

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ A.B.D.**

**Sitokrom P4501-3 (CYP1-3) Ve Faz II  
Enzimlerinin Türk Ülseratif Kolit  
Hastalarında Genetik Polimorfizmi**

Hazırlayan  
**Özgen BÜYÜKGÖZE**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Ana Bilim Dalı: BİYOLOJİ A.B.D.**

**Prof. Dr. Alaattin ŞEN**

**DENİZLİ, EKİM 2010**

## YÜKSEK LİSANS TEZ ONAY FORMU

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 081461003 nolu öğrencisi Özgen BÜYÜKGÖZE tarafından hazırlanan “Sitokrom P4501-3 (CYP1-3) Ve Faz II Enzimlerinin Türk Ülseratif Kolit Hastalarında Genetik Polimorfizmi ” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı :  
(Jüri Başkanı)

Prof. Dr. Alaattin ŞEN (PAÜ)



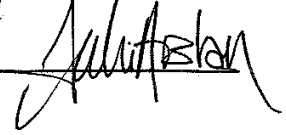
Jüri Üyesi:

Doç. Dr. Hakan AKÇA (PAÜ)



Jüri Üyesi :

Yrd. Doç. Dr. Şevki ARSLAN (PAÜ)



Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 27/10/2010 tarih ve 23.11.2.... sayılı kararıyla onaylanmıştır.




Prof. Dr. Halil KARAHAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

İmza

: 

Öğrenci Adı Soyadı :Özgen BÜYÜKGÖZE

## TEŐEKKÜRLER

Sitokrom P4501-3 (CYP1-3) Ve Faz II Enzimlerinin Türk Ülseratif Kolit Hastalarında Genetik Polimorfizmi alıőması, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D. biyokimya ve moleküler toksikoloji araştırma laboratuvarında yapılarak yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışma konumuzun belirlenmesinde yardımcı olan ve yardımlarını bizden esirgemeyen değerli danıőmanım, Prof. Dr. Alaattin ŞEN' e teőekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca eğitimimiz süresince yardımlarını eksik etmeyen tüm Bölüm Hocalarımıza, laboratuvar çalıőmalarımnda desteğini ve bilgilerini esirgemeyen Yard. Doç. Dr. Şevki ARSLAN Hocamıza, araştırma Görevlisi Aslı SEMİZ Hocamıza, kan alımında bize büyük yardımları olan sayın Prof. Dr. Necla OSMANOğLU'na ve Dr.İldeniz DURAN'a ve her zaman yanımızda olan ve beni bu günlere özveriyle getiren aileme sonsuz teőekkürler.

20.10.2010

Özgen BÜYÜKGÖZE

## İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ .....	1
1.1. DNA Polimorfizmi.....	1
1.1.1. Tek Nükleotid Polimorfizmi (TNP).....	2
1.2. Ülseratif Kolit .....	3
1.2.1. Belirtiler .....	7
1.2.2. Komplikasyonlar .....	8
1.2.3. Tedavi.....	8
1.2.4. Kolorektal Kanser .....	9
1.3. Ksenobiyotik Metabolizması .....	9
1.3.1. CYP 1A1*2A .....	14
1.3.2. Mikrozomal Epoksit Hidrolaz.....	16
1.3.3. Glutasyon-S-Transferaz.....	20
1.3.4. XRCC1 (X-ray repair complementing group 1) .....	22
1.3.5. CYP 2C9*3 .....	23
1.3.6. TPMT (Tiyopürin metiltransferaz) .....	24
1.3.7. CYP3A4*1B .....	26
1.3.8. CYP2D6*2 .....	27
1.4. Çalışmanın Amacı.....	28
2. BÖLÜM .....	29
2.1. Materyal .....	29
2.1.1. Kan Örneklerinin Toplanması.....	29
2.1.2. Enzimler ve Kimyasallar.....	30
2.1.3. Primerler.....	30
2.2. Metod .....	33
2.2.1. İnsan Kanından Genomik DNA İzolasyonu .....	33
2.2.2. Genomik DNA' nın Agaroz Jel Elektrofrezisi İle Görüntülenmesi .....	34
2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	34
2.2.4. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleriyle Kesimi .....	37
2.3. İstatistiksel Analiz.....	39
3.BULGULAR .....	40
3.1.1. Çalışma Grubu .....	40
3.1.2. Hasta Grubu .....	40
3.2. İnsan Kanından Genomik DNA İzolasyonu ve Analizi.....	41
3.3.1. CYP1A1*2A geni polimorfizmiyle ilgili bulgular .....	42
3.3.2. CYP2C9*3 geni polimorfizmiyle ilgili bulgular.....	44
3.3.3. mEPHX*3 geni polimorfizmiyle ilgili bulgular .....	46

3.3.4. mEPHX*4 geni polimorfizmiyle ilgili bulgular .....	48
3.3.5. CYP3A4*1B geni polimorfizmiyle ilgili bulgular.....	49
3.3.6. CYP2D6*2 geni polimorfizmiyle ilgili bulgular .....	51
3.3.7. GST geni polimorfizmiyle ilgili bulgular .....	53
3.3.8. TPMT*2 geni polimorfizmiyle ilgili bulgular .....	56
3.3.9. TPMT*3B geni polimorfizmiyle ilgili bulgular.....	57
3.3.10. TPMT*3C geni polimorfizmiyle ilgili bulgular.....	58
3.3.11. XRCC1 Kodon 194 geni polimorfizmiyle ilgili bulgular .....	60
3.3.12. XRCC1 Kodon 399 geni polimorfizmiyle ilgili bulgular .....	62
4.TARTIŞMA .....	67
5. SONUÇ .....	86
EK-1 .....	105
EK-2 .....	111

## TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. 1 Ülseratif Kolitin Genetik Geçişini Destekleyen Özellikler (Lukas M, ve diğ. 2006).....	4
Tablo 1. 2 Hastalığın etiyojisinde infeksiyöz nedenlerin bulunmadığının kanıtları şunlardır (Lukas M, ve diğ. 2006) .....	6
Tablo 1. 3 Sigaranın ÜK üzerine olumlu etkileri şu nedenlere bağlanabilir (Lukas M, ve diğ. 2006).....	7
Tablo 1. 4 Faz I ve Faz II'de gerçekleşen reaksiyonlar (Ingelman-Sundberg, M. 2001)	11
Tablo 2. 1 Primerler ve özellikleri .....	31
Tablo 2. 2 Primerler ve özellikleri .....	32
Tablo 2. 3 Pzr koşulları .....	35
Tablo 2. 4 GST Pzr koşulları.....	35
Tablo 2. 5 Pzr sıcaklık, döngü ve zamanları .....	36
Tablo 2. 6 PZR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesim şartları.....	38
Tablo 3. 1 Hasta grubuna ilişkin bilgiler.....	41
Tablo 3. 2 1A1*2A, 2C9*3, mEPH*3, mEPH*4, 3A4*1B, GSTT1, GSTM1, TPMT*2, TPMT*3B, TPMT*3C, XRCC1 kodon 194, XRCC1 kodon 399 genlerinin allel dağılımları (%) ve odss oranları .....	65
Tablo 3. 3 Genlerin allel sıklıkları .....	66
Tablo 4. 1 Farklı popülasyonlarda mEPHX genotip sıklıkları.....	73
Tablo 4. 2 Farklı popülasyonlarda CYP2C9*3 polimorfik allel sıklığı.....	81

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1 Ülseratif kolitin etiyopatogenezinin şematik görünümü.....	5
Şekil 1. 2 Ksenobiyotik metabolizması (Murray K. R. 1996) .....	12
Şekil 1. 3 Ksenobiyotikler tarafından başlatılan karsinogenez süreci (Perera, F. P. 1996) .....	13
Şekil 1. 4 Benzopren aktivasyonu ve DNA-adduct oluşumu (Best, W., Kane).....	18
Şekil 1. 5 GST enzimlerinin katalizlediği ksenobiyotik metabolizması .....	20
Şekil 1. 6 TPMT tarafında 6MP nin metilasyonu .....	25
Şekil 2. 1 Kan örneklerinin alındığı K3-EDTA' lı tüpler .....	29
Şekil 3. 1 İzole edilen parçalanmamış genomik DNA' nın %1' lik agaroz jel elektroforezinde tanımlanması.....	42
Şekil 3. 2 1A1*2A geninin PZR ve restriksiyon enzimleri ile kesiminin agaroz jelde görüntüsü. ....	43
Şekil 3. 3 CYP1A1*2A için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları.....	44
Şekil 3. 4 2C9*3 geninin PZR ve restriksiyon enzimleri ile kesiminin agaroz jelde görüntüsü. ....	45
Şekil 3. 5 2C9*3 için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları.....	46
Şekil 3. 6 mEPHX*3 için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları.....	47
Şekil 3. 7 mEPHX*4 için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları.....	49
Şekil 3. 8 mEPHX*3 ve mEPHX*4 genlerinin ve restriksiyon enzimleri ile kesiminin %2 agaroz jelde görüntüsü.....	49
Şekil 3. 9 3A4*1B için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları.....	51
Şekil 3. 10 3A4*1B geninin restriksiyon enzimleri ile kesiminin %2 agaroz jelde görüntüsü .....	51
Şekil 3. 11 2D6*2 geninin restriksiyon enzimleri ile kesiminin %2 agaroz jelde görüntüsü .....	52
Şekil 3. 12 2D6*2 için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları.....	53
Şekil 3. 13 GSTT1 için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları .....	54
Şekil 3. 14 GSTM1 için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları .....	55
Şekil 3. 15 GSTT1 ve GSTM1 genlerinin %2 agaroz jelde görüntüsü.....	56
Şekil 3. 16 TPMT*2 geninin %2 agaroz jelde görüntüsü. ....	56
Şekil 3. 17 TPMT*3B geninin restriksiyon enzimi ile kesiminin %2 agaroz jelde görüntüsü. ....	57
Şekil 3. 18 TPMT*3B için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları .....	58
Şekil 3. 19 TPMT*3C geninin restriksiyon enzimi ile kesiminin %2 agaroz jelde görüntüsü. ....	59
Şekil 3. 20 TPMT*3C için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları .....	60
Şekil 3. 21 XRCC1 kodon 194 geninin restriksiyon enzimi ile kesiminin %2 agaroz jelde görüntüsü.....	61
Şekil 3. 22 XRCC Kodon 194 için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları.....	62
Şekil 3. 23 XRCC1 kodon 399 geninin restriksiyon enzimi ile kesiminin %2 agaroz jelde görüntüsü.....	63
Şekil 3. 24 XRCC kodon 399 için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları.....	64

## KISALTMALAR DİZİNİ

MO = Monooksijenaz

FMO= Flavin monooksijenaz

cDNA= Komplementer deoksiribonükleik asit

GSH= Glutasyon

CO= Karbonmonoksit

PAH= Poliaromatik hidrokarbon

NADP= Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

NADPH= Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat'ın indirgenmiş formu

FAD= Flavin adenin dinükleotit

FMN= Flavin adenin mononükleotit

PCB= Poliklorlu bifeniller

EROD= 7-etoksirezorufin O-deetilaz

TCDD= 2,3,7,8-tetra klorodibenzo-p-dioksin

B(a)P= Benzopren

EDTA= Etilen diamin tetra asetik asit

SDS= Sodyum dodosil sülfat

KCl= Potasyum klorür

NaCl= Sodyum klorür

MgCl<sub>2</sub>= Magnezyum klorür

TKME= Tris-Potasyum klorür-Magnezyum klorür-EDTA

EtOH= Etil alkol

TAE= Tris-Asetik asit-EDTA

EtBr= Etidyum bromür

PZR= Polimeraz zincir reaksiyonu



RFLP= Restriction fragment length polymorphism

BSA= Bovine serum albumin

BÇ=Baz Çifti

CYP1A1\*2A= Sitokrom p450 1A1\*2A

CYP2C9\*3=Sitokrom P450 2C9\*3

mEPH\*3=Mikrozomal epoksit hidrolaz ekzon 3

mEPH\*4=Mikrozomal epoksit hidrolaz ekzon 4

CYP3A4\*1B=Sitokrom P450 3A4\*1B

GSTT1=Glutasyon S Transferaz theta1

GSTM1=Glutasyon S Transferaz mü1

TPMT\*2=Tiyopürin Metil Transferaz \*2

TPMT\*3B= Tiyopürin Metil Transferaz \*3B

TPMT\*3C=Tiyopürin Metil Transferaz \*3C

XRCC1= X-ray repair cross-complementing

O.R.= Odds Ratio

TNP=Tek Nükleotid Polimorfizmi

AZA=Azatipyürin

## ÖZET

### Sitokrom P4501-3 (CYP1-3) ve Faz II Enzimlerinin Türk Ülseratif Kolit Hastalarında Genetik Polimorfizmi

Özgen BÜYÜKGÖZE

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji TÜRKİYE

Danışman: Prof. Dr. Alaattin ŞEN

Ekim 2010, 127 Sayfa

İlaçları metabolize eden enzimlerin genetik polimorfizmi, sitokrom P450 gibi, insanda ilaç yanıtınlığının çeşitliliğinde büyük rol oynamaktadır. Bu çalışmada yaygın polimorfizim gösteren sitokrom P450 enzimlerinden CYP1A1\*2A, CYP2C9\*3, CYP2D6\*2, mEPHX\*3, mEPHX\*4, CYP3A4\*1B, GSTT1, GSTM1, TPMT\*2, TPMT\*3B, TPMT\*3C, XRCC1 kodon 194 ve XRCC1 kodon 399 genlerinin polimorfizmlerinin prevalansını belirlemek ve bu enzimlerinin polimorfizmlerinin normal ve kolit hastalarındaki dağılımları tespit edilmeye çalışılarak ülseratif kolit hastalığı ile olası bağıntıları saptanmaya çalışılmıştır. Bu amacı gerçekleştirebilmek için CYP1A1\*2A geni için Türk populasyonunu temsil eden 200 kontrol ve 115 ülseratif kolit, 2C9\*3, 2D6\*2, mEPH\*3, mEPH\*4, 3A4\*1B, GSTT1, GSTM1, TPMT\*2, TPMT\*3B, TPMT\*3C, XRCC1 kodon 194, XRCC1 kodon 399 genleri için 130 kontrol 115 ülseratif kolitli gönüllü bireyden kan örnekleri toplanmış, her birinin genomik DNA'ları izole edilmiş ve her biri için "PCR-RFLP" yöntemiyle bu genlerinin allel çeşitliliği ve odds oranları hesaplanmıştır. 2D6\*2, 2C9\*3, mEPH\*4, 3A4\*1B, GSTM1, TPMT\*2, TPMT\*3B, TPMT\*3C, XRCC kodon 194 genlerinin odds oranları sırasıyla polimorfik ve heterozigot bireylerinin odds oranları sırasıyla 1,56; 0,75; 1,76; 1,14; 1,24; 0;1,73; 1,44; 0; 0; 1,96; 0; 1,15; 1,71; 0,93 hesaplanmıştır ve istatistiksel olarak bir anlam ifade etmemektedir. Ülseratif kolit gelişiminde bu genler risk faktörü oluşturmamaktadır. 1A1\*2A, mEPH\*3, GSTT1 ve XRCC kodon 399 genlerinin odds oranları sırasıyla 6,42, 4,62, 1,87 ve 2,28 olarak hesaplanmıştır ve istatistiksel olarak anlam ifade etmektedir. Ülseratif kolit gelişimde bu genler bir risk faktörü oluşturur diyebiliriz.

Anahtar kelimeler: 1A1\*2A, 2C9\*3, 2D6\*2, mEPH\*3, mEPH\*4, 3A4\*1B, GSTT1, GSTM1, TPMT\*2, TPMT\*3B, TPMT\*3C, XRCC1 kodon 194, XRCC1 kodon 399, Polimorfizm; Türkiye, Ülseratif kolit

## ABSTRACT

### Genetic Polymorphisms Of Cytochrome P4501-3 (CYP1-3) And Phase II Enzymes in Turkish Ulcerative Colitis Patients

Özgen BÜYÜKGÖZE

Master's Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Alaattin ŞEN

October 2010, 127 Pages

Genetic polymorphisms of drug metabolizing enzymes, such as CYPs, play major roles in the variations of drug responsiveness in human. The aim of the present study was to determine the prevalence of the most common allelic variants of the polymorphic CYP enzymes 1A1\*2A, 2C9\*3, 2D6\*2, mEPH\*3, mEPH\*4, 3A4\*1B, GSTT1, GSTM1, TPMT\*2, TPMT\*3B, TPMT\*3C, XRCC1 codon 194, XRCC1 codon 399 and to predict the allele frequency for each polymorphism in the Turkish population. For this purpose, whole blood samples were collected from 200 healthy volunteers and 115 case for CYP1A1\*2A, 130 healthy volunteers and 115 case with ulcerative colitis for 2D6\*2, 2C9\*3, mEPH\*3, mEPH\*4, 3A4\*1B, GSTT1, GSTM1, TPMT\*2, TPMT\*3B, TPMT\*3C, XRCC1 codon 194, XRCC1 codon 399 representing Turkish population and genomic DNA for each subject was isolated and was used to determine the frequency and odds ratio of these genes allelic variants by the PCR-RFLP. The odds ratio for 2D6\*2, 2C9\*3, mEPH\*4, 3A4\*1B, GSTM1, TPMT\*2, TPMT\*3B, TPMT\*3C, XRCC1 codon 194 were determined as 1.56; 1.76; 1.14; 0; 1.44; 0; 0; 0; 1.71. These results suggested that these genotypes are not possible factor for risk of incidence of ulcerative colitis. On the other hand, the odds ratio's, for 1A1\*2A, mEPH\*3, GSTT1 and XRCC codon 399 were found to be as 3.5; 3.0881; 2.0491. These results suggested that the genotypes of these genes might be a possible factor for the risk of incidence of ulcerative colitis since we found that these variant genotypes had a 6.42; 4.62; 1.87 and 2.28 fold higher risks of developing ulcerative colitis than these with the wild type genotype .

Keywords: 1A1\*2A, 2C9\*3, 2D6\*2, mEPH\*3, mEPH\*4, 3A4\*1B, GSTT1, GSTM1, TPMT\*2, TPMT\*3B, TPMT\*3C, XRCC1 codon 194, XRCC1 codon 399, Polymorphism, Turkish, Ulcerative colitis.

## 1.GİRİŞ

İnsan genomu yaklaşık  $3 \times 10^9$  baz çiftinden oluşmaktadır. Genetik bilgiyi taşıyan yaklaşık otuzbin gen, 23 çift kromozomda bulunmaktadır. İnsanların DNA'sı yaklaşık %99.9 oranında benzerdir ve genetik çeşitlilik DNA zincirindeki küçük farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Bazı DNA dizilerindeki farklar fenotipi etkilememekte, bazıları ise doğrudan hastalığa neden olmaktadır (Hemminki ve Shields, 2002).

Genom hareketliliğine bağlı olarak DNA'nın baz dizilimlerindeki değişimlerin bireyler arası farklılıklar göstermesine polimorfizm ve bu değişimlerin kalıcı kalıtsal hastalıklara neden olanlarına da mutasyon denir. Bu değişiklikler, delesyon, duplikasyon, substitüsyon, inversiyon, insersiyon gibi mutasyonların yanı sıra yapısal ve sayısal kromozom anomalileridir (Kantarıcı ve diğ., 1999; Nussbaum ve diğ., 2005). Mutasyonlar, genom mutasyonu, kromozom mutasyonu ve gen mutasyonları olarak üçe ayrılır (Nussbaum ve diğ., 2005).

İnsan genomunda polimorfizmlerin en yaygın tipi genetik çeşitliliğin %90 üzerinde olduğu tek nükleotid polimorfizmleri (TNP)'dir (Monzo ve diğ., 2006). DNA dizilerindeki gen mutasyonları tek nükleotid değişimlerinden yüzlerce baz çifti değişimlerine kadar olabilmektedir. Bu değişimlerin belirlenmesinde moleküler düzeyde özel teknikler kullanılır. DNA'daki bu baz değişiklikleri gen ekspresyonunun azalma veya kaybına, hatalı protein sentezine ve fenotipik değişimlere sebep olur. DNA'daki bu baz değişimleri DNA'nın replikasyonu sırasında meydana gelen ya da DNA hasarının giderilmesi sırasında oluşan hatalardan kaynaklanmaktadır. Hasarların bazıları doğal olarak bazıları ise fiziksel veya kimyasal mutajenlerden kaynaklanmaktadır (Hemminki ve Shields, 2002).

### 1.1. DNA Polimorfizmi

Organizmada gelişimsel planları belirleyen ve tüm hücrel aktivitelelerin yönetiminden sorumlu olan molekül DNA'dır. DNA dizilerindeki değişiklikler bireylerin birbirinden farklı olmasına yol açar. Genom proteine dönüşecek olan genler ve çok miktarda protein kodlamayan dizilerinden oluşur. Genlerin içinde de ekzon ve intron adı verilen 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, 2006). Böylece genetik çeşitliliğe yol açtığı 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.

### **1.1.1. Tek nükleotid polimorfizmi (TNP)**

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 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 dizilerince (codon) tanımlanırlar. 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 "eş anlamlı" (sinonim) 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 (nonsinonim) değişiklikler olarak adlandırılır. Bütün bu değişiklikler polimorfizm kapsamı içinde ele alınırlar, 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. TNP'ler bugün özellikle DNA çip teknolojisinin gelişmesi ile ilgili hastalıklara genetik yatkınlıkların sınındığı en önemli gösterge haline gelmişlerdir

(Akarsu, 1999). TNP değişiklikleri ile çalışmak, DNA parçacığında büyüklük farkı yaratan diğer polimorfizmlerle çalışmaktan farklıdır. Burada tek bir baz başka bir baza değişmektedir ve büyüklük farkı oluşmadığı için bu bölgeleri PZR metodu ile çoğaltıp jelde oluşturacağı büyüklük farkları açısından değerlendirmenin bir anlamı yoktur. Alellerden 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 floresan işaretlerle tanıyan otomatik analizatrlerin kullanılması da bu amaçla kullanılan pahalı fakat etkin yöntemlerdir (Akarsu, 2004).

## 1.2. Ülseratif Kolit

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH), gastrointestinal kanalda kronik veya tekrarlayan immün aktivasyon ve inflamasyon ile karakterli hastalıklardır. Genel olarak, Crohn hastalığı ve ülseratif kolit (K) olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar (Stenson, 2004). Ülseratif kolit rektum ve kolon mukozasının inflamasyon ve lserleşmesi ile seyreden, etiyolojisi tartışmalı, nonspesifik inflamatuvar bağırsak hastalığıdır. İlk kez 1859 yılında Samuel Wilks tarafından tanımlanmış ve sonraki yıllarda bağırsak mukozasındaki patolojik değişiklikler ortaya konmuştur (Bliss DZ ve Sawchuk L. 2004, Devocioğlu S ve diğ. 1996, Jewell DP 2002). K prevalansı % 0,08-0,12 , insidansı ise 100.000 de 3-15’dir. Irk , etnik köken, yaşanılan coğrafya insidansı ve prevalansı etkiler. Yahudilerde daha sık görülür. Kuzey Avrupa’da kadın erkek oranı kadın aleyhine değişmiştir (Lashner B. 1995, Mendeloff ALCalkins BM 1995 ). 15-35 yaş arasında daha sık görülür ve 60’lı yaşlar civarında ikinci bir pik yapar (Anders PG. ve Friedman LS. 1999). Tutulum yeri ve hastalığın şiddetine bağlı olarak farklılıklar gösterse de ana semptomlar rektal kanama, karın ağrısı ve kanlı mukuslu diare’dir (Farmer R.G. 1994, Both H. ve diğ. 1983, Rao SS. ve Holdsworth CD. 1988, Sandle GI. ve diğ. 1990).

Ülseratif kolitin etiyolojisinde psikosomatik, genetik, immünolojik, bakteriyel ve çevresel faktörlerin üzerinde durulmaktadır (Aksoy G. ve diğ. 1992,

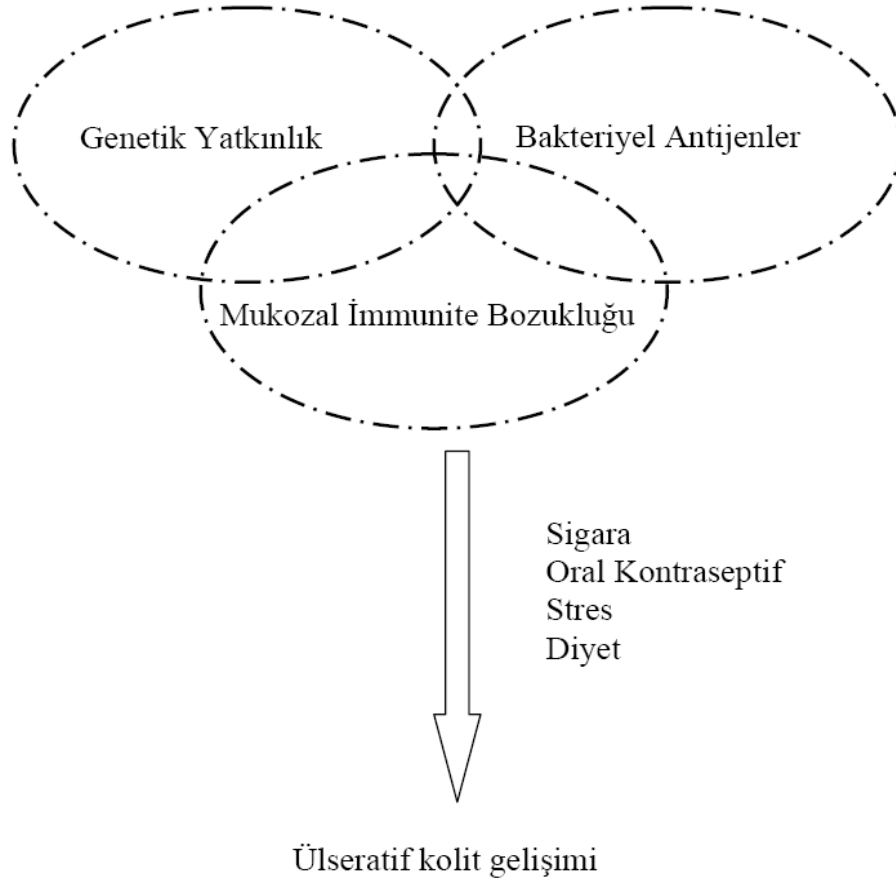
Bliss DZ ve Sawchuk L. 2004, Devecioğlu S ve diğ. 1996, Hawsk JH. 1997, Jewell DP. 2002, Mercan S. 2002, Şelimen D. 1998). Ülseratif kolit için aile insidansı yıllardır bilinmektedir. Veriler farklılık arz etmekle birlikte ülseratif kolitli bireylerin %10 ile %20'sinin ailesinde en az bir birey daha etkilenmiştir (Satsangi J. ve diğ. 1994). Ailesel ilişki genelde birinci derece akrabalarda görülür. Etkilenen aile üyelerinde ya ülseratif kolit yada Crohn hastalığı olmakla birlikte genellikle ülseratif kolit bulunur (Benett RA. ve diğ. 1991, Satsangi J. ve diğ. 1996). İkiizlerde yapılan çalışmalar genetik ve çevresel etkileşimi açıklamada yardımcı olmuştur. Çünkü bunlar hem genetik olarak benzerdir ve hem de çevre koşulları aynıdır. Crohn hastalığı için monozigot ikiizlerde %30-67 konkordans var iken, dizigotlarda bu %4'dür. Ülseratif kolit içinse monozigotlarda konkordans %13 ve dizigotlarda %2'dir. Bundan dolayı genetik, minör rol oynar ve Crohn'da daha baskındır (van Heel da. ve diğ. 2000). 2, 3, 6, 7 ve 12'inci kromozomlarda bulunan genlerin ülseratif kolit eğilimi yarattıkları kabul edilmektedir. Özellikle 12. kromozomdaki lokusun, önem arz ettiği birçok farklı merkez tarafından ortaya konmuştur (Parkes M. ve diğ. 2000). Bu lokusların bazıları Crohn hastalığı tarafından da paylaşılmaktadır ve bu durumda inflamatuvar bağırsak hastalığına yatkınlık yaratan gen havuzu fikrini ortaya koymuştur. Genetik yatkınlık, bakteriyel antijenler ve mukozal immün cevap bozukluğu intestinal inflamasyonun majör faktörleridir (Lukas M, ve diğ. 2006). ÜK için genetik yatkın kişilerde bakteriyel antijenlere karşı uygunsuz immün cevap geliştiği, inflamasyon oluştuğu, çeşitli faktörlerin etkisiyle oluşan inflamasyonun baskılandığı yada alevlendiği düşünülmektedir (Şekil 1.1).

Tablo 1. 1 Ülseratif Kolitin Genetik Geçişini Destekleyen Özellikler (Lukas M, ve diğ. 2006).

Aynı ailede birden çok ÜK hastası bulunması
Nadir ailevi sendromlarla birlikteliği
Aynı aile bireylerinde benzer patern göstermesi
Bazı etnik gruplarda sık görülmesi

ÜK ve infeksiyöz kolit arasındaki bazı benzerlikler kalın bağırsaktaki kronik inflamasyonun oluşumunda bilinmeyen mikroorganizmaların etkili olabileceği

görüşünü gündeme getirmiştir. İnflamatuvar bağırsak hastalığı olanlarda enterik bakterilere karşı anormal mukozal immün reaktivite geliştiği ve böylece bağırsak hasarının oluştuğu düşünülmektedir. Batı tipi beslenme, kemoteropatik ve antibiyotik kullanımı, bebek mamaları, yüksek hijyenik standart ve sanitasyonlar intestinal bakteriyel floranın gelişimini etkilemektedir (Lukas M, ve diğ. 2006). Bağırsak bakterileri bağırsak mukozal immün sisteminin oluşumu ve intestinal epitelyum hücrelerin indüksiyonunda önemli fonksiyonlara sahiptir. Ayrıca lenfosit apoptozisinin önlenmesi ve lenfositlerin uyarılmasında da rol alırlar (Marteau P. ve diğ. 2004).



Şekil 1. 1 Ülseratif kolitin etiyopatogenezinin şematik görünümü.

Gram pozitif bakteriler interlökin 12 ve gram negatif bakteriler interlökin 4 aracılığıyla selektif bakteriyel stimülasyona neden olabilirler (Lukas M. ve diğ. 2006). Standart tekniklerle mikrofloradaki organizmaların ancak %30 kadarı saptanabilmektedir. ÜK'li hastalarda bifidobakteri ve laktobasiller gibi yararlı bakteriler genellikle yoktur (Kleessen B. ve diğ. 2002). Ayrıca *E.coli*, *Fusobacterium* gibi gram negatif anaerob bakterilerin arttığı gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda ÜK'li



hastaların kolon biyopsi örneklerinde mukozal bakteriyel invazyon saptanmıştır (Furrie E. ve diğ. 2004, Macfarlane S, ve diğ. 2004, Ohkusa T. ve diğ. 2002 , Tamboli CP. ve diğ. 2004). Genetik yatkın kişilerde luminal bakteri mevcudiyeti kronik intestinal inflamasyona yol açabilir (Dieleman LA. 2003, Schultz M.ve diğ. 2002). Bu çalışmalar ÜK’de bakteriyel etkenlerin önemini vurgulamaktadır. Ancak aksi görüşü savunan ve ÜK etiolojisinde infeksiyöz nedenlerin bulunmadığını ileri süren çalışmalar da mevcuttur. Günümüze kadar hastalık etiolojisinde suçlanabilecek spesifik bir mikrobiyal ajan saptanamamıştır (Lukas M, ve diğ. 2006).

Tablo 1. 2 Hastalığın etiolojisinde infeksiyöz nedenlerin bulunmadığının kanıtları şunlardır (Lukas M, ve diğ. 2006)

Hastalar arasında ÜK geçişinin olmaması
Bağırsak infeksiyonlarının düşük sıklıkla görüldüğü bölgelerde ÜK’in sık saptanması
Düşük sanitasyon ve işlenmemiş gıdaların hastalık riskini azaltıcı etkisi
Çocukluk çağında erken ve sık antibiyotik kullanımının hastalık riskini artırıcı etkisi
Antimikrobiyal ajanların ÜK tedavisinde kalıcı etkisi olmaması
ÜK’li hastalarda dışkı kültür sonuçlarının tutarsızlığı

ÜK hastalarında epitel hücrelerinde de anormallikler bildirilmiştir. Bu anormallikler  $\beta$  oksidasyon eksikliği, hücre membran geçirgenliğinde anormallik, mukus anormallikleri, strese hücre sel cevapta bozukluk, “toll-like” gen reseptör polimorfizmi gibi eksikliklerdir (Lukas M, ve diğ. 2006). İntestinal epitel hücrelerinin kendi aralarında iletişimi ve patojenlerin saptanması için sahip oldukları mekanizmalardan en iyi bilineni “toll-like” reseptör (TLR) ve “nucleotidebinding oligomerisation domain” (NOD) reseptördür. Bakteriler epitel hücreleri ve lenfoid dokuları uyararak lokal veya sistemik immun cevabı aktifleştirir. Bakteriyel antijenlerin teması membranöz TLR veya intrasellüler NOD reseptörlerince tanınır. Bakteriyel ligandlar intestinal hücre reseptörlerine bağlandığında sitokinler, eikosanoidler ve antimikrobiyal peptitler gibi değişik moleküllerin yapımına yol açarlar. Bu aşamadan sonra sınırlanamayan kronik bir inflamasyonun oluştuğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar TLR’lerden özellikle 4 ve 9’un ÜK etioloji ve patogenezinde sorumlu olabileceğini desteklemektedir (Ismail AS. ve Hooper LV. 2005). İmmun supressiflerin ÜK tedavisindeki etkinliği ve immun hastalıklarla birlikteliği patogeneizde immun sistemin etkisini düşünmektedir (Zhang SZ. ve diğ.

2006). ÜK hastalığı sigara içmemiş ya da içip bırakmış kişilerde daha sık görülmektedir. Sigara içimi atakları düzeltebilir, oral steroid kullanımı ve kolektomi ihtiyacını azaltabilirken kesilmesi hastalığın aktivasyonunu artırır (Thomas GA. 1998).

Tablo 1. 3 Sigaranın ÜK üzerine olumlu etkileri şu nedenlere bağlanabilir (Lukas M, ve diğ. 2006)

Musin sentezini artırması
Proinflamatuvar sitokinlerin yapımını azaltması
Bağırsaklardaki düz kas tonusunu azaltması
Makromoleküllerin intestinal permeabilitesini değiştirmesi

ÜK'de oral kontraseptif kullanımının etkisi tartışmalı olmakla birlikte hastalığın aktivasyonunu tetikleyebileceği düşünülmektedir (Godet PG. ve diğ. 1995). Bazı çalışmalarda stresin lokal ve sistemik immun cevap üzerinden inflamasyonu etkileyebileceği gösterilmiştir (Mayer EA. ve 2000). Remisyondaki inflamatuvar bağırsak hastalığında depresyon skorunun artışı hastalığın aktivasyonunda önemli bir risktir (Mittermaier C. ve diğ. 2004) ve negatif emosyonel olaylar ÜK'i aktive edebilir (Bitton A. ve diğ. 2003, Mawdsley JE. ve Rampton DS. 2005). Aşırı miktarda süt ve süt ürünlerinin veya az miktarda lifli gıdaların alımı (Fernández-Bañares F. ve diğ. 1999) ile sülfat ve sülfür içeren gıdalarla beslenmenin ÜK'i aktive edebileceği düşünülmektedir (Russel MG. ve diğ. 1998, Tilg H. ve Kaser A. 2004). Tanı öncesi apendektomi yapılan hastalarda ÜK gelişim riski ve atak ciddiyetinin azaldığı (Koutroubakis IE. ve Vlachonikolis IG. 2000), coğrafik ve sosyal durum gibi çeşitli çevresel faktörlerin inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBH) için risk faktörü olduğu bildirilmiştir (Danese S. ve diğ. 2004).

### 1.2.1.Belirtiler

Ülseratif kolitin en belirgin belirtileri kanlı ishal ve kramp tarzında karın ağrılarıdır. Orta düzey ülseratif kolit vakalarında kanamalar artar ve sistemik belirtiler ortaya çıkar (ateş, halsizlik, iştahsızlık). Ciddi vakalarda ise günde 10-20 kez kanlı- mukuslu ishaller, yüksek ateş, beden ağırlığının % 10'undan daha fazla kilo kaybı, anemi, taşikardi ve su kaybı da tabloya ilave olur (Aksoy G. ve diğ. 1992, Bliss DZ ve Sawchuk L. 2004, Devecioğlu S ve diğ. 1996, Hawsk JH. 1997, Jewell DP. 2002, Mercan S. 2002, Şelimen D. 1998).

### **1.2.2. Komplikasyonlar**

Ülseratif kolite özgü komplikasyonlar bağırsağa ait ve bağırsak dışı olarak iki bölümde incelenir. Barsağa ait komplikasyonlar kanama, darlık, delinme, toksik megakolon ve kolonun dilatasyonudur. Bağırsak dışı komplikasyonlar ise eklemlerde (periferal artrit, ankilozan spondilit), deride (eritema nodosum, piyoderma gangrenosum), ağızda (aft ülserleri), gözlerde (uveit, konjonktivit) ve hematolojik sistemde (anemi, lökositoz, trombositoz) ortaya çıkar. Ayrıca, ince bağırsak patolojisine bağlı olarak malabsorbsiyon, safra ve böbrek taşları görülebilir. Primer sklerozan kolanjit, osteoporozis, amiloidozis ve peptik ülser ülseratif kolite eşlik edebilir (Aksoy G. ve diğ. 1992, Bliss DZ ve Sawchuk L. 2004, Devecioğlu S ve diğ. 1996, Hawsk JH. 1997, Jewell DP. 2002, Mercan S. 2002, Şelimen D. 1998).

### **1.2.3. Tedavi**

Ülseratif kolit tedavisinde asıl amaç remisyonu sağlamak ve devam ettirmektir. Remisyonda iltihap belirtilerinin (rektal kanama, ishal) kaybolması ile birlikte mukozada iyileşme gözlenir. İdame tedavisi ile remisyonun devamı ve nüksün önlenmesi amaçlanmaktadır (Akkiz H. 2000, Bliss DZ ve Sawchuk L. 2004).

Ülseratif kolitin patogenezinde genetik, çevresel ve özellikle immünolojik faktörlerin önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle immüno-inflamatuar yolları hedefleyen ilaçlar son 10 yıldan beri ülseratif kolit tedavisinde kullanılmaktadır. Bu amaçla birçok yeni ilaç geliştirilmiş olmakla birlikte, halen günümüzde ülseratif kolitin tedavisinde en çok kullanılan ilaçlar aminosalisilatlar ve kortikosteroidlerdir. Mesalazin (5-aminosalisilik asit) hafif veya orta şiddetteki ÜK vakalarının primer tedavisinde topikal veya sistemik ajan olarak sıklıkla kullanılan bir moleküldür. Proksimal ince bağırsaklardan hızla absorbe edilir, intestinal epitel ve karaciğerde metabolize edildikten sonra idrarla atılır. Mesalazin kullanımının ÜK'li hastada kolon kanseri riskini azalttığına dair yayınlar mevcuttur (Eaden J. ve diğ. 2000). Kortikosteroidler ciddi yan etkileri nedeniyle uzun dönem tedavisi önerilmeyen semptomların geriletilmesinde oldukça etkili ilaçlardır. Hücre içindeki glukokortikoid reseptörleri üzerinden etki ederler (Chapman RW. ve diğ. 1986). Bu

tedavilere beklenen cevap alınamayan hastalarda immünomodülatör ajanlar olarak azatiyopürin (AZA), 6-merkaptopürin (6-MP), metotreksat (MTX) ve siklosporin kullanılmaktadır. Tiyopürin metil transferaz enzimi azatiyopürin yıkımında önemli olan, eksikliğinde ilaç yan etkilerinin sık izlendiği ve düzeyi ölçülebilen bir enzimdir (Lennard L. ve diğ. 1989). Homozigot ya da heterozigot gen defektlerinde aşırı miktarda aktif metabolit birikimi ve sonuçta ciddi hematolojik yan etkiler izlenebilir. Bazı otörlerce tedavi öncesi enzim düzeyinin bakılması önerilmektedir. Azatiyopürini tolere edemeyen hastalarda 6-Merkaptopürin kullanılabilir (Collins P. ve diğ. 2006 ). Siklosporin ciddi refrakter kolitlerde salvaj tedavisinde önerilen kalsinörin inhibitörü bir ajandır (Hawthorne AB. 2003). Ayrıca standart tedavilere cevap vermeyen hastalarda, etkileri kesinleşmiş olmamakla birlikte nikotin, heparin, antibiyotikler, probiyotikler ve kısa zincirli yağ asitleri de uygulanmaktadır. Hastaların yaklaşık % 85'i konservatif tedavi ve iyi bir hemşirelik bakımı ile remisyona girmektedir (Akkiz H. 2000, Bliss DZ ve Sawchuk L. 2004, Kaymakoğlu S. 2000, Boztaş G. 2002, Devecioğlu S ve diğ. 1996, Hawsk JH. 1997, Jewell DP. 2002, Mercan S. 2002, Şelimen D. 1998).

#### **1.2.4. Kolorektal kanser**

Etiyolojileri tam olarak bilinmeyen iltihabi bağırsak hastalıklarında özellikle ülseratif kolitlerde, kolorektal kanser riski hastalığın yaşı ile paralel olarak artış gösterir. İlk 10 yılda % 3-5, ikinci 10 yılda % 20'ye kadar yükselen malign dejenerasyon söz konusu olmaktadır (Malazgirt 1996, Topuz ve diğ 1998).

Ülseratif kolitli hastalarda kolon kanseri riski yaygın ve total kolitli hastalarda en yüksektir. Özellikle 10 yılı aşkın hastalığı olanlarda belirgindir. Erken yaşta başlayıp kronik seyir gösterenlerde, risk daha yüksek olabilir, fakat bu tüm çalışmalarda bağımsız bir risk faktörü olarak belirlenmemiştir. Proktitli hastalarda kanser riski artmaz, sol yan hastalığı olanlarda risk minimal artmıştır, fakat çalışmalar arasında çelişkiler vardır. Yaygın hastalığı olanlarda, çalışmalar arasında büyük çapta metodolojik probleme bağlı olarak önemli farklar izlenmektedir.

#### **1.3. Ksenobiyotik Metabolizması**

Ksenobiyotikler canlı organizmalar tarafından üretilmeyen, vücuda dışarıdan alınan yabancı kimyasallardır. Başlıca ksenobiyotikler arasında ilaçlar, böcek

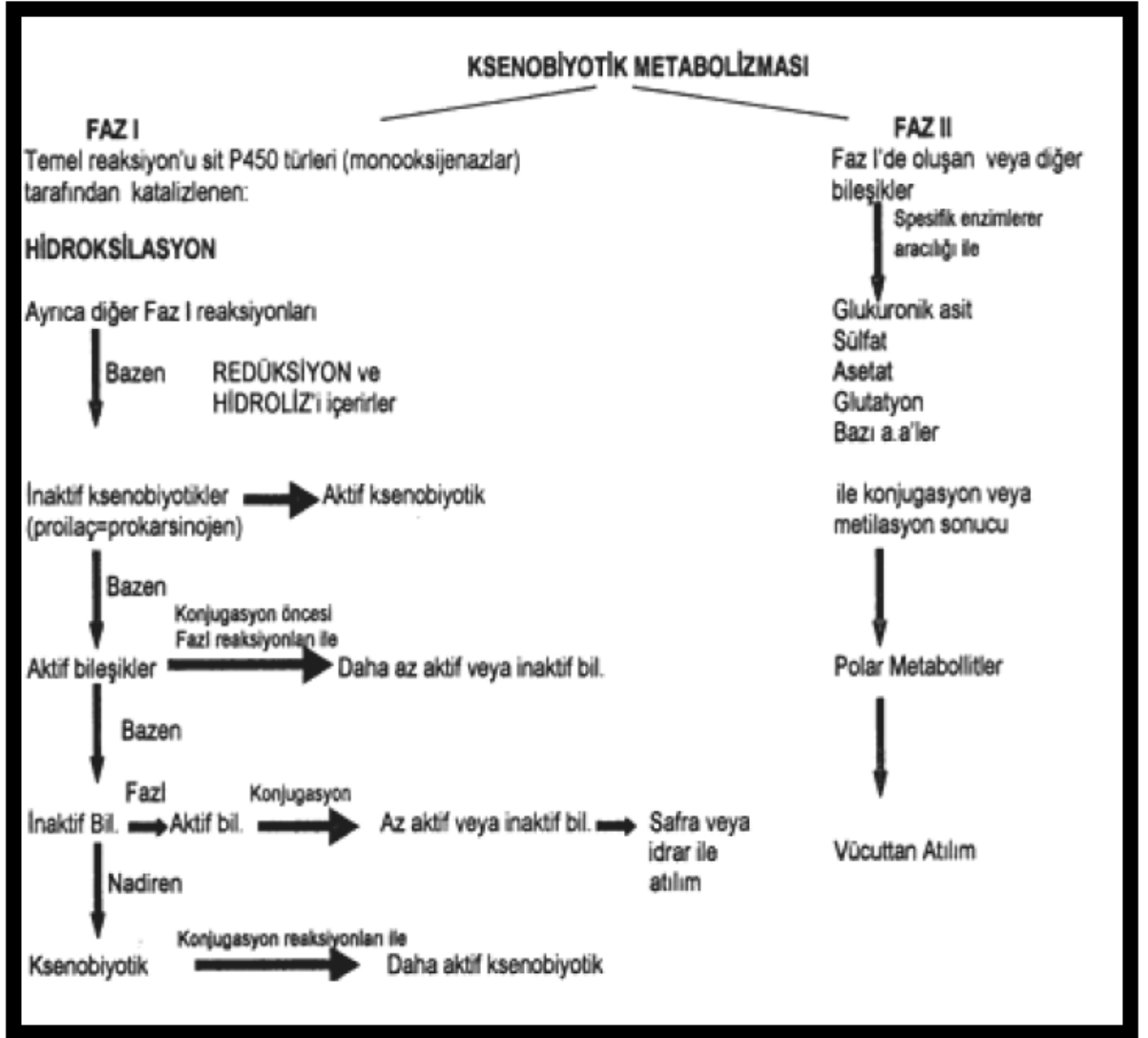
öldürücüler, anestetikler, petrol ürünleri, diyet ve sigara dumanı içerisinde yer alan karsinogenler sayılabilir (Pınarbaşı H. 2002, Murray K. R. 1996). Canlı organizmalar çevre kaynaklı çok ve çeşitli sayıdaki ksenobiyotiklere maruz kalırlar. Bu kimyasalların çoğu lipofilik bileşiklerdir ve uzaklaştırılmadıkları sürece hücrelerde kolaylıkla birikip çok çabuk toksik ya da letal konsantrasyonlara ulaşabilirler. Böyle bir birikimi engellemek için organizmalar ksenobiyotikleri suda çözünen ve vücuttan kolaylıkla uzaklaştırılabilen bileşikler haline dönüştürerek elimine eden enzimatik yollar geliştirmişlerdir. Ksenobiyotiklerin enzimatik detoksifikasyonu iki faz da gerçekleştirilir. Faz I ve faz II reaksiyonlarıyla lipofilik ve nonpolar özellikteki ksenobiyotikler, suda çözünebilen, daha az toksik ve hücrelerden daha kolay uzaklaştırılabilen ürünlere dönüştürülür. Faz I reaksiyonları sitokrom P450 enzimleri tarafından katalizlenirken, faz II reaksiyonları N-asetil transferaz, glutatyon S-transferaz, aldehit dehidrogenaz, sülfotransferaz, tiyopürin metiltransferaz ve epoksit hidrolaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlarla gerçekleşir (Ingelman-Sundberg, M. 2001).

Kanserojen olan polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve diğer bazı bileşikler, vücutta karaciğer mikrozomal enzimleri tarafından epoksid türevlerine dönüştürülür. Lipofilik ve son derece elektrofilik olan epoksidler, DNA, RNA gibi makromoleküllerin nükleofilik gruplarına kovalent bağlarla bağlanarak onları ariller, alkiler ve böylece yapılarını bozarlar. Epoksidler genelde çok kısa ömürlü ara metabolitler olmalarına rağmen, reaktiflikleri nedeni ile ksenobiyotiklerin ve bazı zehirli maddelerin karsinogenik, mutajenik, teratojenik, hepatotoksik ve diğer bazı toksik etkilerinden sorumludurlar (Indulski, J. A. ve Lutz, W. 2000). Karsinogenlerin, metabolik aktivasyonu, faz I enzimleri tarafından hidroliz, oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları aracılığı ile yürütülmektedir. Faz II enzimleri, faz I reaksiyonları sonucu aktive olan ara ürünlerin detoksifikasyonuna katılırlar (Tablo 1.4).

Tablo 1. 4 Faz I ve Faz II’de gerçekleşen reaksiyonlar (Ingelman-Sundberg, M. 2001)

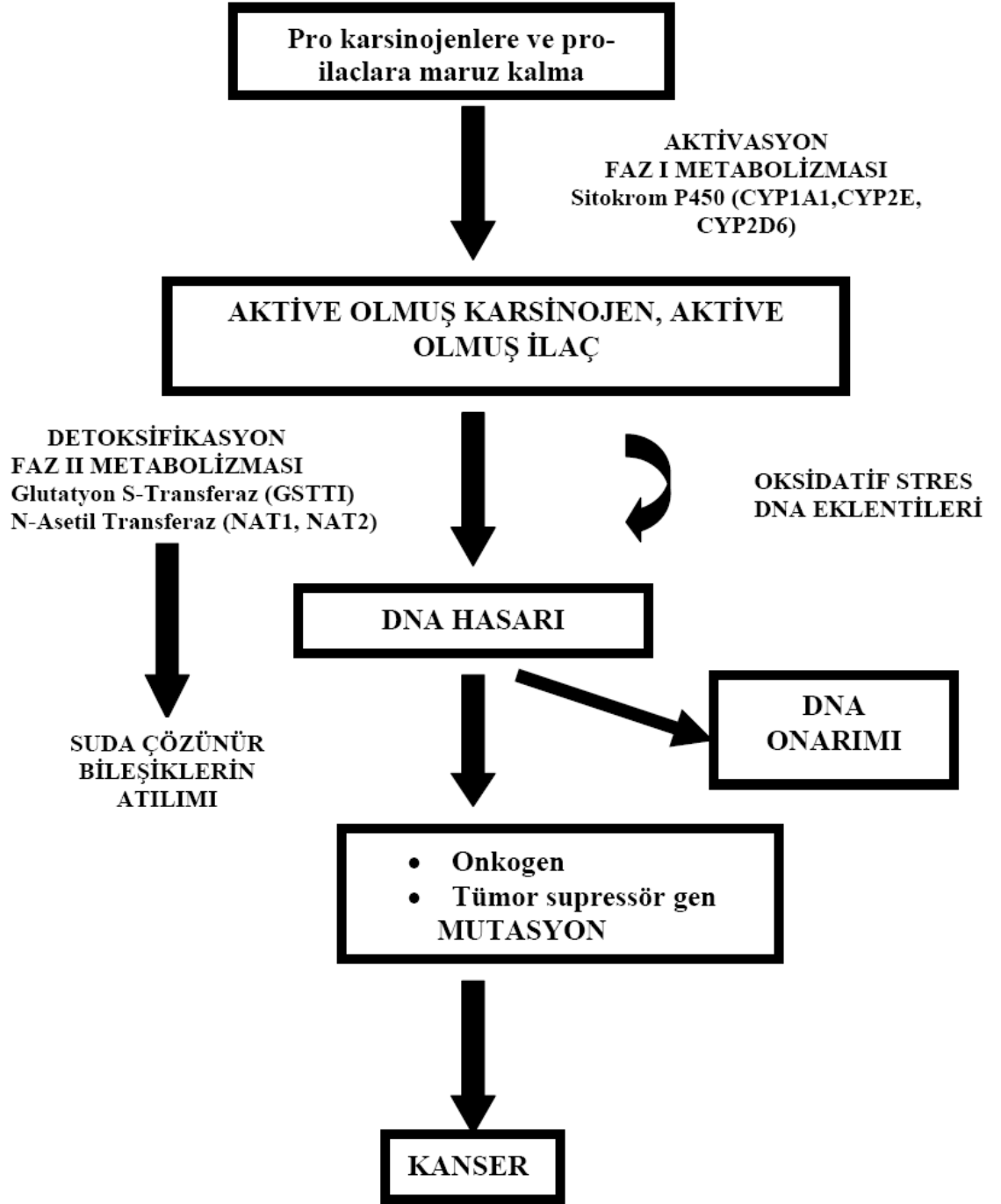
Faz I reaksiyonları			Faz II reaksiyonları
Oksidasyon	Redüksiyon	Hidroliz	Konjugasyon
Aromatik halka hidroksilasyonu (AHH)	Azo ve nitro grubu-amin dönüşüm reaksiyonları	Hidroliz	Glukuronik asitle birleşme
Alifatik hidroksilasyon (yan zincir oksitlenmesi)			Glutasyon konjugasyonu
N-,O-,S- dealkilasyon			N-,O-,S- metilasyon
Destülfürasyon	Nitro grubu - hidroksilamin dönüşüm reaksiyonları	Dekarboksillenme	Sülfat konjugasyonu
N-, S- oksidasyon (sülfidril oluşumu)			
N- hidroksilasyon			
$\alpha$ -metilli aminlerin oksidatif deaminasyonu	Aldehid-alkol dönüşüm reaksiyonları	Glikozidlerin hidrolizi	Asetilasyon
			Aminoasitlerle birleşme

Faz II enzimleri glukuronidasyon, sülfasyon, asetilasyon, metilasyon ve glutasyon ile konjugasyon gibi reaksiyonlar ile aktive türevleri, nonreaktif ve suda çözünebilen ürünler haline getirip safra ve idrarla atılımını sağlayan reaksiyonları katalizler (Şekil 1.2).



Şekil 1. 2 Ksenobiyotik metabolizması (Murray K. R. 1996)

Faz I ve faz II enzimatik aktiviteleri arasındaki denge kansere bireysel yatkınlıkta kritik bir noktadır (Şekil 1.3) (Perera, F. P. 1996).



Şekil 1. 3 Ksenobiyotikler tarafından başlatılan karsinogenez süreci (Perera, F. P. 1996)



### 1.3.1. CYP 1A1\*2A

Sitokrom P450'ler arasında sitokrom P4501A kanserojenlerin biyoaktivasyonunda önemli bir rol oynar. CYP1A1'in indüklenmesine; akciğer ve plasenta gibi ekstrahepatik dokularda sigara kullanımı ve polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) maruziyeti neden olur. P4501A1, çeşitli organik kimyasalların oksidasyonunu katalizleyerek onları daha hidrofilik veya Faz II enzimleri tarafından ileri konjügasyonlara uğratılabilecek formlara dönüştürüp vücuttan atılımını sağlayan sitokrom P450 bağımlı monooksijenazların alt ailesidir. Özellikle P4501A1 izozimi, PCB, PAH ve dioksin gibi kimyasalların reaktif ara ürünlere dönüşümlerini katalize eder. PAH'ların bir üyesi olan, sigarada, petrol ürünlerinde ve endüstriyel atıklarda bulunan benzo(a)piren (B(a)P), mutajenik ve karsinojenik forma CYP1A1 tarafından katalize edilerek dönüştürülür (Alaattin Şen ve Emel Arınç 1998). Bu reaktif ara metabolitler kuvvetli karsinojenik maddelerdir. Bu nedenle ksenobiyotikler tarafından bir hücrenin karsinogenez sürecinin başlatılmasında, CYP1A1 geninin ekspresyonunun indüklenmesi önemli mekanizmalardan birini oluşturmaktadır. CYP1A1 enziminin indüklenmesiyle hücrenin kanser formasyonu arasındaki ilişki iki şekilde açıklanmaktadır. Birincisi; besin ve diğer yollarla organizmaya alınan ksenobiyotiklerin, hücrede CYP1A1 geninin ekspresyonunu indüklediği ve enzimin hücre içi konsantrasyonunu yükselttiği belirtilmektedir. Böylece CYP1A1 enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonlar artacak ve oluşan zararlı ara metabolitler, Glutasyon S-Transferaz (GST) gibi Faz II enzimlerince yeterli biçimde polar ve zararsız metabolitlere dönüştürülemeyecektir. Hücre içerisinde biriken bu zararlı reaktif ara metabolitler Deoksiribonükleik Asit (DNA), Ribonükleik Asit (RNA) ve proteinlerin yapısını değiştirebilmektedir. Hücre organik moleküllerinin yapısında meydana gelen değişiklikler, hücrenin karsinojenik forma dönüşümünü başlatmaktadır (Ma ve Lu, 2003). CYP1A1'in indüklenmesiyle, hücrede karsinogenez sürecinin başlaması arasındaki ilişkiyi açıklamaya yönelik ikinci yaklaşım ise; CYP1 A1'in indüklenmesiyle başlayan katalitik reaksiyonlar sonunda oluşan reaktif oksijen türleriyle ilgilidir. CYP1A1 gibi monooksijenazların katalitik aktiviteleri sırasında reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Reaktif oksijen türleri, DNA, RNA ve proteinlerin oksidasyonuna neden olmaktadır. Bu nedenle, indüklenen CYP1A1 enzimleri tarafından, bir takım ksenobiyotik metabolizması sonucu oluşan reaktif

oksijen türlerinin hücrenin karsinojenik forma dönüşümünü tetikleyebileceği bildirilmektedir (Barouki ve Morel, 2001).

Bazı çalışmalar sitokrom P4501A1 geninin indüklenme seviyesinin kişiler arasında farklı olduğunu yansıtmaktadır. Sitokrom P4501A1 geninin çeşitli toksik, karsinojenik ve terapötik ilaçlarla indüklenmesi; belirtilen bu farklılığın bireylerin kansere olan yatkınlıklarıyla pozitif ilişki içerisinde olabileceği görüşünü doğurmaktadır. Bu konuda yapılan bazı çalışmalarda, P4501A'nın indüklenmesinin artan akciğer kanseriyle ilişkili olduğu bildirilmektedir (Ma ve Lu., 2003).

Sitokrom P450 1A1 geni kromozomun 15q22–q24 bölgesinde lokalizedir, 5987 bp uzunluğundadır ve 512 amino asitlik bir proteini kodlar. CYP1A1\*2A gen polimorfizmi 3' kodlanmayan bölgede 6235. pozisyonda olan Timin (T) bazı yerine Sitozin (C) bazı gelmesiyle oluşmaktadır. Bu bölge MspI restriksiyon kesim bölgesi olarak ta bilinir. Bu polimorfizm enzim aktivitesini arttırır (Crofts, ve diğ. 1994). CYP1A1\*2A geni m1 varyantı olarak ta bilinmektedir.

CYP1A1 geninin varyant tiplerine bağlı indüklenme potansiyeli çalışmaları yanında, bir çok ırkta ve farklı hastalık tiplerinde CYP1A1 geninin polimorfik varyantlarının araştırıldığı polimorfizm çalışmaları bulunmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda m1, m2 ve m4 varyantlarının artan kanser riskiyle ilişkili olduğu ve bu varyantlarda CYP1A1 geninin daha fazla indüklendiği belirtilmektedir (Arvanitis ve diğ., 2003; Balta ve diğ., 2003; Canelle ve diğ., 2004; Crofts ve diğ., 1993; D'alo ve diğ., 2004; Galleos ve diğ., 2004; Krajinovic ve diğ., 1999; Mathonnet ve diğ., 2003). CYP1A1 enzimini kodlayan gen polimorfizmi ile ilgili solid tümörler (akciğer, servikal, baş-boyun ve prostat kanserleri) ve hematolojik neoplazilerde yapılan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Aktaş ve diğ., 2004; Aktaş ve diğ., 2002; Chang ve diğ., 2003; Goodman ve diğ., 2001; Hefler ve diğ., 2004; Olshan ve diğ., 2000; Song ve diğ., 2001, Suzuki ve diğ., 2003). Suzuki ve diğ. (2003) tarafından, Japon popülasyonunda prostat kanserli bireyler değerlendirilerek yaptıkları çalışma sonucunda; CYP1A1 geni m1 ve m2 genotiplerinin artmış prostat kanseri riskiyle orantılı olduğu gösterilmektedir. Nagai ve arkadaşan tarafından (2002), lenfoid ve myeloid seride CYP1A1 geninin ekspresyon seviyesinin artışının kan hücrelerinin

karsinogenezi ile birliktelik gösterebileceği bildirilmiştir. Aynacıoğlu ve diğ.'nin (1998), ülkemiz Güney Doğu Anadolu sınırları içerisinde yaptıkları CYP1A1 geni polimorfizm araştırmasında Türk popülasyonunda CYP1A1 geni m1, m2 ve m4 varyantlarının yüksek olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada, sağlıklı ve herhangi bir malignensisi olmayan, toplam 271 bireyin değerlendirildiği rapor edilmektedir (Aynacıoğlu ve diğ., 1998). Balta ve diğ.'nin (2003) ALL hastaları üzerinde yaptığı m1 aleli polimorfizm çalışmasında, kontrol grubu bireylerde m1 alelinin yüksek olduğu bildirilmektedir. Dj De Jong ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada bu genin ülseratif kolite çok yakın bir hastalık olan Crohn hastalığı ile olası ilişkisine bakılmış ve hastalığın 1A1\*2A ile ilişkili olmadığını göstermişlerdir.

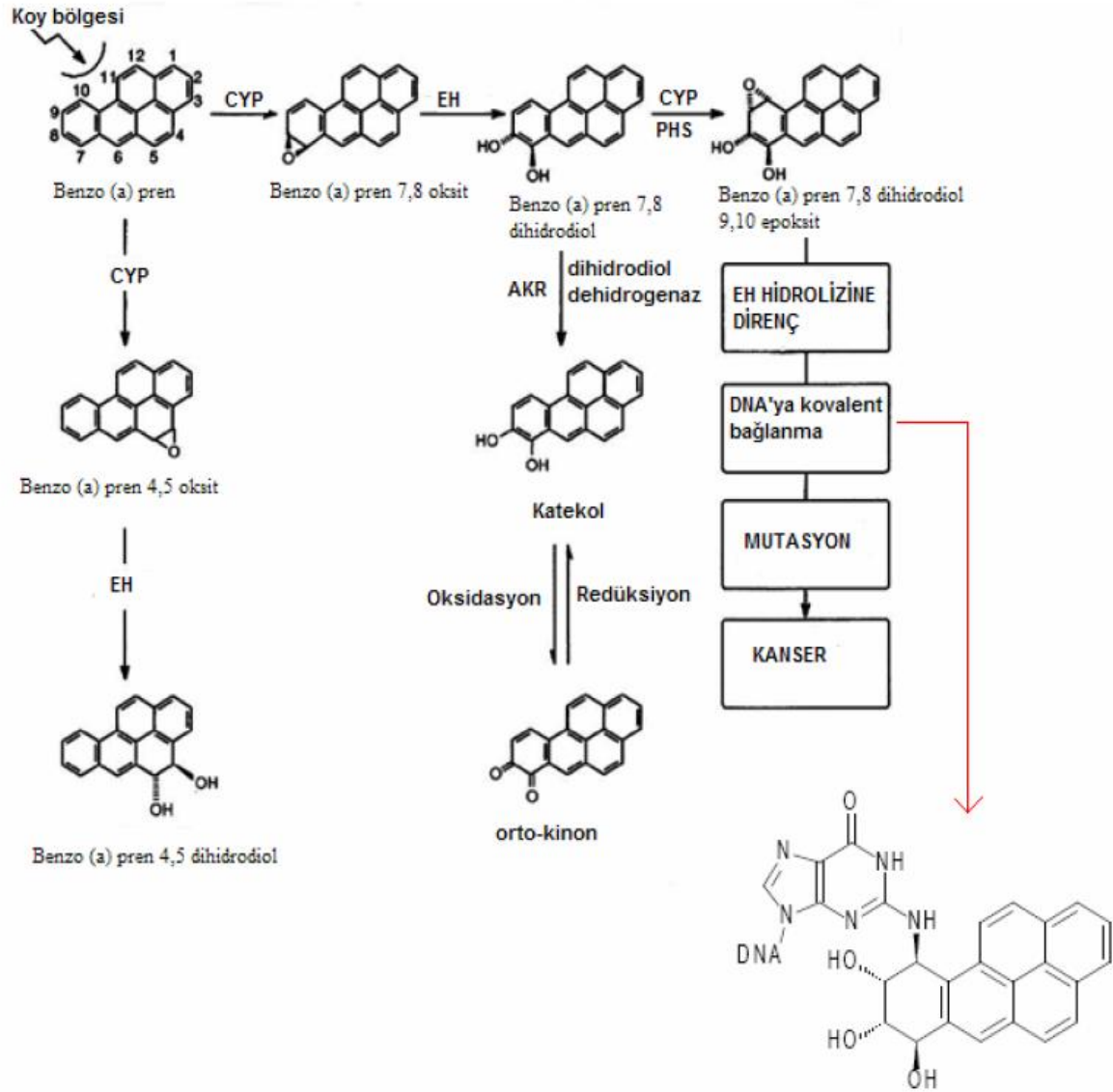
### **1.3.2. Mikrozoal epoksit hidrolaz**

Epoksit hidrolazlar memeli, bitki, böcek, fungus, bakteri gibi pek çok organizmada geniş bir dağılım gösteren enzim grubudur. Organizmadan organizmaya biyolojik rolleri değişir. Epoksit hidrolazların detoksifikasyon, karbon kaynaklarının yıkımı ve sinyal molekül düzenlenmesi şeklinde üç ana fonksiyonu vardır. Detoksifikasyon görevini memeli hücrelerinde genotoksik epoksitleri inaktive ederek gerçekleştirir. Katabolizma görevini bakterilerde bulunan limonen epoksit hidrolaz başarır. Sinyal molekül düzenlenmesi memeli hücrelerinde daha çok sEH ve mEH enzimleri ile gerçekleştirilir (Arand, M. ve diğ. 2003). Epoksit hidrolazlar ilk kez 1973'de Oesch tarafından detoksifikasyon enzimleri olarak tanımlanmıştır (Oesch, F. 1973). Epoksit hidrolazlar oksiren türevlerinin hidrolitik parçalanmasını sağlarlar. Yani hidratlamayla basit epoksitleri ve aren oksitleri transdihidrodiollere çevirir. Birçok doku mikrozomlarında da bu enzimin aktivitesi görülür. sEH endojen olarak tüvlenen yağ asidi epoksitlerinin metabolizmasına katılan ve ekzojen olarak trans-stilben oksit gibi ksenobiyotikleri metabolize eden bir enzimdir. Bu enzim sinyal molekülü gibi davranan lipid epoksitlerinin işlenmesinde anahtar bir rol oynar. Ayrıca sEH vazoaaktif araşidonik asit epoksitlerinin yıkımından da sorumludur. Bu enzimi kodlayan gen 8p21-p12 nolu kromozom üzerinde lokalize olmuştur (Arand, M. ve diğ. 2003, J. Fretland, A. ve Omiecinski, C.J. 2000).

Mikrozomal epoksit hidrolaz enzimi benzopren gibi epoksitleri hidrolizleyerek reaktif ara ürünler oluşturan faz I enzimi olarak görev aldığı gibi (Laasanen, J. ve diğ. 2002), aren, alken ve alifatik epoksitlerin hidrolizi sonucu oluşan reaktif ara ürünlerin detoksifikasyonundan sorumlu faz II enzimi olarak da fonksiyon görmektedir (Raunio, H. ve Pelkonen, O. 1995, Gsur, A. ve diğ. 2003). Dolayısıyla mEH biyoaktivasyonda ikili rol oynayan bir enzimdir. İnsan mEH enzimi (E.C.3.3.2.3.) 1 nolu kromozomun uzun kolu üzerinde lokalize olan tek bir fonksiyonel gen (EPHX 1) tarafından kodlanır (Seidegard, J.ve Ekström, G. 1997). Bu gen 16 kb uzunluğunda olup 8 intronla ayrılmış 9 ekzona sahiptir. Mikrozomal EH yaklaşık 50 kDa proteini karşılayan 455 aminoasit kalıntısı içerir (Falany, C.N. ve ark. 1987, Skoda, R.C. ve ark. 1988). EPHX 1 prenatal 1. trimesterden itibaren hepatositlerde ifade edilmeye başlar (McCarver, D.G. ve Hines, R.N. 2002). Mikrozomal EH neredeyse bütün memeli dokularında bulunur. Ratlar üzerinde yapılan ilk çalışmalarda en çok karaciğer olmak üzere akciğer, testis, beyin, lökosit gibi 26 farklı organ ve dokuda mEH aktivitesi belirlenmiştir. Beynin birçok kısmında da mEH ifadesi tespit edilmiştir (İHOP 1993, Newman, J.W. ve ark. 2005). Bir organda bulunan mEH ifadesi daha çok o organın belli hücrelerinde lokalize olmuştur. mEH diğer ilaç metabolize eden enzimlerle birlikte beyin kılcal damarlarında yüksek oranda bulunduğu için kan-serebrospinal-beyin bariyeri gibi fonksiyonu olan dokularda koruyucu gücü önemli ölçüde artırır. mEH aktivitesi koroid pleksusda neredeyse karaciğerdeki kadar fazladır. Lenfosit ve monosit gibi kan hücrelerinde de mEH aktivitesi ve gen ifadesi belirlenmiştir (Newman, J.W. ve ark. 2005).

Mikrozomal EH'nin detoksifikasyon rolünün daha çok karaciğerde olmak üzere ekstrahepatik dokularda ve beynin koroid pleksusunda da olduğu bildirilmiştir. Mikrozomal EH'nin steroid metabolizmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir. Epoksi-steroidler endojen bileşikler olarak bilinir. mEH steroidojenik dokularda bulunur. mEH antiöstrojen bağlayan bölgenin bir altbirimi olarak tanımlanmıştır ve epoksi streoidleri vicinal diollerine hidroliz eder. Epoksit steroidler toksik olabilir. Örneğin östrojen epoksit kritik bir meme kanseri başlatıcı faktör olabilir (Newman,

J.W. ve ark. 2005). Mikrozomal EH hepatositlerde düz ER'ye Na<sup>+</sup> bağımlı konjuge safra asidi geçişine aracılık eder. İyi bilinen bir PAH olan ve sigara dumanı, egzoz dumanı ve çok pişmiş gıdalarda bulunan benzo (a) pren CYP'ler ile benzo (a) pren 7,8 oksite çevrilir. Yeni oluşan molekülü mEH enzimi metabolize ederek onu çok karsinojenik olan benzopren 7,8 dihidrodiole çevirir (Şekil 1.4). Burada mEH'in kimyasal madde detoksifikasyon görevinin yanı sıra bazen de kimyasal maddeleri aktive edebileceği görülür (Hirvonen, A. 1999).



Şekil 1. 4 Benzopren aktivasyonu ve DNA-adduct oluşumu (Best, W., Kane).

mEH enziminin yedi polimorfik varyasyon bölgesi vardır. Bu polimorfik varyasyon bölgeleri 113 (ekzon-3), 139, 148 (ekzon-4), 348 (ekzon-8), 396, 406,

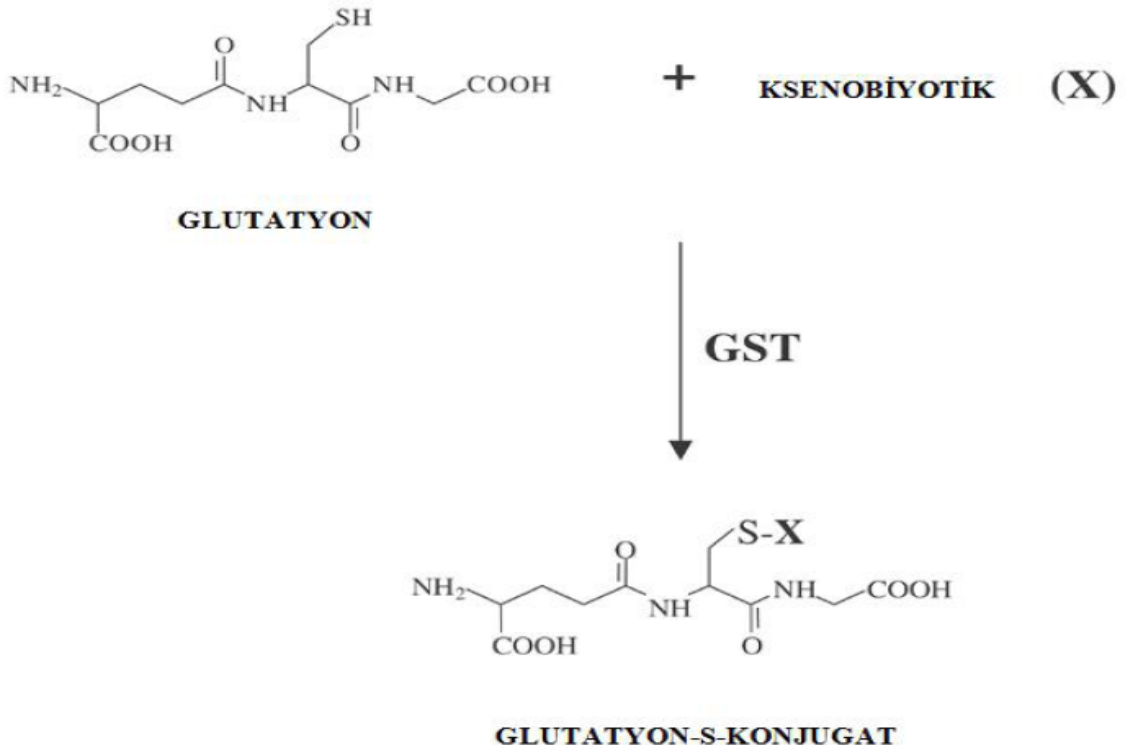
420 (ekzon-9) aminoasit kalıntılarındadır. PZR-genotip analizlerinden insan mEH'in iki polimorfik varyasyonunun protein üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Hassett, C. ve ark. 1994). Bunlardan birincisi ekzon-3 polimorfizmi olup burada proteinin 113. pozisyonundaki tirozin aminoasidi histidin aminoasidi ile yer değiştirmiştir (Tyr113→His113). Burada esas olarak T bazının C bazına dönüştüğü tek nükleotid değişimi bulunmaktadır. Bu olay enzim aktivitesinde % 50 oranında bir azalmaya neden olduğundan ekzon-3 polimorfizmi yavaş allel olarak bilinir. İkincisi ekzon-4 polimorfizmi olup burada proteinin 139. pozisyonundaki histidin amino asidi arjinin amino asidi ile yer değiştirmektedir (His139→Arg139). Yine burada A bazının G bazına dönüşmesiyle enzim aktivitesinde % 25 oranında bir artış meydana geldiğinden ekzon-4 polimorfizmi hızlı allel olarak bilinir (Takeyabu, K. ve ark. 2000). Japonya'da 96 epileptik hastanın yer aldığı bir çalışmada, EPHX 1 genine ait beş yeni SNP bulunmuştur. Bu polimorfizmler; başlama kodonunda, ekzon 2, ekzon 8, intron 8 ve ekzon 9'da bulunmuştur. Bu polimorfizmlerin mEH enzim aktivitesini etkilemediği bildirilmiştir (Shiseki, K. ve ark. 2003).

Kimyasal karsinojenlerin metabolizmasında önemli rol oynayan mEH enzimi ve onun polimorfizmi ile kanser arasındaki ilişki çok yoğun bir şekilde incelenmiştir. Örneğin akciğer kanseri ile mEH polimorfizmi arasındaki ilişki pek çok popülasyonda çalışılmış ve yavaş allelin (ekzon 3) akciğer kanserine karşı koruyucu, hızlı allelin (ekzon 4) ise risk oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda sigara dumanı, kimyasallar gibi çevresel faktörlerin yanı sıra kimyasal karsinojen metabolizmasına dahil olan enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfizmlerin akciğer kanserine kişisel eğilimi değiştirdiği bulunmuştur (Benhamou, S. ve ark. 1998, Lin, P. ve ark. 2000, Yin, L. ve ark. 2001, Zhao, H. ve ark. 2002, Wu, X. ve ark. 2001). Mikrozomal EH polimorfizmi ile özefaranjial ve larinks kanserleri arasında da bir ilişki bulunmuştur (Figueras, J.T. ve ark. 2002, Gasson, A.G. ve ark. 2003, Jourenkova – Mironova, N. ve ark. 2000). Kolorektal polipte çok pişmiş et ve sigara tüketimi varlığında yavaş fenotipi (ekzon 3) bir risk artışıyla ilişkilendiren çalışmalar vardır (Ulrich, C.M. ve ark. 2001, Cortessis, V. ve ark. 2001). Smith ve arkadaşları mEH polimorfizmi ile amfizem arasında önemli ilişkiler bulurken (Smith, C.A.D. ve ark. 1997), Kore popülasyonunda yapılan çalışmada böyle bir ilişki bulunamamıştır (Yim, J.J. ve ark. 2000). Aflatoksin B1'e bağlı hepatosellüler karsinoma (HCC) ile mEH polimorfizmi arasında anlamlı

ilişkiler bulunmuştur (Timersma, E.W. ve ark. 2001, McGlynn, K.A. ve ark. 1995). İngiltere popülasyonunda yapılan bir çalışmada mEH polimorfizmi ile ovaryum kanseri arasında bir ilişki bulunamazken (Baxter, S.W. ve ark. 2002), Kafkas popülasyonunda yapılan çalışmada ekzon-4 polimorfizmi ile ovaryum kanseri arasında bir ilişki bulunmuştur (Lancaster, J.M. ve ark. 1996). Kafkasyalı bir hasta kontrol çalışmasında mesane kanseri ile mEH polimorfizmi arasında bir ilişki gösterilememiştir (Ulrich, C.M. ve ark. 2001). Dj De Jong ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada bu genin ülseratif kolite çok yakın bir hastalık olan Crohn hastalığı ile olası ilişkisine bakılmış ve hastalığın 1A1\*2A ile ilişkili olmadığını göstermişlerdir.

### 1.3.3. Glutasyon-S-Transferaz

GST'ler, oksidatif stres ve elektrofilik metabolizma ürünlerine karşı koruyucu rol oynayan faz II metabolizma enzimleridir. GST'ler glutasyonla konjugasyon yoluyla vücutta bulunan değişik karsinojenik bileşiklerin atılımını sağlarlar (A. Şen ve A. Kırıkbakan 2004). GST'ler elektrofil bileşiklerle, nükleofil glutasyonun konjugasyonunu katalizleyen çok fonksiyonlu enzim ailesidir. GST enzimlerinin katalizlediği ksenobiyotik metabolizması aşağıdaki şekilde görülmektedir (Şekil 1.5). GST'lerin katalizlediği reaksiyon (Ruddon RW. 2007);



Şekil 1. 5 GST enzimlerinin katalizlediği ksenobiyotik metabolizması

Öncelikli görevleri DNA'ya bağlanabilecek elektrofilleri detoksifiye etmektir. Ayrıca dokuları oksidatif strese koruyan hidroperoksit redüksiyonunu da katalizlerler (68). GST enzimleri 4 ana sınıfta incelenebilir. Bunlar  $\alpha$  (GSTA),  $\mu$ (GSTM),  $\pi$ (GSTP) ve  $\theta$ (GSTT)'dir (Mannervik B. ve ark. 1982). GSTT1 ve GSTM1 enzimleri, CYP'lerin katalizlediği reaksiyon ürünlerinin, lipid ve DNA peroksitlerin detoksifikasyonunu sağlar (Taningher M. ve ark. 1999). GSTM1'in en önemli substratları arasında; aril oksid, aflotoksin B-1, aflotoksin B1 7,8 epoksid yer almaktadır (Scarpato ve ark., 1996; Autrup, 2000). Enzim, bu karsinojenleri, glutatyon ile konjüge ederek detoksifiye etmektedir. GSTM1 null bireyler teorik olarak daha fazla seviyede karsinojen-DNA bileşenlerine sahip olduğu söylenebilir (Hemminki ve ark., 1997) de bu konuda çelişkili sonuçlar vardır (Motykiewicz ve ark., 1998). GSTM1 geni için kromozom 1p13.3 üzerinde üç farklı alel tanımlanmıştır. Bunlardan biri GSTM1 geni üzerindeki gen delesyonudur, null alel olarak adlandırılır ve homozigot etki gösterir. GSTM1'in null aleli enzim aktivitesi göstermez. Diğer iki polimorfizm enzim aktivitesinde değişikliğe neden olmaz (Rebeck TR. 1997). GSTM1 null alelinin görülme frekansı beyaz ırkta yaklaşık %50'lerdeyken diğer popülasyonlarda %23-62'dir (Cotton SC. ve ark. 2000). GSTM1 null genotipinin kolon kanseri üzerindeki etkisinin araştırıldığı 15 çalışmadan 3 tanesinde GSTM1 ve kolon kanseri arasında bağlantı bulunamamıştır (Deakin M. ve ark. 1996, Butler WJ. ve ark. 1997, Gertig DM. ve ark. 1998). 5 tanesinde azalan risk bulunmuştur (Chenevix Trench G. ve ark. 1995, Lee E. ve ark. 1998, Slattery ML. ve ark. 1998, Abdel RS. ve ark. 1999, Slattery ML. Ve ark. 2000). 7 çalışmada GSTM1 null aleli ile kolon kanseri arasında artan risk bulunmuştur (Strange RC. ve ark. 1991, Zhong S. ve ark. 1993, Katoh T. ve ark. 1996, Welfare M. ve ark. 1999, Gawronska SB. ve ark. 1999, Kiss I. ve ark. 2000, Chen CL. Ve ark. 1996). Artan riskin bulunduğu 7 çalışmanın yalnız 2'sinde istatistiksel anlama ulaşılmıştır.

GSTT1 geni enzimi büyük miktarda karaciğerde ifade edilse de diğer bazı dokularda (eritrosit, akciğer, böbrek, beyin) da az miktarda ifade edilmektedir (Juronen ve ark., 1996a; Juronen ve ark., 1996b; Landi, 2000). Enziminin substratları arasında diklormetan (DCM), etilendibromid (EDB), p-nitrobenzil klorid (PNBC), p-nitrofenetil bromid (PNPB), metilklorid (MeC), metiliodid (MeI) ve değişik halojenize metan ve etanlar bulunmaktadır (Whittington ve ark., 1999; Landi, 2000). GSTT1 için kromozom 12q11.2 üzerinde iki farklı alel tanımlanmıştır. Bu alellerin



biri gen delesyonudur ve null alel olarak adlandırılır. GSTT1'in null alelinde enzim aktivitesi görülmez (Rebbeck TR. ve ark. 1997). Beyaz ırkta %20 olarak bulunan null alel frekansı diğer popülasyonlarda %16-64 arasında bulunmaktadır. GSTT1'in null aleli ile kolon kanseri arasındaki bağlantıyı araştıran 8 çalışmanın 4'ünde kanser riskinin azdığı bulunmuştur (Gertig DM. ve ark. 1998, Chenevix Trench G. ve ark. 1995, Ali-Osman F. ve ark. 1997). Diğer 4 çalışma da GSTT1'in null aleli ile kolon kanseri arasında artan bir ilişki bulunmuştur (Deakin M. ve ark. 1996, Butler WJ. ve ark. 1997, Katoh T. ve ark. 1996, Welfare M. ve ark. 1999). Artan riskin bulunduğu çalışmaların 2'sinde istatistiksel anlama ulaşılmıştır. GSTT1 delesyonunun GSTM1 ile etkileşimi birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Teorik olarak GSTT1 ve GSTM1 genlerinin null alelini taşıyan bireyler kimyasal karsinogenlere açık hale gelmektedirler. Bu sebepten GSTT1 ve GSTM1'in birlikte çalışıldığı metotlar geliştirilmiştir. Chen ve ark. yaptıkları çalışmaya göre GSTT1 null aleli taşıyan beyaz ırkta GSTM1 geninde de null alel bulunması Afrikan-Amerikalılara göre daha yüksektir (Chen CL. Ve ark. 1996). Abdel Rahman ve ark. yaptığı başka bir çalışmada da GSTM1'in null alelinin sıklığı Kuzey Amerikalılarda %51 iken Mısırlılar da bu %44 olarak bulunmuştur. GSTT1 null aleli ise sırasıyla %15, %14.7 olarak bulunmuştur (Abdel RS. ve diğ. 1999).

#### **1.3.4. XRCC1 (X-ray repair complementing group 1)**

DNA tamir kapasitesi ile karsinogenezis ve genetik instabilite arasında ilişki gösterilmiştir. Erişkin glioması, mesane, meme, özafagus, akciğer, prostat, mide, baş ve boyun kanseri, melanoma gibi birçok kanser türü ile DNA tamir genleri arasındaki ilişki araştırılmıştır (OGG1, RCC1, ERCC1, XPC, XPD, XPF, BRCA2, XRCC3, gibi). Mutajenler eksojen ve endojen olarak DNA'ya etki ederler. DNA onarım mekanizmaları ile onarılmayan genler apoptoz veya kansere yol açabilir. Onarım mekanizmalarının amacı replikasyonun korunmasıdır. Hücresel seviyede kontrol noktaları aktive olur ve hücre döngüsü duraklar. Genetik bütünlüğü korumak ve DNA seviyesinde tamir sağlanmış olur (Gros L. ve ark. 2002). DNA tamir genlerinin polimorfizmleri enzimleri değiştirir ve karsinogenezise neden olur. Ayrıca sitotoksik ve radyasyon tedavisinin etkinliği ile farmakogenetik yatkınlık ilişkisi araştırılmaktadır.

“X-ray repair complementing group 1” (XRCC1) DNA tamir genlerinden olup, 19. kromozomun q 13.2 bölgesinde yer alan 17 ekzonu, 2087 baz çifti (bç) transkripsiyon ürünü olan bir genidir. XRCC1 gen ürünü, DNA polimeraz beta ve DNA ligaz III gibi DNA proteinleri ile BER ve tek iplik kırılmalarının tamirinde görev almaktadır. BER DNA tamir mekanizmasının hasarında etkili olan faktörler iyonize radyasyon, alkilleyici ajanlar ve oksidasyondur (Chacko ve ark., 2005).

XRCC1 DNA tamir geninde yaygın üç polimorfizm vardır. Bunlar kodon 194 (Arg→Trp), kodon 280 (Arg→His) ve kodon 399 (Arg→Gln)’dur. XRCC1 kodon 399 evrim sürecinde türlerde korunmuştur. XRCC kodon 399’da, poly (ADP-riboz) polimeraz (PARP) ile BRCT (BRCA1 C-ucu) proteini ile ilişkilidir. BER yolunda, PARP DNA iplik kırılmalarını ortaya çıkaran çinko parmak şeklinde enzim olup, endojen oksidatif DNA hasarının tamirinde büyük öneme sahiptir (Duell ve ark., 2000; Lei ve ark., 2002; Chacko ve ark., 2005). XRCC1 hasarlı bazların ve tek iplik kırıklarının tamirinde etkili rol oynar. XRCC1’in enzimatik bir aktivitesi yoktur ancak diğer BER mekanizması proteinleri için bir iskelet görevi görür (Hu Z. ve ark. 2005). XRCC1’in yokluğu DNA ligaz III düzeyinde azalmaya sebep olur (Hung RJ. ve ark. 2005).

XRCC1 geni polimorfizmleri birçok hastalıkta ve dokuda çalışılmıştır. Özellikle kolorektal kanserlerde, meme kanserlerinde (Duell ve ark., 2001; Moullan ve ark., 2003; Smith ve ark., 2003), pankreas kanserinde (Duell ve ark., 2002) mesane kanseri (Stern ve ark., 2001; 2002), baş ve boyun kanserlerinde (Tae ve ark., 2004;), akciğer kanserleri (David-Beabes ve London, 2001; Park ve ark., 2002; Sreeja ve ark., 2007), prostat kanserinde (Rybicki ve ark., 2004), deri kanserlerinde (Hemminki ve ark., 2001), lökosit hastalıklarında (Duell ve ark., 2000; Qiao ve ark., 2002) ve hematolojik malignansilerde DNA tamir geni XRCC1 geni polimorfizmleri incelenmiştir (Seedhouse ve ark., 2002; 2004; 2006). Deri, mesane, prostat, akciğer kanserinde ve hematolojik malignansilerde XRCC-1 polimorfizminin koruyucu etkisi gösterilirken meme kanseri gelişimde risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Kolon kanserinde ise istatistiksel anlama ulaşan bir sonuç elde edilmemiştir.

### **1.3.5. CYP 2C9\*3**

CYP2C9 geni kromozomun 10 q24.1 bölgesinde haritalanmış yaklaşık 55 kb uzunluğunda ve 9 ekzondan oluşan bir genidir. CYP2C9 da diğer P450 enzimleri gibi substratlarının dealkilasyon, demetilasyon ve hidrosilasyonundan sorumludur.

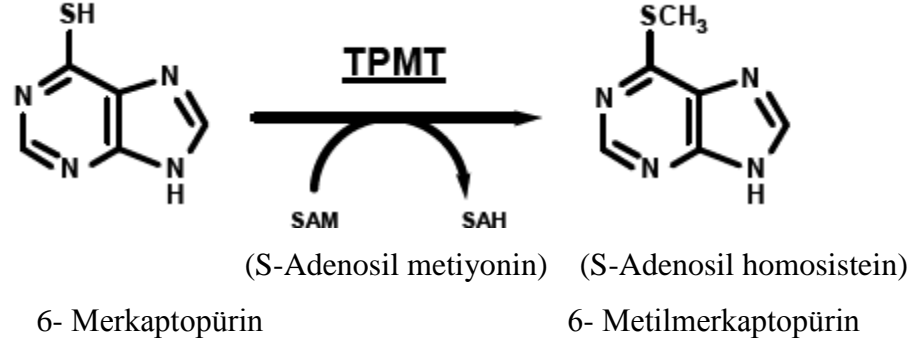
Ayrıca diğ er P450 enzimleri gibi CYP2C9'un metabolize ettiğ i substratlar arasında endojen bileşiklerde yer almaktadır. CYP2C9 karaciğ er araş idonik asitini tek baş na metabolize etmektedir. CYP2C9 birçok ilacın metabolize edilmesine katılır ve bu gendeki polimorfizm ilaçların etkisini değ işt irebilir veya toksisitesini artırabilir (Ablin ve ark 2004). CYP2C9 için en iyi bilinen ilaç substratları yapılarında karboksilik grup iç eren zayıf asitlerdir. Tolbutamid gibi oral hipoglisemik ajanlar, fenitoin gibi antiepileptik ilaçlar, oral antikoagö lan 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 oluş an genetik polimorfizm enzim aktivitesi üzerinde ö nemlidir. CYP2C9\*3 ekson 7'de A1075C transversiyon sonucu izolö sinin lö sin ile yer değ işt irilmesiyle oluş ur (Herrman ve ark. 2003, Ablin ve ark 2004, Tabrizi ve ark 2002). CYP2C9\*3 genotipini heterozigot (CYP2C9\*1/\*3) ya da homozigot (CYP2C9\*3/\*3) olarak taş ıyan, bir ya da her iki allelde mutasyon olan bireylerdir. CYP2C9 ile 359Leu (A1075C) olarak da bilinen bu genotipe sahip bireylerde CYP2C9 enzimi %5 kapasite ile ç alış ur. CYP2C9\*3 varyantının fonksiyonel ö nemi *in vitro* ve *in vivo* olarak pek ç ok substrat için ç alış ılmış tır (Miners, J.O. ve Birkett, D.J. 1998). CYP2C9\*3 varyantı için enzim aktivitesinde farklı substratlar söz konusu olduğ unda 3-30 kat arasında bir azalma olduğu g ö sterilmiş tir (Takanashi, K. ve diğ . 2000).

### 1.3.6. TPMT (Tiyopürin metiltransferaz)

Tiyopürin metiltransferaz (TPMT) Faz II grubundan olan ilaç metabolizmasında yer alan sitoplazmik bir enzimdir. Hem prokaryot hem ö karyotlarda mevcuttur. Ö nceleri fare ve sı ç anların bö brek ve karaciğ erlerinde bulundu daha sonra insan kalp, plesanta, kan hü creleri, pankreas ve bağ ırsak dakularında da olduğu g ö sterilmiş tir. (Krynetski ve Evans 2003).

TPMT geni kromozomun 6p22.3. bölgesinde lokalizedir. Bu gen yaklaşık 34 kb uzunluğ unda 10 ekzon 9 introndan oluş ur. (Szumlanski ve diğ . 1996). TPMT geni yaklaşık 35 kD molekö ler ađ ırlığ ında ve 245 amino asitten oluş an bir proteini kodlar. TPMT enzimi tiyopürin iç eren ilaçlardaki aromatik S-metilasyonu ve heterosiklik sü lfidril bileşikleri katalizler (Ames ve diğ . 1986). Metiltransferaz bağ ımlı S-adenosil-L-metiyonin (SAM) alt ailesi TPMT ye aittir ve metil donö rü olarak SAM kullanır. Ş ekil 1.6. TPMT nin katalizlediğ i reaksiyonu g ö sterir. Fakat bu enzim diğ er

metiltransferaz bağımlı SAM'ler ile dizi olarak bir benzerlik taşımaz. Aynı zamanda bilinen SAM bağlama motiflerinden yoksundur.



Şekil 1. 6 TPMT tarafında 6MP nin metilasyonu

TPMT endojen substrat içermez ve biyolojik rolü henüz cevaplanamamıştır. Tiyopürin kullanılmadıkça fenotipik olarak TPMT eksik bireylerde yaban tip bireylerden bir fark ayırt edilemez. Bu gerçek TPMT'nin vücutta hayati bir fonksiyonu olmadığını gösterir. Çalışmalar TPMT'nin endojen substratlarını tespit etmeye yönelik devam etmektedir. Karşılaştırmalı genomik çalışmalar bu enziminin biyolojik rolünün araştırılmasında iyi bir araçtır. Karşılaştırmalı genomik çalışmalardaki veriler gösteriyor ki TPMT'nin biyolojik rolü muhtemelen sülfür, selenyum, tellur içeren organik ve inorganik bileşiklerin metil grubu kaynağı olarak SAM ile metilasyondur. Sıçan detoksifikasyon yolağındaki dimetil selenide teşkilinden dolayı insanda TPMT nin sülfür, selenyum ve tellurun daha az toksik metilli bileşiklere detoksifikasyonunda rol aldığı varsayıılır. (Hassoun ve ark. 1995; Krynetski ve ark. 1995).

TPMT monomerik bir enzimdir ve 2 set alfa heliks yapının arasındaki 9 beta yaprak yapıdan oluşan tek domainli bir proteindir. (Rutherford ve Daggett, 2008). Tek nükleotid değişimleri olan genetik polimorfizmler TPMT'de amino asid değişimi ile sonuçlanır. Bu amino asid değişimleri aktif bölgede bozukluğa yok açar ve protein yapısında bozukluk olur (Rutherford ve Daggett, 2008).

Değişik TPMT alleleri polimorfizmler taşırlar ve bunlarda enzim eksikliği veya düşük aktiviteye neden olur. Mutasyon taşımayan TPMT allelerinde (homozigot yaban tip) genellikle yüksek enzim aktivitesi görülür. Homozigot mutant

allelere ise TPMT eksikliği görülürken heterozigot olan bir mutant bir yaban tip allel taşıyan bireylerde orta seviyede enzim aktivitesi görülür.

Bugüne kadar 23 tane tek nükleotid değişiminin TPMT’de enzim aktivitesini değiştirdiği bildirilmiştir. (Teml ve diğ. 2007). Gendeki tek nükleotid değişimi ile eksik amino asit kodlanır ve enzim aktivitesi değişmiş olur. Defektif allellerde enzim aktivitesi % 80 den daha fazla düşer (G238C, G460A ve A719G) ve bunlar TPMT\*2, TPMT\*3B ve TPMT\*3C olarak isimlendirilmiştir. (Yates ve diğ. 1997). TPMT\*2’de ekzon 5’teki G238C değişimi Ala80Pro aminoasid değişimi ile sonuçlanır. (Krynetski ve diğ. 1995). TPMT\*3B’de ekzon 7’deki G560A değişimi Ala154Thr aminoasid değişimi ile sonuçlanır. TPMT\*3C’de ekzon 10’daki A719G değişimi Tyr240Cys aminoasid değişimi ile sonuçlanır. (Loennechen ve diğ. 1998).

### **1.3.7. CYP3A4\*1B**

CYP3 karaciğerde en çok bulunan ailedir ve tek bir alt aileyi içerir. N-dealkilasyon reaksiyonlarını katalize eden CYP3A4 ilaç metabolizmasında rol alan CYP450 enzimleri içinde, en aktif olanıdır. Ayrıca kalın bağırsakta yüksek yoğunlukta bulunur (Rendic ve ark. 1997, Thummel ve ark. 1998).

CYP3A alt ailesi, protein seviyesi bireyler arasında 40 kat değişebilmesine rağmen, insan karaciğerindeki toplam P450’nin %30’unu oluşturur (Shimada ve ark. 1994, Pelkonen ve Breimer 1994). Bu alt aile 3 üyeden oluşur (Nelson ve ark. 1996). İnsan karaciğerinde en çok bulunan CYP enzimi CYP3A4’tür ve pek çok dokuda ekspres edilir. Ancak ilaçların ve diğer kimyasalların metabolizmasında, karaciğer kadar ince bağırsaktaki ekspresyonda çok önemlidir (Guengerich 1999). CYP3A4 günümüzde kullanılan ilaçların yarısının metabolizmasına katılır (Bertz ve Granneman 1997). Örneğin; testosteron 6β-hidroksilasyonu, midazolam 1’- ve 4-hidroksilasyonları, nifedipin oksidasyonu ve eritromisin N-demetilasyonu bu enzim tarafından katalize edilir. CYP3A4’ün bilinen substratları, asetaminofen (Mr 151), siklosporin A (Mr 1201) gibi düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir (Guengerich 1999).

3A4\*1B nin polimorfik varyantlarında enzim aktivitesi değişmektedir. Enzim aktivitesi değişen bireylerde ilaç detoksifikasyonu da değişmektedir. 3A4\*1B de tek nükleotid değişimi polimorfizmi vardır. 3A4\*1B’nin 5’ kodlanmayan bölgesinde

A293G değişimi vardır. Bu genetik allele sahip bireylerde prostat kanserine yakalanma riski sağlıklı bireylere göre daha fazladır. (Rebbeck TR. ve ark. 1998)

### 1.3.8. CYP2D6\*2

Genetik polimorfizm gösteren CYP2D6 enzimi, CYP2D alt-ailesine ait; 1 geni ve 4 pseudogeni bulunmaktadır. CYP2D6 (E.C.1.14.14.1.) gen kümesi, 22. (22q13.1) kromozomun uzun kolu üzerinde CYP2D8P, CYP2D7P/CYP2D7AP ve CYP2D7BP pseudogenleriyle (inaktive edici mutasyonları içerirler) birlikte yer almaktadır (Benny, K. ve Abraham, C. 2001). CYP2D6 geni 4.3 kb (4381 bp) uzunluğunda olup 7 intronla ayrılmış 9 exon içerir ve 497 amino asit (55.769 Da) içeren bir proteini kodlar (Ingelman-Sundberg, M. ve Benjamin, M. 2005).

Genotipleme çalışmalarıyla, CYP2D6 lokusunun 70'den fazla varyant alleli olduğu ve bunlardan en azından 15 tanesinin fonksiyonel olmayan gen ürünlerini kodladığı saptanmıştır (Aynacıoğlu, A. S. 2001). Defektif allellerin, gen delesyonu sonucu pseudogenlerle ve tek baz mutasyonlarıyla meydana gelen çerçeve kayması, yanlış anlamlı, anlamsız ya da "splice-site" mutasyonlarıyla olduğu düşünölmektedir. Bu alleller normal genden farklılık göstermekte ve enzimin etkinliğini önemli oranda değiştirmektedir. Sonuçta; ilaç toksisitesinden, kanser ve bazı hastalıklara olan yatkınlıktan sorumlu olabilen; yavaş, orta, hızlı ya da ultra hızlı metabolizör fenotipleri meydana gelmektedir (Kayaalp, O. 1994).

CYP2D6\*2 olarak adlandırılıp sonradan CYP2D6\*41 olarak değiştirilen \*41 allelinde, -1584 C>G polimorfizminin yanısıra, 2988G>A polimorfizminde intron 6 bölgesinde meydana geldiği, yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur. Yeni çalışmalarda bu allelin oluşum sürecinde alternatif splayzing'inde rol oynayabileceği fikri üzerinde durulmaktadır. CYP2D6\*41 alleli tüm populasyonların % 8'ini oluştururken, beyaz ırk'da IM (orta metabolizör) fenotipine sahip bireylerin % 50'sini oluşturmaktadır (Ulrich, M. ve ark. 2004). Fonksiyonel allel grubunun bir diğer üyesi olan ve artan enzim aktivitesi gösteren allellerden (CYP2D6\*1xN,\*2xN,\*35xN), CYP2D6xN allelleri (UM), Batı Avrupa populasyonunda % 1-2'lik bir dağılım gösterirken, Etiyopyalılarda, Suudi Arabistanlılarda ve İşpanyollarda bu dağılımın daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Fonksiyonel allel grubunun son üyesi olan ve normal fonksiyon gösteren alleller ise CYP2D6\*1,\*2,\*33 ve \*35 allelleridir (Griese, E. U. ve diğ. 1998, Dahl, M. L. ve diğ.

1995, Agundez, J. A.. ve diğ. 1995, Ingelman-Sundberg, M. ve diğ. 1999, Sachse, C. ve diğ. 1997).

#### **1.4. Çalışmanın Amacı**

İnsandan insana genom farklılıkları (polimorfizm), immün cevabın ve ilaç etkinliğinin kişiden kişiye değişmesinin, insanların hastalıklara karşı yatkınlıklarının gerçek nedeni olarak gösterilmektedir. Farmakogenetik, ilaca yanıt oluşturma veya toksisitenin gelişmesi bakımından bireyler veya çeşitli toplumlar arasında gözlenen farklılıkların oluşumunda genetik faktörlerin katkısını inceler. Bireylerde özellikle ilaç metabolize edici enzimlerin genetik varyasyonları, en uygun ilaç veya doz seçimi yapmaya olanak sağlayan farmakogenetik/toksikogenetik veya toksikogenomik yaklaşım giderek daha fazla klinik ve terapötik önem kazanmaktadır.

İlaçların büyük bir çoğunluğunun oksidatif metabolizmasından sorumlu sitokrom P450 enzimlerinde karşılaşılan genetik farklılıklar ilaç tedavilerinin yetersiz kalmasına ya da toksik reaksiyonların ortaya çıkmasına neden olarak bir çok ilacın metabolizmasında önemli rol oynamaktadır.

Bu araştırmada ilaç metabolizmasında önemli rol oynayan sitokrom P450 enzim ailerinden genetik polimorfizm gözlenen 3 aileye ait (CYP1, CYP2 ve CYP3) ve Faz II enzimlerinin polimorfizmlerinin normal ve kolit hastalarındaki dağılımları tespit edilmeye çalışılacak ve kolit hastalığı ile olası bağlantıları saptanacaktır. Ülseratif kolit hastaları tedavi amaçlı fazla miktarda ilaç kullanmaktadırlar bu çalışmadaki enzim gruplarından TPMT\*2, TPMT\*3B, TPMT\*3C, 3A4\*1B, 2C9\*3 ve 2D6\*2 kullanılan bu ilaçların metabolizmasında görev alan önemli enzimlerdir ve bu genlerdeki polimorfizmler hastalığın seyrini, tedavisini veya gelişimini önemli ölçüde etkileyebilir. Ayrıca ülseratif kolit hastalarının kanser gibi ikincil hastalıklara yakalanma riskleri yüksektir. Bu nedenle 1A1\*2A, mEPHX\*3, mEPHX\*4, GSTT1, GSTM1, XRCC1 kodon 194 ve XRCC1 kodon 399 gibi kanser metabolizmasında görev alan enzimlerin polimorfizmleri de incelendi.

## 2. BÖLÜM

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Kan örneklerinin toplanması

CYP1A1\*2A geni için 200, CYP2C9\*3, CYP2D6\*2, mEPHX\*3, mEPHX\*4, CYP3A4\*1B, GSTT1, GSTM1, TPMT\*2, TPMT\*3B, TPMT\*3C, XRCC1 kodon 194, XRCC1 kodon 399 genleri için 130 kan örneği Yenişehir Aile Sağlığı Merkezi'nde Dr. İldeniz DURAN kontrolünde sağlıklı gönüllü bireylerden alındı. Kanları alınan her birey için adı, soyadı, cinsiyeti, doğum yeri ve yılı, ebeveynlerinin doğum yeri, sigara kullanıp kullanmadığı ve kronik rahatsızlığının olup olmadığını içeren gönüllü formu verilmiş ve imzalatıldı. Bu formlardan bir örnek ek-1 kısmında belirtilmiştir. Kronik rahatsızlığı bulunan kanser, diyabet vb. bireyler bu çalışmaya dahil edilmedi.

CYP1A1\*2A, CYP2C9\*3, CYP2D6\*2, mEPHX\*3, mEPHX\*4, CYP3A4\*1B, GSTT1, GSTM1, TPMT\*2, TPMT\*3B, TPMT\*3C, XRCC1 kodon 194, XRCC1 kodon 399 genleri için 115 kan örneği Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bölümünde Prof. Dr. Necla OSMANOĞLU kontrolünde ülseratif kolit teşhisi konmuş bireylerden alındı. Kanları alınan her birey için adı, soyadı, cinsiyeti, doğum yeri ve yılı, ebeveynlerinin doğum yeri, sigara kullanıp kullanmadığı ve kronik rahatsızlığının olup olmadığını içeren gönüllü formu verildi ve imzalatıldı. Bu formlardan bir örnek ek-1 kısmında belirtilmiştir. Kronik rahatsızlığı bulunan kanser, diyabet vb. bireyler bu çalışmaya dahil edilmedi.

Gönüllü bireylerden vakumlu K<sub>3</sub>-EDTA' lı tüplere alınan 2 mL' lik kan örnekleri kullanılabildiği kadar -80°C' de saklandı. Bu kanlar kullanım sırasında 4°C' de tutulmuştur.



Şekil 2. 1 Kan örneklerinin alındığı K3-EDTA' lı tüpler



### 2.1.2. Enzimler ve kimyasallar

Agaroz (A-9539), etilen daimin tetra asetik asit (EDTA; E-5134), sodyum dodesil sülfat (SDS; L-4390), 2-amino-2(hidroksimetil)-1,3-propendiol (Tris; T6066) Sigma Kimyasal Firmasından alınmıştır.

Etidyum bromür (CAS#N/A), Triton X-100 (CAS#9002-93-1) Bio Basic Inc. Firması, Saint Louis, Missouri, USA' den sağlanmıştır.

Absolut etanol (121086) Pancreac Firmasından alınmıştır.

Sodyum klorür (NaCl; 13423), Potasyum klorür (KCl; 12636) Riedel de Haën Firması, Seelze' den alınmıştır.

Hot start Taq DNA polimeraz (#EP0602), dNTP (#RO191), 10X PCR tamponu (00023213), MgCl<sub>2</sub> (00022182) ve restriksiyon enzimleri MspI (Hpa II; #ER0541), Eco47I (Ava II; #ER0311), Mph1103I (Ava III; #ER0731), MboII (#ER0821), HhaI (#ER1851), MwoI (#ER1731), AccI (#ER1482) ve PvuII (#ER0631) tamponları da Buffer TANGO (#YBY5), Buffer R (#BR5) MBI Fermentas, USA firmasından sağlanmıştır.

### 2.1.3. Primerler

CYP1A1\*2A, CYP2C9\*3, CYP2D6\*2, mEPHX\*3, mEPHX\*4, CYP3A4\*1B, GSTT1, GSTM1, TPMT\*2, TPMT\*3B, TPMT\*3C, XRCC1 kodon 194, XRCC1 kodon 399 genlerinin polimorfizmlerinin belirlenmesi için 13 set oligonükleotid primer kullanılmıştır. Kullandığımız bu primerler HPLC saflığında ve 100 nmol skalada Bio Basic Inc. firmasından sağlanmış ve -20<sup>0</sup>C'de saklanmıştır. Kullanılan primerler tablo 2.1 ve 2.2' de verilmiştir.

Tablo 2. 1 Primerler ve özellikleri

Gen	İleri Primer ve Geri Primer	Uzunluk	GC İçeriği	Erime Sıcaklığı (1M Na+)	Molekül Ağırlığı
CYP1A1*2A	5'-TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT-3'	21 Baz	47,62%	68,88	6,403.10 µg/umol
	5'-CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT-3'	21 Baz	57,14%	72,79	6,511.21 µg/umol
CYP2C9*3	5'-AAT AAT AAT ATG CAC GAG GTC CAG AGA TGC-3'	30 Baz	40%	75,4	9272,03 µg/umol
	5'-GAT ACT ATG AAT TTG GGA CTT C-3'	22 Baz	36,36%	65,73	6764,37 µg/umol
CYP2D6*2	5'-GCTGGGGCCTGAGACTT-3'	17 Baz	52,68%	69,86	5786,98 µg/umol
	5'-GGCTATCACCAGGTGCTGGTGCT-3'	23 Baz	51,36%	66,63	7021,63 µg/umol
mEPHX*3	5'- CTTGAGCTCTGTCCTTCCCATCCC -3'	24 Baz	54%	68,76	6809,76 µg/umol
	5'- AATCTTAGTCTTGAAGTGACGGT -3'	23 baz	51,66%	67,09	6730,47 µg/umol
mEPHX*4	5'- GGGGTACCAGAGCCTGACCGT -3'	21 Baz	44,98%	68,98	6231,09 µg/umol
	5'- AACACCGGGCCACCTTGGC -3'	21 Baz	43,89%	67,9	6243,87 µg/umol
CYP3A4*1B	5'- GAACTCCCTGAAAAGCTAAAG -3'	21 Baz	42,86%	66,93	6432,26 µg/umol
	5'- GTTGGGCTCAAATATACGGTGG -3'	22 Baz	50%	71,32	6830,47 µg/umol
GSTT1	5'- TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC -3'	23 Baz	47,83%	71,76	6876,44 µg/umol
	5'- TCACCGGATCATGGCCAGCA -3'	20 Baz	60%	72,35	6086,99 µg/umol

Tablo 2. 2 Primerler ve özellikleri

Gen	İleri Primer ve Geri Primer	Uzunluk	GC İçeriği	Erime Sıcaklığı (1M Na+)	Molekül Ağırlığı
GSTM1	5'- GAACTCCCTGAAAAGCTAAAG -3'	21 Baz	42,86%	66,93	6432,26 µg/umol
	5'- GTTGGGCTCAAATATACGGTGG -3'	22 Baz	50%	71,32	6830,47 µg/umol
CYP1A1	5'- GAACTGCCACTTCAGCTGTCT -3'	21 Baz	52,38%	70,83	6357,14 µg/umol
	5'- CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC -3'	21 Baz	52,38%	70,83	6437,2 µg/umol
TPMT*2	5'- GTATGATTTTATGCAGGTTTG 3'	21 Baz	33,33%	63,02	6497,24 µg/umol
	5'- GTATGATTTTATGCAGGTTTC 3'	21 Baz	33,33	63,02	6497,21 µg/umol
	5'-TAAATAGGAACCATCGGACAC-3'	21 Baz	42,86%	66,93	6432,26 µg/umol
TPMT*3B	5'- AGGCTCCTAAAACCATGAGGG -3'	21 Baz	52,38%	70,83	6464,26 µg/umol
	5'- GTATACTAAAAAATTAAGACAGC -3'	23 Baz	26,09%	62,85	7072,7 µg/umol
TPMT*3C	5'-CAGGCTTTAGCATAATTTTCAATTCCT C-3'	27 Baz	45,78%	69,78	8987,43 µg/umol
	5'-TGTTGGGATTACAGGTGTGAGCCA C-3'	25 Baz	41,43%	70,12	8675,09 µg/umol
XRCC1 Kodon 194	5'- GCCCCGTCCCAGGTA -3'	15 Baz	73,33%	66,57	4513,96 µg/umol
	5'- AGCCCCAAGACCCTTTCCT -3'	20 Baz	55%	70,3	5981,91 µg/umol
XRCC1 Kodon 399	5'- TCTCCCTTGGTCTCCAACCT -3'	20 Baz	55%	70,3	5954,85 µg/umol
	5'- AGTAGTCTGCTGGCTCTGG -3'	19 Baz	57,89%	69,71	5850,81 µg/umol

## 2.2. Metod

### 2.2.1. İnsan kanından genomik DNA izolasyonu

İnsan kanından genomik DNA izolasyonu için toplanan kanlardan 750 µL kan eppendorf tüplerine aktarıldı. Bu miktarın üzerine 750 µL TKME (Tris-Cl-KCl-MgCl<sub>2</sub>-EDTA) tamponu (pH 7,6) ve 80 µL Triton X-100 eklendi (Bu çözeltilerin hazırlanışları Ek-2' de belirtilmiştir). Bu karışım el yardımıyla 3 kez aşağı-yukarı hareket ettirilerek karıştırıldı. Karıştırmadan sonra oda sıcaklığında 10000xg' de 10 dakika Sigma 1-4 (Sigma Aldrich, Germany) masaüstü santrifüjü kullanılarak karışım 2 faza ayrıştırıldı. Santrifüj işleminden sonra supernatant kısmı mikropipet (Finnepipette) yardımıyla atıldı. Pelet kısmına 750 µL TKME eklenerek 3 kez pelet yıkama işlemi gerçekleştirildi.

Yıkama işleminden sonra arta kalan pelet üzerine 200 µL TKME ve 20 µL %10' luk SDS (Sodyum dodesil sülfat) eklenip vortex ile 8 saniye karıştırıldı. Ardından 60°C' de Pasteur fırınında 10 dakika inkübasyon işlemine tabi tutuldu.

İnkübasyon işleminden sonra karışımın üzerine 75 µL doymuş NaCl (Sodyum klorür) çözeltisi eklenerek 4°C' de 14000xg' de Sigma 1-15K santrifüjüyle 10 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Bu işlem yapılırken yeni steril eppendorflar hazırlandı ve santrifüj işleminden çıkan karışımın supernatant kısmı yeni eppendorflara aktarıldı.

Yeni eppendorflardaki supernatantın üzerine 590 µL %100' lük EtOH (Etil alkol) eklendi. Bu karışım -20°C' de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon işleminden sonra bu karışım 4°C' de 10000xg' de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra supernatant kısmı atılıp üzerine %70' lik EtOH ilave edildi ve 4°C' de 10000xg' de 10 dakika santrifüj edildi. Bu işlemden sonra supernatant kısmı atıldı ve oda sıcaklığında pelet kurumaya bırakıldı.

Kurutma işleminden sonra pelet üzerine 200 µL TE (TrisCl-EDTA) tamponu (pH 8.0) eklenerek 37°C' de Pasteur fırınında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra parçalanmamış genomik DNA izole edildi ve -80°C' de şifreli bir biçimde saklandı.

### **2.2.2. Genomik DNA' nın agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi**

İzole edilen DNA' lar %1' lik agaroz jel hazırlanarak 8 cm x 9 cm tablaya sahip Thermo yatay agaroz jel elektroforezi ile yürütüldü. %1' lik agaroz jel, 0,4 gr agaroz erlende tartılıp üzerine 10X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tamponundan 40 mL 1X' lik TAE tamponu ilave edildi. Bu karışım mikrodalga fırınında kontrollü bir şekilde agaroz çözünene dek ısıtma işlemi gerçekleştirildi.

Çözünme işleminden sonra agaroz solüsyonu soğutularak üzerine 1 µL EtBr (Etidyum bromür) eklendi ve daha önceden kurulmuş elektroforez tablasına dökülerek katı hal oluşuncaya kadar beklendi. Katı hal alan agaroz jel, taraklar çıkarıldıktan sonra elektroforez tankına, kuyucuklar DNA'nın -' den +' ya yürüyebilmesi için elektroforezin (-) kutbuna doğru yerleştirildi.

Elektroforez tankı DNA' yı yürütmek için 250 mL 1X TAE yürütme tamponuyla dolduruldu. Yürütme tamponu tanka jele zarar vermeyecek şekilde dikkatli bir biçimde jelden 1 mm yukarıda olacak şekilde dolduruldu. 6 µL DNA örneği 2 µL yürütme boyası ile muamele edilerek mikropipet ile jelde bulunan kuyucuklara aktarıldı. Elektroforez güç kaynağına bağlandı 90 Volt, maksimum 500 mA de 50 dk süresince yürütüldü. Yürütme bitince jel UV transilluminatörde incelenip DNR LightBis ProImage Analysis System (DNR BioImaging System Ltd. Jerusalem, Israel) cihazında fotoğraflandı.

### **2.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu**

İzolasyonu yapılan DNA' lar polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile çoğaltıldı. Bu amaçla CYP1A1\*2A, CYP2C9\*3, CYP2D6\*2, mEPHX\*3, mEPHX\*4, CYP3A4\*1B, GSTT1, GSTM1, TPMT\*2, TPMT\*3B, TPMT\*3C, XRCC1 kodon 194, XRCC1 kodon 399 genleri için ayrı ayrı polimeraz zincir reaksiyonu için sıcaklık, döngü ve zamanları optimize edildi. Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi Techne Progene (Techne Ltd., Duxford, Cambridge) cihazı ile gerçekleştirildi. Pzr koşulları Tablo 2.3 ve 2.4'te, sıcaklık, döngü ve zamanlar ise Tablo 2.5'te verilmiştir.

Tablo 2. 3 Pzr koşulları

Gen	10X Pzr Tamponu	MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	dNTP Karışımı (10 mM)	İleri Primer (10 pmol)	Geri Primer (10 pmol)	Genomik DNA	Taq Polimeraz (5U/μL)	Steril Ultra Saf Su
<b>CYP1A1*2A</b>	2,5 μL	2 μL	0,75 μL	0,5 μL	0,5 μL	1 μg	0,4 μL	25 μL ye tamamlayana kadar
<b>CYP2C9*3</b>	2,5 μL	1,75 μL	0,75 μL	0,5 μL	0,5 μL	1 μg	0,4 μL	25 μL ye tamamlayana kadar
<b>CYP2D6*2</b>	2,5 μL	2 μL	0,75 μL	0,5 μL	0,5 μL	1 μg	0,4 μL	25 μL ye tamamlayana kadar
<b>mEPH*3</b>	2,5 μL	2 μL	0,75 μL	0,5 μL	0,5 μL	1 μg	0,4 μL	25 μL ye tamamlayana kadar
<b>mEPH*4</b>	2,5 μL	2 μL	0,75 μL	0,5 μL	0,5 μL	1 μg	0,4 μL	25 μL ye tamamlayana kadar
<b>CYP3A4*1B</b>	2,5 μL	2 μL	0,75 μL	0,5 μL	0,5 μL	1 μg	0,4 μL	25 μL ye tamamlayana kadar
<b>TPMT*2</b>	2,5 μL	1 μL	0,75 μL	1 μL	1 μL	1 μg	0,4 μL	25 μL ye tamamlayana kadar
<b>TPMT*3B</b>	2,5 μL	2 μL	0,75 μL	1 μL	1 μL	1 μg	0,4 μL	25 μL ye tamamlayana kadar
<b>TPMT*3C</b>	2,5 μL	1 μL	0,75 μL	1 μL	1 μL	1 μg	0,4 μL	25 μL ye tamamlayana kadar
<b>XRCC1 Kodon 194</b>	2,5 μL	1,5 μL	0,75 μL	0,5 μL	0,5 μL	1 μg	0,4 μL	25 μL ye tamamlayana kadar
<b>XRCC1 Kodon 399</b>	2,5 μL	1,5 μL	0,75 μL	0,5 μL	0,5 μL	1 μg	0,4 μL	25 μL ye tamamlayana kadar

Tablo 2. 4 GST Pzr koşulları

Gen	10X Pzr Tamponu	MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	dNTP Karışımı (10 mM)	İleri Primer T1, M1, CYP1A1 (10 pmol)	Geri Primer T1, M1, CYP1A1 (10 pmol)	Genomik DNA	Taq Polimeraz (5U/μL)	Steril Ultra Saf Su
<b>GST</b>	2,5 μL	2 μL	0,75 μL	1,5 μL	1,5 μL	1 μg	0,4 μL	25 μL ye tamamlayana kadar

Tablo 2. 5 Pzr sıcaklık, döngü ve zamanları

Gen	Başlangıç Denaturasyonu		Denaturasyon		Yapışma		Uzama		Son Uzama	
	°C	Dakika	°C	Saniye	°C	Saniye	°C	Saniye	°C	Dakika
<b>CYP1A1*2A</b>	95	3	94	60	55	90	72	75	72	6
<b>CYP2C9*3</b>	95	3	95	60	59	90	72	120	72	6
<b>CYP2D6*2</b>	95	3	94	45	62	45	72	75	72	6
<b>mEPH*3</b>	95	5	94	60	54	60	72	60	72	10
<b>mEPH*4</b>	95	5	94	60	64	60	72	60	72	10
<b>CYP3A4*1B</b>	95	3	94	45	61	90	72	150	72	6
<b>GST</b>	94	5	94	120	59	60	72	60	72	10
<b>TPMT*2</b>	95	5	94	60	57	120	72	60	72	7
<b>TPMT*3B</b>	95	5	94	60	53	120	72	60	72	7
<b>TPMT*3C</b>	95	5	94	60	55	120	72	60	72	7
<b>XRCC1 Kodon 194</b>	95	3	94	30	61	45	72	45	72	5
<b>XRCC1 Kodon 399</b>	95	3	94	30	57	45	72	45	72	5

#### **2.2.4. PZR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesimi**

MspI, MboII, Mph1103I, HhaI, MwoI, AccI, PvuII, MspI, TthIII, RsaI restriksiyon endonükleazları sırasıyla 1A1\*2A, 3A4\*1B\*, 2C9\*3, 2D6\*2, TPMT\*3B, TPMT\*3C, XRCC1 Kodon 194, XRCC1 Kodon 399, mEPH\*3 ve mEPH\*4 genlerinin polimorfizleri için RFLP analizinde kullanılmıştır.

Tablo 2.6’da PZR ürünlerinin kesim şartları verilmiştir. 8 µL PZR ürünü 2 µL tampon, 10 µL ultra steril saf su ve 2,5 ünite restriksiyon enzimi ile eppendorf tüpün içerisinde 37 °C’de 16 saat inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra genotip analizi için kesim ürünlerine % 2’lik agaroz jel elektroforezi uygulandı.

##### **2.2.4.1. GST’lerin genotip Analizi**

PZR işleminden sonra. homozigot dominant, ve null polimorfizmlerini (polimorfik) belirleyebilmek için %2’ lik agaroz jel elektroforezinde yürütülme işlemi gerçekleştirilmiştir. Görüntüleme sonucunda GSTT1 için 459 bç bir bandın, GSTM1 için 219 bç’lik bir bandın varlığına veya yokluğuna göre sırasıyla homozigot dominant veya null olduğuna karar verilmiştir. CYP 1A1 geni internal kontrol olarak kullanılmıştır 314 bç lik bir bant her zaman gözükmelidir.

##### **2.2.4.2.TPMT\*2’nin Genotip analizi**

PZR işleminden sonra. homozigot dominant, ve null polimorfizmlerini (polimorfik) belirleyebilmek için %2’ lik agaroz jel elektroforezinde yürütülme işlemi gerçekleştirilmiştir. Görüntüleme sonucunda her iki PZR için 254 bç bir bandın varlığına veya yokluğuna göre sırasıyla homozigot dominant veya null olduğuna karar verilmiştir.



Tablo 2. 6 PZR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesim şartları

Gen	Tampon (10x)		PZR Ürünü	Enzim (10 U/μL)		Saf Su
	Adı	Eklenen Hacim	Eklenen Hacim	Adı	Eklenen Hacim	Eklenen Hacim
<b>CYP1A1*2A</b>	TANGO	2 μL	8 μL	MspI	0,25 μL	10 μL
<b>CYP2C9*3</b>	R	2 μL	8 μL	Mph1103I	0,25 μL	10 μL
<b>CYP2D6*2</b>	TANGO	2 μL	8 μL	HhaI	0,25 μL	10 μL
<b>mEPH*3</b>	B	2 μL	8 μL	TthIII	0,25 μL	10 μL
<b>mEPH*4</b>	TANGO	2 μL	8 μL	RsaI	0,25 μL	10 μL
<b>CYP3A4*1B</b>	B	2 μL	8 μL	MboII	0,25 μL	10 μL
<b>TPMT*3B</b>	TANGO	2 μL	8 μL	MwoI	0,25 μL	10 μL
<b>TPMT*3C</b>	B	2 μL	8 μL	AccI	0,25 μL	10 μL
<b>XRCC1 Kodon 194</b>	G	2 μL	8 μL	PvuII	0,25 μL	10 μL
<b>XRCC1 Kodon 399</b>	TANGO	2 μL	8 μL	MspI	0,25 μL	10 μL

### **2.3. İstatistiksel Analiz**

Sağlıklı kontroller ve ülseratif kolitli hastalarda genlerin polimorfizmlerinin genotip, allel frekansları ve haplotip dağılım frekanslarının Sisa (Simple Interactive Statistical Analysis) Online istatistik programında Chi Square ( $\chi^2$ ) ve logistik regression analizi (Odds ratios (ORs) testi; %95 confidence intervals (%95 CIs) yapılmıştır ve  $p < 0,05$  olan değerleri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir.

### **3.BULGULAR**

#### **3.1.1. Çalışma grubu**

CYP1A1\*2A geni için 200, CYP2C9\*3, CYP2D6\*2, mEPHX\*3, mEPHX\*4, CYP3A4\*1B, GSTT1, GSTM1, TPMT\*2, TPMT\*3B, TPMT\*3C, XRCC1 kodon 194, XRCC1 kodon 399 genleri için 130 kan örneği Türk popülasyonuna ait sağlıklı gönüllü bireylerden, CYP1A1\*2A, CYP2C9\*3, CYP2D6\*2 mEPHX\*3, mEPHX\*4, CYP3A4\*1B, GSTT1, GSTM1, TPMT\*2, TPMT\*3B, TPMT\*3C, XRCC1 kodon 194, XRCC1 kodon 399 genleri için 115 kan örneği Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bölümünde Prof. Dr. Necla OSMANOĞLU kontrolünde ülseratif kolit teşhisi konmuş bireylerden alındı ve bu kanlardan DNA izolasyonu yapılarak” PZR-RFLP” tekniğiyle bu genlerin allel dağılımlarına ve odds oranlarına bakıldı.

#### **3.1.2. Hasta grubu**

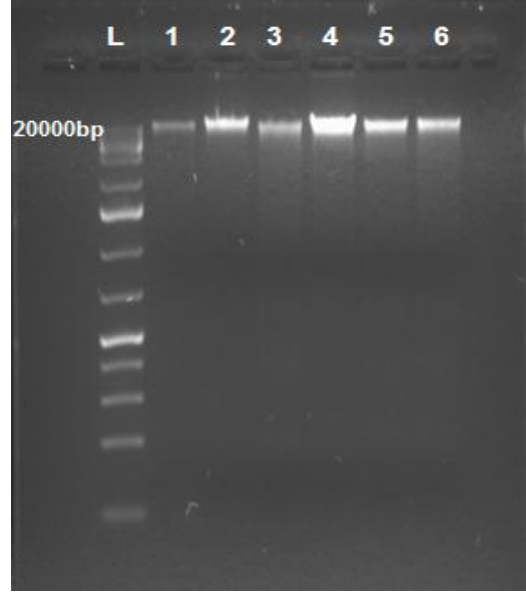
Ülseratif kolitli 115 hastadan 48’i (%41,7) kadın, 67’si (%58,3) erkektir. Hasta grubunun yaş ortalaması 45,69’dur. Erkek hastaların yaş ortalaması 48,74 iken kadın hastaların yaş ortalaması 41,23’tür. Hasta grubunun yaş aralığı ise 18 ile 77 arasında değişmektedir. Tanı öncesi sigara içme oranı %26,1 (30) iken tanı sonrası sigara içme oranı %7,83 (9)’tür. Alkol içme oranı ise tanı öncesi %13,04 (15) iken tanı sonrası %9,57 (11)’dir. Ailesinde inflamatuvar bağırsak hastalığı olanlar %12,17 (14)’dir. Ülseratif kolitten başka kronik rahatsızlığı olanların oranı %33,04 (38)’tür. Tablo 3.1’de hasta grubuna ilişkin bilgiler verilmiştir.

Tablo 3. 1 Hasta grubuna ilişkin bilgiler

Birey Sayısı	Hasta n (%)
Cinsiyet	
Toplam	115
Erkek	67 (58,3)
Kadın	48 (41,7)
Yaş	
Aralık	18-77
Yaş Ortalaması	
Erkek	48,74
Kadın	41,23
Sigara Hikayesi	
Tanı Öncesi İçenler	30 (26,1)
Tanı Sonrası İçenler	9 (7,83)
Alkol Hikayesi	
Tanı Öncesi	15 (13,04)
Tanı Sonrası	11 (9,57)
Ailede İBH Hikayesi	
Var	14 (12,17)
Yok	101 (87,83)
Başka Kronik Rahatsızlık	
Var	38 (33,04)
Yok	77 (66,96)

### 3.2. İnsan Kanından Genomik DNA İzolasyonu ve Analizi

DNA izolasyonu bu çalışmanın en kritik basamağıdır çünkü çalışmanın doğruluğu için DNA'nın parçalanmamış bir biçimde elde edilmesi gerekmektedir. Bu yüzden PZR basamağına sağlıklı bir şekilde geçebilmek için çalışılan her DNA örneğinin agaroz jel elektroforezinde tam bir şekilde görüntülenmesi gerekmektedir. Parçalanmış DNA bu tür çalışmalarda yanıltıcı sonuç oluşturabileceği için tercih edilmez. Şekil 3.1'de izolasyonu yapılan genomik DNA'ların fotoğrafları görüntülenmiştir.

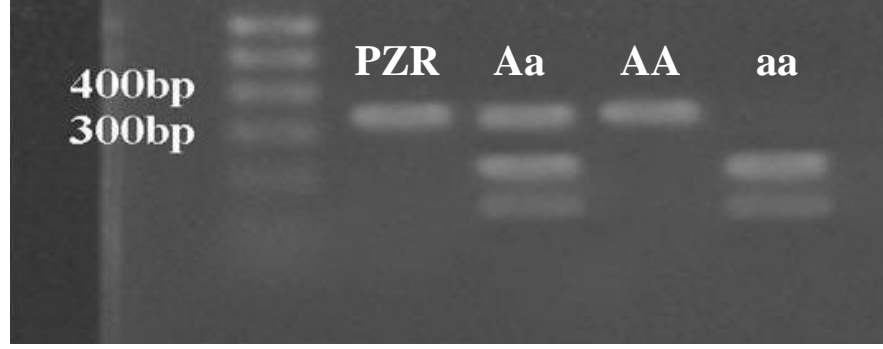


Şekil 3. 1 İzole edilen parçalanmamış genomik DNA' nın %1' lik agaroz jel elektroforezinde tanımlanması.

Her kuyucuğa 6 µL DNA örneği yüklenmiştir ve 50 dk süresince 90 Volt' ta yürütülmüştür. Şekilde 14, 15, 17, 20, 21, 82 numaralı DNA örnekleri görüntülenmiştir.

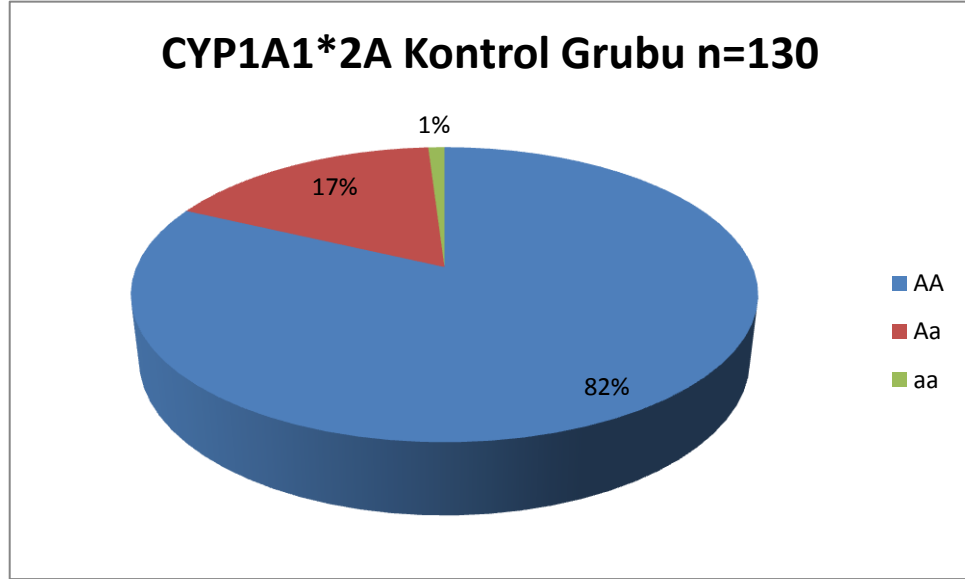
### 3.3.1. CYP1A1\*2A geni polimorfizmiyle ilgili bulgular

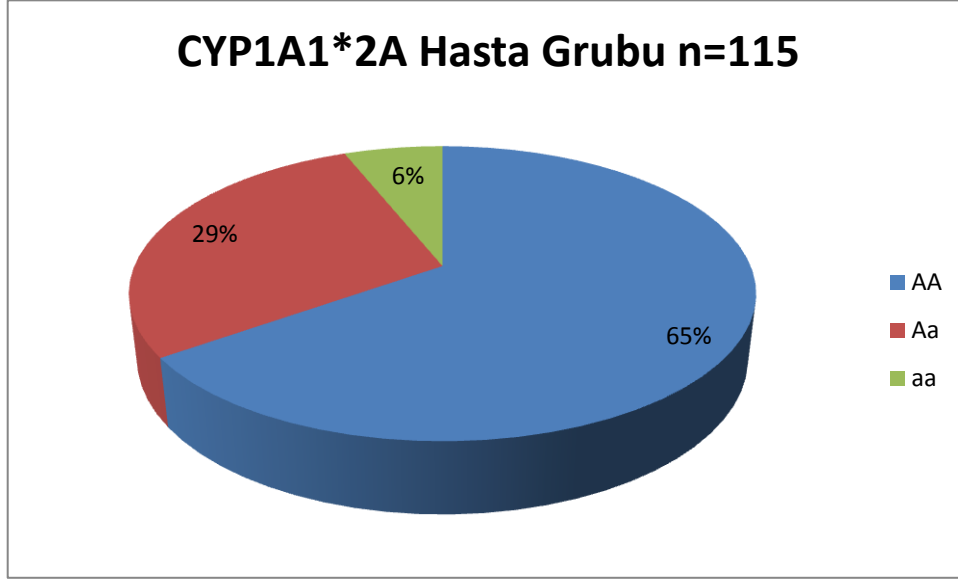
PZR işleminden sonra MspI restriksiyon enzimiyle kesim gerçekleştirildi. 16 saatlik inkübasyon sonrasında homozigot dominant, heterozigot ve homozigot çekinik (polimorfik) genleri belirleyebilmek için %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülme işlemi gerçekleştirildi. Şekil 3.2'de 1A1\*2A geni için homozigot, heterozigot ve polimorfik bireyler görüntülenmiştir. Görüntüleme sonucunda PZR ürünü 340 bç'lik tek bant, homozigot dominant 340 bç'lik tek bant, heterozigot 340, 200 ve 140 bç'lik 3 bant, homozigot resesif (polimorfik) 200 ve 140 bç'lik 2 bant şeklinde bulunmuştur.



Şekil 3. 2 1A1\*2A geninin PZR ve restriksiyon enzimleri ile kesiminin agaroz jelde görüntüsü.

1A1\*2A geni için kontrol grubunda homozigot yaban 164 (%82), heterozigot 34 (%17) ve homozigot çekinik 2 (%1) birey bulunmuştur. Vaka grubunda ise homozigot yaban 75 (%65), heterozigot 33 (%29) ve homozigot çekinik 7 (%6) birey bulunmuştur. Bu verilerden yararlanılarak bu gende polimorfik bireylerin odds oranı 6,42 (%95 CI 1,31<O.R.<31,4308) p değeri 0,00167 olarak hesaplanmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 3.2) (Şekil 3.3.).



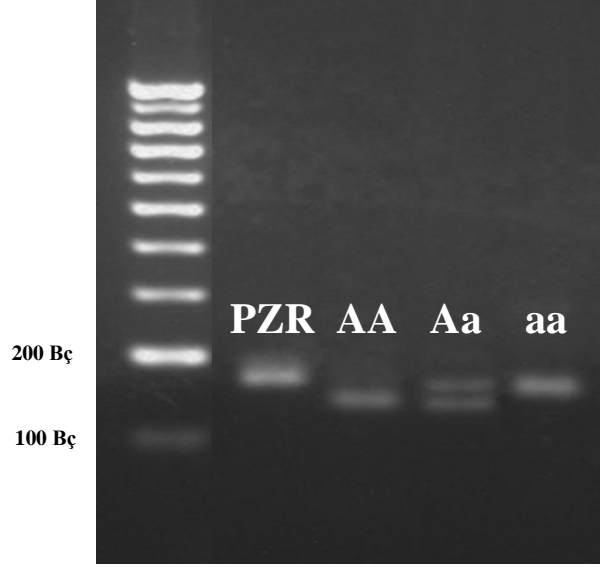


Şekil 3. 3 CYP1A1\*2A için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları

İstatistik olarak anlamlı olan bu gen için hasta analizlerine baktığımızda polimorfik olan 7 bireyin 4 tanesi erkek 3 tanesi kadındır ve cinsiyet bakımında bu genin polimorfizm oranı değişmemektedir. Polimorfik olan 7 birey de hastalık tanısı öncesi ve sonrası sigara veya alkol kullanmamaktadırlar. Bu hastalardan 2 tanesinde ülseratif kolit dışında hipertansiyon vardır. Diğer 5 hastanın ise ülseratif kolit dışında herhangi bir kronik rahatsızlığı yoktur. Polimorfik olan 7 hastadan 2 tanesinin birinci derece akrabalarında inflamatuvar bağırsak hastalığı vardır.

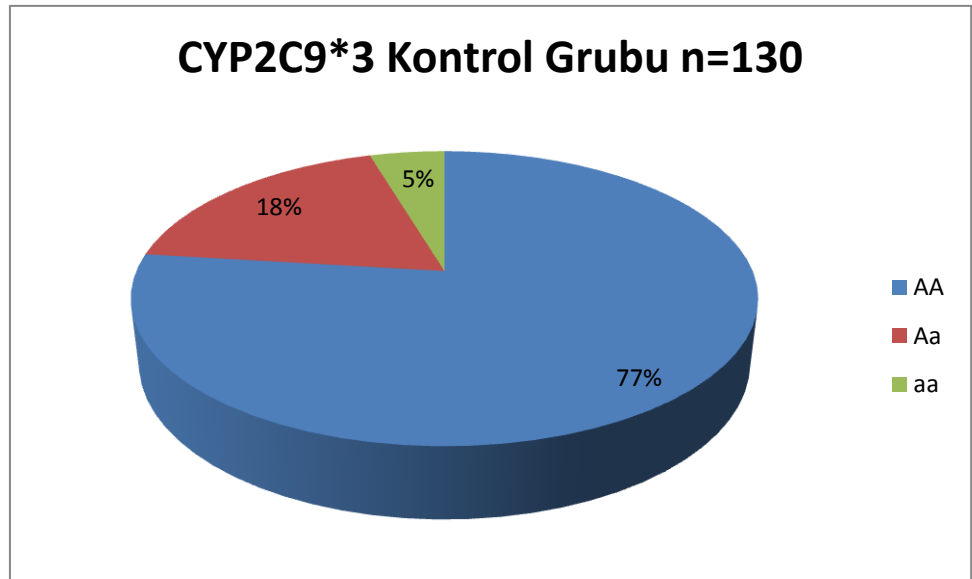
### 3.3.2. CYP2C9\*3 geni polimorfizmiyle ilgili bulgular

PZR işleminden sonra Mph1103I restriksiyon enzimiyle kesim gerçekleştirildi. 16 saatlik inkübasyon sonrasında homozigot dominant, heterozigot ve homozigot çekinik (polimorfik) genleri belirleyebilmek için %2' lik agaroz jel elektroforezinde yürütülme işlemi gerçekleştirildi. Şekil 3.4'de 2C9\*3 geni için homozigot, heterozigot ve polimorfik bireyler görüntülenmiştir. Görüntüleme sonucunda PZR ürünü 165 bç'lik tek bant, homozigot dominant 134 ve 31 bç'lik iki bant, heterozigot 165, 134 ve 31 bç'lik üç bant, homozigot resesif (polimorfik) 165 bç'lik tek bant şeklinde bulunmuştur.

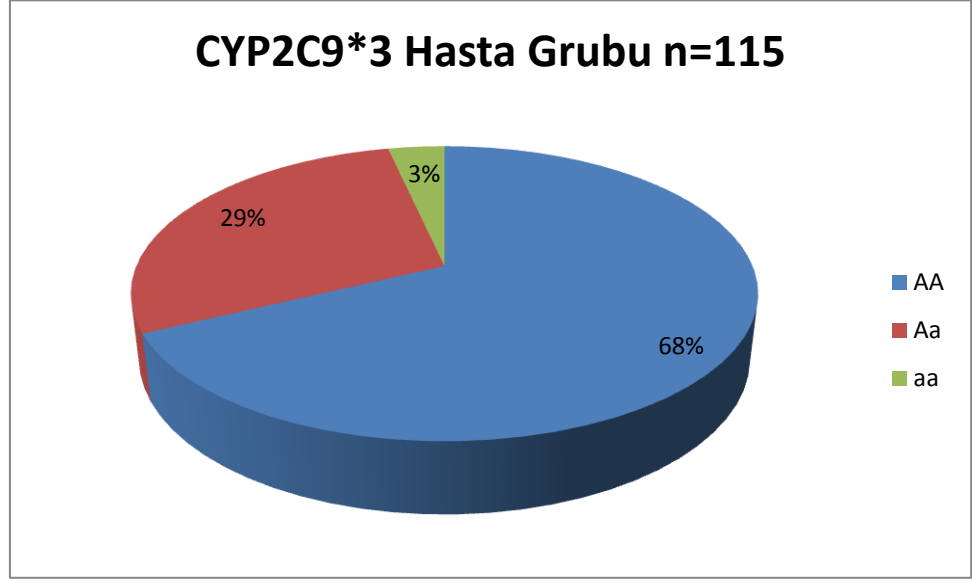


Şekil 3. 4 2C9\*3 geninin PZR ve restriksiyon enzimleri ile kesiminin agaroz jelde görüntüsü.

2C9\*3 geni için kontrol grubunda homozigot yaban 100 (%76,9), heterozigot 24 (%18,5) ve homozigot çekinik 6 (%4,6) birey bulunmuştur. Vaka grubunda ise homozigot yaban 78 (%67,8), heterozigot 33 (%28,7) ve homozigot çekinik 4 (%3,5) birey bulunmuştur. Bu verilerden yararlanılarak bu gende polimorfik bireylerin odds oranı 0,75 (%95 CI 0,2048<O.R.<2,7078) p değeri 0,2313 olarak hesaplanmıştır ve istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir (Tablo 3.2) (Şekil 3.5).





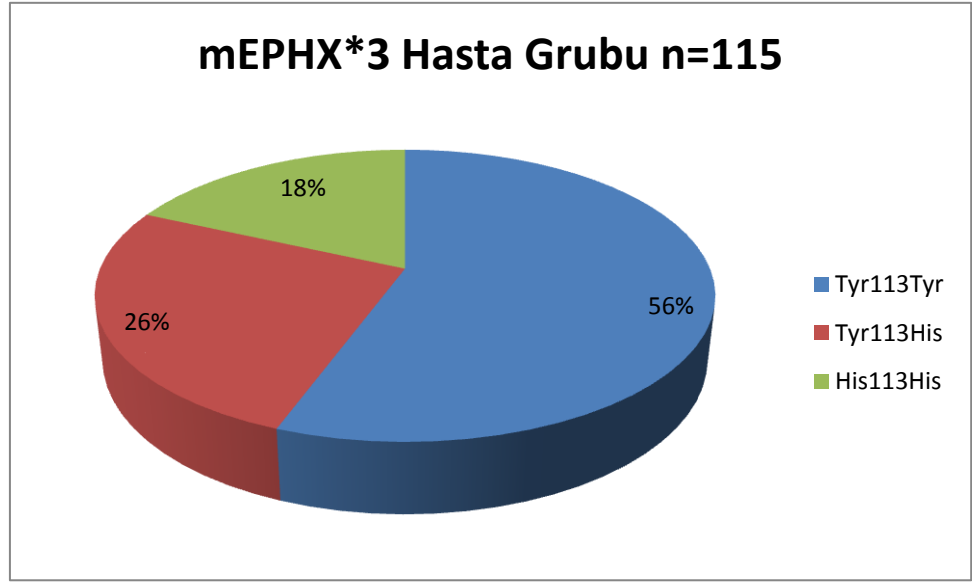
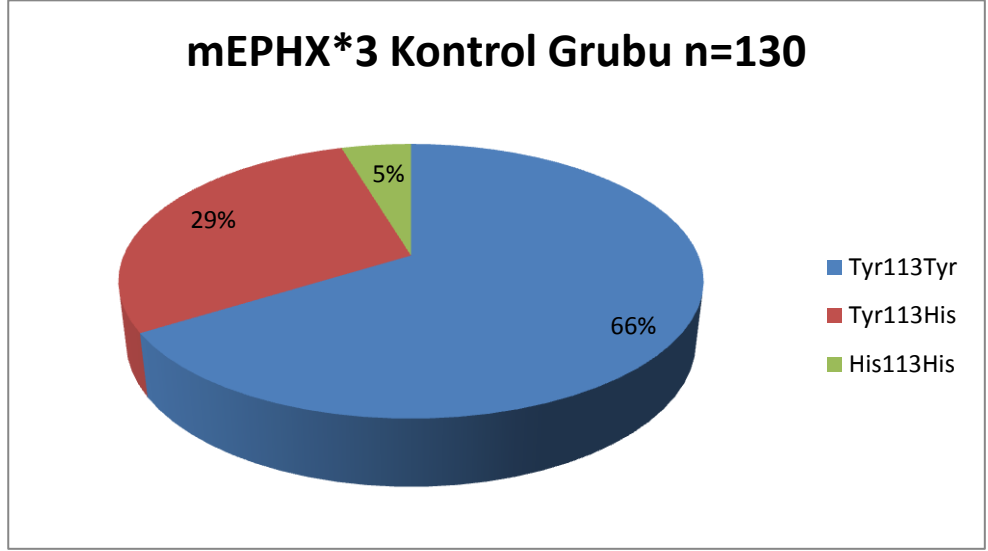


Şekil 3. 5 2C9\*3 için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları

### 3.3.3. mEPHX\*3 geni polimorfizmiyle ilgili bulgular

PZR işleminden sonra TthIII restriksiyon enzimiyle kesim gerçekleştirildi. 16 saatlik inkübasyon sonrasında homozigot dominant, heterozigot ve homozigot çekinik (polimorfik) genleri belirleyebilmek için %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülme işlemi gerçekleştirildi. Görüntüleme sonucunda PZR ürünü 231 bç'lik tek bant, homozigot dominant 231 bç'lik tek bant, heterozigot 231, 209 ve 22 bç'lik üç bant, homozigot resesif (polimorfik) 209 ve 22 bç'lik iki bant şeklinde bulunmuştur. (Şekil 3.8)

mEPHX\*3 geni için kontrol grubunda homozigot yaban 86 (%66,15), heterozigot 38 (%29,23) ve homozigot çekinik 6 (%4,62) birey bulunmuştur. Vaka grubunda ise homozigot yaban 64 (%56,7), heterozigot 30 (%26,1) ve homozigot çekinik 21 (%18,3) birey bulunmuştur. Bu verilerden yararlanılarak bu gende polimorfik bireylerin odds oranı 4,62 (%95 CI 1,7926<O.R.<11,8915) p değeri 0,00047 olarak hesaplanmıştır ve istatistiksel olarak anlamlıdır (Tablo 3.2) (Şekil 3.6).



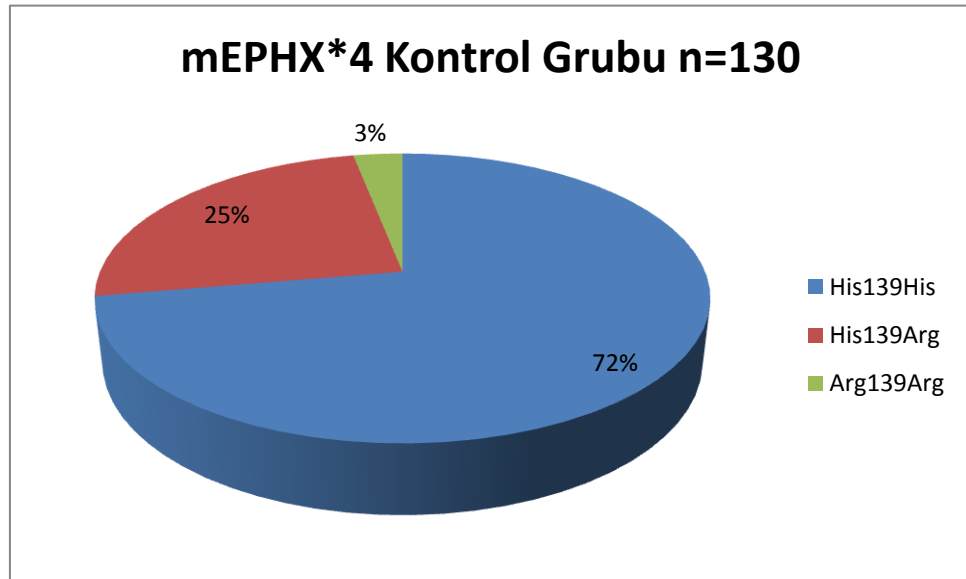
Şekil 3. 6 mEPHX\*3 için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları

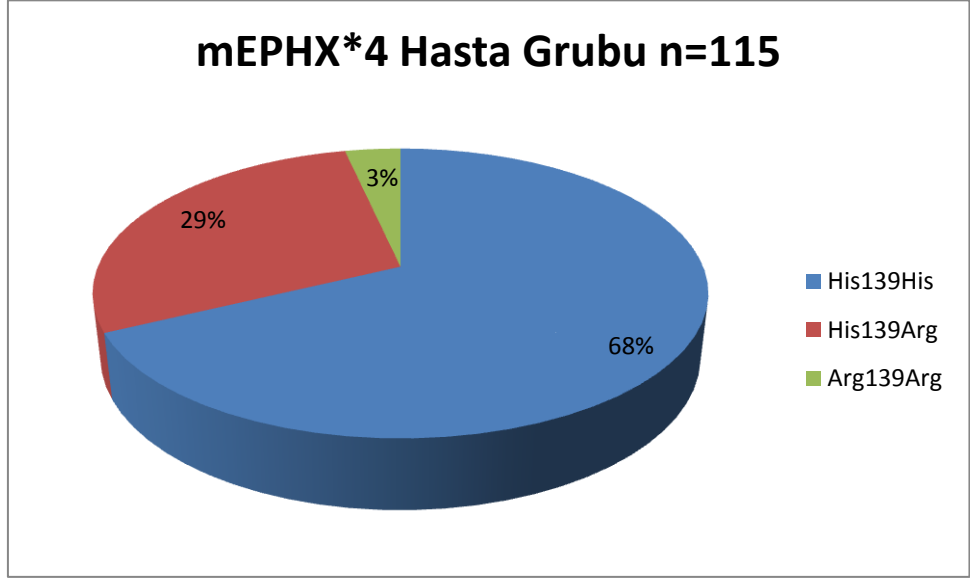
İstatistik olarak anlamlı olan bu gen için hasta analizlerine baktığımızda polimorfik olan 21 bireyin 14 tanesi erkek 7 tanesi kadındır ve cinsiyet bakımından bu genin polimorfizm oranı erkeklerde daha fazladır. Polimorfik olan 21 bireyden 12'si hastalık tanısı öncesi ve sonrası sigara veya alkol kullanmamaktadırlar. 9 bireyden 4'ü alkol, 5'i ise tanı öncesi sigara kullanmışlardır. Bu hastalardan 3 tanesinde ülseratif kolit dışında hipertansiyon, 2'sinde diabet ve 1'inde de ankilozan kolanjit vardır. Diğer 15 hastanın ise ülseratif kolit dışında herhangi bir kronik rahatsızlığı yoktur. Polimorfik olan 21 hastadan 2 tanesinin birinci derece akrabalarında inflamatuvar bağırsak hastalığı vardır.

### 3.3.4. mEPHX\*4 geni polimorfizmiyle ilgili bulgular

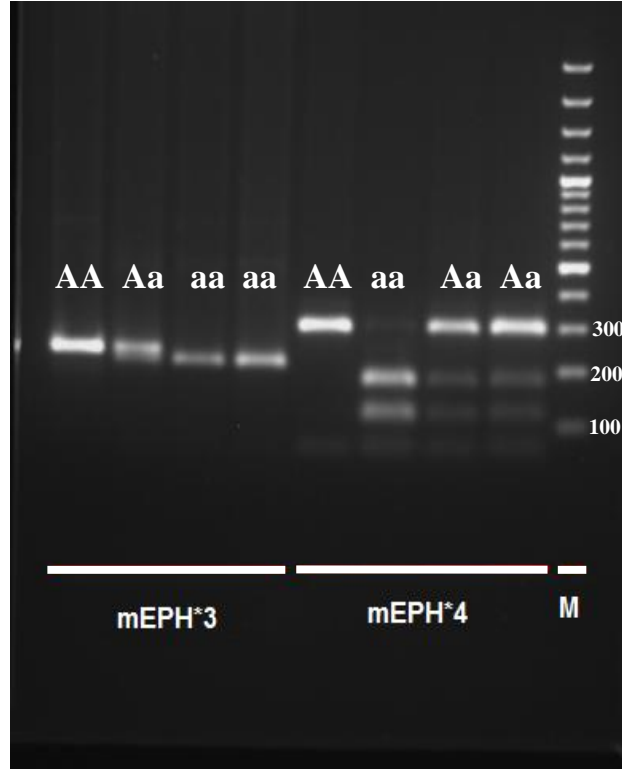
PZR işleminden sonra RsaI restriksiyon enzimiyle kesim gerçekleştirildi. 16 saatlik inkübasyon sonrasında homozigot dominant, heterozigot ve homozigot çekinik (polimorfik) genleri belirleyebilmek için %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülme işlemi gerçekleştirildi. Görüntüleme sonucunda PZR ürünü 357 bç'lik tek bant, homozigot dominant 295 ve 62 bç'lik iki bant, heterozigot 295, 174, 121 ve 62 bç'lik dört bant, homozigot resesif (polimorfik) 174, 121 ve 62 bç'lik üç bant şeklinde bulunmuştur (Şekil 3.8).

mEPHX\*4 geni için kontrol grubunda homozigot yaban 94 (%72,3), heterozigot 32 (%24,6) ve homozigot çekinik 4 (%3,1) birey bulunmuştur. Vaka grubunda ise homozigot yaban 78 (%67,8), heterozigot 33 (%28,7) ve homozigot çekinik 4 (%3,5) birey bulunmuştur. Bu verilerden yararlanılarak bu gende polimorfik bireylerin odds oranı 1,14 ( $0,2774 < O.R. < 4,6458$ ) p değeri ise 0,2738 olarak hesaplanmıştır ve istatistiksel olarak bir anlam ifade etmemektedir. (Tablo 3.2) (Şekil 3.7.)





Şekil 3. 7 mEPHX\*4 için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları



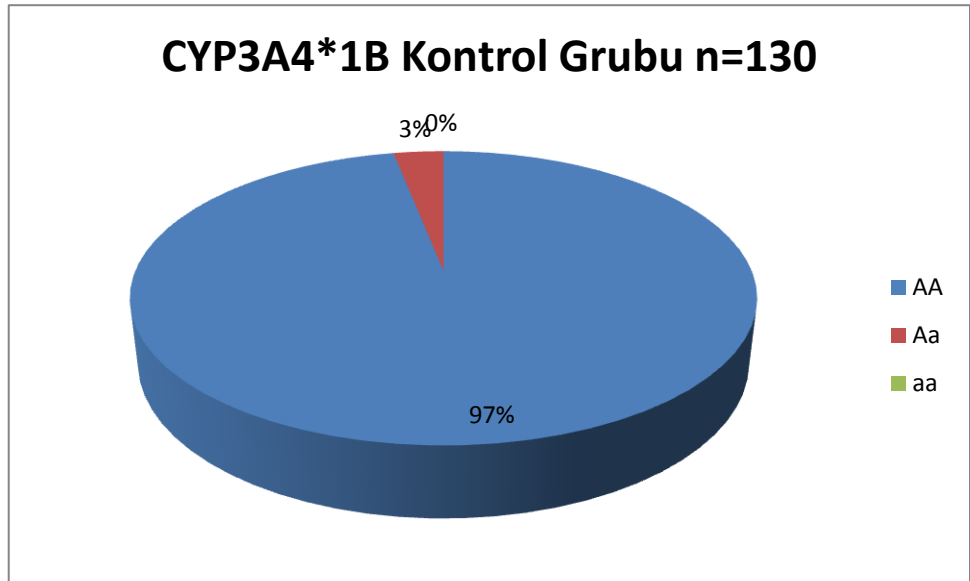
Şekil 3. 8 mEPHX\*3 ve mEPHX\*4 genlerinin ve restriksiyon enzimleri ile kesiminin %2 agaroz jelde görüntüsü.

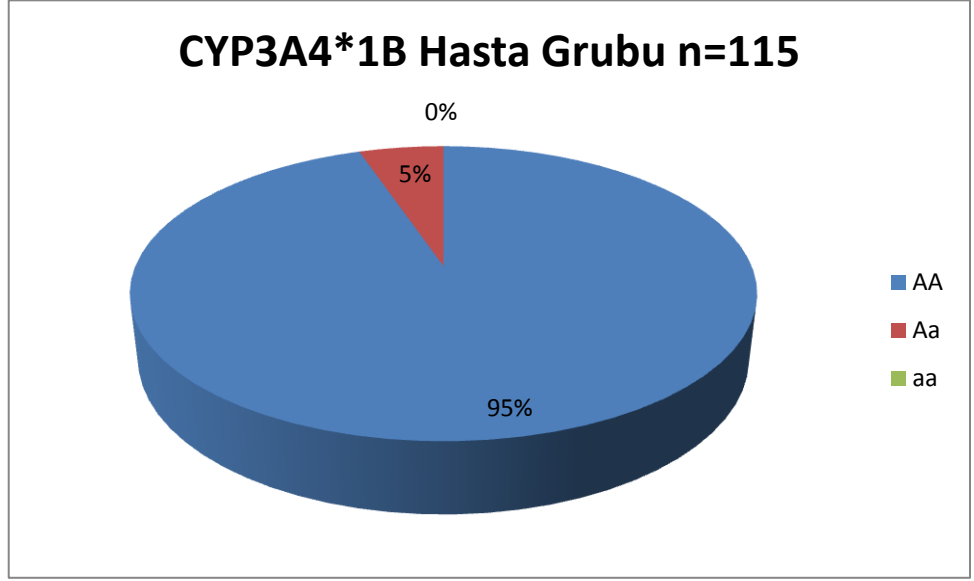
### 3.3.5. CYP3A4\*1B geni polimorfizmiyle ilgili bulgular

PZR işleminden sonra MboII restriksiyon enzimiyle kesim gerçekleştirildi. 16 saatlik inkübasyon sonrasında homozigot dominant, heterozigot ve homozigot

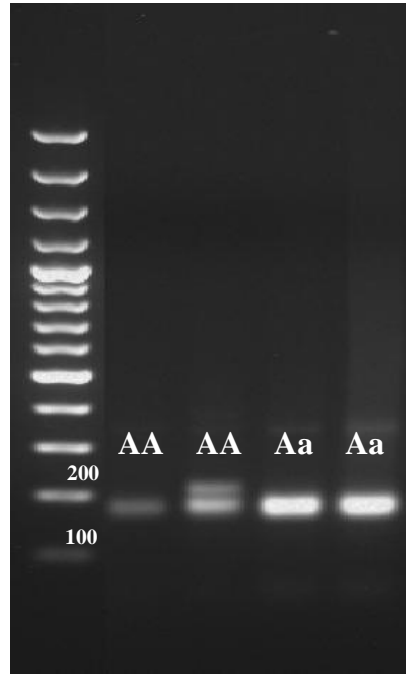
çekinik (polimorfik) genleri belirleyebilmek için %2' lik agaroz jel elektroforezinde yürütülme işlemi gerçekleştirildi. Görüntüleme sonucunda PZR ürünü 385 bç'lik tek bant, homozigot dominant 175, 169 ve 41 bç'lik üç bant, heterozigot 210, 175, 169 ve 41 bç'lik dört bant, homozigot resesif (polimorfik) 210 ve 175 bç'lik iki bant şeklinde bulunmuştur (Şekil 3.10).

3A4\*1B geni için kontrol grubunda homozigot yaban 126 (%97), heterozigot 4 (%3) ve homozigot çekinik 0 (%0) birey bulunmuştur. Vaka grubunda ise homozigot yaban 109 (%94,8), heterozigot 6 (%5,2) ve homozigot çekinik 0 (%0) birey bulunmuştur. Bu verilerden yararlanılarak bu genin hastalık ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (Tablo3.2) (Şekil 3.9).





Şekil 3. 9 3A4\*1B için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları

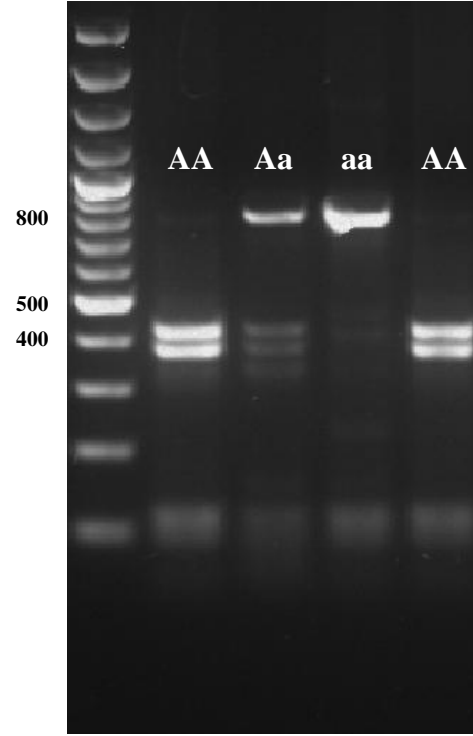


Şekil 3. 10 3A4\*1B geninin restriksiyon enzimleri ile kesiminin %2 agaroz jelde görüntüsü

### 3.3.6. CYP2D6\*2 geni polimorfizmiyle ilgili bulgular

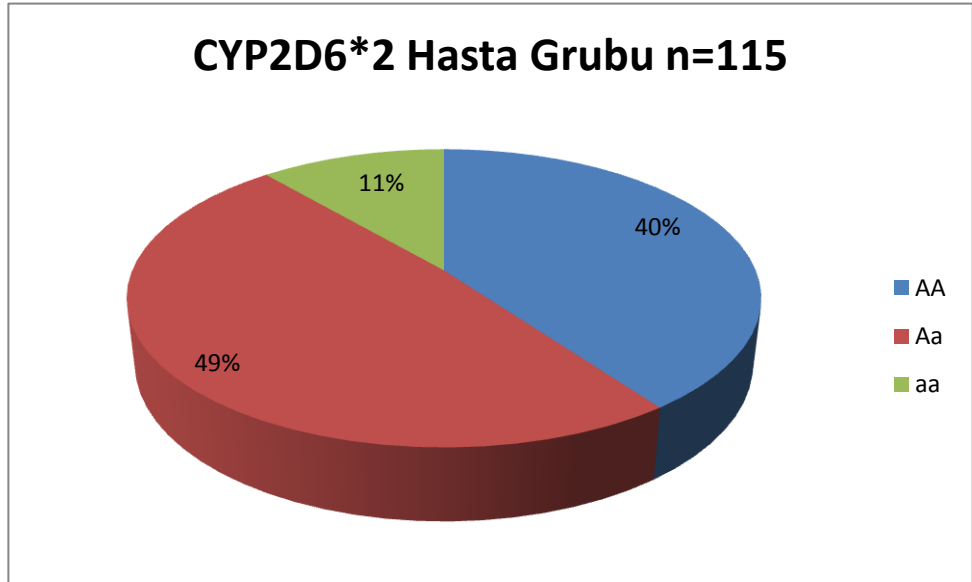
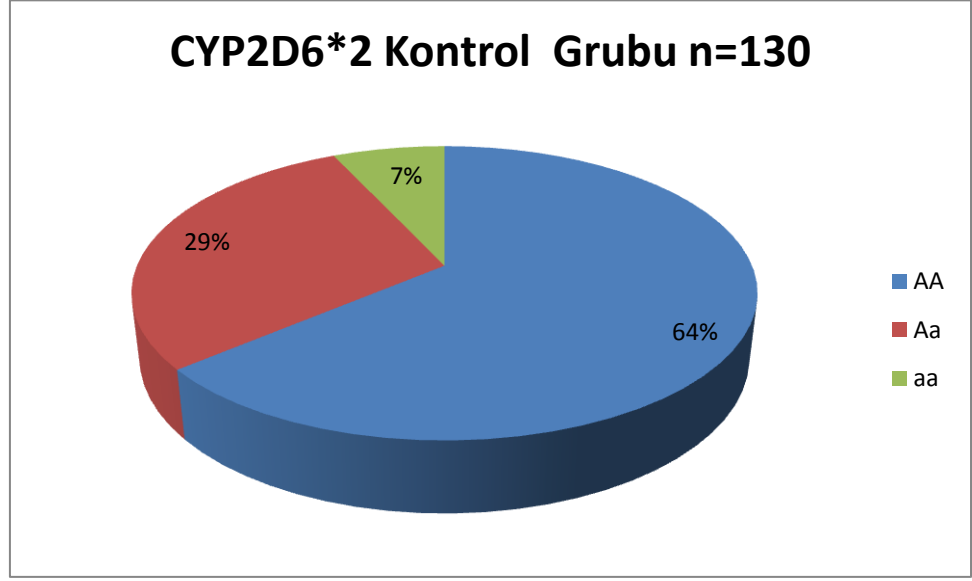
PZR işleminden sonra HhaI restriksiyon enzimiyle kesim gerçekleştirildi. 16 saatlik inkübasyon sonrasında homozigot dominant, heterozigot ve homozigot çekinik (polimorfik) genleri belirleyebilmek için %2' lik agaroz jel elektroforezinde yürütülme işlemi gerçekleştirildi. Görüntüleme sonucunda PZR ürünü 1029 bç'lik

tek bant, homozigot dominant 414, 372, 111, 91 ve 41 bç'lik beş bant, heterozigot 786, 414, 372, 111, 91 ve 41 bç'lik altı bant, homozigot resesif (polimorfik) 786, 111, 91 ve 41 bç'lik dört bant şeklinde bulunmuştur (Şekil 3.11).



Şekil 3. 11 2D6\*2 geninin restriksiyon enzimleri ile kesiminin %2 agaroz jelde görüntüsü

CYP2D6\*2 geni için kontrol grubunda homozigot yaban 83 (%63,85), heterozigot 38 (%29,23) ve homozigot çekinik 9 (%6,92) birey bulunmuştur. Vaka grubunda ise homozigot yaban 46 (%40), heterozigot 56 (%48,70) ve homozigot çekinik 13 (%11,3) birey bulunmuştur. Bu verilerden yararlanılarak bu genin hastalık ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (Tablo3.2) (Şekil 3.12).



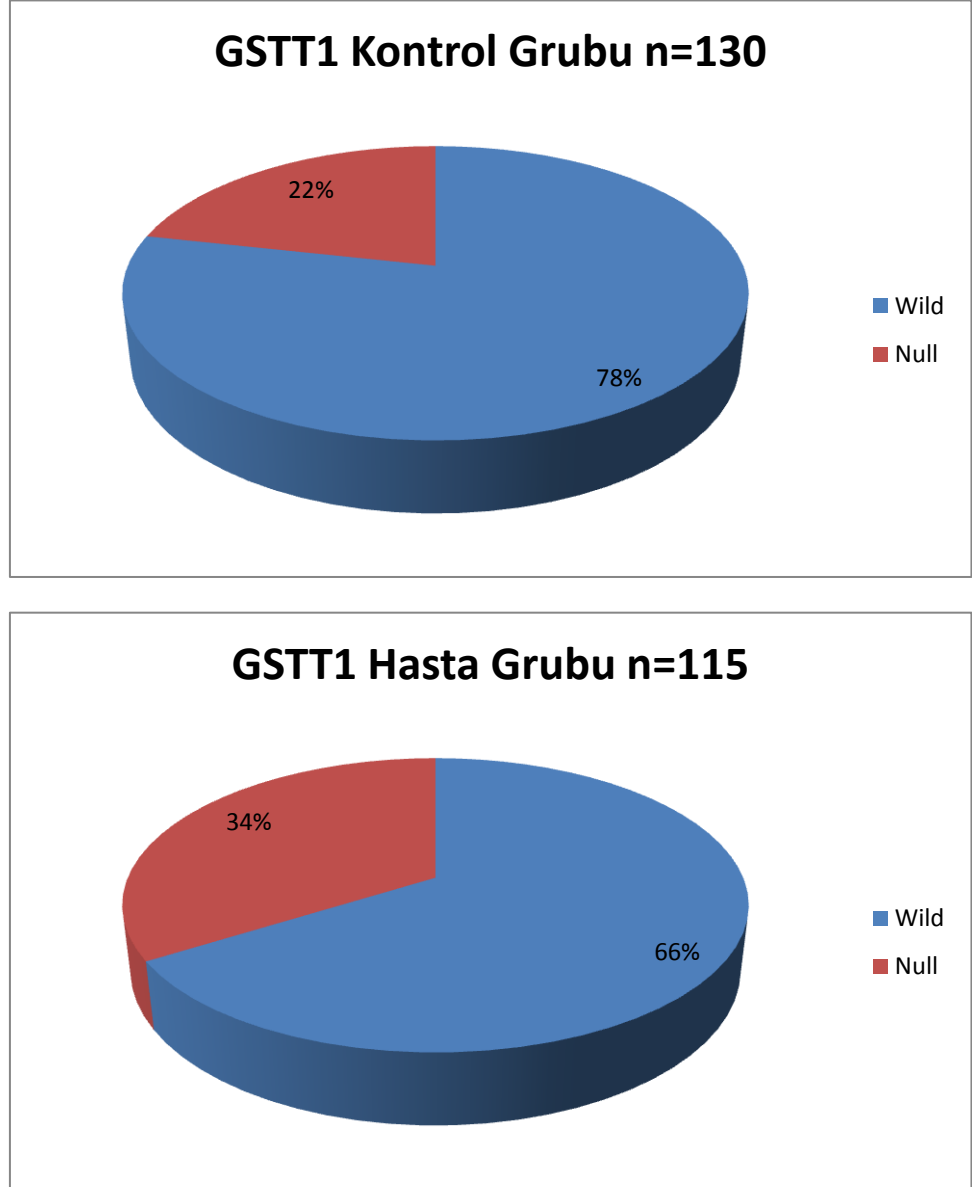
Şekil 3. 12 2D6\*2 için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları

### 3.3.7. GST geni polimorfizmiyle ilgili bulgular

PZR işleminden sonra homozigot dominant, ve null polimorfizmlerini (polimorfik) belirleyebilmek için %2' lik agaroz jel elektroforezinde yürütülme işlemi gerçekleştirildi. Görüntüleme sonucunda GSTT1 için 459 bç bir bandın, GSTM1 için 219 bç'lik bir bandın varlığına veya yokluğuna göre sırasıyla homozigot dominant veya null olduğuna karar verildi. CYP 1A1 geni internal kontrol olarak kullanıldı 314 bç lik bir bant her zaman gözükmelidir (Şekil 3.15).



GSTT1 geni için kontrol grubunda homozigot yaban 102 (%78,46) ve null 28 (%21,54) birey bulunmuştur. Vaka grubunda ise homozigot yaban 76 (%66,1) ve null 39 (%33,9) birey bulunmuştur. Bu verilerden yararlanılarak bu genin odds oranı 1,87 (%95 CI 1,0581<O.R.<3,3027) p değeri 0,0111 olarak hesaplanmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo3.2) (Şekil 3.13)

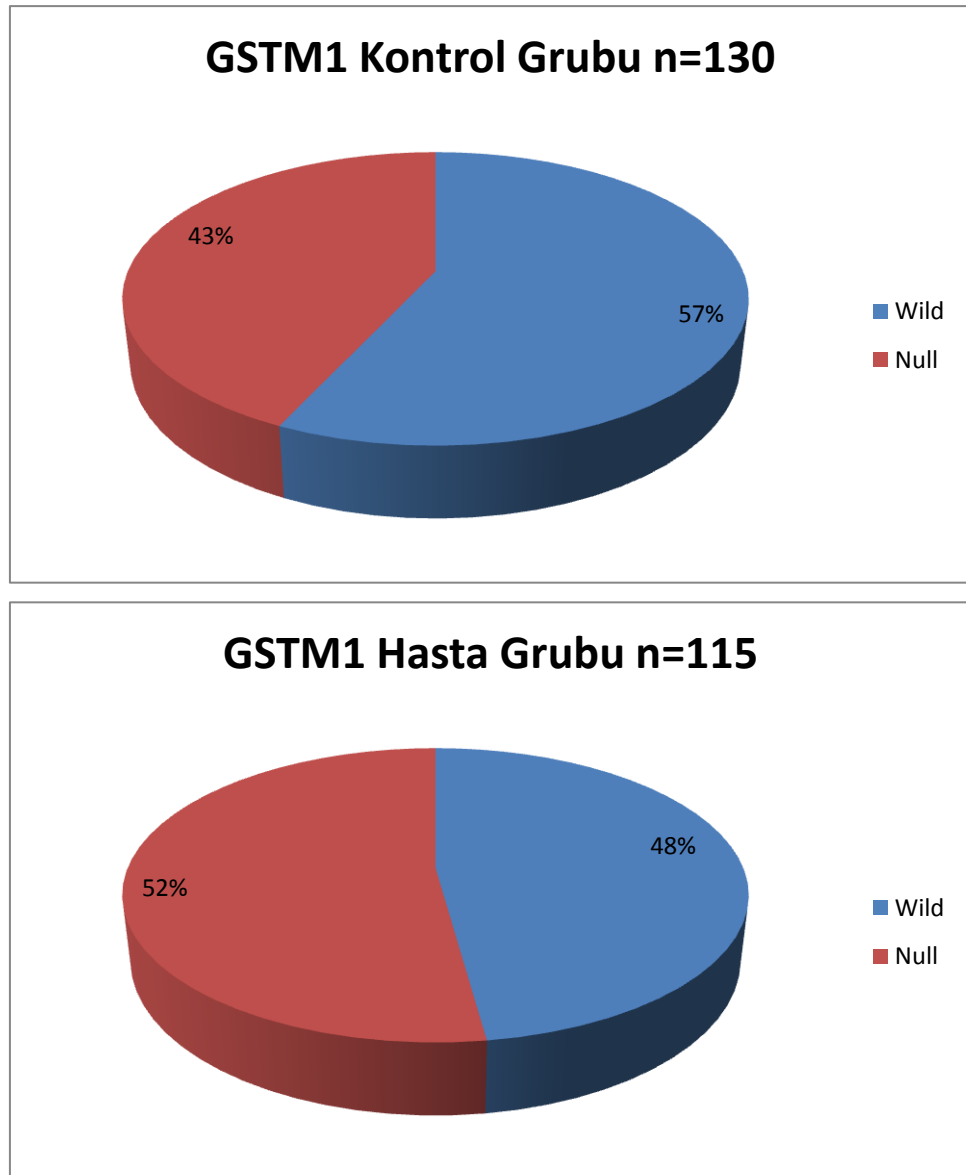


Şekil 3. 13 GSTT1 için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları

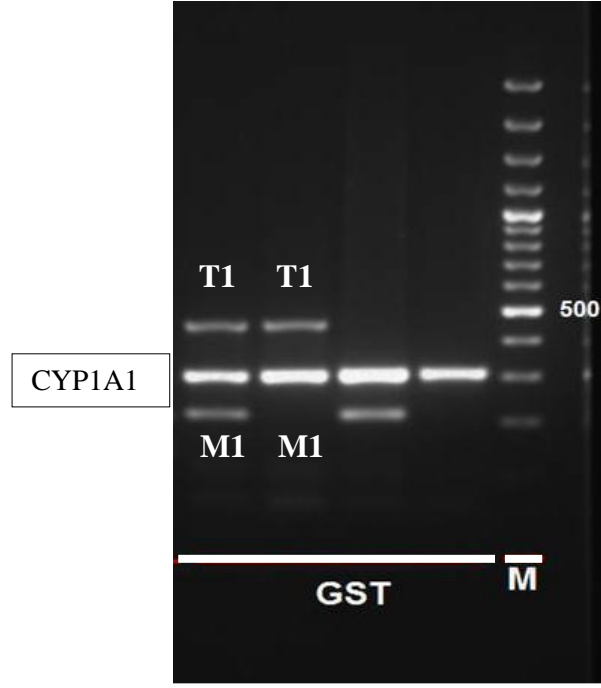
İstatistik olarak anlamlı olan GSTT1 için hasta analizlerine baktığımızda polimorfik olan 39 bireyin 23 tanesi erkek 16 tanesi kadındır ve cinsiyet bakımından bu genin polimorfizm oranı değişmemektedir. Polimorfik olan 39 bireyden 24'ü hastalık tanısı öncesi ve sonrası sigara veya alkol kullanmamaktadırlar. 15 bireyden 6'sı alkol, 9'u ise tanı öncesi sigara kullanmışlardır. Bu hastalardan 14 tanesinde

ülseratif kolit dışında hipertansiyon, diabet ve astım gibi kronik rahatsızlıklar vardır. Diğer 25 hastanın ise ülseratif kolit dışında herhangi bir kronik rahatsızlığı yoktur. Polimorfik olan 39 hastadan 5 tanesinin birinci derece akrabalarında inflamatuvar bağırsak hastalığı vardır.

GSTM1 geni için kontrol grubunda homozigot yaban 74 (%56,92) ve null 56 (%43,08) birey bulunmuştur. Vaka grubunda ise homozigot yaban 55 (%47,8) ve null 60 (%52,2) birey bulunmuştur. Bu verilerden yararlanılarak bu genin odds oranı 1,44 (%95 CI 0,8705<O.R.<2,3871) p değeri 0,0373 olarak hesaplanmıştır ve istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (Tablo 3.2) (Şekil 3.14).



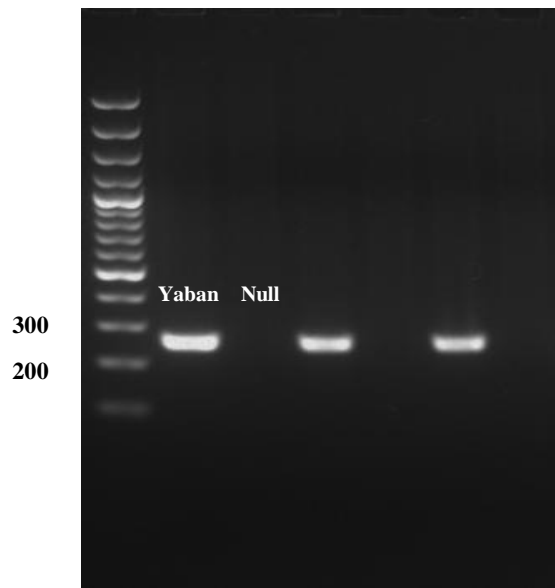
Şekil 3. 14 GSTM1 için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları



Şekil 3. 15 GSTT1 ve GSTM1 genlerinin %2 agaroz jelde görüntüsü.

### 3.3.8. TPMT\*2 geni polimorfizmiyle ilgili bulgular

PZR işleminden sonra. homozigot dominant, ve null polimorfizmlerini (polimorfik) belirleyebilmek için %2' lik agaroz jel elektroforezinde yürütülme işlemi gerçekleştirildi. Görüntüleme sonucunda her iki PZR için 254 bp'lik bir bandın varlığına veya yokluğuna göre sırasıyla homozigot dominant veya null olduğuna karar verilmiştir (Şekil 3.16).

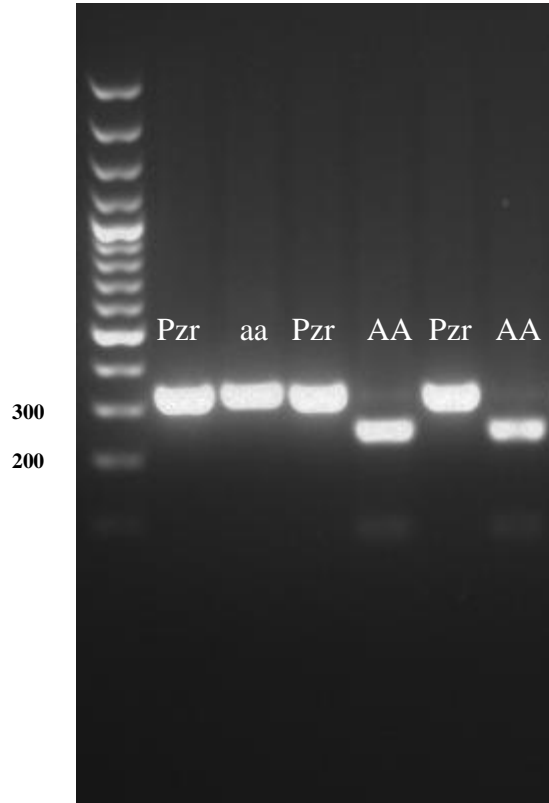


Şekil 3. 16 TPMT\*2 geninin %2 agaroz jelde görüntüsü.

TPMT\*2 geni için kontrol grubunda homozigot yaban 130 (%100), heterozigot 0 (%0) ve homozigot çekinik 0 (%0) birey bulunmuştur. Vaka grubunda ise homozigot yaban 115 (%100), heterozigot 0 (%0) ve homozigot çekinik 0 (%0) birey bulunmuştur. Bu verilerden yararlanılarak bu genin hastalık ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. (Tablo 3.2)

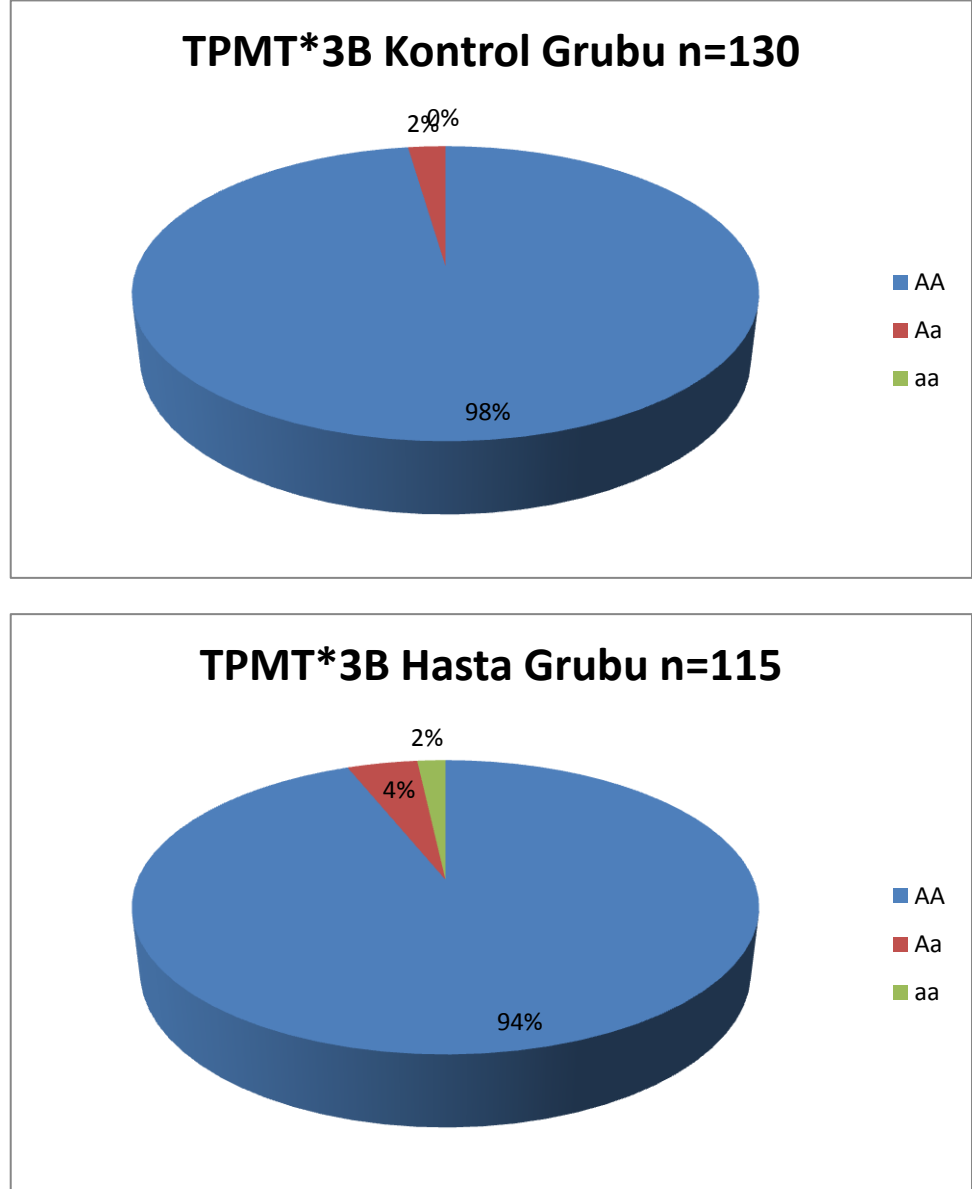
### 3.3.9. TPMT\*3B geni polimorfizmiyle ilgili bulgular

PZR işleminden sonra MwoI restriksiyon enzimiyle kesim gerçekleştirildi. 16 saatlik inkübasyon sonrasında homozigot dominant, heterozigot ve homozigot çekinik (polimorfik) genleri belirleyebilmek için %2' lik agaroz jel elektroforezinde yürütülme işlemi gerçekleştirildi. Görüntüleme sonucunda PZR ürünü 317 bç'lik tek bant, homozigot dominant 240 ve 77 bç'lik iki bant, heterozigot 317, 240 ve 77 bç'lik üç bant, homozigot resesif (polimorfik) 317 bç'lik tek bant şeklinde bulunmuştur (Şekil 3.17).



Şekil 3. 17 TPMT\*3B geninin restriksiyon enzimi ile kesiminin %2 agaroz jelde görüntüsü.

TPMT\*3B geni için kontrol grubunda homozigot yaban 127 (%97,69), heterozigot 3 (%2,31) ve homozigot çekinik 0 (%0) birey bulunmuştur. Vaka grubunda ise homozigot yaban 108 (%93,9), heterozigot 5 (%4,3) ve homozigot çekinik 2 (%1,2) birey bulunmuştur. Bu verilerden yararlanılarak bu genin hastalık ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (Tablo 3.2) (Şekil 3.18).

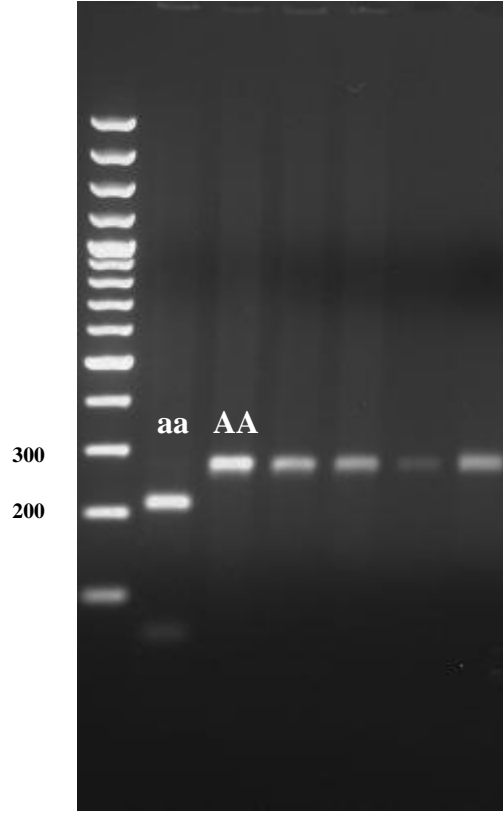


Şekil 3. 18 TPMT\*3B için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları

### 3.3.10. TPMT\*3C geni polimorfizmiyle ilgili bulgular

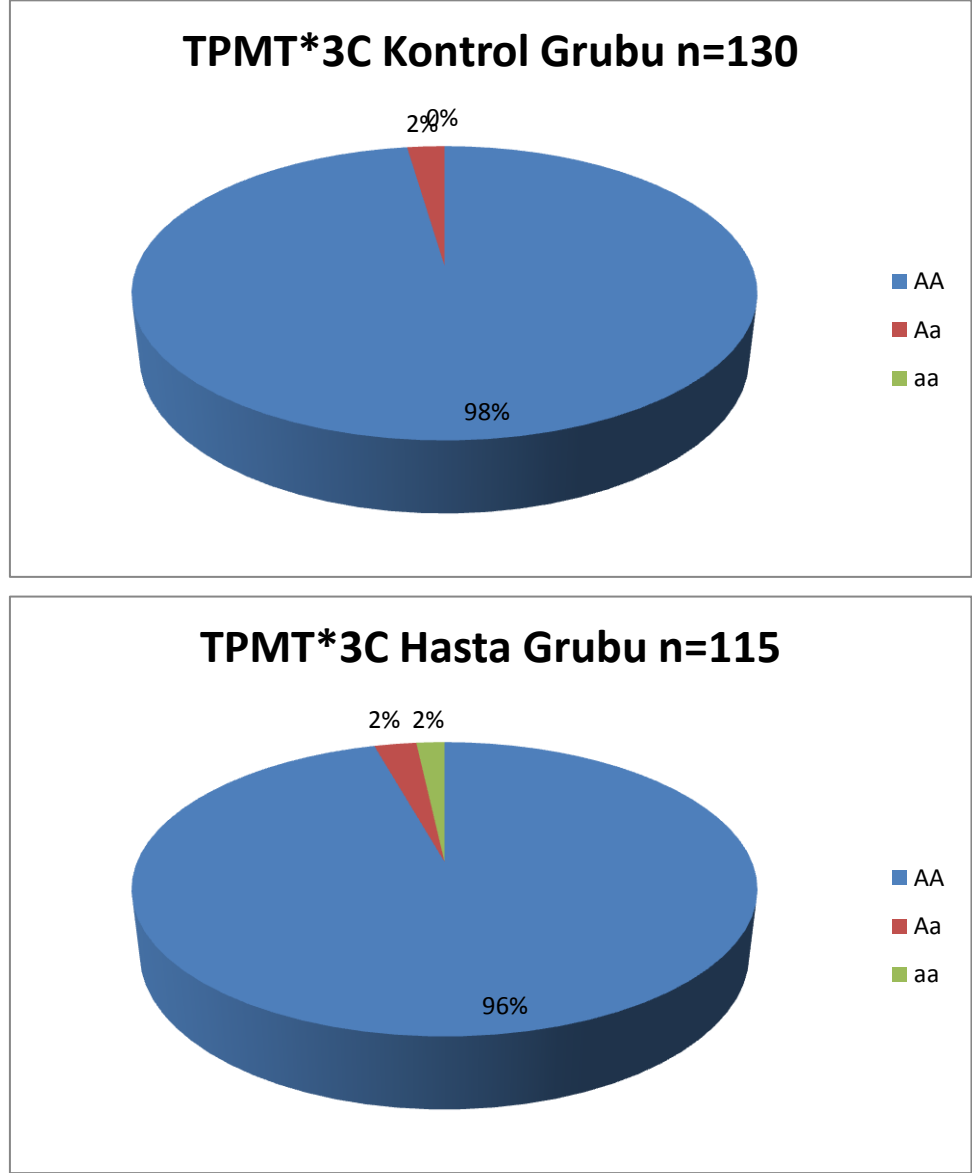
PZR işleminden sonra AccI restriksiyon enzimiyle kesim gerçekleştirildi. 16 saatlik inkübasyon sonrasında homozigot dominant, heterozigot ve homozigot çekinik (polimorfik) genleri belirleyebilmek için %2' lik agaroz jel elektroforezinde yürütülme işlemi gerçekleştirildi. Görüntüleme sonucunda PZR ürünü 293 bç'lik tek

bant, homozigot dominant 293 bç'lik tek bant, heterozigot 293, 207 ve 86 bç'lik üç bant, homozigot resesif (polimorfik) 207 ve 86 bç'lik iki bant şeklinde bulunmuştur (Şekil 3.19).



Şekil 3. 19 TPMT\*3C geninin restriksiyon enzimi ile kesiminin %2 agaroz jelde görüntüsü.

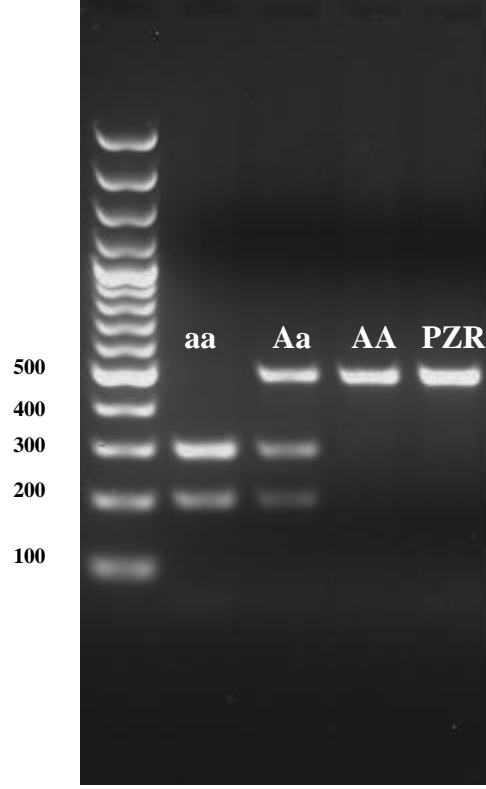
TPTM\*3C geni için kontrol grubunda homozigot yaban 127 (%97,69), heterozigot 3 (%2,31) ve homozigot çekinik 0 (%0) birey bulunmuştur. Vaka grubunda ise homozigot yaban 110 (%95,7), heterozigot 3 (%2,6) ve homozigot çekinik 2 (%1,7) birey bulunmuştur. Bu verilerden yararlanılarak bu genin hastalık ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (Tablo3.2) (Şekil 3.20).



Şekil 3. 20 TPMT\*3C için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları

### 3.3.11. XRCC1 Kodon 194 geni polimorfizmiyle ilgili bulgular

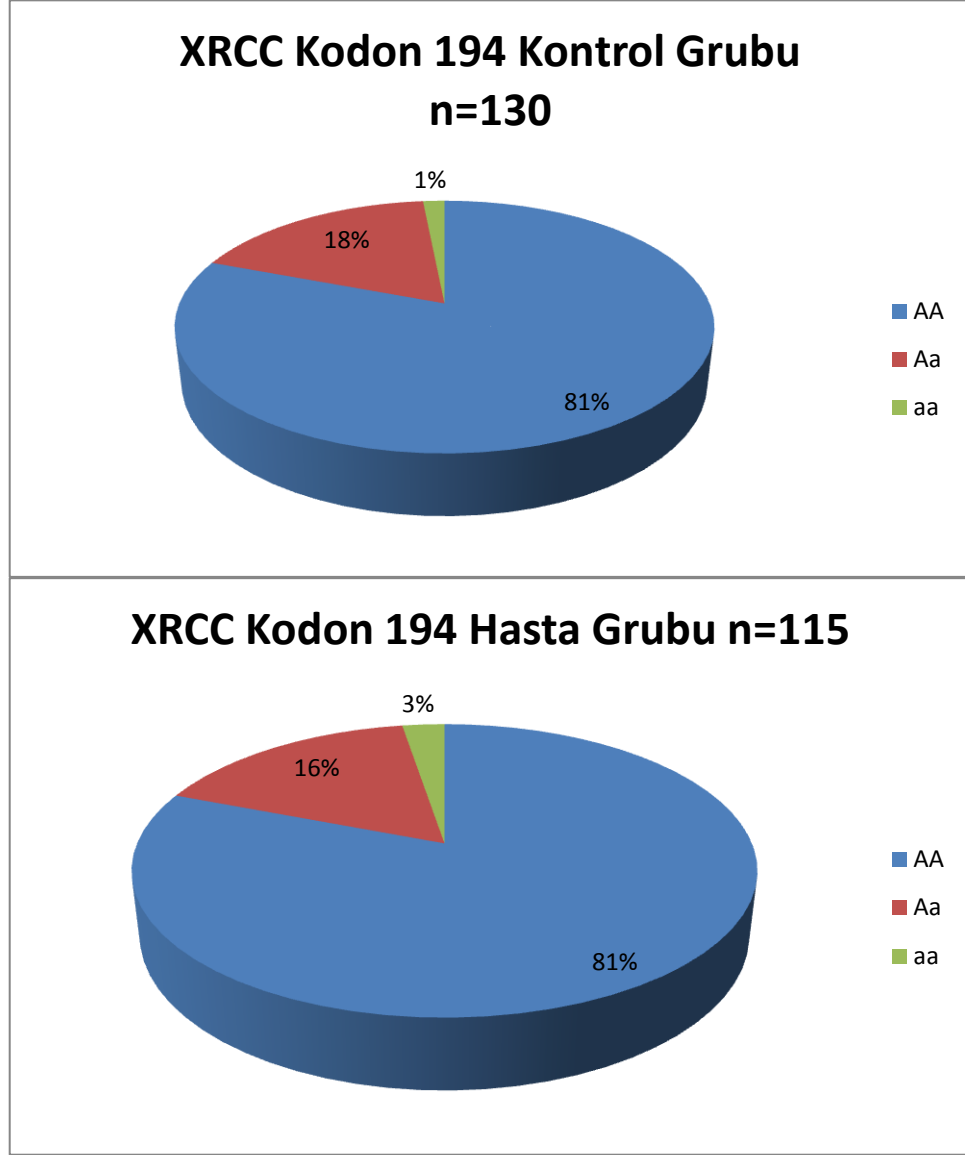
PZR işleminden sonra PvuII restriksiyon enzimiyle kesim gerçekleştirildi. 16 saatlik inkübasyon sonrasında homozigot dominant, heterozigot ve homozigot çekinik (polimorfik) genleri belirleyebilmek için %2' lik agaroz jel elektroforezinde yürütülme işlemi gerçekleştirildi. Görüntüleme sonucunda PZR ürünü 490 bç'lik tek bant, homozigot dominant 490 bç'lik tek bant, heterozigot 490, 294 ve 196 bç'lik üç bant, homozigot resesif (polimorfik) 294 ve 196 bç'lik iki bant şeklinde bulunmuştur (Şekil 3.21).



Şekil 3. 21 XRCC1 kodon 194 geninin restriksiyon enzimi ile kesiminin %2 agaroz jelde görüntüsü.

XRCC1 Kodon 194 geni için kontrol grubunda homozigot yaban 105 (%80,8), heterozigot 23 (%17,7) ve homozigot çekinik 2 (%1,5) birey bulunmuştur. Vaka grubunda ise homozigot yaban 93 (%80,9), heterozigot 19 (%16,5) ve homozigot çekinik 3 (%2,6) birey bulunmuştur. Bu verilerden yararlanılarak bu genin odds oranı 1,71 (%95 CI 0,2814<O.R.<10,4448) p değeri 0,2933 olarak hesaplanmıştır ve istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (Tablo3.2) (Şekil 3.22).

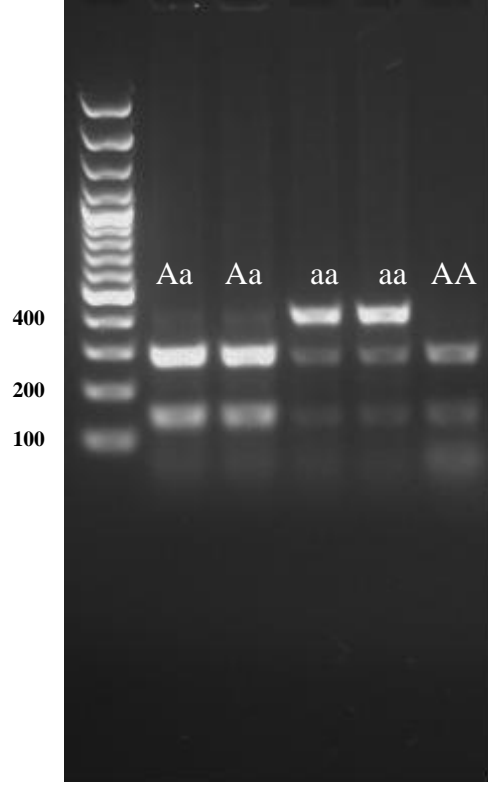




Şekil 3. 22 XRCC Kodon 194 için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları

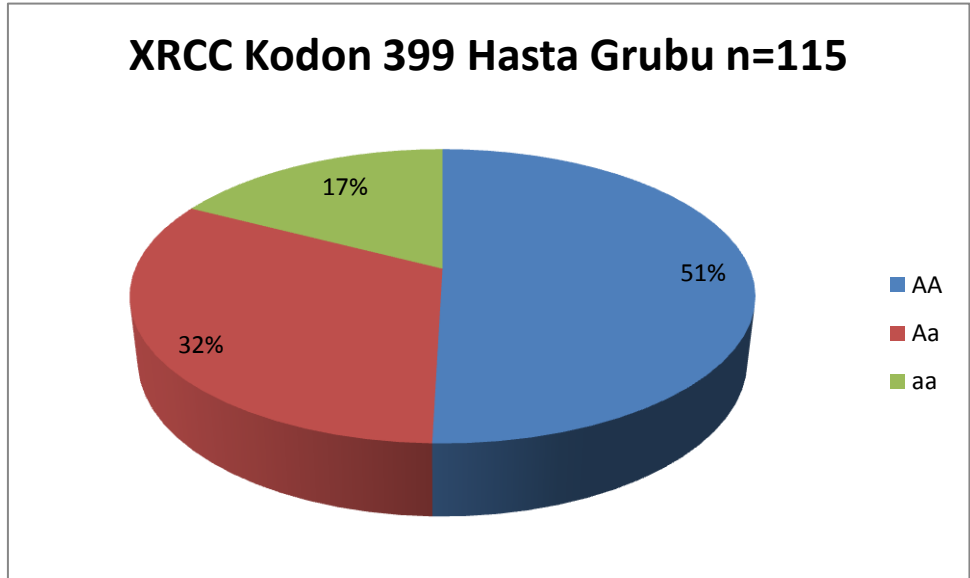
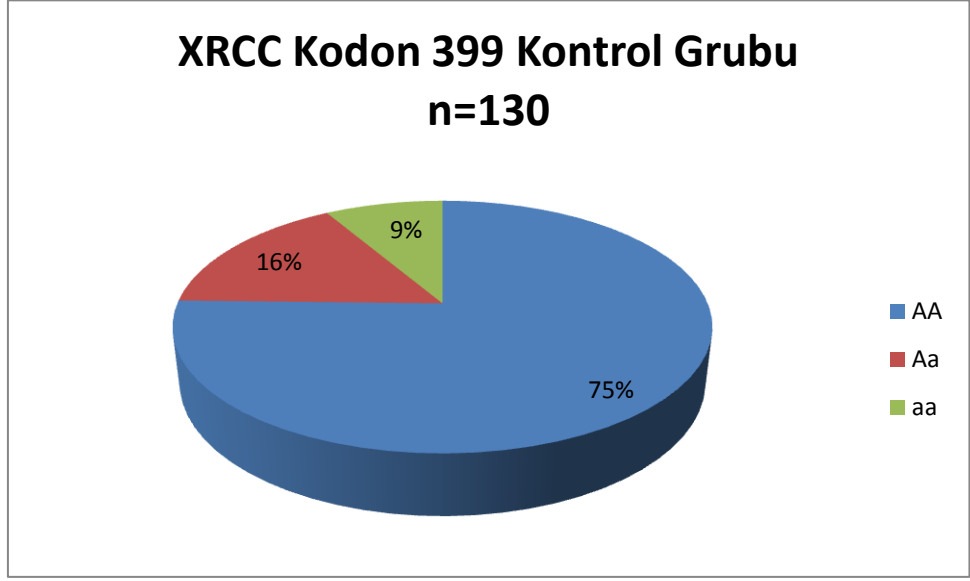
### 3.3.12. XRCC1 Kodon 399 geni polimorfizmiyle ilgili bulgular

PZR işleminden sonra MspI restriksiyon enzimiyle kesim gerçekleştirildi. 16 saatlik inkübasyon sonrasında homozigot dominant, heterozigot ve homozigot çekinik (polimorfik) genleri belirleyebilmek için %2' lik agaroz jel elektroforezinde yürütülme işlemi gerçekleştirildi. Görüntüleme sonucunda PZR ürünü 402 bç'lik tek bant, homozigot dominant 269 ve 133 bç'lik iki bant, heterozigot 402, 269 ve 133 bç'lik üç bant, homozigot resesif (polimorfik) 402 bç'lik tek bant şeklinde bulunmuştur (Şekil 3.23).



Şekil 3. 23 XRCC1 kodon 399 geninin restriksiyon enzimi ile kesiminin %2 agaroz jelde görüntüsü.

XRCC1 Kodon 399 geni için kontrol grubunda homozigot yaban 98 (%75,4), heterozigot 21 (%16,2) ve homozigot çekinik 11 (%8,4) birey bulunmuştur. Vaka grubunda ise homozigot yaban 58 (%50,4), heterozigot 37 (%32,2) ve homozigot çekinik 20 (%17,4) birey bulunmuştur. Bu verilerden yararlanılarak bu genin odds oranı 2,28 (%95 CI 1,0403<O.R.<4,9863) olarak hesaplanmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo3.2) (Şekil 3.24).



Şekil 3. 24 XRCC kodon 399 için hasta ve kontrol grubunda allel dağılımları

İstatistik olarak anlamlı olan XRCC-399 için hasta analizlerine baktığımızda polimorfik olan 20 bireyin 10 tanesi erkek 10 tanesi kadındır ve cinsiyet bakımından bu genin polimorfizm oranı değişmemektedir. Polimorfik olan 20 bireyden 17'si hastalık tanısı öncesi ve sonrası sigara veya alkol kullanmamaktadırlar. 3 bireyden 1'i alkol, 2'si ise tanı öncesi sigara kullanmışlardır. Bu hastaların 8 tanesinde ülseratif kolit dışında hipertansiyon, diabet ve sklorozan kolanjit gibi kronik rahatsızlıklar vardır. Diğer 12 hastanın ise ülseratif kolit dışında herhangi bir kronik rahatsızlığı yoktur. Polimorfik olan 20 hastadan 5 tanesinin birinci derece akrabalarında inflamatuvar bağırsak hastalığı vardır.

Tablo 3. 2 1A1\*2A, 2C9\*3, mEPH\*3, mEPH\*4, 3A4\*1B, GSTT1, GSTM1, TPMT\*2, TPMT\*3B, TPMT\*3C, XRCC1 kodon 194, XRCC1 kodon 399 genlerinin allel dağılımları (%) ve odss oranları

Polimorfizm	Genotip	Kontrol n (%)	Hasta n (%)	O.R.	%95 CI	P Değeri
CYP1A1*2A	T/T	164 (82)	75 (65,2)			
	T/C	34 (17)	33 (28,7)	<b>2,12*</b>	1,2228<O.R.<3,6837	0,003244
	C/C	2 (1)	7 (6,1)	<b>6,42*</b>	1,31<O.R.<31,4308	0,001671
CYP2C9*3	wt/wt	100 (76,92)	78 (67,8)			
	wt/mt	24 (18,46)	33 (28,7)	1,76	0,9641<O.R.<3,2232	0,022119
	mt/mt	6 (4,62)	4 (3,5)	0,75	0,2048<O.R.<2,7078	0,231262
CYP2D6*2	wt/wt	83 (63,85)	46 (40)			
	wt/mt	38 (29,23)	56 (48,70)	2,66	1,538 <O.R.< 4,596	0,0004
	mt/mt	9 (6,92)	13 (11,3)	1,56	0,642 <O.R.< 3,792	0,322879
mEPHX*3	Tyr/Tyr	86 (66,15)	64 (55,7)			
	Tyr/His	38 (29,23)	30 (26,1)	1,06	0,5953<O.R.<1,8905	0,114786
	His/His	6 (4,62)	21 (18,2)	<b>4,62*</b>	1,7926<O.R.<11,8915	0,00047
mEPHX*4	His/His	94 (72,3)	78 (67,8)			
	His/Arg	32 (24,6)	33 (28,7)	1,24	0,7018<O.R.<2,2008	0,08782
	Arg/Arg	4 (3,1)	4 (3,5)	1,14	0,2774<O.R.<4,6458	0,273755
CYP3A4*1B	wt/wt	126 (96,9)	109 (94,8)			
	wt/mt	4 (3,1)	6 (5,2)	1,73	0,4769<O.R.<6,3047	0,179283
	mt/mt	0	0			
GSTT1	Homozigot	102 (78,46)	76 (66,1)			
	Null	28 (21,54)	39 (33,9)	<b>1,87*</b>	1,0581<O.R.<3,3027	0,011071
GSTM1	Homozigot	74 (56,92)	55 (47,8)			
	Null	56 (43,08)	60 (52,2)	1,44	0,8705<O.R.<2,3871	0,037285
TPMT*2	wt/wt	130 (100)	115 (100)			
	wt/mt	0 (0)	0 (0)	-	-	-
	mt/mt	0 (0)	0 (0)	-	-	-
TPMT*3B	wt/wt	127 (97,69)	108 (93,9)			
	wt/mt	3 (2,31)	5(4,4)	1,96	0,4578<O.R.<8,3903	0,187104
	mt/mt	0 (0)	2 (1,7)	-	-	-
TPMT*3C	wt/wt	127 (97,69)	110 (95,7)			
	wt/mt	3 (2,31)	3 (2,6)	1,15	0,2284<O.R.<5,8373	0,311722
	mt/mt	0 (0)	2 (1,7)	-	-	-
XRCC1 Kodon 194	Arg/Arg	105 (80,8)	93 (80,9)			
	Arg/Trp	23 (17,7)	19 (16,5)	0,93	0,4779<O.R.<1,8202	0,132468
	Trp/Trp	2 (1,5)	3 (2,6)	1,71	0,2814<O.R.<10,4448	0,293237
XRCC1 Kodon 399	Arg/Arg	98 (75,4)	58 (50,4)			
	Arg/Gln	21 (16,2)	37 (32,2)	<b>2,98*</b>	1,5915<O.R.<5,5688	0,0003
	Gln/Gln	11 (8,4)	20 (17,4)	<b>2,28*</b>	1,0403<O.R.<4,9863	0,017413

Not: \* ile işaretli olanlar istatistiksel olarak anlam ifade eder.

Çalışmamızdaki genlerin allel sıklıkları tablo 3.3’de gösterilmiştir.

Tablo 3. 3 Genlerin allel sıklıkları

GEN	Kontrol		Hasta	
	p	q	p	q
<b>CYP1A1*2A</b>	0,905	0,095	0,796	0,204
<b>CYP2C9*3</b>	0,862	0,138	0,822	0,178
<b>CYP2D6*2</b>	0,78	0,22	0,64	0,36
<b>CYP3A4*1B</b>	0,9847	0,0153	0,974	0,026
<b>mEPH*3</b>	0,808	0,192	0,687	0,313
<b>mEPH*4</b>	0,846	0,154	0,822	0,178
<b>TPMT*2</b>	1	0	1	0
<b>TPMT*3B</b>	0,988	0,012	0,961	0,039
<b>TPMT*3C</b>	0,988	0,012	0,97	0,03
<b>XRCC1-194</b>	0,891	0,109	0,891	0,109
<b>XRCC1-399</b>	0,835	0,165	0,665	0,335

#### 4.TARTIŞMA

İlaç etkileşimlerine yanıt verme ve ksenobiyotiklere karşı geliştirilen koruma mekanizmaları bakımından bireyler arasında sık sık büyük farklılıklar görülmektedir. Bu çeşitliliğin sebebi olarak bireyin yaşı, ırkı, beslenme alışkanlığı, sigara kullanması, ilaç etkileşimleri ve en büyük faktör olarak kişinin ilaç metabolizmasındaki farmakogenetik polimorfizmi ve sahip olduğu gen gösterilebilir.

İnsan genom projesinin açığa kavuşturulmasına bağlı olarak son zamanlarda ilaç metabolize eden enzimlerin polimorfizmlerinin tanımlanması, çalışması ve fenotiplerinin belirlenmesi kolaylaşmıştır. Polimorfizm çalışmalarıyla toplumdaki bireylerin allel sıklıkları belirlenebilmekte ve toplumlar arasında karşılaştırma yapılabilmektedir. Bunun sonucunda ortaya konan sonuçlarla alternatif ilaçlar ya da tedaviler geliştirilebilmektedir.

TPMT, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6 genleri ilaç metabolizmasında rol almalarından dolayı bu genlerin polimorfizmlerinin belirlenmesiyle ilaç dozlarının ayarlanması ve yeni geliştirilecek ilaçların özelliklerinin belirlenmesi sağlanabilir. Kanser metabolizmasından sorumlu olan CYP1A1, GST, mEPHX ve XRCC genlerinin polimorfizminin belirlenmesiyle de kanser için alternatif önlemler alınabilir. Ayrıca, İlaç metabolizmasında rol alan enzimlerdeki polimorfizmler diyabet ve kanser gibi birçok hastalığa yakalanma yatkınlığında artırmaktadır. Bu hastalıklardan biri de ülseratif kolittir.

Bu çalışmada CYP1A1\*2A, CYP2C9\*3, CYP2D6\*2 mEPH\*3, mEPH\*4, 3A4\*1B, GSTT1, GSTM1, TPMT\*2, TPMT\*3B, TPMT\*3C, XRCC1 kodon 194, XRCC1 kodon 399 genlerinin polimorfizmlerinin belirlenmesi için laboratuvarında her bir gen için uygun koşullar optimize edilerek en doğru sonuçlara ulaşabilmek için prosedürlerde zaman zaman değişiklikler yapılmıştır ve 130 sağlıklı birey ile 115 ülseratif kolitli bireyin genotip dağılımları belirlenip hastalık ile olası ilişkileri tespit edilmeye çalışılmıştır.

CYP1A1 geninin 3' kodlanmayan bölgesinde timin sitozin değişiminden kaynaklı polimorfizm, gen ekspresyon seviyesini, lokasyonunu, ve zamanlamasını ya da CYP1A1 mRNA'sının stabilasyonunu değiştirerek indüklemiş bir fenotipe neden olmaktadır. Bunun sonucunda bu polimorfizmlere sahip insanlarda bazı kanser türlerine olan yatkınlık artmaktadır (Crofts ve diğ. 1994).

Kawajiri, Hayashi, Nakachi, Japon popülasyonunda ayrı ayrı yaptıkları çalışmalarda artan akciğer kanseri riski ile MspI polimorfizmi arasında ilişki bulmuşlardır (Kawajiri ve diğ. 1990, de Jong MM ve diğ. 2002, Hayashi SI ve diğ. 1991). Xu ve arkadaşları 1A1\*2A heterozigot ve homozigot mutant alelleri ile akciğer kanseri oluşumu arasında istatistiksel anlama ulaşan bir ilişki bulmuşlar ve 1A1\*2A mutant varyantlarının Japon ve beyaz ırkta akciğer kanseri riskini arttırdığını göstermişlerdir (de Jong MM ve diğ. 2002).

Anttila ve El-Zein yaptıkları çalışmalarda tütün kaynaklı karsinojenlerin CYP'ler tarafından aktive edildiklerini göstermişlerdir (Anttila S ve diğ. 1994, El-Zein RA ve diğ. 1997). Bu sonuçlar CYP1A1'in enzim aktivitesini arttıran mutant alelinin sadece akciğer kanseri için değil, diğer kanserler için de risk artırıcı faktör olabileceğini göstermektedir. Sigara içimi ve diyet kaynaklı PAH'ların kolon kanserine neden olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Giovannucci E ve diğ. 1994, de Jong MM ve diğ. 2002). Sivaraman ve arkadaşları değişik etnik gruplardan 43 hasta ve 123 kontrol üzerinde yaptıkları çalışmada CYP1A1 polimorfizmlerinin kolon kanseri riski oluşturduğunu göstermişlerdir. 1A1\*2A mutant aleli olan C alelini bulunduran genotipi ile kolon kanseri arasında anlamlı bir ilişki göstermişlerdir (Sivaraman L ve diğ. 1994). Taioli ve arkadaşları Avrupa ve Amerikan-Afrikan kadınlarda yaptığı çalışmalarda MspI polimorfizmi ve meme kanseri arasındaki ilişkiyi araştırmış, Avrupalı kadınlarda kanser ile polimorfizm arasında ilişki bulunmazken Amerikan-Afrikan popülasyonunda istatistiksel anlama ulaşan bir ilişki bulmuşlardır (Taioli E ve diğ. 1995). Ishibe ve arkadaşları Avrupa popülasyonundaki kadınlarla yaptıkları çalışmada CYP1A1 polimorfizmi ile meme kanseri arasında ilişki bulamamış, sadece 18 yaşından önce sigara içmeye başlayanlarla hiç sigara içmeyenler karşılaştırıldığında sigara içenlerde artan meme kanseri riski bulmuşlardır (Ishibe N ve diğ. 1998).

Çalışmamızda CYP1A1\*2A geni için polimorfik bireylerin odds oranı 6,4, p değeri 0,001671, heterozigot bireylerin odds oranı 2,12, p değeri de 0,003244 olarak hesaplanmıştır ve hastalık ile ilişkili bulunmuştur. Daha önce Dj Jong ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada bu genin ülseratif kolite çok yakın bir hastalık olan Crohn hastalığı ile olası ilişkisi araştırılmış odds oranı 0,87 bulunmuştur (Dj Jong ve diğ. 2003). Arvind P. Singh ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, baş ve boyun kanserli hastalarda CYP1A1\*2A heterozigot bireylerin odds oranı 1,66, p değeri 0,05 bulunmuştur. Polimorfik bireylerin odds oranı ise 2,20, p değeri 0,08

bulunmuştur (Arvind P. Singh ve diğ. 2009). Soya Sisy Sam ve arkadaşlarının Hindistan popülasyonunda yaptığı bir çalışmada, üst solunum yolu kanseri olan hastalarda CYP1A1\*2A heterozigot bireylerin odds oranı 1,76, p değeri 0,005 bulunmuştur. Polimorfik bireylerin odds oranı 2,83 p değeri 0,003 bulunmuştur (Soya Sisy Sam ve diğ. 2008). M.P. Gallegos-Arreola ve arkadaşlarının Meksika popülasyonunda yaptığı bir çalışmada, ALL olan hastalarda CYP1A1\*2A heterozigot bireylerin odds oranı 8,4, p değeri <0.001 bulunmuştur (M.P. Gallegos-Arreola ve diğ. 2008). Ningxia Lu ve arkadaşlarının Çin popülasyonunda yaptığı bir çalışmada, kısır erkeklerde CYP1A1\*2A heterozigot bireylerin odds oranı 1,27, p değeri 0,258 bulunmuştur. Polimorfik bireylerin odds oranı 1,38, p değeri 0,309 bulunmuştur (Ningxia Lu ve diğ. 2007). Chih-Ching Yeh ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada koroner damar hastalıklarında CYP1A1\*2A heterozigot bireylerin odds oranı 0,92 bulunmuştur. Polimorfik bireylerin odds oranı 0,69, p değeri 0,33 bulunmuştur (Chih-Ching Yeh ve diğ. 2009). Müge Aydın ve arkadaşlarının Türk popülasyonunda yaptığı araştırmada CYP1A1\*2A heterozigot bireylerin % 17,9, allel frekansı 0,846 bulunmuştur. Polimorfik bireylerin % 6,4 allel frekansı 0,154 bulunmuştur (Müge Aydın ve diğ. 2006). R. C. Sobti ve arkadaşlarının kuzey Hindistan popülasyonunda akciğer kanserli hastalarda yaptığı çalışmada CYP1A1\*2A heterozigot bireylerin odds oranı 1,6 bulunmuştur. Polimorfik bireylerin odds oranı 1,17 bulunmuştur (R. C. Sobti ve diğ. 2003). Adalet Demir ve arkadaşlarının Türk popülasyonunda yaptığı araştırmada CYP1A1\*2A polimorfizminin akciğer kanseri ile olan ilişkisi araştırılmış kontrol grubu ve vaka grubunda polimorfik bireye hiç rastlanılmamıştır. Heterozigot bireylerin odds oranı 1,24, p değeri ise 0,74 bulunmuştur (Adalet Demir ve diğ. 2005). Tuğba Ünsal ve arkadaşlarının Türk popülasyonunda yaptığı bir başka araştırmada CYP1A1\*2A polimorfizminin polikistik yumurtalık sendromu ile olan ilişkisi araştırılmış kontrol ve vaka grubunda hiç polimorfik bireye rastlanılmamıştır. Heterozigot bireylerin odds oranı 1,78, p değeri ise 0,188 bulunmuştur (Tuğba Ünsal ve diğ. 2009). Yavuz Siliğ ve arkadaşlarının Türk popülasyonunda yaptığı bir başka araştırmada CYP1A1\*2A polimorfizminin prostat kanseri ile olan ilişkisi araştırılmış kontrol ve vaka grubunda polimorfik ve heterozigot bireylerin odds oranı 0,67, p değeri ise 0,343 bulunmuştur (Yavuz Siliğ ve diğ. 2006).

Yukarıda belirtildiği üzere CYP1A1\*2A ülseratif kolit hastalarında polimorfik bulunmuştur. CYP1A1 çoğu karsinojenik olan benzopiren gibi



poliaromatik hidrokarbonlar metabolik aktivasyonunda rol almaktadır (Şen ve Arıç 1998). Ülseratif kolitli hastalarda bu kimyasallara olan maruziyet sonucunda polimorfik CYP1A1 indüklenmiş fenotipinden dolayı daha fazla reaktif metabolit açığa çıkacak ve bu kişilerde kansere yakalanma riski artabilecektir.

Birçok kanser çalışması CYP1A1 ve GST enzimlerini polimorfizmlerinin birlikte araştırmıştır. GSTM1 enzimi özellikle CYP1A1 tarafından aktive edilmiş PAH'ların faz II metabolizmasından sorumludur (de Jong MM ve diğ. 2002). Nakachi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada GSTM1 null ve CYP1A1 enziminin mutant alellerinin birlikte bulunmasının PAH kaynaklı akciğer kanseri riskini arttırdığını göstermişlerdir (Nakachi ve diğ. 1993). Alexandrie ve arkadaşları İsveç popülasyonunda yaptıkları çalışmada GSTM1 null ve CYP1A1 mutant alelinin birlikte bulunması ile skuamöz hücre karsinomları arasında istatistiksel anlama ulaşmış bir ilişki bulmuşlardır (Alexandrie ve diğ. 1994).

GST'ler faz I detoksifikasyonda aktiflenmiş elektrofil karsinojenlerle nükleofil olan glutatyonun konjugasyonunu sağlarlar (Pickett CB ve Lu AYH 1989). GST enzim ailesinin kanser vakalarında en çok çalışılan üyeleri GSTM1, GSTT1 ve GSTP1'dir. GSTM1 ve GSTT1, CYP enzimlerinin katalizlediği reaksiyon ürünlerine substrat olarak kullanırlar. Bu sayede dokular oksidatif stresten korunmuş olur (Mannervik B ve Danielson UH 1988, Ketterer B ve diğ. 1992, Berhane K ve diğ. 1994). GSTM1 ve GSTT1 genleri delesyonlu varyantlara sahiplerdir. Delesyonlu varyantlar null alel adını alır (Seidegard J ve diğ. 1988, Pemble S ve diğ. 1994). Chen ve arkadaşları beyaz ırk ve Amerikan-Afrikan'larda yaptıkları çalışmalara göre GSTM1 geni null genotipi beyaz ırkta %53,5 iken Amerikan-Afrikan'larda %27,6'dır. Aynı çalışmada GSTT1 geni null genotipi ise Amerikan-Afrikan'larda %24,1 iken beyaz ırkta %15'tir (Chen ve diğ. 1996). Abdel Rahman ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada ise Kuzey Amerika ve Mısır popülasyonu incelenmiştir. GSTM1 null aleli Kuzey Amerika popülasyonu için %51, Mısır popülasyonu için %44 olarak bulunmuştur. GSTT1 null alel frekansları Kuzey Amerikalılarda %15 iken Mısırlılarda %14,7 olarak bulunmuştur (Abdel Rahman ve diğ. 1996).

Çalışmamızda GSTM1 null alelinin kontrol grubundaki görülme sıklığı %43, hasta grubundaki görülme sıklığı ise %52,2 olarak bulunmuştur. GSTT1 için null alel görülme sıklığı kontrol grubunda %21,5, hasta grubunda ise %33,9 olarak bulunmuştur. GSTM1 null alelinin toplumumuzdaki frekansı beyaz ırka benzerlik

göstermekteyken, GSTT1 null aleli kontrol grubunda beyaz ırk ile uyumlu iken hasta grubunda beyaz ırktan yüksek bulunmuştur.

Ayrıca çalışmamızda hasta ve kontrol gruplarının GSTM1 ve GSTT1 null alel frekansları karşılaştırılmış GSTM1 için istatistiksel bir anlam bulunamamış fakat GSTT1 için istatistiksel anlama ulaşılmıştır (O.R.:1,87 (%95 CI 1,0581<O.R.<3,3027) p: 0,0111). GSTT1 null aleli hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek oranda bulunmuştur.

Seidegard ve arkadaşlarının 1986 yılında yaptıkları çalışmada sigara içenlerde GSTM1 null alelinin akciğer kanseri riskini arttırdığı göstermişlerdir (Seidegard J ve diğ. 1988,). Kato ve arkadaşları GSTM1 null genotipi varlığından PAH'ların DNA'ya bağlanma seviyelerinin arttığını göstermişlerdir (Kato S ve diğ. 1995). Ryberg ve arkadaşlarının GSTM1 null genotipi varlığında aromatik/hidrofobik karsinogenlerin DNA'ya bağlanma seviyelerini kadın ve erkekler arasında araştırmışlardır. Erkeklerde yüksek bir bağlanma seviyesi bulunurken sigara içimiyle de bağlantılı olarak kadın grubunda bağlanma seviyesi erkek grubuna göre daha yüksek bulunmuştur (Ryberg D ve diğ. 1994). Yapılan çalışmalar GSTM1 geninin kimyasal karsinogenler karşısında koruyucu etkisinin olduğunu ve DNA'yı karsinogenlerin zararlarından koruduğunu göstermiştir (de Jong MM ve diğ. 2002). Ryberg ve arkadaşları başka bir çalışmada ise sigara içen ve GSTP1 geni mutant alelini taşıyanlarda akciğer kanser riskinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada GSTM1 null aleli de kanser hastalarında araştırılmış ancak istatistiksel anlama ulaşamamış artan risk bulunmuştur (Ryberg D ve diğ. 1994). Alexandrie ve arkadaşlarının 66 yaşın altındaki akciğer hastaları üzerinde yaptıkları çalışmada GSTM1 null aleli ve artan akciğer kanseri riski arasında istatistiksel anlama ulaşmış bir ilişki bulunmuştur (Alexandrie AK ve diğ. 1994). GSTM1 sadece akciğer kanseri ile değil, diğer çevresel etkilere bağlantılı kanser tipleriyle de (baş-boyun, mesane, kolon) ilişkilendirilmiştir. GSTM1 null alelinin baş boyun kanserinde riski arttırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (de Jong MM ve diğ. 2002). Kihara ve arkadaşları GSTM1 null alelinin sigara içenlerde baş boyun kanseri riskini arttırdığını göstermişlerdir (Kihara M ve diğ. 1997). Jourenkova ve arkadaşlarının GSTM1 null genotipi ile artan larinks kanseri riski arasında istatistiksel anlama ulaşmış bir ilişki bulmuşlardır (Jourenkova N ve diğ. 1998). Katoh ve arkadaşlarının Japon popülasyonunda yaptıkları çalışmada mesane kanseri hastalarında yüksek GSTM1 null genotipi frekansı bulmuşlardır (Katoh T ve

diğ. 1995). Katoh ve arkadaşları başka bir çalışmalarında GSTM1 null aleli ile gastrik adenokarsinom oluşumu arasında anlamlı bir ilişki göstermişlerdir (Katoh T ve diğ. 1995). Zhong ve arkadaşları İskoç popülasyonunda 196 hasta ve 225 kontrolle yaptıkları çalışmada GSTM1 null aleli ile artan kolon kanseri riski arasında istatistiksel anlama ulaşılmış bir ilişki göstermişlerdir (Zhong ve diğ. 1993). Benzer olarak Gowronksa ve arkadaşlarının Polonya popülasyonunda GSTM1 null aleli ile kolon kanseri oluşumu arasında istatistiksel anlama ulaşılmış ilişki bulmuşlardır (Gowronksa ve diğ 1999).

Çalışmamızda GSTM1 null aleli ile ülseratif kolit hastaları arasında istatistiksel ilişkiler aranmış fakat fark bulunamamıştır. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, kendi çalışmamız için GSTM1 null genotipinin ülseratif kolit gelişimiyle ilişkili olmadığını düşünmekteyiz.

Deakin ve arkadaşları kolon kanseri hastalarında GSTT1 null genotipini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulmuşlardır (Deakin ve diğ 1996). Jahnke ve arkadaşları Alman popülasyonunda yaptıkları çalışmalarında GSTT1 null genotipi ile skuamöz hücreli larinks karsinomu arasında ilişki olduğunu göstermişlerdir (Jahnke ve diğ. 1996). Butler ve arkadaşları Beyaz ırkta yaptıkları çalışmalarda GSTT1 null aleli ve kolon kanseri oluşumu arasında istatistiksel anlama ulaşılmış bir ilişki bulmuşlardır (Butler ve diğ. 1997). Saadat ve arkadaşları 88 gastrik ve kolon kanseri üzerinde yaptıkları çalışmalarında GSTM1 ve GSTT1 null alellerinin mide ve kolon kanseri oluşumu üzerine istatistiksel anlama ulaşılmış etkilerinin olduğunu göstermişlerdir (Saadat ve diğ. 2001). Mittal ve arkadaşları Hindistan popülasyonundaki yaptıkları çalışmalarında GSTM1 ve GSTT1 null alellerinin prostat kanseri riskini arttırdığını göstermişlerdir (Mittal ve diğ 2004).

Çalışmamızda GSTT1 null aleli ile ülseratif kolit hastaları arasında istatistiksel ilişkiler aranmış ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, kendi çalışmamız için GSTT1 null genotipinin ülseratif kolit oluşumuyla ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

Prokarsinojen metabolizmasındaki genetik değişikliklerin diğer kanserlerde olduğu gibi ülseratif kolitinin devamı sayılabilen kolon kanseri için de kişisel yatkınlık oluşturma olasılığı üzerinde durulmalıdır. Vücuda giren prokarsinojenler insan enzim sistemleri tarafından aktivasyon ve detoksifikasyona uğrarlar. Örneğin benzopren insanlarda karsinojen olarak bilinen bir moleküldür. Bu molekül sigara

içimi ve soluduğumuz havayla hücrelerimize ulaşır. Ligand-reseptör kompleksi oluşturarak promotor bölgelere bağlanır ve karsinojen metabolize eden enzimlerin indüklenmesine yol açar. Böylece faz I (oksidasyon) ve faz II (konjugasyon) basamaklarından sonra suda çözülebilen ve idrarla atılabilen ürünler oluştururlar. Fakat oksidasyon sonrası oluşan ara ürünler çok daha reaktif ve dolayısıyla da karsinojendir. Bu ara ürünler DNA'ya bağlanıp DNA-adduct, spesifik hücre-gen mutasyonları ve onkogen mutasyonlarının meydana gelmesine neden olurlar. Solunan karsinojenlerin aktive deaktive edilmesi kişiden kişiye değişmektedir. Karsinojen metabolize eden hem faz I hem de faz II enzimlerindeki polimorfizmler ile kanser riski arasındaki ilişkiyi inceleyen moleküler epidemiyoloji çalışmaları çelişkili sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Çünkü prokarsinojen metabolizması polimorfizmlerinin sıklığı populasyonlar arasında farklılık göstermektedir ve bir populasyonda yatkınlık oluşturan bir faktör diğerinde oluşturmazabilir. Farklı populasyonlarda karsinojen metabolizması enzimi olan mEPHX'in polimorfizminin sıklığı, bu çalışmada elde edilen sonuçlarla birlikte tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4. 1 Farklı populasyonlarda mEPHX genotip sıklıkları

Populasyonlar	Ekzon-3 (%)			Ekzon-4 (%)		
	Tyr/Tyr	Tyr/His	His/His	His/His	His/Arg	Arg/Arg
Finlandiya	52	36	12	74	26	<1
Sudan	65	26	9	57	38	5
Kafkasya	50	33	17	67	29	4
Latin	23	52	25	76	24	<1
Japon	25	44	31	67	28	5
Kore	28	29	43	73	21	6
Kanada	14	34	52	69	27	4
Avusturya	48	43	9	68	29	3
Kontrol	66	29	5	72	25	3
Hasta	56	26	18	68	29	3

Bizim çalışmamızda mEPHX ekzon 3'te polimorfik varyant sıklığı kontrol grubunda % 5 civarındadır bu sonuç diğer populasyonlara oranla biraz daha düşüktür ve benzerlik göstermemektedir. Kontrol grubu heterozigot sıklığı ise % 29 civarında olup Sudan, Kafkasya, Kore, Finlandiya ve Kanada populasyonu ile benzerlik gösterirken Latin, Japon ve Avusturya populasyonu ile uyum göstermemektedir (Zhou ve diğ. 2001, Timersma ve diğ. 2001, Yim ve diğ. 2000, Cortessis ve diğ.

2001, Gasson ve diğ. 2003, Takeyabu ve diğ. 2000, Laasanen ve diğ. 2002, Gsur ve diğ. 2003) mEPHX ekzon 4'te kontrol grubunda polimorfik varyant sıklığı % 3 civarındadır ve bu oran hemen hemen bütün populasyonlarda aynıdır ve benzerlik gösterir. Heterozigot sıklığı ise % 25 civarında olup Sudan populasyonu dışında diğer populasyonlarla uyum göstermektedir.

Hasta grubunda mEPHX ekzon 3'te polimorfik varyant sıklığı %18 civarındadır ve Kafkasya populasyonu ile benzerlik gösterirken diğer populasyonlar ile uyum göstermemektedir. Heterozigot sıklığı ise %26 civarında olup Avusturya, Japon ve Latin popülasyonu dışında benzerlik göstermektedir. Hasta grubunda mEPHX ekzon 4'te polimorfik varyant sıklığı %3 civarında olup hemen hemen tüm populusyanlar ile uyum göstermektedir. Heterozigot sıklığı da % 29 civarında olup diğer populasyonlar ile benzerlik göstermektedir.

115 ülseratif kolit hastası ve 130 kontrolü içeren çalışmamızda ksenobiyotik metabolizmasında hem faz I hem de faz II enzimi olarak değerlendirilen mEPHX'in polimorfik varyantları ile ülseratif kolit arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre mEH ekzon-3 polimorfizmi ile ülseratif kolit arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (O.R. :4,62, p:0,00047, %95 CI 1,7926<O.R.<11,8915). mEPHX ekzon-4 polimorfizmi ile ise anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (O.R.:1,14, p: 0,2738, 0,2774<O.R.<4,6458).

Çalışmamızda mEPHX\*3 geni için polimorfik bireylerin odds oranı 4,62, p değeri 0,00047, heteerozigot bireylerin odds oranı 1,06, p değeri ise 0,1148 bulunmuştur. Daha önce Dj Jong ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada bu genin ülseratif kolite çok yakın bir hastalık olan Crohn hastalığı ile olası ilişkisine bakılmış odds oranı 2,92 bulunmuştur ve istatistiksel olarak anlamlıdır (Dj Jong ve diğ. 2003). Jozef Židzik ve arkadaşlarının Slovakya'da yaptığı bir çalışmada kronik kalp rahatsızlığı olan hastalarda bu genin hastalık ile olan ilişkisi araştırılmış odds oranı 2,32 olarak hesaplanmış ve hastalık ile ilişkili olduğu söylenmiştir.

mEPHX\*4 geni için polimorfik bireylerin odds oranı 1,14, p değeri ise 0,2738, heterozigot bireylerin odds oranı 1,24, p değeri ise 0,0878 bulunmuştur. Daha önce Dj Jong ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada bu genin ülseratif kolite çok yakın bir hastalık olan Crohn hastalığı ile olası ilişkisine bakılmış odds oranı 1,36 bulunmuş ve bu hastalık ile ilişkisi bulunmamıştır. Jozef Židzik ve arkadaşlarının Slovakya'da yaptığı bir çalışmada bir çalışmada kronik kalp

rahatsızlığı olan hastalarda bu genin hastalık ile olan ilişkisi araştırılmış odds oranı 0,98 olarak hesaplanmıştır ve bizim çalışmamıza benzer bir şekilde hastalık ile bu genin polimorfik varyantının bir ilişkisi bulunmamıştır.

Ahmet O. Ada ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada erkek Türk popülasyonunda mEPHX\*3 ve mEHX\*4 polimorfizmleri araştırılmış, mEHX\*3 için His113His olan polimorfik bireylerin yüzdesi 7,5, mEH\*4 için Arg139Arg olan polimorfik bireylerin yüzdesi 2,2 bulunmuştur ve bu sonuçlar kontrol grubu için bizim çalışmamızın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir (Ahmet O. Ada ve diğ. 2007).

Ergün Pınarbaşı ve arkadaşlarının kadın Türk popülasyonunda yaptığı bir araştırmada mEHX\*3 ve mEHX\*4 polimorfizminin gebe bayanlardaki dağılımı araştırılmış, mEHX\*3 için His113His olan polimorfik bireylerin odds oranı 1,13, p değeri ise 0,66 bulunmuştur ve bizim çalışmamız ile benzerlik göstermemektedir. mEHX\*4 için Arg139Arg olan polimorfik bireylerin odds oranı 1,17, P değeri ise 0,89 bulunmuştur bu sonuç bizim sonucumuz ile uyum gösterir (Ergün Pınarbaşı ve diğ. 2007).

Biyodönüşüm enzimlerini kodlayan tek bir gendeki polimorfizm tek başına kanser gelişimi için yeterli olmayabilir ve kanser gelişimi için ksenobiyotik metabolizmasında görev alan biyodönüşüm enzimlerindeki polimorfizmlerden birkaçının birlikte taşınması gerekebilir. Ayrıca ksenobiyotik metabolizmasında görev alan enzimleri kodlayan genler ile kanser oluşumundan sorumlu başka genler arasında linkaj olabilir. Hassett ve arkadaşlarına göre ekzon 3 teki tirozin histidin değişimi enzim aktivitesini %40 oranında düşürmektedir. Ekzon 4 teki histidin arjinin değişimi ise enzim aktivitesini %25 oranında arttırmaktadır (Hassett ve diğ. 1994). Çalışmamızda Ülseratif kolit hastalarında ekzon 3 te polimorfizm oranı kontrol grubuna göre daha yüksektir ve epoksit hidrolazın düşük aktivitesi bağırsak iltihabına ve dolayısıyla kolon kanserinin öncüsü olan üllseratif kolite yol açıyor olabilir.

DNA tamir mekanizması transkripsiyonu başlatma ve hücre döngüsünü sonlandırma fonksiyonundan dolayı genom kararlılığında hayati önem taşır. DNA tamir mekanizmasının amacı DNA hasarını tamir etmek ve genom kararlılığını korumaktır. Gen-çevre etkileşimi sonucu oluşan DNA tamir genlerindeki

polimorfizmler DNA tamir kapasitesini etkileyerek hücrelerin kansere yatkınlığı arttırır. Farmakogenetik olarak DNA tamir kapasitesi sitotoksik ve radyasyon tedavilerinde yanıtı düzenleyebilir (Fojo ve diğ. 2001). DNA tamir genlerindeki polimorfizmler tedaviye yanıtta, toksidite de, yaşam beklentisinde sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür (Goode ve diğ. 2002). Karsinojenler direkt veya dolaylı DNA hasarına sebep olmaktadır. DNA hasarını onarım için vücutta yanıt olarak farklı biyolojik mekanizmalar vardır ve bu sayede genomun bütünlüğü korunmaktadır. DNA tamir kapasitesindeki azalma DNA hasarına karşı oluşan biyolojik yanıtta değişikliklere sebep olur ve bunun sonucunda farklı malign tümörler gelişebilir (Berwick M ve diğ. 2000).

XRCC1 geni 19q 13.2-13.3'da yer alır (Mohrenweiser ve diğ. 1989). XRCC1 proteini (Mr 70000) iyonize radyasyon ve alkalize ajanların sebep olduğu DNA tek zincir kırıklarında ve sabit baz hasarlarında baz eksizyon tamir yolunun önemli bileşenidir. XRCC1 protein DNA ligaz III, DNA Polimeraz b , AP endonükleaz, polinükleotid kinaz ve poli (ADPriboz) polimeraz ile ilgilidir (Shen M ve diğ. 2003). Tek zincir kırıklarını tanıyıp ve bağlanır (Stern ve diğ. 2001).

BER ve NER; DNA tamir mekanizmalarının önemli olduğu birçok hastalıkta; kolon ve rektum (Stern ve diğ. 2007), akciğer (Sreeja ve diğ. 2007), meme (Mechanic ve diğ. 2006), mesane (Andrew ve diğ. 2008), pankreas (Jiao ve diğ. 2007), prostat (Bau ve diğ. 2007), nasofarinks (Yang ve diğ., 2007), mide (Ruzzo ve diğ. 2007), deri kanserlerinde (McCarty ve diğ. 2007), özefagus (Ye ve diğ. 2006) ve kas myolomların da (Hsieh ve diğ. 2008), kan kanserinde (Rzeszowska-Wolny ve diğ. 2005) ve de katarakt hastalığında (Unal ve diğ. 2007) ayrıntılı bir şekilde çalışılmıştır.

Kolon ve rektum kanserlerinde XRCC1-399 polimorfizmi, alkol ve sigara içenlerde mutasyon oluşumunu tetikleme özelliğinden dolayı kanser araştırmalarında yararlı bağımsız marker olarak kullanılmaktadır. Bu esnada reaktif oksijen türleri genotoksinlerle ilişkili olarak önemli rol oynamakta ve sonuçta kanser riskini arttırmaktadır (Stern ve diğ. 2006a, b).

Enflamasyonla gelişen hastalıklardan sadece romatoid artirit ile XRCC1 Arg399Gln polimorfizmi arasındaki ilişki incelenmiştir. Akiko Koyama ve arkadaşlarının Japon popülasyonunda yaptığı bu çalışmanın bulgularına göre XRCC1

399Gln alleli taşıyıcılığı Romatoid artirit için bir risk faktörü oluşturmamaktadır (Koyama ve diğ. 2006).

Elde ettiğimiz bulgudan yola çıkarak XRCC1Arg399Gln polimorfizminin farklı hastalıklarda farklı etkilere yol açtığı düşünülen polimorfizmler arasında kabul edilebileceğini düşündüren bazı çalışmalar da literatür bilginiz arasında bulunmaktadır.

Günümüze kadar yapılan araştırmalarda XRCC1Arg399Gln polimorfizmi ile kanser arasındaki ilişki incelenmiş ve farklı kanser çeşitleri için farklı bulgular elde edilmiştir. Zhibin Hu ve arkadaşlarının XRCC1 genleri ve kanser riski arasındaki ilişkiyi meta analizi ile inceledikleri çalışmalarında XRCC1'in 399. Kodonundaki polimorfizminin yabani ve mutant homozigot tiplerinin her ikisinin de kanser ile ilişkili olmadığını gözlemlemişlerdir (Hung ve diğ. 2005). Bu bulguya paralel olarak Yun Cao ve arkadaşları Çin popülasyonunda XRCC1 genleri ile nazofarenjeal karsinoma riski arasındaki ilişkiyi araştırmış ve nazofarenjeal karsinoma ile bu polimorfizm arasında bir ilişki gözlemediklerini bildirmişlerdir (Cao ve diğ. 2006). Bu iki çalışmanın aksine, Priya Chacko ve arkadaşlarının Hindistanlı kadınlarda XRCC1 kodon 194 ve kodon 399 ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarının sonucunda 399. Kodondaki polimorfik Gln allelini hasta popülasyonunda yüksek oranda görmüşler ve bu polimorfizmin meme kanseri riskini 6 kat yükselttiğini ileri sürmüşlerdir (Chacko ve diğ. 2005). Bu bulguya paralel olarak Sook-Un Kim ve arkadaşlarının Koreli kadınlarda XRCC1 genleri ile göğüs kanseri arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmalarının sonucunda 399. kodondaki polimorfik mutant allelin göğüs kanseri riskini 2,4 kat arttırdığını gözlemlemişlerdir (Kim ve diğ. 2002). Sandra Costa ve arkadaşlarının benzer bir şekilde Portekiz popülasyonunda DNA tamir mekanizması polimorfizmleri ile göğüs kanseri arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmaları sonucunda XRCC1Arg399Gln polimorfizminin göğüs kanseri için risk oluşturduğunu bildirmişlerdir (Costa ve diğ. 2006).

Yaptığımız çalışmada da XRCC1-194 geni için hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel bir anlama ulaşan ilişki tespit edilememiştir (O.R.:1,71 %95 CI 0,2814<O.R.<10,4448 p: 0,2933). XRCC1-399 geni için ise hasta ve kontrol grubu arasında hem heterozigot olan Arg/Gln alleli varlığı (O.R.:2,98 %95 CI 1,5915<O.R.<5,5688 p:0,0003) hem de mutant olan Gln/Gln alleli varlığı (O.R.:2,28



%95 CI 1,0403<O.R.<4,9863 p:0,017413) ülseratif kolit gelişimde bir risk faktörü oluşturduğu istatistiksel olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızdaki CYP1A1\*2A, GSTT1, GSTM1, mEPHX\*3, mEPHX\*4, XRCC1-194 ve XRCC1-399 genleri kanser metabolizmasında yer alan genler ve enzimlerdir. Ülseratif kolit hastalığı kolon kanserinin öncü bir belirtisi olarak görülebilir. Hastalık yaşı arttıkça kolon kanserine dönüşme hızı da artmaktadır. Dolayısıyla ülseratif kolit hastalarının olası kolon kanseri riski oldukça yüksektir. Çalışmamızdaki bulgular da bu sonucu destekler niteliktedir. CYP1A1\*2A, GSTT1, mEPHX\*3 ve XRCC1-399 genleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ve bu gen bakımından mutant olan bireyler kolon kanseri öncüsü olan ülseratif kolit bakımından yüksek risk altındadır. Bu genler bakımından polimorfik bireylerde CYP1A1\*2A artan enzim aktivitesi, GSTT1 null, mEPHX\*3 azalan enzim aktivitesi ve XRCC1-399 için de düşen DNA tamir kapasitesi kanser gelişiminde büyük risk faktörüdür.

Tiyopürin metiltransferaz (TPMT) Faz II grubundan olan ilaç metabolizmasında yer alan sitoplazmik bir enzimdir. Hem prokaryot hem ökaryotlarda mevcuttur. TPMT enzimi tiyopürin içeren ilaçlardaki aromatik S-metilasyonu ve heterosiklik sülfidril bileşikler katalizler (Ames ve diğ. 1986). Tiyopürin kullanılmadıkça fenotipik olarak TPMT eksik bireylerde yaban tip bireylerden bir fark ayırt edilemez. Bu gerçek TPMT'nin vücutta hayati bir fonksiyonu olmadığını gösterir. TPMT genindeki tek nükleotid değişimleri enzim aktivitesinde değişikliklere yol açar. Değişik TPMT alleleri polimorfizmler taşırlar ve bunlarda enzim eksikliği veya düşük aktiviteye neden olur. Mutasyon taşımayan TPMT allelerinde (homozigot yaban tip) genellikle yüksek enzim aktivitesi görülür. Homozigot mutant allellerde ise TPMT eksikliği görülürken heterozigot olan bir mutant bir yaban tip allel taşıyan bireylerde orta seviyede enzim aktivitesi görülür.

Ülseratif kolit hastaları sürekli olarak ilaç kullanmak zorundadırlar. Bu ilaçlar genellikle bağırsaktaki kronik iltihabı gidermeye yöneliktir. Bu ilaç gruplarının arasında immünomodülatör ajanlar olarak azatiyopürin (AZA), 6-merkaptopürin (6-MP) gibi ajanlar vardır. Tiyopürin metil transferaz enzimi azatiyopürin yıkımında önemli olan, eksikliğinde ilaç yan etkilerinin sık izlendiği ve düzeyi ölçülebilen bir enzimdir (Lennard L. ve diğ. 1990). Homozigot ya da heterozigot gen defektlerinde aşırı miktarda aktif metabolit birikimi ve sonuçta ciddi hematolojik yan etkiler

izlenebilir. Bazı otörlerce tedavi öncesi enzim düzeyinin bakılması önerilmektedir. TPMT genin polimorfizmi bu sebeplerden dolayı önem kazanmaktadır.

Çalışmamızda kontrol grubundaki 130 sağlıklı birey ve vaka grubundaki 115 ülseratif kolitli bireyden TPMT\*2 için hiç null genotipe rastlanılmamıştır. Tuğba Boyuneğmez Tümer ve arkadaşlarının Türk popülasyonunda yaptığı çalışmada lenf kanserinin bu gen ile olan ilişkisi araştırılmış ve bizim çalışmamıza paralel olarak hiç polimorfik bireye rastlanılmamıştır (Tuğba Boyuneğmez Tümer ve diğ. 2007).

Bizim çalışmamıza benzer olarak Kazak, Kenya, Gana, Japon ve Çin popülasyonlarında da TPMT\*2 geni için hiç null bireye rastlanılmamıştır (Wei ve diğ., 2005, McLeod ve diğ., 2000, Ameway ve diğ., 1999, Hiratsuka ve diğ., 2000, Collie-Duguid ve diğ., 1999). Fransız popülasyonunda null genotipe %0.5 (Mc Leod ve Siva, 2002), İngiliz popülasyonunda %0.5 (Ameway ve diğ., 1999), Amerikan popülasyonunda %0.2 (Hon ve diğ., 1999) oranında rastlanılmıştır.

Çalışmamızda TPMT\*3B için kontrol grubunda 130 bireyden hiç polimorfik bireye rastlanılmazken ülseratif kolitli vaka grubunda 115 bireyde 2 polimorfik bireye rastlanıldı. Tuğba Boyuneğmez Tümer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada lenf kanserinin bu gen ile olan ilişkisi araştırılmış ve bizim sonuçlarımıza benzer bir şekilde hiç polimorfik bireye rastlanılmamıştır (Tuğba Boyuneğmez Tümer ve diğ. 2007).

Bizim çalışmamızda TPMT\*3C geni için kontrol grubunda hiç polimorfik tipe rastlanılmazken vaka grubunda 2 polimorfik bireye rastlanılmıştır. Heterozigot bireylerin odds oranı 1,15, p değeri ise 0,3117 bulunmuştur. Tuğba Boyuneğmez Tümer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada lenf kanserinin bu gen ile olan ilişkisi araştırılmış ve 2 polimorfik bireye rastlanılmıştır (Tuğba Boyuneğmez Tümer ve diğ. 2007). Hiromistu Ban ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada japon popülasyonunda TPMT A719G polimorfizminin iltihabi bağırsak hastalığı ile olan ilişkisi araştırılmış, 157 ülseratif kolitli ve 78 crohn hastasında hiç polimorfik bireye rastlanmazken, 2 grup içinde heterozigot 2 şer bireye rastlanılmıştır. Kontrol grubunda ise 44 sağlıklı bireyde hiç polimorfik bireye rastlanmazken 1 tane heterozigot bireye rastlanılmıştır (Hiromitsu ve diğ. 2010).

Noritaka Takatsu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada japon popülasyonunda TPMT\*2, TPMT\*3B ve TPMT\*3C polimorfizlerinin iltihabi bağırsak hastalıkları ile olan ilişkisi araştırılmış, ülseratif kolitli bireylerde yaban tip

%98, Crohnlu bireylerde taban tip % 97,9 oranında tespit edilmiştir (Noritaka ve diğ. 2009). Qian Cao ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada çin popülasyonunda TPMT\*2, TPMT\*3B ve TPMT\*3C polimorfizlerinin iltihabi bağırsak hastalıkları ile olan ilişkisi araştırılmış, ülseratif kolitli, Crohnlu ve kontrol grubunda polimorfik bireye hiç rastlanılmazken, TPMT\*3C geninde heterozigot allel frekansı ülseratif kolitli grupta 2,45, crohnlu grupta 0,57 ve kontrol grubunda ise 1,47'dir (Qion ve diğ. 2009). Ondrej Slanar ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada Çek popülasyonunda TPMT\*2, TPMT\*3B ve TPMT\*3C polimorfizlerinin iltihabi bağırsak hastalıkları ile olan ilişkisi araştırılmış, ülseratif kolitli, Crohnlu ve kontrol grubunda polimorfik bireye hiç rastlanılmazken, TPMT\*2 geninde heterozigot allel frekansı inflamatuvar bağırsak hastalıklı grupta 0,13 iken kontrol grubunda ise 0,16'dir. TPMT\*3B geninde heterozigot allel frekansı ibh'li grupta 0,13 iken kontrol grubunda ise 0'dır. TPMT\*3C geninde heterozigot allel frekansı ibh'li grupta 0,38 iken kontrol grubunda ise 0,50 dir (Ondrej Slanar ve diğ. 2008).

Çalışmamızdaki sonuçlar literatür ile paralellik göstermektedir. Genel olarak TPMT geni polimorfizm oranı diğer popülasyonlarda da düşük seviyededir. Ülseratif kolit gelişimde TPMT geni polimorfizmi istatistiksel olarak anlama ulaşan bir seviyede risk faktörü oluşturmadığı yönündedir.

Sitokrom P450 enzimleri birçok ilacın metabolizmasına katkıda bulunur. Ancak, metabolizmaya katılan enzimlerin bir kısmı polimorfik özelliktedir. Genlerdeki mutasyon sonucu oluşan polimorfizm, enzim aktivitesinde ya da enzimin salgılanmasında azalmaya, artmaya veya yokluğuna neden olabilir. Buna bağlı olarak da ilaç metabolizmasında bireyler arası ve toplumlar arası farklılıklar ortaya çıkar. CYP2C9, CYP2D6 ve CYP3A4 ilaç metabolizmasında önemli rolleri olan sitokrom P450 enzimlerindedir.

CYP2C9\*3 ekson 7'de 359. kodonda izolösin'in lösin ile yer değiştirmesine neden olan şifre değişikliği bulunmaktadır (Herman ve diğ. 2003, Ablin ve diğ. 2004, Tabrizi ve diğ 2002). Bu alleli heterozigot veya homozigot taşıyanlarda enzim aktivitesi azalmaktadır. Bu nedenle metabolizmasında rol aldıkları ilaçların etkisini değiştirebilirler (Ablin ve diğ 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 nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlar ve losartan gibi angiotensin II

blokerleri CYP2C9 tarafından metabolize edilir (Ablin ve diğ 2004, Tabrizi ve diğ 2002).

Çalışmamızda CYP2C9\*3 için kontrol grubunda polimorfik allel sıklığı 0,138 iken hasta grubunda polimorfik allel sıklığı 0,178 civarındadır. Tablo 4.2.'de farklı populasyonlarda polimorfik allel frekansları verilmiştir. Türk populasyonunda diğer populasyonlara oranla CYP2C9\*3 polimorfizm oranı biraz daha yüksektir. Aynacıoğlu ve arkadaşlarının 1999 yılında Türk populasyonunda yaptığı bir araştırmada CYP2C9\*3 polimorfik allel sıklığını 0,1 civarında bulmuştur ve bizim sonuçlarımıza paralellik göstermektedir. İsveç, Beyaz Amerikalı, Zenci Amerikalı, Japon ve İngiliz populasyonlarında ise polimorfik allel sıklığı bizim çalışmamızdakinden daha düşük seviyede gösterilmiştir. Bunun nedeni etnik farklılıklar ve farklı yaşam biçimleri olarak gösterilebilir. Tayvan ve Alman populasyonlarında ise CYP2C9\*3 için hiç polimorfik varyanta rastlanılmamıştır.

Tablo 4. 2 Farklı populasyonlarda CYP2C9\*3 polimorfik allel sıklığı

<b>Populasyon</b>	<b>CYP2C9*3 Polimorfik allel sıklığı</b>	<b>Kaynak</b>
İsveçliler n=430	0,074	Yasar U. ve diğ. 1999
Beyaz Amerikalılar n=461	0,06	London Sj. ve diğ. 1996
Zenci Amerikalılar n=239	0,005	London Sj. ve diğ. 1996
Japonlar n=39	0,004	Inoue K. ve diğ. 1997
Beyaz Amerikalılar n=45	0,033	Inoue K. ve diğ. 1997
İngilizler n=100	0,085	Stubbins Mj. ve diğ. 1996
Japonlar n=218	0,021	Kayoko N. ve diğ. 1997
Tayvanlılar n=82	0	Wang Sl. ve diğ. 1995
Almanlar n=127	0	Aynacıoğlu ve diğ. 1999
Türkler n=499	0,1	Aynacıoğlu ve diğ. 1999
Kontrol n=130	0,138	Bu çalışma
Hasta n=115	0,178	Bu çalışma

Sitokrom P450 CYP2C9 Kanada'da yerleşik Hint kökenlilerde, Kuzey Amerikalı beyazlar, Çinliler ve Eskimolarda araştırılmış ve CYP2C9\*3'ün Çin ve Eskimo populasyonunda 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 (Andra ve diğ 2001).

Çalışmamızda CYP2C9\*3 için ülseratif kolitli grup ve kontrol grubu arasında polimorfik allel sıklığı bakımından istatistiksel anlama ulaşan bir ilişki tespit edilmemiştir.

Genetik polimorfizm gösteren CYP2D6 enzimi, CYP2D alt-ailesine ait; 1 geni ve 4 pseudogeni bulunmaktadır. CYP2D6'da ilaç metabolizmasında ve ksenobiyotik detoksifikasyonunda rol alan bir enzimdir. Genotipleme çalışmalarıyla, CYP2D6 lokusunun 70'den fazla varyant alleli olduğu ve bunlardan en azından 15 tanesinin fonksiyonel olmayan gen ürünlerini kodladığı saptanmıştır (Aynacıoğlu ve diğ. 2001). Defektif allellerin, gen delesyonu sonucu pseudogenlerle ve tek baz mutasyonlarıyla meydana gelen çerçeve kayması, missense, nonsense ya da “splice-site” mutasyonlarıyla oluştuğu düşünülmektedir. Bu alleller normal genden farklılık göstermekte ve enzimin etkinliğini önemli oranda değiştirmektedir. Sonuçta; ilaç toksisitesinden, kanser ve bazı hastalıklara olan yatkınlıktan sorumlu olabilen; yavaş, orta, hızlı ya da ultra hızlı metabolizör fenotipleri meydana gelmektedir (Kaya 1994). Günümüzde, çok sayıda ilacın metabolize edilmesinde etkisi olduğu saptanmış enzim, reseptör, kanal ve transport protein polimorfizmlerinin çeşitli etnik gruplarda farklı allel ve genotip frekansları ile temsil edildikleri ve tedavi amaçlı ilaç kullanımında farklı cevapların alınmasından sorumlu olabilecekleri gösterilmiştir. Bunlar arasında bizim çalışmamızda yer alan sitokrom P4502D6 enzimi çok önemli bir paya sahiptir, çünkü ilaçların yaklaşık % 25'inin metabolizmasından sorumludur. İlaçların metabolizmasından sorumlu CYP2D6 enziminin polimorfizimlerine bağlı olarak enzim etkinliğinin bireyler arası ve toplumlar arası değişkenlik göstermesi, yetersiz ilaç tedavisi ya da ilaçlara bağlı istenmeyen etkilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Bizim çalışmamızda hasta ve kontrol grubu genel olarak karşılaştırıldığında, CYP2D6\*2 polimorfizmi ile ülseratif kolit arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Ülseratif kolit ile CYP2D6 polimorfizmi arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalar sınırlıdır.

CYP2D6 enziminin farklı kanser türleri üzerine olan etkisi yoğun bir şekilde incelenmiştir. CYP2D6 gen polimorfizimlerinin aday olarak gösterildiği kanserlerden biri lösemi'dir. Aydın ve diğ. 2006 yılında, Türk popülasyonunda, CYP2D6 geninin allel sıklıklarını akut myeloblastik (AML) ve akut lenfoblastik lösemili (ALL) pediyatrik ve yetişkin hasta gruplarında ve sağlıklı bireylerden oluşan

kontrol grubunda araştırmışlardır (Aydın ve diğ. 2006). Pediatrik ve yetişkin akut myeloblastik lösemi hasta gruplarında CYP2D6\*3 polimorfik varyantının bir risk faktörü olmadığı gösterilmiştir. Pediatrik ve yetişkin akut lenfoblastik lösemi (ALL) hasta gruplarında da CYP2D6\*4 polimorfik varyantının bir risk faktörü olmadığı bulunmuştur (Aydın ve diğ. 2006).

Bizim sonuçlarımızla paralellik gösteren benzer bir çalışmada, Li ve arkadaşları CYP2D6\*10 polimorfizmiyle meme kanseri riski arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulamamışlardır (Li ve diğ. 2006). Lösemi hastalarında, CYP2D6 polimorfik genotipinin kontrollere kıyasla daha yüksek bir sıklıkta bulunduğu saptanmış (% 76,6-% 57) ve bu genotipin lösemi riskini arttırdığu ileri sürülmüştür. Lemos ve arkadaşları bu durumun, tanımlanamayan bazı kimyasal karsinojenlerin metabolik aktivasyonundaki artışla ya da karsinogeneziz içerisinde bulunan farklı komşu genler ile CYP2D6 geni arasında, 22q13 lokusunda meydana gelen bir linkaj sonucu gerçekleşebileceğini öne sürmüşlerdir (Lemos ve diğ. 1999). Faz I metabolizması sonucu bazen toksik ara ürünler oluşmaktadır ve bu ürünler biyodönüşüme uğrayıncaya kadar orjinal substrattan çok daha zararlı bir etki yaratmaktadır. Bu durumda, polimorfik genotip tarafından prokarsinojenlerin aktivitesinin arttırılması, karsinogeneziz riskinin de artması ile ilişkilendirilebilir. İlginç olarak daha önceki bir çalışmada, lösemi hastalarında, yaban genotip sıklığının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Smith ve diğ. 1992). Yapılan diğer çalışmalardaki bu çelişkili bulguların, farklı toplumlarda bulunan çevresel karsinojenlerin tiplerinden de kaynaklanabileceği düşünölmektedir.

CYP3A4 ilaç metabolizmasında rol alan CYP450 enzimleri içinde, en aktif olanıdır. Ayrıca kalın bağırsakta yüksek yoğunlukta bulunur (Rendic ve diğ. 1997, Thummel ve diğ. 1998). İnsan karaciğerinde en çok bulunan CYP enzimi CYP3A4'tür ve pek çok dokuda ekspres edilir. Ancak ilaçların ve diğer kimyasalların metabolizmasında, karaciğer kadar ince bağırsaktaki ekspresyonda çok önemlidir (Guengerich 1999). CYP3A4 günümüzde kullanılan ilaçların yarısının metabolizmasına katılır (Bertz ve Granneman 1997).

Çalışmamızda kontrol grubu ve hasta grubu arasında CYP3A4\*1B polimorfik varyant allel sıklığı arasında istatistiksel anlama ulaşan bir fark tespit edilememiştir. Kontrol ve hasta grubunda hiç polimorfik varyanta rastlanılmamıştır. Heterozigot bireyler arasında da istatistiksel anlama ulaşan bir fark tespit edilmedi (O.R.: 1,73, 0,4769<O.R.<6,3047 p: 0,179283).

Adam A. Garsa ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada bizim sonuçlarımıza paralel olarak 95 Avrupalıda CYP3A4\*1B için hiç polimorfik bireye rastlanılmazken, 95 Afrikalıda %82 oranında polimorfik varyanta rastlanılmıştır (Adam A. Garsa ve diğ. 2005). Avrupalı popülasyonu ile bizim çalışmamızın sonucu benzerlik gösterirken Afrika popülasyonu benzerlik göstermemektedir. Bunun nedeni etnik, ırksal, çevresel faktörler ve beslenme farklılıkları olabilir.

S. Pakakasama ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada CYP3A4\*1B polimorfizmi ile ALL arasındaki ilişki araştırılmış ve istatistiksel olarak anlama ulaşan bir ilişki tespit edilememiştir. Bizim çalışmamıza benzer olarak 107 hasta ve 320 kontrol grubunda CYP3A4\*1B için hiç polimorfik bireye rastlanılmamıştır ( S. Pakakasama ve diğ 2005).

Pamela L. Paris ve arkadaşlarının Amerikan popülasyonunda yaptığı başka bir araştırmada CYP3A4 varyantlarının prostat kanseri ile olan ilişkisi araştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (Pamela ve diğ. 1999).

CYP3A4\*1B polimorfizminin inflamatuvar bağırsak hastalıkları ile olan ilişkisinin araştırıldığı çalışma sayısı çok yetersizdir. Özellikle Türk popülasyonunda 3A4\*1B ile inflamatuvar bağırsak hastalıkları arasındaki ilişkiyi gösteren çalışma yok denecek kadar azdır.

İnsanlarda yaygın olarak görülen multi-faktöriyel hastalıkların SNP'ler ile ilişkisi araştırılmakta ve SNP haritası sayesinde ne tür genetik polimorfizmlerin, hastalıkların oluşumunda etkili olduğu anlaşılmaya çalışılmaktadır. Tüm polimorfizmlerin popülasyon içinde oluşturduğu varyasyonlar; herhangi bir ilacın alınımı, taşınımı, yıkımı ve atılımı gibi her bir basamağında etkili olan; reseptör, enzim ve taşımadan sorumlu çok sayıda proteinin dahil olduğu sistemde olabilir. Dolayısıyla, ilacın veya etkenin, hedeflenen doğrultuda tedavi edici veya etkili olabilme özelliğinin standardizasyonundan ziyade, genotipe uygun şekilde verilmesi daha gerçekçi ve akılcıdır. Günümüzde, çok sayıda ilacın metabolize edilmesinde etkisi olduğu saptanmış enzim, reseptör, kanal ve transport protein polimorfizmlerinin çeşitli etnik gruplarda farklı allel ve genotip frekansları ile temsil edildikleri ve tedavi amaçlı ilaç kullanımında farklı cevapların alınmasından sorumlu olabilecekleri gösterilmiştir. Çalışmamızdaki TPMT\*2, TPMT\*3B, TPM\*3C, CYP2C9\*3, CYP2D6\*2 ve CYP3A4\*1B genleri ilaç metabolizmasında yer alan genler ve enzimlerdir. Ülseratif kolit hastaları yüksek dozlarda ve sürekli olarak bağırsaktaki iltihabı gidermek için ilaç kullanmak zorundadırlar. Dolayısıyla bu

genlerdeki polimorfizmler ülseratif kolit gelişimine, ilaç seçimine, dozuna ve hastalığın seyrinde önemli derece etkilidir. Çalışmamızdaki bulgular bu genlerdeki genotipik dağılımların kontrol ve hasta grubunda farklılık göstermediği yönündedir.



## 5. SONUÇ

Çalışmamızda, Türkiye populasyonundan 130 sağlıklı birey ve 115 ülseratif kolit hastası bireyin kanser metabolizmasında yer alan CYP1A1\*2A, mEPHX\*3, mEPHX\*4, GSTT1, GSTM1, XRCC1-194 ve XRCC-399 genlerinin genotipik dağılımlarına, hastalıkla olan olası ilişkilerine ve kanser gibi olası ikincil hastalıkların gelişimindeki rolü araştırıldı. Ülseratif kolit hastaları ilerleyen yaşlarda kolon kanseri gibi hastalıklara yakalanma bakımından risk altındadır. Bizim sonuçlarımız da kanser metabolizmasında yer alan enzim gruplarından CYP1A1\*2A, mEPHX\*3, GSTT1 ve XRCC1-399 genleri ile ülseratif kolit gelişimi arasında istatistiksel anlama ulaşan bir ilişki olduğu yönündedir. Bu genler bakımından polimorfik olan bireyler ülseratif kolit ve kolon kanseri gibi hastalıklara yakalanma bakımından diğer gruplara göre daha fazla risk altındadır. Bu kişiler yaşam kalitesini artırma adına çevre koşullarına ve beslenme şartlarına polimorfik olmayan diğer bireylere kıyasla daha fazla özen göstermelidirler.

Çalışmamızın bir diğer hipotezi olan ilaç detoksifikasyonu ve metabolizmasında yer alan CYP2C9\*3, CYP2D6\*2, CYP3A4\*1B, TPMT\*2, TPMT\*3B ve TPMT\*3C genlerinin allel frekansları ve genotipik dağılımları da sağlıklı ve ülseratif kolitli bireylerde tespit edildi. Ülseratif kolitli bireyler kronik bağırsak iltihabını önlemek için yüksek dozlarda ve sürekli olarak antiinflamatuvar ilaçlar kullanmaktadırlar. Bu ilaçlar arasında özellikle TPMT grubu enzimlerin substratı olan Azatiyopürin yer almaktadır. Bu genler bakımından polimorfik olan bireyler aldığı ilaç dozuna ve cinsine özen tedaviye iyi yanıt ve hastalığın seyri adına göstermelidirler. Yaptığımız istatistiksel analizlere göre ilaç metabolize eden enzimlerin polimorfik varyantlarının sağlıklı ve ülseratif kolitli bireyler arasında anlamlı bir fark teşkil etmediği yönündedir.

## 6. KAYNAKLAR

Abdel Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA, AU WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett* 1996, 107: 229–233.

Abdel RS, Soliman AS, Bondy ML, Wu X, El-Badawy SA, Mahgoub KG ve ark. Polymorphism of glutathione S-transferase loci GSTM1 and GSTT1 and susceptibility to colorectal cancer in Egypt. *Cancer Lett* 1999; 142: 97– 104.

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.

Adalet DEMİR, Sedat ALTIN, İbrahim DEMİR, Vedat KÖKSAL, Ümran ÇETİNÇELİK, S. İbrahim DİNÇER. The role of CYP1A1 MspI gene polymorphism on lung cancer development in Turkey *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* 2005; 53(1): 5-9

Adam A Garsa<sup>1</sup>, Howard L McLeod<sup>1,2</sup> and Sharon Marsh\*<sup>1,2</sup> CYP3A4 and CYP3A5 genotyping by Pyrosequencing *BMC Medical Genetics* 2005, 6:19

Agundez, J. A., Ledesma, M. C., Ladero, J. M., Benítez, J. (1995). Prevalence of CYP2D6 gene duplication and its repercussion on the oxidative phenotype in a white population, *Clin Pharmacol Ther.*, 57: 265-269.

Ahmet O. Ada, H. Sinan Suzen, and Mumtaz Iscan. Polymorphisms of Microsomal Epoxide Hydrolase and Glutathione S-transferase P1 in a Male Turkish Population. *International Journal of Toxicology*, 26:41–46, 2007

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

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

Akkiz H. Enflamatuar barsak hastalıklarında tedavi seçenekleri. *Cerrahi Ostomi Dergisi* 2000 ; 3 : 5-6.

Aksoy G, Kanan N, Akyolcu N. *Cerrahi Hastalıkları Hemşireliği*. Web-Ofset, Eskişehir, 1992; 420-440.

Alaattin Sen, Emel Arinc Preparation of highly purified cytochrome P4501A1 from leaping mullet (*Liza saliens*) liver microsomes and its biocatalytic, molecular and immunochemical properties *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 121 (1998) 249–265

A. Sen and A. Kirikbakan Biochemical Characterization and Distribution of Glutathione S\_Transferases in Leaping Mullet (*Liza saliens*) *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 69, No. 9, 2004, pp. 993\_1000.

Alexandrie AK, Sundberg MI, Seidegård J, Tornling G, Rannug A. Genetic susceptibility to lung cancer with special emphasis on CYP1A1 and GSTM1: a study

on best factors in relation to age at onset, gender and histological cancer types. *Carcinogenesis* 1994; 15: 1785–1790.

Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. *J Biol Chem* 1997; 272: 10004 -10012.

Ames MM, Selassie CD, Woodsoon LC, Loon JA, Hansch C, Weinshilbourn R, (1986) Thiopurine methyltransferase: structure-activity relationships for benzoic acid inhibitors and thiophenol substrates *J.Med. Chem.* 29: 354.

Ameyaw MM, Collie-Duguid ES, Powrie RH, Ofori-Adjei D, McLeod HL (1999) Thiopurine methyltransferase alleles in British and Ghanaian populations. *Hum Mol Genet* 8:367-370.

Anders PG, Friedman LS. Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Clin North Am.* 1999; 28:255-265

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

Andrew, A. S., Karagas, M. R., Nelson, H. H., Guarrera, S., Polidoro, S., Gamberini, S., Sacerdote, C., Moore, J. H., Kelsey, K. T., Demidenko, E., Vineis, P. and Matullo, G., 2008, DNA repair polymorphisms modify bladder cancer risk: a multifactor analytic strategy *Hum Hered*, 65 (2), 105-118.

Anttila S, Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Karjalainen A, Nurminen T, Vainio H. Combined effect of CYP1A1 inducibility and GSTM1 polymorphism on histological type of lung cancer. *Carcinogenesis* 1994; 15: 1133–1135.

Arvind P. Singh, Parag P. Shah, Munindra Ruwali, Neeraj Mathur, Mohan C. Pant, and Devendra Parmar. Polymorphism in Cytochrome P4501A1 is Significantly Associated with Head and Neck Cancer Risk *Cancer Investigation*, 27:869–876, 2009

Autrup H., (2000). Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutation Research*, 464, 65– 76.

Aynacıoğlu A.S., Brockmüller J., Bauer S., Sachse C., Güzelbey P., Öngen Z., Nacak M., Roots I., Frequency of cytochrome P4502C9 variants in a Turkish population and functional relevance for phenytoin, *Br. J. Clin. Pharmacol* 48 (1999) 409-415.

Aynacıoğlu, A. S. (2001). Psikiyatrik Hastalıkların İlaçlarla Tedavisinde Farmakogenetiğin Önemi. *Klinik Psikiyatri*;4: 249-252.

BAROULI R., MOREL Y., (2001). Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochemical Pharmacology*: 61:511-516.

Bau, D. T., Wu, H. C., Chiu, C. F., Lin, C. C., Hsu, C. M., Wang, C. L., Wang, R. F. and Tsai, F. J., 2007, Association of XPD polymorphisms with prostate cancer in Taiwanese patients, *Anticancer Res*, 27 (4C), 2893-2896.

Baxter, S.W., Choong, D.Y.H., Campbell, I.G., Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and susceptibility to ovarian cancer. *Cancer Letters*, 2002, 177, 75–81.

Benett RA, Rubin PH, Present DH: Frequency of inflammatory bowel disease in offspring of couples both presenting with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 100(6):1638,1991.

Benhamou, S., Reinikainen, M., Bouchardy, C., Dayer, P., Hirvonen, A. Association between lung cancer and microsomal epoxide hydrolase genotypes. *Cancer Research*, 1998, 58, 5291–5293.

Benny, K. and Abraham, C. (2001). Genetic polymorphism of CYP2D6, *Indian Journal of Pharmacology*, 33: 147-169.

Berhane K, Widersten M, Engström A, Kozarich JW, Mannervik B Detoxication of base propanals and other  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1480–1484.

Bitton A, Sewitch MJ, Peppercorn MA, deB Edwardes MD, Shah S, Ransil B, Locke SE. Psychosocial determinants of relapse in ulcerative colitis: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol*. 2003;98(10):2203-8

Bliss DZ, Sawchuk L . Nursing management lower gastrointestinal problems. In : Lewis S M, H eitkemper MM, D irksen S R ( eds). *M edical-Surgical Nursing*, 6. e d. Mosby, SLLouis, 2004 ; 1067-1076.

Both H,Torp-Pedersen K,Kreiner S,et alrClinical appearance at diagnosis ulcerative colitis and Chron's disease in regional patient group.*Scand J Gastroenterol* 18(7):987,1983

Boztaş G. Ülseratif kolitte tıbbi tedavi ve ameliyat indikasyonları. Kolon ve Rektum Hastalıkları 2000 7.*Uzmanlık Sonrası Eğitim Kursu*, Crowne Plaza Hotel, İstanbul, 11-12 Ekim 2002; 39-44.

Butler WJ, Ryan P, Roberts Thomson IC. Metabolic genotypes and risk for colorectal cancer: increased risk in individuals with glutathione transferase Theta 1 (GSTT1) gene defect. *Gastroenterology* 1997; 112: A542.

Cao Y. Miao XP. Huang MY. Deng L. et al. Polymorphisms of XRCC1 genes and risk of nasopharyngeal carcinoma in the Cantonese population. *BMC Cancer*. 2006; 6: 167

Chacko P. Rajan B. Joseph T. et al. Polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 and genetic susceptibility to breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2005; 89: 15-21

Chapman RW, Selby WS, Jewell DP. Controlled trial of intravenous metronidazole as an adjunct to corticosteroids in severe ulcerative colitis. *Gut*. 1986;27(10):1210-2

Chen CL, Liu Q, Relling MV. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 187–191.

Chen CL, Liu Q, Relling MV. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 187–191.

Chenevix Trench G, Young J, Coggan M, Board P. Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms: susceptibility to colon cancer and age of onset. *Carcinogenesis* 1995; 16: 1655– 1657.

Chih-Ching Yeha, Fung-Chang Sungc, Li-Tang Kuod,e, Wan-Ping Hsua, Hsiang-Yu Chua Polymorphisms of cytochrome P450 1A1, cigarette smoking and risk of coronary artery disease. *Mutation Research* 667 (2009) 77–81 2009

Collins P, Rhodes J. Ulcerative colitis: diagnosis and management. *BMJ* 2006;333;340-3

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

Cortessis, V., Seigmund, K., Chen, Q., Zhou, N., Diep, A., Frankl, H., Lee, E., Zhu, Q.S., Haile, R., Levy, D. A case – control study of microsomal epoxide hydrolase, smoking, meat consumption, glutathione S-transferase M3 and risk of colorectal adenomas. *Cancer Research*, 2001, 61, 2381–2385.

Costa S. Pinto D. Paraira D. et al. DNA repair polymorphisms might contribute differentially on familial and sporadic breast cancer susceptibility: a study on a Portuguese population. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2006; 10(1007): 10549-006-9364-z

Cotton SC, Sharp L, Little J, Brockton N. Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 7– 32.

Crofts F, Taioli E, Trachman J, Cosma GN, Currie D, Toniolo P, Garte SJ: Functional significance of different human CYP1A1 genotypes. *Carcinogenesis* 1994; 15: 2961–2963.

D J de Jong, E M J van der Logt, A van Schaik, H M J Roelofs, W H M Peters, T H J Naber. Genetic polymorphisms in biotransformation enzymes in Crohn's disease: association with microsomal epoxide hydrolase *Gut* 2003;52:547 551

Dahl, M. L., Johansson, I., Bertilsson., L., Ingelman-Sundberg, M., Sjoqvist, F. (1995). Ultrarapid hydrxylation of debrisoquine in a Swedish population. *Analysis of the molecular genetic basis, J Pharmacol Exp Ther.*, 274:516-520.

Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev.* 2004;3(5):394-400. Review

de Jong MM, Nolte IM, te Meerman GJ, van der Graaf WTA, de Vries EGE, Sijmons RH ve ark. Low-penetrance genes and their involvement in colorectal cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1332–1352.

Deakin M, Elder J, Hendrickse C, Peckham D, Baldwin D, Pantin C ve ark. Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis* 1996; 17: 881–884.

Devecioğlu S, Şen D, Tufan T . Ülseratif kolit. İçinden : Sayek İ (ed). *Temel Cerrahi*. 2.ed. Melisa Matbaacılık, İstanbul, 1996 ; 1124-1133.

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.

Dieleman LA, Goerres MS, Arends A, Sprengers D, Torrice C, Hoentjen F, Grenther WB, Sartor RB. Lactobacillus GG prevents recurrence of colitis in HLA-B27 transgenic rats after antibiotic treatment. *Gut.* 2003;52(3):370-6

Eaden J, Abrams K, Ekbom A, Jackson E, Mayberry J. Colorectal cancer prevention in ulcerative colitis: a case-control study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2000;14(2):145-53

El-Zein RA, Zwischenberger JB, Abdel-Rahman SZ, Sankar AB, Au WW. Polymorphism of metabolizing genes and lung cancer histology: prevalence of CYP2E1 in adenocarcinoma, *Cancer Lett* 1997; 112: 71–78.

Epoxide hydrolase Tyr113His polymorphism is associated with elevated risk of colorectal polyps in the presence of smoking and high meat intake. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2001, 10, 875–882.

Ergun Pinarbasi, Ferda E. Percin, Meral Yilmaz, Egemen Akgun, Meral Cetin and Ali Cetin. Association of microsomal epoxide hydrolase gene polymorphism and pre-eclampsia in Turkish women. *J. Obstet. Gynaecol. Res. Vol. 33, No. 1: 32–37, February 2007*

Farmer R.G. Inflammatory bowel disease, clinical features. In: Berk JE, Haubrich WS, Kalser MH, Roth JLA, Schaffner F, eds. *Bockus gastroenterology*. Vol 2. 5th ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1994; 1338-42.

Fernández-Bañares F, Hinojosa J, Sánchez-Lombrana JL, Navarro E, Martínez-Salmerón JF, García-Pugés A, González-Huix F, Riera J, González-Lara V, Domínguez-Abascal F, Giné JJ, Moles J, Gomollón F, Gassull MA. Randomized

Figueras, J.T., Gene, M., Gomez – Catalan, J., Pigue, E., Borrego, N., Coballero, M., Cruellas, F., Raya, A., Dicenta, M., Corbella, J. Microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase polymorphisms in relation to laryngeal carcinoma risk. *Cancer Letters*, 2002, 187, 95–101.

Fojo T. Cancer DNA repair mechanisms and resistance to chemotherapy. *J for Rheumatoid arthritis. Rheumatol Int.* 2006; 26: 749-751

Furrie E, Macfarlane S, Cummings JH, Macfarlane GT. Systemic antibodies towards mucosal bacteria in ulcerative colitis and Crohn's disease differentially activate the innate immune response. *Gut.* 2004;53(1):91-8

Gasson, A.G., Zheng, Z., Chiasson, D., MacDonald, K., Riddell, D.C., Guernsey, J.R., Guernsey, D.L., McLaughlin, J. Associations between genetic polymorphisms of phase I and phase II metabolizing enzymes, P53 and susceptibility to esophageal adenocarcinoma. *Cancer Detection and Prevention*, 2003, 27, 139-146.

Gawronska SB, Lubinski J, Kladny J, Kurzawski G, Bielicki D, Wojcicki M et al. Polymorphism of GSTM1 gene in patients with colorectal cancer and colonic polyps. *Exp Toxicol Pathol* 1999; 51: 321–325.

Gertig DM, Stampfer M, Haiman C, Hennekens CH, Kelsey K, Hunter DJ. Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and colorectal cancer risk: a prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 1001–1005.

Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Kearney J et al. A prospective study of cigarette smoking and risk of colorectal adenoma and colorectal cancer in U.S. men. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 183-191.

glutathione S-transferase T1 and microsomal epoxide hydrolase in aflatoxin – associated hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2001, 10, 785–791.

Godet PG, May GR, Sutherland LR. Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. *Gut.* 1995;37(5):668-73

Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and

Griese, E. U., Asante Poku, S., Ofori-Adjei, D., Mikus, G., Eichelbaum, M. (1999). Analysis of the CYP2D6 gene mutations and their consequences for enzyme

Gros L, Saparbaev M, Laval J. Enzymology of the repair of free radicals induced DNA damage. *Oncogene* 2002; 21: 8905-8925.

Gsur, A., Zidek, T., Schnattinger, K., Feik, E., Haidinger, G., Hollaus, P., Mohn – Staudner, A., Armbruster, C., Madersbacher, S., Schatzl, G., Trieb, K., Vutuc, C., Micksche, M. Association of microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk. *British Journal of Cancer*, 2003, 89, 702–706.

Hassett C, Aicher L, Sidhu JS, et al. Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Hum Mol Genet* 1994;3:421–8.

Hawsk JH. Nursing care of clients with intestinal disorders. In : *Black JM (ed). Medical- Surgical Nursing*. 5.ed. W.B.Saunders Company, Philadelphia, 1997 ; 1794-1808.

Hawthorne AB. Ciclosporin and refractory colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003;15(3):239-44. Review

Hayashi SI, Watanabe J, Nakachi K, Kawajiri K. Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA1 gene. *J Biochem* 1991; 110: 407–411.

Hemminki, K. and Shields, P. G., 2002, Skilled use of DNA polymorphisms as atol for polygenic cancers, *Carcinogenesis*, vol. 23, no.2, 379-380. *Hepatol*. 1998;10(3):243-9

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

Hiratsuka M, Inoue T, Omori F, Agatsuma Y, Mizugaki M (2000) Genetic analysis of thiopurine methyltransferase polymorphism in a Japanese population. *Mutat Res* 448(1):91-5.

Hiromistu Ban, Akira Andoh, Hirotsugu Imaeda, Ayako Kobori, Shigeki Bamba, Tomoyuki Tsujikawa, Masaya Sasaki, Yasuharu Saito, Yoshihide Fujiyama The multidrug-resistance protein 4 polymorphism is a new factor accounting for thiopurine sensitivity in Japanese patients with inflammatory bowel disease *J Gastroenterol*.

Hirvonen, A. Polmorphisms of xenobiotics-metabolizing enzymes and susceptibility to cancer. *Environmental Health Perspectives*, 1999, 107, 37–47.

Hon YY, Fessing MY, Pui CH, Relling MV, Krynetski EY, Evans WE (1999) Polymorphism of theopurine Smethyltransferase gene in African-Americans. *Hum Mol Genet* 8(2):371-376.

Hsieh, Y. Y., Chang, C. C., Bau, D. T., Yeh, L. S., Tsai, F. J. and Tsai, C. H, 2008, X-ray repair cross-complementing group 4 (XRCC4) promoter 1394( \*)T related genotype, but not XRCC4 codon 247/intron 3 or xeroderma pigmentosum group D codon 312, 751/promoter -114, polymorphisms are correlated with higher susceptibility to myoma, *Fertil Steri*, Jan 2 (in press).

Hu Z. Ma H. Chen F. Wei Q. Shen H. XRCC1 Polymorphisms and Cancer Risk: A Meta –analysis of 38 Case-Control Studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14:7

Ingelman-Sundberg, M. (2001). Genetic Variability in Susceptibility and Response to Toxicants, *Toxicol Lett.*,120, no. 1-3 : 259-68.

Ingelman-Sundberg, M., Oscarsson, M. , Lellan, R. A. (1999). Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment,



Ishibe N, Hankinson SE, Colditz GA, Spiegelman D, Willett WC, Speizer FE, Kelsey KT, Hunter DJ. Cigarette smoking, cytochrome P450 1A1 polymorphisms and breast cancer risk in the Nurses' Health Study. *Cancer Res* 1998; 58: 667–671.

Ismail AS, Hooper LV. Epithelial cells and their neighbors. IV. Bacterial contributions to intestinal epithelial barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;289(5):779-84. Review

IHOP – Information Hyperlinked over Proteins. Regiospecific expression of importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol*, 45 (6), 525-538.  
inactivation of carcinogenic and cytotoxic metabolites derived from aromatic and

J. Fretland, A., Omiecinski, C.J. Epoxide Hydrolases: Biochemistry and molecular biology. *Chemico-Biological Interactions*, 2000, 129, 41–59.

Jahnke V, Matthias C, Fryer A, Strange R. Glutathione S-transferase and cytochrome-P-450 polymorphism as risk factors for squamous cell carcinoma of the larynx. *Am J Surg* 1996; 172: 671–673.

Jewell DP . Ulcerative colitis. In : Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH (eds). *Gastrointestinal and Liver Disease*. 7. ed. B.Saunders Company, Philadelphia, 2002 ; 2039-2058.

Jiao, L., Hassan, M. M., Bondy, M. L., Abbruzzese, J. L., Evans, D. B. and Li, D., 2007, The XPD Asp312Asn and Lys751Gln polymorphisms, corresponding haplotype, and pancreatic cancer risk, *Cancer Lett*, 8, 245 (1-2), 61-68.

Jourenkova – Mironova, N., Mitrunen, K., Bouchardy, C., Dayer, P., Benhamou, S., Hirvonen, A. High – activity microsomal epoxide hydrolase genotypes and risk of oral, pharynx, and larynx cancers. *Cancer Research*, 2000, 60, 534–536.

Jourenkova N, Reinikainen M, Bouchardy C, Dayer P, Benhamou S, Hirvonen A. Larynx cancer risk in relation to glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes and tobacco smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 19–23.

Kantarci, S., Eraslan, S. ve Laleli, K. Y., 1999, Türk toplumunda sık görülen kalıtsal hastalıklarda PCR tekniğine dayalı DNA tanı yöntemlerinin geliştirilmesi ve servis olarak sunulması, *Perinotoloji Dergisi*, c., 7, s. 1.

Kato S, Bowman ED, Harrington AM, Blomeke B, Shields PG. Human lung carcinogen–DNA adduct levels mediated by genetic polymorphisms in vivo. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 902–907.

Katoh T, Inatomi H, Nagaoka A., Sugita A. Cytochrome P4501A1 gene polymorphism and homozygous deletion of the glutathione S-transferase M1 gene in urothelial cancer patients. *Carcinogenesis* 1995; 16: 655–657.

Katoh T, Nagata N, Kuroda Y, Itoh H, Kawahara A, Kuroki N ve ark. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) genetic polymorphism and

susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1855– 1859.

Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Yoshii A, Shinoda N, Watanabe J. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P4501A1 gene. *FEBS Lett* 1990; 263: 131-133.

Kayaalp, O. (1994). İlaçların biyotransformasyonu; *Tıbbi Farmakoloji*, Feryal

Kaymakoğlu S. Ulseratif kolitte ne zamana kadar tıbbi tedavi? İndetermine kolit tanısının önemi. Kolon ve Rektum Hastalıkları 2000 5. *Uzmanlık Sonrası Eğitim Kursu*. Eresin Hotel, İstanbul, 20-21 Ekim 2000 ; 70-71.

Ketterer B, Haris JM, Talaksa G Meyer DJ, Pemble SE, Taylor JB ve ark. The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer. *Environ Health Perspect* 1992; 98: 87–94.

Kihara M, Kihara M, Kubota A, Furukawa M, Kimura H. GSTM1 gene polymorphism as a possible marker for susceptibility to head and neck cancers among Japanese smokers. *Cancer Lett* 1997; 112: 257–262.

Kim SU, Kyung S, Yoon KS. et al. XRCC1 genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Pharmacogenetics*. 2002; 12: 335-338

Kiss I, Sandor J, Pajkos G, Bogner B, Hegedus G, Ember I. Colorectal cancer risk in relation to genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1, 2E1, and glutathione-S-transferase M1 enzymes. *Anticancer Res* 2000; 20: 519– 522.

Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol*. 2002;37(9):1034-41

Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG. Appendectomy and the development of ulcerative colitis: results of a metaanalysis of published case-control studies. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(1):171-6

Koyama A, Kubota Y, Shimamura T, Horiuchi S. Possible association of the Xray cross complementing gene 1 (XRCC1) Arg280His polymorphisms as a risk

Lancaster, J.M., Brownlee, H.A., Bell, D.A., Futreal, P.A., Marks, J.R., Berchuck, A., Wiseman, R.W., Taylor, J.A. Microsomal epoxide hydrolase polymorphism as a risk factor for ovarian cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 1996, 17, 160–2.

Lashner B. AApidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am*.1995;24(3):467-74.

Lee E, Huang Y, Zhao B, Seow CF, Balakrishnan A, Chan SH. Genetic polymorphism of conjugating enzymes and cancer risk: GSTM1, GSTT1, NAT1 and NAT2. *J Toxicol Sci* 1998; 23:140–142.

Lemos, M. C., Cabrita, F.J., Silva, H.A., Vivan, M., Plácido, F., Regateiro, F.J.(1999). Genetic polymorphism of CYP2D6, GSTM1 and NAT2 and susceptibility to haematological neoplasias. *Carcinogenesis.*, 20 (7): 1225-9.

Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM. (1990) Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Lancet.* 336, 225–229.

Lennard L, Van Loon JA, Weinshilboum RM. Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity: relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Clin Pharmacol Ther.* 1989;46(2):149-54

Li H., Feng L., Xu Y., Yao L., Ouyang T., Li J., Wang T., Fan Z., Lin B., Li J., Xie Y. (2006). The association of CYP2D6 \*10 polymorphism with breast cancer risk and clinico-pathologic characteristics in Chinese women. *Acta. Oncol.*, 45(5), 597- 601.

Lin, P., Wang, S.L., Chen, K.W., Lee, H.S., Tsai, K.J., Chen, C.Y., Lee, H. Association of CYP1A1 and mEH polymorphisms with lung squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 2000, 82, 852–857.

Lukas M, Bortlik M, Maratka Z. What is the origin of ulcerative colitis? Still more questions than answers. *Postgrad Med J.* 2006;82(972):620-5. Review

M.P. Gallegos-Arreola, J.R. González-García, L.E. Figuera, A.M. Puebla-Pérez, J.L. Delgado-Lamas, G.M. Zúñiga-González *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 41 (2008) 91–94

MA Q., LU AYH. (2003). Origins of Individual Variability in P450 1A Induction. *Chemical Research in Toxicology*, March. 16(3):249-256.

Macfarlane S, Furrie E, Cummings JH, Macfarlane GT. Chemotaxonomic analysis of bacterial populations colonizing the rectal mucosa in patients with ulcerative colitis. *Clin Infect Dis.* 2004;38(12):1690-9  
maintaining remission in ulcerative colitis. Spanish Group for the Study of Crohn's

Mannervik B, Awasthi YC, Board PG, Hayes JD, Di Ilio C, Ketterer B et al. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem J* 1992; 282: 305–306.

Mannervik B, Danielson UH. Glutathione transferase structure and catalytic activity. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1988; 23: 281–337.

Marteau P, Lepage P, Mangin I, Suau A, Doré J, Pochart P, Seksik P. Review article: gut flora and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20 (suppl 4):18-23. Review

Mawdsley JE, Rampton DS. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut.* 2005;54(10):1481-91. Review

Mayer EA. The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut.* 2000;47(6):861-9. Review

McCarty, K. M., Smith, T. J., Zhou, W., Gonzalez, E., Quamruzzaman, Q., Rahman, M., Mahiuddin, G., Ryan, L., Su, L. and Christiani, D. C., 2007, Polymorphisms in XPD (Asp312Asn and Lys751Gln) genes, sunburn and arsenic-related skin lesions, *Carcinogenesis*, 28 (8), 1697-1702.

McGlynn, K.A., Rosvold, E.A., Lustbader, E.D., Hu, Y., Clapper, M.L., Zhou, T., Wild, C.P., Xia, X., Baffoe-Bonnie, A., Ofori-Adjei, D., Chen, G., London, W.T., Shen, F., Buetow, K.H. Susceptibility to hepatocellular carcinoma is associated with genetic variation in the enzymatic detoxification of aflatoxin B1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92, 2384–2387.

McLeod HL, Krynetski EY, Relling MV, Evans WE (2000) Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia *Leukemia* 14: 567–572.

Mechanic, L. E., Millikan, R. C., Player, J., de Cotret, A. R., Winkel, S., Worley, K., Heard, K., Heard, K., Tse, C. K. and Keku, T., 2006, Polymorphisms in nucleotide excision repair genes, smoking and breast cancer in African Americans and whites: a populationbased case-control study, *Carcinogenesis*, 27 (7), 1377-1385

Mendeloff AL, Calkins BM: The epidemiology of idiopathic inflammatory bowel disease. In Kirsner JB, Shorter RG (eds): *Inflammatory Bowel Disease*, 4th ed. Philadelphia, Lea and Febiger, 1995, p 31

Mercan S . Kolitler. İçinden : Kalaycı G (ed). *Genel Cerrahi* . Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2002 ; 1321-1326.

Miller M.C., Harvey W., Douglas M., Bell A. (2001). Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicology Letters*, 120, 269–280.

Mittal RD, Srivastava DS, Mandhani A, Kumar A, Mittal B. Polymorphism of GSTM1 and GSTT1 genes in prostate cancer: a study from North India. *Indian J Cancer* 2004; 41: 115-119.

Mittermaier C, Dejaco C, Waldhoer T, Oefflerbauer-Ernst A, Miehsler W, Beier M, Tillinger W, Gangl A, Moser G. Impact of depressive mood on relapse in patients with inflammatory bowel disease: a prospective 18-month follow-up study. *Psychosom Med.* 2004;66(1):79-84

Mohrenweiser HW, Carrano AV, Fertitta A ve ark. Refined mapping of the three DNA repair genes ERCC1, ERCC2 and XRCC1 on human chromosome 19. *Cytogenet.cell genet.*, 1989; 52: 11-14.

Monzo, M., Brunet, S., Urbano-Ispizua, A., Navarro, A., Perea, G., Esteve, J., Artells, R., Granell, M., Berlanga, J., Ribera, J. M., Bueno, J., Llorente, A., Guardia, R., Tormo, M., Torres, P., Nomdede'u, J. F., Montserrat, E. And Sierra, J., 2006, Genomic polymorphisms provide prognostic information in intermediterranean acute myeloblastic leukemia, *BLOOD*, vol,107, no,12, 4871- 4879.

Muge Aydin-Sayitoglu, Ozden Hatirnaz, Nevin Erensoy, and Ugur Ozbek. Role of CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1, GSTT1, and GSTM1 Genes in the

Susceptibility to Acute Leukemias. *American Journal of Hematology* 81:162–170 (2006).

Murray K. R. (1996). *Harper'in Biyokimyası*, Zenobiyotiklerin Metabolizması, S: 799-806, ISBN:975-953-1-1.

Nakachi K, Imai K, Hayashi S, Kawajiri K. Polymorphism of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population. *Cancer Res* 1993; 53: 2994–2999. *Nat.Cancer Inst* 2001; 93: 1434-1436.

Newman, J.W., Morisseau, C., Hammock, B.D. Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Progress in Lipid Research*, 2005, 44, 1– 51.

Ningxia Lu, Bin Wu, Yankai Xia, Wei Wang, Aihua Gu, Jie Liang, Chuncheng Lu, cLin Song, Shoulin Wang, Yuzhu Peng, Zhengdong Zhang and Xinru Wang Polymorphisms in CYP1A1 gene are associated with male infertility in a Chinese population. *International journal of andrology* ISSN 0105-6263 2007

Noritaka Takatsu, Toshiyuki Matsui, Yuji Murakami, Hiroshi Ishihara, Takashi Hisabe, Takashi Nagahama, Shinichirou Maki, Takahiro Beppu, Yasuhiro Takaki, Fumihito Hirai and Kenshi Yao Adverse reactions to azathioprine cannot be predicted by thiopurine S-methyltransferase genotype in Japanese patients with inflammatory bowel disease

Nussbaum, R. L., McInnes, R. R. And Willard, H. F., Çeviren:Emre, S., 2005, İnsanlarda genetik varyasyon, mutasyon ve polimorfizm, *Tompson&Tompson Tıbbi Genetik*, s, 79-94, Güneş Kitapevi, Ankara.

Ohkusa T, Sato N, Ogihara T, Morita K, Ogawa M, Okayasu I. Fusobacterium varium localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002;17(8):849-53

Ondrej Slanar, Martin Bortlík, Helena Buzkova , Robert Donoval, Kristina Pechandova , Ivan Sebesta, Milan Lukas, and Frantisek Perlík POLYMORPHISMS OF THE TPMT GENE IN THE CZECH HEALTHY POPULATION AND PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, 27:835–838, 2008

Pamela L. Paris,2 Patrick A. Kupelian, Jeffrey M. Hall, eri L. Williams, Howard Levin, Eric A. Klein Graham Casey, and John S. Witte Association between a CYP3A4 Genetic Variant and Clinical Presentation in African-American Prostate Cancer Patients *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* Vol. 8, 901–905, October 1999

Parkes M, Barmada MM, Satsangi J, et al: The IBD2 locus shows linkage heterogeneity between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Am J Hum Genet* 67:1605,2000.

Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM ve ark. Human glutathione S-transferase Theta\_GSTT1.: cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994; 300: 271–276.

Perera, F. P. (1996). Molecular Epidemiology: Insights Into Cancer Susceptibility, Risk Assessment, and Prevention. *J Natl Cancer Inst* 88, no. 8:496-509.

Pınarbaşı, H. (2002). Bir türk popülasyonunda GSTM1 polimorfizmi ve akciğer kanseri ilişkisi, Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Sivas.

Pickett CB, Lu AYH. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 743–764.

Punnonen, K., Heinonen, S. Two exonic single nucleotide polymorphisms in the microsomal epoxide hydrolase gene are jointly associated with pre – eclampsia. *European Journal of Human Genetics*, 2002, 10, 569–573.

Qian Cao a, b Qin Zhu c Yan Shang b Min Gao a, b Jianmin Si a, b Thiopurine Methyltransferase Gene Polymorphisms in Chinese Patients with *Inflammatory Bowel Disease Digestion* 2009;79:58–63

R. C. SOBTI, S. SHARM, A. JOSHI, S. K. JINDAL and A. JANMEJA. CYP1A1 and CYP2D6 polymorphism and risk of lung cancer in a North Indian population. *BIOMARKERS, VOL. 8, NO. 5 (SEPTEMBER\_/OCTOBER 2003), 415\_/428*

Rao SS, Holdsworth CD, Read NW: Symptoms and stool patterns in patients with ulcerative colitis. *Gut* 29(3):342, 1988

Raunio, H., Pelkonen, O. Genetic factors in the activation and inactivation of chemical carcinogens. *Cancer Genetics*, 1995, 1, 230–258.

Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB: Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 1998, 90:1225-1229.)

Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6: 733- 743.

Ruzzo, A., Canestrari, E., Maltese, P., Pizzagalli, F., Graziano, F., Santini, D., Catalano, V., Ficarella, R., Mari, D., Bissoni, R., Giordani, P., Giustini, L., Lippe, P., Silva, R., Mattioli, R., Torresi, U., Latini, L. and Magnani, M., 2007, Polymorphisms in genes involved in DNA repair and metabolism of xenobiotics in individual susceptibility to sporadic diffuse gastric cancer, *Clin Chem Lab Med*, 45, 822-828.

Ryberg D, Høwer A, Phillips DH, Haugen A. Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female cancer patients. *Cancer Res* 1994; 54: 5801–5803.

Rzeszowska-Wolny J, Polanska J, Pietrowska M, Palyvoda O, Jaworska J, Butkiewicz D, Hancock R., 2005, Influence of polymorphisms in DNA repair genes XPD, XRCC1 and MGMT on DNA damage induced by gamma radiation and its repair in lymphocytes *in vitro*, *Radiat Res*, 164 (2),132-140.

S. Pakakasama, E. Mukda, W. Sasanakul, P. Kadegasem, U. Udomsubpayakul, A. Thithapandha, and S. Hongeng Polymorphisms of Drug-Metabolizing Enzymes and Risk of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia *American Journal of Hematology* 79:202–205 (2005)

Saadat I, Saadat M. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes and the risk of gastric and colorectal cancers. *Cancer Lett* 2001; 169 (1): 21-26.

Sachse, C., Brockmöller, J., Bauer, S., Roots, I. (1997). Cytochrome P4502D6 variants in a Caucasian population; allele frequencies and phenotypic consequences, *Am J Hum Genet*, 60, 284-295.

Sandle GI,Higgs N,Crowe P,et ahCellular basis for defective electrolyte transport in inflamed human colon.*Gastroenterology* 99(1):97,1990.

Satsangi J, Grootcholten C, Holt H, Jewell DP: Clinical patterns of familia inflammatory bowel disease. *Gut* 38:738,1996.

Satsangi J, Jewell DP, Rosenberg WMC, Bell JI: Genetics of inflammatory bowel disease. *Gut* 35:696,1994.

Schultz M, Veltkamp C, Dieleman LA, Grenther WB, Wyrick PB, Tonkonogy SL, Sartor RB. Lactobacillus plantarum 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis*. 2002;8(2):71-80

Seidegård J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WR. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on *trans*-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 7293– 7297.

Shen M ,Hung RJ, Brennan P ve ark. Polymorphisms of the DNA repair genes XRCC1, XRCC3, XPD interaction ith environmental exposures, and bladder cancer risk in a case-control study in Northern Italy. *Cancer Epidem. Biomarkers and Preven.* 2003; 12: 1234-1240.

Shiseki, K., Itoda, M., Saito, Y., Nakajima, Y., Maekawa, K., Kimura, H., Goto, Y., Saitoh, O., Katoh, M., Ohnuma, T., Kawai, M., Sugai, K., Ohtsuki, T., Suzuki, C., Minami, N., Ozawa, S., Sawada, J. Five novel single nucleotide polymorphism in the EPHX gene encoding microsomal epoxide hydrolase. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2003, 18, 150–153.

Sivaraman L, Leatham MP, Yee J, Wilkens LR, Lau AF, Le Marchand L. CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 3692–3695.

Skoda, R.C., Demierre, A., McBride, O.W., Gonzalez, F.J., Meyer, U.A. Human microsomal xenobiotic epoxide hydrolase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263, 1549–1554.

Slattery ML, Potter JD, Ma KN, Caan BJ, Leppert M, Samowitz W. Western diet, family history of colorectal cancer, NAT2, GSTM-1 and risk of colon cancer. *Cancer Causes Control* 2000; 11: 1–8.

Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Bigler J, Caan B, Leppert M. NAT2, GSTM-1, cigarette smoking, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 1079–1084.

Smith, C. A., Gough, A. C., Moss, J. E., Vallis, K. A., Wolf, C. R. (1992). Relationship between the debrisoquine hydroxylase polymorphism and cancer susceptibility, *Carcinogenesis*, Oxford Univ Press, Pp. 1035-1038.

Smith, C.A.D., Harrison, D.J., Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *The Lancet*, 1997, 350, 630–33.

Soya Sisy Sam, MPharm, (PhD), Vinod Thomas, MD, CYP1A1 POLYMORPHISMS AND THE RISK OF UPPER AERODIGESTIVE TRACT CANCERS IN AN INDIAN POPULATION *HEAD & NECK*—DOI 10.1002/hed December 2008

Sreeja, L., Syamala, V. S., Syamala, V., Hariharan, S., Raveendran, P. B., Vijayalekshmi., R. V., Madhavan, J. and Ankathil, R., 2007, Prognostic importance of DNA repair gene polymorphisms of XRCC1 Arg399Gln and XPD Lys751Gln in lung cancer patients from India, *J Cancer Res Clin Oncol*, 0171-5216, 1432-c1335.

Stenson WF: Inflammatory bowel disease. In Goldman L, Ausiello D (eds): *Cecil textbook of medicine*, 22nd edition. 861- 868, 2004.

Stern MC, Umbach DM, Van Gils CH ve ark. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark Prev*. 2001; 10: 125-131.

Stern, M. C., Conti, D. V., Siegmund, K. D., Corral, R., Yuan, J. M., Koh, W. P. and Yu, M. C., 2007, DNA repair single-nucleotide polymorphisms in colorectal cancer and their role as modifiers of the effect of cigarette smoking and alcohol in the Singapore Chinese Health Study, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16 (11), 2363-2372.

Stern, M. C., Siegmund, K. D., Conti, D. V., Corral, R. and Haile, R. W., 2006a, XRCC1, XRCC3, and XPD polymorphisms as modifiers of the effect of smoking and alcohol on colorectal adenoma risk, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15 (12), 2384- 2390.

Strange RC, Matharoo B, Faulder GC, Jones P, Cotton W, Elder JB ve ark. The human glutathione S-transferases: a case-control study of the incidence of the GST1 0 phenotype in patients with adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 1991; 12: 25–28.



Şelimen D. Gastro-intestinal sistem cerrahisinde hemşirelik bakımı. İçinden : Aksoy G (ed). *Cerrahi Hastalıkları Hemşireliği El Kitabı*. 1.baskı. Birlik Ofset, İstanbul, 1998; 115-136.

T.J., Su, L.,Christiani, D.C. The interactions between microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and cumulative cigarette smoking in different histological subtypes of lung cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2001, 10, 461–466.

Tabrizi A.R, Zehnbauer 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

Taioli E, Trachman J, Chen X, Toniolo P, Garte SJ. A CYP1A1 restriction fragment length polymorphism is associated with breast cancer in African–American women. *Cancer Res* 1995; 55: 3757–3758.

Takanashi, K., Tainaka, H., Kobayashi, K., Yasumori, T., Hosakawa, M.,Chiba, K. (2000) CYP2C9 Ile359 and Leu359 variants: enzyme kinetic study with seven substrates. *Pharmacogenetics*, 10 (2), 95-104.

Takeyabu, K., Yamaguchi, E., Suzuki, I., Nishimura, M., Hizawa, N., Kamakami, Y. Gene polymorphism for mEH and susceptibility to emphysema in a Japanese population. *European Respiratory Journal*, 2000,15, 891–894.

Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease.*Gut*. 2004;53(1):1-4

Taningher M, Malacarne D, Izzotti A, Ugolini D, Parodi S. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *Mutat Res*. 1999 ;436: 227-61.

Thomas GA, Rhodes J, Green JT. Inflammatory bowel disease and smoking--a review. *Am J Gastroenterol*. 1998;93(2):144-9. Review

Tilg H, Kaser A. Diet and relapsing ulcerative colitis: take off the meat? *Gut*.

Timersma, E.W., Omer, R.E., Bunschoten, A., Veer, P.V., Kok, F.J., Idris, M.O., Kadaru, A.M.Y., Fedail, S.S., Kampman, E. Role of genetic polymorphism of glutathione S-transferase T1 and microsomal epoxide hydrolase in aflatoxin – associated hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2001, 10, 785–791.

Tronstad – Elfström, L. Characterization of epoxide hydrolases from yeast and potato. *Uppsala University*, 2005.

Tugba Unsal & Ece Konac & Ediz Yesilkaya & Akin Yilmaz & Aysun Bideci & Hacer Ilke Onen & Peyami Cinaz & Adnan Menevse Genetic polymorphisms of FSHR, CYP17, CYP1A1, CAPN10, INSR, SERPINE1 genes in adolescent girls with polycystic ovary syndrome *J Assist Reprod Genet* (2009) 26:205–216.

Ulrich, M., Zanger, Raimundo,S., Eichelbaum, M. (2004). Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry, Naunyn-Schmiedeberg's *Archives of Pharmacology*, Volume 369, Number 1, pp. 23-37.

Unal, M., Güven, M., Batar, B., Ozaydin, A., Sarici, A. and Devranoglu, K., 2007 Polymorphisms of DNA repair genes XPD and XRCC1 and risk of cataract development, *Exp Eye Res*, 85, 328-334.

van Heel da, Satsangi J, Carey AH, Jewell DP: Inflammatory bowel disease:Progress toward a gene. *Can J Gastroenterol* 14(3): 207,2000.

Wei H, Zhou S, Li C, Zhang J, Wu J, Huang M (2005) Phenotyping and Genotyping Studies of Thiopurine S-Methyltransferase in Kazaks. *Pharm Res* 22(10):1762-

Welfare M, Monesola AA, Bassendine MF, Daly AK. Polymorphisms in GSTP1, GSTM1, and GSTT1 and susceptibility to colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 289– 292.

Wu, X., Gwyn, K., Amos, I.C., Makan, N., Hong, W.K., Spitz, M.R. The association of microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk in African – Americans and Mexican – Americans. *Carcinogenesis*, 2001, 22, 923–928.

Yang, Z. H., Du, B., Wei, Y. S., Zhang, J. H., Zhou, B., Liang, W. B., Jia, J., Zhang, B. L. and Zhang, L., 2007, Genetic polymorphisms of the DNA repair gene and risk of nasopharyngeal carcinoma, *DNA Cell Bio*, 26, 491-496.

Yavuz Silig, Hatice Pinarbasi, Sezgin Gunes, Semih Ayan, M.D., Hasan Bagci, and Oge Cetinkaya, Polymorphisms of CYP1A1, GSTM1, GSTT1, and Prostate Cancer Risk in Turkish Population *Cancer Investigation*, 24:41–45, 2006 ISSN: 0735-7907 print / 1532-4192 online Copyright c\_ Taylor & Francis Group, LLC

Ye, W., Kumar, R., Bacova, G., Lagergren, J., Hemminki, K. and Nyrén, O., 2006, The XPD 751Gln allele is associated with an increased risk for esophageal adenocarcinoma: a population-based case-control study in Sweden, *Carcinogenesis*, 27 (9), 1835-1841.

Yim, J.J., Park, G.Y., Lee, C.T., Kim, Y.W., Han, S.K., Shim, Y.S., Yoo, C.G. Genetic susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Koreans: combined analysis of polymorphic genotypes for microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase M1 and T1. *Thorax*, 2000, 55, 121–125.

Yin, L., Pu, Y., Liu, T.Y., Tung, Y.H., Chen, K.W., Lin, P. Genetic polymorphisms of NAD(P)H quinone oxidoreductase, CYP1A1 and microsomal epoxide hydrolase and lung cancer risk in Nanjing, China. *Lung Cancer*, 2001, 33, 133–41.

Zhang SZ, Zhao XH, Zhang DC. Cellular and molecular immunopathogenesis of ulcerative colitis. *Cell Mol Immunol*. 2006;3(1):35-40. Review

Zhong S, Wyllie AH, Barnes D, Wolf CR, Spurr NK. Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1821– 1824.

## EK-1

### PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ TIBBİ ETİK KURULU

#### BAŞVURU FORMU

**2 Ocak 2008.**

#### Araştırmanın Adı:

Sitokrom P450 1A1, 2A6, 2C9, 2D6, 2E1 ve 3A4 enzimlerinin Türk Ülseratif kolit hastalarında ve normal popülasyonda genetik polimorfizmi

#### Araştırmanın Genel Niteliği

Farmakogenetik ve Toksikokinetik

#### Araştırmanın Gerekçesi ve Amacı

Farmakogenetik, ilaca yanıt oluşturma veya toksisitenin gelişmesi bakımından bireyler veya çeşitli toplumlar arasında gözlenen farklılıkların oluşumunda genetik faktörlerin katkısını inceler. Bireylerde özellikle ilaç metabolize edici enzimlerin genetik varyasyonları, en uygun ilaç veya doz seçimi yapmaya olanak sağlayan farmakogenetik/toksikogenetik veya toksikogenomik yaklaşım giderek daha fazla klinik ve terapötik önem kazanmaktadır.

İlaçların büyük bir çoğunluğunun oksidatif metabolizmasından sorumlu sitokrom P450 enzimlerinde karşılaşılan genetik farklılıklar ilaç tedavilerinin yetersiz kalmasına ya da toksik reaksiyonların ortaya çıkmasına neden olarak bir çok ilacın metabolizmasında önemli rol oynamaktadır.

Bu araştırmada ilaç metabolizmasında önemi rol oynayan sitokrom P450 enzim ailerinden genetik polimorfizm gözlenen 3 aileye ait (CYP1, CYP2 ve CYP3) polimorfizmlerin normal ve kolit hastalarındaki dağılımları tespit edilmeye çalışılacak ve kolit hastalığı ile olası bağlantıları saptanmaya çalışılacaktır

#### Araştırmanın Gereç ve Yöntemi

Araştırmada Normal ve Kolit hastası bireylerden 2 mL kan alınarak bireylerde yukarıda verilen genlerin genotiplenmesi gerçekleştirilecektir. Bu amaçla;

1. Genomik DNA izolasyonu: Alınan kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu Takara's Dr. GenTLE (Blood) System Kit kullanılarak gerçekleştirilecektir. Sonuçta elde edilen DNA'nın konsantrasyonu spektrofotometrik olarak saptanacak ve -20°C'de saklanacaktır.
2. Genetik sinyalin çoğaltılması-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile DNA amplifikasyonu: İncelenecek gen bölgesi ticari olarak BioGen Firması aracılığı ile BioBasic (almanya) sentezlettiğimiz primerler (8 çift-8 polimorfizm için) PCR ile in vitro ortamda çoğaltılacaktır.

Örnek PCR Bileşemi (25 µl için)

2,5 µl 10X Taq buffer

2,5 µl MgCl

5 µldNTP karışımı (

0.5 µl Primer 1 (10pmol)

0.5 µl Primer 2 (10 pmol)

0,250µl Taq polimeraz (0,5 Unite)

1-4 µl genomik DNA (500 ng)

Distile su (hacmi 25 µl'ye tamamlayacak miktar)

94°C 30 s

35 Döngü 94°C 30 s

72°C 30 s

60°C 30 s

3. Genetik sinyalin tanımlanması- Endonükleaz kesimi ile mutasyon saptanması: PCR ile çoğaltılmış genetik sinyalin hangi şifreyi taşıdığı daha önce saptanmış bir mutasyonun (tek nükleotid polimorfizmi “SNP”) saptanması restriksiyon endonükleazların kullanılması ile gerçekleştirecektir.
4. Genetik sinyalin görüntülenmesi – DNA jel elektroforezi: Kesim reaksiyonu sonrasında oluşan ürünlerin agaroz jel üzerinde yürütülmesinden sonra oluşan bant paterni incelenerek bireyde mutasyon olup olmadığı saptanacaktır.

## Referanslar

Nebert DW 1997. Am. J. Hum. Genet. 60:265-271.

Handley L.JL et al., 2007. TRENDS in Genetics 23(9): 432-9.

Roelofs MJ et al., 2001. J. Med. Genet 38;234-237

Zemin Wang Z et al., 2006. BMC Cancer 6:287-295

Krajinovic M et al., 1999. Blood 93(5):1496-1501

## Araştırmanın Uygulama Yeri/Yerleri

Araştırmanın temel uygulama yeri PAÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji/Toksikoloji Araştırma Laboratuvarıdır. Gönüllülerden alınan örneklerin analiz ve incelemeleri burada gerçekleştirilecektir.

Hastalardan Kan örnekleri Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Kliniğine gelen kolit hastalığı teşhisi konulmuş hastalardan Prof. Dr. Necla OSMANOĞLU'nun kontrolünde alınacaktır. Gönüllülerden Kan örnekleri Müşerref Osman Nuri Yılmaz Aile Sağlık Merkezinde (Yenişehir-DENİZLİ) Doktor İl Deniz DURAN gözetiminde alınacaktır.

Alınan örneklerden yukarıda belirtilen yöntemler ile DNA izole edilecek ve izole edilen DNA'lar Araştırma laboratuvarımızda bulunan, şifreli-kodlanmış bir biçimde, kimseye bilgi verilmeden kilitlenebilen -80 °C derin dondurucuda muhafaza edilecektir. Bu örnekler zaten ancak çalışmada yapılacak analizleri karşılayacak kadardır ve artan örnek beklenmemektedir. Ancak çalışma tamamlandığında artan örnekler belirli süre sonunda kullanım özellikleri de yitirdiklerinden dolayı otoklav ile imha edilerek yok edilecektir.

### **Araştırmaya Kurum Dışından Katılan Merkezler (Varsa)**

Ege Üniversitesi Bu kuruma da ayrıca etik başvurusu yapılacaktır.

### **Araştırmada Öngörülen Gönüllüler Ve Varsa Kontrol Sayısı Ve Yaş Aralığı**

Araştırmada kan verecek olan bireyler Gönüllü bireyler olacaktır ve bu amaçla ekte sunulan Bilgilendirilmiş Gönüllü Onay Belgesi bireylere imzalatılacak ve bireyler bilgilendirilecektir.

Araştırma konusu toplum tarama çalışması olduğu için hem kontrol ve hem de hasta bireylerin dışlanma kriterleri yoktur. Ancak etik ve hukuki kısıtlamalar nedeni ile hasta ve kontrol grubu bireylerinin en az 18 yaşında reşit bireyler olması aranacaktır. Her iki grup bireyler için de üst yaş sınırı yoktur.

Hasta birey sayısı 200 kişi olarak hedeflenirken kontrol grubu birey sayısı 350- kişi olarak hedeflenmiştir. Bu sayılar bir toplum çalışmasında öngörülen sonuçlar elde edebilmek için gerekli minimum sayılar olduğu için seçilmiştir.

Hasta ve kontrol gruplar her hangi bir coğrafik kısıtlamaya tabi tutulmayacağı için nereden seçileceği gibi bir tanımlama getirilmesi son derece zordur. Hasta bireylerin çoğunlukla İzmir toplumundan olması muhtemeldir ancak ben şahsen kendim de bu hastalığı taşıyan bir birey olarak bu çalışmaya katılacağım ve kendim gibi tanıdığım bireylerden de örnek alınacaktır. Ayrıca çevre illerden gelen hastalarında olduğunu göz önüne alındığında Ege Bölgesi bireyleri olacağını söylemek yanlış olmayacaktır. Kontrol grubu bireyler için ise Denizli ili toplumunda bulunan bireyler olacaktır ancak burada da yine özellikle öğrencilerin farklı illerden olduğu göz önüne alındığında Türkiye toplumu olacaktır. Netice itibari ile hedeflenen çalışma araştırma başlığında da belirtildiği gibi Türk toplumunu belirlemektir ve o nedenle bireyler Türk toplumundan seçilecektir.

## **Gönüllüler İçin Araştırmaya Dahil Olma Kriterleri**

Kontrol grubu için Dahil olma kriterleri

- 18 yaş üstü olması
- Herhangi bir kronik rahatsızlığının olmaması
- Gönüllü olması

Hasta grubu için Dahil olma kriterleri

- Kolit hastası olması
- Gönüllü olması

Her iki grup için Dışlama Kriterleri

- 18 yaş altı olması

## **Uygulama Sırasında Alınması Gereken Güvenlik Önlemleri**

**(Entoksikasyon olasılığı varsa tedavisi belirtilmeli)**

Yoktur

**Araştırma Ekibi (Adı, Soyadı, Ünvanı)**

**İmza**

**a) Sorumlu Yürütücü:** Prof. Dr. Alaattin ŞEN

**b) Diğer araştırmacılar** Prof. Dr. Necla OSMANOĞLU

Dr. İldeniz DURAN

Araş. Gör. Aslı SEMİZ

Kübra AYNACI

Esra KUŞ

Seda SABAH

Levent ELMAS

Özgen BÜYÜKGÖZE



Araştırmaya Destek Veren Kurum ve/veya Kuruluşlar

Araştırmaya mali destek veren kurum yada kuruluş yoktur. Sorumlu yürütücünün kendi laboratuvar imkanları ile yürütülecektir ve bu imkanlar (sarf ve cihaz olarak) birimizde mevcuttur.

*Bu araştırma süresince Dünya Tıp Birliği (WMA) HELSİNKİ Bildirgesi (ve/veya Dünya Psikiyatri Birliği HAWAİİ Bildirgesi), İyi Klinik Uygulamaları ve İyi Laboratuvar Uygulamaları Kurallarına uyacağıma, beklenmeyen ters bir etki veya bir olay olduğunda derhal Etik Kurul'u haberdar edeceğime, araştırma sırasında çalışma protokolünde değişiklik yapılması gerektiğinde bunu yazılı olarak kurula bildireceğime, araştırmanın süresine göre 6 ayda bir Etik Kurul'a araştırmanın gidişi ile ilgili rapor sunacağıma, araştırma durdurulmuş ise bunu derhal Etik Kurul'a bildireceğime söz veririm.*

ARAŞTIRMA SORUMLU YÜRÜTÜCÜSÜ

Prof. Dr. Alaattin ŞEN

NOT: Araştırmacılar doldurdıkları bu başvuru formu ile birlikte 21480 Sayılı İlaç Araştırmaları Hakkında Yönetmelik'in 16-17.maddeleri doğrultusunda hazırlanmış onbir nüsha çalışma dosyasını da Tıbbi Etik Kurul Başkanlığı'na vereceklerdir.

## EK-2

### TAMPONLAR VE SOLÜSYONLAR

#### **Tris-HCl, pH 7,6 ( 10Mm );**

0,121 gr Tris tartılarak 60 mL distile suda çözülmüştür. Solüsyon sterilizasyon aşamasından sonra 4<sup>0</sup>C'de saklanmıştır.

#### **EDTA, pH 7.5 ( 100mM );**

3,72 gr Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O tartılmıştır ve bir miktar distile suda çözülmüştür. Çözünen EDTA pH 7.5 olacak şekilde 1M NaOH ile titre edilmiştir ve son hacim 100 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.Son olarak solüsyon sterile edilmiştir ardından 4<sup>0</sup>C'de saklanır.

#### **KCl ( 10Mm );**

7,45 gr KCl tartılmıştır ve bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Solüsyon sterile edildikten sonra 4<sup>0</sup>C'de saklanmıştır.

#### **MgCl<sub>2</sub> ( 400mM );**

8,13 gr MgCl<sub>2</sub> tartılmıştır ve bir miktar suda çözüldükten sonra son hacim 100mL'ye tamamlanmıştır. Solüsyon sterile edildikten sonra 4<sup>0</sup>C'de saklanmıştır.

### **T K M E ( Tris-KCl-MgCl<sub>2</sub>-EDTA ) Tamponu hazırlanışı;**

İlk olarak hazırladığımız Tris-HCl solüsyonunun üzerine 1mL KCl ( 1M ), 2mL EDTA (100mM ) pH 7.5 ve 1mL MgCl<sub>2</sub> ( 400M ) eklenmiştir. Ardından 1M HCl ile pH 7.6 olacak şekilde titrasyon işlemi yapılmıştır. Son hacim distile su ile 100mL'ye tamamlanmıştır. Solüsyon sterile edildikten sonra 4<sup>0</sup>C'de saklanmıştır.

### **4X Triton X-100;**

Triton-X-100'den 1mL alınmıştır ve 3mL distile su eklenmiştir.

### **% 20'lik SDS;**

20 gr SDS 70 mL distile suda çözülmüştür. Çözünen solüsyon 68<sup>0</sup>C'de ısıtılmıştır ve pH 7.2 olacak şekilde birkaç damla HCl eklenmiştir. Son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Bu solüsyon sterilizasyon işlemi gerektirmemiştir ve Ayrıca oda sıcaklığında saklanmıştır.

### **TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) Tamponu**

**10X stok solüsyon:**12,1 gr Trizma-base az suda çözülmüştür. Bu işlemden sonra 1,86 gr Na-EDTA bir miktar suda çözülmüştür. Bunun üzerine 2,86 mL glacial asetik asit eklenmiştir. Hazırlanan solüsyonlar 250mL'lik balona aktarılmıştır. Son hacim ultra saf su ile 250mL'ye tamamlanmıştır.

### **%70'lik ve %100'lük Etil Alkol ( EtOH );**

70 mL Etil alkol alınmıştır ve son hacim 100mL'ye tamamlanmıştır.

### **10X Loading Tampon;**

%0,25 bromfenol mavisi, %0,25 ksilen siyanol, % 20 fikor 400/ %30 gliserol, 0,1 EDTA pH 8.0, % 1 SDS. Tampon hazırlandıktan sonra 1'er mL olacak şekilde ependorflara konmuştur ve -20<sup>0</sup>C'de saklanmıştır.

### **PCR Tamponu ( 10X ) ( MBI Fermentas );**

100 mM Tris-HCl (pH 8.8 25<sup>0</sup>C), 500 mM KCl, %0.8 Nonidet P40. Bu tampon ve 25 mM MgCl<sub>2</sub> solüsyonu, Taq DNA polimeraz ile birlikte kullanılmıştır. Taq polimeraz, PCR tamponu ve MgCl<sub>2</sub> solüsyonları -20<sup>0</sup>C'de saklanmıştır.

### **dNTP Karışımı ( MBI Fermentas );**

10 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP solüsyon içinde sıvı halde bulunur. Solüsyon -20<sup>0</sup>C'de saklanmıştır.

### **Buffer TANGO™ ( MBI Fermentas )**

33mM Tris-asetat ( pH 7.9 ), 10 mM magnezyum asetat, 66 mM potasyum asetat, 0.1 mg/mL BSA.

Bu tampon MspI restriksiyon enzimi ile birlikte kullanılmıştır. Restriksiyon enzimi ve tampon -20<sup>0</sup>C'de saklanmıştır.

**Buffer R ( MBI Fermentas )**

10mM Tris-HCl ( pH 8.5 ), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM KCl , 0.1 mg/mL BSA.

Bu tampon Mph1103I ve Eco47I restriksiyon enzimi ile birlikte kullanılmıştır.  
Restriksiyon enzimi ve tampon -20<sup>0</sup>C 'de saklanmıştır.

## **ÖZGEÇMİŞ**

**Adı Soyadı:** Özgen BÜYÜKGÖZE  
**Doğum Tarihi:** 17 Ocak 1986  
**Yazışma Adresi:** Pamukkale Üniversitesi  
Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Bölümü  
20070 Denizli, Türkiye  
**Tel:** 05446386762  
**E-mail:** ozgenbuyukgoze@gmail.com

### ***1. ÖĞRENİM DURUMU***

**Yüksek Lisans (2008- Devam ediyor):** Biyoloji Anabilim Dalı

Pamukkale Üniversitesi

**Lisans (2004-2008):**

Biyoloji Bölümü

Pamukkale Üniversitesi

#### ***Lisans Bitirme Tezi ve Tez Danışmanı***

“Alternatif İnsektisit: Kolinesteraz İnhibitörü Olarak Kaliksarenler” Prof. Dr. Alaattin ŞEN, PAÜ, Denizli, 2008.

#### ***1. Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı***

“Sitokrom P4501-3 (CYP1-3) Ve Faz II Enzimlerinin Türk Ülseratif Kolit Hastalarında Genetik Polimorfizmi” Prof. Dr. Alaattin ŞEN, Fen Bilimleri Enstitüsü, PAÜ, Denizli, Devam Ediyor.

## **YAYINLAR**

### ***Uluslar arası Bildiriler***

\* M. OZKARSLI, Ö. BÜYÜKGÖZE, S. SABAH, N. OSMANOĞLU, A. SEN (2008). Genetic polymorphism of biotransformation enzymes CYP 1A1, P4502A6 and microsomal epoxide hydrolase. *FEBS Journal* 275: Suppl. 1, pp. 110.

## ***2. Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler***

\* TOPÇU Z., BÜYÜKGÖZE Ö., KARAKUŞ Ö., ÖZDEMİR Ö., DELİGÖZ H., ŞEN A. (2008) Asetilkolinesteraz İnhibitörleri olarak Kaliks[n]arenler. *19. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 23-28 Haziran, Trabzon, syf: 628-629 (PZ385).

## **PROJELER**

“Bazı Türk ve Bulgar Nehirlerinde Kimyasal Kirliliğin *Chironomidae* (diptera)’nın Genetik ve Biyokimyasal Analiziyle Saptanması”, TÜBİTAK-BAS İşbirliği Projesi, 2009-devam ediyor.

### ***Katıldığı Kongreler***

\* Temmuz 2008, 33<sup>rd</sup> *FEBS Congress & 11<sup>th</sup> IUBMB Conference*, Athens, Greece.

### ***Referans ve Sertifikalar***

\*Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D. Merkez Laboratuvarı koordinatörü Yar. Doç. Dr. Hakan ERBAŞ.

\* ISO 9001:2000 Kalite Yönetim Sistemi ve İç Denetçi sertifikası.

\* Milli Eğitim Bakanlığı 1. Seviye İngilizce Eğitim sertifikası.