: N metil D aspartat
PAH	: polisiklik aromatik hidrokarbon
PZR	: polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	: ribo nükleik asit
TBE	: Tris Borik asit EDTA

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Alkol dünya genelinde en yaygın olarak kullanılan ve bağımlılık yapan bir maddedir. Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre, 2 milyar alkol kullanıcısı vardır. Halk sağlığında mortalite, morbidite ve sosyal maliyet terimlerine etkisi oldukça büyüktür. Alkolizmin genetik temelinin anlaşılması yeterli korunma stratejileri ve kişisel tedaviler geliştirmek için önemli bir basamaktır. Bu amaç için, alkolizme kişisel meyil genlerinin, alkol tüketimiyle ortaya çıkan ılımlı genlerin, tedaviye cevabın hangi genler aracılığıyla etkilendiğinin ayrıca genler arası ve çevresel faktörlerle etkileşim mekanizmasının tanımlanması önemlidir (1).

Genetik faktörlerin alkolizmde bir rol oynadığı açıkça bilinmesine rağmen ilgili spesifik genlerin saptanmasının zor olduğu bildirilmiştir. Alkolizm genetik olarak komplekstir, açık bir Mendelyan kalıtım şekli göstermez. En büyük karışıklıklar muhtemelen genetik heterojenite, çok genlilik, fenokopiler, gen-çevre etkileşimleri ve eksik penetrans göstermesi nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda geniş aile-temelli ve vaka-kontrol örneklerinin toplanması bağlantı ve ilişkilendirme için bilgi vericidir. Daha iyi belirlenmiş fenotip karakterizasyonları, alkolizmin multi-faktöriyel etiyolojisinin hesaplanabileceği istatistiksel metodların kullanımı ve gelişen moleküler genetik teknolojiler, ilk yapılan genetik çalışmaların birçok sınırlarını ortadan kaldırmıştır (2).

Sonuç olarak alkolizme hassasiyete aracılık eden bazı genetik lokuslar tanımlanmıştır. Fenotip düzeyinde intermediate fenotiplerin kullanılmasıyla büyük ilerleme kaydedilmiştir. Alkolizm multi-faktöriyel bir hastalıktır ve çevresel faktörlerin yanı sıra birkaç genin, herbirinin ufak etkisi, dahil edilebilmektedir. Bazı örneklerde yaygın fonksiyonel allellerin küçük etkileri tanımlanırken, farklı vakalarda yaygın olmayan allellerin güçlü etkileri bilinmektedir.

Biz bu çalışmada alkol metabolizmasında mikrozomal enzimler olarak bilinen P450 grubundaki dört farklı geni (CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1 ve CYP3A4) araştırarak farklı bir bakış açısıyla hem alkol bağımlılarında söz konusu genlerin ekspresyon değişikliklerini hem de alkol tedavisi için başvuran bu kişilerin tedavisinde etkili olabilecek genlerin polimorfizmlerini çalıştık. Bu genler alkolizm için risk taşıyor mı sorusunun cevabını aradık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.ALKOL VE MADDE BAĞIMLILIĞI

Merkezi sinir sistemini etkileyen kimyasallar psikoaktif madde olarak tanımlanırlar. Bunlar düşünce, duygu ve davranışları değiştirirler.

Psikoaktif maddeler Maya, Aztek ve Mısır gibi ilk medeniyetlerden beri kullanılmaktadır. Bu dönemlerde; çeşitli dini törenler bu “keyif verici” maddeler eşliğinde yapılmıştır. Bununla birlikte; hazzı artırma, olumsuz duygular (üzüntü, endişe, öfke gibi) ve fiziksel şikayetlerle (çeşitli ağrılar gibi) başa çıkma aracı görevi de görmüşlerdir.

Tıbbi kavram olarak alkolizm, Magnus Huss tarafından 1849’da tanımlandı. Biyopsikososyal bir hastalık olarak bağımlılık ise Jellinek tarafından 1960 yılında açıklandı.

Psikoaktif maddeler; alkol, kenevir (marihuana, esrar, haşhaş), opiatlar (eroin, kodein, morfin), kokain, amfetaminler (speed, crystal), halüsinojenler (asit, LSD, PCP), sakinleştiriciler (xanax, valium, atarax, diazem), uçucu maddeler (tiner, bali, spreyler), steroidler, nikotin ve kafein olarak ayrılırlar. Bu maddeler; ağız yoluyla, enjekte veya

inhale edilerek alınabilirler. Alkol ve nikotin, kullanımı en yaygın psikoaktif maddelerdir (3).

Zarara yol açabilen alkol tüketimi; tüketimin yaşam boyu miktarı ve ağır episodik içiciliğin sıklığı ve miktarı olmak üzere iki temel başlık altında incelenebilir. Avrupa birliği (AB)'nde yetişkin nüfusun %15'i ortalama 40gr/gün(erkekse), 20gr/gün(kadınsa)'den fazla alkol tüketmektedirler, alkolle ilişkili ölüm için yaşamboyu risk oranları sırasıyla %4 ve %1'dir.Yaklaşık 80 milyon AB sakini 15 yaş ve üzeridir, yani yetişkin nüfusun beşte biri, haftada en az bir kez tek seferde 50gr alkol alarak ağır içici bölümünde bildirilmektedir. Alkol tüketiminin üçüncü başlığı ev yapımı olarak belirtilen kayıt dışı alkol tüketiminin yol açacağı zararlarıdır. Kaçak üretilen veya kaçak ev yapımı alkol insan tüketimi için yüksek etanol konsantrasyonundan veya kumarin, üretan ve dietil fitalat gibi hepatoksik kimyasallar içerebileceği için uygun değildir. Dünya sağlık örgütü (WHO) Avrupa bölgesinde alkol bir yılda tüm ölümlerin %6.5'inden (erkek ölümlerinin %11,bayan ölümlerin %1.8), tüm sakatlık veya erken ölümlerin %11.6'sıdan (erkeklerde %17.3 ve kadınlarda %4.4) sorumludur (4).

Bağımlılık kendini özellikle tolerans artışı (kişinin zaman içinde artan alkol&madde tüketimi) ve yoksunluk belirtileri (alkol&madde alınmadığı takdirde yaşanan titreme, bulantı, kusma, uykusuzluk, baş ağrıları gibi fiziksel belirtiler) ile gösterir. Bununla birlikte kontrol kayıpları, hafıza kayıpları, davranış değişiklikleri ve işlevsellik kaybı gözlemlenir.

Alkol bağımlılığı tanısı için (Dünya Sağlık Örgütü tanı ölçütleri) aşağıdaki kriterlerden en az üçünün bulunması gerekmektedir:

- *Alkol içmek için güçlü bir istek,
- *Alkol alma davranışını denetlemede güçlük (alınan alkol miktarını ayarlayamama, kullanım süresini ayarlayamama, başarısız bırakma girişimleri),
- *Alkol kullanımı azaltıldığında ya da bırakıldığında tipik yoksunluk belirtileri.
- *Alkol ile gerekli iyilik halini elde etmek için (rahatlık, sarhoşluk, keyif) gittikçe artan miktarlarda alkole gereksinim duyma (tolerans gelişimi)
- *Alkolü elde etmek, kullanmak ve etkilerini gizlemek için harcanan zaman ve çabanın diğer ilgi ve uğraşlara yer vermeyecek şekilde giderek artması

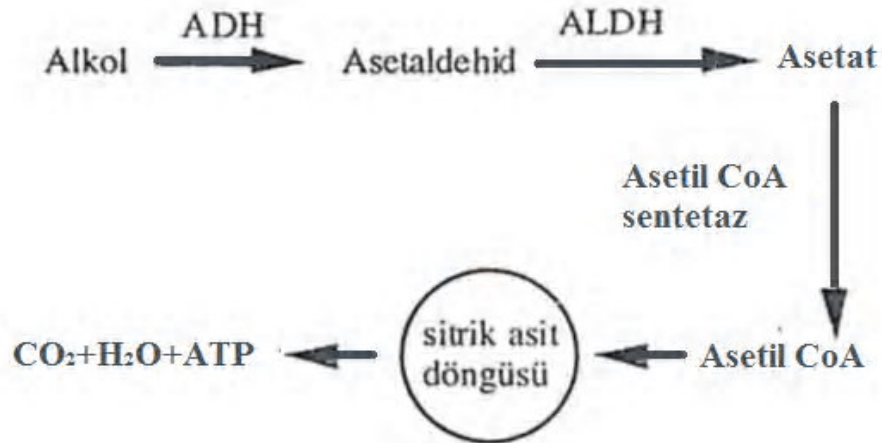
*Aşırı alkol kullanımı nedeni ile ruhsal, sosyal, fiziksel zararlar ortaya çıkmasına rağmen alkol kullanımını sürdürme (1).

2.2.ALKOL METABOLİZMASI

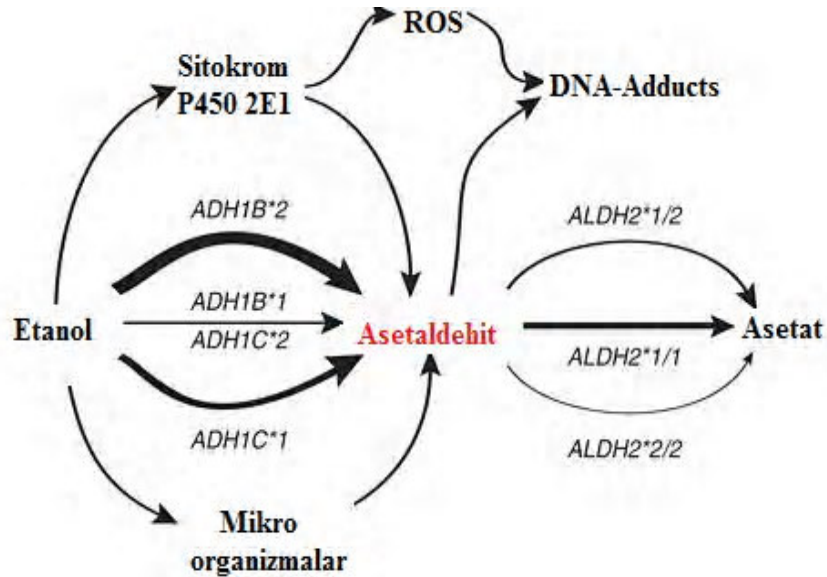
Oral olarak alınan etil alkol, hemen gastrointestinal sistemden absorblanarak vücut sıvılarında homojen olarak yayılmaktadır. Vücut sıvı ve dokularında etil alkolün dağılma hızı, dokunun büyüklüğüne, geçirgenliğine ve kan akışına bağlıdır. Etil alkol %90'ı karaciğerde metabolize olmaktadır. Etil alkolün biyotransformasyonundaki ana yol, karaciğerde asetaldehit ve hidrojene oksidasyonudur. Üç enzim, sitozolik alkol dehidrogenaz (ADH), mikrozomal etil alkol oksitleyici sistem (MEOS) ve katalaz, etil alkolün oksidasyonundan sorumludur. Asetaldehit, aldehit dehidrogenaz enziminin katalizör etkisiyle asetata oksitlenir. Asetatın büyük bir kısmı ise karaciğer dışındaki dokularda karbondioksit ve suya oksitlenir (5-7).

Alkol dehidrogenaz, etil alkol metabolizması için major oksidatif yolu teşkil eder. İnsan ADH'sı, herbirinin molekül ağırlığı 40-kDa. (Kilo Dalton) olan, iki subunitin oluşturduğu dimerik bir proteindir. Son araştırmalara göre, ADH enzimi, beş sınıf izozim (ADH₁, ADH₂, ADH₃, ADH₄, ADH₅) ve yedi genle ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, \zeta, \eta$) ifade edilmektedir. Polimorfizmin, kodlanmış ADH subunitlerinden beş sınıfın ikisinde olduğu bildirilmektedir (ADH₂, ADH₃).

Polimorfik ADH₂ lokusunda oluşan değişmiş enzim, β_1 subuniti yerine değişmiş β_2 subuniti içeren atipik ADH olarak bilinmektedir. İngilizlerin %5-10'unda, Almanların %9-14'ünde, İsviçrelilerin %20'sinde, Japonların, Çinlilerin ve diğer Asyalıların %85'inde atipik ADH bulunduğu gösterilmiştir. ADH izozimlerinin polimorfik şekillerinin kinetik özelliklerindeki farklılıklar, etanol metabolizmasının in vivo hızında farklılıklara sebep olur ve alkol eliminasyon hızında etnik gruplar arasında gözlenen büyük değişimlerle açıklanabilir(8).



Şekil 2.1: Alkol metabolizması (ADH alkol dehidrogenaz, ALDH asetaldehit dehidrogenaz)



Şekil 2.2: Etanol metabolizması ve karsinogenezdeki rolünü göstermektedir. Etanol çeşitli aldehit dehidrogenaz(ADH)enzimleri, sitokrom P450 2E1(CYP2E1) ve insan gastrointestinal yolunda yaşayan mikroorganizmalar (örneğin;ağız ve kolon)tarafından asetaldehite oksitlenir. Asetaldehit ise öncelikli olarak aldehit dehidrogenaz 2(ALDH2) enzimi tarafından asetata oksitlenir. Okların kalınlığı insanlardaki asetaldehitin oksidasyon oranına işaret etmektedir sırasıyla iki aktif ALDH2*1 alleli, bir aktif ALDH2*1 alleli ve bir inaktif ALDH2*2 alleli, veya iki inaktif ALDH2*2 alleli gösterilmiştir. Kanseri-indükleyen bileşikler alkol metabolizmasının çeşitli yollarında yer almaktadır. Örneğin asetaldehit oldukça yüksek oksijen içeren bileşikler (reaktif oksijen türlerini, ROS) CYP2E1 tarafından oluşturmaktadır ve katımlar asetaldehit veya ROS ile DNA ile etkileşime girmektedir.

2.3.ALKOL BAĞIMLILIĞININ GENETİK VE EPİGENETİK YÖNÜ

Bağımlılık genetiği araştırmaları öncelikle ikiz ve aile çalışmaları ile başlamıştır. Bu çalışmalarla genetik geçişin olduğu, bağımlıların birinci derece akrabalarında, ikizlerinde (özellikle tek yumurta ikizlerinde) bağımlılık oranının yüksek olduğu gösterilmiştir (9).

Modern moleküler genetik teknikleri genel olarak iki ana analiz yöntemi kullanmaktadır. Bunlar bağlantı (linkage) analizi ve ilişki (association) analizi yöntemleridir. Bağlantı analizi, belirlenmiş yatkınlaştırıcılığı olan hastalık lokusunun kromozom lokalizasyonunu ortaya koymak için başvurulanan yöntemdir. İlişki analizleri ise, akraba olmayan hasta bireyler ve kontrol grubu arasındaki farklılıklar üzerinde çalışılarak ilişki arama çalışmalarıdır. Yapılan çalışmaların çoğunu ilişki analizi çalışmaları oluşturmaktadır. Bu çalışmalarda bir hedef gen belirlenmekte ve bu genin farklı polimorfik yapılarına sahip bireyler arasında bağımlılık ve tedaviye yanıt oranları arasındaki fark olup olmadığı incelenmektedir. Hedef gen çalışmalarında doğal olarak bağımlılıkta rol oynayan nörotransmitterleri ve enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfik farklılıklar incelenmektedir. Alkol ve aldehit dehidrogenaz enzimleri, dopaminerjik, GABAerjik, glutamaterjik, opioid, kolinerjik ve serotonerjik sistemle ilgili genlerdeki genetik varyantların olası etkileri yoğun biçimde araştırılmaktadır. Çalışmalarda tek nokta mutasyonun incelenmesi, genlerin ortak etkileri ve birbiriyle olan ilişkilerinin incelenmemesi bu çalışmaların en büyük kısıtlılığını oluşturmaktadır. Ayrıca alanın yeni olması ve teknoloji ile yakından ilişkili olması, sürekli olarak aynı gen üzerinde farklı polimorfik yapıların saptanmasını sağlamakta, bu da daha önce yapılmış ve o genin bağımlılıkla ilişkisini gösteren araştırmaların değerini azaltmaktadır. Çalışmalarda ayrıca bağımlılık şiddetiyle, tedaviye yanıtla, yoksunluk sendromu ve deliryum gibi madde bağımlılığına bağlı ortaya çıkan özgül tablolarla ve birçok değişik bağımlılık ölçütleriyle farklı genetik polimorfizmler arasında bir ilişki olup olmadığı üzerinde durulmaktadır (10,11).

2.3.1 Alkol Bağımlılığının Genetiği

Alkol bağımlılığı konusundaki genetik çalışmalarda en sık olarak bağımlılık gelişmesinde farklı genetik varyantların ne kadar etkili olduğu üzerinde durulmaktadır. Çalışmalarda alkolü metabolize eden enzimler, dopaminerjik, GABAerjik,

glutamaterjik, opioid, kolinerjik, serotonerjik ve diğer yollardaki reseptörler ve taşıyıcılarda saptanan genetik farklılıkların etkileri araştırılmıştır (11).

2.3.1.1. Alkol Dehidrogenaz (ADH) ve Aldehit Dehidrogenaz (ALDH):

Alkolün karaciğerdeki metabolizması ve bu metabolizmadan sorumlu olan ADH ve ALDH enzimlerinin etki düzeneği genel olarak alkolün beyindeki etkilerine göre çok daha nettir (12).

Çalışmalarda ADH1B*2 ve ADH1B*3 alellerinin enzim aktivitesini değiştirdiği gösterilmiştir. Alkol bağımlılarında ADH1B*2 ve ADH1C*2 alellerinin alkol bağımlılarında daha az gözleendiği, ADH1B*2 alelinin alkol içme miktarı ile ilgili olduğu (13),

ADH1B*3 ve ADH1C*2 alellerinin alkol bağımlılığına karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir. Asetaldehidin asetata metabolizmasında rol oynayan ALDH enzimini kodlayan genlerle yapılmış çalışma sayısı daha azdır. ALDH2*2 alelinin varlığı enzim aktivitesinde bozukluğa, bu durumda alele sahip olan bireylerin asetaldehidin toksik etkilerine daha fazla maruz kalmalarına neden olmaktadır. Özellikle bu alelin daha sık gözleendiği Asya toplumlarında genin alkol bağımlılığına karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (14,15). ADH ve ALDH ile ilgili genetik farklılıklar genel olarak alkol bağımlılığı ile ilişkili bulunmuştur.

2.3.1.2. Dopaminerjik Sistem

Alkol bağımlılığında mezolimbik dopaminerjik sistemin çok önemli rol oynadığı bilinmektedir. Dopaminin hem beyin ödüllendirme sistemine etki etmesi, hem de pozitif pekiştirici etkiye katkı sağlaması bağımlılık genetiğinde dopamini en sık çalışılan nörotransmitterler arasına sokmuştur. Bu konudaki ilk çalışma 1990 yılında Blum ve arkadaşları tarafından yapılmış ve bu çalışmada dopamin reseptöründe gözlenen DRD2 TaqI-A1 polimorfizmi ile alkol bağımlılığı arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir (16).

Dopamini metabolize eden enzimler olan dopamin β -hidroksilaz (DBH), katekolamin O-metiltransferaz (COMT) ve monoamino oksidazda (MAO) gözlenen genetik polimorfizmlerle alkol bağımlılığı arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda ise genel olarak negatif sonuçlar elde edilmiştir (17,18).

Çalışmalar alkol bağımlılığı gelişmesinde rol oynayan dopaminerjik sistemle ilgili en olası hedef genlerin DRD2 ve DAT genleri olduğunu göstermektedir.

2.3.1.3.GABAerjik Sistem

GABA merkezi sinir sistemindeki ana inhibitör nörotransmitterdir ve alkolün sedasyon, motor koordinasyon bozukluğu ve yoksunluk gibi birçok davranışsal etkisinden sorumludur(19).

GABAA ve GABAB olmak üzere iki tip reseptörü vardır. Bunlardan GABAA reseptörünün α , β , γ ve δ alt üniteleri vardır ve bu alt ünitelerde gözlenen polimorfizmlerle alkol bağımlılığı arasında ilişki bulunmuştur (20).

GABAA $\alpha 1$ alt ünitesinde gözlenen genetik farklılıklarla alkole erken yaşta başlama ve şiddetli yoksunluk sendromu belirtileri arasında da ilişki bulunmuştur (21).

GABAB ise çok az sayıda araştırmacı tarafından incelenmiş ve olumsuz sonuçlar elde edilmiştir. Reseptörler dışında GABA sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan glutamat dekarboksilaz enziminin sentezinde rol oynayan gende gözlenen genetik polimorfizmlerin de alkol bağımlılığı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (22,23).

Genel olarak GABAerjik sistemle ilgili çalışmalarda elde edilen pozitif sonuçlar, bu sistemin alkol bağımlılığı gelişmesinde etkili olduğu varsayımını desteklemektedir.

2.3.1.4.Glutamaterjik Sistem

Glutamat aminoasit yapılı, merkezi sinir sisteminin ana eksitatör nörotransmitteridir. Eksitatör aminoasit reseptörleri içinde alkole en duyarlı olan glutamat NMDA (N metil D aspartat) reseptörleridir. NMDA'nın beş alt ünitesi vardır ve bunlardan özellikle NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B alt üniteleri alkol tarafından inhibe edilir (24).

Wernicke ve arkadaşları NMDAR1 G2108A polimorfizmi ile şiddetli alkol yoksunluğu arasında ilişki bulmuş, ancak alkol bağımlılığı ile bir ilişki saptamamışlardır. Pastör ve arkadaşları ise, NMDAR2A ve NMDAR2B reseptörlerinin fosforilizasyonunda rol oynayan Fyn tyrosine kinase geninde gözlenen -93A/G polimorfizminde G aleli taşıyanlarda alkol bağımlılığının daha sık gözlemlendiğini bildirmiştir. Bu çalışmalar dışındaki çalışmalarda ise genel olarak negatif sonuçlar bulunmuştur (25-27).

2.3.1.5.Opioid Sistem

Gerek insan, gerekse hayvan çalışmaları alkolün opioidi, özellikle beta endorfin salınımını uyardığını, opioid antagonistlerinin alkol içmeyi azalttığını göstermiştir (28).

Genetik çalışmalarda mu-opioid reseptörünü kodlayan OPRM1 geninde bulunan Asn40Asp (A118G) polimorfizmi araştırılmış ve yaklaşık çalışmanın bir metaanalizde değerlendirilmesi sonucunda bu polimorfizm alkol bağımlılığı ile ilişkisiz bulunmuştur (29).

2.3.1.6.Serotonerjik Sistem

Serotonerjik sistem disregülasyonu, özellikle dürtüsel ve agresif içme davranışı, klinikte sıklıkla alkol bağımlılığının depresyon, anksiyete, ve intihar davranışlarıyla komorbid oluşundan yola çıkılarak ele alınmıştır (30).Serotonin taşıyıcı sistemde gözlenen genetik farklılıklar genel olarak psikiyatride üzerinde en çok araştırma yapılan genetik konulardan biridir. Depresyonla, anksiyete bozukluklarıyla, antidepresanlara yanıtla serotonin taşıyıcı sistemde gözlenen polimorfizmler (5-HTTLPR) arasındaki ilişkiyi gösteren çok sayıda çalışma vardır. Feinn ve arkadaşları, 5-HTTLPR ile alkol yoksunluğu şiddetli ve komorbid psikiyatrik bozukluğu olan alkol bağımlıları arasında ilişki olduğunu, S aleline sahip olanların risk altında olduğunu bildirmiştir (31).

Tüm bu çalışmaların yanında herhangi bir ilişki olmadığını gösteren çalışmalar da vardır. Ülkemizden yapılan çalışmalarda da alkol bağımlılığı ile serotonin taşıyıcı gen polimorfizmi arasında bir ilişki olmadığı bildirilmiştir (32).

Yukarıda söz edilen sistemler dışında nöropeptit Y, galanin, BDNF (brain-derived neurotrophic factor) ve kolinerjik sistemde gözlenen genetik polimorfizmlerle alkol bağımlılığının ilişkisi araştırılmış ve bazı çalışmalarda ilişkili bulunmuştur. Bunların alkol bağımlılığı üzerine etkileri hakkında daha net konuşmak için ileri çalışmalara gereksinme vardır (33).

2.3.1.7.Tüm Genomun İncelenmesi

Genetik çalışmalarda bir ileri aşama, tüm genomun tarandığı ilişkilendirme ve bağlantı çalışmaları oluşturmaktadır. Bu tür çalışmalarla aynı anda 500000 polimorfizm incelenebilmekte, böylece hem daha az sıklıkla rastlanan polimorfizmler saptanmakta, hem de genlerin ortak etkileri değerlendirilebilmektedir. Johnson ve arkadaşları, bir genom taramasında alkol bağımlılığına duyarlılığı artıran çok sayıda genetik

polimorfizm saptamıştır. Ma ve arkadaşları ise alkol bağımlılarında tüm genomu bağlantı analizi yöntemi ile incelemiş ve 12 kromozom bölgesiyle alkol bağımlılığı arasında bağlantı bulmuştur (34-36).

Fakat bu çalışmalara alınan denek sayısının az olması çalışmalarının istatistiksel gücünün düşük olmasına yol açmıştır. Zira tüm genomun incelendiği çalışmalarda yeterli istatistiksel güç için 15000 civarında denek gereklidir.

2.3.1.8.Bağımlılıkta Epigenetik

Son olarak bağımlılık genetiğinde çalışılan alanlardan biri de epigenetik düzeneklerdir. Epigenetik düzenekler DNA kodunda herhangi bir değişiklik olmaksızın metilasyon, asetilasyon ve fosforilasyon gibi düzeneklerle gen aktivitesinin değişmesini içerir. Epigenetiği anlamada en iyi örnek, genetik yapının aynı olmasına karşın vücudun farklı yerlerinde bulunan hücrelerin gösterdiği işlev farklılıklarıdır (37).

Gen ekspresyonunun epigenetik uyarlaması, nörogenetik süreçlerde çevresel etkilere ve organizmanın gereksinimlerine uyum sağlayıcı düzenlemeleri gerçekleştirmektedir. Organizmanın gelişim sürecinde enerjiyi dengeleme ve karşılaştığı stresli koşullara uyum sağlamak üzere geliştirdiği fizyolojik ve davranışsal tepkiler, fenotipi güçlü ve kalıcı bir şekilde etkileyebilmektedir. Epigenetik düzeneklerin beslenme, uyarın düzeyi, toksik maruziyetler gibi çevresel uyarılara oldukça açık olduğu görülmektedir. Beynin uyum kapasitesini aşan stres koşulları bilişsel işlevleri olumsuz etkileyerek patolojik süreçleri başlatabilmektedir (38,39).

Epigenetik düzenekler beslenme, annenin bakım/davranış özellikleri, hormonlar, alkol ve ilaçlar gibi çeşitli çevresel uyarılardan etkilenmektedir. Örneğin beslenme, DNA metilasyonu yoluyla gen ekspresyonunu etkileyebilmektedir (40). Anormal DNA metilasyonu, anormal nöronal işlevle, postnatal ölümle ve azalmış nörogenezisle sonuçlanmaktadır. Son yıllarda, birkaç demetilaz enzimindeki mutasyonun veya aşırı ekspresyonun, kanser ve nörolojik hastalıklarla bağlantılı olduğu saptanmıştır. Örneğin, kokain ve antipsikotik ilaçlar, striatumda H3 histonunun fosfoasetilasyonunu ve H4 histonunun asetilasyonunu indüklemekte ve bu yolla farelerin nükleus akkumbenslerinde HDAC5 fosforilasyonu artmaktadır. Bu artış enzimin translokasyonuna neden olarak gen ekspresyonunu etkilemektedir (41).

Beynin ödüllendirici sistemindeki gen aktivitesinde ortaya çıkan değişiklikler bağımlılığın oluşmasına ve sürdürülmesine etki etmektedir. Bu alandaki çalışmaların çoğu deneysel çalışmalar olup özellikle hayvan modelleriyle yapılmıştır. Bu çalışmalarda özellikle uzun süre maddenin etkisine maruz kalan hayvanlarda BDNF ve Cdk5 gibi genlerde hiperasetilasyon olduğu ve eğer bu modifikasyonlar engellenirse maddeye verilen yanıtın değiştiği gözlemlenmiştir. İnsanlarda yapılan birkaç çalışmada da DNA metilasyonunda artışın alkol bağımlılığı ve aşırme (craving) ile ilişkili olduğu, DNA metilasyonunun alkol dehidrogenaz geninin ekspresyonunu etkilediği, insanlarda da epigenetik düzeneklerin bağımlılık gelişiminde etkili olduğu bildirilmiştir (42).

Epigenetik düzeneklerin bağımlılık patogeneğinde etkili olduğu ile ilgili giderek daha çok kanıt elimize geçmekte, bu da yeni tedavi seçenekleri için umut vermektedir (33).

2.4.FARMAKOGENETİK

İlaç yanıtının bireyler arası değişkenliğinden sorumlu bir çok faktörler arasında yaş, vücut ağırlığı, eliminasyon organlarının hastalıkları, ilacın veriliş yolu, çevresel faktörler, beslenme alışkanlıkları ve ilacın plasebo etkisi bulunmaktadır. Ancak ilaç yanıtının bireyler arası değişkenliğine yol açan daha önemli bir etkenin genetik faktörler olduğu son zamanlarda anlaşılmıştır. Birçok ilacın etkinliği ve toksisitesindeki bireyler arası farklılıklar; ilaç metabolize eden enzimler, transport proteinleri, reseptörler ve diğer ilaç hedeflerinde gözlenen genetik polimorfizmlerle ilişkilidir. Normal bir popülasyonda varyant ya da mutant genlerin %1'den daha sık görülmesine genetik polimorfizm adı verilir. Bu tür polimorfizmlerle ilgili araştırmalar farmakogenetik disiplininin çalışma konuları arasında yer almaktadır. Farmakogenetik; genetik kontrollü farklılıklar sonucu ilaç yanıtında gözlenen bireyler arası değişiklikleri araştıran bir bilim dalıdır. Farmakogenetik çalışmalar sayesinde ilaç dispozisyonu ve etkisindeki bireyler arası farklılıkların kalıtsal doğası hızla aydınlanmaktadır. Bu tür çalışmalar bir yandan yeni ilaç geliştirilmesine katkı sağlarken diğer yandan hastaların genetik yapıları temel alınarak, ilaç dozunun optimal düzeyde uygulanmasına yardımcı olmaktadır. Farmakogenetik alanındaki moleküler çalışmalar, esas olarak sitokrom P450 2D6'nın (CYP2D6) karakterize edilmesi ve klonlanması ile başlamış ve günümüzde 20'den fazla ilaç metabolize edici enzim, ilaç reseptörleri ve çeşitli ilaç transport sistemlerinin de içerisinde bulunduğu diğer insan genlerinin tanımlanmasıyla genişleyerek devam etmektedir (43).

Bu bilim dalından son on yılda evrimleşen farmakogenomik ise insan genomu hakkındaki bilgi artışına dayanarak geleneksel ilaç geliştirme sürecini değiştirmektedir. Polimorfik metabolizma yollarının belirlenmesi yakın bir gelecekte DNA testleri desteğinde kişiye-özel ilaç tasarımına ve dozlarının belirlenmesine olanak verecektir (44).

Ancak, hastaların genotipi ile ilgili bilginin kime ve ne kadar bildirilebileceği etik tartışmalara yol açan bir konudur.

2.5.BİYOTRANSFORMASYON

Biyotransformasyon canlı bir organizmanın bir molekülde kimyasal değişiklikler oluşturma sürecidir. Yağda çözünebilir (lipofilik) ilaçlar biyolojik membranlardan kolaylıkla geçerek etki yerlerine ulaşırlar. Yağda çözünürlük ilacın vücuttan atılımını (eliminasyon) kısıtlar. İlaçların yapısal değişikliğe uğramadan böbrekler yoluyla atılmaları toplam ilaç eliminasyonunda büyük bir rol oynamaz. Çünkü lipofilik maddeler böbreklerde glomerüler filtrasyona uğradıktan sonra büyük oranda renal tübüllerden geri emilirler. Bu nedenle, endojen olarak üretilmeyen, vücuda yabancı, farmakolojik, endokrinolojik veya toksikolojik aktivitesi olan maddeler (ksenobiyotikler) biyolojik aktivitelerinin sonlandırılması ve vücuttan atılmaları için suda çözünme özelliği yüksek hidrofilik maddelere dönüştürülmeleri gerekir. Biyotransformasyon işlevsel açıdan kısaca polarizasyon olarak da tanımlanabilir. Biyotransformasyon reaksiyonları sonucu genellikle vücuttan atılımı kolay olan polaritesi yüksek ve inaktif metabolitler oluşur (detoksifikasyon). Bunun yanı sıra, ilaçlardan inaktif metabolitlerini oluşturan birçok metabolik biyotransformasyon reaksiyonları vücutta sentezlenen (endojen) bileşikler biyolojik aktivitesi olan metabolitlere de dönüştürebilirler (biyoaktivasyon).

Bütün dokularda bir ölçüde metabolik aktivite olmakla birlikte ilaç biyotransformasyonunda rol oynayan enzim sistemlerinin bulunduğu temel yer karaciğerdir. Böbrekler, mide-bağırsak kanalı, deri ve akciğerler de önemli metabolik kapasitesi olan diğer organlardır. İlaç metabolize edici aktivitenin büyük bölümü hücre içi bir organel olan endoplazmik retikulum (ER) ve sitozolda bulunur. Bunun yanı sıra, ilaçlar mitokondri, nükleus membranı ve plazma membranında da biyotransformasyona uğrarlar (45).

2.5.1.Ksenobiyotik Metabolizma Enzimleri

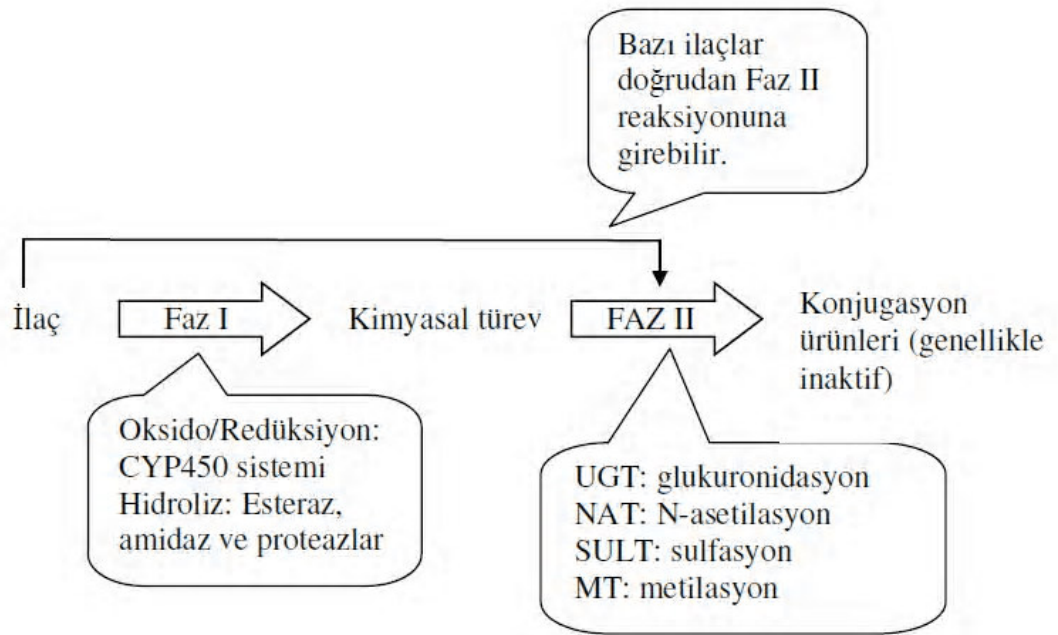
Ksenobiyotik-metabolizma enzimleri organizmanın korunmasından sorumludur. Ksenobiyotikler hızlı ve kolay kimyasal işlemler ile tepkimeye girmeyen yan ürünlere dönüştürülür ve böylelikle idrar veya safra yoluyla vücuttan kolaylıkla elimine edilirler.

Detoksifikasyon yanı sıra, aynı zamanda protoksinlerin ve pro-kanserojenlerin metabolik aktivasyonu ile kimyasalların toksisitesine oldukça sık aracılık ederler, yani onlarında kimyasalların neden olduğu hastalıklar ve kansere bireysel yatkınlıkta bir rolleri olduğu düşünülmektedir. Ksenobiyotik metabolizmasında ve transformasyon reaksiyonlarında karaciğer temel organdır. Bu olay Faz I ve Faz II reaksiyonları olarak isimlendirilen iki farklı aşamada gerçekleşir (44).

Faz I reaksiyonlarında yer alan enzimler özellikle Endoplazmik Retikulum'da(ER) bulunurlar. Faz II konjugasyon enzim sistemleri ise çoğunlukla sitozoliktir. ER'de bir faz I reaksiyonu ile biyotransformasyona uğrayan bir ilaç aynı hücrenin sitozolik fraksiyonunda konjuge olur.

Faz I reaksiyonları; ana bileşiğe ya işlevsel bir grup ekler ya da ana bileşikteki işlevsel bir grubu maskeler. Faz I reaksiyonları genellikle farmakolojik aktivitenin kaybolmasına neden olmakla beraber ilaç aktivitesinin gecikmesine ya da artmasına da neden olabilir. Faz I biyotransformasyon ürünleri hızla idrar içine atılmazlarsa endojen bileşiklerle reaksiyona girerek suda çözünürlüğü çok yüksek olan konjugatları oluştururlar. Seyrek olarak, metabolizma sonucu ilacın farmakolojik aktivitesi değişebilir.

Faz II konjugasyon reaksiyonları; ana bileşikteki işlevsel grubun kovalent bağ ile glukuronik asit, asetat, sülfat, glutatyon veya aminoasit bağlanmasına neden olur. Polaritesi yüksek olan bu konjugatlar genellikle inaktif olup idrar ya da feçez ile vücuttan atılırlar(ancak, morfinin glukuronid metaboliti morfinden daha etkilidir) (45).



Şekil 2.3: İlaç metabolizmasının iki fazı (CYP450, sitokrom P450; UGT, Uridin difosfat glukuronosiltransferaz; NAT, N-asetiltransferaz; SULT, sulfotransferaz; MT, metiltransferaz)(10).

İlaç metabolizmasındaki enzimlerin çoğu türler arasında ifade farklılıkları göstermektedir, son derece polimorfiktirler ve ilaç yanıtındaki bireylerarası değişiklikten sorumludur (46).İlaç metabolizma sisteminin en önemli bileşenleri Sitokrom P450'lerdir. Birçok ilaç veya ksenobiyotikler karaciğerde ilk olarak bu enzimle karşılaşır. Dokular homojenize edildikten sonra kademeli olarak değişik hızlarda santrifüj edilirse ER parçalanır ve membran parçaları mikrozom adı verilen mikrovezikülleri oluştururlar. ER'de bulunan ilaç metabolize-edici enzimlere bu nedenle mikrozomal enzimler adı verilir. Faz I reaksiyonlarında yer alan enzimler özellikle ER'de bulunurlar. Faz II konjugasyon enzim sistemleri ise çoğunlukla sitozoliktir. ER'de bir faz I reaksiyonu ile biyotransformasyona uğrayan bir ilaç aynı hücrenin sitozolik fraksiyonunda konjuge olur.

2.5.2.İlaçların Biyotransformasyonlarını Etkileyen Faktörler

Biyotransformasyon reaksiyonlarının düzenlenmesinde genetik, çevresel ve fizyolojik faktörler rol oynarlar. Genetik olarak belirlenmiş farklılıklar, ilaçların birlikte kullanımı, çevre kirliliği ve endüstriyel kimyasallarla etkileşim, hastalık durumu, yaş ve beslenme durumu ilaçların oksidasyon ve konjugasyonlarını etkileyen önemli faktörlerdir. Bu faktörler ilaçların etkilerinde artış, farmakolojik etkilerde uzama ve toksik reaksiyonlarda artışa neden olabilir.

2.5.2.1.İndüksiyon

Bazı ilaçlar ve çevre kirliliği ile etkileşim sonucu CYP450 enzim sentezinde artış (ya da degradasyonlarında azalma) olur. Bu olaya mikrozomal enzim indüksiyonu adı verilir. CYP450 enzim sistemi kimyasal maddeler tarafından en çok indüklenen enzim sistemidir. Bu enzim indüksiyonu biyotransformasyon hızını artırarak ana ilacın vücuttaki miktarını azaltır. Reaktif bileşiklere dönüşen ilaçlar için indüksiyon toksisitede artışa neden olabilir.

Bazı durumlarda bir bileşik başka bir bileşiğin biyotransformasyonunu indükleyebildiği gibi kendi metabolizmasını da indükleyebilir. Otoindüksiyon olarak tanımlanan bu mekanizma bir antikonvülsan ilaç olan karbamazepin ile görülmüştür. Mikrozomal olmayan enzimlerde de indüksiyon görülebilir (sitoplazmada gerçekleşen hepatik alkol dehidrogenaz enziminin indüksiyonu gibi).

İki şekilde gerçekleşir;

- Enzim sentezinin artışı (mRNA, transkripsiyon artışı)
- Enzim yıkılımının azalması (mRNA veya sentezlenmiş proteinin degradasyonunun azalması).

2.5.2.2.İnhibisyon

Biyotransformasyonu inhibe edilen ilacın konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak farmakolojik etkileri uzar ve ilacın neden olduğu toksik reaksiyonlarda artış görülür. İki ya da daha fazla ilacın biyotransformasyonunda işlev gören bir enzimin aktif bölgesi için yarışan iki ilaçtan birinin metabolizması artarken diğerininki azalır. Bu durum, ilaçların bağıl konsantrasyonları ve enzimdeki bağlanma yerine karşı olan afiniteleri ile ilişkilidir.

İki şekilde gerçekleşir;

- Basit kompetitif inhibisyon: İlaç-ilaç farmakokinetik etkileşimi ile oluşur.

Aynı enzim tarafından metabolize olan iki ilaçtan aktif bölgeye afinitesi yüksek olan “kazanır”.

- Mekanizma-tabanlı inhibisyon (intihar inhibisyonu): İnhibitör ilaç, enzime bağlanan reaktif bir bileşiğe metabolize olarak enzimi geri dönüşümsüz olarak bloke eder. (eritromisin-CYP3A4) (45).

CYP enzimlerinin inhibisyonu ilaç-ilaç etkileşimlerinin en zararlı sonucudur ve bu yüzden geçen yıllarda birkaç ilaç piyasadan kaldırılmıştır. Özellikle ön-ilaçlarda, inhibisyon aktif ilaç formunun miktarındaki azalmayla sonuçlanabilir. Böylece CYP'lerin inhibisyonu bir ilacın etkinliğindeki azalma veya toksisiteye neden olabilir(47).

2.5.2.3.Genetik Polimorfizm

Organizmada aynı gen üzerinde birden fazla fenotip ve allel bulunmasıyla oluşan monogenik özelliktir. Az görülen allelin sıklığı genellikle %1'den fazladır. Polimorfizmler genellikle herhangi bir hastalığa veya üreme etkinliği gibi problemlere sebep olmaz (44).

Polimorfizm bir toplum içindeki bireylerin bir ilacı belirli bir mekanizma ile metabolize etme yeteneklerinde farklılıklara yol açan önemli bir faktördür. İlaç biyotransformasyonuna ilişkin genetik polimorfizm ilk defa 30 yıl önce tüberküloz tedavisinde kullanılan izoniazid adlı ilacın N-asetilasyonu için tanımlanmıştır. Polimorfik olarak kontrol edilen mekanizmalar aracılığı ile atılan ilacın miktarındaki bireysel farklılıklar bu kişilerin metabolizmalarının “hızlı” ya da “yavaş” olarak tanımlanmasına yol açar. Bazen bu bireysel metabolizma hızları arasında on kattan fazla farklılık görülebilir. Doğal olarak metabolizması yavaş kişilerde söz konusu ilacın istenmeyen yan etkilerinin yanı sıra toksik reaksiyonların oluşum sıklığı da artar. Günümüzde artık ilaç yanıtındaki bireysel farklılıkların kalıtsal temelleri incelenmektedir (45).

Yavaş ya da hızlı N-asetilleyici polimorfizminden sorumlu olan NAT2 geni sigara içiminden veya çevresel toksik ajanlardan kaynaklanan mesane kanseri riskinin artışı ile ilişkili bulunmuştur. Bireylerde debrizokin spartein ilaç oksidasyonunun zayıf veya yaygın oluşundan sorumlu olan CYP2D6 genindeki farklılık ise gastrointestinal, karaciğer ve akciğer kanseri oluşum riski ile ilgili görülmektedir. Etanol ve nikotin metabolizmasından sorumlu olan ALDH2 ve CYP2D6 polimorfizmleri alkol, sigara ve ilaç bağımlılığı toplumsal alışkanlıklarda yaygın sorunlara yol açabileceği için önemlidir (45).

2.5.2.3.1.Enzim Polimorfizmlerinin Moleküler Temeli

Genetik polimorfizmlerin gen ürünlerinin veya ilgili enzimin katalitik aktivite ifadesini etkileyebilen bazı temel yollar aşağıda özetlenmiştir:

- (a) Genin kodlanan bölgesindeki nükleotid değişimleri amino asit değişimiyle sonuçlanır; enzim aktivitesi veya substrat bağlanması değişir (*CYP2D6*).
- (b) Kodlanan bölgedeki delesyonlar inaktif bir enzime veya yetersiz protein sentezine yol açabilir (*CYP2A6*, *CYP2D6*, and *GSTM1*).
- (c) Kodlanmayan bölgedeki polimorfizmler temel enzim ekspresyonunu ve indüklenmesini içeren transkripsiyonel kontrol elementlerini etkiler (*CYP1A1*).
- (d) Bir genin poliadenilasyon sinyalindeki değişimler, transkriptin yarılanma süresini ve böylece enzimin miktarını etkiler (*NAT1*).
- (e) Gen amplifikasyonu enzimin miktarını artırır (*CYP2D6*).
- (f) Polimorfik genlerin kompleks etkileşimleri ve/veya onların enzimleri ürünü katalizleyebilir (örneğin *GSTM1*-eksik bireyler veya hücreler, muhtemelen indüklenen bileşiklerin daha çok biyoayarından dolayı *CYP1A1* ve *1A2*'yi daha çok indükleyebilir) (48).

2.5.2.4.Hastalık durumu

Hepatit, alkolik karaciğer hastalığı, biliyer siroz (safra kanalı tıkanıklarına bağlı olarak gelişen siroz), yağlı karaciğer hastalığı ve hepatokarsinoma (karaciğer kanseri) gibi normal karaciğer fonksiyonlarının bozulduğu durumlarda hepatik ilaç biyotransformasyonu değişebilir. Sitokrom P450 enzim aktivitesi ve hepatik eliminasyonun düzeyi karaciğerde doku yıkımının şiddetine bağlı olarak azalır. Kalp yetmezliği veya adrenerjik reseptör blokajı gibi karaciğer kan akımında azaltan etkenler hepatik biyotransformasyonu azaltır.

2.5.2.5.Yaş

Reaksiyon hızları yetişkinlere oranla daha düşük olmakla birlikte yenidoğan bebeklerde Faz I biyotransformasyon reaksiyonları etkin bir şekilde katalize edilebilir. Yaşlanmaya bağlı olarak karaciğer kitlesinin, hepatik enzim aktivitelerinin ve hepatik kan akımının azalması yaşlılarda genel olarak karaciğerin metabolik kapasitesini azaltır.

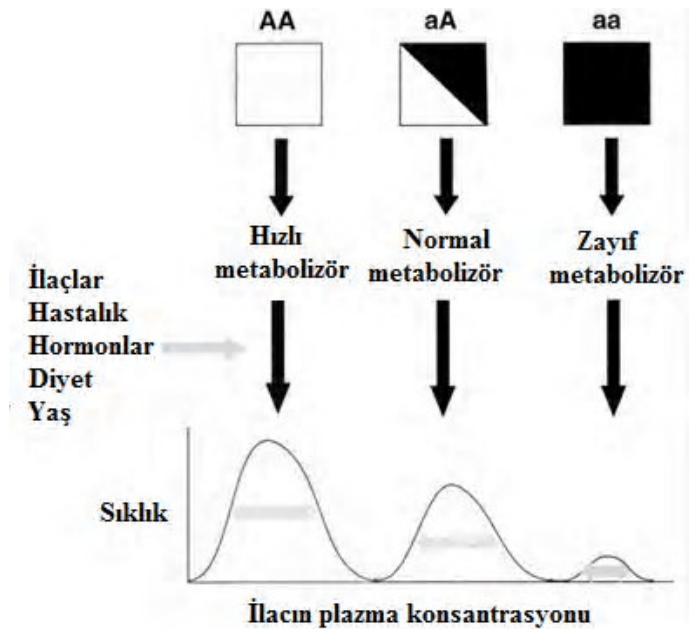
2.5.2.6.Cinsiyet

Östrojen ve benzodiazepinlerin oksidasyon düzeylerinin kadınlarda erkeklere oranla daha düşük görülmekle birlikte ilaç biyotransformasyonunda cinsiyetin etkisine ilişkin henüz bir genelleme yapılamamaktadır.

2.5.2.7.Beslenme

Beslenmeyle ilgili aşağıdaki durumların ilaç metabolizmasını etkilediği belirlenmiştir:

- 1) Protein eksikliği.
- 2) Esansiyel yağ asitlerinden yoksun yağsız diyet.
- 3) Aşırı şeker tüketimi.
- 4) A vitamini, riboflavin, askorbik asit ve E vitamini eksikliği.
- 5) Kronik alkol tüketimi (karaciğerde monooksijenaz ve sitokrom P450 enzim miktarlarını artırır. İlaçların plazmadan uzaklaştırılması da artar)
- 6) Akut alkol tüketimi (İlaç metabolizmasını inhibe eder. Başta santral sinir sistemi depresanları olmak üzere birçok ilacın etkisi uzar ve kuvvetlenir).



Şekil 2.4: İlaç metabolizma enzimlerinin aktivitelerinin belirlenmesinde genetik ve epigenetik faktörler arasındaki etkileşim. A, yabancıl tip allel; a, mutant allel; eğrilerin içindeki gri oklar epigenetik faktörlerle değişimi belirtmektedir.

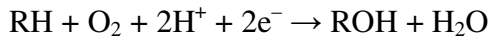
2.5.2.8.İlaçlararası metabolik etkileşimler

İki ya da daha fazla sayıda ilacın birlikte kullanılması sıklıkla bu ilaçlardan birinin vücuttan atılımını etkiler. İlaç etkileşimleri absorpsiyon, proteinlere bağlanma ve idrar ile atılımda değişikliklere yol açmakla beraber biyotransformasyon üzerine olan etkileri genellikle daha belirgindir. Aynı enzimle metabolize edilen bir ilaç diğ erinin biyotransformasyonunu azaltır ya da arttırabilir (45).

2.6.SİTOKROM P450 SİSTEMİ

Sitokrom P450 (CYP) geniş ve farklı grup enzimlerden oluşan bir süper ailedir. Sitokrom P450 gen ailesinin kökeni 3.5 milyar yıl öncesine uzandığı ileri sürülmektedir. CYP enzimlerinin çoğunun fonksiyonu organik substratların oksidasyonla katalizlenmesidir. CYP enzimlerinin substratları ilaçlar ve diğ er toksik kimyasallar gibi ksenobiyotik substratların yanı sıra lipidler ve steroid hormonların aracılık ettiğ i metabolitleri de içerir.

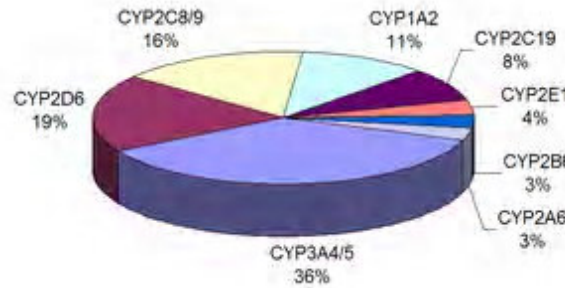
Sitokrom P450 tarafından katalizlenen en yaygın reaksiyon monooksijenaz reaksiyonudur, bir oksijen atomu organik substrata(RH) eklenirken diğ er oksijen atomu suya indirgenir:



CYP'ler bir heme-kofaktör içeren protein süper ailesine ait olduğı için hemoproteinler olarak ta isimlendirilirler. CYP'ler enzimatik reaksiyonlarda çeşitli küçük ve geniş molekülleri substrat olarak kullanırlar. Çoğu kez çok bileşenli elektron transfer kanalları şeklini alırlar ve P450-içeren sistemler olarak isimlendirilir. CYP hücresel (cyto) yerleşimi ve spektrofotometrik (heme demir şekline karbonmonoksit (CO) eklenerek indirgendiğ inde P450 enzimleri yaklaşık 450 nm dalga boyunda ışığı absorblar ve karakteristik olarak tanımlanabilir) karakteristiklerinden (chrome) temel alınarak isimlendirilmiştir. CYP enzimleri tüm yaşamların (hayvanlar, bitkiler, mantar, bakteri vs) krallığı olarak tanımlanmıştır. 11500 den fazla CYP proteini bilinmektedir. Sitokrom P450 enzimleri CYP genleri tarafından şifrelenir. İnsanda 57'den fazla gen ve 59 pseudo gen tanımlanmıştır. Bu genler 18 aile ve 43 alt aile'den oluşmaktadır. CYP'lerin isimlendirilmesinde öncelikle bir numara bulunur, bu numara gen ailesini belirtir. Sonrasında verilen büyük harf genin alt ailesi, sonrasındaki numara ise geni belirtir (Örneğ in CYP2D6) (49).

Bir hücrede birbirinden farklı CYP450 enzimleri de bulunabilir. CYP450 multigen familyası için her bir enzimi oluşturan proteinin yapısında bulunan aminoasit dizi benzerliği kullanılarak standart bir sınıflandırma yapılmıştır. Bütün ilaç biyotransformasyonlarında rol oynayan enzimlerin çoğunu sitokrom *P450 1, 2 ve 3 gen* familyaları (*CYP1*, *CYP2* ve *CYP3*) kodlar. Diğer CYP450 familyalarının gen ürünleri steroid ve yağ asitleri gibi endojen bileşiklerin metabolizmasında önemlidir. CYP450 proteinleri arasında substrat özgüllüğünün (spesifisite) kısmen düşük olması nedeniyle sözkonusu bir reaksiyonu iki ya da daha fazla enzim katalize edebilir.

Sayıları gittikçe artan çevresel kimyasallar, besin zehirleri ve ilaçların metabolizmalarına uyum sağlamak için P450 enzimleri zaman içinde farklılaşmışlardır. Bu farklılaşma sonucu oluşan enzim süperfamilyası çok çeşitli oksidasyon reaksiyonlarını katalize ederler ve kimyasal yapısı farklı olan substratlara karşı da aktivite gösterirler. Sitokrom P450 enzimleri **hem** grubu taşıyan ve çeşitli dokularda düz (pürüzsüz) endoplazmik retikulumda lokalize olmuş membran proteinleridir (45,50-52).



Şekil 2.5:CYP'lerin farklı ailelerinin ilaç metabolizmasındaki oranları.

Sitokrom P450 enzimleri pratik olarak tüm dokularda bulunmakla birlikte en yüksek miktarda ve en geniş sayıdaki bireysel CYP şekli karaciğerde bulunur. CYP'ler ayrıca bağırsak, akciğer, beyin, adrenal bezler, gonadlar, kalp, nazal ve trakeal mukoza ve deride bulunurlar. İnsan karaciğerindeki CYP enzimleri toplam mikromozomal proteinlerin yaklaşık %2 sini içine alır. Şu anda kullanılan ilaçların yaklaşık %70'inin tasfiyesinde temel yol metabolizmadır. Yetişkin insan karaciğerindeki CYP lerden 10 tanesi tüm CYP-aracılı metabolizmaları gerçekleştirir. Birçok ilacın biyotransformasyonunda rol oynayan CYP3A4 karaciğer dışında da belirgin düzeylerde

sentezlenir. Günümüzde mide-bağırsak kanalında CYP3A4 tarafından gerçekleştirilen metabolizma birçok ilacın oral biyo ayarlanımını azaltan belirgin bir faktördür. Asya popülasyonunun küçük bir kısmında karaciğerdeki CYP3A5 nisbeten yüksek miktarda bulunur, CYP3A7 ise fetal bir enzimdir. En çok bulunan ikinci enzim ise CYP2D6'dır ve o da birçok ilacın metabolizmasına aracılık eder.

CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 ve CYP3A4 birlikte bilinen oksidatif ilaç metabolizma reaksiyonlarının %90'dan fazlası için sorumludurlar (45,47,53).

CYP substratları olan ksenobiyotiklerin ayrıntılı listesi internet sitesinde (<http://medicine.iupui.edu/flockhart>) ayrıntılı olarak bulunmaktadır. CYP enzimlerini şifreleyen genler çok polimorfiktirler. Birçok çalışmada özgün CYP genlerinin birkaç varyant allelinin fonksiyonel olarak yetersiz enzimleri şifrelemektedir. Buna başlıca örnek CYP2D6'dır. CYP2D6'nın substratı olduğu bir ilaç, örneğin dextromethorphan, yetersiz enzim fenotipli bireylere verildiği zaman ilacın yüksek serum konsantrasyonlarından dolayı yan etkilerle karşılaşılabilir. Diğer yönden, CYP 2D6 geninin çok kopyasını bulunduran bireylerde (ultra rapid metabolizör) ilaç ilk girişte metabolize olacağı için yetersiz klinik cevap alınacaktır. Böylece hastalara ilaç tedavisi uygulamadan önce CYP2D6 ve diğer ilaç metabolizma genlerine genotipleme yapılması yararlı olabilir. Buna rağmen bu tip bir genetik bilginin pratikte uygulanması bireysel ilaç tedavisi gerçeğinden önce bazı engellemelerle karşılaşılmaktaydı (54). CYP sistemiyle tasfiye edilen ilaçların çoğu CYP'nin birkaç şekli aracılığıyla metabolize edilir. Genel kural ilaçların tek bir CYP formu tarafından metabolize edildiği şeklindeyken ilaç etkileşimlerinde ilaçlar birçok CYP formu tarafından metabolize edilmektedir. Araştırmalar için, ideal bir markır (prob) ilaç tek bir CYP formu tarafından metabolize edilmesi gereklidir. FDA ilaç etkileşim çalışmalarından bir rehber yayınlamıştır. Bu rehberde klinik ilaç etkileşim çalışmalarında kullanılan substratlar, inhibitörler ve indükleyicilerden örnekler verilmektedir.

2.6.1.CYP1 Ailesi

CYP1A2 CYP 1 ailesinin tek hepatik üyesidir. CYP1A1 ve CYP1B1 bu ailenin diğer enzimleridir. CYP1A1 insanda en büyük ekstrahepatik CYP formudur. CYP1B1'in hepatik ekspresyonu hayalidir, ancak neredeyse diğer tüm dokularda eksprese olduğu bilinmektedir. Bu ailenin tüm üyelerinin AhR-reseptörü tarafından düzenlendiği bilinmektedir. Detoksifikasyonun yanı sıra, CYP1 ailesi üyeleri sıklıkla polisiklik

aromatik hidrokarbonların (PAH) ve aromatik aminlerin metabolik aktivasyonundan sorumludur, bu yolla kimyasal karsinogenezle ilişkilidirler (55,56).

CYP1A1 ve CYP1A2 genleri açık okuma çerçevesi içermeyen 23kilobaz'lık segmentle birbirinden ayrılmaktadır.CYP1A1 ve CYP1A2 genleri zıt yerleşimli ve 5' düzenleyici bölgesi iki gen arasında ortaktır. CYP1A1 ve CYP1A2 sekanslarının analiziyle ksenobiyotik cevap elementlerinin (XREs) mevcudiyeti tanımlanmıştır. Her iki genin de 5' ucunda tüm XRE'lerinin bulunması CYP1A1 ve CYP1A2 genlerinin ekspresyonlarının kontrolünde bilinen düzenleyici elementlerden olduğunu öne sürmektedir (57).

2.6.1.1.CYP1A2

Sitokrom P450 1A2 (CYP1A2), karma fonksiyonlu oksidaz sistemi sitokrom P450 üyesi, vücutta ksenobiyotiklerin metabolizmasına katılır. İnsanlarda, CYP1A2 enzim CYP1A2 gen tarafından kodlanır. CYP1A2 ekspresyonu çeşitli besin bileşenleri ile uyarılmaktadır. Sitokrom P450 proteinleri birçok reaksiyon içeren ilaç metabolizması ve kolesterol, steroid ve diğer lipidlerin sentezini içeren birçok reaksiyonu katalizleyen monooksijenazlardır. CYP1A2 ER'de yerleşmiştir ve PAH (bazıları sigara dumanında bulunur) tarafından indüklenerek ifade edilir. Enzimin endojen substratı bilinmemektedir; ancak, bazı PAH'lerden kanserojen araçlara kadar metabolize edebilmektedir. Bu enzimin diğer ksenobiyotik substratlarına kafein, alfatoksin B1 ve asetaminofen dahil edilebilir.

Başlangıçta CYP1A2'nin ekspresyonunun karaciğerle sınırlı olduğu düşünülmekteydi, fakat son çalışmalar göstermiştir ki CYP1A1 ile birlikte akciğerde de eksprese olmaktadır (58). CYP1A2'nin sekansı ve organizasyonu insan kromozomunun 15q24.1 bölgesinde belirlenmiştir. İnsan CYP1A2 geninin yaklaşık 7.8 kb ve 7 eksondan oluştuğu bildirilmiştir. İlk ekson kodlanmayan eksondur (59). Bu genin transkripti 3 'çevrilmeyen bölgede direk tekrarlar yanında dört Alu sekansı da içerir (60,61).CYP1A2'de yaygın bireylerarası varyasyona rağmen, sistematik sekanslama çabaları ile prediktif CYP1A2 polimorfizmleri bildirilmemiştir. Fakat son ikiz çalışmaları CYP1A2 fonksiyonundaki genetik faktörlerin güçlü rolünü ileri sürmüşlerdir(62,63). Bugüne kadar oniki CYP1A2 varyant allel bildirilmiştir. Bu varyantlar arasında CYP1A2 geninin promotor bölgesinde -2964 pozisyonundaki G→A mutasyonu (*CYP1A2*1C*) Japon sigara içenlerde kafein-3-demetilasyon oranında

ölçüldüğünde CYP1A2 indüklenmesinde önemli bir azalmaya neden olmaktadır. Ayrıca, intron 1'de 734. pozisyonundaki C→A mutasyonu (*CYP1A2*1F*) artmış CYP1A2 indüklenmesiyle ilişkilendirilmektedir (64).

2.6.1.2.1 CYP1A2'nin Substrat ve İnhibitörleri

CYP1A2 yapısal olarak önemli planar poliaromatik amid ve amin gruplarının ait olduğu birçok önemli sayıdaki kimyasalın metabolizmasında en büyük enzimdir (65)(Tablo1'de listelenmiştir).

İlaçların işlenmesi yolağındaki azalma yetisinde ilaçlara atfedilen inhibitörler eş yönetim ile metabolik yolakta listelenen ilaçların metabolizma oranı azalacağından toksisite ihtimali artacaktır.

İndükleyiciler bir yolakta ilacın aktivitesini artırır. Eş yönetim belirtilen yolak aracılığıyla metabolize edilen ilaçların atılım oranını artırır, ilacın etkinliğini azaltır.

Kafeinin metabolizmasının çoğu ve bu substrat probun mükemmel toleritesinde CYP1A2'nin baskın rolünden dolayı in vivo fenotiplleme de kafein metabolizması 'altın standart' olarak kabul edilmektedir (66).

Tablo 2.1:Sitokrom p450 1A2 aracılığıyla aktive olan veya deaktive olan ilaçlara atfedilen substratlar,inhibitörler ve indükleyiciler gösterilmiştir.

SUBSTRATLAR		
Acetaminophen	Gregafloxacin	Ropinirole
amitriptyline	haloperidol	Ropivacaine
caffeine	Imipramine	R-warfarin
chlordiazepoxide	Melatonin	Tacrine
Chloropromazine	Mesoridazine	tamoxifen
Clomipramine	Mexiletine	theophylline
Clozapine	Mibefradil	Thioridazine
cyclobenzaprine	Mirtazapine	Thiothixene
Dacarbazine	naproxen	Toremifrene
diazepam	olanzapine	Trifluoperazine
duloxetine	Ondansetron	Verapamil
estrogens	Perphenazine	Ziprasidone
Fluphenazine	Phenacetin	Zolmitriptan
Flutamide	Propafenone	Zolpidem
Fluvoxamine	Propanolol	
Frovatriptan	Riluzole	

Tablo 2.1:Sitokrom p450 1A2 aracılığıyla aktive olan veya deaktive olan ilaçlara atfedilen substratlar,inhibitörler ve indükleyiciler gösterilmiştir. (Devamı)

İNHİBİTÖRLER			İNDÜKLEYİCİLER		
Anastrozole	isoniazid	Phenacetin	Broccoli	Chronic smoking	Moricizine
caffeine	Lidocaine	Propafenone	Brussel spouts	Clarithromycin	Omeprazole
Cimetidine	Lomefloxacin	Ranitidine	Cabbage	Erythromycin	Phenobarbital
Ciprofloxacin	Mexiletine	Rifampin	caffeine	Esomeprazole	phenytoin
Enoxacin	Mibefradil	Ropinirole	carbamazepine	griseifulvin	Rifampin
Fluphenazine	Nelfinavir	Sparfloxacin	Cauliflower	Insulin	Ritonavir
Flutamide	Norfloxacin	Tacrine	Charbroiled foods	Lansoprazole	
Fluvoxamine	Ofloxacin	Ticlopidine			
Grapefruit juice	Oral contraceptives	Verapamil			
Grepafloxacin	Perphenazine	Zafirlukast			

2.6.2.CYP2 AİLESİ

İnsan CYP2 ailesi oldukça çeşitlidir ve birçok önemli ilaç-metabolizma CYP'sini içermektedir. Bu ailenin üyeleri herhangi yaygın düzenleyici şekilleri yoktur. Substrat spesifitesi ve doku ekspresyonu çok çeşitlidir. CYP2B6, CYP2D6 ve CYP2E1 ailenin en fonsiyonel enzimleridir, CYP2A'nın iki ve CYP2C'nin dört fonsiyonel üyesi vardır. Klinik olarak en önemli CYP polimorfizmleri CYP2 ailesi içerisinde bulunur (örn;CYP2C9, CYP2C19 ve CYP2D6) (67).

2.6.2.1.CYP2D6

CYP2D6 enzimi ile ciddi psikiyatrik hastalıklar ve antipsikotiklerin yan etkileri arasında bir ilişki olabileceğini belirten çalışmalar vardır. 1970'lerin sonlarında debrisoquine ve sparteinin oksidasyonunda bireylerarası farklılıkların karakterizasyonu, CYP2D6 farmakogenetik beklentiyle en çok çalışılan CYP olmuştur (68). CYP2D6 497 amino asitlik bir proteindir ve 22 numaralı kromozomun uzun kolunda yer alan (22q13.1) yaklaşık 4.5 kb uzunluğundaki CYP2D6 geni tarafından kodlanmaktadır(68).CYP2D6'nın kopya sayısı, varyasyonları tanımlanmış ve sabit bir şekilde kalıtıldığı bildirilmiştir. Enzim aktivitesini kaybetmiş, azalmış, normal ve ultra hızlı olan 63 polimorfik allel tanımlanmıştır. Farklı CYP2D6 allellerinin sıklıkları ve fonsiyonel sonuçları büyük oranda belirlenmiştir.CYP2D6*4 ve CYP2D6*5 null allellerdir şifreledikleri enzim fonsiyonel değildir(49). CYP2D6 içerisindeki genetik polimorfizmler CYP2D6'nın enzim aktivitesinde klinik olarak önemli ve geniş sonuçlar içerir (62,69,70).

Tablo 2.2: CYP2D6 varyant allelleri ve enzim aktiviteleri belirtilmektedir.

CYP2D6 allel ve enzim aktivitesi	
Allel	CYP2D6 aktivitesi
CYP2D6*1	Normal
CYP2D6*2	Artmış
CYP2D6*3	Yok
CYP2D6*4	Yok
CYP2D6*5	Yok
CYP2D6*9	Azalmış
CYP2D6*10	Azalmış
CYP2D6*17	Azalmış

CYP2D6 enziminin etkinliği tam bir yetersizlik halinden çok hızlı (ultra) etkinlik arasında geniş bir değişkenlik göstermektedir. Bireyler, CYP2D6 etkinliği bakımından yavaş, orta, hızlı ve ultrahızlı olmak üzere başlıca dört farklı sınıfa ayrılmaktadır (66).

-Yavaş metabolizör; bu bireyler çok az veya hiç CYP2D6 fonksiyonu göstermezler.

-Orta metabolizör; bu bireyler ilaçları zayıf ve hızlı metabolizörler arasındaki oranda işlev görürler.

-Hızlı metabolizör; bu bireyler normal CYP2D6 fonksiyonuna sahiptir.

-Ultra hızlı metabolizer; Bu bireyler CYP2D6 geninin birden fazla kopyasını eksprese ederler ve bu yüzden normalin çok üstünde CYP2D6 fonksiyonu vardır.

CYP2D6'nın mevcut fenotipleri etnik gruplar arasında geniş farklılıklar vardır. Doğu toplumlarında zayıf metabolizör fenotip görülmemektedir, ultra hızlı metabolizör fenotip ise bazı Araplarda ve Doğu Afrika toplumlarında sıklıkla görülmektedir. Kafkaslar yaklaşık %7 ve %5,5 oranında sırasıyla zayıf metabolizer ve ultra hızlı metabolizer olarak tanımlanmıştır (62, 71, 72).

Avrupa toplumlarında CYP2D6 enzim etkinliği bakımından bireylerin %2-10'unda tam bir yetersizlik durumu söz konusudur. CYP2D6 eksikliği olan bireylerde, bu enzimle metabolize edilen ilaçlar daha yavaş metabolize edilmektedir. Dolayısıyla ilaçların etki süreleri uzamaktadır ve toksik etkiler ortaya çıkabilmektedir. Toplumumuz için yavaş metabolizör fenotip sıklığı %3.4 olarak bulunmuştur (73). Moleküler genetik yöntemler kullanılarak Avrupa toplumları için en sık gözlenen yavaş metabolizör alellerinin araştırıldığı bir çalışmada ise yavaş metabolizör sıklığı yaklaşık olarak %1.5-2 olarak

saptanmıştır (74). İlginç olarak aynı çalışmada CYP2D6 gen duplikasyonu, yani ultrahızlı bireylerin sıklığı yaklaşık olarak %8 olarak bulunmuştur. Oysa Avrupa toplumlarının çoğunda bireylerin yaklaşık %1-2'si ultra hızlı, %7'si ise yavaş CYP2D6 etkinliğine sahiptir. Ultrahızlı bireylerde, CYP2D6 ile metabolize edilen ilaçlar terapötik dozlarda uygulandığında etkisiz kalabilmekte ve etkin tedavi için çok daha yüksek dozların uygulanması gerekmektedir.

CYP2D6'nın önemi antiaritmikler, antihipertansifler, β blokörler, monoamin oksidaz inhibitörleri, morfin türevleri ve psikiyatrik hastalıkların tedavisinde sıkça kullanılan antipsikotikler ve trisiklik antidepresanlar gibi önemli ilaç gruplarını metabolize etmesinden kaynaklanmaktadır (67).

2.6.2.1.1.CYP2D6'nın Substrat ve İnhibitörleri

Tablo 2.3:Sitokrom P450 2D6 aracılığıyla aktive olan veya deaktive olan ilaçlara atfedilen substratlar, inhibitörler ve indükleyiciler gösterilmiştir.

Substratlar	İnhibitörler	İndükleyiciler
İ majör: <u>beta-blockers</u> metoprolol carvedilol timolol <u>debrisoquine</u> (antihypertensive) <u>Class I antiarrhythmics</u> flecainide lidocaine propafenone encainide mexiletine All tricyclic antidepressants, e.g. • imipramine • amitriptyline • etc. ☐ Most SSRIs (antidepressant), e.g. • fluoxetine • paroxetine ☐ venlafaxine (SNRI antidepressant) ☐ opioids • codeine • tramadol • oxycodone ¹⁹ antipsychotics, e.g. • haloperidol • risperidone • perphenazine • thioridazine • zuclopenthixol • remoxipride • aripiprazole ☐ dextromethorphan (antitussive) ☐ ondansetron (antiemetic) minör: • alprenolol (beta-blocker) • atenolol (beta-blocker) • mianserin (tetracyclic antidepressant) • phenformin (antidiabetic)	☐ güçlü: • <u>SSRIs</u> citalopram fluoxetine paroxetine Some other antidepressants bupropion duloxetine terbinafine (antifungal) • quinidine (class I antiarrhythmic agent) • MDMA (recreational empathogen) zayıf: • buprenorphine¹ (in opioid addiction) tanımlanmamış: • amiodarone (antiarrhythmic) • dronedarone (antiarrhythmic) • antihistamine (H1-receptor antagonists) ◦ chlorphenamine ◦ diphenhydramine • antipsychotic ◦ chlorpromazine ◦ haloperidol • celecoxib (NSAID) • cimetidine (H2-receptor antagonist) • clomipramine (tricyclic antidepressant) • chloramphenicol (laevomycetin) • cocaine (stimulant) • doxorubicin (chemotherapeutic) • metoclopramide (antiemetic, prokinetic) • methadone (analgesic and anti-addictive) • moclobemide (antidepressant) • quinidine (Class I antiarrhythmic) • ranitidine (H2-receptor antagonist) • ranolazine (antianginal) • ritonavir (antiretroviral)	☐ güçlü: • Piperidines and derivatives (pharmacokinetic modifiers) ◦ glutethimide (piperidinedione derivative) dengeli: • carbamazepine tanımlanmamış: • dexamethasone (glucocorticoid) • rifampicin (bactericidal)

2.6.2.2.CYP2E1

CYP2E1 en çok bulunan hepatik CYP'lerden biri olmasına rağmen çok az ilaç bu enzim aracılığıyla metabolize edilmektedir. Fakat toksikoloji açısından bakıldığında CYP2E1'in rolü önemlidir. CYP2E1 çoğunlukla etanol metabolizmasındaki merkezi rolünden dolayı çalışılmaktadır (75,76). Ayrıca birkaç endüstriyel çözücünün biyoaktivasyonunda, kimyasal karsinogenezde bir aktivatör olarak ve CYP2E1'in substratları ve inhibitörleri çalışılmaktadır. CYP2E1 tarafından inert polar metabolitlere veya reaktif ara maddelere çevrildiğinde bu bileşikler aseptik inflamasyonu, toksisiteyi ve DNA mutasyonlarını başlatabilir.

CYP2E1 10.kromozomun q terminalinde 10q24.3 bölgesinde lokalize olmuştur(77)11413 baz çifti uzunluğunda ve dokuz ekzon içerir ayrıca tipik bir TATA bölgesi mevcuttur (65).CYP2E1'in substratları genellikle hidrofilik ve düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir (78). CYP2E1'in etanol, aseton ve pirazol gibi birkaç substratı bu enzimin indüklenmesinde önemli rol oynarlar. CYP2E1'in inhibitörlerinden piridin ve disülfiram alkol bağımlılığının tedavisi için klinik uygulamalarda son zamanlarda kullanılmaktadır (71).

CYP2E1 ekspresyonunun etanol tüketimiyle indüklendiği ve değiştiği bilinmektedir. Birkaç çalışmada varyant c2 alleli artmış enzim aktivitesiyle ilişkilendirilmiştir. Hayashi ve ark. c2/c2 DNA'sının c1/c1 DNA'sından yaklaşık 10 kat artmış aktivitesini bildirmişlerdir. Transkripsiyonel aktivitedeki bu farklılık insan karsinogenezinde hassasiyetle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (79).Birçok CYP2E1 alleli tanımlanmıştır, CYP2E1*1A doğal gen yapısını ifade eder. CYP2E1'in dört alleli ise, CYP2E1*1D, CYP2E1*5B, CYP2E1*6 ve CYP2E1*7B kanser veya değişmiş transkripsiyonel ekspresyon için artmış hassasiyetle ilişkilendirilmektedir (72). Bu alellerden CYP2E1*1D indüklenebilir CYP2E1 ekspresyonu için anlamlı fenotipik farklılıklarla sonuçlanmaktadır, ayrıca alkol ve nikotin bağımlılığıyla da ilişkilidir. Ayrıca bir çalışma dışında CYP2E1*7B alleli ve alkolle indüklenen pankreas kanseri arasında ilişki bulunamamıştır, CYP2E1*7B alelinin fenotipik sonuçları detaylı bir şekilde çalışılmamıştır (80).

Alkol dehidrogenaz-2(ADH2), aldehit dehidrogenaz (ALDH2) ve CYP2E1 insanlarda etanolün asetaldehite ve asetata dönüştürülmesinde kataliz için en önemli enzimlerdir. CYP2E1'in yanı sıra ADH2 ve ALDH2'de de genetik polimorfizmler bildirilmiştir (81).

Asetaldehit'in alkol alımından sonraki, kusma, yüz kızarması, çarpıntı, baş ağrısı, terleme ve alkol karaciğer hastalığının gelişimi gibi istenmeyen semptomların ortaya çıkmasındaki büyük rolü bilinmektedir. Alkol alındıktan sonra karaciğer ve kanda asetaldehit birikimi, onun oluşumu ve kaldırılmasındaki 3 enzimin interaktif hareketinden etkilenmektedir. ALDH2 polimorfizmleri ile Asya nüfusunun bireysel içme davranışları arasında güçlü bir ilişki olduğu bilinmektedir. ALDH2*2 alleli tarafından üretilen inaktif ALDH2 asetaldehitin atılımını geciktirir ve Doğu toplumlarında (Japon ve Çin toplumlarının yaklaşık yarısında) ağır içiciliğe karşı genetik bir koruma sağlar. ADH2 ve CYP2E1'in polimorfizmlerinin etkisi aynı etnik grupta çalışılmasına rağmen hala tartışılmaktadır (82,83).

Tanaka ve ark. sağlıklı Japon erkeklerinde alkol tüketiminde ALDH2 ve CYP2E1 arasındaki etkiye bakmışlar ve CYP2E1 lokusundaki c2/c2 genotipinin ALDH2*1 homozigot genotipli bireylerde c1/c1 genotipinden daha çok alkol tüketimine sebep olduğunu gözlemlemişlerdir (80).

2.6.2.2.1.CYP2E1'in Substratları ve İnhibitörleri

Tablo 2.4:Sitokrom P450 2E1 aracılığıyla aktive olan veya deaktive olan ilaçlara atfedilen substratlar, inhibitörler ve indükleyiciler gösterilmiştir.

SUBSTRATLAR			
Endojenler	Töropatik İlaçlar/Anestezik Gazlar	Çözücüler ve Diğer Kimyasallar	
Ethanol Acetone Acetoacetate Acetol Acetaldeyde Fatty acids (arachidonic acid, lauric acid) Glycerol	Acetaminophen Chlorzoxazone Dapsone Enflurane,sevoflurane, isoflurane Halothane Disulfiram Isoniazid p-nitrophenol Phenacetin	Acrylonitrile, methacrylonitrile Alcohols, ethers, alkanes Acetone Benzene (and derivatives) Styrene Chloroform Carbontetrachloride Pyrazole Phenol Butadiene Ethylene dibromide 1,1,1-trichloropropanol	Pyridine Acrylamide Nitrosamines (e.g. NDMA) Ethyl carbamate, vinyl carbamate Vinyl chloride, vinyl bromide Diethylether Hexane Methyl chloride Methylene chloride Ethylene dichloride 1,2-dichloropropanol

Tablo 2.4:Sitokrom P450 2E1 aracılığıyla aktive olan veya deaktive olan ilaçlara atfedilen substratlar, inhibitörler ve indükleyiciler gösterilmiştir. (Devamı)

İndükleyiciler	İnhibitörler
Ethanol Acetone Benzene Isoniazid Isopropanol Pyrazole Pyridine Açlık Diyabet	Diallylsulfide, diallylsulfone Chlormethiazole Diethyldithiocarbamate Isothiocyanates 4-methyl-pyrazole Disulfiram

2.6.3.CYP3 Ailesi

İnsan CYP3 ailesi karaciğerdeki toplam P450 miktarının yaklaşık %30'unu temsil eder ve ilaçların biyotransformasyonunda en önemli CYP altailesi olarak değerlendirilir. Bu aile 3 fonksiyonel protein içermektedir; bunlar CYP3A4, CYP3A5 ve CYP3A7 ve bir pseudoprotein olan, CYP3A34'dür (84). Bu enzimlerin katalitik özellikleri örtüşmekte ancak dokulardaki ekspresyon şekilleri farklıdır. CYP3A5 insan karaciğerindeki en az polimorfizm gösteren CYP şeklidir (85). Fakat karaciğer dışındaki dokularda(böbrek, karaciğer, kolon ve özofagus) sürekli eksprese edilmektedir (86,87). CYP3A4 ve CYP3A5'in substrat ve inhibitör spesifitesi oldukça benzerdir, fakat katalitik aktivitesi biraz düşük olabilir (88,89).

CYP3A7 çoğunlukla embriyonik, fetal ve yenidoğan karaciğerlerinde eksprese edilir ve bu dönemlerin en etkili CYP şeklidir (90,91),yetişkin karaciğerinde ise CYP3A7 minör formda görülmektedir (92). İlaç metabolizmasındaki CYP3A7 rolü ise henüz açık değildir.

2.6.3.1.CYP3A4

CYP3A4 mRNA düzeyinde ve karaciğer ve ince bağırsaktaki majör CYP şekilleri arasında insan karaciğerinde en çok bulunan altıncı enzimdir (93,94).Ksenobiyotiklerin metabolizmasında CYP3A4'ün çok önemli bir rolü vardır. Klinikte kullanılan ilaçların yaklaşık %50'sinin metabolizmasından sorumlu olduğu tahmin edilmektedir.CYP3A4'ün aktif bölgesi çok geniş ve esnek olduğu için aynı anda birçok küçük molekülün aktif bölgeye bağlanmasına izin vermektedir (95,96).

CYP3A4 ve onun substratları arasındaki kinetik etkileşim, ilaç-ilâç etkileşimi aracılı CYP3A4'ün öngörü ve modellemesinin yapılması sıklıkla atipik ve zahmetlidir (95).

CYP 3A4 geni 7q22.1 bölgesinde lokalize olmuştur (97).

2.6.3.1.1. CYP3A4'ün Substrat ve İnhibitörleri

Tablo 2.5: Sitokrom P450 3A4 aracılığıyla aktive olan veya deaktive olan ilaçlara atfedilen substratlar, inhibitörler ve indükleyiciler gösterilmiştir.

SUBSTRATLAR		
İmajör: immunosuppressants ciclosporin sirolimus tacrolimus Chemotherapeutic anastrozole cyclophosphamide docetaxel doxorubicin erlotinib ^[10] etoposide ifosfamide paclitaxel tamoxifen teniposide vinblastine vindesine gefitinib azole antifungals clotrimazole ketoconazole itraconazole macrolide clarithromycin erythromycin tricyclic antidepressants amitriptyline clomipramine imipramine SSRIs citalopram escitalopram fluoxetine and norfluoxetine sertraline buspirone (anxiolytic) venlafaxine (SNRI) antipsychotics Aripiprazole haloperidol Risperidone Ziprasidone •	• opiate analgesics ○ alfentanil ○ codeine (analgesic, antitussive, antidiarrheal) ○ fentanyl ○ methadone (analgesic, anti-addictive) • benzodiazepines ○ alprazolam ○ clonazepam ○ flunitrazepam ○ midazolam ○ triazolam ○ pimizide • statins ○ atorvastatin ○ lovastatin ○ simvastatin • calcium channel blockers ○ amlodipine ○ diltiazem ○ felodipine ○ nifedipine ○ verapamil • amiodarone (antiarrhythmic) • PDE5 inhibitors ○ sildenafil • kinins (vasodilators, smooth muscle contractors) • sex hormones agonists and antagonists ○ estradiol (estrogen) ○ ethinylestradiol (hormonal contraceptive) ○ finasteride (antiandrogen) ○ levonorgestrel (female sex hormone, oral contraceptive) ○ testosterone (androgen) ○ toremifene (SERM) • Astemizole^[11] (H1 antagonist, antipruritic) • warfarin (anticoagulant)	minör: • protease inhibitors ○ indinavir ○ ritonavir ○ saquinavir ○ nelfinavir • Mirtazapine (NaSSA) • nefazodone (antidepressant) • pimozide (antipsychotic) • reboxetine (antidepressant) • zopiclone (hypnotic) • non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors ○ nevirapine • budesonide (glucocorticoid) • donepezil (acetylcholinesterase inhibitor) • proton pump inhibitors omeprazole and esomeprazole • glibenclamide (antidiabetic) • cisapride (5-HT₄ receptor agonist) • terfenadine (H₁-receptor antagonist) • barbiturates ○ phenobarbital • carbamazepine (anticonvulsant, mood stabilizing) • dextromethorphan (antitussive) • digoxin (Antiarrhythmic) • ergot alkaloids (circulation, neurotransmission) • ivabradine (in angina pectoris) • lidocaine (local anesthetic, antiarrhythmic) • montelukast (leukotriene receptor antagonist) • ondansetron (5-HT₃ antagonist) • paracetamol (analgesic, antipyretic) • • quinine (antipyretic, anti-smallpox, analgesic) • theophylline (stimulant) • valproate (anticonvulsant, mood-stabilizing) • tetrahydrocannabinol (psychoactive)

Tablo 2.5: Sitokrom P450 3A4 aracılığıyla aktive olan veya deaktive olan ilaçlara atfedilen substratlar, inhibitörler ve indükleyiciler gösterilmiştir (**Devamı**).

İNHİBİTÖRLER		İNDÜKLEYİCİLER
Güçlü/ılımlı protease inhibitors ritonavir^[14] indinavir nelfinavir macrolide antibiotics¹ erythromycin telithromycin clarithromycin azole antifungals fluconazole ketoconazole itraconazole nefazodone (antidepressant) bergamottin (constituent of grapefruit juice) quercetin (nutritional supplement) aprepitant (antiemetic) verapamil (calcium channel blocker) chloramphenicol (antibiotic)^[15] zayıf: cimetidine (H2-receptor antagonist) buprenorphine (analgesic)¹ cafestol (in unfiltered coffee)^[17]	tanımlanmamış: amiodarone (antiarrhythmic) - ciprofloxacin (antibiotic) - ciclosporin (immunosuppressant) - diltiazem (calcium channel blocker) - imatinib (anticancer) - echinacea (immunostimulator) - enoxacin (antibacterial) - ergotamine (in migraine) - metronidazole (antibacterial) - mifepristone (abortifacient) - norfloxacin (antibiotic) - tofisopam (anxiolytic) - non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors - delavirdine - efavirenz - nevirapine - gestodene (hormonal contraceptive) - mibefradil (in angina pectoris) - protease inhibitors - saquinavir - SSRIs - fluoxetine/norfluoxetine - fluvoxamine - star fruit^[19] - piperine - milk thistle	güçlü: - anticonvulsants, mood stabilizers - phenytoin (anticonvulsant) - carbamazepine - oxcarbazepine - barbiturates - phenobarbital - non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors - efavirenz - nevirapine - etravirine - rifampicin¹ (bactericidal) - modafinil (stimulant) - hyperforin (constituent of St Johns Wort) - cypoterone (antiandrogen, progestin) zayıf - dexamethasone (anti-inflammatory, immunosuppressant) - felbamate (anticonvulsant) - glucocorticoids (blood glucose increase, immunosuppressive) - griseofulvin (antifungal) - pioglitazone (hypoglycemic) - primidone (anticonvulsant) - topiramate (anticonvulsant) - troglitazone (hypoglycemic) - rifabutin (in tuberculosis)

2.7. MOLEKÜLER YÖNTEMLER

2.7.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PZR)

PZR'ın keşfi ile sadece moleküler biyoloji alanında değil, organizma ve populasyon biyolojisi alanlarında da genetik marker oluşturmak adına bir çığır açmıştır.

PZR kısaca in vitro koşullarda DNA'nın çoğaltılması işlemidir. Bu teknikte DNA çoğaltımının başlamasına olanak sağlayacak olan 3'OH grubunu sağlamak için iki oligonükleotit (primer) kullanılır. Primerler çoğaltmak istediğimiz gen bölgesinin başlangıç ve sondaki dizilerine komplementerdir. Reaksiyon kalıp DNA, DNA polimeraz I, primerler, dNTP (deoksi-nükleotit trifosfatlar; dATP, dGTP, dCTP, dTTP) ve enzimin optimum koşullarını sağlamak için eklenen kimyasalların oluşturduğu bir ortamda gerçekleştirilir. PZR üç temel adımdan oluşur. İlki, çift zincirli DNA'nın ısıtılarak (94°C) denatüre edilmesi (denatürasyon); ikinci aşama, sıcaklığın düşürülmesi ile (40–60°C) primerlerin tek zincir DNA üzerinde kendilerine komplementer olan bölgelere bağlanması (annealing); son olarak, hibritleşmeden sonra ısı dayanıklı bir DNA polimeraz (*taq* polimeraz ile (72°C'de) ile yeni zincirin sentezlenmesi (extension) aşamalarıdır. Bu işlemler 20 ya da daha çok kez tekrarlanarak istenilen DNA bölgesi çoğaltılmış olur (yaklaşık 2^n kopya). Bu artılmış DNA bölgesi; daha sonra çeşitli amaçlara yönelik başka metotlar uygulanarak adli tıpta suçluları saptama, hastalıklara neden olan gen mutasyonlarının saptanması, patojen saptama, gen ekspresyonu çalışmaları, populasyon genetiği ve filogenetik analizlerde kullanılmaktadırlar (98).

2.7.2. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Restriksiyon uzunluk polimorfizmi metodu, restriksiyon endonükleazlar kullanılarak DNA'nın sindirimine (kesimine) dayanır. Restriksiyon endonükleazlar 1968 yılında keşfedilmiş bakteri enzimleridir. Restriksiyon endonükleazlar DNA üzerindeki bazı özel dizileri tanır ve DNA'yı bu dizilerden keserler. Farklı bakteri suşlarından farklı sayıda bazdan oluşan ve farklı tanıma dizisine sahip, farklı enzimler elde edilebilir. DNA üzerindeki restriksiyon tanıma dizilerinde oluşan herhangi bir nükleotid değişimi (SNP; tek nucleotit polimorfizm, insersiyon/delesyon, translokasyon vb mutasyon çeşitleri) restriksiyon enziminin o bölgeyi tanıyamaması akabinde, kesimin gerçekleşmemesine yol açar. Bu bilgiye dayanarak; aynı restriksiyon enzim kullanılarak farklı kaynaklı

(farklı tür ya da birey vs.) DNA molekülleri kesildiğinde, farklı uzunlukta DNA parçaları oluşabilir. RFLP kesim ürünlerinin analizi genellikle agaroz ya da poliakrilamid jel elektroforezi yapılır. Kesim ürünlerinin jel elektroforezinde yürüttüğümüzde ise, bir sindirim profili (görüntüsü) oluşur. Jel profilinde oluşan farklılıklar bize, tanıma bölgelerindeki nükleotid polimorfizmlerinin varlığını belirtir. Bu yöntem bize dolaylı olarak nükleotid değişimi varlığını gösterir

Jeldeki ürünleri görüntülemek için birkaç teknik kullanılabilir. Eğer bir kuyucuğa düşen DNA miktarı 50ng'dan büyükse, etidyum bromür ile boyama her bir bandın açıkça görüntülenmesini sağlar.

RFLP metodu kullanılarak, PCR ile çoğaltılmış belirli bir gen bölgesi, tanımlanmış özel mutasyonlara karşı uyumlu eşsiz bir restriksiyon enzimi ile taranabilir. Analiz edilen gen bölgesi, jel profilindeki bantların sayılarına, büyüklüklerine bakılarak genotiplenebilir ve lokusa ait genotip/allel sıklıkları saptanabilir (98).

2.7.3. Kantitatif Real-Time PZR Yöntemi

Bilim ve tıp alanındaki çalışmalar, nükleik asit miktarı belirleme analizleri içerisinde en etkili tekniği sunmayı başarmıştır: Real-time PZR tekniği. Bu teknik seksenli yılların ortasında Kary Mullis ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen PZR'ın ileri bir versiyonudur. Klasik PZR ile çok karmaşık bir örnekten herhangi bir nükleik asit dizisini analiz etmek için çok sayıda döngüsel işlemle istenilen miktarda çoğaltmak mümkündür. Ancak bu işlem tek başına matematiksel olarak ürün miktarı hakkında bilgi sağlamakla birlikte sonrasında da ürün miktarını net olarak belirlemek de oldukça güçtür. Çünkü klasik PZR, başlangıçta var olan DNA miktarından bağımsız olarak bir ürün miktarı ortaya çıkarır. Higuchi ve arkadaşları 1992 yılında Real-Time PZR' ı geliştirmişlerdir. Real-Time PZR tekniği ile DNA dizileri eş zamanlı olarak çoğaltılmış ve belirlenebilmiş, reaksiyon süreci boyunca, oluşan ürünün miktarını Real-time PZR sırasında gözlemek mümkün olmuştur.

Amplifikasyonun her basamağını takip edilebilmesi, Real-time PZR' ı özel kılan en önemli özelliğidir. Amplifikasyon eğrileri üzerinden tüm amplifikasyon profili gözlenebilmektedir. Bu imkân reaksiyon için kullanılan primerler ve hedefe özgü flöresan işaretli problemler ile sağlanır (98).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Demirbaş Malzemeler

Aletler / Markası

Yatay Elektroforez düzeneği/(Biozym TC)

UV. Transillüminatör /Vilber Lourmat

Buzdolabı /Arçelik

Derin Dondurucu (-20oC) / Beko

Derin Dondurucu (-80oC) / Sanyo

Distile Su Cihazı / Millipore

Doğru Akım Güç Kaynağı / Biometra PP4000

Etüv / Nüve FN500

Hassas Terazı / Libror AEG-220

Isı Döngü Cihazı / Techne Genius

Laminar Air Flow Kabin / Heraus

Manyetik Karıştırıcı / Janke-Kunkel

Mikrodalga Fırın / Arçelik
 Mikrosantrifüj / Heraus
 Otoklav / Aesculap
 Otomatik Mikropipetler / Eppendorf Gilson
 pH Metre / WTW
 Real Time PZR Cihazı / Corbett (Qiagen)
 Soğutmalı Santrifüj / Sigma
 Thermocycler / Perkin Elmer 9700
 DNA İzolasyon Cihazı / Magna Pure LC
 Vorteks / MS1
 Minishaker / IKA®

3.1.2. Sarf Malzemeler

Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeleri / Markası

Etilendiamin Tetra Asetik Asit (EDTA) (MP, EDTA05MI)
 Etanol (MERK, 603-002-00-5)
 Tris (PROMEGA, H5133)
 Borik Asit (CARLO ERBA, 302177)
 Etidyum Bromür (APPLİCHEM, A1151,0010)
 dNTP Set (FERMENTAS, R0185)
 MgCl₂(magnezyum klorür) (THERMO SCIENTIFIC, AB-1605/A)
 Kandan RNA İzolasyon kiti (QIAGEN MİNİ KİT, 74106)
 Kandan DNA İzolasyon kiti (ROCHE, MAGNA PURE LC DNA ISOLATION KIT, 03 003 990 001)
 Eppendorf Tüpler (0.2 ,0.5, 1.5 ,2'lik) (THERMO, AB-0620)
 cDNA Sentez Kiti (PRIMER DESIGN, PRECISION qSCRIPT REVERSE TRANSCRIPTION KİT)
 Primer Prob (CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4) (PRIMER DESIGN)
 Taq DNA Polimeraz Enzimi (THERMO SCIENTIFIC,AB-1605/A)
 10X PZR Tamponu (THERMO SCIENTIFIC,AB-1605/A)
 BstNI Restriksiyon Enzimi (FERMENTAS, ER0551)
 ApaI Restriksiyon Enzimi (FERMENTAS, ER1411)
 RsaI Restriksiyon Enzimi (FERMENTAS, ER0551)
 PstI Restriksiyon Enzimi (FERMENTAS, ER0551)

Agaroz (BIO BASIC INC, 902-36-6,D0012M)

100bç'lik Boyut Markırı (BIO BASIC INC,M1070-2)

6X Yükleme Tamponu (FERMENTAS, R0631)

Buzluk

Distile Su

3.2. KAN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurul komisyonundan onay alınarak (Karar no:09\209) yapılan çalışmada Psikiyatri Anabilim Dalı ve Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi AMATEM'den tedavi için yatan alkol bağımlılarından hasta onam formları imzalatılarak ,tedavi öncesi(hastaneye yatırıldıkları ilk gün) ve tedavi sonrası (28.gün) 3 tüp EDTA'lı (9 ml) kan örnekleri toplanmıştır.23 kişiden kontrol kan örneği alındı. Kontrol grubuna, hasta grubuyla uyumlu yaş grubundaki sigara içen erkek bireylerden seçildi. Daha sonra bu kan örneklerinin 1 tüpünden Magna Pure LC cihazında polimorfizm çalışmaları için DNA elde edildi. Ekspresyon çalışmaları için manuel yöntemle lökosit izolasyonu ve RNA izolasyonu (Qiagen minikit) yapılmıştır.

3.3. GEN POLİMORFİZM ÇALIŞMALARI

Gen polimorfizm çalışmaları için öncelikle alkol hastalarından ve kontrollerden DNA örnekleri Magna Pure LC cihazında izole edildi.

3.3.1. CYP1A2 Geni *1F Polimorfizmi

Elde edilen DNA örneklerinden CYP1A2 Geni*1F polimorfizmi için uygun primerlerle polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) (Perkin Elmer 9700) gerçekleştirildi.

CYP 1A2 *1F	Sense	Antisense
Primer	5'- AGA AGC TCT GTG GCC GAG AAG G - 3'	5' CAA CCC TGC CAA TCT CAA GCA C - 3'
GC%	52.4	59.1
Uzunluk	21	22
Tm	61.0	66.0

PZR İçeriği

PZR İÇERİĞİ	STOK KONSANTRAS YONU	EKLENEN MİKTAR	SON KONSANTRASYON (50 µl reaksiyon için)
PZR Buffer	10X	5 µL	1x
MgCl ₂	25 mM	4 µL	2 mM
dNTP karışım	2.5 mM	3 µL	150 µM
Reverse Primer	10 pmol/µL	3 µL	0.6 pmol
Forward Primer	10 pmol/µL	3 µL	0.6 pmol
DMSO	%98'lik	5 µL	%10
DNA Örneği	Değişken	5 µL	~200 ng
Taq DNA Polimeraz	5 U/Ml	0.5 µL	2.5 U
Steril H ₂ O		21.5 µL	

PZR Programı

94 °C 4 dak

94°C 45 sn
53°C 1 dak
72°C 1 dak

} 35 siklus

72 °C 5 dak

PZR işlemleri gerçekleştirildikten sonra % 2'lik agaroz (Sigma) jelde PZR ürünleri koşturuldu. 518 bp ürün elde edildi. Elde edilen ürünler daha sonra *ApaI* restriksiyon enzimi ile kesildi.

ApaI Restriksiyon Enzim Muamelesi

10X Reaksiyon Buffer 2.5µl

PZR Örneği 15 µl

Enzim (*ApaI* RE) 1 µl

Toplam hacim 25 µl'ye distile su ile tamamlandıktan sonra 37°C'de 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra ürünler %3'lük agaroz jelde koşturuldu. CYP1A2 Geni intron I'de bulunan 734(A\C) polimorfizmi normal genotip için 518 bç, heterozigot genotip için 518, 312, 206 bç ve homozigot mutant genotip için ise; 312, 206 bç ürünler elde edildi ve sonuçları verildi.

3.3.2. CYP 2D6*4 1934 (G/A) ve CYP 2D6*6 1795(1 bç del) Polimorfizmleri

Elde edilen DNA örneklerinden varyant yavaş metabolizör alleller CYP2D6*4 (1934 pozisyonundaki G/A değişimi) ve CYP2D6*6 (1795 pozisyonundaki 1 bç T delesyonu) için ekzon 3/intron 4 primerleri kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirildi.

CYP 2D6*4 1934(G/A) ve CYP 2D6*6 1795(1bç del)	Sense	Antisense
Primer	5' _CCT GGG CAA GAA GTC GTC GGA CCA G - 3'	5' _GAG ACT CCT CGG TCT CTC G--3'
GC%	64	63.2
Uzunluk	25	19
Tm	72.0	62.0

PZR İÇERİĞİ	STOK KONSANTRASYONU	EKLENEN MİKTAR	SON KONSANTRASYON(50 µl reaksiyon için)
PZR Buffer	10X	5 µL	1x
MgCl₂	25 mM	3µL	1.5 mM
dNTP karışım	2.5 mM	3 µL	150 µM
Reverse Primer	10 pmol/µL	3 µL	0.6 pmol
Forward Primer	10 pmol/µL	3 µL	0.6 pmol
DNA Örneği	Değişken	5 µL	~200 ng
Taq DNA Polimeraz	5 U/Ml	0.5 µL	2.5 U
Steril H₂O		27.5 µL	

PZR Programı

94°C	3 dak	
94°C	30 sn	} 38 siklus
62°C	30sn	
72°C	40 sn	
72°C	5 dak	

PZR işlemi gerçekleştirildikten sonra % 2'lik agaroz jelde PZR ürünleri koşturuldu. 353 bç ürün elde edildi. Elde edilen ürünler daha sonra *BstNI* restriksiyon enzimi ile kesildi.

BstNI Restriksiyon Enzim Muamelesi

10X Reaksiyon Buffer	2,5µl
PZR Örneği	15 µl
Enzim (BstNI RE)	1 µl

Toplam hacim 25 µl'ye distile su ile tamamlandıktan sonra 37°C'de 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra ürünler % 3'lük agaroz jelde koşturuldu. CYP2D6*4 (1934 pozisyonundaki G/A değişimi) normal genotip için 190, 163 bç homozigot mutant genotip için 353 bç ve CYP2D6*6 (1795 pozisyonundaki 1 bç T delesyonu) normal genotip için; 190,163 bç; homozigot mutant genotip için ise; 190, 139, 23 bç ürünler elde edildi ve sonuçları verildi.

3.3.3.CYP 2E1 c1/c2 (*Rsa*+/*Pst*+)Polimorfizmi

Elde edilen DNA örneklerinden CYP2E1 Geni c1/c2 polimorfizmi için uygun primerlerle PZR (Perkin Elmer 9700) işlemi gerçekleştirildi.

CYP 2E1(c1/c2)	Sense	Antisense
Primer	5_-CCA GTC GAG TCT ACA TTG TCA 3_	5_TTC ATT CTG TCT TCT AAC TGG-3
GC%	47.6	38.1
Uzunluk	21	21
Tm	59.0	55.0

PZR İçeriği

PZR İçERİğİ	STOK KONSANTRAS YONU	EKLENEN MİKTAR	SON KONSANTRASYON(50 µl reaksiyon için)
PZR Buffer	10X	5 µL	1x
MgCl ₂	25 mM	4µL	2 mM
dNTP karışım	2.5 mM	3 µL	150 µM
Reverse Primer	10 pmol/µL	3 µL	0.6 pmol
Forward Primer	10 pmol/µL	3 µL	0.6 pmol
DNA Örneği	Değişken	5 µL	~200 ng
Taq DNA Polimeraz	5 U/µL	0.5 µL	2.5 U
Steril H ₂ O		21.5 µL	

PZR Programı

94°C 5 dak

94°C 2 dak

59°C 1 dak

72°C 1 dak

72°C 10 dak

35 siklus

PZR işlemleri gerçekleştirildikten sonra % 2'lik agaroz jelde PZR ürünleri koşturuldu. 410 bp ürün elde edildi. Elde edilen ürünler daha sonra *RsaI* ve *PstI* restriksiyon enzimleri ile kesildi.

RsaI ve *PstI* Restriksiyon Enzim Muameleleri

10X Reaksiyon Buffer 2.5µl

PZR Örneği 15 µl

Enzim (*RsaI*/ *PstI* RE) 1 µl

Toplam hacim 25 µl'ye distile su ile tamamlandıktan sonra 37°C'de 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra ürünler % 4'lük agaroz jelde koşturuldu. c1 genotipi için *RsaI* enzimi ile muamele edildi. Normal genotip için ; 360,50 bç; heterozigot genotip için; 412, 360 , 50 bç, homozigot mutant genotip için ise; 412 bç ürünler elde edildi, sonuçları verildi. c2 genotipi için *PstI* enzimi ile muamele edildi. Normal genotip için; 410 bç; heterozigot genotip için; 410, 290, 120 bç, homozigot mutant genotip için ise; 290,120 bç ürünler elde edildi, sonuçları verildi.

3.3.4.CYP 3A4*V Polimorfizmi

Elde edilen DNA örneklerinden CYP3A4 geni (A/G) polimorfizmi için uygun primerlerle PZR (Perkin Elmer 9700) işlemi gerçekleştirildi.

CYP 3A4*V(A/G)	Sense	Antisense
Primer	5_-AACAGGACGTGGA AACACAAT-3	5_-CTTTCCTGCCCTGCA CAG-3
GC%	42.9	61.1
Uzunluk	21	18
Tm	57.0	58.0

PZR İçeriği

PZR İÇERİĞİ	STOK KONSANTRAS YONU	EKLENEN MİKTAR	SON KONSANTRASYON(50 µl reaksiyon için)
PZR Buffer	10X	5 µL	1x
MgCl ₂	25 mM	3µL	1.5 mM
dNTP karışım	2.5 mM	3 µL	150 µM
Reverse Primer	10 pmol/µL	3 µL	0.6 pmol
Forward Primer	10 pmol/µL	3 µL	0.6 pmol
DNA Örneği	Değişken	5 µL	~200 ng
Taq DNA Polimeraz	5 U/µL	0.5 µL	2.5 U
Steril H ₂ O		27.5 µL	

PZR işlemi gerçekleştirildikten sonra % 2'lik agaroz jelde PZR ürünleri koşturuldu. 592 bp ürün elde edildi. Elde edilen ürünler daha sonra *BstNI* restriksiyon enzimi ile kesildi.

PZR Programı

94°C	5 dak	
94°C	1 dak	} 35 sikluss
61°C	1 dak	
72°C	1 dak	
72°C	10 dak	

***BstNI* Restriksiyon Enzim Muameleleri**

10X Reaksiyon Buffer	2.5µl
PZR Örneği	15 µl
Enzim (<i>BstNI</i> RE)	1 µl

Toplam hacim 25 µl'ye distile su ile tamamlandıktan sonra 37°C'de 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra ürünler % 4'lük agaroz jelde koşturuldu. Normal genotip için; 396, 121, 75 bp; heterozigot genotip için; 517, 396, 121, 75 bp, homozigot mutant genotip için ise; 517,75 bp ürün elde edildi, sonuçları verildi.

Tablo 3.1: Çalışılan polimorfizmlerin restriksiyon enzimleri ve bant boyutları

Çalışılan Gen Polimorfizmi	Kullanılan Restriksiyon Enzimi	PZR Ürünü	Normal genotip	Heterozigot Genotip Ürünleri	Homozigot mutant Genotip
CYP 1A2*1F	<i>Apa I</i>	518bç	518bç	518bç 312bç 206bç	312bç 206bç
CYP2D6*4(C1934A)	<i>BstNI</i>	353bç	190bç 163bç	353bç 190bç 161bç	353bç
CYP2D6*6(delT1795)	<i>BstNI</i>	353bç	190bç 163bç	190bç 163bç 139bç	190bç 139bç 23bç
CYP 2E1 c1	<i>Rsa I+ / Pst I-</i>	410bç	360bç 50bç	410bç 360bç 50bç	410bç
CYP 2E1 c2	<i>Rsa I- / Pst I+</i>	410bç	410bç	410bç 290bç 120bç	290bç 120bç
CYP 3A4*V	<i>BstNI</i>	592bç	396bç 121bç 75bç	517bç 396bç 121bç 75bç	517bç 75bç

3.4.PZR ve RFLP Ürünlerinin Elektroforezi

PZR amplifikasyonlarının ve enzim kesim ürünleri kontrol edilmesi için agaroz jelde koşturuldu.

3.4.1.Agaroz Jel Hazırlanması

3.4.1.1.Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

TBE Tamponu (10X)

0.89 M Tris

0.89 M Borik Asit

0.5 M EDTA tartılarak distile su ile 1lt'ye tamamlanır.

Etidyum Bromür Hazırlanması

0.2 gr etidyum bromür tartılarak distile su ile 20ml'ye tamamlanır.

%2'lik Agaroz Jel Hazırlanması

2 gr agaroz tartılır, TBE tamponu ile 100ml'ye tamamlanır. Mikrodalga fırında kaynatılarak eritilir. Soğutulur, jel kalıbına dökmeden içine 5µl etidyum bromür eklenir, karıştırılır ve kalıba dökülür. Kuyucukların oluşması için tarak konur ve donmaya bırakılır.

%3'lük Agaroz Jel Hazırlanması

3 gr agaroz tartılır, TBE ile 100ml'ye tamamlanır. Mikrodalga fırında kaynatılarak eritilir. Soğutulur, jel kalıbına dökmeden içine 5µl etidyum bromür eklenir, karıştırılır ve kalıba dökülür. Kuyucukların oluşması için tarak konur ve donmaya bırakılır.

%4'lük Agaroz Jel Hazırlanması

4 gr agaroz tartılır, TBE ile 100ml'ye tamamlanır. Mikrodalga fırında kaynatılarak eritilir. Soğutulur, jel kalıbına dökmeden içine 5µl etidyum bromür eklenir, karıştırılır ve kalıba dökülür. Kuyucukların oluşması için tarak konur ve donmaya bırakılır.

3.4.1.2.PZR ve RFLP Ürünlerinin Agaroz Jele Yüklenmesi:

PZR ve RFLP ürünlerinin yüklenecek miktarlarının % 10'u kadar içerisine 6X yükleme tamponu eklenir ve kuyucuklara mikropipetle yüklenir. Jeldeki ilk ve son kuyucuğa ürünün bant boyutunu belirleyebilmek için 100bp'lik boyut markırı yüklenir. 85V'ta 30 dakika koşturulur ve UV transilluminatörde görüntülenir.

3.5.GEN EKSPRESYONU ÇALIŞMA YÖNTEMİ

Alkol bağımlısı hasta ve kontrol gruplarından toplanan periferik kan örneklerinden ilk olarak RNA izole edildi.

3.5.1.RNA İzolasyonu

1. Alınan 6ml EDTA'lı periferik kan örneklerinden her bir hasta için 2 adet 15 ml'lik falkon tüp içerisine 3'er ml kan örnekleri sonra üzerine kan miktarının 3 katı kadar Red Cell Lisis (155mM Amonyum Klorid, 10mM potasyum Bikarbonat, 1mM EDTA) solüsyonu eklendi.
2. +4°C'de 20 dk bekledikten sonra 2000rpm'de 10dk santrifüj edildi.
3. Süpernatant atıldı. Pellet (lökositler) üzerine 3cc red cell lisis solüsyonu eklenerek 10dk +4C'de bekletildi.
4. 2000rpm'de 10dk santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
5. Pellet üzerine 500 µl RLT Buffer eklenerek 2ml'lik enjektörle 8-10 kez resüspanse edildi ve 2ml'lik ependorf tüpe alındı.
6. Qiagen Minikit ile RNA izolasyonu yapıldı.
7. RNA'lar nanodropta ölçüldü.
8. RNA'ların konsantrasyonu yaklaşık 1000 ng olacak şekilde dilüe edildi, çalışılncaya kadar -80°C derin dondurucuya kaldırıldı.

3.5.2.cDNA Sentezi

Her bir RNA örneğinden aşağıdaki basamaklar izlenerek cDNA izolasyonu yapıldı.

A: Anneling (yapışma) basamağı

1. Her bir RNA örneği için 0,2'lik PZR tüplerine aşağıdaki şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı.

Miks içeriği	1 reaksiyon için
RNA örneği (1µg)	Xµl
RT primer	1µl
RNase/DNase free water	Yµl
Final hacim	10µl

2. Hazırlanan reaksiyon karışımı 65°C’de 5dk inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası tüpler hemen buz üzerine alınıp hızlı şekilde soğuması sağlandı.

B: Extension (uzama) basamağı

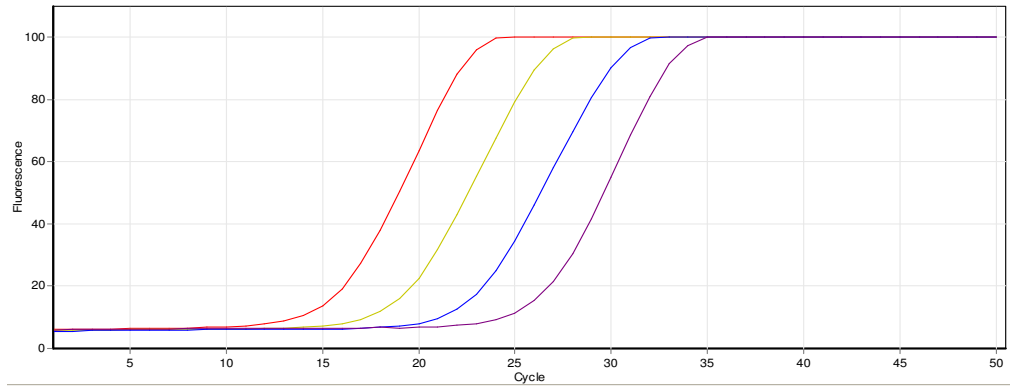
1. Her bir RT reaksiyonu için 10µl aşağıdaki protokole uygun bir karışım hazırlandı.

Miks içeriği	1 reaksiyon için
qScript 10x buffer	2 µl
dNTP miks (10mM)	1 µl
DTT 100Mm	2 µl
RNase/DNase free water	4 µl
qScript enzim	1 µl
Final hacim	10 µl

2. Buz üzerindeki örneklerin her birine 10 µl bu karışımdan eklendi.
3. Tüpler hafifce vortekslendikten sonra 55°C’de 20dk inkübe edildi. Elde edilen cDNA’lar 1/10 oranında dilüe edildi (20 µl cDNA+ 180 µl distile su). Daha sonra cDNA’lar -20°C derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.5.3.Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Elde edilen hasta ve kontrol cDNA’ları, CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 ve housekeeping gen Beta Aktin (ACTB) mRNA dizisine spesifik FAM ile işaretli primer/problar (Tablo 3.2) ile 20 µl reaksiyon hacminde 0.2ml PZR tüplerinin içinde amplifiye edildi. Amplifikasyon için Primer Design marka primer/prob kiti kullanıldı. Genlerin mRNA kopya sayılarının belirlenmesinde her bir gen için 100.000, 10.000, 1.000 ve 100 kopya içeren pozitif kontroller (standartlar) kullanıldı (Şekil 3.1). Amplifikasyonlar Real-Time RT-PZR cihazı olan Corbett cihazında gerçekleştirildi. Çalışmaya alınan bütün örnekler standartlar ile birlikte ve en az 2 kez çalışıldı.



Şekil 3.1. Beta Aktin geni standartlarının Real Time PZR görüntüsü.

3.5.3.1.Real-Time PZR Reaksiyon Protokolü

Aşağıdaki tabloya göre her bir gen için ayrı ayrı primer/prob kullanılmak üzere qPZR karışımı hazırlandı.

Malzeme	1 reaksiyon
Primer prob miks	1 µl
2X qPZR master miks	10 µl
Distile su	4 µl
Son hacim	15 µl

Hazırlanan karışım soğuk blok üzerinde PZR tüplerine dağıtıldıktan sonra her bir tüpe 5 µl cDNA örneği ilave edildi ve aşağıdaki programa göre Corbett Real-Time PZR cihazında Real Time PZR gerçekleştirildi.

1 siklus	Süre	Sıcaklık
Enzim aktivasyonu	10 dk	95°C
50 siklus		
Denatürasyon	15sn	95°C
Veri toplama	30sn	50°C
Extension (uzama)	15sn	72°C

Sonuçlar Corbett Software ile kantitasyon analiz yapılarak değerlendirildi.

Tablo 3.2. Ekspresyonu çalışılan genlerin gen bank numaraları ve primer dizileri

GEN ADI	GENBANK NO	PRİMER DİZİ
ACTB	(X00351_1)	F: 5'CCAACCGCGAGAAGATGA3' R: 5'CCAGAGGCGTACAGGGATAG3'
CYP1A2	(NM_000761_3)	F: 5'GCCTTCATCCTGGAGACCTT3' R: 5'TCAGCGTTGTGTCCCTTGT3'
CYP2D6	(NM_000106_4)	F: 5'GACATCGAAGTACAGGGCTT3' R: 5'GGGCATCCAGAAGTGTTTC3'
CYP2E1	(NM_000773)	F: 5'AAGTTTCTAAGGCTGATGTATTTGTT3' R: 5'GCTTCCAGGCAAGTAGTGTAG3'
CYP3A4	(NM_017460)	F: 5'ACCGTAAGTGGAGCCTGAAT3' R: 5'AAGTAATTTGAGGTCTCTGGTGTT3'

3.6.İSTATİSTİK ANALİZLER

Çalışmamızda iki farklı yöntem kullanarak söz konusu genlerin alkol bağımlılığı üzerine etkileri araştırıldı. Bunlardan polimorfizm çalışmaları için *Ki* Kare testi yapıldı. Ekspresyon analizlerinde ise öncelikle verilerin normal dağılımının sağlanması için logaritmaları alındı. Verilerin geometrik ortalaması %95 güven aralığında alındı. Gruplar arası hasta ve kontrol örneklerinin karşılaştırılmasında beden kitle indeksi, yaş, sigara içme süresi ve sigara içme adedi faktörlerinden arındırılarak Kovaryans analizi ve ayrıca bağımsız iki örneklem T testi uygulandı. Hastaların ilk ve son kan örneklerinin karşılaştırılmasında ise beden kitle indeksi, yaş, sigara içme süresi ve sigara içme adedi, alkol içme süresi ve alkol içme miktarı faktörlerinden arındırılarak Kovaryans analizi ve ayrıca bağımlı iki örneklem T testi kullanılarak çalışmaların istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapıldı.

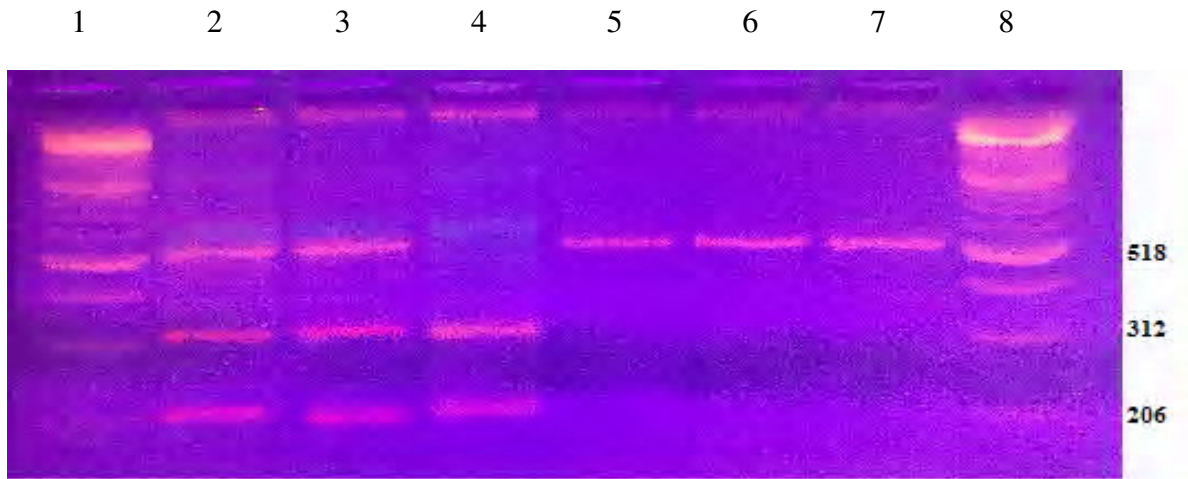
4.BULGULAR

Bu çalışmada 50 Alkol Bağımlısı erkek hasta ve 23 kontrol erkek birey kullanıldı. Alkol bağımlısı hastalardan tedavi öncesi ve tedavi süresi boyunca klinikte kalan hastaların tedavi sonrası (çoğunlukla 28. gün) kanları alındı. Tedaviyi tamamlamadan ayrılan hastalardan tedavi sonrası kanları alınamadı. Hasta grubundan sadece 32 hasta tedavi sonuna kadar kaldığı için tedavi sonrası kanı 32 kişidir. Tedavi öncesi 50, tedavi sonrası 32 hastadan ve kontrol grubu olarak 23 kişiden RNA örnekleri izole edildi ve CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 genlerinin ekspresyon paternleri araştırıldı. Ayrıca 30 alkol bağımlısı hastadan ve 23 kontrol kişisinden DNA örnekleri izole edildi ve sözkonusu genlerin polimorfizmleri, araştırıldı.

4.1.POLİMORFİZM BULGULARI

4.1.1.CYP1A2*1F Polimorfizm Bulguları

CYP1A2 Geni *1F polimorfizmi için uygun primerler kullanılarak yapılan PZR-RFLP çalışmasında hasta grubunda 25 normal, 1 heterozigot, 1 homozigot mutant, kontrol grubunda ise 9 normal, 10 heterozigot, 4 homozigot mutant genotip tespit edildi. Hasta grubundan 3 kişinin DNA örneği 3 kez tekrar çalışıldı ancak sonuç alınamadı. Sonuçları Tablo 4.6 ve Tablo 4.7’de verilmiştir. CYP1A2 Geni *1F polimorfizminin agaroz jel görüntüsü Şekil 4.1’de verilmiştir.

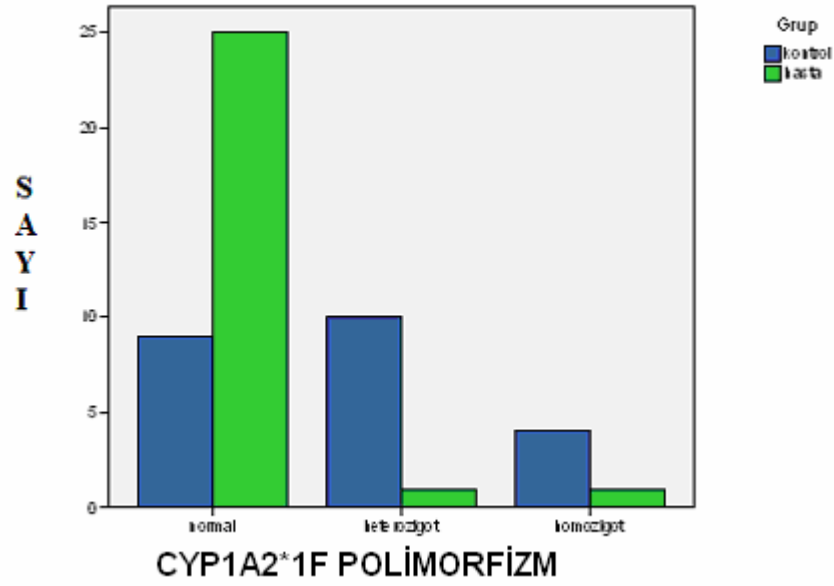


Şekil 4.1. CYP1A2*1F polimorfizmi agaroz jel görüntüsü (Sıra 1 ve 8 boyut markırı 100 bç aralıklı), sıra 2, 3 heterozigot (518bç, 312 bç, 206 bç), sıra 4 homozigot mutant (312bç, 206bç) sıra 5, 6 normal (512bç), sıra 7 PCR ürünü (518bç))

Tablo 4.1. Gruplar arası CYP1A2*1F polimorfizm sonuçları.

	Gruplar arası CYP1A2*1F polimorfizm sonuçları							
	Normal		Heterozigot		Mutant		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Hasta grubu	25	92.6	1	3.7	1	3.7	27	54.0
Kontrol grubu	9	39.1	10	43.5	4	17.4	23	46.0
Toplam	34	68.0	11	22.0	5	10.0	50	100
p< 0.05								

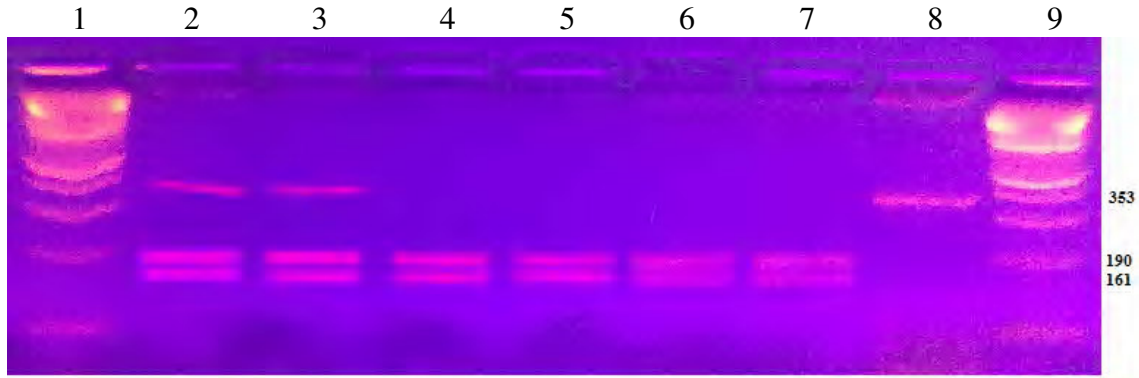
Alkol bağımlısı hasta grupları ve kontrol grubu arasında CYP1A2 geni *1F polimorfizm bulgularının karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grupları arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Buna göre kontrol grubunda CYP1A2 geni *1F polimorfizmi hasta grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. Şekil 4.2’de çubuk grafikte gösterilmektedir.



Şekil 4.2: CYP1A2 geni *1F polimorfizminin hasta ve kontrol gruplarında grafiksel gösterimi.

4.1.2.CYP 2D6*4 1934 (G/A) ve CYP 2D6*6 1795(1 bç del) Polimorfizm Bulguları

CYP2D6 Geni *4 ve *6 polimorfizmleri ekzon3/intron 4 primerleri kullanılarak yapılan PZR-RFLP çalışmasında hasta grubunda CYP2D6*4 polimorfizmi için 25 normal, 3 heterozigot, kontrol grubunda ise 17 normal, 6 heterozigot genotip tespit edildi, homozigot mutant genotip bulunamadı. Hasta grubundan 2 kişinin DNA örneği 3 kez tekrar çalışıldı ancak sonuç alınamadı. CYP2D6*6 polimorfizmi görülmedi. Sonuçları Tablo 4.6 ve Tablo 4.7’de verilmiştir. CYP2D6*4/*6 polimorfizmlerinin agaroz jel görüntüsü Şekil 4.3’de verilmiştir.



Şekil 4.3. CYP 2D6*4/*6 polimorfizmi agaroz jel görüntüsü (Sıra 1 ve 9 boyut markırı 100 bç aralıklı), sıra 2, 3, CYP 2D6*4 heterozigot (353bç, 190bç,161bç), sıra 4,5, 6, 7 CYP 2D6*4/*6 normal (190bç, 161bç,), sıra 8 PZR ürünü (353bç)

Tablo 4.2. Gruplar arası CYP2D6 *4 (C1934A) polimorfizm sonuçları

	Gruplar arası CYP2D6*4 polimorfizm sonuçları					
	Normal		Heterozigot		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Hasta grubu	25	89.3	3	10.7	28	54.9
Kontrol grubu	17	73.9	6	26.1	23	45.1
Toplam	42	82.4	9	17.6	51	100
p>0.05						

Alkol bağımlısı hasta grupları ve kontrol grubu arasında CYP 2D6*4 1934 (G/A) polimorfizm bulgularının karşılaştırılmasında *Ki*-kare testi kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

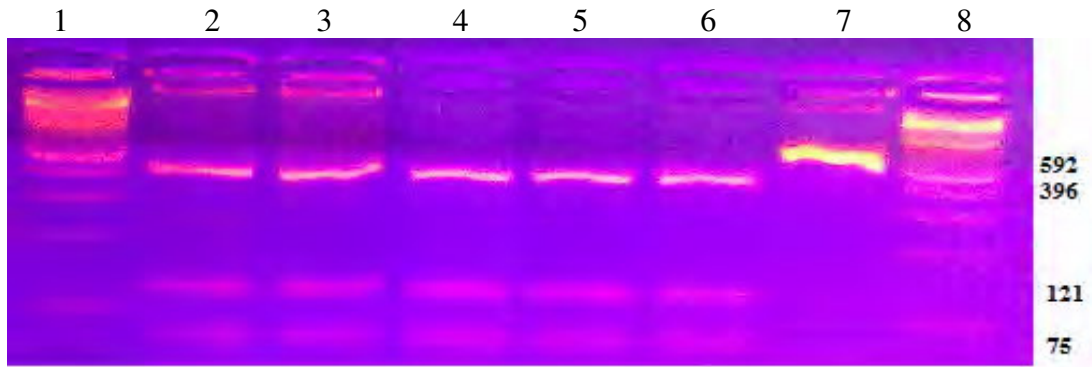
Tablo 4.3. Gruplar arası CYP 2D6*6 1795 (1 bç del) polimorfizm sonuçları

	Gruplar arası CYP2D6*6 polimorfizm sonuçları			
	Normal		Toplam	
	n	%	n	%
Hasta grubu	25	59.5	25	59.5
Kontrol grubu	17	40.5	17	40.5
Toplam	42	100	42	100

Alkol bağımlısı hasta ve kontrol grupları arasında CYP2E1 geni c1/c2 polimorfizm bulgularının karşılaştırılmasında *Ki*-kare testi kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

4.1.4.CYP 3A4*V Polimorfizm Bulguları

CYP3A4*V polimorfizmi için uygun prim erler kullanılarak yapılan PZR-RFLP çalışmasında hasta grubunda CYP3A4*V polimorfizmi için 30 normal, kontrol grubunda ise 23 normal genotip tespit edildi. Sonuçları Tablo 4.6 ve Tablo 4.7’de verilmiştir. CYP3A4*V polimorfizminin agaroz jel görüntüsü Şekil 4.4’de verilmektedir.



Şekil 4.5. CYP3A4*V Polimorfizmi Agaroz Jel Görüntüsü (Sıra 1 ve 8 boyut markırı 100 bç aralıklı), sıra 2,3,4,5,6, normal (396bç, 121bç,75bç), sıra 7 kesilmemiş PZR ürünü (592 bç)

Tablo 4.5. Gruplar arası CYP3A4*V polimorfizm sonuçları.

	Gruplar arası CYP3A4*V polimorfizm sonuçları			
	Normal		Toplam	
	n	%	n	%
Hasta grubu	30	100	30	56.6
Kontrol grubu	23	100	23	43.4
Toplam	53	100	53	100

Alkol bağımlısı hasta ve kontrol gruplarında CYP3A4*V polimorfizmi görülmemiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmemiştir.

Tablo 4.6: Kontrol grubu CYP1A2*1F, CYP2D6*4, CYP2D6*6, CYP2E1(c1/c2), CYP3A4*V
Polimorfizm Bulguları.

SIRA NO	CYP1A2*1F	CYP2D6*4	CYP2D6*6	CYP2E1(c1/c2)	CYP3A4*V
1	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
2	HETEROZİGOT	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
3	HETEROZİGOT	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
4	HETEROZİGOT	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
5	HETEROZİGOT	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
6	HOMOZİGOT	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
7	HETEROZİGOT	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
8	HETEROZİGOT	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
9	HOMOZİGOT	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
10	NORMAL	HETEROZİGOT	NORMAL	NORMAL	NORMAL
11	HOMOZİGOT	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
12	HETEROZİGOT	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
13	NORMAL	HETEROZİGOT	NORMAL	NORMAL	NORMAL
14	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
15	HETEROZİGOT	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
16	HETEROZİGOT	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
17	HOMOZİGOT	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
18	NORMAL	HETEROZİGOT	NORMAL	NORMAL	NORMAL
19	NORMAL	HETEROZİGOT	NORMAL	NORMAL	NORMAL
20	HETEROZİGOT	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
21	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
22	NORMAL	HETEROZİGOT	NORMAL	NORMAL	NORMAL
23	NORMAL	HETEROZİGOT	NORMAL	HETEROZİGOT	NORMAL

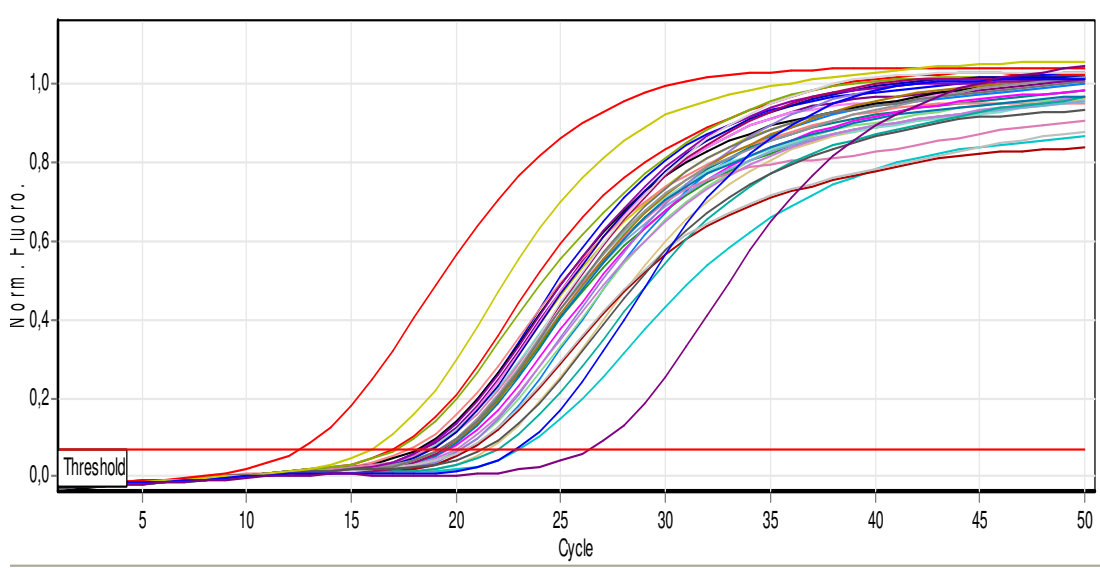
Tablo 4.7: Hasta grubu CYP1A2*1F, CYP2D6*4, CYP2D6*6, CYP2E1(c1/c2), CYP3A4*V Polimorfizm Bulguları.

SIRA NO	CYP1A2*1F n=27	CYP2D6*4 n=28	CYP2D6*6 n=28	CYP2E1(c1/c2) n=22	CYP3A4*V n=30
1	HETEROZİGOT	HETEROZİGOT	NORMAL	NORMAL	NORMAL
2	HOMOZİGOT	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
3	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
4		NORMAL	NORMAL		NORMAL
5	NORMAL	HETEROZİGOT	NORMAL	HETEROZİGOT	NORMAL
6	NORMAL	NORMAL	NORMAL		NORMAL
7	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
8					NORMAL
9	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
10	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
11	NORMAL	NORMAL	NORMAL		NORMAL
12	NORMAL	NORMAL	NORMAL		NORMAL
13	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
14	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
15	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
16	NORMAL	NORMAL	NORMAL	HETEROZİGOT	NORMAL
17	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
18	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
19	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
20	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
21	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
22	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
23					NORMAL
24	NORMAL	HETEROZİGOT	NORMAL		NORMAL
25	NORMAL	NORMAL	NORMAL		NORMAL
26	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
27	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
28	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
29	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL
30	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL

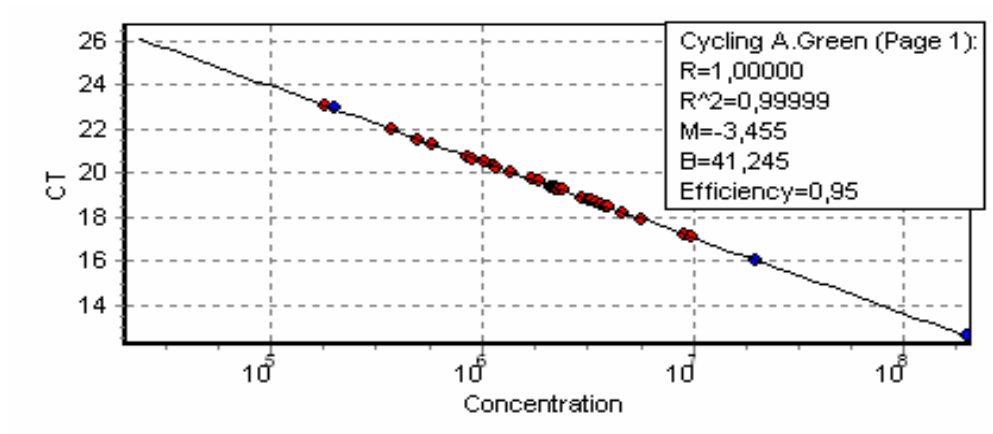
4.2.EKSPRESYON BULGULARI

4.2.1. Beta Aktin Geni Ekspresyon Bulguları

Alkol bağımlısı hasta ve kontrol bireylerinden çalışmaya dahil edilen genlerin ekspresyon bulgularında internal kontrol olarak Beta Aktin geni kullanıldı. Verilen her bir genin sonucu bu house-keeping gene oranlanarak verildi. Beta Aktin geninin Real Time PZR görüntüsü ve ekspresyon verimliliği Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de verilmektedir.



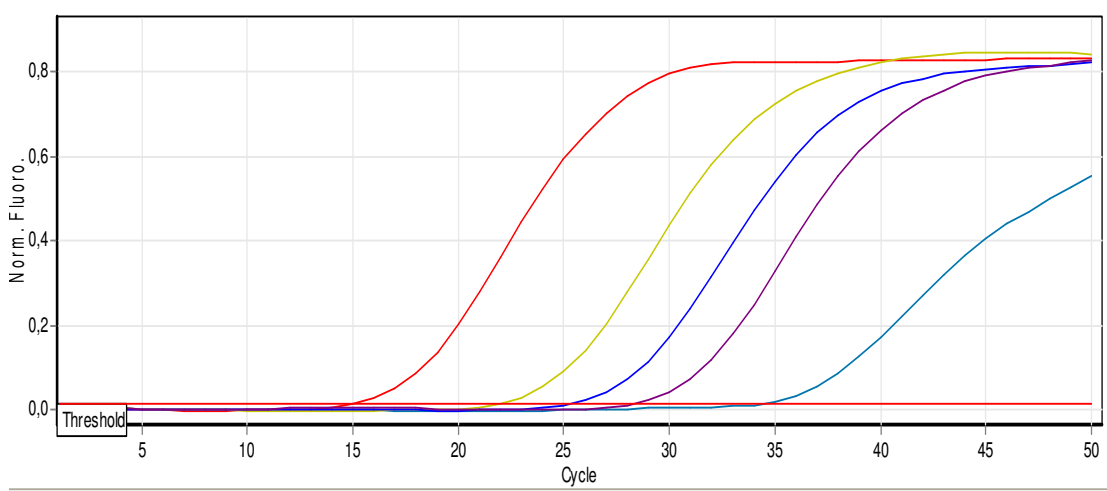
Şekil 4.6: ACTB geni ekspresyonunun Real time PZR görüntüsü



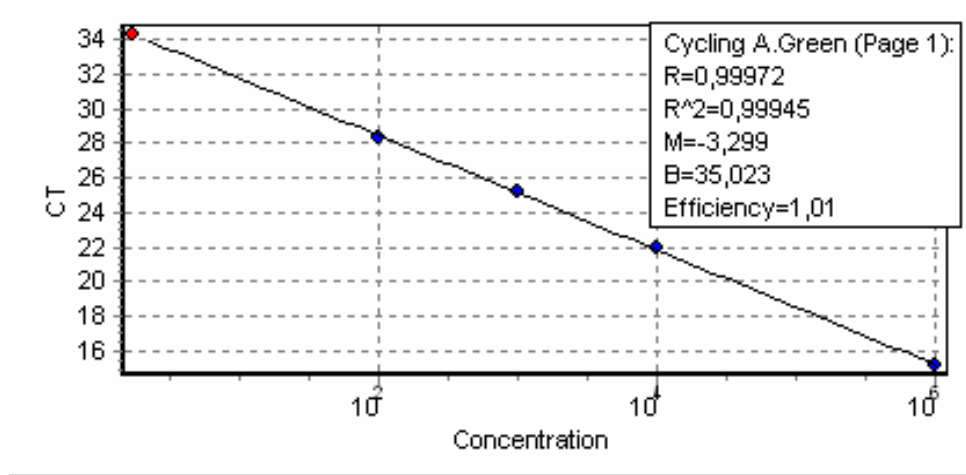
Şekil 4.7: ACTB geni ekspresyon verimliliği

4.2.2.CYP1A2 Geni Ekspresyon Bulguları

CYP1A2 geni mRNA ekspresyonu sadece Alkol bağımlısı hasta grubunda 2 örnekte tesbit edilmiştir, kontrol grubunda ekspresyon bulunamamıştır. Bu yüzden istatistiksel olarak değerlendirilememiştir. CYP1A2 geninin Real Time PZR görüntüsü ve ekspresyon verimliliği Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’da verilmektedir.



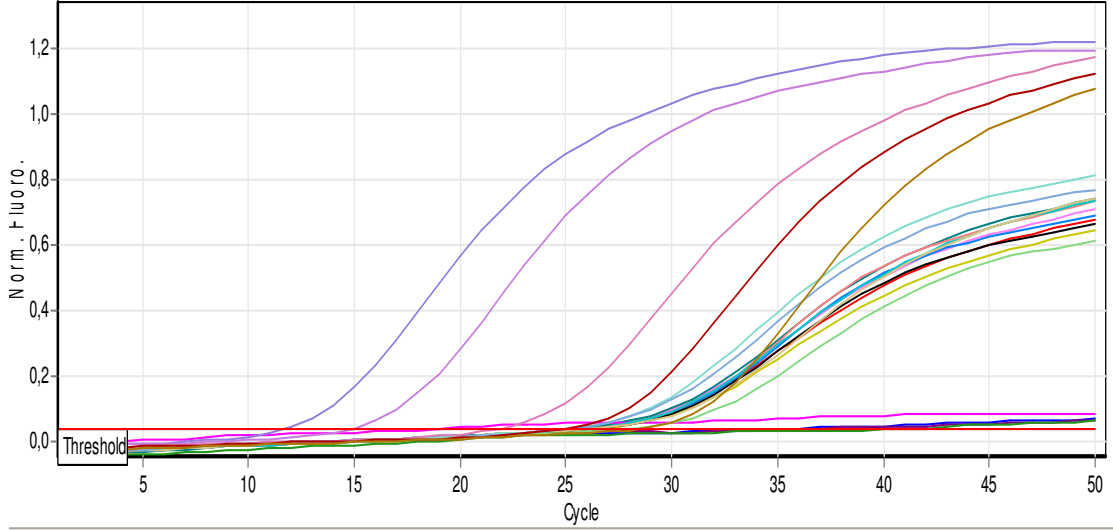
Şekil 4.8: CYP1A2 geni ekspresyonu Real Time PZR görüntüsü.



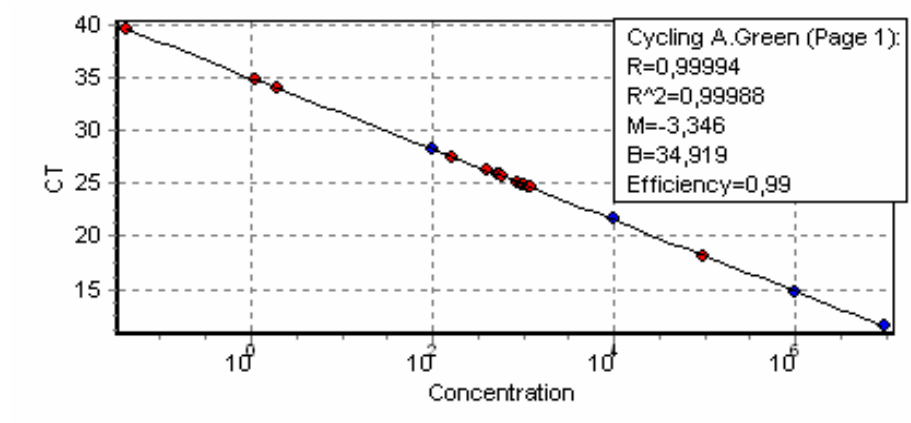
Şekil 4.9:CYP1A2 geni ekspresyon verimliliği.

4.2.3.CYP2D6 Geni Ekspresyon Bulguları

CYP2D6 geni mRNA ekspresyonu hasta ve kontrol grubu sonuçları Tablo 4.7 ve Tablo 4.8’de verilmektedir. CYP2D6 geninin Real Time PZR görüntüsü ve ekspresyon verimliliği Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de verilmektedir.



Şekil 4.10: CYP2D6 geni ekspresyonu Real Time PZR görüntüsü.



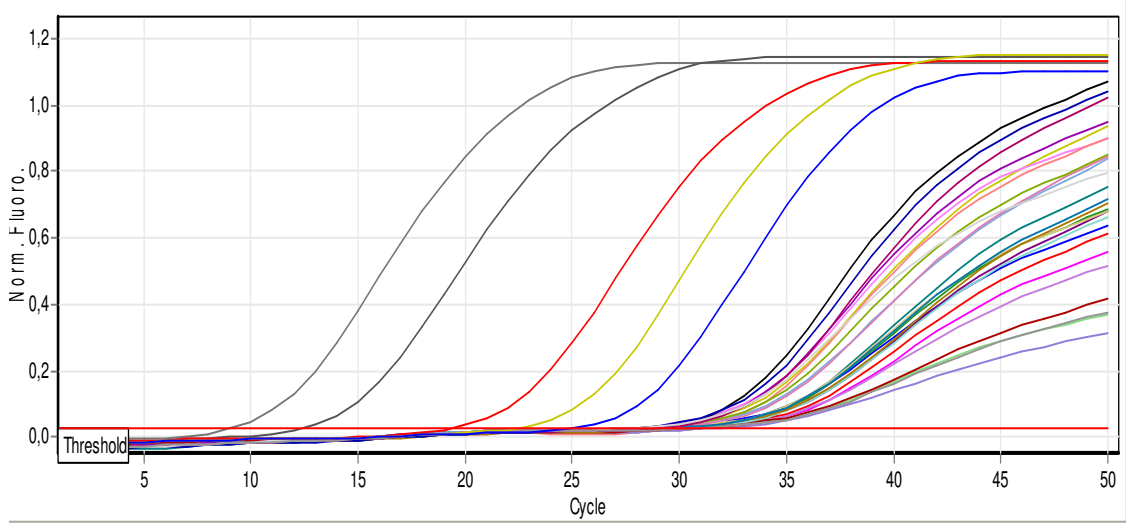
Şekil 4.11: CYP2D6 geni ekspresyon verimliliği.

CYP2D6 geni ekspresyon seviyelerinin alkol bağımlısı hasta ve kontrol grupları arasındaki ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesinde Kovaryans analizi ve Bağımsız iki örneklem T testi kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Ayrıca hasta grubunda tedavi öncesi ve sonrası ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasında Kovaryans analizi ve Bağımlı iki örneklem T testi kullanılmıştır. Tedavi öncesi ve sonrası arasında

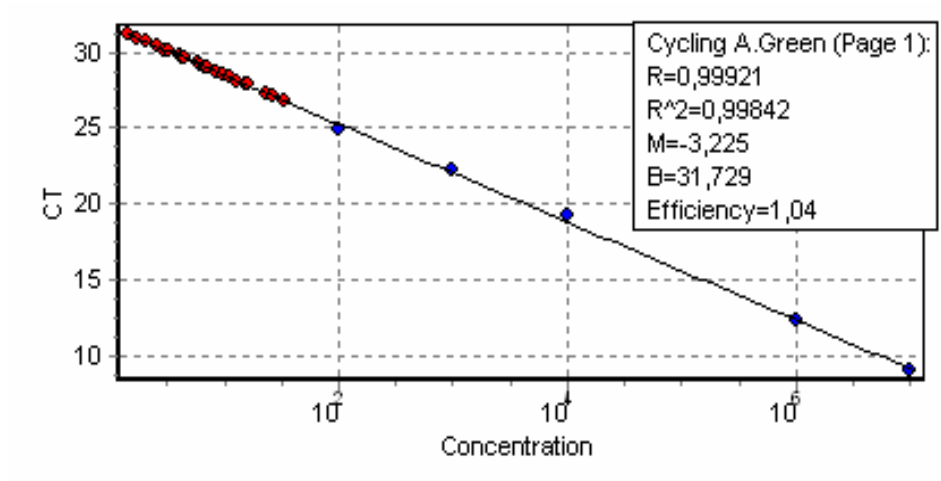
istatistiksel olarak fark bulunamamıştır ($p>0.05$) İstatistiksel sonuçlar Tablo 4.9’da verilmektedir.

4.2.4.CYP2E1 Geni Ekspresyon Bulguları

CYP2E1 geni mRNA ekspresyonu hasta ve kontrol grubu sonuçları Tablo 4.7 ve Tablo 4.8’de verilmektedir. CYP2E1 geninin Real Time PZR görüntüsü ve ekspresyon verimliliği Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’de verilmektedir.



Şekil 4.12:CYP2E1 geni ekspresyonu Real Time PZR görüntüsü.



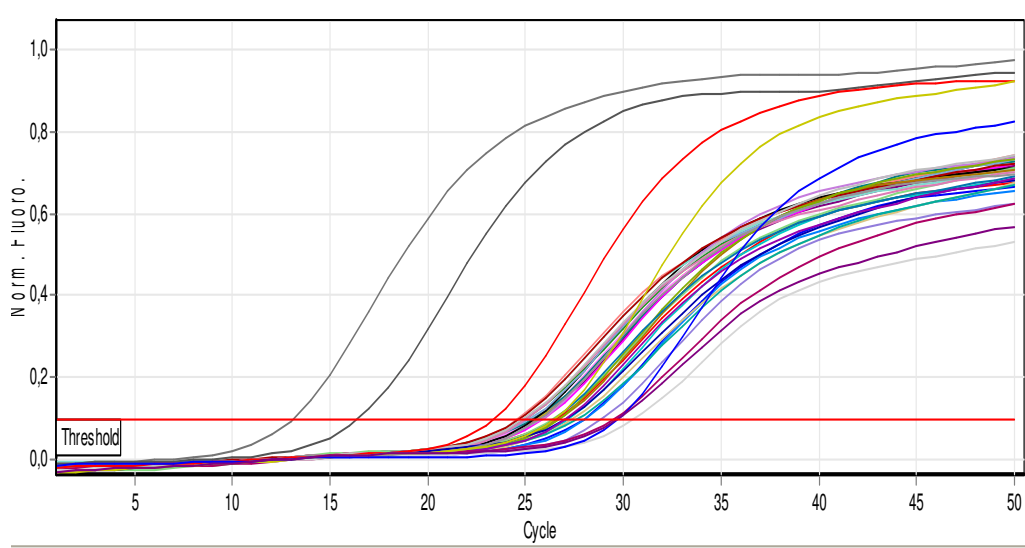
Şekil 4.13:CYP2E1 geni ekspresyon verimliliği.

CYP2E1 geni ekspresyon seviyelerinin alkol bağımlısı hasta ve kontrol grupları arasındaki ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesinde Kovaryans analizi ve Bağımsız iki örneklem T testi kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grupları arasında

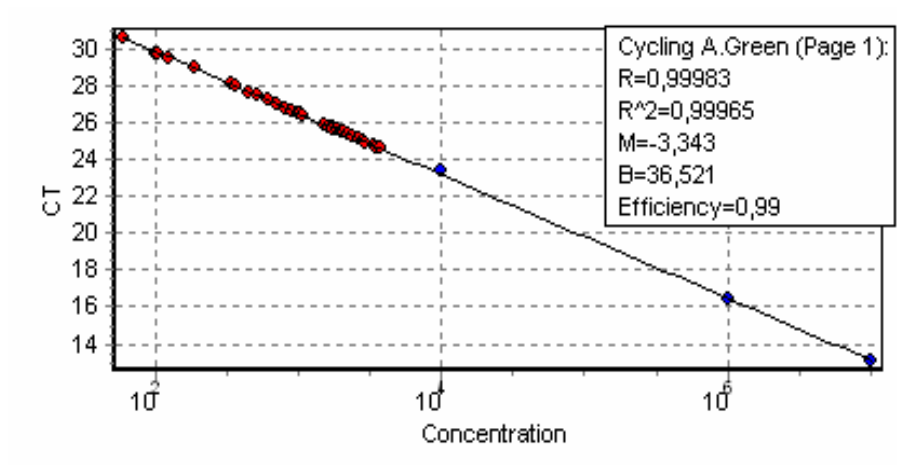
istatistiksel olarak fark anlamlı bulunamamıştır ($p>0.05$). Ayrıca hasta grubunda tedavi öncesi ve sonrası ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasında Kovaryans analizi ve Bağımlı iki örneklem T testi kullanılmıştır. Tedavi öncesi ve sonrası arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır ($p>0.05$). İstatistiksel sonuçlar Tablo 4.9’da verilmektedir.

4.2.5.CYP3A4 Geni Ekspresyon Bulguları

CYP3A4 geni mRNA ekspresyonu hasta ve kontrol grubu sonuçları Tablo 4.7 ve Tablo 4.8’de verilmektedir. CYP3A4 geninin Real Time PZR görüntüsü ve ekspresyon verimliliği Şekil 4.14 ve Şekil 4.15’de verilmektedir.



Şekil 4.14:CYP3A4 geni ekspresyonu Real Time PZR görüntüsü.



Şekil 4.15:CYP3A4 geni ekspresyon verimliliği.

CYP3A4 geni ekspresyon seviyelerinin alkol bağımlısı hasta ve kontrol grupları arasındaki ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesinde Kovaryans analizi ve Bağımsız iki örneklem T testi kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Ayrıca hasta grubunda tedavi öncesi ve sonrası ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasında Kovaryans analizi ve Bağımlı iki örneklem T testi kullanılmıştır. Tedavi öncesi ve sonrası arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır ($p>0.05$). İstatistiksel sonuçlar Tablo 4.10'da verilmektedir.

Tablo 4.8:Kontrol grubunda CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 genlerinin ekspresyon verileri.

SIRA NO	CYP 2D6/ACTB	CYP 2E1/ACTB	CYP 3A4/ACTB
K1	$2,38249.10^{-5}$	$7,73896.10^{-7}$	$1,3156210^{-5}$
K2	0	0	0,005404761
K3	$7,64918.10^{-6}$	$1,9123.10^{-6}$	0,000302461
K4	$1,0843.10^{-5}$	$8,09182.10^{-7}$	$5,1787610^{-5}$
K5	$1,46274.10^{-5}$	$5,62594.10^{-7}$	$2,5785610^{-5}$
K6	$2,07634.10^{-5}$	$9,88735.10^{-7}$	0,000159022
K7	4,706666667	0	0,026666667
K8	0	0	0,02006689
K9	$5,8182.10^{-6}$	$1,24676.10^{-6}$	0,000334131
K10	$1,69893.10^{-5}$	$1,02965.10^{-6}$	0,00043889
K11	0,0125	0	0,0625
K12	0	$1,17319.10^{-6}$	0,000109473
K13	0	0	0,107142857
K14	5	0	0,4
K15	$7,25838.10^{-6}$	$1,17703.10^{-6}$	0,000117507
K16	12,02564103	0,102564103	98,38461538
K17	0	0	$3,4572610^{-7}$
K18	0,000145991	$9,1244610^{-7}$	0,000211687
K19	0,000143571	$8,89910^{-7}$	0,000125847
K20	0,051282051	0	0,076923077
K21	0,00013014	$5,2405410^{-7}$	0,000248052
K22	0,000175952	$1,9769810^{-6}$	0,000551826
K23	0,000188693	$1,2485910^{-6}$	0,000151235

Tablo 4.9: Hasta grubunda ilk ve son kan (S) örneklerindeki CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 genlerinin ekspresyon verileri.

SIRA NO	CYP 2D6/B.ACT	CYP 2E1/B.ACT	CYP 3A4/B.ACT
1	7,24882.10-6	2,73144.10-6	1,2239.10-5
2	6,53369.10-6	3,47898.10-6	5,46454.10-5
2S	3,78549.10-5	7,13964.10-7	3,36753.10-5
3	1,50754.10-6	3,01508.10-6	2,61307.10-5
3S	0,002038043	5,16614.10-6	0,08645024
4	1,54903.10-6	2,06538.10-6	0,00027547
5	2,17201.10-5	7,75719.10-6	0,000477843
6	0	0	0,007376807
7	0,01532902	0,000378854	0,184268812
8	0,000512076	1,39657.10-5	5,77249.10-5
9	5,59597.10-5	6,43536.10-6	0,001133603
10	1,65247.10-5	9,91482.10-6	0,012732275
10S	0,000766377	4,51253.10-6	0,001599315
11	8,13438.10-6	2,71146.10-6	0,000268435
11S	4,77399.10-5	0	0,001208153
12	2,16994.10-5	5,94932.10-7	1,38556.10-5
12S	3,30038.10-5	0	0,005771658
13	8,39179.10-6	9,74047.10-7	0,000130372
14	4,76597.10-6	1,90639.10-7	0,000124297
14S	1,90158.10-5	0	0,001606868
15	6,4731.10-8	1,61828.10-7	0,000102955
15S	8,78451.10-6	0	0,003781731
16	8,19142.10-6	2,04785.10-6	0,014537717
17	6,39267.10-6	1,52206.10-6	0,001322978
18	4,2768.10-5	9,08609.10-7	5,46011.10-5
19	8,26496.10-6	8,06337.10-7	6,59181.10-5
20	1,0706.10-5	3,87195.10-7	5,55432.10-5
21	0,000232592	4,47293.10-6	0,031668359
21S	4,36428.10-6	3,11734.10-7	0,004145441

Tablo 4.9: Hasta grubunda ilk ve son kan (S) örneklerindeki CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 genlerinin ekspresyon verileri devamı.

SIRA NO	CYP 2D6/ACTB	CYP 2E1/ACTB	CYP3A4/ACTB
22	7,86468.10-7	2,78889.10-7	0,001317055
22S	2,51954.10-7	6,46037.10-7	0,000380516
23	0,000945901	4,204.10-7	0,017155487
24	0,000661063	5,4334.10-7	0,002272066
25	8,65636.10-7	4,55598.10-7	0,000283154
26	0,00013134	4,10437.10-7	0,000846322
27	0,000318446	1,92997.10-7	0,003791435
28	2,31635.10-7	2,92872.10-7	0,001276389
28S	0	1,11633.10-7	0,000726731
29	3,76591.10-7	3,28901.10-7	0,00085103
29S	2,21133.10-7	0	0,000926492
30	5,63802.10-7	5,03394.10-7	9,8766.10-7
30S	4,29439.10-7	3,62906.10-7	0,000568553
31	1,34145.10-7	1,80579.10-7	9,23534.10-7
31S	2,96812.10-7	4,39721.10-7	0,000482869
32	0,000100438	1,04112.10-7	0,000618551
32S	1,30677.10-7	2,17794.10-7	0,000366983
33	3,75139.10-7	1,8079.10-7	0,000996605
33S	2,4194.10-7	5,22173.10-7	0,000650802
34	2,04916.10-7	1,74396.10-7	0,001223826
34S	1,15758.10-7	1,15758.10-7	0,000865291
35	5,13773.10-7	1,5111.10-7	0,000446205
35S	3,33485.10-7	0	0,003446014
36	4,16131.10-7	1,18895.10-7	0,001024474
36S	1,22941.10-7	1,75631.10-7	0,000939623
37	9,17268.10-7	3,15311.10-7	0,000955678
37S	3,12498.10-7	3,96125.10-7	0,001042688
38	1,35434.10-7	8,46463.10-7	0,000156596
38S	1,94273.10-7	2,15859.10-7	0,001164201
39	3,36949.10-7	2,18393.10-7	0,000835196
39S	7,31332.10-7	3,48253.10-7	0,004096619

Tablo 4.9: Hasta grubunda ilk ve son kan (S) örneklerindeki CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 genlerinin ekspresyon verileri devamı

SIRA NO	CYP2D6/ACTB	CYP2E1/ACTB	CYP3A4/ACTB
40	9,81253.10-6	2,80358.10-6	0,000382689
40S	3,53729.10-6	1,76864.10-6	9,78281.10-5
41	1,59795.10-5	3,46222.10-5	0,001209113
41S	1,56596.10-5	5,93984.10-6	0,000563205
42	5,10779.10-5	9,07304.10-6	0,00023926
42S	1,71359.10-5	3,27598.10-6	0,000177407
43	1,30183.10-5	4,6494.10-6	5,81176.10-5
43S	6,47984.10-6	1,03677.10-5	2,59194.10-5
44	1,84704.10-5	2,91638.10-6	0,002873608
44S	2,08356.10-5	1,66685.10-6	0,000716327
45	3,20473.10-5	0	0,000652964
45S	1,01849.10-5	3,39497.10-6	0,001963993
46	6,95402.10-6	9,07046.10-7	0,000332583
46S	8,51643.10-6	0	0,000837035
47	3,76923.10-6	4,71154.10-7	0,01020613
47S	1,68187.10-5	2,40267.10-6	0,000143199
48	0	0	0,000583138
48S	0	0	0,002207175
49	1,53748.10-5	7,68738.10-7	0,000767584
49S	8,05973.10-7	1,61195.10-6	3,46568.10-5
50			
50S	1,48032.10-5	1,85041.10-6	0,001319709

Tablo 4.10: Hasta grubunun ilk kan ve son kan, kontrol grubunun ilk kan örneklerinde çalışılan CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 genleri ekspresyon sonuçlarının toplu istatistiksel değerlendirmeleri.

GENLER		İLK KAN (hasta n=50, kontrol n=23) Geometrik Ortalama (%95 GA)	SON KAN (hasta n=32) Geometrik Ortalama (%95 GA)	p (gruplar- arası)	p (ölçümler- arası)	p* (gruplar- arası)	p* (ölçümler- arası)
CYP2D6	HASTA	2.002248.10 ⁻⁵	2.410868 10 ⁻⁵	0.296	0.661	0.069	0.329
	KONTROL	7.819751.10 ⁻⁵	-				
CYP2E1	HASTA	1.79888.10 ⁻⁶	1.854031.10 ⁻⁶	0.676	0.327	0.071	0.956
	KONTROL	1.015503.10 ⁻⁶	-				
CYP3A4	HASTA	5.405588.10 ⁻⁴	5.882772 10 ⁻⁴	0.412	0.286	0.779	0.533
	KONTROL	6.759383 10 ⁻⁴	-				

p; Kovaryans Analizi

P*; T testi

5. TARTIşMA VE SONUÇ

Alkolizm, alkol bağımlılığı olarak da bilinir, hasar bırakan bir bağımlılık hastalığıdır. İçicinin sağlığı, akrabalık ilişkileri ve sosyal statüsündeki negatif etkilere rağmen alkol tüketiminde kontrolsüz ve kompulsif olmasıyla karakterizedir. Diğer madde bağımlılıkları gibi alkolizm de tıbbi olarak tedavi edilebilir bir hastalık olarak tanımlanır. Alkolizmin altında yatan biyolojik mekanizmalar belirsizdir, sosyal çevre, stres, mental sağlık, genetik meyil, yaş, etnik grup ve cinsiyet risk faktörleridir.

Alkol bağımlılığı; ilk alkol kullanımının başlamasından yaklaşık 5 yıl sonra gelişen bir hastalıktır. Alkol bağımlısının klinik tedaviye başvurma davranışı ise yaklaşık 15-20 yıllık bir süreç sonunda olmaktadır (99,100).

Ülkemizde (96) alkol kullanım sıklığının araştırılmasına yönelik çalışmaların sayısı sınırlıdır. Bu konuda yapılan bir çalışmada, erkeklerde sosyal içicilik oranı %10.4, bağımlılık oranı ise %1.6 olarak; kadınlarda sosyal içicilik yaygınlığı %3.4, bağımlılık ise %0.03 oranında bulunmuştur.

Mırsal ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada alkol bağımlılığında bir yıllık içmeme oranı ortalama %65 dolaylarındadır. Ayrıca ilk tedavi sonrası remisyon oranını %88.2 gibi yüksek bir oranda bulunmuştur. İlk tedaviye başvuru nedenlerinin belirlenmesi, klinik tedavi sürecindeki özelliklerin saptanması, klinik tedavi sonrası

izleme özelliklerinin kontrollü-prospektif çalışmalarla takip edilmesi, bağımlılığın tedavisi açısından çok büyük gelişmeler sağlayacaktır (96).

Kronik alkol tüketimiyle ilişkili hastalıklardan en önemlisi ve en yaygını alkolle indüklenen karaciğer hasarıdır. Karaciğer alkol metabolizmasında birincil bölgedir. Metabolik sürecin ilk aşamasında alkol asetaldehite dönüştürülür, reaksiyon temelde alkol dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenir, mikrozomal sistem daha az aktiftir. Asetaldehit hızlı bir şekilde asetata, o da karbondioksit ve suya çevrilir (Şekil 2.1). Asetaldehit karaciğer ve diğer organlar için çok toksik olduğu için bu metabolik dönüşüm çok önemlidir. Asetaldehitin yükselmesi kronik alkol tüketimiyle ilişkilidir ve alkoliklerde sıklıkla gözlenen alkolle ilişkili yaralanmaların sebebi olduğu ileri sürülmektedir. Bazı teoriler, karaciğerdeki etanolün zararlı etkileri için etanol metabolizmasını öne sürmektedirler (99).

Alkol dehidrogenaz etanolün çeşitli metabolik etkilerini açıklar fakat tolerans açıklanamaz. Bu gerçek, kronik alkol tüketiminden sonra düz endoplazmik retikulumdaki proliferasyonun keşfinden sonra Lieber ve DeCarli tarafından ilave bir yolağın mevcudiyetiyle açıklanmıştır. Sitokrom P450'yi de içeren mikrozomal etanol oksidasyon sistemi (MEOS) ismiyle tanımlanmıştır. Alkol dehidrogenaz enzimi olmayan geyik farelerinde, kronik alkol tüketiminden sonra sitokrom P450, özellikle CYP2E1, artışıyla ilişkili olarak MEOS aktivitesi artmıştır (100).

İnsan Sitokrom P450 (CYP) karma fonksiyonlu mono-oksijenazları şifreleyen süper bir ailedir, en az 50 farklı gen 10 ailede gruplandırılmıştır ve yaklaşık %40 sekans homolojisi gösterir. CYP'ler temelde karaciğerde eksprese olur, CYP1, CYP2 ve CYP3 ailesi genleri endoplazmik retikulumda lokalizedir, ve en büyük rolü ksenobiyotiklerin metabolizmasıdır. CYP'ler faz I enzim reaksiyonlarından sorumludur, fonksiyonel grupların oluşmasıyla sonuçlanır ve substratların 'reaktif merkezleri'(örn;-OH, -NH₂, -SH, -COOH) onları faz II konjugasyon reaksiyonlarına hazırlar. Fakat onlar ayrıca toksik veya karsinogenik bileşiklerin aktivasyonuna da neden olabilir. Toplumda bu enzimlerin çoğu iyi karakterize edilmiş fonksiyonel polimorfizmler gösterir (99).

CYP1A2'de yaygın bireylerarası varyasyona rağmen, sistematik sekanslama çabaları ile prediktif CYP1A2 polimorfizmleri gösterilememiştir Bugüne kadar oniki CYP1A2 varyant allel bildirilmiştir. Bunlardan sadece üçünün fonksiyonel sonuçları tanımlanmıştır. İnsanda CYP1A2 intron I'deki 734 (C/A,*1F) polimorfizmi özellikle

sigara içenlerde normal (CC) allelle kıyaslandığında artmış enzim aktivitesiyle ilişkilendirilmektedir (101, 102). Torres ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada %46 C/A ve %54 AA genotipi görülmüştür, hiç normal (CC) genotipe rastlanmamıştır. Bu değerler Asya ve Kafkas popülasyonlarıyla benzerdir (103).

Bizim çalışmamızda CYP1A2*1F polimorfizmi hastalarda normal (CC), heterozigot (C/A) ve homozigot mutant (AA) yüzdeleri sırasıyla %92.6, %3.7, %3.7 kontrol bireylerinde ise %39.1, %43.5, %17.4 olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasındaki polimorfizm değerlendirmesi istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur.

CYP1A2 geni çalışmaya dahil edilirken hem hasta hem de kontrol bireylerinin sigara içen kişilerden oluşması ve ayrıca CYP1A2 geninin substratları arasında olan diazepamın alkol hastalarında tedavi sürecinde kullanılıyor bu genin çalışmaya dahil edilmesinin nedenidir.

Hiperindüksiyon, bir etken madde mevcudiyetinde normal indüksiyon düzeyinden daha yüksek indüksiyon göstermesidir. Normal indüksiyon fenotipine sahip bireylerden yaklaşık %40 daha yüksek bir indüksiyon olabilir. Bir veya iki CYP1A2*1F alleli içeren genotipler hiperindüksiyon fenopinine uygundur. Bu fenotipte olan hastalar ilaçları normalden daha hızlı metabolize edecekleri için CYP1A2 substratlarının artmış dozajı gerekebilir (5,11).

Bu çalışmada CYP1A2*1F polimorfizmi açısından hasta bireylerin çoğunlukla normal genotipte olması olumlu olarak değerlendirilmektedir. Çünkü CYP1A2*1F polimorfizmi artmış enzim indüksiyonu ile ilişkilidir ve alkol bağımlılarına yoksunluk belirtilerini azaltmak amaçlı verilen diazepamın terapatik doza ulaşması mümkün olmayabilirdi.

CYP1A2 kimyasal toksinlerden (örneğin sigara dumanında bulunan) karsinojenlere metabolik aktivasyon sürecine de dahil edilir. 1A2'nin metabolik aktivitesi genetik faktörlerden, çevresel faktörlerden ve ilaç-ilaç etkileşimlerinden anlamlı varyasyon gösterir (104, 105).

CYP enzimlerinin temel lokalizasyon yeri karaciğerdir. Fakat CYP enzimlerinin ekspresyonu çok çeşitli dokularda örneğin; bağırsak, akciğerler ve kanda tanımlanmaktadır. Kandaki CYP enzim aktivitesi ilk kez 30 yıl önce tanımlanmıştır. Lökositler hızlı bir devirle çok büyük miktarlarda bulunmasına rağmen, kandaki ilaç

metabolizmasında kantitatif ve klinik önem açısından ihmal edilebilmektedir. Bununla birlikte kemik iliğinin kimyasal yolla oluşan toksisitesinde hematojen CYP enzimlerinin önemini göz ardı edilemez. İlaçların neden olduğu ciddi kan diskrazileri nadiren düzenli olarak bildirilmektedir. Kandaki sitokrom P450 enzimleri etyolojik önemini bu tür ilaç yan etkilerinden almaktadır (106).

Literatürde CYP1A2'nin birçok aracıyla veya gıda-ilaç etkileşimleriyle indüklenabilir veya inhibe edilebilir (açık veya kapalı pozisyona getirilebilir) olduğu bildirilmektedir (103,104).

CYP1A2 geninin ekspresyon çalışması 50 hasta ve 23 kontrol bireyi dahil edilmiştir. Her iki gruptaki bireyler de sigara kullanmaktadırlar. Ayrıca hastalara tedavi süresince yoksunluk belirtilerini önlemek amacıyla diazem tedavisi uygulanmaktadır. Ancak alkol bağımlısı iki hastanın tedavi öncesi kanları hariç ne hastaların tedavi öncesi ve sonrasında ne de kontrol bireylerinde CYP1A2 gen ekspresyonuna rastlanmamıştır.

Literatürde CYP1A2 ekspresyonu bir çalışma hariç kanda tanımlanmamıştır. Finnström ve arkadaşları lökositlerdeki sitokrom P450 gen ekspresyonunun cinsiyet farklılıklarına bakmış oldukları çalışmalarında diğer sitokrom P450 (1B1, 2E1 ve 3A4) ekspresyon düzeylerine kıyasla 1A2 ekspresyonunun çok daha düşük ve daha az bireyde olduğunu tesbit etmişlerdir. Bu yüzden CYP1A2'nin kanda çok az önemli olduğu görüşünü ileri sürmüşlerdir (104).

Biz de çalışmamızda CYP1A2 ekspresyonunu öncelikle bağımlılardaki diazem tedavisi ile birlikte yoksunluk belirtilerinin azaltılmasında gerekli doz ayarlamalarında kullanılabilir mi? sorusuna cevap aramak için çalışmıştık. Ancak kanda ekspresyon tesbit edilememiş olması dolayısıyla böyle bir kullanım mümkün görülmemektedir.

Sitokrom P450-2D6 (CYP2D6), birçok tipik ve atipik antipsikotiğin ve antidepresanların metabolizmasında rol oynamaktadır. Bu enzimin polimorfik olduğu ve buna bağlı olarak birçok ilacın metabolize edilme hızında bireyler ve toplumlar arası farklılıkların bulunduğu bilinmektedir. Bu enzimin aktivitesi bakımından bireyler yavaş, orta, hızlı ve ultra hızlı metabolizörler olmak üzere dört alt gruba ayrılırlar(105).

Bu enzimin aktivitesi toplumdan topluma değişiklik gösterebildiği gibi psikiyatrik hasta grubunda bu farklılıkların normal popülasyondan farklı olabileceği belirtilmektedir. A.B.D. ve Avrupa'da yavaş metabolizör oranı yaklaşık %7 iken, A.B.D.'de bir

psikiyatri hastanesinde yatarak tedavi gören 100 hasta üzerinde yapılan çalışmada hastaların %14'ünün yavaş metabolizör oldukları bulunmuştur (104).

Ülkemizde Herken ve arkadaşlarının psikiyatri hastalarında yapmış olduğu çalışmada CYP2D6*4 polimorfizmi allel sıklığı%8.1, Aynacıoğlu ve ark. Türk popülasyonunda tarama amaçlı yapmış olduğu çalışmada ise %11 olarak bulunmuştur (105,106).

Bizim çalışmamızda hasta grubunda CYP2D6*4 allel sıklığı %5.3 kontrol grubunda ise %13.1 olarak tesbit edilmiştir. Sonuçlarımız literatürle uyumlu bulunmuştur (105,106).

CYP2D6 ile metabolize edilen ilaçlarla tedavi edilen psikiyatri hastalarında yapılan retrospektif analizlerin sonuçları, genotiplemenin tedavi başarısını arttırdığını, advers ilaç etkilerini önlediğini ve tedavinin maliyetini azalttığını göstermektedir. Bu nedenlerle, antidepresanlar ya da antipsikotikler gibi psikiyatride sıklıkla kullanılan ilaçların uygulanmasından önce, hastanın özellikle CYP2D6 genotip ve/veya fenotipinin tayin edilmesinin çok önemli olduğu vurgulanmaktadır (105).

CYP2D6 ekspresyonu, çalışmamızda hem hasta hemde kontrol grubunda tesbit edilmiş olup gruplar arasında ekspresyon düzeyleri açısından istatistiksel fark anlamlı bulunamamıştır ancak hasta ve kontrol sayısı artırıldığında bu genin alkolizm için önemli olabileceğini düşünmekteyiz.

CYP2D6*4 polimorfizmi sonucu bir stop kodonu oluşmakta ve hiç fonksiyonel CYP2D6 proteini üretilmemektedir. Bizim çalışmamızda CYP2D6*4 polimorfizmi açısından hem hastalarda hem de kontrollerde heterozigot genotipler tesbit edilmiştir. Hiç CYP2D6*4/*4 genotipine rastlanmamıştır. Buna göre bir fonksiyonel allelin enzim aktivitesini azaltmadan mRNA ekspresyonuna devam ettiği görülmektedir.

Bu konuda Miksys ve arkadaşlarının yapmış olduğu ilginç çalışmada alkoliklerde bölgesel ve hücresel CYP2D6 mRNA ve protein düzeyleri incelenmiştir. Alkoliklerde beyinde yükselmiş CYP2D6 ekspresyonunun santral etkili ilaçlar ve alkolün nörotoksik ve davranışsal etkileri aracılığıyla değişmiş duyarlılığa katkıda bulunabileceğini ileri sürülmüştür (107).

Herken ve arkadaşlarının çalışmalarına göre Türk psikiyatri hastalarına sitokrom P450 ve 2D6 enzimiyle metabolize edilen antipsikotik ve antidepresanlar verildiğinde hastaların yaklaşık %10'unda etkili kan düzeyi elde edilmeyeceği ve %1-2 hastada kan düzeylerinin aşırı yükselmesine bağlı olarak şiddetli ilaç yan etkisi görülmüştür (105).

CYP2D6 tarafından metabolize edilen ilaçların cevabı bireyler arasında farklılık göstermektedir. Birincil sebep polimorfik gen ekspresyonudur, fakat hormonal durum, diyet ve tütün kullanımı gibi faktörler de etkileyebilmektedir ve hatta beyinde bu enzimin ekspresyonunun ksenobiyotik regülasyonu da ilaç cevabı etkisine karışabileceği öne sürülmektedir (106).

Literatür verileri ve bizim sonuçlarımızı birlikte değerlendirdiğimizde antipsikotik ve antidepresanların kullanılmasından önce bu grup ilaçların çoğunun metabolizmasından sorumlu olan sitokrom P450-2D6 enzim aktivitesinin tayin edilmesi etki ve yan etkilerin tahmin edilebilmesi yönüyle faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

Çeşitli P450'ler arasında CYP2E1; etanol, aseton, ilaçlardan asetaminofen, izoniazid ve birçok prokarsinojen, benzen, N-nitrozodimetilamin (NMDA) ve siterin gibi birçok düşük molekül ağırlıklı bileşiğin biyoaktivasyonu ve metabolizmasındaki rolünden dolayı çok dikkat çekmektedir. Diğer ksenobiyotik-metabolizma enzimleri gibi CYP2E1 polimorfizmleri de etnik ve sosyal gruplar arasındaki sıklığı oldukça farklıdır.

Ulusoy ve arkadaşlarının Türk popülasyonunda yapmış oldukları çalışmada %96,12 normal (c1/c1), %3,88 heterozigot (c1/c2) ve %0 homozigot mutant (c2/c2) genotip tesbit edilmiştir. CYP2E1*5B polimorfizmi Kafkasyalılarla uyumlu Doğu Asya toplumlarından farklı olarak bulunmuştur (43).

Bizim çalışmamızda gruplar CYP2E1 c1/c2 polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde hasta grubunda %90,9 normal (c1/c1), %9,1 heterozigot (c1/c2) ve %0 homozigot mutant (c2/c2); kontrol grubunda ise %95,5 normal (c1/c1), %4,3 heterozigot (c1/c2) ve %0 homozigot mutant (c2/c2) genotip tesbit edilmiştir. Nadir c2/c2 alleli bizim gruplarımız arasında da tesbit edilememiştir. Gruplar arasında istatistiksel bir fark yoktur. Sonuçlarımız literatür ile uyumlu bulunmuştur (43).

Gao ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada CYP2E1-Rsa polimorfizmi artmış rektal kanser riskiyle ilişkili olarak bulunmuştur. Ayrıca önemli bir ilişki de hem kolon hem de rektal kanser gelişiminde alkol ve sigara içme alışkanlıklarıyla Rsa polimorfizmi arasında tesbit edilmiştir (108).

CYP2E1 genindeki nadir Rsa (c2) alleli artmış transkripsiyonel aktivite CYP2E1 mRNA ve protein seviyelerinin yükselmesi ile ilişkilendirilmektedir. Bununla birlikte bazı çalışmalarda yaygın genotip taşıyanların daha yüksek CYP2E1 enzim aktivitesine

sahip oldukları gösterilmektedir. CYP2E1 aktivitesindeki farklılıkların etnik durum ve cinsiyet farklılıklarından kaynaklandığı öne sürülmüştür. Bayanlar erkeklere göre %25 daha az aktivite göstermektedir. CYP2E1 aktivitesi Japonlarda Kafkasyalılardan, vücut ölçülerindeki farklılık dikkate alındıktan sonra bile, %30-%40 daha az görülmektedir (43).

CYP2E1 ekspresyon çalışmasındaki bulgularımız ise; Hasta grubundaki CYP2E1 ekspresyonu kontrol grubundaki ekspresyonla kıyaslandığında %95 güven aralığında değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde fark yoktur. Ancak artmış ekspresyon değerleri tesbit edilmiştir ve hasta sayısının artırılmasıyla farkın anlamlı olabileceğini düşünmekteyiz.

CYP2E1'in aktivitesi etanol tarafından indüklendiği gibi obezite, açlık ve karaciğer fonksiyon bozukluğu gibi çeşitli fizyolojik belirleyiciler tarafından da değiştirilmektedir. Literatürde de alkol tüketimi ve kandaki CYP2E1 ekspresyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda ılımlı alkol tüketimiyle CYP2E1 ekspresyonunun indüklenmediği sadece ağır alkol tüketiminin CYP2E1 ekspresyonuyla ilişkisinin olduğu gösterilmiştir (109).

CYP2E1 substrat yokluğunda bile değişmiş NADPH oksidaz aktivitesi ve yüksek miktarda O_2 ve H_2O_2 radikalleri üretiminden dolayı ROS üretimi için etkili bir enzimdir (110).

CYP2E1 geninin ROS yolağındaki rolünden dolayı ekspresyon düzeyi artmış olan alkol bağımlısı hastalar için birçok kanser türüne artmış hassasiyetleri olduğu düşünülmektedir. Literatürde de CYP2E1 geni ve oral, özafagus, nazofarengal, kolon, rektal ve göğüs kanserleri arasında da artmış ilişkiler rapor edilmektedir (108).

Akut etanol tedavilerinin, CYP2E1 geni içerisinde etanole duyarlı özel unsurlar bulunmadığı için CYP2E1 mRNA düzeylerini etkilemediği gösterilmiştir (111).

Çalışmada alkol bağımlılarının tedavi öncesi ve tedavi sonrası CYP2E1 ekspresyon bulguları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bunun nedeni yukarıda belirtildiği gibi CYP2E1 geni içerisinde etanole duyarlı özel unsurlar bulunmayışı olabilir. Ancak neden etanol CYP2E1 ekspresyonunu indükleyebiliyor da etanol yokluğu bu genin ekspresyonunu azaltmıyor. Bunun muhtemel açıklamaları arasında alkol bağımlılarının tedavisi süresinin (yaklaşık 28 gün) CYP2E1 mRNA düzeyinin indirgenmesi için yeterli olmaması veya hastalarda bu tedavi sonrası

remisyona girenlerin yaklaşık %88.2 gibi yüksek bir oranda bulunması da olabileceği kanısındayız.

CYP3A4 karaciğerde en çok bulunan CYP türlerindendir. Toplam CYP içeriğinin %60'ından fazlasını oluşturduğu hesap edilmektedir. İnsan karaciğerindeki CYP3A4 aktivitesinde 60 kata kadar bireylerarası varyasyon bulunabilmektedir. CYP3A4 ekspresyonu çoğunlukla ksenobiyotik maruziyetiyle değiştirilmektedir. Enzim aktivitesindeki değişimlerin genetik temeli tam olarak anlaşılamamıştır (112).

CYP3A4 geninde 28'in üzerinde tek gen polimorfizmi (SNP) tanımlanmıştır, fakat bunlardan hiçbirisi in vivo'da bireylerarası önemli varyasyon göstermez. 5' kodlanmayan bölgedeki CYP3A4*V polimorfizminin enzimi indükleyebildiği gösterilmektedir. Sağlıklı bireylerdeki varyant allel sıklığı %1.5 olarak bulunmuştur Kafkasyalılarda bildirilen allel sıklıklarıyla uygundur (101,112).

Bizim çalışmamızda ne alkol bağımlısı hasta grubunda ne de kontrol grubunda CYP3A4*V polimorfizmi bulunamamıştır. Hasta ve kontrol grubu tamamen normal genotip göstermektedir.

Ülkemizde CYP3A4 polimorfizmleri ile ilgili yapılmış çalışmalar bulunamamıştır. Literatürdeki çalışmalarda da bu polimorfizm çok az tespit edilebilmiştir. CYP3A4*V polimorfizminin allel frekansının az olması ve bizim çalışmamızda hasta sayısının kısıtlılığı nedeniyle polimorfizm tesbit edilemediğini düşünmektedir.

Ksenobiyotiklerin metabolizmasında CYP3A4'ün çok önemli bir rolü vardır. Klinikte kullanılan ilaçların yaklaşık %50'sinin metabolizmasından sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. CYP3A4'ün aktif bölgesi çok geniş ve esnek olduğu için aynı anda birçok küçük molekülün aktif bölgeye bağlanmasına izin vermektedir (99,100).

Çalışmamızda CYP3A4 geninin periferik kandaki ekspresyon düzeylerine bakıldığında hem hastalarda hem de kontrol bireylerinde çalışmada incelenen diğer ekspresyon (CYP1A2, CYP2D6 ve CYP2E1) verileriyle kıyaslandığında oldukça yüksek oranlarda CYP3A4 ekspresyon düzeyleri tesbit edilmiştir ancak hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Bir enzim birden fazla ilacı metabolize edebildiği gibi bir ilaç da birden fazla enzim aracılığıyla metabolize olabilir (113). Örneğin; Alkol yoksunluğunda tedavi amaçlı kullanılan diazepam, hem CYP1A2, hem de CYP3A4 ile metabolize edilen bir ilaçtır. Birden fazla enzimle metabolize olan ilaçlarda alternatif metabolizma yolağı

oluştduğundan ilaç etkileşimleri azalabilmektedir. Tek bir yoldan birden fazla ilacın metabolize edilmesi ise ilaç-ilac etkileşimlerine neden olmaktadır.

Ayrıca etanol ve diğer alkollerin CYP3A4'ü indüklediği literatürde çeşitli çalışmalarda gösterilmektedir. İnsanlarda alkolün CYP3A'ları indüklemesi çok az tanımlanmıştır. İlaçların %50'den fazlasının metabolize edilmesinden sorumlu tutulan CYP3A4'ün etil alkol ve diazem metabolizmasındaki rollerinden dolayı ekspresyon verilerinin değerlendirilmesi bizim için önemliydi. Ancak gruplar arasında ve hastaların tedavi öncesi ve sonrası örneklerinde herhangi bir fark olmaması alkol bağımlılığının gelişiminde ve tedavi süresince bu genin ekspresyonunun takibi önemini yitirmektedir.

Alkolizm psikolojik ve sosyal faktörlerle birlikte kalıtımın kompleks şeklini içeren multifaktöriyel bir hastalık olduğu düşünülmektedir. Aile, evlat edinme ve ikiz çalışmalarının çoğu kalıtsal faktörlerin alkolizmin gelişmesi için önemli bir belirleyici olduğunu ortaya çıkarmıştır. Genetik ilişki çalışmaları genetik bozukluklar ve çevresel faktörlerden etkilenen kronik hastalıklar için çok sayıda genetik risk faktörleri tanımlanmıştır.

Bizim çalışmamıza ilaç metabolizmasında görev alan genlerden CYP1A2 (%11), CYP2D6 (%19), CYP2E1 (%4), CYP3A4 (%36) ilaç metabolizma oranlarınına bakıldığında bu genlerin hem fonksiyonel polimorfizmlerinin değerlendirilmesi hem de sözkonusu polimorfizmlerin ekspresyona yansımalarının yapıldığı oldukça değerli veriler mevcuttur. Tüm farmakogenetik değişiklikler farklı etnik gruplarda ve bunların altpopulasyonları arasında farklı sıklıklarda meydana gelmektedir. Bu etnik farklılıklar (gen coğrafyası) nedeniyle hem farmakogenetik çalışmalarda hem de farmakoterapide etnik orijinin göz önünde bulundurulmasının ne denli önemli olduğunu gösterilmektedir.

Çalışmaya dahil edilen alkol bağımlısı hastaların tedavileri için bu farmokogenetik yaklaşımların önemi açıktır. Alkolün ve tedavi amaçlı kullanılan ilaçların çapraz etkileşimlerinin hastanın tedavisinde önemle üzerinde durulması gereken konular olduğunu düşünmekteyiz. Alkol bağımlılığının tedavisinde hastaların remisyona girmesi ve tedavi için en az birkaç kez kliniğe yatırılmaları bu konuda uygulanan tedavilerin başarısını düşündürmektedir.

Günümüzde farmakogenetik biliminin gelişmesiyle hastanın genotipi ortaya konularak kişiye özel tedavi seçenekleri sunulmakta ve hangi ilacın nasıl verilmesi gerektiği

konularında daha özenli tedaviler sunulabilmektedir. Örneğin CYP1A2 ve CYP2D6 gibi yaygın varyasyon gösteren genlerin polimorfizmlerinin toplum taramaları yapılarak allel frekansları ortaya konulmalı ve toplumumuzdaki ilaç yan etkileri için risk hesaplamaları yapılabilmelidir.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization Regional Office in Europe. Handbook for action to reduce alcohol-related harm.
Erişim:[www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0012/43320/E92820.pdf], Erişim Tarihi:10 Aralık 2010.
2. Guilherme P, Homero P. The Role of Genetics in Alcohol Dependence. Rev. Bras. Psiquiatr., May 2004: vol.26 suppl.1, 54-58.
3. Yenigün M. Alkol Tüketimi ve Tıp (Alcohol Consumption and Medicine)Haseki Dergisi, 2006 :3-1.
4. Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi Psikoloji Köşesi
Erişim:[<http://www.biltek.tubitak.gov.tr/gelisim/psikoloji/biliyormusunuz.htm>] Erişim Tarihi:10 Aralık 2010.
5. Agarwal DP and Goedde HW. Pharmacogenetics of alcohol metabolism and alcoholism. Pharmacogenetics 1992: 2, 48-62.
6. Snyder R, Andrews LS, Klaassen CD et al. Toxic effects of solvents and vapors. In Casarett and Doull's Toxicology (The Basic Science of Poisons). 5th Ed., Health Professions Division 1996: 753-754.
7. Goedde HW, Agarwal DP. Polymorphism of aldehyde dehydrogenase and alcohol sensitivity. Enzyme 1987: 37, 29-44.
8. Sayın H. Vural N.Karaciğer Alkol Dehidrogenaz Aktivitesini Etkileyen Bazı Faktörlerin Araştırılması Ankara Ecz. Fak. Derg., 2000: 29 (2), 19-32.

9. Yüncü Z, Savaş HA. Madde kullanım bozukluklarında genetik bir gözden geçirme. Bağımlılık Dergisi 2007; 8, 146-152.
10. Herken H. Depresyonun etiolojisinde genetik kanıtlar. Klinik Psikiyatri 2002; (Suppl.4):5-10.
11. Gemma S, Vichi S, Testai E. Individual susceptibility and alcohol effects: biochemical and genetic aspects. Ann Ist Super Sanita 2006; 42: 8-16.
12. Şengül C, Herken H. Genetikten epigenetiğe alkol bağımlılığı, Anadolu Psikiyatri Derg 2009; 10: 239-245.
13. Agarwal DP. Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes. Pathol Biol 2001; 49,703- 709.
14. Neumark YD, Friedlander Y, Thomasson HR et al. Association of the ADH2*2 allele with reduced ethanol consumption in Jewish men in Israel: a pilot study. J Stud Alcohol 1998; 59,133-139.
15. Chen WJ, Loh EW, Hsu YP et al. Alcohol-metabolising genes and alcoholism among Taiwanese Han men: independent effect of ADH2, ADH3 and ALDH2. Br J Psychiatry 1996; 168, 762-767.
16. Smith L, Watson M, Gates S et al. Meta-Analysis of the association of the Taq1A polymorphism with the risk of alcohol dependency: A HuGE Gene-Disease Association Review. Am J Epidemiol 2008; 167,125-138.
17. Kohnke MD, Zabetian CP, Anderson GM et al. A genotypecontrolled analysis of plasma dopamine betahydroxylase in healthy and alcoholic subjects: evidence for alcohol-related differences in noradrenergic function. Biol Psychiatry 2002; 52, 1151-1158.
18. Hallikainen T, Lachman H, Saito T et al. Lack of association between the functional variant of the catechol-o-methyltransferase (COMT) gene and early-onset alcoholism associated with severe antisocial behavior. Am J Med Genet 2000; 96, 348-352.
19. Buck KJ. Molecular genetic analysis of the role of GABAergic systems in the behavioral and cellular actions of alcohol. Behav Genet 1996; 26, 313- 323.
20. Loh EW, Ball D. Role of the GABA(A)beta2, GABA(A)alpha6, GABA (A)alpha1 and GABA(A) gamma2 receptor subunit genes cluster in drug responses and the development of alcohol dependence. Neurochem Int 2000; 37, 413-423.

21. Park CS, Park SY, Lee CS et al. Association between alcoholism and the genetic polymorphisms of the GABA-A receptor genes on chromosome 5q33-34 in Korean population. *J Korean Med Sci* 2006; 21, 533-538.
22. Sander T, Samochowiec J, Ladehoff M et al. Association analysis of exonic variants of the gene encoding the GABAB receptor and alcohol dependence. *Psychiatr Genet* 1999; 9, 69-73.
23. Loh el-W, Lane HY, Chen CH et al. Glutamate decarboxylase genes and alcoholism in Han Taiwanese men. *Alcohol Clin Exp Res* 2006; 30,1817-1823.
24. Tsai G, Coyle JY. The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism. *Annu Rev Med* 1998;49, 173-184.
25. Wernicke C, Samochowiec J, Schmidt LG et al. Polymorphisms in the N-methyl-D-aspartate receptor 1 and 2B subunits are associated with alcoholism-related traits. *Biol Psychiatry* 2003; 54, 922-928.
26. Pastor IJ, Laso FJ, Inés S et al. Genetic association between - 93A/G polymorphism in the Fyn kinase gene and alcohol dependence in Spanish men. *Eur Psychiatry*.2008; 08, 007.
27. Tadic A, Dahmen N, Szegedi A et al. Polymorphisms in the NMDA subunit 2B are not associated with alcohol dependence and alcohol withdrawal-induced seizures and delirium tremens. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2005; 255, 29-35.
28. McBride W, Li T. Animal models of alcoholism: neurobiology of high alcohol-drinking behaviour in rodents. *Crit Rev Neurobiol* 1998; 12, 339-369.
29. Arias A, Feinn R, Kranzler HR. Association of an Asn40Asp (A118G) polymorphism in the muopioid receptor gene with substance dependence: a meta-analysis. *Drug Alcohol Depend* 2006; 83, 262-268.
30. Grant K. The role of 5-HT3 receptors in drug dependence. *Drug Alcohol Depend* 1995; 38, 155-171.
31. Feinn R, Nellissery M, Kranzler HR. Metaanalysis of the association of a functional serotonin transporter promoter polymorphism with alcohol dependence. *Am J Med Genet B (Neuropsychiatr Genet)* 2005; 133, 79-84.
32. Altıntoprak E, Tezcanlı B, Özel R ve ark. Alkol bağımlılığında serotonin reseptörü 5-HTR2A ve serotonin transportörü 5-HTT gen polimorfizmlerinin araştırılması. 4. Ulusal Bağımlılık Kongresi: 2007, Çeşme,İzmir.

33. Ducci F, Goldman D. Genetic approaches to addiction: genes and alcohol. *Addiction* 2008; 103,1414-1428.
34. Johnson C, Drgon T, Liu QR et al. Pooled association genome scanning for alcohol dependence using 104 268 SNPs: validation and use to identify alcoholism vulnerability loci in unrelated individuals from the collaborative study on the genetics of alcoholism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006;141, 844-853.
35. Ma Q, Yu Y, Meng Y et al. Genome-wide linkage analysis for alcohol dependence: a comparison between single-nucleotide polymorphism and microsatellite marker assays. *BMC Genetics* 2005; Suppl.1,1-8.
36. Tsankova N, Renthall W, Kumar A et al. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8, 355-367.
37. Gilbert SF. Ecological developmental biology: developmental biology meets the real world. *Dev Biol* 2001; 233,11 -12.
38. Gluckman PD, Hanson MA. Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatr Res* 2004; 56, 311-317.
39. Tsankova N, Renthall W, Kumar A et al. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8, 355-367.
40. Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 2004; 47, 24-32.
41. Tsankova N, Renthall W, Kumar A et al. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8, 355-367.
42. Karabulut H.G. Farmakogenetik: Laboratuvar dan Klinik Uygulamaya Türkiye Klinikleri *J Med Sci* 2010; 30(Suppl 1), 5-15.
43. Ulusoy G. Genetic polymorphisms of alcohol inducible CYP2E1 in Turkish population. M.Sc., Department of Biochemistry January, 2004, 123 pages.
44. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9. ed. 1996(10).
45. Gonzalez FJ Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res* 2005;569,101–110.
46. Wienkers LC, Heath TG. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4, 825–833.

47. Bartsch H, Nair U, Risch A. Genetic Polymorphism of CYP Genes, Alone or in Combination, as a Risk Modifier of Tobacco-related Cancers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2000; Vol. 9, 3–28.
48. Julian C Knight Human Genetic Diversity Functional Consequences for Health and Disease Language Arts & Disciplines 2009: 119-122
Erişim:[<http://books.google.com.tr/books?isbn=0199227691>], Erişim Tarihi:10 Aralık 2010.
49. Nelson DR. The Cytochrome P450 Homepage. *Human Genomics* 4, 59-65.
Erişim:[<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.Html>], Erişim Tarihi: 10 Aralık 2010.
50. Guengerich FP, Wu Z, Bartleson CJ. Function of human cytochrome P450s: characterisation of the orphans. *Biochem Biophys Res Commun* 2005: 338, 465–469.
51. Seliskar M, Rozman D. Mammalian cytochromes P450-importance of tissue specificity. *Biochim Biophys Acta* 2007:1770, 458–466 .
52. Guengerich FP Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol* 2008:21,70–83.
53. Nebert DW, Zhang G, Vesell ES. From human genetics and genomics to pharmacogenetics and pharmacogenomics: past lessons, future directions. *Drug Metab Rev* 2008: 40, 187–224.
54. Boobis AR, Lynch AM, Murray S et al. CYP1A2-catalyzed conversion of dietary heterocyclic amines to their proximate carcinogens is their major route of metabolism in humans. *Cancer Res* 1994: 54, 89–94.
55. Ioannides C, Lewis DF Cytochromes P450 in the bioactivation of chemicals. *Curr Top Med Chem* 2004: 4, 1767–1788.
56. Corchero J, Pimprale S, Kimura S et al. Organization of the CYP1A cluster on human chromosome 15: implications for gene regulation.. *Pharmacogenetics*. 2001:11(1),1-6.
57. Wei C, Caccavale RJ, Weyand EH et al. Induction of CYP1A1 and CYP1A2 expressions by prototypic and atypical inducers in the human lung. *Cancer Lett* 2002:178, 25–36.

58. Liu C, Russell RM, Wang XD. Exposing ferrets to cigarette smoke and a pharmacological dose of beta-carotene supplementation enhance in vitro retinoic acid catabolism in lungs via induction of cytochrome P450 enzymes. *J Nutr* 2003; 133, 173–179.
59. Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M et al. Phenotyping of CYP1A2 in Japanese population by analysis of caffeine urinary metabolites: absence of mutation prescribing the phenotype in the CYP1A2 gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3, 413–421.
60. Sachse C, Brockmoller J, Bauer S et al. Functional significance of a C→A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 1999;47, 445–449.
61. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A et al. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther* 2007;116, 496–526.
62. Rasmussen BB, Brix TH, Kyvik KO et al. The interindividual differences in the 3-demethylation of caffeine alias CYP1A2 is determined by both genetic and environmental factors. *Pharmacogenetics* 2002;12, 473–478.
63. Ghotbi R, Christensen M, Keun Roh H. et al. Comparisons of CYP1A2 genetic polymorphisms, enzyme activity and the genotype-phenotype relationship in Swedes and Koreans *Eur J Clin Pharmacol* 2007; 63, 537–546.
64. Lewis DF 57 Varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics* 2004;5, 305–318.
65. Faber MS, Jetter A, Fuhr U. Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when? *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 97, 125–134.
66. Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J et al. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status *Arch Toxicol* 2008; 82, 667–715.
67. Karabulut HG. Farmakogenetik: Laboratuvar dan Klinik Uygulamaya Türkiye Klinikleri *J Med Sci* 2010;30(Suppl 1): 5-15.
68. Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE . Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med* 2006;57, 119–137.
69. Aynacıoğlu AŞ. Psikiyatrik Hastalıkların İlaçlarla Tedavisinde Farmakogenetiğin Önemi *Klinik Psikiyatri* 2001;4, 249-252.

70. Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; 369,23–37.
71. Bozkurt A, Basci NE, Isimer A ve ark. Polymorphic debrisoquine metabolism in a Turkish population. *Clin Pharmacol Ther*1994; 55, 399-401.
72. Aynacioglu AS, Sachse C, Bozkurt A ve ark. Low frequency of defective alleles of cytochrome p450 enzymes 2C19 and 2D6 in the Turkish population. *Clin Pharmacol Ther*1999; 66,185-192.
73. Kessova I, Cederbaum AI. CYP2E1: biochemistry, toxicology, regulation and function in ethanol-induced liver injury. *Curr Mol Med* 2003; 3: 509–518.
74. Lieber CS. The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. *Drug Metab Rev* 2004; 36: 511–529.
75. Kölble K.Regional mapping of short tandem repeats on human chromosome 10: cytochrome P450 gene CYP2E, D10S196, D10S220, and D10S225. *Genomics*. 1993;18(3),702-704.
76. Umeno W, McBride O, Yang CS et al. Human ethanol-inducible P450IIE1: complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping and cDNA-directed expression. *Biochemistry*. 1988; 27, 9006-9013.
77. Cai L, Yu SZ, Zhang ZF. Cytochrome P450 2E1 genetic polymorphism and gastric cancer in Changle, Fujian Province *World J Gastroenterol* 2001;7(6),792-795.
78. Qiu LO, Linder MW, Antonino-Green DM. Suppression of Cytochrome P450 2E1 Promoter Activity by Interferon- γ and Loss of Response Due to the -71G>T Nucleotide Polymorphism of the CYP2E1*7B Allele *JPET*, 2004; 308,284–288.
79. Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J Biochem*. 1991; Oct 110(4):559.
80. Tanaka F, Shiratori Y, Yokosuka O et al.Polymorphism of alcohol-metabolizing genes affects drinking behavior and alcoholic liver disease in Japanese men. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997; Jun:21(4):596-601.
81. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A et al. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther*. 2007; 116, 496–526.

82. Westlind-Johnsson A, Malmebo S, Johansson A et al. Comparative analysis of CYP3A expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 2003; 31, 755–761.
83. Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003; 43,149–173.
84. Burk O, Wojnowski L. Cytochrome P450 3A and their regulation. *Arch Pharmacol*. 2004; 369,105–124.
85. Wrighton SA, Brian WR, Sari MA et al. Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III_A5 (HLp3). *Mol Pharmacol*. 1990; 38, 207–213.
86. Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE et al. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos* 30: 883–891.
87. Kitada M, Kamataki T. Cytochrome P450 in human fetal liver: significance and fetal-specific expression. *Drug Metab Rev.*: 1994; 26, 305–323.
88. Hakkola J, Raunio H, Purkunen R et al. Cytochrome P450 3A expression in the human fetal liver: evidence that CYP3A5 is expressed in only a limited number of fetal livers. *Biol Neonate* 2001; 80,193–201.
89. Schuetz JD, Beach DL, Guzelian PS. Selective expression of cytochrome P450 CYP3A mRNAs in embryonic and adult human liver. *Pharmacogenetics* 1994; 4,11–20.
90. Paine MF, Hart HL, Ludington SS et al. The human intestinal cytochrome P450 “pie”. *Drug Metab Dispos* 2006; 34, 880–886.
91. Rostami-Hodjegan A, Tucker GT. Simulation and prediction of in vivo drug metabolism in human populations from in vitro data. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6, 140–148.
92. Ekins S, Stresser DM, Williams JA. In vitro and pharmacophore insights into CYP3A enzymes. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24, 161–166.
93. Scott EE, Halpert JR. Structures of cytochrome P450 3A4. *Trends Biochem Sci* 2005; 30: 5–7.
94. Inoue K, Inazawa J, Nakagawa H et al. Assignment of the human cytochrome P-450 nifedipine oxidase gene (CYP3A4) to chromosome 7 at band q22.1 by fluorescence in situ hybridization. *Jpn J Hum Genet*. 1992; 37(2),133-138.

95. Rubin E. How alcohol damages the body Perspectives on Current Research Alcohol Health & Research World Fall,1989.
96. Mırsal H, Kalyoncu A, Pektaş Ö. İlk Kez Tedavi Gören Alkol Bağımlılarının Sosyodemografik Özellikleri ve Erken Dönem Tedavi Sonuçları Yeni Sempozyum: 2000: 38 (3),112-115.
97. Özsoy SD. Erken ve Geç Alkol Yoksunluğunda HPA Eksen Aktivitesi,Nörosteroidler ve Bunların Agresyon Eğilimi ile İlişkisi,Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı, Kayseri 2005, 5-6.
98. Taheri S. Behçet Hastalarında İnterlökin-1 α , İnterlökin-1 β , İnterlökin-2, İnterlökin-8 ve Tümör Nekrosis Faktor- α Gen Polimorfizmlerinin Belirlenmesi ve Bu Genlerin Behçet Hastalığının Aktif ve İnaktif Fazdaki Ekspresyonlarının Karşılaştırılması, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji AD, Kayseri 2009, 32-33.
99. Silvestri L, Sonzogni L, De Silvestri A. CYP Enzyme Polymorphisms and Susceptibility to HCV-Related Chronic Liver Disease and Liver Cancer Int. J. Cancer, 2003: 104, 310–317.
100. Lieber CS. The Discovery of the Microsomal Ethanol Oxidizing System and Its Physiologic and Pathologic Role Drug Metabolism Reviews 2004: Vol. 36, No. 3-4 , 511-529.
101. Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M et al. Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human CYP1A2 gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans. J Biochem.1999: Apr 125(4), 803-808.
102. Aklillu E, Carrillo JA, Makonnen E et al. Genetic Polymorphism of CYP1A2 in Ethiopians Affecting Induction and Expression: Characterization of Novel Haplotypes with Single-Nucleotide Polymorphisms in Intron 1. Mol Pharmacol 2003: 64, 659-669.
103. Torres FC, Cantú AM, Bermúdez de León M et al. CYP1A2 Phenotype and Genotype in a Population From the Carboniferous Region of Coahuila, Mexico Toxicology Letters: 2005: 156, 331–339.
104. Finnström N, Ask B, Dahl ML. Intra-individual variation and sex differences in gene expression of cytochromes P450 in circulating leukocytes. The Pharmacogenomics Journal. 2002: 2, 111–116.
105. Herken H, Aynacıoğlu Ş, Esgi K ve ark. Psikiyatri Hastalarında Sitokrom P450 2D6 Yavaş ve Ultra Hızlı Metabolizör Sıklıkları Türk Psikiyatri Dergisi 2001: 12(2), 83-88.

106. Aynacıoğlu AŞ: Psikiyatrik Hastalıkların İlaçlarla Tedavisinde Farmakogenetiğin Önemi Klinik Psikiyatri Dergisi, 2001: 4(4),249-252.
107. Miksys S, Rao Y, Hoffmann E et al. Regional and cellular expression of CYP2D6 in human brain: higher levels in alcoholics, Journal of Neurochemistry, 2002: 82,1376–1387.
108. Gao CM, Takezaki T, Wu JZ et al. CYP2E1 Rsa polymorphism impacts on risk of colorectal cancer association with smoking and alcohol drinking World J Gastroenterol 2007 November 21; 13(43), 5725-5730.
109. Liangpunsakul S, Kolwankar D, Pinto et al. Activity of CYP2E1 and CYP3A enzymes in adults with moderate alcohol consumption: A comparison with nonalcoholics Hepatology, May 2005: Volume 41, Issue 5, 1144–1150.
110. Lu Y, Cederbaum AI. Cisplatin-Induced Hepatotoxicity Is Enhanced by Elevated Expression of Cytochrome P450 2E1 Toxicological Sciences. 2006: 89(2), 515–523.
111. Ingelman-Sundberg M, Johansson I, Yin H et al. Ethanol-inducible cytochrome P4502E1: Genetic polymorphism, regulation, and possible role in the etiology of alcoholinduced liver disease. Alcohol 1993: 10, 447-452.
112. Westlind A, Löfberg L, Tindberg N et al Interindividual Differences in Hepatic Expression of CYP3A4: Relationship to Genetic Polymorphism in the 5'-Upstream Regulatory Region Biochemical and Biophysical Research Communications, May 1999: Volume 259, Number 1, 201-205.
113. Herken H, Öngen HZ, Esgi K ve ark. Sitalopram Alımının Ardından Şiddetli Yan Etkiler Gelişen Üç Olgunun Sitokrom P450 2C19 ve 3A4 Açısından Değerlendirilmesi Klinik Psikiyatri 2000:3,197-202.

KONTROL BİLGİLERİ

KONTROL NO	BKI	YAŞ	Sigara kul süresi	Sigara adet (günlük)
1	28.40	38	15	3
2	19.27	27	15	30
3	26.45	25	13	30
4	28.04	39	15	10
5	22.23	35	15	15
6	24.61	43	18	10
7	24.98	28	10	3
8	27.78	23	10	6
9	22.23	31	15	15
10	21.19	28	12	20
11	19.59	35	10	10
12	25.95	29	12	20
13	23.72	44	17	15
14	20.70	33	15	6
15	29.30	30	10	7
16	23.03	24	10	10
17	19.53	55	45	20
18	29.30	50	10	10
19	29.09	37	20	8
20	32.89	30	4	4
21	24.49	23	12	10
22	31.44	30	-	-
23	28.29	26	-	-

HASTA BİLGİLERİ

HASTA NO	BKİ	YAŞ	ALKOL KULLANIM SÜRESİ	GÜNLÜK ALKOL MİKTARI(GR)	SİGARA SÜRESİ	SİGARA MİKTARI (ADET)
1	23.03	48	15	315	30	30
2	23.66	38	15	266	20	30
3	27.54	35	17	157.5	18	20
4-	25.71	53	28	266	30	30
5	21.97	50	20	266	30	30
6	25.51	37	20	315	23	30
7	28.73	55	25	315	30	30
8	22.49	20	5	450	5	20
9	22.65	60	15	315	45	40
10	24.24	26	8	315	16	20
11	22.49	26	6	266.25	10	20
12	26.23	60	21	157.5	40	30
13	23.30	34	10	157.5	15	20
14	21.46	52	36	315	5	30
15	23.03	24	5	266	7	20
16	23.67	48	30	300	35	30
17	22.03	21	5	315	5	20
18	24.61	34	10	266.25	15	20
19	22.59	45	15	266	25	30
20	25.05	34	15	315	15	30
21	24.48	45	15	315	25	30
22	22.89	29	10	266	10	20
23	21.51	54	20	266	34	30
24	22.85	54	15	266	30	30
25	21.22	36	15	315	25	30
26	29.01	23	7	157.5	10	40
27	23.12	28	9	115	-	-
28	20.51	61	36	157.5	46	20
29	24.91	28	11	135	16	20
30	22.53	51	30	472	30	30
31	20.76	46	25	315	-	-
32	21.51	38	16	315	15	40
33	22.12	36	19	315	20	20
34	23.30	40	20	157.5	20	20
35	29.38	50	33	157.5	30	40
36	21.13	51	18	157.5	30	20
37	27.04	34	10	315	19	10
38	36.71	50	25	315	25	40
39	24.61	48	24	177.5	29	30
40	21.87	40	20	315	20	40
41	25.45	54	24	472.5	37	20
42	24.28	38	18	671	23	20
43	20.61	59	43	200	35	20
44	29.38	65	25	315	40	20
45	25.71	56	34	355	36	30
46	27.75	31	13	370.5	11	20
47	22.09	53	30	236.5	30	20
48	24.69	29	14	386	10	40
49	23.38	47	30	246.25	27	40
50	24.09	25	5	266	7	20

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
İLAÇ ARAŞTIRMALARI YEREL ETİK KURULU
(Talas Yolu Üzeri 38039 KAYSERİ Tel 0 352 437 49 10 -11 Faks: 0 352 437 52 85)

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	
	PROTOKOL ADI	Alkol Yoksunluğunda Sitokrom (CYP) 1A2, 2D6, 2E1 ve 3A4 Enzimlerinin Ekspresyon ve Polimorfizimlerinin Araştırılması
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Yrd.Doç.Dr. Çetin Saatçi
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
	BAŞVURULAN ETİK KURUL	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
	DESTEKLEYİCİ FIRMA	
	FAZİ	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	☒ Tek Merkez ☐ Çok Merkez ☐ Ulusal ☐ Uluslararası

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Değişiklik No.su	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ			Türkçe ☐ İngilizce ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 09/209	Karar : 07.04.2009
	Fakültemiz Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Çetin Saatçi'nin sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen tek merkezli araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve kurumumuz kararının sorumlu araştırmacıya ve dekanlık mazamına arzına toplantıya katılan öğretim üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KLAVUZU

Ünvanı / Adı Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Kader KÖSE	Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU	Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Olgun KONTAŞ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Murat AKSU	Nöroloji	E.Ü. Tıp Fak.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	Radyodiyagnostik	E.Ü. Tıp Fak.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Mustafa KENDİRCİ	Çocuk Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Oğuz EKMEKÇİOĞLU	Üroloji	E.Ü. Tıp Fak.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Hasan Basri ULUSOY	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Zübeyde ÇELEBİ Avukat	Avukat	E.Ü.	K	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	

* Araştırma ile ilişkili

** Toplantıda bulunma



ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı: Nazife TAŞÇIOĞLU

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 18 Mart 1978, KAYSERİ

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 3524374901/20197

Fax: +90 312 4370600

email: ntascioglu@erciyes.edu.tr

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD
Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece Kurum Mezuniyet Tarihi

Yüksek Lisans EÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik, Kayseri, 2005

Lisans Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, 1998

Lise Kayseri Lisesi, Kayseri 1994

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl Kurum Görev

2000- Halen Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD, Kimyager

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1. **Taşcıoğlu N**, Taheri S, Saatçi Ç, Özkul Y Gastrointestinal Sistem Kanserlerinde Metilentetrahidrofolat Redüktaz Geni 677C→T Polimorfizminin İncelenmesi Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences) 15(1) 41-45, 2006
2. Saatçi C, Ozkul Y, Tasdemir S, Kırız A, Müderris İİ, **Taşcıoğlu N**, Çağlayan AO, DüNDAR M. İnvazif Prenatal Tanı Yöntemleri Uygulanan 2295 Olgunun Retrospektif Analizi. Perinatoloji Dergisi 2007; 15(3): 116 – 119