

T.C
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK BİLİM DALI
SABE PROJE NO:
525/7757

**KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA SİTOKROM P450
(CYP2C9 ve CYP2C19) ENZİM GENETİK POLİMORFİZMİ**

DOKTORA TEZİ
MURAT BÜYÜKDOĞAN

Danışman

Prof. Dr. SENNUR DEMİREL

KONYA-2007

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİ	3
2.1. Kolon ve Rektum.....	3
2.2. Kolorektal Kanser.....	4
2.2.1. Kolorektal Kanselerde Etiyolojik Faktörler.....	6
2.2.1.1. Genetik Faktörler.....	6
2.2.1.2. Çevresel Faktörler.....	10
2.2.1.3. Prekanseroz Hastalıklar.....	10
2.2.1.3.1. Kolorektal Polipler.....	10
2.2.1.3.2. İltihabi Barsak Hastalıkları.....	11
2.2.1.3.3. Yüksek Risk Grupları.....	11
2.2.2. Kolorektal Kanselerde Klinik Bulgular.....	11
2.2.3. Kolorektal Kanselerde Laboratuvar Tetkikleri.....	12
2.2.4. Kolorektal Kanselerde Tanıda Kullanılan Genetik Testler.....	12
2.2.5. Kolorektal Kanselerde Radyolojik Tanı.....	12
2.2.6. Kolorektal Kanselerde Lokalizasyon.....	14
2.2.7. Kolorektal Kanselerin Histolojik tipleri.....	14
2.2.8. Kolorektal Kanselerde Evrelendirme.....	14
2.2.9. Kolorektal Kanselerde Prognozu Etkileyen Faktörler.....	15
3. POLİMORFİZM	18
3.1. Kısa DNA Baz Tekrarları.....	18
3.2. Uzun DNA Baz Tekrarları.....	19
3.3. DNA'nın Tek Bir Bazında Değişiklikler.....	19
3.4. DNA'yı Kesen Enzimlerin Oluşturduğu Uzunluk Polimorfizmleri.....	21
3.5. Kan Grupları ve Diğer Polimorfizimler.....	21
3.6. Tıbbi Genetikte Polimorfizmlerin Kullanımı.....	22
4. CYP450 (Sitokrom P450 Monooksijenaz) ENZİM SİSTEMLERİ	23
4.1. CYP450'nin Yapısı.....	24
4.1.1. CYP Enzimlerinin Özellikleri.....	26
4.1.2. Steroidejenik CYP Enzimleri.....	26
4.1.3. Ksenobiyotik CYP Enzimleri.....	26

4.2.1. CYP2C9 Gen Ailesi.....	27
4.2.2. CYP2C19 Gen Ailesi.....	30
5. MATERYAL VE METOT	33
5.1. Çalışma Grubu ve Örnek Alımı.....	33
5.2. Kullanılan Kimyasallar.....	34
5.3. Kullanılan Aletler.....	34
5.4. Kullanılan Cihazlar.....	34
5.5. Kullanılan Kitler.....	34
5.6. Tam Kandan DNA İzolasyonu.....	34
5.6.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Ayıraçların Hazırlanması.....	35
5.6.2. DNA İzolasyon Protokolü.....	36
5.6.3. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	36
5.6.3.1. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu melting Curve Analizi ile Genotip Belirlenmesi	36
5.6.4. CYP2C9 ve CYP2C19 PCR Protokolü ve Melting Pik Analizi.....	37
5.7. İstatistiksel Yöntem.....	45
6. BULGULAR	46
6.1. Çalışma Grubunun Demografik Özellikleri ve Kan Grupları.....	46
6.2. Çalışma Grubunda Saptanan Kolorektal Kansere İçin Muhtemel Risk Faktörleri...	47
6.3. CYP2C9 ve CYP2C19 Allel Frekansları ve Odds Oranları.....	47
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	50
8. ÖZET	57
9. SUMMARY	58
10. KAYNAKLAR	59
11. ÖZGEÇMİŞ	68
12. TEŞEKKÜR	69

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

TABLO 2.1. Türkiye’de en sık görülen on kanser türü (T.C Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı Yay.no 518- 2003)	4
TABLO 2.2. Türkiye’de erkeklerde en sık görülen on kanser türü (T.C Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı Yay.no 518- 2003)	5
TABLO 2.3. Türkiye’de kadınlarda en sık görülen on kanser türü (T.C Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı Yay.no 518- 2003)	5
Tablo 4.1. Farklı populasyonlarda CYP2C9 yavaş metabolizör sıklığı (Herken ve ark 2000)	31
Tablo 4.2. CYP2C9 ve CYP2C19’ deki nükleotid değişikliklerinin enzime etkisi (Nada ve ark 2003)	32
Tablo 5.1. DNA izolasyon kit içeriği (Roche Diagnostic Germany)	35
Tablo 5.2. CYP2C9 mutasyon belirleme kit içeriği ve kullanılan miktarlar (Roche Diagnostic Germany)	37
Tablo.5.3. CYP2C9 için PCR protokolü	38
Tablo 5.4. CYP2C19 mutasyon belirleme kit içeriği ve kullanılan miktarlar	39
Tablo 5.5. CYP2C19 için PCR protokolü	39
Tablo 5.6. Kanal 2 (F2)’de izlenen CYP2C9*2 genotipleme Tm ve Pik sayıları	40
Tablo 5.7. Kanal 3 (F3)’de izlenen CYP2C9*3 genotipleme Tm ve Pik sayıları	40
Tablo 5.8. Kullanılan floresan ve tesbit edilen mutasyon	40

Tablo 5.9. Kanal 2'de izlenen CYP2C19*3 genotiplemesi Tm ve Pik sayıları	41
Tablo 5.10. Kanal 3'de izlenen CYP2C19*2 genotiplemesi, Tm ve Pik sayıları	41
Tablo 5.11. Kullanılan floresan ve tesbit edilen mutasyon	41
Tablo 6.1. Demografik bilgileri	46
Tablo 6.2. Kan grupları	46
Tablo 6.3. Kolorektal kanser için muhtemel risk faktörleri	47
Tablo 6.4. CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 allel frekansı ve odds oranı	48
Tablo 6.5. CYP2C19*2 ve CYP2C19*3 allel frekansı ve odds oranı	49
Şekil 2.1. Kolon ve rektum anatomisi (Romolo 1996)	3
Şekil 4.1. CYP450 enzimleri ile katalizlenen genel reaksiyon (Özerol 1996)	24
Şekil 4.2. CYP450 molekülü (Çetinkaya ve ark 2002)	25
Şekil 4.3. CYP450 molekülü (Çetinkaya ve ark 2002)	26
Şekil 4.4 . CYP2C9 geninin kromozomal yerleşimi (Tassies ve ark 2002).	28
Şekil 5.1. CYP2C9*2 (C430T) heterozigot genotip örneği melting curve analiz sonucu	42
Şekil 5.2. CYP2C9*3 (A1075C) heterozigot genotip örneği melting curve analiz sonucu	42
Şekil 5.3 . CYP2C9*1 wild tip genotip örneği melting curve analiz sonucu	43

Şekil 5.4 . CYP2C19*2 heterozigot genotip örneği melting curve analiz sonucu	43
Şekil 5.5 . CYP2C19*2 (G →A 681) mutant genotip örneği melting curve analiz sonucu	44
Şekil 5.6. CYP2C19*3 (G →A 636) mutant genotip örneği melting curve analiz sonucu	44
Şekil 5.7. CYP2C19*3 heterozigot genotip örneği melting curve analiz sonucu.	45

1. GİRİŞ

Kolorektal kanserler, özellikle gelişmiş batı ülkelerinin önemli bir sağlık sorunudur. ABD, Kanada, İngiltere, Fransa, Almanya v.b. ülkelerde görülme sıklığı yüz binde 40-60 arasında değişmektedir. ABD'de yılda yaklaşık olarak 150.000, Avrupa'da 170.000 tüm dünyada ise yılda bir milyon yeni vaka görülmektedir. Bu veriler toplumda her 50 kişiden birinde kolorektal kanser görüldüğünü ortaya koymaktadır. ABD'de görülme sıklığı yeni kanser vakaları içinde %11 ile üçüncü sırayı alır, Avrupa ülkelerinde ise akciğer kanserinden sonra kanserden ölümün en sık nedenidir (Boring ve ark 1993).

Ülkemizde Devlet İstatistik Enstitüsü'nün verilerine göre, kanser bütün ölüm nedenleri arasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır. Kolorektal kanser insidansının ülkelere göre farklı olması çevresel faktörler, lokal karsinojenler ve diyetle bağlanmaktadır. Düşük kolorektal kanser insidansına sahip bölgelerden (örneğin Asya) batı ülkelerine göç eden insanlarda riskin artması, bölgesel diyet alışkanlıklarının önemli bir risk faktörü olabileceğini desteklemektedir (Le Marchand 1999).

Gıdalarda pişirme yöntemine bağlı olarak oluşan heterosiklik aromatik aminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve saklama amaçlı kullanılan nitrit, nitrat ve benzeri bileşiklerin meme ve kolorektal kanser riskini arttırabileceği öne sürülmektedir (Clinton ve ark 1997, Rock 1998).

Heterosiklik aromatik aminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gıdaların kızartma, ızgara, alevde pişirme, közlenmesi sırasında oluşurlar ve genotoksiktirler (Clinton ve ark 1997). Bu tür pişirme yöntemlerini tercih edenlerin 6,5 kat daha fazla kolon kanser riskine sahip oldukları bildirilmektedir (Wetherilt 1991).

Organizma, dışarıdan alınan çeşitli kimyasal maddeleri, terapötik ilaçları, besinlere bulaşan tarım ilaçlarını, petrol ürünlerini ya da endojen kaynaklı bileşikleri metabolize eden mikrozomal enzim sistemlerine sahiptir. Bunlardan en çok araştırılan sitokrom P450 (CYP)'dir ve aktivitesi bu enzimleri kodlayan gendeki polimorfizme bağlı kişisel farklılıklar göstermektedir. Gen polimorfizminden kaynaklanan bu farklılıkların çeşitli kanserlerle olan ilişkisini ve polimorfik genlerin popülasyon dağılımlarını ortaya

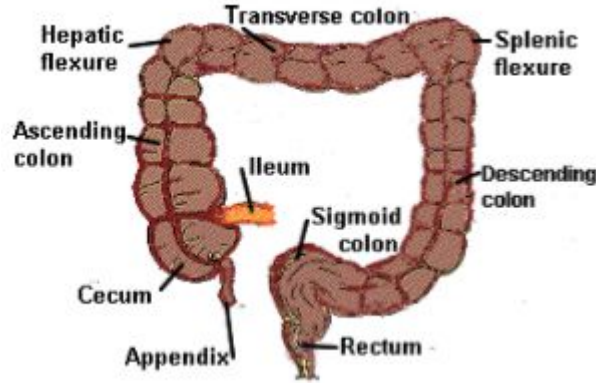
koymak için pek çok araştırma yapılmıştır (Martinez ve ark 2001, Sachse ve ark 2002, Landi ve ark 2005, Tamer ve ark 2006).

Biz bu çalışmamızda, Konya ili ve çevresindeki sitokrom P450 (CYP2C9 ve CYP2C19) gen polimorfizmlerini tespit ederek bu gen polimorfizmlerinin kolorektal kanserli hastalardaki sıklığını ve bunun bir risk faktörü olup olmadığını araştırmayı amaçladık. İleri dönemde yapacağımız araştırmalarda ise bu genetik polimorfizme sahip hastalarda kemoterapik ajanlara direnç veya duyarlılık durumuna göre tedavi şemasının planlanmasına yardımcı olmayı planladık. Çalışmada güncel bilgi ve teknolojinin kullanılması dikkate alındı. CYP2C9*2, CYP2C9*3 ve CYP2C19*2, CYP2C19*3 gen polimorfizmleri moleküler gen teknolojisi kullanılarak araştırıldı; elde edilen veriler değerlendirilerek tartışıldı.

2. LİTERATÜR BİLGİ

2.1. KOLON ve REKTUM

Kalın barsaklar yaklaşık 120-200 cm olup ileoçekal valvden anüse kadar uzanır. Bu mesafe, toplam gastrointestinal sistem uzunluğunun yaklaşık 1/5'ini teşkil eder. Terminal ileum ileoçekal valvde posteromedial sınırdaki çekuma eklenir. Kalın barsaklar çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektumdan oluşmaktadır. Duodenum önünden geçen dikey bir planla sağ ve sol kolon olmak üzere ikiye ayrılır. Sağ kolon; çekum, apendiks, çıkan kolon, fleksura hepatica ve transvers kolon başlangıcına kadar, sol kolon; transvers kolonun distali, fleksura lienalis, inen kolon, sigmoid kolon ve rektumdan oluşur. Terminal ileum ile kolon arasındaki geçiş yerinde olan kapağa, kolon kapağı, Bouhin kapağı veya ileo-çekal-valv denir. Bu kapak alt ve üst dudaktan oluşur. Dudaklar çift kat mukoza ve sirküler adalelerden meydana gelir. Bu valv bir sfinkter görevi görerek içeriğin ileumdan çekuma hızla boşalmasına ve reflüye engel olur (Romolo 1996).



Şekil: 2.1. Kolon ve rektum anatomisi (Romolo 1996).

2.2. KOLOREKTAL KANSER

Kolon ve rektumun kanserlerine kolorektal kanserler denir. Kolorektal kanserlere yakalanma sıklığı, gelişmiş ülkelerde hızla artmaktadır. ABD’de kolorektal kanser görülme sıklığı akciğer kanserinden sonra ikinci sıradadır. Her 10 yılda bir, risk iki katına çıkmaktadır. Her yıl yaklaşık 152.000 yeni kanser olgusu saptanmakta ve yılda ortalama 57.000 hasta bu nedenle kaybedilmektedir (Boring ve ark 1993).

T.C Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı’nın yaptığı istatistiklere göre ülkemizde kolorektal kanser, akciğer kanseri ve meme kanserini takiben 3.sırada yer almaktadır. Görülme sıklığı %7.7 dir (Tablo 2.1).

Hastaların % 59’u erkek, % 41’i kadındır. Erkek/Kadın oranı 1.44’dür. Erkeklerde kolorektal kanser, akciğer ve mide kanserinden sonra 3.sırada yer alırken, kadınlarda meme, deri, mide ve over kanserini takiben 5.sırada yer almaktadır (Tablo 2.2, Tablo 2.3).

Multifaktöryel nedenlerle gelişen kolorektal kanserlerin tanı konma yaşı ortalama 62’dir. Kolorektal kanserler için hastalığa yakalanma yaşı 50-75 yaş arasında değişir. Yaş ilerledikçe kolorektal kanser gelişme riski artar (Fenoglio ve ark 1990).

TABLO 2. 1. Türkiye’de en sık görülen on kanser türü

ORGANLAR	OLGU SAYISI	YÜZDE%	İNSİDANS* Per(100.000)
Akciğer	7754	15.70	11.04
Meme	5828	11.80	8.30
Deri	3703	7.50	5.27
Mide	3448	6.98	4.91
Mesane	2400	4.86	3.42
Kalın Barsak	2247	4.55	3.20
Prostat	2122	4.30	3.02
Kemik İliği	1833	3.71	2.61
Beyin	1643	3.33	2.34
Rektum	1555	3.15	2.21
Diğer	16854	34.13	24.00
Toplam	49387	100.00	70.32

TABLO 2.2. Türkiye’de erkeklerde en sık görülen on kanser türü

ORGANLAR	OLGU SAYISI	YÜZDE %	İNSİDANS* Per(100.000)
Akciğer	6828	24.22	19.20
Mide	2275	8.07	6.40
Prostat	2122	7.53	5.97
Mesane	2109	7.48	5.93
Deri	2006	7.12	5.64
Larinks	1324	4.70	3.72
Kalın Barsak	1240	4.40	3.49
Kemik İliği	1090	3.87	3.06
Beyin	923	3.27	2.60
Rektum	906	3.21	2.55
Diğer	7366	26.13	20.71
Toplam	28189	100.00	79.26

TABLO 2.3. Türkiye’de kadınlarda en sık görülen on kanser türü

ORGANLAR	OLGU SAYISI	YÜZDE%	İNSİDANS* Per(100.000)
Meme	5634	26.58	16.25
Deri	1697	8.01	4.90
Mide	1173	5.53	3.38
Ovaryum	1137	5.36	3.28
Kalın Barsak	1007	4.75	2.90
Akciğer	926	4.37	2.67
Endometriyum	813	3.84	2.35
Tiroid	797	3.76	2.30
Serviks	763	3.60	2.20
Kemik İliği	743	3.51	2.14
Diğer	6508	30.70	18.77
Toplam	21198	100.00	61.15

(T.C Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı Yay.no 518- 2003)

2.2.1. Kolorektal Kanselerde Etyolojik Faktörler

Kolorektal kanserler hem kalıtsal (~%5), hem de sporadik (~%95) olarak ortaya çıkar. Bu kanserlerin etyolojisinde genetik faktörler, çevresel faktörler ve prekanseröz hastalıklar rol oynamaktadır.

2.2.1.1. Genetik Faktörler

Kolorektal kanserlerin ortaya çıkışında genetik değişiklikler önemli rol oynar. Hastaların büyük çoğunluğunda kolon kanseri bir seri somatik mutasyon sonucunda gelişir. Kolorektal kanserler malign gelişim ile sonuçlanan genetik ve hücrel olaylar zinciri açısından bilgi elde etmek amacıyla oldukça detaylı araştırılmış bir kanser tipidir. Tümörlerin malign formu zaten var olan benign tümörlerden gelişir. Gelişim esnasında birçok prekanseröz aşama geçirilir. Bu aşamalar izole edilerek çalışılmıştır.

Kalıtsal olmayan sporadik gelişen kolorektal kanser spontan vakalarda adenomatöz poliplerin ortaya çıkıp tümör dokusunun gelişmesinden, iki vuruş modeli (two-hit hipotezi) söz konusudur. Adenomlarda APC (adenomatöz polipozis koli) geninin her iki kopyasında kayıp olması APC mutasyonu epitelyal hücreleri özellikle hücre siklusunu kontrolden çıkarır. Sporadik tümörlerin ve bu dokuyu çevreleyen normal dokuda bu kaybın izlenmemesi bu görüşü desteklemektedir. Adenomların %80'inde APC gen mutasyonu tesbit edilmiştir. Bunu takiben ortaya çıkan başka mutasyonlar tümör oluşum aşamalarının gerçekleşmesine yol açarlar. Çevresel faktörler kolorektal kanserlerin ortaya çıkışını hızlandırabilir. Bu kanserlerde kalıtım şekli mendeliyan değildir (Strate 2005).

Başlıca kalıtsal kolorektal kanser tipleri; a) Familyal Adenomatöz Polipozisler (FAP), b) Kalıtsal Nonpolipozis Kolon Sendromları (HNPCC) = Lynch Sendromu,

c) Hamartamatöz Polipozis Sendromları ve oluş mekanizmaları aşağıda özetlenmiştir.

a) Familyal Adenomatöz Polipozisler (FAP)

Otozomal dominant geçiş gösteren, hemen hemen tüm vakalarda penetransı %100 olan bir hastalıktır. Normalde yüzlerce benign poliple seyreden bir durum söz konusudur. FAP'ın bir takım varyantları mevcuttur. Bunlar: i) Gardner sendromu,

ii) Turcot sendromu, iii) Ailesel adenomatöz polypozis coli (AAPC) dir. FAP ile birlikte izlenen kolorektal kanserlerdeki mekanizma şu şekilde gerçekleşir; APC genine ait mutant bir allel etkilenmiş bir ebeveynden aktarılır. Diğer allelde ortaya çıkan kazanılmış bir somatik mutasyon kanser gelişimine yol açar. Vakaların 1/3'ünde ise yeni ortaya çıkan bir germline mutasyon söz konusudur. APC geni 5 numaralı kromozomun uzun kolunda (5q21) haritalanmış bir tümör baskılayıcı genidir. Bu mutasyon kolondaki normal epitelyal hücrelerde ortaya çıkar. Mutasyonların büyük çoğunluğu >%90'nı nonsense veya frameshift mutasyonlardır. Vakaların yaklaşık %80-90'ında APC gen mutasyonu tanımlanmıştır. APC geni Wnt arayolunu kontrol eden genidir. Wnt arayolu uyarıldığı zaman hücre proliferasyonu artar. Wnt proteinleri hücre yüzeyindeki Wnt reseptörlerine bağlanırlar. APC-Axin-GSK (glikojen sentaz kinaz-3) kompleksini inaktive edecek proteinleri indükleyerek devreye sokarlar. Bu kompleks β -katenin proteinini fosforilleyerek ubiquinizasyonla proteozomlarda yıkılmasına yol açmaktadır. Dolayısıyla hücrede β -katenin miktarının azalması ile Wnt arayolu inaktif, artmasıyla aktif hal almaktadır. β -katenin nükleusa girerek transkripsiyon faktörleri ile etkileşir. Aralarında c-Myc geninin de yer aldığı çeşitli genlerin aktif okunmasına yol açarak hücre çoğalmasının indüklenmesine yol açar. APC mutasyonları sonucunda her iki allel de kayba uğrayınca Wnt arayolu üzerindeki kontrol kalkar. Bu yol sürekli açık kalır. Hücre bölünmesi kontrolsüz kalır. Hiperaktif β -katenin oluşumuna yol açan mutasyonlar da bu tabloya yol açabilir. Erken adenom evresine geçilmiş olur. Bunu takip eden RAS onkogen mutasyonları tabloyu bir ileri aşamaya taşır. Yaklaşık 1 cm civarındaki adenomların %10'unda, 1cm'in üstündeki adenomların %50'sinde K-ras veya N-ras mutasyonlarından biri izlenir. K-ras mutasyonları sıklıkla bulunurken, H-ras mutasyonları nadirdir. Onkogenlerin bir allelinde ortaya çıkan bir mutasyon onkojenik progresyon için yeterlidir. 12p üzerinde yer alan ras onkogenindeki mutasyonlar APC genindeki mutasyonla üstüste binince polip giderek büyür ve parmaklı uzantılara sahip bir hal alır. Bu aşama intermediate (ara) adenom aşamasıdır. Bunu takiben 18. kromozomun uzun kolunda kayıplar izlenir. Erken ve intermediate adenomların %10'unda 18q'da kayıp vardır. Geç dönem adenomlar ve adenokarsinomlarda bu kromozoma ait kayıp oranı %50'lere yükselir.

18q21'de yerleşim gösteren DCC (deleted in colon cancer) ve SMAD4 ve SMAD2 genleri kayba uğramış olur. DCC bir yüzey proteinini kodlar. Bu protein hücre adezyon proteinleri ve yüzey glikoprotein molekülleri ile oldukça homoloji gösterir. DCC'nin bir tümör baskılayıcı gen olduğu düşünülmektedir. SMAD4 ve SMAD2 TGF- β arayolunda etkindir. TGF- β arayolu normal hücre büyümesini baskılayarak kontrol altında tutar. TGF- β arayolunun devreden çıkması ile gelişim hızlanır. Geç dönem adenomlar gelişir. Daha sonra p53 geninde ortaya çıkan kayıplar tabloyu hızlandırır. Gen 17p13 bölgesinde yer almaktadır. Erken ve intermediate aşamasında p53 kaybı %20 civarındayken, geç dönem adenomlarda bu oran %30 olarak izlenmekte ve kanserlerde %75'e çıkmaktadır. p53 geni bir tümör baskılayıcı genidir ve her iki allelin birden etkilenmesi şarttır. Hücre bölünmesinin baskılanması, stres ve hasara cevaben hücrede apoptozis gelişimi p53 geninin kontrolü altındadır. Bunu diğer genlerde ortaya çıkan değişiklikler takip eder ve tablo giderek ağırlaşır. Kolon kanserlerinde APC, RAS, SMAD ve p53 mutasyonları mutlak olarak izlenmektedir (Strate 2005).

Adenom → karsinoma şeklindeki aşamalı kolorektal karsinogenez aşamaları şu şekilde şematize edilebilir:

Normal epitelyum → Kromozom 5q üzerinde APC ve MCC lokusunun kaybı veya mutasyonu → Hiperproliferatif epitel → DNA metilasyon kaybı → Erken evredeki adenom → Kromozom 12p üzerindeki ras geninin mutasyonu → Orta evredeki adenom → Kromozom 18q üzerindeki DCC geninin kaybı → Geç evredeki adenom → Kromozom 17p üzerindeki p53 genini kaybı = **KARSİNOM** (Rosai ve ark 1996).

i) Gardner Sendromu: Bu sendromda görülen adenomlar yalnız kolonda değil mide, duodenum ve ince barsakta da oluşabilir. Gastrointestinal adenomatoz polipozise eşlik eden lezyonları bulunan otozomal dominant geçişli bir sendromdur. Eşlik eden lezyonları, osteom (mandibula ve kraniumda), fibrom epidermoid kist, desmoid tümör, diş anomalileri, glioblastoma, tiroid papiller karsinomu, hepatoblastoma, safra yolları kanserleri ve pankreas karsinomu bunlardan bazılarıdır (Malazgirt 1996, Topuz ve ark 1998).

ii) Turcot Sendromu: Kolon yerleşimli adenomatozis polipozise, nöroepitelyal santral sinir sistemi tümörleri (medullablastoma) eşlik etmektedir (Topuz ve ark 1998).

iii) Ailesel Adenomatöz Polipozis Koli (AAPC) : Oftalmolojik muayenede retinal pigment epitelinin konjenital hipertrofisi tespit edildiğinde hastalığın varlığı belirlenebilir. Tüm gastrointestinal sistemi tutabilen, daha çok kolon ve rektumda çok sayıda polipoid oluşumla karakterize ailevi bir hastalıktır. Bu adenomlar 10 yaş civarında görülür ve 30-40 yaşlarında adenokarsinom gelişme riski %80'dir (Topuz ve ark 1998).

b) Kalıtsal Nonpolipozis Kolon Sendromları (HNPCC) = Lynch Sendromu

HNPCC vakalarında 2.2.1.1. (a)'da anlatılan APC gen mutasyon mekanizmasına ek olarak hatalı eşleşme tamir (mismatch repair=MMR) genlerindeki mutasyonların bu hastalığın patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir. hMSH2 kromozom 2p'de, hMLH1 kromozom 3p üzerinde yer almaktadır. Klinik tanısı HNPCC olan ailelerin %15-60'ında bu genlere ait mutasyonlar saptanmıştır. Diğer daha az rastlanan mutasyonlar ise hPMS1, hPMS2 ve hMSH6 genlerinde izlenmektedir.

DNA MMR proteinleri DNA replikasyonu esnasında ortaya çıkan küçük dizilim hatalarını tanıyarak düzeltirler. MMR genlerinin her iki kopyasında birden ortaya çıkan mutasyonlar özellikle DNA'nın çok sayıda kısa tekrarlayan dizilimlerinin yani mikrosatellitlerin (örn. -G-C-G-C-G-C) olduğu bölgelerde yer alan genlerde DNA dizilim hatalarının birikmesine yol açarlar. Bu dizilim hataları kritik öneme haiz büyüme-regülasyon genlerinde ortaya çıktığında kanser gelişimi izlenir. HNPCC hastalarındaki tümör dokularında karakteristik olarak MSI= mikrosatellit instability izlenir. HNPCC'de kolorektal kanserli vakaların %90'ında ve adenomalı vakaların %80'inde MSI tesbit edilmiştir (Strate 2005).

Bu hastalık, genellikle sağ kolon kanseriyle karakterizedir ve erken yaşta ortaya çıkar. Lynch I, Lynch II Sendromları olarak da bilinmektedirler. Lynch I'de kolon ve rektumda kanserler olmasına karşın, Lynch II sendromunda mide, kolorektal, jinekolojik, üriner sistem, ve meme kanserleri birlikte görülebilir. Bu hastaların %25'inde metakron, %20'sinde senkron tümörler görülür (Malazgirt 1996).

c)Hamartamatöz Polipozis Sendromları

i) Peutz-Jeghers Sendromu: Gastrointestinal sistem boyunca en çok ince barsaklarda, daha az oranda mide ve kolonda olmak üzere 1-4 cm büyüklüğünde hamartamatöz polipler ile birlikte dudaklar ve ağız mukozasında melanin lekeleri ve benekleri ile karakterizedir. Kanser gelişme riski %2-3 kadardır.

ii) Familyal Juvenil Polipozis: Polipler genellikle kolon ve rektumdadır, puberte sırasında kaybolabilir. Hastaların %70'inde soliter, geri kalanlarda 2-3 polip olabilir, nadiren sayı 10'dan fazla olduğunda hastalık juvenil polipozis olarak nitelendirilir. Kanser bakımından risk taşır (Kalaycı 2002).

2.2.1.2.Çevresel Faktörler

Kolorektal kanserler gelişmiş ülkelerde çok görülürken Asya ve Afrika da daha azdır. Özellikle yüksek ısıda pişirilen kırmızı et (heterosiklik aminler), şeker ve yağ (kolesterol) oranından yüksek kalorili, lifsel komponenti olmayan beslenme alışkanlığı, karsinojenlerle temas, sigara, alkol, iyonize radyasyon, katkı maddeleri ve oksijen radikallerinin tümör oluşumunda önemli rolü vardır. Buna karşın taze sebzeler bol ve kaba lifli gıdaların, vitamin A, C, E, Beta Karoten ve selenyum gibi antioksidanların, kalsiyum ve balık yağının dışkıda mutajenlerin üretimini azaltarak kolon adenom ve kanserlerinin oluşmasını önlediği belirtilmektedir (Malazgirt 1996, Topuz ve ark 1998).

2.2.1.3. Prekanseroz Hastalıklar

- i. Kolorektal polipler
- ii. İltihabi (inflamatuvar) barsak hastalıkları
- iii. Yüksek risk grupları

2.2.1.3. 1. Kolorektal Polipler ve Polipozis Sendromları

Polip terimi barsak lümenine projekte olan herhangi bir epitelyal lezyona verilen addır. Polip klinik ve endoskopik bir terim olup, makroskopik tanımlar yapılır ancak, en önemli özelliği histolojik tipidir. Kolorektal polipler oluştuğu mukozaya bir uzantı ile bağlı olabilir (pediküllü, saplı polip) ya da geniş bir tabanı ile mukoza üzerine oturabilir (sesil, sapsız polip). Poliplerde büyüme ya da ülserasyon gözlemlendiğinde malignite yönünden değişim akla getirilmelidir. Çok sayıda ve yaygın

olduğunda polipozis olarak isimlendirilir. Kesin tanı histopatolojik inceleme sonucu yapılır (Topuz ve ark 1998, Kalaycı 2002).

2.2.1.3.2. İltihabi Barsak Hastalıkları

Kolorektal mukozanın prekanseröz ve tümöral lezyonlarında kripta tabanında yer alan hücrelerin hiperproliferasyonuna neden olan faktörler arasında, iltihabi barsak hastalıkları özellikle ülseratif kolit ve chron hastalığı bulunmaktadır. Lezyon iltihabi barsak hastalığı zemininde displazi gösteren adenomatöz, hiperplazik ve polipöz lezyon olarak tanımlanır. Etyolojileri tam olarak bilinmeyen iltihabi barsak hastalıklarında özellikle ülseratif kolitlerde, kolorektal kanser riski hastalığın yaşı ile paralel olarak displazi zemininde artış gösterir. Mukozada yaygın ülserler ve psödopolipoid lezyonlar ile mukozal atrofinin görülmeye başladığı kripta ve yüzey epitelinde erken yassı adenom tipinde displazik hücresel değişiklikler uzun yıllar sonra dikkati çekmektedir. Bu tür vakalarda ilk 10 yılda % 3-5, ikinci 10 yılda % 20'ye kadar yükselen malign dejenerasyon söz konusu olmaktadır (Malazgirt 1996, Topuz ve ark 1998).

2.2.1. 3. 3. Yüksek Risk Grupları

Kolorektal kanser öyküsü olanlar (Daha önce opere edilip takip edilenler). En az iki, birinci derece akrabasında kolorektal kanser öyküsü olanlar, kolonik adenomatöz polipleri olanlar, meme, over yada endometrium kanser öyküsü olanlar, radyoterapi hikayesi olanlar, inflamatuvar barsak hastalığı olanlar, familial adenomatosis polipozisi olanlar, Lynch I-II sendromlu hastalardır (Malazgirt 1996, Topuz ve ark 1998).

2.2.2. Kolorektal Kanserlerde Klinik Bulgular

Genellikle görülen klinik bulgular şunlardır; dışkılama alışkanlığında değişiklik, anüsten kanama, rektal akıntı şeklinde veya dışkıyla karışık mukus sekresyonu, dışkının özelliklerinde ve çapında değişiklik, tenezm, yaş ve kötü kokulu gaz, karın ağrısı ve anorektal ağrı, distansiyon, obstrüksiyon, tümör perforasyonu, abse, fistül, kilo kaybı, halsizlik, iştahsızlık ve anemi görülmektedir. Fizik muayenede ele gelen kitle, rektal tuşede tümörün tespit edilebilmesi mümkündür. Rektum tümörlerinin 1/3'ü tuşe mesafesindedir (Topuz ve ark 1998).

2.2.3. Kolorektal Kanserlerde Laboratuvar Tetkikleri

Laboratuvar tetkiklerinde; kan sayımı, karaciğer fonksiyon testleri, CRP, dışkıda gizli kan, Siasyltransferaz, Galaktosiltransferaz II, Procalcitonin, CEA, CA-19-9, CA 50, CA 242, TPA (Tissue polipeptit antijen) ve TPS (Tissue polipeptit spesifik antijen) dir. En sık kullanılanları CEA, CA 19-9 ve TPA dır. Primer tümörün rezeksiyonundan önce CEA düzeyi tespit edilirse prognoz açısından yol gösterici olabilir. Ancak bunların hiçbiri tek başına tanı koydurucu değildir, diğer radyolojik tetkiklerle desteklenmesi gerekmektedir (Malazgirt 1996, Topuz ve ark 1998).

2.2.4. Tanıda Kullanılan Genetik Testler

Amerikan Gastroenteroloji Birliği HPNCC'li vakalara Bethesda kriterlerine göre düzenlenmiş tümör dokusunda MSI testi yapılması ile başlayan bir test stratejisi önermektedir (Strate 2005). Bunu takiben MSI-yüksek tümörlere sahip olanlara germline hMSH2 ve hMSH1 mutasyonlarına bakılır. Tümör dokusu elde edilmesi mümkün olmayan vakalara ise Bethesda kriterlerinin ilk üçüne sahiplerse, (1. 50 yaşından önce teşhis konmuşsa 2. Yaşa bakılmaksızın senkron, metakron veya diğer HNPCC tümör bulunması 3. 60 yaşından önce infiltratif lenfositik kanser tipine sahip olmak) germline test önerilir. Eğer patojenik bir mutasyon tanımlanırsa diğer aile üyeleri de test edilmelidir HPNCC ile birliktelik gösteren hPMS1, hPMS2 ve hMSH6 genlerinin rutin klinik uygulaması ise yoktur. FAP'ta ilk önerilen test protein truncation testtir. Hasta olduğu bilinen bir aile üyesi ile teste başlanır. APC mutasyonları araştırılır. Etkilenen bireyler (tek gen mutasyonlu) hastalık gelişmeden evvel saptanırsa hastalık hakkında bilgilendirme yapılarak bir takım cerrahi metodlara gidilebilir (Strate 2005).

2.2.5. Kolorektal Kanserlerde Radyolojik Tanı

i. Akciğer Grafisi: Kolorektal karsinomlar karaciğerden sonra en sık akciğere metastaz yaparlar. Bu nedenle cerrahi girişim öncesi ve takipler esnasında akciğer grafisi çekilmelidir (Kodner ve ark 1994).

ii. Baryumlu Kolon Grafisi: Digital radyografi cihazları ile yapılan çift kontrast yöntemle saptanabilen en küçük polip çapı 2 mm olarak ölçülmüştür. En etkin primer başvurulması gereken radyolojik görüntüleme yöntemidir (Topuz ve ark 1998, Kodner ve ark 1994).

iii. Ultrasonografi (USG): Batın içi kitlelerin değerlendirilmesinde, karaciğer metastazların saptanmasında ve rektum tümörlerinin evrelendirilmesinde kullanılmaktadır (Kodner ve ark 1994, Scrock ve ark 1996).

iv. Bilgisayarlı Tomografi: Cerrahi girişim öncesi abdominal kavitenin değerlendirilmesine imkan tanır. Karaciğer, adrenal, over, lenf nodu ve pelvis içi organlardaki metastazları gösterir. Ayrıca nüks veya rezidü kanser araştırılmasında yardımcı olur. Anjiyografi ile BT'nin birlikte yapıldığı dinamik BT'de karaciğerdeki metastazların saptama oranı % 95' lere ulaşmaktadır. Tetkikin tek dezavantajı barsak duvarı katmanlarında invazyon derinliğini ayırt edememesidir (Scrock ve ark 1996).

v. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG): Yumuşak dokunun görüntülenmesinde BT'ye göre daha üstün bir yöntem olması ve multiplanar inceleme olanağı sağlaması avantajlarıdır. Cerrahi girişim öncesi evrelendirmede ve karaciğer metastazının ortaya konulmasında tomografiye eşdeğerken, nükslerin saptanması açısından BT'den üstündür (Kodner 1994, Scrock ve ark 1996).

vi. Pozitron Emisyon Tomografisi (PET): Pelvisteki nüks tümör ile fibröz dokuyu ayırt etmekte kullanılır. Temeli hastaya fluorodeoksiglukoz adlı substrat enjekte ederek doku metabolizmasındaki farklılığı ortaya koymaya dayanır. Kanserli hücrelerde hipermetabolizma olması nedeniyle kanser hücrelerinin bulunduğu yerde aktivite tutulumu olacaktır (Kodner 1994). PET ve CT küçük rekürrensleri veya lenfadenopatilerdeki tümör odaklarını gösterebilir. Helikal CT ise artefaktların az olması ve birçok planda üç boyutlu görüntü verebilmesi ile farklı avantajlar sunmaktadır (Fabbri ve ark 1997).

vii. Endoskopik İncelemeler: Endoskopik tetkik öncesi iyi bir barsak temizliği yapılması şarttır. Endoskopi ile direk tanı ve inceleme için biopsi alınabilir.

viii. Rektosigmoidoskopi: Linea dentata'nın 20-25 cm proksimalindeki lezyonlar görüntülenebilir. 40 yaş altı düşük riskli bireylerin taraması için uygundur.

ix. Fleksibl Sigmoidoskopi: Kolorektal kanserlerin % 50 si bu bölgede olduğu için double kontrastlı baryum enema ile birlikte yapılırsa kolonoskopiye alternatif olabilir.

x. Kolonoskopi: Diğer radyolojik teşhis metotlarına karşın endoskopik tetkikin en önemli üstünlüğü; biyopsi alma, tanıyı doğrulama ve gereğinde tedaviyi aynı anda gerçekleştirmesidir (Waxner ve ark 1998).

2.2.6. Kolorektal Kanserlerde Lokalizasyon: Tümör % 55-60 oranında rektosigmoid yerleşimli olup, % 25 oranında inen kolonda, % 5 transvers kolonda, % 15 çıkan kolonda görülür. Sağ kolon tümörleri ileri yaşlarda daha sık olup, divertiküloz hastalığı ile beraberlik göstermektedir. Kolorektal karsinomların % 3-6'sı multisentrik ve senkron olarak gelişebilir (Topuz ve ark 1998).

2.2.7. Kolorektal kanserlerin histolojik tipleri: Adenokarsinom (İyi, orta, kötü diferansiye), Müsinöz adenokarsinom, Taşlı yüzük hücreli karsinom (Skiröz tip, lenfangiozis tip), Skuamöz diferansiyasyon gösteren karsinom (Adenoskuamöz, saf skuamöz), Saydam hücre komponentli karsinom, Bazaloid (Cloacogenic) karsinom, Koriokarsinomatöz diferansiyasyon gösteren adenokarsinom, Nöroendokrin diferansiyasyon gösteren adenokarsinom, Nöroendokrin tümörler (Karsinoid tümör, nöroendokrin, küçük hücreli karsinom). En fazla görülen kanser tipi adenokarsinom olup, tüm tümörlerin %85 'ini oluşturur (Topuz ve ark 1998).

2.2.8. Kolorektal Kanserlerde Evrelendirme: Kolorektal kanserlerde ilk kez patolojik evrelendirmeyi Cuthbert E. Dukes 1932 yılında yapmıştır. Sınıflandırma kanserin direkt yayılımı ve lenfatik tutulum üzerine dayanır (Topuz ve ark 1998).

1954 yılında Aster-Coller tarafından tümör derinliğinin önemine dayanarak Dukes klasifikasyonu modifiye edilmiştir. 1967 Yılında Turnbull, Dukes sistemine uzak metastazla ilgili olan stage D yi eklemiştir. Günümüzde American Joint Committee on Cancer (AJCC) ve Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) tarafından yapılan TNM evrelemesi kullanılmaktadır.

To : Primer tümöre ait bulgu yok.

Tis : Sadece mukozada sınırlı. Karsinoma insitu.

T1 : Tümör submukozaya ulaşmış.

T2 : Tümör muskularis propriayı tutmuş.

T3 : Tümör serozaya ulaşmış, perikolik yağ dokusu invazyonu mevcut.

T4 : Tümör periton boşluğuna veya organlara yayılım yapmış.

Tx : Primer tümör değerlendirilemedi.

No : Lenf nodu tutulumu yok.

N1 : Perikolik veya perirektal lenf nodlarından 1-3 adet metastaz.

N2 : Perikolik veya perirektal lenf nodlarından en az 4 adet metastaz.

N3 : Major arterler trasesinde pozitif lenf nodları.

Mo : Bilinen uzak metastaz yok.

M1 : Uzak organ metastaz var (Sayek 1991).

Kolorektal kanserlerde yapılan bu evreleme sistemlerine göre 5 yıllık yaşam oranları hesaplanabilmektedir, buna göre:

Evre 0 **Tis** No Mo ---- ----

Evre I **T1** No Mo

T2 No Mo A B1 % 85-95

Evre II **T3** No Mo

T4 No Mo B B2 % 60-80

Evre III **Tx** N1 Mo

Tx N2-3 Mo C C1 - C2 % 30-50

Evre IV **Tx** Nx M1 D

% 5-10 yaşam şansı bulunmaktadır.

Kolorektal karsinomlar; komşu yapılara direk invazyon, implantasyon, lenfatik geçiş ve hematojen yolla yayılırlar. Tümör hücrelerinin deskuamasyonu sonucu hücreler lümen içine dökülebilirler. Bu hücrelerin mukozaya invazyonu gösterilememiştir. İntraperitoneal implantasyon peritoneal karsinomatozise yol açmaktadır. En sık yayılma yolu lenfatiklerledir. Barsak duvarındaki invazyonu tam kata ulaşmış olan hastaların %50'sinde lenf bezi metastazı saptanır. Hematojen yayılım karsinom hücrelerinin kan dolaşımına geçmesi ile en sık karaciğer, ikinci sıklıkta akciğere metastaz yaparlar (Sayek 1991).

2.2.9. Kolorektal Kanserlerde Prognozu Etkileyen Faktörler

Kolorektal kanserlerde tümör muskularis propriayı tamamen penetre etmemişse 5 yıllık survi % 95, tamamını penetre etmiş, fakat lenf nodu yayılımı yoksa 5 yıllık survi % 80, nodal metastaz varsa 5 yıllık survi % 20-40 dır.

Kolorektal kanserlerin prognozu çok sayıda klinik ve patolojik parametrelerle ilişkilidir. Bunlar önem sırasına bakılmaksızın aşağıda belirtilmiştir:

i. Yaş; Tümör çok genç ve yaşlılarda görüldüğünde prognoz kötüdür.

ii. Cinsiyet; Prognoz kadınlarda erkeklere göre daha iyidir.

iii. Lokal yayılım; Mukoza ve submukozada sınırlı olanlarda da prognoz iyidir. Regional lenf nodlarına metastaz yapmış veya barsak duvarını aşmış invazyonu olan tümörlerde prognoz kötüdür.

iv. Perforasyon; Barsak duvarında aşırı tümör invazyonu sonucu oluşan perforasyon kötü prognozla ilişkili bulunmuştur.

v. Mikroskopik tip ve Grade; Mikroskopik grade ve prognoz arasında belirgin ilişki bulunmuştur. Mikroskopik subtiplerinden müsinöz karsinom, signet ring cell karsinom, küçük hücreli karsinom diğer olağan adenokarsinomlarından daha kötü prognozludur.

vi. Müsin ilişkili antijenler; Müsinle ilişkili sialasy1-Tn ve sialasy1 Lewis antijeni eksprese eden kolorektal karsinomlar çok agresiv klinik seyirli bulunmuştur.

vii. İnflamatuvar reaksiyon; Stromanın eozinofiller ve S100 protein pozitif dendritik hücrelerle infiltrasyonu, Crohn hastalığındakine benzer özellikteki peritümöral lenfositik infiltrasyon iyi prognozla ilişkilidir.

viii. Vasküler ve perinöral invazyon; Ven invazyonu olduğunda 5 yıllık yaşam belirgin azalır. Perinöral invazyon ilerlemiş bir hastalığın işaretidir ve genellikle kötü bir patolojik bulgudur. Lenf damar invazyonu daha az önemlidir.

ix. Lenf nodu tutulumu; Tümör lenf nodlarına yayıldığında 5 yıllık yaşam oranı düşer. Lokalizasyon ve lenf nod tutulumunun yaygınlığı önemlidir. Tümörün hemen komşuluğunda tutulan nodlar dışında lenf nodu tutulumu varsa kür çok nadirdir. Apikal nod tutulumu kötü prognozu gösterir. Çok sayıda lenf nodu tutulumu olduğunda prognoz iyi değildir. Lenf nodu tutulumu derecesi ve tümörün boyutları arasında korelasyon bulunmuştur.

x. Kromozom 18q'nun allelik kaybı; Bu karyotipik değişiklik kolorektal karsinomun güçlü negatif prognostik işaretidir.

xi. Tümör belirleyiciler; Kolorektal karsinomlar için 6 değişik tümör belirleyicisinden bahsedilmektedir. Bunlar TPA (tissue polipeptit antijen) , CEA, CA 19-9, CA 50, CA 242, ve TPS (tissue polipeptit spesifik antijen)'dir. En sık kullanılanları CEA, CA 19-9, ve TPA'dır. TPA ve TPS tümör DNA'sının S fazını dolayısıyla proliferasyon hızını gösterir. CEA, CA 19-9 ve TPA primer tümörün tanısı, nükslerin saptanması ve gerek cerrahi gerekse adjuvan tedaviye tümörün verdiği cevabın gösterilmesinde rol oynar.

İlk ameliyatta safra kesesi içinden alınan sıvıda yapılan CEA ölçümlerinde yüksek değer tespit edilmesi gizli karaciğer metastazlarının ortaya konulmasına yardımcı olmaktadır. Ayrıca ameliyat sonrası yapılan kolonoskopik tetkiklerde anastomoz kenarlarından alınan biyopsilerde, human metallo panstimulin'in (MPS-1) yüksek oluşu kolon tümörünün daha agresif kimliği olduğunu ortaya koyar. Adenomatöz polipi olanların rektal biyopsilerinde tirozinaz artışının kanser gelişmesinin en erken belirtisi olduğu bildirilmektedir (Lindmark ve ark1991, Wojciechowics ve ark 1999, Ganger ve ark 1993, Kordek ve ark 1997).

xii. Tümör hücrelerinin DNA indeksi; Flow sitometre ile tümör hücrelerinin DNA indeksi ortaya konulabilir. Bu hücreler daha ziyade diploid nükleuslu olup aneuploid nükleuslu tümörlere göre daha az metastaz yaparlar. İleri evre tümörlerin aneuploid olma eğilimi vardır. Bazı çalışmalarda tümörün klinikopatolojik evresinden bağımsız olarak DNA indeksinin prognostik değeri olduğu ortaya konulmuştur (Jones ve ark 1988, Kokal ve ark 1989).

3. POLİMORFİZM

Organizmada gelişimsel planları belirleyen ve tüm hücrel aktivitelere yönetiminden sorumlu olan molekül DNA'dır. DNA dizilerindeki değişiklikler bireylerin birbirinden farklı olmasına yol açar (genetik çeşitlilik). Genom proteine dönüşecek olan genler ve çok miktarda protein kodlamayan dizilerinden oluşur. Genlerin içinde de ekzon ve intron dediğimiz iki farklı kısım vardır. Bunlardan ekzonlar protein yapısına katılırken protein kodlamayan ve genomun %25'ini oluşturan intronlar RNA işlenirken kesilerek şifreden uzaklaştırılırlar. Diğer yandan genomun %60'ından fazlasını, çeşitli tipte tekrarlayan DNA dizileri, psödogenler, genler arasındaki tekrarlanmayan aralayıcı diziler ve mRNA'ların 5' ve 3' uçlarında bulunan, proteine çevrilmeyen diziler oluşturur (Cooper 2000). Böylece genetik çeşitliliğe yol açtığını var saydığımız değişikliklerin DNA'nın hangi kısmında olduğu önem kazanır.

Protein kodlayan ve oluşan proteinin işlevini önemli ölçüde sınırlayan DNA değişiklikleri mutasyon olarak adlandırılır ve hastalığa yol açarlar. Proteinlerde farklılık yaratmayan, ya da oluşan farklılıkların fenotipte değişikliğe yol açmadığı, DNA dizi değişiklikleri ise 'normal varyasyonlar' ya da polimorfizm kavramı altında ele alınır. Evrim boyunca seçici baskı altında olan mutasyonlar toplumda nadir gözlenen değişiklikler olmasına karşın polimorfizmler toplumda yaygın olarak bulunurlar (%1'in üzerinde). Oluş mekanizmalarına ve buldukları yere göre farklı tipte polimorfizmler mevcuttur.

3.1. Kısa DNA Baz Tekrarları (Short tandem repeat polimorfizm; STRP veya microsatellite): İnsan genom çalışmaları sırasında genomda şifreye dönüşmeyen bölgelerde iki baz (örneğin sitozin-adenin; CACACACA....gibi) ya da dört bazlık (Guanin-Adenin-Timin-Adenin; GATAGATAGATA.....gibi) tekrar bölgeleri olduğu görülmüştür. Bunların şu andaki bilgilerimize göre işlevsel herhangi bir görevleri yoktur, ancak bireylerin DNA'larının birbirinden farklı olmalarına neden olurlar ve toplumda yaygın bulunurlar. Bu bölgeler içerdikleri tekrar sayılarına göre DNA'da bölgeye özgü bireysel büyüklük farkları yaratırlar. Homolog kromozomlardan birisi babadan diğeri anneden gelmiş olduğu için ilgilendiğimiz

tekrar bölgesi açısından bireyin iki kromozomu arasında fark olabilir. Böyle bir bireyin DNA'sının ilgili bölgesini PCR metodu ile çoğaltıp jelde yüksek elektrik akımı altında yürütecek olursak, daha kısa olan DNA parçası daha hızlı ilerleyecek diğeri ise geride kalacaktır. Böylelikle jel üzerinde farklı bant görünümüleri oluşacaktır. İncelenen bireylere ait DNA'lar çoğaltılıp jelde yan yana yürütülecek ve jel görüntüleri karşılaştırılacak olursa bireysel DNA farklılıkları saptanabilir ve genetik gösterge olarak kullanılabilir.

İnsan genom projesi kapsamında genomda böyle özelliğe sahip bölgeler saptanarak bu bölgelerin PCR metodu ile çoğaltılmasına olanak verecek, bölgeye özgü nükleotid dizileri (Primer) ve bunların kromozom bölgelerine göre yerleri bilinmektedir. Gen haritalama çalışmalarında kullandığımız genetik göstergeler STRP bölgelerini çoğaltmaya yarayan bu primer dizilerinden oluşmaktadır ve gen haritalama çalışmalarında kullanım kolaylığı sağlamaktadır (Akarsu 2004).

3.2. Uzun DNA Baz Tekrarları (Variable Number Tandem Repeats (VNTR); minisatellitler): DNA'nın bazı bölgelerinde blok halinde büyük DNA parçalarının (9-70 baz çifti ve daha uzun bölgeler) tekrarlandığı görülür. Bu tekrar bölgelerini içeren DNA parçaları bölgeyi içine alacak şekilde bölgenin dışından enzimler aracılığı ile (Restriksiyon enzimleri) kesilir. Daha sonra ilgili bölge nitroselülöz bir membrana aktarılır ve VNTR bölgelerine özgü işaretli DNA parçaları ile (probe) birleştirilir (Southern blotting yöntemi). Böylelikle bireyler arasında farklı uzunlukta olan DNA parçaları görünür hale getirilmiş olur. VNTR'lerin saptanması özellikle adli tıpta genetik parmak izi (genetic fingerprinting) dediğimiz işlemde geniş kullanım alanı bulmuştur (Brock 1993).

3.3. DNA'nın Tek Bir Bazındaki Değişiklikler Single nucleotid polymorphisms (SNP): Burada tek bir DNA bazında (Örneğin Adenin) başka bir baza değişme (Örneğin Guanin) söz konusudur. Bu değişiklik genomun şifreye dönmeyen kısımlarında meydana geldiği zaman yorumlanmaları tıpkı yukarıda anlatılan kısa ve uzun baz tekrarlarındaki farklılıklar gibidir (bireyler arasında genetik çeşitliliğe yol açar). Genetik materyaldeki normal varyasyonlar bazen gen içinde hatta ekzonlar içinde de olabilir. Proteinlerin yapısına katılan amino asitler 3'lü DNA baz dizilerini (codon) tanırlar. Örneğin GTT dizisi daima Valin amino asidini kodlar. Bu üçlü

yapının ilk iki bazındaki değişiklikler amino asit yapısında değişikliğe yol açarken son bazdaki değişiklik (GTC;GTA;GTG gibi) yine valin amino asidini tanıyarak, sonuçta oluşan amino asit şifresinde bir farklılık yaratmaz. Bu tip değişiklikler gen içinde oldukları halde proteinde değişiklik yapmadıkları için “eşanlamlı” (synonymous) mutasyonlar olarak adlandırılırlar. Bazı durumlarda da oluşan DNA değişikliği amino asidi değiştirir ancak bu değişiklik proteinin fonksiyonunda etkili olmaz. Bu tip değişiklikler de “sessiz mutasyonlar” ya da eş anlamlı olmayan (nonsynonymous) değişiklikler olarak adlandırılır. Bütün bu değişiklikler polimorfizm kapsamı içinde ele alınır, toplumda yaygın olarak bulunurlar ve bireylerin genetik materyalini birbirinden farklılaştırarak genetik gösterge olarak kullanılabilirler. SNP değişikliklerinin son yıllarda fark edilen önemli bir yararı da bu değişikliklerin pek çoğunun gen içinde yer almaları nedeni ile gen haritalama çalışmalarında hastalığın doğrudan çalışılan gene bağlantı gösterip göstermediğinin saptanabilmesine yardımcı olmasıdır. SNP’ler bugün özellikle DNA çip teknolojisinin gelişmesi ile ilgili hastalıklara genetik yatkınlıkların sınıandığı en önemli gösterge haline gelmişlerdir (Akarsu 1999).

SNP değişiklikleri ile çalışmak, DNA parçacığında büyüklük farkı yaratan diğer polimorfizmlerle (örneğin STRP) çalışmaktan farklıdır. Burada tek bir baz başka bir baza değişmektedir ve büyüklük farkı oluşmadığı için bu bölgeleri PCR metodu ile çoğaltıp jelde oluşturacağı büyüklük farkları açısından değerlendirmenin bir anlamı yoktur. Allellerden birinde oluşan bu baz değişikliğini tanıyacak ve çoğaltma sonrasında iki allel arasında büyüklük farkı yaratacak farklı primer kullanılmasına dayalı “allele özel amplifikasyon” bu amaçla kullanılan yöntemlerden biridir. Oluşan değişiklik belli DNA bölgelerini tanıyıp kesen enzim bölgelerinde oluşmuşsa, ilgili enzimin DNA’yı kesip kesmemesini denemeye dayalı DNA’yı kesen enzimlerin oluşturduğu uzunluk polimorfizmleri (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP) de kullanılabilir. Yine bu değişimi florasan işaretlerle tanıyan otomatik analizatörlerin kullanılması da bu amaçla kullanılan pahalı fakat etkin yöntemlerdir (Akarsu 2004).

3.4. DNA'yı Kesim Enzimlerin Oluşturduğu Uzunluk Polimorfizmleri (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP): DNA 'yı belli baz dizilerinden tanıyıp kesen enzimler "DNA kesim enzimleri (Restriction Endonucleases)" olarak isimlendirilirler. Bazı kesim enzimlerinin özgül tanıma bölgeleri genellikle 4-6 DNA bazından oluşur. Normalde enzimin tanıma bölgesi olan bu bazlarda bir değişiklik olduğunu var saydığımızda enzimin DNA'yı kesme kalıbı değişecektir. Yani genomik DNA'da oluşan dizi değişiklikleri, belirli kesim bölgeleri yaratır veya onları yok eder. Bu nedenden dolayı boyutları değişen bir veya birden fazla DNA fragment Southern blot ve klonlanmış DNA probu ile hibridizasyondan sonra görünür hale getirilebilir. Bu enzim kesim özellikleri polimorfik nitelikteki genetik göstergelerin bir diğer örneği olarak kabul edilebilir ve bağlantı ya da ilişkilendirme analizlerinde kullanılabilir (Dib ve ark 1996).

Görülüyor ki altta yatan moleküller değişiklik ne olursa olsun polimorfizm dediğimiz zaman genetik materyalde bireyleri (hatta aynı bireyin farklı allelleri) birbirinden farklılaştıran ve toplumda yaygın olarak bulunan değişikliklerden söz edilmektedir.

3.5. Kan Grupları ve Diğer Polimorfizmler

Genetik olarak belirlenmiş ilk polimorfizm örneği kanda bulunan antijenlerde tesbit edilmiştir. Bunlara kan grubu antijenleri adı verilmiştir. Çok sayıda polimorfizmin insan kan bileşenlerinde, özellikle de kırmızı kan hücrelerinin ABO ve Rh antijenlerinde, bulunduğu bilinmektedir. ABO ve Rh sistemleri kan transfüzyonunda, doku-organ transplantasyonunda ve yeni doğan hemolitik hastalıkların tedavisinde önemlidir. Daha sonra serum protein çalışmaları, α 1-Antitripsin geninin polimorfik olduğunu ve aynı allellerin farklı popülasyonlarda %10-75 arasında değişebileceğini ortaya koydu. Bu allellerin her biri fonksiyonel olarak bir proteinin farklı tiplerini kodlar ve α 1-Antitripsin polimorfizminin tıbbi önemi, serum α 1-Antitripsin aktivite eksikliğine neden olan allellerle ilgilidir.

α 1-Antitripsin loksunda oluşan genetik polimorfizmler enzim aktivitesinde birkaç kat değişime neden olabilir. Bu değişikliklerin bazıları, genel sağlık açısından çok anlamlı olabilir. Görünümde normal olan insanlar arasında akciğer hastalığı, asthma ve

romatoid artrit hastalıklarına yatkınlığın α 1-Antitripsin polimorfizmleriyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. (Robert ve ark 2005).

3.6. Tıbbi Genetik'te Polimorfizmlerin Kullanımı

Polimorfizmler, tüm insan genetik araştırmalarında anahtar niteliğindeki elementlerdir. Polimorfizmler, genin farklı kalıtsal formlarını veya genomun farklı bölgelerini ayırt edebilmek için kullanılmaktadır. Genetik belirleyiciler olarak tıbbi genetikte kullanım için pratiklik sunar. Kullanıldığı alanlar bağlantı analiz yolu ile kromozomların belirli bölgelerindeki genlerinin haritalanması, genetik hastalıklarda doğum öncesi tanı, heterozigot taşıyıcıların belirlenmesi, koroner kalp hastalığı, kanser ve diyabet gibi yaygın yetişkin hastalıklara yatkın kişilerde yüksek ve düşük risklerin değerlendirilmesi, adli tıpta, babalık testi ve organ transplantasyonu için doku tiplemesidir (Robert ve ark 2005).

4. CYP450 (Sitokrom P450 Monooksijenaz) ENZİM SİSTEMLERİ

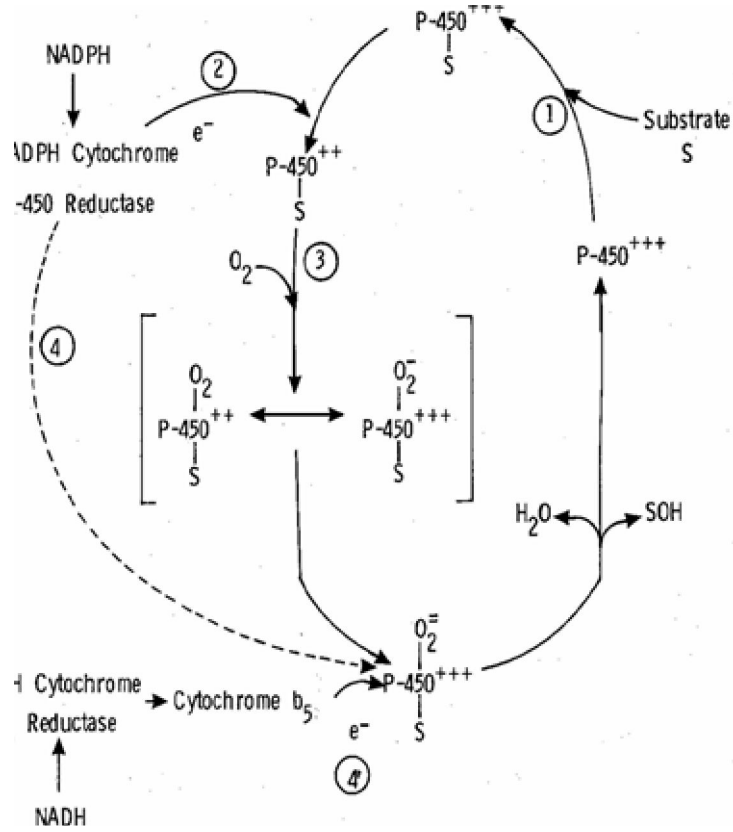
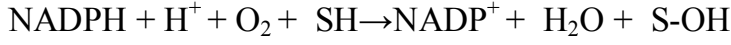
CYP450 (Sitokrom P450 monooksijenaz) enzim sistemleri, matür eritrosit ve iskelet kası hücreleri dışında tüm memeli hücre tiplerinde ve prokaryotlarda bulunan hem-protein ailesidir. Bu enzimler, yapısal olarak çeşitli farklı bileşiklerin oksidasyonunu katalize ederler. Endojen sentezlenen birçok bileşik, CYP450 enzimlerinin substratı olarak görev yapar. Bu bileşikler: prostaglandin ve lökotrienler dahil yağ asitleri, steroidler, eksojen yiyecek katkı maddeleri, ilaçlar olup ayrıca besinlerle, enjeksiyonla, havadan inhalasyonla ya da deriden absorpsiyonla vücuda giren endüstriyel maddelerdir. Sitokrom P450 enzimleri, ilaç biyotransformasyonu ve metabolizması için en önemli sistemlerden biridir. Bu sistem indüksiyon veya inhibisyon gibi sayısız mekanizmalarla değişime uğrayabilir ve bireyler arasında oldukça farklı formları ortaya çıkabilir. CYP450 enzimleri, 400–530 aminoasitten oluşan proteinlerdir. Baz dizilimi benzerliklerine göre P450 sistemi 40 farklı aile içinde sınıflandırılır. CYP450 sisteminin organizmada çok önemli etkileri vardır:

Bunlar; a) terapötik maddeleri inaktive veya aktive etme b) kimyasal maddeleri oldukça yüksek derecede reaktif moleküllere dönüştürme ve istenmeyen hücre hasarı, hücre ölümü veya mutasyon gibi olaylara neden olma c) steroid hormon sentezindeki bazı adımlara katılma ve d) yağ asidi ve türevlerinin metabolizmasıdır (Özerol 1996, Çetin 1999).

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

kontrol eden gen ailelerine veya substrat spesifikliğine göre sınıflandırılmaktadırlar (Özerol 1996).

CYP450 enzimleri ile katalizlenen genel reaksiyon aşağıdaki gibidir



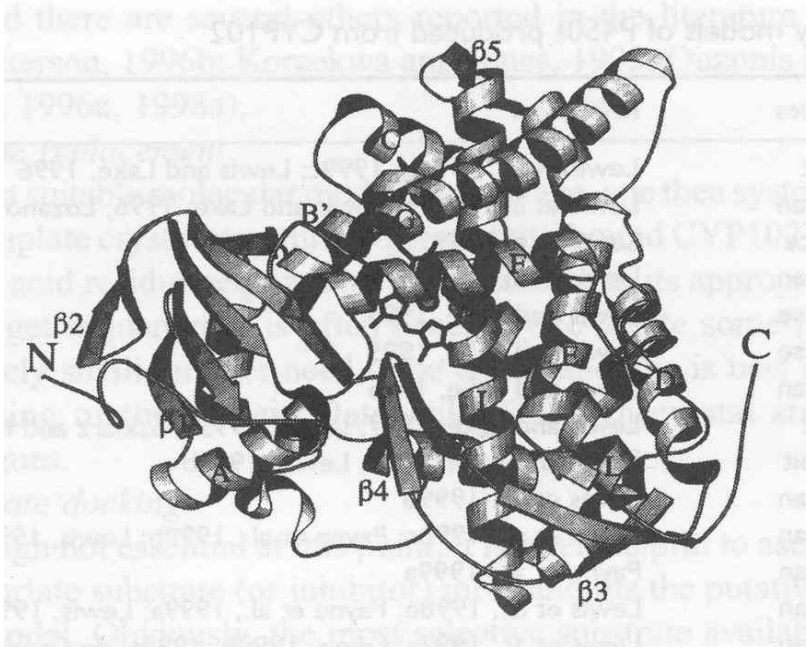
Şekil 4.1 CYP450 enzimlerinin genel reaksiyonu (Özerol 1996)

Buradaki substrat (S), bir steroid, yağ asidi, ilaç yada oksijen bağlama yeri olarak görev yapan alkan, alken, aromatik halka veya heterosiklik halka ekleri olan diğer kimyasal maddeler olabilir. Substrata iki oksijen atomundan sadece biri katıldığı için bu reaksiyona monooksijenasyon reaksiyonu ve bu enzimlere de sitokrom P450 monooksijenaz enzimleri adı verilmektedir (Özerol 1996).

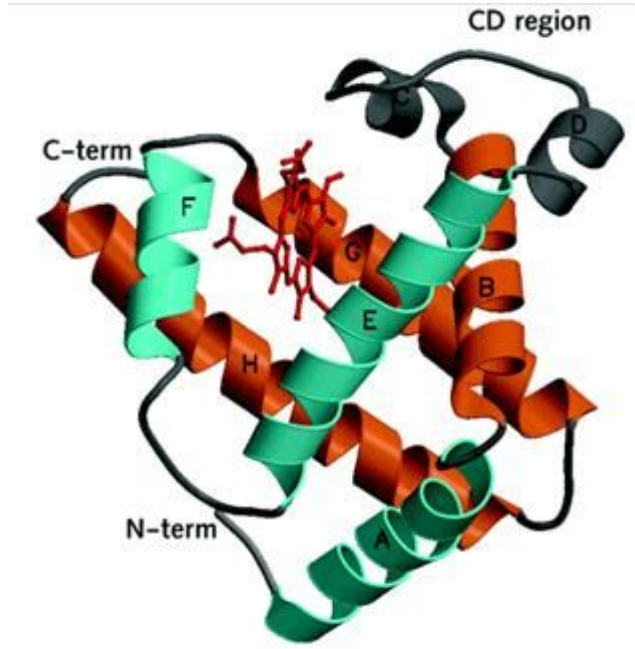
4.1. CYP450'nin Yapısı

CYP450 proteinlerinde bir tek demir protoporfirin IX prostetik grubu bulunur. Her hem proteininde hem bir oksijen molekülünün hem de substratların bağlanabileceği yerler vardır. Bilinen tüm CYP450'lerdeki hem demiri, porfirin halkasındaki 4 piro

nitrojen atomuna ve iki aksiyal liganda bağlıdır. Aksiyal ligandların birinde molekülün karboksil ucuna yakın yerleşmiş bir sistein aminoastinde bir sülfidril grubu bulunur. Hem demiri, hekza yerleşimde düşük spinli demir ve penta yerleşimde yüksek spinli demir olmak üzere iki farklı spin durumunda bulunabilir. Düşük ve yüksek spinli durumlar demir atomunu çeviren elektronik kalkanlar olarak tanımlanır ve hemdeki demir atomunu hekza yerleşimli durumdan penta yerleşimli duruma çevirir. CYP450 molekülü bir substrata bağlanınca, bu elektronik kalkanda irritasyon meydana gelir ve hemdeki demir atomu hekza yerleşimden penta yerleşime geçer. Substrata bağlı, penta koordine durum (-170 mV), substrata bağlanamayan hekza koordine duruma (-270 mV) göre daha fazla pozitif indirgenme potansiyeline sahip olduğu için CYP450, NADPH'dan elde edilen elektronlarla indirgenebilir. Hidroksilasyon (monooksijenasyon) reaksiyonunun meydana gelmesi sırasında oksijenin hem demirine bağlanabilmesi için (hemdeki demir ferrik (Fe^{3+}) durumundan ferro (Fe^{2+}) durumuna indirgenmelidir. Monooksijenasyon reaksiyonunda toplam 2 elektron (e^-) gerekir. Elektronlar CYP450 molekülüne tek tek transfer edilir. İlk önce oksijen bağlanır ve daha sonra substratın reaksiyona katılabilmesi için aktif oksijen türleri oluşturarak ayrılır (Özerol 1996).



Şekil 4.2 CYP450 molekülü (Çetinkaya ve ark 2002)



Şekil 4.3 CYP450 molekülü bağlantı bölgeleri (Çetinkaya ve ark 2002)

4.1.1. CYP Enzimlerinin Özellikleri

1. Birçok dokuda işlev görürler.
2. Hepatositlerde en yüksek derişimde bulunurlar.
3. Primer olarak oksidatif metabolizmayı düzenlerler.
4. Hücre içinde bulunduğu yere göre: Mitokondride bulunan streoidojenik CYP enzimleri ve endoplazmik retikulumda bulunan ksenobiyotik CYP enzimleri olmak üzere iki grupta incelenirler (Çetin 1999, Nemeroff 1996).

4.1.2. Streoidojenik CYP Enzimleri

1. Tek hücreli organizmaların hücre zarı bütünlüğünü sağlarlar.
2. Farklılaşmış organizmaların gelişiminin hormonal düzenleyicileridirler.
3. Etki ettiği maddeler konusunda özgündürler.
4. Tüketilen maddelerin biyolojik kullanım yapılarına dönüştürülmesini sağlarlar (steroidler, safra asitleri, kolesterol, prostaglandin sentezi) (Çetin 1999, Nemeroff ve ark 1996).

4.1.3. Ksenobiyotik CYP Enzimleri

1. Bitki-hayvan farklılaşması döneminde streoidojenik CYP enzimlerinden türemişlerdir.
2. Transferaz enzimleriyle eş zamanlı türemişlerdir.

3. Bitkilerin oluşturduğu diyet toksinlerini yıkarlar.
4. Eliminasyon için ilaçları biyotransformasyona uğratırlar.
5. Tüketilen maddelerin detoksifikasyonunda görev alırlar (toksinler, karsinogenler, ilaçlar, mutajenler (Çetin 1999, Nemeroff ve ark 1996).

Sitokrom P450 enzimleri hepatositlerde en yüksek derişimde bulunmakla birlikte, başka dokularda da görülebirlirler. Tiplerine göre hücrenin mitokondrisinde veya endoplazmik retikulumunda bulunabilirler (Çetin 1999, Nemeroff ve ark 1996).

Spesifik CYP enzimlerini kodlayan genlerin izole edilmesiyle bu enzimlerin aminoasit dizilimleri belirlenebilmiştir. Bu bilgi kullanılarak, farklı enzimler aminoasit dizilimine göre sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmada enzimler hem yapı hem fonksiyonel olarak birbirlerine yakın enzimlerdir. CYP enzimleri ilk numaradan itibaren ailelere ayrılmıştır. Bu ailedeki bütün enzimler aminoasit dizilimi yönünden en az %40 benzerlik gösterenler aynı aile içine alınmaktadır. Alfabetik harfler ile alt grup ailelere ayrılmaktadır. Aynı alt aile grubunda ise aminoasit dizilim homolojisi en az %55 olmaktadır. En son numara ise enzimi kodlayan genin numarasıdır (Çetin 1999, Rogers ve ark 2002).

Örnek 4.1

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

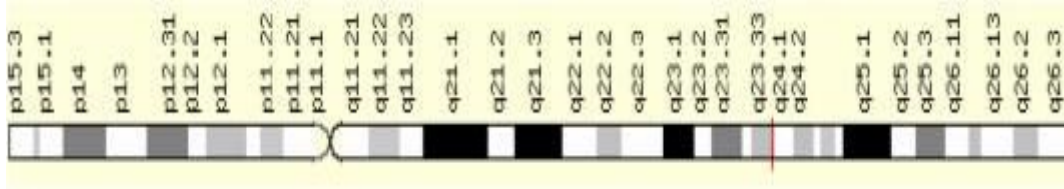
Sitokrom P450 enzimleri içerdikleri aminoasit benzerliklerine göre sınıflandırılırlar. En önemli CYP450 izoenzimleri CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 ve CYP2C19'dur (Rogers ve ark 2002, Linder ve ark 2002).

4.2.1. CYP2C9 Gen Ailesi

CYP2C gen ailesi 10 numaralı kromozomun uzun kolunda (q24) yer alan CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 ve CYP2C19 alt aile genlerinden oluşur. CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 ve CYP2C19 genleri %82'den fazla aminoasit dizi benzerliğine sahip olmalarına rağmen, oldukça az substrat spesifitesi gösterirler.

Bu alt ailenin bütün üyeleri polimorfiktir. CYP2C9'un kodladığı protein 490 aminoasit içermekte olup CYP2C19 ile %92 oranında homologdur ve 490 aminoasitten sadece 43'ü farklıdır (Tassies ve ark 2002, Herrman ve ark 2003).

CYP2C9 geni kromozomun 10 q24.1 bölgesinde haritalanmış yaklaşık 55 kb uzunluğunda ve 9 ekzondan oluşan bir gendir (Şekil 4.4). CYP2C9 da diğer P450 enzimleri gibi substratlarının dealkilasyon, demetilasyon ve hidrosilasyonundan sorumludur. Ayrıca diğer P450 enzimleri gibi CYP2C9'un metabolize ettiği substratlar arasında endojen bileşiklerde yer almaktadır. CYP2C9 karaciğer arasıidonik asitini tek başına metabolize etmektedir



10.Kromozom (10q24.1) (Tassies ve ark 2002).

Şekil 4.4 . CYP2C9 geninin kromozomal yerleşimi

CYP2C9 birçok ilacın metabolize edilmesine katılır ve bu gendeki polimorfizm ilaçların etkisini değiştirebilir veya toksisitesini artırabilir (Ablin ve ark 2004).

CYP2C9 için en iyi bilinen ilaç substratları yapılarında karboksilik grup içeren zayıf asitlerdir. Tolbutamid gibi oral hipoglisemik ajanlar, fenitoin gibi antiepileptik ilaçlar, oral antikoagülan kumadin, ibuprofen gibi nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçlar ve losartan gibi angiotensin II blokerleri CYP2C9 tarafından metabolize edilir (Ablin ve ark 2004, Tabrizi ve ark 2002).

CYP2C9'da oluşan genetik polimorfizm enzim aktivitesi üzerinde önemlidir. Wild tip (Normal) allele (CYP2C9*1) ek olarak CYP2C9'da nokta mutasyonlar sonucu iki allelik varyant oluşmuştur. CYP2C9*2 ekzon 3'de C₄₃₀T transisyonu sonucu arjininin sistein ile yer değiştirmesi sonucu; CYP2C9*3 ekzon 7'de A₁₀₇₅C transversiyon sonucu izolösinin lösün ile yer değiştirmesiyle oluşur (Herrman ve ark. 2003, Ablin ve ark 2004, Tabrizi ve ark 2002).

Türk popülasyonunda CYP2C9*1, CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 allelleri bulunur; frekansı Beyaz Irk ile benzerlik gösterir (Pchelina ve ark 2005, Aynacioglu ve ark 1999).

CYP2C9*1/*1 genotipi: Wild tip olarak bilinen, enzimin tam kapasite ile çalıştığı ve her iki allelin de normal olduğu formdur. Bu genotipi taşıyan bireyler "hızlı metabolizör" olarak adlandırılır (Gaedigk ve ark 2001, Linder ve ark 2002, Spreafico ve ark 2003).

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

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

CYP2C9 *2/*3 genotipi: Her iki mutant alleli de taşıyan "compound heterozigot" bireylerdir- CYP2C9 *1/*2, *2/*2, 1/*3, *3/*3 ve *2/*3 genotiplerini taşıyan bireyler "yavaş metabolizör" olarak adlandırılır (Gaedigk ve ark 2001, Linder ve ark 2002, Spreafico ve ark 2003).

4.2.2. CYP2C19 Gen ailesi

Bu enzim ilaç metabolizmasında önemli rol oynayan ve genetik polimorfizm gösteren enzimlerden biridir. Başta karaciğer hepatositleri olmak üzere akciğerler, gastrointestinal kanal mukozası ve lümeni, böbrekler, cilt, santral sinir sistemi, plazma, eritrositler, ağız mukozası, diş etleri ve plasenta gibi yapılarda bulunur (Avlan ve ark 1991, Kayaalp 1994).

Bu enzimdeki polimorfizm ilk kez S-mefenitoinin hidroksilasyonunda bireyler arasında farklılıkların saptanmasıyla tanımlanmıştır (Wedlund ve ark 1984, deMorais ve ark 1994).

Daha sonra yapılan çalışmalar CYP2C19 enziminin S-mefenitoin'in yanı sıra omeprazol, diazepam, mefobarbital, imipramin ve sitalopram gibi klinikte sık kullanılan pek çok ilacın ve bazı ksenobiyotiklerin metabolizmasına da aracılık ettiğini göstermiştir (Kupfer ve ark 1985, Bertilsson ve ark 1989, Ward ve ark 1989, Helsby ve ark. 1990, Belpaire ve ark 1996, Marzo ve ark 1996, Coller ve ark 1999).

CYP2C19 enzimini kodlayan CYP2C19 geni 1473 baz çifti uzunluğundadır ve 10. kromozomda lokalize olmuştur (10q24.1-10q24.3) (Alvan 1991, Romkes ve ark 1991, Daly 1995, Meyer ve ark 1997).

CYP2C19 enziminin özelliklerini belirlemek için yapılan çalışmalarda CYP2C19 genindeki mutasyonların enzimin katalitik aktivitesinin azalmasına ya da yokluğuna neden oldukları belirlenmiştir. CYP2C19 polimorfizminin araştırılması amacıyla yapılan ilk çalışmalarda enzim yetersizliği ile metabolizma kusurlarından iki mutant allelin sorumlu olduğu deMorais ve arkadaşları (1994) tarafından saptanmıştır. CYP2C19'un şimdiye kadar belirlenen 7 mutant alleli gösterilmiştir. Normal aktiviteli allel CYP2C19*1 (wild tip)'tir. Aktivite azlığına ya da yokluğuna neden olan mutant alleller ise CYP2C19*2 (m1), CYP2C19*3 (m2), CYP2C19*4 (m3), CYP2C19*5 (m4), CYP2C19*6 (m5), CYP2C19*7 (m6) ve CYP2C19*8 (m7)'dir (deMorais ve ark. 1994a, 1994b, deMorais ve ark. 1995, Kupfer ve ark. 1997, Xiao ve ark. 1997, Ferguson ve ark 1997, Ibeanu ve ark.1998).

CYP2C19 yavaş metabolizörlerinin oranı toplumlar arasında da farklılık göstermektedir. Bu enzim bakımından Beyaz ırkta yavaş metabolizör sıklığı %2-5

iken, Doğu populasyonunda bu sıklık %11-23 arasında değişmektedir. Tablo 4.1'de değişik toplumlardaki CYP2C19 yavaş metabolizör oranları gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Farklı populasyonlarda CYP2C19 yavaş metabolizör sıklığı

Populasyon	Yavaş metabolizör (%)	Kaynak
Türkler	0.99	Aynacıoğlu ve ark. 1999
Türkler	0.94	Başçı ve ark. 1994
Kafkaslar (İsveç)	2.1	An Goldstein ve ark. 1997
Zenci Amerikalılar	3.6	Edeki ve ark. 1996
Etiyopyalılar	5.2	Persson ve ark. 1996
Zimbabweli Shonalar	3.9	Masimirembwa ve ark. 1995
Çinliler	11	deMoraes ve ark. 1995
Koreliler	16	Roh ve ark. 1996a
Koreliler	12.6	Roh ve ark. 1996b
Çinli-Tayvanlılar	16	Goldstein ve ark. 1996
Çinli Hanlar	20	Xiao ve ark. 1997
Japonlar	23.6	Kimura ve ark. 1998

(Herken ve ark 2000)

Türk populasyonunda CYP2C19 polimorfizmi ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Başçı ve arkadaşları (1994) S-mefenitoin kullanarak 106 sağlıklı bireyde yaptıkları bir fenotipik çalışmada yavaş metabolizör sıklığını %0.94 bulmuşlardır. Aynacıoğlu ve arkadaşları 1999 ise CYP2C19 m1, m2, m3 ve m4 mutasyonlarını 404 Türk bireyinde tayin etmişler ve genotipik olarak yavaş metabolizör sıklığını ~%1 bulmuşlardır. Bu çalışmalarında yavaş metabolizör genotipten sorumlu mutasyonun CYP2C19*2 (m1) olduğunu, ayrıca bireylerin hiçbirinde m3 ve m4 mutasyonu saptamadıklarını ve CYP2C19*3 (m2) mutasyonu bakımından homozigot olan bireylerin bulunmadığını da bildirmişlerdir.

CYP2C19*2 (G682A), CYP2C19*3 (G636A)'deki tek nokta mutasyonu ile CYP2C19*1 (wild tip)'den farklılaşan allellerdir, bu farklılıklar enzim aktivitesinde azalmaya sebep olmaktadır. CYP2C9 ve CYP2C19'daki nükleotid değişiklikleri ve enzim aktivitesine etkisi Tablo 4,2'de verilmiştir.

Tablo 4.2 CYP2C9 ve CYP2C19'daki nükleotid değişiklikleri ve enzim aktivitesi

Allel	Nükleotid değişikliği	Etki	Enzim Aktivitesi
CYP2C9*1	Yok	Yok	Normal
CYP2C9*2	C 430 T	R 144 C	Azalış
CYP2C9*3	A 1075 C	I 359 L	Azalış
CYP2C19*1	Yok	Yok	Normal
CYP2C19*2	G 681 A	Splicing defect	Yok
CYP2C19*3	G 636 A	Stop kodon	Yok

(Nada ve ark 2003)

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Çalışma Grubu ve Örnek Alımı

Bu çalışma 07102004 proje no ile Selçuk Üniversitesi BAP desteği; Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun 28.05.2007 tarih ve 2007/126 karar no'lu gerekli onayın alınmasıyla başlamıştır. Çalışma grubu, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi ve Tıbbi Onkoloji Ana Bilim Dallarına başvuran ve yatarak tedavi gören klinik ve histopatolojik olarak kolorektal kanser tanısı almış 41 kadın ve 44 erkek toplam 85 hasta ve Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezine kan bağışlamak üzere başvuran, belirli bir hastalığı olmayan 40'ı kadın 60'ı erkek 100 sağlıklı donör (kontrol grubu) oluşturmaktadır. Hasta ve kontrol grubuna kolorektal kanser için muhtemel risk faktörlerini belirleyebilmek için hasta tarama ve onam formu (Form 5.1) uygulanmış ve %7.5 etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) içeren tüplere 2 şer cc kan örneği alınmıştır. Alınan örnekler DNA izolasyonu yapıncaya kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmalar Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya ve Mikrobiyoloji Ana Bilim Dallarında laboratuvarlarında yapılmıştır.

Form 5.1 Hasta tarama ve onam formu

KOLOREKTAL HASTA TARAMA ve ONAM FORMU

Ad Soyad :
Cinsiyet :
Yaş :
VKİ: :
Kan Grubu :
İl :
Meslek :
Sigara kullanımı: Evet Hayır
Alkol kullanımı: Evet Hayır
Beyaz Toprak Maruziyeti: Evet Hayır
Ailede hastalık risk faktörü: Meme Over Kolon Diğer Ca Hikayesi:
Eşlik eden Sistemik Hastalık: D.M H.T Hiperkolesterolemi Diğer:
Yukardaki bilgileri ve kan örneğini bilimsel araştırmada kullanmak için onadım. İmza:

5.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Mutlak etil alkol	Merck (Almanya)
Mutlak isopropranol	Merck (Almanya)

5.3. Kullanılan Aletler

- Soğutmalı santrifüj (Sigma 3K30, Almanya)
- Santrifüj (Nüve NF 800, Sigma Ultrasantrifüj, Almanya)
- Etüv (Nüve EN 500, Almanya)
- Derin dondurucu (Uğur derin dondurucu, Türkiye)
- Soğutucu (Bosch, Danimarka)
- Eppendorf tüpü (1,5 ml'lik, isolab)
- 5 ml'lik EDTA'lı cam tüp (%7,5'lik)
- Otomatik pipet (Medisis)

5.4. Kullanılan Cihazlar

- Light Cycler 2.0 System Real Time PCR (Roche, Almanya)

5.5. Kullanılan Kitler

- High Pure PCR Template Kit (Katalog no. 1 796 828 001, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)
- Light Cycler CYP2C9 Mutation Detection Kit (CYP2C9*2 and CYP2C9*3) (Katalog no. 3 266 982, RocheDiagnostics GmbH Mannheim. Germany) .
- LightCycler CYP2C19 Mutation Detection Kit (CYP2C19*2 and CYP2C19*3) (Kat. no. 03 515 575 001, RocheDiagnostics GmbH Mannheim. Germany) .

5.6. Tam Kandan DNA İzolasyonu

Hücreler, tüm nükleazları hemen inhibe eden bir koatropik tuz (guanidin-HCl) varlığında proteinaz K ile kısa bir inkübasyon sonunda parçalandı. Hücresel nükleik asitler çok saf pürifikasyon filtre tüplerinde bulunan özel fiber glas yapıya seçici olarak bağlandı. Bağlı nükleik asitler kontamine edici hücresel elemanlardan hızlı yıkama ve çevirme işlemleri ile arındırıldı. Özel bir inhibitör temizleyici tampon ile bu işlem gerçekleştirildi. Son olarak düşük yoğunluklu tuz solüsyonu ile nükleik asitlerin fiber glastan ayrılması sağlandı.

5.6.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Ayıraçların Hazırlanması

Çalışmada DNA izolasyonu için high pure PCR template kiti kullanılmıştır. Kit içeriği (Tablo 5.1)'de verilmiştir.

Tablo 5.1. DNA izolasyon kit içeriği (Roche Diagnostic-Germany)

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

Yukarıda kit içeriğinde verilen DNA izolasyon setinde bulunan Proteinaz-K, inhibitör uzaklaştırıcı tampon, yıkama tamponu DNA izolasyon kitinin prospektüsünde verilen bilgiler doğrultusunda işlemlere tabi tutuldu. Proteinaz K: Liyofilize proteinaz K'ya 4.5 ml bidistile su eklendi ve çalışma gününe kadar 500'er μ l'lik porsiyonlara ayrılarak -20°C'de saklandı. İnhibitör uzaklaştırıcı tampon: 33 ml tampona 20 ml mutlak etil alkol eklendi. Yıkama tamponu: 20 ml yıkama tamponuna 80 ml mutlak etil alkol eklendi.

5.6.2. DNA izolasyon protokolü:

1. Ependorf tüpüne, 200 μ l EDTA'lı tam kan kondu ve üzerine sırasıyla 200 μ l binding tampon ve 40 μ l proteinaz K eklendi ve vortekslendi.
2. 10 dakika 72 °C'de inkübe edildi.
3. Tüpe 100 μ l izopropanol eklendi, vortekslendi ve karışım özel filtre tüplerine aktarıldı.
4. 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi, filtreden geçen karışım atıldı.
5. Filtre tüpün içine 500 μ l inhibitör uzaklaştırıcı tampon eklendi.
6. 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi, filtreden geçen karışım atıldı.
7. Filtre tüpün içine 500 μ l yıkama tamponu eklendi.
8. 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi, filtreden geçen karışımı atıldı.

9. İkinci kez filtre tüpün içine 500 µl yıkama tamponu eklendi.
10. 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi, filtreden geçen karışım atıldı.
11. Filtre tüp boşaltıldıktan sonra 10 saniye 8000 rpm'de santrifüj edildi.
12. Filtre tüpü, yeni bir ependorf tüpü içine yerleştirildi. 72 °C'de bekletilmiş olan elüsyon tampondan 200 µl, filtre tüpe pipetlendi.
13. 1 dakikada 8000 rpm'de santrifüj sonunda, filtre tüpten ayrılan, saf DNA elde edilmiş oldu.

5.6.3. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Real Time PCR hedef DNA'daki nükleotid dizisi bilinen nokta mutasyon içeren bir bölgenin amplifiye edilerek mutasyonun tespit edilmesi amacıyla kullanıldı. Analiz denaturasyon, amplifikasyon, melting ve cooling olmak üzere dört basamakta yapıldı. Çalışmaya başlarken Taq polimeraz, iki primer ve prob, dört çeşit deoksiribonükleotid fosfat (dNTP), belirli derişimde magnezyum klorür (MgCl₂) ve üzerinde çalışılacak DNA'dan oluşan karışım hazırlandı.

Denatürasyon basamağında sıcaklık arttırıldı ve DNA zincirindeki nükleotidler arasındaki bağlar kopararak amplifikasyon işlemine hazır hale getirildi. DNA denatüre edildikten sonra oligonükleotid yapısındaki primerler sentezlenecek hedef bölgeyi belirleyecek şekilde ayrılan DNA zincirlerine yapıştılar. Termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan saflaştırılan Taq polimeraz enzimi yardımıyla belirlenen bölge dört çeşit dNTP kullanılarak sentezlendi. Annealing (uzama) adı verilen sentez işlemi sırasında mutasyon olan diziye uygun olarak sentezlenmiş olan mutasyon probu (mutation probe) mutasyon bölgesine, diğer prob olan çapa probu (anchor probe) ise mutasyon probunun 5' ucu tarafına ve arada en fazla 5 nükleotidlik mesafe kalacak şekilde yerleşti. Amplifikasyon işlemi ortalama 40–50 kez tekrar edilerek yaklaşık 2⁴⁰⁻⁵⁰ sayıda ürün elde edildi.

5.6.3.1. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu Melting Curve Analizi ile Genotip Belirlenmesi

Bir DNA molekülünün erime ısı (Melting temperature: T_m) içerdiği G+C (guanin+sitozin) miktarına, uzunluğuna ve iki zincir arasında gösterdiği homolojiye bağlı olarak değişmektedir. Melting curve analizi ile genotip belirlenmesi İki hibridizasyon probu kullanılarak yapılmaktadır. Hibridizasyon problelerinden ilki

mutasyon olan diziye bağlanan ve 5'ucundan LightCycler-Red (LC-Red) fluorophore (LC-Red 640 yada LC-Red 705) ile işaretlenmiş olan mutasyon probudur. Diğer hibridizasyon probu ise 3'ucundan fluorescein ile işaretlenmiş olan çapa probudur. İki hibridizasyon probu hedef dizilere yapıştıktan sonra verici prob olan çapa probundaki fluorescein maddesi LightCycler cihazının ışık kaynağı tarafından eksile edilir ve eksilasyon enerjisinin bir kısmı mutasyon probunda bulunan LC-Red'e transfer edilir (Fluorescence Resonance Transfer Energy: FRET). LC-Red tarafından saçılan floresan LightCycler cihazı tarafından ölçülür. Melting basamağında sıcaklık yavaş yavaş (0.1 sn/°C) arttırılır. Mutasyon probunun bağlandığı bölgede mutasyon varsa nükleotidlerin eşleşmesi tam olarak gerçekleşmediği için Tm daha düşük olacak ve prob bağlandığı yerden daha düşük sıcaklıkta ayrılacaktır. Eğer mutasyon yoksa prob daha yüksek sıcaklıkta ayrılacaktır. Mutasyon probunun bağlandığı diziden kopmasıyla iki prob arasındaki FRET gerçekleşemez, cihaz tarafından ölçülen floresan düzeyi azalır ve ekrana bir pik olarak yansır.

5.6.4. CYP2C9 ve CYP2C19 PCR Protokolü ve Melting Pik Analizi

PCR ve mutasyon görüntüleme için, LightCycler CYP2C9*2, CYP2C9*3 ve LightCycler CYP2C19*2 ve CYP2C19*3 Mutasyon Belirleme Kitleri kullanıldı. CYP2C9 için kit içerikleri ve örnek başına kullanılan miktarlar tablo 5,2 'de CYP2C9 PCR protokolü tablo 5,3'de CYP2C19 için kit içerikleri ve örnek başına kullanılan miktarlar tablo 5,4'de, uygulanan; CYP2C19 PCR protokolü ise tablo 5,5'de verildi.

Tablo 5.2. CYP2C9 mutasyon belirleme kit içeriği ve kullanılan miktarlar (Roche Diagnostic-Germany)

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

Tablo.5.3. CYP2C9 için PCR protokolü

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

Tablo 5.4. CYP2C19 mutasyon belirleme kit içeriği ve kullanılan miktarlar

Karışımlar	İçerikleri	Bir örnek için harcanan miktar (µl)
LC-CYP2C19	Mg solusyonu	1.6
LC-CYP2C19 Mutasyon Belirleme Karışımı Reaksiyon Karışımı	Fast Start Taq polimeraz reaksiyon karışımı, dNTP karışımı Primer, hibridizasyon probu	4
LC-CYP2C19 Enzim Solusyonu	Fast Start Taq polimeraz	2
Kontrol Templat	Heterezigot Plazmit DNA'sı	2
Steril Su	PCR grade steril distile su	7.4

Tablo 5.5. CYP2C19 için PCR protokolü

Denatürasyon			
Siklus	1		
Hedef sıcaklık(C°)	95		
İnkübasyon süresi (sn)	600		
Sıcaklık değişim oranı (C°/sn)	20		
Amplifikasyon			
Siklus	45		
	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Hedef sıcaklık(C°)	95	60	72
İnkübasyon süresi (sn)	10	10	10
Sıcaklık değişim oranı (C°/sn)	20	20	3
Melting Curve analizi			
Siklus	1		
	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Hedef sıcaklık(C°)	95	40	85
İnkübasyon süresi (sn)	60	60	0
Sıcaklık değişim oranı (C°/sn)	20	20	0.2
Cooling			
Siklus	1		
Hedef sıcaklık(C°)	40		
İnkübasyon süresi (sn)	30		
Sıcaklık değişim oranı (C°/sn)	20		

Çalışmada, 2. Kanal (F2)'de izlenen CYP2C9*2 genotiplemeesi, Melting pik sayı ve Tm dereceleri C° tablo 5,6'da; 3. Kanal (F3)'de izlenen CYP2C9*3 genotiplemeesi, Melting pik sayı ve Tm dereceleri C° tablo 5,7'de gösterildi.

Tablo 5.6. Kanal 2 (F2) 'de izlenen CYP2C9*2 genotiplemeesi, Tm ve Pik sayıları

Genotip	MeltingPik Sayısı	MeltingPik . Tm	Δ Tm
Wild Tip	1	61.0 C°	-
Heterozigot	2	61.0 C°+ 50.0 C°	11.0 C°
Mutant	1	50.0 C°	-

Tablo 5.7. Kanal 3 (F3) 'de izlenen CYP2C9*3 genotiplemeesi, Tm ve Pik sayıları

Genotip	Melting Pik Sayısı	MeltingPik . Tm	Δ Tm
Wild Tip	1	60.0 C°	-
Heterozigot	2	61.0 C°+ 52.0 C°	8.0 C°
Mutant	1	52.0 C°	-

Kanal 2 (F2) ve Kanal 3 (F3) de kullanılan floresan ve tesbit edilen mutasyonlar tablo 5,8'de gösterildi.

Tablo 5.8. Kullanılan floresan ve tesbit edilen mutasyon

	Kanal 2 (F2)	Kanal 3 (F3)
Kullanılan Floresan	Light Cycler Red 640	Light Cycler Red 705
Analiz edilen Nükleotid Pozisyonu	C 430→T CYP2C9*2	A 1075→C CYP2C9*3

2. Kanal (F2)'de izlenen CYP2C19*3 genotiplemeesi, Melting pik sayısı ve Tm dereceleri C° tablo 5.9'da; 3. Kanal (F3)'de izlenen CYP2C19*2 genotiplemeesi, Melting pik sayısı ve Tm dereceleri C° tablo 5.10'da; Kanal 2 (F2) ve Kanal 3 (F3)' de kullanılan floresan ve tesbit edilen mutasyon tablo 5.11'de gösterildi.

Tablo 5.9. Kanal 2 (F2)'de izlenen CYP2C19*3 genotiplemeesi, Tm ve Pik sayıları

Genotip	MeltingPik Sayısı	MeltingPik . Tm	Δ Tm
Wild Tip	1	62.0 C°	-
Heterozigot	2	62.0 C°+53.5 C°	8.5 C°
Mutant	1	53.5 C°	-

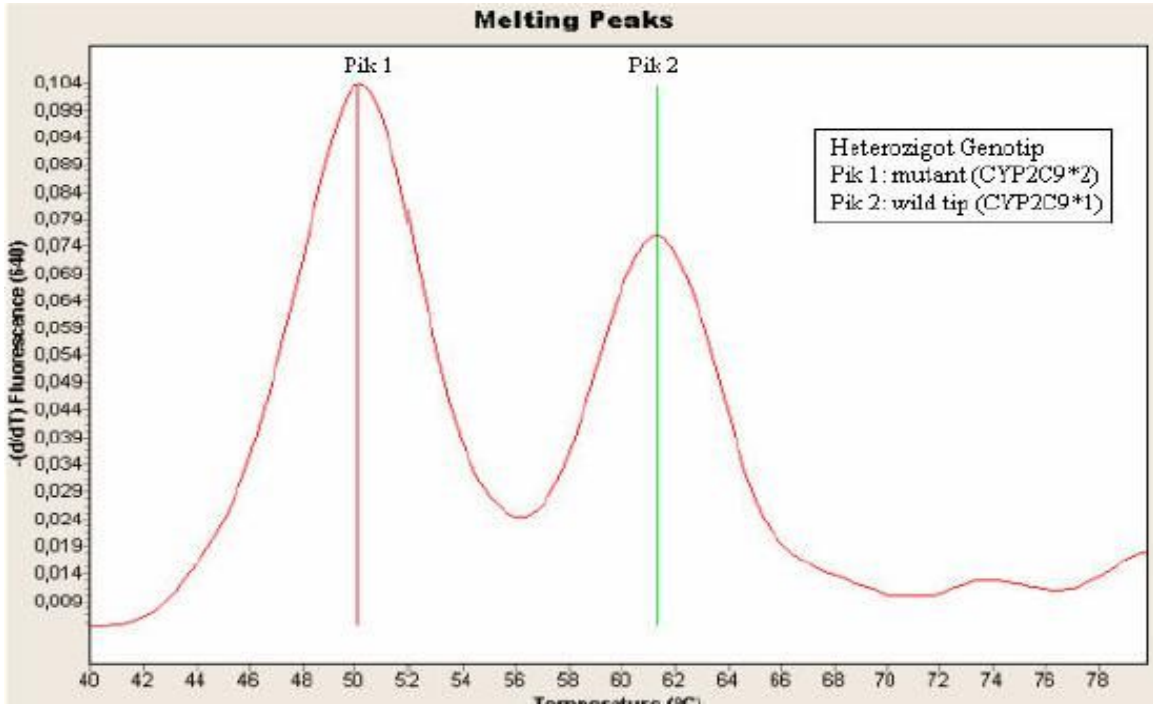
Tablo 5.10. Kanal 3 (F3)'de izlenen CYP2C19*2 genotiplemeesi, Tm ve Pik sayıları

Genotip	Melting Pik Sayısı	MeltingPik . Tm	Δ Tm
Wild Tip	1	60.0 C°	-
Heterozigot	2	60.5 C°+ 52.0 C°	8.5 C°
Mutant	1	52.0 C°	-

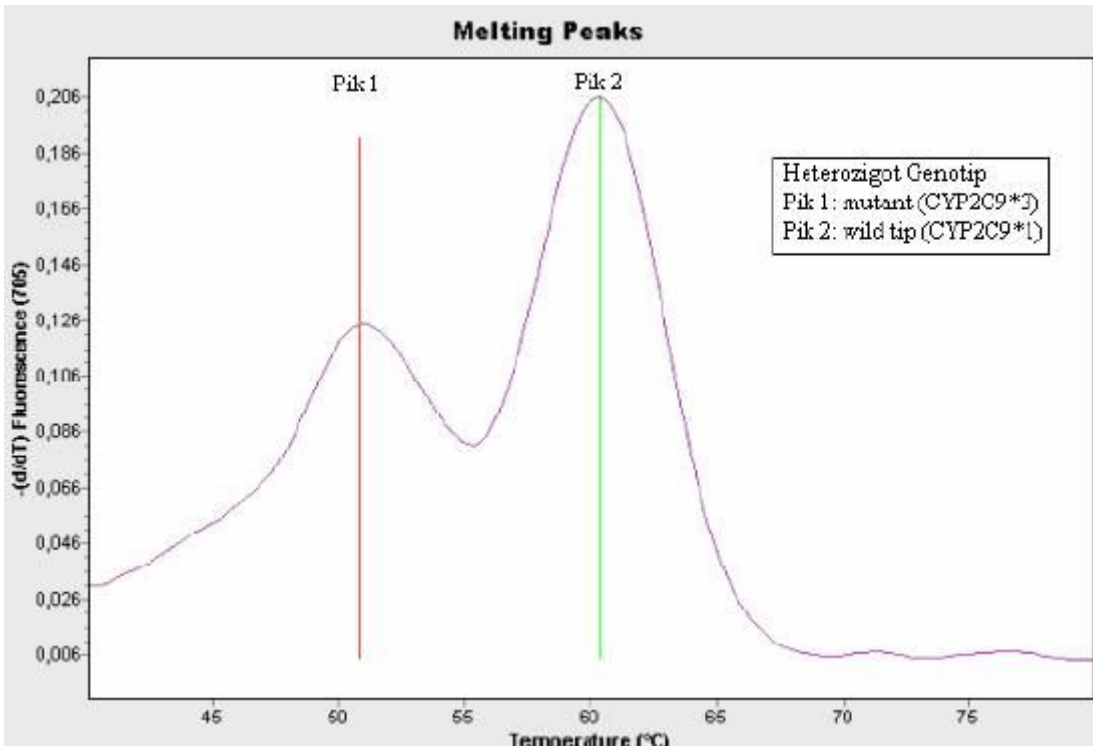
Tablo 5.11. Kullanılan floresan ve tesbit edilen mutasyon

	Kanal 2 (F2)	Kanal 3 (F3)
Kullanılan Floresan	Light Cyclers Red 640	Light Cyclers Red 705
Analiz edilen Nükleotid	G →A 636 CYP2C19*3	G →A 681 CYP2C19*2

Real Time PCR ile Kanal 2 ve Kanal 3'de elde ettiğimiz bulgular; Sırasıyla Tablo 5.6- Tablo 5.10'da belirtilen genotiplemelerin Tm ve melting Pik sayılarının görüntüleri, Şekil 5.1- Şekil 5.7'de verildi.

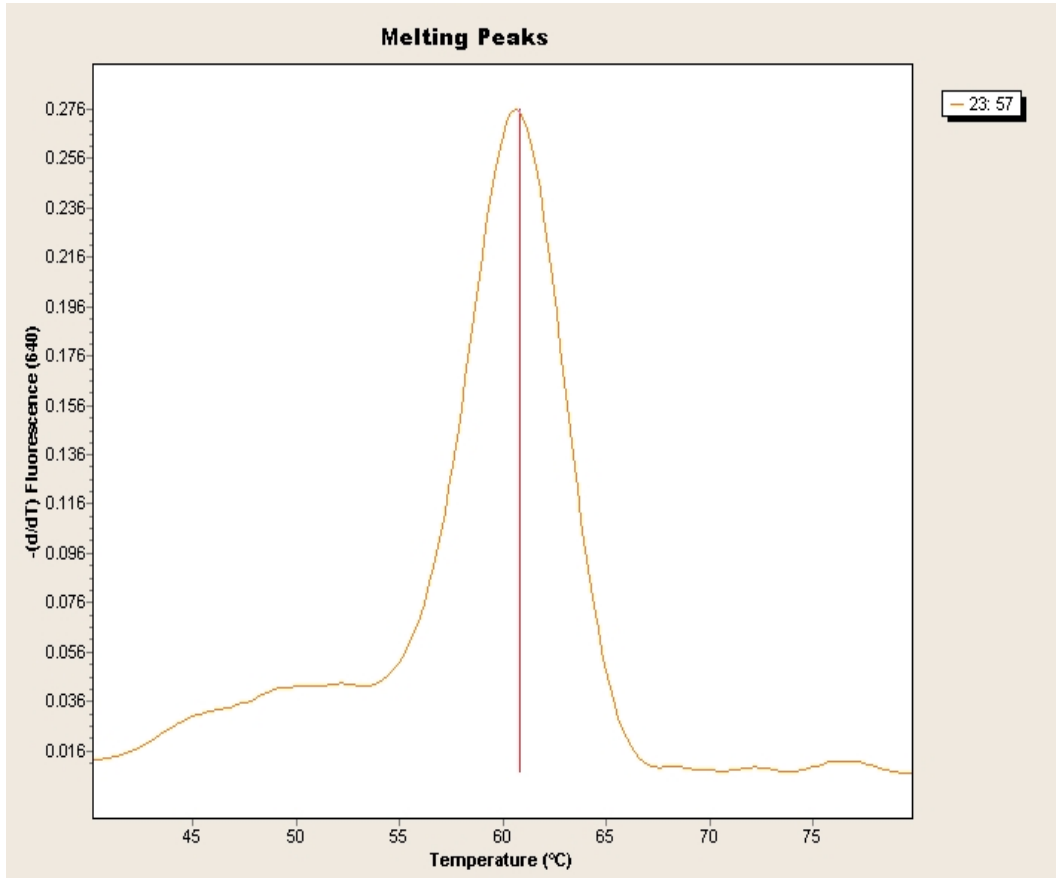


Şekil 5.1: CYP2C9*2 (C430T) heterozigot genotip örneği melting curve analiz sonucu. **Pik 1:** mutant, T_m 50.0 ± 2.5 °C; **Pik 2:** wild tip. T_m 61 ± 2.5 °C. Kanal 3 (F3)

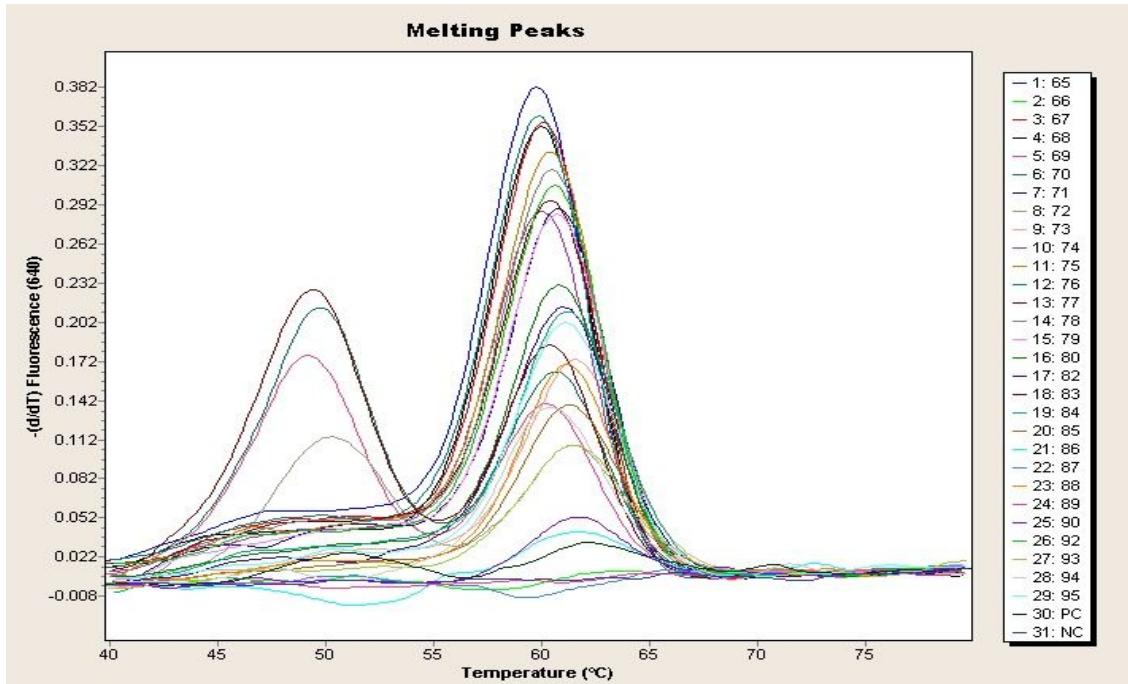


Şekil 5.2: CYP2C9*3 (A1075C) heterozigot genotip örneği melting curve analiz sonucu.

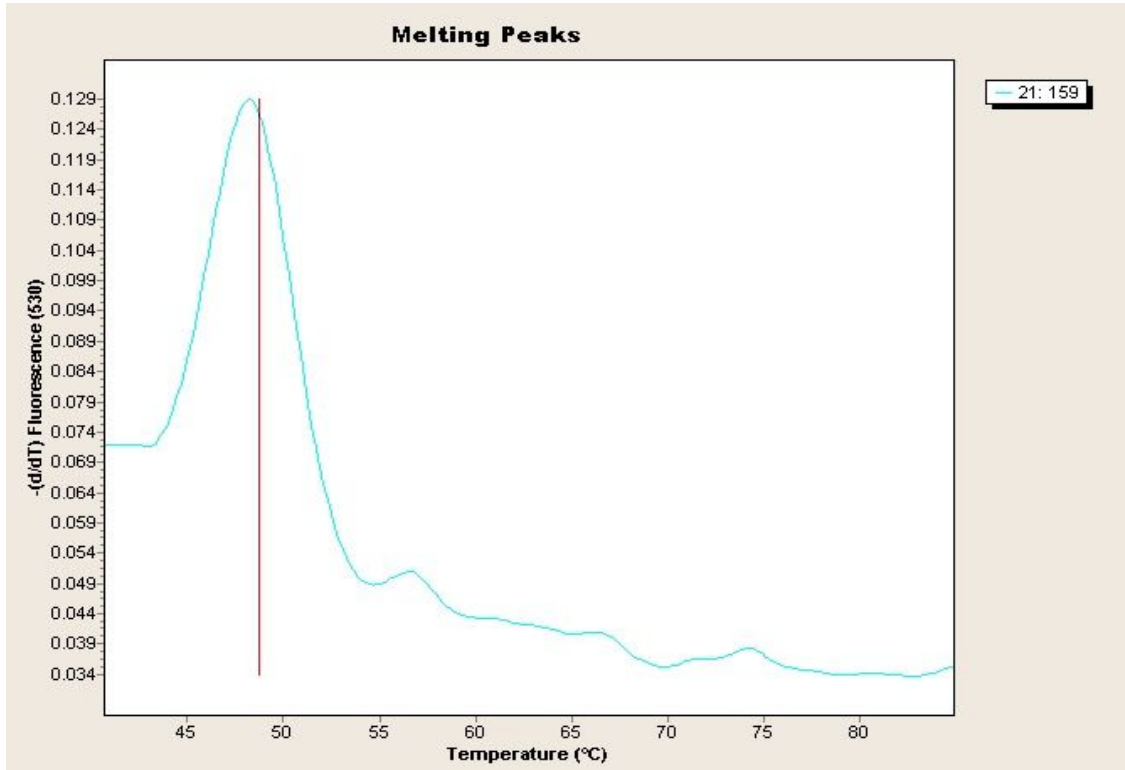
Pik 1: mutant T_m 52.0 ± 2.5 °C; **Pik 2:** wild tip. T_m 60 ± 2.5 °C. Kanal 2 (F2)



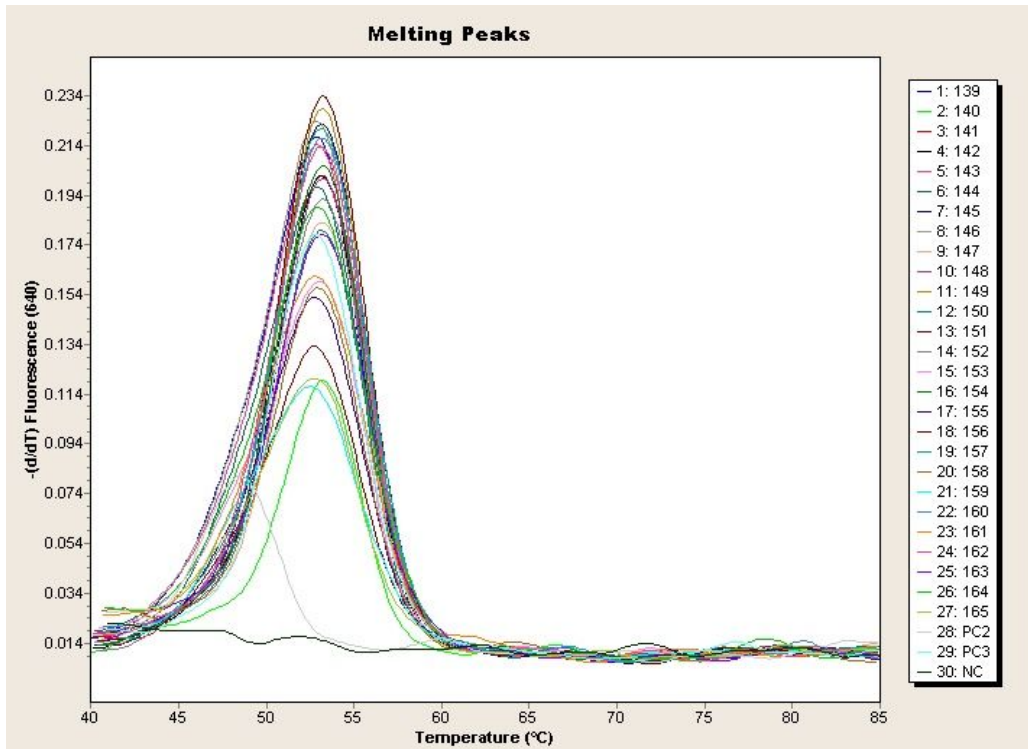
Şekil 5.3 : CYP2C9*1 wild tip genotip örneği melting curve analiz sonucu T_m 60 ± 2.5 °C Kanal 2 (F2)



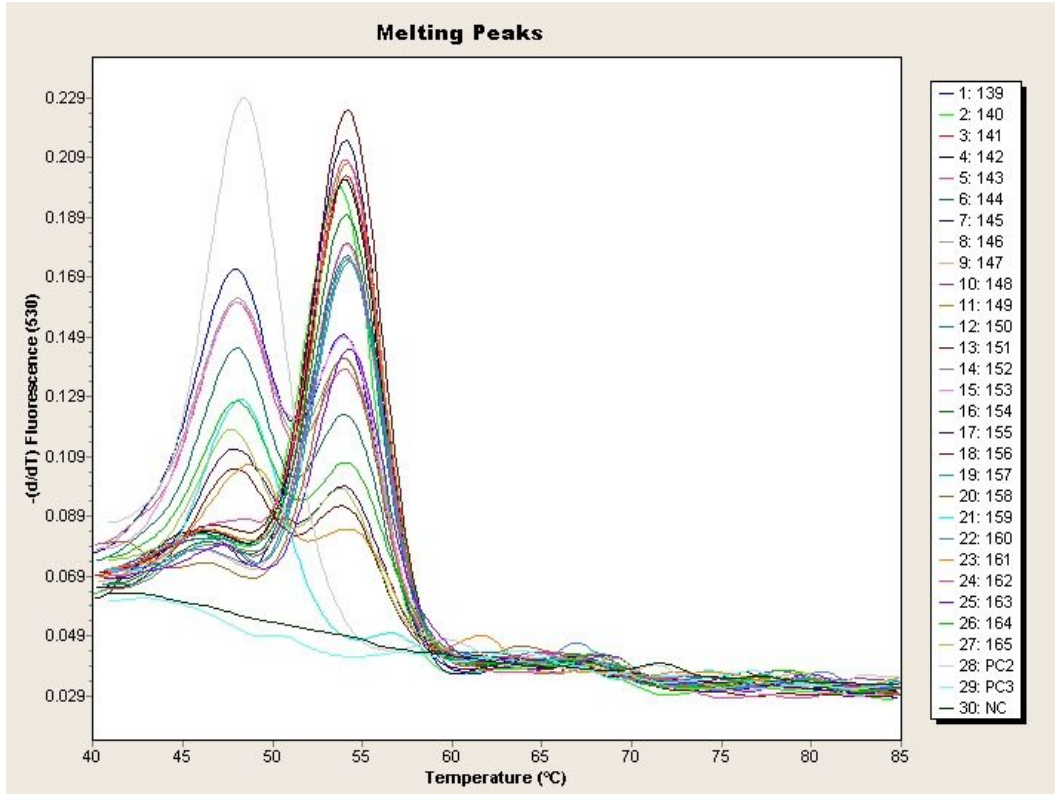
Şekil 5.4 : CYP2C19*2 heterozigot genotip örneği melting curve analiz sonucu. **Pik 1:** mutant, T_m 50.0 ± 2.5 °C; **Pik 2:** wild tip. T_m 61 ± 2.5 °C. Kanal 3 (F3)



Şekil 5.5 : CYP2C19*2 (G →A 681) mutant genotip örneği melting curve analiz sonucu T_m 50.0 ± 2.5 °C Kanal 3 (F3)



Şekil 5.6: CYP2C19*3 wild genotip örneği melting curve analiz sonucu T_m 50.0 ± 2.5 °C Kanal 2 (F2)



Şekil 5.7: CYP2C19*3 heterozigot genotip örneği melting curve analiz sonucu. **Pik 1:** mutant, T_m 50.0 ± 2.5 °C; **Pik 2:** normal tip. T_m 61 ± 2.5 °C. Kanal 2 (F2)

5.7. İstatistiksel Yöntem

Veriler bilgisayar ortamına aktarılarak hata kontrolleri yapıldı. Statistic Packet of Social Science (SPSS 15.0) paket programı kullanılarak istatistik çözümler yapıldı. Veriler ortalama, standart sapma ve yüzde olarak özetlendi. Kategorik verilerin karşılaştırması χ -kare testiyle gerekli durumlarda Fisher Exact testi kullanılarak yapıldı. Parametrik verilerin gruplar arası karşılaştırması t Testi ile yapıldı. Farklılık çıkan parametreler Multiple Logistik Regresyon analizine tabi tutuldu. CYP2C9*2, CYP2C9*3 ve CYP2C19*2, CYP2C19*3 genlerinin mutant, heterozigot allel frekansları, yüzdesi ve odds oranları (%95 CI) olarak hesaplandı. Anlamlılık seviyesi 0.05 olarak alındı.

6. BULGULAR

6.1. Çalışma Grubunun Demografik Özellikleri ve Kan Grupları

100 sağlıklı kontrol grubu ve 85 hastadan oluşan vaka kontrol çalışmamızda, kontrol ve hasta gruplarının cinsiyet, yaş ve vücut kitle indeksleri Tablo 1’de, kan gruplarına göre dağılımı Tablo 2’de gösterildi.

Tablo 6.1 Demografik bilgileri

	Kontrol (n=100)	Hasta (n=85)
Cinsiyet	40 kadın (% 40) 60 erkek (% 60)	41 kadın (%48) 44 erkek (%52)
Yaş	33.9 ± 9.74	*60.1 ± 12.1
Vücut Kitle İndeksi	25.79 ± 3.86	25.46 ± 6.75

* P < 0. 05

Tablo 6.2 Kan grupları

	Kontrol (n=100)	Hasta (n=85)
A Rh +	28 (% 28)	34 (% 40.0)
A Rh -	2 (% 2)	3 (% 3.5)
B Rh +	27 (% 27)	10 (% 11.8)
B Rh -	-	1 (% 1.2)
AB Rh +	6 (% 6)	4 (% 4.7)
AB Rh -	-	-
O Rh +	35 (% 35)	29 (% 34.1)
O Rh -	2 (% 2)	4 (% 4.7)

Kontrol grubu (n=100), 40 kadın (% 40), 60 erkek (% 60)’ den; yaşları 33.9 ± 9.74, vücut kitle indeksleri 25.79 ± 3.86 idi. Hasta grubu (n=85), 41 kadın (%48), 44 erkek (%52) den oluşmaktaydı; vücut kitle indeksleri 25.46 ± 6.75; yaşları ise 60.1 ± 12.1 di (Tablo 6.1).

Kontrol grubunun kan gruplarına göre sırasıyla dağılımı: O Rh + % 35, A Rh + % 28, B Rh + % 27, AB Rh + % 6, A Rh - % 2, O Rh - % 2; Hasta grubunun kan gruplarına göre sırasıyla dağılımı ise: A Rh + % 40, O Rh + % 34.1, B Rh + % 11.8, AB Rh + % 4.7, O Rh - % 4.7, A Rh - % 3.5, B Rh - % 1.2 dir (Tablo 6.2).

6.2. Çalışma Grubunda Saptanan Kolorektal Kanser İçin Muhtemel Risk Faktörleri

Çalışma grubunun Form 5.1 ile saptanan kolorektal kanser için muhtemel risk faktörleri Tablo 6.3’de gösterildi.

Tablo 6.3:Kolorektal kanser için muhtemel risk faktörleri

	Kontrol (n=100)	Hasta (n=85)
Sigara	51 (% 51)	20 (% 23.5)
Alkol	14 (% 14)	1 (% 1.2)
Ailede kanser hikayesi	10 (% 10)	13 (% 15.3)
Beyaz toprak maruziyeti	1 (% 1)	*26 (% 30.6)
Eşlik eden hastalığı olan	5 (% 5)	10 (% 11.8)

* P < 0. 05

Kontrol grubunda sigara içme % 51, alkol kullanma % 14, ailesinde kanser hikayesi olan % 10, beyaz toprak maruziyeti olan % 1, eşlik eden sistemik hastalığı (Diabetes Mellitus, Hipertansiyon, Hiperkolesterolemi v.b) olan % 5. Hasta grubunda ise; sigara içme % 23.5, alkol kullanma % 1.2, ailesinde kanser hikayesi olan % 15.3, beyaz toprak maruziyeti olan % 30.6, eşlik eden hastalığı olan %11.8 dir.

6.3. CYP2C9 ve CYP2C19 Allel Frekansları ve Odds Oranları

Çalışmamızda Real Time PCR ile LightCycler CYP2C9*2 ve CYP2C9*3; LightCycler CYP2C19*2 ve CYP2C19*3 Mutasyon Belirleme Kitleri kullanarak, elde ettiğimiz CYP2C9 *2/*1 (wild Tip, wt/wt), CYP2C9 *2/*2 (heterozigot, wt/mut), CYP2C9 *2/*3 (mutant, mut/mut) ; CYP2C9 *3/*1 (wild tip, wt/wt), CYP2C9 *3/*2 (heterozigot, wt/mut), CYP2C9 *3/*3 (mutant, mut/mut) allellerinin frekansları ve odds oranları, Tablo 6.4’de; CYP2C19 *2/*1 (wild tip, wt/wt), CYP2C19 *2/*2 (heterozigot, wt/mut), CYP2C19 *2/*3 (mutant, mut/mut), CYP2C19 *3/*1 (wild tip, wt/wt), CYP2C19 *3/*2 (heterozigot, wt/mut), CYP2C19 *3/*3 (mutant, mut/mut) allel frekansı ve odds oranları OR (%95 CI) ise; Tablo 6.5’de gösterildi.

Tablo 6.4: CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 allel frekansı ve odds oranı

	Kontrol (n=100)	Hasta (n=85)	Odds Oranları % 95 CI
CYP2C9*2/*1 Wild Tip wt/wt	75 (%75.0)	65 (% 76.5)	-
CYP2C9*2/*2 Heterozigot wt/mut	22 (% 22.0)	18 (% 21.2)	0.944 (0.466-1.912)
CYP2C9 *2/*3 Mutant mut/mut	3 (% 3.0)	2 (% 2.4)	0.769 (0.125-4.746)
CYP2C9*3/*1 Wild Tip wt/wt	87 (% 87)	74 (% 87.1)	-
CYP2C9*3/*2 Heterozigot wt/mut	13 (% 13.0)	11 (% 12.9)	0.995 (0.421-2.352)
CYP2C9*3/*3 Mutant mut/mut	- (% 0)	- (% 0)	-

P > 0.05

Tablo 6.5 : CYP2C19*2 ve CYP2C19*3 allel frekansı ve odds oranı

	Kontrol (n=100)	Hasta (n=85)	Odds Oranları % 95 CI
CYP2C19*2/*1 Wild Tip wt/wt	67 (%67)	70 (% 82.4)	-
CYP2C19*2/*2 Heterozigot wt/mut	30 (% 30)	14 (% 16.5)	0.447 (0.218-0.915)
CYP2C19 *2/*3 Mutant mut/mut	3 (% 3)	1 (% 1.2)	0.319 (0.032-3.144)
CYP2C19*3/*1 Wild Tip wt/wt	95 (% 95)	83 (% 97.6)	-
CYP2C19*3/*2 Heterozigot wt/mut	5 (% 5)	2 (% 2.4)	0.458 (0.087-2.423)
CYP2C19*3/*3 Mutant mut/mut	- (% 0)	- (% 0)	-

P > 0.05

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi ile tam genom dizilerinin belirlenmesi ve hücre davranışlarının genetik temelini açıklanabilmesi gibi heyecan verici bir noktaya ulaşılmıştır. Gen klonlama, genlerin yapılarını ve işlevlerini inceleme imkanı sağlamış; genom dizileme projelerinin gelişmesi ise genetik hastalıkların tanı ve tedavi yaklaşımları üzerine zengin bilgi kaynağı oluşturmuştur.

Günümüzde artık bireysel farklılıklar ön plana çıkmaktadır. Özellikle kanser ve çeşitli hastalıklara genetik yatkınlıkların saptanması, gen-çevre etkileşiminin incelenmesi, enzim polimorfizmlerinin ilaca yanıtı, genetik kimliğe göre ilaç dozunun ayarlanması ve bireye özel tedavi stratejilerinin düşünülmesi DNA dizi polimorfizm çalışmalarının sonuçlarına dayandırılmaktadır. Genomun farklı bölgelerini veya genin farklı kalıtsal formlarını ayırt edebilmek için polimorfizmler anahtar niteliğinde pratiklik sunmaktadır.

Son yıllarda endojen, ekzojen kimyasallar ve ilaç metabolizmasında önemli rolleri olan enzimlerden biri olan Sitokrom P450 enzimlerinin polimorfik yapısı ve fonksiyonları konusunda ayrıntılı araştırmalar yapılmıştır.

Sitokrom P450 enzim sistemini kodlayan genler baz dizilim benzerliklerine göre 40 farklı aile içinde sınıflandırılmış ve bunlardan en çok çalışılan CYP2C gen ailesinin; CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 ve CYP2C19 alt ailelerinden oluşmuştur. Bu alt ailelerin tüm üyelerinin polimorfik yapıları ile ilaç metabolizması ve kanser gibi multifaktöriyal hastalıklardaki rolü çeşitli populasyonlarda araştırılmaktadır (Stubbins ve ark 1996, Maria ve ark 2004, Tasies ve ark 2002).

Genellikle CYP2C aileleri tek tek ele alınarak incelenmiştir. CYP2C9 geni için şimdiye kadar 7 farklı CYP2C9 cDNA dizisi rapor edilmiş ve bunlardan yalnızca üçünün CYP2C9 genlerini temsil ettiği görülmüştür; diğerlerinin ise klonlama artefaktları olabileceği belirtilmiştir. Bunlar CYP2C9*1, CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 olarak adlandırılmıştır (Daly ve ark 1999, Stubbins ve ark 1996).

CYP2C9*1 için homozigot bireyler enzimin tam kapasite ile çalıştığı 'hızlı metabolizör'lerdir. CYP2C9*2 ekson 3'de I44. kodonda arjinin'in sistein ile yer

değiştirmesine, CYP2C9*3 ekson 7'de 359. kodonda izolösin'in lösün ile yer değiştirmesine neden olan şifre değişikliği bulunmaktadır (Herrman ve ark. 2003, Ablin ve ark 2004, Tabrizi ve ark 2002). Bu allelleri heterozigot veya homozigot taşıyanlarda enzim aktivitesi azalmaktadır. Bu nedenle metabolizmasında rol aldıkları ilaçların etkisini değiştirebilirler (Ablin ve ark 2004).

CYP2C9 için en iyi bilinen ilaç substratları yapılarında karboksilik grup içeren zayıf asitlerdir. Tolbutamid gibi oral hipoglisemik ajanlar, fenitoin gibi antiepileptik ilaçlar, oral antikoagölan kumadin, ibuprofen gibi nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlar ve losartan gibi angiotensin II blokerleri CYP2C9 tarafından metabolize edilir (Ablin ve ark 2004, Tabrizi ve ark 2002).

Türk popülasyonunda yapılan çalışmalar ile CYP2C9*1, CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 allellerinin varlığı gösterilmiş ve frekansının Beyaz Irk ile benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Pchelina ve ark 2005, Aynacıoğlu ve ark 1999).

CYP2C19 gen polimorfizmleri ise; CYP2C19*2 (G682A), CYP2C19*3 (G636A)'deki nokta mutasyonları ile CYP2C19*1 normal tipinden farklılaşmışlardır (deMorais ve ark. 1994a). Bu enzimdeki polimorfizm ilk kez S-mefenitoinin hidroksilasyonunda bireyler arasında farklılıkların saptanmasıyla tanımlanmıştır (Wedlund ve ark. 1984, deMorais ve ark. 1994). Daha sonra yapılan çalışmalar CYP2C19 enziminin S-mefenitoin'in yanı sıra omeprazol, diazepam, mefobarbital, imipramin ve sitalopram gibi klinikte sık kullanılan pek çok ilacın ve bazı ksenobiyotiklerin metabolizmasına da aracılık ettiğini göstermiştir (Kupfer ve ark 1985, Bertilsson ve ark. 1989, Ward ve ark. 1989, Helsby ve ark. 1990, Belpaire ve ark 1996, Marzo ve ark 1996, Coller ve ark. 1999).

CYP2C19 enziminin özelliklerini belirlemek için yapılan çalışmalarda CYP2C19 genindeki mutasyonların enzimin katalitik aktivitesinin azalmasına ya da yokluğuna neden oldukları belirlenmiştir. CYP2C19 polimorfizminin araştırılması amacıyla yapılan ilk çalışmalarda enzim yetersizliği ile metabolizma kusurlarından CYP2C19'un mutant allellerinin sorumlu olduğu deMorais ve arkadaşları (1994) tarafından saptanmıştır. CYP2C19'un şimdiye kadar belirlenen 7 mutant alleli gösterilmiştir. Normal aktiviteli allel CYP2C19*1 (wild tip)'dir. Aktivite azlığına ya da yokluğuna neden olan mutant alleller ise CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*4,

CYP2C19*5, CYP2C19*6, CYP2C19*7 ve CYP2C19*8'dir (deMorais ve ark. 1994a, 1994b, deMorais ve ark 1995, Kupfer ve ark 1997, Xiao ve ark 1997, Ferguson ve ark 1998, Ibeanu ve ark 1998).

CYP2C19 yavaş metabolizörlerinin oranı toplumlar arasında da farklılık göstermektedir. Bu enzim bakımından Beyaz ırkta yavaş metabolizör sıklığı %2-5 iken, Doğu popülasyonunda bu sıklık %11-23 arasında değişmektedir (Tablo 4.1).

Türk popülasyonunda CYP2C19 polimorfizmi ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Başçı ve arkadaşları (1994) 'de S-mefenitoin kullanarak 106 sağlıklı bireyde yaptıkları bir fenotipik çalışmada yavaş metabolizör sıklığını %0.94 bulmuşlardır. Aynacıoğlu ve arkadaşları 1999 ise CYP2C19'un mutant allellerini 404 Türk bireyinde tayin etmişler ve genotipik olarak yavaş metabolizör sıklığını ~%1 bulmuşlardır. Bu çalışmalarında yavaş metabolizör genotipten sorumlu mutasyonun CYP2C19*2 olduğunu, ayrıca bireylerin hiçbirinde CYP2C19*4 ve CYP2C19*5 mutasyonu saptamadıklarını ve CYP2C19*3 mutasyonu bakımından homozigot olan bireylerin bulunmadığını bildirmişlerdir.

Stubbins ve arkadaşları (1996) yaptıkları çalışmada CYP2C9 allel frekanslarının ırklar arası değişkenlik gösterdiğini belirlemişler; yine aynı çalışmada Beyaz ırkta CYP2C9*1 frekansını 0.79, CYP2C9*2 frekansını 0.125, CYP2C9*3 frekansını 0.085 olarak tesbit etmişlerdir.

İtalyan popülasyonunda CYP2C9, CYP2C19 ve CYP2D6 allel ve genotip frekanslarını çalışan Maria ve arkadaşları (2004) CYP2C9*1'i 0.778, CYP2C9*2'yi 0.125, CYP2C9*3'ü 0.097; CYP2C19*1'i 0.89, CYP2C19*2'nin 0.11, CYP2C19*3'ün ise bulunmadığını saptamışlardır.

Sağlıklı İranlılarda CYP2C9 ve CYP2C19'un genetik polimorfizminin araştırıldığı bir çalışmada; CYP2C9*1'in 0.82, CYP2C9*2'nin 0.105, CYP2C9*3'ün 0.075; CYP2C19*1 0.75, CYP2C19*2'nin 0.22, CYP2C19*3'ün 0.03 olduğu ancak CYP2C9*2'nin Beyaz ırktan daha sık olduğu, CYP2C19*3'ün farklı olmadığı bildirilmiştir (Zand ve ark 2007).

Sitokrom P450 CYP2C9 Kanada'da yerleşik Hint kökenlilerde, Kuzey Amerikalı beyazlar, Çinliler ve Eskimolarda araştırılmış ve CYP2C9*2 ve CYP2C9*3'ün Çin ve Eskimo popülasyonunda çok nadir bulunduğu veya

bulunmadığı; ancak Hint ve Beyaz ırkta 0.03 ve 0.08-0.15 olduğu, bu durumun da ilaçların yavaş metabolize edilmesine sebep olabileceği vurgulanmıştır (Andrea ve ark 2001).

Çin popülasyonunda CYP2C9*1'in 0.98 oranında bulunduğu diğer allellerin çok nadir olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark 1995).

Güney Hint popülasyonunda ise CYP2C9*1'in 0.88, CYP2C9*2'nin 0.04, CYP2C9*3'ün 0.08; CYP2C19*1'in 0.67, CYP2C19*2'nin 0.33, CYP2C19*3'ün olmadığı; CYP2C9*2'nin Çinli ve Beyaz ırktan yüksek, CYP2C9*3/*3'ün ise benzer olduğu bildirilmiştir (Rosemary ve ark 2004).

Çalışmamızın kontrol grubunda CYP2C9*1 0.75 olarak tesbit edilmiştir. Bu frekans Stubbins ve arkadaşlarının buldukları Beyaz ırk allel frekansına çok yakın Wang ve arkadaşlarının (1995) Çin toplumu için buldukları allel frekansından düşüktür. CYP2C9*2 0.22 olarak bulunmuş olup, Stubbins ve arkadaşlarının saptadığı Beyaz ırk allel frekansından yüksek; CYP2C9*3 0.03'ün ise düşük, CYP2C19*1'in wild tipi 0.67, CYP2C19*2'nin heterozigot tipi 0.30, CYP2C19*2'nin mutant tipi 0.03, CYP2C19*3'ün wild tip 0.95, CYP2C19*2'nin heterozigot tipi 0.5, CYP2C19*3'ün mutant tipinin ise olmadığı tesbit edilmiştir.

Bulgularımız CYP2C9*2, ve CYP2C19*2'nin heterozigot ve mutant tiplerinin Beyaz ırktan yüksek olduğunu, CYP2C19*2'nin İran popülasyonuna benzer;

CYP2C9*3 ve CYP2C19*3'ün heterozigot ve mutant tiplerinin Beyaz ırka benzer olduğunu; Beyaz ırkta çok az bulunan allellerden CYP2C19*2 mutant tipinin bizde 0.03 olduğunu; CYP2C9*3'ün ve CYP2C19*3'ün mutant tipinin bizim çalışmamızda bulunmadığını gösterdi (Tablo 6.4- Tablo 6.5).

Çalışmamızda hasta ve kontrol grubumuzda; CYP2C9*2 ve CYP2C19*2'nin allel frekanslarının Stubbins ve arkadaşlarının saptadığı Beyaz ırk allel frekanslarından yüksek olduğu için; Tolbutamid gibi oral hipoglisemik ajanlar, fenitoin gibi anti epileptik ilaçlar, oral antikoagülan kumadin, ibuprofen gibi non-steroid anti enflamatuvar ilaçlar, losartan gibi angiotensin II blokerleri, karboksilik grup içeren zayıf asidik ilaçlar (kemoterapotikler), omeprazol, diazepam, mefobarbital, imipramin ve sitalopram gibi klinikte sık kullanılan ilaçlar öncelikle hasta-kontrol grubumuzda ve

Konya popülasyonunda kullanılırken, yavaş metabolize olabileceğinden tedavide bu ilaçların yan etkisi akla getirilmeli, kullanılacak doz ona göre ayarlanmalıdır.

Martinez ve arkadaşları (2001), CYP2C9*1 genotipinin oluşturduğu enzim aktivitesi ve kolorektal kanser arasında ilişki olduğunu, heterosiklik aromatik aminlerin ve polisiklik aromatik hidrokarbonların metabolik aktivitesine aracılık eden CYP2C9*1'in, distal kolon kanserlerine göre proksimal kolon kanserlerinde daha yüksek bulunduğunu ($p < 0.024$ ve Odds oranı 2.36 %95 CI 1.185-4.72) saptamış, bunun çalışılan popülasyonda kolon kanseri için sekonder risk faktörü olabileceğini savunmuşlardır.

Yaşar ve arkadaşları (2002), aynı popülasyonda kendi çalışmalarının da olduğunu; Martinez'in çalışmasındaki risk oluşturan yüksek oranın, sağlıklı kontrol grubunun atipik allelik dağılımından kaynaklanabileceğini vurgulamışlardır.

Sachse ve arkadaşları (2002), kolorektal kanser etyolojisinde yer alan diyet karsinojenleri üzerine yaptıkları farmakogenetik bir çalışmada CYP2C9*2 ile kolorektal kanser riski arasında ters ilişki olduğunu saptamışlardır.

Landi ve arkadaşları (2005) kolorektal kanser riski ve Faz I, Faz II metabolizma enzimleri polimorfizminin karşılaştırıldığı çalışmalarında, CYP2C9 ve CYP2C19 polimorfizmlerinin risk oluşturmadığını CYP1B1 ve CYP1A1 genlerinin kolorektal kanser etyolojisinden sorumlu tutulduklarını, kolorektal kanserlerde aromatik amin metabolizmasının karsinojenik rol aldığını kanıtladıklarını öne sürmüşlerdir.

Tamer ve arkadaşları (2006), çevresel karsinojenlerin, ilaçların, xenobiyo- tik ön metabolizatörü olan Sitokrom P450'nin gastrik ve kolorektal kanserli hasta- larda risk faktörü olup olmadığını araştırdıkları bir çalışmada CYP2C9*2 'nin heterozigot genotiplerinin bu kanserlerde yüksek görülmesine rağmen (OR 1.79, CI:0.829-3.865) bu yüksekliğin kolorektal kanserlerle ilişkili olmadığını ortaya koymuşlardır.

Çalışmamızda CYP2C9*2, CYP2C9*3 ve CYP2C19*2, CYP2C19*3 genetik polimorfizmleri 85 kolorektal kanserli ve 100 sağlıklı kontrol grubunda ayrı, ayrı tesbit edilerek karşılaştırıldı ve allel frekansları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Odds oranları OR (%95CI)'da kolorektal kanserli hasta grubunda saptanan heterozigot ve homozigot mutant genotip oranlarının sağlıklı kontrollerden farklı olmadığını ortaya koydu. Bu sonuçlar CYP2C9*2, CYP2C9*3 ve CYP2C19*2, CYP2C9*3 genetik

polimorfizmleri ile kolorektal kanser arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığını göstermektedir.

Çalışmamızın sonuçları Yaşar ve arkadaşları, Tamer ve arkadaşları ile Landi ve arkadaşlarının sonuçlarını desteklemektedir. Bu durum Sitokrom P450 enzim sistemlerini kodlayan gen sayısının çok fazla olması ve polimorfik yapılarının yaygınlığı organizma için bir avantaj olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan çalışmalar kolorektal kanserin ortaya çıkma yaşının ortalama 62 yaş civarında yoğunlaştığını ortaya koymuştur (Fenoglio ve ark1990). Bizim çalışmamızda da kolorektal kanserli hastalarımızın yaşlarının 60.1 ± 12.1 olduğu ($p<005$) Tablo 6.1'de görülmektedir.

Verilere göre kolorektal kanserin kadınlara göre erkeklerde 1.44 oranında daha sık görüldüğü ortaya konmuştur (Boring ve ark 1993). Çalışmamızda da hasta grubumuzun %52'nin erkek %48'nin kadın olduğu belirlendi (Tablo 6.1).

Hasta grubunda en sık görülen kan grubu %40 ile A kan grubu iken, kontrol grubunda %37 ile 0 kan grubuydu. Hasta ve kontrol kan grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildi (Tablo 6.2).

Sigara içenlerin oranı kontrol grubunda %52, hasta grubunda %23.5 alkol kullananların oranı kontrol grubunda %14 ve hasta grubunda %1.2 olarak tesbit edildi. Sigara kullanımının kolorektal kanser için risk faktörü olarak bildirildiği çalışmalar bulunmakta (Sache ve ark 2002, Naoka ve ark 2000), ancak çalışmamızda sigara ve alkol kullanımının hasta ve kontrol gruplarının kullanımı arasında istatistik olarak anlam taşımadığı görülmüştür (Tablo 6.3).

Ailesinde kanser hikayesi olanların oranı hasta grubunda %15.3 kontrol grubunda %10 bulunmuş, hasta grubunda artış olmasına rağmen bu yüksekliğin istatistik olarak anlam taşımadığı görülmüştür (Tablo 6.3).

Kolorektal kansere eşlik eden hastalığı olanların oranı hasta grubunda %11,8 kontrol grubunda ise %5 dir. Bu oranlarda da istatistiksel önem bulunmamıştır (Tablo 6,3).

Çalışmamızda beyaz toprak maruziyeti olan hasta grubumuzun oranı %26, kontrol grubunun ise %1 dir. Kolorektal kanserli hastalarımızın beyaz toprağa daha sık maruz

kaldığı belirlendi ve literatürde pek fazla ele alınmamış olan beyaz toprağın kolorektal kanserler için risk faktörü olabileceği düşünüldü ($p<0.05$) (Tablo 6.3)

Sonuç olarak; çeşitli çevresel kimyasalların ve ilaçların metabolizmasında anahtar role sahip olan Sitokrom P450 gen polimorfizmlerinin (CYP2C9*2, CYP2C9*3 ve CYP2C19*2, CYP2C9*3) kolorektal kanser ile ilişkisinin araştırıldığı bu vaka kontrol çalışmasında incelenen polimorfik allellerle kolorektal kanser arasında ilişki bulunmadı ($P>0.05$). Ancak hasta grubunda beyaz toprağa maruz kalanların oranı kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.05$). Bu sonuç beyaz toprağın kolorektal kanser için çevresel bir risk faktörü olabileceğini düşündürdü. Çalışmamız beyaz toprak maruziyetinin ve Sitokrom P450 enzimlerinin daha ayrıntılı incelenmesinin gereğini ortaya koymuştur.

8. ÖZET

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Genetik Bilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2007

Murat BÜYÜKDOĞAN

Kolorektal Kanserli Hastalarda Sitokrom P450

(CYP2C9 ve CYP2C19) Enzim Genetik Polimorfizmi

Kolorektal kanserin multifaktöriyel bir hastalık olduğu bilinmektedir. Maruz kalınan çevresel kanserojenler veya endojen kaynaklı bileşikler ile bireyin genetik yapısının etkileşimi sonucu kompleks bir yolla hastalık için risk oluşmaktadır. Bu ilişkiyi aydınlatmak için çeşitli araştırmalar yapılmaktadır.

Çalışmamızda, endojen ve ekzojen kaynaklı bileşiklerin modifikasyonunda özellikle de ilaç metabolizmasında önemli roller alan Sitokrom P450 enzim sistemlerini kodlayan gen ailelerinden CYP2C9 ve CYP2C19 alt ailelerinin polimorfik yapıları 85 kolorektal kanserli hasta ve 100 sağlıklı kontrolde araştırıldı. CYP2C9*2, CYP2C9*3 ve CYP2C19*2, CYP2C9*3 genlerinin her birinde tek baz değişiklikleriyle normal allellerden farklılaşan heterozigot ve mutant alleller Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemiyle çalışıldı. Veriler hasta-kontrol grubu istatistik sonuçları ve odds oranları incelenerek değerlendirildi. Ayrıca hasta ve kontrol gruplarına uygulanan hasta formunda sigara-alkol alışkanlıkları, kanserli akrabalarının varlığı, kolorektal kansere eşlik eden hastalıkları ve beyaz toprağa maruziyetleri sorgulandı.

Sonuçta; polimorfik bir yapıya sahip olan CYP2C9 ve CYP2C19 genlerinin allel sıklığı kolorektal kanser hastalarında ve sağlıklı kontrollerde karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). Bulgularımız incelenen heterozigot ve mutant allellerden hiçbirinin kolorektal kanser için risk faktörü olmadığını ortaya koydu. Ancak kolorektal kanserli hastalarda beyaz toprağa maruz kalanların oranı sağlıklı kontrollerden anlamlı oranda ($p<0.05$) yüksek bulundu ve beyaz toprağın kolorektal kanser için bir risk faktörü olabileceği düşünüldü.

9. SUMMARY

Gene Polimorphism in The Cytochrome P450 (CYP2C9 and CYP2C19) Enzymes in Patients with Colorectal Carsinoma

Colorectal carsinoma is considered to be a multifactorial disease, in which multiple exposures to endogenous factors and environmental carcinogens interact with individual genetic background in a complex manner resulting in modulation of the risk. There are kindly researches which examined especially relation with the colorectal carsinoma and Cytochrome P450.

In this case-control study; we researched the gene polimorphisms of CYP2C9 and CYP2C19, which are the members of CYP 450 super family, playing important roles in metabolisms of endogenous and exogenous compounds and also drugs, in 85 patients with colorectal carsinoma and 100 unrelated, healthy volunteers. Heterozygote and mutant alleles of CYP2C9*2, CYP2C9*3 and CYP2C19*2, CYP2C9*3 gene alleles which is differ from each other with a single base substitutions; called heterozygote type and mutant type, determinated by Real Time Polymerase Chain Reaction. Results were compared in this case-control subjects statistically and calculated odds ratios were used. Alcohol consumption, smoky habbits, presence of multisystemic diseases, carsinoma history in their families and exposure to asbestos were determined in both control and patients groups.

As a result; we compared the polymorphic allele frequencies of CYP2C9 and CYP2C19 genes between patients with colorectal carsinoma and control groups, there were no significant differences among the groups ($p>0.05$).

None of the heterozygote and mutant alleles which we studied was a risk factor for colorectal carsinoma. But exposed asbestos ratio in the patients with colorectal carsinoma was significantly higher ($p<0.05$) then control subjects in our patients, so exposed asbestos may be a risk factor for colorectal carsinoma.

10. KAYNAKLAR

Ablin J, Cabili S, Eldor A, Lagziel A, Peretz H (2004) *Warfarin therapy is feasible in CYP2C9*3 homozygous patients*. European Journal of Internal Medicine; 15, 22-27.

Akarsu A.N, Çakır B (2004) *Psikiatrik genetik araştırmalarda kullanılabilir genetik yöntemler: IV-A.Hastalık Geni Haritalanması*, 3P Dergisi; Cilt; 12 Ek Sayı:1, 31-48

Akarsu A.N (1999) *Genetik hastalıklara neden olan genlerin saptanmasında aile ağacı analizlerinin önemi*, Hacettepe Tıp Dergisi; 30(1), 85-91.

Alvan G (1991) *Clinical consequences of polymorphic drug oxidation*, Fundam. Clin. Pharmacol; 5, 209-228.

Andra G. Wiliam LC, Rachel F. Seller M. Malle J.R, Leeder S (2001) *Cytochrome P4502C9 (CYP2C9) allele frequencies in Canadian Native Indian and Inuit populations*, Can. J. Physiol. Pharmacol. 79 (10) : 841-847

Aynacıoğlu S, Brockmüller J, Bauer S, Sache S, Güzelbey P, Öngen Z, Nacak M, Roots I (1999) *Frequency of Cytochrome P450 CYP2C9 variants in a Turkish population and functional relevance for phenytoin*, Br J Clin. Pharmacol; 48: 409-415

Başcı N.E, Bozkurt A, Kortunay S, Sayal A, Işimer A, Kayaalp S.O. (1996) *Proguanil metabolism in relation to S-mephenytoin oxidation in a Turkish population*. Br. J. Clin. Pharmacol. 42: 771-773.

Belpaire FM, Bogaert MG (1996) *Cytochrome P450 Genetic polymorphism and drug interactions*, Acta Clin Belg; 51-4, 254-260.

Bertilsson L, Henthorn TK, Sanz E et al (1989) *Importance of genetic factors in the regulation of diazepam metabolism: relationship to S-mephenytoin, but not debrisoquin, hydroxylation phenotype*, Clin Pharmacol Ther; 45, 348-355.

Boring C.C, Squires T.S. and Tong T. (1993) *Cancer Statistics*, CA Cancer J.Clin; 43,7.

Brock DJH (1993) *Molecular Genetics for the Clinician*, Cambridge University Pres.

Clinton SK, Giovannucci EL (1997) *Nutrition in the Etiology and Prevention of Cancer*. Cancer medicine, Holland JF, Frei E, Bast RC, Kufe DW, Morton DL, Weichselbaum R(eds) Williams and Wilkins, Baltimore; pp 465-494.

Coller JK, Somogyi AA, Bochner F (1999) *Comparison of (S)-mephenytoin and proguanil oxidation in vitro: contribution of several CYP isoforms*, Br J Clin Pharmacol; 48, 158-167.

Cooper G.M, Hausman R.E (2006) *Hücre: Moleküler Yaklaşım*, 3. Baskı İzmir Tıp Kitabevi İzmir 145-148

Çetin M (1999) *Drug Interactions Psychiatric Practice*. Bull. Clin. Psychopharmacol; 9(2), 78-92

Daly AK (1995) *Molecular basis of polymorphic drug metabolism*, J Mol Med; 73, 539-553.

deMorais SMF, Goldstein JA, Xie HG et al (1995) *Genetic analysis of the S-mephenytoin polymorphism in a Chinese population*, Clin Pharmacol Ther; 58, 404-411.

deMorais SMF, Wilkinson GR, Blaisdell J et al (1994a) *The major genetic defect responsible of S-mephenytoin metabolism in humans*, J Biol Chem; 269, 15419-422.

deMorais SMF, Wilkinson GR, Blaisdell J et al (1994b) *Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese*, Mol Pharmacol; 46, 594-598.

Dib C, Faure S, Fizames C et al (1996) *A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites*, Nature; 380, 1-138.

Fabbri C, Cirocchi R, Rossi P, Pacifici A, Volpi G, Bisacci R (1997) *Surgery of local recurrence in rectal cancer*, *Minevra Chir*; 52(1-2), 21-4.

Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE (1995) *Other Tumours of the Large Intestine*, Chapter 41, In: *Gastrointestinal and Oesophageal Pathology*, ed. Whitehead R, Churchill Livingstone, New York 2 th ed; pp:863-905.

Fenoglio-Preiser CM, Pascal RR, Perzin KH (1990) *Tumors of the Large and Small Intestine*, AFIP Fascicle, 2nd Series; 34, 261-2.

Ferguson RJ, Demorais SMF, Benhamou S et al (1998) *A new genetic defect in human CYP2C19: Mutation of the initiation codon is responsible for poor metabolism of S-mephenytoin*, *J Pharmacol Exp Ther*; 284, 356-361.

Gaedigk A, Casley WL, Tyndale RF, Sellers EM, Jurima-Romet M, Leeder JS (2001) *Cytochrome P4502C9 (CYP2C9) allele frequencies in Canadian Native Indian and Inuit populations*; *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 79 (10), 841-847.

Ganger Dr, Fletcher JW, Fernandez Pol JA, Hamilton PD(1997) *Metalloproteinase is overexpressed in a patient with colonic carcinoma anti cancer response*; *Anticancer Res.* 17(3C), 9.

Haines J.L, Eds. Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR., Moir DT, Morton CC, Seidman JG, Smith DR. (1994) *Genetic Mapping .Current Protocols in Human Genetics, first edition*; 1.01-1.8.30.

Helsby NA, Ward SA, Howells RE et al (1990) *In vitro metabolism of the biguanide antimalarials in human liver microsomes: evidence for a role of the mephenytoin hydroxylase (P450MP) enzyme*, *Br J Clin Pharmacol*; 30, 287-291.

Herken H, Öngen H.Z, Esgi K, Aynacioğlu A (2000) *Sitalopram Aliminin Ardından Şiddetli Yan Etkiler Gelişen Üç Olgunun Sitokrom P450 2C19 ve 3A4 Açısından Değerlendirilmesi*; *Klinik Psikiatri* 3,197-202

Herman D, Dolzan V, Breskvar K (2003) *Genetic polymorphism of Cytochrome P 450 2C9 and 2C19 in Slovenian population*, Zdrav Vestn; 72, 347-51.

Ibeanu GC, Blaisdell J, Ferguson RJ et al (1999) *A novel transversion in the intron 5 donor splice junction of CYP2C19 and a sequence polymorphism in exon 3 contribute to the poor metabolizer phenotype for the anticonvulsant drug Smephenytoin*, J Pharmacol Exp Ther; 290, 635-640.

Jones DJ, Moore M (1988) *Prognostic significance of DNA ploidy in colorectal carcinoma*, A prospective flow cytometric study. Br. J.Surgery; 75,28.

Kalaycı G (2002) *Kolon Kanserleri*, Genel Cerrahi Nobel Tıp Kitabevi İstanbul; 2, 1343-59.

Kayaalp SO (1994) *İlaçların Biyotransformasyonu*, RTY Tıbbi Farmakoloji, Ankara Feryal Matbaacılık San. ve Tic. Ltd. Şti, 7. baskı, 1. Cilt, s. 97.

Kodner I.J. Fry D.R. , Fleshman J.W. Birnbaum E.H(1994) *Colon Rektum and Anus*, Diagnosis Schwartz Principles of Surgery; 2,1262-64.

Kokal WA, Gardine RL (1989) *Tumor DNA content in resectabl primer colorectal Carcinoma*, Ann. Surg; 209,1888.

Kordek R, Biernat W, Tureaud J, Libersky PP, Majumdar AP (1997) *Differential activation of total and EGF receptör tyrozine kinase in the rektal mucoza in patients whit adenomatous polyps, ulcerative colitis and colon cancer*; Hepatogastroenterology 44(14), 435-40.

Kupfer A, Branch RA (1985) *Steroselective mephobarbital hydroxylation cosegregates with mephenytoin hydroxylation*, Clin Pharmacol Ther; 38, 414-418.

Landi S, Gemignani F, Moreno V, GioiaPatricola L, Chabrier A, Guino E et al and Bellvitge Coorectal Cancer Study Group (2005) *A comprehensive analysis of phase I and phase II metabolism gene polymorphism and risk of colorectal cancer*, Pharmacogenetics and genomics; 15: 535-546.

Le Marchand L(1999) *Combined influence of genetic and dietary factors on colorectal cancer in Japanese Americans* J. Natls. Cancer Inst. Monogr; 26,101-105.

Linder MW, Looney S, Adams JE, Johnson N, Antonino-Green D, Lacefield N, Bukaveckas BL, Valdes R Jr (2002) *Warfarin dose adjustments based on CYP2C9 genetic polimorphsym* J.Thromb. Thrombolysis; 14 (3), 223-232.

Lindmark M, Gerdin B, Pahlman L(1991) *Prognostic predictors in colorectal carsinom Di*, Colon Rektum; 37 (12) , 1219-29.

Malazgirt Z (1996) *Kolon Kanseri Etyolojisi*, Genel Cerrahi Nobel Tıp Kitapevi İstanbul; 1, 371-72.

Maria G.S, Achille P.C, Concetta D, Gluseppina F, Endoardo S (2004) *Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in an Italian population* Pharmacol. Res. 195-200.

Martinez C, Garcia-Martin E, Ladero JM., Sastre J, Garcia-Gamito F, Diaz-Rubio M et al (2002) *Association of CYP2C9 genotypes leading to high enzyme activity and colorectal cancer risk (Response to letter to editor)* Carcinogenesis; 23, 667-668.

Martinez G, Garcia M, Ladero J.M, Sastre J, GarciaGF, Diaz Robino M, Agundez J.A (2001) *Association of CYP2C9 genotypes leadng to high enzyme activity and colorectal cancer risk*, Carcinogenesis; 5 (3), 211-224(14).

Marzo A, Balant LP (1996) *Investigation of xenobiotic metabolism by CYP2D6 and CYP2C19: importance of enantioselective analytical methods*, J Chromatogr B Biomed Appl; 678, 73-92.

Meyer UA, Zanger UM (1997) *Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism*, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 37, 269-296.

Nada B, Granic P, Zdenka L, Tramisak I, Lovric M, Rukavina AS (2003) *Genetic polymorphisms of Cytochromes P450 in Croatian Population*, *CMJ* 44(4):425-428

Naoko I, Meir S, David J.H, Hennekes C, Kelsey K.T (2000) *A Prospective Study of Cytochrome P450 1A1 Polymorphisms and Colorectal Cancer Risk in Men*, *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* Vol. 9,855-856

Nemeroff CB, De Vane CL, Pollack BV (1996) *Newer Antidepressants and the Cytochrom P450 System* *Am. J. Psychiatry*; 153, 311-320.

Özerol E(1996) *Cytochrom P 450 containing monooxygenase enzyme systems*, *Journal of Tugut Özal Medical Center*; 3(33), 257-275.

Pchelina O, Sofya N, Anastasiya E, Tatyana V, Alexander L, Eugene I.(2005) *The frequency of cytochrome P450 2C9 genetic variants in the Russian population and their associations with individual sensitivity of warfarin*, *Thrombosis Research*; V 115, 3: 199-203

Robert L, Nussbaum, MD Roderick R, McInnes, MD PhD, FRS (C) Huntington F. Willard, PhD (2005), *Thompson Thompson Genetics in Medicine Güneş Kitabevi*

Rock CL(1998) *Nutritional Factors in Cancer Prevention*, *Hematol Oncol Clin Nort Am*; 12, 975-992.

Rogers JF, Nafziger AN, Bertino JS (2002) *Pharmacogenetics affects dosing, efficacy and toxicity of cytochrom P 450 metabolised drugs*, *Am. J. Med*; 113, 746-750.

Romkes M, Faletto MB, Blaisdell JA et al (1991) *Cloning and expression of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome P450IIC subfamily*, *Biochemistry*; 30, 3247-3255.

Romolo J.L (1996) *Embriyoloji and anatomi of the colon Shackelford's Surgery of the Alimentary, Tract*; 4, 3-16.

Rosai J (1996) *Large Bowel*, Chapter 11. In *Ackerman's Surgical Pathology*, ed Rosai J. St Louis. Mosby; 729-799, 8 th.

Rosemary J, Chandrasekaran A, Sam S.S, Gerard N, Chanolean S, Abraham B.K et al (2004) *CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms frequencies in the South Indian population*; 19, 101-105

Sachse C, Gillian S, Murray JV et all and Colorectal Study Group (2002) *A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer*, *Carcinogenesis*; 23,1839-1845.

Sayek İ (1991) *Kolorektal Kanserler*, *Temel Cerrahi*; 1, 830-39.

Scrock T.R.(1996) *Colon and Rektum*, *Diagnostic Tecniques*, *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract*; 4, 23-38.

Spreafico M, Peyvardi F, Pizzotti D, Moia M, Mannucci PM (2003) *Warfarin and acenocoumaroldose requirements according to CYP2C9 genotyping in North Italian patients*. *J. Thromb. Haemost*;1 (10):2252-2253

Strate L, Syngal S (2005) *Hereditary colon cancer syndromes*, *Cancer Cause and Control* 16.201-213

Stubbins MJ, Harries LW, Smith G, Tarbit MH, Wolf CR (1996) *Genetic analysis of the human cytochrome P450 CYP2C9 locus*. *Pharmacogenetics*; 6, S.429-439,

Tabrizi A.R, Zehnbaauer B.A, Brocki IB, Mc Grath S.D, Freeman B.D (2002) The frequency and effects of Cytochrome P450 CYP2C9 polimorphism in patients receiving warfarin, *J.Am. Coll. Surg*, 194: 267-273

Tamer L, Ercan B, Ercan S, Ateş N, Ateş C, Öcal K ve ark. (2006) *CYP2C19 Polymorphisms in Patients with Gastric and Colorectal Carcinoma*; *İnt J Gastrointest Cancer* 37(1), 1-5.

Tassies D, Freire C, Pijoan J, Marasall S, Monteaguda J, Ordinas A, Revetrer JC (2002) *Pharmacogeneetics of acenocourmarol Cytochrome P 450 CYP2C9 polimorphisms influence dose requirements and stability of anticoagulation*, *Hematologia*; 87(11), 1185-1191.

T.C Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı (2003) Yayın No:582

Topuz E, Aykan F.N (1998) *Sindirim Sistemi Kanseri*, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları; 373-475.

Ward SA, Walle T, Walle UK et al (1989) *Wilkinson GR, Branch RA: Propranolol's metabolism is determined by both mephenytoin and debrisoquin hydroxylase activities*, *Clin Pharmacol Ther*, 45, 72-79.

Wang R, Liu L, Cheng H. (1995) *Identification of human liver cytochrome P450 isoforms involved in the in vitro metabolism of cyclobenzaprine*. *Drug Metab Dispos* 24:786-791

Waxner S.D, Forde K.A, Sellers G, Geron N, Lopes A, Weisse G (1998) *How well can surgeons perform colonoscopy* *Surg. End*; 12(12), 1410-14.

Wetherilt H (1991) *Beslenme ve kanser, 1. Etkin Mekanizmalar, enerji ve makro besin öğeleri*, *Gıda sanayi*; 22,34-42.

Wojciechowics D.C, Mallon RG, Picon A, Paty PB(1999) *Characterisation of lectin resistant cell populations derived from human colon carcinoma, correlation of K-Ras whitbetal-6 branching of N-linked carbohydrate and CEA production*, Biophys. Res. Commun; 259(3), 588-93.

Wu M, Chen S, Wu X (2006) *Differences in cytochrome P450 2C19 (CYP2C19) expression in adjacent normal and tumor tissues in chinese cancer patients*; Med. Sci. Monit, 12 (5), 174-178.

Xiao ZS, Goldstein JA, Xie HG et al (1997) *Differences in the incidence of the CYP2C19 polymorphism affecting the Smephenytoin phenotype in Chinese Han and Bai populations and identification of a new rare CYP2C19 mutant allele*, J Pharmacol Exp Ther; 281, 604-609.

Yasar Ü, Eliasson E, Dahl and ML (2002) *Association of CYP2C9 genotypes leading to high enzyme activity and colorectal cancer risk (letter to editor)*; Carcinogenesis vol 23 (4), 665.

Yüksel N (2001) *Sitokrom P450 Enzim Sistemi ve İlaç Etkileşmeleri*; Klinik Psikiatri Ek 1: 5-16.

Zand N, Tajik N, Moghaddam AS, Milanian I (2007) *Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes 2C9 and 2C19 in a healthy Iranian population*; Clin Exp Pharmacol Physiol, 34 (1-2):102-105.

11. ÖZGEÇMİŞ

1964 yılında Konya’da doğdu. İlk ve orta öğretimini Konya’da tamamladı. Lisans eğitimini 1982-1988 yıllarında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İzmir’de tamamladı. 1988-1992 tarihlerinde mecburi hizmet ve askerlik görevlerini tamamladı. 1992 yılında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesinde E.S.W.L (Taş Kırma) merkezinde göreve başladı. 2003 tarihininde Başhekim Yardımcılığı’na atandı halen bu görevde çalışmaktadır. Evli ve iki çocuk babasıdır. İngilizce bilmektedir.

12. TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim ve tez aşamasında emeği olan Genetik Anabilim Dalından, Prof. Dr. Hasan Acar, Prof. Dr. Aynur Acar, Doç Dr. Selman Yıldırım, Doç Dr. Tülin Çora, Yard. Doç. Dr. Ayşegül Zamani, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalından Prof. Dr. Ferhan Paydak, Yard. Doç. Dr. H. Gül Durakbaşı Dursun, Yard. Doç. Dr. Bülent Turhan'a Danışmanın Prof. Dr. Sennur Demirel ve yeterlilik ve tez savunma sınavına katılan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalından Prof. Dr. Mehmet Emin Erdal'a; araştırmamızı destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, BAP Komisyon Başkanı Rektör Yardımcısı Prof. Dr. Şefik Bilir'e, çalışmalarında yardımcı olan Biyokimya AB'dalından Prof. Dr. İdris Akkuş'a, Doç. Dr. Ali Ünlü'ye Mikrobiyoloji AB'dalından Prof. Dr. Duygu Fındık'a, Genel Cerrahi AB'dalından Prof. Dr. Şakir Tavlı'ya ve Yard. Doç. Mehmet Erikoğlu'na Halk Sağlığı AB' dalından Prof. Dr. Kemal Tahir Şahin'e, Tıbbi Onkoloji AB 'dalından Yard. Doç. Dr. M. Cem Börüban'a Uzm. Dr. Fatih Kara'ya, Hemşire Esra Güvece'ye, Bahar Yumak'a ve aileme teşekkür etmeyi bir borç bilirim.